



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월15일

(11) 등록번호 10-2214612

(24) 등록일자 2021년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/50 (2017.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0035194(분할)

(22) 출원일자 2020년03월23일

심사청구일자 2020년03월23일

(65) 공개번호 10-2020-0034703

(43) 공개일자 2020년03월31일

(62) 원출원 특허 10-2017-0146274

원출원일자 2017년11월03일

심사청구일자 2017년11월03일

(56) 선행기술조사문헌

Hepatology, Vol. 58(2), 692-705.(2013.3.16. 공개)\*

Hepatology, Vol. 66(6), 1894-1909. (2017.6.23. 공개)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

정상훈

강원도 강릉시 사임당로 679

김영주

강원도 강릉시 사임당로 679

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영철, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 PROX1의 발현 또는 활성 조절제를 포함하는 텔로머라제 역전사효소의 발현 조절용 조성물 또는 텔로머라제 역전사효소 조절제의 스크리닝 방법

## (57) 요약

본 명세서에는 PROX1(prospero homeobox protein 1)과 텔로머라제 역전사효소(TERT; telomerase reverse transcriptase)의 상관관계를 기반으로 하여, TERT의 발현 조절용 조성물, TERT 발현 조절제의 스크리닝 방법, TERT 발현 상태 진단용 조성물, 진단용 키트, 진단을 위한 정보제공 방법 또는 암 진단을 위한 정보제공방법이 개시된다. 구체적으로 일 측면에서 본 발명의 PROX1은 TERT 프로모터, 특히 -124 또는 -146bp 위치에 염기의 치환이 발생한 돌연변이 TERT 프로모터에 결합하여 TERT의 발현을 조절할 수 있고, 간암 중에서도 비-B형 간염 바이러스 유래 간암 내 TERT의 발현을 특이적으로 억제할 수 있다는 특징이 있다. 이에 본 발명은 TERT의 발현 조절용 조성물, B형 간염 바이러스 유래 간암의 예방 또는 치료용 조성물 등을 포함한 다양한 의생명 분야에서 활용될 수 있다는 이점이 있다.

대표도 - 도2a

Identified Protein Name	R <sub>0</sub>	
	-124<T	-146<T
Prospero homeobox protein 1	3.9	4.3
cDNA FLJ76127, highly similar to Homo sapiens replication factor C (activator 1) 5	3.5	4.3
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	2.3	3.5
Double-strand-break repair protein rad21 homolog	2.2	3.4
Nucleoporin NUP188 homolog	2.2	2.9
Titin, isoform CRA_a	2.2	2.1
SMARCA1 protein	1.8	3.0

(52) CPC특허분류

**C12Q 1/6886** (2018.05)  
**G01N 33/5008** (2013.01)  
**G01N 33/57438** (2019.01)  
**C12Q 2600/136** (2013.01)  
**C12Q 2600/158** (2013.01)

(72) 발명자

**송대근**

강원도 강릉시 사임당로 679

**박영년**

서울특별시 용산구 이촌로 303, 23동 302호

**유정은**

인천광역시 서구 승학로 447, 502동 1003호

**이형진**

서울특별시 서초구 신반포로33길 15, 101동 302호

**전영식**

서울특별시 강동구 천중로 11-12, 102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711029890
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발
연구과제명	인체 간암 발생과정에서 암 및 비만 동시조절인자의 발굴 및 검증
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2015.12.01 ~ 2016.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711057966
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발
연구과제명	간암의 임상-유전체 통합 DB구축 및 신약 타겟의 기능-병리 검증
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2017.06.30 ~ 2018.03.29

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

텔로머라제(telomerase)의 활성 증가로 인하여 유도되는 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로서,

상기 조성물은 PROX1(prospero homeobox protein 1)의 발현 또는 활성 억제제를 포함하고,

상기 PROX1의 발현 억제제는 PROX1의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임(ribozyme), DNA 기반 효소(DNAzyme) 및 PNA(peptide nucleic acid)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상이고,

상기 PROX1의 활성 억제제는 PROX1의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 그의 항원 결합 단편, 및 앵타머로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상이며,

상기 조성물은 상기 PROX1가 텔로머라제 역전사효소(TERT; telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 결합되는 것을 억제하여, TERT 유전자의 발현을 억제할 필요가 있는 대상에게 투여되는 것이며,

상기 예방, 개선 또는 치료는 상기 텔로머라제의 활성을 감소시키는 것에 의한 것이며,

상기 암은 알코올성 간암 또는 A형 간염 바이러스 유래 간암이 아닌, 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약학적 조성물인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 상기 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 4

(a) 분리된 세포에 TERT 발현 또는 활성 조절 후보물질을 처리하는 단계;

(b) 상기 세포에서 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 PROX1가 텔로머라제 역전사효소(TERT; telomerase reverse transcriptase) 유전자의 발현을 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 텔로머라제(telomerase)의 활성 증가로 인하여 유도되는 암 치료제의 스크리닝 방법;

여기서 상기 치료제는 상기 텔로머라제의 활성을 감소시키는 것이며,

상기 암은 알코올성 간암 또는 A형 간염 바이러스 유래 간암이 아니다.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 방법은 (c) 후보물질 처리에 의하여, 후보물질을 처리하지 않은 세포에 비하여 PROX1 발현 또는 활성 수준이 낮아지면 상기 후보물질을 암 치료제로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

## 청구항 8

삭제

## 청구항 9

삭제

## 청구항 10

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 명세서에는 PROX1(prospero homeobox protein 1)과 텔로머라제 역전사효소(TERT; telomerase reverse transcriptase)의 상관관계를 기반으로 하여, TERT의 발현 조절용 조성물, TERT 발현 조절제의 스크리닝 방법, TERT 발현 상태 진단용 조성물, 진단용 키트, 진단을 위한 정보제공 방법 또는 암 진단을 위한 정보제공방법이 개시된다.

### 배경 기술

[0002] 텔로미어(Telomeres)는 진핵세포 염색체의 말단에서 발견되며 염색체들의 분해나 말단-대-말단 융합을 방지하는 특별한 구조이다. 텔로머릭(telomeric) DNA는 짧은 염기서열의 직렬 반복(인간의 경우 TTAGGG)으로 구성된 일차적 구조로서, 그 길이는 하등 진핵세포의 수백 bp에서부터 포유동물 세포의 수천 bp까지 변화한다. 텔로머릭 DNA 부분은 동원체(centromere) 영역에서와 같이 GC의 불균형(GC-rich)을 나타낸다. 이러한 성질은 염색체가 복제될 때 종래 DNA 폴리머라제에 의한 G-가닥의 불완전 복제를 야기하여, 노출된 반대가닥의 C-가닥이 핵산제거 효소에 의해 분해되거나 텔로머라제에 의한 합성으로 텔로머릭 말단부위가 완성될 수 있다.

[0003] 텔로머라제는 활성 소단위인 TERT (human telomerase reverse transcriptase)와 텔로머릭 DNA의 합성을 위한 주형을 제공하는 RNA 성분인 TR(Telomerase RNA)로 구성된 리보뉴클레오프로테인(ribonucleoprotein) 복합체이다. 모든 텔로머라제 활성 소단위에서 보존된(conserved) 도메인은 레트로바이러스 및 레트로트랜스포존로부터의 역전사효소(RT)의 활성 도메인과 구조적으로 관련되어 있다. 비록 TERT와 TR이 텔로머라제 리보뉴클레오프로테인 구조체의 최소 단위이지만, 다른 단백질들도 이 효소 복합체와 구조적으로 또는 일시적으로 연관되어 있다.

[0004] 텔로머라제는 텔로미어 신장에서 역 전사효소로 작용하며, 말단 복제 문제로 인한 텔로미어의 손실을 방지한다. 텔로머라제가 없으면, 텔로미어는 각 세포 분열로 짧아져 염색체가 불안정하게 되므로, 노화, 아포토시스(apoptosis) 및 세포사를 초래한다. 텔로머라제는 체세포에서 불활성이지만, 암 세포의 90%에서는 활성이며, 여기서 텔로머라제가 재활성화된다. 텔로머라제는 암 발생 과정을 모방할 수 있기 때문에 텔로머라제 활성화는 위험할 수 있지만, 텔로머라제 증진제는 이론적으로 노화방지제로 적용할 수 있고 특정 의학 증상에 임상적으로 유용할 수 있다. 대조적으로, 텔로머라제 억제제는 암과 싸우는 데 유용할 수 있다. 암과 노화는 서로 밀접하게 관련되어 있다. 암에 대한 보호적 개입은 조기 노화를 초래하지만, 악성 암 세포의 형성에는 세포의 불멸화가 필요하다. 이론적인 발암 활성화 위험에도 불구하고, 텔로머라제의 활성화는 노화 속도를 감소시킬 수 있다.

[0005] 텔로미어 길이의 산정은 텔로미어의 생물학적 및 임상학적 중요도를 이해하는 데 중요하다. 텔로미어 길이는 세포의 염색체 안정성, 텔로머라제 활성 및/또는 발현, 증식 능력 및 노화 과정 연구에 유용한 지표로 작용한다. 텔로미어의 임상적 가치는 암, 조로 증후군 또는 부분적 조로증; 유전적 이상, 염색체 불안정으로 인한 질환 예컨대 블룸(Bloom) 증후군(감염자 염색체의 단절 및 재배열 빈도가 높은 희귀한 유전적 장애) 및 노화-관련 질환 예컨대 워너 증후군(Warner's Syndrome)(비교적 젊은 사람에서 급 노화를 나타내는 희귀 질환)에서 그 중요성이 입증될 수 있다. 텔로미어 길이의 동태는 특정 질환 진행에서 독특한 발현 패턴을 갖는다. 따라서, 이는 질환의 예측에 매우 유용하다.

[0006] 이에 텔로미어와 간암 간의 상관관계에 대하여 연구하던 중, PROX1이 텔로머라제 역전사효소 프라이머에 결합하

여 텔로머라제 역전사효소의 발현을 조절하는 인자로 작용하며, 동시에 비-B형 간염 바이러스 유래 간암에서 텔로머라제 역전사효소의 발현을 조절하는 인자로 작용함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007]

(특허문헌 0001) KR 등록특허공보 제10-1600374호

(특허문헌 0002) KR 공개특허공보 제10-2009-0052670호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008]

일 측면에서, 본 발명의 목적은 TERT 발현 조절용 조성물 또는 TERT 발현조절제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0009]

일 측면에서, 본 발명의 또 다른 목적은 TERT 발현 상태 진단용 조성물, 진단용 키트, 진단을 위한 정보제공방법 또는 비-B형 간염 바이러스 유래 간암 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010]

상기 과제를 달성하기 위하여, 일 측면에서 본 발명은 PROX1의 발현 또는 활성 조절제를 포함하는, TERT 발현 조절용 조성물을 제공한다.

[0011]

또한, 일 측면에서 본 발명은 (a) 분리된 세포에 TERT 발현 조절 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 세포에서 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, TERT 발현 조절제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0012]

또한, 일 측면에서 본 발명은 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제제를 포함하는, TERT 발현 상태 진단용 조성물을 제공한다.

[0013]

또한, 일 측면에서 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, TERT 발현 상태 진단용 키트를 제공한다.

[0014]

또한, 일 측면에서 본 발명은 생물학적 시료로부터 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 측정된 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 TERT 발현 상태 진단을 위한 정보로 제공하는 단계를 포함하는, TERT 발현 상태 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0015]

또한, 일 측면에서 본 발명은 생물학적 시료로부터 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 측정된 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 진단을 위한 정보로 제공하는 단계를 포함하는, 비-B형 간염 바이러스 유래 간암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0016]

또한, 일 측면에서 본 발명은 생물학적 시료로부터 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 측정된 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 암의 진단을 위한 정보로 제공하는 단계를 포함하며, 상기 정보로 제공하는 단계는, 상기 측정된 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 진단을 위한 정보로는 제공하되, B형 간염 바이러스 유래 간암의 진단에는 배제시키는 것을 특징으로 하는, 암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0017]

일 측면에서 본 발명의 PROX1은 TERT 프로모터, 특히 -124 또는 -146bp 위치에 염기의 치환이 발생한 돌연변이 TERT 프로모터에 결합하여 TERT의 발현을 조절할 수 있고, 간암 중에서도 비-B형 간염 바이러스 유래 간암 내 TERT의 발현을 특이적으로 억제할 수 있다는 특징이 있다. 이에 본 발명은 TERT의 발현 조절용 조성물, 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 예방 또는 치료용 조성물 등을 포함한 다양한 의생명 분야에서 활용될 수 있다는 이점이 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 발광효소 분석(luciferase assay)을 통한 암세포주 내 TERT 프로모터의 유전적 변이에 따른 TERT 프로모터의 활성화 변화 확인한 결과를 나타내는 도로, 구체적으로 도 1a는 HepG2 세포주에 대한 결과를 나타낸 도이고, 도 1b는 Hep3B 세포주에 대한 결과를 나타낸 도이며, 도 1c는 PLC/PRF/5 세포주에 대한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 액체 크로마토그래피-이중 질량분석법(LC-MS/MS) 분석과 결합된 올리고 풀-다운 실험을 통한 TERT 프로모터의 전사에 관여하는 관련 단백질 선별한 결과를 나타낸 도로, 구체적으로 도 2a는 야생형 프로모터 대비 돌연변이 프로모터에서 강화된 단백질에 대한  $R_{sc}$  값을 나타낸 도이고, 도 2b는 PROX1에 대한 LS-MS/MS 스펙트럼 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 면역블롯 분석(immunoblot assay)을 통한 TERT 프로모터에 대한 PROX1의 결합 친화력 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 면역블롯 분석을 통한 ETS/TCF 모티프의 돌연변이 발생에 따른 TERT 프로모터에 대한 PROX1의 결합 친화력 변화 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 면역블롯 분석을 통한 암 세포주 종류에 따른 내인성 PROX1의 결합 친화력 변화 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 6a는 앰플리콘 1 내지 3의 서열 부위를 도식화하여 나타낸 도이고, 도 6b는 크로마틴 면역침강(ChIP; chromatin immunoprecipitation) 분석을 통한 TERT 프로모터와 내인성 PROX1의 결합 친화력 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 발광효소 분석을 통한 PROX1의 TERT 유전자의 전사 조절 여부 및 그 정도 확인한 결과를 나타내는 도로, 구체적으로 도 7a는 Hep3B 세포주에 대한 결과를 나타낸 도이고, 도 7b는 HepG2 세포주에 대한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 8은 SNU423을 이용한 발광효소 분석을 통한 PROX1의 TERT 유전자의 전사 조절 효과 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 9는 B형 간염 바이러스 유래 간암에 대한 TERT 프로모터 돌연변이의 임상병리학적 및 진단적 특성 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 10은 q-PCR을 통한 B형 간염 바이러스 유래 간암에 대한 TERT 프로모터 돌연변이의 임상병리학적 및 진단적 특성 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 11은 qRT-PCR 분석을 통한 간암 유형에 따른 TERT 및 PROX1 mRNA 발현 간의 상관관계 확인한 결과를 나타내는 도로, 구체적으로 도 11a는 B형 간염 바이러스 유래 간암에 대한 결과를 나타낸 도이고, 도 11b는 비-B형 간암 바이러스 유래 간암에 대한 결과를 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 상세히 설명한다.
- [0020] 일 측면에서 본 발명은 PROX1의 발현 또는 활성 조절제를 포함하는, TERT 발현 조절용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 명세서에 있어서, 'PROX1'은 'Prospero homeobox protein 1'의 약자로 인체 내에서 PROX1 유전자에 의하여 암호화된 단백질을 지칭한다. 이하에서는 상황에 맞게 유전자 또는 단백질 형태 모두를 나타내는 용어로 사용하였다.
- [0022] 본 명세서에 있어서, 'PROX1의 발현 또는 활성 조절제'는 PROX1의 발현 또는 활성을 조절하는 물질을 통칭하는 의미로 사용되며, 보다 구체적으로는 PROX1에 직접적으로 작용하거나 그의 리간드에 간접적으로 작용하는 등의 방식을 통해 PROX1의 발현을 전사 수준에서 감소 또는 증가시키거나 그 활성을 방해하거나 촉진함으로써 PROX1의 발현 또는 활성을 감소 또는 증가시키는 모든 물질을 포함할 수 있다.
- [0023] 구체적으로, PROX1의 발현 또는 활성 조절제는 PROX1의 발현 또는 활성 억제제일 수 있고, 이때 본 발명은 일 실시예로 PROX1의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는, TERT 발현 억제용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0024] 본 명세서에 있어서, 'TERT'는 텔로머라제 역전사효소(Telomerase reverse transcriptase)의 약칭으로 효소인 텔로머라제의 촉매 소단위로 텔로머라제 RNA 요소(TERC)와 함께 텔로머라제의 가장 중요한 구성이다. 본 발명의



일 실시예에 따르면, PROX1은 TERT에 대한 전사촉진인자로서 PROX1의 발현 또는 활성을 억제시키는 경우 TERT의 프라이머 내 전사촉진인자의 결합 부재로 인하여 TERT의 발현이 억제되는 바, TERT 발현 억제를 위하여 PROX1의 발현 또는 활성 억제제를 이용할 수 있다.

- [0025] 상기 'PROX1 발현 억제제'는 PROX1을 표적으로 하여 PROX1의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물, 핵산, 펩타이드, 바이러스 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등 그 형태에 제한 없이 사용 가능하다. 일례로 PROX1의 mRNA에 특이적으로 결합하여 PROX1 mRNA의 발현을 저해하는 siRNA(small interference RNA), shRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임(ribozyme), DNA 기반 효소(DNAzyme), PNA(peptide nucleic acids) 등일 수 있고, 바람직하게는 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 보다 바람직하게는 siRNA이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 상기 'siRNA'는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 21 내지 25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각을 의미한다. 본 발명의 siRNA는 센스 가닥(mRNA 서열에 상응하는(corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. 본 발명의 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사를 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다.
- [0027] 상기 siRNA는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하며, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열의 변이체 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 siRNA의 작용성 등가물, 예를 들어, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 서열 중 일부가 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 이를 통해 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 PROX1 유전자를 녹아웃시키는 siRNA와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다.
- [0028] 구체적으로, siRNA는 각 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 아미노산에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인된다.
- [0029] 상기 'PROX1 활성 억제제'는 일례로 PROX1의 단백질에 특이적으로 결합하여 PROX1 단백질의 활성을 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 앵타머, 화합물 등이 포함되며, 바람직하게는 항체이나 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 상기 항체는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 지칭하는 것으로, 본 발명의 목적상, 항체는 PROX1에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수항체도 포함된다. 본 발명에 있어서 토끼 항-PROX1(11067-2-AP, Proteintech, Rosemont, IL, USA)인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 조성물은 다양한 형태로 제공될 수 있다.
- [0032] 일례로, 본 발명은 PROX1의 발현 또는 활성 조절제를 포함하는, TERT 발현 조절용 약학적 조성물을 제공한다. 일 실시예로 본 발명은 상기 조성물은 PROX1의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0033] 본 명세서에 있어서, '약학적'은 질병을 예방하거나 치료하는 데 사용되는 물질을 연구하는 분야를 의미한다.
- [0034] 본 명세서에 있어서, '예방'은 조성물의 투여에 의해 C형 바이러스성 간암 또는 알코올성 간암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0035] 본 명세서에 있어서, '치료'는 조성물의 투여에 의해 C형 바이러스성 간암 또는 알코올성 간암을 낮게 하는 행위를 모두 의미한다.
- [0036] 상기 조성물은 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 예방 또는 치료 용도를 가지는 것으로, 비-B형 간염 바이러

스 유래 간암 특이적인 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것이 특징이다. 즉, 본 발명의 일 실시예로 PROX1의 발현 또는 활성 조절을 통하여 예방 또는 치료를 피할 수 있는 것은 비-B형 간염 바이러스 유래 간암에 제한된다. 이를 바탕으로 보다 효율적인 간암의 예방 또는 치료를 피할 수 있다.

- [0037] 이때, 상기 비-B형 간염 바이러스 유래 간암은 B형 간염 바이러스에 의한 간암을 제외한 모든 간암을 포함하는 개념으로, 바람직하게는 A형 간염 바이러스 유래 간암, C형 간염 바이러스 유래 간암 또는 알코올성 간암일 수 있고, 보다 바람직하게는 C형 간염 바이러스 유래 간암 또는 알코올성 간암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 명세서에 있어서, '투여'는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 PROX1 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 조성물을 제공하는 것을 의미하는 것으로, 상기 PROX1 발현 또는 활성 억제제는 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0039] 본 명세서에 있어서, '약학적으로 유효한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일례로 상기 PROX1 발현 또는 활성 억제제의 1일 투여 용량은 0.1mg/kg/일 내지 5000mg/kg/일, 보다 구체적으로는 50 mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0041] 상기 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육 또는 피하에 투여될 수 있다.
- [0042] 상기 조성물은 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 식이요법, 물리치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0043] 또 다른 예로 본 발명은 PROX1 발현 또는 활성 조절제를 포함하는 TERT 발현 조절용 건강기능식품을 제공한다. 일 실시예로 본 발명은 상기 조성물은 PROX1의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 명세서에 있어서, '건강기능식품'이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병 방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.
- [0045] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 건강기능식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0047] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 건강기능식품의 예로는 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병 방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계된 식품을 모두 포함한다.
- [0048] 상기 외에 본 명세서 내 개시된 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세



린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

- [0050] 또한, 일 측면에서 본 발명은 (a) 분리된 세포에 TERT 발현 조절 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 세포에서 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, TERT 발현 조절제의 스크리닝 방법을 제공한다. 일 실시예에서 상기 TERT 발현 조절제는 비-B형 간염 바이러스 유래 간암 간암 치료제일 수 있다.
- [0051] 상기 (a) 단계의 세포는 PROX1을 발현하거나 활성화시키는 세포이다.
- [0052] 상기 (a) 단계의 후보물질은 후보물질은 TERT 발현을 억제할 수 있을 것으로 예상되는 물질 또는 그 예후를 개선시킬 수 있을 것으로 기대되는 미지의 물질로서, 화합물, 단백질 또는 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 상기 (b) 단계의 'PROX1의 발현 수준을 측정'하기 위한 분석 방법은 중합효소반응(PCR), 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), 또는 DNA 마이크로어레이 분석법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 상기 (b) 단계의 'PROX1의 활성 수준을 측정'하기 위한 분석 방법은 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법(Radioimmunoassay), 방사면역 확산법(Radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(Rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역 침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complete fixation assay), 유세포분석법(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 또는 단백질 칩(protein chip) 분석법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 상기 (b) 단계는 (c) 후보물질 처리에 의하여 후보물질을 처리하지 않은 세포에 비하여 PROX1 발현 또는 활성 수준이 낮아지면 TERT 발현 억제제로 판정하고, PROX1 발현 또는 활성 수준이 높아지면 TERT 발현 촉진제로 판정하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0056] 또한, 일 측면에서 본 발명은 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제제를 포함하는, TERT 발현 상태 진단용 조성물을 제공한다.
- [0057] 또한, 일 측면에서 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 TERT 발현 상태 진단용 키트를 제공한다.
- [0058] 본 명세서에 있어서, '진단'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단이란 TERT 발현 상태를 확인하는 것일 수 있고, 이를 통하여 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 발병 여부를 확인하는 것일 수 있다. 이때, 본 발명은 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 발병 여부에 대한 판단은 배제시키는 것이 특징이다.
- [0059] 보다 구체적으로, TERT는 비-B형 간염 바이러스 유래 간암인 A형 간염 바이러스 유래 간암, C형 간염 바이러스 유래 간암, 알코올성 간암, 조로 증후군, 부분적 조로증, 유전적 이상, 블룸(Bloom) 증후군을 포함하는 염색체 불안정으로 인한 질환 또는 워너 증후군(Warner's Syndrome)을 포함하는 노화-관련 질환의 발생 등을 나타내는 인자인 바, 일례로 본 발명은 신체 세포 또는 조직을 적절히 선택하여 TERT 발현 상태를 진단하여 암, 조로 증후군, 부분적 조로증, 유전적 이상, 염색체 불안정으로 인한 질환 또는 노화의 발생을 진단할 수 있도록 한다.
- [0060] 상기 진단용 키트는 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제제 외에, 분석방법에 적합한 한 종류 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있으며, 어떠한 형태로든 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.
- [0061] 일례로, PROX1의 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0062] 또한, PROX1의 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 마이크로어레이 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 상기 마이크로어레이 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관을 포함하고 기관은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있으며,

본 발명의 마커를 이용하여 당업계에서 통상적으로 사용되는 제조 방법에 의하여 용이하게 제조될 수 있다. 마이크로어레이 칩을 제작하기 위해서, 상기 탐색된 마커를 탐침 DNA 분자로 이용하여 DNA 칩의 기관상에 고정화시키기 위해 파이조일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting)법 또는 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 마이크로어레이 칩의 기관은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-Llysine) 및 알데히드(aldehyde)로 이루어진 군에서 선택되는 활성기가 코팅된 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 기관은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막 및 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 또한, PROX1의 활성 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC등이 사용될 수 있고, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.

[0064] 또한, 일 측면에서 본 발명은 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 체제를 포함하는 TERT 발현 상태 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0065] 또한, 일 측면에서 본 발명은 생물학적 시료로부터 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 측정된 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 진단을 위한 정보로 제공하는 단계를 포함하는, 비-B형 간염 바이러스 유래 간암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0066] 또한, 일 측면에서 본 발명은 생물학적 시료로부터 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 측정된 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 암의 진단을 위한 정보로 제공하는 단계를 포함하며, 상기 정보로 제공하는 단계는, 상기 측정된 PROX1의 발현 또는 활성 수준을 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 진단을 위한 정보로는 제공하되, B형 간염 바이러스 유래 간암의 진단에는 배제시키는 것을 특징으로 하는, 암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0067] 본 명세서에 있어서, '진단을 위한 정보제공방법'은 진단을 위한 예비적 단계로서 TERT 발현 상태 진단을 위하여 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것이며 의사의 임상적 판단 또는 소견은 제외된다. 더 나아가 상기 진단을 위한 정보제공방법은 암의 진단, 특히 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 진단을 위하여 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것 또한 포함한다.

[0068] 본 명세서에 있어서, '생물학적 시료'란 개체로부터 분리되어 목적 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 직접적인 대상을 의미하고, 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함한다. 일례로 본 발명의 시료란 TERT 과발현 의심 개체에서 TERT 발현 상태를 진단하기 위한 시료, 또는 비-B형 간염 바이러스 유래 간암 의심 개체에서 비-B형 간염 바이러스 유래 간암 발병 여부를 진단하기 위한 시료이다.

[0069] 일 실시예에서 상기 TERT 발현 상태 진단을 위한 정보제공방법은 정상인 대조군과 비교하여 PROX1 유전자의 발현 또는 활성 수준이 높아지면 TERT 발현이 증가된 것으로 진단하는 단계를 더 포함할 수 있다. 반대로, 정상인 대조군과 비교하여 PROX1 유전자의 발현 또는 활성 수준이 낮아지면 TERT의 발현이 감소된 것으로 판단하여 정보를 제공할 수 있다.

[0070] 구체적으로 TERT는 비-B형 간염 바이러스 유래 간암인 A형 간염 바이러스 유래 간암, C형 간염 바이러스 유래 간암, 알코올성 간암, 조로 증후군, 부분적 조로증, 유전적 이상, 블룸(Bloom) 증후군을 포함하는 염색체 불안정으로 인한 질환 또는 워너 증후군(Warner's Syndrome)을 포함하는 노화-관련 질환의 발생 등을 나타내는 인자인 바, 일례로 본 발명은 신체 세포 또는 조직을 적절히 선택하여 TERT 발현 상태를 진단하여 암, 조로 증후군, 부분적 조로증, 유전적 이상, 염색체 불안정으로 인한 질환 또는 노화의 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다.

[0071] 보다 구체적으로 본 발명은 일 실시예에서 상기 비-B형 간염 바이러스 유래 간암 진단을 위한 정보제공방법과 암 진단을 위한 정보제공방법은 정상인 대조군과 비교하여 PROX1 유전자의 발현 또는 활성 수준이 높아지면 비-B형 간염 바이러스 유래 간암으로 진단하는 단계를 더 포함할 수 있다. 반대로, 정상인 대조군과 비교하여 PROX1 유전자의 발현 또는 활성 수준이 비슷하거나 낮아지면 비-B형 간염 바이러스 유래 간암 간암이 아니라고

판단하여 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다.

- [0072] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0073] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 및 제조예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 및 제조예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 및 제조예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0074] **실시예 1. 세포 배양**
- [0075] 인간 간암 세포주인 HepG2 및 Hep3B는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)으로부터 공급받았고, SNU423은 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)으로부터 공급받았다. 공급받은 각 세포주는 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하 10% 소태아혈청(Gibco), 100 U/mL 페니실린 및 10 µg/ml 스트렙토마이신으로 보충한 DMEM(Gibco, Carlsbad, MD, USA)에서 배양하였다.
- [0076] **실시예 2. 발광효소 분석(luciferase assay)을 통한 암세포주 내 TERT 프로모터의 유전적 변이에 따른 TERT 프로모터의 활성화 변화 확인**
- [0077] 발광효소 분석을 통하여 암세포주 내 TERT 프로모터의 유전적 변이에 따른 TERT 프로모터의 활성화 변화를 확인하였다. 구체적으로 96-웰 플레이트(SPL Life Science, Pocheon, Korea) 내에서 웰당 야생형 프로모터(WT)나 TERT 유전자 서열 내 ATG를 기준으로 -124bp 또는 -146bp 위치에 시토신(C)가 티민(T)으로 치환된 돌연변이 프로모터(-124C>T 또는 -146C>T), 또는 상기 각 프로모터에 rs2853669의 대립유전자에 변이가 유도된 프로모터(rs-CC)와 상기 각 프로모터를 포함하는 실시예 2-1의 방식으로 제조된 TERT 리포터 구성물(TERT reporter construct) 100 ng, pNL1.1.TK 벡터(Promega) 0.25 ng와 0.5 µl의 FuGENE® HD 형질주입 시약(Promega)를 처리하여 암세포주, 특히 간암세포주로 알려진 HepG2, Hep3B 및 PLC/PRF/5 각각에 대하여 공-형질주입시켰다. 형질주입 후 48시간이 경과되었을 때, 제작자가 제공하는 매뉴얼에 따라 Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System(Promega)를 이용하여 발광효소의 활성 변화를 측정하였다. 발광효소의 활성은 NanoLuc™ 발광효소 발현으로 표준화하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.
- [0078] 한편, 상기 TERT 리포터 구성물은 다음의 방식으로 제조하였다. 우선, rs2853669의 TT 및 CC 유전자형을 가지는 정상적인 간 조직으로부터 추출한 DNA를 이용하여 각 TERT 프로모터 영역(ATG 시작 부분으로부터 -424 내지 +65 bp)을 증폭시켰다. 증폭은 PCR을 통하여 수행하였으며, 각 PCR은 이 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 5' 연장 가닥과 Sac I 및 Xho I 제한효소 자리를 포함하는 특이적인 프라이머와 Q5® High-Fidelity DNA 중합효소(NEB, Ipswich, MA, USA)를 이용하여 수행하였다. PCR 산물은 Sac I 및 Xho I 으로 분해되었고, 이에 따라 제조된 앰플리콘은 pGL3-인핸서 벡터(Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하였다. 이때, 높은 수준으로 *luc+*이 전사 되도록 하기 위하여 상기 벡터 내 SV40 인핸서가 *luc+* 및 폴리(A) 신호의 다운스트림에 위치하도록 하였다.
- [0079] 도 1에 나타낸 바와 같이, 돌연변이 프로모터를 포함하는 리포터 구조물, 특히 -124C>T 프로모터를 처리한 경우 모든 간암 세포주에서 야생형 프로모터보다 약 1.5 내지 2배 정도의 TERT 프로모터 활성 증가를 나타내었다. 한편, 프로모터 활성 증가는 rs2853669의 C 대립유전자의 존재 하에서 미묘하게 감소하였으나, rs283669의 대립유전자 변이는 프로모터 내 다른 돌연변이가 존재하지 않는 경우 TERT 프로모터의 활성화에 유의적인 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 이는 TERT 프로모터 내 유전적 변이가 간암 생성을 야기하는 TERT의 전사 수준을 증가시킴으로써 텔로머라제(telomerase) 활성화에 직접적으로 관여함을 나타낸다.
- [0080] **실시예 3. TERT 프로모터에 대한 PROX1의 결합 친화력 확인**
- [0081] **3-1. 액체 크로마토그래피-이중 질량분석법(LC-MS/MS) 분석과 결합된 올리고 풀-다운 실험을 통한 TERT 프로모터의 전사에 관여하는 관련 단백질 선별**
- [0082] 서열번호 3로 표시되는 컨센서스 ETS/TCF 바인딩 사이트(consensus ETS/TCF binding site, CCGGAA)는 TERT 프로모터에서 돌연변이를 야기시키고, 동시에 상기 ETS/TCF 전사 인자에 의하여 TERT 전사가 증가됨이 알려져 있다. 그럼에도 불구하고, 신생(*de novo*) 부위에 직접적으로 결합하는 단백질의 유형(즉, ETS/TCF 패밀리 단백질 또는 기타 단백질)은 실험적으로 아직 밝혀지지 못하였다. 이에 액체 크로마토그래피-이중 질량분석법(LC-MS/MS) 분석과 결합된 올리고 풀-다운 실험을 통하여 돌연변이 TERT 프로모터의 전사에 관여하는 관련 단백질을

검출하였다.

[0083] 구체적으로, TERT 프로모터에 상보적인 비오틴이 표지된 이중나선 올리고인 하기 표 1의 야생형인 WT#1 및 돌연변이형 124C>T 및 146C>T 서열을 합성하고, 각 올리고를 동일한 부피로 어닐링 버퍼(10 mM Tris-HCL [pH 7.4], 50 mM NaCl, 1 mM EDTA)에서 재현탁하고, 5분 동안 95℃에서 가열한 후 상온에서 서서히 식혀가면서 어닐(anneal)하였다. 이 후 스트렙타아비딘-코팅된 자성 구슬(Dynabead M-280 스트렙타아비딘, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 어닐된 올리고 100 pmol과 함께 30분 동안 상온에서 배양하였다.

표 1

	서열번호	서열
WT #1	4	GACCCCTCCCGGGTCCCGGCCAGCCCCCTCCGGGCCCTC
-124 C>T	5	GACCCCTCCCGGGTCCCGGCCAGCCCCCTCCGGGCCCTC
-146 C>T	6	GACCCCTCCCGGGTCCCGGCCAGCCCCCTCCGGGCCCTC

[0085] 별도로 -124C>T 또는 -146C>T 프로모터의 활성이 높은 암세포주인 Hep3B로부터 이 기술분야에서 일반적으로 사용되는 방식으로 핵 추출물을 분리하였고, 분리한 핵 추출물 1 mg을 상기 자성 구슬에 첨가한 후 4℃에서 2시간 동안 배양하였다. 상기 배양의 결과로, 자성 구슬에서 분리된 단백질에 대하여 이 기술 분야에 일반적으로 사용되는 SDS-PAGE 및 LS-MS/MS(liquid chromatography-tandem mass spectrometry) 수행하여 단백질-DNA 친화력 수준을 분석을 위하여 각 샘플의 스펙트럼 계수 값을 비교하였다. 그 결과는 야생형 프로모터 대비 돌연변이 프로모터에서 강화된 단백질에 대한  $R_{sc}$ (fold-change ratio)값으로 도 2a에 나타내었다. 아울러, PROX1에 대한 LS-MS/MS 스펙트럼 결과는 도 2b에 별도로 나타내었다.

[0086] 도 2에 나타난 바와 같이, 몇몇 단백질들에서 WT#1 올리고보다 -124C>T 및 -146C>T 치환된 올리고와 높은 결합력을 가짐을 확인하였고, 상기 단백질 중에 특히 유의적인 결합력을 나타낸 PROX1(prospero homeobox protein 1, 분자량 83 kDa)을 선택하였다.

### [0087] 3-2. 면역블롯 분석(immunoblot assay)을 통한 TERT 프로모터에 대한 PROX1의 결합 친화력 확인

[0088] 면역블롯 분석을 통하여 TERT 프로모터에 대한 PROX1의 결합 친화력, 특히 상기 실시예 3-1에서 올리고 풀-다운 분석 결과로 수득한 샘플 WT#1, -124C>T 및 -146C>T 각각에 대하여 TERT 프로모터와 PROX1 간의 결합 친화력을 확인하였다. 1차 항체로 토끼 항-PROX1(11067-2-AP, Proteintech, Rosemont, IL, USA)을 사용하여 이 기술분야에서 일반적으로 면역블롯 분석 방식으로 실험을 수행하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0089] 도 3에 나타난 바와 같이, WT#1 올리고를 포함한 -124C>T 및 -146C>T 올리고를 처리한 TERT 프로모터 모두 PROX1에 대한 양성 반응을 나타내었다. 다만, PROX1 결합은 WT#1 올리고에서도 검출되었으나, 이는 -124C>T 또는 -146C>T 올리고를 처리했을 때 보다는 낮았다. 이는 PROX1이 야생형 TERT 프로모터에서보다 돌연변이 TERT 프로모터에서 결합력이 우수하여, 돌연변이 TERT 프로모터를 가진 세포에서 보다 우수한 TERT 발현 증가를 야기 시킴을 나타낸다.

### [0090] 3-3. 면역블롯 분석을 통한 ETS/TCF 모티프의 돌연변이 발생에 따른 TERT 프로모터에 대한 PROX1의 결합 친화력 변화 확인

[0091] 다양한 야생형(WT) 올리고인 WT#1, WT#2 및 WT#3과 ETS/TCF 모티프를 완전히 망가뜨린 돌연변이(MT) 올리고를 이용한 올리고 풀-다운 분석 및 면역블롯 분석을 통하여 TERT 프로모터에 대한 PROX1의 결합 친화력, 즉 TERT 프로모터 내 핫스팟 지역인 서열번호 3로 표시되는 ETS/TCF 모티프에서 PROX1과의 결합이 특이적으로 발생하는 것인지 여부를 확인하였다.

[0092] 구체적으로 하기 표 2의 야생형(WT) 올리고인 WT#1, WT#2 및 WT#3과 MT 올리고를 사용한 것 외에는 상기 실시예 3-1 및 3-2에 개시된 방식과 동일한 방식으로 올리고 풀-다운 분석 및 면역블롯 분석을 수행하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

표 2

	서열번호	서열
WT #1	4	GACCCCTCCCGGGTCCCGGCCAGCCCCCTCCGGGCCCTC
WT #2	7	AGCCCCCTCCGGGCCCTC



WT #3	8	GACCCCTCCCGGGTCCCC
MT	9	GACCTCCGCGCGTCCCCGGCCAGCCCCCGTCGCGCCCTC

[0094] 도 4에 나타난 바와 같이, PROX1은 특이적으로 야생형 TERT 프로모터 서열인 CCGGAG 및 CCGGGA에 결합하고, ETS/TCF 결합 모티프가 완전히 붕괴된 MT 올리고와의 결합이 현저하게 감소되었음을 확인하였다. 이는 TERT 프로모터와 PROX1과의 결합 친화력은 직접적으로 TERT 프로모터 내 ETS/TCF 모티프와의 결합되는 영역의 범위와 비례함을 나타낸다. **실시예 4. TERT 프로모터에 대한 내인성 PROX1의 결합 친화력 확인**

[0095] **4-1. 면역블롯 분석을 통한 암 세포주 종류에 따른 내인성 PROX1의 결합 친화력 변화 확인**

[0096] 면역블롯 분석을 통하여 세포주 종류에 따른 내인성 PROX1의 결합 친화력이 변화를 확인하였다. 이때, 면역 블롯은 1차 항체로 토끼 항-PROX1(11067-2-AP, Proteintech, Rosemont, IL, USA), 토끼 항-COX IV(48844, CST) 및 토끼 항-Lamin B1(ab16048, Abcam)을 사용하여 이 기술분야에서 일반적으로 사용되는 방식으로 수행하였다. 결과는 도 5에 나타내었으며, Lamin B1은 핵 단백질 마커로 사용하고, COX IV는 세포질 단백질 마커로 사용하였다.

[0097] 도 5에서 나타난 바와 같이, 내인성 PROX1은 간암 세포주인 Hep3B 및 HepG2의 세포질 (C, cytoplasm)에서 보다 핵 (N, nucleus) 내에서 다량 검출되었으나, SNU423 어느 곳에서도 내인성 PROX1이 검출되지 않았다. 또한, Hep3B 내 PROX1 발현 수준이 다른 세포에서보다 높음을 확인하였다. 이는 암 세포주간 TERT 프로모터의 활성화가 PROX1 발현 패턴에 의존함을 시사한다.

[0098] **4-2. 크로마틴 면역침강(ChIP; chromatin immunoprecipitation) 분석을 통한 TERT 프로모터와 내인성 PROX1의 결합 친화력 확인**

[0099] 크로마틴 면역침강 분석을 통하여 세포 내 내인성 PROX1이 TERT 프로모터와 물리적으로 결합하는지 여부를 확인하였다. 구체적으로, 야생형 TERT 프로모터를 지닌 Hep3B 세포 및 -124C>T TERT 프로모터를 지닌 HepG2 세포에 대하여 제조자가 제공하는 매뉴얼에 따라 SimpleChIP® Plus Enzymatic Chromatin IP 키트(CST)를 이용하여 크로마틴 면역침강 분석을 수행하였다. 이때, 5-10 µg의 크로마틴과 1 µg의 PROX1 항체(11067-2-AP, Proteintech)를 사용하였다. 이 후 상기 실험에 대한 결과를 정량화하기 위하여 하기 표 3에 개시된 프라이머를 이용하여 qRT-PCR(Quantitative real-time PCR)을 수행하였다. 앰플리콘 1 내지 3은 도 6a에 나타난 서열로, 앰플리콘 1 및 2는 핫스팟을 포함하는 TERT 프로모터 영역의 복제 산물이고, 앰플리콘 3은 TERT의 3'-UTR 부분의 복제산물이다. 상기 일련의 과정을 통하여 수득한 결과는 도 6b에 나타내었다.

**표 3**

[0100]

이름	서열번호	서열	어닐링 온도(℃)
TERT 앰플리콘 1	Forward	CTGCCCCCTTACCTTCCAG	58
	Reverse	AGCGCTGCCTGAAACTCG	
TERT 앰플리콘 2	Forward	CTCCAGTGGATTTCGCGG	60
	Reverse	CTGCCTGAAACTCGCGCC	
TERT 앰플리콘 3	Forward	ATTCGCCATTGTTACCCCT	60
	Reverse	CTGTGTACAGGCACACCTT	

[0101] 도 6에 나타난 바와 같이, 두 세포주 모두에서 프로모터 내 -48 내지 -286 사이에 위치의 서열인 앰플리콘 1 및 2 모두 PROX1과 결합하나, TERT의 3'-UTR 위치의 서열인 앰플리콘 3은 PROX1과 결합하지 않음을 확인하였다. 이는 PROX1은 TERT 프로모터, 특히 핫스팟 영역에 결합함을 나타낸다. **실시예 5. TERT 유전자에 대한 내인성 PROX1의 전사활성인자로서의 역할 확인**

[0102] **5-1. 발광효소 분석을 통한 PROX1의 TERT 유전자의 전사 조절 여부 및 그 정도 확인**

[0103] qRT-PCR을 수행하여 Hep3B 및 HepG2 세포 내 PROX1의 TERT 유전자의 전사 조절 여부 및 그 정도를 확인하였다. 구체적으로, 96-웰 플레이트(SPL Life Science, Pocheon, Korea) 내에서 웰당 야생형 프로모터(WT)나 124 또는 146 위치에 시토신(C)가 티민(T)으로 치환된 돌연변이 프로모터(-124C>T 또는 -146C>T)를 포함하는 TERT 리포터 구성물(TERT reporter construct) 100 ng, pNL1.1.TK 벡터(Promega) 0.25 ng, 하기에 표시한 서열번호 1 및 2로 표시되는 PROX1 siRNA와 0.4 µl의 DharmaFECT™ Duo 형질주입 시약(GE Healthcare, Little Chalfont, UL)

을 처리한 후 암세포주, 특히 간암세포주로 알려진 HepG2 및 Hep3B 각각에 대하여 공-형질주입시켰다. 형질주입 후 48시간이 경과되었을 때 발광효소 분석을 수행하였다. 각 단계는 상기 실시예 2에 개시된 방식을 참고하였으며, 서열번호 2의 PROX1 siRNA에 대한 실험 수행 결과는 도 7에 나타내었다.

[0104]

서열번호 1

[0105]

: CCUAUAACUUGUUAUCAUU

[0106]

(Thermo Fisher scientific assay ID; n331082)

[0107]

서열번호 2

[0108]

: GCUGUAGUGUAUUCACCUA

[0109]

(Thermo Fisher scientific assay ID; n331083)

[0110]

도 7에 나타낸 바와 같이, PROX1의 녹다운으로 Hep3B 및 HepG2 세포주 모두에서 TERT mRNA 발현이 현저하게 억제됨을 확인하였다. 특히, PROX1 녹다운은 야생형 프로모터의 활성뿐만 아니라 -124C>T 및 -146C>T 돌연변이 구조의 강화된 프로모터 활성을 현저하게 억제시킴을 확인하였다.

[0111]

## 5-2. SNU423을 이용한 발광효소 분석을 통한 PROX1의 TERT 유전자의 전사 조절 효과 확인

[0112]

PROX1에 영향을 받지 않는 SNU423 세포주를 이용하여 PROX1의 TERT 유전자의 전사 조절 효과를 보다 분명하게 확인하였다. 구체적으로 96-웰 플레이트(SPL Life Science, Pocheon, Korea) 내에서 웰당 야생형 프로모터(WT)나 124 또는 146 위치에 시토신(C)가 티민(T)으로 치환된 돌연변이 프로모터(-124C>T 또는 -146C>T)를 포함하는 TERT 리포터 구성물(TERT reporter construct) 50 ng, pNL1.1.TK 벡터(Promega) 0.125 ng, pCMV6-PROX1 벡터(RC201140, Origene, Beijing, China)와 0.5  $\mu$ l의 FuGENE® HD 형질주입 시약(Promega)를 처리한 후 SNU423 세포주에 대하여 공-형질주입시켰다. 형질주입 후 48시간이 경과되었을 때 발광효소 분석을 수행하였다. 각 단계는 상기 실시예 2에 개시된 방식을 참고하였으며, 실험 수행 결과는 도 8에 나타내었다.

[0113]

도 8에 나타낸 바와 같이, 과발현된 PROX1에 의하여 야생형 프로모터(WT)의 활성이 약 2.4배 증가함을 확인하였으며, -124C>T 프로모터 및 -146C>T 프로모터에 대해서는 각각 약 4.3배 및 3.5배 정도 활성이 증가함을 확인하였다. 이는 PROX1이 TERT 유전자의 발현에 중요한 전사활성인자이며, 특히 돌연변이 TERT 프로모터에 우선적으로 결합하여 작용함을 나타낸다.

[0114]

## 실시예 6. TERT 프로모터 돌연변이의 임상병리학적 및 진단적 특성 확인

[0115]

### 6-1. B형 간염 바이러스 유래 간암에 대한 TERT 프로모터 돌연변이의 임상병리학적 및 진단적 특성 확인

[0116]

98명의 환자로부터 102 가지의 B형 간염 바이러스 유래 간암을 조사하였고, 이 기술분야에서 일반적으로 사용되는 생거 시퀀싱(sanger sequencing)을 수행하여 TERT 프로모터 영역 내 rs2853669 체세포 돌연변이 발생 및 상태를 확인하였다. 그 결과는 도 9에 나타내었다. 이에 더하여 qRT-PCR 분석을 통하여 99 개의 B형 간염 바이러스 유래 간암에서 TERT 프로모터 및 TERT 발현 내 유전적 변이 사이의 상관관계를 확인하였으며, 그 결과는 도 10에 나타내었다. 분석은 상기 102 가지의 B형 간암 바이러스 유래 간암 시료를 사용한 것 외에는 상기 실험예 4-1에서 개시된 방식과 동일한 방식을 이용하여 수행하였다.

[0117]

도 9에 나타낸 바와 같이, -124C>T 치환이 발생한 돌연변이 TERT 프로모터는 29개(28.4%)의 간암에서 발견되었고, -146C>T 치환은 어떤 암에서도 발견되지 않았다. 5개의 일반적인 간 및 33개의 간경변 상태의 간에서는 TERT 프로모터 돌연변이가 발견되지 않았다. 또한, Rs2853669의 보유자의 변이는 55명의 환자에서 검출되었다(56.1%; TC 이형접합체: 45.9%, CC 동형접합체: 10.2%), 이는 아시아 인구의 1000개의 게놈 데이터베이스 내에서 알려진 비율(52.4%, 285 개체에 이용 가능한 자료)과 비슷하다. 이는 Rs2853669 상태는 B형 간염 바이러스 유래 간암 환자 내 TERT 프로모터 돌연변이의 빈도에 큰 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

[0118]

아울러, 도 10에 나타낸 바와 같이, TERT mRNA 발현은 야생형 TERT 프로모터를 가진 사람보다 돌연변이 TERT 프로모터를 가진 간암 환자에서 보다 현저하게 감소함을 확인하였다( $p=0.0024$ ). 한편, 간암 내 TERT mRNA 수준은 rs2853669의 C 대립유전자 존재(SNP)에 유무에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 상기 실험예 1 내지 4를 통해서 얻은 결과와 반대되는 결과로, 본 발명의 PROX1은 HBV 유전자에 의한 간암인 B형 간염 바이러스 유래 간암 외 다른 간암에서만 유효한 것임을 나타낸다.

[0119]

### 6-2. qRT-PCR 분석을 통한 간암 유형에 따른 TERT 및 PROX1 mRNA 발현 간의 상관관계 확인



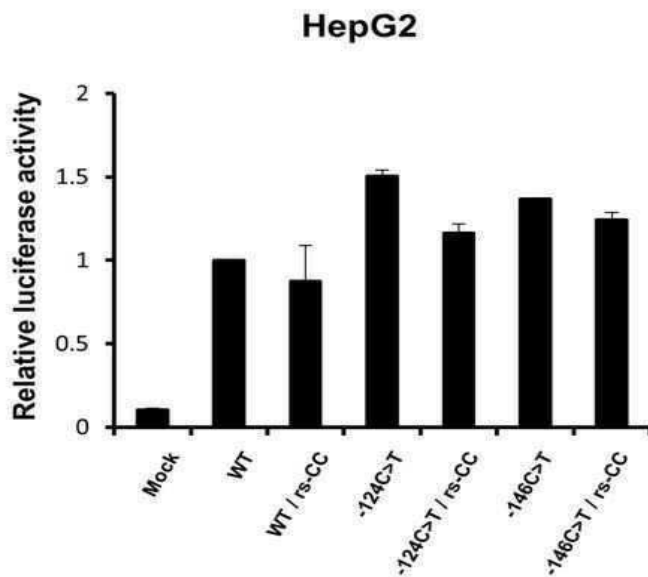
- [0120] qRT-PCR 분석을 통하여 PROX1이 TERT 프로모터 내 전사활성인자로서 TERT의 발현을 증가시키는 현상이 B형 간염 바이러스 유래 간암 외 다른 간암 유형에서 효과를 나타내는 지 여부를 확인하였다. 구체적으로, 비-B형 간염 바이러스 유래 간암(14 C형 간염 바이러스 유래 간암 및 11 알코올성 간암)에 대하여 상기 표 3에 개시된 프라이머를 이용하여 qRT-PCR(Quantitative real-time PCR)을 수행하였다. 그 결과는 도 11에 나타내었다.
- [0121] 도 11a에 나타난 바와 같이, B형 간염 바이러스 유래 간암에서는 TERT와 PROX1 mRNA 발현 사이에 유의적인 상관관계가 존재하지 않음을 확인하였다. 이는 상기 실시예 6-1의 결과와 상응하는 결과이다. 다만, 도 11b에 나타난 바와 같이 비-B형 간염 바이러스 유래 간암에서는 TERT 및 PROX1 mRNA 발현 간에 양의 상관관계가 존재함을 확인하였다. 이는 상기 실시예 3 내지 5에서의 결과와 상응하는 결과이다. 상기 결과들은 PROX1은 간암 중에서도 비-B형 간염 바이러스 유래 간암인 C형 바이러스성 간암 및 알코올성 간암에서 특이적으로 TERT 발현 조절 효과를 가짐을 나타낸다.
- [0122] 종합적으로, 상기 개시한 바와 같이, 일 측면에서 본 발명의 PROX1은 TERT 프로모터, 특히 -124 또는 -146bp 위치에 염기의 치환이 발생한 돌연변이 TERT 프로모터에 결합하여 TERT의 발현을 조절할 수 있고, 간암 중에서도 비-B형 간염 바이러스성 간암 내 TERT의 발현을 특이적으로 억제할 수 있다는 특징이 있다. 이에 본 발명은 TERT의 발현 조절용 조성물, 비-B형 간염 바이러스 유래 간암의 예방 또는 치료용 조성물 등을 포함한 다양한 의생명 분야에서 활용될 수 있다는 이점이 있다.
- [0123] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 제형예를 아래에서 설명하나, 다른 여러 가지 제형으로도 응용 가능하며, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아니라 본 발명을 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0124] **제제예 1. 약학적 제제의 제조**
- [0125] **1-1. 산제 제조**
- [0126] PROX1의 발현 또는 활성 조절제 20mg, 유당 100mg 및 탈트 10mg을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0127] **1-2. 정제 제조**
- [0128] PROX1의 발현 또는 활성 조절제 10mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0129] **1-3. 캡슐제 제조**
- [0130] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 PROX1의 발현 또는 활성 조절제 10mg, 결정성 셀룰로오스 3mg, 락토오스 14.8mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.2mg을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0131] **1-4. 주사제 제조**
- [0132] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1앰플당(2mL) 당귀 PROX1의 발현 또는 활성 조절제 10mg, 만니톨 180mg, 주사용 멸균 증류수 2,974mg 및  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  26mg으로 제조하였다.
- [0133] **1-5. 액제 제조**
- [0134] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 PROX1의 발현 또는 활성 조절제 20mg, 이성화당 10g 및 만니톨 5g을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합하였다. 그 다음 정제수를 더 가하여 전체 100mL로 조절한 후 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.
- [0135] **제제예 2. 식품 제제의 제조**
- [0136] **2-1. 건강식품 제조**
- [0137] PROX1의 발현 또는 활성 조절제 100mg, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg 및 염화마그네슘 24.8mg을 혼합한 다음, 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다. 이때, 상기 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0138] 2-2. 건강음료 제조

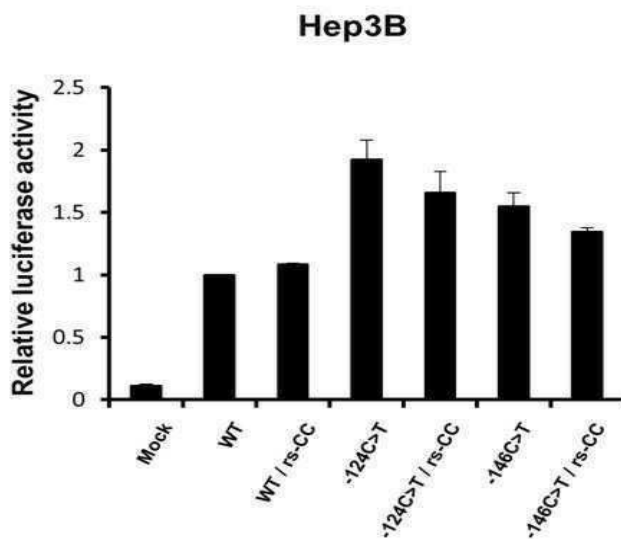
[0139] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 PROX1의 발현 또는 활성 조절제 100mg, 비타민 C 15g, 비타민 E(분말) 100g, 젖산철 19.75g, 산화아연 3.5g, 니코틴산아미드 3.5g, 비타민 A 0.2g, 비타민 B1 0.25g, 비타민 B2 0.3g 및 정량의 물을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하여 건강음료를 제조하였다. 이때, 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

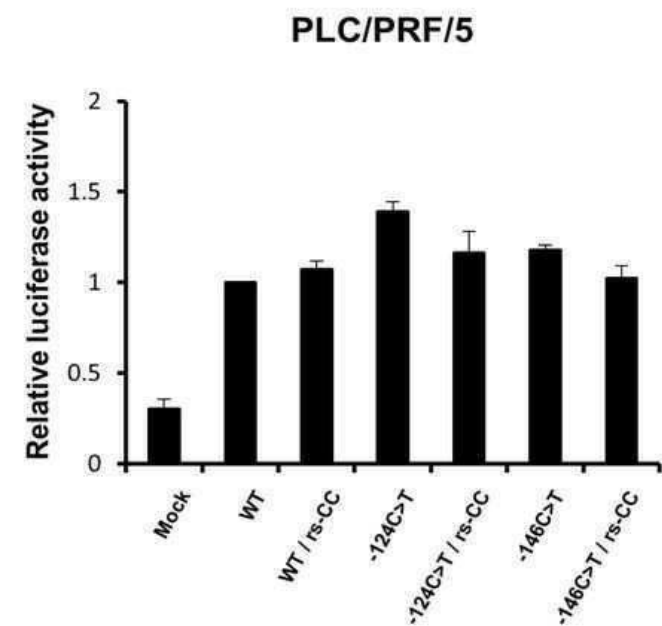
도면1a



도면1b



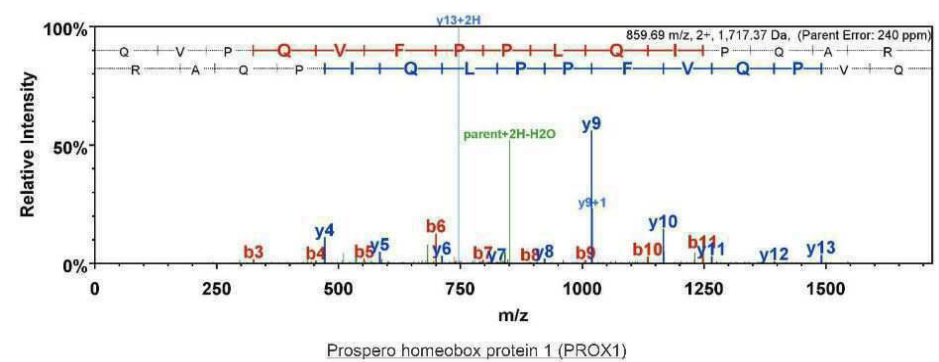
도면1c



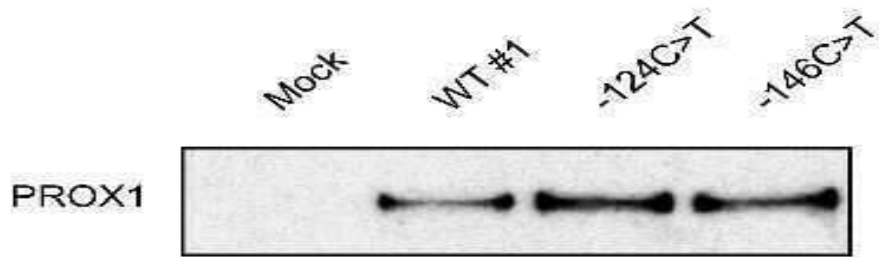
도면2a

Identified Protein Name	R <sub>ic</sub>	
	-124C>T	-146C>T
Prospero homeobox protein 1	3.9	4.3
cDNA FLJ76127, highly similar to Homo sapiens replication factor C (activator 1) 5	3.5	4.3
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	2.3	3.5
Double-strand-break repair protein rad21 homolog	2.2	3.4
Nucleoporin NUP188 homolog	2.2	2.9
Titin, isoform CRA_a	2.2	2.1
SMARCA1 protein	1.8	3.0

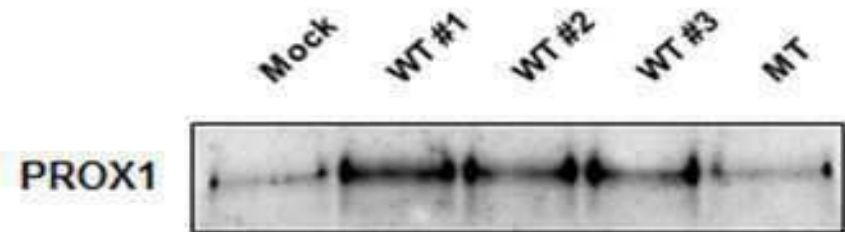
도면2b



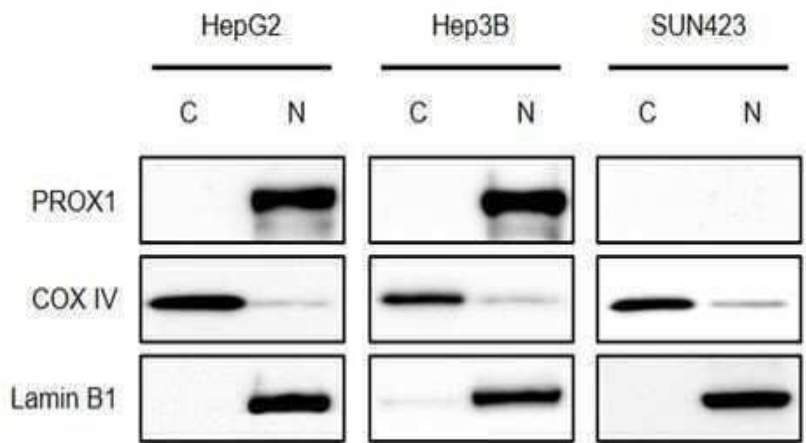
도면3



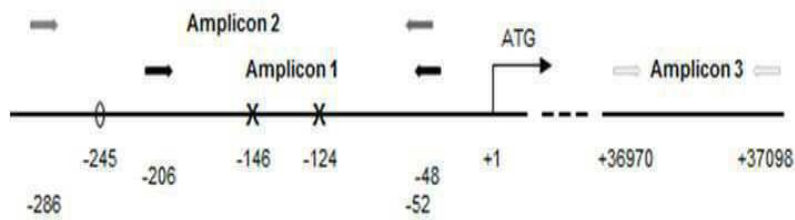
도면4



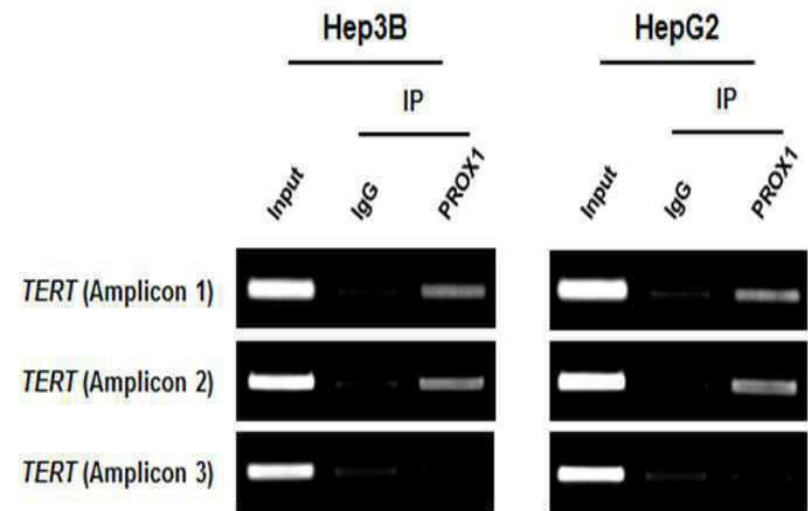
도면5



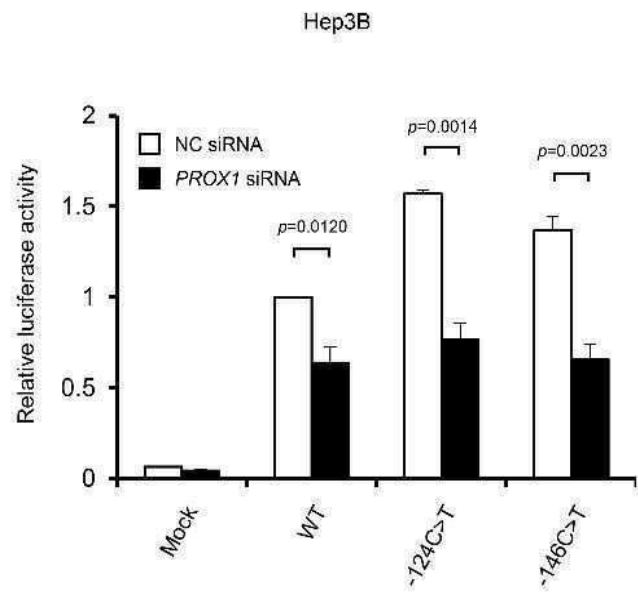
도면6a



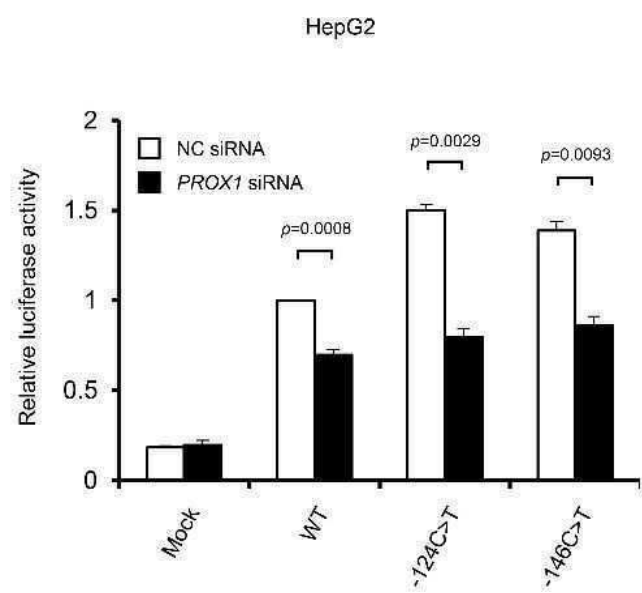
도면6b



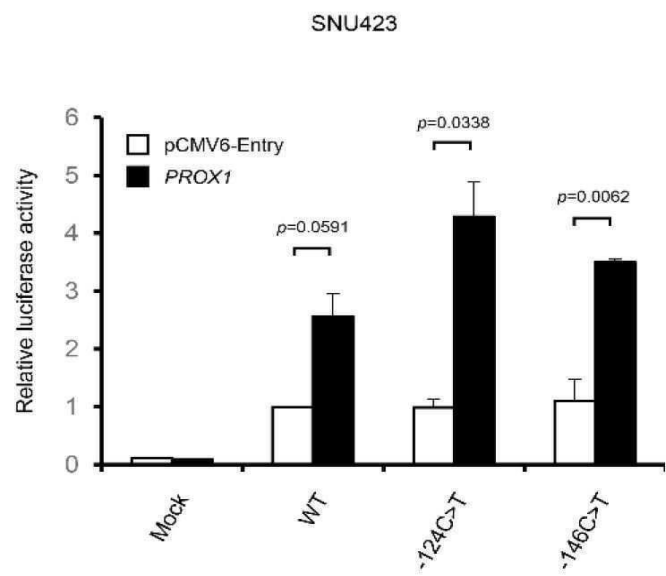
도면7a



도면7b



도면8





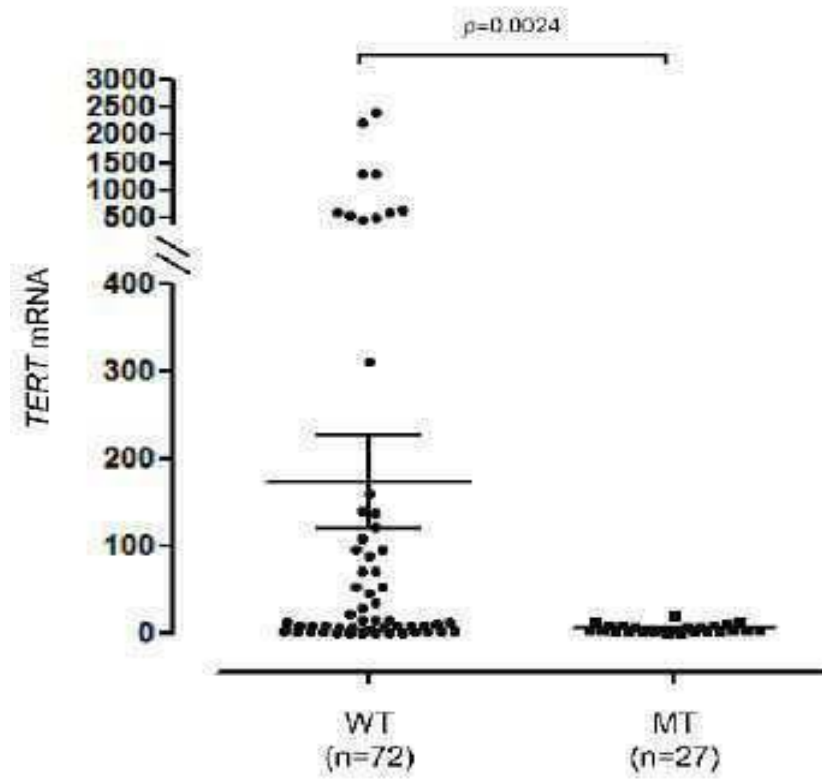
도면9a

Case	-124C>T	-146C>T	rs2853669	IERI	PROXI	GABPa	ETS2	HBv
HCC 1	G>A	WT	CC	12.7	433.7	149.1	2012.0	full
HCC 2	WT	WT	WT	29.1	260.1	143.0	1091.5	ΔC
HCC 3	WT	WT	TC	646.4	261.1	119.8	2007.3	ΔC
HCC 4	G>A	WT	CC	1.9	288.4	125.6	4521.0	ΔC
HCC 5	WT	WT	TC	600.0	289.6	144.5	1883.4	full
HCC 6	G>A	WT	WT	8.6	245.5	174.2	1526.6	ΔC
HCC 7-1	G>A	WT	WT	1.7	338.6	117.1	8038.1	ΔC
HCC 7-2	WT	WT	WT	0.8	162.3	250.4	4261.9	full
HCC 8-1	WT	WT	WT	1299.9	130.7	42.1	1506.8	full
HCC 8-2	G>A	WT	WT	5.5	180.8	85.7	3104.8	full
HCC 9-1	G>A	WT	WT	2.1	164.1	144.0	4096.6	full
HCC 9-2	G>A	WT	WT					
HCC 10	WT	WT	TC	8.7	419.6	195.7	1097.6	ΔC
HCC 11	WT	WT	WT	70.4	87.5	88.7	830.0	full
HCC 12	WT	WT	WT	13.0	205.2	164.7	2293.6	full
HCC 13-1	WT	WT	TC	547.1	211.4	108.3	11163.5	full
HCC 13-2	WT	WT	TC					
HCC 14	G>A	WT	WT					
HCC 15	WT	WT	WT	0.4	70.1	36.4	1959.4	full
HCC 16	WT	WT	TC	69.3	137.1	30.4	2151.3	full
HCC 17	G>A	WT	TC	0.5	66.8	53.1	2016.6	ΔC
HCC 18	WT	WT	WT	15.2	118.6	36.2	3573.8	full
HCC 19	WT	WT	TC	121.0	116.3	80.9	1599.9	full
HCC 20	WT	WT	WT	0.1	161.9	40.8	2080.8	ΔC
HCC 21	WT	WT	TC	0.7	459.0	271.8	1342.8	full
HCC 22	G>A	WT	WT	0.0	122.6	39.1	2745.0	full
HCC 23	WT	WT	WT	6.0	104.5	63.8	694.6	full
HCC 24	WT	WT	TC	8.9	199.5	31.9	708.0	ΔC
HCC 25	WT	WT	WT	34.1	797.9	105.8	1423.1	ΔC
HCC 26	WT	WT	WT	1.6	42.4	20.8	465.3	full
HCC 27	G>A	WT	TC	0.4	189.8	54.0	3210.6	ΔC
HCC 28	WT	WT	WT	14.5	197.6	20.6	2549.2	ΔC
HCC 29	WT	WT	WT	136.3	234.8	83.0	2349.7	full
HCC 30	WT	WT	TC	0.7	270.6	119.9	1627.5	ΔC
HCC 31	WT	WT	TC	1.1	238.3	62.0	834.5	ΔC
HCC 32	WT	WT	CC	4.2	345.9	35.0	816.1	full
HCC 33	WT	WT	TC	0.1	253.0	57.9	815.9	ΔC
HCC 34	WT	WT	WT	8.5	296.5	55.6	639.5	ΔC
HCC 35	WT	WT	TC	1.5	256.3	49.6	648.4	ΔC
HCC 36	WT	WT	WT	1309.1	528.1	137.4	452.7	full
HCC 37	WT	WT	WT	1.1	111.7	24.6	647.1	full
HCC 38	WT	WT	WT	94.5	284.0	122.7	301.0	ΔC
HCC 39	WT	WT	WT	87.6	262.7	89.8	635.9	full
HCC 40	WT	WT	TC	0.6	275.7	63.5	1431.3	ΔC
HCC 41	WT	WT	TC	0.6	227.6	50.4	161.3	ΔC
HCC 42	WT	WT	TC	108.9	302.0	39.8	355.4	full
HCC 43	WT	WT	TC	2.2	286.2	87.2	526.8	full
HCC 44	WT	WT	TC	0.2	651.9	160.9	723.7	full
HCC 45	WT	WT	WT	0.9	437.8	88.7	454.5	ΔC
HCC 46	WT	WT	TC	94.5	195.1	61.2	1531.6	ΔC
HCC 47	G>A	WT	TC	2.0	228.7	25.0	496.8	full

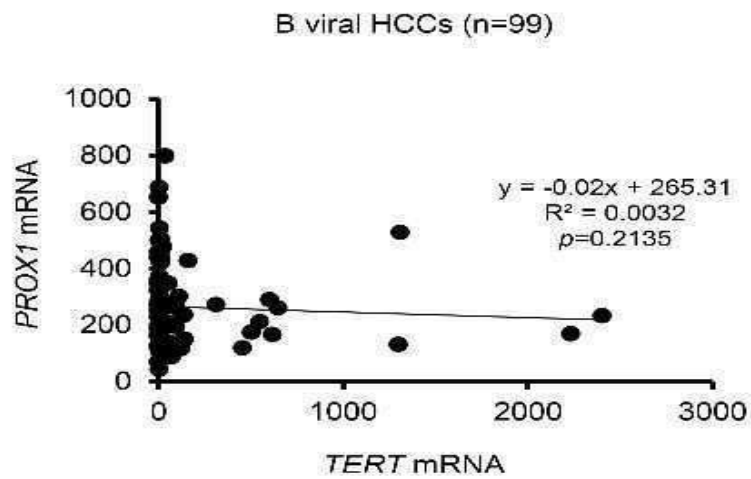
도면9b

Case	-124C>T	-146C>T	rs2853669	IER1	PRONI	GABPa	ETS2	HBx
HCC 48	WT	WT	TC	1.6	267.2	45.5	1154.1	full
HCC 49	WT	WT	TC	9.2	495.3	90.6	1184.9	full
HCC 50	G>A	WT	CC	2.3	240.1	119.3	681.9	full
HCC 51	G>A	WT	WT	3.6	252.8	58.6	293.6	ΔC
HCC 52	WT	WT	TC	139.6	149.7	25.9	367.0	full
HCC 53	WT	WT	TC	311.4	271.9	73.2	307.0	ΔC
HCC 54	WT	WT	WT	15.7	467.2	62.7	256.2	full
HCC 55	WT	WT	WT	8.2	258.2	62.5	465.7	ΔC
HCC 56	WT	WT	TC	12.1	289.2	46.2	440.3	ΔC
HCC 57	WT	WT	CC	6.6	260.3	42.2	581.0	full
HCC 58	G>A	WT	TC	3.0	277.6	43.5	488.6	full
HCC 59	WT	WT	TC	453.4	118.9	49.7	1068.7	full
HCC 60	WT	WT	WT	160.1	428.1	64.2	788.3	full
HCC 61	G>A	WT	WT	9.8	188.4	45.5	426.1	ΔC
HCC 62	G>A	WT	TC	8.0	115.6	206.7	1150.9	full
HCC 63	WT	WT	TC	1.6	253.9	30.3	365.6	ΔC
HCC 64	G>A	WT	WT	20.3	206.8	67.4	313.1	ΔC
HCC 65	WT	WT	WT	2.5	192.4	90.3	419.4	ΔC
HCC 66	WT	WT	WT	3.9	163.9	18.1	92.6	ΔC
HCC 67	WT	WT	CC	45.6	197.3	65.6	886.8	ΔC
HCC 68	WT	WT	TC	501.0	173.9	42.7	354.4	ΔC
HCC 69	G>A	WT	WT	2.7	271.0	40.1	412.3	ΔC
HCC 70	WT	WT	TC	617.4	166.3	57.6	611.4	full
HCC 71	G>A	WT	TC	7.6	169.3	46.2	472.5	ΔC
HCC 72	WT	WT	TC	0.4	127.7	56.2	370.7	full
HCC 73	G>A	WT	WT	11.7	152.2	26.0	297.9	full
HCC 74	WT	WT	CC	53.2	207.0	93.7	1329.4	ΔC
HCC 75	WT	WT	TC	1.3	178.8	109.5	1006.8	ΔC
HCC 76	WT	WT	CC	2232.7	168.6	53.6	537.1	ΔC
HCC 77	WT	WT	WT	3.5	372.7	90.8	370.4	ΔC
HCC 78	G>A	WT	CC	2.6	169.5	27.1	379.6	full
HCC 79	G>A	WT	WT	2.7	257.5	30.7	273.9	ΔC
HCC 80	G>A	WT	TC	5.5	321.1	75.8	825.7	full
HCC 81	G>A	WT	TC	2.7	499.3	133.7	519.4	ΔC
HCC 82	WT	WT	TC	10.5	504.6	117.7	888.1	full
HCC 83	WT	WT	WT	21.5	477.2	80.7	930.1	full
HCC 84	WT	WT	TC	3.3	687.7	104.4	407.0	ΔC
HCC 85	G>A	WT	WT	2.1	171.2	64.6	465.4	full
HCC 86	WT	WT	WT	6.1	274.7	36.0	235.8	ΔC
HCC 87	WT	WT	CC	2401.4	232.2	102.9	346.3	ΔC
HCC 88	WT	WT	TC	8.0	348.3	69.5	679.8	full
HCC 89	G>A	WT	WT	5.8	543.1	145.6	1203.9	full
HCC 90	G>A	WT	TC	4.4	207.8	67.5	727.8	ΔC
HCC 91	WT	WT	TC	2.0	123.1	35.3	395.5	ΔC
HCC 92	WT	WT	TC	0.3	322.4	42.8	524.9	full
HCC 93	WT	WT	WT	53.4	348.2	118.9	428.0	ΔC
HCC 94	WT	WT	TC	3.6	229.8	66.2	2111.5	ΔC
HCC 95	WT	WT	WT	0.0	349.3	86.2	1063.7	ΔC
HCC 96	G>A	WT	WT	4.8	173.9	18.5	161.8	full
HCC 97	WT	WT	WT	4.8	180.6	61.5	1008.8	full
HCC 98	WT	WT	TC	0.0	360.3	50.9	1518.4	ΔC

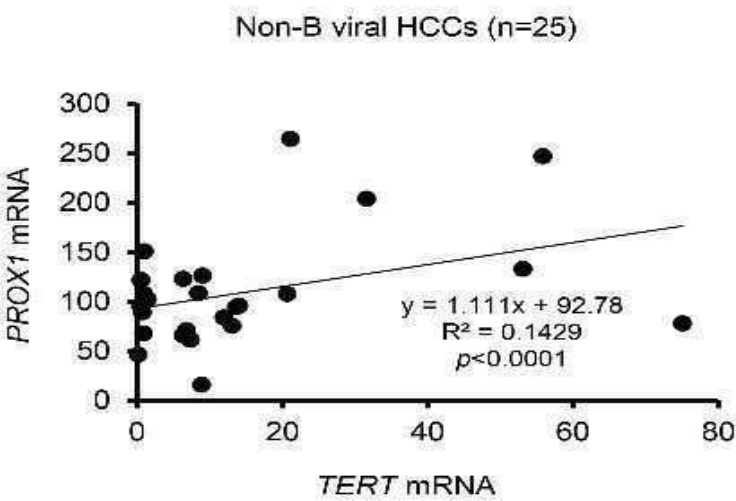
도면10



도면11a



도면11b



서열 목록

- <110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A composition for regulating expression or activity of telomerase reverse transcriptase comprising expression or activity regulators of PROX1 and a method for screening telomerase reverse transcriptase inhibitors
- <130> 17P483IND
- <160> 15
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- 
- <220><223> PROX1 siRNA
- <400> 1
- ccuauaacuu guuaucauu
- <210> 2
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PROX1 siRNA

<400>	2	
gcuguagugu auucaccua		19
<210>	3	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	consensus ETS/TCF binding site	
<400>	3	
ccggaa		6
<210>	4	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	wild-type(WT#1) oligo for TERT promoter	
<400>	4	
gaccctccc gggccccgg ccagcccc tccgggcct c		41
<210>	5	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	-124 C>T oligo for TERT promoter	
<400>	5	
gaccctccc gggccccgg ccagccct tccgggcct c		41
<210>	6	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	-126 C>T oligo for TERT promoter	
<400>	6	
gacccttcc gggccccgg ccagcccc tccgggcct c		41
<210>	7	
<211>	18	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> wild-type(WT#2) oligo for TERT promoter

<400> 7

agccccctcc gggccctc 18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> wild-type(WT#3) oligo for TERT promoter

<400> 8

gaccctccc gggtcccc 18

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutant(MT) oligo for TERT promoter

<400> 9

gaccctcgc gcgtccccgg ccagcccc gtcgcgcct c 41

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TERT amplicon 1\_Forward

<400> 10

ctgccccttc accttcag 19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TERT amplicon 1\_Reverse

<400> 11

agcgctgcct gaaactcg 18

<210> 12



<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TERT amplicon 2_Forward	
<400>	12	
	ctcccagtgg attcgcg	18
<210>	13	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TERT amplicon 2_Reverse	
<400>	13	
	ctgcctgaaa ctgcgcc	18
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TERT amplicon 3_Forward	
<400>	14	
	attcgccatt gttcacccct	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TERT amplicon 3_Reverse	
<400>	15	
	ctgtgtacag ggcacacctt	20