

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2019-0016172 (43) 공개일자 2019년02월18일
	(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/09 (2010.01) A61K 31/7105 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01) (52) CPC특허분류 C12N 5/0693 (2013.01) A61K 31/7105 (2013.01) (21) 출원번호 10-2017-0099795 (22) 출원일자 2017년08월07일 심사청구일자 2017년08월07일	(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 차혁진 서울특별시 강남구 선릉로130길 19, 101동 106호 (삼성동, 서광아파트) 권옥선 서울특별시 강북구 삼양로19길 25 102동 803호 (미아동, 삼성래미안트리베라1차아파트) (74) 대리인 윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 10 항

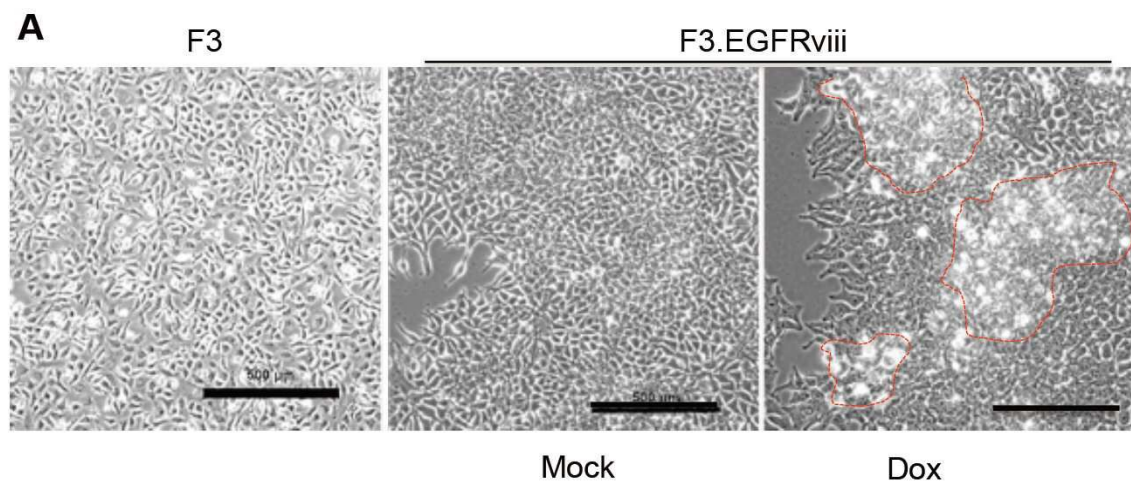
(54) 발명의 명칭 EGFRviii 발현을 이용한 신경 줄기세포의 종양화 유도방법

(57) 요약

본 발명은 신경교종 (Glioma)의 유래가 되는 종양성 뇌신경 줄기세포의 유도 방법; 상기 형성된 종양성 뇌신경 줄기세포를 이용한 신경교종 치료제 후보물질을 스크리닝 하는 방법; 및 암(특히, 신경교종)의 치료 조성물에 관한 것이다. 본 발명자들은 신경교종 환자들에게서 많이 발견되는 EGFR의 돌연변이 형태인 EGFRviii 돌연변이 유

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



전자를 세포에 발현 가능한 형태로 도입시키기 위한 방법으로 테트라사이클린 EGFRviii 유도 벡터를 제작하였고, 이를 통해 암세포와 뇌신경 줄기세포의 특성을 모두 보유하는 종양성 뇌신경 줄기세포를 제조하였다. 또한, 본 발명자들은 종양성 뇌신경 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 LAMTOR3 유전자 발현을 shRNA 를 통해 억제함으로써 종양성 뇌신경 줄기세포의 줄기세포성을 상실함을 확인으로서, 당업계에서 개발한 항암제를 통해 LAMTOR3 발현정도를 억제하여 다형성 교아종의 새로운 치료 방법으로 응용할 수 있음을 밝혔다. 따라서 본 발명의 종양성 뇌신경 줄기세포는 다형성 교아종의 발생 과정 연구 및 항암 치료제 후보물질 발굴 시 스크리닝에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/71 (2013.01)

G01N 33/5011 (2013.01)

G01N 33/5058 (2013.01)

C12N 2502/081 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A2A01005970

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자 지원 사업

연구과제명 미분화만능줄기세포 검출과 사멸 유도를 통한 기형종 형성 억제 연구

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093822

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중점 연구소 지원 사업

연구과제명 세포 손상 제어 소재 발굴

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 제 1 서열로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 EGFRviii (type III EGFR mutation) 발현 유전자 전 달체를 신경줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)의 종양화 유도방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 종양화 유도방법은 상기 EGFRviii 발현 벡터가 도입된 신경줄기세포를 구형 배양 (sphere culture) 조건 하에서 배양하여 신경 암 줄기성(neural cancer stemness)을 증가시키는 단계를 추가적으로 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

다음 단계를 포함하는 EGFRviii 발현 세포주(EGFRviii inducible cell line)를 이용한 항암물질의 스크리닝 방법:

- (a) EGFRviii (type III EGFR mutation) 발현 세포주에 시험물질을 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 EGFRviii 발현 세포주에서 (i) 세포구 형성(sphere formation) 증감, (ii) 비부착증식(anchorage independent growth) 정도 또는 LAMTOR3 (Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3)의 발현을 분석하는 단계;를 포함하며,

상기 단계 (b)에서 시험물질 비처리 세포주와 비교하여, 시험물질을 처리한 EGFRviii 발현 세포주의 세포구 형성이 감소하거나, 비부착성 증식이 감소하거나, 또는 LAMTOR3의 mRNA 또는 단백질 발현이 감소하는 경우 항암물질로 판단한다.

청구항 4

다음을 포함하는 암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물:

- (a) (i) LAMTOR3 (Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3) 단백질 발현을 억제하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 담체의 억제학적 유효량; 및
- (b) 억제학적으로 허용되는 담체(carrier).

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 LAMTOR3 단백질은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 서열목록 제2 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, shRNA, siRNA, RNAi, miRNA 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 shRNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 서열목록 제5 서열 및 제 6 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 4 항에 있어서, 상기 암은 신경교종, 구강암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암 또는 요관암인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 EGFRviii 발현을 이용한 신경줄기세포의 종양화 유도방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 종양 형성(tumorigenesis) 및 세포 가소성(cellular plasticity)과 관련된 생물학적 특성을 나타내는 세포 집단의 하위 집합은 암 줄기 세포 (cancer stem cells, CSCs) 또는 종양 개시 세포 (tumor-initiating cells, TICs)로 지정된다. 신경 교종 [glioma stem cell (GSCs) 또는 신경 교종 유사세포 (glioma stem-like cells, GSLCs)]에서 CSC가 화학 요법 및 방사선 요법에 대한 내성으로 인해 임상 결과가 좋지 않은 주요 원인이 될 수 있다는 새로운 증거가 제시되었다. 따라서 GSCs는 신경교종 치료의 중요한 목표로 간주되며, GSCs의 생물학을 이해하기 위한 연구가 활발히 진행 중이다 [Jhaveri N et al., *Cancer Lett* 2016, 371:240-250; Lee JS et al., *Neuro Oncol* 2015, 17:95-106].

[0004] 최근에 종양 변형(neoplastic transformation)이 나타나는 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs)가 신경 교종 형성에 관여한다는 것이 증명되었다(Alcantara Llaguno S et al., *Cancer Cell* 2009, 15:45-56; Sanai N et al., *N Engl J Med* 2005, 353:811-822; Koso H et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109:E2998-3007). NSC는 분화된 신경아 교세포보다 발암성 변이에 더 민감하다. 예컨대, v-myc (HB.F3 세포) 도입으로 확립된 불멸화된 인간 태아 NSC는 유전자 변형 NSC 또는 신경 교세포의 가능한 치료 효과를 조사하기 위한 모델 시스템으로 널리 사용되며, Akt가 아닌 H-Ras (암성 신경줄기세포 (CNSCS)를 형성함: F3.Ras 세포)에 의한 발암성 변형을 겪는다. 특히, F3 세포에서 유래한 희소 돌기 아교 세포는 H-Ras에 의한 종양 형질 전환에 내성을 가지며, 이는 NSC가 신경교세포 (예: 성상 세포 및 희소 돌기 아교 세포)보다 종양 전이에 더 민감하다는 것을 의미한다. 중요한 것은 F3.Ras 세포는 GSCs와 유사한 분자적 성질을 가지고 있으며, 이는 일반적인 기전이 GSCs와 CNSCs 모두에서 신경 암 줄기성을 조절한다는 것을 암시한다.

[0005] 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)의 증폭 및 기능 획득변이(gain-of-function)는 뇌종양에서 가장 흔한 유전적 변형이며, 신경교종에서 약 40 %의 빈도를 갖는다. 특히 III 형 EGFR 돌연변이 (EGFRviii 또는 del2-7 EGFR라고도 함)는 EGFR의 세포 외 도메인에서 267 개의 아미노산이 인-프레임(in-frame) 결실되어 구성적인 활성화를 일으킨다. 이것은 다형성 교모세포종 (glioblastoma multiforme, GBM)에서 가장 흔한 유전적 돌연변이이며 전반적

으로 20-30 %의 유병률을 보인다. EGFR의 downstream effector 인 RAS는 많은 종류의 암에서 가장 빈번하게 변이된 발암유전자(oncogenes) 중 하나이지만, 신경교종에서의 RAS 돌연변이는 상대적으로 드물다. RAS 돌연변이 대신에 MEK/ERK1/2에 대한 Ras 신호 전달 조절 인자인 NF1 (neurofibromin 1)에서 기능 상실 돌연변이가 관찰되었다. 이와 동일하게, NF1과 Trp53 돌연변이된 마우스에서는 줄기 세포 특징을 가진 성상 세포종(astrocytoma)이 나타났다. 마찬가지로 Pten (phosphatase and tensin homolog)과 Trp53의 이중 녹아웃(knockout)은 일차 인간 GBM과 유사하고, NSC자가-재생 능력을 증가시키는 고등급 악성 신경 교종을 유발한다. 주목할 것은, PTEN 기능손실과 MEK/ERK1/2 활성화로 인한 Akt 활성화는 GSCs의 자가-재생(self-renewal)과 종양 형성(tumorigenicity)에 중요하다는 것이다. 그러나, EGFR 활성화와 관련된 Akt와 MEK/ERK1/2 다운스트림 사이의 차이점은 신경 교종 및 GSCs에서 아직 명확하게 밝혀지지 않았다.

[0006] MP1 (MEK partner-1)을 코딩하는 LAMTOR3 (Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3)은 ERK1 활성화를 가능하게 하는 MEK1과 ERK1의 스캐폴딩 단백질(scaffolding protein)로 처음 발견되었다. LAMTOR3은 endosomal signaling의 주요 조절자로 잘 알려져 있으며 MEK와 ERK 과발현을 통한 암에서의 MP1의 역할은 최근에 체장 중앙 발생에서 입증되었다[Jun S et al., *Cell Rep* 2013, 5:314-322].

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 신경교종 또는 신경줄기세포의 신경 암 줄기성(neural cancer stemness)을 억제할 수 있는 항암 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 EGFRviii-발현 양성 신경줄기세포(cancerous neural stem cells, CNCs) 모델을 구축하였고 이를 이용하여 신경 암 줄기성 유지와 관련된 분자적 기전을 밝혔다. 본 발명에서는 EGFRviii를 안정적으로 발현하는 F3.EGFRviii CNCs 세포주를 이용하여, 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme, GBM)에서 LAMTOR3가 MEK1/ERK1/2 신호경로를 조절하는 중요한 신호 매개자임을 밝혔고, MEK1/ERK1/2 경로의 활성화로 신경 암 줄기성(neural cancer stemness)을 유지 및 LAMTOR3 발현 억제를 통한 항암효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)의 종양화 유도방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 항암물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 1 서열로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 EGFRviii (type III EGFR mutation) 발현 벡터를 신경줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)의 종양화 유도방법을 제공한다.

[0019] 본 발명자들은 신경교종 또는 신경줄기세포의 신경 암 줄기성(neural cancer stemness)을 억제할 수 있는 항암 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, EGFRviii-발현 양성 신경줄기세포(cancerous neural stem cells, CNCs) 모델을 구축하였고 이를 이용하여 신경 암 줄기성 유지와 관련된 분자적 기전을 밝혔다. 본 발명에서는 EGFRviii를 안정적으로 발현하는 F3.EGFRviii CNCs 세포주를 이용하여, 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme, GBM)에서 LAMTOR3가 MEK1/ERK1/2 신호경로를 조절하는 중요한 신호 매개자임을 밝

했고, MEK1/ERK1/2 경로의 활성화로 신경 암 줄기성(neural cancer stemness)을 유지 및 LAMTOR3발현 억제를 통한 항암효과를 확인하였다.

[0021] 신경 교종 줄기 세포 (Glioma stem cell, GSCs)는 악물 내성이 높고 분화 가능성이 있기 때문에 신경교종 재발의 주요 원인이 된다. 따라서 GSCs의 '암 줄기성 (cancer stemness)'을 조절하는 분자 메커니즘을 이해하는 것이 신경 교종 환자의 예후를 향상시키는 데 특히 중요하다. 본 발명자들은 이전 연구에서 H-Ras 종양 유전자를 사용하여 불멸화된(immortalized) 인간 신경 줄기 세포 (F3 세포)로부터 암 신경 줄기 세포 (cancerous neural stem cells, CNCs)를 구축하였다. 즉, 본 발명에서는 뇌암에서 빈번하게 발생하는 EGFRviii 돌연변이를 이용하여 다른 CNC 세포주(F3.EGFRviii)를 확립하였으며, 이 신규 세포주는 세포구 배양(spheroid culture)에 의해 줄기성(stemness)을 나타내었다.

[0022] 하기 실시예에서와 같이, 본 발명의 F3.EGFRviii 세포주는 인 비트로에서 종양 발생이 높았으며, 세포구 배양(spheroid culture) 조건 하에서 SOX2와 NANOG와 같은 암 줄기성과 관련된 다양한 유전자의 발현뿐만 아니라 높은 ERK1/2 활성을 나타내었다. 메타 분석(meta-analysis), PCR 슈퍼 어레이 및 후속 생화학 분석을 통해, MP1 (MEK partner-1, LAMTOR3 유전자에 의해 코딩됨)의 유도가 세포구 배양 조건 하 암 줄기의 획득 과정에서 ERK1/2 활성을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. MP1 유전자의 높은 발현은 뇌암의 나쁜 예후와 밀접한 관련이 있다. 결론적으로 MP1은 ERK 활성을 유도하여 EGFRviii-발현 신경 교종 세포에서 암 줄기 세포 증식에 기여하였다.

[0024] I. EGFRviii 발현을 이용한 신경줄기세포의 종양화 유도방법

[0025] 본 발명에서는 서열목록 제 1 서열로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 EGFRviii (type III EGFR mutation) 발현 유전자 전달체를 신경줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는 신경줄기 세포(neural stem cells, NSCs)의 종양화 유도방법을 제공한다.

[0026] 본 명세서에서 용어 “종양화”는 종양형성능을 획득하는 과정을 의미하며, 세포의 성장 속도의 증가, 부착비의 존성 획득, 구 형성능을 통한 암성 줄기세포를 유도하는 다양한 유전자의 발현 증가를 통해 확인할 수 있다.

[0027] 본 발명에 따르면, 서열목록 제 1 서열은 III 형 EGFR 돌연변이 (EGFRviii 또는 del2-7 EGFR)를 포함하는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)의 아미노산 서열을 나타낸다. 본 발명에서 상기 아미노산 서열은 서열목록 제 2 서열로 표시되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩될 수 있다(ACCESSION NM_001346941). 본 발명의 일 구현예에 따르면, EGFRviii 아미노산 서열은 서열목록 제 2열 중 258 번째 내지 3089번째 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다.

[0029] 본 발명에서 상기 서열목록 제 2 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.

[0030] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.

[0031] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0032] 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. 48:443(1970); Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, Gene 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-3(1989); Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90(1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65(1992) and Pearson et al., Meth. Mol. Biol. 24:307-31(1994)에 개시되

어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

- [0034] 본 발명에 따르면, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 적절한 유전자 전달체(gene delivery system)에 포함되어 있다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 “유전자 전달체”는 원하는 타겟 유전자를 대상 세포에 도입하여 발현시키기 위한 매개체를 의미한다. 이상적인 유전자 전달체는 인체에 무해하고 대량생산이 용이하며 효율적으로 유전자를 전달할 수 있어야 한다.
- [0036] 본 명세서에서, 용어 “유전자 전달”은 유전자가 세포 내로 운반되는 것을 의미하며, 유전자의 세포내 침투(transduction)와 동일한 의미를 가진다. 조직 수준에서, 상기 용어 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달체는 유전자 침투 시스템 및 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 유전자 전달체를 제조하기 위해, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 적합한 발현 컨스트럭트(expression construct) 내에 존재하는 것이 바람직하다. 상기 발현 컨스트럭트에서, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 프로모터에 작동적으로 연결되는 것이 바람직하다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다. 본 발명에 있어서, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열에 결합된 프로모터는, 바람직하게는 동물세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동하여 LAMTOR3 유전자의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대 CMV(포유동물 사이토 메갈로 바이러스) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림프톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, U6 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 유전자 전달체는 다양한 형태로 제작할 수 있는 데, 이는 (i) 내이키드(naked) 재조합 DNA 분자, (ii) 플라스미드, (iii) 바이러스 벡터, 그리고, (iv) 상기 내이키드 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드를 내포하는 리포솜 또는 니오솜의 형태로 제작할 수 있다.
- [0039] LAMTOR3 단백질 억제 뉴클레오타이드 서열은 통상적인 유전자 치료에 이용되는 모든 유전자 전달 시스템에 적용될 수 있으며, 바람직하게는 플라스미드, 아데노바이러스(Lockett LJ, et al., Clin. Cancer Res. 3:2075-2080(1997)), 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV, Lashford LS., et al., Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations Ed. A. Meager, 1999), 레트로바이러스(Gunzburg WH, et al., Retroviral vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations Ed. A. Meager, 1999), 렌티 바이러스(Wang G. et al., J. Clin. Invest. 104(11):R55-62(1999)), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Chamber R., et al., Proc. Natl. Act. Sci USA 92:1411-1415(1995)), 배시니아 바이러스(Puhlmann M. et al., Human Gene Therapy 10:649-657(1999)), 리포솜(Methods in Molecular Biology, Vol 199, S.C. Basu and M. Basu (Eds.), Human Press 2002) 또는 니오솜에 적용될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 유전자 전달체는 본 발명의 뉴클레오타이드 분자를 렌티바이러스에 적용하여 제조할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서, 유전자 전달체가 바이러스 벡터에 기초하여 제작된 경우에는, 상기 접착시키는 단계는 당업계에 공지된 바이러스 감염 방법에 따라 실시된다. 바이러스 벡터를 이용한 숙주 세포의 감염은 상술한 인용문헌에 기재되어 있다.
- [0041] 본 발명에서 유전자 전달체가 내이키드(naked) 재조합 DNA 분자 또는 [0047] 플라스미드인 경우에는, 미세 주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980); 및 Harland와 Weintraub, J. Cell Biol. 101:1094-1099(1985)), 칼슘포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973); 및 Chen과 Okayama, Mol. Cell. Biol. 7:2745-2752(1987)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982); 및 Tur-Kaspa et al.,

Mol. Cell Biol., 6:716-718(1986)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980); Nicolau. etene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190(1982); 및 Nicolau. et al., Methods Enzymol., 149:157-176(1987)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 방법에 의해 유전자를 세포내로 이입시킬 수 있다.

[0043] 한편, 본 발명의 신경줄기세포 종양화 유도방법은 상기 EGFRviii 발현 유전자 전달체가 도입된 신경줄기세포를 구형 배양(sphere culture) 조건 하에서 배양하여 신경 암 줄기성(neural cancer stemness)을 증가시키는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 구현예에 따르면, EGFRviii 발현 유전자 전달체가 도입된 신경줄기세포(F3.EGFRviii 세포)를 부착성 배양 조건 하에서 배양한 경우 EGFRviii는 Akt를 통해 시그널링되었지만, 신경 암 줄기성(neural cancer stemness)을 증가시키는 spheroid-inducing 조건 하에서 배양되었을 때는 MEK/ERK1/2를 통한 EGFRviii 신호 전달이 우세하였다.

[0045] 본 명세서에서 신경줄기세포는 배아 신경줄기세포, 성체 신경줄기세포, 배아생식 신경줄기세포 및 배아종양 신경줄기세포를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] II. EGFRviii 발현 세포주를 이용한 항암물질 스크리닝 방법

[0048] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 EGFRviii 발현 세포주(EGFRviii inducible cell line)를 이용한 항암물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0049] (a) EGFRviii (type III EGFR mutation) 발현 세포주에 시험물질을 처리하는 단계; 및

[0050] (b) 상기 EGFRviii 발현 세포주에서 (i) 세포구 형성(sphere formation) 증감, (ii) 비부착증식(anchorage independent growth) 정도 또는 LAMTOR3 (Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3)의 발현을 분석하는 단계;를 포함하며,

[0051] 상기 단계 (b)에서 시험물질 비처리 세포주와 비교하여, 시험물질을 처리한 EGFRviii 발현 세포주의 세포구 형성이 감소하거나, 비부착증식 증식이 감소하거나, 또는 LAMTOR3의 mRNA 또는 단백질 발현이 감소하는 경우 항암물질로 판단한다.

[0052] 상기 LAMTOR3 (Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3)은 ERK1 활성화를 가능하게 하는 MEK1과 ERK1의 스캐폴딩 단백질(scaffolding protein)로서, MP1 (MEK partner-1) 을 코딩한다.

[0053] 본 발명에서 EGFRviii 발현 세포주(EGFRviii inducible cell line)는 상술한 본 발명의 신경줄기세포 종양화 유도방법에 의해 제조된 세포주를 의미한다.

[0054] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 본 발명의 EGFRviii 발현 세포주에서, (i) 세포구 형성(sphere formation) 증감, (ii) 비부착증식(anchorage independent growth) 정도 또는 LAMTOR3 (Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3)의 발현에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA, shRNA 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명의 스크리닝 방법은 다양한 방식으로 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 세포구 형성(sphere formation) 분석, 비부착증식(anchorage independent growth) 분석, 또는 유전자 발현 분석에 따라 실시할 수 있다.

[0056] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시험물질 또는 LAMTOR3 (또는 MP1)는 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스레이쉬 퍼옥시다아제, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시페라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C14, I125, P32 및 S35), 형광 표지[예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-

phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM], 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.

[0057] 검출가능한 표지가 레이블링된 LAMTOR3 (또는 MP1) 단백질 또는 시험물질을 이용하는 경우, LAMTOR3 (또는 MP1) 단백질과 시험물질 사이의 결합 발생 여부는 표지로부터 나오는 시그널을 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2 '-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.

[0059] III. LAMTOR3 발현 억제 항암 조성물

[0060] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다:

[0061] (a) (i) LAMTOR3 (Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3) 단백질 발현을 억제하는 핵산분자를 포함하는 유전자 담체(gene carrier)의 약제학적 유효량; 및

[0062] (b) 약제학적으로 허용되는 담체.

[0064] 본 발명의 조성물은 “서열목록 제 3서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물”과 동일한 의미로 사용된다. LAMTOR3 단백질은 서열목록 제 3서열의 아미노산 서열로 구성되며, 상기 아미노산 서열은 서열목록 제 4 서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 LAMTOR3 단백질은 서열목록 제 4열 중 250번째 내지 603번째 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다.

[0066] 본 발명에서 발현이 억제되는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.

[0067] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.

[0068] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0069] 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. 48:443(1970); Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, Gene 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-3(1989); Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90(1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65(1992) and Pearson et al., Meth. Mol. Biol. 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

- [0071] 본 발명에서 이용되는 핵산분자는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 핵산분자는 shRNA이다.
- [0072] 본 명세서에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA)”는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, in vivo상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 즉, shRNA는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열이다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다. shRNA는 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 유전자 발현억제가 유전되도록 한다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 내 기작에 의하여 절단되어 siRNA가 된 후 RISC(RNA-induced silencing complex)에 결합한다. 이들 RISC는 mRNA에 결합하여 이를 절단한다. shRNA는 RNA 폴리머레이즈 III에 의해 전사된다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 shRNA는 서열목록 제5 서열 및 제 6 서열로 표시된다.
- [0073] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다. siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음)등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 타겟 유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.
- [0074] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 유전자 발현을 조절하며, 전장 20-50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20-45개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 20-40개 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 20-30개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21-23개의 뉴클레오타이드로 구성된 단일 가닥 RNA분자를 의미한다. miRNA는 세포 내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.
- [0075] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기 서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.
- [0076] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequenceselective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다. PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학

적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.

- [0077] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 오타이드 본 발명의 안티센스 뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.
- [0078] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당솔포네이 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-테아자구아닌, N6(6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.
- [0080] 본 발명의 조성물은 본 발명의 핵산 분자의 약제학적 유효량이 포함된 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.
- [0081] 본 명세서에서 용어 “약제학적 유효량”은 상술한 본 발명의 관절염 예방, 경감 또는 치료 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0082] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0083] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구, 바람직하게는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 국소 투여, 경피 투여, 암 조직 내 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 1일 당 0.0001-100 mg/kg이다.
- [0085] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0087] 본 발명에 따르면, 본 발명의 핵산분자는 유전자 담체 또는 유전자 전달체(gene delivery system)에 포함되어 있다. “유전자 전달체”에 대해서는 상술한 바와 같다.
- [0089] 본 발명에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물에 의해 암을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0090] 상기 암은 신경교종, 구강암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암 또는 요관암이며,

이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 암은 신경교종(glioblastoma)이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 암은 EGFRviii 발현 신경교종 또는 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme, GBM)이다.

발명의 효과

- [0092] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0093] (a) 본 발명은 신경교종 (Glioma)의 유래가 되는 종양성 뇌신경 줄기세포의 유도 방법; 상기 형성된 종양성 뇌신경 줄기세포를 이용한 신경교종 치료제 후보물질을 스크리닝 하는 방법; 및 암(특히, 신경교종)의 치료 조성물에 관한 것이다.
- [0094] (b) 본 발명자들은 신경교종 환자들에게서 많이 발견되는 EGFR의 돌연변이 형태인 EGFRviii 돌연변이 유전자를 세포에 발현 가능한 형태로 도입시키기 위한 방법으로 테트라사이클린 EGFRviii 유도 벡터를 제작하였고, 이를 통해 암세포와 뇌신경 줄기세포의 특성을 모두 보유하는 종양성 뇌신경 줄기세포를 제조하였다.
- [0095] (c) 또한, 본 발명자들은 종양성 뇌신경 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 LAMTOR3 유전자 발현을 shRNA 를 통해 억제함으로써 종양성 뇌신경 줄기세포의 줄기세포성을 상실함을 확인으로서, 당업계에서 개발한 항암제를 통해 LAMTOR3 발현정도를 억제하여 다형성 교아종의 새로운 치료 방법으로 응용할 수 있음을 밝혔다. 따라서 본 발명의 종양성 뇌신경 줄기세포는 다형성 교아종의 발생 과정 연구 및 항암 치료제 후보물질 발굴 시 스크리닝에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0097] **도 1a-1f.** EGFRviii를 발현하는 인간 신경 줄기 세포의 구축 (1a) 독시사이클린 (DOX; 1 μ g / ml) 처리 후 대조군(scale bar = 500 μ m)과 비교하여 모세포 F3 세포와 F3.EGFRviii 세포의 형태 학적 특성을 보여주는 위상 차이이미지(Phase-contrast images). (1b) F3 및 F3.EGFRviii 세포에서 EGFRviii의 mRNA 발현을 실시간 PCR (n = 2)로 측정하였다. F3.EGFRviii 세포를 일정 시간에 DOX (1 μ g / ml)로 처리하였다. (1c) F3 및 F3.EGFRviii 세포를 DOX (1 μ g / ml)로 처리하고 일정 시간에 수확하였다. 로딩 대조군으로서 α -튜불린을 사용하여 면역 블로팅으로 EGFR의 수준을 결정하였다. (1d) F3.EGFRviii 세포에 Dox (1 μ g / ml) 처리한 후 pEGFR (녹색)에 대한 항체로 면역염색 하였다. DAPI (4', 6'-디아미디노-2-페닐인돌; 청색)를 핵 염색제로 사용하였다. 흰색 화살표는 pEGFR 양성 세포를 나타낸다. (1e) F3 및 Dox 처리 F3.EGFRviii 세포 (1 μ g / ml)를 지정된 시간에 수확하고 β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하여 면역 블롯 분석 하였다. (1f) F3 및 Dox 처리 F3.EGFRviii 세포 (1 μ g / ml)를 24시간 후에 수확하고 EGFRviii의 mRNA양을 실시간PCR로 분석하였다.

도 2a-2m. 양성 신경줄기세포로서의 F3.EGFRviii 세포 (2a) F3 세포에 대한 F3.EGFRviii 세포의 증식은 세포 계수로 결정하였다. (2b) F3 및 F3.EGFRviii 세포와 clonogenic 분석에서의 대표 이미지(상단 패널). 그래프는 콜로니의 평균 수와 크기를 보여준다. (1c) 연한천에서 콜로니 형성의 이미지(왼쪽 패널), 그리고 콜로니 번호와 평균 콜로니 크기를 나타낸다(오른쪽 패널). (2d-2f) F3, F3.EGFRviii 및 U87 세포에서 신경 줄기 세포 및 뇌 종양 마커의 발현을 실시간 PCR (n = 3)에 의해 분석하였다. (2g) F3 및 F3.EGFRviii 세포에 Cdr3 시약을 통해 1시간 동안 염색 후 Cdr3에 의해 염색된 세포를 FACS를 통해 분석하였다. (2h) F3.EGFRviii를 spheroid 배양을 한 후 (1st sphere) 다시 단일 세포로 분리 한 뒤 spheroid 배양을 하여 2nd sphere 형성능을 확인함. (2i) F3.EGFRviii를 각각 배양 접시와 spheroid 배양을 한 후 Cdr3 를 통해 염색하였고, Cdr3의 염색강도를 FACS 를 통해 분석하였다. (2j) 부착성 F3.EGFRviii 세포와 sphere에서 FABP7의 mRNA 양을 실시간 qPCR을 통해 분석하였다. (2k) 부착성 F3.EGFRviii세포와 sphere 에서 SIRT1, SOX2, OLIG2, FABP7의 mRNA양을 실시간 qPCR을 이용하여 분석하였다. (2l) 양성 줄기세포와 관련된 superarray를 이용하여 부착성 F3.EGFRviii 세포와 sphere의 유전자 발현 양상 비교. (2m) 양성 줄기세포 superarray에서 양성줄기세포에 관련된 유전자의 발현에 따른 heatmap과 부착성 F3.EGFRviii와 sphere에서 발현이 차이 나는 유전자 목록.

도 3a-3j. 암 줄기성이 증가된 F3.EGFRviii 세포구에서 ERK1/2 활성화. (1a) 14 일 후 F3 및 F3.EGFRviii 세포에서의 세포구 형성 저배율 및 고배율 이미지(왼쪽 패널), 및 각 세포 유형의 평균 구 직경 (n = 30, 오른쪽 패널). (2b-2c) F3 세포, 부착성 F3.EGFRviii 세포 (Adh) 및 F3.EGFRviii 구 (Sph)에서 유전자의 발현을 실시간

PCR (n = 3)에 의해 분석하였다. (3d) F3 세포, 부착성 F3.EGFRviii 세포 (Adh) 및 F3.EGFRviii 구 (Sph)에서의 SIRT1 발현은 α -튜불린을 로딩 대조군으로 사용하여 면역 블롯 분석에 의해 결정하였다. (3e) F3 세포, 부착성 F3.EGFRviii 세포 (Adh) 및 F3.EGFRviii 구 (Sph)에서 해당 단백질의 면역 블롯 분석결과. 로딩 대조군으로서 α -튜불린 (*, 야생형 EGFR; 화살표, 발현된 EGFRviii). (3f) 부착성 및 구형 F3.EGFRviii 세포를 PMA (1 μ g / ml)로 처리하고 면역 블롯 분석을 위해 수확하였다. (3g) F3, 부착성 F3.EGFRviii 세포 및 F3.EGFRviii 구 (sphere)에서 EGFRviii의 mRNA 양을 실시간 PCR로 분석하였다. (3h) F3, 부착성 F3.EGFRviii 세포 및 F3.EGFRviii 구 (sphere)에서 EGFR의 단백질 양을 면역블랏으로 분석하였으며, α -tubulin은 로딩 대조군으로 사용하였다. (3i) 부착성 F3.EGFRviii와 F3.EGFRviii 구에서 cyclohexamide를 처리 후 표기된 시간에 수확하여 EGFR의 단백질 양을 면역블랏으로 분석하였고, EGFR의 band density를 그래프로 표기함. B-actin은 로딩 대조군으로 사용되었다. (3j) F3.EGFRviii 구 (sphere)에 각각 MG132 와 Chloroquine을 처리한 후 24시간 후에 수확하여 EGFR의 단백질양을 면역블랏으로 분석함. A-tubulin은 로딩 대조군으로 사용되었다.

도 4a-4j. F3.EGFRviii 세포구에서 LAMTOR3의 높은 발현은 ERK1/2 활성화와 관련이 있다 (4a) 부착성 및 구형 F3.EGFRviii 세포에서 pAKT, pMEK1/2 및 pERK1/2의 발현수준은 α - 튜블린을 대조군으로 하여 면역 블롯 분석에 의해 결정하였다. (4b) F3.EGFRviii 세포 및 F3.EGFRviii 세포구에서 MAPK 경로 super array를 이용한 MAPK 신호 연관 유전자의 발현 프로파일 분석 (적색, 2 배 이상 상향 조절된 유전자; 파란색, 2 배 이상 하향 조절된 유전자; 회색, 유의한 변화없음). 검은 색 화살표는 LAMTOR3을 나타낸다. (4c) F3.EGFRviii 세포구(sphere)에서 신호를 구별하는 후보 유전자를 추론하기 위한 GEO 분석. 원발성 뇌종양 세포 (GSE23806, GSE15824)를 사용하는 2 건의 연구와 신경 모세포종 샘플 (GSE44537)에서 유래된 암 줄기 세포를 이용한 연구에서 공통적으로 변경된 유전자를 선정하였다. 후보 유전자는 'protein complex scaffold' 유전자에 대한 유전자 온톨로지를 사용하여 좁혀졌다. 빨간색과 파란색은 각각 상향 조절된 유전자 또는 하향 조절된 유전자를 나타낸다. (4d) 부착성 F3.EGFRviii 세포 및 F3.EGFRviii 세포구에서 LAMTOR3의 발현은 실시간 PCR (n = 3)에 의해 결정하였다. (4e) MP1, SIRT1 및 pERK1/2의 수준은 로딩 컨트롤로 α -튜불린을 사용하여 부착성 및 구형 F3.EGFRviii 세포에서 면역 블로팅 하여 결정하였다. (4f) F3.EGFRviii 세포 및 F3.EGFRviii 세포구에서 MAPK 경로 superarray를 이용하여 분석한 결과 변화된 유전자 목록. (4g) 분석에 사용된 GSE 연구에 대한 간략한 정보. (4h) 부착성 F3.EGFRviii 와 F3.EGFRviii 세포구에서 SOX2, CAV1, APAP13, WWC2 LAMTOR3의 mRNA 양을 실시간 PCR을 이용하여 분석하였다. (4i) 신경교종환자들의 조직에서 LAMTOR3와 SIRT1의 mRNA발현의 상관관계를 REMBRANDT 을 통해 분석하였다 (4j) GSE23806을 이용하여 GBM neurophsere, GSC, Glioma cell line에서 FABP7, SOX2, LAMTOR3의 mRNA 발현양을 분석함.

도 5a-5h. F3.EGFRviii 세포에서 LAMTOR3 발현 및 ERK 활성화 (5a) MP1 발현은 α -튜불린을 로딩 컨트롤로 사용하여 shRNA 컨트롤 렌티바이러스 (shCtl) 또는 LAMTOR3 (shLAMTOR3 # 1 및 # 2)에 대한 shRNA를 발현하는 렌티바이러스로 형질 감염된 F3.EGFRviii 세포의 면역 블롯 분석으로 결정하였다. (5b) pERK1/2 및 pAKT의 수준은 F3.EGFRviii 세포에서 면역 블로팅으로 결정하였다. 총 ERK2는 로딩 컨트롤로 사용되었다. (5c-5d) F3.EGFRviii 세포를 PMA (1 μ g / ml)로 처리하고, 면역 블롯 분석을 위해 정해진 시간에 수확하였다. 로딩 대조군으로서 β - 액틴을 사용하였다. (5e) F3.EGFRviii shCtl, sh#1, sh#2에서 LAMTOR3의 mRNA발현 양을 실시간 PCR을 통해 분석함. (5f) F3.EGFRviii shCtl 및 shLAMTOR3 세포를 clonogenic 분석한 결과의 대표 이미지와 이를 콜로니 크기와 콜로니 수를 통해 분석한 그래프. (5g) soft agar array 분석을 통해 콜로니 형성 이미지와 이를 콜로니 사이즈와 수를 통해 분석한 그래프. (5h) F3.EGFRviii shCtl, sh#1 및 sh#2에서 GLI1, OLIG2, SIRT1의 mRNA양을 실시간 PCR을 통해 분석하였다.

도 6a-6f. F3.EGFRviii 세포구에서 LAMTOR3의 역할. (6a) LAMTOR3 발현의 유무에 따른 Sphere 형성은 14 일 후에 비교하였다(왼쪽 패널). 그래프는 대조군과 shLAMTOR3 구체의 평균 직경을 나타낸다 (n = 30, 오른쪽 패널). (6b-6c) 표시된 유전자의 발현은 실시간 PCR (n = 2)에 의해 결정되었다. (6d) SIRT1과 MP1의 수준은 로딩 컨트롤로 β -액틴을 사용하여 면역블로팅하여 결정되었다. (6e) F3.EGFRviii세포주에 LAMTOR3의 발현을 siRNA를 이용하여 억제시킨 후 sphere 형성한 대표 이미지와 형성된 sphere 의 크기를 분석한 그래프 (6f) F3.EGFRviii shCtl와 shLAMTOR3의 sphere 형성 후 단일 세포로 분리 후 다시 sphere형성함을 나타내는 대표 이미지와 Sphere의 크기 및 수를 분석한 그래프.

도 7a-7c. 뇌종양에서 LAMTOR3 발현의 예후 유의성. (7a) LAMTOR3 발현에 따라 Kaplan-Meier 생존 분석을 수행하였다. (7b-7c) TCGA 데이터베이스의 데이터를 분석하였다. (7b) GBM 샘플 (n = 419)을 EGFR의 DNA 카피 수 및 mRNA 발현 에 기초하여 두 그룹으로 나누었다(왼쪽 패널). 적색선으로 표시된 샘플은 EGFR 증폭 (n = 173)으로 간주되는 반면, 녹색 선으로 표시된 샘플은 EGFR 증폭 (n = 246)이 없는 것으로 간주되었다 (왼쪽 패널). 두

그룹에서 LAMTOR3의 발현은 오른쪽 패널에 표시하였다($p < 0.0002$). (7c) EGFR 증폭이 없거나 (왼쪽 패널) 있는 (오른쪽 패널) 환자에서 LAMTOR3에 따른 Kaplan-Meier 비재발없는 생존 분석(Kaplan-Meier relapse-free survival analyses).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0098] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0099] 실시예
- [0101] 실험방법
- [0102] 세포배양
- [0103] F3 세포는 공지된 방법으로 배양하였다 [Lee JS et al., *Neuro Oncol* 2015, 17:95-106.]. F3. EGFRviii 세포는 F3 세포로부터 유래하였고, U87 및 293T 세포는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank)에서 구입하였다. 세포는 10% FBS 및 젤타마이신 (50 $\mu\text{g/ml}$)이 첨가된DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco-BRL) 배지에서, 37° C 습윤 5% CO₂ 환경에서 배양하였다.
- [0105] 시약 및 항체
- [0106] EGFR (cat# sc-03), SIRT1 (cat# sc-15404), β -actin (cat# sc-47778), α -tubulin (cat# sc-8035) 및 ERK2 (cat# sc-154)의 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다. phosphor-EGF Receptor (pEGFR, Tyr1068: cat# 3777X), LAMTOR3 (cat# 8168), phosphorylated AKT (pAKT, ser473: cat# 4060X), phospho-p44/42 (pERK, Thr202/Tyr204: cat# 9106), phospho-c-Jun (pc-Jun, ser63: cat# 9261), phospho-MEK1/2 (pMEK, ser217/221: cat# 9121), Sox2 (cat# 14962X), phospho-p38 MAPK (p38, Thr180/Tyr182: cat# 4631), phosphorylated p90RSK (pRSK, ser380: cat# 9341) 및 phospho-SAPK/JNK (pJNK, Thr183/Tyr185: cat#9251)의 1차 항체는 Cell Signaling Technology 에서 구입하였다. 포볼-12-미리스테이트 13-아세테이트 (PMA, cat# P1585) 및 독시사이클린 하이클레이트 (DOX, cat# D9891)는 시그마에서 구입하였다. 0.25% 트립신 EDTA는 Gibco-BRL 에서 구입하였다.
- [0108] EGFRviii 유도성 세포주(EGFRviii inducible cell line) 제조
- [0109] Clonase II (Invitrogen) 를 이용한 Gateway Technology 방법으로 독시사이클린 유도성 EGFRviii를 발현하는 CSIV-TRE-RfA-EF-KT 렌티바이러스 플라스미드를 구축하였다 [Kurita R et al., *PLoS One* 2013, 8:e59890]. 프라이머 서열은 다음과 같다: attB-EGFRviii-F: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCGACCC TCCGGGACGGC-3', attB-EGFRviii-R: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGTTTCATGCTCCAATAAATTCA-3'.
- [0110] 독시사이클린-유도성 EGFRviii를 포함하는 렌티바이러스는 293FT 세포 (Invitrogen)에서 ViraPower Lentiviral expression system을 이용하여 제조되었다. 요약하면, 293FT 세포에 렌티바이러스 플라스미드 및 2개의 패키징 플라스미드(pMDL-gpRRE 및 pCMV-VSVG-RSV-Rev; 비율 2:2:1) 를 형질도입하였다. 형질도입 48시간 후, 상층액을 수거하여 필터링하고, 1:1 비율로 2회 F3 세포에 형질도입하였다. FACS 로 Kusabira-Orange 양성세포를 분리하였다.
- [0112] 정량적 실시간 PCR
- [0113] RNA 추출키트(Intron, cat# 17061)를 사용하여 세포에서 전체 RNA를 추출하였다. 이어, PrimeScript RT Master Mix (Takara, cat# RR036)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 cDNA를 수득하였다. 합성된 cDNAs를 주형으로 하여 SYBR Premix Ex Taq (Takara, cat# RR420)를 이용한 Light Cycler 480 Instrument II (Roche)로 실시간 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 변성 95° C, 30 s; 40 사이클, 95° C, 5 s, 58° C, 15 s, 및 72° C, 20

s. 각 유전자의 평균 threshold cycle은 3회 반응으로 결정하였고, TBP (TATA-binding protein) 또는 RPL13A (Ribosomal protein L13a)에 대한 유전자 발현레벨을 결정하였다. 프라이머 세트는 다음과 같다:

[표 1]

Genes		Primer Sequence (5' to 3')
TBP	F	GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC
	R	TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG
RPL13A	F	CATAGGAAGCTGGGAGCAAG
	R	GCCCTCCAATCAGTCTTCTG
EGFRviii	F	AGGAAAAGAAAGGTAATTATGT
	R	TAAATGCCACCGGCAGGATGT
NANOG	F	AAATTGGTGATGAAGATGTATTCG
	R	GCAAAACAGAGCCAAAAACG
BMI-1	F	CCAGCAGCAATGATCGTGATGCAC
	R	CCATCTCTCTGGTGACTGATCTTC
MUSASHI	F	GTTCGGCTTCGTCACCTTC
	R	AAGGCCACCTTAGGGTCAAT
GLI-1	F	GCATTGCTGGCACTGGTCTGTC
	R	TGACAGTATAGGCAGAGCTGATG
ALDH1	F	CAGATGAGATGCGCATTGCCAAAGAG
	R	ACTGGGCACTTACCACGCCATAGC
OLIG2	F	GACAAGCTAGGAGGCAGTGG
	R	CGGCTCTGTCAATTGCTTCT
SOX2	F	TCACATGTGTGAGAGGGGCAGTGTGC
	R	TTCACATGTCCCAGCACTACCAGA
SIRT1	F	GAAACAATACCTCCACCTGA
	R	AGCATAAATACCATCCCTTGA
MPI	F	ACCAGGTGGTTCAATTTAATCG
	R	CTTCAAACAATGGAGCAAGTTC

ERK 의존적 유전자 발현은 RT2 profiler PCR array human MAP kinase Signaling Pathway 로 증명하였다. 반응은 Applied Biosystems 7900HT Fast-Real Time PCR System에서 수행하였다.

세포구 배양(Sphere Culture)

F3 및 F3.EGFRviii 세포는 신경구(neurospheres) 배양조건에서 배양하였다: 2 % B27, 8 mM HEPES, 0.1% 젤타마 이신, 20 ng/mL bFGF (basic fibroblast growth factor), 20 ng/mL EGF (epidermal growth factor, Invitrogen)이 첨가된 DMEM/F12에서 14 일간 배양됨 [Lee JS et al., Neuro Oncol 2015, 17:95-106].

렌티바이러스 유전자 전달

shRNA LAMTOR3 플라스미드 (SHCLNG-NM_021970) 는 Sigma Aldrich에서 구입하였다. 모든 과정은 제조사의 지시에 따라 수행하였다 (ViraPower Lentiviral ExpressionSystems, Invitrogen). 각 바이러스 플라스미드 (10 µg: gene of interest, VSVG, 5 µg: Gag/Pol) 는 리포펙타민(Invitrogen, #11668-027)을 이용하여 293T 세포에 형질도입하였다. 48시간 후, 바이러스를 포함하는 배양배지를 수거하여 필터링하였다 (0.45 µm filter, Millipore). F3.EGFRviii 세포는 4 µg/ml 폴리브렌 (Sigma Aldrich)과 바이러스 포함 배지를 24시간동안 처리하였다. 감염세포는 1 µg/ml 푸로마이신으로 선별하였다.

TCGA 분석

약 500 GBM 환자에서 얻은 DNA 카피넘버, mRNA 발현 및 임상 데이터는 TCGA 데이터 포털 (tcga-data.nci.nih.gov)에서 다운로드하였다. 유전자 발현 데이터는 Agilent 마이크로어레이 칩으로 생성하였고, 다

중 프로브를 평균하여 유전자 단일 발현량을 계산하였다. DNA 카피넘버 데이터는 Affymetrix SNP6.0 chips로 생성하였고, 유전자당 분절된 카피넘버를 평균내었다. EGFR 증폭샘플은 EGFR 유전자의 상향조절된 mRNA 발현 레벨 (≥ 2 folds) 및 높은 DNA 카피넘버 (≥ 8) 로 정의된다. EGFR-증폭된 및 EGFR-정상 샘플간의 LAMTOR3 의 mRNA 레벨을 비교하기 위하여, t-test를 이용하였다. Kaplan-Meier 생존 분석 및 log-rank 테스트를 수행하여 LAMTOR3 mRNA 로서 교모세포종(glioblastoma) 환자의 생존율을 측정, 비교하였다. 교모세포종 환자를 LAMTOR3 mRNA 발현레벨로 그룹화하여 3그룹으로 나누었다; high, med 및 low.

[0128] 통계분석

[0129] 그래픽 데이터는 평균± 표준편차로 나타내었다. 3그룹간 및 2그룹간의 통계적 유의성은 one- 또는 two-way analysis of variance (ANOVA)로 결정하였고, 이어 Bonferroni multiple comparisons post-test 및 Student's t-test를 각각 실시하였다. $P < 0.05(*)$, $P < 0.01(**)$, and $P < 0.001(***)$.

[0131] 면역블로팅

[0132] 세포를 PBS로 2회 세척하고, ice 상에서 0.2 mM 소듐 바나테이트 및 1 mM 프로테아제 억제제 콕테일 (Roche, 11873580001)을 포함하는 조직 용해액 (tissue lysis buffer, TLB) (20mM Tris-HCl, pH 7.4, 137mM NaCl, 2mMEDTA, 1% Triton X-100, and 10% glycerol)을 30분간 처리하여 수용성 및 막-결합 단백질을 추출하였다. 약 10-20 μ g의 단백질을 7.5%, 10%, 12% 또는 15% SDS-PAGE에 로딩하였다. 단백질을 PVDF (polyvinylidene fluoride) 막에 옮긴 후 5% 탈지분유 및 0.1% Tween-20 를 포함하는 TBS-T 용액을 처리하여 1-2시간동안 블로킹하였다. 이후 상기 막에 1차 항체(1:1000)를 4℃에서 overnight 처리하고, TBST-T로 5분간 3회 세척하였다. 그 다음 HRP-컨쥬게이트된 2차 항체(1:10000) (Jackson Immunoresearch Laboratories) 를 처리하고 상온에서 1 시간 반응시켰다. 최종적으로 ECL검출시스템(Amersham Biosciences)을 이용하여 면역활성도를 측정하였다.

[0134] 성장곡선

[0135] 세포 성장을 모니터링하기 위하여, IncuCyte FLR (Essen Bioscience)으로 EGFRviii가 있는 또는 없는 F3 세포의 컨플루언시(confluency)를 4시간 간격으로 2일간 측정하였다. F3.EGFRviii 세포는 완전배지 상에서 80% 컨플루언시를 나타내었다.

[0137] 소프트 아가 어세이(Soft Agar Assay)

[0138] 6- 웰 플레이트의 각 웰을 3 ml의 하부 한천 혼합물 (DMEM, 10 % FBS 및 0.6 % 한천)으로 코팅하였다. 바닥층이 고형화된 후, 각 웰에 5×10^5 세포를 포함하는 상부 한천 혼합물 (DMEM, 10 % FBS 및 0.3 % 한천) 2 ml을 첨가하고, 37℃, 5 % CO₂ 하에서 배양하였다. 2 일마다 보통 배양 배지를 배양물 위에 천천히 첨가하였다. 콜로니 성장은 광학 현미경을 사용하여 매일 관찰하였다. 콜로니 형성 후, 콜로니를 10 분 동안 차가운 메탄올로 고정시키고 0.1 % 크리스탈 바이올렛으로 30 분 동안 염색하였다. 크리스탈 바이올렛을 제거하기 위해 플레이트를 30 분 동안 여러 번 세척하였다. 연한 한천에서 형성된 콜로니를 배양 14 일 후에 디지털 카메라로 촬영했다.

[0140] 집락형성 분석(Clonogenic assay)

[0141] 웰당 1×10^3 세포를 포함한 6-웰 플레이트를 37℃, 5 % CO₂ 하에서 배양하였다. 콜로니 성장은 광학현미경으로 매일 관찰하였다. 2주 후, 세포를 차가운 PBS (pH 7.2)로 세척하고, 10분간 메탄올로 고정하였다. 콜로니를 0.1% 크리스탈 바이올렛으로 30분간 염색하였다. 이후 플레이트를 PBS로 여러 번 세척하였고, 콜로니를 디지털 카메라로 촬영하였다.

[0143] 면역형광분석(Immunofluorescence)

- [0144] 세포를 4% 포름알데하이드로 10분간 고정시키고 0.1% Triton X-100를 포함하는 PBS로 5분간 처리하였다. 고정된 세포를 3% BSA가 포함된 TBS-T에서 1-2시간동안 블로킹하였다. 이어, 3% BSA 함유 TBS-T 하의 pEGFR, MUSASHI 또는 GLI-1 항체 (1:200)를 4° C overnight 처리하였다. 다음으로 세포를 TBS-T로 5분간 3회 세척하고, Cy2 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)-컨쥬게이션된 2차 항체 (1:200) 및 0.5 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)를 처리하였다.
- [0146] **실험결과**
- [0147] EGFRviii-발현 인간 신경줄기세포의 구축
- [0148] 독시사이클린(Dox)-유도성 EGFRviii 가 F3 세포에서 안정하게 발현되도록 하여 Dox-유도성 F3.EGFRviii 세포를 구축하였다. 도 1에서와 같이, Dox 가 없는 경우 EGFRviii 발현에 약간의 누설현상(leakage)이 생기므로(도 1f), F3.EGFRviii 세포는 F3 세포와 비교하여 형태학적 변화를 나타내었다(도 1a). 그러나 Dox 처리시 F3.EGFRviii 세포에서 형질전환된 세포의 형태(예컨대, 응집된 세포질, 병소형성(focus formation), 및 접촉 저해(contact inhibition) 감소)가 분명히 관찰되었다 (도 1a, 적색선). 일정한 Dox 처리 후에 세포에서 이러한 형태학적 변화가 관찰된 것은, Dox가 없는 경우 낮은 수준의 EGFRviii 누출이 F3.EGFRviii 세포의 종양 형질 전환을 유도하기에는 불충분하다는 것을 나타낸다 (도 1f). 예상대로, Dox 처리는 EGFRviii mRNA (도 1b)와 단백질 (도 1c)을 유도하였다. Dox 처리에 의해 EGFRviii 발현이 유도되었을 때, 원형질막에서 EGFR (pY1068)의 활성화 인산화가 관찰되었다 (흰색 화살표, 도 1d). 따라서 본 발명자들은 인산화 Akt 및 ERK1/2의 레벨을 측정함으로써 EGFRviii의 중요한 2개 하위 경로인 PI3K/Akt 및 MEK/ERK1/2 경로를 조사하였다. EGFRviii 발현 누설로 인해, Dox 처리에도 불구하고 Akt 가 활성화되었다(도 1f). MEK/ERK1/2 활성화는 EGFRviii 발현과 함께 Dox 처리 후 명백히 나타났다 (도 1e).
- [0150] 암성 신경 줄기세포인 F3.EGFRviii
- [0151] EGFRviii 활성화 인산화 때문에 Akt 및 MEK/ERK1/2 활성화가 나타나고(도 1e), 형질전환된 EGFRviii는 반복적인 Dox 처리로 활발히 증식되었으며(도 2a), 단일세포로부터 클론성 콜로니를 형성하였다 (도 2b). *인 비트로* 형질 전환 능력을 실험하기 위하여, soft agar assay 를 이용하여 비부착증식(anchorage-independent growth)을 측정하였다. F3세포와 비교하였을 때 연한천(soft agar)에서 자란 F3.EGFRviii 콜로니의 수가 매우 증가하였고, 이는 F3.EGFRviii 세포가 반복적인 Dox 처리로 인해 형질전환 되었음을 의미한다 (도 2c). 발암적 변형(oncogenic transformation)이 일어난 이후, F3.EGFRviii 세포에서 musashi1 (MSI1) 발현이 유지되었으나, SOX2 또는 NESTIN 는 그렇지 않았고, 이들 중 U87 신경교종 세포(glioma cells)에서 고발현되는 것은 없었다(도 2d). 대신, GLI1 (glioma-associated oncogene 1) 및 OLIG2 (oligodendrocyte lineage transcription factor 2)의 발현은 증가되었는데(도 2e), 이들의 발현은 신경교종 및 GSCs와 연관된다. 더욱 중요한 것은 NANOG (nanog homeobox) 및 ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1)가 F3.EGFRviii 세포에서 높게 발현되었다는 것인데 (도 2f), 이의 발현은 GSCs에서 나타나는 특징이다.
- [0153] F3.EGFRviii 세포가 신경 줄기성을 보유하고 있음을 확인하기 위해, 상업적으로 이용 가능한 NSC 특이 형광 프로브 (NeuroFluor; StemCell Technologies) 인 CDr3를 사용하여 F3 및 F3.EGFRviii 세포를 염색하였다 (도 2g). 이 프로브는 예상대로 F3 및 F3.EGFRviii 세포를 효과적으로 표지하였다. 또한, 일반적으로 줄기성(stemness; 또는 자기-리뉴얼 성질)을 결정하는 것으로 인정되는 2 차 스피어 형성이 F3.EGFRviii 세포에서 나타났다 (도 2h). 이러한 결과는 F3.EGFRviii 세포가 신경 암 줄기성을 보유함을 나타낸다.
- [0155] 암 줄기성이 증가된 F3.EGFRviii 스피어에서 ERK1/2의 활성화
- [0156] F3.EGFRviii 세포를 sphere 배양하여 신경 암 줄기성(neural cancer stemness)을 증가시켰다. 흥미로운 것은 sphere 배양하에서는 대조군인 F3세포와 비교하여 F3.EGFRviii 세포에서 sphere 형성이 눈에 띄게 증가했다는 것이다 (도 3a). 이는 sphere culture 동안 F3.EGFRviii 세포에서 암 줄기성이 증가했다는 것을 의미한다. 이러한 가설을 실험하기 위하여, F3, F3EGFRviii 부착세포(adherent) 및 F3.EGFRviii spheres에서 여러 개의 신경

암 줄기 마커를 측정하였다.

- [0158] MSI1 발현이 비정상적인 것과 반대로, SOX2는 sphere culture 조건 하에서 F3.EGFRviii 세포에서 명백히 증가하였다(도 3b). 이전 연구에서 본 발명자들은 SOX2 및 SIRT1의 동시발현이 신경 암 줄기성과 밀접히 연관됨을 증명하였다. 이와 유사하게, F3.EGFRviii sphere에서 SIRT1 발현이 명백히 증가하였고(도 3c 및 도 3d), 최근 신경교종 및 GSCs에서의 특징으로 알려진 OLIG2의 발현도 증가하였다. 또한, F3.EGFRviii spheres을 CDr3로 염색하여, 부착 F3.EGFRviii 세포와 염색 레벨을 비교하였다. 도 2i에서 볼 수 있듯이, F3.EGFRviii sphere에서 CDr3의 염색강도가 증가하였다.
- [0160] CDR3 염색이 NSCs 및 GBMs의 줄기 유사 세포에서 높게 발현되는 지방산 결합 단백질 7 (FABP7)의 발현에 의한 것임을 감안하여 FABP7 발현을 조사한 결과, 부착성 F3.EGFRviii 세포와 비교하여 F3.EGFRviii sphere에서 명확히 상향 조절되었다(도 2j). SIRT1, SOX2 및 OLIG2도 F3.EGFRviii sphere에서 상향 조절되었다(도 2k). 추가적으로 F3.EGFRviii sphere의 증가된 암 줄기성을 입증하기 위해, 상업적으로 이용가능한 PCR 어레이를 사용하여 전형적인 암 줄기 유전자의 발현 수준을 측정하였다. LIN28A, CD44, SOX2, CXCL8 (IL-8), MYCN, ID1 및 KLF4 GSCs에서 과다 발현되는 것으로 보고된 세포는 부착 형 대조군 세포와 비교하여 F3.EGFRviii 세포구에서 상당히 상향 조절되었다(도 2l 및 2m).
- [0162] Dox에 의한 EGFRviii 유도가 부착성 및 spheroid 배양에서 유사함에도 불구하고(도 3g), 부착성 F3.EGFRviii 세포는 높은 Akt 활성을 보였으나 ERK1/2 활성은 낮았으며(도 3e), ERK1/2 활성화는 F3.EGFRviii sphere에서 현저하게 증가하였다(도 3a). 본 발명자들은 비슷한 mRNA 발현에도 불구하고(도 3g) F3.EGFRviii sphere에서 EGFRviii 단백질 발현이 현저히 낮은 것을 발견하였다(도 3e 및 도 3h). F3.EGFRviii 세포에 대한 사이클로헥시미드(cycloheximide, CHX) 처리로 EGFR 단백질 수준이 감소되었으나(도 3i), proteasome inhibitor MG132 또는 자가포식 억제제 클로로퀸(autophagy inhibitor chloroquine) 처리는 EGFR 단백질 수준을 증가시켰다(도 3j). 이로 인해 EGFRviii F3.EGFRviii sphere의 경우 프로테아좀(proteasomal) 또는 리소좀(lysosomal) 분해가 있을 수 있음을 알 수 있다. 다음으로 F3.EGFRviii 세포에 PMA(phorbol 12-myristate 13 acetate)를 처리하였다. PMA는 PKC(protein kinase C)를 통해 Akt와 ERK1/2를 동시에 활성화시킬 수 있다. 흥미롭게도, ERK1/2 시그널링은 Akt 시그널링이 아니지만 F3.EGFRviii sphere에서 PMA 처리 후 현저하게 증가하였고, 반면 Akt 및 ERK1/2는 부착성 F3.EGFRviii 세포에서 활성화되었다(도 3f). 이러한 결과는 EGFRviii의 ERK1/2 신호 전달에 대한 선호(preferance)가 신경 암 줄기성을 유지하는데 관여한다는 것을 시사한다.
- [0163]
- [0164] F3.EGFRviii spheres에서 ERK1/2 활성화를 위한 LAMTOR3 고발현
- [0165] F3.EGFRviii spheres에서 ERK1/2 활성화에 따른 분자적 메커니즘, 즉 ERK1/2의 단독 상위 키나아제인 MEK1/2 활성도를 측정하였다. 놀랍게도, ERK1/2 활성화가 F3.EGFRviii spheres에서 명확히 증가되었지만, MEK1/2 인산화 수준은 F3.EGFRviii spheres와 부착성 세포에서 유사하게 나타났다(도 4a). 본 발명자들은 MEK/ERK1/2 신호 전달 축에 관여하는 유전자의 발현이 증가하면 F3.EGFRviii spheres에서 ERK1/2 신호 전달이 증가될 것이라 가정하였다. 이 가설을 확인하기 위해 F3.EGFRviii spheres에서 특이적으로 변형된 MEK/ERK1/2 시그널링 축 조절에 관여하는 유전자를 확인하기 위해, 인간 MAPK 신호 전달 경로에 대한 PCR 어레이를 사용하여 F3.EGFRviii 세포를 분석하였다. 측정된 84 개의 유전자 중 14 개의 유전자가 부착 세포와 비교하여 F3.EGFRviii spheres에서 발현에 상당한 변화를 보였다(도 4b 및 도 4f). 다음으로, 14 개의 유전자 중 가능한 후보자를 좁히기 위해 Gene Expression Omnibus 데이터베이스(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)를 검색하고 1차 뇌암(GSE23806), 신경 아세포종(GSE15824) 및 신경 모세포종(GSE44537)과 같은 신경 세포종(GSS)에서의 세 가지 독립적인 GSE 연구를 선택하였고, 신경교종 또는 GSCs의 유전자 발현 시그니처를 각각 정상 세포 또는 신경 교세포 종양과 비교하였다. 유전자 온톨로지 용어 'protein complex scaffold'에 기반하여, 발현이 현저히 변화된 578 개 유전자 중에서 [p < 0.05, 2-배높음(적색) 또는 더 낮음(청색)], F3.EGFRviii spheres의 ERK1/2 활성화에 관여하는 추정 유전자 후보를 선정하였다. 4 개의 추정 유전자 후보자(두 개의 하향 조절된 유전자(파란색) 및 두 개의 상향 조절된 유전자(적색))가 확인되었고(도 4c), F3.EGFRviii spheres에서 4 개의 후보자의 상대적 발현 수준을 SOX2(sphere 형성의 양성대조군)와 함께 확인하였다. 중요한 것은, ERK1 및 ERK1/2를 활성화시키는 MP1(MEK

partner-1)을 코딩하는 유전자인 LAMTOR3의 유도는 PCR 어레이에서 F3.EGFRviii spheres (도 4b) 또는 GSC (또는 spheres) (도 4c)에서 상향 조절되었다.

[0167] 다른 실험에서, F3.EGFRviii spheres 에서 LAMTOR3 mRNA (도 4d) 및 MP1 단백질의 상향 조절이 높은 ERK1/2 인산화 및 SIRT1 발현과 동시에 확인되었다(도 4e). 흥미롭게도 LAMTOR3과 SIRT1의 상관관계는 GBM의 임상 유전체학 데이터베이스 (betastasis.com/glioma/rembrandt)에서도 확인되었다 (도 4i). 또한, 정상 신경 교종 세포주 (GSE23806)와 비교하여 GSC 유전자 발현 데이터를 분석 한 결과, LAMTOR3 발현은 FABP7 및 SOX2 발현과 함께 줄기성 신경교종 세포 (즉, 신경구 배양 및 GSC에 의해 형성된 신경교종 세포)에서 유의하게 높았고, 정상 신경 교종 세포주보다 높았다(도 4j).

[0169] F3.EGFRviii 세포에서 LAMTOR3 발현 및 ERK 활성화

[0170] 높은 ERK1/2 활성을 보이는 F3.EGFRviii spheres 에서 MP1의 높은 발현을 고려할 때, MP1 발현이 ERK1/2 활성화에 기여할 수 있다고 가정하였다. 이 가설을 시험하기 위해, F3.EGFRviii 세포에서 MP1을 고갈시킨 후에 ERK1/2 활성을 평가하였다. LAMTOR 에 대한 두 가지 shRNA 서열 중 shLAMTOR # 2는 MP1 단백질 수준의 가장 명확한 하향 조절을 나타냈다 (도 5a 및 도 5e). 예측한 바와 같이, MP1 발현의 감소는 F3.EGFRviii 세포에서 ERK1/2 인산화의 수준을 현저하게 감소시키기에 충분했다 (도 5b). 중요한 것은, MP1의 손실은 F3.EGFRviii 세포를 접착성 배양했을 때, clonogenic 성장 (도 5f), 고정 독립 성장 가능성 (도 5g), 그리고 GLI1, OLIG2 및 SIRT1의 발현에 단지 한계 효과(marginal effects)를 나타내었다 (도 5h). 다음으로, 도 3f의 실험과 유사하게, 세포를 PMA로 처리하여 Akt 및 MEK / ERK1/2를 동시에 자극하였다. 흥미롭게도, MEK1/2 신호 전달은 PMA 처리 후에도 그대로 유지되었지만, ERK1/2 및 그 다운스트림 표적 S6 키나아제 (RSK)의 활성화는 감소되었다 (도 5c). 다른 MAPK (p38 및 JNK) 및 Akt 시그널링의 활성화는 MP1 발현의 소실에 의한 영향을 적게 받았다 (도 5d). 상기 결과는 MP1 발현이 F3.EGFRviii sphere 형성 동안 ERK1/2에 대한 시그널링 선호 경향을 변화시킬 수 있음을 시사한다(도 3f).

[0172] F3.EGFRviii spheres에서 LAMTOR3의 역할

[0173] F3.EGFRviii 세포의 구형 형성 과정에서 ERK1/2 활성화와 ERK 활성화에 있어서 MP1의 역할을 고려할 때, MP1 감소에 의한 ERK1/2 활성화 감소는 구형 형성을 저해할 수 있다고 추측하였다. 이 가설을 시험하기 위해, MP1을 억제시킨 후 F3.EGFRviii 세포의 구형 형성능을 평가하였다. 예상대로 siRNA(도 5e) 또는 shRNA (도 6a)에 의한 LAMTOR3의 knockdown은 F3.EGFRviii 세포의 구형 형성능을 현저하게 손상시켰다. F3.EGFRviii 세포의 감소된 구형 형성 능력과 병행하여, 2 차 sphere 형성에 의해 결정되는 자가-재생성(self-renewality) 또한 LAMTOR3의 결실 후 현저하게 감소되었다 (도 6f). 또한 OLIG2와 GLI1과 같은 glial 종양 마커 및 MSI1과 SOX2 같은 GSC 마커도 F3.EGFRviii 세포에서 크게 감소했다 (도 6b). 신경 암 줄기성(neural cancer stemness) 및 생존과 함께 신경 줄기성(neural stemness)에 중요한 SIRT1발현은 MP1이 감소됨으로써 mRNA (도 6c)와 단백질 (도 6d) 모두 현저하게 감소되었다.

[0175] 뇌 종양에서 LAMTOR3의 예후 유의성(Prognostic significance)

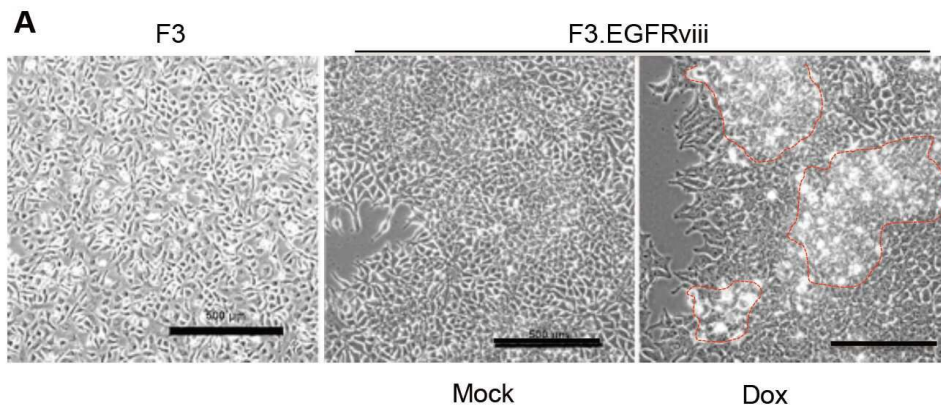
[0176] MP1의 예후적 중요성을 조사하기 위해, DR1GSURV (www.bioprofiling.de/cgi-bin/GEO/DRUGSURV/start_GENE.pl)를 사용하여 공개적으로 이용 가능한 clinicogenomics 연구 (GSE4271)의 데이터를 사용하여 고악성도 신경 교종에서 생존 분석을 수행하였다. 도 7a에 도시된 바와 같이, 77 명 (p = 0.122)에서의 높은 LAMTOR3 발현은 나쁜 임상 결과와 크게 상관 관계가 있다. EGFR 증폭과 관련된 LAMTOR3의 임상적 중요성은 The Cancer Genome Atlas (TCGA)의 대형 GBM 데이터 세트를 사용하여 조사하였다. 아교모세포종(glioblastoma) 샘플은 EGFR의 DNA 카피 수 및 mRNA 발현 수준에 기초하여 2 개의 서브 그룹으로 분류되었다. TCGA에서 500 개의 아교 모세포종 샘플 중, 173 개의 샘플을 EGFR 증폭 샘플 (빨간색 원)으로 분류하고 정상 또는 낮은 DNA 카피 수 및 EGFR 발현을 갖는 246 개의 샘플 (녹색 원)을 EGFR 정상 샘플 (도 7a)로 분류하였다. LAMTOR3 발현은 EGFR- 증폭군에서 유의하게 높았다 (p = 0.0002) (도 7b). LAMTOR3 발현이 생존율에 미치는 영향 또한 EGFR 상태에 따라 다르다. EGFR 증폭군에서는 LAMTOR3 발현이 낮은 샘플에서 생존 확률이 유의하게 좋

았지만, EGFR 증폭이 없는 시료에서는 LAMTOR3 발현에 따른 생존율에 유의한 차이가 없었다 (도 7c).

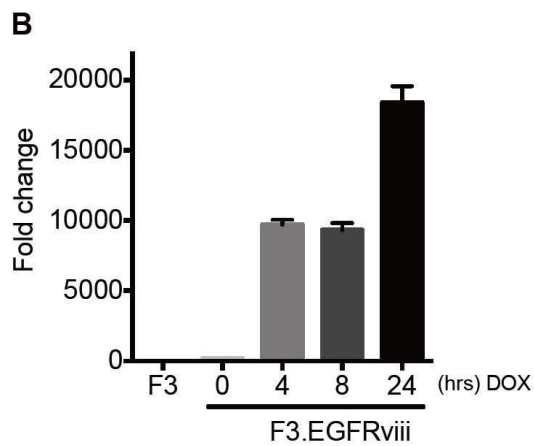
[0178] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

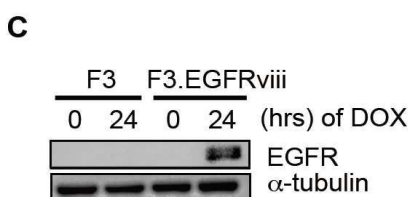
도면1a



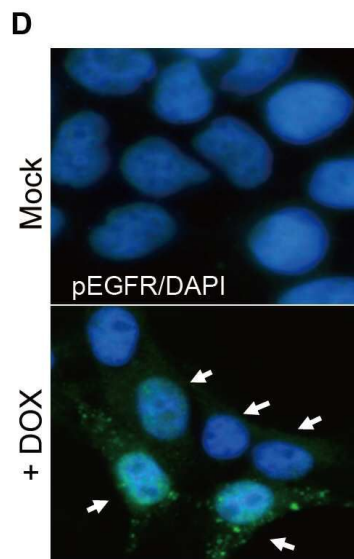
도면1b



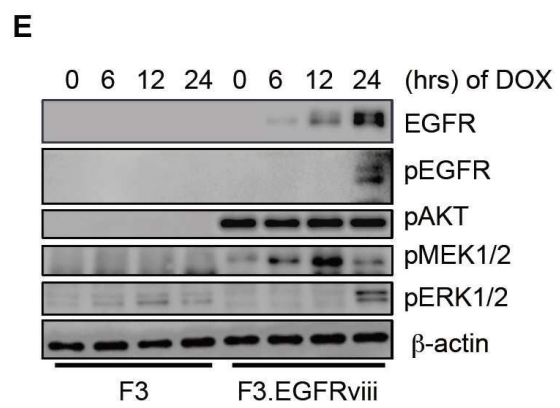
도면1c



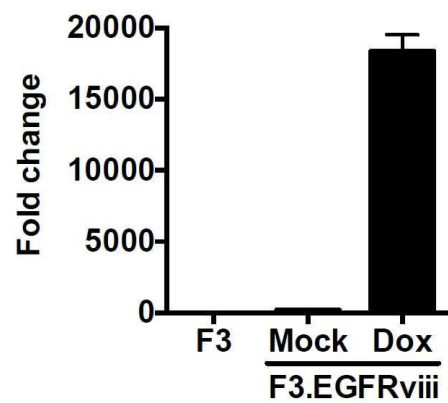
도면1d



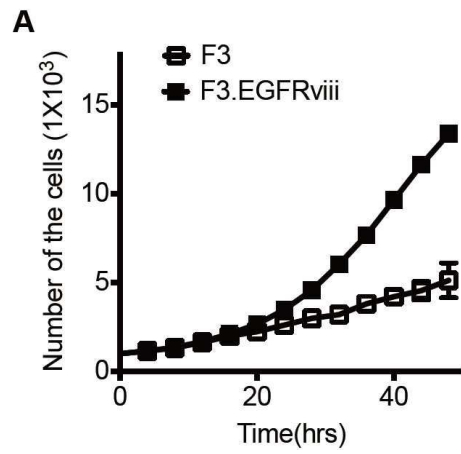
도면1e



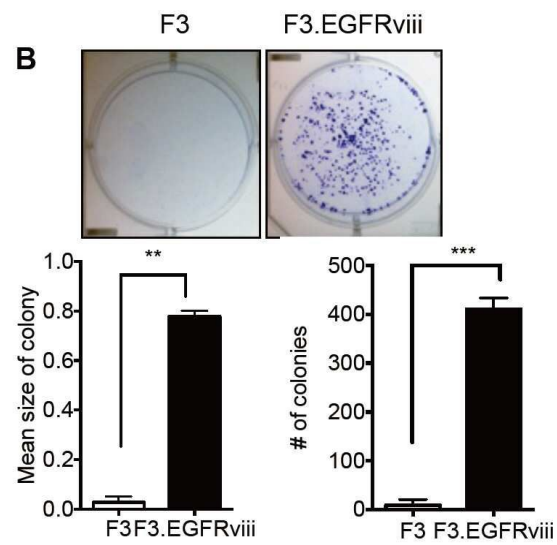
도면1f



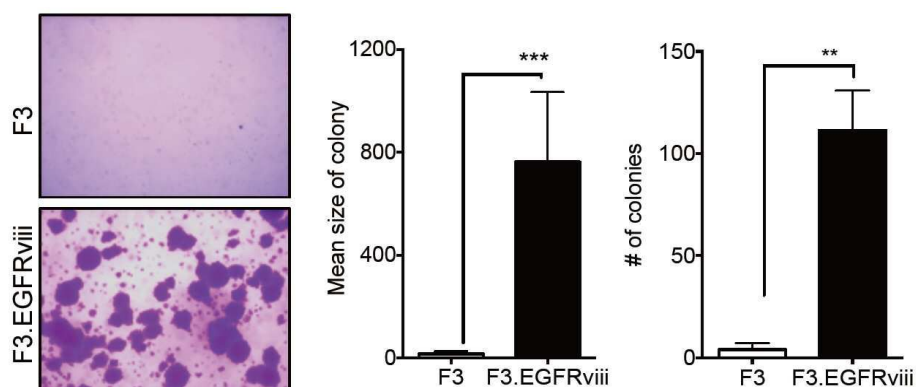
도면2a



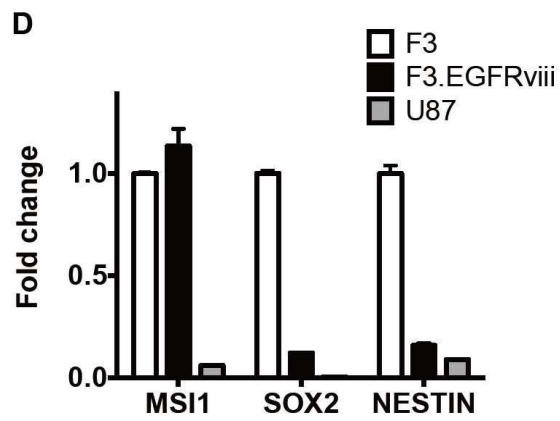
도면2b



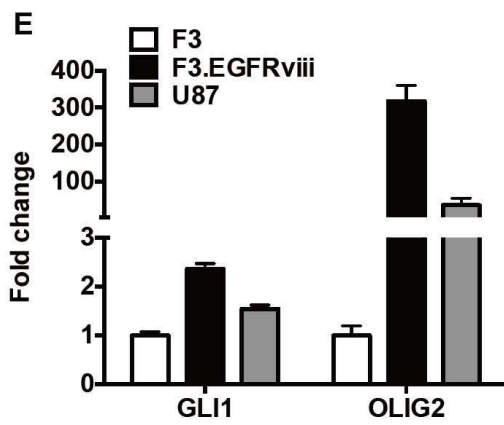
도면2c



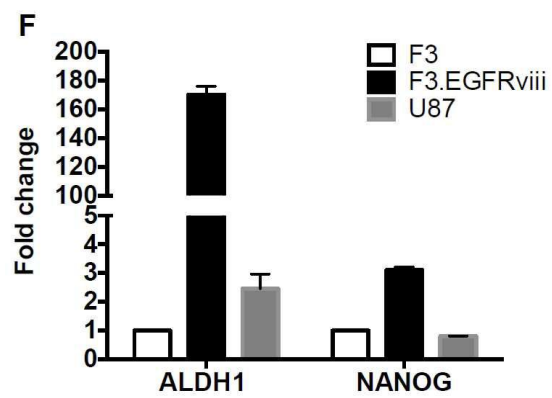
도면2d



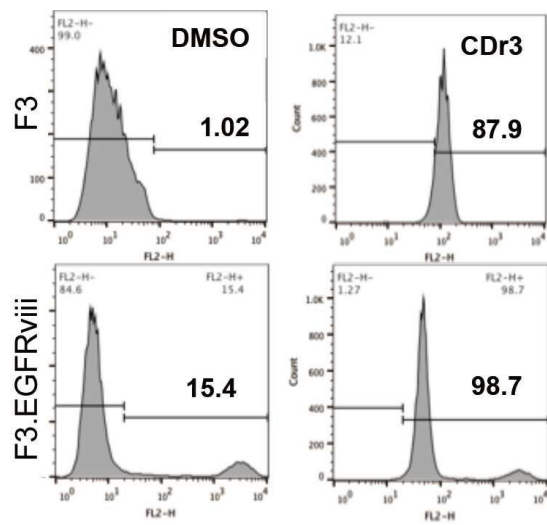
도면2e



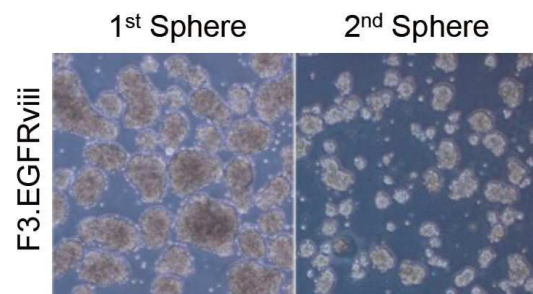
도면2f



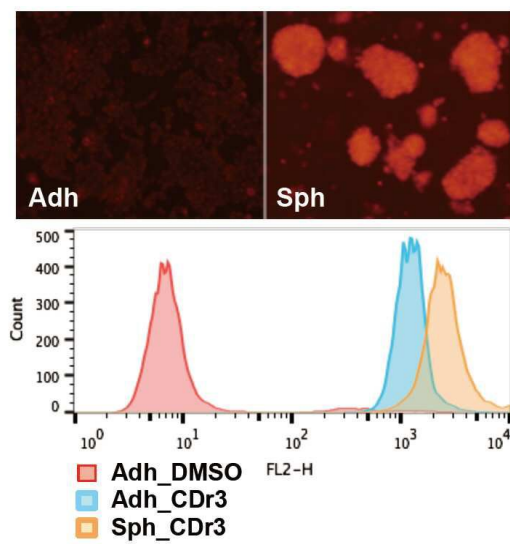
도면2g



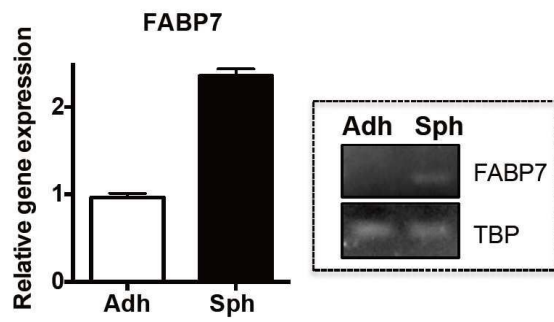
도면2h



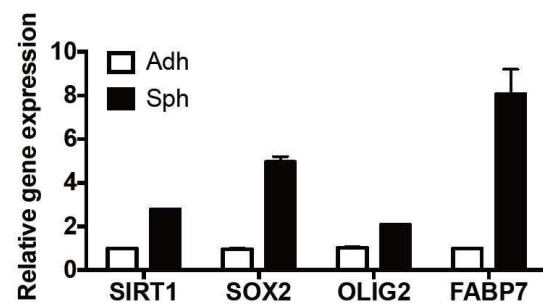
도면2i



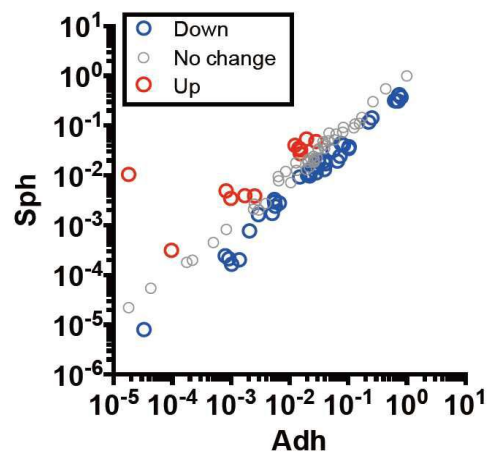
도면2j



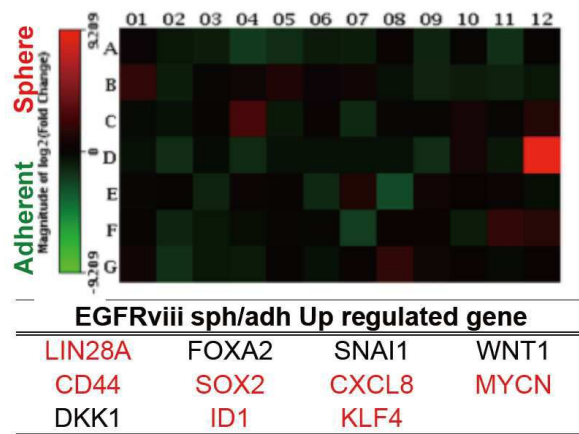
도면2k



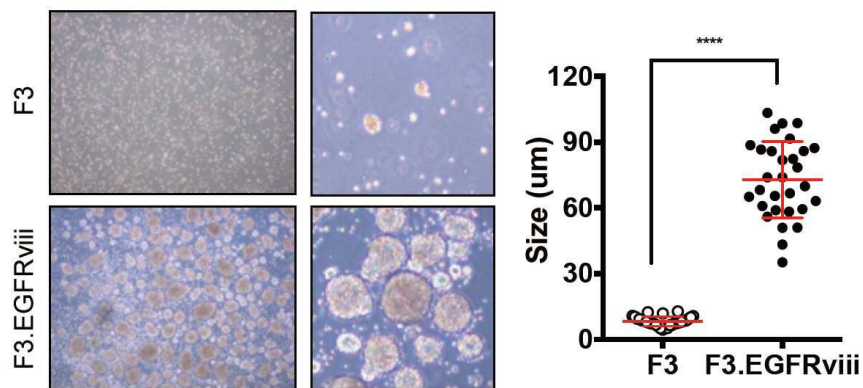
도면2l



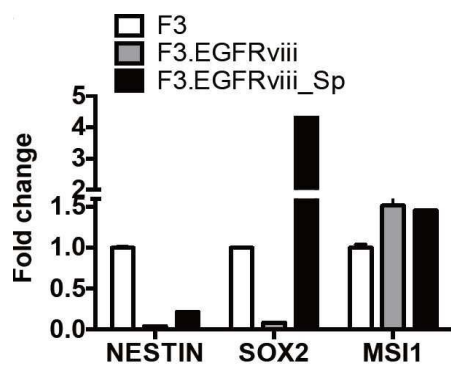
도면2m



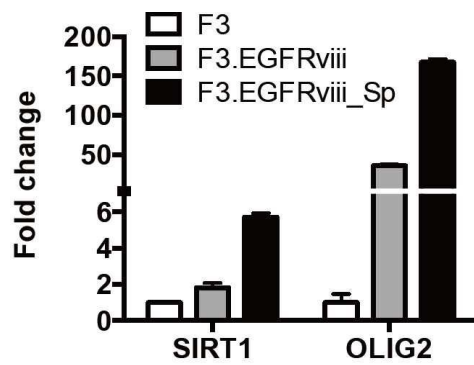
도면3a



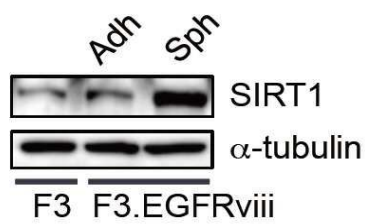
도면3b



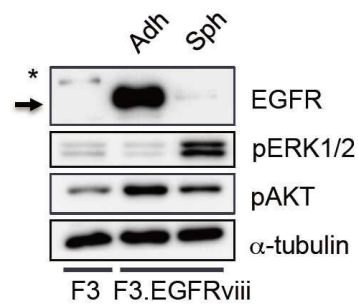
도면3c



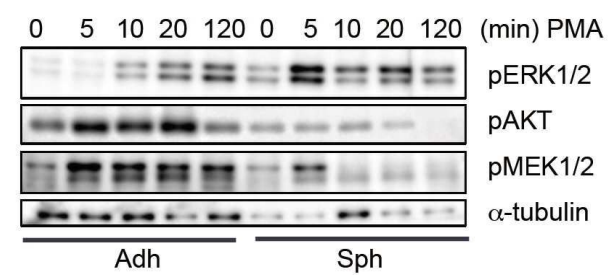
도면3d



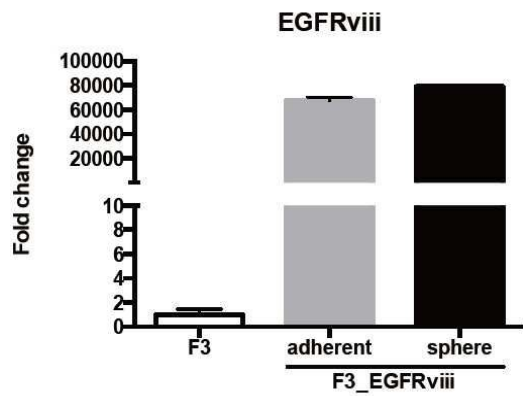
도면3e



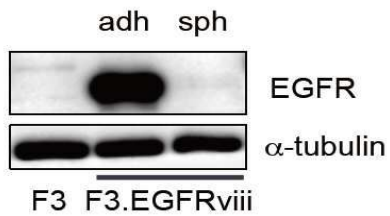
도면3f



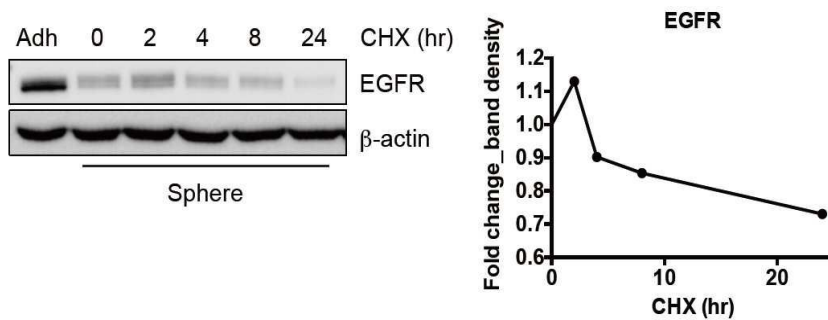
도면3g



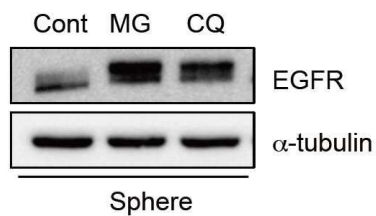
도면3h



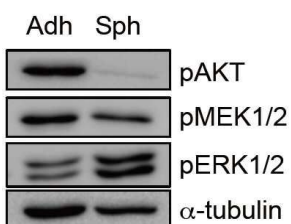
도면3i



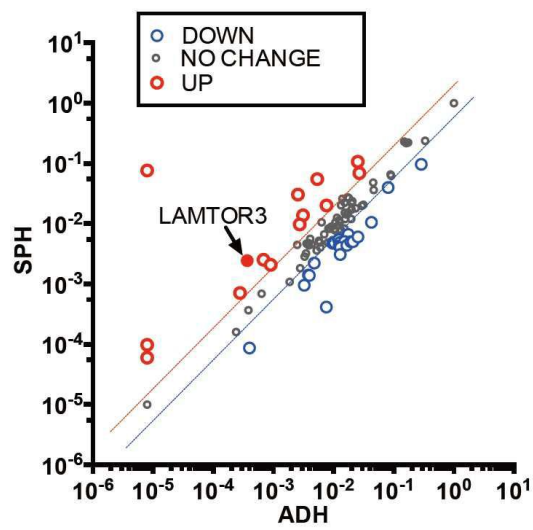
도면3j



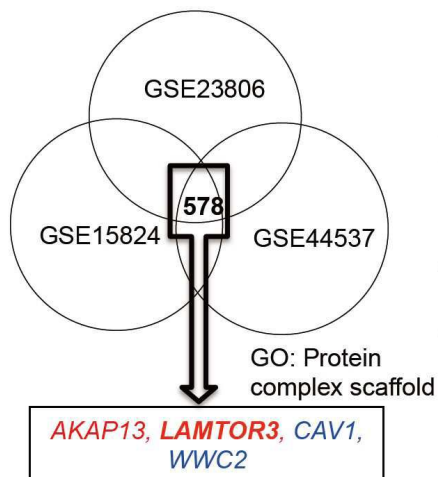
도면4a



도면4b

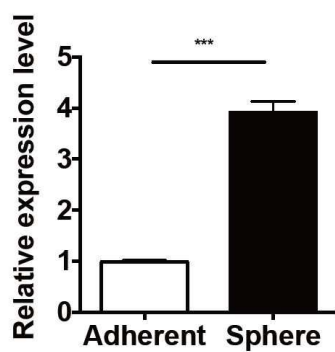


도면4c

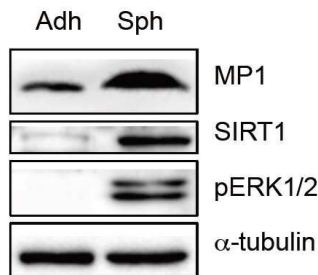


Gene symbol	Gene.title	Gene.ID
AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13	11214
LAMTOR3	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3	8649
CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	857
WWC2	WW and C2 domain containing 2	80014

도면4d



도면4e



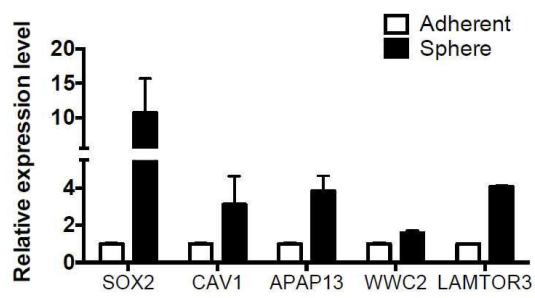
도면4f

	Gene	Description	Adh	Sph	Sph/Adh
up-regulated	CCNA1	Cyclin A1	9.E-04	2.E-03	2.2981
	CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	5.E-03	5.E-02	10.2773
	CDKN2D	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	3.E-03	1.E-02	4.4498
	DLK1	Delta-like 1 homolog (Drosophila)	8.E-06	1.E-04	11.6244
	EGR1	Early growth response 1	3.E-02	7.E-02	2.5739
	ETS2	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	3.E-03	1.E-02	3.5512
	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	3.E-03	3.E-02	11.9138
	JUN	Jun proto-oncogene	3.E-02	1.E-01	4.2256
	LAMTOR3	Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3	4.E-04	2.E-03	6.6144
	MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	8.E-03	2.E-02	2.6442
	MAPK13	Mitogen-activated protein kinase 13	3.E-04	7.E-04	2.54
	MOS	V-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog	8.E-06	6.E-05	7.1163
	SFN	Stratifin	7.E-04	3.E-03	3.673
	B2M	Beta-2-microglobulin	8.E-06	8.E-02	9056.4191
Down-regulated	CCNB2	Cyclin B2	2.E-02	7.E-03	-2.6455
	CCNE1	Cyclin E1	1.E-02	5.E-03	-2.0341
	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	3.E-02	6.E-03	-4.1872
	EGFR	Epidermal growth factor receptor	4.E-03	1.E-03	-2.7104
	ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family	4.E-03	1.E-03	-2.8533
	HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	1.E-02	4.E-03	-2.9012
	KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	2.E-02	5.E-03	-2.9968
	MAP2K2	Mitogen-activated protein kinase kinase 2	2.E-02	5.E-03	-4.1758
	MAP2K5	Mitogen-activated protein kinase kinase 5	1.E-02	3.E-03	-4.188
	MAP2K6	Mitogen-activated protein kinase kinase 6	8.E-03	4.E-04	-18.3175
	MAPK10	Mitogen-activated protein kinase 10	4.E-04	9.E-05	-4.5934
	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	1.E-02	5.E-03	-2.2454
	MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	1.E-02	4.E-03	-3.2163
	MAPKAPK3	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	1.E-02	5.E-03	-2.6215
	MKNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1	5.E-03	2.E-03	-2.1523
	MST1	Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	3.E-03	1.E-03	-3.419
	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	4.E-02	1.E-02	-4.0609
	PAK1	P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1	1.E-02	5.E-03	-2.1442
	PRDX6	Peroxiredoxin 6	8.E-02	4.E-02	-2.0336
	TP53	Tumor protein p53	2.E-02	4.E-03	-3.7839
	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3.E-01	1.E-01	-2.9624
	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	2.E-02	5.E-03	-3.8152

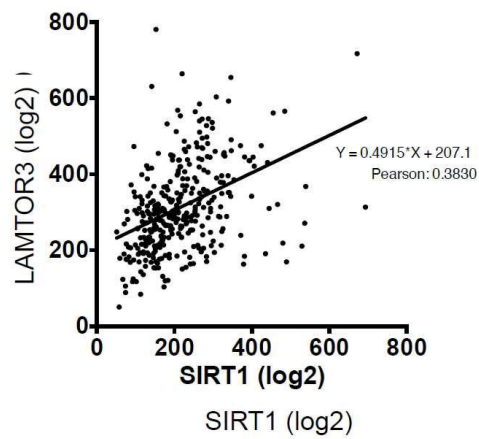
도면4g

GSE No.	Cancer model	Sample size	Reference (PMID#)
GSE23806	primary brain tumor	Control (32), Tumor (12)	25543125 21294158 18037961
GSE15824	primary glioblastomas	Control (2), Tumor (12)	21406405
GSE44537	Neuroblastoma SKNAS induced cancer stem cells	Monolayer(2), Sphere(4)	23479628

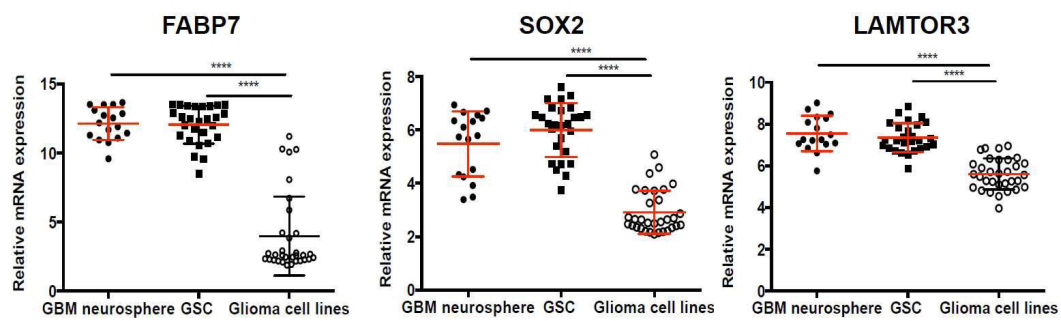
도면4h



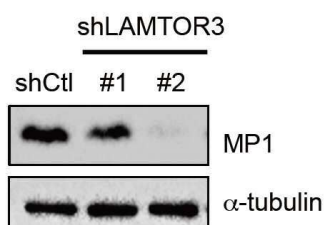
도면4i



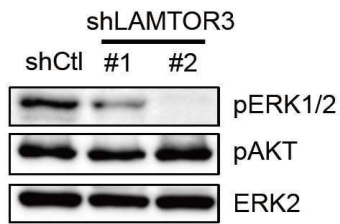
도면4j



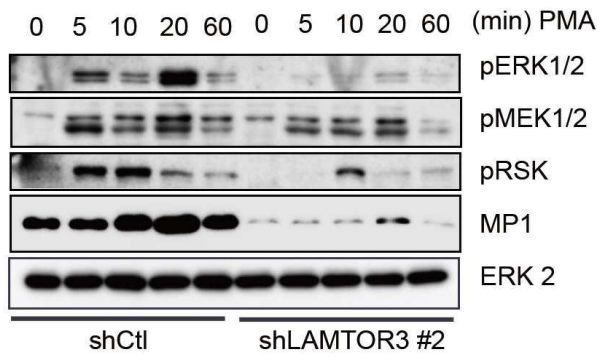
도면5a



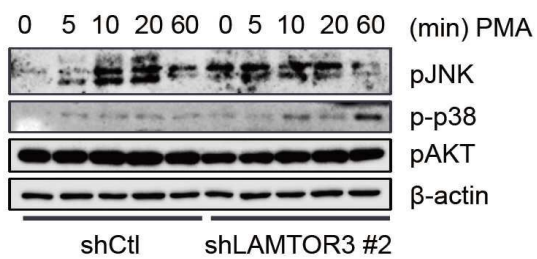
도면5b



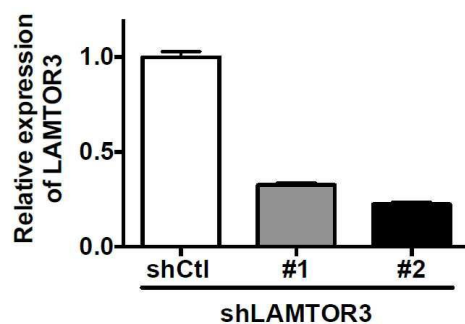
도면5c



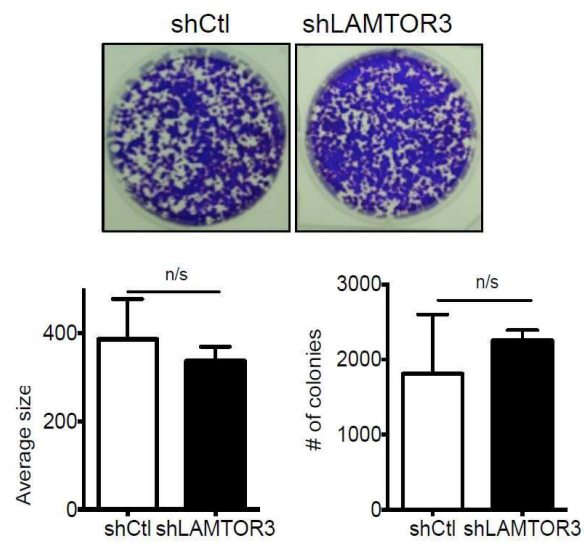
도면5d



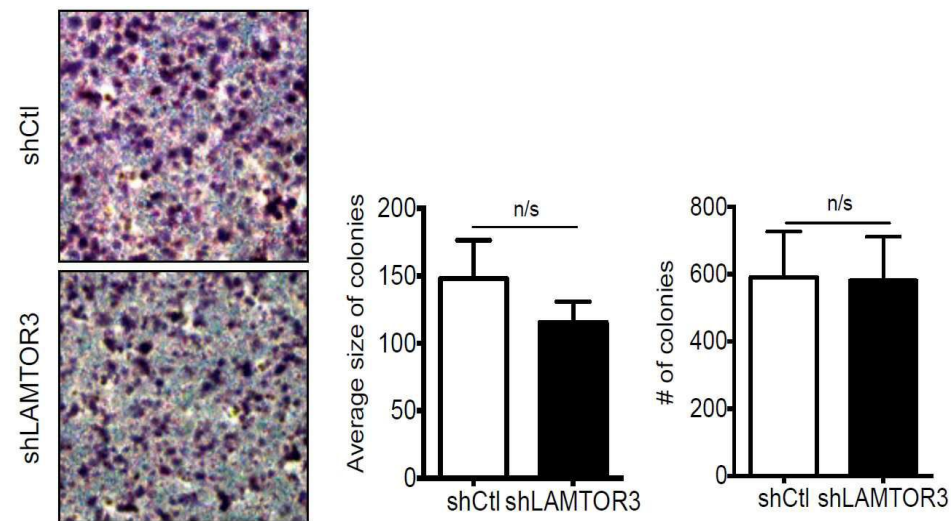
도면5e



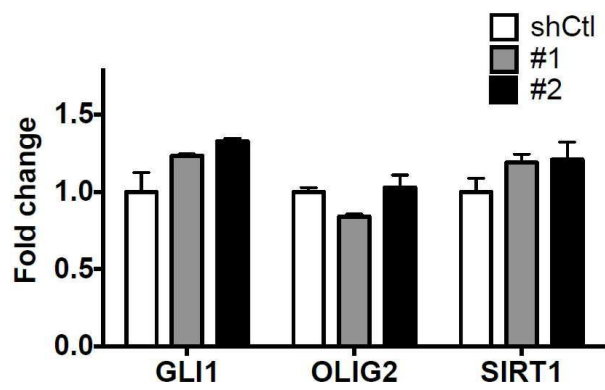
도면5f



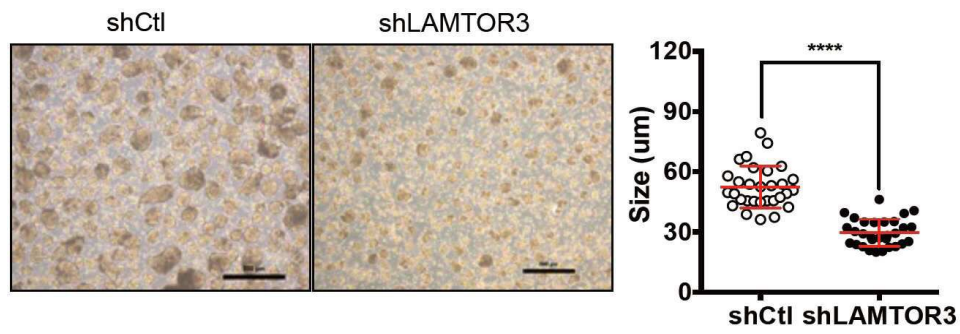
도면5g



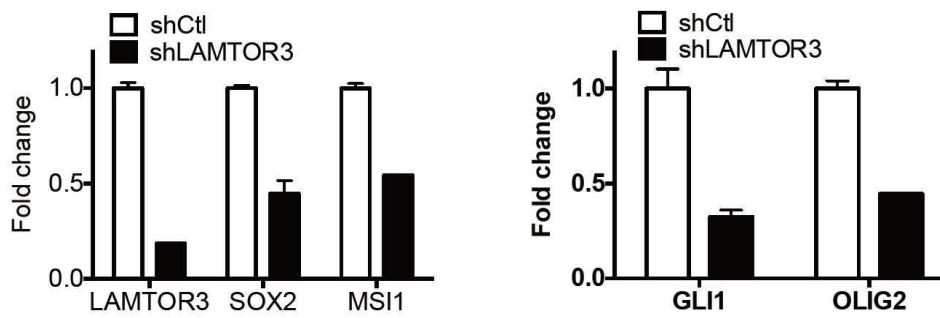
도면5h



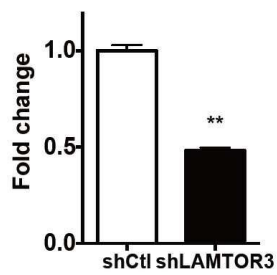
도면6a



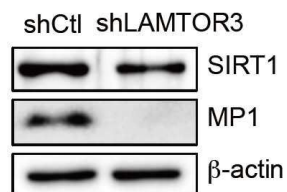
도면6b



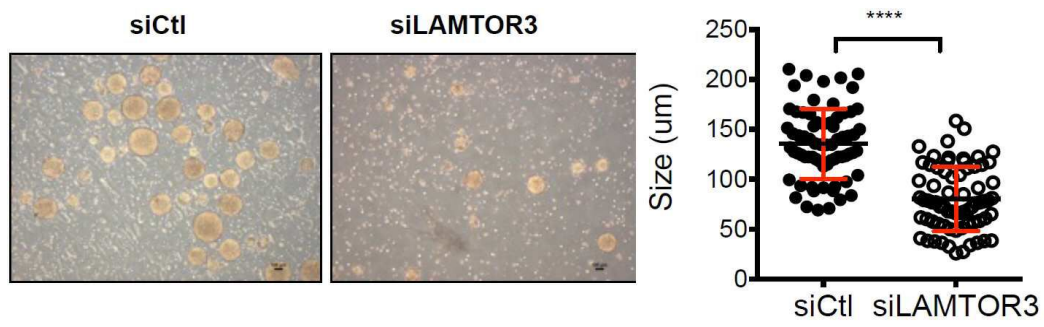
도면6c



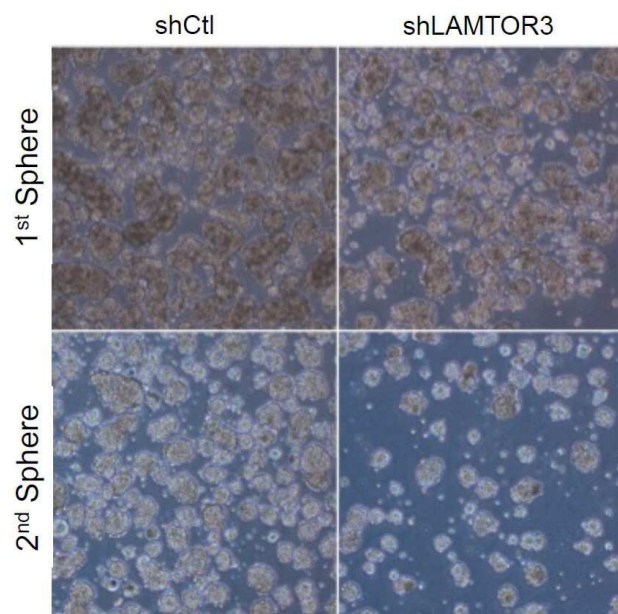
도면6d



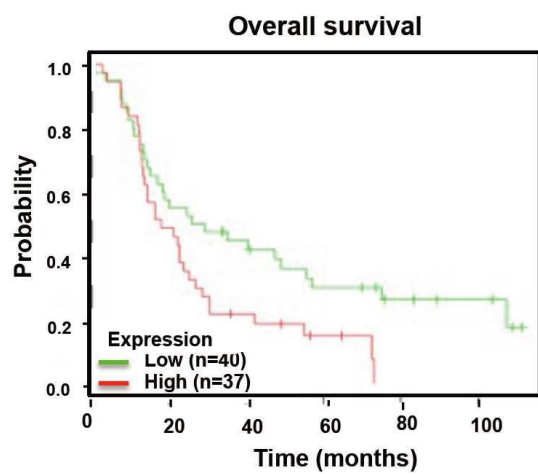
도면6e



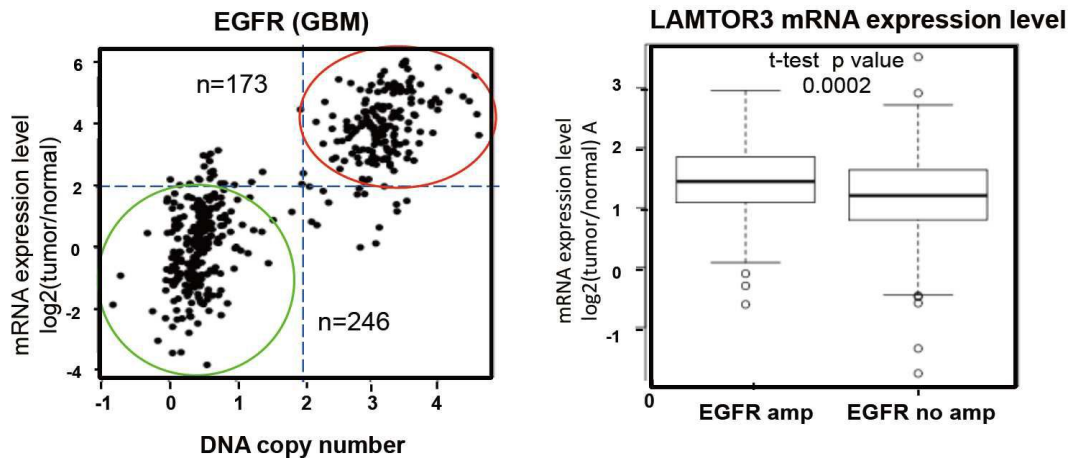
도면6f



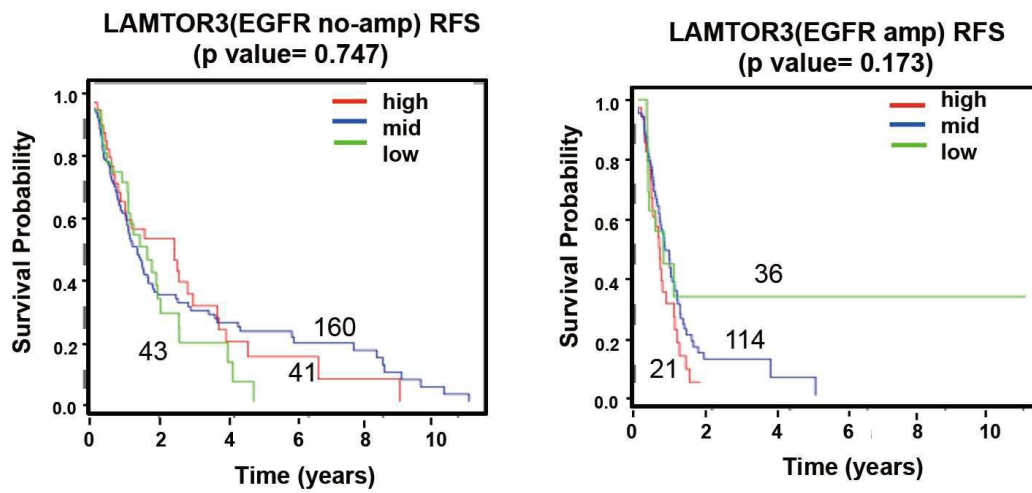
도면7a



도면7b



도면7c



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Methods for inducing tumorigenesis of neural stem cells using EGFRviii expression
- <130> PN170142
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 943
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr
20 25 30

Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser
35 40 45

Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly
50 55 60

Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp
65 70 75 80

Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr
85 90 95

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp
100 105 110

Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu
115 120 125

Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro
130 135 140

Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg
145 150 155 160

Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu
165 170 175

Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly
180 185 190

Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile
195 200 205

Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile
210 215 220

Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His
225 230 235 240

Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys
245 250 255

Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys

260 265 270
 Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys
 275 280 285
 Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys
 290 295 300
 Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp
 305 310 315 320

 Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
 325 330 335
 Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu
 340 345 350
 Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly
 355 360 365
 Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val
 370 375 380
 Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe

 385 390 395 400
 Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu
 405 410 415
 Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro
 420 425 430
 Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile
 435 440 445
 Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp
 450 455 460

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

515 520 525
Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser

530 535 540
Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr
545 550 555 560

Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
565 570 575

Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala
580 585 590

Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys
595 600 605

Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr
610 615 620

Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu
625 630 635 640

Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile
645 650 655

Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys
660 665 670

Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala

675 680 685
Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met

690 695 700
Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met

705 710 715 720
His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp

725 730 735
Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro

740 745 750

Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu
755 760 765

Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp
 770 775 780
 Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln
 785 790 795 800
 Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
 805 810 815
 Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys

820 825 830
 Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu
 835 840 845
 Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr
 850 855 860
 Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val
 865 870 875 880
 Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His
 885 890 895

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

<210> 2
 <211> 5552
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

gtccgggcag cccccggcgc agcgcggccg cagcagcctc cgccccccgc acggtgtgag 60
 cccccgacgc ggccgaggcg gccggagtcc cgagctagcc ccggcggccg ccgccgccca 120
 gaccggacga caggccacct cgtcggcgctc cgcccagtc cccgcctcgc cgccaacgcc 180
 acaaccaccg cgcacggccc cctgactccg tccagtattg atcgggagag ccggagcgag 240
 ctcttcgggg agcagcgatg cgaccctccg ggacggccgg ggacgcgctc ctggcgctgc 300

tggtgcgct ctgcccggcg agtcgggctc tggaggaaaa gaaaggtaat tatgtggtga	360
cagatcacgg ctctgctgc cgcagctgtg gggccgacag ctatgagatg gaggaagacg	420
gcgtccgcaa gtgtaagaag tgcgaagggc cttgccgcaa agtgtgtaac ggaataggta	480
ttggtgaatt taaagactca ctctccataa atgctacgaa tattaacac ttcaaaaact	540
gcacctccat cagtggcgat ctccacatcc tgcgggtggc atttaggggt gactccttca	600
cacatactcc tectctggat ccacaggaac tggatatctt gaaaaccgta aaggaaatca	660
cagggttttt gctgattcag gcttggcctg aaaacaggac ggacctccat gcctttgaga	720
acctagaaat catacgcggc aggaccaagc aacatggtca gttttctctt gcagtcgtca	780
gcctgaacat aacatccttg ggattacgt cctcaagga gataagtgat ggagatgtga	840
taatttcagg aaacaaaaat ttgtgctatg caaatacaat aaactggaaa aaactgtttg	900
ggacctccgg tcagaaaacc aaaattataa gcaacagagg tgaaaacagc tgcaaggcca	960
caggccagggt ctgccaatgcc ttgtgctccc ccgagggtg ctggggcccg gagcccaggg	1020
actgctctc ttgccggaat gtcagccgag gcagggaatg cgtggacaag tgcaaccttc	1080
tggagggtga gccaaggag tttgtggaga actctgagtg catacagtc caccagagt	1140
gcctgcctca ggccatgaac atcacctgca caggacgggg accagacaac tgtatccagt	1200
gtgccacta cattgacggc cccactgcg tcaagacctg cccggcagga gtcattggag	1260
aaaacaacac cctggctcgg aagtacgcag acgccggcca tgtgtgccac ctgtgccatc	1320
caaaactgcac ctacggaatg actgggccag gtcttgaagg ctgtccaacg aatgggccta	1380
agatcccgtc catcgccact gggatggtgg gggccctcct cttgtctgtg tgggtggccc	1440
tggggatcgg ccctttcatg cgaaggcgcc acatcggtcg gaagcgacg ctgcggaggc	1500
tgtctgcagga gaggagcctt ttggagcctc ttacaccag tggagaagct cccaaccaag	1560
ctctcttgag gatcttgaag gaaactgaat tcaaaaagat caaagtgtg ggctccggtg	1620
cgttcgccac ggtgtataag ggactctgga tcccagaagg tgagaaagt aaatttccc	1680
tcgtatcaaa ggaattaaga gaagcaacat ctccgaaagc caacaaggaa atcctcgatg	1740
aagcctacgt gatggccagc gtggacaacc cccacgtgtg ccgctgtgt ggcatctgcc	1800
tcacctccac cgtgcagtc atcacgcagc tcattgccctt cggctgcctc ctggactatg	1860
tccgggaaca caaagacaat attggctccc agtacgtgt caactggtgt gtgcagatcg	1920
caaaggcat gaactacttg gaggaccgtc gcttgggtga ccgcgacctg gcagccagga	1980
acgtactggt gaaaacaccg cagcatgtca agatcacaga ttttgggctg gccaaactgc	2040
tgggtgcgga agagaaagaa taccatgcag aaggaggcaa agtgcctatc aagtggatgg	2100

cattggaatc aattttacac agaattctata cccaccagag tgatgtctgg agctacgggg	2160
tgactgtttg ggagttgatg acctttggat ccaagccata tgacggaatc cctgccagcg	2220
agatctcttc catcctggag aaaggagaac gcctccctca gccaccata tgtaccatcg	2280
atgtctacat gatcatggtc aagtgtctga tgatagacgc agatagtcgc ccaaagtcc	2340
gtgagttgat catcgaattc tccaaaatgg cccgagaccc ccagcgtac cttgtcattc	2400
agggggatga aagaatgcat ttgccaagtc ctacagactc caacttctac cgtgccctga	2460
tggatgaaga agacatggac gacgtgggtg atgccgacga gtacctatc ccacagcagg	2520
gcttcttcag cagccccctc acgtcacgga ctccccctct gagctctctg agtgcaacca	2580
gcaacaattc caccgtggct tgcatgtata gaaatgggct gcaaagctgt cccatcaagg	2640
aagacagctt cttgcagcga tacagctcag accccacagg cgccttgact gaggacagca	2700
tagacgacac cttctctcca gtgctgaat acataaacca gtccgttccc aaaaggcccc	2760
ctggctctgt gcagaatcct gtctatcaca atcagcctct gaacccccgcg cccagcagag	2820
accacacta ccaggacccc cacagcactg cagtgggcaa ccccgagtat ctcaacactg	2880
tccagccac ctgtgtcaac agcacattcg acagccctgc ccaactgggc cagaaaggca	2940
gccaccaaat tagcctggac aacctgact accagcagga cttctttccc aaggaagcca	3000
agccaaatgg catctttaag ggctccacag ctgaaaatgc agaataccta agggtcgcgc	3060
cacaaagcag tgaatttatt ggagcatgac cacggaggat agtatgagcc ctaaaaatcc	3120
agactctttc gataccagg accaagccac agcaggctct ccatccaac agccatgccc	3180
gcattagctc ttagaccac agactggttt tgcaacgttt acaccgacta gccaggaagt	3240
acttcacct cgggcacatt ttgggaagtt gcattccttt gtcttcaaac tgtgaagcat	3300
ttacagaaac gcatccagca agaattatgt ccttttgagc agaaatttat ctttcaaaga	3360
ggtatatttg aaaaaaaaaa aaagtatatg tgaggatttt tattgattgg ggatcttga	3420
gtttttcatt gtcgtattg atttttactt caatgggctc ttccaacaag gaagaagctt	3480
gctggtagca cttgctaccc tgagttcatc caggcccaac tgtgagcaag gaggacaagc	3540
cacaagtctt ccagaggatg cttgattcca gtggttctgc ttcaaggctt ccaactgcaaa	3600
acactaaaga tccaagaagg ctttcatggc cccagcaggc cggatcggta ctgtatcaag	3660
tcatggcagg tacagtagga taagccactc tgtcccttc tgggcaaaga agaaacggag	3720
gggatggaat tcttccttag acttactttt gtaaaaatgt cccacaggta cttactcccc	3780
actgatggac cagtggtttc cagtcagtag cgttagactg acttgtttgt cttccattcc	3840

attgttttga aactcagtat gctgccccctg tcttgctgtc atgaaatcag caagagagga 3900
 tgacacatca aataataact cggattccag cccacattgg attcatcagc atttgacca 3960
 atagcccaca gctgagaatg tggaatacct aaggatagca ccgcttttgt tctcgcaaaa 4020
 acgtatctcc taatttgagg ctcatatgaa atgcatcagg tcctttgggg catagatcag 4080
 aagactacaa aaatgaagct gctctgaaat ctcttttagc catcaccca acccccacaa 4140
 attagtttgt gttacttatg gaagatagtt ttctcttttt acttcacttc aaaagctttt 4200
 tactcaaaga gtatatgttc cctccaggtc agctgcccc aaacccctc cttacgcttt 4260

gtcacacaaa aagtgtctct gccttgagtc atctattcaa gcacttacag ctctggccac 4320
 aacaggcat tttacagggt cgaatgacag tagcattatg agtagtgtgg aattcaggta 4380
 gtaaataatga aactagggtt tgaaattgat aatgctttca caacatttgc agatgtttta 4440
 gaaggaaaa agttccttc taaaataatt tctctacaat tggaagattg gaagattcag 4500
 ctagttagga gccaccttt ttctctaact tgtgtgtgcc ctgtaacctg actggttaac 4560
 agcagtcctt tgtaaacagt gttttaact ctcttagtca atatccacc catccaattt 4620
 atcaaggaag aaatggttca gaaaatattt tcagcctaca gttatgttca gtcacacaca 4680

catacaaaat gtctcttttg cttttaaagt aatttttgac tcccagatca gtcagagccc 4740
 ctacagcatt gttaagaaag tatttgattt ttgtctcaat gaaaataaaa ctatattcat 4800
 ttccactcta ttatgctctc aaataccct aagcatctat actagcctgg tatgggtatg 4860
 aaagatacaa agataaataa aacatagtcc ctgattctaa gaaattcaca atttagcaaa 4920
 ggaaatggac tcatagatgc taaccttaaa acaacgtgac aaatgccaga caggacccat 4980
 cagccaggca ctgtgagagc acagagcagg gaggttgggt cctgcctgag gagacctgga 5040
 agggaggcct cacaggagga tgaccaggtc tcagtcagcg gggagggtgga aagtgcaggt 5100

gcatcagggg caccctgacc gaggaacag ctgccagagg cctccactgc taaagtccac 5160
 ataaggctga ggtcagtcac cctaacaac ctgctccctc taagccaggg gatgagcttg 5220
 gagcatcca caagtccct aaaagttgca gccccaggg ggattttgag ctatcatctc 5280
 tgcacatgct tagtgagaag actacacaac atttctaaga atctgagatt ttatattgtc 5340
 agttaaccac tticattatt cattcacctc aggacatgca gaaatatttc agtcagaact 5400
 gggaacaga aggacctaca ttctgtgtc acttatgtgt caagaagcag atgatgatg 5460
 aggcaggta gttgtaagt agtcacattg tagcattaaa ttctagtatt ttgtagttt 5520

gaaacagtaa ctttaataaaa gagcaaaagc ta 5552

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Asp Asp Leu Lys Arg Phe Leu Tyr Lys Lys Leu Pro Ser Val

1 5 10 15

Glu Gly Leu His Ala Ile Val Val Ser Asp Arg Asp Gly Val Pro Val

20 25 30

Ile Lys Glu His Ala Leu Arg Pro Gly Phe Leu Ser Thr Phe Ala Leu

35 40 45

Ala Thr Asp Gln Gly Ser Lys Leu Gly Leu Ser Lys Asn Lys Ser Ile

50 55 60

Ile Cys Tyr Tyr Asn Thr Tyr Gln Val Val Gln Phe Asn Arg Leu Pro

65 70 75 80

Leu Val Val Ser Phe Ile Ala Ser Ser Ser Ala Asn Thr Gly Leu Ile

85 90 95

Val Ser Leu Glu Lys Glu Leu Ala Pro Leu Phe Glu Glu Leu Arg Gln

100 105 110

Val Val Glu Val Ser

115

<210> 4

<211> 4259

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ggaggggagg ggcgcggccg ccggacgcgc cctcgcagct tccgccgggc ccctccggaa 60

atcccgtatc gtagggcgac ggcggttag aaagtgttc ctggagcgca gacgaggtca 120

tgaatcatgt gacggtggct tgaggaggaa cctgtcttta aagctgtccc tgaagtaca 180

gcggagagaa ccaggcagcc cagaaacccc aggcgtggag attgatcctg cgagagaagg 240

gggttcatca tggcggatga cctaaagcga ttcttgtata aaaagttacc aagtgttgaa 300

gggtccatg ccattgttgt gtcagataga gatggagtac ctgttattaa agagcatgct 360

ttgcgacctg gtttcttacc cacttttgcc ctgcaacag accaaggaag caaacttgga 420

ctttcaaaa ataaaagtat catctgttac tataacacct accaggtggt tcaatttaat 480

cgtttacctt tgggtggtgag ttctatagcc agcagcagtg ccaatacagg actaattgtc	540
agcctagaaa aggaacttgc tccattgttt gaagaactga gacaagttgt ggaagtttct	600
taatctgaca gtggtttcag tgtgtacctt atcttcatta taacaacaca atatcaatcc	660
agcaatcttt agactacaat aatactttta tccatgtgct caagaaaggg cccctttttc	720
caacttatac taaagagcta gcatatagat gtaatttata gatagatcag ttgctatatt	780
ttctggtgta gggctctttct tatttagtga gatctaggga taccacagaa atggttcagt	840
ctatcacagc tcccatggag ttagtctggc caccagatat ggatgagaga ttctattcag	900
tggatcagaa tcaaactggt acattgatcc acttgagccg ttaagtgtcg ccaattgtac	960
aatatgcccc ggcttgcaga ataaagccaa ctttttattg tgaataataa taaggacata	1020
tttttcttca gattatgttt tatttctttg cattgagtga ggaacataaa atggcttggc	1080
aaaagtaata aaatcagtac aatcactaac ttctcttctg acatattatt ttgcagtata	1140
gatgaatatt actaatcagt ttgattattc tcagagggtg ctgctcttta atgaaaatga	1200
aaattatagc taatgttttt tcttcaaact ctgctttctg taaccaatca gtgttttaat	1260
gtttgtgtgt tcttcataaa atttaaatc aattcgttat tctgtttcca atgttagtat	1320
glatgtaaac atgatatgac agccattttt ttcatatgtg agtaaaaata aaatagtatt	1380
tttaaaaata tagtttgagc actgtatagg tctttttttt gttcagactt ttccaaaaa	1440
tctaaacata attaatatac tctttcagcc acatgaataa ataatgagtg ttctttgtag	1500
glattggttt ggagattgtt ttacggtagt atgaactgtt aactggaaaa gaaacctgag	1560
attgcagtca gccaaagattg tgccactgca ccccgagctg ggcaacagag actccgtctc	1620
aaaaacaaaa aagaaaagaa accaagaaac ctcaggcatg aacctaatTT aatctccatg	1680
aaagaggtag tacagttcta gaatatacc tttatgttca ggaatgcagt ctatcattca	1740
gagttaatTT ctttctaggc tctttgacaa tcagtttttc cctggatcag ttcagtagat	1800
atgcattgag cactgtgtg ccagtcagcc gagctatcac attgcacaat tctaagaagc	1860
accattcatg tctcatcata tttctatgct ctgggagttg cctttcacat agaatatgtg	1920
tgattgttat cctagaatt gtgcagttag gcaattggct aggtgctgtg ctgctttttc	1980
tttctttctt ttttttttta agagacagag tcttgctgtg ttgccagtc tggagtgcag	2040
tggtggcatg atcttgcctc actgtaacct ctgcctcctg ggttcaagct gttctcatgc	2100
cccattctcc ctgttagctg ggattacagg cttacacat cgcacttggc aaatttgtgt	2160
atTTTTtagta gagacaggaa ttcacatgti tggccaggct ggtcttgaac tctgactta	2220
aagtgatcca cctgctttgg cctcccaaaa tgetaggatt ataggtgtga gccactgcac	2280
cgggccatgt gctacttttt cttctttcca tcttctctcc cttcttcagt gtaaatatga	2340

gattaatttg tgatacctta ctttaaagaa cttagagttc agtaaaggaa gcaggatag	2400
aaagtgctat gataaagcta tacataggat ggtatagaac cacagactag gggcacttaa	2460
aatgggcaag aaaatagcct ttgtaataaa aatagaggca agagatataa tgctttacct	2520
gcaaagagct ataaatacag ccatgtacca tataatgatg tttcagttag tgaaggacca	2580
catacgaggg tggtcagaac agcaggctat accatatagc ctagggtgtg agtaggctat	2640
accatatagc ctagggtgtg agtagtaggc tataccatat agcctaggtg ttagtagta	2700
ggcgatacca tatagcctag gtgtgtagta gtaggctata ccatatagcc taggtgtata	2760
gtagtaggct ataccatata gcctagggtg gtagtaggct ataccatata gcctaggat	2820
gtagtagtag gctataccat atagcctagg tgtgtagtag taggctatac catctgggt	2880
tcctgtcagt acagtatgat gttcacataa tgatgaaac acctaacaaa gcatgtctcg	2940
aaatgtatcc acattgttac gtaacacatg actgtagtta attgttacia ttgaaatact	3000
agatgtactc attgaaatcc agaattccca ttatctggat tatttaatat cgttcaggaa	3060
atTTTTGCCA gtgcaatggg gcatgaaaca atgtctttta gaaatgaggt ggccagattt	3120
ctatttgcag ataataattg tatactctaaa aatcctagaa aaagaaatga taacaaatgg	3180
agctacttaa cctttacatg ttgaatgctg ccactgttaa aatttctgag ggggtataat	3240
agataaacta tcccatagtt catctggaaa aataagggtg tgaaaattgc taagaaattt	3300
ttgaaagggt aatgtaaacc tagattaact gtttttgaaa ggtagtacag aactgaatgc	3360
acaactagat atcaatggta tgtactcacc cagaaaaaag acttcagtac atacatgta	3420
gggcttaaaa cattgttata aagacgggat cacaatggga aaaggattat tcaataagta	3480
gggcaggcat tcctatgcc tgctagggaa gtgtgacttg ttatactctt tatgtacagc	3540
aattggcagt ctgtgaaact tttaaattca tatacataac cttttgcct gcaattccac	3600
ttctagaaat ttatctacc aaacaaagca catagatgtg caaaagtatg tatttacaag	3660
tatattcttt gcaacttggg aatgtcaaag aattggaagc aacctaaata tctgcatag	3720
gtaggataac catatgcttt ggctttttga aactaccag ttatactg ctgttcttgg	3780
ataattatta atagtcttt cattctcaat gtctcacttt agataataaa ttacagagga	3840
ttggtgaaac taatttgccc aatggaaaaa ggaatgaaga agtgctttag gtactgagat	3900
gaaaagatct ctaaggcata ataatgttta ttgagaaaag catggtgtca aactgtatgg	3960
catgtctaaa ttgatgtata agaagaaaaa atgtgtatgt attcctattt gtttgtatat	4020
ggtagactgt ctctgaagac atatatggaa gaacctgatc acattggtag tctccaagga	4080

gcagaactag atacctgggg gataaggatc ccaggagtga gccttttcat tgtaaacttc 4140

attgtacttt gagtttttaa ctgttcaaaa ataataaaat tagaaataaa atatttcaac 4200

aaacaataaa atgggatatt tggggaagaa agttgtctca gggtcttcca aagaagcag 4259

<210> 5

<211> 58

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAMTOR3 shRNA #1

<400> 5

ccggcttgct ccattgtttg aagaactcga gttcttcaaa caatggagca agtttttg 58

<210> 6

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAMTOR3 shRNA #2

<400> 6

gtaccggata ctaaagagct agcatatact cgagtatatg ctagctcttt agtatTTTT 60

tg 62