(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0013764
(43) 공개일자 2018년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *A61K 35/407* (2015.01)
C12N 15/85 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/067 (2013.01)
A61K 35/407 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0095363
(22) 출원일자 2017년07월27일
심사청구일자 2017년07월27일
(30) 우선권주장
1020160096469 2016년07월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김정범
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
박명래
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **체세포로부터 간 줄기세포, 간세포, 또는 담관세포로의 직접교차분화 유도용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 체세포로부터 간 줄기세포 (induced Hepatic stem cell, iHSC), 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 직접교차분화 유도용 조성물, 상기 조성물을 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 체세포를 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 직접교차분화하는 방법, 및 상기 방법에 의해서 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화 유도된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 간 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 5/0672 (2013.01)
G01N 33/5067 (2013.01)
C12N 2506/14 (2013.01)
G01N 2500/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016M3A9B4919719
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오의료개발사업 (줄기세포연구사업)
연구과제명 유전자 비삽입형 in vivo 리프로그래밍 기술 기반 난치성 간질환 치료 원천기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2016.07.01 ~ 2021.03.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711052664
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 세포재생기술개발사업
연구과제명 조직 재건용 바이오잉크 기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2017.04.01 ~ 2021.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF4α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질, NR4A2 (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2) 단백질, NR4A1 (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1) 단백질, TBX3 (T-box transcription factor 3) 단백질, NR5A1 (Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1) 단백질, NR5A2 (Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2) 단백질, 및 NR0B2 (Nuclear receptor subfamily 0 group B member 1) 단백질,

(2) 상기 각각의 단백질을 코딩하는 핵산분자들, 및

(3) 상기 각각의 핵산분자가 도입된 벡터들

로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는,

체세포로부터 간 줄기세포(induced Hepatic stem cells, iHSC), 간세포 (Hepatocytes), 및 담관세포 (Cholangiocytes)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

OCT4 단백질, OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자, 및 OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상 및

HNF4α 단백질, NR4A1 단백질, NR4A2 단백질, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, 및 NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, TBX3 단백질, NR5A1 단백질, NR5A2 단백질, NR0B2 단백질, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, 및 NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 (Retrovirus) 벡터, HIV (Human immunodeficiency virus) 벡터, MLV (Murineleukemia virus)벡터, ASLV (Avian sarcoma/leukosis) 벡터, SNV (Spleen necrosis virus)벡터, RSV (Rous sarcoma virus)벡터, MMTV(Mouse mammary tumor virus) 벡터, 아데노바이러스 (Adenovirus) 벡터, 아데노 관련 바이러스 (Adeno-associatedvirus) 벡터 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 (Herpes simplex virus) 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 체세포는 섬유아세포 (fibroblast), 상피세포, 근육세포, 신경세포, 모발세포, 모근세포, 모낭세포, 구강상피세포, 소변에서 추출한 체세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, B세포, 주피세포, 성상교세포 (astrocyte) 혈액세포, 신경 줄기세포, 조혈모 줄기세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 간 줄기세포는 간세포 또는 담관세포로 분화할 수 있는 것인, 조성물.

청구항 7

(1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF4α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질, NR4A2 (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2) 단백질, NR4A1 (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1) 단백질, TBX3 (T-box transcription factor 3) 단백질, NR5A1 (Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1) 단백질, NR5A2 (Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2) 단백질, 및 NR0B2 (Nuclear receptor subfamily 0 group B member 1) 단백질,

(2) 상기 각각의 단백질을 코딩하는 핵산분자들, 및

(3) 상기 각각의 핵산분자가 도입된 벡터들

로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는,직접교차분화 유도용 조성물을 체세포에 도입하는 단계를 포함하는,

체세포를 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 직접교차분화하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 직접교차분화 유도용 조성물은 OCT4 단백질, OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자, 및 OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상 및 HNF4α 단백질, NR4A1 단백질, NR4A2 단백질, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, 및 NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 직접교차분화 유도용 조성물은 TBX3 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, NR5A1 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, NR5A2 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, NR0B2 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, 및 NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스(Retrovirus) 벡터, HIV(Human immunodeficiency virus) 벡터, MLV(Murineleukemia virus)벡터, ASLV(Avian sarcoma/leukosis) 벡터, SNV(Spleen necrosis virus)벡터, RSV(Rous sarcoma virus)벡터, MMTV(Mouse mammary tumor virus) 벡터, 아데노바이러스(Adenovirus) 벡터, 아데노 관련 바이러스(Adeno-associatedvirus) 벡터 및 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 체세포는 섬유아세포, 상피세포, 근육세포, 신경세포, 모발세포, 모근세포, 모낭세포, 구강상피세포, 소변에서 추출한 체세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, B세포, 주피세포, 성상교세포, 혈액세포, 신경줄기세포, 조혈모줄기세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인, 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 직접교차분화된 간 줄기세포를 간세포 또는 담관세포로 분화시키는 단계를 추가로 포함하

는, 방법.

청구항 13

제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 의하여 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 간 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 간 질환은 간 섬유화, 간경변증, 간염, 간암, 알코올성 지방간, 비알코올성 지방간, 고호모시스테인혈증과 이와 관련된 심뇌혈관계 질환, 혈전증, 동맥경화로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인, 약학 조성물.

청구항 15

제1 세포 시료에 후보 물질을 접촉시키는 단계;

상기 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준을 측정하는 단계;

상기 후보 물질을 접촉시킨 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준을 후보 물질을 접촉시키지 않은 제2 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준과 비교하는 단계; 및

상기 후보 물질을 접촉시킨 제1 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준이 후보 물질을 접촉시키지 않은 제2 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준보다 낮은 경우, 상기 후보 물질을 간 질환의 예방 또는 치료 약물의 후보 약물로 결정하는 단계

를 포함하고,

상기 제1 세포 시료 및 제2 세포 시료는 각각 독립적으로 제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 의하여 직접교차분화된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인,

간질환의 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 체세포로부터 간 줄기세포(induced Hepatic stem cell, iHSC), 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 직접교차분화 유도용 조성물 및 상기 조성물을 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 체세포를 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 직접교차분화하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 기존의 배아줄기세포 및 역분화줄기세포를 이용한 간세포 분화방법은 배아를 파괴하여 배아줄기세포를 확립하거나 체세포에서 역분화줄기세포의 단계로 역분화 과정 (Reprogramming)을 거친 후 이어서 간세포로 분화단계(Differentiation)를 거쳐야 간세포를 제작할 수 있다. 그러나 기존의 방법은 배아줄기세포를 얻는 과정에서 발생하는 윤리적 문제점이 존재하고, 역분화줄기세포를 이용할 경우 분화단계의 시간적, 금전적 비용 및 노력이 많이 소요되고, 수율 (Efficiency)이 낮으며, 인위적인 분화능의 조절이 용이하지 않아 비효율적인 방법이라는 문제점이 존재한다.

[0003] 또한, 종래의 배아줄기세포 및 역분화줄기세포를 이용한 간세포 분화방법은 시험관수준에서 약물대사와 독성 검증에 요구되는 충분한 수의 세포를 확보하기 어렵고, 간 기능 재생을 위한 세포치료를 적용단계에서 미분화세포로부터 유래한 기형종 (teratoma)이 형성될 가능성이 높아 안전성이 담보되지 않는 기술이라는 문제점이 존재한다.

[0004] 따라서, 체세포에서 간 줄기세포, 간세포, 담관세포 등으로 직접교차분화하는 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 또한, 기존의 약물 스크리닝에 사용되는 다양한 세포 자원들은 다음과 같은 문제점과 한계가 있다. 예를 들어 마우스 유래 초대배양 간세포는 사람에서 유래한 세포가 아니라 약물의 효과를 정확히 검증하기 어렵고, 사람에

서 유래한 초대배양 간세포는 그 확보가 제한적이며 시험관 환경에서 증식 (proliferation)이 어렵고 기능을 유지하기 어려운 한계가 있다. 간암세포에서 유래한 HepG2와 HepaRG의 경우 시험관 환경에서 증식은 가능하지만 담관세포로 분화능이 없거나 매우 낮으며 약물의 기능을 검증하기에 부적절한 수준의 약물대사기능을 갖는 세포이므로 약물 스크리닝에 사용하기에는 부적합하다.

[0006] 따라서, 약물 스크리닝에 적합한 세포 자원을 확보하여야 할 필요성이 대두되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 직접교차분화인자를 포함하는 체세포로부터 유도간 줄기세포(induced Hepatic stem cell, iHSC), 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로의 직접교차분화 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 상기 직접교차분화인자는

[0009] (1) OCT4 단백질, HNF4α 단백질, NR4A2 단백질, NR4A1 단백질, TBX3 단백질, NR5A1 단백질, NR5A2 단백질, 및 NR0B2 단백질,

[0010] (2) 상기 각각의 단백질을 코딩하는 핵산분자들, 및

[0011] (3) 상기 각각의 핵산분자가 도입된 벡터들

[0012] 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 직접교차분화인자를 체세포에 도입하는 단계를 포함하는, 체세포를 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 직접교차분화하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해서 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화 유도된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 간 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 렌티바이러스를 이용하여 OCT4, HNF4α 등의 직접교차분화인자를 체세포의 대표예로서 선택된 마우스 섬유아세포에 도입하여, 섬유아세포를 간 줄기세포로 직접교차분화시켰다. Reverse transcription PCR을 수행하여 직접교차분화 인자를 도입하기 전의 섬유아세포에서는 간세포 및 담관세포 마커가 음성을 나타내는 것을 확인했다.

[0016] 또 다른 실시예에서는, 상기의 유도된 간 줄기세포를 간세포 및 담관세포로 분화시켰다. 간세포의 약물 신진대사, 글리코겐 저장기능, 해독기능, 지방 흡수기능, 및 담관세포의 in vitro 분비기능을 확인하여 간 줄기세포에서 분화한 간세포 및 담관세포가 정상적으로 기능함을 알 수 있었다.

[0017] 또한, 유도된 간 줄기세포 또는 유도된 간 줄기세포에서 분화한 간세포를 이용하여 in vitro 알코올성 지방간 질병 모델로 사용 가능함을 Oil Red O 염색 및 Bodipy 형광 염색을 수행하여 확인했다.

[0018] 또한, CCl_4 유도 간 섬유화 모델 마우스에 대하여 유도된 간 줄기세포, 또는 유도된 간 줄기세포에서 분화한 간세포를 주입하여 상기 간세포가 간 섬유화 현상을 저해하는 치료효과가 있음을 확인했다.

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명의 하나의 양태는 직접교차분화인자를 포함하는 체세포로부터 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로의 직접교차분화 유도용 조성물에 관한 것이다.

[0021] 다른 양태는 직접교차분화인자를 체세포에 도입하는 단계를 포함하는, 체세포를 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 직접교차분화하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 생체 내 (in vivo) 또는 생체 외 (in vitro)에서 수행할 수 있으며, 예컨대 인체 외에서 수행되는 것일 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 제공되는 직접교차분화 유도용 조성물 및 직접교차분화 방법에 사용된 직접교차분화인자는

[0023] (1) OCT4 단백질, HNF4α 단백질, NR4A2 단백질, NR4A1 단백질, TBX3 단백질, NR5A1 단백질, NR5A2 단백질, 및 NR0B2 단백질,

[0024] (2) 상기 각각의 단백질을 코딩하는 핵산분자들, 및

[0025] (3) 상기 각각의 핵산분자가 도입된 벡터들

[0026] 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0027] 일 구체예에서, 상기 직접교차분화인자는 OCT4 단백질, HNF4α 단백질, NR4A1 단백질, TBX3 단백질, NR5A1 단백질, NR5A2 단백질, NR0B2 단백질, OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자, OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, 및 NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0028] 다른 구체예에서, 상기 직접교차분화인자는

[0029] (a) OCT4 단백질, OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자, 및 OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상, 및

[0030] (b) HNF4α 단백질, NR4A1 단백질, NR4A2 단백질, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, 및 NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상

[0031] 을 포함하는 것일 수 있다.

[0032] 다른 구체예에서, 상기 직접교차분화인자는, 상기 (a) 및 (b)에 더하여,

[0033] (c) TBX3 단백질, NR5A1 단백질, NR5A2 단백질, NR0B2 단백질, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, 및 NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상

[0034] 을 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0035] 상기 직접교차분화인자는 (a) 및 (b)에 더하여 (c)를 추가로 포함함으로써, 직접교차분화 속도가 보다 개선된 부가적 효과를 얻을 수 있다.

[0036] 상기 OCT4 (octamer-binding transcription factor 4) 단백질은 POU5F1 단백질으로도 알려져 있으며, POU5F1 유전자에 의하여 코딩된다. OCT4는 POU 패밀리의 호메오도메인 (homeodomain) 전사 인자 중 하나이다. OCT4 단백질은 분화되지 않은 배아줄기세포의 자가분열과 관계되어 있음은 알려져 있으나, 체세포로부터 간 줄기세포, 간세포, 또는 담관세포로의 직접교차분화와 관계된 내용은 전혀 알려진 바가 없다. 서열번호 73의 인간 OCT4의 유전자 서열은 NM_002701.5. (NCBI)으로, 서열번호 74의 인간 OCT4 단백질 아미노산 서열은 NP_002692.2. (NCBI)로 각각 알려져 있다. 이와 대응되는 마우스 OCT4의 유전자 서열은 NM_013633.3 (서열번호 89)이고, 마우스 OCT4의 아미노산 서열은 NP_038661.2 (서열번호 90)이다.

[0037] 상기 HNF4α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질은 전사 단계에서 조절되는 전사 인자로서, 간, 신장, 및 장의 발달과정에서 필수적 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 서열번호 75의 인간 HNF4α의 유전자 서열은 NM_000457.4. (NCBI)으로, 서열번호 76의 인간 HNF4α의 단백질 아미노산 서열은 NP_000448.3. (NCBI)으로 각각 알려져 있다. 이와 대응되는 마우스 HNF4α의 유전자 서열은 NM_008261.3 (서열번호 91)이고, 마우스 HNF4α의 아미노산 서열은 NP_032287.2 (서열번호 92)이다.

[0038] 상기 NR4A2 (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2) 단백질은 발생과정에서 meso-diencephalic

dopaminergic (mdDA) 뉴런의 분화와 유지에서 중요한 역할을 하는 전사 조절자로 알려져 있으나, 체세포로부터 간 줄기세포, 간세포, 또는 담관세포로의 직접교차분화와 관계된 내용은 전혀 알려진 바가 없다. 서열번호 77의 인간 NR4A2 의 유전자 서열은 NM_006186.3. (NCBI)으로, 서열번호 78의 인간 NR4A2 단백질 아미노산 서열은 NP_006177.1. (NCBI)으로 각각 알려져 있다.

[0039] 상기 NR4A1 (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2) 단백질은 ligand가 알려져 있지 않은 orphan nuclear receptor로서, 간 재생 동안 delayed-early 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있으나, 체세포로부터 간 줄기세포, 간세포, 또는 담관세포로의 직접교차분화와 관계된 내용은 전혀 알려진 바가 없다. 서열번호 79의 인간 NR4A1의 유전자 서열은 NM_001202233.1. (NCBI)으로, 서열번호 80의 인간 NR4A1의 단백질 아미노산 서열은 NP_001189162.1. (NCBI)으로 각각 알려져 있다.

[0040] 상기 TBX3 (T-box transcription factor 3)는 발달 과정에서 전사 저해제로 기능하는 것으로 알려져 있으나, 체세포로부터 간 줄기세포, 간세포, 또는 담관세포로의 직접교차분화와 관계된 내용은 전혀 알려진 바가 없다. 서열번호 81의 인간 TBX3의 유전자 서열은 NM_005996.3. (NCBI)으로, 서열번호 82의 인간 TBX3의 단백질 아미노산 서열은 NP_005987.3. (NCBI)으로 각각 알려져 있다.

[0041] 상기 NR5A1 (Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1)는 성적 발달에 필수적인 전사 활성제로 알려져 있으나, 체세포로부터 간 줄기세포, 간세포, 또는 담관세포로의 직접교차분화와 관계된 내용은 전혀 알려진 바가 없다. 서열번호 83의 인간 NR5A1의 유전자 서열은 NM_004959.4. (NCBI)으로, 서열번호 84의 인간 NR5A1의 단백질 아미노산 서열은 NP_004950.2. (NCBI)으로 각각 알려져 있다.

[0042] 상기 NR5A2 (Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2)는 hepatitis B 바이러스의 유전자 중에서 5'-AACGACCGACCTTGAG-3' element 서열과 결합하여 cis-element의 발현과 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 체세포로부터 간 줄기세포, 간세포, 또는 담관세포로의 직접교차분화와 관계된 내용은 전혀 알려진 바가 없다. 서열번호 85의 인간 NR5A2의 유전자 서열은 NM_001276464.1. (NCBI)으로, 서열번호 86의 인간 NR5A2의 단백질 아미노산 서열은 NP_001263393.1. (NCBI)으로 각각 알려져 있다.

[0043] 상기 NR0B2 (Nuclear receptor subfamily 0 group B member 1)는 orphan nuclear receptor로서 배아줄기세포의 전분화능 (pluripotency)을 유지하고 배아의 발달을 조절하는데 중요한 역할을 함이 알려져 있으나, 체세포로부터 간 줄기세포, 간세포, 또는 담관세포로의 직접교차분화와 관계된 내용은 전혀 알려진 바가 없다. 서열번호 87의 인간 NR0B2의 유전자 서열은 NM_021969.2. (NCBI)으로, 서열번호 88의 인간 NR0B2의 단백질 아미노산 서열은 NP_068804.1. (NCBI)으로 각각 알려져 있다.

[0044] 본 발명의 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2는 단백질 또는 이의 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 제공될 수 있다. 상기 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질은 인간, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 포유 동물 유래의 모든 OCT4, HNF4α, NR4A1, TBX3, NR5A1, NR5A2, 또는 NR0B2를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 사용 가능한 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질은 이들의 야생형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질의 변이체 (예컨대, 각 단백질의 아형(subtype)들)를 포함할 수 있다.

[0045] OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질의 변이체란 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2의 천연 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 천연 아미노산 서열과 상이한 서열을 가지면서 천연(wild-type) 단백질의 고유의 생물학적 기능을 유지하는 단백질을 의미한다. 상기 변이체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이거나 필요에 의해서 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체일 수 있고, 물리, 화학적 환경에 대한 구조적 안정성이 증대되거나 생리학적 활성이 증대된 변이체일 수 있다.

[0046] 상기 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질 또는 이의 변이체는 천연에서 분리되거나, 재조합적 또는 합성적으로 제조된(non-naturally occurring) 것 일 수 있다.

[0047] 또한, 상기 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질을 코딩하는 염기서열로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질을 코딩하는 염기서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA

분자(게놈, cDNA) 또는 RNA (mRNA) 분자일 수 있다.

[0048] 본 발명의 일 구현예로, 본 발명에서 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자는 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 OCT4, HNF4α, NR4A1, NR4A2, TBX3, NR5A1, NR5A2, 및/또는 NR0B2 단백질을 발현하는 벡터에 삽입된 상태로 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 전달체를 의미할 수 있다.

[0050] 본 발명의 벡터는 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. 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 DNA에 통합될 수 있다.

[0051] 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 바람직하게는, 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스(Retrovirus), 예를 들어 HIV(Human immunodeficiency virus), MLV(Murineleukemia virus) ASLV(Avian sarcoma/leukosis), SNV(Spleen necrosis virus), RSV(Rous sarcoma virus), MMTV(Mouse mammary tumor virus) 등, 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노 관련 바이러스(Adeno-associatedvirus), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 등에서 유래한 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 벡터 시스템은 특정 세포에 관련된 유전자를 체세포에서 과발현시켜 직접교차분화를 유도하는 목적을 위해 사용하는것으로써 어떠한 벡터 시스템을 사용하더라도 본 발명의 효과를 나타낼 수 있다.

[0052] 본 발명의 구체적인 실시예로서, 앞서 설명한 직접교차분화유도인자를 발현하는 렌티바이러스 벡터일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다 (도 1).

[0053] 또한, OCT4 단백질을 코딩하는 핵산, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산, NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산, 및 NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산은 당 분야의 공지 방법, 예를 들어 벡터 형태의 네이키드 DNA로 세포내로 전달하거나, 리포좀 (Liposome), 양이온성 고분자 (Cationic polymer)등을 이용하여 세포 내로 전달할 수 있다. 리포좀은 유전자 전달을 위하여 DOTMA나 DOTAP 등의 양이온성 인지질을 혼합하여 제조한 인지질 막으로, 양이온성의 리포좀과 음이온성의 핵산이 일정 비율로 혼합하면 핵산-리포좀 복합체가 형성될 수 있다.

[0054] 본 발명에서 OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자는, OCT4단백질을 코딩하는 핵산, NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산, NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 패키징 세포로 형질 전환 및 감염시켜 OCT4단백질, NR4A2 단백질, HNF4α 단백질, NR4A1 단백질, TBX3 단백질, NR5A1 단백질, NR5A2 단백질, NR0B2 단백질을 발현하도록 제작한 벡터 (예컨대, 바이러스 벡터)에 포함되어 체세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 적용될 수 있는 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 등을 포함하며 이로 제한되지 않는다.

[0055] 본 발명의 일 예에서 제공되는 직접교차분화 유도용 조성물 및 직접교차분화 방법에서 유도되는 직접교차분화에 의하여, 체세포로부터 간줄기세포, 간세포, 및/또는 담관세포로의 직접적 분화유도가 가능하다.

[0056] 다른 예에서 제공되는 직접교차분화 유도용 조성물 및 직접교차분화 방법에서 유도되는 직접교차분화에 의하여, 체세포로부터 간 줄기세포로의 분화가 유도되며, 여기에서 다시 간세포 및/또는 담관세포로 분화될 수 있다. 이 경우, 상기 직접교차분화 방법은 앞서 설명한 직접교차분화인자를 체세포에 도입하여 얻어진 간 줄기세포를 간세포 및/또는 담관세포로 분화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 이 때 간 줄기세포를 간세포 및/또는 담관세포로 분화시키는 단계는 일반적인 분화 기술을 적용하여 수행되는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명에서 용어 "체세포"는, 생식세포를 제외한 모든 세포를 의미하는 것일 수 있으며, 예컨대, 인간, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 포유 동물 유래의 것 또는 분리된 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 체세포

는 생체에서 분리된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 체세포는 섬유아세포, 상피세포, 근육세포, 신경세포, 모발세포, 모근세포, 모낭세포, 구강상피세포, 소변에서 추출한 체세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, B세포, 주피세포, 혈액세포, 성상교세포 혈액세포, 신경 줄기세포, 조혈모 줄기세포, 중간엽 줄기세포 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 시작세포가 체세포이면 특정 조직세포에 상관없이 적용할 수 있으므로, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 마우스 꼬리에서 유래한 피부 섬유아세포 또는 인간 섬유아세포를 사용하였다.

[0058] 용어 "간 줄기세포 (Hepatic stem cell)"는 간세포 및 담관세포로 분화하는 잠재능력을 갖춘 세포를 말한다. 간 줄기세포는 알부민을 생산하는 간세포와 cytokeratin 19 양성인 담관세포로 분화할 수 있다. 또한, 본 발명에서 'iHSC (induced hepatic stem cell)"는 유도된 간 줄기세포를 말하고, 예를 들어, 본 발명의 방법에 따른 직접교차분화를 통하여 체세포로부터 유도된 간 줄기세포를 의미할 수 있다.

[0059] 용어 "간세포 (Hepatocytes)"는 간의 실질 조직 (parenchymal tissue)을 구성하는 세포를 말한다. 크기는 약 20 um이며, 단백질의 합성과 저장, 탄수화물의 변환, 콜레스테롤, 쓸개즙산, 인지질의 합성, 내생 및 외생물질의 해독, 변성, 배출에 관여하고, 쓸개즙 생성과 분비를 촉진하는 작용을 한다. 또한, 본 발명에서 "iHep"는 유도된 간세포를 말하고, 예를 들어, 본 발명의 방법에 따른 직접교차분화를 통하여 체세포로부터 유도된 간세포 또는 상기의 유도된 간 줄기세포로부터 분화된 간세포를 의미할 수 있다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에서는 인간 체세포 (섬유아세포)에 직접교차분화인자를 도입하여 체세포로부터 간 줄기세포와 간세포가 직접교차분화 유도됨을 확인하였고 (실시예 6-1 및 6-2), 상기 체세포로부터 직접교차분화 유도된 간세포의 특성 분석을 수행하여 정상적인 간세포 특성을 가지고 있음을 확인하였다 (실시예 6-3).

[0061] 본 발명의 일 실시예에서 인간 체세포에서 간 줄기세포와 간세포로 직접교차분화 유도하기 위해서 사용한 직접교차분화인자는 인간 OCT4 (NM_002701.5, 서열번호 73) 및 HNF4? (NM_000457.4., 서열번호 75) (실시예 1) 또는 OU, OUT, ON7, 또는 ON7T (O:OCT4, NM_002701.5., 서열번호 73); U:NR4A2/NURR1, NM_006186.3., 서열번호 77; N7:NR4A1/NUR77, NM_001202233.1., 서열번호 79; T:TBX3, NM_005996.3., 서열번호 81) (실시예 6)이다.

[0062] 용어 "담관세포 (Cholangiocytes)"는 담관 (bile duct) 상피세포 (epithelial cells)를 말한다. 건강한 간에서, 담관세포는 담즙의 분비하는 기능을 한다. 또한, 본 발명에서 "담관세포"는 유도된 담관세포를 말하고, 예를 들어, 본 발명의 방법에 따른 직접교차분화를 통하여 체세포로부터 유도된 담관세포 또는 상기의 유도된 간 줄기세포로부터 분화된 담관세포를 의미할 수 있다.

[0063] 본 발명의 일 실시예에서는 인간 체세포에 직접교차분화인자를 도입하여 체세포로부터 담관세포가 직접교차분화 유도됨을 확인하였다 (실시예 5 및 실시예 6-4).

[0064] 본 발명의 일 실시예에서 체세포에서 담관세포로 직접교차분화 유도하기 위해서 사용한 직접교차분화인자는 인간 OCT4 (NM_002701.5, 서열번호 73) 및 HNF4α (NM_000457.4., 서열번호 75) (실시예 1) 또는 OU, OUT, ON7, 또는 ON7T (O:OCT4, NM_002701.5., 서열번호 73); U:NR4A2/NURR1, NM_006186.3., 서열번호 77; N7:NR4A1/NUR77, NM_001202233.1., 서열번호 79; T:TBX3, NM_005996.3., 서열번호 81) (실시예 6)이다.

[0065] 용어 "직접교차분화 (Direct reprogramming, Direct conversion, Transdifferentiation)"는 고등생물에서 전혀 다른 세포타입을 가지는 성숙한(분화가 끝난) 세포간의 전환을 유도하는 과정이다. 이는 유도만능줄기세포 (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)로 리프로그래밍 하고 이를 재분화하여 목적하는 세포로 만들어야 하는 과정과 달리, 유도만능줄기세포 단계를 거치지 않고 바로 목적하는 세포로의 전환을 유도한다는 점에서 차이를 가진다. 현재 직접교차분화는 질병모델링과 신약 발굴 등에 이용될 가능성을 인정받고 있으며, 미래에는 유전자 치료 그리고 재생의학 등에도 응용될 수 있을 것으로 예상된다.

[0066] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명의 일 예는 상기 직접교차분화 유도용 조성물을 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 체세포를 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 직접교차분화하는 방법을 제공한다.

[0067] 상기 방법은 체세포를 간 줄기세포로 직접교차분화 유도하는 방법을 이용하여 생성한 간 줄기세포를 간세포 또는 담관세포로 분화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0068] 일 구체예에서, 상기 직접교차분화 방법은 체세포를 배지에서 배양하는 단계, 상기 배양한 체세포에 OCT4 유전자를 삽입한 벡터, HNF4 α 유전자를 삽입한 벡터, NR4A2 유전자를 삽입한 벡터, NR4A1 유전자를 삽입한 벡터, TBX3 유전자를 삽입한 벡터, NR5A1 유전자를 삽입한 벡터, NR5A2 유전자를 삽입한 벡터, 및 NR0B2 유전자를 삽

입한 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 형질감염 (transfection) 시키는 단계, 및 상기 감염된 체세포를 직접교차분화를 유도할 수 있는 배양조건에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0069] 상기 체세포의 배양에 사용되는 배지는 당해 분야에서 체세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 프로타민 설페이트(protamine sulphate)를 함유하는 배지를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 또한, 상기 체세포를 직접교차분화를 유도할 수 있는 배양조건은 당해 분야에서 체세포에 대하여 직접교차분화를 유도하는 데 통상적으로 사용되는 배지 및/또는 통상적인 배양 조건을 포함할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 2 mM L-Glutamine (Invitrogen, 25030-081), MEM Non-essential amino acid (NEAA, Gibco, 11140-050), 55 uM β-Mercaptoethanol (β-ME, Invitrogen, 21985-023) 및 Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, 15140-122))을 포함하는 MEF medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, 10313-021))를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 상기 본 발명의 직접교차분화 유도용 조성물을 체세포에 도입하는 단계를 통하여, OCT4 등의 직접교차분화인자들의 이소성 발현 (Ectopic expression)을 유도할 수 있다. 이소성 발현이란, 어떤 유전자가 원래 발현하는 조직이나 세포 외에서 발현하는 것, 또는 원래 발현하는 시기와 다른 시기에 발현하는 것을 의미한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 유도용 조성물을 체세포에 도입함으로써 OCT4 단백질, HNF4α 단백질, NR4A2 단백질, NR4A1 단백질, TBX3 단백질, NR5A1 단백질, NR5A2 단백질, 및 NR0B2 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 발현하지 않는 체세포에서 OCT4 단백질, HNF4α 단백질, NR4A2 단백질, NR4A1 단백질, TBX3 단백질, NR5A1 단백질, NR5A2 단백질, 및 NR0B2 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현을 유도할 수 있다. 그에 따라, 체세포로부터 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 제조될 수 있다.

[0072] 본 발명에 따라 제조된 간 줄기세포, 간세포, 및/또는 담관세포는 간의 쓸개즙 생성 및 분비, 단백질의 저장, 해독 등의 과정에서 필수적인 역할을 하고, 상기 직접교차분화된 간 줄기세포는 간세포 및 담관세포로 분화가 가능하므로 간의 기능 저하 및 상실로 인한 질병의 예방 또는 치료에 적용될 수 있다.

[0073] 따라서, 본 발명의 하나의 양태로, 앞서 기재된 바와 같은 체세포를 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 직접교차분화하는 조성물 또는 방법에 의하여 분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화 유도된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0074] 상기 간 질환은 간 섬유화 (Liver fibrosis), 간경변증 (Liver cirrhosis), 간염 (Hepatitis; 예컨대, B형 간염, C형 간염 등), 간암 (Liver cancer), 비알코올성 지방간 (Nonalcoholic fatty liver), 알코올성 지방간 (Alcoholic fatty liver), 고호모시스테인혈증 (Hyperhomocysteinemia)과 이와 관련된 심뇌혈관계 질환, 혈전증 (Thrombosis), 동맥경화 (Atherosclerosis) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 간의 기능 저하, 소실, 및/또는 비정상적 기능에 의하여 야기되는 모든 질병 및/또는 병적 증상을 포함할 수 있다.

[0075] 또 하나의 양태로 본 발명은, 본 발명의 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 환자에게 투여하는 단계를 포함하고,

[0076] 상기 직접 교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포는,

[0077] (1) OCT4 단백질, HNF4α 단백질, NR4A2 단백질, NR4A1 단백질, TBX3 단백질, NR5A1 단백질, NR5A2 단백질, 및 NR0B2 단백질,

[0078] (2) 상기 각각의 단백질을 코딩하는 핵산분자들, 및

[0079] (3) 상기 각각의 핵산분자가 도입된 벡터들로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 직접교차분화 유도용 조성물을 체세포에 도입하여 직접 교차분화 유도된 것인, 간 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0080] 상기 직접교차분화 유도용 조성물은 OCT4 단백질, OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자, 및 OCT4 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상 및 HNF4α 단백질, NR4A1 단백질, NR4A2 단백질, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR4A2 단백질을 코딩하는 핵

산분자, HNF4α 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR4A1 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, 및 NR4A2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0081] 또한, 상기 직접교차분화 유도용 조성물은 TBX3 단백질, NR5A1 단백질, NR5A2 단백질, NR0B2 단백질, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자, NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자, TBX3 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR5A1 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, NR5A2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터, 및 NR0B2 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0082] 상기 본 발명의 방법에 의해서 직접교차분화 유도된 간 줄기세포는 간세포 또는 담관세포로 분화할 수 있다.

[0083] 상기 예방 및/또는 치료 대상은 포유류, 예컨대 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 마우스, 래트 등을 포함하는 설치류, 또는 개과, 고양이과 등을 포함하는 애완용 동물 등이거나, 이들의 생체로부터 분리된 세포 또는 조직일 수 있다. 일 예에서, 상기 대상은 간 질환, 예컨대 간 섬유화를 앓는 포유류, 예컨대 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 마우스, 래트 등을 포함하는 설치류, 또는 개과, 고양이과 등을 포함하는 애완용 동물 등이거나, 이들의 생체로부터 분리된 세포 또는 조직일 수 있다.

[0084] 상기 환자에게 투여하는 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 비장내 (intrasplenically), 또는 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0085] 본 명세서에 있어서 환자에게 투여하는 발명의 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유효양은 간 질환의 예방 또는 치료의 의미있는 효과를 나타낼 수 있는 정도를 의미한다. 1회 투여를 위한 상기 유효량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 간격, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 따라서 다양하게 처방될 수 있다. 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다. 예컨대, 1회 투여를 위한 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유효양은 투여대상 중량 기준으로 1 x 107 내지 6 x 109 cell/kg, 구체적으로 1 x 107 내지 4 x 108 cell/kg, 보다 구체적으로 1 x 108 내지 4 x 108 cell/kg일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 1회 투여를 위한 상기 유효량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 상기한 투여량은 평균적인 경우를 예시한 것으로서 개인적인 차이에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다.

[0086] 상기 환자에게 투여하는 발명의 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상은 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 및 완충액 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0087] 또 하나의 양태로 본 발명은, 본 발명의 체세포에서 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화 유도된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 간질환의 치료제 스크리닝용 조성물로 사용될 수 있다.

[0088] 즉, 상기 간 질환의 치료 후보 물질의 존재 및 부재하에서 본 발명의 체세포에서 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화 유도된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 반응성을 확인하는 방법으로 간 질환의 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0089] 예를 들어, 본 발명의 체세포에서 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화 유도된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상은 간 질환의 회복 또는 치료에 중요한 세포로서 후보 물질에 대한 독성 또는 약효를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0090] 상기 독성의 평가는 본 발명의 치료 후보 물질의 존재 및 부재하에서 본 발명의 체세포에서 직접교차분화 유도된 간 줄기세포가 간세포 또는 담관세포로 분화를 억제하거나 또는 본 발명의 체세포에서 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화 유도된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 대한 IC50 (세포의 50% 사멸을 유도하는 치료 후보물질의 최저 농

도)등 당업계에서 통상적으로 독성을 판단하는 방법에 따라 평가할 수 있다. 또한, 상기 약효의 평가는 본 발명의 치료 후보 물질의 존재 및 부재하에서 본 발명의 체세포에서 직접교차분화 유도된 간 줄기세포가 간세포 또는 담관세포로 분화를 촉진하거나 또는 체세포에서 직접교차분화 유도된 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포, 및 상기 직접교차분화 유도된 간 줄기세포로부터 분화 유도된 간세포 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 간 질환의 치료를 촉진하는 등 당업계에서 간 질환의 치료에 효과가 있음을 확인할 수 있는 방법에 따라 평가할 수 있다.

[0091] 일 구체예에서,

[0092] 제1 세포 시료에 후보 물질을 접촉시키는 단계;

[0093] 상기 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준을 측정하는 단계;

[0094] 상기 후보 물질을 접촉시킨 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준을 후보 물질을 접촉시키지 않은 제2 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준과 비교하는 단계; 및

[0095] 상기 후보 물질을 접촉시킨 제1 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준이 후보 물질을 접촉시키지 않은 제2 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준보다 낮은 경우, 상기 후보 물질을 간 질환의 예방 또는 치료 약물의 후보 약물로 결정하는 단계

[0096] 를 포함하는 간질환의 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법이 제공된다.

[0097] 상기 간질환은 앞서 설명한 바와 같다.

[0098] 상기 제1 세포 시료 및 제2 세포 시료는 각각 독립적으로 본 발명의 직접교차분화 방법에 의하여 생산된(직접교차분화 유도된) 간 줄기세포, 간세포, 및 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0099] 상기 후보물질은 각종 소분자 화학 약물 (small molecular drug), 펩타이드, 단백질 (예컨대, 항체 등), 핵산분자, 천연물, 천연물의 추출물 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0100] 본 발명은 역분화줄기세포의 전분화능 (Pluripotency) 단계를 거치지 않고 직접교차분화 유도인자 발현을 통해 체세포로부터 간세포와 담관세포로 분화 가능하며 자가증식이 가능한 간 줄기세포로 직접교차분화를 유도할 수 잇는 조성물을 제공하고, 상기 조성물을 이용하여 체세포로부터 간 줄기세포, 간세포 또는 담관세포로의 직접교차분화를 유도할 수 있는 방법을 제공하며, 이를 이용하여 간 질환의 예방 및 치료가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0101] 도 1는 간 줄기세포 제작에 이용한 바이러스 전달 시스템 (viral delivery system)을 나타낸다.

도 2는 간 줄기세포 제작 흐름을 나타낸 도식이다.

도 3는 간줄기세포 유도인자 도입후 체세포의 형태적 변화를 현미경을 통해 관찰한 것을 나타낸다. 스케일 바는 250 um를 나타낸다.

도 4는 제작된 간 줄기세포의 간 줄기세포 유전자 (GATA4, FOXA2, GATA6, HNF4α, EPCAM, ECAD, DLK1, OC2), 간세포 유전자 (ALB, TTR, CK8, CK18, AFP, AAT, TAT, G6P, CYP7a1), 담관세포 유전자 (CK7, CK19, GGT1)의 발현 확인을 나타낸다.

도 5는 제작된 간 줄기세포 특이적 마커 (Epcam, Hnf4α) 단백질 발현을 면역형광 염색법으로 관찰한 것을 나타낸다. 스케일 바는 100 um를 나타낸다.

도 6는 CYP450 관련 유전자의 발현을 간세포 (iHep)와 초대배양 간세포 (primary hepatocyte, Pri-Hep)에서 확인한 것을 나타낸다.

도 7는 약물 처리에 의한 간세포의 CYP450 관련 유전자의 발현 변화의 확인을 나타낸다. 3-methylcholanthrene (3Mc), glucocorticoid (Dex, dexamethasone), 또는 ethanol을 이용하여 CYP 패밀리 유전자의 발현을 유도했다.

도 8는 간세포의 글리코겐 저장기능 (PAS stain)을 현미경을 통해 확인한 것을 나타낸다. 스케일 바는 250 um를

나타낸다.

도 9는 간세포의 해독기능(ICG 배출실험)을 현미경을 통해 확인한 것을 나타낸다. 상단의 Fibs는 섬유아세포, 중단의 iHep는 섬유아세포에서 직접교차분화된 간세포, 하단은 상기의 직접교차분화된 간세포를 확대한 것을 나타낸다. Uptake는 ICG의 흡수를 나타내고, Release는 ICG가 배출된 후를 나타낸다. 스케일 바는 250 um를 나타낸다.

도 10는 간세포의 콜레스테롤 대사기능 (LDL uptake)을 확인한 것을 나타낸다. 스케일 바는 100 um를 나타낸다.

도 11는 간세포의 알부민 배출을 확인한 것을 나타낸다. Y축은 알부민 농도 (ng/mL/1.0 X 10^6 cells)를 나타낸다.

도 12는 Matrigel에서 3차원 배양하여 낭포 (cystic) 형태의 담관세포 형성을 관찰 (왼쪽 상단)하고, Collagen에서 3차원 배양을 통해 관 (tube) 형태의 담관세포 형성을 관찰 (왼쪽 하단)한 것을 나타낸다. 면역형광 염색을 수행하여 담관세포 특이적 마커 단백질인 Keratin 19 (CK19)의 발현을 확인 (오른쪽)했다.

도 13는 낭포 구조의 담관세포에서 apical-basal 극성을 확인하기 위하여 F-actin (Phalloidin, 녹색 (GFP))과 담관세포의 마커 단백질 (CK19, CK7, 붉은색)을 면역형광 염색하고 세포내 위치를 확인하기 위해서 공초점 현미경 (Olympus, Laser scanning confocal microscopy, FY1000) 으로 분석한 결과이다 (상단, 중간). 낭포 구조를 이룬 담관세포에서 면역형광 염색을 수행하여 담관세포 특이적 마커 단백질들 (CK19, CK7)의 발현을 확인한 결과를 나타낸다 (하단).

도 14는 담관세포의 약물분비 기능을 공초점 현미경 (Olympus, Laser scanning confocal microscopy, FY1000)을 사용해 확인한 것으로서, 3차원 배양한 낭포 형태의 담관세포에 MDR 억제제 (Verapamil)를 처리한 경우 (하단), MDR 억제제를 처리하지 않은 그룹 (상단)과 비교하여 형광입자 (Rhodamine 123) 가 MDR을 통과하여 담관구조의 내부 (lumen)로 통과하지 못하고 외부면에만 머물고 있는 것을 나타낸다. 스케일 바는 2 um를 나타낸다.

도 15는 도 14의 오른쪽 이미지에서 붉은 선을 경계로 분석한 형광 intensity 분포도를 나타낸다. X축은 도 14의 오른쪽의 A와 B의 구간이고, Y축은 형광의 세기를 나타낸다.

도 16는 in vitro에서 알콜올에 일정시간 노출하여 지방간 모델의 간세포를 제작하여 대조구 (상단)와 알코올 노출한 그룹 (하단)에 대하여 광학 현미경을 이용하여 형태적 변화를 관찰 (왼쪽), Oil Red O stain으로 지방의 축적 확인 (중간), 세포내 축적된 lipid droplet을 확인하기 위하여 지방 특이적 형광 염색액 (Bodipy 430)으로 염색하여 형광 현미경으로 관찰 (오른쪽)한 것을 나타낸다.

도 17은 C57BL/6J 마우스 (10주령)에 일정시간 지속적으로 사염화탄소 (CCl4)를 주입하여 간 섬유형성 모델의 질병 동물 모델을 구축하고, 제작된 간세포를 주입하는 과정을 나타낸다.

도 18는 마우스에 주입한 세포 (CM-Dil)가 간 조직에 자리잡은 것을 형광 현미경으로 확인한 것을 나타낸다. 스케일 바는 100 um를 나타낸다.

도 19는 간세포가 주입된 간 섬유형성 모델에서 치료효과를 H & E stain (상단), α-SMA 염색 (하단)을 통해 형태학적으로 검증한 것을 나타낸다. 스케일 바는 100 um를 나타낸다.

도 20은 도 19의 결과를 정량적으로 분석하여 그래프화한 것을 나타낸다.

도 21은 체세포 (섬유아세포)에서 간 줄기세포 특이적 마커의 발현을 면역형광 염색하여 확인한 것을 나타낸다. 스케일 바는 100 um를 나타낸다.

도 22는 본 발명의 일 실시예에 따라서 직접교차분화인자에 의해서 체세포에서 담관세포로 형태적 변화를 현미경으로 관찰한 것을 나타낸다. 스케일바는 100 um를 나타낸다.

도 23는 본 발명의 일 실시예에 따라서 직접교차분화인자에 의해서 체세포에서 담관세포로 직접교차분화가 일어나는지 면역형광 염색으로 관찰한 것을 나타낸다. 스케일바는 100 um를 나타낸다.

도 24는 본 발명의 일 실시예에 따라서 직접교차분화인자에 의해서 섬유아세포가 간 줄기세포 및 간세포로 형태적 변화를 현미경으로 관찰한 것을 나타낸다. 스케일바는 250 um를 나타낸다.

도 25는 본 발명의 일 실시예에 따라서 섬유아세포에서 직접교차분화된 세포는 간 줄기세포 마커 단백질을 발현

하고 (HNF4, E-Cadherin). 간세포 마커 단백질을 발현 (AFP, ALB)함을 확인한 것을 나타낸다. 스케일바는 100 um를 나타낸다.

도 26는 본 발명의 일 실시예에 따라서 섬유아세포에서 직접교차분화된 세포는 섬유아세포 특이적 마커 (TWIST2, COLIA2)의 발현이 감소하지만, 간 줄기세포 및 간세포 특이적 마커의 발현은 증가함을 확인한 결과를 나타낸다.

도 27는 본 발명의 일 실시예에 따라서 섬유아세포에서 직접교차분화된 세포는 간세포 특이적 마커 (AFP, ALB)를 발현하고, LDL 수용체에 의해서 매개되는 세포내이입 (endocytosis)을 통해 LDL (low-density lipoprotein)을 흡수하며, 글리코겐 저장을 나타내는 Periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 확인하고, ICG 흡수 세포 (녹색)를 통해 해독능력 여부를 확인한 것을 나타낸다.

도 28는 본 발명의 일 실시예에 따라서 섬유아세포에 직접교차분화인자를 도입하여 담관세포로 직접교차분화유도됨을 담관세포 표지 단백질 (CK19, CK7)로 면역형광 염색하여 확인한 것을 나타낸다. 스케일바는 100 um를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0102] 이하, 본 발명을 참고예 및 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 참고예 및 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[0104] **<참고예 1> 클로닝 및 렌티바이러스 플라스미드의 구성**

[0105] NR4A2, HNF4α, OCT4을 포함하는 플라스미드는 John Gearhart (Addgene plasmid # 43918), Atsushi Suzuki (Addgene plasmid # 33002), Shinya Yamanaka (Addgene plasmid # 27077)에게서 얻었다. NR4A1, TBX3, NR5A1, NR5A2, NR0B2는 HepG2, H9 cDNA에서 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, M05305)를 사용한 PCR (polymerase chain reaction)을 통해 증폭했다. NR4A2, HNF4α, OCT4, NR4A1, TBX3, NR5A1, NR5A2, NR0B2는 렌티바이러스 트랜스퍼 벡터 (Lentiviral transfer vector)에 삽입했다. 상기 유전자를 렌티바이러스 트랜스퍼 벡터에 삽입하여 제작한 렌티바이러스 트랜스퍼 플라스미드 (Lentiviral transfer plasmid)는 서열분석을 통해 확인했다.

[0107] **<참고예 2> 렌티바이러스 패키징**

[0108] X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche, 06365787001)를 사용해서 렌티바이러스 트랜스퍼 플라스미드 (lentiviral transfer plasmid):패키징 플라스미드 (packaging plasmid (psPAX2)):엔벨로프 플라스미드 (envelope plasmid (VSV-G))를 3:2:1의 비율로 섞어서 패키징 혼합물을 제조했다. 전체 부피는 DMEM (DMEM, Invitrogen, 10313-021)을 사용해서 200 uL로 맞췄다. 40-60% 컨프루언시 (confluency) 상태의 293T 세포 (293 cells with large T antigen, ATCC)에 트랜스 직접교차분화하는 방법

[0109] 퀵션하기 전에, 상온에서 30분간 배양하였다. 각각의 인자들은 분리하여 준비했다. 바이러스 패키징 혼합물과 37 및 5% CO2에서 48시간 동안 배양된 세포 미디어는 0.45 um 필터를 사용하여 세포 찌거기를 제거하여 수집하고 -80에 보관했다.

[0111] **<참고예 3> in vitro 분화**

[0112] 간세포 분화를 위해서, 간 줄기세포를 콜라겐으로 코팅된 접시에 심고 HEP 미디어 (Hepatocyte Culture Medium, 간세포 배양 미디어, Lonza HCM bulletkit (cc3198))에 20 ng /mL Oncostatin M (R & D system)를 첨가해서 변경된 미디어에서 배양했다. 배양 미디어는 2일에 한번씩 교환했다.

[0113] 담관세포 (Cholangiocytes) 분화를 위해서, 간 줄기세포를 제조사의 지침에 따라 콜라겐 type 1 (BD 354236)을 이용하여 3차원 배양했다. 간략하게, 간 줄기세포들 (0.5×10^4 세포)을 40% (w/v) Matrigel (BD 354234)을 포함한 신선하게 준비한 콜라겐 젤과 섞고 4-well 그릇에 놓았다. 담관세포 분화 (Cholangiocyte differentiation (CLD)) 미디어 (20 ng/mL EGF (Peprotech)를 첨가한 HEP 미디어)를 젤이 굳은 후에 첨가하고

3일 동안 배양했다.

[0115] **<참고예 4> 면역형광 염색**

[0116] 면역세포화학을 위해서, 세포들은 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Corning, 21-031-CV)에 녹인 4% (v/v) paraformaldehyde (Santacruz, SC-281692)로 상온에서 10분동안 고정했다. 고정한 세포들은 PBS에 녹인 0.05% (v/v) Tween-20 (Sigma, P7949)를 사용해 3번 세척하고, DPBS에 녹인 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma, T9284)를 사용해 상온에서 10분간 투과시켰다 (permeabilized). DPBS/ Tween 20 (PBST)로 3회 세척한 후에, 비특이적 결합을 저해하기 위한 블락킹 (blocking)을 위해서 DPBS에 녹인 4% (v/v) FBS를 상온에서 60분 동안 처리했다. 그리고 나서 세포들은 일차 항체 (항-Albumin (1:200; R&D, MAB1455), 항-E-cadherin (1:200; Abcam, AB76055), 항-α-fetoprotein (1:200; R&D, MAB1368), 항-Cytokeratin7 (1:200; Abcam, AB9021) 및 항-Cytokeratin19 (1:400; Abbomax, 602-670))와 상온에서 60분간 배양하고, 3차례 세척 후에 2차 형광 항체 (Alexa Fluorophore-conjugated secondary antibodies 488 또는 Alexa Fluor® 594 (1:1000; Invitrogen))와 어둠속에서 배양했다. 만일 이중 염색이 필요하다면, 상기의 다른 일차 항체와 배양하기 전에 30분간 상온에서 추가적 블락킹을 한다. 세포들은 형광 현미경을 사용한 시각화를 위해서 PBS에서 보관했다.

[0118] **<참고예 5> 통계적 분석**

[0119] 모든 통계적 분석은 unpaired two-tailed Student's t-test를 사용하여 수행하였고 유의도는 $*p < 0.05$ 또는 $**p < 0.01$이다.

[0121] **실시예 1. 직접교차분화인자에 의한 섬유아세포의 간 줄기세포(induced hepatic stem cell, iHSC)로의 유도**

[0122] 간 줄기세포 유도를 위한 가능성을 판단하기 위해서, 마우스 꼬리에서 유래한 피부 섬유아세포를 배양 접시에 심고 24시간 동안 도 1과 같은 렌티바이러스 발현 시스템을 통해 마우스 OCT4 (NM_013633.3, 서열번호 89) 및 HNF4α(NM_008261.3, 서열번호 91)를 섬유아세포에 도입했다. 섬유아세포는 젤라틴으로 코팅한 배양접시에 피부 조직을 붙여서 초대배양하여 얻어서 사용하였다. 상기 섬유아세포는 MEF 배지 (Dullbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) FBS, nonessential amino acids, L-glutamine, penicillin/streptomycin, mercaptoethanol)상에서 37, 5% CO2 배양기에서 배양하였다.

[0123] 섬유아세포에 간 계통 세포가 섞여있지 않았음을 확인하기 위해서 도 21에서 볼 수 있는 것과 같이 참고예 4와 같은 방법으로 면역형광 염색을 수행하여 간 마커 (Alb 및 Afp), 간 줄기세포 마커 (E-cad), 및 담관세포 마커 (CK19)가 음성을 나타내는 것을 확인했다.

[0124] 본 발명에서는 간 줄기세포 마커중의 하나로 E-cad를 사용하였는데, 상기 E-cad은 상피세포 마커 및 간 줄기세포의 마커로 알려져 있다.

[0125] 간 줄기세포를 제작하는 과정은 다음과 같다. 섬유아세포 (1.0×10^4 세포)는 렌티바이러스 감염 하루 전에 젤라틴이 코팅된 12 웰 접시에 심는다. 전사 인자를 가지고 있는 렌티바이러스를 세포를 심은 다음날 감염시킨다. 렌티바이러스 감염 3일 후에, 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum, Invitrogen), 2 mM L-Glutamine (Invitrogen, 25030-081), MEM Non-essential amino acid (NEAA, Gibco, 11140-050), 55 uM β-Mercaptoethanol (β-ME, Invitrogen, 21985-023) 및 Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, 15140-122)를 포함하는 MEF 미디어 (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, 10313-021)를 HEP 미디어 (Hepatocyte Culture Medium, 간세포 배양 미디어, Lonza HCM bulletkit (cc3198))로 교체했다. 이와 같은 제작 과정은 도 2에 도식화 되어 있다.

[0126] 세포의 형태적 변화를 현미경으로 관찰한 결과인 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이 렌티바이러스로 감염시키고 14일이었을 때, 선명한 핵을 가지고 있는 정육면체 형태의 세포가 콜라겐으로 코팅된 플레이트를 통과한 후에도 원래 형태와 유사한 형태를 유지할 수 있는 콜로니로 나타났다. 이러한 세포들을 간 줄기세포라고 부른다.

[0127] 간 줄기세포는 간세포 특이적인 마커 및 담관세포 특이적인 마커를 발현하는 특징이 있다. 렌티바이러스로 감염한 세포가 간세포 특이적 마커를 발현하는지 확인하기 위해서 reverse transcription PCR을 다음과 같이 수행했

다.

[0128] 전체 RNA는 RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104)를 사용하여 세포 용해물에서 얻었고, TRIzol® Reagent (Invitrogen, 15596-018)를 사용하여 간 조직에서 얻었다. 500 ng의 합성한 전체 RNA, Omniscript® Reverse Transcriptase (Qiagen, 205111), 및 oligo-dT 프라이머를 20 uL 반응 혼합물에 넣고 37에서 1시간 반응하여 cDNA를 합성했다. Reverse transcription PCR (Polymerase chain reaction)은 Taq polymerase (Invitrogen, 10342-020)와 프라이머를 58에서 38사이클 반응하는 조건으로 수행했다. 반응 결과물을 100 V에서 2시간동안 2% (w/v) 아가로즈 젤 전기영동을 수행하였다. Reverse transcription PCR에 사용한 프라이머 서열은 하기에 나타나 있다 (하기 서열은 5'에서 3' 방향으로 표시되어 있다).

[0130] Gata4_F : GACACCCCAATCTCGATATGTT (서열번호 1)

[0131] Gata4_R : GGACCTGCTGGCGTCTTAG (서열번호 2)

[0132] Foxa2_F : CACCTGAGTCCGAGTCTGAG (서열번호 3)

[0133] Foxa2_R : AAGGAGAGAGAGTGGCGGAT (서열번호 4)

[0134] Gata6_F : GTGAACTGCGGCTCCATCC (서열번호 5)

[0135] Gata6_R : TGATGCCCCTACCCCTGAG (서열번호 6)

[0136] Hnf4a_F : AGGCAATGACTACATCGTCCC (서열번호 7)

[0137] Hnf4a_R : CAGACCCTCCGAGAAGCATC (서열번호 8)

[0138] EpCam_F : GGTGAATGCCAGTGTACTT (서열번호 9)

[0139] EpCam_R : CAATGATGATCCAGTAGGTCC (서열번호 10)

[0140] Ecad_F : GCAGGTCTCCTCATGGCTTTG (서열번호 11)

[0141] Ecad_R : TTGGATTCAGAGGCAGGGTCG (서열번호 12)

[0142] Dlk1_F : GCACCTATGGGGCTGAATG (서열번호 13)

[0143] Dlk1_R : GGCAGGGAGAACCATTGAT (서열번호 14)

[0144] Oc2_F : GCTACACCACGCCATGAGTAT (서열번호 15)

[0145] Oc2_R : TGGGGCTGAGCATTTTGTC (서열번호 16)

[0146] Alb_F : TGAAGTTGCCAGAAGACATCC (서열번호 17)

[0147] Alb_R : CAAGTTCCGCCCTGTCATCTG (서열번호 18)

[0148] Ttr_F : GCTTCCCTTCGACTCTTCCTC (서열번호 19)

[0149] Ttr_R : GCCAAGTGTCTTCCAGTACGA (서열번호 20)

[0150] CK8_F : AGAAGGATGTGGACGAAGCA (서열번호 21)

[0151] CK8_R : ATCTCTGTCTTTGTGCGGCG (서열번호 22)

[0152] CK18_F : ATGAAGAGGAAGTCCAAGGTC (서열번호 23)

[0153] CK18_R : GTTCTCCAAGTTGATGTTCTG (서열번호 24)

[0154] Afp_F : GCAGGATGGGGAAAAAGTCA (서열번호 25)

[0155] Afp_R : CCTAAGGTCTGGTAGAGAGCG (서열번호 26)

[0156] Aat_F : GACCAAGACACAGTTTTCGC (서열번호 27)

[0157] Aat_R : ATCTGGGCTAACCTTCTGCG (서열번호 28)

[0158] Tat_F : ATCGGCTACCTATCCAGTCG (서열번호 29)

[0159] Tat_R : GCCACTGCCAAAATCTTCTGA (서열번호 30)

[0160] G6P_F : TCAACCTCGTCTTCAAGTGGATT (서열번호 31)

[0161] G6P_R : CACAGCAATGCCTGACAAGA (서열번호 32)

[0162] Cyp7a1_F : GGAGCCCTGAAGCAATGAAA (서열번호 33)

[0163] Cyp7a1_R : AAAAGTCAAAGGGTCTGGGT (서열번호 34)

[0164] CK7_F : CCTTCACGAGACAGAGTTAGCA (서열번호 35)

[0165] CK7_R : ACTTGGCACGCTGGTTCTT (서열번호 36)

[0166] CK19_F : AGTTTGAGACAGAACACGCCT (서열번호 37)

[0167] CK19_R : CTCCTCAATCCGAGCAAG (서열번호 38)

[0168] Ggt1_F : ATCTACAACAGCACCACAGGA (서열번호 39)

[0169] Ggt1_R : TCAACCGTCATAATGCCACCA (서열번호 40)

[0170] Gapdh_F : ACGACCCCTTCATTGACCTCAACT (서열번호 41)

[0171] Gapdh_R : ATATTTCTCGTGGTTCACACCCAT (서열번호 42)

[0173] 상기와 같은 방법으로 reverse transcription PCR을 수행한 결과, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 렌티바이러스에 감염된 세포들이 간 줄기세포 마커 (GATA4, FOXA2, GATA6, HNF4α, EPCAM, E-CAD, DLK1, OC2), 간세포 마커 (ALB, TTR, CK8, CK18, AFP, AAT, TAT, G6P) 및 담관세포 마커 (CK7, CK19, GGT1)들이 발현함을 확인할 수 있었다.

[0174] 또한, 간세포 특이적 마커의 단백질 발현을 확인하기 위해서 참고예 4와 같은 방법으로 면역형광 이미지 분석을 수행하여 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이 렌티바이러스로 감염시킨 세포는 간 줄기세포 마커 (Epcam, Hnf4α)의 발현을 확인할 수 있었다.

[0175] 즉, mRNA 수준 및 단백질 수준에서 간세포 특이적인 마커의 발현을 확인한 상기의 결과들을 종합해 보면, 렌티바이러스를 감염시켜 OCT4 및 HNF4α를 섬유아세포에 도입하여 섬유아세포로부터 간 줄기세포를 생성했음을 알 수 있다.

[0177] **실시예 2. 간 줄기세포에서 간세포 및 담관세포의 in vitro 분화**

[0178] 실시예 1과 같은 방법으로 제작한 간 줄기세포가 간세포 및 담관세포 모두로 분화할 수 있는지 여부를 확인했다. 간 줄기세포의 이중 분화능력을 확인하기 위해서, 참고예 3과 같은 방법으로 간 줄기세포를 콜라겐으로 코팅되고 Oncostatin M을 포함하는 HEP 미디어가 담긴 접시에 플레이팅하여 간세포로 분화시켰다. 간 줄기세포가 성숙한 간세포 (유도 간세포, iHep)로 분화한 후에, 추가적 실험을 수행하여 분화한 간세포의 기능성을 확인했다.

[0179] Cytochrome P450 (CYP) 패밀리는 약의 생체내 변화 및 반응에 있어서 필수적인 효소이다. 간세포에서 Cytochrome P450 (CYP)와 관련된 유전적 발현의 변화를 비교하기 위해서, qRT-PCR (real time quantitative PCR)을 수행했다.

[0180] 실시예 1과 같은 방법으로 전체 RNA를 추출하고 cDNA를 합성했다. 합성한 cDNA를 이용하여 qRT-PCR을 수행했다. LightCycler® 480 장비에서 SYBR Green I Master (Roche, 04887352001)와 프라이머를 사용하여 특정 유전자의 mRNA 발현을 확인했다. 3번의 분석에 대해서 평균값을 산출하고 Gapdh (5'-TGCCCCCATGTTTGTGAT-3' 및 5'-TGTGGTCATGAGCCCTTC-3')를 사용하여 정규화했다. mRNA의 발현 수준은 comparative Ct method를 사용하여 대비했다. qRT-PCR에 사용한 프라이머 서열은 하기에 나타나 있다 (하기 서열은 5'에서 3' 방향으로 표시되어 있다).

[0181] Cyp1a2_F : ATAACTTCGTGCTGTTTCTGC (서열번호 43)

[0182] Cyp1a2_R : ACCGCCATTGTCTTTGTAGT (서열번호 44)

[0183] Cyp1b1_F : ATTCTCAGTGGGCAAACGG (서열번호 45)

[0184] Cyp1b1_R : GGATTCTAAACGACTTGGGCT (서열번호 46)

[0185] Cyp2b10_F : CTGTCGTTGAGCCAACCTTC (서열번호 47)

[0186] Cyp2b10_R : TCCGCAGTTCCTCCACTAAA (서열번호 48)

[0187] Cyp2c37_F : TGTGGAGGAACTTAGGAAAACC (서열번호 49)

[0188] Cyp2c37_R : AGGGCTGCTCAGAATCTTTGT (서열번호 50)

[0189] Cyp2d22_F : GCCTTCATGCCATTCTCAGC (서열번호 51)

[0190] Cyp2d22_R : CAGAGCCCTAAAGACGCC (서열번호 52)

[0191] Cyp2e1_F : GGAATGGGGAAACAGGGTAAT (서열번호 53)

[0192] Cyp2e1_R : GCACAGCCAATCAGAAAGGT (서열번호 54)

[0193] Cyp3a11_F : TGGGACTCGTAAACATGAACTT (서열번호 55)

[0194] Cyp3a11_R : TTGACCATCAAACAACCCCC (서열번호 56)

[0195] Cyp3a13_F : GGGGACGATTCTTGCTTACC (서열번호 57)

[0196] Cyp3a13_R : AAATACCCACTGGACCAAAGC (서열번호 58)

[0198] qRT-PCR 결과, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 간세포 (iHep)는 CYP 연관된 유전자의 mRNA 발현이 증가 (주황색)했고 이러한 발현의 변화는 콜라겐 분해효소를 사용한 2단계 분해과정을 통해 10주된 성체 마우스 간에서 분리한 초대배양 간세포 (Pri-Hep)에서 나타나는 mRNA 발현 증가 (파란색)와 상당히 유사했다.

[0199] 상기 CYP 패밀리 멤버들은 간 조직에서 풍부하게 발견되는 아릴 탄화수소 수용체 (aryl hydrocarbon receptor, AhR), constitutive androstane receptor (CAR), pregnane X receptor (PXR), 및 nuclear receptor에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다. 이러한 수용체에 자극이 가해진 경우 간세포가 CYP 유도를 하는지 여부를 확인하기 위해서, 아릴 탄화수소 수용체 (Cyp1 family members)에 작용하는 3-methylcholanthrene (3Mc) 및 글루코코르티코이드 수용체 (CAR 및 PXR을 조절하는 glucocorticoid receptor는 Cyp2/3 family members의 upstream임)에 작용하는 글루코코르티코이드 (Dex, dexamethasone)같은 화학적 화합물을 수용체에 처리했다.

[0200] 구체적으로, 세포들은 dexamethasone를 첨가하지 않은 HEP 미디어에서 60% confluency로 배양했다. DMSO, 25 mM 3-methylcholanthrene (3-Mc), 1 uM dexamethasone (Dex), 또는 50 mM ethanol (Eth)을 첨가하고 신선하게 매일 미디어를 교체하며 72시간 동안 배양했다. Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, D2650)를 처리한 세포는 대조군으로 사용했다.

[0201] 그 결과 도 7에서 나타난 결과와 같이, 상기와 같은 방법으로 qRT-PCR을 수행하여 화학적 화합물을 상기 간세포에 처리한 경우 CYP 관련 유전자의 mRNA가 증가함을 확인할 수 있었다. 또한, 상기의 화학적 화합물을 처리한 경우 72시간 동안에는 처리한 세포들의 생존력에는 영향이 없음을 세포의 형태를 관찰하여 확인 했다. 이러한 결과들을 통해 제조된 간세포는 정상적으로 약물 신진대사 (drug metabolism) 기능을 할 수 있음을 알 수 있다.

[0202] 또한, 분화한 간세포의 글리코겐 (glycogen) 저장기능을 확인하기 위해서 Periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 하기와 같은 방법으로 수행했다.

[0203] 제조사의 설명에 따라서 세포들을 periodic acid-Schiff (PAS, Muto Pure Chemical, Japan, 15792)로 염색했다. 세포를 고정하기 위해서 15분 동안 10% (v/v) formalin-methanol을 배양하고 이어서 자유 알데하이드 그룹을 생성하기 위해서 1% (v/v) Periodic acid를 10분간 처리하여 글리코겐 또는 글리코단백질의 탄소와 탄소 사이를 절단했다. 그리고 나서, 알데히드 그룹은 quinoid magenta color products를 형성하기 위해서 37에서 30분간 Schiff's reagent와 컨쥬게이션(conjugation)하고 현미경으로 분석하기 위해서 PBS에 보관했다.

Schiff's reagent를 처리하는 단계를 제외한 모든 단계들은 상온에서 수행하였다. 세포들은 각 단계 사이마다 물을 사용해 5분씩 3차례 세척하였다.

[0204] 그 결과 도 8 왼쪽에서 볼 수 있는 바와 같이, 분화된 간세포에서 글리코겐 저장을 나타내는 Periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 확인할 수 있었다.

[0205] 또한, 간세포의 해독 기능을 확인하기 위해서, Indocyanine green (ICG) 검정을 수행했다. ICG는 형광 염색제로서 간 기능을 진단하는데 사용되는 지시물질 (indicator substance)이다. ICG는 간에서 대사되어 간 및 담관을 통해 배출되므로, 간의 해독 능력을 판단하는데 사용된다. ICG 검정은 하기와 같은 방법으로 수행했다.

[0206] Indocyanine green (ICG, Sigma, I2633-25MG)을 100 mg/mL stock 농도로 만들기 위해서 250 uL DMSO에 녹인 것을 소분한 후에 어두운 곳에서 -20 상태로 보관했다. 100 mg/mL ICG stock을 세포 미디어로 희석하여 1 mg/mL로 만든 ICG를 37에서 1시간 배양하고, 이어서 본 검정을 위해서 PBS로 3회 세척했다 (Uptake). 추가로 ICG가 없는 HEP 미디어상의 37에서 6시간동안 배양하고 본 검정을 위해서 PBS로 3회 세척했다 (Release). ICG를 배양한 후에 현미경으로 관찰한 것은 ICG를 흡수한 세포 (uptake)를 나타내고, ICG가 없는 HEP 미디어에서 6시간 배양한 후에 현미경으로 관찰한 것은 ICG가 배출된 후 (release)를 나타낸다. 플레이트상의 동일한 지점을 검정 전체과정 동안 추적해서 관찰했다.

[0207] ICG 검정 결과 도 9에 나타난 것과 같이, ICG 흡수 세포 (녹색)는 6시간 이후에 급격하게 사라짐을 확인할 수 있었고, 이를 통해 분화된 간세포는 해독 능력을 갖고 있음을 알 수 있다.

[0208] 또한, Dil-ac-LDL 흡수 검정을 수행하여 분화된 간세포가 LDL을 흡수 할 수 있는지 여부를 확인했다. Dil-ac-LDL 흡수 검정은 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (Biomedical Technologies, BT-902)으로 표지된 acetylated low density lipoprotein (ac-LDL)이 흡수된 세포를 표준 로다민 excitation/emission 필터를 장착한 형광 형미경으로 관찰하여 수행했다. Dil-ac-LDL 흡수 검정은 200 ng/mL ac-LDL를 세포에 처리하고 5% CO2 및 37 조건에서 6시간동안 배양했다. 핵은 DAPI로 대비 염색했다.

[0209] Dil-ac-LDL 흡수 검정결과 도 10에서 나타난 것과 같이, 분화된 간세포는 LDL 수용체에 의해서 매개되는 세포내 이입 (endocytosis)을 통해 LDL (low-density lipoprotein)을 흡수했다.

[0210] 또한, 간세포의 알부민 단백질을 생성 기능을 확인하기 위해서 배양하는 미디어에 존재하는 알부민의 양을 측정하였다. 알부민 ELISA Kit (Bethyl Laboratories)를 제조사의 지침에 따라서 사용하여 마우스 배아 섬유아세포 (MEF), 간세포, 및 초대배양 간세포를 배양하여 얻은 배양 상청액을 분석했다.

[0211] 그 결과 도 11에서 나타난 것과 같이 간세포를 배양한 미디어로 알부민이 배출되었음을 확인했다.

[0212] 상기와 같은 결과들은 종합해 보면, 간 줄기세포에서 분화된 간세포는 정상적으로 기능하는 간세포임을 알 수 있다.

[0213] 간 줄기세포에서 담관세포로 분화시키기 위해서, 참고예 3과 같은 방법으로 3차원 형태 I 콜라겐 젤 배양 시스템에서 40% Matrigel을 포함하는 담관세포 분화 (Cholangiocyte differentiation (CLD)) 미디어 안에서 간 줄기세포를 배양했다.

[0214] 도 12에서 나타난 것과 같이, 분화한 간세포는 낭포 (cystic) 및 관 (tube)을 형성한 담관세포로 분화함을 phase contrast 현미경을 통해 관찰하고 (왼쪽)하고 참고예 4 같은 방법으로 면역형광 염색을 수행하여 담관세포 특이적 마커인 CK19을 발현 (오른쪽)함을 확인할 수 있었다.

[0215] 간 줄기세포에서 유래한 담관세포의 기능성을 평가하기 위해서, 직접교차분화 유도된 간 줄기세포를 참고예 3과 같은 방법으로 Matrigel에서 배양하여, 분화한 담관세포에 대하여 낭포 형성을 유도했다. 그리고 나서, apical-basal 극성을 평가하기 위해서, Phalloidin를 이용해서 F-actin 염색을 수행하여 참고예 4와 같은 방법으로 면역형광 염색을 수행했다. 그 결과 도 13에서 나타난 것과 같이, 담관 낭포의 내부의 안쪽 면에서의 F-actin의 위치화를 확인할 수 있었다. 또한 이러한 낭포는 담관세포 마커인 CK19 및 CK7을 공동발현했다 (하단).

[0216] 또한, 분화된 담관세포가 in vitro에서 분비 기능을 나타내는지 확인하기 위해서 Rhodamine 123 transport 검정을 수행하였다. Rhodamine 123 transport 검정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0217] 담관세포 (Cholangiocytes)를 100 uM rhodamine 123(Sigma)과 37에서 5분동안 배양하고 그리고 나서 HEP 미디어로 3회 세척했다. 그 다음에 담관세포들은 신성한 HEP 미디어 상에서 37로 추가적으로 40분간 배양했다. Rhodamine 123 transfer가 실제로 막 채널 MDR1 (Multidrug Resistance Protein 1)의 활성을 반영하는지 확인

하기 위해서, 세포들을 10 uM verapamil (Sigma-Aldrich)과 37에서 30분간 배양하고 본 검정을 반복했다. 공초점 현미경을 사용해 이미지들은 얻었다. 내부 (Lumen)의 Rhodamine 123 형광은 주위의 배경으로 정규화했다.

[0218] 도 14 및 도 15에서 볼 수 있는 바와 같이, 낭포 담관세포 (cystic cholangiocytes)는 담관세포 표면 글리코단백질 (Glycoprotein) MDR (multidrug resistance protein)에 대한 형광 기질인 rhodamine 123을 내부로 수송했다. 상기 담관세포의 수송 잠재력은 MDR 저해제인 Verapamil의 처리에 의해서 저해됐다.

[0220] 따라서, 상기와 같은 결과들을 종합해 보면, 간 줄기세포에서 분화된 담관세포는 정상적으로 기능하는 담관세포임을 알 수 있다.

[0222] **실시예 3. 간세포를 이용한 in vitro 알코올 간 질병 모델링**

[0223] 상기 간세포를 in vitro 알코올 간 질병 모델로 사용가능 여부를 확인하기 위해서, 간세포에 대하여 50 mM EtOH를 48시간 동안 처리하고 현미경을 이용해서 50 mM EtOH를 48시간 처리한 세포들의 형태적 변화를 관찰했다.

[0224] 도 16에서 나타난 것과 같이, EtOH를 처리한 간세포들을 Oil Red O 및 Bodipy로 염색하고 각각 광학 현미경 및 참고예 4와 같은 방법으로 형광 현미경으로 관찰하여 EtOH를 처리한 간세포의 세포질에서 지방의 축적 및 지질 작은 방물 (droplet)의 형성을 관찰할 수 있었다.

[0225] 이를 통해, 상기 간세포가 in vitro상에서 알코올에 의한 간 손상을 나타내는 모델로 사용이 가능함을 알 수 있다.

[0227] **실시예 4. In vivo 섬유화 간 질병 모델에 대한 치료 효과**

[0228] 간세포의 in vivo 치료 효과를 살펴보기 위해서, CCl_4 (carbon tetrachloride, 사염화탄소) 유도 간 섬유화 모델을 제작해서 간 용량의 재구성을 확인하는데 사용했다. 주입한 CCl4는 Cyp2e1에 의해서 대사과정을 거쳐 자유라디컬 (CCl3)로 변환되며, 축적되는 자유 라디컬에 의해서 간세포가 손상될 수 있다. 이렇게 손상된 간세포는 염증반응을 일으켜 간에 존재하고 있는 면역세포인 kupffer cell을 activation 하게 되고, 이 면역세포가 분비하는 인자 (cytokines)들이 간조직에 있는 간성상세포를 활성화하여 간 섬유화를 유발하게 된다.

[0229] CCl_4 유도 마우스 모델에 대한 세포 주입은 하기와 같은 방법으로 수행하였다. 4주 동안 일주일에 CCl_4를 두 번 주입하여 초기 섬유화 형성을 유도했다. CCl_4 주입된 세포에 대한 면역반응을 저해하기 위해서, 실험기간 동안 면역저해제인 cyclosporin A를 매일 주입했다. 구체적으로, CCl_4에 의해서 유도된 마우스 모델은 Japan SLC, Inc.에서 구입했다. 6주된 수컷 C57BL/6N 마우스에 CCl_4 (2 mL/kg)를 올리브유에 녹여 (1:1) 4주동안 일주일에 두 번 복강내 주사하여 간 섬유화를 유도했다. CCl_4 유도 마우스 모델에 주입하기 위해서 CellTracker™ CM-DiI (Invitrogen, C7000)로 표지 된 간세포를 제작하였다. 제조사의 프로토콜을 따라서 10 ug/mL CellTracker™ CM-DiI 용액을 상기 간 줄기세포에서 분화 유도된 간세포와 37에서 5분동안 배양하여 간세포를 상기 용액으로 염색하였다. CellTracker™ CM-DiI로 표지 된 2 x 10^6 간세포들은 100 uL PBS로 재부유하고 UNIST in vivo 연구센터 (IVRC) (Ulsan National Institute of Science and Technology)의 승인하에 CCl_4를 주입하여 간 섬유화가 유도된 마우스 간의 비장내 (intrasplenically)로 주입했다. OCT 화합물 (CellPath, KMA-0100-00A)에 매입되어 동결된 샘플과 Paraffin에 내장된 (Leica, 39601006) 조직 샘플들은 세포 주입 후 4주 후에 간 조직에서 수집했다. 이와 같은 제작 과정은 도 17에 도식화 되어 있다.

[0230] CM-DiI이 표지된 간세포가 이식된 간에 대하여 참고예 4와 같은 방법으로 면역형광 염색을 수행한 결과, 도 18에서 나타난 것과 같이, 이식된 간세포가 in vivo 상에서 albumin을 발현하는 것을 확인했다. 낮은 이식 효율은 손상된 간에 이식된 세포가 접근하기 위한 공간이 제한적으로 존재하기 때문인 것으로 보인다.

[0231] CCl_4 유도 마우스 모델에서 간세포의 치료 효과를 하기와 같은 조직학적 분석을 수행하여 확인하였다. Paraffin이 내장된 간 조직은 4 um 두께로 절단했다. 조각들은 xylene에서 Paraffin을 분리하고 descending 알코올로 재수화(rehydrate)했다.

[0232] 면역조직화학 (Immunohistochemistry, IHC)을 위한 항원 회복 (antigen retrieval)을 위해서 끓인 10 mM sodium citrate을 20분 동안 처리했다. 그리고 나서, PBS상의 0.1% (v/v) Triton X-100 (PBS-T)로 투과시키기 전에 슬라이드를 증류수에서 식혔다. 내인성 (endogenous) peroxidase를 저해하기 위해서, 3% (v/v) H2O2 (in deionized water)를 30분간 처리하고 비특이적 결합을 최소화하기 위해서 CAS-Block (Invitrogen, 00-8120)을 8분동안 배양했다. α-SMA (1:200, Abcam, AB7817)는 상온에서 1시간 동안 배양했다. PBS-T로 세척한 후에, 조각들을 염소 항-마우스 IgG-HRP (1:200, Santa Cruz, sc-2302)과 배양했다. α-SMA는 AEC single solution (Invitrogen, 00-1111)으로 검출했다. 핵은 hematoxylin (Sigma, HHS32)으로 염색하고 0.2% (v/v) ammonium hydroxide로 파란색이 되게 한 후에, 글리세롤 (Sigma, G5516)로 마운팅했다. ImageJ (National Institutes of Health)를 사용해서 역치 값을 86으로 하여 총 18개의 조각에 대해서 각 조각에 대하여 무작위로 선정한 15개의 이미지에 대하여 양성 면적의 퍼센트를 계산했다. Hematoxylin & eosin 염색을 위해서 우선 핵을 염색하고, 그리고 나서 조직은 Eosin Y 용액 (Sigma, HT110332)에 담그고 수 차례에 걸쳐 세척하고 탈수하였다. 슬라이드는 마운팅 용액 (Leica, 3801122)으로 마운팅했다.

[0233] 염증 및 간세포의 손상에 의해 활성화된 간성상세포 (hepatic stellate cells)를 나타내는 작은 염증 림프구 침윤 (small inflammatory lymphocytes infiltration, 화살표) 및 α-SMA (α-smooth muscle actin) 염색 (화살표 머리)을 통해 간 섬유화 형성 모델의 제작과 유도 간세포의 치료효과를 확인할 수 있다. 상기와 같은 방법으로 조직학적 및 면역조직학적 분석을 수행하여, 도 19 및 도 20에 나타난 것과 같이, 간세포를 주입하고 1달 후 간세포 주입 CCl4 유도 마우스는 간세포 대신 PBS를 주입한 마우스에 비해서 더 적은 림프구 및 더 적은 비율의 α-SMA 양성 부위를 나타냄을 확인했다.

[0234] 상기의 결과들은 통해, 간 조직에 간세포를 이식할 수 있으며 간세포의 이식은 CCl_4에 의해 손상된 간세포의 재생 및 간 섬유화 질병에 치료 효과가 있음을 알 수 있다.

[0236] **실시예 5. 직접교차분화인자에 의한 인간 섬유아세포의 담관세포로의 유도**

[0237] 직접교차분화인자에 의해서 체세포에서 담관세포로 직접교차분화가 일어나는지 확인하기 위해서, 실시예 1과 같은 방법으로 인간 섬유아세포 (CRL-2097, ATCC)에 인간 OCT4 (NM_002701.5, 서열번호 73) 및 HNF4α (NM_000457.4., 서열번호 75) 유전자를 도입하였다.

[0238] 상기 방법을 수행하여 섬유아세포에서 담관세포를 유도한 후, 실시예 1과 같은 방법으로 세포의 형태적 변화를 관찰한 결과는 도 22에 나타나 있다. 오른쪽 그림은 왼쪽 그림을 확대한 그림이다. 스케일바는 100 um를 나타낸다.

[0239] 도 22의 A는 상기 방법으로 섬유아세포에서 담관세포로 직접교차분화 유도한 후 담관세포 (iCLC)를 현미경으로 관찰한 결과를 나타내고,

[0240] 도 22의 B는 상기 방법으로 섬유아세포에 직접교차분화인자 유전자를 도입한 후에, 참고예 2와 같은 방법으로 담관세포로 분화 유도한 담관세포 (iHSC-CLC)를 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

[0241] 도 22에서 나타난 것과 같이, 섬유아세포에 직접교차분화인자 유전자를 도입하여 담관세포로 직접교차분화 유도한 경우, 섬유아세포를 간 줄기세포로 직접교차분화 유도한 후, 상기 간 줄기세포를 담관세포로 분화시킨 경우의 담관세포에서 관찰되는 담관구조 (ductal structure)를 확인할 수 있었다.

[0242] 또한, 상기 방법으로 섬유아세포에서 담관세포로 직접교차분화 유도한 담관세포를 참고예 4와 같은 방법으로 면역형광 염색 분석하여 담관세포의 표면에서 특이적으로 발현하는 마커인 CK19 및 CK7의 발현을 확인하였다.

[0243] 상기 실험결과는 도 23에 나타나 있다.

[0244] 도 23에 나타난 것과 같이 상기 방법으로 섬유아세포에서 담관세포로 직접교차분화 유도한 담관세포에서는 담관세포의 표면에서 특이적으로 발현하는 마커인 CK19와 CK7가 발현함을 확인할 수 있었다.

[0246] **실시예 6. 직접교차분화인자에 의한 인간 섬유아세포의 직접교차분화 확인**

[0247] **6-1. 직접교차분화인자에 의한 인간 섬유아세포의 간 줄기세포 및 간세포로의 직접교차분화 유도**

[0248] 직접교차분화인자의 다른 조합에 의해서 인간 섬유아세포에서 간 줄기세포 및 간세포로 직접교차분화를 유도하

기 위해서 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[0249] 구체적으로, 실시예 1과 같은 방법으로 섬유아세포에 직접교차분화인자를 도입하되, 상기 직접교차분화인자의 조합은 하기와 같다:

[0250] OU, OUT, ON7, 또는 ON7T (O:OCT4, NM_002701.5., 서열번호 73); U:NR4A2/NURR1, NM_006186.3., 서열번호 77; N7:NR4A1/NUR77, NM_001202233.1., 서열번호 79; T:TBX3, NM_005996.3., 서열번호 81).

[0251] 상기 방법으로 섬유아세포에서 직접교차분화 유도한 세포를 현미경으로 관찰한 결과는 도 24에 나타나 있다.

[0252] 도 24는 섬유아세포에 상기 직접교차분화인자를 도입시킨 후 실시예 1과 같은 방법으로 세포의 형태학적 변화를 관찰하여, 섬유아세포의 형태학적 특징을 가지고 있지 않음을 확인하였다.

[0253] 오른쪽 그림은 왼쪽 그림을 확대한 그림이다. 스케일바는 250 um를 나타낸다.

[0255] **6-2. 직접교차분화인자에 의한 인간 섬유아세포의 간 줄기세포 및 간세포로의 직접교차분화 유도 확인**

[0256] 6-2-1. 면역형광 분석

[0257] 실시예 6-1의 방법으로 인간 섬유아세포에서 직접교차분화된 세포를 참고예 4와 같은 방법으로 간 줄기세포 마커 및 간세포 마커로 면역형광 분석하였다.

[0258] 상기 실험결과는 도 25에 나타나 있다.

[0259] 도 25에 나타난 것과 같이, 실시예 6-1의 방법으로 인간 섬유아세포에서 직접교차분화된 세포는 간 줄기세포 마커 단백질을 발현하고 (HNF4, E-Cadherin). 간세포 마커 단백질을 발현 (AFP, ALB)함을 확인할 수 있었다.

[0260] 따라서, 상기 결과를 통해서 섬유아세포에서 직접교차분화인자를 도입하여 간 줄기세포 및 간세포를 직접교차분화시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0262] 6-2-2. Real-time RT-PCR 분석

[0263] 실시예 6-1의 방법으로 인간 섬유아세포에서 직접교차분화된 섬유아세포 마커, 간 줄기세포 마커 및 간세포 마커의 발현을 real-time reverse transcription PCR로 확인하였다.

[0264] 구체적으로, 실시예 6-1의 방법으로 인간 섬유아세포에 직접교차분화인자를 도입한 다음 3일, 1주일, 3주일 마다 세포를 샘플링하여 전체 RNA를 RNeasy mini kit (Qiagen)을 이용하여 추출하고, 추출한 전체 RNA중 500 ng 및 SuperScript® III 역전사효소 (Invitrogen)를 이용하여 cDNA를 합성하고, 상기 합성한 cDNA 20 uL 부피를 하기 기재된 프라이머 및 LightCycler 480 SYBR Green I Mastermix (Roche)을 이용하여 실시간 PCR 분석을 수행하였다. 상기 실험은 3회 반복하여 실시하였고, 항존 유전자 (housekeeping gene) GAPDH로 정상화 (normalize)하였고, 유전자 발현은 Ct값 계산 방법으로 측정하였다.

[0265] HF는 인간 섬유아세포에 직접교차분화인자를 도입했을 때이고, D3는 상기 직접교차분화인자 도입한 다음 3일후이고, 1wk는 상기 직접교차분화인자 도입한 다음 1주일후이고, 3wk는 상기 직접교차분화인자 도입한 다음 3주일후이고, 간암세포주 HepG2 (ATCC)는 양성대조구이다.

[0266] Real-time RT-PCR 분석에 사용한 프라이머 서열은 하기에 나타나 있다 (하기 서열은 5'에서 3' 방향으로 표시되어 있다).

[0268] hCOLIA2-qF : CAGAGTGGAGCAGTGGTTAC (서열번호 59)

[0269] hCOLIA2-qR : CAGTTCTTGGCTGGGATGTT (서열번호 60)

[0270] hTWIST2-qF : CCTCAGCTACGCCTTCTC (서열번호 61)

[0271] hTWIST2-qR : GAATGCATCCCAATTCCACTTG (서열번호 62)

[0272] hALB-qF : GCACAGAATCCTTGGTGAACAG (서열번호 63)

[0273] hALB-qR : ATGGAAGGTGAATGTTTCAGCA (서열번호 64)

[0274] hAFP qF : GCTTGGTGGTGGATGAAACA (서열번호 65)

[0275] hAFP qR : TCCTCTGTTATTTGTGGCTTTTG (서열번호 66)

[0276] hHNF4a qF : TCGCAGATGTGTGTGAGTCC (서열번호 67)

[0277] hHNF4a qR : CACTCAACGAGAACCAGCAG (서열번호 68)

[0278] hFOXA2 qF : ACCACTACGCCTTCAACCAC (서열번호 69)

[0279] hFOXA2 qR : GCCTTGAGGTCCATTTTGTG (서열번호 70)

[0280] hGAPDH R : GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT (서열번호 71)

[0281] hGAPDH F : GTGGACCTGACCTGCCGTCT (서열번호 72)

[0283] 상기 방법을 수행하여 얻은 실험결과는 도 26에 나타나 있다.

[0284] 도 26에 나타난 것과 같이 직접교차분화인자를 도입 후 3일이 경과한 세포에서 섬유아세포 특이적 마커(TWIST2, COLIA2)의 발현이 각각 72%, 36% 감소하였으나, 반면에 직접교차분화인자를 도입 후 3주일이 경과한 세포에서 HNF4a의 발현이 367% 증가, FOXA2의 발현이 513% 증가, AFP의 발현이 363% 증가, ALB의 발현이 421% 증가함을 확인할 수 있었다 (간 줄기세포 (HNF4a, FOXA2), 및 간세포 (AFP, ALB) 마커).

[0286] **6-3. 직접교차분화된 간세포의 특징 분석**

[0287] 실시예 6-1의 방법으로 섬유아세포에서 직접교차분화된 세포를 참고예 4와 같은 방법으로 간세포 특이적 마커의 발현을 확인하고, 실시예 2와 같은 방법으로 LDL 흡수 검정을 수행, 실시예 2와 같은 방법으로 간세포의 글리코겐 (glycogen) 저장기능을 확인(Periodic acid-Schiff (PAS) 염색), 및 실시예 2와 같은 방법으로 ICG 흡수 분석을 수행하였다.

[0288] 그 결과 도 27에 나타난 것과 같이, 실시예 6-1의 방법으로 섬유아세포에서 직접교차분화된 세포는 간세포 특이적 마커 (AFP, ALB)를 발현하고, LDL 수용체에 의해서 매개되는 세포내이입 (endocytosis)을 통해 LDL (low-density lipoprotein)을 흡수하며, 글리코겐 저장을 나타내는 Periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 확인하였고, ICG 흡수 세포 (녹색)는 6시간 이후에 급격하게 사라짐을 통해서 해독능력이 있음을 확인 할 수 있었다.

[0289] 상기 결과들을 통해서 실시예 6-1의 방법으로 섬유아세포에서 직접교차분화된 세포는 정상적인 간세포 특성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

[0291] **6-4. 직접교차분화인자에 의한 인간 섬유아세포의 간 담도세포로의 직접교차분화 확인**

[0292] 직접교차분화인자의 다른 조합에 의해서 인간 섬유아세포에서 간 담도세포로 직접교차분화되는지 여부를 확인하기 위해서 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[0293] 구체적으로, 실시예 6-1과 같은 방법으로 인간 섬유아세포에 직접교차분화인자를 도입하고, 상기 세포를 참고예 3과 같은 방법으로 마트리젤 (Materigel)으로 코팅된 플레이트에서 배양한 후, 참고예 4와 같은 방법으로 면역형광 염색을 수행하였으며, 상기 직접교차분화인자의 조합은 하기와 같다:

[0294] OU, OUT, ON7, 또는 ON7T (O:OCT4, NM_002701.5., 서열번호 73); U:NR4A2/NURR1, NM_006186.3., 서열번호 77; N7:NR4A1/NUR77, NM_001202233.1., 서열번호 79; T:TBX3, NM_005996.3., 서열번호 81).

[0295] 상기 방법을 수행하여 얻은 실험결과는 도 28에 나타나 있다.

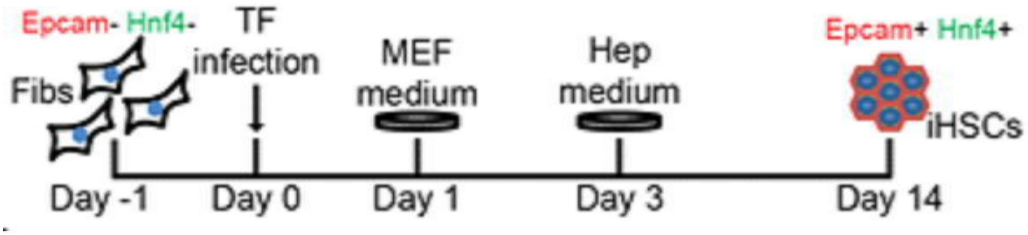
[0296] 도 28에 나타난 것과 같이 인간 섬유아세포에 상기 직접교차분화인자를 도입한 세포를 마트리젤 (Materigel)으로 코팅된 플레이트에서 배양할 경우 담관 구조 (ductal structure)에서 발현하는 담관세포 표지 단백질 (CK19, CK7)이 발현됨을 확인할 수 있었고, 이를 통해서 섬유아세포에 상기 직접교차분화인자를 도입하는 경우 담관세포로 직접교차분화유도됨을 확인할 수 있었다.

도면

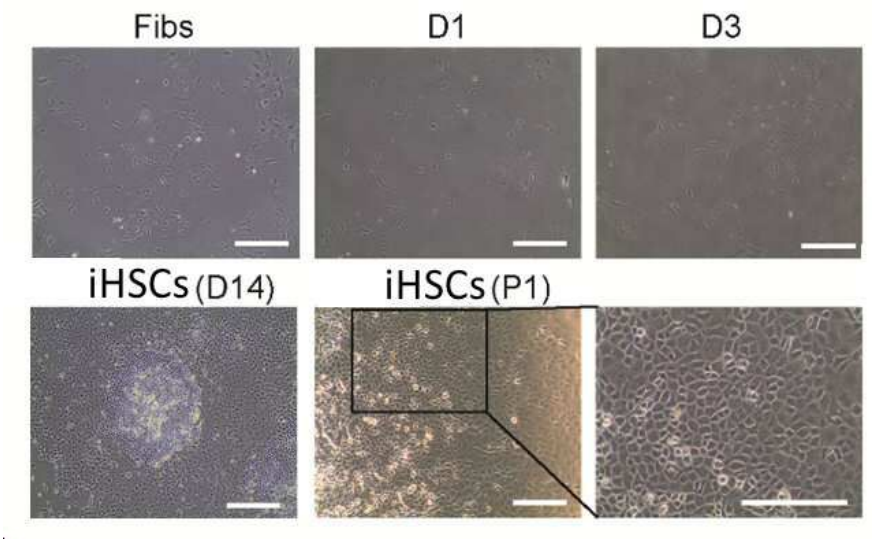
도면1



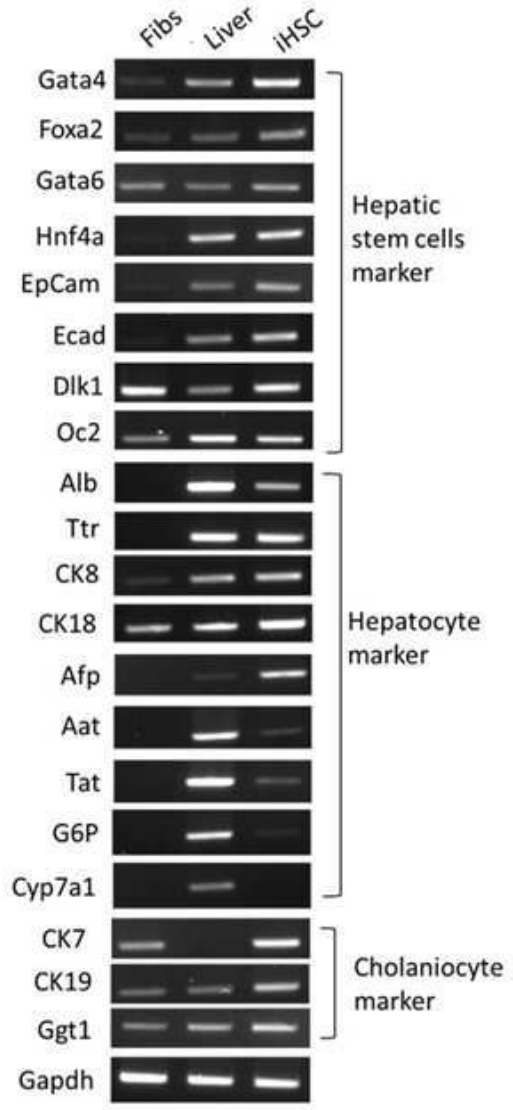
도면2



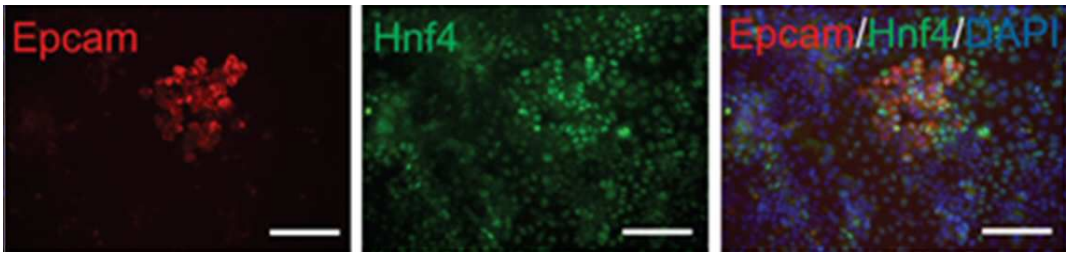
도면3



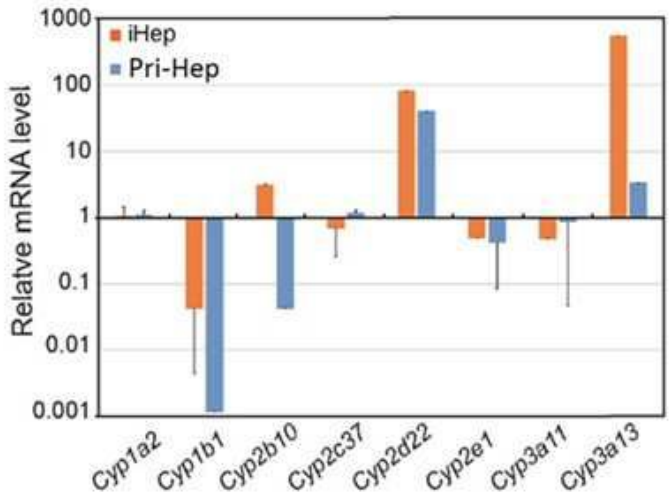
도면4


Fibs
Liver
iHSC
Gata4
Foxa2
Gata6
Hnf4a
EpCam
Ecad
Dlk1
Oc2
Hepatic stem cells marker
Alb
Ttr
CK8
CK18
Afp
Aat
Tat
G6P
Cyp7a1
Hepatocyte marker
CK7
CK19
Ggt1
Cholaniocyte marker
Gapdh

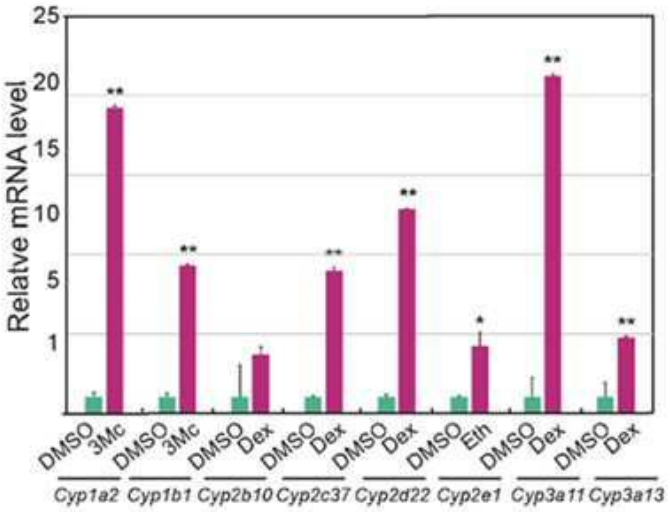
도면5


Epcam
Hnf4
Epcam/Hnf4/DAPI

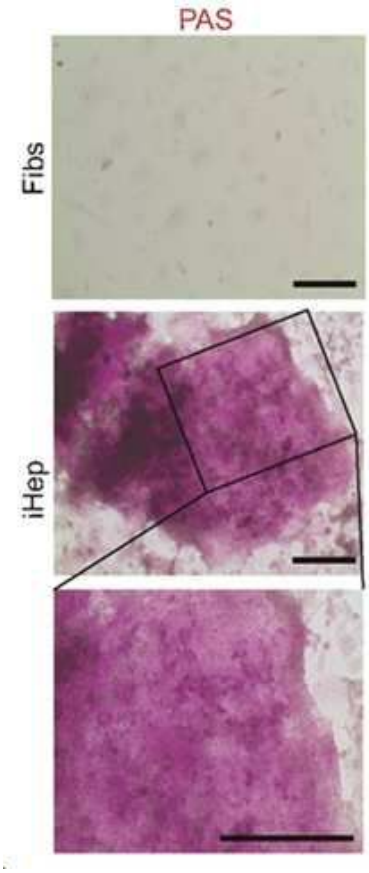
도면6


1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
iHep
Pri-Hep
Relative mRNA level
Cyp1a2
Cyp1b1
Cyp2b10
Cyp2c37
Cyp2d22
Cyp2e1
Cyp3a11
Cyp3a13

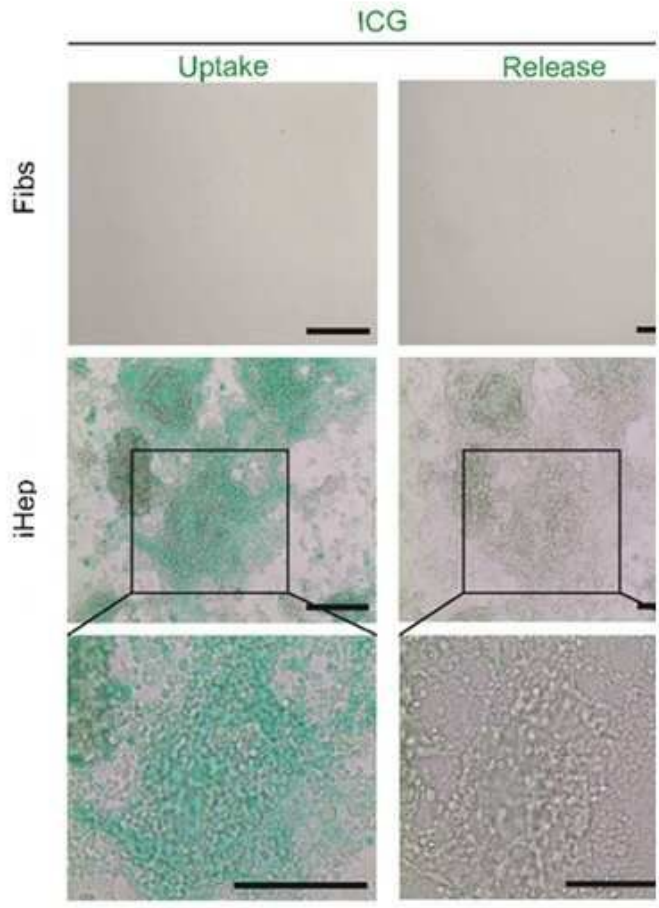
도면7


25
20
15
10
5
1
Relative mRNA level
**
*
DMSO
3Mc
Dex
Eth
Cyp1a2
Cyp1b1
Cyp2b10
Cyp2c37
Cyp2d22
Cyp2e1
Cyp3a11
Cyp3a13

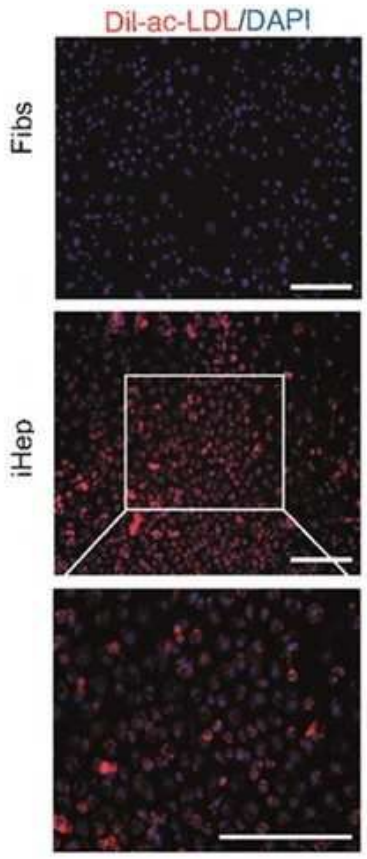
도면8



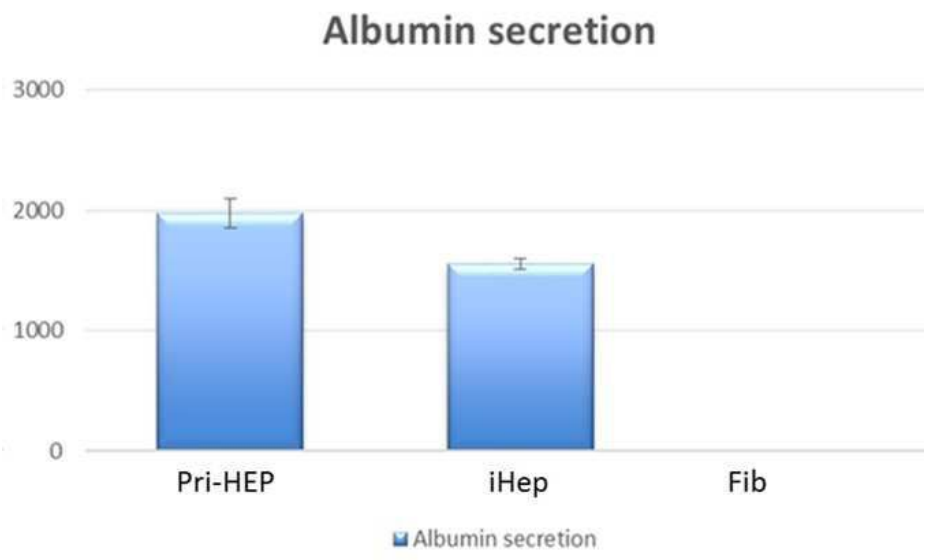
도면9



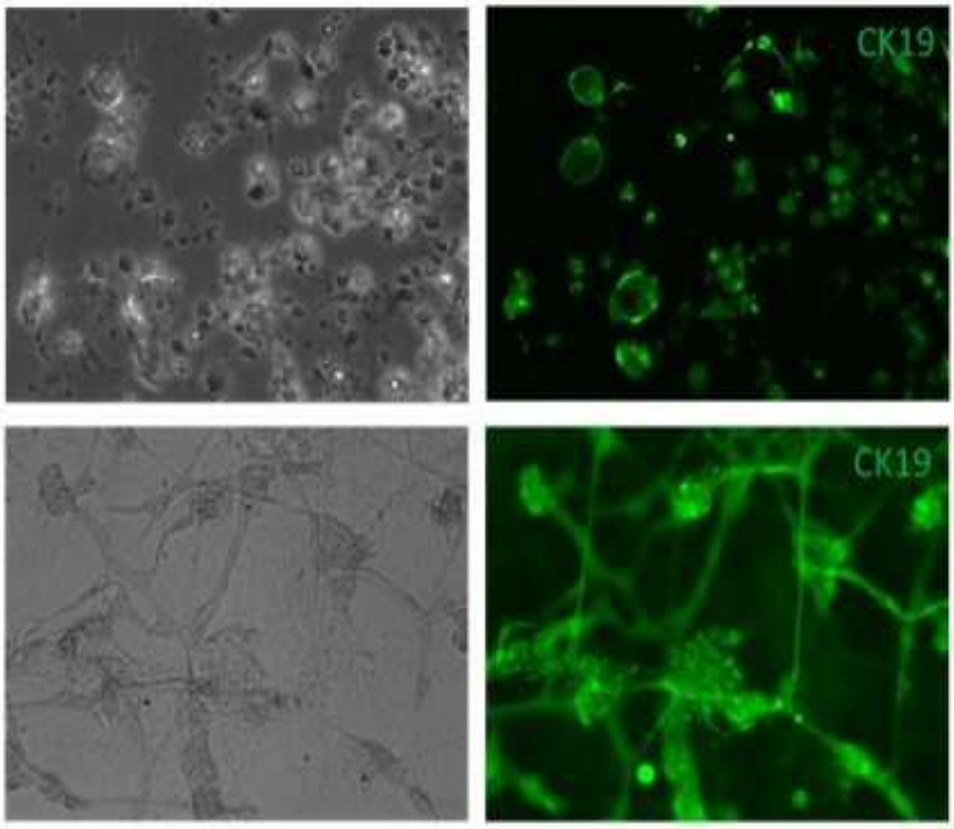
도면10


Dil-ac-LDL/DAPI
Fibs
iHep

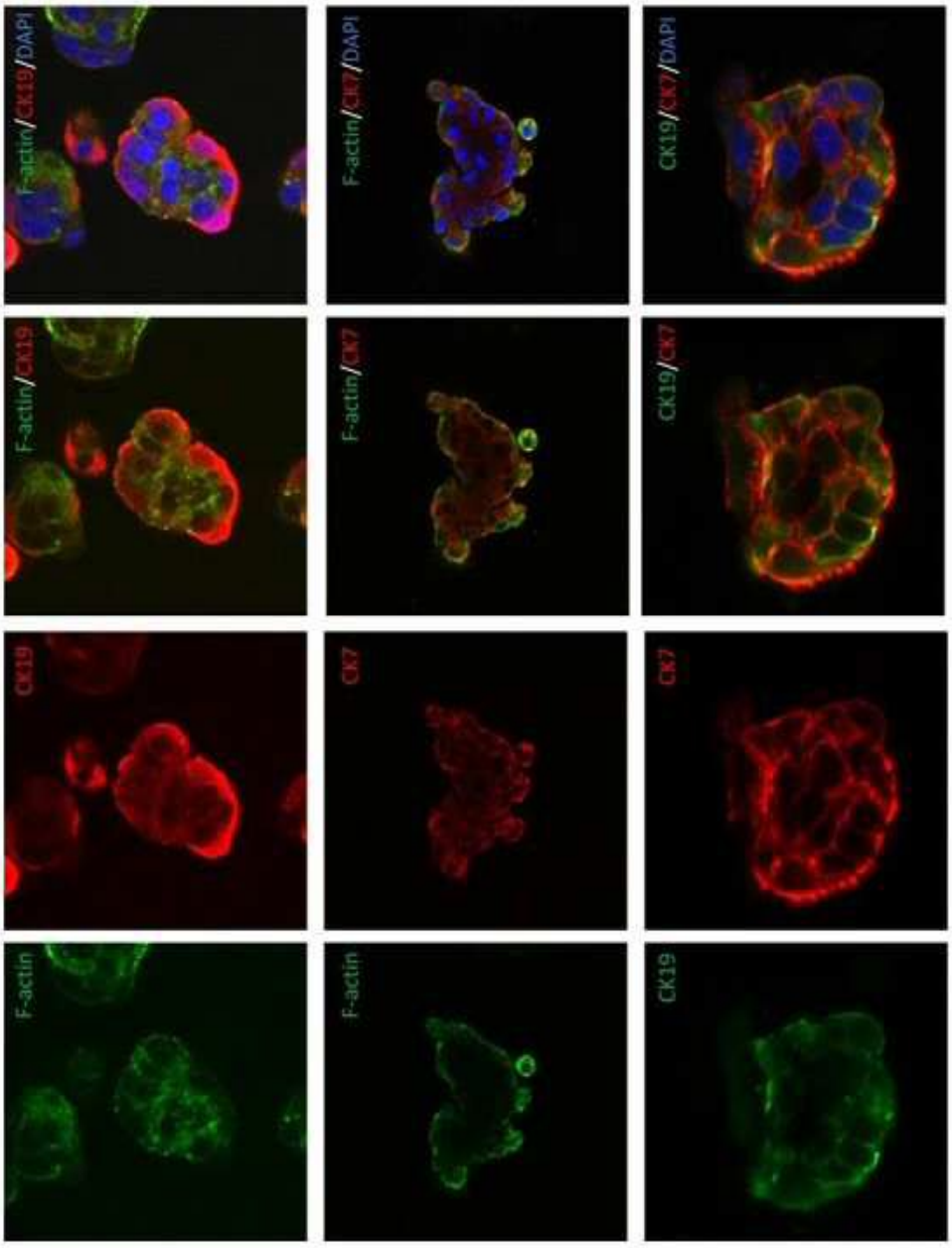
도면11


Albumin secretion
3000
2000
1000
0
Pri-HEP
iHep
Fib
Albumin secretion

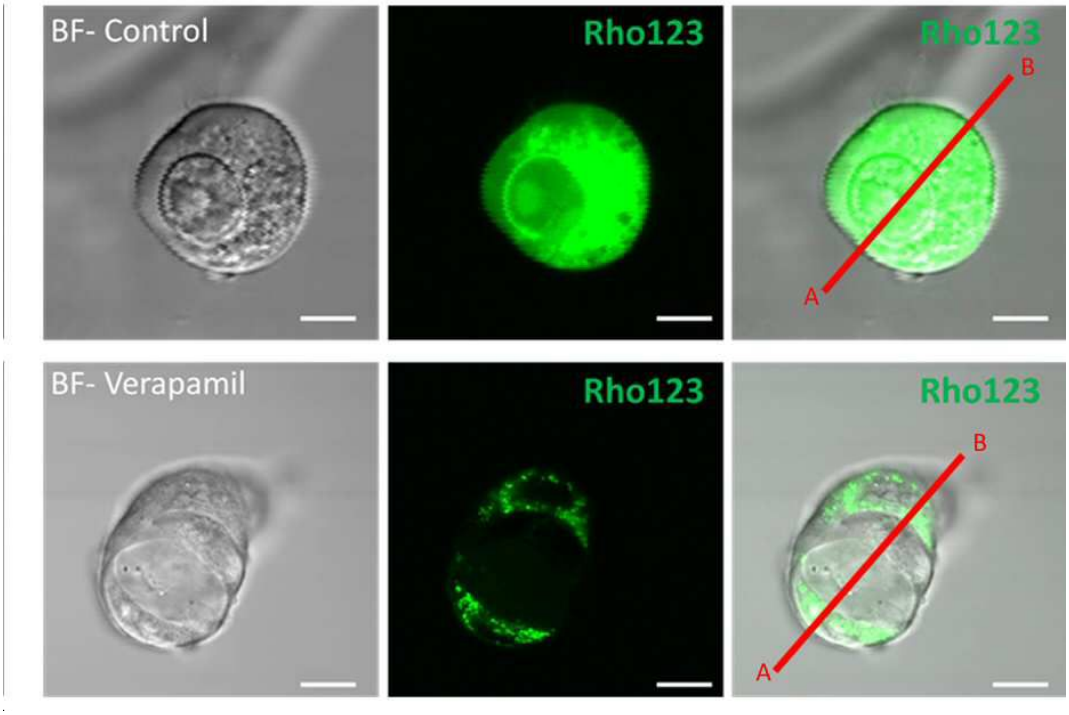
도면12



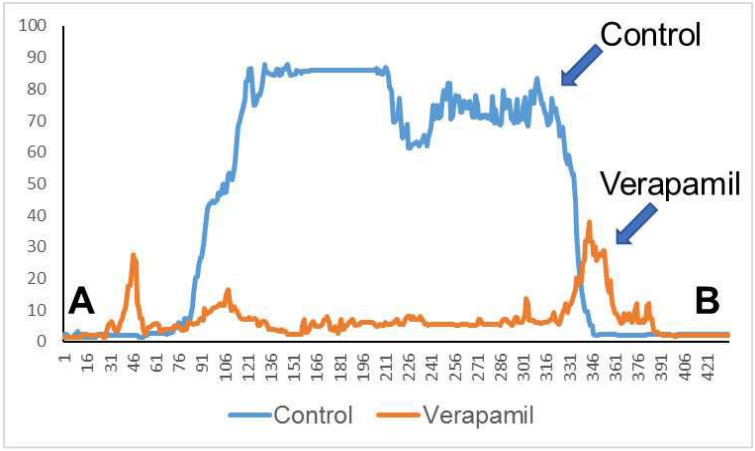
도면13

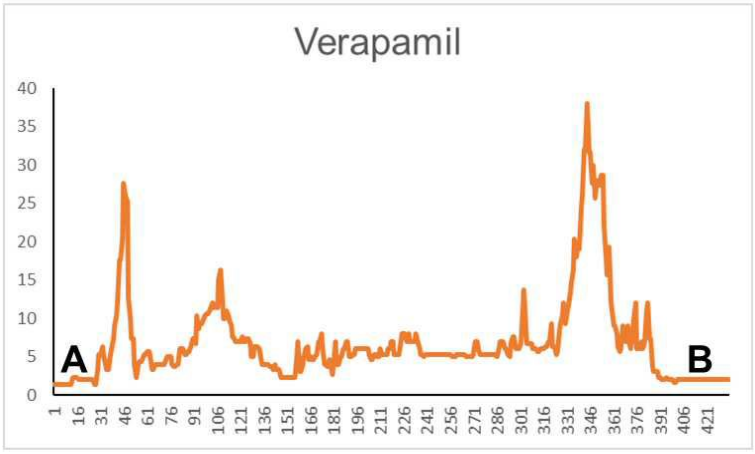

F-actin/CK19/DAPI
F-actin/CK7/DAPI
CK19/CK7/DAPI
F-actin/CK19
F-actin/CK7
CK19/CK7
CK19
CK7
CK7
F-actin
F-actin
CK19

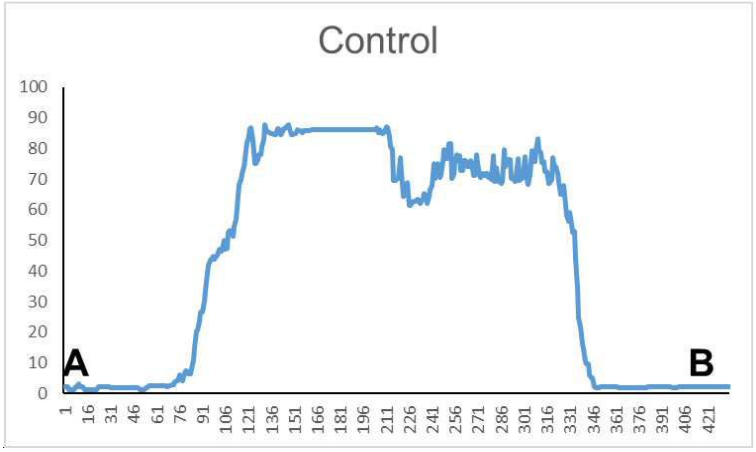
도면14



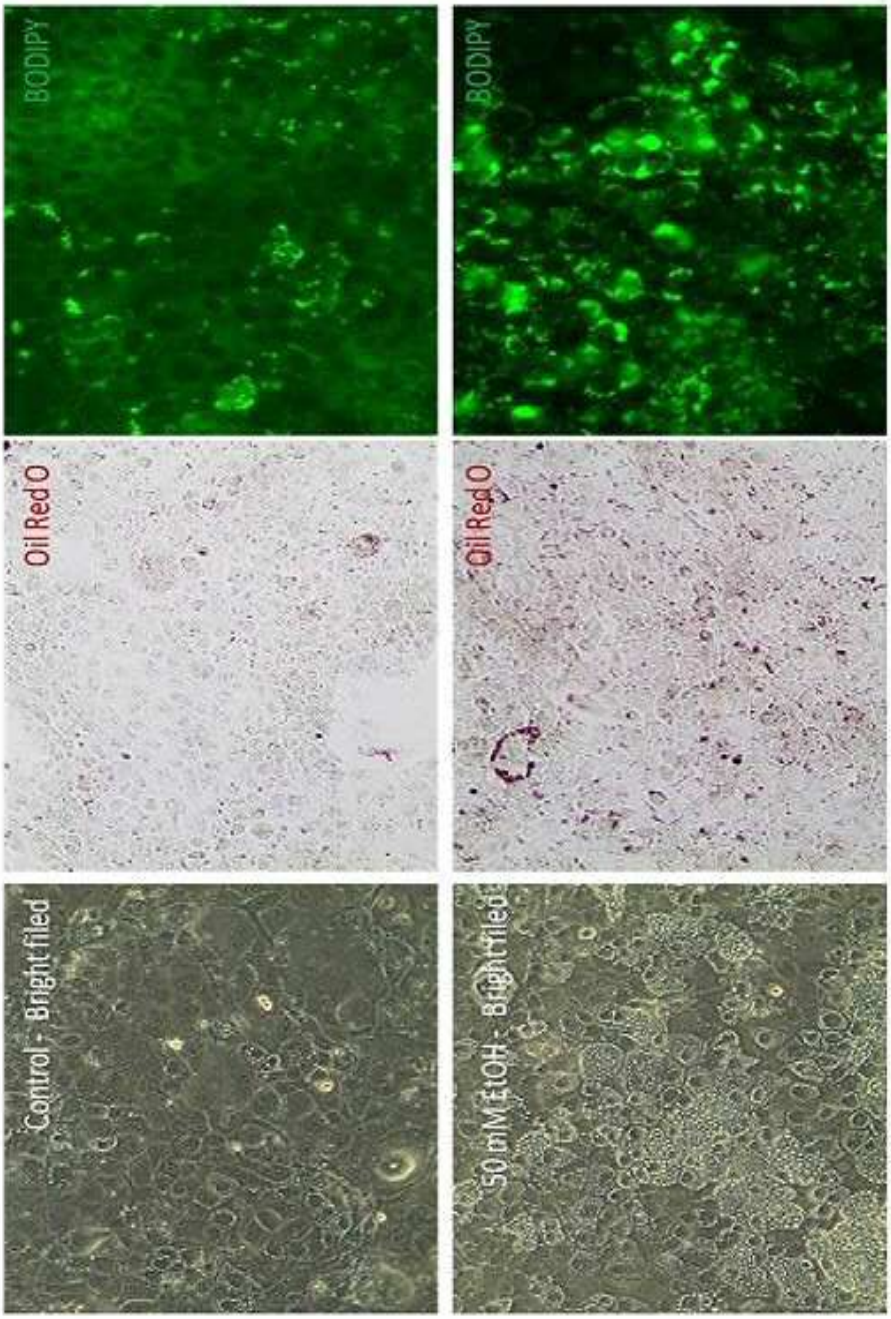
도면15


Control
Verapamil
A
B
Control
Verapamil

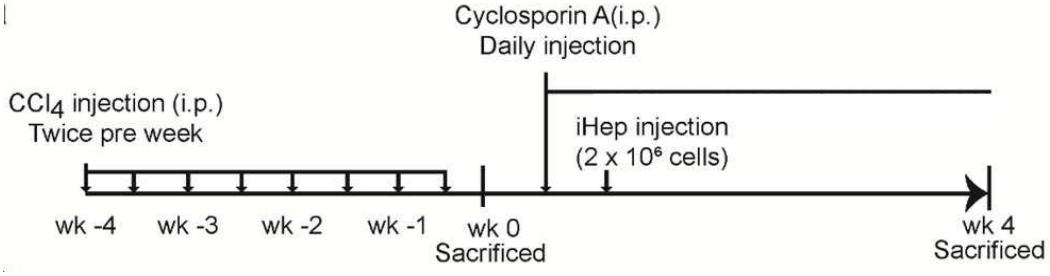

Verapamil
A
B


Control
A
B

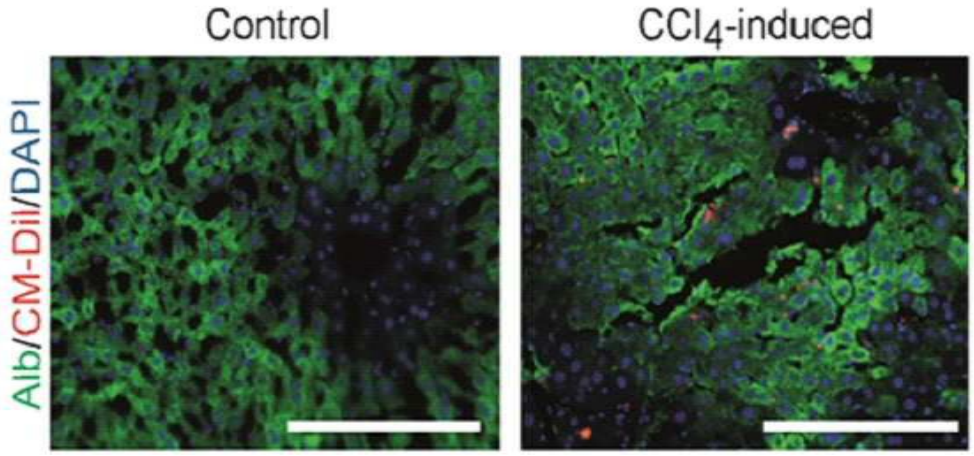
도면16


BODIPY
BODIPY
Oil Red O
Oil Red O
Control - Bright filed
50 mM EtOH - Bright filed

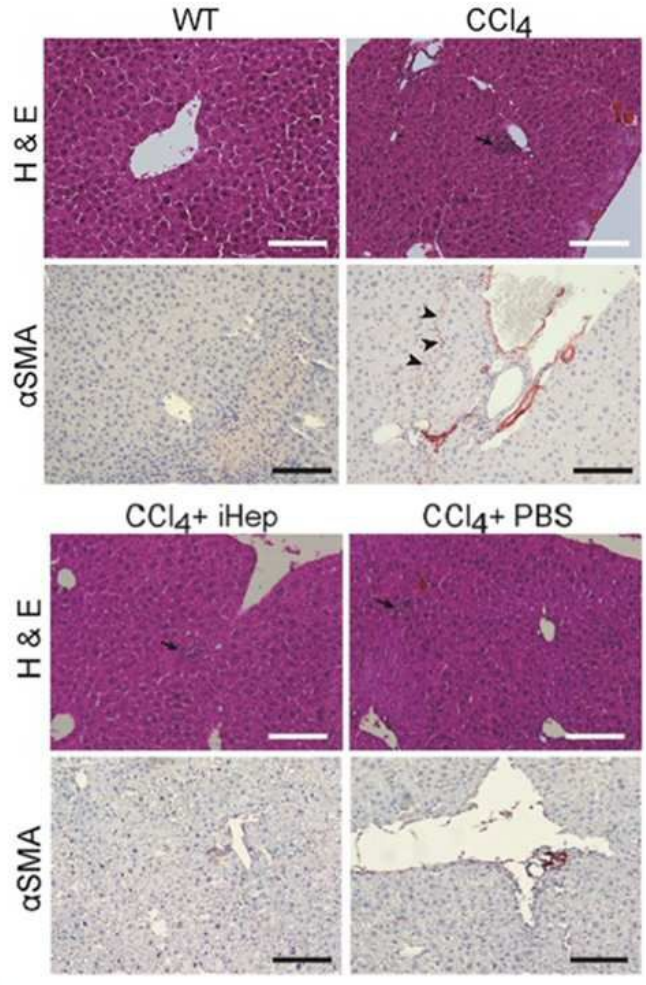
도면17


Cyclosporin A(i.p.)
Daily injection
CCl4 injection (i.p.)
Twice pre week
iHep injection
(2 x 10⁶ cells)
wk -4
wk -3
wk -2
wk -1
wk 0
Sacrificed
wk 4
Sacrificed

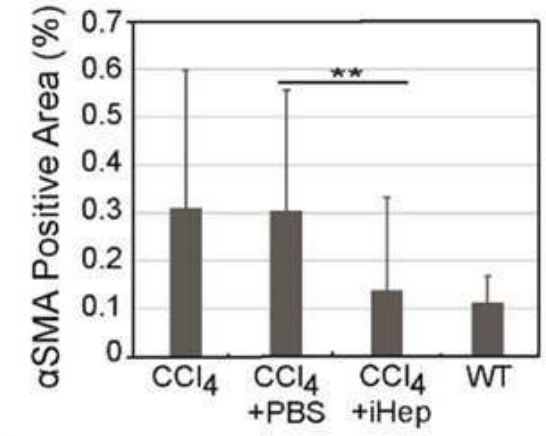
도면18


Control
CCl4-induced
Alb/CM-DiI/DAPI

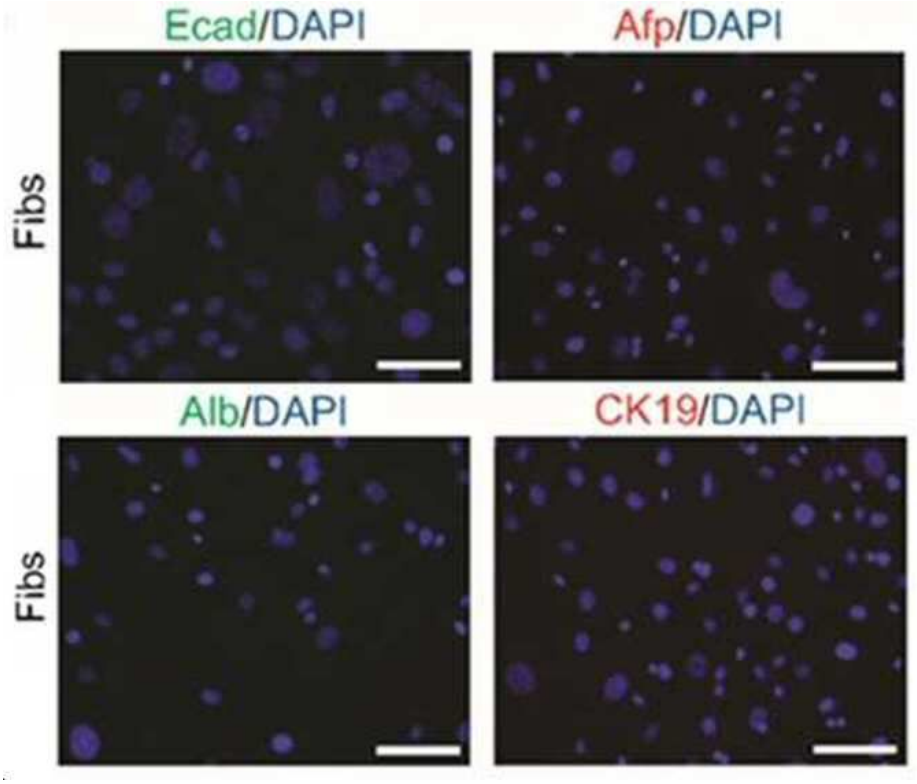
도면19


WT
CCl4
H & E
αSMA
CCl4+ iHep
CCl4+ PBS
H & E
αSMA

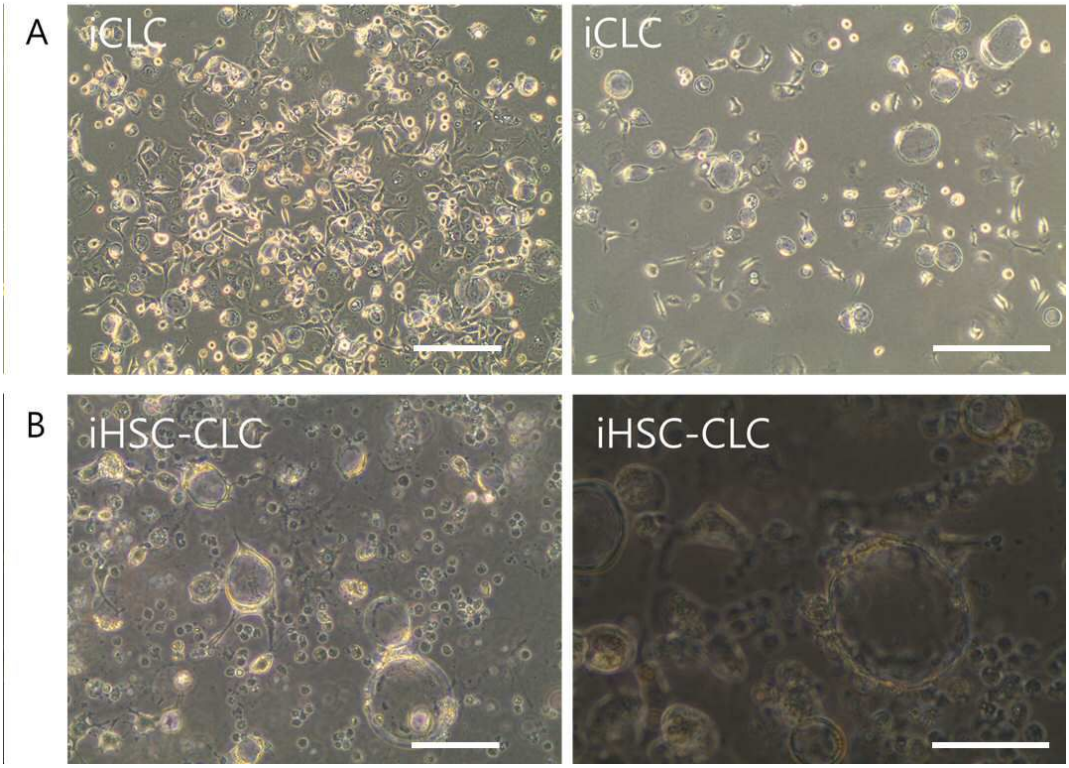
도면20


αSMA Positive Area (%)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
**
CCl4
CCl4 +PBS
CCl4 +iHep
WT

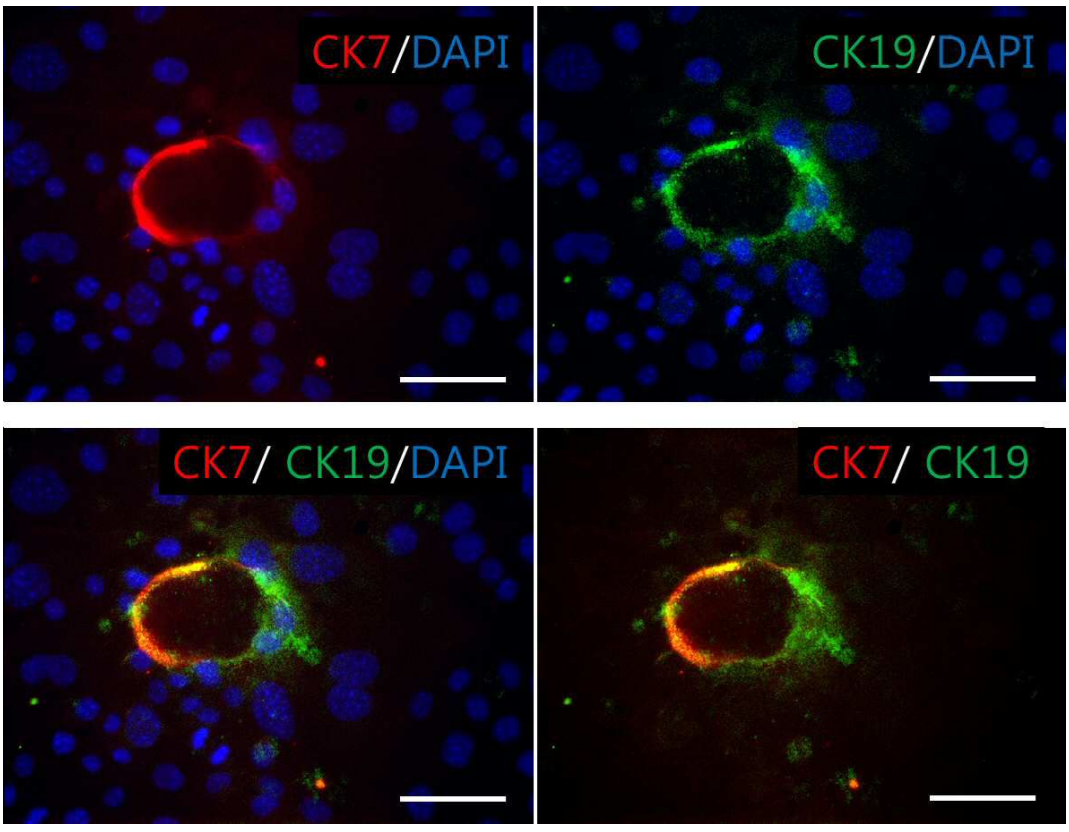
도면21


Ecad/DAPI
Afp/DAPI
Fibs
Alb/DAPI
CK19/DAPI
Fibs

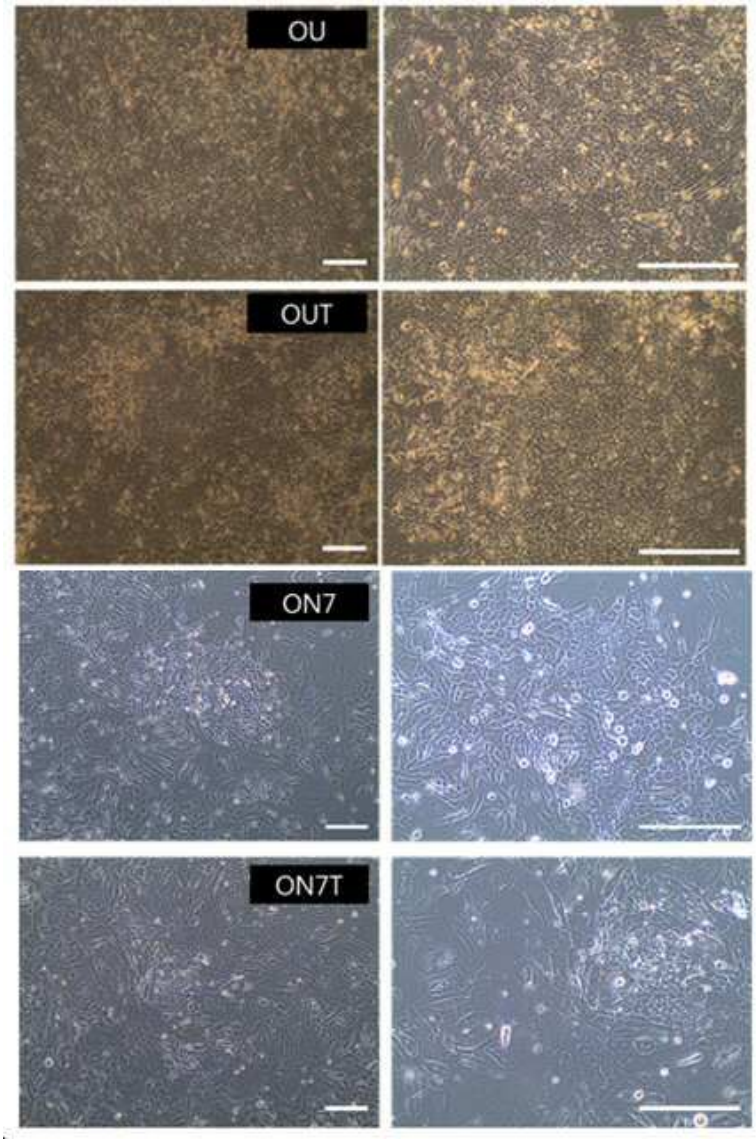
도면22


A
iCLC
iCLC
B
iHSC-CLC
iHSC-CLC

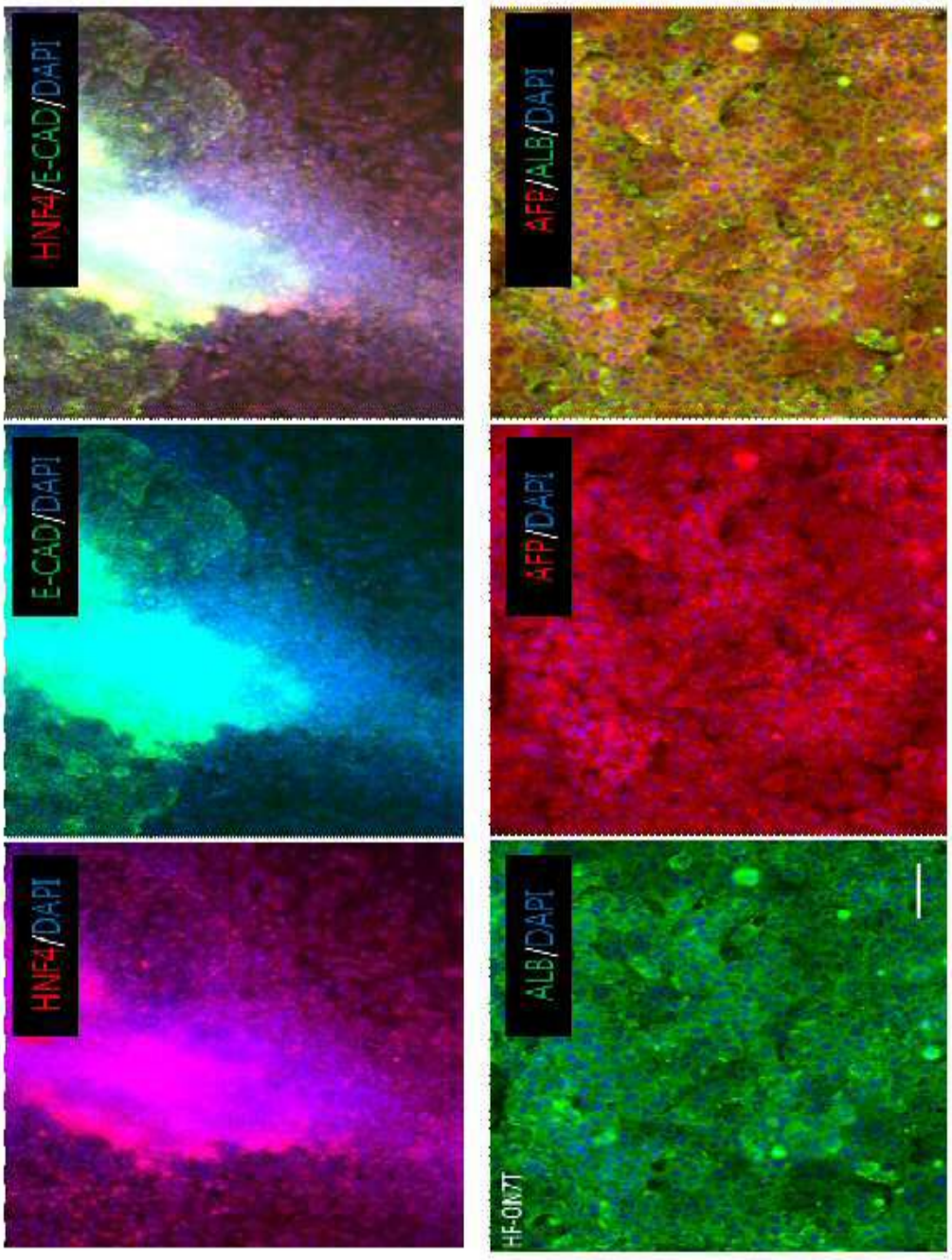
도면23


CK7/DAPI
CK19/DAPI
CK7/ CK19/DAPI
CK7/ CK19

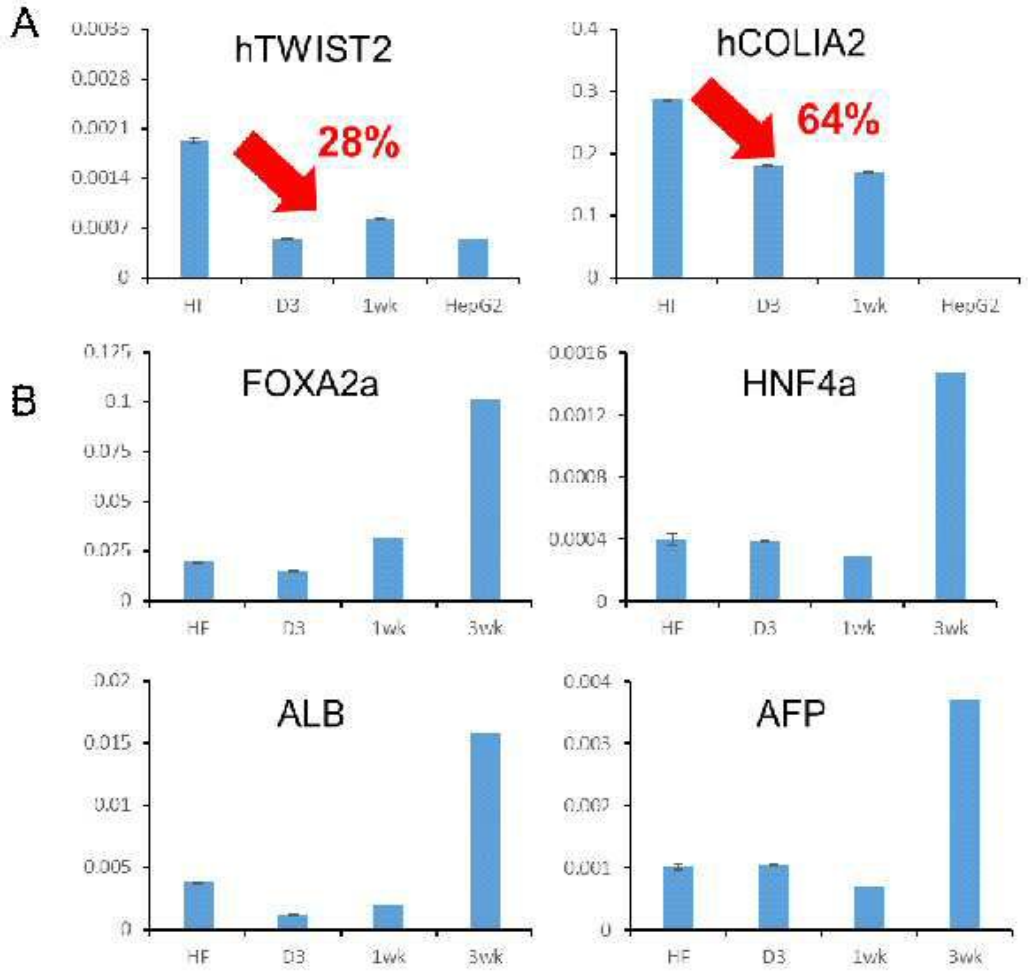
도면24



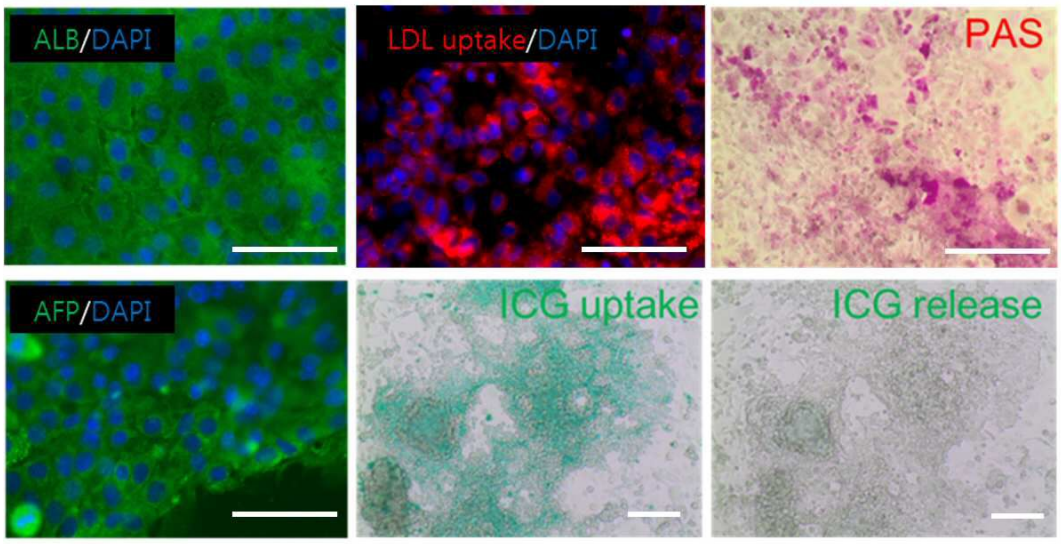
도면25


HNF4/E-CAD/DAPI
E-CAD/DAPI
HNF4/DAPI
AFP/ALB/DAPI
AFP/DAPI
ALB/DAPI
HF-ON/T

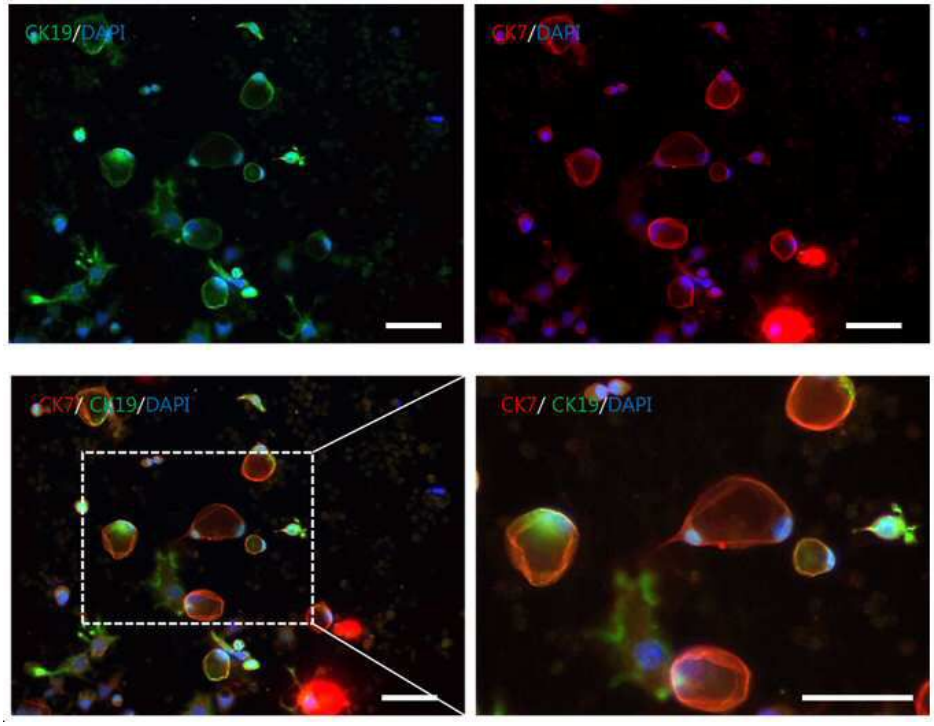
도면26


A
hTWIST2
28%
HI
D3
1wk
HepG2
hCOLIA2
64%
HI
D3
1wk
HepG2
B
FOXA2a
HF
D3
1wk
3wk
HNF4a
HF
D3
1wk
3wk
ALB
HF
D3
1wk
3wk
AFP
HF
D3
1wk
3wk

도면27


ALB/DAPI
LDL uptake/DAPI
PAS
AFP/DAPI
ICG uptake
ICG release

도면28



서 열 목 록

<110> ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Composition for inducing direct conversion of somatic cell into hepatic stem cell, hepatic cell, or cholangiocyte

<130> DPP20162108

<150> KR 2016/0096469

<151> 2016-07-28

<160> 92

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gata4_F

<400> 1

gacaccccaa tctcgatatg tt 22

<210> 2

<

211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gata4_R

<400> 2

ggacctgctg gcgtcttag 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxa2_F

<400> 3

cacctgagtc cgagtctgag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxa2_R

<400> 4

aaggagagag agtggcggat 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gata6_F

<400> 5

gtgaactgcg gctccatcc 19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gata6_R

<400> 6

tgatgcccct acccctgag 19

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hnf4a_F

<400> 7

aggcaatgac tacatcgtcc c 21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hnf4a_R

<400> 8

cagaccctcc gagaagcatc 20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EpCam_F

<400> 9

ggtgaatgcc agtgtactt 19

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EpCam_R

<400> 10

caatgatgat ccagtaggtc c 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ecad_F

<400> 11

gcaggtctcc tcatggcttt g 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ecad_R

<400> 12

ttggattcag aggcagggtc g 21

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dlk1_F

<400> 13

gcacctatgg ggctgaatg 19

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dlk1_R

<400> 14

ggcagggaga accattgat 19

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oc2_F

<400> 15

gctacaccac gccatgagta t 21

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oc2_R

<400> 16

tggggctgag cattttgtc 19

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alb_F

<400> 17

tgaagttgcc agaagacatc c 21

<210> 18

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alb_R

<400> 18

tgaagttgcc agaagacatc ccaagttccg ccctgtcatc tg 42

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ttr_F

<400> 19

gcttcccttc gactcttcct c 21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ttr_R

<400> 20

gccaagtgtc ttccagtacg a 21

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CK8_F

<400> 21

agaaggatgt ggacgaagca 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CK8_R

<400> 22

atctctgtct ttgtgcggcg 20

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CK18_F

<400> 23

atgaagagga agtccaaggt c 21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CK18_R

<400> 24

gttctccaag ttgatgttct g 21

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Afp_F

<400> 25

gcaggatggg gaaaaagtca 20

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Afp_R

<400> 26

cctaaggtct ggtagagagc g 21

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Afp_R

<400> 27

gaccaagaca cagttttcgc 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aat_R

<400> 28

atctgggcta accttctgcg 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat_F

<400> 29

atcggctacc tatccagtcg 20

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat_R

<400> 30

gccactgcca aaatcttctg a 21

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G6P_F

<400> 31

tcaacctcgt cttcaagtgg att 23

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G6P_R

<400> 32

cacagcaatg cctgacaaga 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp7a1_F

<400> 33

ggagccctga agcaatgaaa 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp7a1_R

<400> 34

aaaagtcaaa gggtctgggt 20

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CK7_F

<400> 35

ccttcacgag acagagttag ca 22

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CK7_R

<400> 36

acttggcacg ctggttctt 19

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CK19_F

<400> 37

agtttgagac agaacacgcc t 21

<210> 38

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CK19_R

<400> 38

ctcctcaatc cgagcaag 18

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ggt1_F

<400> 39

atctacaaca gcaccacagg a 21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ggt1_R

<400> 40

tcaaccgtca taatgccacc a 21

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gapdh_F

<400> 41

acgacccctt cattgacctc aact 24

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gapdh_R

<400> 42

atatttctcg tggttcacac ccat 24

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp1a2_F

<400> 43

ataacttcgt gctgtttctg c 21

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp1a2_R

<400> 44

accgccattg tctttgtagt 20

<210> 45

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp1b1_F

<400> 45

attctcagtg ggcaaacgg 19

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp1b1_R

<400> 46

ggattctaaa cgacttgggc t 21

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp2b10_F

<400> 47

ctgtcgttga gccaaccttc 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp2b10_R

<400> 48

tccgcagttc ctccactaaa 20

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp2c37_F

<400> 49

tgtggaggaa cttaggaaaa cc 22

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp2c37_R

<400> 50

agggctgctc agaatctttg t 21

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp2d22_F

<400> 51

gccttcatgc cattctcagc 20

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp2d22_R

<400> 52

cagagcccta aagacgcc 18

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp2e1_F

<400> 53

ggaatgggga aacagggtaa t 21

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp2e1_R

<400> 54

gcacagccaa tcagaaaggt 20

<210> 55

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp3a11_F

<400> 55

tgggactcgt aaacatgaac tt 22

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp3a11_R

<400> 56

ttgaccatca aacaaccccc 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp3a13_F

<400> 57

ggggacgatt cttgcttacc 20

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyp3a13_R

<400> 58

aaatacccac tggaccaaag c 21

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCOLIA2-qF

<400> 59

cagagtggag cagtggttac 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCOLIA2-qR

<400> 60

cagttcttgg ctgggatgtt 20

<210> 61

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hTWIST2-qF

<400> 61

cctcagctac gccttctc 18

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hTWIST2-qR

<400> 62

gaatgcatcc caattccact tg 22

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hALB-qF

<400> 63

gcacagaatc cttggtgaac ag 22

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hALB-qR

<400> 64

atggaaggtg aatgtttcag ca 22

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hAFP qF

<400> 65

gcttggtggt ggatgaaaca 20

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hAFP qR

<400> 66

tcctctgtta tttgtggctt ttg 23

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hHNF4a qF

<400> 67

tcgcagatgt gtgtgagtcc 20

<210> 68

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hHNF4a qR

<400> 68

cactcaacga gaaccagcag 20

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hFOXA2 qF

<400> 69

accactacgc cttcaaccac 20

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hFOXA2 qR

<400> 70

gccttgaggt ccattttgtg 20

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hGAPDH R

<400> 71

ggaggagtgg gtgtcgctgt 20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hGAPDH F

<400> 72

gtggacctga cctgccgtct 20

<210> 73

<211> 1430

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 73

agagaggggt tgagtagtcc cttcgcaagc cctcatttca ccaggccccc ggcttggggc 60

gccttccttc cccatggcgg gacacctggc ttcggatttc gccttctcgc cccctccagg 120

tggtggaggt gatgggccag gggggccgga gccgggctgg gttgatcctc ggacctggct 180

aagcttccaa ggccctcctg gagggccagg aatcgggccg ggggttgggc caggctctga 240

ggtgtggggg attcccccat gccccccgcc gtatgagttc tgtgggggga tggcgtactg 300

tgggccccag gttggagtgg ggctagtgcc ccaaggcggc ttggagacct ctcagcctga 360

gggcgaagca ggagtcgggg tggagagcaa ctccgatggg gcctccccgg agccctgcac 420

cgtcacccct ggtgccgtga agctggagaa ggagaagctg gagcaaaacc cggaggagtc 480

ccaggacatc aaagctctgc agaaagaact cgagcaattt gccaagctcc tgaagcagaa 540

gaggatcacc ctgggatata cacaggccga tgtggggctc accctggggg ttctatttgg 600

gaaggtattc agccaaacga ccatctgccg ctttgaggct ctgcagctta gcttcaagaa 660

catgtgtaag ctgcggccct tgctgcagaa gtgggtggag gaagctgaca acaatgaaaa 720

tcttcaggag atatgcaaag cagaaaccct cgtgcaggcc cgaaagagaa agcgaaccag 780

tatcgagaac cgagtgagag gcaacctgga gaatttgttc ctgcagtgcc cgaaacccac 840

actgcagcag atcagccaca tcgcccagca gcttgggctc gagaaggatg tggtccgagt 900

gtggttctgt aaccggcgcc agaagggcaa gcgatcaagc agcgactatg cacaacgaga 960

ggattttgag gctgctgggt ctcctttctc agggggacca gtgtcctttc ctctggcccc 1020

agggccccat tttggtaccc caggctatgg gagccctcac ttcactgcac tgtactcctc 1080

ggtccctttc cctgaggggg aagcctttcc ccctgtctcc gtcaccactc tgggctctcc 1140

catgcattca aactgaggtg cctgcccttc taggaatggg ggacaggggg aggggaggag 1200

ctagggaaag aaaacctgga gtttgtgcca gggtttttgg gattaagttc ttcattcact 1260

aaggaaggaa ttgggaacac aaagggtggg ggcaggggag tttggggcaa ctggttggag 1320

ggaaggtgaa gttcaatgat gctcttgatt ttaatcccac atcatgtatc actttttct 1380

taaataaaga agcctgggac acagtagata gacacactta aaaaaaaaaa 1430

<210> 74

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Met Ala Gly His Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Asp Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro

20 25 30

Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly

35 40 45

Pro Gly Val Gly Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro

50 55 60

Pro Pro Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val

65 70 75 80

Gly Val Gly Leu Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu

85 90 95

Gly Glu Ala Gly Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro

100 105 110

Glu Pro Cys Thr Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys

115 120 125

Leu Glu Gln Asn Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly

165 170 175

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

180 185 190

Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val

195 200 205

Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu

210 215 220

Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg

225 230 235 240

Val Arg Gly Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr

245 250 255

Leu Gln Gln Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp

260 265 270

Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser

275 280 285

Ser Ser Asp Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro

290 295 300

Phe Ser Gly Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe

305 310 315 320

Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser

325 330 335

Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr

340 345 350

Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn

355 360

<210> 75

<211> 4737

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 75

ggtttgaaag gaaggcagag agggcactgg gaggaggcag tgggagggcg gagggcgggg 60

gccttcgggg tgggcgccca gggtagggca ggtggccgcg gcgtggaggc agggagaatg 120

cgactctcca aaaccctcgt cgacatggac atggccgact acagtgctgc actggaccca 180

gcctacacca ccctggaatt tgagaatgtg caggtgttga cgatgggcaa tgacacgtcc 240

ccatcagaag gcaccaacct caacgcgccc aacagcctgg gtgtcagcgc cctgtgtgcc 300

atctgcgggg accgggccac gggcaaacac tacggtgcct cgagctgtga cggctgcaag 360

ggcttcttcc ggaggagcgt gcggaagaac cacatgtact cctgcagatt tagccggcag 420

tgcgtggtgg acaaagacaa gaggaaccag tgccgctact gcaggctcaa gaaatgcttc 480

cgggctggca tgaagaagga agccgtccag aatgagcggg accggatcag cactcgaagg 540

tcaagctatg aggacagcag cctgccctcc atcaatgcgc tcctgcaggc ggaggtcctg 600

tcccgacaga tcacctcccc cgtctccggg atcaacggcg acattcgggc gaagaagatt 660

gccagcatcg cagatgtgtg tgagtccatg aaggagcagc tgctggttct cgttgagtgg 720

gccaagtaca tcccagcttt ctgcgagctc cccctggacg accaggtggc cctgctcaga 780

gcccatgctg gcgagcacct gctgctcgga gccaccaaga gatccatggt gttcaaggac 840

gtgctgctcc taggcaatga ctacattgtc cctcggcact gcccggagct ggcggagatg 900

agccgggtgt ccatacgcat ccttgacgag ctggtgctgc ccttccagga gctgcagatc 960

gatgacaatg agtatgccta cctcaaagcc atcatcttct ttgacccaga tgccaagggg 1020

ctgagcgatc cagggaagat caagcggctg cgttcccagg tgcaggtgag cttggaggac 1080
tacatcaacg accgccagta tgactcgcgt ggccgctttg gagagctgct gctgctgctg 1140
cccaccttgc agagcatcac ctggcagatg atcgagcaga tccagttcat caagctcttc 1200
ggcatggcca agattgacaa cctgttgcag gagatgctgc tgggagggtc ccccagcgat 1260
gcaccccatg cccaccaccc cctgcaccct cacctgatgc aggaacatat gggaaccaac 1320
gtcatcgttg ccaacacaat gcccactcac ctcagcaacg gacagatgtg tgagtggccc 1380
cgacccaggg gacaggcagc cacccctgag accccacagc cctcaccgcc aggtggctca 1440

gggtctgagc cctataagct cctgccggga gccgtcgcca caatcgtcaa gcccctctct 1500
gccatccccc agccgaccat caccaagcag gaagttatct agcaagccgc tggggcttgg 1560
gggctccact ggctcccccc agccccctaa gagagcacct ggtgatcacg tggtcacggc 1620
aaaggaagac gtgatgccag gaccagtccc agagcaggaa tgggaaggat gaagggcccg 1680
agaacatggc ctaagggcca catcccactg ccacccttga cgccctgctc tggataacaa 1740
gactttgact tggggagacc tctactgcct tggacaactt ttctcatgtt gaagccactg 1800
ccttcacctt caccttcatc catgtccaac ccccgacttc atcccaaagg acagccgcct 1860

ggagatgact tgaggcctta cttaaaccca gctcccttct tccctagcct ggtgcttctc 1920
ctctcctagc ccctgtcatg gtgtccagac agagccctgt gaggctgggt ccaattgtgg 1980
cacttggggc accttgctcc tccttctgct gctgccccca cctctgctgc ctccctctgc 2040
tgtcaccttg ctcagccatc ccgtcttctc caacaccacc tctccagagg ccaaggaggc 2100
cttggaaacg attccccccag tcattctggg aacatgttgt aagcactgac tgggaccagg 2160
caccaggcag ggtctagaag gctgtggtga gggaagacgc ctttctcctc caacccaacc 2220
tcatcctcct tcttcaggga cttgggtggg tacttgggtg aggatccctg aaggccttca 2280

acccgagaaa acaaacccag gttggcgact gcaacaggaa cttggagtgg agaggaaaag 2340
catcagaaag aggcagacca tccaccaggc ctttgagaaa gggtagaatt ctggctggta 2400
gagcaggtga gatgggacat tccaaagaac agcctgagcc aaggcctagt ggtagtaaga 2460
atctagcaag aattgaggaa gaatggtgtg ggagagggat gatgaagaga gagagggcct 2520
gctggagagc atagggtctg gaacaccagg ctgaggtcct gatcagcttc aaggagtatg 2580
cagggagctg ggcttccaga aaatgaacac agcagttctg cagaggacgg gaggctggaa 2640
gctgggaggt caggtggggt ggatgatata atgcgggtga gagtaatgag gcttggggct 2700

ggagaggaca agatgggtaa accctcacat cagagtgaca tccaggagga ataagctccc 2760

agggcctgtc tcaagctctt ccttactccc aggcactgtc ttaaggcatc tgacatgcat 2820

catctcattt aatcctccct tcctccctat taacctagag attgtttttg ttttttattc 2880

tcctcctccc tccccgccct cacccgcccc actccctcct aacctagaga ttgttacaga 2940

agctgaaatt gcgttctaag aggtgaagtg attttttttc tgaaactcac acaactagga 3000

agtggctgag tcaggacttg aacccaggtc tccctggatc agaacaggag ctcttaacta 3060

cagtggctga atagcttctc caaaggctcc ctgtgttctc accgtgatca agttgagggg 3120

cttccggctc ccttctacag cctcagaaac cagactcgtt cttctgggaa ccctgcccac 3180

tcccaggacc aagattggcc tgaggctgca ctaaaattca cttagggtcg agcatcctgt 3240

ttgctgataa atattaagga gaattcatga ctcttgacag cttttctctc ttcactcccc 3300

aagtcaaggg gaggggtggc aggggtctgt ttcctggaag tcaggctcat ctggcctgtt 3360

ggcatggggg tgggacagtg tgcacagtgt gggggcaggg gagggctaag caggcctggg 3420

tttgagggct gctccggaga ccgtcactcc aggtgcattc tggaagcatt agaccccagg 3480

atggagcgac cagcatgtca tccatgtgga atcttggtgg ctttgaggac attctggaaa 3540

atgccactga ccagtgtgaa caaaagggat gtgttatggg gctggaggtg tgattaggta 3600

ggagggaaac tgttggaccg actcctgccc cctgctcaac actgaccct ctgagtggtt 3660

ggaggcagtg ccccagtgcc cagaaatccc accattagtg attgtttttt atgagaaaga 3720

ggcgtggaga agtattgggg caatgtgtca gggaggaatc accacatccc tacggcagtc 3780

ccagccaagc ccccaatccc agcggagact gtgccctgct cagagctccc aagccttccc 3840

ccaccacctc actcaagtgc ccctgaaatc cctgccagac ggctcagcct ggtctgcggt 3900

aaggcaggga ggctggaacc atttctgggc attgtggtca ttcccactgt gttcctccac 3960

ctcctccctc cagcgttgct cagacctctg tcttgggaga aaggttgaga taagaatgtc 4020

ccatggagtg ccgtgggcaa cagtggccct tcatgggaac aatctgttgg agcaggggt 4080

cagttctctg ctgggaatct accccttttct ggaggagaaa cccattccac cttaataact 4140

ttattgtaat gtgagaaaca caaaacaaag tttacttttt tgactctaag ctgacatgat 4200

attagaaaat ctctcgctct ctttttttttt ttttttttttt tttttggcta cttgagttgt 4260

ggtcctaaaa cataaaatct gatggacaaa cagagggttg ctgggggggac aagcgtgggc 4320

acaatttccc caccaagaca ccctgatctt caggcgggtc tcaggagctt ctaaaaatcc 4380

gcatggctct cctgagagtg gacagaggag aggagagggt cagaaatgaa cgctcttcta 4440

tttcttgtca ttaccaagcc aattactttt gccaaatttt tctgtgatct gccctgatta 4500

agatgaattg tgaaatttac atcaagcaat tatcaaagcg ggctgggtcc catcagaacg 4560

acccacatct ttctgtgggt gtgaatgtca ttaggtcttg cgctgacccc tgagccccca 4620

tcactgccgc ctgatggggc aaagaaacaa aaaacatttc ttactcttct gtgttttaac 4680

aaaagtttat aaaacaaaat aaatggcgca tatgttttct aaaaaaaaaa aaaaaaa 4737

<210> 76

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Met Arg Leu Ser Lys Thr Leu Val Asp Met Asp Met Ala Asp Tyr Ser
1 5 10 15

Ala Ala Leu Asp Pro Ala Tyr Thr Thr Leu Glu Phe Glu Asn Val Gln
20 25 30

Val Leu Thr Met Gly Asn Asp Thr Ser Pro Ser Glu Gly Thr Asn Leu
35 40 45

Asn Ala Pro Asn Ser Leu Gly Val Ser Ala Leu Cys Ala Ile Cys Gly
50 55 60

Asp Arg Ala Thr Gly Lys His Tyr Gly Ala Ser Ser Cys Asp Gly Cys
65 70 75 80

Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Arg Lys Asn His Met Tyr Ser Cys
85 90 95

Arg Phe Ser Arg Gln Cys Val Val Asp Lys Asp Lys Arg Asn Gln Cys
100 105 110

Arg Tyr Cys Arg Leu Lys Lys Cys Phe Arg Ala Gly Met Lys Lys Glu
115 120 125

Ala Val Gln Asn Glu Arg Asp Arg Ile Ser Thr Arg Arg Ser Ser Tyr

130 135 140

Glu Asp Ser Ser Leu Pro Ser Ile Asn Ala Leu Leu Gln Ala Glu Val
145 150 155 160

Leu Ser Arg Gln Ile Thr Ser Pro Val Ser Gly Ile Asn Gly Asp Ile
165 170 175

Arg Ala Lys Lys Ile Ala Ser Ile Ala Asp Val Cys Glu Ser Met Lys
180 185 190

Glu Gln Leu Leu Val Leu Val Glu Trp Ala Lys Tyr Ile Pro Ala Phe
195 200 205

Cys Glu Leu Pro Leu Asp Asp Gln Val Ala Leu Leu Arg Ala His Ala
210 215 220
Gly Glu His Leu Leu Leu Gly Ala Thr Lys Arg Ser Met Val Phe Lys
225 230 235 240
Asp Val Leu Leu Leu Gly Asn Asp Tyr Ile Val Pro Arg His Cys Pro
245 250 255
Glu Leu Ala Glu Met Ser Arg Val Ser Ile Arg Ile Leu Asp Glu Leu
260 265 270
Val Leu Pro Phe Gln Glu Leu Gln Ile Asp Asp Asn Glu Tyr Ala Tyr

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

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

420 425 430
Pro Gln Pro Ser Pro Pro Gly Gly Ser Gly Ser Glu Pro Tyr Lys Leu

435 440 445

Leu Pro Gly Ala Val Ala Thr Ile Val Lys Pro Leu Ser Ala Ile Pro

450 455 460

Gln Pro Thr Ile Thr Lys Gln Glu Val Ile

465 470

<210> 77

<211> 3546

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 77

gctgacgcgc gctgacgcgc ggagacttta ggtgcatgtt ggcagcggca gcgcaagcca 60

cataaacaaa ggcacattgg cggccagggc cagtccgccc ggcggctcgc gcacggctcc 120

gcggtccctt ttgcctgtcc agccggccgc ctgtccctgc tccctccctc cgtgaggtgt 180

ccgggttccc ttcgcccagc tctcccaccc ctacccgacc ccggcgcccg ggctcccaga 240

gggaactgca cttcggcaga gttgaatgaa tgaagagaga cgcggagaac tcctaaggag 300

gagattggac aggctggact ccccattgct tttctaaaaa tcttggaaac tttgtccttc 360

attgaattac gacactgtcc acctttaatt tcctcgaaaa cgcctgtaac tcggctgaag 420

ccatgccttg tgttcaggcg cagtatgggt cctcgcctca aggagccagc cccgcttctc 480

agagctacag ttaccactct tcgggagaat acagctccga tttcttaact ccagagtttg 540

tcaagtttag catggacctc accaacactg aaatcactgc caccacttct ctccccagct 600

tcagtacctt tatggacaac tacagcacag gctacgacgt caagccacct tgcttgtacc 660

aaatgcccct gtccggacag cagtcctcca ttaaggtaga agacattcag atgcacaact 720

accagcaaca cagccacctg ccccccccagt ctgaggagat gatgccgcac tccgggtcgg 780

tttactacaa gccctcctcg cccccgacgc ccaccacccc gggcttccag gtgcagcaca 840

gccccatgtg ggacgacccg ggatctctcc acaacttcca ccagaactac gtggccacta 900

cgcacatgat cgagcagagg aaaacgccag tctcccgcct ctccctcttc tcctttaagc 960

aatcgccccc tggcaccccg gtgtctagtt gccagatgcg cttcgacggg cccctgcacg 1020

tccccatgaa cccggagccc gccggcagcc accacgtggt ggacgggcag accttcgctg 1080

tgcccaaccc cattcgcaag cccgcgtcca tgggcttccc gggcctgcag atcggccacg 1140

cgtctcagct gctcgacacg caggtgccct caccgccgtc gcggggctcc ccctccaacg 1200

aggggctgtg cgctgtgtgt ggggacaacg cggcctgcca acactacggc gtgcgcacct 1260

gtgagggctg caaaggcttc tttaagcgca cagtgcaaaa aaatgcaaaa tacgtgtgtt 1320

tagcaaataa aaactgccca gtggacaagc gtcgccggaa tcgctgtcag tactgccgat 1380
ttcagaagtg cctggctgtt gggatggtca aagaagtggt tcgcacagac agtttaaaag 1440
gccggagagg tcgtttgccc tcgaaaccga agagcccaca ggagccctct ccccccttcgc 1500
ccccggtgag tctgatcagt gccctcgtca gggcccatgt cgactccaac ccggctatga 1560
ccagcctgga ctattccagg ttccaggcga accctgacta tcaaatgagt ggagatgaca 1620
cccagcatat ccagcaattc tatgatctcc tgactggctc catggagatc atccggggct 1680
gggcagagaa gatccctggc ttcgcagacc tgcccaaagc cgaccaagac ctgctttttg 1740

aatcagcttt cttagaactg tttgtccttc gattagcata caggtccaac ccagtggagg 1800
gtaaactcat cttttgcaat ggggtggtct tgcacaggtt gcaatgcgtt cgtggctttg 1860
gggaatggat tgattccatt gttgaattct cctccaactt gcagaatatg aacatcgaca 1920
tttctgcctt ctcctgcatt gctgccctgg ctatggtcac agagagacac gggctcaagg 1980
aacccaagag agtggaagaa ctgcaaaaca agattgtaaa ttgtctcaaa gaccacgtga 2040
ctttcaacaa tgggggggttg aaccgcccca attatttgtc caaactgttg gggaagctcc 2100
cagaacttcg tacccctttgc acacaggggc tacagcgcat tttctacctg aaattggaag 2160

acttggtgcc accgccagca ataattgaca aacttttcct ggacacttta cctttctaag 2220
acctcctccc aagcacttca aaggaactgg aatgataatg gaaactgtca agaggggggca 2280
agtcacatgg gcagagatag ccgtgtgagc agtctcagct caagctgccc cccatttctg 2340
taaccctcct agccccccttg atccctaaag aaaacaaaca aacaaacaaa aactgttgct 2400
atttcctaac ctgcaggcag aacctgaaag ggcattttgg ctccggggca tcctggattt 2460
agaacatgga ctacacacaa tacagtggta taaacttttt attctcagtt taaaaatcag 2520
tttgttgttc agaagaaaga ttgctataat gtataatggg aaatgtttgg ccatgcttgg 2580

ttgttgcagt tcagacaaat gtaacacaca cacacataca cacacacaca cacacacaga 2640
gacacatctt aaggggaccc acaagtattg ccctttaaca agacttcaaa gttttctgct 2700
gtaaagaaag ctgtaatata tagtaaaact aaatgttgcg tgggtggcat gagttgaaga 2760
aggcaaaggc ttgtaaattt acccaatgca gtttggcttt ttaaattatt ttgtgcctat 2820
ttatgaataa atattacaaa ttctaaaaga taagtgtgtt tgcaaaaaaa aagaaaataa 2880
atacataaaa aagggacaag catgttgatt ctaggttgaa aatgttatag gcacttgcta 2940
cttcagtaat gtctatatta tataaatagt atttcagaca ctatgtagtc tgttagattt 3000

tataaagatt ggtagttatc tgagcttaaa cattttctca attgtaaaat aggtgggcac 3060

aagtattaca catcagaaaa tcctgacaaa agggacacat agtgtttgta acaccgtcca 3120

acattccttg tttgtaagtg ttgtatgtac cgttgatgtt gataaaaaga aagtttatat 3180

cttgattatt ttgttgtcta aagctaaaca aaacttgcat gcagcagctt ttgactgttt 3240

ccagagtgct tataatatac ataactccct ggaaataact gagcactttg aatttttttt 3300

atgtctaaaa ttgtcagtta atttattatt ttgtttgagt aagaatttta atattgccat 3360

attctgtagt atttttcttt gtatatttct agtatggcac atgatatgag tcactgcctt 3420

ttttctatg gtgtatgaca gttagagatg ctgatttttt ttctgataaa ttctttcttt 3480

gagaaagaca attttaatgt ttacaacaat aaaccatgta aatgaacaga aaaaaaaaaa 3540

aaaaaa 3546

<210> 78

<211> 598

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Gly Ala Ser
1 5 10 15

Pro Ala Ser Gln Ser Tyr Ser Tyr His Ser Ser Gly Glu Tyr Ser Ser

20 25 30

Asp Phe Leu Thr Pro Glu Phe Val Lys Phe Ser Met Asp Leu Thr Asn
35 40 45

Thr Glu Ile Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met
50 55 60

Asp Asn Tyr Ser Thr Gly Tyr Asp Val Lys Pro Pro Cys Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Met Pro Leu Ser Gly Gln Gln Ser Ser Ile Lys Val Glu Asp Ile Gln
85 90 95

Met His Asn Tyr Gln Gln His Ser His Leu Pro Pro Gln Ser Glu Glu
100 105 110

Met Met Pro His Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Lys Pro Ser Ser Pro Pro
115 120 125

Thr Pro Thr Thr Pro Gly Phe Gln Val Gln His Ser Pro Met Trp Asp

130 135 140

Asp Pro Gly Ser Leu His Asn Phe His Gln Asn Tyr Val Ala Thr Thr

145 150 155 160

His Met Ile Glu Gln Arg Lys Thr Pro Val Ser Arg Leu Ser Leu Phe

165 170 175

Ser Phe Lys Gln Ser Pro Pro Gly Thr Pro Val Ser Ser Cys Gln Met

180 185 190

Arg Phe Asp Gly Pro Leu His Val Pro Met Asn Pro Glu Pro Ala Gly

195 200 205

Ser His His Val Val Asp Gly Gln Thr Phe Ala Val Pro Asn Pro Ile

210 215 220

Arg Lys Pro Ala Ser Met Gly Phe Pro Gly Leu Gln Ile Gly His Ala

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Ser Asn Glu Gly Leu Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys

260 265 270

Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys

275 280 285

Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn

290 295 300

Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe

305 310 315 320

Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp

325 330 335

Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro

340 345 350

Gln Glu Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Val Ser Leu Ile Ser Ala Leu

355 360 365

Val Arg Ala His Val Asp Ser Asn Pro Ala Met Thr Ser Leu Asp Tyr

370 375 380

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

450 455 460
Cys Asn Gly Val Val Leu His Arg Leu Gln Cys Val Arg Gly Phe Gly
465 470 475 480
Glu Trp Ile Asp Ser Ile Val Glu Phe Ser Ser Asn Leu Gln Asn Met
485 490 495
Asn Ile Asp Ile Ser Ala Phe Ser Cys Ile Ala Ala Leu Ala Met Val
500 505 510
Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu Gln
515 520 525

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

595

<210> 79
<211> 2603
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 79

ttcctggtgt aagctttggt atggatggtg gccgtctccc tacagactgg gagctgttag 60

agggcaggga tcctagctga cacatctatg tcctcgcctt ggttggaggc ctccaccatg 120

gacagaggcc aggccctgcc cctcccaggc agcctggctc cttctgctgg gccctgaagg 180

cagacgggat aatgtggttg gccaaggcct gttggtccat ccagagtgag atgccctgta 240

tccaagccca atatgggaca ccagcaccga gtccgggacc ccgtgaccac ctggcaagcg 300

acccccctgac ccctgagttc atcaagccca ccatggacct ggccagcccc gaggcagccc 360

ccgctgcccc cactgccctg cccagcttca gcaccttcat ggacggctac acaggagagt 420

ttgacacctt cctctaccag ctgccaggaa cagtccagcc atgctcctca gcctcctcct 480

cggcctcctc cacatcctcg tcctcagcca cctcccctgc ctctgcctcc ttcaagttcg 540

aggacttcca ggtgtacggc tgctaccccg gccccctgag cggcccagtg gatgaggccc 600

tgtcctccag tggctctgac tactatggca gcccctgctc ggccccgtcg ccctccacgc 660

ccagcttcca gccgccccag ctctctccct gggatggctc cttcggccac ttctcgccca 720

gccagactta cgaaggcctg cgggcatgga cagagcagct gcccaaagcc tctgggcccc 780

cacagcctcc agccttcttt tccttcagtc ctcccaccgg ccccagcccc agcctggccc 840

agagcccccc gaagttgttc ccctcacagg ccacccacca gctgggggag ggagagagct 900

attccatgcc tacggccttc ccaggtttgg cacccacttc tccacacctt gagggctcgg 960

ggatactgga tacacccgtg acctcaacca aggcccggag cggggcccca ggtggaagtg 1020

aaggccgctg tgctgtgtgt ggggacaacg cttcatgcca gcattatggt gtccgcacat 1080

gtgagggctg caagggcttc ttcaagcgca cagtgcagaa aaacgccaag tacatctgcc 1140

tggctaacaa ggactgccct gtggacaaga ggcggcgaaa ccgctgccag ttctgccgct 1200

tccagaagtg cctggcggtg ggcatggtga aggaagttgt ccgaacagac agcctgaagg 1260

ggcggcgggg ccggctacct tcaaaaccca agcagccccc agatgcctcc cctgccaatc 1320

tcctcacttc cctggtccgt gcacacctgg actcagggcc cagcactgcc aaactggact 1380

actccaagtt ccaggagctg gtgctgcccc actttgggaa ggaagatgct ggggatgtac 1440

agcagttcta cgacctgctc tccggttctc tggaggtcat ccgcaagtgg gcggagaaga 1500

tccctggctt tgctgagctg tcaccggctg accaggacct gttgctggag tcggccttcc 1560

tggagctctt catcctccgc ctggcgtaca ggtctaagcc aggcgagggc aagctcatct 1620

tctgctcagg cctggtgcta caccggctgc agtgtgcccg tggcttcggg gactggattg 1680

acagtatcct ggccttctca aggtccctgc acagcttgct tgtcgatgtc cctgccttcg 1740

cctgcctctc tgcccttgtc ctcatcaccg accggcatgg gctgcaggag ccgcggcggg 1800

tggaggagct gcagaaccgc atcgccagct gcctgaagga gcacgtggca gctgtggcgg 1860

gcgagcccca gccagccagc tgcctgtcac gtctgttggg caaactgccc gagctgcgga 1920

ccctgtgcac ccagggcctg cagcgcatct tctacctcaa gctggaggac ttggtgcccc 1980

ctccacccat cattgacaag atcttcatgg acacgctgcc cttctgaccc ctgcctggga 2040

acacgtgtgc acatgcgcac tctcatatgc caccccatgt gcctttagtc cacggacccc 2100

cagagcaccc ccaagcctgg gcttgagctg cagaatgact ccaccttctc acctgctcca 2160

ggaggtttgc agggagctca agcccttggg gaggggggatg ccttcatggg ggtgacccca 2220

cgatttgtct tatccccccc agcctggccc cggcctttat gtttttgta agataaaccg 2280

tttttaacac atagcgccgt gctgtaaata agcccagtgc tgctgtaaat acaggaagaa 2340

agagcttgag gtgggagcgg ggctgggagg aagggatggg ccccgccttc ctgggcagcc 2400

tttccagcct cctgctggct ctctcttcct accctccttc cacatgtaca taaactgtca 2460

ctctaggaag aagacaaatg acagattctg acatttatat ttgtgtattt tcctggattt 2520

atagtatgtg acttttctga ttaatatatt taatatattg aataaaaaat agacatgtag 2580

ttggaactga aaaaaaaaaa aaa 2603

<210> 80

<211> 611

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Met Trp Leu Ala Lys Ala Cys Trp Ser Ile Gln Ser Glu Met Pro Cys
1 5 10 15

Ile Gln Ala Gln Tyr Gly Thr Pro Ala Pro Ser Pro Gly Pro Arg Asp
20 25 30

His Leu Ala Ser Asp Pro Leu Thr Pro Glu Phe Ile Lys Pro Thr Met
35 40 45

Asp Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Pro Ala Ala Pro Thr Ala Leu Pro
50 55 60

Ser Phe Ser Thr Phe Met Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Phe Asp Thr Phe
65 70 75 80

Leu Tyr Gln Leu Pro Gly Thr Val Gln Pro Cys Ser Ser Ala Ser Ser
85 90 95

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

165 170 175
Ser Gln Thr Tyr Glu Gly Leu Arg Ala Trp Thr Glu Gln Leu Pro Lys
180 185 190
Ala Ser Gly Pro Pro Gln Pro Pro Ala Phe Phe Ser Phe Ser Pro Pro
195 200 205
Thr Gly Pro Ser Pro Ser Leu Ala Gln Ser Pro Leu Lys Leu Phe Pro
210 215 220
Ser Gln Ala Thr His Gln Leu Gly Glu Gly Glu Ser Tyr Ser Met Pro
225 230 235 240

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

305 310 315 320
Asp Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Phe Cys Arg
325 330 335
Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr
340 345 350

Asp Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Gln
355 360 365
Pro Pro Asp Ala Ser Pro Ala Asn Leu Leu Thr Ser Leu Val Arg Ala
370 375 380

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

450 455 460
Ala Tyr Arg Ser Lys Pro Gly Glu Gly Lys Leu Ile Phe Cys Ser Gly
465 470 475 480
Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Ala Arg Gly Phe Gly Asp Trp Ile
485 490 495
Asp Ser Ile Leu Ala Phe Ser Arg Ser Leu His Ser Leu Leu Val Asp
500 505 510
Val Pro Ala Phe Ala Cys Leu Ser Ala Leu Val Leu Ile Thr Asp Arg
515 520 525

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

595 600 605

Leu Pro Phe

610

<210> 81

<211> 4754

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 81

gaattctaga ggcggcggag ggtggcgagg agctctcgct ttctctcgct ccctccctct 60

ccgactccgt ctctctctct ctctctctct ctcccctccc tctctttccc tctgttccat 120

tttttccccc tctaaatcct ccctgccctg cgcgcctgga cacagattta ggaagcgaat 180

tcgctcacgt tttaggacaa ggaagagaga gaggcacggg agaagagccc agcaagattt 240

ggattgaaac cgagacaccc tccggaggct cggagcagag gaaggaggag gagggcggcg 300

aacggaagcc agtttgcaat tcaagttttg atagcgctgg tagaaggggg tttaaatcag 360

atttttttt ttttaaagga gagagacttt ttccgctctc tcgctccctg ttaaagccgg 420

gtctagcaca gctgcagacg ccaccagcga gaaagaggga gaggaagaca gataggggggc 480

gggggaagaa gaaaaagaaa ggtaaaaagt cttctaggag aacctttcac atttgcaaca 540

aaagacctag gggctggaga gagattcctg ggacgcaggg ctggagtgtc tatttcgagc 600

tcagcggcag ggctcgggcg cgagtcgaga ccctgctcgc tcctctcgct tctgaaaccg 660

acgttcagga gcggcttttt aaaaacgcaa ggcacaagga cggtcacccg cgcgactatg 720

tttgctgatt tttcgccttg ccctctttaa aagcggcctc ccattctcca aaagacactt 780

cccctcctcc ctttgaagtg cattagttgt gatttctgcc tccttttctt ttttctttct 840

tttttgtttt gctttttccc ccctttttgaa ttatgtgctg ctgttaaaca acaacaaaaa 900

aacaacaaaa cacagcagct gcggacttgt ccccggctgg agcccagcgc cccgcctgga 960

gtggatgagc ctctccatga gagatccggt cattcctggg acaagcatgg cctaccatcc 1020

gttcctacct caccgggcgc cggacttcgc catgagcgcg gtgctgggtc accagccgcc 1080

gttcttcccc gcgctgacgc tgcctcccaa cggcgcggcg gcgctctcgc tgccgggcgc 1140

cctggccaag ccgatcatgg atcaattggt gggggcggcc gagaccggca tcccgttctc 1200

ctccctgggg ccccaggcgc atctgaggcc tttgaagacc atggagcccg aagaagaggt 1260

ggaggacgac cccaaggtgc acctggaggc taaagaactt tgggatcagt ttcacaagcg 1320

gggcaccgag atggtcatta ccaagtcggg aaggcgaatg tttcctccat ttaaagtgag 1380

atgttctggg ctggataaaa aagccaaata cattttattg atggacatta tagctgctga 1440

tgactgtcgt tataaatttc acaattctcg gtggatggtg gctggtaagg ccgaccccga 1500

aatgccaaag aggatgtaca ttcacccgga cagccccgct actggggaac agtggatgtc 1560

caaagtcgtc actttccaca aactgaaact caccaacaac atttcagaca aacatggatt 1620

tactatattg aactccatgc acaaatacca gccccggttc cacattgtaa gagccaatga 1680

catcttgaaa ctcccttata gtacatttcg gacatacttg ttccccgaaa ctgaattcat 1740

cgctgtgact gcataccaga atgataagat aacccagtta aaaatagaca acaacccttt 1800

tgcaaaaggt ttccgggaca ctggaaatgg ccgaagagaa aaaagaaaac agctcaccct 1860

gcagtccatg agggtgtttg atgaaagaca caaaaaggag aatgggacct ctgatgagtc 1920

ctccagtgaa caagcagctt tcaactgctt cgcccaggct tcttctccag ccgcctccac 1980

tgtagggaca tcgaacctca aagatttatg tcccagcgag ggtgagagcg acgccgaggc 2040

cgagagcaaa gaggagcatg gccccgaggc ctgcgacgcg gccaagatct ccaccaccac 2100

gtcggaggag ccctgccgtg acaagggcag ccccgcggtc aaggctcacc ttttcgctgc 2160

tgagcggccc cgggacagcg ggcggctgga caaagcgtcg cccgactcac gccatagccc 2220

cgccaccatc tcgtccagca ctcgcggcct gggcgcggag gagcgcagga gcccggttcg 2280

cgagggcaca gcgccggcca aggtggaaga ggcgcgcgcg ctcccgggca aggaggcctt 2340

cgcgccgctc acggtgcaga cggacgcggc cgccgcgcac ctggcccagg gccccctgcc 2400

tggcctcggc ttcgccccgg gcctggcggg ccaacagttc ttcaacgggc acccgctctt 2460

cctgcacccc agccagtttg ccatgggggg cgccttctcc agcatggcgg ccgctggcat 2520

gggtcccctc ctggccacgg tttctggggc ctccaccggt gtctcgggcc tggattccac 2580

ggccatggcc tctgccgctg cggcgcaggg actgtccggg gcgtccgcgg ccaccctgcc 2640

cttccacctc cagcagcacg tcctggcctc tcagggcctg gccatgtccc ctttcggaag 2700

cctgttccct taccctaca cgtacatggc cgcagcggcg gccgcctcct ctgcggcagc 2760

ctccagctcg gtgcaccgcc acccttcct caatctgaac accatgcgcc cgcggctgcg 2820

ctacagcccc tactccatcc cggtgccggt cccggacggc agcagtctgc tcaccaccgc 2880

cctgccctcc atggcggcgg ccgcggggcc cctggacggc aaagtcgccg ccctggccgc 2940

cagcccggcc tcggtggcag tggactcggg ctctgaactc aacagccgct cctccacgct 3000

ctcctccagc tccatgtcct tgtcgcccaa actctgcgcg gagaaagagg cggccaccag 3060

cgaactgcag agcatccagc ggttggttag cggcttggaa gccaagccgg acaggtcccg 3120

cagcgcgtcc ccgtagaccc gtcccagaca cgtcttttca ttccagtcca gttcaggctg 3180

ccgtgcactt tgtcggatat aaaataaacc acgggcccgc catggcgtta gcccttcctt 3240

ttgcagttgc gtctgggaag gggccccgga ctccctcgag agaatgtgct agagacagcc 3300

cctgtcttct tggcgtggtt tatatgtccg ggatctggat cagattctgg gggctcagaa 3360

acgtcggttg cattgagcta ctgggggtag gagttccaac atttatgtcc agagcaactt 3420

ccagcaaggc tggtctgggt ctctgcccac caggcgggga ggtgttcaaa gacatctccc 3480

tcagtgcgga tttatatata tatttttcct tcactgtgtc aagtggaaac aaaaacaaaa 3540

tctttcaaaa aaaaaatcgg gacaagtgaa cacattaaca tgattctgtt tgtgcagatt 3600

aaaaacttta tagggacttg cattatcggt tctcaataaa ttactgagca gctttgtttg 3660

gggagggaag tccctaccat ccttgtttag tctatattaa gaaaatctgt gtctttttaa 3720

tattcttgtg atgttttcag agccgctgta ggtctcttct tgcatgtcca cagtaatgta 3780

tttgtggttt ttattttgaa cgcttgcttt tagagagaaa acaatatagc cccctaccct 3840

tttcccaatc ctttgccctc aaatcagtga cccaagggag ggggggattt aaagggaagg 3900

agtgggcaaa acacataaaa tgaatttatt atatctaagc tctgtagcag gattcatgtc 3960

gttctttgac agttctttct ctttcctgta tatgcaataa caaggtttta aaaaaataat 4020

aaagaagtga gactattaga caaagtattt atgtaattat ttgataactc ttgtaaatag 4080

gtggaatatg aatgcttgga aaattaaact ttaatttatt gacattgtac atagctctgt 4140

gtaaatagaa ttgcaactgt caggttttgt gttcttgttt tcctttagtt gggtttattt 4200

ccaggtcaca gaattgctgt taacactaga aaacacactt cctgcaccaa caccaatacc 4260

ctttcaaaag agttgtctgc aacatttttg ttttcttttt taatgtccaa aagtggggga 4320

aagtgctatt tcctattttc accaaaattg gggaaggagt gccactttcc agctccactt 4380

caaattcctt aaaatataac tgagattgct gtggggaggg aggagggcag aggctgcggt 4440

ttgacttttt aatttttctt ttgttatttg tatttgctag tctctgattt cctcaaaacg 4500

aagtggaatt tactactgtt gtcagtatcg gtgttttgaa ttggtgcctg cctatagaga 4560

tatattcaca gttcaaaagt caggtgctga gagatggttt aaagacaaat tcatgaaggt 4620

atattttgtg ttatagttgt tgatgagttc tttggttttc tgtatttttc cccctctctt 4680

taaaacatca ctgaaatttc aataaatttt tattgaaatg tctaaaaaaa aaaaaaaaaa 4740

aaaaaaaaaa aaaa 4754

<210> 82

<211> 723

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

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

1 5 10 15

Tyr His Pro Phe Leu Pro His Arg Ala Pro Asp Phe Ala Met Ser Ala

20 25 30

Val Leu Gly His Gln Pro Pro Phe Phe Pro Ala Leu Thr Leu Pro Pro

35 40 45

Asn Gly Ala Ala Ala Leu Ser Leu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Pro Ile

50 55 60

Met Asp Gln Leu Val Gly Ala Ala Glu Thr Gly Ile Pro Phe Ser Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Glu Val Glu Asp Asp Pro Lys Val His Leu Glu Ala Lys Glu Leu

100 105 110

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

115 120 125

Gly Arg Arg Met Phe Pro Pro Phe Lys Val Arg Cys Ser Gly Leu Asp

130 135 140

Lys Lys Ala Lys Tyr Ile Leu Leu Met Asp Ile Ile Ala Ala Asp Asp

145 150 155 160

Cys Arg Tyr Lys Phe His Asn Ser Arg Trp Met Val Ala Gly Lys Ala

165 170 175

Asp Pro Glu Met Pro Lys Arg Met Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Ala

180 185 190

Thr Gly Glu Gln Trp Met Ser Lys Val Val Thr Phe His Lys Leu Lys

195 200 205

Leu Thr Asn Asn Ile Ser Asp Lys His Gly Phe Thr Ile Leu Asn Ser

210 215 220

Met His Lys Tyr Gln Pro Arg Phe His Ile Val Arg Ala Asn Asp Ile

225 230 235 240

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

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

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

435 440 445
Glu Ala Arg Ala Leu Pro Gly Lys Glu Ala Phe Ala Pro Leu Thr Val
450 455 460
Gln Thr Asp Ala Ala Ala Ala His Leu Ala Gln Gly Pro Leu Pro Gly
465 470 475 480
Leu Gly Phe Ala Pro Gly Leu Ala Gly Gln Gln Phe Phe Asn Gly His
485 490 495

Pro Leu Phe Leu His Pro Ser Gln Phe Ala Met Gly Gly Ala Phe Ser
500 505 510

Ser Met Ala Ala Ala Gly Met Gly Pro Leu Leu Ala Thr Val Ser Gly
515 520 525

Ala Ser Thr Gly Val Ser Gly Leu Asp Ser Thr Ala Met Ala Ser Ala
530 535 540

Ala Ala Ala Gln Gly Leu Ser Gly Ala Ser Ala Ala Thr Leu Pro Phe
545 550 555 560

His Leu Gln Gln His Val Leu Ala Ser Gln Gly Leu Ala Met Ser Pro
565 570 575

Phe Gly Ser Leu Phe Pro Tyr Pro Tyr Thr Tyr Met Ala Ala Ala Ala

580 585 590

Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ser Val His Arg His Pro Phe
595 600 605

Leu Asn Leu Asn Thr Met Arg Pro Arg Leu Arg Tyr Ser Pro Tyr Ser
610 615 620

Ile Pro Val Pro Val Pro Asp Gly Ser Ser Leu Leu Thr Thr Ala Leu
625 630 635 640

Pro Ser Met Ala Ala Ala Ala Gly Pro Leu Asp Gly Lys Val Ala Ala
645 650 655

Leu Ala Ala Ser Pro Ala Ser Val Ala Val Asp Ser Gly Ser Glu Leu
660 665 670

Asn Ser Arg Ser Ser Thr Leu Ser Ser Ser Ser Met Ser Leu Ser Pro
675 680 685

Lys Leu Cys Ala Glu Lys Glu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Gln Ser Ile
690 695 700

Gln Arg Leu Val Ser Gly Leu Glu Ala Lys Pro Asp Arg Ser Arg Ser
705 710 715 720

Ala Ser Pro

<210> 83

<211> 3095

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 83

ggaggacgga cggacagggc cagcctgctg tccggctgcc gcccgccgtg gtgtgagggg 60

gtttctgcgc acccacagtc gccaccgtcc cacctgggct gccggagcct ccccctggac 120

ccctggtgcc cactgccacc ctcatccggt gtgagagcgc tgcttccgct tcgcggacgc 180

cgcgggcatg gactattcgt acgacgagga cctggacgag ctgtgccccg tgtgcgggga 240

caaggtgtcc ggctaccact acggactgct cacgtgtgag agctgcaagg gcttcttcaa 300

gcgcacggtg cagaacaaca agcactacac gtgcaccgag agccagagct gcaagatcga 360

caagacgcag cgcaagcgct gtcccttctg ccgcttccag aaatgcctga cggtggggat 420

gcgcctggaa gccgtgcgcg ctgaccgtat gaggggtggc cggaacaagt ttgggccgat 480

gtacaagcgg gaccgggccc tgaaacagca gaagaaggca cagattcggg ccaatggctt 540

caagctggag acagggcccc cgatgggggt gcccccgccg ccccctcccg caccggacta 600

cgtgctgcct cccagcctgc atgggcctga gcccaagggc ctggccgccg gtccacctgc 660

tgggccactg ggcgactttg gggccccagc actgcccatg gccgtgcccg gtgcccacgg 720

gccactggct ggctacctct accctgcctt tcctggccgt gccatcaagt ctgagtaccc 780

ggagccttat gccagccccc cacagcctgg gctgccgtac ggctacccag agcccttctc 840

tggagggccc aacgtgcctg agctcatcct gcagctgctg cagctggagc cggatgagga 900

ccaggtgcgg gcccgcatct tgggctgcct gcaggagccc accaaaagcc gccccgacca 960

gccggcggcc ttcggcctcc tgtgcagaat ggccgaccag accttcatct ccatcgtgga 1020

ctgggcacgc aggtgcatgg tcttcaagga gctggaggtg gccgaccaga tgacgctgct 1080

gcagaactgc tggagcgagc tgctggtgtt cgaccacatc taccgccagg tccagcacgg 1140

caaggagggc agcatcctgc tggtcaccgg gcaggaggtg gagctgacca cagtggccac 1200

ccaggcgggc tcgctgctgc acagcctggt gttgcgggcg caggagctgg tgctgcagct 1260

gcttgcgctg cagctggacc ggcaggagtt tgtctgcctc aagttcatca tcctcttcag 1320

cctggatttg aagttcctga ataaccacat cctggtgaaa gacgctcagg agaaggccaa 1380

cgccgccctg cttgactaca ccctgtgcca ctacccgcac tgcggggaca aattccagca 1440

gctgctgctg tgcctggtgg aggtgcgggc cctgagcatg caggccaagg agtacctgta 1500

ccacaagcac ctgggcaacg agatgccccg caacaacctg ctcatcgaaa tgctgcaagc 1560

caagcagact tgagcctggg ccgggggcgg ggccgggact gggggcggga ctgggggcgg 1620

ggcctgggcg gggccgcagc cacaccgctg gctccgcatg gttcattttc tgatgcccac 1680

cgaggagccc cagccccgtc ccagaggccg ctgcccctga gttctgacac tgtgtgtttg 1740

ggaaggtggg tgaggctggg cagggcctgg cggaggtgga gtggccactg gcacttgcct 1800

gctgcttgga gtgccccaag gaggtggctg ttaaccaccc gccccgcccc ctccctgctc 1860

ccagctctct ctcctggagt ctgaagcctg caggtccggg gaggaggttc gggattccct 1920

ggtgggcctc gacgtccctt ggatcagagg tcatcccttc ctcctctcct ggaaacagac 1980

agggagaagt tgagcaggta tcaactaggg gaggagagag ggtctccagt gttcccccca 2040

tagagaccag gagggagagc ctctgttttg taaactaagg ataaccgagt ttgctaaatt 2100

gagaggggct attgggccct agaggacact aggagactgg ttaggacaaa aagaccttct 2160

ccctagccct tctaccccac ctgacctctg caagaggggg cattgataca tcatcgggaa 2220

aaaactttgc tccaggcatc actgattccc tctcccaccc aaggagaacg tttggtacaa 2280

tcgacatcct agccccaccc agaggtggcc ctcccaggct ggtatttatc tgcaaggttg 2340

tagtcaagag gtttttctcc ccgctttttg tttttaagct tctagacact ccttgaaatg 2400

tgtgtgtgat ggagggaagg ggacagattt gaggactgaa gctggggctt ggggattgcc 2460

actaagtaca gctgacggtt tctccccgga cactcgccta ctaagtaccc ttggggtggt 2520

gctgggtcat tacttctgag ccccagcccc aatccagaga agcgctgttg cccgccctcc 2580

acccactagg tgaacagcag gatgccctgt tgggggcttc aggtctctgt gggtgggaat 2640

gcaagtgaac ttgggagggg gcacgggcct gtagatcagg gatagcgctg ttgatcccct 2700

ctctgtggct ccaacccgtt gggtcccttg ctgcaaaccc atgaagctgg ccctcagctc 2760

cctgaccccc tgtcctaggt catgaaggac actctgcagg gtgaagcacc agggagaggc 2820

ctcggctgtc tcctgtcccc ggcggggtgc ctgctgtccg tcccgctttc atgttactgt 2880

tgcagcttgt gctgagcctg cccagttgga ggagactggg cacccctgcc tcctgcctcc 2940

cgcctcccgc caccctgtct cagtacctcc cctccccgcc ccctgaaaca tgtgcccctg 3000

ccaaggccgg agacccacag ccctgaaacg agaagtgccc ttaaggatca ccccagcccc 3060

cacagccctg gaataaattt cgcaattagt ttcca 3095

<210> 84

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Met Asp Tyr Ser Tyr Asp Glu Asp Leu Asp Glu Leu Cys Pro Val Cys

1 5 10 15

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

85 90 95
Pro Met Tyr Lys Arg Asp Arg Ala Leu Lys Gln Gln Lys Lys Ala Gln
100 105 110
Ile Arg Ala Asn Gly Phe Lys Leu Glu Thr Gly Pro Pro Met Gly Val
115 120 125
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Asp Tyr Val Leu Pro Pro Ser Leu
130 135 140
His Gly Pro Glu Pro Lys Gly Leu Ala Ala Gly Pro Pro Ala Gly Pro
145 150 155 160

Leu Gly Asp Phe Gly Ala Pro Ala Leu Pro Met Ala Val Pro Gly Ala
165 170 175
His Gly Pro Leu Ala Gly Tyr Leu Tyr Pro Ala Phe Pro Gly Arg Ala
180 185 190
Ile Lys Ser Glu Tyr Pro Glu Pro Tyr Ala Ser Pro Pro Gln Pro Gly
195 200 205
Leu Pro Tyr Gly Tyr Pro Glu Pro Phe Ser Gly Gly Pro Asn Val Pro
210 215 220
Glu Leu Ile Leu Gln Leu Leu Gln Leu Glu Pro Asp Glu Asp Gln Val

225 230 235 240
Arg Ala Arg Ile Leu Gly Cys Leu Gln Glu Pro Thr Lys Ser Arg Pro
245 250 255

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

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

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

Asn Asn Leu Leu Ile Glu Met Leu Gln Ala Lys Gln Thr
450 455 460

<210> 85
<211> 4787
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 85
atagtttgtc atctttttag ctgcgaagac gccttcgtgg gtctgcgtcc ggagcaaggc 60

ggttacccga tcccggcagt gagccgcgcc gcgcgtcgtg gcggcctgat ttctgtttaa 120

ctttaatagg gcgatctcga gtgtctcaat ttaaaatggt gaattactcc tatgatgaag 180

atctggaaga gctttgtccc gtgtgtggag ataaagtgtc tgggtaccat tatgggctcc 240

tcacctgtga aagctgcaag ggatttttta agcgaacagt ccaaaataat aaaaggtaca 300

catgtataga aaaccagaac tgccaaattg acaaaacaca gagaaagcgt tgtccttact 360

gtcgttttca aaaatgtcta agtgttggaa tgaagctaga agctgtaagg gccgaccgaa 420

tgcgtggagg aaggaataag tttgggccaa tgtacaagag agacagggcc ctgaagcaac 480

agaaaaaagc cctcatccga gccaatggac ttaagctaga agccatgtct caggtgatcc 540

aagctatgcc ctctgacctg accatttcct ctgcaattca aaacatccac tctgcctcca 600

aaggcctacc tctgaaccat gctgccttgc ctcctacaga ctatgacaga agtccctttg 660

taacatcccc cattagcatg acaatgcccc ctcacggcag cctgcaaggt taccaaacat 720

atggccactt tcctagccgg gccatcaagt ctgagtaccc agacccctat accagctcac 780

ccgagtccat aatgggctat tcatatatgg atagttacca gacgagctct ccagcaagca 840

tcccacatct gatactggaa cttttgaagt gtgagccaga tgagcctcaa gtccaggcta 900

aaatcatggc ctatttgcag caagagcagg ctaaccgaag caagcacgaa aagctgagca 960

cctttgggct tatgtgcaaa atggcagatc aaactctctt ctccattgtc gagtgggcca 1020

ggagtagtat cttcttcaga gaacttaagg ttgatgacca aatgaagctg cttcagaact 1080

gctggagtga gctcttaatc ctcgaccaca tttaccgaca agtggtacat ggaaaggaag 1140

gatccatctt cctggttact gggcaacaag tggactattc cataatagca tcacaagccg 1200

gagccaccct caacaacctc atgagtcatg cacaggagtt agtggcaaaa cttcgttctc 1260

tccagtttga tcaacgagag ttcgtatgtc tgaaattctt ggtgctcttt agtttagatg 1320

tcaaaaacct tgaaaacttc cagctggtag aaggtgtcca ggaacaagtc aatgccgccc 1380

tgctggacta cacaatgtgt aactacccgc agcagacaga gaaatttgga cagctacttc 1440

ttcgactacc cgaaatccgg gccatcagta tgcaggctga agaatacctc tactacaagc 1500

acctgaacgg ggatgtgccc tataataacc ttctcattga aatgttgcat gccaaaagag 1560

cataagttac aacccctagg agctctgctt tcaaaacaaa aagagattgg gggagtgggg 1620

aggggggaaga agaacaggaa gaaaaaaagt actctgaact gctccaagta acgctaatta 1680

aaaacttgct ttaaagatat tgaatttaaa aaggcataat aatcaaatac ttaatagcaa 1740

ataaatgatg tatcagggta tttgtattgc aaactgtgaa tcaaaggctt cacagcccca 1800

gaggattcca tataaaagac attgtaatgg agtggattga actcacagat ggataccaac 1860

acggtcagaa gaaaaacgga cagaacggtt cttgtatatt taaactgatc tccactatga 1920

agaaatttag gaactaatct tattaattag gcttatacag cgggggattt gagcttacag 1980

gattcctcca tggtaaagct gaactgaaac aattctcaag aatgcatcag ctgtacctac 2040
aatagcccct ccctcttcct ttgaaggccc cagcacctct gccctgtggt caccgaatct 2100
gtactaagga cctgtgttca gccacaccca gtggtagctc caccaaatca tgaacagcct 2160
aattttgagt gtctgtgtct tagacctgca aacagctaat aggaaattct attaatatgt 2220
tagcttgcca ttttaaatat gttctgaggg ttgttttgtc tcgtgttcat gatgttaaga 2280
aaatgcaggc agtatccctc atcttatgta agtgttaatt aatattaagg gaaatgacta 2340
caaactttca aagcaaatgc tccatagcta aagcaactta gaccttattt ctgctactgt 2400

tgctgaaatg tggctttggc attgttggat ttcataaaaa atttctggca ggaagtcttg 2460
ttagtataca tcagtctttt tcatcatcca agtttgtagt tcatttaaaa atacaacatt 2520
aaacacattt tgctaggatg tcaaatagtc acagttctaa gtagttggaa acaaaattga 2580
cgcatgttaa tctatgcaaa gagaaaggaa aggatgaggt gatgtattga ctcaaggttc 2640
attcttgctg caattgaaca tcctcaagag ttgggatgga aatggtgatt tttacatgtg 2700
tcctggaaag atattaaagt aattcaaatc ttccccaaag gggaaaggaa gagagtgata 2760
ctgacctttt taagtcatag accaaagtct gctgtagaac aaatatggga ggacaaagaa 2820

tcgcaaattc ttcaaatgac tattatcagt attattaaca tgcgatgcca caggtatgaa 2880
agtcttgcct tatttcacaa ttttaaaagg tagctgtgca gatgtggatc aacatttgtt 2940
taaaataaag tattaatact ttaaagtcaa ataagatata gtgtttacat tctttaggtc 3000
ctgaggggca gggggatctg tgatataaca aaatagcaaa agcggtaatt tccttaatgt 3060
tatttttctg attggtaatt atttttaaca gtacttaatt attctatgtc gtgagacact 3120
aaaatcaaaa acgggaatct catttagact ttaatttttt tgagattatc ggcggcacaa 3180
tcactttgta gaaactgtaa aaaataaaag tatctcctag tcccttaatt ttttcataaa 3240

tatttctggc ttttgagtag tgtatttata ttgtatatca tactttcaac tgtagacaat 3300
tatgatgcta atttattgtt tcttggtttc acctttgtat aagatatagc caagactgaa 3360
gaaaccaaat atatgtgttt actgtagcat gtcttcaaat tagtggaact tagttcaggg 3420
acatagaaga gtcttaatga attaaaatca ttcacttgat taaatgtctg taaatcttca 3480
tcattcctac tgtagtttat ttaatatcta ttgtaaatta tgtgacttgt agcttcctct 3540
ggttttcaag taaactcaac aaggtggagt cttacctggt tttcctttcc aagcattgta 3600
aattgtatac caaagatatt agttattact tctgtgtgta caaagaggat tattttatta 3660

tgtttattaa tcacctctaa tactcatcca catgaagggt acacattagg taagctgggc 3720

gttgactcat gcgcagtctc agtcacccgt gttatcttcg tggctcaaag gacaatgcaa 3780

aatcgccgat cagagctcat acccaaagca ttacagagaa cagcagcatc attgccctcc 3840

ccagctgaaa aacaagttgg ctagaagata catggagagg aatggtgtgg tcaacagtta 3900

atgaaacggt tctatcatgc atgtgtaatg tggatggaga caattataag atttgactat 3960

aactatttgg agggtcttta acattgccaa aaaaacaaat atgttgattt ttatttttatt 4020

ttatttttta ttttaagagg cgggatcttg atctcacatg ttgcccaggc tggccttgaa 4080

ctcctgggct caagcattcc tcctgcctca gcctccccca tagctgggac taggggtgca 4140

tgccagcata cctggctacg ttgactctta aaatctatgt tctcttattt taaagataca 4200

gtgctcccca ctgaaaatta aacctaaaaa atgtcacata ttggtatgtt gttaacctgg 4260

tagattaaat catgagaatg attagaaaga cgggcaacac agcgggttac atccacactg 4320

ctgatcacac caacgacagg agctgataag caagaaagcg tcacagccag cgtctgttca 4380

cccaaggttg acaagtgaag tttctctaat gttgattgtt agccgatttg taacctggca 4440

tttacttagc aactgcctta tcaattacag gatttgccgg taaaagcaga ctcaaatata 4500

aaggtttttg gcttaacttg gtttattata gttgctctat gtttgtaaac agacaatctc 4560

taatgtctga ttatttgtat cacagatctg cagctgcctt ggacttgaat ccatgcaatg 4620

tttagagtgt gaagtcagtt acttgttgat gttttcttac tgtatcaatg aaatacatat 4680

tgtcatgtca gttcttgcca ggaacttctc aacaaaatgg aatttttttt ttcagtattt 4740

caataaatat tgatatgccc agcctgataa tttttaaaaa aaaaaaa 4787

<210> 86

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Met Val Asn Tyr Ser Tyr Asp Glu Asp Leu Glu Glu Leu Cys Pro Val

1 5 10 15

Cys Gly Asp Lys Val Ser Gly Tyr His Tyr Gly Leu Leu Thr Cys Glu

20 25 30

Ser Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val Gln Asn Asn Lys Arg Tyr

35 40 45

Thr Cys Ile Glu Asn Gln Asn Cys Gln Ile Asp Lys Thr Gln Arg Lys

50 55 60

Arg Cys Pro Tyr Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ser Val Gly Met Lys
65 70 75 80

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

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

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

290 295 300
Leu Leu Gln Asn Cys Trp Ser Glu Leu Leu Ile Leu Asp His Ile Tyr

305 310 315 320

Arg Gln Val Val His Gly Lys Glu Gly Ser Ile Phe Leu Val Thr Gly

325 330 335

Gln Gln Val Asp Tyr Ser Ile Ile Ala Ser Gln Ala Gly Ala Thr Leu

340 345 350

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

355 360 365

Leu Gln Phe Asp Gln Arg Glu Phe Val Cys Leu Lys Phe Leu Val Leu

370 375 380

Phe Ser Leu Asp Val Lys Asn Leu Glu Asn Phe Gln Leu Val Glu Gly

385 390 395 400

Val Gln Glu Gln Val Asn Ala Ala Leu Leu Asp Tyr Thr Met Cys Asn

405 410 415

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

420 425 430

Glu Ile Arg Ala Ile Ser Met Gln Ala Glu Glu Tyr Leu Tyr Tyr Lys

435 440 445

His Leu Asn Gly Asp Val Pro Tyr Asn Asn Leu Leu Ile Glu Met Leu

450 455 460

His Ala Lys Arg Ala

465

<210> 87

<211> 1277

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 87

tttttttcaa tgaacatgac ttctggagtc aaggttgttg ggccattccc cccgttccac 60

tcactgggaa tataaatagc acccacagcg cagaacacag agccagagag ctggaagtga 120

gagcagatcc ctaaccatga gcaccagcca accaggggcc tgcccatgcc agggagctgc 180

aagccgcccc gccattctct acgcacttct gagctccagc ctcaaggctg tcccccgacc 240

ccgtagccgc tgcctatgta ggcagcaccg gcccgtccag ctatgtgcac ctcatcgcac 300

ctgccgggag gccttggatg ttctggccaa gacagtggcc ttcctcagga acctgccatc 360

cttctggcag ctgcctcccc aggaccagcg gcggctgctg cagggttgct ggggcccccc 420

cttcctgctt gggttggccc aagatgctgt gacctttgag gtggctgagg ccccggtgcc 480

cagcatactc aagaagattc tgctggagga gcccagcagc agtggaggca gtggccaact 540

gccagacaga ccccagccct ccctggctgc ggtgcagtgg cttcaatgct gtctggagtc 600

cttctggagc ctggagctta gccccaagga atatgcctgc ctgaaaggga ccatcctctt 660

caaccccgat gtgccaggcc tccaagccgc ctcccacatt gggcacctgc agcaggaggc 720

tcactgggtg ctgtgtgaag tcctggaacc ctggtgccca gcagcccaag gccgcctgac 780

ccgtgtcctc ctcacggcct ccaccctcaa gtccattccg accagcctgc ttggggacct 840

cttctttcgc cctatcattg gagatgttga catcgctggc cttcttgggg acatgctttt 900

gctcaggtga cctgttccag cccaggcaga gatcaggtgg gcagaggctg gcagtgctga 960

ttcagcctgg ccatccccag aggtgaccca atgctcctgg agggggcaag cctgtataga 1020

cagcacttgg ctccttagga acagctcttc actcagccac accccacatt ggacttcctt 1080

ggtttggaca cagtgttcca gctgcctggg aggcttttgg tggtccccac agcctctggg 1140

ccaagactcc tgtcccttct tgggatgaga atgaaagctt aggctgctta ttggaccaga 1200

agtcctatcg actttataca gaactgaatt aagttattga tttttgtaat aaaaggtatg 1260

aaacacttgg aaaaaaa 1277

<210> 88

<211> 257

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Met Ser Thr Ser Gln Pro Gly Ala Cys Pro Cys Gln Gly Ala Ala Ser

1 5 10 15

Arg Pro Ala Ile Leu Tyr Ala Leu Leu Ser Ser Ser Leu Lys Ala Val

20 25 30

Pro Arg Pro Arg Ser Arg Cys Leu Cys Arg Gln His Arg Pro Val Gln

35 40 45

Leu Cys Ala Pro His Arg Thr Cys Arg Glu Ala Leu Asp Val Leu Ala

50 55 60

Lys Thr Val Ala Phe Leu Arg Asn Leu Pro Ser Phe Trp Gln Leu Pro

65 70 75 80

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

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

Lys Ser Ile Pro Thr Ser Leu Leu Gly Asp Leu Phe Phe Arg Pro Ile
225 230 235 240
Ile Gly Asp Val Asp Ile Ala Gly Leu Leu Gly Asp Met Leu Leu Leu
245 250 255
Arg

<210> 89
<211> 1353
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 89
gaggtgaaac cgtccctagg tgagccgtct ttccaccagg cccccggctc ggggtgccca 60
ccttccccat ggctggacac ctggcttcag acttcgcctt ctcaccccca ccaggtgggg 120

gtgatgggtc agcagggctg gagccgggct gggtggatcc tcgaacctgg ctaagcttcc 180

aagggcctcc aggtgggcct ggaatcggac caggctcaga ggtattgggg atctccccat 240

gtccgcccgc atacgagttc tgcggaggga tggcatactg tggacctcag gttggactgg 300

gcctagtccc ccaagttggc gtggagactt tgcagcctga gggccaggca ggagcacgag 360

tggaaagcaa ctcagaggga acctcctctg agccctgtgc cgaccgcccc aatgccgtga 420

agttggagaa ggtggaacca actcccgagg agtcccagga catgaaagcc ctgcagaagg 480

agctagaaca gtttgccaag ctgctgaagc agaagaggat caccttgggg tacacccagg 540

ccgacgtggg gctcaccctg ggcgttctct ttggaaaggt gttcagccag accaccatct 600

gtcgcttcga ggccttgcag ctcagcctta agaacatgtg taagctgcgg cccctgctgg 660

agaagtgggt ggaggaagcc gacaacaatg agaaccttca ggagatatgc aaatcggaga 720

ccctggtgca ggcccggaag agaaagcgaa ctagcattga gaaccgtgtg aggtggagtc 780

tggagaccat gtttctgaag tgcccgaagc cctccctaca gcagatcact cacatcgcca 840

atcagcttgg gctagagaag gatgtggttc gagtatggtt ctgtaaccgg cgccagaagg 900

gcaaaagatc aagtattgag tattcccaac gagaagagta tgaggctaca gggacacctt 960

tcccaggggg ggctgtatcc tttcctctgc ccccaggtcc ccactttggc accccaggct 1020

atggaagccc ccacttcacc acactctact cagtcccttt tcctgagggc gaggcctttc 1080

cctctgttcc cgtcactgct ctgggctctc ccatgcattc aaactgaggc accagccctc 1140

cctggggatg ctgtgagcca aggcaaggga ggtagacaag agaacctgga gctttggggt 1200

taaattcttt tactgaggag ggattaaaag cacaacaggg gtgggggggtg ggatggggaa 1260

agaagctcag tgatgctgtt gatcaggagc ctggcctgtc tgtcactcat cattttgttc 1320

ttaaataaag actgggacac acagtagata gct 1353

<210> 90

<211> 352

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 90

Met Ala Gly His Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Asp Gly Ser Ala Gly Leu Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro Arg
20 25 30

Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly Pro
35 40 45

Gly Ser Glu Val Leu Gly Ile Ser Pro Cys Pro Pro Ala Tyr Glu Phe

50 55 60

Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly Leu Gly Leu Val
65 70 75 80

Pro Gln Val Gly Val Glu Thr Leu Gln Pro Glu Gly Gln Ala Gly Ala
85 90 95

Arg Val Glu Ser Asn Ser Glu Gly Thr Ser Ser Glu Pro Cys Ala Asp
100 105 110

Arg Pro Asn Ala Val Lys Leu Glu Lys Val Glu Pro Thr Pro Glu Glu
115 120 125

Ser Gln Asp Met Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys
130 135 140

Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val
145 150 155 160

Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr
165 170 175

Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Leu Lys Asn Met Cys Lys
180 185 190

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

195 200 205

Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ser Glu Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys
210 215 220

Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Trp Ser Leu Glu Thr
225 230 235 240

Met Phe Leu Lys Cys Pro Lys Pro Ser Leu Gln Gln Ile Thr His Ile
245 250 255

Ala Asn Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg Val Trp Phe Cys
260 265 270

Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ile Glu Tyr Ser Gln Arg

275 280 285

Glu Glu Tyr Glu Ala Thr Gly Thr Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val Ser

290 295 300

Phe Pro Leu Pro Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser

305 310 315 320

Pro His Phe Thr Thr Leu Tyr Ser Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala

325 330 335

Phe Pro Ser Val Pro Val Thr Ala Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn

340 345 350

<210> 91

<211> 4391

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 91

agaggacagt ttgaaagaga ggaaggcaga gaagggacct gggaggaggc aggaggaggg 60

cggggacggg gggggctggg gctcagccca ggggcttggg tggcatcctg ggccgggcag 120

gacaggggggc taaggcgtgg gtaggggaga atgcgactct ctaaaaccct tgccggcatg 180

gatatggccg actacagcgc tgccctggac ccagcctaca ccaccctgga gtttgaaaat 240

gtgcaggtgt tgaccatggg caatgacacg tccccatctg aaggtgccaa cctcaattca 300

tccaacagcc tgggcgtcag tgccctgtgc gccatctgtg gcgaccgggc caccggcaaa 360

cactacggag cctcgagctg tgacggctgc aaggggttct tcaggaggag cgtgaggaag 420

aaccacatgt actcctgcag gtttagccga caatgtgtgg tagacaaaga taagaggaac 480

cagtgtcgtt actgcaggct taagaagtgc ttccgggctg gcatgaagaa ggaagctgtc 540

caaaatgagc gggaccggat cagcacgcgg aggtcaagct acgaggacag cagcctgccc 600

tccatcaacg cgctcctgca ggcagaggtt ctgtcccagc agatcacctc tcccatctct 660

gggatcaatg gcgacattcg ggcaaagaag attgccaaca tcacagacgt gtgtgagtct 720

atgaaggagc agctgctggt cctggtcgag tgggccaagt acatcccggc cttctgcgaa 780

ctccttctgg atgaccaggt ggcgctgctc agggcccacg ccggtgagca tctgctgctt 840

ggagccacca agaggtccat ggtgtttaag gacgtgctgc tcctaggcaa tgactacatc 900

gtccctcggc actgtccaga gctagcggag atgagccgtg tgtccatccg catcctcgat 960

gagctggtcc tgcccttcca agagctgcag attgatgaca atgaatatgc ctgcctcaaa 1020

gccatcatct tctttgatcc agatgccaag gggctgagtg acccgggcaa gatcaagcgg 1080

ctgcggtcac aggtgcaagt gagcctggag gattacatca acgaccggca gtacgactct 1140

cggggccgct ttggagagct gctgctgctg ttgcccacgc tgcagagcat cacctggcag 1200

atgatcgaac agatccagtt catcaagctc ttcggcatgg ccaagattga caacctgctg 1260

caggagatgc ttctcggagg gtctgccagt gatgcacccc acacccacca ccccctgcac 1320

cctcacctga tgcaagaaca catgggcacc aatgtcattg ttgctaacac gatgccctct 1380

cacctcagca atggacagat gtgtgagtgg ccccgaccca gggggcaggc agccactccc 1440

gagactccac agccatcacc accaagtggc tcgggatctg aatcctacaa gctcctgcca 1500

ggagccatca ccaccatcgt caagcctccc tctgccattc cccagccaac gatcaccaag 1560

caagaagcca tctagcaagc tgctgggggg gtcaggggtt ctgctggctc ataccctcag 1620

aagagcacct gggagtaacc tagtcatggc aaagaagatg tgacacgagg gaccagtccc 1680

agagcagcta cagaaagggt gtgaggcccc aaaaccgtgt gctgaggggc gaatgcgtcg 1740

ccacccctga ccccgcatct ggagggcggg gctttgcttg agaagacccc agggaggact 1800

gtcttccact gcctggactc ctctcaagtt gaagtcatcg tcttcatctt cctccgtatc 1860

ttcttccctc aacttcttca cccctgaagg acgactgtct gcagatgttg caggaccttg 1920

ttttaaaatc aactcccttc tctcccagcg gggggcctct tccttcctgg tgctggtcag 1980

ggggcctgga aacaaacttt ctgaggctgg gtcagcttgc cttatagtac tcctctcctg 2040

ctatgccaac ctcaggtgac ctgctaccat cctctatacc ttcctccgcc atctgacttc 2100

tctaaagcca tctctctgga ggctgaggaa gctgtggtaa ccatttcccc actcattctg 2160

agagccttct gtaagcactg acctgggtaa ggcagagggt aggagtcacc atccctcctc 2220

tgccaatatc gctacaactc ctgcctccag cactaggcta taactttgga gtgataagtc 2280

ctatggcttt ctacagtaga gaaccaccca agggtgtcga ttataacaga atgtggagag 2340

tgggtggccg tcattgggaa agcatcgaga aagaggcgag ctttgcatct gtcccttgac 2400

agggaaggta ggcttctggc tagcagagca ggtgacacaa accagtttat tggagaacag 2460

cctggacaaa ggcccatagg taggtaaaat agtatgggag ggaggcaatg aagaaatcag 2520

ttcccatgga gttgtgacag ggtacacact ggggaccatt gaatgacaaa ctgaggtcag 2580

gggtagctgc agtgtggggc tgtcagaaga tgaatacagc atcccgcaga ggtaggatat 2640

gaggaggcta tactggagcg tagggatgag ataaagggat ggatccgagt cctcccgggg 2700

cctgccaagc ttttccatac ttccagatga tgttataagg cattaaacag ccaccatcgc 2760

atagaacctt ccctgtaacc cagacattgt caaggaagat atacgtagag gatcttaact 2820

gactcacagg aagcacttgt cccccctggc acggaatcca gagggttcct cgtcctttac 2880

cagtgtcaac cccagaggct ttctctctcc agaactggcc agctagagac cgttctaaag 2940

tccactggaa gtcaagaatc tcgtttactg ataatagtaa agttgattca tgacccctgt 3000

cctttttttt ctactgatct acccaagtgt aggtgagccg cagcagggag tgattcctag 3060

aagacggatc agtctagtct ggcagtcaag gctcaggagt ttgggagagg ggcaggagaa 3120

ggataagaaa gcctgggttt taggcttgcc tgggaagcta cagtcaaggt gcattctggg 3180

agctactcat ccccagcagt tagcgctccg ccccggttga ctcttgatgg ctttgcggag 3240

cccctgcaaa gtgtcactag tcaatgggaa caagaggaat gtcccctggt ctggaagtgt 3300

gctaagtgga aggaatgggc tgtgagactg gatagttatg gtgcatcaag gctgatcctt 3360

ctgattgggt ggggcgagca tcccagtgtc caaaaattcc agcctaaatg acaggtcctc 3420

tgaaaaagag gtgctgagga gtaatggggc cagctgatta aagaaaaaga acccccacac 3480

aacaggactg tcaggacaga ttgagttaac ccctcaagcc aagtcccggg tgtcaggaac 3540

agttgtccat gctcagagcc ctcaagccat ccttggccac tctcactcca gtgccccccа 3600

gagaccccag ccagatggct cagactgtcc tgcatgaagg caggagagct gaactctctc 3660

tggtccttgt ctttcccaat ctttgtccct ccatccccag tggcatcagg agaggagtag 3720

gtaatgttgg ccttcagtgg tagcagtctt ctggggcagg ggtcagccac tgtcccaatc 3780

agtcctttct gaaggagaaa cccattccac attaacaaat ttattacagt acagggaaca 3840

tggaataaag gaaagtttac tcttctgatt ataagctgag gatgctatgt tgcagtttgt 3900

ttgcttgttt ttttcttctg agctttgttt ctagtacacg atatgacggg accaagtaca 3960

agctggtggt ggacagagct gggtgccaca gttttccacc aagagcagcc tcttttcttc 4020

atggagttct cagaaccttt cagggttcag gaggctcccc tgagaataga caggagaggg 4080

tcagaagcag acgtcctcct tttcttgtga taaccacgct acttgccttt gctagagctc 4140

tctgtggcca accctgggaa atgctaatca tgaccttcac accaaacatt cagaagtagg 4200

ctgtgtccca tcagatcaat ctgcaccttc ctgtggttgt gcaaacatca cggggcccta 4260

ccctgatccc caaggcccca ccatcactgc ccaagggggt aaaaaagaga aaaagccctc 4320

aaaaacagtt cttactcctg tgttttagca aaaatttatc aaacaaaata aatggtactt 4380

atgttttcta a 4391

<210> 92

<211> 474

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 92

Met Arg Leu Ser Lys Thr Leu Ala Gly Met Asp Met Ala Asp Tyr Ser

1 5 10 15

Ala Ala Leu Asp Pro Ala Tyr Thr Thr Leu Glu Phe Glu Asn Val Gln
20 25 30
Val Leu Thr Met Gly Asn Asp Thr Ser Pro Ser Glu Gly Ala Asn Leu
35 40 45
Asn Ser Ser Asn Ser Leu Gly Val Ser Ala Leu Cys Ala Ile Cys Gly
50 55 60

Asp Arg Ala Thr Gly Lys His Tyr Gly Ala Ser Ser Cys Asp Gly Cys
65 70 75 80
Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Arg Lys Asn His Met Tyr Ser Cys
85 90 95
Arg Phe Ser Arg Gln Cys Val Val Asp Lys Asp Lys Arg Asn Gln Cys
100 105 110
Arg Tyr Cys Arg Leu Lys Lys Cys Phe Arg Ala Gly Met Lys Lys Glu
115 120 125
Ala Val Gln Asn Glu Arg Asp Arg Ile Ser Thr Arg Arg Ser Ser Tyr

130 135 140
Glu Asp Ser Ser Leu Pro Ser Ile Asn Ala Leu Leu Gln Ala Glu Val
145 150 155 160
Leu Ser Gln Gln Ile Thr Ser Pro Ile Ser Gly Ile Asn Gly Asp Ile
165 170 175
Arg Ala Lys Lys Ile Ala Asn Ile Thr Asp Val Cys Glu Ser Met Lys
180 185 190
Glu Gln Leu Leu Val Leu Val Glu Trp Ala Lys Tyr Ile Pro Ala Phe
195 200 205

Cys Glu Leu Leu Leu Asp Asp Gln Val Ala Leu Leu Arg Ala His Ala
210 215 220
Gly Glu His Leu Leu Leu Gly Ala Thr Lys Arg Ser Met Val Phe Lys
225 230 235 240
Asp Val Leu Leu Leu Gly Asn Asp Tyr Ile Val Pro Arg His Cys Pro
245 250 255
Glu Leu Ala Glu Met Ser Arg Val Ser Ile Arg Ile Leu Asp Glu Leu
260 265 270

Val Leu Pro Phe Gln Glu Leu Gln Ile Asp Asp Asn Glu Tyr Ala Cys

275 280 285

Leu Lys Ala Ile Ile Phe Phe Asp Pro Asp Ala Lys Gly Leu Ser Asp

290 295 300

Pro Gly Lys Ile Lys Arg Leu Arg Ser Gln Val Gln Val Ser Leu Glu

305 310 315 320

Asp Tyr Ile Asn Asp Arg Gln Tyr Asp Ser Arg Gly Arg Phe Gly Glu

325 330 335

Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr Leu Gln Ser Ile Thr Trp Gln Met Ile

340 345 350

Glu Gln Ile Gln Phe Ile Lys Leu Phe Gly Met Ala Lys Ile Asp Asn

355 360 365

Leu Leu Gln Glu Met Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ser Asp Ala Pro His

370 375 380

Thr His His Pro Leu His Pro His Leu Met Gln Glu His Met Gly Thr

385 390 395 400

Asn Val Ile Val Ala Asn Thr Met Pro Ser His Leu Ser Asn Gly Gln

405 410 415

Met Cys Glu Trp Pro Arg Pro Arg Gly Gln Ala Ala Thr Pro Glu Thr

420 425 430

Pro Gln Pro Ser Pro Pro Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Tyr Lys Leu

435 440 445

Leu Pro Gly Ala Ile Thr Thr Ile Val Lys Pro Pro Ser Ala Ile Pro

450 455 460

Gln Pro Thr Ile Thr Lys Gln Glu Ala Ile

465 470