

(43) 공개일자 2020년07월17일

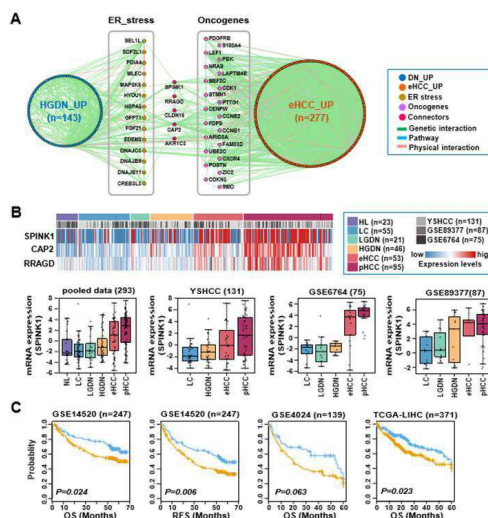
- 전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 간암 조기 진단용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 간암 초기 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서는 간암 진행 과정에서 따라 SPINK1 유전자 액손 부위의 메틸화가 감소하고, SPINK1 유전자 및 단백질의 발현이 증가되는 것을 확인한 바, SPINK1을 전암병변 및 초기 간암을 구분하는 바이오마커로 활용하고자 하며, 상기 SPINK1은 높은 정확도와 민감도를 가지는 바, 간암 초기 진단용 바이오마커 조성물, 간암 초기 진단용 조성물, 간암 초기 치료 예후 예측용 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/154 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/4704 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

지별아

경기도 용인시 기흥구 용구대로2394번길 27, 103동
503호 (마북동, 삼성래미안1차아파트)

박영년

서울특별시 용산구 이촌로 303, 23동 302호 (이촌
동, 현대아파트)

이형진

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 101동 302호

유정은

인천광역시 서구 송학로 447, 502동 1003호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1E1A1A01074733

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구

연구과제명 비암호화 및 암호화 유전자 변이 프로파일링을 이용한 간암진화 모델링 및 암화 제어기술

개발

기 여 율 25/100

주관기관 아주대학교

연구기간 2017.11.01 ~ 2022.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9B6061509

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-바이오의료기술개발사업

연구과제명 간암의 유전체-CDW 통합분석을 위한 개방형 지능형 시스템 구축

기 여 율 25/100

주관기관 아주대학교

연구기간 2017.06.30 ~ 2022.06.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9B6061512

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-바이오의료기술개발사업

연구과제명 간암의 임상-유전체 통합 DB 구축 및 신약 타겟의 기능-병리 검증

기 여 율 30/100

주관기관 연세대학교

연구기간 2017.06.30 ~ 2022.06.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B4005871

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자 지원 사업

연구과제명 간암발생에서 암줄기 세포의 조절 기전

기 여 율 20/100

주관기관 연세대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

SPINK1(serine protease inhibitor Kazal type 1), 이를 코딩하는 유전자, 엑손 부위에 메틸화된 SPINK1을 유효성분으로 포함하는 간암 조기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 SPINK1의 아미노산 서열은 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 간암 조기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 유전자의 염기 서열은 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 간암 조기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

SPINK1(serine protease inhibitor Kazal type 1) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 진단용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 제제는 SPINK1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물, SPINK1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 간암 조기 진단용 조성물.

청구항 6

제 4항 또는 제 5항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 간암 조기 진단용 키트.

청구항 7

SPINK1(serine protease inhibitor Kazal type 1) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 치료 예후 예측용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 제제는 SPINK1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물, SPINK1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 간암 조기 치료 예후 예측용 조성물.

청구항 9

제 7항 또는 제 8항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 간암 조기 치료 예후 예측용 키트.

청구항 10

- (a) 환자에서 분리된 시료로부터 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계;
- (b) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 간 전암병변 환자의 시료와 비교하는 단계;
- (c) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준이 간 전암병변 환자의 시료보다 높거나 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준이 낮은 경우, 간암 조기로 판단하는 단계;

를 포함하는 간암 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 간 전암병변은 간경변(liver cirrhosis), 저등급 이형결절(low grade dysplastic nodule) 및 고등급 이형결절(high grade dysplastic nodule)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 간암 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

(a) 치료를 시행하기 전 환자에서 분리된 시료로부터 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료와 비교하는 단계;

(c) 치료를 시행한 후의 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준이 치료를 시행하기 전보다 낮아지거나 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준이 높아진 경우, 간암 조기 치료에 효과가 있는 것으로 판단하는 단계;

를 포함하는 간암 조기 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 13

SPINK1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

SPINK1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간암 조기 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 SPINK1을 이용한 간암 조기 진단용 바이오마커 조성물, 간암 조기 진단용 조성물, 간암 조기 치료 예후 예측용 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오늘날에도 암, 특히 대다수를 차지하는 고형암(solid tumor: 혈액암을 제외한 나머지 암) 환자의 경우 5년 생존율이 50% 미만에 불과한 것으로 보고된 바 있다. 특히, 전체 암 환자의 약 3분의 2는 진행된 단계에서 발견되며, 이들 대부분은 진단 후 2년 이내에 사망한다. 이와 같이 저조한 암의 치료 효과는 단순히 치료법의 문제 뿐만 아니라, 실제 암을 조기에 진단할 수 있는 방법과 진행된 암을 정확히 진단하고 치료 후 추적 조사하는 것이 용이하지 않기 때문이다.

[0003] 한편, 간암은 간에 발생하는 악성 종양을 총칭하며, 기전에 따라서 간에 원발성으로 발생하는 간 외 장기에서 발생하여 간 내 전이된 전이 간암으로 크게 나눌 수 있으며, 암으로 인한 사망 원인 중 세 번째를 차지한다. 간암은 상당히 진행되어서야 증상이 나타나는 질환으로, 이로 인해 적절한 치료 시기를 놓치는 경우가 빈번하고, 치료를 하는 경우에도 예후가 극히 나쁘다. 이러한 현실을 고려하였을 때 간암의 조기 진단 및 예후를 예측할 수 있는 기술은 간암 치료의 가장 현실적 대안이고 차세대 간암 진료의 가이드라인이 될 수 있다.

[0004] 간암의 조기 검진을 위한 검사로는 초음파 검사와 알파태아단백의 혈중 농도 측정이 주로 시행되고 있으나 실제로는 이들 검사는 간암의 크기가 작은 경우 민감도가 낮아 간암 조기 진단에 실패하는 경우가 많으며, 컴퓨터 단층 촬영법 또는 자기공명영상은 초음파 검사에 비해 정확도가 높은 편이나 간편성 및 비용면에서 비실용적이다. 따라서 현재까지는 간암을 조기에 정확하게 발견해 낼 수 있는 바이오마커가 개발되지 않은 실정이다.

[0005] 최근에는 DNA 메틸화 측정을 통하여 암을 진단하는 방법들이 제시되고 있다. 특정 유전자의 과메틸화 및 저메틸화는, 그 유전자의 발현을 차단(gene silencing) 또는 활성화(gene activation) 하는 것으로 알려져 있다. 이는 생체 내에서 유전자의 기능이 소실되거나 활성화되는 주요 기전 중 하나로, 인체 암에서 다수의 종양 억제

유전자(tumor suppressor genes)의 기능소실 및 발암유전자(oncogene)의 기능 활성화의 원인으로 해석되고 있다. 따라서 암과 관련된 유전자의 메틸화를 분석하는 것은 암 연구에 큰 도움이 된다.

[0006] 특히, 암의 진행과정 중에 침윤과 전이를 억제하는 종양억제 유전자들에 메틸화가 발생하는 경우, 또는 발암유전자에 저메틸화가 발생하는 경우는, 유전자의 발현 기능을 조절하여 그 결과 암의 발생과 진행을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.

[0007] 이에, 간암을 조기 진단할 수 있는 특이성과 민감도가 향상된 바이오마커의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1704533호 (2017.02.02 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 간암 조기 진단용 바이오마커 조성물, 간암 조기 진단용 조성물 또는 간암 조기 치료 예후 예측용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 간암 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법 또는 간암 조기 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 간암 조기 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 간암 조기 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SPINK1(serine protease inhibitor Kazal type 1), 이를 코딩하는 유전자, 엑손 부위에 메틸화된 SPINK1을 유효성분으로 포함하는 간암 조기 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 SPINK1(serine protease inhibitor Kazal type 1) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 진단용 조성물, 또는 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 간암 조기 진단용 키트를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 SPINK1(serine protease inhibitor Kazal type 1) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 치료 예후 예측용 조성물, 또는 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 간암 조기 치료 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 (a) 환자에서 분리된 시료로부터 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 간 전암병변 환자의 시료와 비교하는 단계; (c) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준이 간 전암병변 환자의 시료보다 높거나 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준이 낮은 경우, 간암 조기로 판단하는 단계;를 포함하는 간암 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 (a) 치료를 시행하기 전 환자에서 분리된 시료로부터 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료와 비교하는 단계; (c) 치료를 시행한 후의 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준이 치료를 시행하기 전보다 낮아지거나 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준이 높아진 경우, 간암 조기 치료에 효과가 있는 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 간암 조기 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 SPINK1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 간암 조기 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에서는 간암 진행 과정에서 따라 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화가 감소하고, SPINK1 유전자 및 단백질의 발현이 증가되는 것을 확인한 바, SPINK1을 전암병변 및 조기 간암을 구분하는 바이오마커로 활용하고자 하며, 상기 SPINK1은 높은 정확도와 민감도를 가지는 바, 간암 조기 진단용 바이오마커 조성물, 간암 조기 진단용 조성물, 간암 조기 치료 예후 예측용 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 간암 진행 과정에 따른 SPINK1 유전자의 발현 변화 및 SPINK1 유전자의 발현에 따른 간암 환자의 생존율을 확인한 결과이다.

도 2는 간암 진행 과정에 따른 유전자의 발현 변화 및 메틸화와의 상관관계를 확인한 결과이다.

도 3은 간암 진행 과정에 따른 SPINK1 유전자 엑손1 부위의 메틸화 변화 및 SPINK1 유전자 발현과 메틸화와의 연관성을 확인한 결과이다.

도 4는 외부 데이터를 이용하여 간암 조직과 정상 조직에서 SPINK1의 메틸화 정도를 확인한 결과이다.

도 5는 간암 진행 과정에 따른 SPINK1 단백질의 발현 변화를 확인한 결과이다.

도 6은 간암 세포주를 이용하여 SPINK1 유전자 발현과 메틸화와의 연관성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명의 발명자들은 간암 진행 과정에서 따라 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화가 감소하고, SPINK1 유전자 및 단백질의 발현이 증가되는 것을 확인한 바, SPINK1을 전암병변 및 조기 간암을 구분하는 바이오마커로 활용이 가능함을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

[0022] 본 발명은 SPINK1(serine protease inhibitor Kazal type 1), 이를 코딩하는 유전자, 엑손 부위에 메틸화된 SPINK1을 유효성분으로 포함하는 간암 조기 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0023] 상기 SPINK1의 아미노산 서열은 서열번호 1로 표시되는 것일 수 있다.

[0024] 상기 유전자의 염기 서열은 서열번호 2로 표시되는 것일 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 SPINK1(serine protease inhibitor Kazal type 1) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 체제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 진단용 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 체제는 SPINK1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물, SPINK1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0028] 상기 메틸화는 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이셀라이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의해 수행될 수 있으며, 상기 생물학적 시료는 혈액, 소변 또는 생검조직으로부터 얻어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 간암 조기 진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는 간암 조기 진단용 키트를 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 SPINK1(serine protease inhibitor Kazal type 1) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 체제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 치료 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0033] 상기 체제는 SPINK1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물, SPINK1 유전자에 특이

적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

- [0035] 또한, 본 발명은 상기 간암 조기 치료 예후 예측용 조성물을 유효성분으로 포함하는 간암 조기 치료 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 (a) 환자에서 분리된 시료로부터 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 간 전암병변 환자의 시료와 비교하는 단계; (c) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준이 간 전암병변 환자의 시료보다 높거나 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준이 낮은 경우, 간암 조기로 판단하는 단계;를 포함하는 간암 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0038] 상기 간 전암병변은 간경변(liver cirrhosis), 저등급 이형결절(low grade dysplastic nodule) 및 고등급 이형결절(high grade dysplastic nodule)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0040] 또한, 본 발명은 조기 간암과 간 전암병변을 구분하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라 조기 간암과 진행성 간암을 구분하는데 사용될 수 있다.
- [0041] 즉, (a) 환자에서 분리된 시료로부터 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 진행성 간암 환자의 시료와 비교하는 단계; (c) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준이 진행성 간암 환자의 시료보다 낮거나 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준이 높은 경우, 간암 조기로 판단하는 단계;를 포함하는 간암 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0042] 조기 간암 또는 진행성 간암은 현재까지 개발되어 사용되어 온 대표적인 간암의 병기체계인 BCLC(Barcelona Clinic Liver Cancer) 분류에 기반하여 구분될 수 있다. 상기 BCLC 분류에서는 간암을 기대되는 치유도에 따라 병기의 완치를 기대할 수 있는 단계(stage A: Early HCC), 불완전하지만 치료 효과를 기대할 수 있는 단계(stage B: Intermediate, stage C: Advanced HCC), 객관적인 치료 효과를 판단하기 어려운 단계(stage D: End stage HCC)로 구분한다. 구체적인 특성을 살펴보면, Early HCC 종양의 유형은 뚜렷한 혈관 침윤을 보이지 않는 단일 종양으로 3 cm 미만 크기의 3개 이하의 종양이 이에 해당되며, 신체활력도를 나타내는 PS(Performance Status)는 무증상인 0, 간기능 상태는 Child A-B 등급, Okuda stage(빌리루빈 농도, 알부민 농도, 복수 유무 및 종양의 단면적의 4가지 인자로 분류되는 병기임)는 I-II에 해당된다. 간암의 병변이 진행된 상태인 Intermediate HCC 종양의 유형은 다결절형의 특성을 보이며, Child A-B 등급 및 Okuda stage I-II에 해당되고, Advanced HCC 종양의 유형은 신체활력도가 저하 상태인 PS1-2이며, 혈관 침윤 및 간 이외의 다른 장기의 전이를 나타내는 특징을 갖는다. 한편, End stage HCC 종양의 유형은 신체활력도가 무력한 상태인 PS 3-4, Child C 등급 및 Okuda stage III에 해당된다.
- [0043] 본 발명에서는 실시예 5와 같이, 간암 조직에서 SPINK1 단백질의 발현 수준을 확인하기 위해 면역조직화학 분석을 수행하였으며, 실험에 사용된 간암 조직 시료는 총 171개로 병변에 따라 간경병증(LC, n=30), 저등급 이형결절(low grade dysplastic nodule; LGDN, n=30), 고등급 이형결절(HGDN, n=30), 조기 간세포암종(eHCC, n=40) 및 진행성 간세포암종(pHCC HCC, n=41) 군으로 나누었다. 조직에서의 SPINK1 단백질 발현은 semiquantitative 방식을 사용하였다. 즉, 마커의 발현에 따라 0-1-2-3 등급으로 나누어 점수를 매겼으며, 그 결과, 간암 초기인 eHCC의 시료에서 SPINK1의 발현이 관찰되기 시작하였으며, 진행성 간암 pHCC으로 진행됨에 따라 SPINK1 단백질의 발현이 점차 증가하는 것을 확인하였다.
- [0044] 즉, 본 발명에서는 시료로부터 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자의 메틸화 수준을 측정하여 간암 조기 진단에 필요한 정보를 제공할 수 있으며, 더불어 조직병리학 검사를 수행함으로써 간암 조기 진단의 정확성을 극대화시킬 수 있다.

- [0046] 또한, 본 발명은 (a) 치료를 시행하기 전 환자에서 분리된 시료로부터 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준, 또는 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료와 비교하는 단계; (c) 치료를 시행한 후의 SPINK1 단백질 또는 SPINK1 유전자의 발현 수준이 치료를 시행하기 전보다 낮아지거나 SPINK1 유전자 엑손 부위의 메틸화 수준이 높아진 경우, 간암 조기 치료에 효과가 있는 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 간암 조기 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0048] 또한, 본 발명은 SPINK1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0049] 상기 SPINK1 단백질의 발현 억제제는 SPINK1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)일 수 있고, 상기 SPINK1 단백질 활성 억제제는 SPINK1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 또는 천연물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0051] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0055] 또한, 본 발명은 SPINK1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 간암 조기 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.
- [0056] 상기 SPINK1 단백질의 발현 억제제는 SPINK1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)일 수 있고, 상기 SPINK1 단백질 활성 억제제는 SPINK1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 또는 천연물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0058] 본 발명의 조성물이 건강식품 조성물인 경우, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보

호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0059] 또한, 상기 건강식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, 식품첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0060] 상기 식품첨가물공전에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0061] 이때, 건강식품 조성물을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 조성물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

[0063] 이하에서는 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.

[0065] 실시예 1: 간암 시료 준비

[0066] 메틸화 분석에 사용된 간암 조직 시료는 총 32개로 병변에 따라 간경병증(liver cirrhosis; LC n=6), 고등급 이형결절(high grade dysplastic nodule; HGDN, n=11), 조기 간세포암종(early HCC; eHCC, n=9) 및 진행성 간세포암종(progressed HCC; pHCC, n=6) 군으로 나누었다.

[0068] 발현 분석에 사용된 간암 조직 시료는 총 131개로 병변에 따라 간경병증(LC, n=30), 고등급 이형결절(HGDN, n=28), 조기 간세포암종(eHCC, n=30) 및 진행성 간세포암종(pHCC, n=43) 군으로 나누었다.

[0070] 실시예 2: 외부 데이터 획득

[0071] 메틸화, 발현 및 생존 분석을 검증하기 위해 TCGA 및 GEO 웹 사이트로부터 외부 데이터를 획득하였다(Accession No: GSE89377, GSE6764, GSE25097, GSE14520, GSE44970, GSE60753, GSE73003, GSE4024, GSE87630 및 GSE65373).

[0073] 실시예 3: 유전자 발현 분석

[0074] 3-1. RNA 시퀀싱

[0075] 간암 조직 시료에서 Total RNA를 추출을 위해 Total RNA 추출 키트(TRIZOL RNA Isolation Reagents, Life Technologies, Carlsbad, CA)를 사용하였으며, RNA의 integrity는 bioanalyzer(Agilent RNA 6000 Pico Kit, Agilent, Santa Clara, CA)를 이용하여 확인하였다. mRNA에 대한 시퀀싱 라이브러리는 TruSeq RNA 샘플 키트(Illumina, San Diego, CA)를 이용하여 제작하였으며, 시퀀싱은 Illumina HiSeq2000으로 100 bp의 paired end(2 X 100)로 수행하였다. 이미지 데이터는 FASTQ 형식으로 저장되어 서열 중 30 phred score 미만이거나 어댑터 서열은 trim_galore를 이용하여 제거한 후, Tophat을 이용하여 인간참조유전체인 hg38에 매핑을 수행하고 cufflinks를 사용하여 유전자의 발현 값을 얻었으며, 발현 값은 분석을 위해 log2로 변환하였다.

[0077] 3-2. 발현 분석

- [0078] 간암 조직 시료에 특이적으로 발현하는 유전자들을 선별하기 위해 본 발명의 데이터와 외부 데이터인 GSE89377(n=87)과 GSE6764(n=75)를 이용하여 총 293개의 데이터를 구축하였다. 간암이 진행되면서 변화하는 유전자를 선별하기 위해 각 군마다(예를 들어, HGDN vs. LC, eHCC vs. HGDN, pHCC vs. eHCC) permutation T-test를 수행하여 p 값이 0.05 이하이고, 군 간의 차이가 0.3 이상인 DEG(differentially expressed genes)를 확인하였다.
- [0079] 그 결과, 상기 DEG 중에서도 지속적으로 발현하거나 발현이 저해되는 유전자로 SPINK1, CAP2, RRAGD 유전자를 확인하였다(도 1B). 상기 세 개의 유전자는 이미 네트워크 분석을 통해 connector로 확인된 유전자였다(도 1A). 이중 SPINK1의 발현이 다른 두 유전자들보다 큰 발현 변화를 보이는 것을 확인하였다. 간암이 진행됨에 따라 SPINK1 유전자의 발현이 점점 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 본 실험에서 뿐만 아니라 외부 데이터(GSE6764, GSE89377)를 통해서도 검증되었다(도 1B). 또한, SPINK1의 발현과 생존 분석을 확인한 결과, SPINK1 발현이 높을수록 생존율이 감소하는 것을 확인하였다(도 1C).
- [0081] **실시예 4: 메틸화 분석**
- [0082] 4-1. methylation beadchip 분석
- [0083] genomic DNA 추출 키트(DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 32개의 간암 조직 시료로부터 각 genomic DNA를 추출하고, EZ-96 DNA 메틸화 키트(Zymo Research Corporation, Orange, USA)를 이용하여 genomic DNA에 바이설파이트(bisulfite) 변형을 수행한 후, Illumina Infinium HD 메틸화 프로토콜에 따라 genomic cDNA를 증폭하였다. 이후 효소를 이용하여 절단한 후, Human CpG 마이크로 어레이(Infinium Human Methylation 450 BeadChip)에 하이브리다이제이션(hybridization) 시켰다. 하이브리다이제이션 후, 일련의 세척 과정을 거친 다음, Illumina scanner를 이용하여 스캐닝하였다. 메틸화의 신호 값은 스캐닝한 이미지 파일인 idat 파일을 이용하였다.
- [0085] 4-2. 메틸화 분석
- [0086] 이미지 파일인 idat 파일을 RnBeads의 R 패키지 라이브러리를 사용하여 각 프로브들의 메틸화 값을 가져오고, R 패키지 라이브러리 'liftOver'를 사용하여 인간참조유전체 hg38로 주석 처리를 진행하였으며, batch effect는 empirical Bayes 방법인 라이브러리 'combat'을 사용하여 값을 보정하였고, 성 염색체에 위치하고 있는 프로브와 3개 이상의 시료에서 missing value를 가진 프로브들을 걸러 내었으며, 나머지 missing value의 경우 라이브러리 'impute'를 실행하였다.
- [0088] 진행성 간암에 특이적으로 메틸화 되어 있는 프로브를 선별하기 위해 두 가지 방법을 이용하였다. 첫째는 간암이 진행되면서 변화하는 프로브를 선별하기 위해 각 군마다(예를 들어, HGDN vs. LC, eHCC vs. HGDN, pHCC vs. eHCC) asymptotic one-way Fisher-Pitman permutation test를 수행하여 p값이 0.001 이하이고, 군 간의 차이가 0.1 이상인 DMP(differentially methylated probe) 595개를 확인하였다. 다음은 메틸화와 유전자 발현과의 상관분석(correlation analysis)을 수행하여 메틸화와 상관관계가 있는 48개의 프로브를 확인하였다(도 2).
- [0090] 두 가지 방법 모두에서 나온 프로브를 확인한 결과, 하나의 프로브만이 겹치는 것을 확인하였다. 단 하나의 프로브는 cg04577715(SPINK1)인 것을 확인하였으며(도 3A), 이를 간암 진단을 위한 메틸화 바이오마커로 확보하였다. 간암이 진행됨에 따라 상기 SPINK1 프로브의 메틸화가 점점 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 본 실험에서 뿐만 아니라 외부 데이터(GSE44970)를 통해서도 검증되었다(도 3B). 상기 cg04577715 프로브는 인간참조유전체(Human reference genome; GRCh37)를 기준으로 염색체 5번 147,211,181에 위치하고 있으며, 이는 첫 번째 엑손 부위에 위치하고 있다. 또한, SPINK1 발현과 SPINK1 메틸화와의 상관관계를 분석한 결과 negative correlation으로 SPINK1의 발현이 SPINK1 메틸화에 영향을 받는 것을 확인하였다(도 3C).
- [0092] 또한, 외부 데이터를 이용하여 간암 조직과 정상 조직 간의 SPINK1의 프로브를 확인한 결과, 정상 조직에 비해

간암 조직에서 메틸화 발현이 낮은 것을 확인하였다(도 4).

[0094] 실시예 5: 면역조직화학 분석

[0095] 간암 조직에서 SPINK1 단백질의 발현 수준을 확인하기 위해 면역조직화학을 수행하였다. 실험에 사용된 간암 조직 시료는 총 171개로 병변에 따라 간경병증(LC, n=30), 저등급 이형결절(low grade dysplastic nodule; LGDN, n=30), 고등급 이형결절(HGDNe, n=30), 조기 간세포암종(eHCC, n=40) 및 진행성 간세포암종(pHCC HCC, n=41) 군으로 나누었다.

[0096] 조직 표본의 제작은 검체의 고정, 육안 검색 후 병소 부위를 절취한 다음, 파라핀 블록 제작을 위한 탈수, 투명, 침투, 포매 과정 후에 박절, 염색 과정으로 진행되었다. SPINK1의 항체(antibody) (마우스 단일 클론, 4D4, ABNOVA, Taipei, Taiwan)를 1:50으로 희석하여 사용하였으며, 조직에서의 SPINK1 단백질 발현은 semiquantitative 방식을 사용하였다. 즉, 마커의 발현에 따라 0-1-2-3 등급으로 나누어 점수를 매겼으며, 그 기준은 다음과 같다(0, 5% 미만의 세포; 1, 5-10%, 2, 11-50%, 3, 51-100%의 종양 상피 세포).

[0097] 그 결과, 간경병증, 저등급 이형결절, 고등급 이형결절에서는 SPINK1 단백질의 발현이 관찰되지 않았으나, 간암 이 초기인 eHCC에서 SPINK1 단백질의 발현이 관찰되기 시작하고 진행성 간암 pHCC으로 진행됨에 따라 SPINK1 단백질의 발현이 점차 증가하는 것을 확인하였다(도 5).

[0099] 실시예 6: 세포 및 시약

[0100] 실험에 사용된 간암세포주(Huh7, Hep3B 및 HepG2)는 한국 세포주 은행 (KCLB)에서 구입하여 10% 우태아혈청 (FBS), 100 U/ml 페니실린 및 100µg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다. 웨스턴 블롯 (western blot)에 사용된 anti-DNMT1(DNA methyltransferase 1) 항체는 Cell signaling Biotechnology(Danvers, MA, USA)에서, anti-β-actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Dallas, TX, USA)에서, 탈메틸화 시약(demethylating agent)인 5-aza-deoxycytidine와 ER 스트레스 유도제인 타프시가진 (thapsigargin), 튜니카마이신(tunicamycin) 및 디티오프레이톨(dithiothreitol)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0102] 실시예 7: SPINK1 발현 및 SPINK1 메틸화의 상관관계 분석

[0103] 7-1. 실시간 qPCR

[0104] RNeasy 키트(Qiagen, Venlo, Netherlands)를 사용하여 간암세포주인 hepG2, Hep3B 및 Huh7 세포주로부터 RNA를 추출하였으며, PrimeScript RT 키트(Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 mRNA를 cDNA로 역전사 시켰다. PCR은 Ssoadvanced Universal Supermix(Bio-Rad)가 장착된 CFX96 Real Time PCR Detection System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 각 시료에 대해 적어도 3회 반복 실험을 수행하였으며, 상대정량을 통해 값을 분석하였다.: 평균값의 $2^{-\Delta \Delta CT} \pm S.D$ (표준 편차). 프라이머의 서열은 하기 표 1 과 같다.

표 1

Gene	5' primer	3' primer
SPINK1	5'- CCTTGGCCCTGTTGAGTCTA -3'	5'- TAGAAGTCTGGCGTTTCCGA -3'
GRP78	5'- GTGGTAGTGCAAGCTGAAGG -3'	5'- TTCAGCCAGTTGCCCATCTA -3'
β-actin	5'- TGGCACCCAGCACAATGAA -3'	5'- CTAAGTCATAGTCGCCTAGAAGCA -3'

[0108] 7-2. 유전자 발현 구조물(constructs) 및 렌티바이러스 벡터 형질주입(transfection)

[0109] DNMT1 유전자가 간암세포주(HepG2, Hep3B, 및 Huh7)에 들어가서 영구적으로 발현하는 세포주를 구축하는 방법

은 다음과 같다. 먼저, DNMT1 발현 벡터 (Addgene 구입)를 렌티바이러스 벡터인 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro에 클로닝한 후(System Biosciences, Mountain View, CA, USA), 렌티바이러스 벡터를 형질주입 시약(Invitrogen, Waltham, MA, USA)인 Lipofectamin 3000 사용하여 293TN 세포(System Biosciences)에 감염시켰다. 293TN 세포는 다시 간암세포주에 감염시키는데 사용되었으며, DNMT1 유전자가 들어있는 세포를 확인하기 위해, selection drug인 푸로마이신을 1주 동안 처리하여 세포를 선별하였다.

[0111] 7-3. 웨스턴 블롯

[0112] 세포 용해물(lysates)을 만들기 위해, 세포를 high salt lysis buffer[20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1% Triton X-100, 2 mM EDTA 및 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]에서 용해시키고, 얼음에서 20분 동안 방치한 다음 세포의 잔해(debris)를 제거하기 위해 20분 동안 원심분리하였다. 총 20 μ g의 세포 용해물을 사용하여 SDS-PAGE를 수행하였으며 단백질을 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 이동시켰다. 이후, 막을 1차 항체와 함께 4° C에 밤새 반응시키고, 세척 과정을 거친 후, 퍼옥시다아제가 결합된 2차 항체(PIERCE, Rockford, IL, USA)와 함께 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 단백질의 신호를 강화하는 화학-발광 검출 키트(PIERCE)를 사용하여 필름으로부터 단백질 발현 정도를 확인하였다.

[0114] SPINK1 발현과 DNA 메틸화와의 관련성을 조사하기 위해, 간암세포주를 이용하여 DNMT1 유전자가 발현된 세포주를 구축하고 SPINK1의 발현을 확인하였다. 그 결과, RT-PCR 분석 결과에서 DNMT1 유전자가 발현된 세포주의 경우 벡터와 비교해보면, SPINK1의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 6A). 또한, 탈메틸화 시약인 5-aza-deoxycytidine의 처리는 간암 세포주에서 SPINK1 발현을 증가시키는 것을 확인하였다(도 6B). 이러한 결과는 SPINK1 발현이 DNMT1-의존 DNA 메틸화에 의해 조절된다는 것을 의미한다.

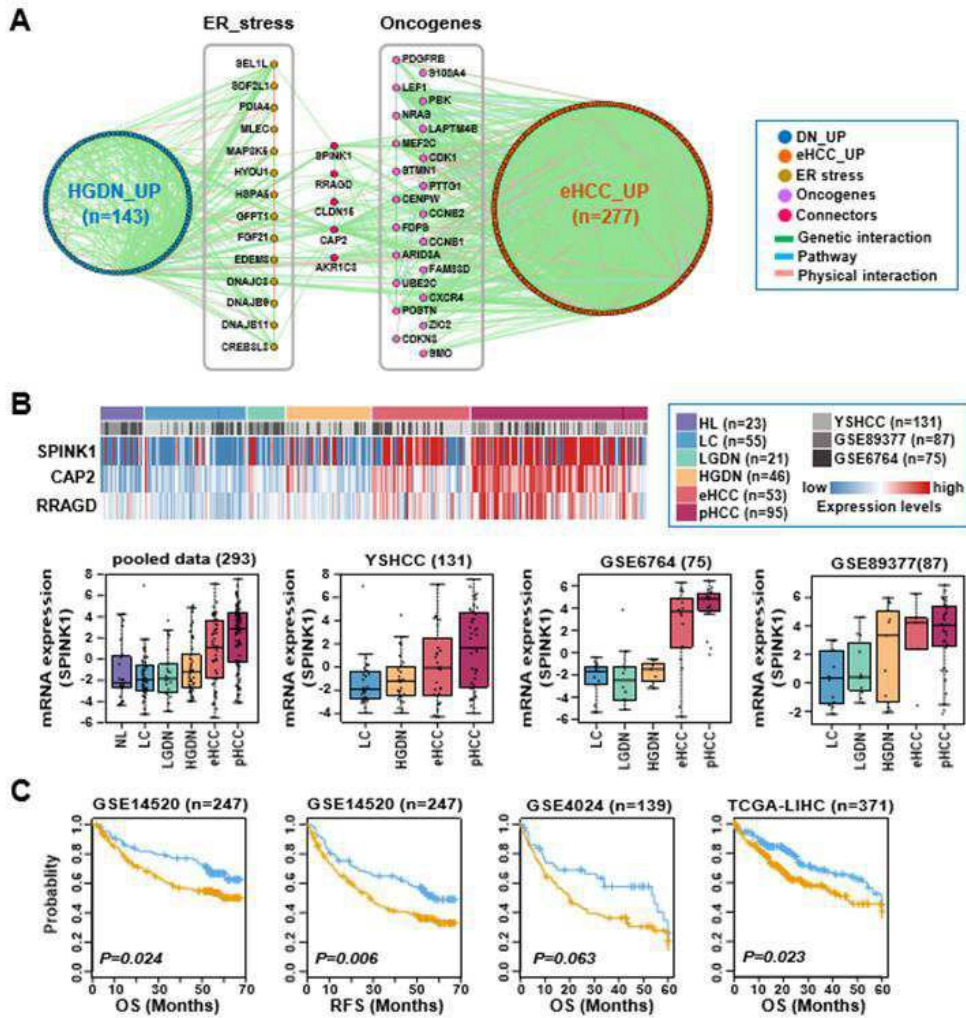
[0115] 또한, 네트워크 분석을 통해, HGDN 군의 ER 스트레스가 eHCC 군에서 종양유전자(oncogene)의 활성을 촉진하는 것으로 제시되어짐에 따라, ER 스트레스가 DNMT1-의존 DNA 메틸화를 조절함으로써 SPINK1의 발현을 유도할 수 있는지를 평가하였다. ER 스트레스 유도제로 알려진 타프시자진, 튜니카마이신 및 디티오프레이톨을 처리한 결과, 웨스턴 블롯 결과에서는 간암 세포주에서 DNMT1의 단백질 발현이 감소하는 반면 RT-PCR 결과에서는 SPINK1 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 6C).

[0117] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

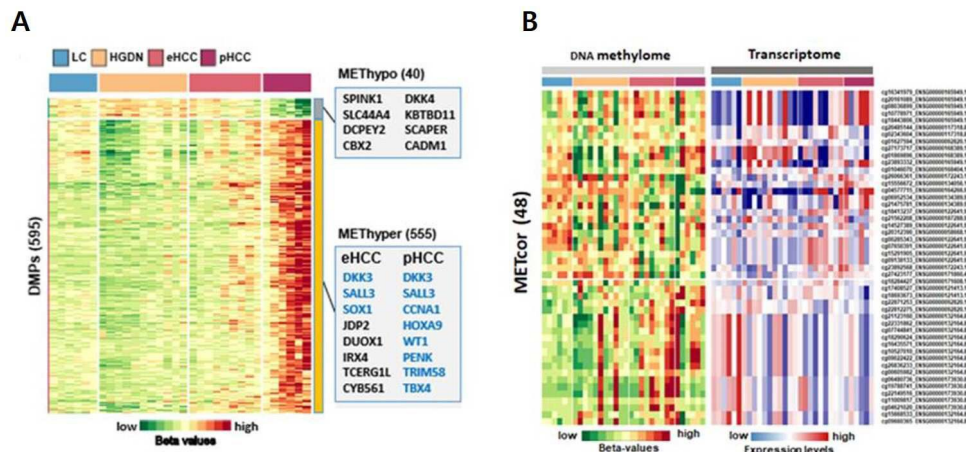
[0118] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

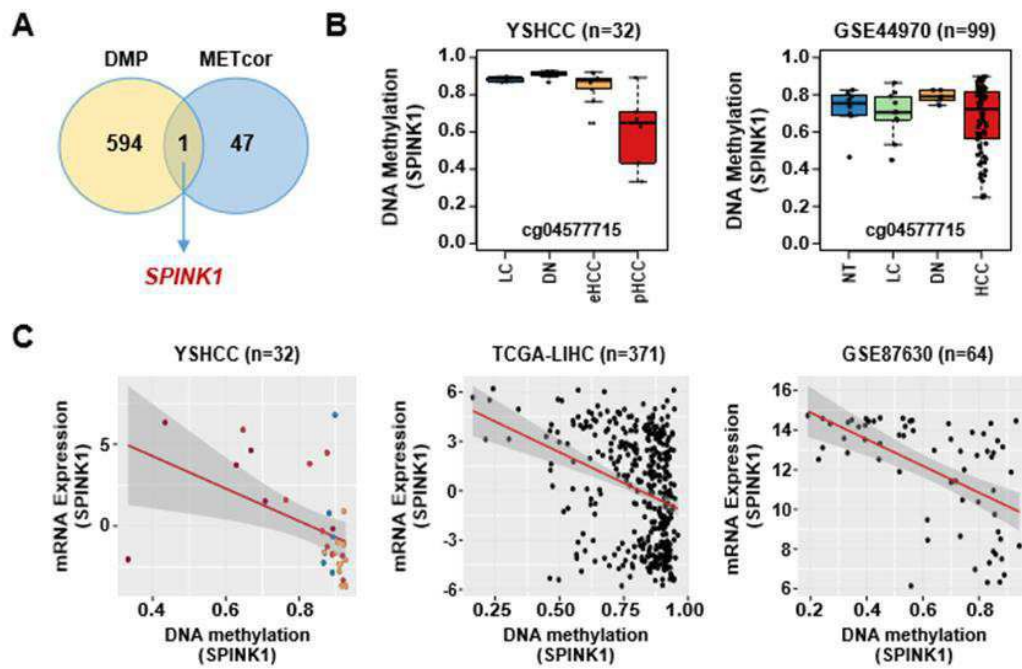
도면1



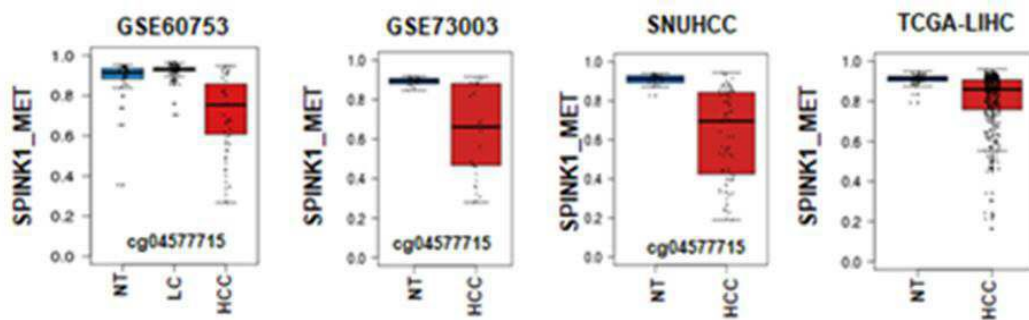
도면2



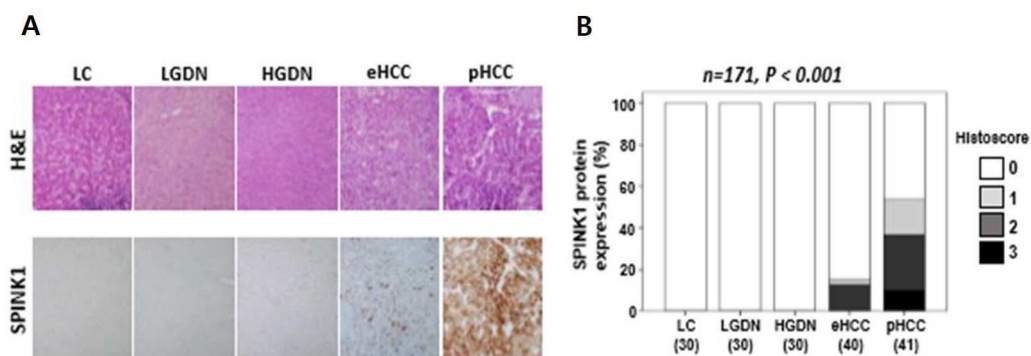
도면3



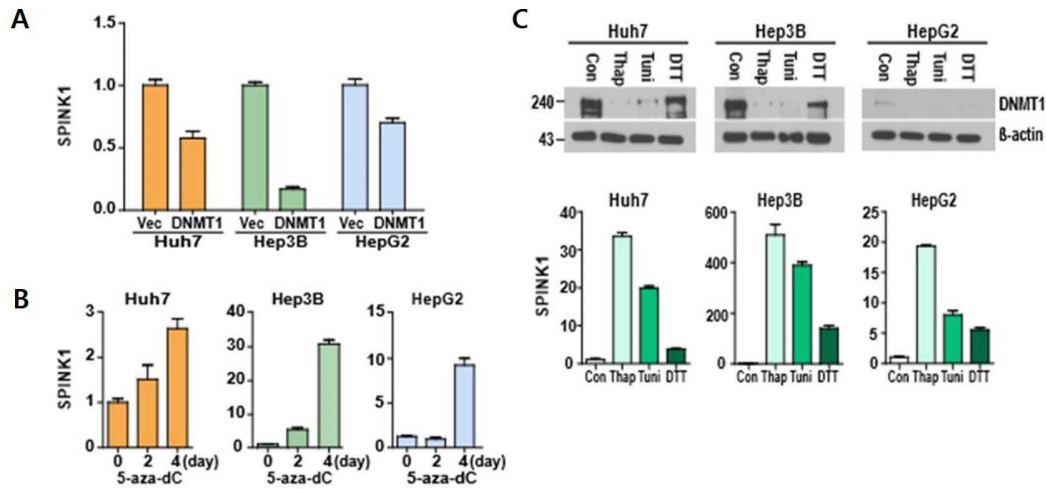
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Biomarker composition for early diagnosis of liver cancer
- <130> ADP-2018-0512
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 79
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Lys Val Thr Gly Ile Phe Leu Leu Ser Ala Leu Ala Leu Leu Ser

1 5 10 15

Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ala Asp Ser Leu Gly Arg Glu Ala Lys Cys

20 25 30

Tyr Asn Glu Leu Asn Gly Cys Thr Lys Ile Tyr Asp Pro Val Cys Gly

35 40 45

Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro Asn Glu Cys Val Leu Cys Phe Glu Asn

50 55 60

Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln Lys Ser Gly Pro Cys

65 70 75

<210> 2

<211> 21652

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tatctgagaa tggcagcaaa gagagtatcc atcctccata atatattgga gctcactaaa 60

ggtaataata aaatgtggca actgggggttg agatggagat aatgtggcta aactggataa 120

aactgagagg atggaaaaaa ttgcagaggt cacctgttca tcataacagc caagaatgga 180

agcaattagg ggactgactt cttggattta ggcagtaatt ttttgttatt ttggtcttga 240

ttgtgcattt gatgaatttc tcaaccttct acccacaact ttattctaca gctcctttta 300

cctcaagtgg gaagcaagtg ttcttgcttc ttacttgatt tcagctttag catcctcatc 360

tgaaagtgta caggatcaac tggaggacct ctgcagtatt ttagagcagc cttaatattg 420

gataaatcat tgittgactc agttgctttt gccactctt ttcaagggtc tggcgctgta 480

ctaaactcaa ttataattcc tctctcttga gacagaggtc tccaggctga gttaactgtt 540

tctgatacct cctattagct tgttcccgat acctcctatt agcttgttcc ctctcacttt 600

acaagggtt aattagccat tataggagac tctttccaaa tgcaggcttt gcaaaatgat 660

tagtgctatg ggccgtactt caaaaataaa attgcattta ggataatttt ctcataattt 720

aaaatgttac ttcatgata aaaaataata caggaaaaca ttcttattgc ttcaaaaaat 780

ccaaactgta ctacacagtg aaattactgc ttgactctga cccaattata ttcaagcctt 840

ctgttaataa ccatttgcaa tgttttatac ataaatggga tcacctctga acttatttat 900

ttcacaatac aacatggggc tctttaatgt aagcaggtaa agatctgaga ataaggtaat 960

aatttttaaa cacaatttta cttggttcag tcatttactt ttaagaacc tactatgtgt 1020

ttggcacatc atttactttt taaagacctt tgatctacta ggtactggga aaaggaagct 1080

gcagactctg cattccaggg acctcctgtt tcacatggaa agctataata gaagctattc 1140

agcggtagtg ggaacacaaa ggagagcctg attgattagg tctcaaagtg tccaagagtt 1200

tccaaaaaca gaactgagga ccctagaacg aatgcagctt actgggtaaa cactctcttt 1260

gggaatgatt aagtctttct cactgtctaa aatctgtctc tttcctgaaa gatatttggc 1320

aaacctaca cattgcatat ttectagaac agaatttgcc catttttaat cctaagttaa 1380

catactattc attcaatgaa aataagcctt tttaaagtac tttgtgataa gtactatgct 1440

agcttctgta gcagccataa agatatataa aaccaaattg cccccctaaa gaagcattac 1500

atttattagg gggatataaa ctgtaaaaca aatacacaac tcaaaaaaaaa aacaaaatct 1560

ttgcatgcta gagcctacaa agtagctcca ctgttcaca aggaaatacc atacagatgt 1620

atcctaaaac cctttcactg tgaactttga tggaactttg aaaaagactc agatgttcag	1680
cagatctaata ttaaagggtc atatgaaaat atgtctggaa aaaattaaag ttaacgagga	1740
cctctggctc cttatcaaat ataaaaggag acaactgggt ggcatatagc ctccaaatca	1800
ttcatcctta gtcagcttca gagattctga gccctgacca cgctattttc tcatttacat	1860
tgaaataccc tgaaatgctc cattctgtcc tcccagttca ggctcccaat agttaacatc	1920
aaattatttc tcacctacca atgttccctc ccaattgtaa tccattcaaa tccccaccaa	1980
aacaatattc ctaaaataca gctttgatca ggtaactcgt aactctcctg ctttaagtac	2040
ttcgctatgt gtcctttata tgataagtga agcccaaatt ttgtagcctg gtattcaagc	2100
aagacccttt ccaatctggt ttgtagaatt tggttttcct ccttattctc tgactgcata	2160
tgcttcattt aagcaccaaa acttggggaa aggccatata tcattcactt tcacattctc	2220
ctcactacta gtagatactt aagggatgtt agacatatata aaaggttttc tataagcttg	2280
aggctctctt tactgctcgt atccactcct gcatgcattg aatgttaagt ccaactgttca	2340
caacagtaaa agaaatagca agtttcccggt gtaaaagaag cccaagttgc tcacaatgta	2400
atcagaacaa tgatgcacce ctttttctcc ttttctgac ttacagttgg tttcctactc	2460
ctgcttgctg ccaagtaaac tacttgtctt gagctttgca ttggagaggc gtgggggaga	2520
gttgattcaa attaagttaa ttgttttctt ttctacccc gattttctaa cataatttat	2580
atctgtgaat tgataacaat tcacatagca ttttcaaaaa cttatttcat tgcattcaaa	2640
ctattaatgt ctaaaaagcc atcacatttg ttttacaat gaagacactg tgggttaattg	2700
ccattgtgaa gatcacataa ttattcattc aatatagttt attcagagtc tgctaccatg	2760
tggtcagcac actacggaaa tacatagaaa gattttctaaa cccatgtttt aatgggaagg	2820
ggcagctgat aaaaagaagtc ttctcagaat agctgaaatt taaactgaga tacagatgaa	2880
tttgttcata agtaaggagt aaatcacaaa ggatctctta tgcaatgcta gggatttgca	2940
ttttatcata attgcaaaaa ggaattttta gtaaggtagt tgcaggatta aactgggaat	3000
agggaggcca aagggtacaa agttatacag atgaaaaagt ctagatatcg gccaggcacg	3060
gtggctcatg ccgttaattc cagtactttg ggaggccgag gcaggtggat cacaaggtca	3120
ggagttaag accagtctgg ccaacatggt gaagcccat ctctactaaa aatacaaaaa	3180
ttagccgggc attgtggcgg gtgctgttaa tcccagctac tcgggaggtt aaggcaggaa	3240
aatctcatga acccaagagg cggaggttgc agcaagccaa ggttgacca gtgcattcca	3300
gactgggcga cagagcagaa ctccgtctcc aacaacaaca aaaaaaagtc tgaatatcta	3360

acatacagca tgaaggactat aattaataat atttcattgt ataccagaaa ttttctaaga	3420
gagtagacag atgttaagca ttcttatcat ttttttaaaa aaggtaacaa tgtgagatga	3480
tgaatgtgtt aattagcttg actgtagtag tcgtttaact atgtatataa aaacatgttg	3540
tacaccttaa aatatataac aatttttaaa tgttttctta aaacatatat attatatata	3600
tatatatata tagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagagt tgagcatctc	3660
gtagtgccca aaaacaaaat tttcaacaaa caaaataaac aaaaaataaa agtatgtcaa	3720
agtgctatag gagccagtc t gaaagctcac ccaatggaat gaccaaact ggaacaattt	3780
gaccacaaa ataaatagtg tattattgaa ttataacca aatattaaat acatattcac	3840
gagactttgt acttctctat ctcaatattt atactgatat aaatcctttt ctaagiaca	3900
gaatatatca ataaagagaa agagacatat gtctcttata gaggaatttg aaatggttta	3960
tggagatact ctgttctcaa agagttgaag cttaactcct cattcccaa tgtgggctgc	4020
acttactggc ttcttccaa ataattgggct atgaaaagg ggtcaaaatt agttttatag	4080
ttgagaaaca ccacctggac cagatgataa agtttagcat cacgggtgat gtcataataa	4140
tagcatgtat ccataatate tgatgagaaa ggtatctgat ctctttaatt tagaggttct	4200
ttccccaat ccctaactcc agtctactca tgagaaaaac atttttaaaa aattgagga	4260
tatttgaaaa aatactgac tactcctcaa aactgtcca ggtaatgaaa aacgaggaat	4320
aactgatttt ccttaatat ttctaacttg tgacagaaga gactaaggac aatcagttat	4380
tttttccac atttaattgt tgtgttttct tagtctgttc tgtcacagat cagagagact	4440
aaggaaacac aatcactaaa tgtgatgtta taccctagat gagatcctgg aacaggaaaa	4500
gaatactagt ggaaaaacta ctgaaatcac agtgaagtat agtgtttaat taatggtaat	4560
atgccagtgt ttgttttgta gttttgaaaa atgtaccag gtaatgtaa atgttaagaa	4620
tagggaaaac tgggttaggg atatccatac attttctgta caaactttac aattttttga	4680
caaatctaaa actatcctaa aatactttca tatttttaaa atagcaggat gcaatgaaca	4740
gttaggcaac ttcaacaagt tgataatcat ctgaatggag gaagaatcag caaaacaaat	4800
atggagatag agtcaagtag gtttaacgtg gtttgatgac tgatatgatt tgactgtgtc	4860
cccacctaag tctcatcttg aattgtagtt ccataatcc ctatgtgtca tgggaggac	4920
ccagtgggga ggtaactgaa tcatgggtgt ggttaccctc atgtgttct tgtgacagt	4980
agtaagttct cacaaggtct gatagtttta taagggactt ttctccctt tgctcaatac	5040
ttctccttgc tgcigccatg tgaagaagga tgtgtttgct tctccttctg ccatgattgt	5100

aagtttcctg aggcctcccc agccatgtgg aactgtgagt caattaaacc tctttccttt	5160
ataaagtacg cagtccttggg tatgtcttta ttagcagtat gagagcagac taatccagtg	5220
actatgttag gggaaatagg aggctgggtga gggaaagagg agacagggat cacagtgttg	5280
gtgagaggca gatcaagtca tcaatccagg tcctctccct cttcaggacc atgagatgga	5340
tagcctatag caagtaggag agaccatggg gaaccgtggg ggaatactgt aggcctagag	5400
tgatggaaga tgaatagaaa gatgaatgta gatgaaagat gaattaggaa agttgatgat	5460
ggattagatc aagagccatg gaaaagcaaa gaacaagacc ccaggagact ctaaaccaaa	5520
gatttgaaat aatggctatg ctctcaagag aactggagaa atttgggaaa gaagaattgt	5580
taaaaataa tcagatatat ttataaagt ataaaagttt gaaatgatat cagggcatta	5640
tatggaaatg tttcacagta cagtgaagcc aactagagtc tggagacata tacaacacat	5700
ctagaaaagt gagaaaaagt aaaaaagatc atatgaattg gcaagaataa attcattaat	5760
aagacataag aggttttggtt aagagtatgg gaccagaagc cagaatctac tgaaattgtt	5820
tttatgatct tcatacactc tcctcttgc tatagttgtt ccacagcatt ctatatctcc	5880
ttatctgaaa tgtggttatt cattaattga cctttgtcc ccagatatac actactacct	5940
ttagctacag aattcttctt tgattttcat aggttacaag aaacatttgt ttttcttcc	6000
agtaaacacg tttctcaact ggatgcttcc ttgtcttatg tttgaacatt tagttaatga	6060
ttgctgtagg ggatcagtc cagattgaga gaagagcaaa gcttctggaa aacgagactt	6120
agaggctcat cagtgaaaa agctgatggg aggcattcat aaaactcttg tgggtccaag	6180
acaggtggcc tccaacacgg atggcttgtc cctgtaagaa aagttaatgt ggctgggcac	6240
agtggctcat gcctgtaatc ccagcacttt gtggggccga ggcggttgga tcacctgagg	6300
tcaggagtgc gagaccagcc tggccaacat ggtgaaaccc cctctccact aaaaatacaa	6360
aaattagcca ggtgccacgg tgcttgctg tagtcccagc tactcaggag gctgaggcag	6420
gagaatcact tgaaccggga agacagaggt tgcagtaagc tgagatcatg cactgcact	6480
ccagcccagg tgacagagtg agactccatc ccaaaaaaga aagaaagaaa gaaagaaaga	6540
aagaaagaaa gaaagaaaga aagaaagaaa gaaagaaaga aaagaagtta atgtaagagc	6600
agtttcagaa atttctata aattgaacat acaataagga aagattacac caatataagg	6660
aaagagaaag ggcacgtagt tgatcccaaa ttgacatga gccaccatat ggcagcaata	6720
gtagaagtag gcacaggcac ttattaaccc cttgttgtcc tgggtgagc tatgagcctt	6780
atgcaaaggc attatcctct taattcctca taacaactct gtgaagtatc tacaggtcca	6840
cagtccttaa ttcatcttt caaacccac agagggttt gttttgttt tgtttgttt	6900
cagaagtttt tctttgttt cttttgtta ctatttgac agcaaatct gtcaagagat	6960

gatttaagga taattatttt cctacatga tacgttttgc agaagaatta ttggtgtatt	7020
tgattaaagg gtgctgtgcc aggcaccact gggctttctg aactgcacat ataacttttc	7080
aaaaatttac aaaaaaatt tgaattttta aacccatcca gcctgagggt atttagagga	7140
aaaattatga aaattgaggg tcataaatat gaagtttagc tcaaagttac acataggttt	7200
gaactgaggt ctgtcattct gcaaagatta gactttcaat cattaaatga catgctggaa	7260
atgttattat ctttacagct ggcaccagaa tttatttttag ggaaagaact gtcttttttg	7320
ggaaaatc ctgaaaagaa cttgttagat atggtatctc cagagccaag gtgtcatctg	7380
tttctgttct agacaaggaa agaaactggg tgtttcattc ctggctggag agagtagaaa	7440
agagaatgaa gatggagtaa catacatttg taagtttggc tactgcttgg cgggaaatga	7500
ccaagaaaga ctccagtta agagtagtta taaagtctga catgttttta aaatatattg	7560
ttgcctagtg tgtgatgcaa ttctttgcaa tcttattaaa gtctactatg cccacaaatg	7620
cttagaaggc atggatttcg cacatattat cagggtgccac tggatctaac agtgtacttg	7680
actgtgtaga taaaaggcca tgacatccag gagtttagta aaggagacaa ataagaaaaa	7740
tgaaaaatta gaatttccag tttaaagtgc tgaacagag acgtttaagt gcagggttta	7800
catagacgag ggggcaaccc tttcttttg gcagtattaa attaagaatc ctggtttctt	7860
ggagttaaat ccaatgttct aaccatgaca ttaagtttgt acacacacac acacacacac	7920
acacacacac acacaaatca gtaataacca tatctgttaa tctgttacca ggaacaagaa	7980
aactgaaatc tctgtgcttc agtttccttt cttataaaag agaaataaca atgatatcag	8040
gattaaaatg atgaaaataa aatactgcag tgactgatga atagaagctt ttgaaaaata	8100
ttagtagtgg ctataatgat aatgatgagg aggaggatgt aatcaatgta attattaagt	8160
gatagcttta caaactgcta tgagaggcaa aggaaagtga gtaaatcttt cctaattgca	8220
tcaagcacca cagacatttt acccaagctg tagaggatgg gtacagcaaa taggtacaca	8280
tgcaacctat ttggagaaca agcagtggaa taaaaacaag aggtcattta tgaaaagcca	8340
tgaagttccc taaataatga aaaataaaaag ttgaagaatt aagttgcagc tatgtcaagg	8400
aggtctccaa atgtcaagga ggtctctaaa tataataagc tgtatatctc tagtttctgt	8460
catttttttc ttactagtta aactttgggc acagaatgtg aaaatcaaca ggtgccagcc	8520
caatacccc attccaacat gtattatcaa catccattag agcagttctc ttgagttttg	8580
tcatcactct ttactcaggt gaataattag tccttgaatc agaggggagt aggtcataat	8640
atgtttactt gagttccaa agatagacat gcataaatat gtactcagag cagtaaagaa	8700
gaaaaggaaa aaatgtacac aaggttgagc aatgtaaaca cattcaatat gactaatagt	8760
ctagcacggt ggcaggattt ctctggtcaa tgcactctc atctcccggg gcaacaata	8820

tttattctgt caagaattga ttgtatgagg cctcagtata ttttctattg ttctaattca	8880
tggaaggagg gtgatattat tactagctag caattataat tcctggacat gtgaggaata	8940
atatttttgc acaatattta cttatggttt cttggtttat tctcacacca aatgaacact	9000
glatgatgtg tatttttgta gttgagaaaa ctgttttgcc cactcatgtc acagttgaaa	9060
tggcagattht ataattggag acaggccccct ttctccatgg gtttttttta tcctctttaa	9120
cttgttgtct gcaaagggcc attccctatc acaaatthtag ggccagthtt taactagaat	9180
tcactcttagt attgtatgta tttaaaaaac aagattgtct aggggccata ggatatgttt	9240
ctgtatgtaa atgttttttc taatcacaga ttaggattgg caaactggga tggaatagaa	9300
taaaaaaatc tatcaagagt cctcacatat aataagactg ttttattttt taacaactgt	9360
atttgtctgc tcacatatct acatataatg catatgctag gccataactc aaaattttta	9420
ctttaggthc acagtcaaaa tgttttaaaaa gcactgtttg gtgaaaaaag tccaggtttt	9480
ggcatcaggc aggcctaaat ctaaagttat tactgtctgt attattatct aatgagthtc	9540
tgtgaccaga tccagccaa ttcccttctc cccacactgc ttgtgagacc caagaaaaaa	9600
atccttttct catatatgaa ctttctttaa cagtggtht tggaagthtc ttactggtca	9660
caaaactact atttaataa tgatttgaga tgaaaagaac caatatattt tcactcaaa	9720
tcaaatcaaa tatgatccaa ccaacatcta tcaatgctaa gactaaactc catgagggca	9780
gacatcatat ccatttccct agcactcagc caaaaatttt tgtatagtaa ggacttgatg	9840
aatatttgaa tatattaata gttgaatgaa taaaaggccg aatggtgaac caatgaatgg	9900
ctactcaacc ggaggcccg gagacacaga agtgaacaag gcataaacct tggthtctag	9960
aaatatatac atttatcact taatttatgt ttttagcaaa tattatttta gtatcaacta	10020
ttttccagac actttgttag gtgctacaat aaataaagca actgtattta ctccctaaaa	10080
ataaagatat tacataataa tcgtatgaat agctatagag ttggaattat tttaatgca	10140
atgaagggtt ttatgaagat cgtacaatag gaggaataa tctagatgca gaaagaagta	10200
aaggaagacc cagaaagaat ggcttcttga gaaaatacca cttaaccttt taaccttaga	10260
aggtgaaaag ctgttttgta ttattttgtt ttgttggtcc tagtaaaggg taacagagaa	10320
atgaccaacg tagcaaggaa atgaccagat tgagcaagga agaathcttt ggggaataaa	10380
gatagaaagg agccaagthc tacaggacct aaattcttcc tgagcattct gaacaatgag	10440
aaactggaca gatcatgat caaatttgca gtccataaag atccctatgg gcctthctat	10500
gggcagcagc ttttaaggaa aaataacaac aaatattgag aaactctttg caggaaatgc	10560

agaaaccag ggggaaagga tggcattgtc ttagatatga cagtgggaagc taatgagaag	10620
tgtccaggat tgaggttatt ttgaacatga atccaagaag agaacttggt agcaaattaa	10680
gtgtggaaga tgatgcatag aaaggggaaa gggaaatatac agggagaaca acgaggtttg	10740
ggcttgagt atctactgga aagaaaagaa gctgtaggga gaatagagac aaaaatattg	10800
tggtgaaaga tcaaaatagt agtatggaac atattagatt tgaggtagct gtaaacatc	10860
caaatagtga ttcaagaac taaacacttc caaagcttcc ctttgataaa aaccaaagtc	10920
cttactctag actgcactag atttagacc tcactgcttc cattatttca tctccattt	10980
tgcctctat cactttgtc aagccagagt gtcctcctgg atgtttctca aacatgtcaa	11040
accagcgtca gcctcagaac ctttgcgtt actattctct ctgtctggaa tgcacatcct	11100
tggaataaat gcatagtcca aatcctcatt tccttcatgt ctctgtgtga tatcacctga	11160
aaagcaagac ctctctgat tacgtatga tacatatctc cttaaccctc cagcaccctt	11220
atccttcttg tccttttctc cataatattt atctgatata ttttataatc acttattatt	11280
ttttgtcact tgccctcctc aacaaaaagg caatggaagc tccatgaaga cagagattgt	11340
tatttttatt tactgatctg tcttaagaga taaatacagt tcttgtcatg acttggaag	11400
ggtttgagat ttatcctac ttggaagcta agaagttagc ctgccacatt ataatggttt	11460
ctggcagaag gcacagactc ctggctcaga gaaaaggac ttaattatc catagcaaca	11520
gccagagtat tggaatttgt tctggtttcc caagcccaa tttccacagg ccaatttaag	11580
gggcatcaag tgatagtgc agggaaagta cagtgtgtta aaggaaagaa aggccaagct	11640
tttaaaaacc cgaatcttt tgtaagggc aattaacatg gtctttgccc tagaaggaga	11700
tattaacttt attacactaa acagtaaaca aacctgcctt ttggtgcaga gggagacatt	11760
acgtattttc taaggctgtt tgttatataa acaccctaa aaagatagtc tgaaacaaag	11820
gttatcagta ccttactca taagacacac caaaacatga gagaggatgg agaattctct	11880
tctaataaca catggtagat atccagcaca tattctcttt taccagcac atattctcag	11940
atgaaagagt aacctttga attaggtgtt attattattt taatttcag atgaatacac	12000
agaagcacag caaaagtggc tccaacaagc acctctagc tccagaatac acgctttagg	12060
gaactgagtc ctctctctc cttgctttct cttccctct catctgccac tccatcagct	12120
actttaggtt ttgtgaatga gtgagggaaa aatagagaaa agagaaagaa gaataagaaa	12180
ggaagagtgg aggaaaggaa aaaagaatgg agaggtttta ccctacttgg aataaaattc	12240
tttctagtag ctatccatac ctgctcatct atccagaact acagagtaga agggatcttt	12300
gagttcatct tacaggtgag aaaacaggct tgagaaggga atgactttcc cacaaccaca	12360
gagggagtta gggatcaaac taaccactag aactattttc ctgacagaat ctttgccttg	12420

catgtttcag gccacactgg ctcttttcac ctttcttaca caggtgacat tcccagaacc	12480
tggaggccag gctatgacac agagtcaatc aataaccagg gagatctgtg atatagccca	12540
gtaggtgggg ccttgctgcc atctgccata tgacccttcc agtcccaggc ttctgaagag	12600
acgtggtaag tgcggtgcag ttttcaactg acctctggac gcagaacttc agccatgaag	12660
gtaacaggca tctttcttct cagtgccttg gccctgttga gtctatctgg taagtgttgc	12720
atatttttca aatttaaata aaactgtttt gacctgttgc tttgtgaagc acattatctt	12780
ctagactttt gatgtagtct agtcttcgag agatgttttg gacctaatga gatgaaataa	12840
aatcaacagg taagaattat tttttaagag gaatttttaa cctactataa ggaaaacaat	12900
tctactagta agaaattccc agaaataaaa tggttttcct ctattgatgt ggctgacctt	12960
ttgttgggat atggtagaga aaaaagggtt aaaatatatt aactttaagt atacttctca	13020
ttctgtaaat gtgtaaggcc aaattacaaa ttttaaattc tcatgggatt gcataaaata	13080
gataaatggc ttccagttaa tcagtataaa aggcataatt tgactgatta aaaatttatt	13140
tttttattgt ataggtttca gtgtacttga atcatgtata gttgtcaga tttatccctg	13200
aatagcta atatgtgata taaagggaat tttttatttt caattcctgg tatttcttat	13260
tagtatctgg aaatacaaaa attgcatttt gtgtatttac attacacatt ttgaatgttt	13320
tgaaagaaaa tattctgctt gaatagatgg tgcacatata cctccaactg catcttgaca	13380
atgttgacag acaactctga acccgagag ccaagatcag tttccttttt atcactggaa	13440
atggttaaca ttttcaactt cacctctcat gtagtgaagg atcctgtgga gagccaaatc	13500
agcactttgc taagaagagg aagaatattg tttgttttat ttgctgaata tttatggcaa	13560
cagtcagtgt tccctttccc cctctcatg catgttaatt aatacaaata gatgcctgtg	13620
atgagacct gctcttcagt ttttagactc aactagattc taaaagccag tgggccccca	13680
acaacatcaa gtctgacta tcccggggga aattctccaa gctcatagat gcctcactaa	13740
ttttcattac atttagatac aaagaactac ctctttgctc agatcacctc aaagattgat	13800
gatattaaaa ttaattttca ggaatgtttc cttatttgat tgctatcata ttagttccct	13860
ttcccttcca tgaacttacc cacagttacc atttctata tgtgtcagc aaaacctctg	13920
ctattttctg ggggaataga gattagctat ttgactacc tgtaatttca acaaatgtga	13980
gttagacca tagtccatat gatgcaattg ttggaaatag ctctttggga actgatagt	14040
agttggcaaa agaactctat ttttcaaca atacttaca aagggaattt aaatgtaatt	14100
gaaaaagcta actttgcatc agaagacctg gttactgctt atgataactg tttcacagct	14160
agttataaaa actctccata ctttcatctg taaactgaga taaaaattat acttactaa	14220
ttgtgagatt aaagatctag taactggttt tgagaatgtt tgtgagtatt caaaagataa	14280

tttgctcagt gcctgattca tttccagcag taagtgcata atttctgttt tcaaggaaat	14340
agatcaactt cctaaaacat caaatcgaga tactttggtc ataatacaag ttttactcaa	14400
actttttaag gttttgcca ggaaggggta caggaaaatc agtcagatac ttttggaaga	14460
ttagagaaat cagaaagggt ggggaatgaa agagcctagt aaagaagtca cagtctgcaa	14520
tgaaagcaga gaattctgat gaagaataga tctgacttct ttcatttagg acccaactta	14580
ccatacttga tttatttcta ggtaacactg gagctgactc cctgggaaga gaggtaaaga	14640
gatatattga atttcttatt tctcagactg gaacagtttg atccaacaaa aatgcagcct	14700
tgctgtcacc tttcagttta gcctgaagtt aagaggagta tgaatgctag ggagggttaa	14760
cgtagagaaat gcaaatggta gtagtagttc caaccacag gcgtatattg aaggacaatt	14820
tcactgatgt ataagcaagt tccatatagt cctacagtgc ttgctgtgaa ggggttttta	14880
tatagactag tgatagctgt agacaagtat ttgggggtgga agccttctca acttactcc	14940
aagtagccct tctccttac agccagtttg accatgttgg catgcagctc tcccaatcac	15000
caaggtgtgg ctctaattta taatgaatga cagaaaataa taaactaggt tctccttcta	15060
gaaaaatatt ctaactctaa ccttttcata ttttttgtt taagaggtaa tttcagtaaa	15120
tttgagagacc agaggaagaa gtgtccctgt tctcagtaca tttatatcta gtcagagaca	15180
gctgatagac caaaagttca tgaatgaatg caatattaca ttttgataa gtgttatgaa	15240
aaagtctctg tgcggttagg aacttagcct agttagaaaa atcagggagg gtgctccgaa	15300
glaactgagg ggttattttg agccaaaaaa aaaaaatgag tgtttagtaa acaaaactgg	15360
tggggagatg tagtagaata aagtacttaa gagctaaagc tcaggaactc tgactaggtt	15420
tgaattctga atttaggaat tccttagctg ggtggccttg gctaatttta ttgctttgtg	15480
cctcattatc ttcacctgaa gaagaatata atacttagtt cacaggatag ttaggaggtt	15540
taaacagaat aatatataaa aagcactaga acaatgtcta ggacaatgac aatcatttga	15600
tgattataaa ctcttactgg agtagaatgc aaagacttcc aacacccgac aatgcctagt	15660
gcctttaagt gcctaataga agaccagtgt gtgtggacta cagtgtacaa ggaagaacgt	15720
gccccagat gtggccaacc tgagagatgc cagcacccgc agtaattgca aacttgaaca	15780
ttatctcacc catccatgta aatctcaca caacactatg agataggtgg gaaatggtaa	15840
tatcatcact gttttgcaga tgaactgact gagtttcaga agggccatag gacttactaa	15900
gttcacacag ctiagaata gcagaggcat gacttaaaac aaggttttct gtctccagat	15960
agtaggttat ttctcttaca acacacagta tcattctccc aatcacagtt attccccaga	16020

gaaataaaac catttcagag attttgctat gaactcaaga atggagaata atgggaaatg 16080
 attctgttta attccatttt taggccaaat gttacaatga acttaatgga tgcaccaaga 16140
 tataatgacc tgctctgtggg actgatggaa atacttatcc caatgaatgc gtgttatgtt 16200
 ttgaaaatcg gtgagtacaa acttgagttt cttttaaaact atatatatta agttagtatt 16260
 cttcaagtgt actgataata tgaatctcac cccgagaaaa gcaactatt tactttttcc 16320
 aaaaacagtt atctctttct tattctccct tttatatatt tagcattaaa tattattttt 16380
 tagaagtcac ttgtatgata aaagcctata ttttttacag caaaatagtc gatagcttgg 16440

 atttttataa agtacacaca aaataccttt aattaaaaaa attattagtgt gttgcaatga 16500
 ttgtgttttt taaagccctc agttatgcaa atataaattg tatagattat ataaccaaaa 16560
 atatattttt acttatggat atgaaagcca gtttcagtaa agcttcattt cctcagtgac 16620
 cataagtagg tgatgtgata cagagaaata gattcaacac agatttccta tctcactcag 16680
 caactgaaac cttagcatgt ctcaagcatc atgctaatat tccctgtctt acttgtgctt 16740
 atgactaaga aaacatcatg agcatgtata ggatggcttc ttataacttg gggcaaatgc 16800
 cagaagatga ggtgtaaata aagtgaaca ggagtgaagc agagatacat attttttatt 16860

 aaaaggggcc aagaaaggat ccatgaaaag aatagaatgc cagccgggtg cagtggctca 16920
 ctctgtaat ccagcactt tgggaggccg atgcaggtgg atcacctgag accagcctgg 16980
 ccaacatggt gaaaccccat ggtggcgggc gcctataata ccagctactc aggaggtga 17040
 ggcagaagaa tcgcttcaat ctgggaggca gaggttgcag tgagctgaga ttgtgccact 17100
 gcactccaac ctgggtgaca agagtgagac tccatcttaa aaaaaaggaa aaaaaagaa 17160
 tagaatgcca tttaaataga gttctgaatt ttggcaatat caaaagagca tgccaggtta 17220
 aataaagggtg tggaatgaac aaagcaaata aaagggattc cacgagtgac tttagttttt 17280

 ctgagattga cttgatatta aagactttga ctgaggtca aatgactgtg taaatttcca 17340
 ttatatctta ctgcataaat tcccttttct gtaatgcaa ccttcttctt gggtgtttt 17400
 aaaccatttt ggaaaattct cagagtttag caagtattgt ggaaatagga cctctggatg 17460
 agaggtctaa tatcctgaag ttttagacc aaaacattag gtattctact ttgtaataaa 17520
 tctgtttcca taattaagac ttgtaaaaag aatttgaagc cacctgttag ttttctcatg 17580
 accatgttc ttgacattaa gctcaacat catatttcca tccaatggga ggagaaagca 17640
 agagaacaac agctttgaga cttgggaaat ttccaagtgc cgctcaacat ttacagtga 17700

 acattagaaa aatattagta gagggctgga acaccctatc tgcttagcct ctgaaacctc 17760
 cgagtttctg cttattcttt ctatttggtc aaaactatgt aaatatggga ggcacatttg 17820
 tatgctagaa aacatgacct ctcttcctat atttctcaga taagaaaatt taggtctaga 17880

gacaaaaatgt tgcttttctca aatacaacat atttcctaatt gtatgacatt gccttttttca	17940
ctgttgatta aaagtcccaa acttattacc tagtaactaa agccagacgc tgaccctagt	18000
ttgagacaag tagataatac caaacaaggg cttgcaaatc agtctttttg gtgattatgt	18060
gcttggcaaa tatattcaat aaacactttt tctatttcctt ctacgtcttc aaaggaatc	18120
tgtaccggca aattcttttc cataaacctg catctccaat agaaccttct ataatgatgg	18180
aaatgttcta tgtttatgct gtctaataca tagccactag ccacaaaaca gtagccttaa	18240
tgtggctaac actaacttaa atgtggctag taaaactgat cagctgaata tttaatatta	18300
tctaaactaa tttacattta catagctata tgtggatagt gaatatatga aactagagt	18360
aacagcatag caactcttgt ttattctgtt taggtgtgtg tgcttatgta tgctaaactga	18420
tttggaaatc agtattaatg agcagttaat gattgtggga caagaaagca ttaaaaaatc	18480
ttaaagagtt tggtcgggca tgggtggctca tgcctgtaat cccagcactt tgggaagtccc	18540
aggcaggtgg atcacttttg ttaggagttt gagaccagcc tggccaacat ggtaaaaccc	18600
cgtctctact aaaaatacaa atattagcca ggcatggtgg cattcacctg taatcccagc	18660
tacttgggag gctgaggcag gagaatcact tgaacccggg aggtggaggc tgcagtgagc	18720
caaggtcaca ccaactgact ccagcctggg caacagagtg agactctgtc ttaaaaaaag	18780
aaaaaaaaga aaaaaagaaa agaaaaaaa aagaaaaaaa agtatatgga agtcagatgt	18840
ccttcagtaa tagagaagta gaagaatttt tgaagcccg tacattcaaa gaaaaaatgg	18900
ttagaaaaat taaagacctg gaaacagtct tctaggaac aattataaaa ttagagata	18960
tttagtttag ggaagagaaa actagtttgg taatggtagt gtggggcgaa cagagaggtt	19020
ttatctggag gggaggatgt ttagaactgg caggaatcat gtggaataaa tatgtgattt	19080
acttttgtga gacctcacg atacgaatcc ccagagctct aagatgaaag gtcaatcaat	19140
tagaaggtec aacaatagct caggcatcag ctgagatgga aacctggtgg cgaaggcaga	19200
ggcatcagga gcaaaagatg caacaatagi tttagattta atttcagggg ttcactgtaa	19260
caccccagga gatctgtaaa aactgtaagg acagatatat ttcctttctg ttgtatcctt	19320
agtgatttca acagtaatca ataaatattt gatgaattaa tgactaagtg aatgtataaa	19380
tgaatgaaag acagagaaaa gattataaat ctcaaacctc tccaacttta aatgaagctg	19440
ttatttttcc cctgttttt cteccatagt cactttttca tcagtgaagt ttaagctgat	19500
atattttttt taatctctac tgcaggaaac gccagacttc tatcctcatt caaaaatctg	19560
ggccttgctg agaaccaagg ttttgaaatc ccatcaggtc accgagagc ctgactggcc	19620
ttattgttga ataatgtat ctgaatatcc cctgtttttt ccatttgctt tttcctcaaa	19680
ggtatgtttg attataccag ggtcagggga ctttggttaag actgagaata gaccaagttt	19740

taaaaacatc aggaatcctg taatttcaga cagggtttcc ctcataattc cttttctttc	19800
ctcatctttc tcacatcctg aggtcactgc cttagaaaat gtgattgcag atattaaatg	19860
gcagagcaca gatgatcatg aatacaagaa attctttgag gactggacta ctattttaag	19920
gaacaattgg aaaataccca gtccagaaac atgttaccca tcacagtctg ctgattgcaa	19980
taactccttt aggtttcctt gggatttgat tgagcatcta ttgtggctgg cacaggtcta	20040
cgtgcatggg catagagctg cctatatggt ggaatagagt ttagtctttg agattttcca	20100
cttatctcag aatgtagatt ttgggtcaga cataattgtc tcaaaaagat ttgaatcatt	20160
gagaaaacaa acaaaaaaag tacatcttct taacaaggct atggagcagc ttctggactt	20220
agccttagtt cticccacgc agggccagtt ccccataggt tactaagggtg aatggtggtg	20280
acgtagagcc tgtggttgct cctgataacc cggggcttgg atggaggact tcctcttggtg	20340
cttccttggg agatctgctt catagggcct gatgggtttg tgctgtgcta acctgaggca	20400
ggtaggtggg gaggcctgat tctggattaa ctttgggaat ggtctcttct actatcaaac	20460
cattcccaaa agataatctg acaaggaaaa aagtgactat agactggatg aactgatcaa	20520
gagacctttg tgcagcacac ttgtgtttat gtgtgggcca aaacaaccct ataagattat	20580
ccttatctta tgagtaaact tagaactaag tgaaatcacc tgcctaatat tgcaagcaaa	20640
caaagcgaca ggcttaggtt ttattataa tacaggactg acttcaaac taatgcttct	20700
tccattaagc cacaatcacc tcacgtgagt tactcattgc ctatttttc tatagaaact	20760
tcagataaca ctttctatt aaaaaggact atgtgtttat attcaggga gcaaatcaga	20820
taaaactaaa gaagttcccc aaaagaaaaa aaaggtatgt acagctatta aaagaagaat	20880
aaggaggagg aggaggagga agaggaggta gaggaggagg aagaggaggt agaggaggag	20940
aagaaggaga aggaaaagga ggaggaaaga agaaagagga ggaggagaga agagagagga	21000
ggaggaggag ggggaaagga gaaggagggg cagggggagg aagaggaggg ggaggtggag	21060
gaagaagatg aaaaagcagc ttgaattccc aaactcatga agaactagcc tagaatggaa	21120
aactgggtag agagctaaca gagcctgaga taacagcagg ttttctaata tacagcagga	21180
aatagatcac ccattgaatc agaaataatc agtcaaaagc tattgcacac ttgccaacaa	21240
cagttgcctg acactctaag gtttaggtta atttcttggt atattcagaa tatacacgtc	21300
ttgaggttta aatctgacca ctagaggatg ctgtagtctg ccaagtgcct cagccaaacc	21360
gccgtctaac agctctcatt aaatatcact ctaacagcag ttatggatgc aagatggctt	21420
ccaacaactt gtctgtgatg ctagaggaca ctgaaggac atccctaata ttaaggacct	21480

ttgcatgat aaacagaaat taaataattg aatgctacaa attttcatgt ccaattgaac	21540
cagtctacaa gtctggagag acaagacttg gagattataa gcagaagcaa cccattaacc	21600
caaattgtct atctttaatg gttctgttct ctctctgacc catcagaaag ca	21652