(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0138920
(43) 공개일자 2017년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A23K 20/147* (2016.01)
A23K 20/153 (2016.01) *A23L 33/13* (2016.01)
A23L 33/18 (2016.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) *A61K 8/64* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A23K 20/147 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2017-0013799
(22) 출원일자 2017년01월31일
심사청구일자 2017년10월17일
(30) 우선권주장
1020160071252 2016년06월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
고정민
서울특별시 강남구 삼성로 151, 2동 1201호(대치동, 선경아파트)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

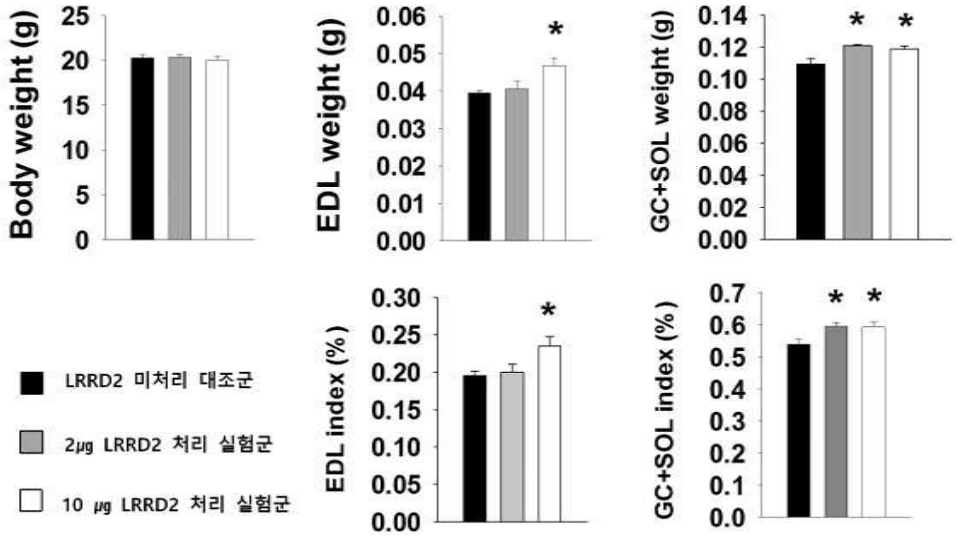
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **SLIT-ROBO 시스템을 이용한 근감소증 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 SLIT-ROBO 시스템을 이용한 근감소증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 slit1, slit2, slit3, robo1, robo2, 및 이들의 단편에서 선택된 유전자 또는 그 발현 단백질을 유효성분으로 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용, 또는 근 기능 개선용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도9b



(52) CPC특허분류
A23K 20/153 (2016.05)
A23L 33/13 (2016.08)
A23L 33/18 (2016.08)
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 8/606 (2013.01)
A61K 8/64 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2500/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI13C1634
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 Slit3를 이용한 골다공증 신약 후보 물질의 효능 및 안전성검증
기 여 율 1/1
주관기관 서울아산병원
연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2, 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

하기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물:

서열번호 1의 아미노산으로 구성된 Slit3 단백질;

서열번호 2의 아미노산으로 구성된 Robo1 단백질;

서열번호 3의 아미노산으로 구성된 Robo2 단백질; 및

서열번호 4의 아미노산으로 구성된 LRRD2 도메인.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 Slit3 단백질은 서열번호 5의 염기서열로 구성되는 *slit3* 유전자로부터 발현되는 것을 특징으로 하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 Robo1 단백질은 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 *robo1* 유전자로부터 발현되는 것을 특징으로 하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 Robo2 단백질은 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 *robo2* 유전자로부터 발현되는 것을 특징으로 하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 LRRD2 도메인은 서열번호 8의 염기서열로 구성되는 유전자로부터 발현되는 것을 특징으로 하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

Slit 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 활성화제(activator)를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

Robo 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제 1항, 제 2항, 제7항 또는 제 8항에 있어서, 상기 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것을 특징으로 하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2, 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자; 또는 이들의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 12

하기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 개선용 건강기능식품:

서열번호 1의 아미노산으로 구성된 Slit3 단백질;

서열번호 2의 아미노산으로 구성된 Robo1 단백질;

서열번호 3의 아미노산으로 구성된 Robo2 단백질; 및

서열번호 4의 아미노산으로 구성된 LRRD2 도메인.

청구항 13

Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2, 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자; 또는 이들의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 화장료 조성물.

청구항 14

하기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 화장료 조성물:

서열번호 1의 아미노산으로 구성된 Slit3 단백질;

서열번호 2의 아미노산으로 구성된 Robo1 단백질;

서열번호 3의 아미노산으로 구성된 Robo2 단백질; 및

서열번호 4의 아미노산으로 구성된 LRRD2 도메인.

청구항 15

Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2, 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 이를

암호화하는 유전자; 또는 이들의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 사료 첨가물.

청구항 16

하기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 사료 첨가물:

서열번호 1의 아미노산으로 구성된 Slit3 단백질;

서열번호 2의 아미노산으로 구성된 Robo1 단백질;

서열번호 3의 아미노산으로 구성된 Robo2 단백질; 및

서열번호 4의 아미노산으로 구성된 LRRD2 도메인.

청구항 17

i) 실험군인 피검체 유래 시료에서 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Slit3 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

ii) 상기 단계 i)에서 측정한 Slit3 단백질의 발현 수준을 대조군인 정상 개체 유래 시료의 Slit3 단백질 발현 수준과 비교하는 단계; 및

iii) 상기 단계 ii)에서 비교한 실험군의 Slit3 단백질 발현 수준이 대조군에 비해 감소하는 경우 실험군을 근육 질환으로 판단하는 단계;를 포함하는, 근육질환 진단의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것을 특징으로 하는, 근육질환 진단의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증, 근위축증, 근이영양증, 근무력증, 악액질 및 근감소증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 근육 질환 진단의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법.

청구항 20

i) 피검 화합물 또는 조성물을, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Slit3 단백질, 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 Robo1 단백질 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 Robo2 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 발현하는 세포주에 처리하는 단계;

ii) 상기 단계 i)의 처리한 세포주에서 상기 Slit3 단백질의 발현 정도 또는 상기 Robo1 단백질 또는 Robo2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및

iii) 상기 단계 ii)의 Slit3 단백질의 발현 정도, 또는 Robo1 단백질 또는 Robo2 단백질의 활성이 피검 화합물 또는 조성물을 무처리한 대조군 세포주와 비교하여 증가된 피검 화합물 또는 조성물을 선별하는 단계를 포함하는, 근육 질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것을 특징으로 하는, 근육 질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증, 근위축증, 근이영양증, 근무력증, 악액질 및 근감소증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 근육 질환 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 SLIT-ROBO 시스템을 이용한 근감소증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 slit1, slit2, slit3, robo1, robo2, 및 이들의 단편에서 선택된 유전자 또는 그 발현 단백질; 및/또는 이의 활성화제를 유효성분으로 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용, 또는 근 기능 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] Slit 단백질은 신경계의 발생 과정 동안에 뉴런과 액손의 이동을 조절하는 것으로서 잘 알려져 있는 단백질이다. Slit 단백질은 Robo 수용체와 작용하여 생리학적 활성을 조절할 수 있으며, 심장, 폐, 신장, 유방 조직 등 다양한 조직에서 다양한 세포 내 과정을 조절하는 인자로서 역할을 하는 것으로 알려졌으며, 최근 세포의 생장, 부착능 및 이동능의 조절에 중요한 역할이 있음이 보고되면서 세포의 분화과정에서의 이동 및 암의 발생과 전이 과정에 Slit 단백질이 관여할 수 있음이 보고된 바 있다. 구체적으로, 척추동물의 배아 발달 단계에서 Slit 단백질 및 Robo 단백질이 발현되며, Slit3, Robo1 및 Robo2 단백질의 발현이 근육 조직에서 증가하는 것이 보고된 바 있다(Neil Vargesson et. al., Mechanisms of development 106.1 (2001): 175-180). 이 보고에 따르면, Slit3 단백질은 배아 뒷다리 근육 조직의 근육모세포에서 발현이 증가하나, 이동능(migration)에 관여될 뿐 근육모세포의 분화에는 관련하지 않을 것으로 언급하고 있다.

[0004] 인간 Robo 단백질은 Robo1, Robo2, Robo3 및 Robo4의 네 가지 형태로 존재한다. Slit과 Robo는 어떠한 아형이 서로 결합하느냐에 따라 다양한 역할을 할 수 있을 것으로 보고되었지만, 발현 세포에 따라 역할이 달라질 수 있어 아직까지 활발하게 연구되고 있다. 이와 관련하여, 대한민국 등록특허 제 10-1617497호에서는 Slt3 단백질이 Robo1 또는 Robo2와 상호작용하여 활성을 나타내고, 이를 통해 조골세포의 분화를 유도할 수 있고 골 형성을 증가시킬 수 있음이 기재되어있다.

[0006] 근감소증은 골격근의 양 및 기능이 저하된 상태를 말한다. 근감소증은 노화, 호르몬 이상, 영양 부족, 신체 활동 부족, 염증 및 퇴행성 질환 등 다양한 원인에 의해 발생되는데, 그 중 노화및 성호르몬 부족이 주요 원인이 될 수 있는 것으로 알려져 있고, 의료기술의 발전 및 다양한 치료제 개발로 인해 전 세계적으로 평균 수명이 증가함에 따라 고령화 인구가 증가하고 있으며, 이에 따라 근감소증에 대한 치료의 요구 또한 지속적으로 증가할 것으로 예상되고 있다.

[0007] 근감소증 환자에서, 근육모세포의 줄기 세포인 위성 세포의 모집, 활성 또는 증식의 장애로 인한 근육모세포(myoblast)의 개수가 감소하며, 근육모세포의 증식 및 분화가 감소하고, 이에 따라 근감소증 환자의 근육은 조직학적인 수준에서 근 섬유의 크기 및 수가 감소하여 근기능이 감소하는 증상이 나타난다.

[0008] 과거 10여년간 미국 및 유럽을 중심으로 근감소증의 역학에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 최근에 근감소증의 임상적 중요성에 대한 관심이 폭증하고 있다. 초기 연구에서는 근감소증이 전신 쇠약, 활동 장애 및 근력 감소에 의해 삶의 질 저하를 유발한다는 결과들이 주류를 이루었지만, 최근 발표되는 연구들에서는 삶의 질 이외에도 골다공증성 골절 위험이 현저히 증가할 수 있음이 보고되었다. 또한, 근감소증 환자에서 당뇨병 및 대사증후군, 비만, 만성 신부전, 만성 간부전 등의 만성 질환이 유발되며, 궁극적으로는 사망률도 증가시키기 때문에, 근감소증은 적절하게 치료받아야 하는 질환으로서 관심이 집중되고 있다.

[0009] 최근 미국에서는 근감소증 환자에서 신체 장애가 발생할 가능성이 약 1.5배 내지 약 3.5배가 증가함으로써 연간

185억 USD의 사회적 비용을 유발한다고 보고된 바 있다. 우리나라에서는 국민건강영양조사에 따르면 근감소증 유병률은 60세 이상 남성의 42.0%와 여성의 42.7%로 매우 흔한 질환이며, 특히 우리나라는 전세계에서도 고령화 속도가 가장 높기 때문에 향후 중요한 사회적 문제가 될 것이 확실하다.

[0010] 현재 근감소증에는 운동, 단백질 및 칼로리보충이 도움이 된다고 알려져 있으나, 근감소증 환자의 대부분을 차지하는 노인들에서는 크게 도움이 되지 않아 근감소증 치료제가 절실히 필요하다. 그러나, 현재 근감소증에 사용되는 치료제들은 근육감소 개선 및 근육량 증진에 직접적인 효과를 나타내는 약물은 아직까지 암상실험 수준의 단계이며, 현재 최종적으로 FDA 승인을 받은 약제는 없는 상황이다. 때문에 근감소증 치료를 위해서 일부 selective androgen receptor modulator, activin receptor antagonist, fast skeletal muscle troponin inhibitor 등을 근감소증 치료제로 개발하려는 노력들은 있으나, 현재 초기 임상을 시도하는 수준이다.

[0011] 근감소증 치료제 동향에 대한 리포트들에 따르면 2010년 전세계적인 근감소증 치료제 시장은 약 1000만 달러(US)이며, 2018년 2000만 달러(US) 규모로 성장할 것으로 예측된다고 보고되었다(“Sarcopenia Therapeutics - Pipeline Assessment and Market Forecasts to 2018” , 2011.11.17). 또한, 2013년 EU 산하 민간 보관협력체인 Innovative Meticines Initiative에서는 4대 보건 연구 주제 중 하나로서 노인 근감소증 치료제의 개발에 약 5천만 유로를 투자하기로 발표하여 진행중에 있다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 근감소증에 대하여 직접적으로 치료 효과를 나타낼 수 있는 치료제를 개발하기 위해 노력한 결과, Slit 단백질이 결핍된 마우스에서 근육량이 감소하였으며, Slit 단백질이 Robo1 또는 Robo2 수용체와 결합하여 Slit-Robo 시스템을 통해 근육모세포의 M-카데린에 결합되어있던 β-카테닌이 유리(release)되어 β-카테닌을 활성화하고 미오게닌의 발현을 증가시켜, 근육모세포의 분화를 유도함으로서 근육 형성을 촉진할 수 있음을 확인하였다. 또한, 특히 Slit 단백질 전장 뿐 아니라 이의 활성 단편인 LRRD2 단백질을 처리하는 경우에도 근육모세포의 분화를 촉진시켜 근육량의 증가를 유도할 수 있으므로, Slit 단백질, Robo 단백질, 이들의 활성 단편, 또는 이를 암호화하는 유전자는 근감소증 예방 및 치료용/개선용 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) KR 10-1617497 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 이와 같이, 본 발명자들은 Slit 단백질이 Robo1 또는 Robo2 수용체와 결합하여 Slit-Robo 시스템을 통해 근육모세포의 M-카데린에 결합되어있던 β-카테닌을 유리(release)하여 β-카테닌을 활성화하고 미오게닌의 발현을 증가시켜, 근육모세포의 분화를 유도함으로서 근육 형성을 촉진할 수 있음을 확인하였다. 또한, Slit 단백질 전장 뿐 아니라, 특히 이의 활성 단편을 처리하는 경우에도 근육모세포의 분화를 촉진시켜 근육량의 증가를 유도할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0017] 따라서, 본 발명의 목적은 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또다른 목적은 근육 질환 예방 및 개선용 건강기능식품, 또는 사료 첨가물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또다른 목적은 근기능 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또다른 목적은 근육질환 진단의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또다른 목적은 근육 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2, 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자; 이의 활성화제(activator)를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 바람직한 일실시예에서는, 하기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0025] 서열번호 1의 아미노산으로 구성된 Slit3 단백질;

[0026] 서열번호 2의 아미노산으로 구성된 Robo1 단백질;

[0027] 서열번호 3의 아미노산으로 구성된 Robo2 단백질; 및

[0028] 서열번호 4의 아미노산으로 구성된 LRRD2 단백질.

[0030] 또한, 본 발명은 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2, 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자; 또는 이들의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0031] 본 발명의 바람직한 일실시예에서는, 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2, 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자; 또는 이들의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명의 바람직한 일실시예에서는, 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2, 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자; 또는 이들의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 사료 첨가물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 바람직한 일실시예에서는, 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 사료 첨가물을 제공한다.

[0039] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 Slit3 단백질은 서열번호 5의 염기서열로 구성되는 *slit3* 유전자로부터 발현되는 것일 수 있다.

[0040] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 Robo1 단백질은 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 *robo1* 유전자로부터 발현되는 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 Robo2 단백질은 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 *robo2* 유전자로부터 발현되는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 LRRD2 단백질은 서열번호 8의 염기서열로 구성되는 유전자로부터 발현되는 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 또다른 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환일 수 있고, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은

[0047] i) 실험군인 피검체 유래 시료에서 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Slit3 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0048] ii) 상기 단계 i)에서 측정한 Slit3 단백질의 발현 수준을 대조군인 정상 개체 유래 시료의 Slit3 단백질 발현 수준과 비교하는 단계; 및

[0049] iii) 상기 단계 ii)에서 비교한 실험군의 Slit3 단백질 발현 수준이 대조군에 비해 감소하는 경우 실험군을 근육 질환으로 판단하는 단계;를 포함하는, 근육질환 진단의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법을 제공한다.

[0050] 아울러, 본 발명은

[0051] i) 피검 화합물 또는 조성물을, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Slit3 단백질, 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 Robo1 단백질 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 Robo2 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 발현하는 세포주에 처리하는 단계;

[0052] ii) 상기 단계 i)의 처리한 세포주에서 상기 Slit3 단백질의 발현 정도 또는 상기 Robo1 단백질 또는 Robo2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및

[0053] iii) 상기 단계 ii)의 Slit3 단백질의 발현 정도, 또는 Robo1 단백질 또는 Robo2 단백질의 활성이 피검 화합물 또는 조성물을 무처리한 대조군 세포주와 비교하여 증가된 피검 화합물 또는 조성물을 선별하는 단계를 포함하는, 근육 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0055] 본 발명은 SLIT-ROBO 시스템을 이용한 근감소증 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다. 특히 본 발명은 slit1, slit2, slit3, robo1, robo2, 및 이들의 단편에서 선택된 유전자 또는 그 발현 단백질; 또는 이의 활성화제를 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용, 또는 근 기능 개선용 조성물을 제공할 수 있다.

[0056] 특히, 구체적으로는 본 발명의 Slit 단백질은 Robo1 또는 Robo2 수용체와 결합하여 Slit-Robo 시스템을 통해 근육모세포의 M-카데린(M-caderin)에 결합되어있던 β-카테닌(β-catenin)을 유리(release)하여 β-카테닌을 활성화하고 미오게닌(myogenin)의 발현을 증가시켜, 근육모세포(myoblast)의 분화를 유도함으로서 근육 형성을 촉진할 수 있다. 또한, Slit 단백질 전장뿐 아니라 이의 활성 단편, 특히 바람직하게는 LRRD2 단백질을 처리하는 경우에도 근육모세포의 분화를 촉진시켜 근육량의 증가를 유도할 수 있으므로, 본 발명의 Slit 단백질, Robo 단백질, 이들의 활성단편, 또는 이를 암호화하는 유전자는 근감소증 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있으므로, 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 Slit3이 결핍된 마우스 모델에서 체중 변화 및 근감소 지표를 확인한 결과이다:

도 1a는 Slit3이 결핍된 수컷 마우스 모델군에서 체중 변화 및 근감소 지표를 나타내며; 및

도 1b는 Slit3이 결핍된 암컷 마우스 모델군에서 체중 변화 및 근감소 지표를 나타낸다.

도 2는 Slit3이 결핍된 마우스 모델에서 근육 면적 변화를 나타낸다:

도 2a는 Slit3이 결핍된 수컷 마우스 모델군의 EDL 근육을 H&E 염색한 결과를 나타내며;

도 2b는 Slit3이 결핍된 수컷 마우스 모델군의 GC 근육을 H&E 염색한 결과를 나타내고; 및

도 2c는 Slit3이 결핍된 수컷 마우스 모델군의 GC 근육을 면역조직화학 염색한 결과를 나타낸다.

도 3은 Slit3의 근육모세포 분화 촉진 효과를 확인한 도이다:

도 3a는 Slit3 처리에 따른 C2C12 세포주의 세포 생존능 변화의 확인을 나타내며; 및

도 3b는 근육모세포로부터 근관세포(myotube)로의 분화에 있어서 Slit3의 분화 증가 효과를 나타낸다.

도 4는 근육모세포로부터 근관세포로의 분화에 있어서 Slit3에 의해 발현 유도되는 인자를 확인한 결과이다:

도 4a는 근육모세포의 분화 과정에서 Slit3 처치에 따른 다양한 근원성 조절인자의 mRNA 발현 수준의 변화를 나타내며;

도 4b는 근육모세포의 분화 과정에서 Slit3 처치에 따른 미오게닌의 단백질 발현수준의 변화를 나타내고; 및

도 4c는 근육모세포의 분화 과정에서 Slit3 처치에 따른 미오게닌 양성 세포 수의 차이를 나타낸다.

도 5는 근육모세포에서 발현되는 카데린(Caderin) 단백질의 종류 및 발현 수준을 확인한 도이다:

도 5a는 근육모세포에서 M-카데린 및 N-카데린의 mRNA 발현 수준을 나타내고; 및

도 5b는 근육모세포에서 M-카데린 및 N-카데린의 단백질 발현 수준을 나타낸다.

도 6은 Slit3의 β-카테닌(β-catenin) 활성화에 의한 근육모세포 분화 유도 효과를 확인한 도이다:

도 6a는 근육모세포에서 Slit3의 첨가에 따른 β-카테닌 활성의 확인을 나타내며;

도 6b는 Slit3 처치에 따른 M-카데린 및 β-카테닌의 결합 수준의 변화를 공동면역침전법으로 확인한 결과를 나타내고;

도 6c는 β-카테닌 발현 유무에 따른 Slit3의 근육모세포 분화 수율의 확인을 나타내며; 및

도 6d는 β-카테닌 발현 유무에 따른 Slit3 처치한 근육모세포에서 미오게닌의 발현 수준 변화를 나타낸다.

도 7은 근육모세포에서 Slit3와 결합하는 Robo 수용체 아형을 확인한 도이다:

도 7a는 근육모세포인 C2C12 세포에서 발현하는 Robo 수용체의 아형을 나타내며; 및

도 7b는 C2C12 세포에서 Robo1 또는 Robo2 넉아웃에 따라 Slit3에 의한 미오게닌 발현 증가 효과가 유의적으로 증가하지 못함을 나타낸다.

도 8은 Robo 수용체가 결핍된 마우스 모델에서 체중 변화 및 근감소 지표의 확인을 나타낸다.

도 9는 Slit3의 LRRD2 도메인에 의한 근육모세포 분화 및 근육량 증진 효과를 확인한 도이다:

도 9a는 시험관 내 수준에서 Slit3의 LRRD2에 의한 근육모세포 분화 효과를 나타내고; 및

도 9b는 생체 내 수준에서 Slit3의 LRRD2에 의한 체중 및 근감소 지표 증가 효과의 확인을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 상술한 바와 같이, 전 세계적으로 평균 수명이 증가함에 따라 고령화 인구가 증가하고 있으며, 이에 따라 근감소증에 대한 치료 요구 또한 지속적으로 증가할 것으로 예상되나, 아직까지 근감소증 치료제로서 FDA의 승인을 받은 수준의 약제는 보고된 바 없다.

[0061] 본 발명의 일구체예에서는, Slit 단백질 또는 이의 활성 단편은 Robo1 또는 Robo2 수용체와 결합하여 Slit-Robo 시스템을 통해 근육모세포의 M-카데린(M-caderin)에 결합되어있던 β-카테닌(β-catenin)을 유리하여 β-카테닌을 활성화하고 미오게닌(myogenin)의 발현을 증가시켜, 근육모세포(myoblast)의 분화를 유도함으로서 근육 형성을 촉진할 수 있으므로, 직접적으로 근감소증에 대한 치료에 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0063] 따라서, 본 발명은 Slit1, Slit2, Slit3 단백질, Robo1 단백질, Robo2 단백질 및 LRRD2 단백질로 구성된 군으

로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자; 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0065] 본 발명의 "Slit3 단백질"은 서열번호 1의 아미노산으로 구성되며, 본 발명의 "Robo1 단백질"은 서열번호 2의 아미노산으로 구성되고, 본 발명의 "Robo2 단백질"은 서열번호 3의 아미노산으로 구성되며, 본 발명의 "LRRD2 단백질"은 서열번호 4의 아미노산으로 구성되는 것이 바람직하며, 상기 단백질 또는 펩티드의 기능적 동등물을 포함할 수 있다.

[0066] 상기 "기능적 동등물"은 단백질 또는 펩티드의 아미노산 부가, 치환 또는 결실로 인해, 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 구성된 단백질 또는 펩티드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질 또는 펩티드를 말한다.

[0067] 본 발명의 "활성화제"는, Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2, 및/또는 이들의 단편의 발현을 증강시킬 수 있거나, SLIT-ROBO 시스템을 활성화시킬 수 있는 각종 화합물, 단백질 또는 펩티드, 염기서열 등을 포함한다. 상기 화합물, 단백질 또는 펩티드, 염기서열의 각종 대사체, 전구체, 약제학적 등가물도 또한 상기 활성화제에 포함된다.

[0068] 본 발명의 "Slit3 단백질"은 서열번호 5의 염기서열로 구성되는 *slit3* 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하고, "Robo1 단백질"은 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 *robo1* 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하며, "Robo2 단백질"은 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 *robo2* 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하고, "LRRD2 단백질"은 서열번호 8의 염기서열로 구성되는 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0070] 본 발명의 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환으로 당업계에 보고된 질병인 것이 바람직하며, 구체적으로 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0071] 상기 근육 소모 또는 퇴화는 선천적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특징으로 한다.

[0072] 보다 구체적으로, 상기 근육은 심줄, 근육, 건을 포괄적으로 지칭하고, 근 기능 또는 근육 기능은 근육의 수축에 의해 힘을 발휘할 수 있는 능력을 의미하며, 근육이 저항을 이겨내기 위하여 최대한의 수축력을 발휘할 수 있는 근력; 근육이 주어진 중량에 얼마나 오랫동안 또는 얼마나 여러 번 수축과 이완을 반복할 수 있는지 나타내는 능력인 근 지구력; 및 단시간 내에 강한 힘을 발휘하는 능력인 순발력을 포함한다. 상기 근 기능은 근육량에 비례하며, 용어 근 기능 개선은 근 기능을 보다 긍정적인 방향으로 향상시키는 것을 의미한다.

[0074] 본 발명의 바람직할 실시예에서, 본 발명자들은 Slit3 발현과 근육량의 관계를 확인한 결과, Slit3가 결핍된 마우스는 골격근이 감소하고(도 1a, 도 1b, 표 1 및 표 2) 근섬유의 면적은 현저하게 감소하나, 근육모세포 및 이의 위성세포의 개수 자체에는 변화가 없는 것을 확인하였다(도 2a 내지 도 2c).

[0075] 또한, 본 발명자들은 Slit3의 근육모세포 분화 촉진 효과를 확인한 결과, Slit3는 근육모세포의 생존능에는 영향을 미치지 않으며 근육모세포가 근육 근섬유로 분화할 수 있도록 함을 확인하였고(도 3a 및 도 3b), 이러한 분화에 관여하는 근원성 조절 인자 중 Slit3에 의해 미오게닌의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 4a 내지 도 4c).

[0076] 또한, 본 발명자들은 근육모세포가 근육 근섬유로 분화되는 과정에 있어서, 근육모세포에 발현된 M-카데린과 이와 결합하는 β-카테닌 활성이 Slit3에 의해 증가됨을 확인하여(도 5a, 도 5b 및 도 6a), 근육모세포의 분화 과정에서 Slit3을 통해 M-카데린이 Robo 단백질의 결합이 벌어져, β-카테닌 역시 M-카데린과 결합하지 않고 활성이 증가하고 미오게닌의 발현을 증가시켜, 근육모세포의 분화를 유도함으로서 근육 형성 촉진에 관여할 수 있음을 확인하였다(도 6b, 도 6c 및 도 6d).

[0077] 또한, 본 발명자들은 근육모세포에서 Slit3와 결합하는 Robo 수용체 아형을 확인한 결과, 근육모세포 표면에

Robo1 및 Robo2 수용체가 발현되어 있어, 이들이 Slit-Robo 시스템을 이루어 Slit3의 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 7a 및 도 7b). 특히 Robo1이 결핍되는 경우 생체 수준에서 근육량이 감소됨을 나타내므로, Slit3 및, Robo1 또는 Robo2의 결합 시스템을 통해 근감소증의 개선 효과가 나타날 수 있음을 확인하였다(표 3 및 도 8).

[0078] 또한, 본 발명자들은 Slit3의 LRRD2 도메인에 의한 근육모세포 분화 및 근육량 증진 효과를 확인한 결과, 시험관 내 수준에서는 Slit3의 LRRD2에 의한 근육모세포 분화 효과가 증가하였으며, 생체 내 수준에서는 Slit3의 LRRD2를 투여한 근감소증 모델 마우스에서 체중 및 근감소 지표가 증가됨을 확인하였다(도 9a, 도 9b 및 표 4).

[0080] 따라서, 본 발명의 Slit 단백질은 Robo1 또는 Robo2 수용체와 결합하여 Slit-Robo 시스템을 통해 근육모세포의 M-카데린에 결합되어있던 β-카테닌을 유리하여 β-카테닌을 활성화하고 미오게닌의 발현을 증가시켜, 근육모세포의 분화를 유도함으로서 근육 형성을 촉진할 수 있다. 또한, Slit 단백질 전장뿐 아니라 이의 활성 단편을 처리하는 경우에도 근육모세포의 분화를 촉진시켜 근육량의 증가를 유도할 수 있으므로, 본 발명의 특히 바람직하게는, Slit3 단백질 또는 Slit3의 LRRD2 단백질, 또는 이를 암호화하는 유전자는 근감소증 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있다.

[0082] 본 발명의 단백질 또는 펩티드는 이의 야생형 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 펩티드뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체 또한 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 상기 아미노산 서열 변이체란 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 또는 LRRD2의 야생형 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질 또는 펩티드를 의미한다.

[0083] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서 가능한 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아세틸화(acetylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

[0084] 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 및 LRRD2 단백질, 또는 이의 변이체는 천연에서 추출하거나 합성(Merrifleld, J. Amer. chem. Soc. 85:2149-2156, 1963) 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 유전자 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다 (Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2판, 1989).

[0086] 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 및 LRRD2 단백질은 단백질의 형태뿐만 아니라, 유전자 치료나 백신 등에 사용되기 위하여 세포 내에서 Slit3, Robo1, Robo2 단백질 및 LRRD2 단백질을 암호화하는 유전자를 발현할 수 있는 발현벡터의 형태로 제공될 수 있다.

[0087] 상기 발현벡터는 상기 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질을 암호화하는 유전자를 삽입하여 발현할 수 있는 당업계에 공지된 발현벡터를 이용할 수 있으며, 예컨대 pBK-CMV (Staratagene), pCR3.1 (Invitrogen) 등의 발현벡터를 사용할 수 있다.

[0088] 또한, 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 및 LRRD2 단백질을 암호화하는 염기서열, 즉 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 DNA 분자를 발현을 조절하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결한 형태, 예를 들어 발현벡터의 형태로 치료대상 환자 내에서 이것이 발현되도록 상기 폴리뉴클레오티드를 투여할 수 있다. 상기 벡터는 따라서 코딩 서열을 발현시킬 수 있는 프로모터 부위를 포함하는 적당한 전사 조절 신호를 포함하고, 상기 프로모터는 치료될 환자 내에서 작동 가능한 것이 바람직하다. 따라서, 인간 유전자 치료용으로, RNA 폴리머라제를 전사 개시 부위로 인도하는데 필요한 서열뿐만 아니라, 적당하다면 인헨서를 포함하는 다른 작동 서열 또는 조절 서열들을 포함하는 용어인 프로모터는, 바람직하게는 인간 유전자로부터의 인간 프로모터 서열 또는 일반적으로 인간에게서 발현되는 유전자로부터의 인간 프로모터 서열, 예를 들어 인간 사이토메갈로바이러스(CMV)로부터의 프로모터일 수 있다. 이러한 관점에서 적당한 공지된 진핵 프로모터 중에서 CMV 즉초기 프로모터, HSV 티미딘키나제 프로모터, 초기 및 후기 SV40 프로모터, 루 육종 바이러스(“RSV”)의 것들과 같은

레트로바이러스 LTR 프로모터, 및 생쥐 메탈로티오네인-1 프로모터와 같은 메탈로티오네인 프로모터가 적합하다.

[0089] 상기 폴리뉴클레오티드 서열 및 전사 조절 서열은 상업적으로 입수 가능한 pBR322와 같은 플라스미드에 기초하여 복제 가능한 플라스미드 벡터 내에 클로닝되어 제공되거나 또는 잘 알려진 공개된 절차의 일상적인 응용에 의해 입수 가능한 플라스미드로부터 구축될 수도 있다.

[0090] 상기 벡터는 또한 상기 유전자 서열의 3'에 위치하는 전사 조절 서열, 및 인간 치료로 사용될 때 SV40 바이러스와 같은 바이러스로부터의 상응하는 서열과 같이 치료될 환자에게서 인식 가능한 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다. 기타 전사 조절 서열이 이 기술분야에 잘 알려져 있어 이용 가능하다.

[0092] 상기 발현벡터는 또한 상기 벡터가 전파될 수 있도록 항생제 저항성과 같은 선택가능한 마커를 포함할 수 있다.

[0093] 그 자체로 상기 단백질 또는 펩티드를 합성할 수 있는 발현 벡터들을 물리적 방법으로 직접적으로 상처 부위에 도입시킬 수 있다. 이들의 예로는 예를 들어 인산 완충 염수(PBS)와 같은 제약학적으로 허용되는 부형제 중의 용액 내에 적당합 비히클 내의 "네이키드" 핵산 벡터를 국부적으로 적용하는 것, 또는 당업계에 알려진 방법에 따라 "유전자 총" 기술로도 알려진 입자 총알과 같은 물리적 방법으로 벡터를 투여하는 것을 포함한다. 상기 "유전자 총" 기술은 미국특허번호 제5371015호에 기술된 바와 같이, 추진 장치로부터의 고압력하에서 방출시키는 방법으로, 벡터로 코팅된 금 비드와 같은 불활성 입자를 상처 부위, 예를 들어 피부 세포의 표면을 통과할 수 있을 정도로 충분한 속력으로 가속하는 것이다. 또한, DNA를 직접 수용체에 투여하는 기타 물리적 방법으로는 초음파, 전기적 자극, 전기투과 및 마이크로시딩(microseeding) 등이 있다.

[0094] 상기 유전자 서열은 또한 형질전환된 숙주 세포의 수단으로 상처 부위에 투여될 수 있다. 세포는 환자로부터 수거된 세포를 포함하며, 상기 핵산 서열을 이 세포내로 당업계에 공지인 유전자 도입 방법에 의해 도입하여 형질전환된 세포를 배양액 중에서 성장시켜 환자에게 이식할 수 있다.

[0095] 상술한 바와 같은 발현 구조체를 본 발명의 치료에 다양한 방법으로 사용할 수 있다. 따라서, 상기 발현 구조체들은 환자에서 치료가 필요한 부위에 직접 투여될 수 있다.

[0097] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질의 발현을 증가시키는 활성인자를 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0098] 상기 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질의 발현을 증가시키는 활성인자는 *slit1, slit2, slit3, robo1, robo2* 유전자 또는 LRRD2를 암호화는 유전자에 직접 또는 간접적으로 작용하여 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질의 생물학적 활성을 개선, 유도, 자극, 증가시키는 물질을 의미한다. 상기 물질은 유기 또는 무기 화합물과 같은 단일 화합물, 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물 및 복수 화합물의 복합체 등을 포함한다. 상기 *slit1, slit2, slit3*의 발현을 증가시키는 활성 인자는 *slit1, slit2, slit3*의 발현, 활성, 또는 기능의 감소에 의해 발병되는 질병의 예방, 개선 및 치료에 이용될 수 있다.

[0099] 상기 물질이 *slit1, slit2, slit3, robo1, robo2* 유전자 또는 LRRD2를 암호화는 유전자를 활성화시키는 기작은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 물질은 전사, 번역 등의 유전자 발현을 증대시키거나, 비활성형을 활성형으로 전환시키는 기작으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, *slit1, slit2, slit3, robo1, robo2* 유전자 또는 LRRD2를 암호화는 유전자를 활성화시키는 물질은 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물이다. 핵산 및 단백질 서열이 이미 공지된 slit1, slit2, slit3에 대하여 당업자는 유도제 또는 활성제로 작용하는 유기 또는 무기 화합물과 같은 단일 화합물 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물 및 복수 화합물의 복합체 등을 당 분야의 기술을 이용하여 제조하거나 스크리닝할 수 있다.

[0101] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충진제, 증량제, 결합제, 아쥬반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0102] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 덱스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.

[0103] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있으며, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0104] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0105] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용; 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제; 경피 투여제; 또는 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.

[0106] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 행크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 덱스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.

[0108] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니멘트제, 에어롤제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 경피 투여는 약학 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.

[0110] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기제의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다. 비경구 투여용 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

[0112] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량

(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0113] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량으로는, 비경구 투여 시 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.1 내지 30 mg의 양으로 투여되도록, 그리고 경구 투여 시는 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 100 mg, 더 바람직하게는 0.01 내지 10 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0114] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0115] 본 발명의 약학 조성물은 또한 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질, 또는 이를 암호화하는 염기서열을 유효성분으로 포함하는 외용제의 제형으로 제공할 수 있다. 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 피부외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 유화제, 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 활성제, 친유성 활성제 또는 지질 소낭 등 피부 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0116] 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물이 피부 외용제로 제공될 경우, 이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 겔, 크림 또는 분무제 등의 제형일 수 있다.

[0118] 또한, 본 발명은 Slit1 단백질, Slit2 단백질, Slit3 단백질, Robo1 단백질, Robo2 단백질 및 LRRD2 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0119] 본 발명의 “Slit3 단백질”은 서열번호 1의 아미노산으로 구성되며, 본 발명의 “Robo1 단백질”은 서열번호 2의 아미노산으로 구성되고, 본 발명의 “Robo2 단백질”은 서열번호 3의 아미노산으로 구성되며, 본 발명의 “LRRD2 단백질”은 서열번호 4의 아미노산으로 구성되는 것이 바람직하며, 상기 단백질 또는 펩티드의 기능적 동등물을 포함할 수 있다.

[0120] 상기 “기능적 동등물”은 단백질 또는 펩티드의 아미노산 부가, 치환 또는 결실로 인해, 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 구성된 단백질 또는 펩티드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질 또는 펩티드를 말한다.

[0121] 본 발명의 “Slit3 단백질”은 서열번호 5의 염기서열로 구성되는 *slit3* 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하고, “Robo1 단백질”은 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 *robo1* 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하며, “Robo2 단백질”은 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 *robo2* 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하고, “LRRD2 단백질”은 서열번호 8의 염기서열로 구성되는 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0122] 본 발명의 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환으로 당업계에 보고된 질병인 것이 바람직하며, 구체적으로 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0123] 상기 근육 소모 또는 퇴화는 선천적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특징으로 한다.

[0124] 보다 구체적으로, 상기 근육은 심줄, 근육, 건을 포괄적으로 지칭하고, 근 기능 또는 근육 기능은 근육의 수축에 의해 힘을 발휘할 수 있는 능력을 의미하며, 근육이 저항을 이겨내기 위하여 최대한의 수축력을 발휘할 수 있는 근력; 근육이 주어진 중량에 얼마나 오랫동안 또는 얼마나 여러 번 수축과 이완을 반복할 수 있는지 나타내는 능력인 근 지구력; 및 단시간 내에 강한 힘을 발휘하는 능력인 순발력을 포함한다. 상기 근 기능은 근육량에 비례하며, 용어 근 기능 개선은 근 기능을 보다 긍정적인 방향으로 향상시키는 것을 의미한다.

[0126] 본 발명의 Slit 단백질은 Robo1 또는 Robo2 수용체와 결합하여 Slit-Robo 시스템을 통해 근육모세포의 M-카데린에 결합되어있던 β-카테닌을 유리하여 β-카테닌을 활성화하고 미오게닌의 발현을 증가시켜, 근육모세포의 분화를 유도함으로서 근육 형성을 촉진할 수 있다. 또한, Slit 단백질 전장뿐 아니라 이의 활성 단편, 특히 바람직하게는 LRRD2 단백질을 처리하는 경우에도 근육모세포의 분화를 촉진시켜 근육량의 증가를 유도할 수 있으므로, 본 발명의 Slit 단백질 또는 Slit의 활성 단편, 또는 이를 암호화하는 유전자는 근감소증 예방 및 개선용 건강기능식품의 유효성분으로서 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 Slit 단백질 또는 Slit의 활성 단편, 또는 이를 암호화하는 유전자는 근감소증 예방 및 개선용 사료 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있다.

[0128] 본 발명에 따른 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 일반 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과실 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치이즈 등), 식용식물 유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 영양보조제로는 이에 한정되지 않지만 캡슐, 타블렛, 환 등에 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 건강기능식품으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질 자체를 차, 쥬스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용(건강음료)할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질과 근육 질환 예방 및 근 기능 개선 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

[0130] 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질을 건강음료로 이용하는 경우, 상기 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0132] 또한, 본 발명의 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질은 근육 질환 예방 및 근 기능 개선용 식품 조성물의 유효성분으로 함유될 수 있는데, 그 양은 근육 질환 예방 및 근 기능 개선용 작용을 달성하기에 유효한 양으로 특별히 한정되는 것은 아니나, 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%인 것이 바람직하다. 본 발명의 식품 조성물은 Slit1, Slit2, Slit3, Robo1, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질과 함께 근육 질환 예방 및 근 기능 개선용 조성물에 효과가 있는 것으로 알려진 다른 활성 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있다.

[0134] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄

산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0136] 또한, 본 발명은 Slit1 단백질, Slit2 단백질, Slit3 단백질, Robo1 단백질, Robo2 단백질 및 LRRD2 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 화장료 조성물을 제공한다. 상기 화장료 조성물은 특히 제한되는 것은 아니나, 피부 외용으로 사용하거나, 경구 섭취할 수 있다.

[0137] 본 발명의 "Slit3 단백질"은 서열번호 1의 아미노산으로 구성되며, 본 발명의 "Robo1 단백질"은 서열번호 2의 아미노산으로 구성되고, 본 발명의 "Robo2 단백질"은 서열번호 3의 아미노산으로 구성되며, 본 발명의 "LRRD2 단백질"은 서열번호 4의 아미노산으로 구성되는 것이 바람직하며, 상기 단백질 또는 펩티드의 기능적 동등물을 포함할 수 있다.

[0138] 상기 "기능적 동등물"은 단백질 또는 펩티드의 아미노산 부가, 치환 또는 결실로 인해, 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 구성된 단백질 또는 펩티드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질 또는 펩티드를 말한다.

[0139] 본 발명의 "Slit3 단백질"은 서열번호 5의 염기서열로 구성되는 *slit3* 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하고, "Robo1 단백질"은 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 *robo1* 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하며, "Robo2 단백질"은 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 *robo2* 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하고, "LRRD2 단백질"은 서열번호 8의 염기서열로 구성되는 유전자로부터 발현되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0140] 본 발명의 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환으로 당업계에 보고된 질병인 것이 바람직하며, 구체적으로 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0141] 상기 근육 소모 또는 퇴화는 선천적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특징으로 한다.

[0142] 보다 구체적으로, 상기 근육은 심줄, 근육, 건을 포괄적으로 지칭하고, 근 기능 또는 근육 기능은 근육의 수축에 의해 힘을 발휘할 수 있는 능력을 의미하며, 근육이 저항을 이겨내기 위하여 최대한의 수축력을 발휘할 수 있는 근력; 근육이 주어진 중량에 얼마나 오랫동안 또는 얼마나 여러 번 수축과 이완을 반복할 수 있는지 나타내는 능력인 근 지구력; 및 단시간 내에 강한 힘을 발휘하는 능력인 순발력을 포함한다. 상기 근 기능은 근육량에 비례하며, 용어 근 기능 개선은 근 기능을 보다 긍정적인 방향으로 향상시키는 것을 의미한다.

[0144] 본 발명의 Slit 단백질은 Robo1 또는 Robo2 수용체와 결합하여 Slit-Robo 시스템을 통해 근육모세포의 M-카데린에 결합되어있던 β-카테닌을 유리하여 β-카테닌을 활성화하고 미오게닌의 발현을 증가시켜, 근육모세포의 분화를 유도함으로서 근육 형성을 촉진할 수 있다. 또한, Slit 단백질 전장뿐 아니라 이의 활성 단편, 특히 바람직하게는 LRRD2 단백질을 처리하는 경우에도 근육모세포의 분화를 촉진시켜 근육량의 증가를 유도할 수 있으므로, 본 발명의 Slit 단백질 또는 Slit의 활성 단편, 또는 이를 암호화하는 유전자는 근기능 개선용 화장료 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0146] 본 발명의 근 기능 개선용 조성물은 또한 화장료 조성물일 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은 Slit1 단백질, Slit2 단백질, Slit3 단백질, Robo1 단백질, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질을 유효성분으로 함유하며 피부학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물(화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼 및 클렌징 워터와 같은 세안제, 팩, 보디오일), 색조 화장품 조성물(화운데이션, 립스틱, 마스카라, 메이크업 베이스), 두발 제품 조성물(샴푸, 린스, 헤어컨디셔너, 헤어젤) 및 비누 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0147] 상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화장료 조성물로 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 상기 Slit1 단백질, Slit2 단백질, Slit3 단백질, Robo1 단백질, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질을 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형(O/W)의 크림베이스에 Slit1 단백질, Slit2 단백질, Slit3 단백질, Robo1 단백질, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질, 또는 이를 암호화하는 염기서열을 첨가하여 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다.

[0148] 본 발명의 화장료 조성물에 함유되는 Slit1 단백질, Slit2 단백질, Slit3 단백질, Robo1 단백질, Robo2 단백질 또는 LRRD2 단백질의 함량은 이에 한정되지 않지만 전체 조성물 총중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%인 것이 바람직하고, 0.01 내지 5중량%인 것이 더욱 바람직하다. 상기 함량이 0.001중량% 미만에서는 목적하는 항노화 또는 주름개선 효과를 기대할 수 없고, 10중량% 초과에서는 안전성 또는 제형상의 제조에 어려움이 있을 수 있다.

[0150] 또한, 본 발명은

[0151] i) 실험군인 피검체 유래 시료에서 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Slit3 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0152] ii) 상기 단계 i)에서 측정한 Slit3 단백질의 발현 수준을 대조군인 정상 개체 유래 시료의 Slit3 단백질 발현 수준과 비교하는 단계; 및

[0153] iii) 상기 단계 ii)에서 비교한 실험군의 Slit3 단백질 발현 수준이 대조군에 비해 감소하는 경우 실험군을 근육 질환으로 판단하는 단계;를 포함하는, 근육질환 진단의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법을 제공한다.

[0154] 본 발명에서 “단백질의 발현 수준을 측정”하는 것은 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 측정함으로써 확인할 수 있다.

[0156] 또한, 본 발명은

[0157] i) 피검 화합물 또는 조성물을, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Slit3 단백질, 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 Robo1 단백질 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 Robo2 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 발현하는 세포주에 처리하는 단계;

[0158] ii) 상기 단계 i)의 처리한 세포주에서 상기 Slit3 단백질의 발현 정도 또는 상기 Robo1 단백질 또는 Robo2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및

[0159] iii) 상기 단계 ii)의 Slit3 단백질의 발현 정도, 또는 Robo1 단백질 또는 Robo2 단백질의 활성이 피검 화합물 또는 조성물을 무처리한 대조군 세포주와 비교하여 증가된 피검 화합물 또는 조성물을 선별하는 단계를 포함하는, 근육 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0160] 본 발명의 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환으로 당업계에 보고된 질병인 것이 바람직하며, 구체적으로 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0161] 상기 근육 소모 또는 퇴화는 선천적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특징으로 한다.

[0162] 보다 구체적으로, 상기 근육은 심줄, 근육, 건을 포괄적으로 지칭하고, 근 기능 또는 근육 기능은 근육의 수축에 의해 힘을 발휘할 수 있는 능력을 의미하며, 근육이 저항을 이겨내기 위하여 최대한의 수축력을 발휘할 수 있는 근력; 근육이 주어진 중량에 얼마나 오랫동안 또는 얼마나 여러 번 수축과 이완을 반복할 수 있는지 나타내는 능력인 근 지구력; 및 단시간 내에 강한 힘을 발휘하는 능력인 순발력을 포함한다. 상기 근 기능은 근육량

에 비례하며, 용어 근 기능 개선은 근 기능을 보다 긍정적인 방향으로 향상시키는 것을 의미한다.

[0164] 본 발명의 Slit 단백질 또는 이의 LRRD2 단백질은 Robo1 또는 Robo2 수용체와 결합하여 Slit-Robo 시스템을 통해 근육모세포의 M-카데린에 결합되어있던 β-카테닌을 유리하여 β-카테닌을 활성화하고 미오게닌의 발현을 증가시켜, 근육모세포의 분화를 유도함으로서 근육 형성 촉진할 수 있다. 따라서, Slit 단백질 또는 이의 LRRD2 단백질의 발현 수준을 통해 직접적인 증상이 나타나기 이전에 근감소증에 대한 발병 여부를 판단할 수 있다. 또한, Slit 단백질 발현 수준 또는 Robo 수용체의 활성을 증가시킬 수 있는 화합물 또는 조성물을 근감소증 치료제 후보물질로서 선별할 수 있다.

[0166] 본 발명의 방법에 있어서, mRNA의 발현 수준을 측정하는 것은 생물학적 시료에서 SLIT3 단백질 또는 LRRD2 단백질을 암호화하는 mRNA의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다. 이를 위한 분석 방법으로는, 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들어 중합효소반응(PCR), 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0167] 본 발명의 방법에 있어서, 단백질의 발현 수준을 측정하는 것은 생물학적 시료에서 SLIT3 단백질 또는 LRRD2 단백질의 존재 여부 및 발현 정도를 확인하는 과정으로 단백질의 양을 측정하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들어 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다

[0169] 상기 근육질환 진단의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법 및 근육 질환 치료제 스크리닝 방법에 있어서, 바람직할 일실시예의 Slit3를 사용하여 기재하고 있지만, Slit1, Slit2; 또는 Slit1, Slit2, Slit3의 활성 단편을 사용할 수 있다.

[0171] 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.

실 시 예 1

[0173] **Slit3 발현과 근육량의 관계 확인**

[0174] **<1-1> Slit3가 결핍된 마우스 모델에서 체중 변화 및 근감소 지표 확인**

[0175] Slit3가 생체에서 골격근 형성에 관여하는지를 확인하기 위해서, Slit3 발현 유무에 따른 마우스 모델의 근육량 변화를 확인하였다.

[0176] 구체적으로, Mutant Mouse Regional Resource Centers(Stock number 030759-MU; columbia, MO, USA)로부터 slit3 넉아웃 마우스의 배아를 구입하고, 수컷 및 암컷 slit3 +/- C57BL/6J 마우스를 교배하여, Slit3 결핍 마우스 모델을 제조하였다. Slit3 결핍 마우스 모델은 수컷군과 암컷군으로 다시 나누어, Slit3 발현이 결핍된 마우스 모델의 체중을 측정하였다. 마우스 모델이 7주령이 되면, 수컷군과 암컷군을 희생하고, 각각의 장지신근(extensor digitorum longus, EDL) 및, 장단지근과 비장근(gastrocnemius와 soleus, GC+SOL) 근육을 수득하여 무게를 측정하였다. 근감소에 대한 지표(sarcopenic index)는 마우스 체중에 대한 근육량을 백분율로 나타내기

위해 “sarcopenic index(%) = 100 × 근육의 중량 ÷ 체중”의 수식을 사용하여 나타내었다.

[0177] 그 결과 도 1a, 1b, 하기 [표 1] 및 [표 2]에서 나타난 바와 같이, Slit3가 결핍된 마우스 모델에서는 수컷군 및 암컷군 모두에서 정상 대조군 마우스에 비해 체중이 낮았고, EDL의 중량 및 GC+SOL의 중량도 낮았으며, EDL의 근감소 지표 및 GC+SOL의 근감소 지표도 정상대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 1a, 도 1b, 표 1 및 표 2). 이를 통해, 성별 및 근육의 종류와 관계없이 생체에서 Slit3가 결핍되면 골격계 근육량도 감소하는 것을 확인하였다.

표 1

[0179] Slit이 결핍된 수컷 마우스에서 체중 변화 및 근감소 지표의 비교

실험군	체중(g)	근육 중량(g)		근감소 지표(%)	
	체중(g)	EDL	GC+SOL	EDL	GC+SOL
정상 대조군	22.8±0.7	0.058±0.002	0.131±0.001	0.257±0.011	0.578±0.015
Slit3 결핍군	19.8±1.0	0.041±0.003	0.101±0.008	0.207±0.014	0.507±0.022

표 2

[0180] Slit이 결핍된 암컷 마우스에서 체중 변화 및 근감소 지표의 비교

실험군	체중(g)	근육 중량(g)		근감소 지표(%)	
	체중(g)	EDL	GC+SOL	EDL	GC+SOL
정상 대조군	18.6±0.5	0.047±0.006	0.104±0.007	0.250±0.026	0.558±0.028
Slit3 결핍군	18.2±0.4	0.031±0.003	0.083±0.004	0.171±0.020	0.458±0.028

[0182] **<1-2> Slit3이 결핍된 마우스 모델에서 근육 면적 변화 확인**

[0183] Slit3가 결핍된 마우스는 골격근이 감소하는 것을 확인하였으므로, 이를 구체적으로 확인하기 위해 근육을 염색하여 근육 면적을 비교하였다.

[0184] 구체적으로, 7주령의 Slit3이 결핍된 수컷 마우스 모델군을 희생하여, EDL 및 GC+SOL 근육 조직을 수득한 다음, 4% 포름알데하이드로 고정하고 OCT 화합물에 포매하였다(embedding). 그런 다음, 헤마토실린(hematoxylin) 및 에오신(Eosin)을 처리하여 H-E 염색(Hematoxylin & Eosin staining)을 통해 근육 조직을 염색하였다. 염색한 근육 조직의 사진을 찍어 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 근육의 조직의 핵과 섬유질 부분 수를 비교하고 면적을 확인하였다.

[0185] 또한, 세포의 수를 보다 구체적으로 비교하기 위해 근섬유초(sarcolemma), 핵(nucleus) 및 근육모세포의 줄기세포인 위성세포의 마커 단백질을 면역조직화학염색하였다. GC 근육 조직의 단면에 1차 항체로 항-라미닌(laminin) 항체 및 항-PAX7 항체를 각각 처리하여 제조사의 프로토콜에 따라 반응한 후, 2차 항체로 발색하여, 근섬유초 및 근육모세포의 줄기세포인 위성세포의 마커 단백질을 염색하였고, 4'6-디아미디노-2-페닐인돌(4'6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)를 처리하여 핵을 염색한 다음, 형광 현미경(fluorescence microscope)으로 관찰하여 GC 근육 조직 내 세포 중 근육모세포의 줄기세포 비율을 구하였다.

[0186] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 Slit3이 결핍된 마우스 모델에서는 EDL 및 GC 근육 모두에서 정상 대조군 마우스에 비해 근섬유 및 핵의 수가 유사한 것을 확인하였다(도 2a 및 도 2b). GC 조직 단면의 면역조직화학염색하였을 때 라미닌 염색을 통해 Slit3 결핍 마우스에서 근섬유의 면적이 유의적으로 감소하는 반면, 핵 및 PAX7을 염색한 것을 통해 조직 내 전체 핵의 수 및 PAX7 양성 세포의 수에서는 유의적인 차이를 나타내지 않는 것을 확인하였다(도 2c). 이를 통해, 생체 수준에서 Slit3가 결핍되었을 때 근섬유의 면적은 현저하게 감소하나, 근육모세포 및 이의 위성세포의 개수 자체에는 변화가 없어, Slit3 결핍에 의한 근육량 감소는 근육모세포의 증식, 이의 위성세포의 증식 및 증가(resruitment)와는 무관한 것을 확인하였다.

실 시 예 2

[0188] **Slit3의 근육모세포 분화 촉진 효과의 확인**

[0189] **<2-1> Slit3에 의한 근육모세포의 생존능 변화 여부 확인**

[0190] Slit3 결핍에 따라 골격근의 양이 감소하는 것을 확인하였으므로, Slit3가 근육량을 증가시키기 위해 어떠한 역할을 하는지 확인하였다. 먼저, 근육량을 증가시키는데 있어서 Slit3의 역할이 근육세포의 생존능 증가 효과인지 확인하였다.

[0191] 구체적으로, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 DMEM 배지에 근육모세포(myoblast)인 C2C12 세포주(ATCC 구입, 미국)를 접종하여 37℃에서 5% CO_2가 유지되도록 배양하였다. 배양 24시간 후, 재조합 Slit3(Abcam 사, Cambridge, Ma, USA; 및 R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)를 1 ㎍/㎖ 또는 3 ㎍/㎖의 농도로 배양한 세포에 처리하여 24 시간 동안 추가 배양하였다. 그런 다음 PBS 용액으로 2 회 세척하고 MTT 시약을 처리한 다음, 2 시간 동안 추가로 배양하여 450 ㎚에서 엘리사 플레이트 리더기(ELISA plate reader)로 흡광도를 측정하였다. 미처리 대조군으로는 Slit3를 처리하지 않은 C2C12 세포주를 동일한 조건에서 배양하였으며, 양성 대조군으로는 TNF-α를 처리한 C2C12 세포주를 사용하였다.

[0192] 그 결과, 도 3a에서 나타난 바와 같이 TNF-α를 처리한 양성대조군에서는 미처리 대조군에 비해 세포 생존능이 유의적으로 증가하는 반면, Slit3를 처리한 실험군에서는 세포 생존능에 대한 유의적인 변화가 나타나지 않는 것을 확인하였다(도 3a).

[0194] **<2-2> 근육모세포로부터 근육 근섬유(myotube)로의 분화에 있어서 Slit3의 분화 증가 효과 확인**

[0195] Slit3 결핍에 따라 골격근의 양이 감소하는 것을 확인하였으므로, Slit3가 근육량을 증가시키기 위해 어떠한 역할을 하는지 확인하였다. Slit3에 의해 근육모세포의 생존에 유의적인 변화가 없었으므로, 근육모세포가 근육 근섬유로 분화되는 과정에서 Slit3의 효과를 확인하였다.

[0196] 구체적으로, C2C12 세포를 10% FBS을 포함하는 DMEM 배지에 접종하여 100% 포화(confluent)될 때까지 배양하였다. 그런 다음, 배양 배지를 1 ㎍/㎖ Slit3 재조합 단백질 및 2% 말 혈청(horse serum)을 포함하는 DMEM 배지로 교환하고 배양하여 C2C12 세포를 근육 근섬유로 분화되도록 유도하였다. 유도 후, 분화된 세포를 수득하여 4% 포름알데히드를 포함하는 인산완충식염수(PBS)를 처리하여 실온에서 15 분간 고정하고, 0.1% 트리톤 X-100(triton X-100)을 처리하여 세포막에 투과성(Permeability)를 부여하였다. 그런 다음, 처리한 세포에 4% 정상 당나귀 혈청을 첨가하여 1 시간 동안 상온에서 차단(blocking)한 다음, 1차 항체로 항-미오신 H 사슬(myosin heavy chain, MyHC) 항체를 처리하여 4℃에서 밤새 배양하고, 0.1% 트윈-20을 포함하는 PBS인 PBST로 수회 세척하였다. 세척 후, 알렉사 플루오르 594(Alexa Fluor 594)가 결합된 2차 항체를 처리하여 1 시간 동안 배양하여 MyHC를 면역형광염색(immunocytochemistry, ICC staining)하였다. 그런 다음, DAPI를 처리하여 세포의 핵을 염색하고, 이를 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0197] 그 결과, 도 3b에서 나타난 바와 같이 Slit3 재조합 단백질을 첨가하지 않은 미처리 대조군에 비해 Slit3 처치하에서 분화된 실험군에서 세포 개수의 변화는 없으나, 근섬유의 면적이 유의적으로 증가하였으며 fusion index가 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 3b).

실 시 예 3

[0199] **근육모세포의 분화 과정에 있어서 Slit3 관여 인자의 확인**

[0200] 근육모세포가 근육 근섬유로 분화되는 과정에서, Myf5, Mrf4, MyoD, 미오게닌(myogenin), Mef2A 및 Mef2c과 같은 다양한 근원성 조절 인자(myogenic regulatory factor, MRF)가 근육모세포의 분화를 유발함이 알려져 있으므로, Slit3가 이러한 조절 인자의 발현을 유도함을 통해 근육모세포의 분화를 유도하는지 여부를 확인하였다.

[0201] 구체적으로, C2C12 세포를 10% FBS을 포함하는 DMEM 배지에 접종하여 100% 포화될 때까지 배양한 후, 배양 배지를 1 ㎍/㎖ Slit3 재조합 단백질 및 2% 말 혈청을 포함하는 DMEM 배지로 교환하고 총 5일 동안 배양하여 C2C12 세포를 근육 근섬유로 분화되도록 유도하였다. 배양하면서 24 시간마다 세포를 수득하고, 트리졸(TRIzol;

Invitrogen, 미국) 시약에 현탁하고 제조사의 프로토콜에 따라 분화된 근육 근섬유의 전체 RNA를 추출하여, 1 ㎍의 RNA를 주형으로 하고 해당 프라이머 및 수퍼스크립트 III 키트(superscript III kit; Invitrogen 사, 미국)를 사용하여 역전사하여 Myf5, Mrf4, MyoD, 미오게닌(myogenin), Mef2A 및 Mef2c의 cDNA를 각각 합성하였다. 합성을 위한 증폭 조건은, 95℃에서 30초간 변성(denaturation), 60℃에서 30초간 어닐링(annealing) 및 72℃에서 30초간 신장(extension)의 30 싸이클로 구성하였다. 합성한 cDNA는 Light Cycler 480 SYBR Green I Master Mix(Roche)를 사용하고, 95℃에서 10분간 전반응, 95℃에서 10초간, 55℃에서 15초간 및 72℃에서 20초간 세트(set)인 45 사이클의 증폭 반응조건으로 Light Cycler 480(Roche) 기기에서 real-time PCR을 수행하여, 분화가 유도되는 근육모세포에서 Slit3의 처리 유무에 따라 근원성 조절 인자들의 발현 수준 변화를 확인하였다.

[0202] 또한, 2일 동안 분화 유도한 C2C12 세포를 수득하여, 상기 실시예 <2-2>와 동일한 방법으로 항-미오게닌 항체를 사용하여 분화 유도된 세포에서 Slit3에 의해 발현 증가 유도된 미오게닌을 형광면역염색하여 단백질 수준에서 발현을 확인하였다.

[0203] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이 Slit3는 Myf5, Mrf4, MyoD, Mef2A 및 Mef2c 등의 발현에는 유의적인 변화를 나타내지 않았으나, Slit3을 처리한 실험군에서는 미오게닌의 mRNA의 발현 수준이 현저히 증가하여, 미처리 대조군에서의 미오게닌 mRNA 발현 수준에 비해 약 1.8배 증가된 수준을 나타내는 것을 확인하였다(도 4a). 또한, 미오게닌 단백질 발현 수준을 형광면역염색하여 확인하였을 때, Slit3를 처치한 실험군에서 미처리 대조군에 비해 미오게닌-양성 세포의 개수가 현저하게 증가하는 것을 나타내어(도 4b 및 도 4c), Slit3는 미오게닌의 발현을 증가시켜 근육모세포의 분화를 촉진함으로써, 근육 형성을 유발할 수 있음을 확인하였다.

실 시 예 4

[0205] **Slit3의 β-카테닌(β-catenin) 활성화에 의한 근육모세포 분화 유도 효과 확인**

[0206] **<4-1> 근육모세포에서 발현되는 카데린(Caderin) 단백질의 종류 및 발현 수준 확인**

[0207] Slit 단백질의 수용체는 세포막 단백질인 Robo 단백질로 잘 알려져 있다. Robo 단백질은 세포막에서 카데린(Caderin)과 결합한 형태로 세포막에 존재하는데, Slit가 Robo와 결합하면 Robo와 카데린의 결합이 벌어져 카데린에 결합되어 있던 β-카테닌이 세포 안으로 이동하여 활성화되는 것으로 알려져 있다. 근육모세포에서 발현되는 카데린은 N-카데린 및 M-카데린이므로, 근육모세포에서 Robo 단백질과 관련되어 Slit3에 의해 영향을 받을 수 있는 카데린이 어떠한 종류인지 확인하였다.

[0208] 구체적으로, 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에 C2C12 세포주, HEK297 세포주(신장 세포주)를 접종하여 37℃에서 5% CO_2가 유지되도록 배양하였다. 배양 24시간 후 각각의 세포 및 뇌조직을 수득하여, <실시예 3>과 동일한 과정으로 real-time PCR을 수행하여 C2C12 세포, HEK293 세포 또는 뇌조직에서 M-카데린 및 N-카데린의 mRNA 발현 수준을 확인하였다.

[0209] 또한, 상기 수득한 각각의 세포에 용해버퍼(20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM -glycerophosphate, 1 mM Na3VO4, 1 mM NaF, 및 a protease-inhibitor mixture)를 혼합하고 4℃에서 20분간 반응하여 세포 용해물을 제조하였고, BCA 단백질 분석키트(Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA)를 이용하여 용해물 내 단백질의 농도를 확인하였다. 10 내지 20 ㎍ 단백질을 포함하는 세포 용해물 시료는 10% 겔 SDS-PAGE로 분리한 다음, 니트로셀룰로오스 멤브레인 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)로 이동시켰다. 그런 다음, 5% 스킴 밀크를 포함하는 TBST 완충용액(500 mM Tris-HCL [pH 7.4], 1.5 M NaCl, 0.1% Tween-20) 멤브레인에 처리하고 1 시간 동안 실온에서 블로킹한 후, 항-M-카데린 항체 또는 항-N-카데린 항체를 1차 항체로 처리하여 4℃에서 밤새 배양하고, TBST로 세척하여, 거위 유래의 항-마우스 IgG 항체(goat anti-mouse IgG)를 2차 항체로 하여 1% 소혈청알부민(bovine serum albumi, BSA)을 포함하는 TBST와 함께 멤브레인에 처리하여 한 시간 동안 배양하여 웨스턴블럿(western blot)을 수행하였다.

[0210] 그 결과, 도 5a 및 도 5b에서 나타난 바와 같이 C2C12 세포에서는 M-카데린이 N-카데린에 비해 mRNA 발현 수준이 유의적으로 높은 것을 확인하였고(도 5a), 단백질 발현 수준에서도 C2C12 세포에서 M-카데린의 단백질 발현이 N-카데린보다 현저히 높은 수준으로 발현되는 것을 확인하였다(도 5b).

[0212] **<4-2> Slit3의 첨가에 따른 근육모세포에서 β-카테닌 활성 확인**

[0213] Slit 단백질들은 β-카테닌을 활성화하며, β-카테닌은 또한 미오게닌의 프로모터 부위에 결합하여 미오게닌의 발현을 증가시켜 근육모세포의 분화를 촉진함이 알려져 있으므로, 본 발명에서도 Slit3에 의해 근육모세포의 β-카테닌 활성이 변화하는지 여부를 확인하였다.

[0214] 구체적으로, β-카테닌-루시퍼라아제(luciferase, luc) 리포터 유전자를 포함하는 β-카테닌 발현 벡터로 C2C12 세포에 형질감염하였다. 그런 다음, 형질감염한 C2C12 세포를 10% FBS을 포함하는 DMEM 배지에 접종하여 100% 포화될 때까지 배양한 후, 배양 배지를 1 ㎍/㎖ Slit3 재조합 단백질 및 2% 말 혈청을 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 배양하고, 리포터 용해 완충용액(reporter lysis buffer)에 상기 배양한 C2C12 세포를 현탁하여 세포 단백질을 추출하였다. 상기 추출한 세포 단백질 10 ㎕에 루시퍼라제 기질(luciferase substrate; promega 사, 미국)과 혼합하여 루미노미터(luminometer)로 발광도(luminescence)를 측정하여 β-카테닌-루시퍼라제의 활성을 확인하였다.

[0215] 그 결과, 도 6a에서 나타난 바와 같이 Slit3는 근육모세포에서 β-카테닌-루시퍼라제의 활성을 미처리 대조군에 비해 약 1.5 배 수준으로 증가시키는 것을 확인하였다(도 6a).

[0217] **<4-3> Slit3 처치에 따른 M-카데린 및 β-카테닌의 결합 수준 변화 확인**

[0218] C2C12 세포에 Slit3를 처리했을 때 β-카테닌의 활성이 높은 것을 통해 Slit3가 Robo 수용체와 결합하여 β-카테닌의 활성이 증가할 수 있으며, C2C12 세포에서 M-카데린의 발현 수준이 N-카데린의 발현 수준보다 높음을 확인하였으므로, M-카데린과 β-카테닌의 결합이 Slit3 처치에 따라 변화하는지 여부를 공동-면역침전(co-immunoprecipitation)하여 확인하였다.

[0219] 구체적으로, GFP-tagged M-카데린의 인간 cDNA를 구입하여, 리포펙타민 2000(Gibco, Grand Island, NY, USA)으로 C2C12 세포에 형질전환한 후, 1 ㎍/㎖ Slit3 재조합 단백질을 처리하여 세포를 배양하였다. 그런 다음, 배양한 세포를 수득하여 프로테아제 저해제 혼합물(protease inhibitor cocktail; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 포스파타아제 저해제(phosphatase inhibitors; 1 mM Na3VO4, 1 mM NaF)를 포함하는 TNE 버퍼(25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA)로 용해하였다. 용해된 용해물은 4℃에서 30분 동안 M-카데린 항체 및 IgG로 면역침전하고, 상기 실시예 <4-1>의 방법으로 항-β-카테닌 항체를 사용하여 웨스턴블럿을 수행하였다.

[0220] 그 결과, 도 6b에서 나타난 바와 같이 Slit3를 처치한 실험군에서 M-카데린과 결합된 β-카테닌의 수준이 현저히 감소하는 것을 확인하여, Slit3을 통해 M-카데린이 Robo 단백질의 결합이 벌어져, β-카테닌 역시 M-카데린으로부터 유리되어활성이 증가할 수 있음을 확인하였다(도 6b).

[0222] **<4-4> β-카테닌 발현 유무에 따른 Slit3의 근육모세포 분화 촉진 효과 차이의 확인**

[0223] Slit3가 근육모세포의 분화를 촉진하는 과정에서 β-카테닌이 관여하는 것을 확인하였으므로, Slit3를 처리하였을 때 β-카테닌의 발현 유무에 따라 근육 형성 효과에 차이가 나타나는지 확인하였다.

[0224] 구체적으로, 10% FBS를 포함하는 DMEM에서 C2C12 세포를 배양한 후, β-카테닌에 대한 siRNA(CTNNB1 siRNA)을 포함하는 리포펙타민 2000(Invitrogen) 혼합물을 첨가한 다음, C2C12 세포를 추가 6시간 동안 더 배양하였다. 배양 후, 배양 배지를 신선한 DMEM 배지로 교체하여 2일 간 추가 배양하여, β-카테닌이 넉아웃된 C2C12 세포를 제조하였다. β-카테닌을 발현하는 정상 대조군으로 사용하기 위해서, CTNNB1 siRNA 대신 scrambled SiRNA를 형질전환하여 정상 대조군 세포를 제조하였다.

[0225] 그런 다음, 제조한 β-카테닌 넉아웃 C2C12 세포 또는 정상 대조군 세포를 10% FBS을 포함하는 DMEM 배지에 접종하여 100% 포화될 때까지 배양한 후, 배양 배지를 1 ㎍/㎖ Slit3 재조합 단백질 및 2% 말 혈청을 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 배양하였다. 배양 후 세포를 수득하여 1차 항체로 항-MyHC 항체를 사용하여 상기 실시예 <2-2>의 방법으로 면역형광염색(ICC staining)하였다. 그런 다음, DAPI를 처리하여 세포의 핵을 염색하고, 이를 형광 현미경으로 관찰하여 형광값으로 세포의 수를 정량하였다. Fusion index(%)는 전체 MyHC 발현 세포의 핵 수에 대한 MyHC 발현 근육 근섬유의 핵 수를 백분율로 나타내었다. 또한, 상기 배양 후 수득한 세포를 상기

실시예 <4-1>의 방법으로, 항-미오게닌 항체를 사용하여 웨스턴블럿을 수행하였다.

[0226] 그 결과, 도 6c 및 도 6d에서 나타난 바와 같이 β-카테닌 siRNA로 β-카테닌의 발현을 억제한 실험군에서는 Slit3에 의해 촉진되었던 근섬유의 비대화 및 fusion index가 현저히 억제하는 것을 확인하였으며, 미오게닌의 발현 또한 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 6c 및 도 6d). 이를 통해, Slit3는 M-카데린에 결합되어있던 β-카테닌을 유리(release)하여 근육모세포의 β-카테닌을 활성화하고 미오게닌의 발현을 증가시켜, 근육모세포의 분화를 유도함으로서 근육 형성 촉진에 관여할 수 있음을 확인하였다.

실 시 예 5

[0228] **근육모세포에서 Slit3와 결합하는 Robo 수용체 아형의 확인**

[0229] **<5-1> 근육모세포에서 발현하는 Robo 수용체 아형 확인**

[0230] 근육모세포의 분화 과정에서 Slit3가 β-카테닌 활성 및 미오게닌의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하였고, 이는 Slit3-Robo 수용체의 결합을 통해 유도될 수 있음을 확인하였다. Slit 단백질의 수용체는 Robo 단백질로서, 현재까지 Robo1 내지 Robo4의 네 가지 아형이 존재함이 알려져 있으므로, 근육모세포에서는 Slit3와 연관된 Robo 수용체가 어떠한 아형인지 확인하기 위해, 근육모세포에서 발현되는 Robo 수용체를 확인하였다.

[0231] 구체적으로, 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에 C2C12 세포주, HEK297 세포주(신장 세포주)를 접종하여 37℃에서 5% CO_2가 유지되도록 배양하였다. 배양 24시간 후 각각의 세포를 수득하여, 상기 <실시예 4>와 동일한 과정으로 항-Robo1 항체, 항-Robo2 항체, 항-Robo3 항체 및 항-Robo4 항체를 사용하여 웨스턴블럿을 수행하여, C2C12 세포, HEK293 세포 또는 뇌조직에서 Robo1, Robo2, Robo3 및 Robo4의 단백질 발현 수준을 확인하였다.

[0232] 그 결과 도 7a에서 나타난 바와 같이 C2C12 세포에서 Robo1 및 Robo2 단백질이 유의적인 수준으로 발현되었으나, Robo3 및 Robo4 단백질은 발현되지 않는 것을 확인하였다(도 7a).

[0234] **<5-2> 근육모세포에서 Slit3-Robo1 및 Slit3-Robo2 결합 여부 확인**

[0235] 근육모세포에서 Robo1 및 Robo2 단백질이 발현되는 것을 확인하였으므로, Slit3 단백질의 수용체가 Robo1 및 Robo2일 것으로 판단하였다. 이를 확인하기 위해, Robo1 및 Robo2의 발현이 억제되었을 때 Slit3의 작용이 소실되는지 여부를 확인하였다.

[0236] 구체적으로, 상기 실시예 <4-4>와 동일한 방법을 수행하여 Robo1 또는 Robo2에 대한 siRNA로 각각 형질전환하여 Robo1 또는 Robo2이 넉아웃된 C2C12 세포를 제조하고, 이를 10% FBS을 포함하는 DMEM 배지에 접종하여 100% 포화될 때까지 배양한 후, 배양 배지를 1 ㎍/㎖ Slit3 재조합 단백질 및 2% 말 혈청을 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 배양하였다. 배양 후 세포를 수득하고, 상기 <실시예 3>과 동일한 과정으로 real-time PCR을 수행하여, Robo1 및 Robo2의 발현이 억제되었을 때 Robo1, Robo2 및 미오게닌의 mRNA 발현 수준을 확인하였다.

[0237] 그 결과, 도 7b에서 나타난 바와 같이 Slit3에 의해 발현이 증가되었던 미오게닌은 Robo1 및 Robo2 발현이 억제됨에 따라 발현이 유의적으로 억제되어, Slit3 미처리 대조군과 유사한 수준으로 미오게닌을 발현하는 것을 확인하였다(도 7b).

실 시 예 6

[0239] **생체 내에서 Slit3에 의한 근육 형성 촉진 효과에 있어서 Robo 수용체의 역할 확인**

[0240] 본 발명에서 확인한 결과를 생체 내에서 구체적으로 확인하기 위해, Robo 수용체가 결핍된 마우스 모델에서 근육량 변화를 확인하였다.

[0241] 구체적으로, Mutant Mouse Regional Resource Centers(Stock number 030759-MU; columbia, MO, USA)로부터 Robo1 또는 Robo2 넉아웃 마우스의 배아를 구입하고, 수컷 및 암컷 slit3 +/- C57BL/6J 마우스를 교배하여, Robo1 또는 Robo2 넉아웃 마우스 모델을 각각 제조하였다. 이 중 수컷을 실험군으로 선별하여, 상기 실시예 <1-1>과 같은 방법으로 7주령의 마우스 모델의 체중 및 근육 무게와 근감소에 대한 지표를 확인하였다. Robo2 결핍

군은 7주까지 생존하지 못해 실험군으로서 사용하지 못하고, Robo1 결핍군에 대하여만 실험을 수행한 다음, 정상대조군과 비교하였다.

[0242] 그 결과, 하기 [표 3] 및 도 8에서 나타난 바와 같이 Robo1이 결핍된 마우스 모델에서는 정상 대조군 마우스에 비해 체중이 낮았고, EDL의 중량 및 GC+SOL의 중량도 낮았으며, EDL의 근감소 지표 및 GC+SOL의 근감소 지표도 정상대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 8 및 표 3). 이를 통해, Slit3가 골격근 형성에 관여하는 근육모세포의 수용체는 Robo1 및 Robo2이며, 특히 Robo1이 결핍되는 경우 생체 수준에서 근육량이 감소됨을 나타내므로, Slit3 및, Robo1 또는 Robo2의 결합 시스템을 통해 근감소증의 개선 효과가 나타날 수 있음을 확인하였다.

표 3

[0243] Robo1이 결핍된 수컷 마우스에서 체중 변화 및 근감소 지표의 비교

실험군	체중(g)	근육 중량(g)		근감소 지표(%)	
	체중(g)	EDL	GC+SOL	EDL	GC+SOL
정상 대조군	21.1±0.6	0.048±0.002	0.117±0.001	0.206±0.009	0.541±0.014
Robo1 결핍군	17.6±0.9	0.029±0.003	0.085±0.002	0.162±0.011	0.474±0.024

실 시 예 7

[0245] **Slit3의 LRRD2 도메인에 의한 근육모세포 분화 및 근육량 증진 효과의 확인**

[0246] 인간 Slit3 단백질은 1,523개의 아미노산으로 구성되어 약 170 kDa의 분자량을 가지는 매우 큰 물질이므로, Slit3 단백질 전장을 사용하는 약제는 실용성이 높지 않을 것으로 판단하여, Slit3 전장 중에서 근육모세포 분화 및 근육량 증진 효과를 나타낼 것으로 판단되는 도메인 단편만을 선별하고자 하였다. Slit3 단백질은 류신이 풍부한 도메인(Leucine-rich domain)을 4 개 포함하고, 이 중 130 개의 아미노산으로 구성된 Leucine rich domain 2(LRRD2)가 수용체와 결합하는 부분이며, 이를 통해 다양한 세포작용을 할 수 있을 것으로 판단되어, 본 발명의 근육모세포 분화 촉진 및 근육량 증진 효과에 있어서도 LRRD2가 Slit3 전장의 효과를 나타낼 수 있는지 여부를 확인하였다.

[0248] **<7-1> 시험관 내 수준에서 Slit3의 LRRD2에 의한 근육모세포 분화 효과의 확인**

[0249] 구체적으로, C2C12 세포를 10% FBS을 포함하는 DMEM 배지에 접종하여 100% 포화될 때까지 배양한 후, 배양 배지를 10 nM 재조합 LRRD2(특허문헌 1) 및 2% 말 혈청을 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 배양하였다. 배양 후 세포를 수득하여 1차 항체로 항-MyHC 항체를 사용하여 상기 실시예 <2-2>의 방법으로 면역형광염색(ICC staining)하였다. 그런 다음, DAPI를 처리하여 세포의 핵을 염색하고, 이를 형광 현미경으로 관찰하여 형광값으로 세포의 수를 정량하였다. Fusion index(%)는 전체 MyHC 발현 세포의 핵 수에 대한 MyHC 발현 근육 근섬유의 핵 수를 백분율로 나타내었다.

[0250] 그 결과, 도 9a에서 나타난 바와 같이 재조합 LRRD2 단백질을 처치한 실험군에서 미처리 대조군에 비해 근육 근섬유의 면적 및 fusion index 수준이 현저하게 증가하였으며, 이는 Slit3 단백질 전장을 처치하는 경우와 유사한 수준을 나타내는 것을 확인하였다(도 9a).

[0252] **<7-2> 생체 내 수준에서 Slit3의 LRRD2에 의한 체중 및 근감소 지표 증가 효과의 확인**

[0253] 구체적으로, 8 주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 개복하고 난소를 절제하여 성호르몬이 결핍되도록 유도된 근감소증 마우스 모델을 만들고, 9 주령부터 4 주 동안 재조합 LRRD2 도메인을 2 ㎍ 또는 10 ㎍ 투여량을 1일 1회, 1주일 5회의 투여횟수로 근감소증 마우스 모델에 정맥 주사하였다. 4 주 후, 상기 실시예 <1-1>과 같은 방법으로 13주령의 마우스 모델의 체중 및 근육 무게와 근감소에 대한 지표를 확인하였다.

[0254] 그 결과, 하기 [표 4] 및 도 9b에서 나타난 바와 같이 LRRD2를 투여한 마우스 모델의 체중은 LRRD2 미투여 대조군에 비해 유의적인 변화를 나타내지 않았으나, 근육량 및 근감소 지표와 관련하여, LRRD2를 투여한 마우스 모

델에서 LRRD2 미투여 대조군에 비해 EDL의 중량 및 GC+SOL의 중량이 유의적으로 증가하였으며, EDL의 근감소 지표 및 GC+SOL의 근감소 지표도 LRRD2 미투여 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 9b 및 표 4).

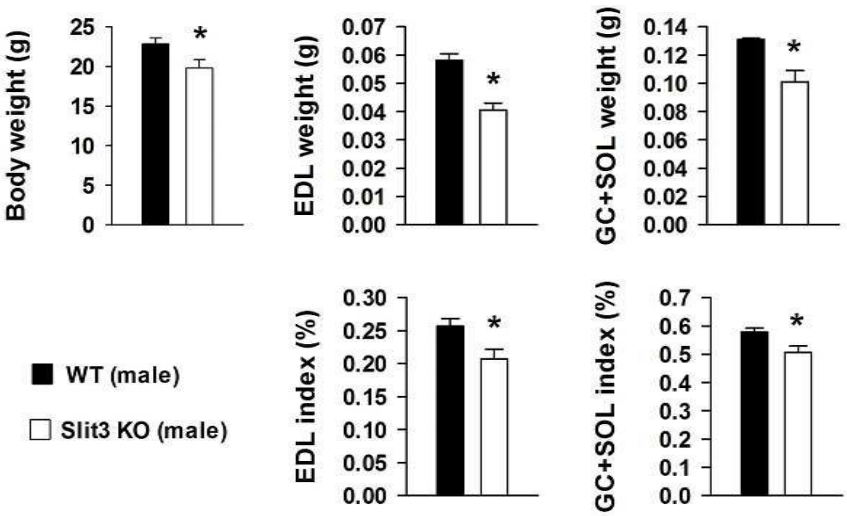
표 4

[0256] 난소 절제 암컷 마우스에서 LRRD2에 의한 근감소 지표의 비교

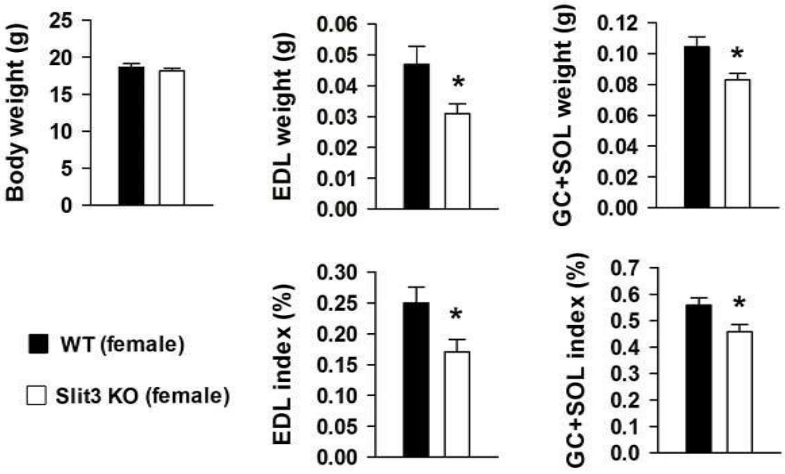
실험군		근육 중량(g)		근감소 지표(%)	
		EDL	GC+SOL	EDL	GC+SOL
정상 대조군		0.040±0.001	0.109±0.003	0.196±0.006	0.540±0.017
LRRD2 처치군	2 ㎍	0.041±0.005	0.121±0.001	0.200±0.010	0.596±0.011
	10 ㎍	0.047±0.002	0.119±0.002	0.235±0.013	0.594±0.015

도면

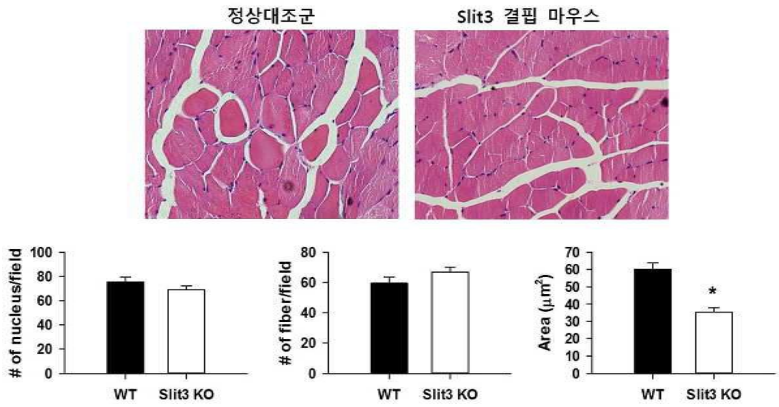
도면1a



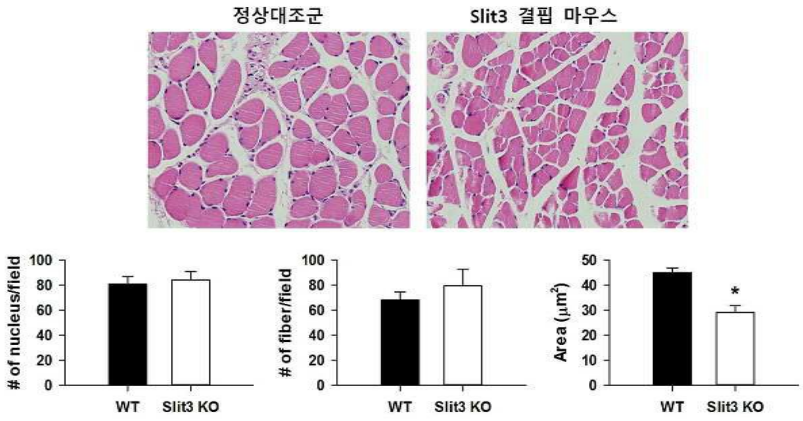
도면1b



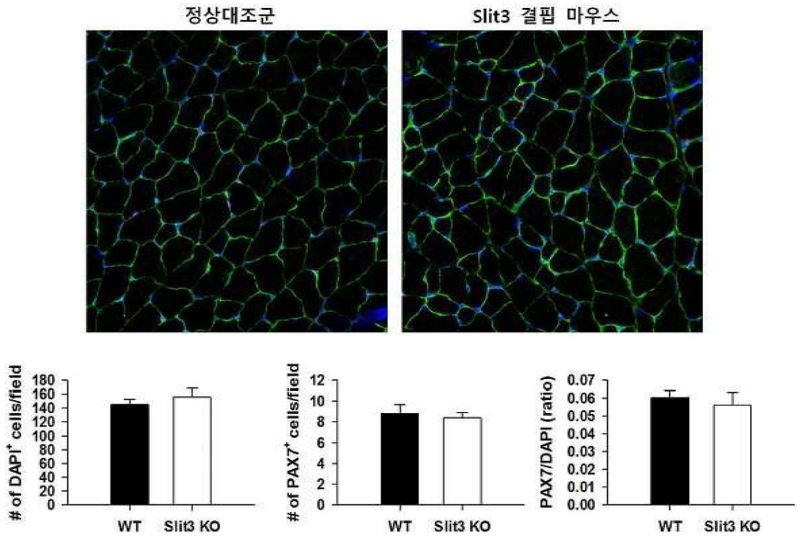
도면2a



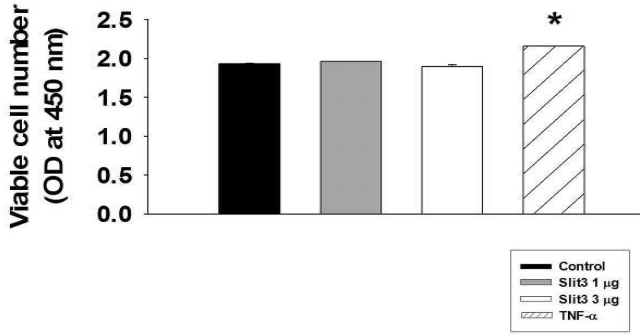
도면2b



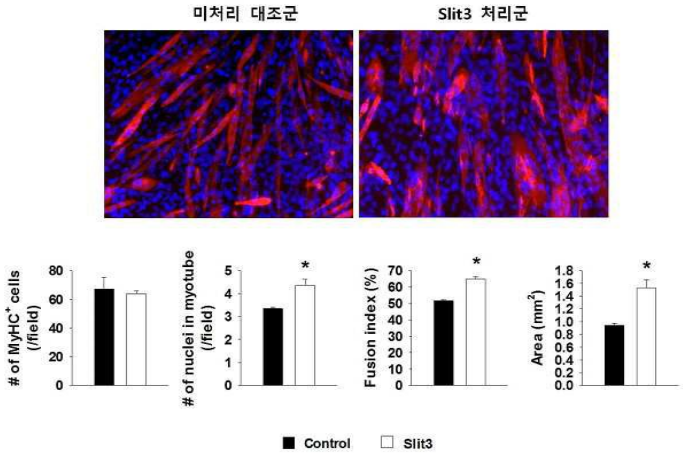
도면2c



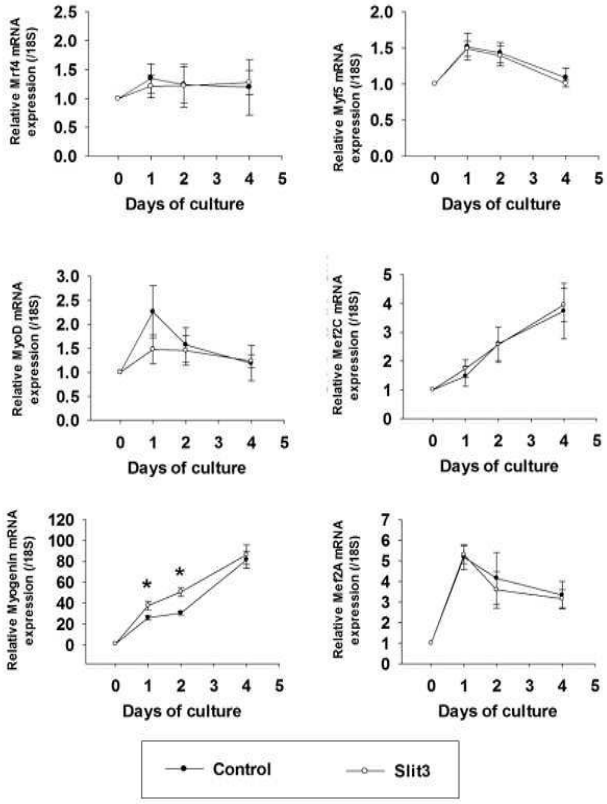
도면3a


Viable cell number (OD at 450 nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Control
Slit3 1 μg
Slit3 3 μg
TNF-α

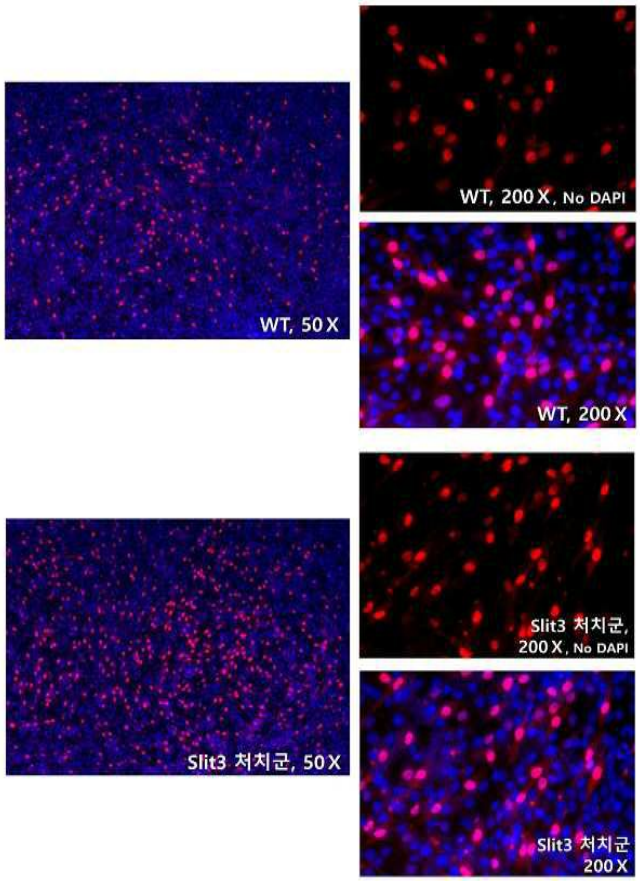
도면3b


미처리 대조군
Slit3 처리군
# of MyHC+ cells (/field)
# of nuclei in myotube (/field)
Fusion index (%)
Area (mm2)
Control
Slit3

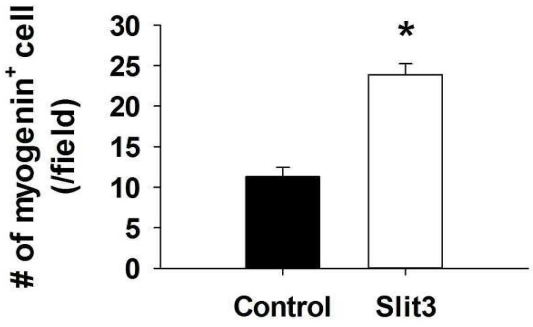
도면4a


Relative Mrf4 mRNA expression (/18S)
Relative Myf5 mRNA expression (/18S)
Relative MyoD mRNA expression (/18S)
Relative Mef2C mRNA expression (/18S)
Relative Myogenin mRNA expression (/18S)
Relative Mef2A mRNA expression (/18S)
Days of culture
*
Control
Slit3

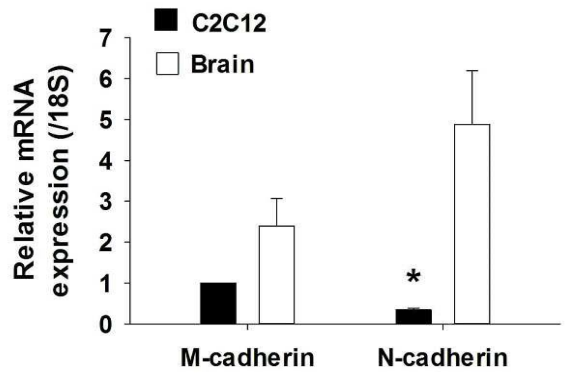
도면4b


WT, 50X
WT, 200X, No DAPI
WT, 200X
Slit3 처치군, 50X
Slit3 처치군, 200X, No DAPI
Slit3 처치군 200X

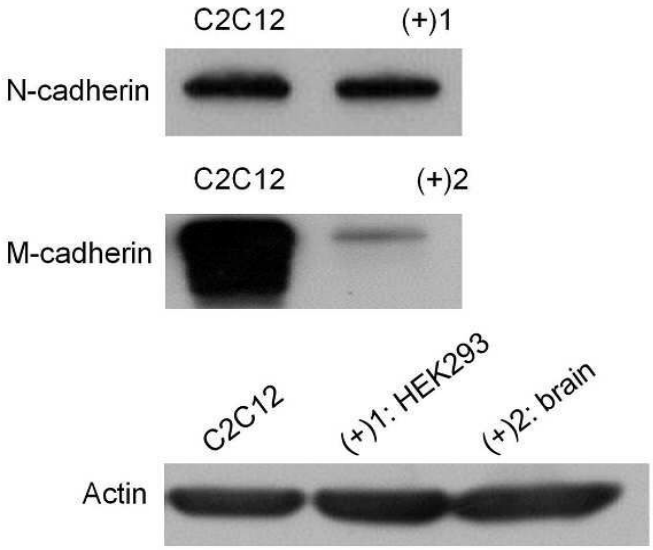
도면4c


# of myogenin+ cell (/field)
30
25
20
15
10
5
0
*
Control
Slit3

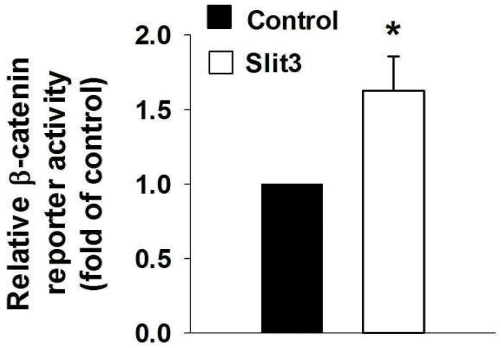
도면5a



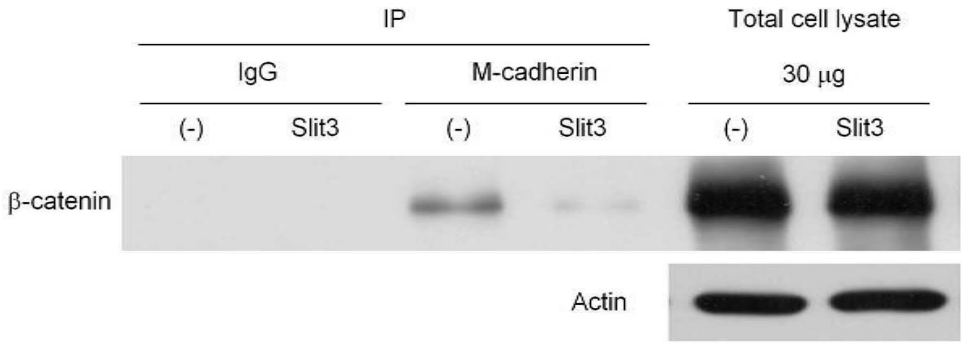
도면5b



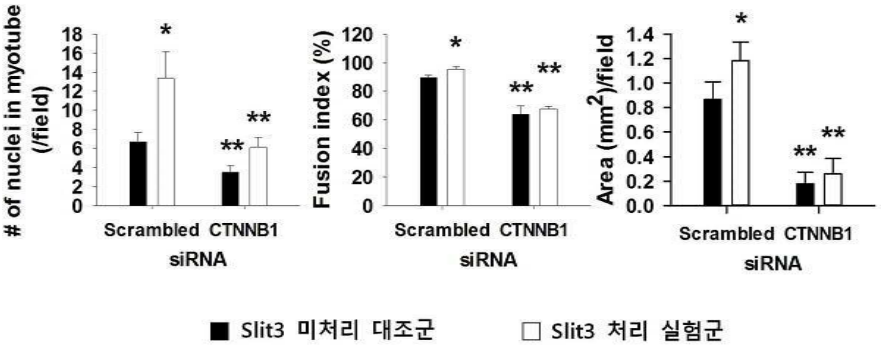
도면6a



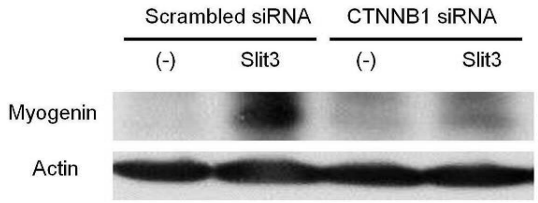
도면6b



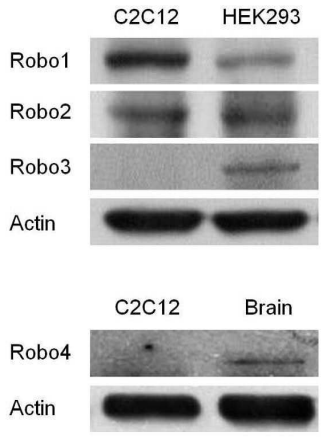
도면6c



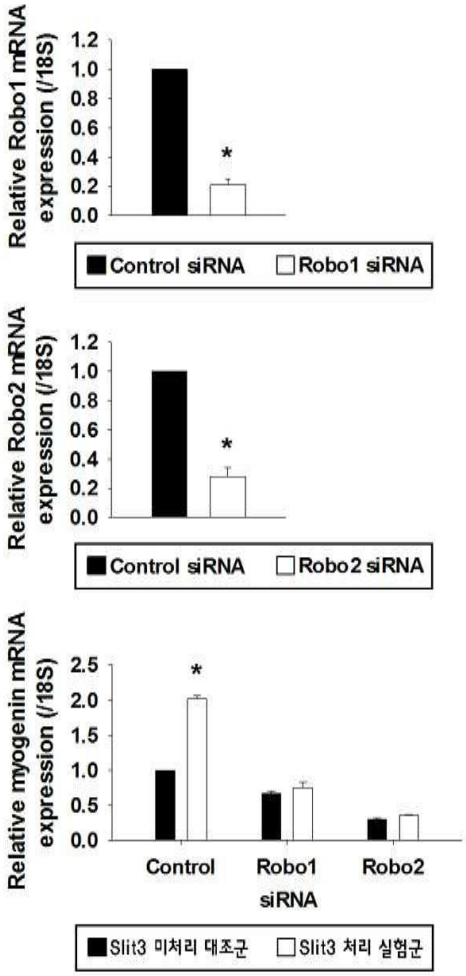
도면6d



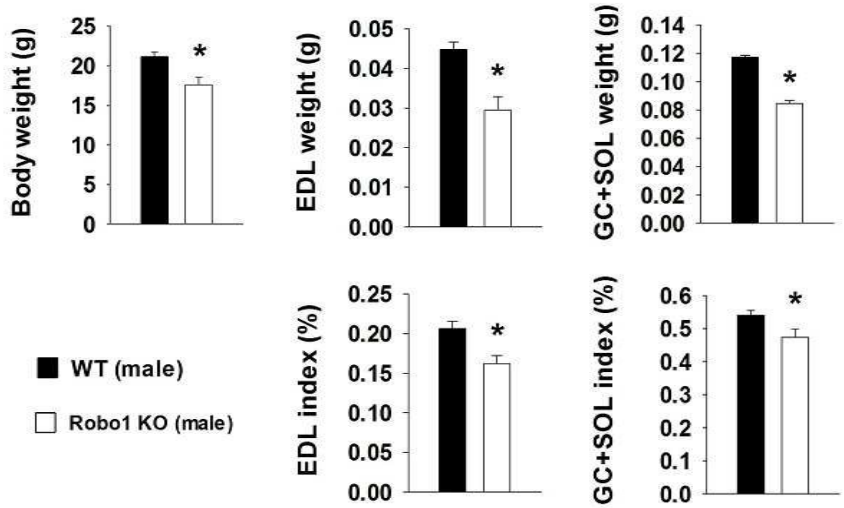
도면7a



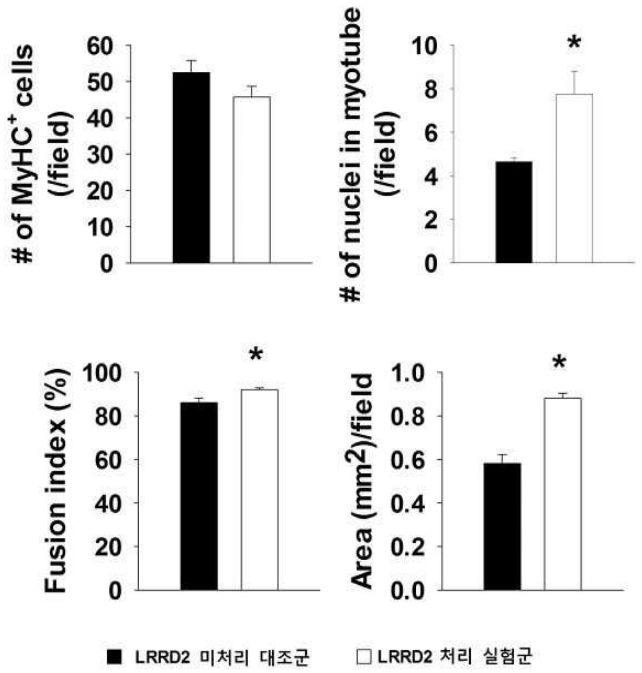
도면7b


Relative Robo1 mRNA expression (/18S)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
Control siRNA
Robo1 siRNA
Relative Robo2 mRNA expression (/18S)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
Control siRNA
Robo2 siRNA
Relative myogenin mRNA expression (/18S)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Control
Robo1 siRNA
Robo2
Slit3 미처리 대조군
Slit3 처리 실험군

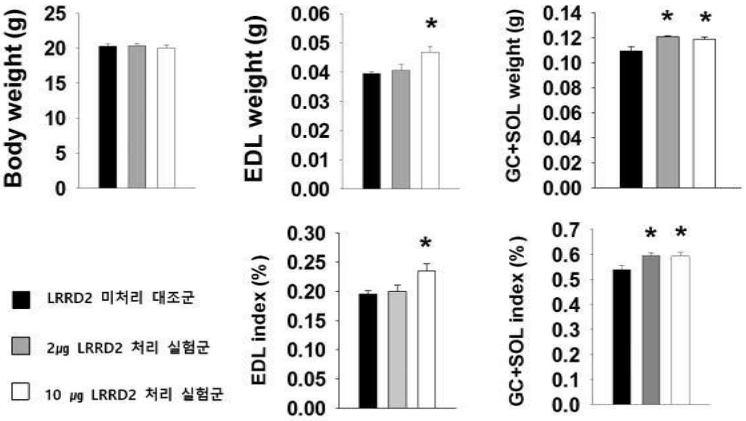
도면8


Body weight (g)
25
20
15
10
5
0
*
EDL weight (g)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
*
GC+SOL weight (g)
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
WT (male)
Robo1 KO (male)
EDL index (%)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
GC+SOL index (%)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*

도면9a



도면9b



서 열 목 록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Composition for treating or preventing sarcopenia using SLIT-ROBO system

<130> 1062032

<150> KR 10-2016-0071252

<151> 2016-06-08

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1523

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Slit3 amino acid(AAQ89243)

<400> 1

Met Ala Pro Gly Trp Ala Gly Val Gly Ala Ala Val Arg Ala Arg Leu
1 5 10 15

Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Ser Val Leu Ser Gly Pro Pro Ala Val
20 25 30

Ala Cys Pro Thr Lys Cys Thr Cys Ser Ala Ala Ser Val Asp Cys His
35 40 45

Gly Leu Gly Leu Arg Ala Val Pro Arg Gly Ile Pro Arg Asn Ala Glu
50 55 60

Arg Leu Asp Leu Asp Arg Asn Asn Ile Thr Arg Ile Thr Lys Met Asp
65 70 75 80

Phe Ala Gly Leu Lys Asn Leu Arg Val Leu His Leu Glu Asp Asn Gln

85 90 95

Val Ser Val Ile Glu Arg Gly Ala Phe Gln Asp Leu Lys Gln Leu Glu
100 105 110

Arg Leu Arg Leu Asn Lys Asn Lys Leu Gln Val Leu Pro Glu Leu Leu
115 120 125

Phe Gln Ser Thr Pro Lys Leu Thr Arg Leu Asp Leu Ser Glu Asn Gln
130 135 140

Ile Gln Gly Ile Pro Arg Lys Ala Phe Arg Gly Ile Thr Asp Val Lys
145 150 155 160

Asn Leu Gln Leu Asp Asn Asn His Ile Ser Cys Ile Glu Asp Gly Ala
165 170 175

Phe Arg Ala Leu Arg Asp Leu Glu Ile Leu Thr Leu Asn Asn Asn Asn
180 185 190

Ile Ser Arg Ile Leu Val Thr Ser Phe Asn His Met Pro Lys Ile Arg
195 200 205
Thr Leu Arg Leu His Ser Asn His Leu Tyr Cys Asp Cys His Leu Ala
210 215 220
Trp Leu Ser Asp Trp Leu Arg Gln Arg Arg Thr Val Gly Gln Phe Thr

225 230 235 240
Leu Cys Met Ala Pro Val His Leu Arg Gly Phe Asn Val Ala Asp Val
245 250 255
Gln Lys Lys Glu Tyr Val Cys Pro Ala Pro His Ser Glu Pro Pro Ser
260 265 270
Cys Asn Ala Asn Ser Ile Ser Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn
275 280 285
Asn Ile Val Asp Cys Arg Gly Lys Gly Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn
290 295 300

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

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

435 440 445

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

515 520 525
His Leu Pro Glu Tyr Val Thr Asp Leu Arg Leu Asn Asp Asn Glu Val
530 535 540
Ser Val Leu Glu Ala Thr Gly Ile Phe Lys Lys Leu Pro Asn Leu Arg
545 550 555 560
Lys Ile Asn Leu Ser Asn Asn Lys Ile Lys Glu Val Arg Glu Gly Ala
565 570 575
Phe Asp Gly Ala Ala Ser Val Gln Glu Leu Met Leu Thr Gly Asn Gln
580 585 590

Leu Glu Thr Val His Gly Arg Val Phe Arg Gly Leu Ser Gly Leu Lys
595 600 605
Thr Leu Met Leu Arg Ser Asn Leu Ile Ser Cys Val Ser Asn Asp Thr
610 615 620
Phe Ala Gly Leu Ser Ser Val Arg Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Arg
625 630 635 640
Ile Thr Thr Ile Thr Pro Gly Ala Phe Thr Thr Leu Val Ser Leu Ser
645 650 655
Thr Ile Asn Leu Leu Ser Asn Pro Phe Asn Cys Asn Cys His Leu Ala

660 665 670
Trp Leu Gly Lys Trp Leu Arg Lys Arg Arg Ile Val Ser Gly Asn Pro
675 680 685

Arg Cys Gln Lys Pro Phe Phe Leu Lys Glu Ile Pro Ile Gln Asp Val
690 695 700
Ala Ile Gln Asp Phe Thr Cys Asp Gly Asn Glu Glu Ser Ser Cys Gln
705 710 715 720
Leu Ser Pro Arg Cys Pro Glu Gln Cys Thr Cys Met Glu Thr Val Val
725 730 735

Arg Cys Ser Asn Lys Gly Leu Arg Ala Leu Pro Arg Gly Met Pro Lys
740 745 750
Asp Val Thr Glu Leu Tyr Leu Glu Gly Asn His Leu Thr Ala Val Pro
755 760 765
Arg Glu Leu Ser Ala Leu Arg His Leu Thr Leu Ile Asp Leu Ser Asn
770 775 780
Asn Ser Ile Ser Met Leu Thr Asn Tyr Thr Phe Ser Asn Met Ser His
785 790 795 800
Leu Ser Thr Leu Ile Leu Ser Tyr Asn Arg Leu Arg Cys Ile Pro Val
805 810 815
His Ala Phe Asn Gly Leu Arg Ser Leu Arg Val Leu Thr Leu His Gly
820 825 830
Asn Asp Ile Ser Ser Val Pro Glu Gly Ser Phe Asn Asp Leu Thr Ser
835 840 845
Leu Ser His Leu Ala Leu Gly Thr Asn Pro Leu His Cys Asp Cys Ser
850 855 860
Leu Arg Trp Leu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Tyr Lys Glu Pro Gly
865 870 875 880

Ile Ala Arg Cys Ser Ser Pro Glu Pro Met Ala Asp Arg Leu Leu Leu
885 890 895
Thr Thr Pro Thr His Arg Phe Gln Cys Lys Gly Pro Val Asp Ile Asn
900 905 910
Ile Val Ala Lys Cys Asn Ala Cys Leu Ser Ser Pro Cys Lys Asn Asn
915 920 925
Gly Thr Cys Thr Gln Asp Pro Val Glu Leu Tyr Arg Cys Ala Cys Pro
930 935 940

Tyr Ser Tyr Lys Gly Lys Asp Cys Thr Val Pro Ile Asn Thr Cys Ile

945 950 955 960

Gln Asn Pro Cys Gln His Gly Gly Thr Cys His Leu Ser Asp Ser His

965 970 975

Lys Asp Gly Phe Ser Cys Ser Cys Pro Leu Gly Phe Glu Gly Gln Arg

980 985 990

Cys Glu Ile Asn Pro Asp Asp Cys Glu Asp Asn Asp Cys Glu Asn Asn

995 1000 1005

Ala Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Asn Tyr Val Cys Ile Cys Pro Pro

1010 1015 1020

Asn Tyr Thr Gly Glu Leu Cys Asp Glu Val Ile Asp His Cys Val Pro

1025 1030 1035 1040

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

1045 1050 1055

Gly Phe Ser Cys Glu Cys Val Pro Gly Tyr Ser Gly Lys Leu Cys Glu

1060 1065 1070

Thr Asp Asn Asp Asp Cys Val Ala His Lys Cys Arg His Gly Ala Gln

1075 1080 1085

Cys Val Asp Thr Ile Asn Gly Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Gln Gly Phe

1090 1095 1100

Ser Gly Pro Phe Cys Glu His Pro Pro Pro Met Val Leu Leu Gln Thr

1105 1110 1115 1120

Ser Pro Cys Asp Gln Tyr Glu Cys Gln Asn Gly Ala Gln Cys Ile Val

1125 1130 1135

Val Gln Gln Glu Pro Thr Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe Ala Gly Pro

1140 1145 1150

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

1155 1160 1165

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

1170 1175 1180

Gln Val Ala Thr Asp Lys Asp Asn Gly Ile Leu Leu Tyr Lys Gly Asp

1185 1190 1195 1200

Asn Asp Pro Leu Ala Leu Glu Leu Tyr Gln Gly His Val Arg Leu Val

1205 1210 1215

Tyr Asp Ser Leu Ser Ser Pro Pro Thr Thr Val Tyr Ser Val Glu Thr

1220 1225 1230

Val Asn Asp Gly Gln Phe His Ser Val Glu Leu Val Thr Leu Asn Gln

1235 1240 1245

Thr Leu Asn Leu Val Val Asp Lys Gly Thr Pro Lys Ser Leu Gly Lys

1250 1255 1260

Leu Gln Lys Gln Pro Ala Val Gly Ile Asn Ser Pro Leu Tyr Leu Gly

1265 1270 1275 1280

Gly Ile Pro Thr Ser Thr Gly Leu Ser Ala Leu Arg Gln Gly Thr Asp

1285 1290 1295

Arg Pro Leu Gly Gly Phe His Gly Cys Ile His Glu Val Arg Ile Asn

1300 1305 1310

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

1315 1320 1325

Ser Pro Gly Cys Lys Ser Cys Thr Val Cys Lys His Gly Leu Cys Arg

1330 1335 1340

Ser Val Glu Lys Asp Ser Val Val Cys Glu Cys Arg Pro Gly Trp Thr

1345 1350 1355 1360

Gly Pro Leu Cys Asp Gln Glu Ala Arg Asp Pro Cys Leu Gly His Arg

1365 1370 1375

Cys His His Gly Lys Cys Val Ala Thr Gly Thr Ser Tyr Met Cys Lys

1380 1385 1390

Cys Ala Glu Gly Tyr Gly Gly Asp Leu Cys Asp Asn Lys Asn Asp Ser

1395 1400 1405

Ala Asn Ala Cys Ser Ala Phe Lys Cys His His Gly Gln Cys His Ile

1410 1415 1420

Ser Asp Gln Gly Glu Pro Tyr Cys Leu Cys Gln Pro Gly Phe Ser Gly

1425 1430 1435 1440

Glu His Cys Gln Gln Glu Asn Pro Cys Leu Gly Gln Val Val Arg Glu

1445 1450 1455

Val Ile Arg Arg Gln Lys Gly Tyr Ala Ser Cys Ala Thr Ala Ser Lys
1460 1465 1470
Val Pro Ile Met Glu Cys Arg Gly Gly Cys Gly Pro Gln Cys Cys Gln
1475 1480 1485
Pro Thr Arg Ser Lys Arg Arg Lys Tyr Val Phe Gln Cys Thr Asp Gly
1490 1495 1500
Ser Ser Phe Val Glu Glu Val Glu Arg His Leu Glu Cys Gly Cys Leu
1505 1510 1515 1520
Ala Cys Ser

<210> 2
<211> 1651
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Robo1 amino acid (AAC39575)
<400> 2
Met Lys Trp Lys His Val Pro Phe Leu Val Met Ile Ser Leu Leu Ser
1 5 10 15
Leu Ser Pro Asn His Leu Phe Leu Ala Gln Leu Ile Pro Asp Pro Glu
20 25 30
Asp Val Glu Arg Gly Asn Asp His Gly Thr Pro Ile Pro Thr Ser Asp
35 40 45
Asn Asp Asp Asn Ser Leu Gly Tyr Thr Gly Ser Arg Leu Arg Gln Glu

50 55 60
Asp Phe Pro Pro Arg Ile Val Glu His Pro Ser Asp Leu Ile Val Ser
65 70 75 80
Lys Gly Glu Pro Ala Thr Leu Asn Cys Lys Ala Glu Gly Arg Pro Thr
85 90 95
Pro Thr Ile Glu Trp Tyr Lys Gly Gly Glu Arg Val Glu Thr Asp Lys
100 105 110
Asp Asp Pro Arg Ser His Arg Met Leu Leu Pro Ser Gly Ser Leu Phe

115 120 125

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

195 200 205
Ser Pro Leu Asp Asp Lys Asp Glu Arg Ile Thr Ile Arg Gly Gly Lys
210 215 220
Leu Met Ile Thr Tyr Thr Arg Lys Ser Asp Ala Gly Lys Tyr Val Cys
225 230 235 240
Val Gly Thr Asn Met Val Gly Glu Arg Glu Ser Glu Val Ala Glu Leu
245 250 255
Thr Val Leu Glu Arg Pro Ser Phe Val Lys Arg Pro Ser Asn Leu Ala
260 265 270

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

340 345 350
Phe Val Val Lys Pro Arg Asp Gln Val Val Ala Leu Gly Arg Thr Val
355 360 365

Thr Phe Gln Cys Glu Ala Thr Gly Asn Pro Gln Pro Ala Ile Phe Trp
370 375 380
Arg Arg Glu Gly Ser Gln Asn Leu Leu Phe Ser Tyr Gln Pro Pro Gln
385 390 395 400
Ser Ser Ser Arg Phe Ser Val Ser Gln Thr Gly Asp Leu Thr Ile Thr
405 410 415

Asn Val Gln Arg Ser Asp Val Gly Tyr Tyr Ile Cys Gln Thr Leu Asn
420 425 430
Val Ala Gly Ser Ile Ile Thr Lys Ala Tyr Leu Glu Val Thr Asp Val
435 440 445
Ile Ala Asp Arg Pro Pro Pro Val Ile Arg Gln Gly Pro Val Asn Gln
450 455 460
Thr Val Ala Val Asp Gly Thr Phe Val Leu Ser Cys Val Ala Thr Gly
465 470 475 480
Ser Pro Val Pro Thr Ile Leu Trp Arg Lys Asp Gly Val Leu Val Ser
485 490 495
Thr Gln Asp Ser Arg Ile Lys Gln Leu Glu Asn Gly Val Leu Gln Ile
500 505 510
Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Thr Gly Arg Tyr Thr Cys Ile Ala Ser
515 520 525
Thr Pro Ser Gly Glu Ala Thr Trp Ser Ala Tyr Ile Glu Val Gln Glu
530 535 540
Phe Gly Val Pro Val Gln Pro Pro Arg Pro Thr Asp Pro Asn Leu Ile
545 550 555 560

Pro Ser Ala Pro Ser Lys Pro Glu Val Thr Asp Val Ser Arg Asn Thr
565 570 575
Val Thr Leu Ser Trp Gln Pro Asn Leu Asn Ser Gly Ala Thr Pro Thr
580 585 590
Ser Tyr Ile Ile Glu Ala Phe Ser His Ala Ser Gly Ser Ser Trp Gln
595 600 605
Thr Val Ala Glu Asn Val Lys Thr Glu Thr Ser Ala Ile Lys Gly Leu
610 615 620

Lys Pro Asn Ala Ile Tyr Leu Phe Leu Val Arg Ala Ala Asn Ala Tyr

625 630 635 640

Gly Ile Ser Asp Pro Ser Gln Ile Ser Asp Pro Val Lys Thr Gln Asp

645 650 655

Val Leu Pro Thr Ser Gln Gly Val Asp His Lys Gln Val Gln Arg Glu

660 665 670

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

675 680 685

Ser Ser Ile Glu Val His Trp Thr Val Asp Gln Gln Ser Gln Tyr Ile

690 695 700

Gln Gly Tyr Lys Ile Leu Tyr Arg Pro Ser Gly Ala Asn His Gly Glu

705 710 715 720

Ser Asp Trp Leu Val Phe Glu Val Arg Thr Pro Ala Lys Asn Ser Val

725 730 735

Val Ile Pro Asp Leu Arg Lys Gly Val Asn Tyr Glu Ile Lys Ala Arg

740 745 750

Pro Phe Phe Asn Glu Phe Gln Gly Ala Asp Ser Glu Ile Lys Phe Ala

755 760 765

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

770 775 780

Ser Lys Asn Asp Gly Asn Gly Thr Ala Ile Leu Val Ser Trp Gln Pro

785 790 795 800

Pro Pro Glu Asp Thr Gln Asn Gly Met Val Gln Glu Tyr Lys Val Trp

805 810 815

Cys Leu Gly Asn Glu Thr Arg Tyr His Ile Asn Lys Thr Val Asp Gly

820 825 830

Ser Thr Phe Ser Val Val Ile Pro Phe Leu Val Pro Gly Ile Arg Tyr

835 840 845

Ser Val Glu Val Ala Ala Ser Thr Gly Ala Gly Ser Gly Val Lys Ser

850 855 860

Glu Pro Gln Phe Ile Gln Leu Asp Ala His Gly Asn Pro Val Ser Pro

865 870 875 880

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

885 890 895

Pro Ala Phe Ile Ala Gly Ile Gly Ala Ala Cys Trp Ile Ile Leu Met

900 905 910

Val Phe Ser Ile Trp Leu Tyr Arg His Arg Lys Lys Arg Asn Gly Leu

915 920 925

Thr Ser Thr Tyr Ala Gly Ile Arg Lys Val Pro Ser Phe Thr Phe Thr

930 935 940

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

945 950 955 960

Arg Pro Gly Leu Leu Asn Ile Ser Glu Pro Ala Ala Gln Pro Trp Leu

965 970 975

Ala Asp Thr Trp Pro Asn Thr Gly Asn Asn His Asn Asp Cys Ser Ile

980 985 990

Ser Cys Cys Thr Ala Gly Asn Gly Asn Ser Asp Ser Asn Leu Thr Thr

995 1000 1005

Tyr Ser Arg Pro Ala Asp Cys Ile Ala Asn Tyr Asn Asn Gln Leu Asp

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035 1040

Val Asp Leu Ser Asn Lys Ile Asn Glu Met Lys Thr Phe Asn Ser Pro

1045 1050 1055

Asn Leu Lys Asp Gly Arg Phe Val Asn Pro Ser Gly Gln Pro Thr Pro

1060 1065 1070

Tyr Ala Thr Thr Gln Leu Ile Gln Ser Asn Leu Ser Asn Asn Met Asn

1075 1080 1085

Asn Gly Ser Gly Asp Ser Gly Glu Lys His Trp Lys Pro Leu Gly Gln

1090 1095 1100

Gln Lys Gln Glu Val Ala Pro Val Gln Tyr Asn Ile Val Glu Gln Asn

1105 1110 1115 1120

Lys Leu Asn Lys Asp Tyr Arg Ala Asn Asp Thr Val Pro Pro Thr Ile

1125 1130 1135

Pro Tyr Asn Gln Ser Tyr Asp Gln Asn Thr Gly Gly Ser Tyr Asn Ser

1140 1145 1150

Ser Asp Arg Gly Ser Ser Thr Ser Gly Ser Gln Gly His Lys Lys Gly

1155 1160 1165

Ala Arg Thr Pro Lys Val Pro Lys Gln Gly Gly Met Asn Trp Ala Asp

1170 1175 1180

Leu Leu Pro Pro Pro Pro Ala His Pro Pro Pro His Ser Asn Ser Glu

1185 1190 1195 1200

Glu Tyr Asn Ile Ser Val Asp Glu Ser Tyr Asp Gln Glu Met Pro Cys

1205 1210 1215

Pro Val Pro Pro Ala Arg Met Tyr Leu Gln Gln Asp Glu Leu Glu Glu

1220 1225 1230

Glu Glu Asp Glu Arg Gly Pro Thr Pro Pro Val Arg Gly Ala Ala Ser

1235 1240 1245

Ser Pro Ala Ala Val Ser Tyr Ser His Gln Ser Thr Ala Thr Leu Thr

1250 1255 1260

Pro Ser Pro Gln Glu Glu Leu Gln Pro Met Leu Gln Asp Cys Pro Glu

1265 1270 1275 1280

Glu Thr Gly His Met Gln His Gln Pro Asp Arg Arg Arg Gln Pro Val

1285 1290 1295

Ser Pro Pro Pro Pro Pro Arg Pro Ile Ser Pro Pro His Thr Tyr Gly

1300 1305 1310

Tyr Ile Ser Gly Pro Leu Val Ser Asp Met Asp Thr Asp Ala Pro Glu

1315 1320 1325

Glu Glu Glu Asp Glu Ala Asp Met Glu Val Ala Lys Met Gln Thr Arg

1330 1335 1340

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

1345 1350 1355 1360

Asp Leu Glu Ser Ser Val Thr Gly Ser Met Ile Asn Gly Trp Gly Ser

1365 1370 1375

Ala Ser Glu Glu Asp Asn Ile Ser Ser Gly Arg Ser Ser Val Ser Ser
1380 1385 1390
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Thr Asp Ala Asp Phe Ala Gln Ala Val Ala
1395 1400 1405
Ala Ala Ala Glu Tyr Ala Gly Leu Lys Val Ala Arg Arg Gln Met Gln
1410 1415 1420

Asp Ala Ala Gly Arg Arg His Phe His Ala Ser Gln Cys Pro Arg Pro
1425 1430 1435 1440
Thr Ser Pro Val Ser Thr Asp Ser Asn Met Ser Ala Ala Val Met Gln
1445 1450 1455
Lys Thr Arg Pro Ala Lys Lys Leu Lys His Gln Pro Gly His Leu Arg
1460 1465 1470
Arg Glu Thr Tyr Thr Asp Asp Leu Pro Pro Pro Pro Val Pro Pro Pro
1475 1480 1485
Ala Ile Lys Ser Pro Thr Ala Gln Ser Lys Thr Gln Leu Glu Val Arg

1490 1495 1500
Pro Val Val Val Pro Lys Leu Pro Ser Met Asp Ala Arg Thr Asp Arg
1505 1510 1515 1520
Ser Ser Asp Arg Lys Gly Ser Ser Tyr Lys Gly Arg Glu Val Leu Asp
1525 1530 1535
Gly Arg Gln Val Val Asp Met Arg Thr Asn Pro Gly Asp Pro Arg Glu
1540 1545 1550
Ala Gln Glu Gln Gln Asn Asp Gly Lys Gly Arg Gly Asn Lys Ala Ala
1555 1560 1565

Lys Arg Asp Leu Pro Pro Ala Lys Thr His Leu Ile Gln Glu Asp Ile
1570 1575 1580
Leu Pro Tyr Cys Arg Pro Thr Phe Pro Thr Ser Asn Asn Pro Arg Asp
1585 1590 1595 1600
Pro Ser Ser Ser Ser Ser Met Ser Ser Arg Gly Ser Gly Ser Arg Gln
1605 1610 1615
Arg Glu Gln Ala Asn Val Gly Arg Arg Asn Ile Ala Glu Met Gln Val
1620 1625 1630

Leu Gly Gly Tyr Glu Arg Gly Glu Asp Asn Asn Glu Glu Leu Glu Glu

1635 1640 1645

Thr Glu Ser

1650

<210> 3

<211> 1394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Robo2 amino acid (NP_001122401.1)

<400> 3

Met Ala Arg Arg His Glu Arg Val Thr Arg Arg Met Trp Thr Trp Ala

1 5 10 15

Pro Gly Leu Leu Met Met Thr Val Val Phe Trp Gly His Gln Gly Asn

20 25 30

Gly Gln Gly Gln Gly Ser Arg Leu Arg Gln Glu Asp Phe Pro Pro Arg

35 40 45

Ile Val Glu His Pro Ser Asp Val Ile Val Ser Lys Gly Glu Pro Thr

50 55 60

Thr Leu Asn Cys Lys Ala Glu Gly Arg Pro Thr Pro Thr Ile Glu Trp

65 70 75 80

Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Val Glu Thr Asp Lys Asp Asp Pro Arg Ser

85 90 95

His Arg Met Leu Leu Pro Ser Gly Ser Leu Phe Phe Leu Arg Ile Val

100 105 110

His Gly Arg Arg Ser Lys Pro Asp Glu Gly Ser Tyr Val Cys Val Ala

115 120 125

Arg Asn Tyr Leu Gly Glu Ala Val Ser Arg Asn Ala Ser Leu Glu Val

130 135 140

Ala Leu Leu Arg Asp Asp Phe Arg Gln Asn Pro Thr Asp Val Val Val

145 150 155 160

Ala Ala Gly Glu Pro Ala Ile Leu Glu Cys Gln Pro Pro Arg Gly His

165 170 175

Pro Glu Pro Thr Ile Tyr Trp Lys Lys Asp Lys Val Arg Ile Asp Asp

180 185 190

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

195 200 205

Thr Arg Lys Ser Asp Ala Gly Met Tyr Thr Cys Val Gly Thr Asn Met

210 215 220

Val Gly Glu Arg Asp Ser Asp Pro Ala Glu Leu Thr Val Phe Glu Arg

225 230 235 240

Pro Thr Phe Leu Arg Arg Pro Ile Asn Gln Val Val Leu Glu Glu Glu

245 250 255

Ala Val Glu Phe Arg Cys Gln Val Gln Gly Asp Pro Gln Pro Thr Val

260 265 270

Arg Trp Lys Lys Asp Asp Ala Asp Leu Pro Arg Gly Arg Tyr Asp Ile

275 280 285

Lys Asp Asp Tyr Thr Leu Arg Ile Lys Lys Thr Met Ser Thr Asp Glu

290 295 300

Gly Thr Tyr Met Cys Ile Ala Glu Asn Arg Val Gly Lys Met Glu Ala

305 310 315 320

Ser Ala Thr Leu Thr Val Arg Ala Pro Pro Gln Phe Val Val Arg Pro

325 330 335

Arg Asp Gln Ile Val Ala Gln Gly Arg Thr Val Thr Phe Pro Cys Glu

340 345 350

Thr Lys Gly Asn Pro Gln Pro Ala Val Phe Trp Gln Lys Glu Gly Ser

355 360 365

Gln Asn Leu Leu Phe Pro Asn Gln Pro Gln Gln Pro Asn Ser Arg Cys

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Pro Pro Ile Ile Leu Gln Gly Pro Ala Asn Gln Thr Leu Ala Val Asp

435 440 445

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

450 455 460

Ile Ser Trp Leu Lys Glu Gly Phe Thr Phe Pro Gly Arg Asp Pro Arg

465 470 475 480

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

485 490 495

Ser Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Val Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu

500 505 510

Thr Ser Trp Ser Ala Val Leu Asp Val Thr Glu Ser Gly Ala Thr Ile

515 520 525

Ser Lys Asn Tyr Asp Leu Ser Asp Leu Pro Gly Pro Pro Ser Lys Pro

530 535 540

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

545 550 555 560

Gly Thr Pro Gly Thr Leu Pro Ala Ser Ala Tyr Ile Ile Glu Ala Phe

565 570 575

Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser Trp Gln Thr Val Ala Asn His Val Lys

580 585 590

Thr Thr Leu Tyr Thr Val Arg Gly Leu Arg Pro Asn Thr Ile Tyr Leu

595 600 605

Phe Met Val Arg Ala Ile Asn Pro Gln Gly Leu Ser Asp Pro Ser Pro

610 615 620

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

625 630 635 640

Val Asp His Arg Gln Val Gln Lys Glu Leu Gly Asp Val Leu Val Arg

645 650 655

Leu His Asn Pro Val Val Leu Thr Pro Thr Thr Val Gln Val Thr Trp

660 665 670

Thr Val Asp Arg Gln Pro Gln Phe Ile Gln Gly Tyr Arg Val Met Tyr

675 680 685

Arg Gln Thr Ser Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Trp Gln Asn Leu Asp
690 695 700
Ala Lys Val Pro Thr Glu Arg Ser Ala Val Leu Val Asn Leu Lys Lys
705 710 715 720
Gly Val Thr Tyr Glu Ile Lys Val Arg Pro Tyr Phe Asn Glu Phe Gln
725 730 735
Gly Met Asp Ser Glu Ser Lys Thr Val Arg Thr Thr Glu Glu Ala Pro
740 745 750
Ser Ala Pro Pro Gln Ser Val Thr Val Leu Thr Val Gly Ser Tyr Asn

755 760 765
Ser Thr Ser Ile Ser Val Ser Trp Asp Pro Pro Pro Pro Asp His Gln
770 775 780
Asn Gly Ile Ile Gln Glu Tyr Lys Ile Trp Cys Leu Gly Asn Glu Thr
785 790 795 800
Arg Phe His Ile Asn Lys Thr Val Asp Ala Ala Ile Arg Ser Val Ile
805 810 815
Ile Gly Gly Leu Phe Pro Gly Ile Gln Tyr Arg Val Glu Val Ala Ala
820 825 830

Ser Thr Ser Ala Gly Val Gly Val Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ile Ile
835 840 845
Ile Gly Arg Arg Asn Glu Val Val Ile Thr Glu Asn Asn Asn Ser Ile
850 855 860
Thr Glu Gln Ile Thr Asp Val Val Lys Gln Pro Ala Phe Ile Ala Gly
865 870 875 880
Ile Gly Gly Ala Cys Trp Val Ile Leu Met Gly Phe Ser Ile Trp Leu
885 890 895
Tyr Trp Arg Arg Lys Lys Arg Lys Gly Leu Ser Asn Tyr Ala Val Thr

900 905 910
Phe Gln Arg Gly Asp Gly Gly Leu Met Ser Asn Gly Ser Arg Pro Gly
915 920 925

Leu Leu Asn Ala Gly Asp Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Ala Asp Ser Trp
930 935 940
Pro Ala Thr Ser Leu Pro Val Asn Asn Ser Asn Ser Gly Pro Asn Glu
945 950 955 960
Ile Gly Asn Phe Gly Arg Gly Asp Val Leu Pro Pro Val Pro Gly Gln
965 970 975

Gly Asp Lys Thr Ala Thr Met Leu Ser Asp Gly Ala Ile Tyr Ser Ser
980 985 990
Ile Asp Phe Thr Thr Lys Thr Ser Tyr Asn Ser Ser Ser Gln Ile Thr
995 1000 1005
Gln Ala Thr Pro Tyr Ala Thr Thr Gln Ile Leu His Ser Asn Ser Ile
1010 1015 1020
His Glu Leu Ala Val Asp Leu Pro Asp Pro Gln Trp Lys Ser Ser Ile
1025 1030 1035 1040
Gln Gln Lys Thr Asp Leu Met Gly Phe Gly Tyr Ser Leu Pro Asp Gln

1045 1050 1055
Asn Lys Gly Asn Asn Gly Gly Lys Gly Gly Lys Lys Lys Lys Asn Lys
1060 1065 1070
Asn Ser Ser Lys Pro Gln Lys Asn Asn Gly Ser Thr Trp Ala Asn Val
1075 1080 1085
Pro Leu Pro Pro Pro Pro Val Gln Pro Leu Pro Gly Thr Glu Leu Glu
1090 1095 1100
His Tyr Ala Val Glu Gln Gln Glu Asn Gly Tyr Asp Ser Asp Ser Trp
1105 1110 1115 1120

Cys Pro Pro Leu Pro Val Gln Thr Tyr Leu His Gln Gly Leu Glu Asp
1125 1130 1135
Glu Leu Glu Glu Asp Asp Asp Arg Val Pro Thr Pro Pro Val Arg Gly
1140 1145 1150
Val Ala Ser Ser Pro Ala Ile Ser Phe Gly Gln Gln Ser Thr Ala Thr
1155 1160 1165
Leu Thr Pro Ser Pro Arg Glu Glu Met Gln Pro Met Leu Gln Ala His
1170 1175 1180

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

1185 1190 1195 1200

Trp His Ile Gln Ser Asn Asn Gln Pro Pro Gln Pro Pro Val Pro Pro

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

Ala Asp Asp Asp Ala Asp Asp Glu Glu Glu Ala Leu Glu Ile Pro Arg

1235 1240 1245

Pro Leu Arg Ala Leu Asp Gln Thr Pro Gly Ser Ser Met Asp Asn Leu

1250 1255 1260

Asp Ser Ser Val Thr Gly Lys Ala Phe Thr Ser Ser Gln Arg Pro Arg

1265 1270 1275 1280

Pro Thr Ser Pro Phe Ser Thr Asp Ser Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser

1285 1290 1295

Gln Ser Gln Arg Pro Arg Pro Thr Lys Lys His Lys Gly Gly Arg Met

1300 1305 1310

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

1315 1320 1325

Glu Ala Leu Val Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Phe Pro Ser Pro Gly Gly

1330 1335 1340

His Ser Ser Ser Gly Thr Ala Ser Ser Lys Gly Ser Thr Gly Pro Arg

1345 1350 1355 1360

Lys Thr Glu Val Leu Arg Ala Gly His Gln Arg Asn Ala Ser Asp Leu

1365 1370 1375

Leu Asp Ile Gly Tyr Met Gly Ser Asn Ser Gln Gly Gln Phe Thr Gly

1380 1385 1390

Glu Leu

<210> 4

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRD2 amino acid

<400> 4

Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala
1 5 10 15

Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys
20 25 30

Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser
35 40 45

Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys
50 55 60

Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala
65 70 75 80

Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn
85 90 95

Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Gly Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln
115 120 125

Asn Pro

130

<210> 5

<211> 4842

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> slit3 gene(AY358884)

<400> 5

cgcgctcccc gcgcgcctcc tcgggctcca cgcgtcttgc cccgcagagg cagcctcctc 60

caggagcggg gccctgcaca ccatggcccc cgggtgggca ggggtcggcg ccgccgtgcg 120

cgcccgcctg gcgctggcct tggcgctggc gagcgtcctg agtgggcctc cagccgtcgc 180

ctgccccacc aagtgtacct gctccgctgc cagcgtggac tgccacgggc tgggcctccg 240

cgcggttcct cggggcatcc cccgcaacgc tgagcgcctt gacctggaca gaaataatat 300

caccaggatc accaagatgg acttcgctgg gctcaagaac ctccgagtct tgcatctgga 360
agacaaccag gtcagcgtca tcgagagagg cgccttccag gacctgaagc agctagagcg 420
actgcgcctg aacaagaata agctgcaagt ccttccagaa ttgcttttcc agagcacgcc 480
gaagctcacc agactagatt tgagtgaaaa ccagatccag gggatcccga ggaaggcgtt 540
ccgcggcatc accgatgtga agaacctgca actggacaac aaccacatca gctgcattga 600
agatggagcc ttccgagcgc tgcgcgattt ggagatcctt accctcaaca acaacaacat 660
cagtcgcatc ctggtcacca gcttcaacca catgccgaag atccgaactc tgcgcctcca 720

ctccaaccac ctctactgcg actgccacct ggcctggctc tcggattggc tgcgacagcg 780
acggacagtt ggccagttca cactctgcat ggctcctgtg catttgaggg gcttcaacgt 840
ggcggatgtg cagaagaagg agtacgtgtg cccagccccc cactcggagc ccccatcctg 900
caatgccaac tccatctcct gcccttcgcc ctgcacgtgc agcaataaca tcgtggactg 960
tcgaggaaag ggcttgatgg agattcctgc caacttgccg gagggcatcg tcgaaatacg 1020
cctagaacag aactccatca aagccatccc tgcaggagcc ttcacccagt acaagaaact 1080
gaagcgaata gacatcagca agaatcagat atcggatatt gctccagatg ccttccaggg 1140

cctgaaatca ctcacatcgc tggtcctgta tgggaacaag atcaccgaga ttgccaaggg 1200
actgtttgat gggctggtgt ccctacagct gctcctcctc aatgccaaca agatcaactg 1260
cctgcgggtg aacacgtttc aggacctgca gaacctcaac ttgctctccc tgtatgacaa 1320
caagctgcag accatcagca aggggctctt cgcccctctg cagtccatcc agacactcca 1380
cttagcccaa aacccatttg tgtgcgactg ccacttgaag tggctggccg actacctcca 1440
ggacaacccc atcgagacaa gcggggcccg ctgcagcagc ccgcgccgac tcgccaacaa 1500
gcgcatcagc cagatcaaga gcaagaagtt ccgctgctca ggctccgagg attaccgcag 1560

caggttcagc agcgagtgct tcatggacct cgtgtgcccc gagaagtgtc gctgtgaggg 1620
cacgattgtg gactgctcca accagaagct ggtccgcatc ccaagccacc tccctgaata 1680
tgtcaccgac ctgcgactga atgacaatga ggtatctgtt ctggaggcca ctggcatctt 1740
caagaagttg cccaacctgc ggaaaataaa tctgagtaac aataagatca aggaggtgcg 1800
agagggagct ttcgatggag cagccagcgt gcaggagctg atgctgacag ggaaccagct 1860
ggagaccgtg cacgggcgcg tgttccgtgg cctcagtggc ctcaaaacct tgatgctgag 1920
gagtaacttg atcagctgtg tgagtaatga caccttgcc ggcctgagtt cggtgagact 1980

gctgtccctc tatgacaatc ggatcaccac catcacccct ggggccttca ccacgcttgt 2040

ctccctgtcc accataaacc tcctgtccaa ccccttcaac tgcaactgcc acctggcctg 2100

gctcggcaag tggttgagga agaggcggat cgtcagtggg aaccctaggt gccagaagcc 2160

atttttcctc aaggagattc ccatccagga tgtggccatc caggacttca cctgtgatgg 2220

caacgaggag agtagctgcc agctgagccc gcgctgcccg gagcagtgca cctgtatgga 2280

gacagtggtg cgatgcagca acaaggggct ccgcgccctc cccagaggca tgcccaagga 2340

tgtgaccgag ctgtacctgg aaggaaacca cctaacagcc gtgcccagag agctgtccgc 2400

cctccgacac ctgacgctta ttgacctgag caacaacagc atcagcatgc tgaccaatta 2460

caccttcagt aacatgtctc acctctccac tctgatcctg agctacaacc ggctgaggtg 2520

catccccgtc cacgccttca acgggctgcg gtccctgcga gtgctaaccc tccatggcaa 2580

tgacatttcc agcgttcctg aaggctcctt caacgacctc acatctcttt cccatctggc 2640

gctgggaacc aacccactcc actgtgactg cagtcttcgg tggctgtcgg agtgggtgaa 2700

ggcggggtac aaggagcctg gcatcgcccg ctgcagtagc cctgagccca tggctgacag 2760

gctcctgctc accaccccaa cccaccgctt ccagtgcaaa gggccagtgg acatcaacat 2820

tgtggccaaa tgcaatgcct gcctctccag cccgtgcaag aataacggga catgcaccca 2880

ggaccctgtg gagctgtacc gctgtgcctg cccctacagc tacaagggca aggactgcac 2940

tgtgcccatc aacacctgca tccagaaccc ctgtcagcat ggaggcacct gccacctgag 3000

tgacagccac aaggatgggt tcagctgctc ctgccctctg ggctttgagg ggcagcggtg 3060

tgagatcaac ccagatgact gtgaggacaa cgactgcgaa aacaatgcca cctgcgtgga 3120

cgggatcaac aactacgtgt gtatctgtcc gcctaactac acaggtgagc tatgcgacga 3180

ggtgattgac cactgtgtgc ctgagctgaa cctctgtcag catgaggcca agtgcatccc 3240

cctggacaaa ggattcagct gcgagtgtgt ccctggctac agcgggaagc tctgtgagac 3300

agacaatgat gactgtgtgg cccacaagtg ccgccacggg gcccagtgcg tggacacaat 3360

caatggctac acatgcacct gcccccaggg cttcagtgga cccttctgtg aacacccccc 3420

acccatggtc ctactgcaga ccagcccatg cgaccagtac gagtgccaga acggggccca 3480

gtgcatcgtg gtgcagcagg agcccacctg ccgctgccca ccaggcttcg ccggccccag 3540

atgcgagaag ctcatcactg tcaacttcgt gggcaaagac tcctacgtgg aactggcctc 3600

cgccaaggtc cgaccccagg ccaacatctc cctgcaggtg gccactgaca aggacaacgg 3660

catccttctc tacaaaggag acaatgaccc cctggcactg gagctgtacc agggccacgt 3720

gcggctggtc tatgacagcc tgagttcccc tccaaccaca gtgtacagtg tggagacagt 3780

gaatgatggg cagtttcaca gtgtggagct ggtgacgcta aaccagaccc tgaacctagt 3840

agtggacaaa ggaactccaa agagcctggg gaagctccag aagcagccag cagtgggcat 3900

caacagcccc ctctaccttg gaggcatccc cacctccacc ggcctctccg ccttgcgcca 3960

gggcacggac cggcctctag gcggcttcca cggatgcatc catgaggtgc gcatcaacaa 4020

cgagctgcag gacttcaagg ccctcccacc acagtccctg ggggtgtcac caggctgcaa 4080

gtcctgcacc gtgtgcaagc acggcctgtg ccgctccgtg gagaaggaca gcgtggtgtg 4140

cgagtgccgc ccaggctgga ccggcccact ctgcgaccag gaggcccggg acccctgcct 4200

cggccacaga tgccaccatg gaaaatgtgt ggcaactggg acctcataca tgtgcaagtg 4260

tgccgagggc tatggagggg acttgtgtga caacaagaat gactctgcca atgcctgctc 4320

agccttcaag tgtcaccatg ggcagtgcca catctcagac caaggggagc cctactgcct 4380

gtgccagccc ggctttagcg gcgagcactg ccaacaagag aatccgtgcc tgggacaagt 4440

agtccgagag gtgatccgcc gccagaaagg ttatgcatca tgtgccacag cctccaaggt 4500

gcccatcatg gaatgtcgtg ggggctgtgg gccccagtgc tgccagccca cccgcagcaa 4560

gcggcggaaa tacgtcttcc agtgcacgga cggctcctcg tttgtagaag aggtggagag 4620

acacttagag tgcggctgcc tcgcgtgttc ctaagcccct gcccgcctgc ctgccacctc 4680

tcggactcca gcttgatgga gttgggacag ccatgtggga ccccctggtg attcagcatg 4740

aaggaaatga agctggagag gaaggtaaag aagaagagaa tattaagtat attgtaaaat 4800

aaacaaaaaa tagaacttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 4842

<210> 6

<211> 4956

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Robo1 gene(AF040990)

<400> 6

atgaaatgga aacatgttcc ttttttggtc atgatatcac tcctcagctt atccccaaat 60

cacctgtttc tggcccagct tattccagac cctgaagatg tagagagggg gaacgaccac 120

gggacgccaa tccccacctc tgataacgat gacaattcgc tgggctatac aggctcccgt 180

cttcgtcagg aagattttcc acctcgcatt gttgaacacc cttcagacct gattgtctca 240

aaaggagaac ctgcaacttt gaactgcaaa gctgaaggcc gccccacacc cactattgaa 300

tggtacaaag ggggagagag agtggagaca gacaaagatg accctcgctc acaccgaatg 360

ttgctgccga gtggatcttt atttttctta cgtatagtac atggacggaa aagtagacct 420

gatgaaggag tctatgtctg tgtagcaagg aattaccttg gagaggctgt gagccacaat 480

gcatcgctgg aagtagccat acttcgggat gacttcagac aaaaccttc ggatgtcatg 540

gttgcagtag gagagcctgc agtaatggaa tgccaacctc cacgaggcca tcctgagccc 600

accatttcat ggaagaaaga tggctctcca ctggatgata aagatgaaag aataactata 660

cgaggaggaa agctcatgat cacttacacc cgtaaaagtg acgctggcaa atatgtttgt 720

gttggtacca atatggttgg ggaacgtgag agtgaagtag ccgagctgac tgtcttagag 780

agaccatcat ttgtgaagag acccagtaac ttggcagtaa ctgtggatga cagtgcagaa 840

tttaaatgtg aggcccgagg tgaccctgta cctacagtac gatggaggaa agatgatgga 900

gagctgccca aatccagata tgaaatccga gatgatcata ccttgaaaat taggaaggtg 960

acagctggtg acatgggttc atacacttgt gttgcagaaa atatggtggg caaagctgaa 1020

gcatctgcta ctctgactgt tcaagaacct ccacattttg ttgtgaaacc ccgtgaccag 1080

gttgttgctt tgggacggac tgtaactttt cagtgtgaag caaccggaaa tcctcaacca 1140

gctattttct ggaggagaga agggagtcag aatctacttt tctcatatca accaccacag 1200

tcatccagcc gattttcagt ctcccagact ggcgacctca caattactaa tgtccagcga 1260

tctgatgttg gttattacat ctgccagact ttaaatgttg ctggaagcat catcacaaag 1320

gcatatttgg aagttacaga tgtgattgca gatcggcctc ccccagttat tcgacaaggt 1380

cctgtgaatc agactgtagc cgtggatggc actttcgtcc tcagctgtgt ggccacaggc 1440

agtccagtgc ccaccattct gtggagaaag gatggagtcc tcgtttcaac ccaagactct 1500

cgaatcaaac agttggagaa tggagtactg cagatccgat atgctaagct gggtgatact 1560

ggtcggtaca cctgcattgc atcaaccccc agtggtgaag caacatggag tgcttacatt 1620

gaagttcaag aatttggagt tccagttcag cctccaagac ctactgaccc aaatttaatc 1680

cctagtgccc catcaaaacc tgaagtgaca gatgtcagca gaaatacagt cacattatcg 1740

tggcaaccaa atttgaattc aggagcaact ccaacatctt atattataga agccttcagc 1800

catgcatctg gtagcagctg gcagaccgta gcagagaatg tgaaaacaga aacatctgcc 1860

attaaaggac tcaaacctaa tgcaatttac cttttccttg tgagggcagc taatgcatat 1920

ggaattagtg atccaagcca aatatcagat ccagtgaaaa cacaagatgt cctaccaaca 1980

agtcaggggg tggaccacaa gcaggtccag agagagctgg gaaatgctgt tctgcacctc 2040

cacaacccca ccgtcctttc ttcctcttcc atcgaagtgc actggacagt agatcaacag 2100

tctcagtata tacaaggata taaaattctc tatcggccat ctggagccaa ccacggagaa 2160

tcagactggt tagtttttga agtgaggacg ccagccaaaa acagtgtggt aatccctgat 2220

ctcagaaagg gagtcaacta tgaaattaag gctcgccctt tttttaatga atttcaagga 2280

gcagatagtg aaatcaagtt tgccaaaacc ctggaagaag cacccagtgc cccaccccaa 2340

ggtgtaactg tatccaagaa tgatggaaac ggaactgcaa ttctagttag ttggcagcca 2400

cctccagaag acactcaaaa tggaatggtc caagagtata aggtttggtg tctgggcaat 2460

gaaactcgat accacatcaa caaaacagtg gatggttcca ccttttccgt ggtcattccc 2520

tttcttgttc ctggaatccg atacagtgtg gaagtggcag ccagcactgg ggctgggtct 2580

ggggtaaaga gtgagcctca gttcatccag ctggatgccc atggaaaccc tgtgtcacct 2640

gaggaccaag tcagcctcgc tcagcagatt tcagatgtgg tgaagcagcc ggccttcata 2700

gcaggtattg gagcagcctg ttggatcatc ctcatggtct tcagcatctg gctttatcga 2760

caccgcaaga agagaaacgg acttactagt acctacgcgg gtatcagaaa agtcccgtct 2820

tttaccttca caccaacagt aacttaccag agaggaggcg aagctgtcag cagtggaggg 2880

aggcctggac ttctcaacat cagtgaacct gccgcgcagc catggctggc agacacgtgg 2940

cctaatactg gcaacaacca caatgactgc tccatcagct gctgcacggc aggcaatgga 3000

aacagcgaca gcaacctcac tacctacagt cgcccagctg attgtatagc aaattataac 3060

aaccaactgg ataacaaaca aacaaatctg atgctccctg agtcaactgt ttatggtgat 3120

gtggacctta gtaacaaaat caatgagatg aaaaccttca atagcccaaa tctgaaggat 3180

gggcgttttg tcaatccatc agggcagcct actccttacg ccaccactca gctcatccag 3240

tcaaacctca gcaacaacat gaacaatggc agcggggact ctggcgagaa gcactggaaa 3300

ccactgggac agcagaaaca agaagtggca ccagttcagt acaacatcgt ggagcaaaac 3360

aagctgaaca aagattatcg agcaaatgac acagttcctc caactatccc atacaaccaa 3420

tcatacgacc agaacacagg aggatcctac aacagctcag accggggcag tagtacatct 3480

gggagtcagg ggcacaagaa aggggcaaga acacccaagg taccaaaaca gggtggcatg 3540

aactgggcag acctgcttcc tcctccccca gcacatcctc ctccacacag caatagcgaa 3600

gagtacaaca tttctgtaga tgaaagctat gaccaagaaa tgccatgtcc cgtgccacca 3660

gcaaggatgt atttgcaaca agatgaatta gaagaggagg aagatgaacg aggccccact 3720

ccccctgttc ggggagcagc ttcttctcca gctgccgtgt cctatagcca tcagtccact 3780

gccactctga ctccctcccc acaggaagaa ctccagccca tgttacagga ttgtccagag 3840

gagactggcc acatgcagca ccagcccgac aggagacggc agcctgtgag tcctcctcca 3900

ccaccacggc cgatctcccc tccacatacc tatggctaca tttcaggacc cctggtctca 3960

gatatggata cggatgcgcc agaagaggaa gaagacgaag ccgacatgga ggtagccaag 4020

atgcaaacca gaaggctttt gttacgtggg cttgagcaga cacctgcctc cagtgttggg 4080

gacctggaga gctctgtcac ggggtccatg atcaacggct ggggctcagc ctcagaggag 4140

gacaacattt ccagcggacg ctccagtgtt agttcttcgg acggctcctt tttcactgat 4200
gctgactttg cccaggcagt cgcagcagcg gcagagtatg ctggtctgaa agtagcacga 4260
cggcaaatgc aggatgctgc tggccgtcga cattttcatg cgtctcagtg ccctaggccc 4320
acaagtcccg tgtctacaga cagcaacatg agtgccgccg taatgcagaa aaccagacca 4380
gccaagaaac tgaaacacca gccaggacat ctgcgcagag aaacctacac agatgatctt 4440
ccaccacctc ctgtgccgcc acctgctata aagtcaccta ctgcccaatc caagacacag 4500
ctggaagtac gacctgtagt ggtgccaaaa ctcccttcta tggatgcaag aacagacaga 4560

tcatcagaca gaaaaggaag cagttacaag gggagagaag tgttggatgg aagacaggtt 4620
gttgacatgc gaacaaatcc aggtgatccc agagaagcac aggaacagca aaatgacggg 4680
aaaggacgtg gaaacaaggc agcaaaacga gaccttccac cagcaaagac tcatctcatc 4740
caagaggata ttctacctta ttgtagacct acttttccaa catcaaataa tcccagagat 4800
cccagttcct caagctcaat gtcatcaaga ggatcaggaa gcagacaaag agaacaagca 4860
aatgtaggtc gaagaaatat tgcagaaatg caggtacttg gaggatatga aagaggagaa 4920
gataataatg aagaattaga ggaaactgaa agctga 4956

<210> 7
<211> 8393
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Robo2gene(NM_001128929.3)
<400> 7
agtagcacgg gcagctcgcg cgctggagga gggaggcgga aggacagcgc tgcgccacca 60
cccggaggag ggagcgcggt agctgcaggc aggggaggga gaggaaagaa aaggaaggac 120
ggctcccaga cagagagtgg gagaaaccgg ggagcagcgg gagcagcagg tccgggggga 180
gctgttccgc tgcgctgccc tcgttattca cacggacgct gcggagcttc ccagggctgc 240
ttccctgtcc ccctgggtgg aggctgccgt ctaaacctga ctccagagtt taagatgcaa 300

tggccagaag acatgaacgt gtcactagaa ggatgtggac atgggctccg ggactgttga 360
tgatgactgt ggtgttttgg ggtcatcagg ggaatggaca aggccaagga tcgcgtcttc 420
gccaggagga ctttcccccg cggattgtgg agcatccttc cgatgtcatc gtctctaagg 480
gcgagcccac gactctgaac tgcaaggcgg agggccggcc aacgcccacc attgagtggt 540
acaaagatgg ggagcgagtg gagactgaca aggacgatcc ccggtcccac aggatgcttc 600

tgcccagcgg atccttattc ttcttgcgca tcgtgcacgg gcgcaggagt aaacctgatg 660

aaggaagcta cgtttgtgtt gcgaggaact atcttggtga agcagtgagt cgaaatgcgt 720

ctctggaagt ggcattgtta cgagatgact tccgacaaaa ccccacagat gttgtagtgg 780

cagctggaga gcctgcaatc ctggagtgcc agcctccccg gggacaccca gaacccacca 840

tctactggaa aaaagacaaa gttcgaattg atgacaagga agaaagaata agtatccgtg 900

gtggaaaact gatgatctcc aataccagga aaagtgatgc agggatgtat acttgtgttg 960

gtaccaatat ggtgggagaa agggacagtg acccagcaga gctgactgtc tttgaacgac 1020

ccacatttct caggaggcca attaaccagg tggtactgga ggaagaagct gtagaatttc 1080

gttgtcaagt ccaaggagat cctcaaccaa ctgtgaggtg gaaaaaggat gatgcagact 1140

tgccaagagg aaggtatgac atcaaagacg attacacact aagaattaaa aagaccatga 1200

gtacagatga aggcacctat atgtgtattg ctgagaatcg ggttggaaaa atggaagcct 1260

ctgctacact caccgtccga gctcccccac agtttgtggt tcggccaaga gatcagattg 1320

ttgctcaagg tcgaacagtg acatttccct gtgaaactaa aggaaaccca cagccagctg 1380

ttttttggca gaaagaaggc agccagaacc tacttttccc aaaccaaccc cagcagccca 1440

acagtagatg ctcagtgtca ccaactggag acctcacaat caccaacatt caacgttccg 1500

acgcgggtta ctacatctgc caggctttaa ctgtggcagg aagcatttta gcaaaagctc 1560

aactggaggt tactgatgtt ttgacagata gacctccacc tataattcta caaggcccag 1620

ccaaccaaac gctggcagtg gatggtacag cgttactgaa atgtaaagcc actggtgatc 1680

ctcttcctgt aattagctgg ttaaaggagg gatttacttt tccgggtaga gatccaagag 1740

caacaattca agagcaaggc acactgcaga ttaagaattt acggatttct gatactggca 1800

cttatacttg tgtggctaca agttcaagtg gagagacttc ctggagtgca gtgctggatg 1860

tgacagagtc tggagcaaca atcagtaaaa actatgattt aagtgacctg ccagggccac 1920

catccaaacc gcaggtcact gatgttacta agaacagtgt caccttgtcc tggcagccag 1980

gtacccctgg aacccttcca gcaagtgcat atatcattga ggctttcagc caatcagtga 2040

gcaacagctg gcagaccgtg gcaaaccatg taaagaccac cctctatact gtaagaggac 2100

tgcggcccaa tacaatctac ttattcatgg tcagagcgat caacccccaa ggtctcagtg 2160

acccaagtcc catgtcagat cctgtgcgca cacaagatat cagcccacca gcacaaggag 2220

tggaccacag gcaagtgcag aaagagctag gagatgtcct tgtccgtctt cataatccag 2280

ttgtgctgac tcccaccacg gttcaggtca catggacggt tgatcgccaa ccccagttta 2340

tccaaggcta ccgagtgatg tatcgtcaga cttcaggtct gcaggcgaca tcttcgtggc 2400

agaatttaga tgccaaagtc ccgactgaac gaagtgctgt cttagtcaac ctgaaaaagg 2460

gggtgactta tgaaattaaa gtacggccat attttaatga gttccaagga atggatagtg 2520

aatctaaaac ggttcgtact actgaagaag ccccaagtgc cccaccacag tctgtcactg 2580

tactgacagt tggaagctac aatagcacaa gtattagtgt ttcctgggat cctcctcctc 2640

cagatcacca gaatggaatt atccaagaat acaagatctg gtgtctagga aatgaaacgc 2700

gattccatat caacaaaact gtggatgcag ccattcggtc cgtaataatt ggtggattat 2760

tcccaggtat tcaataccgg gtagaggttg cagctagtac cagtgcaggg gttggagtaa 2820

agagtgagcc acagccaata ataatcggga gacgcaatga agttgtcatt actgaaaaca 2880

ataacagcat aactgagcaa atcactgatg tggtgaagca accagccttt atagctggta 2940

ttggtggtgc ctgctgggta attctgatgg gttttagcat atggttgtat tggcgaagaa 3000

agaagaggaa gggactcagt aattatgctg ttacgtttca aagaggagat ggaggactaa 3060

tgagcaatgg aagccgtcca ggtcttctca atgctggtga tcccagctat ccatggcttg 3120

ctgattcttg gccagccacg agcttgccag taaataatag caacagtggc ccaaatgaga 3180

ttggaaattt tggccgtgga gatgtgctgc caccagttcc aggccaaggg gataaaacag 3240

caacgatgct ctcagatgga gccatttata gtagcattga cttcactacc aaaaccagtt 3300

acaacagttc cagccaaata acacaggcta ccccatatgc cacgacacag atcttgcatt 3360

ccaacagcat acatgaattg gctgtcgatc tgcctgatcc acaatggaaa agctcaattc 3420

agcaaaaaac agatctgatg ggatttggtt attctctacc tgatcagaac aaaggtaaca 3480

atggtgggaa aggtggaaaa aagaagaaaa ataaaaactc ttctaaacca cagaaaaaca 3540

atggatccac ttgggccaat gtccctctac ctccccccc agtccagccc cttcctggca 3600

cggagctgga acactatgca gtggaacaac aagaaaatgg ctatgacagt gatagctggt 3660

gcccaccatt gccagtacaa acttacttac accaaggtct ggaagatgaa ctggaagaag 3720

atgatgatag ggtcccaaca cctcctgttc gaggcgtggc ttcttctcct gctatctcct 3780

ttggacagca gtccactgca actcttactc catccccacg ggaagagatg caacccatgc 3840

tgcaggctca cctggatgag ttgacaagag cctatcagtt tgatatagca aaacaaacat 3900

ggcacattca aagcaataat caacctccac agcctccagt tccaccgtta ggttatgtgt 3960

ctggagcctt gatttctgat ttggaaacgg atgttgcaga tgatgatgcc gacgacgaag 4020

aggaagcttt agaaatcccc aggcccctga gagcactgga ccagactcct ggatccagca 4080

tggacaatct agacagctct gtgacaggaa aagcctttac ctcctctcaa agacctcgac 4140

ctaccagccc attttctact gacagtaaca ccagtgcagc cctgagtcaa agtcagaggc 4200

ctcggcccac taaaaaacac aagggagggc ggatggacca acaaccagca ttgcctcatc 4260

gaagggaagg aatgacagat gaggaggcct tggtgcccta tagcaagccc agtttcccat 4320

ctccaggtgg ccacagctca tcaggaacag cttcttctaa gggatccact ggacctagga 4380

aaaccgaggt gttgagagca ggccaccagc gcaatgccag cgaccttctt gacataggat 4440

atatgggctc caacagtcaa ggacagttta caggtgaatt atagtaaatg agaggagaca 4500

tacaaagctg ctctgaagga ccatcaggtc cggactcatg gaagtgatga ctctaaacag 4560

tgcaatgaac aatttattta tgtactatta aaagaactgt aaatgcaatg taaagacaca 4620

cagccacaca tatcccacag atattttcat tgtgttcttc tcttaagtac accacccacc 4680

ttaactcttt cttgtcagga gtatataaaa aagaaagaaa acaaaactcg ccctacagga 4740

agaaaaggat tctcctctgt atataatttc ttttgtgcat tgctatgcaa gctcactctt 4800

tttagctctg ctcatattat tgtctgttct tattggtctg ttgtactata tgtgaattaa 4860

taggctgtgg tgccatatat taacttttaa ttgtgtaact tttatgttta aattttgcac 4920

tgcaatttta tttggtgata agcacaaatc tctactcctc atgacatgaa gaaaaagact 4980

gaatgtgaag ggagtttctg tactgtaagc tagattggat aatgatggct gtaacaaatc 5040

atgttagatg gttttcagtt ggggtgtaga aataggaaga tgcaaaggaa caatggtgtt 5100

ggcaaagtct tctttgaata tcagggactg agtcaataaa aaaaatagta gaaaggtggc 5160

ttttactatt gacaaaagcc ggggtcaaaa aaagtagttt aagtcttaag actgaatatg 5220

cattaaagta tgcaggtagc aaagatgtaa taaatttgct taaaaaaaga aattaaagtt 5280

ttatttagaa tcaattttac ctgtcattgt aattgaccca tctgagaatt acaataagca 5340

agaggaaatt aaggtgtttt gcaagagctg tatttatatt acagtttttt aaaaacattt 5400

tctgaattat cgtaattaag ctctccaact cgttaagtca gaatataata tgaagttccc 5460

caaggaaacg aacaaaatga actctagaat atctagcaaa tagttaaaga agcaatttat 5520

tattagggca tactcgggct gtttccaaat ataaactcta ttgcaatatc ttatttcatc 5580

tttctaatac atgtacagtg cacactagag gatagagctg catcacttaa attcatgact 5640

taaaaaataa tacagtttat atacaacttg ttttttattt gattaagaag tgaagtttac 5700

gccacccaat gtatagccaa attgtacgtg cttaaaaaac agtgccgaga gtatgttcag 5760

ttcgcagtaa gtagatttat tggaataaat attctatggt acattctcag aaattggctt 5820

ccaactaaaa tacgtttgac ccattttgaa taaggaaatt gaaaagaaaa atttaaaagg 5880

agaaaaaaat gcatgtttat aaacttttta aataaaacca gaccttgtaa gtggacatta 5940

ataattgtcc tgcctcattt gttttcacga ctttgacaac aagaagttcc tgaacattag 6000

tcatgtatgc tcagaataaa tgtgactttg aaatatatgt tagctactgt acatgtatag 6060

tcagtcaagt agaagaggac cttcctgaaa ttcccacttg tgacattttc ccatgggttt 6120

cctacacaat cttaaatttt atttctgtct atactttctc aaatttttcc tatgataagt 6180

tcagttgttg gtactcttct aaaaatattc aacgtgatta ggatcagttc taaaatacgg 6240

gacccctttg agtgacaatt cgcactccat gcattattgg ctcagtagcc aatttttgtc 6300

acgtcgttat aacaaggaga tgacataatt aaacatttcc atcctttcta ttccctgaga 6360

ctgcatcagc acaggcaagt atagaatgta atgttcttca tgggccccac cagctttttg 6420

gtgccatgta atttatttct tcgctgaaga gaaaaagaat tctgagacac agttattaaa 6480

ccctttatca actttctacc atcagtgcct gaattctaat gcagtgtgat ttctctggga 6540

caaagagact gaggaagatg aaaagtttct tcaaagagtg aatacatact tattcacaac 6600

tctaggatgt gaggacttta aatatctctt tatgaagttc cctgcctaac ctctttctat 6660

ttaaaggcaa acaaatttcg aagaggtttt gtgttccctc tttatgtttc tctatgaccc 6720

agtttagtct aaaaccttag ttcattacat atacaacaca tagcctttga tccctggtaa 6780

ctggcaggtg ttggtgatta ataaaccaag gcttcaaagt gaagtatgtg tgtgcagatg 6840

acttttggaa taacgtgggc atagcatcat accttcctga ttgtcttcag catataaaaa 6900

ttaactgttg tagttaaaat tatgtcagtg cagagcttgt ggttacttgg aatgttcttt 6960

cagaatagtc catgttgcct attaaaccta gttttaaaca cattgggcag tcaatttatg 7020

cacccaaaat atcaccctca ggtagattga gggcaagata aaatgctgta tgtagctata 7080

caaaggaatt cagaaacatt actggaaagc aaagcctttg tcagcttgct actgacaaag 7140

tagtaaaaag ctactaatca gtgttgagtc agatgtcaac agaaaaatac aaatacctat 7200

gagagccaca gcagtttctc gtttcatagc cgattcaatg aatatgatta gaaattcact 7260

gagctcactc ttgcaggttt aaatggaggc ctgcataagg actgcaagag gaaatctggg 7320

tgggagagaa tgtaatctga tcttgcactc ataggcaatg ctgcaatgca atcatgtcca 7380

atacaagcac agcttcattc ataacaggaa acgtcttctt tgggaaaata gctctattgg 7440

tgcccaaact caggtatgcc agtgtatgca ggtggagtcg ccctacccct cttccaaaca 7500

tgtcctgtga gatttttaaa ataagatggg atagtacagg ggcatgaaaa gaattgattc 7560

cttcacagga tttgaatcca gttcaaggga gaatgtagaa aattcaaaac caacatataa 7620

ggtatcacac aaccaagaaa agtaaaacca ttgcaagttt acttgcgttg agtacaaaac 7680

agatttaatg gtgttctatg tcatagttta atgctctggg tatttaaata tgttttcaac 7740

aggatttgag ttgaaagttt gtaatgtgct ttgatggaac acctctcaat ttctattcaa 7800

taaacttatg taattgtcca ttgacaatat aatgataaca gtaccattga actctaaact 7860

gtggtttatc ttcactactg ggaagcaact gtgcatcagt attaaagata tgcagaaaca 7920

taatattcac taatttgttc atctgcttct gtatattgtt tatggaatta catggcaaga 7980

actgttctaa agcaacatgt ctttccacat tattttagag gtgaaattac ttttgttttg 8040

cttctctata atgtgtactt caaatgaaac accatacttt tttctaaaaa aagatgttca 8100

atttactaat ttttttaaat ctcataattt aaaaagcatt tgttgtgatt ttaaagtgtt 8160

gcaagaaaag ggattttgtg gccgtgggta gacttttat actttgtttt atagatggat 8220

ttttttaac tgtagtttgt ttaagtcacc aagcagcatc caaaatctta atgtgtttca 8280

tttgatgttg ttagatcaga gaagaaattg gcataaaatc ggttaatagt attgtcaaag 8340

aattgtgtat tgtgtactca ctgggaaaaa ataaaatata ttcacatttc aaa 8393

<210> 8

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRD2 gene

<400> 8

atcgtcgaaa tacgcctaga acagaactcc atcaaagcca tccctgcagg agccttcacc 60

cagtacaaga aactgaagcg aatagacatc agcaagaatc agatatcgga tattgctcca 120

gatgccttcc agggcctgaa atcactcaca tcgctggtcc tgtatgggaa caagatcacc 180

gagattgcca agggactgtt tgatgggctg gtgtccctac agctgctcct cctcaatgcc 240

aacaagatca actgcctgcg ggtgaacacg tttcaggacc tgcagaacct caacttgctc 300

tccctgtatg acaacaagct gcagaccatc agcaaggggc tcttcgcccc tctgcagtcc 360

atccagacac tccacttagc ccaaaaccca 390