



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0012696  
(43) 공개일자 2018년02월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 38/17 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 38/1709 (2013.01)  
A61K 48/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0088477  
(22) 출원일자 2017년07월12일  
심사청구일자 2017년07월12일
- (30) 우선권주장  
1020160095043 2016년07월26일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자  
이한웅  
서울특별시 중구 소월로2길 30,704호 (남대문로5가, 남산트라펠리스)
- 수실 데브코타  
서울특별시 서대문구 연희로8길 28-41, B02호(연희동)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인이름리온

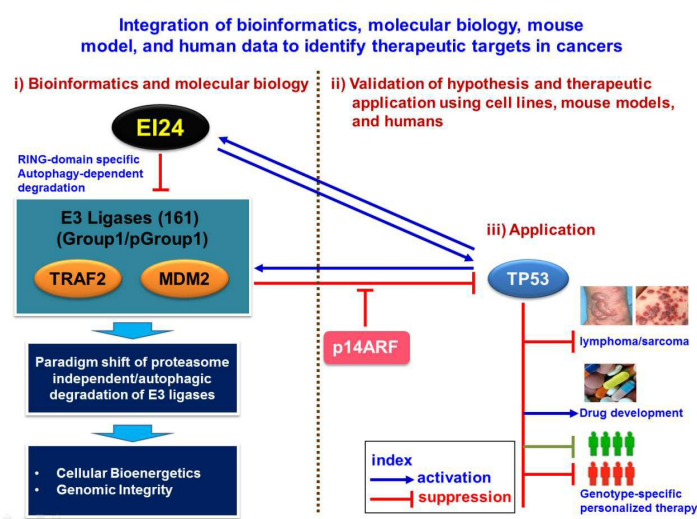
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 EI24 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 EI 24 단백질 또는 이의 단편, 또는 상기 EI 24 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 암 치료제 후보물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

**G01N 33/5008** (2013.01)

**G01N 33/57484** (2013.01)

**G01N 2500/00** (2013.01)

(72) 발명자

**성영훈**

서울특별시 강북구 도봉로47길 26, 401 (미아동, 오봉예체플안)

**진영**

서울특별시 마포구 망원동 411-11번지

**박완제**

경기도 수원시 영통구 동탄원천로1109번길 37, 105동 808호(매탄동, 한국아파트)

**김윤미**

서울특별시 서대문구 거북골로20길 42 (북가좌동)

**최정민**

인천광역시 연수구 아트센터대로 203 (송도동, 센트럴파크 푸르지오시티)

**남태욱**

서울특별시 서대문구 연희로10길 72, 404호 (연희동, 서문빌리지)

**최유라**

강원도 원주시 행구로 287, 101동 104호 (행구동, 건영아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016-11-0175

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 불멸화유전자의 세포기능 및 대사조절에 관한 연구

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-22-0028

부처명 연세대학교

연구관리전문기관 연세대학교

연구사업명 교내연구지원

연구과제명 노령화 사회 - 젊게 사는 프로젝트 : 불멸화 유전자 연구

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.06.30

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

EI 24 단백질 또는 이의 단편; 또는 EI24 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 EI 24 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 암은 ARF 유전자가 비활성 되어 있는 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 암은 p53 단백질 또는 유전자의 발현 및 활성이 정상 세포와 유사한 수준인 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 암은 유방암(Breast Cancer), 자궁경부암(Cervix Cancer), 백혈병(Leukemia), 위암(Gastric Cancer), 육종(Sarcoma), 간암(Liver Cancer), 폐암(Lung Cancer), 직장암(Colorectal Cancer) 및 신장암(Renal Carcinoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 7

EI 24의 발현 또는 활성을 증가시키는 활성화제를 포함하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 8

- i) EI24 단백질을 저 발현 또는 발현하지 못하는 세포를 포함하는 환자 유래 시료에 피검물질을 처리하는 단계;
- ii) 상기 단계 i)에서 처리한 시료에서 EI24 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 EI24 단백질의 발현 수준이 피검물질 미처리 대조군에 비해 증가하도록 하는 피

검물질을 선별하는 단계;를 포함하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 단계 ii)의 측정은 면역침강법 (Immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학 (Immunohistochemistry), 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 수행하는 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

#### 청구항 10

- i) EI24 단백질을 포함하는 시료에 피검물질을 처리하는 단계;
- ii) 상기 단계 i)에서 처리한 시료에서 EI24 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 상기 EI24 단백질의 활성 수준이 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군에 비해 증가하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 단계 ii)의 측정은 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 수행하는 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

#### 청구항 12

제 8 또는 10항에 있어서, 상기 암은 ARF 유전자가 비활성 되어 있는 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

#### 청구항 13

제 8 또는 10항에 있어서, 상기 암은 p53 단백질 또는 유전자의 발현 및 활성이 정상 세포와 유사한 수준인 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

#### 청구항 14

제 8 또는 10항에 있어서, 상기 암은 유방암(Breast Cancer), 자궁경부암(Cervix Cancer), 백혈병(Leukemia), 위암(Gastric Cancer), 육종(Sarcoma), 간암(Liver Cancer), 폐암(Lung Cancer), 직장암(colorectal Cancer) 및 신장암(Renal Carcinoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

#### 청구항 15

- i) EI24 단백질을 저 발현 또는 발현하지 못하는 세포를 포함하는 환자 유래 시료에 피검물질을 처리하는 단계;
- ii) 상기 단계 i)에서 처리한 시료에서 EI24 단백질의 하위 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 EI24 단백질의 하위 단백질의 발현 수준을 피검물질 미처리 대조군과 비교하여 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

## 청구항 16

- i) EI24 단백질을 포함하는 시료에 피검물질을 처리하는 단계;
- ii) 상기 단계 i)에서 처리한 시료에서 EI24 단백질의 하위 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 상기 EI24 단백질의 하위 단백질의 활성 수준을 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군과 비교하여 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

## 청구항 17

- 제 15 또는 16항에 있어서, 상기 EI24 단백질의 하위 단백질은 하기 a) 및 b) 중 어느 하나 또는 둘 다인 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법:a) 발현 수준 또는 활성 수준이 감소하는 단백질로서, AKT, p-AKT, SRC, pTEM, p-PDK1, P38, pP38, ERK, p-ERK, GSKa/b, p-GSK b, p70 S6K, p-p70 S6K 및 HSP60으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 및
- b) 발현 수준 또는 활성 수준이 증가하는 단백질로서, p38a, JNK1/2/3, GSK-3 $\alpha/\beta$ , MSK1/2, CREB, HSP27, AMPK $\alpha$ 2, P70 S6K(T389), P70 S6K(T421/S424) 및 Chk-2로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질.

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 EI 24 단백질 또는 이의 단편; 또는 상기 EI 24 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 암 치료제 후보물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

- [0003] 'The guardian of the genome' 으로 알려진 p53은 종양억제인자이다. 세포 내에서 p53-MDM2-ARF 복합체의 밸런스를 유지하는 것은 항상성을 유지하고 암으로 발전하는 과정을 억제하기 때문에 매우 중요하다. 실제로 사람에게서 발견되는 50% 정도의 암에서 p53 유전자의 돌연변이가 관찰된다. 이는 나머지 50%의 암은 유전적으로 손상되지 않은 p53 유전자를 가지고 있지만 MDM2-ARF 신호전달에 의해서 p53단백질의 활성이 억제되면서 암으로 발전될 수 있다는 것을 의미한다. ARF 신호전달은 MDM2를 인(nucleolus)으로 데리고 감으로써 p53이 MDM2에 의해 분해되는 것을 억제하는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 따라서 p53의 기능을 다시 회복시키는 분자생물학적 기전을 규명해낸다면 이를 'miracle drug'으로써 암 치료제로 적용시킬 수 있을 것으로 기대되고 있다. 종래 기술에서 p53을 표적으로 하는 암 치료방법에는 p53을 분해시키는 프로테아좀의 활성을 억제하는 것과 화학물질인 Nutlin-3A를 이용하여 p53과-MDM2의 상호작용을 억제하는 방법이 사용되고 있다. 그러나 지금까지 선행연구에서 진행되었던 임상시도는 암 치료에 있어 만족스러운 결과를 얻지 못했다.
- [0006] 거대자가포식(이하 자가포식으로 약칭함)은 이중막 구조로 이루어져있고 이동수단으로 작용되는 자가소화포(autophagosome)를 통해 세포질 물질을 라이소좀(lysosome)으로 전달하는 진화론적 과정이다. 일반적으로 자가포식 기전은 손상된 세포 소기관을 분해하는 등 세포의 항상성을 유지하는데 매우 중요한 역할을 수행한다. 영양적으로 결핍된 상태가 되면 자가포식 기전은 더욱 활성화되며 self-limited survival mechanism인 이화물질 대사를 촉진한다. 유비퀴틴화된 단백질을 특이적으로 인식하여 단백질을 분해하는 프로테아좀 기전과 자가소화포에 의해 세포질에 있는 물질이 분해되는 과정인 자가포식 기전은 극명하게 대조적이지만 오랫동안 이 둘의 개

념이 분리되어 있지 않았다. 그러나 세포질의 액상부분에서 p62나 NBM1 (Neighbor of BRCA1 gene)과 같은 여러 종류의 특정 자가포식 공여체들이 UBA에 의해 유비퀴틴과 상호작용하고 LIR 모티프에 의해 LC3와 상호작용하는 것이 밝혀졌으며 이를 통해 자가포식기전과 프로테아좀 기전이 기능적으로 다르다고 밝혀졌다.

[0007] 현재까지 손상된 소기관과 모든 단백질 또는 병원체에 대하여 선택적으로 작용하는 자가포식기전에 대해 규명되고 부분적으로는 그 개념이 구체화되었다. 그러나 세포의 생리학적 기능을 유지하기 위해 작용하는 자가포식 기전에 대해서는 아직까지 완전하게 구체화되지 않았다.

[0009] p53에 의해 조절되는 EI24는 종양억제인자로써 암 세포의 성장을 저해한다. 또한 EI24의 발현이 침윤성관상피암과 자궁경부암 발달에 영향을 준다고 알려져 있다. 최근에는 EI24가 마우스와 예쁜꼬마선충에서 자가포식 시스템의 중요한 역할을 갖고 있는 유전자임이 규명되었다. 또한, 본 연구진은 선행연구에서 EI24가 TRAF2/5에 의존적으로 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제함으로써 EMT (epithelial to mesenchymal transition)의 활성이 저해되어 암이 형성된다는 것을 밝혔다. 그러나 아직 EI24가 자가포식과 어떤 연관성에 의해 조절되는지 기능적 측면에서 어떠한 중요한 역할을 하는지에 대한 분자생물학적 기전은 밝혀지지 않았다. 그러나 자가포식 기전에서 EI24의 역할이나 암에서 생리학적 중요성에 대한 연구는 아직까지 많은 부분에서 밝혀지지 않았다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 EI24의 신규한 용도를 발굴하기 위해 노력한 결과, EI24는 ARF 유전자의 활성이 없는 상태에서 자가포식 시스템을 활성화하여, MDM2의 분해를 촉진하고, 이에 따라 p53의 활성을 회복시킬 수 있음을 확인하여, EI24 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 과발현하는 것을 통해 암 세포 증식 억제 효과를 나타낼 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) KR 10-1213033 B1 (2012.12.11)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0014] 상술한 바와 같이, p53의 유전자가 손상되지 않았더라도 MDM2에 의해 분해 유도되어 p53의 기능이 억제되어, 이를 회복하는 것을 타겟으로 하는 항암제들이 개발되고 있으나, ARF 유전자의 기능이 발현되지 않는 환경하에서는 만족스러운 효과를 얻지 못하는 한계성을 보여주었다.

[0016] 따라서, 본 발명의 목적은 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0019] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 EI 24 단백질 또는 이의 단편; 또는 상기 EI 24 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 EI 24 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 것일 수 있고, 상기 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 ARF 유전자가 비활성 되어 있는 것일 수 있고, p53 단백질

또는 유전자의 발현 및 활성이 정상 세포와 유사한 수준일 수 있다.

- [0022] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 유방암(Breast Cancer), 자궁 경부암(Cervix Cancer), 백혈병(Leukemia), 위암(Gastric Cancer), 육종(Sarcoma), 간암(Liver Cancer), 폐암(Lung Cancer), 직장암(Colorectal Cancer) 및 신장암(Renal Carcinoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0024] 본 발명은 또한, 아래와 같은 단계를 포함하는 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0025] i) EI24 단백질을 저 발현 또는 발현하지 못하는 세포를 포함하는 환자 유래 시료에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0026] ii) 상기 단계 i)에서 처리한 시료에서 EI24 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0027] iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 EI24 단백질의 발현 수준이 피검물질 미처리 대조군에 비해 증가하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계.
- [0028] 또한, 본 발명은 아래와 같은 단계를 포함하는 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0029] i) EI24 단백질을 포함하는 시료에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0030] ii) 상기 단계 i)에서 처리한 시료에서 EI24 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0031] iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 상기 EI24 단백질의 활성 수준이 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군에 비해 증가하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계.
- [0032] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 ARF 유전자가 비활성 되어 있는 것일 수 있고, p53 단백질 또는 유전자의 발현 및 활성이 정상 세포와 유사한 수준일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 유방암(Breast Cancer), 자궁 경부암(Cervix Cancer), 백혈병(Leukemia), 위암(Gastric Cancer), 육종(Sarcoma), 간암(Liver Cancer), 폐암(Lung Cancer), 직장암(Colorectal Cancer) 및 신장암(Renal Carcinoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

### 발명의 효과

- [0035] 본 발명에 따르는 EI24는 자가포식 시스템을 통해 MDM2를 분해시키고 이로 인해 MDM2-유도된 p53 활성 감소를 다시 회복시킬 수 있다. 이는 ARF 신호전달과는 관계없이 일어날 수 있어, ARF 활성이 저해 또는 억제된 암 환경에서도 EI24 단백질의 발현을 통해 p53 기능을 회복시키고, 암 치료 효과를 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명의 EI24와 연계된 기전의 활성화는 다양한 암 치료제 개발에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1은 EI24가 자가포식기전을 활성화시킴을 나타낸 결과를 보여준다.
- 도 2는 EI24가 자가포식기전을 통해 RINCK1을 분해시킴을 나타낸 결과를 보여준다.
- 도 3은 EI24가 RING 도메인을 통해 RINCK1과 상호작용하여 분해시키는 결과를 보여준다.
- 도 4는 EI24가 RING 도메인을 갖고 있는 단백질을 분해할 수 있음을 나타낸 결과를 보여준다.
- 도 5는 EI24에 의해 분해되는 여러 종류의 E3-리가아제들을 예측한 결과를 보여준다.
- 도 6은 MPLS-DA를 이용해 EI24의 표적들을 분자정보학적 측면에서 분석한 결과를 보여준다.
- 도 7은 예측했던 여러 종류의 E3-리가아제들을 EI24의 발현에 따른 단백질 수준에서의 변화를 확인해 본 결과를 보여준다.
- 도 8은 EI24의 표적들은 주로 자가포식기전의 활성화에 영향을 미치는 세포 내 구역에 위치하고 있음을 나타낸 결

과를 보여준다.

도 9는 자가포식기전에 의해 분해되는 E3-리가아제와 EI24의 생리학적 역할에 대해 나타낸 결과를 보여준다.

도 10은 EI24에 의해 유도되는 자가포식기전이 MDM2를 분해시킨다는 것을 분자학적 모델로 제시한 결과를 보여준다.

도 11은 CDKN2A 유전자가 결손되었거나 MDM2 유전자가 증폭된 암 환자의 대부분이 EI24 및 p53 유전자가 정상임을 보여준다. 그러므로 EI24가 암의 치료의 타겟이 될 수 있음을 시사한다.

도 12는 EI24는 LIR-모티프를 가지고 있어 LC3와 결합할 수 있으며 이를 통해 자가포식기전을 활성화 시킨다는 것을 보여준다.

도 13은 EI24 siRNA를 이용해 EI24의 활성을 감소시켰으며 이로 인해 자가포식기전이 작용할 수 없다는 결과에 대해서 보여준다.

도 14는 EI24가 자가포식기전을 통해 MDM2를 분해시키고 이로 인해 p53의 발현이 증가되는 사실에 대한 결과를 보여준다.

도 15는 EI24가 MDM2의 RING 도메인을 인식하고 결합할 수 있음을 보여준다.

도 16는 EI24의 LIR 모티프가 MDM2의 RING 도메인에 결합함으로써 자가포식기전이 활성화되어 MDM2가 분해되는 결과를 보여준다.

도 17은 EI24가 p53의 발현을 일정 수준으로 유지할 수 있다는 결과를 보여준다.

도 18은 EI24로 인해 MDM2의 E3-리가아제 활성이 줄어들고 이를 통해 p53의 다시 활성화되는 것을 보여준다.

도 19는 여러 종류의 종양세포에서 p53, ARF의 발현 양상을 분석한 결과를 보여준다.

도 20은 암을 유발하는 기능을 하는 MDM2의 발현을 EI24가 저해시킬 수 있다는 결과를 보여준다.

도 21은 유전적독성 스트레스 상황에서 EI24가 p53의 전사활성 능력을 극대화시켜 세포성장과정 중 G2M 단계를 정지시키고 있다는 결과를 보여준다.

도 22는 생체 외에서 EI24가 p53의 암 억제 기능을 활성화 시킨다는 사실을 보여준다.

도 23은 생체 내에서 EI24가 p53의 암 억제 기능을 활성화 시킨다는 사실을 보여준다.

도 24는 MDA-MB-231 암세포주를 이식한 누드 마우스에서 EI24 발현 유도에 따른 종양 생성 억제 효과를 보여준다.

도 25는 PyMT 암 모델 마우스에서 EI24의 발현에 따른 종양 조직 성장의 억제 효과를 나타낸다.

도 26은 PyMT 암 모델 마우스에서 EI24의 발현에 따른 폐로의 전이 억제 효과를 나타낸다.

도 27는 여러 종류의 암 환자표본에서 EI24, p53, MDM2의 발현 양상을 상호 비교 분석한 결과를 보여준다.

도 28은 EI24 과발현을 유도하는 암 조직에서 발현 수준이 변화하는 유전자 및 이를 포함하는 신호전달경로를 보여준다.

도 29 및 도 30은 암 세포에서 EI24 과발현에 따라 발현 수준이 변화하는 단백질을 나타낸다.

도 31은 암 세포에서 EI24 과발현에 따라 활성 수준이 변화하는 단백질을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0038]

상술한 바와 같이, p53의 유전자가 손상되지 않았더라도 MDM2에 의해 분해 유도되어 p53의 기능이 억제되어, 이를 회복하는 것을 타겟으로 하는 항암제들이 개발되고 있으나, ARF 유전자의 기능이 발현되지 않는 환경에서는 만족스러운 효과를 얻지 못하는 한계성을 지니고 있었다.

[0040]



- [0042] 본 발명에 따르는 EI24는 자가포식 시스템을 통해 MDM2를 분해시키고 이로 인해 MDM2-유도된 p53 활성 감소를 다시 회복시킬 수 있다. 이는 ARF 신호전달과는 관계없이 일어날 수 있어, ARF 활성이 저해 또는 억제된 암 환경에서도 EI24 단백질의 발현을 통해 p53 기능을 회복시키고, 암 치료 효과를 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명의 EI24와 연계된 기전의 활성화는 다양한 암 치료제 개발에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다.
- [0044] 따라서, 본 발명은 EI24 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터; 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 EI24 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터; 또는 이의 활성화제의 암 예방 및 치료 용도를 제공한다. 본 발명은 EI24 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터; 또는 이의 활성화제를 가지고 치료를 요하는 환자에게 투여하는 암 예방 및 치료 방법을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 "EI24 단백질"은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되며, 상기 단백질 또는 이의 활성 단편의 기능적 동등물을 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 "기능적 동등물"은 단백질 또는 펩티드의 아미노산 부가, 치환 또는 결실로 인해, 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 구성된 단백질 또는 펩티드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질 또는 펩티드를 말한다.
- [0048] 본 발명의 "활성화제"는, EI24 단백질 및/또는 이의 단편의 발현을 증강시킬 수 있거나, EI24 단백질에 의한 자가포식 시스템을 활성화시킬 수 있는 각종 화합물, 단백질 또는 펩티드, 염기서열 등을 포함한다. 상기 화합물, 단백질 또는 펩티드, 염기서열의 각종 대사체, 전구체, 약제학적 등가물도 또한 상기 활성화제에 포함된다.
- [0049] 본 발명의 "유전자"는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 본 발명의 "암"은 ARF 유전자가 활성 또는 비활성 되어 있을 수 있으나, 보다 바람직하게는 ARF 유전자가 비활성된 암일 수 있다. ARF 유전자가 활성화되어 있는 경우, ARF 단백질이 MDM2와 상호 결합할 수 있어 MDM2에 의한 p53의 분해를 억제할 수 있도록 하나, ARF 유전자가 비활성된 암에서는 MDM2에 의한 p53의 분해가 나타나, 암 억제자로서의 역할을 수행하지 못하게 되므로, 본 발명의 암은 ARF 유전자가 비활성된 암 인 것이 바람직하다.
- [0051] 본 발명의 "암"은 p53 단백질 또는 유전자의 발현 및 활성이 정상 세포와 유사한 수준인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. p53의 발현 및/또는 기능이 정상세포보다 낮을 때 암 억제자로서의 역할을 효과적으로 수행할 수 없으므로, 본 발명의 암은 p53의 발현 및/또는 기능이 정상 세포와 유사한 수준인 것이 바람직하다.
- [0052] 본 발명의 "암"은 유방암(Breast Cancer), 자궁경부암(Cervix Cancer), 백혈병(Leukemia), 위암(Gastric Cancer), 육종(Sarcoma), 간암(Liver Cancer), 폐암(Lung Cancer), 직장암(Colorectal Cancer) 및 신장암(Renal Carcinoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이 바람직하며, 보다 구체적으로 직장암, 폐암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0054] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 본 발명자들은 EI24 단백질이 자가포식 시스템을 활성화(도 1 및 도 2)하여, E3-리가아제의 RING 도메인을 인식하고 결합하여 이를 분해할 수 있음을 확인하였다(도 3 및 도 4). 이에, EI24 단백질에 의해 자가포식 분해될 수 있는 E3-리가아제의 분자정보학적 분석(도 5 내지 도 8) 및 기능적 유효성 분석(도 9 및 도 10)한 결과, EI24가 RING 도메인을 가지고 있는 E3-리가아제를 자가포식 시스템을 유도시켜 분해시킨다는 것을 실험을 통해 확인하였으며 생물정보학적 분석을 통해 이에 대한 새로운 물을 만들었다.
- [0055] 또한, 본 발명자들은 EI24 발현에 따른 암 치료효과를 확인하였다. 먼저, 육종 환자의 15%에서 ARF 기능이 상실되어있고, 이 중 92%가 p53이 정상적인 기능을 할 수 있음을 확인하였다(도 11).
- [0056] 또한, 본 발명자들은 EI24 발현 여부에 따라 자가포식 활성이 유도되는 것을 확인하였고(도 12 및 도 13), 이에

따라 MDM2가 분해되어 p53 유전자의 발현 수준이 증가되는 것을 확인하였다(도 15 내지 도 18).

[0057] 또한, 본 발명자들은 ARF 발현 또는 비발현암세포주에서 EI24 발현 여부에 따라 암세포주의 증식능이 감소하고 p53이 회복됨에 따라 종양 세포의 생존능이 감소하는 것을 확인하였다(도 19 내지 도 22).

[0058] 아울러, 본 발명자들은 시험관 내 수준에서 확인한 위의 결과를 생체 내에서 확인하기 위해 마우스에서 종양을 형성하고 EI24 발현이 종양 형성에 미치는 영향을 확인한 결과 EI24가 과발현된 세포로 만든 경우에는 암의 성장이 억제되는 것을 확인하였다(도 23 및 도 27).

[0060] 따라서, 본 발명에 따르는 EI24는 자가포식 시스템을 통해 MDM2를 분해시키고 이로 인해 MDM2-유도된 p53 활성 감소를 다시 회복시킬 수 있다. 이는 ARF 신호전달과는 관계없이 일어날 수 있어, ARF 활성이 저해 또는 억제된 암 환경에서도 EI24 단백질의 발현을 통해 p53 기능을 회복시키고 암 치료 효과를 제공할 수 있으므로, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 EI24 단백질은 단백질의 형태뿐만 아니라, 유전자 치료나 백신 등에 사용되기 위하여 세포 내에서 EI24를 암호화하는 유전자를 발현할 수 있는 발현벡터의 형태로 제공될 수 있다.

[0063] 상기 발현벡터는 상기 EI24 단백질 또는 이의 활성단편을 암호화하는 유전자를 삽입하여 발현할 수 있는 당업계에 공지된 발현벡터를 이용할 수 있으며, 예컨대 pBK-CMV (Staratagene), pCR3.1 (Invitrogen) 등의 발현벡터를 사용할 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명의 EI24 단백질을 암호화하는 염기서열, 즉 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 DNA 분자를 발현을 조절하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결한 형태, 예를 들어 발현벡터의 형태로 치료 대상환자 내에서 이것이 발현되도록 상기 폴리뉴클레오티드를 투여할 수 있다. 상기 벡터는 따라서 코딩 서열을 발현시킬 수 있는 프로모터 부위를 포함하는 적당한 전사 조절 신호를 포함하고, 상기 프로모터는 치료될 환자 내에서 작동 가능한 것이 바람직하다. 따라서, 인간 유전자 치료용으로, RNA 폴리머라제를 전사 개시 부위로 인도하는데 필요한 서열뿐만 아니라, 적당하다면 인헨서를 포함하는 다른 작동 서열 또는 조절 서열들을 포함하는 용어인 프로모터는, 바람직하게는 인간 유전자로부터의 인간 프로모터 서열 또는 일반적으로 인간에게서 발현되는 유전자로부터의 인간 프로모터 서열, 예를 들어 인간 사이토메갈로바이러스(CMV)로부터의 프로모터일 수 있다. 이러한 관점에서 적당한 공지된 진핵 프로모터 중에서 CMV 즉 초기 프로모터, HSV 티미딘키나제 프로모터, 초기 및 후기 SV40 프로모터, 루 욱종 바이러스("RSV")의 것들과 같은 레트로바이러스 LTR 프로모터, 및 생쥐 메탈로티오네인-1 프로모터와 같은 메탈로티오네인 프로모터가 적합하다.

[0065] 상기 폴리뉴클레오티드 서열 및 전사 조절 서열은 상업적으로 입수 가능한 pBR322와 같은 플라스미드에 기초하여 복제 가능한 플라스미드 벡터 내에 클로닝되어 제공되거나 또는 잘 알려진 공개된 절차의 일상적인 응용에 의해 입수 가능한 플라스미드로부터 구축될 수도 있다.

[0066] 상기 벡터는 또한 상기 유전자 서열의 3'에 위치하는 전사 조절 서열, 및 인간 치료로 사용될 때 SV40 바이러스와 같은 바이러스로부터의 상응하는 서열과 같이 치료될 환자에게서 인식 가능한 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다. 기타 전사 조절 서열이 이 기술분야에 잘 알려져 있어 이용 가능하다.

[0068] 상기 발현벡터는 또한 상기 벡터가 전파될 수 있도록 항생제 저항성과 같은 선택 가능한 마커를 포함할 수 있다.

[0070] 그 자체로 상기 단백질 또는 펩티드를 합성할 수 있는 발현 벡터들을 물리적 방법으로 직접적으로 상처 부위에 도입시킬 수 있다. 이들의 예로는 예를 들어 인산 완충 염수(PBS)와 같은 제약학적으로 허용되는 부형제 중의 용액 내에 적당한 비히클 내의 "네이키드" 핵산 벡터를 국부적으로 적용하는 것, 또는 당업계에 알려진 방법에 따라 "유전자 총" 기술로도 알려진 입자 총알과 같은 물리적 방법으로 벡터를 투여하는 것을 포함한다. 상기 "유전자 총" 기술은 미국특허번호 제5371015호에 기술된 바와 같이, 추진 장치로부터의 고압력하에서 방출시키는 방법으로, 벡터로 코팅된 금 비드와 같은 불활성 입자를 상처 부위, 예를 들어 피부 세포의 표면을 통과할 수 있을 정도로 충분한 속력으로 가속하는 것이다. 또한, DNA를 직접 수용체에 투여하는 기타 물리적 방법으로는

초음파, 전기적 자극, 전기투과 및 마이크로시딩(microseeding) 등이 있다.

- [0071] 상기 유전자 서열은 또한 형질전환된 숙주 세포의 수단으로 상처 부위에 투여될 수 있다. 세포는 환자로부터 수거된 세포를 포함하며, 상기 핵산 서열을 이 세포내로 당업계에 공지인 유전자 도입 방법에 의해 도입하여 형질전환된 세포를 배양액 중에서 성장시켜 환자에게 이식할 수 있다.
- [0072] 상술한 바와 같은 발현 구조체를 본 발명의 치료에 다양한 방법으로 사용할 수 있다. 따라서, 상기 발현 구조체들은 환자에서 치료가 필요한 부위에 직접 투여될 수 있다.
- [0074] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 EI24 단백질 또는 이의 활성단편의 발현을 증가시키는 활성인자를 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0075] 상기 EI24 단백질 또는 이의 활성단편의 발현을 증가시키는 활성인자는 EI24 유전자 또는 이의 활성단편을 암호화하는 유전자에 직접 또는 간접적으로 작용하여 EI24 단백질을 또는 이의 활성단편의 생물학적 활성을 개선, 유도, 자극, 증가시키는 물질을 의미한다. 상기 물질은 유기 또는 무기 화합물과 같은 단일 화합물, 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물 및 복수 화합물의 복합체 등을 포함한다. 상기 EI24 단백질의 발현을 증가시키는 활성 인자는 EI24 단백질의 발현, 활성, 또는 기능의 감소에 의해 발병되는 질병의 예방, 개선 및 치료에 이용될 수 있다.
- [0076] 상기 물질이 EI24 유전자 또는 이의 활성단편을 암호화하는 유전자를 활성화시키는 기작은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 물질은 전사, 번역 등의 유전자 발현을 증대시키거나, 비활성형을 활성형으로 전환시키는 기작으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, EI24 유전자 또는 이의 활성단편을 암호화하는 유전자를 활성화시키는 물질은 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물이다. 핵산 및 단백질 서열이 이미 공지된 EI24 단백질에 대하여 당업자는 유도제 또는 활성제로 작용하는 유기 또는 무기 화합물과 같은 단일 화합물 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물 및 복수 화합물의 복합체 등을 당 분야의 기술을 이용하여 제조하거나 스크리닝할 수 있다.
- [0078] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제, 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0079] 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 텍스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.
- [0080] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있으며, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0081] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0082] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구투여시 피부외용; 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제; 경피투여제; 또는 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.

- [0083] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매 질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵스 용액, 링거 용액, 트리에탄올아민이 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0085] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 젼제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어졸제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 경피 투여는 약학 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.
- [0087] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다. 비경구 투여용 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.
- [0089] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0090] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량으로는, 비경구 투여 시 EI24 단백질 또는 이의 활성단편을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.1 내지 30 mg의 양으로 투여되도록, 그리고 경구 투여 시는 본 발명의 EI24 단백질 또는 이의 활성단편을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 100 mg, 더 바람직하게는 0.01 내지 10 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0091] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0092] 본 발명의 약학 조성물은 또한 EI24 단백질 또는 이의 활성단편, 또는 이를 암호화하는 염기서열을 유효성분으로 포함하는 외용제의 제형으로 제공할 수 있다. 본 발명의 암 예방 및 치료용 약학 조성물을 피부외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형유화제, 비이온형유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 활성제, 친유성 활성제 또는 지질 소낭 등 피부 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상



적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0093] 본 발명의 암 예방 및 치료용 약학 조성물이 피부 외용제로 제공될 경우, 이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 겔, 크림 또는 분무제 등의 제형일 수 있다.

[0095] 또한, 본 발명은 아래와 같은 단계를 포함하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0096] i) EI24 단백질을 저 발현 또는 발현하지 못하는 세포를 포함하는 환자 유래 시료에 피검물질을 처리하는 단계;

[0097] ii) 상기 단계 i)에서 처리한 시료에서 EI24 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0098] iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 EI24 단백질의 발현 수준이 피검물질 미처리 대조군에 비해 증가하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계.

[0099] 본 발명의 단계 ii)에서, "측정"은 면역침강법 (Immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법 (ELISA), 면역조직화학 (Immunohistochemistry), 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0101] 또한, 본 발명의 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법은 아래와 같은 단계를 포함하는 구성일 수 있다:

[0102] i) EI24 단백질을 포함하는 시료에 피검물질을 처리하는 단계;

[0103] ii) 상기 단계 i)에서 처리한 시료에서 EI24 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및

[0104] iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 상기 EI24 단백질의 활성 수준이 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군에 비해 증가하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계.

[0105] 본 발명의 단계 ii)에서, "측정"은 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0107] 본 발명에서, EI24와 후보물질 간의 반응 확인은 단백질-단백질, 단백질-화합물, DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질, DNA-화합물, RNA-단백질, RNA-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들면, 생체 외부(in vitro)에서 EI24 유전자와 후보물질 사이의 결합 여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류 세포와 시험 대상물질을 반응시킨 후 노던 블랏팅, 정량적 PCR, 정량적 실시간 PCR 등을 통한 상기 유전자의 발현을 측정 방법, 또는 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 시험 대상물질과 반응시키고 리포터 단백질의 발현율을 측정하는 방법, EI24 단백질과 후보물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(Yeast two-hybrid), EI24 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩티드 클론 (Phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화학물질 라이브러리(Chemical library) 등을 이용한 HTS(High Throughput Screening), 약물 히트 HTS(Drug Hit HTS), 세포 기반 스크리닝(Cell-based Screening), 또는 디엔에이 마이크로레이(DNA micro array)를 이용하는 스크리닝법 등을 사용할 수 있다.

[0108] 본 발명의 "암"은 ARF 유전자가 활성 또는 비활성 되어 있을 수 있으나, 보다 바람직하게는 ARF 유전자가 비활성된 암일 수 있다. ARF 유전자가 활성화되어 있는 경우, ARF 단백질이 MDM2와 상호 결합할 수 있어 MDM2에 의한 p53의 분해를 억제할 수 있도록 하나, ARF 유전자가 비활성된 암에서는 MDM2에 의한 p53의 분해가 나타나, 암 억제자로서의 역할을 수행하지 못하게 되므로, 본 발명의 암은 ARF 유전자가 비활성된 암 인 것이 바람직하다.

[0109] 본 발명의 "암"은 p53 단백질 또는 유전자의 발현 및 활성이 정상 세포와 유사한 수준인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. p53의 발현 및/또는 기능이 정상세포보다 낮을 때 암 억제자로서의 역할을 효과적으로 수행할 수 없으므로, 본 발명의 암은 p53의 발현 및/또는 기능이 정상 세포와 유사한 수준인 것이 바람직하다.

[0110] 본 발명의 "암"은 유방암(Breast Cancer), 자궁경부암(Cervix Cancer), 백혈병(Leukemia), 위암(Gastric Cancer), 육종(Sarcoma), 간암(Liver Cancer), 폐암(Lung Cancer), 직장암(Colorectal Cancer) 및 신장암(Renal Carcinoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이 바람직하며, 보다 구체적으로 직장암,

폐암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0112] 또한, 본 발명은 아래와 같은 단계를 포함하는, 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0113] i) EI24 단백질을 저 발현 또는 발현하지 못하는 세포를 포함하는 환자 유래 시료에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0114] ii) 상기 단계 i)에서 처리한 시료에서 EI24 단백질의 하위 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0115] iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 EI24 단백질의 하위 단백질의 발현 수준을 피검물질 미처리 대조군과 비교하여 피검물질을 선별하는 단계.
- [0116] 또한, 본 발명의 암 예방 및 치료용 후보물질의 스크리닝 방법은 아래와 같은 단계를 포함하는 구성일 수 있다:
- [0117] i) EI24 단백질을 포함하는 시료에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0118] ii) 상기 단계 i)에서 처리한 시료에서 EI24 단백질의 하위 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0119] iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 상기 EI24 단백질의 하위 단백질의 활성 수준을 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군과 비교하여 피검물질을 선별하는 단계.
- [0120] 상기 EI24 단백질의 하위 단백질 EI24 유전자 또는 EI24 단백질의 발현 조절을 통해 발현 수준이 변할 수 있거나 EI24 단백질에 의해 분해될 수 있는 단백질을 의미한다. 구체적으로, 상기 하위 단백질은 EI24를 과발현하였을 때 이로 인해 발현 수준이 변할 수 있는 단백질을 포함할 수 있고, 이는 물질대사(metabolism), 지방세포 형성(adipogenesis), 칼슘 합성(calcium synthesis), 면역 반응(Immunology), JAK-STAT 신호경로(JAK-STAT signaling pathway)에 속한 단백질일 수 있다.
- [0121] 보다 구체적으로, 상기 EI24 단백질의 하위 단백질은 하기 a) 및 b) 중 어느 하나 또는 둘 다인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:
- [0122] a) 발현 수준 또는 활성 수준이 감소하는 단백질로서, AKT, p-AKT, SRC, pTEM, p-PDK1, P38, pP38, ERK, p-ERK, GSKa/b, p-GSK b, p70 S6K, p-p70 S6K 및 HSP60으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 및
- [0123] b) 발현 수준 또는 활성 수준이 증가하는 단백질로서, p38a, JNK1/2/3, GSK-3  $\alpha/\beta$ , MSK1/2, CREB, HSP27, AMPK  $\alpha$ 2, P70 S6K(T389), P70 S6K(T421/S424) 및 Chk-2로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질.
- [0124] 본 발명의 "암"은 ARF 유전자가 활성 또는 비활성 되어 있을 수 있으나, 보다 바람직하게는 ARF 유전자가 비활성된 암일 수 있다. ARF 유전자가 활성화되어 있는 경우, ARF 단백질이 MDM2와 상호 결합할 수 있어 MDM2에 의한 p53의 분해를 억제할 수 있도록 하나, ARF 유전자가 비활성된 암에서는 MDM2에 의한 p53의 분해가 나타나, 암 억제자로서의 역할을 수행하지 못하게 되므로, 본 발명의 암은 ARF 유전자가 비활성된 암 인 것이 바람직하다.
- [0125] 본 발명의 "암"은 p53 단백질 또는 유전자의 발현 및 활성이 정상 세포와 유사한 수준인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. p53의 발현 및/또는 기능이 정상세포보다 낮을 때 암 억제자로서의 역할을 효과적으로 수행할 수 없으므로, 본 발명의 암은 p53의 발현 및/또는 기능이 정상 세포와 유사한 수준인 것이 바람직하다.
- [0126] 본 발명의 "암"은 유방암(Breast Cancer), 자궁경부암(Cervix Cancer), 백혈병(Leukemia), 위암(Gastric Cancer), 육종(Sarcoma), 간암(Liver Cancer), 폐암(Lung Cancer), 직장암(Colorectal Cancer) 및 신장암(Renal Carcinoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이 바람직하며, 보다 구체적으로 직장암, 폐암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0129] 이하, 실험예 및 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실험예 및 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실험예 및 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는

않는다.

- [0131] [실험예]
- [0132] (세포배양)
- [0133] 포유류 세포주(293T 배아의 신장에서 유래한 종양세포, HepG2 간 종양세포)의 경우, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS)와 100 units/ml 페니실린과 100 ?g/ml 스트렙토마이신(PS) 을 넣은 것을 사용하였다. HCT116 직장 종양세포와 H1299 폐 종양세포의 경우 RPMI 배지에 10% FBS와 PS을 첨가한 것을 사용하였다. 모든 세포주는 5% CO<sub>2</sub>, 37 세포배양기에서 배양하였다. Transfection은 Lipopectamin 2000을 이용하였으며 siRNA을 형질 전환하는 경우에는 Lipopectamin RNAiMAX를 사용하였다. EI24 knockdown siRNA 시퀀스는 5'-GCAAGAGAGUGAGCCACGUAUUGUUTT-3' 이다.
- [0135] (면역조직화학)
- [0136] 면역결핍 마우스에 종양 세포주를 이식하여 형성한 종양을 분리하여 5?m 파라핀으로 포매, 박절하였다. 자일렌(Xylene)을 이용하여 박절한 시료에 Vecta-stain 키트를 사용하여 p53, MDM2 그리고 EI24 유전자의 발현 정도를 확인하였다.
- [0138] (면역세포화학)
- [0139] 세포는 젤라틴이 코팅된 커버슬라이드(Coverslips)에 분주하였으며 4% 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde)를 이용해 고정시켰다. 그리고 0.5% Triton-100을 이용해 투과성을 높여주었다. 또한 0.1% Triton X-100이 포함된 1% normal goat serum을 이용해 블로킹(Blocking)하였으며 1차 항체를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. Alexa-488 혹은 Alexa-568 2차 항체 복합체(Invitrogen)를 사용하여 1차 항체를 검출하였다. 염색한 세포는 공초점 현미경(Confocal microscope, Zeiss)을 이용해 확인하였다.
- [0141] (면역침강법과 웨스턴 블롯(Western Blotting))
- [0142] - 면역침강법시 NP-40 버퍼(20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 2 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, aprotinin/pepstatin/luepeptin 20 ?g/ml 동량)를 이용해 세포를 용해시켰으며 1 ?g 1차 항체를 넣어 3시간 동안 반응시켰다. Protein G agarose beads(Invitrogen)을 30 ?l 넣고 3시간 동안 추가로 반응시켜 목적하는 단백질을 침강한 뒤, 웨스턴블롯을 수행하였다.
- [0143] 단백질 시료를 수득하기 위해서, RIPA 버퍼(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA, 프로테아제, 포스포테아제저해제)를 사용하여 세포를 용해시켰다.
- [0145] (유비퀴틴화 분석)
- [0146] Transfection 30시간 후 2 mM N-ethylmaleimide (NEM)을 넣은 PBS를 사용하여 세포를 수확하였으며 1% SDS와 20 mM NEM이 포함된 Tris-buffer saline(TBS)를 이용하여 세포를 용해시켰다. 용해된 lysate를 끓인 후 sonication해서 원심분리하였고, 그 상층액을 2 mM NEM이 포함된 NP-40 버퍼에 희석하여 면역침강법을 수행하였다.
- [0148] (RNA 분리 및 발현량 측정)
- [0149] 마우스조직이나 종양 세포주에 Trizol(Invitrogen)을 이용하여 total RNA를 분리하여 Superscript First-Strand Synthesis System with oligodT primer (Invitrogen)를 이용하여 cDNA로 전환하였다. 유전자 발현량은

IQ SYBR Green SuperMix를 사용하였고 iQ5 optical system software(Bio-Rad)를 이용하여 정량 분석하였다.

- [0151] (세포 생존도 분석)
- [0152] HepG2 간 종양세포에 공백터(Control), MDM2 발현 벡터, MDM2 & Myc tagged EI24 발현 벡터를 형질 전환하여 MDM2 또는 EI24 단백질을 과발현하는 세포를 제조한 뒤  $1 \times 10^5$  개를 세포 배양 접시에 분주하고 0, 2, 4, 6 일 쯤 각각 세포의 성장 속도를 관찰하였다. 각 세포를 크리스탈 바이올렛(Crystal violet)으로 염색하여 콜로니를 관찰하였으며 10% 아세트산으로 탈염, 추출하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0154] (유세포 분석법)
- [0155] FACS caliburapparature 342975 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 유세포를 분석하였다. 세포를 70% 에탄올에 고정시킨 뒤 RNase A (Sigma-Aldrich, R4875)를 처리하고 프로피디움 요오드화물(Sigma-Aldrich, P4170)을 이용하여 DNA를 염색하였다. GAPDH를 이용하여 세포 주기의 G1, S, G2, M 단계를 표현하였다.
- [0157] (면역결핍마우스에 종양세포이식)
- [0158] HCT116 직장 종양세포에 공백터(Control), GFP-tagged EI24 발현 벡터를 형질 전환하여 EI24 단백질을 과발현하는 세포를 제조한 후  $5 \times 10^6$  개를 세포를 마트리젤(Matrigel)과 1:1로 혼합하여 면역결핍마우스에 이식하였다. 20일 동안 관찰하였으며 2~3일 간격으로 종양크기를 캘리퍼(Caliper)를 사용하여 측정하였다. 마우스 실험은 연세대학교 IACUC의 승인을 받아 진행하였으며 특정 병원균이 없는 사육실에서 수행하였다.
- [0160] (세포의 반감기 측정)
- [0161] HCT116 직장 종양세포에 MDM2, p53을 과발현시켰으며 10  $\mu$ g/ml 시클로헥사미드(Cycloheximide)를 각 시간대 별로 처리하였으며 웨스턴 블롯(Western Blotting)을 하여 발현 정도를 확인하였다.
- [0163] (암 유전체학과 TCGA 데이터분석)
- [0164] 환자에서 EI24, p53, MDM2 유전자의 발현 여부와 복제수 변이 패턴을 분석하기 위해 OncominePrimium Edition Database (Compendia Biosciences, USA; [www.oncomine.org](http://www.oncomine.org))를 이용하였다. 또한 유전자 발현에 대한 통계학적 분석을 위해 암유전체학 알고리즘을 이용하였다. p53과 ARF 유전자의 돌연변이 발현 여부는 TCGA 데이터베이스를 이용하여 분석하였다.

## 실시예 1

- [0166] **EI24 단백질의 자가포식(autophage) 시스템의 활성화 확인**
- [0167] <1-1> EI24 발현 세포에서 자가포식 활성화 여부 확인
- [0168] EI24가 마우스와 예쁜꼬마선충에서 자가포식 시스템의 중요한 인자임이 알려져 있기 때문에 자가포식 기전에서 EI24의 역할을 구체화하기 위해서, 먼저 EI24 발현 세포에서 자가포식이 나타나는지 여부를 확인하였다.
- [0169] 그 결과, 도 1에 나타난 것과 같이 암에서 유래된 세포주에 EI24를 과발현시켰을 때 GFP로 표지된 LC3 점이 증가되었으며 이를 통해 자가포식 기전이 활성화되는 것을 확인하였다(도 1).
- [0171] <1-2> EI24 발현에 의한 E3-리가아제 분해 기전 확인
- [0172] EI24가 자가포식 시스템을 통해 단백질을 분해할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 프로테아좀(Proteasome) 억



제제인 MG132 또는 오토파고솜(Autophagosome) 억제제인 BafA1을 처리한 배지에서 EI24 과발현 세포를 배양하여, EI24에 의해 분해되는 E3-리가아제인 RINCK1의 발현 수준 변화를 확인하였다.

[0173] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 EI24가 과발현되었을 때 E3-리가아제인 RINCK1의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 특히, EI24의 단백질 분해과정 중에서 MG132(specific, potent, reversible and cell permeable proteasome inhibitor) 처리 여부에 관계없이 RINCK1의 발현 감소되었고, BafA1 (dSERCA의 억제에 의해 autophagosome-lysosome fusion을 방해) 처리를 하는 경우에는 처리하지 않은 군과 RINCK1의 발현량의 차이가 없는 것으로 미루어, EI24에 의한 단백질 분해 과정 중에서 자가포식이 활성화되고 프로테아좀 시스템에 영향을 미치는 것을 확인하였다(도 2).

[0175] <1-3> EI24가 자가포식 시스템을 활성화시킴으로써 RING 도메인을 갖고 있는 E3-리가아제에 미치는 영향확인

[0176] EI24가 E3-리가아제인 RINCK1과 상호 작용하는 도메인을 확인하기 위해서, 도 3a에 나타난 바와 같이 RINCK1의 다양한 도메인을 각각 삭제한 형태의 RINCK1을 제작하여, 면역침강법으로 상호작용 여부를 확인하였다.

[0177] 그 결과, 도 3에서와 같이 EI24가 E3-리가아제인 RINCK1과 상호작용하고 있음을 확인하였다. 또한 RINCK1이 갖고 있는 도메인의 역할을 알아보기 위해 스크리닝 하였으며 RING 도메인이 EI24와의 상호작용에 있어 매우 중요함을 확인하였다.

[0179] 이러한 결과를 바탕으로 RING 도메인을 가지는 여러 종류의 E3-리가아제를 스크리닝하여 동일하게 EI24 과발현 시 이들이 분해되는지 여부를 확인하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 EI24는 RING 도메인을 인식하고 결합함으로써 E3-리가아제를 분해시켰으며 이는 자가포식기전에 의해 유도됨을 확인하였다. 그러나, 스크리닝 과정에서 EI24의 표적이 되지 못하는 E3-리가아제들도 발견되었다. 따라서 상기에 기술한 현상들에 대해서 분자 정보학적 기술을 이용하여 상호 비교 분석을 수행하였다.

## 실시예 2

[0181] EI24에 의해 분해되는 E3-리가아제들의 분자정보학적 분석 및 예측 결과

[0182] EI24에 의해 분해되는 E3-리가아제를 그룹 1, EI24에 의해 분해되지 못하는 E3-리가아제를 그룹 2로 나누어 각 그룹의 특징을 알아보기 위해 분자정보학적 분석을 진행하였다.

[0184] 그 결과, 도 5 에서 나타난 바와 같이, "multiple sequence alignment analysis"을 수행하였을 때 그룹 1과 그룹2의 RING 도메인 유사 정도가 높았기 때문에 시퀀스 모티프에는 분명한 차이가 보이지 않았다. 또한 세포 상의 위치와 상호작용체의 분석에도 그룹 1과 그룹2 사이에 뚜렷한 차이가 없는 것을 확인하였다.

[0186] 또한, 여러 종류의 E3-리가아제들을 MPLS-DA (Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis) 시스템을 이용하여 분석한 결과, 도 6 에서와 같이 161개의 E3-리가아제들을 그룹 1으로 64개의 E3-리가아제들을 그룹 2로 예측하고 나눌 수 있었다.

[0188] 또한, 도 6 에서 예측하여 나눈 그룹 중 무작위로 선택하여 세포에서 EI24를 과발현시켜서 단백질 수준 변화를 확인한 결과, 도 7 에서와 같이 예측한 그룹 1의 경우 EI24에 의해 E3-리가아제가 분해되는 것을 확인하였으나 그룹 2의 경우에는 E3-리가아제가 분해되지 않는다는 사실을 확인하였다.

[0190] 또한, GOCC(Gene ontology cellular component) 분석을 수행한 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이 그룹 1의 경우에는 액포, 엔도솜, 라이소솜, 세포 골격, 유비퀴틴라이게이즈 복합체와 같은 주로 세포 내 소기관에 위치하고 있음을 확인했다. 반면에 그룹 2의 경우에는 핵 주위의 세포질이나 골지체에 관련이 있음을 확인할 수 있었

다.

### 실시예 3

#### [0192] EI24에 의해 분해되는 E3-리가아제의 기능적 유효성 분석

[0193] EI24에 의해 분해되는 E3-리가아제들을 분자정보학적으로 분석하였으므로, 기능적인 측면에서 EI24에 의해 분해되는 E3-리가아제(그룹 1)의 유효성을 분석하였다.

[0195] 먼저, GOBPs (Gene ontology biological functions), GOMFs (Gene ontology molecular functions) 분석을 수행한 결과, 도 9 에서 나타난 것과 같이 그룹 1에서는 세포사멸, 세포주기, 히스톤 및 염색질의 변화, RNA 물질 대사 과정에 대한 연관성이 높은 것을 확인하였다. 또한 ATM, CHEKS, mTOR, AKT1 신호전달에 의해 EI24의 표적 E3-리가아제들이 인산화가 되는 것을 확인하였다.

[0197] 상술한 결과를 종합하였을 때 도 10 에서 나타난 것과 같이, EI24가 RING 도메인을 가지고 있는 E3-리가아제를 자가포식 시스템을 유도시켜 분해시킨다는 것을 실험을 통해 확인하였으며 생물정보학적 분석을 통해 이에 대한 새로운 룰을 만들었다. 더 나아가 EI24가 자가포식, 유비퀴틴프로테아좀 시스템을 연결하는 중요한 매개체임을 보여주었다. 이러한 기전은 생물 에너지학 및 유전체 보존 등 여러 세포 내 과정에 밀접한 상호 연관성을 있음을 보여주었다.

### 실시예 4

#### [0199] 암에서 ARF와 p53의 발현 양상 분석

[0200] 본 발명의 EI24 단백질을 통한 암 치료 효과를 확인하기에 앞서, 먼저 암에서 ARF와 p53의 발현 양상을 분석하였다.

[0201] TCGA 데이터분석(TCGA database analysis)을 통해 264명의 육종 환자의 암에서 p53과 ARF 유전자 발현 양상을 분석하여, 도 11에서 나타난 바와 같이 p53과 ARF의 변이가 상호 배타적임을 확인하였다. 구체적으로, 총 264명의 육종 환자 중 15%가 ARF의 기능을 상실해 있었고, 그 중 92%는 p53이 정상적인 기능을 했으며 8%에서는 p53 돌연변이가 발생되었다. 이를 통해 ARF의 기능이 상실되었으나 p53이 정상적인 기능을 갖고 있는 92%암에서는 EI24의 발현에 따라 치료 가능성이 있음을 확인하였다.

### 실시예 5

#### [0203] EI24의 발현 여부에 따른 자가포식 활성화의 유도

[0204] EI24 단백질이 자가포식 시스템을 이용하여 E3-리가아제를 분해할 수 있음을 확인하였으므로, EI24 단백질 중에서 자가포식 기전을 유도하는 모티프를 확인하고자 하였다. 이에, EI24 아미노산의 서열 배열 분석(Sequence alignment)을 통해 기존의 자가포식 기전을 유도하는 단백질에서 주요 모티프로 알려진 LIR-모티프를 확인하였다.

[0206] 그 결과, 도 12에서 나타난 것과 같이 EI24 단백질은 다른 자가포식 기전 유도 단백질에서 나타나는 LIR-모티프를 포함하고 있는 것을 확인하였으며(도 12a), 293T 배아의 신장에서 유래한 종양세포에 LC3와 EI24를 과발현시켰을 때 두 단백질이 서로 상호작용하고 있음을 확인하였다. 이는 내생적 수준에서도 확인하였다. 또한 자가포식기전에서 EI24의 LIR-모티프의 유효성을 알아보기 위해 대상을 선정하였다. 이를 위해, EI24 단백질 아미노산 서열의 81 내지 86 번째 아미노산 서열인 LIR1 모티프를 LIR-모티프 1번으로 지정하였고, EI24 단백질 아미노산 서열의 113 내지 118 번째 아미노산 서열인 LIR2 모티프를 LIR-모티프 2번으로 지정하였다. LIR-모티프 1, 2번 각각의 유효성을 알아보기 위해 이들 각 모티프가 결실된 EI24를 제작하였으며 H1299 폐 종양세포에 과발현시켜

자가포식기전의 활성 여부를 확인해보았다. 대조군과 비교했을 때 LIR 2번 모티프가 결실되었을 때 자가포식기전이 활성이 줄어들었으며 이를 통해 자가포식 기전의 활성에 중요함 역할을 하고 있음을 확인하였다.

- [0208] 또한, 도 13 에서와 같이, EI24의 발현에 따른 자가포식기전의 활성을 알아보기 위해 EI24 siRNA를 이용하여 발현을 저하시킨 293T 배아의 신장에서 유래한 종양세포에 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution) 적용시켜 영양적으로 결핍한 상태를 유도하여 자가포식 기전을 인위적으로 활성화하고 p62 및 LC3의 발현 수준을 비교하였다. 그 결과, 자가포식기전의 주요 요인인 p62, LC3 발현 수준을 통해 EI24의 발현이 줄어들었을 때 자가포식기전 활성 또한 감소되었음을 확인하였다.

## 실시예 6

- [0210] **EI24가 유도하는 자가포식 기전의 활성에 따른 MDM2와 p53 유전자의 발현 여부 확인**

- [0211] <6-1> EI24에 의한 자가포식을 통한 MDM2 분해 여부 확인

- [0212] 상술한 실시예에서 EI24가 표적으로 하는 RING 도메인 E3-리가아제의 규칙을 만들었으며 이를 통해 161개의 E3-리가아제들이 EI24에 의해 분해되는 것을 확인하였다. 이에, 그 중 한 종류인 MDM2를 표적으로 기능적 역할에 대해 구체화하기 위해 EI24가 유도하는 자가포식 기전의 활성에 따른 발현 여부를 비교 분석하였다.

- [0214] 먼저, 도 14 에서 나타낸 것과 같이, p53의 활성을 갖고 있는 HCT116 직장 종양 세포에 EI24를 과발현시켰을 때 MDM2의 단백질 발현이 감소하였고 이에 따른 p53의 단백질 발현은 증가됨을 확인하였다. 또한 이러한 결과는 자가포식 기전에 의해 유도됨을 확인하였다.

- [0217] 또한, 도 15 에서와 같이 293T 배아의 신장에서 유래한 종양세포에 MDM2와 EI24를 과발현시켰을 때 두 단백질이 서로 상호작용하고 있음을 확인하였다. 내생적 수준에서도 확인하였다. 또한 RING 도메인이 결실되었을 때 MDM2와 EI24이 서로 결합하지 못하였고 이를 통해 두 단백질의 상호작용에 있어 RING 도메인의 중요성을 확인하였다.

- [0219] 또한, MDM2의 RING 도메인과 EI24의 LIR-모티프의 결실을 만들어 각 도메인과 모티프의 유효성을 증명하기 위해 EI24에 발현에 따른 MDM2의 발현 여부를 확인한 결과, 도 16에서와 같이 MDM2의 RING 도메인 또는 EI24의 LIR 모티프 중 어느 하나라도 결실되는 경우 단백질의 상호작용이 일어나지 않는 것을 확인하여, 이들 도메인 및 모티프는 단백질 상호 작용에서 중요한 역할을 할 수 있음을 확인하였다.

- [0221] <6-2> EI24 발현수준 변화에 따른 MDM2 분해 수준 변화의 확인

- [0222] p53의 활성을 갖고 있는 HCT116 직장 종양 세포에 EI24를 과발현 시킨 후 단백질 합성을 억제하는 시약인 시클로헥사미드(Cycloheximide)를 0, 1, 3시간 동안 처리하여, MDM2 분해 여부 변화를 확인하고, EI24의 siRNA를 이용하여 발현 저하시킨 HCT116 직장 종양 세포에서 p53 및 MDM2의 발현 수준을 확인하였다.

- [0223] 그 결과, 도 17 에서 나타낸 것과 같이, 시클로헥사미드를 처리했을 때 p53의 발현이 MDM2에 의해 분해되지 않고 일정 수준을 유지하는 것을 확인하였다. 이는 EI24 siRNA를 이용하여 발현을 저하시킨 뒤 같은 방법으로 적용하였을 때 p53의 발현이 줄어들었음을 다시 한번 확인하였다.

- [0225] 또한, 도 18 에서 결과와 같이 p53이 활성화된 HCT116 직장 종양세포와 H1299 폐 종양세포에서 각각 p53의 유비퀴틴화 정도를 확인하였을 때 EI24가 과발현된 세포에서 자가포식 기전에 의해 MDM2가 분해됨으로써 MDM2에 의한 p53의 유비퀴틴화를 억제하는 것을 확인하였다.

## 실시예 7

[0227] **ARF 발현 또는 비발현 암세포주에서 EI24 여부에 따른 암세포 증식 능력 확인**

[0228] **<7-1> 다양한 종류의 암 세포에서 ARF와 p53의 발현 양상 여부 확인**

[0229] EI24에 의한 p53 발현 수준 변화를 확인하기 위하여, 다양한 종류의 암 세포에서 p53의 발현 및 이를 조절하는 단백질인 ARF의 발현 유형 및 수준을 분석하였다.

[0231] 도 19에서 나타난 바와 같이, 직장, 간 및 폐의 종양 세포를 이용하여 ARF 및 p53의 발현을 확인한 결과, HepG2 간 종양세포의 경우 ARF와 p53 모두 발현되었고 이에 반면 H1299 폐 종양세포에서는 ARF는 발현이 되었으나 p53은 발현되지 않음을 확인하였다. HCT116 p53 활성, 비활성 직장 종양세포에서는 ARF의 기능이 없음을 확인하였다 (도 19).

[0233] **<7-2> 암세포주에서 EI24 및/또는 MDM2 과발현에 따른 세포 증식능 변화 확인**

[0234] ARF가 활성화되어 있는 HepG2 간 종양세포에서 EI24 및 MDM2를 같이 과발현하거나, MDM2를 단독으로 과발현시킨 군으로 나뉜 세포의 증식 능력(Cell proliferation)과 콜로니 형성(Colony formation) 실험을 수행하였다. 세포의 증식 능력을 측정하는 실험에서는 2, 4, 6일에 세포 수를 집계하여 확인하였고 콜로니 형성 실험은 12일 동안 세포 배양한 후 크리스탈 바이올렛(Crystal violet)으로 염색하여 콜로니 수를 측정하였다.

[0236] 그 결과, 도 20 에서 나타난 것과 같이, MDM2만 과발현되었을 때는 세포의 증식 능력이 높았으며 콜로니도 많이 형성되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 EI24가 같이 발현되었을 때에는 대조군과 비슷하게 증식 속도를 보였고 콜로니 수도 감소함을 확인할 수 있었다.

[0238] **<7-3> 유전자의 독성 스트레스 상태에서 EI24 발현에 따른 세포 생존능 확인**

[0239] 유전자의 독성 스트레스 상태에서 EI24-MDM2-p53 신호전달의 발현여부를 비교 분석하기 위해 HCT116 p53 활성 직장 종양세포에 EI24 siRNA를 이용하여 발현을 감소시키고 시스플라틴(Cisplatin)을 24시간 동안 처리하여 스트레스 상황을 유도하였다.

[0241] 그 결과 도 21 에서 결과와 같이, 유전자의 독성 스트레스 상태에서 EI24의 발현이 감소되었을 때 p53의 일정 수준을 유지하지 못하였고 이에 따라 p53의 전사인자인 p21의 발현에 까지 영향을 미치는 것을 확인하였다. 이를 통해 p53이 유전자 독성에 대항할 때 EI24가 MDM2를 분해하는 기전이 중요하다는 것을 확인하였다.

[0243] 추가로, 상술한 실시예에서 확인한 기전과 ARF 신호전달과의 연관성을 알아보기 위해 ARF의 활성이 없는 상태에서 EI24-MDM2-p53 복합체의 생리학적 역할을 비교 분석하였고, HCT116 p53 활성 및 비활성 직장 종양세포에 EI24를 과발현시켜 콜로니 형성(Colony formation) 능력을 확인해보았다. 또한, 세포배양한 것을 기준으로 12일 뒤에 크리스탈바이올렛(Crystal violet)으로 염색하여 콜로니 수를 측정하였다.

[0245] 그 결과, 도 22 에서 나타난 것과 같이, HCT116 p53 활성 직장 종양세포에서는 EI24의 발현에 따른 콜로니 수가 줄어들었음을 확인할 수 있었다. 반면에 HCT116 p53 비활성 직장 종양세포에서는 EI24가 과발현되었음에도 불구하고 콜로니 수가 대조군과 비교했을 때 차이가 없음을 보였다. 이 같은 결과를 통해 EI24가 MDM2를 분해시키는 등 종양억제인자로서 역할을 할 때는 p53의 발현이 정상적으로 이루어져야 한다는 것을 확인하였다.

## 실시예 8

### [0247] 마우스 모델에서 EI24의 발현에 따른 종양 형성억제능 분석

[0248] 위의 시험관 내 실험 결과를 바탕으로 생체 내에서 같은 현상이 관찰되는지 확인하기 위하여, HCT116 p53 활성 및 비활성 직장 종양세포, 또는 삼중음성유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에 EI24 과발현 벡터로 형질전환한 세포를 면역결핍 마우스에 이식(Xenograft)하여 20일 동안 종양 형성 여부를 관찰하였다. 각 마우스에서 형성된 암 조직을 분리하였으며 조직 별로 EI24, ARF, MDM2, p53의 발현을 확인하였다.

[0250] 그 결과, 도 23 에서 나타난 것과 같이, 위의 시험관 내 수준의 실시예에서 확인한 결과와 동일한 양상의 결과가 나타나는 것을 확인하였으며, p53의 활성이 유효한 상태에서 EI24의 발현에 따른 종양 형성이 감소되었음을 확인하였다. 반면에 p53의 활성이 없을 때는 EI24의 종양억제인자로서 그 역할을 제대로 수행할 수 없음을 확인하였다. 또한 암 조직에서 각 유전자의 활성 여부를 확인하였을 때 EI24가 과발현된 p53 활성 및 비활성 세포가 만든 암에서 모두 MDM2의 활성이 감소되었으며 p53 활성의 경우 p53의 활성 세포가 만든 암에서만 EI24의 발현에 의한 그 활성이 증가함을 확인하였다.

[0251] 또한, 도 24에서 나타난 것과 같이 삼중음성유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포를 이식한 마우스에서도 대조군에 비해 EI24를 과발현시킨 세포주에서 종양 형성의 수준이 현저하게 감소하는 것을 확인하여, EI24가 삼중음성유방암을 대상으로 암 억제 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0253] 이와 동일한 방법으로, 유방암 마우스 모델인 PyMT 마우스에 EI24 과발현을 유도한 다음, EI24 과발현을 유도하지 않은 마우스와 유방암 형성 및 크기를 비교하였다.

[0255] 그 결과, 도 25에서 나타나는 바와 같이 EI24가 과발현된 마우스에서는 유방암 형성 수준 및 크기가 감소하는 것으로 확인하였다. 이와 함께, 폐에 대하여도 전이 여부를 확인한 결과, 도 26에서 나타난 바와 같이 EI24 과발현을 유도하지 않은 마우스에서는 종양이 폐에 전이되는 반면, EI24 과발현을 유도한 마우스에서는 폐로의 전이가 유의적인 수준으로 나타나지 않는 것을 확인하였다

## 실시예 9

### [0257] 다양한 종류의 암에서의 EI24, MDM2, p53의 발현 여부

[0258] 본 발명에서 확인한 EI24, MDM2 및 p53의 상호 관계를 보다 구체적으로 확인하기 위하여, 유방암, 육종, 백혈병 및 위암 환자의 조직 표본에서 EI24, MDM2, p53의 발현을 확인하였다.

[0259] 그 결과, 도 27에서 나타난 바와 같이 EI24 DNA copy number가 p53과는 양성적으로 HDM2와는 음성적으로 상호작용 함을 확인하였다.

## 실시예 10

### [0261] EI24 단백질에 의한 암 억제 효과에 관여하는 EI24 하위 단백질의 확인

#### [0262] <10-1> EI24에 의해 발현 수준이 변화하는 하위단백질의 확인

[0263] 상기 [실시예 8]을 통해 PyMT 마우스에서 EI24를 과발현하였을 때 유방암의 성장이 저해되는 것을 확인하였으므로, EI24에 의한 암 억제 과정에 관여하는 하위 유전자 또는 단백질을 확인하고자 하였다.

[0264] 먼저, 유방암 마우스 모델인 PyMT 마우스에 EI24 과발현을 유도하여 유방암 조직 및 EI24 과발현을 유도하지 않은 마우스의 유방암 조직을 적출한 다음, 각각의 유방암 조직으로부터 RNA를 추출하여 마이크로어레이 분석을 통해 유전자 발현 수준의 변화를 확인하였다.



[0266] 그 결과, 도 28에서 나타난 바와 같이 물질대사(metabolism), 지방세포 형성(adipogenesis), 칼슘 합성(calcium synthesis), 면역 반응(Immunology), JAK-STAT 신호경로(JAK-STAT signaling pathway)에 속한 유전자의 발현이 조절되는 것을 확인하였다.

[0268] 이 중, EI24에 의해 발현 수준이 변하는 단백질을 재확인하기 위해, MCF7 세포주에서 PyMT 유전자 및/또는 EI24를 과발현한 다음, 세포 내 발현되는 단백질의 발현 수준을 웨스턴블롯으로 확인하였다.

[0270] 그 결과, 도 29 및 도 30에서 나타난 바와 같이, EI24 과발현 세포에서 AKT 경로에 속한 단백질인 AKT, p-AKT, SRC, pTEM, 및 p-PDK1과, P38, pP38, ERK, p-ERK, GSKa/b, p-GSK b, p70 S6K 및 p-p70 S6K의 발현 수준이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

[0271] 이를 통해, EI24는 AKT와 p-AKT를 타겟으로 하여, EI24가 과발현 되었을 경우 AKT와 p-AKT가 감소하며, 따라서 EI24는 AKT 경로를 통해 종양 억제자로서의 역할을 할 수 있을 것으로 확인하였다.

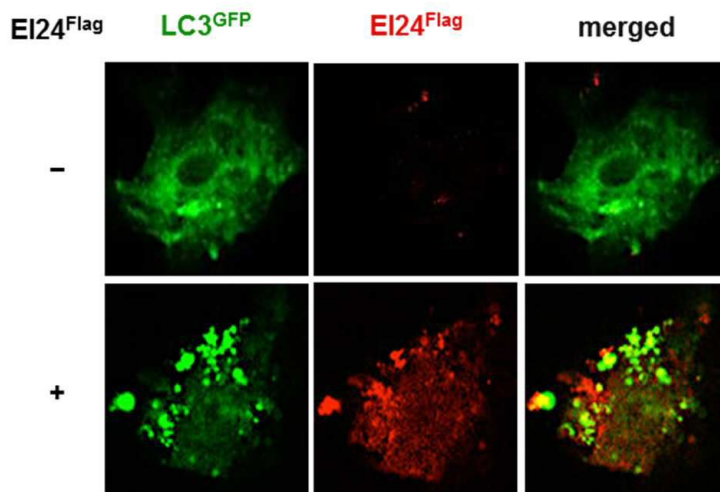
#### [0273] <10-2> EI24에 의해 활성 수준이 변화하는 하위단백질의 확인

[0274] EI24의 과발현에 의해 발현 수준이 감소하는 EI24 하위 단백질 이외에, 활성 수준이 변화하는 단백질을 확인하고자 유방암 세포에서 EI24 및 PyMT를 과발현시킨 다음, kinase array를 통해 활성 수준이 변화하는 단백질을 스크리닝 하였다.

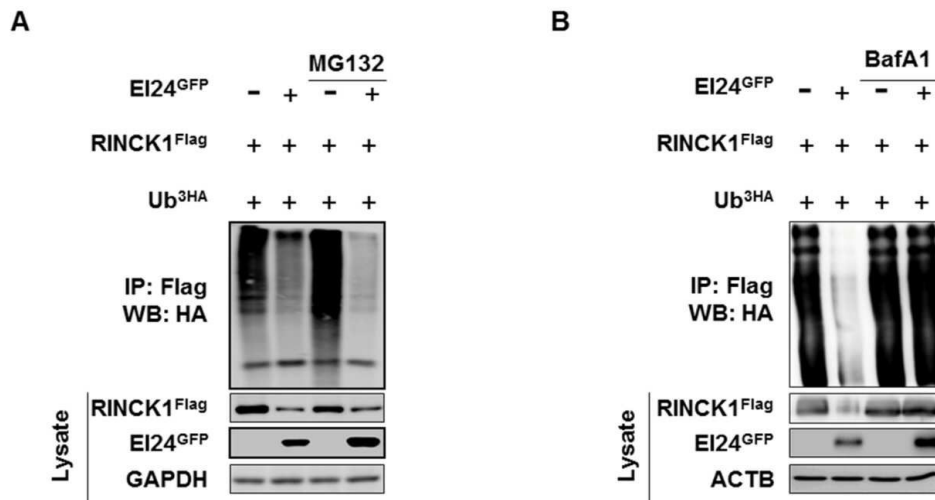
[0276] 그 결과, 도 31에서 나타난 바와 같이, PyMT만을 과발현한 암세포주와 PyMT 및 EI24를 과발현한 암세포주에서의 단백질 활성을 비교하였을 때, p38a, JNK1/2/3, GSK-3  $\alpha/\beta$ , MSK1/2, CREB, HSP27, AMPK  $\alpha$ 2, P70 S6K(T389), P70 S6K(T421/S424) 및 Chk-2 단백질이 EI24 발현에 따라 활성이 증가하는 것으로 확인하였다. 이에 비해, HSP60은 EI24 발현에 따라 활성 수준이 감소하는 것으로 확인하였다.

## 도면

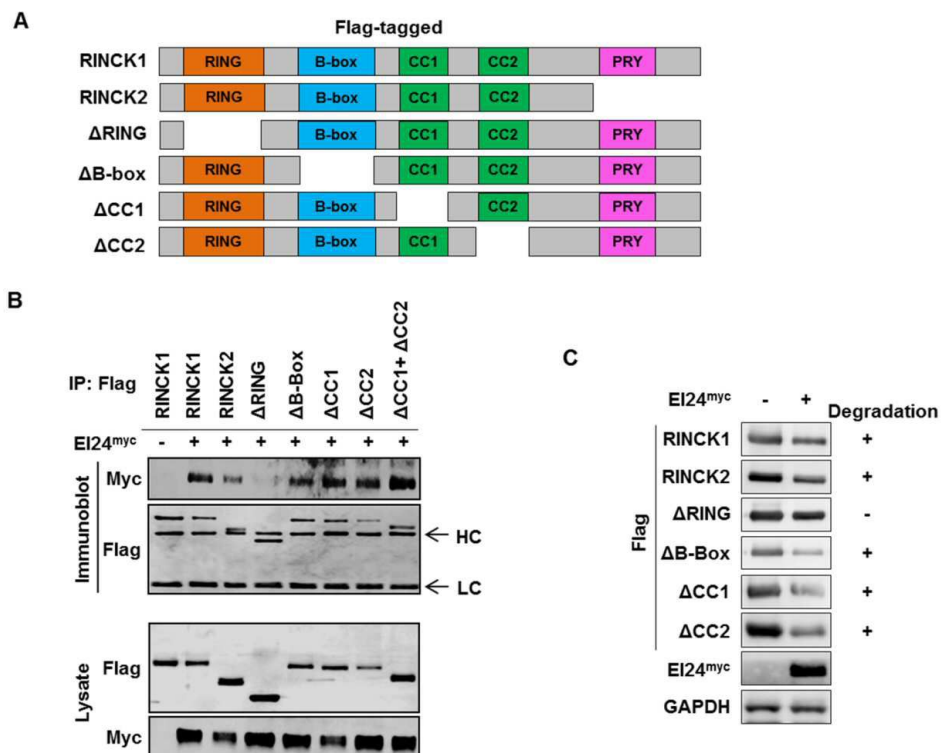
### 도면1



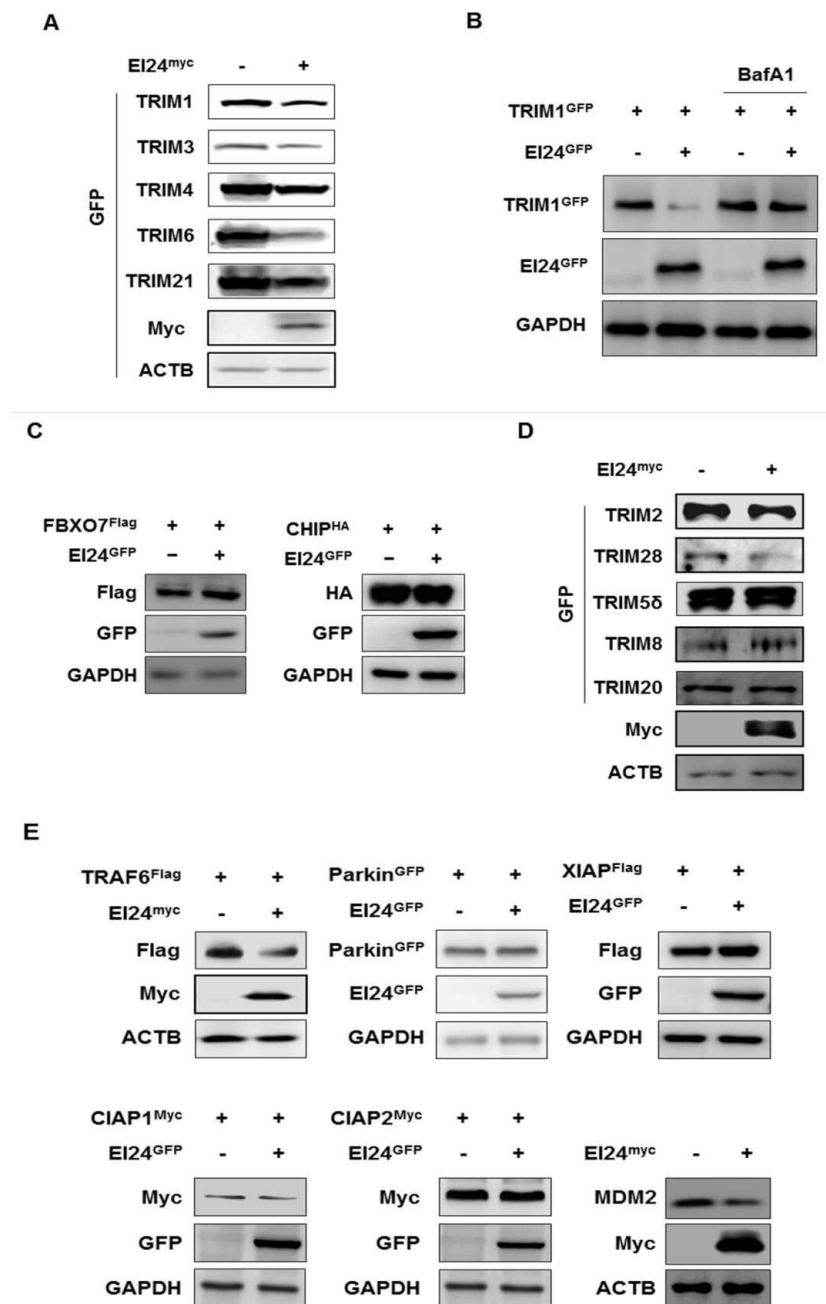
도면2



도면3

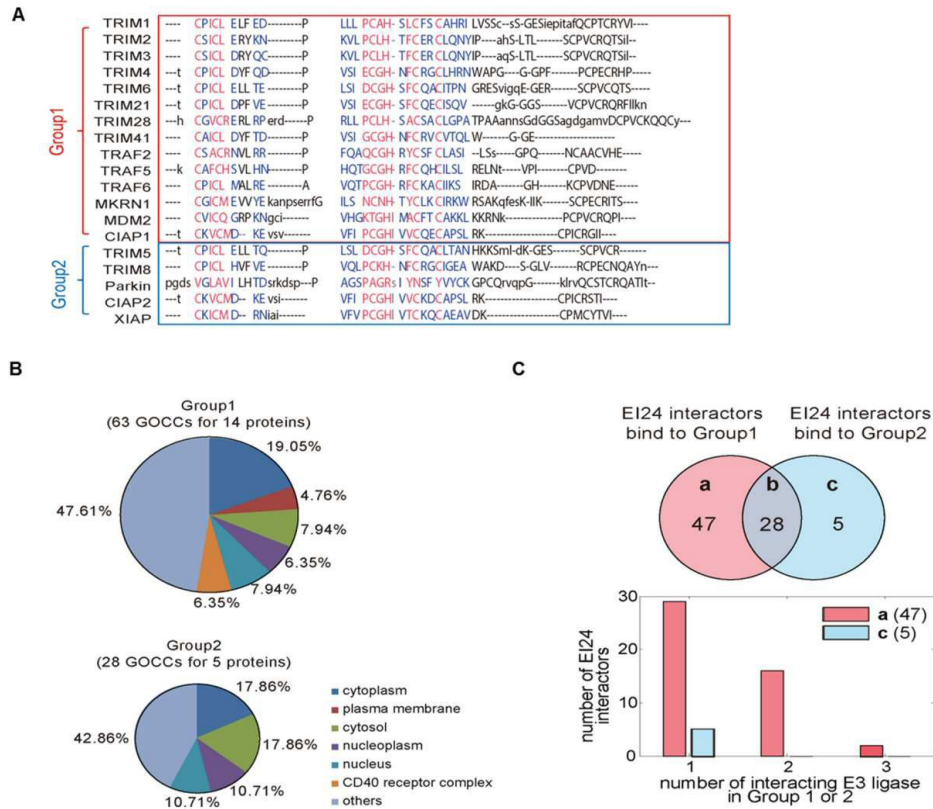


도면4

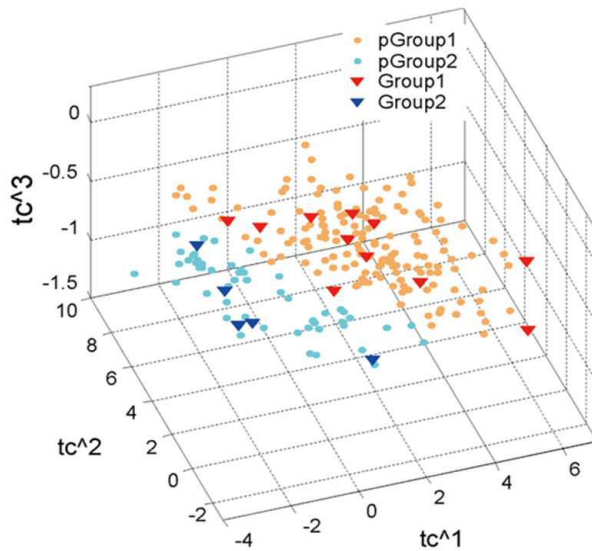




도면5

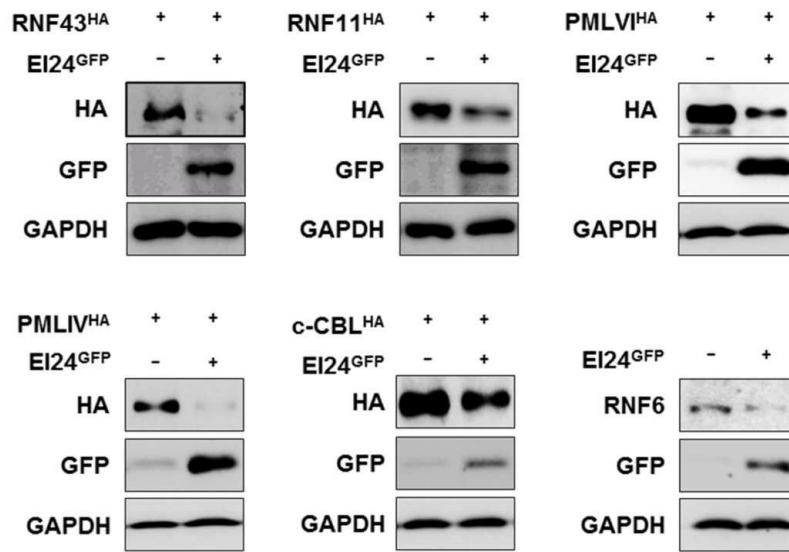


도면6

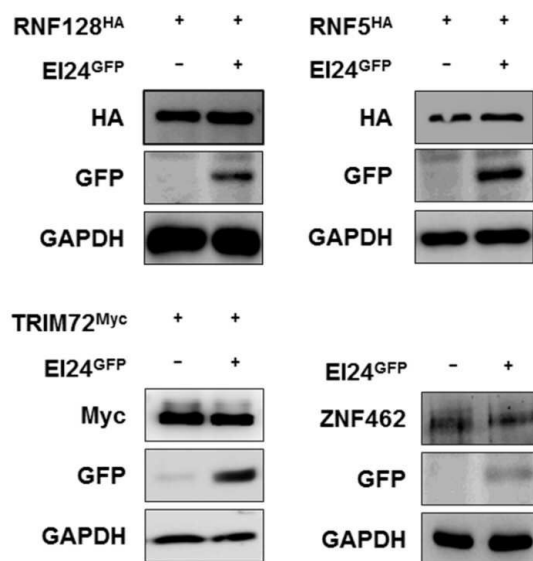


도면7

A



B

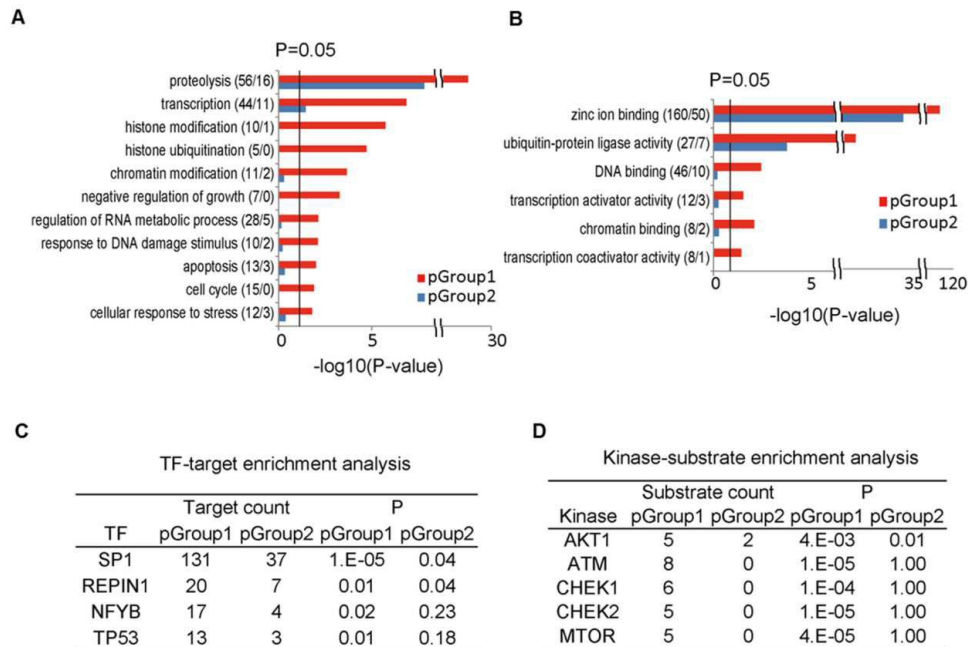


도면8

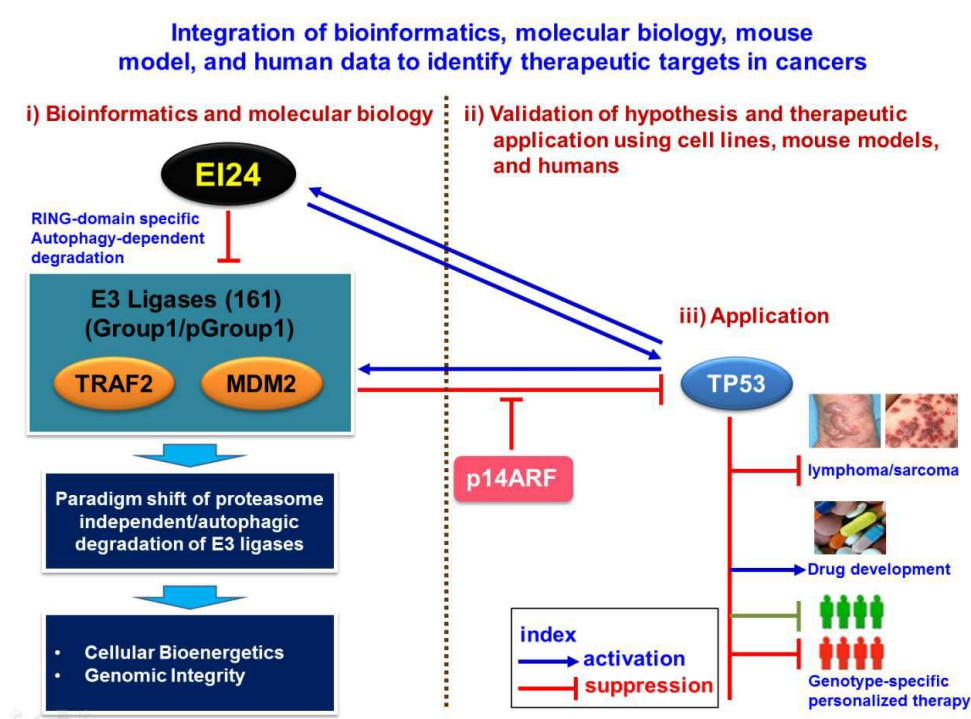
G1\_1, G2\_1 : probability>=0.95  
G1\_2, G2\_2 : probability>=0.9  
G1\_3, G2\_3 : probability>=0.85  
G1\_4, G2\_4 : probability>=0.8  
G1\_5, G2\_5 : probability>=0.75

GOCC	G1_1	G1_2	G1_3	G1_4	G1_5	G2_3	G2_4	G2_5
endosome	6	6	6	7	7	1	3	3
ubiquitin ligase complex	7	12	12	13	14	0	1	1
chromosome	7	7	9	10	11	0	2	2
nucleoplasm	12	12	13	13	14	0	2	3
vacuole	7	7	7	7	7	0	0	0
lysosome	5	5	5	5	5	0	0	0
nuclear ubiquitin ligase complex	2	3	3	3	3	0	0	0
peroxisome	2	4	4	4	5	0	0	0
chromatin	3	3	4	4	5	0	2	2
cytoskeleton	7	9	10	13	13	1	2	3
heterochromatin	2	2	2	2	3	0	2	2
perinuclear region of cytoplasm	1	3	3	4	4	2	4	4
Golgi apparatus	3	3	3	3	3	2	5	6

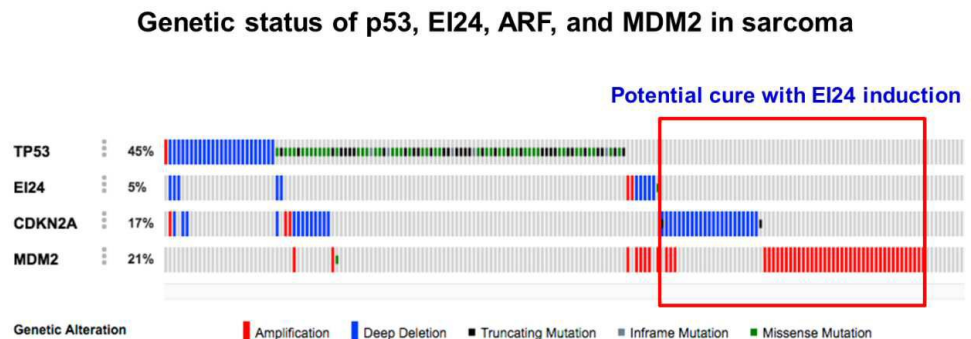
도면9



도면10



도면11



In sarcoma, most cancers patients with ARF loss or amplification of MDM2 retain wild-type E124 and p53. Thus, induction of E124 is an attractive therapeutic strategy.

Note: Red box indicates patients who can be cured by E124 induction.

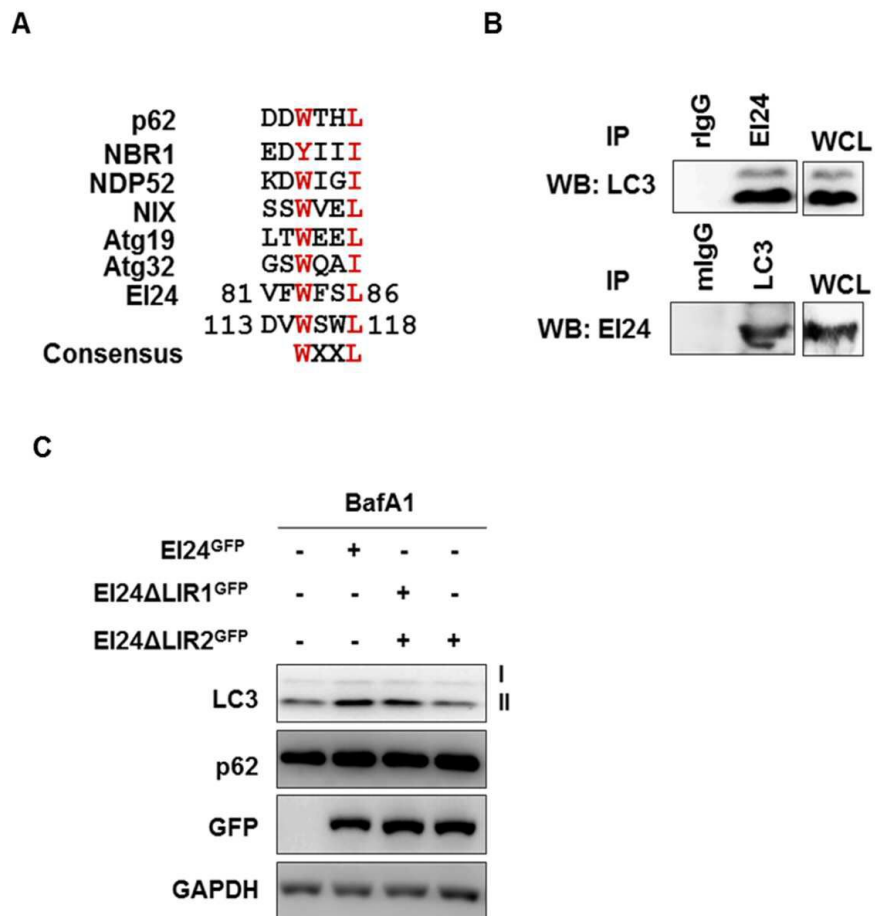
Total no. of individuals=240

No. of individuals with WT p53 and E124 but loss of ARF (23) and amplification of MDM2 (39)=23+39=62

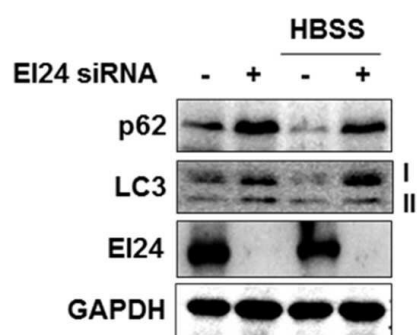
Therefore, percentage of individuals with possible cure= 62/240 (25.8%)

Ref. cBioPortal

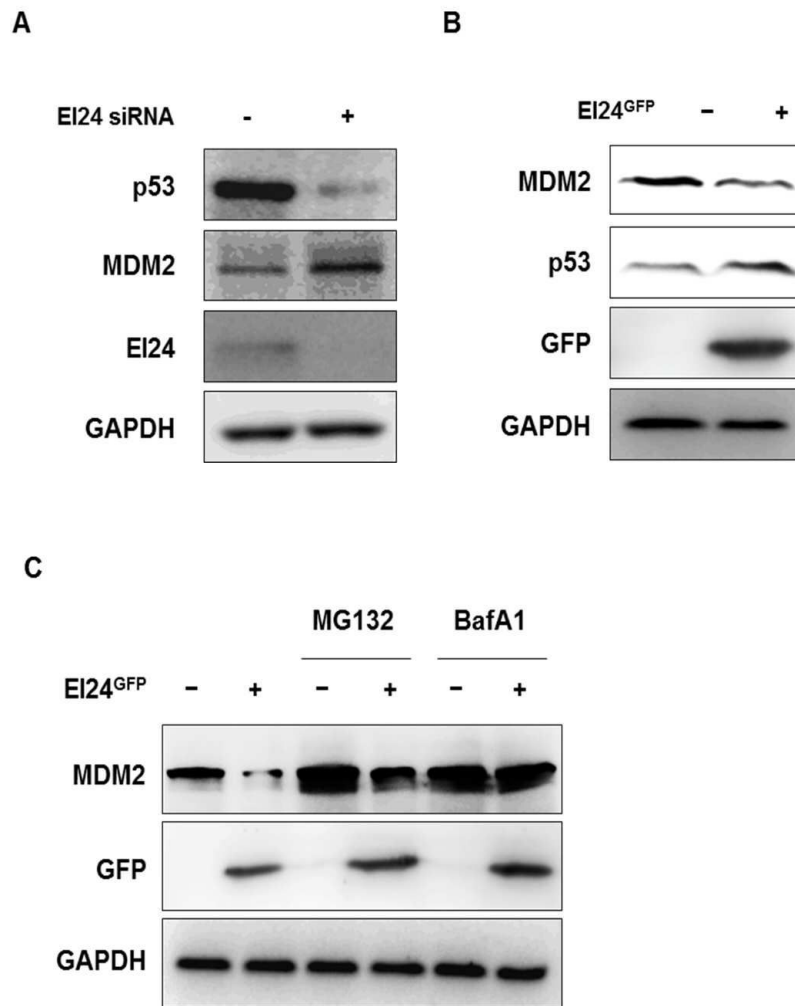
도면12



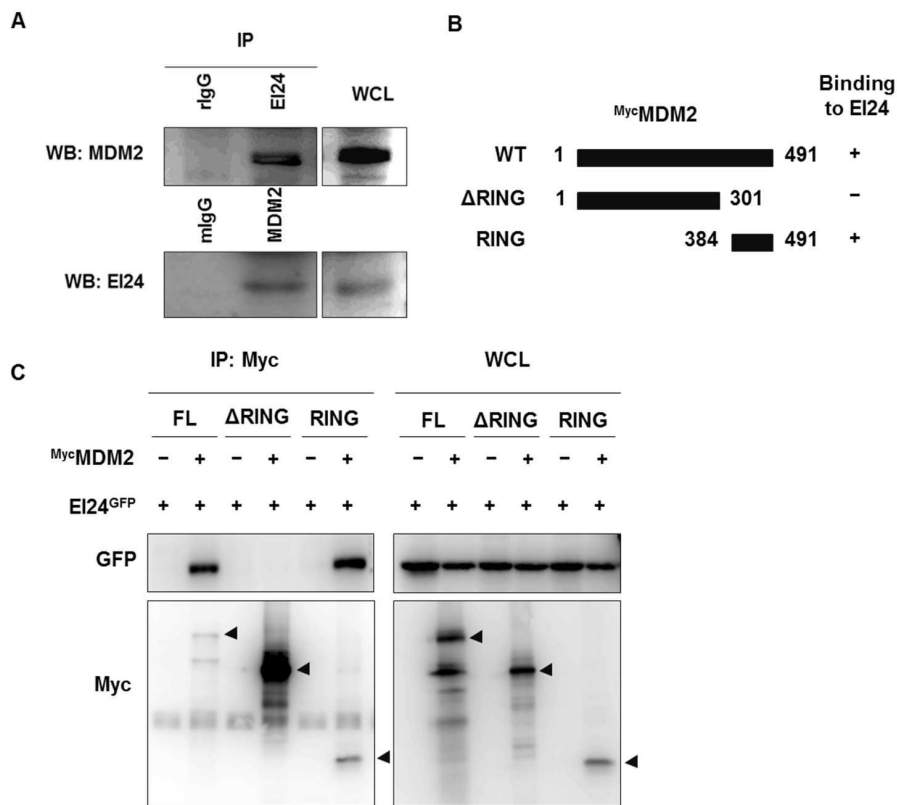
도면13



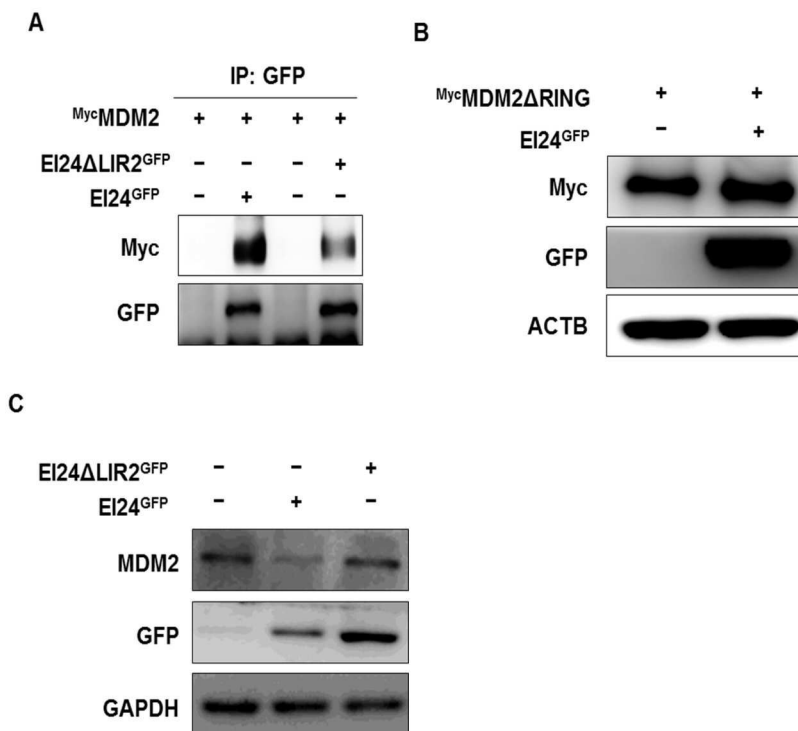
도면14



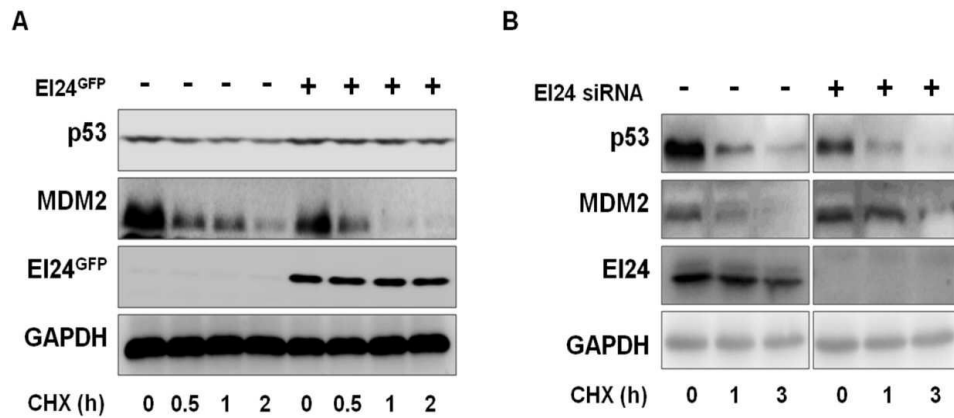
도면15



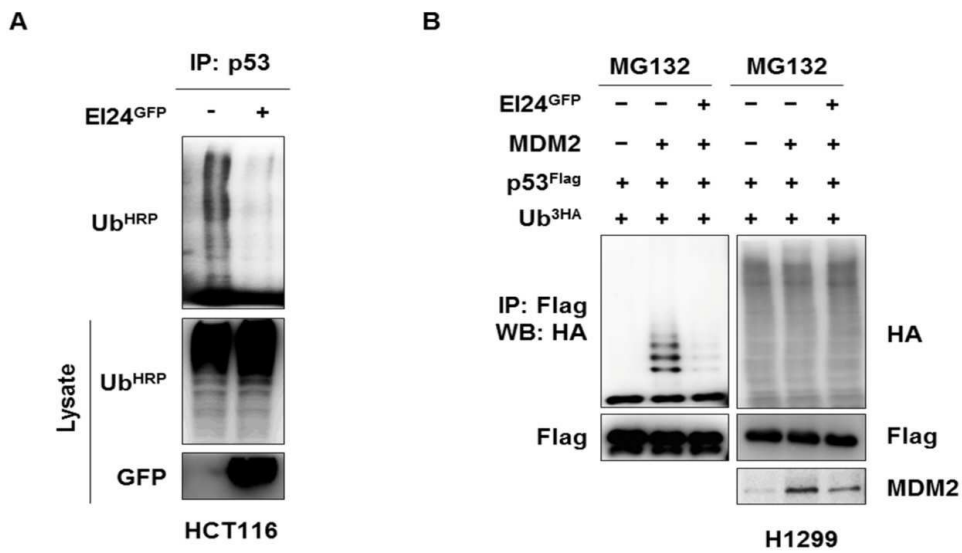
도면16



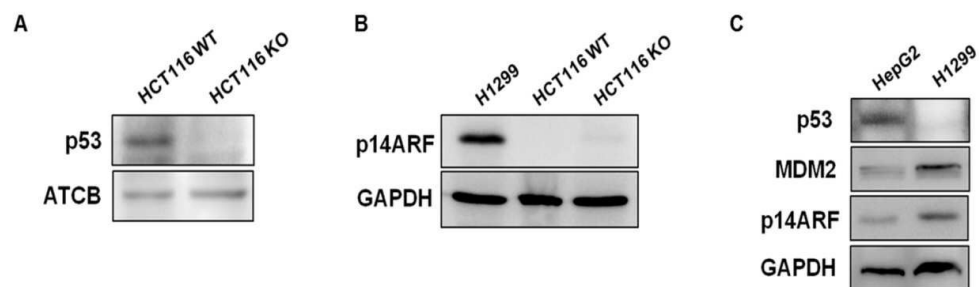
도면17



도면18

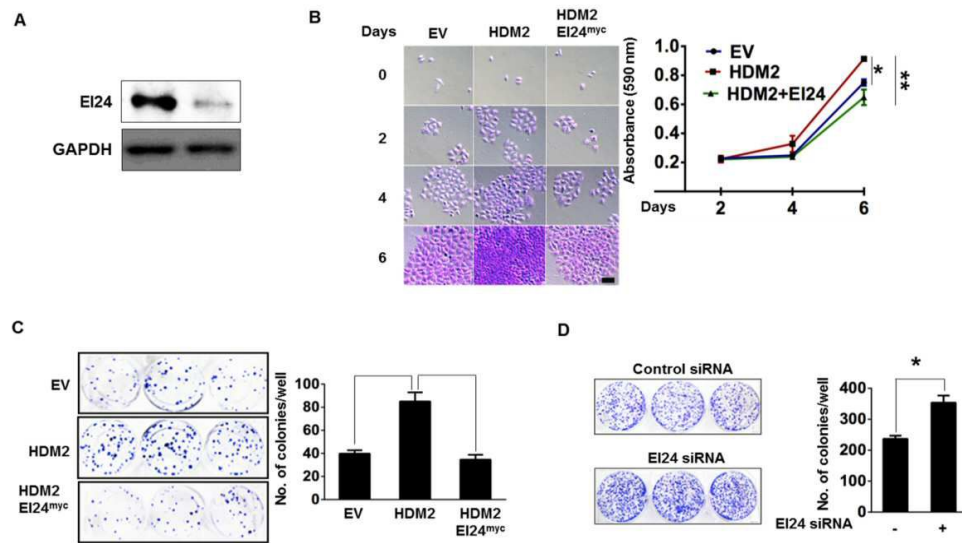


도면19

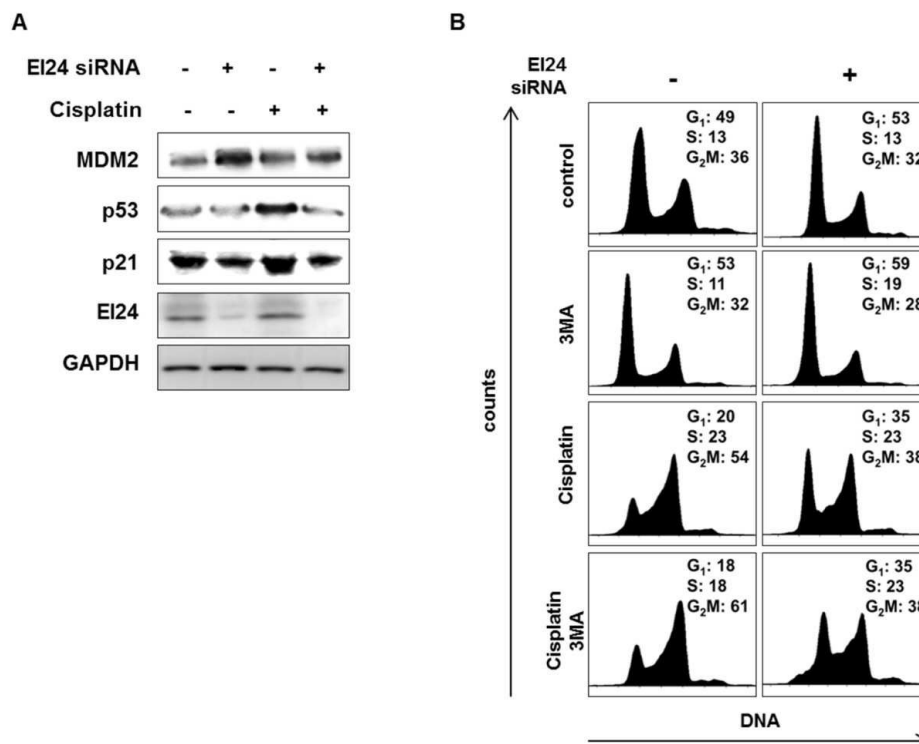




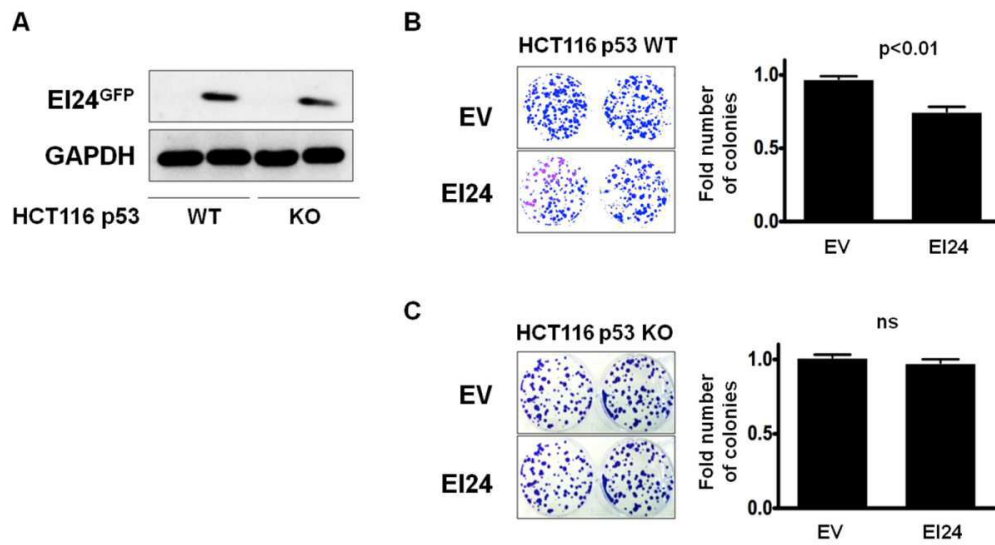
도면20



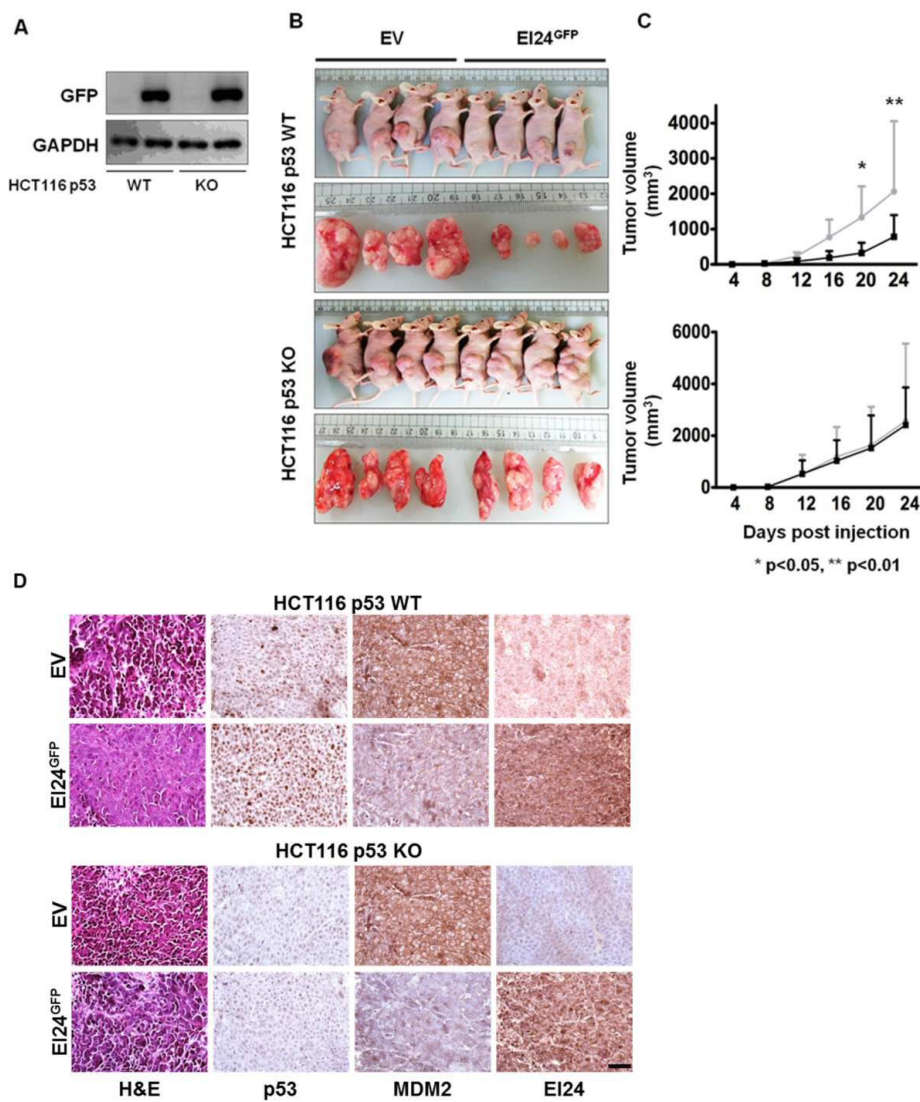
도면21



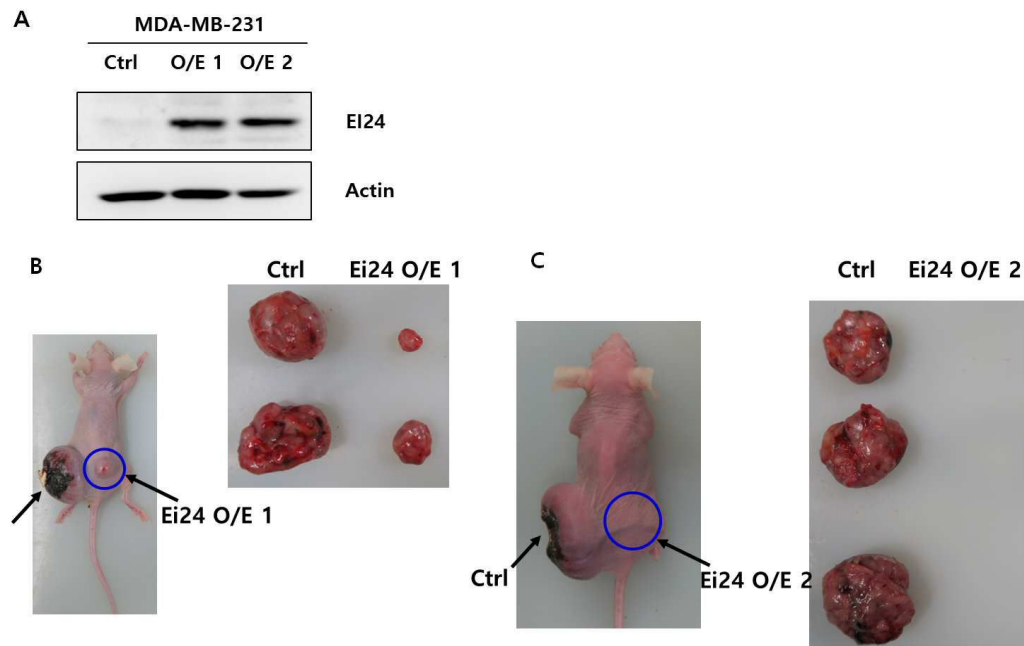
도면22



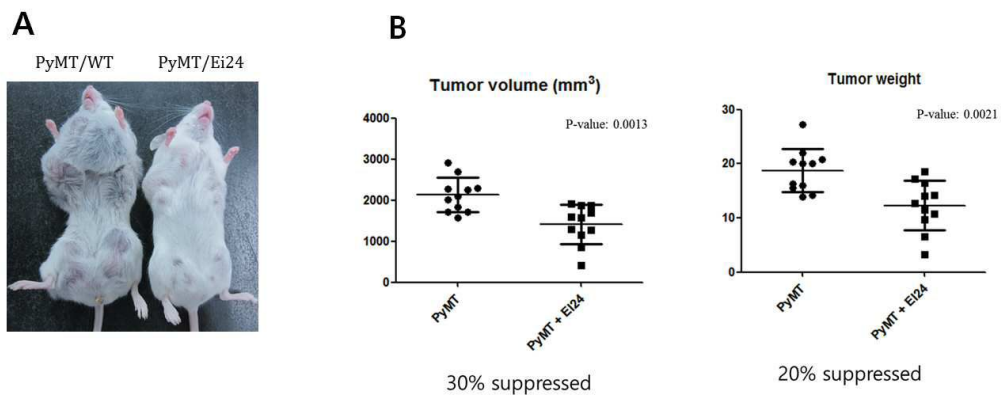
도면23



도면24

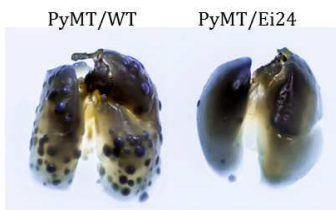


도면25

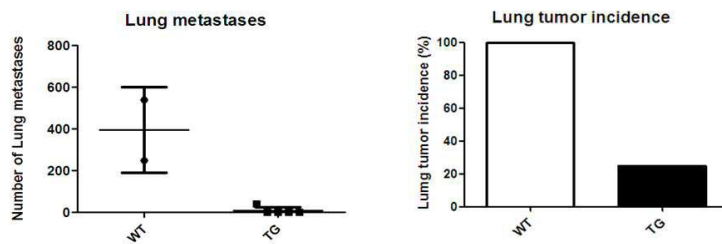


도면26

A

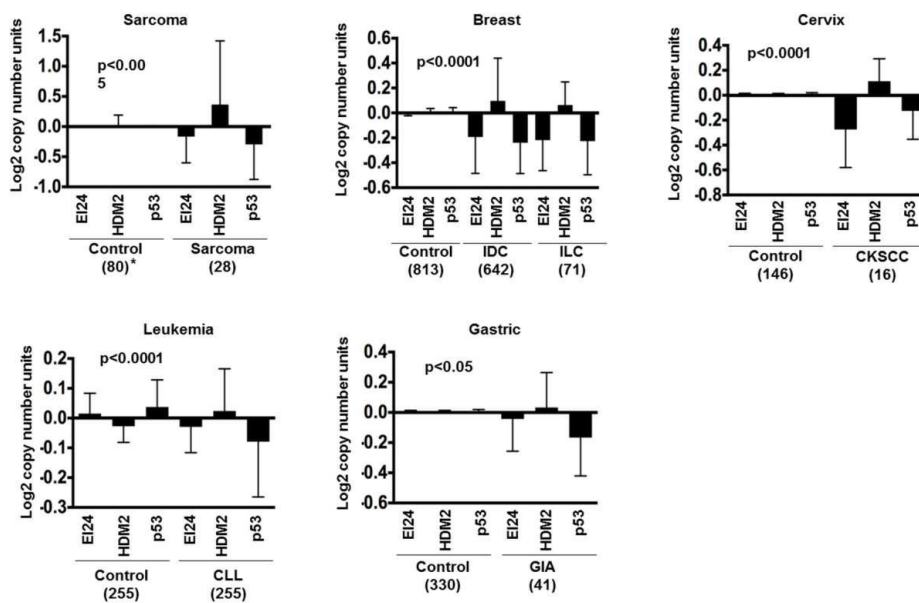


B

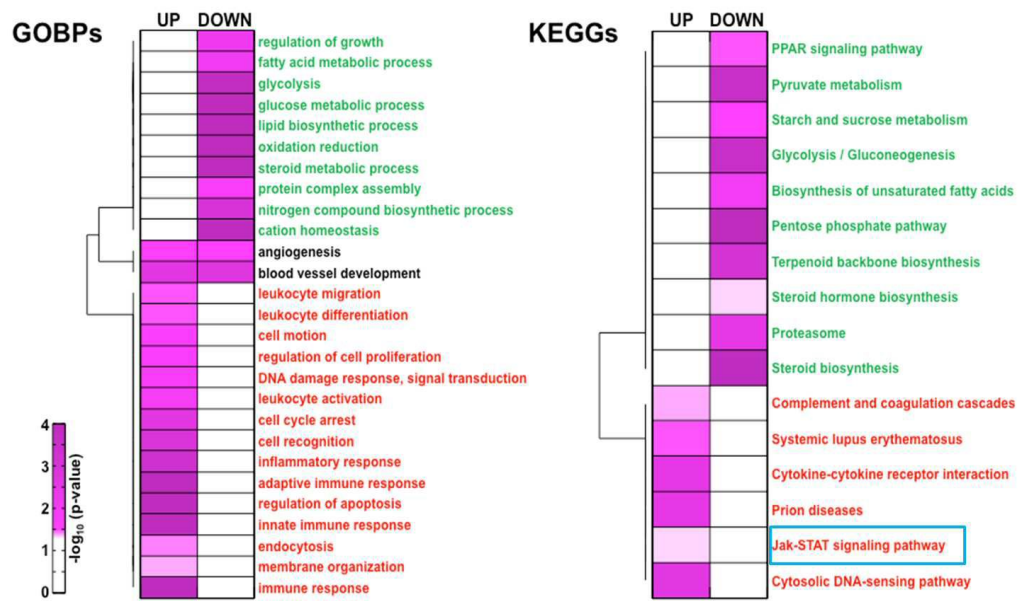


도면27

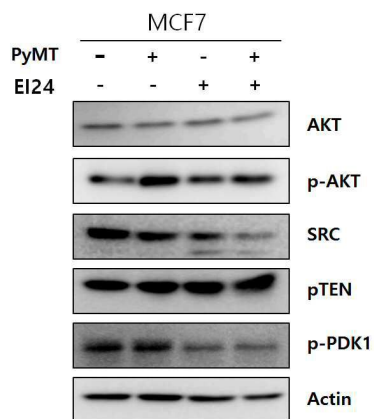
A



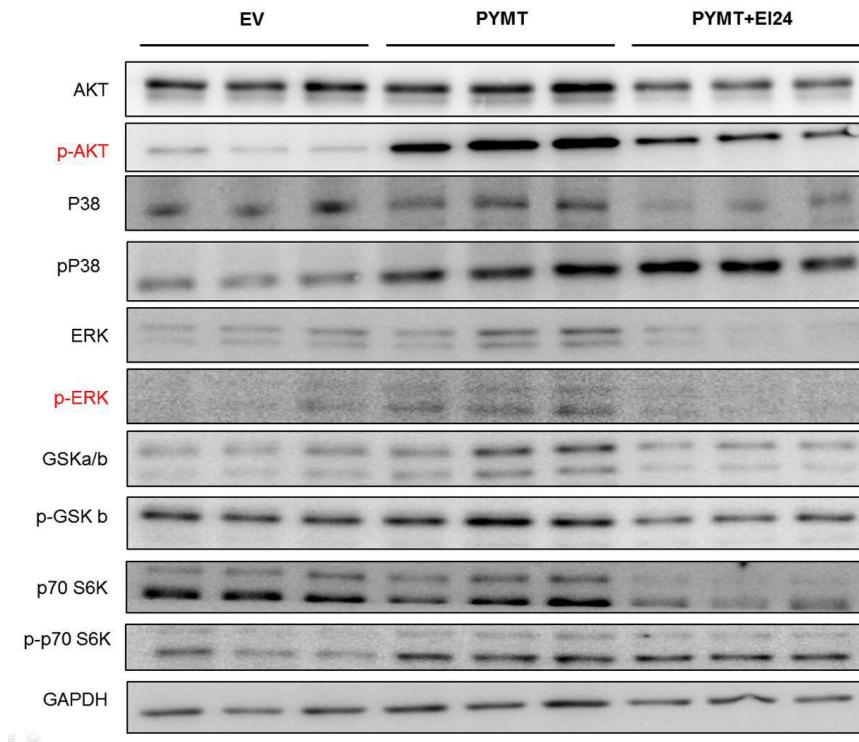
도면28



도면29

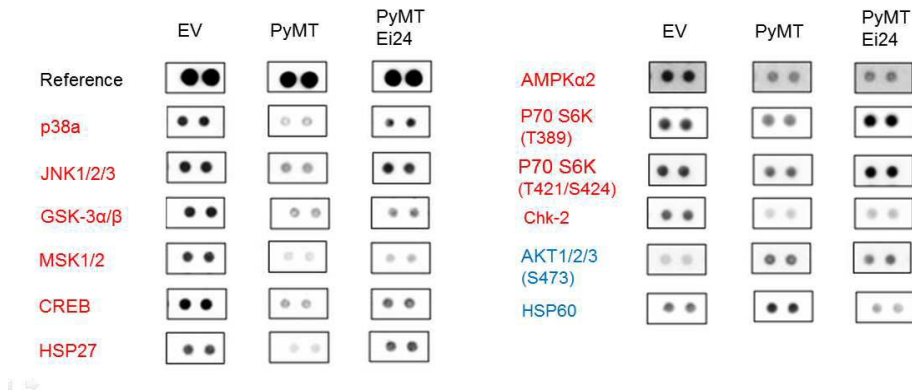


### 도면30



### 도면31

Kinase Array in MCF7 cells



### 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation. Yonsei University
- <120> Pharmaceutical composition for the prevention and treatment of cancer comprising EI24 protein or its encoding gene
- <130> 1062766
- <150> KR 10-2016-0095043
- <151> 2016-07-26
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 Met Ala Asp Ser Val Lys Thr Phe Leu Gln Asp Leu Ala Arg Gly Ile  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Ser Ile Trp Gly Ile Cys Thr Ile Ser Lys Leu Asp Ala Arg  
 20 25 30  
 Ile Gln Gln Lys Arg Glu Glu Gln Arg Arg Arg Arg Ala Ser Ser Val  
 35 40 45  
 Leu Ala Gln Arg Arg Ala Gln Ser Ile Glu Arg Lys Gln Glu Ser Glu  
 50 55 60  
 Pro Arg Ile Val Ser Arg Ile Phe Gln Cys Cys Ala Trp Asn Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Val Phe Trp Phe Ser Leu Leu Leu Phe Tyr Arg Val Phe Ile Pro Val  
 85 90 95  
 Leu Gln Ser Val Thr Ala Arg Ile Ile Gly Asp Pro Ser Leu His Gly  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Ser Trp Leu Glu Phe Phe Leu Thr Ser Ile Phe Ser Ala  
 115 120 125  
 Leu Trp Val Leu Pro Leu Phe Val Leu Ser Lys Val Val Asn Ala Ile  
 130 135 140  
 Trp Phe Gln Asp Ile Ala Asp Leu Ala Phe Glu Val Ser Gly Arg Lys  
 145 150 155 160  
 Pro His Pro Phe Pro Ser Val Ser Lys Ile Ile Ala Asp Met Leu Phe  
 165 170 175  
 Asn Leu Leu Leu Gln Ala Leu Phe Leu Ile Gln Gly Met Phe Val Ser  
 180 185 190  
 Leu Phe Pro Ile His Leu Val Gly Gln Leu Val Ser Leu Leu His Met  
 195 200 205  
 Ser Leu Leu Tyr Ser Leu Tyr Cys Phe Glu Tyr Arg Trp Phe Asn Lys

210 215 220  
Gly Ile Glu Met His Gln Arg Leu Ser Asn Ile Glu Arg Asn Trp Pro

225 230 235 240  
Tyr Tyr Phe Gly Phe Gly Leu Pro Leu Ala Phe Leu Thr Ala Met Gln

245 250 255  
Ser Ser Tyr Ile Ile Ser Gly Cys Leu Phe Ser Ile Leu Phe Pro Leu

260 265 270  
Phe Ile Ile Ser Ala Asn Glu Ala Lys Thr Pro Gly Lys Ala Tyr Leu

275 280 285  
Phe Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Val Val Phe Leu Ser Asn Arg Leu

290 295 300

Phe His Lys Thr Val Tyr Leu Gln Ser Ala Leu Ser Ser Ser Thr Ser

305 310 315 320  
Ala Glu Lys Phe Pro Ser Pro His Pro Ser Pro Ala Lys Leu Lys Ala

325 330 335

Thr Ala Gly His

340

<210> 2

<211> 2279

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ccccgcctcg tgggtgccggc tggttcttcg cgctcgcccg acttcccagc ggccccgtgc 60

ggccccgggca tgcccagtcg gggcgcagcg gccccggccc tggaagcgcc ccggcggagc 120

tggcctgcgg tgggctaggg gcagggccgg agccgcggcg gcggagctgt ggatccttca 180

tgatgagaga ttgggggaca cttctctctc ctgtgtgtag ttgatagttt ggtgggaag 240

agatggctga cagtgtcaaa acctttctcc aggaccttgc cagaggaatc aaagactcca 300

tctgggggtat ttgtaccatc tcaaagctag atgctcgaat ccagcaaaag agagaggagc 360

agcgtcgaag aagggaagt agtgtcttgg cacagagaag agcccagagt atagagcgga 420

agcaagagag tgagccacgt attgttagta gaattttcca gtgttgtgct tggaatgggtg 480

gagtgttctg gttcagtcctc ctcttgtttt atcgagtatt tattcctgtg cttcagtcgg 540



taacagcccg aattatcggg gacccatcac tacatggaga tgtttggtcg tggctggaat	600
tcttcctcac gtcaattttc agtgcctctt gggtgctccc cttgtttgtg cttagcaaag	660
tggatgaatgc catttgggtt caggatatag ctgacctggc atttgaggta tcaggaggga	720
agcctcacc attccctagt gtcagcaaaa taattgctga catgctcttc aaccttttgc	780
tgcaggctct tttcctcatt cagggaatgt ttgtgagtct ctttcccatc catcttctcg	840
gtcagctggg tagtctcctg catatgtccc ttcctactc actgtactgc ttggaatc	900
gttgggtcaa taaaggaatt gaaatgcacc agcgggtgtc taacatagaa aggaattggc	960
cttactactt tgggttttgg ttgcccttgg cttttctcac agcaatgcag tcctcatata	1020
ttatcagtgg ctgccttttc tctatcctct ttcctttatt cattatcagc gccaatgaag	1080
caaagacccc tggcaaagca tatctcttc agttgcgcct cttctccttg gtggctctct	1140
taagcaacag actcttccac aagacagtct acctgcagtc ggccctgagc agctctactt	1200
ctgcagagaa gticccttca ccgcatccgt cgcctgcca actgaaggct actgcaggtc	1260
actgagttgc ctgccatcca aaggggatgg gcgggattgg aagaagctgt ggcagctctt	1320
ttccctgttc acctcccgcc tgccaggga ggcaggacc gctctgcca gggccctctg	1380
cgatttccct tctctctgag gaattgaaat tttgtctct ggtgcacgta aggcagaatg	1440
ttccctgaca ccagtgtgtg gatttttaac atcacctga gtctgaaagg accacaggtt	1500
tttctgcagc tttttctag catttgccag tcctgtgccc tggactgatt ggaacacttt	1560
gtttttctcc ctgtgccatt tacccttcca ctttccatc ctgccttcta ccaccttgg	1620
atgaatggat ttgtaatc tagctgtgt atttgtgaa ttgttaatt ttgttgttt	1680
tctgtgaaac acataattg gatatgggag gtaaaggagt gtccagttg ctctggtca	1740
ctccctttat agccattact gtcttgtttc ttgtaactca ggtaggttt tggctctct	1800
tgctccactg caaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaagcctga agagatgaga	1860
taggaggaaa gacctcacag ccagatctgc tgggttttga ggagtgattt tctttcttc	1920
ccttgaagg gaaaaagcta ttttcattgg tacattttaa gtccccaac tatggggagg	1980
taccaattct ggacaagtgc cactacaaca aactaaacc tgaactttc aactcgttg	2040
gtggtgggag gcagcgggca gaaatttact gtggccact gccaggctta ttcatattt	2100
caaaggaata ttgggtgtg catataggaa ctgaagggt caatgtatta aactgtgat	2160
tggttgtttt ccgtcatctt tgagagacta aatgtgggg gcagatgtca aaatactgt	2220
acaattttaa aatgtcaca ttaacatga gctggtttcc caaaaaaaaa aaaaaaaaa	2279