



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0027474
(43) 공개일자 2019년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2018.05)

C12Q 2600/142 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0114290

(22) 출원일자 2017년09월07일

심사청구일자 2017년09월07일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

이윤한

경기도 고양시 일산동구 강송로 195, 815동 502호
서유리

경상북도 경산시 성암로1길 22-14

(74) 대리인

서장찬, 박병석

전체 청구항 수 : 총 6 항

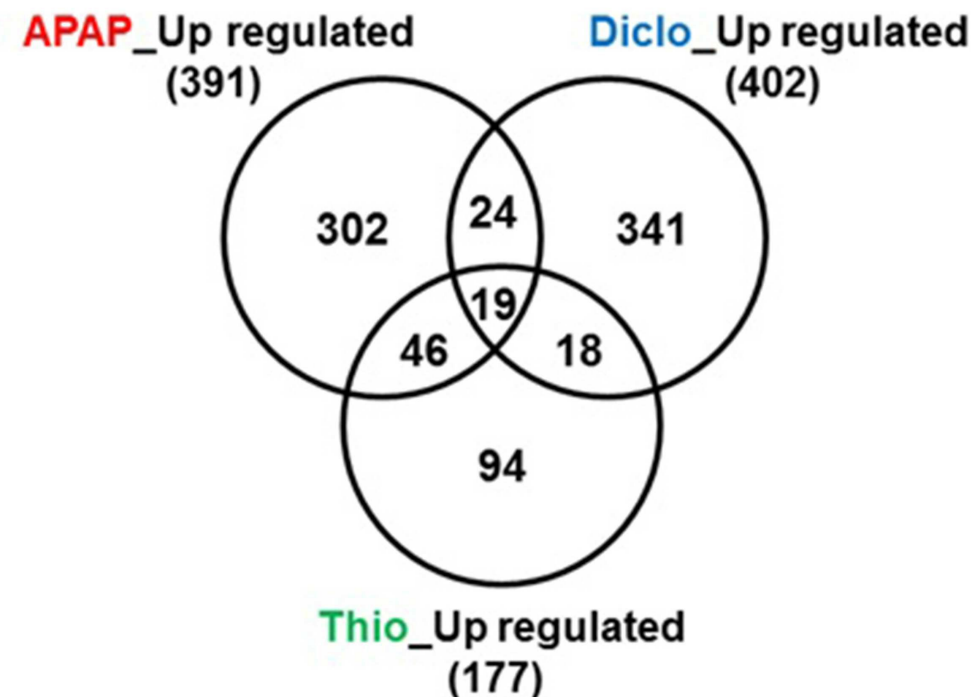
(54) 발명의 명칭 간독성 유발 물질 예측용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 간독성 유발 물질의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 간독성(hepatotoxicity) 유발 물질 예측용 바이오마커(biomarker) 조성물 및 이를 이용한 간독성 유발 물질의 스크리닝(screening) 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 임의의 화합물이 인체 간세포에서 독성을 가지는지의 여부를 효과적으로 예측할 수 있는 표지자로서의 바이오마커 조성물과 상기 바이오마커 조성물을 사

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3a



용하여 임의의 화합물이 처리된 인체 간세포에서 상기 바이오마커 유전자의 발현량을 측정 및 비교함으로써 간독성을 유발하는 화합물을 효과적으로 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 간독성 유발 예측용 바이오마커 조성물 및 상기 바이오마커 조성물을 이용한 간독성 유발 물질의 스크리닝 방법에 따르면, 시험관 내에서 인체 배아 줄기세포 유래의 간세포를 대상으로 본 발명의 신규한 바이오마커 유전자의 발현량을 측정 및 비교함으로써 후보 약물의 간독성 유발 가능성 여부를 신속하고 정확하게 확인할 수 있으므로, 분자 진단 분야에 적용 가능성이 높으며, 의료 산업상 매우 유용한 발명이다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012M3A9C7050149
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업(줄기세포기반신약스크리닝시스템개발사업)
연구과제명	줄기세포 기반 독성예측 분자지표 개발 및 독성 평가시스템 구축에 응용
기 여 율	1/1
주관기관	계명대학교 산학협력단
연구기간	2016.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 17로 이루어지는 군으로부터 선택되는 유전자를 포함하는 간독성 유발 물질 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 2

다음의 단계들을 포함하는 간독성 유발 물질의 스크리닝 방법:

- (1) 분리된 간세포에 시료를 처리하는 단계;
- (2) 상기 시료가 처리된 간세포로부터 RNA를 분리하는 단계;
- (3) 상기 RNA로부터 서열번호 1 내지 서열번호 17로 이루어지는 군으로부터 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및
- (4) 상기 시료 무처리군과 대비하여 상기 유전자의 발현량이 증가된 경우 상기 시료를 간독성 유발 물질로 예측하는 단계.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 간세포는 인간 유래인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 간세포는 인간 유래 줄기세포로부터 분화된 간세포인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 간세포는 인간 유래 배아줄기세포로부터 분화된 간세포인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 단계 (3)의 측정에 사용되는 방법은 RT-PCR(reversetranscriptase polymerase chain reaction) 또는 노던-블로팅(northern blotting)인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 간독성(hepatotoxicity) 유발 물질 예측용 바이오마커(biomarker) 조성물 및 이를 이용한 간독성 유발 물질의 스크리닝(screening) 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 임의의 화합물이 인체 간세포에서 독성을 가지는지의 여부를 효과적으로 예측할 수 있는 표지자로서의 바이오마커 조성물과 상기 바이오마커 조성물을 사용하여 임의의 화합물이 처리된 인체 간세포에서 상기 바이오마커 유전자의 발현량을 측정 및 비교함으로써 간독성을 유발하는 화합물을 효과적으로 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

약물 유발 간 손상(drug induced liver injury, DILI)은 약물의 유해 작용으로 나타나는 현상이며, 결국 간부전(liver failure)에 이르게 한다. DILI는 기본적으로 두 가지 범주로 나눌 수 있다. 하나는 급성 간세포 상해이며, 이는 간세포 사멸 및 괴사 등의 돌이킬 수 없는 세포 손상이다. 또 다른 하나는 간염유증과 간경변을 포함한 만성 간 세포 손상이다.

[0003] DILI는 의약품 개발의 실패 및 승인된 약물의 회수 원인의 큰 부분을 차지하고 있다¹. 전 임상 약물 개발 단계에서 간독성을 평가하는 수 많은 노력에도 불구하고, 마우스(mouse)와 랫트(rat)와 같은 비인간 기원의 시험관 내(*in vitro*) 전-임상(pre-clinical)은 종 간 차이로 인하여 정확한 약물 독성을 보여주지는 못하였다^{2,3}. 또한, 인간의 간세포(hepatocytes)와 간조직(liver tissues)을 사용하는 경우에는 프라이머리(primary) 인간 간세포 및 간 표본을 분리 및 배양하는데 개인적인 차이를 나타내는 몇 가지 제한이 있었다⁴. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 인간 배아 줄기세포(human embryonic stem cells, hESCs)로부터 분화된 간세포가 시험관 내에서 후보 약물의 독성을 평가하기 위한 최적화된 세포 형태로서 부각되었다.

[0004] 독성유전체학은 독성학과 유전체학을 결합한 새로운 분야이다. 이 기술은 조직 병리학적 효과 및 장기 중량의 변화를 보여줄 수 있는 고전적인 독성학과 비교하여, 약물의 활성, 특히, 분자 메커니즘 측면의 포괄적 이해를 제공한다^{5,6}. 독성유전체학에 의해 얻어진 게놈 발현 프로파일은 대조군과 후보 약물 처리군 사이에서 전사체(transcriptome)의 변화를 제공한다. 변화된 유전자 발현 패턴을 분석하면, 이러한 분석 결과로부터 독성 경로, 스트레스 신호 또는 세포 사멸 경로와 같은 유해한 약물 활성을 유발하는 가능성 있는 세포 사건을 예측할 수 있다⁷.

[0005] 약물 독성을 평가하는 몇 가지 분석이 현재 개발되고 있다. 그 하나는 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP) 리포터 시스템을 이용하여 시각적으로 감지하는 것을 허용하는 ToxTracker Assay이다. 예를 들어, Srnx1-GFP 리포터 시스템은 산화적 스트레스 조건에서 활성화된다. 만약, 특정 후보 약물이 산화적 스트레스를 유도하면, ToxTracker Assay는 산화적 스트레스 신호의 마커 유전자로서 Srnx1-GFP 형광을 나타낸다⁸. 이 방법은 독성 분자의 검출을 형광 강도의 비교를 통해 쉽게 할 수 있기 때문에 매우 유용한 도구이다. 형광은 간접적으로 분자 수준에서 화합물의 독성을 나타낸다. 세포 스트레스 신호 전달에 관련된 단백질을 검출하기 위한 고급 시험관 독성 분석법을 확립하기 위해서는 잠재적인 독성을 갖는 특정 유전자를 세포 손상의 독성 예측 마커로 확인하는 것이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) 1. Regev A. Drug-induced liver injury and drug development: industry perspective. *Seminars in liver disease*. 2014 May;34(2):227-39.
- (비특허문헌 0002) 2. Jensen J, Hyllner J, Bjorquist P. Human embryonic stem cell technologies and drug discovery. *Journal of cellular physiology*. 2009 Jun;219(3):513-9.
- (비특허문헌 0003) 3. Li AP. Accurate prediction of human drug toxicity: a major challenge in drug development. *Chemico-biological interactions*. 2004 Nov 1;150(1):3-7.
- (비특허문헌 0004) 4. Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, et al. Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2012;27(6):598-604.
- (비특허문헌 0005) 5. Guerreiro N, Staedtler F, Grenet O, Kehren J, Chibout SD. Toxicogenomics in drug development. *Toxicologic pathology*. 2003 Sep-Oct;31(5):471-9.
- (비특허문헌 0006) 6. Khan SR, Baghdasarian A, Fahlman RP, Michail K, Siraki AG. Current status and future prospects of toxicogenomics in drug discovery. *Drug discovery today*. 2014 May;19(5):562-78.
- (비특허문헌 0007) 7. Pognan F. Toxicogenomics applied to predictive and exploratory toxicology for the safety assessment of new chemical entities: a long road with deep potholes. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques*. 2007;64:217, 9-38.
- (비특허문헌 0008) 8. Hendriks G, Atallah M, Morolli B, Calleja F, Ras-Verloop N, Huijskens I, et al. The ToxTracker assay: novel GFP reporter systems that provide mechanistic insight into the genotoxic properties of chemicals. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*.

2012 Jan;125(1):285-98.

(비특허문헌 0009) 9. Kon K, Ikejima K, Okumura K, Aoyama T, Arai K, Takei Y, et al. Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. Journal of gastroenterology and hepatology. 2007 Jun;22 Suppl 1:S49-52.

(비특허문헌 0010) 10. Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. Handbook of experimental pharmacology. 2010 (196):369-405.

(비특허문헌 0011) 11. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2003 Dec;31(12):1499-506.

(비특허문헌 0012) 12. Gomez-Lechon MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Castell JV, Jover R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. Biochemical pharmacology. 2003 Dec 1;66(11):2155-67.

(비특허문헌 0013) 13. Gomez-Lechon MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Jover R, Castell JV. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA. 2003 Oct-Dec;17(5-6):675-80.

(비특허문헌 0014) 14. Yeong TT, Lim KH, Goubet S, Parnell N, Verma S. Natural history and outcomes in drug induced autoimmune hepatitis. Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology. 2015 May 5.

(비특허문헌 0015) 15. Scully LJ, Clarke D, Barr RJ. Diclofenac induced hepatitis. 3 cases with features of autoimmune chronic active hepatitis. Digestive diseases and sciences. 1993 Apr;38(4):744-51.

(비특허문헌 0016) 16. Ledda-Columbano GM, Coni P, Curto M, Giacomini L, Faa G, Oliverio S, et al. Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. The American journal of pathology. 1991 Nov;139(5):1099-109.

(비특허문헌 0017) 17. Wasser S, Tan CE. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat. Annals of the Academy of Medicine, Singapore. 1999 Jan;28(1):109-11.

(비특허문헌 0018) 18. Munoz Torres E, Paz Bouza JI, Lopez Bravo A, Abad Hernandez MM, Carrascal Marino E. Experimental thioacetamide-induced cirrhosis of the liver. Histology and histopathology. 1991 Jan;6(1):95-100.

(비특허문헌 0019) 19. Aashish Pandit TSaPB. Drug-Induced Hepatotoxicity: A Review. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2011;2012(2541):233-243.

(비특허문헌 0020) 20. Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, et al. Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. Drug metabolism and pharmacokinetics. 2012;27(6):598-604.

(비특허문헌 0021) 21. Holtz WA, Turetzky JM, O'Malley KL. Microarray expression profiling identifies early signaling transcripts associated with 6-OHDA-induced dopaminergic cell death. Antioxidants & redox signaling. 2005 May-Jun;7(5-6):639-48.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 시험관 내에서 신속하고 정확하게 후보 약물의 간독성 유발 가능성 여부를 예측할 수 있는 신규한 바이오마커 조성물 및 상기 바이오마커 조성물을 사용하여 후보 약물의 간독성 유발 가능성 여부를 신속하고 정확하게 예측할 수 있는 간독성 유발 물질의 스크리닝 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 17로 이루어지는 군으로부터 선택되는 유전자를 포함하는 간독성 유발 물질 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 (1) 분리된 간세포에 시료를 처리하는 단계; (2) 상기 시료가 처리된 간세포로부터 RNA를 분리하는 단계; (3) 상기 RNA로부터 서열번호 1 내지 서열번호 17로 이루어지는 군으로부터 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및 (4) 상기 시료 무처리군과 대비하여 상기 유전자의 발현량이 증가된 경우 상기 시료를 간독성 유발 물질로 예측하는 단계를 포함하는 간독성 유발 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0010] 상기 간세포는 인간 유래인 것이 바람직하다.
- [0011] 상기 간세포는 인간 유래 줄기세포로부터 분화된 간세포인 것이 바람직하다.
- [0012] 상기 간세포는 인간 유래 배아줄기세포로부터 분화된 간세포인 것이 바람직하다.
- [0013] 상기 단계 (3)의 측정에 사용되는 방법은 RT-PCR(reversetranscriptase polymerase chain reaction) 또는 노던-블로팅(northern blotting)인 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명의 간독성 유발 예측용 바이오마커 조성물 및 상기 바이오마커 조성물을 이용한 간독성 유발 물질의 스크리닝 방법에 따르면, 시험관 내에서 인체 배아줄기세포 유래의 간세포를 대상으로 본 발명의 신규한 바이오마커 유전자의 발현량을 측정 및 비교함으로써 후보 약물의 간독성 유발 가능성 여부를 신속하고 정확하게 확인할 수 있으므로, 분자 진단 분야에 적용 가능성이 높으며, 의료 산업상 매우 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본 발명의 인간 배아 줄기세포-유래 간세포-유사 세포(hES-derived hepatocyte-like cells, hES-HEP)의 현미경 사진을 나타낸다.
- 도 2a 내지 도 2c는 각각 아세트아미노펜(acetaminophen, APAP), 디클로페낙(diclofenac) 및 티오아세트아미드(thioacetamide)를 24시간 처리 후 hES-HEP의 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 3a 및 도 3b는 APAP, 디클로페낙 및 티오아세트아미드를 6시간 및 12시간 처리한 후 상향 조절되거나, 하향 조절되는 유전자의 수를 벤 다이어그램으로 나타낸 것이다.
- 도 4a 내지 도 4f는 3종의 간독성 약물 처리에 의하여 2종 이상 공통적으로 발현량의 변화가 관찰된 유전자의 IPA(Inguity Pathway Analysis) 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 IPA 분석에 의한 유전자들의 생물학적 분자 네트워크를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0017] 독성유전체학은 분자 메커니즘 측면에서 유해한 약물의 활성을 보다 포괄적으로 이해하기 위한 독성학 분야에 기여하는 바가 크다. 또한, 독성유전체학의 발전은 전-임상 시험에 장기간의 시간을 요하고, 많은 동물 모델을 필요로 하는 고전적인 독성 시험의 문제점인 약물 개발의 비용과 시간을 절감시킬 수 있을 것이다. 본 발명의 발명자는 이와 같은 독성유전체학 연구의 일환으로서, 아홉토시스에 의한 간독성을 나타내는 것으로 알려져 있는 3종의 간 독성 약물을 hES-HEP에 일정한 농도 및 시간 동안 처리한 후, 상기 간 독성 약물을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포의 유전자 발현의 변화 양상을 마이크로어레이로 분석하여, 상기 3종의 간 독성 약물에서 공통적으로 상향 조절되는 17종의 유전자를 확인하고, 상기 17종의 유전자를 이용하면 간독성 유발 물질을 효과적으로 예측할 수 있음을 확인하고, 상기 17종의 유전자를 간독성 유발 물질 예측용 바이오마커로서 개발하고, 상기 바이오마커를 이용하여 임의의 후보 약물의 간독성 유발 가능성을 효과적으로 예측할 수 있는 스크리닝 방법의 개발을 완성하였다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 17로 이루어지는 군으로부터 선택되는 유전자를 포함하는 간독성 유발 물질 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 간독성 유발 물질 예측용 바이오마커 조성물을 구성하는 17종의 유전자들은 서열번호 1 내지 서열번호 17로 표시되며, 각 유전자의 구체적인 명칭은 다음 표 1에 나타내었다.

표 1

[0020]

서열번호	유전자 명칭
1	<i>CRYAB</i>
2	<i>DNAJB1</i>
3	<i>FOS</i>
4	<i>GADD45B</i>
5	<i>HSPA1A</i>
6	<i>HSPA6</i>
7	<i>MT1E</i>
8	<i>MT1F</i>
9	<i>MT1G</i>
10	<i>MT1H</i>
11	<i>MT1M</i>
12	<i>MT1X</i>
13	<i>MT2A</i>
14	<i>NEFM</i>
15	<i>RRAD</i>
16	<i>SERPINB9</i>
17	<i>SHISA2</i>

[0021] 상기 열거된 서열번호 1 내지 서열번호 17로 표시되는 유전자들은 간독성을 나타낼 것으로 예측되는 임의의 후보 약물이 처리된 간세포에서 상기 약물을 처리하지 않은 간세포와 비교하여 유전자의 상향 조절, 즉, 유전자의 발현량이 증가할 수 있다.

[0022] 본 발명의 바이오마커 조성물은 서열번호 1 내지 서열번호 17로 표시되는 유전자가 조성물 중 적어도 1종 이상 포함될 수 있으며, 간독성 예측의 정확성을 높이기 위해서는 가능한 다수의 유전자를 포함시키는 것이 바람직하다.

[0023] 한편, 본 발명의 발명자는 상기와 같은 본 발명의 간독성 유발 물질 예측용 바이오마커 조성물을 사용하여 시험관 내의 조건에서 간세포에 임의의 후보 약물을 처리하여 상기 바이오마커 유전자의 발현량을 측정 및 비교함으로써 간독성 유발 물질을 효과적으로 스크리닝하는 방법을 제안한다.

[0024] 따라서, 본 발명은 (1) 분리된 간세포에 시료를 처리하는 단계; (2) 상기 시료가 처리된 간세포로부터 RNA를 분리하는 단계; (3) 상기 RNA로부터 서열번호 1 내지 서열번호 17로 이루어지는 군으로부터 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및 (4) 상기 시료 무처리군과 대비하여 상기 유전자의 발현량이 증가된 경우 상기 시료를 간독성 유발 물질로 예측하는 단계를 포함하는 간독성 유발 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0025] 상기 단계 (1)에서 언급된 간세포는 바람직하게는 포유동물 기원일 수 있으며, 보다 바람직하게는, 인간 기원일 수 있다. 또한, 상기 간세포는 인간 유래의 줄기세포 기원일 수 있다. 바람직한 구체예로서, 상기 간세포는 인간 배아줄기세포 유래의 간세포, 인간 배아줄기세포 유래의 간세포 유사 세포(hES-derived hepatocyte-like cells, hES-HEP) 또는 인간 배아줄기세포 유래의 간세포 유사 세포주일 수 있다.

[0026] 상기 시료는 신약 개발을 위하여 연구 중인 임의의 후보 약물을 의미하며, 예를 들어, 유기 합성 화합물 또는 생물학적 물질(예를 들어, 단백질, 폴리펩티드, 올리고펩티드, 핵산 및 올리고뉴클레오티드)일 수 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 상기 시료를 분리된 간세포에 처리하는 구체적인 방법은 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 사항이며, 구체적으로는, 본 발명의 명세서 중 하기 실시예를 참조할 수 있다.

[0028] 상기 단계 (2)는 간세포에 시료를 처리한 후 일정 시간 동안 인큐베이션하고, 상기 간세포로부터 RNA를 분리하는 과정이다. 단계 (2)에서는 대조군으로서 시료를 무첨가한 간세포를 동일하게 인큐베이션하고, 이로부터도

RNA를 분리할 수 있다.

- [0029] 간세포로부터 RNA를 분리하는 구체적인 방법은 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 사항이며, 구체적으로는, 본 발명의 명세서 중 하기 실시예를 참조할 수 있다.
- [0030] 상기 단계 (3)은 단계 (2)로부터 분리된 RNA로부터 본 발명의 바이오마커 유전자의 발현량을 측정하는 단계이다.
- [0031] 유전자 발현량의 측정에 사용되는 방법은, 제한되지는 않지만, 예를 들어, RT-PCR(reversetranscriptase polymerase chain reaction), 노던-블로팅(northern blotting), 마이크로어레이(microarray) 또는 Real-time PCR일 수 있다.
- [0032] 상기 측정 방법에 있어서, PCR을 사용하는 경우에 사용되는 유전자 증폭용 프라이머 서열은 본 발명의 서열번호 1 내지 서열번호 17로 표시된 염기 서열로부터 쉽게 디자인될 수 있을 것이다. 또한, 상기 측정 방법에 있어서, 노던-블로팅 및 마이크로어레이를 사용하는 경우에 사용되는 탐침(probe)의 서열은 본 발명의 서열번호 1 내지 서열번호 17로 표시된 염기 서열로부터 쉽게 디자인될 수 있을 것이다.
- [0033] 상기 단계 (4)는 상기 시료를 처리한 간세포와 시료 무처리 간세포의 본 발명의 바이오마커 유전자의 발현량을 정량적으로 비교하여 시료 무처리 간세포의 유전자 발현량보다 시료 처리 간세포에서 유전자 발현량이 증가하는 경우에 상기 시료가 간독성 유발 물질인 것으로 예측하는 단계이다.
- [0034] 간독성 유발 물질의 예측 정확성을 증가시키기 위하여, 가능한 다수의 바이오마커 유전자의 발현량을 비교하는 것이 바람직하다.
- [0035] 이하에서는, 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 하나의 구체예를 기재한 것이며, 하기 실시예에 기재된 사항에 의하여 본 발명의 권리범위가 한정되어 해석되는 것이 아님은 명백하다.
- [0036] **[실시예]**
- [0037] **1. 재료 및 방법**
- [0038] **1.1. 세포 배양(Cell culture)**
- [0039] 인간 배아줄기세포-유래 간세포-유사 세포(hES-derived hepatocyte-like cells)는 Cellartis(Cellartis Inc., Gothenburg, Sweden)에서 구입하였다. 세포는 1% penicillin/streptomycin solution 및 1% Insulin Transferrin Selenium(ITS) + oncostatin M(OSM, 10ng/ml) 및 dexamethasone(DEX, 10^{-6} mol/L)로 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12(DMEM/F12)으로 37℃, 5% CO₂의 조건하에서 배양되었다(도 1).
- [0040] **1.2. 약물 처리(Drug treatment)**
- [0041] 인간 배아 줄기세포-유래 간세포-유사 세포는 Acetaminophen(APAP; Sigma-Aldrich Cat# A7085-100G), Diclofenac sodium salt(Sigma-Aldrich Cat# D6899-10G), Thioacetamide(Sigma-Aldrich 163678-25G)의 IC₅₀ 값으로 처리되었다. 모든 약물은 배양 배지로 희석되었다.
- [0042] **1.3. 세포 생존율 측정(Cell viability assay)**
- [0043] Cell Counting Kit-8(CCK-8)(Dojindo Molecular Technologies, Inc., Tokyo, Japan)을 이용하여 제조자의 권고에 따라 세포 생존율을 측정하였다. 인간 배아 줄기세포-유래 간세포-유사 세포를 96-well plates에 트리플리케이트로 플레이트팅하고, 가습된 5% CO₂ 분위기 하에서, 37℃로 24시간 동안 간독성 약물을 처리하였다. CCK-8 용액을 전체 용량의 10%가 되도록 well에 첨가하였다. 착색된 생성물(포르 마잔)은 VersaMax 마이크로 플레이트 리더(Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 검출하였다.
- [0044] **1.4. Gene expression analysis**
- [0045] 인간 배아 줄기세포-유래 간세포-유사 세포를 APAP, Diclofenac 및 Thioacetamide의 개별 IC₅₀ 값으로 처리하였다. 6시간 및 12시간 후 전체 RNA를 분리하고, GeneChip Human Genome U133 plus 2.0 array(Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 microarray 분석에 적용하였다. 생물학적 기능, 독성 기능 및 네트워크 분석

은 Ingenuity Pathway Analysis(QIAGEN/Ingenuity Systems, Inc Redwood City, CA)을 이용하여 수행하였다.

1.5. 통계 처리(Statistical analysis)

결과는 3번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SE(표준 편차)로 표현되었다. 두 군의 비교에서 통계학적 유의성은 Student's t-test에 의해 계산하였다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2. 실험 결과

간독성 약물에 의해 변화한 전체적인 유전자 발현 프로파일을 조사하기 위하여, 일반적으로 알려진 3종의 간독성 약물인 APAP, Diclofenac 및 Thioacetamide를 인간 배아 줄기세포-유래 간세포-유사 세포에 처리하였다. APAP는 간세포의 사멸과 피사를 유도하는 능력이 있다고 보고되고 있다⁹⁻¹¹. Diclofenac은 간세포의 아포토시스, 자가 면역성 간염을 일으키는 것으로 알려져 있다¹²⁻¹⁵. Thioacetamide는 간세포의 사멸, 피사, 섬유화 및 간경변을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁸. 상기 3종의 약물은 공통적으로 아포토시스를 통하여 세포사(cell death)를 유도한다.

우선, IC₅₀ 값의 농도가 생존과 죽음 관련 유전자를 모두 포함하는 유전자 발현 변화를 나타낼 것으로 추측했기 때문에, 세포 생존을 분석을 실시하여 3종의 간독성 약물의 IC₅₀ 값을 확인하였다. APAP는 50-100mM의 농도에서 세포의 약 50%의 생존율을 나타내었고, Diclofenac은 약 1,000mM의 농도에서 세포의 50%의 생존율을 보였다. 그러나, Thioacetamide로 처리한 세포의 생존율은 30-100mM의 범위에서 유의하게 감소했지만 이후 점차 증가하였다. 이 결과는 용해 한도를 초과한 용해에 의한 것일 가능성일 수 있다. 인간 배아 줄기세포-유래 간세포-유사 세포의 Thioacetamide의 IC₅₀ 값은 77mM로 산출되었다(도 2a 내지 도 2c). 본 발명의 발명자는 마이크로어레이 분석을 더 진행하기 위하여 선택한 농도를 사용하였다.

또한, 일반적으로 2-3종의 간독성 약물, 특히, 약물 처리 6시간과 12시간 모두에서 공통적으로 변화하는 유전자의 수를 확인하였다. 일반적으로, 2종 또는 3종의 약물에 의한 업-레귤레이트된 유전자의 수는 107개였고(도 3a), 다운-레귤레이트된 유전자의 수는 191이며(도 3b), 특히, 187개는 APAP와 Thioacetamide의 중복 부분에 있었다. 또한, 3종의 약물에서 공통적으로 업-레귤레이트된 유전자는 19개였다. 2종 또는 3종의 약물 데이터 세트(107개의 업-레귤레이트된 유전자와 191개의 다운-레귤레이트된 유전자)에서 일반적으로 발현된 유전자를 추가 분석을 위해 IPA로 사용하였다.

IPA 결과는 Tox function의 목록이 간독성과 관련되며, 각각의 p 값을 결정함을 보여주었다(도 4a 내지 도 4f). 본 발명의 발명자는 간괴사/세포사, 간 증식, 간 염증/간염, 간세포 폐색시증 증식, 간 이상 증식/과잉 증식이 통계학적 유의성에 의해 평가된 것을 확인하였다. Tox function의 목록에서 간괴사/세포사는 $p < 7.50E-05$ - $2.88E-02$ 로서 가장 중요한 세포 독성 경로인 것으로 확인되었다(도 4c).

IPA는 2-3종의 간 독성 약물 데이터 세트의 중복 부분에서 107개의 유전자의 업-레귤레이트된 유전자 및 191개의 다운-레귤레이트된 유전자에 대한 가능한 생물학적 네트워크를 구축하였다(도 5). 녹색은 유전자 발현의 하향 제어를 나타내고, 빨간색은 유전자 발현의 상향 조절을 나타내었다.

3. 논 의

간독성 약물은 약물 유발 간 손상의 가장 큰 원인이며, 승인된 약물의 회수로 이어진다¹⁹. 전-임상 단계의 시험관 내 및 동물 모델을 사용하여 후보 약물의 독성을 평가한다고 하더라도, 종 간의 대사 효소의 차이와 같은 동물로부터의 보외성(extrapolation)의 제한에 의하여 임상 시험과 같은 약물 개발의 최종 단계에서 간독성이 여전히 문제된다²⁰. 이러한 문제점에 대한 응답으로서 인간 배아 줄기세포 유래의 세포주를 사용한 인간 생물학 기반의 독성 테스트가 요구된다.

본 발명에서는 기존의 간 독성 약물, 즉 APAP, 디클로페낙 및 티오아세트아미드를 인간 배아 줄기세포 유래의 간세포-유사 세포에 처리하였다. 이 세 가지 약물은 아포토시스를 통해 간세포의 세포사를 유도하는 것으로 보고되고 있다.

본 발명자들은 마이크로어레이에 의해 얻어진 게놈 데이터 세트에 따라 약물 유발 간 손상 상태에서 변화된 유전자 발현 패턴을 조사하였다. 본 발명의 발명자는 IPA를 위하여 3종의 간독성 약물에 따라 발현량에서 차이가 있는 유전자의 수를 표시한 벤 다이어그램의 중복 부분에서 107개의 업-레귤레이션된 유전자 및 191개의 다운-

레귤레이션된 유전자를 사용하였다. 그 결과, IPA는 그럴듯한 생물학적 분자 네트워크를 구축하였다.

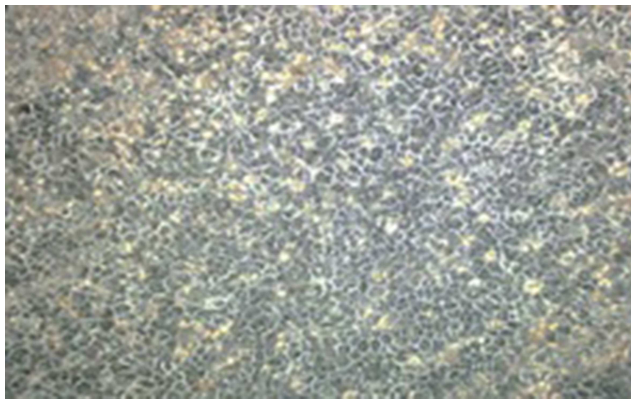
[0058] 독성유전체학의 발전은 분자 메커니즘 측면에서 유해한 약물의 활성을 보다 포괄적으로 이해하는 것에 대한 독성학 분야에 영향을 미친다. 또한, 독성유전체학적 접근은 전-임상 시험에 긴 시간을 요하고, 많은 동물 모델을 필요로하는 고전적인 독성 시험과 비교하여 약물 개발의 비용과 시간을 절감할 수 있을 것으로 기대되고 있다²¹. 그러므로, 다수의 연구 그룹은 약물 개발 파이프 라인의 초기 단계에서 후보 약물의 독성을 예측하기 위해 독성 예측 바이오 마커 또는 바이오마커 서명의 발견과 확인에 집중하고 있다. 이러한 독성 예측 바이오 마커는 세포 독성 분자 메커니즘에 대한 더 유용한 정보를 제공할 수 있다. 예를 들어, DNA 손상 복구에 관여하는 유전자의 발현 수준이 특정 화합물에 의해 증가했을 경우, 그 화합물은 유전 독성 물질로 간주 될 수 있다. 최근 Giel 등은 ToxTracker Assay라는 새로운 독성 분석법을 개발하였다. 이것은 잠재적인 유전 독성 화합물에서 선택적으로 활성화되는 GFP 리포터 시스템이다. 이러한 분석 시스템은 기계적인 정보를 고감도로 제공하는 이점이 있다.

[0059] 4. 결 론

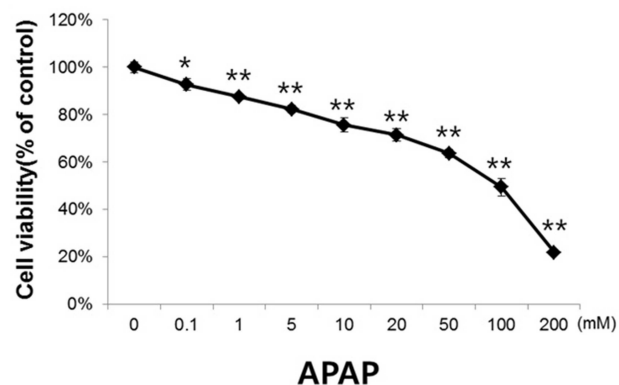
[0060] 본 발명자에 의하여 확인된 3종의 간독성 물질에 공통적으로 발현량이 증가되는 유전자들은 그 자체로서 간독성을 효과적으로 예측하기 위한 바이오마커로서 적용할 수 있으며, 나아가, 간독성 약물 발견에 대한 보다 간편한 독성 분석 시스템의 구축에 적용될 수 있을 것이다.

도면

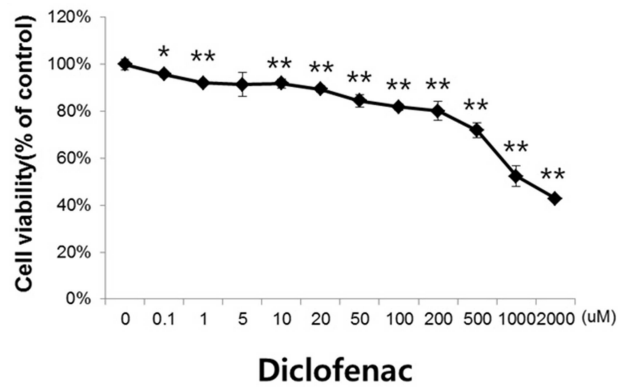
도면1



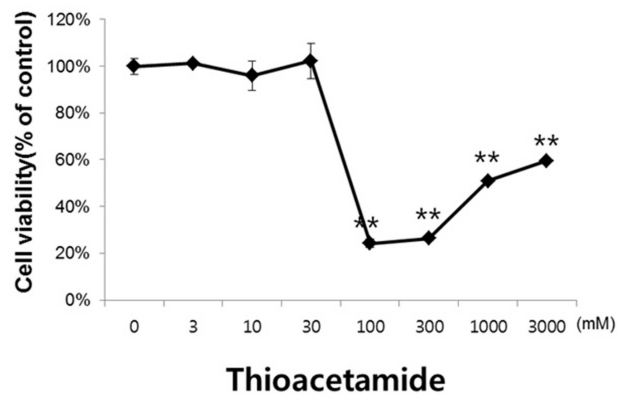
도면2a



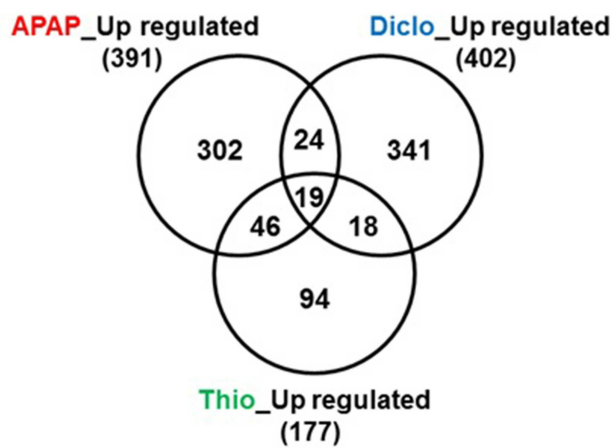
도면2b



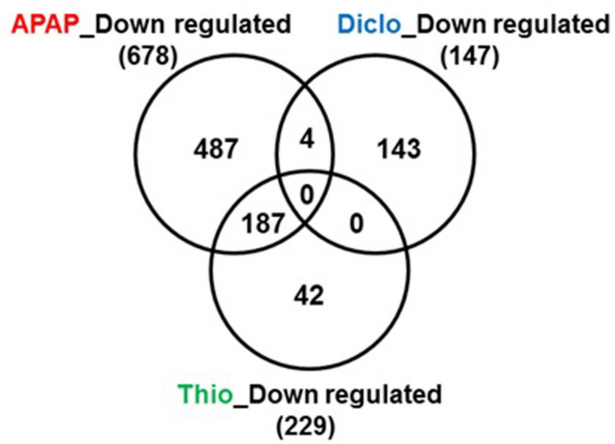
도면2c



도면3a



도면3b



도면4a

Top Canonical Pathways			
Name	p-value	Ratio	
IL-17A Signaling in Fibroblasts	1.59E-03	4/35 (0.114)	
Tetrahydrofolate Salvage from 5,10-methylenetetrahydrofolate	2.04E-03	2/5 (0.4)	
Folate Polyglutamylation	2.04E-03	2/5 (0.4)	
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	4.85E-03	8/180 (0.044)	
IL-17A Signaling in Gastric Cells	5.48E-03	3/25 (0.12)	
Top Upstream Regulators			
Upstream Regulator	p-value of overlap	Predicted Activation State	
PD98059	1.68E-13	Activated	
motexafin gadolinium	4.79E-13	Activated	
triamcinolone acetonide	5.99E-13	Activated	
PDGF BB	9.72E-13	Activated	
TREM1	1.79E-12		

도면4b

Top Diseases and Bio Functions			
Diseases and Disorders			
Name	p-value	# Molecules	
Cancer	1.18E-08 - 1.45E-02	234	
Organismal Injury and Abnormalities	1.18E-08 - 1.45E-02	85	
Reproductive System Disease	1.18E-08 - 8.74E-03	64	
Neurological Disease	1.19E-08 - 1.45E-02	55	
Cardiovascular Disease	3.93E-06 - 1.42E-02	37	
Molecular and Cellular Functions			
Name	p-value	# Molecules	
RNA Post-Transcriptional Modification	2.16E-09 - 1.24E-05	16	
Cell Death and Survival	1.31E-07 - 1.45E-02	95	
Cellular Growth and Proliferation	1.98E-07 - 1.40E-02	110	
Cellular Compromise	4.69E-07 - 1.45E-02	23	
Cellular Function and Maintenance	4.69E-07 - 1.45E-02	72	
Physiological System Development and Function			
Name	p-value	# Molecules	
Connective Tissue Development and Function	1.64E-05 - 1.45E-02	37	
Hematological System Development and Function	2.51E-05 - 1.45E-02	42	
Hematopoiesis	2.51E-05 - 1.40E-02	29	
Lymphoid Tissue Structure and Development	2.51E-05 - 1.31E-02	35	
Organismal Survival	5.92E-05 - 5.92E-05	28	

도면4c

Top Tox Functions

Assays: Clinical Chemistry and Hematology

Name	p-value	# Molecules
Increased Levels of Albumin	2.88E-02 - 2.88E-02	1
Increased Levels of Alkaline Phosphatase	4.29E-02 - 6.30E-01	2
Increased Levels of Bilirubin	8.39E-02 - 8.39E-02	1
Increased Levels of AST	1.85E-01 - 1.85E-01	1
Increased Levels of Creatinine	1.85E-01 - 1.85E-01	1
Cardiotoxicity		
Name	p-value	# Molecules
Cardiac Necrosis/Cell Death	2.82E-03 - 5.68E-02	10
Cardiac Arteropathy	1.42E-02 - 1.45E-02	10
Cardiac Inflammation	1.88E-02 - 2.09E-01	4
Heart Failure	2.88E-02 - 4.52E-01	5
Cardiac Hypertrophy	3.18E-02 - 5.44E-01	9
Hepatotoxicity		
Name	p-value	# Molecules
Liver Necrosis/Cell Death	7.50E-05 - 2.88E-02	12
Liver Proliferation	1.45E-04 - 4.90E-01	10
Liver Inflammation/Hepatitis	1.13E-03 - 3.06E-01	12
Hepatocellular Peroxisome Proliferation	1.45E-02 - 1.45E-02	1
Liver Hyperplasia/Hyperproliferation	1.89E-02 - 5.59E-01	32

도면4d

Top Tox Functions			
Nephrotoxicity			
Name	p-value	# Molecules	
Renal Necrosis/Cell Death	1.31E-07 - 3.26E-01	23	
Glomerular Injury	1.35E-02 - 2.64E-01	7	
Renal Hyperplasia/Hyperproliferation	1.45E-02 - 1.45E-02	1	
Renal Fibrosis	3.02E-02 - 1.59E-01	4	
Renal Atrophy	3.41E-02 - 2.86E-01	3	
Top Regulator Effect Networks			
I. Regulators	Diseases & Functions		Consistency Score
D			
1 FOXO3, IL1A, MAP2K1, PRDM1, SMAD4	apoptosis of hepatoma cell lines (+1 more)		7.778
2 AGT, IRF8, MYC, PDGF BB	colony formation of fibroblast cell lines (+1 more)		5.669
3 FGF2	conversion of cells		-14.000
Top Networks			
I. Associated Network Functions			Score
D			
1 Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease			53
2 Cell Death and Survival, Renal Necrosis/Cell Death, Gene Expression			36
3 Neurological Disease, Cancer, Organismal Injury and Abnormalities			33
4 Cellular Growth and Proliferation, Carbohydrate Metabolism, Small Molecule Biochemistry			31
5 Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation			29

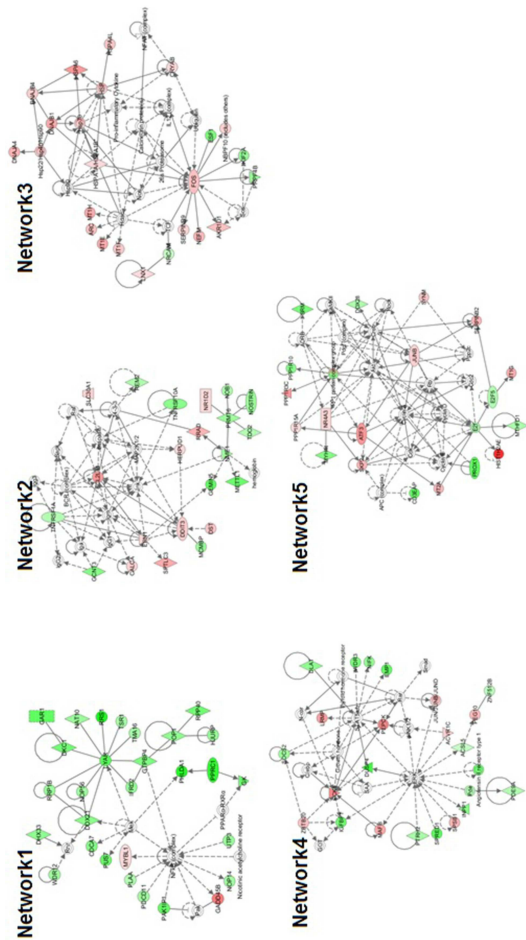
도면4e

Top Tox Lists			
Name	p-value	Ratio	
Acute Renal Failure Panel (Rat)	1.29E-09	11/62 (0.177)	
Renal Necrosis/Cell Death	4.95E-07	23/475 (0.048)	
Liver Necrosis/Cell Death	6.73E-04	12/273 (0.044)	
CAR/RXR Activation	7.73E-04	4/29 (0.138)	
Liver Proliferation	1.45E-03	10/220 (0.045)	
Top Molecules			
Log Ratio up-regulated			
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart	
HIST1H2AE	↑6.964		
HIST1H2BG	↑6.125		
HIST1H4D	↑3.923		
GADD45B	↑3.900		
TIGD3	↑3.683		
HIST1H2BF	↑3.607		
PCK1	↑3.434		
HIST1H4H	↑3.346		
CBX4	↑3.291		
PLAG1	↑3.212		
Log Ratio down-regulated			

도면4f

Top Molecules		
Log Ratio up-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
HIST1H2AE	↑6.964	
HIST1H2BG	↑6.125	
HIST1H4D	↑3.923	
GADD45B	↑3.900	
TIGD3	↑3.683	
HIST1H2BF	↑3.607	
PCK1	↑3.434	
HIST1H4H	↑3.346	
CBX4	↑3.291	
PLAG1	↑3.212	
Log Ratio down-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
ARL14	↓4.661	
RRS1	↓4.487	
PHLDA1	↓4.290	
ST6GAL2	↓4.274	
PPRC1	↓4.058	
FUX1	↓3.932	
DUSP4	↓3.873	
DIEXF	↓3.856	
H3ST3A1	↓3.661	
THBD	↓3.566	

도면5



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Keimyung University
- <120> BIOMARKER COMPOSITION FOR PREDICTION OF THE COMPOUNDS CAUSING HEPATOTOXICITY AND SCREENING METHOD OF THE COMPOUNDS CAUSING HEPATOTOXICITY USING THE SAME
- <130> YP170009
- <160> 17
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 528
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> human CRYAB cds
- <400> 1

atggacatcg ccattccacca cccctggatc cgcgcgccct tctttccttt ccaactcccc

60

agccgcctct ttgaccagtt cttcggagag cacctgttgg agtctgatct tttcccgacg	120
tctacttccc tgagtccctt ctaccttcgg ccacctcctt tcctgcgggc acccagctgg	180
tttgacactg gactctcaga gatgcgcctg gagaaggaca ggttctctgt caacctggat	240
gtgaagcact tctccccaga ggaactcaaa gttaagggtg tgggagatgt gattgaggtg	300
catggaaaac atgaagagcg ccaggatgaa catggtttca tctccaggga gttccacagg	360
aaataccgga tcccagctga tgtagacct ctcaccatta cttcatccct gtcactgat	420
ggggtcctca ctgtgaatgg accaaggaaa caggctctctg gccctgagcg caccattccc	480
atcacccgtg aagagaagcc tgctgtcacc gcagccccc aaaaatag	528
<210> 2	
<211> 1023	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human DNAJB1 cds	
<400> 2	
atgggtaaag actactacca gacgttgggc ctggcccgcg gcgcgtcgga cgaggagatc	60
aagcgggcct accgcccca ggcgtgcgc taccaccgg acaagaaca ggagcccgc	120
gccgaggaga agttcaagga gatcgtgag gccacgacg tgctcagca cccgcgaag	180
cgcgagatct tcgaccgcta cggggaggaa ggcctaaagg ggagtgccc cagtggcgg	240
agcggcgggtg gtgccaatgg tacctctttc agctacacat tccatggaga cctcatgcc	300
atgtttgtctg agttcttcgg tggcagaaat ccttttgaca ctttttttgg gcagcgaac	360
ggggaggaag gcatggacat tgatgacca ttctctggct tccctatggg catgggtggc	420
ttaccaacg tgaactttgg ccgtcccgc tctgccaag agcccgccg aaagaagcaa	480
gatccccag taccacga ccttcgagtc tccttgaag agatctacag cggctgtacc	540
aagaagatga aaatctcca caagcggcta aacccgacg gaaagagcat tcgaaacgaa	600
gacaaaatat tgaccatga agtgaagaag ggtgggaaag aaggaacaa aatcatttc	660
cccaaggaag gagaccagac ctccaacaac attccagctg atatcgtctt tgttttaaag	720
gacaagcccc acaatatctt taagagagat ggctctgatg tcatttatcc tgccaggatc	780
agcctccggg aggtctctgtg tggctgcaca gtgaacgtcc cactctgga cggcaggacg	840
ataccgtcg tattcaaaga tggtatcagg cctggcatgc ggcgaaaagt tcctggagaa	900
ggcctcccc tccccaaaac acccgagaaa cgtggggacc tcattattga gtttgaagt	960
atcttccccg aaaggattcc ccagacatca agaaccgtac ttgacgaggt tcttcaata	1020

tag	1023
<210> 3	
<211> 1143	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human FOS cds	
<400> 3	
atgatgttct cgggcttcaa cgcagactac gaggcgtcat cctcccgtg cagcagcgcg	60
tccccggcgg gggatagcct ctcttactac cactcaccg cagactcctt ctccagcatg	120
ggctcgcctg tcaacgcgca ggacttctgc acggacctgg ccgtctccag tgccaacttc	180
attccacagg tcaactgccat ctcgaccagt ccggacctgc agtggctggt gcagcccgcc	240
ctcgtctcct ccgtggcccc atcgcagacc agagcccctc accctttcgg agtccccgcc	300
ccctccgtg gggcttactc cagggtggc gttgtgaaga ccatgacagg aggccgagcg	360
cagagcattg gcaggagggg caaggtggaa cagttatctc cagaagaaga agagaaaagg	420
agaatccgaa gggaaaggaa taagatggct gcagccaaat gccgcaaccg gaggagggag	480
ctgactgata cactccaagc ggagacagac caactagaag atgagaagtc tgctttgcag	540
accgagattg ccaacctgct gaaggagaag gaaaaactag agttcatcct ggcagctcac	600
cgacctgcct gcaagatccc tgatgacctg ggcttcccag aagagatgtc tgtggcttcc	660
cttgatctga ctgggggcct gccagagggt gccaccccg agtctgagga ggccttcacc	720
ctgcctctcc tcaatgacce tgagcccaag ccctcagtgg aacctgtcaa gagcatcagc	780
agcatggagc tgaagaccga gccctttgat gacttctgt tcccagcatc atccaggccc	840
agtggctctg agacagcccg ctccgtgcca gacatggacc tatctgggtc cttctatgca	900
gcagactggg agcctctgca cagtggctcc ctggggatgg ggcccatggc cacagagctg	960
gagccctgt gcactccggt ggtaacctgt actcccagct gcactgctta cacgtcttcc	1020
ttcgtcttca cctacccga ggctgactcc ttccccagct gtgcagctgc ccaccgcaag	1080
ggcagcagca gcaatgagcc ttctctgac tcgtcagct caccacgct gctggcctg	1140
tga	1143
<210> 4	
<211> 483	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> human GADD45B cds

<400> 4

atgacgctgg aagagctcgt ggcgtgacgac aacgcggcgc agaagatgca gacggtgacc	60
gccgcggtgg aggagctttt ggtggccgct cagcgccagg atcgccctcac agtgggggtg	120
tacgagtcgg ccaagttgat gaatgtggac ccagacagcg tggtcctctg cctcttggcc	180
attgacgagg aggaggagga tgacatcgcc ctgcaaatcc acttcacgct catccagtc	240
ttctgctgtg acaacgacat caacatcgtg cgggtgtcgg gcatgcagcg cctggcgag	300
ctcctgggag agccggccga gaccagggc accaccaggg cccgagacct gcattgtctc	360
ctggtcacga accctcacac ggacgcctgg aagagccacg gcttgggtga ggtggccagc	420
tactggaag aaagccgggg caacaaccag tgggtccctt acatctctct tcaggaacgc	480
tga	483

<210> 5

<211> 1926

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human HSPA1A cds

<400> 5

atggccaaag ccgcggcgat cggcatcgac ctgggcacca cctactcctg cgtgggggtg	60
ttccaacacg gcaaggtgga gatcatcgcc aacgaccagg gcaaccgcac cccccccagc	120
tacgtggcct tcacggacac cgagcggctc atcggggatg cggccaagaa ccaggtggcg	180
ctgaaccgcg agaacaccgt gtttgacgag aagcggctga ttggccgcaa gttcggcgac	240
ccggtggtgc agtcggacat gaagcactgg cctttccagg tgatcaacga cggagacaag	300
cccaaggtgc aggtgagcta caagggggag accaaggcat tctaccccga ggagatctcg	360
tccatggtgc tgaccaagat gaaggagatc gccgagcgt acctgggcta cccggtgacc	420
aacgcggtga tcaccgtgcc ggcctacttc aacgactgc agcgccaggc caccaaggat	480
gcgggtgtga tcgcggggct caacgtgctg cggatcatca acgagccac ggccgccgcc	540
atcgctacg gcctggacag aacgggcaag ggggagcgca acgtgctcat ctttgacctg	600
ggcgggggca ccttcgactg gtccatcctg acgatcgacg acggcatctt cgaggtgaag	660
gccacggcgg gggacaccca cctgggtggg gaggactttg acaacaggct ggtgaaccac	720
ttcgtggagg agttcaagaa aaaacacaag aaggacatca gccagaacaa gcgagccgtg	780
aggcggctgc gcaccgcctg cgagagggcc aaggaggccc tgtcgtccag caccagggcc	840

agcctggaga tcgactccct gtttgagggc atcgacttct acacgtccat caccagggcg 900
 aggttcgagg agctgtgtc cgacctgttc cgaagcacc tggagcccgt ggagaaggct 960
 ctgcgcgacg ccaagctgga caaggcccag attcacgacc tggctcctggt cgggggctcc 1020
 acccgcatcc ccaaggtgca gaagctgtct caggacttct tcaacgggcg cgacctgaac 1080
 aagagcatca accccgacga ggctgtggcc tacggggcgg cgggtcaggc ggccatcctg 1140
 atgggggaca agtccgagaa cgtgcaggac ctgctgtctc tggacgtggc tccccgtctg 1200
 ctggggctgg agacggccgg aggcgtgatg actgccctga tcaagcgcaa ctccaccatc 1260

cccaccaagc agacgcagat cttcaccacc tactccgaca accaaccgg ggtgctgac 1320
 caggtgtacg agggcgagag ggccatgacg aaagacaaca atctgttggg gcgcttcgag 1380
 ctgagcggca tccctccggc cccaggggc gtccccaga tcgaggtgac cttcgacatc 1440
 gatgccaacg gcatcctgaa cgtcacggcc acggacaaga gcaccggcaa ggccaacaag 1500
 atcaccatca ccaacgacaa gggccgcctg agcaaggagg agatcgagcg catggtgcag 1560
 gaggcggaga agtacaagc ggaggacgag gtgcagcgcg agagggtgtc agccaagaac 1620
 gccctggagt cctacgcctt caacatgaag agcgccgtgg aggatgaggg gctcaagggc 1680

aagatcagcg aggcggacaa gaagaaggtg ctggacaagt gtcaagaggt catctcgtgg 1740
 ctggacgcca acaccttggc cgagaaggac gagtttgagc acaagaggaa ggagctggag 1800
 caggtgtgta accccatcat cagcggactg taccagggtg ccggtggtcc cgggcctggg 1860
 ggcttcgggg ctcagggtcc caaggagggg tctgggtcag gccccacat tgaggaggtg 1920
 gattag 1926

<210> 6

<211> 1932

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human HSPA6 cds

<400> 6

atgcaggccc cacgggagct cgcggtgggc atcgacctgg gcaccaccta ctctgcgtg 60
 ggctgtttc agcagggccg cgtggagatc ctggccaacg accagggcaa ccgcaccacg 120
 cccagctacg tggccttcac cgacaccgag cggctggtcg gggacgcggc caagagccag 180
 gcggccctga acccccacaa caccgtgttc gatccaagc ggctgatcgg gcgcaagtcc 240
 gcggacacca cgggtgcagtc ggacatgaag cactggccct tccgggtggt gagcgagggc 300
 ggcaagccca aggtgcgcgt atgctaccgc ggggaggaca agacgttcta ccccaggag 360

atctcgtcca tggctgtgag caagatgaag gagacggccg aggcgtacct gggccagccc	420
gtgaagcacg cagtgatcac cgtgcccgc tatttcaatg actcgcagcg ccaggccacc	480
aaggacgagg gggccatcgc ggggtcaac gtgttgcgga tcatcaatga gcccacggca	540
gctgccatcg cctatgggct ggaccggcgg ggcgcgggag agcgcaacgt gctcatTTTT	600
gacctgggtg ggggcacctt cgatgtgtcg gttcttcca ttgacgtgg tgtctttgag	660
gtgaaagcca ctgctggaga taccacctg ggaggagagg acttcgaca cggctcgtg	720
aaccacttca tggagaatt ccggcggaag catgggaagg acctgagcgg gaacaagcgt	780
gccctgcga ggctgcgcac agcctgtgag cgcgccaagc gcacctgtc ctccagcacc	840
caggccacc tggagataga ctccctgtt gagggcgtgg acttctacac gtccatcact	900
cgtgcccgtt ttgaggaact gtgctcagac ctcttcgca gcacctgga gccggtggag	960
aaggccctgc gggatgcca gctggacaag gccagattc atgacgtcgt cctggtgggg	1020
ggctccacac gcatcccaa ggtgcagaag ttgctgcagg acttcttcaa cggcaaggag	1080
ctgaacaaga gcatcaacc tgatgaggct gtggcctatg gggctgctgt gcaggcggcc	1140
gtgttgatgg gggacaaatg tgagaaagt caggatctc tctgctgga tgtggctccc	1200
ctgtctctgg ggctggagac agcaggtggg gtgatgacca cgctgatcca gaggaacgcc	1260
actatccca ccaagcagac ccagacttt accacctact cggacaacca gcctggggtc	1320
ttcatccagg tgiatgaggg tgagagggcc atgaccaagg acaacaacct gctggggcgt	1380
tttgaactca gtggcatccc tctgcccc cgtggagtcc ccagataga ggtgactttt	1440
gacattgatg ctaatggcat cctgagcgtg acagccactg acaggagcac aggttaaggct	1500
aacaagatca ccatcacaa tgacaaggc cggctgagca aggaggaggt ggagaggatg	1560
gttcatgaag ccgagcagta caagctgag gatgagggc agagggacag agtggctgcc	1620
aaaaactcgc tggaggccca tgtcttccat gtgaaagggt ctttgcaaga ggaaagcctt	1680
agggacaaga ttcccgaaga ggacaggcgc aaaatgcaag acaagtgtcg ggaagtcctt	1740
gcctggctgg agcacaacca gctggcagag aaggaggagt atgagcatca gaagagggag	1800
ctggagcaaa tctgtcggc catcttctcc aggctctatg gggggcctgg tgtccctggg	1860
ggcagcagtt gtggcactca agcccgccag ggggaccca gcaccggccc catcattgag	1920
gaggttgatt ga	1932
<210> 7	
<211> 186	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> human MT1E cds

<400> 7

atggacccca actgctcttg cgccactggt ggctcctgca cgtgcgccgg ctctgcaag	60
tgcaaagagt gcaaatgcac ctctgcaag aagagctgct gttcctgctg ccccgtaggc	120
tgtgccaagt gtgcccaggg ctgctctgca aaaggggcat cggagaagtg cagctgctgt	180
gcctga	186

<210> 8

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human MT1F cds

<400> 8

atggacccca actgctcctg cgccgctggt gtctcctgca cctgcgctgg ttctgcaag	60
tgcaaagagt gcaaatgcac ctctgcaag aagagctgct gctcctgctg ccccgtaggc	120
tgtagcaagt gtgcccaggg ctgtgtttgc aaaggggctg cagagaagtg cagctgctgc	180
gactga	186

<210> 9

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human MT1G cds

<400> 9

atggacccca actgctcctg tgccgctggt gtctcctgca cctgcgccag ctctgcaag	60
tgcaaagagt gcaaatgcac ctctgcaag aagagctgct gctcctgctg ccccgtaggc	120
tgtgccaagt gtgcccaggg ctgcatctgc aaaggggcat cggagaagtg cagctgctgc	180
gcctga	186

<210> 10

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human MT1H cds

<400> 10

atggacccca actgctcctg cgaggctggt ggctcctgcg cctgcgccgg ctctgcaag 60
tgcaaaaagt gcaaatgcac ctctgcaag aagagctgct gctcctgttg cccctgggc 120
tgtgccaagt gtgccacagg ctgcatctgc aaagggcgct cagagaagtg cagctgctgt 180

gcctga 186

<210> 11

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human MT1M cds

<400> 11

atggacccca actgctcctg caccactggt gtctcctgcg cctgcaccgg ctctgcaag 60
tgcaaaagagt gcaaatgcac ctctgcaag aagagctgct gctcctgtg cccctgggc 120
tgtgccaagt gtgccacagg ctgtgtctgc aaagggacgt tggagaactg cagctgctgt 180
gcctga 186

<210> 12

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human MT1X cds

<400> 12

atggacccca actgctcctg ctgcctgtt ggctcctgtg cctgtgccgg ctctgcaaa 60
tgcaaaagagt gcaaatgcac ctctgcaag aagagctgct gctcctgtg cctgtgggc 120
tgtgccaagt gtgccacagg ctgcatctgc aaagggacgt cagacaagtg cagctgctgt 180
gcctga 186

<210> 13

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> human MT2A cds

<400> 13

atggatccca actgctcctg cgccgccggt gactcctgca cctgcgccgg ctctgcaaa 60
tgcaaaagagt gcaaatgcac ctctgcaag aaaagctgct gctcctgtg cctgtgggc 120

tggtccaagt gtgcccaggg ctgcatctgc aaaggggcgt cggacaagtg cagctgctgc	180
gcctga	186
<210> 14	
<211> 2751	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human NEFM cds	
<400> 14	
atgagctaca cgttggactc gctgggcaac ccgtccgcct accggcgggt aaccgagacc	60
cgctcgagct tcagcccgct cagcggctcc ccgtccagtg gcttccgctc gcagtcgtgg	120
tcccgcggct cgcccgac cgtgtcctcc tcctataagc gcagcatgct cgccccgcgc	180
ctcgcttaca gctcggccat gctcagctcc gccgagagca gccttgactt cagccagtcc	240
tcgtccctgc tcaacggcgg ctccggaccg ggcggcgact acaagctgtc ccgtccaac	300
gagaaggagc agctgcagg gctgaacgac cgctttgccg gctacataga gaaggtgcac	360
tacctggagc agcagaataa ggagattgag gcggagatcc aggcgctgcg gcagaagcag	420
gcctcgcacg ccagctggg cgacgcgtac gaccaggaga tccgcgagct gcgcgccacc	480
ctggagatgg tgaaccacga gaaggctcag gtgcagctgg actcggacca cctggaggaa	540
gacatccacc ggctcaagga gcgctttgag gaggaggcgc ggttgcgcga cgacactgag	600
gcggccatcc gcgcgtgcg caaagacatc gaggaggcgt cgctggtcaa ggtggagctg	660
gacaagaagg tgcagtcgt gcaggatgag gtggccttcc tgcggagcaa ccacaggag	720
gaggtggcgc accttctggc ccagatccag gcatcgcaca tcacggtgga gcgcaaagac	780
tacctgaaga cagacatctc gacggcgtg aaggaaatcc gctcccagct cgaaagccac	840
tcagaccaga atatgcacca ggccgaagag tggttcaaat gccgctacgc caagctcacc	900
gaggcggccg agcagaacaa ggaggccatc cgctccgcca aggaagagat cgccgagtac	960
cggcgccagc tgcagtcgga gagcatcgag ctagagtcgg tgcgcggcac caaggagtec	1020
ctggagcggc agctcagcga catcgaggag cgccacaacc acgacctcag cagctaccag	1080
gacaccatcc agcagctgga aaatgagctt cggggcacaa agtgggaaat ggctcgtcat	1140
ttgcgcgaat accaggacct cctcaacgtc aagatggctc tggatataga aatcgtgctg	1200
tacagaaaac tcctggaggg tgaagagact agatttagca catttgcagg aagcatcact	1260
gggccactgt atacacaccg acccccaatc acaatatcca gtaagattca gaaacccaag	1320
gtggaagctc ccaagcttaa ggtccaacac aaatttgtcg aggagatcat agaggaaacc	1380

aaagtggagg atgagaagtc agaaatggaa gaggccctga cagccattac agaggaattg	1440
gccgtttcca tgaaggaaga gaagaaagaa gcagcagaag aaaaggaaga ggaacccgaa	1500
gctgaagaag aagaagtagc tgccaaaaag tctccagtga aagcaactgc acctgaagtt	1560
aaagaagagg aaggggaaaa ggaggaagaa gaaggccagg aagaagagga ggaagaagat	1620
gagggagcta agtcagacca agccgaagag ggaggatccg agaaggaagg ctctagttaa	1680
aaagaggaag gtgagcagga agaaggagaa acagaagctg aagctgaagg agaggaagcc	1740
gaagctaaag aggaaaagaa agtggaggaa aagagtgagg aagtggctac caaggaggag	1800
ctggtggcag atgccaaggt ggaaaagcca gaaaaagcca agtctcctgt gccaaaatca	1860
ccagtggaag agaaaggcaa gtctcctgtg cccaagtcac cagtggaga gaaaggcaag	1920
tctcctgtgc ccaagtcacc agtggagag aaaggcaagt ctctgtgcc gaaatcacca	1980
gtggaagaga aaggcaagtc tctgtgtca aaatcaccag tggaagagaa agccaaatct	2040
cctgtgcaa aatcaccagt ggaagaggca aagtcaaaag cagaagtggg gaaagtgaa	2100
cagaaagagg aagaagaaaa ggaagtcaag gaagctcca aggaagagaa ggtagagaaa	2160
aaggaagaga aaccaaagga tgtgccagag aagaagaaag ctgagtcacc tgtaaaggag	2220
gaagctgtgg cagaggtggt caccatcacc aaatcggtaa aggtgcactt ggagaaagag	2280
accaaagaag aggggaagcc actgcagcag gaaaaagaga aggagaaagc gggaggagag	2340
ggaggaagtg aggggaagg gagtgataaa ggtgccaagg gatccaggaa ggaagacata	2400
gctgtcaatg gggaggtaga aggaaaagag gaggtagagc aggagaccaa ggaaaaagc	2460
agtgggaggg aagaggagaa aggcgtgtc accaatggcc tagacttgag cccagcagat	2520
gaaaagaagg ggggtgataa aagtgaggag aaagtgggtg tgaccaaacc ggtagaaaaa	2580
atcaccagtg aggggggaga tgggtctacc aaatacatca ctaaactgt aaccgtcact	2640
caaaagggtg aagagcatga agagaccttt gaggagaaac tagtgtctac taaaaagta	2700
gaaaaagtca cttcacacgc catagtaaag gaagtcaccc agagtgacta a	2751
<210> 15	
<211> 927	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human RRAD cds	
<400> 15	
atgacctga acggcggcgg cagcggagcg ggccggagcc gcggtggggg ccaggagcgc	60
gagcgccgtc ggggcagcac accctggggc cccgccccgc cgctgcaccg ccgcagcatg	120

ccggtggacg agcgcgacct gcaggcggcg ctgaccccg gtgccctgac ggccggccgcg 180
gcccgggacgg ggacccaggg tcccaggctg gactggcccc aggactccga ggactcgctc 240
agctcagggg gcagcgactc agacgagagc gtttacaagg tgctgctgct gggggcgccc 300
ggcgtgggca agagcgccct ggcgcgcatc ttcggcggtg tggaggacgg gcctgaagca 360
gaggcagcag ggcacaccta tgatcgctcc attgtagtgg acggagaaga ggcatactc 420
atggtctacg acatttggga gcaggacggg ggccgctggt tgcccggcca ctgcatggcc 480
atgggggatg cctatgtcat tgtgtactca gtgacggaca agggcagctt cgagaaggcc 540

tcagaactgc ggggccagct gcggcgtgca cggcaaacag atgatgtgcc catcatcctc 600
gtgggcaaca agagcgacct ggtgcgctct cgtgaggtct cggtggatga gggccgggcc 660
tgcgcggtgg tctttgactg caagttcatt gagacatcag cggcattgca ccacaatgtc 720
caggcgctgt ttgaaggtgt cgtgcgccag atacgcctgc gcagggacag caaagaagcc 780
aacgcacgac ggcaagcagg caccggagg cgagagagcc ttggcaaaaa ggcgaagcgc 840
ttcttgggcc gcatcgtagc tcgtaacagc cgcaaatgg cctttcgcg caaatccaag 900
tcctgccacg acctctcggt tctctag 927

<210> 16

<211> 1131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human SERPINB9 cds

<400> 16

atggaaactc tttctaagc aagtgtact tttgccatc gccttttaa gatactgtgt 60
caagataacc cttgcacaa cgtgttctgt tctcctgtga gcatctctc tgccctggcc 120
atggtttctc taggggcaaa gggaacacc gcaaccaga tggcccaggc actgtcttta 180
aacacagagg aagacattca tcgggctttc cagtcgcttc tactgaagt gaacaaggct 240
ggcacacagt acctgctgag aacggccaac aggtctttg gagagaaaac ttgtcagttc 300

ctctcaacgt ttaaggaatc ctgtcttcaa tttaccatg ctgagctgaa ggagctttcc 360
tttatcagag ctgcagaaga gtccaggaaa cacatcaaca cctgggtctc aaaaaagacc 420
gaaggtaaaa ttgaagagt ttgtccgggt agctcaattg atgcagaaac caggctggtt 480
cttgtcaatg ccatctactt caaaggaaag tggaatgaac cgtttgacga aacatacaca 540
agggaaatgc cctttaaaat aaaccaggag gagcaaaggc cagtcagat gatgtatcag 600
gaggccacgt ttaagctcgc ccacgtgggc gaggtgcgcg cgcagctgct ggagctgccc 660

tacgccagga aggagctgag cctgctgggtg ctgctgcctg acgacggcgt ggagctcagc	720
acggtggaaa aaagtctcac ttttgagaaa ctcacagcct ggaccaagcc agactgtatg	780
aagagtactg aggttgaagt tctccttcca aaatttaaac tacaagagga ttatgacatg	840
gaatctgtgc ttcggcattt gggaattgtt gatgccttcc aacagggcaa ggctgacttg	900
tcggcaatgt cagcggagag agacctgtgt ctgtccaagt tegtgcacaa gagttttgtg	960
gaggtgaatg aagaaggcac cgaggcagcg gcagcgtcga gctgctttgt agttgcagag	1020
tgctgcatgg aatctggccc caggttctgt gctgaccacc ctttcctttt cttcatcagg	1080
cacaacagag ccaacagcat tctgttctgt ggcaggttct catcgccata a	1131
<210> 17	
<211> 888	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human SHISA2 cds	
<400> 17	
atgtggggcg ctgcgcgtc gtccgtctcc tcacctgga acgcccgttc gtcctgcag	60
ctgctgctgg ctgcgtgct ggccgcccgg gcgagggcca gcggcgagta ctgccacggc	120
tggtggacg cgcagggcgt ctggcgcatc ggcttccagt gtcccagagc cttcgacggc	180
ggcgacgcca ccatctgctg cggcagctgc gcgttgcgt actgtgctc cagcgcagag	240
gcgcgcctgg accagggcgg ctgcgacaat gaccgccagc agggcgctgg cgagcctggc	300
cgggcggaca aagacggccc cgacggctcg gcagtgccca tctacgtgcc gtccctcatt	360
gttggtccg tgtttgtcgc ttttatcctc ttggggctcc ttggtgcagc ctgttgcctc	420
agatgtctcc ggctaagca ggatccccag cagagccgag ccccaggggg taaccgcttg	480
atggagacca tccccatgat cccagtgcc agcacctccc gggggtcgtc ctcacgccag	540
tccagcacag ctgccagttc cagctccagc gccaaactcag gggcccgggc gcccccaaca	600
aggtcacaga ccaactgttg ctggccgga gggacatga acaactgta tgtcaacatg	660
cccacgaatt tctctgtgct gaactgtcag caggccaccc agattgtgcc acatcaaggg	720
cagtatctgc atccccata cgtgggggtac acggtgcagc acgactctgt gcccattgaca	780
gctgtgccac ctttcatgga cggcctgcag cctggctaca ggcagattca gtcccccttc	840
cctcacacca acagtgaaca gaagatgtac ccagcgtga ctgtataa	888