

	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호	10-2015-0002935
	(12) 공개특허공보(A)	(43) 공개일자	2015년01월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인		
A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)	울산대학교 산학협력단		
A61P 7/06 (2006.01)	울산광역시 남구 대학로 93		
(21) 출원번호	10-2013-0074159	(72) 발명자	
(22) 출원일자	2013년06월27일	박정우	
심사청구일자	2013년06월27일	울산광역시 남구 신북로71번길 12, 101동 703호(무거동, 현대아파트)	
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도		마니 무라리다란	
		울산광역시 남구 대학로21번길 30(무거동)	
		(뒷면에 계속)	
	(74) 대리인		
	위병갑		

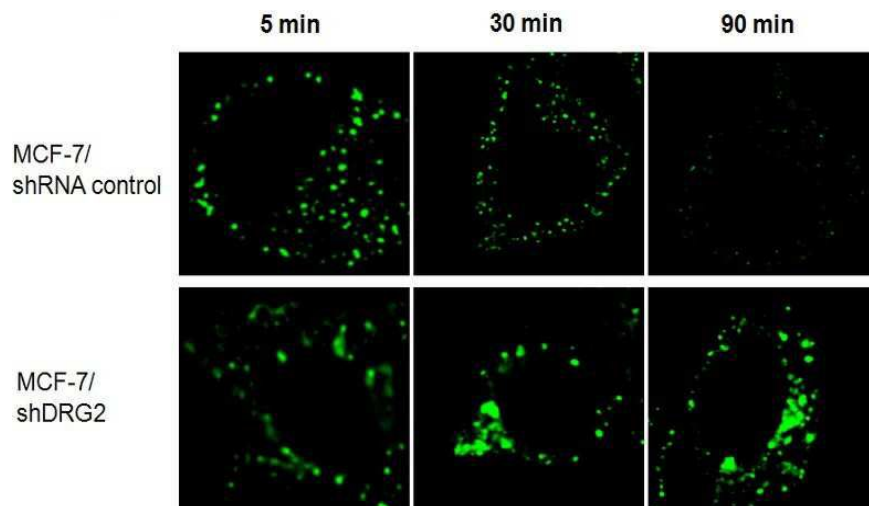
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 DRG2 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 철대사 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 DRG2 단백질 또는 DRG2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 철대사 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물; 철대사 이상질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법; 철대사 이상질환의 예방 또는 치료방법; 및 가축의 철분공급을 위한 사료첨가제 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 철의 운반 단백질인 트랜스페린(transferrin)의 세포 밖으로의 이동을 조절하여 세포 내부로 철의 공급을 원활하게 함으로써 철에 대한 체내 대사 이상을 정상상태로 효과적으로 회복시킬 수 있으므로, 철대사(iron-metabolism) 이상으로 인해 유발될 수 있는 질환들을 예방 또는 치료할 수 있는 치료제로서 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1b



(72) 발명자

이언화

울산광역시 울주군 범서읍 대리2길 46, 203동 160
3호(구영푸르지오)

윤날애

울산광역시 북구 동해안로 1540(정자동)

조연수

울산광역시 울주군 언양읍 북문11길 9, 107동 130
1호(경남아너스빌)

고명석

제주특별자치도 제주시 구좌읍 행원리

김효정

울산광역시 울주군 범서읍 대리로 15-12, 107동
303호(호반베르디움)

조화자

울산광역시 남구 대학로145번길 70, 805호(무거동,
아성홈토피아)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0456

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구과제지원(공동연구)사업

연구과제명 DRG2에 의한 세포분화 조절 연구(2차년도)

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2009.07.01 ~ 2010.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

DRG2 단백질; 또는 DRG2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 철 대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 철대사 이상질환은 빈혈, 이상혈색소증(hemoglobinopathy) 또는 혈색소증(Hemochromatosis)인 것을 특징으로 하는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 이상혈색소증은 겸상 적혈구성 빈혈 또는 지중해빈혈인 것을 특징으로 하는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 철의 운반 단백질인 트랜스페린(transferrin)의 세포 밖으로의 이동을 조절하여 세포 내부로 철의 공급을 원활하게 함으로써 철에 대한 체내 대사 이상을 정상상태로 회복시키는 효과를 갖는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

(a) DRG2 유전자 또는 DRG2 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 DRG2 유전자의 발현양, DRG2 단백질의 양 또는 DRG2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, DRG2 유전자의 발현양, DRG2 단백질의 양 또는 DRG2 단백질의 활성이 증가되는 경우에 상기 시료는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 (b) 단계의 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay;RIA), 방사면역확산법

(radioimmunoassay), 면역침전분석법 (immunoprecipitation assay) 및 면역조직 화학적 분석 (immunohistochemical analysis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 9

DRG2 유전자의 발현 또는 DRG2 단백질의 활성을 증진하는 것을 특징으로 하는 인간을 제외한 포유동물의 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료방법.

청구항 10

DRG2 유전자의 발현 증진제 또는 DRG2 단백질의 활성 증진제를 유효성분으로 포함하는 가축의 철분공급을 위한 사료첨가제 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 DRG2 단백질 또는 DRG2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 철대사 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물; 철대사 이상질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법; 철대사 이상질환의 예방 또는 치료방법; 및 가축의 철분공급을 위한 사료첨가제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 철은 거의 모든 생명체에 있어서 필수적인 미량원소이며 성장 및 혈액의 형성과 관련하여 그러하다. 이 경우 철대사(iron metabolism)의 균형은 주로 노화되는 적혈구의 헤모글로빈으로부터의 철 회수 수준 및 식이 철의 십이지장 흡수에 의하여 제어된다. 배출된 철은 소장, 특히 특이적인 전달계 (DMT-1, 페로포르틴, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체)를 통해 흡수되어 순환계로 유입되고 이에 의하여 적절한 조직과 장기로 전달된다.

[0003] 인체 내에서 원소 철은 산소 전달, 산소 흡수, 미토콘드리아 전자 전달과 같은 세포 기능, 및 궁극적으로는 전체 에너지 대사에 있어서 매우 중요한 역할을 한다.

[0004] 평균적으로, 인체는 4~5g의 철을 함유하는데 주로 효소, 헤모글로빈 및 미오글로빈 중에 존재하며 페리틴과 헤모시데린의 형태로 철이 저장 또는 보유된다.

[0005] 이러한 철의 대략 절반, 즉 약 2g은 헴 철(heme iron)로서 존재하며 적혈구의 헤모글로빈 내에 결합된다. 이러한 적혈구는 제한된 수명 (75-150일)만을 가지기 때문에, 새로운 적혈구들이 끊임없이 형성되고 오래된 것들은 제거되어야 한다. 이러한 높은 재생능력은 노화되는 적혈구를 잡아먹고 이들을 용해시킴으로써 해서 이렇게 얻어진 철을 철의 대사를 위해 재순환시킴으로써 달성된다. 적혈구 생성에 필요한 약 25 mg의 철의 1일 요구량은 이렇게 하여 대부분 제공된다.

[0006] 신체 내 총 철 함량은 소장으로부터의 흡수 및 골수의 적혈구 생성 활성을 통해 주로 조절된다. 흡수시, 철은 혈청 단백질 트랜스페린에 의해 다양한 조직 및 기관으로 수송된다. 일단 표적 조직 또는 기관으로 수송되면, 철은 페리틴/헤모시데린 형태로 수송 및 세포간 저장된다. 정상상태 하에서, 트랜스페린은 건강한 개체에서 철에 의해 약 30% 포화되며, 철 흡수, 저장 및 이용 부위들 사이에서 평형이 유지된다. 이들 항상성 조절은 철뿐만 아니라, 구리, 아연 및 코발트와 같은 기타 필수적 금속 이온의 생리적 함량을 유지시킨다.

[0007] 포유동물은 능동적으로 철을 배출할 수 없으며, 철 대사는 실질적으로 대식세포, 간세포 및 장세포로부터 철의 세포 방출을 통하여 헵시딘에 의해 제어된다. 병리학적인 상태에서는, 환원된 혈청 철 수준이 헤모글로빈 수준의 감소, 적혈구 생산 감소를 일으켜 이로 인한 빈혈을 야기한다.

[0008] 빈혈은 헤모글로빈 수의 감소, 혈액 내 헤모글로빈의 양적 감소, 헤모글로빈 분자의 산소결합 능력의 저하로 인한 조직세포로의 산소 공급이 감소한 생리적 반응으로 정의된다. 빈혈은 400 종류 이상이 있고, 철 결핍, 엽산 등의 영양소 결핍, 용혈성, 염증성 질환, 골수기능 저하 등 다양한 원인에 의해 발생되는데 그 비율이 매우 높고 특히 여성에서 출산 등과 관련하여 남성에 비하여 보다 많이 발생되는 것으로 보고되고 있다. 높은 비율로 관찰되는 빈혈은 여러 병리적 현상을 수반하기 때문에 이것을 치료하기 위하여 원인별로 다양한 치료가 시도되어 왔다.

- [0009] 빈혈은 종종 영양실조 또는 저철분 식이, 또는 철분 함량이 낮은 불균형한 식습관 등에 의해 야기될 수 있다. 뿐만 아니라, 빈혈은 예컨대 크론씨 병과 같은 질환이나 위절제술로 인한 철 흡수 감소 또는 저조한 철 흡수에 기인할 수도 있다. 또한, 철 결핍은 상처, 생리 출혈 과다 또는 혈액 공여와 같은 증가된 혈액 손실에 기인할 수도 있다. 나아가, 청소년 및 아동의 성장기뿐만 아니라 임신 중 여성의 경우에도 철의 요구량이 증가한다고 알려져 있다. 철 결핍은 적혈구 형성 감소로 이어질 뿐만 아니라, 이로 인하여 개체에 대한 산소 공급이 저조해 지고, 이는 전술한 피로, 창백, 집중력 저하와 같은 증상으로 이어질 수 있고, 특히 사춘기 청소년의 경우 인지 능력에 장기간 부정적인 영향을 미치기 때문에, 고도로 효율적이고 잘 관용되는 치료법이 특히 필요한 실정이다.
- [0010] 한편, 또 다른 철 대사 이상질환으로서 혈색소증(Hemochromatosis)은 혈중 철이 지나치게 많은 상태로, 철이 간, 췌장, 심장 및 그 밖의 다른 기관과 같은 다수의 기관에서 축적되는 질환이다. 과잉의 철 침착은 만일 치료하지 않고 방치하면, 조직 손상 및 다양한 기관, 예를 들어, 철 과다 기관에 대한 비가역적인 손상이 있는 섬유증, 예를 들어, 내분비 기능장애 또는 간경화증을 야기한다.
- [0011] 현재까지 철대사 이상과 관련된 질환을 치료하기 위한 방법으로는 철 결핍에 따른 단순한 철의 공급이나 정맥철 개술과 같은 외과적 치료가 있어왔으나, 이들은 환자의 특징에 따라 증상의 개선이 크지 않을 뿐만 아니라 부작용의 위험성이 크기 때문에, 체내에서 부작용이 없으면서 보다 근본적인 발병 기작의 조절을 통해 치료효과가 우수한 치료제의 개발이 요구되고 있다.
- [0012] 이에 본 발명자들은 철대사(iron-metabolism) 이상으로 나타나는 질환의 근본적인 발병 기작을 조절할 수 있는 관련 유전자를 찾고자 노력하였으며, DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2)가 철의 운반 단백질인 트랜스페린(transferrin)의 세포 내 이동을 조절하여 세포 안으로 철의 공급을 원활하게 하는 역할과 관련된 유전자임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2001-0029476호
(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2008-0112407호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 따라서 본 발명의 목적은 DRG2 단백질; 또는 DRG2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현벡터를 이용하여 철에 대한 체내 대사 이상을 정상상태로 회복시킴으로서 근본적인 철대사 이상질환을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 DRG2 유전자의 발현양, DRG2 단백질의 양 또는 DRG2 단백질의 활성 변화 등을 이용하여 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 또한, 본 발명의 다른 목적은 DRG2 유전자의 발현 또는 DRG2 단백질의 활성을 증진시키는 과정을 통하여 포유동물의 철대사(iron-metabolism) 이상질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 나아가 본 발명의 또 다른 목적은 DRG2 유전자의 발현 증진제 또는 DRG2 단백질의 활성 증진제를 이용하여 가축에 철분을 효과적으로 공급할 수 있는 사료첨가제 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 DRG2 단백질; 또는 DRG2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 철대사 이상질환은 빈혈, 이상혈색소증(hemoglobinopathy) 또는 혈색소증(Hemochromatosis)일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 이상혈색소증은 겸상 적혈구성 빈혈 또는 지중해빈혈일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 철의 운반 단백질인 트랜스페린(transferrin)의 세포 밖으로의 이동을 조절하여 세포 내부로 철의 공급을 원활하게 함으로써 철에 대한 체내 대사 이상을 정상상태로 회복시키는 효과를 가질 수 있다.
- [0024] 본 발명은 또한, (a) DRG2 유전자 또는 DRG2 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 DRG2 유전자의 발현양, DRG2 단백질의 양 또는 DRG2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, DRG2 유전자의 발현양, DRG2 단백질의 양 또는 DRG2 단백질의 활성이 증가되는 경우에 상기 시료는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (b) 단계의 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay;RIA), 방사면역 확산법(radioimmunoassay), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 및 면역조직 화학적 분석(immunohistochemical analysis)으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.
- [0026] 본 발명은 또한, DRG2 유전자의 발현 또는 DRG2 단백질의 활성을 증진하는 것을 특징으로 하는 인간을 제외한 포유동물의 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 또한, DRG2 유전자의 발현 증진제 또는 DRG2 단백질의 활성 증진제를 유효성분으로 포함하는 가축의 철분공급을 위한 사료첨가제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명의 조성물은 철의 운반 단백질인 트랜스페린(transferrin)의 세포 밖으로의 이동을 조절하여 세포 내부로 철의 공급을 원활하게 함으로써 철에 대한 체내 대사 이상을 정상상태로 효과적으로 회복시킬 수 있으므로, 철대사(iron-metabolism) 이상으로 인해 유발될 수 있는 질환들을 예방 또는 치료할 수 있는 치료제로서 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1a는 DRG2 shRNA로 형질전환된 세포(MCF-7/shDRG2)에서 DRG2의 단백질 양을 웨스턴 블롯 분석을 통해 측정한 것이다.
- 도 1b는 형광 표지된 트랜스페린을 대조군(MCF-7/shRNA control) 및 DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2) 각각에 도입한 후 세포 내 트랜스페린 단백질의 위치를 공초점현미경으로 관찰한 결과이다.
- 도 1c는 형광 표지된 트랜스페린을 MEF(mouse embryonic fibroblast) 야생형, MEF-DRG2+/-, MEF-DRG2-/- 세포 각각에 도입한 후 세포 내 트랜스페린 단백질의 위치를 공초점현미경으로 관찰한 결과이다.
- 도 2는 대조군(MCF-7/shRNA control) 및 DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2) 각각에 적색 형광이 붙은 Rab5 유전자를 형질주입시키고 녹색 형광이 붙은 트랜스페린을 처리한 후 5분, 30분, 90분 시간 경과에 따른 Rab5 단백질 및 트랜스페린 단백질의 위치를 공초점현미경으로 관찰한 결과이다.
- 도 3은 대조군(MCF-7/shRNA control) 및 DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2) 각각에 녹색 형광이 붙은 Rab11 유전자를 형질주입시키고 적색 형광이 붙은 트랜스페린을 처리한 후 Rab11 단백질 및 트랜스페린 단백질의 위치를 공초점현미경으로 관찰한 결과이다.
- 도 4는 대조군(MCF-7/shRNA control) 및 DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2) 각각에 적색 형광이 붙은 Rab5와 녹색 형광이 붙은 Rab5 GAP 유전자를 형질주입한 후 Rab5와 Rab5 GAP의 결합 여부를 공초점현미경으로 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명은 DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2)를 이용하여 철대사(iron-metabolism) 이상 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 것을 그 특징으로 한다.
- [0031] 하나의 양태로서, 본 발명은 DRG2 단백질; 또는 DRG2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현백터를 유효성분으로 함유하는 철대사 이상질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명자들은 체내에서 철의 대사이상에 의해 유발되는 질환의 치료방법을 찾기 위해 연구하던 중, DRG2 유전자가 매우 중요한 역할을 한다는 사실을 본 발명에서 최초로 규명하였다. 즉, DRG2 유전자는 철의 운반 단백질인 트랜스페린(transferrin)의 세포 내 이동을 조절하여 세포 내부로 철의 공급에 영향을 준다는 사실을 최초로 규명하였으며, 이러한 작용을 통해 철에 대한 체내 대사이상을 정상상태로 회복시킬 수 있음을 제시하였다.
- [0033] 본 발명에서 관심을 가지게 된 DRG2는 세포내의 여러 가지 조절에 관여하는 단백질로서 large superfamily를 이루고 있는 것으로 알려져 있는데, 이러한 superfamily에는 trimeric G protein(e.g. transducin), monomeric G protein(e.g. ras) 및 단백질 합성에 관여하는 GTPase(e.g. elongation factor Tu) 등과 같은 중요한 3개의 subfamily가 존재하는데(Bourne et al., 1991; Sprang, 1997), 최근 이들과 염기서열 및 기능이 다른 새로운 그룹의 G protein 들이 발견되었으며, DRG(developmentally regulated GTP-binding protein)는 GTP와 결합에 필요한 G1부터 G5까지의 5개 region을 모두 지니고 있고 크기는 trimeric G protein과 유사하다. 그러나 아미노산 서열이 trimeric G protein 뿐만 아니라 기존의 G protein subfamily들과 전혀 다른 특성을 지니고 있어 새로운 subfamily로 구분되고 있다.
- [0034] 또한 DRG에는 DRG1과 DRG2가 있는데 (Schenker & Trueb, 1997), 세균으로부터 사람에 이르기까지 거의 모든 종류의 세포에 존재한다. 예를 들면 *Halobacterium cutirubrum* (Shimmin & Dennis, 1989), *Thermoplasma acidophilum* (Tamura et al., 1996), *Methanococcus jannaschii* (Bult et al., 1996), *Caenorhabditis elegans* (Wilson et al., 1994), *Schizosaccharomyces pombe* (Hudson & Young, 1993), *Drosophila melanogaster* (Sommer et al., 1994), *Xenopus laevis* (Kumar et al., 1993), *Arabidopsis thaliana* (unpublished) 및 *Saccharomyces cerevisiae* (unpublished) 등에서 존재함이 확인되었다.
- [0035] 그러나 아직까지 DRG2가 철의 대사에 관여하는 사실에 대해서는 알려진 바가 없다.
- [0036] 본 발명자들은 DRG2가 철의 운반 단백질인 트랜스페린(transferrin)의 세포 밖으로의 이동을 조절하여 세포 내부로 철의 공급을 원활하게 하는 관련 유전자임을 최초로 규명하였다.
- [0037] 본 발명의 하기 실시예 1에서는, DRG2 발현이 트랜스페린(transferrin)의 세포 내 이동에 미치는 영향을 살펴본 것으로, 그 결과 대조군(MCF-7/shRNA control) 세포에서는 트랜스페린이 세포 안으로 들어갔다가 30분과 90분이 지난 이후에는 다시 세포밖으로 나와 세포 안에는 존재하지 않는 것으로 나타난 반면, DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2)에서는 트랜스페린이 세포 안으로 들어 간 이후 다시 세포 밖으로 나가지 못하고 30분, 90분이 지난 후에도 계속 세포 안에 머물러 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해, DRG2 발현이 억제되는 경우 철의 운반 단백질인 트랜스페린의 세포 밖으로의 이동이 차단되어 세포 내부로 철의 공급이 원활이 이루어질 수 없음을 알 수 있었다.
- [0038] 또한, 본 발명의 하기 실시예 2에서는 DRG2 발현 억제가 endosome-Rab5 결합에 미치는 영향을 살펴본 것으로, 그 결과 대조군(MCF-7/shRNA control)의 경우 Rab5가 처음에는 트랜스페린을 지니는 엔도솜에 결합하여 존재하다가 30분 이후부터는 엔도솜에서 떨어져 나가는 반면, DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2)에서는 처음에 Rab5가 트랜스페린을 지니는 엔도솜에 붙은 이후 30분 및 90분이 지나도록 떨어지지 않고 계속 엔도솜에 결합되어 있음이 확인할 수 있었다.
- [0039] 엔도솜의 이동은 Rab이라는 GTP-결합 단백질 활성화에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다. 먼저 세포내 섭취(endocytosis)된 엔도솜의 경우 Rab5가 붙어서 엔도솜을 세포 안으로 이동시킨다. 세포 안으로 들어 온 이후 Rab5가 떨어져 나가야 엔도솜이 세포 밖으로 이동할 수 있다.
- [0040] 따라서 본 발명의 하기 실시예 2의 결과를 통해, DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2)에서의 트랜스페린의 세포 밖으로의 이동 차단은 Rab5 단백질의 엔도솜에 결합 유지에 따른 것임을 알 수 있었다.
- [0041] 또한, 본 발명의 하기 실시예 3에서는 DRG2 발현 억제가 Rab11의 endosome 결합에 미치는 영향을 살펴본 것으로, 그 결과 대조군(MCF-7/shRNA control)과 DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2) 모두 Rab11이 트랜스페린을

지니는 엔도솜에 결합함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 DRG2가 Rab11의 엔도솜 결합에는 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

[0042] 또한, 본 발명의 하기 실시예 4에서는 DRG2 발현 억제제가 Rab5 GAP의 활성화에 미치는 영향을 살펴보았으며(엔도솜에 결합된 Rab5가 다시 분리되기 위해서는 Rab5가 불활성화 되어야 하며, Rab5의 불활성화는 Rab5 GAP에 의하여 이루어짐), 그 결과 대조군(MCF-7/shRNA control) 세포에서는 Rab5와 Rab5 GAP의 결합이 관찰되지 않았으며, 이에 반해 DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2)에서는 Rab5와 Rab5 GAP 대부분이 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 정상세포에서는 Rab5 GAP이 Rab5를 지니는 엔도솜에 결합한 후 정상적으로 Rab5를 불활성화 시켜 엔도솜에서 Rab5를 떼어낸 반면, DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2)에서는 Rab5 GAP이 Rab5를 지니는 엔도솜에 결합한 이후 Rab5를 불활성화시키지 못하여 Rab5가 떨어져 나가지 못함을 알 수 있었다.

[0043] 상기와 같은 실시예 1 내지 4의 결과를 통해, 본 발명자들은 DRG2 발현이 억제되는 경우 철 운반 단백질인 트랜스페린의 세포 밖으로의 이동이 차단됨으로써 종국에는 세포 내부로 철의 공급이 원활이 이루어질 수 없음을 알 수 있었으며, 트랜스페린의 세포 밖으로의 이동 차단은 Rab5 단백질의 엔도솜에 결합 유지에 기인하는 것을 실험을 통해 입증하였다.

[0044] 그러므로 DRG2 단백질; 또는 DRG2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 철대사(iron-metabolism) 이상질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 상기 ‘철대사 이상질환’이란 정상적인 철대사에 이상으로 발생하는 질환이라면 모두 포함할 수 있으며, 바람직하게는 빈혈, 겸상 적혈구성 빈혈, 지중해빈혈 및 혈색소증(Hemochromatosis) 등일 수 있으나, 특별히 그 종류를 한정하는 것은 아니다.

[0046] 본 발명에서, DRG2는 단백질 야생형뿐만 아니라 90% 이상의 아미노산 상동성을 가지고 동일한 단백질 활성을 가지는 기능적 상동체를 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 용어 ‘상동성’이란 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 DRG2 단백질은 서열번호 1의 서열로 정의되는 야생형 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

[0048] 본 기술 분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 90% 이상의 상동성이 유지되고 본 발명에서 DRG2 야생형 단백질과 동일한 활성을 보유하는 한 균등한 단백질을 쉽게 이해할 것이다.

[0049] 본 발명에 따른 DRG2 단백질은 야생형과 동일한 단백질 활성을 보유하는 한 이들의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다. 여기서 변이체란 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다.

[0050] 이러한 변이체는 야생형과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 상동체 또는 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가지는 단백질을 포함한다. 바람직하게는 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체이다. 예를 들어, 온도, 수분, pH, 전해질, 환원당, 가압, 건조, 동결, 계면장력, 광선, 동결과 해동의 반복, 고농도 조건 등의 물리적 요인과 산, 알칼리, 중성염, 유기용매, 금속이온, 산화환원제, 프로티아제 등의 화학적 요인의 외부 환경에 대한 구조적 안정성이 증대된 변이체이다. 또한 아미노산 서열상의 변이로 효소 활성이 증대된 변이체일 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 DRG2 단백질은 생물체로부터 직접 분리하여 제조하거나, 화학적으로 합성하거나, 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다.

[0052] 먼저, 본 발명에 따른 DRG2 단백질은 생물체로부터 직접 분리하여 제조할 수 있다. 세포에 함유된 본 발명의 DRG2 단백질의 분리 및 정제는 많은 공지 방법에 의해 실시할 수 있다.

[0053] 또한 본 발명에 따른 DRG2 단백질은 화학적으로 합성할 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 폴리펩티드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 폴리펩티드는 통상의 단계적인 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법을 이용하여 제조할 수 있다. 특히, 바람직한 폴리펩티드의 제조방법은 고체상 합성방법(solid phase syntheses)을 이용하는 것이다. DRG2는 보호된 아미노산간의 응축반응(condensation reaction)에 의하여 통상의 고체상 방법으로, C-말단으로부터 시작하여 그 서열에 따라 순차적으

로 진행하면서 합성할 수 있다. 응축 반응 후 보호기 및 C-말단 아미노산이 연결된 담체를 산분해(acid decomposition) 또는 아미놀리시스(aminolysis)와 같은 공지의 방법에 의해 제거할 수 있다. 상기 언급된 폴리펩티드 합성법은 관련 서적에 상세히 기술되어 있다.

[0054] 또한 본 발명에 따른 DRG2 단백질은 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, 본 발명의 DRG2 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(핵산)를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 본 발명의 DRG2 단백질이 발현되도록 숙주세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 상기 단백질을 회수하는 과정으로 수득할 수 있다. 단백질은 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다.

[0055] 본 발명의 조성물은 유효성분으로 DRG2 단백질 이외에, 당업계의 공지된 담체 및 희석제와 함께 적절한 제형으로 투여될 수 있으며, 목적하는 방법에 따라 비경구 투여, 예를 들면, 정맥 내 주사, 근육 내 주사, 복강 내 주사, 피하주사, 좌제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0056] 상기 제형들은 약제학적 조성물에 통상적으로 사용되는 적당한 부형제, 충전물, 결합제, 습윤제, 분해제, 윤활제, 계면활성제, 분산제, 완충액, 방부제, 용해보조제, 소독제, 감미료, 향신료, 진통제, 안정화제, 등장액제 등을 이용한 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0057] 상기 기술된 각각의 제형은 약학적으로 허용되는 담체 또는 첨가제를 포함할 수 있다. 상기 담체 또는 첨가제의 구체적인 예로는 물, 약학적으로 허용되는 유기용매, 콜라겐, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리딘, 카복시비닐 중합체, 알긴산 나트륨, 수용성 텍스트란, 카복시메틸 나트륨 녹말, 펙틴, 잔탄 고무, 아라비아 고무, 카제인, 젤라틴, 한천, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸글리콜, 바셀린, 파라핀, 스테아릴 알코올, 스테아린산, 인간 혈청 알부민, 만니톨, 소비톨 및 젖산 등이 있다. 한 개 또는 그 이상의 첨가제가 조제 형태에 따라 선택되거나 또는 적절히 조합될 수 있다. 더 나아가, 본 발명의 조성물 투여방법으로는, 정맥내, 동맥내 투여와 같은 통상적인 전신투여 이외에 표적세포로의 국소적 투여가 행해질 수 있으며, 카테터 기술 및 외과적 수술과 조합된 투여 방법이 사용될 수 있다.

[0058] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.1 ~ 100 mg이 투여될 수 있다. 예를 들면, 치료적으로 유효한 투여량은, 초기에는 세포배양을 통한 시험관내 분석을 사용하여 결정할 수 있다. 당 분야에서 과도한 실험을 거치지 않고도 치료에 유효한 양을 결정할 수 있을 것이며, 이러한 정보를 이용하여 인간에서 유용한 투여량을 더욱 정확하게 결정할 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명의 DRG2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 자연에서 분리되거나 인위적으로 합성 또는 변형된 것일 수 있는데, DRG2를 암호화하는 염기서열은 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실 또는 삽입에 의해 변형될 수 있으며, 이러한 변형에 의해 발현된 단백질은 이의 생물학적 작용성에 유의한 변화를 포함하지 않아야 한다. 상기한 변형은 이중의 상동성 유전자로의 변형을 포함한다.

[0060] 따라서 DRG2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하되, 이에 한정되지 않고 상기의 핵산서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 표시되는 것을 특징으로 한다.

[0061] 바람직하게는, 본 발명의 DRG2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 이를 발현하는 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현벡터의 형태로 제공될 수 있다. DRG2 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터로는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 당업계에 공지된 플라스미드, 파지, 코스미드, 바이러스벡터 또는 기타 매개체를 의미한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.

[0062] DRG2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터/인핸서 서열과 같은 발현 조절 서열 및 기타 전사, 해독 또는 프로세싱에 필요한 서열들과 함께 결합될 수 있다. 조절 서열은 뉴클레오타이드의 구성적 발현(constitutive expression)을 지시하는 것뿐만이 아니라 조직-특이적 조절 및/또는 유도성 서열을 포함한다. 발현 벡터의 설계는 트랜스팩션시킬 숙주 세포, 목적하는 발현 수준 등과 같은 요소에 의해 결정될 수 있다.

[0063] 본 발명의 DRG2를 발현하는 발현벡터는 비바이러스성 벡터 또는 바이러스성벡터를 사용할 수 있다.

- [0064] 상기 비바이러스성 벡터로는 플라스미드가 대표적이다. 플라스미드 발현 벡터는 사람에게 사용할 수 있는 FDA의 승인된 유전자 전달방법으로 사람 세포에 직접적으로 플라스미드 DNA를 전달하는 방법으로, 플라스미드 DNA는 바이러스 벡터와는 달리 균질하게 정제될 수 있는 장점이 있다. 본 발명에서 사용할 수 있는 플라스미드 발현 벡터로는 당업계에 공지된 포유동물 발현 플라스미드를 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 pRK5(유럽특허 제307,247호), pSV16B(국제특허공개 제91/08291호) 및 pVL1392(PharMingen) 등이 대표적이다.
- [0065] 또한 본 발명의 DRG2를 발현하는 발현벡터로 바이러스 벡터를 사용할 수 있다. 바이러스 벡터는 예를 들어, 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노바이러스-연관 바이러스, 헤르페스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipoxvirus) 등이 포함된다. 바이러스 벡터는 다음의 기준을 충족해야 한다: (1) 목적하는 세포에 감염할 수 있어야 하며 이에 따라 적합한 숙주 범위를 갖는 바이러스 벡터가 선택되어야 하고, (2) 전달된 유전자가 적절한 기간 동안 세포에서 보존되고 발현될 수 있어야 하며, (3) 벡터가 숙주에 안전해야 한다.
- [0066] 상기 레트로바이러스 벡터는 바이러스 유전자가 모두 제거되었거나 또는 변경되어 비-바이러스 단백질이 바이러스 벡터에 의해 감염된 세포 내에서 만들어지도록 제작된 것이다. 유전자 요법을 위한 레트로바이러스 벡터의 주요 장점은 다량의 유전자를 복제세포 내에 전달하고, 세포 DNA 내로 전달된 유전자를 정확하게 통합하며, 유전자 형질 감염 후 연속적인 감염이 유발되지 않는 것이다. FDA에서 인증 받은 레트로바이러스 벡터는 PA317 암 포도포픽 레트로바이러스 패키지 세포를 이용하여 제조한 것이다(Miller, A.D. and Buttimore, C., Molec. Cell Biol., 6:2895-2902, 1986).
- [0067] 비-레트로바이러스 벡터로는 상기에서 언급한 바와 같은 아데노바이러스가 있다. 아데노바이러스의 주요 장점은 다량의 DNA 단편(36kb 게놈)을 운반하고, 매우 높은 역가로 비-복제세포를 감염시킬 수 있는 능력이 있다는 것이다. 또한, 헤르페스 바이러스도 사람 유전자 요법을 위해 유용하게 사용될 수 있다(Wolfe, J.H., et al., Nature Genetics,1:379-384, 1992). 이외에도, 공지된 적절한 바이러스 벡터가 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있다.
- [0068] 세포내로 유전자 전달을 위해 사용할 수 있는 다른 바이러스 벡터로는 뮌헨 백혈병 바이러스(MLV), JC, SV40, 폴리오마, 엡스타인-바르 바이러스 파필로마 바이러스, 백시니아, 폴리오바이러스, 헤르페스 바이러스, 신드비스 바이러스, 렌티 바이러스, 기타 사람 및 동물 바이러스가 포함될 수 있다.
- [0069] 본 발명에 따른 상기 발현벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 세포에 도입할 수 있다. 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지된 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있다(Wu et al., J. Bio. Chem., 267:963-967, 1992; Wu and Wu, J. Bio. Chem., 263:14621-14624, 1988).
- [0070] 본 발명의 상기 조성물이 치료효과를 나타낼 수 있는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 종류로는, 빈혈, 이상혈색소증(hemoglobinopathy) 및 혈색소증(Hemochromatosis) 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0071] 또 다른 양태로서, 본 발명은 철대사(iron-metabolism) 이상질환 치료용 의약의 제조를 위한 DRG2 단백질; 또는 DRG2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 조성물의 용도에 관한 것이다. DRG2 단백질; 또는 DRG2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 철대사(iron-metabolism) 이상질환 치료용 의약의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.
- [0072] 또 다른 양태로서, 본 발명은 포유동물에게 치료상 유효량의 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 철대사(iron-metabolism) 이상질환 치료방법에 관한 것이다.
- [0073] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0074] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"이란, 치료하고자 하는 질환에 대해 완화, 억제, 호전 및/또는 완치효과를 나타내는 유효성분의 양을 말한다. 본 발명의 조성물의 투여량은 다양한 요소에 의해 달라질 수 있으며, 그 투여 경로 또한 환자의 연령, 투여기간, 체중, 질환의 중증도, 환자의 의식 여부, 병용 약물의 종류 등과 같은 다양한 요소에 의해 경구 또는 비경구의 다양한 투여 경로를 사용할 수 있다. 또한, 각각을 별개로 또는

연쇄적으로, 혹은 시간을 두고 별개로 투여하는 것도 가능하다.

[0075] 상기 조성물은 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의해 투여된다. 비 경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 바람직한 투여방식은 정맥 주사, 피하주사, 피내 주사제, 근육주사 및 점적 주사이 다.

[0076] 또 다른 양태로서, 본 발명은 (a) DRG2 유전자 또는 DRG2 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접 촉시키는 단계; (b) 상기 DRG2 유전자의 발현양, DRG2 단백질의 양 또는 DRG2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, DRG2 유전자의 발현양, DRG2 단백질의 양 또는 DRG2 단백질의 활성이 증가 되는 경우에 상기 시료는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함 하는, 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법일 수 있다.

[0077] 본 발명의 방법에 따르면, 먼저 DRG2 유전자 또는 DRG2 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉 시킬 수 있다. 여기서 상기 ‘시료’는 DRG2 유전자의 발현양, DRG2 단백질의 양 또는 DRG2 단백질의 활성에 영 향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화합물질, 뉴클레오티드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이후, 시료가 처리된 세포에서 DRG2 유전자의 발현양, DRG2 단백질의 양 또는 DRG2 단백질의 활성을 측 정할 수 있으며, 측정 결과, DRG2 유전자의 발현양, DRG2 단백질의 양 또는 DRG2 단백질의 활성이 증대된 것이 측정되면 상기 시료는 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료할 수 있는 물질로 판정될 수 있다.

[0078] 여기서 상기 DRG2 유전자의 발현양을 측정하는 방법은 바람직하게 DRG2 유전자가 발현된 mRNA 수준, 즉, mRNA의 양을 측정하는 방법일 수 있으며, 상기 수준을 측정할 수 있는 물질로는 DRG2 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 DRG2 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브는 서열번호 1로 나 타내는 DRG2 유전자 전체 또는 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있 으며, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에 알려진 방법을 통해 디자인할 수 있다.

[0079] 본 발명에서 상기 ‘프라이머’란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴 클레오티드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용 도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 DRG2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상 보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하 다.

[0080] 상기 ‘증폭 반응’은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0081] 본 발명에서, 상기 ‘프로브’라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으 로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브 는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예 컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포 로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아미드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염 기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도 -, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포 르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

- [0082] 또한, 본 발명에서 상기 DRG2 단백질의 양을 측정할 수 있는 물질로는 DRG2 단백질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등의 ‘항체’를 포함할 수 있다.
- [0083] 상기 DRG2 단백질의 양을 측정할 수 있는 DRG2 단백질에 대한 항체의 경우, 시중에서 판매하고 있는 DRG2 단백질에 대한 항체라면 모두 사용 가능하며 또는 상기 항체를 제조하여 사용할 수 있는데, 항체 제조 방법은 당해 기술분야의 일반적 기술자가 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대, 다클론 항체의 경우에는 DRG2 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있으며, 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조가능하다. 단일클론 항체의 경우에는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마(hybridoma) 방법(Kohler et al., European Journal of Immunology, 6, 511-519, 1976)을 이용하여 제조할 수 있으며 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352, 624-628, 1991, Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0084] 이와 같이, DRG2 유전자의 발현양 또는 DRG2 단백질 양의 측정은 앞서 기재된 DRG2에 대한 프라이머, 프로브 및 항체와 같은 물질을 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay;RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 및 면역조직 화학적 분석(immunohistochemical analysis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법을 이용하여 측정할 수 있다.
- [0085] 바람직하게, 상기 DRG2 유전자의 발현양을 측정하는 방법은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블롯 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0086] 또한, 상기 DRG2 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 DRG2 단백질과 이에 특이적인 항체 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성양은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0087] 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블롯, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등을 사용할 수 있다.
- [0088] 또 다른 양태로서, 본 발명은 DRG2 유전자의 발현 또는 DRG2 단백질의 활성을 증진하는 것을 특징으로 하는 인간을 포함하는 포유동물의 철대사(iron-metabolism) 이상질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [0089] 또 다른 양태로서, 본 발명은 DRG2 유전자의 발현 증진제 또는 DRG2 단백질의 활성 증진제를 유효성분으로 포함하는 가축의 철분공급을 위한 사료첨가제 조성물에 관한 것이다.
- [0090] DRG2 유전자의 경우 철의 운반 단백질인 트랜스페린(transferrin)의 세포 밖으로의 이동을 조절하여 세포 내부로 철의 공급을 원활하게 하는 역할과 관련되어 있으므로, DRG2 유전자의 발현 증진제 또는 DRG2 단백질의 활성 증진제를 유효성분으로 포함하는 사료첨가제 조성물의 경우 가축의 철분공급에 효과적일 수 있다.
- [0091] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0092] <실시예 1>

[0093] DRG2 발현이 트랜스페린(transferrin)의 세포 내 이동에 미치는 영향

[0094] 본 발명자들은 DRG2가 트랜스페린의 세포내 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 먼저 사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포에 DRG2에 대한 shRNA (이하 ‘shDRG2’ 라 약칭함)를 처리하여 DRG2의 발현이 안정적으로 억제된 세포주를 제조하였다. 이후 형광이 붙은 트랜스페린의 세포 내 이동을 분석하였다.

[0095] <1-1> shRNA가 처리된 MCF-7 세포주 수립

[0096] shDRG2(DRG2에 대한 shRNA)를 포함하는 MCF-7 세포주를 수립하기 위해 pLKO.1에 사람의 DRG2 shRNA가 들어 있는 pLKO.1-shDRG2 (Sigma, TRCN0000047195)를 MCF-7 세포내로 형질주입하였다. 대조구로는 shRNA control vector (Sigma Cat # SHC002)가 들어간 MCF-7 세포주를 제조하였다. 하기에 서는 pLKO-shDRG2가 도입된 MCF-7 세포를 ‘MCF-7/shDRG2’ 로 표현하였으며, shRNA control vector가 도입된 MCF-7 세포를 ‘MCF-7/shRNA control’ 로 각각 표현하였다.

표 1

[0097] shRNA 염기서열

	염기서열	서열번호
shDRG2	CCGGGCCCTGCCTGTATGTTTATAACTCGAGTTATAAACATACAGGCAGGGCTTTTG	3
shRNA control	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTT	4

[0098] <1-2> shRNA로 형질전환된 MCF-7 세포 내의 DRG2 발현 정도 측정

[0099] 본 발명자들은 먼저 shDRG2(DRG2에 대한 shRNA)가 DRG2를 효과적으로 녹다운(knockdown)시킬 수 있는지를 확인하기 위하여, 상기 제조된 형질전환 세포에서 DRG2 발현정도를 단백질 수준에서 측정하였다. 이를 위해 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다.

[0100] MCF-7, MCF-7/shRNA control, 그리고 MCF-7/shDRG2 세포의 lysate에 존재하는 단백질을 SDS-PAGE로 분리하였다. 이후 단백질을 Hybond-P membrane에 옮긴 후 1차 항체 (chicken anti-human DRG2, Sigma Cat # GW22260A)와 peroxidaserk conjugation 되어 있는 2차 항체 (peroxidase-rabbit anti-chicken IgG, Invitrogen Cat # 61-3120)를 처리하였다. ECL system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp)을 사용하여 DRG2 밴드를 확인하였다.

[0101] 그 결과 도 1a에서 나타난 바와 같이, DRG2 shRNA로 형질전환된 MCF-7 세포에서 DRG2 단백질의 발현이 두드러지게 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0102] <1-3> DRG2 발현과 트랜스페린의 세포내 이동 관련성 분석

[0103] 본 발명자들은 DRG2가 트랜스페린(transferrin)의 세포내 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 형광단백질을 만들어 내는 EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein gene)와 트랜스페린을 융합한 EGFP-트랜스페린을 MCF-7/shDRG2 및 MCF-7/shRNA control 세포 각각에 형질감염(transfection) 시켰다. 이후, 상기 MCF-7 세포를 공초점현미경(Confocal Microscopy)으로 관찰하여 세포 내에서 트랜스페린 단백질의 위치를 확인하였다.

[0104] 그 결과 도 1b에 나타난 바와 같이, 정상적인 세포에서는 트랜스페린이 세포 안으로 도입된 후 30분과 90분이 지난 이후에는 다시 세포밖으로 나와 세포 안에는 존재하지 않는 것으로 나타난 반면, DRG2 발현이 억제된 세포에서는 트랜스페린이 세포 안으로 들어 간 이후 다시 세포 밖으로 나가지 못하고 30분, 90분이 지난 후에도 계속 세포 안에 머물러 있음을 확인할 수 있었다.

[0105] 또한, 이를 재확인하기 위하여 정상적인 생쥐 및 DRG2 유전자를 녹아웃(knockout)시킨 생쥐로부터 제조한 MEF(mouse embryonic fibroblast) 세포에서 형광을 붙인 트랜스페린의 이동을 분석하였다. 그 결과 도 2c에서 나타난 바와 같이, 정상적인 MEF 세포에서는 트랜스페린이 세포 내로 들어갔다가 30분 및 90분이 지난 후 세포 밖으로 방출되었으나, DRG2를 녹아웃시킨 MEF 세포의 경우 세포안으로 들어간 트랜스페린이 밖으로 나오지 못하고 30분 90분 지난 이후에도 계속 안에 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

[0106] 이러한 결과를 통해, DRG2 발현이 억제되는 경우 철의 운반 단백질인 트랜스페린의 세포막으로의 이동이 차단되어 철의 공급이 원활이 이루어질 수 없음을 알 수 있었다.

[0107] <실시예 2>

[0108] DRG2 발현 억제가 endosome-Rab5 결합에 미치는 영향

[0109] 본 발명자들은 DRG2 발현 억제가 트랜스페린을 지니는 엔도솜(endosome)에 Rab5가 결합하는 것에 영향을 주는지를 확인하기 위하여, MCF-7/shDRG2 및 MCF-7/shRNA control 세포 각각에 적색 형광이 붙은 Rab5 유전자를 형질주입시키고 녹색 형광이 붙은 트랜스페린을 처리한 후 5분, 30분, 90분에 세포를 관찰하였다.

[0110] 참고로, 엔도솜의 이동은 Rab이라는 GTP-결합 단백질 활성화에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다. 먼저 세포내 섭취(endocytosis)된 엔도솜의 경우 Rab5가 붙어서 엔도솜을 세포 안으로 이동시킨다. 세포 안으로 들어 온 이후 Rab5가 떨어져 나가야 엔도솜이 세포 밖으로 이동할 수 있다.

[0111] 따라서 본 발명자들은 상기 실시예 1을 통해 DRG2 발현이 트랜스페린의 세포내 이동과 관련이 있음을 확인하였는바, 본 실험에서는 이러한 관련성의 구체적인 분자적 기작을 살펴보기 위하여 DRG2 발현 억제가 트랜스페린을 지니는 엔도솜에 Rab5가 결합하는 것에 영향을 주는 것인지를 대해서도 살펴보았다.

[0112] 그 결과 도 2에서 나타낸 바와 같이, 대조군(MCF-7/shRNA control)의 경우 Rab5가 처음에는 트랜스페린을 지니는 엔도솜에 결합하여 존재하다가 30분 이후부터는 엔도솜에서 떨어져 나감에 확인될 수 있었다. 그러나 DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2)에서는 처음에 Rab5가 트랜스페린을 지니는 엔도솜에 붙은 이후 30분 및 90분이 지나도록 떨어지지 않고 계속 엔도솜에 결합되어 있음이 확인할 수 있었다.

[0113] <실시예 3>

[0114] DRG2 발현 억제가 Rab11의 endosome 결합에 미치는 영향

[0115] 세포안에 있는 엔도솜이 세포막으로 이동하기 위해서는 Rab11이 엔도솜에 붙어야 하는바, 본 실험에서는 DRG2 발현 억제가 Rab11이 엔도솜에 결합하는 것에 영향을 주는지를 확인하기 위하여, MCF-7/shDRG2 및 MCF-7/shRNA control 세포 각각에 녹색 형광이 붙은 Rab11 유전자를 형질주입시키고 적색 형광이 붙은 트랜스페린을 처리한 후 5분, 30분, 90분에 세포를 관찰하였다.

[0116] 그 결과 도 3에서 나타낸 바와 같이, 대조군(MCF-7/shRNA control)과 DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2) 모두 Rab11이 트랜스페린을 지니는 엔도솜에 결합함을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과를 통해 DRG2가 Rab11의 엔도솜 결합에는 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

[0117] 따라서 실시예 2 및 3의 결과를 통해, 본 발명자들은 DRG2가 엔도솜의 세포내 이동에 영향을 미치는 작용을 갖는다는 사실을 확인하였는데, 특히 DRG2의 발현이 억제되면 Rab5와 엔도솜의 결합체가 다시 분리되지 않은 채 Rab5가 엔도솜과 계속 결합된 결합체로 존재하고 있는 것으로 나타났고, 따라서 세포 내로 도입된 엔도솜이 세포 밖으로 이동할 수 없다는 것을 알 수 있었다.

[0118] <실시예 4>

[0119] DRG2 발현 억제가 Rab5 GAP의 활성화에 미치는 영향

[0120] 상기 실시예 2를 통해 DRG2 발현이 억제된 세포에서는 Rab5가 엔도솜에 붙은 후 떨어지지 않아서 트랜스페린을 지니는 엔도솜이 세포막으로 이동하지 못함을 확인하였는바, 본 실험에서는 DRG2 발현 억제가 Rab5 GAP의 활성화에 미치는 영향을 분석하였다.

[0121] 참고로, 엔도솜에 결합된 Rab5가 다시 분리되기(떨어지기) 위해서는 Rab5가 불활성화 되어야 하며, Rab5의 불활성화는 Rab5 GAP에 의하여 이루어진다. 따라서 본 실험에서는 상기 실시예 2를 통해 DRG2 발현이 억제된 세포에서 Rab5가 엔도솜에 붙은 후 떨어지지 않는 것이 Rab5 GAP의 활성화에 영향을 미치는 것인지를 살펴보았다.

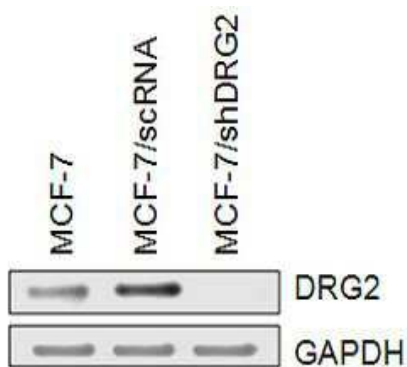
[0122] 이를 위하여 MCF-7/shDRG2 및 MCF-7/shRNA control 세포 각각에 적색 형광이 붙은 Rab5, 그리고 녹색 형광이 붙은 Rab5 GAP 유전자를 형질주입하였다. 이후 공초점현미경(Confocal Microscopy)을 사용하여 Rab5와 Rab5 GAP의 결합 여부를 확인 하였다.

[0123] 그 결과 도 4에서 나타낸 바와 같이, 대조군(MCF-7/shRNA control) 세포에서는 Rab5와 Rab5 GAP의 결합이 관찰되지 않았으며, 이에 반해 DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2)에서는 Rab5와 Rab5 GAP 대부분이 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 정상세포에서는 Rab5 GAP이 Rab5를 지니는 엔도솜에 결합한 후 정상적으로 Rab5를 불활성화 시켜 엔도솜에서 Rab5를 떼어낸 반면, DRG2 발현이 억제된 세포(MCF-7/shDRG2)에서는 Rab5 GAP이 Rab5를 지니는 엔도솜에 결합한 이후 Rab5를 불활성화 시키지 못하여 Rab5가 떨어져 나가지 못함을 나타낸다.

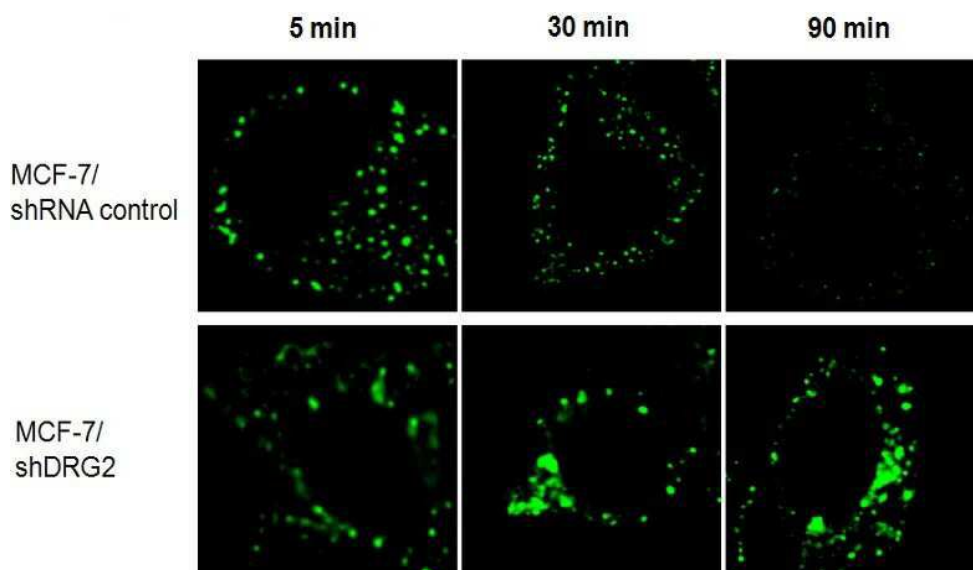
[0124] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

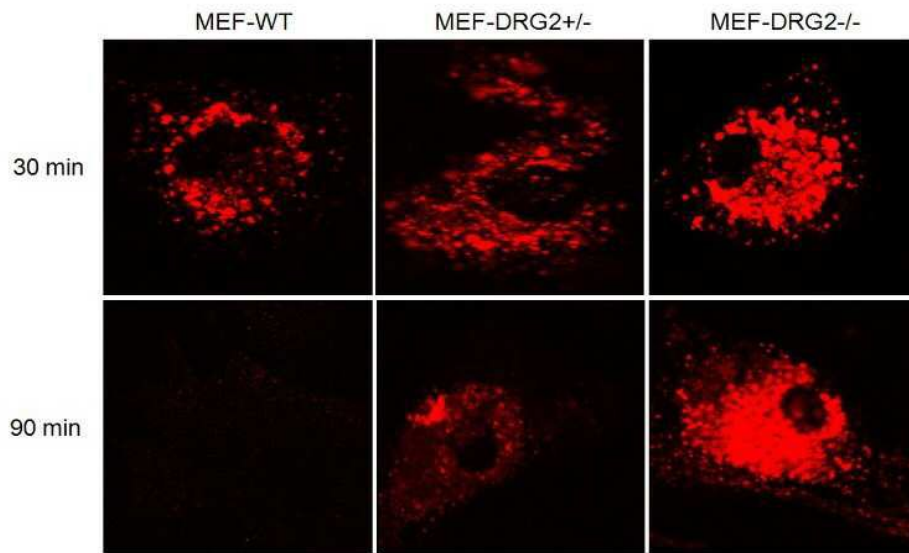
도면1a



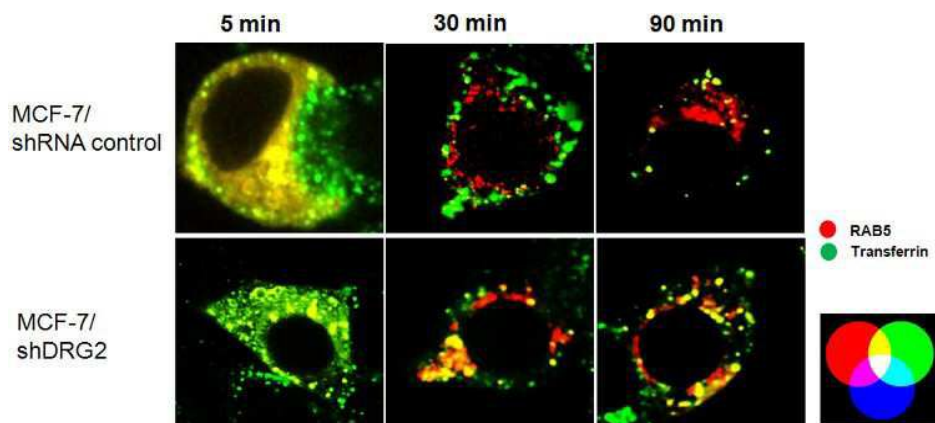
도면1b



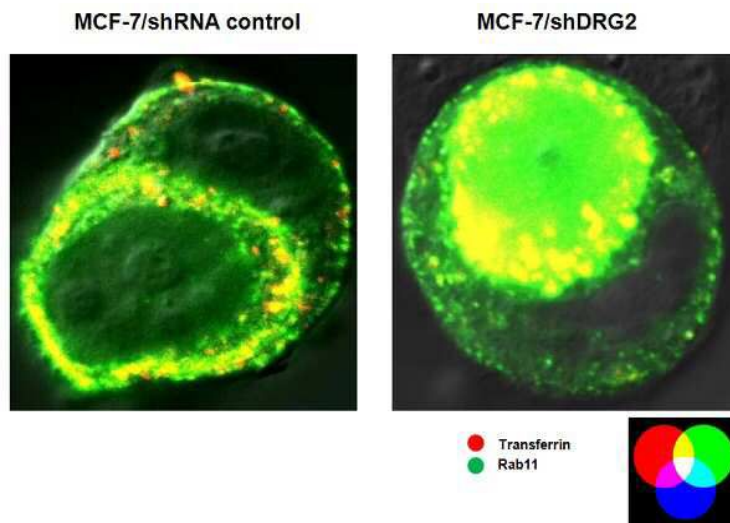
도면1c



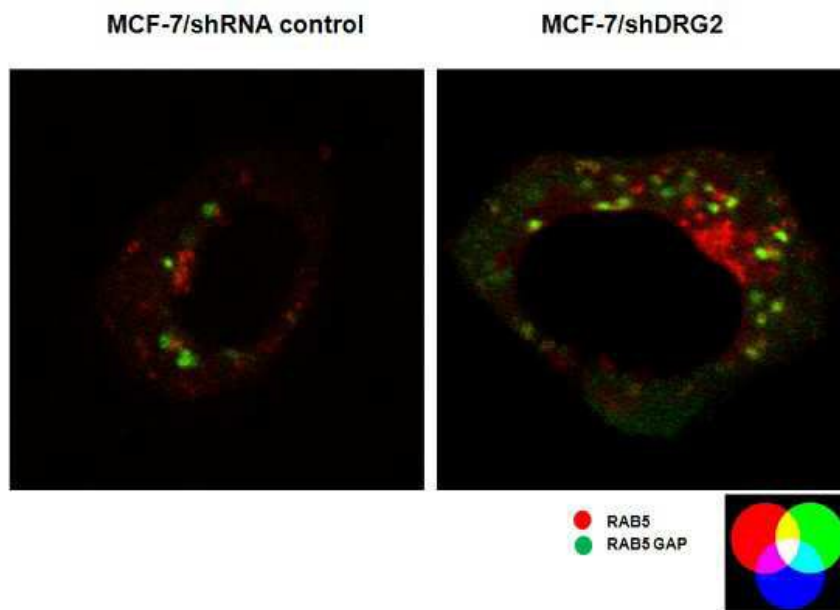
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Composition comprising DRG2 protein or a polynucleotide
encoding the DRG2 for the prevention or treatment of iron metabolism
disorder
- <130> PN1306-202
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human drg2 amino acid seq.

<400> 1

Met Gly Ile Leu Glu Lys Ile Ser Glu Ile Glu Lys Glu Ile Ala Arg

1 5 10 15

Thr Gln Lys Asn Lys Ala Thr Glu Tyr His Leu Gly Leu Leu Lys Ala

20 25 30

Lys Leu Ala Lys Tyr Arg Ala Gln Leu Leu Glu Pro Ser Lys Ser Ala

35 40 45

Ser Ser Lys Gly Glu Gly Phe Asp Val Met Lys Ser Gly Asp Ala Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Met Thr Ser Thr Ala Ser Glu Ala Ala Ser Tyr Glu Phe Thr Thr

85 90 95

Leu Thr Cys Ile Pro Gly Val Ile Glu Tyr Lys Gly Ala Asn Ile Gln

100 105 110

Leu Leu Asp Leu Pro Gly Ile Ile Glu Gly Ala Ala Gln Gly Lys Gly

115 120 125

Arg Gly Arg Gln Val Ile Ala Val Ala Arg Thr Ala Asp Val Ile Ile

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Glu Leu Glu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asn Lys His Lys Pro Asn

165 170 175

Ile Tyr Phe Lys Pro Lys Lys Gly Gly Gly Ile Ser Phe Asn Ser Thr

180 185 190

Val Thr Leu Thr Gln Cys Ser Glu Lys Leu Val Gln Leu Ile Leu His

195 200 205

Glu Tyr Lys Ile Phe Asn Ala Glu Val Leu Phe Arg Glu Asp Cys Ser

210 215 220
Pro Asp Glu Phe Ile Asp Val Ile Val Gly Asn Arg Val Tyr Met Pro

225 230 235 240
Cys Leu Tyr Val Tyr Asn Lys Ile Asp Gln Ile Ser Met Glu Glu Val

245 250 255
Asp Arg Leu Ala Arg Lys Pro Asn Ser Val Val Ile Ser Cys Gly Met

260 265 270
Lys Leu Asn Leu Asp Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Glu Tyr Leu Ala

275 280 285
Leu Thr Cys Ile Tyr Thr Lys Lys Arg Gly Gln Arg Pro Asp Phe Thr

290 295 300

Asp Ala Ile Ile Leu Arg Lys Gly Ala Ser Val Glu His Val Cys His
305 310 315 320

Arg Ile His Arg Ser Leu Ala Ser Gln Phe Lys Tyr Ala Leu Val Trp
325 330 335

Gly Thr Ser Thr Lys Tyr Ser Pro Gln Arg Val Gly Leu Thr His Thr
340 345 350

Met Glu His Glu Asp Val Ile Gln Ile Val Lys Lys
355 360

<210> 2

<211> 1095

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human drg2 polynucleotide seq.

<400> 2

atggggatct tagagaagat ctcggagatc gagaaggaga tcgctcggac acagaagaac	60
aaggccactg agtatcatct gggcctgctg aaagctaagc tcgccaagta tcgggccccag	120
ctcctggaac cgtccaaatc ggcctcgtcc aaaggagagg gctttgatgt catgaagtgc	180
ggtgatgccc gtgtggcgct gattggattt ccctctgtgg gtaagtccac attcttgagt	240
ctgatgacct ccacggccag cgaggcagcg tcctatgagt tcaccactct gacgtgtatt	300
cctgggggtca ttgaatacaa aggtgccaac atccagctcc tggaccttcc tggaatcatt	360

gaaggcgag cccaaggaaa aggccgtggc cggcaggatga tcgctgtggc gcgcacggct 420
gacgtcatca tcatgatgct ggatgccacc aaggagagg tgcagaggtc tctgctggag 480
aaggagctgg agtctgtggg catccgcctc aacaagcaca agcctaacat ctacttcaag 540
ccaagaaaag gtgtgtggcat ctctttaac tcgacagtca cgctgaccca gtgctcggaa 600
aagctgggtc agtcatacct gcacgaatac aagatcttca atgcagaagt gcttttccga 660
gaagactgct ccccgacga gttcatcgat gtgatcgtgg gcaaccgggt gtacatgcc 720
tgcctgtatg ttataaaca aatcgaccag atctccatgg aagaggtgga ccgcctggcc 780

cgaaaaccca acagtgtggt catcagctgc ggcatgaagc tgaacctgga ctatctgctg 840
gagatgcttt gggagtactt ggccctgacc tgcatttaca ccaagaagag aggacagagg 900
ccagacttca cagacgcat cattctcgg aaaggggcct cagtggagca cgtgtgccac 960
cgcatccacc ggtcactgc cagccagttc aagtacgcc tgggtgtggg caccagcacc 1020
aagtacagtc cgcagcgggt ggccctgacc cacacatgg agcatgagga cgtcatccag 1080
atcgtgaaga agtaa 1095

<210> 3
<211> 58
<212> RNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> shDRG2 polynucleotide seq.

<400> 3
ccgggccctg cctgtatgtt tataactcga gttataaaca tacaggcagg gctttttg 58

<210> 4
<211> 57
<212> RNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> shRNA control polynucleotide seq.

<400> 4
ccggcaaca gatgaagagc accaactcga gttgtgtctc ttcatcttgt tgTTTT 57