



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년10월30일
(11) 등록번호 10-1791785
(24) 등록일자 2017년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0061338
(22) 출원일자 2016년05월19일
심사청구일자 2016년05월19일
(56) 선행기술조사문헌
J Asthma. 2008 May;45(4):287-92.
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
오연목
서울특별시 용산구 이촌로 181, 104동 1101호(한강대우아파트)
김주한
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 262동 1101호(리센즈 아파트)
김우진
강원도 춘천시 수풍골길13번길 27, 102동 402호(개나리아파트)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이예리

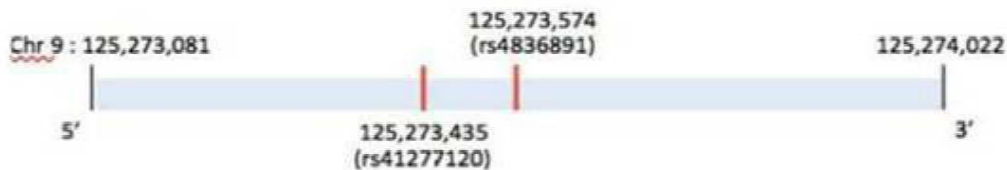
(54) 발명의 명칭 만성폐쇄기도질환 약물 내성 진단 방법 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 기관지 확장용 약물의 반응성과 관련된 특정 유전자의 변이 검출에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 베타 아드레날린성 항진제(Beta-adrenergic agonist) 약물의 반응성을, 후각수용기(Olfactory receptor)-패스웨이 관련 유전자 중 특정 SNP 변이를 이용하여 신속하게 결정하는 방법 및 이러한 방법을 이용하여 만성폐쇄기도질환, 바람직하게는 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)에 대한 약물 치료 방법을 결정하는 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도7

*single coding-exon genes (942 base pairs / 313 amino acids)



variant	codon change	amino acid group change
rs41277120	GCA(Alanine) > ACA(Threonine)	Hydrophobic side groups -> Polar, uncharged side groups
rs4836891	CGG(Arginine) -> CAG(Glutamine)	Electrically charged side groups -> Polar, uncharged side groups

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

(73) 특허권자

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

강원대학교산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(56) 선행기술조사문헌

Biochemical and Biophysical Research

Communications Volume 364, Issue 3, 21

December 2007, Pages 662-667

J Allergy Clin Immunol. 2010 Oct;126(4):853-8.

KR1020070057081 A

KR1020160003959 A

KR1020120048789 A

J Allergy Clin Immunol. 2014 February ;

133(2): 370-378.e15.

PLoS Genetics July 2012 | Volume 8 | Issue 7 |

e1002824

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1634

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건복지부

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 병원 주도 첨단 생명-정보-공학-임상 융합연구

기 여 율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2013.11.01 ~ 2019.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 후각수용체 유전자 OR1J2(Olfactory receptor 1 J2)의 355번째 염기가 G 또는 A이고, 상기 유전자의 494번째 염기가 G 또는 A이고,

상기 유전자의 355번째 염기 또는 상기 유전자의 494번째 염기를 포함하는 10 내지 100 개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 기관지 확장용 약물의 내성 또는 감수성 진단 및 예측을 위한 마커용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 기관지 확장용 약물은 천식 또는 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 치료용 약물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 기관지 확장용 약물은 β 아드레날린 수용체 항진제(β -adrenoreceptor agonist), 항콜린제(Anticholinergics) 또는 잔틴제(Xantines)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 β 아드레날린 수용체 항진제는 알부테롤(albuterol), 레발부테롤(Levalbuterol), 메타프로테레놀(metaproterenol), 테르부탈린(terbutaline), 피르부테롤(pirbuterol), 살메테롤(salmeterol) 및 포르모테롤(formoterol)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항, 제3항, 제4항 및 제6항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 기관지 확장용 약물의 내성 또는 감수성 진단 및 예측을 위한 키트.

청구항 8

기관지 확장용 약물을 복용한 환자에서 추출된 핵산으로부터,

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 후각수용체 유전자 OR1J2(Olfactory receptor 1 J2)의 355번째 염기 및 494번째 염기를 확인하는 단계를 포함하는 기관지 확장용 약물의 내성 또는 감수성 진단 및 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 기관지 확장용 약물은 β 아드레날린 수용체 항진제(β -adrenoreceptor agonist)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

상기 OR1J2의 355번째 염기 및 494번째 염기가 모두 A인 경우 기관지 확장용 약물에 대한 내성이 존재하거나 감수성이 낮은 것으로 판정하고, β 아드레날린 수용체 항진제가 아닌 다른 약물을 이용할 수 있는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서,

상기 OR1J2의 355번째 염기 및 494번째 염기 중 어느 하나만이 A인 경우 β 아드레날린 수용체 항진제를 1차적으로만 이용할 수 있는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 기관지 확장용 약물의 반응성과 관련된 특정 유전자의 변이 검출에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 베타 아드레날린성 항진제(Beta-adrenergic agonist) 약물의 반응성을, 후각수용기(Olfactory receptor)-패스웨이 관련 유전자 중 특정 SNP 변이를 이용하여 신속하게 결정하는 방법 및 이러한 방법을 이용하여 만성폐쇄기도질환, 바람직하게는 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)에 대한 약물 치료 방법을 결정하는 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 WHO에서는 2020년에 인간의 수명과 삶의 질을 결정하는 4대 질환군을 지정하였는데, 이중 하나가 기도폐색에 의한 호흡곤란을 특징으로 하는 만성폐쇄성기도질환(chronic obstructive airway disease)이다.

[0003] 만성폐쇄성기도질환은 가역적인 기도폐색을 특징으로 하는 천식(asthma)과 비가역적인 기도폐색을 특징으로 하는 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)으로 구별할 수 있다.

[0004] 천식은 공기 중에 있는 알레르겐 등에 의한 과민반응으로 만성적인 기도염증과 이에 따른 기도과민성에 의해 가역적인 기도폐색을 특징으로 하는 질환인 반면, COPD는 천식과 달리 비가역적인 기도폐색을 특징으로 하는 질환으로서 만성(세)기관지염(chronic bronchitis/bronchiolitis)과 폐기종(emphysema)이 비가역적 기도폐색을 일으키는 주요 원인 질환으로 알려져 있다.

[0005] 특히, COPD로 인한 사망률은 전 세계적으로 4위를 차지하고 있고 더욱이 10대 사망원인 질환 중에서 사망률이 유일하게 증가하는 질환이다. 고령인구의 증가로 인해 향후 유병률과 사망률이 더욱 증가할 것으로 예측되어, WHO에 의하면 질병부담지수가 1990s 12위에서 2020년에는 세계적으로 5위로 올라설 것으로 전망하고 있다.

[0006] COPD의 치료에 관한 지침은 COPD의 진단과 치료에 관한 국제기구인 GOLD (global initiative for chronic obstructive pulmonary disease)에서 매년 개정하여 발표하고 있으며, 약물치료와 비약물치료로 나누어 광범위하게 이루어져야 한다.

[0007] 적절한 약물 선택은 매우 중요한 전략이고 그렇기 때문에 임상 의들은 각각의 진료 환경에서 최선의 약물을 처방하겠지만 아직까지 이들 질환의 조절상태나 진료지침에 근거한 효과적인 치료방법의 이용률은 크게 기대에 미치지 못하고 있다는 현실적인 문제점들이 거론되고 있기도 하다.

[0008] 현재 천식과 만성폐쇄성폐질환을 치료할 때 선택할 수 있는 약물의 종류는 다양하다. 주로 흡입제나 경구제 형태로 개발되어 있는데, 증상의 발현을 예방하고 완화, 악화의 횟수와 중증도 감소, 건강 상태 향상, 운동 감내 능력 증진 등을 고려하여 다양한 약물치료가 이루어져 왔다.

[0009] 그러나, 가장 널리 사용되는 베타 아드레날린성 차단제(Beta-adrenergic blocker) 이용에 있어서 일부 환자들이

상기 약물에 반응성을 나타내지 않는 문제가 있음이 임상시에 의해 확인되고 있다.

[0010] 그러므로, 약물 내성 또는 감수성을 진단하여 과민성을 나타내는 만성폐쇄성기도질환(chronic obstructive airway disease) 치료 약물의 투여 방법 및 이를 이용한 상기 질환들의 치료방법을 결정할 수 있는 방법의 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

[0011] 이에 본 발명자들은 기관지 확장용 약물인 베타 아드레날린성 차단제의 약물 반응성과 관련된 후각수용기(Olfactory receptor) 유전자 일부를 선정하고, 로지스틱 회귀분석 및 패스웨이 분석(Pathway Enrichment)을 이용하여 베타 아드레날린성 차단제 반응이 낮은 환자군에서 후각 수용기와 관련된 유전적 변이, 특히 rs41277120 및 rs4836891의 유전적 다형성을 발굴함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 1. 한국 등록특허 10-0733695
(특허문헌 0002) 2. 한국 공개특허 10-2012-0078862
(특허문헌 0003) 3. 한국 공개특허 10-2012-0014156

비특허문헌

- [0013] (비특허문헌 0001) 1. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:S77-121.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 후각 수용체(OR) 유전자의 특정 SNP를 이용하여 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 또는 감수성 진단 및 예측을 위한 마커용 조성물 및 이의 이용을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 마커용 조성물을 이용하여 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 또는 감수성 진단 방법을 제공하는 데 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 만성폐쇄성기도질환의 치료를 위하여 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 또는 감수성에 대한 정보를 제공하는 방법 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해, 약물의 내성 또는 감수성 진단에 유전적 특성을 이용하는 것으로,

[0018] 일 구체예로서, 후각수용체 유전자 OR1J2(Olfactory receptor 1 J2)의 단일염기다형성(SNP)을 함유하는, 기관지 확장용 약물 내성 또는 감수성 진단 및 예측을 위한 마커용 조성물을 제공한다. 이 때, 상기 OR1J2의 단일염기다형성(SNP)은 rs41277120 G>A 및/또는 rs4836891 G>A SNP이다.

[0019] 상기 기관지 확장용 약물은 천식 또는 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 치료용 약물로서, 예를 들어, β 아드레날린 수용체 항진제(β -adrenoreceptor agonist), 항콜린제(Anticholinergics) 또는 잔틴제(Xantines) 등일 수 있는데, 본 발명에서 내성 또는 감수성 진단에 바람직하게 이용할 수 있는 것은 특히, β 아드레날린 수용체 항진제(β -adrenoreceptor agonist)이다.

[0020] 상기 β 아드레날린 수용체 항진제는, 비제한적으로, 예를 들어, 알부테롤(albuterol), 레발부테롤(Levalbuterol), 메타프로테레놀(metaproterenol), 테르부탈린(terbutaline), 피르부테롤(pirbuterol), 살메테롤(salmeterol) 및 포르모테로(formotero)로 구성된 군에서 선택되는 1이상의 물질일 수 있다.

[0021] 본 발명은 상기 OR1J2의 단일염기다형성(SNP)은 rs41277120 G>A 및/또는 rs4836891 G>A SNP의 존재 여부에 따

라 상기 약물의 내성 또는 감수성을 판단하여 약물 치료 방법에 활용할 수 있다.

[0023] 본 발명은 다른 구체예로서, 상기 마커용 조성물을 포함하는 기관지 확장용 약물의 내성 또는 감수성 진단 및 예측을 위한 키트를 제공한다.

[0025] 본 발명은 또 다른 구체예로서,

[0026] 기관지 확장용 약물 복용 환자에서 추출한 핵산으로부터, OR1J2의 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A 단일염기다형성(SNP)을 확인하는 단계를 포함하는, 기관지 확장용 약물의 내성 또는 감수성 진단 및 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 가장 바람직한 기관지 확장용 약물은 β 아드레날린 수용체 항진제(β -adrenoreceptor agonist)이다.

[0027] 특히, 이 때, 상기 OR1J2의 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A 단일염기다형성(SNP)이 모두 존재하는 경우 약물의 내성이 존재하거나 감수성이 낮은 것으로 판정하고, β 아드레날린 수용체 항진제가 아닌 다른 약물을 이용할 수 있는 것으로 치료법을 결정할 수 있다. 예를 들어, 만성폐쇄성기도질환의 치료를 위하여 β 아드레날린 수용체 항진제가 아닌 항콜린제를 이용하는 것이 바람직하다.

[0028] 그리고, 상기 OR1J2의 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A 단일염기다형성(SNP) 중 하나 이하로 존재하는 경우 β 아드레날린 수용체 항진제를 1차적으로만 이용할 수 있는 것으로 판정한다.

[0030] 이와 같이, 본 발명은 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성에 대한 OR1J2의 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A SNP 발현 프로파일을 이용하는, 약물 내성 또는 감수성 진단 및 예측 마커로서의 모든 용도를 포함한다.

발명의 효과

[0032] 본 발명에 따른 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 진단 기술은 만성폐쇄성기도질환 환자에 대하여 손쉽게 약물의 반응성을 평가하고, 치료법의 선별 및 평가를 위한 수단 및 치료를 표적화함으로써 만성폐쇄성기도질환의 치료율 및 생존율을 높일 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 수행한 전체적인 workflow를 도시하였다.

도 2는 만성폐쇄성폐질환 환자의 유전변이정보 추출 과정에 대한 간략한 모식도이다.

도 3은 본 발명의 방법에 따른 FASTQC로부터 얻은 리드 퀄리티 그래프이다.

도 4는 만성폐쇄성폐질환 환자148명의 시프트 점수 분포를 나타낸 것이다.

도 5 및 6은 각각 OR1J2 및 OR51E2의 회귀분석 결과, 변이빈도 분석 결과 등 구체적인 분석결과를 나타낸 것이다.

도 7은 OR1J2 유전자에 속하는 rs41277120 및 rs4836891의 정보를 나타낸 것이다.

도 8은 OR1J2 유전자에 속하는 두 변이(rs41277120, rs4836891) 존재 유무에 따른 환자군의 BDR12 분포이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0037] '유전적 다형성(genetic polymorphism)'은 인구집단에서 적어도 1% 이상의 빈도로 유전자 변이가 나타나는 경우를 말한다. DNA에서 한 개의 뉴클레오타드의 삽입, 소실, 또는 치환이 일어나는 것을 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 이라고 한다.

[0038] '다형성'이라는 용어는 군집 내에서 변하는 유전자의 서열에서의 배치를 지칭한다. 다형성은 상이한 "대립유전자"로 구성된다. 이러한 다형성의 배치는 유전자에서의 그의 위치 및 그에서 발견되는 상이한 아미노산 또는 염기에 의해 확인될 수 있다. 이러한 아미노산 변이는 2개의 상이한 대립유전자인, 2개의 가능한 변이체 염기, C 및 T의 결과이다. 유전자형은 2개의 다른 별개의 대립유전자로 구성되기 때문에, 여러 가능한 변이체 중 임의의 변이체가 어느 한 개체에서 관찰될 수 있다 (예를 들어, 이 예에서, CC, CT 또는 TT). 개개의 다형성은 또한 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들면, NCBI 웹사이트 상에서 이용가능한 뉴클레오타드 염기 변이의 단일 뉴클레

오티드 다형성 데이터베이스(Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation)에서 사용되는 것인, 지정된 독특한 식별자 ("기준 SNP", "refSNP" 또는 "rs#")이다.

- [0039] '유전자형'이라는 용어는 세포 또는 조직 샘플에서 특정 유전자의 특이적 대립유전자를 지칭한다. '표현형'은 유전형에 의해서 결정되는 개체의 형태학적, 생리학적, 또는 생화학적 특징을 표현형이라 한다. 유전형이란 표현형과 구별되는 것으로, 개인의 유전자 구성을 뜻하며, 보다 좁은 의미로는 한 유전자 위에 존재하는 대립 유전자들(alleles)을 말한다.
- [0040] '대립 인자' 또는 '대립 유전자'란 같은 염색체 위치(same chromosomal locus)를 점유하는 한 유전자의 둘 또는 그 이상의 선택적인 형태(alternative forms) 중 하나를 뜻한다. 대립유전자의 등가 유전 표지는 관심 대상의 대립유전자에 연관된 유전 표지로서, 즉, 그것은 관심 대상의 대립유전자와 연관불균형을 나타낸다
- [0041] '대립유전자 빈도'는 대립유전자가 개체 내, 계통 내, 또는 계통의 집단 내에 존재하는 빈도 (비율 또는 백분율)을 지칭한다. 계통 또는 집단 내에서의 대립유전자 빈도를, 계통 또는 집단으로부터의 개체들의 샘플의 대립유전자 빈도를 평균화함으로써 추정할 수 있다.
- [0042] '위험'은 특정 다형성 대립유전자를 보유하지 않은 개체의 구성원에서의 질환 또는 상태의 발생 빈도에 비교하여, 특정 다형성 대립유전자를 보유한 개체에서의 질환 또는 상태의 발생 빈도가 통계적으로 높음을 나타낸다.
- [0043] '핵산'은 데옥시리보핵산(DNA), 및 적절하다면 리보핵산(RNA)과 같은 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 나타낸다. 이 용어는 또한, 동등하게, 뉴클레오티드 유사체(예, 펩티드 핵산)로부터 제조된 RNA 또는 DNA 중 어느 하나의 유사체, 및, 서술된 구체예에 적용된대로, 단일(센스 또는 안티센스) 및 이중나선 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명에서는 '핵산'이라는 용어와 '뉴클레오티드'가 병용하여 쓰이고 있다.
- [0044] '프라이머'는 상보성 RNA 또는 DNA 표적 폴리뉴클레오티드에 혼성화하고 예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응에서 발생하는 뉴클레오티드트랜스퍼라제의 작용에 의해 모노뉴클레오티드로부터 폴리뉴클레오티드의 단계적 합성을 위한 출발점으로 기능하는 올리고뉴클레오티드 서열을 의미한다.
- [0045] "기능적 등가물"이라는 용어는 예를 들어, 기준(reference) 서열로부터 하나 또는 그 이상의 치환, 결실 또는 부가, 기준 서열과 실험(subject) 서열 사이의 다양한 기능적 비유사성을 낳지 않는 실제 효과(net effect) 등 변화된 돌연변이 서열의 뉴클레오티드와 핵산서열 모두를 의미한다. 바람직하게는, 뉴클레오티드 서열은 최소한 약 65%의 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 약 75%의 동일성, 가장 바람직하게는 약 95%의 동일성을 가진다. 본 발명의 목적을 위해서는, 실질적으로 등가적인 생물학적 활성과 실질적으로 등가적인 합성 특징을 가지는 서열들은 실질적 등가물로 취급된다.
- [0046] '대상' 또는 '환자'는 인간, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간을 대상으로 하였다.
- [0047] '조직 또는 세포 샘플'은 대상 또는 환자의 조직으로부터 얻은 유사한 세포의 집합체를 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고정 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다. 조직 샘플은 또한 1차 또는 배양 세포 또는 세포주일 수 있다.
- [0048] '진단'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 만성폐쇄성 기도질환 치료용 약물, 바람직하게는 기관지 확장용 약물, 특히 바람직하게는 베타 아드레날린성 차단제(Beta-adrenergic blocker)에 대한 반응성, 즉, 내성 또는 감수성을 확인하는 것이다.
- [0049] '진단용 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)'란 만성폐쇄성 기도질환 치료용 약물, 특히 바람직하게는 베타 아드레날린성 차단제에 대한 내성 또는 감수성을 정상인 경우와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 다당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다.
- [0050] '예측'이란 만성폐쇄성기도질환 환자가 베타 항진 약물 내성 보유 가능성이 있는지를 판별하고, 환자의 만성폐쇄성기도질환 치료에 적합한 방법을 선택하는 가능성과 관련된다. 본 발명의 예측 방법은 임의의 만성폐쇄성기도질환 환자에 대한 베타 항진 약물 처치에 대하여 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 예측 방법은 환자가 예를 들어 소정 치료제 또는 조합물, 화학요법

등의 투여를 비롯한 소정 치료 처방과 같은 치료 처방에 선호적으로 반응하는지를 확인하거나, 치료 처방 후 환자의 장기 생존이 가능한지 여부를 예측할 수 있다.

[0052] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0054] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0056] [기도 질환 약물]

[0057] 본 발명에서 진단하고자 하는 대상은 만성폐쇄성기도질환 환자들이 치료를 위해 사용하는 만성폐쇄성기도질환 치료용 약물의 반응성이다.

[0059] 만성폐쇄성기도질환으로 천식과 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 등을 대표적인 예로 들 수 있다. 가장 바람직하게는 만성폐쇄성폐질환을 들 수 있다. COPD는 기도 염증과 폐 실질에 폐기종성 손상을 일으켜 최종적으로 기도 폐쇄를 일으키는 질환이다.

[0060] 전 세계적으로 기관지천식의 경우 약 3억 명의 환자가 있는 것으로 추정되며 COPD의 경우 40세 이상 성인의 약 10%를 차지한다. 국내의 경우 성인 천식 유병률은 약 5% 정도이며 COPD의 경우 40세 이상 성인에서 13%를 넘고 있다.

[0061] 천식 약물 치료 요법으로는 흡입용스테로이드제를 권장하고 있다. 흡입용스테로이드는 항염증작용으로 기도염증을 조절하고 기도과민성을 호전시키며 폐기능을 개선시키는 효과가 있으며 환자의 조절 상태에 따라 흡입용스테로이드 용량을 증량하거나 흡입지속성베타-2항진제를 추가하여 사용한다. 최근 수십년 동안 흡입용스테로이드와 흡입지속성베타-2항진제 사용으로 천식환자의 사망률과 삶의 질이 향상되었으며 흡입용 약물은 천식 치료의 가장 중요한 위치를 차지하고 있다.

[0062] COPD의 경우는 약물 치료로 흡입용기관지확장제 사용을 권장하고 있다. 기관지확장제는 기도 평활근의 긴장도에 영향을 주어 폐기능을 개선 시키고 삶의 질을 호전시키고 급성악화를 줄여 주는 효과가 있다. 약물 선택은 환자 증상 및 약화력(혹은 폐기능 값)과 초치료 약물에 대한 반응 정도에 따라 기관지확장제인 흡입지속성베타-2항진제, 흡입지속성항콜린제와 항염증 약물인 흡입스테로이드를 병합하여 사용할 것을 권장하고 있다.

[0063] 그러나, 상기 약물 치료에 있어서 환자의 유전적 특징에 따라 약효가 다르게 나타날 수 있어서 만성폐쇄성기도질환의 치료가 원활히 이루어질 수 없는 경우가 있어 문제가 되어 왔다.

[0064] 본 발명은 이러한 기도 작용 약제에 대한 반응성을 진단하는 방법에 관한 것으로, 특히, 본 발명은 기관지 확장용 약물(Bronchodilator), 가장 바람직하게는 베타 아드레날린성 차단제(Beta-adrenergic blocker) 약물의 반응성, 즉, 내성 또는 감수성에 대한 판단에 대한 것이다.

[0065] 기관지 확장용 약물(Bronchodilator)로서, 이하의 약물들을 예로 들 수 있다.

[0066] (i) β 아드레날린 수용체 항진제(β -adrenoreceptor agonist)

[0067] 기도에는 α , β 아드레날린 수용체가 있으며, α 아드레날린 수용체는 기도 평활근(주로 소기도)과 점막하 점액선, β_1 아드레날린 수용체는 점막하 점액선, β_2 아드레날린 수용체는 기도 평활근, 상피세포, 미세혈관평활근, 내피세포에 분포한다. 대부분의 베타 항진제는 모든 기도 평활근의 β_2 수용체에 작용하여 이완 작용을 한다.

[0068] 아드레날린 수용체를 자극하면 기도 평활근을 이완시키고, 점막하 점액선의 점액 분비와 상피세포의 수분 이동을 증가시키며, 혈관 내피 세포에서 백혈구 유착을 억제하고, 조직 염증의 특징인 미세혈관투과성을 감소시킨다. 또한 부교감신경절에서 신경 전달을 억제하여 미주신경(기도 수축과 기도 과분비)의 반대작용을 한다.

[0069] β 아드레날린 수용체 항진제는 기도 평활근에 직접 작용하여 기도 평활근을 이완시킴으로써 기도를 확장시킨다. 기도 평활근에는 다량의 β_2 -adrenergic receptor를 갖고 있어서 이 수용체를 자극하면 adenylyl cyclase를 활성화시켜서 세포내 cyclic AMP를 증가시키고, muscle tone을 감소시키게 된다. 또한 기도 근세포의 K channel 전도를 증가시켜서 막내 과다분극(membrane hyperpolarization)과 이완을 유도한다. 따라서 호흡기

질환에서의 베타 아드레날린 수용체 항진제를 사용하는 경우에는 선택적 $\beta 2$ 아드레날린 수용체 항진제를 사용한다.

- [0070] $\beta 2$ 아드레날린 수용체 항진제는 효과 발현 시간에 따라 속효성(short-acting[10분 이내]), intermediate-acting[3~6시간], 그리고 지속형(long-acting[12시간 이상])으로 분류한다. 투여 경로에 따라 국소적(흡입제) 또는 전신적(주사, 경구제제)으로 투여할 수 있으며, 약제의 발현 시간과 지속 시간 등을 고려하여 환자에 따라 선택하여야 한다. 그러나 β 아드레날린 수용체 항진제를 장기간 사용 시에는 베타 수용체 단백질의 감수성 저하로 내성이 발생할 수 있다.
- [0071] - 속효성 $\beta 2$ -adrenoreceptor agonist(SABA)
- [0072] 기도 수축시에 급성 증상 완화를 목적으로 사용하며, albuterol(Porventil, ventolin), Levalbuterol(Xopenex, the (R)-enantiomer of albuterol), metaproterenol(Albuterol), terbutaline(Brethaire), pirbuterol(Maxair) 등이 이에 속한다. 주로 흡입제로 사용하며, terbutaline(Brethine, Bricanyl), albuterol, metaproterenol 등은 경구용 제제로도 사용이 가능하다.
- [0073] - 지속성 $\beta 2$ -adrenoceptor agonist(LABA)
- [0074] Salmeterol과 formoterol이 있으며, 흡입시 지속적인 기관지 확장 효과가 있어 12시간 이상 지속된다. 지속성 $\beta 2$ -adrenoceptor agonist의 지속적인 사용은 폐기능을 증가시키고, 천식 증상을 감소시키며, 속효성 $\beta 2$ -adrenoceptor agonist의 사용을 줄일 수 있다.
- [0076] (ii) 항콜린제(Anticholinergics)
- [0077] 아트로핀(atropine), 이프라트로피움 브로마이드(ipratropium bromide) 등이 이에 속한다. 이 약제들은 베타 아드레날린 수용체 항진제와 비교하여 심장 자극 효과가 적고, 병합하여 사용 시에는 기관지 확장 효과가 더 좋은 것으로 알려져 있다. COPD 환자에서는 기관지 확장제로서 베타 아드레날린 수용체 항진제보다 더 선호된다.
- [0078] 무스카린 수용체 길항제는 아트로핀은 중추 신경, 말초 신경절과 평활근, 심근 등의 neuroeffector 부위에서 무스카린 수용체에 경쟁적으로 작용하여 아세틸콜린의 결합을 막는 작용을 한다. 따라서 기도내의 분비를 억제하고 기도 점막을 건조시키는 작용이 있다. 아트로핀은 특히 메타콜린 등의 부교감신경 항진제에 의한 기관지 수축에 효과적이다. 4차 항콜린성 약제인 이프라트로피움 브로마이드는 경구 투여 후 흡수가 안되므로 비경구적으로 투여한다.
- [0080] (iii) 잔틴제(Xantines)
- [0081] Xanthine 유도체인 theophylline과 ethylene diamine 염인 aminophylline이 있다. Theophylline은 비선택적으로 세포내의 phosphodiesterase(PDE)를 억제시킴으로써 cAMP와 cGMP를 증가시켜 기도 평활근을 이완시킨다. 또한 adenosine 수용체의 길항제로 작용하여 adenosine에 의한 히스타민과 류코트리엔 분비를 억제함으로써 기도 확장작용을 한다. Theophylline은 IL-5로 자극된 호산구의 세포자멸사를 증가시키고 호산구대사물질인 ECP나 EDN의 유리를 억제하는 등의 면역 조절 능력이 있으며, 세포막 칼슘 통로에 영향을 주어서 횡격막 근육의 수축력을 증가시키고 피로를 감소시키며 점막 섬모 청소율을 증가시키는 효과가 있다.
- [0083] 본 발명의 만성폐쇄성기도질환 치료 약물은 비제한적으로, 상기 기관지 확장용 약물을 포함하고, 가장 바람직한 예로서 β 아드레날린 수용체 항진제(β -adrenoreceptor agonist) 약물을 포함한다. 본 명세서에서 상기 β 아드레날린 수용체 항진제는 베타 항진 약물로 간단히 언급하기도 한다.
- [0084] 본 발명은 이러한 기관지 확장용 베타 항진 약물의 내성 또는 감수성 진단에 유전적 특성을 이용하는 것을 특징으로 한다.
- [0085] 약리개념학의 발전에 따라, 약물 내성 또는 감수성이 특정의 유전자와 관련되어 있을 수 있음이 밝혀졌고, 이에 환자에 있어서의 약물 반응성 관련 유전자의 검출이 그 환자의 약물 치료 방법 및 이의 효율성을 평가함에 유용한 접근 방식이 된다.
- [0086] 특히, 본 발명의 베타 항진 약물의 내성 또는 감수성 진단에 이용하는 유전적 특성 및 메커니즘은 다음과 같다.
- [0087] PNECs(pulmonary neuroendocrine cells, 폐신경 내분비 세포)는 인간 기도에서 화학적센서 세포(chemosensory cells)로 활용되는데, PNECs는 기도의 상피(airway epithelium)에 존재하면서 직간접적으로 기도(airway)의 흡입물(volatile)에 대한 반응을 조절한다. 특히, PNECs는 후각수용체(olfactory receptor, OR) 패밀리들이 이들

PNECs에서 발현되는데, 기도 상피에서 PNECs가 기도 흡입물에 반응하여 세로토닌 수준을 감소시키고 기저층(basal medium)에서 CGRP(neuropeptide calcitonin gene-related peptide)를 분비토록 하고, 상기 세로토닌(5-TH)이 기관지 수축에 관여한다. 이를 통해, PNECs의 자극이 폐 상피세포를 자극시킬 수 있는 인자들의 분비를 촉진시킴을 알 수 있고, 이러한 세로토닌 및 CGRP이 만성폐쇄성기도질환에 영향을 끼치므로, 이러한 PNECs-의존성 화학반응성을 이용하여 상기 질환에서의 흡입물 자극원에 대한 민감도를 파악할 수 있다.

- [0088] 본 발명자들은 PNECs(pulmonary neuroendocrine cells, 폐신경 내분비 세포)가 직접적으로 흡입물에 대한 기도의 생리학적 반응을 인지하고 매개함을 규명하고, 기도의 과민반응 치료에 있어서 주요 분자 및 세포성 타겟을 찾아냈다. PNECs의 활성 수준 또는 이에 의한 기도 세포의 반응성이 기도 내 후각 과민성에 영향을 끼치는 메커니즘에 기반하여, COPD 환자가 활성화된 OR에 의해 분비된 CGRP에 따라 내분비성 수용체 수준 및 흡입된 물질에 대한 민감도를 증가시킴을 확인하였다. 특히, 기도 상피세포에 발현하는 후각 수용체의 직접적 활성을 통해 매개되는 어떠한 화합물에 대한 유전적 관계성을 파악하였다.
- [0089] 따라서, 본 발명은 이러한 관계성을 기반으로 베타 항진 약물에 대한 내성 또는 민감도(감수성)를 판단할 수 있는 유전자의 다형성을 주요한 특징으로 한다.
- [0091] 일 관점에서, 본 발명은 특정 후각수용기(Olfactory receptor, OR) 유전자의 다형성을 이용한, 베타 항진 약물 내성 진단 및 예측 마커로서의 용도에 관한 것으로, OR 유전자의 특정 SNP가 베타 항진 약물 내성 또는 감수성과 관련되어 있음을 처음으로 규명하였다. 상기 내성 또는 감수성은 베타 항진 약물 내성의 진행(progression), 재발(Recurrence) 및 전이(metastasis)를 포함한다.
- [0092] 그러므로, 본 발명은 일 관점에서 OR 유전자의 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 또는 감수성의 진단 마커로서의 용도에 관한 것이다.
- [0093] 구체적으로, 직간접적으로 기도(airway)의 흡입물(volatile)에 대한 반응을 조절하는 PNECs(pulmonary neuroendocrine cells)에서 발현하는 OR 유전자의 단일염기다형성(SNP)의 베타 항진 약물 내성 또는 감수성 진단 및 예측 용도 및 이의 이용에 관한 것이다. 특히, 가장 바람직하게는 OR51E2 및 OR1J2의 유전자에 존재하는 유전자 변이 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A의 이용에 관한 것이다.
- [0094] 특히, 본 발명에서는 PCR법을 이용하여 기도 평활근(airway smooth muscle:ASM)에서 발현하는 후각수용기(Olfactory receptor, OR) 유전자 OR51E2, OR2A1, OR1J1, OR1J2, OR6A2를 우선 선별한 후, OR51E2 및 OR1J2의 유전자에 존재하는 유전자 다형성 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A를 발굴하였다.
- [0095] 상기 OR(Olfactory receptor) 단백질은 공지된 것, 예를 들면 공지된 인간 유래의 서열을 공지된 DB로부터 취득할 수 있는데, 이로 한정하는 것은 아니며, 이의 기능적 동등체를 포함하는 것이다.
- [0096] 유의성 있는 진단 마커의 선택과 적용은 진단 결과의 신뢰도를 결정짓는다. 유의성 있는 진단 마커란, 진단하여 얻은 결과가 정확하여 타당도(validity)가 높고 반복 측정시에도 일관된 결과를 나타내도록 신뢰도(reliability)가 높은 마커를 의미한다. 본 발명의 베타 항진 약물 내성 또는 감수성 진단 마커는, 기도 질환, 바람직하게는 만성폐쇄성 기도질환, 예를 들어 만성폐쇄성폐질환(COPD) 또는 만성 천식 질환 치료에 사용되는 베타 아드레날린성 항진 약물의 내성 또는 감수성 둔화와 함께 직접적 또는 간접적 요인으로 발현이 변화하는 유전자들로 반복된 실험에도 동일한 결과를 나타내며, 발현 수준의 차이가 대조군과 비교할 때 매우 커서 잘못된 결과를 내린 확률이 거의 없는 신뢰도가 높은 마커들이다. 그러므로 본 발명의 유의성 있는 진단 마커의 발현 정도를 측정하여 얻은 결과를 토대로 진단된 결과는 타당하게 신뢰할 수 있다.
- [0098] 본 발명자들은 만성폐쇄성폐질환(COPD) 148명의 환자를 대상으로, 유전체를 시퀀싱하고 유전변이정보를 추출하여 시프트 점수(Sort Intolerant From Tolerant, SIFT)를 이용한 유전변이의 유해성을 산출하였다. 그리고 베타 아드레날린성 차단제 반응성에 영향을 미치는 유전변이를 찾기 위해 로지스틱 회귀분석을 한 후, 패스웨이 분석(Pathway Enrichment)을 수행하였다. 본 발명의 일 실시예에서 수행한 전체적인 workflow를 도 1에 도시하였다.
- [0099] 분석 결과, 베타 아드레날린성 차단제 반응성이 낮은 환자군에서 후각수용기(Olfactory receptor) 관련 패스웨이에 포함된 유전자들에 유전변이를 많이 가지는 것으로 확인하였다.
- [0100] 특히, OR1J2 후각수용체 유전자의 두 유전 변이인 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A 다형성을 모두 가진 환자군이 두 유전변이 중 하나의 변이만 가진 환자군이나 두 변이 모두 가지지 않는 환자군에 비해 베타아드레날린성 차단제 반응성이 낮은 것을 알 수 있었다.

- [0101] 따라서, 본 발명의 OR1J2의 rs41277120 G>A 및/또는 rs4836891 G>A SNP는 만성폐쇄성기도 질환 치료용 베타 항진 약물에 대하여 독립적인 내성 또는 감수성 마커로 볼 수 있으므로, 이에 대한 분석은 베타 항진 약물 내성 또는 감수성에 대한 위험을 가진 환자 그룹을 판별하는데 도움을 주어, 베타 항진 약물 내성의 치료적 결정에 도움을 줄 수 있다.
- [0103] 본 발명의 일 구체예에로서, OR 유전자의 상기 다형성 부위를 포함하는, 만성폐쇄성기도 질환 치료용 약물의 내성 또는 감수성 예측(진단)용 마커 및 이를 포함하는 마커용 조성물에 관한 것이다.
- [0104] 본 발명은 OR1J2 후각수용체 유전자를 코딩하는, 서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 있으며, 본 발명에서 상기 OR rs41277120 G>A SNP는 서열번호 1로 이루어진 폴리뉴클레오티드에서 355번째 염기가 G 또는 A일 수 있고, rs4836891 G>A SNP는 서열번호 1로 이루어진 폴리뉴클레오티드에서 494번째 염기가 G 또는 A일 수 있다.
- [0105] 본 발명에 따른 상기 마커용 조성물은 서열번호 1로 이루어진 폴리뉴클레오티드의 355번째 염기 또는 494번째 염기를 포함하는 10~100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드; 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진, 베타 항진 약물의 내성 또는 감수성 예측용 마커 및 이를 포함하는 마커용 조성물이다.
- [0106] 본 발명에 따른 상기 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드는 10개 이상, 바람직하게는 10 내지 100개, 보다 바람직하게는 10 내지 50개의 연속 염기로 구성될 수 있다.
- [0107] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드는 다형성 서열(polymorphic sequence)이다. 다형성 서열(polymorphic sequence)이란 뉴클레오티드 서열 중에 단일염기다형을 나타내는 다형성 부위(polymorphic site)를 포함하는 서열을 말한다. 다형성 부위(polymorphic site)란 다형성 서열 중 단일염기다형이 일어나는 부위를 말한다.
- [0108] 단일염기다형성은 유전자의 코딩 서열, 유전자의 비-코딩 부위 또는 유전자 사이의 내부 지역(intergenic regions)에 포함될 수 있다. 유전자의 코딩 서열 내의 SNP는 유전암호의 중복성(degeneracy)으로 인해 반드시 타겟 단백질의 아미노산 서열 상에 변화를 일으키지는 않는다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고(침묵 돌연변이라고도 불리움), 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP의 경우 비-동의적(non-synonymous)이라고 한다. 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넌센스일 수 있으며, 미스센스 변화는 다른 아미노산을 발생시키는 반면에 넌센스 변화는 비성숙 종결코돈을 형성한다. 단백질-코딩 부위가 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발시킬 수 있다.
- [0109] 본 발명에서는, OR1J2 유전자에 속하는 두 변이 rs41277120 및 rs4836891에 대한 유전적 접근까지 확장한다.
- [0111] 본 발명의 SNP의 유전자형의 확인은 시퀀싱 분석, 자동염기서열분석기를 사용한 시퀀싱 분석, 파이로시퀀싱(pyrosequencing), 마이크로어레이에 의한 혼성화, PCR-RELP법 (restriction fragment length polymorphism), PCR-SSCP법 (single strand conformation polymorphism), PCR-SSO법 (specific sequence oligonucleotide), PCR-SSO법과 도트 하이브리드화법을 조합한 ASO (allele specific oligonucleotide) 하이브리드화법, TaqMan-PCR법, MALDI-TOF/MS법, RCA법 (rolling circle amplification), HRM (high resolution melting)법, 프라이머 신장법, 서던 블롯 하이브리드화법, 도트 하이브리드화법 등의 공지된 방법에 의하여 수행될 수 있다.
- [0112] 나아가, 상기 SNP 다형성의 결과들은 당업계에서 일반적으로 사용되는 통계학적 분석 방법을 이용하여 통계처리할 수 있으며, 예를 들면, 스튜던트 t-검정(Student's t-test), 카이-스퀘어 테스트(Chi-square test), 선형 회귀선 분석(linear regression line analysis), 다변량 로지스틱 회귀분석 (multiple logistic regression analysis) 등을 통해 얻은 연속 변수 (continuous variables), 절대 변수 (categorical variables), 대응비(odds ratio) 및 95% 신뢰구간 (confidence interval) 등의 변수를 이용하여 분석할 수 있다.
- [0113] 본 발명의 만성폐쇄성 기도 질환, 바람직하게는 만성폐쇄성폐질환(COPD) 또는 만성 천식 치료용 약물, 즉, 기관지 확장용 약물, 예를 들어 베타 항진 약물 또는 항콜린성 약물 등에 대한 내성 또는 감수성 예측(진단)용 마커 및 이를 포함하는 마커용 조성물에 포함되는, 상기 SNP를 검출할 수 있는 체계는, 서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서 상기의 rs41277120 G>A 및/또는 rs4836891 G>A SNP를 포함하는 10~100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 이의 상보적 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드와 특이적으로 혼성화하는 프라이머 및 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 것을 포함할 수 있다.
- [0114] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드와 특이적으로 혼성화하는 프라이

며 또는 프로브는 대립형질 특이적 (allele-specific) 이다.

- [0115] 대립형질 특이적 (allele-specific) 이란 각 대립형질에 특이적으로 혼성화하는 것, 즉, 다형성 서열 중에 존재하는 다형성 부위의 염기를 특이적으로 구별할 수 있도록 혼성화하는 것을 말한다. 여기에서, 혼성화란 보통 엄격한 조건, 예를 들어 1M 이하의 염 농도 및 25 °C 이상의 온도 하에서 보통 수행될 수 있다.
- [0116] 본 발명에 있어서, 프로브는 혼성화 프로브를 의미하는 것으로, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 혼성화 조건은 대립형질 간의 혼성화 강도에 있어서 유의한 차이를 보여 대립형질 중 하나에만 혼성화되도록 충분히 엄격해야 한다. 이러한 본 발명의 프로브는 중앙 부위가 다형성 서열의 다형성 부위와 정렬하는 것이 바람직하다. 이에 따라 서로 다른 대립형질성 형태 간에 좋은 혼성화 차이를 유발할 수 있다. 상기 프로브는 대립형질을 검출하여 약물의 내성 또는 감수성을 예측하기 위한 마이크로어레이 등의 키트나 예측 방법 등에 사용될 수 있다. 중요한 프로브는 검출할 수 있도록 표지될 수 있으며, 예를 들면 방사선 동위원소, 형광 화합물, 바이오 발광 화합물, 화학 발광 화합물, 금속 킬레이트 또는 효소로 표지될 수 있다. 상기와 같은 프로브를 적당하게 표지하는 것은 당해 분야에서 널리 알려진 기술이며, 통상적인 방법을 통하여 수행할 수 있다.
- [0117] 본 발명에 있어서, 프라이머는 짧은 자유 3' 말단 수산화기 (free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트 (template)와 염기쌍 (base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 15 내지 30개의 염기로 구성된다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다. 상기 프라이머는 다형성 부위를 포함하는 DNA 서열에 혼성화하여 다형성 부위를 포함하는 DNA 단편을 증폭시킬 수 있다. 본 발명의 프라이머는 대립형질을 검출하여 약물 내성 또는 감수성을 예측하기 위한 마이크로어레이 등의 키트나 예측 방법 등에 사용될 수 있다.
- [0118] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0119] 상기 방법을 이용하여, 본 발명에서는 OR1J2 후각수용체 유전자 서열 중 특정의 위치에서의 유전형을 확인함으로써 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A SNP 보유 여부 또는 존재 여부를 결정할 수 있다. 그리고 이들의 존재는 기관지 확장용 약물의 내성 또는 감수성의 판단 기준이 될 수 있다.
- [0120] 따라서, 임의의 이용 가능한 방법에 의한 이러한 SNP 마커의 검출이 진단 목적, 예컨대, 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 아드레날린 항진 약물의 내성 또는 감수성에 대한 검출, 그리고 이를 이용하는 환자에 대한 만성폐쇄성 기도질환 치료법을 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0122] 상기 방법에 의한 본 발명의 또 다른 측면은 약리제놈학 프로파일링의 방법이다. "약리제놈학 프로파일링은 질병 또는 의학적 상태, 특히 약물에 대한 부작용이나 반응성과 관련된, 대상자(subject)에 존재하는 유전 인자의 결정을 의미한다.
- [0123] 이 방법은 rs41277120 G>A 및/또는 rs4836891 G>A SNP 존재를 결정하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 필요에 따라 다른 유전 인자(genetic factor)의 결정을 포함할 수 있다. 그러한 다른 유전 인자는 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 아드레날린 항진 약물의 내성 또는 감수성을 포함하는 어떤 질병 또는 의학적 상태의 소인과도 관련될 수 있다.
- [0125] 본 발명은 다른 구체예로서 상기 조성물을 포함하는 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 또는 감수성 예측용 마이크로어레이에 관한 것이다.
- [0126] 상기 마이크로어레이는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 마이크로어레이로 이루어질 수 있다.
- [0127] 마이크로어레이 상에서의 핵산의 혼성화 및 혼성화 결과의 검출은 당업계에 잘 알려져 있다. 상기 검출은 예를 들면, 핵산 시료를 형광 물질, 예를 들면, Cy3 및 Cy5와 같은 물질을 포함하는 검출가능한 신호를 발생시킬 수 있는 표지 물질로 표지한 다음, 마이크로어레이 상에 혼성화하고 상기 표지 물질로부터 발생하는 신호를 검출함

으로써 혼성화 결과를 검출할 수 있다.

- [0128] 상기 마이크로어레이(Microarray) 방법은 종양 내의 수천 또는 심지어 수만 개의 유전자의 RNA 발현을 동시에 연구할 수 있어, 인간 질병의 분자적 기초에 대한 포괄적 통찰력을 보다 효과적으로 얻을 수 있게 해준다. 또한, 이를 이용하여 종양 분류에서의 유전자 발현 패턴, 임상학적 결과 및 화학적 치료요법에 대한 반응의 평가가 가능하다.
- [0130] 유사한 관점에서 본 발명은 또 하나의 예로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 또는 감수성 예측용 키트에 관한 것이다.
- [0131] 본 발명의 키트는 내성 또는 감수성의 예측용 마커인, OR1J2의 rs41277120 G>A 및/또는 rs4836891 G>A 다형성 부위(SNP)를 확인함으로써 기관지 확장용 약물의 내성 또는 감수성을 예측하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 기관지 확장용 약물 내성 또는 감수성의 예측용 키트에는 OR1J2의 rs41277120 G>A 및/또는 rs4836891 G>A의 SNP를 확인하기 위한 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0132] 일 양태로서, 본 발명의 키트는 PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. PCR 키트는, 상기 SNP에 대한 특이적인 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수 (DEPC-water) 및 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0134] 한편, 본 발명은 다른 관점에서, 상기 발견에 기초하여 OR1J2 후각수용체 유전자의 rs41277120 G>A 및/또는 rs4836891 G>A SNP 발현수준 및/또는 변이, 바람직하게는 프레임 시프트 변이를 측정하는 것을 포함하는, 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 또는 감수성 진단 및 예측 방법 또는 이를 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0135] 상기 방법은 또한, 베타 항진 약물의 내성을 방지를 위한 물질 등의 개발에도 유용한 정보를 제공한다.
- [0137] 일 구체예로서, 본 발명의 방법은
- [0138] 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 OR1J2 유전자의 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A SNP 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A SNP 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 정상 대조군 시료의 해당 유전자의 발현과 비교하는 단계를 포함하는 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 또는 감수성 진단 및 예측을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [0139] 이 때, 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서의 OR1J2 유전자의 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A SNP 발현이 모두 나타나는 경우 베타 항진 약물에 대해 내성이 있거나 감수성이 낮은 것으로 판별하고, 두 변이 중 하나만 나타나거나 모두 나타나지 않는 경우, 베타 항진 약물을 1차적으로만 처치할 수 있는 것으로 판별한다.
- [0140] 즉, rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A SNP 발현이 모두 나타나는 경우에는, 약물 내성으로 인해 만성폐쇄성기도 질환의 치료를 위하여 베타 항진 약물이 아닌 다른 약물을 처치하여야 한다. 예를 들어 항콜린성 약물을 대신 처치할 수 있다.
- [0141] 상기 진단방법은, 특히 베타 항진 약물 내성에 따른 특정 마커의 발현 특징을 조사하는 것에 관한 것이고, 본 명세서에 개시된 방법은 베타 항진 약물 내성 환자 치료를 위해 적절하거나 효과적인 요법을 평가할 때 유용한 데이터 및 정보를 얻기 위한 편리하고, 효율적이며, 비용 효과적인 수단을 제공할 수 있을 것이다.
- [0142] 환자의 핵산은 이들 만성폐쇄성기도질환 환자, 바람직하게는 만성폐쇄성폐질환(COPD) 환자로부터 획득한 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨 등의 시료로부터 수득할 수 있으며, 가장 바람직하게는 전혈로부터 수득한다. 이 때, 상기 핵산 시료는 DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA를 포함한다.
- [0143] 본 발명은, 또한, 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성을 판별하여 필요한 베타 항진 약물 투여방법 결정을 위한 정보를 제공할 수 있다.
- [0144] 즉, 본 발명은 베타 항진 약물 내성 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 OR1J2 유전자의 rs41277120 G>A 및 rs4836891 G>A SNP 발현의 다형성을 확인하여 내성 또는 감수성이 나쁜 경우와 그렇지 않은 경우에 따라 투여할 약물의 종류, 양 및 농도 등 항암제 투여 방법을 적합하도록 적용할 수 있다.
- [0145] 이처럼, 본 발명에서는 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 내성에 대한 OR1J2 rs41277120

G>A 및 rs4836891 G>A SNP 발현 프로파일을 이용하는, 약물 내성 또는 감수성 진단 및 예측 마커로서의 모든 용도를 포함한다.

[0146] 그러므로 본 발명에 따른 기관지 확장용 약물, 바람직하게는 베타 항진 약물 내성 또는 감수성의 예측 기술은 만성폐쇄성기도질환 환자에 대하여 손쉽게 환자의 베타 항진 약물의 내성 또는 감수성을 평가하고, 치료법의 선별 및 평가를 위한 수단 및 치료를 표적화함으로써 만성폐쇄성기도질환, 바람직하게는 만성폐쇄성폐질환(COPD) 환자의 생존율을 높일 수 있다.

[0148] [실시예]

[0149] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0150] 달리 지시되지 않는 한, 핵산은 좌측에서 우측으로 5'→3' 배향으로 기록된다. 명세서 내에서 열거된 수치 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함하고, 정의된 범위 내의 각각의 정수 또는 임의의 비-정수 분획을 포함한다.

[0151] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 테스트하기 위한 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에서 기술된다.

[0153] **실시예 1 : 만성폐쇄성폐질환환자 유전적 정보 수득**

[0154] 1-1. 환자의 유전체 시퀀싱

[0155] 148명의 만성폐쇄성폐질환환자의 혈액으로 부터 채취한 디옥시리보핵산(Deoxyribonucleic acid, DNA)을 차세대 시퀀싱 기술(Next generation sequencing, NGS)을 통해 환자의 전체 엑솜 유전정보를 담고 있는 염기서열 정보를 얻었다.

[0157] 1-2. 환자의 유전변이정보 추출

[0158] 1-1의 시퀀싱 결과로 얻게되는 FASTQ 파일을 여러 단계의 처리과정을 거쳐 환자의 유전변이정보를 담고 있는 파일의 포맷인 VCF(Variant call format)파일로 변환하였다.

[0159] 변이정보 추출과정의 간단한 모식도를 도 2에 도시하였다.

[0160] 간략히 설명하면, FASTQ 파일을 FASTQC 프로그램을 이용하여 시퀀싱 리드의 퀄리티를 확인하였으며 결과로 얻어진 그래프를 통해 전체적인 리드의 깊이와 퀄리티를 확인한 후(도 3), 깊이가 낮은 리드나 퀄리티가 낮은 리드들을 제거하는 과정을 진행하였다.

[0161] 다음 단계로 UCSC genome browser에서 제공하는 참조유전체(reference genome)인 hg19 인간참조유전체서열(Human reference genome sequence) 데이터를 기준으로 리드를 정렬하는(alignment) 과정을 BWA 프로그램을 이용하여 진행하여 결과파일인 SAM 파일을 얻었다. Samtools 프로그램을 이용하여 SAM 파일을 BAM파일로 변환하고 시퀀싱 과정에서 발생할 수 있는 중복리드(PCR duplicates)를 제거하는 과정을 거쳐 최종 VCF 파일을 얻었으며, 결과로 얻은 VCF 파일에는 전체 엑솜영역에서 각 환자가 가지고 있는 유전변이에 대한 정보가 포함되어 있다. 염색체번호, 서열위치, 유전변이 변화정보 등이 이에 해당하게 된다.

[0163] 1-3. 유전변이의 유해성 산출

[0164] 1-2에서 얻은 유전변이가 실제 유전자 기능에 영향을 미치는 정도를 시프트 점수(Sort Intolerant From Tolerant, SIFT)를 이용하여 반영하였다. 만성폐쇄성폐질환 환자 148명의 시프트 점수 분포를 도 4에 도시하였다.

[0165] 시프트 점수는 유전체 서열상의 한 염기의 변화가 유전자(단백질)의 아미노산 구성을 변화시켜 유전자 기능에 미치는 정도를 0부터 1까지의 숫자로 반영하는 점수로 이를 반영하여 만성폐쇄성폐질환 환자들이 가지는 유전변이의 유해성을 산출하였다.

[0167] **실시예 2 : 로지스틱 회귀분석**

[0168] 만성폐쇄성폐질환 환자에서의 베타 아드레날린성 차단제 반응성에 영향을 미치는 유전변이를 찾기 위해 로지스틱 회귀분석을 사용하였다.

[0169] 베타 아드레날린성 차단제 처리 후 1초간 노력한 호기량(FEV1)값이 처리 전에 비해 12 퍼센트 이상 향상하였는 지를 나타내는 값인 BDR12값을 종속변수로 사용하였으며 독립변수로는 환자의 나이, 성별, 갑연(1년 동안 하루 한 갑씩 담배를 피웠을 때를 기준으로 하는 담배소비량, Pack year/PY), 그리고 앞서 3에서 산출한 유전변이의 유해성점수를 사용하였다. 모델은 아래와 같다.

$$\ln \left[\frac{y_{BDR12}}{(1 - y_{BDR12})} \right] = \beta_0 + \beta_{age} X_{age} + \beta_{sex} X_{sex} + \beta_{PY} X_{PY} + \beta_{SNV} X_{SNV}$$

[0170]

[0172] 실시예 3 : 패스웨이 분석(Pathway Enrichment)

[0174] 로지스틱 회귀분석의 결과로 얻은 p-value 값이 0.05 이하인 유전변이들을 추출하여 해당 유전변이들이 속한 유전자들을 대상으로 패스웨이 분석을 시행하였다.

[0175] 분석을 위해 사용된 데이터베이스는 KEGG, Reactome 데이터베이스이며, 통계프로그램인 R을 통해 분석을 시행하였다. 분석의 결과로 베타 아드레날린성 차단제 반응성이 낮은 환자군에서 후각수용기(Olfactory receptor) 관련 패스웨이에 포함된 유전자들에 유전변이를 많이 가지는 것으로 확인하였다.

[0176] [표 1] Gene list (variant regression p-value < 0.05 and within GPCR pathway)

Chr	Pos	Rs id	Ref	Alt	SIFT	p-value (regression)	OR	GeneSymbol
1	156907115	rs63387061	T	C	0.04	0.007	3.258	ARHGEF11
1	248436611	rs10888338	G	A	0	0.011	2.863	OR2T33
11	5462374	rs16930982	C	T	0.01	0.015	2.341	OR51I1
11	5443969	rs58283839	A	C	0	0.018	2.281	OR51Q1
15	86123988	rs4075254	G	A	0.04	0.025	2.493	AKAP13
11	58170374	rs12280114	T	C	0	0.026	2.321	OR5B3
3	56771251	rs3772219	A	C	0.04	0.032	2.174	ARHGEF3
1	158368964	rs61818749	C	T	0	0.046	2.159	OR10T2

[0177]

[0179] [표 2] Gene list (genescore regression p-value < 0.05 and within GPCR pathway)

GeneSymbol	p-value (regression)	OR (regression)
OR2T33	0.004	0.317
OR5D16	0.007	0.004
OR51I1	0.007	0.309
ARHGEF11	0.009	0.193
OR51Q1	0.010	0.161
CCR6	0.012	0.002
PTH1R	0.020	0.351
ARHGEF3	0.023	0.201
HTR1A	0.027	0.084
HCRT1	0.033	0.023
KNG1	0.039	0.340
OR5M8	0.041	0.088
AKR1B10	0.042	0.129
LPAR1	0.042	0.134
ARHGEF4	0.045	0.087

[0180]

[0181] [표 3] Gene list (genescore regression p-value < 0.05 and within Systemic lupus erythematosus pathway)

GeneSymbol	p-value (regression)	OR (regression)
H2BFM	0.030	0.439
HIST1H2AK	0.039	0.391

[0182]

[0183] [표 4] Gene list (genescore genescore regression p-value < 0.05 and within ECM organization pathway)

GeneSymbol	p-value (regression)	OR (regression)
LAMA4	0.017	9.268
FBLN2	0.031	4.268
BCAN	0.033	8.891
VCAN	0.038	9.806
LAMA3	0.039	4.456
COL4A2	0.040	8.438

[0184]

[0185] 이와 같은 로지스틱 회귀분석 결과 $p < 0.05$ 를 만족하며 후각수용기 패스웨이군에 속하는 유전자 목록을 다음에 나타내었다.

[0186] [표 5]

GeneSymbol	p-value (regression)	OR (regression)	From KEGG	From Reactome
OR51E2	0.008	55.806	O	O
OR5B12	0.014	48.470	O	O
OR2D3	0.024	2.818	O	O
OR51V1	0.037	2.220	O	O
OR1L1	0.038	3.259	O	O
OR1J2	0.038	2.506	O	O
OR2AK2	0.042	2.570	O	O

[0187]

[0188] 즉, OR1J2 및 OR51E2 내 변이들의 모든 가능한 조합들로 로지스틱 회귀분석한 결과로 다음의 결과를 획득하다.

Gene	#variant combinations (p < 0.05)
OR1J2	1 (rs41277120, rs4836891)
OR51E2	0

[0189]

[0190] 구체적인 OR1J2 분석결과를 도 5에, OR51E2 분석결과를 도 6에 도시하였다.

[0192] **실시예 4 : 베타 아드레날린성 차단제 반응성이 낮은 환자군에서의 후각수용기의 유전변이 확인**

[0193] 패스웨이 분석 결과로 베타 아드레날린성 차단제 반응이 낮은 환자군에서 후각 수용기와 관련된 유전변이들이 많이 존재하는 것을 확인하였다. 만성폐쇄성폐질환 환자의 치료에 주로 사용되는 약물인 베타아드레날린성 차단제가 타겟하는 베타아드레날린성수용체(Beta adrenergic receptor, BDR)와 후각수용기의 작용 메커니즘이 유사한 것을 기존 문헌을 통해 확인하였으며 인간 폐의 평활근(Lung smooth muscle)에서 OR51E2, OR2A1, OR1J1, OR1J2, OR6A2 후각 수용기 유전자의 발현이 근 수축과 연관이 있다고 보고된 최근 문헌(J Huang, et al)을 수집하였다.

[0194] 앞서 시행한 로지스틱 회귀 분석 결과를 통해 유전자 OR1J2 후각수용기 유전자 내의 rs41277120과 rs4836891 유전변이를 둘 다 가지는 환자군이 두 변이 중 하나의 변이만 가지는 환자군보다 베타 아드레날린성 차단제 반응성이 낮으며 두 변이 모두 가지지 않는 환자군에서는 하나의 변이만 가지는 환자군 보다 베타 아드레날린성 차단제 반응성이 높은 것을 확인하였다. OR1J2 유전자에 속하는 rs41277120, rs483689를 모두 가진 환자군이 두 유전변이 하나의 변이만 가진 환자군이나 두 변이 모두 가지지 않는 환자군에 비해 베타아드레날린성 차단제

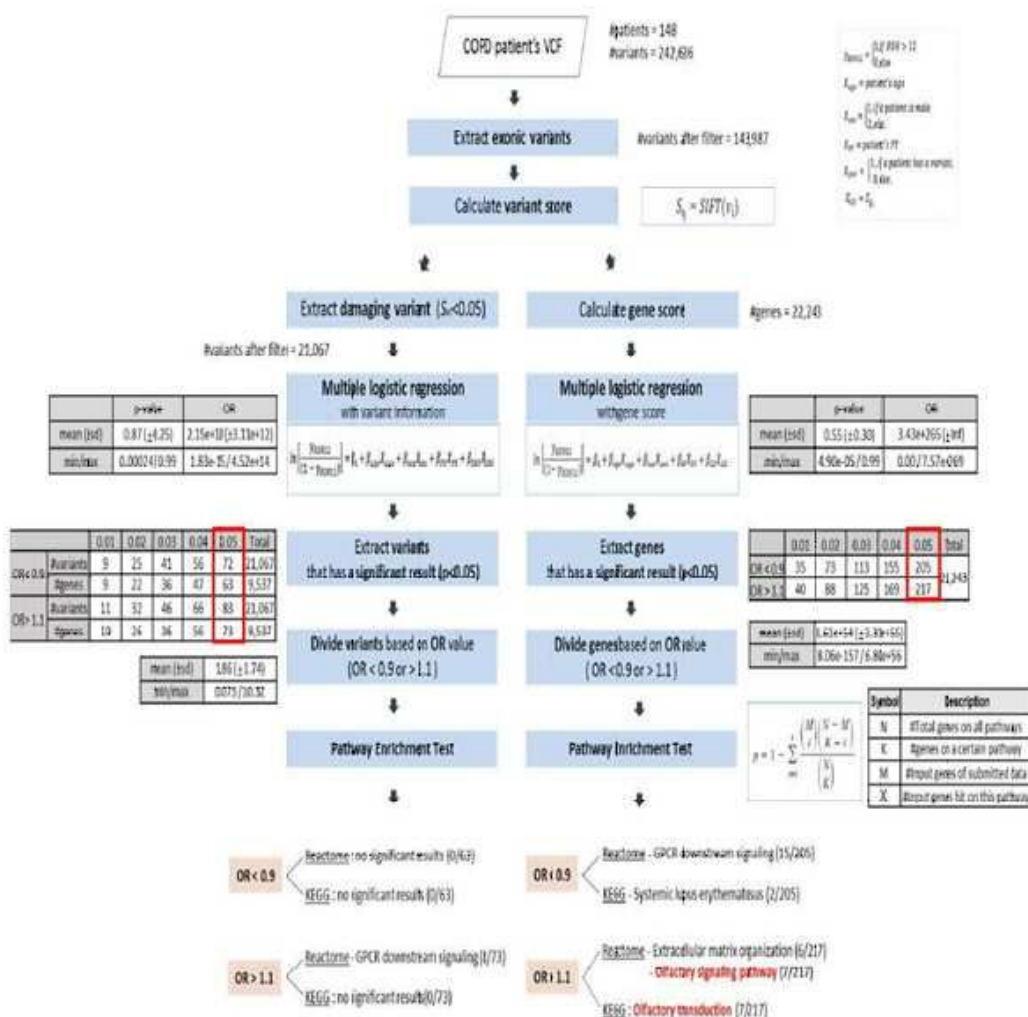
반응성이 낮은 것을 볼 수 있었고, 앞선 로지스틱 회귀분석과 동일한 방법으로 두 유전변이 정보를 독립변수로 하여 로지스틱 회귀분석을 시행한 결과 p-value 0.018, Odd ratio 0.26 (95% CI 0.08-0.77)로 유의한 결과를 얻었다.

[0196] 이러한 결과로부터, 상기 rs41277120, rs4836891 유전변이 정보를 통해 만성폐쇄성폐질환 환자의 베타아드레날린성 차단제 반응성을 진단하고 예측할 수 있을 것이다.

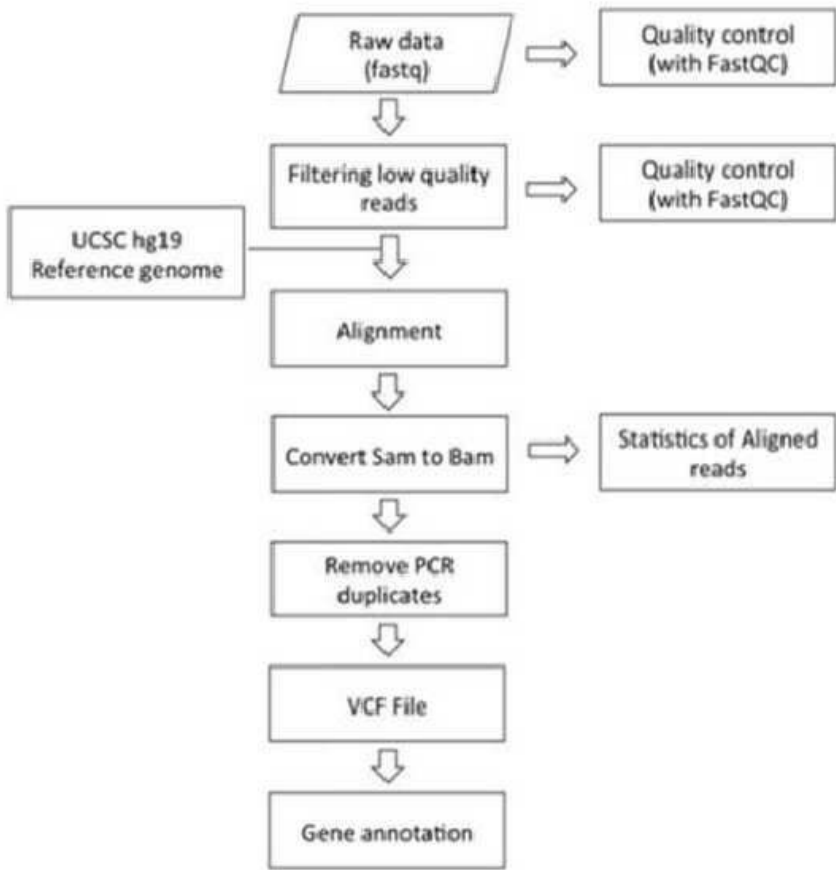
[0197] 이처럼, 본 발명에 따르면 베타아드레날린성 차단제 약물 내성 또는 감수성(ADR) 관련 유전자 변이 rs41277120 및 rs4836891 SNP의 존재 여부를 빠르고 정확하게 확인할 수 있음을 알 수 있다. 따라서, 본 발명을 이용하여 상기 특정 다형성을 신속하게 검출하여 베타아드레날린성 차단제 약물 내성 또는 감수성과 관련된 위험도 예측 및 진단 방법에 효과적으로 활용할 수 있을 것이다.

도면

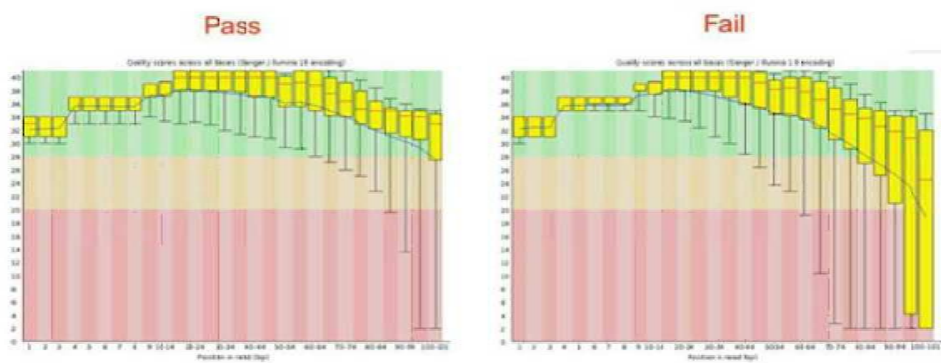
도면1



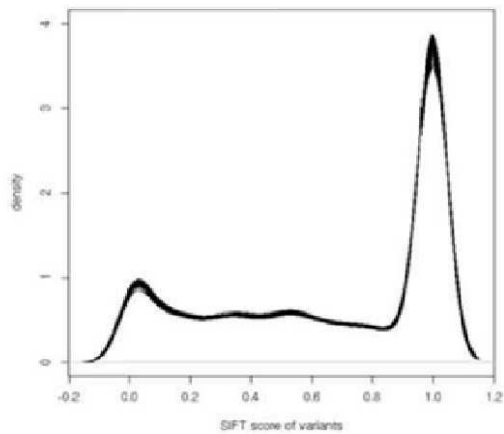
도면2



도면3

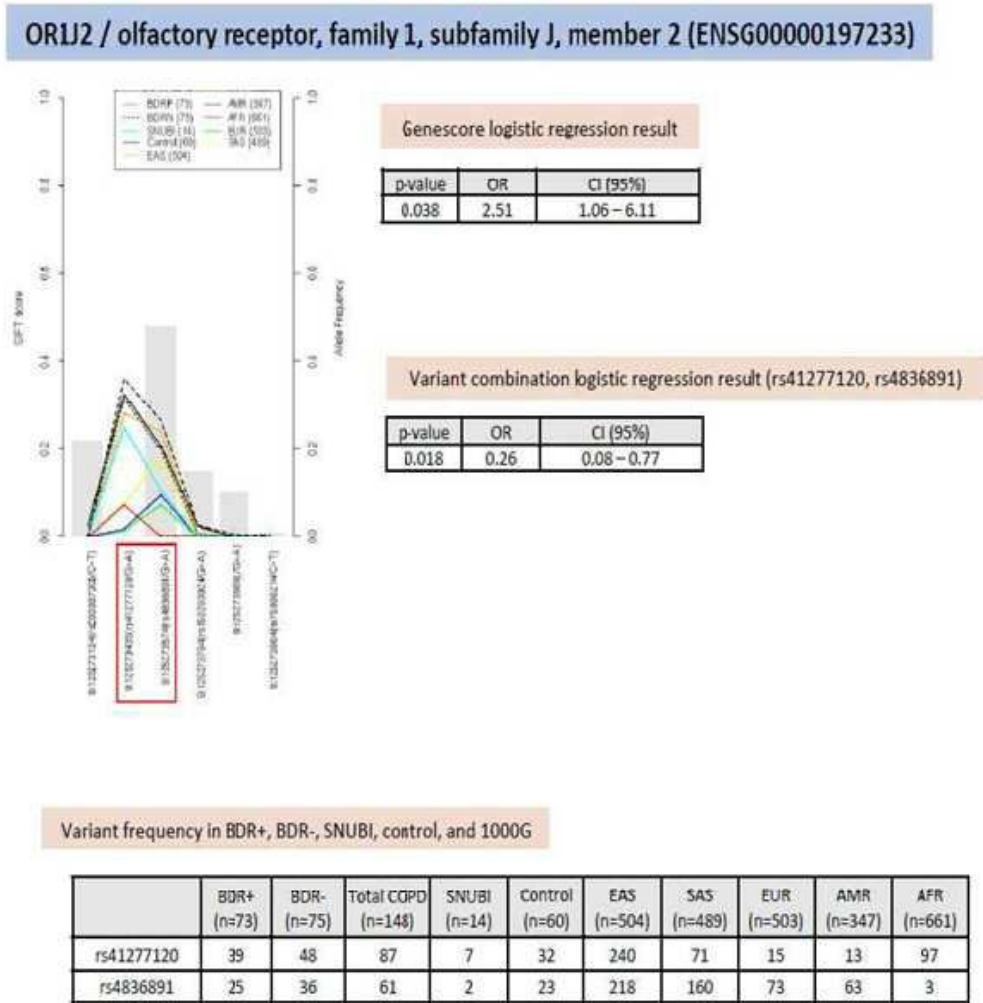


도면4

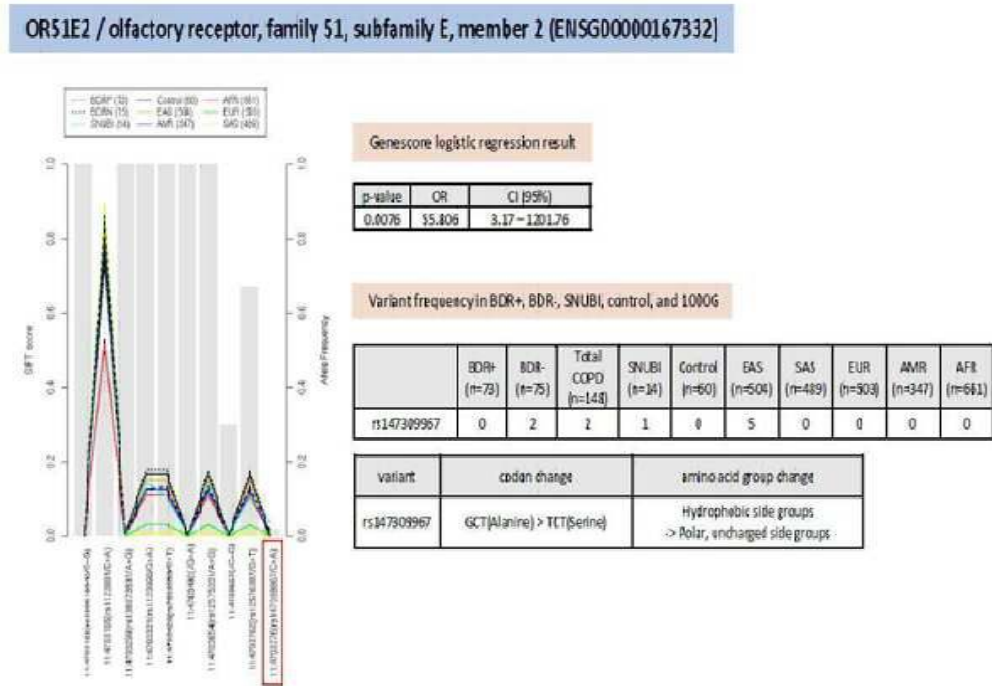


	# of variants
Total variants each person	60262.78 ±7129.70
Variant annotated SIFT each person	16743.46 ±1332.253

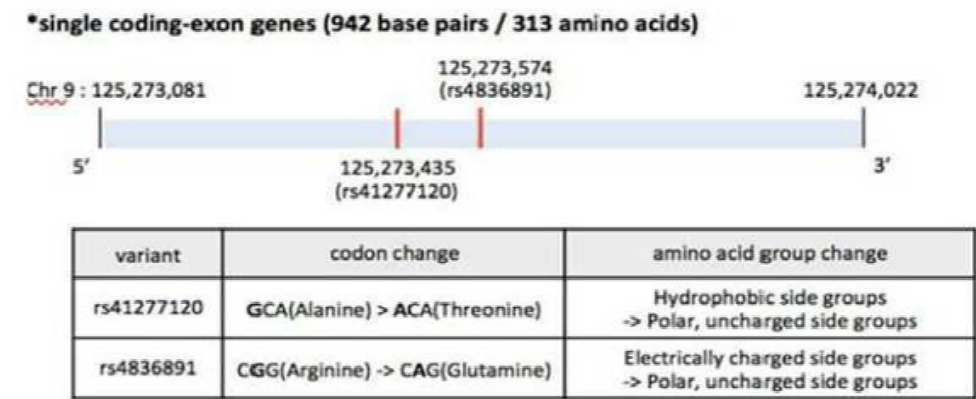
도면5



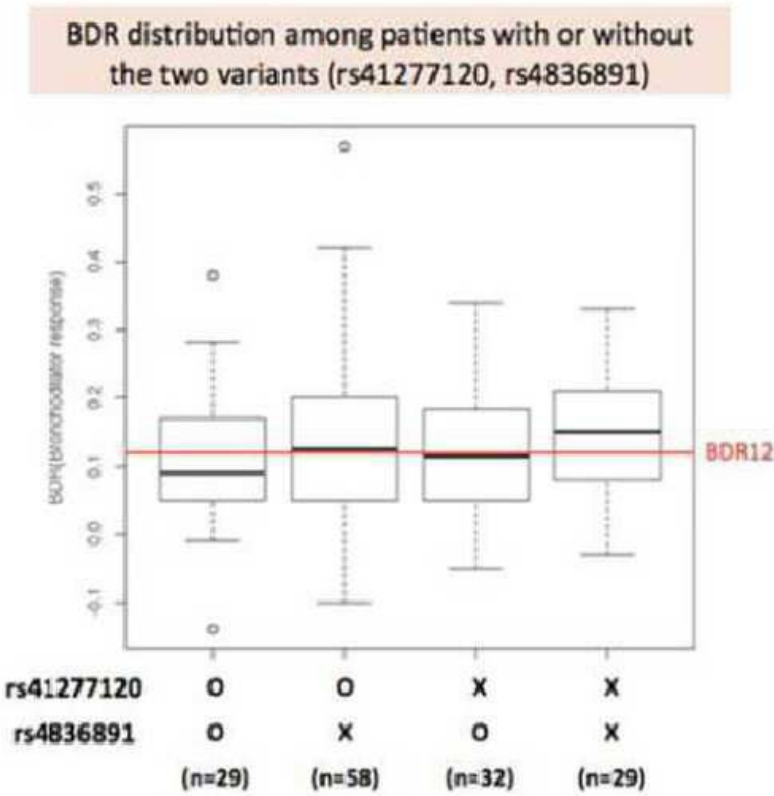
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Ulsan University
- <120> Method of Diagnosing a Drug Resistance for Chronic Obstructive Airway Disease and the Use thereof
- <130> pn1601-021
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 942
- <212> DNA
- <213> OR1J2 exon sequence
- <400> 1

atgagccctg agaaccagag cagcgtgtcc gagttcctcc ttctgggcct ccccatccgg	60
ccagagcagc agcctgtgtt cttcacctg ttctgggca tgtacctgac caccgtgctg	120
gggaacctgc tcatcatgct gctcatccag ctggactctc accttcacac ccccatgtac	180

ttcttctca gccacttggc tctcactgac atctcctttt catctgtcac tgtccctaag	240
atgctgatgg acatgcggac taagtacaaa tcgatcctct atgaggaatg catttctcag	300
atgtattttt ttatatTTTT tactgacctg gacagcttcc ttattacatc aatggcatat	360
gaccgatatg ttgccatag tcacctctc cactacactg tcatcatgag ggaagagctc	420
tgtgtcttct tagtggctgt atcttggatt ctgtcttggg ccagctccct ctctcacacc	480
cttctcctga cccggctgtc tttctgtgtc gcgaacacca tccccatgt cttctgtgac	540
cttctgtccc tgcacaagct gtctgtctca gatatcttcc tcaatgagct ggtcatgttc	600
acagtagggg tgggtggtcat taccctgcc a tcatgtgta tcttgggtatc atatggctac	660
attggggcca ccatcctgag ggtcccttca accaaagga tccacaaagc attgtccaca	720
tgtggctccc atctctctgt ggtgtctctc tattatgggt caatatttgg ccagtacctt	780
ttcccactg taagcagttc tattgacaag gatgtcattg tggctctcat gtacacggtg	840
gtcacacca tgttgaacct ctttatctac agccttagga acaggacat gaaagaggcc	900
cttgggaaac tcttcagtag agcaacattt ttctcttggg ga	942