



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월04일
(11) 등록번호 10-1496745
(24) 등록일자 2015년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7001695(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년06월08일
심사청구일자 2012년03월14일
(85) 번역문제출일자 2011년01월21일
(65) 공개번호 10-2011-0013578
(43) 공개일자 2011년02월09일
(62) 원출원 특허 10-2009-7000478
원출원일자(국제) 2007년06월08일
심사청구일자 2009년04월02일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2007/061652
(87) 국제공개번호 WO 2007/142336
국제공개일자 2007년12월13일
(30) 우선권주장 JP-P-2006-161350 2006년06월09일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌 US20050250137 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자 가부시카가이샤 야쿠르트 혼샤
일본국 도쿄도 미나토구 히가시신바시 1-1-19
(72) 발명자 니시야마 마사히코
c/o 리서치 인스티튜트 포 라디에이션 바이올로지 앤드 메디신, 히로시마 대학교, 1-2-3, 카스미, 미나미-구, 히로시마시, 히로시마, 일본 7348553
히야마 케이코
c/o 리서치 인스티튜트 포 라디에이션 바이올로지 앤드 메디신, 히로시마 대학교, 1-2-3, 카스미, 미나미-구, 히로시마시, 히로시마, 일본 7348553
(뒷면에 계속)
(74) 대리인 이원희

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김정아

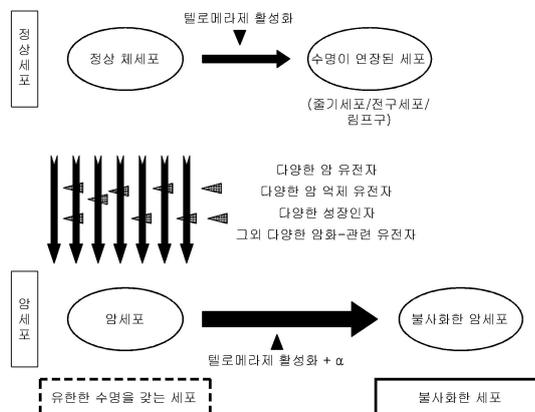
(54) 발명의 명칭 인간 암세포의 불사화에 관련되는 유전자 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 암세포의 불사화에 관련되는 유전자(불사화 규정 유전자) 및 해당 유전자를 갖는 불사화 암세포를 표적으로 한 선택적인 암치료에 유용한 방법을 제공한다.

서열 번호 1~13 중 선택되는 염기 서열 내 적어도 15 염기 길이의 연속한 염기 서열과 특이적으로 하이브리다이징하는 15 염기 길이 이상의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 이용하여, 불사화 암세포를 판정한다. 해당 폴리뉴클레오티드는, 해당 판정 방법에 있어서, 불사화 암세포에 특이적으로 높게 발현하고 있는 불사화 규정 유전자를 검출하기 위한 프라이머나 프로브로 사용된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

타니모토 케이지

c/o 리서치 인스티튜트 포 라디에이션 바이올로지
앤드 메디신, 히로시마 대학교, 1-2-3, 카스미, 미
나미-구, 히로시마시, 히로시마, 일본 7348553

마스코 노리오

c/o 타이호 파마슈티칼 co.,LTD., 1-27, 미스기다
이, 한노시, 사이타마, 일본 3578527

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 염기서열 내의 15 염기 길이 이상의 연속적인 염기서열과, 「1 X SSC, 0.1% SDS, 37°C」의 조건하에서 세정 후에도 특이적으로 하이브리다이즈 상태를 유지하며, 15 염기 길이 이상의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는,

정상세포 중 텔로머라제를 과발현하지 않는 비불사화 정상세포, 정상세포 중 텔로머라제를 과발현하는 불사화 정상세포, 암세포 중 텔로머라제를 과발현하지 않는 비불사화 암세포 및 암세포 중 텔로머라제를 과발현하는 불사화 암세포 중에서, 상기 텔로머라제를 과발현하는 불사화 암세포의 존재를 확인하고, 예후가 나쁜 암인지 아닌지를 판정하기 위한 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 프로브 또는 프라이머인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조성물.

청구항 3

하기 단계 (1) 내지 (4)을 포함하는, 정상세포 중 텔로머라제를 과발현하지 않는 비불사화 정상세포, 정상세포 중 텔로머라제를 과발현하는 불사화 정상세포, 암세포 중 텔로머라제를 과발현하지 않는 비불사화 암세포 및 암세포 중 텔로머라제를 과발현하는 불사화 암세포 중에서, 상기 텔로머라제를 과발현하는 불사화 암세포의 존재를 판정해, 예후가 나쁜 암인지 아닌지를 판정하기 위한 방법:

- (1) 피험자로부터 채취되었고, 암세포가 포함된 생체 시료로부터 수득된 RNA 또는 이의 파생물과 제 1항 또는 제 2항의 폴리뉴클레오타이드를 결합시키는 단계;
- (2) 상기 폴리뉴클레오타이드를 지표로 사용하여, 상기 폴리뉴클레오타이드에 결합한 RNA 또는 이의 유도체의 양을 측정하는 단계;
- (3) 상기 단계 (2)에서 얻은 RNA 또는 이의 파생물의 양(이하, 「RNA량」)과, 불사화되지 않은 정상세포 또는 암세포 또는 불사화한 정상세포에 있어서 상응하는 RNA 또는 이의 파생물의 양(이하, 「대조 RNA량」)을 비교하는 단계; 및,
- (4) 상기 단계 (2)에서 수득한 RNA량이 대조 RNA량 보다 높은 경우에, 피험자의 암세포가 불사화되었다고 판정하고, 높지 않은 경우에 피험자의 암세포가 불사화되지 않았다고 판정하는 단계.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

하기 단계 (1') 내지 (4')를 포함하는, 정상세포 중 텔로머라제를 과발현하지 않는 비불사화 정상세포, 정상세포 중 텔로머라제를 과발현하는 불사화 정상세포, 암세포 중 텔로머라제를 과발현하지 않는 비불사화 암세포 및 암세포 중 텔로머라제를 과발현하는 불사화 암세포 중에서, 상기 텔로머라제를 과발현하는 불사화 암세포의 존재를 판정해, 예후가 나쁜암인지 아닌지를 판정하기 위한 방법:

(1') 피험자로부터 채취되었고, 암세포가 포함된 생체 시료로부터 수득된 폴리펩티드를 포함하는 단백질 함유 분획(protein-containing fraction)과, 서열번호 14로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드를 인식하는 항체를 결합시키는 단계;

(2') 상기 항체를 지표로 하여, 상기 항체에 결합한 폴리펩티드의 양을 측정하는 단계;

(3') 상기 단계 (2')에서 수득한 폴리펩티드량과, 불사화되지 않은 정상세포 또는 암세포 또는 불사화된 정상세포에 있어서 상응하는 폴리펩티드의 양(이하, 「대조 폴리펩티드량」)을 비교하는 단계; 및

(4') 상기 단계 (2')에서 수득한 폴리펩티드량이 대조 폴리펩티드량보다 높은 경우에 피험자의 암세포가 불사화되었다고 판정하고, 높지 않은 경우에 피험자의 암세포가 불사화되지 않았다고 판정하는 단계.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1항의 폴리뉴클레오타이드 및 서열번호 14로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드를 인식하는 항체로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 이상을 포함하는, 정상세포 중 텔로머라제를 과발현하지 않는 비불사화 정상세포, 정상세포 중 텔로머라제를 과발현하는 불사화 정상세포, 암세포 중 텔로머라제를 과발현하지 않는 비불사화 암세포 및 암세포 중 텔로머라제를 과발현하는 불사화 암세포 중에서, 상기 텔로머라제를 과발현하는 불사화 암세포의 존재를 판정해, 예후가 나쁜암인지 아닌지를 판정하기 위한 시약 키트.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은, 암세포의 불사화에 관련되는 유전자(불사화 규정 유전자) 및 해당 유전자를 가지는 불사화 암세포를 표적으로 한 선택적인 암치료에 유용한 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 불사화 규정 유전자를 지표로 하는 불사화 암세포의 판정 방법 및 그 판정에 사용하는 시약을 제공한다. 또한 본 발명은 불사화 암세포를 표적으로 하는 선택적인 항암제(불사화 암세포 증식 억제제)의 유효 성분을 스크리닝 하는 방법 및 해당 항암제(불사화 암세포 증식 억제제)를 제공한다.

배경기술

[0002]

인간 고형암은 근치(根治) 수술이 이루어지지 않는 한 예후 불량이며, 그 주된 요인은 현재의 화학요법의 효과가 불충분하다는데에 기인한다. 종래의 화학요법 약은, 핵산 합성 과정, DNA, 미소관에 작용하여, 핵산으로부터 단백질 생성 과정을 저해하는 것을 기본으로 하여, 암 세포 뿐 아니라 세포 증식이 일어나는 재생성 조직 정상세포에의 장해를 피할 수 없었다. 최근, 암 세포에 특이적으로 발현하고 있는 분자가 차례차례로 분류되고 있어, 이들을 표적으로 하는 저해약의 경우 정상세포에의 유해 반응을 최소화 할 수 있으며 그 결과, 투여량도

증대할 수 있다. 이러한 분자 표적 치료약도 개발되어 왔지만, 그 최대의 결점은, 반드시 많은 증례에 유효한 것은 아니고, 개개의 증례에 의해 효과가 달라, 그것을 투여 전에 예측하는 것이 불완전하다는 것이다. 분자 표적 치료약의 효과가 개개의 증례로 크게 다른 이유로 치료의 표적으로 여겨 온 분자가 발암 과정이나 전이에 관련되는 유전자인 것을 들 수 있다. 발암 과정은 암종에 따라서 뿐 아니라, 같은 암종 내에서도 다양하기 때문에, 표적으로 하는 분자가 암의 증식에 관여하는 정도는 개개의 증례에 따라 다르다고 생각된다. 그러므로, 암종을 넘어 보편적으로 중심적 역할을 하는 분자가 확인되면, 많은 암 증례에 보편적으로 효과를 기대할 수 있는 분자 표적 치료약의 개발이 가능해진다.

[0003]

인간을 포함한 모든 척추동물의 염색체의 양말단은 “TTAGGG” 라고 하는 단순 반복 서열이 계속되지만(인간에서는 약 10 kb, 마우스는 그 수배), 세포 분열에 수반하는 DNA 복제마다 말단을 완전하게는 복제하지 못하고 조금씩(인간에서는 약 200 염기) 단축해 간다. 이 말단 구조가 「텔로미어(telomere)」이며, 텔로미어가 세포 분열에 따라 일정(인간비암세포에서는 약 5 kb) 수준 이하로 단축되면, 이미 세포는 분열할 수 없게 된다. 암화하면 더욱 분열할 수 있지만, 그래도 텔로미어가 궁극적으로 단축하면(약 2 kb) 세포는 사멸하게 된다. 이 단축한 텔로미어를 신장하여 텔로미어의 길이를 안정되게 유지함으로써 세포 분열 수명을 늘리는 것이, 역전사 효소인 「텔로메라제」이다(비특허 문헌 1 참조). 이 텔로메라제는, 통상의 정상 체세포에서는 발현하고 있지 않고, 그러므로 분열 가능 회수는 몇 십회에 한정되어 있지만, 무한히 증식 하는 것이 가능한 생식 세포와 불사화 암세포에서는 높게 발현하고 있다. 이전에는 암세포는 모든 것이 불사화하고 있는 것이라고 생각하는 경향이 있었지만, 임상적으로 분명한 암이어도 반드시 텔로메라제 활성이 검출되지 않는 예가 있고(비특허 문헌 2 및 3 등 참조), 텔로메라제 효소 성분인 TERT를 비(非)암세포에 강제 발현시켜도 암세포의 형질을 나타내지 않는 것(비특허 문헌 4 참조)등을 보아, 현재 암화와 불사화는 다른 현상으로 이해되고 있다.

[0004]

비특허 문헌 1 : Harley CB, Mutation Res, 256: 271-82, 1991

[0005]

비특허 문헌 2 : Kim NW 등, Science 266: 2011-5, 1994

[0006]

비특허 문헌 3 : Hiyama K 등, J Natl Cancer Inst 87: 895-902, 1995

[0007]

비특허 문헌 4 : Morales CP 등, Nat Genet 21: 115-8, 1999

[0008]

비특허 문헌 5 : Shay JW, Bacchetti S, Eur J Cancer 33: 787-91, 1997

[0009]

비특허 문헌 6 : Hiyama K 등, J Immunol 155: 3711-5, 1995

[0010]

비특허 문헌 7 : Hiyama E 등, Int J Oncol 9: 453-8, 1996

[0011]

비특허 문헌 8 : Forsyth NR 등, Aging Cell 2: 235-43, 2003

[0012]

비특허 문헌 9 : Bodnar AG 등, Exp Cell Res 228: 58-64, 1996

[0013]

비특허 문헌 10 : Hiyama K 등, Int J Oncol 27: 87-95, 2005

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014]

본 발명은, 불사화 암세포의 판정 방법 및 그 판정에 사용하는 시약에 관한 것이다. 또한 본 발명은, 불사화 암세포의 증식을 특이적으로 억제하는 작용을 하여 선택적인 항암제로서 유용한, 불사화 암세포 증식 억제제의 유효 성분을 스크리닝 하는 방법 및 해당 불사화 암세포 증식 억제제에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0015]

본 발명자들은 암치료, 특히 많은 암 증례에 보편적으로 효과가 기대되는 분자 표적 치료약의 개발을 목표로 하여, 암세포의 암화(악성화) 형질과는 다른 또 하나의 형질 「불사화」에 주목하였다. 즉, 체내에 암세포가 출현

하더라도 무한 증식을 억제시키면, 숙주를 죽음에 이르게 할 때까지 증대·전이하지는 않을 뿐 아니라, 통상의 화학요법이나 비(非)근직적 수술에 의해 어느 정도 잔존 암세포수를 줄이는 것으로도, 그것이 재차 증대하기까지는 분열 수명이 다해 자연스럽게 사멸하는 것이 기대된다. 지금까지 조사할 수 있던 수 천가지 검체물 임상암 검체의 80% 이상이 텔로메라제를 발현하고 있는 점(비특히 문헌 5 참조), 지금까지 조사할 수 있던 모든 암종에 있어서 텔로메라제 발현이 확인된 점, 인간 암 유래의 세포주는 거의 모두 텔로메라제를 발현하고 있는 점(비특히 문헌 2 참조), 일단 텔로메라제를 발현한 세포는 자연적으로 음성화되지 않는 점 등에서, 다양한 발암과정과 달리, 이 불사화 과정은, 많은 암세포에 꽤 보편적으로 공통적으로 존재한다고 생각된다. 즉, 불사화를 규정하는 분자를 표적으로 함으로써, 암종을 넘어 보편적으로 많은 증례에 유효한 암의 무한 증식 억제가 가능하여질 것으로 기대할 수 있다. 이러한 의미에서, 텔로메라제 자체를 표적으로 하는 항암전략도 시도되고 있다.

[0016] 그렇지만, 본 발명자들은 정상 체세포이어도 재생성 조직의 선구 세포나 임파구에는 텔로메라제 활성이 검출된다는 것을 이미 발견하였고(비특히 문헌 6 및 7 참조), 한층 더 텔로메라제 효소 성분인 TERT를 비암세포에서 강제 발현시켜도 반드시 불사화하지는 않는 점(비특히 문헌 8 참조), 텔로메라제를 발현하는 정상 선구 세포나 임파구는 결코 불사화하고 있는 것은 아니고 연명할 뿐이라는 점(비특히 문헌 6 및 9 참조) 등에서도, 텔로메라제의 발현만으로 세포가 불사화하는 것은 아닌 것이 분명하다. 즉, 인간 세포의 불사화에는, 염색체 말단 텔로미어를 연장하는 효소 텔로메라제의 활성화가 거의 필수이지만 충분하지 않고, 텔로메라제 활성화에 가세해 불사화에 불가결한 분자가 존재하고 있어, 그 분자는 암세포에 특이적으로 작용하고 있을 것으로 예상된다. 사실, 본 발명자들은, 정상 체세포에 TERT를 도입해 텔로메라제를 강제 발현시키고 불사화 시킨 클론(clone)에서 특이적으로 발현 변동하고 있는 유전자는, 보고된 암세포의 발현 변동과는 전혀 다르다는 것을 확인하였다(비특히 문헌 10 참조). 이러한 것으로도 정상세포의 불사화와 암세포의 불사화에 관련되는 유전자는 다르다고 말할 수 있다. 텔로메라제 자체를 표적으로 하면, 임파구, 혈액 전구 세포 및 소화관 점막 클립트 세포 등의 분열 능력이 억제되어 암치료의 유해 현상으로 치명적인 면역능력, 조혈능력 및 소화관 기능 장애가 될 위험성이 높지만, 암세포에서만 작용하는 불사화 규정 인자를 표적으로 하면, 텔로메라제 활성 양성의 정상간(正常幹)/전구 세포 등의 기능을 해치는 일 없이 암세포 특이적인 무한 증식의 저지가 가능해질 것으로 생각된다.

[0017] 앞으로 살펴보겠지만, 본 발명자 등은 인간 암세포의 불사화에 보편적으로 관련되는 유전자를 찾아낼 수 있도록, 예의 탐구하였다. 그 결과, 해당 유전자는 정상세포에 있어서의 텔로메라제의 활성화에 의한 연명에는 관련되지 않고, 암세포의 증식 유지에 특이적으로 작용하고 있다고 생각하여, 그 불사화 규정 유전자로 13개 유전자(표 1 참조)를 특정하였다. 그 개략은 다음과 같다. 우선, 암종을 넘어 보편적으로 발현 증강하고 있는 유전자를 마이크로 어레이 해석에 의해 추출하여, 얻을 수 있던 유전자 중에서, 불사화한 암세포로 구성되어 있는 임상적 암조직에 있어, 불사화하지 않고 있는 암세포로 구성되어 있는 암조직의 발현 수준보다 발현이 증강하고 있고, 게다가 정상세포에 텔로메라제를 도입해 발현시킨 세포에서는 발현 또는 증강하고 있지 않은 유전자를 13종 선택하였다. 그 다음에, 얻을 수 있던 13종의 유전자의 발현을 불사화 암세포내에서 siRNA에 의해 억제하면, 모두 불사화 암세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였다.

[0018] 본 발명자 등은, 이러한 발견에 근거해 한층 더 검토를 거듭한 결과, 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 즉, 본 발명은 하기의 태양을 갖는다.

[0019] 항 1. 서열 번호 1~13 중 어느 하나로 표시되는 염기서열 내의 15 염기 길이 이상의 연속적인 염기서열과 특이적으로 하이브리다이즈하며, 15 염기 길이 이상의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드로 구성되는, 암세포의 불사화를 판정하기 위한 마커 유전자.

[0020] 항 2. 제 1항에 있어서, 암세포의 불사화를 판정하기 위한 마커 유전자는 프로브 또는 프라이머인 것을 특징으로 하는 마커 유전자.

[0021] 항 3.

[0022] (1) 피험자로부터 채취되었고, 암세포가 포함된 것이 예상되는 생체 시료로부터 수득된 RNA 또는 이의 파생물과 1항 또는 2항의 마커 유전자를 결합시키는 단계;

[0023] (2) 상기 마커 유전자를 지표로 사용하여, 상기 마커 유전자에 결합한 RNA 또는 이의 파생물의 양을 측정하는

단계; 및,

- [0024] (3) 상기 단계(2)에서 얻은 RNA 또는 이의 파생물의 양(이하, 「RNA량」)과 불사화되지 않은 정상세포 또는 암세포의 상응하는 RNA 또는 이의 파생물의 양(이하, 「대조 RNA량」)을 비교하는 단계를 포함하는 불사화 암세포의 판정 방법.
- [0025] *항 4. 제 3항에 있어서,
- [0026] (4) 단계 (2)에서 획득한 RNA량이 대조 RNA량보다 높은 경우에, 피험자의 암세포가 불사화되었다고 판정하고, 높지 않은 경우 피험자의 암세포가 불사화되지 않았다고 판정하는 단계를 추가로 포함하는 불사화 암세포의 판정 방법.
- [0027] 항 5. 서열번호 14 내지 26으로 기재되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 인식하는 항체.
- [0028] 상기 항체는 불사화된 암세포의 판정 용도로 적합하다.
- [0029] 항 6. (1') 피험자로부터 채취되었고, 암세포가 포함된 것이 예상되는 생체 시료로부터 획득된 폴리펩티드를 포함하는 단백질 함유 분획(protein-containing fraction)과, 제 5항의 항체를 결합시키는 단계;
- [0030] (2') 상기 항체를 지표로 하여, 상기 항체에 결합한 폴리펩티드의 양을 측정하는 단계; 및,
- [0031] (3') 상기 단계(2')에서 획득한 폴리펩티드량과 불사화되지 않은 정상세포 또는 암세포의 상응하는 폴리펩티드의 양(이하, 「대조 폴리펩티드량」)을 비교하는 단계를 포함하는 불사화 암세포의 판정 방법.
- [0032] 항 7. 제 6항에 있어서,
- [0033] (4') 단계(2')에서 획득한 폴리펩티드량이 대조 폴리펩티드량보다 높은 경우에 피험자의 암세포가 불사화되었다고 판정하고, 높지 않은 경우에 피험자의 암세포가 불사화되지 않았다고 판정하는 단계를 추가로 포함하는 불사화 암세포의 판정 방법.
- [0034] 항 8. 제 1항의 마커 유전자 및 제 5항의 항체로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 이상을 포함하는, 불사화 암세포 판정용 시약 키트.
- [0035] 항 9.
- [0036] (A) 서열번호 1 내지 13으로 기재되는 군으로부터 선택된 어느 하나의 불사화 규정 유전자를 발현할 수 있는 세포를 피험물질과 접촉시키는 단계;
- [0037] (B) 상기 피험물질을 접촉시킨 세포에서 불사화 규정 유전자의 발현량을 측정하는 단계;
- [0038] (C) 상기 단계(B)에서 획득한 불사화 규정 유전자의 발현량과, 피험물질을 접촉시키지 않은 대조세포에 있어서의 상응하는 유전자의 발현량(이하, 「대조 발현량」)을 비교하는 단계; 및,
- [0039] (D) 상기 단계(B)에서 획득한 불사화 규정 유전자의 발현량이 대조 발현량보다 적은 경우, 해당 피험물질을 불사화 암세포의 증식을 억제하는 후보물질로 선택하는 단계를 포함하는 불사화 암세포의 증식을 억제하는 물질의 스크리닝 방법.
- [0040] 항 10.
- [0041] (A') 서열번호 14 내지 26으로 기재되는 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드를

피험물질과 접촉시키는 단계;

- [0042] (B') 상기 피험물질로 접촉된, 서열번호 14 내지 26으로 기재되는 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드의 활성을 측정하는 단계;
- [0043] (C') 상기 단계(B')에서 수득한 폴리펩티드의 활성과, 피험물질을 접촉시키지 않는 대조군의 활성(이하, 「대조 활성」)을 비교하여, 상기 단계(B')에서 얻은 폴리펩티드의 활성 정도를 식별하는 단계; 및,
- [0044] (D') 상기 단계(B')에서 얻은 폴리펩티드의 활성이 대조 활성보다 낮은 경우, 상기 피험물질을 불사화 암세포의 증식을 억제하는 후보물질로 선택하는 단계를 포함하는 불사화 암세포의 증식을 억제하는 물질의 스크리닝 방법.
- [0045] 항 11. 서열 번호 1-13 중 어느 하나로 표시되는 염기 서열의 15 염기 길이 이상의 연속적인 염기서열과 특이적으로 하이브리다이즈하며, 15 염기 이상의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 유효 성분으로 하는 불사화 암세포 증식 억제제.
- [0046] 항 12. 제 11항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가, 서열번호 27-76 중 어느 하나로 표시되는 염기 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 불사화 암세포 증식 억제제.
- [0047] 항 13. 제 11항 또는 제 12항의 불사화 암세포 증식 억제제를 환자의 암세포에 투여하는 단계를 포함하는 항암요법.
- [0048] 항 14. 서열 번호 1-13 중 어느 하나로 표시되는 염기 서열의 15 염기 길이 이상의 연속적인 염기 서열에 특이적으로 하이브리다이즈하는, 15 염기 이상의 염기 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드의, 불사화 암세포 증식 억제제의 제조를 위한 용도.
- [0049] 항 15. 제 14항에 있어서 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 27-76 중 어느 하나로 표시되는 염기 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드인 불사화 암세포 증식 억제제의 제조를 위한 용도.

발명의 효과

- [0050] 본 발명에 의해, 복수의 암종에 대하여, 불사화 암세포에 특이적으로 발현이 증대하여, 암종을 넘어 보편적으로 암세포의 불사화를 규정하는 유전자가 밝혀졌다. 본 발명의 불사화 암세포의 판정 방법 및 그 판정 방법으로 사용하는 시약을 이용하면, 관계된 불사화 규정 유전자의 발현 정도를 식별할 수 있고, 그 정도로부터, 통상의 병리 진단에서는 판정할 수 없었던 불사화 암세포와 유한 수명 세포를 감별 할 수 있다. 그리고 해당 감별에 의해, 암의 조기진단·치료 선택·예후 예측에의 임상 응용이 가능해진다.
- [0051] 또 본 발명의 불사화 규정 유전자를 표적으로 한 스크리닝 방법을 이용하여, 불사화 암세포의 증식을 특이적으로 억제할 수 있는 항암제의 유효 성분을 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0052] [도 1] 인간 세포의 암화(canceration) 및 불사화의 메카니즘을 나타내는 개략도이다.
- [도 2] 본 발명의 표적 유전자 추출 방법을 나타내는 개략도이다.
- [도 3a] 내지 [도 3d] 올리고 어레이(oligo array)를 이용한, 각종 불사화 암세포에 있어 UBE2S 유전자의 발현 수준을 나타내고,

불사화된 암세포(검은색으로 표시, MCF-12A, SV11e, SV11-106 이외에는 모두 인간 유래 암 세포주)는 유한 수명의 비종양성 세포(흰색으로 표시)에 비해 UBE2S 유전자가 고발현되고(도 3a 내지 도 3d), 텔로머라제 양성 폐암 전이조직(불사화된 암세포, 「D4M2」)에서 동일 증상의 텔로머라제 음성 원발조직(비불사화된 암세포, 「D2Pr」) 보다 상기 유전자가 고발현되고(도 3c), 불사화되지 않은 암세포가 혼재되어 있는 체장암 조직(사선으로 표시)보다 불사화된 세포만으로 구성되는 체장암 세포주(검은색으로 표시)에서 상기 유전자가 고발현된다(도 3a).

- [도 4] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 RFC4 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 5] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 PTGES2 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 6] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 MAF1 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 7] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 ACVR2B 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 8] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 FAM119A 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 9] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 LTB4DH 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 10] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 DPM2 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 11] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 SEPX1 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 12] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 PSMA3 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 13] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 CHCHD3 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 14] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 LSM3 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 15] 올리고 어레이에 의한, 각종 불사화 암세포에 있어 GTSE1 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [도 16] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 UBE2S 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 17] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 RFC4 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 18] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 PTGES2 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 19] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 MAF1 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 20] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 ACVR2B 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 21] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 FAM119A 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 22] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 LTB4DH 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 23] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 DPM2 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 24] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 SEPX1 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 25] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 PSMA3 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 26] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 CHCHD3 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).
- [도 27] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 LSM3 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).

2).

[도 28] 암세포주에 있어서의 siRNA에 의한 GTSE1 유전자의 발현 억제와 그 증식 억제 효과를 나타낸다(실시예 2).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] (I) 불사화 규정 유전자

[0054] 본 발명에 있어 「불사화하지 않은 암세포」란, 암세포 가운데, (1) 텔로메라제 활성이 적고, (2) 텔로미어 길이가 단축하는 한편 (3) 텔로메라제 단백질의 발현을 확인할 수 없는 유한 수명 세포를 의미한다. 한편, 본 발명에 있어 「불사화 암세포」란, 암세포 가운데, 상기 (1) ~ (3) 중 적어도 1개의 특징을 갖추지 않은 세포, 즉 텔로메라제 활성이 양성이거나, 텔로미어 길이가 연장하고 있거나, 및/또는 텔로메라제 단백질의 발현을 확인할 수 있는 세포로, 무한하게 세포 증식 하는 것이 가능하게 된 세포를 의미한다.

[0055] 본 발명에 있어 「불사화 규정 유전자」란, 암세포의 불사화를 규정하는 유전자를 의미한다.

[0056] 본 발명이 대상으로 하는 암세포는 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 폐암, 유방암, 식도암, 머리 경부암, 위암, 결장암, 직장암, 간암, 담낭·담관암, 췌장암, 방광암, 전립선암, 자궁경암 등에서 유래된 것들을 들 수 있다.

[0057] 불사화 규정 유전자로는 구체적으로, (1) UBE2S 유전자, (2) RFC4 유전자, (3) PTGES2 유전자, (4) MAF1 유전자, (5) ACVR2B 유전자, (6) FAM119A 유전자, (7) LTB4DH 유전자, (8) DPM2 유전자, (9) SEPX1 유전자, (10) PSMA3 유전자, (11) CHCHD3 유전자, (12) LSM3 유전자, 및 (13) GTSE1 유전자를 들 수 있다. 이러한 유전자의 GenBank 접근번호, 정식 유전자명, 유전자 기호 및 이러한 유전자의 염기 서열을 나타낸 서열 번호를 하기의 표 1에 기재하였다. 한편, 표 1에서 유전자명, 유전자 기호 등은, NCBI로 인터넷 공개 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)된 데이터에 근거하여 기재하였다.

표 1

SEQ ID No.	GenBank Accession No.	Gene Name	Gene Symbol
1	NM_014501	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	<i>UBE2S</i>
2	NM_002916	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	<i>RFC4</i>
3	NM_025072	prostaglandin E synthase 2	<i>PTGES2</i>
4	NM_032272	MAF1 homolog (S. cerevisiae)	<i>MAF1</i>
5	NM_001106	activin A receptor, type IIB	<i>ACVR2B</i>
6	NM_145280	family with sequence similarity 119, member A	<i>FAM119A</i>
7	NM_012212 (D49387, BQ214856)	leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	<i>LTB4DH</i>
8	NM_003863	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit	<i>DPM2</i>
9	NM_016332	selenoprotein X, 1	<i>SEPX1</i>
10	NM_002788	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3	<i>PSMA3</i>
11	NM_017812	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	<i>CHCHD3</i>
12	NM_014463	LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	<i>LSM3</i>
13	NM_016426	G-2 and S-phase expressed 1	<i>GTSE1</i>

[0059] 실시예 1에서 볼 수 있듯이, 상기 각종의 불사화 규정 유전자는, 모두 폐암, 식도암 및 유방암 등의 복수의 암종에서 유래하는 불사화 암세포에 특이적으로 높게 발현하고 있다. 또, 실시예 2에서 볼 수 있듯이, 불사화 암세포내에서 siRNA를 이용하여 이들 13종 유전자의 발현을 억제하면, 모두 불사화 암세포의 증식이 억제되었다. 이러한 것에 근거하여, 상기 13종의 불사화 규정 유전자는 모두 암세포의 불사화를 규정하는 유전자(불사화 규정

유전자)라고 생각된다.

- [0060] (II) 암세포의 불사화를 판정하기 위한 시약(유전자 마커)
- [0061] 전술한 바와 같이, 서열 번호 1~13로 표시되는 염기 서열로 이루어진 각각의 불사화 규정 유전자((1) ~ (13))가 모두 복수의 암종에서 유래하는 불사화 암세포에 특이적으로 높게 발현하고 있다는 점을 이용하여, 이것을 지표(마커 유전자)로 하여 암세포의 불사화의 유무를 판정하는 것이 가능하다.
- [0062] 본 발명은, 관계있는 암세포의 불사화를 판정하기 위해서 매우 적합하게 사용되는 수단(시약)으로 불사화 규정 유전자 마커(이하, 「유전자 마커」)을 제공한다. 해당 유전자 마커는, 전술한 서열 번호 1~13 중 어느 하나로 표시되는 불사화 규정 유전자의 염기 서열내의 적어도 15 염기 길이의 연속한 염기 서열과 특이적으로 하이브리다이징 하는, 적어도 15 염기 길이를 갖는 폴리뉴클레오티드로 설계된다. 아울러 본 발명의 유전자 마커의 형태는, 그 목적에 따라 적당히 설정할 수 있는데, 단일가닥 DNA, 단일가닥RNA, 이중가닥DNA, 이중가닥 RNA 및 DNA:RNA 하이브리드(hybrid) 중 어느 것이어도 좋다.
- [0063] 해당 유전자 마커에는, 불사화 암세포를 판정할 때에, 암세포중에서의 불사화 규정 유전자의 발현의 유무나 그 정도(발현량)를 검출하는데 유용한 프로브나 프라이머가 포함된다. 또한, 이러한 프로브나 프라이머는, 불사화 암세포의 증식을 억제하는 물질의 스크리닝에 있어서, 불사화 규정 유전자의 발현 변동을 검출하는 수단(검출 시약)으로도 유용하다.
- [0064] (II-1) 프로브
- [0065] 불사화 암세포에서 특이적으로 높게 발현하고 있는 상기 불사화 규정 유전자 [(1) UBE2S 유전자, (2) RFC4 유전자, (3) PTGES2 유전자, (4) MAF1 유전자, (5) ACVR2B 유전자, (6) FAM119A 유전자, (7) LTB4DH 유전자, (8) DPM2 유전자, (9) SEPX1 유전자, (10) PSMA3 유전자, (11) CHCHD3 유전자, (12) LSM3 유전자 및 (13) GTSE1 유전자] 중 적어도 하나 이상을 검출함으로써 암세포의 불사화를 판정한다.
- [0066] 이러한 불사화 규정 유전자의 검출에는, 이러한 각 유전자의 염기 서열에 특이적으로 하이브리다이징하여, 해당 불사화 규정 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 폴리뉴클레오티드가 프로브로 이용된다. 아울러 본 발명에서, 용어 「폴리뉴클레오티드」는 복수 개의 염기 서열로 구성되는 올리고뉴클레오티드도 포함된다.
- [0067] 상기 폴리뉴클레오티드는, 각 불사화 규정 유전자의 염기 서열내의, 적어도 15 염기 길이 ~ 각 불사화 규정 유전자의 전체 염기 길이, 바람직하게는 20 염기 길이 ~ 각 불사화 규정 유전자의 전체 염기 길이, 보다 바람직하게는 30 염기 길이~ 각 불사화 규정 유전자의 전체 염기 길이의 연속한 염기 서열과 특이적으로 하이브리다이징 하도록, 상기에 대응하는 염기 길이를 가지는 폴리뉴클레오티드로 설계된다.
- [0068] 본 명세서 전체에서, 또한 특허 청구의 범위에 있어서 「특이적으로 하이브리다이징 한다」는 것은, 엄격한 하이브리다이제이션 조건하에서, 특이적인 하이브리드(hybrid)가 형성되고 비특이적인 하이브리드(hybrid)는 형성되지 않는 것을 말한다. 엄격한 하이브리다이제이션 조건은, 통상적인 방법에 따라 하이브리드(hybrid)를 형성하는 핵산의 용해 온도(T_m) 등에 기초하여 결정할 수 있다. 구체적인 하이브리다이징 상태를 유지할 수 있는 세정 조건으로는 통상 「1×SSC, 0.1%SDS, 37℃」 정도의 조건, 보다 엄격하게는 「0.5×SSC, 0.1%SDS, 42℃」 정도의 조건, 한층 더 엄격하게는 「0.1×SSC, 0.1%SDS, 65℃」 정도의 조건을 들 수 있다.
- [0069] 또한 폴리뉴클레오티드(프로브)는, 상기 불사화 규정 유전자의 적어도 15 염기 길이의 연속하는 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열을 가지는 것이 바람직하지만, 상기 특이적인 하이브리다이제이션이 가능하면, 완전하게 상보적인 필요는 없다. 상기 폴리뉴클레오티드로는 바람직하게는 불사화 규정 유전자의 염기 서열에 대해 연속하는 적어도 15 염기 이상의 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드 또는 그 상보적인 폴리뉴클레오티드와 비교해,

염기 서열에 대해 70%이상, 바람직하게는 80%이상, 보다 바람직하게는 90%이상, 한층 더 바람직하게는 95%이상, 특히 바람직하게는 98%이상의 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드이다. 이 때, 염기 서열의 동일성은, 동일성 검색, 서열 alignment 프로그램, BLAST, FASTA, ClustalW 등을 이용하여 계산할 수 있다.

- [0070] 본 발명에 적합한 프로브는 구체적으로는, 하기와 같이 (1) ~ (13)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드(단, 해당 폴리뉴클레오티드가 RNA의 경우는, 서열중의 염기 「t」는 「u」로 전환되어 있는 것으로 한다)에 하이브리다이징 하는 15 염기 길이~ 각 불사화 규정 유전자의 전체 염기 길이, 바람직하게는 20 염기 길이~ 각 불사화 규정 유전자의 전체 염기 길이, 보다 바람직하게는 30 염기 길이~ 각 불사화 규정 유전자의 전체 염기 길이의 연속한 염기 서열로 된 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다.
- [0071] (1) UBE2S 유전자의 염기 서열(서열 번호 1) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0072] (2) RFC4 유전자의 염기 서열(서열 번호 2) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0073] (3) PTGES2 유전자의 염기 서열(서열 번호 3) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0074] (4) MAF1 유전자의 염기 서열(서열 번호 4) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0075] (5) ACVR2B 유전자의 염기 서열(서열 번호 5) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0076] (6) FAM119A 유전자의 염기 서열(서열 번호 6) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0077] (7) LTB4DH 유전자의 염기 서열(서열 번호 7) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로부터 되는 폴리뉴클레오티드,
- [0078] (8) DPM2 유전자의 염기 서열(서열 번호 8) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0079] (9) SEPX1 유전자의 염기 서열(서열 번호 9) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0080] (10) PSMA3 유전자의 염기 서열(서열 번호 10) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0081] (11) CHCHD3 유전자의 염기 서열(서열 번호 11) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0082] (12) LSM3 유전자의 염기 서열(서열 번호 12) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0083] (13) GTSE1 유전자의 염기 서열(서열 번호 13) 중 15 염기 길이 이상의 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드.
- [0084] 아울러, 이러한 폴리뉴클레오티드(프로브)는 각 불사화 규정 유전자의 표적 염기 서열을 이용하여, 예를 들면 시판 중인 뉴클레오티드 합성기에 의해 통상의 방법으로 제작할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드(프로브)는 불사화 규정 유전자의 표적 염기 서열을 주형으로 하여 PCR 방법에 의해 제조할 수도 있다.
- [0085] 한층 더 바람직하게는, 해당 프로브는 각 불사화 규정 유전자를 용이하게 검출할 수 있도록 방사성 물질, 형광 물질, 화학 발광 물질, 또는 효소로 표지 될 수 있다(자세한 것은 후술한다).
- [0086] 또 이러한 프로브는 임의의 고체 면에 고정화해 이용할 수도 있다. 따라서 본 발명에 적합한 프로브는 앞서 언급한 폴리뉴클레오티드를 임의의 고체 면에 고정화된 프로브(예를 들면, 유전자 칩, cDNA 마이크로 어레이, 올

리고 DNA 어레이 또는 멤브레인 필터(membrane filter)를 포함하는 고정화된 프로브)도 포함된다. 상기 프로브는 불사화 규정 유전자 검출용 DNA 칩, 또는 더욱 특이적으로는 불사화 암세포 검출용 DNA 칩에 적합하다.

[0087] 상기 프로브(폴리뉴클레오티드)의 고정화에 사용되는 고체 면은 폴리뉴클레오티드를 고정화할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면 유리판, 나일론 멤브레인(nylon memvran), 마이크로 비즈(micro beads), 실리콘 칩, 모세관(capillary) 또는 그 외의 기관 등을 들 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 고체 면에 고정하는 것은, 미리 합성한 폴리뉴클레오티드를 고체 면에 심는 방법도 좋고, 표적 폴리뉴클레오티드를 고체 면에서 합성하는 방법일 수 있다. 상기 고정화는 당업계에서 잘 알려진 기술로, 고정화된 프로브의 유형에 따라 임의의 적당한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들면 DNA 마이크로 어레이의 경우, 시판되는 스팟터(spotter)(코스모·바이오 사 제품 등)를 이용할 수 있다 [예를 들면, 광식각(photolithographic) 기술(Affymetrix사) 또는 잉크젯 기술(Rosetta Inpharmatics사)에 의한 폴리뉴클레오티드의 in situ 합성 등] .

[0088]
[0089] (II-2) 프라이머

[0090] 본 발명은 유전자 마커로서 각 불사화 규정 유전자의 염기 서열 영역을 특이적으로 증폭하기 위한 프라이머로서 이용되는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0091] 상기 폴리뉴클레오티드로는, 하기의 (1) ~ (13)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드(단, 해당 폴리뉴클레오티드가 RNA인 경우, 서열 중의 염기 기호 「t」는 「u」로 전환된다)의 일부에 특이적으로 하이브리다이즈하여, 해당 폴리뉴클레오티드 또는 일부 영역을 특이적으로 증폭하기 위하여 이용될 수 있는, 적어도 15 염기 길이, 바람직하게는 15~100 염기 길이, 보다 바람직하게는 15~50 염기 길이, 한층 더 바람직하게는 15~35 염기 길이의 연속한 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 있다.

- [0092] (1) UBE2S 유전자의 염기 서열(서열 번호 1) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0093] (2) RFC4 유전자의 염기 서열(서열 번호 2) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0094] (3) PTGES2 유전자의 염기 서열(서열 번호 3) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0095] (4) MAF1 유전자의 염기 서열(서열 번호 4) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0096] (5) ACVR2B 유전자의 염기 서열(서열 번호 5) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0097] (6) FAM119A 유전자의 염기 서열(서열 번호 6) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0098] (7) LTB4DH 유전자의 염기 서열(서열 번호 7) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0099] (8) DPM2 유전자의 염기 서열(서열 번호 8) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0100] (9) SEPX1 유전자의 염기 서열(서열 번호 9) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0101] (10) PSMA3 유전자의 염기 서열(서열 번호 10) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0102] (11) CHCHD3 유전자의 염기 서열(서열 번호 11) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0103] (12) LSM3 유전자의 염기 서열(서열 번호 12) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드,
- [0104] (13) GTSE1 유전자의 염기 서열(서열 번호 13) 중 15 염기 길이 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드

드.

- [0105] 이러한 폴리뉴클레오티드(프라이머)는, 프로브와 같이, 상기 각 불사화 규정 유전자의 적어도 15 염기 길이의 연속하는 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열을 갖는 것이 바람직하지만, 특이적인 하이브리다이제이션이 가능하면, 완전하게 상보적인 필요는 없다. 상기 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 불사화 규정 유전자의 염기 서열 내 연속하는 적어도 15 염기 이상의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 그 상보적인 폴리뉴클레오티드와 비교해, 염기 서열에 대해 70%이상, 바람직하게는 80%이상, 보다 바람직하게는 90%이상, 한층 더 바람직하게는 95%이상, 특히 바람직하게는 98%이상의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드이다.
- [0106] 아울러 이러한 폴리뉴클레오티드는, 프로브와 같이, 상기 각 불사화 규정 유전자의 표적 염기 서열을 기반으로, 통상적인 방법으로 예를 들면 시판 중인 뉴클레오티드 합성기에 의하여 제작할 수 있다.
- [0107] (II-3) 표지물
- [0108] 상기 본 발명의 유전자 마커(프로브 또는 프라이머)는, 전술한 폴리뉴클레오티드에, 불사화 규정 유전자 검출을 위한 적당한 표지물, 예를 들면 형광 색소, 효소, 단백질, 방사성 동위체, 화학 발광 물질, 비오틴 등이 부가된 것이 포함된다.
- [0109] 예를 들면, 본 발명에서 이용되는 형광 색소, 방사성 동위체 또는 화학 발광 물질등의 표지물들은 뉴클레오티드를 표지하고 핵산의 검출이나 정량에 일반적으로 매우 적합하게 사용될 수 있다. 예를 들면, 형광 색소로는, HEX(4,7,2', 4', 5', 7'-헥사클로로-6-카르복실플루오레세인(7'-hexachloro-6-carboxylfluorescein), 녹색 형광 색소), 플루오레세인(fluorescein), NED(상품명, 어플라이드바이오시스템즈(Applied Biosystems)사 제품, 황색 형광 색소), 또는, 6-FAM(상품명, 어플라이드바이오시스템즈사 제품, 황녹색 형광 색소), 로다민(rhodamin) 또는 그 유도체 [예를 들면, 테트라메치르로다민(TMR)] 를 들 수 있지만, 이것들로 한정되는 것은 아니다. 형광 색소로 뉴클레오티드를 표지 하는 방법은, 공지의 표지법 중 적당한 것을 사용할 수 있다 [Nature Biotechnology, 14, 303-308 (1996) 참조] . 또한, 시판되고 있는 형광 표지 키트를 사용할 수도 있다(예를 들면, 애머섬(Amersham) · 파마시아(Pharmacia)사 제품, 올리고뉴클레오티드 ECL 3'-올리고 표지 시스템 등).
- [0110] 이상의, 유전자 마커(비표지 또는 표지 된 프로브 또는 프라이머)는, 불사화 규정 유전자 검출용 시약, 즉, 불사화 암세포 검출용 시약으로 이용할 수 있다.
- [0111] (II-4) 불사화 암세포 검출용 시약 키트
- [0112] 본 발명은 또한, 상기 불사화 암세포 검출용 시약 [유전자 마커(비표지 또는 표지 된 프로브 또는 프라이머)] 을 키트로 제공한다. 해당 키트는 상기 프로브 또는 프라이머로서 이용되는, 비표지 또는 표지 된 폴리뉴클레오티드(아울러 이것들은 고체 상에 고정화될 수 있다)를 적어도 1개 이상 포함하는 것이다. 본 발명의 시약 키트는 상기 유전자 마커(프로브 또는 프라이머) 외, 필요에 따라서 하이브리다이제이션 용 시약, 프로브 표지 물질, 표지체의 검출제, 완충액 등, 본 발명의 방법의 실시예 필요한 것으로 후술하는 다른 시약, 기구 등을 적절히 포함할 수 있다.
- [0113] (III) 불사화 암세포의 판정 방법
- [0114] (III-1) 상기 본 발명의 유전자 마커(프로브 또는 프라이머)를 이용하여, 피험자로부터 채취한 암세포에서 불사화 규정 유전자(마커 유전자)의 발현량을 측정할 수 있고, 아울러 그 발현량에 근거하여 해당 암세포가 「불사화된 암세포」 인지, 아니면 「불사화되지않은 암세포」 인지 판정할 수 있다. 종래의 병리 진단에서는 불사화 암세포의 판정을 할 수 없었지만, 본 발명의 불사화 암세포의 판정 방법에 의하면, 진행하기 전의 조기의 불사화

암세포라도 판정할 수 있어, 이를 이용하여 환자의 암치료를 조기에 촉진할 수 있다.

- [0115] 이 경우, 상기 본 발명의 프라이머는, 상기 불사화 규정 유전자가 발현한 RNA 또는 그로부터 제조되는 폴리뉴클레오티드(예를 들면, cDNA)를 특이적으로 인식하여 증폭시키기 위한 프라이머이며, 또한 본 발명의 프로브는, 해당 RNA 또는 그로부터 파생하는 폴리뉴클레오티드(예를 들면 cDNA, 또는 RNA나 cDNA로부터 증폭된 DNA)를 특이적으로 검출하기 위한 프로브로 이용된다.
- [0116] 즉, 본 발명의 유전자 마커(프라이머 또는 프로브)는, 노던블롯(northern blotting), RT-PCR, 인 시츄 하이브리다제이션법(in situ hybridization) 등 특정 유전자를 특이적으로 검출하는 종래 방법에 따라, 불사화 규정 유전자를 특이적으로 검출하기 위한 프라이머 및/또는 프로브로 이용될 수 있다. 또한, 암세포에 있어서의 불사화 규정 유전자의 발현량을, DNA 칩을 이용하여 검출 또는 정량할 수 있다. 이때, 본 발명의 프로브는, 해당 DNA 칩의 프로브로 사용할 수 있다.
- [0117] 예를 들면, 본 발명의 프로브, 바람직하게는 방사성 동위 원소, 형광 물질 또는 화학 발광 물질 등의 표지물로 표지된 프로브를 사용하여, 노던블롯으로 불사화 규정 유전자의 발현량을 측정할 수 있다. 구체적으로는, 피험자의 암세포로부터 분리된 RNA를 나일론 멤브레인 등에 침고(transfer), 표지된 프로브를 여기에 하이브리다이징시킨다. 계속해서, 형성된 프로브와 RNA의 이중가닥의 양을, 당해 프로브의 표지물에 유래하는 신호로 측정한다. 신호의 검출은, 프로브의 표지물에 따라 통상적인 방법에 의하여, 예컨대 방사선 검출기나 형광 검출기 등으로 측정하여 실시할 수 있다. 아울러 시판 중인 노던블롯팅 시약 키트(northern blotting reagent kit)를 이용하여, 해당 시약 키트의 프로토콜에 따라 실시하는 것도 가능하다.
- [0118] 또한 RT-PCR에 의한 불사화 규정 유전자 발현량의 측정은, 본 발명의 프라이머, 바람직하게는 방사성 동위 원소, 형광 물질 또는 화학 발광 물질 등의 표지물로 표지된 프라이머를 사용하여 실시할 수 있다. 구체적으로는, 피험자의 암세포로부터 분리된 RNA로부터 제조한 cDNA를 주형으로 하여, 이것에 표지된 프라이머 쌍을 하이브리다이징시켜, 통상적인 방법에 따라 PCR을 실시한다. 계속해서, 이로써 얻은 증폭된 이중가닥 DNA의 양을, 해당 프라이머의 표지에 의한 신호를 이용하여 측정한다. 신호의 검출은, 통상적인 방법에 의하여, 예를 들면, 방사선 검출기나 형광 검출기 등으로 측정해 실시할 수 있다. 아울러 시판 중인 RT-PCR용 시약 키트를 이용하여, 해당 시약 키트의 프로토콜에 따라 실시하는 것도 가능하다.
- [0119] DNA 칩 검사에 의한 불사화 규정 유전자 발현량의 측정은, 본 발명의 프로브, 바람직하게는 방사성 동위 원소나 형광 물질 등의 표지물로 표지된 프로브를 사용하여 실시할 수 있다. 구체적으로는, 우선, 방사성 동위 원소, 형광 물질 또는 화학 발광 물질 등으로 표지한 프로브를 적당한 담체에 고정시킨 DNA 칩을 준비한다. 다음에, 해당 DNA 칩과 피험자의 암세포로부터 분리된 RNA를 기초로 제조된 표지 DNA 또는 RNA를 하이브리다이징시킨다. 계속해서, 형성된, 프로브와 표지 DNA 또는 RNA의 이중가닥의 양을, 해당 프로브의 표지물에 의한 신호를 이용하여 측정한다. 신호의 검출은, 통상적인 방법에 의해, 예를 들면, 방사선 검출기나 형광 검출기 등으로 측정해 실시할 수 있다. 아울러 본 발명의 프로브와 일치하는 DNA가 고정된 것이라면, 시판 중인 DNA 칩을 이용하여도 좋다.
- [0120] 이러한 불사화 규정 유전자 발현량의 측정은, 기본적으로는 하기의 단계(1) 및 (2)를 포함한다.
- [0121] (1) 피험자로부터 채취되었고, 암세포가 포함된 것이 예상되는 생체 시료로부터 분리된 RNA 또는 이의 파생물을 본 발명의 프로브 또는 프라이머와 결합시키는 단계,
- [0122] (2) 프로브 또는 프라이머와 결합한, RNA 또는 해당 이의 파생물의 양을, 해당 프로브 또는 프라이머를 지표로 하여 측정하는 단계.

- [0123] 아울러 상기 단계(1)에 있어, 생체 시료는 피험자 자신의 것으로, 암세포를 포함할 가능성이 있는 시료이면 특별히 한정되지 않고, 예컨대 체액(혈액, 소변 등), 조직, 그 추출물 및 채취된 조직의 배양물 등이다. 또한, 생체 시료의 채취 방법은, 생체 시료의 종류나 암종에 따라 적당한 방법을 선택할 수 있다. 또한 통상적인 방법에 따라 생체 시료로부터 RNA를 준비할 수 있다.
- [0124] 아울러 본 명세서 전체에 있어, 또한 특허 청구의 범위에 있어 「RNA의 파생물」이란, 생체 시료로부터 분리된 RNA를 원료로 하여 제조되는 것을 의미하며, RNA로부터 전사되어 제조된 상보적 폴리뉴클레오티드(cDNA) 및 당해 RNA 또는 cDNA로부터 PCR에 의해 증폭된 DNA가 포함된다. cDNA는 통상적인 방법에 의해 조제할 수 있으며, 상기 DNA는 상기 각 불사화 규정 유전자에 대한 본 발명의 프라이머를 이용하여 PCR을 통하여 조제할 수 있다. 또한 단계(1)에서 사용된 본 발명의 프로브 또는 프라이머는, 방사성 동위 원소, 형광 물질 또는 화학 발광 물질 등의 표지물로 표지 되는 것이 바람직하다.
- [0125] 상기 단계(2)에서 얻은 RNA 또는 해당 RNA 파생물의 양은 피험자에게서의 불사화 규정 유전자의 발현량을 반영한다. 그러므로, 상기 단계(2)에서 얻은 RNA 또는 해당 RNA 파생물의 양(이하, 「RNA량」)을, 불사화되지 않은 정상 또는 암세포의 상응하는 RNA 또는 해당 RNA의 파생물의 양(이하, 「대조 RNA량」)과 비교함으로써, 피험자의 암세포가 불사화되었는지 여부를 판정할 수 있다. 즉, 상기 단계(2)에서 얻은 피험자의 RNA량(불사화 규정 유전자의 발현량)이 대조 RNA량(대조군의 불사화 규정 유전자의 발현량)보다 많은 경우, 피험자의 암세포는 불사화되었다고 판정하고, 높지 않은 경우는 피험자의 암세포는 불사화되지 않았다고 판정할 수 있다.
- [0126] 그러므로 본 발명의 불사화 암세포의 판정 방법은, 상기 단계 (1) 및 (2)에 부가하여, 하기의 단계(3), 한층 더 바람직하게는 단계(4)를 포함한다.
- [0127] (3) 상기 단계(2)에서 얻은 RNA 또는 해당 RNA의 파생물의 양(RNA량)을, 불사화하지 않은 정상 또는 암세포의 상응하는 RNA 또는 해당 RNA 파생물의 양(대조 RNA량)과 비교하는 단계,
- [0128] (4) 단계(2)의 RNA량이 대조 RNA량보다 많은 경우, 피험자의 암세포가 불사화하였다고 판정하고, RNA량이 대조 RNA량보다 많지 않은 경우, 피험자의 암세포가 불사화하지 않았다고 판정하는 단계.
- [0129] 아울러 불사화하지 않은 정상 또는 암세포에 있어 불사화 규정 유전자의 RNA량(대조 RNA량)은, 복수의 불사화되지 않은 정상세포 또는 암세포의 불사화 규정 유전자의 RNA량을 균일한 조건으로 미리 측정하여, 그 RNA량의 평균치 또는 중간치로 정할 수 있다.
- [0130] (III-2) 또한, 암세포의 불사화의 판정은, 본 발명의 불사화 규정 유전자의 발현 산물, 즉 해당 유전자에 의해 코드되는 폴리펩티드(이하, 「불사화 규정 폴리펩티드」)의 생산량에 근거해 할 수 있다. 해당 불사화 규정 폴리펩티드의 생산량은, 해당 폴리펩티드를 인식하는 항체를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0131] 이 때, 본 발명이 대상으로 하는 불사화 규정 폴리펩티드로는, 전술한 각종 불사화 규정 유전자 [(1) ~ (13)]에 상응하여 하기의 것들을 들 수 있다.
- [0132] (14) UBE2S 폴리펩티드 : 서열 번호 1로 표시되는 염기 서열로 된 UBE2S 유전자(1)가 코드하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0133] (15) RFC4 폴리펩티드 : 서열 번호 2로 표시되는 염기 서열로부터 된 RFC4 유전자(2)가 코드하는 폴리펩티드, 구

체적으로는 서열 번호 15로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,

- [0134] (16) PTGES2 폴리펩티드: 서열 번호 3으로 표시되는 염기 서열로 된 PTGES2 유전자(3)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 16으로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0135] (17) MAF1 폴리펩티드: 서열 번호 4로 표시되는 염기 서열로 된 MAF1 유전자(4)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 17로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0136] (18) ACVR2B 폴리펩티드: 서열 번호 5로 표시되는 염기 서열로 된 ACVR2B 유전자(5)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 18로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0137] (19) FAM119A 폴리펩티드: 서열 번호 6로 표시되는 염기 서열로 된 FAM119A 유전자(6)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 19로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0138] (20) LTB4DH 폴리펩티드: 서열 번호 7로 표시되는 염기 서열로 된 LTB4DH 유전자(7)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 20로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0139] (21) DPM2 폴리펩티드: 서열 번호 8로 표시되는 염기 서열로 된 DPM2 유전자(8)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 21로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0140] (22) SEPX1 폴리펩티드: 서열 번호 9로 표시되는 염기 서열로 된 SEPX1 유전자(9)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 22로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0141] (23) PSMA3 폴리펩티드: 서열 번호 10로 표시되는 염기 서열로 된 PSMA3 유전자(10)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 23로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0142] (24) CHCHD3 폴리펩티드: 서열 번호 11로 표시되는 염기 서열로부터 되는 CHCHD3 유전자(11)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 24로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0143] (25) LSM3 폴리펩티드: 서열 번호 12로 표시되는 염기 서열로 된 LSM3 유전자(12)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 25로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드,
- [0144] (26) GTSE1 폴리펩티드: 서열 번호 13로 표시되는 염기 서열로 된 GTSE1 유전자(13)가 코딩하는 폴리펩티드, 구체적으로는 서열 번호 26로 표시되는 아미노산 서열로 된 폴리펩티드.

[0145] 이때, (14) UBE2S 폴리펩티드는, 공지된 폴리펩티드이며, 그 취득 방법 역시 J. Biol. Chem. 267 (22), 15829-15835 (1992)에 기재된 바와 같이 공지이다. (15) RFC4 폴리펩티드 역시, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (12), 5211-5215 (1992)에 기재된 바와 같이 공지이며, 이하, (16) PTGES2 폴리펩티드는 Biochem. Biophys. Res. Commun. 291 (4), 884-889 (2002); (18) ACVR2B 폴리펩티드는 Mol. Cell Biol. 16 (3), 1066-1073 (1996); (20) LTB4DH 폴리펩티드는 J. Biol. Chem. 271 (5), 2844-2850 (1996); (21) DPM2 폴리펩티드는 EMBO J. 19 (11), 2475-2482 (2000); (22) SEPX1 폴리펩티드는 J. Biol. Chem. 274 (48), 33888-33897 (1999); (23) PSMA3 폴리펩티드는 Biochem. Biophys. Res. Commun. 207 (1), 318-323 (1995); (25) LSM3 폴리펩티드는 EMBO J. 18 (12), 3451-3462 (1999); (26) GTSE1 폴리펩티드는 Gene 254 (1-2), 229-236 (2000)에 각각 기재되어 있는바 이들은 모두 공지된 폴리펩티드이다.

[0146] 또한, 상기 불사화 규정 폴리펩티드 [(14) ~ (26)] 는, 상응하는 불사화 규정 유전자 [(1) ~ (13)] 를 클로닝(cloning)하여, 벡터 플라스미드에 라이게이션(ligation)한 후, 대장균 등 숙주세포에 형질 전환하여, 이로써 얻은 형질 전환 세포를 배양하여, 배양물 내에서 회수함으로써 제조할 수도 있다.

[0147] 본 발명에서 이용되는 항체는, 상기 각 불사화 규정 폴리펩티드를 인식하는 것이라면 특별히 제한되지 않고, 단일클론항체 또는 다클론항체 어느 것이든 좋다. 또한 항체는, 상기 불사화 규정 폴리펩티드를 면역 항원으로 하여 조제되는 항체, 또는 해당 불사화 규정 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 서열 중 적어도 연속하는, 8 아미노산, 바람직하게는 15 아미노산, 보다 바람직하게는 20 아미노산으로 구성되는 폴리펩티드에 항원 결합성을 갖는 항체여도 좋다. 상기 폴리펩티드는, 본 발명의 불사화 규정 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 그것을 코딩하는 염기 서열로부터, 통상, 공지된 방법으로 합성할 수 있다. 예를 들면, 아미노산 합성기에 의한 화학적 합성 방

법 또는, 유전자 공학적 방법을 들 수 있다.

- [0148] 본 발명의 항체는, 통상적인 방법에 따라 제조할 수 있다(예를 들면, Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987), Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12-11. 13). 예를 들면, 다클론 항체의 경우는, 통상적인 방법으로 대장균에서 발현시키고 정제 한 상기 폴리펩티드를 이용하거나, 또는 통상적인 방법에 따라 이러한 부분 아미노산 서열을 갖도록 합성한 폴리펩티드를 이용하여, 실험동물에게 면역율 시키고, 당해 면역 동물의 혈청로부터 통상적인 방법에 따라 얻을 수 있다. 한편, 예컨대 단일클론항체의 경우, 통상적인 방법에 따라 대장균 등에서 발현하여 정제한 상기 폴리뉴클레오티드 또는, 통상적인 방법에 따라 이러한 부분적인 아미노산 서열을 갖도록 합성한 폴리펩티드를 이용하여 실험동물에게 면역을 시키고, 당해 실험동물의 비장 세포와 골수종 세포를 융합시켜 잡종세포(hybridoma)를 합성하여, 당해 잡종세포로부터 얻을 수 있다.
- [0149] 아울러 상기 항체 또한, 전술한 암세포의 불사화를 판정하기 위한 시약 및 시약 키트의 유효성분에 포함된다.
- [0150] 불사화 암세포의 판정은, 구체적으로는, 하기의 단계(1') ~ (2')에 의해 실시할 수 있다.
- [0151] (1') 피험자로부터 채취되었고, 암세포가 포함된 것이 예상되는 생체 시료로부터 수득된 폴리펩티드를 포함하는 단백질 함유 분획(protein-containing fraction)과, 본 발명의 불사화 규정 폴리펩티드를 인식하는 항체를 혼합하는 단계
- [0152] (2') 상기 항체를 지표로 하여, 상기 항체에 결합한 폴리펩티드의 양을 측정하는 단계,
- [0153] 아울러 상기 단계(2')으로 얻을 수 있는 폴리펩티드의 양은, 불사화 규정 폴리펩티드의 생산량을 반영하는 것이다.
- [0154] 단계(2')에서, 생체 시료는 피험자 자신의 것이고, 암세포를 포함할 가능성이 있는 시료이면 되고, 특별히 한정되는 것은 아니며, 예컨대 체액(혈액, 소변 등), 조직, 그 추출물 및 채취한 조직의 배양물 등이다. 또한, 생체 시료의 채취 방법은, 생체 시료의 종류 또는 암종에 따라 적당한 방법을 선택할 수 있다. 공지의 분획, 정제 방법을 적당히 조합하여, 생체 시료로부터 단백질 함유 분획(protein-containing fraction)(폴리펩티드를 포함한다)을 제조할 수 있다. 해당 단백질 함유 분획은, 예를 들면 웨스턴 블롯팅법, 효소 면역법(EIA), 방사성 동위 원소 면역법(RIA), 형광 면역법 등의 면역학적 검출법을 이용하여, 상기 항체를 프로브로서 사용하여 불사화 규정 폴리펩티드를 검출할 수 있다.
- [0155] 예컨대 단계(1') 및(2')을, 웨스턴블롯을 이용하여 폴리펩티드량(불사화 규정 폴리펩티드의 생산량)을 측정하는 경우를 상세히 설명하자면, 우선, 해당 불사화 규정 폴리펩티드에 대한 항체를 일차 항체로 하여 피험자의 생체 시료로부터 제조된 단백질 함유 분획과 혼합하여, 해당 단백질 함유분획에 포함된 불사화 규정 폴리펩티드과 결합시킨다. 다음에, 방사성 동위 원소, 형광 물질 또는 화학 발광 물질 등의 표지물로 표지 한 2차 항체를 일차 항체에 결합시킨다. 계속해서, 불사화 규정 폴리펩티드의 양을, 2차 항체의 표지의 신호로 측정한다. 신호의 검출은, 통상적인 방법에 의해, 예를 들면, 방사선 검출기나 형광 검출기 등으로 측정해 할 수 있다.
- [0156] 상기 단계(2')에서 얻은 피험자의 폴리펩티드량(불사화 규정 폴리펩티드의 생산량)을, 불사화하지 않은 정상 또는 암세포의 상응하는 폴리펩티드량(대조 폴리펩티드량)(즉, 대조군의 불사화 규정 폴리펩티드 생산량(대조생 산량))과 비교하고 그 정도를 식별함으로써, 피험자의 암세포가 불사화했는지 아닌지를 판정할 수 있다. 즉, 상기 단계(2')에서 얻은 피험자의 폴리펩티드량(불사화 규정 폴리펩티드의 생산량)이 대조 폴리펩티드량(대조 세 균의 생산량)보다 많은 경우, 피험자의 암세포가 불사화되었다고 판정하고, 높지 않은 경우, 피험자의 암세포가 불사화하지 않았다고 판정할 수 있다.

- [0157] 그러므로 본 발명의 불사화 암세포의 판정 방법은, 상기의 단계(1') 및 (2')에 부가하여, 하기의 단계(3), 한층 더 바람직하게는 단계(4)를 가진다.
- [0158] (3') 상기 단계(2')에서 수득한 폴리펩티드의 양으로 불사화되지 않은 정상 또는 암세포에 있어서의 상응하는 폴리펩티드의 양(대조 폴리펩티드량)을 비교하는 단계,
- [0159] (4') 상기 단계(2')의 폴리펩티드량이 대조 폴리펩티드량에 비교해 높은 경우에 피험자의 암세포가 불사화되었다고 판정하고, 높지 않은 경우 피험자의 암세포가 불사화되지 않았다고 판정하는 단계.
- [0160] 이때, 불사화되지 않은 정상 또는 암세포의 불사화 규정 폴리펩티드의 생산량은 복수의 불사화되지 않은 정상세포 또는 암세포의 불사화 규정 폴리펩티드의 생산량을 균일한 조건으로 미리 측정하여, 그 생산량의 평균치 또는 중간치로 정할 수 있다.
- [0161] (IV) 불사화 암세포 증식 억제제의 스크리닝 방법
- [0162] (IV-1) 실시예에 나타났듯이, 본 발명의 불사화 규정 유전자((1) ~ (13))은, 불사화 암세포에서 특이적으로 높게 발현하므로, 각각의 해당 불사화 규정 유전자의 siRNA를 이용하여 그 발현을 억제함으로써, 불사화 암세포의 증식을 억제할 수 있다. 이것은, 불사화 규정 유전자((1) ~ (13))의 발현을 억제하는 물질이, 불사화 암세포 증식 억제제(항암제)가 될 수 있다는 것을 의미한다. 즉, 전술한 불사화 규정 유전자((1) ~ (13))의 발현 억제를 지표로 함으로써, 불사화 암세포의 증식억제작용을 갖는 물질을 스크리닝 할 수 있다.
- [0163] 따라서, 본 발명은 전술한 불사화 규정 유전자((1) ~ (13))의 발현 억제를 지표로 한 불사화 암세포 증식 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0164] 해당 방법은, 하기의 단계 (A) ~ (D)를 포함할 수 있다.
- [0165] (A) 피험물질과 (1) ~ (13) 중 선택되는 하나의 불사화 규정 유전자를 발현할 수 있는 세포를 접촉시키는 단계,
- [0166] (B) 피험물질을 접촉시킨 세포에서, 해당 불사화 규정 유전자의 발현량을 측정하는 단계,
- [0167] (C) 상기 단계(B)에서 얻은 불사화 규정 유전자의 발현량과, 피험물질을 접촉시키지 않는 세포의 해당 불사화 규정 유전자 발현량(대조 발현량)을 비교하는 단계, 및
- [0168] (D) 상기 단계(B)에서 얻은 유전자의 발현량이 대조 발현량보다 낮은 경우 해당 피험물질을 불사화 암세포의 증식 억제 물질로 선택하는 단계.
- [0169] 본 발명에서 사용하는 세포는 어느 조직에서 유래된 세포든간에, 전술한 (1) ~ (13) 중 적어도 하나의 불사화 규정 유전자를 발현할 수 있는 세포면 된다. 본 발명에서 사용하는 세포는 예컨대, 폐, 위, 결장, 직장, 간장, 담낭·담관, 췌장, 신장, 방광, 전립선, 자궁, 골수, 림프절, 혈액 등으로부터 유래한 세포일 수 있다. 본 발명에서 사용하는 세포는, 포유류 또는 조류에서 유래한 것일 수 있고, 보다 바람직하게는 포유류에서 유래한 세포이며, 한층 더 바람직하게는 인간에게서 유래한 세포이다. 또한, 불사화 규정 유전자의 발현은, 내재성이든 외래성이든 좋다.
- [0170] 피험물질은 특별히 제한되는 것은 아니지만, 핵산(폴리뉴클레오티드를 포함한다), 펩티드(폴리펩티드를 포함한다), 유기 화합물, 무기 화합물 등 어느 것이어도 좋다. 구체적으로 해당 피험물질 또는 해당 피험물질을 포함한 시료(피험시료)를, 상기 불사화 규정 유전자를 발현시킬 수 있는 세포와 접촉시킴으로써 스크리닝을 할 수 있다. 상기 피험시료에는, 세포 추출액, 유전자 라이브러리(gene library)의 발현 산물, 식물이나 동물 유래 천연물의 추출물 등이 포함된다.

- [0171] 한편, 스크리닝 시, 피험물질과 세포를 접촉시키는 조건은 세포가 죽지 않고, 해당 세포에 대해 불사화 규정 유전자를 발현할 수 있는 조건이면 특별히 제한되지 않는다.
- [0172] 상기 단계(B) 및 (C)에서 불사화 규정 유전자의 발현량은, 전술한 본 발명의 프로브 또는 프라이머를 이용하여 노던블롯 또는 RT-PCR 등의 방법으로, 불사화 규정 유전자의 mRNA 또는 그 파생물인 cDNA나 이중가닥 DNA의 양을 측정함으로써 확인할 수 있다. 또한, 상기 단계 (B) 및 (C)에 있어 불사화 규정 유전자의 발현량을, 불사화 규정 유전자의 발현 산물인 불사화 규정 폴리펩티드의 양으로 정하여도 좋다. 불사화 규정 폴리펩티드의 양은, 전술한 불사화 규정 폴리펩티드에 대한 항체를 이용하여, 웨스턴 블롯팅법, 효소 면역법(EIA), 방사성 동위 원소 면역법(RIA), 형광 면역법등의 면역학적 검출법을 실시함으로써, 측정할 수도 있다.
- [0173] 단계(C)에서는, 상기 단계(B)에서 얻은 불사화 규정 유전자의 발현량을, 피험물질을 세포에 접촉시키지 않는 경우의 불사화 규정 유전자의 발현량(대조 발현량)과 비교함으로써, 불사화 암세포의 증식억제물질을 선택할 수 있다. 즉, 상기 단계 (B)에서 얻은 불사화 규정 유전자의 발현량이 대조 발현량과 비교하여 낮은 경우, 해당 피험물질을 불사화 암세포의 증식 억제 물질로 선택할 수 있다.
- [0174] (IV-2) 불사화 암세포의 증식 억제제의 스크리닝은, 본 발명의 불사화 규정 유전자((1) ~ (13))의 발현 산물인 불사화 규정 폴리펩티드((14) ~ (26))의 활성 저해를 지표로 함으로써 실시할 수도 있다. 예를 들면, (14) UBE2S 폴리펩티드는, 유비퀴틴 활성화제 (E2)(ubiquitin activator) (E2))를 포함하는 것으로 알려져 있다(J. Biol. Chem. 267 (22), 15829-15835 (1992)). (16) PTGES2 폴리펩티드는, 프로스타글란딘 H2(prostaglandin H2)를 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2)로 변환시키는 활성을 갖는 것으로 알려져 있으며(Biochem. Biophys. Res. Commun. 291 (4), 884-889 (2002)); (18) ACVR2B 폴리펩티드는 막관통 수용체로, 그 세포내 도메인에 Ser/Thr kinase 활성을 가지는 것(Mol. Cell Biol. 16 (3), 1066-1073 (1996)); (20) LTB4DH 폴리펩티드는 류코트리엔 B4 (leukotriene B4)를 12-옥소-류코트리엔 B4 (12-oxo-leukotriene B4)로 변환하는 활성을 갖는 것(J. Biol. Chem. 271 (5), 2844-2850 (1996)); (22) SEPX1 폴리펩티드는 메티오닌 설펍사이드 (methionine sulfoxide) 환원 활성을 갖는 것(Mol. Biol. Cell 15 (3), 1055-1064 (2004)) 등이, 각각 알려져 있다. 따라서, 특히 상기 불사화 규정 폴리펩티드의 활성 저해를 지표로 하여 불사화 암세포의 증식 억제제의 스크리닝을 할 수 있다.
- [0175] 구체적으로는, 하기의 단계(A') ~ (D')에 의해, 불사화 암세포의 증식억제물질을 스크리닝 할 수 있다.
- [0176] (A') 피험물질과 (14) ~ (26)에서 선택되는 불사화 규정 폴리펩티드를 접촉시키는 단계,
- [0177] (B') 피험물질을 접촉시킨 불사화 규정 폴리펩티드의 활성을 측정하는 단계,
- [0178] (C') 상기 단계(B')에서 얻은 불사화 규정 폴리펩티드의 활성과 피험물질을 접촉시키지 않는 수용액, 세포 또는 세포분획의 불사화 규정 폴리펩티드의 활성(대조 활성)을 비교하는 단계,
- [0179] (D') 상기 단계(B')에서 얻은 불사화 규정 폴리펩티드의 활성이 대조 활성보다 낮은 경우, 해당 피험물질을 불사화 암세포의 증식 억제 물질로 선택하는 단계.
- [0180] 상기 스크리닝은 불사화 규정 폴리펩티드의 활성을 지표로 하며, (14) ~ (26) [바람직하게는(14), (16), (18), (20) 또는(22)] 에서 선택되는 불사화 규정 폴리펩티드를 포함하거나 포함할 수 있는 것을 대상으로하여 실시할 수 있다. 구체적으로 그 대상은 불사화 규정 폴리펩티드의 기능(활성)에 따라 선택되며, 예컨대 (14) ~ (26) [바람직하게는 (14), (16), (18), (20) 또는 (22)] 중 어느 하나의 불사화 규정 폴리펩티드를 포함하는 수용액, (1) ~ (13) [바람직하게는(1), (3), (5), (7) 또는 (9)] 중 어느 하나의 불사화 규정 유전자를 발현시킬 수 있는 세포 또는 해당 세포로부터 제조한 세포분획이다. 이 때, 수용액이란, 불사화 규정 폴리펩티드를 포함하는 한, 특별히 제한되지 않으며, 예컨대, 통상의 수용액 외에도 세포 용해액(cell solution), 핵추출액(nuclear extraction), 또는 배양상청액(liquid culture supernatant) 등이 포함된다. 또한 세포는 내재성 및 외래성 등 그 유래는 상관없으며, 불사화 규정 유전자를 발현시킬 수 있는 상태에 있는 세포이면 된다. 세포분획은, 상기

세포에서 유래하는 각종 분획으로, 예를 들면 세포막 분획(cell membrane fraction), 세포질 분획, 세포핵 분획 등을 들 수 있다.

[0181] 아울러 스크리닝에 사용하는 세포 및 대상으로 하는 피험물질로는 전술한 스크리닝 방법과 같은 것을 사용할 수 있다.

[0182] 단계(B')에서 UBE2S 폴리펩티드(14)의 유비퀴틴 활성화의 측정은 공지 방법에 의해 실시할 수 있는데, 예를 들면, J. Biol. Chem. 267 (22), 15829-15835 (1992)에 기재된 것과 같이, 유비퀴틴, 유비퀴틴 활성화 효소(E1) 및 UBE2S 폴리펩티드를 포함하는 계(system)에서 UBE2S 폴리펩티드의 유비퀴틴화 반응을 행하고, UBE2S 폴리펩티드에 결합한 유비퀴틴의 양을 측정함으로써 실시할 수 있다. 이 때, 유비퀴틴의 양은 공지 방법을 이용하여 확인할 수 있는데, 예를 들면 방사성 물질, 효소 등으로 표지 한 유비퀴틴을 이용하여 상기 반응을 실시하고, 그 표지물의 양을 측정함으로써 확인할 수 있다(J. Biol. Chem. 267 (22), 15829-15835 (1992), J. Biol. Chem. 279 (51), 52970-52977 (2004)). 또한 항유비퀴틴 항체로 검출함으로써 측정할 수도 있다(J. Biol. Chem. 279 (51), 52970-52977 (2004)). 유비퀴틴 및 유비퀴틴 활성화 효소(E1)는, 공지의 단백질 합성법에 의해 제조하여도 좋고, 시판되는 제품을 이용하여도 좋다.

[0183] 단계(B')에서 PTGES2 폴리펩티드(16)의 프로스타글란딘 E2 합성 활성화는 공지 방법을 이용하여 측정할 수 있는데, 예를 들면, Biochem. Biophys. Res. Commun. 291 (4), 884-889 (2002)에 기재된 대로, PTGES2 폴리펩티드 및 프로스타글란딘 H2를 포함한 계에서, PTGES2 폴리펩티드를 이용하여 프로스타글란딘 E2 변환 반응을 일으키고, 생산된 프로스타글란딘 E2의 양을 측정함으로써 실시할 수 있다. 이 때, 프로스타글란딘 E2의 양은 공지 방법을 이용하여 측정할 수 있는데, 예를 들면, 방사성 물질, 효소 등으로 표지 한 프로스타글란딘 H2를 이용하여 상기 반응을 실시하고, 생산된 프로스타글란딘 E2의 표지물의 양을 측정함으로써 실시할 수 있다(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (13), 7220-7225 (1999)). 또한 항프로스타글란딘 E2 항체로 검출함으로써 측정할 수도 있다(J. Dairy. Sci. 87 (7), 2197-2210 (2004)). 프로스타글란딘 H2는, 공지의 합성법으로 제조하여도 좋고 시판되는 제품을 이용하여도 좋다.

[0184] 단계(B')에서 ACVR2B 폴리펩티드(18)의 Ser/Thr kinase 활성의 측정은 공지 방법에 의해 실시할 수 있는데, 예를 들면, Mol. Cell Biol. 16 (3), 1066-1073 (1996)에 기재되어 있는 대로, ACVR2B 폴리펩티드를 포함한 계에서, 기질과 ATP 존재하, kinase 반응을 실시해, 기질의 인산화량을 측정함으로써 실시할 수 있다. 이 때, 기질의 인산화량의 측정은 공지 방법에 의해 실시할 수 있는데 예를 들면, γ ³²P-ATP 또는 γ ³³P-ATP를 트레이서로서 이용하여 방사 활성을 측정함으로써 인산화량을 측정할 수 있다(Mol. Cell Biol. 16 (3), 1066-1073 (1996)). 또, 형광 물질이나 비오틴등으로 표지 한 기질을 이용하여 인산화 반응을 실시해, 인산화 표지물의 양을 측정함으로써 실시할 수 있다. 이때 기질은, ACVR2B 폴리펩티드, 특이적 기질 또는 펩티드를 들 수 있다.

[0185] 단계(B')에 있어서의 LTB4DH 폴리펩티드(20)의 로이코트리엔 B4 변환 활성화의 측정은 공지 방법에 의해 실시할 수 있어 예를 들면, J. Biol. Chem. 271 (5), 2844-2850 (1996)에 기재되어 있는 대로, LTB4DH 폴리펩티드 및 로이코트리엔 B4를 포함한 계에 대해, LTB4DH 폴리펩티드에 의한 로이코트리엔 B4 변환 반응을 실시해, 세균이 고분자물질을 생합성하는 되는 12-oxo-leukotriene B4의 양을 측정함으로써 실시할 수 있다. 이 때, 12-oxo-leukotriene B4의 양은, HPLC 등 공지 방법에 의해 측정할 수 있다. 로이코트리엔 B4는, 공지의 화학 합성법에 의해 취득해도 자주(잘), 또, 시판품을 이용하여도 좋다.

[0186] 단계(B')에 있어서의 SEPX1 폴리펩티드(22)의 메치오닌스르호키시드 환원 활성화의 측정은 공지 방법에 의해 실시할 수 있어 예를 들면, Mol. Biol. Cell 15 (3), 1055-1064 (2004)에 기재되어 있는 대로, SEPX1 폴리펩티드 및 메치오닌스르호키시드를 포함한 계에 대해, SEPX1 폴리펩티드에 의한 메치오닌스르호키시드 환원 반응

을 실시해, 세균이 고분자물질을 생합성하는 되는 메티오닌의 양을 측정함으로써 실시할 수 있다. 이 때, 메티오닌의 양은, HPLC 등 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다. 메티오닌스르호키시드는, 공지의 화학 합성법에 의해 취득해도 자주(잘), 또, 시판품을 이용하여도 좋다.

[0187] 단계(C') 및 (D')에 있어, 상기 단계(B')에서 얻은 불사화 규정 폴리펩티드의 활성을 대조 활성과 비교함으로써, 불사화 암세포의 증식을 억제하는 물질을 선택할 수 있다. 즉, 상기 단계(B')에서 얻은 불사화 규정 폴리펩티드의 활성이 대조 활성보다 낮은 경우, 당해 피험물질을 불사화 암세포의 증식을 억제하는 물질로서 선택할 수 있다.

[0188] 실시예에 기재한 바와 같이, 표 2 및 표 3에 나타낸 안티센스 폴리뉴클레오티드(siRNA)(서열번호 27-76)는, 암세포 내에서 본 발명의 불사화 규정 유전자와 하이브리다이즈함으로써, 당해 불사화 규정 유전자의 발현을 억제하고, 그 결과 불사화 암세포의 증식을 억제한다. 따라서, 이러한 안티센스 폴리뉴클레오티드(siRNA)는, 불사화 암세포 증식 억제제로서 이용할 수 있다. 따라서 본 발명은, 상기 안티센스 폴리뉴클레오티드를 유효 성분으로 하는 불사화 암세포의 증식 억제제를 제공한다.

[0189] 상기 안티센스 폴리뉴클레오티드는, (1) ~ (13)의 불사화 규정 유전자 중 선택되는 염기 서열의 적어도 15 염기 이상이 연속한 염기 서열로 된 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 하이브리다이즈하는 15 염기 길이 이상의 폴리뉴클레오티드로부터 구성된다. 해당 폴리뉴클레오티드는, 상기(1) ~ (13)의 불사화 규정 유전자의 적어도 15 염기 이상의 연속한 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열을 가지는 것이 바람직하지만, 상기의 특이적인 하이브리다이제이션이 가능하고, 해당 불사화 규정 유전자와 하이브리다이즈함으로써, 해당 불사화 규정 유전자의 발현을 억제할 수 있다면, 완전하게 상보적인 필요는 없다. 예를 들면, 당해 불사화 규정 유전자의 상보 서열과 비교해, 염기 서열에 대해 70%이상, 바람직하게는 80%이상, 보다 바람직하게는 90%이상, 한층 더 바람직하게는 95%이상, 특히 바람직하게는 98%이상의 동일성을 갖고, 한편 당해 불사화 규정 유전자의 RNA와 하이브리다이즈함으로써, 당해 불사화 규정 유전자의 발현을 억제할 수 있는 폴리뉴클레오티드이면 괜찮다. 아울러 본 발명의 안티센스 폴리뉴클레오티드의 염기 길이는, 15~1000 염기 길이인 것이 바람직하고, 15~500 염기 길이인 것이 한층 더 바람직하고, 16~30 염기 길이인 것이 특히 바람직하다.

[0190] 본 발명의 안티센스 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 27-76 중 선택되는 어느 하나의 염기 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드가 바람직하고, 상기 염기서열을 갖는 이중가닥 RNA가 보다 더 바람직하다.

[0191] 또, 본 발명의 안티센스 폴리뉴클레오티드는, 안정성 및 세포 투과성을 높이기 위하여, 공지의 변형(modify)이 이루어져도 괜찮다. 예를 들면, 각 뉴클레오티드의 인산 잔기는, 뉴클레아제(nuclease) 등 가수분해 효소에 의한 분해를 막기 위하여, 포스포로치오에이트(phosphorothioate), 메틸 포스포네이트(methyl phosphonate), 포스포로디치오에이트(phosphorodithioate) 등의 화학적으로 수식된 인산 잔기(chemically modified phosphoric residue)로 치환되도 괜찮다.

[0192] 본 발명의 안티센스 폴리뉴클레오티드의 형태는, 단일사슬 DNA, 단일사슬 RNA, 이중가닥 DNA, 이중가닥 RNA 및 DNA:RNA 하이브리드(hybrid) 중 어느 것이어도 괜찮다.

[0193] 본 발명의 안티센스 폴리뉴클레오티드는, 통상, 공지의 방법에 의해 합성할 수 있는데, 예를 들면, 합성기를 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0194] 본 발명의 안티센스 폴리뉴클레오티드는, 레트로바이러스 벡터(retrovirus vector), 아데바이러스 벡터(adenovirus vector), 아데노수반 바이러스 벡터(adeno-associated virus vector) 등 바이러스 벡터 또는 리포

좀(liposome) 등의 비-바이러스 벡터(non-virus vector) 등을 이용하여, ex vivo 또는 in vivo 방법 등에 의하여 환자의 암세포에 도입할 수 있어 적절한 과정을 통하여 항암요법으로 매우 적합하게 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명에는, 해당 안티센스 폴리뉴클레오티드를 유효 성분으로 하는 불사화 암세포 증식 억제제를 암환자에게 투여하는 단계를 포함하는 항암요법이 포함된다.

- [0195] 본 발명의 불사화 암세포 증식 억제제는, 상기 안티센스 폴리뉴클레오티드를 유효 성분으로 하는 것으로, 그 세포 증식 억제 작용을 해치지 않는 범위에서 안정화제, 현탁제, 동결제, 완충액, 용매 등을 함유할 수 있다. 또, 본 발명의 불사화 암세포 증식 억제제의 암환자에 대한 투여량 및 투여 스케줄은, 대상 질환, 환자의 연령·체중 등에 따라 당업자가 적당히 설정할 수 있다. 그러한 투여 스케줄로는, 예를 들면, 1 사이클을 3주간으로 하여, 그 중 2-3주간을 연속으로 2~10 mg/kg/일의 상기 안티센스 폴리뉴클레오티드를 정맥 내 투여하는 투여 스케줄, 1 사이클을 1주간으로서 하여 그 중 5일간 연속으로 80~120 mg/m²/일의 상기 안티센스 폴리뉴클레오티드를 정맥내 투여하는 투여 스케줄, 및 1 사이클을 4주간으로 하여 그 중 3주간 연속으로 80~120 mg/m²/일의 상기 안티센스 폴리뉴클레오티드를 정맥내 투여하는 투여 스케줄을 들 수 있다.
- [0196] [서열목록의 설명]
- [0197] 서열 번호 27은 UBE2S 유전자에 대한 siRNA-1(44-64)의 센스 가닥(sense strand)의 염기 서열을 나타낸다.
- [0198] 서열 번호 28은 UBE2S 유전자에 대한 siRNA-1(146-166)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0199] 서열 번호 29는 UBE2S 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0200] 서열 번호 30은 UBE2S 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0201] 서열 번호 31은 RFC4 유전자에 대한 siRNA-1(897-917)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0202] 서열 번호 32는 RFC4 유전자에 대한 siRNA-1(189-209)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0203] 서열 번호 33은 RFC4 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0204] 서열 번호 34는 RFC4 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0205] 서열 번호 35는 PTGES2 유전자에 대한 siRNA-1(2003-2023)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0206] 서열 번호 36은 PTGES2 유전자에 대한 siRNA-1(1105-1125)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0207] 서열 번호 37은 PTGES2 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0208] 서열 번호 38은 PTGES2 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0209] 서열 번호 39는 MAF1 유전자에 대한 siRNA-1(1538-1558)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0210] 서열 번호 40은 MAF1 유전자에 대한 siRNA-1(1031-1051)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0211] 서열 번호 41은 MAF1 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0212] 서열 번호 42는 MAF1 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0213] 서열 번호 43은 ACVR2B 유전자에 대한 siRNA-1(626-646)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0214] 서열 번호 44는 ACVR2B 유전자에 대한 siRNA-1(208-228)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0215] 서열 번호 45는 ACVR2B 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0216] 서열 번호 46은 ACVR2B 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0217] 서열 번호 47은 FAM119A 유전자에 대한 siRNA-1(754-774)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0218] 서열 번호 48은 FAM119A 유전자에 대한 siRNA-1(1068-1088)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0219] 서열 번호 49는 FAM119A 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.

- [0220] 서열 번호 50은 FAM119A 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0221] 서열 번호 51은 LTB4DH 유전자에 대한 siRNA-1(775-795)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0222] *서열 번호 52는 LTB4DH 유전자에 대한 siRNA-1(658-678)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0223] 서열 번호 53은 LTB4DH 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0224] 서열 번호 54는 LTB4DH 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0225] 서열 번호 55는 DPM2 유전자에 대한 siRNA-1(145-165)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0226] 서열 번호 56은 DPM2 유전자에 대한 siRNA-1(84-104)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0227] 서열 번호 57은 DPM2 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0228] 서열 번호 58은 DPM2 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0229] 서열 번호 59는 SEPX1 유전자에 대한 siRNA-1(870-890)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0230] 서열 번호 60은 SEPX1 유전자에 대한 siRNA-1(794-814)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0231] 서열 번호 61은 SEPX1 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0232] 서열 번호 62는 SEPX1 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0233] 서열 번호 63은 PSMA3 유전자에 대한 siRNA-1(853-873)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0234] 서열 번호 64는 PSMA3 유전자에 대한 siRNA-1(686-706)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0235] 서열 번호 65는 PSMA3 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0236] 서열 번호 66은 PSMA3 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0237] 서열 번호 67은 CHCHD3 유전자에 대한 siRNA-1(546-566)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0238] 서열 번호 68은 CHCHD3 유전자에 대한 siRNA-1(1450-1470)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0239] 서열 번호 69는 CHCHD3 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0240] 서열 번호 70은 CHCHD3 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0241] 서열 번호 71은 LSM3 유전자에 대한 siRNA-1(540-560)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0242] 서열 번호 72는 LSM3 유전자에 대한 siRNA-1(37-57)의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0243] 서열 번호 73은 LSM3 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0244] 서열 번호 74는 LSM3 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0245] 서열 번호 75는 GTSE1 유전자에 대한 siRNA-2의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.
- [0246] 서열 번호 76은 GTSE1 유전자에 대한 siRNA-3의 센스 가닥의 염기 서열을 나타낸다.

[0247] **[실시예]**

[0248] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 한층 더 상세하게 설명하지만, 본 발명의 범위는 이러한 실시예로 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0249] 불사화 규정 유전자의 분류

[0250] 1. 인간 조직 샘플 및 인간 암세포주, 인간비종양성 배양 세포로부터의 total RNA의 제조(preparation)

- [0251] 9종의 폐암 세포주, 21종의 식도암 세포주, 9종의 소화기암, 그 외 다양한 암(위암, 대장암, 머리 경부암, 백혈병) 세포주 및 2종의 비종양성 식도 표피 세포, 2종의 정상 기도 표피로부터, RNeasy™ Mini kit(Qiagen사 제품)을 이용하여 첨부 프로토콜에 따라 total RNA를 추출하여, -80℃에서 보관하였다.
- [0252] 또한 11종의 유방암 세포주, 10종의 난소암 세포주, 10종의 췌장암 세포주, 1종의 비종양성 불사화 유선 표피, 1종의 비종양성 유선 표피, 동일한 췌장암환자 유래의 췌장암조직과 비암부(non-cancer) 췌장 조직 10 세트, 동일한 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer) 환자 유래의 원발소(primary focus)와 전이 폐암 조직 (metastasis portions) 3 세트에서도 total RNA를 추출하여 보존하였다. total RNA는 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies사 제품) 및 RNA LabChip(Agilent Technologies사 제품)를 이용하여, 18 S 및 28S rRNA의 피크가 선명한 고품질인 것을 확인하고 나서 마이크로 어레이 분석에 제공하였다.
- [0253] 2. 마이크로 어레이 분석
- [0254] 상기 제조한 total RNA를 이용하여 마이크로 어레이에 의한 총체적(exhaustive) 유전자 발현 분석을 실시하였다. 마이크로 어레이는 CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray (19881 프로브)를 이용하여 (1) total RNA로부터 cDNA의 합성, (2) cDNA로부터 표지된 cRNA의 합성, (3) 표지된 cRNA의 단편화, (4) 단편화 cRNA와 마이크로 어레이와의 하이브리다이징, (5) 마이크로 어레이의 염색, (6) 마이크로 어레이의 스캔, (7) 유전자 발현 분석의 순서로 하였다.
- [0255] (1) total RNA로부터 cDNA의 합성
- [0256] CodeLink Expression Assay Reagent Kit(GEhealthcare bioscience사 제)를 이용하여, 그 프로토콜에 따라 first-strand cDNA 합성을 실시하였다. 즉, 1.에서 얻은 각 total RNA 1µg를 Nuclease-free Water를 이용하여 10 µl로 조정(adjust)하고, 당해 키트에 포함되는 1µl Bacterial Control mRNA 희석 용액, 1µl T7 Oligo(dT) Primer를 혼합하여, 합계 12 µl를 70℃으로 10 분간 가온한 후, 빙상(on ice)에서 3 분간 급냉하였다. 빙상에서 당해 키트에 포함되는 2 µl 의 10 × First-strand 완충용액, 4 µl의 5 mM dNTP Mix, 1 µl의 RNase Inhibitor, 1 µl의 Reverse Transcriptase(200 U/µl)를 더해 합계 20 µl를 42℃로 2 시간 가온하였다.
- [0257] 계속하여 프로토콜에 따라 RNA-DNA 하이브리드(hybrid)중의 RNA를 분해하고, DNA 사슬로 그 RNA 사슬을 치환하여 Second-strand cDNA (이중가닥 cDNA)를 합성하였다. 즉, 상기 20 µl First-strand cDNA 반응액에, 63 µl Nuclease-free Water, 당해 키트에 포함되는 10×Second-strand 완충용액(10 µl), 5 mM dNTP Mix(4 µl), DNA Polymerase Mix(2 µl : 10 U/µl), 1 µl RNase H를 더해 합계 100 µl를 잘 혼합하여, 16℃으로 2 시간 가온하였다.
- [0258] 반응 종료 후, QIAquick PCR purification Kit(QIAGEN사 제품)를 이용하여, 첨부된 프로토콜에 따라, 합성한 이중가닥 cDNA를 정제하였다. 즉, cDNA 용액 100 µl에 해당 키트에 포함되는 500 µl의 완충용액 PB를 첨가하여 혼합하여, 2 ml의 원심분리튜브에 넣은 QIAquick 스핀 컬럼에 첨가하고, 13,000 rpm으로 50 초간 원심하였다. 용출액을 제거해 다시 QIAquick 스핀 컬럼을 넣어, 해당 키트에 포함되는 700 µl의 완충용액 PE를 첨가하고, 13,000 rpm으로 1 분간 원심분리하였다. 용출액을 제거해 다시 QIAquick 스핀 컬럼을 넣어, 재차 13,000 rpm으로 1 분간 원심분리하여 완전하게 완충용액 PE를 제거하였다. QIAquick 스핀 컬럼을 새로운 1.5 ml 튜브에 넣어, 30 µl 의 Nuclease-free Water를 QIAquick 스핀 컬럼의 멤브레인상에 직접 첨가하고, 1분간 정치 후 13,000 rpm으로 1분간 원심분리하며, 이 과정을 재차 반복하였다(합계 60 µl로 용출). 진공 건조기로, cDNA 용액을 9.5 µl 이하까지 농축하고, Nuclease-free Water로 9.5 µl로 조정하였다.
- [0259] (2) cDNA로부터 표지된 cRNA의 합성
- [0260] 계속해서 CodeLink Expression Assay Reagent Kit(GEhealthcare bioscience사 제품)의 프로토콜에 따라 비오틴

으로 표지한 뉴클레오티드 존재하에서 in vitro transcription (IVT) 반응을 실시하여, cRNA를 합성하였다. 즉, 해당 키트에 포함되는 10 × T7 Reaction 완충용액 4.0 μl, T7 ATP Solution 4.0 μl, T7 GTP Solution 4.0 μl, T7 CTP Solution 4.0 μl, T7 UTP Solution 3.0 μl을 혼합하고, 10 mM Biotin-11-UTP(Perkin Elmer사 제품) 7.5 μl도 더하여 합계 26.5 μl를 (1)에서 조정한 9.5 μl cDNA 용액에 첨가하였다. 아울러 해당 키트에 포함된 10 × T7 Enzyme Mix 4.0 μl를 가하여, 합계 40.0 μl를 잘 혼합하고, 증기 상태(vapor phase)에서 37°C로 14 시간동안 가온하였다. 반응 종료 후, RNeasy Mini Kit(QIAGEN사 제품)를 이용하여 첨부된 프로토콜에 따라, 합성한 cRNA를 정제하였다. 즉, IVT 반응액(40 μl)에 Nuclease-free Water 60 μl를 첨가하고, 해당 키트에 포함된 완충용액 RLT 350 μl를 합계 100 μl의 용액에 첨가하고 잘 혼합하고, 거기에 100% 에탄올 250 μl을 첨가하여 잘 혼합하고, 전체 양(700 μl)을 해당 키트에 포함된 RNeasy 미니 스핀 컬럼에 첨가하여, 12,000 rpm으로 15 초간 원심분리하였다. RNeasy 미니 스핀 컬럼을 새로운 2 ml 튜브에 넣고, 해당 키트에 포함된 완충용액 RPE 500 μl를 컬럼에 첨가하여 12,000 rpm으로 15 초간 원심분리하며, 이 조작을 두 번 반복하였다. 용출액을 제거한 후, 다시 RNeasy 미니 스핀 컬럼을 2 ml 원심분리 겔(튜브)에 넣고, 12,000 rpm으로 2 분간 원심분리하여 컬럼 내의 멤브레인을 건조시킨 후, RNeasy 미니 스핀 컬럼을 또다른 1.5 ml 튜브로 옮겨, Nuclease-free Water 50 μl를 멤브레인 상에 직접 첨가하였다. 실온에서 10 분간 정치 한 후, 12,000 rpm로 1분간 원심분리해, 이 과정을 두 번 반복하였다(합계 100 μl로 용출함).

[0261]

샘플을 잘 혼합하여, 2 μl는 Agilent 2100 Bioanalyzer 에 의한 cRNA 품질 체크용으로, 2 μl는 멸균 증류수로 50배 희석해 cRNA 정량용으로 조제하고, 나머지는 -80°C에서 보존하였다. 정량은 50배 희석 용액의 260 nm 및 280 nm 흡광도를 측정해, cRNA 농도를 정량하고, 260 nm/280 nm 의 흡광도비가 1.8이상인 것을 확인하였다. cRNA 농도가 0.5 μg/μl 이하인 경우는 진공 건조기로 농축하였다. cRNA의 품질 체크는 Agilent 2100 Bioanalyzer 및 RNA LabChip를 이용하여 첨부된 프로토콜에 따라 전기영동하여, 스메어 피크(smear peak)의 길이가 500 염기 이상인 것을 확인하여 수행하였다.

[0262]

(3) 표지된 cRNA의 단편화

[0263]

계속해서 CodeLink Expression Assay Reagent Kit(GEhealthcare bioscience사 제품)의 프로토콜에 따라, cRNA를 약 100-200 염기로 단편화하였다. 즉, cRNA 10 μg가 20 μl가 되도록, 뉴클레아제가 없는 물(Nuclease-free Water)를 첨가하고, 해당 키트에 포함된 5 × 분절화 완충용액(Fragmentation 완충용액) 5 μl을 첨가해, 94°C로 20분간 가열 후, 빙상(on ice)에서 급냉하였다. 단편화된 cRNA 10 μg가 포함된 용액 25 μl에, 해당 키트에 포함된 하이브리드화 완충용액 A(Hybridization 완충용액 A) 78 μl, 하이브리드화 완충용액(Hybridization 완충용액 B) 130 μl, 뉴클레아제가 없는 물(Nuclease-free Water) 27 μl을 가하여 합계 260 μl의 하이브리다이제이션 용액을 제조하였다. 최고 속도로 5 초간 볼텍스(vortex)하고 속도를 감소시켜(spin-down), 90°C으로 5분간 가열해 cRNA 의 열변성을 실시하고, 빙상에서 냉각하였다.

[0264]

(4) 단편화 cRNA와 마이크로 어레이와의 하이브리다이즈

[0265]

CodeLink Shaker Kit(GEhealthcare bioscience사 제품) 및 CodeLink INNOVA 진탕기(shaker)를 이용하여 프로토콜에 따라 하이브리다이즈를 실시하였다. 즉, CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray를 해당 키트에 포함된 12 Slide Shaker Tray에 넣었다. (3)에서 조정한 하이브리다이제이션 용액을 최고 속도로 5초간 볼텍스한 후 속도를 감소시켜(spin-down), 하이브리다이제이션 용액 250 μl를 어레이의 씰링 챔버(sealing chamber)의 오른쪽-아래의 구멍에 주입하고, 어레이의 부속인 씰링 스트립(sealing strip)(sticker)으로 구멍을 밀봉하였다. 어레이를 실은 진탕기 받침(shaker tray)를 CodeLink INNOVA 진탕기 안에 설치하고, 37°C, 300 rpm로 선회시키면서 18시간 동안 가온하였다.

[0266]

(5) 마이크로 어레이의 염색

[0267]

CodeLink Parallel Processing Kit(GEhealthcare bioscience사 제품)를 이용하여 프로토콜에 따라, 어레이의 염색 및 세정을 실시하였다. 즉, 상기 하이브리다이즈가 끝난 어레이에서 씰 챔버(seal chamber)를 제거하고, 실온에서 0.75 × TNT 완충용액 (0.1 M Tris-HCl(pH 7.6), 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) 13 ml를 가하였고,

반응액을 해당 키트에 포함된 바이오어레이 랙(Bioarray Rack)을 이용하여 중형 시약 저장소(medium reagent reservoir)의 슬롯으로 나누었다. 몇 차례 랙(rack)을 상하로 움직여 여분의 하이브리다이제이션 용액을 어레이에서 떨어 뜨리, 46°C에 가온한 0.75 × TNT 완충용액 240 ml로 채운 대형 시약 저장소(large reagent reservoir)로 어레이를 옮겼다. 바이오어레이 랙을 46°C에서 1 시간 동안 가온하였다.

[0268] 염색액으로는, 어레이 1매당 뉴클레아제가 오염되지 않은 증류수(Nuclease-free Water)에 1 mg/ml의 농도로 용해한 스트렙타비딘(Streptavidin)-Cy5액 6.8 μl를 TNB 완충용액(0.1 M Tris-HCl(pH 7.6), 0.15 M NaCl, 0.5 % TSA 차단시약(Blocking Reagent) (Perkin Elmer사 제품)) 3393.2 μl로 실온에서 500배로 희석하여, 합계 3.4 ml를 해당 키트에 포함되는 소형 시약 저장소(Small Reagent reservoir)의 슬롯에 채웠다. 이 소형 시약 저장소에, 어레이가 보관된 바이오어레이 랙을 옮기고, 알루미늄 등으로 차광하며 실온(23°C±2°C)에서 30 분간 염색하였다.

[0269] 염색 후, 바이오어레이 랙을 TNT 완충용액(실온) 240 ml를 채운 대형 시약 저장소로 옮겨, 몇 차례 움직인 후(moved up and down) 실온에서 5 분간 보관하였다. 그리고 새로운 TNT 완충용액(실온)를 채운 대형 시약 저장소로 옮겨 몇 차례 상하로 움직인 후 실온에서 5 분간 보관하며, 이를 총4회 반복하여 세정하였다. 마지막으로 0.05% Tween 20 용액 240 ml을 이용하여 5초간 상하로 움직이면서 세정하고, 이를 두 번 반복하였다. 건조한 중형 시약 저장소에 바이오어레이 랙을 넣어, 600 × g, 실온에서 3분간 원심분리하여 건조시켰다.

[0270] (6) 마이크로 어레이의 스캔

[0271] 염색한 각 어레이를 어질런트 G2565(Agilent G2565 (Agilent사 제품)) 스캐너를 이용하여 염색 패턴을 읽어내어 TIFF 이미지로 보존하였다. TIFF 이미지를 코드링크 발현 분석 소프트웨어(codeLink Expression Analysis software)로 처리하여, 어레이 상의 각 유전자 스팟(spot)을 신호 크기로 수치화(digitize)하였다.

[0272] (7) 유전자 발현 분석

[0273] 상기에서 얻은 신호 강도 데이터를 GeneSpring GX (Agilent사 제품) 마이크로 어레이 유전자 발현 분석 소프트웨어를 이용하여 표준화(Normalization)하여 해석하였다. 즉, 스팟 신호에서 배경 신호를 제거하였고, 그 값이 0.01 미만인 것은 0.01로 보정하고, 어레이의 전체 스팟 신호의 중앙치로 나눈 값을 각각의 유전자의 표준화된 상대적 발현량으로 하였다. 이 상대적 발현량이 정상세포(도 1, 왼쪽 위)에 비해 불사화 암세포주(도 1, 오른쪽 아래)에서 전체적으로(universally) 증가한 유전자를 하기와 같이 선택하였다. 다양한 장기에서 보편적으로 발현이 강화된 유전자는, 정상 체세포(도 1, 왼쪽 위)의 암화(도 1 가운데, 흰색, 파란색 화살표)에 관련된 유전자보다는, 암세포의 불사화(도 1 가운데, 오른쪽 방향 빨강 화살표)와 관련된 유전자일 것으로 예상되었다.

[0274] 9종의 폐암 세포주 중 8종 이상에서 2종의 정상 기도 표피의 중앙치보다 2배 이상 높게 발현하고, 21종의 식도암 세포주 중 19종 이상에서 2종의 비종양성 식도 표피의 중앙치보다 2배 이상 높게 발현하며, 한편 9종의 소화기암 외 다양한 암(위암, 대장암, 머리 경부암, 백혈병) 세포주 중 8종 이상에서, 상기 4종의 비종양성 표피(2종의 기도 표피와 2종의 식도 표피)의 중앙치보다 2배 이상 높게 발현하고 있는 유전자인 51개 유전자를 추출하였다(도 2, 왼쪽 위). 한편, 이들 3 개 군의 장기별 암세포주의 발현 레벨의 평균치가, 각각 대조군으로 한 정상 표피의 평균치의 2배 이상(단, 이 평균치에 의한 선택에 이용한 식도암 세포주는 최초로 분석을 한 7종임)이고, 또한 불사화 폐암 세포로 구성된 전이 폐암 조직에 있어서의 발현 레벨이, 동일 증세의 비불사화 폐암 세포로 구성되는 원발성 조직 및 전이 조직의 평균치의 2배 이상인 유전자를 80개 유전자 추출하였다(도 2, 오른쪽 위). 스크리닝된 이들 2군에서, 7개 유전자가 양쪽 군에서 공통적으로 추출되었다.

[0275] 암세포주가 모두 불사화한 세포라는 것은 이미 알려져 있으며, 이 때, 이용한 불사화·비불사화 폐암 조직은, 텔로메라제 활성(Hiyama K등, J Natl Cancer Inst 87: 895-902, 1995, Case G), 텔로미어 길이(Hiyama K등, Oncogene 10: 937-44, 1995, Case 92-D), 및 hTERT 단백질의 in situ 발현(Hiyama E등, Neoplasia 3: 17-26,

2001, Fig 6A, B) 분석에 의하여, 동일 증세의 원발성(도 3 가운데, 「D2Pr」) 및 간 전이병소(hepatic metastasis focus)(도 3 가운데, 「D5M3」)는 불사화하지 않았으며(텔로메라제 활성은 음성이며, 텔로미어 길이 단축됨, hTERT 단백질 발현은 관찰되지 않음), 림프절 전이병소(lymph node metastasis focus)들 중 하나(도 3 중, 「D4M2」)는 거의 불사화 세포만으로 구성되고(고텔로메라제 활성, 텔로미어 초연장, 거의 모든 세포로 hTERT 단백질 발현), 또 다른 하나의 전이병소(metastasis focus)(도 3 중, 「D3M1」)는, 불사화 세포가 비불사화 세포안에 혼재되었다는 것(텔로메라제 활성 낮음, hTERT 단백질 발현 세포가 비발현 세포 안에 혼재됨)을 확인하였다.

[0276]

게다가 유방암 11개 세포주, 난소암 10개 세포주, 췌장암 10개 세포주에 대해서도 공통적으로 높게 발현되는 유전자의 범위를 좀더 좁혀, 최종적으로, (1)유비퀴틴-콘주게이트 효소 E2S(ubiquitin-conjugating enzyme E2S)(UBE2S), (2) 복제인자 C(replication factor C)(activator 1) 4, 37 kDa(RFC4) (3) 프로스타글란딘 E 합성효소 2(prostaglandin E synthase 2)(PTGES2), (4) MAF1 동족계(homolog)(*S. cerevisiae*)(MAF1), (5) 액티빈 A 수용체(activin A receptor), type IIB(ACVR2B), (6) 서열 상동성 119, 멤버 A의 계열(family with sequence similarity 119, member A)(FAM119A), (7) 류코트리엔 B4 12-하이드록시디하이드로게나제(leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase)(LTB4DH), (8) 돌리치-파스페이트 만노실트랜스페라제 폴리펩타이드 2, 조절부위(dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit)(DPM2), (9) 셀레노프로틴 X(selenoprotein X), 1(SEPX1), (10) 프로테오솜(proteasome)(프로솜(prosome), 마크로파인(macropain)) 부위(subunit), 알파 타입(alpha type), 3(PSMA3), (11) 코일드-코일-헬릭스-코일드-코일-헬릭스 도메인 콘테이닝 3(coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3)(CHCHD3), (12) LSM3 동족체(homolog), U6 작은 핵 RNA 결합(small nuclear RNA associated)(*S. cerevisiae*)(LSM3), 및 (13) G-2 및 S-기 발현 1(G-2 and S-phase expressed 1)(GTSE1)의 합계 13개 유전자가, 폐암 세포주, 식도암 세포주, 소화기암 세포주, 유방암 세포주, 난소암 세포주, 췌장암 세포주, 그 외 암세포주의 대부분에서 공통적으로, 유한한 수명의 비종양성 세포와 비교하여 높게 발현되며, 텔로메라제 양성 폐암 전이 조직(불사화 암세포)에서 동일 증세의 텔로메라제 음성 폐암 전이 조직 및 원발성 조직(비불사화 암세포)보다 높게 발현하고, 불사화 세포 및 불사화하지 않은 세포가 혼재한 췌장암조직보다 불사화한 세포만으로 구성되는 췌장 암세포주에서 더 높게 발현되는 것을 확인하였다(도 3). 이때, 이용한 췌장암조직은, 동일 증세의 정상 췌장 조직과 비교해서, 텔로메라제를 코딩하는 유전자 TERT의 전체 길이 mRNA(full length mRNA) 발현량이 많지만, 불사화 췌장 암 세포주에 비교해서는 확실히 낮아, 불사화하지 않은 세포가 혼재하고 있다고 생각된다.

[0277]

도 3~15에 나타난 것과 같이, 상기의 13개 유전자는,

[0278]

(1) 불사화 세포(도 3~15 검은색 : MCF-12 A, SV11e, SV11-106 외 모두 인간 암 유래 세포주)에서는, 유한 수명의 비종양성 세포(도 3~15 탈색)에 비교해 강하게 발현되었다.

[0279]

(2) 인간 암유래 불사화 암세포(도 3~15, MCF-12 A, SV11e, SV11-106 이외 검은 막대)에서는 유한 수명 암세포(도 3~15, SV12e, SV12-72 이외 사선)보다 강하게 발현되었다.

[0280]

(3) 정상인 폐 섬유모세포(lung fibroblasts)에 텔로메라제를 코딩하는 유전자 TERT를 도입해 얻은 비종양성 텔로메라제 발현 수명-연장(life-extension) 세포(도 3~15, 다이아몬드 모양의 점박이 무늬 막대, TERT6e, TERT6-85)에서는, 부모 세포(TIG-1)에 비교해 덜 강하게 발현되었다.

[0281]

이들 유전자들은 암세포 특이적으로 텔로메라제 양성 불사화 세포에서 높게 발현하는 유전자이다. 이로써 이들 유전자는, 암세포의 불사화를 규정하는 유전자(불사화 규정 유전자)라고 생각된다.

[0282]

게다가 정상 폐 섬유모세포에 텔로메라제를 코딩하는 유전자 TERT 및 SV40 조기항원(early antigen)을 코딩하는 유전자를 도입해 얻은 불사화 형질전환 세포(도 3내지 15, SV11e, SV11-106: 반고형 한천으로 콜로니 형성 분석(colony formation assay with soft agar) 결과, 콜로니를 만들며, 300 PDL 이상에서 통과가 가능하다(passage capability)는 것을 확인하였음)에서는, 부모 세포(TIG-1)나 비종양성 연명 세포(TERT6e, TERT6-85: 반고형 한천으로 콜로니 형성 분석(colony formation assay with soft agar)한 결과 콜로니를 만들지 않고, 100 PDL 미만에서 세포 증식이 정지하는 것을 확인하였음)와 비교할 때, MAF1, LTB4DH 이외에는 강하게 발현하였다. 이들 2개 유전자는, in vitro로 형질전환시킨 세포가 반드시 인간의 암과 동일하게 성장하는 것은 아니기

때문인 것으로 생각된다.

실시예 2

[0283]

불사화 규정 유전자의 siRNA(small interfering RNA)에 의한 암세포 증식 억제

[0284]

실시예 1에서 특정한 13종의 불사화 규정 유전자의 암세포 증식과의 관련성을 해석하기 위해서 각 유전자 서열 특이적 siRNA를 설계, 제작하여, 3종의 암세포주(HeLa: 자궁경암, KYSE150: 식도암, HCC50:대장암)에 유전자를 도입하고, 불사화 규정 유전자의 mRNA 발현의 억제 및 도입 후 96시간 후 세포 증식에 미치는 영향을 검토하였다.

[0285]

(1) 불사화 규정 유전자 서열 특이적 siRNA(small interfering RNA)의 설계 및 제작

[0286]

13종의 각 불사화 규정 유전자에 대하여, 2종 또는 4종의 특이적인 siRNA 서열을 설정하고, 센스 가닥과 안티센스 가닥에 의해 이중가닥이 형성된 siRNA를 Qiagen사 및 일본 바이오 서비스사부터 구입하였다. 각각의 제작된 siRNA의 서열 가운데, 센스 가닥만을 표 2 및 3에 나타내었다. 각 유전자의 siRNA-1은 2 종류의 siRNA가 동일한 몰라 농도로 혼합된 것(equimolar mixture)이었다.

표 2

[0287]

Gene Symbol	siRNA Name	Position	Sequence	SEQ ID No.
UBE2S	siRNA-1	44-64	CCGCCCGCCGAGCCAUGAA	27
		146-166	UGGCAUCAAGGUCUUCCCAA	28
	siRNA-2	473-491	GGAGAACUACGAGGAGUUAU	29
	siRNA-3	659-677	UGGCGAGCGGAUAGAAG	30
RFC4	siRNA-1	897-917	AGGGAUAGCUUAUCUUGUUA	31
		189-209	CUGCACGAGAAGCCAGGCUAA	32
	siRNA-2	745-763	CCGAUUCUGUCUUAUCUGU	33
	siRNA-3	1023-1041	GGGUAUACCAGCUGAGAA	34
PTGES2	siRNA-1	2003-2023	CUGGGACAUGUUUGCAAUAAA	35
		1105-1125	CUGGCUCAUGCUCUACGAGAA	36
	siRNA-2	943-961	AGGAGAAAGCUCGCAACAA	37
	siRNA-3	1086-1104	CCGAGUUCGGCAUUAAGUA	38
MAF1	siRNA-1	1538-1558	CAGCUGGACCGCAGAGUUUAU	39
		1031-1051	UAGCCUCUGGUCCUUAACUA	40
	siRNA-2	604-622	ACGACAACACAUGUUCAA	41

표 3

[0288]

	siRNA-3	856-874	GCCUAGCUGGGUGGUGAA	42
ACVR2B	siRNA-1	626-646	CAGCUCAUGAAUGACUUUGUA	43
		208-228	CACCAUCGAGCUCGUGAAGAA	44
	siRNA-2	684-702	GGCAGAGUGAACGGGAGAU	45
	siRNA-3	840-858	GGAACAUCACAUGGAA	46
FAM119A	siRNA-1	754-774	AAGGUUCACUACGAUCCUGAA	47
		1068-1088	UCGAUUUAUGCUAUUUGUGUA	48
	siRNA-2	201-219	GGAAUUUGGUUGCAGAAA	49
	siRNA-3	810-828	CCAGAAGGAGGACUUUAAA	50
LTB4DH	siRNA-1	775-795	CACUGUUAUCGCCAGAUGAA	51
		658-678	UGGAUUUGAUGUCGUUUUAA	52
	siRNA-2	263-281	GCCAAAAGAUUGAAGGAAG	53
	siRNA-3	725-743	CCUGAUGGUUAUGAUUGUU	54

<i>DPM2</i>	siRNA-1	145-165	CAGCAUGUCAUCCACAAGUAU	55
		84-104	UAGCCUGAUCUUCUACCCUA	56
	siRNA-2	116-134	GGGUGAUUCUCUUGCCAUU	57
	siRNA-3	224-242	UGUUUGUGGGACUGUUCAU	58
<i>SEPX1</i>	siRNA-1	870-890	CAGACUCUCGCCUCACCGAA	59
		794-814	CUGAAUGACGUUACCCUCA	60
	siRNA-2	161-179	GGGCGAGGUUUCAGAAU	61
	siRNA-3	179-197	UCACUUUGAACCCUGCGUU	62
<i>PSMA3</i>	siRNA-1	853-873	CCAGUCCAUGUAACUAUUUA	63
		686-706	CUCAGCUGGGUUGGUGAAUUA	64
	siRNA-2	291-309	UGGCAGAUGCUCGUUCUU	65
	siRNA-3	512-530	GGUGUUUCAUACGGUUAUU	66
<i>CHCHD3</i>	siRNA-1	546-566	CAGGAUGCAUUCUACAAGAA	67
		1450-1470	CUGGAAUAAUGUUUAUGAUUA	68
	siRNA-2	374-392	CGAAGAUCAGAAACGACUA	69
	siRNA-3	522-540	GAGAAAGACCGAGUGCUAA	70
<i>LSM3</i>	siRNA-1	540-560	UCCAAUAAUUAUGACCACCAA	71
		37-57	ACGACGUAGACCAGCAACAAA	72
	siRNA-2	39-57	GACGUAGACCAGCAACAAA	73
	siRNA-3	261-279	ACGAAACGGAAUUAUCCAA	74
<i>GTSE1</i>	siRNA-2	1082-1100	GGGCAAAGCUAAAUCAAGU	75
	siRNA-3	2116-2134	UGACAACACUCCAGACAU	76

[0289] (2) 인간 암세포주의 배양

[0290] 3종의 암세포주(HeLa: 자궁경암, KYSE150: 식도암, HCC50:대장암)는 각각 하기의 조건으로 배양하였다. HeLa는 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)(Sigma사 제품) 및 젠타마이신(gentamycin)(Sigma사 제품)을 포함한 DMEM 배지(Nacalai Tesque사 제품)를 이용하고, KYSE150와 HCC50는 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum) 및 젠타마이신을 포함한 RPMI 1640 배지(Nacalai Tesque사 제품)를 이용하여 배양하였다.

[0291] (3) 불사화 규정 유전자 서열 특이적 siRNA의 암 세포주에의 유전자 도입

[0292] 형질전환하기 전 날, 미리 배양한 각 암세포를 트립신을 처리하여 회수하고, (2)에 기재한 배지에 현탁한 후, 24 웰 플레이트의 1 웰 당, HeLa를 1.2×10^4 개, KYSE150를 2×10^4 개, HCC50를 1.5×10^4 개의 세포를 접종하였다. 형질전환 당일에는 무혈청배지 Opti-MEM(Invitrogen사 제품)으로 교환하여, 올리고펙타민(Oligofectamine)(Invitrogen사 제품) 또는 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000)(Invitrogen사 제품)을 이용하여 표 2 및 표 3에 나타낸 siRNA로 형질전환하였다. 형질전환 시 siRNA의 농도는 1 웰 당, 40 nM로 하였다. 음성 대조군으로 대조군(Control)(non-silencing) siRNA(Qiagen사 제품)를 사용하였다.

[0293] (4) 불사화 규정 유전자의 상대적 mRNA 발현량의 억제 해석

[0294] (3)의 형질전환 후 1일 후 각 암세포주로부터, RNeasy Mini(Qiagen사 제품)를 이용하여 제품의 설명서에 따라, 전체 RNA(total RNA)를 추출하였다. QuantiTect Probe RT-PCR(Qiagen사 제품) 및 불사화 규정 유전자 서열 특이적 TaqMan Probe(ABI사 제품)를 이용하여, 하기 조건에서 정량 RT-PCR(ABI사 제품, ABI PRISM 7000 sequence detection system)를 실시하였다.

[0295] i) 50°C, 30분간,

[0296] ii) 95°C, 15분간,

[0297] iii) 94°C, 15초간 → 60°C, 1분간을 35-45 사이클.

[0298] 내부적인 표준으로 β-액틴 사용해, 각각의 증폭 곡선으로부터 발현량을 수치화하였다. 대조군으로는 NS서열

siRNA를 도입한 세포의 수치를 이용하였다. 아울러 불사화 규정 유전자의 상대적 mRNA량의 측정은, 동일 표적 유전자, 동일 암세포주에 대하여 동일한 조건으로 2회씩 실시하였다.

[0299] 대조군에서의 각 불사화 규정 유전자의 mRNA량을 100%로 했을 때, 각 siRNA를 도입한 세포에 있어 각 불사화 규정 유전자의 상대적 mRNA량을, 도 16~28에 mRNA 정량 1 및 mRNA 정량 2로 표시하였다. 모든 표적 유전자에서, siRNA들(siRNA-1 내지 siRNA-3)중 어느 하나에 의해 mRNA 발현량이 억제된 것이 관찰되었다.

[0300] (5) 암세포주의 증식 측정

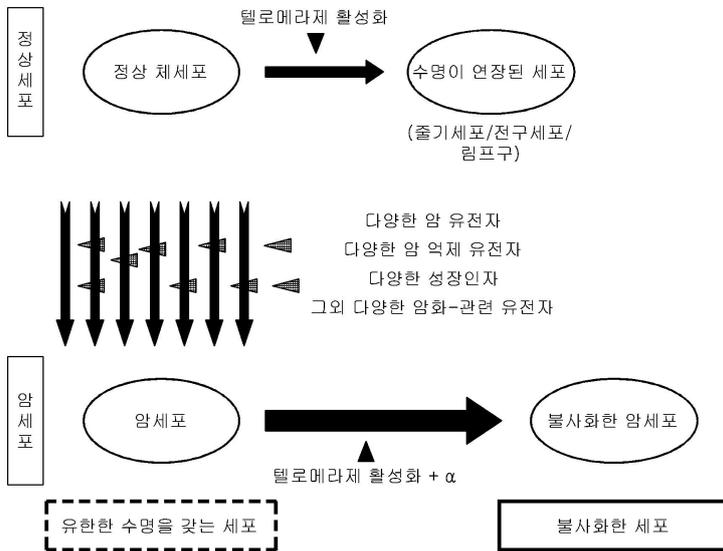
[0301] 암세포주의 증식은 생존 세포수 측정 시약 SF(viable cell count measurement reagent SF, Nacalai Tesque사 제품)를 이용하여 측정하였다. (3)에서 형질전환 후 96시간 후, 1 웰 당, WST 시약을 10 μ l 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C으로 3시간 배양한 후에 플레이트 리더(Perkin Elmer사 제품, Wallac ARVO MX1420 Multilabel Counter)로 450 nm 및 595 nm(참조 파장)의 흡광도를 측정하였다. 450 nm의 흡광도-595 nm의 흡광도-BG(배지만)의 흡광도로 수치화 하여, 3 웰 당 평균치를 구하고 NS서열 siRNA 도입 세포의 값을 100%로서 표시하였다. 아울러 암세포주의 증식 측정은, 동일 표적 유전자 및 동일 암세포주에 대하여 동일한 조건으로 2회씩 실시하였다.

[0302] NS서열 siRNA 도입 시 세포수를 100%로 했을 때, 각 siRNA 도입시의 세포수를 도 16~28에 MTT-1 및 MTT-2로 표시하였다. 모든 표적 유전자에서, 몇 개의 siRNA에 의해 3종의 암세포에서 증식이 억제되는 것이 관찰되었으며, 이것으로부터 이들 13종의 불사화 규정 유전자가, 보편적으로 불사화 암세포의 증식을 억제하는 분자 표적이 될 수 있는 것으로 나타났다.

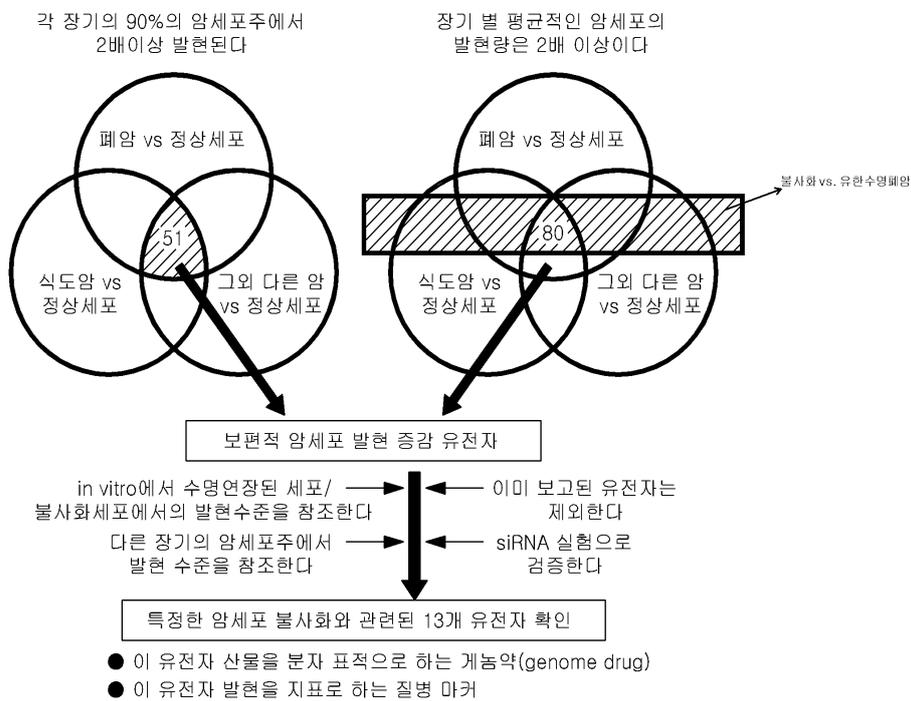
[0303] 본 발명은 치료약으로 개발하는 것뿐 아니라, 암세포에서 불사화와 유한 수명을 감별하는 질환 마커로서의 의의도 크다. 통상 암의 진단은 병리 소견에 의하여 분화도(differentiation)나 이형성(atypism) 등이 진단 가능하지만, 그 세포가 불사화하고 있는지 아닌지, 즉 무한 수명을 획득하고 있는지 아닌지는 통상의 병리 해석에서는 판정할 수 없다. 종래 인간 텔로메라제의 활성화가 불사화의 마커로서 주목받아 왔지만, 전술한 것과 같이, 정상세포의 일부에서도 텔로메라제가 활성화 되는바, 텔로메라제의 활성화만으로 반드시 세포가 불사화하는 것은 아니라는 것이 밝혀지고 있다. 게다가 면역 조직 염색법이 확립되었음에도 불구하고 텔로메라제의 발현량이 매우 낮아, 일부 연구실에서만 성공적으로 수행되고 있다(Hiyama E등, Neoplasia 3: 17-26, 2001). 상기 본 발명의 불사화 규정 유전자의 발현을 마커로 이용함으로써, 통상의 병리 진단에서는 판정할 수 없었던 불사화 암세포를 유한 수명 세포로부터 감별하는 것이 가능해져, 암의 조기진단·치료 선택·예후 예측에의 임상 응용이 기대된다.

도면

도면1



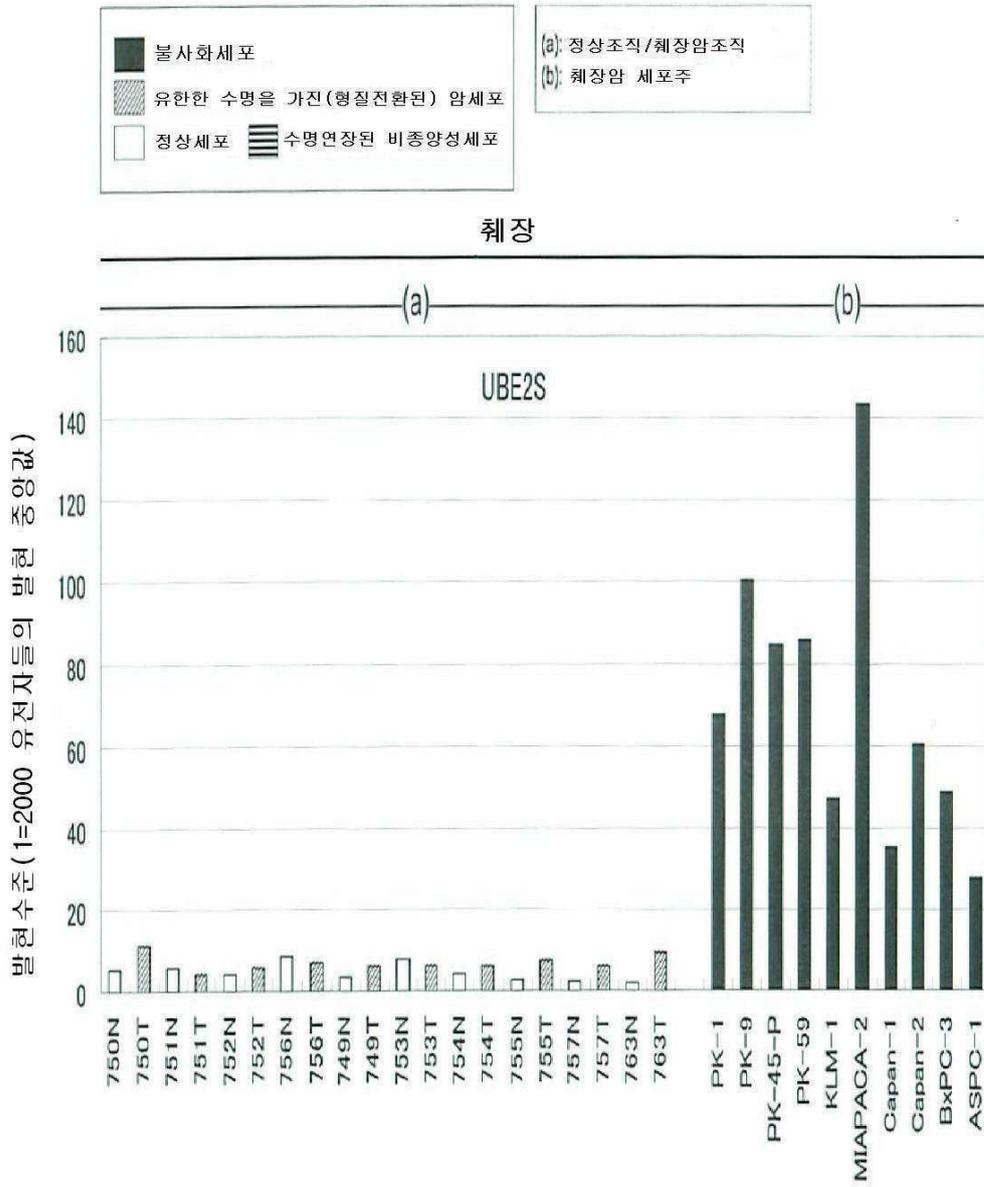
도면2



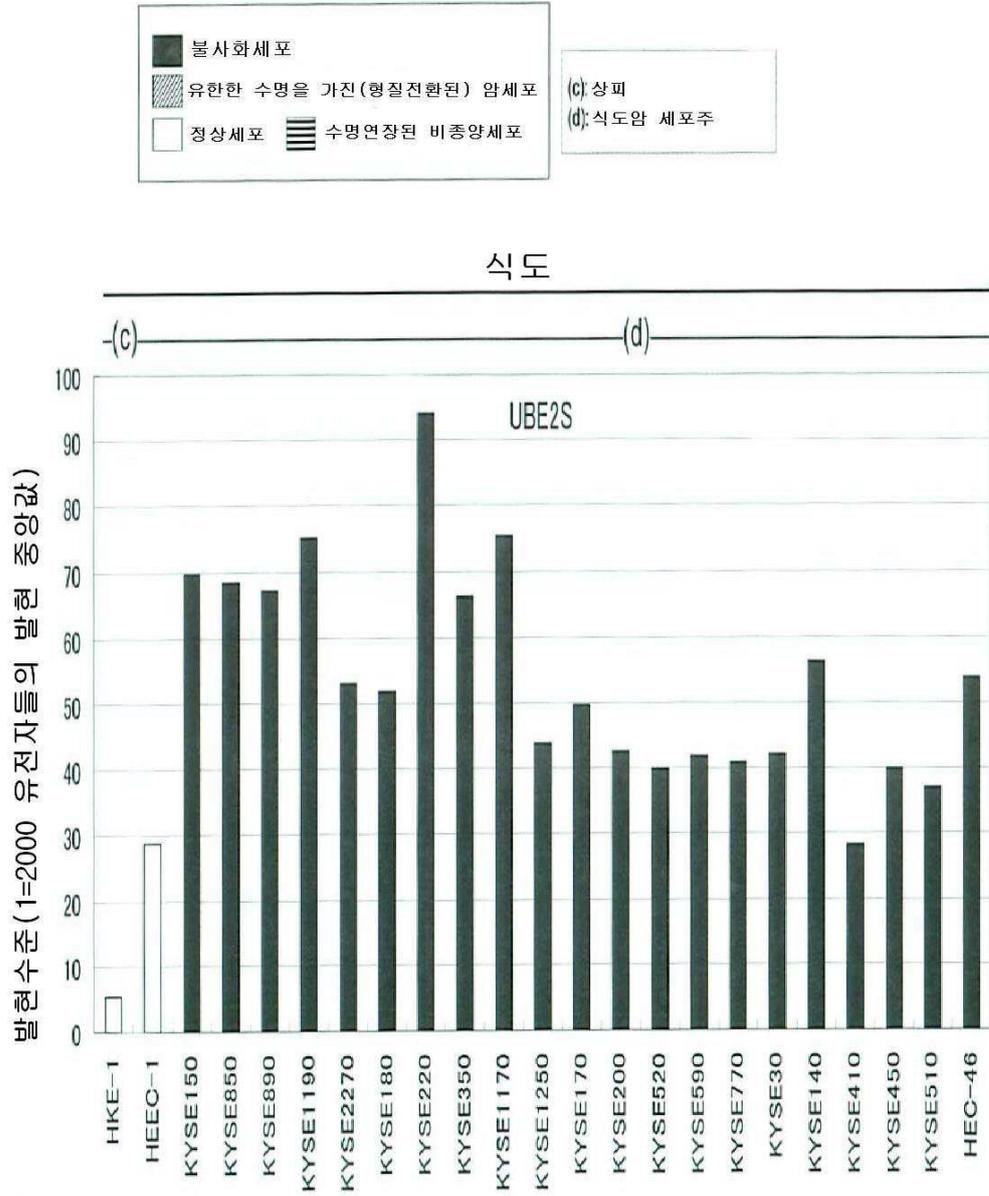
도면3

삭제

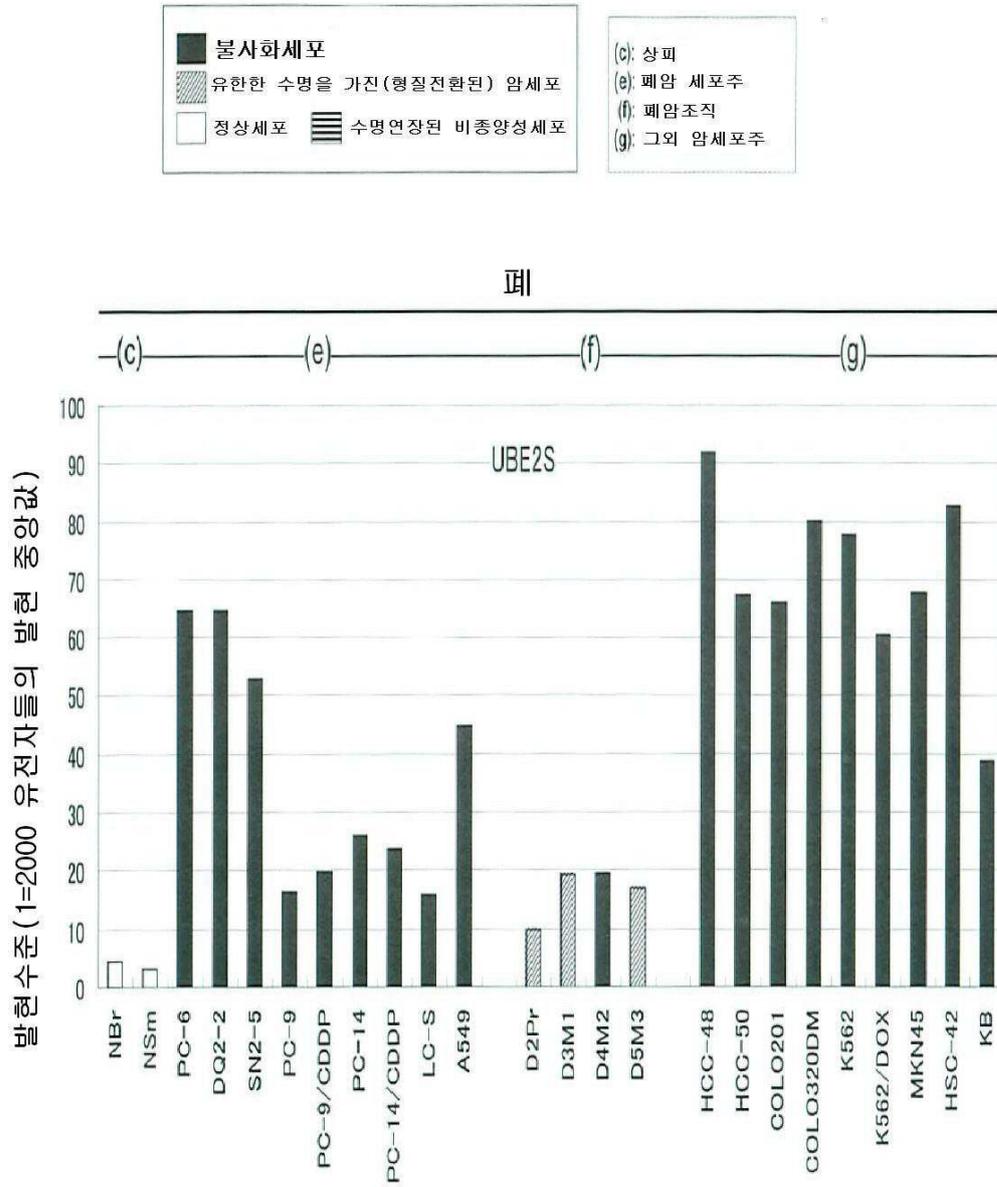
도면3a



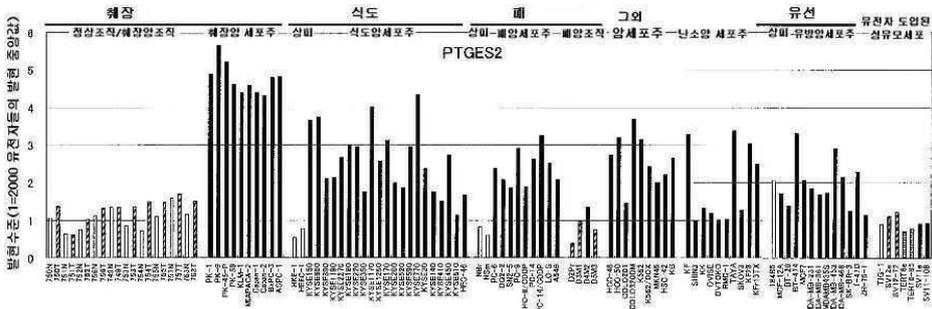
도면3b



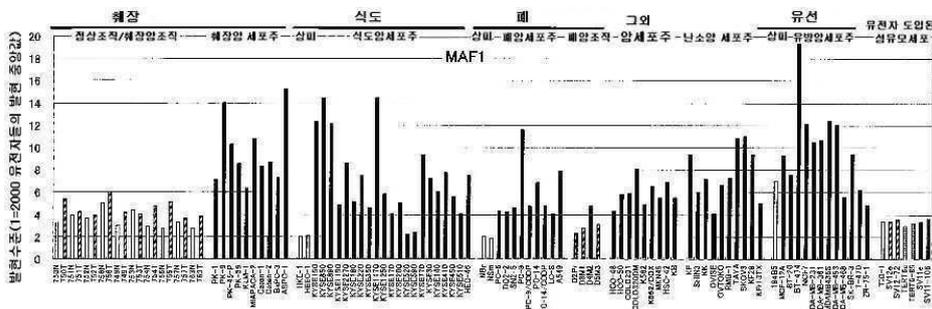
도면3c



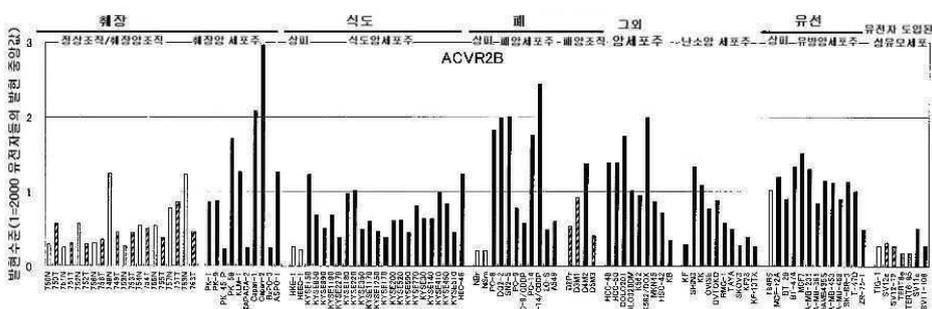
도면5



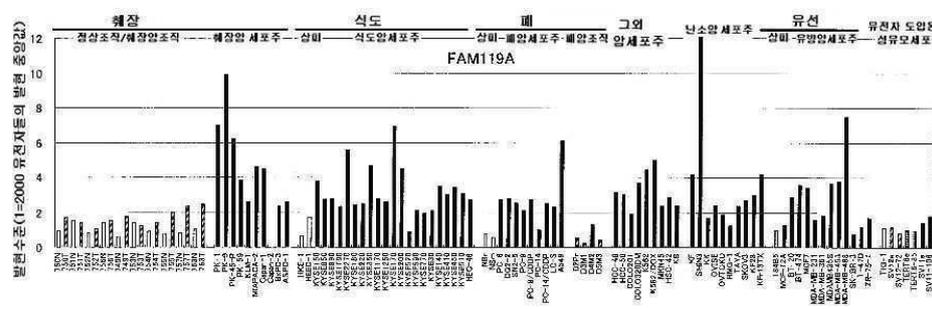
도면6



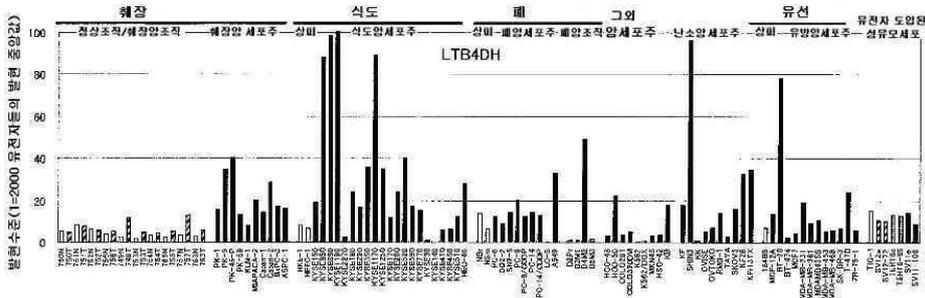
도면7



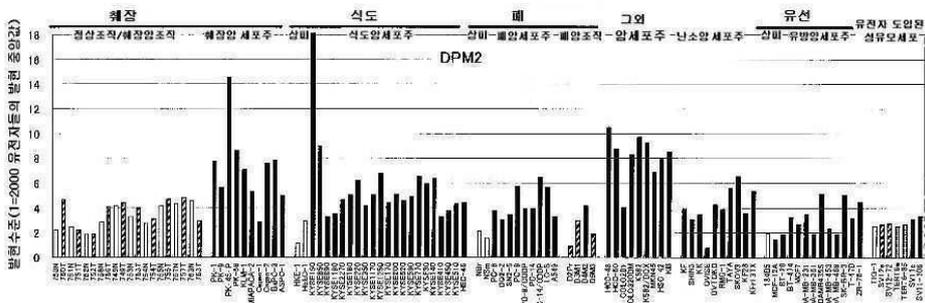
도면8



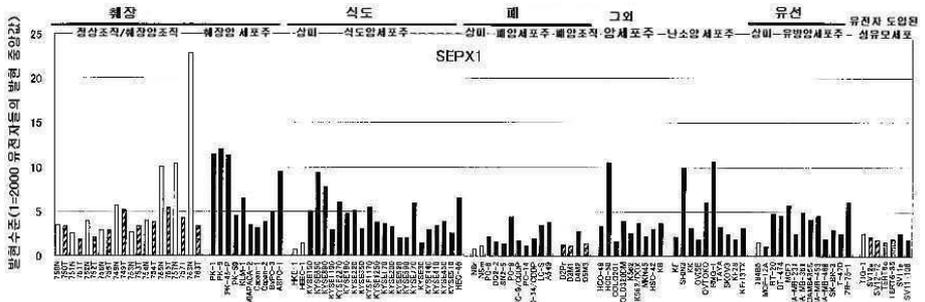
도면9



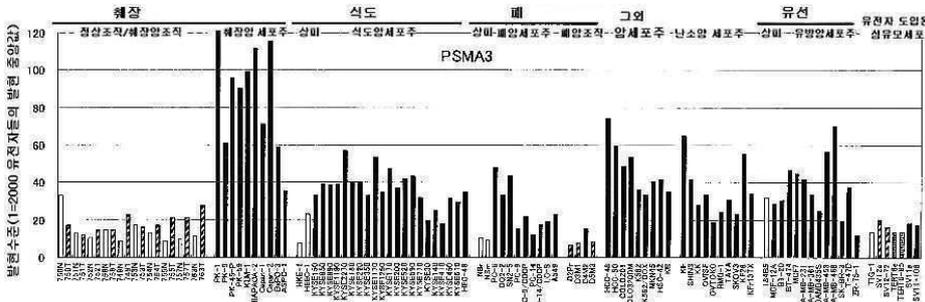
도면10



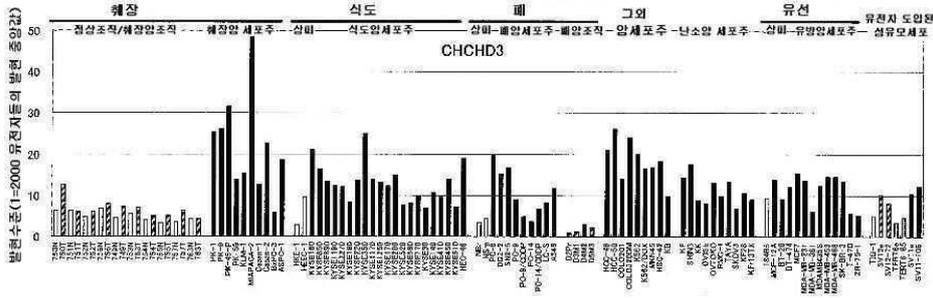
도면11



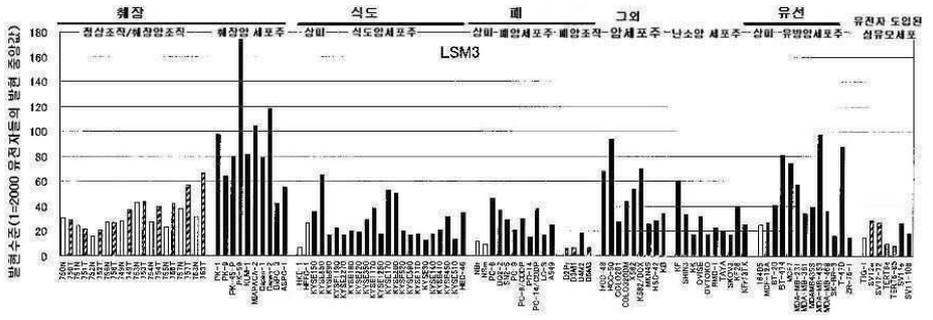
도면12



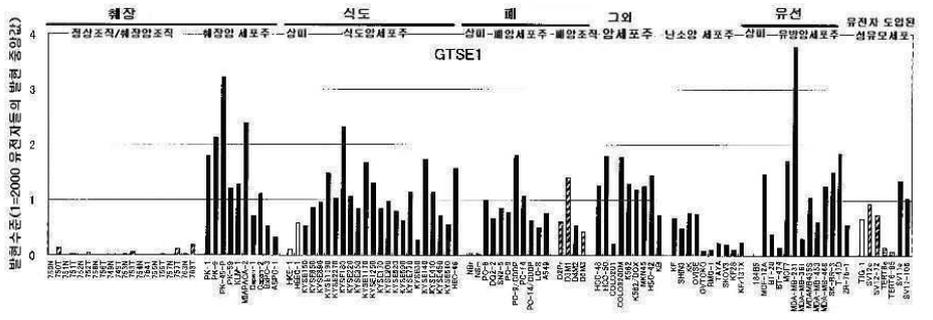
도면13



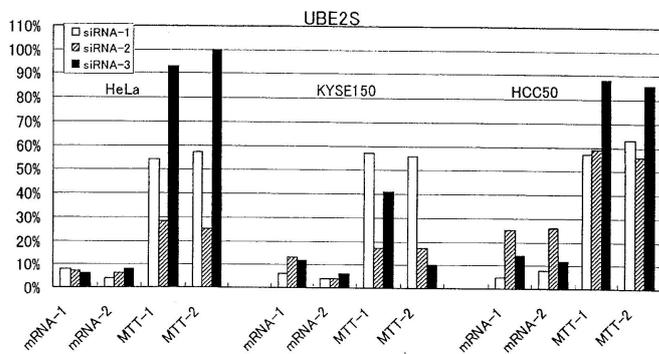
도면14



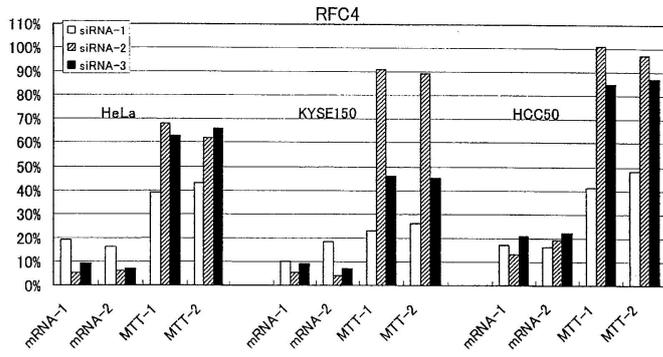
도면15



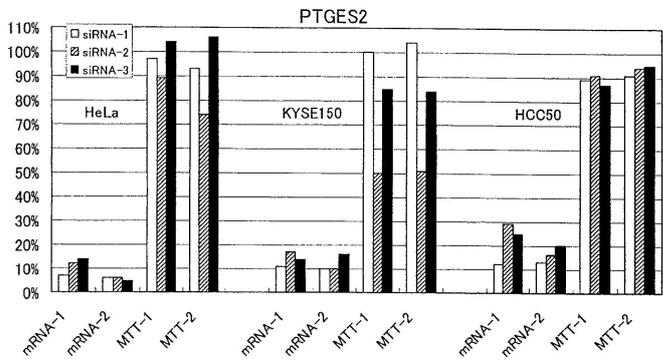
도면16



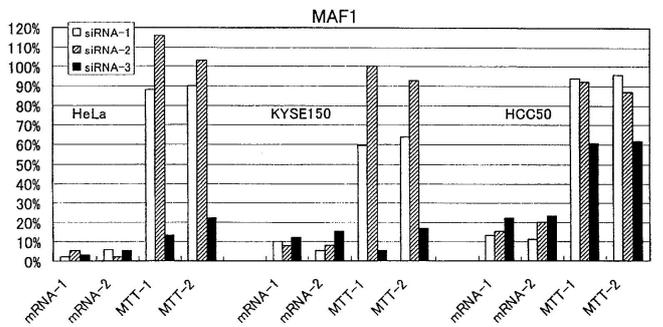
도면17



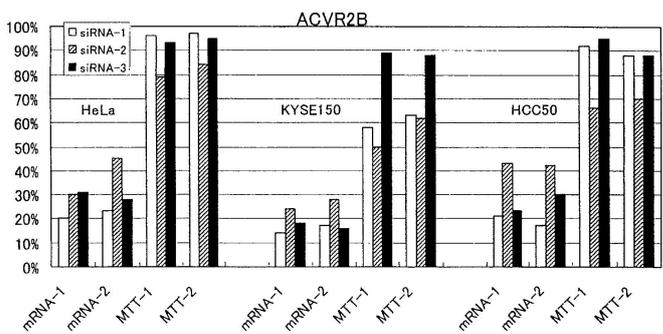
도면18



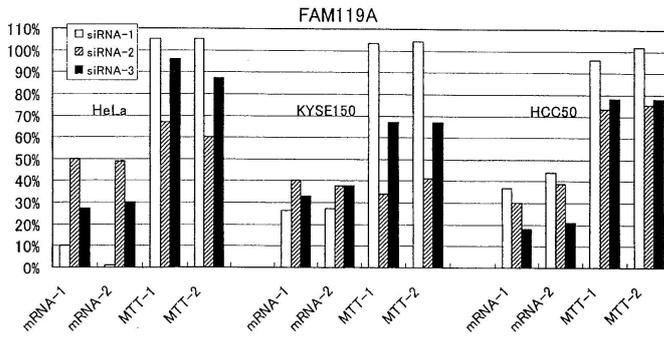
도면19



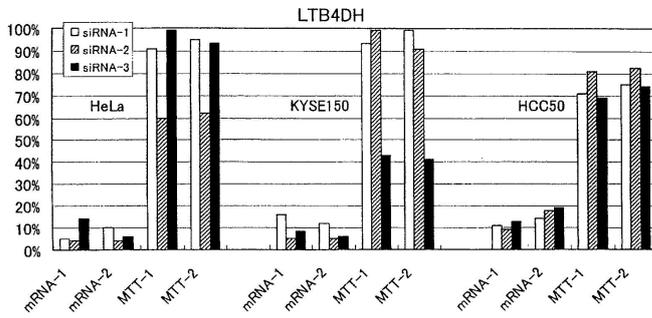
도면20



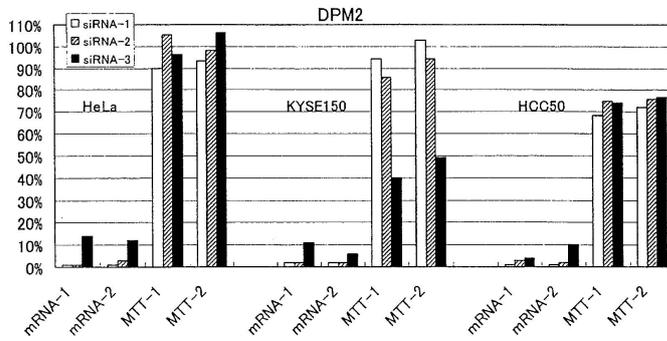
도면21



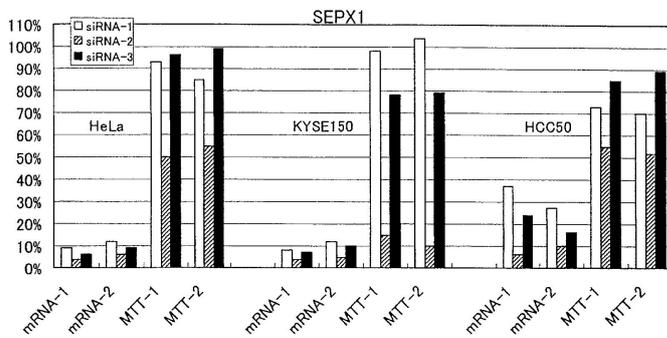
도면22



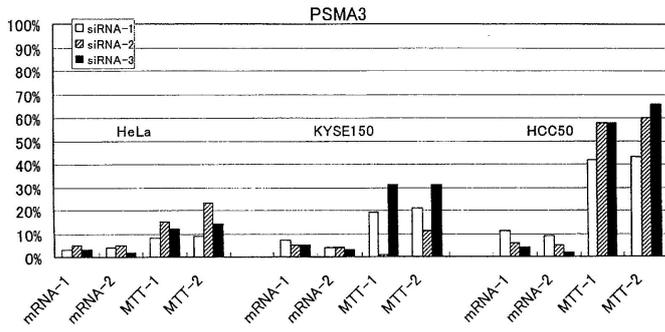
도면23



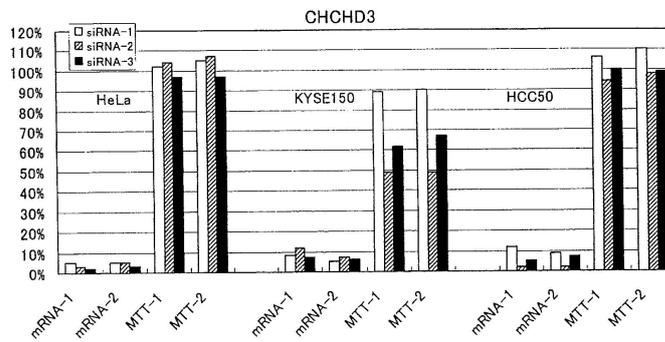
도면24



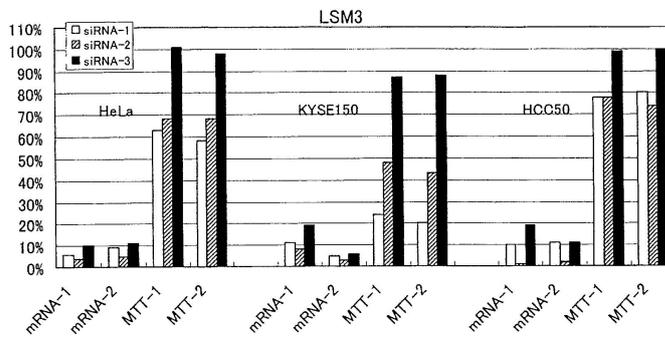
도면25



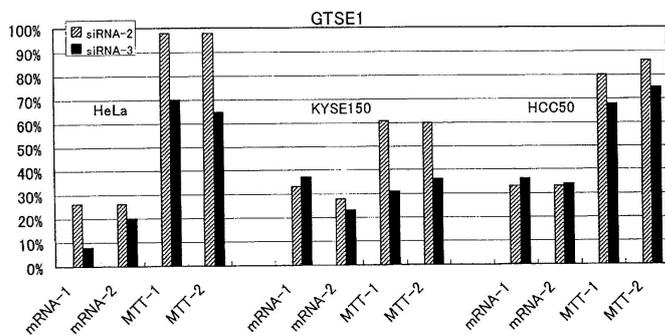
도면26



도면27



도면28



서열목록

<110> KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA
 <120> GENE INVOLVED IN IMMORTALIZATION OF HUMAN CANCER CELL AND USE
 THEREOF
 <130> 10FPI-12-21
 <150> JP 2006-161350
 <151> 2006-06-09
 <160> 76
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 890
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ggcggaccga agaacgcagg aagggggccg gggggaccgg cccccggccg gccgcagcca 60
 tgaactccaa cgtggagaac ctacccccgc acatcatccg cctggtgtac aaggaggtga 120
 cgacactgac cgcagaccca cccgatggca tcaaggtctt tccaacgag gaggacctca 180

ccgacctcca ggtcaccatc gagggccctg aggggacccc atatgctgga ggtctgttcc 240
 gcatgaaact cctgctgggg aaggacttcc ctgcctcccc acccaagggc tacttctctga 300
 ccaagatctt ccaccgaac gtgggcgcca atggcgagat ctgcgtcaac gtgctcaaga 360
 gggactggac ggctgagctg ggcatccgac acgtactgct gaccatcaag tgctctgctga 420
 tccacctaa ccccagctct gcaactcaac aggaggcggg ccgctgctc ttggagaact 480
 acgaggagta tgcggctcgg gccctctgc tcacagagat ccacgggggc gccggcgggc 540
 ccagcggcag ggccgaagcc ggtcgggccc tggccagtgg cactgaagct tcctccaccg 600

acctggggc cccagggggc ccgggagggg ctgagggtcc catggccaag aagcatgctg 660
 gcgagcgcga taagaagctg gcggccaaga aaaagacgga caagaagcgg gcgctgcggg 720
 cgctgcggcg gctgtagtgg gctctcttcc tccttccacc gtgaccccaa cctctctgt 780
 cccctccctc caactctgtc tctaagttat ttaattatg gctggggtcg gggagggtac 840
 agggggcact gggacctgga tttgttttcc taaataaagt tggaaaagca 890

<210> 2
 <211> 1427
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

accggcgat tcccgcctg ctttcgccc gccgttccgt ggcgggaact gagcgactg 60

tggggacatc agtgatecga agtctcctgg gcccgttatt ctacagattag gtgacggagc 120

taagacttcg agaccatctc gtcccttttg taccgaggaa acctgaggaa cgagccggcg 180

gcggtgacct gcacgagaag ccaggctaac tgggtgaagt accatgcaag ctttcttaa 240

aggiacatcc atcagtacta aacccccgct gaccaaggat cgaggagtag ctgccagtgc 300

gggaagtgc ggagagaaca agaaagccaa acccgttccc tgggtggaaa aatatcgccc 360

aaaatgtgtg gatgaagtgt cttccagga agaagtgtt gcagtgtga aaaaatctt 420

agaaggagca gatcttccta atctctgtt ttacggacca cctggaactg gaaaaacatc 480

cactatcttg gcagcagcta gagaactctt tgggcctgaa cttttccgat taagattct 540

tgagttaaat gcatctgatg aacgtggaat acaagtagtt cgagagaaag tgaaaaatt 600

tgctcaatta actgtgtcag gaagtcgctc agatgggaag ccgtgtccgc cttttaagat 660

tgtgattctg gatgaagcag attctatgac ctacagctgt caggcagctt taagacgtac 720

catggagaag gactcgaaaa ccaccgatt ctgtcttacc tgtaactatg tcagtcgaat 780

aattgaacc ctgacctcta gatgttcaaa attccgcttc aagcctctgt cagataaaat 840

tcaacagcag cgattactag acattgcca gaaggaaaat gtcaaaaatta gtgatgaggg 900

aatagcttat cttgttaag tgtcagaagg agacttaaga aaagccatta ctttcttca 960

aagcgtact cgattaacag gtggaaagga gatcacagag aaagtgatta cagacattgc 1020

cgggtaata ccagctgaga aaatgatgg agtatttctt gcctgtcaga tggctcttt 1080

tgacaaacta gaagctgtgg tcaaggattt aatagatgag ggtcatgcag caactcagct 1140

cgtcaatcaa ctccatgatg tggttgtaga aaataactta tctgataaac agaagtctat 1200

tatcacagaa aaacttgccg aagttgaca atgcctagca gatggtgtg atgaacattt 1260

gcaactcacc agcctttgtg caactgtgat gcagcagtta tctcagaatt gttaacgtga 1320

atatatctgg atggggggtt ttgtaataa tgaagttgta ataaaaataa aatgaccaa 1380

agcaccttta aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa 1427

<210> 3

<211> 2120

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggagggcaga gagaaccga acacctggtg ccgggtcggg tcgtttccgg ggctttcagt 60

ggccggaagt cgcggcgct gtactgactc taggaagggc tggagttgtt ttgaatgggc 120

gcccgtgaaga gaggtgggca agtacgtgtt acagacggcc acgccgcctt ttaggcggtc 180
 aaggtggggc gagcagacgt tcgccccct gcagtcggcc gggtcactac ccaagagcct 240

 ttggaggcgg aagcatggaa cggctctgcaa acgttcccga gcgggcctct gcggctctgg 300
 cggcgcttcc gaacttgggc gccgggcaca cgcccagtcg cgagagcgct gagggttccc 360
 ttagcgtcgc cctcaccccg gccaaccgcg ggggcgcccag agtcctggcc ctttaaacgc 420
 cgcgcgtgcc tcggcgtctt cgtttcgcgc gcccgcccgc ggcgccggcg gagcgaacat 480
 ggaccggct gcgcgggtgg tgcgggcgct gtggcctggg gggtgcgct tggcctggag 540
 gctgggaggc cgcgccagc cgctgctacc cacgcagagc cgggctggct tcgcgggggc 600
 ggccggcggc ccgagccccg tggtctgcagc tcgtaagggg agcccgcggc tgctgggagc 660

 tgcggcgtg gccctggggg gagccctggg gctgtaccac acggcgcggt ggcacctgcg 720
 cgcccaggac ctccacgcag agcgcctcagc cgcgcagctc tccctgtcca gccgcctgca 780
 gctgacctg taccagtaca agacgtgtcc cttctgcagc aaggtccgag ccttctcga 840
 cttccatgcc ctgcctacc aggtggtgga ggtgaacct gtgcgcaggg ctgagatcaa 900
 gttctctcc tacagaaagg tgcccatcct ggtggcccag gaaggagaaa gctcgcaaca 960
 actaatgac tcctctgtca tcatcagcgc cctcaagacc tacctggtgt cggggcagcc 1020
 cctggaagag atcatcacct actaccagc catgaaggct gtgaacgagc agggcaagga 1080

 ggtgaccgag ttcggcaata agtactggct catgctcaac gagaaggagg cccagcaagt 1140
 gtatggtggg aaggaggcca ggacggagga gatgaagtgg cggcagtgga cggacgactg 1200
 gctggtgcac ctgatctccc ccaatgtgta ccgcacgccc accgaggtc tggcgtcctt 1260
 tgactacatt gtccgcgagg gcaagttcgg agccgtggag ggtgccgtgg ccaagtacat 1320
 ggggtgcagc gccatgtacc tcatcagcaa gcgactcaag agcaggcacc gcctccagga 1380
 caactgcgc gaggacctct atgaggctgc tgacaagtgg gtggctgctg tgggcaagga 1440
 ccggcccttc atggggggcc agaagccgaa tctcgctgat ttggcgggtg atggcgtgct 1500

 gcgtgtgatg gaggggctgg atgattcga tgacctgatg cagcacacgc acatccagcc 1560
 ctggtacctg cgggtggaga gggccatcac cgaggcctcc ccagcgcact gaatgtccc 1620
 gccagagca gagggaaagg agcggaaagc gccagctgcc agggcctggg gccactgggc 1680
 cagcgcctgg cgatactggt tgggggcagg atcattctgc ccttgtcca cgcaccccca 1740
 ccagccctct cgcttctaac acagggcacc tgctggggct cagggatgtt agggacgagt 1800
 tccagccctg ccaactgcct ggggcgacc ctcctgtcc ctgctcct gctctgccgc 1860

ccctcttctt ggacctcag tggctgtccc atggctacat cctgtgggtg gggccctcgc 1920

acaggacagc aggacggttt gttttcagtg gaatcccatc cctgggttcc cctggttccc 1980

actcttccca agcctcccgg gactgggaca tgtttgcaat aaaggaaagg tttgtggcgc 2040

ctgtcatggc aggcatctca tggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2100

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2120

<210> 4

<211> 1766

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

acccgatggc tattcgagct ctcgatctcg gagactggag cgggccattc agaggcgcgg 60

ggccgggccc ggcggacgct tgttgttgc cggccggggg aggcggaggt cgctcgctcg 120

ctcgctcggc tcgctgactc gccggagcgc tctgtggcgg tcggcggcag gtcggtcgcg 180

agagcgggct ctgtggaagg gggcgaggct atgtcgcggt ggcagcccgg atgggccggc 240

agggccggga gtaacgggac gtcgcccgcg agcttcttcc cccggataca gtgcggcccg 300

agcggaggcc gccggcgcgc cctccgatct tgaagagccc gcgctgcgcg gagcccgcc 360

ccgctgcgc accggcaccg acgcggagcg acccagccca gccagaccg gcccggcgcg 420

gcctgatcta acccagccag gcaggcaata ctagcccctc tggagcacgg agctccttcc 480

ccaaagacat gaagctattg gagaactcga gctttgaagc catcaactca cagctgactg 540

tggagaccgg agatgccac atcattggca ggattgagag ctactcatgt aagatggcag 600

gagacgacaa acacatgttc aagcagttct gccaggaggg ccagccccac gtgctggagg 660

cactttctcc accccagact tcaggactga gccccagcag actcagcaaa agccaaggcg 720

gtgaggagga gggccccctc agtgacaagt gcagccgcaa gacctcttc tacctgattg 780

ccacgtcaa tgagtccttc aggcctgact atgacttcag cacagcccgc agccatgagt 840

tcagccggga gccagcctt agctgggtgg tgaatgcagt caactgcagt ctgttctcag 900

ctgtgcggga ggacttcaag gatctgaaac cacagctgtg gaacgcggtg gacgaggaga 960

tctgcctggc tgaatgtgac atctacagct ataaccaga cttggactca gatcccttcg 1020

gggaggatgg tagcctctgg tccttcaact acttcttcta caacaagcgg ctcaagcgaa 1080

tcgtcttctt tagctgccgt tccatcagtg gctccaccta cacaccctca gaggcaggca 1140

acgagctgga catggagctg ggggaggagg aggtggagga agaaagcaga agcaggggca 1200

gtggggccga ggagaccagc accatggagg aggacagggt cccagtgatc tgtatttgat 1260

gaggaggagc cgaggcccca gcttcatcca gcttcaacca atgcctggac ctgtccacct 1320
gagaggcccc tggggcctcc ccagctgctg gccagaccct ggcgctgcca cagtcttggc 1380

actgccaag gccataacct cctagccett tggtccatc ctgtggatgc ccactcacc 1440
ctcagactcc tgctgcccat gctgtggccg gacttgtcag cagggggcct ggtgggagga 1500
gcgactgccc tgcccaaatt aactgccaca gcaggacag ctggaccgca gagtttattt 1560
ttgtatttct actgggctg cactctcag ccaaagggt ctgtggccgg aggccccacg 1620
agcaggcccc agcagtcacc ggctctgttc ttgggcccgc cccggtgccc acctgtacc 1680
ccactcgc catttggcgc cgtgcaactga gtgtcacttt gctgcagctc gtttctttcc 1740
aataaaagtt tctgtgactt agaaaa 1766

<210> 5

<211> 1584

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gaacatgacg gcgccttggg tggcctcgc cctcctctgg ggatcgtgt ggccccgctc 60
tggcgctggg gagctgaga cacgggagtg catctactac aacccaact gggagctgga 120
gcgcaccaac cagagcggcc tggagcgtg cgaaggcgag caggacaagc ggctgcaactg 180
ctacgcctcc tgggccaaca gctctggcac catcgagctc gtgaagaagg gctgctggct 240
agatgacttc aactgctacg ataggcagga gtgtgtggcc actgaggaga acccccaggt 300
gtactttctg tgctgtgaag gcaacttctg caacgagcgc ttcactcatt tgccagaggc 360

tgggggcccc gaagtcaact acgagccacc cccgacagcc cccaccctgc tcacggtgct 420
ggcctactca ctgctgcccc tggggggcct tccctcacc gtctgctgg ctttttggat 480
gtaccggcat cgcaagcccc cctacggcca tgtggacatc catgaggacc ctgggcctcc 540
accaccatcc cctctggtgg gcctgaagcc actgcagctg ctggagatca aggctcgggg 600
gcgctttggc tgtgtctgga aggcccagct catgaatgac tttgtagctg tcaagatctt 660
cccactccag gacaagcagt cgtggcagag tgaacgggag atcttcagca cacctggcat 720
gaagcacgag aacctgctac agttcattgc tgccgagaag cgaggctcca acctcgaagt 780

agagctgtgg ctcatcacgg ccttccatga caagggtccc ctacaggatt acctcaaggg 840
gaacatcacc acatggaacg aactgtgtca tgtagcagag acgatgtcac gaggcctctc 900
atactgcat gaggatgtgc cctggtgccg tggcgagggc cacaagccgt ctattgcca 960
cagggacttt aaaagtaaga atgtattgct gaagagcgac ctacagccg tgctggtgga 1020

ctttggcttg gctgttcgat ttgagccagg gaaacctcca ggggacaccc acggacaggt 1080
 aggcacgaga cggatcatgg ctctgaggt gctcgaggga gccatcaact tccagagaga 1140
 tgccttctcg cgcattgaca tgtatgcat ggggttgggt ctgtgggagc ttgtgtctcg 1200

ctgcaaggct gcagaccgac ccgtggatga gtacatgctg ccctttgagg aagagattgg 1260
 ccagcacctc tcgttggagg agctgcagga ggtggtgggt cacaagaaga tgaggcccac 1320
 cattaagat cacttggtga aacacccggg cctggcccag ctttgtgtga ccatcgagga 1380
 gtgctgggac catgatgcag aggctcgctt gtccgcgggc tgtgtggagg agcgggtgtc 1440
 cctgattcgg aggtcggtca acggcactac ctccgactgt ctcgtttccc tggtagacac 1500
 tgtaccaat gtggacctgc cccctaaaga gteaagcatc taagcccagg acatgagtgt 1560
 ctctccagac tcagtggatc tga 1584

<210> 6

<211> 1770

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ccacgcgtcc gcacttccag ggtcggggag acggaactgc ggcgaccatg tatttctggt 60
 ttatcaaacc gctaacacc agtctaaggg caggttctgt cccattgtta tcactatcga 120
 agcagccgat ggaggagggg aggtctgagc agagggcggg gtgcaggcgg aatggccctc 180
 gtgccctatg aggagaccac ggaatttggg ttgcagaaat tccacaagcc tcttgcaact 240
 ttttctttg caaacacac gatccagatc cggcaggact ggagacacct gggagtcgca 300
 gcggtggttt gggatgcggc catcgttctt tccacatacc tggagatggg agctgtggag 360

ctcaggggcc gctctgccgt ggagctgggt gctggcacgg ggctggtggg catagtggct 420
 gccctgctgg gtgctcatgt gactatcacg gatcgaag tagcattaga atttcttaa 480
 tcaaacttc aagccaactt acctcctcat atccaaacta aaactgttgt taaggagctg 540
 acttggggac aaaatttggg gagttttct cctggagaat ttgacctgat acttgggtgt 600
 gatatcatat atttagaaga aacattcaca gatcttcttc aaacctgga acatctctgt 660
 agcaatcact ctgtgattct tttagcatgc cgaattcgct atgaacggga taacaacttc 720
 ttagcaatgc tggagaggca atttattgtg agaaaggttc actacgatcc tgaaaaagat 780

gtacatattt acgaagcaca gaagagaac cagaaggagg acttataatt ggctataatt 840
 tataagaatg ttgtcattga gtgtgtcact taaggtctta gactgcaaat ctaaccat 900
 ttaatgaaat gtcttactgt acaaaaagtc taagccaaag gttctcaggg gaaaaagcac 960

atgtgcagtt ttaaacaaca gcagtgcttt gtccattgc tgtgatttt agtcagactt 1020
 tactcagctc gaaatgcaat taacattaaa ggattaagtg tgagatttcg atttatgcta 1080
 tttgtgtatc ccatactcct ccttttaaat aaacagtttc cactgatgat atgaagggcc 1140
 ggtataaaga agtctttaa tgagtaagct ttcttggtaa gattaaatct tacaattat 1200

 ttttaaaacc ttgigatata tacaatgttt agctgagttt tctaattttc tggatgtaaa 1260
 acaaaagggt taacctatac attccttgag ctgtagtgc tatttaaate ttttgcctg 1320
 tttaggtcct aaacactttt agttgagtag gatagagct ttttgggtc tcatatcatg 1380
 ctttttgct taatttcagg tatatatata tataagtaaa ggaattaagt aaaaaataaa 1440
 tttcagttac ttttaaaag cacctgaaat ctggccgat gcggtggctc atgcctgtaa 1500
 tcccaccact ttgggaggcc gaggcggca gatcacctga ggtcgggagt tcaagaccag 1560
 cctggccaac atggtgaac cccatctcta ctaaaaatac aaaaattagc cgggcgtgt 1620

 gtcgggcgcc ttagtcca gctgctcggg aggctgaggc aggggaatcg cttgaacctg 1680
 ggaggcgag gttcagtg gctgagattg cgccattgta ctccagcctg ggggacagga 1740
 gcgagactcc atctcaaaaa aaaaaaaaaa 1770

 <210> 7
 <211> 1257
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

 gtcccagc ctcgccccc cgcagttcct tggagagctt ggagccgc gccggaggga 60
 ataggaaagc ttggttaca cccgggacac ccggagcttc aggatggtc gtactaagac 120
 atggaccctg aagaagcact ttgtggcta tcctactaat agtgactttg agttgaagac 180

 atctgagctc ccaccctta aaaaatggaga ggtcctgctt gaagctttgt tcctcacctg 240
 ggatccctac atgagagtgg cagccaaaag attgaaggaa ggtgatacaa tgatgggca 300
 gcaagtggcc aaagtgtgg aaagtaaaaa ttagcccta ccaaaaggaa ctattgtact 360
 ggcttctcca ggctggacaa cgcactccat ttctgatggg aaagatctgg aaaagctgct 420
 gacagagtgg ccagacacaa taccactgct tttggctctg gggacagtgg gcatgccagg 480
 cctgactgcc tactttggcc tacttgaat ctgtggtgtg aagggtggag aaacagtgat 540
 ggttaatgca gcagctggag ctgtgggctc agtcgtgggg cagattgcaa agctcaaggg 600

 ctgcaaagtt gttggagcag taggtctga tgaagggtt gcctacctc aaaagcttgg 660
 atttgatgct gctttaaact acaagacggt agagtctttg gaagaaacct tgaagaaagc 720

gtctcctgat ggttatgatt gttattttga taatgtaggt ggagagtttt caaacactgt 780
 tatcggccag atgaagaat ttggaaggat tgccatatgt ggagccatct ctacatataa 840
 cagaaccggc ccacttcccc caggccccacc cccagagatt gttatctatc aggagcttcg 900
 catggaagct tttgtcgtct accgctggca aggagatgcc cgccaaaaag ctctgaagga 960
 cttgctgaaa tgggtcttag agggtaaaat ccagtacaag gaatatatca ttgaaggatt 1020

tgaaacatg ccagccgcat ttatgggaat gctgaaagga gataatttgg ggaagacaat 1080
 agtгааagca tgaaaaagag gacacatgga atctggaggc catttagatg attagttaat 1140
 ttgtttttca ccatttagca aaaatgtata ctaccttaa tgtcttaaga aatagtactc 1200
 ataatgagtt tgagctactt aataaaat ac atttaagtgg taaaaaaaa aaaaaa 1257

<210> 8

<211> 910

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gtggcttgcg gctcgggtgg ctgagcgcgc ggggaaatgg ccacggggac agaccagtg 60
 gtgggactcg gcctcgtcgc cgttagcctg atcatcttca cctactacac cgcctgggtg 120

attctcttgc cattcatcga cagtcagcat gtcacccaca agtatttctt gccccgagcc 180
 tatgctgtcg ccatcccact ggctgcaggc ctctctgtgc tctgtttgt gggactgttc 240
 atctcctatg tgatgctgaa gaccaagaga gtgaccaaga aggctcagtg aaggtcccgc 300
 agggatgagg ctgccagecc cttctctgct tcccctccag cacagggacc aagtggggga 360
 gcctgcagaa cctgtccagg cacagtggct cctcaagcct gcctgtcctg cagagtcccc 420
 atggcatgga gcttacacct gactgactgg agccccctcc ccgactccca cttccagaag 480
 ctaggaggga gggatacctg gaagactccg gtcacctcct tcttgctcag ggcctaaaag 540

atgctggtcc tcccaacctc actctcagac tcctgcccac cttttcccct gggttctgcc 600
 gtcttgctc acttcccctc ctgtcacatg ctgacgttgg acttagcagg ttctaaggcc 660
 acatgtgtga cctctctgac ttctcttctt ccaccaagge agctttcctt accctgacac 720
 agccccagac cccacaaagc cttctggacc tggaaagcct ggggaaggac tgacagacce 780
 caggaccagc cctggggctc agggcagcca ccccgggccc ctgaccgact gacctctctt 840
 cacggaggcc cagccccaaa gccccagggc tggcccgttt gggacagctg accaataaac 900
 actgatggtg 910

<210> 9

<211> 1386
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

ggaagccggg attcgcctc cggggagcga ttggtcctcg ggagggcg ggaggtggac 60
 gcgggtaccg gcggtcgtcg ggtcggcagc ctttggcag ttggcagcgg caagcgcgct 120
 gcggttccgg tggcgccatg tcgttctgca gcttcttcgg gggcgaggtt ttccagaatc 180
 actttgaacc tggcgtttac gtgtgtgcca agtgtggcta tgagctgttc tccagccgct 240
 cgaagtatgc aactcgtct ccatggccgg cgttcaccga gaccattcac gccgacagcg 300
 tggccaagcg tccggagcac aatagatctg aagccttgaa ggtgtcctgt ggcaagtgtg 360

gcaatgggtt gggccacgag ttcctgaacg acggccca gccggggcag tcccgattct 420
 gaatattcag cagctcgtcg aagttgtcc ctaaaggcaa agaaacttct gcctcccagg 480
 gtactagcg gggcagccca caccacccc agacggccac cacactgagg ccacacgttg 540
 gccattccac cttggagtgt gaaccctggg cgtcgagaca ggaaggcagg gcgcagtgtt 600
 tgaaacatca ggacactccc aagccccgg cctgaacaa gaccttttcg tttcttgaa 660
 aagagactca tttgctgatg gttcatgctt tctgctggga caggcctggg ctgtgcagcc 720
 aactgtcgg ctgacttagc cccctgctca ctctaggtgc ctccaggagg tgagccctgg 780

gtgcagctgg tctctgaatg acgttacacc ctaccttct tttctggcc ctgtctctgg 840
 actctccct gtgaggccca attccaagac agactctcgt cctcaccgaa gcttaggccc 900
 acatctccca ggctgcttag gagacagaat ggaaacggag gcccccctg ccagccgccc 960
 tggccctgg cactgcatga tccgctctgg tcaaaccctt ccaggccagc cagagtgggg 1020
 atggtctgtg acctgctggg aaggcaggct gatggggcac acccttgcc tctcgtccac 1080
 gaggggagaa acctaaacc tgtttcaca tctgtgcgga agtagcttgc ctacttctg 1140
 cttaggaaag cggctgttgc tccataactc taaccagcac agggctgagg cctgcagtgc 1200

acacctgcag ggaggccctt cccaaggtgt ggtgactgtg ccttactgta catgctcgga 1260
 ggcttgcca tataggaggg tgggtgatgc tgaatcacc ccccatctta agtaattact 1320
 tctggagta atcaggtgga aatccataga caaatgaaac attcagaaaa aaaaaaaaaa 1380
 aaaaaa 1386

<210> 10
 <211> 949
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10

gcgctccggg cctggaatcc ctacgcgtcc ctttgggttt agcacgatga gctcaatcgg 60
 cactgggtat gacctgtcag cctctacatt ctctcctgac ggaagagttt ttcaagtga 120

 atatgctatg aaggctgtgg aaaatagtag tacagctatt ggaatcagat gcaaagatgg 180
 tgttgtcttt ggggtagaaa aattagtctt ttctaaactt tatgaagaag gttccaacaa 240
 aagacttttt aatgttgatc ggcatgttgg aatggcagta gcaggtttgt tggcagatgc 300
 tcgttcttta gcagacatag caagagaaga agcttccaac ttcagatcta actttggcta 360
 caacattcca ctaaaacatc ttgcagacag agtggccatg tatgtgcatg catatacact 420
 ctacagtgct gttagacctt ttggctgcag tttcatgtta gggctttaca gtgtgaatga 480
 cggtgcgcaa ctctacatga ttgacccatc aggtgtttca tacggttatt ggggctgtgc 540

 catcggcaaa gccaggcaag ctgcaaagac ggaaatagag aagcttcaga tgaagaagaat 600
 gacctgccgt gatatcgta aagaagttgc aaaaataatt tacatagtac atgacgaagt 660
 taaggataaa gcttttgaac tagaactcag ctgggttggg gaattaacta atggaagaca 720
 tgaattgtt ccaaaagata taagagaaga agcagagaaa tatgctaagg aatctctgaa 780
 ggaagaagat gaatcagatg atgataatat gtaacattta ctccagcatc tattgtatit 840
 taaatttcta ctccagtcca atgtaactat ttagccctgg attatacata ctgtccaatt 900
 ttcattaat ttttgtctta taactataaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 949

<210> 11

<211> 1623

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gctggtttct gggggtcgtg gccttgctcc cgctgtgcgg gaaaagaatc caggcccttc 60
 cacgcgcgtg tgggtgcggg ggccccgaag tgctcgtggt tccccgctag gtctccgctg 120
 gggcaggaac cggaatcatg ggtgggacca ccagcaccgc cggggtcacc ttcgaggcgg 180
 acgagaatga gaacatcacc gtggtgaagg gcatccgctt ttcggaaaat gtgattgac 240
 gaatgaagga atcctctcca tctggttcga agtctcagcg gtattctggt gcttatggtg 300
 cctcagtttc tgatgaagaa ttgaaaagaa gagtagctga ggagctggca ttggagcaag 360

 ccaagaaaga atccgaagat cagaaacgac taaagcaagc caaagagctg gaccgagaga 420
 gggctgctgc caatgagcag ttaaccagag ccatccttcg ggagaggata tgtagcgagg 480
 aggaacgcgc taaggcaag cacctggcta ggcagctgga agagaaaagac cgagtgctaa 540

agaagcagga tgcattctac aaagaacagc tggctagact ggaggagagg agctcagagt 600
 tctacagagt caccactgaa caatatcaga aagctgctga agaggaggaa gcaaagtca 660
 agcgatatga gtctcatcca gtctgtctg atctgcaggc caaaattctt cagtgttacc 720
 gtgagaacac ccaccagacc ctcaaatgct ccgctctggc caccagat atgcactgtg 780

 tcaatcatgc caaacagagc atgcttgaga agggaggata aaaactttca gaatgagcaa 840
 aacacatca acgtaattc cagagatgga acattttttt tcctagttag aaaacaacc 900
 atttgaagag aagaccacta atgagaagac cactaaagag agacatcaag aatggattca 960
 gcagaatcat ttcacgtttt gaacagcagc agtttgaagg gccaaagcct tgatcaggga 1020
 tcagtatta aaggacactc ttgagtatta gtaaacctc ttatgatgat taaaagagaa 1080
 gggcagcct ctccacctt tggactttc tattcaactt gcactgacca taaaatgtt 1140
 ctcttctgaa caagcccat catttggta acctccacc taacaaagta ggatggggtt 1200

 gggggctaaa ttaattggag tggggcgagg agagagccag aaaacataga tccgagggca 1260
 gcagtgtggt gggagagag ccagaaaaca gatctggagg cagcagtgtt ggatggaatt 1320
 gtctaggctg tggcatgtt gttttgtctt tcttttctcc ttgattatg taagagctat 1380
 ttcatataa cttattatgg tgattatata ggcaagaaga caaaaaggag agaaaatgta 1440
 cctcttctac tggataatg tttatgatta caagtgagat aaggtatgtt tatcaatag 1500
 aaggcaacct tggctgataa aacctctata gtgaatactc acatctttac ttcactcact 1560
 atcaataata aatatatgtt ctgacaaaaga ctggcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620

 aaa 1623
 <210> 12
 <211> 579
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

 acgaggggaa agggcgagg gtttgaaca tggcgagcga cgtagaccag caacaaacta 60
 ccaacactgt agaggagccc ctggatctta tcaggctcag cctagatgag cgaatttatg 120
 tgaaaatgag aatgaccga gagcttcgag gcagattaca tgcttatgat caacatttaa 180
 atatgatctt gggagatgtg gaagaaactg tgactactat agaaattgat gaagaaacat 240
 atgaagagat atataaatca acgaaacgga atattccaat gctctttgtc cggggagatg 300

 gcgttgtcct ggttggccct ccaactgagag ttggctgaaa caaagaattt gtcctgtatg 360
 gaaaacggga gactttgtac agtggcctct ctaaaagtac aaaacattca taagagaac 420

ctgcatacat ttgatatta agaaataatt ccggggattc ttccactcct gaaatgagtt 480
gatttgcaga taactcacia cttcttaagc taaatggtat tttcattttt ctcaagctct 540
ccaataaata tgaccaccaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 579

<210> 13
<211> 4493
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 13

atcgtctgcc gctttggiga cttctgacag ctctctccat ggaaggaggc ggcggccgcg 60

atgagccttc agcctgccgg gcaggggacg tgaacatgga tgaccctaag aaggaagaca 120
ttcttctttt ggccgatgaa aaatttgact tcgatctttc attgtcttct tcgagtgcaa 180
atgaagatga tgaagtcttc ttcggaccct ttggacataa agaaagatgt attgctgcca 240
gcttgaatt aaataatcgg gttcccgaac agcctccgtt gcccacatct gagagtcct 300
ttgcctggag ccctctggcc ggggagaagt tcgtggaggt gtacaaagaa gctcacttac 360
tggttttaca cattgagagc agcagccgga accaggcagc ccaagctgcc aagcctgaag 420
accctcggag ccagggcgtg gaaagattca tacaggagtc aaaattaaaa ataacctct 480

ttgagaaaga aaaggaaatg aagaaaagcc ccacgtctct taaaaggag acatactacc 540
tgtcacagag ccccttgctg gggccccctg tgggtgagcc tcggtcttg gcctctccc 600
cgccctgcc cagctctggt gcccaggccc gcctcaccg ggcgccgggg cctccgact 660
ctgctcatgc tttgccagg gaatcatgca ctgctcatgc tgcaagttag gcagcgactc 720
agaggaagcc cgggacaaaa ttgctgctgc ctgagcggc ctctgttaga ggaagaagca 780
tccctggggc tgcggagaag cccaagaaag agattccagc tagtccttcc aggacaaaaa 840
tcccagctga gaaggaatcc caccgggatg ttctccctga caaacctgcc ccgggtgctg 900

tcaatgtgcc ggccgccgga agccacttgg gccagggcaa gcgggcatc cctgttccaa 960
acaagttggg gctgaagaag accctgttaa aagcaccggt ctctaccagc aatctgcaa 1020
ggaagtcttc ctccgggctt gtttggagcg gggcatccag tgctgacaca tccccagcag 1080
tgggcaaagc taaatcaagt gaatttcaa gtattcctgc aaatagctcc cggectctgt 1140
caaacatcag caagttaggc agaatgggac ccgcatgct gcggccagct ctgctgacag 1200
gccctgtggg ggcatcctcc tggcaggcca agcgggtcga tgtttctgag ctggcagcgg 1260
agcagctcac ggcaccccc tcagatccc ccaccaacc ccagactccg gaagtgccg 1320

gccagtggct gaactccagt tgccttggc cagaatcttc tcaattgaat aagactagaa 1380

gtatcagacg gcgagattcc tgtctaaatt ccaagacaaa ggttatgcct actcctacaa 1440
 atcaatttaa aattcctaag ttttctattg gtgactcccc ggacagctca acaccaaagc 1500
 tttcgcgggc acagcggccg cagtcgtgca cgtcagttgg cagggtcact gtcacagca 1560
 ccccgttag acgctcatct gggccagcac cacaaagcct gctgagcgca cggcgtgtgt 1620
 cagccttgcc cacacccgcc agccggcgct gctctggcct tccaccgatg acccccacaa 1680
 cgatgccag ggccgtgggc tctccctgt gtgtgccagc tcggagacgt tcctctgagc 1740

 cccgcaagaa ctctgcaatg agaactgaac caacaaggga gagcaacaga aagacagatt 1800
 ccaggctggt ggatgtgtcc cctgacaggg gtctctctcc tccccgtgtg cctcaggcac 1860
 ttaacttttc tccagaggaa agcgattcta ctttctccaa aagtactgcc acagaagtag 1920
 ctggggagga agccaagccg ggtggagatg cageccctag tgaggctctt cttgtagata 1980
 tcaactgga accactcgcg gtcactccag atgctgcaag ccagcccctc attgaccttc 2040
 ctctcatcga cttctcgat accccagaag cacacgtggc tgtaggatct gaaagcaggc 2100
 ctctgatcga cctcatgaca aacctccag acatgaataa aaatgtggcc aaaccttcac 2160

 cgggtggtggg acagctcata gacctgagct cccctctgat ccagctgagc cctgaggctg 2220
 acaaggagaa cgtggattcc ccactcctca agttctaagc cgaaccaaat cctttgcctt 2280
 gaaagaacag ccctaagtg gttttcaacc ctcaaaaaca agctttaggc tggcgcagt 2340
 ggcttacct tgtaacccta gaacttggga ggctgaggtg ggccgattac ttgagcccag 2400
 gagttcggga ccagcctggg aaatatagtg aaactcctgt ccctacaaaa aatacaaaaa 2460
 ttagccgggt gtggtagtgc atgcctgtag tcccagctac ttgggaggct gaagtgggag 2520
 gatggcctga gctcaaggag atgcaggctg cagtgggctg tgattgtgcc actgcactcc 2580

 agcctgggca ccaatgtgag aacctgtctt ggaaaaaaaa aaaaagaac atgttttagt 2640
 agaagtttta tttgaaaag aaaaataagc ataaatatat tcccagtct ggagagggtg 2700
 ggctgagga ctggggccag cacggaccac ccaaggcctc tgcttcccgc cgccaccctc 2760
 ctgcctgcca ttctctgggc tggaatgtga agcctcagtc actctaaatg aagaattttc 2820
 ttttgaatgt tttgtatgta aaatagcaag tggctatttt taaagttaag tttgtataaa 2880
 tagttagata ttctagatit acattaaatt gtaaaataaa tggacttatt gaagcatatc 2940
 ttgattttta agcttatctt gattttcaaa catgcatagc tatttttatac actetaatca 3000

 gtaaggctac tatctagact cgaatgcttt catacaagtg attttcaaaa attagtcaat 3060
 aaaaattgat gtcagtgcag gcccaggccc gccccagat aactagttt ctaggtctgg 3120
 ggccagccta gtaattgtta ctaggcacac aggtgatgct gactcgatgg cctgagacac 3180
 accccttag aagaagctgc tctggggaga cgagggtatg agtggaaaga ggatggcgca 3240

ggaggccggg cttacctgga cactaagggtg atggacggcg tctgctgggc aggcctcggg 3300
gaggaccct cagctttgct ctcagcaggg gcccgacaag ctcagtgggc agtggcagga 3360
actgagtgcc actggaaagc ccattccctt tatttagaaa acgagctcca ggaagccgct 3420

actttgtgtc catttctctt gaggaaactt accaccttgg ttgagcggct tcatggcaga 3480
cagcagcgag ccagcggccg gactctgtat ttcggacccc actccagtgc tccctgggtc 3540
ataccaggat ctgctctgt ccacaaagat gagggaaaat gatgactgtg ctgtgctctc 3600
tacttctgc ggttactgcg tgattctaaa gctgccactc ggaacagcga gtcctctgcc 3660
gtcgagagca gggaggggta gggaggacag gcgatgccgt ggaagacgt ctcggtggaa 3720
actgcatgg tggaaagggtg gcgcgcttct cacggctgag ttgctgcgcc tgcagacgga 3780
agcicccac aggcagagct gcttggatgt gtgagtcag aagccagaga agccccgctc 3840

catgagcagt gactccccag gccctgtgac ctccctctg tcttgagct cctcctggca 3900
ccagtccca gggctctct gttggtagtt cctgctttc ttcttgaaa ttcctctggt 3960
acctcgagat cttacccta aaatagtct gttgaattc acctggcaa tgtaattga 4020
tagcttatct tcacagatgc cagacaatgg acaactcacc atcagtcctc tgctcacctg 4080
agacaaatgc atgtctgatt gcttcctctg ccctattgtt tatgtgaaaa tgcagattca 4140
ctgagccaga ctaaggcatc agtgactgtt cctctacctg cctctacat ggagattgtg 4200
tattcagtga aaggctgac aaagaccaa aggaatgcaa cagtttatct cttatctacc 4260

tatgacctgc gagctgcca ccacccccag ttgtgccc tttccagaca gaaccagtgt 4320
acatcttaca cgtattaatt gatgtcctgt gtctccctaa tatgtatcaa agcaagctgt 4380
gcctcgacca ccttgggcac atatcctcag gacatcatcc tgaggctgtg tcaactggcat 4440
gtccttaacc ttggcaaat aaactttcta aattgaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 4493

<210> 14

<211> 225

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Asn Ser Asn Val Glu Asn Leu Pro Pro His Ile Ile Arg Leu Val

1 5 10 15

Tyr Lys Glu Val Thr Thr Leu Thr Ala Asp Pro Pro Asp Gly Ile Lys

20 25 30

Val Phe Pro Asn Glu Glu Asp Leu Thr Asp Leu Gln Val Thr Ile Glu

Thr Lys Asp Arg Gly Val Ala Ala Ser Ala Gly Ser Ser Gly Glu Asn
 20 25 30
 Lys Lys Ala Lys Pro Val Pro Trp Val Glu Lys Tyr Arg Pro Lys Cys
 35 40 45
 Val Asp Glu Val Ala Phe Gln Glu Glu Val Val Ala Val Leu Lys Lys
 50 55 60

 Ser Leu Glu Gly Ala Asp Leu Pro Asn Leu Leu Phe Tyr Gly Pro Pro
 65 70 75 80
 Gly Thr Gly Lys Thr Ser Thr Ile Leu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Phe
 85 90 95
 Gly Pro Glu Leu Phe Arg Leu Arg Val Leu Glu Leu Asn Ala Ser Asp
 100 105 110
 Glu Arg Gly Ile Gln Val Val Arg Glu Lys Val Lys Asn Phe Ala Gln
 115 120 125
 Leu Thr Val Ser Gly Ser Arg Ser Asp Gly Lys Pro Cys Pro Pro Phe

 130 135 140
 Lys Ile Val Ile Leu Asp Glu Ala Asp Ser Met Thr Ser Ala Ala Gln
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Arg Arg Thr Met Glu Lys Glu Ser Lys Thr Thr Arg Phe
 165 170 175
 Cys Leu Ile Cys Asn Tyr Val Ser Arg Ile Ile Glu Pro Leu Thr Ser
 180 185 190
 Arg Cys Ser Lys Phe Arg Phe Lys Pro Leu Ser Asp Lys Ile Gln Gln
 195 200 205

 Gln Arg Leu Leu Asp Ile Ala Lys Lys Glu Asn Val Lys Ile Ser Asp
 210 215 220
 Glu Gly Ile Ala Tyr Leu Val Lys Val Ser Glu Gly Asp Leu Arg Lys
 225 230 235 240
 Ala Ile Thr Phe Leu Gln Ser Ala Thr Arg Leu Thr Gly Gly Lys Glu
 245 250 255
 Ile Thr Glu Lys Val Ile Thr Asp Ile Ala Gly Val Ile Pro Ala Glu
 260 265 270

Lys Ile Asp Gly Val Phe Ala Ala Cys Gln Ser Gly Ser Phe Asp Lys

275 280 285

Leu Glu Ala Val Val Lys Asp Leu Ile Asp Glu Gly His Ala Ala Thr

290 295 300

Gln Leu Val Asn Gln Leu His Asp Val Val Val Glu Asn Asn Leu Ser

305 310 315 320

Asp Lys Gln Lys Ser Ile Ile Thr Glu Lys Leu Ala Glu Val Asp Lys

325 330 335

Cys Leu Ala Asp Gly Ala Asp Glu His Leu Gln Leu Ile Ser Leu Cys

340 345 350

Ala Thr Val Met Gln Gln Leu Ser Gln Asn Cys

355 360

<210> 16

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Asp Pro Ala Ala Arg Val Val Arg Ala Leu Trp Pro Gly Gly Cys

1 5 10 15

Ala Leu Ala Trp Arg Leu Gly Gly Arg Pro Gln Pro Leu Leu Pro Thr

20 25 30

Gln Ser Arg Ala Gly Phe Ala Gly Ala Ala Gly Gly Pro Ser Pro Val

35 40 45

Ala Ala Ala Arg Lys Gly Ser Pro Arg Leu Leu Gly Ala Ala Ala Leu

50 55 60

Ala Leu Gly Gly Ala Leu Gly Leu Tyr His Thr Ala Arg Trp His Leu

65 70 75 80

Arg Ala Gln Asp Leu His Ala Glu Arg Ser Ala Ala Gln Leu Ser Leu

85 90 95

Ser Ser Arg Leu Gln Leu Thr Leu Tyr Gln Tyr Lys Thr Cys Pro Phe

100 105 110

Cys Ser Lys Val Arg Ala Phe Leu Asp Phe His Ala Leu Pro Tyr Gln

115 120 125
 Val Val Glu Val Asn Pro Val Arg Arg Ala Glu Ile Lys Phe Ser Ser
 130 135 140
 Tyr Arg Lys Val Pro Ile Leu Val Ala Gln Glu Gly Glu Ser Ser Gln
 145 150 155 160
 Gln Leu Asn Asp Ser Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Lys Thr Tyr Leu
 165 170 175
 Val Ser Gly Gln Pro Leu Glu Glu Ile Ile Thr Tyr Tyr Pro Ala Met
 180 185 190

Lys Ala Val Asn Glu Gln Gly Lys Glu Val Thr Glu Phe Gly Asn Lys
 195 200 205
 Tyr Trp Leu Met Leu Asn Glu Lys Glu Ala Gln Gln Val Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Lys Glu Ala Arg Thr Glu Glu Met Lys Trp Arg Gln Trp Ala Asp Asp
 225 230 235 240
 Trp Leu Val His Leu Ile Ser Pro Asn Val Tyr Arg Thr Pro Thr Glu
 245 250 255
 Ala Leu Ala Ser Phe Asp Tyr Ile Val Arg Glu Gly Lys Phe Gly Ala

260 265 270
 Val Glu Gly Ala Val Ala Lys Tyr Met Gly Ala Ala Ala Met Tyr Leu
 275 280 285
 Ile Ser Lys Arg Leu Lys Ser Arg His Arg Leu Gln Asp Asn Val Arg
 290 295 300
 Glu Asp Leu Tyr Glu Ala Ala Asp Lys Trp Val Ala Ala Val Gly Lys
 305 310 315 320
 Asp Arg Pro Phe Met Gly Gly Gln Lys Pro Asn Leu Ala Asp Leu Ala
 325 330 335

Val Tyr Gly Val Leu Arg Val Met Glu Gly Leu Asp Ala Phe Asp Asp
 340 345 350
 Leu Met Gln His Thr His Ile Gln Pro Trp Tyr Leu Arg Val Glu Arg

Lys Arg Leu Lys Arg Ile Val Phe Phe Ser Cys Arg Ser Ile Ser Gly
 195 200 205
 Ser Thr Tyr Thr Pro Ser Glu Ala Gly Asn Glu Leu Asp Met Glu Leu
 210 215 220
 Gly Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Ser Arg Ser Arg Gly Ser Gly Ala
 225 230 235 240
 Glu Glu Thr Ser Thr Met Glu Glu Asp Arg Val Pro Val Ile Cys Ile
 245 250 255
 <210> 18
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr

145 150 155 160
 Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
 165 170 175

 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190
 Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205
 Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 210 215 220
 Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240
 His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn

 245 250 255
 Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270
 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285
 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300
 Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320

 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys

 385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
 405 410 415

Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430

His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445

Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

<210> 19

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Ala Leu Val Pro Tyr Glu Glu Thr Thr Glu Phe Gly Leu Gln Lys

1 5 10 15

Phe His Lys Pro Leu Ala Thr Phe Ser Phe Ala Asn His Thr Ile Gln
 20 25 30

Ile Arg Gln Asp Trp Arg His Leu Gly Val Ala Ala Val Val Trp Asp
 35 40 45

Ala Ala Ile Val Leu Ser Thr Tyr Leu Glu Met Gly Ala Val Glu Leu
 50 55 60

Arg Gly Arg Ser Ala Val Glu Leu Gly Ala Gly Thr Gly Leu Val Gly
 65 70 75 80

Ile Val Ala Ala Leu Leu Gly Ala His Val Thr Ile Thr Asp Arg Lys
 85 90 95

Val Ala Leu Glu Phe Leu Lys Ser Asn Val Gln Ala Asn Leu Pro Pro

100 105 110
 His Ile Gln Thr Lys Thr Val Val Lys Glu Leu Thr Trp Gly Gln Asn
 115 120 125
 Leu Gly Ser Phe Ser Pro Gly Glu Phe Asp Leu Ile Leu Gly Ala Asp
 130 135 140
 Ile Ile Tyr Leu Glu Glu Thr Phe Thr Asp Leu Leu Gln Thr Leu Glu

 145 150 155 160
 His Leu Cys Ser Asn His Ser Val Ile Leu Leu Ala Cys Arg Ile Arg
 165 170 175
 Tyr Glu Arg Asp Asn Asn Phe Leu Ala Met Leu Glu Arg Gln Phe Ile
 180 185 190
 Val Arg Lys Val His Tyr Asp Pro Glu Lys Asp Val His Ile Tyr Glu
 195 200 205
 Ala Gln Lys Arg Asn Gln Lys Glu Asp Leu
 210 215

<210> 20

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Val Arg Thr Lys Thr Trp Thr Leu Lys Lys His Phe Val Gly Tyr
 1 5 10 15
 Pro Thr Asn Ser Asp Phe Glu Leu Lys Thr Ala Glu Leu Pro Pro Leu
 20 25 30
 Lys Asn Gly Glu Val Leu Leu Glu Ala Leu Phe Leu Thr Val Asp Pro
 35 40 45
 Tyr Met Arg Val Ala Ala Lys Arg Leu Lys Glu Gly Asp Thr Met Met

 50 55 60
 Gly Gln Gln Val Ala Lys Val Val Glu Ser Lys Asn Val Ala Leu Pro
 65 70 75 80
 Lys Gly Thr Ile Val Leu Ala Ser Pro Gly Trp Thr Thr His Ser Ile
 85 90 95

Ser Asp Gly Lys Asp Leu Glu Lys Leu Leu Thr Glu Trp Pro Asp Thr
 100 105 110

Ile Pro Leu Ser Leu Ala Leu Gly Thr Val Gly Met Pro Gly Leu Thr
 115 120 125

Ala Tyr Phe Gly Leu Leu Glu Ile Cys Gly Val Lys Gly Gly Glu Thr
 130 135 140

Val Met Val Asn Ala Ala Ala Gly Ala Val Gly Ser Val Val Gly Gln
 145 150 155 160

Ile Ala Lys Leu Lys Gly Cys Lys Val Val Gly Ala Val Gly Ser Asp
 165 170 175

Glu Lys Val Ala Tyr Leu Gln Lys Leu Gly Phe Asp Val Val Phe Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Val Glu Ser Leu Glu Glu Thr Leu Lys Lys Ala Ser Pro
 195 200 205

Asp Gly Tyr Asp Cys Tyr Phe Asp Asn Val Gly Gly Glu Phe Ser Asn
 210 215 220

Thr Val Ile Gly Gln Met Lys Lys Phe Gly Arg Ile Ala Ile Cys Gly
 225 230 235 240

Ala Ile Ser Thr Tyr Asn Arg Thr Gly Pro Leu Pro Pro Gly Pro Pro
 245 250 255

Pro Glu Ile Val Ile Tyr Gln Glu Leu Arg Met Glu Ala Phe Val Val
 260 265 270

Tyr Arg Trp Gln Gly Asp Ala Arg Gln Lys Ala Leu Lys Asp Leu Leu
 275 280 285

Lys Trp Val Leu Glu Gly Lys Ile Gln Tyr Lys Glu Tyr Ile Ile Glu
 290 295 300

Gly Phe Glu Asn Met Pro Ala Ala Phe Met Gly Met Leu Lys Gly Asp
 305 310 315 320

Asn Leu Gly Lys Thr Ile Val Lys Ala
 325

<210> 21

<211> 84

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>
 > 21
 Met Ala Thr Gly Thr Asp Gln Val Val Gly Leu Gly Leu Val Ala Val
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Ile Phe Thr Tyr Tyr Thr Ala Trp Val Ile Leu Leu Pro
 20 25 30
 Phe Ile Asp Ser Gln His Val Ile His Lys Tyr Phe Leu Pro Arg Ala
 35 40 45
 Tyr Ala Val Ala Ile Pro Leu Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Phe
 50 55 60
 Val Gly Leu Phe Ile Ser Tyr Val Met Leu Lys Thr Lys Arg Val Thr
 65 70 75 80
 Lys Lys Ala Gln

<210> 22
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Met Ser Phe Cys Ser Phe Phe Gly Gly Glu Val Phe Gln Asn His Phe
 1 5 10 15
 Glu Pro Gly Val Tyr Val Cys Ala Lys Cys Gly Tyr Glu Leu Phe Ser
 20 25 30
 Ser Arg Ser Lys Tyr Ala His Ser Ser Pro Trp Pro Ala Phe Thr Glu
 35 40 45
 Thr Ile His Ala Asp Ser Val Ala Lys Arg Pro Glu His Asn Arg Ser
 50 55 60
 Glu Ala Leu Lys Val Ser Cys Gly Lys Cys Gly Asn Gly Leu Gly His
 65 70 75 80
 Glu Phe Leu Asn Asp Gly Pro Lys Pro Gly Gln Ser Arg Phe Ser Ile
 85 90 95

Phe Ser Ser Ser Leu Lys Phe Val Pro Lys Gly Lys Glu Thr Ser Ala
 100 105 110

Ser Gln Gly His

115

<210> 23

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ser Ser Ile Gly Thr Gly Tyr Asp Leu Ser Ala Ser Thr Phe Ser
 1 5 10 15

Pro Asp Gly Arg Val Phe Gln Val Glu Tyr Ala Met Lys Ala Val Glu
 20 25 30

Asn Ser Ser Thr Ala Ile Gly Ile Arg Cys Lys Asp Gly Val Val Phe
 35 40 45

Gly Val Glu Lys Leu Val Leu Ser Lys Leu Tyr Glu Glu Gly Ser Asn
 50 55 60

Lys Arg Leu Phe Asn Val Asp Arg His Val Gly Met Ala Val Ala Gly
 65 70 75 80

Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ser Leu Ala Asp Ile Ala Arg Glu Glu Ala
 85 90 95

Ser Asn Phe Arg Ser Asn Phe Gly Tyr Asn Ile Pro Leu Lys His Leu
 100 105 110

Ala Asp Arg Val Ala Met Tyr Val His Ala Tyr Thr Leu Tyr Ser Ala
 115 120 125

Val Arg Pro Phe Gly Cys Ser Phe Met Leu Gly Ser Tyr Ser Val Asn
 130 135 140

Asp Gly Ala Gln Leu Tyr Met Ile Asp Pro Ser Gly Val Ser Tyr Gly
 145 150 155 160

Tyr Trp Gly Cys Ala Ile Gly Lys Ala Arg Gln Ala Ala Lys Thr Glu
 165 170 175

Ile Glu Lys Leu Gln Met Lys Glu Met Thr Cys Arg Asp Ile Val Lys

180 185 190
 Glu Val Ala Lys Ile Ile Tyr Ile Val His Asp Glu Val Lys Asp Lys

195 200 205
 Ala Phe Glu Leu Glu Leu Ser Trp Val Gly Glu Leu Thr Asn Gly Arg

210 215 220
 His Glu Ile Val Pro Lys Asp Ile Arg Glu Glu Ala Glu Lys Tyr Ala

225 230 235 240
 Lys Glu Ser Leu Lys Glu Glu Asp Glu Ser Asp Asp Asp Asn Met

245 250 255

<210> 24

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Gly Gly Thr Thr Ser Thr Arg Arg Val Thr Phe Glu Ala Asp Glu

1 5 10 15
 Asn Glu Asn Ile Thr Val Val Lys Gly Ile Arg Leu Ser Glu Asn Val

20 25 30
 Ile Asp Arg Met Lys Glu Ser Ser Pro Ser Gly Ser Lys Ser Gln Arg

35 40 45
 Tyr Ser Gly Ala Tyr Gly Ala Ser Val Ser Asp Glu Glu Leu Lys Arg

50 55 60
 Arg Val Ala Glu Glu Leu Ala Leu Glu Gln Ala Lys Lys Glu Ser Glu

65 70 75 80

Asp Gln Lys Arg Leu Lys Gln Ala Lys Glu Leu Asp Arg Glu Arg Ala

85 90 95
 Ala Ala Asn Glu Gln Leu Thr Arg Ala Ile Leu Arg Glu Arg Ile Cys

100 105 110
 Ser Glu Glu Glu Arg Ala Lys Ala Lys His Leu Ala Arg Gln Leu Glu

115 120 125
 Glu Lys Asp Arg Val Leu Lys Lys Gln Asp Ala Phe Tyr Lys Glu Gln

130 135 140

Leu Ala Arg Leu Glu Glu Arg Ser Ser Glu Phe Tyr Arg Val Thr Thr

145 150 155 160

Glu Gln Tyr Gln Lys Ala Ala Glu Glu Val Glu Ala Lys Phe Lys Arg

165 170 175

Tyr Glu Ser His Pro Val Cys Ala Asp Leu Gln Ala Lys Ile Leu Gln

180 185 190

Cys Tyr Arg Glu Asn Thr His Gln Thr Leu Lys Cys Ser Ala Leu Ala

195 200 205

Thr Gln Tyr Met His Cys Val Asn His Ala Lys Gln Ser Met Leu Glu

210 215 220

Lys Gly Gly

225

<210> 25

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Ala Asp Asp Val Asp Gln Gln Gln Thr Thr Asn Thr Val Glu Glu

1 5 10 15

Pro Leu Asp Leu Ile Arg Leu Ser Leu Asp Glu Arg Ile Tyr Val Lys

20 25 30

Met Arg Asn Asp Arg Glu Leu Arg Gly Arg Leu His Ala Tyr Asp Gln

35 40 45

His Leu Asn Met Ile Leu Gly Asp Val Glu Glu Thr Val Thr Thr Ile

50 55 60

Glu Ile Asp Glu Glu Thr Tyr Glu Glu Ile Tyr Lys Ser Thr Lys Arg

65 70 75 80

Asn Ile Pro Met Leu Phe Val Arg Gly Asp Gly Val Val Leu Val Ala

85 90 95

Pro Pro Leu Arg Val Gly

100

<210> 26

<211> 720
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Met Asp Asp Pro Lys Lys Glu Asp Ile Leu Leu Leu Ala Asp Glu Lys
 1 5 10 15

 Phe Asp Phe Asp Leu Ser Leu Ser Ser Ser Ser Ala Asn Glu Asp Asp
 20 25 30
 Glu Val Phe Phe Gly Pro Phe Gly His Lys Glu Arg Cys Ile Ala Ala
 35 40 45
 Ser Leu Glu Leu Asn Asn Pro Val Pro Glu Gln Pro Pro Leu Pro Thr
 50 55 60
 Ser Glu Ser Pro Phe Ala Trp Ser Pro Leu Ala Gly Glu Lys Phe Val
 65 70 75 80
 Glu Val Tyr Lys Glu Ala His Leu Leu Ala Leu His Ile Glu Ser Ser

 85 90 95
 Ser Arg Asn Gln Ala Ala Gln Ala Ala Lys Pro Glu Asp Pro Arg Ser
 100 105 110
 Gln Gly Val Glu Arg Phe Ile Gln Glu Ser Lys Leu Lys Ile Asn Leu
 115 120 125
 Phe Glu Lys Glu Lys Glu Met Lys Lys Ser Pro Thr Ser Leu Lys Arg
 130 135 140
 Glu Thr Tyr Tyr Leu Ser Asp Ser Pro Leu Leu Gly Pro Pro Val Gly
 145 150 155 160

 Glu Pro Arg Leu Leu Ala Ser Ser Pro Ala Leu Pro Ser Ser Gly Ala
 165 170 175
 Gln Ala Arg Leu Thr Arg Ala Pro Gly Pro Pro His Ser Ala His Ala
 180 185 190
 Leu Pro Arg Glu Ser Cys Thr Ala His Ala Ala Ser Gln Ala Ala Thr
 195 200 205
 Gln Arg Lys Pro Gly Thr Lys Leu Leu Leu Pro Arg Ala Ala Ser Val
 210 215 220

465 470 475 480
 Val Gly Arg Val Thr Val His Ser Thr Pro Val Arg Arg Ser Ser Gly
 485 490 495
 Pro Ala Pro Gln Ser Leu Leu Ser Ala Arg Arg Val Ser Ala Leu Pro
 500 505 510
 Thr Pro Ala Ser Arg Arg Cys Ser Gly Leu Pro Pro Met Thr Pro Lys

 515 520 525
 Thr Met Pro Arg Ala Val Gly Ser Pro Leu Cys Val Pro Ala Arg Arg
 530 535 540
 Arg Ser Ser Glu Pro Arg Lys Asn Ser Ala Met Arg Thr Glu Pro Thr
 545 550 555 560
 Arg Glu Ser Asn Arg Lys Thr Asp Ser Arg Leu Val Asp Val Ser Pro
 565 570 575
 Asp Arg Gly Ser Pro Pro Ser Arg Val Pro Gln Ala Leu Asn Phe Ser
 580 585 590

 Pro Glu Glu Ser Asp Ser Thr Phe Ser Lys Ser Thr Ala Thr Glu Val
 595 600 605
 Ala Arg Glu Glu Ala Lys Pro Gly Gly Asp Ala Ala Pro Ser Glu Ala
 610 615 620
 Leu Leu Val Asp Ile Lys Leu Glu Pro Leu Ala Val Thr Pro Asp Ala
 625 630 635 640
 Ala Ser Gln Pro Leu Ile Asp Leu Pro Leu Ile Asp Phe Cys Asp Thr
 645 650 655
 Pro Glu Ala His Val Ala Val Gly Ser Glu Ser Arg Pro Leu Ile Asp

 660 665 670
 Leu Met Thr Asn Thr Pro Asp Met Asn Lys Asn Val Ala Lys Pro Ser
 675 680 685
 Pro Val Val Gly Gln Leu Ile Asp Leu Ser Ser Pro Leu Ile Gln Leu
 690 695 700
 Ser Pro Glu Ala Asp Lys Glu Asn Val Asp Ser Pro Leu Leu Lys Phe
 705 710 715 720
 <210> 27

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(44-64) oligonucleotide (sense) for human UBE2S mRNA

<400> 27
 ccggccggcc gcagccauga a 21

<210> 28
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(146-166) oligonucleotide (sense) for human UBE2S mRNA

<400> 28
 uggcaucaag gucuuuccca a 21

<210> 29
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human UBE2S mRNA

<400> 29
 ggagaacuac gaggaguau 19

<210> 30
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human UBE2S mRNA

<400> 30
 uggcgagcgc gauaagaag 19

<210> 31
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(897-917) oligonucleotide (sense) for human RFC4 mRNA

<400> 31

agggaauagc uuaucuuguu a 21
 <210> 32
 <211> 21
 <212>
 RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(189-209) oligonucleotide (sense) for human RFC4 mRNA
 <400> 32
 cugcacgaga agccaggcua a 21
 <210> 33
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human RFC4 mRNA
 <400> 33
 ccgauucugu cuuauucugu 19
 <210> 34
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human RFC4 mRNA
 <400> 34
 ggguaauacc agcugagaa 19
 <210> 35
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(2003-2023) oligonucleotide (sense) for human PTGES2 mRNA
 <400> 35
 cugggacaug uuugcaauaa a 21
 <210> 36
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-1(1105-1125) oligonucleotide (sense) for human PTGES2 mRNA

<400> 36

cuggcucaug cucaacgaga a 21

<210> 37

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human PTGES2 mRNA

<400> 37

aggagaaaagc ucgcaacaa 19

<210> 38

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human PTGES2 mRNA

<400> 38

ccgaguucgg caauaagua 19

<210> 39

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-1(1538-1558) oligonucleotide (sense) for human MAF1 mRNA

<400> 39

cagcuggacc gcagaguuuu u 21

<210> 40

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-1(1031-1051) oligonucleotide (sense) for human MAF1 mRNA

<400> 40

uagccucugg uccuacaacu a 21

<210> 41

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human MAF1 mRNA

<400> 41

acgacaaaca cauguuca 19

<210> 42

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human MAF1 mRNA

<400> 42

gccuuagcug gguggugaa 19

<210> 43

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-1(626-646) oligonucleotide (sense) for human ACVR2B mRNA

<400> 43

cagcucauga augacuuugu a 21

<210> 44

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-1(208-228) oligonucleotide (sense) for human ACVR2B mRNA

<400> 44

caccaucgag cugugaaga a 21

<210> 45

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human ACVR2B mRNA

<400> 45
 ggcagaguga acgggagau 19
 <210> 46
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human ACVR2B mRNA
 <400> 46
 ggaacaucau cacauggaa 19
 <210> 47
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(754-774) oligonucleotide (sense) for human LOC151194 mRNA
 <400> 47
 aagguucacu acgauccuga a 21

 <210> 48
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(1068-1088) oligonucleotide (sense) for human LOC151194
 mRNA
 <400> 48
 ucgauuuuug cuuuuugugu a 21
 <210> 49
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human LOC151194 mRNA
 <400> 49
 ggaauuuuggg uugcagaaa 19
 <210> 50

 <211> 19

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human LOC151194 mRNA
 <400> 50
 ccagaaggag gacuuauaa 19
 <210> 51
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(705-725) oligonucleotide (sense) for human LTB4DH mRNA
 <400> 51
 cacuguuauac ggccagauga a 21
 <210> 52
 <211> 21
 <212> RNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(588-608) oligonucleotide (sense) for human LTB4DH mRNA
 <400> 52
 uggauuugau gucgucuuua a 21
 <210> 53
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human LTB4DH mRNA
 <400> 53
 gccaaaagau ugaaggaag 19
 <210> 54
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human LTB4DH mRNA
 <400> 54
 ccugaugguu augauuguu 19

<210> 55
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(145-165)oligonucleotide (sense) for human DPM2 mRNA
 <400> 55
 cagcauguca uccacaagua u 21
 <210> 56
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(84-104)oligonucleotide (sense) for human DPM2 mRNA
 <400> 56
 uagccugauc aucuucaccu a 21
 <210> 57
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human DPM2 mRNA
 <400> 57
 gggugauucu cuugccaau 19
 <210> 58
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human DPM2 mRNA
 <400> 58
 uguuuguggg acuguucau 19
 <210> 59
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(870-890)oligonucleotide (sense) for human SEPX1 mRNA

<400> 59
 cagacucucg uccucaccga a 21
 <210> 60
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(794-814)oligonucleotide (sense) for human SEPX1 mRNA
 <400> 60
 cugaaugacg uuacaccuc a 21
 <210> 61
 <211> 19

 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human SEPX1 mRNA
 <400> 61
 gggcgagguu uuccagaau 19
 <210> 62
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-3oligonucleotide (sense) for human SEPX1 mRNA
 <400> 62
 ucacuuugaa ccuggcguu 19
 <210> 63
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> siRNA-1(853-873)oligonucleotide (sense) for human PSMA3 mRNA
 <400> 63
 ccaguccaau gaaacuauuu a 21
 <210> 64
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-1(686-706)oligonucleotide (sense) for human PSMA3 mRNA

<400> 64

cucagcuggg uuggugaau a 21

<210> 65

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human PSMA3 mRNA

<400> 65

uggcagaugc ucuuucuuu 19

<210> 66

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human PSMA3 mRNA

<400> 66

gguguuucou acgguuuuu 19

<210> 67

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-1(546-566)oligonucleotide (sense) for human CHCHD3 mRNA

<400> 67

caggaugcau ucuacaaaga a 21

<210> 68

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA-1(1450-1470)oligonucleotide (sense) for human CHCHD3 mRNA

<400> 68

cuggaauuuu guuuuugauu a 21

<210> 69

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human CHCHD3 mRNA
 <400> 69
 cgaagaucag aaacgacua 19
 <210> 70
 <211> 19
 <
 212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human CHCHD3 mRNA
 <400> 70
 gagaaagacc gagugcuua 19
 <210> 71
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(540-560)oligonucleotide (sense) for human LSM3 mRNA
 <400> 71
 uccaauaaaau augaccacca a 21
 <210> 72
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-1(37-57)oligonucleotide (sense) for human LSM3 mRNA
 <400> 72
 acgacguaga ccagcaacaa a 21
 <210> 73
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human LSM3 mRNA
 <400> 73

gacguagacc agcaacaaa	19
<210> 74	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human LSM3 mRNA	
<400> 74	
acgaaacgga auauuccaa	19
<210> 75	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA-2 oligonucleotide (sense) for human GTSE1 mRNA	
<400> 75	
gggcaaagcu aaaucaagu	19
<210> 76	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA-3 oligonucleotide (sense) for human GTSE1 mRNA	
<400> 76	
ugacaaacac uccagacau	19

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2

【변경전】

폴리뉴클레오티드

【변경후】

폴리뉴클레오타이드