



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0091076
(43) 공개일자 2020년07월30일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12Q 1/6886</i> (2018.01) <i>G01N 33/574</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12Q 1/6886</i> (2018.05)
<i>G01N 33/57407</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0007842</p> <p>(22) 출원일자 2019년01월22일
심사청구일자 2019년01월22일</p> | <p>(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
송민호
대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 306동 1202호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)</p> <p>강예은
대전광역시 중구 서문로 96, 212동 203호(문화동, 센트럴파크2단지아파트)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
최규환</p> |
|---|--|

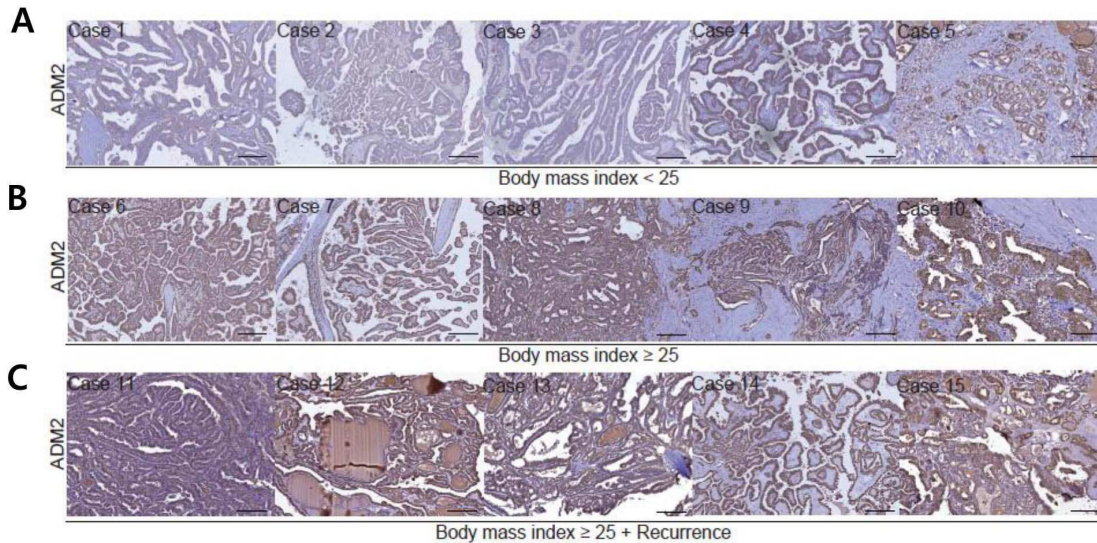
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 ADM2 유전자 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 ADM2 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 갑상선암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 33/57484 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/5753 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)

(72) 발명자

이정호

대전광역시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 E7
 7108호(구성동)

고현용

대전광역시 서구 월평동로 45, 108동 802호(
 월평동, 진달래아파트)

김현정

서울특별시 마포구 마포대로 109, A-1402호(
 공덕동, 롯데캐슬프레지던트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1B03027820
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(교육부)
 연구과제명 BRAFV600E과발현 동물모델에서 단일-탄소 대사회로의 암 제어 타겟 발굴
 기 여 율 1/2
 주관기관 충남대학교산학협력단
 연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017K1A1A2013124
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 집단연구지원(R&D)
 연구과제명 미토콘드리아 단백질 항상성 조절
 기 여 율 1/2
 주관기관 충남대학교산학협력단
 연구기간 2017.06.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

ADM2(adrenomedullin 2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 압타머를 포함하는 것인 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 6

- (1) 갑상선암 의심 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 *ADM2* 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (2) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및
- (3) 상기 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 과발현된 경우에 갑상선암으로 판단하는 단계;를 포함하는 갑상선암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

- (1) 비만 또는 재발된 갑상선암 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 *ADM2* 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (2) 상기 발현 수준을 정상 체중의 갑상선암 환자 시료의 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- (3) 상기 발현 수준이 정상 체중의 갑상선암 환자 시료보다 과발현된 경우에 갑상선암 악화 위험성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 갑상선암 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

갑상선암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 후보 물질의 투여 후 *ADM2* 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 것을 포함하는 갑상선암 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 *ADM2*(adrenomedullin 2) 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 갑상선은 갑상선염의 아래쪽, 숨을 쉴 때 공기의 통로가 되는 기도 앞쪽에 위치한 나비모양의 기관으로, 갑상선 호르몬을 생산 및 저장했다가 필요한 기관에 내보내는 기능을 한다.
- [0003] 갑상선암(thyroid cancer)은 갑상선에 생긴 암을 총칭하는 것으로 내분비계의 가장 흔한 악성종양이다. 갑상선 암은 크게 '잘 분화된 갑상선 암'과 '기타 갑상선암'으로 나뉘는데, 조직학적 모양, 암의 기원세포 및 분화 정도에 따라 유두암(Papillary carcinoma), 여포암(Follicular carcinoma), 수질암(Medullary thyroid carcinoma), 역형성암(Anaplastic carcinoma, 미분화 갑상선암)으로 구분된다. 이 중에서 갑상선유두암종과 갑상선여포암종과 같은 분화종양들은 예후가 좋은 편이지만, 주위 조직으로 침윤해 들어간 경우나 다른 장기에 전이된 경우엔 생존율이 급격히 낮아진다. 역형성암은 드물게 발생하지만 악성도가 높은 미분화암으로 환자의 대부분이 6개월 안에 사망할 수 있다.
- [0004] 갑상선암은 대부분 첫 수술로 치료가 가능하고 병기별로 보면 80~85%가 사망의 위험이 낮은 군에 속하지만 이들 중 일부는 재발의 고위험요소를 가지고 있고, 실제로 20% 정도가 재발하여 재발 환자들 중 많게는 50~60%가 사망할 수 있다고 보고되어 있다. 재발 갑상선암의 치료 후 예후를 판단하는 것은 첫 수술시보다 어렵기 때문에 갑상선암 재발에 관여하는 인자들과 재발 갑상선암의 재발 빈도, 재발 부위, 무병 기간, 재발 시 치료, 치료 결과 등을 분석하여 재발을 줄일 수 있는 방법에 대한 연구가 이루어지고 있다.
- [0005] 한편, 한국등록특허 제1587635호에는 '갑상선암 진단을 위한 갑상선암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화 검출 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1845590호에는 '유전자를 이용한 폐암 예후예측용 조성물'이 개시되어 있으나 본 발명의 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 *ADM2* 유전자 마커 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 비만과 갑상선암의 임상적 연관성에 관한 기전을 확인하기 위해, 암이 생기지 않은 대조군, 정상식이 조건의 갑상선암 동물 모델 및 고지방식이 조건의 갑상선암 동물 모델에서 RNA seq. 분석을 수행한 결과, *ADM2*(adrenomedullin 2) 유전자의 발현 수준이 상기 세 그룹에서 현저한 차이가 있음을 확인하였다. 특히, 동물 모델에서 *ADM2* 유전자의 발현 수준은 갑상선암의 크기와 비례하여 증가되는 것이 관찰되었고, 임상 시료 분석에서 정상 체중 갑상선암 환자군에 비해 비만인 갑상선암 환자군에서 *ADM2* 단백질의 발현이 증가되었고, 비만이면서 재발된 갑상선암 환자에서는 *ADM2* 단백질의 발현이 더욱 증가된 것을 확인하여, 갑상선암의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오마커로 *ADM2* 유전자 또는 이의 단백질의 가능성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 *ADM2*(adrenomedullin 2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 갑상선암의 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 갑상선암 의심 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 *ADM2* 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하여 갑상선암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 비만 또는 재발된 갑상선암 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 *ADM2* 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하여 갑상선암의 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 갑상선암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 후보 물질의 투여 후 *ADM2* 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 것을 포함하는 갑상선암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명의 *ADM2* 유전자 또는 이의 단백질은 갑상선암의 진단, 예후 또는 재발 예측을 위한 신규한

바이오마커로, 갑상선암 진단 또는 중증도 예측 등에 유용하게 활용될 수 있고, *ADM2* 유전자 또는 이의 단백질을 발현 수준 변화 분석을 통해 갑상선암 치료제의 스크리닝 방법에도 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 암이 생기지 않은 대조군(control), 정상식이 조건의 갑상선암 동물모델(NCD) 및 고지방식이 조건의 갑상선암 동물모델(HFD)의 조직 내 유전자 발현 수준을 RNA seq.로 분석한 결과이다.

도 2는 NCD 및 HFD에서 *ADM2* 단백질의 발현을 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)을 통해 확인한 결과 및 *ADM2* 양성 세포의 비율을 계산한 그래프이다.

도 3은 정상체중(Body mass index < 25)의 갑상선암 환자(A), 비만(Body mass index ≥ 25)의 갑상선암 환자(B) 및 비만이면서 재발된 갑상선암 환자(C)의 갑상선암 조직에서 *ADM2* 단백질의 발현을 면역조직화학염색을 통해 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *ADM2*(adrenomedullin 2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0015] *ADM2*(adrenomedullin 2) 유전자 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록(NC_000022.11)되어 있으나, *ADM2* 유전자와 갑상선암과의 연관성은 기존에는 전혀 알려지지 않았다.

[0016] 본 발명의 상기 *ADM2* 유전자는 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열 (추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 (즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명에서, 용어 '진단(diagnosis)'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 갑상선암 발병 여부를 확인하는 것이다.

[0018] 본 발명에서, 용어 '예후(prognosis)'는 갑상선암 중증도의 증가 및 감소를 의미한다. 암 환자에 있어서 예후는 통상적으로 암 발병 또는 외과적 시술 후 일정기간 내에 전이 여부 또는 생존기간을 뜻한다. 예후의 예측은 특히 갑상선암 환자의 화학치료 여부를 비롯하여 향후 치료의 방향에 대한 단서를 제시하는 것으로, 질환의 치료 후 환자의 생리적 또는 환경적 상태를 종합적으로 고려하여 치료 후 경과를 예측하는 모든 행위로 해석될 수 있다.

[0019] 따라서, 본 발명의 목적상 상기 예후 예측은 갑상선암 치료 후 질환의 경고 및 완치 여부를 미리 예상하여 갑상선암 환자의 무병생존율 또는 생존율을 예측하는 것을 의미한다. 예를 들어, '예후가 좋다'고 예측하는 것은 갑상선암 치료 후 환자의 무병생존율 또는 생존율이 높은 수준을 나타내어 갑상선암 환자가 치료될 가능성이 높다는 것을 의미하고, '예후가 나쁘다'고 예측하는 것은 갑상선암 치료 후 환자의 무병생존율 또는 생존율이 낮은 수준을 나타내어 갑상선암 환자로부터 암이 재발하거나 또는 갑상선암으로 인하여 사망할 가능성이 높다는 것을 의미한다. 상기 무병생존율은 갑상선암 치료 후 환자가 암의 재발없이 생존할 수 있는 가능성을 의미하고, 생존율이란 갑상선암 치료 후 환자가 암의 재발여부에 관계없이 생존할 수 있는 가능성을 의미한다.

[0020] 또한, 본 발명에서 'mRNA 발현 수준 측정'은, 갑상선암 진단 또는 예후 예측을 위해 생물학적 시료에서 갑상선암 마커 유전자(*ADM2*)의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR(reverse transcriptase polymerase chain reaction), 정량적 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 또한, 본 발명에서 상기 *ADM2* 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있고, 상기 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 *ADM2* 유전자의 염기서열(accession number; NM_001253845.1)을 참고하여, 당업계의 통상

의 실시자가 공지된 방법, 프로그램 또는 툴을 이용하여 디자인할 수 있다.

- [0022] 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명에서는 *ADM2* 유전자의 염기서열에 결합할 수 있는 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 갑상선암 진단 또는 예후를 예측할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서, 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중연쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 *ADM2* 폴리뉴클레오타이드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 갑상선암 진단 또는 예후를 예측할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명에서 '단백질의 발현 수준 측정'은, 갑상선암 진단 또는 예후 예측을 위해 생물학적 시료에서의 갑상선암 마커 유전자(*ADM2*)에서 발현되는 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 통상적으로 단백질의 양을 확인함으로써 수행될 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏(western blot), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay, RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting) 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명에서 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는 *ADM2* 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체 또는 애포타머일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서, 용어 "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 *ADM2* 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, *ADM2* 유전자의 전장 혹은 일부를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 *ADM2* 유전자의 전장 혹은 일부에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질을 면역원(항원)으로 사용하여, 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 기능적인 단편도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 ScFv 등이 있다.
- [0027] 본 발명에서, 용어 "애포타머(aptamer)"는 안정된 삼차구조를 유지하면서 특정 분자에 특이적으로 강하게 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 특이적 결합을 하는 기능 때문에 항체와 비교되며 항체의 대체 기술로 평가되고 있다.
- [0028] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 키트는 *ADM2* 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 검출여부를 확인함으로써 갑상선암의 진단과 예후를 예측할 수 있다. 본 발명의 갑상선암 진단 또는 예후를 예측하기 위한 키트에는 *ADM2* 유전자의 발현 수준을 검출하기 위한 제제(예컨대, 프라이머 또는 프로브) 또는 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 제제(예컨대, 항체 또는 애포타머) 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 *ADM2* 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 진단 또는 예후용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관, 및 형광표식 프로

브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기관은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 키트가 ADM2 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 키트일 경우, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC(Fluorescein isothiocyanate), RITC(Rhodamine B isothiocyanate) 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸벤지딘)가 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명은 또한,

[0034] (1) 갑상선암 의심 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 ADM2 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0035] (2) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및

[0036] (3) 상기 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 과발현된 경우에 갑상선암으로 판단하는 단계;를 포함하는 갑상선암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 갑상선암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 생물학적 시료로부터 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준 측정, 생물학적 시료로부터 유전자의 mRNA 또는 단백질을 분리하여 측정될 수 있고, 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질의 분리 방법은 당업계의 공지의 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0038] 본 발명에서 용어 '생물학적 시료'란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 상기 생물학적 시료는 조작하거나 조작하지 않은 상태로 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 갑상선암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 갑상선암 의심 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 ADM2 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료에서 측정된 ADM2 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 과발현된 경우, 갑상선암 의심 환자를 갑상선암으로 진단할 수 있다.

[0040] 본 발명은 또한,

[0041] (1) 비만 또는 재발된 갑상선암 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 ADM2 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0042] (2) 상기 발현 수준을 정상 체중의 갑상선암 환자 시료의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

[0043] (3) 상기 발현 수준이 정상 체중의 갑상선암 환자 시료보다 과발현된 경우에 갑상선암 악화 위험성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 갑상선암 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0044] 본 발명의 갑상선암 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법은, 비만인 갑상선암 환자 시료에서 ADM2 유전자 또는 ADM2 단백질의 발현 수준을 측정하여, 정상 체중 갑상선암 환자 시료의 ADM2 유전자 또는 ADM2 단백질 발현 수준과 비교하여, 갑상선암 환자의 예후가 좋은지, 아니면 나쁜지를 예측하기 위한 정보를 제공할 수 있다. 구체적으로는, 비만인 갑상선암 환자 시료의 ADM2 유전자 또는 ADM2 단백질의 발현 수준이 정상 체중의 갑상선암 환자 시료의 발현 수준과 비교했을 때 높게 측정되면 갑상선암 악화 위험성이 높은 것으로 판단할 수 있는 것이다. 또한, 본 발명의 방법은 비만 갑상선암 환자에 비해 비만이면서 갑상선암이 재발된 환자 시료에서 ADM2 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 더욱 증가한 것을 통해 갑상선암 재발의 위험을 예측할 수 있다.

[0045] mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법 및 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법은 전술한 것과 같으며, 정상 체중의 갑상선암 환자에서의 마커 유전자 또는 단백질의 발현량과 비만인 갑상선암 또는 갑상선암 재발 환자에서의 마커 유전자 또는 단백질의 발현량 수준비교는 절대적(예: $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 상대적(예: 시그널의 상대 강도) 차이로 나타낼 수 있다.

[0046] 본 발명은 또한, 갑상선암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 후보 물질의 투여 후 ADM2 유전자의 발현 수준 또

는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 것을 포함하는 갑상선암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0047] 구체적으로, 갑상선암 치료 후보 물질의 존재 및 부재 하에서 *ADM2* 유전자 또는 *ADM2* 단백질의 발현 수준의 변화(증가 또는 감소)를 비교하는 방법으로 갑상선암 치료제를 스크리닝할 수 있고, 바람직하게는 *ADM2* 유전자 또는 *ADM2* 단백질의 발현 수준을 간접적으로 또는 직접적으로 감소시키는 물질은 갑상선암의 치료제로서 선택할 수 있다. 즉, 갑상선암 치료 후보 물질의 부재 하에 갑상선암 세포에서의 본 발명의 *ADM2* 유전자 또는 *ADM2* 단백질의 발현 수준을 측정하고, 또한 갑상선암 치료 후보 물질의 존재하에서 본 발명의 *ADM2* 유전자 또는 *ADM2* 단백질의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 갑상선암 치료 후보 물질이 존재할 때의 본 발명의 *ADM2* 유전자 또는 *ADM2* 단백질의 발현 수준이 갑상선암 치료 후보 물질의 부재 하에서의 발현 수준보다 감소시키는 물질을 갑상선암의 치료제로 예측할 수 있는 것이다.

[0048] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 재료 및 방법

[0050] 1. RNA 시퀀싱

[0051] LSL-BRAF 돌연변이가 티로글로불린(thyroglobulin)에서 특이적으로 발현되는 C57BL/6 마우스 갑상선 발암 동물 모델을 대상으로 정상식이 또는 고지방식이(정상식이의 지방 함량 대비 10배의 지방 함유)한 군의 갑상선 조직과 대조군(LSL-BRAF 돌연변이가 없는 동물 모델; normal)의 갑상선 조직을 트리졸에 보관한 후 Qiagen의 RNA assay 키트를 이용하여 RNA를 추출하고, 마크로젠 회사에 시퀀싱을 의뢰하여 BAM 파일을 받았다. Tuxedo 프로토콜을 이용하여 RNA 시퀀싱에서 유의하게 차이가 나는 유전자를 선정하였으며, 그룹은 대조군 및 정상식이한 갑상선암 동물모델과, 정상식이한 갑상선암 동물모델 및 고지방식이한 갑상선암 동물모델로 나누어 2번 분석하였다.

[0052] 2. 시료 준비

[0053] 2-1. 갑상선암 동물모델 시료 준비

[0054] 기존에 다른 연구에서 사용된 LSL-Braf^{V600E} X TPO-Cre 마우스는 태아기일(embryonic day) 14.5일에 TPO-Cre가 발현할 때 LSL-Braf^{V600E}의 돌연변이가 유도되어 마우스의 갑상선 발달 단계부터 갑상선암이 유도되는 동물모델로, 사람의 갑상선암 발병 시기와 불일치할 수 있다. 사람의 갑상선 암은 정상 갑상선 여포 구조를 이루는 정상적인 갑상선 실질 속 갑상선 결절의 형태로 발생하는 반면, 기존의 TPO-Cre를 이용한 갑상선 특이적 발암 동물모델은 갑상선 전체가 여포 구조의 파괴를 동반하여 악성화된 모델이므로 환자의 생리학(physiology)을 반영하기에 적합하지 않다.

[0055] 본 발명에서 사용한 갑상선암 동물모델은 Tg-Cre/ERT2 마우스(핀란드 투르쿠 대학의 Jukka Kero 교수님으로부터 제공받음; genesis, 2014, 52, 333~340)에 LSL-Braf^{V600E} 마우스(미국 국립보건원(National Institutes of Health)의 Shiko Kimura 교수님으로부터 제공받음; PNAS, 2011, 108(4), 1615~1620)를 교배하고 타목시펜(tamoxifen)을 주입하면 Tg가 발현되어 Braf^{V600E}의 돌연변이가 유도되는 모델이다. 상기 해 정상적인 갑상선의 발달이 이루어졌다고 판단할 수 있는 연령인 8주령의 갑상선암 동물모델이 성체로의 발생 이후 발암 동물 모델로 적합한지 평가하기 위해 수컷 16마리에는 LSL-Braf^{V600E} X Tg-Cre/ERT2에 타목시펜을 1주일간 주입하여 Tg 특이적인 Braf^{V600E}의 돌연변이를 유도하여 갑상선암 동물 모델 16마리를 제작하였으며, 8주령의 수컷 8마리에는 vehicle(saline)을 주입하여 대조군을 제작하였다. 10주령이 된 후부터 22주까지 대조군과 갑상선암 동물 모델 8마리에게는 정상식이를 급이하였고, 나머지 갑상선암 동물 모델 8마리에게는 12주가량 고지방식이(Casein 265g/kg, L-Cystine 4g/kg, Maltodextrin 160g/kg, Sucrose 90g/kg, Lard 310g/kg, Soybean Oil 30g/kg, Cellulose 65.5g/kg, Mineral Mix 48g/kg, Calcium Phosphate 3.4g/kg, Vitamin Mix 21g/kg, Choline Bitartrate 3g/kg 및 Blue Food Color 0.1 g/kg; ENVIGO, TD.06414)를 급이한 후 22주령이 되면 마우스를 희생시켜, 면역조직화학염색(IHC)을 통해 갑상선의 형태학적 변화를 관찰하였다. 조직학적 특성의 분석은 8마리를 기준으로 진행되었으며, RNA 시퀀싱은 그룹당 3마리씩 총 9마리를 대상으로 수행되었다.

[0056] 2-2. 갑상선암 환자 시료 준비

[0057] 갑상선암 진단 및 예후 예측을 위한 유전자 마커의 개발을 위해 실험 대상을 모집하였고, 이들의 갑상선암 조직 샘플을 이용하여 ADM2의 발현 수준을 분석하였다. 모집된 실험 대상 중 하기 표 1의 기준으로 실험군을 선별하였고, 정상체중의 갑상선암 환자는 총 30명, 비만의 갑상선암 환자는 총 40명, 비만의 갑상선암 재발 환자는 총 10명이 최종 선별되었다.

표 1

[0058] 갑상선암 환자 분류

갑상선암 환자 중 정상 체중 환자군	고혈압, 당뇨, 고지혈, 심장질환, 중풍(인지, 비인지) 없는 사람. 혈액응고제 미 복용자. BMI 25 이하, 및 BMI 19 이상인 사람.
갑상선암 환자 중 비만 환자군	고혈압, 당뇨, 고지혈, 심장질환, 중풍(인지, 비인지) 없는 사람. 혈액응고제 미 복용자. BMI 25이상인 사람.
갑상선암 비만 환자 중 재발한 환자군	고혈압, 당뇨, 고지혈, 심장질환, 중풍(인지, 비인지) 없는 사람. 혈액응고제 미 복용자. BMI 25이상인 사람. 갑상선암 재발을 평가하기 위해 시행한 갑상선 초음파에서 재발로 판단이 되고, 혈청 티로글로불린(thyroglobulin)이 증가함을 확인하여 영상학적 및 생화학적 재발이라고 진단되는 경우

[0059] 본 발명은 충남대학교 생명윤리심의위원회의 승인을 받아 진행되었으며, 임상 설문 자료 수집 및 인체유래물 수집은 피험자의 서면 동의를 획득한 후에 진행하였다.

[0060] 3. 면역조직화학염색(IHC)

[0061] 갑상선암으로 진단된 환자 총 80계 증례 중 보관이 잘 되고, 고정상태가 양호한 모든 예의 H&E 염색(Hematoxylin and eosin stain) 슬라이드를 재검하고, 포르말린 고정 후 파라핀에 포매된 조직을 5 μ m 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시키고 60℃의 항온기에서 1시간 동안 가온하고 통상의 방법으로 탈파라핀한 후 각각 다른 농도의 알코올로 함수시키고 증류수로 세척하였다. 내인성 과산화효소(oxidase)의 활성을 억제시키기 위해 3% 과산화수소수(H₂O₂)를 20분간 처리한 후 Tris 완충 용액(Tris 3.025 mg, 1M NaCl 40g, 1M HCl 22mℓ in H₂O 5L, pH 7.4)에 세척하였다. 항원 회복을 위해 구연삼염 완충 용액(sodium citrate 14.7g, 1M HCl 27mℓ in H₂O 5L, pH 6.0)을 프레스처 쿠키(pressure cooker)에 채우고 가온하여 끓기 시작할 때 슬라이드를 넣고 압력이 최고(130 kPa)에 도달하면 2분간 더 끓이고 찬물에 담가 압력을 낮춘 후 슬라이드를 꺼내 Tris 완충 용액에 넣었다. 비특이적 반응을 막기 위해 차단 항체를 실온에서 10분간 반응시키고 1차 항체를 반응시켰다. 항-adrenomedullin 2 항체(SC-140883, Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1차 항체로 사용하였으며, 1차 항체 반응 후 Tris 완충 용액으로 세척하고 LSAB+ 키트(DAKO, 일본)를 이용하여 2차 항체를 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 물에 세척하여 발색반응을 끝내고 해리스 헤마톡실린(Harris hematoxylin)으로 대조염색하고 알코올로 탈수한 후 봉입하여 현미경으로 관찰하였다.

[0062] 실시예 1. 갑상선암 발암 동물모델에서 ADM2의 역할 분석

[0063] 갑상선암 동물모델에서 ADM2의 역할을 분석하기 위해 동물모델 조직에서 ADM2의 발현 수준을 확인하였다. 그 결과, 갑상선암 발암 동물모델에서 고지방식이(HFD)를 한 경우 정상식이(NCD)한 것에 비해 갑상선암의 크기 및 증식성 세포의 수가 증가되는 것을 관찰하였고, 이에 대한 기전 연구를 위해 RNA 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과, 암이 생기지 않은 대조군(control)과 NCD 동물모델에서는 약 2,732개의 유전자가 차이났으며, NCD 동물모델과 HFD 동물모델에서는 약 722개 유전자의 발현이 통계학적으로 차이가 났다. 이 중 ADM2(adrenomedullin 2) 유전자가 대조군, NCD 및 HFD에서 모두 차이가 나는 유전자임을 확인하였다(도 1).

[0064] 또한, 갑상선암 동물모델에서 ADM2 단백질의 발현을 확인한 결과, HFD 동물모델의 ADM2 단백질 발현이 NCD 동물모델에 비해 유의적으로 증가한 것을 확인하였다(도 2).

[0065] 실시예 2. 갑상선암 환자에서 ADM2의 역할 분석

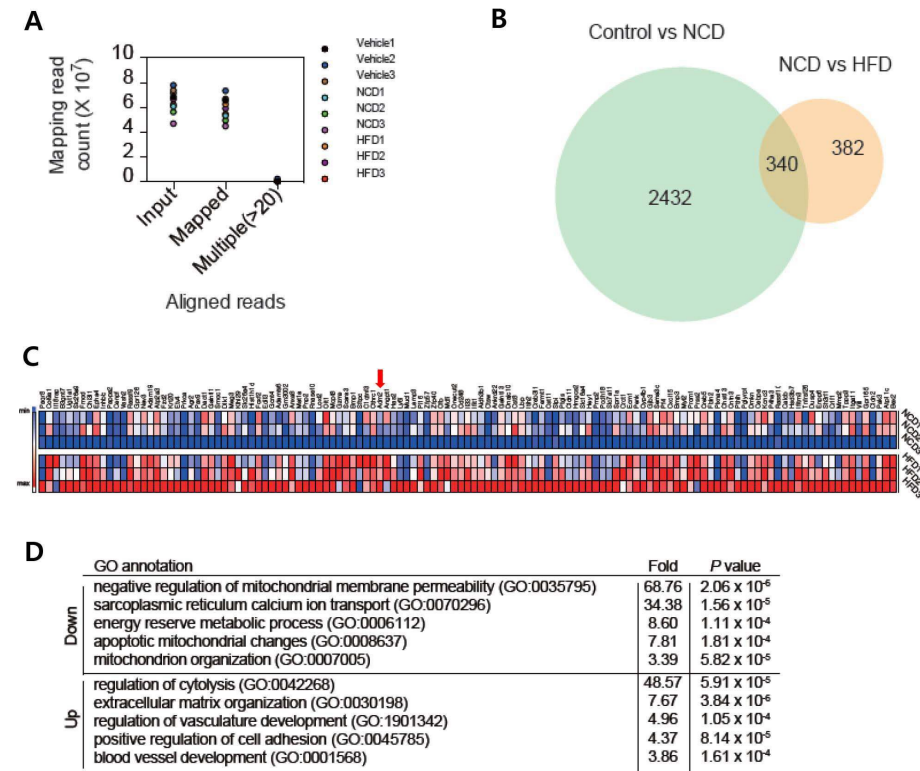
[0066] 갑상선암 환자에서 ADM2의 역할을 분석하기 위해 갑상선암 환자 시료에서 ADM2의 발현 수준을 확인하였다. 그

결과, 정상 체중의 갑상선암 환자(도 3A)에 비해, 갑상선암의 림프절 전이, 재발 등 임상양상이 더욱 악화된 비만 갑상선암 환자의 갑상선암 조직(도 3B)에서 ADM2 발현이 증가되었고, 비만 갑상선암 환자 보다 비만이면서 재발된 갑상선암 환자의 갑상선암 조직(도 3C)에서 ADM2의 발현이 더욱 증가된 것을 관찰하였다.

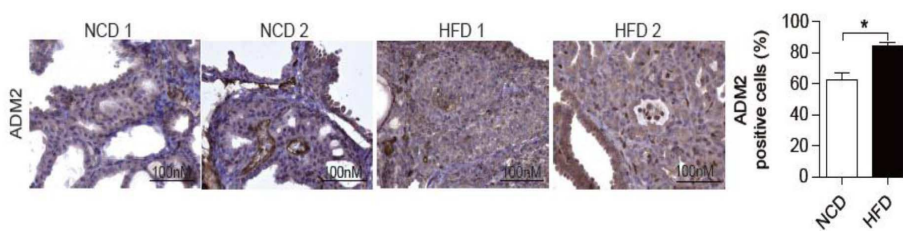
상기 결과를 통해, ADM2 유전자의 발현 수준을 통해 비만에 의한 갑상선암의 악화 연관성뿐만 아니라 갑상선암 치료 후 재발의 위험성을 예측할 수 있으므로, 난치성 갑상선암을 해결하는 치료제 조성물로 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

도면

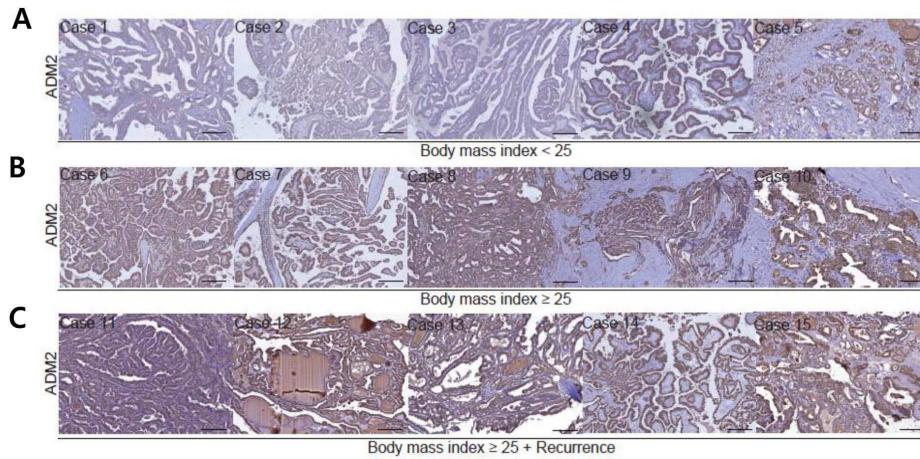
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> ADM2 gene marker for predicting diagnosis or prognosis of thyroid cancer and uses thereof
- <130> PN18377
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 4717
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

cgccacgcc cgccgccccg accgcggagg actccccgag gtgccggcgg agggggtggc	60
tcgggctca ggctgcccc gacgtgcccg gtcaccgcc cctccctg cagccccgcc	120
cgccatggcc cggatccga cggccgccct gggttgcatc agcctctct gcctgcagct	180
ccctggctcg ctgtcccgca gcctgggcgg ggaccgcga cccgtcaaac ccaggtgagt	240
ccaggtcttg ggccagccaa cccctctggc cccgcaggg aagcagagt cggggggccg	300
cggggccgcc ctccctccac gcctccacct gctgctagga ctccctccc aaacaaaggc	360
ccctacccca ggctcaggag gcctgagca ggccagagg cccctcttc tctgcctccc	420
tacacagggc agttgctct cccacacac atgggcacag cagccctct tctgggggtg	480
tctgctgggg gaggggaggg tggcggtatc cctggccggc ctgtgaccac cctaaaggga	540

gggcagaagc cgagtcaccc tgagccctga gagtgggtgac ccgcagaggc tgggccgccg	600
gggtgccctt tggccaagga ggtgccggtt cccgggacac gtgaccggg ccactgagat	660
ggtcccaggc ccaagcccag aggggacgcg ggcttcccct ggccgtgtc caggctgtgt	720
gtggatgggg gctgtgggct tcccctggca gtgaccagg cctgtgtaga ggcaaaagt	780
ggcaggtgtg agttctccaa aaggttgagc catctggttg acattctcca tctgcctctg	840
caggagagccc ccagcccga gcccttcag cagcctgcag cccaggcacc ccgcacccc	900
acctgtggtc tggaagcttc accgggccct ccaggcacag aggggtgccg gcctggcccc	960
tgttatgggt cagcctctcc gggatggtgg ccgccaacac tcgggcccc gaagacactc	1020
gggccccgc aggaccaag cccagctcct gcgagtgggc tgtgtgctgg gcacctgcca	1080
ggtgcagaat ctgaccacc gcctgtggca actcatggga ccggccggcc ggcaggactc	1140
agctcctgtg gacccacga gccccacag ctatggctga ggtggggccg ggccacaccc	1200
ctgccatcc cagccagggt gctgtgcccc cgtccagagc tgcagctgag cccatctga	1260
agcccagtc ctggagctg cagacagcag gtctgcagc aacaatacct gcacggcttt	1320
gcacacgtaa acctagctg gtctacacgc agtgtgtgta cgtcaaggag cctaaacacc	1380
ctgaaattgt gaccccctgg gggacagctg ccagacacag ctggcggcag caccagatgc	1440
taagcgttc agagaggagg tgtctgcca gagatgtgga gcagaagctg ggccctgaac	1500
acacggggcc atgtctggac gagcagggga gagaggctga actggccaga agtggcccct	1560
ccgtgctgg tccagtcaga ctgaagccc gccttgtgcc tgggtgttc ctgctctcat	1620
gcacaaccag ccttcacag tgccctgcctg tgggacagga gggggagcgt gggatgctgt	1680
agccccggg gtigggaag ggaaggatgg tggccctca gaggtcatga agggacctct	1740
gtggctccag ctgccaaccc tggagcccag accgaggtgg ccatggagac tccacctgga	1800
tcccctgtag gaggccagg aggggaactc agcagttcag gagccacccc aaaccattct	1860
gggacaggga cacccttcc taccacaggg cagggcaggg ctgggtgggg caagatcccc	1920
cagcccgaact agaccacct cacctgaagg gggtgagacc cttgttgga gccagacaag	1980
ggtggggctc cacaggcagc acaggcgccc caccaccacc cagtttgggg acccagtggg	2040
accaggtgcg ggggcagagg gtgacttacc aagagccagg gagggcagcc caggcccaag	2100
tgacagcaag aacaagaacc actgccggcg tgcacagact tgggtgtgt ccttccttgg	2160
ggggacgggg gactcacatg tgccctgccac tggagcctct caaccgtcca gcagaacacg	2220
gggttcagaa agggctcctt ctgctattta gcgaacactg agcatttaat ttacaaatgt	2280

ttgctagggt caccctctcg gccatccac gagggtcgcc atgacaccc caactctaga	2340
ggccgcagca gagctcagga cattccccca cagagcttgc ccctcagttc ctacctcaa	2400
gggggagggt cctggaagcg cccacccagg cgcgcgccct gtgcttgctc cccgagctca	2460
gggattgccg agtccacgta actgacctgt actccacgag gccctgtggg aacgggtccag	2520
gctggtcctg ccctgtggag gcctccgtgc actgagagat gtactaggat tgcagcaaag	2580
gtggtcaggg tgatgggccc cacagcgagg cagtcaaggc cagctccctg ggagaagcac	2640
tgggtcaggt gaggtctgag gacagcaggc ctccctagg ggaaggagct gggagtcca	2700
aggccccagg tgcacaggag gcgtggctgc tgagaggctg cagggtggag gggcctcggc	2760
ctcagagtca tgtgccctgt gaccactgaa ggggtgtcagc agagcacacg gcatgaggac	2820
agaggggagg gcacggggag tgaaggagg ggccttgggg caaggctcgg gggtcaggag	2880
ctcagcgtcc gctactcagc ccagccaaaa ccctcccaga cgtctctct cctgcctggg	2940
caaagtccag cttagcacc cgtctggggc ctgcctgtgg tcagggccaa gtgttcctc	3000
ctccaggaaa gcctttacc tctcatgcc ctgtagtcag gagggccct gctgtaacc	3060
tccgtgtcgc ctgggtgcg aaatcagacc cacctgacac catcacgcgg agggccagca	3120
gcacctgcac ccacttccag ctgctctggc caaaatctcc gctcggccag gccccgtggc	3180
tcacacctgt aatcctagca cattgggagg ccaaggcagg cacatcacct gagttcagga	3240
gttcaagacc agcctggcca acatggtgaa atcccgtctc tactaaaaac agaaaattat	3300
ccgggcgtgg tggcacatga ctgtaatccc agctactcag gaggtgagg caggaggatc	3360
acttgaacct gggaggcgga ggttgacgtg agctgagatt gcgccattgc actccagcct	3420
gggcaacaag agcaaaattc tgcctcaaaa aaaaaaatag taataataca aaaattagct	3480
gggcgtgggt gcacatgcca gtaattccat ctactcggga ggctgaggca ggagaatcgt	3540
ctaagcccg gaggtggagg ttgcagtga cccagatggc gctgctgcac tcaagcttgg	3600
atgacagagc aagactccgt ttcaaaaaa aaaaacctcc tctcttctt cacaccttcc	3660
tctgaatccc acccggtccc acctctgaa cctatccaga caccttctcc tgaccaggc	3720
accacctgct ttcggggcga tggccgtagc ctctcccag gcacctgtct gcatecctct	3780
ggccagtga tgctgagcac gtgacctacc cgtgttggga cacgtgagga tacagccttg	3840
acccccagg gctgacattc tagggggaga tagaaggaga caaacgtaga aggtagaata	3900
agtgggtggt ggagtggcag ggagtgtga gtgccacagg aagtcagaca aggaaggaga	3960
gltgtgggca ggtgccgttt aaatgggggg cgtggggtc tctcacagt tgcttctcag	4020
ctcagctgtg ccaggatctt gttgagtcag gtcagctgcc cacagccctc ttgcctgacc	4080
cctgaagccc agaactctga tcttcacagc cctaggtatg gcccagcac cccactgccc	4140

tctctcctgc ccagccgac tgctgttccc agacttccct ggccacgctc caagacgcca	4200
gctctgccgc gggcactttg ttctcacggt gtcttccatg cctgcagggc ccatgcatgg	4260
gaagttgcgt tggcggcctg ggtgttggcg gttccgtgcc tgctccaact ctccgtgagg	4320
ccccctccc agagcctgac acactctgtg gccgaactct aggcaggtgc ccctgagtcc	4380
tttctctgac gaggcctgac cccatcccca tcctcgtgg gcccgccgac cccggtgtta	4440
gcaagaatcc tctaaatcag ttatggaga attaccacc ctcgatatct gatccattc	4500
ctcatctccc acccttgatc tcataccct gccggcctcc tgcaagatcc tcattgagcc	4560
actccagtga gaatccccct accctgaag gccgcctaa caacttccca tccgtgacc	4620
ctccaacgc catcaatctc cagctgtggt tgttgaactc ggaggtgagc tccttcacc	4680
actctcttga ataaagcttt tctcaccatt ttaacaa	4717