



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0113516  
(43) 공개일자 2016년09월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/68 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)  
A23L 1/30 (2006.01) A61K 31/436 (2006.01)  
A61K 31/4375 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12Q 1/6883 (2013.01)  
A01K 67/0275 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0011747  
(22) 출원일자 2016년01월29일  
심사청구일자 없음
- (30) 우선권주장  
1020150038668 2015년03월20일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
한국과학기술원  
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자  
이정호  
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)  
임재석  
대전광역시 유성구 상대로 16 (상대동)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
유미특허법인

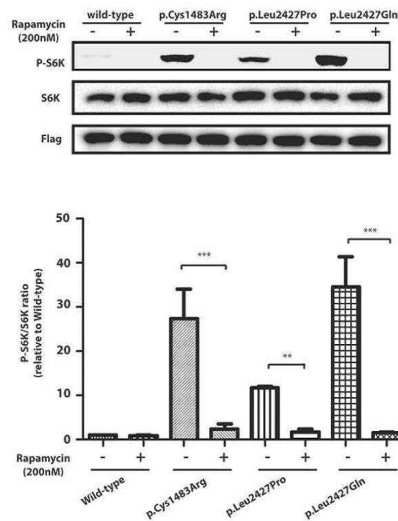
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 난치성 뇌전증 진단 및 치료용 조성물

### (57) 요약

본 발명은 난치성 뇌전증 진단을 위한 바이오마커 패널, 및 이를 이용한 난치성 뇌전증의 진단 기술에 관한 것이다. 보다 상세하게, 본 발명은 난치성 뇌전증 진단을 위한 바이오마커 패널 유전자 또는 단백질, 이를 검출하기 위한 진단 키트, 및 이를 이용한 진단 방법에 관한 것과 난치성 뇌전증의 예방, 개선 또는 치료 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

**A23L 1/30** (2013.01)  
**A61K 31/436** (2013.01)  
**A61K 31/4375** (2013.01)  
**G01N 33/68** (2013.01)  
**A01K 2267/0312** (2013.01)  
**A23V 2002/00** (2013.01)  
**A23V 2200/322** (2013.01)  
**C12Q 2600/112** (2013.01)  
**G01N 2800/2857** (2013.01)

**김우일**

대전광역시 유성구 궁동

**김세훈**

서울특별시 서대문구 연세로 1 (창천동)

(72) 발명자

**김동석**

서울특별시 서대문구 통일로34길 43 (홍제동, 홍제  
 원현대아파트)

**강훈철**

서울특별시 서초구 잠원동 52~67

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0208

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

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

기 여 율 1/3

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2012.12.01 ~ 2015.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M3C7A1056564

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발

발굴 및 조기 진단 유전자 패널 개발  
 연구과제명 차세대 염기서열 분석법을 응용한 mTOR 신호 전달계 관련 대뇌피질 발달 장애 제어 인자

기 여 율 1/3

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2013.08.01 ~ 2016.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KAIST123

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국과학기술원

연구사업명 미래창조과학부 KAIST 미래형시스템헬스케어연구개발사업

연구과제명 뇌질환 환자 맞춤형 유전체 분석 및 유전자 도입 시스템 개발

기 여 율 1/3

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2014.01.01 ~ 2015.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 염기서열에 있어서, 616번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 1871번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 4348번 위치의 티민(T)이 구아닌(G)으로 치환, 4447번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환, 5126번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 5930번 위치의 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환, 6577번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 6644번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 7280번 위치의 티민(T)이 아데닌(A)으로 치환, 및 7280번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환,

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

서열번호 5의 염기서열에 있어서, 4639번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환,

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

서열번호 9의 염기서열에 있어서, 3052번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환을 검출할 수 있는 제제를 포함하는,

난치성 뇌전증의 진단 키트.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치환을 검출할 수 있는 제제는 상기 각 치환 부위에 특이적인 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산인, 진단 키트.

#### 청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열에 있어서, 206번 알지닌(R)이 시스테인(C)로 치환, 624번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1450번 티로신(Y)이 아스파르트 산(D)으로 치환, 1483번 위치의 시스테인(C)이 알지닌(R)으로 치환, 1709번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1977번 트레오닌(T)이 리신(K)으로 치환, 2193번 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 2215번 세린(S)이 페닐알라닌(F)으로 치환, 2427번 위치의 루신(L)이 프롤린(P)으로 치환, 및 2427번 위치의 루신(L)이 글루타민(Q)으로 치환,

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

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

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

서열번호 10의 아미노산 서열에 있어서, 1018번째 아스파르트산(D)이 아스파라긴(N)으로 치환을 검출할 수 있는 제제를 포함하는,

난치성 뇌전증의 진단 키트.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 치환을 검출할 수 있는 제제는 상기 각 치환 부위에 특이적인 항체 또는 압타머인, 진단 키트.

## 청구항 5

- (a) 개체의 시료를 제1항의 진단 키트에 처리하는 단계,
- (b) 서열번호 1의 염기서열에 있어서, 616번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 1871번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 4348번 위치의 티민(T)이 구아닌(G)으로 치환, 4447번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환, 5126번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 5930번 위치의 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환, 6577번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 6644번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 7280번 위치의 티민(T)이 아데닌(A)으로 치환, 및 7280번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환,
- 서열번호 3의 염기서열에 있어서, 64번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 610번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 및 2432번째 구아닌(G)이 티민(T)으로 치환,
- 서열번호 5의 염기서열에 있어서, 4639번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환,
- 서열번호 7의 염기서열에 있어서, 740번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 및
- 서열번호 9의 염기서열에 있어서, 3052번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환을 포함하는 바이오마커 패널을 개체의 시료에서 검출하는 단계, 및
- (c) 상기 하나 이상의 치환을 포함하는 바이오마커 패널이 검출되는 경우 난치성 뇌전증으로 결정하는 단계를 포함하는,
- 난치성 뇌전증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

## 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 시료는 개체의 뇌 조직 시료인 방법.

## 청구항 7

- (a) 개체의 시료를 제3항의 진단 키트에 처리하는 단계
- (b) mTOR 서열번호 2의 아미노산 서열에 있어서, 206번 알지닌(R)이 시스테인(C)로 치환, 624번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1450번 티로신(Y)이 아스파르트 산(D)으로 치환, 1483번 위치의 시스테인(C)이 알지닌(R)으로 치환, 1709번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1977번 트레오닌(T)이 리신(K)으로 치환, 2193번 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 2215번 세린(S)이 페닐알라닌(F)으로 치환, 2427번 위치의 루신(L)이 프롤린(P)으로 치환, 및 2427번 위치의 루신(L)이 글루타민(Q)으로 치환,
- TSC1 서열번호 4의 아미노산 서열에 있어서, 22번째 알지닌(R)이 트립토판(W)으로 치환, 204번째 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 및 811번째 알지닌(R)이 루신(L)으로 치환,
- 서열번호 6의 아미노산 서열에 있어서, 1547번째 발린(V)이 이소류신(I)으로 치환,
- 서열번호 8의 아미노산 서열에 있어서, 247번째 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 및
- 서열번호 10의 아미노산 서열에 있어서, 1018번째 아스파르트산(D)이 아스파라긴(N)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환을 포함하는 바이오마커 패널을 개체의 시료에서 검출하는 단계, 및
- (c) 상기 하나 이상의 치환을 포함하는 바이오마커 패널이 검출되는 경우 난치성 뇌전증으로 결정하는 단계를 포함하는,
- 난치성 뇌전증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

## 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 시료는 개체의 뇌 조직 시료인 방법.

#### 청구항 9

서열번호 2의 아미노산 서열에 있어서, 616번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환,

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

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

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

서열번호 10의 아미노산 서열에 있어서, 1018번째 아스파르트산(D)이 아스파라긴(N)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환을 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질.

#### 청구항 10

서열번호 1의 염기서열에 있어서, 616번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환,

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

서열번호 5의 염기서열에 있어서, 4639번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환,

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

서열번호 9의 염기서열에 있어서, 3052번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환을 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자.

#### 청구항 11

제9항의 단백질 또는 제10항의 유전자를 포함하는, 난치성 뇌전증 진단을 위한 바이오마커 패널.

#### 청구항 12

제9항의 단백질 또는 제10항의 유전자를 포함하는, 난치성 뇌전증의 유도용 조성물.

#### 청구항 13

제9항의 단백질 또는 제10항의 유전자가 도입된, 난치성 뇌전증이 유도된 동물.

#### 청구항 14

제9항의 단백질 또는 제10항의 유전자를 생체 외에서 세포에 도입시키는 단계를 포함하는, 난치성 뇌전증을 유도하는 방법.

#### 청구항 15

mTOR 저해제를 유효성분으로 포함하는 뇌 체성 유전 변이에 의한 난치성 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

# 청구항 16

제15항에 있어서, 라파마이신(Rapamycin) 또는 이의 염, 에베로리무스(Everolimus) 또는 이의 염, 화학식 1의 화합물 또는 이의 염, 화학식 2의 화합물 또는 이의 염, 화학식 3의 화합물 또는 이의 염, 및 화학식 4의 화합물 또는 이의 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는, 뇌 체성 유전 변이에 의한 난치성 뇌전증의 예방 또는 치료용 약학 조성물:

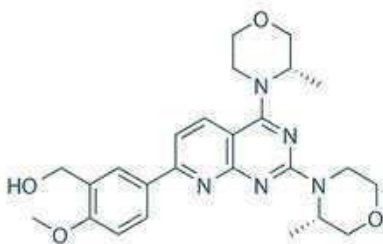
[화학식 1]



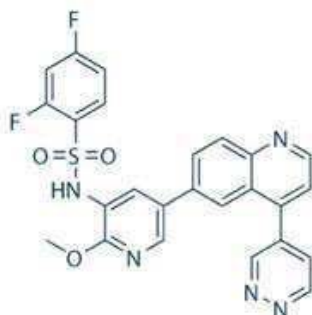
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



#### 청구항 17

제15항에 있어서, 상기 난치성 뇌전증은 국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD), 편측 거대뇌증(hemimegalencephaly, HME) 및 결절성 경화증(Tuberous sclerosis complex, TSC)과 같은 대뇌피질 발달기형(Malformations of Cortical Developments, MCD), 해마경화증(hippocampal sclerosis, HS), 또는 스테이지웨버신드롬(Sturge weber syndrome, SWS)에 의해 발생하는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 난치성 뇌전증은 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 뇌 체성 유전 변이에 의한 난치성 뇌전증인 약학 조성물.

#### 청구항 19

제17항에 있어서, 상기 난치성 뇌전증은 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증인 약학 조성물.

#### 청구항 20

제18항에 있어서, 상기 뇌 체성 유전 변이는,

서열번호 2의 아미노산 서열에 있어서, 624번 알라닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1450번 티로신(Y)이 아스파르트산(D)으로 치환, 1483번 위치의 시스테인(C)이 알라닌(R)으로 치환, 1709번 알라닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1977번 트레오닌(T)이 리신(K)으로 치환, 2193번 알라닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 2215번 세린(S)이 페닐알라닌(F)으로 치환, 2427번 위치의 루신(L)이 프롤린(P)으로 치환, 및 2427번 위치의 루신(L)이 글루타민(Q)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는, 약학 조성물.

#### 청구항 21

제18항에 있어서, 상기 뇌 체성 유전 변이는,

서열번호 1의 염기서열에 있어서, 1871번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 4348번 위치의 티민(T)이 구아닌(G)으로 치환, 4447번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환, 5126번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 5930번 위치의 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환, 6577번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 6644번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 7280번 위치의 티민(T)이 아데닌(A)으로 치환, 및 7280번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는, 약학 조성물.

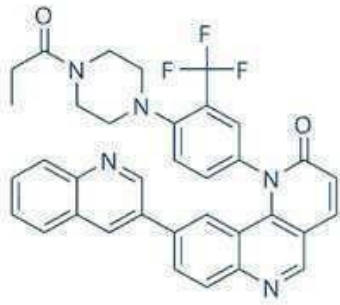
#### 청구항 22

제18항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가로 포함하는, 약학 조성물.

#### 청구항 23

라파마이신 또는 이의 염, 에베로리무스 또는 이의 염, 화학식 1의 화합물 또는 이의 염, 화학식 2의 화합물 또는 이의 염, 화학식 3의 화합물 또는 이의 염, 및 화학식 4의 화합물 또는 이의 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는, 뇌 체성 유전 변이에 의한 난치성 뇌전증의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

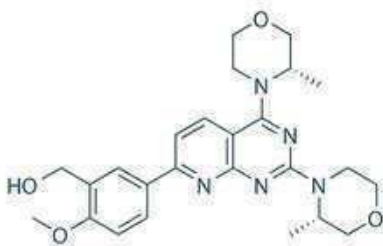
[화학식 1]



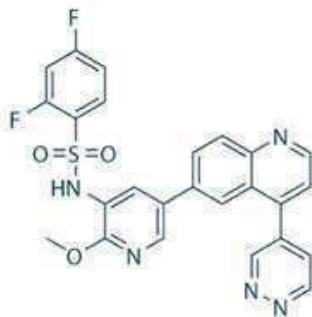
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



#### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 뇌 체성 유전 변이는,

서열번호 2의 아미노산 서열에 있어서, 624번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1450번 티로신(Y)이 아스파르트산(D)으로 치환, 1483번 위치의 시스테인(C)이 알지닌(R)으로 치환, 1709번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1977번 트레오닌(T)이 리신(K)으로 치환, 2193번 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 2215번 세린(S)이 페닐알



라닌(F)으로 치환, 2427번 위치의 루신(L)이 프롤린(P)으로 치환, 및 2427번 위치의 루신(L)이 글루타민(Q)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는, 식품 조성물.

## 청구항 25

제23항에 있어서, 상기 뇌 체성 유전 변이는,

서열번호 1의 염기서열에 있어서, 1871번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 4348번 위치의 티민(T)이 구아닌(G)으로 치환, 4447번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환, 5126번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 5930번 위치의 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환, 6577번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 6644번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 7280번 위치의 티민(T)이 아데닌(A)으로 치환, 및 7280번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는, 식품 조성물.

## 청구항 26

제23항에 있어서, 식품학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가로 포함하는, 식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 난치성 뇌전증, 특히 소아 난치성 뇌전증의 진단을 위한 바이오마커 패널 및 이를 이용한 난치성 뇌전증의 진단 기술, 그리고 난치성 뇌전증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 난치성 뇌전증 진단을 위한 바이오마커 패널 유전자 또는 단백질, 이를 검출하기 위한 진단 키트, 및 이를 이용한 진단 방법과, 난치성 뇌전증의 예방, 개선 또는 치료 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

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

[0003] 뇌전증은 가장 흔한 신경계 질환으로, 전 세계 인구의 약 0.5%~1%가 뇌전증을 앓고 있다. 또한, 전 세계적으로는 매년 10만명당 45명 정도의 새로운 환자가 발생하고 있고, 우리나라의 경우 약 30~40만명의 뇌전증 환자가 있는 것으로 추정되며 매년 2만명 정도의 새로운 뇌전증 환자가 발생한다고 보고되고 있다. 또한, 전체 뇌전증의 70%가 소아 청소년 연령에서 시작되고, 특히 유아기에 발병률이 높은 것으로 알려져 있다. 발병률과 유병률은 생후 1년 이내에 가장 높았다가 급격히 낮아지고, 60세 이상의 노년층에서 다시 급격히 증가하는 U자 형태를 보이며, 일생 동안 발작을 경험하는 유병률은 10~15%에 이른다.

[0004] 뇌전증 중에서 현재까지 개발된 항뇌전증 약물에 반응하지 않는 뇌전증을 난치성 뇌전증(intractable epilepsy)이라고 하며, 전체 뇌전증의 약 20%를 차지하고 있다. 난치성 뇌전증의 원인질환으로는, 국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD), 편측 거대뇌증(hemimegalencephaly, HME) 및 결절성 경화증(Tuberous sclerosis complex, TSC)과 같은 대뇌피질 발달기형(Malformations of Cortical Developments, MCD), 해마경화증(hippocampal sclerosis, HS), 또는 스테지웨버신드롬(Sturge weber syndrome, SWS) 등이 알려져 있다.

[0005] 난치성 뇌전증은 현재 존재하는 항뇌전증 약물에 반응 하지 않아, 뇌전증 조절을 위하여 뇌 병변을 절제하는 뇌신경외과적 처리(neurosurgical treatment)를 필요로 하므로, 난치성 뇌전증을 유발하는 대뇌피질 발달기형 또는 해마경화증에 특이적인 분자생물학적 진단 기술의 개발이 시급한 실정이다.

[0006] 한편, PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로의 비정상적인 활성화는 여러 발달 신경 장애에서 잘 알려져 있다. 인슐린 또는 성장 호르몬과 같은 외부 자극에 의해 수용체 티로신 키나아제(receptor tyrosine kinase, RTK)가 활성화되면, 이는 포스포이노시티드(phospho-inositides)를 인산화 시킬 수 있는 PI3K(phosphoinositide 3-kinase) 복합체를 활성화시킨다. 인산화된 포스포이노시티드는 AKT3(v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3)와 같은 프로틴 키나아제 B(protein kinase B)가 PDK1(pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1)에 의해 활성화

되는 장소인 세포막으로의 이동을 촉진한다. 활성화된 AKT3는 TSC1/TSC2 (Tuberous sclerosis proteins 1 and 2)와 Rheb(Ras homolog enriched in brain)-GTPase를 통해 mTOR 신호전달경로의 활성화를 유발한다. mTOR 활성화는 4E-BP(4E binding protein 1)나 S6K1(ribosomal protein S6 kinase 1) 등을 통해 세포 내 단백질 합성(translation), 대사(metabolism) 뿐만 아니라 세포의 분화와 이동과 같은 많은 과정에 영향을 미친다.

[0007] 그러나, PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자들이 전반적인 난치성 뇌전증의 진단과의 어떠한 관련성이 있는지 구체적으로 알려진 바 없다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국내특허공개 2007-0116555 (2007.12.10 공개)  
(특허문헌 0002) 미국특허공개 2010-0088778 (2010.04.08 공개)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 이에, 본 발명자들은 국소 피질 이형성증(FCD), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테지웨버신드롬(SWS)으로 인한 난치성 뇌전증 수술 환자의 뇌 조직 시료를 분석한 결과, PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자들의 뇌 체성 변이가 특이적으로 존재한다는 것을 확인하였고, 이들 변이들이 난치성 뇌전증을 진단하기 위한 바이오마커 패널로 활용될 수 있음을 확인하였다. 나아가, 본 발명자들은 상기 변이체를 세포에 도입할 경우 mTOR이 과활성화되므로 난치성 뇌전증이 유발될 수 있음을 확인하여 국소 피질 이형성증(FCD), 결절성 경화증, 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테지웨버 신드롬(SWS)으로 인한 난치성 뇌전증의 예방, 개선 또는 치료와, 이들 난치성 뇌전증의 원인 질환인 국소 피질 이형성증(FCD), 결절성 경화증(TSC), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테지웨버신드롬(SWS)의 예방, 개선 또는 치료 용도를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명은 난치성 뇌전증 또는 이의 원인 질병의 진단을 위한 바이오마커 패널, 및 이를 이용한 난치성 뇌전증의 진단 기술을 제공한다. 구체적으로, 상기 난치성 뇌전증의 원인질환은 국소 피질 이형성증(바람직하게는 FCD type II), 편측 거대뇌증(hemimegalencephaly, HME) 및 결절성 경화증(Tuberous sclerosis complex, TSC)과 같은 대뇌피질 발달기형(Malformations of Cortical Developments, MCD), 해마경화증(hippocampal sclerosis, HS), 또는 스테지웨버신드롬(Sturge weber syndrome, SWS)을 포함한다.

[0011] 보다 상세하게는, 본 발명의 하나의 목적은 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질에 존재하는 변이를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 난치성 뇌전증의 진단 키트에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 진단 키트를 이용하여 개체의 시료로부터 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 변이를 검출하는 것을 포함하는, 난치성 뇌전증 진단 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 하나의 목적은 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 변이체를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 하나의 목적은 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 변이체를 포함하는, 난치성 뇌전증 진단을 위한 바이오마커 패널을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 하나의 목적은 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 변이체를 포함하는, 난치성 뇌전증의 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 하나의 목적은 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 변이체가 도입된, 난치성 뇌전증이 유도된 동물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 하나의 목적은 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 변이체를 생체 외에서 세포에 도입시키는 단계를 포함하는, 난치성 뇌전증을 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관련된 유전자의 뇌 체성변이에 의한 난치성 뇌전증,

또는 국소 피질 이형성증(FCD), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테지웨버신드롬(SWS)으로 인한 난치성 뇌전증의 예방, 개선 또는 치료에 관한 약학 조성물 또는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 추가 목적은, PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관련된 유전자의 뇌 체성변이에 의한 난치성 뇌전증, 또는 국소 피질 이형성증(FCD), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테지웨버신드롬(SWS)으로 인한 난치성 뇌전증의 예방, 개선 또는 치료용 키트, 또는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0020] 본 발명은 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병인 국소 피질 이형성증(FCD), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS), 또는 스테지웨버신드롬(SWS)으로 인한 난치성 뇌전증 수술 환자의 치료로부터 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자들의 염기서열을 분석한 결과, 21명의 환자에서 뇌 병변 특이적으로 체성 변이가 존재한다는 것을 확인하였다 (표 1).

표 1

단백질	염기서열 변이	단백질 변이
mTOR	C616T	R206C
mTOR	G1871A	R624H
mTOR	T4348G	Y1450D
mTOR	T4447C	C1483R
mTOR	G5126A	R1709H
mTOR	C5930A	T1977K
mTOR	C6577T	R2193C
mTOR	C6644T	S2215F
mTOR	T7280C	L2427P
mTOR	T7280A	L2427Q
TSC1	C64T	R22W
TSC1	C610T	R204C
TSC1	G2432T	R811L
TSC2	G4639A	V1547I
AKT3	G740A	R247H
PIK3CA	G3052A	D1018N

[0022] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 상기 체성 변이를 각각 발현할 수 있는 변이체 작제물(mTOR mutant construct)을 제조하여, 세포에 형질도입(transfection)하였으며, 그 결과 mTOR 단백질 활성 변화를 알 수 있는 S6K 단백질의 인산화가 증가하고, 라파마이신 처리 후에는 인산화가 감소하였음을 확인하였다. 이러한 결과는, 위와 같은 변이가 일어난 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자 또는 단백질이 mTOR 신호전달계를 활성화시킬 수 있음을 보여주는 결과이며 이에 따라 뇌전증을 유발할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0023] 상기 변이를 포함하는 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자 또는 단백질을 난치성 뇌전증 진단을 위한 바이오마커 패널 유전자 또는 단백질로 제공한다. 또한, 본 발명은 개체의 치료로부터 상기 바이오마커 패널 유전자 또는 단백질을 검출하기 위한 진단 키트 및 이를 이용한 진단 방법을 제공한다. 나아가, 본 발명은 상기 유전 변이 및 단백질 변이를 이용하여 난치성 뇌전증을 유발함으로써 뇌전증 모델을 구축하는 기술을 제공한다.

[0024] 본 발명의 목적은 난치성 뇌전증의 예방, 개선 또는 치료와 이들 난치성 뇌전증의 원인 질환인 국소 피질 이형성증, 편측 거대뇌증 및 결절성 경화증과 같은 대뇌피질 발달기형, 해마경화증, 또는 스테지웨버신드롬의 예방, 개선 또는 치료용 조성물, 키트, 또는 방법을 제공하는 것이다. 바람직하게는, 상기 난치성 뇌전증은 뇌 체성 유전 변이 연관 난치성 뇌전증에 관한 예방, 치료 및/또는 개선 용도에 관한 것이다.

[0025] 구체적으로, 본 발명에 따른 상기 난치성 뇌전증은 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자의 뇌 체성 유전변이에 의한 뇌전증, 또는 국소 피질 이형성증, 편측 거대뇌증 및 결절성 경화증과 같은 대뇌피질 발달기형, 해마경화증, 또는 스테지웨버신드롬에 의한 뇌전증을 포함한다.

[0026] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0027] 본 발명에서 용어 "뇌전증"이란, 신경세포 중 일부가 짧은 시간에 과도한 전기를 발생시켜 발작이 반복적으로

발생하는 만성화된 질환을 의미하며, "난치성 뇌전증"이란, 현재까지 개발된 항뇌전증 약물에 반응하지 않는 뇌 전증을 의미한다. 상기 난치성 뇌전증은 국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD), 편측 거대뇌증(hemimegalencephaly, HME) 및 결절성 경화증(Tuberous sclerosis complex, TSC)과 같은 대뇌피질 발달기형(Malformations of Cortical Developments, MCD), 해마경화증(hippocampal sclerosis, HS), 또는 스톨저웨버신드롬(Sturge weber syndrome, SWS)에 의해 유발된 난치성 뇌전증일 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 난치성 뇌전증의 발병 여부를 확인하거나, 나아가 질환의 진행 여부 또는 심화 여부를 확인하는 것을 의미할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 용어, "진단용 마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)"란 난치성 뇌전증을 지닌 환자의 시료에 차별적으로 존재하는 물질로, 이들을 검출함으로써 난치성 뇌전증의 발병 여부를 진단할 수 있는 물질을 의미할 수 있다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 진단 마커는, 난치성 뇌전증 환자의 뇌 병변 특이적으로 존재하는 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA의 변이 유전자 또는 변이 단백질을 의미할 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어, "바이오마커 패널"은 본원에 개시된 바이오마커들 중 하나 이상을 포함한다. 이들 바이오마커 패널은 시료 내에 존재하는 바이오마커 단백질 또는 유전자들과 직접적으로 또는 간접적으로 결합하거나 연합될 수 있는 검출 제제(또는 검출 시약)를 사용하여 검출할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 용어"국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD)"이란, 대뇌 피질의 정상적인 발달과정에서 신경세포는 뇌의 한 영역에서부터 다른 영역으로 이동하여 층구조를 형성하는데, 신경세포의 부적절한 이동으로 인해 정상적인 층구조를 형성하지 못하여 발생하는 질환을 의미한다. 이는 대뇌의 전체 영역 중 일부 지역이 정상적인 발달에 도달하는 못한 경우일 수 있으며, 방사선학적 영상에서 정상적으로 발달한 것처럼 보이는 지역에서도 병리적으로 일부 세포가 비정상적인 세포의 형태를 나타내어 발생하는 질환일 수 있다. 이러한, 국소 피질 이형성증은 대뇌에서 산발적으로 발생하고, 이형(dysmorphic) 신경세포를 보이고 영향을 받은 부위의 층구조(lamination) 파괴를 동반할 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 난치성 뇌전증과 연관된 뇌 체성 유전 변이는 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 변이체일 수 있으며, 예를 들면 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자 또는 이들 유전자에 상응하는 단백질의 아미노산 변이일 수 있다. 본 발명에서 용어 "뇌 체성 유전 변이"란, 일례로, 야생형의 mTOR 유전자인 서열번호 1의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다.

[0033] 또한, 상기 아미노산 서열에 변이가 일어난 mTOR 변이 단백질은, 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 범위 내에서 추가적인 변이를 포함할 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 경우에 따라서, 상기 mTOR 변이 단백질은, 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification) 될 수도 있다.

[0034] 본 발명에서 야생형의 mTOR 유전자 서열은 서열번호 1, mTOR 단백질 서열은 서열번호 2로 나타내었다. 또한, 야생형의 TSC1 유전자 서열은 서열번호 3, TSC1 단백질 서열은 서열번호 4로 나타내었다. 또한, 야생형의 TSC2 유전자 서열은 서열번호 5, TSC2 단백질 서열은 서열번호 6으로 나타내었다. 또한, 야생형의 AKT3 유전자 서열은 서열번호 7, AKT3 단백질 서열은 서열번호 8로 나타내었다. 또한, 야생형의 PIK3CA 유전자 서열은 서열번호 9, PIK3CA 단백질 서열은 서열번호 10로 나타내었다.

[0035] 본 발명에서 용어 "mTOR 변이 유전자"란, 야생형의 mTOR 유전자인 서열번호 1의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 1의 염기서열의 616번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 1871번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 4348번 위치의 티민(T)이 구아닌(G)으로 치환, 4447번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환, 5126번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 5930번 위치의 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환, 6577번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 6644번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 7280번 위치의 티민(T)이 아데닌(A)으로 치환, 및 7280번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.

[0036] 본 발명에서 용어 "mTOR 변이 단백질"이란, 야생형의 mTOR 단백질인 서열번호 2의 단백질의 아미노산 서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 2의 아미노산 서열의 206번 알지닌(R)이 시스테인(C)로 치환, 624번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1450번 티로신(Y)이 아스파르트 산(D)으로 치환, 1483번 위치의



시스테인(C)이 알지닌(R)으로 치환, 1709번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1977번 트레오닌(T)이 리신(K)으로 치환, 2193번 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 2215번 세린(S)이 페닐알라닌(F)으로 치환, 2427번 위치의 루신(L)이 프롤린(P)으로 치환, 및 2427번 위치의 루신(L)이 글루타민(Q)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0037] 본 발명에서 용어 "TSC1 변이 유전자"란, 야생형의 TSC1 유전자인 서열번호 3의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 3의 염기서열에 있어서, 64번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 610번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 및 2432번째 구아닌(G)이 티민(T)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.

[0038] 본 발명에서 용어 " TSC1 변이 단백질"이란, 야생형의 TSC1 단백질인 서열번호 4의 단백질의 아미노산 서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 4의 아미노산 서열에 있어서, 22번째 알지닌(R)이 트립토판(W)으로 치환, 204번째 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 및 811번째 알지닌(R)이 루신(L)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0039] 본 발명에서 용어 "TSC2 변이 유전자"란, 야생형의 TSC2 유전자인 서열번호 5의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 5의 염기서열에 있어서, 4639번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환을 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.

[0040] 본 발명에서 용어 "TSC2 변이 단백질"이란, 야생형의 TSC2 단백질인 서열번호 6의 단백질의 아미노산 서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 6의 아미노산 서열에 있어서, 1547번째 발린(V)이 이소루신(I)으로 치환을 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0041] 본 발명에서 용어 "AKT3 변이 유전자"란, 야생형의 AKT3 유전자인 서열번호 7의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 7의 염기서열에 있어서, 740번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환을 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.

[0042] 본 발명에서 용어 "AKT3 변이 단백질"이란, 야생형의 AKT3 단백질인 서열번호 8의 단백질의 아미노산 서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 8의 아미노산 서열에 있어서, 247번째 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환을 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0043] 본 발명에서 용어 "PIK3CA 변이 유전자"란, 야생형의 PIK3CA 유전자인 서열번호 9의 유전자의 염기서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 9의 염기서열에 있어서, 3052번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환을 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.

[0044] 본 발명에서 용어 "PIK3CA 변이 단백질"이란, 야생형의 PIK3CA 단백질인 서열번호 10의 단백질의 아미노산 서열에 변이가 일어난 것을 의미한다. 바람직하게, 서열번호 10의 아미노산 서열에 있어서, 1018번째 아스파르트산(D)이 아스파라긴(N)으로 치환을 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0045] 또한, 변이 단백질은, 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 범위 내에서 추가적인 변이를 포함할 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 경우에 따라서, 상기 mTOR 변이 단백질은, 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification) 될 수도 있다.

[0046] 일례로, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에 있어서, 616번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 1871번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 4348번 위치의 티민(T)이 구아닌(G)으로 치환, 4447번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환, 5126번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 5930번 위치의 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환, 6577번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 6644번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 7280번 위치의 티민(T)이 아데닌(A)으로 치환, 및 7280번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환; 서열번호 3의 염기서열에 있어서, 64번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 610번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 및 2432번째 구아닌(G)이 티민(T)으로 치환; 서열번호 5의 염기서열에 있어서, 4639번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환; 서열번호 7의 염기서열에 있어서, 740번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환; 및 서열번호 9의 염기서열에 있어서, 3052번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 난치성 뇌전증의 진단 키트에 관한 것이다.

[0047] 바람직한 일례로, 상기 치환을 검출할 수 있는 제제는 상기 각 치환 부위에 특이적인 프라이머, 프로브 또는 안

티센스 핵산일 수 있다.

[0048] 다른 예로, 본 발명은 (a) 개체의 시료를 상기 진단 키트에 처리하는 단계,

[0049] (b) 서열번호 1의 염기서열에 있어서, 616번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 1871번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 4348번 위치의 티민(T)이 구아닌(G)으로 치환, 4447번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환, 5126번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 5930번 위치의 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환, 6577번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 6644번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 7280번 위치의 티민(T)이 아데닌(A)으로 치환, 및 7280번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환; 서열번호 3의 염기서열에 있어서, 64번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 610번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 및 2432번째 구아닌(G)이 티민(T)으로 치환; 서열번호 5의 염기서열에 있어서, 4639번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환; 서열번호 7의 염기서열에 있어서, 740번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환; 및 서열번호 9의 염기서열에 있어서, 3052번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환을 포함하는 바이오마커 패널을 개체의 시료에서 검출하는 단계, 및

[0050] (c) 상기 하나 이상의 치환을 포함하는 바이오마커 패널이 검출되는 경우 난치성 뇌전증으로 결정하는 단계를 포함하는,

[0051] 난치성 뇌전증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0052] 다른 예로, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열에 있어서, 206번 알지닌(R)이 시스테인(C)로 치환, 624번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1450번 티로신(Y)이 아스파르트 산(D)으로 치환, 1483번 위치의 시스테인(C)이 알지닌(R)으로 치환, 1709번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1977번 트레오닌(T)이 리신(K)으로 치환, 2193번 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 2215번 세린(S)이 페닐알라닌(F)으로 치환, 2427번 위치의 루신(L)이 프롤린(P)으로 치환, 및 2427번 위치의 루신(L)이 글루타민(Q)으로 치환; 서열번호 4의 아미노산 서열에 있어서, 22번째 알지닌(R)이 트립토판(W)으로 치환, 204번째 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 및 811번째 알지닌(R)이 루신(L)으로 치환; 서열번호 6의 아미노산 서열에 있어서, 1547번째 발린(V)이 이소루신(I)으로 치환; 서열번호 8의 아미노산 서열에 있어서, 247번째 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환; 및 서열번호 10의 아미노산 서열에 있어서, 1018번째 아스파르트산(D)이 아스파라긴(N)으로 치환을 검출할 수 있는 체제를 포함하는, 난치성 뇌전증의 진단 키트에 관한 것이다.

[0053] 바람직한 일예로, 상기 치환을 검출할 수 있는 체제는 상기 각 치환 부위에 특이적인 항체 또는 압타머일 수 있다.

[0054] 다른 예로, 본 발명은 (a) 개체의 시료를 상기 진단 키트에 처리하는 단계,

[0055] (b) 서열번호 2의 아미노산 서열에 있어서, 206번 알지닌(R)이 시스테인(C)로 치환, 624번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1450번 티로신(Y)이 아스파르트 산(D)으로 치환, 1483번 위치의 시스테인(C)이 알지닌(R)으로 치환, 1709번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1977번 트레오닌(T)이 리신(K)으로 치환, 2193번 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 2215번 세린(S)이 페닐알라닌(F)으로 치환, 2427번 위치의 루신(L)이 프롤린(P)으로 치환, 및 2427번 위치의 루신(L)이 글루타민(Q)으로 치환; 서열번호 4의 아미노산 서열에 있어서, 22번째 알지닌(R)이 트립토판(W)으로 치환, 204번째 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 및 811번째 알지닌(R)이 루신(L)으로 치환; 서열번호 6의 아미노산 서열에 있어서, 1547번째 발린(V)이 이소루신(I)으로 치환; 서열번호 8의 아미노산 서열에 있어서, 247번째 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환; 및 서열번호 10의 아미노산 서열에 있어서, 1018번째 아스파르트산(D)이 아스파라긴(N)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환을 포함하는 바이오마커 패널을 개체의 시료에서 검출하는 단계; 및

[0056] (c) 상기 하나 이상의 치환을 포함하는 바이오마커 패널이 검출되는 경우 난치성 뇌전증으로 결정하는 단계를 포함하는,

[0057] 난치성 뇌전증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0058] 바람직한 일예로, 상기 시료는 개체의 뇌 조직 시료일 수 있다.

[0059] 다른 예로, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에 있어서, 616번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 1871번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 4348번 위치의 티민(T)이 구아닌(G)으로 치환, 4447번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환, 5126번 위치의 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환, 5930번 위치의 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환, 6577번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 6644번 위치의 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 7280번

위치의 티민(T)이 아데닌(A)으로 치환, 및 7280번 위치의 티민(T)이 시토신(C)으로 치환; 서열번호 3의 염기서열에 있어서, 64번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 610번째 시토신(C)이 티민(T)으로 치환, 및 2432번째 구아닌(G)이 티민(T)으로 치환; 서열번호 5의 염기서열에 있어서, 4639번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환; 서열번호 7의 염기서열에 있어서, 740번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환; 및 서열번호 9의 염기서열에 있어서, 3052번째 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환을 포함하는 염기서열로 이루어진 유전자에 관한 것이다.

[0060] 다른 예로, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열에 있어서, 206번 알지닌(R)이 시스테인(C)로 치환, 624번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1450번 티로신(Y)이 아스파르트 산(D)으로 치환, 1483번 위치의 시스테인(C)이 알지닌(R)으로 치환, 1709번 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환, 1977번 트레오닌(T)이 리신(K)으로 치환, 2193번 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 2215번 세린(S)이 페닐알라닌(F)으로 치환, 2427번 위치의 루신(L)이 프롤린(P)으로 치환, 및 2427번 위치의 루신(L)이 글루타민(Q)으로 치환; 서열번호 4의 아미노산 서열에 있어서, 22번째 알지닌(R)이 트립토판(W)으로 치환, 204번째 알지닌(R)이 시스테인(C)으로 치환, 및 811번째 알지닌(R)이 루신(L)으로 치환; 서열번호 6의 아미노산 서열에 있어서, 1547번째 발린(V)이 이소루신(I)으로 치환; 서열번호 8의 아미노산 서열에 있어서, 247번째 알지닌(R)이 히스티딘(H)으로 치환; 및 서열번호 10의 아미노산 서열에 있어서, 1018번째 아스파르트산(D)이 아스파라긴(N)으로 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환을 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질에 관한 것이다.

[0061] 다른 예로, 본 발명은 상기 변이 단백질 또는 변이 유전자를 포함하는, 난치성 뇌전증 진단을 위한 바이오마커 패널에 관한 것이다.

[0062] 본원에서, 염기서열의 치환의 검출과 관련하여 기재된 용어, "치환을 검출할 수 있는 제제"는 개체의 시료 내에서 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA의 염기서열 상의 치환 (변이)를 검출하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미한다. 구체적인 일례로, 본 발명에서 제공하는 각 염기 치환 부위에 특이적으로 또는 상보적으로 결합할 수 있는 프라이머(primer), 프로브(probe), 안티센스 핵산(antisense oligonucleotide) 등 일 수 있다. 상기 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산은 각 염기 치환 부위에 특이적으로 결합하고 야생형의 서열에는 특이적 결합을 하지 않는 것일 수 있다.

[0063] 이 때, 상보적으로 결합한다는 것은, 소정의 혼성화 또는 어닐링(annealing) 조건, 바람직하게는 생리학적 조건 하에서 안티센스 핵산이 변이 부위 타겟에 선택적으로 혼성화 할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포함하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.

[0064] 일 구현예로, 본원에서 각 유전자의 변이 부위를 검출하는 데 사용되는 제제는, 안티센스 핵산일 수 있다. 용어, "안티센스 핵산"은 타겟으로 하는 변이 부위에 대한 상보적인 서열을 가지고 있어 변이 부위와 이합체를 형성할 수 있는 핵산 기반의 분자를 의미하며, 본원의 유전자 바이오마커 패널을 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0065] 다른 구현예로, 본원에서 각 바이오마커 패널 유전자의 변이 부위를 검출하는 데 사용되는 제제는 프라이머 쌍 또는 프로브일 수 있고, 본원 명세서에 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 변이 유전자의 염기서열이 밝혀져 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.

[0066] 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 7개 내지 50개의 핵산서열을 의미한다. 프라이머는 보통 합성하지만 자연적으로 생성된 핵산에서 이용할 수도 있다. 프라이머의 서열은 반드시 주형의 서열과 정확히 같을 필요는 없으며, 충분히 상보적이어서 주형과 혼성화될 수 있으면 된다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈(polymerase) 또는 역전사 효소(reverse transcriptase)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 3인산(nucleoside triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 본 발명에서는 mTOR 염기서열 부위의 센스(sense) 및 안티센스(antisense) 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 뇌전증을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 프라이머는 본원에서 제공하는 유전자의 변이 부위를 증폭할 수 있는 프라이머일 수 있다.

[0067] 다른 일례로, 본원에서 각 바이오마커 패널 유전자의 변이 부위를 검출하는 데 사용되는 제제는 프로브일 수 있다. 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는

RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링(labeling) 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 mTOR 유전변이와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0068] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 혼입할 수 있는 추가의 특징의 예로 메틸화, 캡화, 하나 이상의 핵산을 동족체로의 치환 및 핵산 간의 변형 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0069] 본원에서, 아미노산 서열의 치환의 검출과 관련하여 기재된 용어, "치환을 검출할 수 있는 제제"는 환자의 시료 내에서 각 바이오마커 패널 단백질의 변이 부위를 검출하는 데 사용될 수 있는 물질을 의미한다. 바람직하게, 본원에서 제공하는 변이를 포함하는 아미노산 서열로 이루어진 단백질에 특이적인 항체 또는 압타머일 수 있다. 바람직하게, 상기 항체는 단클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있다.

[0070] 용어 "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 각 바이오마커 패널 단백질의 변이 부위에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, 각 변이 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝(cloning)하여 상기 각 변이 유전자에 의해 코딩되는 변이 단백질을 얻고, 얻어진 변이 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 변이 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 다클론 항체, 단클론 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.

[0071] 본 발명의 난치성 뇌전증 진단 바이오마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이의 중쇄(heavy chain)를 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')<sub>2</sub> 및 Fv 등이 있다.

[0072] 또한, 본 발명의 바이오마커 패널 유전자 또는 단백질을 검출할 수 있는 제제는 키트의 형태로 구현되어 제공될 수 있다. 본 발명의 키트는 바이오마커 패널 유전자 또는 단백질을 검출할 수 있다. 본 발명의 키트에는 각 바이오마커 패널 유전자를 검출하기 위한 프라이머, 프로브, 안티센스 핵산, 또는 각 바이오마커 패널 단백질을 검출하기 위한 항체 또는 압타머를 포함할 수 있고, 이 외에 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0073] 구체적인 일례로서, 본 발명에서 바이오마커 패널 유전자를 검출하기 위한 키트는 DNA 칩(chip)을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 난치성 뇌전증 진단용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 바이오마커 패널 유전자를 검출하기 위한 제제가 부착되어 있는 기관, 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기관은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편을 검출하기 위한 제제를 포함할 수 있다. 또한, 바이오마커 패널 유전자를 검출하기 위한 키트는 PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. PCR 키트는, mTOR 변이 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너(container), 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 다중 PCR 을 통하여 각 바이오마커 패널 유전자들을 동시에 증폭 및 분석할 수 있는 다중 PCR 키트일 수 있다.

[0074] 또 다른 구체적인 일례로서, 본 발명에서 바이오마커 패널 단백질을 검출하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.



- [0075] 본원에서, 개체의 시료로부터 바이오마커 패널을 검출하는 방법에서, 개체의 시료로부터 게놈(genome) DNA 또는 총 단백질(total protein)의 분리는 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0076] 본 발명에서 용어 "개체의 시료"란 바이오마커 패널 유전자 또는 단백질을 검출할 수 있는 조직, 세포와 같은 시료 등을 포함한다. 바람직하게, 뇌 조직 시료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 일 구현예로, 개체의 시료로부터 바이오마커 패널 유전자를 검출하는 방법은, 환자의 시료로부터 핵산을 증폭하는 단계, 및 상기 증폭된 핵산의 염기서열을 결정하는 단계를 포함하는 방법으로 수행될 수 있다.
- [0078] 구체적으로, 상기 핵산을 증폭하는 단계는, 중합효소 연쇄반응(PCR), 멀티플렉스 PCR, 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR, 부스터(booster) PCR, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 인버스(inverse) 중합효소 연쇄반응, 벡토레트(vectorette) PCR, 테일-PCR (thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR), 리가아제 연쇄 반응, 복구 연쇄 반응, 전사-중재 증폭, 자가 유지 염기서열 복제 또는 타겟 염기서열의 선택적 증폭 반응에 의하여 수행될 수 있다.
- [0079] 또한, 상기 증폭된 핵산의 염기서열을 결정하는 단계는, 생거(Sanger) 시퀀싱, 맥삼-길버트(Maxam-Gilbert) 시퀀싱, 샷건(Shotgun) 시퀀싱, 파이로시퀀싱, 마이크로어레이에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR(allele specific PCR), 다이내믹 대립유전자 혼성화 기법(dynamic allele-specific hybridization, DASH), PCR 연장 분석, TaqMan 기법, 자동염기서열분석, 또는 차세대 염기서열 분석에 의하여 수행될 수 있다. 차세대 염기서열 분석은, 당업계에 널리 사용되는 염기서열 분석 시스템을 사용하여 수행될 수 있으며, 예를 들어 Roche 사의 454 GS FLX, Illumina 사의 Genome Analyzer, Applied Biosystems 사의 SOLid Platform 등을 이용할 수 있다.
- [0080] 또 다른 일예로, 환자의 시료로부터 바이오마커 패널 단백질을 검출하는 방법은, 해당 아미노산 변이를 특이적으로 검출하는 항체를 이용한 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 분석 방법들을 통하여, 변이 단백질과 이에 대한 항체 사이의 항원-항체 복합체를 확인할 수 있고, 변이 단백질과 이에 대한 항체 사이의 항원-항체 복합체를 판단하여, 난치성 뇌전증을 진단할 수 있다.
- [0081] 본원에서 "항원-항체 복합체"란 변이 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성 여부는 검출 라벨(detection label)의 시그널을 통해서 측정 가능하다.
- [0082] 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스(redox) 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는  $\beta$ -글루쿠로니다제,  $\beta$ -D-글루코시다제,  $\beta$ -D-갈락토시다제, 우레아제, 피옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제,  $\beta$ -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌,  $\alpha$ -프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리딘 염색제, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논,  $K_4W(CN)_8$ ,  $[Os(bpy)_3]^{2+}$ ,  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ,  $[Mo(CN)_8]^{4-}$  등이 포함되며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는  $^3H$ ,  $^{14}C$ ,  $^{32}P$ ,  $^{35}S$ ,  $^{36}Cl$ ,  $^{51}Cr$ ,  $^{57}Co$ ,  $^{58}Co$ ,  $^{59}Fe$ ,  $^{90}Y$ ,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{186}Re$  등이 포함되며 이로 제한되지 않는다.
- [0083] 일 구체예로, 바이오마커 패널 단백질과 이에 대한 항체 사이의 항원-항체 복합체 측정은 ELISA법을 이용하는 것이다. ELISA는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 보다 바람직하게는, 고체 지지체에 항체를 부착시키고 시료를 반응시킨 후 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 표지된

항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키거나 항원-항체복합체의 항원을 인지하는 항체에 대해 표지된 2차 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키는 샌드위치 ELISA 방법에 의해서 검출한다. 바이오마커패널 단백질과 항체의 복합체 형성을 확인하여, 난치성 뇌전증의 발병 여부를 확인할 수 있다.

- [0084] 다른 일 구체예로, 바이오마커패널 단백질에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 이용할 수 있다. 예를 들어, 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킬 수 있다. 생성된 항원-항체 복합체를 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 변이 유전자의 발현에 의해 생성된 변이 단백질의 양을 확인하여, 난치성 뇌전증 여부를 확인할 수 있다. 상기 검출 방법은 변이 단백질과 이에 대한 항체 사이의 항원-항체 복합체를 조사하는 방법으로 이루어질 수 있다.
- [0085] 또한, 다른 일 구체예로, 바이오마커 패널 단백질에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 단백질 칩을 이용할 수 있다. 단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 판독하여, 단백질의 존재를 확인하여, 난치성 뇌전증의 발병 여부를 확인할 수 있다.
- [0086] 상기 검출 방법들을 통하여, mTOR 변이 유전자 또는 mTOR 변이 단백질이 검출되는 경우 대뇌피질 발달기형에 의해 유발되는 난치성 뇌전증으로 진단할 수 있다.
- [0087] 다른 예로, 본 발명은 상기 유전 변이 및 단백질 변이를 이용하여 난치성 뇌전증을 유발함으로써 뇌전증 모델을 구축하는 기술을 제공한다.
- [0088] 보다 상세하게, 일 예로, 본 발명은 상기 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및/또는 PIK3CA의 변이 유전자 또는 변이 단백질을 포함하는, 난치성 뇌전증의 유도용 조성물에 관한 것이다.
- [0089] 다른 예로, 본 발명은 상기 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및/또는 PIK3CA의 변이 유전자 또는 변이 단백질이 도입된, 난치성 뇌전증이 유도된 동물에 관한 것이다.
- [0090] 다른 예로, 본 발명은 상기 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및/또는 PIK3CA의 변이 유전자 또는 변이 단백질을 생체 외에서 세포에 도입시키는 단계를 포함하는, 난치성 뇌전증을 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0091] 본원에서 용어, "유도"란, 정상 상태에서 병리 상태로 변화를 유발하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 유도는 난치성 뇌전증이 발병하지 않은 상태에서 난치성 뇌전증이 발병하는 상태로 변화하는 것이다.
- [0092] 일예로, mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및/또는 PIK3CA의 변이 유전자 또는 변이 단백질을 세포에 도입함으로써, 난치성 뇌전증이 유도된 세포를 제조할 수 있다. 상기 세포는 뇌세포 또는 배아를 포함한다. 변이 유전자 또는 변이 단백질이 도입된 세포를 발생시킴으로써 난치성 뇌전증이 유도된 동물을 제조할 수도 있다. 변이 유전자 또는 변이 단백질이 도입될 경우, 변이에 의해 과도하게 mTOR 활성화가 일어나 신경세포의 이동에 장애가 발생하고 인산화된 S6K 단백질이 크게 증가하여 뇌전증이 유도될 수 있다.
- [0093] 아미노산 서열에 변이가 일어난 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및/또는 PIK3CA 단백질은 당 분야에 널리 공지된 방법으로 천연에서 추출 및 정제하여 얻을 수 있다. 달리는, 아미노산 서열에 변이가 일어난 단백질은 화학적으로 합성(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2156, 1963)하거나 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수 있다.
- [0094] 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 폴리펩타이드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, 아미노산 서열에 변이가 일어난 단백질을 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 아미노산 서열이 변이된 단백질이 발현되도록 숙주 세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 아미노산 서열이 변이된 단백질을 회수하는 과정으로 수득할 수 있다. 단백질은 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다.
- [0095] 아미노산 서열에 변이가 일어난 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및/또는 PIK3CA 단백질을 코딩하는 염기서열은, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 염기서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA) 또는 RNA 분자일 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem Int Ed Engl. 37:73-127, 1988)에 기술된 방

법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스페이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.

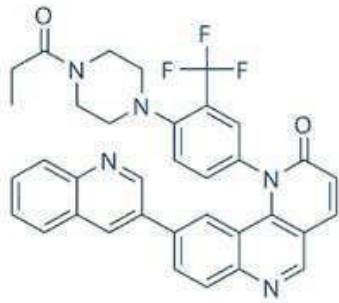
- [0096] 보다 바람직한 양태로서, 본 발명의 변이 단백질 또는 변이 유전자는 재조합 벡터를 이용하여 세포, 배아 또는 동물에 도입할 수 있다.
- [0097] 본 발명에서 "벡터"란 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 숙주 세포로 도입되기 위한 수단을 의미한다. 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 게놈 DNA에 통합될 수 있다.
- [0098] 바람직하게는 벡터 내로 삽입되어 전달된 유전자가 숙주세포의 게놈 내로 비가역적으로 융합되어 세포 내에서 유전자 발현이 장기간 안정적으로 지속되도록 하는 벡터이다.
- [0099] 본 발명의 변이 단백질 또는 변이 유전자는 세포에 도입될 수 있으며, 바람직하게는 뇌세포에 도입될 수 있다. 또한, 배아에 도입될 수 있으며, 바람직하게는 뇌의 형성 또는 발달단계에 있는 배아에 도입될 수 있다.
- [0100] 단백질 또는 유전자를 도입하는 방법은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 형질전환(transformation), 형질도입(transfection 또는 transduction) 등의 방법을 통하여 벡터를 세포 내로 삽입할 수 있다. 세포 내로 삽입된 벡터는 세포 내에서 유전자 발현이 지속적으로 일어나 아미노산 서열이 변이된 단백질을 생성할 수 있다.
- [0101] 본 발명에서 용어, " 뇌전증이 유도된 동물"이란 인간을 제외한 동물을 의미하는 것으로, 세포 내 mTOR 단백질 활성이 정상 세포에 비하여 증가되도록 형질의 변형이 유도된 동물을 의미하고, 아미노산 서열이 변이된 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및/또는 PIK3CA 단백질을 발현하는 벡터를 세포 내 유입함으로써 형질전환을 유도할 수 있다. 난치성 뇌전증이 발생된 상기 형질전환 동물은 난치성 뇌전증 동물 모델로 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0102] 본 발명에서 "동물 모델(animal model)" 또는 "질환 모델(disease model)"은 사람의 질병과 유사한 특정 질환을 가지고 있어서 병인을 규명하고, 병태를 확인할 수 있는 연구 대상이 될 수 있는 모델이 되는 동물을 의미한다. 동물 모델로서 사용하기 위한 동물은, 인간에서와 같은 효과를 예측할 수 있으며, 쉽게 만들 수 있고, 재현성이 있다. 또한, 인간질환의 병인과 같거나 유사하게 진행되어야 한다. 따라서, 인간과 같은 포유류 척추동물이면서, 장기 등의 체내 구조, 면역체계, 체온 등이 유사하고, 고혈압, 암, 면역결핍 등의 질환을 앓는 동물이 동물 모델로서 적합하다. 이런 동물은 바람직하게는 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 래빗, 마우스, 랫트, 기니피그, 햄스터 등의 포유류이고, 보다 바람직하게는 마우스, 랫트, 기니피그, 햄스터 등의 설치류이다. 특히, 마우스는 소형동물로 번식력이 우수하고, 사육관리가 쉽고, 질병에 강하며, 유전적으로 균일하며, 다양한 종류가 개발되었고, 사람에서 발생하는 질병과 같거나 유사한 증상을 보이는 동물의 생산이 가능하며, 인간의 질병을 연구하는데 가장 많이 이용되고 있다.
- [0103] 본 발명의 동물 모델은 뇌전증 질환 모델로, 아미노산 서열이 변이된 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및/또는 PIK3CA 단백질이 발현되도록 유전자 조작하여 제조된 모델이다. 본 발명에서 제공하는 변이 단백질 또는 변이 유전자는 난치성 뇌전증 유도능을 가지므로, 이들을 세포 또는 배아에 도입시켜 발생시킴으로써 난치성 뇌전증 질환 모델을 용이하게 제조할 수 있다.
- [0104] 일례로, 본 발명에서는 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및/또는 PIK3CA 변이 단백질 또는 변이 유전자를 동물의 배아에 도입한 후 발생시킴으로써 난치성 뇌전증이 유도된 동물을 제조할 수 있다. 상기 변이 단백질 또는 변이 유전자는 벡터에 포함된 형태로 배아에 도입될 수 있다. 배아에 벡터를 도입하는 방법은 특별히 한정되지 않는다. 바람직하게, 상기 벡터를 배아에 도입하는 시기는 배아기 중 대뇌 피질층이 형성되는 기간일 수 있다.
- [0105] 본 발명의 뇌전증 동물 모델은 유전자 기능에 대한 연구, 뇌전증의 분자적 기작 및 신규 항 뇌전증제 탐색 등의 연구에 효과적으로 사용할 수 있다.
- [0106] 본 발명의 일례는 난치성 뇌전증 또는 이의 원인질환의 예방, 개선 또는 치료에 관한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다. 상기 난치성 뇌전증의 원인 질환인 국소 피질 이형성증, 편측 거대뇌증 및 결절성 경화증과 같은 대뇌피질 발달기형(Malformations of Cortical Developments, MCD), 해마경화증(hippocampal sclerosis, HS),

또는 스테이지웨버신드롬(Sturge weber syndrome, SWS)을 포함한다.

- [0107] 본 발명에 따른 난치성 뇌전증은 국소 피질 이형성증(FCD), 결절성 경화증(TSC), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테이지웨버신드롬(SWS)의 원인질환에 의한 난치성 뇌전증이거나, 구체적으로 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자들의 뇌 체성 변이에 의한 난치성 뇌전증을 포함할 수 있다.
- [0108] 즉, PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 뇌 체성변이체, 예를 들면 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자 또는 단백질의 뇌 체성 변이체에 의해, 국소 피질 이형성증(FCD), 결절성 경화증(TSC), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테이지웨버신드롬(SWS)가 발생할 수 있고, 이들 질환에 의한 난치성 뇌전증이 발생된다.
- [0109] 따라서, 본 발명에서는 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 뇌 체성 변이체를 발현하는 세포 또는 동물 모델을 제조하여, mTOR 저해제로서 라파마이신을 투여한 경우 자발적 발작 또는 비정상적 신경 세포를 나타내는 상기 동물모델에 대하여 라파마이신을 투여한 경우, 행동발작과 뇌파발작 횟수가 감소하고, 비정상적인 신경 세포의 크기가 감소하는 것을 확인한다. 따라서, mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자의 변이에 의한 mTOR 과활성화로 인한 질환, 예를 들면 국소 피질 이형성증(FCD), 결절성 경화증(TSC), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테이지웨버신드롬(SWS)과 이들의 증상들을 예방, 개선 또는 치료하는데 mTOR 저해제를 사용할 수 있다. 현재 mTOR 저해제는 통상 항암제로 널리 사용되고 있다.
- [0110] 본 발명의 일 예는, mTOR 저해제를 유효성분으로 포함하는 뇌전증 또는 뇌전증의 원인질환의 예방, 개선, 또는 치료 용도를 제공할 수 있다. 상기 뇌전증은 뇌 체성 유전변이에 의한 뇌전증, 바람직하게는 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 뇌 체성 변이에 의한 뇌전증, 더욱 바람직하게는 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자의 뇌 체성 유전변이에 의한 뇌전증일 수 있다. 상기 뇌전증의 원인 질환으로는 PI3K-AKT-mTOR 신호전달경로에 관여하는 유전자 또는 단백질의 뇌 체성 변이에 의한 질환, 바람직하게는 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 유전자의 뇌 체성 유전변이에 의한 질환, 더욱 바람직하게는 국소 피질 이형성증(FCD), 결절성 경화증(TSC), 편측 거대뇌증(HME), 해마경화증(HS) 또는 스테이지웨버신드롬(SWS)일 수 있다.
- [0111] 본 발명에 따른 뇌전증 또는 뇌전증의 원인질환의 예방, 개선, 또는 치료 용도에 사용 가능한 mTOR 저해제는 통상으로 알려진 mTOR 저해제를 모두 포함한다. 이러한 mTOR 저해제의 대표적인 예는 라파마이신 또는 이의 염, 에베로리무스(Everolimus) 또는 이의 염, 화학식 1의 화합물 또는 이의 염, 화학식 2의 화합물 또는 이의 염, 화학식 3의 화합물 또는 이의 염, 및 화학식 4의 화합물 또는 이의 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0112] 본 발명에 적용 가능한 mTOR 저해제의 예는 하기의 물질명, 개발명 또는 상표명을 가지는 mTOR 저해제를 포함할 수 있다: AMG954, AZD8055, AZD2014, BEZ235, BGT226, Everolimus, Sirolimus, CC-115, CC-223, LY3023414, P7170, DS-7423, OSI-027, GSK2126458, PF-04691502, PF-05212384, Temsirolimus, INK128, MLN0128, MLN1117, Ridaforolimus, Metformin, XL765, SAR245409, SF1126, VS5584, GDC0980, GSK2126458. 또한, mTOR 저해제의 추가 예는 W02012/104776, KR 10-1472607B, W02010/039740, US8846670, US8263633, 또는 W02010/002954의 특허 문헌에 기재된 것일 수 있다.
- [0113] 본 발명의 일예에서, 라파마이신 또는 이의 염, 에베로리무스(Everolimus) 또는 이의 염, 화학식 1의 화합물 또는 이의 염, 화학식 2의 화합물 또는 이의 염, 화학식 3의 화합물 또는 이의 염, 및 화학식 4의 화합물 또는 이의 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병, 국소 피질 이형성, 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증, 더욱 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

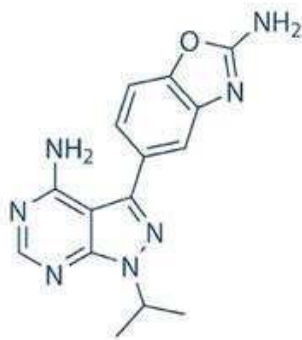


[0114] [화학식 1]



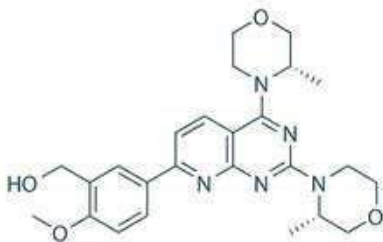
[0115]

[0116] [화학식 2]



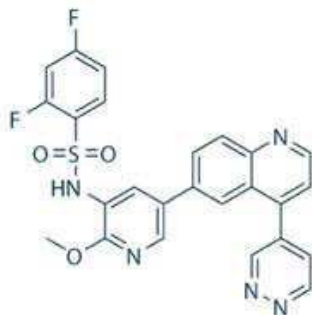
[0117]

[0118] [화학식 3]



[0119]

[0120] [화학식 4]



[0121]

[0122] 본 발명의 또 하나의 목적은, 라파마이신 또는 이의 염, 에베로리무스 또는 이의 염, 화학식 1의 화합물 또는 이의 염, 화학식 2의 화합물 또는 이의 염, 화학식 3의 화합물 또는 이의 염, 및 화학식 4의 화합물 또는 이의 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는, 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병, 국소 피질 이형성, 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증, 더욱 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0123] 본 발명에서 용어 "라파마이신(Rapamycin)"이란, 실로리무스(silormycin)로도 알려져 있는 마크로라이드 락톤계 화합물로서, 면역억제 활성을 갖고 있는 약제를 의미한다. 라파마이신은 종래 장기이식환자의 이식 거부 억제제

로 상품화되어 있고, 이외에도, 폐렴, 전신 홍반성 루푸스, 건선 등의 면역염증 피부질환, 면역염증 장질환, 안염증, 재협착, 류마티스 관절염 등의 치료제 및 항암제로 사용되고 있다. 하지만, 라파마이신이 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병, 국소 피질 이형성, 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증, 더욱 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증의 예방 또는 치료에 사용된 적은 전무하다.

[0124] 본 발명에서 용어 "에베로리무스(Everolimus)"란, 신장암을 치료하기 위해 사용되는 약물로 신생혈관생성을 억제하는 약물인 수니티닙(sunitinib)이나 소라페닙(sorafenib)과 같은 약물에 효과가 없을 때 사용되고 있다. 또한 결정성 경화증을 가진 환자 중 수술을 할 수 없는 뇌실막밑 거대세포 성상세포종을 가진 경우 사용되고 있다. 하지만, 에베로리무스가 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병, 국소 피질 이형성, 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증, 더욱 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증의 예방 또는 치료에 사용된 적은 전무하다.

[0125] 본 발명에서 "화학식 1 내지 4의 화합물"은, mTOR에 대한 억제제로 알려져 있는 화합물들이다. 하지만, 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병, 국소 피질 이형성, 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증, 더욱 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증의 예방 또는 치료와의 관련성은 전혀 알려져 있지 않다.

[0126] 본 발명에서 라파마이신, 에베로리무스 및 화학식 1 내지 4의 화합물은, 그의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용 가능한 염 또는 수화물을 모두 포함한다.

[0127] 상기 약학적으로 허용 가능한 염 또는 수화물은 무기산 또는 유기산으로부터 유도된 염 또는 수화물 일 수 있고, 일례로, 염으로는 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산, 아세트산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 말론산, 석신산, 글루타르산, 푸마르산, 말산, 만델산, 타타르산, 시트르산, 아스코빈산, 팔미트산, 말레인산, 하이드록시말레인산, 벤조산, 하이드록시벤조산, 페닐아세트산, 신남산, 살리실산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 수화물은 라파마이신, 에베로리무스 및 화학식 1 내지 4의 화합물이 물 분자와 결합하여 형성된 것을 의미할 수 있다.

[0128] 본 발명에서 "치료"는 증상의 경감 또는 개선, 질환의 범위의 감소, 질환 진행의 지연 또는 완화, 질환 상태의 개선, 경감 또는 안정화, 부분적 또는 완전한 회복, 생존의 연장 기타 다른 이로인 치료 결과 등을 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 본 발명에서는 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병, 국소 피질 이형성, 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증, 더욱 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증을 나타내는 환자에게 라파마이신, 에베로리무스 및/또는 화학식 1 내지 4의 화합물을 투여함으로써 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병, 국소 피질 이형성, 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증, 더욱 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증과 관련된 증상을 완화, 개선, 경감 또는 치료하는 것을 포함한다.

[0129] 상기 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증과 관련된 증상은, 뇌의 발달과정에서 신경 세포가 적절한 뇌의 지역으로의 이동에 실패하게 되어 나타나는 것으로, 자발적 발작, 행동발작, 뇌파 발작 및 대뇌에서 비정상적인 신경 세포의 발생 등을 예시할 수 있다.

[0130] 따라서, 본 발명에서의 치료는 이러한 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병, 국소 피질 이형성, 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증, 더욱 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증의 환자에 대하여 라파마이신, 에베로리무스, 및/또는 화학식 1 내지 4의 화합물을 투여함으로써, 자발적 발작, 행동발작 또는 뇌파 발작이 나타나는 횟수를 현저하게 경감시키고, 대뇌에서 비정상적인 신경 세포의 개수 또는 크기를 줄이는 것을 의미할 수 있다.

[0131] 본 발명의 약학 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 라파마이신, 에베로리무스, 및/또는 화학식 1 내지 4의 화합물의 유효량은 당업자의 선택에 따라 적절히 조절하여 사용될 수 있다.

[0132] 일례로, 상기 약학 조성물은 라파마이신, 에베로리무스, 및/또는 화학식 1 내지 4의 화합물을 전체 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 10 중량%, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 5 중량%의 양으로 포함할 수 있다.

[0133] 상기 라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물은 상기 약학 조성물 내에 단독으로 포함될 수 있으며, 또는 그 외 약리학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 제제 할 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네

랄 오일 등을 포함하며, 또한, 약학적으로 허용되는 부형제로는 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 즉, 본 발명의 약학 조성물에 첨가될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 사용 목적에 따라서 통상의 기술자가 어려움 없이 선정하여 이루어질 수 있으며, 그 첨가량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택될 수 있다.

[0134] 본 발명의 약학 조성물의 환자에 대한 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 통상의 기술자에 의하여 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 1 mg/kg 내지 1000 mg/kg, 바람직하게는 50 mg/kg 내지 500 mg/kg, 보다 바람직하게는 150 mg/kg 내지 300 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0135] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0136] 본 발명은 또 다른 양태로, 라파마이신 또는 이의 염, 에베로리무스 또는 이의 염, 화학식 1의 화합물 또는 이의 염, 화학식 2의 화합물 또는 이의 염, 화학식 3의 화합물 또는 이의 염, 및 화학식 4의 화합물 또는 이의 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는, 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병, 국소 피질 이형성, 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증, 더욱 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이 연관 국소 피질 이형성증의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0137] 상기 식품 조성물은 통상의 다른 식품 조성물의 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 라파마이신, 에베로리무스, 및/또는 화학식 1 내지 4의 화합물은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품용 조성물 제조시에는 유효성분의 원료에 대하여 0.01 내지 10 중량부, 바람직하게는 0.05 내지 1 중량부의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.

[0138] 상기 식품 조성물은 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병, 국소 피질 이형성, 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증 예방 또는 개선을 위한 목적으로 건강식품에 함유될 수 있으며 그 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 외에 본 발명의 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0139] 본 발명에 따라, 난치성 뇌전증, 또는 이의 원인 질병인 국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD), 편측 거대뇌증(hemimegalencephaly, HME) 및 결절성 경화증(Tuberous sclerosis complex, TSC)과 같은 대뇌피질 발달기형(Malformations of Cortical Developments, MCD), 해마경화증(hippocampal sclerosis, HS), 또는 스토퍼웨버신드롬(Sturge weber syndrome, SWS), 바람직하게는 뇌 체성 유전 변이와 연관된 난치성 뇌전증을 나타내는 환자에 라파마이신, 에베로리무스, 및/또는 화학식 1 내지 4의 화합물을 투여함으로써 뇌 체성 유전 변이와 연관된 국소 피질 이형성증으로 인한 자발적 발작, 행동발작 또는 뇌파 발작이 나타나는 횡수를 현저하게 경감시키고, 대뇌에서 비정상적인 신경 세포의 개수 또는 크기를 줄일 수 있다.

### 발명의 효과

[0140] 본원은 난치성 뇌전증에 효과적인 바이오마커 패널과 이를 이용한 난치성 뇌전증 진단 기술을 제공한다. 또한, 본원은 난치성 뇌전증의 유도 기술을 제공하며, 이에 따라 제조된 뇌전증 동물 모델을 이용하여 유전자 기능에 대한 연구, 뇌전증의 분자적 기작 및 신규 항 뇌전증제 탐색 등의 연구가 가능하다.

### 도면의 간단한 설명

[0141] 도 1은 TSC-1 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 rapamycin 처리(200nM)를 나타낸다. "P-S6K" 은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

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

도 3은 AKT3 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 rapamycin 처리(200nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 4는 mTOR 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 rapamycin 처리(200nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.  $^{**}p<0.01$  and  $^{***}p<0.001$  (야생형 대비,  $n=3-5$  각 그룹당, one-way ANOVA with Bonferroni's post test)

도 5는 mTOR 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 rapamycin 처리(200nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 6은 실시예 3에 따라 TSC-1의 p.Arg22Trp 및 p.Arg204Cys 변이체는 mTOR 과활성화 관련 되어있다. 상기 TSC1 변이체가 mTOR 과활성을 유도하는 기전에 대한 확인을 위한 Immunoprecipitation 결과를 나타낸다. Empty 는 아무것도 처리하지 않은 세포를 나타낸다.

도 7은 실시예 3에 따라 GTP-agarose pull down assay를 나타낸다. 구체적으로 TSC complex의 기질인 GTP-bound Rheb 단백질의 양을 측정함으로써 TSC complex의 활성화 정도를 측정한다.

도 8은 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 라파마이신을 처리한 결과를 나타낸다.  $^{**}p<0.01$  and  $^{***}p<0.001$  (야생형 대비,  $n=3-5$  각 그룹당, one-way ANOVA with Bonferroni's post test)

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

도 10은 본 발명의 mTOR 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 화학식 1 내지 4의 화합물 및 에베로리무스를 처리한 결과를 나타낸다. "P-S6"은 인산화된 S6 단백질, "S6"는 S6 단백질을 나타낸다.

도 11a 및 11b는 실시예 4에 따라 mTOR 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 6가지 약물처리 전후 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 약물 처리(200nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 12a 및 12b는 TSC1 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 6가지 약물처리 전후 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 약물 처리(200nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 13a 및 13b는 TSC2 야생형과 유전변이를 발현하는 HEK293T 세포에 대하여 6가지 약물처리 전후 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. (-)는 control, (+)는 약물 처리(200nM)를 나타낸다. "P-S6K"은 인산화된 S6K 단백질, "S6K"는 S6K 단백질을 나타낸다.

도 14a 및 14c는 mTOR 변이가 TSC1,2의 변이가 확인된 모든 국소피질 이형성증 환자의 병리학적 샘플을 나타낸다. "Non-FCD"는 국소대뇌피질 이형성증 아닌 정상 뇌를 가진 샘플, "P-S6"은 S6 단백질에 인산화가 일어난 결과, "NeuN"은 신경마커(neuronal marker), "Merge"는 P-S6 및 NeuN의 이미지를 병합하여 나타낸 것이다.

도 14b 및 14d는 피질(cortical region)의 4 내지 5 부분에서 S6 단백질에 인산화가 일어난 세포의 비율, 도14 e,f는 신경마커(neuronal marker, NeuN) 양성 세포 크기를 나타낸다.  $^{*}p<0.05$ ,  $^{**}p<0.001$ ,  $^{***}p<0.0001$  [relative to Non-FCD samples, one-way ANOVA with Bonferroni posttest]. Error bars, s.e.m. Scale bars, 50um.

도 15a 는 TSC 마우스 모델에서 신경 세포 이동 장애가 발생하고 그로 인한 대뇌 피질 발달기형을 나타낸다. "Control"은 sgRNA가 삽입되지 않은 경우를 나타내고, 붉은 글씨는 플라스미드를 발현하는 세포의 비율을 나타낸다. Scale bars, 250um.

도 15b는 피질 내에서 전기천공된 세포의 분포를 나타낸다.  $^{*}p<0.05$ ,  $^{***}p<0.0001$  [Two-way ANOVA with Bonferroni posttest]. Error bars, s.e.m.

도 16 자발적 발작을 일으키는 TSC2 마우스 모델에 라파마이신을 투여한 후 자발적 발작의 횟수를 측정한 결과를 나타낸다.  $^{*}p<0.05$  and  $^{**}p<0.01$  ( $n=7-17$  for each group, one-way ANOVA with Bonferroni post test)



도 17a는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 플라스미드로 배아기 14일(E14)에 전기 천공 후 배아기 18일(E18)에 뇌 관상 절단 후 분석하는 과정을 보여주는 개요를 나타낸다.

도 17b는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서 신경 세포 이동 장애 및 mTOR 활성을 확인하기 위하여, 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스 배아기 18일(E18)의 뇌 관상 절단 면을 나타낸다. "CP"는 대뇌 피질 판(Cortical plate), "IZ"은 대뇌 중간층(intermediate zone), "SVZ"는 뇌실하영역(subventricular zone), "VZ"는 뇌실영역(ventricular zone), "Wild type"은 야생형 mTOR 플라스미드가 삽입된 경우, "Relative intensity value"는 각 경우에 GFP(green fluorescent protein)의 상대적인 세기를 나타낸다.  $**p<0.01$ , and  $****p<0.0001$  (relative to wild type,  $n=6-8$ , two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test). Error bars, s.e.m. CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ/VZ, subventricular and ventricular zone. Scale bars, 100um.

도 17c는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스의 배아 피질 발달과정에서 mTOR 활성 변화를 확인한 결과를 나타낸다.  $**p<0.01$  (relative to wild type,  $n=6-10$ , Student's t-test). Scale bars, 20마이크로미터, Error bars, s.e.m.

도 18a는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 플라스미드로 배아기 14일(E14)에 전기천공한 배아를 태어나게 한 후 flashlight(Electron Microscopy Science, USA)로 형광을 발현하는 마우스만을 분류하고 비디오 뇌전도(Video-Electroencephalography, video-EEG)를 측정하고 발작 이후 라파마이신을 투여하여 효과를 확인하는 모식도를 나타낸다. "in utero electroporation (E14)"는 배아기 14일에 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 플라스미드를 주입하는 모식도, "GFP screening at birth (P0)"는 상기 플라스미드가 주입된 배아를 태어나게 한 후 flashlight(Electron Microscopy Science, USA)로 형광을 발현하는 마우스만을 분류하는 모식도, "Video-EEG monitoring(>3weeks)"는 마우스가 젖을 땀 후(>3weeks) video monitoring 만을 통해 seizure가 확인되면 전극을 식립하여 뇌전도(video-EEG)를 측정하는 모식도를 나타낸다.

도 18b는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서 비디오 뇌전도 감시 결과에 근거한 자발적 발작 유무를 나타낸다. "No. of GFP+pups"는 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입되어 GFP가 발현한 마우스의 개체수, "No. of mice with seizure"은 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입되어 발작을 일으키는 마우스의 개체수를 나타낸다.

도 18c는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서 자발적 발작에 대한 비디오 뇌전도 감시 결과를 나타낸다. "LF"는 좌측 전두엽(left frontal), "RF"는 우측 전두엽(right frontal), "LT"는 좌측 측두엽(left temporal), "RT"는 우측 측두엽(right Temporal)을 의미한다.

도 18d는 야생형의 mTOR 유전자가 도입된 마우스 및 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서의 발작 시기를 나타낸다. ( $n=8-20$  for each group). Error bars, s.e.m.

도 18e는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입되어 자발적 발작을 일으키는 마우스에 라파마이신을 투여한 후 자발적 발작의 횟수를 측정한 결과를 나타낸다.  $*p<0.05$  and  $**p<0.01$  ( $n=7-17$  for each group, one-way ANOVA with Bonferroni's post test)

도 18f는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입되어 자발적 발작을 일으키는 마우스 및 상기 마우스에 라파마이신을 투여한 후 GFP 양성 세포의 크기 변화를 확인한 결과를 나타낸다.  $***p<0.001$  (relative to GFP negative neurons,  $n=20-263$  for each group. Student t-test). Scale bars, 20um. Error bars, s.e.m

도 18g는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서의 발작간극과의 빈도 및 상기 마우스에 라파마이신을 투여한 후 발작간극과의 빈도 변화를 나타낸다.  $*p<0.05$  ( $n=7-17$ , one-way ANOVA with Bonferroni's post test) Error bars, s.e.m

도 18h는 본 발명의 염기서열 변이가 일어난 mTOR 유전자가 도입된 마우스에서의 비경련성 뇌파 발작의 빈도 및 상기 마우스에 라파마이신을 투여한 후 비경련성 뇌파 발작의 빈도 변화를 나타낸다.  $*p<0.05$  ( $n=7-17$ , one-way ANOVA with Bonferroni's post test) Error bars, s.e.m

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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

[0142]

[0143] **실시예 1. 서열분석을 통한 난치성 뇌전증 환자군에서 유전변이 확인**

[0144] 환자 시료로부터 얻어진 게놈 DNA 데이터를 두 가지 분석법 (하이브리드 캡처 시퀀싱 및 PCR 기반 앰플리콘 시퀀싱)에서 공통적으로 발견되는 체성 유전변이만 이후 실험에 사용하였다. 또한 하이브리드 캡처 시퀀싱과 PCR을 기반으로 한 앰플리콘 시퀀싱 두 가지에서 모두 발견된 유전변이 중 선별 기준(depth 100이상, mutated call 3개 이상, mapping quality 30 이상)을 만족하는 유전변이만을 질환 관련 유전자 후보로 선정하였다.

[0145] 1-1: 환자 시료로부터 게놈DNA 추출

[0146] 국소 피질 이형성증(focal cortical dysplasia, FCD), 편측 거대뇌증(hemimegalencephaly, HME), 해마경화증(hippocampal sclerosis, HS), 또는 스테이지웨버신드롬(Sturge weber syndrome, SWS)으로 인한 난치성 뇌전증 수술 환자 77명으로부터 환자의 동의 하에 타액, 뇌조직, 혈액, 및 포르말린 고정 파라핀 포매 뇌조직을 얻었다 (세브란스 병원 소아신경외과 및 소아신경과). 상기 타액 및 뇌조직 시료에서 다음의 각각에 해당하는 DNA 추출 kit를 제조사의 지침대로 사용하여 추출하였다.

[0147] 뇌조직: Qiam mini DNA kit (Qiagen, USA), 혈액: Flexigene DNA kit (Qiagen, USA), 타액: prepIT 2P purification kit (DNAgenotek, USA), 포르말린고정 파라핀 포매 뇌조직: Qiam mini FFPE DNA kit (Qiagen, USA).

[0148] 1-2. 하이브리드 캡처(Hybrid capture) 시퀀싱

[0149] SureDesign online tools(Agilent Technologies)를 이용하여 MTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA에 각각 특이적인 probe를 제작하였다. Agilent library preparation protocols을 제조사의 방법대로 사용하여 시퀀싱 라이브러리를 제작하였다. Hiseq2500(illumina)를 사용하여 시퀀싱을 시행하였다 (중앙 read depth 483x). 시퀀싱 후 나온 데이터는 Broad Institute best practice pipeline(<https://www.broadinstitute.org/gatk/>)을 사용하여 분석할 수 있는 형태의 파일(bam file)로 만들었다.

[0150] 1-3: PCR 기반 앰플리콘 (PCR-based amplicon) 시퀀싱

[0151] illumina design studio (<http://designstudio.illumina.com>)에서 제작한 MTOR, TSC1, TSC2, AKT3, PIK3CA amplicon(Truseq custom amplicon kit,illumina)을 이용하였으며 제조사의 방법대로 라이브러리를 제작하였다. Miseq sequencer(Illumina)를 사용하여 시퀀싱을 하였다 (중앙 read depth 1,368x). BWA-MEM algorithm (<http://bio-bwa.sourceforge.net>)을 사용하여 분석할 수 있는 형태의 파일(bam file)으로 만들었다.

[0152] 1-4: 실험결과

[0153] 하이브리드 캡처 시퀀싱과 PCR을 기반으로 한 앰플리콘 시퀀싱 두가지에서 모두 발견된 유전변이 중 선별 기준 (depth 100이상, mutated call 3개 이상, mapping quality 30 이상)을 만족하는 유전변이를 선정한 결과, MTOR, TSC1, TSC2, AKT3 및 PIK3CA 에서 각각 유전변이가 관찰되었다. : mTOR c.616C>T (p.Arg206Cys) mTOR c.1871G>A (p.Arg624His), c. 4348T>G (p.Tyr1450Asp), c.4447T>C (p.Cys1483Arg), c.5126G>A (p.Arg1709His), c.5930C>A (p.Thr1977Lys), c.6577C>T (p.Arg2193Cys), c.6644C>T (p.Ser2215Phe), 및 c.7280T>A (p.Leu2427Gln); TSC1 c.64C>T (p.Arg22Trp), c.610C>T (p.Arg204Cys), c.2432G>T (p.Arg811Leu); TSC2 c.4639C>T (p.Val1547Ile); AKT3 c.740G>A (p.Arg247His), PIK3CA c.3052G>A (p.Asp1018Asn). 총 77명의 난치성 뇌전증 환자 중 21명에서 뇌 병변 특이적 유전변이를 발견하였다.

**표 2**

[0154]

환자/성별	수술 받은 나이	병리학	MRI 결과	단백질	염기변이	단백질변이	Hybrid Capture % Mutated allele	PCR amplicon sequencing % Mutated allele
FCD 4/여	5yr 2m	Cortical dyslamination, Dysmorphic neurons, consistent with FCDIIa	No abnormal signal intensity	MTOR	c.7280T>C	p.Leu2427Pro	7.94%	12.6%

FCD 6/여	5yr	Cortical dyslamination, Dysmorphic neurons, consistent with FCDIIa	No abnormal signal intensity	MTOR	c.7280T>C	p.Leu242Pro	6.90%	7.28%
FCD 64/여	6yr 9m	Cortical dyslamination, Dysmorphic neurons, consistent with FCDIIa	Cortical dysplasia involving left fronto-parietal lobe	TSC1	c.610C>T	p.Arg204Cys	1.75%	1.0%
HME 66/남	2yr 8m	Cortical laminar disturbance with large giant neurons	Rt. hemimegalencephaly	PIK3CA	c.3052G>A	p.Asp1018Asn	1.03%	2.30%
SWS 77/남	11m	Cortical dyslamination, Dysmorphic neurons, consistent with FCDIIa	Diffuse brain atrophy, Right hemisphere	MTOR	c.616C>T	p.Arg206Cys	3.93%	3.45%
FCD 81/여	12yr	Cortical dyslamination, Dysmorphic neurons, consistent with FCDIIa	No abnormal signal intensity	TSC1	c.64C>T	p.Arg22Trp	2.81%	2.0%
HS86/남	13yr 2m	Hippocampal sclerosis	Suggestive of HS, left.	AKT3	c.740G>A	p.Arg247His	1.72%	10%
FCD 91/여	7yr 1m	Cortical dyslamination, Dysmorphic neurons, consistent with FCDIIa	Volume decrease of the left cerebral hemisphere and multifocal lesions in the WM	MTOR	c.6577C>T	p.Arg2193Cys	2.99%	1.26%
FCD 94/여	10yr 3m	Cortical dyslamination, Dysmorphic neurons, consistent with FCDIIa	Subependymal heterotopia, Rt peri-trigone area	TSC2	c.4639C>T	p.Val1547Ile	1.19%	1.55%
FCD 98/남	14yr 3m	Cortical dyslamination, Dysmorphic neurons, consistent with FCDIIa	No abnormal signal intensity	TSC1	c.64C>T	p.Arg22Trp	2.52%	1.98%
FCD 104/남	1yr 2m	Cortical dyslamination, Dysmorphic neurons, consistent with FCDIIa	Cortical dysplasia involving right precentral and postcentral gyri,	MTOR	c.1871G>A	p.Arg624His	1.80%	4.41%
FCD 105/남	3yr 7m	Cortical dyslamination, Dysmorphic neurons, consistent with FCDIIa	No abnormal signal intensity	MTOR	c.5126G>A	p.Arg1709His	1.63%	1.52%

FCD 107/ 여	7yr 3m	Cortical dyslamination, dysmorphic neurons, balloon cells, consistent with FCDIIb	Cortical Dysplasia involving left occipitoparietal lobe and precentral gyrus	MTOR	c.6644C>T	p.Ser2215Phe	2.41%	2.11%
FCD 113/ 여	10yr	Cortical dyslamination, dysmorphic neurons, balloon cells, consistent with FCDIIb	Cortical dysplasia involving left occipital and parietal lobe	MTOR	c.7280T>A	p.Leu2427Gln	3.05%	5.11%
FCD 116/ 남	7yr 9m	Cortical dyslamination, dysmorphic neurons, balloon cells, consistent with FCDIIb	Cortical dysplasia involving left superior frontal gyrus	MTOR	c.5930C>A	p.Thr1977Lys	3.25%	2.93%
FCD 121/ 남	11m	Cortical dyslamination, dysmorphic neurons, balloon cells, consistent with FCDIIb	Cortical dysplasia involving entire right lobe and left superior/middle frontal gyrus	MTOR	c.4348T>G	p.Tyr1450Asp	2.64%	3.76%
FCD 123/ 여	12yr 4m	Cortical dyslamination, dysmorphic neurons, balloon cells, consistent with FCDIIb	Cortical Dysplasia involving right frontal lobe	TSC1	c.64C>T	p.Arg22Trp	2.21%	1.37%
FCD 128/ 여	4yr 4m	Cortical dyslamination, dysmorphic neurons, balloon cells, consistent with FCDIIb	Cortical dysplasia, right frontal lobe	MTOR	c.4447T>C	p.Cys1483Arg	6.38%	9.77%
HME141/여	1yr 9m	Cortical laminar disturbance with large giant neurons	Lt. hemimegalencephaly	TSC1	c.2432G>T	p.Arg811Leu	1.03%	1.68%
FCD 143/ 여	2yr 10m	Cortical dyslamination, dysmorphic neurons, balloon cells, consistent with FCDIIb	No abnormal signal intensity	MTOR	c.6644C>T	p.Ser2215Phe	2.82%	2.33%
FCD 145/ 여	4yr 1m	Cortical dyslamination, dysmorphic neurons, balloon cells, consistent with FCDIIb	Cortical dysplasia involving left precentral gyrus	MTOR	c.5930C>A	p.Thr1977Lys	1.46%	1.51%

[0155] 실시예 2: 세포를 이용한 mTOR 과활성 확인

[0156] 2-1. 돌연변이 유발 및 mTOR 변이체 작제물(mTOR mutant construct) 제작

[0157] 야생형 mTOR 작제물이 플래그-태그 되어 있는 pcDNA3.1(pcDNA3.1 flag-tagged wild-type mTOR construct)을 켈

리포니아대학교 샌디에고 캠퍼스(University of California, Sandiego)의 쿤 리앙 구안(Kun-Liang Guan) 박사로부터 제공받았다. 상기 작제물은 QuikChange ? site-directed mutagenesis kit(200523, Stratagene, USA)와 함께 mTOR 변이체 벡터(Y1450D, C1483R, L2427Q 및 L2427P)를 제조하기 위해 사용하였다.

[0158] pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP 벡터를 만들기 위하여 우선 다음의 annealing primer [forward primer 5'-AATTCCAATTGCCCGGGCTTAAGATCGATACGCGTA-3'(서열번호 11) 및 reverse primer 5'-ccggtacgcgtatcgatcttaagccccgggcaattgg-3'(서열번호 12)]를 사용하여 pCIG2(CAG promoter-MCS-IRES-EGFP)에 MfeI과 MluI 제한효소 절단부위를 삽입하여 pCIG-C1을 만들었다. 새로 삽입한 MfeI과 MluI 제한효소 절단부위에 다음의 프라이머 [hmTOR-MfeI-flag-F ;gATcACAATTGTGGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGatgc (서열번호 13), hmTOR-MluI-R;tgatcaACGCGTttaccagaaagggcaccagccaatatagc (서열번호 14)]를 사용하여 subcloning을 시행하였고. pCIG-mTOR wild type-IRES-EGFP과. pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP 벡터를 만들었다. 돌연변이 유발을 위해 사용한 프라이머는 표 3에 나타내었다.

표 3

[0159]

이름	프라이머		서열번호
Y1450D	정방향	5'-tcgtgcagtttctcatcccaggtagcctggatc-3'	15
	역방향	5'-gatccaggctacctgggatgagaaactgcacga-3'	16
C1483R	정방향	5'-GGCCTCGAGGCGGCGCATGCGGC-3'	17
	역방향	5'-GCCGCATGCGCCGCTCGAGGCC-3'	18
L2427Q	정방향	5'-GTCTATGACCCCTTGCAAACTGGAGGCTGATG-3'	19
	역방향	5'-CATCAGCCTCCAGTTCTGCAAGGGGTCATAGAC-3'	20
L2427P	정방향	GTCTATGACCCCTTGCCGAAGTGGAGGCTGATG	21
	역방향	CATCAGCCTCCAGTTCCGCAAGGGGTCATAGAC	22

[0159] 2-2. 돌연변이 유발 및 TSC1, TSC2, AKT3 변이체 작제물 제작

[0161] 야생형 TSC1, TSC2 또는 AKT3 작제물이 HA-태그 되어 있는 pcDNA3(pcDNA3 HA-tagged wild-type TSC1, TSC2, AKT3 construct)을 Addgene (USA)에서 구입하여 QuikChange ? site-directed mutagenesis kit(200523, Stratagene, USA)와 함께 변이체 벡터를 제조하기 위해 사용하였다.

[0162] 야생형 TSC1, TSC2 또는 AKT3 작제물이 HA-태그 되어 있는 pcDNA3(pcDNA3 HA-tagged wild-type TSC1, TSC2, AKT3 construct)을 Addgene (USA)에서 구입하였다. pcDNA3 TSC1, TSC2, AKT3 wild-type 벡터에 TSC-1 R22W, R204C의 mutagenesis를 위하여 R22W의 경우에는 TSC-1 R22W-F, R22W-R primer를 사용하였고, R204C의 경우에는 TSC-1 R204C-F, R204C-R primer를 사용하였다. pcDNA3 TSC2 wild-type 벡터에 TSC-2 V1547I의 mutagenesis를 위하여 TSC-2 V1547I-F, V1547I-R primer를 사용하였다.pcDNA3 AKT3 wild-type 벡터에 AKT3 R247H의 mutagenesis를 위하여 R247H-F, R247H-R primer를 사용하였다.

[0163] QuikChange II site-directed mutagenesis kit(200523, Stratagene, USA)를 이용하여 point mutation을 만들었다. 각 프라이머는 site specific point mutation sequence 를 포함하고 있어 PCR 시행시 복제되는 서열에 변이가 생기게 된다. 돌연변이 유발을 위해 사용한 프라이머는 아래 표 4에 나타내었다.

표 4

[0164]

유전자	변이위치		프라이머		서열번호
TSC-1	C64T	R22W	TSC-1 R22W-F	gtcacgtcgtccacacaccagcatg	23
			TSC-1 R22W-R	catgctgggtgtgtgggacgacgtgac	24
	C610T	R204C	TSC-1 R204C-F	ctttcatactgtaatgagaacacaaaaaggagacgaagt tgca	25
			TSC-1 R204C-R	tgcaacttcgtctcctttttgtgttctcattacagtatg aaag	26
TSC-2	G4639A	V1547I	TSC-2 V1547I-F	tctccaacatacaggatggcgatcttgtgggtg	27
			TSC-2 V1547I-R	caccacaagatcgccatcctgtatgttggaga	28
AKT3	G740A	R247H	AKT3 R247H-F	caccatagaaacgtgtgtgggtcctcagagaacacc	29
			AKT3 R247H-R	gggtgtctctcgaggaccacacacgtttctatgggtg	30

- [0165] 2-3. 세포 배양, 형질도입(transfection) 및 웨스턴 블랏
- [0166] TSC-1, TSC-2, mTOR 및 AKT3 유전변이가 mTOR 을 과활성시키는지 확인하기 위하여 HEK293T 세포에 야생형과 변이체 벡터를 형질도입하고 mTOR 유전자의 잘 알려진 표지자인 S6K 단백질의 인산화를 웨스턴 블랏으로 확인하였다.
- [0167] 구체적으로, HEK293T cell(thermoscientific)을 10%의 FBS 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 37<sup>o</sup>, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다. 세포는 jetPRIME 형질도입 시약(jetPRIME transfection reagent)(Polyplus, France)를 이용하여 empty flag-tagged 벡터, flag-tagged mTOR 야생형, flag-tagged mTOR 변이체, HA-tagged TSC1 야생형, HA-tagged TSC2 야생형, HA-tagged AKT3 야생형, HA-tagged TSC1 변이체, HA-tagged TSC2 변이체 및 HA-tagged AKT3 변이체를 각각 형질도입하였다.
- [0168] 세포는 형질도입 후 24시간 동안 DMEM 배지에서 0.1%의 FBS로 serum-starved 하고 1mM의 MgCl<sub>2</sub> 및 CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 PBS에서 37<sup>o</sup>, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 1시간 동안 배양하였다. 세포는 1%의 Triton X-100, Halt 단백질 분해효소(Halt protease) 및 phosphatase inhibitor cocktail(78440, Thermo Scientific, USA)을 포함하는 PBS에서 용해(lyse)하였다. 단백질을 SDS-PAGE로 용해(resolve)하고 PVDF 막(membrane)(Milipore, USA)으로 이동시켰다. 막은 0.1%의 Tween 20(TBST)을 포함하는 TBS에서 3%의 BSA로 블락(block)하였다. 그 후, TBST로 4회 반복하여 세척하였다. 막은 1/1000로 희석된 anti-phospho-S6-ribosomal 단백질(5364, Cell Signaling Technology, USA), anti-S6 ribosomal 단백질(2217, Cell Signaling Technology, USA) 및 anti-flag M2(8164, Cell Signaling Technology, USA)를 포함하는 1차 항체와 함께 TBST에서 4<sup>o</sup>로 각각 밤새 배양하였다. 배양 후, 상기 막은 TBST로 4회 반복하여 세척하였다. 그 후, 1/5000으로 희석된 HRP-linked anti-rabbit 또는 anti-mouse 이차 항체(secondary antibodies)(7074, Cell Signaling Technology, USA)와 함께 상온에서 2시간 동안 배양하였다. TBST를 세척하고, ECL 반응 시약을 이용하여 immunodetection을 수행하였다.
- [0170] 2-4. 변이체를 발현하는 세포에 라파마이신 처리 및 웨스턴 블랏
- [0171] 실시예 2-3에서 변이체를 발현하는 세포에 라파마이신을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다.
- [0172] 구체적으로, 실시예 2-4와 동일한 방법으로, HEK293T cell에 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 변이체를 각각 형질도입하고, 24시간 동안 DMEM 배지에서 Empty DMEM으로 24hr starved 하고 1mM의 MgCl<sub>2</sub> 및 CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 PBS에서 37<sup>o</sup>, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 1시간 동안 배양과 함께 라파마이신을 처리하였다. 이후, 상기 실시예 2-4와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 실시하였다.
- [0173] 2-5. 실험결과
- [0174] 실시예 2-3 및 2-4에 따라, TSC-1의 p.Arg22Trp 및 p.Arg204Cys 유전변이, TSC-2의 p.Val1547Ile 유전변이, AKT3의 p.Arg247His 유전변이, p.Tyr1450Asp, p.Cys1483Arg, p.Leu2427Gln, 및 p.Leu2427Pro 유전변이가 mTOR의 활성화 유도 여부를 확인하고자, HEK293T cell에 mTOR, TSC1, TSC2, AKT3 야생형과 변이체를 포함하는 벡터를 형질도입하고 mTOR 유전자의 잘 알려진 표지자인 S6K 단백질의 인산화를 웨스턴 블랏으로 확인하고, 상기 변이체를 발현하는 세포에 라파마이신을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인한 결과는 도 1 내지 도 5에 나타냈으며 각 변이 유전자별 결과는 다음과 같다.
- [0175] (1) 세포에서 TSC-1 변이체의 활성화 확인
- [0176] 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 TSC-1을 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 증가하였고, 라파마이신 처리 후 인산화가 감소하였음을 확인하였다.
- [0177] (2) 세포에서 TSC-2 변이체의 활성화 확인
- [0178] 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 TSC-2를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 증가하였고, 라파마이신 처리 후 인산화가 감소하였음을 확인하였다.
- [0179] (3) 세포에서 AKT3 변이체의 활성화 확인
- [0180] 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 AKT3를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 증가하였고, 라파마이신 처리 후 인산화가 감소하였음을 확인하였다.



- [0181] (4) 세포에서 mTOR 변이체의 활성 확인
- [0182] 도 4 및 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 증가하였고, 라파마이신 처리 후 인산화가 감소하였음을 확인하였다.
- [0183] **실시예 3: TSC1 및 TSC2 변이체가 mTOR 신호전달계 활성화 확인**
- [0184] 3-1: Immunoprecipitation assay
- [0185] TSC1 및 TSC2 변이체가 TSC complex 형성을 저해하는지 확인하기 위하여 Immunoprecipitation assay를 시행하였다. 실시예 2-3과 동일한 방법으로 준비한 TSC1 및 TSC2 변이체 단백질을 anti-TSC2 항체(3990, Cell signaling Technology, USA) 또는 anti-myc 항체(2276, cell signaling technology, USA)로 overnight incubation 한 후 단백질을 A+G magnetic bead 를 넣고 2시간 동안 incubation 하였다. 이후 1% Triton-X100이 포함된 PBS로 3번 세척 후 37℃ SDS buffer에서 10분 배양하였다. 단백질을 elution 한 후 SDS/PAGE gel에 용해시켜 PVDF 막에 흡착시켰다. 블랏팅은 실시예 2-3과 동일한 방법으로 시행하였다.
- [0186] 실험결과를 도 6에 나타냈다. 도 6에서 볼 수 있듯이, TSC-1의 p.Arg22Trp 및 p.Arg204Cys 변이체는 야생형 TSC-2 단백질과의 결합이 약해져 있음을 확인할 수 있었다. 이를 통해 TSC1 변이체는 TSC complex 형성을 저해하여 mTOR 과활성을 유도함을 알 수 있었다.
- [0187] 3-2: GTP-agarose pull down assay
- [0188] Lysis buffer(20 mM Tris-HCl pH: 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM PMSF, 20  $\mu$ M leupeptin, 10  $\mu$ M aprotinin, 150 mM NaCl and 0.1% Triton X-100)를 사용한 후 초음파를 15초 가하여 세포를 용해시켰다. 이 후 이를 4도, 13000g에서 세포를 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 이 상층액을 온도 4도, 100  $\mu$ M GTP-agarose beads (Sigma-Aldrich, cat no. G9768) 에서 30분간 배양하였다. 이후 lysis buffer로 세척한 bead로 overnight 배양하였다. GTP-bound 단백질을 추출한 후 immunoblot 으로 확인하였다.
- [0189] TSC2가 과발현되는 경우 TSC2의 substrate 인 GTP-bound Rheb protein 이 감소하여야 하지만 TSC2 p.Val1547Ile 변이체의 경우 TSC2의 GAP(GTPase activating protein)의 기능이 감소하여 GTP-bound Rheb protein 이 감소하지 않고 그대로 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도 7). 이를 통해 TSC2 변이체의 경우 GAP domain 기능 이상을 유발하여 mTOR pathway 활성을 유발함을 알 수 있었다.
- [0190] **실시예 4: 변이체 mTOR를 발현하는 세포를 이용한, 약물에 의한 S6K 단백질의 인산화 변화 확인**
- [0191] 4-1. 변이체 mTOR를 발현하는 세포
- [0192] 상기 변이체 mTOR를 발현하는 세포에 약물 (라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물)을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다.
- [0193] 상기 실시예 2-3 및 2-4와 동일한 방법으로, HEK293T cell에 변이체를 형질도입하고, 24시간 동안 DMEM 배지에서 0.1%의 FBS로 serum-starved 하고 1mM의 MgCl<sub>2</sub> 및 CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 PBS에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 1시간 동안 배양한 후, 라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물(Torin1, INK128, AZD8055, GSK2126458)을 처리하였다: Torin은 TOCRIS에서 입수하였고, INK128, AZD8055, GSK2126458 는 Selleckchem에서 입수하였으며, 에베로리무스는 LC laboratory에서 입수하였다. 이후, 실시예 2-4와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 실시하였다.
- [0194] 도 8 및 도 9에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 라파마이신에 의해 저해됨을 확인하였다. 구체적으로, 도 8은 mTOR 변이체 C1483R, L2427P 및 L2427Q에 대한 라파마이신 처리후 S6K 단백질의 인산화 결과를 나타낸 것이다. 도 9는 mTOR 변이체 Y1450D를 발현하는 세포에 라파마이신을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 결과를 나타낸 것이다.
- [0195] 도 10은 mTOR 변이체 L2427P를 발현하는 세포에 라파마이신의 처리 농도를, 0, 25, 50, 100, 200 나노몰(nM)으로 처리한 후에 S6 단백질의 인산화 결과를 나타낸 것이다.
- [0196] 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물 각각을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 도 10에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에서 S6 단백질의 인산화가 에베로리무스 및 화학식 1 내지 4의 화합물에 의해 저해됨을 확인하였다. 50nM 이상의 농도에서 S6 단백질의 인산화가 명확히 감소한 것을 확인하였다.

- [0197] 4-2. 다양한 mTOR 저해제 처리 S6K 단백질의 인산화 변화 확인
- [0198] 실시예 3-1과 동일한 방법으로 다양한 변이체 mTOR를 발현하는 세포에 약물로서 라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물)을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 구체적으로 실험에 사용한 mTOR 변이체는 R624H, Y1450D, C1483R, R1709H, Y1977K, S2215F, L2427P 및 L2427Q 이었다.
- [0199] 구체적으로, 변이체 mTOR를 발현하는 세포에 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물 각각을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 mTOR를 발현하는 모든 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 에베로리무스 및 화학식 1 내지 4의 화합물에 의해 저해됨을 확인하였으며, 그 결과를 도 11a 및 11b에 나타냈다.
- [0200] **실시예 5: TSC1 또는 TSC 2 변이체를 발현하는 세포를 이용한, 약물에 의한 S6K 단백질의 인산화 변화 확인**
- [0201] 실시예 2와 동일한 방법으로, HEK293T cell에 TSC1 또는 TSC 2 변이체를 형질도입하고, 24시간 동안 DMEM 배지에서 0.1%의 FBS로 se-rum-starved 하고 1mM의  $MgCl_2$  및  $CaCl_2$ 를 포함하는 PBS에서 37℃, 5%  $CO_2$  조건으로 1시간 동안 배양하였다.
- [0202] 그런 후에, 라파마이신, 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물(Torin1, INK128, AZD8055, GSK2126458)을 처리하였다: Torin은 TOCRIS에서 입수하였고, INK128, AZD8055, GSK2126458 는 Selleckchem에서 입수하였으며, 에베로리무스는 LC laboratory에서 입수하였다. 이후, 실시예 4와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 실시하였다.
- [0203] 상기 변이체 TSC1 또는 TSC2를 발현하는 세포에 라파마이신을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였으며, 상기 실험결과로서 변이체 TSC1에 관한 결과를 도 12a 및 12b에 나타냈으며, 변이체 TSC2에 관한 결과를 도 13a 및 13b에 나타냈다.
- [0204] 도 12a 및 12b 및 도 13a 및 13b에 나타낸 바와 같이, 변이체 TSC1 또는 TSC2를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 라파마이신에 의해 저해됨을 확인하였다. 상기 변이체 TSC1 또는 TSC2를 발현하는 세포에 에베로리무스, 화학식 1 내지 4의 화합물 각각을 처리한 후 S6K 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 TSC1 또는 TSC2를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화가 에베로리무스 및 화학식 1 내지 4의 화합물에 의해 저해됨을 확인하였다.
- [0205] **실시예 6: FCD 환자의 뇌조직 절편의 면역 염색**
- [0206] 유전변이를 가진 FCDII 환자가 mTOR 과활성을 보이는지 확인하기 위하여 S6 인산화 단백질과 NeuN(신경세포 표지자)에 대한 항체로 p.Leu2427Pro 유전변이를 가진 FCD 환자의 뇌조직 절편에서 면역염색을 시행하였다.
- [0207] 대뇌피질 발달기형이 아닌 뇌 시료(Non-MCD brain specimen)는 뇌종양(glioblastoma)을 갖는 환자의 종양이 없는 부분(tumor free margin)에서 수술실에서 채집하였고 병리학적으로 종양이 없는 정상 뇌로 확정하였다. 외과적 조직 덩어리(surgical tissue block)는 밤새 새롭게 준비한 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde에서 고정하고, 20% buffered sucrose에서 밤새 동결방지(cryoprotect) 되었고 gelatin-embedded 조직 덩어리(7.5% gelatin in 10% sucrose/PB)로써 -80℃에서 보관하였다. 동결절편(Cryostat-cut section)(10um 두께)은 채집되어 유리 슬라이드(glass slide)위에 놓았다. 파라핀을 제거한 FFPE 슬라이드는 citrate buffer로 항원부위 회복을 시행하였다. 이후 상온에서 한 시간 동안 PBS-GT(0.2% gelatin 및 0.2% Triton X-100 in PBS)로 차단(block)하고 다음의 항체들로 염색(stain)하였다: 인산화된 S6 ribosomal 단백질에 대한 토끼 항체(rabbit antibody to phosphorylated S6 ribosomal protein)(Ser240/Ser244)(1:100 dilution; 5364, Cell signaling Technology) 및 NeuN에 대한 마우스 항체(mouse antibody to NeuN)(1:100 dilution; MAB377, Millipore). 샘플은 PBS로 세척하고 다음의 이차 항체로 염색(stain)하였다: 마우스에 대한 Alexa Fluor 555-conjugated 염소 항체(Alexa Fluor 555-conjugated goat antibody to mouse)(1:200 dilution; A21422, Invitrogen) 및 토끼에 대한 Alexa Fluor 488-conjugated 염소 항체(Alexa Fluor 488-conjugated goat antibody to rabbit)(1:200 dilution; A11008, Invitrogen). Mounting 용액(mounting solution)(P36931, Life technology)에 포함된 DAPI는 핵 염색에 사용하였다. Leica DMI3000 B 도립 현미경(inverted microscope)을 이용하여 이미지를 얻었다. NeuN에 양성인 세포 수는 10x 대물렌즈(objective lens)를 이용하여 측정하였다; 뉴런이 풍부한 지역(regime) 내에서 하나의 시료(subject)당 4 내지 5 필드를 얻었고, 지역당 100개 이상의 세포를 기록하였다. DAPI-양성 세포의 수는 전체 세포 수를 나타낸다. 뉴런세포 크기는 NeuN 양성 세포에서 ImageJ software의 자동화된 카운팅 프로토콜(automated counting protocol of ImageJ software)(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)을 이용하여 측정하였으며, 상기 실험결과를 도 14a 내지 14f에 나타냈다.



- [0208] 도 14a 내지 14f에 나타난 바와 같이, TSC1 및 TSC2 유전변이를 가진 FCD64,81,94,98,123 환자에서 인산화된 S6 단백질을 가진 신경세포의 수가 증가되었음을 확인하였다. 반면에, Non-FCD 뇌조직에서는 이러한 증가가 관찰되지 않았다. 도 14b 및 도 14d에서 알 수 있듯이 S6 인산화가 증가한 세포의 비율이 증가하였고 또한 도 14e 및 14f에서 알 수 있는 바와 같이, 병리조직에서 S6단백질의 인산화가 증가한 신경세포의 크기를 측정하였고 그 크기가 증가하였음을 확인하였다.
- [0209] **실시예 7: TSC1 또는 TSC2 마우스 모델 제작**
- [0210] 7-1: TSC1 또는 TSC2를 타겟으로 하는 CRISPR/Cas9 vector 제작
- [0211] pX330 플라스미드(Addgene, #42230)를 구입하여 초기 템플레이트로 사용하였다. QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 sgRNA(single guide ribonucleotide) 클로닝 사이트의 BbsI 제한효소 부위(GAAGAC)를 BsaI(GGTC)로 전환하였다. 이후 TSC1, TSC2를 타겟팅하는 sgRNA를 각각 삽입하였으며 그 염기서열은 아래와 같다.
- [0212] TSC1 : 5'-TGCTGGACTCCTCCACTG-3' (서열번호 31)
- [0213] TSC2 : 5'-AATCCCAGGTGTGCAGAAGG-3' (서열번호 32)
- [0214] 이후 mcherry 형광 레포터가 포함된 플라스미드(U6-sgRNA-Cas9-IRES-mCherry)를 만들기 위하여 IRES3-mCherry-CL 플라스미드를 템플레이트로 사용하여 PCR 증폭 후 pX330 플라스미드의 Cas9 서열과 NLS 서열 사이에 삽입하였다.
- [0215] 7-2. 마우스모델 제작
- [0216] 임신중인 마우스(E14)(다물사이언스)를 아이소플루레인(isoflurane) (0.4L/min of oxygen and isoflurane vaporizer gauge 3 during surgery operation)으로 마취하였다. 자궁각(uterine horn)이 노출되고, 개개 배아(embryo)의 측뇌실(lateral ventricle)에 실시예 19-1에서 제조한 TSC1 또는 TSC2를 타겟으로 하는 U6-sgRNA-Cas9-IRES-mCherry 플라스미드와 붉은 형광을 강화하기 위하여 pCAG-Dsred 플라스미드(addgene #11151)를 구입하여 3:1의 비율로 희석하여 사용하였다. 희석된 두가지 플라스미드를 2 내지 3 $\mu$ g과 결합한 Fast Green(F7252, Sigma, USA) 2 $\mu$ g/ml을 pulled 모세관(pulled glass capillary)를 이용하여 주입하였다. 플라스미드는 배아의 머리에 900ms의 간격에 100ms의 5번 전기 펄스인 ECM830 eletroporator(BTX-harvard apparatus)로 50V를 방전하여 전기천공(electroporation) 하였다. 전기천공한 배아를 태어나게 한 후 flashlight(Electron Microscopy Science, USA)로 형광을 발현하는 마우스만을 분류하였다.
- [0217] **실시예 8: TSC1 또는 TSC2 마우스 모델에서 신경세포 이동 분석**
- [0218] 실시예 7-2에서 제작한 성인 마우스(P>56)에서 뇌를 수확하였으며, 밤새 새롭게 준비한 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde에서 고정하고, 30% buffered sucrose에서 밤새 동결방지 되었고 gelatin-embedded 조직 덩어리(7.5% gelatin in 10% sucrose/PB)로써 -80 °C에서 보관하였다.
- [0219] 동결절편(30 $\mu$ m 두께)을 채집하여 유리 슬라이드 위에 놓았다. Mounting 용액(mounting solution)(P36931, Life technology)에 포함된 DAPI는 핵 염색에 사용하였다. 자이스 LSM780 공초점 현미경(Zeiss LSM780 confocal microscope)을 이용하여 이미지를 얻었다. 피질(cortex) 내 전기천공된 세포의 분포를 보여주는 형광 강도(fluorescence intensity)는 명암 값(gray value)으로 전환하고 LayerII/III에서 LayerV/VI까지 ImageJ software(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)를 이용하여 측정하였다.
- [0220] 도 15a 및 도 15b 에서 알 수 있는 바와 같이, TSC 마우스 모델의 뇌조직 절편에서 dsRed 양성인 신경세포가 Layer II/III에서 감소되었고 대뇌 LayerIV,LayerV/VI에 증가되어 있음을 확인하였다. 이를 통하여, 신경세포의 이동에 문제가 있음을 입증하였다.
- [0221] **실시예 9: 비디오-뇌전도감시(Video-Electroencephalography monitoring)**
- [0222] 마우스가 젖을 땀 후(>3weeks), Video monitoring만을 통해 Seizure 발생 유무를 확인한 후 뇌전도 측정을 위해 전극을 식립하는 수술을 진행하였다. 전극은 경막막 상층(epidural layer)에 위치하도록 하였으며 천정점(Bregma)를 기준으로 전두엽 부위에 2개(AP+1.8mm, ML $\pm$ 1.5mm), 측두엽부위에 2개(AP-2.4mm, ML $\pm$ 2.4mm) 소뇌 부위에 1개를 식립하여 총 5개의 전극을 식립하였다. 4일간의 회복기간을 가진 후 저녁 6시부터 새벽 2시의 시간에 마우스당 2~5일간(하루 6시간) 측정을 시행하였다. 신호는RHD2000 amplifier, board(Intan technologies,USA)를 이용해 증폭하였으며 MATLAB EEGLAB(<http://sccn.ucsd.edu/eeglab>) 을 이용하여 분석하였

다.

[0223] CRISPR/Cas9 플라스미드를 이용하여 TSC1 또는 TSC2 유전자를 대뇌 국소적으로 제거한 쥐에서 간질과를 동반한 자발적 발작을 나타냈고, 간질과는 높은 진폭의 고주파, 높은 진폭의 극서파, 저진폭의 고주파를 보였다. 이러한 자발적 발작을 나타내는 마우스는 긴장기, 간대기 후발작기로 이루어진 전신 긴장-간대성 발작을 보이며 이는 FCDII 환자와 유사한 것임을 확인하였다. 또한, 긴장의 뇌파는 저전압, 고주파의 동조된 다주파를 보이고 간대기의 뇌파는 고전압의 일정한 형태를 보이고, 후발작기는 동조된 감쇠 진폭을 보이는 것을 확인하였다. 발작 빈도는 하루 약 10회 정도였다.

[0224] **실시예 10: TSC1 또는 TSC2 마우스 모델의 신경세포 크기 분석**

[0225] 뇌전도 감시가 끝난 마우스를 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde로 Masterflex compact peristaltic pump(cole-parmer international, USA)를 이용해 조직관류(perfusion)를 시행하여 뇌를 적출하였다. 새롭게 준비한 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde에서 고정하고, 30% buffered sucrose에서 밤새 동결방지 되었고 gelatin-embedded 조직 덩어리(7.5% gelatin in 10% sucrose/PB)로써 -80℃에서 보관하였다. 동결절편(30um 두께)을 채집하여 유리 슬라이드 위에 놓았다. 상온에서 한 시간 동안 PBS-GT(0.2% gelatin 및 0.2% Triton X-100 in PBS)로 차단(block)하고 다음의 항체들로 염색(stain)하였다: NeuN에 대한 마우스 항체(mouse antibody to NeuN)(1:500 dilution; MAB377, Millipore). 샘플은 PBS로 세척하고 다음의 이차 항체로 염색(stain)하였다: 마우스에 대한 Alexa Fluor 488-conjugated 염소 항체(Alexa Fluor 488-conjugated goat antibody to mouse)(1:200 dilution; A11008, Invitrogen), Mounting 용액(mounting solution)(P36931, Life technology)에 포함된 DAPI는 핵 염색에 사용하였다. 자이스 LSM780 공초점 현미경(Zeiss LSM510 confocal microscope)을 이용하여 이미지를 얻었다. 신경세포의 크기는 ImageJ software(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)를 이용하여 측정하였다

[0226] CRISPR/Cas9 플라스미드를 이용하여 TSC1 또는 TSC2 유전자를 대뇌 국소적으로 제거한 마우스에서 신경세포는 정상 신경세포에 비해 크기가 유의미하게 증가하였으나, sgRNA 없이 플라스미드만 전기천공한 마우스 신경세포는 크기변화가 없는 것을 확인하였다. 이는 대뇌피질 발달기형 환자에서 나타나는 dysmorphic neuron과 같은 양상이다.

[0227] **실시예 11: TSC2 마우스모델에서 약물 투여로 인한 자발적 발작 변화 확인**

[0228] 자발적 발작을 나타내는 상기 동물모델에 대하여 라파마이신을 투여한 후 그 변화를 확인하였다. 구체적으로, 라파마이신 (LC Labs, USA)를 100% 에탄올에 20mg/ml로 희석하여 원액을 만든 후 -20℃에서 보관하였다. 라파마이신을 주사하기 전에 원액을 5% polyethyleneglycol400 과 5% Tween80 에 희석하여 1mg/ml 라파마이신과 4% 에탄올 용액을 만들었다. 만들어진 용액을 복강내 주사법으로 1 내지 10mg/kg의 농도로 2주간 투여하였다 (10mg/kg/d 복강주사, 2주 동안).

[0229] 도 16에서 알 수 있는 바와 같이, 라파마이신의 투여로 인하여 상기 동물모델에서의 자발적 발작이 거의 나타나지 않음을 확인하였다.

[0230] **실시예 12: 동물모델에서 mTOR 과활성이 대뇌발달에 미치는 영향**

[0231] 빈번하게 관찰되는 p.Leu2427Pro 유전변이를 선택하여 동물모델에서 기능 분석을 하기로 선택하였다. mTOR 변이체 작제물을 쥐의 배아에 전기천공으로 도입하여 대뇌신경세포이동과 S6 단백질의 인산화를 조사하였다.

[0232] 12-1: 동물 모델 제조

[0233] 임신중인 마우스(E14)(다물사이언스)를 아이소플루레인(isoflurane) (0.4L/min of oxygen and isoflurane vaporizer gauge 3 during surgery operation)으로 마취하였다.

[0234] 자궁각(uterine horn)이 노출되고, 개개 배아(embryo)의 측뇌실(lateral ventricle)에 실시예 2에서 제조한, mTOR C1483Y, mTOR E2419K 및 mTOR L2427P 변이체를 발현하는 플라스미드 2 내지 3ug과 결합한 Fast Green(F7252, Sigma, USA) 2ug/ml을 pulled 모세관(pulled glass capillary)를 이용하여 주입하였다. 플라스미드는 배아의 머리에 900ms의 간격에 100ms의 5번 전기 펄스인 ECM830 eletroporator(BTX-harvard apparatus)로 50V를 방전하여 전기천공(electroporation) 하였다.

[0235] 12-2: 마우스 모델의 이미지 분석

[0236] 배아 마우스는 배아기 14일(E14)에 전기천공 되었고, 그 후 발달 4일 후(E18)에 뇌를 수확하였으며, 밤새 새롭

게 준비한 phosphate-buffered(PB) 4% paraformaldehyde에서 고정하고, 30% buffered sucrose에서 밤새 동결방지 되었고 gelatin-embedded 조직 덩어리(7.5% gelatin in 10% sucrose/PB)로써 -80°에서 보관하였다.

[0237] 동결절편(30um 두께)을 채집하여 유리 슬라이드 위에 놓았다. Mounting 용액(mounting solution)(P36931, Life technology)에 포함된 DAPI는 핵 염색에 사용하였다. Leica DMI3000 B 도립 현미경(inverted microscope) 또는 자이스 LSM510 공초점 현미경(Zeiss LSM510 confocal microscope)을 이용하여 이미지를 얻었다. 피질(cortex) 내 전기천공된 세포의 분포를 보여주는 형광 강도(fluorescence intensity)는 명암 값(gray value)으로 전환하고 뇌실 지역(Ventricular zone, VZ)부터 피질 판(Cortical plate, CP)까지 ImageJ software(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)를 이용하여 측정하였다. 멘더의 공존 분석(Mander's co-localization analysis)([http://fiji.sc/wiki/index.php/Colocalization\\_Analysis](http://fiji.sc/wiki/index.php/Colocalization_Analysis))는 Fiji software를 이용하여 수행하였다.

## [0238] 12-3: 실험결과

[0239] 도 17a에서와 같이, IRES-GFP 표지자를 가지는 mTOR 억제형과 p.Leu2427Pro 변이체 작제물을 대뇌 발달 중인 배아 14일째에 전기천공법을 이용하여 도입한 후 배아 18일째 대뇌 신경세포 이동과 GFP 양성 신경세포의 S6 인산화를 측정하였다.

[0240] 도 17b에서 알 수 있는 바와 같이, mTOR 변이체 작제물을 발현하는 쥐의 뇌조직 절편에서 GFP 양성인 신경세포가 대뇌피질판(cortical plate)에 감소되어 있고 대뇌 중간층(intermediate zone) 과 뇌실하영역(subventricular zone) 뇌실영역(ventricular zone)에 증가되어 있음을 확인하였다. 이를 통하여, 신경세포의 이동에 문제가 있음을 입증하였다.

[0241] 또한, 도 17c에서 알 수 있는 바와 같이, mTOR 변이체 작제물을 발현하는 GFP 양성세포가 S6 단백질의 인산화가 증가된 세포와 공존하는 것을 확인하였다. 이를 통하여, 발견된 유전변이가 동물 내에서 mTOR 인산화 효소의 활성을 증가시키고 대뇌피질의 발달을 저해한다는 것을 입증하였다.

## [0242] 실시예 13: 동물모델에서 mTOR 과활성이 환자의 질병 표현형 확인

### [0243] 13-1. 동물모델에서 자발적 발작 또는 비정상적 신경 세포 확인

[0244] 도 18a에서와 같이, 전기천공에 의해 mTOR 변이체 작제물을 발현하는 쥐가 자발적인 발작을 보이는 지 확인하기 위하여 배아기 14일째 전기천공법으로 변이체 작제물을 도입한 후 배아가 태어난 직후 이 작제물이 잘 발현하는 쥐 태아를 GFP 발현 유무로 선별하였다.

[0245] 생후 3주 이후부터 비디오 뇌전도 감시를 시행하였다. 태아를 어미와 분리한 후 하루에 12시간 비디오 감시를 통해서 긴장-간대발작이 시작되는지를 확인하였다. 그 후 발작을 보이는 쥐를 하루 6시간 2일 이상 비디오-뇌전도 감시를 실행하여 간질파를 보이는 자발적 발작에 대해서 조사하였다.

[0246] 구체적으로 마우스가 젖을 땀 후(>3weeks), Video monitoring만을 통해 Seizure 발생 유무를 확인한 후 뇌전도 측정을 위해 전극을 식립하는 수술을 진행하였다. 전극은 경막상층(epidural layer)에 위치하도록 하였으며 천정점(Bregma)를 기준으로 전두엽 부위에 2개(AP+2.8mm, ML±1.5mm), 측두엽 부위에 2개(AP-2.4mm, ML±2.4mm) 소뇌부위에 1개를 식립하여 총 5개의 전극을 식립하였다. 4일간의 회복기간을 가진 후 저녁 6시부터 새벽 2시의 시간에 마우스당 2~5일간(하루 6시간) 측정을 시행하였다. 신호는 amplifier(GRASS model 9 EEG/Polysomnograph, GRASS technologies, USA)에 의해 증폭되었으며 pCLAMP program (Molecular Devices, USA)을 이용하여 분석하였다. 또는 RHD2000 amplifier, board(Intan technologies, USA)와 MATLAB EEGLAB(<http://sccn.ucsd.edu/eeglab>)을 이용하여 분석하였다.

[0247] 발작간극과 비경련성 뇌파발작의 빈도를 측정하기 위하여 10 내지 12시간정도 촬영한 비디오 뇌전도 데이터를 사용하였고 이 데이터로부터 1시간 간격으로 1분의 데이터를 추출하여 분석하였다.

[0248] 발작간극과 비경련성 뇌파발작의 빈도는 쥐의 유전형을 모르는 관찰자가 측정하였다. 발작간극과는 200ms 이하의 간질모양의 파가 일정한 간격으로 나타나며 배경뇌파에 비해 2배이상의 진폭을 가진 경우로 정의하였고 비경련성 뇌파발작은 적어도 2개 이상의 이어진 극서파(1~4Hz)가 배경뇌파에 비해 2배이상의 진폭으로 나타내며 4개의 전극에서 모두 관찰되는 경우로 정의하였다.

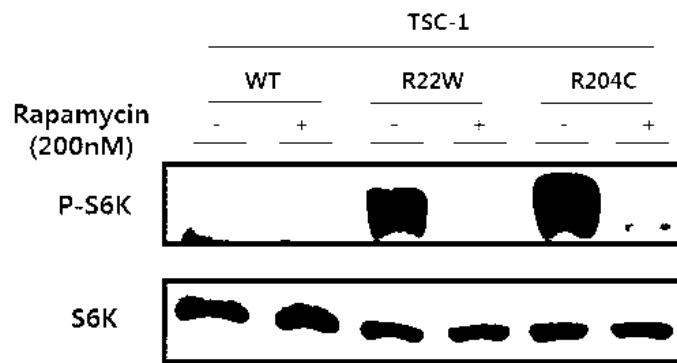
[0249] 도 18b 및 도 18c에서 알 수 있는 바와 같이, 놀랍게도 변이체 mTOR 작제물을 발현하는 쥐의 90% 이상이 간질파를 동반한 자발적 발작을 나타냈고, 간질파는 높은 진폭의 고주파, 높은 진폭의 극서파, 저진폭의 고주파를 보였다. 도 12b에서 알 수 있는 바와 같이, 변이체 작제물을 발현하는 쥐에서 발작간극과 역시 나타나는 것을 확

인하였다. 이러한 자발적 발작을 나타내는 마우스는 긴장기, 간대기 후발작기로 이루어진 전신 긴장-간대성 발작을 보이며 이는 FCDII 환자와 유사한 것임을 확인하였다. 또한, 긴장의 뇌파는 저전압, 고주파의 동조된 다주파를 보이고 간대기의 뇌파는 고전압의 일정한 형태를 보이고, 후발작기는 동조된 감쇠 진폭을 보이는 것을 확인하였다. 하지만, 도 18b에서 알 수 있는 바와 같이, 야생형 mTOR 억제제를 발현하는 쥐는 자발적 발작이나 간질파를 보이지 않았다.

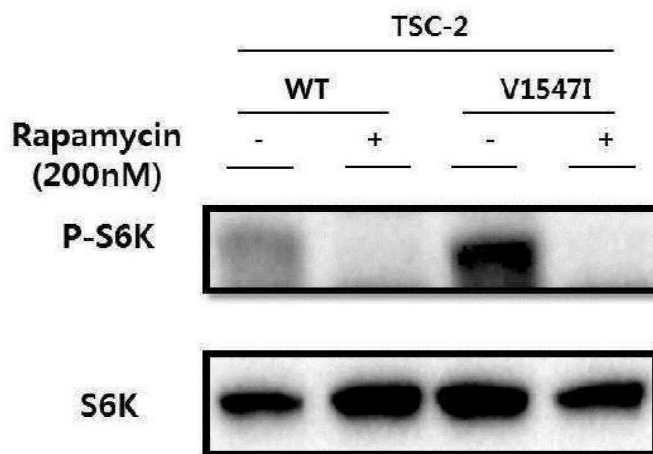
- [0250] p.Leu2427Pro 변이체 억제제를 발현하는 쥐는 평균적으로 생후 약 6주경에 발작이 시작되었으며(도 18d), 이는 사람으로 환산했을 때 FCDII 환자에서 발작이 나타나는 시기(약4세)와 비슷한 것을 확인하였다. 도 18e에서 알 수 있는 바와 같이, 발작의 빈도는 약 하루 6회였다.
- [0251] 발작에 대한 확인이 끝난 후, mTOR 변이체 억제제를 발현하는 쥐가 거대 신경세포와 같은 비정상적인 신경세포 형태를 보이는지 조사하였다.
- [0252] 그 결과, mTOR 변이체 억제제를 전기천공한 대뇌영역의 GFP 양성세포의 세포크기가 매우 증가되어있는 것을 관찰하였다(도 18f).
- [0253] 13-2. 약물 투여로 인한 자발적 발작 또는 비정상적 신경 세포 변화 확인
- [0254] 자발적 발작 또는 비정상적 신경 세포를 나타내는 상기 동물모델에 대하여 라파마이신을 투여한 후 그 변화를 확인하였다.
- [0255] 구체적으로, 라파마이신과 에베로리무스(LC Labs,USA)를 100% 에탄올에 20mg/ml로 희석하여 원액을 만든 후 -20℃에서 보관하였다. 라파마이신을 주사하기 전에 원액을 5% polyethleneglycol400 과 5% Tween80 에 희석하여 1mg/ml 라파마이신과 4% 에탄올 용액을 만들었다. 만들어진 용액을 복강내 주사법으로 1 내지 10mg/kg의 농도로 2주간 투여하였다(10mg/kg/d 복강주사, 2주 동안).
- [0256] Torin1(TOCRIS)을 100% N-methyl-2-pyrrolidone에 25mg/ml로 희석하여 원액을 만든 후 -20℃에서 보관하였다. 이 후 원액을 50% PEG-400에 희석하여 1mg/ml로 농도의 용액을 만들었다. 만들어진 용액을 복강내 주사법으로 1~10mg/kg의 농도로 2주간 투여하였다(10mg/kg/d 복강주사, 2주 동안).
- [0257] INK128(Selleckchem)분말을 5% 1-methyl-2-pyrrolidone, 15% polyvinylpyrrolidone K30, 및 80% 물에 희석하여 0.1mg/ml의 용액을 만든 후 2주 동안 0.3 내지 1.0mg/kg 로 경구투여 하였다.
- [0258] AZD8055(Selleckchem) 분말을 captisol(Cydex)에 녹여 30% 원액(w/v)을 만든 후 2.5 내지 20mg/kg로 2주간 경구 투여하였다.
- [0259] GSK2126458을 1% DMSO/30% polyethylene glycol/1% Tween 80에 녹여 0.1mg/ml의 원액을 만든 후 0.1 내지 1.0mg/kg의 농도로 2주간 경구 투여한다.
- [0260] 도 18e, 18g 및 18h에서 알 수 있는 바와 같이, 라파마이신의 투여로 인하여 상기 동물모델에서의 자발적 발작이 거의 나타나지 않으며, 발작간극과 비경련성 뇌파발작의 빈도가 극적으로 줄어드는 것을 확인하였다.
- [0261] 나아가, 도 18f에서 알 수 있는 바와 같이, 라파마이신의 투여로 인하여 상기 동물모델에서의 비정상적 세포의 크기 또한 감소하는 것을 확인하였다.

도면

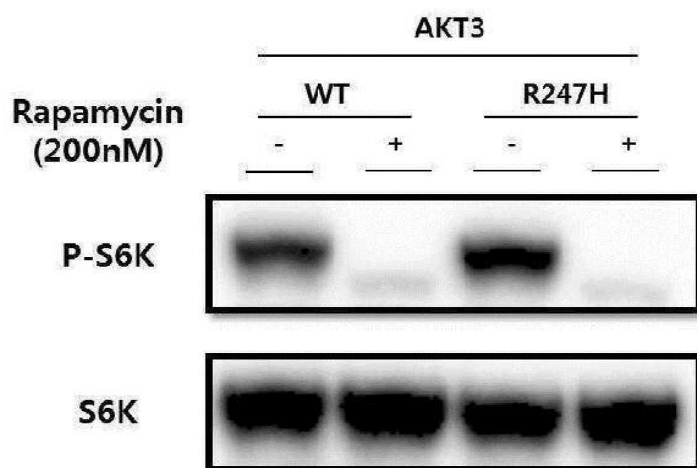
도면1



도면2

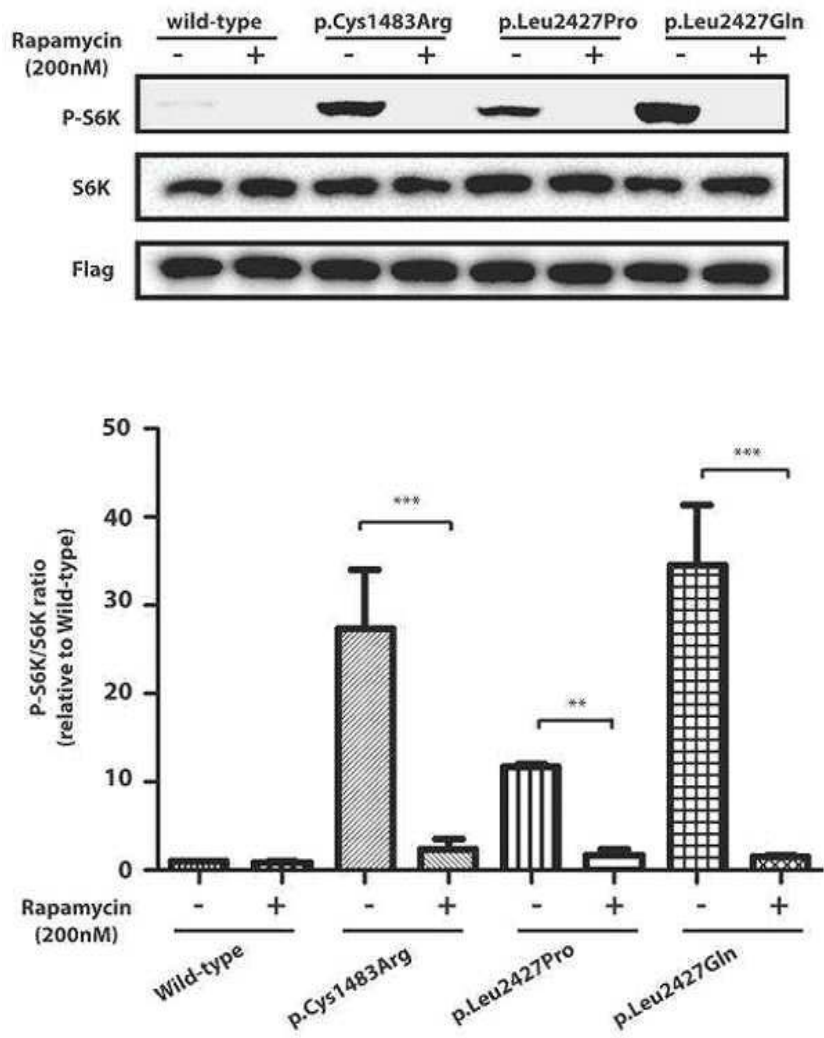


도면3

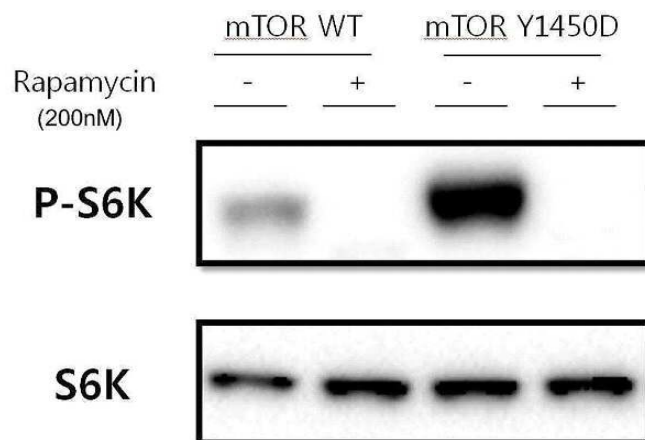




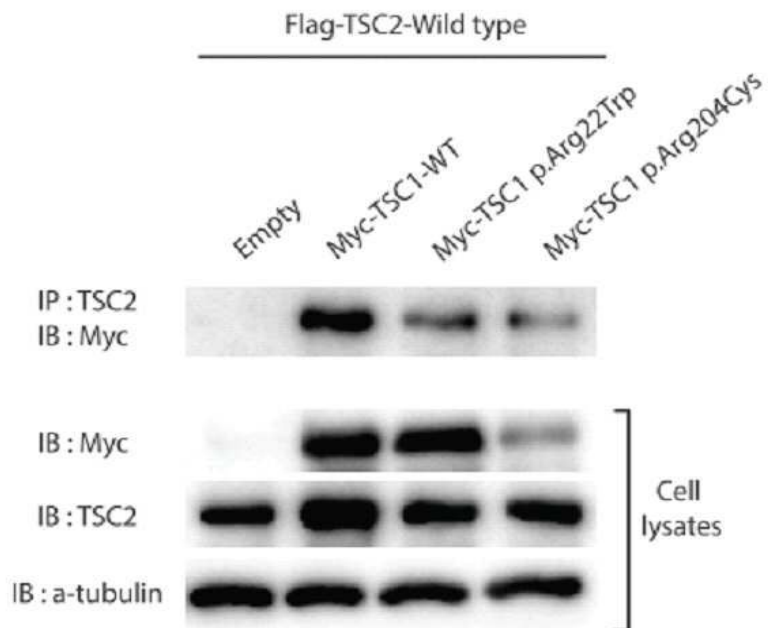
도면4



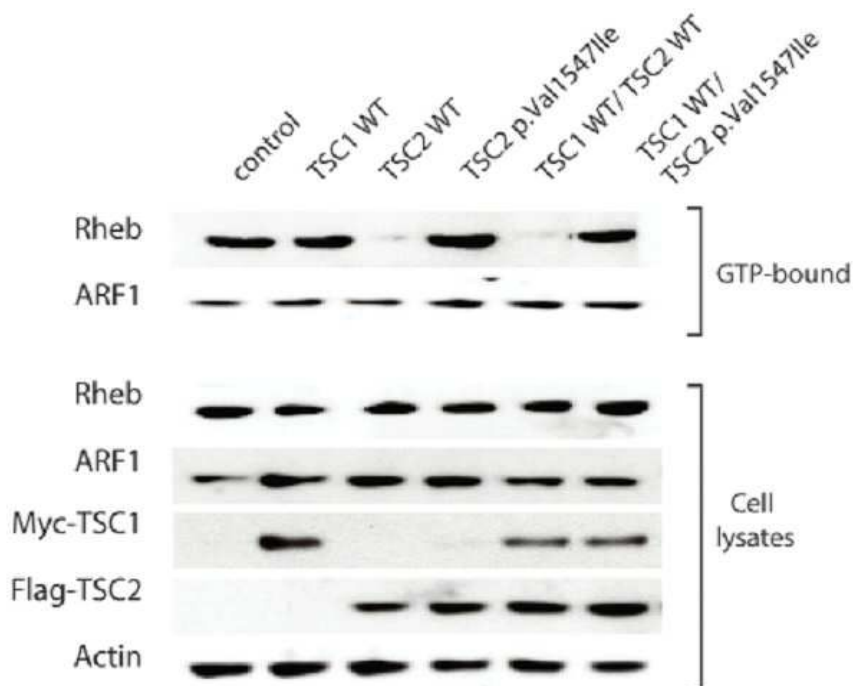
도면5



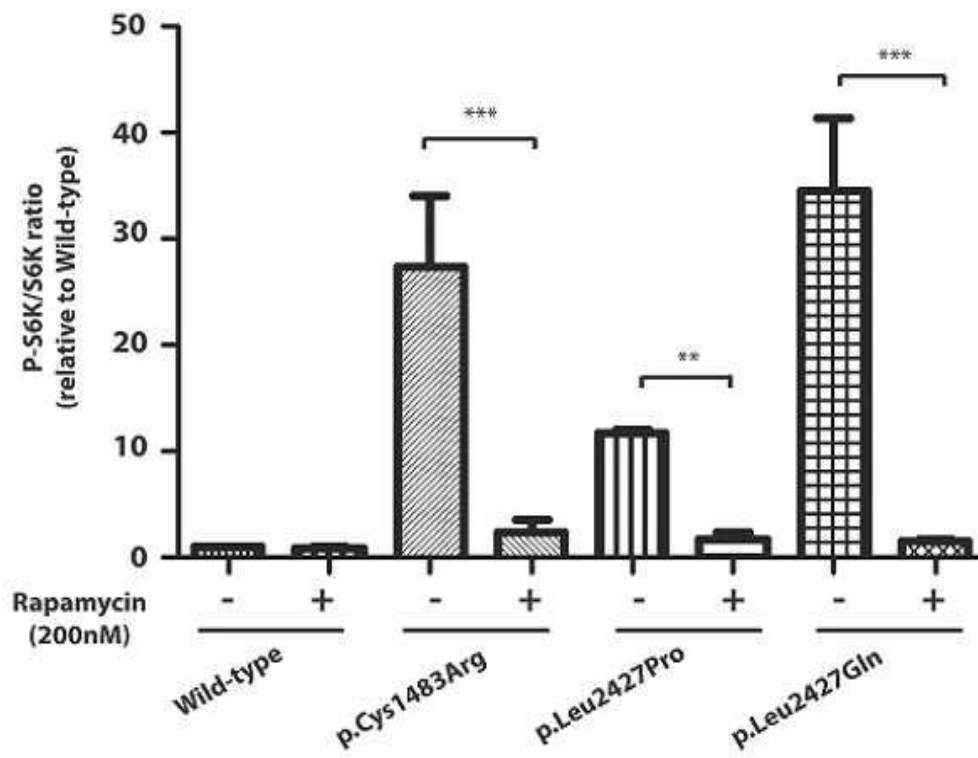
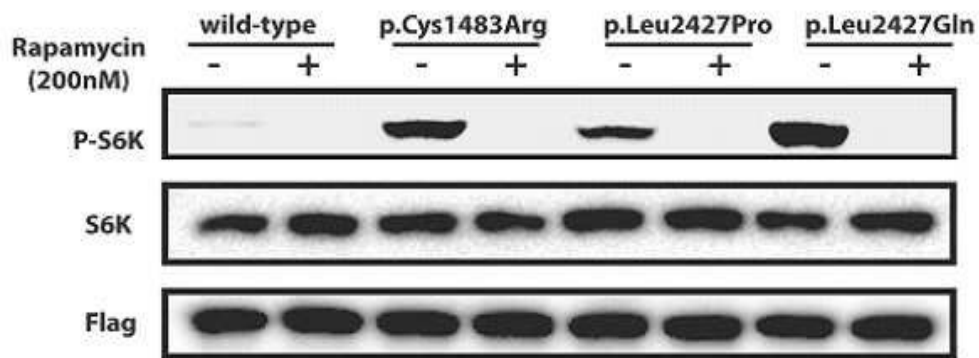
도면6



도면7

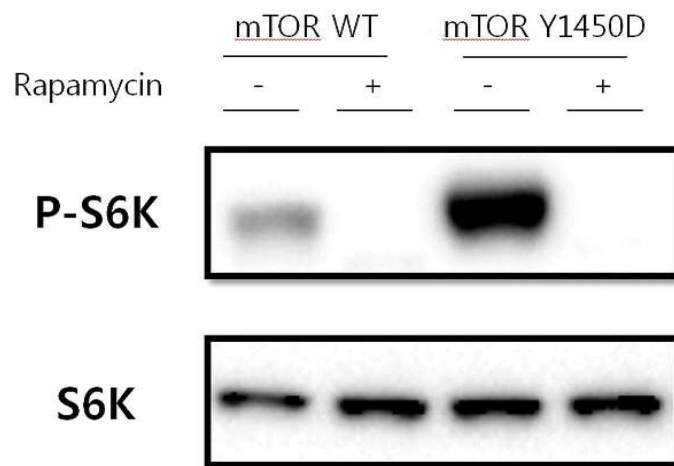


도면8

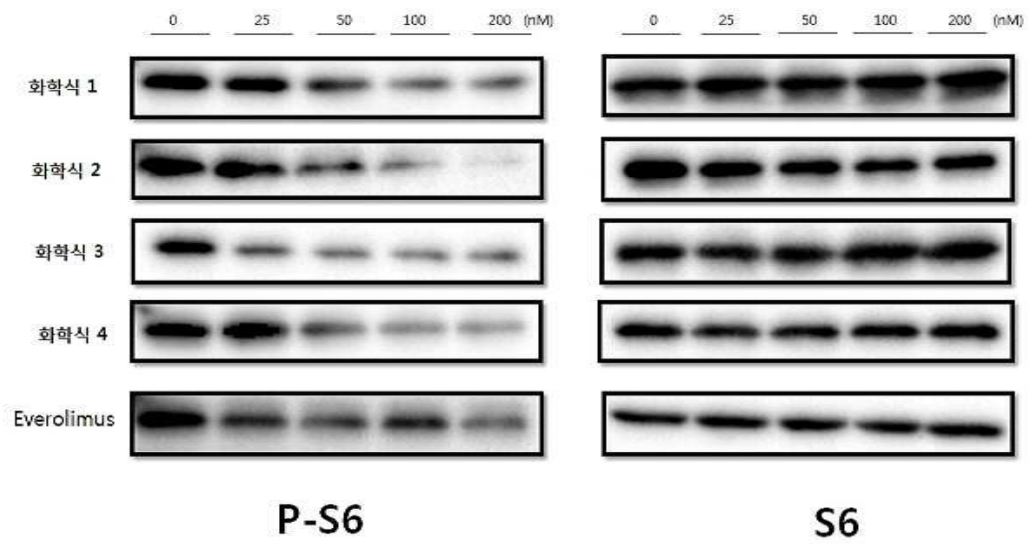




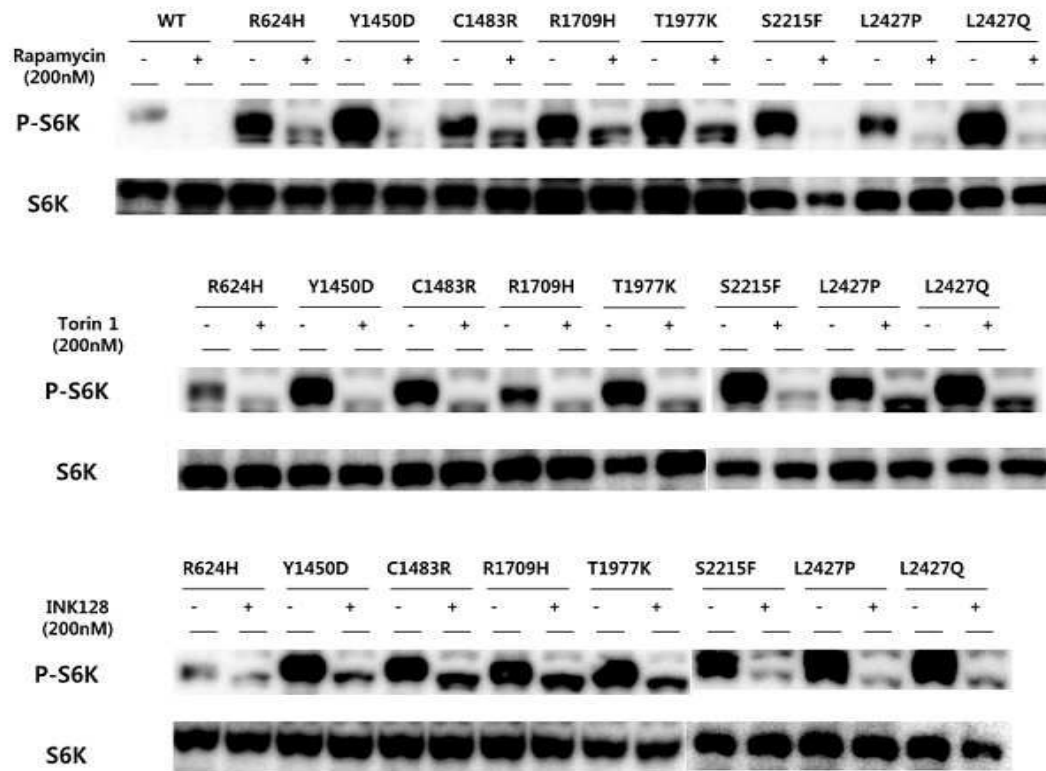
도면9



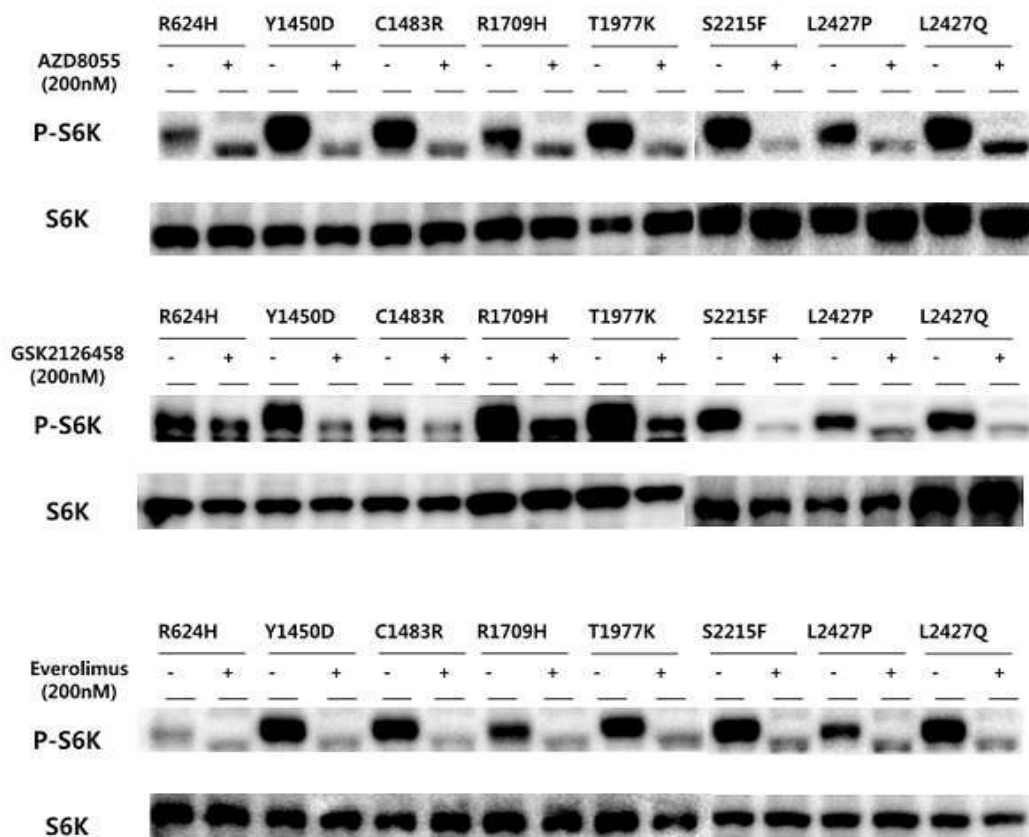
도면10



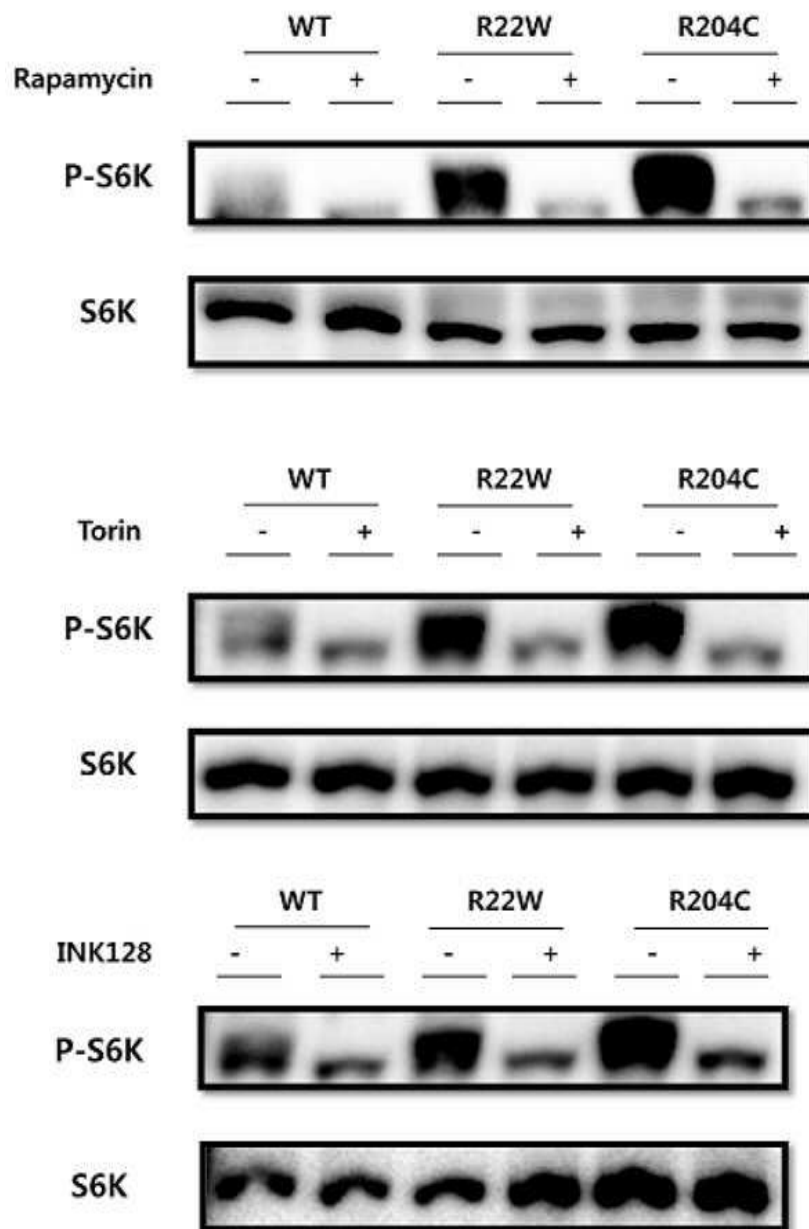
도면11a



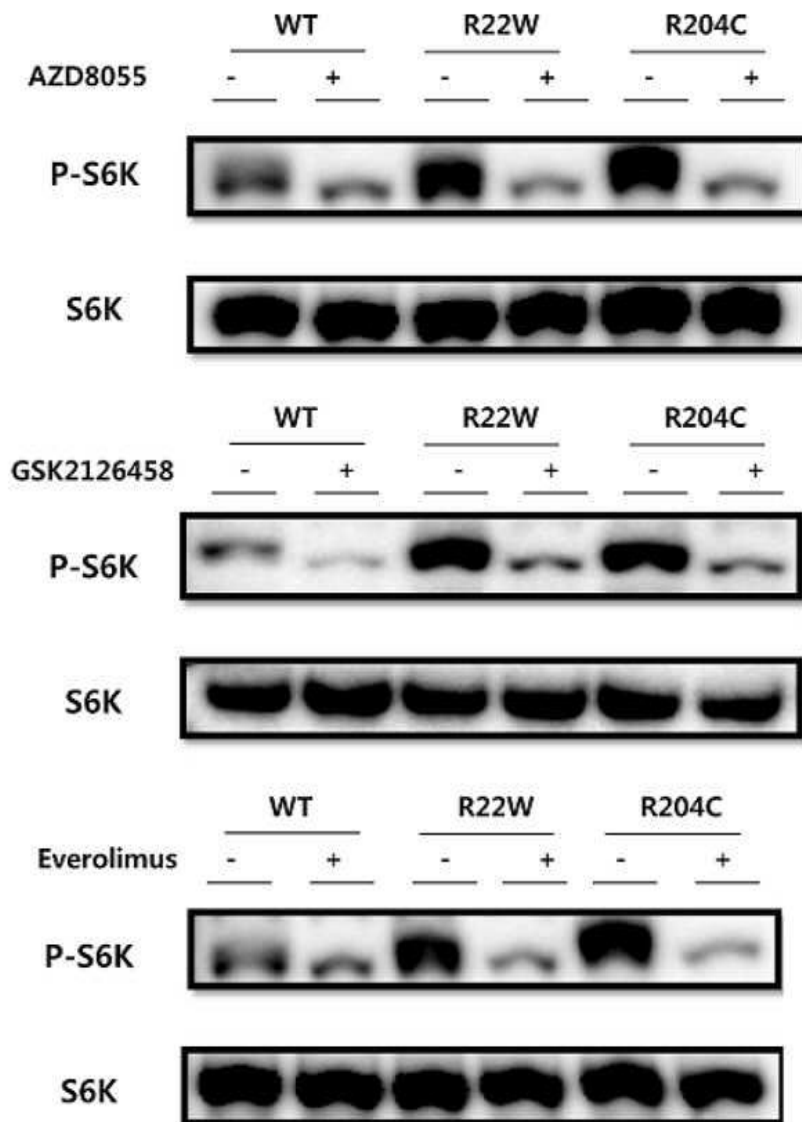
도면11b



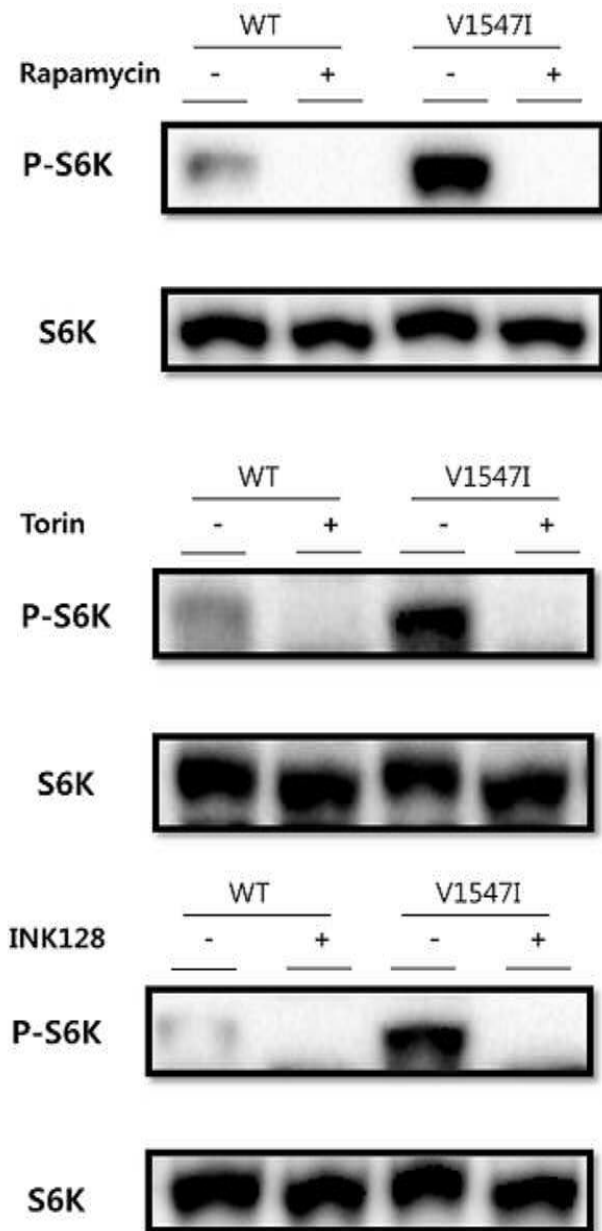
도면12a



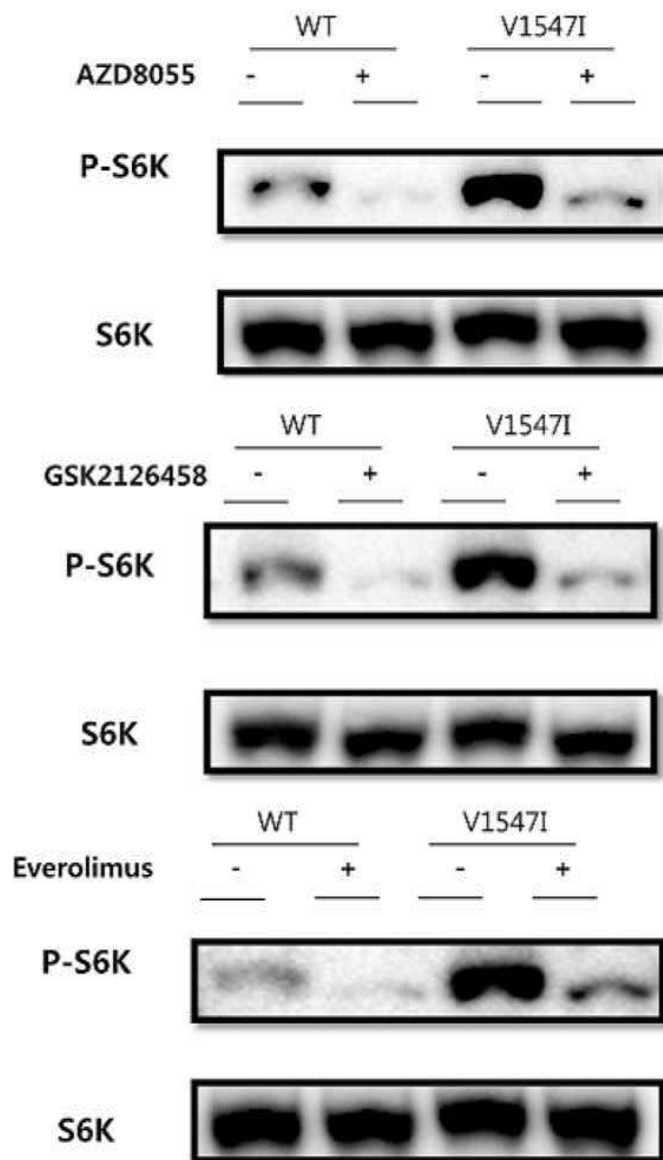
도면12b



도면13a

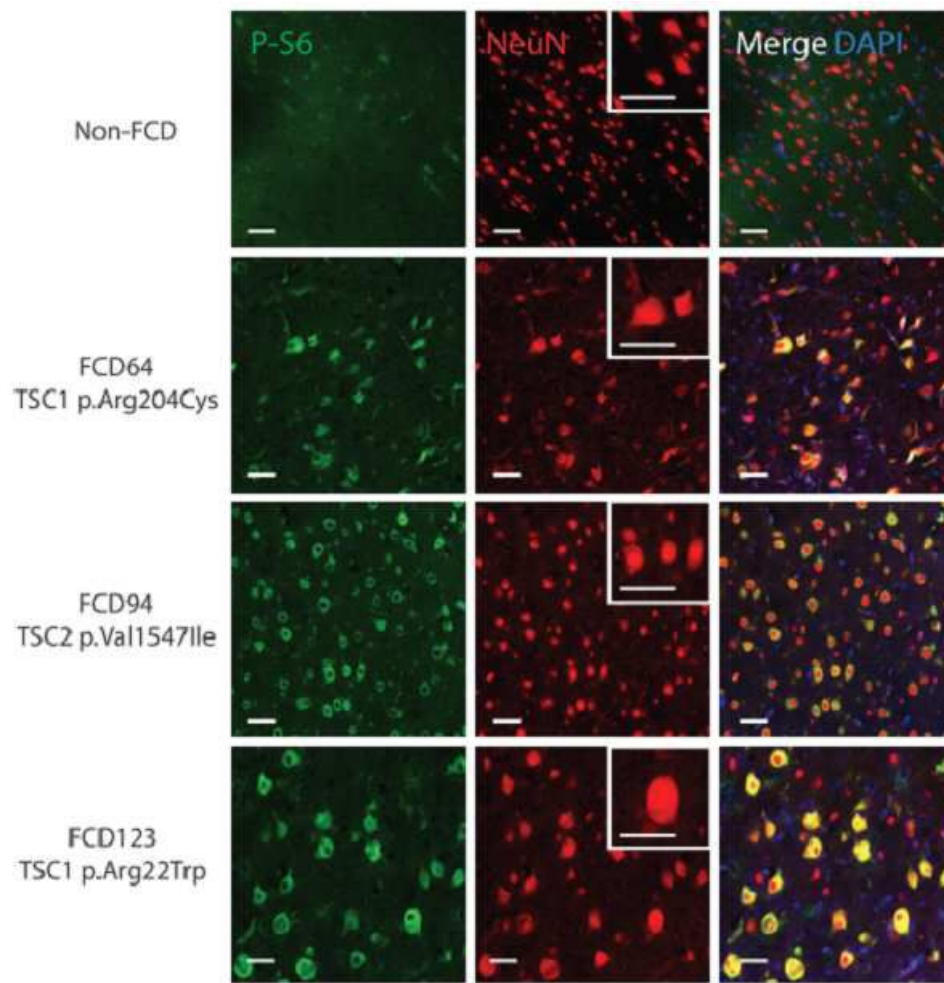


도면13b

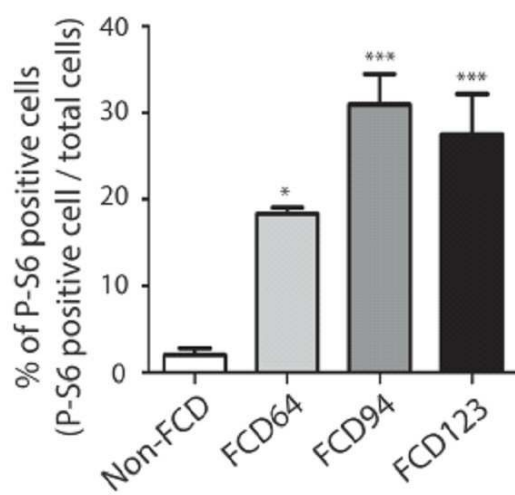




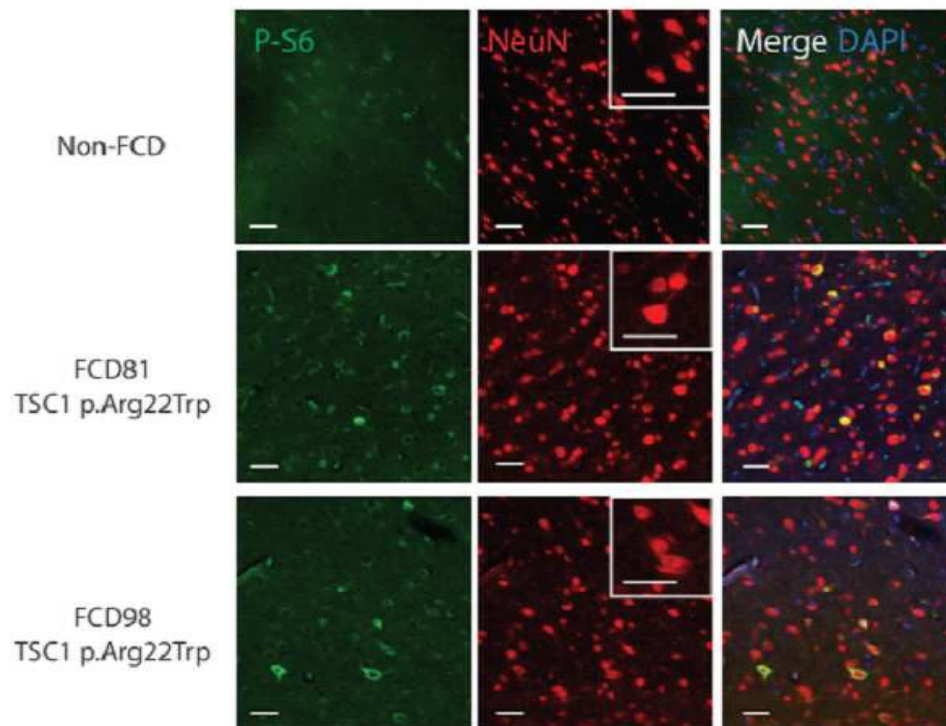
도면14a



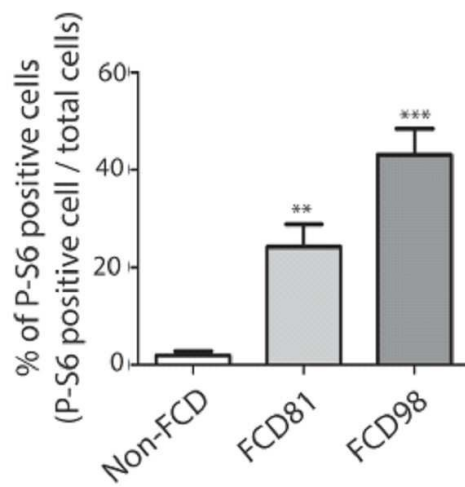
도면14b



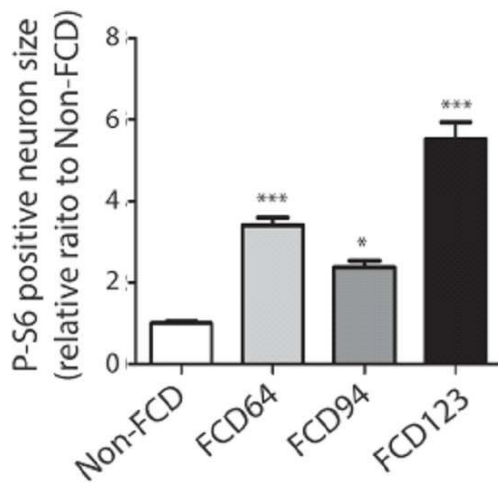
도면14c



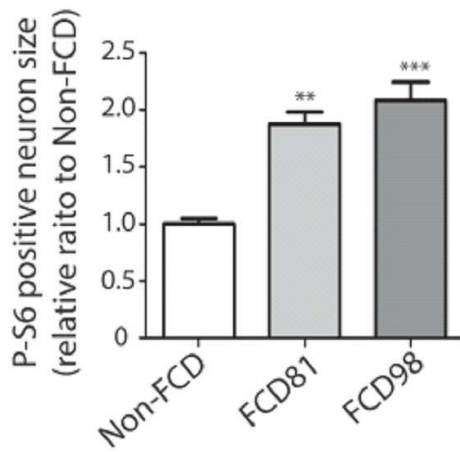
도면14d



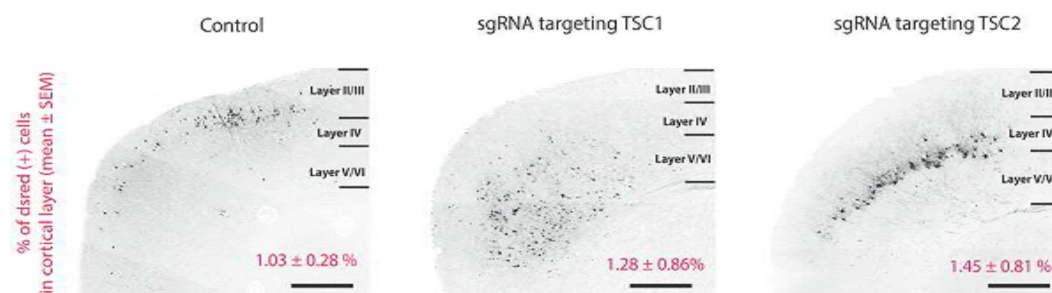
도면14e



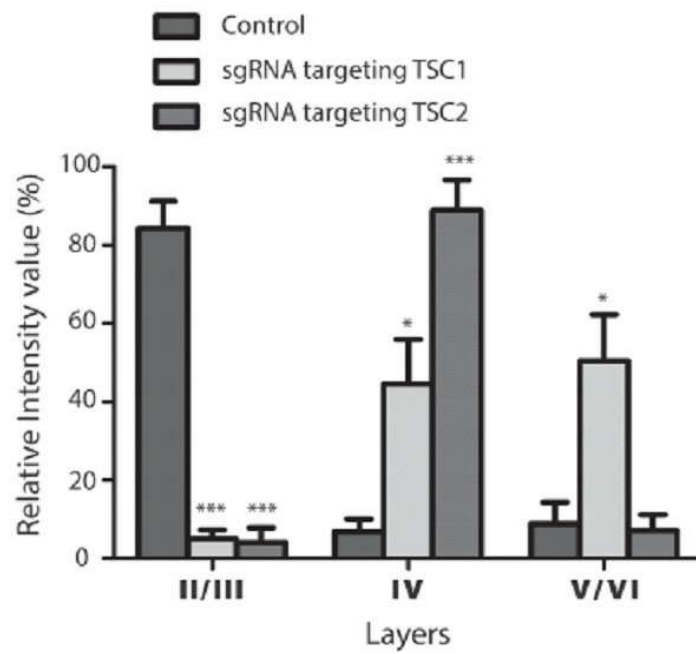
도면14f



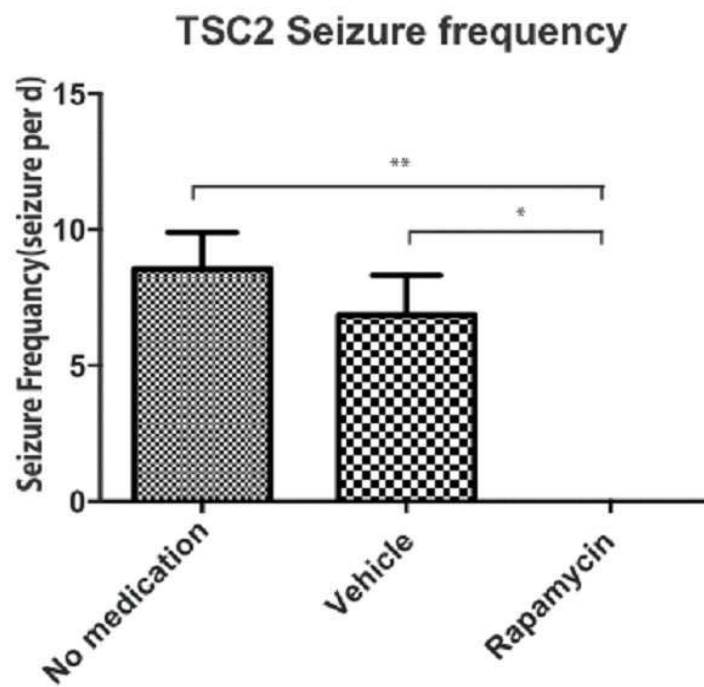
도면15a



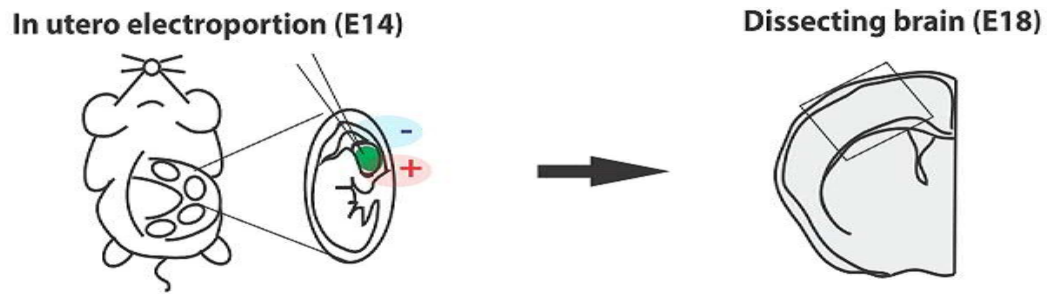
도면15b



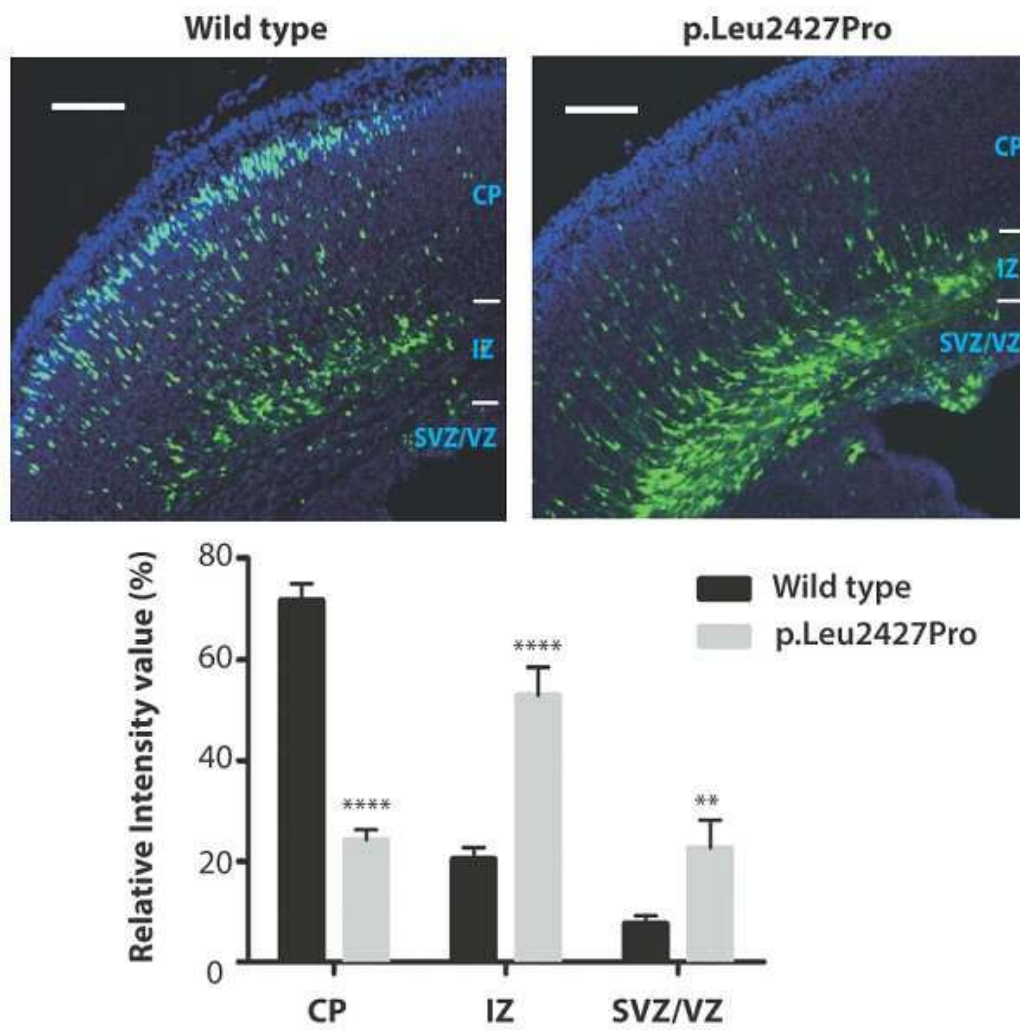
도면16



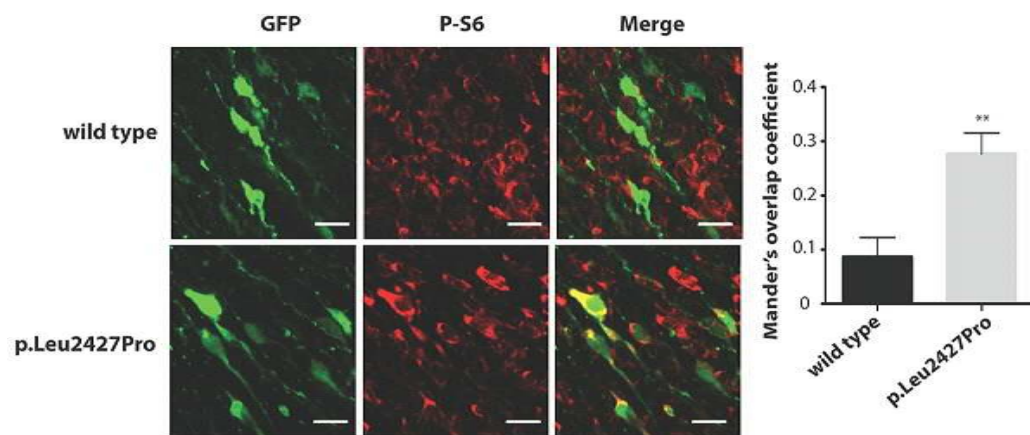
도면17a



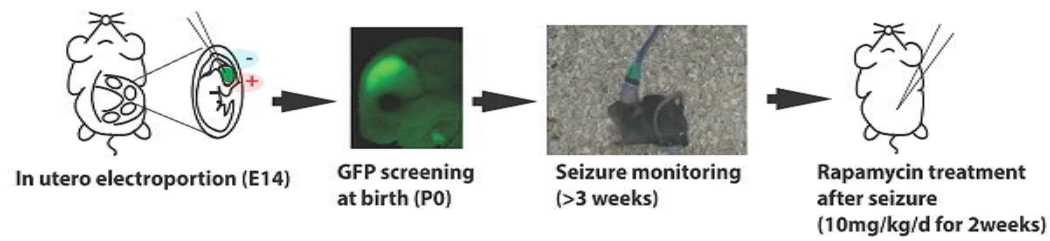
도면17b



도면17c



도면18a

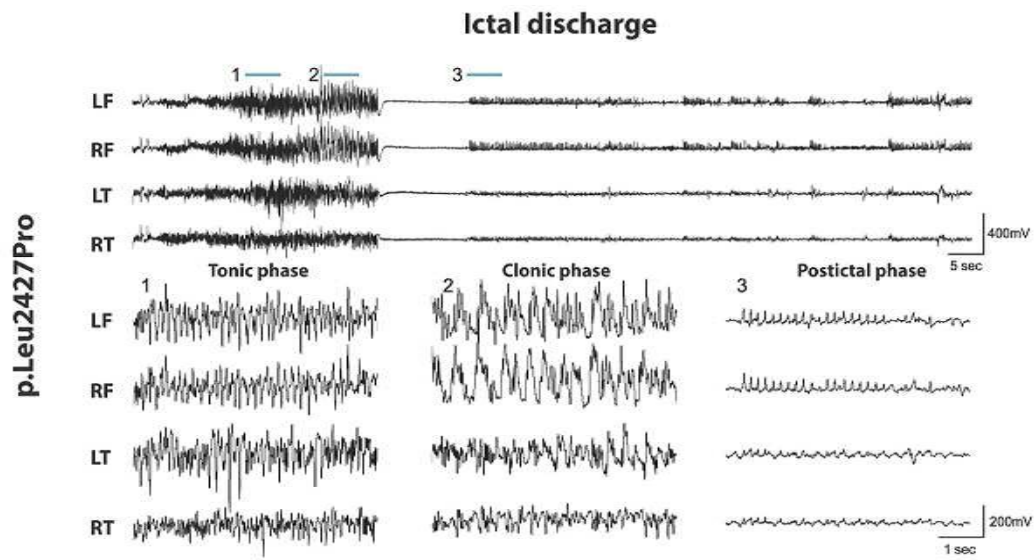


도면18b

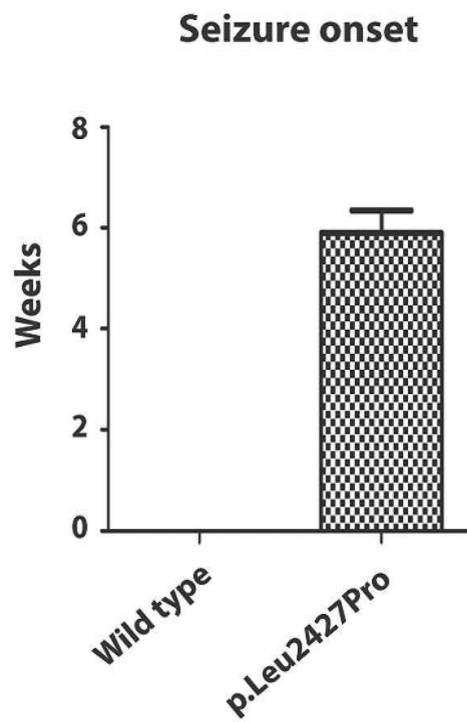
Group	No. of GFP+ pups	No. of mice with seizure	%
Wild type	8	0	0
p.Leu2427Pro	23	21	91.3



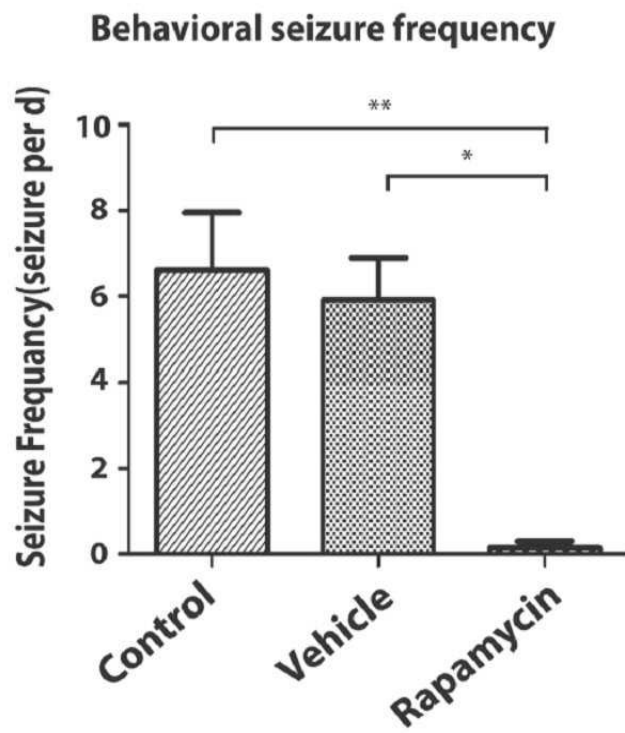
도면18c



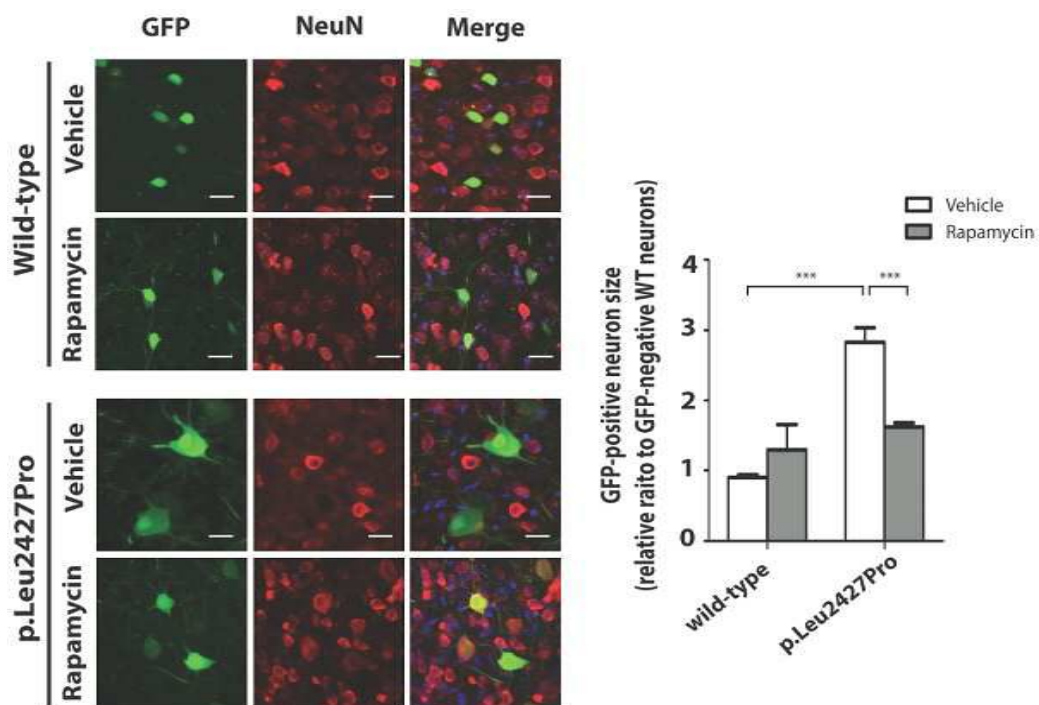
도면18d



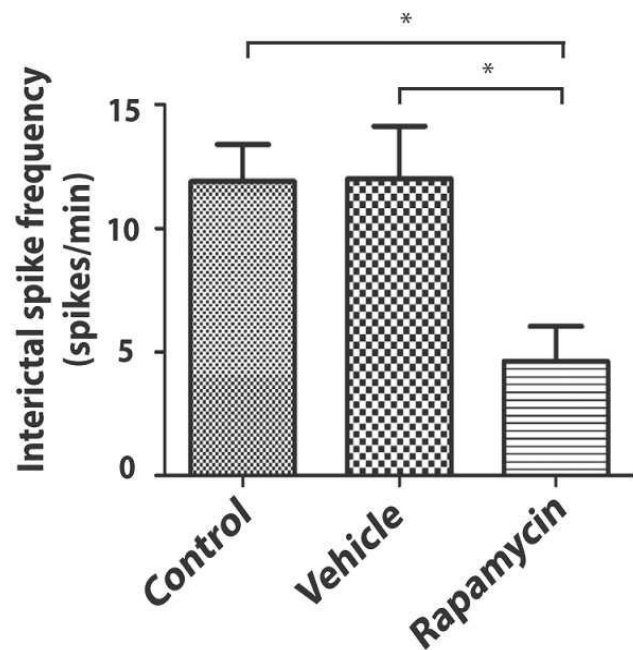
도면18e



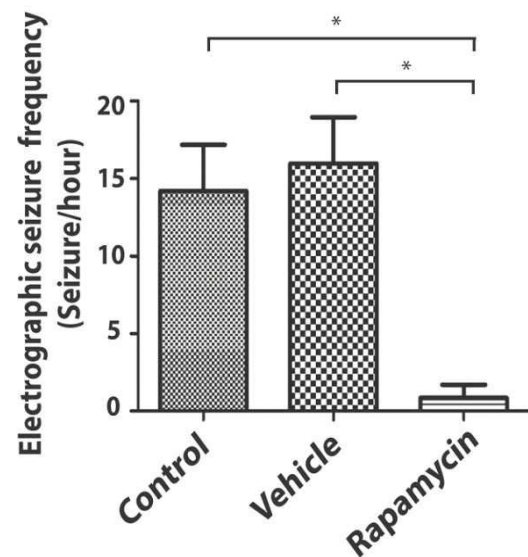
도면18f



도면18g



도면18h



### 서열목록

- <110> KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
Yonsei University, University - Industry Foundation(UIF)
- <120> Composition for diagnosis or treatment of intractable epilepsy
- <130> DPP20160274KR
- <160> 30
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 7650

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(7650)

<223> wild type mTOR

<400> 1

atgcttggaa ccggacctgc cgccgccacc accgctgcca ccacatctag caatgtgagc	60
gtcctgcagc agtttgccag tggcctaaag agccggaatg aggaaaccag ggccaaagcc	120
gccaaggagc tccagcacta tgtcaccatg gaactccgag agatgagtca agaggagtct	180
actcgcttct atgaccaact gaaccatcac atttttgaat tggtttccag ctcatatgcc	240
aatgagagga aaggtggcat cttggccata gctagcctca taggagtgga aggtgggaat	300
gccacccgaa ttggcagatt tgccaactat ctctcggaacc tcctcccctc caatgaccca	360
gttgtcatgg aaatggcatc caaggccatt ggccgtcttg ccatggcagg ggacactttt	420
accgctgagt acgtggaatt tgaggtgaag cgagccctgg aatggctggg tgctgaccgc	480
aatgagggcc ggagacatgc agctgtcctg gttctccgtg agctggccat cagcgtccct	540
accttcttct tccagcaagt gcaacccttc tttgacaaca tttttgtggc cgtgtgggac	600
cccaaacagg ccatccgtga gggagctgta gccgcccttc gtgcctgtct gatttcaca	660
accagcgtg agccgaagga gatgcagaag cctcagtggc acaggcacac atttgaagaa	720
gcagagaagg gatttgatga gaccttggcc aaagagaagg gcatgaatcg ggatgatcgg	780
atccatggag ccttgttgat ccttaacgag ctggtccgaa tcagcagcat ggagggagag	840
cgtctgagag aagaaatgga agaaatcaca cagcagcagc tggtagacga caagtactgc	900
aaagatctca tgggcttcgg aacaaaacct cgtcacatta ccccttcac cagtttccag	960
gctgtacagc ccagcagtc aaatgccttg gtggggtgc tgggtacag ctctaccaa	1020
ggcctcatgg gatttgggac ctccccagt ccagctaagt ccacctggt ggagagccgg	1080
tgttgagag acttgatgga ggagaaattt gatcaggtgt gccagtgggt gctgaaatgc	1140
aggaatagca agaactcgt gatccaaatg acaatcctta atttgttgcc ccgcttggt	1200
gcattccgac ctctgcctt cacagatacc cagtatctcc aagatccat gaacctgtc	1260
ctaagctgtg tcaagaagga gaaggaacgt acagcggcct tccaagcct ggggctactt	1320
tctgtggctg tgaggtctga gtttaagtc tatttgctc gcgtgctgga catcatccga	1380
gcggccctgc ccccaaagga cttcgcccat aagaggcaga aggcaatgca ggtggatgcc	1440
acagtcttca cttgcatcag catgctggct cgagcaatgg ggccaggcat ccagcaggat	1500

atcaaggagc tgctggagcc catgctggca gtgggactaa gccctgccct cactgcagtg	1560
ctctacgacc tgagccgtca gattccacag ctaaagaagg acattcaaga tgggctactg	1620
aaaatgctgt ccttggctct tatgcacaaa ccccttcgcc acccaggcat gccaagggc	1680
ctggcccatc agctggcctc tcctggcctc acgacctcc ctgaggccag cgatgtgggc	1740
agcatcactc ttgccctccg aacgcttggc agctttgaat ttgaaggcca ctctctgacc	1800
caatttgctt gccactgtgc ggatcatttc ctgaacagtg agcacaagga gatccgcatg	1860
gaggctgccc gcacctgtc cgcctgtc acacctcca tccacctcat cagtggccat	1920
gctcatgtgg ttagccagac cgcagtcaa gtggtggcag atgtgcttag caaactgtc	1980
gtagtggga taacagatcc tgacctgac attcgctact gtgtcttggc gtccctggac	2040
gagcgctttg atgcacacct ggcccaggcg gagaactgc aggccttgtt tgtggctctg	2100
aatgaccagg tgtttgagat ccgggagctg gccatctgca ctgtgggccg actcagtagc	2160
atgaacctg cctttgtcat gcctttcctg cgcaagatgc tcatccagat ttgacagag	2220
ttggagcaca gtgggattgg aagaatcaaa gagcagagtg cccgcatgct ggggcacctg	2280
gtctccaatg cccccgact catecgcccc tacatggagc ctattctgaa ggcattaatt	2340
ttgaaactga aagatccaga ccctgatcca aaccagggtg tgatcaataa tgtcctggca	2400
acaataggag aattggcaca ggttagtggc ctggaaatga ggaaatgggt tgatgaactt	2460
tttattatca tcatggacat gctccaggat tcctctttgt tggccaaaag gcagggtgct	2520
ctgtggacct tgggacagt tggggccagc actggctatg tagtagagcc ctacaggaag	2580
tacctactt tgcttgaggt gctactgaat tttctgaaga ctgagcagaa ccagggtaca	2640
cgagagagg ccatccgtgt gttagggttt ttagggttt tggatcctta caagcacaaa	2700
gtgaacattg gcatgataga ccagtcagg gatgcctctg ctgtcagcct gtcagaatcc	2760
aagtcaagtc aggtattctc tgactatagc actagtgaat tgctgggtcaa catgggaaac	2820
ttgcctctgg atgagtctta ccagctgtg tccatggtgg cctgatgcg gatcttccga	2880
gaccagtca tctctcatca tcacaccatg gttgtccagg ccatcacctt catcttcaag	2940
tccttgggac tcaaatgtgt gcagttcctg cccaggtca tgeccagtt ccttaacgtc	3000
attcagctct gtgatggggc catccgggaa tttttgtcc agcagctggg aatgttggtg	3060
tcctttgtga agagccacat cagaccttat atggatgaaa tagtcacct catgagagaa	3120
ttctgggtca tgaacacctc aattcagagc acgatcattc ttctcattga gcaaattgtg	3180
gtagctcttg ggggtgaatt taagctctac ctgcccagc tgatcccaca catgctgcgt	3240
gtcttcatgc atgacaacag cccaggccgc attgtctcta tcaagttact ggctgcaatc	3300
cagctgtttg gcgccaacct ggatgactac ctgcatttac tgctgcctcc tattgttaag	3360

ttgtttgatg cccctgaagc tccactgcca tctcgaaagg cagcgctaga gactgtggac	3420
cgctgacgg agtccctgga tttcactgac tatgcctccc ggatcattca ccctattgtt	3480
cgaacactgg accagagccc agaactgcgc tccacagcca tggacacgct gtcttcactt	3540
gtttttcagc tggggaagaa gtaccaaatt ttcatccaa tggagaataa agttctgggtg	3600
cgacaccgaa tcaatcatca gcgctatgat gtgctcatct gcagaattgt caagggatac	3660
acacttgctg atgaagagga ggatcctttg atttaccagc atcggatgct taggagtggc	3720
caaggggatg cattggctag tggaccagtg gaaacaggac ccatgaagaa actgcacgtc	3780
agcaccatca acctccaaaa ggctggggc gctgccagga gggtctccaa agatgactgg	3840
ctggaatggc tgagacggct gagcctggag ctgctgaagg actcatcatc gccctccctg	3900
cgctcctgct gggccctggc acaggcctac aaccgatgg ccagggatct cttcaatgct	3960
gcattttgtg cctgctggtc tgaactgaat gaagatcaac aggatgagct catcagaagc	4020
atcgagttag ccctcacctc acaagacatc gctgaagtca cacagaccct cttaaacttg	4080
gctgaattca tggaacacag tgacaagggc ccctgccac tgagagatga caatggcatt	4140
gttctgctgg gtgagagagc tgccaagtgc cgagcatatg ccaaagcact aactacaaa	4200
gaactggagt tccagaaagg cccacccct gccattctag aatctctcat cagcattaat	4260
aataagctac agcagccgga ggcagcggcc ggagtgttag aatatgcat gaaacacttt	4320
ggagagctgg agatccaggc tacctgggtat gagaaactgc acgagtggga ggatgccctt	4380
gtggcctatg acaagaaaa ggacaccaac aaggacgacc cagagctgat gctgggccgc	4440
atgcctgcc tcgaggcctt gggggaatgg ggtcaactcc accagcagtg ctgtgaaaag	4500
tggacctggt ttaatgatga gaccaagcc aagatggccc ggatggctgc tgcagctgca	4560
tggggtttag gtcagtggga cagcatggaa gaatacacct gtatgatccc tcgggacacc	4620
catgatgggg cattttatag agctgtgctg gcactgcac aggacctctt ctccttggea	4680
caacagtgca ttgacaaggc cagggacctg ctggatgctg aattaactgc gatggcagga	4740
gagagttaca gtcgggcata tggggccatg gtttcttgcc acatgctgac cgagctggag	4800
gaggttatcc agtaciaaact tgtccccgag cgacgagaga tcatccgcca gatctggtgg	4860
gagagactgc agggctgcca gcgtatcgtg gaggactggc agaaaatcct tatggtgcgg	4920
tcccttgtag tcagccctca tgaagacatg agaacctggc tcaagtatgc aagcctgtgc	4980
ggcaagagtg gcaggctggc tcttgctcat aaaacttttag tgttgctcct gggagttagt	5040
ccgtctcggc aacttgacca tctctgcca acagttcacc ctcaggtgac ctatgcctac	5100



atgaaaaaca tgttgaagag tgcccgaag atcgatgcct tccagcacat gcagcat	5160
gtccagacca tgcagcaaca ggcccagcat gccatcgcta ctgaggacca gcagcataag	5220
caggaactgc acaagctcat ggcccgatgc ttcctgaaac ttggagagtg gcagctgaat	5280
ctacagggca tcaatgagag cacaatcccc aaagtgtgc agtactacag cgccgccaca	5340
gagcacgacc gcagctggta caaggcctgg catgcgtggg cagtgatgaa cttcgaagct	5400
gtgctacact acaaacatca gaaccaagcc cgcgatgaga agaagaaact gcgtcatgcc	5460
agcggggcca acatcaccaa cgccaccact gccgccacca cgcccgccac tgccaccacc	5520
actgccagca ccgagggcag caacagttag agcgaggccg agagcaccga gaacagcccc	5580
accccatcgc cgctgcagaa gaaggtcact gaggatctgt ccaaaaccct cctgatgtac	5640
acggtgcctg ccgtccaggg cttcttccgt tccatctcct tgtcacgagg caacaacctc	5700
caggatacac tcagagttct caccttatgg ttgattatg gtcactggcc agatgtcaat	5760
gaggccttag tggagggggg gaaagccatc cagattgata cctggctaca ggttatacct	5820
cagctcattg caagaattga tacgccaga cccttggtgg gacgtctcat tcaccagctt	5880
ctcacagaca ttggtcggtta ccacccccag gccctcatct acccactgac agtggcttct	5940
aagtctacca cgacagcccc gcacaatgca gccacaaga ttctgaagaa catgtgtgag	6000
cacagcaaca ccttggtcca gcaggccatg atggtgagcg aggagctgat ccgagtggcc	6060
atcctctggc atgagatgtg gcatgaaggc ctggaagagg catctcgttt gtactttggg	6120
gaaaggaacg tgaagggcat gtttgagggt ctggagccct tgcatgctat gatggaacgg	6180
ggccccaga ctctgaagga aacatccttt aatcaggcct atggtcgaga tttaatggag	6240
gccaagagt ggtgcaggaa gtacatgaaa tcagggaatg tcaaggacct cacccaagcc	6300
tgggacctct attatcatgt gttccgacga atctcaaagc agctgcctca gtcacatcc	6360
ttagagctgc aatatgtttc cccaaaactt ctgatgtgcc gggaccttga attggtgtg	6420
ccaggaacat atgaccccaa ccagccaatc attcgcatc agtccatagc accgtctttg	6480
caagtcatca catccaagca gaggccccgg aaattgacac ttatgggcag caacggacat	6540
gagtttgttt tccttctaaa aggccatgaa gatctgcgcc aggatgagcg tgtgatgcag	6600
ctcttcggcc tggtaaacac cttcttgccc aatgacccaa catctcttcg gaaaaacctc	6660
agcatccaga gatacgtgt catcccttta tcgaccaact cgggcctcat tggctgggtt	6720
ccccactgtg acacactgca cgccctcatc cgggactaca gggagaagaa gaagatcctt	6780
ctcaacatcg agcatcgcat catgttgcgg atggctccgg actatgacca cttgactctg	6840

atgcagaagg tggagggtgtt tgagcatgcc gtcaataata cagctgggga cgacctggcc 6900  
aagctgctgt ggctgaaaag cccagctcc gaggtgtggt ttgaccgaag aaccaattat 6960  
acccgttctt tagcggcat gtcaatggtt gggatatatt taggcctggg agatagacac 7020  
ccatccaacc tgatgctgga ccgtctgagt gggaagatcc tgcacattga ctttggggac 7080  
tgctttgagg ttgctatgac ccgagagaag ttccagaga agattccatt tagactaaca 7140  
agaatgttga ccaatgctat ggaggttaca ggctggatg gcaactacag aatcacatgc 7200  
cacacagtga tggagggtgct gcgagagcac aaggacagtg tcatggccgt gctggaagcc 7260

tttgtctatg accccttgc gaactggagg ctgatggaca caaataccaa aggcaacaag 7320  
cgatcccgaa cgaggacgga ttcctactct gctggccagt cagtcgaaat ttgggacggt 7380  
gtggaacttg gagagccagc ccataagaaa acggggacca cagtgccaga atctattcat 7440  
tctttcattg gagacggttt ggtgaaacca gaggcctaa ataagaaagc tatccagatt 7500  
attaacaggg ttcgagataa gctcactggt cgggacttct ctcatgatga cactttggat 7560  
gttccaacgc aagttgagct gctcatcaaa caagcgacat cccatgaaaa cctctgccag 7620  
tgctatattg gctggtgccc tttctggtaa 7650

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

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

Asn Glu Arg Lys Gly Gly Ile Leu Ala Ile Ala Ser Leu Ile Gly Val  
 85 90 95  
 Glu Gly Gly Asn Ala Thr Arg Ile Gly Arg Phe Ala Asn Tyr Leu Arg  
 100 105 110  
 Asn Leu Leu Pro Ser Asn Asp Pro Val Val Met Glu Met Ala Ser Lys  
 115 120 125  
 Ala Ile Gly Arg Leu Ala Met Ala Gly Asp Thr Phe Thr Ala Glu Tyr  
 130 135 140  
 Val Glu Phe Glu Val Lys Arg Ala Leu Glu Trp Leu Gly Ala Asp Arg  
 145 150 155 160  
 Asn Glu Gly Arg Arg His Ala Ala Val Leu Val Leu Arg Glu Leu Ala  
 165 170 175  
 Ile Ser Val Pro Thr Phe Phe Phe Gln Gln Val Gln Pro Phe Phe Asp  
 180 185 190  
 Asn Ile Phe Val Ala Val Trp Asp Pro Lys Gln Ala Ile Arg Glu Gly  
 195 200 205  
 Ala Val Ala Ala Leu Arg Ala Cys Leu Ile Leu Thr Thr Gln Arg Glu  
 210 215 220  
 Pro Lys Glu Met Gln Lys Pro Gln Trp Tyr Arg His Thr Phe Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Lys Gly Phe Asp Glu Thr Leu Ala Lys Glu Lys Gly Met Asn  
 245 250 255  
 Arg Asp Asp Arg Ile His Gly Ala Leu Leu Ile Leu Asn Glu Leu Val  
 260 265 270  
 Arg Ile Ser Ser Met Glu Gly Glu Arg Leu Arg Glu Glu Met Glu Glu  
 275 280 285  
 Ile Thr Gln Gln Gln Leu Val His Asp Lys Tyr Cys Lys Asp Leu Met  
 290 295 300  
 Gly Phe Gly Thr Lys Pro Arg His Ile Thr Pro Phe Thr Ser Phe Gln  
 305 310 315 320  
 Ala Val Gln Pro Gln Gln Ser Asn Ala Leu Val Gly Leu Leu Gly Tyr

				325				330				335			
Ser	Ser	His	Gln	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Pro	Ala
				340				345				350			
Lys	Ser	Thr	Leu	Val	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Asp	Leu	Met	Glu	Glu
				355				360				365			
Lys	Phe	Asp	Gln	Val	Cys	Gln	Trp	Val	Leu	Lys	Cys	Arg	Asn	Ser	Lys
				370				375				380			
Asn	Ser	Leu	Ile	Gln	Met	Thr	Ile	Leu	Asn	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Ala
385				390				395				400			
Ala	Phe	Arg	Pro	Ser	Ala	Phe	Thr	Asp	Thr	Gln	Tyr	Leu	Gln	Asp	Thr
				405				410				415			
Met	Asn	His	Val	Leu	Ser	Cys	Val	Lys	Lys	Glu	Lys	Glu	Arg	Thr	Ala
				420				425				430			
Ala	Phe	Gln	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Val	Ala	Val	Arg	Ser	Glu	Phe
				435				440				445			
Lys	Val	Tyr	Leu	Pro	Arg	Val	Leu	Asp	Ile	Ile	Arg	Ala	Ala	Leu	Pro
450				455				460							
Pro	Lys	Asp	Phe	Ala	His	Lys	Arg	Gln	Lys	Ala	Met	Gln	Val	Asp	Ala
465				470				475				480			
Thr	Val	Phe	Thr	Cys	Ile	Ser	Met	Leu	Ala	Arg	Ala	Met	Gly	Pro	Gly
				485				490				495			
Ile	Gln	Gln	Asp	Ile	Lys	Glu	Leu	Leu	Glu	Pro	Met	Leu	Ala	Val	Gly
				500				505				510			
Leu	Ser	Pro	Ala	Leu	Thr	Ala	Val	Leu	Tyr	Asp	Leu	Ser	Arg	Gln	Ile
				515				520				525			
Pro	Gln	Leu	Lys	Lys	Asp	Ile	Gln	Asp	Gly	Leu	Leu	Lys	Met	Leu	Ser
530				535				540							
Leu	Val	Leu	Met	His	Lys	Pro	Leu	Arg	His	Pro	Gly	Met	Pro	Lys	Gly
545				550				555				560			
Leu	Ala	His	Gln	Leu	Ala	Ser	Pro	Gly	Leu	Thr	Thr	Leu	Pro	Glu	Ala
				565				570				575			

Ser Asp Val Gly Ser Ile Thr Leu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Ser Phe  
580 585 590

Glu Phe Glu Gly His Ser Leu Thr Gln Phe Val Arg His Cys Ala Asp  
595 600 605

His Phe Leu Asn Ser Glu His Lys Glu Ile Arg Met Glu Ala Ala Arg  
610 615 620

Thr Cys Ser Arg Leu Leu Thr Pro Ser Ile His Leu Ile Ser Gly His  
625 630 635 640

Ala His Val Val Ser Gln Thr Ala Val Gln Val Val Ala Asp Val Leu  
645 650 655

Ser Lys Leu Leu Val Val Gly Ile Thr Asp Pro Asp Pro Asp Ile Arg  
660 665 670

Tyr Cys Val Leu Ala Ser Leu Asp Glu Arg Phe Asp Ala His Leu Ala  
675 680 685

Gln Ala Glu Asn Leu Gln Ala Leu Phe Val Ala Leu Asn Asp Gln Val  
690 695 700

Phe Glu Ile Arg Glu Leu Ala Ile Cys Thr Val Gly Arg Leu Ser Ser  
705 710 715 720

Met Asn Pro Ala Phe Val Met Pro Phe Leu Arg Lys Met Leu Ile Gln  
725 730 735

Ile Leu Thr Glu Leu Glu His Ser Gly Ile Gly Arg Ile Lys Glu Gln  
740 745 750

Ser Ala Arg Met Leu Gly His Leu Val Ser Asn Ala Pro Arg Leu Ile  
755 760 765

Arg Pro Tyr Met Glu Pro Ile Leu Lys Ala Leu Ile Leu Lys Leu Lys  
770 775 780

Asp Pro Asp Pro Asp Pro Asn Pro Gly Val Ile Asn Asn Val Leu Ala  
785 790 795 800

Thr Ile Gly Glu Leu Ala Gln Val Ser Gly Leu Glu Met Arg Lys Trp  
805 810 815

Val Asp Glu Leu Phe Ile Ile Ile Met Asp Met Leu Gln Asp Ser Ser  
820 825 830

Leu Leu Ala Lys Arg Gln Val Ala Leu Trp Thr Leu Gly Gln Leu Val

835 840 845

Ala Ser Thr Gly Tyr Val Val Glu Pro Tyr Arg Lys Tyr Pro Thr Leu

850 855 860

Leu Glu Val Leu Leu Asn Phe Leu Lys Thr Glu Gln Asn Gln Gly Thr

865 870 875 880

Arg Arg Glu Ala Ile Arg Val Leu Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asp Pro

885 890 895

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

900 905 910

Ser Ala Val Ser Leu Ser Glu Ser Lys Ser Ser Gln Asp Ser Ser Asp

915 920 925

Tyr Ser Thr Ser Glu Met Leu Val Asn Met Gly Asn Leu Pro Leu Asp

930 935 940

Glu Phe Tyr Pro Ala Val Ser Met Val Ala Leu Met Arg Ile Phe Arg

945 950 955 960

Asp Gln Ser Leu Ser His His His Thr Met Val Val Gln Ala Ile Thr

965 970 975

Phe Ile Phe Lys Ser Leu Gly Leu Lys Cys Val Gln Phe Leu Pro Gln

980 985 990

Val Met Pro Thr Phe Leu Asn Val Ile Arg Val Cys Asp Gly Ala Ile

995 1000 1005

Arg Glu Phe Leu Phe Gln Gln Leu Gly Met Leu Val Ser Phe Val Lys

1010 1015 1020

Ser His Ile Arg Pro Tyr Met Asp Glu Ile Val Thr Leu Met Arg Glu

1025 1030 1035 1040

Phe Trp Val Met Asn Thr Ser Ile Gln Ser Thr Ile Ile Leu Leu Ile

1045 1050 1055

Glu Gln Ile Val Val Ala Leu Gly Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Leu Pro

1060 1065 1070

Gln Leu Ile Pro His Met Leu Arg Val Phe Met His Asp Asn Ser Pro



1075                      1080                      1085  
 Gly Arg Ile Val Ser Ile Lys Leu Leu Ala Ala Ile Gln Leu Phe Gly  
 1090                      1095                      1100  
 Ala Asn Leu Asp Asp Tyr Leu His Leu Leu Leu Pro Pro Ile Val Lys  
 1105                      1110                      1115                      1120  
 Leu Phe Asp Ala Pro Glu Ala Pro Leu Pro Ser Arg Lys Ala Ala Leu  
  
 1125                      1130                      1135  
 Glu Thr Val Asp Arg Leu Thr Glu Ser Leu Asp Phe Thr Asp Tyr Ala  
 1140                      1145                      1150  
 Ser Arg Ile Ile His Pro Ile Val Arg Thr Leu Asp Gln Ser Pro Glu  
 1155                      1160                      1165  
 Leu Arg Ser Thr Ala Met Asp Thr Leu Ser Ser Leu Val Phe Gln Leu  
 1170                      1175                      1180  
 Gly Lys Lys Tyr Gln Ile Phe Ile Pro Met Val Asn Lys Val Leu Val  
 1185                      1190                      1195                      1200  
  
 Arg His Arg Ile Asn His Gln Arg Tyr Asp Val Leu Ile Cys Arg Ile  
 1205                      1210                      1215  
 Val Lys Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Glu Glu Glu Asp Pro Leu Ile Tyr  
 1220                      1225                      1230  
 Gln His Arg Met Leu Arg Ser Gly Gln Gly Asp Ala Leu Ala Ser Gly  
 1235                      1240                      1245  
 Pro Val Glu Thr Gly Pro Met Lys Lys Leu His Val Ser Thr Ile Asn  
 1250                      1255                      1260  
 Leu Gln Lys Ala Trp Gly Ala Ala Arg Arg Val Ser Lys Asp Asp Trp  
  
 1265                      1270                      1275                      1280  
 Leu Glu Trp Leu Arg Arg Leu Ser Leu Glu Leu Leu Lys Asp Ser Ser  
 1285                      1290                      1295  
 Ser Pro Ser Leu Arg Ser Cys Trp Ala Leu Ala Gln Ala Tyr Asn Pro  
 1300                      1305                      1310  
 Met Ala Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ala Phe Val Ser Cys Trp Ser Glu  
 1315                      1320                      1325  
 Leu Asn Glu Asp Gln Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ser Ile Glu Leu Ala

1330	1335	1340	
Leu Thr Ser Gln Asp Ile Ala Glu Val Thr Gln Thr Leu Leu Asn Leu			
1345	1350	1355	1360
Ala Glu Phe Met Glu His Ser Asp Lys Gly Pro Leu Pro Leu Arg Asp			
	1365	1370	1375
Asp Asn Gly Ile Val Leu Leu Gly Glu Arg Ala Ala Lys Cys Arg Ala			
	1380	1385	1390
Tyr Ala Lys Ala Leu His Tyr Lys Glu Leu Glu Phe Gln Lys Gly Pro			
	1395	1400	1405
Thr Pro Ala Ile Leu Glu Ser Leu Ile Ser Ile Asn Asn Lys Leu Gln			
1410	1415	1420	
Gln Pro Glu Ala Ala Ala Gly Val Leu Glu Tyr Ala Met Lys His Phe			
1425	1430	1435	1440
Gly Glu Leu Glu Ile Gln Ala Thr Trp Tyr Glu Lys Leu His Glu Trp			
	1445	1450	1455
Glu Asp Ala Leu Val Ala Tyr Asp Lys Lys Met Asp Thr Asn Lys Asp			
	1460	1465	1470
Asp Pro Glu Leu Met Leu Gly Arg Met Arg Cys Leu Glu Ala Leu Gly			
	1475	1480	1485
Glu Trp Gly Gln Leu His Gln Gln Cys Cys Glu Lys Trp Thr Leu Val			
	1490	1495	1500
Asn Asp Glu Thr Gln Ala Lys Met Ala Arg Met Ala Ala Ala Ala Ala			
1505	1510	1515	1520
Trp Gly Leu Gly Gln Trp Asp Ser Met Glu Glu Tyr Thr Cys Met Ile			
	1525	1530	1535
Pro Arg Asp Thr His Asp Gly Ala Phe Tyr Arg Ala Val Leu Ala Leu			
	1540	1545	1550
His Gln Asp Leu Phe Ser Leu Ala Gln Gln Cys Ile Asp Lys Ala Arg			
1555	1560	1565	
Asp Leu Leu Asp Ala Glu Leu Thr Ala Met Ala Gly Glu Ser Tyr Ser			
1570	1575	1580	

Arg Ala Tyr Gly Ala Met Val Ser Cys His Met Leu Ser Glu Leu Glu  
1585 1590 1595 1600  
Glu Val Ile Gln Tyr Lys Leu Val Pro Glu Arg Arg Glu Ile Ile Arg  
1605 1610 1615  
Gln Ile Trp Trp Glu Arg Leu Gln Gly Cys Gln Arg Ile Val Glu Asp  
1620 1625 1630  
  
Trp Gln Lys Ile Leu Met Val Arg Ser Leu Val Val Ser Pro His Glu  
1635 1640 1645  
Asp Met Arg Thr Trp Leu Lys Tyr Ala Ser Leu Cys Gly Lys Ser Gly  
1650 1655 1660  
Arg Leu Ala Leu Ala His Lys Thr Leu Val Leu Leu Leu Gly Val Asp  
1665 1670 1675 1680  
Pro Ser Arg Gln Leu Asp His Pro Leu Pro Thr Val His Pro Gln Val  
1685 1690 1695  
Thr Tyr Ala Tyr Met Lys Asn Met Trp Lys Ser Ala Arg Lys Ile Asp  
  
1700 1705 1710  
Ala Phe Gln His Met Gln His Phe Val Gln Thr Met Gln Gln Gln Ala  
1715 1720 1725  
Gln His Ala Ile Ala Thr Glu Asp Gln Gln His Lys Gln Glu Leu His  
1730 1735 1740  
Lys Leu Met Ala Arg Cys Phe Leu Lys Leu Gly Glu Trp Gln Leu Asn  
1745 1750 1755 1760  
Leu Gln Gly Ile Asn Glu Ser Thr Ile Pro Lys Val Leu Gln Tyr Tyr  
1765 1770 1775  
  
Ser Ala Ala Thr Glu His Asp Arg Ser Trp Tyr Lys Ala Trp His Ala  
1780 1785 1790  
Trp Ala Val Met Asn Phe Glu Ala Val Leu His Tyr Lys His Gln Asn  
1795 1800 1805  
Gln Ala Arg Asp Glu Lys Lys Lys Leu Arg His Ala Ser Gly Ala Asn  
1810 1815 1820  
Ile Thr Asn Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr  
1825 1830 1835 1840

Thr Ala Ser Thr Glu Gly Ser Asn Ser Glu Ser Glu Ala Glu Ser Thr

1845 1850 1855

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

1860 1865 1870

Leu Ser Lys Thr Leu Leu Met Tyr Thr Val Pro Ala Val Gln Gly Phe

1875 1880 1885

Phe Arg Ser Ile Ser Leu Ser Arg Gly Asn Asn Leu Gln Asp Thr Leu

1890 1895 1900

Arg Val Leu Thr Leu Trp Phe Asp Tyr Gly His Trp Pro Asp Val Asn

1905 1910 1915 1920

Glu Ala Leu Val Glu Gly Val Lys Ala Ile Gln Ile Asp Thr Trp Leu

1925 1930 1935

Gln Val Ile Pro Gln Leu Ile Ala Arg Ile Asp Thr Pro Arg Pro Leu

1940 1945 1950

Val Gly Arg Leu Ile His Gln Leu Leu Thr Asp Ile Gly Arg Tyr His

1955 1960 1965

Pro Gln Ala Leu Ile Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ser Lys Ser Thr Thr

1970 1975 1980

Thr Ala Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn Met Cys Glu

1985 1990 1995 2000

His Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala Met Met Val Ser Glu Glu Leu

2005 2010 2015

Ile Arg Val Ala Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu

2020 2025 2030

Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe

2035 2040 2045

Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr

2050 2055 2060

Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu

2065 2070 2075 2080

Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp

2085                      2090                      2095  
 Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser  
 2100                      2105                      2110  
 Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro  
 2115                      2120                      2125  
 Lys Leu Leu Met Cys Arg Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr  
  
 2130                      2135                      2140  
 Asp Pro Asn Gln Pro Ile Ile Arg Ile Gln Ser Ile Ala Pro Ser Leu  
 2145                      2150                      2155                      2160  
 Gln Val Ile Thr Ser Lys Gln Arg Pro Arg Lys Leu Thr Leu Met Gly  
 2165                      2170                      2175  
 Ser Asn Gly His Glu Phe Val Phe Leu Leu Lys Gly His Glu Asp Leu  
 2180                      2185                      2190  
 Arg Gln Asp Glu Arg Val Met Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu  
 2195                      2200                      2205  
  
 Leu Ala Asn Asp Pro Thr Ser Leu Arg Lys Asn Leu Ser Ile Gln Arg  
 2210                      2215                      2220  
 Tyr Ala Val Ile Pro Leu Ser Thr Asn Ser Gly Leu Ile Gly Trp Val  
 2225                      2230                      2235                      2240  
 Pro His Cys Asp Thr Leu His Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Arg Glu Lys  
 2245                      2250                      2255  
 Lys Lys Ile Leu Leu Asn Ile Glu His Arg Ile Met Leu Arg Met Ala  
 2260                      2265                      2270  
 Pro Asp Tyr Asp His Leu Thr Leu Met Gln Lys Val Glu Val Phe Glu  
  
 2275                      2280                      2285  
 His Ala Val Asn Asn Thr Ala Gly Asp Asp Leu Ala Lys Leu Leu Trp  
 2290                      2295                      2300  
 Leu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Val Trp Phe Asp Arg Arg Thr Asn Tyr  
 2305                      2310                      2315                      2320  
 Thr Arg Ser Leu Ala Val Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu  
 2325                      2330                      2335  
 Gly Asp Arg His Pro Ser Asn Leu Met Leu Asp Arg Leu Ser Gly Lys

2340                      2345                      2350  
 Ile Leu His Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Val Ala Met Thr Arg  
 2355                      2360                      2365  
 Glu Lys Phe Pro Glu Lys Ile Pro Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr  
 2370                      2375                      2380  
 Asn Ala Met Glu Val Thr Gly Leu Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr Cys  
 2385                      2390                      2395                      2400  
 His Thr Val Met Glu Val Leu Arg Glu His Lys Asp Ser Val Met Ala  
 2405                      2410                      2415  
 Val Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro Leu Leu Asn Trp Arg Leu Met  
  
 2420                      2425                      2430  
 Asp Thr Asn Thr Lys Gly Asn Lys Arg Ser Arg Thr Arg Thr Asp Ser  
 2435                      2440                      2445  
 Tyr Ser Ala Gly Gln Ser Val Glu Ile Leu Asp Gly Val Glu Leu Gly  
 2450                      2455                      2460  
 Glu Pro Ala His Lys Lys Thr Gly Thr Thr Val Pro Glu Ser Ile His  
 2465                      2470                      2475                      2480  
 Ser Phe Ile Gly Asp Gly Leu Val Lys Pro Glu Ala Leu Asn Lys Lys  
 2485                      2490                      2495  
  
 Ala Ile Gln Ile Ile Asn Arg Val Arg Asp Lys Leu Thr Gly Arg Asp  
 2500                      2505                      2510  
 Phe Ser His Asp Asp Thr Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Glu Leu Leu  
 2515                      2520                      2525  
 Ile Lys Gln Ala Thr Ser His Glu Asn Leu Cys Gln Cys Tyr Ile Gly  
 2530                      2535                      2540  
 Trp Cys Pro Phe Trp  
 2545  
 <210>     3  
 <211>     3495  
 <212>     DNA  
 <213>     Homo sapiens  
 <220><221>     gene

<222> (1)..(3495)

<223> wild type TSC1

<400> 3

atggcccaac aagcaaatgt cggggagctt ctgccatgc tggactcccc catgctgggt	60
gtgcgggacg acgtgacagc tgtctttaa gaaacctca attctgaccg tggccctatg	120
cttgtaaaca ctttgggtga ttattacctg gaaaccagct ctcagccggc attgcacatc	180
ctgaccacct tgcaagagcc acatgacaag cacctcttgg acaggattaa cgaatatgtg	240
ggcaaagccg cactcgttt atccatctc tcgttactgg gtcatgtcat aagactgcag	300
ccatcttggg agcataagct ctctcaagca cctcttttgc cttctttact aaaatgtctc	360
aagatggaca ctgacgtcgt tgcctcaca acaggcgtct tgggtgtgat aaccatgcta	420
ccaatgattc cacagtctgg gaaacagcat cttcttgatt tctttgacat ttttggccgt	480
ctgtcatcat ggtgccigaa gaaaccaggc cacgtggcgg aagtctatct cgtccatctc	540
catgccagtg tgtacgcaat ctttcatcgc ctttatggaa tgtacccttg caacttcgtc	600
tcctttttgc gttctcatta cagtatgaaa gaaacctgg agacttttga agaagtggtc	660
aagccaatga tggagcatgt gcgaattcat ccggaattag tgactggatc caaggacat	720
gaactggacc ctggaaggtg gaagagatta gaaactcatg atgttgtgat cgagtgtgcc	780
aaaatctctc tggatccac agaagcctca tatgaagatg gctattctgt gtctcaccaa	840
atctcagccc gctttctca tcgttcagcc gatgtacca ccagccctta tgctgacaca	900
cagaatagct atgggtgtgc tacttctacc cttactcca cgtctcggt gatgtgtta	960
aatatgccag ggcagctacc tcagactctg agttcccat cgacacggct gataactgaa	1020
ccaccacaag ctactctttg gagcccatct atggtttgtg gtatgaccac tcctccaact	1080
tctctggaa atgtcccacc tgatctgtca cacccttaca gtaaagtctt tgggtacaact	1140
gcaggtggaa aaggaactcc tctgggaacc ccagcaacct ctctctctcc agccccactc	1200
tgtcattcgg atgactacgt gcacatttca ctccccagg ccacagtcac accccccagg	1260
aaggaagaga gaatggattc tgcaagacca tgtctacaca gacaacacca tcttctgaat	1320
gacagaggat cagaagagcc acctggcagc aaaggttctg tcactctaag tgatcttcca	1380
gggttttttag gtgatctggc ctctgaagaa gatagtattg aaaaagataa agaagaagct	1440
gcaatatcta gagaactttc tgagatcacc acagcagagg cagagcctgt ggttctctga	1500
ggaggttttg actctcctt ttaccgagac agtctcccag gttctcagcg gaagaccac	1560



tcggcagcct ccagttctca gggcgccagc gtgaaccctg agcctttaca ctcctccctg	1620
gacaagcttg ggcctgacac accaaagcaa gcctttactc ccatagacct gccctgcggc	1680
agtgtgatg aaagccctgc gggagacagg gaatgccaga cttctttgga gaccagtatc	1740
ttcactccca gtctttgtaa aattccacct ccgacgagag tgggctttgg aagcgggcag	1800
cctccccct atgatcatct ttttgagggtg gcattgccaa agacagccca tcattttgtc	1860
atcaggaaga ctgaggagct gttaaagaaa gcaaaaggaa acacagagga agatggtgtg	1920
ccctctacct cccaatgga agtgtctggac agactgatac agcagggagc agacgcgcac	1980
agcaaggagc tgaacaagtt gcctttaccc agcaagtctg tcgactggac ccactttgga	2040
ggctctctc cticagatga gatccgcacc ctccgagacc agttgctttt actgcacaac	2100
cagttactct atgagcgttt taagaggcag cagcatgccc tccggaacag gcggctctc	2160
cgcaaggta tcaaagcagc agctctggag gaacataatg ctgccatgaa agatcagttg	2220
aagttacaag agaaggacat ccagatgttg aaggttagtc tgcagaaaga acaagctaga	2280
tacaatcagc tccaggagca gcgtgacact atggtaacca agtccacag ccagatcaga	2340
cagctgcagc atgaccgaga ggaattctac aaccagagcc aggaattaca gacgaagctg	2400
gaggactgca ggaacatgat tgcggagctg cggatagaac tgaagaaggc caacaacaag	2460
gtgtgtcaca ctgagctgct gctcagtcag gtttccaaa agctctcaa cagtgagtcg	2520
gtccagcagc agatggagtt cttgaacagg cagctgttgg ttcttgggga ggtcaacgag	2580
ctctatttgg aacaactgca gaacaagcac tcagatacca caaaggaagt agaaatgatg	2640
aaagccgct atcgaaaga gctagaaaaa aacagaagcc atgttctcca gcagactcag	2700
aggcttgata cctcccaaaa acggattttg gaactggaat ctacactggc caagaaagac	2760
cacctctttt tggaacagaa gaaatatcta gaggatgtca aactccagc aagaggacag	2820
ctgcaggccg cagagagcag gtatgaggt cagaaaagga taaccaggt gtttgaattg	2880
gagatcttag attatatgg caggttggag aaagatggcc tcctgaaaaa acttgaagaa	2940
gaaaaagcag aagcagctga agcagcagaa gaaaggcttg actgttgtaa tgacgggtgc	3000
tcagattcca tggtagggca caatgaagag gcatctggcc acaacggtga gaccaagacc	3060
cccaggccca gcagcggccg gggcagtagt ggaagcagag gtggtggagg cagcagcagc	3120
agcagcagcg agctttctac ccagagaaaa cccccacacc agagggcagg cccattcagc	3180
agtcggtggg agacgactat gggagaagcg tctgccagca tccccaccac tgtgggtca	3240
cttccagtt caaaaagctt cctgggtatg aaggctcgag agttatttcg taataagagc	3300

gagagccagt gtgatgagga cggcatgacc agtagccttt ctgagagcct aaagacagaa 3360  
ctgggcaaag acttgggtgt ggaagccaag attccctga acctagatgg ccctcacccg 3420  
tctccccga ccccgacag tgttgacag ctacatatca tggactacaa tgagactcat 3480  
catgaacaca gctaa 3495

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

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

1	5	10	15
Pro Met Leu Gly Val Arg Asp Asp Val Thr Ala Val Phe Lys Glu Asn			
	20	25	30
Leu Asn Ser Asp Arg Gly Pro Met Leu Val Asn Thr Leu Val Asp Tyr			
	35	40	45
Tyr Leu Glu Thr Ser Ser Gln Pro Ala Leu His Ile Leu Thr Thr Leu			
	50	55	60
Gln Glu Pro His Asp Lys His Leu Leu Asp Arg Ile Asn Glu Tyr Val			
	65	70	75
			80
Gly Lys Ala Ala Thr Arg Leu Ser Ile Leu Ser Leu Leu Gly His Val			
	85	90	95
Ile Arg Leu Gln Pro Ser Trp Lys His Lys Leu Ser Gln Ala Pro Leu			
	100	105	110
Leu Pro Ser Leu Leu Lys Cys Leu Lys Met Asp Thr Asp Val Val Val			
	115	120	125
Leu Thr Thr Gly Val Leu Val Leu Ile Thr Met Leu Pro Met Ile Pro			
	130	135	140
Gln Ser Gly Lys Gln His Leu Leu Asp Phe Phe Asp Ile Phe Gly Arg			
145	150	155	160

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

Thr Pro Pro Arg Lys Glu Glu Arg Met Asp Ser Ala Arg Pro Cys Leu  
 420 425 430  
 His Arg Gln His His Leu Leu Asn Asp Arg Gly Ser Glu Glu Pro Pro  
 435 440 445  
 Gly Ser Lys Gly Ser Val Thr Leu Ser Asp Leu Pro Gly Phe Leu Gly  
 450 455 460  
 Asp Leu Ala Ser Glu Glu Asp Ser Ile Glu Lys Asp Lys Glu Glu Ala  
 465 470 475 480  
 Ala Ile Ser Arg Glu Leu Ser Glu Ile Thr Thr Ala Glu Ala Glu Pro  
 485 490 495  
 Val Val Pro Arg Gly Gly Phe Asp Ser Pro Phe Tyr Arg Asp Ser Leu  
 500 505 510  
 Pro Gly Ser Gln Arg Lys Thr His Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gln Gly  
 515 520 525  
 Ala Ser Val Asn Pro Glu Pro Leu His Ser Ser Leu Asp Lys Leu Gly  
 530 535 540  
 Pro Asp Thr Pro Lys Gln Ala Phe Thr Pro Ile Asp Leu Pro Cys Gly  
 545 550 555 560  
 Ser Ala Asp Glu Ser Pro Ala Gly Asp Arg Glu Cys Gln Thr Ser Leu  
 565 570 575  
 Glu Thr Ser Ile Phe Thr Pro Ser Pro Cys Lys Ile Pro Pro Pro Thr  
 580 585 590  
 Arg Val Gly Phe Gly Ser Gly Gln Pro Pro Pro Tyr Asp His Leu Phe  
 595 600 605  
 Glu Val Ala Leu Pro Lys Thr Ala His His Phe Val Ile Arg Lys Thr  
 610 615 620  
 Glu Glu Leu Leu Lys Lys Ala Lys Gly Asn Thr Glu Glu Asp Gly Val  
 625 630 635 640  
 Pro Ser Thr Ser Pro Met Glu Val Leu Asp Arg Leu Ile Gln Gln Gly  
 645 650 655  
 Ala Asp Ala His Ser Lys Glu Leu Asn Lys Leu Pro Leu Pro Ser Lys

660                                  665                                  670  
 Ser Val Asp Trp Thr His Phe Gly Gly Ser Pro Pro Ser Asp Glu Ile  
 675                                  680                                  685  
 Arg Thr Leu Arg Asp Gln Leu Leu Leu Leu His Asn Gln Leu Leu Tyr  
 690                                  695                                  700  
 Glu Arg Phe Lys Arg Gln Gln His Ala Leu Arg Asn Arg Arg Leu Leu  
 705                                  710                                  715                                  720  
 Arg Lys Val Ile Lys Ala Ala Ala Leu Glu Glu His Asn Ala Ala Met  
  
 725                                  730                                  735  
 Lys Asp Gln Leu Lys Leu Gln Glu Lys Asp Ile Gln Met Trp Lys Val  
 740                                  745                                  750  
 Ser Leu Gln Lys Glu Gln Ala Arg Tyr Asn Gln Leu Gln Glu Gln Arg  
 755                                  760                                  765  
 Asp Thr Met Val Thr Lys Leu His Ser Gln Ile Arg Gln Leu Gln His  
 770                                  775                                  780  
 Asp Arg Glu Glu Phe Tyr Asn Gln Ser Gln Glu Leu Gln Thr Lys Leu  
 785                                  790                                  795                                  800  
  
 Glu Asp Cys Arg Asn Met Ile Ala Glu Leu Arg Ile Glu Leu Lys Lys  
 805                                  810                                  815  
 Ala Asn Asn Lys Val Cys His Thr Glu Leu Leu Leu Ser Gln Val Ser  
 820                                  825                                  830  
 Gln Lys Leu Ser Asn Ser Glu Ser Val Gln Gln Gln Met Glu Phe Leu  
 835                                  840                                  845  
 Asn Arg Gln Leu Leu Val Leu Gly Glu Val Asn Glu Leu Tyr Leu Glu  
 850                                  855                                  860  
 Gln Leu Gln Asn Lys His Ser Asp Thr Thr Lys Glu Val Glu Met Met  
  
 865                                  870                                  875                                  880  
 Lys Ala Ala Tyr Arg Lys Glu Leu Glu Lys Asn Arg Ser His Val Leu  
 885                                  890                                  895  
 Gln Gln Thr Gln Arg Leu Asp Thr Ser Gln Lys Arg Ile Leu Glu Leu  
 900                                  905                                  910  
 Glu Ser His Leu Ala Lys Lys Asp His Leu Leu Leu Glu Gln Lys Lys

915                      920                      925  
 Tyr Leu Glu Asp Val Lys Leu Gln Ala Arg Gly Gln Leu Gln Ala Ala  
 930                      935                      940  
  
 Glu Ser Arg Tyr Glu Ala Gln Lys Arg Ile Thr Gln Val Phe Glu Leu  
 945                      950                      955                      960  
 Glu Ile Leu Asp Leu Tyr Gly Arg Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Lys  
 965                      970                      975  
 Lys Leu Glu Glu Glu Lys Ala Glu Ala Ala Glu Ala Ala Glu Glu Arg  
 980                      985                      990  
 Leu Asp Cys Cys Asn Asp Gly Cys Ser Asp Ser Met Val Gly His Asn  
 995                      1000                      1005  
 Glu Glu Ala Ser Gly His Asn Gly Glu Thr Lys Thr Pro Arg Pro Ser  
  
 1010                      1015                      1020  
 Ser Ala Arg Gly Ser Ser Gly Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser  
 1025                      1030                      1035                      1040  
 Ser Ser Ser Glu Leu Ser Thr Pro Glu Lys Pro Pro His Gln Arg Ala  
 1045                      1050                      1055  
 Gly Pro Phe Ser Ser Arg Trp Glu Thr Thr Met Gly Glu Ala Ser Ala  
 1060                      1065                      1070  
 Ser Ile Pro Thr Thr Val Gly Ser Leu Pro Ser Ser Lys Ser Phe Leu  
 1075                      1080                      1085  
  
 Gly Met Lys Ala Arg Glu Leu Phe Arg Asn Lys Ser Glu Ser Gln Cys  
 1090                      1095                      1100  
 Asp Glu Asp Gly Met Thr Ser Ser Leu Ser Glu Ser Leu Lys Thr Glu  
 1105                      1110                      1115                      1120  
 Leu Gly Lys Asp Leu Gly Val Glu Ala Lys Ile Pro Leu Asn Leu Asp  
 1125                      1130                      1135  
 Gly Pro His Pro Ser Pro Pro Thr Pro Asp Ser Val Gly Gln Leu His  
 1140                      1145                      1150  
 Ile Met Asp Tyr Asn Glu Thr His His Glu His Ser  
  
 1155                      1160

<210> 5  
 <211> 5424  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> gene  
 <222> (1)..(5424)  
 <223> wild type TSC2  
 <400> 5

atggccaaac caacaagcaa agattcaggc ttgaaggaga agtttaagat tctgttggga	60
ctgggaacac cgaggccaaa tcccagggtct gcagagggtta aacagacgga gtttatcatc	120
accgcggaaa tactgagaga actgagcatg gaatgtggcc tcaacaatcg catccggatg	180
atagggcaga tttgtgaagt cgcaaaaacc aagaaatttg aagagcacgc agtggaaagca	240
ctctggaagg cggtcgcgga tctgttgagc ccggagcggc cgctggaggc ccggcacgcg	300
gtgctggctc tgcgaaggc catcgtgcag gggcagggcg agcgtttggg ggtcctcaga	360
gccctcttct ttaaggtcat caaggattac ccttccaacg aagaccttca cgaaaggctg	420
gaggttttca aggccctcac agacaatggg agacacatca cctacttgga ggaagagctg	480
gctgactttg tctgcagtg gatggatgtt ggcttgcctt cggaattcct tctgggtgctg	540
gtgaacttgg tcaaatcaa tagctgttac ctgcagcagt acatcgcaag gatggttcag	600
atgatctgtc tgcgtgtcgt ccggaccgcg tcctctgtgg acatagaggt ctccctgcag	660
gtgctggacg ccgtggctctg ctacaactgc ctgccgctg agagcctccc gctgttcac	720
gttacctctt gtcgaccat caacgtcaag gagctctgcg agccttgctg gaagctgatg	780
cggaacctcc ttggcaccca cctgggccac agcgccatct acaacatgtg ccacctcatg	840
gaggacagag cctacatgga ggacgcgccc ctgctgagag gagccgtgtt ttttgtgggc	900
atggctctct ggggagccca ccggctctat tctctcagga actcgcgac atctgtgttg	960
ccatcatttt accaggccat ggcatgtccg aacgaggtgg tgcctatga gatcgtcctg	1020
tccatcacca ggctcatcaa gaagtatagg aaggagctcc aggtgggtggc gtgggacatt	1080
ctgctgaaca tcatgaacg gctccttcag cagctccaga ccttggacag cccggagctc	1140
aggaccatcg tccatgacct gttgaccacg gtggaggagc tgtgtgacca gaacgagttc	1200
cacgggtctc aggagagata ctttgaactg gtggagagat gtgcggacca gaggcctgag	1260
tcctccctcc tgaacctgat ctccataga gcgcagtcca tccacccggc caaggacggc	1320
tggattcaga acctgcaggc gctgatggag agattcttca ggagcgagtc ccgaggcgcc	1380
gtgcgcatca aggtgctgga cgtgctgtcc tttgtgtgc tcatcaacag gcagttctat	1440



gaggaggagc tgattaactc agtgggtcatc tcgcagctct cccacatccc cgaggataaa	1500
gaccaccagg tccgaaagct ggccaccagc ttgctgggtg acctggcaga gggctgccac	1560
acacaccact tcaacagcct gctggacatc atcgagaagg tgatggcccg ctccctctec	1620
ccacccccgg agctggaaga aagggatgtg gccgcatact cggcctcctt ggaggatgtg	1680
aagacagccg tcttggggct tctgggtcatc cttcagacca agctgtacac cctgcctgca	1740
agccacgcca cgcgtgtgta tgagatgctg gtcagccaca ttcagctcca ctacaagcac	1800
agctacacc tgccaatcgc gagcagcatc cggctgcagg cctttgactt cctgttgctg	1860
ctgcggggcg actcactgca ccgcctgggc ctgccaaca aggatggagt cgtgcggttc	1920
agcccctact gcgtctgca ctacatggag ccagagagag gctctgagaa gaagaccagc	1980
ggcccccttt ctctccac agggcctcct ggcccggcgc ctgcaggccc cggcgtgcgg	2040
ctggggctcg tgcctactc cctgtcttc cgcgtcctgc tgcagtgtt gaagcaggag	2100
tctgactgga aggtgctgaa gctggttctg ggcaggctgc ctgagtcct gcgtataaa	2160
gtgctcatct ttacttccc ttgcagtgtg gaccagctgt gctctgctct ctgctccatg	2220
ctttcaggcc caaagacact ggagcggctc cgaggcgccc cagaaggctt ctccagaact	2280
gacttgcacc tggccgtggt tccagtgtg acagcattaa tctcttacca taactacctg	2340
gacaaaacca aacagcgca gatggtctac tgcttgagc agggcctcat ccaccgtgt	2400
gccagccagt gcgtcgtggc cttgtccatc tgcagcgtgg agatgcctga catcatcatc	2460
aaggcgtgc ctgttctggt ggtgaagctc acgcacatct cagccacagc cagcatggcc	2520
gtcccactgc tggagtctt gtccactctg gccaggctgc cgcacctcta caggaacttt	2580
gccgcggagc agtatgccag tgtgttcgcc atctccctgc cgtacaccaa cccctccaag	2640
tttaatcagt acatcgtgtg tctggcccat cagctcatag ccatgtggt catcaggctc	2700
cgctgcctt tccggaagga ttttgtcct ttcactacta agggcctgcg gtccaatgtc	2760
ctcttgtctt ttgatgacac ccccgagaag gacagcttca gggcccgag tactagtctc	2820
aacgagagac ccaagagtct gaggatagcc agaccccca aacaaggctt gaataactct	2880
ccaccgtga aagaattcaa ggagagctct gcagccgagg ccttccggtg ccgcagcatc	2940
agtgtgtctg aacatgtggt ccgcagcagg atacagacgt ccctcaccag tgccagcttg	3000
gggtctgcag atgagaactc cgtggcccag gctgacgata gcctgaaaaa cctccacctg	3060
gagctcacgg aaacctgtct ggacatgatg gctcgatacg tcttctccaa cttcacggct	3120
gtcccgaaga ggtctcctgt gggcgagttc ctctagcgg gtggcaggac caaacctgg	3180

ctggttggga acaagcttgt cactgtgacg acaagcgtgg gaaccgggac cgggtcgta	3240
ctaggcctgg actcggggga gctgcagtcc ggcccggagt cgagctccag ccccggggtg	3300
catgtgagac agaccaagga ggccggcc aagctggagt cccaggctgg gcagcaggtg	3360
tcccgtgggg cccgggatcg ggtccgttcc atgtcggggg gccatggtct tcgagttggc	3420
gccctggacg tgccggcctc ccagttcctg ggcaagtcca cttctccagg accacggact	3480
gcaccagccg cgaaacctga gaaggcctca gctggcacc gggttctgt gcaggagaag	3540
acgaacctgg cggcctatgt gcccctgtg acccagggtt gggcggagat cctggtcgg	3600
aggccacag ggaacaccag ctggctgatg agcctggaga acccgtcag cctttctcc	3660
tcggacatca acaacatgcc cctgcaggag ctgtctaacg cctcatggc ggctgagcgc	3720
ttcaaggagc accgggacac agccctgtac aagtcactgt cggtgccgc agccagcacg	3780
gccaacccc ctctctgcc tcgtccaac acagtggcct ctttctctc cctgtaccag	3840
tccagctgcc aaggacagt gcacaggagc gtttctggg cagactccgc cgtggctatg	3900
gaggagggaa gtccggcgga ggttctgtg ctggtggagc cccagggtt ggaggacgtt	3960
gaggcagcgc taggcatgga caggcgcacg gatgcctaca gcaggtcgtc ctgagttcc	4020
agccaggagg agaagtcgtt ccacgcggag gagctggttg gcaggggcat cccatcgag	4080
cgagtcgtct cctcggaggg tggccggccc tctgtggacc tctcctcca gccctcgag	4140
cccctgagca agtcagctc ctctcccgag ctgcagactc tgcaggacat cctcggggac	4200
cctggggaca aggccgagt gggccggctg agccctgagg ttaaggccg gtacagtc	4260
gggaccctgg acggggaaag tgctgcctgg tcggcctcgg gcgaagacag tcggggccag	4320
cccagggtc ccttgcctc cagctcccc cgctcgcca gtggcctcg gccccagggt	4380
tacaccatct ccgactcggc cccatcacgc aggggcaaga gtagagag ggacgcctta	4440
aagagcagag ccacagctc caatgcagag aaagtgcag gcatcaacc cagtttcgtg	4500
ttcctgcagc tctaccatc cccctcttt ggcgacgagt caaacaagcc aatcctgtg	4560
cccaatgagt cacagtcctt tgagcggctg gtgcagctcc tcgaccagat cccatcatac	4620
gacaccaca agatgccgt cctgtatgtt ggagaaggcc agagcaacag cgagctcgcc	4680
atcctgtcca atgagcatgg ctctacagg tacacggagt tcctgacggg cctgggccgg	4740
ctcatcgagc tgaaggactg ccagccggac aaggtgtacc tgggagcct ggacgtgtgt	4800
ggtgaggacg gccagttcac ctactgttg cagcatgaca tcatgcaagc cgtcttcac	4860
atgccacc tgaatgccac caaggacgtg gacaagcacc gctgcgaca gaagcggcc	4920
ctgggcaacg actttgtgtc cattgtctac aatgactccg gtgaggactt caagcttggc	4980
accatcaagg gccagttcaa ctttgtccac gtgatgtca cccgctgga ctacagtg	5040

aacctggtgt ccctgcagtg caggaaagac atggagggcc ttgtggacac cagcgtggcc 5100  
aagatcgtgt ctgaccgcaa cctgcccttc gtggccgcc agatggccct gcacgcaaat 5160  
atggcctcac aggtgcatca tagccgctcc aacccacacg atatctaccc ctccaagtgg 5220  
attgcccggc tccgccacat caagcggctc cgccagcgga tctgcgagga agccgcctac 5280

tccaacccca gcctacctct ggtgcaccct cgtgccata gcaaagcccc tgcacagact 5340  
ccagccgagc ccacacctgg ctatgagggtg ggccagcgga agcgccctcat ctctcggtg 5400  
gaggacttca ccgagtttgt gtga 5424

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

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

1 5 10 15

Ile Leu Leu Gly Leu Gly Thr Pro Arg Pro Asn Pro Arg Ser Ala Glu

20 25 30

Gly Lys Gln Thr Glu Phe Ile Ile Thr Ala Glu Ile Leu Arg Glu Leu

35 40 45

Ser Met Glu Cys Gly Leu Asn Asn Arg Ile Arg Met Ile Gly Gln Ile

50 55 60

Cys Glu Val Ala Lys Thr Lys Lys Phe Glu Glu His Ala Val Glu Ala

65 70 75 80

Leu Trp Lys Ala Val Ala Asp Leu Leu Gln Pro Glu Arg Pro Leu Glu

85 90 95

Ala Arg His Ala Val Leu Ala Leu Leu Lys Ala Ile Val Gln Gly Gln

100 105 110

Gly Glu Arg Leu Gly Val Leu Arg Ala Leu Phe Phe Lys Val Ile Lys

115 120 125

Asp Tyr Pro Ser Asn Glu Asp Leu His Glu Arg Leu Glu Val Phe Lys

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

His Asp Leu Leu Thr Thr Val Glu Glu Leu Cys Asp Gln Asn Glu Phe  
 385 390 395 400  
 His Gly Ser Gln Glu Arg Tyr Phe Glu Leu Val Glu Arg Cys Ala Asp  
 405 410 415  
 Gln Arg Pro Glu Ser Ser Leu Leu Asn Leu Ile Ser Tyr Arg Ala Gln  
 420 425 430  
 Ser Ile His Pro Ala Lys Asp Gly Trp Ile Gln Asn Leu Gln Ala Leu  
 435 440 445  
  
 Met Glu Arg Phe Phe Arg Ser Glu Ser Arg Gly Ala Val Arg Ile Lys  
 450 455 460  
 Val Leu Asp Val Leu Ser Phe Val Leu Leu Ile Asn Arg Gln Phe Tyr  
 465 470 475 480  
 Glu Glu Glu Leu Ile Asn Ser Val Val Ile Ser Gln Leu Ser His Ile  
 485 490 495  
 Pro Glu Asp Lys Asp His Gln Val Arg Lys Leu Ala Thr Gln Leu Leu  
 500 505 510  
 Val Asp Leu Ala Glu Gly Cys His Thr His His Phe Asn Ser Leu Leu  
  
 515 520 525  
 Asp Ile Ile Glu Lys Val Met Ala Arg Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu  
 530 535 540  
 Leu Glu Glu Arg Asp Val Ala Ala Tyr Ser Ala Ser Leu Glu Asp Val  
 545 550 555 560  
 Lys Thr Ala Val Leu Gly Leu Leu Val Ile Leu Gln Thr Lys Leu Tyr  
 565 570 575  
 Thr Leu Pro Ala Ser His Ala Thr Arg Val Tyr Glu Met Leu Val Ser  
 580 585 590  
  
 His Ile Gln Leu His Tyr Lys His Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Ala Ser  
 595 600 605  
 Ser Ile Arg Leu Gln Ala Phe Asp Phe Leu Leu Leu Arg Ala Asp  
 610 615 620  
 Ser Leu His Arg Leu Gly Leu Pro Asn Lys Asp Gly Val Val Arg Phe  
 625 630 635 640

Ser Pro Tyr Cys Val Cys Asp Tyr Met Glu Pro Glu Arg Gly Ser Glu  
645 650 655

Lys Lys Thr Ser Gly Pro Leu Ser Pro Pro Thr Gly Pro Pro Gly Pro  
660 665 670

Ala Pro Ala Gly Pro Ala Val Arg Leu Gly Ser Val Pro Tyr Ser Leu  
675 680 685

Leu Phe Arg Val Leu Leu Gln Cys Leu Lys Gln Glu Ser Asp Trp Lys  
690 695 700

Val Leu Lys Leu Val Leu Gly Arg Leu Pro Glu Ser Leu Arg Tyr Lys  
705 710 715 720

Val Leu Ile Phe Thr Ser Pro Cys Ser Val Asp Gln Leu Cys Ser Ala  
725 730 735

Leu Cys Ser Met Leu Ser Gly Pro Lys Thr Leu Glu Arg Leu Arg Gly  
740 745 750

Ala Pro Glu Gly Phe Ser Arg Thr Asp Leu His Leu Ala Val Val Pro  
755 760 765

Val Leu Thr Ala Leu Ile Ser Tyr His Asn Tyr Leu Asp Lys Thr Lys  
770 775 780

Gln Arg Glu Met Val Tyr Cys Leu Glu Gln Gly Leu Ile His Arg Cys  
785 790 795 800

Ala Ser Gln Cys Val Val Ala Leu Ser Ile Cys Ser Val Glu Met Pro  
805 810 815

Asp Ile Ile Ile Lys Ala Leu Pro Val Leu Val Val Lys Leu Thr His  
820 825 830

Ile Ser Ala Thr Ala Ser Met Ala Val Pro Leu Leu Glu Phe Leu Ser  
835 840 845

Thr Leu Ala Arg Leu Pro His Leu Tyr Arg Asn Phe Ala Ala Glu Gln  
850 855 860

Tyr Ala Ser Val Phe Ala Ile Ser Leu Pro Tyr Thr Asn Pro Ser Lys  
865 870 875 880

Phe Asn Gln Tyr Ile Val Cys Leu Ala His His Val Ile Ala Met Trp

885                      890                      895  
 Phe Ile Arg Cys Arg Leu Pro Phe Arg Lys Asp Phe Val Pro Phe Ile  
 900                      905                      910  
 Thr Lys Gly Leu Arg Ser Asn Val Leu Leu Ser Phe Asp Asp Thr Pro  
 915                      920                      925  
 Glu Lys Asp Ser Phe Arg Ala Arg Ser Thr Ser Leu Asn Glu Arg Pro  
 930                      935                      940  
 Lys Ser Leu Arg Ile Ala Arg Pro Pro Lys Gln Gly Leu Asn Asn Ser  
  
 945                      950                      955                      960  
 Pro Pro Val Lys Glu Phe Lys Glu Ser Ser Ala Ala Glu Ala Phe Arg  
 965                      970                      975  
 Cys Arg Ser Ile Ser Val Ser Glu His Val Val Arg Ser Arg Ile Gln  
 980                      985                      990  
 Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ser Leu Gly Ser Ala Asp Glu Asn Ser Val  
 995                      1000                      1005  
 Ala Gln Ala Asp Asp Ser Leu Lys Asn Leu His Leu Glu Leu Thr Glu  
 1010                      1015                      1020  
  
 Thr Cys Leu Asp Met Met Ala Arg Tyr Val Phe Ser Asn Phe Thr Ala  
 1025                      1030                      1035                      1040  
 Val Pro Lys Arg Ser Pro Val Gly Glu Phe Leu Leu Ala Gly Gly Arg  
 1045                      1050                      1055  
 Thr Lys Thr Trp Leu Val Gly Asn Lys Leu Val Thr Val Thr Thr Ser  
 1060                      1065                      1070  
 Val Gly Thr Gly Thr Arg Ser Leu Leu Gly Leu Asp Ser Gly Glu Leu  
 1075                      1080                      1085  
 Gln Ser Gly Pro Glu Ser Ser Ser Ser Pro Gly Val His Val Arg Gln  
  
 1090                      1095                      1100  
 Thr Lys Glu Ala Pro Ala Lys Leu Glu Ser Gln Ala Gly Gln Gln Val  
 1105                      1110                      1115                      1120  
 Ser Arg Gly Ala Arg Asp Arg Val Arg Ser Met Ser Gly Gly His Gly  
 1125                      1130                      1135  
 Leu Arg Val Gly Ala Leu Asp Val Pro Ala Ser Gln Phe Leu Gly Ser



1140 1145 1150  
Ala Thr Ser Pro Gly Pro Arg Thr Ala Pro Ala Ala Lys Pro Glu Lys  
1155 1160 1165

Ala Ser Ala Gly Thr Arg Val Pro Val Gln Glu Lys Thr Asn Leu Ala  
1170 1175 1180

Ala Tyr Val Pro Leu Leu Thr Gln Gly Trp Ala Glu Ile Leu Val Arg  
1185 1190 1195 1200

Arg Pro Thr Gly Asn Thr Ser Trp Leu Met Ser Leu Glu Asn Pro Leu  
1205 1210 1215

Ser Pro Phe Ser Ser Asp Ile Asn Asn Met Pro Leu Gln Glu Leu Ser  
1220 1225 1230

Asn Ala Leu Met Ala Ala Glu Arg Phe Lys Glu His Arg Asp Thr Ala

1235 1240 1245  
Leu Tyr Lys Ser Leu Ser Val Pro Ala Ala Ser Thr Ala Lys Pro Pro

1250 1255 1260  
Pro Leu Pro Arg Ser Asn Thr Val Ala Ser Phe Ser Ser Leu Tyr Gln

1265 1270 1275 1280  
Ser Ser Cys Gln Gly Gln Leu His Arg Ser Val Ser Trp Ala Asp Ser

1285 1290 1295  
Ala Val Val Met Glu Glu Gly Ser Pro Gly Glu Val Pro Val Leu Val

1300 1305 1310

Glu Pro Pro Gly Leu Glu Asp Val Glu Ala Ala Leu Gly Met Asp Arg  
1315 1320 1325

Arg Thr Asp Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Val Ser Ser Gln Glu Glu  
1330 1335 1340

Lys Ser Leu His Ala Glu Glu Leu Val Gly Arg Gly Ile Pro Ile Glu  
1345 1350 1355 1360

Arg Val Val Ser Ser Glu Gly Gly Arg Pro Ser Val Asp Leu Ser Phe  
1365 1370 1375

Gln Pro Ser Gln Pro Leu Ser Lys Ser Ser Ser Ser Pro Glu Leu Gln

1380 1385 1390

Thr Leu Gln Asp Ile Leu Gly Asp Pro Gly Asp Lys Ala Asp Val Gly  
1395 1400 1405

Arg Leu Ser Pro Glu Val Lys Ala Arg Ser Gln Ser Gly Thr Leu Asp  
1410 1415 1420

Gly Glu Ser Ala Ala Trp Ser Ala Ser Gly Glu Asp Ser Arg Gly Gln  
1425 1430 1435 1440

Pro Glu Gly Pro Leu Pro Ser Ser Ser Pro Arg Ser Pro Ser Gly Leu  
1445 1450 1455

Arg Pro Arg Gly Tyr Thr Ile Ser Asp Ser Ala Pro Ser Arg Arg Gly  
1460 1465 1470

Lys Arg Val Glu Arg Asp Ala Leu Lys Ser Arg Ala Thr Ala Ser Asn  
1475 1480 1485

Ala Glu Lys Val Pro Gly Ile Asn Pro Ser Phe Val Phe Leu Gln Leu  
1490 1495 1500

Tyr His Ser Pro Phe Phe Gly Asp Glu Ser Asn Lys Pro Ile Leu Leu  
1505 1510 1515 1520

Pro Asn Glu Ser Gln Ser Phe Glu Arg Ser Val Gln Leu Leu Asp Gln  
1525 1530 1535

Ile Pro Ser Tyr Asp Thr His Lys Ile Ala Val Leu Tyr Val Gly Glu  
1540 1545 1550

Gly Gln Ser Asn Ser Glu Leu Ala Ile Leu Ser Asn Glu His Gly Ser  
1555 1560 1565

Tyr Arg Tyr Thr Glu Phe Leu Thr Gly Leu Gly Arg Leu Ile Glu Leu  
1570 1575 1580

Lys Asp Cys Gln Pro Asp Lys Val Tyr Leu Gly Gly Leu Asp Val Cys  
1585 1590 1595 1600

Gly Glu Asp Gly Gln Phe Thr Tyr Cys Trp His Asp Asp Ile Met Gln  
1605 1610 1615

Ala Val Phe His Ile Ala Thr Leu Met Pro Thr Lys Asp Val Asp Lys  
1620 1625 1630

His Arg Cys Asp Lys Lys Arg His Leu Gly Asn Asp Phe Val Ser Ile  
1635 1640 1645

Val Tyr Asn Asp Ser Gly Glu Asp Phe Lys Leu Gly Thr Ile Lys Gly

1650 1655 1660

Gln Phe Asn Phe Val His Val Ile Val Thr Pro Leu Asp Tyr Glu Cys

1665 1670 1675 1680

Asn Leu Val Ser Leu Gln Cys Arg Lys Asp Met Glu Gly Leu Val Asp

1685 1690 1695

Thr Ser Val Ala Lys Ile Val Ser Asp Arg Asn Leu Pro Phe Val Ala

1700 1705 1710

Arg Gln Met Ala Leu His Ala Asn Met Ala Ser Gln Val His His Ser

1715 1720 1725

Arg Ser Asn Pro Thr Asp Ile Tyr Pro Ser Lys Trp Ile Ala Arg Leu

1730 1735 1740

Arg His Ile Lys Arg Leu Arg Gln Arg Ile Cys Glu Glu Ala Ala Tyr

1745 1750 1755 1760

Ser Asn Pro Ser Leu Pro Leu Val His Pro Pro Ser His Ser Lys Ala

1765 1770 1775

Pro Ala Gln Thr Pro Ala Glu Pro Thr Pro Gly Tyr Glu Val Gly Gln

1780 1785 1790

Arg Lys Arg Leu Ile Ser Ser Val Glu Asp Phe Thr Glu Phe Val

1795 1800 1805

<210> 7

<211> 1398

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(1398)

<223> wild type AKT3

<400> 7

atgagcgatg ttaccattgt gaaagaaggt tgggttcaga agaggggaga atatatataaa 60

aactggaggc caagatactt ccttttgaag acagatggct cattcatagg atataaagag 120

aaacctcaag atgtggattt accttatccc ctcaacaact tttcagtggc aaaatgccag 180

ttaatgaaaa cagaacgacc aaagccaaac acatttataa tcagatgtct ccagtggact 240

actgttatag agagaacatt tcatgtagat actccagagg aaaggaaga atggacagaa 300

gctatccagg ctgtagcaga cagactgcag aggcaagaag aggagagaat gaattgtagt 360

ccaacttcac aaattgataa tataggagag gaagagatgg atgcctctac aacccatcat 420

aaaagaaaga caatgaatga ttttgactat ttgaaactac taggtaaagg cacttttggg 480

aaagtatttt tggttcgaga gaaggcaagt ggaaaatact atgctatgaa gattctgaag 540

aaagaagtca ttattgcaaa ggatgaagtg gcacacactc taactgaaag cagagtatta 600

aagaacacta gacatccctt ttaacatcc ttgaaatatt ccttcagac aaaagaccgt 660

ttgtgttttg tgatggaata tgtaaatggg ggcgagctgt ttttccattt gtcgagagag 720

cgggtgttct ctgaggaccg cacacgtttc tatggtgcag aaattgtctc tgccttggac 780

tatctacatt ccggaagat tgtgtaccgt gatctcaagt tggagaatct aatgctggac 840

aaagatggcc acataaaaaa tacagatttt ggactttgca aagaagggat cacagatgca 900

gccacatga agacattctg tggcactcca gaatatctgg caccagaggt gttagaagat 960

aatgactatg gccgagcagt agactggtgg ggcctagggg ttgtcatgta tgaaatgatg 1020

tgtgggaggt tacctttcta caaccaggac catgagaaac tttttgaatt aatattaatg 1080

gaagacatta aatttcctcg aacactctct tcagatgcaa aatcattgct ttcagggctc 1140

ttgataaagg atccaaataa acgccttggg ggaggaccag atgatgcaaa agaaattatg 1200

agacacagtt tcttctctgg agtaaaactgg caagatgtat atgataaaaa gcttgtacct 1260

ccttttaaac ctcaagtaac atctgagaca gatactagat atttgatga agaatttaca 1320

gtcagacta ttacaataac accacctgaa aaatgtcagc aatcagattg tggcatgctg 1380

ggtaactgga aaaaataa 1398

<210> 8

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(465)

<223>

wild type AKT3

<400> 8

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

1 5 10 15

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

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

Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr

275 280 285  
 Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Ala Thr Met Lys  
 290 295 300  
 Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp  
 305 310 315 320  
 Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met  
 325 330 335  
 Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu  
 340 345 350

Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg Thr  
 355 360 365  
 Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys Asp  
 370 375 380  
 Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Ala Lys Glu Ile Met  
 385 390 395 400  
 Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp Lys  
 405 410 415  
 Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr

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

Lys

465

<210> 9

<211> 3207

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(3207)

<223> wild type PIK3CA

<400> 9

atgcctccac gaccatcatc aggtgaactg tggggcatcc acttgatgcc cccaagaatc	60
ctagtagaat gtttactacc aaatggaatg atagtgactt tagaatgcct ccgtgaggct	120
acattaataa ccataaagca tgaactatctt aaagaagcaa gaaaataccc cctccatcaa	180
cttcttcaag atgaatcttc ttacatcttc gtaagtgtta ctcaagaagc agaaagggaa	240
gaattttttg atgaaacaag acgactttgt gaccttcggc ttttcaacc ctttttaaaa	300
gtaattgaac cagtaggcaa ccgtgaagaa aagatcctca atcgagaaat tggttttgct	360
atcgcatgc cagtgtgtga atttgatatg gttaaagatc cagaagtaca ggacttccga	420
agaaatattc tgaacgtttg taaagaagct gtggatctta gggacctcaa ttcacctcat	480
agtagagcaa tgtatgtcta tcctccaaat gtagaatctt caccagaatt gccaaagcac	540
atataataa aattagataa agggcaaata atagtgtga tctgggtaat agtttctcca	600
aataatgaca agcagaagta tactctgaaa atcaacctg actgtgtacc agaacaagta	660
attgtgaag caatcaggaa aaaaactcga agtatgttc taccctctga acaactaaaa	720
ctctgtgttt tagaataatc gggcaagtat attttaaaag tgtgtggatg tgatgaatac	780
ttcctagaaa aatatectct gagtcatgat aagtatataa gaagctgtat aatgcttggg	840
aggatgcccc atttgatgtt gatggctaaa gaaagccttt atttcaact gccaatggac	900
tgttttacaa tgccatctta ttccagacgc atttcacag ctacaccata tatgaatgga	960
gaaacatcta caaaatccct ttgggttata aatagtgcac tcagaataaa aattctttgt	1020
gcaacctacg tgaatgtaaa tattcgagac attgataaga tctatgttcg aacaggtatc	1080
taccatggag gagaaccctt atgtgacaat gtgaacactc aaagagtacc ttgttccaat	1140
cccaggtgga atgaatggct gaattatgat atatacattc ctgatcttcc tcgtgctgct	1200
cgactttgcc ttccatttg ctctgttaaa ggccgaaagg gtgctaaaga ggaacactgt	1260
ccattggcat ggggaaatat aaacttgttt gattacacag acactctagt atctggaaaa	1320
atggctttga atctttggcc agtacctcat ggattagaag atttgctgaa ccctatttgt	1380
gttactggat caaatccaaa taaagaaact ccattgcttag agttggagtt tgactggttc	1440
agcagtgtgg taaagtcccc agatatgtca gtgattgaag agcatgccaa ttggtctgta	1500
tcccgagaag caggatttag ctattccac gcaggactga gtaacagact agctagagac	1560
aatgaattaa gggaaaatga caaagaacag ctcaaagcaa tttctacacg agatcctctc	1620
tctgaaatca ctgagcagga gaaagatttt ctatggagtc acagacacta ttgtgtaact	1680



atccccgaaa ttctacccaa attgcttctg tctgttaaatt ggaattctag agatgaagta 1740

gcccagatgt attgcttggg aaaagattgg cctccaatca aacctgaaca ggctatggaa 1800

cttctggact gtaattacce agatcctatg gttcgagggt ttgctgttcg gtgcttggaa 1860

aaatatTTaa cagatgacaa actttctcag tatttaattc agctagtaca ggtcctaaaa 1920

tatgaacaat atttggataa cttgcttctg agatTTttac tgaagaaagc attgactaat 1980

caaaggattg ggcactTTTT cttttggcat ttaaaatctg agatgcacaa taaaacagtt 2040

agccagaggt ttggcctgct tttggagtcc tattgtcgtg catgtgggat gtatttgaag 2100

cacctgaata ggcaagtcga ggcaatggaa aagctcatta acttaactga cattctcaaa 2160

caggagaaga aggatgaaac acaaaaggta cagatgaagt ttttagttga gcaaatgagg 2220

cgaccagatt tcatggatgc tctacagggc tttctgtctc ctctaaacce tgctcatcaa 2280

ctaggaaacc tcaggcttga agagtgtcga attatgtcct ctgcaaaaag gccactgtgg 2340

ttgaattggg agaaccaga catcatgtca gagttactgt ttcagaacaa tgagatcatc 2400

tttaaaaatg gggatgattt acggcaagat atgctaacac ttcaaattat tcgtattatg 2460

gaaaatatct ggcaaaatca aggtcttgat ctctgaatgt taccttatgg ttgtctgtca 2520

atcggtgact gtgtgggact tattgagggtg gtgcgaaatt ctcacactat tatgcaaatt 2580

cagtgcaaag gcggcttgaa aggtgcactg cagttcaaca gccacacact acatcagtgg 2640

ctcaaagaca agaacaagg agaaatatat gatgcagcca ttgacctgtt tacacgttca 2700

tgtgtctggat actgtgtagc taccttcatt ttgggaattg gagatcgtca caatagtaac 2760

atcatggatga aagacgatgg acaactgttt catatagatt ttggacactt ttggatcac 2820

aagaagaaaa aatttggtta taaacgagaa cgtgtgccat ttgttttgac acaggatttc 2880

ttaatagtga ttagtaaagg agcccaagaa tgcacaaaga caagagaatt tgagaggttt 2940

caggagatgt gttacaaggc ttatctagct attcgacagc atgccaatct cttcataaat 3000

cttttctcaa tgatgcttgg ctctggaatg ccagaactac aatcttttga tgacattgca 3060

tacattcgaa agaccttagc cttagataaa actgagcaag aggcttttga gtatttcag 3120

aaacaaatga atgatgcaca tcatggtggc tggacaacaa aaatggattg gatcttcac 3180

acaattaaac agcatgcatt gaactga 3207

<210> 10

<211> 1068

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(1068)

<223> wild type PIK3CA

<400> 10

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

1 5 10 15  
Pro Pro Arg Ile Leu Val Glu Cys Leu Leu Pro Asn Gly Met Ile Val

20 25 30  
Thr Leu Glu Cys Leu Arg Glu Ala Thr Leu Ile Thr Ile Lys His Glu

35 40 45  
Leu Phe Lys Glu Ala Arg Lys Tyr Pro Leu His Gln Leu Leu Gln Asp

50 55 60  
Glu Ser Ser Tyr Ile Phe Val Ser Val Thr Gln Glu Ala Glu Arg Glu

65 70 75 80

Glu Phe Phe Asp Glu Thr Arg Arg Leu Cys Asp Leu Arg Leu Phe Gln  
85 90 95

Pro Phe Leu Lys Val Ile Glu Pro Val Gly Asn Arg Glu Glu Lys Ile  
100 105 110

Leu Asn Arg Glu Ile Gly Phe Ala Ile Gly Met Pro Val Cys Glu Phe  
115 120 125

Asp Met Val Lys Asp Pro Glu Val Gln Asp Phe Arg Arg Asn Ile Leu  
130 135 140

Asn Val Cys Lys Glu Ala Val Asp Leu Arg Asp Leu Asn Ser Pro His

145 150 155 160  
Ser Arg Ala Met Tyr Val Tyr Pro Pro Asn Val Glu Ser Ser Pro Glu

165 170 175  
Leu Pro Lys His Ile Tyr Asn Lys Leu Asp Lys Gly Gln Ile Ile Val

180 185 190  
Val Ile Trp Val Ile Val Ser Pro Asn Asn Asp Lys Gln Lys Tyr Thr

195 200 205  
Leu Lys Ile Asn His Asp Cys Val Pro Glu Gln Val Ile Ala Glu Ala

210 215 220

Ile Arg Lys Lys Thr Arg Ser Met Leu Leu Ser Ser Glu Gln Leu Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Cys Val Leu Glu Tyr Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Lys Val Cys Gly  
 245 250 255  
 Cys Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Lys Tyr Pro Leu Ser Gln Tyr Lys Tyr  
 260 265 270  
 Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro Asn Leu Met Leu Met  
 275 280 285  
 Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met Asp Cys Phe Thr Met  
 290 295 300  
 Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr Pro Tyr Met Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn Ser Ala Leu Arg Ile  
 325 330 335  
 Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn Ile Arg Asp Ile Asp  
 340 345 350  
 Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly Gly Glu Pro Leu Cys  
 355 360 365  
 Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser Asn Pro Arg Trp Asn  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp Leu Pro Arg Ala Ala  
 385 390 395 400  
 Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly Arg Lys Gly Ala Lys  
 405 410 415  
 Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile Asn Leu Phe Asp Tyr  
 420 425 430  
 Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu Asn Leu Trp Pro Val  
 435 440 445  
 Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile Gly Val Thr Gly Ser  
 450 455 460  
 Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu Glu Phe Asp Trp Phe  
 465 470 475 480

Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val Ile Glu Glu His Ala  
485 490 495

Asn Trp Ser Val Ser Arg Glu Ala Gly Phe Ser Tyr Ser His Ala Gly  
500 505 510

Leu Ser Asn Arg Leu Ala Arg Asp Asn Glu Leu Arg Glu Asn Asp Lys  
515 520 525

Glu Gln Leu Lys Ala Ile Ser Thr Arg Asp Pro Leu Ser Glu Ile Thr  
530 535 540

Glu Gln Glu Lys Asp Phe Leu Trp Ser His Arg His Tyr Cys Val Thr  
545 550 555 560

Ile Pro Glu Ile Leu Pro Lys Leu Leu Leu Ser Val Lys Trp Asn Ser  
565 570 575

Arg Asp Glu Val Ala Gln Met Tyr Cys Leu Val Lys Asp Trp Pro Pro  
580 585 590

Ile Lys Pro Glu Gln Ala Met Glu Leu Leu Asp Cys Asn Tyr Pro Asp  
595 600 605

Pro Met Val Arg Gly Phe Ala Val Arg Cys Leu Glu Lys Tyr Leu Thr  
610 615 620

Asp Asp Lys Leu Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Leu Val Gln Val Leu Lys  
625 630 635 640

Tyr Glu Gln Tyr Leu Asp Asn Leu Leu Val Arg Phe Leu Leu Lys Lys  
645 650 655

Ala Leu Thr Asn Gln Arg Ile Gly His Phe Phe Phe Trp His Leu Lys  
660 665 670

Ser Glu Met His Asn Lys Thr Val Ser Gln Arg Phe Gly Leu Leu Leu  
675 680 685

Glu Ser Tyr Cys Arg Ala Cys Gly Met Tyr Leu Lys His Leu Asn Arg  
690 695 700

Gln Val Glu Ala Met Glu Lys Leu Ile Asn Leu Thr Asp Ile Leu Lys  
705 710 715 720

Gln Glu Lys Lys Asp Glu Thr Gln Lys Val Gln Met Lys Phe Leu Val

725	730	735
Glu Gln Met Arg Arg Pro Asp Phe Met Asp Ala Leu Gln Gly Phe Leu		
740	745	750
Ser Pro Leu Asn Pro Ala His Gln Leu Gly Asn Leu Arg Leu Glu Glu		
755	760	765
Cys Arg Ile Met Ser Ser Ala Lys Arg Pro Leu Trp Leu Asn Trp Glu		
770	775	780
Asn Pro Asp Ile Met Ser Glu Leu Leu Phe Gln Asn Asn Glu Ile Ile		
785	790	795
		800
Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Ile		
805	810	815
Ile Arg Ile Met Glu Asn Ile Trp Gln Asn Gln Gly Leu Asp Leu Arg		
820	825	830
Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ser Ile Gly Asp Cys Val Gly Leu Ile		
835	840	845
Glu Val Val Arg Asn Ser His Thr Ile Met Gln Ile Gln Cys Lys Gly		
850	855	860
Gly Leu Lys Gly Ala Leu Gln Phe Asn Ser His Thr Leu His Gln Trp		
865	870	875
		880
Leu Lys Asp Lys Asn Lys Gly Glu Ile Tyr Asp Ala Ala Ile Asp Leu		
885	890	895
Phe Thr Arg Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Phe Ile Leu Gly		
900	905	910
Ile Gly Asp Arg His Asn Ser Asn Ile Met Val Lys Asp Asp Gly Gln		
915	920	925
Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Phe Leu Asp His Lys Lys Lys Lys		
930	935	940
Phe Gly Tyr Lys Arg Glu Arg Val Pro Phe Val Leu Thr Gln Asp Phe		
945	950	955
		960
Leu Ile Val Ile Ser Lys Gly Ala Gln Glu Cys Thr Lys Thr Arg Glu		
965	970	975
Phe Glu Arg Phe Gln Glu Met Cys Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Ile Arg		

980 985 990  
Gln His Ala Asn Leu Phe Ile Asn Leu Phe Ser Met Met Leu Gly Ser  
995 1000 1005  
Gly Met Pro Glu Leu Gln Ser Phe Asp Asp Ile Ala Tyr Ile Arg Lys

1010 1015 1020  
Thr Leu Ala Leu Asp Lys Thr Glu Gln Glu Ala Leu Glu Tyr Phe Met  
1025 1030 1035 1040  
Lys Gln Met Asn Asp Ala His His Gly Gly Trp Thr Thr Lys Met Asp  
1045 1050 1055  
Trp Ile Phe His Thr Ile Lys Gln His Ala Leu Asn

1060 1065  
<210> 11  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> annealing forward primer for pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP

<400> 11  
aattccaatt gcccggtt aagatcgata cgcgta 36

<210> 12  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> annealing reverse primer for pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP

<400> 12  
ccggtacgcg tatcgatctt aagcccggtc aattgg 36

<210> 13  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> forward primer for pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP  
<400> 13  
gatcacaatt gtggccacca tggactacaa ggacgacgat gacaagatgc 50

<210> 14  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer for pCIG-mTOR mutant-IRES-EGFP  
 <400> 14  
 tgatcaacgc gttaccaga aaggcacca gccaatatag c 41  
 <210> 15  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Y1450D sense primer  
 <400> 15  
 tcgtgcagtt tctcatcca ggtagcctgg atc 33  
 <210> 16  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 > Y1450D antisense primer  
 <400> 16  
 gatccaggct acctgggatg agaaactgca cga 33  
 <210> 17  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> C1483R sense primer  
 <400> 17  
 ggctcgagg cggcgcacgc ggc 23  
 <210> 18  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> C1483R antisense primer  
 <400> 18

gccgcatgcg ccgcctcgag gcc

23

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> L2427Q sense primer

<400> 19

gtctatgacc ccttgacagaa ctggaggctg atg

33

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> L2427Q antisense primer

<400> 20

catcagcctc cagttctgca aggggtcata gac

33

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> L2427P sense primer

<400> 21

gtctatgacc ccttgccgaa ctggaggctg atg

33

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> L2427P antisense primer

<400> 22

catcagcctc cagttcggca aggggtcata gac

33

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220><223> TSC-1 R22W-F primer

<400> 23

gtcacgtcgt cccacacacc cagcatg

27

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TSC-1 R22W-R primer

<400> 24

catgctgggt gtgtgggacg acgtgac

27

<210> 25

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TSC-1 R204C-F primer

<400> 25

ctttcatact gtaatgagaa cacaaaaagg agacgaagtt gca

43

<210> 26

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TSC-1 R204C-R primer

<400> 26

tgcaacttcg tctccttttt gtgttctcat tacagtatga aag

43

<210> 27

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TSC-2 V1547I-F primer

<400> 27

tctccaacat acaggatggc gatcttgtgg gtg

33

<210> 28

<211> 33

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TSC-2 V1547I-R primer	
<400>	28	
	caccacaag atcgccatcc tgtatgttg aga	33
<210>	29	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AKT3 R247H-F primer	
<400>	29	
	cacatagaa acgtgtgtgg tcctcagaga acacc	35
<210>	30	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AKT3 R247H-R primer	
<400>	30	
	ggtgtttctct gaggaccaca cacgtttcta tgg	35
<210>	31	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DNA sequence corresponding to TSC1 targetting sgRNA	
<400>	31	
	tgctggactc ctccacactg	20
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DNA sequence corresponding to TSC2 targetting sgRNA	
<400>	32	
	aatcccaggt gtgcagaagg	20