

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 8월 11일 (11.08.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/125940 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/11 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/001315
- (22) 국제출원일: 2015년 2월 10일 (10.02.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0016480 2015년 2월 3일 (03.02.2015) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-742 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이준호 (LEE, Jun Ho); 151-742 서울시 관악구 관악로 1, 서울대학교, Seoul (KR). 서범석 (SEO, Beom Seok); 132-766 서울시 도봉구 해동로 307, 102-1309, Seoul (KR). 김천아 (KIM, Chun A); 151-793 서울시 관악구 광신길 160, 107-502, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 박원미 (PARK, weonmee); 135-921 서울시 강남구 논현로 412, 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

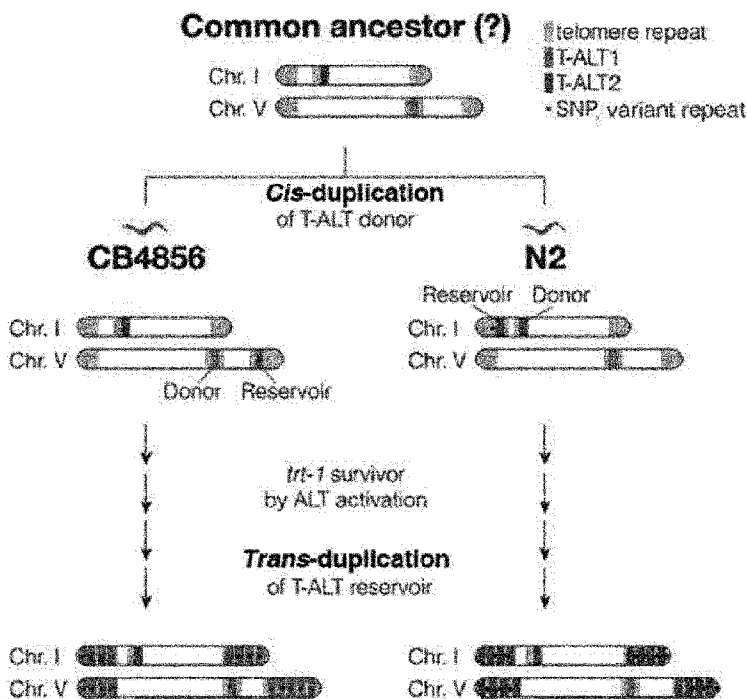
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: ELEMENTS INVOLVED IN INTRACELLULAR ALTERNATIVE-LENGTHENING-OF-TELOMERES ACTIVITY, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 세포내 대안적 텔로미어 유지 활성화에 관여하는 엘리먼트 및 그 용도



(57) Abstract: Disclosed are T-ALT 1 and 2 elements acting on an alternative-lengthening-of-telomeres mechanism, and a use thereof. According to the present application, the elements can be used as a marker for detecting intracellular ALT activity or can be useful for screening for a material, and the like, for a cancer therapeutic agent.

(57) 요약서: 본원은 대안적 텔로미어 길이 유지 이전에 작용하는 T-ALT 1 및 2 엘리먼트 및 그 용도를 개시한다. 본원에 따른 엘리먼트는 세포내 ALT 활성을 검출하는 마커로서 사용되거나 또는 암 치료제 물질 등의 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 세포내 대안적 텔로미어 유지 활성화에 관여하는 엘리먼트 및 그 용도

기술분야

- [1] 본원은 세포내의 텔로미어 길이 연장과 관련된 기전, 이에 관여는 핵산 서열 및 그 용도와 관련된 것이다.

배경기술

- [2] 선형 염색체는 말단의 복제가 완전하지 않아, 복제를 거듭할수록 그 길이가 점차 줄어들게 된다. 텔로미어는 염색체 말단에 위치하는 반복되는 서열로 그 길이를 기준으로 세포의 분열 횟수를 적절한 수준으로 제한하는 역할을 하며, 텔로미어 길이가 적정 수준보다 짧아지게 되면 세포는 분열을 멈추게 된다. 따라서 텔로미어는 정상세포의 지속적 분열을 방지하여, 결국 정상세포가 암세포로 발전하는 것을 억제하게 된다.
- [3] 따라서 암세포는 제한된 분열 횟수를 넘어 계속적으로 분열하기 위해 충분한 텔로미어 길이를 유지하기 위한 기작을 가지고 있으며, 현재 알려진 기작으로는 텔로머라아제(telomerase) 활성을 통한 텔로미어 합성 및 대안적 텔로미어 유지기작 (Alternative Lengthening of Telomere, ALT)이 존재한다. 전자의 경우 2009년에 노벨상을 수상할 정도로 많은 연구가 축적되어 있지만 후자인 대안적 텔로미어 유지 기작 및 그 활성화와 관련되서는 거의 알려진 것이 없다.
- [4] J. D. Henson et al (C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. Nature biotechnology 27, 1181-1185 (2009))은 인간 세포에서 ALT로서 C-circle 형성을 개시한다.
- [5] 암세포는 특정 조건하에서 텔로머라제 의하거나 또는 ALT에 의한 텔로미어 유지기작을 통해 분열을 지속하기 때문에, 이러한 기작은 암치료의 중요한 표적이 된다. 따라서, 암세포가 ALT 또는 텔로머라제 양성 인지 여부를 판별하는 것은 매우 중요하다. 아울러, 텔로머라제 유지 기작의 규명을 통한 암치료제 개발도 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본원에서는 대안적 텔로미어 길이 유지 기작 및 그 용도를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [7] 한 양태에서 본원은 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드에 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 각각에 (TTAGGC)_x(TCAGGC)_y(TTAGGC)_z의 3 종류의 단위서열을 포함하는 제 1 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 (예를 들면 T-ALT 1); 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드에 상기 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 각각에 (TTAGGC)_x(TTAGTA 또는

TTAGTC)_m(TTAGGC)_n의 3 종류의 단위서열을 포함하는 제 2 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 (예를 들면 T-ALT 2)로부터 선택되고, 상기 제 1 서열 및 제 2 서열에서 각각 상기 3 종류의 단위서열의 순서는 무작위이며, 상기 x, y, z, l, m 및 n은 0 또는 1 이상의 정수로, 각각 동일하거나 상이한 것인, 대안적 텔로미어 유지 (Alternative Lengthening of Telomere ALT) 기작에 작용하는 폴리뉴클레오타이드 또는 엘리먼트를 제공한다.

- [8] 본원에 따른 T-ALT 엘리먼트는 선충 또는 세포의 염색체에 존재하는 텔로미어 근위 (proximal to telomere)에 존재하는 것으로, 일 구현예에서 상기 세 종류의 단위서열 각각은 결여되거나 반복될 수 있는 것으로, 예를 들면 ALT의 활성 정도에 따라 변할 수 있는 것으로 특별히 제한되는 것은 아니고 예를 들면 상기 x, y, z, l, m 및 n은 각각 0 또는 1에서 100 사이의 정수일 수 있다.
- [9] 본원에 따른 엘리먼트는 각종 생물학적 시료에 적용되어 ALT 양성 암의 검출에 유용하게 사용될 수 있으며, 이런 측면에서 본원은 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 엘리먼트 검출용 물질을 포함하는, ALT 양성 암 검출용 조성물을 제공한다.
- [10] 본원은 ALT의 기전 및 이에 관여하는 엘리먼트를 규명한 것으로, 이런 측면에서 본원은 또한 꼬마선충을 제공하는 단계; 상기 꼬마선충을 암을 유발할 수 있는 환경에 노출하는 단계; 상기 암 유발환경 노출 전, 노출 후 또는 노출과 함께, 상기 꼬마선충에 텔로미어의 유지를 억제할 것으로 기대되는 시험물질을 처리하는 단계; 및 상기 시험물질로 처리된 꼬마선충과 상기 시험물질로 처리되지 않은 대조군에서 T-ALT (Template-Alternative Lengthening of Telomere) 엘리먼트를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 시험물질로 처리된 꼬마선충에서 상기 대조군과 비교하여 T-ALT의 부재 또는 대조군과 비교하여 증폭된 서열 길이가 짧은 경우 상기 시험물질을 암치료용 후보물질로 선별하는 것인, ALT 양성 암치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [11] 다른 양태에서 본원은 꼬마선충의 ALT 활성을 측정하는 방법을 제공하며 상기 방법은 꼬마선충 유래의 DNA를 제공하는 단계; 상기 DNA로부터 T-ALT 엘리먼트를 증폭하는 단계; 및 상기 증폭된 산물을 정량 또는 정성적으로 검출하는 단계를 포함하며 상기 증폭된 산물 즉, ALT의 존재는 ALT 활성을 나타낸다.

발명의 효과

- [12] 본원은 대안적 텔로미어 길이 유지 기전에 작용하는 T-ALT 엘리먼트 및 그 용도를 개시한다. 본원에 따른 엘리먼트는 세포내 ALT 활성을 검출하는 마커로서 사용되거나 또는 암 치료제 물질 등의 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다 또한 ALT에 의존하는 암세포 판별, 상기 암세포에 대한 맞춤형 치료법 개발, ALT 양성 암 연구, ALT 기전 연구 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 특정 텔로미어 서열을 갖는 꼬마선충에서 안정적 ALT 생존개체의 분리와 관련된 것이다. 도 1a는 이를 위한 실험과정을 도식적으로 나타낸 것이며, 도 1b는 생존개체 CB4856 trt-1, pot-2(tm1400), CS1 및 CS2의 텔로미어 길이를 FISH를 이용하여 정량분석한 결과로 텔로미어는 배아에서 Cy-3-TTAGGC*3 PNA 프로브 (적색)을 사용하여 검출하였으며, DNA는 DAPI (청색)로 카운터염색하였고, 위쪽 패널은 각 생존개체의 대푯값을 나타내며, 통계는 T-test (* P-value < 0.0001) 로 처리하였으며, 평균(Mean) 값은 적색 막대로 나타냈다. 도 1c는 N2, CB4856, pot-1(tm1620), pot-2(tm1400), 및 NheI, DraI, ApaI, NdeI, XhoI, NcoI 및 SacI 6개 핵산을 인식하여 자르는 제한효소의 조합으로 절단된 모든 CS 생존개체에 대한 TRF 분석을 나타내며, DIG-TTAGGC*4 로 프로빙하였으며, 긴 텔로미어에 대한 양성 대조군으로는 pot-1(tm1620) 및 pot-2(tm1400)를 사용하였다. 도 1d는 CB4856, CB4856 trt-1, HinfI 절단 후 DIG-TTAGGC*4로 프로빙된 CS 생존개체에 대한 TRF 분석 결과이다.
- [14] 도 2는 생존개체가 ALT로서 T-ALT1 엘리먼트를 사용하였음을 보여주는 결과이다. 도 2a는 이종교배 후 유지된 CB4856 SNVs의 연합 히트맵을 나타내며, 오른쪽 패널은 V 염색체의 T-ALT 좌위 근방을 확대한 사진이다. 도 2b는 CB4856 trt-1, N2 trt-1, CS1, CS2 및 N2와 이종교배된 CS 생존개체 (CS1x4-1, CS1x4-2 및 CS2x4)의 평균 리드맵쓰 플랏으로부터 변화된 배수를 나타낸 것으로, 스트레인 특이적 변화에 의한 편차를 보정하기 위해 모 CB4856 trt-1(grey bar)의 평균 리드맵쓰에 있어 변화된 배수를 ALT 생존개체의 값에서 차감하였으며, 아래 패널은 염색체 V의 T-ALT를 확대한 것으로 여기에서 내부의 반복되는 텔로미어는 검은색 막대로 나타냈고, T-ALT 좌위 양쪽의 유전자 구조는 보라색 막대로 나타냈다. 도 2c는 판독결과로부터 재구성된 콘티그(적색 막대)로, 한 쌍을 T-ALT 1에 정렬하여 유전체의 좌위를 결정하였으며, 단절점 PCR 및 CB4856의 T-ALT 1 프로브를 이용용한 서던블랏으로 트랜스복제를 확인하였으며, CS1 생존개체는 T-ALT와 서브텔로미어의 경계를 증폭하는 프라이머를 사용하여 분석 (아래 패널)하였으며, 별표는 BLAST로 예측된 단절점 (검은색) 또는 확인된 단절점 (적색)을 나타낸다. 도 2d는 배아단계에서 T-ALT 1 프로브와 텔로미어 프로브를 이용한 FISH 결과로, 스케일바는 10µm이고, DAPI; 녹색, T-ALT 1; 적색, 텔로미어를 나타낸다. 도 2e는 T-ALT 1 프로브와 텔로미어 프로브를 이용한 TRF 분석 결과로 표시된 제한효소로 DNA를 절단하고 표시된 프로브로 교잡하였으며, 약자는 다음과 같다: RE, 제한효소 (restriction endonuclease); C, CB4856 trt-1; S, CS1 생존개체; H, HindIII; B, BamHI; Nc, NcoI; Nd, NdeI; Nh, NheI; S, SacI; Mix, HindIII, BamHI, NcoI, NdeI, NheI 및 SacI의 혼합물.
- [15] 도 3은 ALT로서 T-ALT 2를 이용한 N2 생존개체를 분석한 결과이다. 도 3a는 N2 생존개체의 텔로미어에 대한 TRF 분석으로 N2 trt-1 및 NS 생존개체 (NS1 내지 NS5)의 유전체를 표시된 제한효소로 절단한 후 (TTAGGC)*4 반복서열로

교잡하였으며, 화살표는 절단된 T-ALT 2 엘리먼트이다. 도 3b는 N2 trt-1 및 N2 생존개체의 평균 리드맵스 플롯에서 변화된 배수를 나타내는 것으로, 스트레인 특이적 변화에 의한 편차를 보정하기 위해 모 N2 trt-1 (grey bar)의 평균 리드맵스에 있어 변화된 배수를 ALT 생존개체의 값에서 차감하였으며, 아래 패널은 I 염색체상의 T-ALT를 확대한 것이며, 내부 반복 텔로미어는 검은색으로 나타냈다. 도 3c는 N2 생존개체 텔로미어에 대한 TRF 분석결과로 DNA를 *HinfI*으로 절단한 후 (TTAGGC)*4 프로브로 교잡하였으며, 동일한 블랏에 대해 프로브를 제거한 후, T-ALT 2 특이적 프로브로 재교잡하였다. 도 3d는 CB4856 trt-1, N2 trt-1 및 모든 생존개체의 배아에서 T-ALT 및 텔로미어 프로브를 사용한 FISH 분석 결과로 스케일바는 10 μ m; 청색, DAPI; 녹색, T-ALT; 적색, 텔로미어를 나타낸다.

- [16] 도 4는 ALT 기전에 T-ALT 도너의 근위 텔로미어로의 시스-복제 및 뒤이은 다른 염색체 말단으로의 트랜스-복제가 관여되어 있음을 나타내는 것이다. 도 4a는 N2 trt-1, CB4856 trt-1, CS1 및 CS2의 WGS 데이터 유래의 SNVs (WBvar00067712 및 WBvar00067717)의 평균 커버리지로부터 변화된 배수를 나타내는 것으로, N2 대립유전자 (청색) 및 CB4856(적색) 대립유전자는 개별적으로 플랏팅되었으며, 수치의 큰 차이로 인해, Y 축을 다 나타내지 못하고 중간을 생략하고 표시하였다. 도 4b는 CB4856-유래의 SNVs는 N2가 아닌, CB4856의 염색체 V의 오른쪽 말단에 위치한 것으로 나타났으며, 단절점 PCR 프라이머 (염색체 V, cccaccggaacgaataaat) 와 T-ALT 1 의 근위 텔로미어에 결합하도록 디자인된 프라이머쌍 (적색 화살표)(Reverse 5'-AACAAGCTTCTGGCACGTCT-3'서열번호 4, Forward 5'-GAAGGATGGGATGGAACTGA-3'서열번호 3)을 이용하여 수행하였으며, 위패널은 T-ALT 1 엘리먼트 및 주변의 반복되는 텔로미어 (검은색 박스)를 나타내고, 별표는 CB4856 SNVs를 나타내고, 점선으로 표시된 부분은 유전체 위치를 나타내며 약자는 다음과 같다: CB, CB4856; Rev, 역방향 프라이머; For, 정방향 프라이머. 도 4c는 내부 및 텔로미어 T-ALT 1의 WBvar00067712 및 WBvar00067717의 뉴클레오타이드 변화를 나타낸 것으로, N2 대립유전자는 청색으로, CB 대립유전자는 적색으로 나타냈으며, 뉴클레오타이드의 위치는 패널 B에 표시되어 있다. 도 4d는 N2 유전체 상의 T-ALT 2를 도식적으로 나타낸 것으로, 도 4e에 사용된 프라이머는 증폭산물의 크기와 함께 적색 화살표로 나타냈으며, T-ALT 도너 및 저장소에 특이한 반복 변이체 (별표)도 표시되어 있다. 도 4e는 CB4856 야생형 분리체에서는 T-ALT 2 저장소가 결여되어 있음을 나타내는 것으로, 표시된 프라이머를 사용한 PCR 증폭산물은 전기영동한 후 에씨디움 브로마이드로 염색하였으며 약자는 다음과 같다: N2, N2; CB, CB4856. 도 4f는 CB4856 trt-1, N2 trt-1 및 모든 NS 생존개체의 WGS 데이터에서 수득한 변이체 판독 카운트 값으로, 상기 값은 각 시료에 대한 총 서열 커버리지로 노말라이즈되었다. 도 4g는 실행가능 모델을 나타내는 것으로, ITS가 있는 내부

유전체부위는 꼬마선충 ALT 생존개체의 ALT 주형으로 작용할 수 있으며, 상기 모델은 가상의 공포 조상으로부터 갈라져나온 후, 텔로미어로의 T-ALT 도너의 시스-복제가 이미 자연에서 독립적으로 발생하였음을 나타내고, 텔로미어 크라이시스 후에, 서브텔로미어의 T-ALT 저장소가 텔로미어 유지용 주형으로서 사용될 수 있음을 또한 나타낸다.

- [17] 도 5는 NS 1 생존개체에서 염색체 말단으로 복제된 T-ALT 2 엘리먼트 좌위를 분석한 결과로, 도 5b는 T-ALT 2 엘리먼트 특이적 프라이머 (cctgccaacctatatgctcc, 서열번호 7)와 염색체 말단 특이적 프라이머 (염색체 V의 오른쪽 암: cccaccggaacgaataaat, 염색체 X의 오른쪽 암: ttccagcctccattacgtc, 염색체 II의 왼쪽 암: cgaccgcgtcatcgttaca)를 이용한 PCR 분석을 도식적으로 나타낸 것이다. 도 5b는 염색체 말단 및 T-ALT 2 엘리먼트 경계의 서열을 분석한 결과로 위쪽 패널은 염색체 V의 오른쪽 암이고, 중간 패널은 염색체 X의 오른쪽 암이고, 아래 패널은 염색체 II의 왼쪽 암으로, 적색은 T-ALT 2, 노란색은 텔로미어 반복서열, 파랑색은 염색체 말단을 나타낸다. 도 5b에 있는 결과만으로 보면 기존의 텔로미어는 모조리 제거하는 과정이 진행되는 것으로 보이나, 이러한 기작 이후에 염기서열의 구조는 염색체 말단 특이적 서열 - T-ALT 특이적 서열 - 텔로미어 반복 서열 - T-ALT 특이적 서열 - 텔로미어 반복 서열 - T-ALT 특이적 서열 - 텔로미어 반복 서열 - T-ALT 특이적 서열의 형태로 형성될 것으로 판단되며, 즉, 가장 앞쪽의 단위 이후에는 T-ALT 특이적 서열이 텔로미어로 플랭킹 되는 구조를 가질 것으로 예측된다. 도 5c는 복제된 T-ALT 2가 템플 반복 패턴을 가짐을 보여주는 것으로, 표시된 프라이머 (Forward 5'-cctgccaacctatatgctcc-3' 서열번호 7, Reverse 5'-ggagcatataggttggcagg-3' 서열번호 8)로 PCR 증폭한 후 서던블랏으로 검출하였다. N: N2 NS1: NS 생존개체. 도 5d는 T-ALT 2 특이적 프라이머 (Forward 5'-gttttcagctaaattcaaacg-3' 서열번호 5, Reverse 5'-aaacacaggagcatataggttg-3' 서열번호 6)를 이용한 카피수를 정량 PCR로 분석한 결과로 생존개체 NS1 및 NS2에서 T-ALT 2의 카피수가 증가하였음을 나타내며, 카피수는 act-1 유전자와 비교하였다.

- [18] 도 6은 모든 ALT 생존개체에서 증가된 감마선에 반응한 유전자 세트를 분석한 결과로, A는 CB4856 생존개체의 GSEA 분석결과로 감마선 반응 유전자 세트가 CS1x4-1과 Cs1x4-2 생존개체에서 증가하였으며, 이러한 세트는 FDR (false discovery rate) q-value < 0.005에서 증가하였음을 나타내며, B는 N2 생존개체의 GSEA 결과로, 감마선 반응 유전자 세트가 NS1 및 NS2 생존개체에서 증가하였으며, 이러한 세트는 FDR q-value < 0.005에서 증가하였음을 나타낸다.

- [19] 도 7은 본원에서 규명된 T-ALT 엘리먼트로 T-ALT 1 및 T-ALT 2의 특징을 비교하는 표 및 각 구조를 도식적으로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [20] 본원은 암세포와 같은 세포의 제어되지 않은 계속적 분열에 중요한, 대안적 텔로미어 유지 (Alternative Lengthening of Telomere, ALT) 기작/과정에 관여하는

폴리뉴클레오타이드 일명, DNA 시그니처 또는 T-ALT (Template-ALT) 엘리먼트의 규명에 근거한 것이다.

- [21] 선형 염색체는 말단의 복제가 완전하지 않아, 복제를 거듭할수록 그 길이가 점차 줄어들게 된다. 텔로미어는 염색체 말단에 위치하는 반복되는 서열로 그 길이를 기준으로 세포의 분열 횟수를 적절한 수준으로 제한하는 역할을 하며, 텔로미어 길이가 적정 수준보다 짧아지게 되면 세포는 분열을 멈추게 된다. 따라서 텔로미어는 정상세포의 지속적 분열을 방지하여, 결국 정상세포가 암세포로 발전하는 것을 억제하게 된다. 따라서 암세포는 제한된 분열 횟수를 넘어 계속적으로 분열하기 위해 충분한 텔로미어 길이를 유지하기 위한 기작을 가지고 있으며, 그 중 하나가 ALT (Alternative Lengthening of Telomere)이다.
- [22] 본원에서 ALT (Alternative Lengthening of Telomere)란 염색체 말단에 존재하는 텔로미어 길이를 유지하는 과정을 일컫는 것으로, 텔로머라제 활성을 통한 텔로미어 길이 유지를 제외한 텔로미어 길이 유지를 위한 수단, 방법 및/또는 기전을 포함한다.
- [23] 본원에서 ALT 양성은 ALT가 활성화되어 있는, 즉 ALT 존재하여 작용하는 세포 또는 개체를 의미한다.
- [24] 따라서 한 양태에서 본원은 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드에 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 각각에, 5'-(TTAGGC)_x (TCAGGC)_y(TTAGGC)_z-3'의 3 종류의 반복 또는 단위서열을 포함하는 제 1 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드에 상기 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 각각에 5'-(TTAGGC)_l(TTAGTM)_m(TTAGTM)_n-3'의 3 종류의 반복 또는 단위서열을 포함하는 제 2 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드로부터 선택되며, 상기 제 2 서열에서 M은 A 또는 C이다.
- [25] 본원에 따른 제 1 및 제 2 서열을 구성하는 3 종류 각 반복 또는 단위 서열 즉 제 1 서열의 반복서열인 TTAGGC, TCAGGC, 및 TTAGGC, 그리고 제 2 서열의 반복서열인 TTAGGC, TTAGTM, TTAGTM의 순서는 위에 기재된 순서대로 한정되는 것은 아니며, 즉 무작위이며, 예를 들면 (TTAGGC)_x(TCAGGC)_y (TTAGGC)_z, (TCAGGC)_y(TTAGGC)_z(TTAGGC)_x, (TCAGGC)_y(TTAGGC)_x (TTAGGC)_z, (TTAGGC)_z(TTAGGC)_x(TCAGGC)_y 등과 같이 배열될 수 있으며, 상기 x, y, z, l, m 및 n은 0 또는 1 이상의 정수로, 각각 동일하거나 상이할 수 있다.
- [26] 본원에 따른 T-ALT는 선충 또는 세포의 염색체에 존재하는 텔로미어 근위 (proximal to telomere)에 존재하는 폴리뉴클레오타이드로, 일 구현예에서 상기 세 종류의 단위서열 각각은 결여되거나 반복될 수 있는 것으로, 예를 들면 ALT의 활성 정도에 따라 특히 그 숫자가 변할 수 있는 것으로 특별히 제한되는 것은 아니고 예를 들면 상기 x, y, z, l, m 및 n은 각각 0 또는 1 내지 100 사이의 정수일 수 있다.
- [27] 본원에서 T-ALT 엘리먼트는 대안적 텔로미어 유지 (Alternative Lengthening of

Telomere ALT) 기작에 작용하는 폴리뉴클레오타이드를 일컫는 것이다.

- [28] 일 구현예에서 도 5를 참조하면, 본원에 따른 T-ALT 엘리먼트는 제 1 서열로 플랭킹된 서열번호 1의 서열 (즉, 제1 서열-서열번호 1-제1 서열)의 폴리뉴클레오타이드, 또는 제2 서열로 플랭킹된 서열번호 2의 서열 (즉, 제2 서열-서열번호 2-제2 서열)의 폴리뉴클레오타이드와 같이 나타낼 수 있으며 꼬마선충 유래이다.

- [29] 본원에 따른 T-ALT 엘리먼트 또는 폴리뉴클레오타이드는 ALT 양성 세포의 판별에 유용하게 사용될 수 있으며, 이는 ALT에 의존하는 암세포 판별, 상기 암세포에 대한 맞춤형 치료법 개발, ALT 양성 암 연구, ALT 기전 연구 등에 유용하게 사용될 수 있다.

- [30] 다른 양태에서 본원은 또한 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 또는 상기 벡터로 형질전환된 꼬마선충에 관한 것이다. 이러한 꼬마선충은 ALT에 의존하는 암세포 판별, 상기 암세포에 대한 맞춤형 치료법 개발, ALT 양성 암 연구, ALT 기전 연구 등에 유용하게 사용될 수 있다.

- [31] 따라서 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드 검출용 물질을 포함하는, ALT 양성 세포 검출용, 또는 ALT 양성 암검출용 조성물에 관한 것이다.

- [32] 본원에서 검출이란, 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드의 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 검출 및 발현량 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.

- [33] 본원에서 용어 검출용 물질 또는 검출시약은 본원의 폴리펩타이드를 정량적으로 또는 존재여부의 판단을 위해 이를 검출할 수 있는 물질이다. 핵산 수준의 검출 방법 및 시약은 공지된 것으로서, 예를 들면 상기 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머, 또는 특이적으로 검출할 수 있는 프로브를 포함할 수 있으며, 이들은 칩 방식 또는 나노입자(nanoparticle)과 함께 사용될 수 있다.

- [34] 본원에서 사용된 용어 프라이머는 본원에서 검출하는 폴리뉴클레오타이드에 특이적인, 본원에 따른 폴리펩타이드의 적어도 일부분에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 말하며, 중합효소연쇄반응과 같은 폴리머라제를 사용한 중합반응에서 중합의 시작점이 된다.

- [35] 본원의 프라이머는 이와 높은 서열유사성을 갖는 것을 또한 포함한다. 높은 서열유사성이란, GCG FastA (Genetics Computer Group, Madison, Wis.USA), MacVector 4.5 (Kodak/IBI software package) 또는 기타 당업계에 공지된 서열분석 방법 또는 프로그램을 이용하여, 적어도 70% 이상의 서열유사성이 있는 것을 말한다. 프라이머는 당업계의 공지된 방법 또는 합성회사를 통하여 합성할 수 있으며, 길이는 적어도 약 5개 뉴클레오타이드이다.

- [36] 본원의 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 검출하는 방법에 따라

시각화 할 수 있는 적절한 물질로 표지될 수 있다. 상기 표지물질은 방사선동위원소, 폴리펩타이드성 표지물질, 형광물질, 발색물질 등과 같은 것을 포함한다. 이러한 표지물질은 올리고뉴클레오타이드 합성시에 그 자체에 도입될 수도 있고, PCR을 사용하는 경우 중합과정에서 도입될 수 있다. 방사선물질은 베타, 감마 및 알파선 방출체를 포함하는 것으로, ^{32}P , ^{35}S 및 ^{125}I 를 포함한다. 형광물질은 에너지를 흡수하면 여기되고, 여기상태에서 기저상태로 되돌아가면서 가시광선을 방출하는 물질로 플로세신 및 로다민을 예로 들 수 있다. 폴리펩타이드성 표지물질은 바이오틴, 디그옥시제닌과 같은 항원성 물질과 호스레디쉬퍼옥시다제와 같은 효소를 포함한다. 발색물질은 화학반응으로 흡수한 에너지를 방출하는 화학발광물질 예를 들면 옥시루미네스스와 같은 것을 포함한다.

[37] 본원에 따른 일 구현예에서, 검출은 핵산의 존재여부 또는 존재할 경우 그 양을 검출하는 것을 의미하는 것으로서 핵산 특이적 DNA-DNA, 혼성화 반응을 기본으로 하는 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나, TRF 분석, 인치츄 교잡, 서던블랏 분석, 마이크로칩분석, PCR (정량적 및 정성적 PCR, 실시간 정량적 정성적 PCR 포함)을 포함하는 증폭과 같은 당업계의 다양한 방법을 사용하여 달성될 수 있다.

[38] 일 구현예에서는 핵산 증폭에 사용되며, 특히 PCR에 사용될 수 있다.

[39] 본원에서 사용된 용어 PCR (Polymerase Chain Reaction)은 중합효소를 사용하여 핵산을 연쇄적으로 합성하여 개시 핵산물질을 기하급수적으로 증폭하는 방법으로 당업계에 널리 공지된 방법으로, 특정 핵산의 존재 유무를 확인하는 정성분석 PCR, 특정핵산의 양을 측정하는 정량 PCR 및 PCR 과정을 실시간으로 추적하여 정성 및 정량 분석을 가능하게 하는 실시간 PCR을 모두 포함하는 개념이다. PCR에 의해 증폭된 산물(amplicon)은 주형으로 사용한 분자와 상응하는 서열을 가지며, 당업계에 공지된 다양한 방법으로 분석될 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 공지된 것으로서 예를 들면 젤 전기영동, 실시간 PCR 분석, 정량 PCR, SSCP (single strand conformational polymorphism), RFLP(restriction fragment length polymorphism), CZE(capillary zone electrophoresis), WAVE (HPLC-based nucleic acid analyzing technology) 및 마이크로칩을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[40] 본 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니나, 일 구현예에서 본원에 따른 폴리펩타이드가 관여하는 ALT 기전은 도 4에 기재된 바와 같다. 도 4에 따르면, T-ALT D (도너)가 텔로미어 근위(proximal to telomere)로 시스-복제되고, 이어 다른 염색체 말단으로의 트랜스-복제되어 T-ALT R (저장소)를 생성하여 T-ALT 저장소가 텔로미어 유지용 주형으로서 사용된다.

[41] 따라서 한 양태에서 본원은 꼬마선충을 제공하는 단계; 상기 꼬마선충을 암을 유발할 수 있는 환경에 노출하는 단계; 상기 암 유발환경 노출 전, 노출 후 또는 노출과 함께, 상기 꼬마선충에 텔로미어의 유지를 억제할 것으로 기대되는

시험물질을 처리하는 단계; 및 상기 시험물질로 처리된 꼬마선충과 상기 시험물질로 처리되지 않은 대조군에서 T-ALT (Template-Alternative Lengthening of Telomere) 엘리먼트를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 시험물질로 처리된 꼬마선충에서 상기 대조군과 비교하여 T-ALT의 부재 또는 T-ALT의 반복 정도가 짧은 경우, 상기 시험물질을 암치료용 후보물질로 선별하는 것인, ALT 양성 암치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

- [42] 본원에 따른 방법에서 T-ALT의 부재 또는 T-ALT의 반복 정도는 공지된 기술을 이용하여 검출될 수 있으며, 앞서 기술한 바를 참조할 수 있다. 예를 들면 TRF(Terminal Restriction Fragment) 분석, PCR, 정량 PCR, 인시츄교잡, 서던블랏, 또는 서열분석 방법이 사용될 수 있다.
- [43] 본원에 따른 방법에서 T-ALT 엘리먼트는 도너로 작용하는 염색체 내에 존재하는 T-ALT 도너 및 상기 도너가 시스 또는 트랜스로 텔로미어 근위에 복제되어 생성된 T-ALT 저장소 (R)을 포함하며, 이는 앞서 설명한 바를 참조할 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서 검출은 텔로미어 근위 (proximal to telomere)에 존재하는 T-ALT 저장소를 일컫는 것으로, 근위란, 텔로미어로부터 10,000bp 내의 위치를 일컫는 것이다.
- [44] 본원에 따른 꼬마선충 (*C.elegans*)은 공지의 방법대로 유지될 수 있다. 본원에 따른 방법에서 암을 유발할 수 있는 환경이란, 상기 꼬마선충을 방사선으로 조사 예를 들면 감마선을 60gy 조사할 수 있으며, 또는 기타 하기 문헌에 기재된 것을 참조할 수 있다 (Meier et al. Genome Res. 2014. 24: 1624-1636; 및 Subramaniam et al. Current Biology 2003. 13: 134-139).
- [45] 꼬마선충은 암 유발 환경 노출 전에, 동시에 또는 노출 후에 텔로미어 길이 유지를 억제할 것으로 기대되는 시험물질로 처리된다.
- [46] 본 방법에서 사용되는 시험물질의 양 및 종류 등은 사용하는 구체적인 실험방법 및 시험물질의 종류에 따라 달라지며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있을 것이다. 실험결과 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재하에서 ALT 활성의 활성의 감소 즉, T-ALT의 부재 또는 대조군과 비교하여 T-ALT 특히 T-ALT 저장소 (R)이 적게 검출된 경우 이를 후보물질로 선별한다. 대조군과 비교 약 99% 이하 감소, 약 95% 이하 감소, 약 90% 감소, 약 85% 감소, 약 80% 감소, 약 75% 감소, 약 70% 감소, 약 65% 이하 감소, 약 60% 이하 감소, 약 55% 감소, 약 50% 이하 감소, 약 45% 이하 감소, 약 40% 이하 감소, 약 30% 이하 감소, 약 20% 이하 감소를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [47] 본원의 "시험물질"은 텔로미어 길이 유지를 억제할 것으로 기대되는 물질을 의미하여, 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 또는 바이오의약품(예컨대, 단백질, 항체, 펩타이드, DNA, RNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi, 앵타머, RNAzyme 및 DNAzyme), 또는 당 및 지질 등을 포함하나 이로 한정하는 것은

아니다. 상기 시험물질은 2개 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 6개, 10개, 12개, 20개 이하 또는 20개 초과 예컨대 50개 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있으며 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

- [48] 예를 들면 본원에 따른 스크리닝 목적을 위해서는 화합물은 저분자량의 치료효과를 갖는 것이 사용될 수 있다. 예를 들면 중량이 400 Da, 600 Da 또는 800 Da과 같은 약 1000 Da 내외의 화합물이 사용될 수 있다. 목적에 따라 이러한 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 숫자도 수십개부터 수백만개까지 다양하다. 이러한 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보사이클 및 폴리사이클 화합물 (예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클 (예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함하는 것일 수 있으나, 이는 단지 예시적인 것으로 이로 한정되는 것은 아니다.
- [49] 본원에서는 특히 이러한 저분자 화합물 중 ALT 활성을 억제할 수 있는 물질이 포함된다.
- [50] 또한 예를 들면 바이올로지스가 스크리닝에 사용될 수 있다. 바이올로지스는 세포 또는 바이오분자를 일컫는 것으로, 바이오분자란, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 생체내 및 생체외에서 세포 시스템 등을 이용하여 생산된 물질을 일컫는 것이다. 바이오분자를 단독으로 또는 다른 바이오분자 또는 세포와 조합으로 제공될 수 있다. 바이오분자는 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드,

펩타이드, 항체, 또는 기타 혈장에서 발견되는 단백질 또는 생물학적 유기물질을 포함하는 것이다.

- [51] 본원에 따른 방법은 텔로미어의 위치를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 따른 방법에서 검출되는 T-ALT 엘리먼트는 특히 T-ALT 저장소로, 이는 텔로미어의 근위에 위치하기 때문에, T-ALT 엘리먼트의 검출을 위해서는 텔로미어 근위의 서열을 분석하는 것이 필요하다.
- [52] 기타 본원에 따른 방법에 사용되는 검출 방법은 앞서 언급한 바를 참조할 수 있다.
- [53] 다른 양태에서 본원은 또한 꼬마선충의 ALT 활성을 측정하는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서 상기 방법은 꼬마선충 유래의 DNA를 제공하는 단계; 상기 DNA로부터 T-ALT 엘리먼트를 증폭하는 단계; 및 상기 증폭된 산물을 정량 또는 정성적으로 검출하는 단계를 포함하며, 상기 ALT의 존재는 ALT 활성을 나타내는 것이다.
- [54] 상기 방법에서 꼬마선충 유래의 DNA는 유전체 DNA를 의미하며, T-ALT 엘리먼트, 기타 증폭 및 검출 방법은 앞서 언급한 바를 참조할 수 있다.
- [55] 상기 방법은 ALT의 활성을 측정하는 텔로미어 기초 연구, 암 연구와 같은 분야 등에서 연구 툴로서 사용될 수 있음은 물론 암의 진단 및 항암전략 수립 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.
- [56] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [57] 본 발명은 달리 언급이 없는 한 세포생물학, 세포배양, 분자생물학, 유전자 형질전환 기술, 미생물학, DNA 재조합기술에 관한 당업자의 기술수준 내인 통상의 기술을 사용하여 실시될 수 있다. 또한, 일반적인 기술에 관한 보다 자세한 설명은 Molecular Biotechnology: (Bernard et al., ASM press 1994); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985)을 참고할 수 있다.
- [58] 실시예
- [59] 실험방법 및 재료
- [60] 꼬마선충 (Caenorhabditis elegans) 선별 및 배양
- [61] 꼬마선충은 표준조건 (Brenner, Genetics 1974. 77(1): 71-94에 기재된 사항 참고)에서 20°C에서 배양하였다. 본 발명에 사용된 스트레인들은 다음과 같다: Bristol N2 야생주, Hawaiian CB4856 야생형 분리체, trt-1(ok410)I. N2 trt-1(ok410)는 Hawaiian CB4856와 이종교배하여 CB4856 trt-1(ok410)을 생산하였다. 이종교배의 효과를 극대화시키기 위하여, 모든 염색체 마커의 SNP를 확인하였다. trt-1(ok410) 돌연변이는 PCR로 확인하였으며, trt-1(ok410)

주는 야생형 N2와 이종교배하여 초기 세대의 N2 trt-1(ok410)를 생산하였다.

[62] **EMS 처리**

[63] 동시화된 L4 선충을 M9 완충액 중 50 mM EMS로 4시간 동안 처리하였다. 그 후 처리된 P0 선충이 12시간 동안 알을 낳도록 하였다. 이어 P0 선충을 제거하여 F1 선충을 분리하였다. 초기에 약 100개의 F1 알을 새로운 플레이트에 옮기고, 이어 F2 세대부터는 10~15 마리의 선충을 매 세대마다 수작업으로 옮겼다.

[64] **RNA 간섭**

[65] DsRNA를 발현하는 E. coli HT115를 1 mM 앰피실린을 포함하는 LB에서 37°C로 하룻밤 배양한 후 1 mM IPTG 및 1 mM 앰피실린을 포함하는 NGM 플레이트에 시딩하였다. 이어 매 세대에서, 10-15 L1 유충을 새로운 RNAi 배지 플레이트로 옮겼다.

[66] **텔로미어 형광 인시츄 교잡 (FISH)**

[67] 성체 선충을 블리칭하여 알을 분리하였다. 분리된 알은 2% 파라포름알데하이드로 고정하였다. 알이 담긴 시험관을 액체 질소에 얼린 후 온수에서 녹여 알을 깼다. 폴리라이신으로 코팅된 슬라이드에 알을 안착시킨 후, 0.1% 트윈-20을 포함하는 인산완충용액 (PBST)로 3회 세척하여 잔류하는 PFA를 제거하였다. 이어 슬라이드를 아세톤 및 메탄올에 -20°C에서 각각 5분간 넣어둔 후 0.1% 트윈-20을 포함하는 2 X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate)에서 재수화하였다. 슬라이드를 전교잡 용액 (3X SSC, 50% formamide, 10% dextran sulfate, 50 µg/ml heparin, 100 µg/ml yeast tRNA, 100 µg/ml salmon sperm DNA)에서 37°C로 1시간동안 처리하여 블락킹하였다. PNA-(TTAGGC)₃ 프로브를 16시간 동안 37°C로 습한 챔버에서 배양한 후, 세척액 (2X SSC 및 50 % formamide)으로 각 15분씩 37°C에서 2회 세척하였다. PBS-T로 3회 세척 후, 슬라이드를 DAPI로 카운터 염색 한 후, 항탈색 시약 Vectashield (Vector Laboratory)으로 마운팅 한 후, 콘포칼 현미경 (LSM200, Zeiss)으로 촬영하였다.

[68] T-ALT 1 프로브는 디그옥시제닌 (DIG)으로 표지되었으며, FISH 방법으로 형광분석하였다. FISH 분석 후에, 슬라이드는 5% BSA를 포함하는 PBS-T 용액으로 1시간동안 실온에서 블락킹 한 후, 로다민 결합된 항-DIG 항체로 3시간 동안 처리하였다. PBS-T로 2회 세척한 후 슬라이드를 마운팅하고 상술한 바와 같이 분석하였다. 텔로미어 신호는 TFL-TELO 소프트웨어 (Dr. Peter Lansdorp, Terry Fox Laboratory, Vancouver)를 이용하여 분석하였다. 인시츄교잡에 사용된 프로브는 서열번호 9 (T-ALT 1)과 서열번호 10 (T-ALT 2)와 같다.

[69] **텔로미어 서던 블랏**

[70] 유전체 DNA를 수득하기 위해, 선충을 수확하여 5회 M9 완충액으로 세척하였다. 이어 선충을 용해 완충액 (100µg/ml proteinase K, 50 mM KCL, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20, 1 % beta-mercaptoethanol)에서 8시간 동안 용해하였다. 이어 DNA는 페놀-클로로포름을 사용하여 추출하고 에탄올 침전하였다. DNA를 TE 완충액에

녹인 후 RNAase (10 μ g/ml)로 2시간 처리한 후 다시 추출한 후 완충액 TE(Tris EDTA)에 녹였다.

- [71] 서던 블랏을 위해, 5 μ g의 DNA를 1 유니트의 제한효소로 처리한 후 펄스필드 전기영동 장치를 이용하여 분리한 후 Zeta 프로브 막 (Bio-Rad)으로 하룻밤동안 DNA를 블랏팅 하였다. 이어 막을 UV로 가교한 후 DIG Easy 교잡 완충액 중에서 프로브와 42°C로 16시간 동안 교잡하였다. 이어 막을 실온에서 2x SSC, 0.1 % SDS로 2회 세척하고, 0.2x SSC, 0.1 % SDS로 42°C에서 2회 세척하였다. DIG-표지된 프로브를 항-DIG-AP 항체 화학발광 검출키트 (Roche) 및 ImageQuant LAS-4000 biomolecular imager (GE healthcare)를 사용하여 검출하였다. 프로브 (TTAGGC)₃₀ probe를 T-easy 벡터에 클로닝된 PCR 증폭되는 텔로미어 서열을 이용하여 DIG-UTP로 표지하였다. T-ALT I 및 T-ALT II 프로브는 T-ALTs에 특이한 영역을 표적으로 하는 프라이머를 사용하여 DIG-UTP로 표지하였다. 서던블랏에 사용된 프로브는 서열번호 11 (T-ALT 1)과 서열번호 12 (T-ALT 2)와 같다.

[72] **BAL 31 엑소뉴클레아제 처리**

- [73] DNA 5 μ g을 10 unit의 BAL 31으로 30°C에서 1x BAL 31 완충액 중에서 처리하였다. 반응은 최종농도 25mM의 EGTA로 처리하여 중단하였으며, 처리된 DNA는 에탄올 침전으로 회수하고 BamHI으로 처리하였다.

[74] **텔로미어-서브텔로미어 경계의 서열분석**

- [75] 텔로미어-서브텔로미어 경계의 서열분석은 경계영역을 PCR로 증폭하였다. 이를 위해, 전방 프라이머는 텔로미어로 연장되도록 텔로미어-근접 DNA에 대하여 디자인하였으며, 역방 프라이머는 T-ALT 1 특이적 서열 (T26H2.5의 제1 엑손)로부터 디자인하였다. CS1 유전체 DNA 및 N2 유전체 DNA를 주형으로 사용하였다. 총 30주기의 PCR을 수행하였으며 조건은 다음과 같다: 총 3분간 어닐링 60 °C 및 신장. 산물을 전기영동 후, CS1-특이적 밴드를 잘라내어 DNA를 추출한 후 PCR에 사용된 프라이머와 동일한 프라이머로 서열을 분석하였다.

[76] **전체 유전체 서열분석**

- [77] DNA는 300bp 크기로 절단하고 평균 인서트 크기가 430bp의 서열분석 라이브러리를 만든 후 Hiseq2000 platform (Illumina, USA) 을 이용하여 분석하였다.

[78] **변이체 발굴**

- [79] EMS 및 CB4856 연관된 변이체를 이용한 변이체 발굴을 위해, 참조 유전체로서 WS243 *C. elegans* 유전체 및 주식 데이터를 Wormbase website (www.wormbase.org)에서 획득하였다. 미가공 서열분석 데이터 처리를 위해, Trimmomatics를 적용하여 illumina 어댑터 서열을 제거하였다 (A. M. Bolger, et al., Bioinformatics, btu170 (2014)). 정확하지 않은 3' 및 5' 말단의 데이터를 제거하였다. 전처리된 결과를 상기 참조 유전체와 정렬한Burrows-Wheeler Aligner software (version 0.7.5a)를 이용하여 정렬하였다(H. Li, et al.,

Bioinformatics 25, 1754-1760 (2009)). 판독 결과는 내정 계수를 이용하여 BWA-MEM 알고리즘을 이용하여 참조 유전체에 대하여 정렬하였다. 변이체를 불러내기 전에, Picard's SortSam 및 MarkDuplicates 및 GATK's indel realignment (McKenna et al., Genome research 20, 1297-1303 (2010)) 및 BQSR (base quality score recalibration)을 적용하였다 (A. McKenna, et al., Genome research 20, 1297-1303 (2010)). 인델(indel) 정렬의 경우에는 참조 유전체와 생존개체 사이의 상당한 유전적 차이로 인해 매우 엄격한 계수를 사용하였다. 참조 유전체의 주석으로부터, SNP 및 인델을 선별하고 BQSR에 사용하였다. GATK 최선 실시에 의하면, 변이체 발굴 및 유전형 결정은 GATK 반수체 분석기를 사용하여 모든 시료에 대하여 동시에 수행하였다. 이어, 커버리지 4의 최소 원(raw) 템프로 표준 하드 필터링을 적용하였다.

[80] **T-ALT 1 콘티그 생성**

[81] T-ALT 1은 N2 유전체에는 없는 CB4856 대립유전자 (T-ALT 1 reservoir)로부터 증폭되었기 때문에, T-ALT 1 저장소는 CLC workbench 7 (Qiagen)를 내정세팅을 이용하여 CB4856 trt-1 서열분석 데이터로부터 새로 구축하였다. BWA를 사용하여, 한 쌍 중 적어도 하나가 재구축된 T-ALT 1 저장소에 맵핑되는 경우에만, CS1 판독결과를 수집하였다. 수집된 결과를 이용하여 콘티그 서열을 생성하였으며, 생성된 결과를 BLAST 서치를 이용하여 N2 유전체와 정렬하였다.

[82] **텔로미어 리드(read) 분석을 위한 전체 유전체 서열 분석**

[83] 전체 유전체 서열 데이터를 BWA (H. Li, et al, *ibid*)를 이용하여 ce10/WBcel215 참조 어셈블리에 정렬하고, SAMtools (H. Li, et al., Bioinformatics 25, 2078-2079 (2009))을 이용하여 bam 파일로 변환하였다. 선충주와 상이한 Bam 파일을 종전에 기술된 소프트웨어 (<http://sourceforge.net/projects/motifcounter/>) (D. Conomos, et al., The Journal of cell biology 199, 893-906 (2012))를 이용하여 텔로미어 내에서 유래된 것으로 예측되는 리드에 대하여 분석하였다. 요약하면, 적어도 6개의 공통 (canonical) 텔로미어 반복 (TTAGGC)을 포함하는 판독결과 (read)를 추출한 후 별도의 파일로 저장하였다. 판독결과를 세고 총 판독결과 밀도에 대하여 노말라이즈 하여 텔로미어 길이를 추론하였다. 저장된 파일은 이어 스플리트- 페어 영역 및 변이체 불러오기에 사용하였다.

[84] **T-ALT 바이오인포메틱스 분석**

[85] 텔로미어와 관련있는 영역을 규명하기 위하여, 텔로미어 판독결과를 포함하는 파일을 이용하여 이와 관련된 쌍으로된 말단을 추출하였다. 모든 쌍이 텔로미어인 경우의 판독결과는 제외하였으며, 오로지 한 쌍만이 유전체에 맵핑되는 판독결과만을 남겨두었다. 서브 텔로미어 영역 및 사이 텔로미어를 둘러싸는 좌위에 부가하여, CS1 및 CS2의 경우는 T-ALT1에, 그리고 NS1 및 NS2의 경우에는 T-ALT2에 대부분의 판독결과가 맵핑되었다.

[86] 유전체에 걸쳐 평균 유전체 커버리지는 SAMtools를 이용하여 중복 및 낮은 맵핑 품질 ($q < 20$)의 판독결과를 제거한 후 BedTools package (A. R. Quinlan, et al.,

Bioinformatics 26, 841-842 (2010))의 프로그램인 genomecov를 이용하여 분석하였다. 리드맵스는 유전체의 매 뉴클레오타이드에 대하여 평가되었으며 평균커버리지로 나누어 노말라이즈 하여 리드맵스에 대한 배수의 변화로 나타냈다. 유전체에 걸친 스트레인 특이적 변화를 고려하여 모 스트레인과 비교한 리드맵스의 변화 배수를 ALT 생존개체에서 차감하였다. 유전체 걸친 그리고 좌위 특이적 리드맵스 변화에 대한 선형 플롯을 R로 생성하였다.

[87] 텔로미어 변이체 불러오기

[88] 텔로미어 변이체는 텔로미어 판독결과를 포함하는 파일을 이용하여 분석하였다. 각 변이체 유형의 수는 종전에 기술된 바와 같이 각 라이브러리의 서브세트의 판독결과내에서 카운트하였다 (D. Conomos et al., *ibid*). 각 반복 변이체의 존재여부는 각 서브세트 판독결과내에서 분석하고, 이들의 빈도를 계산하고 파이 차트를 생성하였다.

[89] mRNA 서열분석

[90] Tuxedo pipeline (Tophat2 and Cufflinks pipeline) (C. Trapnell, et al., Nature protocols 7, 562-578 (2012))를 사용하여 전처리된 RNA-Seq 판독결과를 참조 유전체에 정렬하고 전사체의 발현 정도를 측정하였다. 요약하면, 우선 주어진 전사체 주석을 이용하여 Tophat2으로 RNA-Seq 판독결과를 C. elegans 유전체에 맵핑하였다 (D. Kim, G et al., Genome Biol 14, R36 (2013)). 이어 Cufflinks package (C. Trapnell, et al., Nature biotechnology 28, 511-515 (2010))의 cuffquant 및 cuffnorm 소프트웨어를 사용하여 전 시료에 걸쳐 노말라이즈된 RPKM에서 알려진 전사체가 얼마나 많은지 측정하였다.

[91] 유전자 세트 강화 분석 (Gene set enrichment analysis (GSEA))

[92] C. elegans에 대한 유전자 온톨로지 (GO)주석 데이터를 Wormbase website (www.wormbase.org)에서 획득하였다. 피폭시 변화하는 유전자 세트는 참고문헌 (S. Greiss, et al., BMC genomics 9, 334 (2008)) 에서 획득하였다. ALT 시료 및 야생형 시료의 모든 쌍에 대하여, 상기 획득한 데이터를 이용하여 GSEA를 수행하였다 (A. Subramanian, et al., PNAS 102, 15545-15550 (2005)).

[93] 실시예 1: 텔로머라제 유전자 trt-1, trt-1(ok410)이 결여된 꼬마선충 선별 및 특징 규명

[94] 실험방법에 기재된 야생형 꼬마선충 N2 및 CB4856 스트레인을 DNA 알킬화제인 에틸메탄설포네이트 (EMS)로 처리한 후 생존개체를 선별하였다. 결과는 도 1에 기재되어 있다. 선별된 모든 6개 (CS 1 내지 CS6)의 CS 주 및 5개 (NS1 내지 NS5) 중 2 개의 NS 주는 gross 표현형 없이 매 세대에서 10 내지 15 개체를 전달하는 방식으로 적어도 300 세대동안 유지되었으며, 이는 ALT 주(strain)가 안정적으로 유지되고 있음을 나타내는 것이다.

[95] CS 생존개체를 FISH, 말단제한단편 (TRF) 및 전체 유전체 서열 분석 결과 텔로미어의 길이가 모 개체보다 긴 것으로 나타났다 (도 1b 및 1c 참조). 이러한 텔로미어는 BAL31 엑소뉴클리아제 처리로 없어졌으며 이는 텔로미어가 염색체

말단에 존재하고 있음을 나타낸다. 아울러 도 1d에 나타난 바와 같이, 표준 꼬마선충 텔로미어는 자르지 않는 *HinfI* 효소로 절단한 결과 절단되었으며, 이는 생존개체의 텔로미어 내에 부가의 서열이 포함되어 있음을 나타내는 것으로, 이는 생존개체가 모 개체와는 다른 방식으로 텔로미어 길이를 연장시켜 유전체를 유지하고 있음을 나타내는 것이다.

[96] 실시예 2 : T-ALT 엘리먼트 규명 및 특징

[97] 아울러 상기와 같은 생존개체에서 관찰된 ALT와 관련된 유전체 부위를 규명하기 위하여, 연관맵핑 분석을 수행한 결과, V 염색체 상의 한 부위에 존재하는 두 개의 CB4856 *trt-1*-derived SNV (Single Nucleotide Variation)를 발견하였으며, 이 부위가 CS1 및 CS2 생존개체에서 ALT 유도와 높은 관련성이 있음을 나타낸다 (도 2a 참조).

[98] 이어 도 2b에 나타난 바와 같이 CS1 및 CS2에서 유전체 서열 전체를 분석한 결과 1,446 bp (chrV:19,229,654-19,231,100) 의 ALT 표현형과 연관된 2 SNV를 포괄하는 유전체 영역을 규명하였으며, 이들은 평균 서열 텅쓰와 비교하여 100배 이상 높은 값을 나타냈으며, 이는 Template for ALT element 1 (T-ALT 1)으로 명명하고, 이는 상당한 이종교배 후에서 가장 많이 증폭된 서열인 것으로 나타났다.

[99] T-ALT 1 엘리먼트는 꼬마선충의 코딩 유전자 T26H2.5의 제1 엑손 및 프로모터를 포함하는 유니크하게 맵핑되는 서열 (서열번호 1)을 포함하며, 같은 방향의 두 개의 반복서열 (interstitial telomere-like sequences (ITS))이 플랭킹하고 있으며, 구조 및 서열은 도 7에 기재된 바와 같다. T-ALT 1은 모든 생존개체에서 발견되었다 T-ALT 1의 위치를 결정하기 위하여, T-ALT 1 엘리먼트에 맵핑되는 모든 쌍-말단 서열 리드를 추출하며, 오버랩핑되는 쌍을 이용하여 200bp to 1.7kb 길이의 인접하는 단편을 구축하였고, T-ALT 1 엘리먼트 및 염색체 말단 모두에 정렬되는 5개의 콘티그를 규명하였다. 이어 T-ALT 1 엘리먼트에 특이적 프라이머 (5'-AACAAGCTTCTGGCACGTCT-3' 서열번호 4), 염색체 말단에 특이적 프라이머 (염색체 I의 오른쪽 Arm : 5'-TGTGCGGGGAGGGAGTATTA-3', 염색체 II의 오른쪽 Arm : 5'-CGATGCGAAGAGATGGGAGT-3', 염색체 III의 왼쪽 Arm : 5'-GCCTAAAAGCGCGAAATCCT-3') 를 이용하여 PCR을 수행한 결과 도 2c에 기재된 바와 같이 생존개체에서만 증폭되었다. 이어 FISH 실험을 수행한 결과, T-ALT 1 엘리먼트 프로브와 텔로미어 프로브가 같은 곳에 위치하는 것으로 나타났다 (도 2d 참조). 이어 T-ALT 1 엘리먼트에 없는 부위를 자르는 제한효소 및 상기 엘리먼트를 자르는 제한효소를 이용하여 TRF 분석을 수행한 결과, 도 2e에 나타난 바와 같이, T-ALT 1 엘리먼트가 잘리지 않은 경우에 TRF로 분석한 텔로미어 길이가 더 긴 것으로 나타났으며, 이는 T-ALT 1 엘리먼트가 생존개체에서 여러 카피가 존재한다는 것을 나타낸다.

[100] 이어 N2 *trt-1*-유래 ALT 생존개체 유래의 엘리먼트를 분석한 결과, 생존개체 중 NS1 및 NS2에서 더 긴 길이의 텔로미어가 관찰되었으며, 표준 텔로미어는

자르지 않는 제한효소를 이용한 TRF 분석에서 뚜렷이 구분되는 밴드가 나타났다 (도 3a 참조). 이러한 밴드는 CB4856 유래 생존개체의 결과가 아주 상이한 것으로, NS1 & NS2에 대한 WGS 분석결과 염색체 I의 텔로미어 5'에 근접한 특이적 유전체 엘리먼트를 규명하였고(도 3b 참조), 이를 'Template of ALT 2' (T-ALT 2) 엘리먼트로 명명하였다. T-ALT 2 엘리먼트에 특이적인 프로브는 TRF와 FISH 분석에서 텔로미어에 위치하는 것으로 나타났다 (도 3c 및 3d). 이는 NS1 & NS2 생존개체의 염색체 말단에 T-ALT 2 엘리먼트가 존재하는 것을 나타내며, 도 5의 결과와도 일치하는 것이다. T-ALT 2 엘리먼트의 구조는 도 7에 나타난 바와 같이 T-ALT 1 엘리먼트 구조와 유사하며, 즉 서열 (서열번호 2의 서열)을 가운데 두고, 반복서열이 양 쪽에 동일한 방향으로 위치하고 있다.

[101] 텔로미어 유전자가 결여된 꼬마선충의 경우 스테릴러티를 큰 집단의 유지를 통해서 텔로미어 길이 유지 없이도 극복하는 것으로 알려져 있다 (C. Cheng, et al., PNAS 109, 7805-7810 (2012)). 이와 대조적으로, 본원의 생존개체는 텔로미어에 T-ALT 구조를 도입하고, 배양을 위해 각 세대별로 몇 마리씩 새로운 플레이트로 옮기는 방식으로 안정적으로 유지할 수 있었다.

[102] 이러한 이유는 EMS가 DNA 손상 반응을 상승시킨 것으로 판단되며, 생존개체에 대한 RNA-seq 분석결과 ALT 생존개체에서 유의적으로 변경된 유전자는 감마 조사에 의해 유도된 유전자 변화와 상관이 있는 것으로 나타났다 (도 6). 이러한 결과는 인간 ALT 세포와 유사하게 꼬마선충에서도 DSB (double strand break) 반응이 변경되었다는 것을 나타낸다.

[103] 실시예 3 : ALT에서 T-ALT 엘리먼트 작용 기전

[104] CS 생존개체와 연관된 두 개의 SNV 분석 결과, 모 CB4856 개체 및 CS 생존개체 모두 상기 CB4856 유래 SNV에 대하여 헤테로자이코트인 것으로 나타났다. 또한 상기 CB4856 유래된 SNV는 N2 유래된 변이체에 대하여 생존개체에 많이 있는 것으로 나타났다 (도 4a). CS1의 경우, N2-유래 변이체를 포함하는 리드는 유전체 평균 서열 텡쓰 (0.9 배)로 나타났으며, CB4856-유래 변이체를 포함하는 리드는 평균 텡쓰보다 76배 많았다. 마찬가지로 N2 유래된 변이체를 포함하는 CS2는 평균적 수준으로 나타난 반면 (1.2 배), CB4856 유래 변이체를 포함하는 리드는 상당히 증가하였다 (122 배)(도 4a). PCR 및 서열분석을 통해 염색체 V 영역의 내부 T-ALT 1의 SNV 서열은 N2-type SNV에 대해 호모자이코트인 것으로 나타났다. 부가하여, 상기 영역은 모 CB4856 개체에서 중복되었다. 이러한 결과는 CB4856-유래로 명명된 SNV가 실제로는 CB4856 유전체의 다른 부위에 위치하는 것을 나타낸다. 추가 분석 결과 CB4856-유래 SNV는 CB4856 개체주 및 생존개체에서 염색체 V의 오른 말단에 위치하는 것으로 나타났으나 N2에서는 그렇지 않았다 (도 4b, c). 이는 염색체 내에, T-ALT 1이 두 개의 부위 즉, 염색체 안쪽에 위치하는 T-ALT 1 도너 donor (T-ALT1 D) 및 텔로미어 근위에 존재하는 T-ALT 1 저장소 (T-ALT 1 R)로

위치하고 있음을 나타낸다.

- [105] 내부 영역에서 말단의 텔로미어 근위로 복제되는 T-ALT 1 엘리먼트와 유사하게, T-ALT 2 엘리먼트도 내부 좌위 (T-ALT2 D 좌위)에서 염색체 I의 왼편 암의 근위로 복제되었으며 (도 4d), 이는 CB4856 유전체에서는 검출되지 않았다 (도 4e). 이러한 결과는 CB4856 and N2 에서 ALT의 기전으로 서로 상이한 T-ALT 저장소로 진화하였음을 나타낸다. ALT 활성화동안, T-ALT2 D가 아닌, T-ALT2 R 좌위의 변이체 반복서열이 NS 생존개체에 많이 나타났으며, 이는 T-ALT 2 R이 ALT의 주형으로 작용하였음을 나타낸다 (도 4e).
- [106] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.
- [107] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

청구범위

- [청구항 1] 대안적 텔로미어 유지 (Alternative Lengthening of Telomere ALT) 기작에 작용하는 폴리뉴클레오타이드로,
 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드에
 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 5' 또는 3', 또는 5' 및 3'
 각각에 5'-(TTAGGC)_x(TCAGGC)_y(TTAGGC)_z-3'의 3 종류의
 단위서열을 포함하는 제 1 서열이 연결된 폴리뉴클레오타이드;
 또는
 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드에 상기 서열번호 2의
 폴리뉴클레오타이드의 5' 또는 3', 또는 5' 및 3' 각각에
 5'-(TTAGGC)_l(TTAGTM)_m(TTAGGC)_n-3'의 3 종류의 단위서열을
 포함하는 제 2 서열이 연결된 폴리뉴클레오타이드이고
 상기 제 1 서열 및 제 2 서열 각각에서 상기 3 종류의 단위서열의
 순서는 무작위이며, 상기 제 2 서열에서 M은 A 또는 C이고,
 상기 x, y, z, l, m 및 n은 0 또는 1 이상의 정수로, 각각 동일하거나
 상이한 것인, 대안적 텔로미어 유지 (Alternative Lengthening of
 Telomere ALT) 기작에 작용하는 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 x, y, z, l, m 및 n은 각각 1에서 100사이의
 정수인, 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 3] 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 폴리뉴클레오타이드 검출용 물질을
 포함하는, ALT 양성 암 검출용 조성물.
- [청구항 4] 꼬마선충을 제공하는 단계;
 상기 꼬마선충을 암을 유발할 수 있는 환경에 노출하는 단계;
 상기 암 유발환경 노출 전, 노출 후 또는 노출과 함께, 상기
 꼬마선충에 텔로미어의 유지를 억제할 것으로 기대되는
 시험물질을 처리하는 단계; 및
 상기 시험물질로 처리된 꼬마선충과 상기 시험물질로 처리되지
 않은 대조군에서 T-ALT (Template-Alternative Lengthening of
 Telomere) 기작에 작용하는 엘리먼트를 검출하는 단계를
 포함하며,
 상기 T-ALT 엘리먼트는 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드에
 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 5' 또는 3', 또는 5' 및 3'
 각각에 5'-(TTAGGC)_x(TCAGGC)_y(TTAGGC)_z-3'의 제 1 서열의
 폴리뉴클레오타이드가 연결된 폴리뉴클레오타이드, 또는
 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드에 상기 서열번호 2의
 폴리뉴클레오타이드의 5' 또는 3', 또는 5' 및 3' 각각에
 5'-(TTAGGC)_l(TTAGTM)_m(TTAGGC)_n-3'의 제 2 서열의

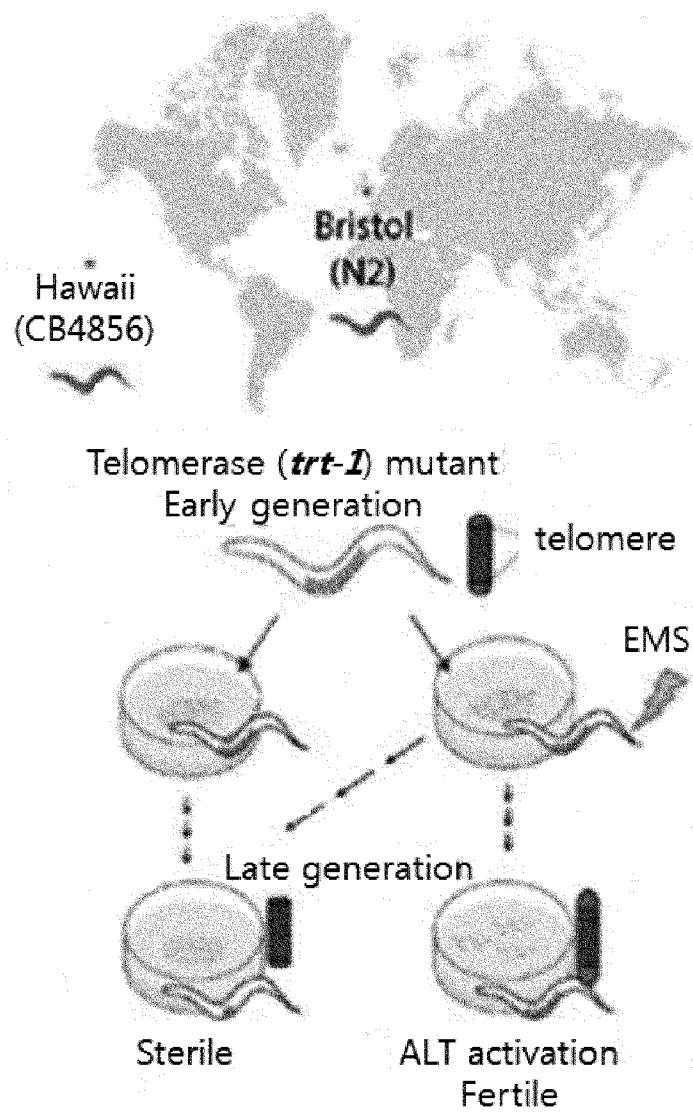
폴리뉴클레오타이드가 연결된 폴리뉴클레오타이드로, 상기 x, y, z, l, m 및 n 은 0 또는 1 이상의 정수로 각각 동일하거나 상이하며, 상기 시험물질로 처리된 꼬마선충에서 상기 대조군과 비교하여 T-ALT의 부재 또는 대조군과 비교하여 T-ALT 길이가 짧은 경우, 상기 시험물질을 암치료용 후보물질로 선별하는 것인, ALT 양성 암치료제 스크리닝 방법.

- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 x, y, z, l, m 및 n 은 각각 1에서 100사이의 정수인, 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 6] 제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 T-ALT는 상기 선충의 염색체에 존재하는 텔로미어 근위 (proximal to telomere)에 존재하는 것인, 방법.
- [청구항 7] 제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 텔로미어를 검출하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제 4 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출은 TRF(Terminal Restriction Fragment) 분석, PCR, 정량 PCR, 인시츄교잡, 서던블랏, 또는 서열분석 방법으로 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서,
상기 PCR은 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 세트 또는 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 세트를 이용하여 수행되며,
상기 인시츄교잡은 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 표시되는 프로브를 이용하여 수행되며,
상기 서던블랏은 서열번호 11 또는 서열번호 12로 표시되는 프로브를 이용하여 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 10] 꼬마선충의 ALT 활성을 측정하는 방법으로, 상기 방법은
꼬마선충 유래의 DNA를 제공하는 단계;
상기 DNA로부터 T-ALT 엘리먼트를 증폭하는 단계; 및
상기 증폭된 산물을 정량 또는 정성적으로 검출하는 단계를 포함하며,
상기 T-ALT 엘리먼트는 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드에
상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 5' 또는 3', 또는 5' 및 3' 각각에 5'-(TTAGGC) $_x$ (TCAGGC) $_y$ (TTAGGC) $_z$ -3'의 제 1 서열의 폴리뉴클레오타이드가 연결된 폴리뉴클레오타이드, 또는
서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드에 상기 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드의 5' 또는 3', 또는 5' 및 3' 각각에 5'-(TTAGGC) $_l$ (TTAGTM) $_m$ (TTAGGC) $_n$ -3'의 제 2 서열의 폴리뉴클레오타이드가 연결된 폴리뉴클레오타이드로, 상기 $x, y,$

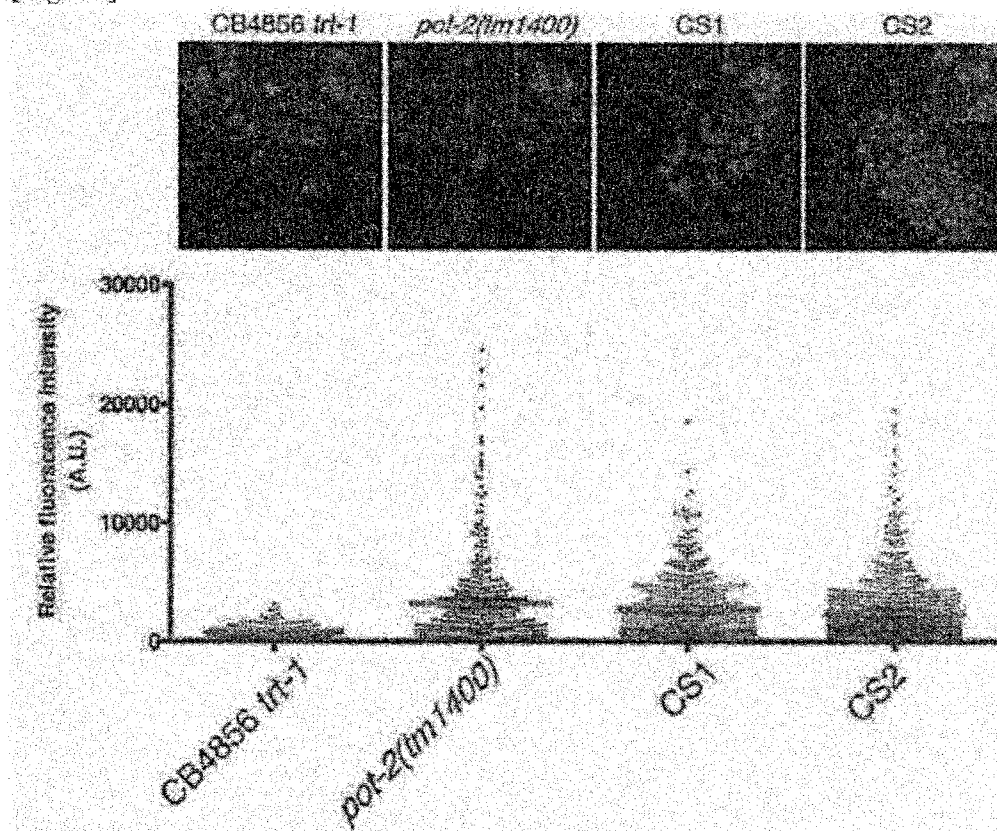
[청구항 11]

z , l , m 및 n 은 0 또는 1 이상의 정수로 각각 동일하거나 상이하며, 상기 T-ALT 엘레먼트의 존재는 ALT 활성을 나타내는 것인, 방법. 제 10 항에 있어서, 상기 T-ALT는 상기 선충에 존재하는 텔로미어 근위 (proximal to telomere)에 존재하는 것인, 방법.

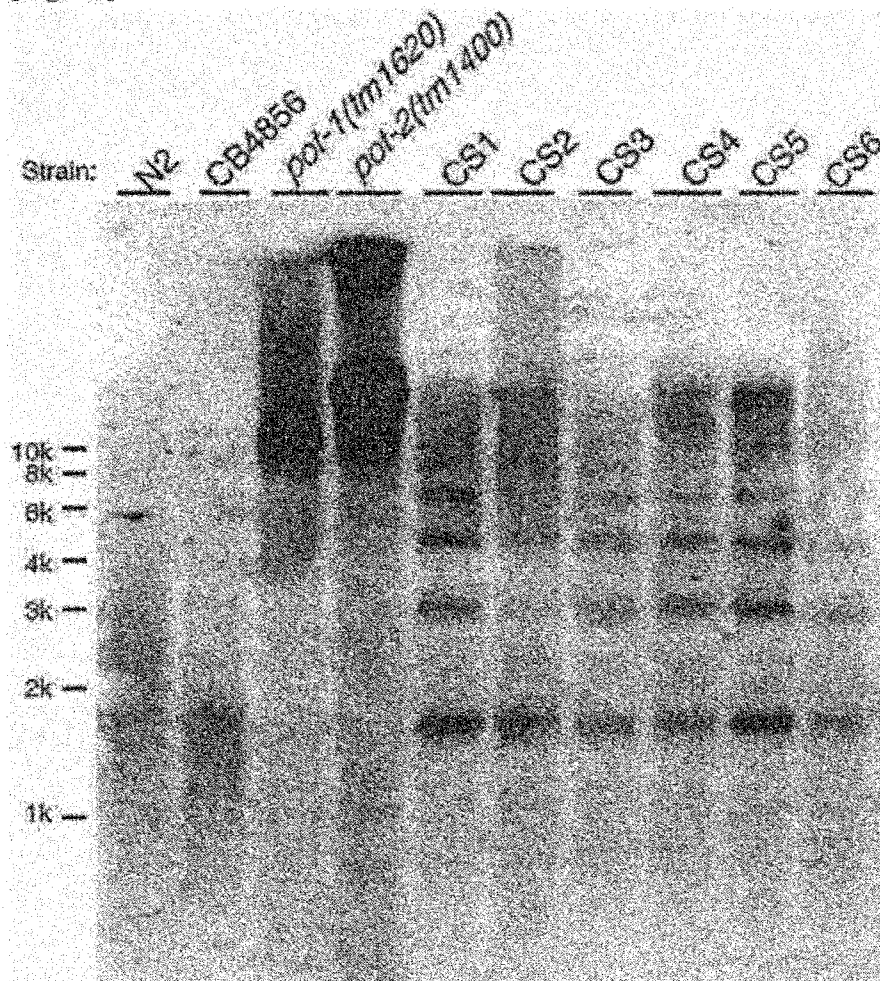
[Fig. 1a]



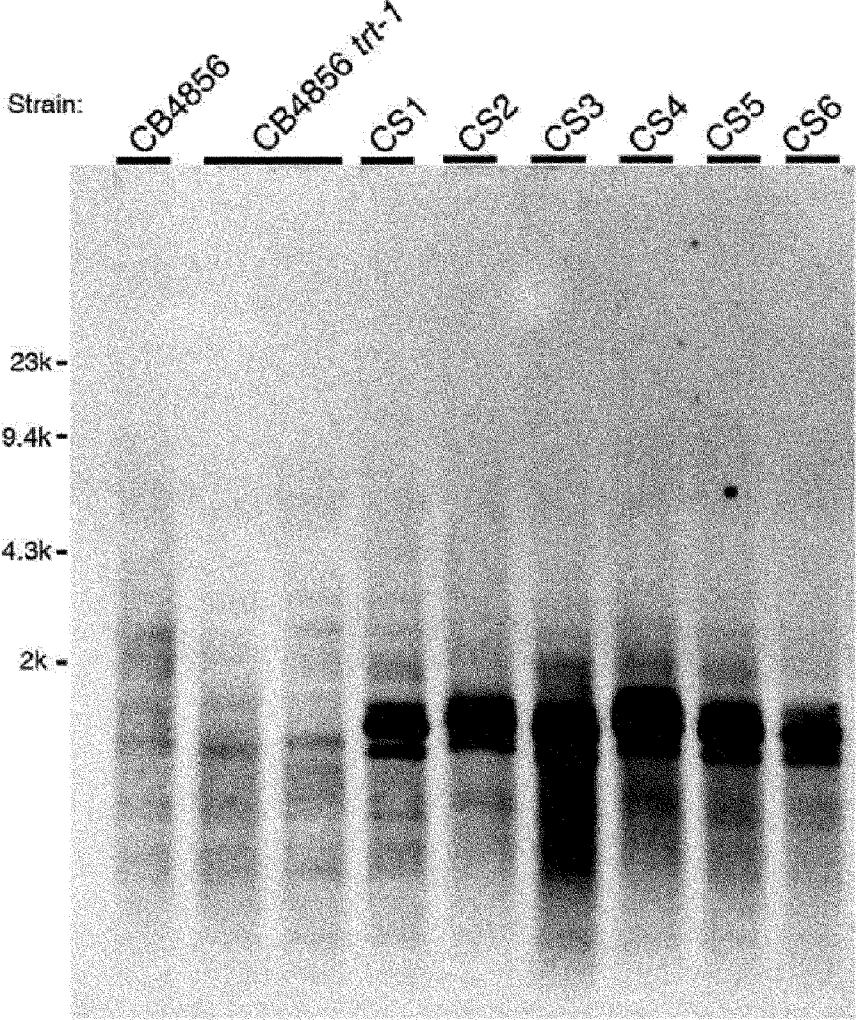
[Fig. 1b]



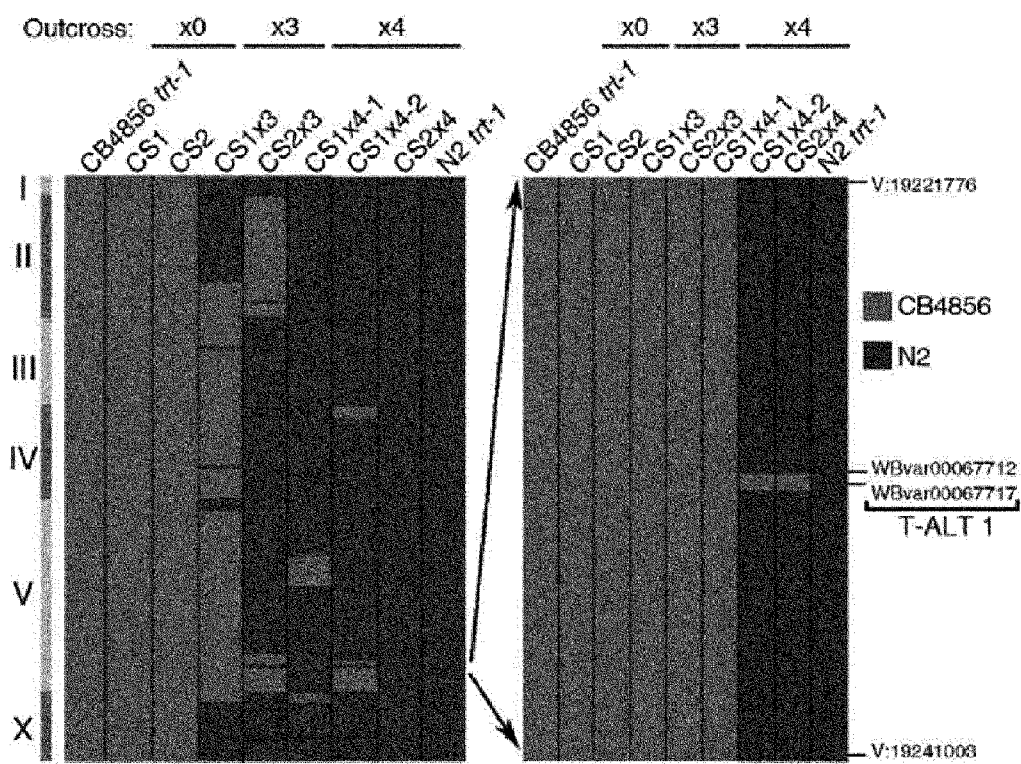
[Fig. 1c]



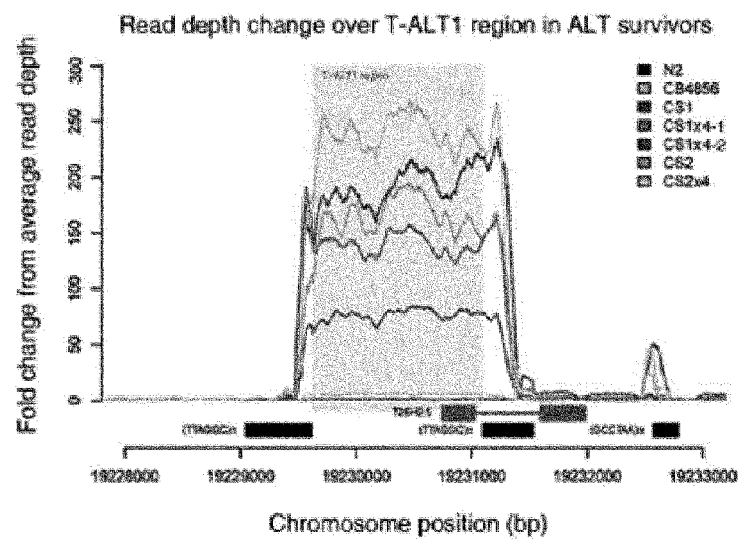
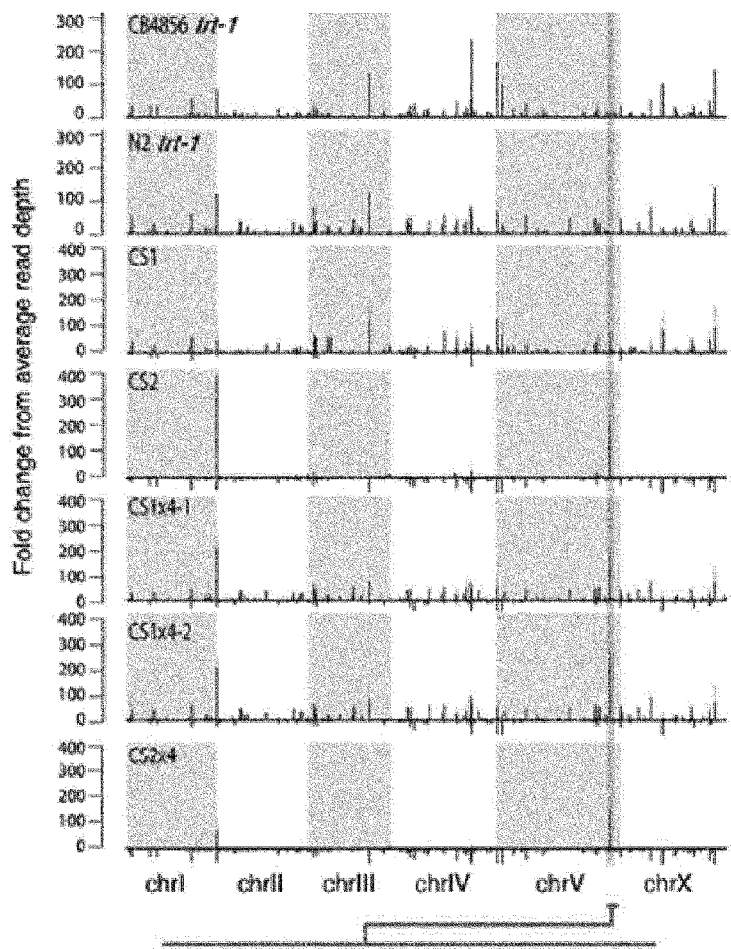
[Fig. 1d]



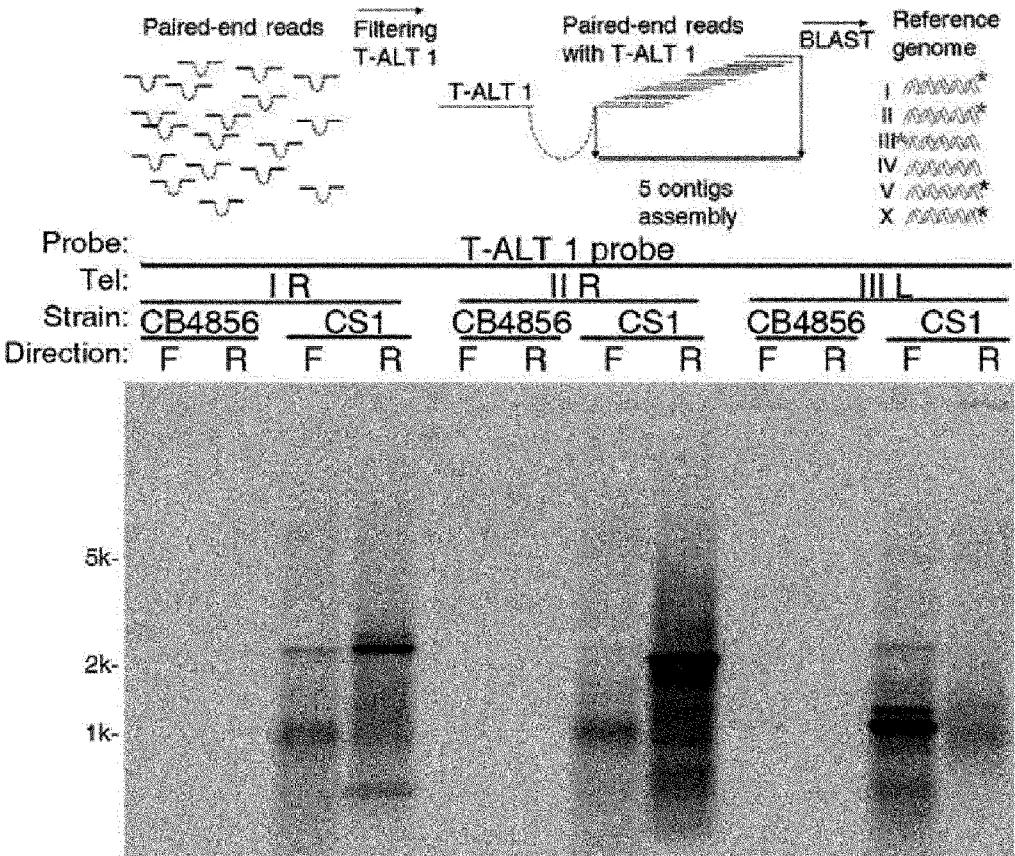
[Fig. 2a]



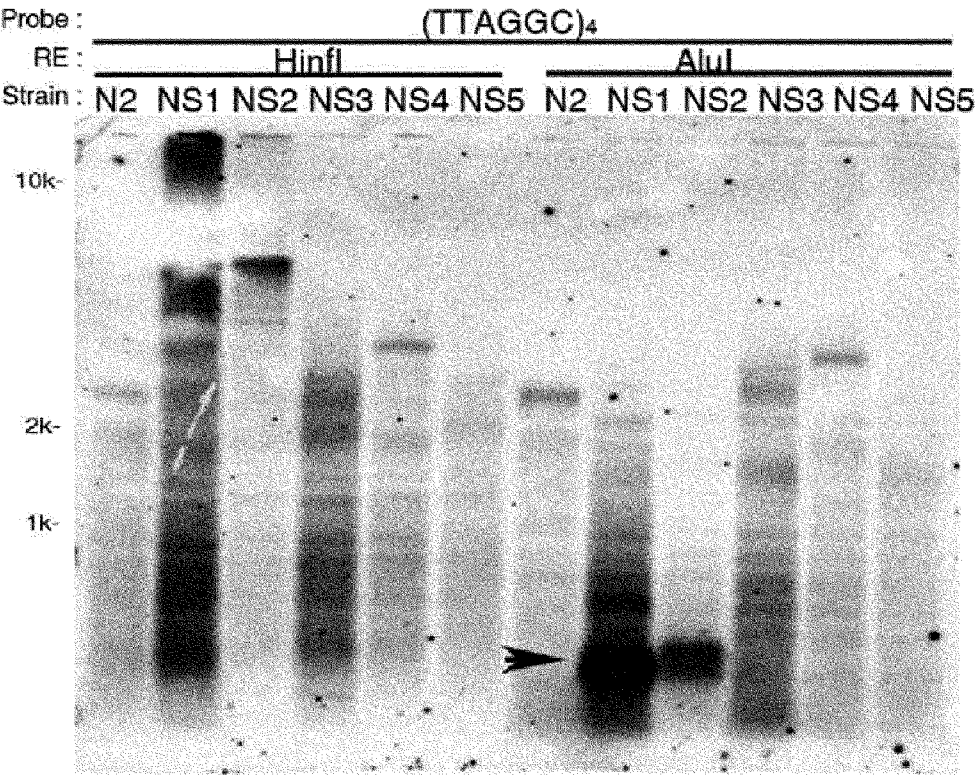
[Fig. 2b]



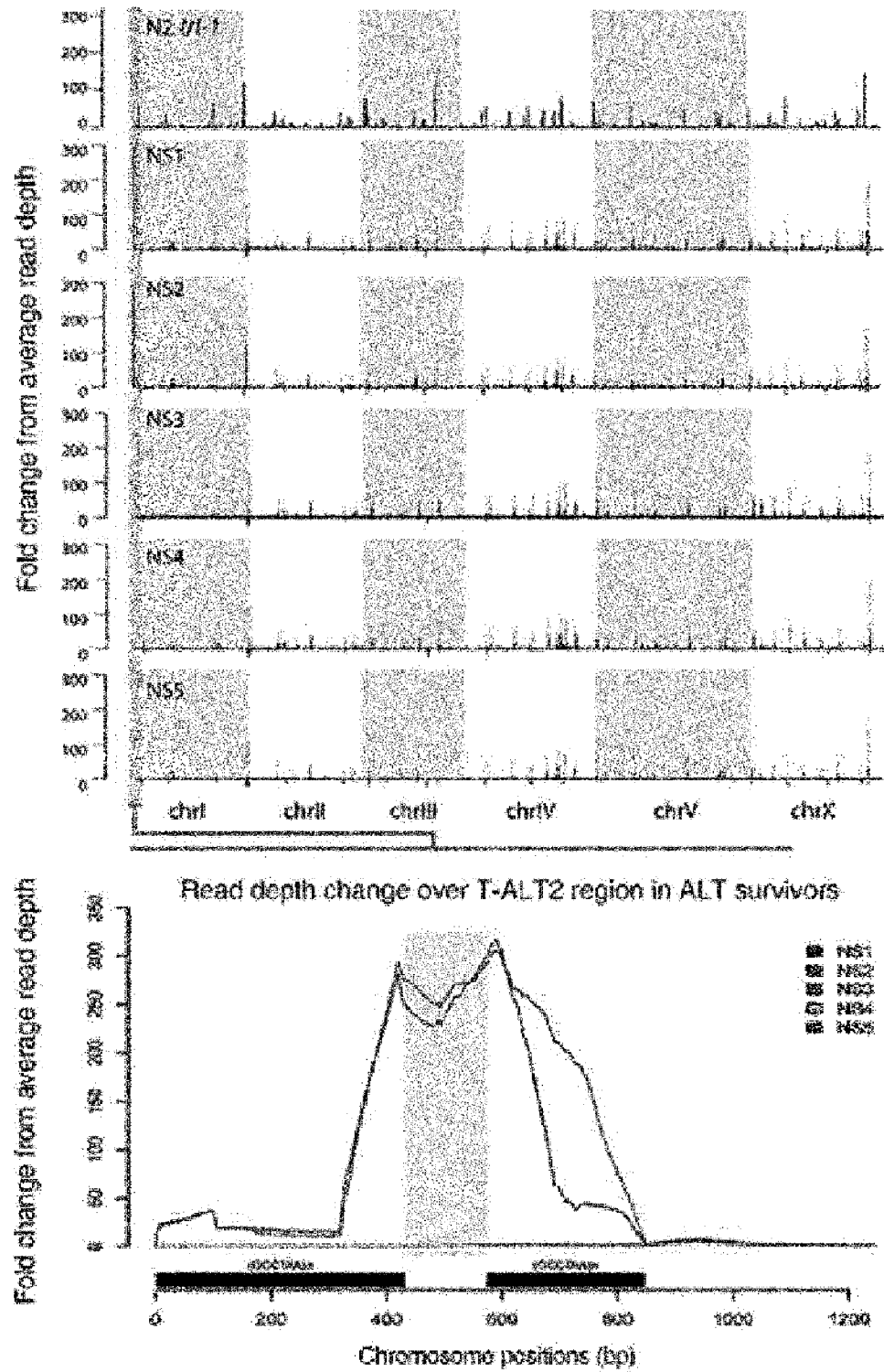
[Fig. 2c]



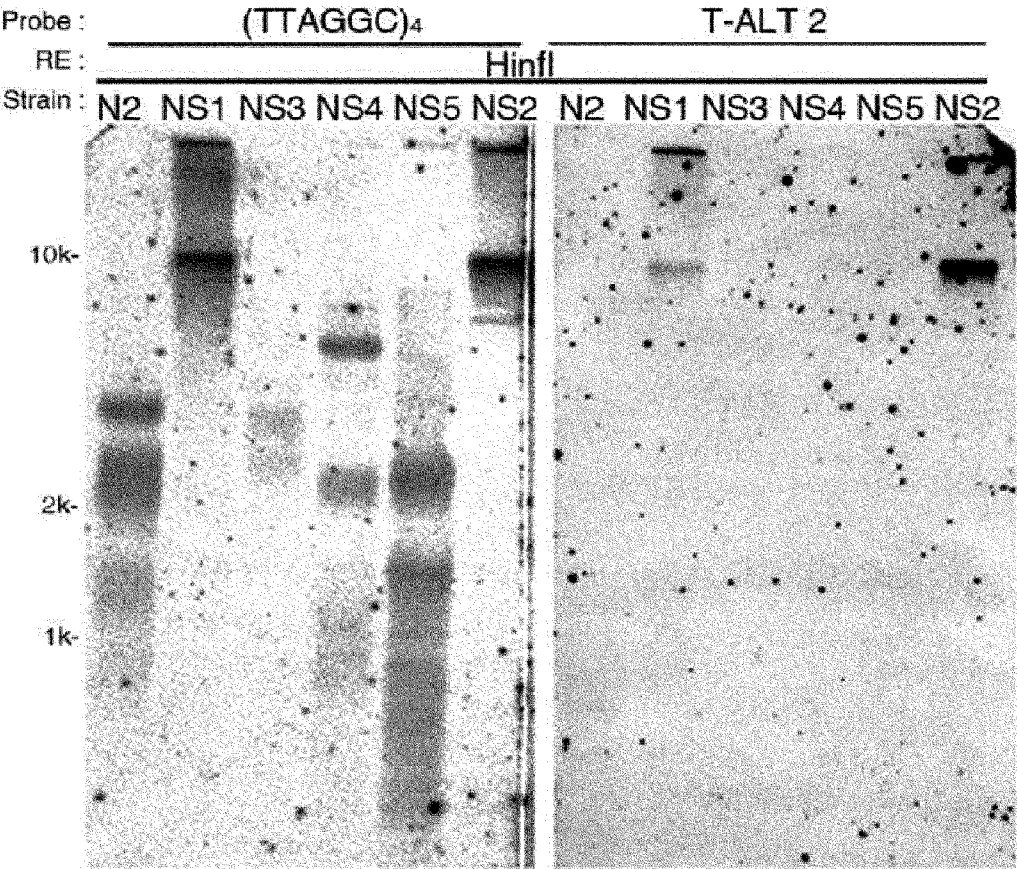
[Fig. 3a]



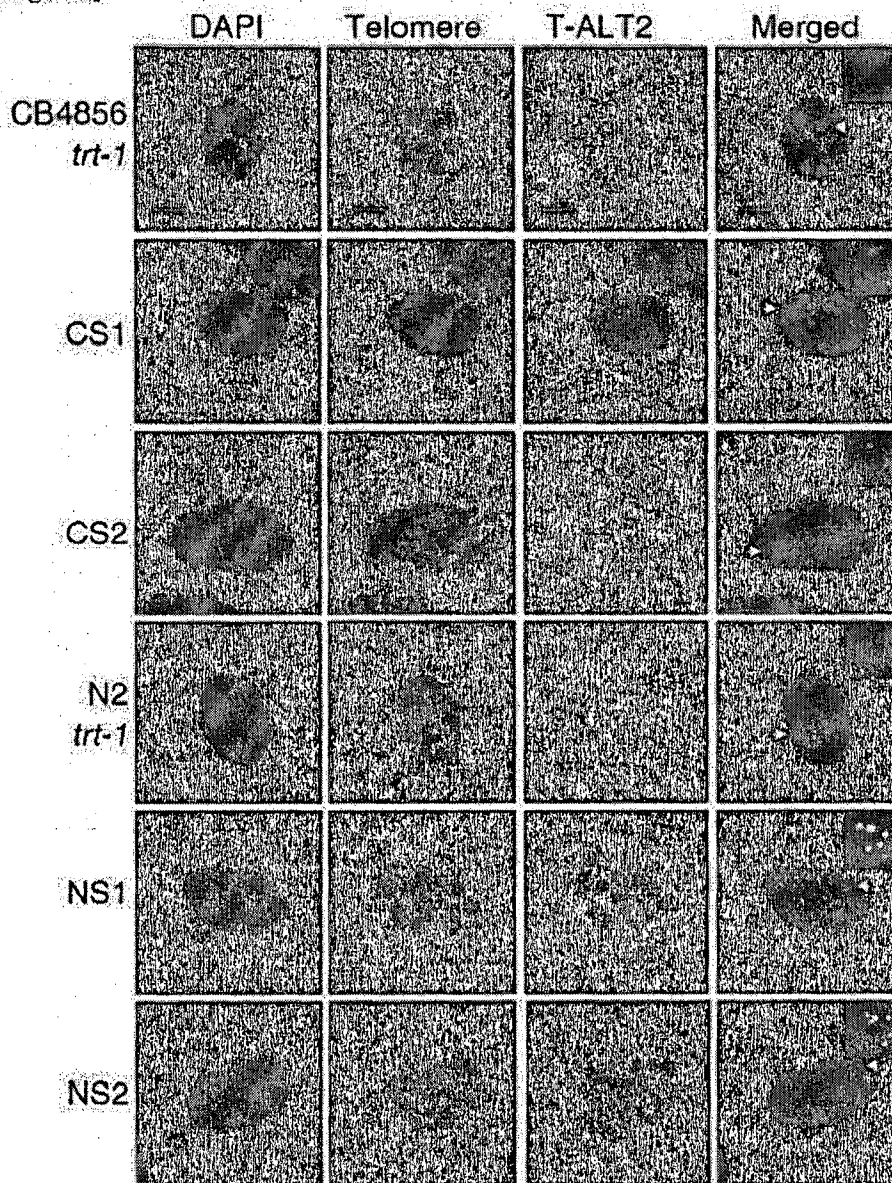
[Fig. 3b]



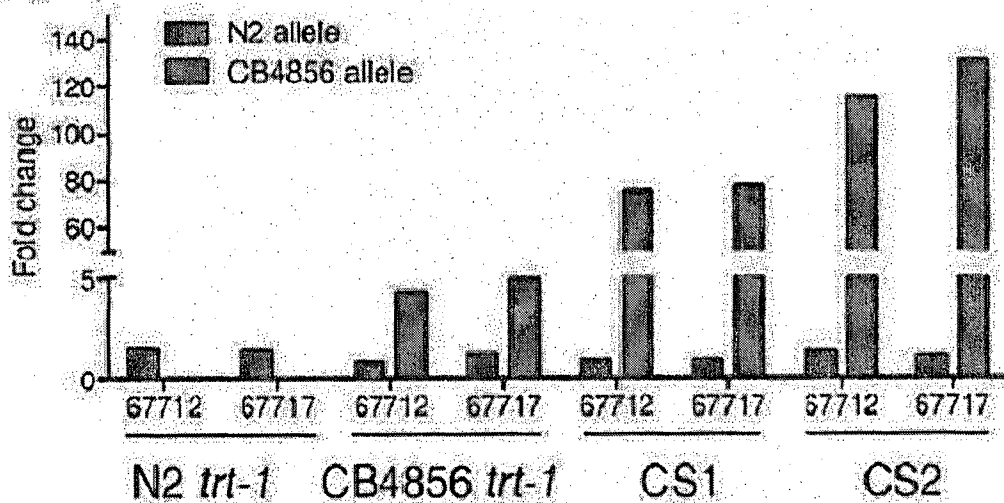
[Fig. 3c]



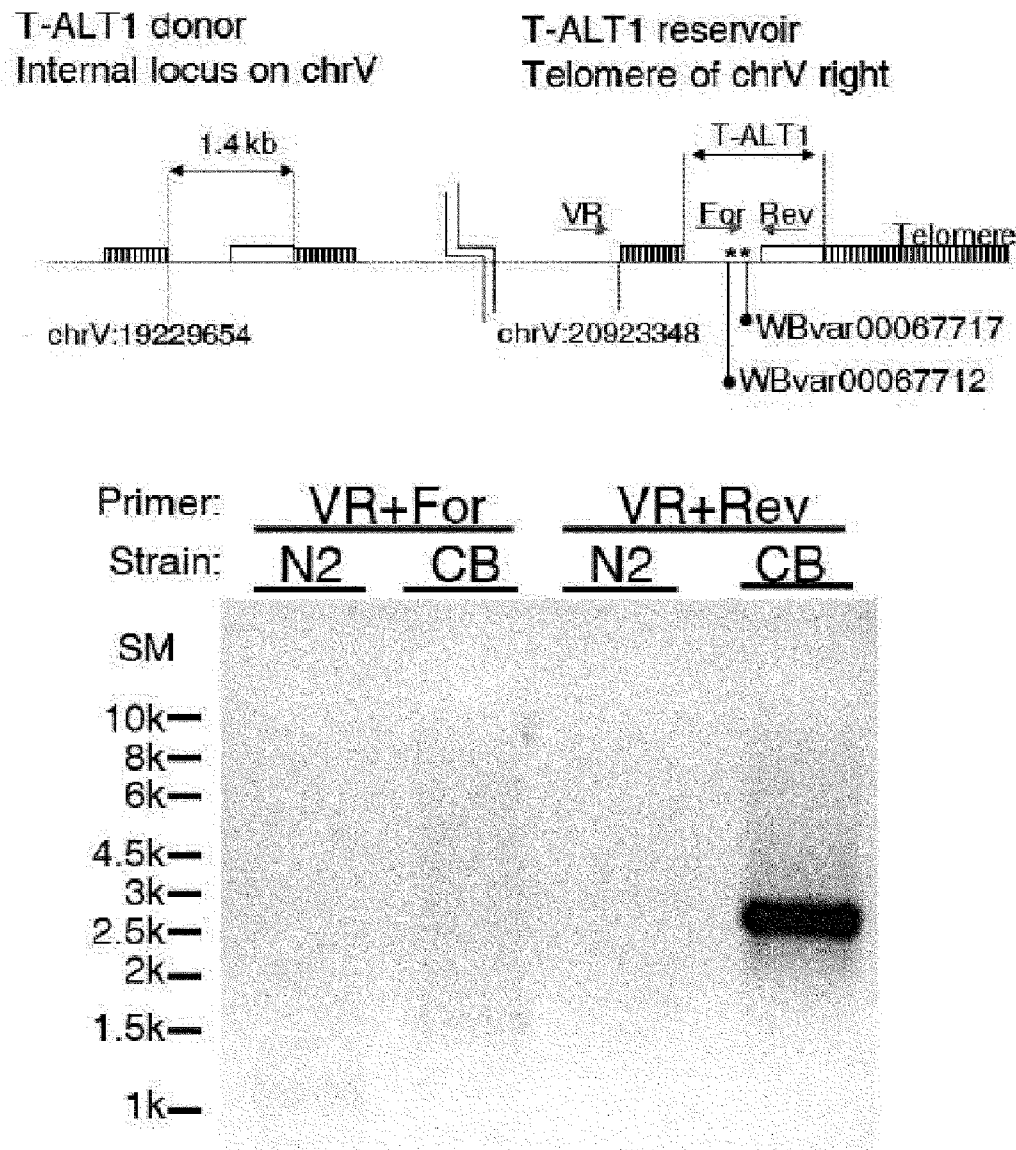
[Fig. 3d]



[Fig. 4a]



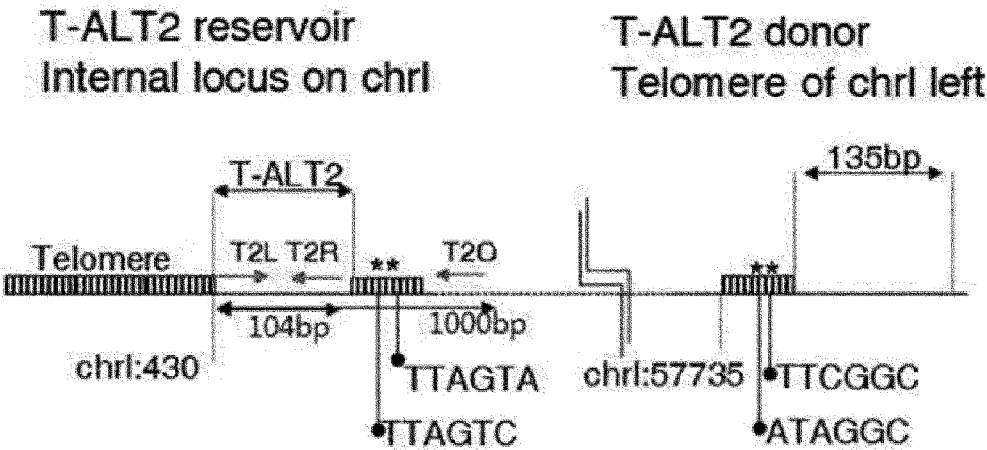
[Fig. 4b]



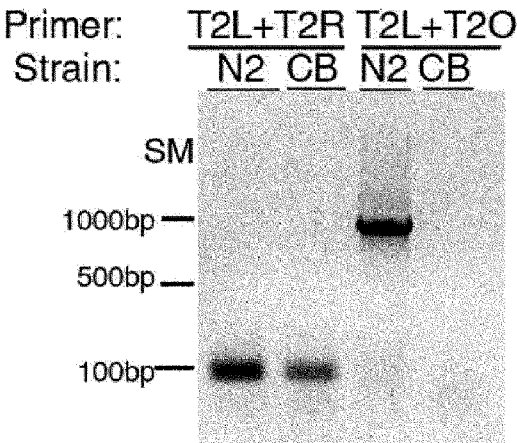
[Fig. 4c]

		WBvar00067712	
N2	Internal:	TGCTCATTCTT	
	End:	N/P	
CB	Internal:	TGCTCATTCTT	
	End:	TGCTCTTTCTT	
		WBvar00067717	
N2	Internal:	TACGTGGTTAT	
	End:	N/P	
CB	Internal:	TACGTGGTTAT	
	End:	TACGTAGTTAT	

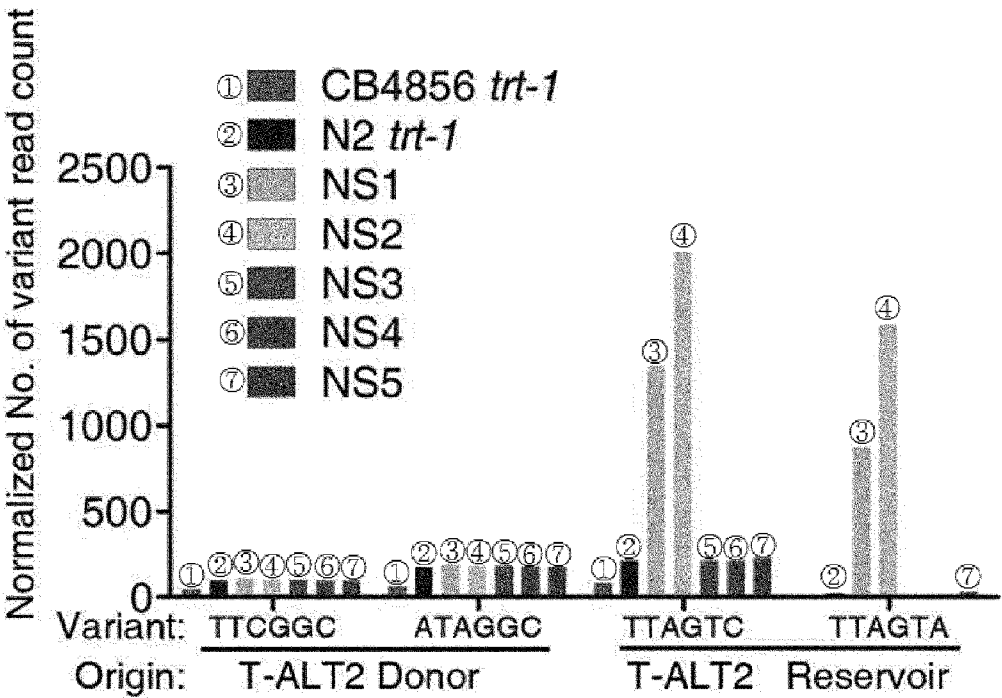
[Fig. 4d]



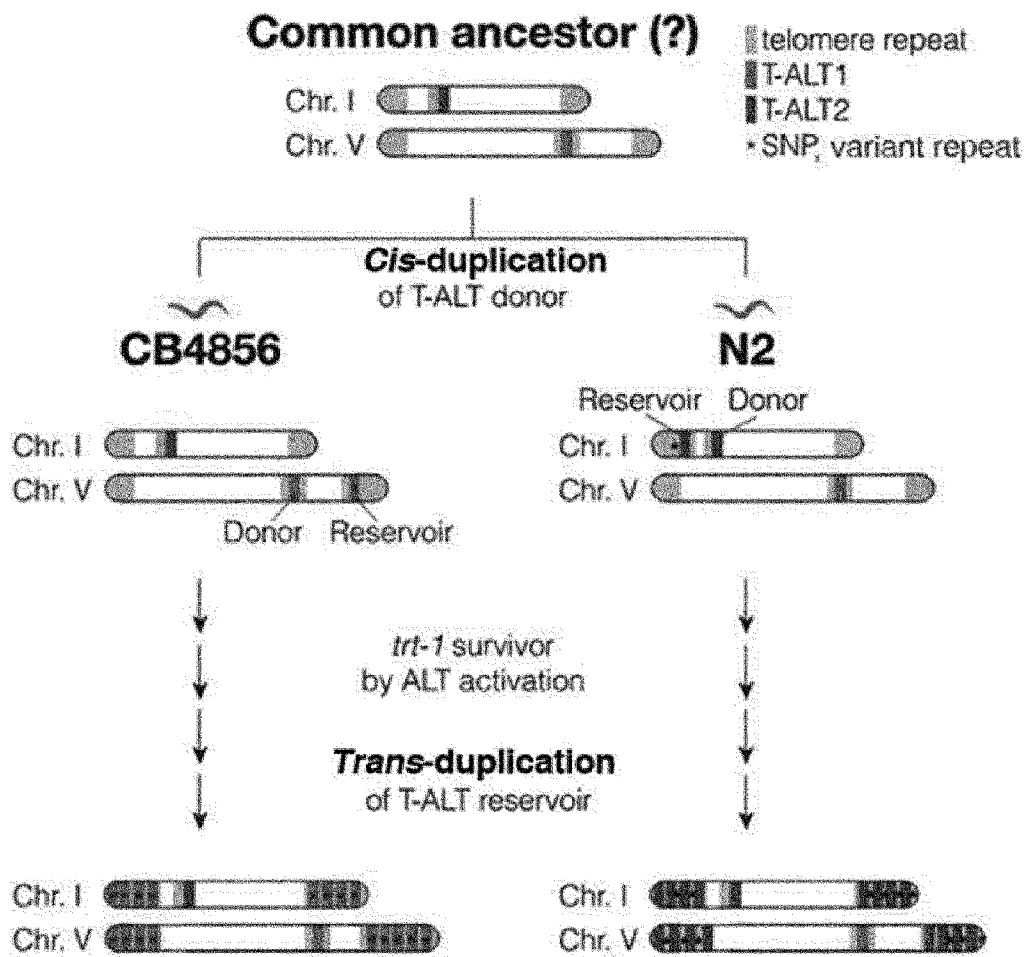
[Fig. 4e]



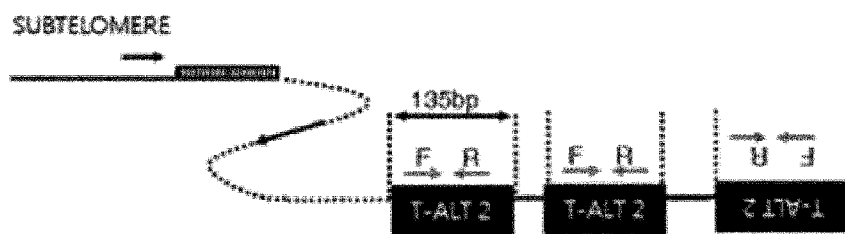
[Fig. 4f]



[Fig. 4g]



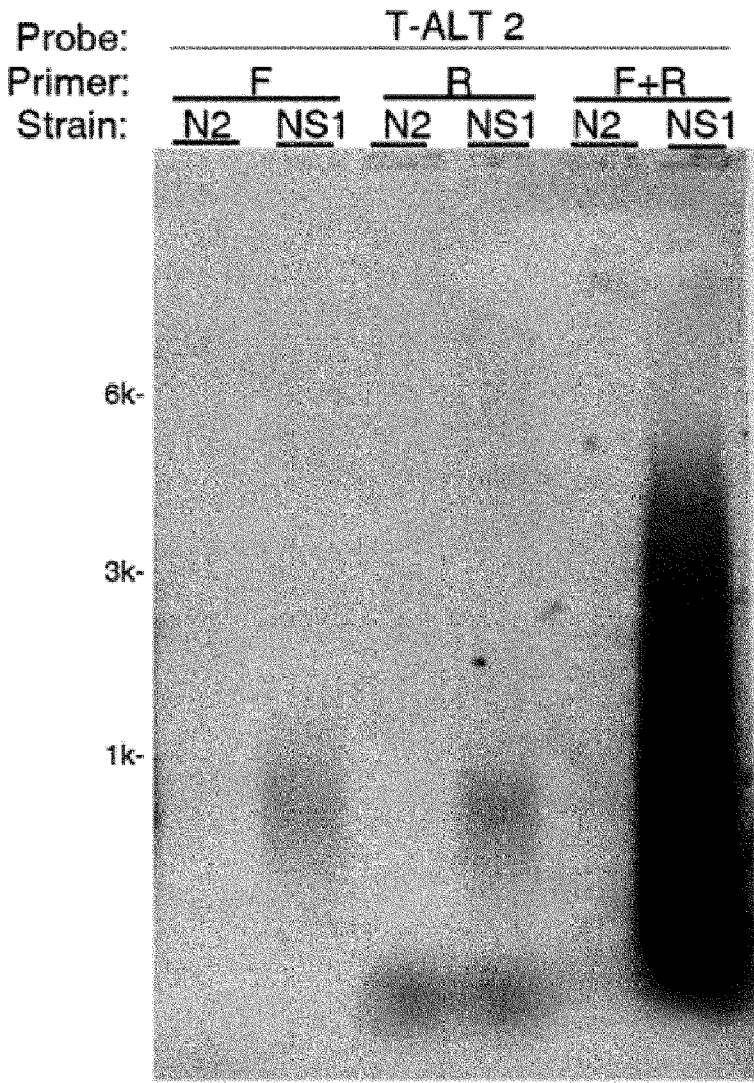
[Fig. 5a]



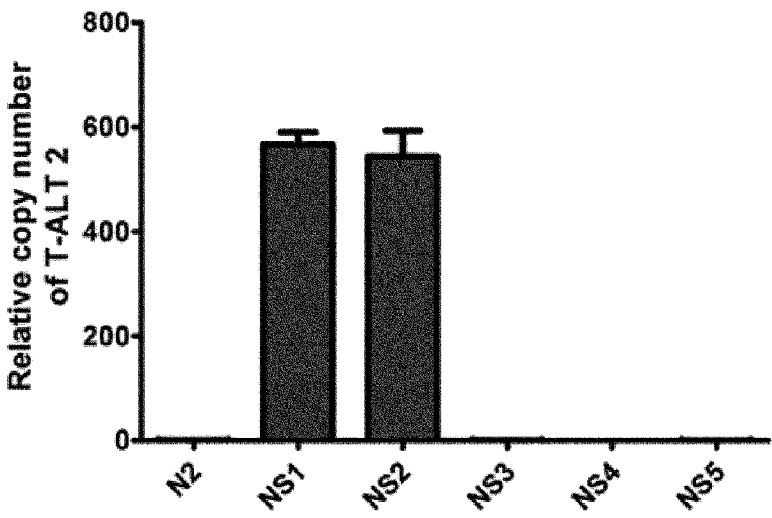
[illegible]

* Blue, Subtelomere sequences; Red, T-ALT sequence; Yellow, Telomere repeat

[Fig. 5c]

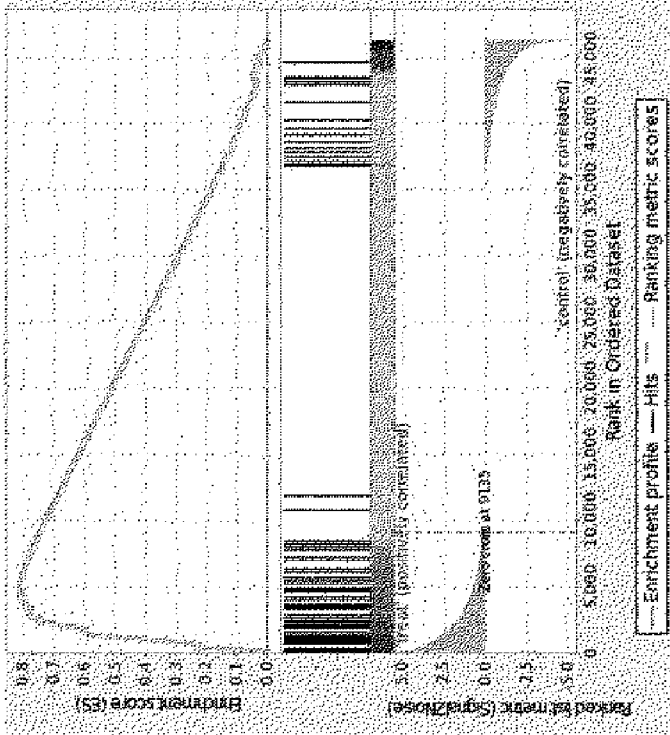


[Fig. 5d]

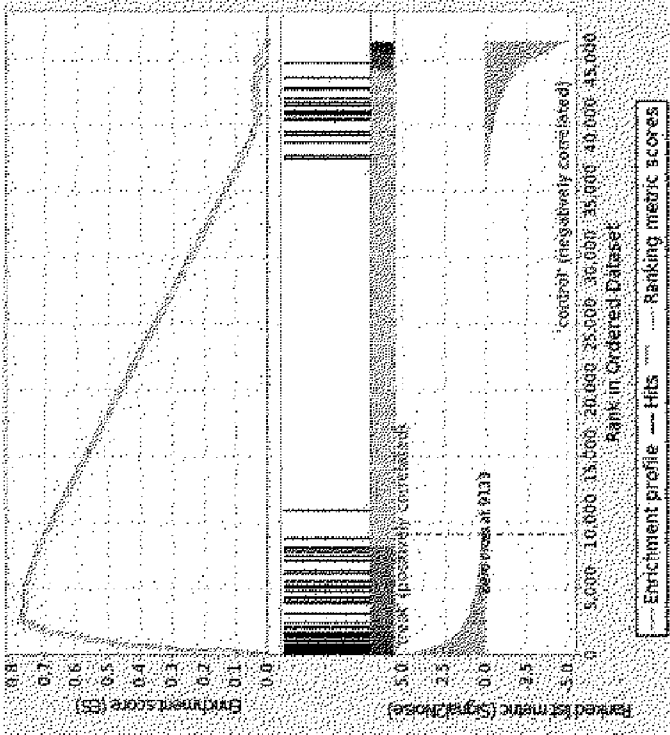


[Fig. 6a]

CS1x4-2

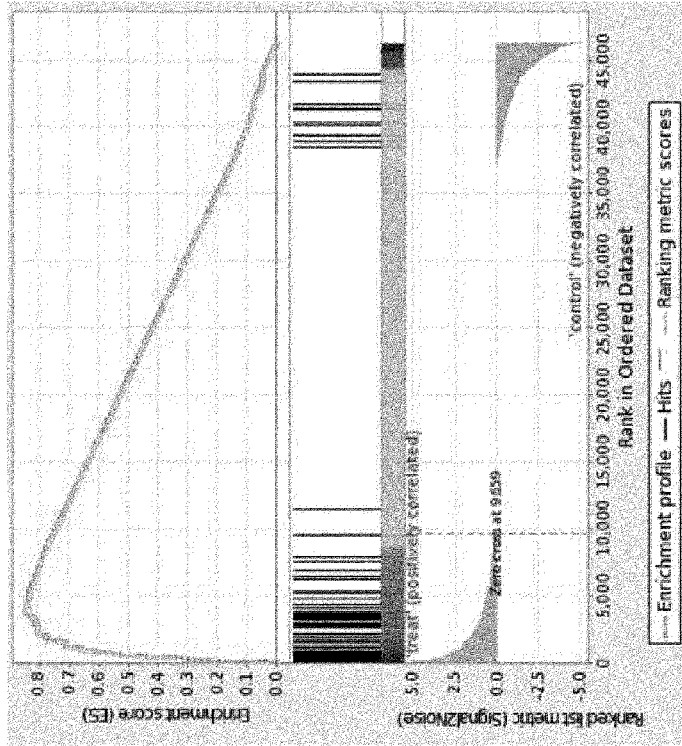


CS1x4-1

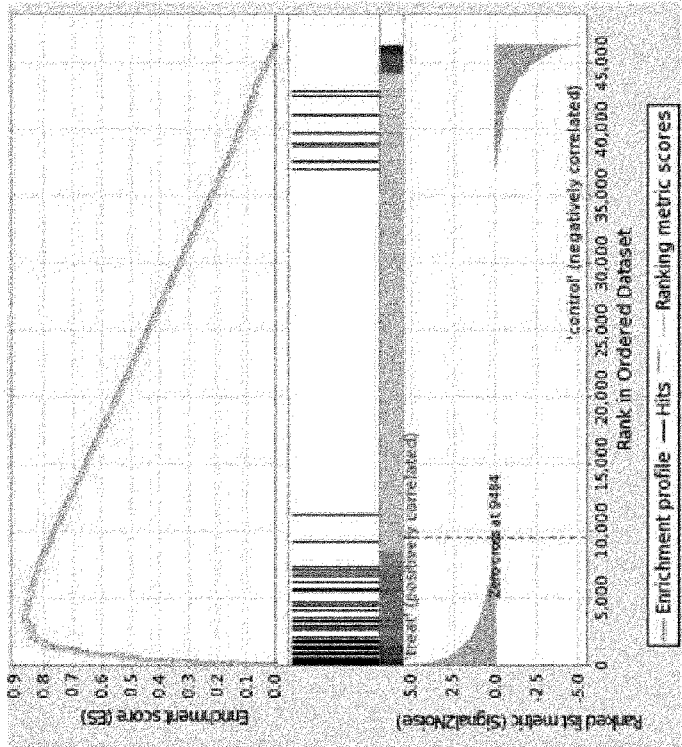


[Fig. 6b]

NS2

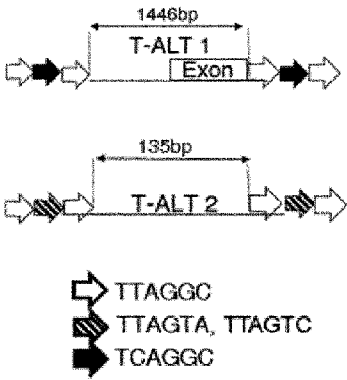


NS1



[Fig. 7]

	T-ALT 1	T-ALT 2
Background	CB4856	N2
Origin	Chromosome V	Chromosome I
Telomere variant	TCAGGC	TTAGTC, TTAGTA
Unique sequence length	1446	135



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/001315**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/11(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/11; A61P 35/00; A61K 31/7072; C12Q 1/68; G01N 33/50; G01N 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: alternative lengthening of telomeres, ALT, polynucleotide, cancer detection, proximal to telomere

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 2623105 A2 (ALT SOLUTIONS, INC.) 07 August 2013 See claims 10-12.	1-6,10-11
A	JEITANY, Maya et al., "A Preclinical Mouse Model of Glioma with an Alternative Mechanism of Telomere Maintenance (ALT)", International Journal of Cancer, 11 September 2014, vol. 136, no. 7, pages 1546-1558 See abstract.	1-6,10-11
A	QUEISSER, Angela et al., "Inhibition of Telomerase induces Alternative Lengthening of Telomeres during Human Esophageal Carcinogenesis", Cancer Genetics, 11 October 2013, vol. 206, no. 11, pages 374-386 See abstract.	1-6,10-11
A	KR 10-2011-0011306 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 08 February 2011 See claims 1-5.	1-6,10-11
A	KR 10-2002-0077618 A (RNA INC.) 12 October 2002 See abstract.	1-6,10-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 OCTOBER 2015 (26.10.2015)

Date of mailing of the international search report

26 OCTOBER 2015 (26.10.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/001315

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEO, Beom Seok et al., "Dissecting Alternative Lengthening of Telomeres in the Nematode <i>Caenorhabditis Elegans</i> ", Proceedings of "An EMBO Conference Series", "Telomeres, Telomerase and Disease", 30 April-04 May 2014, Brussels, Belgium, Poster No. 110 (p. 183) See page 183.	1-6,10-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/001315

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **9**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 9 refers to a claim not complying with the manner of claiming multiple dependent claims, and thus claim 9 is not clear (PCT Rule 6.4(a)).

3. ☒ Claims Nos.: **7-8**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/001315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
EP 2623105 A2	07/08/2013	CA 2553265 A1	04/08/2005
		CN 1925750 A	07/03/2007
		EP 1713337 A2	25/10/2006
		EP 1713337 A4	15/09/2010
		EP 2623105 A3	09/10/2013
		JP 05032129 B2	26/09/2012
		JP 2007-524668 A	30/08/2007
		US 2005-0113324 A1	26/05/2005
		US 2009-0036391 A1	05/02/2009
		US 2009-0099060 A1	16/04/2009
		US 2015-0094215 A1	02/04/2015
		US 8778906 B2	15/07/2014
		WO 2005-069880 A2	04/08/2005
		WO 2005-069880 A3	26/05/2006
KR 10-2011-0011306 A	08/02/2011	NONE	
KR 10-2002-0077618 A	12/10/2002	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/11(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/11; A61P 35/00; A61K 31/7072; C12Q 1/68; G01N 33/50; G01N 33/53

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 대안적 텔로미어 유지, ALT, 폴리뉴클레오타이드, 암 검출, 텔로미어 근위

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	EP 2623105 A2 (ALT SOLUTIONS, INC.) 2013.08.07 청구항 10-12 참조.	1-6, 10-11
A	JEITANY, MAYA 등, 'A preclinical mouse model of glioma with an alternative mechanism of telomere maintenance (ALT)', International Journal of Cancer, 2014.09.11, 136권, 7호, 1546-1558 페이지 요약 참조.	1-6, 10-11
A	QUEISSER, ANGELA 등, 'Inhibition of telomerase induces alternative lengthening of telomeres during human esophageal carcinogenesis', Cancer Genetics, 2013.10.11, 206권, 11호, 374-386 페이지 요약 참조.	1-6, 10-11
A	KR 10-2011-0011306 A (경북대학교 산학협력단) 2011.02.08 청구항 1-5 참조.	1-6, 10-11
A	KR 10-2002-0077618 A (주식회사 알엔에이) 2002.10.12 요약 참조.	1-6, 10-11

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 10월 26일 (26.10.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 10월 26일 (26.10.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

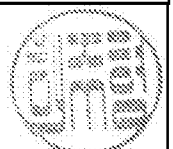
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	서범석 등, "Dissecting Alternative Lengthening of Telomeres in the Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>", Proceedings of "An EMBO Conference Series", "Telomeres, Telomerase and Disease", 2014.04.30 - 05.04., Brussels, Belgium, Poster No. 110 (p. 183) 183 페이지 참조.	1-6,10-11

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 9
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 9는 다중종속항 기재방식을 위반한 항을 인용하기 때문에 불명료합니다 (PCT 규칙 6.4(a))
3. ☒ 청구항: 7-8
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

EP 2623105 A2

2013/08/07

CA 2553265 A1

2005/08/04

CN 1925750 A

2007/03/07

EP 1713337 A2

2006/10/25

EP 1713337 A4

2010/09/15

EP 2623105 A3

2013/10/09

JP 05032129 B2

2012/09/26

JP 2007-524668 A

2007/08/30

US 2005-0113324 A1

2005/05/26

US 2009-0036391 A1

2009/02/05

US 2009-0099060 A1

2009/04/16

US 2015-0094215 A1

2015/04/02

US 8778906 B2

2014/07/15

WO 2005-069880 A2

2005/08/04

WO 2005-069880 A3

2006/05/26

KR 10-2011-0011306 A

2011/02/08

없음

KR 10-2002-0077618 A

2002/10/12

없음