



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월28일

(11) 등록번호 10-2343918

(24) 등록일자 2021년12월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/436 (2006.01) *A61K 31/4725* (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/436 (2013.01)
A61K 31/4725 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0105574(분할)
(22) 출원일자 2020년08월21일
심사청구일자 2020년09월18일
(65) 공개번호 10-2020-0102976
(43) 공개일자 2020년09월01일
(62) 원출원 특허 10-2019-0101251
원출원일자 2019년08월19일
심사청구일자 2019년08월19일
- (30) 우선권주장
1020150031606 2015년03월06일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
Expert Rev. Neurother., 13(6), 627-638
쪽(2013.06.) 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
이정호
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)
임재석
대전광역시 유성구 상대로 16 (상대동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 9 항

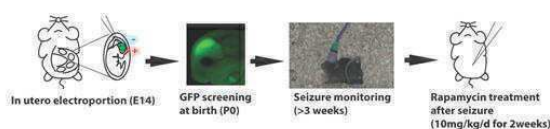
심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 mTOR 억제제를 포함하는 난치성 뇌전증의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 난치성 뇌전증, 예를 들면 국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD)의 예방, 개선 또는 치료에 관한 것이다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

A61K 31/497 (2013.01)

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 31/5377 (2013.01)

(72) 발명자

김우일

대전광역시 유성구 궁동

김동석

서울특별시 서대문구 통일로34길 43, 103동 704호
(홍제동, 홍제원현대아파트)

강훈철

서울특별시 서초구 잠원로14길 48(잠원동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 04120790

과제번호 HI13C0208

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 차세대 염기서열 분석법을 응용한 난치성 소아 뇌전증의 새로운 원인 유전변이 발굴

기 여 율 1/3

과제수행기관명 한국과학기술원

연구기간 2012.12.01 ~ 2015.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 04130226

과제번호 A121070

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 ciliopathy 질환에서 발생하는 뇌신경 기능 이상의 분자 유 전학적 원인 규명

기 여 율 1/3

과제수행기관명 한국과학기술원

연구기간 2012.11.01 ~ 2015.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 01130718

과제번호 2013M3C7A1056564

부처명 미래창조과학부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발

연구과제명 차세대 염기서열 분석법을 응용한 mTOR 신호 전달계 관련 대뇌피질 발달 장애 제어

인자 발굴 및 조기 진단 유전자 패널 개발

기 여 율 1/3

과제수행기관명 한국과학기술원

연구기간 2013.08.01 ~ 2016.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

mTOR 저해제로서 에베로리무스 (Everolimus) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 사람 대상에서 2형 국소 피질 이형성증 (FCD type II형) 또는 2형 국소 피질 이형성증에 의한 증상의 개선, 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 사람 대상은, mTOR, TSC1, TSC2, AKT3, 및 PIK3CA 단백질, 그리고 상기 단백질을 암호화하는 핵산분자로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상에서 일어난 뇌 체성 변이를 가지며, 상기 mTOR의 뇌 체성 변이는 서열번호 2의 아미노산 서열에서 206번, 624번, 1450번, 1709번, 1977번, 2193번 및 2215번 아미노산으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상에 위치하는 것인,

약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 대상은 상기 뇌 체성 변이에 의한 mTOR 과활성화 특성을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 대상은 인산화된 S6 단백질을 포함하는 뇌 신경세포의 수가 증가하는 특성을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 2형 국소 피질 이형성증에 의한 증상은, 자발적 발작, 행동발작, 뇌파 발작, 또는 대뇌에서 비정상적인 신경 세포의 발생인 것인 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사용인 것인 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

서열번호 4의 아미노산 서열에 있어서 22번, 204번, 및 811번,

서열번호 6의 아미노산 서열에 있어서 1547번,

서열번호 8의 아미노산 서열에 있어서 247번, 및

서열번호 10의 아미노산 서열에 있어서 1018번 아미노산에서 일어나는 아미노산 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 뇌 체성 변이는,

서열번호 2의 아미노산 서열에 있어서, 206번 알지닌(R)이 시스테인(C)로 치환, 624번 알지닌(R)이 히스티딘

(H)으로 치환, 1450번 티로신(Y)이 아스파르트 산(D)으로 치환, 1709번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1977번 트레오닌(T)이 리신(K)으로 치환, 2193번 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 및 2215번 세린(S)이 페닐알라닌(F)으로 치환,

서열번호 4의 아미노산 서열에 있어서 22번 알지닌(R)이 트립토판(W)으로 치환, 204번 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 및 811번 알지닌(R)이 루신(L)으로 치환,

서열번호 6의 아미노산 서열에 있어서 1547번 발린(V)이 이소루신(I)으로 치환,

서열번호 8의 아미노산 서열에 있어서, 247번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 및

서열번호 10의 아미노산 서열에 있어서, 1018번 아스파르트산(D)이 아스파라긴(N)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 뇌 체성 변이는,

서열번호 1의 염기서열에 있어서, 616번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 1871번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 4348번 위치의 티민(T)이 구아닌(G)으로 치환, 5126번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 5930번 위치의 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환, 6577번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 및 6644번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환,

서열번호 3의 염기서열에 있어서 64번 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 610번 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 2432번 구아닌(G)이 티민(T)으로 치환,

서열번호 5의 염기 서열에 있어서 4639번째 구아닌이 아데닌(A)으로 치환,

서열번호 7의 염기 서열에 있어서, 740번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 및

서열번호 9의 염기 서열에 있어서, 3052번 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 안정화제, 계면활성제, 젤화제, pH 조절제, 항산화제 및 보존제로 이루어진 군에서 선택된 화합물을 추가적으로 포함하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 난치성 뇌전증, 예를 들면 국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD)의 예방, 개선 또는 치료에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌전증(epilepsy)은 신경세포 중 일부가 짧은 시간에 과도한 전기를 발생시켜 반복적으로 발작이 발생하는 만성화된 질환군으로서, 신경생물학적, 정신적, 인지적, 사회적 변화를 수반하는 심각한 신경 질환이다.

[0003] 뇌전증 중에서 현재까지 개발된 항뇌전증 약물에 반응하지 않는 뇌전증을 난치성 뇌전증(intractable epilepsy)이라고 하며, 전체 뇌전증의 약 20%를 차지하고 있다. 난치성 뇌전증의 원인질환으로는, 국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD), 편측 거대뇌증(hemimegalencephaly, HME) 및 결절성 경화증(Tuberous sclerosis complex, TSC)과 같은 대뇌피질 발달기형(Malformations of Cortical Developments, MCD), 해마경화증(hippocampal sclerosis, HS), 또는 스테지웨버신드롬(Sturge weber syndrome, SWS) 등이 알려져 있다.

[0004] 난치성 뇌전증은 현재 존재하는 항뇌전증 약물에 반응 하지 않아, 뇌전증 조절을 위하여 뇌 병변을 절제하는 뇌신경외과적 처리(neurosurgical treatment)를 필요로 하므로, 난치성 뇌전증을 유발하는 대뇌피질 발달기형 또는 해마경화증에 특이적인 분자생물학적 진단 기술의 개발이 필요하다.

- [0005] 항전간제로 조절되지 않는 난치성 뇌전증의 중요한 원인중 하나로 국소 피질 이형성증이 있으며, 이는 뇌전증으로 인해 수술받은 환자의 50%에 이른다. 국소 피질 이형성증은 산발적으로 발생하는 대뇌피질 발달 기형 중 하나로 영향받은 부위의 대뇌피질의 구조적 이상과 신경세포의 세포학적 이상을 동반한다.
- [0006] 국소 피질 이형성증의 외과적 절제는 60%의 환자를 발작으로부터 자유롭게 하지만, 여전히 많은 환자에게서 수술 후에도 간질발작이 지속되는 문제점이 있다. 또한, 국소 피질 이형성증의 분자유전학적 원인이 밝혀져 있지 않기 때문에 새롭고 효과적인 국소 피질 이형성증 치료법의 개발이 어려운 실정이다. 그 동안 많은 연구를 통해 국소 피질 이형성증이 대뇌 발달 중 체성 유전변이의 영향으로 인해 발생한다는 가설이 세워졌지만, 아직까지 이러한 체성 유전변이가 확인된 바는 없다.
- [0007] 국소 피질 이형성증은 병리학적 기준에 의해 몇 가지 형태로 구분된다. 이 중 FCDII는 균일한 병리적 소견으로 보이는데 피질 층형성 이상과 이상신경세포(dysmorphic neuron) 또는 풍선 세포(balloon cell)을 확인할 수 있다(Epilepsia 52, 158-174 (2011)). 뇌전증 수술을 받는 FCD 환자의 29 내지 39%가 FCDII에 해당한다(Brain 129, 1907-1916 (2006)). 인유두종바이러스(Human papiloma virus)와 FCDII의 연관성이 보고되기는 하였지만, FCDII의 분자유전학적 원인은 아직까지 이해가 부족한 실정이다. 흥미롭게도 FCDII 환자의 뇌자기공명영상은 때때로 정상소견을 보이지만 수술한 조직의 현미경 검사를 시행하면 많은 정상세포에 둘러싸인 이상신경세포들이 관찰된다. 이러한 방사선학적, 조직병리학적 소견을 종합해볼 때, 수술한 조직에 체성유전변이를 포함한 신경세포가 매우 적게 포함되어 있을 가능성이 있지만, 이러한 저빈도의 체성유전변이는 고전적인 생어 시퀀싱(sanger sequencing)이나 read depth 100~150x의 전형적인 전체 엑솜 염기서열 분석법(whole exome sequencing)으로는 효과적으로 발견하기 어렵다.
- [0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 국소 피질 이형성증 수술 환자의 뇌 조직 시료(brain tissue)에 대하여, 전체 엑솜 염기서열 분석법, 하이브리드 캡처 염기서열 분석법(hybrid capture sequencing), 앰플리콘 염기서열 분석법(amplicon sequencing)의 다양한 deep sequencing 기법을 사용하여 국소 피질 이형성증의 뇌 병변 특이적 체성 유전 변이를 발굴하였고, 이러한 체성 유전 변이를 이용하여 국소 피질 이형성증을 나타내는 형질전환 동물을 확립하였으며, 상기 형질전환 동물에 mTOR 억제제를 투여하는 경우 우수하게 국소 피질 이형성증에 대한 증상이 억제될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은, mTOR 저해제를 유효성분으로 포함하는, PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관련된 유전자의 뇌 체성변이에 의한 난치성 뇌전증, 또는 국소 피질 이형성증(FCD), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테이지웨버신드롬(SWS)으로 인한 난치성 뇌전증의 예방, 개선 또는 치료용 키트, 또는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 추가 목적은 mTOR 저해제를 유효성분으로 포함하는, 뇌전증 또는 뇌전증의 원인질환의 예방, 개선, 또는 치료 용도에 관한 것으로서, 난치성 뇌전증은 국소 피질 이형성증에 의한 것일 수 있으며, 자세하게는 국소 피질 이형성증은 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관련된 유전자의 뇌 체성변이에 의한 난치성 뇌전증, 또는 국소 피질 이형성증(FCD), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테이지웨버신드롬(SWS)으로 인한 난치성 뇌전증의 예방, 개선 또는 치료에 관한 약학 조성물 또는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 목적은 mTOR 저해제를 유효성분으로 포함하는, 뇌전증 또는 뇌전증의 원인질환의 예방, 개선, 또는 치료 용도에 관한 것으로서, 난치성 뇌전증은 국소 피질 이형성증에 의한 것일 수 있으며, 자세하게는 국소 피질 이형성증은 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증일 수 있다.
- [0013] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0014] 본 발명자들은 국소 피질 이형성증(FCD), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테이지웨버신드롬(SWS)으로 인한 난치성 뇌전증 수술 환자의 뇌 조직 시료를 분석한 결과, PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자들의 뇌 체성 변이가 특이적으로 존재한다는 것을 확인하였고, 이들 변이들이 난치성 뇌전증을 진단하기 위한 바이오마커 패널로 활용될 수 있음을 확인하였다. 나아가, 본 발명자들은 상기 변이체를 세포에 도입할 경우 mTOR이 과활성화되므로 난치성 뇌전증이 유발될 수 있음을 확인하여 국소 피질 이형성증(FCD), 결절성 경화증,

편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테지웨버신드롬(SWS)으로 인한 난치성 뇌전증의 예방, 개선 또는 치료와, 이들 난치성 뇌전증의 원인 질환인 국소 피질 이형성증(FCD), 결절성 경화증(TSC), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테지웨버신드롬(SWS)의 예방, 개선 또는 치료 용도를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0016] 본 발명자들은 국소 피질 이형성증으로 인한 난치성 뇌전증 수술 환자로부터 뇌 조직, 타액, 혈액 시료를 확보하였고, 염기서열 분석을 통하여, 상기 국소 피질 이형성증으로 인한 난치성 뇌전증 환자들에 특이적으로 존재하는 mTOR 유전자의 유전 변이 및 이에 의한 mTOR 단백질 변이 각 10종과 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 변이 및 이에 의한 단백질 변이 6종을 확인하였다 (표 1).

표 1

순번	유전자 종류	mTOR 유전자 변이	mTOR 단백질 변이	비고
1	mTOR	C616T	R206C	616번 위치의 시토신(C) -> 티민(T) 206번 알라닌(R)-> 시스테인(C)
2	mTOR	G1871A	R624H	1871번 구아닌(G) -> 아데닌(A) 624번 알라닌(R)-> 히스티딘(H)
3	mTOR	T4348G	Y1450D	4348번 티민(T) -> 구아닌(G) 1450번 타이로신(Y) -> 아스파르트산(D)
4	mTOR	T4447C	C1483R	447번 티민(T) -> 시토신(C) 483번 시스테인(C) -> 알라닌(R)
5	mTOR	G5126A	R1709H	126번 구아닌(G) -> 아데닌(A) 1709번 알라닌(R) -> 히스티딘(H)
6	mTOR	C5930A	T1977K	5930번 시토신(C) -> 아데닌(A) 1977번 트레오닌(T) -> 라이신(K)
7	mTOR	C6577T	R2193C	6577번 시토신(C) -> 티민(T) 2193번 알라닌(R) -> 시스테인(C)
8	mTOR	C6644T	S2215F	6644번 시토신(C) -> 티민(T) 2215번 세린(S) -> 페닐알라닌(F)
9	mTOR	T7280C	L2427P	7280번 티민(T) -> 시토신(C) 2427번 루신(L) -> 프롤린(P)
10	mTOR	T7280A	L2427Q	7280번 티민(T)-> 아데닌(A) 427번 루신(L) -> 글루타민(Q)
11	TSC1	C64T	R22W	64번 시토신(C) -> 티민(T) 22번째 알라닌(R)-> 트립토판(W)
12	TSC1	C610T	R204C	610번 시토신(C) -> 티민(T) 204번째 알라닌(R) -> 시스테인(C)
13	TSC1	G2432T	R811L	2432번 구아닌(G)-> 티민(T) 811번째 알라닌(R)-> 루신(L)
14	TSC2	G4639A	V1547I	4639번째 구아닌(G) -> 아데닌(A) 1547번째 발린(V) -> 이소류신(I)
15	AKT3	G740A	R247H	740번째 구아닌(G)->아데닌(A) 247번째 알라닌(R) -> 히스티딘(H)
16	PIK3CA	G3052A	D1018N	3052번 구아닌(G) ->아데닌(A) 1018번 아스파르트산(D) ->아스파라긴(N)

[0018] 상기 mTOR 변이는 타액에서는 발견되지 않았고, 뇌 조직 시료에서 특이적으로 발견되었다. 또한, 국소 피질 이형성증 환자 시료에 상기 10종의 유전 변이 중 1종 또는 그 이상이 존재하는 것을 확인하였고, 유전변이율은 1.26%에서 12.6%까지 비율로 존재하는 것도 확인하였다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 상기 유전변이를 발현할 수 있는 mTOR 변이체 작제물(mTOR mutant construct)을 제조하여, 세포에 형질도입(transfection) 시켜 mTOR 단백질 활성 변화를 알 수 있는 S6 단백질의 인산화 및 mTOR 인산화효소 활성을 측정하였다. 그 결과 mTOR 단백질 활성 변화를 알 수 있는 S6 단백질의 인산화가 증가하고 (도 2a), mTOR 인산화효소 활성이 증가하는 것을 확인하였다 (도 2b). 이를 통해, mTOR 단백질이 과잉활성화(hyperactivation)되어 인산화된 S6 단백질이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 상기 mTOR 변이체 작제물이 도입되어 mTOR 단백질이 과잉활성화된 세포에 라파마

이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물을 처리한 경우, 증가된 S6 단백질의 인산화가 저해되는 것을 확인하였다(도 9a 내지 도 9c).

[0019] 한편, 본 발명에서 제공하는 mTOR 변이가 국소 피질 이형성증을 유발한다는 것은, 국소 피질 이형성증에 의한 난치성 뇌전증 환자(mTOR 유전변이 확인)의 뇌 병리학 샘플에서 인산화된 S6 단백질의 증가와 신경세포의 크기가 크게 증가한 것(도 2c 내지 2e), 그리고 mTOR 변이체 작제물을 배아기 14일째 주입한 마우스의 대뇌 피질에서 신경 세포의 이동에 심각한 장애가 발생하고 인산화된 S6 단백질이 크게 증가하는 것(도 11b, 11c)에 의하여 다시 한 번 확인되었다.

[0020] 이에, 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 유전변이를 발현할 수 있는 mTOR 변이체 작제물을 배아기 14일(E14)의 배아 마우스의 측뇌실로 전기전공한 배아를 태어나게 한 후, 생후 3주 이후부터 비디오 뇌전도(Video-Electroencephalography, video-EEG) 감시를 시행한 결과, 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 변이 유전자를 삽입한 플라스미드를 주입한 마우스에서 간질파를 동반한 자발적 발작을 확인하였고(도 12a 및 12b), 나아가, mTOR 변이체 작제물을 전기전공한 대뇌영역의 GFP 양성세포의 세포크기가 매우 증가되어있어 거대 신경세포와 같은 비정상적인 신경세포 형태를 보이는 것을 확인하였다(도 3d).

[0021] 또한, 자발적 발작 또는 비정상적 신경 세포를 나타내는 상기 동물모델에 대하여 라파마이신을 투여한 경우, 행동발작과 뇌파발작 횟수가 감소하였고(도 3c), 비정상적인 신경 세포의 크기가 감소하는 것을 확인하였다(도 3d).

[0022] 이와 같이, 본 발명에서는 상기 유전변이가 일어난 유전자 또는 아미노산 서열에 변이가 일어난 단백질이 국소 피질 이형성증 환자 시료에서 특이적으로 검출될 뿐만 아니라, 상기 변이들이 국소 피질 이형성증을 유발할 수 있음을 입증하였다. 아울러, 본 발명에서는 mTOR 저해제, 예를 들면 라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물이 상기 mTOR 변이와 연관된 난치성 뇌전증, 예컨대 국소 피질 이형성증에서 mTOR 단백질의 과잉활성화, 자발적 발작, 행동발작, 뇌파 발작 및 비정상적인 신경 세포 발생 등을 완화시킬 수 있음을 입증하였다.

[0023] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 상기 체성 변이를 각각 발현할 수 있는 변이체 작제물(mTOR mutant construct)을 제조하여, 세포에 형질도입(transfection)하였으며, 그 결과 mTOR 단백질 활성 변화를 알 수 있는 S6K 단백질의 인산화가 증가하고, 라파마이신 처리 후에는 인산화가 감소하였음을 확인하였다. 이러한 결과는, 위와 같은 변이가 일어난 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자 또는 단백질이 mTOR 신호전달계를 활성화시킬 수 있음을 보여주는 결과이며 이에 따라 뇌전증을 유발할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0024] 상기 변이를 포함하는 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자 또는 단백질을 난치성 뇌전증 진단을 위한 바이오마커 패널 유전자 또는 단백질로 제공한다. 또한, 본 발명은 개체의 시료로부터 상기 바이오마커 패널 유전자 또는 단백질을 검출하기 위한 진단 키트 및 이를 이용한 진단 방법을 제공한다. 나아가, 본 발명은 상기 유전 변이 및 단백질 변이를 이용하여 난치성 뇌전증을 유발함으로써 뇌전증 모델을 구축하는 기술을 제공한다.

[0025] 본 발명은 난치성 뇌전증의 예방, 개선 또는 치료와 이들 난치성 뇌전증의 원인 질환인 국소 피질 이형성증, 편측 거대뇌증 및 결절성 경화증과 같은 대뇌피질 발달기형, 해마경화증, 또는 스테이지웨버신드롬의 예방, 개선 또는 치료용 조성물, 키트, 또는 방법을 제공하는 것이다. 바람직하게는, 상기 난치성 뇌전증은 뇌 체성 유전 변이 연관 난치성 뇌전증에 관한 예방, 치료 및/또는 개선 용도에 관한 것이다.

[0026] 구체적으로, 본 발명에 따른 상기 난치성 뇌전증은 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자의 뇌 체성 유전변이에 의한 뇌전증, 또는 국소 피질 이형성증, 편측 거대뇌증 및 결절성 경화증과 같은 대뇌피질 발달기형, 해마경화증, 또는 스테이지웨버신드롬에 의한 뇌전증을 포함한다.

[0027] 본 발명에서 용어 "뇌전증"이란, 신경세포 중 일부가 짧은 시간에 과도한 전기를 발생시켜 발작이 반복적으로 발생하는 만성화된 질환을 의미하며, "난치성 뇌전증"이란, 현재까지 개발된 항뇌전증 약물에 반응하지 않는 뇌전증을 의미한다. 상기 난치성 뇌전증은 국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD), 편측 거대뇌증(hemimegalencephaly, HME) 및 결절성 경화증(Tuberous sclerosis complex, TSC)과 같은 대뇌피질 발달기형(Malformations of Cortical Developments, MCD), 해마경화증(hippocampal sclerosis, HS), 또는 스테이지웨버신드롬(Sturge weber syndrome, SWS)에 의해 유발된 난치성 뇌전증일 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어 "국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD)"이란, 대뇌 피질의 정상적인 발달과정에서 신경세포는 뇌의 한 영역에서부터 다른 영역으로 이동하여 층구조를 형성하는데, 신경세포의 부적절한 이동으로 인해 정상적인 층구조를 형성하지 못하여 발생하는 질환을 의미한다. 이는 대뇌의 전체 영역 중 일부 지역이 정상적인 발달을 실패하는 경우 일 수 있으며, 방사선학적 영상에서 정상적으로 발달한 것처럼 보이는 지

역에서도 병리적으로 일부 세포가 비정상적인 세포의 형태를 나타내어 발생하는 질환일 수 있다. 이러한, 국소 피질 이형성증은 대뇌에서 산발적으로 발생하고, 이형(dysmorphic) 신경세포를 보이고 영향을 받은 부위의 층구조(lamination) 파괴를 동반할 수 있다.

- [0029] 상기 국소 피질 이형성증과 연관된 뇌 체성 유전 변이는 mTOR 유전자의 유전 변이 또는 mTOR 단백질의 아미노산 변이일 수 있다.
- [0030] mTOR(mammalian target of rapamycin) 단백질은 인간에서 FRAP1 유전자에 의해 발현되며, 기능적으로 세포 성장, 세포 증식, 세포 사망, 세포 생존, 단백질 합성 및 전사를 조절하는 세린/트레오닌 단백질 키나제 (serine/threonine protein kinase)로서, 포스포티딜이노시톨 3-인산화-관련 키나제 단백질 패밀리 (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase protein family)에 속한다. 본 발명에서 야생형의 mTOR 유전자의 염기 서열은 서열번호 1, mTOR 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 2로 나타내었다.
- [0031] 본 발명에서 용어 "뇌 체성 유전 변이"란, 야생형의 유전자에서 하나 이상의 위치에서 염기서열의 변이가 일어난 것을 의미한다. 예를 들면 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자 또는 이들 유전자에 상응하는 단백질의 아미노산 변이일 수 있다. 구체적인 예로서, 야생형의 mTOR 유전자인 서열번호 1의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 서열번호 1의 염기서열의 616번, 1871번, 4348번, 4447번, 5126번, 5930번, 6577번, 6644번, 7280번 및 7280번으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기에서 염기치환이 일어난 변이를 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.
- [0032] 또 다른 예로, 본 발명에서 뇌 체성 유전 변이는, 야생형의 mTOR 단백질인 서열번호 2의 단백질의 아미노산 서열에 변이가 일어난 것일 수 있다. 예를 들어, 서열번호 2의 아미노산 서열의 206번 위치의 알라닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 624번 위치의 R이 H로 치환, 1450번 위치의 Y가 D로 치환, 1483번 위치의 C가 R로 치환, 1709번 위치의 R이 H로 치환, 1977번 위치의 T가 K로 치환, 2193번 위치의 R이 C로 치환, 2215번 위치의 S가 F로 치환, 2427번 위치의 L이 P로 치환, 및 2427번 위치의 L이 Q로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다. 상기 치환된 아미노산은 서열번호 1의 염기서열에서 대응하는 위치의 염기서열 변이를 포함하는 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있다. 각각의 변이 염기를 포함하는 염기서열과 대응하는 아미노산 변이를 상기 표 1에 나타난 바와 같다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "TSC1 변이 유전자"란, 야생형의 TSC1 유전자인 서열번호 3의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 3의 염기서열에 있어서, 64번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 610번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 및 2432번째 구아닌(G)이 티민(T)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어 "TSC1 변이 단백질"이란, 야생형의 TSC1 단백질인 서열번호 4의 단백질의 아미노산 서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 4의 아미노산 서열에 있어서, 22번째 알라닌(R)이 트립토판(W)으로 치환, 204번째 알라닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 및 811번째 알라닌(R)이 루신(L)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어 "TSC2 변이 유전자"란, 야생형의 TSC2 유전자인 서열번호 5의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 5의 염기서열에 있어서, 4639번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환을 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 용어 "TSC2 변이 단백질"이란, 야생형의 TSC2 단백질인 서열번호 6의 단백질의 아미노산 서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 6의 아미노산 서열에 있어서, 1547번째 발린(V)이 이소루신(I)으로 치환을 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 용어 "AKT3 변이 유전자"란, 야생형의 AKT3 유전자인 서열번호 7의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 7의 염기서열에 있어서, 740번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환을 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 용어 "AKT3 변이 단백질"이란, 야생형의 AKT3 단백질인 서열번호 8의 단백질의 아미노산 서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 8의 아미노산 서열에 있어서, 247번째 알라닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환을 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 용어 "PIK3CA 변이 유전자"란, 야생형의 PIK3CA 유전자인 서열번호 9의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 9의 염기서열에 있어서, 3052번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로

치환을 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.

- [0040] 본 발명에서 용어 "PIK3CA 변이 단백질"이란, 야생형의 PIK3CA 단백질인 서열번호 10의 단백질의 아미노산 서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 10의 아미노산 서열에 있어서, 1018번째 아스파르트산(D)이 아스파라긴(N)으로 치환을 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.
- [0041] 또한, 변이 단백질은, 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 범위 내에서 추가적인 변이를 포함할 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 경우에 따라서, 상기 mTOR 변이 단백질은, 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification) 될 수도 있다.
- [0042] 본 발명에 적용 가능한 mTOR 저해제의 예는 하기 출원번호의 출원에 기재된 mTOR 저해제를 포함할 수 있다: Danaferber cancer institute의 PCT/US09/005656; Dolcetta, Diego의 US14/400469; Exelixis의 PCT/US10/030354, US13/989,366, US12/784,254, US13/322,160, US13/988,948, US13/988,903, US13/989,156, US13/989,330, PCT/US12/042582, PCT/US10/035638, PCT/US10/035639; Sanofi의 US13/381571, US14/374838; Infinity Pharmaceuticals의 US12/199,689, US11/965,688, KR20097015914; Intellikine의 US12/586,241, PCT/US09/005958, PCT/US09/005959, PCT/US09/049983, PCT/US09/049969, US14/238,426, US12/920,970, US12/920,966, US14/619556; Takeda Pharmaceutical Company Limited의 PCT/US10/000234, US12/841,940, US12/657,853, US12/657,854; S*Bio Pte Ltd의 US13/001,099; Schering Corporation의 PCT/US10/030350; The Regents of The University of California의 EP2012175019; Xuanzhu Pharma Corporation Limited의 EP2013836950; 포항공과대학교 산학협력단의 KR20130049854; Signal RX Pharmaceuticals의 EP2009703974; Semafore Pharmaceuticals의 US11/962,612, US11/111201, US10/818,145; Kudos Pharmaceuticals의 US13/014,275, US13/307,342, US11/842,927, US11/361,599, US11/817,134, PCT/GB06/000671; AstraZeneca의 US11/667,064, US11/842,930, US11/844,092, US12/160,752, US12/170,128, US12/668,056, US12/668,059, US12/252,081, US12/301722, US12/299,369, US12/299,359, US12/441,298, US12/441,305, US12/441299, US12/441,301, US12/668,060, PCT/GB07/003414, PCT/GB07/003417, PCT/GB07/003454, PCT/GB07/003493, PCT/GB07/003497; Ariad Pharmaceuticals의 US10/862,149, US13/463,951, US14/266291; Merck Sharp & Dohme Limited의 US13/263,193, US13/379,685, US13/520,274, US13/818,153, US13/818,177, US13/876,192, US14/234,837, PCT/US12/047522; Wyeth의 US12/251,712, US12/354,027, US12/470,521, US13/950,584, US13/718,928, US14/477,650, US12/470,525, US12/050,445, US12/044,500, US12/473,605, US12/276,459, US12/363,013, US12/361,607, US12/397,590, US12/473,658, US12/506,291, US12/556,833, US12/558,661; Norvartis의 US12/599,131, US12/792,471, US12/792,187, US13/073,652; F.Hoffmann-La-Roche AG의 EP2012177885, US13/738,829, US12/890,810, US13/568,707, EP2010769036, PCT/EP10/067162; Genentech Inc의 US11/951,203, US12/821,998, US12/943,284.
- [0043] 구체적으로, 본 발명에 적용 가능한 mTOR 저해제의 예는 하기의 물질명, 개발명 또는 상표명을 가지는 mTOR 저해제를 포함할 수 있다: AMG954, AZD8055, AZD2014, BEZ235, BGT226, 라파마이신, Everolimus, Sirolimus, CC-115, CC-223, LY3023414, P7170, DS-7423, OSI-027, GSK2126458, PF-04691502, PF-05212384, Temsirolimus, INK128, MLN0128, MLN1117, Ridaforolimus, Metformin, XL765, SAR245409, SF1126, VS5584, GDC0980, GSK2126458. 또한, mTOR 저해제의 추가 예는 WO2012/104776, KR 10-1472607B, WO2010/039740, US8846670, US8263633, 또는 WO2010/002954의 특허 문헌에 기재된 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 mTOR 저해제의 구체적인 예는, 라파마이신(Rapamycin) 또는 이의 염, 에베로리무스(Everolimus) 또는 이의 염, 화학식 1의 화합물 또는 이의 염, 화학식 2의 화합물 또는 이의 염, 화학식 3의 화합물 또는 이의 염, 및 화학식 4의 화합물 또는 이의 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 용어 "라파마이신(Rapamycin)"이란, 실로리무스(sirolimus)로도 알려져 있는 마크로라이드 락톤계 화합물로서, 면역억제 활성을 갖고 있는 약제를 의미한다. 라파마이신은 종래 장기이식환자의 이식 거부 억제제로 상품화되어 있고, 이외에도, 폐렴, 전신 홍반성 루푸스, 건선 등의 면역염증 피부질환, 면역염증 장질환, 안염증, 재협착, 류마티스 관절염 등의 치료제 및 항암제로 사용되고 있다. 하지만, 라파마이신이 뇌 체성 유전변이와 연관된 국소 피질 이형성증의 예방 또는 치료에 사용된 적은 전무하다.
- [0046] 본 발명에서 용어 "에베로리무스(Everolimus)"란, 신장암을 치료하기 위해 사용되는 약물로 신생혈관생성을 억제하는 약물인 수니티닙(sunitinib)이나 소라페닙(sorafenib)과 같은 약물에 효과가 없을 때 사용되고 있다. 또

한 결정성 경화증을 가진 환자 중 수술을 할 수 없는 뇌실막밑 거대세포 성상세포종을 가진 경우 사용되고 있다. 하지만, 에베로리무스가 뇌 체성 유전 변이와 연관된 국소 피질 이형성증의 예방 또는 치료에 사용된 적은 전무하다.

- [0047] 본 발명에서 "화합식 1 내지 4의 화합물"은, mTOR에 대한 억제제로 알려져 있는 화합물들이다. 하지만, 뇌 체성 유전 변이와 연관된 국소 피질 이형성증의 예방 또는 치료와의 관련성은 전혀 알려져 있지 않다.
- [0048] 본 발명에서 라파마이신, 에베로리무스 및 화합식 1 내지 4의 화합물은, 그의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용 가능한 염 또는 수화물을 모두 포함한다.
- [0049] 상기 약학적으로 허용 가능한 염 또는 수화물은 무기산 또는 유기산으로부터 유도된 염 또는 수화물 일 수 있고, 일례로, 염으로는 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산, 아세트산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 말론산, 석신산, 글루타르산, 푸마르산, 말산, 만델산, 타타르산, 시트르산, 아스코빈산, 팔미트산, 말레인산, 하이드록시말레인산, 벤조산, 하이드록시벤조산, 페닐아세트산, 신남산, 살리실산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 수화물은 라파마이신, 에베로리무스 및 화합식 1 내지 4의 화합물이 물 분자와 결합하여 형성된 것을 의미할 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 "치료"는 증상의 경감 또는 개선, 질환의 범위의 감소, 질환 진행의 지연 또는 완화, 질환 상태의 개선, 경감 또는 안정화, 부분적 또는 완전한 회복, 생존의 연장 기타 다른 이로인 치료 결과 등을 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 본 발명에서는 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증을 나타내는 환자에게 mTOR 저해제를 투여함으로써 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증과 관련된 증상을 완화, 개선, 경감 또는 치료하는 것을 포함한다.
- [0051] 상기 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증과 관련된 증상은, 뇌의 발달과정에서 신경 세포가 적절한 뇌의 지역으로의 이동에 실패하게 되어 나타나는 것으로, 자발적 발작, 행동발작, 뇌파 발작 및 대뇌에서 비정상적인 신경 세포의 발생 등을 예시할 수 있다.
- [0052] 따라서, 본 발명에서의 치료는 이러한 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증 환자에 대하여 mTOR 저해제, 예를 들면 라파마이신, 에베로리무스, 및/또는 화합식 1 내지 4의 화합물을 투여함으로써, 자발적 발작, 행동발작 또는 뇌파 발작이 나타나는 횟수를 현저하게 경감시키고, 대뇌에서 비정상적인 신경 세포의 개수 또는 크기를 줄이는 것을 의미할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 약학 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 mTOR 저해제의 유효량은 당업자의 선택에 따라 적절히 조절하여 사용될 수 있다.
- [0054] 일례로, 상기 약학 조성물은 mTOR 저해제를 전체 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 10 중량%, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 5 중량%의 양으로 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 mTOR 저해제는 상기 약학 조성물 내에 단독으로 포함될 수 있으며, 또는 그 외 약리학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 제제 할 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하며, 또한, 약학적으로 허용되는 부형제로는 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 즉, 본 발명의 약학 조성물에 첨가될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 사용 목적에 따라서 통상의 기술자가 어려움 없이 선정하여 이루어질 수 있으며, 그 첨가량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 약학 조성물의 환자에 대한 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 통상의 기술자에 의하여 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 1 mg/kg 내지 1000 mg/kg, 바람직하게는 50 mg/kg 내지 500 mg/kg, 보다 바람직하게는 150 mg/kg 내지 300 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0058] 본 발명은 또 다른 양태로, mTOR 저해제, 예를 들면 라파마이신 또는 이의 염, 에베로리무스 또는 이의 염, 화학식 1의 화합물 또는 이의 염, 화학식 2의 화합물 또는 이의 염, 화학식 3의 화합물 또는 이의 염, 및 화학식 4의 화합물 또는 이의 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는, 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. 상기 화학식 1 내지 4의 화합물을 상기 기재한 것과 동일하다.

[0059] 상기 식품 조성물은 통상의 다른 식품 조성물의 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. mTOR 저해제는 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품용 조성물 제조시에는 유효성분의 원료에 대하여 0.01 내지 10 중량부, 바람직하게는 0.05 내지 1 중량부의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.

[0060] 상기 식품 조성물은 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증의 예방 또는 개선을 위한 목적으로 건강식품에 함유될 수 있으며 그 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0061] 본 발명에 따라, 뇌 체성 유전 변이와 연관된 국소 피질 이형성증을 나타내는 환자에 mTOR 저해제, 예를 들면 라파마이신, 에베로리무스, 및/또는 화학식 1 내지 4의 화합물을 투여함으로써 난치성 뇌전증 또는 이의 원인질환, 예를 들면 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증으로 인한 자발적 발작, 행동발작 또는 뇌파 발작이 나타나는 횟수를 현저하게 경감시키고, 대뇌에서 비정상적인 신경 세포의 개수 또는 크기를 줄일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1a는 mTOR 유전변이를 가지고 있는 환자(FCD4, FCD6으로 명명)에 대한 수술 후 자기공명영상 사진 및 병리조직 시료에 대하여 H&E 염색을 시행한 결과를 나타낸다. 흰색 화살표는 수술 후 자기공명영상에서 제거된 뇌 부위, 검은색 화살표는 거대 신경세포를 나타낸다(Scale bar = 50um).

도 1b는 Deep 시퀀싱을 통해서 국소 피질 이형성증 환자에서 발견한 mTOR 관련 체성 유전변이 위치를 나타낸다.

도 1c는 mTOR 아미노산 서열 중 mTOR 관련 체성 변이가 나타난 아미노산 잔기가 진화적으로 보존되어 있음을 확인한 결과를 나타낸다.

도 2a는 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에서 S6 인산화(phosphorylation)를 웨스턴 블롯(western blot)으로 분석한 결과를 나타낸다. "P-S6"은 인산화된 S6 단백질, "S6"는 S6 단백질, "Flag"은 flag 단백질을 나타낸다. "20% serum"은 20% serum에 1시간 동안 노출된 것으로 mTOR의 활성을 나타내는 양성 대조군(positive control)으로 사용하였다.

도 2b는 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에서 mTOR 인산화효소의 활성을 측정된 결과를 나타낸다.

도 2c는 국소 피질 이형성증에 의한 난치성 뇌전증 환자의 병리조직 시료에 대하여 인산화된 S6 단백질 및 세포의 크기를 확인하기 위하여 면역조직화학 검사를 수행한 결과를 나타낸다.

도 2d는 국소 피질 이형성증에 의한 난치성 뇌전증 환자의 대뇌피질의 대표적인 부위에서 인산화된 S6 단백질의 평균 개수를 나타낸다. (number of counted cells=197-1182 per case).

도 2e는 국소 피질 이형성증에 의한 난치성 뇌전증 환자의 대뇌피질의 대표적인 부위에서 신경 세포 크기의 평균을 나타낸다.

도 3a는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 플라스미드로 배아기 14일(E14)에 전기천공한 배아를 태어나게 한 후 flashlight(Electron Microscopy Science, USA)로 형광을 발현하는 마우스만을 분류하고 비디오 뇌전도(Video-Electroencephalography, video-EEG)를 측정하고 발작 이후 라파마이신을 투여하여 효

과를 확인하는 모식도를 나타낸다. "in utero electroporation (E14)"는 배아기 14일에 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 플라스미드를 주입하는 모식도, "GFP screening at birth (P0)"는 상기 플라스미드가 주입된 배아를 태어나게 한 후 flashlight(Electron Microscopy Science, USA)로 형광을 발현하는 마우스만을 분류하는 모식도, "Video-EEG monitoring(>3weeks)"는 마우스가 젖을 땀 후(>3weeks) video monitoring 만을 통해 seizure가 확인되면 전극을 식립하여 뇌전도(video-EEG)를 측정하는 모식도를 나타낸다.

도 3b는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서 비디오 뇌전도 감시 결과에 근거한 자발적 발작 유무를 나타낸다. "No. of GFP+pups"는 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입되어 GFP가 발현한 마우스의 개체수, "No. of mice with seizure"은 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입되어 발작을 일으키는 마우스의 개체수를 나타낸다.

도 3c는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입되어 자발적 발작을 일으키는 마우스에 라파마이신을 투여한 후 자발적 발작의 횟수를 측정한 결과를 나타낸다. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ ($n = 7-17$ for each group, one-way ANOVA with Bonferroni's post test)

도 3d는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입되어 자발적 발작을 일으키는 마우스 및 상기 마우스에 라파마이신을 투여한 후 GFP 양성 세포의 크기 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 국소 피질 이형성증 환자로부터 얻은 시료를 이용하여 Deep 시퀀싱 분석을 수행하고, 이후 세포 및 생체 기능 분석을 수행하는 실험의 개요를 나타낸다.

도 5a는 Deep 시퀀싱 수행 결과에 대하여 Virmid (Genome Biology, 14(8), R90 (2013)) 및 MuTect software (Nature Biotechnology, 31, 213 (2013))을 동시에 이용하여 뇌 특이적 유전 변이를 발굴한 알고리즘을 나타낸다.

도 5b는 국소 피질 이형성증 환자의 시료에 대하여 Deep 전체 엑솜 시퀀싱 및 amplicon 시퀀싱으로부터 기준 대립 유전자(Ref), 변이된 대립 유전자(Mut) 및 변이율을 나타낸다.

도 6은 Deep 전체 엑솜 시퀀싱에서 발견된 국소 피질 이형성증에서의 체성 유전변이를 Integrative Genomic Viewer(IGV)의 collapsed mode를 이용하여 색이 표시된 막대로 시각화하여 나타낸 것이다.

도 7은 국소 피질 이형성증 환자에 대한 자기공명영상을 나타낸다. 화살표는 질환에 이환된 부위를 나타낸다.

도 8은 pymol(The PyMOL Molecular Graphics System, Schrodinger, LLC)사용해서 확인한 mTOR 인산화효소의 3차원 구조와 영역구성을 나타낸다. "FAT"은 mTOR의 FRAP, ATM, TRRAP 영역, "FRB"는 FKBP12-라파마이신 부착영역, "KD"는 인산화 영역의 N, C 말단을 나타낸다. 촉매 및 활성 loop 를 각각 파란색과 붉은색으로 나타내었다. ATPrS 는 막대로 Mg^{2+} 는 구로 나타내었다. FCD 환자에서 발견된 유전변이 부위는 붉은색으로 나타내었다.

도 9a는 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 라파마이신을 처리한 결과를 나타낸다.

도 9b는 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 라파마이신을 처리한 결과를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6 단백질, "S6K"는 S6 단백질을 나타낸다.

도 9c는 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 화학식 1 내지 4의 화합물 및 에베로리무스를 처리한 결과를 나타낸다. "P-S6"은 인산화된 S6 단백질, "S6"는 S6 단백질을 나타낸다.

도 10은 뇌전증 수술을 받은 국소 피질 이형성증에 의한 난치성 뇌전증 환자의 병리조직에서 S6 단백질의 인산화가 증가한 거대신경세포를 미세박리하고, sanger 시퀀싱을 통하여 mTOR 유전자에서 본 발명의 유전변이 대립 유전자가 증폭되었음을 확인한 결과를 나타낸다. 노란점은 NeuN에 양성인면서 S6 단백질의 인산화가 증가한 거대신경세포, "LCM"은 레이저 캡처 세포박리법을 이용하여 미세박리된 거대세포를 나타낸다. 대조군은 환자의 뇌 조직에서 증폭없이 추출한 게놈 DNA를 사용하였다. Scale bar, 100 μm

도 11a는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 플라스미드로 배아기 14일(E14)에 전기 천공 후 배아기 18일(E18)에 뇌 관상 절단 후 분석하는 과정을 보여주는 개요를 나타낸다.

도 11b는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서 신경 세포 이동 장애 및 mTOR 활성을 확인하기 위하여, 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스 배아기 18일(E18)의 뇌 관상 절단 면을 나타낸다. "CP"는 대뇌 피질 판(Cortical plate), "IZ"은 대뇌 중간층(intermediate zone), "SVZ"는 뇌실하영역(subventricular zone), "VZ"는 뇌실영역(ventricular zone), "Wild type"은 야생형 mTOR

플라스미드가 삽입된 경우, "Relative intensity value"는 각 경우에 GFP(green fluorescent protein)의 상대적인 세기를 나타낸다.

도 11c는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스의 배아 피질 발달과정에서 mTOR 활성 변화를 확인한 결과를 나타낸다. (Scale bars, 20 um, Error bars, s.e.m.)

도 12a는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서 자발적 발작에 대한 비디오 너전도 감시 결과를 나타낸다. "LF"는 좌측 전두엽(left frontal), "RF"는 우측 전두엽(right frontal), "LT"는 좌측 측두엽(left temporal), "RT"는 우측 측두엽(right Temporal)을 의미한다.

도 12b는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서 발작간극과(interictal spike) 및 비경련성 뇌파 발작(electrographic seizure) 를 나타낸다.

도 12c는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서의 발작간극과의 빈도 및 상기 마우스에 라파마이신을 투여한 후 발작간극과의 빈도 변화를 나타낸다.

도 12d는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서의 비경련성 뇌파 발작의 빈도 및 상기 마우스에 라파마이신을 투여한 후 비경련성 뇌파 발작의 빈도 변화를 나타낸다.

도 12e는 야생형의 mTOR 유전자가 도입된 마우스 및 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서의 발작 시기를 나타낸다. (n=8-20 for each group). Error bars, s.e.m.

도 13 및 도 14는 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 다양한 mTOR 저해제를 처리한 결과를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6 단백질, "S6K"는 S6 단백질을 나타낸다.

도 15는 TSC-1 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 rapamycin 처리(200 nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 16는 TSC-2 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 rapamycin 처리(200 nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 17는 AKT3 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 rapamycin 처리(200 nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 18은 실시예 9에 따라 TSC-1의 p.Arg22Trp 및 p.Arg204Cys 변이체는 mTOR 과활성화 관련 되어있다. 상기 TSC1 변이체가 mTOR 과활성을 유도하는 기전에 대한 확인을 위한 Immunoprecipitation 결과를 나타낸다. Empty는 아무것도 처리하지 않은 세포를 나타낸다.

도 19는 실시예 9에 따라 GTP-agarose pull down assay를 나타낸다. 구체적으로 TSC complex의 기질인 GTP-bound Rheb 단백질의 양을 측정함으로써 TSC complex의 활성화 정도를 측정한다.

도 20은 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 라파마이신을 처리한 결과를 나타낸다. **p<0.01 and ***p<0.001 (야생형 대비, n=3-5 각 그룹당, one-way ANOVA with Bonferroni's post test)

도 21는 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 라파마이신을 처리한 결과를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6 단백질, "S6K"는 S6 단백질을 나타낸다.

도 22은 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 화학식 1 내지 4의 화합물 및 에베로리무스를 처리한 결과를 나타낸다. "P-S6"은 인산화된 S6 단백질, "S6"는 S6 단백질을 나타낸다.

도 23a 및 23b는 실시예 10에 따라 mTOR 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 6가지 약물처리 전후 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 약물 처리(200 nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 24a 및 24b는 TSC1 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 6가지 약물처리 전후 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 약물 처리(200 nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 25a 및 25b는 TSC2 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 6가지 약물처리 전후 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 약물 처리(200 nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 26a 및 26c는 mTOR 변이가 TSC1 및 TSC2의 변이가 확인된 모든 국소피질 이형성증 환자의 병리학적 샘플을 나타낸다. "Non-FCD"는 국소대뇌피질 이형성증 아닌 정상 뇌를 가진 샘플, "P-S6"은 S6 단백질에 인산화가 일어난 결과, "NeuN"은 신경마커(neuronal marker), "Merge"는 P-S6 및 NeuN의 이미지를 병합하여 나타낸 것이다.

도 26b 및 26d는 피질(cortical region)의 4 내지 5 부분에서 S6 단백질에 인산화가 일어난 세포의 비율을 나타내고,

도 26e 및 26f는 신경마커(neuronal marker, NeuN) 양성 세포 크기를 나타낸다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ [relative to Non-FCD samples, one-way ANOVA with Bonferroni posttest]. Error bars, s.e.m. Scale bars, 50 μm .

도 27a는 TSC 마우스 모델에서 신경 세포 이동 장애가 발생하고 그로 인한 대뇌 피질 발달기형을 나타낸다. "Control"은 sgRNA가 삽입되지 않은 경우를 나타내고, 붉은 글씨는 플라스미드를 발현하는 세포의 비율을 나타낸다. Scale bars, 250 μm .

도 27b는 피질 내에서 전기천공된 세포의 분포를 나타낸다. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ [Two-way ANOVA with Bonferroni posttest]. Error bars, s.e.m.

도 28 자발적 발작을 일으키는 TSC2 마우스 모델에 라파마이신을 투여한 후 자발적 발작의 횟수를 측정한 결과를 나타낸다. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ ($n=7-17$ for each group, one-way ANOVA with Bonferroni's post test)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0065] 실시예 1: 전체 엑솜 시퀀싱 유전자 발견 과정 및 재확인

[0066] 실시예 1-1: 4명의 환자에서 전체엑솜시퀀싱으로 mTOR 유전변이 3가지 후보군 확인

[0067] FCDII 환자 4명 (FCD3, FCD4, FCD6, FCD23으로 명명)의 뇌조직 시료에서 deep whole exom sequencing(read depth 412-668?)를 시행하였고 Virmid와 Mutect 두 가지 알고리즘에서 동시에 발견되는 후보 유전변이 3가지를 선택하였다.

[0068] 전체 엑솜 시퀀싱 데이터 획득(whole exome sequencing)의 구체적으로 방법으로서, Agilent library preparation protocols (Agilent Human All Exon 50 Mb kit)을 제조사의 방법대로 사용하여 시퀀싱 라이브러리를 제작하였다. Hiseq2000(illumina)를 사용하여 시퀀싱을 시행하였으며 분석을 보다 정확하게 진행하기 위해 일반적인 시퀀싱 depth보다 5배정도 증가시킨 ~500x로 시퀀싱을 시행하였다. 시퀀싱 후 나온 데이터는 Broad Institute best practice pipeline(<https://www.broadinstitute.org/gatk/>)을 사용하여 분석할 수 있는 형태의 파일로 만들었다.

[0070] 실시예 1-2: 위치-특이적인 앰플리콘 시퀀싱을 이용한 3개 후보 유전변이의 재확인을 통해 한 개 유전변이 (L2427P) 확인

[0071] 다음으로 이들 후보 유전변이에 대해서 위치-특이적인 앰플리콘 시퀀싱을 시행하였다(read depth, 100-347,499?). 이에 사용된 시료는 같은 환자의 조직에서 생물학적 복제를 통해서 얻었기 때문에 저빈도의 유전변이로 오인될 수 있는 시퀀싱 오류가 최소화할 수 있었다. 위치특이적 앰플리콘 시퀀싱에서는 유전 변이율이 1%를 넘는 경우에만 변이가 있는 것으로 정하였다.

[0072] 위치-특이적 앰플리콘 염기서열 분석법(Site-specific amplicon sequencing) mTOR 표적 유전자 코돈 부위(아미노산 Cys1483, Leu2427을 포함하는 부위)가 포함되도록 2개의 표적을 가지는 2쌍의 프라이머를 제작하였다 (표 2).

표 2

[0073]

표적 부위	프라이머		서열번호
Chr1:11174301	정방향	5'-TAGGTTACAGGCTGGATGG-3'	11
~Chr1:11174513	역방향	5'-CTTGGCCTCCCAAAATGTTA-3'	12
Chr1:11217133	정방향	5'-TCCAGGCTACCTGGTATGAGA-3'	13
~Chr1:11217344	역방향	5'-GCCTTCCTTTCAAATCCAAA-3'	14

[0074]

각각의 프라이머는 환자 특이적인 표지자(index)를 포함하고 있으며 한 환자의 시료당 한 가지의 표지자를 사용하여 유전변이 분석시 염기서열이 어느 환자에서 유래되었는지 알 수 있도록 하였다. 이렇게 제작한 프라이머를 사용하여 표적 부위의 PCR을 진행하여 2개의 표적 부위 염기서열을 증폭하였다. 이후 Truseq DNA kit(Illumina)를 이용하여 DNA library를 제작하였으며 Miseq sequencer(Illumina)를 이용하여 표적 유전자 재시퀀싱을 시행하였다(중량 read depth 135,424x). Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) 프로그램을 사용하여 분석할 수 있는 형태의 파일(bam file)으로 만들었다.

[0076]

실시예 1-3: 서열분석결과

[0077]

2가지 시퀀싱 방법을 사용하고 생물학적 복제를 시행한 결과, 도 5a에서 알 수 있는 바와 같이, mTOR c.7280T>C p.Leu2427Pro 이 2명의 환자에서 반복적으로 재현되었다. 도 5b에서 알 수 있는 바와 같이, 유전변이율은 FCD4 환자에서 9.6 내지 12.6%, FCD6 환자에서 6.9 내지 7.3%였다.

[0078]

또한, 도 5b 및 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 유전변이는 혈액 시료에서는 발견되지 않는 것을 확인하였다.

[0080]

실시예 2: 확대 환자군에서 mTOR 특이적 유전변이 검색

[0081]

실시예 1에서 4명 환자군에서 mTOR 특이적 유전변이 검색한 결과를 바탕으로, 환자군을 확대하여 73명의 추가환자에서 mTOR 특이적 유전변이 조사하였다.

[0083]

실시예 2-1: 환자 시료 채취 및 게놈DNA 추출

[0084]

국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD)으로 인한 난치성 뇌전증 수술 환자 73명의 동의 하에 환자의 뇌조직(1~2g), 타액(1~2ml), 혈액(약 5ml) 포르말린 고정 파라핀 포매된 뇌 조직을 얻었다(세브란스 병원 소아신경외과 및 소아신경과). 환자의 뇌조직, 혈액, 타액, 포르말린 고정 파라핀 포매 뇌조직에서 다음의 각각에 해당하는 DNA 추출 kit를 제조사의 지침대로 사용하여 추출하였다:

[0085]

뇌조직: Qiaamp mini DNA kit (Qiagen, USA), 혈액: Flexigene DNA kit (Qiagen, USA), 타액: prepIT2P purification kit (DNAgenotek, USA), 포르말린고정 파라핀 포매 뇌조직: Qiaamp mini FFPE DNA kit (Qiagen, USA).

[0087]

실시예 2-2: 서열분석

[0088]

하이브리드 캡처 시퀀싱 (read depth, 100-17,700?)은 73명의 추가적인 FCDII 환자의 뇌조직 샘플에서 시행하였고 PCR 기반 앰플리콘 시퀀싱은 위치특이적 앰플리콘 시퀀싱(read depth, 100-347,499?, 73명환자)과 mTOR 앰플리콘 시퀀싱(read depth, 100-20,210?, 59명환자) 두 가지를 시행하였다.

[0089]

하이브리드 캡처 염기서열 분석법(hybrid capture sequencing)으로서, SureDesign online tools(Agilent Technologies)를 이용하여 mTOR 특이적인 probe를 제작하였다. Agilent library preparation protocols을 제조사의 방법대로 사용하여 시퀀싱 라이브러리를 제작하였다. Hiseq2500(illumina)를 사용하여 시퀀싱을 시행하였다(중량 read depth 515x). 시퀀싱 후 나온 데이터는 Broad Institute best practice pipeline(<https://www.broadinstitute.org/gatk/>)을 사용하여 분석할 수 있는 형태의 파일(bam file)로 만들었다.

[0090]

mTOR amplicon 시퀀싱)으로서, illumina design studio (<http://designstudio.illumina.com>)에서 제작한 mTOR amplicon(Truseq custom amplicon kit,illumina)을 이용하였으며 제조사의 방법대로 라이브러리를 제작하였다. Miseq sequencer(Illumina)를 사용하여 시퀀싱을 하였다(중량 read depth 1,647x). BWA-MEM algorithm (<http://bio-bwa.sourceforge.net>)을 사용하여 분석할 수 있는 형태의 파일(bam file)으로 만들었다.

[0092] 실시예 2-3: 서열분석 실험결과

[0093] 뇌조직 특이적인 de novo 체성 유전변이를 찾기 위하여 혈액-뇌조직을 짝으로(paired) Virmid (<http://sourceforge.net/projects/virmid/>) 와 Mutect (<http://www.broadinstitute.org/cancer/cga/mutect>) 각각의 분석법을 전체 엑스 시퀀싱 데이터에 사용하여 분석하였다. 두 가지 분석법에서 공통적으로 발견되는 체성 유전변이만 이 후 실험에 사용하였다.

[0094] 또한 하이브리드 캡처 시퀀싱과 PCR을 기반으로 한 앰플리콘 시퀀싱 두 가지에서 모두 발견된 유전변이 중 선별 기준(depth 100이상 mutated call 3개 이상(mapping quality 30 이상))을 만족하는 유전변이만을 질환 관련 유전자 후보로 선정하였다.

[0095] 이에 따라 발견된 9개의 체성 유전변이 위치(chr1:11298590 for c.1871G>A, chr1:11217330 for c.4348T>G, chr1:11217231 for c.4447T>C, chr1:11199365 for c.5126G>A, chr1:11188164 for c.5930C>A, chr1:11184640 for c.6577C>T, chr1:11184573 for c.6644C>T, chr1:11174395 for c.7280T>C and c.7280T>A)를 1000 게놈 프로젝트에서 시행한 2508개의 CRAM(compressed BAM)에서 확인하였다. 그 결과 9개 유전변이 위치 모두 상기 선별 조건을 만족하는 체성 유전변이는 발견되지 않았다. 그에 따라, 본 발명에서 확인한 유전변이가 질환 특이적이라는 것을 확인하였다.

[0097] 실시예 2-4:서열분석 결과

[0098] 하이브리드 캡처 시퀀싱(73명)과 mTOR 앰플리콘 시퀀싱(59명) 두 가지 방법을 사용 이중 두 가지 모두에서 나오는 유전변이만을 진성유전변이 후보군으로 선정 그 결과 총 9개의 진성유전변이 후보군을 수득하게 되었다(실시예 1에서 찾은 유전변이 포함)

[0099] 시퀀싱 오류를 확실히 제거하기 위하여 유전변이율이 1% 이상인 경우만 양성으로 보았고 하이브리드 캡처와 PCR 기반 앰플리콘 시퀀싱 두 가지 모두에서 발견되고 다양한 시료에서 재확인된 것들만 진성 유전변이로 선택하였다.

[0100] 그 결과, 도 1b에서 알 수 있는 바와 같이, 또 다른 10명의 FCDII 환자에서 8개의 서로 다른 mTOR 유전변이가 관찰되었다: mTOR c.1871G>A (p.Arg624His), c. 4348T>G (p.Tyr1450Asp), c.4447T>C (p.Cys1483Arg), c.5126G>A (p.Arg1709His), c.5930C>A (p.Thr1977Lys), c.6577C>T (p.Arg2193Cys), c.6644C>T (p.Ser2215Phe), 및 c.7280T>A (p.Leu2427Gln). 최종적으로 15.6%(12/77)의 환자에서 9개의 서로 다른 mTOR 유전변이를 발견하였다(표 3).

표 3

[0101]

환자	수술 나이	성별	병리학	mTOR 유전자 변이	mTOR 단백질 변이
FCD 4	5년2개월	여	FCDIIa와 일치 (피질이상적층(Cortical dyslamination) / 신경세포 이형성 (Dysmorphic neurons))	c.7280T>C	p.Leu2427Pro
FCD 6	5년	여	상동	c.7280T>C	p.Leu2427Pro
FCD 91	7년1개월	여	상동	c.6577C>T	p.Arg2193Cys
FCD 104	1년2개월	남	상동	c.1871G>A	p.Arg624His
FCD 105	3년7개월	남	상동	c.5126G>A	p.Arg1709His
FCD 107	7년3개월	여	FCDIIb와 일치 (피질이상적층 / 신경세포 이형성 / 풍선세포(balloon cells))	c.6644C>T	p.Ser2215Phe
FCD 113	10년	여	상동	c.7280T>A	p.Leu2427Gln
FCD 116	7년9개월	남	상동	c.5930C>A	p.Thr1977Lys
FCD 121	11개월	남	상동	c.4348T>G	p.Tyr1450Asp
FCD 128	4년4개월	여	상동	c.4447T>C	p.Cys1483Arg
FCD 143	2년10개월	여	상동	c.6644C>T	p.Ser2215Phe
FCD 145	4년1개월	여	상동	c.5930C>A	p.Thr1977Lys

[0102] 모든 발견된 유전변이는 유전변이 양성환자의 타액과 혈액에서 모두 음성이었다. 발견된 유전변이는 1000 게놈 데이터베이스에서 모두 음성이었다. 발견된 유전변이 중 p.Thr1977Lys, p.Ser2215Phe, 및 p.Leu2427Pro 는 2

환자에서 반복적으로 검출되었다. 모든 환자가 한 개의 mTOR 유전변이를 가지고 있음을 확인하였다. 유전변이율은 1.26% 내지 12.6%로 나타났고, 도 1c에서 알 수 있는 바와 같이, 유전변이 부위의 아미노산 잔기는 진화적으로 보존되어 있었다.

[0104] 실시예 3: 세포를 이용한 mTOR 유전변이에 의한 mTOR 과활성 확인

[0105] p.Tyr1450Asp, p.Cys1483Arg, p.Leu2427Gln, 및 p.Leu2427Pro 유전변이가 mTOR를 과활성시키는지 확인하기 위하여 HEK293T세포에 야생형과 변이체 mTOR 백터를 형질도입하고 mTOR유전자의 잘 알려진 표지자인 S6 단백질과 S6K 단백질의 인산화를 웨스턴블랏으로 확인하였다.

[0107] 실시예 3-1: 돌연변이 유발 및 mTOR 변이 작제물(mTOR mutant construct) 제작

[0108] 야생형 mTOR 작제물이 플래그-태그 되어 있는 pcDNA3.1(pcDNA3.1 flag-tagged wild-type mTOR construct)을 캘리포니아대학교 샌디에고 캠퍼스(University of California, Sandiego)의 쿤 리앙 구안(Kun-Liang Guan) 박사로부터 제공받았다. 상기 작제물은 QuikChange site-directed mutagenesis kit(200523, Stratagene, USA)와 함께 mTOR 변이체 백터(Y1450D, C1483R, L2427Q 및 L2427P)를 제조하기 위해 사용하였다.

[0109] pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP 백터를 만들기 위하여 우선 다음의 annealing primer [forward primer 5'-AATTCGAATTGCCCGGGCTTAAGATCGATACGCGTA-3'(서열번호 15) 및 reverse primer 5'-ccggtacgcgtatcgatcttaagcccgggcaattgg-3'(서열번호 16)]를 사용하여 pCIG2(CAG promoter-MCS-IRES-EGFP)에 MfeI과 MluI 제한효소 절단부위를 삽입하여 pCIG-C1을 만들었다. 새로 삽입한 MfeI과 MluI 제한효소 절단부위에 다음의 프라이머[hmTOR-MfeI-flag-F; gATcACAATTGTGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGatgc (서열번호 17), hmTOR-MluI-R;tgatcaACGCGTttaccagaaagggcaccagccaatatagc (서열번호 18)]를 사용하여 subcloning을 시행하였고. pCIG-mTOR wild type-IRES-EGFP과. pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP 백터를 만들었다. 돌연변이 유발을 위해 사용한 프라이머는 표 4에 나타내었다.

표 4

[0110]

이름	프라이머	서열번호
Y1450D	정방향	5'-tcgtgcagttttctcatcccaggtagcctggatc-3'
	역방향	5'-gatccaggtacctgggatgagaaactgcacga-3'
C1483R	정방향	5'-GGCCTCGAGGCGGCGCATGCGGC-3'
	역방향	5'-GCCGATGCGCCGCTCGAGGCC-3'
L2427Q	정방향	5'-GTCTATGACCCCTTGCGAACTGGAGGCTGATG-3'
	역방향	5'-CATCAGCCTCCAGTTCTGCAAGGGGTCATAGAC-3'
L2427P	정방향	GTCTATGACCCCTTGCCGAAGTGGAGGCTGATG
	역방향	CATCAGCCTCCAGTTTCGGCAAGGGGTCATAGAC

[0112] 실시예 3-2. 야생형 및 변이체 mTOR 백터를 형질도입(transfection) 및 웨스턴 블랏

[0113] HEK293T cell(thermoscientific)을 10%의 FBS 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 세포는 jetPRIME 형질도입 시약(jetPRIME transfection reagent)(Polyplus, France)를 이용하여 empty flag-tagged 백터, flag-tagged mTOR 야생형 및 flag-tagged mTOR 변이체로 형질도입하였다. 세포는 형질도입 후 24시간 동안 DMEM 배지에서 0.1%의 FBS로 serum-starved 하고 1mM의 MgCl₂ 및 CaCl₂를 포함하는 PBS에서 37, 5% CO₂ 조건으로 1시간 동안 배양하였다. 세포는 1%의 Triton X-100, Halt 단백질 분해효소(Halt protease) 및 phosphatase inhibitor cocktail(78440, Thermo Scientific, USA)을 포함하는 PBS에서 용해(lyse)하였다. 단백질을 SDS-PAGE로 용해(resolve)하고 PVDF 막(membrane)(Milipore, USA)으로 이동시켰다. 막은 0.1%의 Tween 20(TBST)을 포함하는 TBS에서 3%의 BSA로 블락(block)하였다. 그 후, TBST로 4회 반복하여 세척하였다. 막은 1/1000로 희석된 anti-phospho-S6-ribosomal 단백질(5364, Cell Signaling Technology, USA), anti-S6 ribosomal 단백질(2217, Cell Signaling Technology, USA) 및 anti-flag M2(8164, Cell Signaling Technology, USA)를 포함하는 1차 항체와 함께 TBST에서 4로 각각 밤새 배양하였다. 배양 후, 상기 막은 TBST로 4회 반복하여 세척하였다. 그 후, 1/5000으로 희석된 HRP-linked anti-rabbit 또는 anti-mouse 이차 항체(secondary antibodies)(7074, Cell Signaling Technology, USA)와 함께 상온에서 2시간 동안 배양하였다. TBST를 세척하고, ECL 반응 시약을 이용하여 immunodetection을 수행하였다.

- [0115] 실시예 3-3. 변이체 mTOR를 발현하는 세포에서 S6 단백질의 인산화 변화 확인
- [0116] 생체 외 mTOR 인산화효소 활성 측정(In vitro mTOR kinase assay)하고자, mTOR의 인산화 활성은 K-LISA mTOR 활성 키트(CBA055, Calbiochem, USA)를 이용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 형질도입된 세포(HEK293T cell)는 1%의 Tween 20, Halt 단백질 분해효소 및 phosphatase inhibitor cocktail을 포함하는 TBS에서 용해(lyse)하였다. 전체 용해물(lysate)의 1 mg은 15 ul의 단백질 G-비드(G-beads)(10004D, Life technologies, USA)를 첨가하여 pre-clear하고 4에서 15분간 배양하였다. Anti-flag 항체를 pre-clear 된 용해물에 첨가하고 4에서 밤새 배양하였다. 그리고 20% 슬러리 단백질 G-비드 50 ul를 첨가하고 4에서 90분간 배양하였다. 상청액(supernatant)을 조심스럽게 제거하였다. 펠릿 비드(pelleted beads)는 라이시스 버퍼(lysis buffer) 500 ul로 4번 반복하여 세척하고 K-LISA mTOR 활성 키트(K-LISA mTOR activity kit)에서 제공받은 1X 인산화효소 버퍼(kinase buffer)로 1회 세척하였다. 펠릿 비드는 2X 인산화효소 버퍼 50 ul 및 mTOR 기질(substrate)(p70S6K-GST fusion protein) 50 ul로 재현탁하고 이어 30에서 30분간 배양하였다. 반응 혼합물(reaction mixture)은 글루타치온-코팅된 96-well 플레이트(Glutathione-coated 96-well plate)에 배양하고 30에서 30분간 배양하였다. Anti-p70S6K-pT389 항체, HRP 항체-결합체(antibody-conjugate) 및 TMB 기질(substrate)를 이용하여 인산화 기질(phosphorylated substrate)을 검출하였다. 상대적인 활성은 450 nm에서 흡광도를 읽어 측정하였다
- [0117] 도 2a 및 9b에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에서 S6 단백질의 인산화가 증가하였다.
- [0118] 또한, 야생형과 변이체 mTOR 단백질을 각각 야생형과 변이체를 발현하는 HEK293T 세포에서 분리하고 생체외(in vitro) mTOR 인산화 효소활성을 측정하였다. 도 2b에서 알 수 있는 바와 같이, pCys1483Arg, p.Leu2427Gln, 및 p.Leu2427Pro 변이를 가진 mTOR 단백질이 높은 인산화 효소활성을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0120] 실시예 3-4. 약물 처리 후 S6K 단백질의 인산화 변화 확인
- [0121] 상기 변이체 mTOR를 발현하는 세포에 약물 (라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물)을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다.
- [0122] 상기 3-2와 동일한 방법으로, HEK293T cell에 mTOR 변이체를 형질도입하고, 24시간 동안 DMEM 배지에서 0.1%의 FBS로 serum-starved 하고 1 mM의 MgCl₂ 및 CaCl₂를 포함하는 PBS에서 37, 5% CO₂ 조건으로 1시간 동안 배양한 후, 라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물(Torin1, INK128, AZD8055, GSK2126458)을 처리하였다: Torin은 TOCRIS에서 입수하였고, INK128, AZD8055, GSK2126458 는 Selleckchem에서 입수하였으며, 에베로리무스는 LC laboratory에서 입수하였다. 이후, 실시예 9와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 실시하였다.
- [0123] 도 9a 및 도 9b에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 라파마이신에 의해 저해됨을 확인하였다.
- [0124] 상기 변이체 mTOR를 발현하는 세포에 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물 각각을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다.
- [0125] 도 9c에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 에베로리무스 및 화학식 1 내지 4의 화합물에 의해 저해됨을 확인하였다.
- [0127] 실시예 3-5. 다양한 mTOR 저해제 처리 S6K 단백질의 인산화 변화 확인
- [0128] 실시예 3-2와 동일한 방법으로 다양한 변이체 mTOR를 발현하는 세포에 약물로서 라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물)을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 구체적으로 실험에 사용한 mTOR 변이체는 R624H, Y1450D, C1483R, R1709H, Y1977K, S2215F, L2427P 및 L2427Q 이었다.
- [0129] 구체적으로, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물 각각을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 모든 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 에베로리무스 및 화학식 1 내지 4의 화합물에 의해 저해됨을 확인하였으며, 그 결과를 도 13 및 14에 나타냈다.
- [0131] 실시예 4: 환자시료를 이용한 mTOR 유전변이에 의한 mTOR 과활성 확인
- [0132] 실시예 4-1: FCD 환자의 뇌조직 절편의 면역 염색
- [0133] 유전변이를 가진 FCDII 환자가 mTOR 과활성을 보이는지 확인하기 위하여 S6 인산화 단백질과 NeuN(신경세포 표

지자)에 대한 항체로 p.Leu2427Pro 유전변이를 가진 FCD 환자의 뇌조직 절편에서 면역염색을 시행하였다.

- [0134] 대뇌피질 발달기형이 아닌 뇌 시료(Non-MCD brain specimen)는 뇌종양(glioblastoma)을 갖는 환자의 종양이 없는 부분(tumor free margin)에서 수술실에서 채집하였고 병리학적으로 종양이 없는 정상 뇌로 확인하였다. 외과적 조직 덩어리(surgical tissue block)는 밤새 새롭게 준비한 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde에서 고정하고, 20% buffered sucrose에서 밤새 동결방지(cryoprotect) 되었고 gelatin-embedded 조직 덩어리(7.5% gelatin in 10% sucrose/PB)로써 -80에서 보관하였다. 동결절편(Cryostat-cut section)(10 um 두께)은 채집되어 유리 슬라이드(glass slide)위에 놓고, 상온에서 한 시간 동안 PBS-GT(0.2% gelatin 및 0.2% Triton X-100 in PBS)로 차단(block)하고 다음의 항체들로 염색(stain)하였다: 인산화된 S6 ribosomal 단백질에 대한 토끼 항체(rabbit antibody to phosphorylated S6 ribosomal protein)(Ser240/Ser244)(1:100 dilution; 5364, Cell signaling Technology) 및 NeuN에 대한 마우스 항체(mouse antibody to NeuN)(1:100 dilution; MAB377, Millipore). 샘플은 PBS로 세척하고 다음의 이차 항체로 염색(stain)하였다: 마우스에 대한 Alexa Fluor 555-conjugated 염소 항체(Alexa Fluor 555-conjugated goat antibody to mouse)(1:200 dilution; A21422, Invitrogen) 및 토끼에 대한 Alexa Fluor 488-conjugated 염소 항체(Alexa Fluor 488-conjugated goat antibody to rabbit)(1:200 dilution; A11008, Invitrogen). Mounting 용액(mounting solution)(P36931, Life technology)에 포함된 DAPI는 핵 염색에 사용하였다. Leica DMI3000 B 도립 현미경(inverted microscope)을 이용하여 이미지를 얻었다. NeuN에 양성인 세포 수는 10x 대물렌즈(objective lens)를 이용하여 측정하였다; 뉴런이 풍부한 지역(regine) 내에서 하나의 시료(subject)당 4 내지 5 필드를 얻었고, 지역당 100개 이상의 세포를 기록하였다. DAPI-양성 세포의 수는 전체 세포 수를 나타낸다. 뉴런세포 크기는 NeuN 양성 세포에서 ImageJ software의 자동화된 카운팅 프로토콜(automated counting protocol of ImageJ software)(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)을 이용하여 측정하였다.
- [0135] 도 2c에서 알 수 있는 바와 같이, p.Leu2427Pro 유전변이를 가진 FCD4, 6 환자에서 인산화된 S6 단백질을 가진 신경세포의 수가 증가되었음을 확인하였다. 반면에, 도 2d에서 알 수 있는 바와 같이, Non-FCD 뇌조직에서는 이러한 증가가 관찰되지 않았다. 또한, 도 2e에서 알 수 있는 바와 같이, 병리조직에서 S6단백질의 인산화가 증가한 신경세포의 크기를 측정하였고 그 크기가 증가하였음을 확인하였다.
- [0137] 실시예 4-2: FCD 환자의 뇌조직 절편에서 S6 단백질의 인산화가 증가한 거대신경세포를 미세박리하고 sanger 시퀀싱
- [0138] 외과적 조직 덩어리(surgical tissue block)는 밤새 새롭게 준비한 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde에서 고정하고, 20% buffered sucrose에서 밤새 동결방지(cryoprotect) 되었고 gelatin-embedded 조직 덩어리(7.5% gelatin in 10% sucrose/PB)로써 -80에서 보관하였다. 동결절편(Cryostat-cut section)(10 um 두께)은 채집되어 유리 슬라이드(glass slide)위에 놓고, 상온에서 한 시간 동안 PBS-GT(0.2% gelatin 및 0.2% Triton X-100 in PBS)로 차단(block)하고 다음의 항체들로 염색(stain)하였다: 인산화된 S6 ribosomal 단백질에 대한 토끼 항체(rabbit antibody to phosphorylated S6 ribosomal protein)(Ser240/Ser244)(1:100 dilution; 5364, Cell signaling Technology) 및 NeuN에 대한 마우스 항체(mouse antibody to NeuN)(1:100 dilution; MAB377, Millipore). 샘플은 PBS로 세척하고 다음의 이차 항체로 염색(stain)하였다: 마우스에 대한 Alexa Fluor 555-conjugated 염소 항체(Alexa Fluor 555-conjugated goat antibody to mouse)(1:200 dilution; A21422, Invitrogen) 및 토끼에 대한 Alexa Fluor 488-conjugated 염소 항체(Alexa Fluor 488-conjugated goat antibody to rabbit)(1:200 dilution; A11008, Invitrogen).
- [0139] Mounting 용액(mounting solution)(P36931, Life technology)에 포함된 DAPI는 핵 염색에 사용하였다. 형광 염색된 슬라이드에서 PALM Laser capture system(Carl zeiss, Germany) 과 adhesive cap(Carl zeiss, Germany)를 사용하여 인산화된 S6 단백질 염색에 양성인 세포(약20개)들만 잘라내었다.
- [0140] 이후 QiAamp microkit(Qiagen, USA)를 사용하여 게놈 DNA를 추출하였고 하기 primer를 사용하여 PCR을 진행하여 유전변이 부위(mTOR c.7280T>C)를 증폭하였다(Sense 5'-CCCAGGCACTTGATGATCTC-3'(서열번호 27) 및 antisense, 5'-CTTGCTTTGGGTGGAGAGTT-3'(서열번호 28)).
- [0141] 증폭된 PCR 산물은 MEGAquick spin total fragment purification kit(Intron, Korea) 으로 정제한 후 BioDye Terminator and automatic sequencer system(Applied Biosystems)을 사용하여 Sanger 시퀀싱을 시행하였다.
- [0142] 도 10에서 알 수 있는 바와 같이, 같은 병리조직에서 S6 단백질의 인산화가 증가한 거대신경세포를 미세박리하고 sanger 시퀀싱을 p.Leu2427Pro 유전변이 대립유전자가 증폭되었음을 확인하였다. 이를 통하여, 발견된 유전

변이가 mTOR 유전자의 과활성과 세포 성장을 비정상적으로 조절한다는 것을 입증하였다.

[0144] **실시예 5: 동물모델에서 mTOR 과활성이 대뇌발달에 미치는 영향**

[0145] 빈번하게 관찰되는 p.Leu2427Pro 유전변이를 선택하여 동물모델에서 기능 분석을 하기로 선택하였다. mTOR 변이체 작제물을 쥐의 배아에 전기천공으로 도입하여 대뇌신경세포이동과 S6 단백질의 인산화를 조사하였다.

[0147] 실시예 5-1: 동물 모델 제조

[0148] 임신중인 마우스(E14)(다물사이언스)를 아이소플루레인(isoflurane) (0.4L/min of oxygen and isoflurane vaporizer gauge 3 during surgery operation)으로 마취하였다.

[0149] 자궁각(uterine horn)이 노출되고, 개개 배아(embryo)의 측뇌실(lateral ventricle)에 실시예 3-1에서 제조한, mTOR C1483Y, mTOR E2419K 및 mTOR L2427P 변이체를 발현하는 플라스미드 2 내지 3 μ g과 결합한 Fast Green(F7252, Sigma, USA) 2 μ g/ml을 pulled 모세관(pulled glass capillary)를 이용하여 주입하였다. 플라스미드는 배아의 머리에 900 ms의 간격에 100 ms의 5번 전기 펄스인 ECM830 eletroporator(BTX-harvard apparatus)로 50V를 방전하여 전기천공(electroporation) 하였다.

[0151] 실시예 5-2: 마우스 모델의 이미지 분석

[0152] 배아 마우스는 배아기 14일(E14)에 전기천공 되었고, 그 후 발달 4일 후(E18)에 뇌를 수확하였으며, 밤새 새롭게 준비한 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde에서 고정하고, 30% buffered sucrose에서 밤새 동결방지 되었고 gelatin-embedded 조직 덩어리(7.5% gelatin in 10% sucrose/PB)로써 -80에서 보관하였다.

[0153] 동결절편(30 μ m 두께)을 채집하여 유리 슬라이드 위에 놓았다. Mounting 용액(mounting solution)(P36931, Life technology)에 포함된 DAPI는 핵 염색에 사용하였다. Leica DMI3000 B 도립 현미경(inverted microscope) 또는 자이스 LSM510 공초점 현미경(Zeiss LSM510 confocal microscope)을 이용하여 이미지를 얻었다. 피질(cortex) 내 전기천공된 세포의 분포를 보여주는 형광 강도(fluorescence intensity)는 명암 값(gray value)으로 전환하고 뇌실 지역(Ventricular zone, VZ)부터 피질 판(Cortical plate, CP)까지 ImageJ software(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)를 이용하여 측정하였다. 멘더의 공존 분석(Mander's co-localization analysis)(http://fiji.sc/wiki/index.php/Colocalization_Analysis)는 Fiji software를 이용하여 수행하였다.

[0155] 실시예 5-3: 실험결과

[0156] 도 11a에서와 같이, IRES-GFP 표지자를 가지는 mTOR 야생형과 p.Leu2427Pro 변이체 작제물을 대뇌 발달 중인 배아 14일째에 전기천공법을 이용하여 도입한 후 배아 18일째 대뇌 신경세포 이동과 GFP 양성 신경세포의 S6 인산화를 측정하였다.

[0157] 도 11b에서 알 수 있는 바와 같이, mTOR 변이체 작제물을 발현하는 쥐의 뇌조직 절편에서 GFP 양성인 신경세포가 대뇌피질판(cortical plate)에 감소되어 있고 대뇌 중간층(intermediate zone) 과 뇌실하영역(subventricular zone) 뇌실영역(ventricular zone)에 증가되어 있음을 확인하였다. 이를 통하여, 신경세포의 이동에 문제가 있음을 입증하였다.

[0158] 또한, 도 11c에서 알 수 있는 바와 같이, mTOR 변이체 작제물을 발현하는 GFP 양성세포가 S6 단백질의 인산화가 증가된 세포와 공존하는 것을 확인하였다. 이를 통하여, 발견된 유전변이가 동물 내에서 mTOR 인산화 효소의 활성을 증가시키고 대뇌피질의 발달을 저해한다는 것을 입증하였다.

[0160] **실시예 6: 동물모델에서 mTOR 과활성에 의한 환자의 질병 표현형 확인**

[0161] 실시예 6-1. 동물모델에서 자발적 발작 또는 비정상적 신경 세포 확인

[0162] 도 3a에서와 같이, 전기천공에 의해 mTOR 변이체 작제물을 발현하는 쥐가 자발적인 발작을 보이는 지 확인하기 위하여 배아기 14일 제 전기천공법으로 변이체 작제물을 도입한 후 배아가 태어난 직후 이 작제물이 잘 발현하는 쥐 태아를 GFP 발현 유무로 선별하였다.

[0163] 생후 3주 이후부터 비디오 뇌전도 감시를 시행하였다. 태아를 어미와 분리한 후 하루에 12시간 비디오 감시를 통해서 긴장-간대발작이 시작되는지를 확인하였다. 그 후 발작을 보이는 쥐를 하루 6시간 2일 이상 비디오-뇌전도 감시를 실행하여 간질파를 보이는 자발적 발작에 대해서 조사하였다.

[0164] 구체적으로 마우스가 젖을 땀 후(>3weeks), Video monitoring만을 통해 Seizure 발생 유무를 확인한 후 뇌전도 측정을 위해 전극을 식립하는 수술을 진행하였다. 전극은 경뇌막 상층(epidural layer)에 위치하도록 하였으며

천정점(Bregma)를 기준으로 전두엽 부위에 2개(AP+2.8mm, ML+1.5 mm), 측두엽 부위에 2개(AP-2.4mm, ML-2.4 mm) 소뇌부위에 1개를 식립하여 총 5개의 전극을 식립하였다. 4일간의 회복기간을 가진 후 저녁 6시부터 새벽 2 시의 시간에 마우스당 2~5일간(하루 6시간) 측정을 시행하였다. 신호는 amplifier(Grass model 9 EEG/Polysomnograph, Grass technologies, USA)에 의해 증폭되었으며 pCLAMP program (Molecular Devices, USA)을 이용하여 분석하였다. 또는 RHD2000 amplifier, board(Intan technologies, USA)와 MATLAB EEGLAB(<http://sccn.ucsd.edu/eeglab>) 을 이용하여 분석하였다.

[0165] 발작간극과 비경련성 뇌파발작의 빈도를 측정하기 위하여 10 내지 12시간정도 촬영한 비디오 뇌전도 데이터를 사용하였고 이 데이터로부터 1시간 간격으로 1분의 데이터를 추출하여 분석하였다.

[0166] 발작간극과 비경련성 뇌파발작의 빈도는 쥐의 유전형을 모르는 관찰자가 측정하였다. 발작간극과는 200 ms 이하의 간질모양의 파가 일정한 간격으로 나타나며 배경뇌파에 비해 2배이상의 진폭을 가진경우로 정의하였고 비경련성 뇌파발작은 적어도 2개 이상의 이어진 극서파(1~4 Hz)가 배경뇌파에 비해 2배이상의 진폭으로 나타내며 4개의 전극에서 모두 관찰되는 경우로 정의하였다.

[0167] 도 3b 및 도 12a에서 알 수 있는 바와 같이, 놀랍게도 변이체 mTOR 작제물을 발현하는 쥐의 90% 이상이 간질파를 동반한 자발적 발작을 나타냈고, 간질파는 높은 진폭의 고주파, 높은 진폭의 극서파, 저진폭의 고주파를 보였다. 도 12b에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 작제물을 발현하는 쥐에서 발작간극과 역시 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 자발적 발작을 나타내는 마우스는 긴장기, 간대기 후발작기로 이루어진 전신 긴장-간대성 발작을 보이며 이는 FCDII 환자와 유사한 것임을 확인하였다. 또한, 긴장의 뇌파는 저전압, 고주파의 동조된 다주파를 보이고 간대기의 뇌파는 고전압의 일정한 형태를 보이고, 후발작기는 동조된 감소 진폭을 보이는 것을 확인하였다. 하지만, 도 3b에서 알 수 있는 바와 같이, 야생형 mTOR 작제물을 발현하는 쥐는 자발적 발작이나 간질파를 보이지 않았다.

[0168] p.Leu2427Pro 변이체 작제물을 발현하는 쥐는 평균적으로 생후 약 6주경에 발작이 시작되었으며(도 12e), 이는 사람으로 환산했을 때 FCDII 환자에서 발작이 나타나는 시기(약 4세)와 비슷한 것을 확인하였다. 도 3c에서 알 수 있는 바와 같이, 발작의 빈도는 약 하루 6회였다.

[0169] 발작에 대한 확인이 끝난 후, mTOR 변이체 작제물을 발현하는 쥐가 거대 신경세포와 같은 비정상적인 신경세포 형태를 보이는지 조사하였다.

[0170] 그 결과, mTOR 변이체 작제물을 전기천공한 대뇌영역의 GFP 양성세포의 세포크기가 매우 증가되어있는 것을 관찰하였다(도 3d).

[0172] 실시예 6-2. 약물 투여로 인한 자발적 발작 또는 비정상적 신경 세포 변화 확인

[0173] 자발적 발작 또는 비정상적 신경 세포를 나타내는 상기 동물모델에 대하여 라파마이신을 투여한 후 그 변화를 확인하였다.

[0174] 구체적으로, 라파마이신과 에베로리무스(LC Labs, USA)를 100% 에탄올에 20mg/ml로 희석하여 원액을 만든 후 -20에서 보관하였다. 라파마이신을 주사하기 전에 원액을 5% polyethyleneglycol400 과 5% Tween80 에 희석하여 1mg/ml 라파마이신과 4% 에탄올 용액을 만들었다. 만들어진 용액을 복강내 주사법으로 1 내지 10 mg/kg의 농도로 2주간 투여하였다(10 mg/kg/d 복강주사, 2주동안).

[0175] 도 3c, 12c 및 12d에서 알 수 있는 바와 같이, 라파마이신의 투여로 인하여 상기 동물모델에서의 자발적 발작이 거의 나타나지 않으며, 발작간극과와 비경련성 뇌파발작의 빈도가 극적으로 줄어드는 것을 확인하였다.

[0176] 나아가, 도 3d에서 알 수 있는 바와 같이, 라파마이신의 투여로 인하여 상기 동물모델에서의 비정상적 세포의 크기 또한 감소하는 것을 확인하였다.

[0178] **실시예 7: 서열분석을 통한 난치성 뇌전증 환자군에서 유전변이 확인**

[0179] 환자 시료는 실시예 1 및 2에 기재된 총 77명의 환자에 대해서, 상기 실시예 2의 방법과 실질적으로 동일한 방법으로 환자 시료로부터 게놈DNA 추출하고, 하이브리드 캡처 시퀀싱과 PCR을 기반으로 한 앰플리콘 시퀀싱 두 가지에서 모두 발견된 유전변이 중 선별 기준(depth 100이상, mutated call 3개 이상, mapping quality 30 이상)을 만족하는 유전변이를 선정한 결과, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 에서 각각 유전변이가 관찰되었다.

[0180] 하이브리드 캡처 시퀀싱과 PCR을 기반으로 한 앰플리콘 시퀀싱 두 가지에서 모두 발견된 유전변이 중 선별 기준(depth 100이상, mutated call 3개 이상, mapping quality 30 이상)을 만족하는 유전변이를 선정한 결과, SC1,

TSC2, AKT3 및 PIK3CA 에서 각각 유전변이가 관찰되었다. TSC1 c.64C>T (p.Arg22Trp), c.610C>T (p.Arg204Cys), c.2432G>T (p.Arg811Leu); TSC2 c.4639C>T (p.Val1547Ile); AKT3 c.740G>A (p.Arg247His), PIK3CA c.3052G>A (p.Asp1018Asn). 총 MTOR 유전변이가 없는 51명의 환자중, 8명의 환자에서 TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자에서 뇌병변 특이적 유전변이를 발견하였다.

표 5

환자/성별 /수술나이	병리학	단백질 종류	유전자 변이	단백질 변이	Hybrid Capture % Mutated allele	PCR sequencing % Mutated allele
FCD 64/여 /6yr 9m	Cortical dyslaminat ion, Dysmorphi c neurons, consisten t with FCDIIa	TSC1	c.610C>T	p.Arg204Cys	1.75%	1.0%
HME 66/남 /2yr 8m	Cortical laminar disturbance with large giant neurons	PIK3CA	c.3052G>A	p.Asp1018Asn	1.03%	2.30%
FCD 81/여 /12yr	Cortical dyslaminat ion, Dysmorphi c neurons, consisten t with FCDIIa	TSC1	c.64C>T	p.Arg22Trp	2.81%	2.0%
HS86/남 13yr 2m	Hippocampal sclerosis	AKT3	c.740G>A	p.Arg247His	1.72%	10%
13yr 2m	Cortical dyslaminat ion, Dysmorphi c neurons, consisten t with FCDIIa	TSC2	c.4639C>T	p.Val1547Ile	1.19%	1.55%
10yr 3m/14yr 3m	Cortical dyslaminat ion, Dysmorphi c neurons, consisten t with FCDIIa	TSC1	c.64C>T	p.Arg22Trp	2.52%	1.98%
FCD 123/ 여/12yr 4m	Cortical dyslaminat ion, dysmorphi c neurons, balloon cells, consisten t with FCDIIb	TSC1	c.64C>T	p.Arg22Trp	2.21%	1.37%
HME141/여 /1yr 9m	Cortical laminar disturbance with large giant neurons	TSC1	c.2432G>T	p.Arg811Leu	1.03%	1.68%

실시예 8: 세포를 이용한 mTOR 과활성 확인

8-1. 돌연변이 유발 및 TSC1, TSC2, AKT3 변이체 작제물 제작야생형 TSC1, TSC2 또는 AKT3 작제물이 HA-태그되어 있는 pcDNA3(pcDNA3 HA-tagged wild-type TSC1, TSC2, AKT3 construct)을 Addgene (USA)에서 구입하여 QuikChange site-directed mutagenesis kit(200523, Stratagene, USA)와 함께 변이체 벡터를 제조하기 위해 사용하였다.

야생형 TSC1, TSC2 또는 AKT3 작제물이 HA-태그 되어 있는 pcDNA3(pcDNA3 HA-tagged wild-type TSC1, TSC2, AKT3 construct)을 Addgene (USA)에서 구입하였다. pcDNA3 TSC1, TSC2, AKT3 wild-type 벡터에 TSC-1 R22W, R204C의 mutagenesis를 위하여 R22W의 경우에는 TSC-1 R22W-F, R22W-R primer를 사용하였고, R204C의 경우에는 TSC-1 R204C-F, R204C-R primer를 사용하였다. pcDNA3 TSC2 wild-type 벡터에 TSC-2 V1547I의 mutagenesis를 위하여 TSC-2 V1547I-F, V1547I-R primer를 사용하였다.pcDNA3 AKT3 wild-type 벡터에 AKT3 R247H의 mutagenesis를 위하여 R247H-F, R247H-R primer를 사용하였다.

QuikChange II site-directed mutagenesis kit(200523, Stratagene, USA)를 이용하여 point mutation을 만들

었다. 각 프라이머는 site specific point mutation sequence 를 포함하고 있어 PCR 시행시 복제되는 서열에 변이가 생기게 된다. 돌연변이 유발을 위해 사용한 프라이머는 아래 표 6에 나타내었다.

표 6

유전자	변이 위치		프라이머		서열번호
TSC-1	C64T	R22W	TSC-1 R22W-F	gtcacgtcgtcccacacacccagcatg	29
			TSC-1 R22W-R	catgctgggtgtgtgggacgacgtgac	30
	C610T	R204C	TSC-1 R204C-F	ctttcactactgtaatgagaacacaaaaagga gacgaagttgca	31
			TSC-1 R204C-R	tgcaacttcgtctcctttttgtgttctcatt acagtatgaaag	32
TSC-2	G4639A	V1547I	TSC-2 V1547I-F	tctccaacatacaggatggcgatcttgtggg tg	33
			TSC-2 V1547I-R	caccacaagatcgccatcctgtatgttgga ga	34
AKT3	G740A	R247H	AKT3 R247H-F	caccatagaaacgtgtgtggtcctcagagaa cacc	35
			AKT3 R247H-R	ggtgttctctgaggaccacacacgtttctat ggtg	36

8-2. 세포 배양, 형질도입(transfection) 및 웨스턴 블랏

TSC-1, TSC-2 및 AKT3 유전변이가 mTOR 을 과활성시키는지 확인하기 위하여 HEK293T 세포에 야생형과 변이체 백터를 형질도입하고 mTOR 유전자의 잘 알려진 표지자인 S6K 단백질의 인산화를 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 구체적으로, HEK293T cell(thermoscientific)을 10%의 FBS 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 37, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 세포는 jetPRIME 형질도입 시약(jetPRIME transfection reagent)(Polyplus, France)를 이용하여 empty flag-tagged 백터, HA-tagged TSC1 야생형, HA-tagged TSC2 야생형, HA-tagged AKT3 야생형, HA-tagged TSC1 변이체, HA-tagged TSC2 변이체 및 HA-tagged AKT3 변이체를 각각 형질도입하였다.

세포는 형질도입 후 24시간 동안 DMEM 배지에서 0.1%의 FBS로 serum-starved 하고 1 mM의 MgCl₂ 및 CaCl₂를 포함하는 PBS에서 37, 5% CO₂ 조건으로 1시간 동안 배양하였다. 세포는 1%의 Triton X-100, Halt 단백질 분해효소(Halt protease) 및 phosphatase inhibitor cocktail(78440, Thermo Scientific, USA)을 포함하는 PBS에서 용해(lyse)하였다. 단백질을 SDS-PAGE로 용해(resolve)하고 PVDF 막(membrane)(Milipore, USA)으로 이동시켰다. 막은 0.1%의 Tween 20(TBST)을 포함하는 TBS에서 3%의 BSA로 블락(block)하였다. 그 후, TBST로 4회 반복하여 세척하였다. 막은 1/1000로 희석된 anti-phospho-S6-ribosomal 단백질(5364, Cell Signaling Technology, USA), anti-S6 ribosomal 단백질(2217, Cell Signaling Technology, USA) 및 anti-flag M2(8164, Cell Signaling Technology, USA)를 포함하는 1차 항체와 함께 TBST에서 4 로 각각 밤새 배양하였다. 배양 후, 상기 막은 TBST로 4회 반복하여 세척하였다. 그 후, 1/5000으로 희석된 HRP-linked anti-rabbit 또는 anti-mouse 이차 항체(secondary antibodies)(7074, Cell Signaling Technology, USA)와 함께 상온에서 2시간 동안 배양하였다. TBST를 세척하고, ECL 반응 시약을 이용하여 immunodetection을 수행하였다.

8-3. 변이체를 발현하는 세포에 라파마이신 처리 및 웨스턴 블랏

실시에 8-2에서 변이체를 발현하는 세포에 라파마이신을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다.

구체적으로, 실시에 8-2와 동일한 방법으로, HEK293T cell에 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 변이체를 각각 형질도입하고, 24시간 동안 DMEM 배지에서 Empty DMEM으로 24hr starved 하고 1mM의 MgCl₂ 및 CaCl₂를 포함하는 PBS에서 37, 5% CO₂ 조건으로 1시간 동안 배양과 함께 라파마이신을 처리하였다. 이후, 상기 실시에 2-2와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 실시하였다.

8-4. 실험결과

실시에 8-2 및 8-3에 따라, TSC-1의 p.Arg22Trp 및 p.Arg204Cys 유전변이, TSC-2의 p.Val1547Ile 유전변이,

AKT3의 p.Arg247His 유전변이가 mTOR 의 활성화 유도 여부를 확인하고자, HEK293T cell에 TSC1, TSC2, AKT3 야생형과 변이체를 포함하는 벡터를 형질도입하고 mTOR 유전자의 잘 알려진 표지자인 S6K 단백질의 인산화를 웨스턴 블랏으로 확인하고, 상기 변이체를 발현하는 세포에 라파마이신을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인한 결과는 도 15 내지 도 17에 나타냈으며 각 변이 유전자별 결과는 다음과 같다.

[0199] (1) 세포에서 TSC-1 변이체의 활성화 확인

[0200] 도 15에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 TSC-1을 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 증가하였고, 라파마이신 처리 후 인산화가 감소하였음을 확인하였다.

[0201] (2) 세포에서 TSC-2 변이체의 활성화 확인

[0202] 도 16에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 TSC-2를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 증가하였고, 라파마이신 처리 후 인산화가 감소하였음을 확인하였다.

[0203] (3) 세포에서 AKT3 변이체의 활성화 확인

[0204] 도 17에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 AKT3를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 증가하였고, 라파마이신 처리 후 인산화가 감소하였음을 확인하였다.

[0206] 실시예 9: TSC1 및 TSC2 변이체가 mTOR 신호전달계 활성화 확인

[0207] 9-1: Immunoprecipitation assay

[0208] TSC1 및 TSC2 변이체가 TSC complex 형성을 저해하는지 확인하기 위하여 Immunoprecipitation assay를 시행하였다. 실시예 8-3과 동일한 방법으로 준비한 TSC1 및 TSC2 변이체 단백질을 anti-TSC2 항체(3990, Cell signaling Technology, USA) 또는 anti-myc 항체(2276, cell signaling technology, USA)로 overnight incubation 한 후 단백질을 A+G magnetic bead 를 넣고 2시간 동안 incubation 하였다. 이후 1% Triton-X100이 포함된 PBS로 3번 세척 후 37 SDS buffer에서 10분 배양하였다. 단백질을 elution 한 후 SDS/PAGE gel에 용해시켜 PVDF 막에 흡착시켰다. 블랏팅은 실시예 2-3과 동일한 방법으로 시행하였다.

[0209] 실험결과를 도 18에 나타냈다. TSC-1의 p.Arg22Trp 및 p.Arg204Cys 변이체는 야생형 TSC-2 단백질과의 결합이 약해져 있음을 확인할 수 있었다. 이를 통해 TSC1 변이체는 TSC complex형성을 저해하여 mTOR 과활성을 유도함을 알 수 있었다.

[0211] 9-2: GTP-agarose pull down assay

[0212] Lysis buffer(20 mM Tris-HCl pH: 7.5, 5 mM MgCl₂, 2 mM PMSF, 20 ?g/mL leupeptin, 10 ?g/mL aprotinin, 150 mM NaCl and 0.1% Triton X-100)를 사용한 후 초음파를 15초 가하여 세포를 용해시켰다. 이 후 이를 4℃, 13000g에서 세포를 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 이 상층액을 온도 4℃, 100 ul의 GTP-agarose beads (Sigma-Aldrich, cat no. G9768) 에서 30분간 배양하였다. 이후 lysis buffer로 세척한 bead로 overnight 배양하였다. GTP-bound 단백질을 추출한 후 immunoblot 으로 확인하였다.

[0213] TSC2가 과발현되는 경우 TSC2의 substrate 인 GTP-bound Rheb protein 이 감소하여야 하지만 TSC2 p.Val1547Ile 변이체의 경우 TSC2의 GAP(GTPase activating protein)의 기능이 감소하여 GTP-bound Rheb protein 이 감소하지 않고 그대로 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도 19). 이를 통해 TSC2 변이체의 경우 GAP domain 기능이상을 유발하여 mTOR pathway 활성을 유발함을 알 수 있었다.

[0215] 실시예 10: 변이체 mTOR를 발현하는 세포를 이용한, 약물에 의한 S6K 단백질의 인산화 변화 확인

[0216] 10-1. 변이체 mTOR를 발현하는 세포

[0217] 상기 변이체 mTOR를 발현하는 세포에 약물 (라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물)을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다.

[0218] 상기 실시예 8-2 및 8-3와 동일한 방법으로, HEK293T cell에 변이체를 형질도입하고, 24시간 동안 DMEM 배지에서 0.1%의 FBS로 serum-starved 하고 1mM의 MgCl₂ 및 CaCl₂를 포함하는 PBS에서 37, 5% CO₂ 조건으로 1시간 동안 배양한 후, 라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물(Torin1, INK128, AZD8055, GSK2126458)을 처리하였다: Torin은 TOCRIS에서 입수하였고, INK128, AZD8055, GSK2126458 는 Selleckchem에서 입수하였으며, 에베로리무스는 LC laboratory에서 입수하였다. 이후, 실시예 2-4와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을

실시하였다.

- [0219] 도 20 및 도 21에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 라파마이신에 의해 저해됨을 확인하였다. 구체적으로, 도 20은 mTOR 변이체 C1483R, L2427P 및 L2427Q에 대한 라파마이신 처리후 S6K 단백질의 인산화 결과를 나타낸 것이다. 도 21은 mTOR 변이체 Y1450D를 발현하는 세포에 라파마이신을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 결과를 나타낸 것이다.
- [0220] 도 22은 mTOR 변이체 L2427P를 발현하는 세포에 라파마이신의 처리 농도를, 0, 25, 50, 100, 200 나노몰(nM)으로 처리한 후에 S6 단백질의 인산화 결과를 나타낸 것이다.
- [0221] 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물 각각을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 도 22에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에서 S6 단백질의 인산화가 에베로리무스 및 화학식 1 내지 4의 화합물에 의해 저해됨을 확인하였다. 50 nM 이상의 농도에서 S6 단백질의 인산화가 명확히 감소한 것을 확인하였다.
- [0223] 10-2. 다양한 mTOR 저해제 처리 S6K 단백질의 인산화 변화 확인
- [0224] 실시예 9-1과 동일한 방법으로 다양한 변이체 mTOR를 발현하는 세포에 약물로서 라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물)을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 구체적으로 실험에 사용한 mTOR 변이체는 R624H, Y1450D, C1483R, R1709H, Y1977K, S2215F, L2427P 및 L2427Q 이었다.
- [0225] 구체적으로, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물 각각을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 모든 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 에베로리무스 및 화학식 1 내지 4의 화합물에 의해 저해됨을 확인하였으며, 그 결과를 도 23a 및 23b에 나타냈다.
- [0227] **실시예 11: TSC1 또는 TSC 2 변이체를 발현하는 세포를 이용한, 약물에 의한 S6K 단백질의 인산화 변화 확인**
- [0228] 실시예 8와 동일한 방법으로, HEK293T cell에 TSC1 또는 TSC 2 변이체를 형질도입하고, 24시간 동안 DMEM 배지에서 0.1%의 FBS로 serum-starved 하고 1mM의 MgCl2 및 CaCl2를 포함하는 PBS에서 37, 5% CO2 조건으로 1시간 동안 배양하였다.
- [0229] 그런 후에, 라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물(Torin1, INK128, AZD8055, GSK2126458)을 처리하였다: Torin은 TOCRIS에서 입수하였고, INK128, AZD8055, GSK2126458 는 Selleckchem에서 입수하였으며, 에베로리무스는 LC laboratory에서 입수하였다. 이후, 실시예 10과 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 실시하였다.
- [0230] 상기 변이체 TSC1 또는 TSC2를 발현하는 세포에 라파마이신을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였으며, 상기 실험결과로서 변이체 TSC1에 관한 결과를 도 24a 및 24b에 나타냈으며, 변이체 TSC2에 관한 결과를 도 25a 및 25b에 나타냈다.
- [0231] 도 24a 및 24b 및 도 25a 및 25b에 나타낸 바와 같이, 변이체 TSC1 또는 TSC2를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 라파마이신에 의해 저해됨을 확인하였다. 상기 변이체 TSC1 또는 TSC2를 발현하는 세포에 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물 각각을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 TSC1 또는 TSC2를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 에베로리무스 및 화학식 1 내지 4의 화합물에 의해 저해됨을 확인하였다.
- [0233] **실시예 12: FCD 환자의 뇌조직 절편의 면역 염색**
- [0234] 유전변이를 가진 FCDII 환자가 mTOR 과활성을 보이는지 확인하기 위하여 S6 인산화 단백질과 NeuN(신경세포 표지자)에 대한 항체로 p.Leu2427Pro 유전변이를 가진 FCD 환자의 뇌조직 절편에서 면역염색을 시행하였다.
- [0235] 대뇌피질 발달기형이 아닌 뇌 시료(Non-MCD brain specimen)는 뇌종양(glioblastoma)을 갖는 환자의 종양이 없는 부분(tumor free margin)에서 수술실에서 채집하였고 병리학적으로 종양이 없는 정상 뇌로 확정하였다. 외과적 조직 덩어리(surgical tissue block)는 밤새 새롭게 준비한 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde에서 고정하고, 20% buffered sucrose에서 밤새 동결방지(cryoprotect) 되었고 gelatin-embedded 조직 덩어리(7.5% gelatin in 10% sucrose/PB)로써 -80 °C에서 보관하였다. 동결절편(Cryostat-cut section)(10um 두께)은 채집되어 유리 슬라이드(glass slide)위에 놓았다. 파라핀을 제거한 FFPE 슬라이드는 citrate buffer로 항원부위 회복을 시행하였다. 이후 상온에서 한 시간 동안 PBS-GT(0.2% gelatin 및 0.2% Triton X-100 in PBS)로 차단(block)하고 다음의 항체들로 염색(stain)하였다: 인산화된 S6 ribosomal 단백질에 대한 토끼 항체(rabbit

antibody to phosphorylated S6 ribosomal protein)(Ser240/Ser244)(1:100 dilution; 5364, Cell signaling Technology) 및 NeuN에 대한 마우스 항체(mouse antibody to NeuN)(1:100 dilution; MAB377, Millipore). 샘플은 PBS로 세척하고 다음의 이차 항체로 염색(stain)하였다: 마우스에 대한 Alexa Fluor 555-conjugated 염소 항체(Alexa Fluor 555-conjugated goat antibody to mouse)(1:200 dilution; A21422, Invitrogen) 및 토끼에 대한 Alexa Fluor 488-conjugated 염소 항체(Alexa Fluor 488-conjugated goat antibody to rabbit)(1:200 dilution; A11008, Invitrogen). Mounting 용액(mounting solution)(P36931, Life technology)에 포함된 DAPI는 핵 염색에 사용하였다. Leica DMI3000 B 도립 현미경(inverted microscope)을 이용하여 이미지를 얻었다. NeuN에 양성인 세포 수는 10x 대물렌즈(objective lens)를 이용하여 측정하였다; 뉴런이 풍부한 지역(regime) 내에서 하나의 시료(subject)당 4 내지 5 필드를 얻었고, 지역당 100개 이상의 세포를 기록하였다. DAPI-양성 세포의 수는 전체 세포 수를 나타낸다. 뉴런세포 크기는 NeuN 양성 세포에서 ImageJ software의 자동화된 카운팅 프로토콜(automated counting protocol of ImageJ software)(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)을 이용하여 측정하였으며, 상기 실험결과를 도 26a 내지 26f에 나타냈다.

[0236] 도 26a 내지 26f에 나타낸 바와 같이, TSC1 및 TSC2 유전변이를 가진 FCD64,81,94,98,123 환자에서 인산화된 S6 단백질을 가진 신경세포의 수가 증가되었음을 확인하였다. 반면에, Non-FCD 뇌조직에서는 이러한 증가가 관찰되지 않았다. 도 26b 및 도 26d에서 알 수 있듯이 S6 인산화가 증가한 세포의 비율이 증가하였고 또한 도 26e 및 26f에서 알 수 있는 바와 같이, 병리조직에서 S6단백질의 인산화가 증가한 신경세포의 크기를 측정하였고 그 크기가 증가하였음을 확인하였다.

[0238] **실시예 13: TSC1 또는 TSC2 마우스 모델 제작**

[0239] 13-1: TSC1 또는 TSC2를 타겟으로 하는 CRISPR/Cas9 vector 제작

[0240] pX330 플라스미드(Addgene, #42230)를 구입하여 초기 템플레이트로 사용하였다. QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 sgRNA(single guide ribonucleotide) 클로닝 사이트의 BbsI 제한효소 부위(GAAGAC)를 BsaI(GGTCTC) 전환하였다. 이후 TSC1, TSC2를 타겟팅하는 sgRNA를 각각 삽입하였으며 그 염기서열은 아래와 같다.

[0241] TSC1 : 5'-TGCTGGACTCCTCCACACTG-3' (서열번호 37)

[0242] TSC2 : 5'-AATCCAGGTGTGCAGAAGG-3' (서열번호 38)

[0243] 이후 mcherry 형광 레포터가 포함된 플라스미드(U6-sgRNA-Cas9-IRES-mCherry)를 만들기 위하여 IRES3-mCherry-CL 플라스미드를 템플레이트로 사용하여 PCR 증폭 후 pX330 플라스미드의 Cas9 서열과 NLS 서열 사이에 삽입하였다.

[0245] 13-2. 마우스모델 제작

[0246] 임신중인 마우스(E14)(다물사이언스)를 아이소플루레인(isoflurane) (0.4 L/min of oxygen and isoflurane vaporizer gauge 3 during surgery operation)으로 마취하였다. 자궁각(uterine horn)이 노출되고, 개개 배아(embryo)의 측뇌실(lateral ventricle)에 실시예 13-1에서 제조한 TSC1 또는 TSC2를 타겟으로 하는 U6-sgRNA-Cas9-IRES-mCherry 플라스미드와 붉은 형광을 강화하기 위하여 pCAG-Dsred 플라스미드(addgene #11151)를 구입하여 3:1의 비율로 희석하여 사용하였다. 희석된 두가지 플라스미드를 2 내지 3 μ g과 결합한 Fast Green(F7252, Sigma, USA) 2 μ g/ml을 pulled 모세관(pulled glass capillary)를 이용하여 주입하였다. 플라스미드는 배아의 머리에 900ms의 간격에 100ms의 5번 전기 펄스인 ECM830 eletroporator(BTX-harvard apparatus)로 50V를 방전하여 전기천공(electroporation) 하였다. 전기천공한 배아를 태어나게 한 후 flashlight(Electron Microscopy Science, USA)로 형광을 발현하는 마우스만을 분류하였다.

[0248] 13-3: TSC1 또는 TSC2 마우스 모델에서 신경세포 이동 분석

[0249] 실시예 13-2에서 제작한 성인 마우스(P>56)에서 뇌를 수확하였으며, 밤새 새롭게 준비한 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde에서 고정하고, 30% buffered sucrose에서 밤새 동결방지 되었고 gelatin-embedded 조직 덩어리(7.5% gelatin in 10% sucrose/PB)로써 -80 에서 보관하였다.

[0250] 동결절편(30 μ m 두께)을 채집하여 유리 슬라이드 위에 놓았다. Mounting 용액(mounting solution)(P36931, Life technology)에 포함된 DAPI는 핵 염색에 사용하였다. 자이스 LSM780 공초점 현미경(Zeiss LSM780 confocal microscope)을 이용하여 이미지를 얻었다. 피질(cortex) 내 전기천공된 세포의 분포를 보여주는 형광 강도(fluorescence intensity)는 명암 값(gray value)으로 전환하고 LayerII/III에서 LayerV/VI까지 ImageJ

software(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)를 이용하여 측정하였다.

[0251] 도 27a 및 도 27b 에서 알 수 있는 바와 같이, TSC 마우스 모델의 뇌조직 절편에서 dsRed 양성인 신경세포가 Layer II/III에서 감소되었고 대뇌 LayerIV,LayerV/VI에 증가되어 있음을 확인하였다. 이를 통하여, 신경세포의 이동에 문제가 있음을 입증하였다.

[0253] 13-4: 비디오-뇌전도감시(Video-Electroencephalography monitoring)

[0254] 마우스가 젖을 땀 후(>3weeks), Video monitoring만을 통해 Seizure 발생 유무를 확인한 후 뇌전도 측정을 위해 전극을 식립하는 수술을 진행하였다. 전극은 경뇌막 상층(epidural layer)에 위치하도록 하였으며 천정점(Bregma)를 기준으로 전두엽 부위에 2개(AP+1.8mm, ML?1.5mm), 측두엽부위에 2개(AP-2.4mm, ML?2.4mm) 소뇌부위에 1개를 식립하여 총 5개의 전극을 식립하였다. 4일간의 회복기간을 가진 후 저녁 6시부터 새벽 2시의 시간에 마우스당 2~5일간(하루 6시간) 측정을 시행하였다. 신호는RHD2000 amplifier, board(Intan technologies,USA)를 이용해 증폭하였으며 MATLAB EEGLAB(<http://sccn.ucsd.edu/eeglab>) 을 이용하여 분석하였다.

[0255] CRISPR/Cas9 플라스미드를 이용하여 TSC1 또는 TSC2 유전자를 대뇌 국소적으로 제거한 쥐에서 간질파를 동반한 자발적 발작을 나타냈고, 간질파는 높은 진폭의 고주파, 높은 진폭의 극서파, 저진폭의 고주파를 보였다. 이러한 자발적 발작을 나타내는 마우스는 긴장기, 간대기 후발작기로 이루어진 전신 긴장-간대성 발작을 보이며 이는 FCDII 환자와 유사한 것임을 확인하였다. 또한, 긴장의 뇌파는 저전압, 고주파의 동조된 다주파를 보이고 간대기의 뇌파는 고전압의 일정한 형태를 보이고, 후발작기는 동조된 감쇠 진폭을 보이는 것을 확인하였다. 발작 빈도는 하루 약 10회 정도였다.

[0257] 13-5: TSC1 또는 TSC2 마우스 모델의 신경세포 크기 분석

[0258] 뇌전도 감시가 끝난 마우스를 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde로 Masterflex compact peristaltic pump(cole-parmer international,USA)를 이용해 조직관류(perfusion)를 시행하여 뇌를 적출하였다. 새롭게 준비한 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde에서 고정하고, 30% buffered sucrose에서 밤새 동결방지 되었고 gelatin-embedded 조직 덩어리(7.5% gelatin in 10% sucrose/PB)로써 -80 °C에서 보관하였다. 동결절편(30 um 두께)을 채집하여 유리 슬라이드 위에 놓았다. 상온에서 한 시간 동안 PBS-GT(0.2% gelatin 및 0.2% Triton X-100 in PBS)로 차단(block)하고 다음의 항체들로 염색(stain)하였다: NeuN에 대한 마우스 항체(mouse antibody to NeuN)(1:500 dilution; MAB377, Millipore). 샘플은 PBS로 세척하고 다음의 이차 항체로 염색(stain)하였다: 마우스에 대한 Alexa Fluor 488-conjugated 염소 항체(Alexa Fluor 488-conjugated goat antibody to mouse)(1:200 dilution; A11008, Invitrogen), Mounting 용액(mounting solution)(P36931, Life technology)에 포함된 DAPI는 핵 염색에 사용하였다. 자이스 LSM780 공초점 현미경(Zeiss LSM510 confocal microscope)을 이용하여 이미지를 얻었다. 신경세포의 크기는 ImageJ soft-ware(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)를 이용하여 측정하였다

[0259] CRISPR/Cas9 플라스미드를 이용하여 TSC1 또는 TSC2 유전자를 대뇌 국소적으로 제거한 마우스에서 신경세포는 정상 신경세포에 비해 크기가 유의미하게 증가하였으나, sgRNA 없이 플라스미드만 전기천공한 마우스 신경세포는 크기변화가 없는 것을 확인하였다. 이는 대뇌피질 발달기형 환자에서 나타나는 dysmorphic neuron과 같은 양상이다.

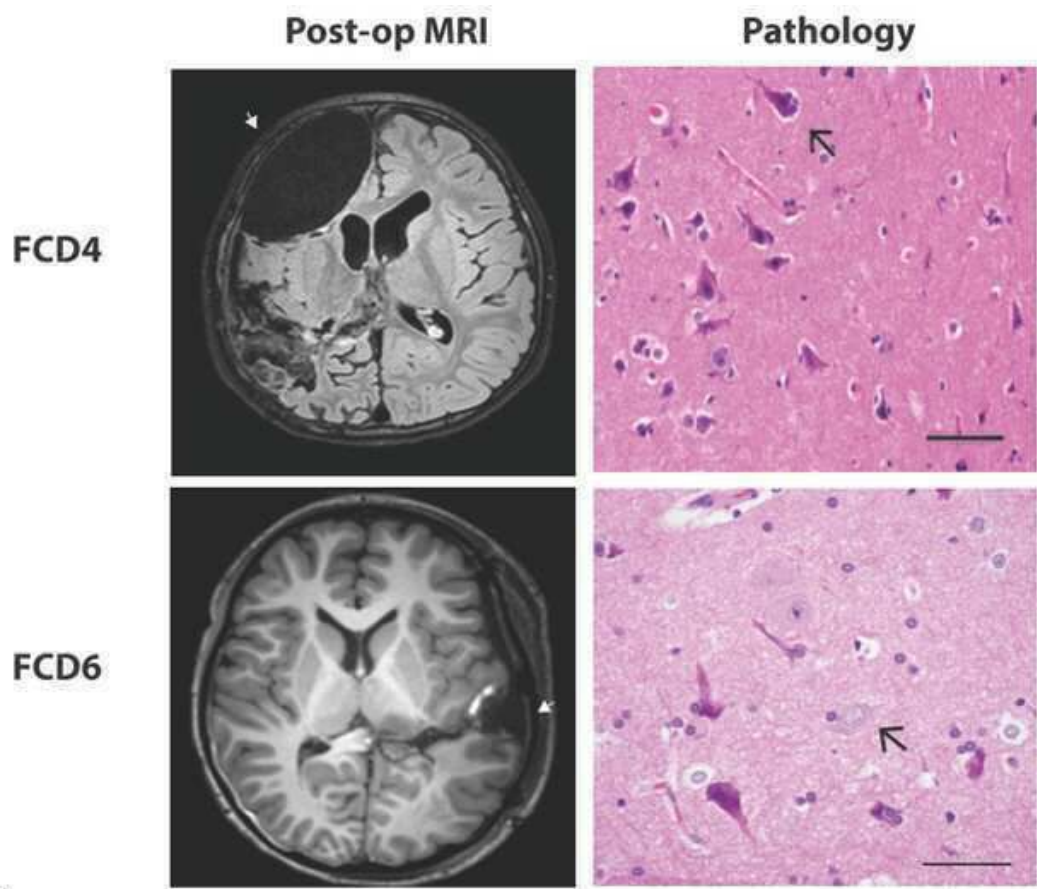
[0261] **실시예 14: TSC2 마우스모델에서 약물 투여로 인한 자발적 발작 변화 확인**

[0262] 자발적 발작을 나타내는 상기 동물모델에 대하여 라파마이신을 투여한 후 그 변화를 확인하였다. 구체적으로, 라파마이신 (LC Labs,USA)를 100% 에탄올에 20 mg/ml로 희석하여 원액을 만든 후 -20 °C에서 보관하였다. 라파마이신을 주사하기 전에 원액을 5% polyethleneglycol400 과 5% Tween80 에 희석하여 1 mg/ml 라파마이신과 4% 에탄올 용액을 만들었다. 만들어진 용액을 복강내 주사법으로 1 내지 10 mg/kg의 농도로 2주간 투여하였다(10 mg/kg/d 복강주사, 2주 동안).

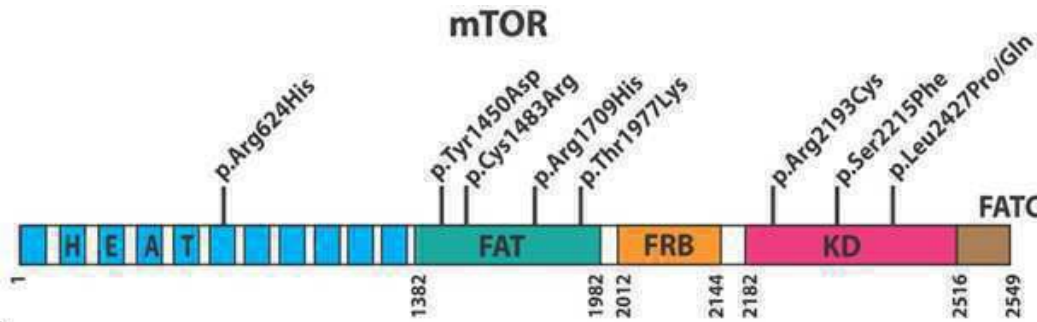
[0263] 도 28에서 알 수 있는 바와 같이, 라파마이신의 투여로 인하여 상기 동물모델에서의 자발적 발작이 거의 나타나지 않음을 확인하였다.

도면

도면1a



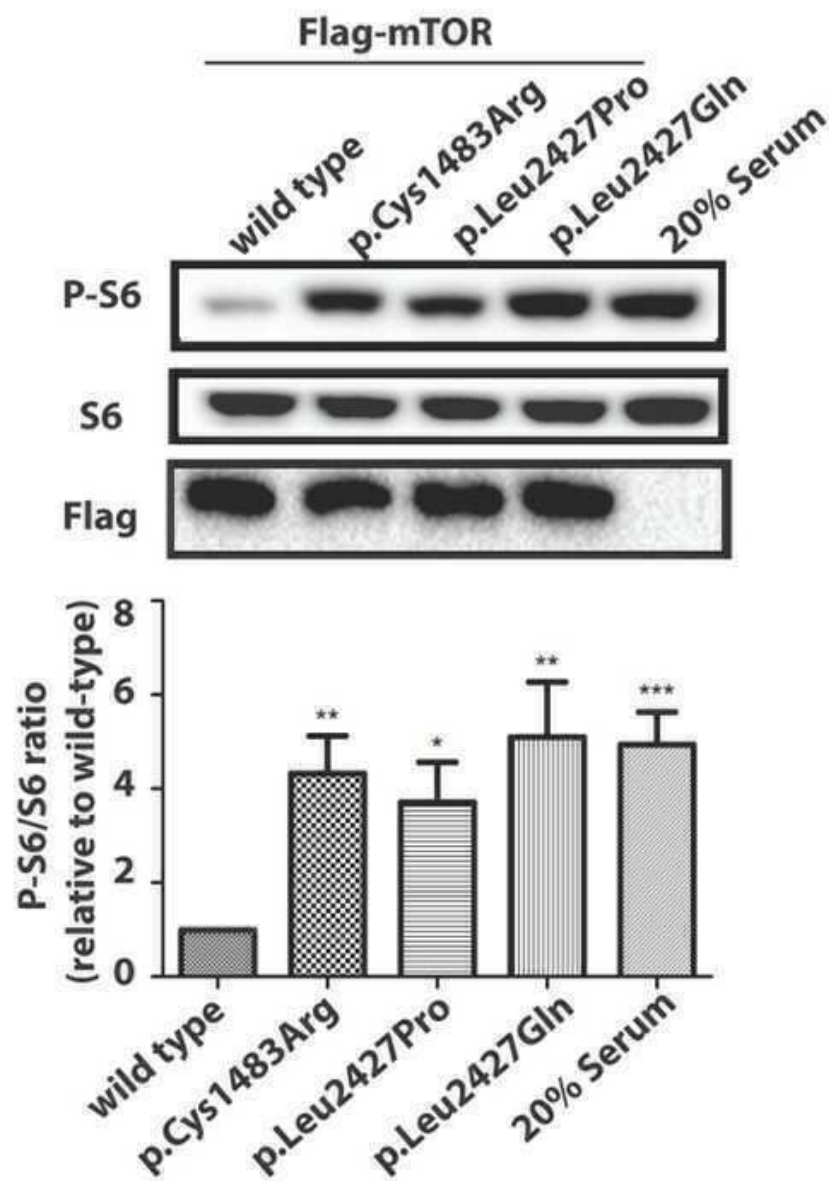
도면1b



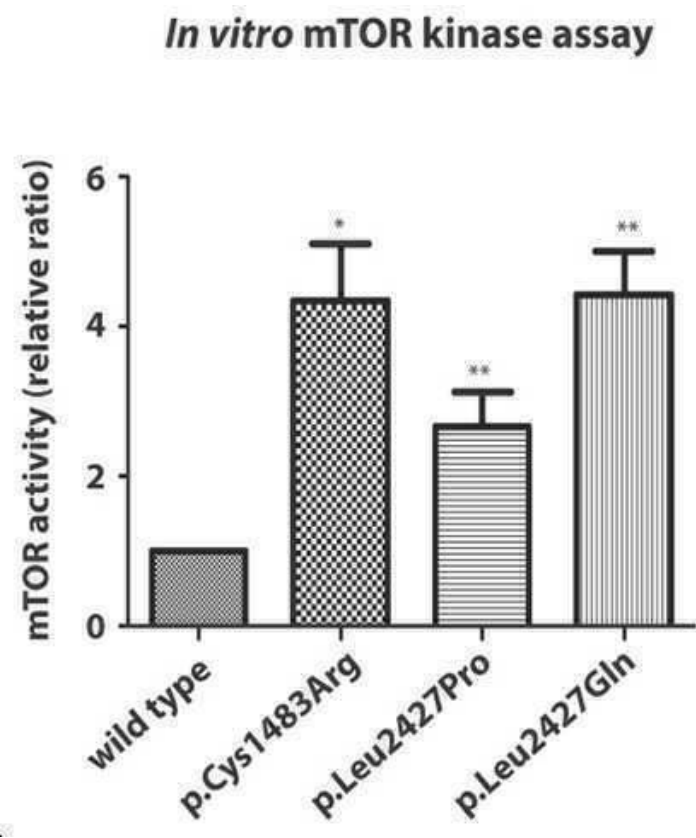
도면1c

		p.Arg624	p.Tyr1450	p.Cys1483	p.Arg1709	p.Thr1977	p.Arg2193	p.Ser2215	p.Ser2427
Human	...	AARTC ...	TWYEK ...	MRCLE ...	SARKI ...	PLTVA ...	DLRQD ...	PTSLR ...	PLLNW
Rhesus	...	AARTC ...	TWYEK ...	MRCLE ...	SARKI ...	PLTVA ...	DLRQD ...	PTSLR ...	PLLNW
Mouse	...	AARTC ...	TWYEK ...	MRCLE ...	SARKI ...	PLTVA ...	DLRQD ...	PTSLR ...	PLLNW
Dog	...	AARTC ...	TWYEK ...	MRCLE ...	STRKI ...	PLTVA ...	DLRQD ...	PTSLR ...	PLLNW
Elephant	...	AARTC ...	TWYEK ...	MRCLE ...	SARKI ...	PLTVA ...	DLRQD ...	PTSLR ...	PLLNW
Opssum	...	AARTC ...	TWYEK ...	MRCLE ...	SARKI ...	PLTVA ...	DLRQD ...	PTSLR ...	PLLNW
Chicken	...	AARTC ...	TWYEK ...	MRCLE ...	SARKI ...	PLTVA ...	DLRQD ...	PTSLR ...	PLLNW
X_tropicalis	...	AARTC ...	TWYEK ...	MRCLE ...	STRKI ...	PLTVA ...	DLRQD ...	PASLR ...	PLLNW
Zebrafish	...	AARTC ...	TWYEK ...	MRCLE ...	STRKI ...	PLTVA ...	DLRQD ...	PASLR ...	PLLNW

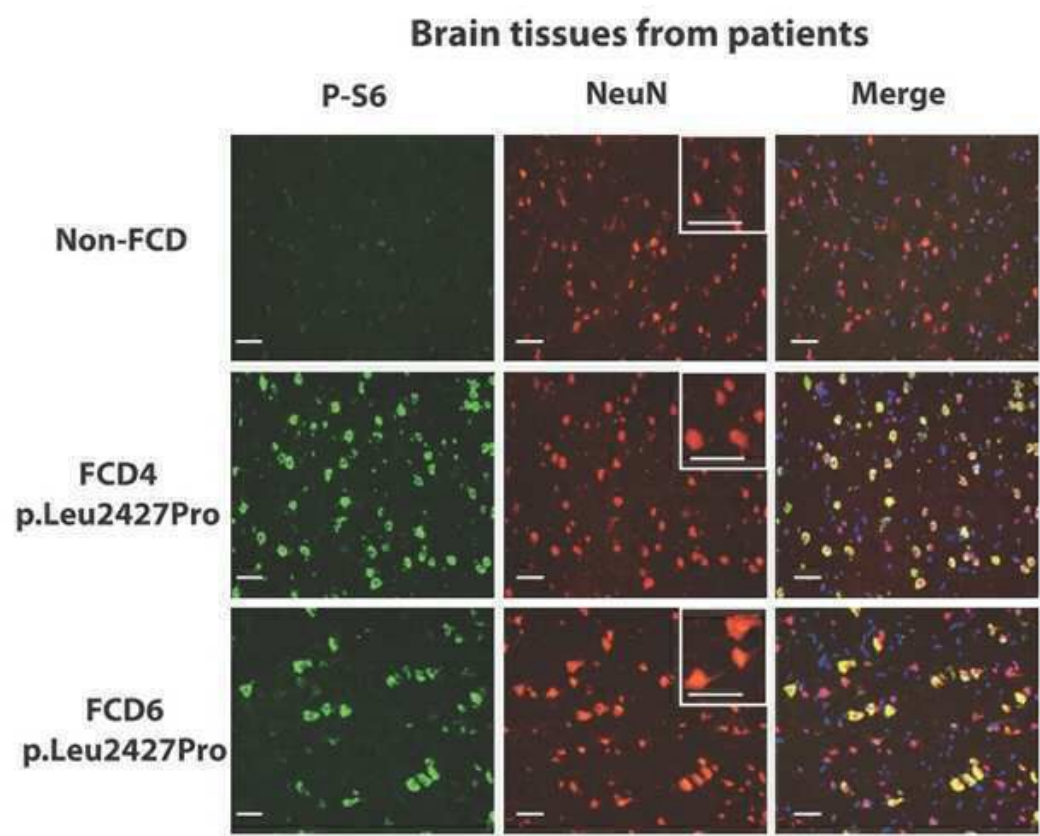
도면2a



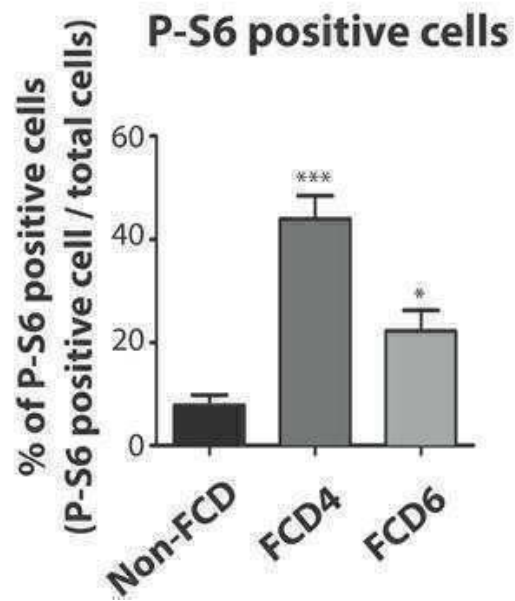
도면2b



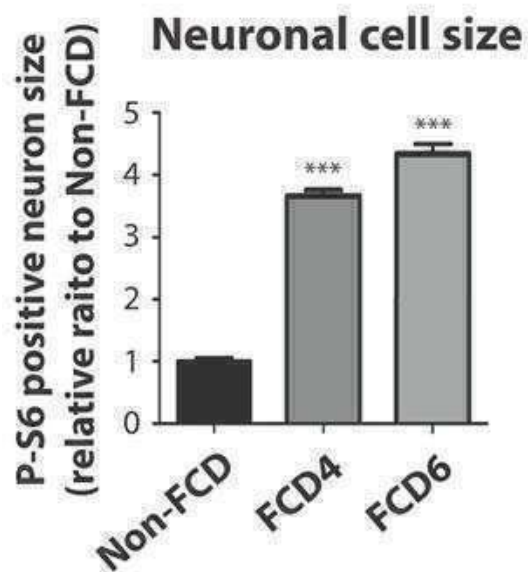
도면2c



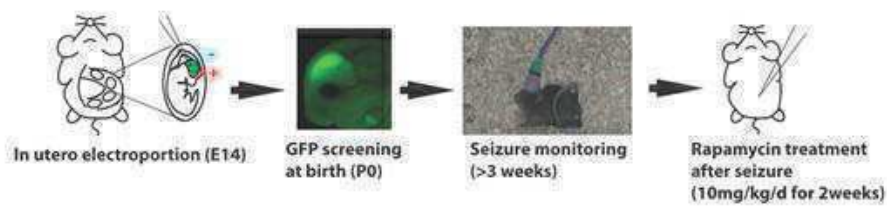
도면2d



도면2e



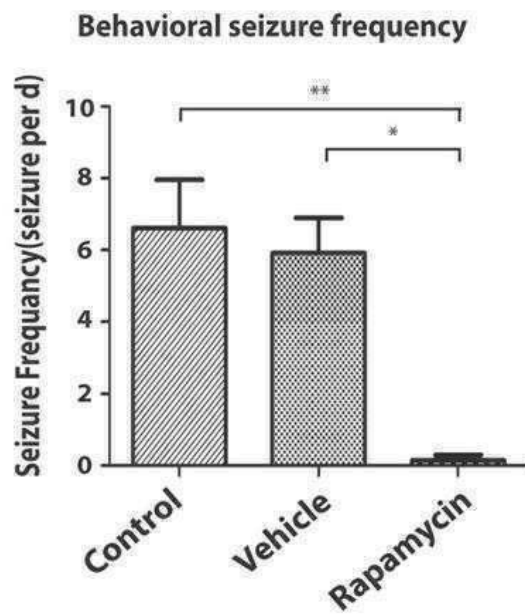
도면3a



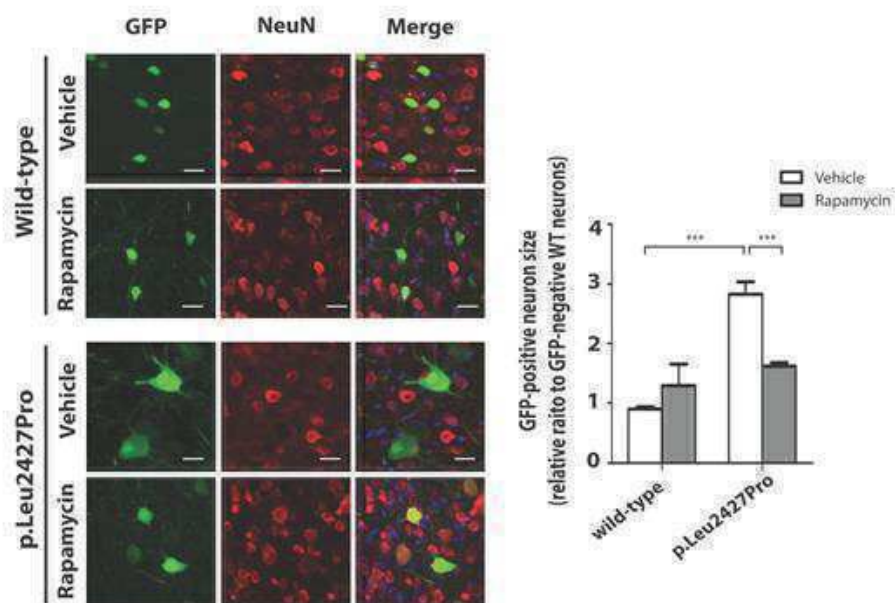
도면3b

Group	No. of GFP+ pups	No. of mice with seizure	%
Wild type	8	0	0
p.Leu2427Pro	23	21	91.3

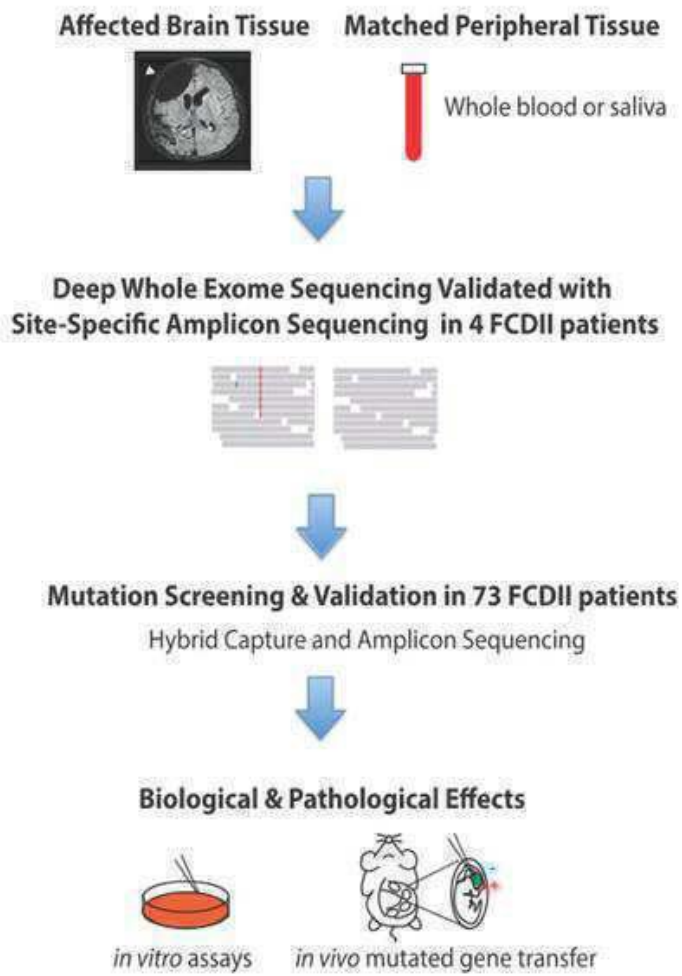
도면3c



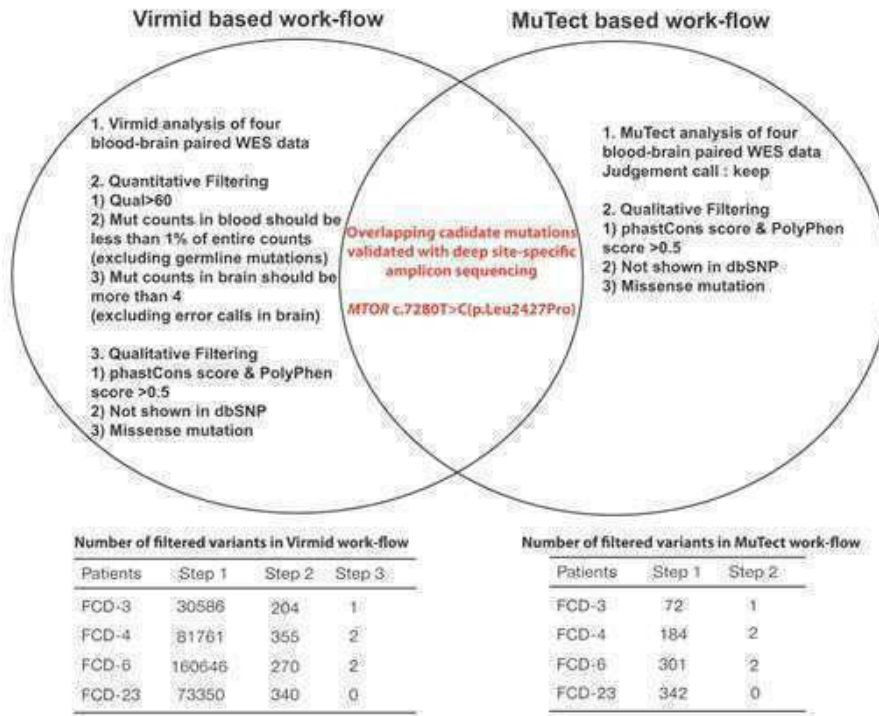
도면3d



도면4



도면5a

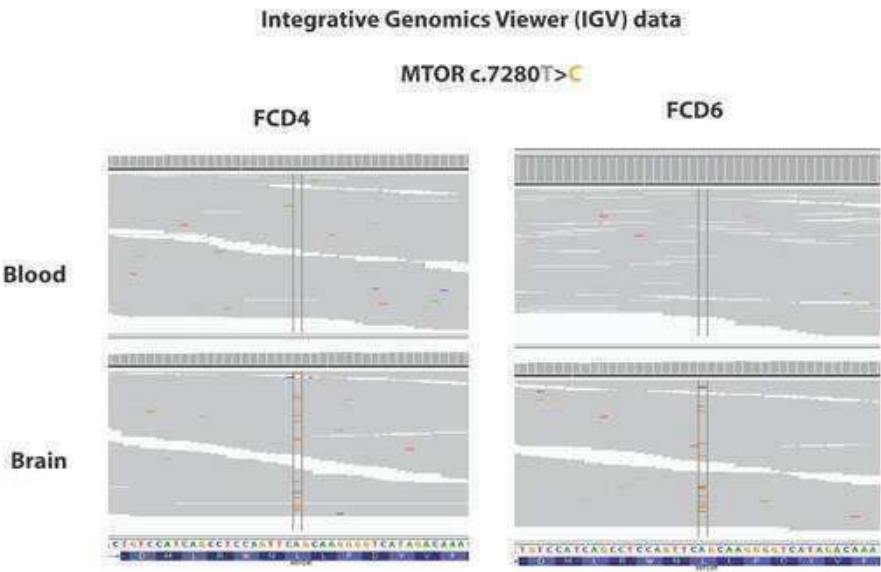


도면5b

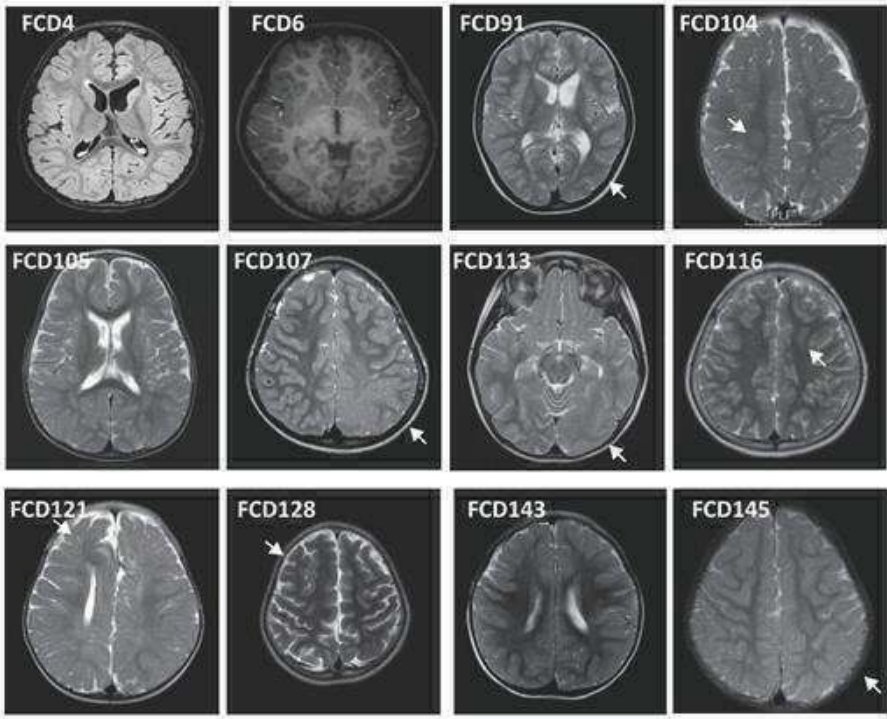
**MTOR c.7280T>C
(p.Leu2427Pro)**

Deep whole exome sequencing							Deep amplicon sequencing						
	Brain			Blood				Brain			Blood		
	Ref	Mut	%	Ref	Mut	%		Ref	Mut	%	Ref	Mut	%
FCD4	338	36	9.6	268	0	0	FCD4	150,460	21,751	12.6	937	4	0.43
FCD6	270	20	6.9	417	0	0	FCD6	141,798	11,140	7.3	1262	4	0.32

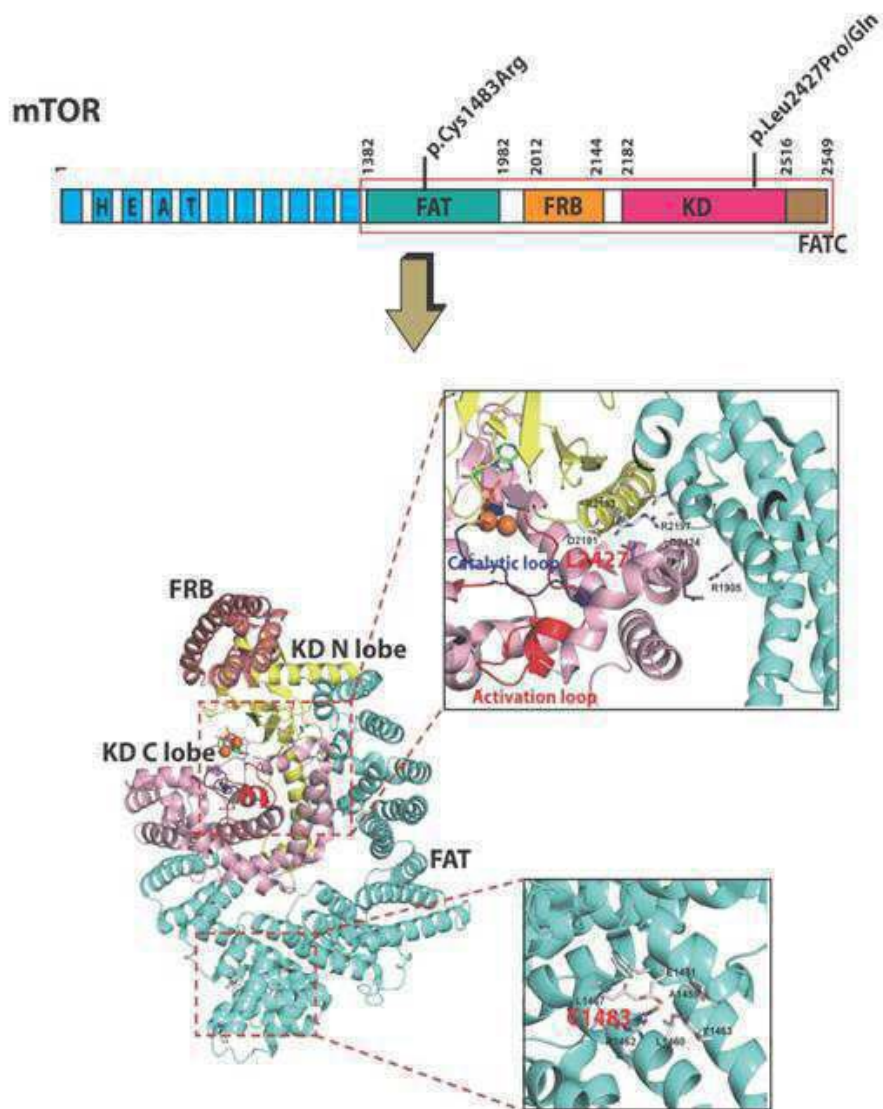
도면6



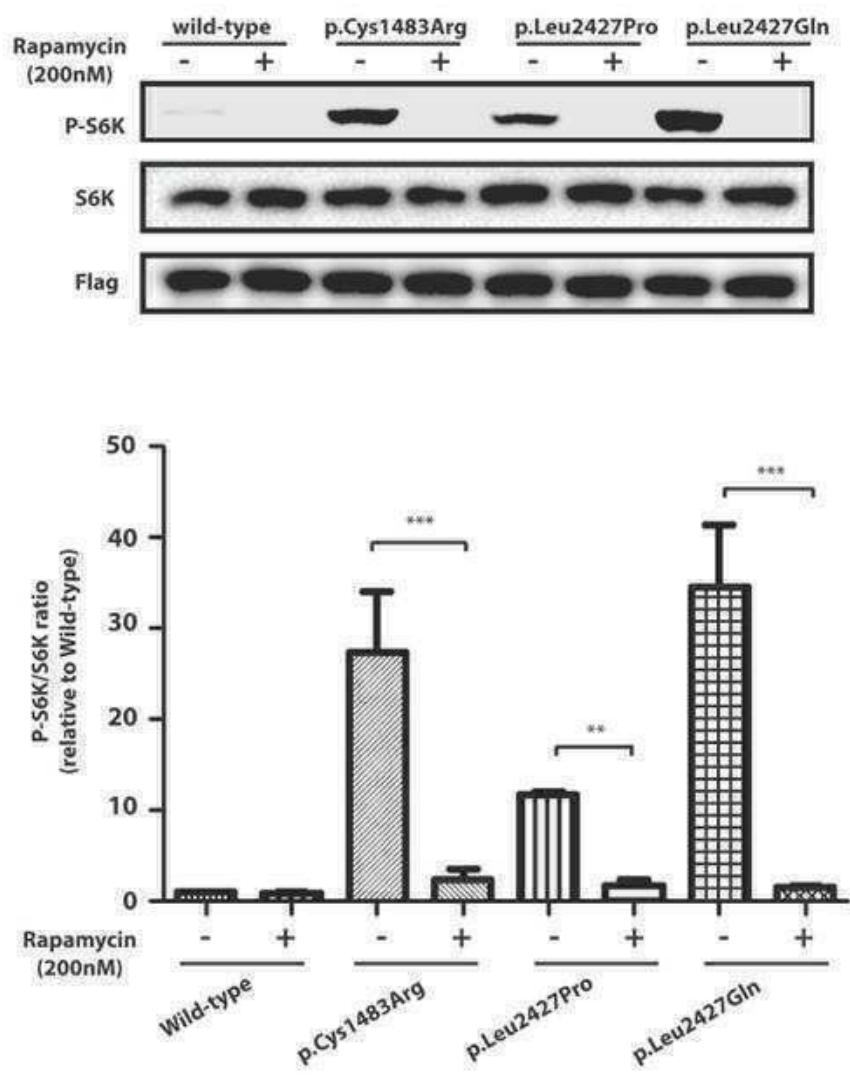
도면7



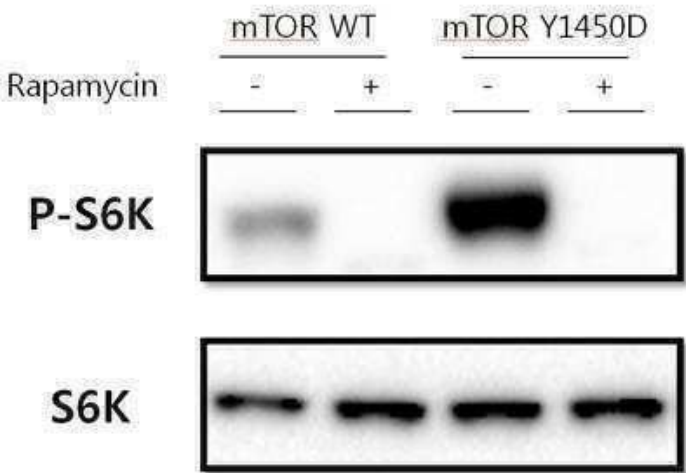
도면8



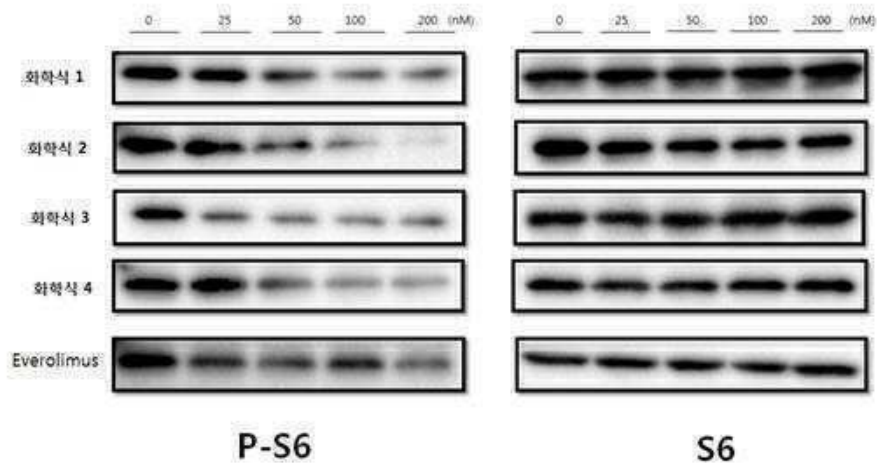
도면9a



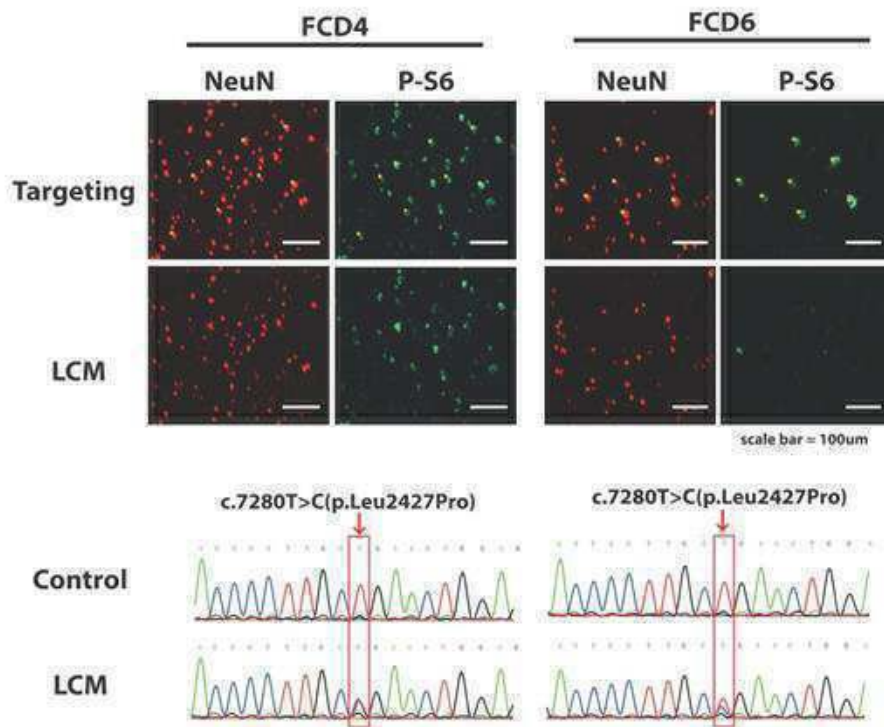
도면9b



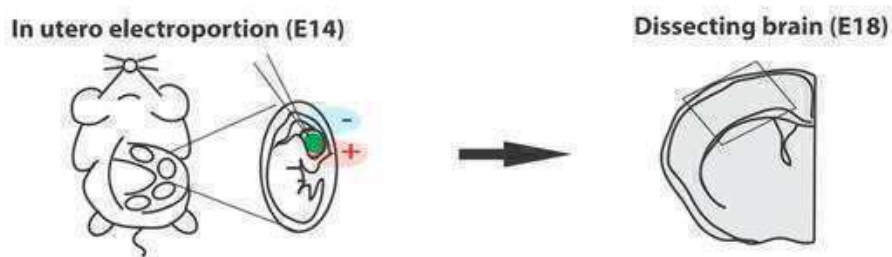
도면9c



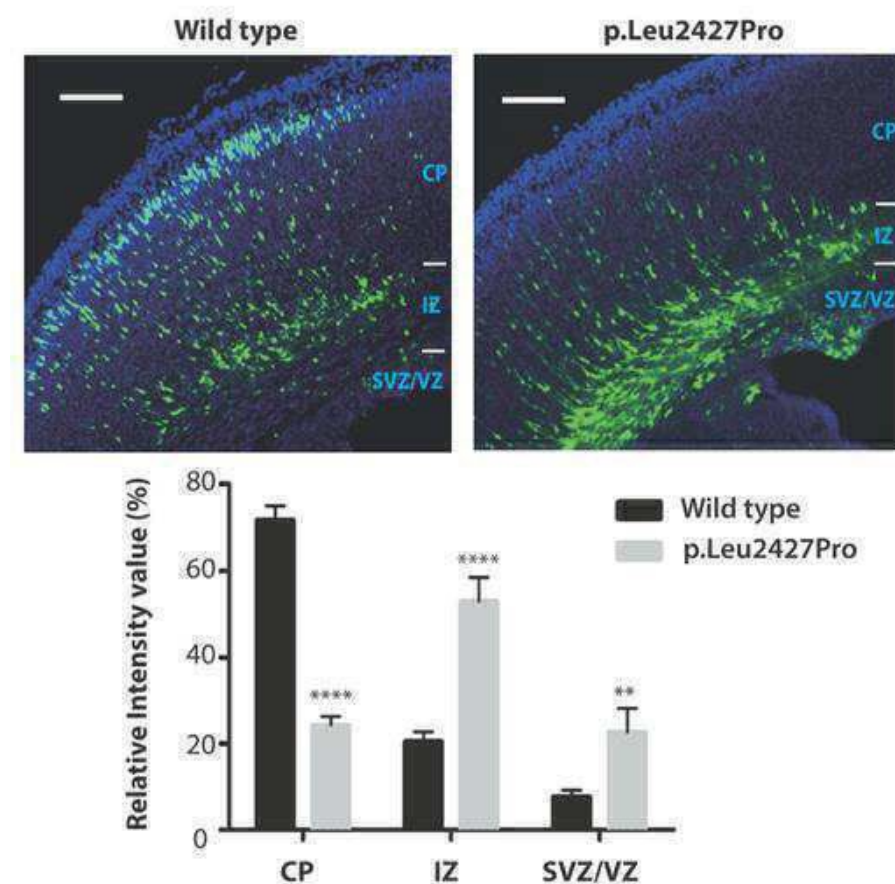
도면10



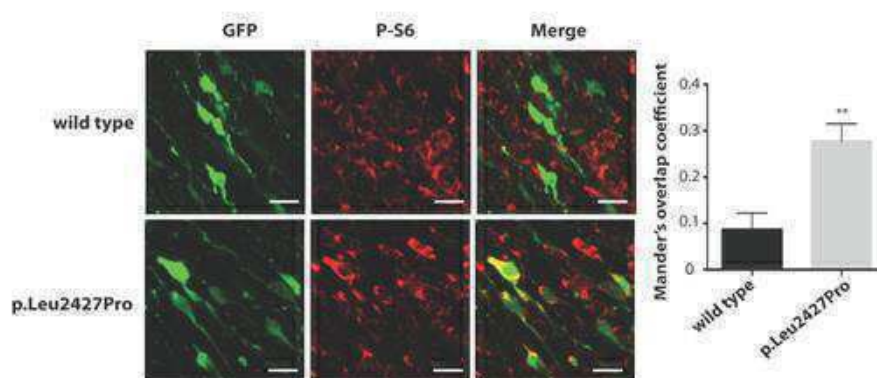
도면11a



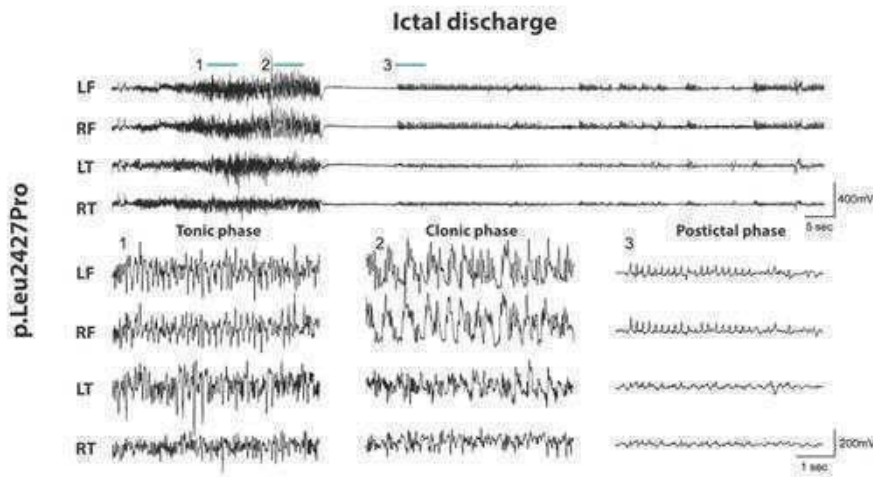
도면11b



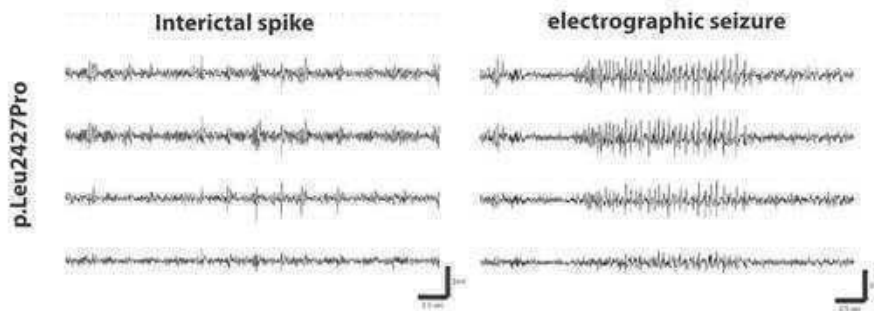
도면11c



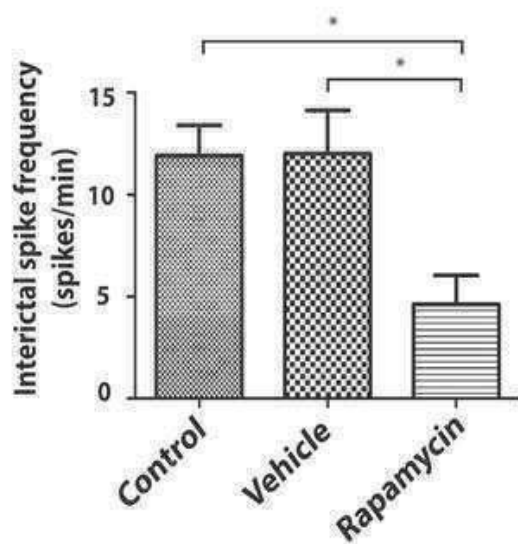
도면12a



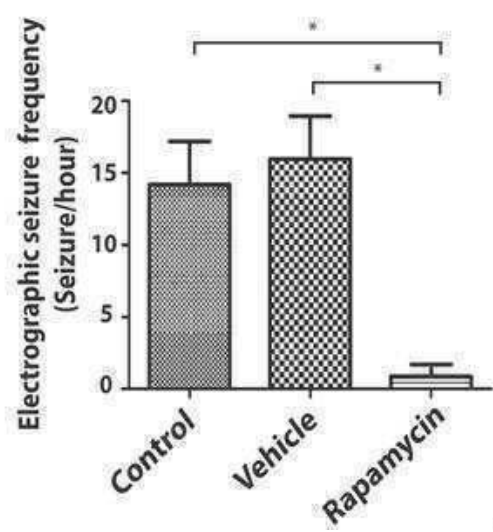
도면12b



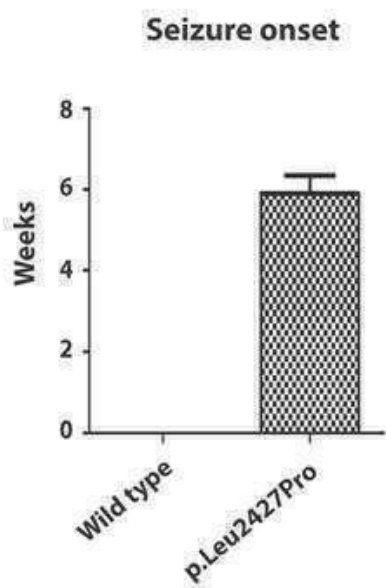
도면12c



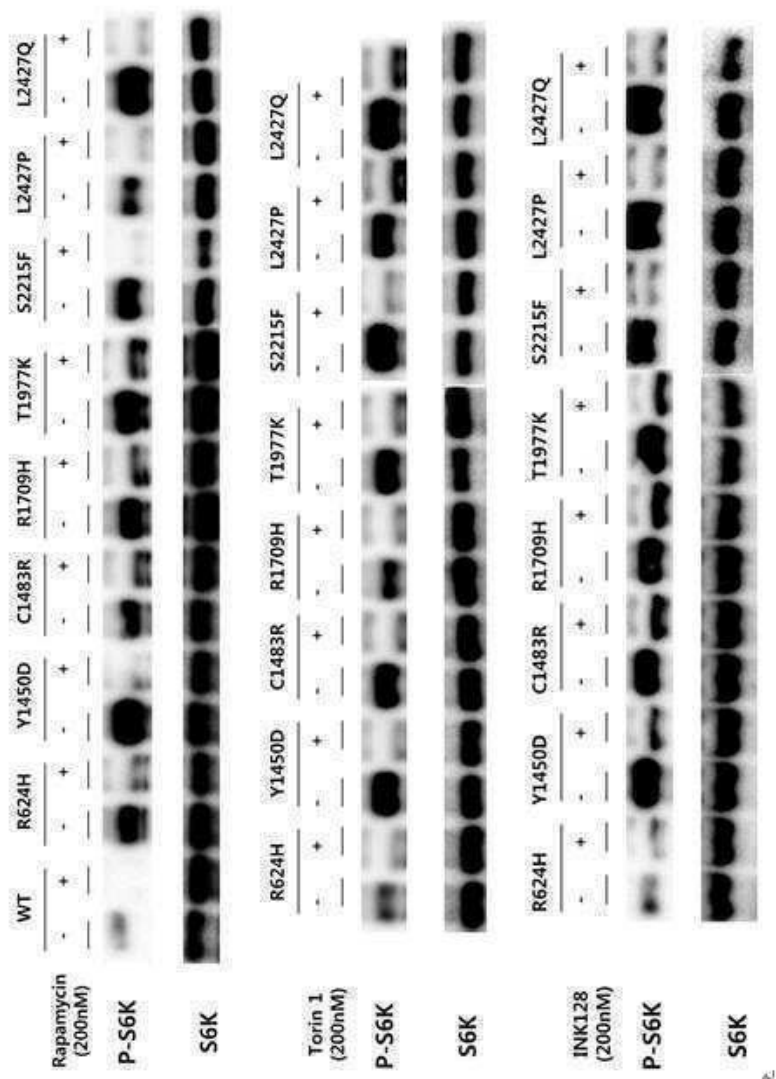
도면12d



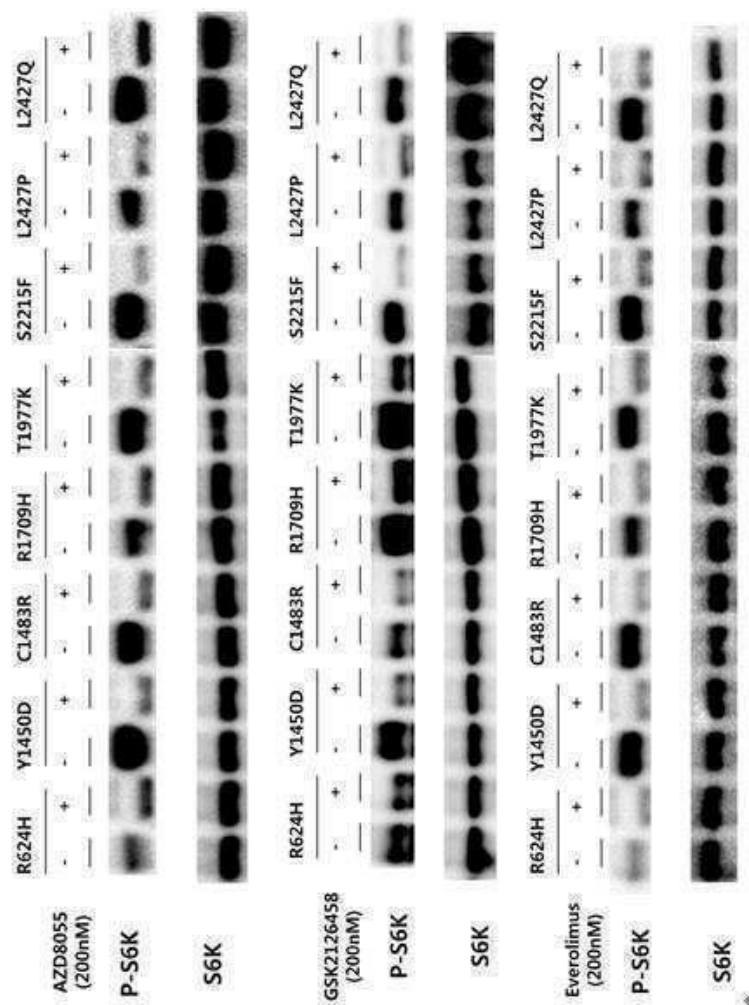
도면12e



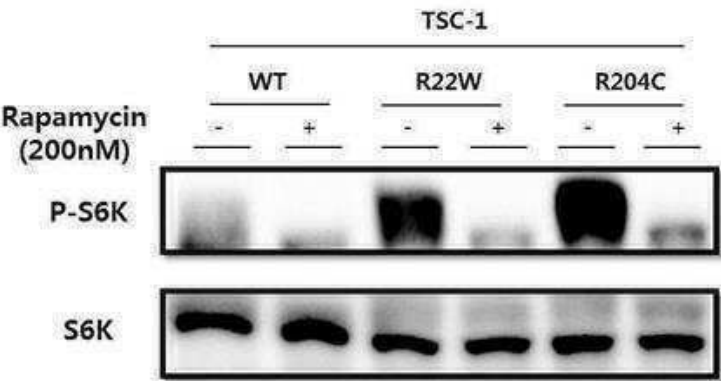
도면13



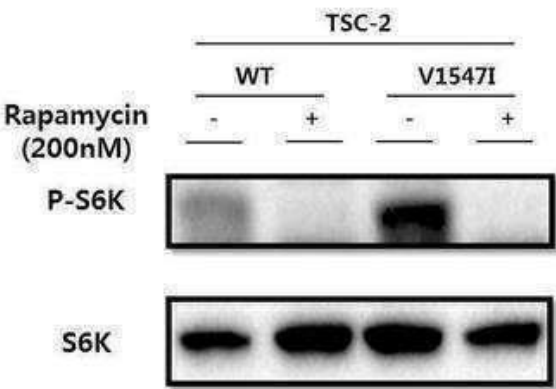
도면14



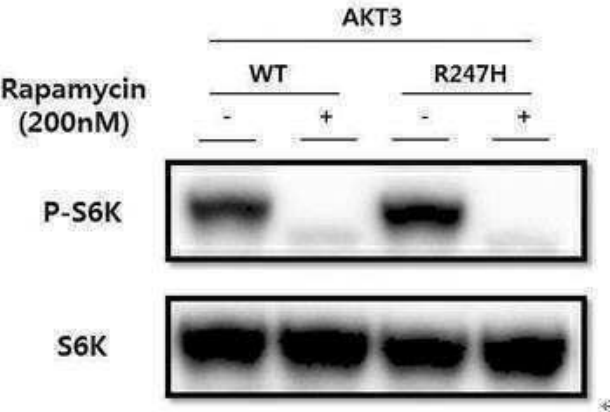
도면15



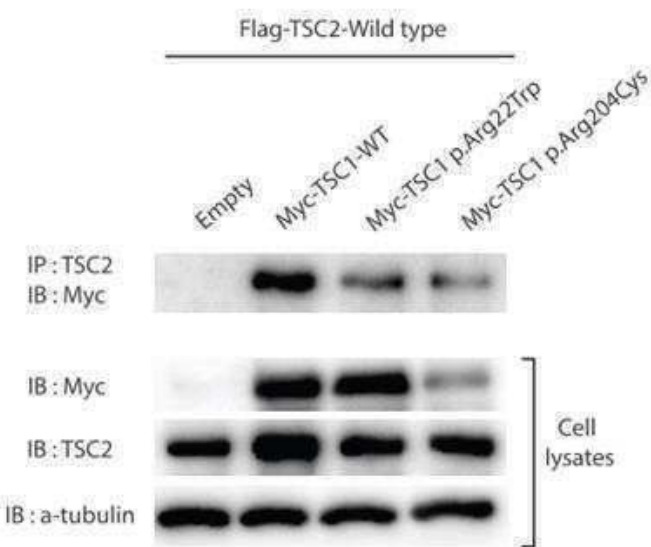
도면16



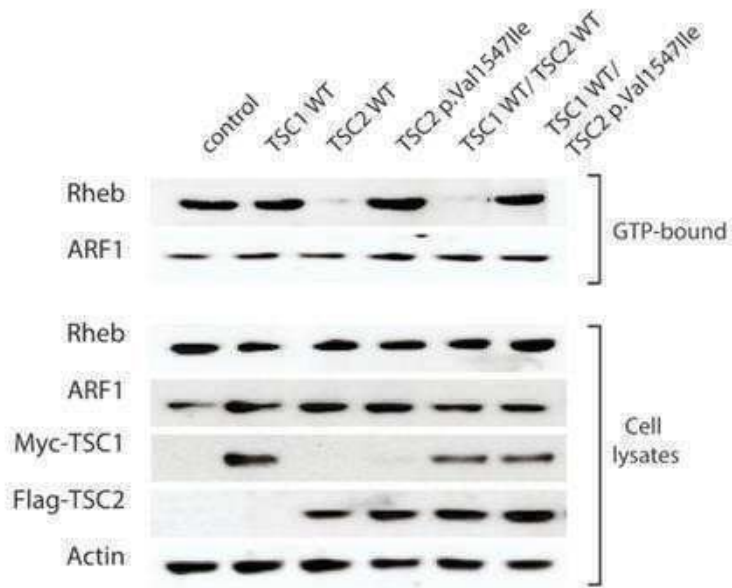
도면17



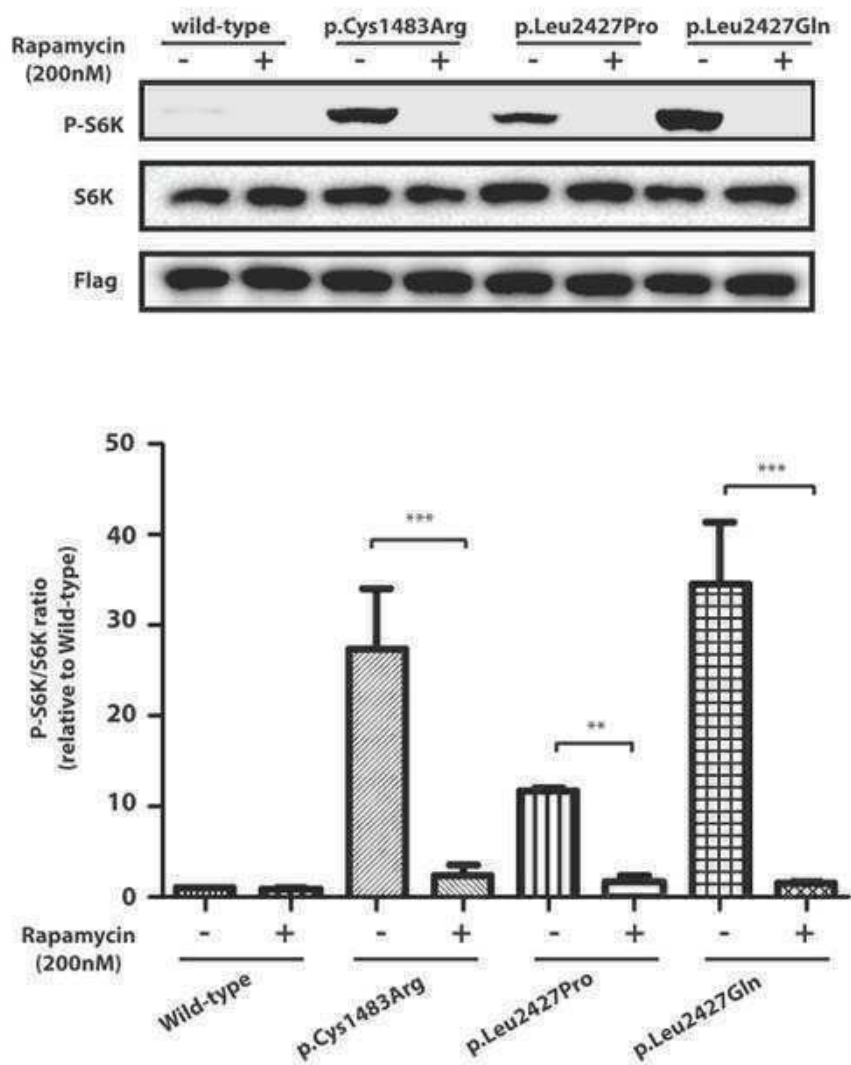
도면18



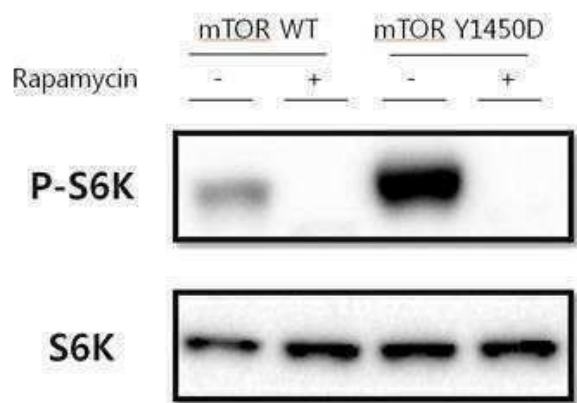
도면19



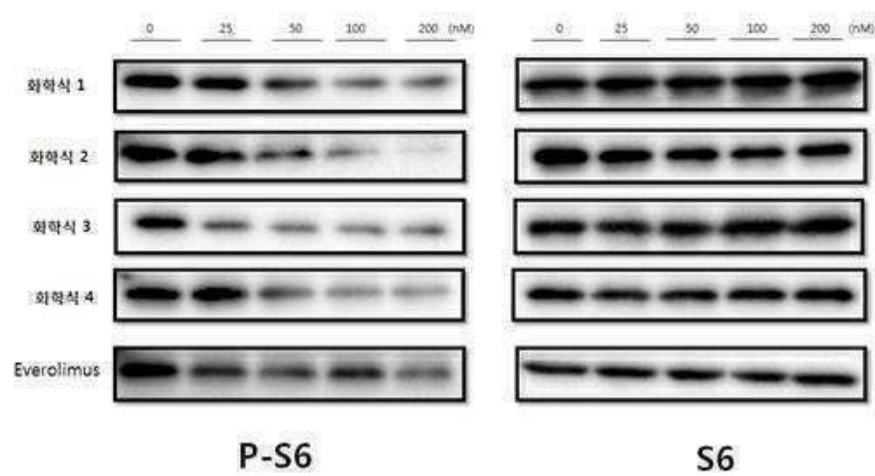
도면20



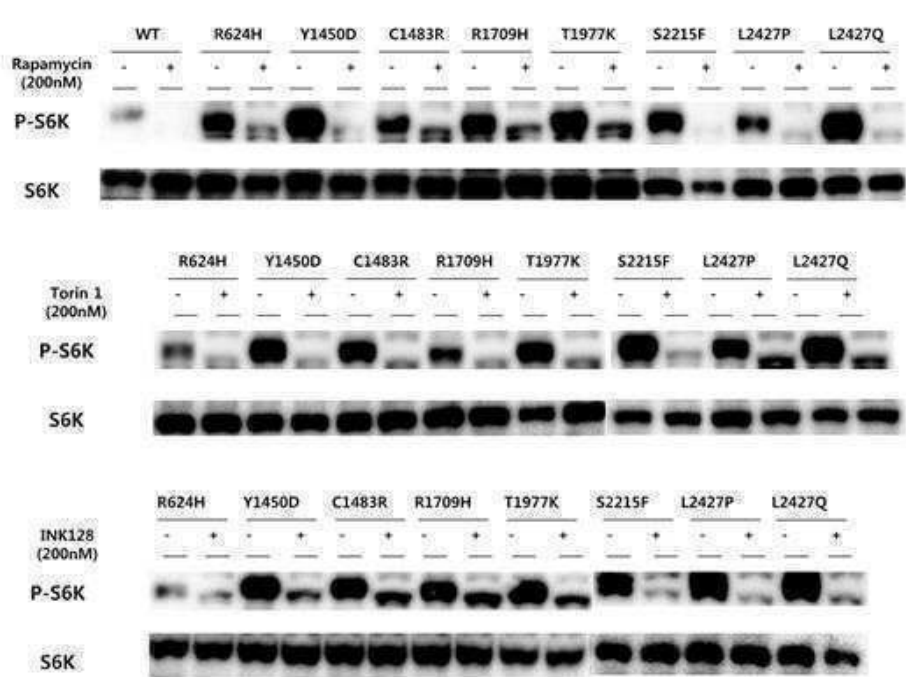
도면21



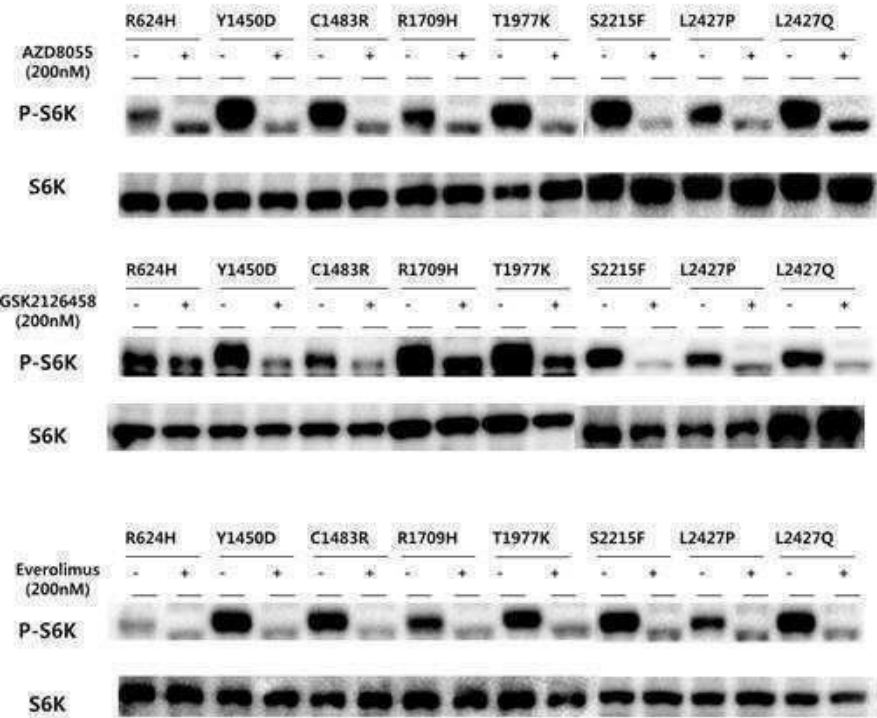
도면22



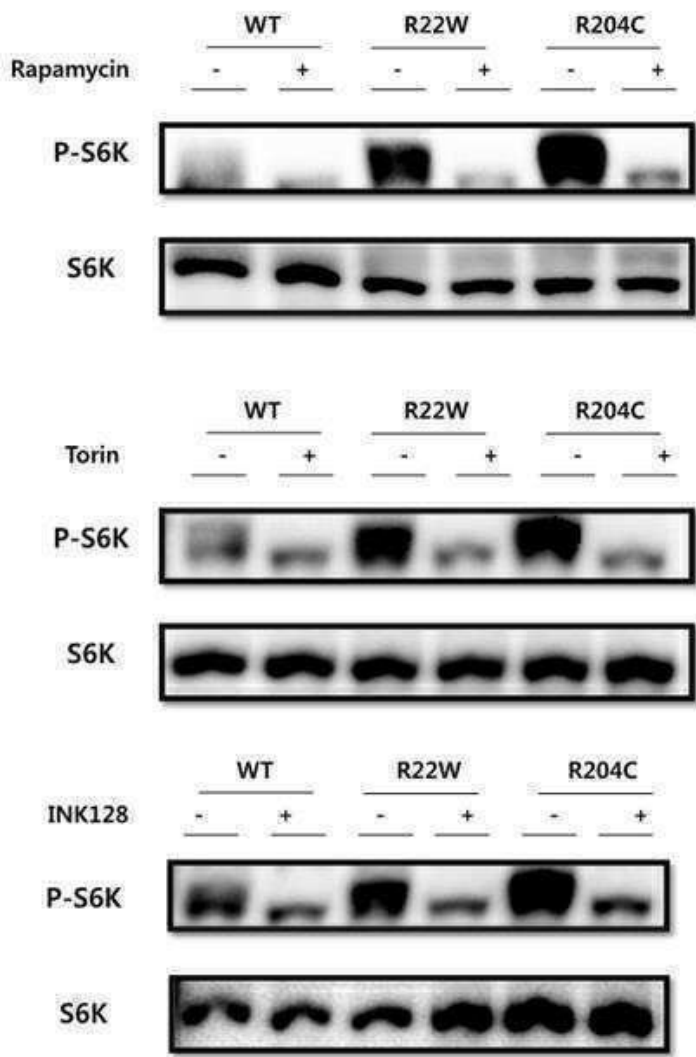
도면23a



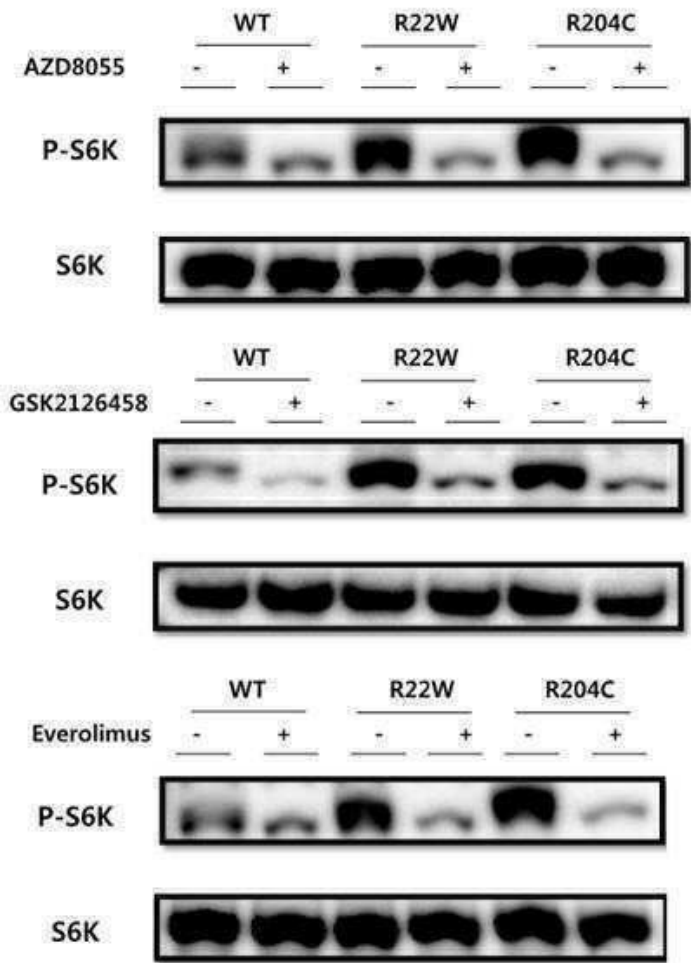
도면23b



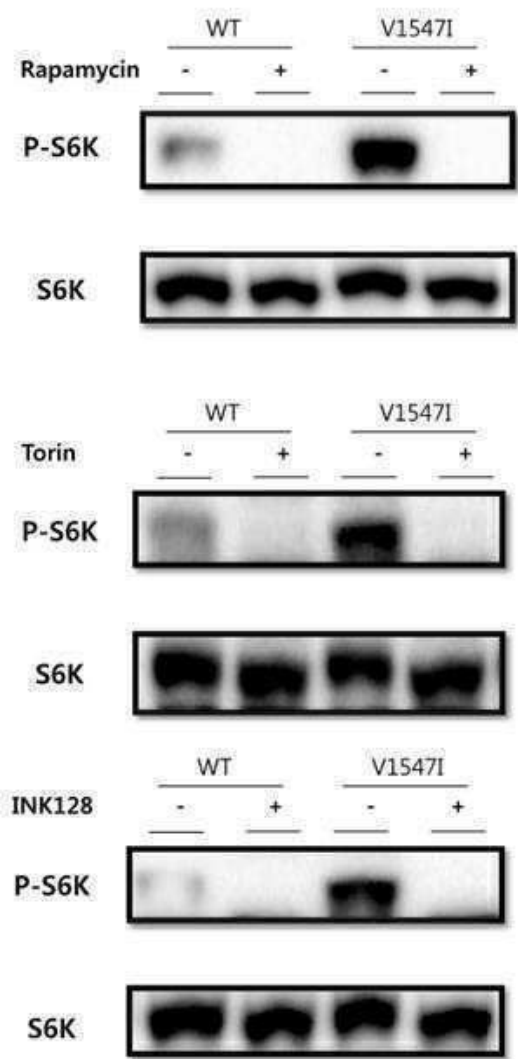
도면24a



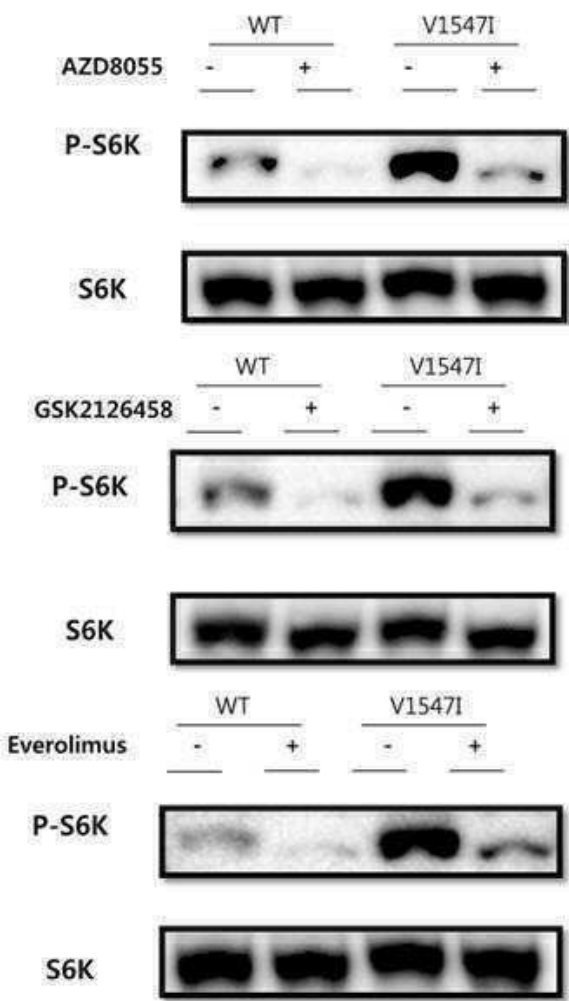
도면24b



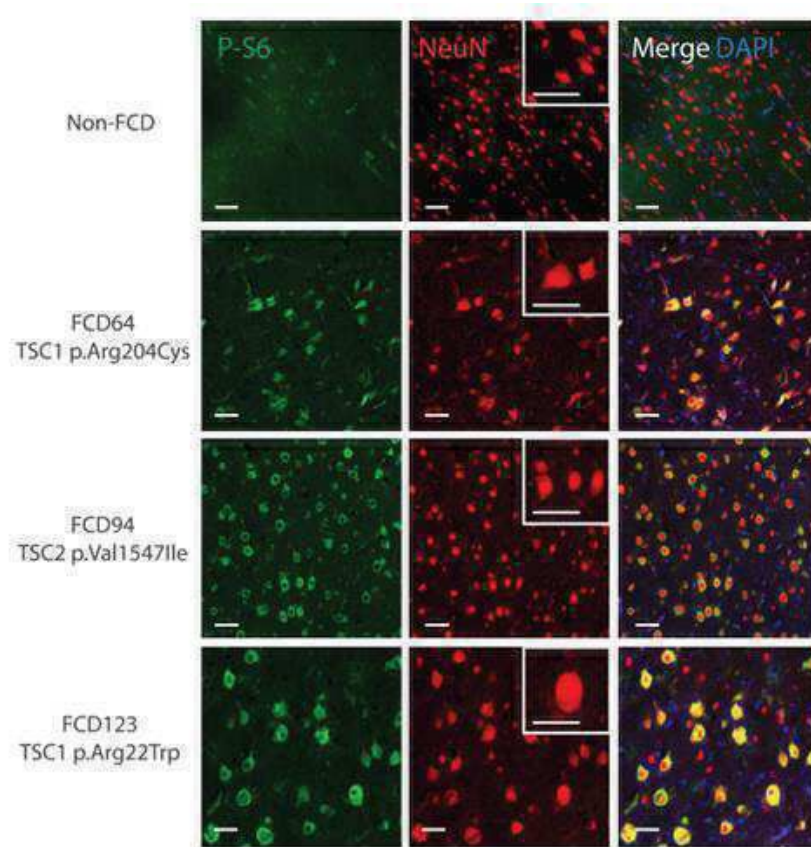
도면25a



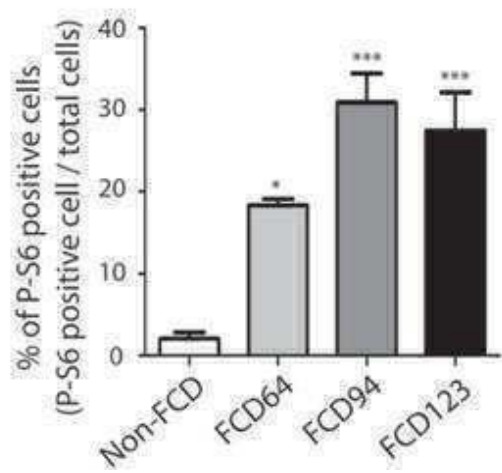
도면25b



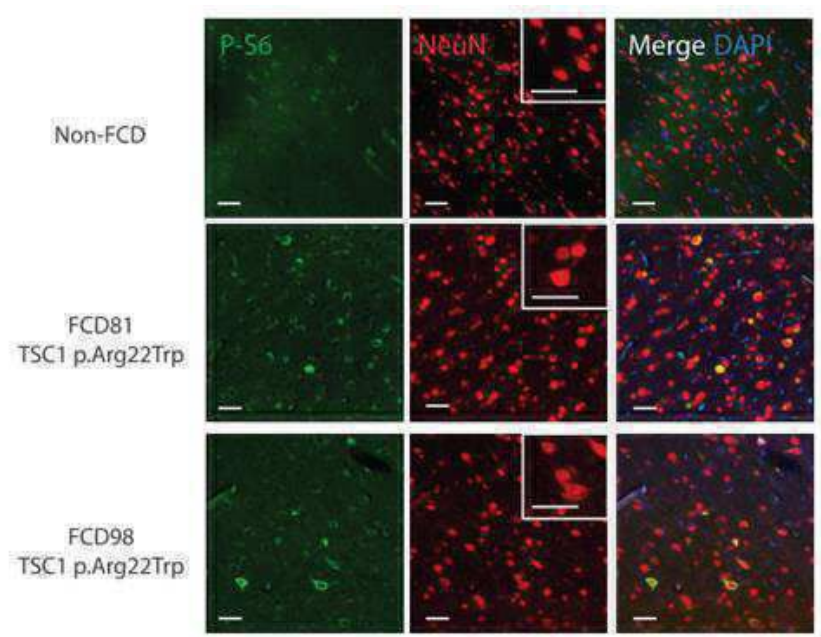
도면26a



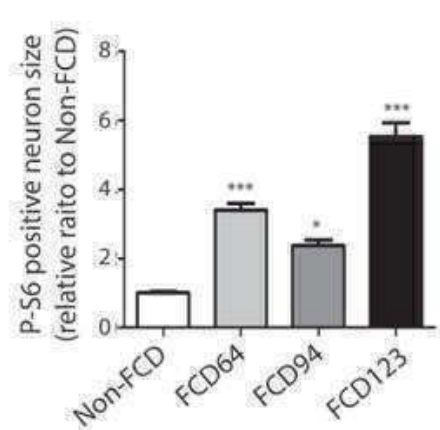
도면26b



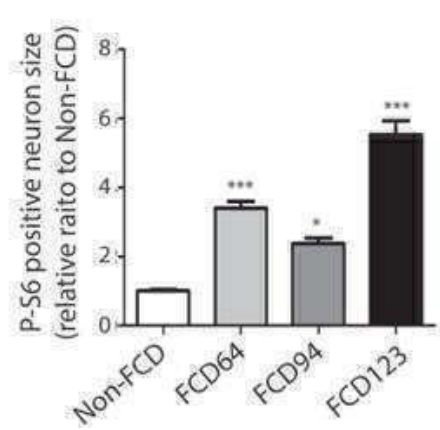
도면26c



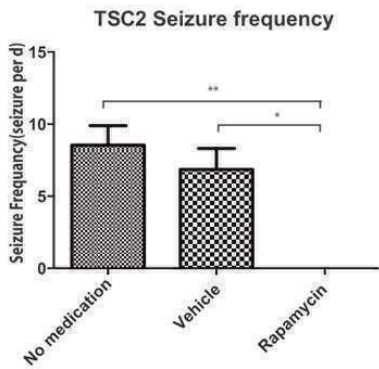
도면26d



도면26e



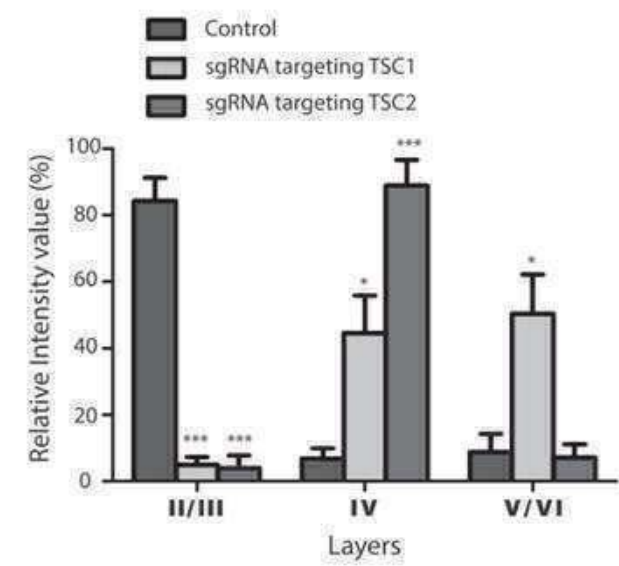
도면26f



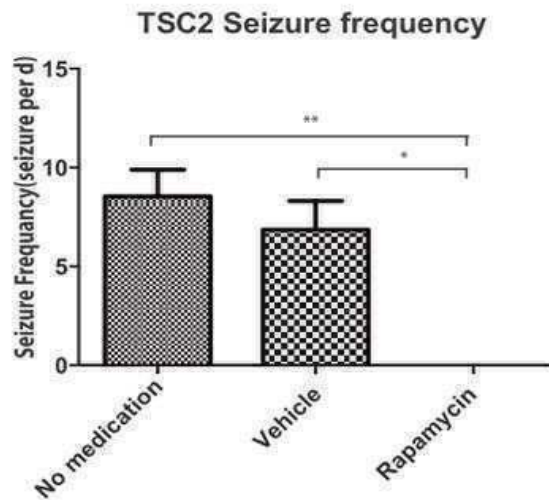
도면27a



도면27b



도면28



서열 목록

<110>	KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY	
	Yonsei University, University - Industry Foundation(UIF)	
<120>	Composition for diagnosis or treatment of intractable epilepsy	
<130>	DPP20193485KR	
<160>	38	
<170>	Kopatent In 1.71	
<210>	1	
<211>	7650	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<220><221>	gene	
<222>	(1)..(7650)	
<223>	wild type mTOR	
<400>	1	
	atgcttggaa ccggacctgc cgccgccacc accgtgccca ccacatctag caatgtgagc	60
	gtcctgcagc agtttgccag tggcctaaag agccggaatg aggaaaccag ggccaaagcc	120
	gccaaggagc tccagcacta tgtcaccatg gaactccgag agatgagtca agaggagtct	180
	actcgcttct atgaccaact gaaccatcac atttttgaat tggtttccag ctgagatgcc	240
	aatgagagga aaggtggcat cttggccata gctagcctca taggagtgga aggtgggaat	300
	gccacccgaa ttggcagatt tgccaactat ctctcggaacc tcctccctc caatgaccca	360
	gttgtcatgg aaatggcatc caaggccatt ggccgtcttg ccatggcagg ggacactttt	420
	accgtgagt acgtggaatt tgaggtgaag cgagccctgg aatggctggg tgctgaccgc	480

aatgagggcc ggagacatgc agctgtcctg gttctccgtg agctggccat cagcgtccct	540
accttcttct tccagcaagt gcaacccttc ttgacaaca tttttgtggc cgtgtgggac	600
cccaaacagg ccatccgtga gggagctgta gccgcccttc gtgcctgtct gattctcaca	660
accagcgtg agccgaagga gatgcagaag cctcagtggg acaggcacac atttgaagaa	720
gcagagaagg gatttgatga gaccttggcc aaagagaagg gcatgaatcg ggatgatcgg	780
atccatggag ctttgttgat ccttaacgag ctgggtccgaa tcagcagcat ggaggagag	840
cgtctgagag aagaaatgga agaaatcaca cagcagcagc tggtagacga caagtactgc	900
aaagatctca tgggcttcgg aacaaaacct cgtcacatta ccccttcac cagtttccag	960
gctgtacagc cccagcagtc aaatgccttg gtggggctgc tgggtacag ctctcaccaa	1020
ggcctcatgg gatttgggac ctccccagt ccagctaagt ccacctggt ggagagccgg	1080
tgttgacag acttgatgga ggagaaattt gatcaggtgt gccagtgggt gctgaaatgc	1140
aggaatagca agaactcgt gatccaaatg acaatcctta atttgttgcc ccgcttggct	1200
gcattccgac ctctgcctt cacagatacc cagtatctcc aagataccat gaacctgtc	1260
ctaagctgtg tcaagaagga gaaggaacgt acagcggcct tccaagcct ggggctactt	1320
tctgtggctg tgaggtctga gttaaggctc tatttgctc gcgtgctgga catcatccga	1380
gcggccctgc ccccaaagga cttcgcccat aagaggcaga aggcaatgca ggtggatgcc	1440
acagtcttca ctgcatcag catgctggct cgagcaatgg ggccaggcat ccagcaggat	1500
atcaaggagc tgcctggagcc catgctggca gtgggactaa gccctgcct cactgcagt	1560
ctctacgacc tgagccgtca gattccacag ctaaagaagg acattcaaga tgggctactg	1620
aaaatgctgt ccttggctct tatgcacaaa ccccttcgcc acccaggcat gccaagggc	1680
ctggccctac agctggcctc tctggcctc acgacctcc ctgaggccag cgatgtgggc	1740
agcatcactc ttgccctccg aacgcttggc agctttgaat ttgaaggcca ctctctgacc	1800
caatttgttc gccactgtgc ggatcatttc ctgaacagtg agcacaagga gatccgcatg	1860
gaggctgccc gcacctgtc ccgctgtctc acacctcca tccacctcat cagtggccat	1920
gtcatgtgg ttagccagac cgcagtgcaa gtggtggcag atgtgcttag caaactgctc	1980
gtagtggga taacagatcc tgacctgac attcgctact gtgtcttggc gtccctggac	2040
gagcgtttt atgcacacct ggcccaggcg gagaacttgc aggccttgtt tgtggctctg	2100
aatgaccagg tgtttgagat ccgggagctg gccatctgca ctgtgggccg actcagtagc	2160
atgaacctg cttttgtcat gcctttctg cgcaagatgc tcatccagat tttagacagag	2220

ttggagcaca gtgggattgg aagaatcaaa gagcagagtg cccgcatgct ggggcacctg	2280
gtctccaatg cccccgact catccgcccc tacatggagc ctattctgaa ggcattaatt	2340
ttgaaactga aagatccaga cccatgatcca aaccaggtg tgatcaataa tgtcctggca	2400
acaataggag aattggcaca ggtagtggc ctggaaatga ggaaatgggt tgatgaactt	2460
tttattatca tcatggacat gctccaggat tcctctttgt tggccaaaag gcagggtggt	2520
ctgtggacct tgggacagtt ggtggccagc actggctatg tagtagagcc ctacaggaag	2580
taccctactt tgcttgaggt gctactgaat ttctgaaga ctgagcagaa ccagggtaca	2640
cgagagagg ccatccgtgt gttagggtct ttaggggtct tggatcctta caagcacaaa	2700
gtgaacattg gcatgataga ccagtcctgg gatgcctctg ctgtcagcct gtcagaatcc	2760
aagtcaagtc aggattcctc tgactatagc actagtgaat tgctgggtcaa catgggaaac	2820
ttgcctctgg atgagttcta cccagctgtg tccatggtgg cccatgatcg gatcttcga	2880
gaccagtac tcctcatca tcacacatg gttgtccagg ccatcacctt catcttcaag	2940
tccctgggac tcaaatgtgt gcagttctg cccaggtca tggccaggt ccttaacgtc	3000
attcaggtct gtgatggggc catccgggaa tttttgttc agcagctggg aatgttggtg	3060
tcctttgtga agagccacat cagaccttat atggatgaaa tagtcaccct catgagagaa	3120
ttctgggtca tgaacacctc aattcagagc acgatcattc ttctcattga gcaaattgtg	3180
gtagctcttg ggggtgaatt taagctctac ctgccccagc tgatccaca catgctgcgt	3240
gtcttcatgc atgacaacag cccagggcgc attgtctcta tcaagttact ggctgcaatc	3300
cagctgtttg gcgccaacct ggatgactac ctgcatttac tgctgcctcc tattgttaag	3360
ttgtttgatg cccctgaagc tccactgcca tctcgaaagg cagcgctaga gactgtggac	3420
cgctgacgg agtccctgga ttctactgac tatgcctccc ggatcattca ccctattgtt	3480
cgaacactgg accagagccc agaactgcgc tccacagcca tggacacgt gtcttcactt	3540
gtttttcagc tggggaagaa gtaccaaatt ttattccaa tggatgaata agttctgggtg	3600
cgacaccgaa tcaatcatca gcgctatgat gtgctcatct gcagaattgt caagggatac	3660
acacttgctg atgaagagga ggatcctttg atttaccagc atcgatgct taggagtggc	3720
caaggggatg cattggctag tggaccagt gaaacaggac ccatgaagaa actgcacgtc	3780
agcaccatca acctccaaa ggcctggggc gctgccagga gggtctcaa agatgactgg	3840
ctggaatggc tgagacggct gagcctggag ctgctgaagg actcatcatc gccctccctg	3900
cgctcctgct gggccctggc acaggcctac aaccgatgg ccagggtatc cttcaatgct	3960
gcatttgtgt cctgctggtc tgaactgaat gaagatcaac aggatgagct catcagaagc	4020
atcgagtgg ccctcacctc acaagacatc gctgaagtca cacagaccct cttaaacttg	4080

gctgaattca tggaacacag tgacaagggc cccctgccac tgagagatga caatggcatt	4140
gttctgctgg gtgagagagc tgccaagtgc cgagcatatg ccaaagcact aactacaaa	4200
gaactggagt tccagaaagg ccccccctt gccattctag aatctctcat cagcattaat	4260
aataagctac agcagccgga ggcagcggcc ggagtgttag aatatgcat gaaacacatt	4320
ggagagctgg agatccaggc tacctggtat gagaaactgc acgagtggga ggatgccctt	4380
gtggcctatg acaagaaaat ggacaccaac aaggacgacc cagagctgat gctggccgc	4440
atgcgctgcc tcgaggcctt gggggaatgg ggtcaactcc accagcagtg ctgtgaaaag	4500
tggaccctgg ttaatgatga gacccaagcc aagatggccc ggatggctgc tgcagctgca	4560
tggggtttag gtcagtggga cagcatggaa gaatacacct gtatgatccc tcgggacacc	4620
catgatgggg cattttatag agctgtgctg gcactgcatc aggacctctt ctcttggca	4680
caacagtgca ttgacaaggc cagggacctg ctggatgctg aattaactgc gatggcagga	4740
gagagttaca gtcgggcata tggggccatg gtttcttgc acatgctgc cgagctggag	4800
gaggttatcc agtacaaact tgtccccgag cgacgagaga tcatcccca gatctggtgg	4860
gagagactgc agggctgcca gcgtatcgtg gaggactggc agaaaatcct tatggtgcgg	4920
tcccttgtgg tcagccctca tgaagacatg agaacctggc tcaagtatgc aagcctgtgc	4980
ggcaagagtg gcaggtggc tcttctcat aaaactttag tgttctcct gggagtgtat	5040
ccgtctcgcc aacttgacca tcctctgcca acagttcacc ctacagtgac ctatgcctac	5100
atgaaaaaca tgtggaagag tgcccgaag atcgatgcct tccagcacat gcagcatctt	5160
gtccagacca tgcagcaaca ggcccagcat gccatcgcta ctgaggacca gcagcataag	5220
caggaactgc acaagctcat ggcccgatgc ttcttgaaac ttggagagtg gcagctgaat	5280
ctacagggca tcaatgagag cacaatcccc aaagtgtgc agtactacag cgccgccaca	5340
gagcacgacc gcagctggtg caagccctgg catgcgtggg cagtgtatgaa cttcgaagct	5400
gtgtactact acaaacatca gaaccaagcc cgcgatgaga agaagaaact gcgtcatgcc	5460
agcggggcca acatcaccaa cgccaccact gccgccacca cggccgccac tgccaccacc	5520
actgccagca ccgagggcag caacagttag agcaggccg agagcaccga gaacagcccc	5580
accccatcgc cgctgcagaa gaaggtcact gaggatctgt ccaaacctt cctgatgtac	5640
acggtgcctg ccgtccaggg cttcttcctt tccatctctt tgtcacgagg caacaacctc	5700
caggatacac tcagagttct caccttatgg ttgtattatg gtcactggcc agatgtcaat	5760
gaggccttag tggagggggt gaaagccatc cagattgata cctggctaca ggttatacct	5820
cagctcattg caagaattga tacgccaga ccttgggtgg gacgtctcat tcaccagctt	5880
ctcacagaca ttggtcggtg ccacccccag gcctcatct acccactgac agtggcttct	5940

aagtctacca cgacagcccg gcacaatgca gccaacaaga ttctgaagaa catgtgtgag	6000
cacagcaaca ccttggtcca gcaggccatg atggtgagcg aggagctgat ccgagtggcc	6060
atcctctggc atgagatgtg gcatgaaggc ctggaagagg catctcgttt gtactttggg	6120
gaaaggaacg tgaagggcat gtttgagggtg ctggagccct tgcatgctat gatggaacgg	6180
ggccccaga ctctgaagga aacatccttt aatcaggcct atggtcgaga tttaatggag	6240
gcccagagt ggtgcaggaa gtacatgaaa tcagggaatg tcaaggacct cacccaagcc	6300
tgggacctct attatcatgt gttccgacga atctcaaagc agctgcctca gctcacatcc	6360
ttagagctgc aatatgtttc cccaaaactt ctgatgtgcc gggaccttga attggctgtg	6420
ccaggaacat atgaccccaa ccagccaatc attcgcatc agtccatagc accgtctttg	6480
caagtcatca catccaagca gaggccccgg aaattgacac ttatgggcag caacggacat	6540
gagtttgttt tctttctaaa aggccatgaa gatctgcgcc aggatgagcg tgtgatgcag	6600
ctcttcggcc tggtaaacac ctttctggcc aatgacccaa catctcttcg gaaaaacctc	6660
agcatccaga gatacgtgt catcccttta tcgaccaact cgggcctcat tggctgggtt	6720
ccccactgtg acacactgca cgccctcatc cgggactaca gggagaagaa gaagatcctt	6780
ctcaacatcg agcatcgcat catgttgcgg atggctccgg actatgacca cttgactctg	6840
atgcagaagg tggagggtgtt tgagcatgcc gtcaataata cagctgggga cgacctggcc	6900
aagctgctgt ggctgaaaag cccagctcc gaggtgtggt ttgaccgaag aaccaattat	6960
accgttctt tagcggtcac gtcaatggtt gggtatattt taggcctggg agatagacac	7020
ccatccaacc tgatgctgga ccgtctgagt gggaagatcc tgcacattga ctttggggac	7080
tgctttgagg ttgctatgac ccgagagaag ttccagaga agattccatt tagactaaca	7140
agaatgttga ccaatgctat ggaggttaca ggcttgatg gcaactacag aatcacatgc	7200
cacacagtga tggagggtgt gcgagagcac aaggacagtg tcatggccgt gctggaagcc	7260
tttgtctatg accccttgct gaactggagg ctgatggaca caaatacca aggcaacaag	7320
cgatcccgaa cgaggacgga ttctactct gctggccagt cagtcgaaat ttggacggt	7380
gtggaacttg gagagccagc ccataagaaa acggggacca cagtgcaga atctattcat	7440
tctttcattg gagacggttt ggtgaaacca gaggcctaa ataagaaagc tatccagatt	7500
attaacaggg ttcgagataa gctcactggt cgggacttct ctcatgatga cactttggat	7560
gttccaacgc aagttgagct gctcatcaaa caagcgacat cccatgaaaa cctctgccag	7620
tgctatattg gctggtgccc tttctggtaa	7650

<210> 2
 <211> 2549
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(2549)
 <223> wild type mTOR
 <400> 2

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

Thr Met Glu Leu Arg Glu Met Ser Gln Glu Glu Ser Thr Arg Phe Tyr
 50 55 60
 Asp Gln Leu Asn His His Ile Phe Glu Leu Val Ser Ser Ser Asp Ala
 65 70 75 80
 Asn Glu Arg Lys Gly Gly Ile Leu Ala Ile Ala Ser Leu Ile Gly Val
 85 90 95
 Glu Gly Gly Asn Ala Thr Arg Ile Gly Arg Phe Ala Asn Tyr Leu Arg
 100 105 110
 Asn Leu Leu Pro Ser Asn Asp Pro Val Val Met Glu Met Ala Ser Lys

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

Asn Ile Phe Val Ala Val Trp Asp Pro Lys Gln Ala Ile Arg Glu Gly
 195 200 205
 Ala Val Ala Ala Leu Arg Ala Cys Leu Ile Leu Thr Thr Gln Arg Glu
 210 215 220
 Pro Lys Glu Met Gln Lys Pro Gln Trp Tyr Arg His Thr Phe Glu Glu
 225 230 235 240
 Ala Glu Lys Gly Phe Asp Glu Thr Leu Ala Lys Glu Lys Gly Met Asn
 245 250 255
 Arg Asp Asp Arg Ile His Gly Ala Leu Leu Ile Leu Asn Glu Leu Val
 260 265 270
 Arg Ile Ser Ser Met Glu Gly Glu Arg Leu Arg Glu Glu Met Glu Glu
 275 280 285
 Ile Thr Gln Gln Gln Leu Val His Asp Lys Tyr Cys Lys Asp Leu Met
 290 295 300
 Gly Phe Gly Thr Lys Pro Arg His Ile Thr Pro Phe Thr Ser Phe Gln
 305 310 315 320
 Ala Val Gln Pro Gln Gln Ser Asn Ala Leu Val Gly Leu Leu Gly Tyr
 325 330 335
 Ser Ser His Gln Gly Leu Met Gly Phe Gly Thr Ser Pro Ser Pro Ala
 340 345 350
 Lys Ser Thr Leu Val Glu Ser Arg Cys Cys Arg Asp Leu Met Glu Glu
 355 360 365
 Lys Phe Asp Gln Val Cys Gln Trp Val Leu Lys Cys Arg Asn Ser Lys
 370 375 380
 Asn Ser Leu Ile Gln Met Thr Ile Leu Asn Leu Leu Pro Arg Leu Ala
 385 390 395 400
 Ala Phe Arg Pro Ser Ala Phe Thr Asp Thr Gln Tyr Leu Gln Asp Thr
 405 410 415
 Met Asn His Val Leu Ser Cys Val Lys Lys Glu Lys Glu Arg Thr Ala
 420 425 430
 Ala Phe Gln Ala Leu Gly Leu Leu Ser Val Ala Val Arg Ser Glu Phe
 435 440 445

Lys Val Tyr Leu Pro Arg Val Leu Asp Ile Ile Arg Ala Ala Leu Pro
 450 455 460
 Pro Lys Asp Phe Ala His Lys Arg Gln Lys Ala Met Gln Val Asp Ala
 465 470 475 480

 Thr Val Phe Thr Cys Ile Ser Met Leu Ala Arg Ala Met Gly Pro Gly
 485 490 495
 Ile Gln Gln Asp Ile Lys Glu Leu Leu Glu Pro Met Leu Ala Val Gly
 500 505 510
 Leu Ser Pro Ala Leu Thr Ala Val Leu Tyr Asp Leu Ser Arg Gln Ile
 515 520 525
 Pro Gln Leu Lys Lys Asp Ile Gln Asp Gly Leu Leu Lys Met Leu Ser
 530 535 540
 Leu Val Leu Met His Lys Pro Leu Arg His Pro Gly Met Pro Lys Gly

 545 550 555 560
 Leu Ala His Gln Leu Ala Ser Pro Gly Leu Thr Thr Leu Pro Glu Ala
 565 570 575
 Ser Asp Val Gly Ser Ile Thr Leu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Ser Phe
 580 585 590
 Glu Phe Glu Gly His Ser Leu Thr Gln Phe Val Arg His Cys Ala Asp
 595 600 605
 His Phe Leu Asn Ser Glu His Lys Glu Ile Arg Met Glu Ala Ala Arg
 610 615 620

 Thr Cys Ser Arg Leu Leu Thr Pro Ser Ile His Leu Ile Ser Gly His
 625 630 635 640
 Ala His Val Val Ser Gln Thr Ala Val Gln Val Val Ala Asp Val Leu
 645 650 655
 Ser Lys Leu Leu Val Val Gly Ile Thr Asp Pro Asp Pro Asp Ile Arg
 660 665 670
 Tyr Cys Val Leu Ala Ser Leu Asp Glu Arg Phe Asp Ala His Leu Ala
 675 680 685
 Gln Ala Glu Asn Leu Gln Ala Leu Phe Val Ala Leu Asn Asp Gln Val

690 695 700
 Phe Glu Ile Arg Glu Leu Ala Ile Cys Thr Val Gly Arg Leu Ser Ser
 705 710 715 720
 Met Asn Pro Ala Phe Val Met Pro Phe Leu Arg Lys Met Leu Ile Gln
 725 730 735
 Ile Leu Thr Glu Leu Glu His Ser Gly Ile Gly Arg Ile Lys Glu Gln
 740 745 750
 Ser Ala Arg Met Leu Gly His Leu Val Ser Asn Ala Pro Arg Leu Ile
 755 760 765

 Arg Pro Tyr Met Glu Pro Ile Leu Lys Ala Leu Ile Leu Lys Leu Lys
 770 775 780
 Asp Pro Asp Pro Asp Pro Asn Pro Gly Val Ile Asn Asn Val Leu Ala
 785 790 795 800
 Thr Ile Gly Glu Leu Ala Gln Val Ser Gly Leu Glu Met Arg Lys Trp
 805 810 815
 Val Asp Glu Leu Phe Ile Ile Ile Met Asp Met Leu Gln Asp Ser Ser
 820 825 830
 Leu Leu Ala Lys Arg Gln Val Ala Leu Trp Thr Leu Gly Gln Leu Val

 835 840 845
 Ala Ser Thr Gly Tyr Val Val Glu Pro Tyr Arg Lys Tyr Pro Thr Leu
 850 855 860
 Leu Glu Val Leu Leu Asn Phe Leu Lys Thr Glu Gln Asn Gln Gly Thr
 865 870 875 880
 Arg Arg Glu Ala Ile Arg Val Leu Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asp Pro
 885 890 895
 Tyr Lys His Lys Val Asn Ile Gly Met Ile Asp Gln Ser Arg Asp Ala
 900 905 910

 Ser Ala Val Ser Leu Ser Glu Ser Lys Ser Ser Gln Asp Ser Ser Asp
 915 920 925
 Tyr Ser Thr Ser Glu Met Leu Val Asn Met Gly Asn Leu Pro Leu Asp
 930 935 940
 Glu Phe Tyr Pro Ala Val Ser Met Val Ala Leu Met Arg Ile Phe Arg

945 950 955 960
 Asp Gln Ser Leu Ser His His His Thr Met Val Val Gln Ala Ile Thr
 965 970 975
 Phe Ile Phe Lys Ser Leu Gly Leu Lys Cys Val Gln Phe Leu Pro Gln

 980 985 990
 Val Met Pro Thr Phe Leu Asn Val Ile Arg Val Cys Asp Gly Ala Ile
 995 1000 1005
 Arg Glu Phe Leu Phe Gln Gln Leu Gly Met Leu Val Ser Phe Val Lys
 1010 1015 1020
 Ser His Ile Arg Pro Tyr Met Asp Glu Ile Val Thr Leu Met Arg Glu
 1025 1030 1035 1040
 Phe Trp Val Met Asn Thr Ser Ile Gln Ser Thr Ile Ile Leu Leu Ile
 1045 1050 1055

 Glu Gln Ile Val Val Ala Leu Gly Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Leu Pro
 1060 1065 1070
 Gln Leu Ile Pro His Met Leu Arg Val Phe Met His Asp Asn Ser Pro
 1075 1080 1085
 Gly Arg Ile Val Ser Ile Lys Leu Leu Ala Ala Ile Gln Leu Phe Gly
 1090 1095 1100
 Ala Asn Leu Asp Asp Tyr Leu His Leu Leu Leu Pro Pro Ile Val Lys
 1105 1110 1115 1120
 Leu Phe Asp Ala Pro Glu Ala Pro Leu Pro Ser Arg Lys Ala Ala Leu

 1125 1130 1135
 Glu Thr Val Asp Arg Leu Thr Glu Ser Leu Asp Phe Thr Asp Tyr Ala
 1140 1145 1150
 Ser Arg Ile Ile His Pro Ile Val Arg Thr Leu Asp Gln Ser Pro Glu
 1155 1160 1165
 Leu Arg Ser Thr Ala Met Asp Thr Leu Ser Ser Leu Val Phe Gln Leu
 1170 1175 1180
 Gly Lys Lys Tyr Gln Ile Phe Ile Pro Met Val Asn Lys Val Leu Val
 1185 1190 1195 1200

Arg His Arg Ile Asn His Gln Arg Tyr Asp Val Leu Ile Cys Arg Ile
 1205 1210 1215
 Val Lys Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Glu Glu Glu Asp Pro Leu Ile Tyr
 1220 1225 1230
 Gln His Arg Met Leu Arg Ser Gly Gln Gly Asp Ala Leu Ala Ser Gly
 1235 1240 1245
 Pro Val Glu Thr Gly Pro Met Lys Lys Leu His Val Ser Thr Ile Asn
 1250 1255 1260
 Leu Gln Lys Ala Trp Gly Ala Ala Arg Arg Val Ser Lys Asp Asp Trp

 1265 1270 1275 1280
 Leu Glu Trp Leu Arg Arg Leu Ser Leu Glu Leu Leu Lys Asp Ser Ser
 1285 1290 1295
 Ser Pro Ser Leu Arg Ser Cys Trp Ala Leu Ala Gln Ala Tyr Asn Pro
 1300 1305 1310
 Met Ala Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ala Phe Val Ser Cys Trp Ser Glu
 1315 1320 1325
 Leu Asn Glu Asp Gln Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ser Ile Glu Leu Ala
 1330 1335 1340

 Leu Thr Ser Gln Asp Ile Ala Glu Val Thr Gln Thr Leu Leu Asn Leu
 1345 1350 1355 1360
 Ala Glu Phe Met Glu His Ser Asp Lys Gly Pro Leu Pro Leu Arg Asp
 1365 1370 1375
 Asp Asn Gly Ile Val Leu Leu Gly Glu Arg Ala Ala Lys Cys Arg Ala
 1380 1385 1390
 Tyr Ala Lys Ala Leu His Tyr Lys Glu Leu Glu Phe Gln Lys Gly Pro
 1395 1400 1405
 Thr Pro Ala Ile Leu Glu Ser Leu Ile Ser Ile Asn Asn Lys Leu Gln

 1410 1415 1420
 Gln Pro Glu Ala Ala Ala Gly Val Leu Glu Tyr Ala Met Lys His Phe
 1425 1430 1435 1440
 Gly Glu Leu Glu Ile Gln Ala Thr Trp Tyr Glu Lys Leu His Glu Trp
 1445 1450 1455

Glu Asp Ala Leu Val Ala Tyr Asp Lys Lys Met Asp Thr Asn Lys Asp
 1460 1465 1470
 Asp Pro Glu Leu Met Leu Gly Arg Met Arg Cys Leu Glu Ala Leu Gly
 1475 1480 1485

 Glu Trp Gly Gln Leu His Gln Gln Cys Cys Glu Lys Trp Thr Leu Val
 1490 1495 1500
 Asn Asp Glu Thr Gln Ala Lys Met Ala Arg Met Ala Ala Ala Ala Ala
 1505 1510 1515 1520
 Trp Gly Leu Gly Gln Trp Asp Ser Met Glu Glu Tyr Thr Cys Met Ile
 1525 1530 1535
 Pro Arg Asp Thr His Asp Gly Ala Phe Tyr Arg Ala Val Leu Ala Leu
 1540 1545 1550
 His Gln Asp Leu Phe Ser Leu Ala Gln Gln Cys Ile Asp Lys Ala Arg

 1555 1560 1565
 Asp Leu Leu Asp Ala Glu Leu Thr Ala Met Ala Gly Glu Ser Tyr Ser
 1570 1575 1580
 Arg Ala Tyr Gly Ala Met Val Ser Cys His Met Leu Ser Glu Leu Glu
 1585 1590 1595 1600
 Glu Val Ile Gln Tyr Lys Leu Val Pro Glu Arg Arg Glu Ile Ile Arg
 1605 1610 1615
 Gln Ile Trp Trp Glu Arg Leu Gln Gly Cys Gln Arg Ile Val Glu Asp
 1620 1625 1630

 Trp Gln Lys Ile Leu Met Val Arg Ser Leu Val Val Ser Pro His Glu
 1635 1640 1645
 Asp Met Arg Thr Trp Leu Lys Tyr Ala Ser Leu Cys Gly Lys Ser Gly
 1650 1655 1660
 Arg Leu Ala Leu Ala His Lys Thr Leu Val Leu Leu Leu Gly Val Asp
 1665 1670 1675 1680
 Pro Ser Arg Gln Leu Asp His Pro Leu Pro Thr Val His Pro Gln Val
 1685 1690 1695
 Thr Tyr Ala Tyr Met Lys Asn Met Trp Lys Ser Ala Arg Lys Ile Asp

1700	1705	1710	
Ala Phe Gln His Met Gln His Phe Val Gln Thr Met Gln Gln Gln Ala			
1715	1720	1725	
Gln His Ala Ile Ala Thr Glu Asp Gln Gln His Lys Gln Glu Leu His			
1730	1735	1740	
Lys Leu Met Ala Arg Cys Phe Leu Lys Leu Gly Glu Trp Gln Leu Asn			
1745	1750	1755	1760
Leu Gln Gly Ile Asn Glu Ser Thr Ile Pro Lys Val Leu Gln Tyr Tyr			
1765	1770	1775	
Ser Ala Ala Thr Glu His Asp Arg Ser Trp Tyr Lys Ala Trp His Ala			
1780	1785	1790	
Trp Ala Val Met Asn Phe Glu Ala Val Leu His Tyr Lys His Gln Asn			
1795	1800	1805	
Gln Ala Arg Asp Glu Lys Lys Lys Leu Arg His Ala Ser Gly Ala Asn			
1810	1815	1820	
Ile Thr Asn Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr			
1825	1830	1835	1840
Thr Ala Ser Thr Glu Gly Ser Asn Ser Glu Ser Glu Ala Glu Ser Thr			
1845	1850	1855	
Glu Asn Ser Pro Thr Pro Ser Pro Leu Gln Lys Lys Val Thr Glu Asp			
1860	1865	1870	
Leu Ser Lys Thr Leu Leu Met Tyr Thr Val Pro Ala Val Gln Gly Phe			
1875	1880	1885	
Phe Arg Ser Ile Ser Leu Ser Arg Gly Asn Asn Leu Gln Asp Thr Leu			
1890	1895	1900	
Arg Val Leu Thr Leu Trp Phe Asp Tyr Gly His Trp Pro Asp Val Asn			
1905	1910	1915	1920
Glu Ala Leu Val Glu Gly Val Lys Ala Ile Gln Ile Asp Thr Trp Leu			
1925	1930	1935	
Gln Val Ile Pro Gln Leu Ile Ala Arg Ile Asp Thr Pro Arg Pro Leu			
1940	1945	1950	
Val Gly Arg Leu Ile His Gln Leu Leu Thr Asp Ile Gly Arg Tyr His			

1955	1960	1965	
Pro Gln Ala Leu Ile Tyr	Pro Leu Thr Val Ala Ser Lys Ser Thr Thr		
1970	1975	1980	
Thr Ala Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn Met Cys Glu			
1985	1990	1995	2000
His Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala Met Met Val Ser Glu Glu Leu			
	2005	2010	2015
Ile Arg Val Ala Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu			
	2020	2025	2030
Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe			
	2035	2040	2045
Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr			
	2050	2055	2060
Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu			
2065	2070	2075	2080
Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp			
	2085	2090	2095
Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser			
	2100	2105	2110
Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro			
	2115	2120	2125
Lys Leu Leu Met Cys Arg Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr			
2130	2135	2140	
Asp Pro Asn Gln Pro Ile Ile Arg Ile Gln Ser Ile Ala Pro Ser Leu			
2145	2150	2155	2160
Gln Val Ile Thr Ser Lys Gln Arg Pro Arg Lys Leu Thr Leu Met Gly			
	2165	2170	2175
Ser Asn Gly His Glu Phe Val Phe Leu Leu Lys Gly His Glu Asp Leu			
	2180	2185	2190
Arg Gln Asp Glu Arg Val Met Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu			
	2195	2200	2205

Leu Ala Asn Asp Pro Thr Ser Leu Arg Lys Asn Leu Ser Ile Gln Arg
 2210 2215 2220
 Tyr Ala Val Ile Pro Leu Ser Thr Asn Ser Gly Leu Ile Gly Trp Val
 2225 2230 2235 2240
 Pro His Cys Asp Thr Leu His Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Arg Glu Lys
 2245 2250 2255
 Lys Lys Ile Leu Leu Asn Ile Glu His Arg Ile Met Leu Arg Met Ala
 2260 2265 2270
 Pro Asp Tyr Asp His Leu Thr Leu Met Gln Lys Val Glu Val Phe Glu
 2275 2280 2285
 His Ala Val Asn Asn Thr Ala Gly Asp Asp Leu Ala Lys Leu Leu Trp
 2290 2295 2300
 Leu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Val Trp Phe Asp Arg Arg Thr Asn Tyr
 2305 2310 2315 2320
 Thr Arg Ser Leu Ala Val Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu
 2325 2330 2335
 Gly Asp Arg His Pro Ser Asn Leu Met Leu Asp Arg Leu Ser Gly Lys
 2340 2345 2350
 Ile Leu His Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Val Ala Met Thr Arg
 2355 2360 2365
 Glu Lys Phe Pro Glu Lys Ile Pro Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr
 2370 2375 2380
 Asn Ala Met Glu Val Thr Gly Leu Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr Cys
 2385 2390 2395 2400
 His Thr Val Met Glu Val Leu Arg Glu His Lys Asp Ser Val Met Ala
 2405 2410 2415
 Val Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro Leu Leu Asn Trp Arg Leu Met
 2420 2425 2430
 Asp Thr Asn Thr Lys Gly Asn Lys Arg Ser Arg Thr Arg Thr Asp Ser
 2435 2440 2445
 Tyr Ser Ala Gly Gln Ser Val Glu Ile Leu Asp Gly Val Glu Leu Gly
 2450 2455 2460

Glu Pro Ala His Lys Lys Thr Gly Thr Thr Val Pro Glu Ser Ile His
 2465 2470 2475 2480
 Ser Phe Ile Gly Asp Gly Leu Val Lys Pro Glu Ala Leu Asn Lys Lys
 2485 2490 2495

Ala Ile Gln Ile Ile Asn Arg Val Arg Asp Lys Leu Thr Gly Arg Asp
 2500 2505 2510
 Phe Ser His Asp Asp Thr Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Glu Leu Leu
 2515 2520 2525
 Ile Lys Gln Ala Thr Ser His Glu Asn Leu Cys Gln Cys Tyr Ile Gly
 2530 2535 2540

Trp Cys Pro Phe Trp

2545

<210> 3

<211> 3495

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(3495)

<223> wild type TSC1

<400> 3

atggcccaac aagcaaatgt cggggagctt cttgccatgc tggactcccc catgctgggt	60
gtgcgggacg acgtgacagc tgtctttaaa gagaacctca attctgaccg tggccctatg	120
cttgtaaaca ccttggtgga ttattacctg gaaaccagct ctgagccggc attgcacatc	180
ctgaccacct tgcaagagcc acatgacaag cacctcttgg acaggattaa cgaatatgtg	240
ggcaaagccg ccaactcgtt atccatcttc tcgttactgg gtcattgtcat aagactgcag	300
ccatcttgga agcataagct ctctcaagca cctcttttgc cttctttact aaaatgtctc	360
aagatggaca ctgacgtcgt tgtcttcaca acaggcgtct tgggtgttgat aaccatgcta	420
ccaatgattc cacagtctgg gaaacagcat cttcttgatt tctttgacat ttttggccgt	480
ctgtcatcat ggtgcctgaa gaaaccaggc cacgtggcgg aagtctatct cgtccatctc	540
catgccagtg tgtacgcact ctttcatgcg ctttatggaa tgtacccttg caacttcgtc	600
tcctttttgc gtcttcatta cagtatgaaa gaaaacctgg agacttttga agaagtggtc	660
aagccaatga tggagcatgt gcgaattcat ccggaattag tgactggatc caaggacat	720

gaactggacc ctgaagggtg gaagagattt gaaactcatg atgttgtgat cgagtgtgcc	780
aaaatctctc tggatccac agaagcctca tatgaagatg gctattctgt gtctcaccaa	840
atctcagccc gcttctctca tcgttcagcc gatgtcacca ccagccctta tgctgacaca	900
cagaatagct atgggtgtgc tacttctacc ccttactcca cgtctcggct gatgttgtta	960
aatatgccag ggcagctacc tcagactctg agttcccat cgacacggct gataactgaa	1020
ccaccacaag ctactctttg gageccatct atggtttgtg gtatgaccac tcctccaact	1080
tctcctggaa atgtccacc tgatctgtca cacccttaca gtaaagtctt tggtaact	1140
gcaggtggaa aaggaactcc tctgggaacc ccagcaacct ctctctctcc agccccactc	1200
tgtcattcgg atgactacgt gcacatttca ctccccagg ccacagtcac accccccagg	1260
aaggaagaga gaatggattc tgcaagacca tgctacaca gacaacacca tcttctgaat	1320
gacagaggat cagaagagcc acctggcagc aaaggttctg tcaactaag tgatcttcca	1380
gggttttttag gtgatctggc ctctgaagaa gatagtattg aaaaagataa agaagaagct	1440
gcaatatcta gagaactttc tgagatcacc acagcagagg cagagcctgt ggttctctga	1500
ggaggtttg actctccctt ttaccgagac agtctccag gttctcagcg gaagaccac	1560
tcggcagcct ccagttctca gggcgccagc gtgaacctg agcctttaca ctctcctg	1620
gacaagcttg ggcctgacac accaaagcaa gcctttactc ccatagacct gccctgcggc	1680
agtgtctgat aaagccctgc gggagacagg gaatgccaga cttctttgga gaccagtatc	1740
ttcactccca gtctttgtaa aattccacct ccgacgagag tgggctttgg aagcgggcag	1800
cctccccgt atgateatct ttttgagggt gcattgcaa agacagcca tcattttgtc	1860
atcaggaaga ctgaggagct gttaaagaaa gaaaaggaa acacagagga agatggtgtg	1920
ccctctacct cccaatgga agtgtctggac agactgatac agcagggagc agacgcgcac	1980
agcaaggagc tgaacaagtt gcctttacc agcaagtctg tcgactggac ccactttgga	2040
ggctctctc cttcagatga gatccgacc ctccgagacc agttgctttt actgcacaac	2100
cagttactct atgagcgttt taagaggcag cagcatgccc tccggaacag gcggtctctc	2160
cgcaaggatga tcaaagcagc agctctggag gaacataatg ctgccatgaa agatcagttg	2220
aagttacaag agaaggacat ccagatgtgg aaggttagtc tgcagaaaga acaagctaga	2280
tacaatcagc tccaggagca gcgtgacact atggtaacca agtccacag ccagatcaga	2340
cagctgcagc atgaccgaga ggaattctac aaccagagcc aggaattaca gacgaagctg	2400
gaggactgca ggaacatgat tgcggagctg cggatagaac tgaagaagc caacaacaag	2460

gtgtgtcaca ctgagctgct gctcagtcag gtttcccaaa agctctcaaa cagtgagtcg 2520
gtccagcagc agatggagtt cttgaacagg cagctgttgg ttcttgggga ggtcaacgag 2580
ctctatttgg aacaactgca gaacaagcac tcagatacca caaaggaagt agaaatgatg 2640
aaagccgcct atcggaagaa gctagaaaaa aacagaagcc atgttctcca gcagactcag 2700
aggcttgata cctcccaaaa acggattttg gaactggaat ctcacctggc caagaaagac 2760
caccttcttt tggaacagaa gaaatatcta gaggatgtca aactccaggc aagaggacag 2820
ctgcaggccg cagagagcag gtatgaggct cagaaaagga taaccaggt gtttgaattg 2880

gagatcttag atttatatgg caggttggag aaagatggcc tctgaaaaa acttgaagaa 2940
gaaaaagcag aagcagctga agcagcagaa gaaaggcttg actgttgtaa tgacgggtgc 3000
tcagattcca tggtagggca caatgaagag gcatctggcc acaacggtga gaccaagacc 3060
cccaggccca gcagcgcccg gggcagtagt ggaagcagag gtggtggagg cagcagcagc 3120
agcagcagcg agctttctac cccagagaaa ccccccacacc agagggcagg cccattcagc 3180
agtcggtggg agacgactat gggagaagcg tctgccagca tccccaccac tgtgggctca 3240
cttcccagtt caaaaagctt cctgggtatg aaggctcgag agttatttcg taataagagc 3300

gagagccagt gtgatgagga cggcatgacc agtagccttt ctgagagcct aaagacagaa 3360
ctgggcaaag acttgggtgt ggaagccaag attccctga acctagatgg ccctcaccg 3420
tctccccga ccccgacag tgttggacag ctacatatca tggactaaa tgagactcat 3480
catgaacaca gctaa 3495

<210> 4
<211> 1164
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> PEPTIDE
<222> (1)..(1164)
<223> wild type TSC1
<400> 4

Met Ala Gln Gln Ala Asn Val Gly Glu Leu Leu Ala Met Leu Asp Ser

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

Tyr Leu Glu Thr Ser Ser Gln Pro Ala Leu His Ile Leu Thr Thr Leu
 50 55 60
 Gln Glu Pro His Asp Lys His Leu Leu Asp Arg Ile Asn Glu Tyr Val
 65 70 75 80

 Gly Lys Ala Ala Thr Arg Leu Ser Ile Leu Ser Leu Leu Gly His Val
 85 90 95
 Ile Arg Leu Gln Pro Ser Trp Lys His Lys Leu Ser Gln Ala Pro Leu
 100 105 110
 Leu Pro Ser Leu Leu Lys Cys Leu Lys Met Asp Thr Asp Val Val Val
 115 120 125
 Leu Thr Thr Gly Val Leu Val Leu Ile Thr Met Leu Pro Met Ile Pro
 130 135 140
 Gln Ser Gly Lys Gln His Leu Leu Asp Phe Phe Asp Ile Phe Gly Arg

 145 150 155 160
 Leu Ser Ser Trp Cys Leu Lys Lys Pro Gly His Val Ala Glu Val Tyr
 165 170 175
 Leu Val His Leu His Ala Ser Val Tyr Ala Leu Phe His Arg Leu Tyr
 180 185 190
 Gly Met Tyr Pro Cys Asn Phe Val Ser Phe Leu Arg Ser His Tyr Ser
 195 200 205
 Met Lys Glu Asn Leu Glu Thr Phe Glu Glu Val Val Lys Pro Met Met
 210 215 220

 Glu His Val Arg Ile His Pro Glu Leu Val Thr Gly Ser Lys Asp His
 225 230 235 240
 Glu Leu Asp Pro Arg Arg Trp Lys Arg Leu Glu Thr His Asp Val Val
 245 250 255
 Ile Glu Cys Ala Lys Ile Ser Leu Asp Pro Thr Glu Ala Ser Tyr Glu
 260 265 270
 Asp Gly Tyr Ser Val Ser His Gln Ile Ser Ala Arg Phe Pro His Arg
 275 280 285
 Ser Ala Asp Val Thr Thr Ser Pro Tyr Ala Asp Thr Gln Asn Ser Tyr

290 295 300
 Gly Cys Ala Thr Ser Thr Pro Tyr Ser Thr Ser Arg Leu Met Leu Leu
 305 310 315 320
 Asn Met Pro Gly Gln Leu Pro Gln Thr Leu Ser Ser Pro Ser Thr Arg
 325 330 335
 Leu Ile Thr Glu Pro Pro Gln Ala Thr Leu Trp Ser Pro Ser Met Val
 340 345 350
 Cys Gly Met Thr Thr Pro Pro Thr Ser Pro Gly Asn Val Pro Pro Asp
 355 360 365

 Leu Ser His Pro Tyr Ser Lys Val Phe Gly Thr Thr Ala Gly Gly Lys
 370 375 380
 Gly Thr Pro Leu Gly Thr Pro Ala Thr Ser Pro Pro Pro Ala Pro Leu
 385 390 395 400
 Cys His Ser Asp Asp Tyr Val His Ile Ser Leu Pro Gln Ala Thr Val
 405 410 415
 Thr Pro Pro Arg Lys Glu Glu Arg Met Asp Ser Ala Arg Pro Cys Leu
 420 425 430
 His Arg Gln His His Leu Leu Asn Asp Arg Gly Ser Glu Glu Pro Pro

 435 440 445
 Gly Ser Lys Gly Ser Val Thr Leu Ser Asp Leu Pro Gly Phe Leu Gly
 450 455 460
 Asp Leu Ala Ser Glu Glu Asp Ser Ile Glu Lys Asp Lys Glu Glu Ala
 465 470 475 480
 Ala Ile Ser Arg Glu Leu Ser Glu Ile Thr Thr Ala Glu Ala Glu Pro
 485 490 495
 Val Val Pro Arg Gly Gly Phe Asp Ser Pro Phe Tyr Arg Asp Ser Leu
 500 505 510

 Pro Gly Ser Gln Arg Lys Thr His Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gln Gly
 515 520 525
 Ala Ser Val Asn Pro Glu Pro Leu His Ser Ser Leu Asp Lys Leu Gly
 530 535 540
 Pro Asp Thr Pro Lys Gln Ala Phe Thr Pro Ile Asp Leu Pro Cys Gly

545 550 555 560
 Ser Ala Asp Glu Ser Pro Ala Gly Asp Arg Glu Cys Gln Thr Ser Leu
 565 570 575
 Glu Thr Ser Ile Phe Thr Pro Ser Pro Cys Lys Ile Pro Pro Pro Thr

 580 585 590
 Arg Val Gly Phe Gly Ser Gly Gln Pro Pro Pro Tyr Asp His Leu Phe
 595 600 605
 Glu Val Ala Leu Pro Lys Thr Ala His His Phe Val Ile Arg Lys Thr
 610 615 620
 Glu Glu Leu Leu Lys Lys Ala Lys Gly Asn Thr Glu Glu Asp Gly Val
 625 630 635 640
 Pro Ser Thr Ser Pro Met Glu Val Leu Asp Arg Leu Ile Gln Gln Gly
 645 650 655

 Ala Asp Ala His Ser Lys Glu Leu Asn Lys Leu Pro Leu Pro Ser Lys
 660 665 670
 Ser Val Asp Trp Thr His Phe Gly Gly Ser Pro Pro Ser Asp Glu Ile
 675 680 685
 Arg Thr Leu Arg Asp Gln Leu Leu Leu Leu His Asn Gln Leu Leu Tyr
 690 695 700
 Glu Arg Phe Lys Arg Gln Gln His Ala Leu Arg Asn Arg Arg Leu Leu
 705 710 715 720
 Arg Lys Val Ile Lys Ala Ala Ala Leu Glu Glu His Asn Ala Ala Met

 725 730 735
 Lys Asp Gln Leu Lys Leu Gln Glu Lys Asp Ile Gln Met Trp Lys Val
 740 745 750
 Ser Leu Gln Lys Glu Gln Ala Arg Tyr Asn Gln Leu Gln Glu Gln Arg
 755 760 765
 Asp Thr Met Val Thr Lys Leu His Ser Gln Ile Arg Gln Leu Gln His
 770 775 780
 Asp Arg Glu Glu Phe Tyr Asn Gln Ser Gln Glu Leu Gln Thr Lys Leu
 785 790 795 800

Glu Asp Cys Arg Asn Met Ile Ala Glu Leu Arg Ile Glu Leu Lys Lys
 805 810 815
 Ala Asn Asn Lys Val Cys His Thr Glu Leu Leu Leu Ser Gln Val Ser
 820 825 830
 Gln Lys Leu Ser Asn Ser Glu Ser Val Gln Gln Gln Met Glu Phe Leu
 835 840 845
 Asn Arg Gln Leu Leu Val Leu Gly Glu Val Asn Glu Leu Tyr Leu Glu
 850 855 860
 Gln Leu Gln Asn Lys His Ser Asp Thr Thr Lys Glu Val Glu Met Met
 865 870 875 880
 Lys Ala Ala Tyr Arg Lys Glu Leu Glu Lys Asn Arg Ser His Val Leu
 885 890 895
 Gln Gln Thr Gln Arg Leu Asp Thr Ser Gln Lys Arg Ile Leu Glu Leu
 900 905 910
 Glu Ser His Leu Ala Lys Lys Asp His Leu Leu Leu Glu Gln Lys Lys
 915 920 925
 Tyr Leu Glu Asp Val Lys Leu Gln Ala Arg Gly Gln Leu Gln Ala Ala
 930 935 940
 Glu Ser Arg Tyr Glu Ala Gln Lys Arg Ile Thr Gln Val Phe Glu Leu
 945 950 955 960
 Glu Ile Leu Asp Leu Tyr Gly Arg Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Lys
 965 970 975
 Lys Leu Glu Glu Glu Lys Ala Glu Ala Ala Glu Ala Ala Glu Glu Arg
 980 985 990
 Leu Asp Cys Cys Asn Asp Gly Cys Ser Asp Ser Met Val Gly His Asn
 995 1000 1005
 Glu Glu Ala Ser Gly His Asn Gly Glu Thr Lys Thr Pro Arg Pro Ser
 1010 1015 1020
 Ser Ala Arg Gly Ser Ser Gly Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser
 1025 1030 1035 1040
 Ser Ser Ser Glu Leu Ser Thr Pro Glu Lys Pro Pro His Gln Arg Ala
 1045 1050 1055

Gly Pro Phe Ser Ser Arg Trp Glu Thr Thr Met Gly Glu Ala Ser Ala
1060 1065 1070

Ser Ile Pro Thr Thr Val Gly Ser Leu Pro Ser Ser Lys Ser Phe Leu
1075 1080 1085

Gly Met Lys Ala Arg Glu Leu Phe Arg Asn Lys Ser Glu Ser Gln Cys
1090 1095 1100

Asp Glu Asp Gly Met Thr Ser Ser Leu Ser Glu Ser Leu Lys Thr Glu
1105 1110 1115 1120

Leu Gly Lys Asp Leu Gly Val Glu Ala Lys Ile Pro Leu Asn Leu Asp
1125 1130 1135

Gly Pro His Pro Ser Pro Pro Thr Pro Asp Ser Val Gly Gln Leu His
1140 1145 1150

Ile Met Asp Tyr Asn Glu Thr His His Glu His Ser

1155 1160

<210> 5

<211> 5424

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(5424)

<223> wild type TSC2

<400> 5

atggccaaac caacaagcaa agattcaggc ttgaaggaga agtttaagat tctgttggga 60

ctgggaacac cgaggccaaa tcccaggtct gcagagggtta aacagacgga gtttatcatc 120

accgcggaaa tactgagaga actgagcatg gaatgtggcc tcaacaatcg catccggatg 180

atagggcaga ttigtgaagt cgcaaaaacc aagaaatttg aagagcacgc agtggaagca 240

ctctggaagg cggtcgcgga tctgttcag cggagcggc cgctggaggc ccggcacgcg 300

gtgttggtc tgetgaaggc catctgcag gggcaggcg agcgtttggg ggtcctcaga 360

gccctcttct ttaaggtcat caaggattac ccttccaacg aagacattca cgaaaggctg 420

gaggttttca aggccctcac agacaatggg agacacatca cctacttgga ggaagagctg 480

gtgactttg tctgcagtg gatggatgtt ggcttgcct cggaattcct tctggtgctg 540

gtgaacttgg tcaaattcaa tagctgttac ctgcagagt acatcgcaag gatggttcag 600

atgatctgtc tgctgtgcgt ccggaccgcg tcctctgtgg acatagaggt ctccctgcag	660
gtgctggacg ccgtggctctg ctacaactgc ctgccgctg agagcctccc gctgttcac	720
gttacctctt gtcgcacat caacgtcaag gagctctgcg agccttgctg gaagctgatg	780
cggaacctcc ttggcaccca cctgggccac agcgccatct acaacatgtg ccacctcatg	840
gaggacagag cctacatgga ggacgcgccc ctgctgagag gagccgtgtt ttttgtgggc	900
atggctctct ggggagccca ccggtctat tctctcagga actcgccgac atctgtgttg	960
ccatcatctt accaggccat ggcatgtccg aacgaggtgg tgtcctatga gatcgctctg	1020
tccatcacca ggctcatcaa gaagtatagg aaggagctcc aggtggtggc gtgggacatt	1080
ctgctgaaca tcacgaacg gctccttcag cagctccaga ccttgacag cccggagctc	1140
aggaccatcg tccatgacct gttgaccacg gtggaggagc tgtgtgacca gaacgagttc	1200
cacgggtctc aggagagata ctttgaactg gtggagagat gtgcggacca gaggcctgag	1260
tctcctctcc tgaacctgat ctctataga ggcagttca tccaccggc caaggacggc	1320
tggattcaga acctgcaggc gctgatggag agattcttca ggagcgagtc ccgaggcgcc	1380
gtgcgcatca aggtgctgga cgtgctgtcc tttgtgtgc tcacaaacag gcagttctat	1440
gaggaggagc tgattaaact agtggtcac tcgcagctct cccacatccc cgaggataaa	1500
gaccaccagg tccgaaagct ggccaccag ttgctggtgg acctggcaga gggctgccac	1560
acacaccact tcaacagcct gctggacatc atcgagaagg tgatggcccg ctccctctcc	1620
ccacccccgg agctggaaga aagggatgtg gccgcatact cggcctcctt ggaggatgtg	1680
aagacagccg tctggggct tctggtcatc cttcagacca agctgtacac cctgcctgca	1740
agccacgcca cgcgtgtgta tgagatgtg gtcagccaca ttcagctcca ctacaagcac	1800
agctacacc tgccaatcg gagcagcatc cgctgcagg cctttgactt cctgttgctg	1860
ctgcgggccc actcactgca ccgctgggc ctgccaaca aggatggagt cgtgcggttc	1920
agcccctact gcgtctgca ctacatggag ccagagagag gctctgagaa gaagaccagc	1980
ggcccccttt ctctccac agggcctcct ggcccgccgc ctgcaggccc cgccgtgcgg	2040
ctggggtccg tgcctactc cctgtcttc cgcgtcctgc tgcagtgtt gaagcaggag	2100
tctgactgga aggtgtgaa gctggttctg ggcaggctgc ctgagtcct gcgtataaa	2160
gtgtcatct ttacttcccc ttgcagtgtg gaccagctgt gctctgtct ctgtccatg	2220
ctttcaggcc caaagacact ggagcggctc cgaggcggc cagaaggctt ctccagaact	2280
gacttgacc tggccgtggt tccagtgtg acagcattaa tctctacca taactacctg	2340

gacaaaaacca aacagcgga gatggtctac tgcctggagc agggcctcat ccaccgtgt	2400
gccagccagt gctcgtggc cttgtccatc tgcagcgtgg agatgcctga catcatcatc	2460
aaggcgtgc ctgttctggt ggtgaagctc acgcacatct cagccacagc cagcatggcc	2520
gtcccactgc tggagtctct gtccactctg gccaggctgc cgcacctcta caggaacttt	2580
gccgcggagc agtatgccag tgtgttcgcc atctccctgc cgtacaccaa cccctccaag	2640
tttaatcagt acatcgtgtg tctggcccat cacgtcatag ccatgtggtt catcagggtc	2700
cgctgccct tccggaagga tttgtccct ttcactacta agggcctgcg gtccaatgtc	2760
ctcttgtctt ttgatgacac ccccgagaag gacagcttca gggcccgag tactagtctc	2820
aacgagagac ccaagagtct gaggatagcc agaccccca aacaaggctt gaataactct	2880
ccaccgtga aagaattcaa ggagagctct gcagccgagg ccttccggtg ccgcagcatc	2940
agtgtgtctg aacatgtggt ccgcagcagg atacagacgt cctcaccag tgccagcttg	3000
gggtctgcag atgagaactc cgtggcccag gctgacgata gcctgaaaaa cctccacctg	3060
gagctcacgg aaacctgtct ggacatgatg gctcgatagc tcttctcaa cttcacggct	3120
gtcccgaaga ggtctctgt gggcgagttc ctctagcgg gtggcaggac caaacctgg	3180
ctggttggga acaagcttgt cactgtgacg acaagcgtgg gaaccgggac ccggtcgta	3240
ctaggcctgg actcggggga gctgcagtcc ggcccggagt cgagctccag ccccggggtg	3300
catgtgagac agaccaagga ggcccgggc aagctggagt cccaggctgg gcagcagggtg	3360
tcccgtgggg cccgggatcg ggtccgttcc atgtcgggg gccatggtct tcgagttggc	3420
gccctggacg tgccggcctc ccagttctg ggagtgcca cttctccagg accacggact	3480
gcaccagccg cgaaacctga gaaggcctca gctggcacc gggttcctgt gcaggagaag	3540
acgaacctgg cggcctatgt gccctgtg acccagggt gggcgagat cctggtccg	3600
aggccacag ggaacaccag ctggtgatg agcctggaga acccgctcag cctttctec	3660
tcggacatca acaacatgcc cctgcaggag ctgtctaac cctcatggc ggctgagcgc	3720
ttcaaggagc accgggacac agccctgtac aagtcactgt cgggtccgac agccagcacg	3780
gccaaacccc ctctctgcc tcgtccaac acagtggcct ctttctctc cctgtaccag	3840
tccagctgcc aaggacagt gcacaggagc gtttctggg cagactccgc cgtggcatg	3900
gaggaggga gtccgggca ggttctgtg ctggtggagc cccagggtt ggaggacgtt	3960
gaggcagcgc taggcatgga caggcgcacg gatgcctaca gcaggtcgtc ctcagtctcc	4020
agccaggagg agaagtcgt ccacgcggag gagctggtg gcaggggcat ccccatcgag	4080
cgagtctct cctcgagggt tggccggccc tctgtggacc tctcttcca gccctcgag	4140
cccctgagca agtcagctc ctctcccgag ctgcagactc tgcaggacat cctcggggac	4200

cctggggaca aggccgacgt gggccggctg agccctgagg ttaaggcccg gtcacagtca 4260
 gggaccctgg acggggaaag tgctgcctgg tcggcctcgg gcgaagacag tcggggccag 4320
 cccgagggtc ccttgccttc cagctccccc cgctcgccca gtggcctccg gccccgaggt 4380
 tacaccatct ccgactcggc cccatcacgc aggggcaaga gagtagagag ggacgcctta 4440

aagagcagag ccacagcctc caatgcagag aaagtgccag gcatcaaccc cagtttcgtg 4500
 ttctgcagc tctaccattc ccccttcttt ggcgacgagt caaacaagcc aatcctgctg 4560
 cccaatgagt cacagtcctt tgagcggctg gtgcagctcc tcgaccagat cccatcatac 4620
 gacaccaca agatcgccgt cctgtatgtt ggagaaggcc agagcaacag cgagctcgcc 4680
 atcctgtcca atgagcatgg ctctacagg tacacggagt tcctgacggg cctgggcccgg 4740
 ctcatcgagc tgaaggactg ccagccggac aaggtgtacc tgggaggcct ggacgtgtgt 4800
 ggtgaggacg gccagttcac ctactgctgg cacgatgaca tcatgcaagc cgtcttccac 4860

atgccaccc tgatgccac caaggacgtg gacaagcacc gctgcgaca gaagcgccac 4920
 ctgggcaacg actttgtgtc cattgtctac aatgactccg gtgaggactt caagcttggc 4980
 accatcaagg gccagttcaa ctttgtccac gtgatcgtca ccccgctgga ctacgagtgc 5040
 aacctggtgt ccctgcagtg caggaaagac atggagggcc ttgtggacac cagcgtggcc 5100
 aagatcgtgt ctgaccgcaa cctgcccttc gtggcccgcc agatggccct gcacgcaaat 5160
 atggcctcac aggtgcatca tagccgctcc aacccaccg atatctaccc ctccaagtgg 5220
 attgcccggc tccgccat caagcggctc cgccagcgga tctgcgagga agccgcctac 5280

tccaacccca gctacctct ggtgcacct cgtcccata gcaaagcccc tgcacagact 5340
 ccagccgagc ccacacctgg ctatgagggt ggccagcgga agcgctcat ctctcggtg 5400
 gaggacttca ccgagtttgt gtga 5424

<210> 6
 <211> 1807
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(1807)
 <223> wild type TSC2
 <400> 6

Met Ala Lys Pro Thr Ser Lys Asp Ser Gly Leu Lys Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ile Leu Leu Gly Leu Gly Thr Pro Arg Pro Asn Pro Arg Ser Ala Glu
 20 25 30
 Gly Lys Gln Thr Glu Phe Ile Ile Thr Ala Glu Ile Leu Arg Glu Leu
 35 40 45
 Ser Met Glu Cys Gly Leu Asn Asn Arg Ile Arg Met Ile Gly Gln Ile
 50 55 60
 Cys Glu Val Ala Lys Thr Lys Lys Phe Glu Glu His Ala Val Glu Ala
 65 70 75 80
 Leu Trp Lys Ala Val Ala Asp Leu Leu Gln Pro Glu Arg Pro Leu Glu
 85 90 95
 Ala Arg His Ala Val Leu Ala Leu Leu Lys Ala Ile Val Gln Gly Gln
 100 105 110
 Gly Glu Arg Leu Gly Val Leu Arg Ala Leu Phe Phe Lys Val Ile Lys
 115 120 125
 Asp Tyr Pro Ser Asn Glu Asp Leu His Glu Arg Leu Glu Val Phe Lys
 130 135 140
 Ala Leu Thr Asp Asn Gly Arg His Ile Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu
 145 150 155 160
 Ala Asp Phe Val Leu Gln Trp Met Asp Val Gly Leu Ser Ser Glu Phe
 165 170 175
 Leu Leu Val Leu Val Asn Leu Val Lys Phe Asn Ser Cys Tyr Leu Asp
 180 185 190
 Glu Tyr Ile Ala Arg Met Val Gln Met Ile Cys Leu Leu Cys Val Arg
 195 200 205
 Thr Ala Ser Ser Val Asp Ile Glu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Ala
 210 215 220
 Val Val Cys Tyr Asn Cys Leu Pro Ala Glu Ser Leu Pro Leu Phe Ile
 225 230 235 240
 Val Thr Leu Cys Arg Thr Ile Asn Val Lys Glu Leu Cys Glu Pro Cys
 245 250 255
 Trp Lys Leu Met Arg Asn Leu Leu Gly Thr His Leu Gly His Ser Ala
 260 265 270

Ile Tyr Asn Met Cys His Leu Met Glu Asp Arg Ala Tyr Met Glu Asp
 275 280 285
 Ala Pro Leu Leu Arg Gly Ala Val Phe Phe Val Gly Met Ala Leu Trp
 290 295 300

 Gly Ala His Arg Leu Tyr Ser Leu Arg Asn Ser Pro Thr Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Phe Tyr Gln Ala Met Ala Cys Pro Asn Glu Val Val Ser Tyr
 325 330 335
 Glu Ile Val Leu Ser Ile Thr Arg Leu Ile Lys Lys Tyr Arg Lys Glu
 340 345 350
 Leu Gln Val Val Ala Trp Asp Ile Leu Leu Asn Ile Ile Glu Arg Leu
 355 360 365
 Leu Gln Gln Leu Gln Thr Leu Asp Ser Pro Glu Leu Arg Thr Ile Val

 370 375 380
 His Asp Leu Leu Thr Thr Val Glu Glu Leu Cys Asp Gln Asn Glu Phe
 385 390 395 400
 His Gly Ser Gln Glu Arg Tyr Phe Glu Leu Val Glu Arg Cys Ala Asp
 405 410 415
 Gln Arg Pro Glu Ser Ser Leu Leu Asn Leu Ile Ser Tyr Arg Ala Gln
 420 425 430
 Ser Ile His Pro Ala Lys Asp Gly Trp Ile Gln Asn Leu Gln Ala Leu
 435 440 445

 Met Glu Arg Phe Phe Arg Ser Glu Ser Arg Gly Ala Val Arg Ile Lys
 450 455 460
 Val Leu Asp Val Leu Ser Phe Val Leu Leu Ile Asn Arg Gln Phe Tyr
 465 470 475 480
 Glu Glu Glu Leu Ile Asn Ser Val Val Ile Ser Gln Leu Ser His Ile
 485 490 495
 Pro Glu Asp Lys Asp His Gln Val Arg Lys Leu Ala Thr Gln Leu Leu
 500 505 510
 Val Asp Leu Ala Glu Gly Cys His Thr His His Phe Asn Ser Leu Leu

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

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

 660 665 670
 Ala Pro Ala Gly Pro Ala Val Arg Leu Gly Ser Val Pro Tyr Ser Leu
 675 680 685
 Leu Phe Arg Val Leu Leu Gln Cys Leu Lys Gln Glu Ser Asp Trp Lys
 690 695 700
 Val Leu Lys Leu Val Leu Gly Arg Leu Pro Glu Ser Leu Arg Tyr Lys
 705 710 715 720
 Val Leu Ile Phe Thr Ser Pro Cys Ser Val Asp Gln Leu Cys Ser Ala
 725 730 735

 Leu Cys Ser Met Leu Ser Gly Pro Lys Thr Leu Glu Arg Leu Arg Gly
 740 745 750
 Ala Pro Glu Gly Phe Ser Arg Thr Asp Leu His Leu Ala Val Val Pro
 755 760 765
 Val Leu Thr Ala Leu Ile Ser Tyr His Asn Tyr Leu Asp Lys Thr Lys

770 775 780
 Gln Arg Glu Met Val Tyr Cys Leu Glu Gln Gly Leu Ile His Arg Cys
 785 790 795 800
 Ala Ser Gln Cys Val Val Ala Leu Ser Ile Cys Ser Val Glu Met Pro

 805 810 815
 Asp Ile Ile Ile Lys Ala Leu Pro Val Leu Val Val Lys Leu Thr His
 820 825 830
 Ile Ser Ala Thr Ala Ser Met Ala Val Pro Leu Leu Glu Phe Leu Ser
 835 840 845
 Thr Leu Ala Arg Leu Pro His Leu Tyr Arg Asn Phe Ala Ala Glu Gln
 850 855 860
 Tyr Ala Ser Val Phe Ala Ile Ser Leu Pro Tyr Thr Asn Pro Ser Lys
 865 870 875 880

 Phe Asn Gln Tyr Ile Val Cys Leu Ala His His Val Ile Ala Met Trp
 885 890 895
 Phe Ile Arg Cys Arg Leu Pro Phe Arg Lys Asp Phe Val Pro Phe Ile
 900 905 910
 Thr Lys Gly Leu Arg Ser Asn Val Leu Leu Ser Phe Asp Asp Thr Pro
 915 920 925
 Glu Lys Asp Ser Phe Arg Ala Arg Ser Thr Ser Leu Asn Glu Arg Pro
 930 935 940
 Lys Ser Leu Arg Ile Ala Arg Pro Pro Lys Gln Gly Leu Asn Asn Ser

 945 950 955 960
 Pro Pro Val Lys Glu Phe Lys Glu Ser Ser Ala Ala Glu Ala Phe Arg
 965 970 975
 Cys Arg Ser Ile Ser Val Ser Glu His Val Val Arg Ser Arg Ile Gln
 980 985 990
 Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ser Leu Gly Ser Ala Asp Glu Asn Ser Val
 995 1000 1005
 Ala Gln Ala Asp Asp Ser Leu Lys Asn Leu His Leu Glu Leu Thr Glu
 1010 1015 1020

Thr Cys Leu Asp Met Met Ala Arg Tyr Val Phe Ser Asn Phe Thr Ala
 1025 1030 1035 1040
 Val Pro Lys Arg Ser Pro Val Gly Glu Phe Leu Leu Ala Gly Gly Arg
 1045 1050 1055
 Thr Lys Thr Trp Leu Val Gly Asn Lys Leu Val Thr Val Thr Thr Ser
 1060 1065 1070
 Val Gly Thr Gly Thr Arg Ser Leu Leu Gly Leu Asp Ser Gly Glu Leu
 1075 1080 1085
 Gln Ser Gly Pro Glu Ser Ser Ser Ser Pro Gly Val His Val Arg Gln

 1090 1095 1100
 Thr Lys Glu Ala Pro Ala Lys Leu Glu Ser Gln Ala Gly Gln Gln Val
 1105 1110 1115 1120
 Ser Arg Gly Ala Arg Asp Arg Val Arg Ser Met Ser Gly Gly His Gly
 1125 1130 1135
 Leu Arg Val Gly Ala Leu Asp Val Pro Ala Ser Gln Phe Leu Gly Ser
 1140 1145 1150
 Ala Thr Ser Pro Gly Pro Arg Thr Ala Pro Ala Ala Lys Pro Glu Lys
 1155 1160 1165

 Ala Ser Ala Gly Thr Arg Val Pro Val Gln Glu Lys Thr Asn Leu Ala
 1170 1175 1180
 Ala Tyr Val Pro Leu Leu Thr Gln Gly Trp Ala Glu Ile Leu Val Arg
 1185 1190 1195 1200
 Arg Pro Thr Gly Asn Thr Ser Trp Leu Met Ser Leu Glu Asn Pro Leu
 1205 1210 1215
 Ser Pro Phe Ser Ser Asp Ile Asn Asn Met Pro Leu Gln Glu Leu Ser
 1220 1225 1230
 Asn Ala Leu Met Ala Ala Glu Arg Phe Lys Glu His Arg Asp Thr Ala

 1235 1240 1245
 Leu Tyr Lys Ser Leu Ser Val Pro Ala Ala Ser Thr Ala Lys Pro Pro
 1250 1255 1260
 Pro Leu Pro Arg Ser Asn Thr Val Ala Ser Phe Ser Ser Leu Tyr Gln
 1265 1270 1275 1280

Ser Ser Cys Gln Gly Gln Leu His Arg Ser Val Ser Trp Ala Asp Ser
 1285 1290 1295
 Ala Val Val Met Glu Glu Gly Ser Pro Gly Glu Val Pro Val Leu Val
 1300 1305 1310

 Glu Pro Pro Gly Leu Glu Asp Val Glu Ala Ala Leu Gly Met Asp Arg
 1315 1320 1325
 Arg Thr Asp Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Val Ser Ser Gln Glu Glu
 1330 1335 1340
 Lys Ser Leu His Ala Glu Glu Leu Val Gly Arg Gly Ile Pro Ile Glu
 1345 1350 1355 1360
 Arg Val Val Ser Ser Glu Gly Gly Arg Pro Ser Val Asp Leu Ser Phe
 1365 1370 1375
 Gln Pro Ser Gln Pro Leu Ser Lys Ser Ser Ser Ser Pro Glu Leu Gln

 1380 1385 1390
 Thr Leu Gln Asp Ile Leu Gly Asp Pro Gly Asp Lys Ala Asp Val Gly
 1395 1400 1405
 Arg Leu Ser Pro Glu Val Lys Ala Arg Ser Gln Ser Gly Thr Leu Asp
 1410 1415 1420
 Gly Glu Ser Ala Ala Trp Ser Ala Ser Gly Glu Asp Ser Arg Gly Gln
 1425 1430 1435 1440
 Pro Glu Gly Pro Leu Pro Ser Ser Ser Pro Arg Ser Pro Ser Gly Leu
 1445 1450 1455

 Arg Pro Arg Gly Tyr Thr Ile Ser Asp Ser Ala Pro Ser Arg Arg Gly
 1460 1465 1470
 Lys Arg Val Glu Arg Asp Ala Leu Lys Ser Arg Ala Thr Ala Ser Asn
 1475 1480 1485
 Ala Glu Lys Val Pro Gly Ile Asn Pro Ser Phe Val Phe Leu Gln Leu
 1490 1495 1500
 Tyr His Ser Pro Phe Phe Gly Asp Glu Ser Asn Lys Pro Ile Leu Leu
 1505 1510 1515 1520
 Pro Asn Glu Ser Gln Ser Phe Glu Arg Ser Val Gln Leu Leu Asp Gln

1525	1530	1535	
Ile Pro Ser Tyr Asp Thr His Lys Ile Ala Val Leu Tyr Val Gly Glu			
1540	1545	1550	
Gly Gln Ser Asn Ser Glu Leu Ala Ile Leu Ser Asn Glu His Gly Ser			
1555	1560	1565	
Tyr Arg Tyr Thr Glu Phe Leu Thr Gly Leu Gly Arg Leu Ile Glu Leu			
1570	1575	1580	
Lys Asp Cys Gln Pro Asp Lys Val Tyr Leu Gly Gly Leu Asp Val Cys			
1585	1590	1595	1600
Gly Glu Asp Gly Gln Phe Thr Tyr Cys Trp His Asp Asp Ile Met Gln			
1605	1610	1615	
Ala Val Phe His Ile Ala Thr Leu Met Pro Thr Lys Asp Val Asp Lys			
1620	1625	1630	
His Arg Cys Asp Lys Lys Arg His Leu Gly Asn Asp Phe Val Ser Ile			
1635	1640	1645	
Val Tyr Asn Asp Ser Gly Glu Asp Phe Lys Leu Gly Thr Ile Lys Gly			
1650	1655	1660	
Gln Phe Asn Phe Val His Val Ile Val Thr Pro Leu Asp Tyr Glu Cys			
1665	1670	1675	1680
Asn Leu Val Ser Leu Gln Cys Arg Lys Asp Met Glu Gly Leu Val Asp			
1685	1690	1695	
Thr Ser Val Ala Lys Ile Val Ser Asp Arg Asn Leu Pro Phe Val Ala			
1700	1705	1710	
Arg Gln Met Ala Leu His Ala Asn Met Ala Ser Gln Val His His Ser			
1715	1720	1725	
Arg Ser Asn Pro Thr Asp Ile Tyr Pro Ser Lys Trp Ile Ala Arg Leu			
1730	1735	1740	
Arg His Ile Lys Arg Leu Arg Gln Arg Ile Cys Glu Glu Ala Ala Tyr			
1745	1750	1755	1760
Ser Asn Pro Ser Leu Pro Leu Val His Pro Pro Ser His Ser Lys Ala			
1765	1770	1775	
Pro Ala Gln Thr Pro Ala Glu Pro Thr Pro Gly Tyr Glu Val Gly Gln			

1780	1785	1790	
Arg Lys Arg Leu Ile Ser Ser Val Glu Asp Phe Thr Glu Phe Val			
1795	1800	1805	
<210> 7			
<211> 1398			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220><221> gene			
<222> (1)..(1398)			
<223> wild type AKT3			
<400> 7			
atgagcgatg ttaccattgt gaaagaaggt tgggttcaga agaggggaga atatatataaa	60		
aactggaggc caagatactt ccttttgaag acagatggct cattcatagg atataaagag	120		
aaacctcaag atgtggattt accttatccc ctcaacaact tttcagtggc aaaatgccag	180		
ttaatgaaaa cagaacgacc aaagccaaac acatttataa tcagatgtct ccagtggact	240		
actgttatag agagaacatt tcatgtagat actccagagg aaagggaaga atggacagaa	300		
gctatccagg ctgtagcaga cagactgcag aggcaagaag aggagagaat gaattgtagt	360		
ccaacttcac aaattgataa tataggagag gaagagatgg atgcctctac aacctcatcat	420		
aaaagaaaga caatgaatga ttttgactat ttgaaactac taggtaaagg cacttttggg	480		
aaagttatgt tgggttcaga gaaggcaagt ggaaaatact atgctatgaa gattctgaag	540		
aaagaagtca ttattgcaaa ggatgaagtg gcacacactc taactgaaag cagagtatta	600		
aagaacacta gacatccctt tttaacatcc ttgaaatatt ccttcagac aaaagaccgt	660		
ttgtgttttg tgatggaata tgtaaatggg ggcgagctgt ttttcattt gtcgagagag	720		
cgggtgttct ctgaggaccg cacacgtttc tatggtgcag aaattgtctc tgccttggac	780		
tatctacatt ccggaaagat tgtgtaccgt gatctcaagt tggagaatct aatgctggac	840		
aaagatggcc acataaaaat tacagatttt ggactttgca aagaagggat cacagatgca	900		
gccacatga agacattctg tggcactcca gaatatctgg caccagaggt gttagaagat	960		
aatgactatg gccgagcagt agactgggtg ggcctagggg ttgtcatgta tgaaatgatg	1020		
tgtgggaggt tacctttcta caaccaggac catgagaaac tttttgaatt aatattaatg	1080		
gaagacatta aatttcctcg aacactctct tcagatgcaa aatcattgct ttcagggtctc	1140		
ttgataaagg atccaaataa acgccttggg ggaggaccag atgatgcaa agaaattatg	1200		

agacacagtt tcttctctgg agtaaactgg caagatgtat atgataaaaa gcttgtacct 1260
 ccttttaaac ctcaagtaac atctgagaca gatactagat attttgatga agaatttaca 1320
 gctcagacta ttacaataac accacctgaa aatgtcagc aatcagattg tggcatgctg 1380
 ggtaactgga aaaaataa 1398

<210> 8

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(465)

<223>

wild type AKT3

<400> 8

Met Ser Asp Val Thr Ile Val Lys Glu Gly Trp Val Gln Lys Arg Gly

1 5 10 15

Glu Tyr Ile Lys Asn Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Thr Asp

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Lys Cys Gln Leu Met Lys Thr

50 55 60

Glu Arg Pro Lys Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp Thr

65 70 75 80

Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Thr Pro Glu Glu Arg Glu

85 90 95

Glu Trp Thr Glu Ala Ile Gln Ala Val Ala Asp Arg Leu Gln Arg Gln

100 105 110

Glu Glu Glu Arg Met Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gln Ile Asp Asn Ile

115 120 125

Gly Glu Glu Glu Met Asp Ala Ser Thr Thr His His Lys Arg Lys Thr

130 135 140

Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly

145 150 155 160

Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr Tyr Ala Met
 165 170 175
 Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp Glu Val Ala His
 180 185 190
 Thr Leu Thr Glu Ser Arg Val Leu Lys Asn Thr Arg His Pro Phe Leu
 195 200 205
 Thr Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr Lys Asp Arg Leu Cys Phe Val
 210 215 220
 Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val
 245 250 255
 Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp Leu
 260 265 270
 Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr
 275 280 285
 Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Ala Thr Met Lys
 290 295 300
 Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp
 305 310 315 320
 Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met
 325 330 335
 Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu
 340 345 350
 Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg Thr
 355 360 365
 Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys Asp
 370 375 380
 Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Ala Lys Glu Ile Met
 385 390 395 400
 Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp Lys
 405 410 415

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

420 425 430
Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr Pro
435 440 445
Pro Glu Lys Cys Gln Gln Ser Asp Cys Gly Met Leu Gly Asn Trp Lys
450 455 460

Lys

465

<210> 9

<211> 3207

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(3207)

<223> wild type PIK3CA

<400> 9

atgcctccac gaccatcatc aggtgaactg tggggcatcc acttgatgcc cccaagaatc 60

ctagtagaat gtttactacc aaatggaatg atagtgactt tagaatgcct ccgtgaggct 120

acattaataa ccataaagca tgaactatct aaagaagcaa gaaaataccc cctccatcaa 180

cttcttcaag atgaatcttc ttacatcttc gtaagtgtta ctcaagaagc agaaagggaa 240

gaattttttg atgaaacaag acgactttgt gaccttcggc tttttcaacc ctttttaaaa 300

gtaattgaac cagtaggcaa ccgtgaagaa aagatcctca atcgagaaat tggttttgct 360

atcggtatgc cagtgtgtga atttgatatg gttaaagatc cagaagtaca ggacttcgga 420

agaaatattc tgaacgtttg taaagaagct gtggatctta gggacctcaa ttcacctcat 480

agtagagcaa tgtatgtcta tcctccaaat gtagaatctt caccagaatt gccaaagcac 540

atatataata aattagataa agggcaaata atagtggatg tctgggtaat agtttctcca 600

aataatgaca agcagaagta tactctgaaa atcaaccatg actgtgtacc agaacaagta 660

attgtgaag caatcaggaa aaaaactcga agtatgttgc tatcctctga acaactaaaa 720

ctctgtgttt tagaataatc gggcaagtat attttaaaag tgtgtggatg tgatgaatac 780

ttctagaaa aatatcctct gagtcatgat aagtatataa gaagctgtat aatgcttggg 840

aggatgcccc atttgatgtt gatggctaaa gaaagccttt attctcaact gccaatggac 900

tgttttacaa tgccatctta ttccagacgc atttccacag ctacaccata tatgaatgga	960
gaaacatcta caaaatccct ttgggttata aatagtgcac tcagaataaa aattctttgt	1020
gcaacctacg tgaatgtaaa tattcgagac attgataaga tctatgttcg aacaggtatc	1080
taccatggag gagaaccctt atgtgacaat gtgaacactc aaagagtacc ttgttccaat	1140
cccaggtgga atgaatggct gaattatgat atatacattc ctgatcttcc tcgtgctgct	1200
cgacttggcc ttccatttg ctctgtttaa ggccgaaagg gtgctaaaga ggaacactgt	1260
ccattggcat ggggaaatat aaacttggtt gattacacag acactctagt atctggaaaa	1320
atggctttga atctttggcc agtacctcat ggattagaag atttgcgtga ccctattgg	1380
gttactggat caaatccaaa taaagaaact ccatgccttag agttggagtt tgactggttc	1440
agcagtgtgg taaagtcccc agatatgtca gtgattgaag agcatgcaa ttggtctgta	1500
tcccagaag caggatttag ctattccac gcaggactga gtaacagact agctagagac	1560
aatgaattaa gggaaaatga caaagaacag ctcaaagcaa tttctacag agatcctctc	1620
tctgaaatca ctgagcagga gaaagatttt ctatggagtc acagacacta ttgtgtaact	1680
atccccgaaa ttctaccaa attgcttctg tctgttaaat ggaattctag agatgaagta	1740
gcccagatgt attgcttggg aaaagattgg cctccaatca aacctgaaca ggctatggaa	1800
cttctggact gtaattaccc agatcctatg gttcgaggtt ttgctgttcg gtgcttggaa	1860
aaatatttaa cagatgacaa actttctcag tatttaattc agctagtaca ggtcctaaaa	1920
tatgaacaat atttggataa cttgcttgtg agatttttac tgaagaaagc attgactaat	1980
caaaggattg ggcacttttt cttttggcat ttaaaatctg agatgcacaa taaaacagtt	2040
agccagaggt ttggcctgct ttggagtc tttgtcgtg catgtgggat gtatttgaag	2100
cacctgaata ggcaagtcga ggcaatggaa aagctcatta acttaactga cattctcaa	2160
caggagaaga aggatgaac acaaaaggta cagatgaagt ttttagttga gcaaatgagg	2220
cgaccagatt tcatggatgc tctacagggc ttctgtctc ctctaaacc tgctcatcaa	2280
ctaggaaacc tcaggcttga agagtgtcga attatgtcct ctgcaaaaag gccactgtgg	2340
ttgaattggg agaaccaga catcatgtca gagttactgt ttcagaacaa tgagatcatc	2400
tttaaaatg gggatgattt acggcaagat atgctaacac ttcaaattat tcgtattatg	2460
gaaaatatct ggcaaatca aggtcttgat ctctgaatgt taccttatgg ttgtctgtca	2520
atcggtgact gtgtgggact tattgagggt gtgcgaaatt ctacactat tatgcaaatt	2580
cagtgcaaag gcggcttgaa aggtgcactg cagttcaaca gccacacact acatcagtgg	2640
ctcaaagaca agaacaagg agaatatat gatgcagcca ttgacctgtt tacacgttca	2700
tgtgctggat actgtgtagc taccttcatt ttgggaattg gagatcgtca caatagtaac	2760

atcatggtga aagacgatgg acaactgttt catatagatt ttggacactt ttggatcac 2820
aagaagaaaa aatttggtta taaacgagaa cgtgtgccat ttgttttgac acaggatttc 2880
ttaatagtga ttagtaaagg agcccaagaa tgcacaaaga caagagaatt tgagaggttt 2940
caggagatgt gtiacaaggc ttatctagct attcgacagc atgccaatct cttcataaat 3000

cttttctcaa tgatgcttgg ctctggaatg ccagaactac aatcttttga tgacattgca 3060
tacattcgaa agaccctagc cttagataaa actgagcaag aggcttttga gtatttcattg 3120
aaacaaatga atgatgcaca tcatggtggc tggacaacaa aaatggattg gatcttccac 3180
acaattaaac agcatgcatt gaactga 3207

<210> 10

<211> 1068

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(1068)

<223> wild type PIK3CA

<400> 10

Met Pro Pro Arg Pro Ser Ser Gly Glu Leu Trp Gly Ile His Leu Met

1	5	10	15
Pro	Pro	Arg	Ile
Leu	Val	Glu	Cys
Leu	Leu	Pro	Asn
Gly	Met	Ile	Val
20	25	30	
Thr	Leu	Glu	Cys
Leu	Arg	Glu	Ala
Thr	Leu	Ile	Thr
Ile	Lys	His	Glu
35	40	45	
Leu	Phe	Lys	Glu
Ala	Arg	Lys	Tyr
Pro	Leu	His	Gln
Leu	Leu	Gln	Asp
50	55	60	
Glu	Ser	Ser	Tyr
Ile	Phe	Val	Ser
Val	Thr	Gln	Glu
Ala	Glu	Arg	Glu
65	70	75	80
Glu	Phe	Phe	Asp
Glu	Thr	Arg	Arg
Leu	Cys	Asp	Leu
Arg	Leu	Phe	Gln
85	90	95	
Pro	Phe	Leu	Lys
Val	Ile	Glu	Pro
Val	Gly	Asn	Arg
Glu	Glu	Lys	Ile
100	105	110	
Leu	Asn	Arg	Glu
Ile	Gly	Phe	Ala
Ile	Gly	Met	Pro
Val	Cys	Glu	Phe
115	120	125	

Asp Met Val Lys Asp Pro Glu Val Gln Asp Phe Arg Arg Asn Ile Leu
 130 135 140
 Asn Val Cys Lys Glu Ala Val Asp Leu Arg Asp Leu Asn Ser Pro His

 145 150 155 160
 Ser Arg Ala Met Tyr Val Tyr Pro Pro Asn Val Glu Ser Ser Pro Glu
 165 170 175
 Leu Pro Lys His Ile Tyr Asn Lys Leu Asp Lys Gly Gln Ile Ile Val
 180 185 190
 Val Ile Trp Val Ile Val Ser Pro Asn Asn Asp Lys Gln Lys Tyr Thr
 195 200 205
 Leu Lys Ile Asn His Asp Cys Val Pro Glu Gln Val Ile Ala Glu Ala
 210 215 220

 Ile Arg Lys Lys Thr Arg Ser Met Leu Leu Ser Ser Glu Gln Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Cys Val Leu Glu Tyr Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Lys Val Cys Gly
 245 250 255
 Cys Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Lys Tyr Pro Leu Ser Gln Tyr Lys Tyr
 260 265 270
 Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro Asn Leu Met Leu Met
 275 280 285
 Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met Asp Cys Phe Thr Met

 290 295 300
 Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr Pro Tyr Met Asn Gly
 305 310 315 320
 Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn Ser Ala Leu Arg Ile
 325 330 335
 Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn Ile Arg Asp Ile Asp
 340 345 350
 Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly Gly Glu Pro Leu Cys
 355 360 365

 Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser Asn Pro Arg Trp Asn

370 375 380
 Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp Leu Pro Arg Ala Ala
 385 390 395 400
 Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly Arg Lys Gly Ala Lys
 405 410 415
 Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile Asn Leu Phe Asp Tyr
 420 425 430
 Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu Asn Leu Trp Pro Val

 435 440 445
 Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile Gly Val Thr Gly Ser
 450 455 460
 Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu Glu Phe Asp Trp Phe
 465 470 475 480
 Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val Ile Glu Glu His Ala
 485 490 495
 Asn Trp Ser Val Ser Arg Glu Ala Gly Phe Ser Tyr Ser His Ala Gly
 500 505 510

 Leu Ser Asn Arg Leu Ala Arg Asp Asn Glu Leu Arg Glu Asn Asp Lys
 515 520 525
 Glu Gln Leu Lys Ala Ile Ser Thr Arg Asp Pro Leu Ser Glu Ile Thr
 530 535 540
 Glu Gln Glu Lys Asp Phe Leu Trp Ser His Arg His Tyr Cys Val Thr
 545 550 555 560
 Ile Pro Glu Ile Leu Pro Lys Leu Leu Leu Ser Val Lys Trp Asn Ser
 565 570 575
 Arg Asp Glu Val Ala Gln Met Tyr Cys Leu Val Lys Asp Trp Pro Pro

 580 585 590
 Ile Lys Pro Glu Gln Ala Met Glu Leu Leu Asp Cys Asn Tyr Pro Asp
 595 600 605
 Pro Met Val Arg Gly Phe Ala Val Arg Cys Leu Glu Lys Tyr Leu Thr
 610 615 620
 Asp Asp Lys Leu Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Leu Val Gln Val Leu Lys

625 630 635 640
 Tyr Glu Gln Tyr Leu Asp Asn Leu Leu Val Arg Phe Leu Leu Lys Lys
 645 650 655

 Ala Leu Thr Asn Gln Arg Ile Gly His Phe Phe Phe Trp His Leu Lys
 660 665 670
 Ser Glu Met His Asn Lys Thr Val Ser Gln Arg Phe Gly Leu Leu Leu
 675 680 685
 Glu Ser Tyr Cys Arg Ala Cys Gly Met Tyr Leu Lys His Leu Asn Arg
 690 695 700
 Gln Val Glu Ala Met Glu Lys Leu Ile Asn Leu Thr Asp Ile Leu Lys
 705 710 715 720
 Gln Glu Lys Lys Asp Glu Thr Gln Lys Val Gln Met Lys Phe Leu Val

 725 730 735
 Glu Gln Met Arg Arg Pro Asp Phe Met Asp Ala Leu Gln Gly Phe Leu
 740 745 750
 Ser Pro Leu Asn Pro Ala His Gln Leu Gly Asn Leu Arg Leu Glu Glu
 755 760 765
 Cys Arg Ile Met Ser Ser Ala Lys Arg Pro Leu Trp Leu Asn Trp Glu
 770 775 780
 Asn Pro Asp Ile Met Ser Glu Leu Leu Phe Gln Asn Asn Glu Ile Ile
 785 790 795 800

 Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Ile
 805 810 815
 Ile Arg Ile Met Glu Asn Ile Trp Gln Asn Gln Gly Leu Asp Leu Arg
 820 825 830
 Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ser Ile Gly Asp Cys Val Gly Leu Ile
 835 840 845
 Glu Val Val Arg Asn Ser His Thr Ile Met Gln Ile Gln Cys Lys Gly
 850 855 860
 Gly Leu Lys Gly Ala Leu Gln Phe Asn Ser His Thr Leu His Gln Trp

 865 870 875 880

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

885 890 895

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

900 905 910

Ile Gly Asp Arg His Asn Ser Asn Ile Met Val Lys Asp Asp Gly Gln

915 920 925

Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Phe Leu Asp His Lys Lys Lys Lys

930 935 940

Phe Gly Tyr Lys Arg Glu Arg Val Pro Phe Val Leu Thr Gln Asp Phe

945 950 955 960

Leu Ile Val Ile Ser Lys Gly Ala Gln Glu Cys Thr Lys Thr Arg Glu

965 970 975

Phe Glu Arg Phe Gln Glu Met Cys Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Ile Arg

980 985 990

Gln His Ala Asn Leu Phe Ile Asn Leu Phe Ser Met Met Leu Gly Ser

995 1000 1005

Gly Met Pro Glu Leu Gln Ser Phe Asp Asp Ile Ala Tyr Ile Arg Lys

1010 1015 1020

Thr Leu Ala Leu Asp Lys Thr Glu Gln Glu Ala Leu Glu Tyr Phe Met

1025 1030 1035 1040

Lys Gln Met Asn Asp Ala His His Gly Gly Trp Thr Thr Lys Met Asp

1045 1050 1055

Trp Ile Phe His Thr Ile Lys Gln His Ala Leu Asn

1060 1065

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C1483 sense primer

<400> 11

taggttacag gcctggatgg

<210> 12

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C1483 antisense primer
 <400> 12
 ctggcctcc caaatgtta 20
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> L2427 sense primer
 <400> 13
 tccaggctac ctggtatgag a 21
 <210> 14

 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> L2427 antisense primer
 <400> 14
 gccttccttt caaatccaaa 20
 <210> 15
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> annealing forward primer for pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP
 <400> 15
 aattccaatt gcccggtt aagatcgata cgcgta 36
 <210> 16
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > annealing reverse primer for pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP
 <400> 16

ccggtacgcg tatcgatctt aagcccgggc aattgg 36

<210> 17

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP

<400> 17

gatcacaatt gtggccacca tggactacaa ggacgacgat gacaagatgc 50

<210> 18

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP

<400> 18

tgatcaacgc gtttaccaga aagggcacca gccaatatag c 41

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Y1450D sense primer

<400> 19

tcgtgcagtt tctcatccca ggtagcctgg atc 33

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Y1450D antisense primer

<400> 20

gatccaggct acctgggatg agaaactgca cga 33

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C1483R sense primer

<400> 21

ggcctcgagg cggcgcgatgc ggc 23

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C1483R antisense primer

<400> 22

gccgcatgcg ccgcctcgag gcc 23

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> L2427Q sense primer

<400> 23

gtctatgacc ccttgcagaa ctggaggctg atg 33

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> L2427Q antisense primer

<400> 24

catcagcctc cagttctgca aggggtcata gac 33

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> L2427P sense primer

<400> 25

gtctatgacc ccttgccgaa ctggaggctg atg 33

<210> 26

<211> 33

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> L2427P antisense primer
 <400> 26
 catcagcctc cagttcggca aggggtcata gac 33
 <210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 7280T sense primer
 <400> 27
 cccaggcact tgatgatact c 21
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 7280T antisense primer
 <400> 28
 cttgctttgg gtggagagtt 20

 <210> 29
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TSC-1 R22W-F primer
 <400> 29
 gtcacgtcgt cccacacacc cagcatg 27
 <210> 30
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TSC-1 R22W-R primer
 <400> 30
 catgctgggt gtgtgggacg acgtgac 27
 <210> 31

<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TSC-1 R204C-F primer	
<400>	31	
	ctttcatact gtaatgagaa cacaaaaagg agacgaagtt gca	43
<210>	32	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TSC-1 R204C-R primer	
<400>	32	
	tgcaacttcg tctccttttt gtgttctcat tacagtatga aag	43
<210>	33	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TSC-2 V1547I-F primer	
<400>	33	
	tctccaacat acaggatggc gatcttgtgg gtg	33
<210>	34	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TSC-2 V1547I-R primer	
<400>	34	
	caccacaag atcgccatcc tgtatgttgg aga	33
<210>	35	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AKT3 R247H-F primer	
<400>	35	

caccatagaa acgtgtgtgg tcctcagaga acacc	35
<210> 36	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AKT3 R247H-R primer	
<400> 36	
ggtgtttctct gaggaccaca cacgtttcta tgggtg	35
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA sequence corresponding to TSC1 targetting sgRNA	
<400> 37	
tgctggactc ctccacactg	20
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA sequence corresponding to TSC2 targetting sgRNA	
<400> 38	
aatcccaggt gtgcagaagg	20