



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월27일
(11) 등록번호 10-2138131
(24) 등록일자 2020년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6881 (2018.01) C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6881 (2018.05)
C07K 16/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0089601
(22) 출원일자 2018년07월31일
심사청구일자 2018년08월02일
(65) 공개번호 10-2019-0095074
(43) 공개일자 2019년08월14일
(30) 우선권주장
1020180014741 2018년02월06일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR101492436 B1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
강석구
경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6114동
601호 (이의동, 이편한세상광교)
이정호
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

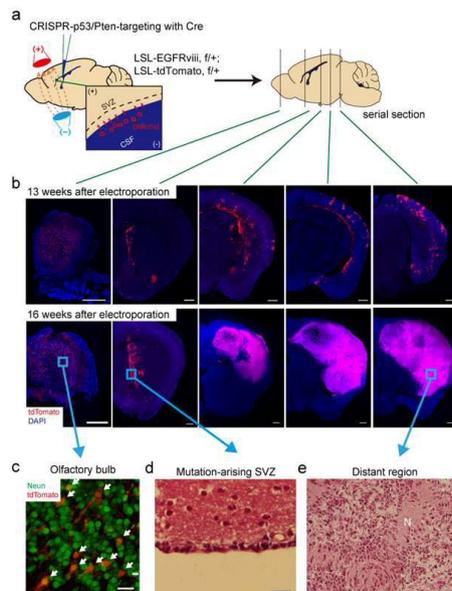
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **뇌 종양 동물 모델 및 이의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 암 유전자 돌연변이를 확인하여 원발부위 불명 뇌 종양의 조직 기원을 예측하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 목적하는 개체의 뇌실하 영역(subventricular zone) 조직과 뇌 종양 조직에 대하여 TERT 1,295,228 C>T(C228T) 및 TERT 1,295,250 C>T(C250T) 중 적어도 하나의 돌연변이의 발현 수준을 측정할 수 있는 방법(뒷면에 계속)

대표도 - 도20



뇌실하 영역 조직과 상기 뇌 종양 조직에서 상기 돌연변이를 공유하고, 상기 뇌실하 영역 조직에서의 상기 돌연변이의 발현 수준이 상기 뇌 종양 조직에서 상기 돌연변이의 발현 수준 보다 낮은 경우, 상기 뇌 종양의 조직 기원은 뇌실하 영역 유래인 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 뇌 종양의 조직 기원을 예측하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 뇌실하 영역(Subventricular Zone; SVZ)과 뇌 종양 조직의 암 유전자 돌연변이의 발현 수준을 비교하여 원발부위 불명 뇌 종양의 조직 기원을 예측할 수 있고, 이에 따라 상기 뇌 종양의 치료 효과를 극대화시킬 수 있는 치료 타겟 부위를 결정하여 적절한 치료 전략을 수립할 수 있도록 한다.

본 발명은 인간 환자에서의 현상을 그대로 반영한 뇌종양 동물 모델 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 p53, Pten, 및 EGFR 유전자에 돌연변이가 도입된 뇌종양 동물 모델과 상기 동물 모델을 이용한 뇌종양 치료제의 스크리닝 방법 및 상기 동물 모델의 제조 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/30 (2013.01)

C07K 16/40 (2013.01)

C12Q 1/6886 (2018.05)

C12Q 2537/16 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

이주호

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)

이정은

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)

(56) 선행기술조사문헌

JP2009523709 A

US20100100974 A1

NCBI, Genbank accession no. JN964617.1

NCBI, Genbank accession no. KX421108.1

KR1020180024262 A

- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 NRF-2013R1A1A2055597
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 기본연구지원사업
 연구과제명 뇌실하 영역에서 새로운 교종암줄기세포 분리 및 차세대 염기서열 분석을 이용한 교모세포
 종 뇌실하 영역의 새로운 actionable alteration 발굴
 기여율 1/7
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 HI14C0042
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 한국보건산업진흥원-질병중심중개연구(중점연구)
 연구과제명 교모세포종 중앙미세환경 어레이 틀을 이용한 미세환경 규명 및 기질-억제 조절 물질 발굴
 기여율 1/7
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2014.06.01 ~ 2017.05.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 HI16C0415010016
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 질환극복기술개발사업
 연구과제명 약물 저항성 뇌전증 환자에서 뇌유전체 연구(2016)
 기여율 1/7
 주관기관 한국과학기술원
 연구기간 2016.04.01 ~ 2017.03.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 NRF-2016R1D1A1A09916521
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 기본연구지원사업(후속연구지원)
 연구과제명 다른 공간적 적소에서 분리된 기질간엽세포에 의한 고등급 교종 암세포 침윤 증가와 세포
 외 기질 재형성 조절 기전 발굴 및 치료 저항성 획득 기전 발굴
 기여율 1/7
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 NRF-2017M2A2A7A01071036
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 원자력연구개발사업-방사선기술개발사업
 연구과제명 방사선치료 저항성 극복을 위한 암 생체에너지 대사 조절 병용 교모세포종 치료 기술 개발
 기여율 1/7
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2017.09.21 ~ 2020.02.29
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 HI17C2586
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 한국보건산업진흥원-질병중심중개연구(중점연구)

연구과제명 에너지대사 조절을 활용한 악성 신경교종 치료제 개발
 기 여 율 1/7
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2017.12.21 ~ 2020.09.30
 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 HI16C0415
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 한국보건산업진흥원-질병중심중개연구(중점연구)
 연구과제명 약물 저항성 뇌전증 환자에서 뇌유전체 연구
 기 여 율 1/7
 주관기관 한국과학기술원
 연구기간 2016.04.01 ~ 2019.03.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

엑손 2 내지 7이 결실된 변이 EGFR 유전자를 가지며, p53 및 Pten 유전자가 뇌실하영역의 신경줄기세포 특이적으로 녹아아웃된 형질전환 신경교종 동물로서, 상기 뇌실하영역의 신경줄기세포 부위는 정상 세포구조를 가지고, 상기 뇌실하영역으로부터 등측면 방향으로 이격된 피질 영역에 신경교종이 발생하며, 상기 신경교종은 GFAP 양성 신경줄기세포로부터 발생한 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한, 신경교종을 갖는 형질전환 동물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 동물은 마우스인 것인, 동물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신경교종은, 종양 조직에 대하여 괴사, 미세혈관 증식 및 유사분열 등의 특징을 가지는 고등급의 신경교종이고, GFAP, Nestin, Olig2, 및 PDGFR α에 대해 면역 반응성을 가지는 것인, 형질전환 신경교종 동물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 형질전환 동물은 신경교종 발생 후에도 뇌실하영역의 신경줄기세포 특이적 녹아아웃 변이가 유지되고 있는 것인, 형질전환 신경교종 동물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 p53 유전자는 서열번호 38 내지 40 중 어느 하나의 서열을 포함하고, Pten 유전자는 서열번호 41 내지 43 중 어느 하나의 서열을 포함하는 것인, 형질전환 신경교종 동물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 신경교종이 유도된, 인간을 제외한 형질전환 신경교종 동물에, 뇌종양 치료 후보물질을 투여한 후 뇌종양 경감 또는 치료 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 뇌종양 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 뇌종양의 경감 또는 치료 여부를 확인하는 단계는 NeuN, nestin, GFAP, Olig2, S100b, MBP 및 Ki67로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 마커의 유전자 발현량 또는 단백질의 활성 수준을 측정하여 이루어지는 것인, 뇌종양 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 9

피질 영역에 신경교종을 갖는 형질전환 동물을 제조하는 방법으로서,

- (a) 엑손 2 내지 7이 결실된 변이 EGFR 유전자를 갖는 동물을 준비하는 단계;
- (b) p53 및 Pten을 녹아아웃하는 벡터를 준비하는 단계; 및
- (c) 상기 (b)단계에서 제조된 벡터를 (a)단계에서 제조된 동물의 뇌실하영역에 전기천공법을 이용하여 주입하는 단계;

를 포함하는, 인간을 제외한, 신경교종을 갖는 형질전환 동물의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 (b)단계의 녹아웃 벡터는 CRISPR/Cas9 벡터인 것을 특징으로 하는, 동물의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 CRISPR/Cas9 벡터는 p53을 타게팅하는 sgRNA 및 Pten을 타게팅하는 sgRNA를 포함하는 것인, 동물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 p53을 타게팅하는 sgRNA는 서열번호 29인 것인, 동물의 제조 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 Pten을 타게팅하는 sgRNA는 서열번호 30인 것인, 동물의 제조 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 동물은 마우스인 것인, 동물의 제조방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 뇌종양은 교모세포종인 것인, 신경교종 동물의 제조 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제
- 청구항 37
- 삭제
- 청구항 38
- 삭제
- 청구항 39
- 삭제
- 청구항 40
- 삭제
- 청구항 41
- 삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 암 유전자 돌연변이의 발현 수준을 확인하여 원발부위 불명 뇌 종양의 조직 기원을 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [0002] 본 발명은 신경교종을 갖는 형질전환 동물 및 상기 동물의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 신경교종(glioma)은 원발성 뇌 종양(primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서, 발생 빈도가 높고 치료가 어려워, 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 악성 종양에 해당한다. 그 중 가장 악성으로 분류되고 있는 교모세포종(glioblastoma, GBM)의 경우, 다른 암과 비교하였을 때 방사선 및 항암제 치료에 대한 저항성이 매우 높아 일단 진단되면 생존기간이 1년에 불과하므로, 각 환자의 발생 기원과 과정에 대한 적절한 진단 및 이해가 중요하다.
- [0004] 또한, 상기 뇌 종양의 경우, 뇌혈관 장벽(Brain Blood Barrier)이 존재하기 때문에 치료를 위한 약물 전달이 목적하는 뇌 부위로 전달되기 어려울 뿐만 아니라, 상대적으로 뇌신경 생물학에 대한 이해가 부족하여 치료제 개발이 활발하지 못한 것이 현실이다. 더욱이, 교모세포종은 다른 뇌 종양과 비교해볼 때 공격적 변이(aggressive variant)를 나타내어, 이를 빠른 시일 내에 치료하지 않으면 몇 주 이내에 치명적인 결과를 초래할 수 있다.
- [0005] 따라서, 교모세포종의 치료에는 외과적 처치 이외에 방사선 치료 및 화학 약물 치료가 함께 수행되고 있으나, 상기 치료는 내성 변이의 발생, 종양줄기세포에 의한 재발 등의 원인으로 인하여 완벽한 치료법이 없다. 따라서, 발생 기원에 대한 초기 진단과 이해 및 그에 기반한 새로운 치료법을 개발하여야 할 필요성이 요구되고 있는 실정이다.
- [0006] 이러한 치료법의 개발을 위해 인간 환자에서의 현상을 그대로 반영할 수 있는 동물 모델 개발의 필요성이 시급하다. 이러한 동물 모델의 연구는 뇌종양의 기전을 정확히 알아내고, 다양한 새로운 치료 표적 및 새로운 치료법의 효과 검증에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 일 목적은 뇌실하 영역(subventricular zone, SVZ)에서 암 유전자(oncogene) 돌연변이 발현 수준과

뇌 종양 조직에서 암 유전자 돌연변이의 발현 수준을 비교하여 뇌 종양의 조직 기원을 예측하는 방법에 관한 것이다.

- [0008] 본 발명의 다른 목적은 뇌 종양의 조직 기원을 예측하여 뇌 종양을 효과적으로 치료할 수 있는 타겟 부위를 결정하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 신경교종을 갖는 형질전환 동물, 더욱 자세하게는 뇌실하영역의 신경줄기세포 특이적으로 p53, Pten, 및 EGFR 돌연변이를 가지는 뇌 종양 모델 동물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.
- [0010] 본 발명의 추가 목적은 뇌 종양 모델 동물을 이용한 후보 약물의 효능을 시험하여 치료제를 스크리닝 하는, 뇌 종양 동물 모델의 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 암 유전자 돌연변이를 확인하여 원발부위 불명 뇌 종양의 조직 기원을 예측하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 목적하는 개체의 뇌실하 영역(subventricular zone) 조직과 뇌 종양 조직에 대하여 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 돌연변이의 발현 수준을 측정된 뒤 상기 뇌실하 영역 조직과 상기 뇌 종양 조직에서 상기 돌연변이를 공유하고, 상기 뇌실하 영역 조직에서의 상기 돌연변이의 발현 수준이 상기 뇌 종양 조직에서 상기 돌연변이의 발현 수준 보다 낮은 경우, 상기 뇌 종양의 조직 기원은 뇌실하 영역 유래인 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 뇌 종양의 조직 기원을 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명은 인간 환자에서의 현상을 그대로 반영한 뇌종양 동물 모델 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 p53, Pten, 및 EGFR 유전자에 돌연변이가 도입된 뇌종양 동물 모델과 상기 동물 모델을 이용한 뇌종양 치료제의 스크리닝 방법 및 상기 동물 모델의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명은 뇌실하 영역(Subventricular Zone; SVZ)과 뇌 종양 조직의 암 유전자 돌연변이의 발현 수준을 비교하여 원발부위 불명 뇌 종양의 조직 기원을 예측할 수 있고, 이에 따라 상기 뇌 종양의 치료 효과를 극대화시킬 수 있는 치료 타겟 부위를 결정하여 적절한 치료 전략을 수립할 수 있도록 한다.
- [0014] 교모세포종(Glioblastoma, GBM)은 난치성 뇌 종양의 일종으로, 진단 후 평균 총 생존기간이 15개월 정도에 불과하다. GBM을 일으키는 돌연변이를 가지는 기원 세포를 확인함으로써 GBM 질환의 진행을 이해하고 새로운 치료법 개발을 위해 한발짝 더 나아갈 수 있다. 체세포 돌연변이의 축적으로 인하여 신경교종발생(gliomagenesis)이 일어날 수 있으며, 특히 성인 뇌의 뇌실하 영역에서 자가-재생 및 증식능을 가지는 신경 줄기 세포(neural stem cells, NSCs)는 GBM을 발생시키는 세포가 될 수 있다. 하지만 현재까지는 이에 대하여 유전적 증거에 기반하여 설명한 바가 없다.
- [0015] 이에 본 발명자들은 인간 뇌 조직과 게놈 변형된 마우스 모델을 이용하여, 뇌실하 영역에서 정상교세포-유사 신경 줄기 세포(astrocyte-like NSCs)가 인간 IDH-야생형(IDH-wildtype) GBM을 일으키는 돌연변이를 가지는 기원 세포임을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예는,
- [0018] (a) 목적하는 개체의 뇌실하 영역(subventricular zone) 조직으로부터 TERT(Telomerase reverse transcriptase) 1,295,228 C>T(TERT C228T) 및 TERT 1,295,250 C>T(TERT C250T) 중 적어도 하나의 변이 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0019] (b) 목적하는 개체의 뇌 종양 조직으로부터 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 변이 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0020] (c) 상기 뇌실하 영역 조직과 상기 뇌 종양 조직에서 상기 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 변이 유전자를 공유하고, 본 발명의 일예는 TERT C228T) 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 변이 유전자는, 상기 뇌실하 영역 조직에서 측정된 발현 수준이, 뇌 종양 조직에 대하여 측정된 발현 수준 보다 낮은 경우, 상기 뇌 종양의 조직 기원은 뇌실하 영역 유래인 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 뇌 종양의 조직 기원을 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, (a) 목적하는 개체의 뇌실하 영역(subventricular zone) 조직으로부터 TERT(Telomerase reverse transcriptase) 1,295,228 C>T(C228T) 및 TERT 1,295,250 C>T(TERT C250T) 중 적어도 하나의 변이 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;

- [0022] (b) 목적하는 개체의 뇌 종양 조직으로부터 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 변이 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0023] (c) 상기 뇌실하 영역 조직과 상기 뇌 종양 조직에서 상기 변이 유전자를 공유하고, 상기 뇌실하 영역 조직에 대하여 측정된 상기 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 변이 유전자의 발현 수준이 상기 뇌 종양 조직에 대하여 측정된 상기 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 변이 유전자의 발현 수준 보다 낮은 경우, 상기 뇌 종양의 조직 기원은 뇌실하 영역 유래인 것으로 예측하는 단계; 및
- [0024] (d) 상기 뇌실하 영역을 치료용 타겟 부위로 결정하는 단계를 포함하는, 뇌 종양의 치료용 타겟 부위를 결정하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명에서 상기 "치료용 타겟 부위"라 함은 뇌 종양이 효과적으로 치료될 수 있도록 방사선, 화학, 또는 면역 등의 항암 치료가 집중 적용될 수 있는 부위 또는 세포를 의미하는 것이다.
- [0026] 본 발명에서는 상기 뇌실하 영역 조직과 상기 뇌 종양 조직에 대하여 변이유전자는 TERT C228T 및 TERT C250T 외에, EGFR(Epidermal growth factor receptor) 돌연변이, TP53(Tumor protein p53) 돌연변이, PTEN(Phosphatase and tensin homolog) 돌연변이, 및 Rb1(Retinoblastoma 1) 돌연변이로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상의 변이 유전자의 발현 수준을 추가로 측정할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 상기 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이, 및 Rb1 돌연변이의 발현 수준의 측정은 상기 돌연변이 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정일 수 있으며, 바람직하게는 변종 대립 유전자의 빈도(variant allele frequency, VAF) 또는 복제수 변이(copy number variation; CNV)를 측정할 수 있다. 본 발명에서는 상기 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이의 변종 대립 유전자의 빈도를 측정하고, 상기 EGFR 돌연변이의 복제수 변이를 측정할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 뇌 종양이 발병하였거나 그 발병이 의심되는 환자로, 뇌 종양의 적절한 치료가 필요하거나 예상되는 환자를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서 상기 조직 기원을 예측하는 대상이 되는 "뇌 종양"은 신경교종(glioma)일 수 있고, 보다 바람직하게는 교모세포종(glioblastoma)일 수 있으며, 가장 바람직하게는 이소시트레이트 디하이드로제네이스(isocitrate dehydrogenase, IDH)-야생형의 1차 교모세포종(primary glioblastoma)일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 상기 "교모세포종(glioblastoma; GBM)" 이란, 뇌 척수 조직이나 이를 싸고 있는 막 영역으로부터 발생하는 원발성 종양으로, 정상적으로 뇌조직에 풍부하게 존재하고 있는 신경교세포(neuroglia cell)에서 시작된 종양이다. 본 발명에서 상기 교모세포종의 대다수(>90%)는 이전에 전구 질환(precursor disease)이 없이 새로이 발생하는 1차 종양에 해당하는 반면, 2차 교모세포종(secondary glioblastoma)은 흔하지 않은 질환으로 저등급 성상세포종(low-grade astrocytoma)에서 진행되어 발병할 수 있다. 대부분의 2차 교모세포종은 IDH 돌연변이를 가지고 있지만, 이러한 IDH 돌연변이는 1차 교모세포종에서는 거의 존재하지 않는다.
- [0032] 본 발명에서 상기 "뇌실하 영역(subventricular zone)"이란, 측뇌실(lateral ventricle)의 측벽(lateral wall)에 뇌실막층과 거의 맞닿은 곳에 위치하는 영역으로, 증식하는 세포들은 뇌실하 영역에 많이 모여 있을 뿐만 아니라, 다양한 성숙단계에 있는 다양한 종류의 신경계열 세포들로 구성되어 있다는 특징이 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 목적하는 개체로부터 분리되는 상기 뇌실하 영역 조직과 뇌 종양 조직은 서로 1 내지 40 mm, 3 내지 35 mm, 또는 5 내지 30 mm의 거리가 이격된 위치에 존재할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 또한, 본 발명에서 상기 목적하는 개체로부터 분리되는 뇌실하 영역 조직은, 뇌실하 영역의 임의의 부위로부터 분리될 수 있지만, 바람직하게는 뇌실하 영역을 이루는 성상교세포 대(astrocytic ribbon)로부터 분리될 수 있고, 보다 바람직하게는 상기 성상교세포 대의 성상교세포-유사 신경 줄기 세포(astrocyte-like neural stem cells)을 포함하는 것이, 조직 기원의 예측 정확도를 높임에 있어 바람직하다.
- [0036] 본 발명에서 상기 뇌실하 영역 조직과 상기 뇌 종양 조직이 준비되면, 각 조직에 대하여 종양 유발 돌연변이인 TERT 프로모터 돌연변이로, TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 돌연변이, 바람직하게는 TERT C228T 돌연변이의 발현 수준을 측정할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 상기 "TERT 1,295,228 C>T(C228T)" 및 "TERT 1,295,250 C>T(C250T)"는, 멜라노마-프론(melanoma-prone) 패밀리어서 TERT(telomerase reverse transcriptase) 유전자의 프로모터 부위에 발생한 돌연변이로, 특히 TERT 유전자의 프로모터의 체세포 돌연변이가 높은 빈도로 관찰되는 부분인 C228T 및 C250T를 의미한다

(Science 339(6122): 959-9). 구체적으로, 본 발명에서 상기 TERT C228T는 TERT의 ATG 시작 부위로부터 124 bp 업스트림(upstream)의 뉴클레오타이드 C가 T로 변이된 것으로, 'c.-124C>T'로도 나타낼 수 있다. 또한, 상기 TERT C250T는 TERT의 ATG 시작 부위로부터 146 bp 업스트림의 뉴클레오타이드 C가 T로 변이된 것으로, 'c.-146C>T'로 나타낼 수 있다.

- [0039] 본 발명에서 상기 TERT C228T 및/또는 TERT C250T 돌연변이의 발현 수준의 측정은 상기 돌연변이가 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정일 수 있으며, 바람직하게는 변종 대립 유전자의 빈도(variant allele frequency, VAF)를 측정할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 상기 "변종 대립 유전자의 빈도(variant allele frequency, VAF)"란 조직의 표적 부위에서 변종, 예를 들어, 돌연변이의 대립 유전자 빈도를 의미하는 것이며, 상기 "대립 유전자의 빈도(allele frequency)"란 표적 부위에서 대립 유전자의 상대적 빈도를 나타내는 것이며 %로 나타낼 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 TERT C228T 및/또는 TERT C250T 돌연변이의 변종 대립 유전자의 빈도는 DNA-서열(DNA-sequencing) 분석에 의해 수행될 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 돌연변이에 특이적인 프라이머를 사용하여 200 내지 350 bp의 표적 부위를 PCR로 증폭시킨 뒤 상기 TERT C228T 및/또는 TERT C250T 돌연변이의 대립 유전자의 상대적 빈도(%)를 측정하며 수행할 수 있다. 이때, 상기 PCR은 이에 제한되는 것은 아니지만, 예를 들면, 서열번호 1로 표시되는 정방향 프라이머와 서열번호 2로 표시되는 역방향 프라이머를 사용하며 수행될 수 있다.
- [0042] 바람직하게는, 본 발명에서 마이크로 RNA 폴리뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 생성물의 생성 여부를 통해 질병의 발병 여부를 예측할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 상기와 같이 뇌실하 영역 조직과 뇌 종양 조직 각각에 대하여 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 돌연변이에 대하여 변종 대립 유전자의 빈도를 측정된 뒤, 그 결과 상기 뇌실하 영역 조직과 상기 뇌 종양 조직 모두에서 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 동일한 돌연변이가 공유되며, 상기 적어도 하나의 돌연변이의 변종 대립 유전자의 빈도가, 뇌실하 영역 조직의 측정치가 상기 뇌 종양 조직의 측정치보다 작은 경우, 상기 뇌 종양 조직은 상기 뇌실하 영역, 바람직하게는 상기 뇌실하 영역의 정상교세포 대, 보다 바람직하게는 상기 정상교세포 대의 정상교세포-유사 줄기세포로부터 유래된 것으로 예측할 수 있다.
- [0045] 예를 들면, 본 발명에서 상기 뇌실하 영역 조직에 있어서 상기 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 돌연변이에 대하여 측정된 변종 대립 유전자의 빈도(VAF1)는 0 초과 50% 이하, 0 초과 40% 이하, 0 초과 30% 이하, 0 초과 25% 이하, 0 초과 20% 이하, 0 초과 15% 이하, 또는 0 초과 10% 이하일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에서 상기 뇌 종양 조직에 있어서 상기 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 돌연변이에 대하여 측정된 변종 대립 유전자의 빈도(VAF2)는 10 내지 100%, 20 내지 100%, 20 내지 95%, 25 내지 95%, 또는 25 내지 90%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명에서 상기 뇌 종양 조직에 있어서 상기 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 돌연변이에 대하여 측정된 변종 대립 유전자의 빈도(VAF2)가, 상기 뇌실하 영역 조직에 있어서 상기 TERT C228T 및 TERT C250T 중 적어도 하나의 돌연변이에 대하여 측정된 변종 대립 유전자의 빈도(VAF1) 대비 1배 초과 50 배 이하인 경우, 1 배 초과 45배 이하 또는 1.5배 내지 45배인 경우 (VAF2/VAF1 비율이 1 초과 50이하, 1초과 내지 45이하 또는 1.5 내지 45인 경우), 상기 뇌 종양 조직은 뇌실하 영역, 바람직하게는 상기 뇌실하 영역의 정상교세포 대, 보다 바람직하게는 상기 정상교세포 대의 정상교세포-유사 줄기세포로부터 유래된 것으로 예측할 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명에서는 상기 뇌실하 영역 조직과 상기 뇌 종양 조직에 대하여 TERT C228T 및 TERT C250T 외에, EGFR(Epidermal growth factor receptor) 돌연변이, TP53(Tumor protein p53) 돌연변이, PTEN(Phosphatase and tensin homolog) 돌연변이, 및 Rb1(Retinoblastoma 1) 돌연변이로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상의 돌연변이에 대한 발현 수준을 추가로 측정할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서, "p53"은 종양 억제 인자의 하나로, 세포의 이상 증식을 억제하고 암세포가 사멸되도록 유도하는 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. TP53으로도 표현되며, 마우스 유전자에서는 Trp53으로 표현될 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 상기 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이, 및 Rb1 돌연변이의 발현 수준의 측정은 상기 돌연변이가 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정일 수 있으며, 바람직하게는 변종 대립 유전자의 빈도(variant

allele frequency, VAF) 또는 복제수 변이(copy number variation; CNV)를 측정할 수 있다. 본 발명에서는 상기 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이의 변종 대립 유전자의 빈도를 측정하고, 상기 EGFR 돌연변이의 복제수 변이를 측정할 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 "복제수 변이(copy number variation; CNV)"란, 유전체에서의 구조적 변이의 한 형태로, 1Kb 이상의 DNA 절편의 증폭(amplification) 또는 결실(deletion)을 가리킨다.

[0053] 본 발명에서 상기 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이, 및 Rb1 돌연변이는 구체적으로 하기 표 1로 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

표 1

| 유전자 | Reference 번호 | 돌연변이 아미노산 | 돌연변이 핵산서열(CDS) | 염색체 | 시작 부위 | 종료 부위 |
|------|--------------|---|--|-------|--|--|
| EGFR | NM_005228.4 | Ala289Val (Substitution - Missense, position 289, A->V) (서열번호 11) | C866T (Substitution, position 866, C->T) (서열번호 12) | Chr7 | 55154129 (on Assembly GRCh38) 55221822 (on Assembly GRCh37) | 55154129 (on Assembly GRCh38) 55221822 (on Assembly GRCh37) |
| TP53 | NM_000546.5 | Cys176Tyr (Substitution - Missense, position 176, C->Y) (서열번호 13) | G527A (Substitution, position 527, G->A) (서열번호 14) | Chr17 | 7675085 (on Assembly GRCh38) 7578403 (on Assembly GRCh37) | 7675085 (on Assembly GRCh38) 7578403 (on Assembly GRCh37) |
| TP53 | NM_000546 | Glu285Lys (Substitution - Missense, position 285, E->K) (서열번호 15) | G853A (Substitution, position 853, G->A) (서열번호 16) | Chr17 | 7673767 (on Assembly GRCh38) 7577085 (on Assembly GRCh37) | 7673767 (on Assembly GRCh38) 7577085 (on Assembly GRCh37) |
| PTEN | COSM4943 | Val1317fs*6 (서열번호 17) | 950_954del (서열번호 18) | Chr10 | 89720798 | 89720798 |
| PTEN | COSM4899 | Val1317fs*3 (서열번호 19) | 951_954del (서열번호 20) | Chr10 | 89720799 | 89720799 |
| Rb1 | - | Lys202fs (서열번호 21) | 606_607AG>A (서열번호 22) | Chr13 | 48923158 | 48923159 |

[0056] 본 발명의 일 실시예에서, 인간 IDH-야생형(IDH-wildtype) GBM 환자에서 종양으로부터 충분한 거리를 두고 이격된 정상 SVZ세포, 종양 조직 사이에 공통적으로 나타나는 유전자 변이를 확인하였다. 상기 표 1에 해당 변이를 나타내었다. EGFR, TP53, PTEN 및 Rb1에서 공통적인 돌연변이가 확인되었고, 구체적으로 PTEN 및 Rb1에서는 프레임시프트(frameshift, fs)가 발생하였다.

[0057] 구체적으로, 본 발명에서 상기 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이의 변종 대립 유전자의 빈도 또는 복제수 변이는 DNA-서열(DNA-sequencing) 분석에 의해 수행될 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 돌연변이에 특이적인 프라이머를 사용하여 200 내지 350 bp의 표적 부위를 PCR로 증폭시킨 뒤 상기 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 또는 Rb1 돌연변이의 대립 유전자의 상대적 빈도(%)를 측정하며 수행할 수 있다. 이때, 상기 PCR의 수행 시 상기 EGFR 돌연변이 유전자에 특이적인 프라이머로서, 서열번호 3의 정방향 프라이머 및 서열번호 4의 역방향 프라이머를 사용할 수 있고, 상기 PTEN 돌연변이 유전자에 특이적인 프라이머로 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머를 사용할 수 있으며, 상기 TP53 돌연변이 유전자에 특이적인 프라이머로 서열번호 7의 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 역방향 프라이머를 사용할 수 있고, 상기 Rb1 돌연변이 유전자에 특이적인 프라이머는 서열번호 9의 정방향 프라이머 및 서열번호 10의 역방향 프라이머를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명에서는 상기와 같이 뇌실하 영역 조직과 뇌 종양 조직 각각에 있어서, EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 대하여 변종 대립 유전자의 빈

도 또는 복제수 변이를 측정된 뒤, 그 결과 상기 뇌실하 영역 조직과 상기 뇌 종양 조직 모두에서 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이가 존재하며, 상기 변종 대립 유전자의 빈도 또는 복제수 변이가, 상기 뇌실하 영역 조직에서 측정치가 뇌 종양 조직에 대하여 측정된 측정치보다 작은 경우, 상기 뇌 종양 조직은 뇌실하 영역, 바람직하게는 상기 뇌실하 영역의 정상교세포 대, 보다 바람직하게는 상기 정상교세포 대의 정상교세포-유사 줄기세포로부터 유래된 것으로 예측할 수 있다.

- [0060] 본 발명에서 상기 뇌실하 영역 조직에 있어서 상기 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 대하여 측정된 변종 대립 유전자의 빈도(VAF3)는 0 초과 50% 이하, 0 초과 40% 이하, 0 초과 30% 이하, 0 초과 25% 이하, 0 초과 20% 이하, 0 초과 15% 이하, 또는 0 초과 10% 이하일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명에서 상기 뇌 종양 조직에 있어서 상기 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 대하여 측정된 변종 대립 유전자의 빈도(VAF4)는 10 내지 100%, 20 내지 100%, 20 내지 95%, 또는 25 내지 95%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명에서 상기 뇌 종양 조직에 있어서 상기 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 대하여 측정된 변종 대립 유전자의 빈도(VAF4)가 상기 뇌실하 영역 조직에 있어서 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 대하여 측정된 변종 대립 유전자의 빈도(VAF3) 대비 1배 초과 내지 50 배 이하인 경우, 1 배 초과 내지 40배 이하, 1.5배 내지 40배, 1.5배 내지 30배, 1.5배 내지 25배, 2배 내지 25배, 또는 2배 내지 20배인 경우(VAF4/VAF3 비율이 1초과 내지 50 이하인 경우, 1 초과 내지 40 이하, 1.5 내지 40, 1.5 내지 30, 1.5 내지 25, 2 내지 25, 또는 2 내지 20인 경우), 상기 뇌실하 조직은 뇌실하 영역, 바람직하게는 상기 뇌실하 영역의 정상교세포 대, 보다 바람직하게는 상기 정상교세포 대의 정상교세포-유사 줄기세포로부터 유래된 것으로 예측할 수 있다.
- [0063] 본 발명에서 상기 뇌실하 영역 조직에 있어서 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 대하여 측정된 복제수 변이(CNV1)는 0 초과 30 이하, 0 초과 25 이하, 0 초과 20 이하, 0 초과 15 이하, 또는 0 초과 10 이하일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명에서 상기 뇌 종양 조직에 있어서 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 대하여 측정된 복제수 변이(CNV2)는 10 내지 200, 10 내지 180, 10 내지 170, 10 내지 160, 또는 10 내지 150일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 본 발명에서 상기 뇌 종양 조직에 있어서 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 대하여 측정된 복제수 변이가, 상기 뇌실하 영역 조직에 있어서 EGFR 돌연변이, TP53 돌연변이, PTEN 돌연변이 및 Rb1 돌연변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 대하여 측정된 복제수 변이 대비 1배 초과 내지 50 배 이하인 경우, 1배 초과 내지 40배 이하, 1.5배 내지 40배, 1.5배 내지 30배, 또는 2배 내지 30배인 경우 (CNV2/CNV1 비율이 1 초과 내지 50이하, 1 초과 내지 40 이하, 1.5 내지 40, 1.5 내지 30, 또는 2 내지 30인 경우), 상기 뇌 종양 조직은 상기 뇌실하 영역, 바람직하게는 상기 뇌실하 영역의 정상교세포 대, 보다 바람직하게는 상기 정상교세포 대의 정상교세포-유사 줄기세포로부터 유래된 것으로 예측할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, TERT C228T, TERT C250T, EGFR A1a289Val, TP53 Cys176Tyr, TP53 E285K, PTEN Val1317fs*6, PTEN Val1317fs*3 및 Rb1 Lys202fs으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 의해 발현되는 단백질에 특이적인 항체를 유효성분으로 포함하는 뇌 종양의 재발 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0068] 본 발명에서 상기 뇌 종양이 뇌실하 영역으로부터 유래된 것이라면, 상기 뇌 종양을 제거하는 절제 수술 후에도 뇌 종양이 재발할 가능성이 매우 높다. 따라서, 본 발명에서는 뇌 종양의 치료로 예를 들어, 뇌 종양 절제 수술 후, 뇌 종양과 그 기원 조직인 뇌실하 영역 간에 공유하는 돌연변이인, TERT C228T, TERT C250T, EGFR A1a289Val, TP53 Cys176Tyr, TP53 E285K, PTEN Val1317fs*6, PTEN Val1317fs*3 및 Rb1 Lys202fs로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 의해 발현되는 단백질에 특이적인 항체를 상기 뇌실하 영역, 바람직하게는 뇌실하 영역의 정상교세포 대, 보다 바람직하게는 정상교세포 대의 정상교세포-유사 줄기세포에 처리함으로써 뇌 종양이 다시 재발하는 것을 효과적으로 방지할 수 있다.

- [0069] 본 발명의 약학적 조성물은 TERT C228T에 의해 발현되는 단백질에 특이적인 항체 및 TERT C250T에 의해 발현되는 단백질에 특이적인 항체 중 1종 이상을 포함하는 것이 바람직하고, EGFR Ala289Val, TP53 Cys176Tyr, TP53 E285K, PTEN Val1317fs*6, PTEN Val1317fs*3 및 Rb1 Lys202fs로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 돌연변이에 의해 발현되는 단백질에 특이적인 항체를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0070] 본 발명에서 상기 항체란, 본 발명의 돌연변이로부터 발현되는 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 보다 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 본 발명의 암 진단 마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0071] 본 발명에서 상기 항체는 본 발명의 변이 유전자로부터 발현되는 단백질의 아미노산 서열을 바탕으로 당업자는 상기 단백질에 특이적인 항체를 디자인할 수 있다. 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체는 당업계에 통상적인 모노클로날 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 모노클로날 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수도 있고, 이는 당업계에 통상적인 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다.
- [0072] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 뇌 종양 증상이 재발하는 것을 차단하거나, 뇌 종양 증상의 재발 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 약학적 조성물은 다른 항암제와도 추가로 병용 투여할 수 있으며, 이를 통해서 뇌 종양의 재발 방지 및 억제 효과를 더욱 증강시킬 수 있다.
- [0074] 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미드, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세특시맙, 비스쿰알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투마이신, 이브리투모맙티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산훈몰 키토산, 쟈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오데라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토푸린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 칼티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라블, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비갈루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며,

주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

- [0077] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0078] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0079] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약무형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [0082] 본 발명은, 동물, 바람직하게는 인간을 제외한 동물(non-human animal)의 뇌실하영역에 p53, Pten 및 EGFR 돌연변이를 유도하여 뇌종양 동물 모델을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0083] 본 발명에서, "동물"은 인간 이외의 임의의 포유류 동물, 바람직하게는 마우스, 래트, 기니피그, 햄스터 등의 설치류, 보다 바람직하게는 마우스를 의미한다. 상기 동물은 배아, 태아, 신생아 및 성체를 포함하는 모든 연령의 동물을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 동물들은, 예를 들어, 상업용 소스로부터 이용할 수 있다.
- [0084] 본 발명에서, "동물 모델"이란, 사람의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 인간을 제외한 동물을 의미한다. 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의해, 질병 연구에 있어 생체의학 질환모델 동물은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공한다. 질환모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내고, 유전자들 간의 상호작용을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다.
- [0085] 본 발명에 따른 동물 모델은 뇌종양을 비롯한 체세포 암, 예를 들면 신경교종 또는 교모세포종을 갖는 것이며, 구체적으로, 돌연변이가 발생한 SVZ에서 이격된 피질 영역에서 신경교종 또는 교모세포종이 발생하며, GBM 환자에서 종양이 없는 SVZ와 마찬가지로 SVZ 영역은 정상인 세포 구조를 나타내며, SVZ로부터 암 유발 돌연변이를 가진 NSCs가 이동하여 회소돌기아교전구세포주의 비정상적 성장을 통해 신경교종이 유발된 것이다. 상기 동물 모델의 신경교종은, 종양 조직에 대하여 헤마톡실린 및 에오신 염색(H&E staining) 결과로부터 괴사(necrosis), 미세 혈관 증식(microvascular proliferation) 및 유사 분열(mitosis) 등의 특징을 가지는 고등급의 신경교종(glioma)임을 알 수 있으며, GFAP, Nestin, Olig2, 및 PDGFR α 에 대하여 면역 반응성을 가지며, 뇌실하 영역(SVZ)의 자가-재생 및 증식능을 가지는 신경 줄기 세포(neural stem cells, NSCs)가 등측면으로 이동하며 악성 신경교종으로 진행된 것이다. 체세포 암 유발 돌연변이로, 예를 들어, Trp53, Pten, 및 EGFR 돌연변이는 SVZ의 NSCs가 악성의 신경교종으로 진행할 수 있는 능력을 가지며, 이에 Trp53, Pten, 및 EGFR 돌연변이를 이용한 동물 모델은 GFAP-양성 NCS로부터 교모세포종이 발생하는 인간 환자에서의 현상을 그대로 반영한, 교모세포종을 가진다.
- [0087] 상기 뇌종양 동물 모델의 제조방법은 (a) 변이 EGFR를 갖는 동물을 준비하는 단계; (b) p53 및 Pten을 녹아아웃하는 벡터를 준비하는 단계; 및 (c) (a)단계의 동물의 뇌실하영역에, 상기 (b)단계의 벡터를 전기천공법으로 주입하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0088] 상기 뇌종양은, 악성 신경교종, 바람직하게는 교모세포종(Glioblastoma, GBM)일 수 있다. 상기 뇌실하영역은, 뇌실하영역의 신경줄기세포를 포함하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 뇌실하영역의 신경줄기세포를 의미한다.

본 발명의 일 실시예에서, 상기 뇌종양 동물 모델의 제조 방법을 이용하는 경우, 90%의 마우스에서 뇌종양이 발생했으며, 평균 수명은 약 20주였다(도 25e).

- [0090] 상기 (a)단계의 변이 EGFR을 갖는 동물을 준비하는 단계는 상업적으로 목적 돌연변이를 가지는 동물을 구입하여 얻는 방법을 포함할 수 있다. 상기 EGFR 변이는, 예를 들면, EGFRviii 변이(FEBS J. 2013 Nov;280(21):5350-70)일 수 있다.
- [0091] 본 발명의 일 실시예에서, NCI mouse repository로부터 구매한 LoxP-Stop-LoxP EGFRviii 마우스(FVB strain)와 The Jackson Laboratory로부터 구매한 LoxP-Stop-LoxP-tdTomato 마우스(C57BL/6)를 교배하여 LoxP-Stop-LoxP EGFRviii f/+;LoxP-Stop-LoxP tdTomato f/+ 마우스를 제작하였다.
- [0093] 상기 (b)단계의 p53 및 Pten을 녹아웃하는 벡터는 유전자 편집에 사용되는 벡터를 사용하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상동성 재조합(Homologous recombination), TALEN, ZFN, 또는 CRISPR-Cas9 벡터를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, p53 및 Pten을 녹아웃 할 수 있는 벡터라면 종류에 상관없이 필요에 따라 통상의 기술자가 적절한 벡터를 선택할 수 있다.
- [0094] 본 발명의 일 실시예에서, p53 및 Pten을 녹아웃하는 벡터는 p53 또는 Pten을 표적하는 sgRNA를 포함하는 CRISPR-Cas9 벡터를 제조하는 단계는 게놈-편집 테스트를 마친 sgRNA를 CRISPR-Cas9 벡터에 재조합하는 방법으로 제작되었다(도 25a).
- [0095] 상기 CRISPR-CAS9 벡터는 당업계에 널리 알려진 방법으로 합성 또는 상업적으로 구입하여 사용할 수 있다.
- [0096] 상기 sgRNA의 게놈-편집 테스트는 당업계에 알려진 방법을 사용해 자유롭게 이루어질 수 있으며, 구체적으로, 형질도입 후 T7E1 분석을 통해 게놈-편집 효율을 계산할 수 있다.
- [0097] 상기 sgRNA의 게놈-편집 테스트는 돌연변이 빈도를 계산하는 과정을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0098] 상기 p53을 표적하는 sgRNA는 서열번호 29의 서열을 가질 수 있으며, Pten을 타겟팅하는 sgRNA는 서열번호 30의 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0099] 상기 sgRNA의 게놈 편집 효율(genome-editing frequency)은 돌연변이 빈도 30 내지 99.9%, 40 내지 99.9%, 45 내지 99.9%, 50 내지 99.9%, 55 내지 99.9%, 60 내지 99.9%, 65 내지 99.9%, 70 내지 99.9%, 75 내지 99.9%, 80 내지 99.9%, 85 내지 99.9%, 30 내지 95%, 40 내지 95%, 45 내지 95%, 50 내지 95%, 55 내지 95%, 60 내지 95%, 65 내지 95%, 70 내지 95%, 75 내지 95%, 80 내지 95%, 85 내지 95%, 또는 50 내지 90%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0101] 상기 (c) 단계에서, 전기천공 방법으로 벡터를 주입함으로써 신경줄기세포 영역인 뇌실하 영역(SVZ)에 특이적으로 유전자를 전달한다. 상기 전기천공법을 통해 바이러스 등 다른 주입법을 사용할 경우 뇌실하영역 외의 다른 지역으로도 유전자 전달이 일어날 수 있는 위험성을 극복할 수 있다.
- [0102] 상기 (c) 단계에서, 벡터 주입량은 0.1 내지 10ng, 0.1 내지 8ng, 0.1 내지 6ng, 0.1 내지 5ng, 0.1 내지 4ng, 0.1 내지 3ng, 0.1 내지 2.7ng, 0.1 내지 2.5ng, 0.5 내지 10ng, 0.5 내지 8ng, 0.5 내지 6ng, 0.5 내지 5ng, 0.5 내지 4ng, 0.5 내지 3ng, 0.5 내지 2.7ng, 0.5 내지 2.5ng, 1 내지 10ng, 1 내지 8ng, 1 내지 6ng, 1 내지 5ng, 1 내지 4ng, 1 내지 3ng, 1 내지 2.7ng, 1 내지 2.5ng, 1.5 내지 10ng, 1.5 내지 8ng, 1.5 내지 6ng, 1.5 내지 5ng, 1.5 내지 4ng, 1.5 내지 3ng, 1.5 내지 2.7ng, 또는 1.5 내지 2.5ng, 바람직하게는 2ng일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 필요에 따라 당업계의 기술 상식에 따라 적절히 변형하여 주입량을 결정할 수 있다.
- [0103] 본 발명의 일 실시예에서, LoxP-Stop-LoxP EGFRviii f/+;LoxP-Stop-LoxP tdTomato f/+ 마우스에 pU6-sgP53-pU6-sgPTEN_CbH-Cas9-P2A-Cre 플라스미드를 전기천공법을 사용하여 주입한 결과, 90%의 마우스에서 뇌종양이 발생하였고, 반면 단순히 sgLacZ-타겟팅 CRISPR-CAS9 벡터를 전기 천공한 마우스(대조군)에서는 뇌종양이 발생하지 않았다. 따라서 뇌종양이 전기천공의 충격에 의해 발생한 것이 아닌, 주입된 돌연변이에 의해 발생한 것임을 알 수 있다.
- [0105] 본 발명은, 동물, 바람직하게는 인간을 제외한 임의의 포유류 동물에 p53, Pten 및 EGFR 돌연변이를 유도한, 뇌종양 동물 모델을 제공한다. 보다 상세하게는, EGFR 변이 동물의 뇌실하영역 특이적으로 p53 및 Pten 녹아웃 돌연변이가 유도된 뇌종양 동물 모델을 제공한다.
- [0106] 상기 p53, Pten 및 EGFR 돌연변이는 인간 환자군에서 나타난 돌연변이와 대응되는 것일 수 있다. 바람직하게는,

p53, Pten 및 EGFR이 변이된 돌연변이일 수 있으며, 예를들어 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실(indel), 또는 프레임시프트(frameshift)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, p53, Pten, 및 EGFR 유전자가 암호화하는 단백질의 기능을 상실하도록 하는 목적을 달성하는 범위 내에서 자유롭게 선택될 수 있다.

- [0107] 상기 단백질의 기능 상실은 단백질이 발현되지 않는 경우, 단백질이 발현은 되지만 활성이 없는 경우, 및 정상 또는 야생형 단백질 대비 단백질 활성이 현저히 저해된 경우를 모두 포함한다.
- [0108] 본 발명의 동물 모델은, 뇌 종양 발생률이 50%이상, 60%이상, 75%이상, 또는 80%이상일 수 있으며, 예를 들면 50 내지 100%, 60 내지 100%, 70 내지 100%, 75 내지 100%, 80 내지 100%, 80 내지 100%, 85 내지 100%, 50 내지 99%, 60 내지 99%, 70내지 99%, 75 내지 99%, 80 내지 99%, 85 내지 99%, 50 내지 95%, 60내지 95%, 70 내지 95%, 75 내지 95%, 80 내지 95%, 또는 85 내지 95%일 수 있다.
- [0109] 본 발명의 일 실시예에서, Trp53, Pten을 표적하는 sgRNA를 포함하는 CRISPR/Cas9 벡터가 주입된 마우스의 90%에서 뇌 종양이 발생한 반면, Lacz를 타게팅하는 sgRNA를 도입한 대조군에서는 뇌 종양이 발생하지 않았다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 동물 모델이 뇌 종양 모델로서 적합함을 알 수 있다.
- [0110] 본 발명의 일 실시예에서, 앰플리콘 시퀀싱을 통해 sgRNA에 의한 변이를 확인한 결과, Trp53 유전자는 서열번호 38 내지 40 중 어느 하나를 포함하는 빈도가 약 80%, Pten 유전자는 서열번호 41 내지 43중 어느 하나를 포함하는 빈도가 약 80%로 나타났다.
- [0111] 본 발명의 마우스 모델의 평균 수명은 10 내지 50주, 10 내지 40주, 10 내지 35주, 10 내지 30주, 10 내지 28주, 10 내지 25주, 12 내지 50주, 12 내지 40주, 12 내지 35주, 12 내지 30주, 12 내지 28주, 또는 12 내지 25주일 수 있다.
- [0112] 본 발명의 동물 모델은, 돌연변이 주입 위치와 종양 발생 위치가 이격되어 있는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 돌연변이 주입 위치로부터 등측면 방향으로 이격된 위치, 예를 들어 뇌실하영역에서 이격된 피질 영역에 종양을 형성하는 것일 수 있으며, 상기 이격 거리는 1 내지 40 mm, 3 내지 35 mm, 또는 5 내지 30 mm일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0113] 본 발명의 동물 모델은, 상기 Trp53, Pten, 및 EGFR 돌연변이를 가지는 뇌실하 영역은 돌연변이의 유전자형을 가지고 표현형은 정상 조직을 유지하는 것을 특징으로 한다. 따라서 돌연변이 주입 위치에서는 종양이 발생하지 않는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0114] 본 발명의 동물 모델은, 상기 Trp53, Pten 및 EGFR 돌연변이는 전기천공 부위, 예를 들어 뇌실하영역의 신경줄기세포 위치에 특이적으로 존재하는 것일 수 있다.
- [0115] 본 발명의 일 실시예에서, 마우스 모델의 뇌 종양을 분석한 결과, 괴사(necrosis), 미세 혈관 증식(microvascular proliferation) 및 유사 분열(mitosis) 등의 특징을 가지는 고등급의 신경교종(glioma)이 관찰되었고(도 20), GFAP, Nestin, Olig2, 및 PDGFR α에 대하여 면역 반응성을 가지는 인간 신경교종의 특징, 보다 구체적으로는 뇌실하영역에서의 GFAP 양성 NSC로부터 교모세포종이 발생하는 특징을 가지고 있고, Ki67을 통하여 고증식능이 확인되었다.
- [0116] 구체적으로, 본 발명이 제공하는 뇌종양 동물 모델은, 인간 뇌실하영역의 GFAP-양성 신경줄기세포(GFAP-positive neural stem cell)로부터 교모세포종(Glioblastoma)이 발생하는 인간 환자의 현상을 그대로 반영하는 특징을 가진다.
- [0117] 보다 구체적으로, 본 발명의 동물 모델은, 상기 돌연변이가 주입된 뇌실하영역의 전단부(frontal SVZ)에서 돌연변이 세포가 등측면 방향(dorso-lateral direction)으로 이동하여 종양을 형성하는 반면, 처음 돌연변이를 주입한 뇌실하영역 전단부는 정상 구조를 유지하는 특성을 가진다.
- [0118] 본 발명의 일 실시예에서, 처음 돌연변이를 주입한 뇌실하영역은 정상구조를 유지함과 동시에, 여전히 돌연변이를 가지는 뇌줄기세포가 존재함이 tdTomato 마커를 통해 확인되었다. 즉, 신경교종 발생 후에도 뇌실하영역의 신경줄기세포 특이적 변이가 유지되었다. 상기 tdTomato 양성 뇌줄기세포를 레이저미세현미경절제를 통해 분리 후 유전자 분석을 수행한 결과 유전자 변이가 확인되었다. 즉, 원발 부위의 유전자 변이가 종양 발생 후에도 유지되고 있어 추후 원발 부위의 잔여 돌연변이 줄기세포에 대한 기능 연구, 분자적 기작, 신규 뇌종양 예방제, 치료제 탐색에 사용 가능하다.
- [0119] 본 발명의 뇌종양 동물 모델은 유전자 기능에 대한 연구, 뇌종양의 분자적 기작 및 신규 항 뇌종양 예방제 또는

치료제 탐색 등의 연구에 효과적으로 사용할 수 있다.

- [0120] 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 뇌종양이 유도된 동물에 뇌종양 치료 후보물질을 투여한 후 뇌종양 경감 여부를 확인하는 단계를 포함하는 뇌종양 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0121] 구체적으로, 뇌종양이 유도된 동물은 뇌종양 치료 후보물질의 존재 및 부존재 하에서 뇌종양 증상 경감 여부를 확인하는 방법으로 뇌종양 치료제를 스크리닝 하는데 유용하게 사용할 수 있다. 뇌종양 증상을 간접적으로 또는 직접적으로 경감시키는 물질은 뇌종양 치료제로서 선택할 수 있다. 즉, 뇌종양 치료 후보물질의 부재 하에 뇌종양 증상을 측정하고, 뇌종양 치료 후보물질 존재 하에서 뇌종양 증상을 측정하여 양자를 비교한 후, 뇌종양 치료 후보물질이 존재할 때의 뇌종양 증상이 뇌종양 치료 후보물질의 부재 시 증상보다 경감시키는 물질을 뇌종양 치료제로 예측할 수 있는 것이다.
- [0122] 상기 뇌종양 증상 경감 여부를 확인하는 단계는 뇌종양 마커의 발현량 또는 단백질의 활성 수준을 측정하는 방법으로 이루어지는 것일 수 있다. 상기 뇌종양 마커는 NeuN, nestin, GFAP, Olig2, S100b, MBP 및 Ki67로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업계에 알려진 뇌종양 마커를 자유롭게 선택할 수 있다.
- [0123] 상기 단백질의 발현 또는 활성 수준 측정은, 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질 발현 또는 활성 수준을 측정하는 방법으로 수행하는 것일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0124] 상기 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계는 mRNA 전사량 수준을 측정하여 이루어지는 것일 수 있다. 상기 mRNA는 상기 단백질을 암호화하는 유전자로부터 전사된 mRNA 또는 상기 단백질이 조절하는 목적 유전자로부터 전사된 mRNA일 수 있다.
- [0125] 상기 mRNA의 전사량 수준 측정은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 mRNA의 전사량 수준 측정방법으로 수행하는 것일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0126] 상기 후보물질의 투여 방법은 피하주사, 근육주사, 안연고, 점안, 점어, 흡입, 삽항투여, 경구투여, 설하투여, 경피투여 등 당업계의 상식에 따라 임의의 경로를 선택하여 투여될 수 있다.
- [0127] 본 발명에 있어서 "후보물질"은 뇌종양, 바람직하게는 교모세포종 치료제로서 테스트할 물질을 의미하며, 예컨대 추출물, 단백질, 올리고펩티드, 소형 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오티드 및 광범위한 화합물 등의 임의 분자를 포함할 수 있다. 이러한 후보물질은 또한 천연물질 외에 합성물질도 포함한다.

발명의 효과

- [0129] 본 발명은 뇌종양 동물 모델 및 그 제조방법, 보다 구체적으로는 인간 뇌실하 영역(Subventricular Zone; SVZ)의 GFAP-양성 신경줄기세포(GFAP-positive neural stem cell)로부터 교모세포종(Glioblastoma)이 발생하는 인간 환자에서의 현상을 그대로 반영하는 동물 모델 및 그 제조방법을 제공한다. 상기 동물 모델 및 그 제조방법은 인간 뇌종양의 진단 방법, 치료제 스크리닝 및 신약 개발 등에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0130] 또한 본 발명은 원발부위 불명 뇌 종양의 조직 기원을 예측할 수 있고, 이에 따라 상기 뇌 종양의 치료 효과를 극대화시킬 수 있는 치료 타겟 부위를 결정하여 적절한 치료 전략을 수립할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

- [0132] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자로부터 분리된 시료를 이용하여 심층 시퀀싱 분석(deep sequencing analysis)을 수행하기 위한 실험 요약도(schematic presentation)를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자의 GBM 종양과 종양이 없는 SVZ 조직의 시료 채취 부위를 나타낸 사진(왼쪽)으로, 3D-재구성된 MRI 영상 종양 가장자리와 SVZ 조직의 시료 채취 부위의 거리를 나타낸다(오른쪽).

도 3은 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자 2명(GBM187, GBM26)의 GBM 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직에서 돌연변이의 VAFs의 상관 관계를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자 4명(GBM245, GBM276, GBM499, GBM520)의 GBM 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직에서 돌연변이의 VAFs의 상관 관계를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자의 GBM 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직에서 측정된 돌연변이의 VAFs를 표로 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에서 IDH-돌연변이 GBM 환자(GBM160)의 GBM 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직에서 돌연변이의 VAFs의 상관 관계를 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에서 뇌수막종 환자(MEN246)의 뇌수막종 조직과 종양이 없는 SVZ 조직에서 돌연변이의 VAFs의 상관 관계를 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에서 GBM 이외의 종양 환자, 또는 GBM이 SVZ로 침윤한 환자(GBM146) 및 IDH-돌연변이 GBM 환자(GBM261)의 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직에서 측정된 돌연변이의 VAFs를 표로 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에서 IDH-돌연변이 GBM 환자에서 GBM 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직에서 공유되고 있는 돌연변이의 VAFs를 그래프로 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자로, 상기 GBM이 SVZ로 침윤한 환자(GBM146)의 GBM 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직에서 돌연변이의 VAFs의 상관 관계를 그래프로 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자로, 상기 GBM이 SVZ로 침윤한 환자에서 GBM 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직에서 공유되고 있는 돌연변이의 VAFs를 그래프로 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자의 GBM 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직에서 측정된 EGFR 돌연변이의 CNVs의 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자(GBM185)의 GBM 종양 조직에서 SVZ와 공유되는 돌연변이와 종양만의 일과성 돌연변이에 대한 단일 세포 Sanger 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자(GBM520)의 GBM 종양 조직에서 SVZ와 공유되는 돌연변이와 종양만의 일과성 돌연변이에 대한 단일 세포 Sanger 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에서 심층 WES 데이터에 기반하여 종양 조직과 SVZ 조직에서의 CNVs 결과를 나타낸 것으로, 도 15a는 GBM 종양 조직에서 SVZ와 공유되는 돌연변이를 가진 IDH-야생형 GBM 환자에서 CNVs 결과를 나타낸 것이고, 도 15b는 IDH-돌연변이 GBM 환자와 뇌수막종 환자에서 CNVs 결과를 나타낸 것이며, 도 15c는 GBM이 SVZ로 침윤한 IDH-야생형 GBM 환자에서 CNVs 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자에서 심층 앰플리콘 시퀀싱 후 레이저 캡처 현미해부 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자의 현미해부된 정상교세포 대에서 TERT C228T 돌연변이와 관련하여 부위-특이적 앰플리콘 시퀀싱 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자의 GBM 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직, GBM이 SVZ에 침윤한 IDH-야생형 GBM 환자에서 SVZ 조직에서 돌연변이의 치환을 포함하는 돌연변이 스펙트라를 나타낸 것이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에서 IDH-야생형 GBM 환자의 GBM 종양 조직과 종양이 없는 SVZ 조직, GBM이 SVZ에 침윤한 IDH-야생형 GBM 환자에서 SVZ 조직에서 시그니처 1과 시그니처 5 및 기타 시그니처의 공현율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에서 SVZ의 NCSs에 저-발현 암 유발 돌연변이를 가지도록 설계한 마우스 모델에서 신경교종의 발생을 나타낸 것으로, 도 20a는 sgRNAs를 가진 플라스미드를 전기 천공법으로 실험하는 과정을 개략도로 나타낸 것이고, 도 20b는 전기 천공 후 13주 및 16주 경과하였을 때 마우스의 연속 절편의 사진을 나타낸 것이며, 도 20c 내지 20e는 꼬리 피질에서 고-등급 신경교종을 가진 마우스의 P53/Pten/EGFR을 면역 염색 또는 H&E 염색한 사진을 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명의 일 실시예에서 마우스 모델의 꼬리 피질 영역에서 tdTomato-양성 세포의 이미지 분석을 위한 실험 개략도와, 그 결과로 꼬리 피질 영역에서 tdTomato 신호의 상대적 강도의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명의 일 실시예에서 마우스 모델에서 종양의 조직학(histology) 및 MRI 사진과, 종양이 발생한 위치의 비율을 나타낸 것이다.

도 23은 본 발명의 일 실시예에서 마우스 모델의 꼬리 피질 영역에서 Olig2-, PDGFRa-, GFAP- 및 tdTomato- 양성 세포의 면역 염색 결과와, 뉴런, 성상교세포, 희돌기교세포 및 희소돌기아교전구세포 각각의 마커에 대하여 양성의 세포 비율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 24는 본 발명의 일 실시예에서 OPCs의 비정상적 성장을 통한 종양의 진행을 개략도로 나타낸 것이다.

도 25a 내지 j는 본 발명의 일 실시예에서 뇌실하영역에 P53/Pten/EGFR 돌연변이를 가지는 게놈 편집 마우스 개발을 나타낸 그림이다. a는 Cas9과 Cre재조합효소를 발현하고 p53과 Pten을 타게팅하는 sgRNA를 포함하는 단일 벡터의 벡터맵을 나타낸 것이다. b는 Neuro-2a 세포에서 p53과 Pten을 타게팅하는 sgRNA를 스크리닝한 결과를 나타낸다. c는 전기천공 3일 경과 후 NCS의 면역염색 이미지이다. 스케일 바는 50um를 나타낸다. d는 nestin 또는 GFAP와 함께 염색된 tdTomato-양성 세포의 산포도이다. e는 마우스의 Kaplan-Meier 생존 그래프이다. 각 그룹별로 10마리의 마우스 사용, P=0.000063, log-rank test. f는 세포괴사(necrosis), 미세혈관 증식(M), 및 체세포분열(화살표)와 같은 전통적인 고도 교모세포종의 증상을 나타내는 H&E염색 이미지이다. g는 전기천공 16주 후 마우스 3마리의 MRI 영상이다. h는 종양에서의 다양한 고도 신경교종 관련 마커, 예를 들어 NeuN뿐만 아니라 nestin, GFAP, Olig2, S100b, MBP 및 Ki67의 면역염색 결과이다. i의 막대 그래프는 위치 특이적 앰플리콘 시퀀싱을 이용한, 돌연변이를 가진 마우스의 고도 신경교종의 인텔을 가지는 시퀀싱 리드를 나타낸다. j는 돌연변이를 가진 마우스의 종양에서의 EGFRviii(360bp)를 qRT-PCR을 이용하여 측정된 것이다. 대조군으로 Actb가 사용되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0133] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0135] **[준비에 1] 시료의 준비**

[0136] 종양 조직으로부터 떨어진 정상 뇌실하 영역에서 체세포 돌연변이를 확인하기 위하여, 이소시트레이트 디하이드로제네이스(isocitrate dehydrogenase, IDH)-야생형 GBM(primary GBM), IDH-돌연변이 GBM(secondary GBM), 또는 뇌수막종(meningioma), 핍지교종(oligodendroglioma), 및 전이성 암(metastatic cancer) 환자 17명으로부터 i) 병리학적 그리고 방사선학적으로 정상의 뇌실하 영역 조직, ii) 종양 조직, 및 iii) 영향을 받지 않은 정상 피질 조직(cortical tissue) 또는 혈액과 같은 55개의 조직 시료를 확보하였다(도 1).

[0137] 본 실험에 사용된 뇌 종양 환자는 측두엽에 주로 존재하는 종양을 광범위 절제(supro-total resection) 또는 다른 외과적 절제술로 제거하였고, 자기 공명 영상(MRI)-항법 시스템(navigation system)의 원조 아래 정상 SVZ 조직을 접근할 수 있도록 하였다(도 2). 3D 재구성 MRI 영상을 이용하여 종양이 없는 SVZ 조직을 종양 가장자리로부터 대략 5.3 내지 33.3 mm 거리가 떨어진 안전한 부위에서 절제하였다. 조직 검사(histologic examination)를 통하여 이렇게 채취한 SVZ 시료가 종양이 없는 상태임을 확인하였다. 또한, 본 실험에서는 양성 대조군으로서, GBM이 SVZ에 침윤한 두 환자로부터 상기 i) 내지 iii)의 시료를 수집하였다.

[0139] **[준비에 2] 유전자 발현의 마이크로어레이 데이터셋 및 아형 분류**

[0140] Qiagen RNeasy 키트(Qiagen, USA)를 이용하여 GBM 종양 시료로부터 총 RNA를 추출하였다. Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip를 이용하여 RNA 발현 프로파일을 획득하였다. R/Bioconductor lumi package를 이용하여 퀀타일 노말라이제이션(quantile normalization) 방법에 따라 로우 데이터를 분산 안정화 변환 및 정규화 하였다. 그리고, (values - MIN) / (MAX - MIN)에 의하여 [0, 1]로 표준화 하였다. GBM의 4가지 유전자 시그니처(Verhaak, R. G. W. et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. Cancer cell 17, 98, (2010). 참조)를 유전자 발현 데이터에 반영하였다. 시료의 아형을 결정하기 위하여, ssGSEA(single sample gene set enrichment analysis)를 이용하여 각 아형에서 인리치먼트 값(enrichment scores)을 나타내었다.

[0142] **[준비에 3] 환자 조직에 대한 심층 전장 시퀀싱(Deep whole-exome sequencing)**

[0143] Qiamp mini DNA 키트(Qiagen, USA)를 이용하여 냉동된 뇌 조직으로부터, 그리고 Wizard Genomic DNA Purification 키트(Promega, USA)를 이용하여 혈액으로부터 유전체 DNA를 추출하였다. Agilent Human All Exon 50 Mb 키트를 이용하여 Agilent 라이브러리 준비 프로토콜(Agilent library preparation protocols)에 따라 각 시퀀싱된 샘플을 준비하였다. Illumina HiSeq 2000 및 2500 장비 (average read depth of 392X)를 이용하여 라이브러리를 페어드-엔드 리드 시퀀싱(paired-end sequencing)을 수행하였다. Broad Institute에 의해 설계된 "Best Practices" 작업 흐름(workflow)에 따라 Fastq 파일로부터 analysis-ready bam 파일을 얻었다. 간단히 말하여, BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net>)을 이용하여 fastq 파일로부터 로우 시퀀스를 얼라인한 뒤 sam 파일을 얻어 이를 다시 bam 파일로 전환하고, Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard>)를 이용하여 복사하였다. 그 후 RealignerTargetCreator 및 GATK 분석 툴의 IndelRealigner (<http://www.broadinstitute.org/gatk/download>)를 이용하여 bam 파일에 있는 indel 아티팩트(artifacts)를 정리하였다. 다음으로, 신뢰할 수 있는 염기서열 변이 정보만 추출(variant calling)하기 위하여 GATK analysis tools의 BaseRecalibrator를 이용하여 염기 품질 스코어 재교정(base quality score recalibration) 작업을 수행하였다.

[0145] **[준비에 4] GBM 관련 유전자의 심층 시퀀싱**

[0146] SureDesign 온라인 툴(Agilent Technologies)을 이용하여 79개의 GBM 관련 유전자의 하이브리드 캡처 프로브(hybrid capture probes)를 설계하였다. GBM 관련 유전자는 일본의 II 및 III 등급 신경교종 환자의 대규모 코호트와, TCGA Consortium으로부터 얻어진 의미있는 게놈 데이터와 현저하게 변이된 유전자(AF>2%)의 TCGA GBM 전장 유전자 시퀀싱 결과를 포함하고 있다(Brennan, C. W. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell 155, 462-477, (2013); Suzuki, H. et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. Nat Genet 47, 458-468, (2015)). 유전체 DNA(>200 ng)를 절단한 후 얻어진 DNA 조각의 3'말단을 A로 연장하며 말단 부위를 복구하고, 페어드-엔드 어댑터(paired-end adaptors)로 연결 및 증폭하였다(6 cycles). 어댑터 연결된 라이브러리를 비오틴화된 올리고 RNA 베이트(baits)와 24 시간 동안 혼성화시킨 후 스트렙타비딘-퀸주게이트된 마그넷 비즈(streptavidin-conjugated magnetic beads)로 채웠다(enriched). 최종 라이브러리를 Illumina HiSeq 2500 시퀀서(median read depth of 655X)에서 PCR, 16 사이클로 추가 증폭시켰다. 그 후 GATK 베스트 프랙티스 데이터 클린업 파이프라인(GATK best practice data cleanup pipeline)을 이용하여 analysis-ready bam 파일을 형성하였다. 이러한 bam 파일을 Samtools (<http://samtools.sourceforge.net>)을 이용하여 pileup 파일로 전환시켰다.

[0148] **[준비에 5] TERT 프로모터의 돌연변이의 부위-특이적 앰플리콘 시퀀싱(Site-specific amplicon sequencing)**

[0149] TERT 프로모터의 C228T 돌연변이(c.-124C>T) 및 C250T 돌연변이(c.-146C>T) 옆에 배치되도록 타겟 영역(target region)을 274 bp 크기로 설계하였다. 이러한 부위는 프라이머(정방향 프라이머: AGCACCTCGGGTAGTGG; 및 역방향 프라이머 GTCCTGCCCTTCACCTT)를 이용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 이러한 영역은 6개의 염기쌍 인덱스 서열을 포함하는 타겟 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. PCR은 적절한 온도 조건 하에서 PrimeSTAR GXL(Takara, Japan) high-fidelity DNA 폴리머라제를 사용하여 수행하였다. 그 후, TruSeq DNA 샘플 준비 가이드에 따라 DNA 라이브러리를 준비하였다. 즉, TruSeq DNA 키트(Illumina, USA)를 사용하여 말단 복구 및 3'말단에 A(아데닌) 돌출부(overhangs)를 갖도록 수행하였다. Indexed TruSeq 어댑터를 연결한 뒤 AMPure 비즈(Agencourt Bioscience, USA)로 정제하였다. 386 bp DNA 조각(274 bp of DNA plus 55 bp of adaptors with 57 bp of index)을 아가로스 겔로부터 제거한 뒤 Mini elute 겔 추출 키트(Qiagen, USA)를 사용하여 정제하였다. 그 후 양 말단에 어댑터 분자를 가진 DNA 조각을 풍부하게 하여, PCR 프라이머 콕테일 및 마스터 믹스(PCR primer cocktail and master mix)(Illumina, USA)를 이용하여 라이브러리 내 DNA의 양을 증폭시켰다. HiSeq 시퀀서(Illumina, USA)(median read depth of 917,384x)를 이용하여 라이브러리를 시퀀싱한 뒤, 인-하우스 트랜스크립트(in-house transcripts)를 이용하여 환자-특이적 fastq 파일을 형성하기 위하여 인덱스(index)에 의해 상기 HiSeq 시퀀서로부터 로우 시퀀스를 분류하였다. Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>)를 이용하여 분류한 서열을 얼라인한 뒤 bam 파일을 형성하였다. 이러한 bam 파일을 Samtools (<http://samtools.sourceforge.net>)을 이용하여 pileup 파일로 전환시켰다.

[0151] **[준비에 6] 후보 변이군의 검증 시퀀싱(Validation sequencing of candidate variants)**

[0152] 후보 변이군(candidate variants)을 검증하기 위하여, 변이를 위해 PCR-증폭된 DNA의 Sanger 시퀀싱을 이용하였다. PCR 증폭을 위한 프라이머는 Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)을 이용하여 설계하였다

(Untergasser, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res 35, W71-74, (2007). 참조). PCR은 적절한 온도 조건 하에서 PrimeSTAR GXL (Takara, Japan) high-fidelity DNA 폴리머라제를 사용하여 수행하였다. PCR 산물을 아가로스 겔에서 평가하였다. Big Dye Terminator 반응 후 Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer(Applied Biosystems, USA)에서 로딩을 하여 Sanger 시퀀싱을 수행하였다. 낮은 변이 빈도 <10% 혹은 Sanger 시퀀싱에서 분명치 않은 후보 변이군에 대하여 부위-특이적 앰플리콘 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과 돌연변이 빈도가 1.9% 내지 99.1%로 나타난 GBM 관련 돌연변이와 임의 선택된 돌연변이 946개 중 10개 (11.0%)에 대하여만 검증하였다. 검증된 타겟으로, 104개의 돌연변이 중 96개만 확인하였다. 부위-특이 앰플리콘 시퀀싱에 의해 측정된 VAFs는 SVZ와 종양 사이 관련성을 분석하기 위하여 WES의 VAFs로 대체하였다.

[0154] [준비예 7] 실시간 정량 PCR(Real-time quantitative PCR)

[0155] 썬델 사이클러 시스템(CFX-96, Biorad, USA)에서 iQ제 SYBR® Green Supermix (Biorad, USA)을 이용하여 실시간 정량 PCR을 수행하였다. Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>)을 이용하여 설계된 것으로, EGFR 서열과 RNase P 및 LDHA에 특이적 프라이머(표 2)를 이용하여 CNVs의 존재를 확인하였다. PCR 수행 시 온도 사이클은 초기 변성 및 효소 활성화는 95°C, 3분; 그 후 95°C, 10초 40회; 결합(annealing) 및 신장(extension)은 55~60°C, 30초 동안 수행하였다. CFX Manager제 소프트웨어로 측정된 상대적 정규화 표현법을 이용하여 혈액 또는 정상 뇌 조직 대비 상대적 배수 변화를 나타내었다.

표 2

[0156]

| Gene | Locus | Forward | Reverse | Product size |
|--------|-------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------|
| EGFR | Ch7:55229262-55229347 | CGTCTCTTGCCGGAATGT(서열번호 23) | GGATAAAGAAATAACCTCTACCC(서열번호 24) | 86 |
| RNaseP | Chr15:75246734-75246832 | GGGAGATGCGGAAGAATGT(서열번호 25) | CCTCCAGTCAGCCACAGAA(서열번호 26) | 99 |
| LDHA | Chr11:18408413-18408534 | Actgtgacccttatccagge(서열번호 27) | Cttcccttaactagctctcagga(서열번호 28) | 122 |

[0158] [준비예 8] Sanger 시퀀싱을 이용한 단일 핵 분리

[0159] 냉동된 뇌 조직 시료로부터 단일 핵을 분리하였다. 보다 상세하게, 조직 시료를 NST-DAPI 버퍼에 넣고 메스(scalpels)를 이용하여 잘게 찢었다. 이후 형광 현미경을 통하여 노출된 단일 핵(free nuclei)을 확인한 뒤 DAPI로 염색된 핵을 FACS로 분석하였다. DAPI 양성 집단 중 단일 핵을 분류하였다. Sanger 시퀀싱을 위하여 GBM과 뇌실하 영역에서 공유하고 있는 돌연변이와 GBM만 보유하고 있는 돌연변이를 선별하였다. MPprimer(<http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/>)를 이용하여 공유 돌연변이와 GBM만 보유한 돌연변이의 부위 옆에 배치될 수 있는 2개의 프라이머 세트를 설계하였다. 상기 프라이머 세트를 이용하여 돌연변이 부위를 multiplex PCR을 이용해 증폭시켰다. 적절한 온도 조건 하에서 HotStarTaq DNA 폴리머라제 (Qiagen, USA)를 이용하여 단일 핵 PCR을 수행하였다.

[0161] [준비예 9] 레이저 캡처 현미해부(Laser capture microdissection)

[0162] 종양이 없는 SVZ로부터 얻어진 포르말린-고정된 후 파라핀-고정된 조직을 유리 슬라이드에 놓았다. 크실렌(xylene)을 이용하여 슬라이드에 파라핀을 제거한 뒤 수분을 제거하였다. Tris-EDTA 버퍼를 이용하여 90에서 20분 동안 열-유도 항원 회수(Heat-induced antigen retrieval)를 수행하였다. 슬라이드를 상온에서 PBS-GT로 1시간 동안 블로킹한 뒤 GFAP에 대한 마우스 항체(1:500; G3893, Sigma)와 S100b에 대한 토끼 항체(1:500; ab52642, abcam)로 결합시키고, PBS로 세척한 뒤 2차 항체로 토끼-컨쥬게이트된 Alexa Fluor 488(1:500 dilution; Invitrogen)와 마우스-컨쥬게이트된 Alexa Fluor 555(1:500 dilution; Invitrogen)로 결합시켰다. 시료를 PBS로 세척하고 300 nM DAPI (Invitrogen)를 포함하는 PBS 내에서 배양하였다. GFAP, S100b 항체 및 DAPI로 면역 형광 염색을 수행한 뒤, PALM 레이저 캡처 시스템(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 뇌실하 영역을 뇌실막 층(ependymal layer), 저세포 간격(hypocellular gap) 및 성상교세포 대(astrocytic ribbon)로 미세 해부하였다. QiAamp 마이크로 키트(Qiagen, USA)를 이용하여 회수된 세포로부터 DNA 유전체를 추출하였다. TERT 프로모터의 C228T 돌연변이의 타겟 영역을 프라이머와 high-fidelity PrimeSTAR GXL DNA 폴리머라제 (Takara, Japan)를 이용하여 증폭시켰다. 증폭된 DNA 산물을 정제한 뒤 상기 준비예 5에 나타난 부위-특이적 앰플리콘 시

퀵싱을 수행하였다.

[0164] [준비에 10] 돌연변이 시그니처의 분석

[0165] 돌연변이 과정의 발생 원인을 결정하기 위하여 다중 회귀 접근(multiple regression approach) 방식으로 deconstructSigs(Rosenthal, R., McGranahan, N., Herrero, J., Taylor, B. S. & Swanton, C. DeconstructSigs: delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies and patterns of carcinoma evolution. *Genome Biol* 17, 31, (2016) 참조)를 수행하여 COSMIC signature framework (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures>)에 근거해 시그니처를 추출하였다. 최종 돌연변이 인풋(input)은 11개의 종양이 없는 SVZ으로부터 얻어진 261개와 9개의 GBM에서 얻어진 812개의 돌연변이와, 하나의 GBM-침윤된 SVZ로부터 얻어진 60개의 돌연변이로 얻어졌다.

[0167] [실시에 1] 종양이 없는 SVZ와 종양의 유전자 돌연변이 확인

[0168] 상기 준비예 1에서 채취한, 종양으로부터 떨어진 정상 SVZ 시료에 체세포 돌연변이가 존재한다면, 상기 정상 SVZ에서 유전자 돌연변이의 정도(mutational burden) 또는 변종 대립 유전자의 빈도(variant allele frequency, VAF)가 종양에서 보다 매우 낮을 것으로 예측하여 이하의 실험을 수행하였다. 구체적으로, 종양이 없는 SVZ 조직의 저-수준의 체세포 돌연변이를 확인하기 위하여, 상기 i) 내지 iii)의 시료에 대하여 심층 시퀀싱 분석(deep sequencing analysis)을 수행하였다. 즉, 34개 시료에 대하여 심층 전장 유전체 시퀀싱(deep whole exome sequencing)(average read depth of 392X)을 수행하였고, 61개의 시료에 대하여는 2개의 텔로머라제 역전사 효소(telomerase reverse transcriptase, TERT) 프로모터 부위(average read depth of 948,608X), 그리고 18개의 시료에 대하여 Cancer Genome Atlas(Brennan, C. W. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462-477, (2013); Suzuki, H. et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet* 47, 458-468, (2015) 참조)에 의해 알려진 하기 표 3의 79개의 신경교종-관련 유전자(average read depth of 601X)에 대하여는 심층 표적 시퀀싱(deep targeted sequencing)을 수행하였다. 최근에 GBM 환자의 83%에 있어서 TERT ATG 시작 부위의 124 bp 위쪽(C228T) 및 146 bp 위쪽(C250T) 부위의 돌연변이가 발암 인자에 해당한다고 알려진 바 있다. 이후, Strelka algorithm (<https://sites.google.com/site/strelkasomaticvariantcaller/>)과 Integrative Genomic Viewer of aligned bam files을 이용하여 모든 엑손 부위와 TERT 프로모터 부위의 체세포 돌연변이를 조사하고, SVZ와 종양 조직의 VAFs를 측정하였다. 환자로부터 수득한 시료 중 영향을 받지 않은 뇌 또는 혈액 조직의 시료에서만 체세포 돌연변이가 관찰되지 않았다. 심층 WES를 통해 분석된 조직 중에서, 각각의 종양이 없는 SVZ에서는 평균 25.2개의 체세포 돌연변이를 확인하였고, 종양 조직에서는 평균 86.3개의 체세포 돌연변이를 확인할 수 있었다. 체세포 돌연변이의 입증을 위하여, 상기 표 3에 나타난 프라이머를 이용하여 Sanger 시퀀싱 또는 부위-특이적 앰플리콘 시퀀싱(site-specific amplicon sequencing)을 수행하였고, 그 결과 선별된 체세포 돌연변이의 92.3%(96 of 104)가 진정 체세포 돌연변이에 해당함을 확인할 수 있었다. 심층 시퀀싱 분석을 통하여 환자의 47%(8 of 17)가 종양이 없는 SVZ의 TERT 프로모터 부위 또는 그 코딩 지역에 적어도 하나의 체세포 돌연변이를 가지며, 이는 GBM 종양 조직 부위에도 존재함을 확인할 수 있었다(도 3, 4 및 5). 8명의 환자에 대하여 심층 전장 유전체 시퀀싱 결과, 개인별 평균 체세포 돌연변이의 13.3개의 종류가 종양이 없는 SVZ와 GBM 종양 사이에 공유되고 있음을 확인할 수 있었다. 이렇게 종양이 없는 SVZ와 GBM 종양 사이에 체세포 돌연변이가 공유되는 것은 IDH-야생형 GBM 환자에서만 관찰되었고, 그 외의 뇌 종양에서는 확인되지 않았다(도 6, 7 및 8). 또한, SVZ와 종양 사이 체세포 돌연변이가 공유되던 IDH-야생형 GBM 환자의 75%(6 of 8)에서 TERT 프로모터와 EGFR, PTEN, TP53 또는 RB1과 같은 암 유발 유전자에 매우 낮은 수준의 암 유발 돌연변이가 관찰되었다. SVZ에서 이러한 돌연변이의 VAFs는 1% 내지 22% 정도로 측정되었다. 흥미롭게도 TERT 프로모터 돌연변이는 종양이 없는 SVZ 조직에 암 유발 돌연변이가 존재하는 IDH-야생형 GBM 환자 모두에게서 발견되었다. 이러한 암 유발 돌연변이의 VAFs는 SVZ 보다 종양 조직에서 29% 내지 92% 정도로 훨씬 높은 수준으로 측정되었다(도 9). 반면, GBM이 SVZ로 침윤한 환자를 대상으로 한 심층 WES 결과, 종양에서 관찰된 체세포 돌연변이의 93%가 SVZ 조직에서도 관찰되었고, 이러한 돌연변이의 VAFs는 종양 조직 보다 SVZ에서 더욱 높게 측정되었다(도 8, 10 및 11). 나아가 GBM에서 종종 발견되는 EGFR 복제수 변이(copy number variations, CNVs)를 분석하기 위하여 실시간 정량 PCR(real-time quantitative PCR)을 수행한 결과, 종양이 없는 SVZ 조직에서 CNVs가 관찰되었다. 종양이 없는 SVZ 조직에 암 유발 돌연변이가 존재하는 IDH-야생형 GBM 환자 6명 중 4명에서, SVZ 조직에서 EGFR 유전자 증폭이 관찰되었다(표 4). 심층 WES 결과와 마찬가지로 종양이 없는 SVZ 조직보다 종양 조직에서 EGFR 복제수의 상대적 배수가 현저히 높게 측정되었다(도 12).

[0169] 이를 통하여 IDH-야생형 GBM 환자에 있어서, SVZ와 종양 조직에서 체세포 돌연변이를 공유하지만, 상기 SVZ 조

직에서가 종양 조직에서보다 그 발현 수준이 현저히 낮은 것을 알 수 있었다.

표 3

[0170]

| 신경교종-관련 유전자 | |
|---|--|
| NOTCH1, NOTCH2, PDGFRA, EGFR, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, NF1, CIC, ATRX, IDH1, FUBP1, ARID1A, ARID1B, SMARCA4, CDKN2A, TP53, SETD2, MLL2, IDH2, ABCB1, ABCC9, ADAM29, AFM, ANKRD36, BRAF, C1orf150, CALCR, CARD6, CD3EAP, CDH18, CDH9, CDHR3, CDX4, COL1A2, CXorf22, DCAF12L2, DRD5, DYNC1I1, FGA, FOXR2, FRMD7, GABRA1, GABRA6, GABRB2, GPX5, HEATR7B2, IL18RAP, KEL, KRTAP20-2, LCE4A, LRRC55, LUM, LZTR1, MMP13, NLRP5, ODF4, PARD6B, PLCH2, PODNL1, QKI, RB1, RFX6, RPL5, SCN9A, SEMA3C, SEMA3E, SEMG1, SIGLEC8, NRAS, KRAS, CDK4, CDKN2B, FGFR, MDM2, MDM4, MET, CDKN2C, CDK6 | |

표 4

| Patient no. | Distance between SVZ and tumor (mm) | Shared mutations | | |
|-------------|-------------------------------------|---|--------------------------------|------------------------------|
| | | SNV, Indel (VAF, SVZ→tumor) | TERT promoter (VAF, SVZ→tumor) | CNV (fold change, SVZ→tumor) |
| GBM 26 | 13.4 | EGFR:p.Ala289Val (3% → 48%) PTEN:p.Val317fs (2% → 35%) | c228t (1% → 37%) | EGFR (5 → 137) |
| GBM 187 | 18.8 | TP53:p.Cys176Tyr (7% → 92%) | c228t (2% → 42%) | - |
| GBM 245 | 7.2 | TP53:p.Glu285Lys (13% → 82%) | c228t (6% → 52%) | - |
| GBM 276 | 5.3 | - | c228t (2% → 33%) | EGFR (3 → 18) |
| GBM 499 | 7.6 | EGFR:p.Ala289Val (4% → 29%) | c228t (1% → 38%) | EGFR (7 → 83) |
| GBM 520 | 26.6 | RB1:p.Lys202fs (19% → 39%) | c228t (22% → 36%) | EGFR (10 → 21) |

[0171]

[실시예 2] GBM 종양 기원 부위 확인

[0173]

상기 실시예 1에서 IDH-야생형 GBM 환자의 SVZ와 종양 조직에서 체세포 돌연변이를 공유하지만, 상기 SVZ 조직에서 종양 조직에서보다 그 발현 수준이 현저히 낮은 것과 관련하여, 상기 SVZ 조직에서 발견된 클론이 암 유발 돌연변이를 획득한 뒤 종양으로 발전하는 과정에서 종양만의 일과성 변이(tumor-private passenger mutations)를 얻은 것으로 가정할 수 있다. 상기 가정에 의하면, 종양은 단일 세포 수준에서 SVZ와 공유하는 돌연변이뿐만 아니라 종양만의 일과성 변이 또한 포함해야 하므로, 이를 확인하기 위하여 이하의 실험에서는 IDH-야생형 GBM 환자의 SVZ와 암 유발 돌연변이를 공유하는 종양의 단일 세포 시퀀싱(single cell sequencing)을 수행하였다. 보다 상세하게는 유세포 분석기(fluorescence-activated cell sorting, FACS)를 이용하여, GBM 종양과 SVZ 모두에서 TP53, c.527G>A의 암 유발 돌연변이가 존재하고, GBM 종양에서만 TCERG1L, c.1127G>A의 일과성 변이를 가지는 환자(GBM187)의 GBM 종양으로부터 단일 핵을 분리하였다.

[0174]

상기 GBM 종양에서 TP53, c.527G>A 및 TCERG1L, c.1127G>A의 VAFs는 각각 91.8% 및 87.2%로 측정되었는데, 이는 종양에서 돌연변이 정도와 유사하였다. 그 후 TP53, c.527G>A 및 TCERG1L, c.1127G>A 부위에 대하여 단일 세포 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과, 47개의 시퀀싱된 클론 중 42개의 경우에서만 TP53, c.527G>A과 TCERG1L, c.1127G>A 돌연변이가 관찰되었고, 다른 2개의 클론은 두 부위 모두에서 정상 대립 유전자(alleles)를 보였다(도 13). TP53, c.527G>A 및 TCERG1L, c.1127G>A 중 어느 하나의 돌연변이만을 가진 클론은 없었다. 유사하게, 다른 IDH-야생형 GBM 환자(GBM520)에서 획득한 종양에 대하여 SVZ와 공유하고 있는 TERT 프로모터 돌연변이 C228T와 종양만의 돌연변이인 RPS13, c.*3T>G의 VAFs는 각각 36.0% 및 40.8%로 측정되었고, 25개의 시퀀싱된 클론 중 12개에서 상기 두 돌연변이가 모두 존재하였다. 나머지는 두 부위 모두에서 정상 대립 유전자를 보였으며(도 14), 두 돌연변이 중 어느 하나만 가지고 있는 클론은 없었다. 클론 진화(clonal evolution)의 방향을 더욱 조사하기 위하여, 심층 WES 데이터를 이용하여 종양이 없는 SVZ와, GBM이 침윤한 SVZ에서 모든 염색체에 대하여 CNVs 패턴을 분석하였다. 그 결과, 종양이 없는 SVZ에서는 종양에서 발견된 염색체의 구조적 변형이 관찰되지 않았으나, GBM이 침윤한 SVZ에서는 종양 조직과 동일한 CNV 패턴을 보였다. 이를 통하여, 단일 세포 시퀀싱 데이터에서와 마찬가지로, 종양이 없는 SVZ에서 CNVs는 종양 세포로부터 기인한 것이 아님을 알 수 있었다(도 15).

[0176]

이로부터, 종양으로부터 떨어진 종양 없는 SVZ에서 암 유발 돌연변이를 가진 세포가 GBM으로 변형 및 진행되는

것임을 알 수 있었다.

[0178] **[실시예 3] 종양이 없는 SVZ에서 종양 유발 부위 및 세포 확인**

[0179] 다음으로, 종양이 없는 SVZ 내 어떠한 세포가 GBM으로 진행되는 것인지 확인하였다. 인간의 SVZ는 해부학적으로 뇌실막 층(ependymal layer), 저세포 간격(hypocellular gap) 및 성상교세포 대(astrocytic ribbon)로 구분될 수 있다. 이러한 3가지 층 중 GFAP 양성 성상교세포 대는 성상교세포-유사 줄기세포를 포함하고 있는데, 상기 성상교세포-유사 줄기세포가 SVZ에서 암 유발 돌연변이를 일으키는 지 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다. 먼저, GBM 환자에서 SVZ 3층을 구분하기 위하여 S100b, GFAP, 및 DAPI를 면역 염색하였다(도 16). GBM499 및 GBM187 두 환자 모두 종양이 없는 SVZ 조직에서 낮은 수준의 TERT 프로모터 C228T 돌연변이를 나타냈다. 이후, 성상교세포 대에서 GFAP-양성 성상교세포-유사 줄기세포와, 뇌실막층에서 S100b-양성 뇌실막 세포, 그리고 저세포 간격 또는 다른 부위에서 DAPI-양성 세포를 분리하기 위하여 레이저-포착 현미 해부(laser capture microdissection)를 수행하였다(도 16). SVZ에서 어떤 세포가 암 유발 돌연변이를 보유하고 있는 지 확인하기 위하여, 각 층에 풍부한 세포에 대하여 TERT 프로모터 C228T 돌연변이의 심층 부위-특이적 앰플리콘 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과, 상기 TERT 프로모터 C228T 돌연변이는 오로지 성상교세포 대의 GFAP-양성 성상교세포-유사 줄기세포에서만 확인할 수 있었다(도 16 및 17).

[0180] 이를 통하여 SVZ의 성상교세포 대의 GFAP양성의 성상교세포-유사 줄기세포가 암 유발 돌연변이를 보유하며 SVZ를 떠나서 종양을 유발하는 것을 알 수 있었다.

[0182] **[실시예 4] 종양이 없는 SVZ에서 체세포 돌연변이의 원인의 확인**

[0183] 종양이 없는 SVZ에서 체세포 돌연변이의 원인을 확인하기 위하여, 돌연변이 과정으로 본질적 DNA 복제 오류(intrinsic DNA replication errors), 외인성 또는 내인성 돌연변이원의 노출(exogenous or endogenous mutagen exposure) 및 결함이 있는 DNA의 손상(defective DNA repair) 등과 같은 체세포 돌연변이를 유발할 수 있는 기작의 유전적 특성을 분석하였다. DeconstructSigs를 이용하여 11개의 종양이 없는 SVZ(271개의 체세포 돌연변이), 9개의 종양(845개의 체세포 돌연변이), 및 한 개의 GBM-침윤 SVZ(64개의 체세포 돌연변이) 각각의 심층 WES 시퀀싱에서 밝혀진 코딩 지역에서 체세포 돌연변이의 돌연변이적 특성을 분석하였다(도 18). 이를 통하여 종양이 없는 SVZ에 대한 돌연변이 스펙트럼에서 두가지 주된 원인은 시그니처 1(33.9%)과 시그니처 5(45.4%)에 해당함을 알 수 있었다. 한편, 상기 시그니처 1은 종양(86.2%)과 GBM-침윤 SVZ(81.5%)에서 유일하게 우성적 시그니처에 해당하였다(도 19). 최근 시그니처 5의 비율이 높은 것은 체세포 돌연변이의 축적을 나타내는 것으로, 이는 아직 명확히 밝혀지지는 않았지만, 일반적 유전적 노화기작에 의한 것임이 밝혀진 바 있다. 반면, 시그니처 1의 비율이 높은 것은 빠른 증식에 기한 돌연변이에 해당함이 밝혀진 바 있다.

[0184] 상기의 결과로, 종양이 없는 SVZ에서 시그니처 5 돌연변이의 정도가 높은 것으로부터, GBM 발생의 원인이 되는 SVZ에서의 체세포 돌연변이는 변형된 세포의 빠른 증식보다는, 한정된 자가 재생을 가진 NCS의 자연적 노화에 더욱 영향을 주는 것임을 알 수 있었다.

[0186] **[실시예 5] GBM 종양 마우스 모델 제작**

[0187] 다음으로 SVZ의 NSCs의 낮은 수준의 체세포 돌연변이가 실제로 SVZ로부터 떨어진 곳에서 GBM을 형성할 수 있는지 확인하기 위하여, SVZ의 NSCs에 Trp53(p53 또는 TP53), Pten, 및 EGFR 돌연변이를 가진 마우스 모델을 제작하였다: 이러한 돌연변이는 인간 GBM 환자의 종양이 없는 SVZ에서 재발성 암 유발 돌연변이를 일으키는 돌연변이에 해당한다.

[0189] 5-1. 마우스 실험 정보 및 LoxP-Stop-LoxP EGFRvii f/+;LoxP-Stop-LoxP tdTomato f/+ 마우스 제작

[0190] 모든 마우스 실험은 한국과학기술연구원(KAIST) 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 지침에 따라 승인 및 수행되었다.

[0191] 각 마우스는 격리된 케이지에서 물과 사료에 자유롭게 접근 가능하도록 사육되었다. 사육실은 병원성 미생물 부재(SPF), 23°C의 온도가 유지되고, 19시에 조명을 소등하는 12시간 명-암 사이클 조건을 유지하였다. 규칙적으로 수의사와 실험 수행자가 마우스의 건강 상태를 점검하였다.

[0192] 질병 특이적 생존(Disease Specific Survival; DSS)의 종점은 마우스의 사망 혹은 IACUC 프로토콜에 따른 안락사에서 결정되었다. 안락사 조건은 다음과 같다: (i) 20% 이상의 극심한 체중 감소, (ii) 마비, 발작 및 운동능력 손상에 의한 활처럼 흰 자세를 포함하는 극심한 신경학적 손상, (iii) 머리가 부풀어오르는 증상.

[0193] NCI mouse repository로부터 구매한 LoxP-Stop-LoxP EGFRviii 마우스(FVB strain)와 The Jackson Laboratory로부터 구매한 LoxP-Stop-LoxP-tdTomato 마우스(C57BL/6)를 교배하여 LoxP-Stop-LoxP EGFRvii f/+;LoxP-Stop-LoxP tdTomato f/+ 마우스를 제작하였다.

[0195] 5-2. Cre-포함 CRISPR-Cas9 벡터 제작

[0196] 마우스 SVZ의 NSCs에 Trp53, Pten, 및 EGFR 돌연변이를 주입하기 위하여, 고효율의 sgRNAs 타겟팅 Trp53 및 Pten을 가지며, Cas9 및 Cre 재조합효소(recombinase)를 나타내는 단일 벡터를 제작하였다.

[0197] 구체적으로, pU6-(BbsI)_CBh-Cas9-T2A-BFP 플라스미드는 R. Kuehn (Addgene plasmid 64323)로부터 제공받았다. Trp53을 타겟팅하는 sgRNA(sgP53) 및 Pten을 타겟팅하는 sgRNA(sgPTEN)는 잠재적인 타겟 외 효과를 최소화하기 위해 CRISPRtool (<http://crispr.mit.edu>)을 사용하여 설계되었다. p53과 LacZ에 대한 sgRNA 후보군은 기존에 알려진 방법(Cancer Cell 28, 429-440 (2015))으로 제작되었다. sgRNA 염기서열을 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

| 서열번호 | 목적 유전자 | 서열(5'→3') |
|------|--------|------------------------|
| 29 | Trp53 | GGTGTAATAGCTCCTGCATGG |
| 30 | PTEN | GGTTGGTCAAGATCTTCACAGA |
| 31 | LacZ | ggtgccaatcgccccacgcgat |

[0201] 각 sgRNA 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드는 Cosmogenetech에서 합성되었고, Thermocycler를 사용하여 시험관 내에서 어닐링하였다. pU6-(BbsI)_CBhCas9-T2A-BFP 플라스미드를 BbsI 제한효소로 처리 후 어닐링 된 올리고뉴클레오티드와 결찰(ligate)하였다.

[0202] sgRNA를 포함하는 플라스미드를 이용한 게놈-편집 테스트는 당업계에 기존에 공지된 방법(Nat. Protocols 8, 2281-2308 (2013))으로 수행하였다. 약술하면, Neur-2a 세포를 sgRNA 후보가 포함된 플라스미드로 jetPRIME 트랜스펙션 시약(Polyplus)을 사용하여 트랜스펙션하고 2일 후에 Qiamp mini DNA 키트(Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출하고, 이 DNA를 주형으로 하여 목적하는 부위를 PCR 증폭하였다. 그 후에 T7 엔도뉴클레아제 I 분석(T7E1 assay; NEB)을 수행하여 sgRNA 후보물질의 게놈-편집 효율을 확인하였다. T7E1 결과를 도 25b에 나타내었다. 돌연변이 빈도(mutation frequency)는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정된 밴드의 세기와 하기 [수학식 1]을 통해 계산되었다.

[0203] [수학식 1]

[0204] 돌연변이 빈도(%)= 100 x (1-(1-fraction cleaved)^{1/2})

[0206] Trp53/Pten, Cas9, 및 Cre 재조합효소를 목적으로 하는 sgRNAs를 포함하는 단일 벡터를 얻기 위해, P2A-Cre with AAV: ITR-U6-sgRNA(backbone)pEFS-Rluc-2A-Cre-WPRE-hGHpA-ITR(F.Zhang 제공, Addgene plasmid 60226)를 증폭하고, pU6-(BbsI)_CBh-Cas9T2A-BFP의 T2A-BFP를 P2A-Cre로 치환하였다. 다음으로, pU6-sgP53, pU6-sgPTEN를 증폭하여 pU6-sgP53-pU6-sgPTEN_CBh-Cas9-P2A-Cre 플라스미드를 제작하기 위해 pU6-(BbsI)_CBh-Cas9-P2A-Cre플라스미드의 pU6-(BbsI)을 pU6-sgP53-pU6-sgPTEN으로 치환하였다. 추가적으로, sgLacZ-Cas9-Cre를 제작하기 위해 sgLacZ를 pU6-(BbsI)_CBh-Cas9-P2A-Cre에 삽입하였다. 최종 벡터 맵을 도 25a에 나타내었다.

[0208] 5-3. 전기천공을 이용한 마우스 SVZ에 벡터 주입

[0209] 마우스의 SVZ의 특정 위치 내에 있는 NSCs에 암 유발 돌연변이를 부여하고, SVZ로부터 돌연변이된 세포의 이동을 확인하기 위하여, LoxP-Stop-LoxP EGFRviii f/+; LoxP-Stop-LoxP tdTomato 마우스의 대뇌반구 한쪽 부위의 앞면 SVZ에 상기 실시예 5-2의 방법으로 제작된 Cre-포함 CRISPR-Cas9 벡터를 전기 천공법으로 주입하였다.

[0210] 구체적으로, 생후 2-3일 된 마우스 신생아(P2-P3)를 저온마취(5분 이상)한 후, 지지대에 접촉 석고를 사용하여 고정하였다. 일반적인 위치 마커로서 오늘쪽 눈과 람다를 연결하는 가상의 선을 설정하고 모세관 주사(capillary needle)를 이 선의 눈으로부터 1/3 지점에 삽입하였다. 우측 뇌실에는 두개골에서 2mm 지점에 플라스미드 용액 1ul(2ug/ul, 1%(v/v) FastGreen 함유) 주입되었다. 뇌측실의 형상이 Fast Green 염색되는 것으로 주사의 성부를 확인하였다. 주사가 성공적으로 이루어진 동물에만 1mm 트위저 전극(CUY650P1, Nepagene)과 ECM830 전기천공기(BTX-Harvard apparatus)를 사용하여 전기 펄스(100V, 50ms, 90ms 인터벌) 5회를 주었다. 양극은 눈을 향하도록 했고, 음극은 측실의 반대 방향을 향하도록 하였다. 전기천공 후, 쥐들을 37℃의 가열판에

서 완전히 회복시키고 모체에 돌려보냈다. 주사 2일 후, tdTomato를 발현하는 형질도입된 세포들은 주로 뇌측실 전방각(anterior horn)의 주둥이-등측면(rostral-dorsolateral side)에 위치하였다. 그러나, 형질도입된 세포들은 꼬리 방향으로 갈수록 서서히 감소하였고, 해마의 앞쪽 관상면(coronal section)에서 관찰되지 않았다.

[0211] 도 25c에 전기천공 3일 후의 Trp53/Pten/EGFR 돌연변이 마우스의 면역염색 결과를 나타내었다. 흰색 화살표 표시 부분은 뇌실하영역에서 tdTomato 양성 반응이 GFAP 또는 nestin과 함께 나타난 부위를 나타낸다. 따라서, tdTomato 양성 세포가 SVZ에 위치한 것을 확인할 수 있었다. 도 25d에는 tdTomato 양성과 nestin 또는 GFAP가 함께 염색된 세포의 산포도를 나타내었다.

[0213] 5-4. 마우스 모델의 뇌종양 발생 확인

[0214] 전기 천공된 마우스의 90%(9 of 10)에서 뇌 종양이 발생하였고, 평균 수명은 20주 정도인 반면, 단순히 sgLacz-타겟팅 CRISPR-Cas9 벡터를 전기 천공한 마우스 대조군에서는 뇌 종양이 발생하지 않았다(도 25e). 도 25e에 대조군과 비교한 전기천공된 마우스의 생존율을 그래프로 나타내었다. 각 그룹별로 10마리의 마우스를 사용하였다.

[0215] 또한, 뇌 종양에서 EGFRviii의 발현과 Trp53 및 Pten 인델(indels)의 존재를 확인하였다. 구체적으로, 메스를 이용하여 분리한 종양 덩어리를 다시 레이저 미세절제기(laser-microdissection)를 사용하여 후각 신경구(olfactory bulb)의 tdTomato-양성 세포를 미세 절제하고, 유전체 DNA를 분리하였다. 하기 표 6에 나타낸 프라이머를 사용하여 마우스 게놈의 Trp53 및 Pten 부위를 증폭하였다.

표 6

| 서열번호 | 프라이머 이름 | 서열(5'→3') |
|------|---------------------|----------------------|
| 32 | Mouse_Trp53_forward | AGGTAGGGAGCGACTTCACC |
| 33 | Mouse_Trp53_reverse | TAAGGATAGGTCGGCGGTC |
| 34 | Mouse_Pten_forward | AGACCATAACCCACCACAGC |
| 35 | Mouse_Pten_reverse | TACACCAGTCCGTCCTTTC |

[0218] 목적 부위의 서열 증폭 후, 준비예 5에 기재된 방법으로 부위 특이적 앰플리콘 시퀀싱을 수행하였다. 목적 부위의 인델 빈도(indel frequency) 측정을 위해 Cas-Analyzer 알고리즘(<http://www.rgenome.net/cas-analyzer/#!>)을 사용하였다. 해당 인델 빈도 측정 결과를 도 25i에 나타내었다.

[0219] 구체적으로, sgRNA의 표적 위치(targeting site) 주변에서 인델이 무작위로 발생하게 되며, Trp53과 Pten 모두 80% 이상의 높은 인델 빈도를 나타낼 수 있다. 보다 구체적으로, UCSC 마우스 표준 게놈 기준으로, Trp53의 경우, 11번 염색체의 69402693 내지 69402702 위치 범위에서 무작위로 인델이 나타났으며, Pten의 경우, 19번 염색체의 32874403 내지 32874412 위치 범위에서 무작위로 인델이 발생하였다.

[0220] 하기 표 7에 Trp53 및 Pten의 주요 앰플리콘 시퀀싱 결과, 전체 리드(read) 중 1% 이상의 비율로 나타난 염기서열을 나타내었다. 하기 표7의 리드 빈도는 전체 리드 대한 해당 염기 서열을 가지는 리드의 비율을 의미한다.

표 7

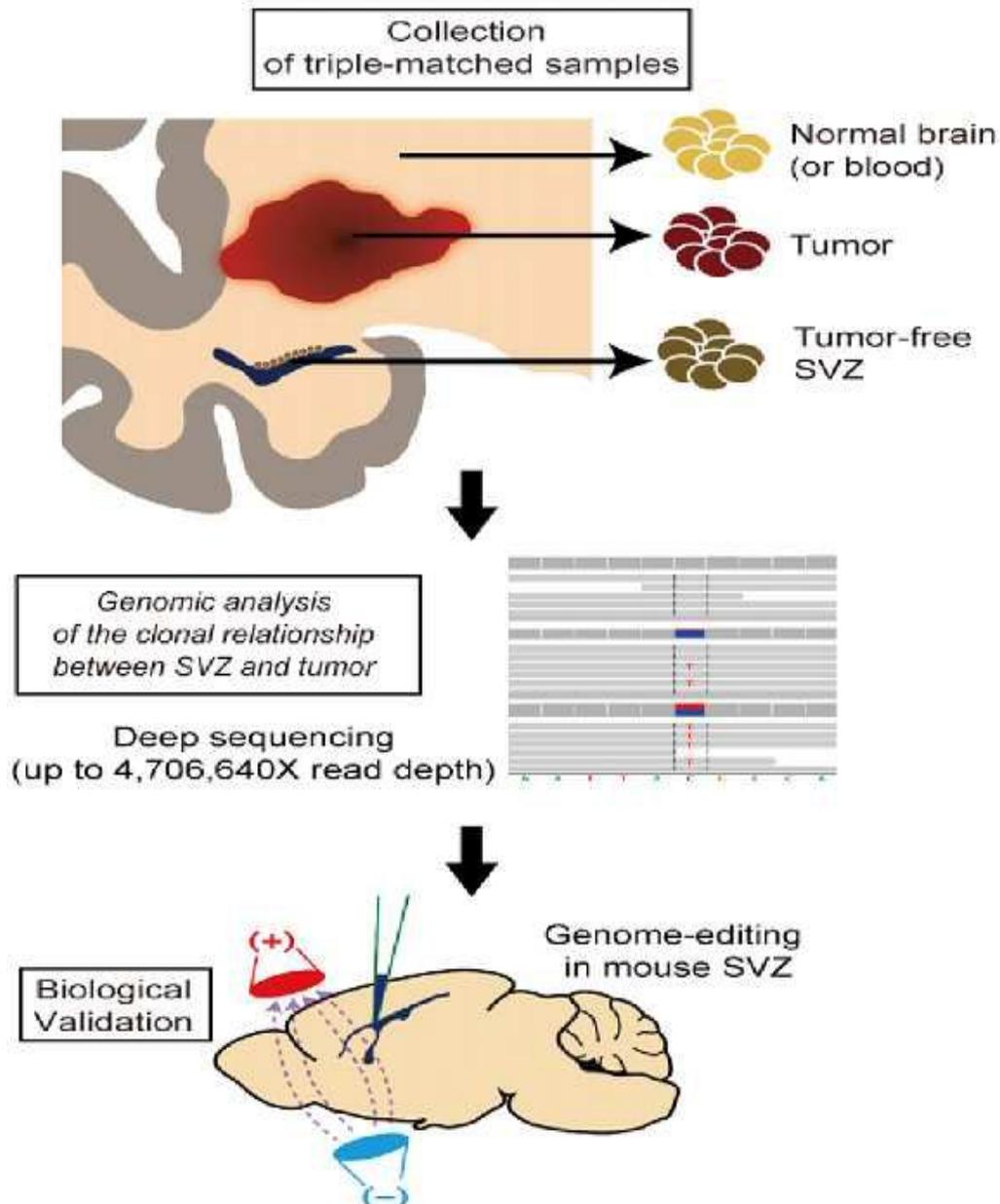
| Trp53 | | |
|-------|--|----------|
| 서열번호 | 염기서열 | 리드 빈도(%) |
| 38 | TGTGTCTTCCCCAGCCGGCTCTGAGTATACCACCATCCACTACAAGTACATGTGTAATAGCTCCTGCACTTGGGGGGCATGAA CCGCCGACCTATCCTTA | 36.3 |
| 39 | TGTGTCTTCCCCAGCCGGCTCTGAGTATACCACCATCCACTACAAGTACATGTGTAATAGCTCCTGTGGGGGGCATGAACCGC CGACCTATCCTTA | 34.7 |
| 40 | TGTGTCTTCCCCAGCCGGCTCTGAGTATACCACCATCCACTACAAGTACATGTGTAATAGCTCCTGCAATGGGGGGCATGAAC CGCCGACCTATCCTTA | 8.0 |
| Pten | | |
| 41 | AGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTTATCAAACCTTCTTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTG CAGCAATTCACGTAAAGCTGGAAA | 38.9 |
| 42 | AGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTTATCAAACCTTCTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTGCA GCAATTCACGTAAAGCTGGAAA | 36.6 |
| 43 | AGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTTATCAAACCTTCTGGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTG CAGCAATTCACGTAAAGCTGGAAA | 3.3 |

- [0223] 종양에서의 EGFRviii 발현 측정을 위해, 종양 및 미처리 뇌 조직으로부터 RNeasy Mini Kit(Qiagen)을 사용하여 RNA를 추출하였다. SuperScript II(Invitrogen)을 사용하여 추출된 RNA로부터 cDNA를 합성하고, cDNA로부터 EGFRviii를 증폭하기 위해, 인간 EGFR exon 1 및 8에 어닐링하는 프라이머를 디자인하였다. 프라이머 서열은 정방향(forward)은 5' -CCCAGGCACTTGATGATACTC-3' '(서열번호 36), 역방향(reverse)은 5' -CTTGCTTTGGGTGGAGAGTT-3' '(서열번호 37)이다. PCR 조건은 98℃ 2분; 98℃ 10초, 60℃ 15초, 68℃ 30초의 35회 반복; 4℃ 정지;로 수행되었다. 애플리콘은 2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 분석되었다. 대조군으로는 Actb가 사용되었다. 이 전기영동 결과를 도 25j에 나타내었다. 도 25j에 나타난 바와 같이, EGFRviii는 종양에서만 발현됨을 확인할 수 있다.
- [0225] 전기 천공 후 16주 경과하였을 때 MRI를 통하여 큰 규모의 종양을 확인하였다. 해당 MRI 영상을 도 25g에 나타내었다.
- [0226] 구체적으로, MRI는 다음과 같은 조건에서 수행되었다. 마우스를 공기/산소 혼합물 중 5%(v/v)의 이소플루란(isoflurane)을 흡입시켜 마취하고, MRI 스캔을 위한 크래들에 놓고 공기/산소 혼합물 중 1.5%(v/v) 이소플루란이 포함된 호흡 마스크와 연결하였다. MRI 실험은 버드케이지 마우스 헤드 코일(birdcage mouse head coil)을 구비한 3T MRS 3000 스캐너(MR Solutions)로 수행되었다.
- [0227] 해부학적 및 병리학적 조건을 검사하기 위해 스핀 에코(Spin Echo; SP) 및 고속스핀에코(Fast Spin Echo; FSE) 시퀀스를 이용하여 T1 강조영상 및 T2 강조영상을 각각 얻었다. 스캔 파라미터는 다음과 같다: time to repeat/echo time=550/11ms (SE) 및 3000/68ms (FSE), field of view = 22x22mm², 매트릭스 크기=256x256(SE) 및 256x248(FSE), 절편두께 = 1mm, 절편 수 = 19, 스캔 시간 = 9분 23초(SE) 및 9분 18초(FSE).
- [0228] 상기 종양 조직에 대하여 헤마톡실린 및 에오신 염색(H&E staining)을 수행하였으며, 도 25f 및 h에 H&E염색 결과 및, 신경교종 마커들의 면역염색결과를 나타내었다. 상기 염색 분석 결과로부터, 괴사(necrosis), 미세 혈관 증식(microvascular proliferation) 및 유사 분열(mitosis) 등의 특징을 가지는 고등급의 신경교종(glioma)이 관찰되었다(도 20 및 도 25h). 이러한 종양은 GFAP, Nestin, Olig2, 및 PDGFR α에 대하여 면역 반응성을 가지며, 인간 신경교종의 특징을 가지고 있고, Ki67을 통하여 고증식능을 확인할 수 있었다.
- [0229] 이를 통하여, 체세포 암 유발 돌연변이로, 예를 들어, Trpp53, Pten, 및 EGFR 돌연변이는 SVZ의 NSCs가 악성의 신경교종으로 진행할 수 있게끔 하는 능력을 가진 것을 알 수 있었다.
- [0231] 5-6. 인간 신경교종과의 유사성
- [0232] (1) 신경교종 발생의 경시적 분석
- [0233] SVZ에서 돌연변이의 발생과 신경교종의 형성 사이의 시간적 및 공간적 관계를 확인하기 위하여, 시간의 경과에 따른 신경교종의 발생을 분석하였다.
- [0234] 구체적으로, 전기천공 후 2일, 8주 및 13~15주가 경과하였을 때 후각 신경구(olfactory bulb)로부터 꼬리 피질(caudal cortex)까지 마우스 뇌의 연속적 절편을 얻은 뒤, tdTomato-양성 세포의 이동을 추적하였다. 그 결과, 상기 tdTomato-양성 세포가 SVZ에서 배측면-꼬리 피질 및 후각 신경구까지 이동하는 것을 확인할 수 있었다(도 20).
- [0235] 계놈 조작된 마우스(n=18)에서, 암 유발 돌연변이를 가진 세포 중 후각신경구로 이동한 세포는 성숙한 뉴런으로 분화되고 신경교종으로 진행되지는 않은 반면, 배측면-꼬리 피질로 이동한 세포는 신경교종으로 진행하였다(도 20).
- [0236] tdTomato-양성 세포는 Trp53, Pten, 및 EGFR 돌연변이 마우스의 연속적 절편 전반에서 증식함이 관찰되었다. 특히 상기 tdTomato-양성 세포는 그 돌연변이가 발생한 SVZ에서 이격된 피질 영역(브레그마로부터 -2.5 및 -3.5mm)에서 숫자가 현저하게 증가하였다(도 21).
- [0237] 또한, 연속적 절편 또는 MRI 이미지에서 신경교종의 위치를 측정한 결과, 신경교종의 67%가 돌연변이가 발생한 SVZ에서 이격된 피질 영역에서 진행된 것을 확인할 수 있었다(도 22). 상기와 같이 피질 영역에서 신경교종이 발생한 마우스(n=12)에서, 돌연변이가 발생한 SVZ에 대하여 H&E 염색 및 GFAP, 네스틴, S100b, 및 DAPI에 대하여 면역 염색한 결과, GBM 환자에서 종양이 없는 SVZ와 마찬가지로 정상의 세포 구조를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 20).

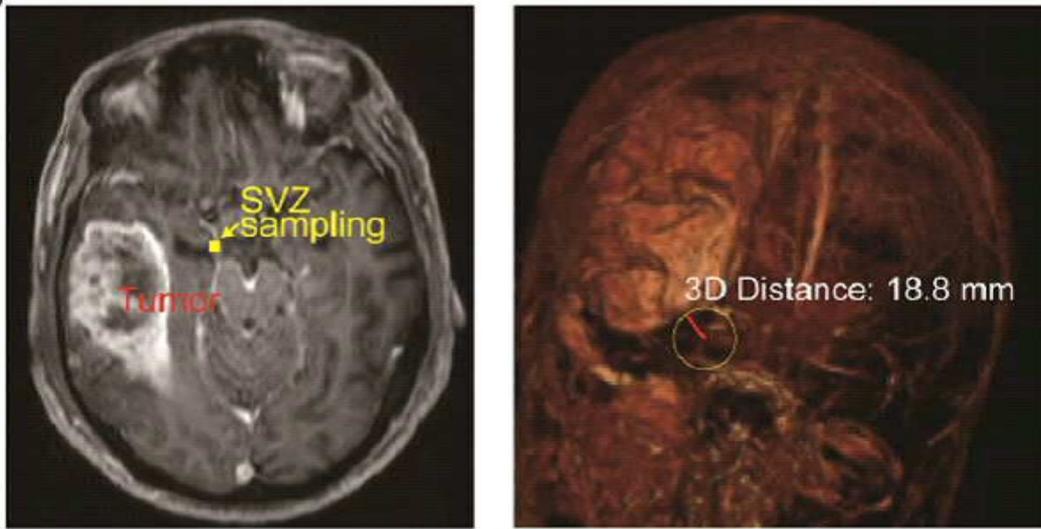
- [0239] (2)신경교종을 형성하는 세포주 확인
- [0240] 이어서, NSCs 유래 어떠한 세포주가 신경교종을 형성하는 것인지 확인하기 위하여, 뉴런, 성상교세포, 희돌기교세포(oligodendrocyte) 및 희소돌기아교전구세포(oligodendrocyteprecursor cells)에서 비정상적 증식을 분석하였다.
- [0241] 구체적으로는, 시각적으로 확인할 수 있는 종양을 형성하기 전 상태에서, 피질 영역 내 tdTomato-양성 세포를, 뉴런에 대한 NeuN, 성상교세포에 대한 GFAP, 성숙 희돌기교세포에 대한 MBP, 희소돌기아교전구세포에 대한 Olig2 및 PDGFRa를 면역 염색하였다.
- [0242] 그 결과, 대부분의 tdTomato-양성 세포가 Olig2 또는 PDGFRa를 발현하는 것을 확인할 수 있었다(도 23). 이를 통하여 SVZ로부터 암 유발 돌연변이를 가진 NSCs가 이동하여 희소돌기아교전구세포주의 비정상적 성장을 통하여 고등급의 악성 신경교종을 유발하는 것을 알 수 있었다(도 24).

도면

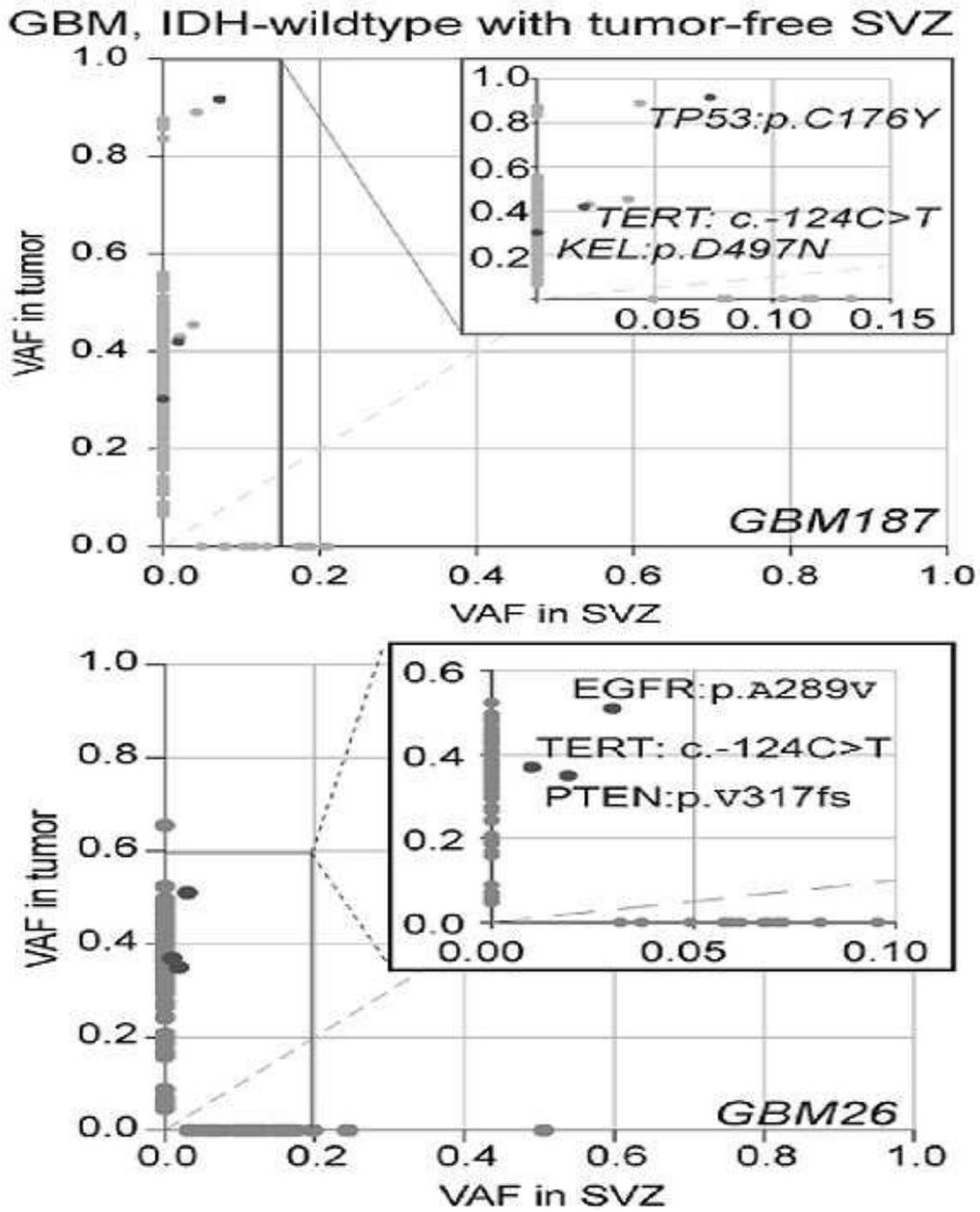
도면1



도면2

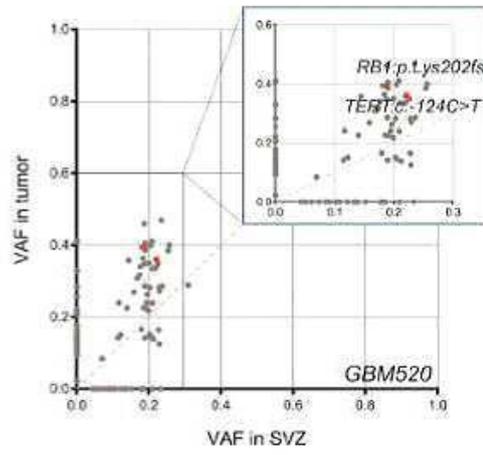
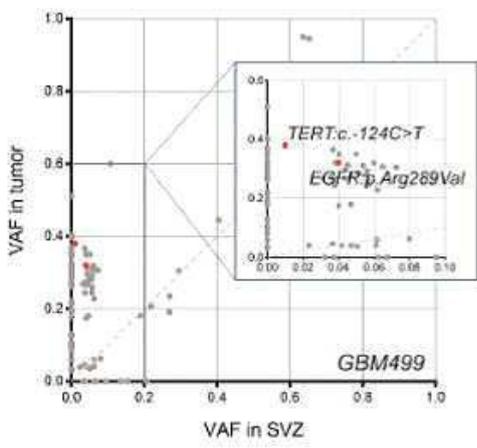
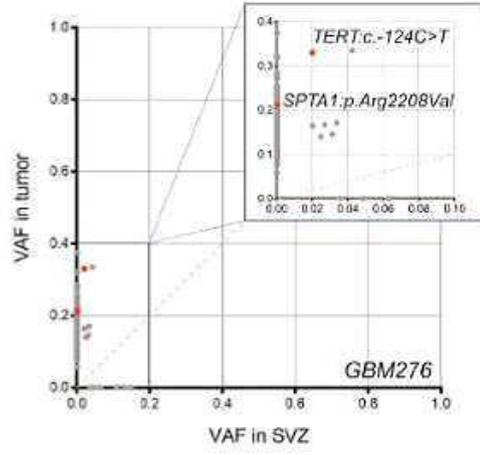
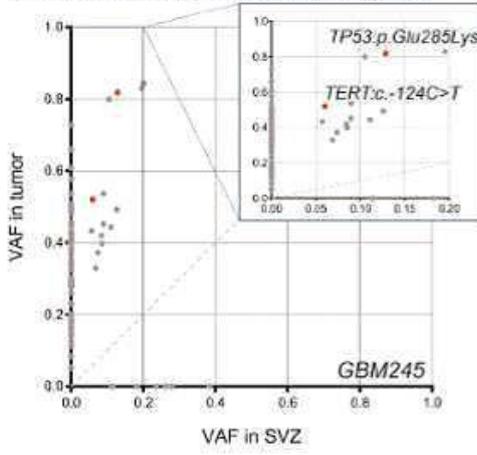


도면3

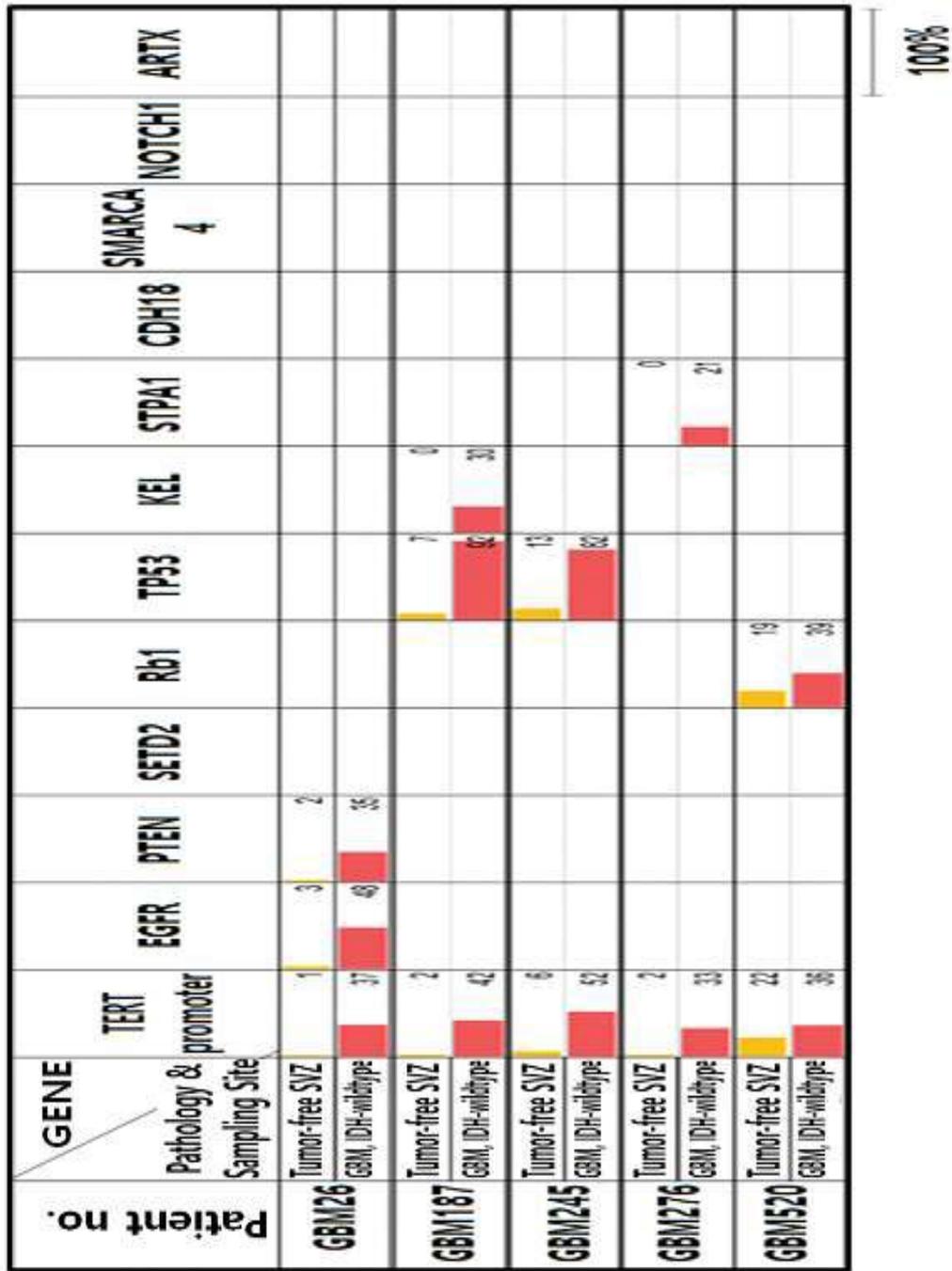


도면4

GBM, IDH-wildtype with tumor-free SVZ

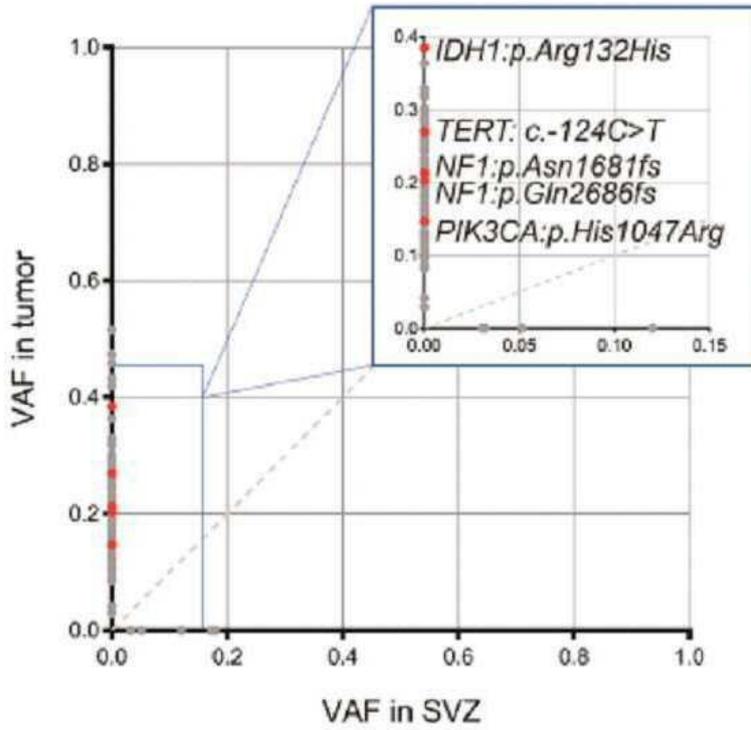


도면5



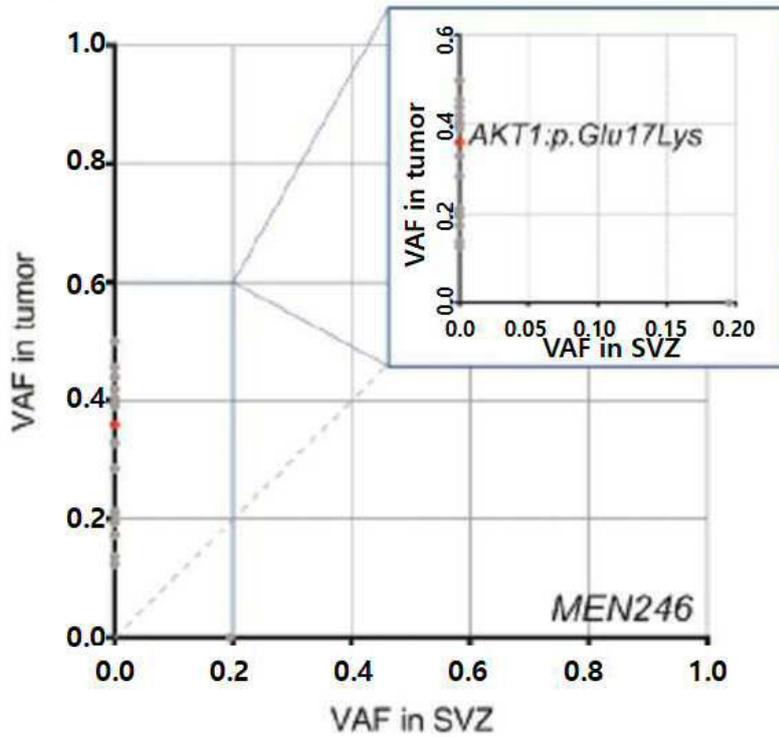
도면6

GBM, IDH-mutant with tumor-free SVZ

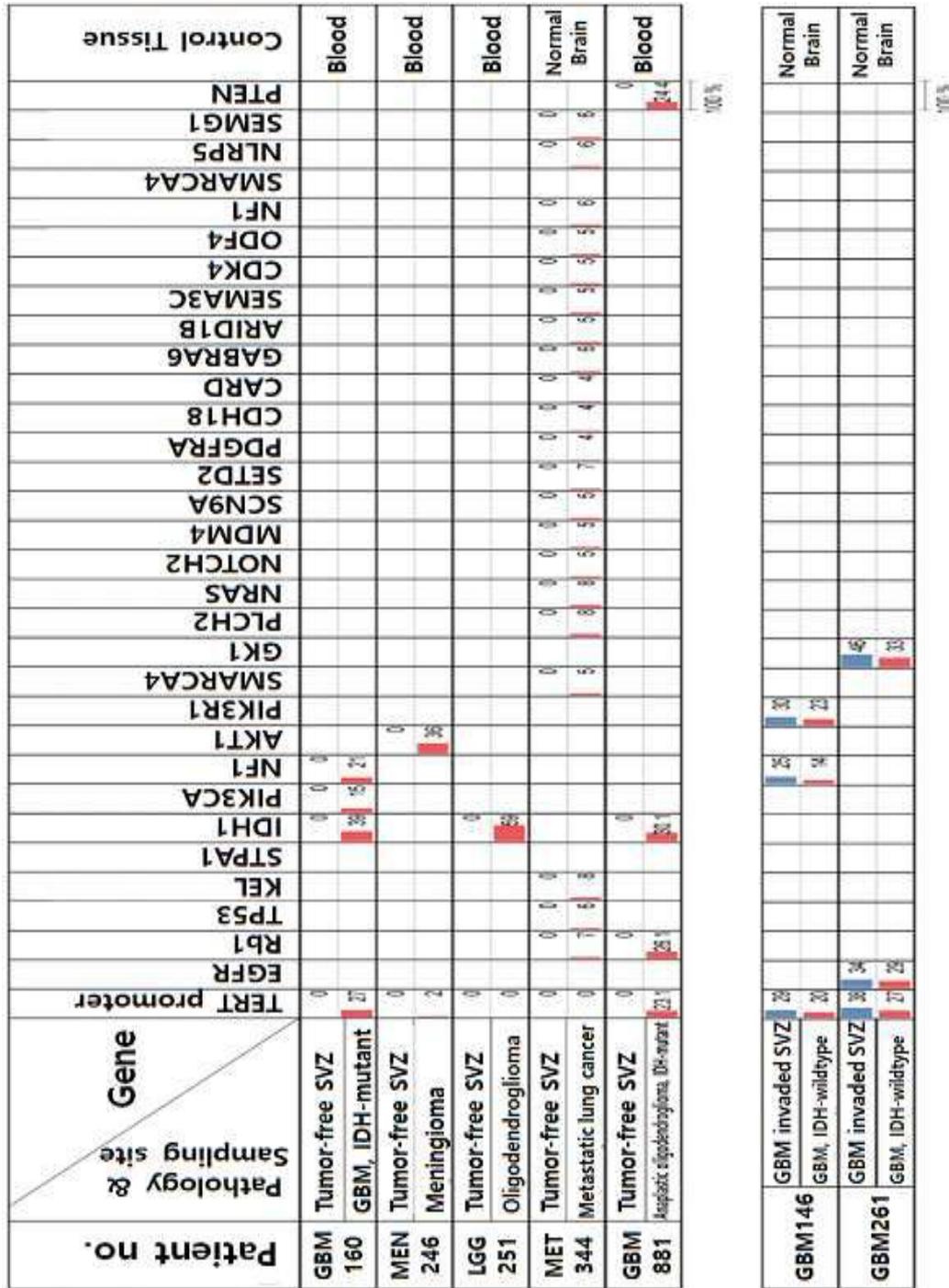


도면7

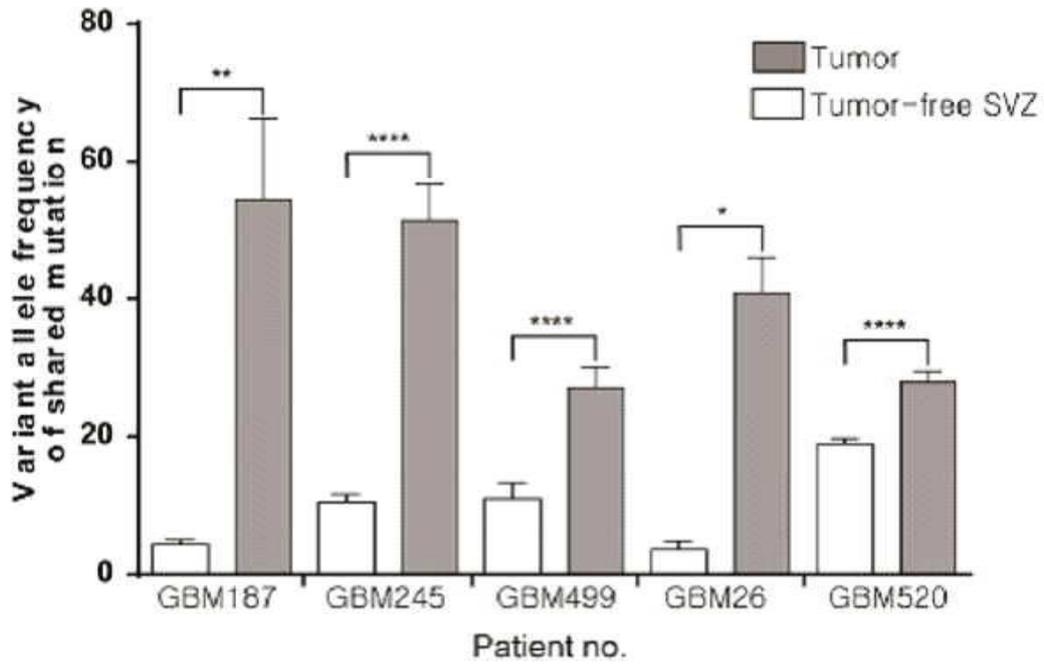
Meningioma with tumor-free SVZ



도면8

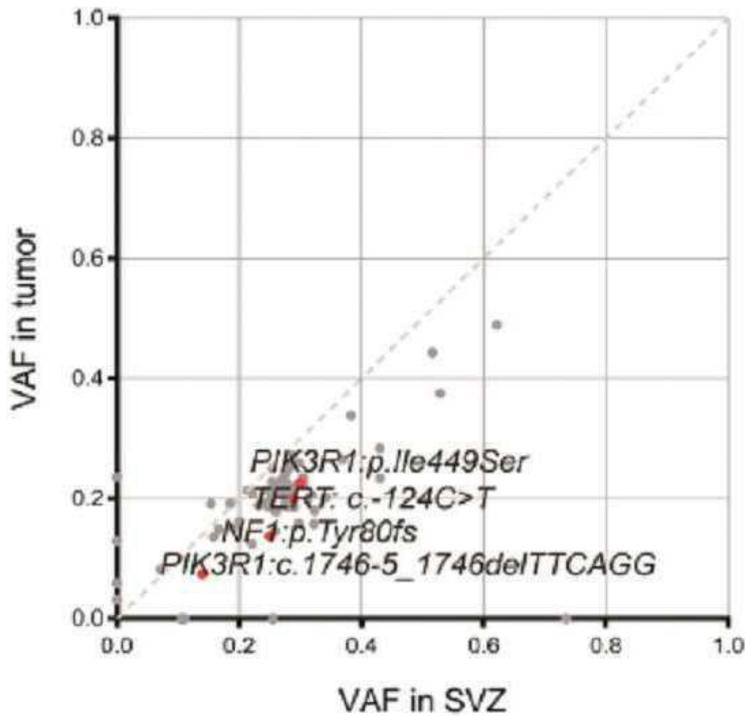


도면9

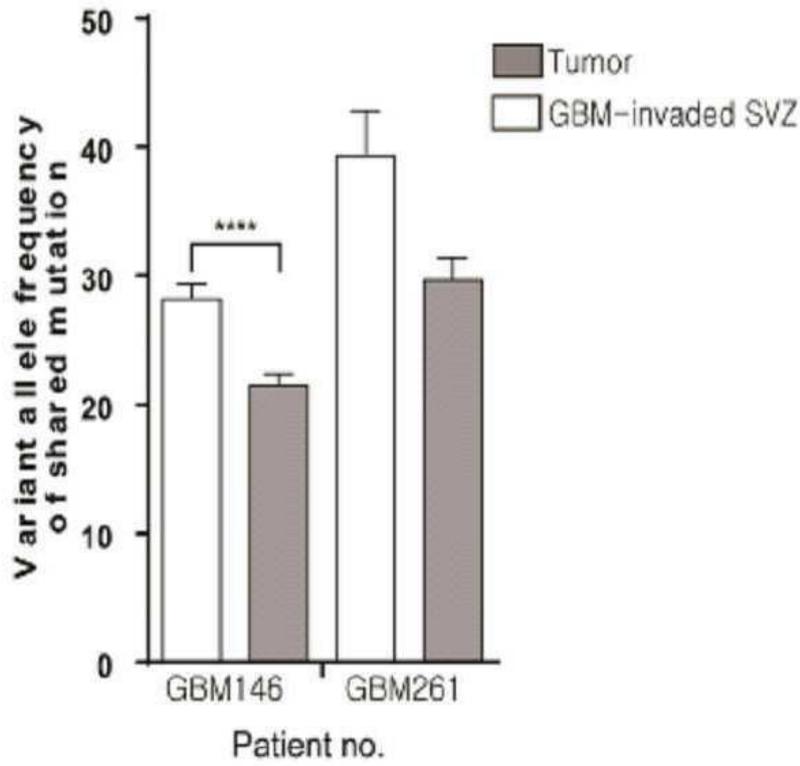


도면10

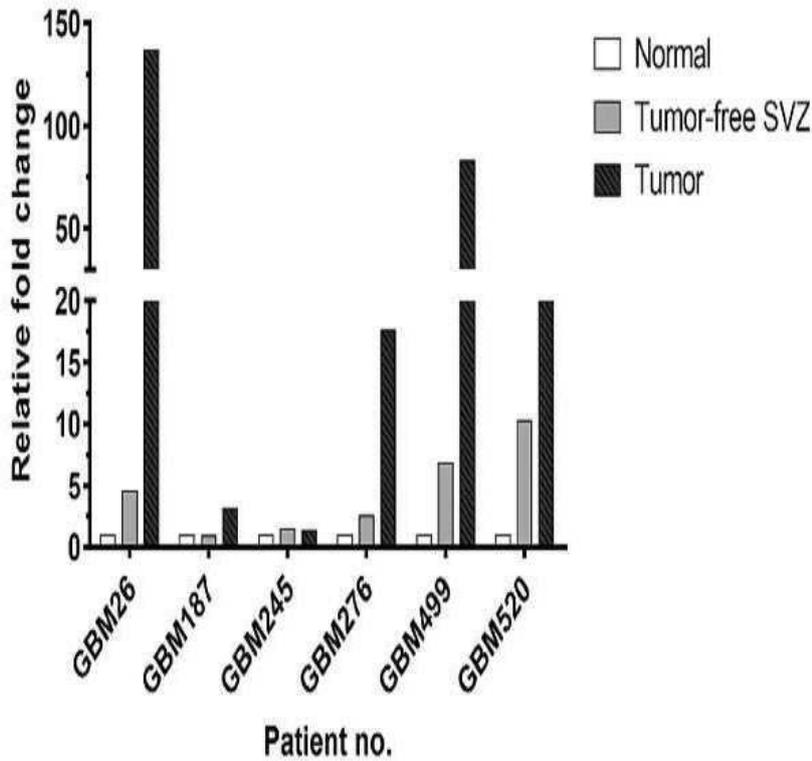
GBM, IDH-wildtype with GBM-invaded SVZ



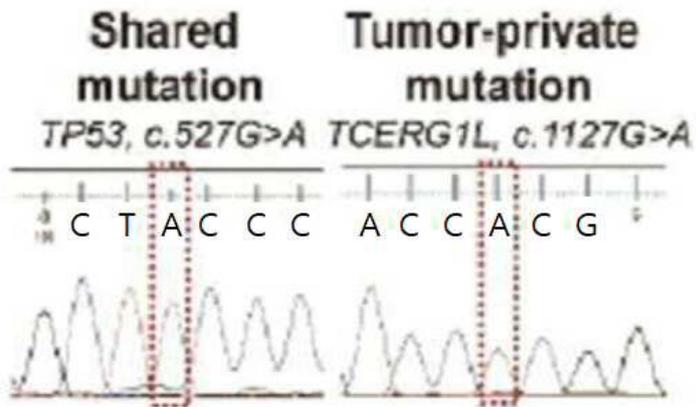
도면11



도면12



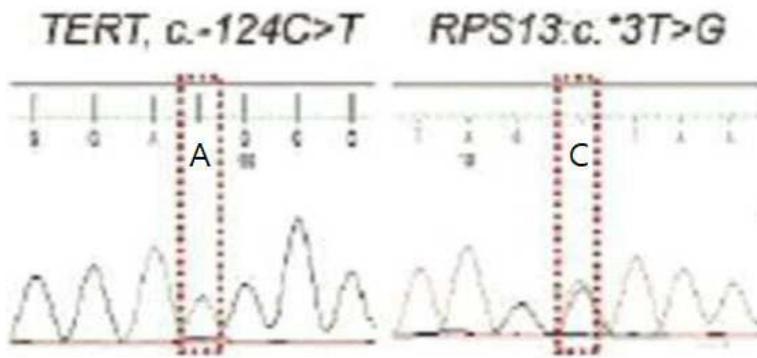
도면13



GBM185

| Shared \ Tumor-private | Tumor-private mutation | Reference sequence |
|------------------------|------------------------|--------------------|
| Shared mutation | 42 | 0 |
| Reference sequence | 0 | 5 |

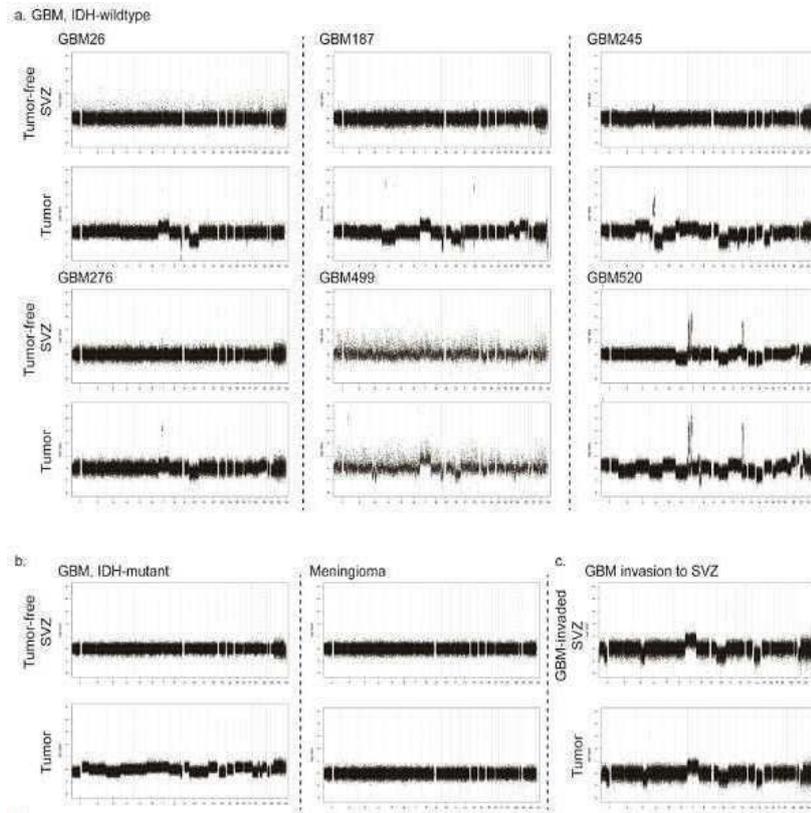
도면14



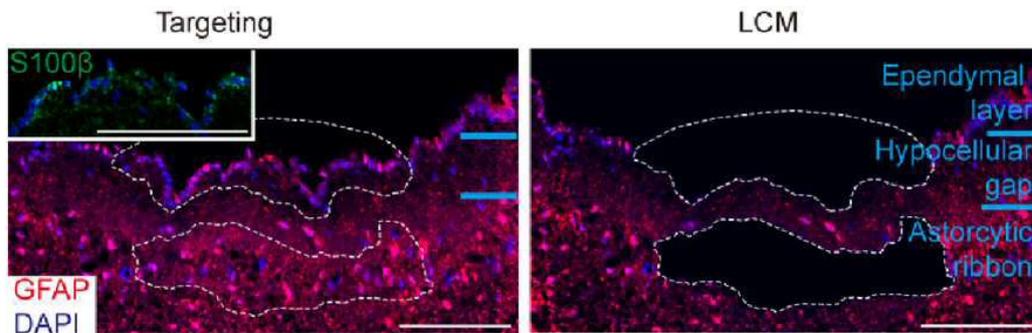
GBM520

| Shared \ Tumor-private | Tumor-private mutation | Reference sequence |
|------------------------|------------------------|--------------------|
| Shared mutation | 12 | 0 |
| Reference sequence | 0 | 13 |

도면15

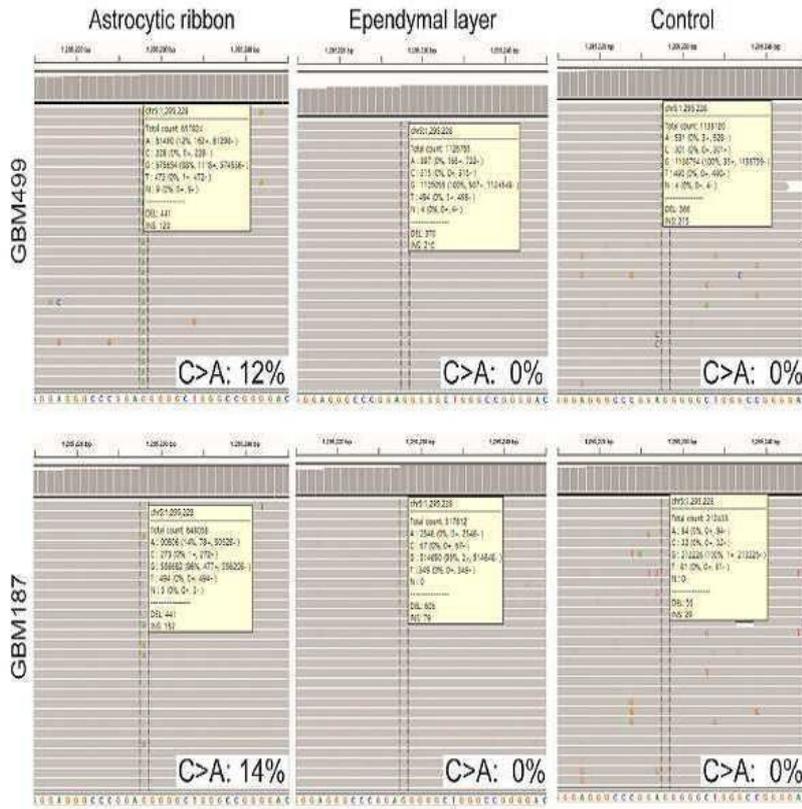


도면16

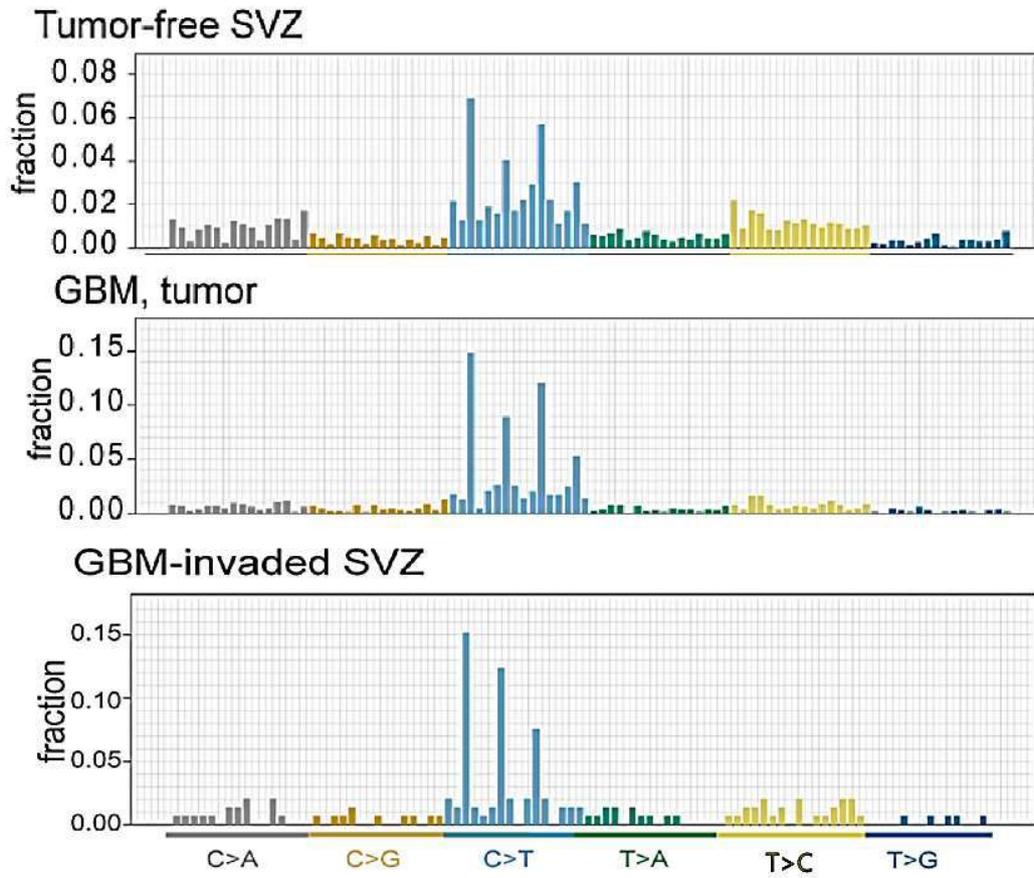


| TERT c.-124C>T | VAF (%) | |
|-------------------|---------|--------|
| | GBM499 | GBM187 |
| Patient no. | | |
| Bulk DNA | 1.2 | 1.6 |
| Astrocytic ribbon | 16.0 | 17.0 |
| Ependymal layer | 0 | 0 |
| Other region | 0 | 0 |

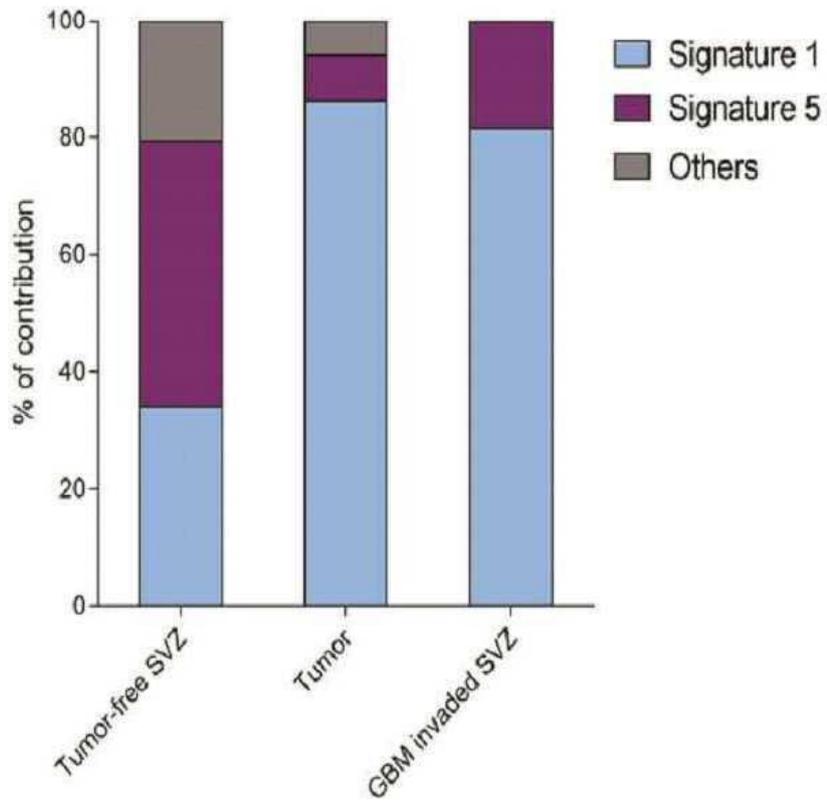
도면17



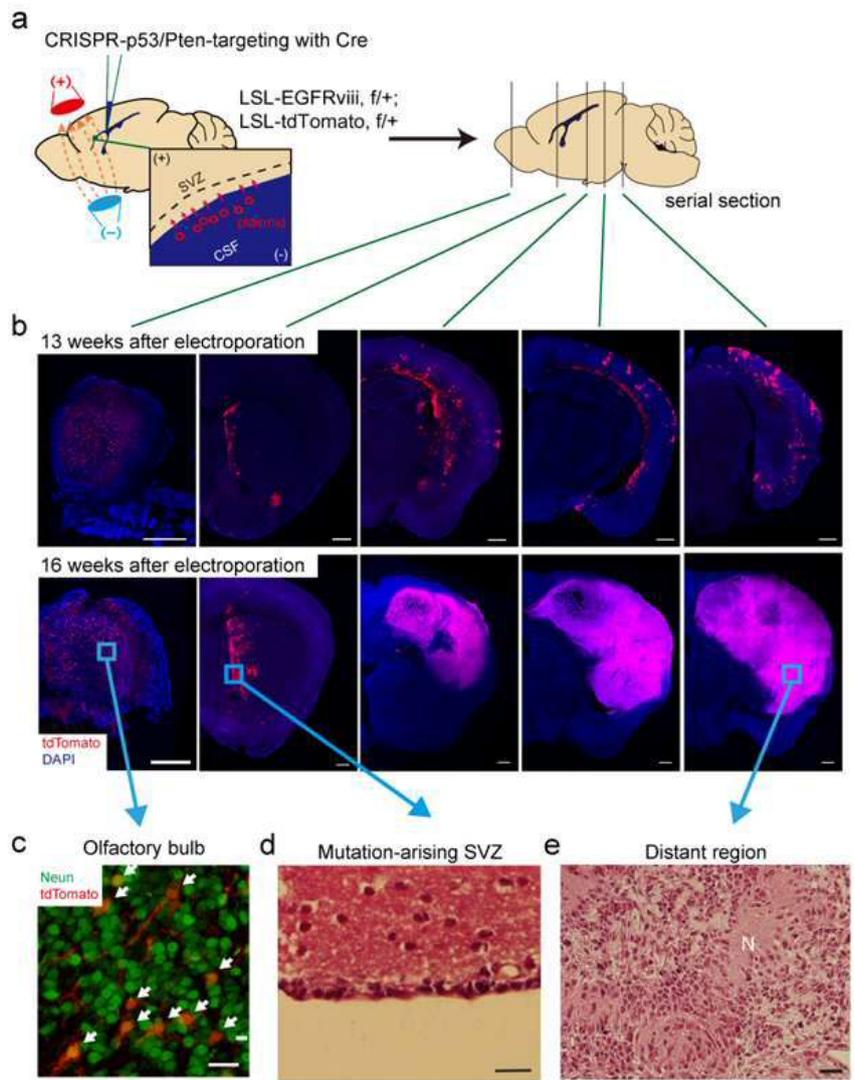
도면18



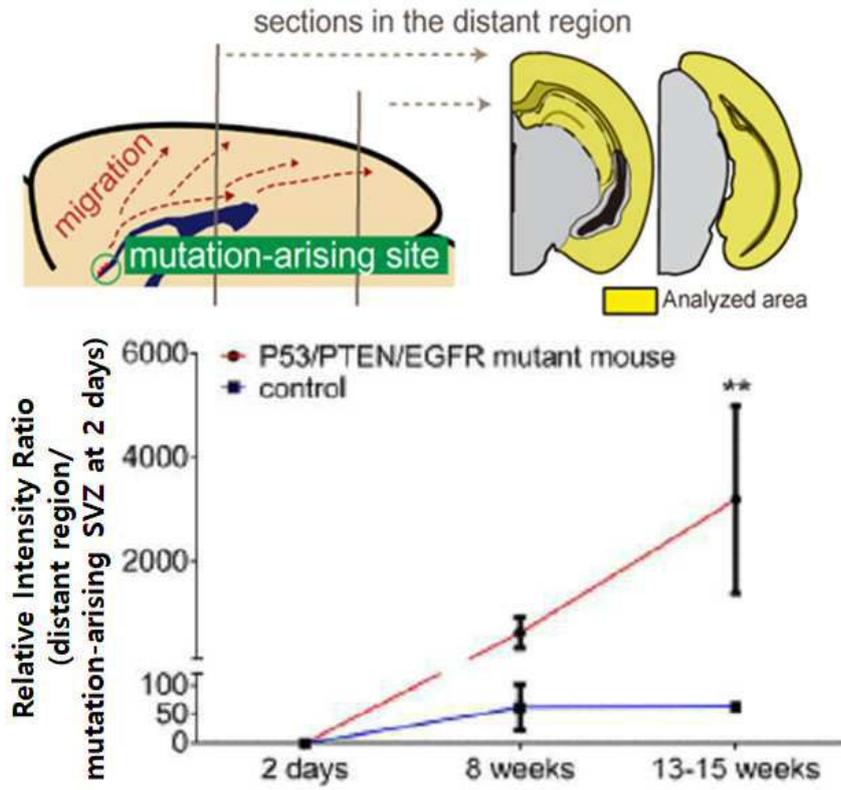
도면19



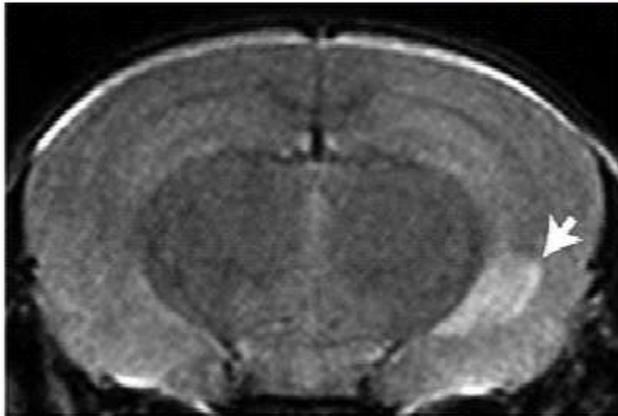
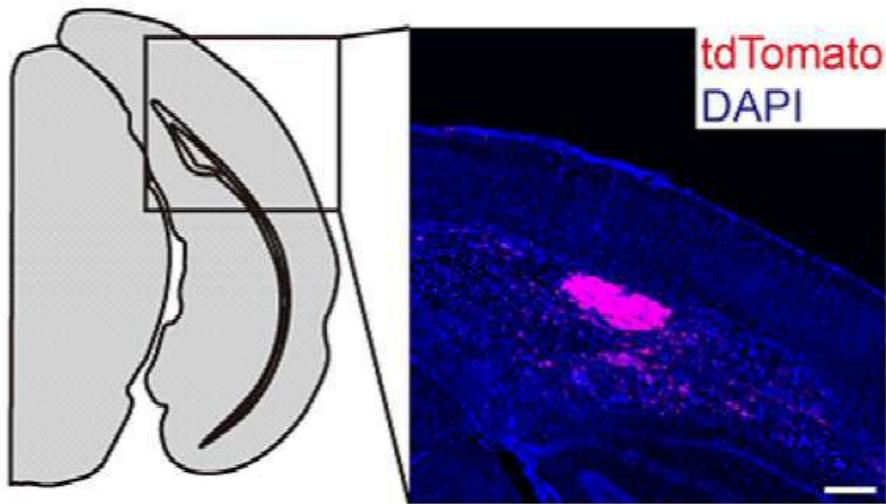
도면20



도면21

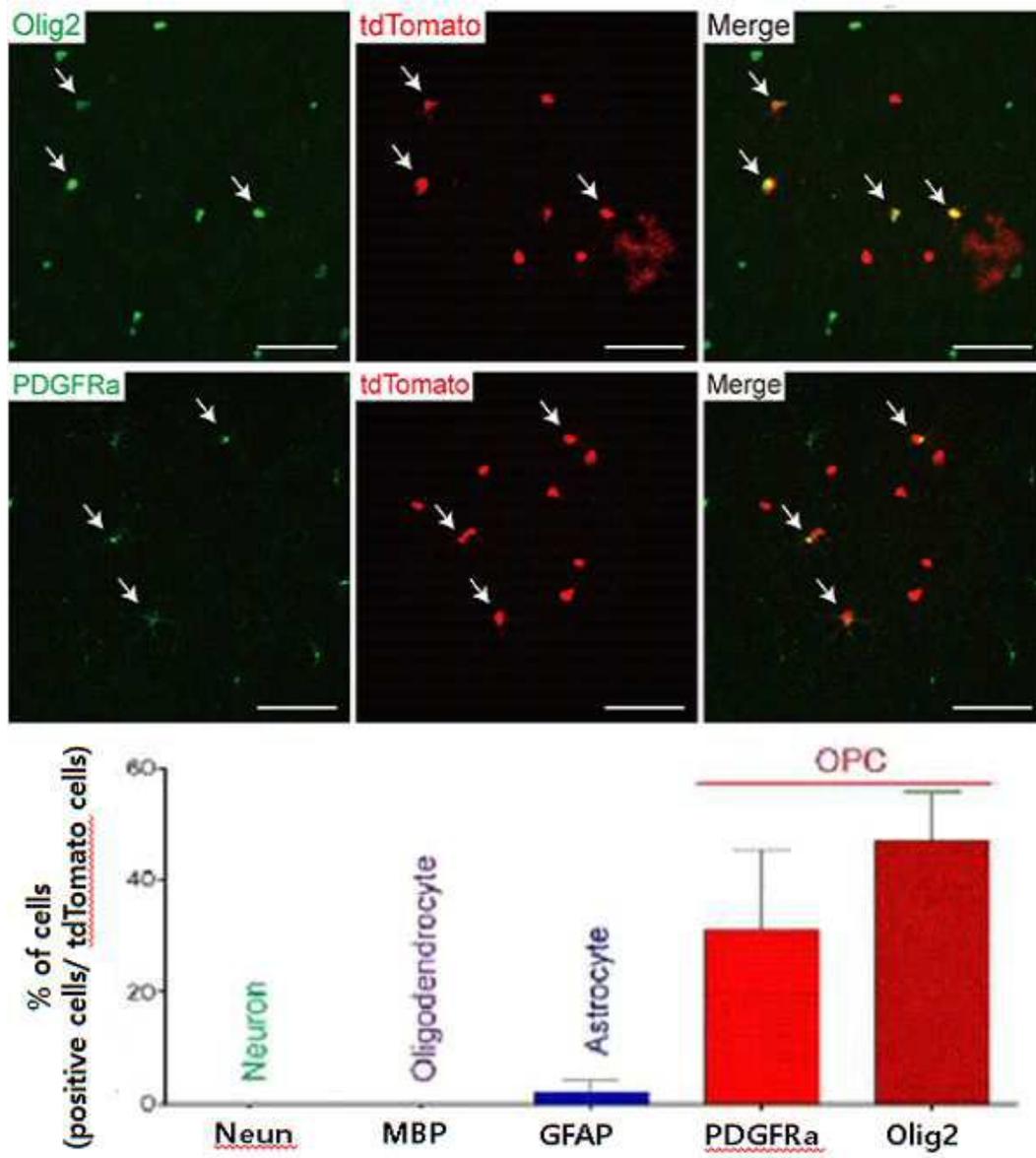


도면22

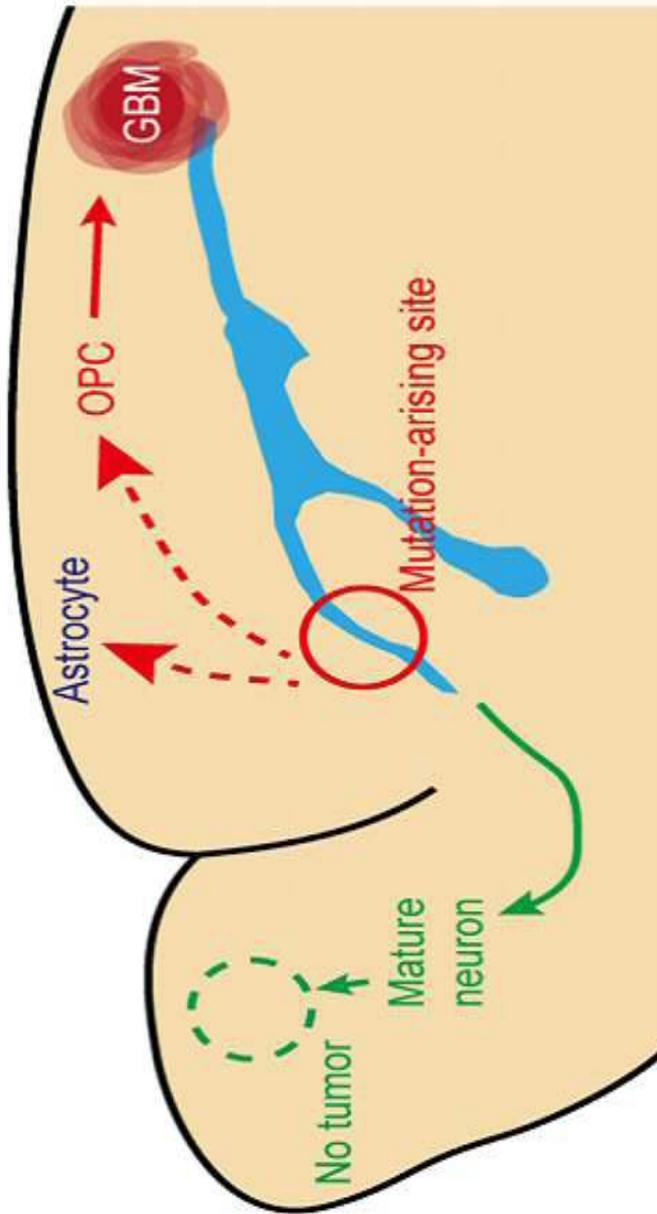


| | Rostral part | Distal part |
|-------|--------------|-------------|
| n (%) | 6 (33%) | 12 (67%) |

도면23



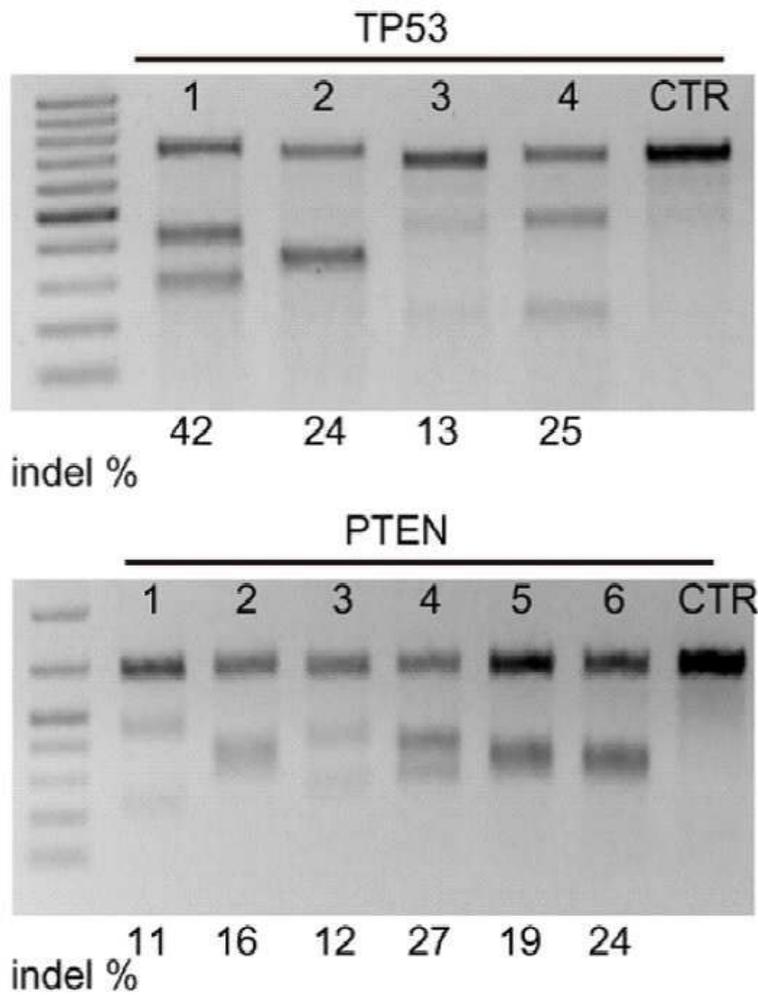
도면24



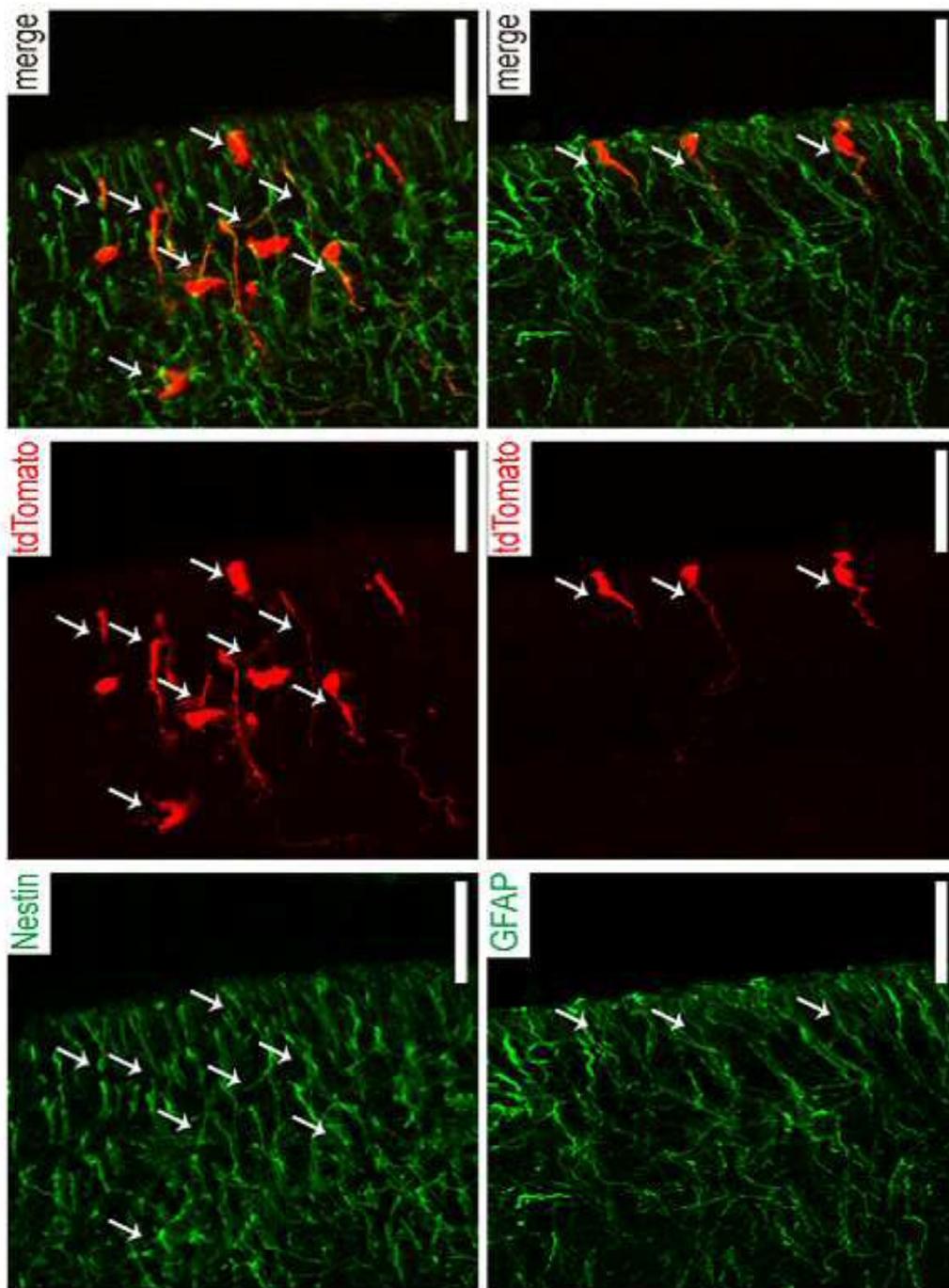
도면25a



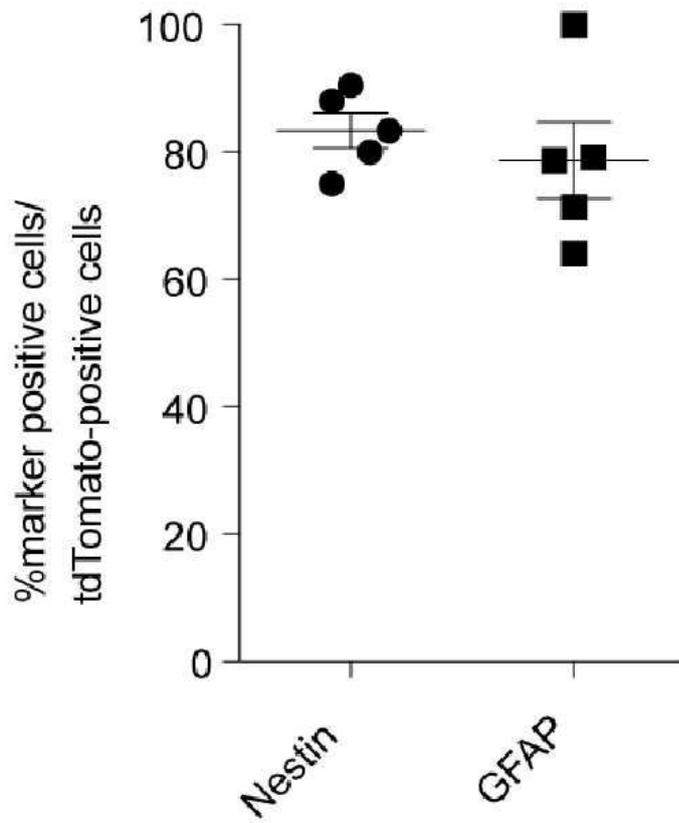
도면25b



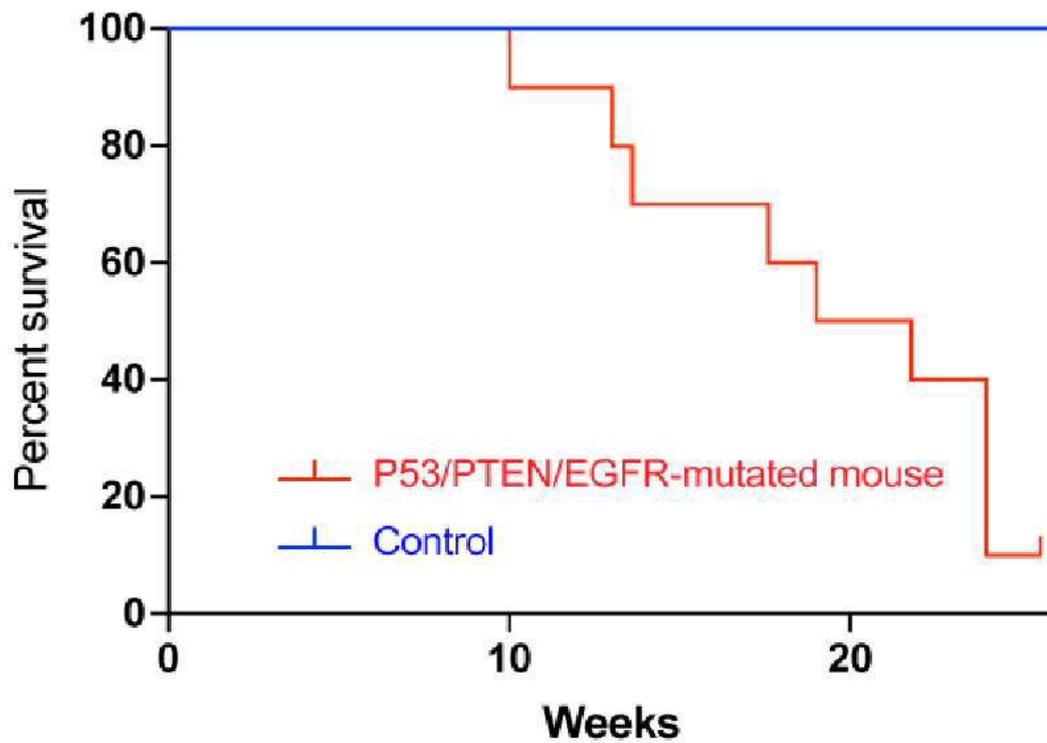
도면25c



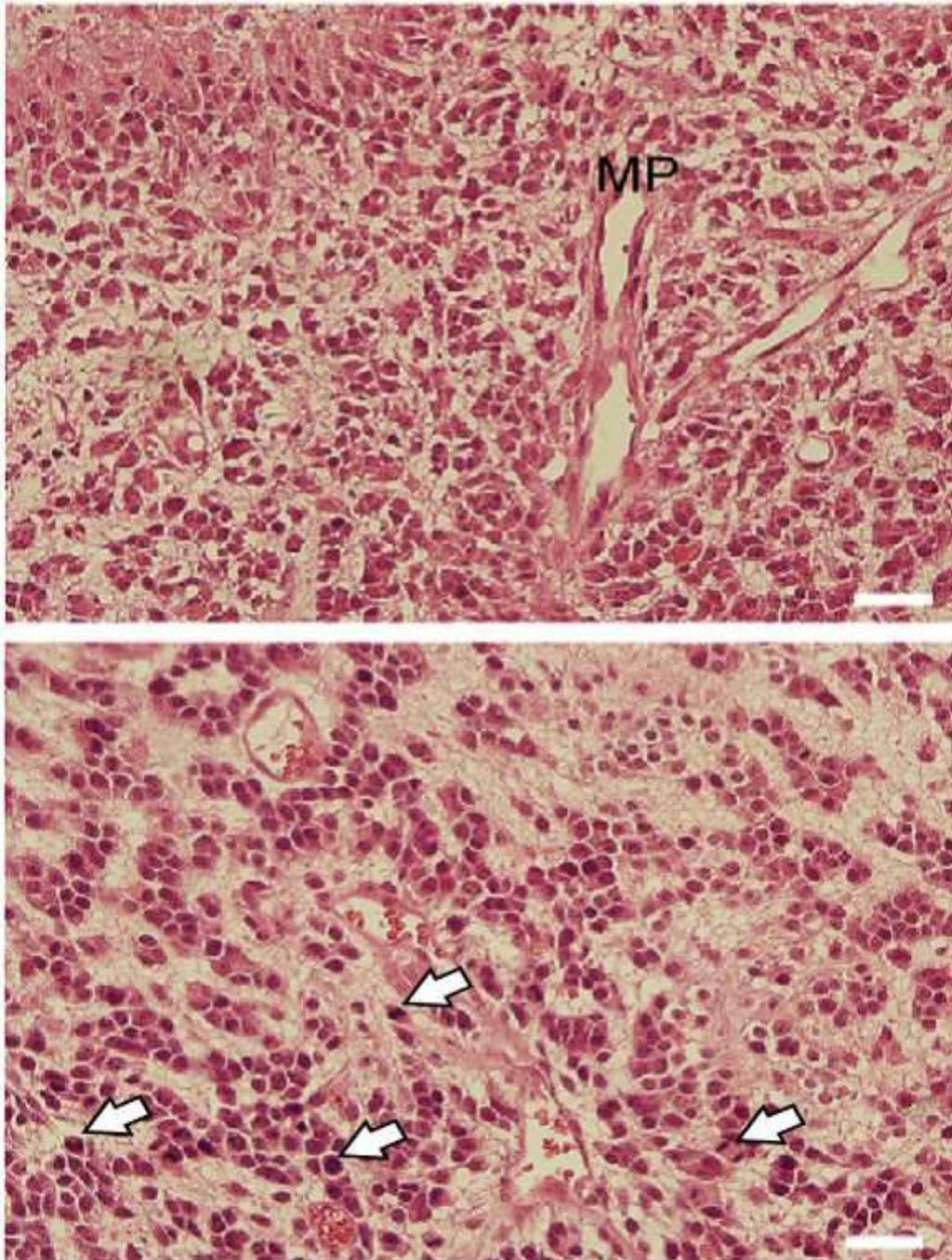
도면25d



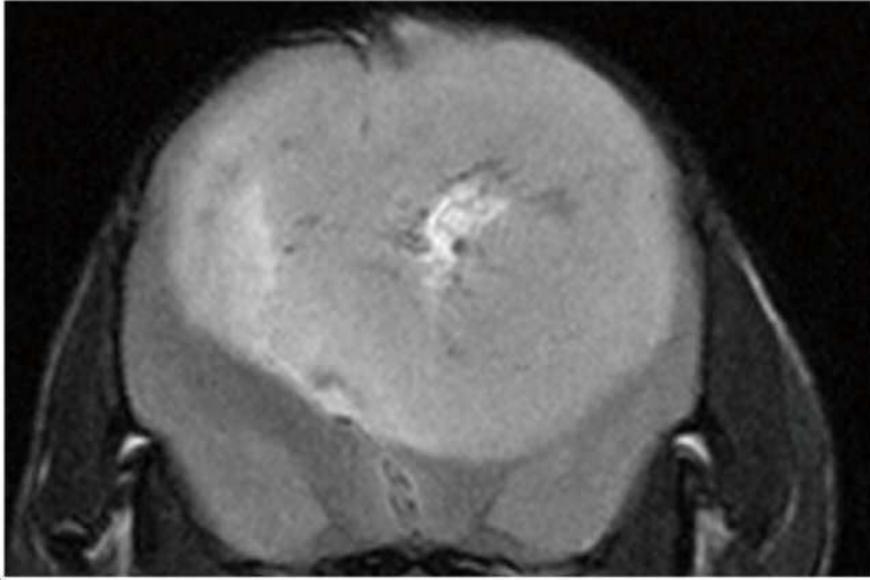
도면25e



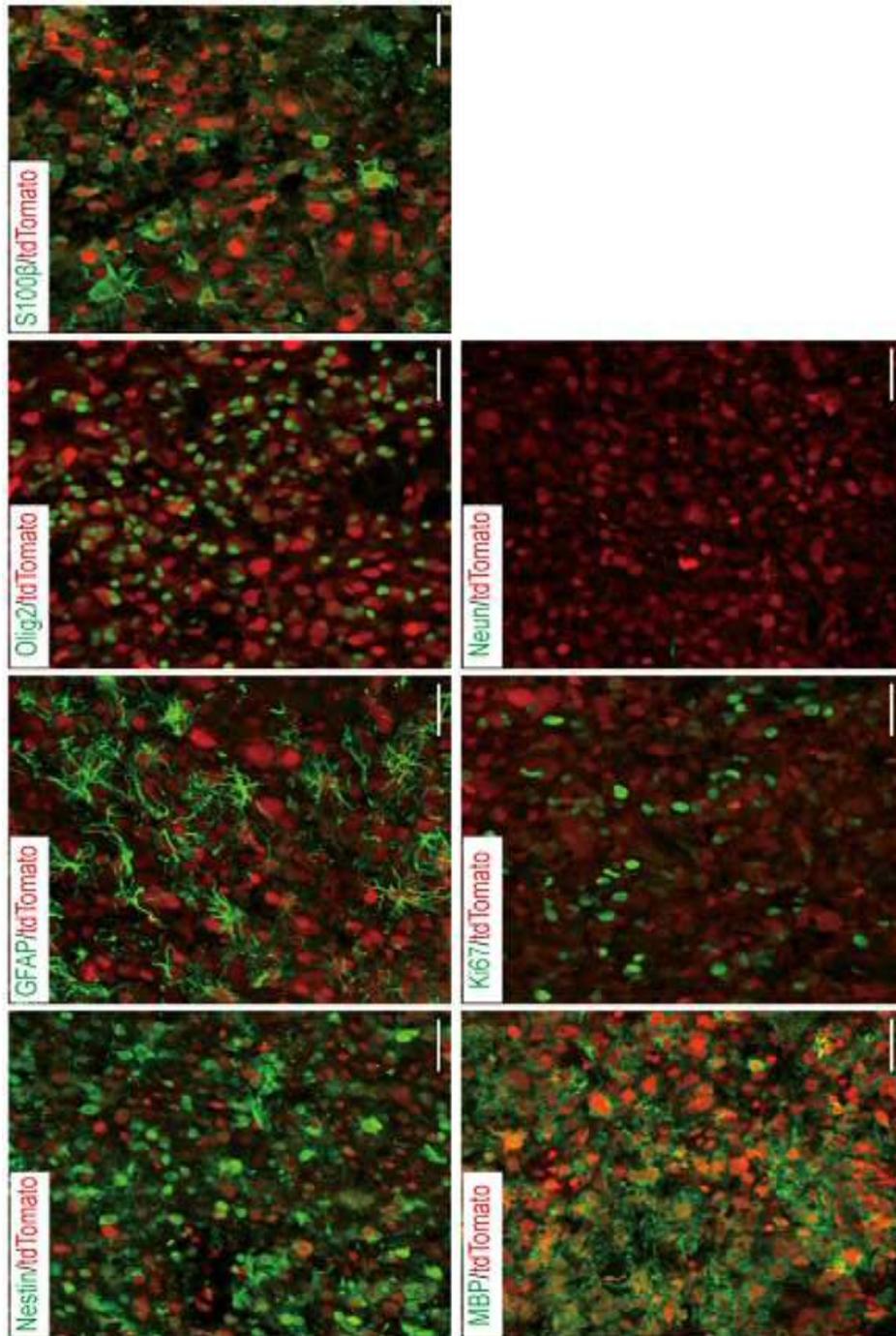
도면25f



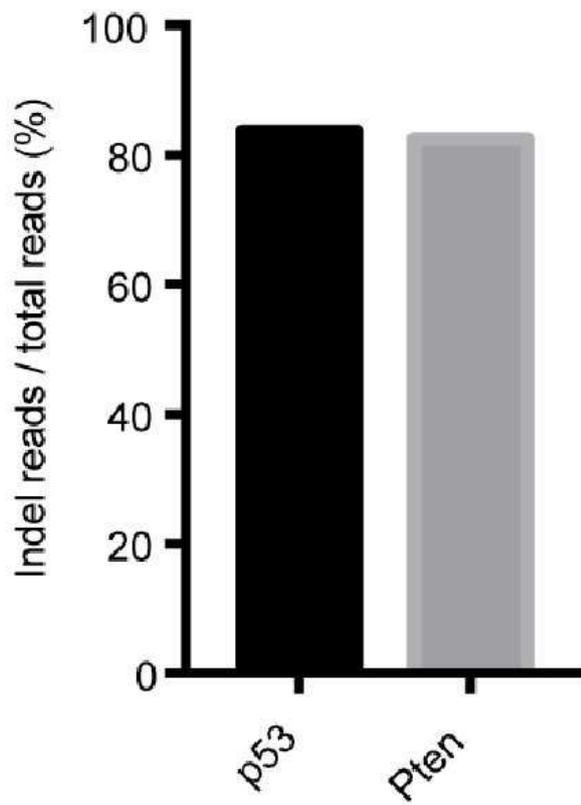
도면25g



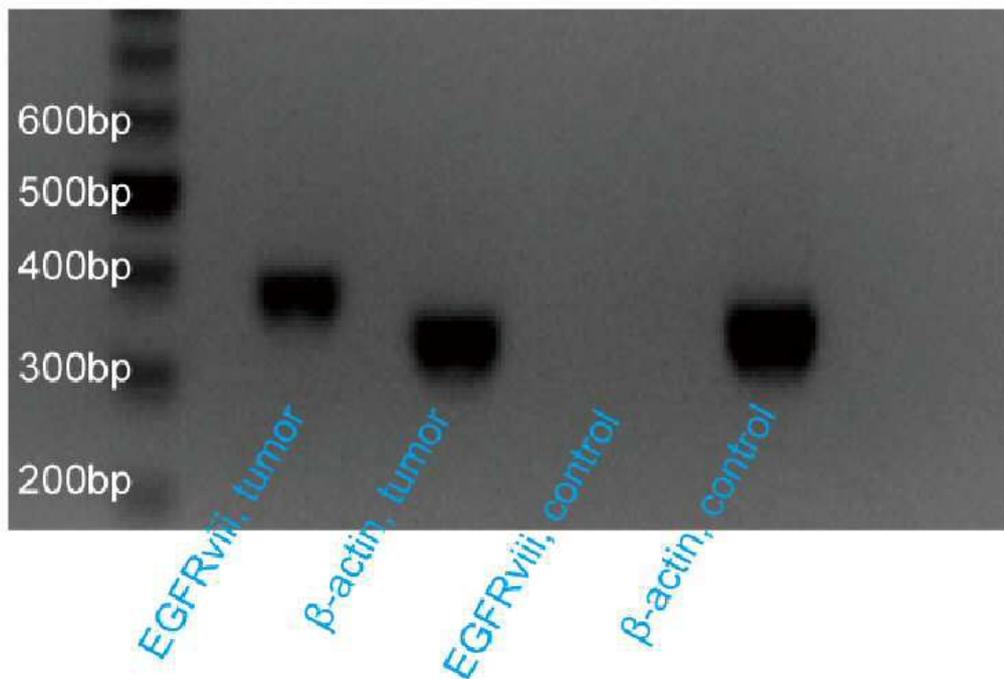
도면25h



도면25i



도면25j



서열목록

<110> KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
YONSEI UNIVERSITY, UNIVERSITY - INDUSTRY FOUNDATION (UIF)

<120> Animal model of brain tumor and manufacturing method of animal
model

<130> OPP20182622US

<150> KR 10-2018-0014741

<151> 2018-02-06

<160> 43

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TERT_forward

<400> 1

gcacctcgcg gtagtgg 17

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TERT_reverse

<400> 2

gtcctgcccc ttcacctt 18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR_forward

<400> 3

ctacaacccc accacgtacc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR_reverse

<400> 4

ccacccaag actctccaag 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PTEN_forward
 <400> 5

accaggacca gaggaaacct 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PTEN_reverse
 <400> 6

agtcaacaac cccacaaaa 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TP53_forward
 <400> 7

gggccagacc taagagcaat 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TP53_reverse
 <400> 8

ctttgaggtg cgtgtttgtg 20

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Rb1_forward
 <400> 9
 gcacaaaaag aaacacccaa a 21
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Rb1_reverse
 <400> 10
 gtccaaagga atgccaattt 20

<210> 11
 <211> 1136
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human EGFR A289V protein
 <400> 11

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

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140
 His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160
 Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165 170 175
 Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
 180 185 190
 Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
 195 200 205
 Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
 210 215 220
 Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
 245 250 255
 Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
 260 265 270
 Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
 275 280 285
 Val Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 290 295 300
 Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
 325 330 335
 Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
 340 345 350
 Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
 355 360 365
 Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
 370 375 380

<210> 12

<211> 3411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human EGFR A289V cDNA

<400> 12

```

atgcgaccct ccgggacggc cggggcagcg ctctggcgc tgctggctgc gctctgcccg      60
gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagt tgcgaaggca cgagtaacaa gctcacgcag      120
ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg      180
gtccttggga atttggaat tacctatgtg cagaggaatt atgatcttc cttcttaaag      240
accatccagg aggtggctgg ttatgtctc attgcctca acacagtga gcgaattcct      300

ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca      360
gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgccat gagaaattta      420
caggaaatcc tgcattggcg cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag      480
agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc      540
cagaaccacc tgggcagctg ccaaaaagtgt gatccaagct gtccaatgg gagctgctgg      600
ggtgcaggag aggagaactg ccagaaaactg accaaaatca tctgtgcca gcagtgtctc      660
gggcgctgcc gtggcaagtc cccagtgac tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc      720

acaggcccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc      780
aaggacacct gccccact catgtcttac aacccacca cgtaccagat ggatgtgaac      840
cccgagggca aatacagctt tgggtgcacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg      900
gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa      960
gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata      1020
ggtattgggt aatttaaaga ctactctcc ataatgcta cgaatattaa aacttcaaa      1080
aactgcacct ccatcagtg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag gggtgactcc      1140

ttcacacata ctctcctct ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa      1200
atcacagggt ttttctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt      1260
gagaacctag aatcatacg cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgcagtc      1320
gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat      1380
gtgataatth caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaata caataaactg gaaaaaactg      1440
tttgggacct ccggtcagaa aacaaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag      1500

```

gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtgc tccccgagg gctgctgggg cccggagccc 1560

agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga caagtgcaac 1620

cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccaccea 1680

gagtgcctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740

cagtgtgccc actacattga cggccccac tgcgtcaaga cctgccccgc aggagtcatg 1800

ggagaaaaca acaccttggf ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc 1860

catccaaact gcacctacgg atgcaactgg ccaggtcttg aaggctgtcc aacgaatggg 1920

cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtgggggccc tectcttgct gctggtggtg 1980

gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacgctgcgg 2040

aggctgctgc aggagagggg gcttgtggag cctcttacac ccagtgagga agctcccaac 2100

caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc 2160

ggtgcgttcg gcacggtgta taagggactc tggatcccag aaggtagaaa agttaaatt 2220

cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaaca ggaaatctc 2280

gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgccgcct gctgggcatc 2340

tgctcacct ccacctgca gctcatcac cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac 2400

tatgtccggg aacacaaaga caatattgac tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag 2460

atcgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cgtcgcttgg tgcaccgca cctggcagcc 2520

aggaaactac tggtagaaac accgcagcat gtcaagatca cagatcttgg gctggccaaa 2580

ctgctgggtg cggaagagaa agaatacct gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640

atggcatttg aatcaatttt acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700

ggggtgactg tttgggagtt gatgacctt ggatccaagc catafgacgg aatccctgcc 2760

agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctcagccacc catatgtacc 2820

atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgccccaaag 2880

ttccgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccag acccccagcg ctacctgtc 2940

attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctacctgcc 3000

ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag 3060

cagggtctct teagcagecc ctccacgtca cggactcccc tectgagctc tetgagtgca 3120

accagcaaca attccacctg ggcttgcat gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccatc 3180

aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagaccca caggcgctt gactgaggac 3240

agcatagacg acaccttctc cccagtgctt ggtgagtggc ttgtctggaa acagtctctgc 3300
 tcctcaacct cctcgaccca ctcagcagca gccagtcctc agtgtccaag ccaggtgctc 3360
 cctccagcat ctccagaggg ggaaacagtg gcagatttgc agacacagtg a 3411

<210> 13

<211> 341

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human TP53 C176Y protein

<400> 13

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln

1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu

20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp

35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro

50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro

65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser

85 90 95

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

100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro

115 120 125

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

130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met

145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Tyr

165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln

180 185 190
 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
 195 200 205
 Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220
 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 245 250 255
 Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270
 Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 275 280 285
 Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320
 Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Asp Gln Thr Ser Phe
 325 330 335

Gln Lys Glu Asn Cys
 340

- <210> 14
- <211> 1026
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> human TP53 C176Y cDNA
- <400> 14

atggaggagc cgcagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca 60
 gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg 120

 gatgatattga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tcaactgaaga cccaggtcca 180
 gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct cccccgtgg cccctgcacc agcagctcct 240
 acaccggcgg ccctgcacc agccccctcc tggcccctgt catcttctgt cccttccag 300

aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag 360
 tctgtgactt gcacgtactc ccctgcctc aacaagatgt tttgccaact ggccaagacc 420
 tgcctgtgc agctgtgggt tgattccaca cccccgccg gcaccccgct ccgcgccatg 480
 gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctaccc ccacatgag 540

cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat 600
 ttgcgtgtgg agtatttga tgacagaaac acttttcgac atagtgtgtt ggtgcctat 660
 gagccgctg aggttggctc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt 720
 tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcatcacact ggaagactcc 780
 agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgcgtg tttgtgctg tcttgggaga 840
 gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc 900
 ccaggagca ctaagcgagc actgcccac aacaccagct cctctccca gccaaagaag 960

aaaccactgg atggagaata tttcacctt caggaccaga ccagctttca aaaagaaat 1020
 tgtaa 1026

<210> 15

<211> 341

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human TP53 E285K protein

<400> 15

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln

1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu

20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp

35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro

50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro

65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser

85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
 100 105 110
 Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
 115 120 125
 Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
 130 135 140
 Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
 145 150 155 160
 Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
 165 170 175

 Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
 180 185 190
 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
 195 200 205
 Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220
 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 225 230 235 240
 Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr

 245 250 255
 Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270
 Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Lys Glu Glu Asn
 275 280 285
 Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300
 Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320

 Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Asp Gln Thr Ser Phe
 325 330 335
 Gln Lys Glu Asn Cys

340

<210> 16
 <211> 1026
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human TP53 E285K cDNA
 <400> 16

atggaggagc cgcagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca 60
 gacctatgga aactacttcc tgaaaaaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg 120
 gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tcaactgaaga cccaggtcca 180

gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct cccccctgg ccctgcacc agcagctcct 240
 acaccggcgg ccctgcacc agccccctcc tggcccctgt catcttctgt ccttcccag 300
 aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcatcttgg gacagccaag 360
 tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt tttgccaact ggccaagacc 420
 tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca ccccccccgc gcacccgcgt cgcgcctatg 480
 gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctgccc ccacatgag 540
 cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcacc ttatccgagt ggaaggaaat 600

ttgcgtgtgg agtatttga tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat 660
 gagccgcctg aggttggctc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt 720
 tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcatcacact ggaagactcc 780
 agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgctg tttgtgctg tctggggaga 840
 gaccggcgca caaaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc 900
 ccaggagca ctaagcgagc actgccaac aacaccagct cctctccca gccaaagaag 960
 aaaccactgg atggagaata tttcacctt caggaccaga ccagctttca aaaagaaat 1020

tgtaa 1026

<210> 17
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human PTEN V317fs6 protein
 <400> 17

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

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

 Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys
 115 120 125
 Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys
 130 135 140
 Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr
 145 150 155 160
 Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr
 165 170 175
 Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala
 180 185 190
 Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly
 195 200 205
 Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile
 210 215 220
 Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr
 225 230 235 240
 Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu
 245 250 255

Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met Phe His
 260 265 270
 Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu
 275 280 285
 Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys
 290 295 300
 Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Asp Phe Asn Lys
 305 310 315 320
 Lys

<210> 18

<211> 1207

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human PTEN V317fs6 DNA

<400> 18

atgacagcca tcatcaaaga gatcgttagc agaacaacaaa ggagatatca agaggatgga 60
 ttcgacttag acttgaccta tatttatcca aacattattg ctatgggatt tctgcagaa 120
 agacttgaag gcgtatacag gaacaatatt gatgatgtag taagggtttt ggattcaaag 180
 cataaaaacc attacaagat atacaatctt tgtgctgaaa gacattatga caccgcaaaa 240
 ttaattgca gagtgcaca atatcctttt gaagaccata acccaccaca gctagaactt 300
 atcaaaccct tttgtgaaga tcttgaccaa tggctaagtg aagatgacaa tcatgttgca 360

 gcaattcact gtaaagctgg aaaggacga actggtgtaa tgatatgtgc atatttatta 420
 catcggggca aatttttaa ggcacaagag gccttagatt tctatgggga agtaaggacc 480
 agagacaaaa agggagtaac tattcccagt cagaggcgct atgtgtatta ttatagctac 540
 ctgttaaaga atcatctgga ttatagacca gtggcactgt tgtttcacia gatgatgttt 600
 gaaactatc caatgttcag tggcggaaact tgcaatctc agtttgggt ctgccagcta 660
 aaggtgaaga tatattctc caattcagga cccacacgac gggaagacaa gttcatgtac 720
 tttgagttcc ctacgccgtt acctgtgtgt ggtgatata aagtagagtt cttccacaaa 780

 cagaacaaga tgctaaaaaa ggacaaaatg tttcactttt gggtaaatac attcttcata 840
 ccaggaccag aggaaacctc agaaaaagta gaaaatggaa gtctatgtga tcaagaaatc 900
 gatagcattt gcagtataga gcgtgcagat aatgacaagg aatatctaga ctttaacaaa 960

aaatgatctt gacaaagcaa ataaagacaa agccaaccga tacttttctc caaatTTTaa 1020
 ggtgaagctg tacttcacaa aaacagtaga ggagccgtca aatccagagg ctagcagttc 1080
 aacttctgta acaccagatg ttagtgacaa tgaacctgat cattatagat attctgacac 1140
 cactgactct gatccagaga atgaaccttt tgatgaagat cagcatacac aaattacaaa 1200

agtctga 1207

<210> 19

<211> 318

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human PTEN V317fs3 protein

<400> 19

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

1 5 10 15

Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile

20 25 30

Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn

35 40 45

Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His

50 55 60

Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys

65 70 75 80

Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro

85 90 95

Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu

100 105 110

Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys

115 120 125

Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

gcaattcact gtaaagctgg aaagggacga actggtgtaa tgatatgtgc atatttatta 420
 catcggggca aatttttaa ggcacaagag gccttagatt tctatgggga agtaaggacc 480
 agagacaaaa agggagtaac tattcccagt cagaggcgct atgtgtatta ttatagctac 540
 ctgttaaaga atcatctgga ttatagacca gtggcactgt tgtttcacia gatgatgttt 600
 gaaactattc caatgttcag tggcggaact tgcaatctc agtttgtggt ctgccagcta 660
 aaggtgaaga tatattctc caattcagga cccacacgac gggaagacia gttcatgtac 720
 tttgagttcc ctacgccgtt acctgtgtgt ggtgatata aagtagagtt cttccacaaa 780

cagaacaaga tgctaaaaaa ggacaaaatg tttcactttt gggtaaatac attcttcata 840
 ccaggaccag aggaaacctc agaaaaagta gaaaatggaa gtctatgtga tcaagaaatc 900
 gatagcattt gcagtataga gcgtgcagat aatgacaagg aatatctagt actttaacia 960
 aaaaatgatc tgacaaaaga aataaagaca aagccaaccg atacttttct ccaaatttta 1020
 aggtgaagct gtacttcaca aaaacagtag aggagccgctc aaatccagag gctagcagtt 1080
 caacttctgt aacaccagat gtttagtaca atgaacctga tcattataga tattctgaca 1140
 ccaactgactc tgatccagag aatgaacctt ttgatgaaga tcagcatata caaattacia 1200

aagtctga 1208

<210> 21

<211> 212

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human Rb K202fs protein

<400> 21

Met Pro Pro Lys Thr Pro Arg Lys Thr Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

Ala Ala Glu Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Glu Glu Asp

20 25 30

Pro Glu Gln Asp Ser Gly Pro Glu Asp Leu Pro Leu Val Arg Leu Glu

35 40 45

Phe Glu Glu Thr Glu Glu Pro Asp Phe Thr Ala Leu Cys Gln Lys Leu

50 55 60

Lys Ile Pro Asp His Val Arg Glu Arg Ala Trp Leu Thr Trp Glu Lys

65 70 75 80

Val Ser Ser Val Asp Gly Val Leu Gly Gly Tyr Ile Gln Lys Lys Lys

85 90 95
 Glu Leu Trp Gly Ile Cys Ile Phe Ile Ala Ala Val Asp Leu Asp Glu
 100 105 110

Met Ser Phe Thr Phe Thr Glu Leu Gln Lys Asn Ile Glu Ile Ser Val
 115 120 125

His Lys Phe Phe Asn Leu Leu Lys Glu Ile Asp Thr Ser Thr Lys Val
 130 135 140

Asp Asn Ala Met Ser Arg Leu Leu Lys Lys Tyr Asp Val Leu Phe Ala
 145 150 155 160

Leu Phe Ser Lys Leu Glu Arg Thr Cys Glu Leu Ile Tyr Leu Thr Gln
 165 170 175

Pro Ser Ser Ser Ile Ser Thr Glu Ile Asn Ser Ala Leu Val Leu Lys
 180 185 190

Val Ser Trp Ile Thr Phe Leu Leu Ala Lys Gly Lys Tyr Tyr Lys Trp
 195 200 205

Lys Met Ile Trp
 210

<210> 22

<211> 2786

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human Rb K202fs DNA

<400> 22

atgccgcccc aaacccccg aaaaacggcc gccaccgcc cgcctgccgc cgcggaacct 60
 ccggcaccgc cgcgcgcc ccctcctgag gaggaccag agcaggacag cggccccggag 120
 gacctgcctc tcgtcaggct tgagttagaa gaaacagaag aacctgattt tactgcatta 180

tgtcagaaat taaagatacc agatcatgtc agagagagag cttggttaac ttgggagaaa 240
 gtttcatctg tggatggagt attgggaggt tatattcaaa agaaaaagga actgtgggga 300
 atctgtatct ttattgcagc agttgacctg gatgatgt cgttcacttt tactgagcta 360
 cagaaaaaca tagaaatcag tgtccataaa ttctttaact tactaaaaga aattgatacc 420
 agtaccaaag ttgataatgc tatgtcaaga ctgttgaaga agtatgatgt attgtttgca 480
 ctcttcagca aattgaaag gacatgtgaa cttatatatt tgacacaacc cagcagttcg 540

atatctactg aaataaatc tgcatgggtg ctaaaagttt cttggatcac atttttatta 600

 gctaaagga agtattaca atggaagatg atctggatg ttcatttcag ttaatgctat 660
 gtgtccttga ctattttatt aaactctcac ctcccatggt gctcaaagaa ccatataaaa 720
 cagctgttat acccattaat ggttcacctc gaacaccag gcgaggtcag aacaggagtg 780
 cacggatagc aaaacaacta gaaaatgata caagaattat tgaagttctc tgtaagaac 840
 atgaatgtaa tatagatgag gtgaaaaatg tttatttcaa aaattttata ccttttatga 900
 attctcttgg acttgaaca tctaattggac ttccagaggt tgaaatctt tctaacgat 960
 acgaagaat ttatcttaa aataaagatc tagatgcaag attatttttg gatcatgata 1020

 aaactcttca gactgattct atagacagt tfgaaacaca gagaacacca cgaaaaagta 1080
 accttgatga agaggatgaat gtaattctc cacacactcc agttaggact gttatgaaca 1140
 ctatccaaca attaatgatg attttaaat cagcaagtga tcaaccttca gaaaatctga 1200
 tttcctat ttaacaactgc acagtgaatc caaaagaaag tatactgaaa agagtgaagg 1260
 atataggata catctttaa gagaaattg ctaaagctgt gggacagggt tgtgtcga 1320
 ttggatcaca gcgatacaaa cttggagttc gcttgatata ccgagtaatg gaatccatgc 1380
 ttaaatcaga agaagaacga ttatccattc aaaattttag caaacttctg aatgacaaca 1440

 tttttcatat gtctttatg gcgtgcgctc ttgaggttgt aatggccaca tatagcagaa 1500
 gtacatctca gaatcttcat tctggaacag atttgtcttt cccatggatt ctgaatgtgc 1560
 ttaatttaa agcctttgat ttttacaag tgatcgaag ttttatcaa gcagaaggca 1620
 acttgacaag agaatgata aaacatttag aacgatgtga acatcgaatc atggaatccc 1680
 ttgatggct ctcatgata cctttatttg atcttattaa acaatcaaag gaccgagaag 1740
 gaccaactga tcacctgaa tctgcttgc ctcttaatct tcctctccag aataatcaca 1800
 ctgcagcaga tatgtatctt tctctgtaa gatctcaaa gaaaaaggt tcaactacgc 1860

 gtgtaaattc tactgcaat gcagagacac aagcaacctc agccttcag acccagaagc 1920
 cattgaaatc tacctctctt tcaactgttt ataaaaaagt gtatcggtc gcctatctcc 1980
 ggctaaatac acttttgtaa cgccttctgt ctgagcacc agaattagaa catatcatct 2040
 ggaccctttt ccagcacacc ctgcagaatg agtatgaact catgagagac aggcatattg 2100
 accaaattat gatgtgttcc atgtatggca tatgcaaagt gaagaatata gaccttaaat 2160
 tcaaatcat tgiaacagca tacaaggatc ttctcatgc tgttcaggag acattcaaac 2220
 gigtattgat caaagaagag gagtatgatt ctattatagt attctataac tcggtcttca 2280

tgcagagact gaaaacaaat attttgcagt atgcttccac caggccccct accttgtcac 2340
 caatactca cattcctcga agcccttaca agtttcttag ttcaccctta cggattcctg 2400
 gagggaacat ctatatttca cccctgaaga gtccatataa aatttcagaa ggtctgccaa 2460
 caccaacaaa aatgactcca agatcaagaa tcttagtadc aattgggtgaa tcattcggga 2520
 cttctgagaa gttccagaaa ataaatcaga tggtagttaa cagcgaccgt gtgctcaaaa 2580
 gaagtgctga aggaagcaac cctcctaaac cactgaaaaa actacgcttt gatattgaag 2640
 gatcagatga agcagatgga agtaaaccatc tcccaggaga gtccaaatth cagcagaaac 2700

 tggcagaaat gacttttact cgaacacgaa tgcaaaagca gaaaatgaat gatagcatgg 2760
 atacctcaaa caaggaagag aatga 2786
 <210> 23
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EGFR_RTqPCR_Forward
 <400> 23
 cgtctcttgc cggaatgt 18
 <210> 24
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EGFR_RTqPCR_Reverse
 <400> 24
 ggattaaaga aataacctcc tacc 25

 <210> 25
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RNaseP_RTqPCR_Forward
 <400> 25
 gggagatgcg gaagaatgt 19
 <210> 26
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> RNaseP_RTqPCR_Reverse
 <400> 26
 cctccagtca gccacagaa 19
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LDHA_RTqPCR_Forward
 <400> 27
 actgtgacc ttatccaggc 20
 <210> 28
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LDHA_RTqPCR_Reverse
 <400> 28
 cttcccttaa ctagtctca gga 23
 <210> 29
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sgRNA_p53
 <400> 29
 ggtgtaatag ctctgcatg g 21
 <210> 30
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sgRNA_Pten
 <400> 30
 ggttggtcaa gatcttcaca ga 22
 <210> 31

<211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sgRNA_lacz
 <400> 31
 ggtgccaata cgcccacgcg at 22
 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mouse_Trp53_forward
 <400> 32
 aggtaggag cgacttcacc 20

 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mouse_Trp53_reverse
 <400> 33
 taaggatagg tcggcggttc 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mouse_Pten_forward
 <400> 34
 agaccataac ccaccacgc 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mouse_Pten_reverse
 <400> 35

tacaccagtc cgtcccttc 20

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR_seq_forward

<400> 36

cccaggcact tgatgatact c 21

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR_seq_reverse

<400> 37

cttgctttgg gtggagagtt 20

<210> 38

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trp53_indel1

<400> 38

tgtgtcttcc cccaggccgg ctctgagtat accaccatcc actacaagta catgtgtaat 60

agctcctgca ctgggggggc atgaaccgcc gacctatcct ta 102

<210> 39

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trp53_indel2

<400> 39

tgtgtcttcc cccaggccgg ctctgagtat accaccatcc actacaagta catgtgtaat 60

agctcctgtg gggggcatga accgccgacc taccctta 98

<210> 40

<211> 101

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Trp53_indel3
 <400> 40
 tgtgtcttcc cccaggccgg ctctgagtat accaccatcc actacaagta catgtgtaat 60
 agctcctgca atggggggca tgaaccgceg acctatectt a 101
 <210> 41
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pten_indel1
 <400> 41
 agaccataac ccaccacagc tagaacttat caaaccttc ttgaagatct tgaccaatgg 60
 ctaagtgaag atgacaatca tgttcagca attcactgta aagctggaaa 110

 <210> 42
 <211> 108
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pten_indel2
 <400> 42
 agaccataac ccaccacagc tagaacttat caaacctct gaagatcttg accaatggct 60
 aagtgaagat gacaatcatg ttgcagcaat tcaactgtaaa gctggaaa 108
 <210> 43
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pten_indel3
 <400> 43
 agaccataac ccaccacagc tagaacttat caaaccttc gtgaagatct tgaccaatgg 60
 ctaagtgaag atgacaatca tgttcagca attcactgta aagctggaaa 110