(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월13일
(11) 등록번호 10-2601496
(24) 등록일자 2023년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/566 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/566 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0135027
(22) 출원일자 2021년10월12일
심사청구일자 2021년10월12일
(65) 공개번호 10-2023-0051976
(43) 공개일자 2023년04월19일
(56) 선행기술조사문헌
JP2021027813 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
박태선
서울특별시 종로구 사직로8길 20, 101동 1103호(내수동, 경희궁 파크팰리스)
강위석
서울특별시 마포구 동교로27길 3-22, 201호(동교동)
(74) 대리인
특허법인충현

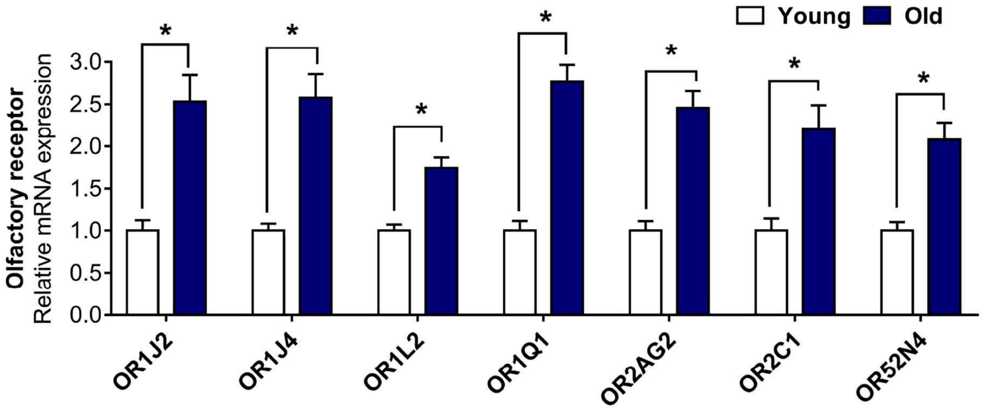
전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 **피부 노화 진단을 위한 후각 수용체 유전자 및 이들의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 피부 노화의 진단용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 내인성 요인으로 인한 현재의 피부 노화 정도를 평가할 뿐 아니라, 향후 이러한 피부 노화가 진행될 유전적 위험성을 높은 신뢰도로 예측함으로써 피부 노화에 대한 개인별 맞춤 치료 전략을 조기에 수립하는 데에 유용하게 이용될 수 있다. 본 발명은 또한 피부 노화 개선제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명의 스크리닝 방법은 피부 진피(dermis)의 노화에 따라 감소된 진피 섬유아세포의 콜라겐 생성을 복원하여 피부 조직의 결합력 저하, 탄력 감소, 수분 상실 및 장벽기능 손상을 가역적으로 회복시킴으로써 수분 공급과 같은 대증적 요법을 넘어서는 근원적인 피부 노화 억제제를 정확하고 신속하게 탐색할 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/705 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/7042 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020180088162 A
WO2021170618 A1
Duroux Romain et al, Molecules (2020.), vol 25, no 20, pp 1-15.
Romana Souza Bruna et al, Mechanisms of Ageing and Development (2015.), vol 152, pp 63-73.
Romana Souza Bruna et al, Journal of Functional Foods (2019.), vol 54, pp 310-319.
Son Bomin et al, International Journal of Molecular Sciences (2021.), vol 22, no 17, pp 1-13.
Kwang W et al, International journal of molecular sciences (2021.03.), vol 22, no 2799, pp 1-13.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711109058
과제번호	2019R1A2C2003340
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업(핵심)
연구과제명	후각수용체를 통한 수베르산의 피부노화 개선효능 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

OR1J2(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily J Member 2), OR1J4(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily J Member 4), OR1L3(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily L Member 3), OR1Q1(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily Q Member 1), OR2AG2(Olfactory Receptor Family 2 Subfamily AG Member 2), OR2C1(Olfactory Receptor Family 2 Subfamily C Member 1) 및 OR52N4(Olfactory Receptor Family 52 Subfamily N Member 4)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 내적 요인에 의해 유발된 피부 노화의 진단용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 내적 요인에 의해 유발된 피부 노화는 내적 요인에 의해 발생하는 미세주름, 과색소침착, 피부 탄력의 소실 및 수분 결핍으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 노화 현상을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 내적 요인에 의해 발생하는 피부의 노화 정도를 예측하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 유전자의 발현량을 측정하는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단백질의 발현량을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 앱타머인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 피부 노화 진단용 조성물을 포함하는, 피부노화 진단용 키트.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것을 특징으로 하는, 피부노화 진단용 키트.

청구항 8

개체로부터 분리된 생물학적 시료 내에서 OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 피부 노화의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 피부조직 또는 피부조직 유래 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 피부조직 유래 세포는 피부 섬유아세포(dermal fibroblast)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 내적 요인에 의해 유발된 피부 노화 개선용 조성물의 스크리닝 방법:

(a) OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 접촉시키는 단계;

(b) 상기 시료 내 상기 유전자 또는 상기 유전자가 인코딩하는 단백질의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,

상기 OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량 또는 활성이 증가한 경우, 상기 후보물질은 내적 요인에 의해 유발된 피부 노화 개선용 조성물로 판정한다.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 세포는 피부 섬유아세포(dermal fibroblast)인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피부 진피 노화의 지표가 되는 후각 수용체 유전자 및 이를 이용한 피부 노화 진단 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피부는 크게 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하지방(hypodermis)의 세층으로 구성되어 있다. 표피, 특히 표피의 가장 외층인 각질층은 피부장벽의 역할을 함으로서 피부로부터 수분과 전해질 손실되는 것을 억제하는 한편, 진피층은 피부 주로 결합조직으로 구성되어 피부의 탄력을 유지하고 구조를 지지하는 역할을 한다. 피부결합조직에는 세포외기질 단백질 중 콜라겐이 가장 많은 양으로 존재하며, 그 밖에 엘라스틴, 피브로넥틴, 인테그린, 피브릴린, 프로테로글리칸 등의 단백질들로 구성되어 있으며, 그 사이로 히알루론산이 채워져있어 피부보습을 담당한다(Fore, J., *Ostomy/wound management*, 52(9): 24,2006; Yamauchi et al., *Journal of Biological Chemistry*, 262(24):11428, 1987).

[0003] 콜라겐은 피부섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 새로이 합성된 프로콜라겐으로부터 만들어지는데, 이 프로콜라겐은 효소반응을 거쳐 피부세포의 세포외 공간으로 분비된 후 삼중나선구조(triple helix configuration)의 마이크로피브릴(microfibril)을 형성하고, 마이크로피브릴(microfibril)들은 류신-리치 스몰 프로테오글리칸(leucine-rich small proteoglycans)과 결합하여 피브릴(fibril)을 형성한다. 결과적으로 이렇게 만들어진 피브릴(fibril)들이 모여 피부의 결합력과 탄력성을 제공하는 콜라겐 섬유를 형성되어 피부의 기계적 견고성, 조

직의 결합력 및 탄력성 등에 관여한다(Veis, A et al., *Journal of Biological Chemistry*, 264(7):3884, 1989; Hulmes, D. J., *Journal of structural biology*, 137(1):2, 2002).

[0004] 피부노화가 진행됨에 따라 피부 결합조직 중 대부분을 차지하는 단백질인 콜라겐 함량이 감소하는데, 콜라겐은 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에 피부노화에 따른 콜라겐의 감소는 주름생성, 탄력감소와 같은 증상을 일으키는 직접적인 원인으로 지목되고 있다. 이렇게 자연스럽게 일어나는 노화의 현상은 세포실험에서 계대배양을 진행함에 따라 계대수(passage) 증가에 의한 콜라겐 감소, 세포노화인자(p16, β-galactosidase activity 등)의 증가 등으로 확인할 수 있다 (Yang et al., *Experimental gerontology*, 40(10):813-819, 2005; Ohtani et al., *Nature*, 409(6823):1067-1070).

[0005] 최근 유전정보를 기반으로 한 개인별 맞춤의료가 보건산업의 새로운 패러다임으로 등장하면서 진단검사와 소비자 직접의뢰(DTC; Direct To Consumer) 검사를 수행하는 기업이 점차 증가하고, 유전자 검사 시장이 2017년 58.2억 달러(약 7.7조원)에서 연평균 10.6%씩 성장하여 2024년에는 117.9억 달러(약 14.3조원) 규모로 성장할 것이라는 전망이 보고되었다(생명공학정책연구센터, 2019). 현재 국내의 DTC 유전자 검사 진단 키트는 테라젠바이오와 아모레퍼시픽의'아이오페 랩 지노 인덱스', 마크로젠의'마이지놈스토리 더플러스', 바이오니아의'진투라이프'등 다양한 바이오 업체에서 제작되어 대부분 생체 DNA 분석을 통해 타고난 개인의 유전자 발현 상태를 측정하여 혈당, 혈압, 탈모, 콜레스테롤 등 해당 질병에 대해 얼마나 취약한지를 파악하는 것에 초점이 맞춰져 있으나, 선천적 유전 정보가 아닌 현재의 피부 노화 진행 상태를 반영하는 진단 키트는 전무한 실정이다. 또한 시중의 진단 키트는 여러가지 항목에 대한 유전자를 종합 검사하기 위하여 검체를 피부가 아닌 구강상피세포에서 채취하고 있으므로 피부에서 직접 피부노화 상태를 검사할 수 있는 보완 제품의 필요성이 절실한 실정이다.

[0006] 한편, 후각 수용체(OR; olfactory receptor)는 후각 상피세포에서 주로 발현되는 것으로 알려져 있다. 공기 중의 냄새분자가 후각상피세포의 세포막에 존재하는 후각 수용체와 결합하면, Golf(olfactory G protein)을 우선적으로 활성화시키고 곧이어 AC3(olfactory-related adenylate cyclase)를 활성화시킨다. 후자는 후각세포 내에서 ATP로부터 cAMP(cyclic AMP)의 생성을 촉진시키고, 칼슘이온 채널을 활성화시켜서 궁극적으로 뇌로 신호를 전달하여 냄새 분자를 인식하도록 하는 작용을 한다(Fleischer et al., *Frontiers in Cellular Neuroscience* 3:9, 2009). 인간에서는 약 350종의 후각 수용체 아형(isoform)이 발현하는 것으로 보고되었고, 이는 전체 지놈 유전자의 1% 이상에 달하는 큰 유전자군으로서, GPCR 중에서도 가장 거대한 군에 해당되는 유전자로 알려져 있다. 단일 후각수용체가 담당하는 냄새 분자는 약 2-3가지이며, 약 100여 가지 후각 수용체의 조합에 따라 사람은 1만 가지 정도의 냄새(또는 냄새 분자)를 구별할 수 있다(Pluznick et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6):2059-2064, 2009).

[0007] 최근 연구에 의하면 후각 수용체는 후각 조직 뿐 아니라 피부, 폐, 방광, 대장 등 비후각 조직에서 광범위하게 발현되어 신체의 상태에 따라 발현이 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 아토피 환자의 피부에서 정상인의 피부보다 OR10G7 유전자의 발현이 더 높게 나타났으며(Tham et al., *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(5):1838-1848. 2019), 천식 환자의 폐조직에서 OR2AG2 유전자의 발현이 정상인의 폐조직보다 낮은 것으로 보고되어 현재 질환의 상태 및 민감성을 예측할 수 있는 마커로 제시되었다(Chakraborty et al., *Scientific reports* 9(1):1-10, 2019). 또한 정상인 방광에 비하여 방광암 환자의 방광에서 OR10H1 유전자의 발현이 현저하게 높아, 방광암의 조기 진단용 바이오마커로 제시된 바 있으며(Weber, L et al., *Frontiers in physiology*, 9:456,2018), 대장에서 OR7C1 유전자의 발현이 대장암 환자에서 정상인보다 높게 나타나 대장암 진단을 위한 새로운 마커로 제시되었다(Morita et al., *Clinical Cancer Research*, 22(13):3298-3309, 2016). 따라서 후각수용체의 이소성 발현은 단순히 후각을 인지하는 것 이상으로 생리학 및 병리학적 상태를 진단 및 대변할 수 있는 마커로서 역할을 할 수 있다는 사실이 최근 2~3년 사이에 보고되고 있으나, 피부노화 상황에서 진피의 피부섬유아세포의 후각수용체의 발현 변화 여부에 대해서는 크게 알려진 바가 없다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Romain Duroux et al., A Rose Extract Protects the Skin against Stress

Mediators: A Potential Role of Olfactory Receptors. Molecules 25:4743(2020)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 피부 노화의 진행 정도를 정확하게 평가하는 분자 진단 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 노화된 피부의 진피(dermis) 조직에서 특정 후각수용체(Olfactory receptor) 유전자의 발현이 유의하게 변화되며, 이들의 발현 수준을 측정할 경우 현재의 피부 노화정도 뿐 아니라 향후 피부 조직의 기계적 견고성, 결합력, 탄력 및 장벽기능이 상실될 유전적 위험성을 높은 신뢰도로 예측할 수 있으며, 치료과정에서 피부노화의 개선 정도를 모니터링할 수 있다는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 피부 노화의 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용한 피부 노화 진단 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 피부 노화 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 OR1J2(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily J Member 2), OR1J4(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily J Member 4), OR1L3(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily L Member 3), OR1Q1(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily Q Member 1), OR2AG2(Olfactory Receptor Family 2 Subfamily AG Member 2), OR2C1(Olfactory Receptor Family 2 Subfamily C Member 1) 및 OR52N4(Olfactory Receptor Family 52 Subfamily N Member 4)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 피부 노화의 진단용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명자들은 피부 노화의 진행 정도를 정확하게 평가하는 분자 진단 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 외적 또는 내적 요인에 의해 피부 노화가 야기될 경우 피부의 진피(dermis) 조직에서 특정 후각수용체(olfactory receptor) 유전자(OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4)의 발현이 특이적으로 증가하여 피부 노화 정도 및 피부 노화 진행 단계에 대한 정보를 제공하고, 나아가 피부 조직의 기계적 견고성, 결합력, 탄력 및 장벽 기능이 상실될 유전적 위험성을 높은 신뢰도로 예측할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0016] 본 명세서에서 용어 "진단"은 피부 노화에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 현재 개체에서 진행된 피부 노화 정도의 판정 및 향후 피부 노화와 관련한 객체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다. 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명에서 발굴된 후각수용체 유전자들의 발현은 피부 노화에 대한 표지자인 β-gal 및 p16의 발현 변화와 밀접하게 관련되어 있을 뿐만 아니라, 피부 조직의 견고성 및 탄력성에 대한 표지자인 콜라겐(collagen)의 발현 변화와도 밀접하게 관련되어 있으므로, 용어 "피부노화 진단"은 "피부 장벽기능의 평가" 또는 "콜라겐 결핍 관련 피부 질환의 진단"의 의미를 포함하는 것일 수 있다.

[0017] 본 명세서에서 용어 "콜라겐 결핍 관련 피부 질환"은 피부 진피조직 내 섬유아세포에 의한 콜라겐 생성이 저하되거나, 콜라겐 유전자(COL1A1) 발현이 증가하거나 또는 MMP-1(collagenase)에 의한 콜라겐 분해 속도가 섬유아세포에 의한 콜라겐 합성 속도를 상회함으로써 나타나는 진피 내 콜라겐의 양적 소실을 원인으로 하는 모든 병적 상태를 포괄하는 의미이다. 각질형성세포(keratinocyte)로 밀집된 피부 표피와는 달리, 피부 진피의 대부분은 세포가 없는 기질 단백질로 이루어져 있다. 콜라겐은 피부 건조 중량의 75%를 차지하는 가장 중요한 기질 단백질로서, 콜라겐의 양적 소실은 전체 기질 단백질의 결핍 및 진피 조직의 구조적 붕괴로 이어져 피부 조직의 결합력 저하, 탄력 감소, 수분 상실 및 장벽기능 손상을 야기한다. 이에, 본 발명의 조성물은 진피 조직 내 유일한 세포성분인 섬유아세포의 후각수용체 유전자 발현양상을 통해 콜라겐 생성의 증감을 정확하게 예측함으로써, 콜라겐 결핍으로 인한 피부 손상 여부 및 향후 손상 발생의 유전적 위험성에 대한 중요한 정보를 제공할 수 있다.

[0018] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 진단될 수 있는 피부 노화는 외적 또는 내적 요인에 의해 야기된 노화일 수 있으며, 내적 요인에 의한 피부 노화는 시간이 지남에 따라 발생하는 자연적인 노화 현

상으로 주름 형성, 피부 탄력 감소를 보이는 것일 수 있다. 또한 상기 외적 요인에 의한 피부노화는 외부에서 유래된 요인으로 인해 발생하는 것으로, 흡연, 음주, 영양부족, 자외선, 스트레스 및 염증 등에 의한 피부 노화로, 미세주름, 과색소침착, 피부 탄력의 소실 및 수분 결핍으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 노화 현상을 보이는 것일 수 있다.

[0019] 본 명세서에서 용어 "진단용 조성물"은 대상체의 피부노화 정도를 판단하거나 향후 피부노화 진행 정도를 예측하기 위해 상기 나열된 후각수용체 유전자 또는 이의 단백질 발현량 측정수단을 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 "진단용 키트"로 표현될 수도 있다.

[0020] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 조성물은 OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 포함한다. 보다 구체적으로, 상기 나열된 유전자 또는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 포함할 경우 본 발명의 조성물은 피부의 노화 정도를 예측할 수 있다. 보다 더 구체적으로, 대상체의 시료에서 상기 유전자 중 OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질이 정상 시료보다 고발현될 경우, 대상체의 피부가 내적 또는 외적 요인으로 인해 피부 노화가 발생한 것으로 판단한다.

[0021] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 내적 요인에 의한 피부 노화는 시간이 지남에 따라 발생한 자연적인 노화 현상을 포함하는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 이에 제한되지 않고 직접적 또는 간접적인 원인으로 하는 모든 피부 노화 현상을 포괄적으로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 잔주름, 피부 건조, 피부 탄력의 소실, 피부 두께 감소, 콜라겐과 엘라스틴 및 피지분비 감소로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 피부 장벽 기능의 약화 현상을 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 외적 요인에 의한 피부 노화는 흡연, 음주, 영양부족, 자외선 노출, 스트레스 또는 염증 등에 의한 피부의 노화일 수 있다. 예를 들어 상기 자외선 노출에 의한 피부 노화는 미세주름, 과색소침착, 피부 탄력의 소실 및 수분 결핍으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 광노화(Photoaging) 현상을 포함하나, 이에 제한되지 않고 자외선 자극을 직접적 또는 간접적인 원인으로 하는 모든 피부 노화 현상을 포괄적으로 포함한다.

[0023] 상기 스트레스로 인한 피부노화는 물리적, 심리적, 생리적 자극으로 발생하는 스트레스를 직접 또는 간접적인 원인으로 하는 모든 피부 노화 현상을 포괄적으로 포함하며, 본 명세서에서 용어 "스트레스"는 생체의 균형을 붕괴시키는 내외적인 자극에 의해 일어나는 유기체 내의 모든 변화를 포괄하는 의미이다. 스트레스의 원인이 되는 자극은 크게 물리적, 심리적, 생리적 자극으로 분류되며, 물리적 자극은 자연계에 존재하는 기온, 자외선, 화학적 자극 등을, 심리적 자극은 정신적인 고통, 분노, 불안, 긴장 등을, 생리적 자극은 세균이나 바이러스, 알레르기 물질 등을 포함한다.

[0024] 상기 염증에 의한 피부의 노화는 아토피 피부염, 피부근염, 피부경화증, 천포창, 환상홍반 및 홍반루푸스로 구성된 군으로부터 선택되는 염증성 또는 자가면역성 피부질환으로 인한 피부 노화를 포함하나, 이에 제한되지 않고 과도한 면역반응 또는 염증에 의한 피부 손상을 직접적 또는 간접적인 원인으로 하는 모든 피부 노화 현상을 포괄적으로 포함한다.

[0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 조성물은 OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 포함한다. 보다 구체적으로, 상기 유전자 또는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 포함할 경우 본 발명의 조성물은 피부의 장벽 기능 손상에 의한 피부의 노화 정도를 예측한다. 보다 더 구체적으로, 대상체의 시료에서 상기 유전자 중 하나 이상의 유전자의 또는 이들이 인코딩하는 단백질이 정상 시료보다 고발현될 경우, 대상체의 피부가 장벽 기능 손상에 의해 노화가 발생한 것으로 판단한다.

[0026] 본 명세서에서 용어 "피부 장벽기능 장애(skin barrier dysfunction) 관련 질환"은 콜라겐 소실 및 진피층의 두께 감소로 인해 피부가 외부의 유해분자 투과(permeation)를 차단하고 내부의 수분 유출을 억제하는 장벽기능을 상실함으로써 유발되는 일련의 질환을 포괄하는 의미이다. 장벽기능의 상실은 예를 들어 진피층의 두께 감소로 인한 수분 상실로 인한 피부 노화, 병원균의 침투로 인한 다양한 감염성 질환, 아토피 피부염, 접촉성 피부염과 같은 염증성·자가면역 질환 등의 다양한 병적 상태의 원인이 된다. 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 내적 요인에 의해 발생하는 피부 장벽 기능 저하를 야기하기 위하여 계대수를 증가시켜 피부 노화를 유도하였고, 그 결과, 피부 섬유아세포에서 노화마커의 발현이 증가하였고, 콜라겐 합성이 감소함과 동시에 상기 나열된 후각수용

체 유전자의 발현이 유의하게 증가함을 확인하였다.

[0027] 본 명세서에서 용어 "고발현"은 피부 노화에 대한 양성마커(positive marker)임이 규명된 본 발명의 후각수용체 유전자 또는 이의 인코딩 단백질 발현량이 노화가 진행되지 않은 개체에 비하여 유의하게 높은 경우를 의미하며, 구체적으로는 그 발현량이 정상 개체의 130% 이상인 경우를, 보다 구체적으로는 150% 이상인 경우를, 가장 구체적으로는 170% 이상인 경우를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 유전자의 발현량을 측정하는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이다.

[0029] 본 명세서에서, 용어 "핵산 분자"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

[0030] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머"는 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.

[0032] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산 예를 들어 상기 나열된 후각수용체 유전자의 특정 염기서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 "상보적"은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우를 모두 포괄하는 의미이며, 구체적으로는 완전히 상보적인 경우를 의미한다. 본 명세서에서 용어"실질적으로 상보적인 서열"은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.

[0033] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, pH 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 이러한 프라이머의 설계는 타겟 뉴클레오티드 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 더욱 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 나열된 각 후각수용체 유전자의 특정 염기서열에 완전하게 (perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로 (substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 타겟 서열의 3'-말단 또는 5'-말단에 상보적인 프로브를 사용하는 것이 바람직하다. 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다.

[0035] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 단백질의 발현량을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 앱타머일 수 있다.

[0036] 본 발명에 따르면, 본 발명의 후각수용체 단백질을 항원-항체 반응을 이용한 면역분석(immunoassay) 방법에 따라 검출하여 개체의 상피장벽 기능 상실 여부를 분석하는 데 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된

다양한 면역분석 또는 면역염색 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.

[0037] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14}, I^{125}, P^{32} 및 S^{35})로 표지된 항체가 이용될 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 용어 "항체"는 포유류의 면역 체계에 의해 생성된, 항원의 에피토프에 결합하는 하나 이상의 가변 도메인을 포함하여 해당 항원을 특이적으로 인식하는 면역글로불린 단백질을 의미한다. 본 발명에서 각각의 후각수용체 단백질을 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.

[0039] 본 발명의 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; 및 Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984에 상세하게 기재되어 있다.

[0040] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 강도를 분석함으로써, 상피장벽 기능을 예측할 수 있다. 즉, 개체의 시료에서 양성 마커인 각 후각수용체에 대한 시그널이 정상 시료 보다 강하게 검출되거나 음성 마커인 후각 수용체가 약하게 검출되는 경우, 개체의 피부 장벽기능이 상실되거나 저하되어 피부 노화가 진행된 것으로 판단된다.

[0041] 본 명세서에서 용어 "항원 결합 단편(antigen binding fragment)"은 면역글로불린 전체 구조 중 항원이 결합할 수 있는 폴리펩티드의 일부를 의미하며, 예를 들어 F(ab')2, Fab', Fab, Fv 및 scFv를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 명세서에서 용어, "특이적으로 결합(specifically binding)" 은 "특이적으로 인식(specifically recognizing)"과 동일한 의미로서, 항원과 항체(또는 이의 단편)가 면역학적 반응을 통해 특이적으로 상호작용하는 것을 의미한다.

[0043] 본 발명은 항체 대신 각 후각수용체 단백질에 특이적으로 결합하는 앱타머를 이용할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 "앱타머"는 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자를 의미한다. 앱타머의 일반적인 내용은 Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.

[0044] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 OR1J2(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily J Member 2), OR1J4(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily J Member 4), OR1L3(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily L Member 3), OR1Q1(Olfactory Receptor Family 1 Subfamily Q Member 1), OR2AG2(Olfactory Receptor Family 2 Subfamily AG Member 2), OR2C1(Olfactory Receptor Family 2 Subfamily C Member 1) 및 OR52N4(Olfactory Receptor Family 52 Subfamily N Member 4)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 피부 노화의 진단용 조성물을 포함하는, 피부노화 진단용 키트를 제공한다.

[0045] 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.

[0046] 본 발명의 키트에는 OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제 외에, 분석방법에 적합한 한 종류 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있으며, 어떠한 형태로든 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0047] 상기 RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너,

반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(우센), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명의 키트는 마이크로어레이 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 상기 마이크로어레이 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있으며, 본 발명의 마커를 이용하여 당업계에서 통상적으로 사용되는 제조방법에 의하여 용이하게 제조될 수 있다. 마이크로어레이 칩을 제작하기 위해서, 상기 탐색된 마커를 탐침 DNA 분자로 이용하여 DNA 칩의 기판상에 고정화시키기 위해 파이조일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting)법 또는 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 마이크로어레이 칩의 기판은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-Llysine) 및 알데히드(aldehyde)로 이루어진 군에서 선택되는 활성기가 코팅된 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 기판은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막 및 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 상기 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 키트는, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광 물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료 내에서 OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 피부 노화의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0051] 본 발명에서 발굴한 신규 바이오마커인 후각수용체 유전자 및 이를 이용하여 진단될 수 있는 피부 노화에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 이를 생략한다.

[0052] 본 발명자들은 상기 나열된 후각수용체 유전자와 피부 노화 간의 상관관계를 최초로 규명하였다. 이에, 개체 내 상기 후각수용체 유전자 또는 이의 단백질 발현량을 표지자로 하여 개체의 피부 노화 정도를 평가할 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 용어 "개체"는 각 후각수용체 유전자 또는 이의 단백질 발현량을 측정하기 위한 시료를 제공하고, 궁극적으로 피부 노화 여부의 분석 대상이 되는 개체를 의미한다. 개체는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함하며, 구체적으로는 인간이다. 본 발명의 조성물은 현재의 피부노화 정도 뿐 아니라 향후 피부노화 과정이 촉진될 유전적 위험성을 예측하기 위한 정보도 제공하므로, 본 발명의 "개체"는 피부 노화가 진행되거나 피부 장벽기능이 저하된 환자일 수도 있고 아직 피부 노화가 진행되지 않은 정상개체(healthy subject)일 수도 있다.

[0054] 본 명세서에서 용어 "생물학적 시료"는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, 상술한 후각수용체 유전자를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는, 상기 생물학적 시료는 피부조직 또는 피부조직 유래 세포를 포함하며, 보다 구체적으로는 피부 진피 조직 또는 피부 진피 조직 유래 세포를 포함하고, 가장 구체적으로는 피부 섬유아세포(dermal fibroblast)를 포함한다.

[0055] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 피부 노화 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0056] (a) OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 접촉시키는 단계;

[0057] (b) 상기 시료 내 상기 유전자 또는 상기 유전자가 인코딩하는 단백질의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,

[0058] 상기 OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전

자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량 또는 활성이 증가한 경우, 상기 후보물질은 피부 노화 개선용 조성물로 판정한다.

[0059] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 스크리닝 방법에 이용되는 세포는 피부 조직 유래 세포이며, 보다 구체적으로는 피부 표피 조직 유래 세포이고, 가장 구체적으로는 피부 섬유아세포(dermal fibroblast)이다.

[0060] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "후보물질"은 상기 나열된 후각수용체를 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 각 후각수용체 유전자 또는 단백질의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 각 후각수용체의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다.

[0061] 본 명세서에서 용어 "활성 또는 발현량의 증가"는 내적 또는 외적 요인에 의해 발생하는 내인성 피부 노화 및 피부 장벽기능 손상이 측정 가능한 수준으로 개선될 정도로 피부 노화에 대한 양성마커(positive marker)인 후각수용체의 생체 내 고유한 기능 또는 발현량이 증가하는 것을 의미하며, 구체적으로는 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 130%인 경우를, 보다 구체적으로는 150% 이상인 경우를, 가장 구체적으로는 170% 이상인 경우를 의미할 수 있으나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0062] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0063] (a) 본 발명의 조성물은 다양한 생리적 및 외적 요인으로 인한 현재의 피부 노화 정도를 평가할 뿐 아니라, 향후 이러한 피부 노화가 진행될 유전적 위험성을 높은 신뢰도로 예측함으로써 피부 노화에 대한 개인별 맞춤 치료 전략을 조기에 수립하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

[0064] (b) 본 발명의 피부 노화 개선용 조성물의 스크리닝 방법은 또한 피부 진피(dermis)의 노화에 따라 감소된 진피 섬유아세포의 콜라겐 생성을 복원하여 피부 조직의 결합력 저하, 탄력 감소, 수분 상실 및 장벽기능 손상을 가역적으로 회복시킴으로써 수분 공급과 같은 대증적 요법을 넘어서는 근원적인 피부 노화 억제제를 정확하고 신속하게 탐색할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 피부 섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 계대수에 따른 β-galactosidase의 발현 변화를 측정한 결과이다. 도 1A는 노화되지않은 일반 피부섬유아세포(Young)이고, 도 1B는 노화된 피부섬유아세포(Old)이다.

도 2는 피부 섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 계대수에 따른 β-galactosidase의 발현 변화를 정량화하여 나타낸 그래프이다. 각 값들은 평균 ± 표준오차(SEM)로 나타내었으며, 그룹 간 유의한 차이가 있는 경우 별표(*$p < 0.05$)로 표시하였다.

도 3은 피부 섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 계대수에 따른 p16 유전자의 발현 변화를 정량화하여 나타낸 그래프이다. 각 값들은 평균 ± 표준오차(SEM)로 나타내었으며, 그룹 간 유의한 차이가 있는 경우 별표(*$p < 0.05$)로 표시하였다.

도 4는 피부 섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 계대수에 따른 콜라겐의 함량을 측정한 그래프이다. 각 값들은 평균 ± 표준오차(SEM)로 나타내었으며, 그룹 간 유의한 차이가 있는 경우 별표(*$p < 0.05$)로 표시하였다.

도 5는 피부 섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 계대수에 따른 COL1A1의 발현 변화를 나타낸 그래프이다. 각 값들은 평균 ± 표준오차(SEM)로 나타내었으며, 그룹 간 유의한 차이가 있는 경우 별표(*$p < 0.05$)로 표시하였다.

도 6은 피부 섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 계대수에 따른 MMP1의 발현 변화를 나타낸 그래프이다. 각 값들은 평균 ± 표준오차(SEM)로 나타내었으며, 그룹 간 유의한 차이가 있는 경우 별표(*$p < 0.05$)로 표시하였다.

도 7은 피부 섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 계대수에 따른 후각수용체 유전자의 발현 변화를 나타낸 그래프이다. 각 값들은 평균 ± 표준오차(SEM)로 나타내었으며, 그룹 간 유의한 차이가 있는 경우 별표(*$p < 0.05$)

로 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0067] 실시예

[0068] 실시예 1: 계대수 증가에 의한 피부노화 모델 구축

[0069] 1) 피부 섬유아세포 배양 및 노화모델 구축

[0070] 실험에 사용한 피부 섬유아세포(dermal fibroblast cell line, Hs68)는 ATCC사(Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 10% 우태혈청(fetal bovine serum; HyClone, Logan, UT, USA)과 1% 항생제(페니실린 및 스트렙토마이신; Gibco)를 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium; Hyclone) 배지를 사용하여 37 ℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였다. 계대배양은 세포를 37 ℃에서 5분간 트립신 - 에틸렌 디아민 테트라 아세트산(EDTA) 용액을 사용하여 플레이트로부터 분리하여 진행되었다. 이후 세포가 포함된 용액을 15 ML 튜브에 옮겨, 5 분 동안 250 Xg에서 세포를 원심 분리 후, 상층액은 제거되고 하층의 세포는 배양배지로 부드럽게 피펫팅된 후 다시 플레이트로 분주되었다. 노화되지않은 일반 피부섬유아세포(Young)로 5계대의 세포가 사용되었고, 노화된 피부섬유아세포(Old) 모델로는 30계대의 세포가 사용되었다.

[0071] 2) β-galactopyranoside assay(SA-β-gal)

[0072] 피부 섬유아세포에서 계대수가 증가함에 따라 노화가 유도되는지 확인하기 위해, 노화되지않은 세포(Young) 및 노화된 세포(Old)를 플레이트에 시딩(seeding)하고, senescence β-galactosidase staining kit(Cell signaling technology co.)를 사용하여 β-galactosidase의 발현 여부를 확인하였다.

[0073] 3) 콜라겐 함량

[0074] 계대수가 증가에 따른 피부섬유아세포에서 탄력과 주름과 관련된 콜라겐 대사 활성을 비교하기 위해, 노화되지 않은 세포(Young) 및 노화된 세포(Old)를 24-well plate에 5ㅅ104 cell/well의 농도로 접종한 후 24시간 배양하였다. 세포를 phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척한 후 무혈청 배양액을 첨가한다. 24시간 후 시료를 처리하고 48시간 동안 배양한다. 배양액을 수집하여 측정에 사용하였다. 세포배양액 내의 콜라겐 합성 정도는 procollagen type I C-peptide assay kit(Takara Bio Inc.)를 사용하여 콜라겐의 함량을 측정하였다.

[0075] 4) RNA 추출 및 실시간 PCR

[0076] 피부 섬유아세포에서 계대수가 증가함에 따라 변화하는 피부노화 관련 유전자를 정량적으로 분석하기 위해 실시간 PCR을 이용하였다. 세포에서 RNA를 추출하기 위해 배양액을 제거하고 차가운 PBS로 세척한 다음 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 분리한 후 분광광도계(NanoQuant Infinite M200 Pro; Tecan, M㈛nnedor, Switzerland)로 RNA를 정량하였다. 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위해 역전사효소(SuperScript Ⅳ reverse transcriptase; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다.

[0077] 실시간 PCR은 사이버그린 믹스(SYBR green supermix; BioRad, Hercules, CA, USA)에 프라이머와 cDNA를 넣고 CFX Connect™ 실시간 PCR Detection System (BioRad)을 이용하여 95℃에서 10초, 58℃에서 15초, 60℃에서 15초의 과정을 36회 반복하여 수행하였으며 결과는 Bio-Rad CFX Manager 3.0으로 확인하였다. 각 유전자의 발현은 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)의 발현에 대해 표준화하여 비교ㅇ분석하였다. 검출하고자 하는 유전자 특이적인 프라이머를 제작하여 사용하였으며, 사용된 프라이머의 염기서열은 표 1에 나타내었다.

[0078]

표 1

유전자	프라이머 염기서열 (5′ → 3′)	
COL1A1	F	ACATGTTCAGCTTTGTGGACC (서열 15)
	R	TGTACGCAGGTGATTGGTGG (서열 16)
MMP1	F	AGGGGAGATCATCGGGACAACTC (서열 17)
	R	GAGAGTCCAAGAGAATGGCCGA (서열 18)
p16	F	TGCCCAACGCACCGAATAG (서열 19)
	R	CCCCTGCAAACTTCGTCCTC (서열 20)

GAPDH	F	AAATCAAGTGGGGCGATGC (서열 21)
	R	AGGGGGCAGAGATGATGACC (서열 22)

[0079] 5) 통계 분석

[0080] 모든 실험결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였고, SPSS Statistics(version 24.0, Chicago, IL, USA)를 사용하여 독립표본 *t*-검정(student's *t*-test)을 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

[0081] 실험결과

[0082] 1) 계대수 증가에 의한 피부노화 확인

[0083] 세포의 노화를 확인하기 위한 대표적인 노화마커로 β-gal 및 p16이 있다. β-gal로 표시되는 베타-갈락토시다아제(βgalactosidase)는 젖당(lactose)의 글리코시드 결합을 가수분해하여 포도당과 갈락토오스로 분해하는 효소이고, p16은 세포성장주기에 관여하여, 세포가 노화됨에 따라 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다.

[0084] 피부 섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 계대수에 따른 노화마커(β-gal 및 p16)의 발현 변화를 측정하여, 도 1 내지 도 3에 나타내었다. 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 노화되지 않은 인간 피부 섬유아세포(Young) 대비 노화된 인간 피부 섬유아세포(Old)에서 베타-갈락토시다아제(β-galactosidase)가 4~8 배 이상 유의미하게 과량발현되는 것을 확인할 수 있다.

[0085] 도 3에 나타난 바와 같이, 노화되지 않은 인간 피부 섬유아세포(Young) 대비 노화된 인간 피부 섬유아세포(Old)에서 p16의 유전자 발현이 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있다.

[0086] 즉, 계대수가 6배 증가한 노화된 피부 섬유아세포(old)에서 노화마커(β-gal 및 p16)의 발현이 유의적으로 증가한 바, 본 발명의 실험을 통해 외적인 인자의 처리없이 계대수를 통해 피부노화를 유도할 수 있다는 것을 검증하였다.

[0087] 2) 피부노화에 의한 콜라겐 유전자 감소 및 콜라겐 분해 유전자 증가 확인

[0088] 도 4 내지 도 6은 피부 섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 계대수에 따른 콜라겐 생성, 콜라겐 유전자(COL1A1) 발현 및 콜라겐분해효소(MMP1)의 발현을 측정하여 나타낸 그래프로, 이에 따르면 노화된 피부 섬유아세포(Old)는 노화되지 않은 피부 섬유아세포(Young)에 비해 콜라겐 생성과 콜라겐 유전자(Collagen Type I Alpha 1 Chain; COL1A1)의 발현이 유의적으로 현저히 낮은 것을 확인할 수 있다.

[0089] 이에 반해, 콜라겐 분해 유전자(Matrix Metallopeptidase 1; MMP1)의 경우에는, 노화되지 않은 피부 섬유아세포(Young)보다 노화된 피부 섬유아세포(Old)에서 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0090] <u>실시예 2: 피부노화에 따른 후각수용체 유전자의 발현 변화</u>

[0091] 1) 피부 섬유아세포 배양 및 노화모델 구축

[0092] 실험에 사용한 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast cell line, Hs68)는 실시예 1에서와 동일한 방법으로 배양하였고, 노화되지않은 일반 피부섬유아세포(Young)와 노화된 피부섬유아세포(Old) 모델도 실시예 1에서와 동일한 방법으로 제조하였다.

[0093] 2) RNA 추출 및 실시간 PCR

[0094] 노화되지않은 일반 피부섬유아세포(Young)와 노화된 피부섬유아세포(Old) 모델에서 후각수용체 유전자 발현패턴을 정량적으로 분석하기 위해 실시간 PCR을 이용하였다. RNA 추출 및 실시간 PCR은 실시예 1에서와 동일한 방법으로 진행되었다. 검출하고자 하는 유전자 특이적인 프라이머를 제작하여 사용하였으며, 실시예 2에서 사용된 프라이머의 염기서열은 표 2에 나타내었다.

[0095]

표 2

유전자	프라이머 염기서열 (5′ → 3′)	
OR1J2	F	TGTCACCCTCTCCACTACAC (서열 23)
	R	CTGGCACAAGACAGAATCCAAG (서열 24)
OR1J4	F	GTCACCATCCTCAAGGCTCCA (서열 25)
	R	ACCGTGTACATCACAGAGGCA (서열 26)
OR1L3	F	TTCTCTTGGGACTCTCCTCTC (서열 27)
	R	CACGAGCATCTTTGGGACTATG (서열 28)
OR1Q1	F	TTCTCTCTGCTCCACGCCTC (서열 29)
	R	TTTCCATGACGGCGAAGCAA (서열 30)
OR2AG2	F	TCTACAGCCTGAGGAATAAGGA (서열 31)
	R	GGAGGAATGGTGAGAGGCAA (서열 32)
OR2C1	F	TCAATACGTGCCTCTCCCATC (서열 33)
	R	TTCTTGGCCGGAAGCAGATAC (서열 34)
OR52N4	F	CCAAGCTCCTGCCCTACTGC (서열 35)
	R	AAGGCCTTCTGCCGAGCATC (서열 36)
GAPDH	F	AAATCAAGTGGGGCGATGC (서열 37)
	R	AGGGGGCAGAGATGATGACC (서열 38)

[0096] 3) 통계 분석

[0097] 모든 실험결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였고, SPSS Statistics(version 24.0, Chicago, IL, USA)를 사용하여 독립표본 *t*-검정(student's *t*-test)을 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

[0098] **실험결과**

[0099] 도 7은 피부 섬유아세포(Dermal fibroblast)에서 계대수에 따른 후각수용체 유전자의 발현 변화를 나타낸 그래프로, 이에 따르면 노화된 피부 섬유아세포(Old)에서 후각수용체 유전자 OR1J2, OR1J4, OR1L3, OR1Q1, OR2AG2, OR2C1 및 OR52N4의 발현이 노화되지 않은 피부 섬유아세포(Young)에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있다.

표 3

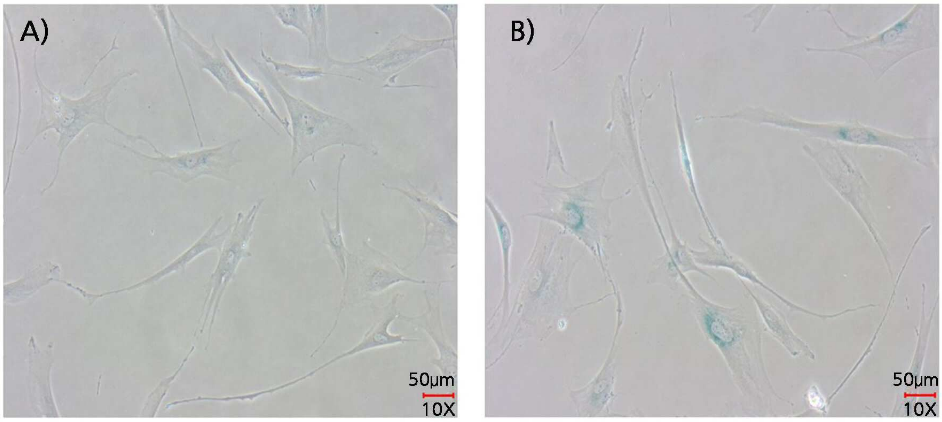
[0100] 본 발명에서 시험된 각 후각수용체의 유전자 및 단백질의 서열정보

후각수용체	서열번호 및 Genbank 접근번호	
	아미노산 서열	뉴클레오타이드 서열
OR1J2	제1서열 (NP_473448.1)	제2서열 (NM_054107.1)
OR1J4	제3서열 (NP_001004452.1)	제4서열 (NM_001004452.1)
OR1L3	제5서열 (NP_001005234.1)	제6서열 (NM_001005234.1)
OR1Q1	제7서열 (NP_036496.1)	제8서열 (NM_012364.1)
OR2AG2	제9서열 (NP_001004490.1)	제10서열 (NM_001004490.2)
OR2C1	제11서열 (NP_036500.2)	제12서열 (NM_012368.3)
OR52N4	제13서열 (NP_001005175.3)	제14서열 (NM_001005175.5)

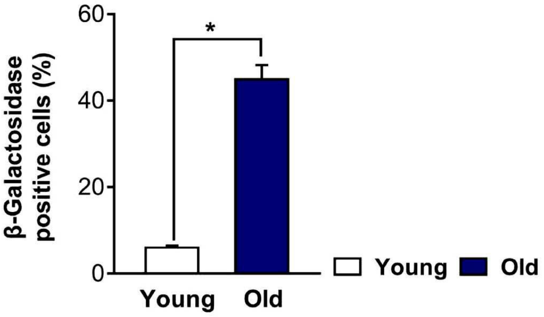
[0101] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

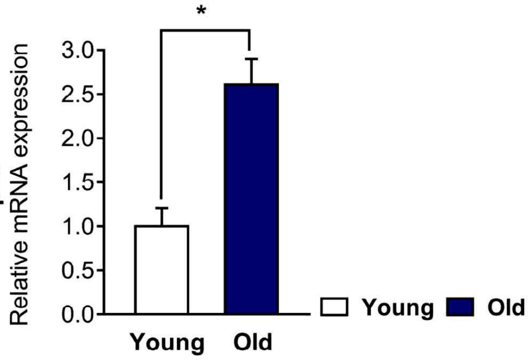
도면1



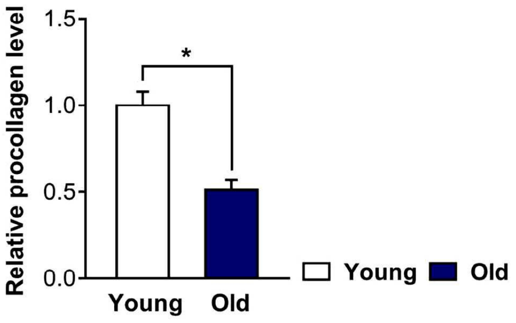
도면2



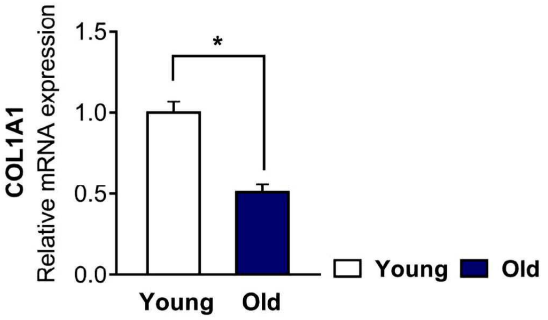
도면3



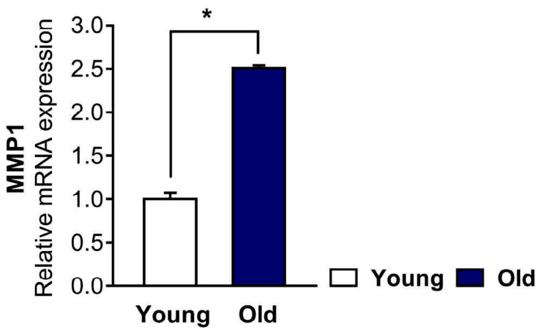
도면4



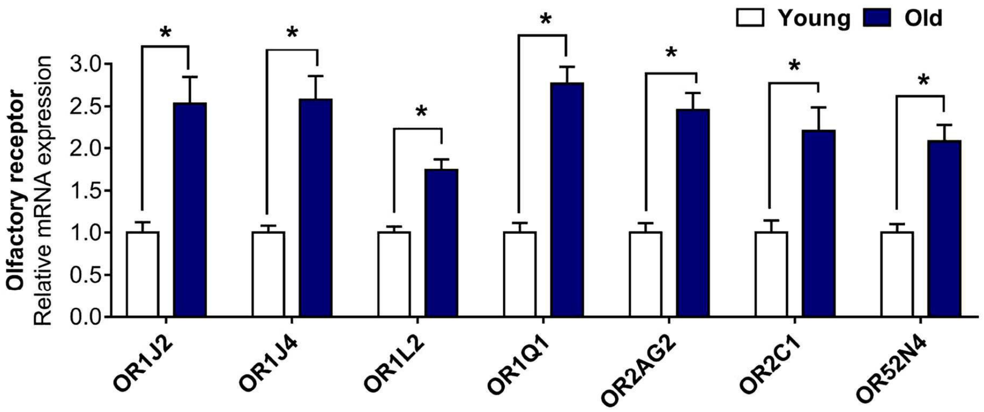
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Olfactory Receptor Genes for diagnosing Skin Aging and Use Thereof

<130> HPC10072

<160> 38

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 313

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Pro Glu Asn Gln Ser Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Arg Pro Glu Gln Gln Ala Val Phe Phe Thr Leu Phe Leu
20 25 30

Gly Met Tyr Leu Thr Thr Val Leu Gly Asn Leu Leu Ile Met Leu Leu
35 40 45

Ile Gln Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu Ser
50 55 60

His Leu Ala Leu Thr Asp Ile Ser Phe Ser Ser Val Thr Val Pro Lys
65 70 75 80

Met Leu Met Asp Met Arg Thr Lys Tyr Lys Ser Ile Leu Tyr Glu Glu
85 90 95

Cys Ile Ser Gln Met Tyr Phe Phe Ile Phe Phe Thr Asp Leu Asp Ser

100 105 110

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

Pro Leu His Tyr Thr Val Ile Met Arg Glu Glu Leu Cys Val Phe Leu
130 135 140

Val Ala Val Ser Trp Ile Leu Ser Cys Ala Ser Ser Leu Ser His Thr
145 150 155 160

Leu Leu Leu Thr Arg Leu Ser Phe Cys Ala Ala Asn Thr Ile Pro His

165 170 175

Val Phe Cys Asp Leu Ala Ala Leu Leu Lys Leu Ser Cys Ser Asp Ile

180 185 190

Phe Leu Asn Glu Leu Val Met Phe Thr Val Gly Val Val Val Ile Thr

195 200 205

Leu Pro Phe Met Cys Ile Leu Val Ser Tyr Gly Tyr Ile Gly Ala Thr

210 215 220

Ile Leu Arg Val Pro Ser Thr Lys Gly Ile His Lys Ala Leu Ser Thr

225 230 235 240

Cys Gly Ser His Leu Ser Val Val Ser Leu Tyr Tyr Gly Ser Ile Phe

245 250 255

Gly Gln Tyr Leu Phe Pro Thr Val Ser Ser Ser Ile Asp Lys Asp Val

260 265 270

Ile Val Ala Leu Met Tyr Thr Val Val Thr Pro Met Leu Asn Pro Phe

275 280 285

Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Arg Asp Met Lys Glu Ala Leu Gly Lys Leu

290 295 300

Phe Ser Arg Ala Thr Phe Phe Ser Trp

305 310

<210> 2

<211

> 939

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgagccctg agaaccagag cagcgtgtcc gagttcctcc ttctgggcct ccccatccgg 60

ccagagcagc aggctgtgtt cttcaccctg ttcctgggca tgtacctgac cacggtgctg 120

gggaacctgc tcatcatgct gctcatccag ctggactctc accttcacac ccccatgtac 180

ttcttcctca gccacttggc tctcactgac atctcctttt catctgtcac tgtccctaag 240

atgctgatgg acatgcggac taagtacaaa tcgatcctct atgaggaatg catttctcag 300

atgtattttt ttatattttt tactgacctg gacagcttcc ttattacatc aatggcatat 360

gaccgatatg ttgccatatg tcaccctctc cactacactg tcatcatgag ggaagagctc 420

tgtgtcttct tggctgtatc ttggattctg tcttgtgcca gctccctctc tcacaccctt 480

ctcctgaccc ggctgtcttt ctgtgctgcg aacaccatcc cccatgtctt ctgtgacctt 540

gctgccctgc tcaagctgtc ctgctcagat atcttcctca atgagctggt catgttcaca 600

gtaggggtgg tggtcattac cctgccattc atgtgtatcc tggtatcata tggctacatt 660

ggggccacca tcctgagggt cccttcaacc aaagggatcc acaaagcatt gtccacatgt 720

ggctcccatc tctctgtggt gtctctctat tatgggtcaa tatttggcca gtaccttttc 780

ccgactgtaa gcagttctat tgacaaggat gtcattgtgg ctctcatgta cacggtggtc 840

acacccatgt tgaacccctt tatctacagc cttaggaaca gggacatgaa agaggccctt 900

gggaaactct tcagtagagc aacatttttc tcttggtga 939

<210> 3

<211> 313

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Arg Glu Asn Gln Ser Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Pro Ile Trp Pro Glu Gln Gln Ala Val Phe Phe Thr Leu Phe Leu
20 25 30

Gly Met Tyr Leu Ile Thr Val Leu Gly Asn Leu Leu Ile Ile Leu Leu
35 40 45

Ile Arg Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro Met Phe Phe Phe Leu Ser
50 55 60

His Leu Ala Leu Thr Asp Ile Ser Leu Ser Ser Val Thr Val Pro Lys
65 70 75 80

Met Leu Leu Ser Met Gln Thr Gln Asp Gln Ser Ile Leu Tyr Ala Gly
85 90 95

Cys Val Thr Gln Met Tyr Phe Phe Ile Phe Phe Thr Asp Leu Asp Asn
100 105 110

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

Pro Leu Arg Tyr Thr Thr Ile Met Lys Glu Gly Leu Cys Asn Leu Leu
130 135 140

Val Thr Val Ser Trp Ile Leu Ser Cys Thr Asn Ala Leu Ser His Thr

145 150 155 160

Leu Leu Leu Ala Gln Leu Ser Phe Cys Ala Asp Asn Thr Ile Pro His

165 170 175

Phe Phe Cys Asp Leu Val Ala Leu Leu Lys Leu Ser Cys Ser Asp Ile

180 185 190

Ser Leu Asn Glu Leu Val Ile Phe Thr Val Gly Gln Ala Val Ile Thr

195 200 205

Leu Pro Leu Ile Cys Ile Leu Ile Ser Tyr Gly His Ile Gly Val Thr

210 215 220

Ile Leu Lys Ala Pro Ser Thr Lys Gly Ile Phe Lys Ala Leu Ser Thr

225 230 235 240

Cys Gly Ser His Leu Ser Val Val Ser Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Ile

245 250 255

Gly Leu Tyr Phe Leu Pro Ser Ser Ser Ala Ser Ser Asp Lys Asp Val

260 265 270

Ile Ala Ser Val Met Tyr Thr Val Ile Thr Pro Leu Leu Asn Pro Phe

275 280 285

Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Arg Asp Ile Lys Gly Ala Leu Glu Arg Leu

290 295 300

Phe Asn Arg Ala Thr Val Leu Ser Gln

305 310

<210> 4

<211

> 939

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgaagaggg agaatcagag cagtgtgtct gagttcctcc tcctggacct ccccatctgg 60

ccagagcagc aggctgtgtt cttcaccctg ttcttgggca tgtacctgat cacggtgctg 120

gggaacctgc tcatcatcct gctcatccgg ctggactctc accttcacac ccccatgttc 180

ttcttcctca gccacttggc tctcactgac atctcccttt catctgtcac tgtcccaaag 240

atgttattaa gcatgcaaac tcaggatcaa tccattcttt atgcagggtg tgtaactcag 300

atgtattttt tcatattttt cactgatcta gacaatttcc ttctcacttc aatggcatac 360

gatcggtatg tggccatctg tcaccccctc cgctacacca ctatcatgaa agagggactg 420

tgtaacttac tcactgtgtc ctggatcctc tcctgtacca atgccctgtc tcacactctc 480

ctcctggccc agctgtcctt ttgtgctgac aacaccatcc cccatttctt ctgtgatctt 540

gttgccctac tcaagctctc atgctcagac atctccctca atgagctggt cattttcaca 600

gtgggacagg cagtcattac tctaccacta atatgcatct tgatctctta tggccacatt 660

ggggtcacca tcctcaaggc tccatctact aagggcatct tcaaagcttt gtccacctgt 720

ggctctcacc tctctgtggt gtctctgtat tatggcacaa ttattggact gtattttctc 780

ccctcatcca gtgcctccag tgacaaggac gtaattgcct ctgtgatgta cacggtgatc 840

accccattgc tgaatccctt catttatagc ctaaggaaca gggacataaa gggagccctg 900

gagagactct tcaacagggc aacagtctta tctcaatga 939

<210> 5

<211> 324

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gly Met Ser Asn Leu Thr Arg Leu Ser Glu Phe Ile Leu Leu Gly
1 5 10 15

Leu Ser Ser Arg Ser Glu Asp Gln Arg Pro Leu Phe Ala Leu Phe Leu
20 25 30

Ile Ile Tyr Leu Val Thr Leu Met Gly Asn Leu Leu Ile Ile Leu Ala
35 40 45

Ile His Ser Asp Pro Arg Leu Gln Asn Pro Met Tyr Phe Phe Leu Ser
50 55 60

Ile Leu Ser Phe Ala Asp Ile Cys Tyr Thr Thr Val Ile Val Pro Lys
65 70 75 80

Met Leu Val Asn Phe Leu Ser Glu Lys Lys Thr Ile Ser Tyr Ala Glu
85 90 95

Cys Leu Ala Gln Met Tyr Phe Phe Leu Val Phe Gly Asn Ile Asp Ser

100 105 110

Tyr Leu Leu Ala Ala Met Ala Ile Asn Arg Cys Val Ala Ile Cys Asn

115 120 125

Pro Phe His Tyr Val Thr Val Met Asn Arg Arg Cys Cys Val Leu Leu

130 135 140

Leu Ala Phe Pro Ile Thr Phe Ser Tyr Phe His Ser Leu Leu His Val

145 150 155 160

Leu Leu Val Asn Arg Leu Thr Phe Cys Thr Ser Asn Val Ile His His

165 170 175

Phe Phe Cys Asp Val Asn Pro Val Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ser Thr

180 185 190

Phe Val Asn Glu Ile Val Ala Met Thr Glu Gly Leu Ala Ser Val Met

195 200 205

Ala Pro Phe Val Cys Ile Ile Ile Ser Tyr Leu Arg Ile Leu Ile Ala

210 215 220

Val Leu Lys Ile Pro Ser Ala Ala Gly Lys His Lys Ala Phe Ser Thr

225 230 235 240

Cys Ser Ser His Leu Thr Val Val Ile Leu Phe Tyr Gly Ser Ile Ser

245 250 255

Tyr Val Tyr Leu Gln Pro Leu Ser Ser Tyr Thr Val Lys Asp Arg Ile

260 265 270

Ala Thr Ile Asn Tyr Thr Val Leu Thr Ser Val Leu Asn Pro Phe Ile

275 280 285

Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Met Lys Arg Gly Leu Gln Lys Leu Ile

290 295 300

Asn Lys Ile Lys Ser Gln Met Ser Arg Phe Ser Thr Lys Thr Asn Lys

305 310 315 320

Ile Cys Gly Pro

<210> 6

<211> 975

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

atgggaatgt ccaacctgac aagactctct gaatttattc tcttgggact ctcctctcgg 60
tctgaagacc agaggccact ctttgccctc tttcttatca tatacctggt cactttgatg 120
ggaaatctgc tcatcatctt ggctatccac tctgatcctc gacttcaaaa ccctatgtat 180
tttttcctaa gcatcttgtc ctttgctgat atttgctaca caacagtcat agtcccaaag 240
atgctcgtga acttcttatc agagaaaaag accatttcct atgctgaatg tctggcacag 300
atgtatttct tcctggtttt tggaaacata gatagttatc tcctggcggc tatggccatc 360

aaccgctgtg tagccatttg taacccattc cattatgtca ctgttatgaa ccgcagatgc 420
tgtgtgttgc tactagcatt ccccatcact ttctcctatt tccactctct cctacatgtc 480
ctcctggtga atcggctcac cttttgtaca tcaaatgtta tccatcattt tttttgtgat 540
gtcaaccctg tgctgaaact gtcctgctcc tccacctttg tcaatgaaat tgtggccatg 600
acagaagggc tggcctctgt gatggctcca tttgtctgta tcatcatctc ttatctaaga 660
attctcatcg ctgttctcaa gattccctca gcagctggaa aacacaaagc cttctccacc 720
tgcagctccc atctcactgt ggtgattctg ttttatggga gtattagcta tgtctatttg 780

cagcctttgt ccagctatac tgtcaaggac cgaatagcaa caatcaacta cactgtgttg 840
acatcagtgt tgaacccatt tatctacagt ttaagaaaca aagacatgaa acggggctta 900
cagaaattga taaacaagat taagtctcaa atgagtaggt tctctacaaa gaccaataaa 960
atctgtggac cctga 975

<210> 7

<211> 314

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Asp Asn Ser Asn Trp Thr Ser Val Ser His Phe Val Leu Leu Gly
1 5 10 15

Ile Ser Thr His Pro Glu Glu Gln Ile Pro Leu Phe Leu Val Phe Ser
20 25 30

Leu Met Tyr Ala Ile Asn Ile Ser Gly Asn Leu Ala Ile Ile Thr Leu
35 40 45

Ile Leu Ser Ala Pro Arg Leu His Ile Pro Met Tyr Ile Phe Leu Ser
50 55 60

Asn Leu Ala Leu Thr Asp Ile Cys Phe Thr Ser Thr Thr Val Pro Lys
65 70 75 80

Met Leu Gln Ile Ile Phe Ser Pro Thr Lys Val Ile Ser Tyr Thr Gly

85 90 95

Cys Leu Ala Gln Thr Tyr Phe Phe Ile Cys Phe Ala Val Met Glu Asn

100 105 110

Phe Ile Leu Ala Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Ile Ala Ile Cys His

115 120 125

Pro Phe His Tyr Thr Met Ile Leu Thr Arg Met Leu Cys Val Lys Met

130 135 140

Val Val Met Cys His Ala Leu Ser His Leu His Ala Met Leu His Thr

145 150 155 160

Phe Leu Ile Gly Gln Leu Ile Phe Cys Ala Asp Asn Arg Ile Pro His

165 170 175

Phe Phe Cys Asp Leu Tyr Ala Leu Met Lys Ile Ser Cys Thr Ser Thr

180 185 190

Tyr Leu Asn Thr Leu Met Ile His Thr Glu Gly Ala Val Val Ile Ser

195 200 205

Gly Ala Leu Ala Phe Ile Thr Ala Ser Tyr Ala Cys Ile Ile Leu Val

210 215 220

Val Leu Arg Ile Pro Ser Ala Lys Gly Arg Trp Lys Thr Phe Ser Thr

225 230 235 240

Cys Gly Ser His Leu Thr Val Val Ala Ile Phe Tyr Gly Thr Leu Ser

245 250 255

Trp Val Tyr Phe Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Ser Val Thr Lys Gly Arg

260 265 270

Ile Ile Thr Val Val Tyr Thr Val Val Thr Pro Met Leu Asn Pro Phe

275 280 285

Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Gly Asp Val Lys Gly Gly Phe Met Lys Trp

290 295 300

Met Ser Arg Met Gln Thr Phe Phe Phe Arg

305 310

<210> 8

<211> 945

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atggacaaca gcaactggac cagtgtgtcc cattttgttc tcttgggcat ttccacccac 60

ccagaagagc aaatcccact cttccttgtt ttctcactca tgtacgcaat caatatttct 120

ggcaacttgg ccatcatcac actgattctc tctgctccac gcctccacat ccccatgtac 180

atcttcctca gtaacttggc cttgacagac atctgcttca cctccaccac ggtccccaag 240

atgctgcaga ttattttctc ccctacaaag gtaatttcct acacaggctg tttagcccaa 300

acttatttct tcatttgctt cgccgtcatg gaaaacttca tcctggctgt gatggcctat 360

gacaggtaca ttgccatctg ccaccctttc cactacacta tgatcctgac tagaatgctg 420

tgtgtgaaga tggtggtcat gtgccatgct ctctcccacc ttcatgccat gctgcatacc 480

tttctcatag gccaactaat cttctgtgca gataacagaa tcccccactt cttctgtgac 540

ctctacgctc tgatgaagat ctcctgcacc agcacctacc tcaacaccct tatgattcac 600

acagaaggtg ctgttgtaat cagtggagct ctggccttca ttactgcctc ctatgcctgc 660

atcatcctgg tggtcctccg gatcccctca gccaagggca ggtggaaaac cttttctacc 720

tgcggctccc acctcactgt ggtggccata ttctatggca ccctcagttg ggtctacttc 780

cggcccccttt ccagctattc agtgaccaag ggtcgcatta taacagtcgt gtacacagtg 840

gtgactccca tgctgaaccc cttcatctac agcctgagga atggggatgt caagggaggc 900

ttcatgaaat ggatgagcag aatgcagact tttttcttta gataa 945

<210> 9

<211> 316

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Ile Leu Asn Asp Ser Gly Ser Pro Glu Leu Leu Tyr Ala Thr Phe Thr
20 25 30

Ile Leu Tyr Met Leu Ala Leu Thr Ser Asn Gly Leu Leu Leu Leu Ala
35 40 45

Ile Thr Ile Glu Ala Arg Leu His Met Pro Met Tyr Leu Leu Leu Gly

50 55 60

Gln Leu Ser Leu Met Asp Leu Leu Phe Thr Ser Val Val Thr Pro Lys

65 70 75 80

Ala Leu Ala Asp Phe Leu Arg Arg Glu Asn Thr Ile Ser Phe Gly Gly

85 90 95

Cys Ala Leu Gln Met Phe Leu Ala Leu Thr Met Gly Ser Ala Glu Asp

100 105 110

Leu Leu Leu Ala Phe Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys His

115 120 125

Pro Leu Lys Tyr Met Thr Leu Met Ser Pro Arg Val Cys Trp Ile Met

130 135 140

Val Ala Thr Ser Trp Ile Leu Ala Ser Leu Ile Ala Ile Gly His Thr

145 150 155 160

Met Tyr Thr Met His Leu Pro Phe Cys Val Ser Trp Glu Ile Arg His

165 170 175

Leu Leu Cys Glu Ile Pro Pro Leu Leu Lys Leu Ala Cys Ala Asp Thr

180 185 190

Ser Arg Tyr Glu Leu Ile Ile Tyr Val Thr Gly Val Thr Phe Leu Leu

195 200 205

Leu Pro Ile Ser Ala Ile Val Ala Ser Tyr Thr Leu Val Leu Phe Thr

210 215 220

Val Leu Arg Met Pro Ser Asn Glu Gly Arg Lys Lys Ala Leu Val Thr

225 230 235 240

Cys Ser Ser His Leu Ile Val Val Gly Met Phe Tyr Gly Ala Ala Thr

245 250 255

Phe Met Tyr Val Leu Pro Ser Ser Phe His Ser Pro Lys Gln Asp Asn

260 265 270

Ile Ile Ser Val Phe Tyr Thr Ile Val Thr Pro Ala Leu Asn Pro Leu

275 280 285

Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Glu Val Met Arg Ala Leu Arg Arg Val

290 295 300

Leu Gly Lys Tyr Ile Leu Leu Ala His Ser Thr Leu

305 310 315

<210> 10

<211> 4224

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

atgaaacaca gcatgagggg aatatatgaa atctgaggac ctggacttaa gaactcagct 60

agaaccattc caaagcagta aggactttct cgcaaggaca gtgaatgaga gaactttgga 120

agagattcag ctcctcactt ctgcaggatc ctgccctagg ttctcagctg cctgtctgca 180

tctatctcta cttccagaga ggacttgcag tgccagtgac tggaggagcc tttgatctct 240

gatcctagag acagccatac acacacctac attcatcctg gccagaagaa gcaacttttc 300

tttctttggc ttcttgaacc tctttacctg gaagctatgc cccttcccat atgagcagag 360

cagcacttga agagtccagg tgatcaagca gcccaagaac ccagagattc tcctactgag 420

gaaagtaatc aacaacaatg agactggttt aagggagaag acagcaaaga ggttttttat 480

aaataaaatt ttaaaaactg aattggaatt ccaactacat tttaagcaga aaaatagcta 540

gatcttaaac caatccccag tatatttgtt cattgtgaag aaagagatgc tttcatctat 600

ctacaaagat gtttgcttgg gcttattctt caggatacct tatttgaagg gatttctaaa 660

tgattactat taacaacatg tcaaaatacc tgataccagt ttagctgatg gtttatttca 720

ataaaagcat tcagaaatca gaggcatact aagaaatgga aaatatatca tattatggga 780

ttcctattgg ccaatgcaca gtgacctaga acaatccaaa gctagagtga acacctttag 840

aaaagcttcc actgataata tatttggttc taggcaacta aaaaaacaca tcatggagct 900

ccggaactcc accttgggaa gcggcttcat cttggtgggg attctgaatg acagtgggtc 960

tcctgaactg ctctatgcta catttacaat cctatacatg ttggcactga ccagcaatgg 1020

tctgctgctc ctggccatca ccatagaagc ccggctccac atgcccatgt acctcctgct 1080

tgggcagctc tctctcatgg acctcctgtt cacatctgtt gtcactccca aggcccttgc 1140

ggactttctg cgcagagaaa acactatctc ctttggaggc tgtgcacttc agatgttcct 1200

ggcactgaca atgggtagcg ctgaggacct cctactggcc ttcatggcct atgacaggta 1260

tgtggccatt tgtcatcctc tgaaatacat gaccctcatg agcccaagag tctgctggat 1320

catggtggcc acatcctgga tcctggcatc cctgattgct ataggacata ccatgtacac 1380

tatgcacctc cctttctgtg tgtcctggga aatcaggcat ctgctctgtg agatcccacc 1440

cttgctgaag ttggcctgtg ctgatacctc caggtatgag cttataatat acgtgacagg 1500

tgtgactttc ctcttgctcc ccatttctgc cattgtggcc tcctacacac tagtcctatt 1560

cactgtgctt cgtatgccat caaatgaggg gaggaagaaa gcccttgtca cctgctcttc 1620
ccacctgatt gtggtcggga tgttctatgg agctgccaca ttcatgtatg tcttgcccag 1680
ttccttccac agccccaaac aagacaacat catctctgtt ttctacacaa ttgtcactcc 1740
agccctgaat ccactcatct acagcctgag gaataaggag gtcatgcggg ccttgaggag 1800
ggtcctggga aaatacatac tgctggcaca ttccacgctc tagggaagga tcatggcttg 1860
cctctcacca ttcctcctcc agataaaatt ctctactcac tcattcctgc tccaaataaa 1920
attctctact cactcattct tcaatactgt actctgagat gatagataca ttttttaaat 1980

tttactttta ttttcaactg tgaatctggt gtgtacaatg atcttgagtt aaactcattt 2040
ggcacacatc atcctgactt tggaaaccca tgttataaaa ataaccagat gggggaaaag 2100
ccttgaatgg gtgttgtaga ctcactctgt ggtaggcatc gtcctgacac attaccaagt 2160
agacatggta ggggattagc tttccatttt aacatcacat agcagtgaga agcagcagta 2220
gttttggact gaccaaattc caatagcctc tcagcatcag aggaggacta ctccctttga 2280
agcagattct taaactacta atagagggaa gaattttcag aagatatatt agacttcctg 2340
tttattaagt agatgattat ttgagcagtt agtggaaatg aataagagtt atgtgactgc 2400

atttgtactc tagacctaag ggaccttcac attggttact tgagtaatga taaataatta 2460
cattgaaaga gtgtggccag gcgcagtagc tcacgcctgt aatccaagca ctttgggagg 2520
ctgaggtggg cagatcacct gaggtaagga gttcaagacc agcctggcca acgtgtggaa 2580
cccgggtctc tactaaaaat acaaaaatga gcggggcata gttgtgggtg cctgtaatcc 2640
cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat tgcttgaccc tgggaggcgg aggtcgcagt 2700
gagctgagat cgcgccactg cactccagcc tgagcaacag agagagactc cgtttcaata 2760
aataaataaa taaatagaaa gaaagaatgg aaaaggataa agaaagatat ttctacttgg 2820

aaattttgac agtctttttg aaaatgggca tttttacatt gcctaaaatt aaaactaaaa 2880
taaagaatga ataaaataga attgaaagta ccagttttaa agtgagtaca ataacaatga 2940
gagaaatttg ttgggaatat tgtctaagtt ttttaaaatg tggacttgca gatatgtgaa 3000
tgtgttttta aacattaaaa caattgaaag aggttatatt cttgaggtga gtgtatgtac 3060
atgtgtgttt ccatagaaaa ggaagtataa aatttataat ttgctttcta gctagcctaa 3120
ataagcctta ttttttttat tctactcatc agtgtgggaa gatttatagc aaaatttggg 3180
aacttaaatt tgttgaatgc agaattccca aaatatcttg gcttacatag gtgttattat 3240

tcttgagaat agtgctttgt caaaacacaa taattcttgt tttctttata gaaataatat 3300
tacattattt aatctataaa gctaaaccat aaaaaataaa agataaagct aatctataaa 3360
attaatccaa ctttgttata aaaactgaga aaattaaaaa aattagaata aatcaaaaat 3420
cacttataaa tttttctttt ttgttgcaca tatatgcatt ttactgaatt taaatgtcca 3480
tgatgatgaa ggtcctgtgt tttttccatt tgaaatttgg tgaatcttct tccttgctat 3540
gagggaatat tttagagtag tgatgagaaa gcagaccaga gtgcccgcat ttgaatccct 3600
ctcttccttt ggtcatctat gcatctttga acgctaaatt aaactctttg taccttagtc 3660

tgctgatgtt aaaagtggtg atatttactg gcctgctctt gtgatattgt tgggtagatt 3720
aaataagata attaatatca ggtactgaga ccacagctta gtaaactgtg cttaaaacat 3780
tttggctgct atatggataa atagtaaaaa gcctttttaa aaaatcttat tttattattt 3840
ccttttagaa atgaaacatt tgtttattat ttttattgac aaaatatgta tgtcttaatg 3900
tagtaaaaca tgatgttttg aaatatgtat actttatgga attgctaaat caagccaact 3960
aacatatgct ttactccaca tacttatctt ttttgcatta ggaaaagtta aaatctactt 4020
tctcagcaat tttcaagcac acaatataat ctgattaact ataattgcca tgatctacaa 4080

taaatctctt gaacttattc ctcctgtcta actgaagttt tgtgtccttt caccagcatc 4140
tcccaaatcc ccctacctca acatttggta accaccattt tactctctgt ttctgtaaat 4200
tcagcttaca ggttctgcat ataa 4224

<210> 11

<211> 312

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Asp Gly Val Asn Asp Ser Ser Leu Gln Gly Phe Val Leu Met Gly
1 5 10 15

Ile Ser Asp His Pro Gln Leu Glu Met Ile Phe Phe Ile Ala Ile Leu
20 25 30

Phe Ser Tyr Leu Leu Thr Leu Leu Gly Asn Ser Thr Ile Ile Leu Leu
35 40 45

Ser Arg Leu Glu Ala Arg Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu Ser
50 55 60

Asn Leu Ser Ser Leu Asp Leu Ala Phe Ala Thr Ser Ser Val Pro Gln
65 70 75 80

Met Leu Ile Asn Leu Trp Gly Pro Gly Lys Thr Ile Ser Tyr Gly Gly

85 90 95

Cys Ile Thr Gln Leu Tyr Val Phe Leu Trp Leu Gly Ala Thr Glu Cys

100 105 110

Ile Leu Leu Val Val Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Val Cys Arg

115 120 125

Pro Leu Arg Tyr Thr Ala Ile Met Asn Pro Gln Leu Cys Trp Leu Leu

130 135 140

Ala Val Ile Ala Cys Leu Gly Gly Leu Gly Asn Ser Val Ile Gln Ser

145 150 155 160

Thr Phe Thr Leu Gln Leu Pro Leu Cys Gly His Arg Arg Val Glu Gly

165 170 175

Phe Leu Cys Glu Val Pro Ala Met Ile Lys Leu Ala Cys Gly Asp Thr

180 185 190

Ser Leu Asn Gln Ala Val Leu Asn Gly Val Cys Thr Phe Phe Thr Ala

195 200 205

Val Pro Leu Ser Ile Ile Val Ile Ser Tyr Cys Leu Ile Ala Gln Ala

210 215 220

Val Leu Lys Ile Arg Ser Ala Glu Gly Arg Arg Lys Ala Phe Asn Thr

225 230 235 240

Cys Leu Ser His Leu Leu Val Val Phe Leu Phe Tyr Gly Ser Ala Ser

245 250 255

Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Ala Lys Asn Ser Lys Gln Asp Gln Gly Lys

260 265 270

Phe Ile Ser Leu Phe Tyr Ser Leu Val Thr Pro Met Val Asn Pro Leu

275 280 285

Ile Tyr Thr Leu Arg Asn Met Glu Val Lys Gly Ala Leu Arg Arg Leu

290 295 300

Leu Gly Lys Gly Arg Glu Val Gly

305 310

<210> 12

<211> 1418

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ttccagcagc ttgcgctaaa tgaattcatc aagtgactga agacaaccag tgatggacgg 60
ggtgaatgat agctccttgc agggctttgt tctgatgggc atatcagacc atccccagct 120
ggagatgatc tttttatag ccatcctctt ctcctatttg ctgaccctac ttgggaactc 180
aaccatcatc ttgctttccc gcctggaggc ccggctccat acacccatgt acttcttcct 240
cagcaacctc tcctccttgg accttgcttt cgctactagt tcagtccccc aaatgctgat 300
caatttatgg ggaccaggca agaccatcag ctatggtggc tgcataaccc agctctatgt 360

cttcctttgg ctgggggcca ccgagtgcat cctgctggtg gtgatggcat ttgaccgcta 420
cgtggcagtg tgccggcccc tccgctacac cgccatcatg aacccccagc tctgctggct 480
gctggctgtg attgcctgcc tgggtggctt gggcaactct gtgatccagt caacattcac 540
tctgcagctc ccattgtgtg ggcaccggag ggtggaggga ttcctctgcg aggtgcctgc 600
catgatcaaa ctggcctgtg gcgacacaag tctcaaccag gctgtgctca atggtgtctg 660
caccttcttc actgcagtcc cactaagcat catcgtgatc tcctactgcc tcattgctca 720
ggcagtgctg aaaatccgct ctgcagaggg gaggcgaaag gcgttcaata cgtgcctctc 780

ccatctgctg gtggtgttcc tcttctatgg ctcagccagc tatgggtatc tgcttccggc 840
caagaacagc aaacaggacc agggcaagtt catttccctg ttctactcgt tggtcacacc 900
catggtgaat cccctcatct acacgctgcg gaacatggaa gtgaagggcg cactgaggag 960
gttgctgggg aaaggaagag aagttggctg agagaacact ccttcgttat ttattgcgtc 1020
ttcatctcta catgcgtttc tcattaactc tctctggcca ggtgaacatg aggaatacta 1080
attccggtaa aaccaaggca tgttcctgac agccctaagc tgacagccct aagctgttgg 1140
gaacatggtt agtgttattc gtaatgttct acacttattt accaaaaatc ctactgtgga 1200

ctaccgatag caggggagac atgttgttga gggctcagag gttattgacc tgtgacagac 1260
ctgtctcact gtctctgtct ctgttgccca catgttattt aatatgcctt atatttctgc 1320
agaattctgt acttttctaa gcaaagcacc tccacttgca gtatcttaca taatgttact 1380
ataattccat aaaatcaagc catgtattat taacttca 1418

<210> 13

<211> 321

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Leu Thr Leu Asn Lys Thr Asp Leu Ile Pro Ala Ser Phe Ile Leu
1 5 10 15

Asn Gly Val Pro Gly Leu Glu Asp Thr Gln Leu Trp Ile Ser Phe Pro
20 25 30

Phe Cys Ser Met Tyr Val Val Ala Met Val Gly Asn Cys Gly Leu Leu
35 40 45

Tyr Leu Ile His Tyr Glu Asp Ala Leu His Lys Pro Met Tyr Tyr Phe
50 55 60

Leu Ala Met Leu Ser Phe Thr Asp Leu Val Met Cys Ser Ser Thr Ile
65 70 75 80

Pro Lys Ala Leu Cys Ile Phe Trp Phe His Leu Lys Asp Ile Gly Phe
85 90 95

Asp Glu Cys Leu Val Gln Met Phe Phe Thr His Thr Phe Thr Gly Met
100 105 110

Glu Ser Gly Val Leu Met Leu Met Ala Leu Asp Arg Tyr Val Ala Ile
115 120 125

Cys Tyr Pro Leu Arg Tyr Ser Thr Ile Leu Thr Asn Pro Val Ile Ala
130 135 140

Lys Val Gly Thr Ala Thr Phe Leu Arg Gly Val Leu Leu Ile Ile Pro
145 150 155 160

Phe Thr Phe Leu Thr Lys Leu Leu Pro Tyr Cys Arg Gly Asn Ile Leu
165 170 175

Pro His Thr Tyr Cys Asp His Met Ser Val Ala Lys Leu Ser Cys Gly
180 185 190

Asn Val Lys Val Asn Ala Ile Tyr Gly Leu Met Val Ala Leu Leu Ile
195 200 205

Trp Gly Phe Asp Ile Leu Cys Ile Thr Asn Ser Tyr Thr Met Ile Leu
210 215 220

Arg Ala Val Val Ser Leu Ser Ser Ala Asp Ala Arg Gln Lys Ala Phe
225 230 235 240

Asn Thr Cys Thr Ala His Ile Cys Ala Ile Val Phe Ser Tyr Thr Pro
245 250 255

Ala Phe Phe Ser Phe Phe Ser His Arg Phe Gly Glu His Ile Ile Pro
260 265 270

Pro Ser Cys His Ile Ile Val Ala Asn Ile Tyr Leu Leu Leu Pro Pro
275 280 285

Thr Met Asn Pro Ile Val Tyr Gly Val Lys Thr Lys Gln Ile Arg Asp
290 295 300

Cys Val Ile Arg Ile Leu Ser Gly Ser Lys Asp Thr Lys Ser Tyr Ser
305 310 315 320

Met

<210> 14

<211> 1329

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

tcagtcagtc attaagaata aaaattaaaa agtcaacatc tcatctctca gatcatcagt 60
gaggaaagcc cagacaaatt ttgagctatt tcataaccta ccagacttat catgctaaca 120
ctgaataaaa cagacctaat accagcttca tttattctga atggagtccc aggactggaa 180
gacacacaac tctggatttc cttcccattc tgctctatgt atgttgtggc tatggtaggg 240

aattgtggac tcctctacct cattcactat gaggatgccc tgcacaaacc catgtactac 300
ttcttggcca tgctttcctt tactgacctt gttatgtgct ctagtacaat ccctaaagcc 360
ctctgcatct tctggtttca tctcaaggac attggatttg atgaatgcct tgtccagatg 420
ttcttcaccc acaccttcac agggatggag tctggggtgc ttatgcttat ggccctggat 480
cgctatgtgg ccatctgcta ccccttacgc tattcaacta tcctcaccaa tcctgtaatt 540
gcaaaggttg ggactgccac cttcctgaga ggggtattac tcattattcc ctttactttc 600
ctcaccaagc tcctgcccta ctgcagaggc aatatacttc cccataccta ctgtgaccac 660

atgtctgtag ccaaattgtc ctgtggtaat gtcaaggtca atgccatcta tggtctgatg 720
gttgccctcc tgatttgggg ctttgacata ctgtgtatca ccaactccta taccatgatt 780
ctccgggcag tggtcagcct ctcctcagca gatgctcggc agaaggcctt taatacctgc 840
actgcccaca tttgtgccat tgttttctcc tatactccag ctttcttctc cttcttttcc 900

caccgctttg gggaacacat aatcccccct tcttgccaca tcattgtagc caatatttat 960

ctgctcctac cacccactat gaaccctatt gtctatgggg tgaaaaccaa acagatacga 1020

gactgtgtca taaggatcct ttcaggttct aaggatacca aatcctacag catgtgaatg 1080

aacacttgcc aggagtgaga agagaaggaa agaattactt ctatttgcct cttatgcagg 1140

agttcataaa atctttctgg aagcactgta ttgatcacaa aatggagttt gttaactggt 1200

gcattctcaa taagtacctt gggaatctca acatcattgg aaggcccacc aacatttcta 1260

taaatttttt accttctcac tcatgtgaag gaccagtcta ataattaaac catattttat 1320

tcgacaaaa 1329

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COL1A1 forward primer

<400> 15

acatgttcag ctttgtggac c 21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COL1A1 reverse primer

<400> 16

tgtacgcagg tgattggtgg 20

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP1 forward primer

<400> 17

aggggagatc atcgggacaa ctc 23

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP1 reverse primer

<400> 18

gagagtccaa gagaatggcc ga 22

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p16 forward primer

<400> 19

tgcccaacgc accgaatag 19

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p16 reverse primer

<400> 20

cccctgcaaa cttcgtcctc 20

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH forward primer

<400> 21

aaatcaagtg gggcgatgc 19

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH reverse primer

<400> 22

agggggcaga gatgatgacc 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR1J2 forward primer

<400> 23

tgtcaccctc tccactacac 20

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR1J2 reverse primer

<400> 24

ctggcacaag acagaatcca ag 22

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR1J4 forward primer

<400> 25

gtcaccatcc tcaaggctcc a 21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR1J4 reverse primer

<400> 26

accgtgtaca tcacagaggc a 21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR1L3 forward primer

<400> 27

ttctcttggg actctcctct c 21

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR1L3 reverse primer

<400> 28

cacgagcatc tttgggacta tg 22

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR1Q1 forward primer

<400> 29

ttctctctgc tccacgcctc 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR1Q1 reverse primer

<400> 30

tttccatgac ggcgaagcaa 20

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR2AG2 forward primer

<400> 31

tctacagcct gaggaataag ga 22

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR2AG2 reverse primer

<400> 32

ggaggaatgg tgagaggcaa 20

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR2C1 forward primer

<400> 33

tcaatacgtg cctctcccat c 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR2C1 reverse primer

<400> 34

ttcttggccg gaagcagata c 21

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR52N4 forward primer

<400> 35

ccaagctcct gccctactgc 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OR52N4 reverse primer

<400> 36

aaggccttct gccgagcatc 20

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH forward primer

<400> 37

aaatcaagtg gggcgatgc 19

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH reverse primer

<400> 38

agggggcaga gatgatgacc 20