



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0140630
(43) 공개일자 2020년12월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2019-0067519
(22) 출원일자 2019년06월07일
심사청구일자 2019년06월07일

(71) 출원인
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
남진우
서울특별시 강남구 압구정로61길 37 한양아파트 72동 913호
유보현
서울특별시 성동구 왕십리로 222, 한양대학교 푸전테크센터 1123호(사근동)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 4 항

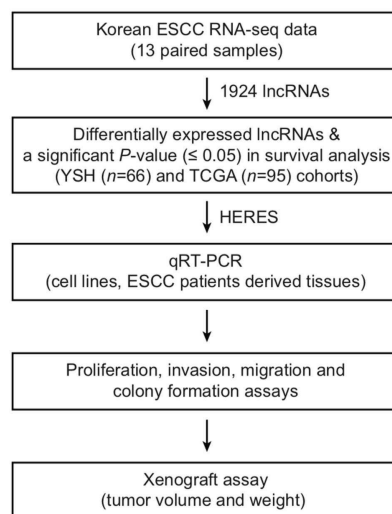
(54) 발명의 명칭 HERES 발현 억제제를 포함하는 편평상피세포암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 HERES (Highly Expressed lncRNAs in Esophageal Squamous Cell Carcinoma) 발현 억제제를 포함하는 편평상피세포암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 HERES 발현 억제제를 이용하여 HERES의 발현을 감소시켜 Wnt signaling pathway에 영향을 주어 편평상피세포암을 예방 또는 치료하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명자들은 HERES의 발현 양상이 편평상피세포암의 발병과 관련 있음을 발견하고, 상기 HERES가 편평상피세포암의 치료 타겟이 될 수 있다는 것을 규명하였으며, 이에, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 HERES의 발현 억제제를 포함함으로써, 편평상피세포암의 증식, 전이 등의 억제 효과를 가짐을 확인하였는바, 편평상피세포암의 예방 및 치료 또는 개선 용도로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이상길

서울특별시 강남구 압구정로 113, 25동 1102호(압구정동, 미성아파트)

윤정호

서울특별시 영등포구 선유동2로 29, 201동 304호(양평동3가, 현대2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1A2B2003782

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 (재)한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업 / 중견연구자지원사업 / 중견연구(총연구비3억초과~5억이하)

연구과제명 긴 비번역 RNA의 선택적 스플라이싱에 의한 암 발생 기전 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한양대학교 산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

HERES (Highly Expressed lncRNAs in Esophageal Squamous Cell Carcinoma)의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 편평상피세포암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 HERES (Highly Expressed lncRNAs in Esophageal Squamous Cell Carcinoma)는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 편평상피세포암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 발현 억제제는 siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA), miRNA (micro RNA), 리보자임 (ribozyme), DNAzyme, PNA (peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오티드 (Antisense oligonucleotide, ASO) 및 화합물 (chemical compound)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 편평상피세포암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 EZH2의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 편평상피세포암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 HERES (Highly Expressed lncRNAs in Esophageal Squamous Cell Carcinoma) 발현 억제제를 포함하는 편평상피세포암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 HERES 발현 억제제를 이용하여 HERES의 발현을 감소시켜 Wnt signaling pathway에 영향을 주어 편평상피세포암을 예방 또는 치료하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 편평상피세포암은 식도, 두경부, 폐 등의 편평상피세포에 생기는 암종으로 전이율이 매우 높아 예후가 좋지 않다고 보고되었으며, 특히 식도 편평상피세포암은 5년 이내 생존율이 5 내지 10 %에 불과한 것으로 알려져 있다.

[0003] 한편, 암을 확실하게 치료하기 위해 편평상피세포암 환자는 방사선 요법과 항암 화학 요법 등의 치료를 선행적으로 받은 뒤, 암 발생 가능성이 높은 조직을 미리 모두 절제하는 치료를 받는다.

[0004] 또한, 숙련된 의사라 할지라도 편평상피세포암 병태를 가진 환자의 수술 결과가 나오기 전에 상기 암의 치료 여부를 확신할 수 없기 때문에 환자의 환부를 최대한 절제하므로 수술을 받은 환자들은 삶의 질이 떨어지고, 합병증 등의 후유증에 시달리게 되는 것으로 보고된다.

[0005] 이에, 편평상피세포암을 치료할 수 있는 치료제에 대한 연구 (J Cancer. 2016; 7(10): 1258-1264, Shen et

al.)가 활발하나 아직 미흡하며, 외과적 수술 없이 편평상피세포암을 예방 또는 치료할 수 있는 치료제의 개발이 매우 절실한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명자들은 HERES (Highly Expressed lncRNAs in Esophageal Squamous Cell Carcinoma)의 발현 양상이 편평상피세포암의 발병과 관련 있음을 발견하고, 상기 HERES가 편평상피세포암의 치료 타겟이 되고 상기 HERES의 발현을 억제하면 편평상피세포암을 완화시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 이에, 본 발명은 HERES의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 편평상피세포암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은
- [0010] HERES의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 편평상피세포암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 구현예로, 상기 HERES는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 발현 억제제는 siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA), miRNA (micro RNA), 리보자임 (ribozyme), DNase, PNA (peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (Antisense oligonucleotide, ASO) 및 화합물 (chemical compound)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 EZH2의 발현을 억제시킬 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 편평상피세포암 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 편평상피세포암 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명자들은 HERES (Highly Expressed lncRNAs in Esophageal Squamous Cell Carcinoma)의 발현 양상이 편평상피세포암의 발병과 관련 있음을 발견하고, 상기 HERES가 편평상피세포암의 치료 타겟이 될 수 있다는 것을 규명하였으며, 이에, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 HERES의 발현 억제제를 포함함으로써, 편평상피세포암의 증식, 전이 등의 억제 효과를 가짐을 확인하였는바, 편평상피세포암의 예방 및 치료 또는 개선 용도로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 HERES (Highly Expressed lncRNAs in Esophageal Squamous Cell Carcinoma, 이하, HERES)가 식도 편평상피세포암의 치료 타겟임을 검증하기 위한 본 발명에 따른 실험과정을 도시한 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 HERES의 발현 양상을 나타낸 것으로, 도 2a는 여러 식도 편평상피암 세포주에서의 HERES의 발현 양상을 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 2b는 식도 편평상피세포암 환자 유래 조직 샘플에서 HERES의 발현 양상을 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 2c는 HERES의 발현율과 식도 편평상피세포암 환자의 생존율의 상관관계를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 HERES의 발현 억제에 따른 식도 편평상피세포암의 증식, 전이, 침습 및 군집 형성의 변화를 나타낸 것으로, 도 3a는 HERES의 발현을 억제한 경우의 식도 편평상피세포암의 증식 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 3b는 HERES의 발현 억제제 처리 전과 상기 억제제 처리 48시간 경과 후 식도 편평상피세포암의 증식 정도의 차이를 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 3c는 HERES의 발현을 억제한 경우의 식도 편평상피세포암의 증식을 세포 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 3d는 HERES의 발현을 억제한 경우의 식도 편평상피세포암의

군집 형성 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이며, 도 3e는 HERES의 발현을 억제한 경우의 식도 편평상피세포암의 전이 또는 침습 정도를 상기 전이 또는 침습에 관여하는 인자의 단백질 발현 여부 관찰을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 HERES의 발현 억제가 Wnt signaling pathway와 관련된 주요 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 HERES가 EZH2와의 상호작용을 통해 타깃 유전자들의 후성 유전적 조절에 관여한다는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 5a는 HERES와 EZH2 단백질의 직접적인 상호작용을 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 5b는 EZH2 단백질과 타깃 유전자의 직접적인 상호작용을 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 5c는 HERES의 야생형과 HERES의 돌연변이의 염기서열을 나타낸 것이고, 도 5d는 HERES의 야생형과 HERES의 돌연변이에서의 EZH2의 단백질 및 상대적인 mRNA의 발현량을 확인한 결과를 나타낸 것이며, 도 5e는 HERES의 야생형과 HERES의 돌연변이에 서 HERES의 발현과 CACNA2D3의 단백질 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 Xenograft 실험을 통해 HERES의 식도 편평상피세포암 치료 표적 가능성을 검증한 결과를 나타낸 것으로, 도 6a는 HERES의 발현을 억제한 경우와 대조군에서의 식도 편평상피세포암 세포의 부피를 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이고, 도 6b는 HERES의 발현을 억제한 경우와 대조군에서의 식도 편평상피세포암 세포의 부피를 육안으로 비교한 결과를 나타낸 것이며, 도 6c는 HERES의 발현을 억제한 경우와 대조군에서의 식도 편평상피세포암 세포의 무게를 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명자들은 긴 비번역 RNA인 HERES (Highly Expressed lncRNAs in Esophageal Squamous Cell Carcinoma, 이하, HERES)의 발현 양상이 편평상피세포암의 발병과 관련 있음을 발견하고, 상기 HERES가 편평상피세포암의 치료 타깃이 될 수 있다는 것을 규명하였으며, 이에, 본 발명은 HERES의 발현을 억제함으로써, 편평상피세포암의 증식, 전이 등을 억제할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 이에, 본 발명은 HERES의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 편평상피세포암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 대상 질환인 "편평상피세포암 (squamous cell carcinoma)"은 표피의 각질 형성 세포에서 유래한 악성 종양이다. 종양의 크기 및 깊이, 원인, 해부학적 위치, 조직학적 특성에 따른 전이 등의 생물학적 양상이 기저 세포암보다 복잡한 비 흑색종 피부암으로 우리나라에서 기저세포암과 함께 가장 많이 발병되는 피부암 중 하나이다. 또한, 편평상피세포암은 피부뿐만 아니라 점막에서도 발생하며, 발생 부위나 발생 요인에 따라 증상이 다양하고, 일반적으로 비교적 크고 불균일한 모양의 부서진 살덩어리처럼 보이며, 편평상피세포암의 발병 시 종양(암)의 표면이 약해지게 되므로 일반 세균에 의한 감염이 잘 일어나며 농이 나오거나 악취가 나기도 하나, 그 외의 자각 증상은 특별히 없는 것으로 보고된다. 종류로는 발생 원인에 따라 태양에 손상된 피부에서 발생한 편평상피세포암, 만성 염증성 질환 및 반흔 (흉터)에서 발생한 편평상피세포암, 비소 유발 편평상피세포암, 방사성 유발 편평상피세포암, 드노보 (De novo) 편평상피세포암 또는 사마귀양 암종이 있으며, 발생 부위에 따라 얼굴, 목, 팔 등의 편평상피세포암, 폐에서 기원한 편평상피세포암, 식도에서 기원한 편평상피세포암, 두경부에서 기원한 편평상피세포암 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명에 따른 상기 HERES는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다. 이때, 상기 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열과 70 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상, 가장 바람직하게는 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 또는 99 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열도 포함할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명에 따른 HERES를 암호화는 HERES 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어 "발현 억제"란 표적 유전자의 기능 저하를 일으키는 것을 의미하며, 바람직하게는 이에 의해 표적 유전자 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을 의미한다.
- [0025] 본 발명에 따른 상기 발현 억제제는 siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA), miRNA (micro RNA), 리보자임 (ribozyme), DNzyme, PNA (peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오티드 (Antisense oligonucleotide, ASO) 및 화합물 (chemical compound)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나

일 수 있고, 바람직하게는 siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (Antisense oligonucleotide, ASO)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0026] 본 발명에 따른 상기 siRNA (small interfering RNA)는 특정 mRNA의 절단 (cleavage)을 통하여 RNAi (RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 (knock-down) 방법으로서 또는 유전자치료 (gene therapy)의 방법으로 제공된다.
- [0027] 본 발명에 따른 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (Antisense oligonucleotide, ASO)는 표적 핵산, 특히 표적 핵산 상의 인접 서열에 혼성화함으로써 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0028] 본 발명에 따른 상기 조성물은 EZH2의 기능을 억제하여 Wnt signaling pathway를 조절하여 편평상피세포암의 증식, 전이, 침습 및 군집 형성을 감소시킴으로써, 편평상피세포암 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 상기 EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2)는 EZH2 유전자에 의해 암호화 된 히스톤-라이신 N 메틸 전이 효소이다. 상기 EZH2는 보체 S-아데노실-L-메티오닌 (cofactor S-adenosyl-L-methionine)을 사용함으로써, 라이신 (lysine) 27의 히스톤 H3에 메틸기를 추가하는 반응을 매개한다. EZH2의 메틸화 활성화는 헤테로 염색질 형성을 촉진하여 유전자 기능을 침묵시키는 역할을 한다. 또한, EZH2는 Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2)의 기능적 효소 성분으로, 발달과 분화 조절에 관여하는 유전자의 후성 조절을 통해 배아 발달을 유지하는 역할을 하는 것으로 보고된다.
- [0030] 본 발명의 발명자들은 여러 식도 편평상피세포암 세포주 및 식도 상피세포암 환자 유래 조직에서 HERES의 발현 양상의 변화를 확인하여, 상기 HERES를 식도 편평상피세포암 치료의 타겟 후보로 지목하였다.
- [0031] 이에, 본 발명의 일실시예에서, siHERES를 사용하여 HERES의 발현을 억제시키면 식도 편평상피세포암의 증식, 전이, 침습 및 군집 형성이 감소하는 것을 검증하였다 (실시예 3 참조).
- [0032] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서, siHERES를 사용하여 HERES의 발현을 억제시키면 종양 부피 (tumor volume) 및 종양 무게 (tumor weight)가 감소하는 것을 검증하였다 (실시예 5 참조).
- [0033] 상기의 실시예 결과들을 통해 식도 편평상피세포암 세포에서 HERES의 발현을 억제하면 식도 편평상피세포암의 증식, 전이 등을 효과적으로 감소시킴을 확인하였는바, HERES는 매우 유망한 치료 타겟이 됨을 확인할 수 있었다.
- [0034] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 HERES의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으나, 바람직하게는 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0037] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 편평상피세포암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물의, 편평상피세포암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0041] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0043] **[실시예]**
- [0044] **실시예 1. 실험준비 및 실험방법**
- [0045] **1-1. 식도 편평상피세포암 RNA-seq 데이터 생산**
- [0046] 식도 편평상피세포암 환자로부터 척출한 식도 조직에서 균질화 (homogenization)을 거친 뒤, RNA 분석 수행을 위해 RNA 추출을 진행하였다. RNA 추출은 Trizol reagent을 이용하여 RNA, DNA, protein을 제외한 세포 구성 물질들을 제거한 뒤, Chloroform을 사용하여 RNA, DNA, protein을 분리하였다. 분리된 층에서 RNA 층을 추출한 뒤, RNA 세척과 침적을 진행하였다. RNA를 침전시켜 pellet을 만들어준 뒤, Nuclease-free water에 녹여 RNA sample을 확보하였다. Illumina Hiseq 2000을 사용하여 RNA sample로부터 시퀀싱을 수행하였다.
- [0048] **1-2. siRNA을 이용한 HERES의 발현 억제**
- [0049] 두 개의 HERES siRNA (siHERES_1, siHERES_2)를 제작한 뒤, 6 well plate에 준비된 식도암 세포에 Lipofectamine 2000 시약을 사용하여 형질주입을 하였다. 이때 리포좀 형성억제를 방지하게 위해, Serum-free media로 교체하였다.
- [0050] siRNA을 통한 HERES의 발현 억제 대조군으로 사용하기 위해 scrambled RNA를 동일하게 형질주입을 한 후, 48시간 후에 대조군 대비 HERES의 발현 억제를 확인하였다.
- [0052] **실시예 2. 식도 편평상피세포암 세포주 및 환자 유래 샘플에서 긴 비번역 RNA HERES의 발현 양상 확인**
- [0053] **2-1. 식도 편평상피세포암 치료의 타깃 선정**
- [0054] 식도 편평상피세포암 치료의 타깃은 도 1에서 나타낸 바와 같이, 다음의 과정을 통해 선별되었다.
- [0055] 한국인 식도 편평상피세포암 RNA-seq 데이터를 분석하여 식도 편평상피세포암의 발병 시 발현 양상이 변화하는 1924개의 긴 비번역 RNA를 선별하였다. 그 다음으로, YSH (n=66) 및 TCGA (n=95)에서의 긴 비번역 RNA의 차등 발현과 식도 편평상피세포암 환자의 생존율 간의 상관관계를 분석하여 도 2c에서 나타낸 바와 같이, 유의적인 결과를 나타낸 HERES를 식도 편평상피세포암 치료의 타깃으로 선정하였다. 보다 구체적으로, HERES가 과발현되면 식도 편평상피세포암 환자의 생존율이 낮아진다는 것을 확인하였다.
- [0057] **2-2. 식도 편평상피세포암 세포주 및 환자 유래 샘플에서 HERES의 발현 양상 확인**
- [0058] 상기 실시예 2-1의 결과에 기초하여 식도 편평상피세포암에서 발현 양상의 변화를 보이는 HERES가 다양한 식도 편평상피세포암 세포주 및 환자 유래 샘플에서도 발현되는지 여부를 검증하는 실험을 수행하였다.

[0059] 그 결과 도 2a 및 도 2b에서 나타난 바와 같이, 식도편평상피세포암의 다양한 세포주뿐만 아니라 환자 유래 조직 샘플에서 HERES가 과발현되는 것을 확인하였다.

[0061] **실시예 3. HERES의 발현 억제에 따른 식도편평상피세포암 세포주의 증식, 전이, 침습 및 군집 형성의 변화 검증**

[0062] 상기 실시예 2의 결과에 기초하여 식도 편평상피세포암 환자에서 특이적으로 과발현되는 HERES가 식도편평상피세포암의 치료 타깃이 될 수 있는지 검증하기 위해, siHERES의 사용을 통한 HERES의 발현 억제에 따른 식도편평상피세포암 세포주의 증식, 전이, 침습 및 군집 형성의 변화를 확인하는 *in vitro* 실험을 수행하였다.

[0063] 그 결과 도 3a 내지 도 3e에 나타난 바와 같이, HERES의 발현을 억제하면 식도 편평상피세포암의 증식, 전이, 침습 및 군집 형성이 억제된다는 것을 확인하였다.

[0064] 보다 구체적으로 도 3a 내지 도 3c에서 나타난 바와 같이, KYSE-30 및 HCE-7에서 HERES의 발현을 억제한 경우 식도 편평상피세포암의 증식 정도가 대조군에 비해 낮아진다는 것을 확인하였다.

[0065] 또한, 도 3d에서 나타난 바와 같이, KYSE-30 및 HCE-7에서 HERES의 발현을 억제한 경우 식도 편평상피세포암의 군집 형성 정도가 대조군에 비해 적어진다는 것을 확인하였다.

[0066] 또한, 도 3e에서 나타난 바와 같이, KYSE-30 및 HCE-7에서 HERES의 발현을 억제한 경우 식도 편평상피세포암의 전이 또는 침습과 관련된 N-cadherin 및 vimentin의 발현이 대조군에 비해 적어진다는 것을 확인하였다.

[0068] **실시예 4. HERES의 발현 억제에 따른 Wnt signaling pathway의 주요 인자의 변화 검증**

[0069] HERES가 Wnt signaling pathway와 관련된 주요 유전자들을 조절한다는 것을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0070] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이, KYSE-30 및 HCE-7에서 HERES의 발현을 억제한 경우 Wnt signaling pathway에 관여하는 주요 인자들의 발현에 영향을 주는 것을 확인하였다. 보다 구체적으로, Wnt signaling pathway에 관여하는 주요 인자 중 CACNA2D3의 발현이 증가한 것을 확인하였다.

[0071] 또한, HERES가 Wnt signaling pathway와 관련된 주요 유전자들을 조절한다는 것을 확인하기 위해 추가적인 RIP, Mutagenesis assay 및 FISH 실험을 수행하였다.

[0072] 그 결과, 도 5a 내지 도 5e에서 나타난 바와 같이, RIP, Mutagenesis assay 및 FISH 실험으로 HERES와 EZH2가 상호작용을 통해 타깃 유전자들을 후성 유전적으로 조절하는 것을 확인하였다.

[0073] 보다 구체적으로 도 5a 내지 도 5b에서 나타난 바와 같이, KYSE-30에서 HERES와 EZH2가 직접적인 상호작용을 하고, EZH2와 타깃 유전자가 직접적인 상호작용을 하는 것을 확인하였다.

[0074] 또한, 도 5c 내지 도 5d에서 나타난 바와 같이, KYSE-30에서 HERES의 야생형과 HERES의 돌연변이 (EZH2와 상호작용하는 서열을 삭제) 염기서열을 통해 상대적인 EZH2의 단백질 및 mRNA 발현량이 변화하는 것을 확인하였다.

[0075] 또한, 도 5e에서 나타난 바와 같이, KYSE-30에서 HERES의 야생형과 HERES의 돌연변이 염기서열을 통해 HERES와 EZH2의 상호작용을 통해 CACNA2D3의 단백질 발현을 조절하는 것을 확인하였다.

[0077] **실시예 5. HERES 발현 억제에 따른 종양 부피 및 무게에 대한 영향 검증**

[0078] HERES가 Wnt signaling pathway와 관련된 주요 유전자들을 조절한다는 것을 확인하기 위해 Xenograft 실험을 수행하였다.

[0079] 그 결과, 도 6a 내지 6c에서 나타난 바와 같이, HERES의 발현을 억제시키는 경우 종양 부피 (tumor volume)와 종양 무게 (tumor weight)에 직접적인 영향을 주는 것을 확인하였다.

[0080] 보다 구체적으로, 도 6b에서는 하기의 표 1 및 표 2에서 기재하는 염기서열로 이루어진 siHERES를 사용하여 HERES의 발현을 억제시키면 종양 부피 (tumor volume)가 감소하고, 도 6c에서는 siHERES의 사용을 통해 HERES의 발현을 억제시키면 종양 무게 (tumor weight)가 감소함을 확인하였다.

표 1

구분	siHERES_1
Sense (서열번호 4)	CAC UGU GAG UCA GGA UCA GUC UUA U
Antisense (서열번호 5)	A UAA GAC UGA UCC UGA CUC ACA GUG

표 2

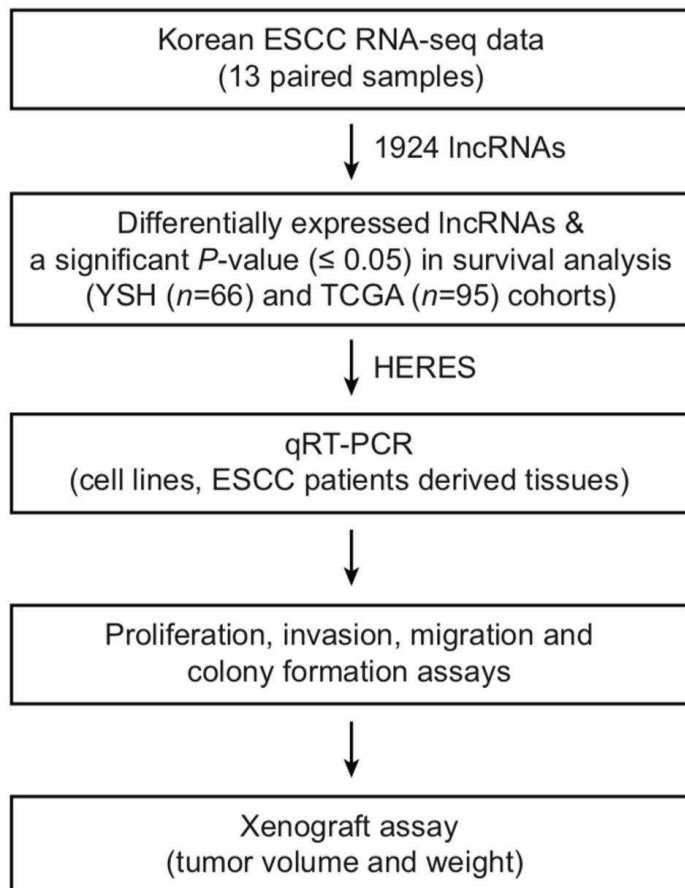
구분	siHERES_2
Sense (서열번호 6)	CAC ACC AAA UGA ACU CUC UAU UCU U
Antisense (서열번호 7)	A AGA AUA GAG AGU UCA UUU GGU GUG

상기의 결과들을 통해 HERES의 식도편평상피세포암의 치료 타겟으로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

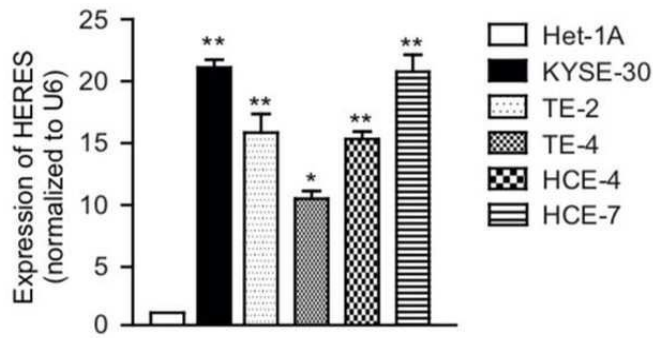
상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

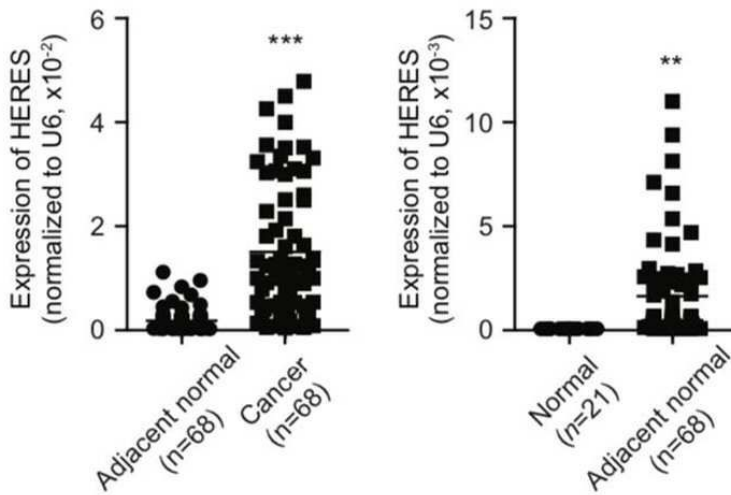
도면1



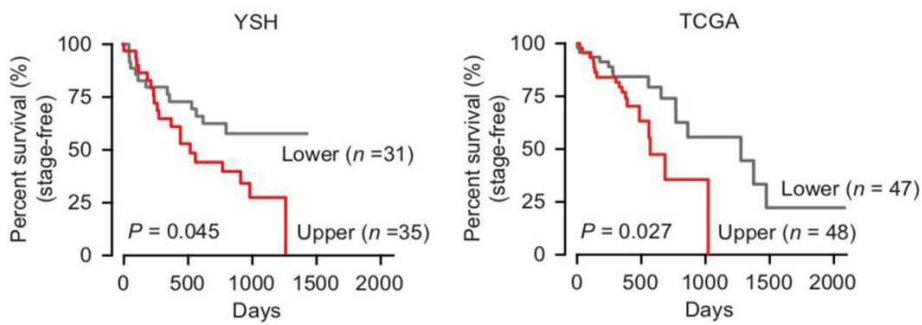
도면2a



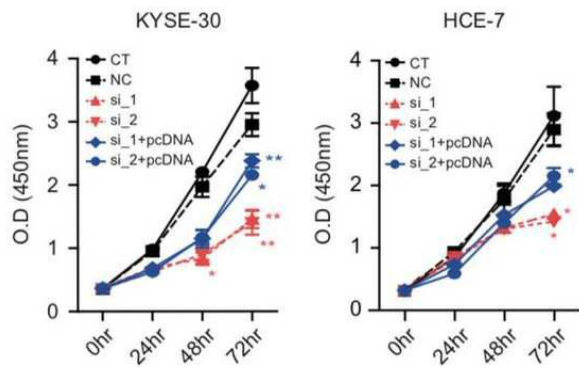
도면2b



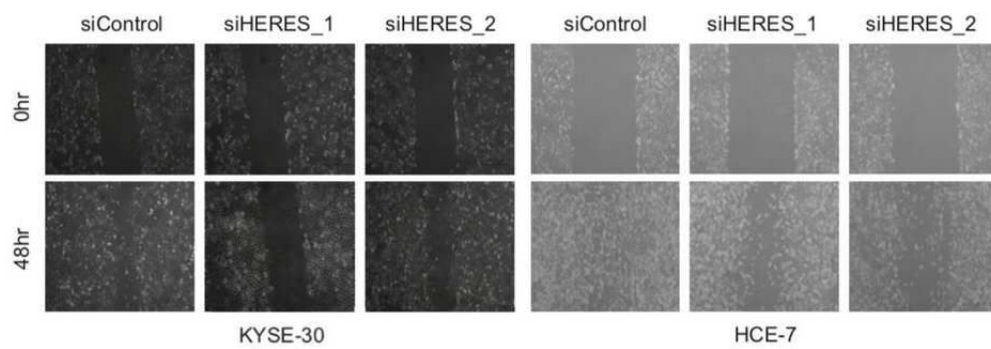
도면2c



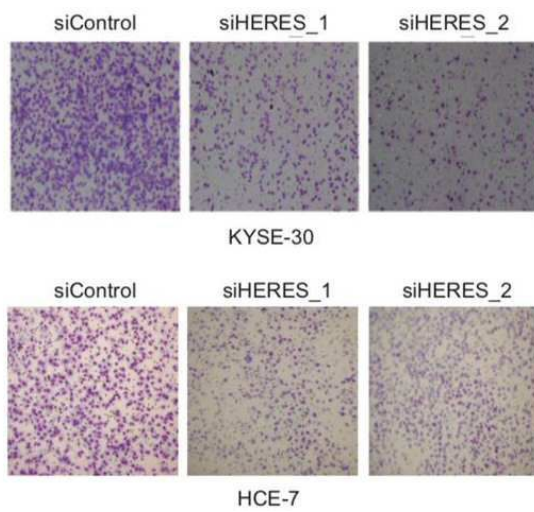
도면3a



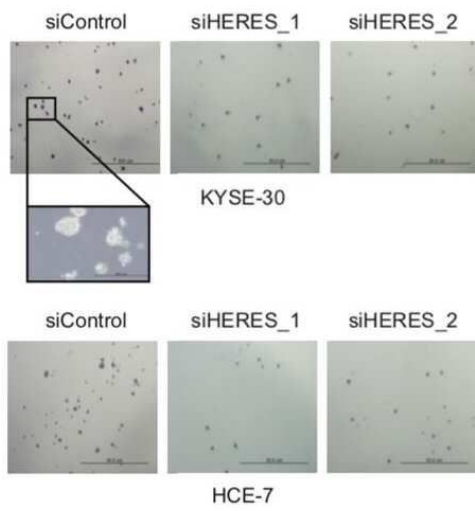
도면3b



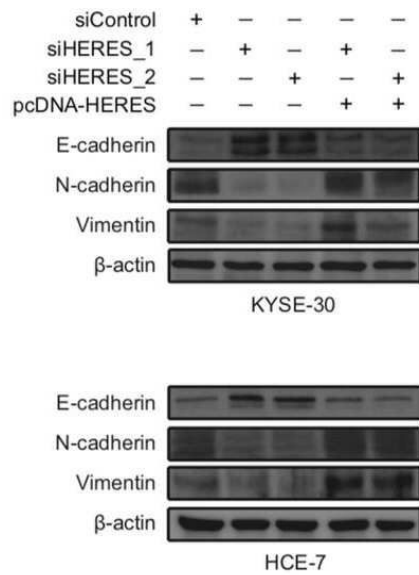
도면3c



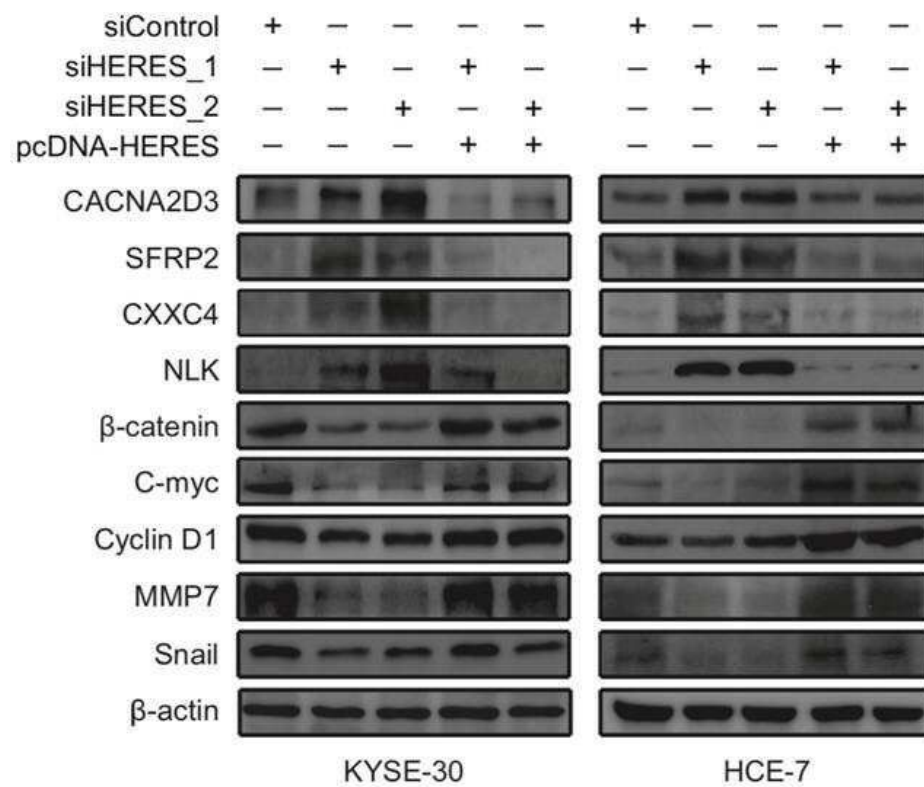
도면3d



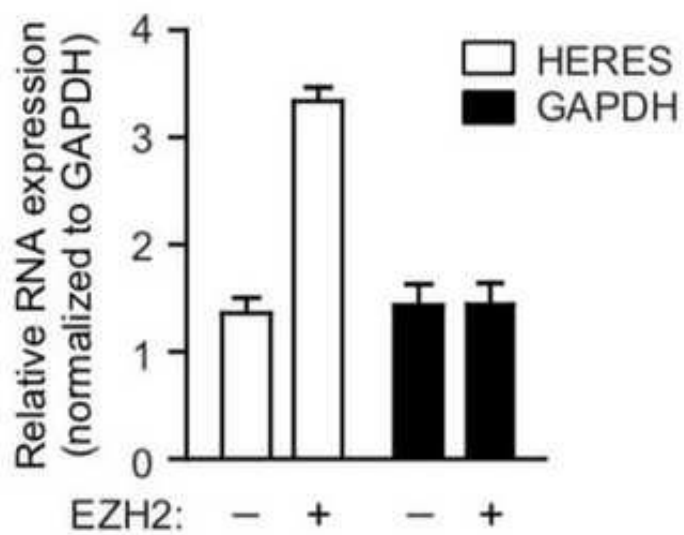
도면3e



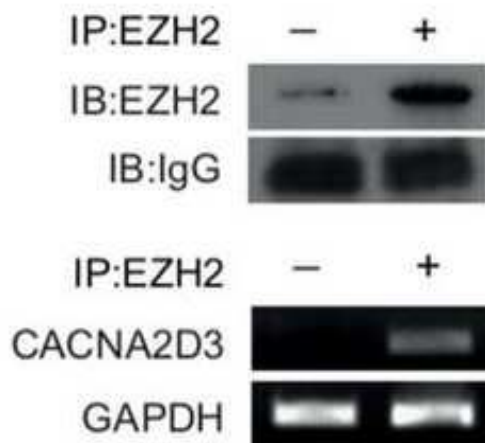
도면4



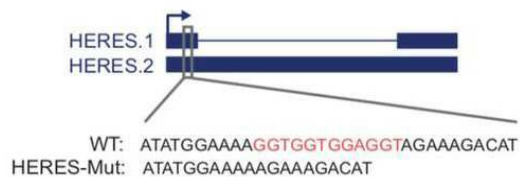
도면5a



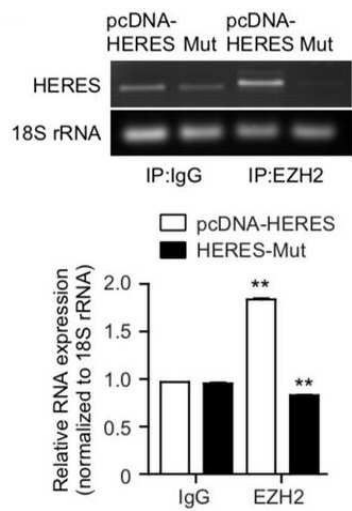
도면5b



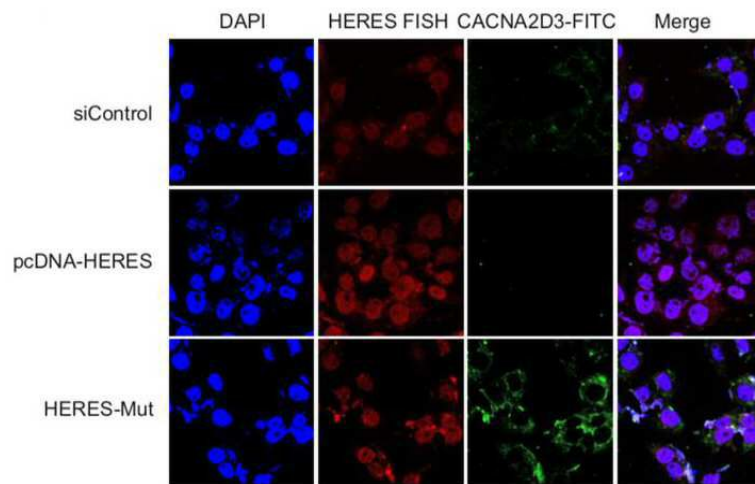
도면5c



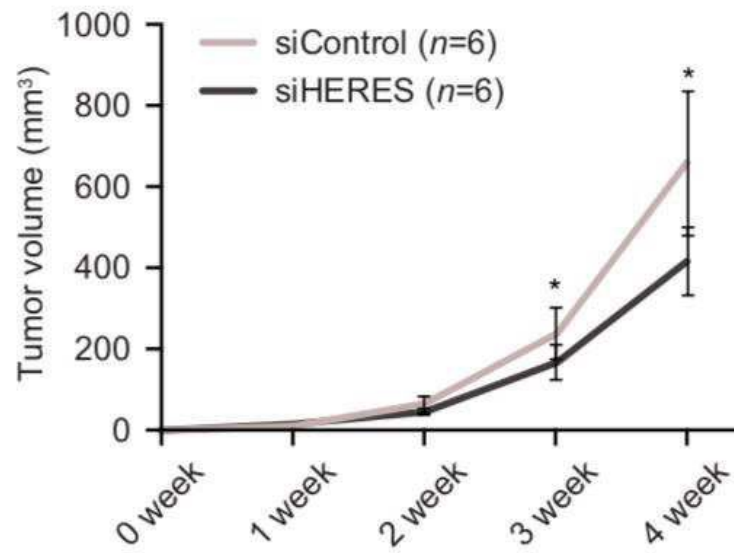
도면5d



도면5e



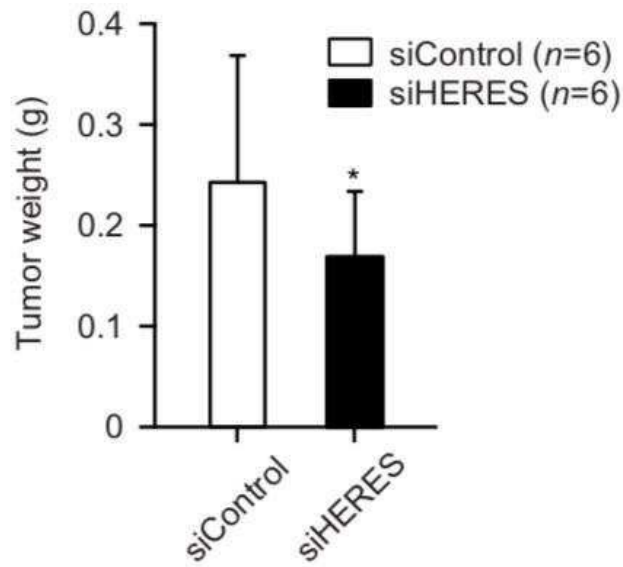
도면6a



도면6b



도면6c



서열 목록

<110> INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY

<120> Pharmaceutical composition for preventing or treating squamous cell carcinoma containing expression inhibitor of HERES

<130> PD19-073

<160> 7

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 2160

<212> RNA

<213> Homosapiens(HERES.1)

<400> 1

ggcaaccagc ttgcgtccgt ttccatgttg tgggagattt gttctttcgc tctttgtggt 60

aaatcttgct actgctcact ctttgagtcc acactgcttt tatgagctgt aacactcacc 120

gggaaggctt gcagcttcaa tcctgaagcc agcgaggcca ccagcccacc gggaggaacg 180

aacaactcca gacgcaccgc cttaagagct gtaacactca ccgcaaggt ctgcagcttc 240

actcctgagc cagcgagacc acgaaccac cagaagaaag aaactccgaa cacatccgaa 300

caccagaagg aacaaactcc agacgcgcca actgtaacac tcaccgcgag gatccgtggc 360

ttcattcttg aagtcagta gaccaagaac ccaccaattc cggacacact gtgagtcagg 420

atcagtctta ttatagctaa ttagagcaac cccattgcta aagagtttag agcctgggtc 480

agacttcatg gtagcaaagc aatgttttat tgtaatagtg taattaggaa tgtgtggcaa	540
tattttaacc cctcctccca agagtccac aatgctttct taacatgttt ataaatattt	600
gcttttgtgc cattttaggg gagctttccg tacaacatt tggttttaa tgagtcatcc	660
acactctgat tcatacccat aagcttccig ctttgttata agtgaatatt gggtcagta	720
actgccttac ttttataatt tacatgaatg aatatggaaa aggtgggtgga ggtagaaaga	780
catattcagg taaatataaa aacaccctgg tttctttaca agagattgac aaatacggcc	840
caatacccta tcatttaaaa aaatagctgc tgccccactc ctgtgccaaa atctgctcca	900
agggatccta tcctagtcag aaggctgtac tctgaatgct gatattagct acaacaccaa	960
ggcttccac tatacaaact ggatcctcaa agtcatccac accaaatgaa ctctctatcc	1020
tttctcccag tagcctgaga actgggttta ccagccttg cccttcttt cttctagcc	1080
tcaaacagg atgggaacag agtctttggc tgtgagaatg ggctcaataa caaaataaag	1140
atgacagaag agtcagtac ttcaatgaca gagcgataga aattaccaat ataaacggag	1200
agaaaagaga ttttttaaaa atgaacaaat cccaaggac ctgtgagaca ataactgtgt	1260
taggttttct aaacttaca gtgtttttat ttatatatgg taagcaacta tgcattattt	1320
gtgtcagaat tattttttgt atatatttaa ggtatacaac atgatgtctc aacatactta	1380
tatgtagtga aatggttact acagtcacca cacttatgt ctcacaggtt attgtcttca	1440
gaaggagagt aaaaagaatg ctgggtagaa gaaatacctg aagaaataat ggcccaacct	1500
caaatttggg gaaagacata aacttacaga ttcaagaaac tgagtgttcc ccaaacagaa	1560
taaactttta agaatecaca ctcaaacaca tcataatcaa acttctgaaa actaacaaca	1620
aagaaaaact taaaatcagc aagagagaaa ccacacatta tcaactgatg aaaagtgact	1680
caagtgcagc cagatttata atcagaaact tgaaggacag aaggaagagg caaaacattt	1740
tgaaagccct aaaaggaaag aactgtcaac ccagaattcg acatccagta aaaatatccg	1800
tcaagaatga atatgaagga aagctaagaa tgaatatatc ttctatttct ttgctaaatt	1860
tttctacttt ttcatattgt gtaagagtgt ttataagtgc ttatggagca tttttatgat	1920
agttggttta caatccttgt ctgagagtag ctatgtgaga tgacgtatat agtaaatggt	1980
gactgtagta accatttcac tacatataag tatgtcaaaa catgtgttac accttaata	2040
tacacaaaaa atagctctga cacaaaaaat gcatagtgtg tattaccatg tataaataaa	2100
aatacttgta agtttagaaa ataaaatcat tgtctgataa ttatctaaat aataaagtcc	2160
	2160

<210> 2

<211> 6675

<212> RNA

<213> Homo sapiens(HERES.2)

<400> 2

ggcaaccagc ttgcgtccgt ttccatgttg tgggagatit gttctttcgc tctttgtggt 60

aaatcttgct actgctcact ctttgagtcc acactgcttt tatgagctgt aacactcacc 120

gggaaggctc gcagcttcaa tctgaagcc agcgaggcca ccagcccacc gggaggaacg 180

aacaactcca gacgcaccgc cttaagagct gtaacactca ccgcgaaggt ctgcagcttc 240

actcctgagc cagcgagacc acgaaccac cagaagaaag aaactccgaa cacatccgaa 300

caccagaagg acaaaactcc agacgcgcca actgtaacac tcaccgcgag gatccgtggc 360

ttcattcttg aagtcagtga gaccaagaac ccaccaattc cggacacact gtgagtcagg 420

atcagcttta ttatagctaa ttagagcaac ccattgcta aagagttag agcctgggtc 480

agacttcagt gtagcaaagc aatgttttat tgtaatagtg taattaggaa tgtgtggcaa 540

tattttaacc cctcctcca agagtccac aatgcttct taacatgttt ataaatattt 600

gcttttgtgc ctttttaggg gagctttccg tacaacatt tggcttttaa tgagtcaccc 660

acactctgat tcatacccat aagcttctg ctttgttacc agtgaatatt gggctcagta 720

actgccttac tttataatt tacatgaatg aatatggaaa aggtggtgga ggtagaaaga 780

catattcagg taaatataaa aacaccctgg tttctttaca agagattgac aaatacggcc 840

caatacccta tcatttaaag taagtgccag aattgtgatg gatttgtgtt tggccttaaa 900

aaaaataaa aataaaaaa aaaacaaaa cacttgata attctacctg atgttacatt 960

tttctttttt ttttctttt cttttttttt tttttttttt gagatggagt tttcctctgt 1020

caccaggtc ggagtgcagt gacgtgacct cagctcgtg caacctctgc ctcccagatt 1080

caagcaattc tctctcaat tgctcagaag ctgagcaatt ctgcctcagc ttcccaaata 1140

gctgggatta caggtgcgtg ccaccaggt cagctaattt ttgtattttt agtagagatg 1200

gggtttcacc atgttgcca ggctggctct gaactcccga cctcaggtga tacgcccgcc 1260

tcggcctccc aaagtgtgg gattacaggc atgagccact gcgcccagcc tgatgttcca 1320

tttttcta at caccaagtgt atttattagc taagggtatc ccagaaatta aattaccaac 1380

ataaaatatt acttgtgcta ttataattta gctattaaat cctaaaatta tcaactgaaa 1440

gctactggaa aaataaatc ttctctttct ttctccata ttgaaagtaa agagaatgag 1500

gatccttagc taagatttta attaaatctt ttctgagcca gaattgcaa gcttttcttt 1560

gtataaataa ggactcagat tataaagcat agaactagca atgagtcctat cttaggtccat	1620
ttggattgct ataaaggagt acctgaggct gggtaattta taaagaaaag acgtttattc	1680
gacacatgat tctgcaggat gtacaagaag catggcacca gcatctgctc ttggtgaaaa	1740
cttcaggtgg ctttgactcc tgggtgaaga agggaagtct agcttgtgca gagctcccat	1800
ggccagagaa ggaagggggg tttaggaggg tgccaggctc ttgtaataga gcgagaactc	1860
actcattacc aagagaaggc accaagccat tcatgaggga tacaccctg tgacceaaac	1920
cttgcccccc ttccaacatt ggggcttaaa ttccaatgtg atgtttaggg gtacaaacat	1980
ccaaaccaca gcagagaaat acagagttct gtatttctat tcccaaaggg caaaatttgg	2040
gaggtgaatg ggictatatg tgtgttgggg ggaagaagtt aatatgaaga aaagaaacta	2100
aagtgcctta cataataatg agaattacag attaaaaaat ctgtaatctt tccttaaaaa	2160
gggaaagaag taccatgcaa attatgaggt aagtagacta tatgacttat ttatttttat	2220
taggttagag caagaattgc aaactcaagg tctgactcc ttgaattgca ctctatggac	2280
ccagtcatac ttcatattgca tattatata taaatgcttt ggcatgatct ttgctcccc	2340
ttacatctc aaaacactct ttttccattt ttcttaaaat atatgttctt ctttgtctat	2400
atattatttt tccaacttg aaaaggactt acacataaaa atggtatcac tttcttctta	2460
actgtaagaa aaatggtctc agccatacat tgatgaatgg cagctgtcat tcagcctcag	2520
tgtgaaggag acaacaatga gtggtgagga ctgtaataaa atggaaagca catgcccatc	2580
caaaagttag cattcacttc taggaactag taaaaatggt aatagccaga tctttctatt	2640
ttttcacaag aagcctgaaa gtattttaa attttatgac taattcaaat gctttaaaaa	2700
taagcaattt gattctagga ggccaaacta gtgtctatct atgatttaaa ccatagtgtc	2760
tttcagaatt aatgtatgtc cttggcgggt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgatcccaa	2820
aacaccaata attaccagtg aaaaatttag gagattaaat atgtgtactt taatccacat	2880
tgggggaaga gagagatata aaaggtgctg agaacctga agtgggtgcc ctcctgatct	2940
gccttctacc ttttcaacat acgtgctgtg caccatgaaa gacttgaagt gcaatggcaa	3000
tctgtgatcc ttigtgaaa cttttcccta atttgcccca gagtgaatgt ttcacacttg	3060
gattcacatt tgctgagaga ggcggaaaaa tcttagggac aattagaaca ataataacaa	3120
cattcatatt attattcaat gacagcaaca ttcataatca ttctttcatt cagcaaatat	3180
ttattgcaca ctigtatgt gctagaacta taaaatggca atgatgtgtt aggtaatgtg	3240
taatcatggg gaaaaaatca gttaggga gacaaaactg ctttccctta tagagattat	3300

attcattgag gagacaaata ataaataaaa tgaatagtgt aacatagggt agatagtac	3360
aagtgtcatg gagaaaaaga aagtaggaaa gggtcatttc tctggtttcc tgatgtgtaa	3420
ttggaataga tatccttggg agctggtaga atctctgcag tgattccttg tactgtgggg	3480
taaaagctat gtiagcaggg gagaccaaga ggaatagctg aaacaaaatt cactttctca	3540
gtaagatagt aaataagaaa gtgatattgc atcctgggaa acatggccga gattagtgt	3600
tctctttaag acctaaagga tgcagagtga tggccctcac tcctcctcat ttaattcacc	3660
tgtcaggccc ttgcaaaaat tggctctgac ctgggggata ataaactcaa ccaaatagtt	3720
gccccattg cttttgttat gcgagatata tctttgctag aacaaactga ttaacctggc	3780
ctcaggtagc ttgcattgat tggcaaatgt attcatttct attcctgtaa agaaagagaa	3840
acaaaagcac gggaaatgaca cagactttta cagcactgag cagggtctaat tctcatgccc	3900
tctgtcataa tataacctaa agggacttgg actgtctgga tactccgcac atcaacacca	3960
taaccacta tactgatgat atcatgtgtg atggttttca aatatgcaca caaatttctg	4020
attcttcttt cttaagagg tggagcttaa tccccctca attgagggtg agtcgggcat	4080
agtgacttgc ttctaattaa taaaatattg cagaagtgat gatgtggttt ttctaagaca	4140
ctgcaacttc ctttcttgc tctctcttga ataacatgct ctgaaggaaa tcaggtagta	4200
tgtgatgagg acattcaagc aatcctaggg agagattcat gtagaaaaga actaaggcct	4260
cctgccaaaa gccattttag tcagccctct tggaaagtaa cctctaccc ctagttaagc	4320
cttcggatga ctgcagccct gggcagcatc ttgactgcaa actcatgaga gacctgagc	4380
cacaatcacc cagctaagcc actcttaaat tcctgtccta tactgtgaga taataaatgt	4440
ttactgggtt cagctgaaag gtgacagagt gggagtcattg tcaccatctc tggctgtaca	4500
cggagaatt acagtgagt acccttaaca caaccctta gtgtccttc ggtaccagtt	4560
aatgagggt tatcatacaa ctatgattat agagcaatag atctggctta ttcattgagac	4620
acttctgagc agtcataaat taaagcatgc atgcaaaagc ccaagatatg ccgttaacaa	4680
cactggaacc agacctcgtt tttctcactt tattatctgt tctctcttc ttgggtttct	4740
ttttattttg tttttttcca tcattgaatg atgggtgaagt taataatgga aaagaggag	4800
ggaagaagag aagaaaggaa gttgaatata tgaaggacca aagagaatat taccttctc	4860
cttctcgggt gtgcttagac acaaaaccta acatccaaat aaaccaaggt gtcatttggg	4920
tctctaattg agattgccaa gagttctgtg tgagacagat tcctattaaa gtctcagaac	4980
acgttctgtg caagatcatc tctggagagc atatatgttg ggaaaccctt ttcctctgc	5040
cttcctataa ttgggtctgg aacactgttt tgggtccac acatatactt caaccaaca	5100
caatctcaac acaagaagag atcagggtta atggggatca ggaaggaata tgtatccttc	5160

ttccagtcac gaatgaactt agatatacagg gggacaaatt tctgagtgtt atttttccat 5220

ggcttcccct gatgtggcct aagtgggtga ggaggcattt ttcccagccc ttatcaccca 5280

agtctttcta ttctggcccc tcagatagag acttggtaac acatcacttt tgttttggct 5340

gccctgcctg acccacctct cctctttcta acagaaaata gctgctgccc cactcctgtg 5400

ccaaaatctg ctccaaggga tctataccta gtcagaaggc tgtactctga atgctgatat 5460

tagctacaac accaaggctt cccactatac aaactggatc ctcaaagtca tccacaccaa 5520

atgaactctc tattctttct cccagtagcc tgagaactgg gtttaccagc cttggccctt 5580

cctttcttc tagcctcaaa acaggatggg aacagagtct ttggctgtga gaatgggctc 5640

aataacaaaa taaagatgac agaagagtca gtgacttcaa tgacagagcg atagaaatta 5700

ccaatataaa cggagagaaa agagattttt taaaaatgaa caaatcccca aggacctgtg 5760

agacaataac tgtgttaggt ttcttaaaact tacaagtgtt tttatttata tatggtaagc 5820

aactatgcat tatttgtgtc agaattattt ttgtatata ttttaaggat acaacatgat 5880

gtctcaacat acttataatg agtgaaatgg ttactacagt caccacactt attgtctcac 5940

aggttattgt cttcagaagg agagtaaaaa gaatgctggg tagaagaaat acctgaagaa 6000

ataatggccc aacctcaaat ttggtgaaag acataaactt acagattcaa gaaactgagt 6060

gttcccaaaa cagaataaac tttaaagaat ccacactcaa acacatcata atcaaacttc 6120

tgaaaactaa caacaaagaa aaacttaaaa tcagcaagag agaaaccaca cattatcaac 6180

tgatgaaaag tgactcaagt gacagcagat ttataatcag aaacttgaag gacagaagga 6240

agaggcaaaa catTTTgaaa gccctaaaag gaaagaactg tcaaccaga attcgacatc 6300

cagtaaaaat atccgtcaag aatgaatatg aaggaaagct aagaatgaat atatcttcta 6360

tttctttgct aaatttttct actttttcat ttgatgtaag agtgtttata agtgcttatg 6420

gagcattttt atgatatgtg gtttacaatc cttgtctgag agtagctatg tgagatgacg 6480

tatatagtaa atggtgactg tagtaacctt ttactacat ataagtatgt caaaacatgt 6540

tgtacacctt aaatatacac aaaaaatagc tctgacacaa aaaatgcata gttgttatta 6600

ccatgtataa ataaaaatag ttgtaagttt agaaaataaa atcatgtgtc gataattatc 6660

taaataataa agtcc 6675

<210> 3

<211> 6675

<212> DNA

<213> Homo sapiens(HERES gene)

<400> 3

ggcaaccagc ttgcgtccgt ttccatgttg tgggagattt gttctttcgc tcttttggt	60
aaatcttgct actgctcact ctttgagtcc acactgcttt tatgagctgt aacactcacc	120
gggaaggctc gcagcttcaa tctgaagcc agcgaggcca ccagcccacc gggaggaacg	180
aacaactcca gacgcaccgc cttaagagct gtaacactca ccgcgaaggt ctgcagcttc	240
actcctgagc cagcgagacc acgaaccac cagaagaaag aaactccgaa cacatccgaa	300
caccagaagg aacaaactcc agacgcgcca actgtaacac tcaccgcgag gatccgtggc	360
ttcattcttg aagtcagtga gaccaagaac ccaccaattc cggacacact gtgagtcagg	420
atcagcttta ttatagctaa ttagagcaac ccattgcta aagagtttag agcctgggtc	480
agacttcatt gtagcaaagc aatgttttat tgtaaatagt taattaggaa tgtgtggcaa	540
tattttaacc cctcctcca agagtccac aatgctttct taacatgttt ataaatattt	600
gcttttgctc cattttaggg gagctttccg tacaacatt tggcttttaa tgagtcatcc	660
acactctgat tcatacccat aagcttcctg ctttgttatt agtgaatatt gggctcagta	720
actgccttac ttttataatt tacatgaatg aatatggaaa aggtgggtgga ggtagaaaga	780
catattcagg taaatataaa aacaccctgg tttctttaca agagattgac aaatacggcc	840
caatacccta tcatttaaag taagtgccag aattgtgatg gatttgtgtt tggccttaaa	900
aaaaaataaa aataaaaata aaaacaaaaa cacttggata attctacctg atgttacatt	960
tttctttttt ttttctttt cttttttttt ttttttttt gagatggagt tttcctctgt	1020
caccaggct ggagtgcagt gacgtgacct cagctcgtg caacctctgc ctcccagatt	1080
caagcaattc tctctcaat tgctcagaag ctgagcaatt ctgcctcagc ttcccaaata	1140
gctgggatta caggtgcgtg ccaccaggct cagctaattt ttgtattttt agtagagatg	1200
gggtttcacc atgttgcca ggctggtctt gaactcccga cctcaggtga tacgcccgcc	1260
tcggcctccc aaagtgetgg gattacaggc atgagccact gcgcccagcc tgatgttcca	1320
tttttcta at caccaagtgt atttattagc taagggtatc ccagaaatta aattaccaac	1380
ataaaatttt acttgtgcta ttataattta gctattaaat cctaaaatta tcaactgaaa	1440
gctactggaa aaataaatac ttctctttct tttctccata ttgaaagtaa agagaatgag	1500
gatccttagc taagatttta attaaatctt tttctgagcca gaattgcaaa gcttttcttt	1560
gtataaataa ggactcgagt tataaagcat agaactagca atgagtctat ctgggtccat	1620
ttggattgct ataaaggagt acctgaggct gggtaattha taaagaaaag acgtttattc	1680
gacacatgat tctgcaggat gtacaagaag catggcacca gcatctgctc ttggtgaaaa	1740
cttcaggtag ctttgaactc tgggtgaaga agggaagtct agcttgtgca gagctcccat	1800
ggccagagaa ggaagggggg tttagaggagg tgccaggctc tttgaataga gcgagaactc	1860

actcattacc aagagaaggc accaagccat tcatgagga tacacccctg tgacccaaac	1920
cttgccccc ttccaacatt ggggcttaaa tttcaatgtg atgtttaggg gtacaaacat	1980
ccaaaccaca gcagagaaat acagagtctt gtattttctat tcccaaaggg caaaatttgg	2040
gaggtgaatg ggtctatatg tgtgttgggg ggaagaagtt aatatgaaga aaagaaacta	2100
aagtgcctta cataataatg agaattacag attaaaaaat ctgtaatctt tccctaaaaa	2160
gggaaagaag taccatgcaa attatgaggt aagtagacta tatgacttat ttatttttat	2220
taggttagag caagaattgc aaactcaagg tctgactcc ttgaattgca ctctatggac	2280
ccagtcatac ttcatattga tattatata taaatgcttt ggcatgatct ttgtccccc	2340
ttacatcctc aaaacactct ttttccattt ttcttaaaat atatgttcct ctttgtctat	2400
attttatttt tccaactttg aaaaggactt acacataaaa atgggtatcac tttcttctta	2460
actgtaagaa aaatggtctc agccatacat tgatgaatgg cagctgtcat tcagcctcag	2520
tgtgaaggag acaacaatga gtggtgagga ctgtaataaa atggaaagca catgcccatc	2580
caaaagttag cattcacttc taggaactag taaaaatggg aatagccaga tctttctatt	2640
ttttcacaag aagcctgaaa gtattttaat attttatgac taattcaaat gctttaaaaa	2700
taagcaattt gattctagga ggccaaacta gttgctatct atgatttaaa ccatagtgtc	2760
tttcagaatt aatgtatgtc cttggcgggt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgatcccaa	2820
aacaccaata attaccagtg aaaaatttag gagattaaat atgtgtactt taatccacat	2880
tgggggaaga gagagatata aaaggtgctg agaaccttga agtggtgccc ctctgatct	2940
gccttctacc tcttcaacat acgtgctgtg caccatgaaa gacttgaagt gcaatggcaa	3000
tctgtgatcc ttigtgaaa cctttccctt atttgcccca gagtgaatgt ttcacacttg	3060
gattcacatt tgctgagaga ggcgaaaaa tcttagggac aattagaaca ataatacaa	3120
cattcatatt attattcaat gacagcaaca ttcataattc ttctttcatt cagcaaatat	3180
ttattgcaca ctigctatgt gctagaacta taaaatggca atgatgtgtt aggtaatgtg	3240
taatcatggg gaaaaaatca gttagggaaa gacaaaactg ccttccctta tagagattat	3300
attcatttag gagacaaata ataaataaaa tgaatagtgt aacataggtt agatagtac	3360
aagtgtatg gagaaaaaga aagtaggaaa gggtcatttc tctggtttcc tgatgtgtaa	3420
ttggaataga tatccttggg agctggtaga atctctgcag tgattccttg tactgtgggg	3480
taaaagctat gtiagcaggg gagaccaaga ggaatagctg aaacaaaatt cactttctca	3540
gtaagatagt aaataagaaa gtgatattgc atcctgggaa acatggccga gattagtgt	3600

tctctttaag acctaaagga tgcagagtga tggccctcac tcctctcat ttaattcacc	3660
tgtcaggccc ttgcaaaaat tggctctgac ctgggggata ataaactcaa ccaaatagtt	3720
gcccgaattg cttttgttat gcgagatata tctttgctag aacaaactga ttaacctggc	3780
ctcaggtacc ttgcattgat tggcaaatgt attcatttct attcctgtaa agaaagagaa	3840
acaaaagcac gggaatgaca cagactttta cagcactgag cagggctaatt tctcatgccc	3900
tctgtcataa tataacctaa agggacttgg actgtctgga tactccgcac atcaacacca	3960
taaccacta tactgatgat atcatgtgtg atggttttca aatatgcaca caaatttctg	4020
attcttcttt cttcaagagg tggagcttaa ttccccttca attgagggtg agtcgggcat	4080
agtgacttgc ttctaattaa taaaatatig cagaagtgat gatgtggttt ttctaagaca	4140
ctgcaacttc ctttcttgc tctctcttga ataacatgct ctgaaggaaa tcaggtacta	4200
tgtgatgagg acattcaagc aatcctaggg agagattcat gtagaaaaga actaaggcct	4260
cctgccaaaa gccattttag tcagccctct tggaagttaa cctctaccc ctagttaagc	4320
cttcggatga ctgcagccct gggcagcatc ttgactgcaa actcatgaga gaccctgagc	4380
cacaatcacc cagctaagcc actcttaaat tctgttcta tactgtgaga taataaatgt	4440
ttactgggtt cagctgaaag gtgacagagt gggagtcattg tcaccatctc tggtgtlaca	4500
cggaagaatt acagtgagtg acctttaaca caaccctta gtgctcttc ggtaccaggt	4560
aaatgaggggt tatcatacaa ctatgattat agagcaatag atctggctta ttcattgagac	4620
acttctgagc agtcataaat taaagcatgc atgcaaaagc ccaagatatg ccgttaacaa	4680
cactggaacc agacctcgggt tttctcactt tattatctgt tctcctcttc ttiggtttct	4740
ttttattttg tttttttcca tcatitgaatg atggtgaagt taataatgga aaagaggagag	4800
ggaagaagag aagaaaggaa gttgaatata tgaaggacca aagagaatat taccttcctc	4860
cttctcgggt gtgcttagac acaaaacctt acatccaaat aaaccaaggt gtcatttga	4920
tctctaattgg agattgccaa gaggttctga tgagacagat tcctattaaa gtctcagaac	4980
acgttctgtg caagatcatc tctggagagc atatatgttg ggaaaccctt ttcctctgc	5040
cttcctaaa ttiggtctgg aacactgttt tggggtccac acatatacctt caaccaaca	5100
caatctcaac acaagaagag atcagggtta atggggatca ggaaggaata tgtatccttc	5160
ttccagtcac gaatgaactt agatatcagg gggacaaatt tctgagtgtt atttctccat	5220
ggcttccctt gatgtggcct aagtgggtga ggaggcattt ttcccagccc ttatcaccca	5280
agtctttcta ttctggcccc tcagatagag acttggtaat acatcacttt tgttttggct	5340

gccctgcctg acccacctct cctcttttcta acagaaaata gctgctgccc cactcctgtg 5400
 ccaaaatctg ctccaaggga tcctatccta gtcagaaggc tgtactctga atgctgatat 5460
 tagctacaac accaaggttt cccactatac aaactggatc ctcaaagtca tccacaccaa 5520
 atgaactctc tattctttct cccagtagcc tgagaactgg gtttaccagc cttggccctt 5580
 cctttccttc tagcctcaaa acaggatggg aacagagtct ttggctgtga gaatgggctc 5640
 aataacaaaa taaagatgac agaagagtca gtgacttcaa tgacagagcg atagaaatta 5700
 ccaatataaa cggagagaaa agagattttt taaaaatgaa caaatcccca aggacctgtg 5760

agacaataac tgtgttaggt tttctaaact tacaagtgtt tttatttata tatggtgaagc 5820
 aactatgcat tatttgtgtc agaattatit tttgtatata ttttaaggat acaacatgat 5880
 gtctcaacat acttatatgt agtgaaatgg ttactacagt caccacactt attgtctcac 5940
 aggttattgt cttcagaagg agagtaaaaa gaatgctggg tagaagaaat acctgaagaa 6000
 ataatggccc aacctcaaat ttggtgaaag acataaactt acagattcaa gaaactgagt 6060
 gttcccaaaa cagaataaac tttaagaat ccacactcaa acacatcata atcaaacttc 6120
 tgaaaactaa caacaaagaa aaacttaaaa tcagcaagag agaaaccaca cattatcaac 6180

tgatgaaaag tgactcaagt gacagcagat ttataatcag aaacttgaag gacagaagga 6240
 agaggcaaaa catittgaaa gccctaaaag gaaagaactg tcaaccaga attcgacatc 6300
 cagtaaaaat atccgtcaag aatgaatatg aaggaaagct aagaatgaat atatcttcta 6360
 tttctttgct aaatitttct actttttcat ttgatgtaag agtgtttata agtgcttatg 6420
 gagcatTTTT atgatagtgt gtttacaatc cttgtctgag agtagctatg tgagatgacg 6480
 tatatagtaa atggtgactg tagtaacat ttcactacat ataagtatgt caaaacatgt 6540
 tgtacacctt aaatatacac aaaaaatagc tctgacacaa aaaatgcata gttgttatta 6600

ccatgtataa ataaaaatc ttgtaagttt agaaaataaa atcatgtgtc gataattatc 6660
 taaataataa agtcc 6675

<210> 4

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siHERES_1 Sense Sequence

<400> 4

cacugugagu caggaucagu cuuau 25

<210> 5

<211> 25

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siHERES_1 Antisense Sequence	
<400>	5	
	auaagacuga uccugacuca cagug	25
<210>	6	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siHERES_2 Sense Sequence	
<400>	6	
	cacaccaaau gaacucucua uucuu	25
<210>	7	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siHERES_2 Antisense Sequence	
<400>	7	
	aagaauagag aguucuuug gugug	25