

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A61K 31/7088  
C12N 15/12  
C12Q 1/68  
A61K 48/00

(11) 공개번호 10-2005-0098954  
(43) 공개일자 2005년10월12일

(21) 출원번호 10-2005-7015276

(22) 출원일자 2005년08월19일

번역문 제출일자 2005년08월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/006598

(87) 국제공개번호 WO 2004/078940

국제출원일자 2004년03월05일

국제공개일자 2004년09월16일

(30) 우선권주장	10/383,614	2003년03월10일	미국(US)
	60/451,677	2003년03월05일	미국(US)
	60/476,194	2003년06월06일	미국(US)
	60/504,731	2003년09월22일	미국(US)

(71) 출원인 세네스코 테크놀로지스 인코포레이티드  
미국 뉴저지주 뉴 브룬스윅 조지 스트리트 303 스위트 420

(72) 발명자 톰슨, 존, 이  
캐나다 온타리오 엔2케이 4엔1 워터루 유니버시티 애비뉴 이 901  
테일러, 캐서린  
캐나다 온타리오 엔2케이 3엔1 워터루 폭스헌트 로드 122

(74) 대리인 김동완

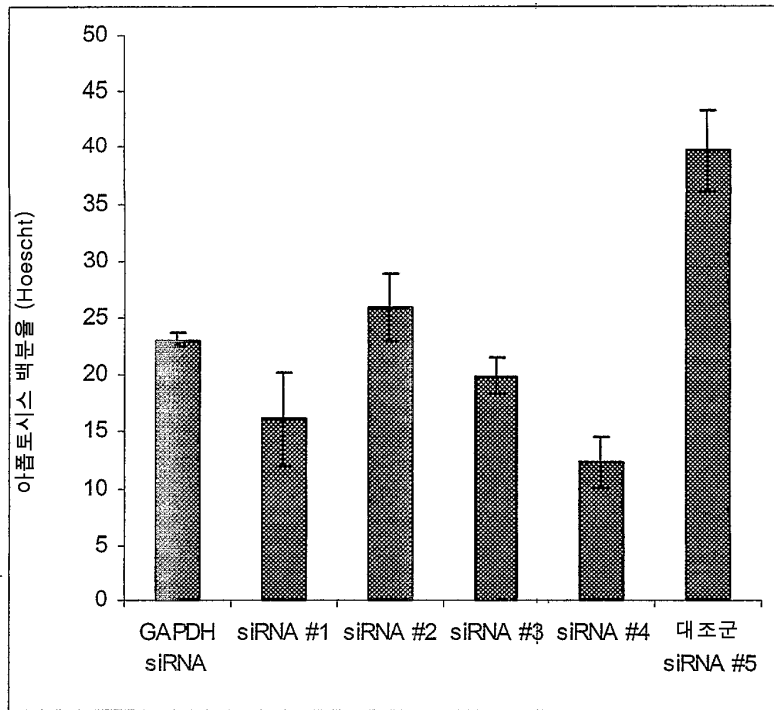
심사청구 : 없음

(54) 이아이에프-5에이1의 발현을 억제하기 위한 안티센스올리고뉴클레오타이드 또는 에스아이알엔에이의 이용

## 요약

본 발명은 아폽토시스 인자 5A1 또는 단순히 인자 5A1으로 표기되는 아폽토시스 특이적 진핵세포성 개시 인자 5A(eIF-5A), 아폽토시스 인자 5A1 핵산 및 폴리펩타이드 및 인자 5A1의 발현을 저해하기 위한 안티센스 뉴클레오타이드 또는 siRNA를 이용하여 세포 내 아폽토시스를 저해하거나 억제하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 아폽토시스 인자 5A의 발현을 저해함으로써 전-염증성 사이토카인 의 발현을 억제하거나 저해하는 것에 관한 것이다.

## 대표도



## 색인어

아포토시스, eIF-5A, 안티센스, 뉴클레오타이드, siRNA, 사이토카인

## 명세서

### 기술분야

### 관련 출원

본 출원은 2001년 7월 23일 출원된 미국 특허출원 제9/909,796호의 부분연속출원인 2002년 5월 7일 출원된 미국 특허출원 제10/141,647호의 부분연속출원인 2002년 7월 23일 출원된 미국 특허출원 제10/200,148호의 부분연속출원인 2002년 10월 23일 출원된 미국 특허출원 제10/383,614호의 부분연속출원이며 이 모두는 본 명세서에 완전히 통합되어 있다. 본 출원은 또한 2003년 3월 5일 출원된 미국 임시출원 제60/504,731호; 2003년 6월 6일 출원된 미국 임시출원 제60/476,194호; 2004년 12월 10일 출원된 미국 임시출원 제60/528,249호에 우선권을 주장하며 이 모두는 본 명세서에 완전히 통합되어 있다.

본 발명은 아포토시스(apoptosis)-특이적 진행세포성 개시 인자-eIF-5A(eIF-5A) 또는 아포토시스 인자 5A 또는 5AI 및 디옥시하이푸신 신타제(deoxyhypusin synthase, DHS)에 관한 것이다. 본 발명은 아포토시스 5A 및 DHS의 발현을 제한하기 위한 아포토시스 인자 5A 및 DHS 핵산 및 폴리펩타이드 및 그 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

아포토시스(apoptosis)는 세포 수축, 염색질 응축, 핵 무사분열(fragmentation) 및 멤브레인 수포(blebbing)와 같은 잘-정의된 형태학적 현상에 의해 특징지어진 유전적으로 프로그램화된 세포 이벤트이다. Kerr *et al.*(1972) Br. J. Cancer, 26:239-257; Wyllie *et al.*, (1980) Int. Rev. Cytol., 68:251-306. 이는 정상 조직 발달 및 항상성에 중요한 역할을 하고, 아포토시스 프로그램 내 결함은 신경퇴행성 및 자가면역성 장애에서부터 종양(neoplasm)까지의 광범위한 인간 대사장애에 영향을 미치는 것으로 여겨진다. Thompson(1995) Science, 267:1456-1462; Mullauer *et al.*(2001) Mutat. Res, 488:211-231. 아포토시스성 세포의 형태학적 특성이 잘 특정되었더라도 이러한 과정을 조절하는 분자적 경로는 단지 해명되기 시작했다.

아폽토시스에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지는 단백질 중의 하나의 그룹은 아폽토시스의 대부분의 경로에 필요한 것으로 보이는 시스테인 프로테아제 패밀리의, 카스페이즈(caspase)이다. Creagh & Martin(2001) Biochem. Soc. Trans., 29:696-701; Dales *et al.*(2001) Leuk. Lymphoma, 41:247-253. 카스페이즈는 다양한 세포 단백질을 분열시킴으로서 아폽토시스 자극에 반응하여 아폽토시스를 시작시키고 이는 세포 수축, 멤브레인 수포 및 DNA 무사분열을 포함한 전형적인 아폽토시스의 징후를 유발한다. Chang & Yang(2000) Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64:821-846.

또한 Bax 또는 Bak와 같은 프로-아폽토시스 단백질은 미토콘드리아 시토크롬 c와 같은 카스페이즈-활성화 분자를 방출하여 아폽토시스를 통한 세포 사멸을 증가시킴으로서 아폽토시스 경로에 중요한 역할을 한다. Martinou & Green(2001) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2:63-67; Zou *et al.*(1997) Cell, 90:405-413. Bcl-2와 같은 항-아폽토시스 단백질은 프로-아폽토시스 단백질, Bax 및 Bak의 활성을 상쇄시킴으로서 세포 생존을 증가시킨다. Tsujimoto(1998) Genes Cells, 3:697-707; Kroemer(1997) Nature Med., 3:614-620. Bax : Bcl-2의 비율은 세포 운명이 결정되는 하나의 방법으로 여겨진다; Bax의 과잉은 아폽토시스를 증가시키고 Bcl-2의 과잉은 세포 생존을 증가시킨다. Salomons *et al.*(1997) Int. J. Cancer, 71:959-965; Wallace-Brodeur & Lowe(1999) Cell Mol. Life Sci., 55:64-75.

아폽토시스에서 중요한 또다른 단백질은 종양 억제자 유전자 p53에 의해 인코딩된다. 본 단백질은 세포 성장을 조절하고 아마도 Bax의 상향-조절을 통해 손상되고 유전적으로 불안정한 세포 내에서 아폽토시스를 유도하는 조절인자이다. Bold *et al.*(1997) Surgical Oncology, 6:133-142; Ronen *et al.*(1996); Schuler & Gree(2001) Biochem. Soc. Trans., 29:684-688; Ryan *et al.*(2001) Curr. Opin. Cell Biol., 13:332-337; Zorning *et al.*(2001) Biochem. Biophys. Acta, 1551, F1-F37.

아폽토시스를 겪는 세포를 특성화하는 뚜렷한 형태학적 특징들은 아폽토시스의 개시 및 진행을 평가하는 많은 방법을 제공한다. 검출에 이용될 수 있는 아폽토시스 세포의 특징의 하나는 플라스마 멤브레인의 내부 리플릿(leaflet)에 일반적으로 위치한 인지질인 포스파티딜세린(phosphatidylserin)의 외부화(externalization)를 초래하는 플리페이즈(flippase)의 활성화이다. Fadok *et al.*(1992) J. Immunol., 149:4029-4035. 외부화된 포스파티딜세린을 품은 아폽토시스 세포는 형광 염료와 컨쥬게이트된 포스파티딜세린-결합 단백질, 아넥신(Annexin) V로 염색함으로써 검출될 수 있다. 아폽토시스 과정 동안 발생한 특징적 DNA 무사분열은 형광-표지된 디옥시뉴클레오타이드로 DNA 단편의 노출된 3'-OH 말단을 표지함으로써 검출될 수 있다. Hoescht 33258과 같은 핵산에 결합하는 형광 염료는 아폽토시스 세포 내 염색질 응축 및 핵 무사분열을 검출하는데 사용될 수 있다. 또한 세포군 내 아폽토시스의 정도는 세포 추출물 내에 존재하는 카스페이즈 단백질분해성 활성 정도로부터 추측될 수 있다.

유전적으로 정의된 과정으로서 다른 발달 프로그램과 같이 아폽토시스는 돌연변이에 의해 분열될 수 있다. 아폽토시스 경로의 변경은 암을 포함한 많은 질병 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. Wyllie *et al.*(1980) Int. Rev. Cytol., 68:251-306; Thompon(1995) Science, 267:1456-1462; Sen & D'Incalci(1992) FEBS Letters, 307:122-127; McDonnell *et al.*(1995) Seminars in Cancer and Biology, 6:53-60. 암 발달 및 진행의 조사는 통상적으로 세포 증식에 초점이 맞춰졌다. 그러나 종양발생에 아폽토시스 미치는 중요한 역할이 최근 명백해졌다. 사실상 아폽토시스의 조절이 종양 세포 내에서 어떤 방법으로 일정하게 변화되기 때문에 아폽토시스에 대해 알려진 많은 것은 종양 모델을 이용하여 알려졌다. Bold *et al.*(1997) Surgical Oncology, 6:133-142.

본 발명은 아폽토시스 유도 직전에 상향 조절된 eIF-5A cDNA의 클로닝에 관한 것이다. 본 아폽토시스-특이적 eIF-5A는 아폽토시스 경로에 관련된 다운스트림 이펙터 및 전사 인자의 후-전사 조절의 단계에서 작용하는 것으로 보이기 때문에 아폽토시스-유발 질병 상태에서의 매개를 위한 적당한 타겟이 되기 쉽다. 특히, 아폽토시스-특이적 eIF-5A는 아폽토시스의 mRNA 인코딩 다운스트림 이펙터 및 전사 인자의 핵으로부터 이후에 번역되는 세포질로의 이동을 선택적으로 촉진시키는 것으로 보인다. 아폽토시스를 개시하는 최후의 결정은 내부 및 외부 프로- 미 항-아폽토시스 시그널 사이의 복잡한 상호작용으로부터 유래되는 것으로 보인다. Lowe & Lin(2000) Carcinogenesis, 21:485-495. 다운스트림 아폽토시스 이펙터 및 전사 인자의 번역을 촉진하는 이러한 능력을 통해 아폽토시스-관련 eIF-5A는 아폽토시스에 따라 이들 신호 사이의 균형을 전복시키는 것으로 보인다.

앞서 기술된 바와 같이 항암제가 아폽토시스를 유도하고 아폽토시스 경로 내 변화가 약물-유도된 세포 사멸을 약화시킬 수 있음은 잘 성립되어 있다. Schmitt & Lowe(1999) J. Pathol., 187:127-137. 예를 들어 많은 항암제는 p53을 상향조절하고, p53을 손실한 종양 세포는 이들 약물에 대한 저항성을 발달시킨다. 그러나 거의 모든 화학치료제는 투여량이 충분한 경우 p53과 독립적으로 아폽토시스를 유도할 수 있고, 이는 약물-저항적 종양에서도 아폽토시스의 경로가 완전하게 차단

되지 않는다. Wallace-Brodeur & Lowe(1999) Cell Mol. Life Sci., 55:64-75. 이는 돌연변이된 유전자를 교정하지 않더라도 아폽토시스 eIF-5A의 유도가 p53-의존적 경로를 우회하고 대안적인 경로를 증가시킴으로서 아폽토시스를 유도시킬 수 있음을 나타낸다.

아폽토시스-관련 eIF-5A의 유도는 정상적인 이웃 세포상에 거의 또는 전혀 효과가 없고 암 세포를 선택적으로 타겟하는 포텐셜을 지닌다. 이는 종양 세포 내에서 발현된 유사분열성 종양유전자가 정상 세포 내에 존재하는 mRNA에 특이적인 종의 형태로 아폽토시스 시그널을 제공하기 때문에 발생한다. Lowe *et al.*(1993) Cell, 74:954-967; Lowe & Lin(2000) Carcinogenesis, 21:485-495. 예를 들어 p53-돌연변이 종양 세포 내에서 야생형 p53의 복구는 종양 세포주 및 제노그래프(xenograph)에서의 약물 민감도를 증가시킬 뿐만 아니라 아폽토시스를 직접 유도할 수 있다(Spitz *et al.*, 1996; Badie *et al.*, 1998).

아폽토시스-eIF-5A의 선택성은 핵으로부터 세포질로의 이동을 매개함으로써 다운스트림 아폽토시스 이펙터 및 전사 인자에 대한 mRNA 번역을 선택적으로 촉진시킨다는 사실로부터 기인한다. 따라서 효과를 지닌 아폽토시스 eIF-5A에 있어서 이들 이펙터 및 전사 인자에 대한 mRNA가 전사되어야 한다. 이들 mRNA가 이웃 정상 세포가 아닌 암 세포 내에서 전사되는 만큼 아폽토시스 eIF-5A가 암 세포 내에서 아폽토시스를 증가시키고 정상세포에서는 있더라도 최소한의 효과를 지닐 것으로 예측된다. 따라서 아폽토시스-관련 eIF-5A를 지닌 종양 세포 내에서 아폽토시스 포텐셜의 복구는 종양 세포의 선택적 타겟팅에 기인하여 암 환자에 의해 경험된 독성 및 부작용을 감소시킨다. 아폽토시스 eIF-5A의 유도는 또한 항암 약물에 대한 종양 세포의 반응을 증가시키는 포텐셜을 지니서 약물-저항성 종양에 대한 이들 약제의 효율성을 증가시킨다. 이는 결국 환자에게 효능있고 감소된 독성을 지닌 낮은 투여량의 항-암 약물을 초래할 수 있다.

아폽토시스 경로에서 교체는 녹내장으로 인해 눈을 멀게하는 망막 신경절 세포의 퇴화에 역할을 담당한다고 또한 믿어진다. 녹내장은 시신경의 손상 및 진행성 시력상실을 야기하는 내부-안압(IOP)을 증가시키는 눈의 조건을 설명한다. 녹내장은 시신경 또는 신경-보호자의 이용에 대한 손상을 감소시키기 위해 IOP을 조절하기 위해 약물 또는 수술에 의해 일반적으로 처리되지만 녹내장 눈에서 아폽토시스에 의한 퇴화로부터 망막 신경절 세포를 보호하기 위한 필요가 남아있다.

사이토카인도 또한 아폽토시스 경로에 포함되어 왔다. 생물학적 시스템은 그들의 조절에 대해 세포 상호작용을 요구하고 세포들 간의 크로스-토크는 일반적으로 다양한 사이토카인을 포함한다. 사이토카인은 많은 다양한 세포 형태에 의해 넓은 다양한 자극에 반응에서 생성되는 중재자이다. 사이토카인은 많은 다양한 세포 형태에서 많은 다양한 효과를 발휘할 수 있는 다면발현성 분자이지만 면역 반응 및 조혈 세포 및 분열 증식 및 분화의 조절에 특히 중요하다. 타겟 세포에서 사이토카인의 작용은 특정 사이토카인, 상대적 농도 및 다른 중재자들의 존재에 의존하여 세포 생존, 분열 증식, 활성화, 분화 또는 아폽토시스를 진행시킬 수 있다.

자가면역 장애(건선, 류마티즘 관절염, Crohn씨 병)를 처리하기 위한 항-사이토카인의 사용은 대중성을 얻고 있다. 전-염증성 사이토카인 IL-1 및 TNF는 이러한 만성 질환의 병리학에서 큰 역할을 하고 이러한 두 개의 사이토카인의 생물학적 작용을 감소시키는 항-사이토카인 요법은 치료법상의 이점을 제공할 수 있다(Dinarello 및 Abraham, 2002).

인터루킨 1(IL-1)은 특정 장소 및 시스템적인 염증 반응을 중재하는 중요한 사이토카인이고 맥관염, 골다공증, 신경퇴행적 장애, 당뇨병, 낭창성신염 및 류마티즘 관절염과 같은 자가면역 장애를 포함하는 많은 장애의 발병에서 TNF와 공동작용을 할 수 있다. 종양 혈관신생 및 침습성에서 IL-1 $\beta$ 의 중요성 역시 흑색종 세포가 주입됐을 때 전이 및 혈관신생에 대해 IL-1 $\beta$  녹아웃 마우스의 저항에 의해 최근 증명되었다(Voronov *et al.*, 2003).

인터루킨 18(IL-18)은 IL-1의 하나로 최근 발견되었고 IL-1에 대한 구조, 수용체 및 기능에 의해 연관되어 있다. IL-18은 인터페론 감마(IFN- $\lambda$ ), TNF- $\alpha$  및 IL-1을 유도하기 위한 그 능력의 결과로써 염증성 및 자가면역 장애에 포함된 주요한 사이토카인이다. IL-1 $\beta$  및 IL-18은 모두 심근허혈 동안 심장 기능장애에 기여하는 것으로 알려진 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유도하는 것이 가능하다(Maekawa *et al.*, 2002). IL-18 결합 단백질의 중화에 의한 IL-18의 억제체는 서프라퓨즈된(suprafused) 인간 심방심근의 허혈/재관류 모델에서 허혈-유도된 심근 기능장애를 감소시키는 것으로 발견되었다(Dinarello, 2001). 마우스 IL-18 결합 단백질을 이용한 IL-18의 중화 역시 IFN- $\lambda$ , TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  전사 수준을 감소시키고 콜라겐-도입된 관절염 마우스 모델에서 관절손상을 감소시키는 것이 가능하였다(Banda *et al.*, 2003). IL-18 생성 또는 효용의 감소는 또한 성공적으로 전이가 억제된 마우스 흑색종 모델에서 IL-18 결합 단백질의 주입으로써 전이 암을 조절하기에 유리한 시험을 할 수도 있다(Carrascal *et al.*, 2003). 전-염증성 사이토카인으로써 더욱 그의 중요성을 나타내는 것으로, IL-18의 플라스마 수준은 만성 간 질병을 갖는 환자에서 높아졌고 증가된 수준은 질병의 고통과 상호 관련이 있었다(Ludwiczek *et al.*, 2002). 유사하게 IL-18 및 TNF- $\alpha$ 는 신장병을 갖는 당뇨병 환자의 혈청에서 높아졌다. 외상성 뇌손상을 수반하는 신경염증 역시 전-염증성 사이토카인 및 뇌 외상을 수반한 마우스에서 신경학상의 회복이 개선된 IL-18 결합 단백질에 의한 IL-18의 억제에 의해 중재되었다(Yatsiv *et al.*, 2002).

사이토카인의 TNF군의 하나인 TNF- $\alpha$ 는 많은 세포 형태에서 조혈세포, 염증성 반응의 유도 및 세포사멸의 유도에서 공동-분열유도 효과로부터 정해지는 다면발현성 효과를 갖는 전-염증성 사이토카인이다. TNF- $\alpha$ 는 보통 박테리아 리포폴리사카라이드, 기생충, 바이러스, 악성 세포 및 사이토카인에 의해 유도되고 트랜스펙션 및 암으로부터의 세포를 유익하게 보호하기 위해 작용한다. 그러나 TNF- $\alpha$ 의 부적당한 유도는 자가면역 장애와 같은 격렬하고 만성적인 염증으로 생기는 장애에 대해 주요한 기여자이고 또한 암, 에이즈, 심장병 및 폐혈증에도 기여할 수 있다(Aggarwal 및 Natarajan, 1996; Sharma 및 Anker, 2002에 의해 재고됨). 인간 장애(즉, 염증성 장질환 및 심한 이식편대숙주병(graft-versus-host disease)에서뿐만 아니라 질병의 실험 동물 모델(즉, 폐혈증 쇼크 및 류마티즘 관절염)에서도 TNF- $\alpha$ 를 방해하는 이로인 효과가 설명될 수 있다(Wallach *et al.*, 1999). TNF- $\alpha$ 의 억제 역시 Crohn씨 병(van Deventer, 1999) 및 류마티즘 관절염(Richard-Miceli 및 Dougados, 2001)과 같은 자가면역 장애를 겪고 있는 환자들에게 고통의 경감을 제공하는 데에 효과적이었다. B 림프구의 생존 및 성장을 증진시키는 TNF- $\alpha$ 의 능력 역시 B-세포 만성 림프성 백혈병(B-CLL)의 발병에서 역할을 한다고 생각되고 B-CLL 내에서 T 세포에 의해 발현되어 있는 TNF- $\alpha$ 수준은 실제로 종양 및 병의 단계와 서로 관련되어 있다(Bojarska-Junak *et al.*, 2002). 인터루킨-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )는 TNF- $\alpha$  생성을 유도하는 것으로 알려진 사이토카인이다.

디옥시하이푸신 신타제(DHS) 및 하이푸신-함유 진핵세포성 번역 개시 인자-5A(eIF-5A)는 세포 성장 및 분화를 포함한 많은 세포 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 독특한 아미노산인 하이푸신은 모든 진핵세포 및 일부 알케오박테리아(archeobacteria)(진핵세포와 관련된 것으로 보임)에서 발견되나 유박테리아(eubacteria)는 그렇지 않고, eIF-5A는 하이푸신-함유 단백질 내에서만 알려져 있다. Park(1988) J. Biol. Chem., 263:7447-7449; Schumann & Klink(1989) System. Appl. Microbiol., 11:103-107; Bartig *et al.*(1990) System. Appl. Microbiol., 13:112-116; Gordon *et al.*(1987a) J. Biol. Chem., 262:16585-16589. 활성 eIF-5A는 2가지 후-번역 단계에서 형성된다: 첫 번째 단계는 스퍼미딘의 4-아미노부틸 모이어티(moiety)의 디옥시하이푸신 신타제에 의해 촉매된 전구체 eIF-5A의 특정 라이신의  $\alpha$ -아미노 그룹으로의 이동에 의한 디옥시하이푸신 잔기의 형성이고; 두 번째 단계는 하이푸신 형성을 위해 디옥시하이푸신 하이드록실라제에 의한 본 4-아미노부틸 모이어티의 하이드록실레이션을 포함한다.

eIF-5A의 아미노산 서열은 종 간에 잘 보존되어 있고 eIF-5A 내 하이푸신 잔기 주변 아미노산 서열의 엄격히 보존되어 있고 이는 이러한 변형이 생존에 중요함을 나타낸다. Park *et al.*(1993) Biofactors 4:95-104. 이러한 가정은 eIF-5A의 이소폼 모두의 불활성화가 효모 내 데이터에서 관찰되고 또는 그의 활성화 내 첫 번째 단계를 촉매하는 DHS 유전자의 불활성화가 세포 분열을 차단한다는 관찰에 의해 더욱 지지된다. Schnier *et al.*(1991) Mol. Cell. Biol., 11:3105-3114; Sasaki *et al.*(1996) FEBS Lett., 384:151-154; Park *et al.*(1998) J. Biol. Chem., 273:1677-1683. 그러나 효모 내 eIF-5A 단백질의 고갈은 총 단백질 합성 내 작은 감소만을 초래하였고 이는 eIF-5A가 단백질 전체 합성보다는 mRNA의 특정 서브세트의 번역에 필요함을 나타내었다. Kang *et al.*(1993), "Effect of initiation factor eIF-5A depletion on cell proliferation and protein synthesis" in Tuite, M.(ed.), Protein Synthesis and Targeting in Yeast, NATO Series H. 또한 eIF-5A에 결합하는 리간드가 매우 보존된 모티프를 공유한다는 최근의 발견은 eIF-5A의 중요성을 지지한다. Xu & Chen(2001) J. Biol. Chem., 276:2555-2561. 더욱이 변형된 eIF-5A의 하이푸신 잔기는 RNA로의 서열-특이적 결합에 필수적인 것으로 나타났고, 결합은 리보뉴클레아제로부터 보호되지 않았다.

더욱이 eIF-5A의 세포내 고갈은 핵 내 특정 mRNA의 유의적인 축적을 초래하고 이는 eIF-5A이 핵으로부터 세포질로의 특정 종류의 mRNA를 수송하는데 중요함을 나타내었다. Liu & Tartakoff(1997) Supplement to Molecular Biology of the Cell, 8:426a. Abstract No. 2476, 37th American Society for Cell Biology Annual Meeting. 핵포어-관련된 핵내 필라멘트에서의 eIF-5A의 축적 및 그의 일반적 핵 익스포트 수용체와의 상호작용은 eIF-5A이 폴리솜의 구성성분이기 보다는 핵세포질성 수송 단백질임을 더욱 나타낸다. Rosorius *et al.*(1999) J. Cell Science, 112:2369-2380.

eIF-5A의 첫 번째 cDNA는 Smit-McBrid *et al.*에 의해 1989년 인간으로부터 클론되었고, 그 이후로 eIF-5A의 cDNA 또는 유전자가 효모, 래트, 병아리 배아, 알팔파(alfalfa) 및 토마토를 포함한 다양한 진핵세포로부터 클론되었다. Smit-McBrid *et al.*(1989a) J. Biol. Chem., 264:1578-1583; Schnier *et al.*(1991)(효모); Sano, A.(1995) Imahori, M. *et al.*(eds), Polyamines, Basic and Clinical Aspects, VNU Science Press, The Netherlands 81-88(래트); Rinaudo & Park(1992) FASEB J., 6:A453(병아리 배아); Pay *et al.*(1991) Plant Mol. Biol., 17:927-929(알팔파); Wang *et al.*(2001) J. Biol. Chem., 276:17541-17549(토마토).

eIF-5A mRNA의 발현은 다양한 인간 조직 및 포유류 세포주에서 조사되었다. 예를 들어 eIF-5A 발현의 변화가 혈청 손실에 이어 혈청 첨가후 인간 섬유아세포 내에서 관찰되었다. Pang & Chen(1994) J. Cell Physiol., 160:531-538. 디옥시하이푸신 신타제 활성의 노화-관련 감소 및 전구체 eIF-5A의 증가는 이소폼의 분화 변화의 평균화를 반영하는 가능성이 결정되지 않았어도 노화 섬유아세포에서 관찰되었다. Chen & Chen(1997b) J. Cell Physiol., 170:248-254.

연구는 eIF-5A가 인간 면역결핍 바이러스 타입 1 Rev 단백질 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 타입 1 Rex 단백질과 같은 다양한 단백질의 세포가 타겟임을 나타내었다. Ruhl *et al.*(1993) J. Cell Biol., 123:1309-1320; Katahira *et al.*(1995) J. Virol., 69:3125-3133. 예비 연구는 Rev와 같은 다른 RNA-결합 단백질과의 상호작용에 의해 RAN를 목표로 하여 이들 바이러스성 단백질이 바이러스성 RNA 처리를 위해 eIF-5A를 요구함을 나타낸다. Liu *et al.*(1997) Biol. Signals, 6:166-174.

따라서, 비록 eIF-5A 및 DHS가 알려져 있지만 어떻게 이 단백질들이 아포토시스 및 사이토카인 발현을 조절하는 것이 가능한 사이토카인 자극뿐만 아니라 아포토틱 경로에도 포함되는지를 이해할 필요가 남아 있다.

### 발명의 요약

본 발명은 아포토시스 특정 진핵세포성 개시 인자 5A(eIF-5A)에 관한 것이며 이것은 아포토시스 인자 5A1 또는 간단하게 인자 5A1로 표기되었다. 본 발명은 또한 인자 5A1의 발현을 저해하기 위해 안티센스 뉴클레오타이드 또는 siRNAs를 이용하여 세포 내에서 아포토시스를 저해 또는 억제하기 위한 아포토시스 인자 5A1 핵산 및 폴리펩타이드 및 그 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 아포토시스 인자 5A1의 발현을 저해하는 것에 의해 전-염증성 사이토카인의 발현을 억제 또는 저해하는 것에 관한 것이다. 한편 본 발명은 아포토시스 인자 5A1의 발현을 저해하는 것에 의해 p53의 발현을 저해하거나 억제하는 것에 관한 것이다. 본 발명은 안티센스 뉴클레오타이드 및 siRNAs를 이용하여 아포토시스 인자 5A1의 발현을 저해하거나 억제하는 것에 의한 Bcl-2 발현을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 사이토카인, 특히 인간 상피 세포 내의 TNF- $\alpha$ 의 생성을 저해하는 방법을 제공한다. 본 발명의 또다른 실시태양에서, 아포토시스-특이적 eIF-5A1에서 목적된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 이용에 의해 아포토시스-특이적 eIF-5A1의 발현을 억제하는 것은 녹내장 눈에서 망막 신경 세포 사멸을 방지하는 방법을 제공한다.

### 발명의 상세한 설명

진핵세포성 개시 인자-5a(eIF-5A)의 몇 개의 이소폼(isoform)들은 분리되어왔고 출간된 데이터뱅크에 존재한다. 이러한 이소폼들은 기능상으로 과다하다고 알려졌다. 본 발명의 발명자들은 아포토시스의 유도 전에 즉시 상향조절된 하나의 이소폼을 발견하였고 이것은 아포토시스 인자 5A 또는 인자 5A1 또는 eIF5-A1을 나타내었다. 본 발명의 목적은 DHS 뿐만 아니라 eIF-5A의 활성화에 포함된 아포토시스 인자 5A를 제공하는 것이다.

본 아포토시스-특이적 eIF-5A은 아포토시스 경로에 관련된 다운스트림 이펙터 및 전사 인자의 후-전사 조절의 수준에서 작용하는 것으로 보이기 때문에 아포토시스-유발 질병 상태에서의 중재에 대한 적당한 타겟이 되기 쉽다. 특히, 아포토시스-특이적 eIF-5A는 아포토시스의 mRNA 인코딩 다운스트림 이펙터 및 전사 인자의 핵으로부터 이후에 번역되는 세포질로의 이동을 선택적으로 촉진시키는 것으로 보인다. 아포토시스를 개시하는 최후의 결정은 내부 및 외부 프로-미항-아포토시스 시그널 사이의 복잡한 상호작용으로부터 유래되는 것으로 보인다. Lowe & Lin(2000) Carcinogenesis, 21:485-495. 다운스트림 아포토시스 이펙터 및 전사 인자의 번역을 촉진하는 이러한 능력을 통해 아포토시스-관련 eIF-5A은 아포토시스에 따라 이들 신호 사이의 균형을 전복시키는 것으로 보인다.

따라서 본 발명은 아포토시스 인자 5A 또는 DHS의 어느 것의 발현을 저해하거나 감소시키는 약제를 투여함으로써 세포 내 아포토시스를 억제하거나 감소시키는 방법을 제공한다. 아포토시스 인자 5A 또는 DHS의 어느 것의 발현을 저해할 수 있거나 감소시킬 수 있는 하나의 약제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드는 생체 내 뿐만 아니라 생체 외에서도 유전자-특이적 억제를 달성하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 안티센스 뉴클레오타이드는 짧고, 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보)인 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟에 결합하고 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 연결로 올리고뉴클레오타이드에서 포스포디에스테르 결합의 자리바꿈과 같이 퇴화에 저항하도록 조절된 백본(backbone)을 사용함으로써(Blake *et al.*, 1985) 뉴클레아제 퇴화를 늦추기 위해(Matzura and Eckstein, 1968) 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 배양 및 질병의 동물 모델에서도 성공적으로 이용되어 왔다(Hogrefe, 1999).

바람직하게 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 아포토시스 인자 5A 폴리펩타이드 또는 아포토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드의 일부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 발명자들은 바이러스 세포주를 하기에 기술한 바와 같이 아포토시스 인자 5A 폴리펩타이드의 일부분을 인코딩하는 안티센스 뉴클레오타이드로 트랜스펙션시켰고 아포



토시스를 겪는 세포의 수를 측정하였다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션된 세포들은 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션되지 않은 같은 세포와 비교했을 때 아폽토시스를 겪는 세포의 수에서 감소를 나타내었다. 도 54-58은 안티센스 아폽토시스 인자 5A 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션되지 않은 세포와 비교하여 안티센스 아폽토시스 인자 5A 올리고뉴클레오타이드로 처리되어 있는 세포에서 아폽토시스를 겪는 세포의 백분율의 감소를 나타낸다.

본 발명은 아폽토시스 인자 5A 폴리펩타이드 또는 DHS 폴리펩타이드를 인코딩하는 많은 적절한 핵산 서열의 사용을 고려한다. 예를 들면 서열번호 1, 3, 4, 5, 11, 15, 19, 20 및 21(아폽토시스-인자 5A 핵산 서열), 서열번호 6 및 8(아폽토시스-특이적 DHS 핵산 서열), 서열번호 12 및 16(아폽토시스 인자 5A 서열) 및 서열번호 7(아폽토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드 서열) 또는 이들의 일부가 적당한 서열로 제공된다. 다른 바람직한 아폽토시스 인자 5A 안티센스 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 35, 37 및 39를 포함한다. 추가적인 안티센스 뉴클레오타이드는 계산된 것 이상(즉 90% 상동)에 대해 실제적 서열 일치율을 나타내거나 계산된 서열번호에 대해 더한 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징된 서열을 갖는 것을 포함한다. 게다가 다른 적당한 서열은 기술(art)에서 알려진 방법에 따라 프로브로 알려진 서열을 이용하여 발견될 수 있다.

본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 단일나선, 이중나선, DNA, RNA 또는 하이브리드일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고 뉴클레아제 퇴화 또는 이와 유사한 것에 대한 저항을 증가시키기 위해 기술에서 알려진 방법에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 기술에서 알려져 있고 올리고뉴클레오타이드의 백분을 변형하는 것, 당 모이어티를 변형하는 것 또는 염기를 변형하는 것을 포함하지만 이러한 것으로 제한되지는 않는다. 이러한 변형에서 또한 포함하는 것은 다양한 DNA-RNA 하이브리드 또는 일반적으로 "갭(gapped)" 올리고뉴클레오타이드로 언급되는 구조이다.

본 발명은 아폽토시스 인자 5A 또는 DHS의 발현을 저해할 수 있거나 감소시킬 수 있는 다른 약제를 제공한다. 이러한 약제의 하나는 siRNAs이다. 낮은 저해 RNAs(Small Inhibitory RNAs, siRNA)는 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 얻어진 것에 대해 동등하거나 상위의 발현 레벨을 얻기 위해 낮은 농도가 요구되기 때문에 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대해 생존 가능한 대안을 나타내고 있다(Thompson, 2002). 긴 이중나선 RNAs는 식물, 선충류 및 과일파리와 같은 다양한 유기체에서 특정 유전자의 발현을 휴지시키기(silent) 위해 사용되어 왔다. Dicer라고 불리는 RNase-III 과의 효소는 이러한 긴 이중나선 RNAs를 21-23 뉴클레오타이드 낮은 저해 RNAs 내로 처리하고 그후 RNA-도입된 사일런싱 콤플렉스(RNA-induced silencing complex, RISC) 내로 통합된다. siRNA의 풀림은 RISC를 활성화시키고 염기쌍에 의한 내인성 mRNA에 대해 단일나선 siRNA가 콤플렉스를 이끌게 한다. RISC에 의한 내인성 mRNA의 인지는 분열의 결과를 낳고 그 결과로 번역에 이용할 수 없도록 한다. 포유류 세포 내로 긴 이중나선 RNA의 도입은 siRNA의 사용에 의해 무시될 수 있는 강한 항바이러스성 반응의 결과를 낳는다(Elbashir *et al.*, 2001). SiRNA는 세포 배양에서 넓게 이용되어 왔고 90% 또는 그 이상의 특정 유전자 발현에 있어서 일상적으로 감소를 얻었다.

siRNAs의 이용 또한 질병의 동물 모델에 있어서 유전자 발현을 저해하는 데 대중성을 얻어 오고 있다. 루시퍼라제에 대한 siRNA를 설명하는 최근의 연구는 유체역학 주입 방출 기술을 이용하여 전-분만 마우스의 넓고 다양한 기관에서 공동-트랜스펙션된 플라스마로부터 루시퍼라제 발현을 방해하는 것이 가능하였다(Lewis *et al.*, 2002). 마우스의 꼬리 정맥으로 유체역학적으로 주입된 TNF 군에서 수용체인 Fas에 대한 siRNA는 간세포의 80% 이상보다 훨씬 많은 트랜스펙션이 가능했었고 마지막 주입 후 10일까지는 간에서 Fas 발현이 90%로 감소하는 것이 가능하였다(Song *et al.*, 2003). Fas siRNA는 간 섬유증 및 간 괴사로부터 마우스를 보호하는 것이 가능하였다. 치사량의 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide)로 처리된 마우스에서 폐혈증의 진행은 TNF $\alpha$ 에 대해 유도된 siRNA의 이용에 의해 저해되었다(Sorensen *et al.*, 2003). SiRNA는 세포 배양 및 생체 내에서 오래 지속되는 효과, 생체 내에서 세포를 트랜스펙션시키는 능력 및 혈청에서 퇴화에 대한 저항의 관점에서 생체 내에서 특정한 유전자의 발현의 저해에 대해 매우 강한 약물이 되는 잠재력을 지닌다(Bertrand *et al.*, 2002).

본 발명의 발명자들은 아폽토시스 인자 5A siRNAs를 지니는 세포를 트랜스펙션시켰고 아폽토시스 인자 5A의 발현에서 그 효과를 연구하였다. 도 64는 아폽토시스 인자 5a 단백질 보다 덜 생산된 아폽토시스 인자 5a siRNA로 트랜스펙션된 세포를 나타낸다. 도 64-67은 아폽토시스 인자 5A siRNAs로 트랜스펙션되지 않은 세포와 비교하여 캄포데신 및 TNF- $\alpha$ 에 노출된 후 아폽토시스를 경험한 세포의 낮은 백분율을 갖는 아폽토시스 인자 5A siRNAs로 트랜스펙션된 세포를 나타낸다.

바람직하게 siRNAs는 서열번호 30, 31, 32, 33 및 34를 포함한다. 추가적인 siRNAs는 계산된 것(즉 90% 상동)에 대해 실제적 서열 일치율을 나타내거나 계산된 서열번호에 대해 더한 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징된 서열을 갖는 것을 포함한다. 도 64는 아폽토시스 인자 5A 단백질 보다 더 생성된 아폽토시스 인자 5A siRNA로 트랜스펙션된 세포를 나타낸다.

많은 중요한 인간 질병은 아포토시스의 조절이 비이상성인 것에 의한 것이다. 이러한 비이상성은 세포 수(예를 들면, 암)에서의 병적인 증가 또는 세포의 손상 손실(예를 들면, 퇴행성 질환) 어느 것의 결과를 낳을 수 있다. 비-제한 예로써는, 본 발명의 방법 및 조성은 다음의 아포토시스-관련된 질병 및 장애를 방지하거나 치료하기 위해 사용될 수 있다: 신경학상/신경퇴행성 장애(예를 들면, 알츠하이머, 파킨슨, 헌팅턴, 근위축성 측삭 경화증(루게릭병), 자가면역 장애(예를 들면, 류마티즘 관절염, 전신성 심상성 낭창(systemic lupus erythematosus(SLE), 다발성 경화증), 뤼센근이영양증(Duchenne Muscular Dystrophy, DMD), 운동뉴런 장애, 허혈, 심허혈, 만성 심부전증, 발작, 유아성 척수성 근육위축증, 심장마비, 신부전, 아토피 피부염, 폐혈증 및 폐혈증 쇼크, 에이즈, 간염, 녹내장, 당뇨병(타입 1 및 타입 2), 천식, 망막 색소변성증, 골다공증, 이종이식거부 및 화상.

아포토시스 조절에서 비이상성에 의해 유발되는 이러한 질병의 하나는 녹내장이다. 아포토시스는 녹내장 환자에 있어서 눈을 멀도록 하는 치명적인 인자이다. 녹내장은 진행성 시력상실의 결과를 낳는 시신경에 대한 손상에서 기인하는 눈 상태의 하나이다. 아포토시스는 이러한 시신경 손상의 직접적인 원인으로 보여져 왔다.

녹내장 연구 분야에서의 초기 연구는 상승된 IOP가 망막 신경절 세포의 사멸에 의해 수반되는 사상관(구멍이 난 아교결합조직)의 단계에서 축삭 이동에 방해가 되게 한다고 나타내었다. Quigley 및 Anderson(1976) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **15**, 606-16; Minckler, Bunt 및 Klock(1978) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **17**, 33-50; Anderson 및 Hendrickson(1974) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **13**, 771-83; Quigley *et al.*, (1980) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **19**, 505-17;. 녹내장의 동물 모델 및 사후 인간 조직의 연구는 녹내장에서 망막 신경절 세포의 사멸이 아포토시스에 의해 발생한다는 것을 암시한다. Garcia-Valenzuela *et al.*, (1995) *Exp. Eye Res.*, **61**, 33-44; Quigley *et al.*, (1995) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **36**, 774-786; Monard(1998) In: Haefliger IO, Flammer J(eds) *Nitric Oxide and Endothelin in the Pathogenesis of Glaucoma*, New York, NY, Lippincott-Raven, 213-220. 증가된 IOP의 결과로써 축삭 이동의 중단은 영양 인자의 손실에 의한 망막 신경절 세포 사멸에 기여할 수도 있다. Quigley(1995) *Aust N Z J Ophthalmol*, **23**(2), 85-91. 녹내장 눈에서 시신경 유두 성장교세포 역시 약간의 신경독성 물질의 증가된 수준을 생성하는 것으로 발견되어 왔다. 예를 들면 종양 괴사 인자- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )의 증가된 생성(Yan *et al.*, (2000) *Arch. Ophthalmol.*, **118**, 666-673) 및 산화질소 합성(Neufeld *et al.*, (1997) *Arch. Ophthalmol.*, **115**, 497-503), 산화질소를 발생시키는 효소는 녹내장 눈의 시신경 유두에서 발견되었다. 더욱이 활성화된 망막 신경교 세포에 의한 산화질소 합성(iNOS) 및 TNF- $\alpha$ 의 유도 가능한 형태의 증가된 발현은 유전적 망막 질병의 래트 모델에서 관찰되어 왔다. Cotinet *et al.*, (1997) *Glia*, **20**, 59-69; de Kozak *et al.*, (1997) *Ocul. Immunol. Inflamm.*, **5**, 85-94; Goureau *et al.*, (1999) *J. Neurochem*, **72**, 2506-2515. 녹내장 시신경 유두에서, 과도한 산화질소는 망막 신경교 세포의 엑손의 퇴화에 연결되어 왔다. Arthur 및 Neufeld, (1999) *Surv Ophthalmol*, **43**(Suppl 1), S129-S135. 마지막으로 의태된 허혈 또는 높아진 유체역학적 압력에 반응하여 망막 신경교 세포에 의해 TNF- $\alpha$ 의 증가된 생성은 공생배양된 망막 신경교 세포에서 아포토시스를 유도하는 것으로 보여져 왔다. Tezel 및 Wax, (2000) *J. Neurosci.*, **20**(23), 8693-8700.

아포토시스에 의한 퇴화로부터 망막 신경교 세포를 보호하는 것은 녹내장으로 기인되는 시력상실에 대해 잠재적인 새로운 치료법으로써 연구하여 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 아포토시스 세포 사멸로부터 망막 신경교 세포를 보호하기 위해 아포토시스 과정에서 주요 단백질을 타겟으로 하기 위한 몇 개의 그룹으로써 사용되어 왔다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 짧고, 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보적인)인 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전사, 번역 또는 스플라이싱 단계에서 타겟에 결합하고 발현을 정지시키는 것으로 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코딩되는 단백질의 발현을 방해하기 위해 설계되었다. 약제로써 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 것에 있어서 곤란한 점의 하나는 혈액 및 세포에서 뉴클레아제에 의한 올리고뉴클레오타이드의 빠른 퇴화이다. 이 문제는 뉴클레아제 퇴화를 지연시키는 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 결합과 올리고뉴클레오타이드 내의 포스포디에스테르 결합을 교체하는 것과 같이 퇴화에 견디내는 변형된 백본을 사용하는 것에 의해 제기되어 왔다. Matzura 및 Eckstein, (1968) *Eur. J. Biochem.*, **3**, 448-452.

안티센스 올리고뉴클레오타이드는 안질환의 동물 모델에서 성공적으로 사용되어 왔다. 일시적인 눈 망막 허혈의 모델에서 카스파제 2의 발현은 허혈 동안 증가되었다. 일차로 망막의 내부 핵 및 신경절 세포 층 내에서 증가되었다. 안티센스 뉴클레오타이드를 이용하는 카스파제의 발현은 망막 전위도에 의해 결정되는 것으로써 중요한 조직생리학적 및 기능상 개선이 되게 한다. Singh *et al.*, (2001) *J. Neurochem.*, **77**(2), 446-75. 시신경의 횡단면에 대한 또다른 연구는 프로-아포토틱 단백질 박스(Bax)를 상향조절하고 아포토시스를 겪는 망막 신경절 세포를 설명하였다. 래트의 관자놀이 상부의 망막 내로 박스 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 되풀이해서 주입하는 것은 박스의 국부 발현을 저해하였고 시신경의 트랜잭션을 수반하는 살아남은 망막 신경절 세포의 수는 증가되었다. Isenmann *et al.*, (1999) *Cell Death Differ.*, **6**(7), 673-82.



망막 신경절 세포로 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 전달은 리포솜에서 올리고뉴클레오타이드를 조심스럽게 보호하는 것에 의해 개선되어 왔다. 올리고뉴클레오타이드는 그 후 융합(HVJ 리포솜)에 의해 불활성화된 HVJ(Hemagglutinating Virus of Japan)의 엔벨로프로 코팅되었다. FITC-표지된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 마우스 내로 초차체내(intravitreal) 주입은 있는 그대로의 FITC-표지된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 형광이 1일 후 사라지는 반면 신경절 층에서 세포의 44% 이내로 3일간 계속되는 높은 형광의 결과를 낳는 HVJ 리포솜에서 조심스럽게 보호하였다. Hangai *et al.*, (1998) *Arch Ophthalmol*, **116**(7), 976.

본 발명의 아포토시스를 방해하거나 조절하는 방법은 다음의 것으로 제한하는 것은 아니지만, 정상세포, 망막 신경절, 망막 신경교 세포 및 사상판과 같은 눈의 세포에서 아포토시스를 조절하는 데에 직접적이다. 녹내장에서 망막 신경절 세포의 사멸은 아포토시스에 의해 발생한다. 따라서 망막 신경절 세포 내에서 아포토시스를 저해하는 방법을 제공하는 것 또는 아포토시스에 의한 퇴화로부터 망막 신경절 세포를 보호하는 것에 의해 녹내장에 의해 기인되는 시력상실의 예방에 대해 신규한 치료법을 제공한다.

본 발명은 아포토시스-특이적 eIF-5A1의 발현을 억제하는 것으로 녹내장 눈에서 망막 신경절 세포 사멸을 방지하는 것에 대한 방법을 제공한다. 아포토시스-특이적 eIF-5A1의 발현을 저해하는 것은 아포토시스를 감소시킨다. 아포토시스-특이적 eIF-5A1은 모든 아포틱 과정을 조절하는 강한 유전자라는 것이 분명하다. 따라서 시신경 유두에서 아포토시스를 조절하는 것은 아포토시스-특이적 eIF-5A1의 발현을 방해하는 것이 녹내장에 대한 치료법을 제공한다는 것을 나타낸다.

아포토시스-특이적 eIF-5A1의 발현의 억제는 다음의 것으로 제한하는 것은 아니지만, 사상판, 정상세포, 망막 신경절 또는 망막 신경교 세포와 같은 눈의 세포에 인간 아포토시스-특이적 eIF5A1에 대해 타겟된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 것에 의해 수행된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상기에 정의한 바와 같이 아포토시스-특이적 eIF-5A1 폴리펩타이드의 최소한 하나의 부분에서 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 인간 아포토시스-특이적 eIF-5A1에 대해 타겟된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 인간 아포토시스-특이적 eIF-5A1 폴리펩타이드의 최소한 하나의 부분에서 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 스트린전트 조건하에서 서열번호 26 및 27에 상보적인 서열에 결합한 서열번호 26 또는 27 또는 올리고뉴클레오타이드로 구성된다.

본 발명의 또다른 실시태양은 사상판 세포, 정상세포, 망막 신경절 세포 또는 망막 신경교 세포에서 아포토시스-특이적 eIF-5A1의 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 다음의 것들로 제한하는 것은 아니지만 인간 아포토시스-특이적 eIF-5A1에 대해 타겟된 서열번호 26 및 27과 같은 것이 사상판 세포, 정상세포, 망막 신경절 세포 또는 망막 신경교 세포에 투여되었다. 세포는 인간의 것일 수도 있다.

아포토시스에서 역할을 갖는 것에 덧붙여 eIF-5A는 면역 반응에서도 역시 역할을 갖는다. 본 발명은 아포토시스 인자 5A 수준이 허혈성 심장 조직에서 두 개의 사이토카인(인터루킨 1-베타 "IL-1β" 및 인터루킨 18 "IL-18")의 상승된 수준과 서로 관련되어 있다는 것을 발견하였다. 따라서 아포토시스 인자 5A가 허혈성 심장 조직에 존재하는 것과 같이 세포 사멸에 포함되어 있다는 것을 또한 증명하였다. 게다가 이러한 아포토시스 인자 5A/인터루킨 상호관계는 비-허혈성 심장 조직에서는 나타나지 않았다. 도 50a-f 및 51 참조. PCR 측정법을 이용하여 아포토시스 인자 5A, 증식하는 eIF-5a(eIF-5A2-이소폼으로 알려진 다른 것), IL-1β 및 IL-18의 수준은 측정되었고 다양한 허혈성 심장 조직(관상 우회로술 및 관막(승모판 및 심방판막) 치환 환자로부터)에서 비교되었다.

이러한 단백질 인터루킨에 대한 아포토시스 eIF-5a의 상호관계는 허혈에서 염증 및 아포토시스 경로가 아포토시스 인자 5A의 수준을 조절하는 것을 거쳐 조절될 수도 있다는 것을 더욱 암시한다. 아포토시스 인자 5A가 면역 반응에 포함되어 있다는 증거는 인간 말초혈 단핵세포(Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)가 보통 eIF-5A의 매우 낮은 수준을 발현한다는 사실에 의해 암시되었다. 그러나 eIF-5A의 T-림프구세포-특이적 자극 발현을 지닌 자극에서 매우 효과적으로 증가된다(Bevec *et al.*, 1994). 이것은 T-세포 분열증식 및/또는 활성화에서 아포토시스 인자 5A에 대한 역할을 암시한다. 활성화된 T 세포가 다양한 사이토카인을 생성하는 것이 가능하기 때문에 아포토시스 인자 5A가 사이토카인 mRNAs에 대한 핵세포질성 셔틀(nucleocytoplasmic shuttle)로써 요구될 수도 있다는 것 역시 가능하다.

또다른 연구는 인간 말초혈 단핵세포(PBMCs)에서 eIF-5A mRNA 및 세포 표면 표지 발현에 주목하고 있고 혈액 세포주는 다양한 성숙 분열 자극 시약으로 처리되었다(Bevec *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10829-10833.(1994)). eIF-5A mRNA 발현은 T-세포 활성을 유도하는 다수의 자극에 의해 PBMCs에서 유도되었다(Bevec *et al.*, 1994). PBMC eIF-5A mRNA 발현의 더 높은 수준은 건강한 혈액 제공자에서보다 HIV-1 환자에서 관찰되었다. 본 연구의 연구자는 그들의 결과를 eIF-5A mRNA가 T-세포 활성 및 HIV-1 복제에 대해서도 필요한 중요한 mRNAs에 대해 핵세포질

성 서클로써 행동할 수 있기 때문에 eIF-5A mRNA가 유도된다는 것을 제안하는 것에 의해 설명하였다(Bevec *et al.*, 1994). eIF-5A는 HIV Rev 단백질에 대해 세포질 결합 인자가 되는 것으로 설명되어 왔고 HIV 복제에 대해 요구되어 왔다(Ruhl *et al.*, 1993).

최근의 연구는 세포의 분화 및 활성화에서 eIF-5A에 대한 중요한 역할을 제안하였다. 미숙한 수상돌기 세포가 분화 및 성숙으로 유도되었을 때 eIF-5A mRNA 수준의 도입은 CD83 단백질 발현의 상승과 일치하였다(Kruse *et al.*, J. Exp. Med. 191(9): 1581-1589(2000)). 수상돌기 세포는 T 세포-중재 면역을 유도하기 위해 보조 및 살해 T 세포를 민감하게 하는 항원제시세포이다(Steinman, 1991). 수상돌기 세포는 T 세포를 자극하기 위한 능력이 부족하고 T 세포를 활성화시킬 수 있는 세포 내로 성숙시키기 위해 적당한 자극(즉 염증성 사이토카인 및/또는 미생물 생성)을 요구한다. 성숙한 수상돌기 세포에서 CD83의 합성 및 표면 발현은 보조 및 살해 T 세포를 민감하게 하고 T 세포-중재 면역을 유도하는 데에 상당한 영향력을 미친다. 미성숙한 수상돌기 세포가 하이푸시네이션(hypusination)의 (저해제(GC7)로 전-처리되어 eIF-5A의 저해제가 활성화되었을 때 CD83의 표면 발현은 방해되었다(Kruse *et al.*, 2000). 본 연구의 연구자는 eIF-5A가 CD83 mRNA의 뉴클레오사이트플라스믹 전좌에 대해 필수적이라는 것과 하이푸시네이션을 방해하여 eIF-5A, CD83 발현 및 수상돌기 세포 성숙이 방해되는 것으로 그들의 결과를 설명하였다(Kruse *et al.*, 2000).

면역 체계에서 eIF-5A에 대한 역할을 포함하는 이러한 연구(Bevec *et al.*, 1994; Kruse *et al.*, 2000)들에서 연구자들은 그들이 시험중이었던 eIF-5A의 이소폼을 일일이 열거하거나 확인하지 않았지만 그것에 이유가 있지는 않았다. 상기에 언급한 바를 요약하면 인간은 분리된 염색에 위에 모두 인코딩된 eIF-5A, eIF-5A1(아포토시스 인자 5A1) 및 eIF-5A2의 두 개의 이소폼을 갖는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들의 발견에 앞서 이러한 이소폼 모두는 기능상 과다하다고 믿어져 왔다. 자극된 PBMCs에서 eIF-5A mRNA를 검출하기 위해 이용되었던 Bevec *et al.*에 의해 설명된 올리고뉴클레오타이드는 인간 eIF-5A1에 대해 100% 상동성을 가지며 연구에 의해 선행된 eIF-5A2의 클로닝을 갖는다. 유사하게 수상돌기 세포가 성숙하는 동안 역전사 중합 연쇄 반응에 의해 eIF-5A를 검출하기 위해 이용되었던 Kruse *et al.*에 의해 설명된 프라이머는 인간 eIF-5A1에 대해 100% 상동성을 갖는다.

본 발명은 수상돌기 세포 성숙 및 PBMC 활성를 조절하기 위한 eIF-5A1의 발현을 조절하는 것에 관한 것이고 이것은 차례로 T 세포-중재 면역을 조절할 수도 있을 것이다. 본 발명자들은 eIF-5A mRNA를 발현하는 것으로 알려진 U-937 세포주를 이용하여 점착성의 대식세포 내로의 단핵세포의 분화에서 eIF-5A1의 역할을 연구하였다(Bevec *et al.*, 1994). U-937은 현탁액에서 성장하는 인간 단핵 세포주이며 PMA의 자극으로 대식세포 내로 점착 및 분화하게 될 것이다. PMA가 배지를 교환하는 것으로 제거되면 세포는 움직이지 않게 되고 그 후 사이토카인을 생성하는 것이 가능해진다(Barrios-Rodiles *et al.*, J. Immunol. 163: 963-969(1999)). 일반적인 염증 반응을 유발하는 것으로 알려진 많은 박테리아의 외부 막에 근거한 인자인 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)에 반응하여 대식세포는 TNF- $\alpha$  및 IL- $\beta$  모두를 생성한다(Barrios-Rodiles *et al.*, 1999). 사이토카인의 간세포 분화 및 결과 생성물의 차트를 나타내는 도 78 참조. U-937 세포 역시 LPS-자극을 수반하는 IL-6 및 IL-10을 생성한다(Izeboud *et al.*, J. Receptor & Signal Transduction Research, 19(1-4): 191-202).

U-937 세포를 이용하여 eIF-5A1가 단핵세포 분화 및 TNF- $\alpha$ 분비 동안에 상향조절된다는 것을 나타내었다. 도 77 참조. 따라서 본 발명의 하나의 관점은 사이토카인의 생산을 저해하거나 감소시키기 위해 대식세포의 성숙을 저해하거나 지연시키는 방법을 제공하는 것이다. 이러한 방법은 DHS 또는 eIF-5A1의 어느 것 하나의 발현을 감소시키는 것을 가능하게 하는 약제를 제공하는 것을 포함한다. DHS의 발현을 감소시키거나 제거하는 것에 의해 eIF-5A1 활성은 감소되거나 제거될 것이다. eIF-5A1가 단핵세포 분화 및 TNF- $\alpha$ 분비 동안에 상향조절되기 때문에 이러한 결과가 발생하는데 필수적이라고 믿어졌다. 따라서 eIF-5A1의 활성을 감소시키거나 제거하는 것에 의해 또는 eIF-5A1 발현을 직접적으로 감소시키거나 제거하는 것에 의해 단핵세포 분화 및 TNF- $\alpha$ 분비는 감소되거나 제거될 수 있다. DHS 또는 eIF-5A1의 발현을 감소시키는 것이 가능한 어떠한 약제도 사용되거나 포함될 수 있지만 여기에 기술한 바와 같이 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNAs로만 제한되는 것은 아니다.

본 발명자들은 특정 자극에 반응하여 사이토카인을 예상대로 생산하는 것으로 알려진 세포주를 이용하여 생체 내에서 사이토카인 mRNAs에 대한 핵세포질성 서클로써 작용하는 것에 의해 사이토카인의 번역을 촉진하기 위한 eIF-5A1의 능력을 연구해 왔다. 최근 얼마간의 연구들은 인간 간 세포주가 다른 사이토카인의 생성을 유도하는 것에 의해 사이토카인 자극에 반응할 수 있다는 것을 발견하였다. HepG2는 사이토카인에 민감한 것으로 알려진 잘 특징지워진 인간 감세포암 세포주이다. IL-1 $\beta$ 에 반응하여 HepG2 세포는 용량 의존성 방법으로 재빨리 TNF- $\alpha$  mRNA 및 단백질을 생성한다(Frede *et al.*, 1996; Rowell *et al.*, 1997; Wordemann *et al.*, 1998). 따라서 HepG2 세포는 TNF- $\alpha$  생성의 조절을 연구하기 위한 모델 시스템으로써 이용되었다. 본 발명자들은 세포가 아포토시스 인자 5A 쪽으로 유도된 안티센스 뉴클레오타이드로 트랜스펙션된 후 TNF- $\alpha$ 를 덜 생산하도록 하는 HepG2 세포에서 eIF-5A1 발현의 저해를 증명해왔다.

따라서 본 발명의 하나의 실시예는 세포에서 사이토카인의 수준을 감소시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 아폽토시스 인자 5A1의 발현을 감소시키는 것이 가능한 세포에 약제를 투여하는 것을 포함한다. 아폽토시스 인자 5A1의 발현을 감소시키는 것은 사이토카인의 발현을 감소시키고 따라서 세포에 의해 생성된 사이토카인의 감소된 양을 감소시킨다. 사이토카인은 바람직하게는 전-염증성 사이토카인이며 IL-1, IL-18, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 를 포함하지만 이것들만으로 제한하는 것은 아니다.

아폽토시스 인자 5A의 발현을 감소시키는 것이 가능한 약제는 아폽토시스 인자 5A에 상보적인 서열을 갖는 안티센스 뉴클레오타이드일 수 있다. 바람직하게는 안티센스 뉴클레오타이드는 서열번호 35, 37 및 39로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나의 서열을 갖거나 서열번호 35, 37 및 39로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열에 대해 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징하는 안티센스 뉴클레오타이드이다.

약제는 또한 아폽토시스 인자 5A에 대해 상보적인 서열을 갖는 siRNA로 구성될 수도 있다. 바람직하게는 siRNA는 서열번호 30, 31, 32 및 33으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖거나 서열번호 30, 31, 32 및 33으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열에 대해 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징하는 siRNA이다. 도 65-67은 아폽토시스 인자 5A siRNAs로 트랜스펙션된 세포가 캄포테신 및 TNF- $\alpha$ 에 노출된 후 아폽토시스를 겪는 세포의 낮은 백분율을 나타낸다. 시약은 또한 안티센스 DHS 뉴클레오타이드를 포함할 수도 있다.

본 발명은 또한 서열번호 35, 37 및 39로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이거나 서열번호 35, 37 및 39로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열에 대해 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징하는 안티센스 뉴클레오타이드에 관한 것이다.

본 발명은 또한 서열번호 30, 31, 32 및 33으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 siRNA에 관한 것이거나 서열번호 30, 31, 32 및 33으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열에 대해 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징하는 siRNA에 관한 것이다.

본 발명은 또한 p53의 발현을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 상기에 기술한 바와 같이 안티센스 뉴클레오타이드 또는 siRNAs와 같은 아폽토시스 인자 5A의 발현을 감소시키는 것이 가능한 약제를 투여하는 것을 포함한다. 아폽토시스 인자 5A1의 발현을 감소시키는 것은 도 52 및 실시예 11에 나타난 바와 같이 p53의 발현을 감소시킨다.

본 발명은 또한 Bcl-2의 발현을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 아폽토시스 인자 5A의 발현을 감소시키는 것이 가능한 약제를 투여하는 것을 수반한다. 바람직한 약제는 상기 기술한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 siRNAs를 포함한다. 아폽토시스 인자 5A1의 발현의 감소는 도 63 및 실시예 13에 나타난 바와 같이 Bcl-2의 발현을 증가시킨다. 도 63은 아폽토시스 인자 5a siRNA로 트랜스펙션된 세포가 아폽토시스 인자 5A1 단백질을 덜 생산한다는 보여주고 덧붙여 Bcl-2 단백질은 더 생산한다는 것을 보여준다. 아폽토시스 인자 5A1 발현에서의 감소는 Bcl-2 발현에서의 감소와 상호 관련이 있다.

본 발명은 또한 상기 기술한 안티센스 뉴클레오타이드 또는 siRNAs의 어느 하나를 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는 것을 필요로 하는 환자에게 TNF- $\alpha$ 의 수준을 감소시키는 방법을 제공한다. 도 69 및 실시예 14에서 설명한 바와 같이 본 발명의 안티센스 인자 5A 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션된 세포는 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션되지 않은 세포 보다 IL-1로의 유도 후 TNF- $\alpha$ 를 덜 생산하였다.

본 발명은 인간 상피 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 수준을 감소시키는 방법을 제공한다. 도 74a 및 b 및 도 75 및 실시예 15에서 설명한 바와 같이 eIF-5A1의 발현을 감소시키거나 저해하는 것은 만약 인간 상피 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 생성을 완전하게 저해하지 않는다면 질병을 유발한다. eIF-5A1에 대한 siRNAs는 eIF-5A1의 발현을 저해하는데 사용되었다. 이러한 발현의 저해는 TNF- $\alpha$ 의 생성을 감소시키거나 저해하는 것뿐만 아니라 사이토카인-유도된 아폽토시스로부터 보호한다. eIF-5A1의 발현을 감소시키는 것에 의해 TNF- $\alpha$ 의 생성은 감소되었다. 이러한 이중 효과는 TNF- $\alpha$ 로 인한 증가된 염증과 관계 있는 크론씨 병 또는 궤양성 대장염과 같은 염증성 장질환으로 고생하는 환자들을 치료하는 방법을 제공한다.

따라서 본 발명은 상기 병리학적인 상태인 포유류에 아폽토시스 인자 5A의 발현을 감소시키는 약제를 투여하는 것을 포함하는 증가된 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-8 수준에 의해 특징지어진 병리학적인 상태를 치료하는 방법을 제공한다.

IL-1, TNF- $\alpha$  또는 IL-6 수준에서의 감소에 의해 특징지어진 알려진 병리학적 상태는 관절염-류마티스 및 골관절염, 천식, 알레르기, 동맥염증, 크론씨 병, 염증성 장질환(ibd), 궤양성 대장염, 관상동맥성 심장질환, 낭포성섬유증, 당뇨병, 낭창, 다발성 경화증, 그레이브스 병, 치근막염, 녹내장 및 황반변성, 원추각막을 포함하는 안구표면 질병, 기관 허혈-심장, 신장, 재관류 손상, 패혈증, 다발성 골수증, 기관 이식거부, 건선 및 습진을 포함하지만 이것들로만 제한하는 것은 아니다.

여기서 사용된 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 다른 서열과 실질적인 구조적 또는 기능적 동의성을 보임을 나타내는데 사용된다. 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열간의 어떠한 구조적 또는 기능적 차이점은 미소마진(*de minimis*)일 것이다; 즉, 원하는 적용에서 나타난 바와 같은 기능을 하는 서열의 능력에 영향을 미치지 않을 것이다. 차이점은 예를 들어 다른 종간의 코돈 용법(usage)의 유전적 변이에 기인한다. 구조적 차이점은 2 이상의 다른 서열간에 유의적인 양의 서열 중복 또는 유사성이 있는 경우 또는 다른 서열들이 길이 또는 구조에서 다르더라도 유사한 생리적 특성을 나타내는 경우 미소마진으로 간주된다. 예를 들어 이러한 특성은 정의된 조건 하에서 하이브리다이징하는 능력 또는 단백질의 경우 면역적 교차반응성, 유사한 효소 활성 등을 포함한다. 숙련된 기술자는 알려진 방법에 의해 이들 특성의 각각을 용이하게 결정할 수 있다.

더욱이 2가지 뉴클레오타이드 서열은 서열이 적어도 약 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 서열 유사성을 지닌 경우 "실질적으로 상보적"이다. 2가지 아미노산 서열은 폴리펩타이드의 활성 또는 기능적으로 관련된 부분 사이에 적어도 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 유사성을 지닌 경우 실질적으로 상동적이다.

2가지 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위해 서열은 최적 비교 목적으로 정렬된다(즉, 갭이 최적 정렬을 위해 첫 번째 및 두 번째 아미노산 또는 핵산 서열의 하나 또는 둘 모두 내에 도입될 수 있고, 비-상동적 서열은 비교 목적으로 무시될 수 있다). 바람직한 실시태양에서 참조 서열 길이의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상이 비교 목적으로 정렬된다. 이후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 비교된다. 첫 번째 서열에서의 위치가 두 번째 서열 내 상응하는 위치로서 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드에 의해 점유될 때 분자는 그 위치에서 동일하다(여기서 사용된 바와 같이 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동등하다). 2가지 서열 사이의 동일성 백분율은 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 기능이고 2가지 서열의 최적 정렬을 위해 도입되는 데 필요한 각각의 갭의 수, 갭의 길이를 고려한다.

2가지 서열 사이의 서열 비교 및 동일성 및 유사성 백분율의 측정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다 (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informations and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

본 발명의 핵산 및 단백질 서열은 예를 들어 다른 패밀리 멤버 또는 관련된 서열을 확인하기 위해 서열 데이터베이스에 대한 검색을 실행하는 "질문 서열"로서 더욱 이용될 수 있다. 이러한 검색은 Altschul, *et al.*(1990) J. Mol Biol. 215:403-10의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(2.0 버전)을 이용하여 실행될 수 있다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 NBLAST 프로그램으로 실행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 발명의 단백질에 상동적인 아미노산 서열을 수득하기 위해 XBLAST 프로그램으로 실행될 수 있다. 비교 목적으로 갭된(gapped) 정렬을 수득하기 위해 갭된 BLAST가 Altschul, *et al.*(1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402에 기술된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 갭된 BLAST 프로그램을 사용할 때 각각의 프로그램의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다(즉, XBLAST 및 NBLAST).

핵산의 "기능적 유도체"라는 용어는 여기서 유전자 또는 뉴클레오타이드 서열의 상동체 또는 아날로그를 의미하는데 사용된다. 기능적 유도체는 본 발명에 따라 그의 유용성을 가능하게 하는 주어진 유전자의 기능의 적어도 일부를 보유한다. 여기에 기술된 아포토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드의 "기능적 유도체"는 아포토시스-특이적 eIF-5A 활성 또는 아포토시스-특이적 eIF-5A에 특이적인 항체와의 면역적 교차반응성의 적어도 일부를 보유한 아포토시스-특이적 eIF-5A의 단편, 변이체, 아날로그 또는 화학적 유도체이다. 아포토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드의 단편은 분자의 서브셋을 나타낸다.

또한 기능적 변이체는 기능에 있어서 변화가 없거나 무의미한 변화를 초래하는 유사한 아미노산의 치환을 포함할 수 있다. 기능에 필수적인 아미노산은 자리-지정 돌연변이 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이와 같은 당 분야에 알려진 방법에 의해 확인될 수 있다(Cunningham *et al.*(1989) Science 244:1081-1985). 후자 방법은 분자 내 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연

변이를 도입한다. 수득된 돌연변이 분자는 키나제 활성과 같은 생물학적 활성 또는 시험관 내 증식 활성과 같은 에세이로 시험된다. 또한 결합 파트너/기질 결합에 중요한 자리는 결정화, 핵 자기공명 또는 포토어피니티 표지와 같은 구조적 분석에 의해 측정될 수 있다(Smith *et al.*(1992) J. Mol. Biol. 224:899-904; de Vos *et al.*(1992) Science 255:306-312).

"변이체"는 하나 이상의 치환된 뉴클레오타이드를 지닌 뉴클레오타이드 치환과 같이 전체 유전자 또는 그의 단편에 실질적으로 유사하나 특정한 유전자와 하이브리다이즈 하거나 본래의 DNA와 하이브리다이즈하는 mRNA 전사체를 인코딩하는 능력을 유지하는 분자를 나타낸다. "상동체"는 다른 동물 속 또는 종으로부터의 단편 또는 변이체 서열을 나타낸다. "아날로그"는 전체 분자, 그의 변이체 또는 단편과 유사하거나 이에 관련된 기능을 하는 비-천연 분자이다.

변이체 펩타이드는 자연발생될 뿐만 아니라 당 분야에 잘 알려진 방법에 의해 제조된 변이체를 포함한다. 이러한 변이체는 분자 기술 및 여기에 개시된 서열 정보를 이용하여 용이하게 확인/제조될 수 있다. 또한 이러한 변이체는 본 발명의 eIF-5A 또는 DHS 단백질 서열 및/또는 구조적 상동체에 기초하여 다른 단백질로부터 용이하게 구별될 수 있다. 존재하는 상동성/동일성의 정도는 단백질이 기능적 변이체인지 비-기능적 변이체인지에 따라, 파랄로그(paralog) 패밀리 내 존재하는 차이의 양 및 오르쎈로그(ortholog) 사이의 진화 거리에 기초할 것이다.

본 발명의 eIF-5A 또는 DHS 단백질의 비-자연발생 변이체는 재조합 기술을 이용하여 용이하게 생성될 수 있다. 이러한 변이체는 단백질의 아미노산 서열 내 삭제, 첨가 및 치환을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 예를 들어 치환의 하나의 종류는 보존된 아미노산 치환이다. 이러한 치환은 단백질의 주어진 아미노산을 유사한 특성의 다른 아미노산으로 치환하는 것이다. 일반적으로 보존적 치환은 지방성 아미노산 Ala, Val, Leu 및 Ile의 서로 대치; 하이드록실 잔기 Ser과 Thr의 상호교환; 산성 잔기 Asp 및 Glu의 교환; 아미드 잔기 Asn 및 Gln 사이의 치환; 염기성 잔기 Lys 및 Arg의 교환; 방향성 잔기 Phe 및 Tyr 사이의 대치이다. 어떤 아미노산 변화가 표현형적으로 침묵(silent)이 되기 쉬운지에 관한 안내가 Bowie *et al.*, Science 247:1306-1310(1990)에 나타나 있다.

여기서 사용된 "하이브리디제이션"이라는 용어는 일반적으로 프로브 서열 및 타겟 서열의 성질에 따라 다르게 당업자에게 용이하게 명백한 적당한 스트린전시 조건에서의 핵산의 하이브리디제이션을 의미하는데 사용된다. 하이브리디제이션 및 세척의 조건은 당 분야에 잘 알려져 있고 다양한 인큐베이션 시간, 온도 및/또는 용액의 이온 강도의 변화에 의한 원하는 스트린전시에 따라 다른 조건의 조정이 용이하게 달성된다. Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989.

조건의 선택은 하이브리다이징하는 서열의 길이 특히, 프로브 서열의 길이, 핵산의 상태 G-C 함량 및 허용된 미스매치의 양에 의해 규정된다. 낮은 스트린전시 조건은 더 낮은 정도의 상보성을 지닌 스트랜드 사이에서의 부분적인 하이브리디제이션을 원할 때 바람직하다. 완전하거나 거의 완전한 상보성을 원할 때는 높은 스트린전시 조건이 바람직하다. 일반적인 높은 스트린전시 조건에 있어서 하이브리디제이션 용액은 6X S.S.C., 0.01 M EDTA, 1X Denhardt's 용액 및 0.5% SDS를 포함한다. 하이브리디제이션은 클론된 DNA의 단편의 경우 약 3~4시간 동안 총 진행세포성 DNA의 경우 약 12~16시간 동안 68°C에서 수행되었다. 낮은 스트린전시에 있어서, 하이브리디제이션의 온도는 이중나선의 녹는점(T<sub>m</sub>) 이하의 약 42°C로 감소된다. T<sub>m</sub>은 G-C 함량 및 이중나선의 길이 뿐만 아니라 용액의 이온 강도의 기능으로 알려진다.

여기서 사용된 DNA 또는 RNA 분자의 "상응하는 부분에 하이브리다이징"라는 어구는 하이브리다이징하는 분자 즉, 올리고뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드 또는 어떤 뉴클레오타이드 서열(센스 또는 안티센스 방향으로)이 거의 동일한 크기이고 충분한 서열 유사성을 지녀서 적당한 조건 하에서 하이브리디제이션 효과를 나타내는 또다른 핵산 분자를 인식하고 하이브리다이징하는 것을 의미한다. 예를 들어 100 뉴클레오타이드 길이 센스 분자는 2개의 서열 사이에 70% 이상의 서열 유사성이 있는 한 뉴클레오타이드 서열의 거의 100 뉴클레오타이드 부분을 인식하고 하이브리다이징할 것이다. "상응하는 부분"의 크기는 하이브리디제이션 내에서 어느 정도 미스매치를 가능하게 하여 "상응하는 부분"이 하이브리다이징하는 분자 보다 예를 들어 20~30% 더 크거나 더 작거나, 바람직하게는 최대한 12~15% 더 크거나 더 작을 수 있음이 이해된다.

더욱이 폴리펩타이드의 기능적 변이체는 또한 기능에 있어서 어떤 변화도 없거나 무의미한 변화를 초래하는 유사한 아미노산 치환을 포함한다. 기능에 필수적인 아미노산은 자리-지정 돌연변이 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이와 같은 당 분야에 알려진 방법에 의해 확인될 수 있다(Cunningham *et al.*, Science 244:1081-1085(1989)). 후자 방법은 분자 내 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 수득된 돌연변이 분자는 생물학적 활성 또는 에세이로 시험된다.

예를 들어, 아포토시스-특이적 eIF-5A의 아날로그는 전체 단백질 또는 그의 단편에 실질적으로 유사한 비-천연 단백질 또는 펩타이드로 나타낸다. 아포토시스-특이적 eIF-5A의 화학적 유도체는 일반적으로 펩타이드 또는 펩타이드 단편의 일부가 아닌 부가적인 화학 모이어티를 포함한다. 변형은 선택된 사이드 체인 또는 말단 잔기와 반응하는 것이 가능한 유기 유도제와 타겟된 아미노산 잔기를 반응시킴으로써 펩타이드 또는 그의 단편에 도입될 수 있다.

예방 또는 치료 목적으로 동물에 사용되는 본 발명의 핵산 및 폴리펩타이드는 약제적으로 수용가능한 담체로 부가적으로 구성된 조성물의 형태로 투여될 것으로 이해된다. 적당한 약제적으로 수용가능한 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 약제적으로 수용가능한 담체는 결합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 최소량의 보조 물질로 더욱 구성될 수 있다. 당 분야에 알려진 바와 같이 주사 조성물은 포유류 내로의 투여 후 활성 성분의 빠르고, 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 포몰레이트될 수 있다.

본 발명의 조성물은 다양한 형태가 될 수 있다. 이들은 예를 들어 정제, 환약, 분말, 액상 용액, 분산액 또는 현탁액, 리포솜, 좌약, 주사 및 주입 용액과 같은 고형, 반-고형 및 액체 투여 형태를 포함한다. 바람직한 형태는 투여 및 치료 적용의 의도된 방식에 따라 달라진다.

이러한 조성물은 제약 분야에서 잘 알려진 방식으로 제조될 수 있다. 조성물 제조시 활성 성분은 일반적으로 담체와 혼합되거나 담체에 의해 희석되거나 또는 예를 들어 캡슐, 봉지, 종이 또는 다른 용기의 형태가 될 수 있는 담체 내에 봉합될 것이다. 담체가 희석제로서 작용할 때 이는 부형약, 첨가제 또는 활성 성분에 대한 매질로서 작용하는 고형, 반-고형 또는 액상 물질이 될 수 있다. 따라서 조성물은 정제, 마름모형 정제, 봉지, 교감, 일릭서(elixir), 현탁액, 연무제(고형 또는 액상 매질), 예를 들어 10 중량%까지의 활성 화합물을 함유한 연고, 연질 및 경질 캡슐, 좌약, 주사 용액, 현탁액, 멸균 포장된 분말 및 국소 패취의 형태가 될 수 있다.

일반적으로 본 발명에서 기술된 것은 하기 예증의 방법으로 제공된 실시예를 통해 더욱 용이하게 이해될 것이다. 실시예는 본 발명을 이해하도록 설명되나 본 범위를 한정하도록 의도되지는 않는다. 실시예는 통상적인 방법의 상세한 설명을 포함하지 않는다. 이러한 방법은 당 분야의 일반적인 숙련자에게 잘 알려져 있고 많은 간행물에 기술된다. 벡터 및 플라스미드의 구조, 플라스미드의 숙주 세포로의 도입 및 유전자 및 유전자 생성물의 발현 및 측정에서 사용된 바와 같은 통상적인 방법의 상세한 설명은 Sambrook, J. *et al.*, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press을 포함한 많은 간행물에서 얻을 수 있다. 여기에 언급된 모든 참고문헌이 모두 포함된다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 래트 아포토시스-특이적 eIF-5A의 3' 말단의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 11) 및 추론된 아미노산 서열(서열번호 12)을 나타낸다.

도 2는 래트 아포토시스-특이적 eIF-5A의 5' 말단의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 15) 및 추론된 아미노산 서열(서열번호 16)을 나타낸다.

도 3은 래트 황체 아포토시스-특이적 eIF-5A 전체 길이 cDNA의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 1)을 나타낸다. 아미노산 서열은 서열번호 2로 나타나 있다.

도 4는 래트 아포토시스-특이적 DHS cDNA의 3' 말단의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 6) 및 추론된 아미노산 서열(서열번호 7)을 나타낸다.

도 5는 래트 황체 아포토시스-특이적 eIF-5A cDNA의 전체-길이 뉴클레오타이드 서열(서열번호 20)과 인간 eIF-5A의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 3)의 정렬이다(접근번호 BC000751 또는 NM\_001970, 서열번호: 3).

도 6은 래트 황체 아포토시스-특이적 eIF-5A cDNA의 전체-길이 뉴클레오타이드 서열(서열번호 20)과 인간 eIF-5A의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 4)의 정렬이다(접근번호 NM\_020390, 서열번호: 4).

도 7은 래트 황체 아포토시스-특이적 eIF-5A cDNA의 전체-길이 뉴클레오타이드 서열(서열번호 20)과 마우스 eIF-5A의 뉴클레오타이드 서열의 정렬이다(접근번호 BC003889). 마우스 뉴클레오타이드 서열(접근번호 BC003889)은 서열번호: 5이다.



도 8은 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 추론된 전체-길이 아미노산 서열(서열번호 2)과 인간 eIF-5A의 추론된 아미노산 서열(서열번호 21)의 정렬이다(접근번호 BC000751 또는 NM\_001970).

도 9는 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 추론된 전체-길이 아미노산 서열(서열번호 2)과 인간 eIF-5A의 추론된 아미노산 서열(서열번호 22)의 정렬이다(접근번호 NM\_020390).

도 10은 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 추론된 전체-길이 아미노산 서열(서열번호 2)과 마우스 eIF-5A의 추론된 아미노산 서열(서열번호 23)의 정렬이다(접근번호 BC003889).

도 11은 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의 일부-길이 뉴클레오타이드 서열(서열번호 6의 잔기 1-453)과 인간 DHS의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 8)의 정렬이다(접근번호 BC000333, 서열번호: 8).

도 12는 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA의 제한 지도이다.

도 13은 일부-길이 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의 제한 지도이다.

도 14는 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA의  $^{32}\text{P}$ -dCTP-표지된 3'-말단으로 프로브된 총 RNA의 노던 블롯(위) 및 에티뮴 브로마이드 염색된 겔(아래)이다.

도 15는 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의  $^{32}\text{P}$ -dCTP-표지된 3'-말단으로 프로브된 총 RNA의 노던 블롯(위) 및 에티뮴 브로마이드 염색된 겔(아래)이다.

도 16은 과잉배란된 래트 황체 내 아폽토시스 정도가 PGF-2 $\alpha$ 로 주입된 후 조사된 DNA 래더링(laddering) 실험을 나타낸다.

도 17은 PGF F-2 $\alpha$ 로의 래트 처리 후 DNA 래더링을 나타내는 아폽토시스 래트 황체로부터 분리된 게놈 DNA의 아가로스 겔이다.

도 18은 과잉배란된 래트 황체의 분산된 세포 내 아폽토시스 정도가 프로스타글라딘 F-2 $\alpha$ (PGF-2 $\alpha$ )에 노출되기 전에 스퍼미딘으로 처리된 래트 내에서 조사된 DNA 래더링 실험을 나타낸다.

도 19는 과잉배란된 래트 황체 내 아폽토시스 정도가 스퍼미딘 및/또는 PGF-2 $\alpha$ 로 처리된 래트 내에서 조사된 DNA 래더링 실험을 나타낸다.

도 20은  $^{32}\text{P}$ -dCTP-표지된 일부-길이 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA로 프로브된 래트 게놈 DNA의 서던 블롯이다.

도 21은 pHM6, 포유류 에피토프 태그 발현 벡터(Roche Molecular Biochemicals)를 나타낸다.

도 22는 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의  $^{32}\text{P}$ -dCTP-표지된 3'-비번역된 구역으로 프로브된 혈청의 철회에 의한 아폽토시스 유도 후 COS-7 세포로부터 분리된 총 RNA의 노던 블롯(위) 및 에티뮴 브로마이드 염색된 겔(아래)이다.

도 23은 COS-7 세포의 순간적 트랜스펙션의 절차를 나타내는 흐름도이다.

도 24는 pHM6로의 트랜스펙션 후 COS-7 세포 내 외부 단백질의 순간적 발현의 웨스턴 블롯이다.

도 25는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 카스페이즈 활성화에 의해 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 26은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 DNA 무사분열에 의해 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 27은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 핵 무사분열에 의해 반영된 아폽토시스 검출을 나타낸다.

도 28은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 핵 무사분열에 의해 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 29는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 포스포티딜세린 노출에 의해 반영된 아폽토시스 검출을 나타낸다.

도 30은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 포스포티딜세린 노출에 의해 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 31은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 핵 무사분열에 의해 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 32는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 33은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 Bcl-2의 하향-조절을 나타낸다. 위쪽 사진은 쿠마시-블루-염색된 단백질 블릿이고; 아래의 사진은 상응하는 웨스턴 블릿이다.

도 34는 프로브로서 Bcl-2를 이용하여 안티센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션된 COS-7의 쿠마시-블루-염색된 단백질 블릿 및 상응하는 웨스턴 블릿이다.

도 35는 프로브로서 c-Myc를 이용하여 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션된 COS-7의 쿠마시-블루-염색된 단백질 블릿 및 상응하는 웨스턴 블릿이다.

도 36은 프로브로서 p53이 사용될 때 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션된 COS-7의 쿠마시-블루-염색된 단백질 블릿 및 상응하는 웨스턴 블릿이다.

도 37은 항-[HA]-퍼옥시다제 프로브를 이용한 COS-7 세포 내 pHM6-전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A 발현의 쿠마시-블루-염색된 단백질 블릿 및 상응하는 웨스턴 블릿 및 p53 프로브가 사용될 때 COS-7 세포 내 pHM6-전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A 발현의 쿠마시-블루-염색된 단백질 블릿 및 상응하는 웨스턴 블릿이다.

도 38은 RKO 세포로부터 분리된 인간 eIF5A2(서열번호 24)의 인간 eIF5A2(서열번호 22)(유전자은행 접근번호 XM\_113401)와의 정렬이다. 교감 서열은 서열번호 28로 나타내었다.

도 39는 순간적 트랜스펙션 후 RKO 및 RKO-E6 세포 내에서 발생한 아폽토시스의 백분율을 나타내는 그래프이다. RKO 및 RKO-E6 세포는 pHM6-LacZ 또는 pHM6-eIF5A1으로 순간적으로 트랜스펙션되었다. 악티노마이신 D로 처리되고 pHM6-eIF5A1으로 트랜스펙션된 RKO 세포는 악티노마이신 D로 처리되지 않고 pHM6-LacZ로 트랜스펙션된 세포에 비해 아폽토시스의 240% 증가를 나타내었다. 악티노마이신 D로 처리되고 pHM6-eIF5A1로 트랜스펙션된 RKO-E6 세포는 악티노마이신 D로 처리되지 않고 pHM6-LacZ로 트랜스펙션된 세포에 비해 아폽토시스의 105% 증가를 나타내었다.

도 40은 순간적 트랜스펙션 후 RKO 세포 내에서 발생한 아폽토시스의 백분율을 나타낸 그래프이다. RKO 및 RKO-E6 세포는 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A1, pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1로 순간적으로 트랜스펙션되었다. pHM6-eIF5A1로 트랜스펙션된 세포는 pHM6-LacZ로 트랜스펙션된 대조군 세포에 비해 아폽토시스의 25% 증가를 나타내었다. 이러한 증가는 pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1으로 트랜스펙션된 세포에서는 분명하지 않았다.

도 41은 순간적 트랜스펙션 후 RKO 세포 내에서 발생한 아폽토시스의 백분율을 나타낸 그래프이다. RKO 세포는 트랜스펙션되지 않거나 pHM6-LacZ 또는 pHM6-eIF5A1로 순간적으로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 효율에 대한 보정 후 pHM6-eIF5A1으로 트랜스펙션된 세포의 60%가 아폽토시스되었다.

도 42는 순간적 트랜스펙션 후 RKO 세포 아폽토시스의 플로우 시토크로메트리(flow cytometry) 분석 결과를 제공한다. RKO 세포는 트랜스펙션되지 않거나 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A1, pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1로 순간적으로 트랜스펙션되었다. 표는 각 게이트의 최대점 하의 구역을 기초로 계산된 아폽토시스를 겪는 세포의 백분율을 나타낸다. 트랜스펙션되지 않은 세포 내 백그라운드 아폽토시스 및 트랜스펙션 효율의 보정 후 pHM6-eIF5A1으로 트랜스펙션된 세포의 80%가 아폽토시스를 나타내었다. pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1로 트랜스펙션된 세포는 단지 백그라운드 수준의 아폽토시스를 나타내었다.

도 43은 0, 3, 37, 24 및 48시간 동안 0.25  $\mu$ g/ml의 악티노마이신 D로 처리된 RKO 세포로부터 추출된 단백질의 웨스턴 블롯을 제공한다. 상위 패널은 1차 항체로서 항-p53을 이용한 웨스턴 블롯을 나타낸다. 중앙 패널은 1차 항체로서 항-eIF5A1을 이용한 웨스턴 블롯을 나타낸다. 하위 패널은 동일한 로딩을 나타내는 화학발광 검출 후 쿠마시 블루로 염색된 항-eIF5A1 블롯에 사용된 멤브레인을 나타낸다. p53 및 eIF5A1은 모두 악티노마이신 D 처리에 의해 상향조절된다.

도 44는 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF5A)와 증식 eIF-5A(eIF5b) 둘 모두가 심장 조직 내에서 발현됨을 나타내는 바 그래프이다. 심장 조직은 관상동맥 우회로 이식술(CABG)을 받은 환자로부터 취해졌다. eIF5A(밝은 회색 바)의 유전자 발현 수준은 eIF5b(어두운 회색 바)와 비교되었다. X-축은 환자 식별자 수이다. Y-축은 pg/18s의 ng이다(리보솜 RNA 18S의 나노그램 중의 메신저 RNA의 피코그램).

도 45는 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF5a)와 증식 eIF-5A(eIF5b) 둘 모두가 심장 조직 내에서 발현됨을 나타내는 바 그래프이다. 심장 조직은 관상 동맥 대치술을 받은 환자로부터 취해졌다. eIF5a(밝은 회색 바)의 유전자 발현 수준은 eIF5b(어두운 회색 바)와 비교되었다. X-축은 환자 식별자 수이다. Y-축은 pg/18s의 ng이다(리보솜 RNA 18S의 나노그램 중의 메신저 RNA의 피코그램).

도 46은 허혈-전 심장 조직 및 허혈-후 심장 조직 내에서의 증식 eIF-5A 대비 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF5a)의 실시간 PCR에 의해 측정된 유전자 발현 수준을 나타낸 바 그래프이다. Y-축은 pg/18s의 ng이다(리보솜 RNA 18S의 나노그램 중의 메신저 RNA의 피코그램).

도 47은 심장 조직 상에서 수행된 실험을 개략적으로 나타낸다. 심장 조직은 정상 산소 수준에 노출되었고 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF5a) 및 증식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준이 측정되었다. 이후, 심장 조직에 전달된 산소량이 저하되었고, 따라서 저산소증 및 허혈을 유도하였고, 결국 심장 조직 내 심장마비를 유도하였다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF5a) 및 증식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준이 측정되었고, 허혈에 의해 손상되기 전 심장 조직의 발현 수준과 비교되었다.

도 48은 허혈이 유도되기 전후의 심장 조직의 EKGs를 나타낸다.

도 49는 도 47에 나타난 실험으로 셋업된 랩 벤치를 나타낸다.

도 50a-f는 아폽토시스 인자 eIF-5a의 수준이 IL-1 $\beta$  및 IL18의 수준과 상호 관련된 곳에서의 환자의 데이터를 나타낸다. 도 50a는 관상동맥우회로이식술 (coronary artery bypass graft, CABG) 환자로부터 얻어진 데이터의 차트이다. 도 50b는 인공판치환 환자로부터 얻어진 데이터의 차트이다. 도 50c는 CABG 환자에서 IL-18에 대한 아폽토시스 인자 eIF-5a(인자 5aI)의 상호 관계를 묘사하는 그래프이다. 도 50d는 CABG 환자에서 IL-18에 대해 증식하는 eIF-5a(인자 5aI)의 상호 관계를 묘사하는 그래프이다. 도 50e는 인공판치환 환자에서 IL-18에 대한 아폽토시스 인자 eIF-5a(인자 5aI)의 상호 관계를 묘사하는 그래프이다. 도 50f는 인공판치환 환자에서 IL-18에 대해 증식하는 eIF-5a(인자 5aI)의 상호 관계를 묘사하는 그래프이다.

도 51은 도 50a-f에서 이용된 환자의 데이터에 의한 환자의 데이터 차트이다.

도 52는 안티센스 올리고 1, 2 및 3으로 처리된 후 RKO 세포에 의해 생성된 단백질의 수준을 나타낸다(아폽토시스 인자 5A에 대해). RKO세포는 안티센스 아폽토시스 인자 5a 뉴클레오타이드로 트랜스펙션된 후 p53에서 뿐만 아니라 아폽토시스 인자 5A에 서도 덜 생성된다.

도 53은 형광으로 표지된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 업테이크(uptake)를 나타낸다.

도 54-58은 안티센스 아포토시스 인자 5A 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션되지 않은 세포와 비교하는 것으로 안티센스 아포토시스 인자 5A 뉴클레오타이드로 처리된 세포에서의 아포토시스를 겪는 세포의 백분율을 감소를 나타낸다.

도 59는 아포토시스를 겪는 세포의 수를 증가하게 하는 TNF- $\alpha$  및/또는 캄포테신으로 사상관 세포를 처리한 것을 나타낸다.

도 60 및 61은 안티센스 아포토시스 인자 5A 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션되지 않은 세포와 비교하는 것으로 안티센스 아포토시스 인자 5A 뉴클레오타이드로 처리된 세포에서의 아포토시스를 겪는 세포의 백분율을 감소를 나타낸다.

도 62는 혈청의 존재 또는 혈청의 부재하에서 표지된 siRNA를 업테이크하는 사상관 세포를 나타낸다.

도 63은 아포토시스 인자 5a 단백질이 덜 생산되고 Bcl-2 단백질이 더 생산되는 아포토시스 인자 5a siRNA로 트랜스펙션된 세포를 나타낸다. 아포토시스 인자 5A 발현의 감소는 BCL-2 발현의 증가와 상호 관련이 있다.

도 64는 아포토시스 인자 5a 단백질이 덜 생산된 아포토시스 인자 5a siRNA로 트랜스펙션된 세포를 나타낸다.

도 65-67은 캄포테신 및 TNF- $\alpha$ 에 노출된 후 아포토시스를 겪는 세포의 낮은 백분율을 갖는 아포토시스 인자 5a siRNA로 트랜스펙션된 세포를 나타낸다.

도 68은 도 67 및 실시예 13에서 설명된 실험으로부터 siRNA로 트랜스펙션되고 캄포테신 및 TNF- $\alpha$ 로 처리된 Hoescht-염색된 사상관 세포주 #506의 사진이다. 아포토시스 세포는 더 밝게 염색된 세포로 보여진다. 아포토시스 세포는 염색질 응축 때문에 더 작은 핵을 지니며 그 형태도 더 작고 불규칙하다.

도 69는 비-트랜스펙션된 세포보다 TNF- $\alpha$ 를 덜 분비하는 아포토시스 인자 5A 세포로 트랜스펙션된 HepG2 세포를 드러내는 IL-1를 나타낸다.

도 70은 인간 아포토시스 인자 5a(서열번호 29)의 서열 및 본 발명의 siRNAs의 서열(서열번호 30, 31, 32, 33 및 34)을 나타낸다.

도 71은 인간 아포토시스 인자 5a(서열번호 29)의 서열 및 본 발명의 3 안티센스 폴리뉴클레오타이드의 서열(서열번호 35-40, 각각 나타난 순서대로)을 나타내는 도면이다.

도 72는 인간 eIF-5A1에 대해 목적된 3개의 안티센스 올리고뉴클레오타이드(서열번호 25-27, 각각 나타난 순서대로)의 결합 위치를 나타낸다. 충분한 길이의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 19이다.

도 73a 및 73b는 인간 eIF-5A2(증식하는 eIF-5A)에 대해 인간 eIF-5A1(아포토시스 인자 5A)의 뉴클레오타이드 정렬(서열번호 41 및 42, 각각 나타난 순서대로) 및 아미노산 정렬(서열번호 43 및 22, 각각 나타난 순서대로)을 나타낸다.

도 74a는 eIF-5A1 대신에 siRNAs가 감소되거나 그렇지 않으면 트랜스펙션된 HT-29 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 생성을 저해하는 곳에서의 웨스턴 블롯의 그림을 나타낸다. 도 74b는 ELISA의 결과를 나타낸다.

도 75는 ELISA의 결과를 나타낸다. TNF- $\alpha$  생성은 대조 세포와 비교하였을 때 eIF-5A1에 대신에 siRNAs로 처리된 세포에서 감소되었다.

도 76은 U-937 분화 실험의 시간 진행을 나타낸다. 실시예 16 참조.

도 77은 단핵세포 분화 및 뒤이은 TNF- $\alpha$  분비 동안 상향-조절된 eIF-5A1를 나타내는 웨스턴 블롯의 결과를 나타낸다.

도 78은 간세포 분화 및 사이토카인 생성을 저해하기 위해 eIF-5A1 대신에 siRNAs의 사용을 나타낸다.

도 79는 인터페론에 반응할 뿐 아니라 TNF- $\alpha$ 에도 반응하여 생성된 IL-8을 나타내는 막대그래프이다. 이 그래프는 eIF-5A 대신에 siRNA가 인터페론 및 TNF의 결합된 처리의 결과로써 생성된 eIL-8의 상당한 양뿐만 아니라 인터페론에 반응하여 생성된 모든 IL-8을 방해하는 것을 나타낸다.

도 81은 8시간 및 24시간 동안 IFN 감마로 처리된 HT-29 세포의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 이 블롯은 HT-29 세포에서 인터페론 감마에 반응한 아포토시스 eIF-5A의 상향조절(8 시간에서 4 접힘)을 나타낸다.

도 82는 면역형광에 의한 사상관 세포를 나타낸다. 83세의 여성의 시신경 유두로부터 분리한 사상관 세포(#506)는 면역형광에 의해 나타내었다. 1차 항체는 a) 액틴; (b) 피브로넥틴(fibronectin); c) 라미닌(laminin); d) GFAP이었다. 모든 사진은 400배 확대되었다.

도 83은 캄포테신 및 TNF- $\alpha$ 의 처리에 반응한 사상관 세포주 #506의 아포토시스를 나타낸다. 사상관 세포주 #506 세포는 8-웰 배양 슬라이드 위에 웰당 40,000개의 세포가 뿌려졌다. 3일 후 합류한 LC 세포는 10 ng/ml TFN- $\alpha$ , 50  $\mu$ M 캄포테신 또는 10 ng/ml TNF- $\alpha$ 와 50  $\mu$ M 캄포테신을 합한 것 중 어느 하나로 처리되었다. 캄포테신에 대한 용액 대조로, 동등한 부피의 DMSO가 처리되지 않은 대조 세포에 첨가되었다. 세포는 Hoescht 33258로 48시간 동안 염색되었고 UV 필터를 사용하여 형광 현미경에 의해 관찰되었다. 응축되거나 단편된 핵의 밝게 염색된 세포는 아포토시스로써 계산되었다.

도 84는 캄포테신 또는 TNF- $\alpha$ 와 캄포테신의 혼합으로 처리하는 동안의 eIF-5A의 발현을 나타낸다. 사상관 세포 # 506 세포는 24-웰 플레이트에서 웰 당 40,000개의 세포가 뿌려졌다. 3일 후 LC 세포는 50  $\mu$ M 캄포테신 또는 10 ng/ml TFN- $\alpha$ 와 50  $\mu$ M 캄포테신을 합한 것의 어느 하나로 처리되었고 단백질 리세이트(lysate)는 1, 4, 8, 24 시간 후에 거두어 들였다. 용액 대조로 대조 세포에 동등한 부피의 DMSO가 첨가되었고 세포 리세이트는 1시간 및 24시간 후에 거두어 들였다. 각 샘플로부터 단백질 5  $\mu$ g이 SDS-PAGE에 의해 분리되었고 PVDF 막에 옮겨졌고 항-eIF-5A 항체로 웨스턴 블롯되었다. 결합된 항체는 화학발광에 의해 검출되었고 X-레이 필름에 노출되었다. 막은 그 후 벗겨졌고 내부 로딩 조절로써 항- $\beta$ -액틴으로 재-블롯되었다.

도 85는 siRNAs로 트랜스펙션된 것을 수반하는 사상관 세포주 #506 및 #517에서 eIF-5A의 발현을 나타낸다. 사상관 세포주 #506 및 #517세포는 24-웰 플레이트위에 웰 당 10,000개의 세포로 뿌려졌다. 3일 후 LC 세포는 GAPDH siRNA, eIF-5A siRNAs #1-4 또는 대조 siRNA #5의 어느 하나로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 3일 후 단백질 리세이트는 거두어 졌고 각 샘플로부터 단백질 5  $\mu$ g이 SDS-PAGE에 의해 분리되었고 PVDF 막으로 옮겨져 항-eIF-5A 항체로 웨스턴 블롯되었다. 결합된 항체는 화학발광에 의해 검출되었고 X-레이 필름에 노출되었다. 막은 그 후 벗겨졌고 내부 로딩 조절로써 항- $\beta$ -액틴으로 재-블롯되었다.

도 86은 eIF-5A siRNA로 트랜스펙션되고 TNF- $\alpha$  및 캄포테신으로 처리된 사상관 세포주 #506세포의 아포토시스를 나타낸다. 사상관 세포주 #506 세포는 8-웰 배양 슬라이드에서 웰 당 7,500개의 세포로 뿌려졌다. 3일 후 LC 세포는 GAPCH siRNA, eIF-5A siRNAs#1-4 또는 대조 siRNA #5의 어느 하나로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 72시간 후 트랜스펙션된 세포는 10 ng/ml TFN- $\alpha$ 와 50  $\mu$ M 캄포테신을 합한 것으로 처리되었다. 24시간 후 세포는 Hoescht 33258로 염색되었고 UV 필터를 이용하여 형광 현미경에 의해 관찰되었다. 응축되거나 단편된 핵의 밝게 염색된 세포는 아포토시스로써 계산되었다. 이 그래프는 n=4 독립적 실험의 평균을 나타낸다.

도 87은 eIF-5A siRNA #1로 트랜스펙션되고 TNF- $\alpha$  및 캄포테신으로 처리된 사상관 세포주 #517 세포의 아포토시스를 나타낸다. 사상관 세포주 #517 세포는 8-웰 배양 슬라이드에서 웰 당 7,500개의 세포로 뿌려졌다. 3일 후 LC 세포는 eIF-5A siRNA #1 또는 대조 siRNA #5의 어느 하나로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 72시간 후 트랜스펙션된 세포는 10 ng/ml TFN- $\alpha$ 와 50 $\mu$ M 캄포테신을 합한 것으로 처리되었다. 24시간 후 세포는 Hoescht 33258로 염색되었고 UV 필터를 이용하여 형광 현미경에 의해 관찰되었다. 응축되거나 단편된 핵의 밝게 염색된 세포는 아포토시스로써 계산되었다. 두 개의 독립적 실험의 결과는 여기에 나타내었다.

도 88은 eIF-5A siRNA #1로 트랜스펙션되고 TNF- $\alpha$  및 캄포테신으로 처리된 사상관 세포주 #506 세포의 TUNEL-표지(labeling)를 나타낸다. 사상관 세포주 #506 세포는 8-웰 배양 슬라이드에서 웰 당 7,500개의 세포로 뿌려졌다. 3일 후 LC 세포는 eIF-5A siRNA #1 또는 대조 siRNA #5의 어느 하나로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 72시간 후 트랜스펙션된 세포는 10 ng/ml TFN- $\alpha$ 와 50  $\mu$ M 캄포테신을 합한 것으로 처리되었다. 24시간 후 세포는 Hoescht 33258로 염색되었고 DNA 무사분열은 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick End Labeling) 법을 사용하여 그 자리에서 평가되었다. A부분은 Hoescht-염색된 핵을 가시화하기 위해 UV 필터를 통해 관찰된 동일한 슬라이드를 나타낸다. 그 결과는 두 개의 독립적인 실험을 대표한다. 모든 사진은 400배 확대되었다.

도 89는 eIF5-A1에 대한 siRNAs의 디자인을 나타낸다(서열번호 44-58, 각각 나타난 순서대로). siRNAs는 서열번호 45, 48, 51, 54 및 56을 지닌다. 충분한 길이의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 29에 나타나 있다.

## 실시예

### (실시예 1)

#### DNA 래더링에 의한 래트 황체 내 아폽토시스의 시각화

아폽토시스의 정도는 DNA 래더링에 의해 측정되었다. 게놈 DNA는 제조사의 지시에 따라 QIAamp DNA Blood Kit(Qiagen)을 이용하여 분산된 황체 세포 및 절제된 황체 조직으로부터 분리되었다. 황체 조직은 PGF-2α로의 처리에 의한 아폽토시스의 유도 전, 아폽토시스의 유도 처리 1 및 24시간 후 절제되었다. 분리된 DNA는 30분간 상온에서 500 ng의 DNA를 0.2 μCi[α-<sup>32</sup>P]dCTP, 1 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 3 유니트의 Klenow 효소 및 각각 0.2 pM의 dATP, dGTP 및 dTTP와 함께 인큐베이트함으로서 말단-표지되었다. 통합되지 않은 뉴클레오타이드는 Sambrook *et al.*에 따라 표본을 1 ml의 Sepadex G-50 컬럼을 통해 통과시킴으로서 제거되었다. 이후 표본은 Tris-아세트레이트-EDTA(1.8%) 겔 전기영동에 의해 해상되었다. 겔은 상온에서 진공상태로 30분간 건조되었고 24시간 동안 -80℃에서 x-선 필름에 노출되었다.

하나의 실시태양에서 과잉배란된 래트 황체 내 아폽토시스의 정도는 PGF-2α로의 주사 0, 1 또는 24시간 후에 조사되었다. 0시간의 대조군에서 난소는 PGF-2α 주사없이 제거되었다. 아폽토시스에 관련된 뉴클레아제 활성을 반영하는 낮은 분자량의 DNA 단편의 래더링은 PGF-2α로의 처리 전 절제된 대조군 황체 조직 내에서는 뚜렷하지 않으나 아폽토시스 유도 1시간 후에는 식별할 수 있고 도 16에 나타난 아폽토시스 유도 24시간 후에서 판명된다. 본 도면에서 상위 패널은 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의 <sup>32</sup>P-dCTP-표지된 3'-비번역 구역으로 프로브된 노던 블롯의 방사능사진이다. 하위 패널은 총 RNA의 에티뮴 브로마이드 염색된 겔이다. 각 레인은 10 μg의 RNA를 포함한다. 데이터는 혈청 철회 후 eIF-5A 전사체의 하향조절이 있음을 나타낸다.

또다른 실시태양에서 상응하는 대조군 동물은 PGF-2α 대신 식염수로 처리되었다. 식염수 또는 PGF-2α로의 처리 15분 후 황체는 동물로부터 제거되었다. 게놈 DNA는 동물로부터의 조직의 제거 3시간 및 6시간 후 황체로부터 분리되었다. 게놈 DNA의 DNA 래더링 및 증가된 말단 표지는 PGF-2α-처리된 동물로부터의 조직 제거 6시간 후에서 뚜렷하나 조직 제거 3시간 후에는 그렇지 않다. 도 17 참조. 아폽토시스를 반영하는 DNA 래더링도 황체가 PGF-2α로의 처리 15분 후 처리될 때 뚜렷하고 EBSS(Gibco) 내 시험관 내 조건 하에서 6시간 동안 유지된다. 아폽토시스와 관련된 뉴클레아제 활성도 게놈 DNA의 더욱 광범위한 말단 표지로부터 뚜렷하다.

또다른 실시태양에서 과잉배란은 500 μg의 PGF-2α으로의 피하 주사에 의해 유도되었다. 대조군 래트는 등량의 식염수로 처리되었다. 15~30분 후 난소가 제거되었고 콜라게나제로 분해되었다. PGF-2α로 처리된 래트로부터의 분산된 세포는 10 mM 글루타민 + 10 mM 스퍼미딘 내에서 1시간 동안, 스퍼미딘 없이 10 mM 글루타민 내에서 5시간 더(레인 2) 또는 10 mM 글루타민 + 10 mM 스퍼미딘 내에서 1시간 동안, 10 mM 글루타민 + 1 mM 스퍼미딘 내에서 5시간 더(레인 3) 인큐베이트되었다. 식염수로 처리된 래트로부터의 대조군 세포는 콜라게나제로 분산되었고 글루타민만으로 1시간 및 5시간 더 인큐베이트되었다(레인 1). 각 표본으로부터의 DNA의 500 ng이 Klenow 효소를 이용하여 [α-<sup>32</sup>P]-dCTP로 표지되었고, 1.8%의 아가로스 겔 상에서 분리되었고 24시간 동안 필름에 노출되었다. 결과는 도 18에 나타나 있다.

또다른 실시태양에서 과잉배란된 래트는 1 mg 스퍼미딘/100 g 체중으로 피하 주사되었고 500 μg의 PGF-2α으로의 피하 주사 24, 12 및 2시간 전에 0.333 mg/100 g 체중의 3 동일 투여량으로 전달되었다. 대조군 래트는 3 세트로 분리되었다: 주사 없음; PGF-2α없이 스퍼미딘의 3회 주사; 및 PGF-2α처리 전 동일한 부피의 식염수 3회 주사. 난소는 프로스타 글란딘 처리 1시간 35분 또는 3시간 45분 후 래트로부터 제거되었고 DNA 분리 사용되었다. 각 표본으로부터의 500 ng의 DNA는 Klenow 효소를 이용하여 [α-<sup>32</sup>P]-dCTP로 표지되었고, 1.8%의 아가로스 겔 상에서 분리되었고 24시간 동안 필름에 노출되었다: 레인 1, 주사 없음(동물은 레인 3-5와 동일한 시간에 희생되었음); 레인 2, 스퍼미딘 3회 주사(동물은 레인 3-5와 동일한 시간에 희생되었음); 레인 3, 식염수 3회 주사 후 PGF-2α 주사(동물은 PGF-2α처리 1시간 35분 후 희생되었음); 레인 4, 스퍼미딘 3회 주사 후 PGF-2α 주사(동물은 PGF-2α처리 1시간 35분 후 희생되었음); 레인 5, 스퍼미딘 3회 주사 후 PGF-2α 주사(동물은 PGF-2α처리 1시간 35분 후 희생되었음); 레인 6, 스퍼미딘 3회 주사 후 PGF-2α 주사(동물은 PGF-2α처리 3시간 45분 후 희생되었음); 레인 7, 스퍼미딘 3회 주사 후 PGF-2α 주사(동물은 PGF-2α처리 3시간 45분 후 희생되었음). 결과는 도 19에 나타나 있다.

#### RNA 분리



총 RNA는 아폽토시스의 PGF-2 $\alpha$  유도 후 다양한 시간에 래트로부터의 황체 조직으로부터 분리되었다. 간단하게는, 조직 (5 g)은 액체 질소 내에서 연마되었다. 연마된 분말은 30 ml의 구아니딘염 완충액(4 M 구아니딘염 이소티오시아네이트, 2.5 mM NaOAc pH 8.5, 0.8%  $\beta$ -메캅토에탄올)과 혼합되었다. 혼합물은 4겹의 Miracloth를 통해 여과되었고 30분간 4°C에서 10,000g로 원심분리되었다. 상층액은 20시간 동안 11,200g로 염화세슘 밀도 변화(gradient) 원심분리되었다. 펠렛된 RNA는 75% 에탄올로 세척되었고 600 ml의 DEPC-처리된 물에 재현탁되었고 RNA는 -70°C에서 1.5 ml의 95% 에탄올 및 60 ml의 3M NaOAc로 침전되었다.

### 계놈 DNA 분리 및 래더링

계놈 DNA는 제조사의 지시에 따라 QIAamp DNA Blood Kit(Qiagen)를 이용하여 추출된 황체 조직 또는 분산된 황체 조직으로부터 분리되었다. DNA는 30분간 상온에서 500 ng의 DNA를 0.2  $\mu$ Ci[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, 1 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 3 유닛의 Klenow 효소 및 각각 0.2 pM의 dATP, dGTP 및 dTTP와 함께 인큐베이션함으로써 말단-표지되었다. 통합되지 않은 뉴클레오타이드는 Maniatis *et al.*에 따라 표본을 1 ml의 Sepadex G-50 컬럼을 통해 통과시킴으로써 제거되었다. 이후 표본은 Tris-아세트산-EDTA(2%) 겔 전기영동에 의해 해상되었다. 겔은 상온에서 진공상태로 30분간 건조되었고 24시간 동안 -80°C에서 x-선 필름에 노출되었다.

### 플라스미드 DNA 분리, DNA 시퀀싱

Sambrook *et al.*, 상동에서 기술된 알칼리성 용해 방법이 플라스미드 DNA를 분리하는데 사용되었다. 전체-길이 양성 cDNA 클론은 다이디옥시 시퀀싱 방법을 이용하여 시퀀싱되었다. Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467. 오픈 리딩 프레임은 BLAST 검색(유전자은행, Bethesda, MD)을 이용하여 실행되었고 서열 정렬은 BCM Search Launcher를 이용하여 달성되었다 : Multiple Sequence Alignment Pattern-Induced Multiple Alignment Method(F. Corpet, Nuc. Acids Res., 16:10881-10890, (1987) 참조). 서열 및 서열 정렬이 도 5~11에 나타난다.

### 래트 황체 RNA의 노던 블롯 하이브리다이제이션

아폽토시스의 다양한 단계에 래트 황체로부터 분리된 20 mg의 총 RNA가 1%의 변성된 포름알데히드 아가로스 겔 상에서 분리되었고 나일론 멤브레인 상에 고정되었다. 무작위 프라이머 키트(Boehringer)를 이용하여 <sup>32</sup>P-dCTP로 표지된 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA(서열번호: 1)가 멤브레인 7  $\times$  10<sup>7</sup>을 프로브하는데 사용되었다. 대안으로, 무작위 프라이머 키트(Boehringer)를 이용하여 <sup>32</sup>P-dCTP로 표지된 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 DHS cDNA(서열번호: 6)가 멤브레인(7  $\times$  10<sup>7</sup> cpm)을 프로브하는데 사용되었다. 멤브레인은 상온에서 1x SSC, 0.1% SDS로 1회 세척되었고, 65°C에서 0.2x SSC, 0.1% SDS로 3회 세척되었다. 멤브레인은 건조되었고 -70°C에서 밤새 x-선에 노출되었다.

나타난 바와 같이 eIF-5A 및 DHS는 모두 아폽토시스하는 황체 조직에서 상향조절되었다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 발현은 PGF-2 $\alpha$ 로의 처리에 의한 아폽토시스 유도 후 유의적으로 증가된다 - 0시간에는 낮으나 처리 1시간 내에 실질적으로 증가되고, 처리 8시간 내에 훨씬 더 증가되고, 처리 24시간 내에 약간 더 증가된다(도 14). DHS의 발현은 0시간에 낮고, 처리 1시간 내에 실질적으로 증가되고 처리 8시간 내에 훨씬 더 증가되고 처리 24시간 내에 약간 더 증가된다(도 15).

### 효모, 진균, 인간 eIF-5A 서열에 기초한 프라이머를 이용한 아폽토시스하는 래트 황체 RT-PCR 생성물의 생성

유전자의 3'-말단에 상응하는 일부-길이 아폽토시스-특이적 eIF-5A 서열(서열번호: 11)은 효모, 진균 및 인간 eIF-5A 서열로부터 고안된 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍을 이용한 RT-PCR에 의해 아폽토시스하는 래트 황체 RNA 주형으로부터 생성되었다. 래트 eIF-5A 유전자의 3'-말단을 분리하는데 사용된 업스트림 프라이머는 20 뉴클레오타이드 퇴화 프라이머이다 : S는 C 및 G로부터 선택되고; R은 A 및 G로부터 선택되고; H는 A, T 및 C로부터 선택되고; Y는 C 및 T로부터 선택되고; N은 어떤 핵산도 되는 5' TCSAARACHGGNAAGCAYGG 3'(서열번호: 9). 래트 eIF-5A 유전자의 3'말단을 분리하는데 사용되는 다운스트림 프라이머는 42 뉴클레오타이드를 포함한다 : 5' GCGAAGCTTCCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'(서열번호: 10). 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)이 수행되었다. 간단하게, 5 mg의 다운스트림 프라이머를 이용하여 cDNA의 첫 번째 스트랜드가 합성되었다. 첫 번째 스트랜드는 이후 업스트림 및 다운스트림 프라이머 모두를 이용하여 RT-PCR 내에서 주형으로 사용되었다.

아가로스 겔 상에서의 RT-PCR 생성물의 분리는 900 bp 단편의 존재를 나타내었고 이는 블런트 말단 라이게이션을 이용하여 pBluescript<sup>TM</sup>(Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA) 내로 서브클론되었고 시퀀스되었다(서열번호: 11). 3' 말단의 cDNA 서열은 서열번호: 11이고 3'말단의 아미노산 서열은 서열번호: 12이다. 도 1-2 참조.

유전자의 5'말단에 상응하고 3'말단과 중복되는 일부-길이 아포토시스-특이적 eIF-5A 서열(서열번호: 15)은 RT-PCR에 의해 아포토시스하는 래트 황체 RNA 주형으로부터 생성되었다. 5' 프라이머는 인간 eIF-5A 서열로 지정된 서열, 5' CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAAGC 3'(서열번호: 13)을 지닌 24-머(mer)이다. 3' 프라이머는 3' 말단 RT-PCR 단편에 따라 고안된, 서열, 5' ATATCTCGAGCCTTGATTGC AACAGCTGCC 3'(서열번호: 14)를 지닌 30-머이다. 역전사효소-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)이 수행되었다. 간단하게, 5 mg의 다운스트림 프라이머를 이용하여 cDNA의 첫 번째 스트랜드가 합성되었다. 첫 번째 스트랜드는 이후 업스트림 및 다운스트림 프라이머 모두를 이용하여 RT-PCR 내에서 주형으로 사용되었다.

아가로스 겔 상에서의 RT-PCR 생성물의 분리는 500 bp 단편의 존재를 나타내었고 이는 각각 업스트림 및 다운스트림 프라이머 내에 존재하는 XbaI 및 XhoI 클로닝 사이트를 이용하여 pBluescript<sup>TM</sup>(Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA) 내로 서브클론되었고 시퀀스되었다(서열번호: 15). 5'말단의 cDNA 서열은 서열번호: 15이고 5'말단의 아미노산 서열은 서열번호: 16이다. 도 2 참조.

래트 아포토시스-특이적 eIF-5A의 3' 및 5' 말단의 서열(각각 서열번호: 11 및 서열번호: 15)은 전체-길이 cDNA 서열(서열번호: 1)과 중복되었고 전체-길이 cDNA 서열(서열번호: 1)을 제공하였다. 본 전체-길이 서열은 유전자은행 데이터베이스 내 서열과 정렬되었고 비교되었다. 도 1-3 참조. cDNA 클론은 16.8 KDa의 계산된 분자량을 지닌 154 아미노산 폴리펩타이드(서열번호: 2)를 인코딩한다. RT-PCR에 의해 수득된 래트 아포토시스-특이적 황체 eIF-5A 유전자의 전체-길이 cDNA에 대한 뉴클레오타이드 서열, 서열번호: 1은 도 3에 나타나 있고, 상응하는 추론된 아미노산 서열은 서열번호: 9이다. eIF-5A의 유도된 전체-길이 아미노산 서열은 인간 및 마우스 eIF-5A 서열과 정렬되었다. 도 8-10 참조.

#### 인간 DHS 서열에 기초한 프라이머를 이용한 아포토시스하는 래트 황체 RT-PCR 생성물의 생성

유전자의 3'말단에 상응하는 일부-길이 아포토시스-특이적 DHS 서열(서열번호: 6)은 인간 DHS 서열로 지정된 올리고 뉴클레오타이드 프라이머쌍을 이용한 RT-PCR에 의해 아포토시스하는 래트 황체 RNA 주형으로부터 생성되었다. 5' 프라이머는 서열, 5' GTCTGTGTATTATTGGGCCC 3'(서열번호: 17)을 지닌 20-머이고; 3' 프라이머는 서열, 5' GCGAAGCTTCCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'(서열번호: 18)을 지닌 42-머이다. 역전사효소-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)이 수행되었다. 간단하게, 5 mg의 다운스트림 프라이머를 이용하여 cDNA의 첫 번째 스트랜드가 합성되었다. 첫 번째 스트랜드는 이후 업스트림 및 다운스트림 프라이머 모두를 이용하여 RT-PCR 내에서 주형으로 사용되었다.

아가로스 겔 상에서의 RT-PCR 생성물의 분리는 606 bp 단편의 존재를 나타내었고 이는 블런트 말단 라이게이션을 이용하여 pBluescript<sup>TM</sup>(Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA) 내로 서브클론되었고 시퀀스되었다(서열번호: 6). RT-PCR에 의해 수득된 래트 아포토시스-특이적 황체 DHS 유전자의 일부 길이 cDNA에 대한 뉴클레오타이드 서열(서열번호: 6)은 도 4에 나타나 있고, 상응하는 추론된 아미노산 서열은 서열번호: 7이다.

#### 계놈 DNA의 분리 및 서던 분석

서던 블랏을 위해 계놈 DNA가 절제된 래트 난소로부터 분리되었다. 약 100 mg의 난소 조직은 작은 조각으로 분리되었고 15 ml 튜브에 놓였다. 조직은 조직 현탁액을 천천히 진탕함으로써 1 ml의 PBS로 2회 세척하였고 이후 피펫을 이용하여 PBS를 제거하였다. 조직은 2.06 ml의 DNA-완충액(0.2 M Tris-HCl pH 8.0 및 0.1 mM EDTA) 내에 재현탁되었고 240  $\mu$ l의 10% SDS 및 100  $\mu$ l의 단백질가수분해효소 K(Boehringer Mannheim; 10 mg/ml)가 첨가되었다. 조직은 45°C에서 밤새 진탕 워터 배스 내에 놓였다. 다음날 100  $\mu$ l의 단백질가수분해효소 K(10 mg/ml)이 첨가되었고 조직 현탁액은 추가 4시간 동안 45°C에서 워터 배스 내에 인큐베이트되었다. 인큐베이션후 조직 현탁액은 페놀 : 클로로포름 : 이소-아밀알코올 (25 : 24 : 1)의 동일한 부피로 1회, 클로로포름 : 이소-아밀알코올 (24 : 1)의 동일한 부피로 1회 추출되었다. 추출후 3 M 아세트산나트륨의 1/10th 부피(pH 5.2) 및 에탄올 2 부피가 첨가되었다. 밀봉되고 Bunsen 버너를 이용하여 후크 내로 형성된 유리 피펫이 용액으로부터 DNA 실을 끌어당기고 DNA를 청결한 마이크로원심분리 튜브 내로 옮기는데 사용되었다. DNA는 70% 에탄올로 1회 세척되었고 10분간 공기-건조되었다. DNA 펠렛은 500  $\mu$ l의 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 용해되었고, 10  $\mu$ l의 RNase A(10 mg/ml)가 첨가되었고, DNA는 37°C에서 1시간 동안 인큐베이트되었다. DNA는

페놀 : 클로로포름 : 이소-아밀 알코올 (25 : 24 : 1)로 1회 추출되었고 DNA는 3 M 아세트산나트륨의 1/10th 부피(pH 5.2) 및 에탄올 2 부피를 첨가함으로써 침전되었다. DNA는 4℃에서 13,000 x g로 10분간 원심분리에 의해 펠렛되었다. DNA 펠렛은 70% 에탄올로 1회 세척되었고 4℃에서 밤새 DNA를 회전시킴으로써 200  $\mu$ l의 10 mM Tris-HCl(pH 8.0) 내에 용해되었다.

서던 블롯 분석을 위해 래트 난소로부터 분리된 게놈 DNA가 내생적 유전자 내에서 절단되지 않거나 한번만 절단된 다양한 제한효소로 분해되었다. 이를 달성하기 위해 10  $\mu$ g의 게놈 DNA, 20  $\mu$ l의 10X 반응 완충액 및 100 U 제한효소가 200  $\mu$ l의 총 반응 부피로 5~6시간 동안 반응되었다. 분해된 DNA는 0.7% 아가로스 겔 상에 로드되었고, 40 볼트에서 6시간 동안 또는 15 볼트에서 밤새 전기영동되었다. 전기영동 후 겔은 0.2 N HCl 내에서 10분간 정화된 후 변성 용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 내에서 2회 15-분 세척되었고 중성화 완충액(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.4)으로 2회 15분 세척되었다. DNA는 나일론 멤브레인으로 옮겨졌고 멤브레인은 하이브리다이제이션 용액(40% 포름아미드, 6 X SSC, 5 X Denhart's 용액(1 X Denhart's 용액은 0.02% Ficoll, 0.02% PVP 및 0.02% BSA임)), 0.5% SDS 및 1.5 mg의 변성된 연어 혈청 DNA) 내에서 미리 하이브리다이즈되었다. 래트 eIF-5A cDNA의 3' UTR의 700 bp PCR 단편(3' UTR의 650 bp 및 코딩의 50 bp)은 무작위 프라임에 의해 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP로 표지되었고 1 X 10<sup>6</sup> cpm/ml에서 멤브레인에 첨가되었다.

유사하게, 래트 DHS cDNA의 606 bp PCR 단편(450 bp 코딩 및 156 bp 3' UTR)은 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP로 무작위 프라임 표지되었고 두 번째 동일한 멤브레인으로 1 X 10<sup>6</sup> cpm/ml에서 첨가되었다. 블롯은 42℃에서 밤새 하이브리다이즈되었고 이후 42℃에서 2 X SSC 및 0.1% SDS로 2회, 42℃에서 1 X SSC 및 0.1% SDS로 2회 세척되었다. 블롯은 3~10일간 필름에 노출되었다.

래트 황체 게놈 DNA는 도 20에 나타난 바와 같이 제한효소로 절단되었고  $^{32}$ P-dCTP-표지된 전체-길이 eIF-5A cDNA로 프로브되었다. 높은 스트린전시 조건 하에서의 하이브리다이제이션은 각각의 제한효소 분해된 DNA 표본에 대한 일부 제한 단편으로의 전체-길이 cDNA 프로브의 하이브리다이제이션을 나타내었고 이는 eIF-5A 일부 이소폼의 존재를 나타내었다. 특히 래트 게놈 DNA가 아포토시스-특이적 eIF-5A이 오픈 리딩 프레임 내 제한 사이트를 지닌 EcoRV로 분해되었을 때 eIF-5A의 아포토시스-특이적 이소폼의 제한 단편이 서던 블롯 내에서 검출가능하였다. 2개의 단편은 도 20의 이중 화살표로 나타나 있다. eIF-5A의 아포토시스-특이적 이소폼에 상응하는 제한 단편은 오픈 리딩 프레임 내에서 절단 사이트가 없는 제한 효소인 EcoRI 및 BamHI로 표지된 레인에서 단일 화살표로 나타나 있다. 이들 결과는 아포토시스-특이적 eIF-5A이 래트에서 단일 카피(copy)임을 나타낸다. 도 5~13에 나타난 바와 같이 eIF-5A 유전자는 종간에 매우 보존되어 있고 어떠한 종 내에서도 이소폼 간의 유의적인 양의 보존이 있음이 예측된다.

도 21은  $^{32}$ P-dCTP-표지된 일부-길이 래트 황체 아포토시스-특이적 DHS cDNA로 프로브된 개트 게놈 DNA의 서던 블롯을 나타낸다. 게놈 DNA는 프로브로 사용된 일부-길이 cDNA를 절단하지 않는 제한 효소인 EcoRV로 절단되었다. 2개의 제한 단편은 유전자의 2개 카피가 있다거나 또는 유전자가 EcoRV 사이트를 지닌 인트론을 포함함을 나타내는 것이 뚜렷하다.

(실시예 2)

본 실시예는 아포토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS로의 아포토시스 조절을 설명한다.

#### COS-7 세포의 배양 및 RNA의 분리

야생형 T 항원을 코드하는 SV40의 돌연변이로 형질전환된 아프리카 그린 원숭이 신장 섬유아세포-유사 세포주인 COS-7이 모든 형질전환-기초 실험에 사용되었다. COS-7 세포는 리터 당 0.584 g의 L-글루타민, 4.5 g의 글루코스, 0.37%의 중탄산나트륨을 지닌 Dulbecco's Modified Eagle's 배지(DMEM) 내에서 배양되었다. 배양 배지는 10%의 태아 소 혈청(FBS) 및 100 유닛의 페니실린/스트렙토마이신으로 보충되었다. 세포는 37℃의 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기의 습한 환경에서 성장되었다. 세포는 0.25%의 트립신 및 1 mM EDTA의 용액으로 점착성 세포를 탈착시킴으로써 3~4일 마다 2차배양되었다. 탈착된 세포는 신선한 배지의 새로운 배양 접시 내에서 1 : 10의 분할 비율로 분산되었다.

RNA의 분리에 사용되는 COS-7 세포는 150-mm 조직 배양 처리된 접시(Corning) 내에서 성장되었다. 세포는 트립신-EDTA의 용액으로 이들을 탈착시킴으로써 배양되었다. 탈착된 세포는 원심분리 튜브에 수집되었고 3000 rmp으로 5분간 원심분리함으로써 펠렛되었다. 상청액은 제거되었고 세포 펠렛은 액체 질소 내에서 순간-동결되었다. RNA는 제조사의 지시에 따라 GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit(Sigma)를 이용하여 동결된 세포로부터 분리되었다.

## 재조합 플라스미드의 구조 및 COS-7 세포의 트랜스펙션

센스 방향으로 래트 아포토시스 eIF-5A의 전체-길이 코딩 서열 및 안티센스 방향으로 래트 아포토시스 eIF-5A의 3' 비번역된 구역(UTR)을 운반하는 재조합 플라스미드가 도 21에 나타난 포유류 에피토프 태그 발현 벡터, pHM6(Rowhe Molecular Biochemicals)을 이용하여 건조되었다. 벡터는 하기를 포함한다: CMV 프로모터 - 인간 시토크롬 P-450 3A4 매개-초기 프로모터/인핸서; HA - 인플루엔자 헤마그글루티닌으로부터의 노나펩타이드 에피토프 태그; BGH pA - 소 생장 호르몬 폴리아데닐레이션 시그널; f1 ori - f1 오리진; SV40 ori - SV40 초기 프로모터 및 오리진; 네오마이신 - 네오마이신 저항성(G418) 유전자; SV40 pA - SV40 폴리아데닐레이션 시그널; Co1 E1 - Co1E1 오리진; 암피실린 - 암피실린 저항성 유전자. 래트 아포토시스 eIF-5A의 전체-길이 코딩 서열 및 래트 아포토시스 eIF-5A의 3' UTR은 pBluescript 내 본래의 래트 eIF-5A 5A RT-PCR 단편(서열번호: 1)으로부터 PCR에 의해 증폭되었다. 전체-길이 eIF-5A를 증폭하기 위해 사용된 프라이머는 하기와 같았다: 전방 5' GCCAAGCTTAATGGCAGATGATTT GG 3'(서열번호: 59)(Hind3) 및 역 5' CTGAATTCCAGT TATTTTGGCATGG 3'(서열번호: 60)(EcoRI). 3' UTR 래트 eIF-5A를 증폭하기 위해 사용된 프라이머는 하기와 같았다: 전방 5' AATGAATTCCGCCATGACAGAGGAGGC 3'(서열번호: 61)(EcoRI) 및 역 5' GCGAAGCTTCCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'(서열번호: 62)(Hind3).

아가로스 겔 전기영동 후 분리된 전체-길이 래트 eIF-5A PCR 생성물은 430 bp 길이인 반면 3' UTR 래트 eIF-5A PCR 생성물은 697 bp 길이였다. pHM6-전체-길이 eIF-5A 및 pHM6-안티센스 3' UTR eIF-5A를 생성하기 위해 PCR 생성물 모두는 pHM6의 Hind3 및 EcoRI 사이트 내로 서브클론되었다. 전체-길이 래트 eIF-5A PCR 생성물은 멀티플 클로닝 사이트의 업스트림에 존재하는 인플루엔자 헤마그글루티닌(HA)로부터의 노나펩타이드 에피토프 태그와 인 프레임으로 서브클론되어 항-[HA]-퍼옥시다제 항체를 이용한 재조합 단백질의 검출을 가능하게 하였다. 발현은 인간 시토크롬 P-450 3A4 매개-초기 프로모터/인핸서에 의해 시작되어 포유류 세포주 내 높은 수준의 발현을 확보한다. 또한 플라스미드는 안정한 트랜스펙턴트(transfectant)의 선택을 가능하게 하는 네오마이신-저항성(G418) 및 COS-7과 같은 SV40 큰 T 항원을 발현하는 세포 내에서 에피솜 복제를 가능하게 하는 SV40 초기 프로모터 및 오리진을 특징으로 한다.

트랜스펙션 실험에 사용되는 COS-7 세포는 단백질 추출에 사용되는 세포용 24 웰 세포 배양 플레이트(Corning) 또는 염색에 사용되는 세포용 4 챔버 배양 슬라이드(Falcon) 내에서 배양되었다. 세포는 10% FBS로 보충되었으나 페니실린/스트렙토마이신이 없는 DMEM 배지 내에서 50~70% 컨플루언시(confluency)가 되도록 생장되었다. 24-웰 플레이트의 하나의 웰 또는 배양 슬라이드에 충분한 트랜스펙션 배지는 42.5  $\mu$ l의 무혈청 DMEM 내에 0.32  $\mu$ g의 플라스미드 DNA를 희석시키고 상온에서 15분간 혼합물을 인큐베이트시킴으로써 준비되었다. 1.6  $\mu$ l의 트랜스펙션 시약, LipofectAMINE(Gibco, BRL)은 42.5  $\mu$ l의 무혈청 DMEM 내에 희석되었고 상온에서 5분간 인큐베이트되었다. 5분 후 LipofectAMINE 혼합물은 DNA 혼합물에 첨가되었고 상온에서 30~60분간 함께 인큐베이트되었다. 트랜스펙트되는 세포는 트랜스펙션 배지와 중복시키기 전에 무혈청 DMEM으로 1회 세척되었고 세포는 4시간 동안 그로쓰 챔버 내에 다시 놓였다.

인큐베이션 후 0.17 ml DMED + 20% FBS가 세포에 첨가되었다. 세포는 염색전 아포토시스를 겪도록 유도되거나 웨스턴 블롯을 위해 채취되기 전에 40시간 더 배양되었다. 대조군으로서 플라스미드 DNA가 트랜스펙션 배지로부터 생략된 모의 트랜스펙션이 수행되었다.

## 단백질 추출 및 웨스턴 블롯팅

세포를 PBS(8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 및 0.24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 내에서 2회 세척하고 150  $\mu$ l의 뜨거운 SDS 겔-로딩 완충액(50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM 디티오프레이트, 2% SDS, 0.1% 브로모페놀 블루 및 10% 글리세롤)을 첨가함으로써 트랜스펙트된 세포로부터 웨스턴 블롯팅을 위해 단백질이 분리되었다. 세포 용해질이 마이크로원심 분리관 내에 수집되었고 10분간 95°C에서 가열된 후 10분간 13,000 x g로 원심분리되었다. 상청액은 신선한 마이크로원심 분리관으로 옮겨졌고 사용전까지 -20°C에서 보관되었다.

웨스턴 블롯팅을 위해 2.5 또는 5  $\mu$ g의 총 단백질이 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리되었다. 분리된 단백질은 폴리비닐리덴 다이플로라이드 멤브레인으로 옮겨졌다. 멤브레인은 차단 용액(PBS 내 5% 스킵 우유 분말, 0.02% 아지드화나트륨)에서 1시간 동안 인큐베이트되었고 PBS-T(PBS + 0.05% Tween-20)로 15분간 3회 세척되었다. 멤브레인은 밤새 4°C PBS-T내에서 보관되었다. 다음날 상온으로 데워진 후 멤브레인은 1  $\mu$ g/ml의 폴리비닐 알코올 내에서 30초간 차단되었다. 멤브레인은 탈이온수로 5회 세척된 후 PBS 내 5% 우유 용액 내에서 30분간 차단되었다. 1차 항체는 멤브레인과의 인큐베이션 전에 PBS 내 5% 우유 용액에서 30분간 미리 인큐베이트되었다.

일부 1차 항체가 사용되었다. 항-[HA]-퍼옥시다제 항체(Roche Molecular Biochemicals)가 재조합 단백질의 발현을 검출하기 위해 1 : 5000로 희석되어 사용되었다. 이러한 항체는 퍼옥시다제에 컨쥬게이트되기 때문에 어떠한 2차 항체도 필요하지 않았고, 블릿은 세척되었고 화학발광에 의해 발달되었다. 사용된 다른 1차 항체는 p53(Ab-6), Bcl-2(Ab-1) 및 c-Myc(Ab-2)를 인식하는 Oncogene으로부터의 단일클론 항체이다. p53에 대한 단일클론 항체는 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 로 희석되어 사용되었고 Bcl-2 및 c-Myc에 대한 단일클론 항체는 모두 0.83  $\mu\text{g/ml}$ 로 희석되어 사용되었다. 1차 항체와의 60~90분간의 인큐베이션 후 멤브레인은 PBS-T 내에서 15분간 3회 세척되었다. 이후 2차 항체가 PBS 내 1% 우유에서 희석되었고 60~90분간 멤브레인과 인큐베이트되었다. p53(Ab-6)가 1차 항체로 사용된 경우 사용된 2차 항체는 1 : 1000으로 희석된 알칼리성 포스파타제(Rockland)에 컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG이다. Bcl-2(Ab-1) 및 c-Myc(Ab-2)가 1차 항체로 사용된 경우 퍼옥시다제(Sigma)에 컨쥬게이트된 토끼 항-마우스 IgG가 1 : 5000으로 희석되어 사용되었다. 2차 항체와의 인큐베이션 후 멤브레인은 PBS-T로 3회 세척되었다.

표색 방법 및 화학발광 방법의 2가지 검출 방법이 블릿을 발달시키는데 사용되었다. 표색 방법은 p53(Ab-6)이 알칼리성 포스파타제-컨쥬게이트된 2차 항체와 컨쥬게이션된 1차 항체로서 사용된 경우에만 사용되었다. 결합된 항체는 0.33 mg/ml 니트로 블루 테트라졸륨, 0.165 mg/ml 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트, 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  및 100 mM Tris-HCl(pH 9.5)의 용액 내에서 암조건으로 블릿을 인큐베이트함으로써 시각화되었다. 발색 반응은 PBS 내 2 mM의 EDTA에서 블릿을 인큐베이트함으로써 정지되었다. 화학발광 검출 방법은 항-[HA]-퍼옥시다제, Bcl-2(Ab-1) 및 c-Myc(Ab-2)를 포함한 다른 모든 1차 항체에 사용되었다. ECL Plus 웨스턴 블롯팅 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech)가 퍼옥시다제-컨쥬게이트된 결합 항체를 검출하는데 사용되었다. 간단히, 멤브레인은 가볍게 블릿드 드라이된 후 시약 A와 시약 B의 40 : 1 혼합으로 5분간 암조건으로 인큐베이트되었다. 멤브레인은 블릿드 드라이되었고 아세테이트 시트(sheet) 사이에 놓였고 10초에서 10분까지 다양한 기간 동안 x-선 필름에 노출되었다.

#### COS-7 세포 내 아포토시스의 유도

혈청 결핍 및 악티노마이신 D, 스트렙토마이세스 sp.(Calbiochem)로의 처리의 2가지 방법이 트랜스펙트된 COS-7 세포 내 아포토시스를 유도하는데 사용되었다. 두 가지 처리 모두에 있어서 배지는 후-트랜스펙션 40시간에 제거되었다. 혈청 결핍 실험에서 배지는 무혈청- 및 무항생제- DMEM으로 대체되었다. 10% FBS로 보충된 무항생제-DMEM 내에서 성장된 세포가 대조군으로 사용되었다. 아포토시스의 악티노마이신 유도에서 배지는 10% FBS 및 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 메탄올 내에 용해된 악티노마이신 D로 보충된 무항생제-DMEM로 대체되었다. 대조군 세포는 10% FBS 및 동일한 부피의 메탄올로 보충된 무항생제-DMEM 내에서 성장되었다. 두 가지 방법 모두에 있어서, 아포토시스 세포의 백분율이 Hoescht 또는 Annexin V-Cy3으로 염색함으로써 48시간 후 측정되었다. 아포토시스의 유도는 도 22에 나타난 바와 같이 노던 블롯 분석에 의해 확인되었다.

#### Hoescht 염색

핵 무사분열 및 응축과 같은 형태학적 특징에 기초하여 아포토시스 세포를 확인하기 위해 핵 염색제, Hoescht이 트랜스펙트된 COS-7 세포의 핵을 표지하는데 사용되었다. 순수 메탄올과 빙초산의 혼합물 3 : 1로 구성된 고정제는 사용 직전에 준비되었다. 동일한 부피의 고정제가 배양 슬라이드 상에서 성장하는 COS-7 세포에 배지에 첨가되었고 2분간 인큐베이트되었다. 배지/고정제 혼합물이 세포로부터 제거되었고 폐기되었고 1 ml의 고정제가 세포에 첨가되었다. 5분 후 고정제가 제거되었고 1 ml의 신선한 고정제가 세포에 첨가되었고 5분간 인큐베이트되었다. 고정제가 제거되었고 세포는 1 ml의 Hoescht 염색제(PBS 내 0.5  $\mu\text{g/ml}$  Hoescht 33258)를 첨가하기 전에 4분간 공기-건조되었다. 암조건에서 10분간 인큐베이션한 후 염색 용액이 제거되었고 슬라이드는 탈이온수로 1분간 3회 세척되었다. 세척 후 1 ml의 McIlvaine's 완충액(0.021 M 구연산, 0.058 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; pH 5.6)이 세포에 첨가되었고 20분간 암조건에서 인큐베이트되었다. 완충액은 제거되었고 세포는 암조건에서 5분간 공기-건조되었고 배양 슬라이드의 웰을 분리하는 챔버가 제거되었다. 형광용 Vectashield 마운팅 배지(Vector Laboratories) 몇 방울이 슬라이드에 첨가되었고 커버슬립으로 덮였다. 염색된 세포는 UV 필터를 이용한 형광 현미경하에서 관찰되었다. 밝게 염색된 세포 또는 무사분열된 핵이 아포토시스로서 득점되었다.

#### 아넥신 V-Cy3 염색

아넥신 V-Cy3 아포토시스 검출 키트(Sigma)가 아포토시스 세포 상에 외부화된 포스파티딜세린을 형광 표지하는데 사용되었다. 키트는 하기 변형과 함께 제조사의 프로토콜에 따라 사용되었다. 간단히, 4개의 챔버 배양 슬라이드 상에서 성장하는 트랜스펙트된 COS-7 세포가 PBS로 2회 세척되었고 1 X 결합 완충액으로 3회 세척되었다. 150  $\mu\text{l}$ 의 염색 용액(1 X 결합 완충액 내 1  $\mu\text{g/ml}$  AnnCy3)이 첨가되었고 세포는 10분간 암조건에서 인큐베이트되었다. 염색 용액이 제거되었고

세포는 1 X 결합 완충액으로 5회 세척되었다. 챔버 벽이 배양 슬라이드에서 제거되었고 1 X 결합 완충액 몇 방울이 세포에 놓였고 커버슬립으로 덮였다. 염색된 세포는 양성으로 염색된(아포토시스) 세포의 적색 형광을 가시화하기 위해 녹색 필터를 이용하여 형광 현미경으로 분석되었다. 총 세포군은 가시광선하에서 세포수를 셈으로서 측정되었다.

### (실시예 3)

본 실시예는 아포토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS의 아포토시스 조절을 설명한다.

상기 실시예에 기술된 일반적인 절차 및 방법을 이용하여 도 23은 무혈청 배지 내에서 세포가 LipofectAMINE 내 플라스미드 DNA 내에서 4시간 동안 인큐베이트되었고, 혈청이 첨가되었고, 세포가 40시간 더 인큐베이트된 COS-7 세포의 순간적 트랜스펙션의 절차를 나타내는 흐름도이다. 이후 세포는 분석전 48시간 더 혈청 함유 일반 배지 내에서 인큐베이트되고(즉, 부가 처리 없음) 분석 전 아포토시스를 유도하도록 48시간 동안 혈청 제거되거나 분석 전 아포토시스를 유도하도록 48시간 동안 악티노마이신 D로 처리된다.

도 22는 pHM6로의 트랜스펙션 후 COS-7 내 외부 단백질의 일시적 발현을 나타내는 웨스턴 블롯이다. 단백질은 모의 트랜스펙션 또는 pHM6-LacZ, pHM6-Antisense 3' rF5A(pHM6-Antisense 3' UTR 래트 아포토시스 eIF-5A) 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체길이 래트 아포토시스 eIF-5A)로의 트랜스펙션 후 COS-7 세포로부터 분리되었다. 각 표본으로부터의 5  $\mu$ g의 단백질이 SDS-PAGE에 의해 분획화되었고 PVDF 멤브레인에 옮겨졌고 항-[HA]-퍼옥시다제로 웨스턴 블롯되었다. 결합된 항체는 화학발광에 의해 검출되었고 30초간 x-선 필름에 노출되었다. LacZ(레인 2) 및 센스 래트 아포토시스 eIF-5A(레인 4)의 발현은 분명히 볼 수 있다.

상기에 기술된 바와 같이 COS-7 세포는 모의 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체 길이 래트 eIF-5A)로 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 40시간 후 세포는 48시간 동안 혈청의 철회에 의해 아포토시스를 겪도록 유도되었다. 트랜스펙트된 세포 추출물 내 카스페이즈 단백질가수분해 활성은 형광 상동성 카스페이즈 에세이 키트(Roche Diagnostics)를 이용하여 측정되었다. DNA 무사분열도 형광-표지된 디옥시뉴클레오타이드로 DNA 단편의 3'-OH 말단을 표지하는 FragEL DNA 분열 아포토시스 검출 키트(Oncogene)를 이용하여 측정되었다.

부가적 COS-7 세포는 모의 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체 길이 래트 eIF-5A)로 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 40시간 후 세포는 혈청 함유 일반 배지(추가 처리 없음) 내에 48시간 더 성장되고, 48시간 동안 혈청의 철회에 의해 아포토시스를 겪도록 유도되거나 48시간 동안 0.5  $\mu$ g/ml의 악티노마이신 D으로의 처리에 의해 아포토시스를 겪도록 유도되었다. 세포는 아포토시스를 수반하는 핵 무사분열을 나타내는 Hoescht 33258로 염색되거나 아포토시스를 수반하는 포스파티딜세린 노출을 나타내는 아넥신 V-Cy3으로 염색되었다. 염색된 세포는 녹색 필터를 이용하여 형광 현미경으로 관찰되었고 아포토시스를 겪는 세포의 백분율을 측정하기 위해 카운트되었다. 총 세포군은 가시광선하에서 카운트되었다.

도 25는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 카스페이즈 활성이 반영된 증가된 아포토시스를 나타낸다. 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A의 발현은 60% 증가된 카스페이즈 활성을 나타내었다.

도 26은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 DNA 무사분열이 반영된 증가된 아포토시스를 나타낸다. 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A의 발현은 273% 증가된 DNA 무사분열을 C 타내었다. 도 27은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 핵 무사분열이 반영된 증가된 아포토시스를 나타낸다. 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A를 발현하는 세포에서 무사분열된 핵의 더 큰 발생률이 있다. 도 28은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 핵 무사분열이 반영된 증가된 아포토시스를 나타낸다. 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A의 발현은 각각 비-혈청 결핍된 표본 및 혈청 결핍된 표본 보다 27% 및 63%로 핵 무사분열이 증가되었다.

도 29는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 포스파티딜세린 노출이 반영된 아포토시스 검출을 나타낸다. 도 30은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 포스파티딜세린 노출이 반영된 증가된 아포토시스 검출을 나타낸다. 래트 아포토시스-유도된 eIF-5A의 발현은 각각 비-혈청 결핍된 표본 및 혈청 결핍된 표본 보다 140% 및 198%로 포스파티딜세린 노출이 증가되었다.



도 31은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 핵 무사분열이 반영된 증가된 아폽토시스 검출을 나타낸다. 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A의 발현은 각각 비처리 및 처리 표본 보다 115% 및 62%로 핵 무사분열이 증가되었다. 도 32는 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트된 COS-7 세포가 더 이상의 처리가 없거나 아폽토시스를 유도하는 처리가 있는 조건 하에서 증가된 아폽토시스의 비교를 나타낸다.

(실시예 4)

본 실시예는 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS의 투여 후 아폽토시스 활성 조절을 설명한다.

더욱이 COS-7 세포는 모의 트랜스펙션, pHM6-LacZ으로 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체 길이 래트 eIF-5A)로 트랜스펙션되고 40시간 동안 인큐베이트되었다. 각 표본으로부터의 단백질 추출물 5  $\mu$ g이 SDS-PAGE에 의해 분획화되었고 PVDF 멤브레인에 옮겨졌고 Bcl-2를 인식하는 단일클론 항체로 웨스턴 블롯되었다. 퍼옥시다제에 컨쥬게이트된 토끼 항-마우스 IgG가 2차 항체로 사용되었고 결합된 항체는 화학발광 및 x-선 필름으로의 노출에 의해 검출되었다. 결과는 도 32에 나타나 있다. pHM6-LacZ으로 트랜스펙트된 것보다 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 Bcl-2가 덜 검출되었고; 따라서 Bcl-2는 하향-조절된다.

추가 COS-7 세포는 모의 트랜스펙션, pHM6-Antisense 3' rF5A(래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 pHM6-안티센스 3' UTR)로 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체 길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A)로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 40시간 후 세포는 48시간 동안 혈청의 철화에 의해 아폽토시스를 겪도록 유도되었다. 각 표본으로부터의 단백질 추출물 5  $\mu$ g이 SDS-PAGE에 의해 분획화되었고 PVDF 멤브레인에 옮겨졌고 Bcl-2를 인식하는 단일클론 항체로 웨스턴 블롯되었다. 퍼옥시다제에 컨쥬게이트된 토끼 항-마우스 IgG가 2차 항체로 사용되었고 결합된 항체는 화학발광 및 x-선 필름으로의 노출에 의해 검출되었다.

또한 부가적으로, COS-7 세포는 모의 트랜스펙션, pHM6-LacZ으로 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체 길이 래트 eIF-5A)로 트랜스펙션되고 40시간 동안 인큐베이트되었다. 각 표본으로부터의 단백질 추출물 5  $\mu$ g이 SDS-PAGE에 의해 분획화되었고 PVDF 멤브레인에 옮겨졌고 p53을 인식하는 단일클론 항체로 웨스턴 블롯되었다. 알칼리성 포스파타제에 컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG가 2차 항체로 사용되었고 결합된 항체는 표색적으로 검출되었다.

마지막으로, COS-7 세포는 모의 트랜스펙션, pHM6-LacZ으로 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체 길이 래트 eIF-5A)로 트랜스펙션되고 40시간 동안 인큐베이트되었다. 각 표본으로부터의 단백질 추출물 5  $\mu$ g이 SDS-PAGE에 의해 분획화되었고 PVDF 멤브레인에 옮겨졌고 p53을 인식하는 단일클론 항체로 웨스턴 블롯되었다. 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A 발현을 측정하기 위해 상응하는 단백질 블롯이 항-[HA]-퍼옥시다제로 프로브되었다. 알칼리성 포스파타제에 컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG가 2차 항체로 사용되었고 결합된 항체는 화학발광에 의해 검출되었다.

도 33은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 Bcl-2의 하향조절을 나타낸다. 상위 패널은 쿠마시 블루-염색된 단백질 블롯을 나타내고; 하위 패널은 상응하는 웨스턴 블롯을 나타낸다. pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 것보다 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 Bcl-2가 덜 검출되었다.

도 34는 COS-7 세포가 안티센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 Bcl-2의 상향조절을 나타낸다. 상위 패널은 쿠마시 블루-염색된 단백질 블롯을 나타내고; 하위 패널은 상응하는 웨스턴 블롯을 나타낸다. 모의 트랜스펙트된 것 또는 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 것보다 pHM6-antisense 3' rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 Bcl-2가 더 많이 검출되었다.

도 35는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 c-Myc의 상향조절을 나타낸다. 상위 패널은 쿠마시 블루-염색된 단백질 블롯을 나타내고; 하위 패널은 상응하는 웨스턴 블롯을 나타낸다. pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 것 또는 모의 대조군보다 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 c-Myc가 더 많이 검출되었다.

도 36은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 p53의 상향조절을 나타낸다. 상위 패널은 쿠마시 블루-염색된 단백질 블롯을 나타내고; 하위 패널은 상응하는 웨스턴 블롯을 나타낸다. pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 것 또는 모의 대조군보다 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 p53이 더 많이 검출되었다.

도 37은 COS-7 세포 내 pHM6-전체 길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A의 발현에 대한 p53 상향조절의 의존도를 나타낸다. 항-[HA]-퍼옥시다제로 프로브된 웨스턴 블롯에서 상위 패널은 쿠마시 블루-염색된 단백질 블롯을 나타내고 하위 패널은 상응하는 웨스턴 블롯을 나타낸다. 두 번째 트랜스펙션보다 첫 번째 트랜스펙션에서 더 많은 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A가 검출될 수 있다. 항-p53으로 프로브된 웨스턴 블롯에서 A의 상위 패널은 상응하는 쿠마시 블루-염색된 단백질 블롯을 나타내고 하위 패널은 p53으로의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 첫 번째 트랜스펙션에 있어서 더 많은 p53이 pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 것 또는 모의 대조군 보다 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 검출될 수 있다. 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A의 발현이 거의 없는 두 번째 트랜스펙션에 있어서, pHM6-Sense rF5A, pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 세포 또는 모의 대조군 사이의 어떠한 검출가능한 차별적 수준의 p53이 없었다.

#### (실시예 5)

도 47은 인간 심장의 박동을 모방하는 심장 조직 상에서 수행되고 뒤이어 심장마비를 유도하는 실험을 나타낸다. 도 49는 셋업된 실험실 벤치를 나타낸다. 판막 대치 시술동안 제거된 인간 심장 조직의 슬라이스가 전극에 후크로 채워졌다. 심장 박동의 강도 측정을 용이하게 하기 위해 심장 조직에 작은 중량이 부착되었다. 전극은 조직이 박동을 시작하게 하는 전기적 자극을 제공하였다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF-5a)와 증식 eIF-5A(eIF5b) 둘 모두의 유전자 발현 수준이 허혈이 유도되기 전에 심장 조직 내에서 측정되었다. 도 46 참조. 허혈-전 심장 조직 내에서 낮은 수준의 eIF-5a와 eIF5b이 생성되었고, 그의 수준은 상대적으로 균형을 이루었다. 이때 산소 및 이산화탄소는 각각 92.5% 및 7.5%로 완충액 내에서 심장으로 전달되었다. 이후, 산소 수준은 감소되었고 질소 수준은 증가되어 허혈을 유도하였고 결국 "심장마비"를 유도하였다. 심장 조직은 박동을 중지하였다. 이후 산소 수준은 정상으로 복귀되었고, 심장 조직은 전기 자극으로 다시 펄스되어 심장 박동을 다시 시작하였다. "심장마비"후 아폽토시스-특이적 eIF-5A와 증식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준이 다시 측정되었다. 이때 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 발현 수준 내에 유의적인 증가가 있는 반면, 증식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준 내의 증가는 두드러지게 적었다. 도 46 참조.

"심장마비"후 심장은 부착된 중량의 더욱 적은 압박/이동에 의해 나타난 바와 같이 강하게 박동하지 않았고, 따라서 심장 조직 세포가 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 존재에 기인하여 빠르게 사멸되고 있음을 나타내었다.

EKG는 도 48에 나타나 있다. 패널의 좌측에서 정상 심장 박동이 나타나 있다(허혈-전 심장 조직). "심장마비"(직선) 및 심장 박동의 재-개시 후 EKG는 근육 세포 사멸에 기인하여 감소된 활성을 나타낸다. EKG는 심장 박동 강도의 상대적 손실을 나타낸다.

#### (실시예 6) 인간 세포주 배양 조건

##### 인간 사상관 및 성상세포 배양

캐나다 온타리오 디비전의 Eye Bank에서 사후 48 시간 이내인 한쌍의 인간의 눈이 얻어졌다. 시신경 유두(부착된 전극으로)는 제거되었고 항생물질/항진균, 글루타민 및 10% FBS를 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's 배지(DMEM) 내에 3시간 동안 두었다. 시신경 유두(OH) 버튼은 각 조직 샘플로부터 회수하였고 정밀한 해부 가위로 4개의 작은 조각으로 잘게 썰었다. 외식편은 DMEM 배지에서 12.5cm<sup>2</sup> 플라스틱 배양 플라스크에서 배양되었다. 생존 가능한 외식편에서 한달 이내에 성장이 관찰되었다. 세포가 한번 90% 합류에 도달하면 세포는 트립시나이즈되고(trypsinize) 사상관(LC) 및 성상세포 개체를 생성하기 위해 특이적인 2차 배양을 필요로 하게 된다. 구체적으로는 LC 세포는 젤타마이신, 글루타민 및 10% FBS를 함유한 DMEM 내 25cm<sup>2</sup>에서 2차 배양되었고 반면 성상세포는 FBS없이 EBM 완전 배지(Clonetics)를 함유하는 25cm<sup>2</sup> 플라스크에 전개되었다. FBS는 2차 배양 10일 후에 성상세포 배지에 첨가되었다. 세포는 이러한 절차에 의하여 부양되었고 2차 배양되었다.

특이적인 2차 배양에 의해 얻어진 세포 개체는 8 웰 배양 슬라이드위에 염색하는 특이적인 형광 항체를 이용하여 동일성과 개체 순도에 대해 특징지어졌다. 세포는 10% 포르말린 용액으로 고정되었고 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)로 3번 세척되었다. DPBS 내 무지방 우유 2%로 블로킹(blocking)한 후 항체는 DPBS내 1% BSA에서 희석되었고 6 웰에서 세포에 적용되었다. 남아있는 두 개의 웰은 오직 1% 소 혈청 알부민(BSA) 용액만으로 처리되었고 대조

군으로써 1차 항체는 없었다. 세포는 실온에서 1시간 동안 1차 항체로 인큐베이트되었고 그후 DPBS로 3번 세척되었다. 적절한 2차 항체는 DPBS내 1% BSA에서 희석되었고 각 웰에 첨가되었으며 1시간 동안 인큐베이트되었다. DPBS로 세척한 후 배양 슬라이드의 웰을 분리하는 챔버는 슬라이드로부터 제거되었고 슬라이드는 이중 증류된 증류수에 잠겼고 그 후 공기로 건조되었다. 플루오로마운트(Vector Laboratories)는 각각의 슬라이드에 적용되었고 22 x 60 mm 커버글라스 슬라이드에 의해 얇게 뒤덮여 졌다.

면역형광 염색은 적절한 필터로 형광 현미경으로 관찰되었고 1차 항체로 처리되지 않은 대조 웰과 비교되었다. 모든 1차 항체는 특별히 언급하지 않는 한 Sigma로부터 얻어졌다. 모든 2차 항체는 Molecular Probes로부터 얻어졌다. LC 세포를 확인하기 위해 사용된 1차 항체는 다음과 같다: 항-콜라겐 I, 항-콜라겐 IV, 항-라미닌(laminin), 항-세포 피브로넥틴(cellular fibronectin). 정상세포를 확인하기 위해 사용된 1차 항체는 다음과 같다: 항-갈락토세레브로시드(galactocerebroside)(Chemicon International), 항-A2B5(Chemicon International), 항-NCAM, 항-인간 폰 빌리브란트 인자(Von Willebrand Factor). 양쪽 모두의 세포 개체에 대해 사용된 추가적인 항체는 항-글리아섬유상(glial fibrillary)(GFAP) 및 항-알파-민무늬근 액틴을 포함하였다. 세포 개체가 만약 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 라미닌, 세포 피브로넥틴, 알파 민무늬근 액틴에 대해서는 양성으로 염색되었고 글리아섬유상(GFAP)에 대해서는 음성으로 염색되었다면 세포 개체는 LC 세포로 구성되는 것으로 결정되었다. 세포 개체가 만약 NCAM, 글리아섬유상(GFAP)에 대해서는 양성으로 염색되었고 갈락토세레브로시드, A2B5, 인간 폰 빌리브란트 인자 및 알파 민무늬근 액틴에 대해서는 음성으로 염색되었다면 세포 개체는 정상세포 구성되는 것으로 결정되었다.

본 준비 연구에서 3개의 인간 안구 세트가 배양을 개시하기 위해 사용되었다. LC 세포주 #506, #517 및 #524는 각각 83세 남성, 17세 남성 및 26세 여성의 시신경 유두로부터 얻어졌다. 모든 LC 세포주는 충분히 특징지어졌고 90% LC 세포보다 더 많이 포함하는 것으로 밝혀졌다.

#### RKO 세포 배양

야생형 p53을 발현하는 인간 콜론 암세포주인 RKO(American Type Culture Collection CRL-2577)는 eIF-5A1 단백질 발현을 억제하기 위한 능력에 대해 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 테스트하는데 이용되었다. RKO는 비-필수 아미노산, Earle's 염 및 L-글루타민을 함유한 Minimum Essential Medium Eagle(MEM)에서 배양되었다. 배양 배지는 10% FBS(fetal bovine serum) 및 페니실린/스트렙토마이신 100 유닛으로 채워져 있었다. 세포는 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기의 습한 환경에서 37°C에서 성장되었다. 세포는 0.25% 트립신 및 1mM EDTA로 점착성 세포를 분리하는 것에 의해 각각 3, 4일에 2차 배양되었다. 분리된 세포는 새로운 배지를 지닌 스플릿 비율이 1:10~1:12인 새로운 배양기 내로 분배되었다.

#### HepG2 세포 배양

인간 간세포암 세포주인 HepG2가 IL-1 $\beta$ 로 처리하는 것에 반응하여 TNF- $\alpha$ 의 생성을 방해하는 인간 eIF-5A1에 대하여 영향을 미치는 안티센스 올리고의 능력을 테스트하기 위하여 사용되었다. HepG2 세포는 젤타마이신, 글루타민 및 10% FBS로 채워진 DMEM 내에서 배양되었고 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기의 습한 환경에서 37°C에서 성장되었다.

(실시예 7)

#### 아포토시스의 유도

아포토시스는 각각 악티노마이신 D(actinomycin D), RNA 중합 저해제 및 캄토테신, 토포아이스오머라제(topoisomerase) 저해제를 이용하여 RKO 및 사상세포 내로 유도되었다. 악티노마이신 D는 0.25  $\mu$ g/ml 농도에서 사용되었고 캄토테신은 20, 40 또는 50  $\mu$ M 농도에서 사용되었다. 아포토시스는 또한 캄토테신(50  $\mu$ M)과 TNF- $\alpha$ (10ng/ml)의 조합을 이용하여 사상판 세포로 유도되었다. 캄토테신과 TNF- $\alpha$ 의 조합은 캄토테신 또는 TNF- $\alpha$ 의 어느 하나를 사용하는 것보다 아포토시스를 유도하는데 있어서 더 효과적이라는 것이 밝혀졌다.

#### 안티센스 올리고뉴클레오타이드

인간 eIF-5A1에 대해 타겟된 3개의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 세트는 Molecula Research Labs에 의해 설계되고 얻어졌다. 인간 eIF-5A1(#1)에 대해 타겟된 첫 번째 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 서열은 5'CCT GTC TCG AAG TCC AAG TC 3'(서열번호 63)이었다. 인간 eIF-5A1(#2)에 대해 타겟된 두 번째 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 서열은 5'GGA CCT TGG CGT GGC CGT GC 3'(서열번호 64)이었다. 인간 eIF-5A1(#3)에 대해 타겟된 세 번째 안티

센스 올리고뉴클레오타이드의 서열은 5'CTC GTA CCT CCC CGC TCT CC 3'(서열번호 65)이었다. 대조 올리고뉴클레오타이드는 서열 5'CGT ACC GGT ACG GTT CCA GG 3'(서열번호 66)이었다. FITC(fluorescein isothiocyanate)-표지된 안티센스 올리고뉴클레오타이드(Molecular Research Labs)는 트랜스펙션 효율을 모니터링하기 위해 사용되었고 서열은 5'GGA CCT TGG CGT GGC CGT GCX 3'(서열번호 67)이었다. 여기서 X는 FITC 표지를 나타낸다. 모든 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 충분히 포스포로티오에이트(phosphorothiate)되었다.

### 안티센스 뉴클레오타이드의 트랜스펙션

eIF-5A1 단백질 발현을 방해하는 eIF-5A1 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 능력은 RKO 세포에서 테스트되었다. RKO 세포는 트랜스펙션 시약인 Oligofectamin(Invitrogen)을 이용하여 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션에 앞서 24 시간, 세포는 10% FBS로 채워져 있지만 페니실린/스트렙토마이신은 부족한 MEM 배지에서 157,000 웰에서 24 웰 플레이트 위로 분리되었다. 24시간 후 세포는 일반적으로 약 50%의 합류에 도달하였다. RKO 세포는 허구로 트랜스펙션되었거나 100 nM 또는 200 nM 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션되었다. 24 웰 플레이트의 하나의 웰에 대해 트랜스펙션 배지 충분한 수량은 혈청-없는 MEM으로 20  $\mu$ M 스톡(stock) 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 0  $\mu$ l, 0.125  $\mu$ l 또는 2.5  $\mu$ l을 최종 부피가 42.5  $\mu$ l가 되도록 희석하는 것에 의해 준비되었고 혼합물을 실온에서 15분 동안 인큐베이트하였다. 올리고펙타민(Oligofectamine) 1.5  $\mu$ l은 혈청-없는 MEM 6  $\mu$ l에서 희석되었고 실온에서 7.5분간 인큐베이트되었다. 5분 후 희석된 올리고펙타민 혼합물은 DNA 혼합물에 첨가되었고 실온에서 20분간 함께 인큐베이트되었다. 세포에 MEM 200  $\mu$ l을 첨가하고 트랜스펙션 배지 50  $\mu$ l을 얇게 뒤덮기 전에 세포는 혈청-없는 MEM으로 한번 세척되었다. 세포는 4시간 동안 성장 챔버 내에 암조건 상태로 놓여졌다. 인큐베이션 후 MEM + 30% FBS 125  $\mu$ l가 세포에 첨가되었다. 세포는 24시간 동안 0.25  $\mu$ g/ml 액틴마이오신 D로 처리되어 그 후 48시간 동안 더 배양된 후 세포 추출물은 웨스턴 블롯 분석으로 거두어 들여졌다.

사상판 세포의 트랜스펙션은 또한 RKO 세포에 대해서 설명했던 동일한 순서로 100 nM 및 200 nM 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 올리고펙타민을 이용하여 테스트되었다. 그러나 사상판 세포의 효과적인 트랜스펙션은 혈청-없는 배지에서 1  $\mu$ M에서 10  $\mu$ M까지 희석된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 24시간 동안 세포에 간단하게 첨가하고 그 후에 총 2~5일 동안 매 24시간 혈청-함유 배지에서 희석된 신선한 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 배지를 교체하는 것에 의해 수행되었다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 트랜스펙션의 효율은 eIF-5A1 안티센스 올리고뉴클레오타이드 #2로써 동일한 서열을 갖는 3' 말단에서 FITC에 컨주게이트되어 있지는 않지만 FITC-표지된 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션을 수행하는 것에 의해 활용되거나 모니터링되었다. RKO 및 사상판세포는 8-웰 배양 슬라이드 위에서 FITC-표지된 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙트되었다. 48시간 후 세포는 PBS로 세척되었고 PBS내의 3.7% 포름알데하이드 내에서 10분간 고정되었다. 웰은 제거되었고 마운팅 배지(Vectashield)가 첨가되었고 커버슬립으로 덮였다. 세포는 그 후 플루오레세인 필터(Green H546, 필터 세트 48915)를 이용하여 형광 현미경학 위의 UV 빛 하에서 가시화되었고 밝은 녹색 형광을 내는 세포는 올리고뉴클레오타이드를 취하는 것으로 결정되었다.

### 아포토시스의 검출

안티센스 올리고뉴클레오타이드로 사상판의 트랜스펙션 및 캄포테신으로 아포토시스의 도입 후, 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 서열번호 26의 어느 것 하나로 처리된 세포 내에서 아포토시스를 겪는 세포의 백분율은 결정되었다. 두 개의 방법이 아포토틱 사상판 세포를 검출하기 위해 사용되었다-Hoescht 염색법 및 DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL. 핵 염색은 핵 무사분열 및 응축과 같은 형태학적 특징에 기초하여 아포토틱 세포를 확인하기 위하여 사상판 세포의 핵을 표지하기 위해 Hoescht 염색법이 사용되었다. 순수한 메탄올 및 결정 아세트산이 3 : 1의 비율로 구성된 염료 고정제는 사용되기 직전에 준비되었다. 동일한 부피의 염료 고정제가 배양 슬라이드 위에서 성장하는 세포의 배지로 첨가되었고 2분간 인큐베이트되었다. 배지/염료 고정제 혼합물은 세포로부터 제거되어 버려졌고 염료 고정제 1 ml가 세포에 첨가되었다. 5분 후에 염료 고정제는 버려졌고 신선한 염료 고정제 1 ml가 세포에 첨가되었고 5분간 인큐베이트되었다. 염료 고정제는 버려졌고 세포는 Hoescht 염색 1 ml(PBS 내의 0.5  $\mu$ g/ml Hoescht 33258)가 첨가되기 전에 4분간 공기-건조되었다. 암조건에서 10분간 인큐베이션 후 염색된 용액은 버려졌고 배양 슬라이드의 웰을 분리하는 챔버는 제거되었고 슬라이드는 탈이온수로 1분간 3번 세척되었다. 세척 후 McIlvaine 완충액(0.021M 시트르산, 0.058M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; pH 5.6)가 세포에 몇 방울 첨가되었고 커버슬립으로 덮여졌다. 염색된 세포는 UV 필터를 사용하여 형광 현미경으로 관찰되었다. 밝게 염색되거나 파괴된 핵을 갖는 세포는 아포토틱으로 기록되었다. 웰 당 최소 200개의 세포가 계산되었다.

DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL(Promega)은 아포토틱 세포의 특유한 특징인 DNA 파괴를 검출하기 위해 사용되었다. Hoescht 염색 후 배양 슬라이드는 증류수로 간단하게 세척되었고 PBS(137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)에서 5분간 두 번 슬라이드를 담구는 것에 의해 더욱 세척되었다. 두 번의 세척 사이에 종이 타월 위에 슬라이드를 블랏(blot)하였다. 세포는 5분 동안 PBS 내의 0.2% Triton X-100 내에 적셔지는 것에 의해 투수되었다(permeabilize). 세포는 그 후 PBS에서 5분 동안 두 번 슬라이드를 담구는 것에 의해 다시 세척되었고 두 번의 세척 사이에 종이 타월 위에 슬라이드를 블랏하였다. 평형 완충액[200 mM 카코딜레이트 칼륨(potassium cacodylate)(pH 6.6), 25 mM Tris-HCl(pH 6.6), 0.2 mM 디티오프레이톨(dithithreitol), 0.25 mg/ml 소 혈청 알부민 및 2.5mM 염화코발트] 25  $\mu$ l를 웰 당 첨가하였고 5~10분간 인큐베이트하였다. 평형 완충액, 뉴클레오타이드 믹스[50  $\mu$ M 플루오레세인-12-dUTP, 100  $\mu$ M dATP, 10 mM Tris-HCl(pH 7.6) 및 1 mM EDTA] 및 말단 디옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 효소(terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme, Tdt, 25 U/ $\mu$ l)가 각각 45:5:1의 비율로 혼합된 반응 혼합물 30  $\mu$ l이 평형 동안 각 웰에 대해 준비되었다. 평형 완충액 안에서의 인큐베이션 후 반응 혼합물 30  $\mu$ l이 웰 당 첨가되었고 커버슬립으로 덮여졌다. 반응은 1시간 동안 37°C의 암조건에서 계속되었다. 반응은 2 X SSC[0.3 M NaCl 및 30 mM 구연산 나트륨(pH 7.0)]에서 슬라이드를 담구는 것에 의해 종결되었고 15분 동안 인큐베이트하였다. 슬라이드는 그 후 5분간 세 번 PBS에 담구는 것에 의해 세척되었다. PBS는 Kim wipe로 웰 주변을 빨아들이는 것으로 제거되었고 마운팅 배지 한 방울(Oncogene research project, JA1750-4ML)은 각각의 웰에 첨가되었고 슬라이드는 커버슬립으로 덮여졌다. 세포는 Hoescht-염색된 핵의 수를 세기 위해 UV 필터(UVG 365, 필터 세트 487902)를 이용하여 형광 현미경으로 관찰되었다. 밝게 염색되거나 파괴된 핵을 갖는 어떠한 세포도 아포토틱으로 계산되었다. 동일한 시야에서 세포는 그 후 플루오레세인 필터를 이용하여 관찰되었고 밝은 녹색으로 형광된 어떠한 핵도 아포토틱으로 계산되었다. 시야에서 아포토틱 세포의 백분율은 플루오레세인 필터를 이용하여 계산된 밝은 녹색 핵의 수를 UV 필터 하에서 계산된 총 핵의 수로 나누는 것에 의해 계산되었다. 웰 당 최소 200개의 세포가 계산되었다.

도 54-57은 이러한 연구의 결과를 나타낸다. 아포토시스-특이적 eIF-5A1로 트랜스펙트된 샘플에서 아포토틱 세포의 백분율은 대조 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙트된 세포에서 나타난 것보다 확실하게 훨씬 적었다.

#### 단백질 추출 및 웨스턴 블랏

트랜스펙트된 RKO 세포로부터의 단백질은 PBS로 세포를 세척하고 웰 당 뜨거운 세포용해 완충액[0.5% SDS, 1 mM 디티오프레이톨, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)]을 첨가하는 것에 의해 웨스턴 블랏 분석을 위해 수확되었다. 세포는 폐기되었고 추출 결과물은 마이크로튜브에 옮겨졌고 5분 동안 끓이고 20°C에서 저장되었다. 단백질은 제조업자의 지시에 따라 Bio-Rad Protein Assay(Bio-Rad)를 이용하여 양을 측정하였다.

웨스턴 블랏을 위해 총 단백질 5  $\mu$ g이 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔 위에서 분리되었다. 분리된 단백질은 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인으로 옮겨졌다. 멤브레인은 차단 용액(PBS 내 5% 스킵 우유 분말)에서 1시간 동안 인큐베이트되었고 0.05% Tween-20/PBS로 15분간 3회 세척되었다. 멤브레인은 밤새 4°C PBS-T 내에서 보관되었다. 다음날 상온으로 데워진 후 멤브레인은 1  $\mu$ g/ml의 폴리비닐 알코올 내에서 30초간 차단되었다. 멤브레인은 탈이온수로 5회 세척된 후 0.025% Tween-20/PBS 내 5% 우유 용액 내에서 30분간 차단되었다. 1차 항체는 멤브레인과의 인큐베이션 전에 0.025% Tween-20/PBS 내 5% 우유 용액에서 30분간 미리 인큐베이트되었다.

일부 1차 항체가 사용되었다. p53(Ab-6) 및 다클론성 항체를 인지하는 Oncogene에서 단일클론성 항체는 닭에서 야기된 인간 eIF-5A1의 c-종결 말단과 상동인 합성 펩타이드(아미노-CRLPEGDLGKEIEQKYD-카복시)(서열번호 68)에 대해 영향을 미쳤다(Gallus Immunotech). 항- $\beta$ -액틴 항체(Oncogene)는 또한 단백질의 동일한 로딩(loading)을 설명하는데 이용되었다. p53에 대한 단일클론성 항체는 0.05 $\mu$ g/ml로 희석되어 사용되었고 eIF-5A1에 대한 항체는 1:1000로 희석되어 사용되었으며 액틴에 대한 항체는 1:20,000으로 희석되어 사용되었다. 60~90분 동안 1차 항체로 인큐베이션한 후 멤브레인은 Tween-20/PBS에서 15분 동안 3번 세척되었다. 2차 항체는 그 후 0.025% Tween-20/PBS 내 1% 우유로 희석되었으며 60~90분 동안 멤브레인과 인큐베이트되었다. p53(Ab-6)가 1차 항체로 사용된 경우 사용된 2차 항체는 1:5000으로 희석된 퍼옥시다제(Sigma)에 컨쥬게이트된 토끼 항-마우스 IgG이었다. 항-eIF-5A1가 1차 항체로 사용된 경우 퍼옥시다제(Gallus Immunotech)에 컨쥬게이트된 토끼-항당 IgY가 1:5000으로 희석되어 사용되었다. 액틴과 사용된 2차 항체는 1:5000으로 희석되어 사용된 퍼옥시다제(Calbiochem)에 컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgM이었다. 2차 항체와 인큐베이션 후 멤브레인은 PBS-에서 3번 세척되었다.

ECL 플러스 웨스턴 브랏팅 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech)는 항체를 결합한 퍼옥시다제-컨쥬게이트를 검출하기 위해 사용되었다. 간단히 말하면 멤브레인은 가볍게 블랏드 드라이된 후 시약 A와 시약 B의 40:1 혼합으로 5분간

암조건으로 인큐베이트되었다. 멤브레인은 블러트 드라이되었고 아세테이트 시트(sheet) 사이에 놓였고 10초에서 30분까지 다양한 시간 동안 X-선 필름에 노출되었다. 멤브레인은 스트리핑 완충액(stripping buffer)[100 mM 2-머캅토에탄올, 2% SDS 및 62.5 mM Tris-HCl(pH 6.7)]내로 멤브레인을 잠기게 하는 것으로써 제거되었고 30분 동안 50℃에서 인큐베이트되었다. 멤브레인은 그 후 탈이온수로 행구어졌고 큰 부피의 0.05% Tween-20/PBS에서 10분 동안 2번 세척되었다. 멤브레인은 제거되었고 3번 재블러트되었다.

(실시예 8)

### siRNA의 구축

인간 eIF-5A1에 대해 영향을 미치는 siRNAs(small inhibitory RNAs)는 RKO 및 사상관 세포에서 eIF-5A1의 발현을 특히 억제하기 위해 사용되었다. 6개의 siRNAs는 *Silencer*<sup>TM</sup> siRNA 구축 키트(Ambion Inc.)를 이용하여 생체 내 전사에 의해 발생되었다. 4개의 siRNAs는 인간 eIF-5A1에 대해 발생되었다(siRNAs #1 ~ #4)(서열번호 30~33). 도 70 참조. 2개의 siRNAs는 대조군으로써 이용되었다; 키트내로 공급된 GAPDH에 영향을 미치는 siRNA, 그 자신은 eIF-5A1을 타겟으로 하지 않지만 eIF-5A1-특이적 siRNA #1(서열번호 30)의 역서열을 지닌 siRNA(siRNA #5)(서열번호 34). 이 siRNAs는 제조업자의 프로토콜에 따라 발생되었다. 간단히 말하면 요구되는 siRNA 가닥을 인코딩하는 DNA 올리고뉴클레오타이드는 siRNA의 개개의 가닥을 발생시키기 위해 T7 프로모터 프라이머의 어닐링 및 Klenow 단편과의 반응 충족 후에 T7 RNA 중합효소에 대한 주형으로써 사용되었다. 센스 가닥 및 안티센스 가닥 모두에 대한 전사 반응 후에 반응은 결합되었고 2개의 siRNA 가닥은 어닐링되었고 DNase 및 RNase로 처리된 후 컬럼은 정화되었다. siRNAs를 발생시키기 위해 사용된 DNA 올리고뉴클레오타이드(밑줄은 T7 프라이머 어닐링 부분)의 서열은 다음과 같았다: siRNA #1 안티센스

5' AAAGGAATGACTTCCAGCTGACCTGTCTC 3' (서열번호 69)	및	siRNA #1 센스 5'
AATCAGCTGGAAGTCATTCCTCCTGTCTC 3'(서열번호 70);	siRNA #2 안티센스 5'	
AAGATCGTCGAGATGTCTACTCCTGTCTC 3'(서열번호 71)	및	siRNA #2 센스 5'
AAAGTAGACATCTCGACGATCCCTGTCTC 3'(서열번호 72);	siRNA #3 안티센스 5'	
AAGGTCCATCTGGTTGGTATTCCTGTCTC 3'(서열번호 73)	및	siRNA #3 센스 5'
AAAATACCAACCAGATGGACCCCTGTCTC 3'(서열번호 74);	siRNA #4 안티센스 5'	
AAGCTGGACTCCTCCTACACACCTGTCTC 3'(서열번호 75)	및	siRNA #4 센스 5'
AATGTGTAGGAGGAGTCCAGCCCTGTCTC 3'(서열번호 76);	siRNA #5 안티센스 5'	
AAAGTCGACCTTCAGTAAGGACCTGTCTC 3'(서열번호 77)	및	siRNA #5 센스 5'
AATCCTTACTGAAGGTCGACTCCTGTCTC 3'(서열번호 78).		

*Silencer*<sup>TM</sup> siRNA 표지 키트-FAM(Ambion)은 RKO 및 사상관 세포 내로 siRNA의 업테이크(uptake)를 모니터링하기 위해 FAM으로 GAPDH siRNA를 표지하는데 사용되었다. 8-웰 배양 슬라이드에서 트랜스펙션 후, 세포는 PBS로 세척되었고 PBS 내 3.7% 포르말데하이드에서 10분 동안 고정되었다. 웰은 제거되었고 마운팅 배지(Vectashield)는 첨가되었고 커버슬립으로 덮여졌다.FAM-표지된 siRNA의 업테이크는 플루오레세인 필터를 이용하여 UV 빛 하에서 형광 현미경으로 관찰되었다. GAPDH siRNA는 제조업자의 프로토콜에 따라 표지되었다.

### siRNA의 트랜스펙션

RKO 세포 및 사상관 세포는 동일한 트랜스펙션 프로토콜을 이용하여 siRNA로 트랜스펙트되었다. RKO 세포는 각각 웰 당 46,000개 세포 및 105,800개 세포의 밀도로 8-웰 배지 슬라이드 또는 24-웰 플레이트에서 트랜스펙션 전날 뿌려졌다. 사상관 세포는 세포 합류가 40~70%일 때 트랜스펙트되었고 트랜스펙션에 앞서 3일 동안 8-웰 배양 슬라이드 위에서 일반적으로 웰 당 7500~10,000개의 세포로 뿌려졌다. 8-웰 배양 슬라이드의 하나의 웰에 대해 충분한 트랜스펙션 배지가 Poti-Mem(Sigma)에서 siRNA 25.5 pmole을 희석하여 최종 부피가 21.2 $\mu$ l이 되도록 하는 것으로 준비되었다. 0.425 $\mu$ l Lipofectamine 2000은 Opti-Mem에서 최종 부피가 21.2 $\mu$ l가 될 때까지 희석되었고 실온에서 7~10분 동안 인큐베이트되었다. 희석된 Lipofectamine 2000 혼합물은 그 후 희석된 siRNA 혼합물에 첨가되었고 20~30분 동안 실온에서 함께 인큐베이트되었다. 세포에 혈청-없는 배지 135 ml를 첨가하고 트랜스펙션 배지 42.4 ml를 더기 전에 세포는 혈청-없는 배지로 한번 세척되었다. 세포는 다시 4시간 동안 성장 챔버내로 두어졌다. 인큐베이션 후 혈청-없는 배지 65 ml + 30% FBS는 세포에 첨가되었다. 웨스턴 블롯 분석을 위해 사용되는 세포 내로의 siRNA의 트랜스펙션은 부피가 2.3배 증가한 것을 제외하고는 8-웰 슬라이드에서의 트랜스펙션과 동일한 조건으로 24-웰 플레이트에서 수행되었다.

트랜스펙션 후, RKO 및 사상판 세포는 웨스턴 블롯 분석을 위한 세포 추출물을 수집하기 전에 72시간 동안 인큐베이트되었다. 아포토시스를 방해하는 eIF-5A1에 대해 영향을 미치는 siRNAs의 유효성을 결정하기 위해 사상판 세포는 트랜스펙션 후 48시간 또는 72시간에서 아포토시스를 유발시키기 위해 캄포테신(Sigma) 50  $\mu$ M 및 TNF- $\alpha$  10 ng/ml로 처리되었다. 세포는 아포토시스를 겪는 세포의 백분율을 결정하기 위해 24시간 또는 48시간 후에 Hoescht로 염색되었다.

(실시예 9)

#### 아포토시스의 검출

안티센스 올리고뉴클레오타이드로 사상판 세포의 트랜스펙션 및 캄포테신으로 아포토시스의 유도 후, 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2의 어느 하나로 처리된 세포에서 아포토시스를 겪는 세포의 백분율은 결정되었다. 두 가지 방법이 아포토틱 사상판 세포를 검출하는데 이용되었다-Hoescht 염색법 및 DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL. 핵 염색은 핵 무사분열 및 응축과 같은 형태학적 특징에 기초하여 아포토틱 세포를 확인하기 위하여 사상판 세포의 핵을 표지하기 위해 Hoescht 염색법이 사용되었다. 순수한 메탄올 및 결정 아세트산이 3:1의 비율로 구성된 염료 고정제는 사용되기 직전에 준비되었다. 동일한 부피의 염료 고정제가 배양 슬라이드 위에서 성장하는 세포의 배지로 첨가되었고 2분 동안 인큐베이트되었다. 배지/염료 고정제 혼합물은 세포로부터 제거되어 버려졌고 염료 고정제 1 ml가 세포에 첨가되었다. 5분 후에 염료 고정제는 버려졌고 신선한 염료 고정제 1 ml가 세포에 첨가되었고 5분 동안 인큐베이트되었다. 염료 고정제는 버려졌고 세포는 Hoescht 염색 1ml(PBS 내의 0.5  $\mu$ g/ml Hoescht 33258)가 첨가되기 전에 4분 동안 공기-건조되었다. 암조건에서 10분간 인큐베이션 후 염색된 용액은 버려졌고 배양 슬라이드의 웰을 분리하는 챔버는 제거되었고 슬라이드는 탈이온수로 1분간 3번 세척되었다. 세척 후 McIlvaine 완충액(0.021 M 시트르산, 0.058 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; pH 5.6)가 세포에 몇 방울 첨가되었고 커버슬립으로 덮여졌다. 염색된 세포는 UV 필터를 사용하여 형광 현미경으로 관찰되었다. 밝게 염색되거나 파괴된 핵을 갖는 세포는 아포토틱으로 기록되었다. 웰 당 최소 200개의 세포가 계산되었다.

DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL(Promega)은 아포토틱 세포의 특유한 특징인 DNA 파괴를 검출하기 위해 사용되었다. Hoescht 염색 후 배양 슬라이드는 증류수로 간단하게 세척되었고 PBS(137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)에서 5분 동안 두 번 슬라이드를 담구는 것에 의해 더욱 세척되었다. 두 번의 세척 사이에 종이 타월 위에 슬라이드를 블롯(blot)하였다. 세포는 5분 동안 PBS 내의 0.2% Triton X-100 내에 적셔지는 것에 의해 투수되었다(permeabilize). 세포는 그 후 PBS에서 5분 동안 두 번 슬라이드를 담구는 것에 의해 다시 세척되었고 두 번의 세척 사이에 종이 타월 위에 슬라이드를 블롯하였다. 평형 완충액[200 mM 카코딜레이트 칼륨(pH 6.6), 25 mM Tris-HCl(pH 6.6), 0.2 mM 디티오프레이트, 0.25 mg/ml 소 혈청 알부민 및 2.5 mM 염화코발트] 25  $\mu$ l를 웰 당 첨가하였고 5~10분간 인큐베이트하였다. 평형 완충액, 뉴클레오타이드 믹스[50  $\mu$ M 플루오레세인-12-dUTP, 100  $\mu$ M dATP, 10 mM Tris-HCl(pH 7.6) 및 1 mM EDTA] 및 말단 디옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 효소(terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme, Tdt, 25 U/ $\mu$ l)가 각각 45:5:1의 비율로 혼합된 반응 혼합물 30  $\mu$ l이 평형 동안 각 웰에 대해 준비되었다. 평형 완충액 안에서의 인큐베이션 후 반응 혼합물 30  $\mu$ l이 웰 당 첨가되었고 커버슬립으로 덮여졌다. 반응은 1시간 동안 37°C의 암조건에서 계속되었다. 반응은 2 X SSC[0.3 M NaCl 및 30 mM 구연산 나트륨(pH 7.0)]에서 슬라이드를 담구는 것에 의해 종결되었고 15분간 인큐베이트하였다. 슬라이드는 그 후 5분 동안 세 번 PBS에 담구는 것에 의해 세척되었다. PBS는 Kim wipe로 웰 주변을 빨아들이는 것으로 제거되었고 마운팅 배지 한 방울(Oncogene research project, JA1750-4ML)은 각각의 웰에 첨가되었고 슬라이드는 커버슬립으로 덮여졌다. 세포는 Hoescht-염색된 핵의 수를 세기 위해 UV 필터(UVG 365, 필터 세트 487902)를 이용하여 형광 현미경으로 관찰되었다. 밝게 염색되거나 파괴된 핵을 갖는 어떠한 세포도 아포토틱으로 계산되었다. 동일한 시야에서 세포는 그 후 플루오레세인 필터를 이용하여 관찰되었고 밝은 녹색으로 형광된 어떠한 핵도 아포토틱으로 계산되었다. 시야에서 아포토틱 세포의 백분율은 플루오레세인 필터를 이용하여 계산된 밝은 녹색 핵의 수를 UV 필터 하에서 계산된 총 핵의 수로 나누는 것에 의해 계산되었다. 웰 당 최소 200개의 세포가 계산되었다.

#### 단백질 추출 및 웨스턴 블롯

트랜스펙트된 RKO 세포로부터의 단백질은 PBS로 세포를 세척하고 웰 당 뜨거운 세포용해 완충액[0.5% SDS, 1 mM 디티오프레이트, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)]을 첨가하는 것에 의해 웨스턴 블롯 분석을 위해 수확되었다. 세포는 폐기되었고 추출 결과물은 마이크로원심분리관에 옮겨졌고 5분간 끓이고 20°C에서 저장되었다. 단백질은 제조업자의 지시에 따라 Bio-Rad Protein Assay(Bio-Rad)를 이용하여 양을 측정하였다.



웨스턴 블랏을 위해 총 단백질 5  $\mu\text{g}$ 이 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔 위에서 분리되었다. 분리된 단백질은 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인으로 옮겨졌다. 멤브레인은 차단 용액(PBS 내 5% 스킵 우유 분말)에서 1시간 동안 인큐베이트되었고 0.05% Tween-20/PBS로 15분간 3회 세척되었다. 멤브레인은 밤새 4°C PBS-T내에서 보관되었다. 다음날 상온으로 데워진 후 멤브레인은 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 폴리비닐 알코올 내에서 30초간 차단되었다. 멤브레인은 탈이온수로 5회 세척된 후 0.025% Tween-20/PBS 내 5% 우유 용액 내에서 30분간 차단되었다. 1차 항체는 멤브레인과의 인큐베이션 전에 0.025% Tween-20/PBS 내 5% 우유 용액에서 30분간 미리 인큐베이트되었다.

일부 1차 항체가 사용되었다. p53(Ab-6; Oncogene)을 인지하는 Oncogenen으로부터의 단일클론성 항체, 인간 bcl-2(Oncogene)을 인지하는 단일클론성 및 다클론성 항체는 닭에서 야기된 인간 eIF-5A1의 c-종결 말단과 상동인 합성 펩타이드(아미노-CRLPEGDLGKEIEQKYD-카르복시)(서열번호 68) 합성 펩타이드에 대해 영향을 미쳤다(Gallus Immunotech). 항- $\beta$ -액틴 항체(Oncogene)는 또한 단백질의 동일한 로딩(loading)을 설명하는데 이용되었다. p53에 대한 단일클론성 항체는 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석되어 사용되었고 bcl-2에 대한 항체는 1:3500으로 희석되어 사용되었으며 eIF-5A1에 대한 항체는 1:1000으로 희석되어 사용되었고 액틴에 대한 항체는 1:20,000으로 희석되어 사용되었다. 60~90분 동안 1차 항체로 인큐베이션한 후 멤브레인은 Tween-20/PBS에서 15분간 3번 세척되었다. 2차 항체는 그 후 0.025% Tween-20/PBS 내 1% 우유로 희석되었으며 60~90분 동안 멤브레인과 인큐베이트되었다. p53(Ab-6)가 1차 항체로 사용된 경우 사용된 2차 항체는 1:5000으로 희석된 퍼옥시다제(Sigma)에 콘주게이트된 토끼 항-마우스 IgG이었다. 항-eIF-5A1가 1차 항체로 사용된 경우 퍼옥시다제(Gallus Immunotech)에 콘주게이트된 토끼-항닭 IgY가 1 : 5000으로 희석되어 사용되었다. 액틴과 사용된 2차 항체는 1 : 5000으로 희석되어 사용된 퍼옥시다제(Calbiochem)에 콘주게이트된 염소 항-마우스 IgM이었다. 2차 항체와 인큐베이션 후 멤브레인은 PBS-에서 3번 세척되었다.

ECL 플러스 웨스턴 브랏팅 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech)는 항체를 결합한 퍼옥시다제-콘주게이트를 검출하기 위해 사용되었다. 간단히 말하면 멤브레인은 가볍게 블랏드 드라이된 후 시약 A와 시약 B의 40 : 1 혼합으로 5분간 암조건으로 인큐베이트되었다. 멤브레인은 블랏드 드라이되었고 아세테이트 시트(sheet) 사이에 놓였고 10초에서 30분까지 다양한 기간 동안 X-선 필름에 노출되었다. 멤브레인은 스트립핑 완충액[100 mM 2-머캅토에탄올, 2% SDS 및 62.5 mM Tris-HCl(pH 6.7)]내로 멤브레인을 잠기게 하는 것으로써 제거되었고 30분 동안 50°C에서 인큐베이트되었다. 멤브레인은 그 후 탈이온수로 행구어졌고 큰 부피의 0.05% Tween-20/PBS에서 10분 동안 2번 세척되었다. 멤브레인은 제거되었고 3번 재블랏되었다.

(실시예 10)

#### HepG2 TNF- $\alpha$ 생성의 정량화

HepG2 세포는 48-웰 플레이트 위에서 웰 당 20,000세포로 플레이트되었다. 72시간 후 배지는 제거되었고 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 2.5  $\mu\text{M}$  또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2(서열번호 26)의 어느 하나를 포함하는 신선한 배지가 세포가 첨가되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함유한 신선한 배지는 24시간 후에 첨가되었다. 올리고뉴클레오타이드와의 인큐베이션 총 48시간 후, 배지는 인터루킨 1 $\beta$ (IK-1 $\beta$ , 1000 pg/ml; Leinco Technologies)을 함유한 배지로 교체되었고 6시간 동안 인큐베이트되었다. TNF- $\alpha$  정량화를 위해 배지는 수집되었고 냉동되었다. 처리되지 않은 세포와 오직 IL-1 $\beta$ 로만 처리된 세포와의 추가적인 대등한 인큐베이션은 대조를 위해 이용되었다. 모든 처리는 두 번씩 수행되었다. 배지 내로 방출된 TNF- $\alpha$ 는 제조업자의 프로토콜에 따라 ELISA 에세이(Assay Designs Inc.)로 측정되었다.

(실시예 11)

하기의 실험은 안티센스 아포토시스 인자 5A 뉴클레오타이드가 p53 뿐만 아니라 아포토시스 인자 5A의 발현도 저해가 가능하다는 것을 나타낸다. RKO 세포는 트랜스펙트되지 않은 채로 있거나, 모의 트랜스펙트되어 있거나 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #1, #2 또는 #3(서열번호 25, 26 및 27) 200nM로 트랜스펙트되어 있었다. RKO 세포는 또한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2(서열번호 26) 100nM로 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 24시간 후, 세포 추출물은 채취되어 각 샘플로부터의 단백질 5 $\mu\text{g}$ 은 SDS-PAGE 겔 위에서 분리되어 PVDF 멤브레인으로 옮겨져 eIF-5A1에 대한 항체로 웨스턴 블랏되었다. 화학발광 검출 후, 멤브레인은 제거되었고 p53에 대한 항체로 다시 프로브되었다. 화학발광 검출 후, 멤브레인은 다시 제거되었고 액틴에 대한 항체로 다시 프로브되었다. 안티센스 올리고 1, 2 및 3(아포토시스 인자 5A에 대해)(각각 서열번호 25, 26 및 27)으로 처리된 후 RKO 세포에 의해 생성된 단백질의 수준을 나타내는 도 52 참조. RKO 세포는 안티센스 아포토시스 인자 5A 뉴클레오타이드로 트랜스펙트된 후 p53를 덜 생산했을 뿐만 아니라 아포토시스 인자 5A도 덜 생산하였다.

(실시예 12)

하기의 실험은 안티센스 아포토시스 인자 5A 뉴클레오타이드가 아포토시스를 감소시키는 것이 가능하다는 것을 나타낸다.

하나의 실험에서, 사상판 세포주 #506은 (A) 올리고펙타민 트랜스펙션 시약을 이용하여 FITC-표지된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 100nM로 트랜스펙트되거나 (B) 혈청-없는 배지에서 직접 희석된 그대로의 FITC-표지된 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙트되었다. 24시간 후 10% FBS를 함유한 배지 및 10 $\mu$ M로 희석된 신선한 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 세포에 첨가되었다. (A) 및 (B)의 세포는 총 48시간 후 고정되었고 플루오레세인 필터를 이용하여 UV 빛 하에서 형광 현미경으로 관찰되었다. 도 53은 형광 표지된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 업테이크를 나타낸다.

또다른 실험에서, 사상판 세포주 #506은 총 4일 동안 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2(서열번호 26)의 10 $\mu$ M로 트랜스펙트되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리를 시작한 48시간 후 세포는 48시간 동안 캄포테신 20  $\mu$ M 또는 40  $\mu$ M로 처리되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 캄포테신-함유 배지는 매일 교체되었다. 아포토틱 세포의 백분율은 Hoescht 및 TUNEL로 세포를 표지하는 것으로 결정되었다. 도 54 참조.

또다른 실험에서, 사상판 세포주 #506은 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2(서열번호 26)의 10  $\mu$ M로 트랜스펙트되었다. 24시간 후 배지는 교체되었고 신선한 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 첨가되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리를 시작한 48시간 후 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 제거되었고 세포는 3일 동안 캄포테신 20 $\mu$ M로 처리되었다. 캄포테신-함유 배지는 매일 교체되었다. 아포토틱 세포의 백분율은 Hoescht 및 TUNEL로 세포를 표지하는 것으로 측정되었다. 도 55 참조.

또다른 실험에서, 사상판 세포주 #517은 총 5일 동안 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2(서열번호 26)의 1 $\mu$ M로 트랜스펙트되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리를 시작한 48시간 후 세포는 3일 또는 4일 동안 캄포테신 20  $\mu$ M으로 처리되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 캄포테신-함유 배지는 매일 교체되었다. 아포토틱 세포의 백분율은 Hoescht 및 TUNEL로 세포를 표지하는 것으로 측정되었다. 도 56 참조.

또다른 실험에서, 사상판 세포주 #517은 총 5일 동안 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2(서열번호 26)의 2.5  $\mu$ M로 트랜스펙트되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리를 시작한 48시간 후 세포는 3일 동안 캄포테신 40  $\mu$ M으로 처리되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 캄포테신-함유 배지는 매일 교체되었다. 아포토틱 세포의 백분율은 Hoescht 및 TUNEL로 세포를 표지하는 것으로 측정되었다. 도 57 참조.

또다른 실험에서, 사상판 세포주 #517은 총 5일 동안 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2(서열번호 26)의 1  $\mu$ M 또는 2.5  $\mu$ M로 트랜스펙트되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리를 시작한 48시간 후 세포는 3일 동안 캄포테신 40  $\mu$ M으로 처리되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 캄포테신-함유 배지는 매일 교체되었다. 아포토틱 세포의 백분율은 Hoescht 및 TUNEL로 세포를 표지하는 것으로 측정되었다. 도 58 참조.

또다른 실험에서, 사상판 세포주 #517은 처리되지 않은 채로 있거나 TNF- $\alpha$  10 ng/ml, 캄포테신 50  $\mu$ M 또는 TNF- $\alpha$  10 ng/ml, 캄포테신 50  $\mu$ M로 처리되었다. 아포토틱 세포의 백분율은 Hoescht로 세포를 표지하는 것으로 결정되었다. 도 59 참조.

또다른 실험에서, 사상판 세포주 #506 및 #517은 총 2일 동안 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2(서열번호 26)의 2.5  $\mu$ M 또는 5  $\mu$ M로 트랜스펙트되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함유한 신선한 배지가 24시간 후에 첨가되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리를 시작한 48시간 후 세포는 2일 동안 캄포테신 50  $\mu$ M 및 TNF- $\alpha$  10 ng/ml로 처리되었다. 아포토틱 세포의 백분율은 Hoescht로 세포를 표지하는 것으로 결정되었다. 도 60 참조.

또다른 실험에서, 사상판 세포주 #506, #517 및 #524는 총 2일 동안 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2(서열번호 26)의 2.5  $\mu$ M로 트랜스펙트되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를

함유한 신선한 배지가 24시간 후에 첨가되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리를 시작한 48시간 후 세포는 2일 동안 캄포테신 50  $\mu$ M 및 TNF- $\alpha$  10 ng/ml로 처리되었다. 아포토틱 세포의 핵분율은 Hoescht로 세포를 표지하는 것으로 결정되었다. 도 61 참조.

#### (실시예 13)

하기의 실험은 아포토시스 인자 5A가 덜 발현된 아포토시스 인자 5A에 대해 타겟된 siRNAs로 트랜스펙트된 세포를 나타낸다. 본 실험은 또한 아포토시스 인자 5A에 대해 타겟된 siRNAs가 아포토시스를 감소시키는 것이 가능하다는 것을 나타낸다.

하나의 실험에서, 사상판 세포주 #517은 트랜스펙션 동안 (A) 혈청이 있거나, (B) 혈청이 없는 리포펙타민 2000 트랜스펙션 시약을 이용하여 FAM-표지된 siRNA 100 nM로 트랜스펙트되었다. (A) 및 (B)의 세포는 총 24시간 후 고정되었고 플루오레세인 필터를 이용하여 UV 빛 하에서 형광 현미경으로 관찰되었다. 도 62 참조.

또다른 실험에서, RKO 세포는 트랜스펙션 동안 혈청이 있거나 혈청이 없는 siRNA 100nM으로 트랜스펙트되었다. 2개의 대조 siRNAs(siRNA #5(서열번호 34) 및 GAPDH에 대해 타겟된 것) 및 eIF-5A1에 대해 타겟된 4개의 siRNAs(siRNA #1~#4)(서열번호 30~34)로 총 6개의 siRNAs가 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 72시간 후 세포 추출물은 채취되어 각 샘플로부터 단백질 5  $\mu$ g이 SDS-PAGE 겔 위에서 분리되어 PVDF 멤브레인으로 옮겨져 eIF-5A1에 대한 항체로 웨스턴 블롯되었다. 화학발광 검출 후, 멤브레인은 제거되었고 bcl-2에 대한 항체로 다시 프로브되었다. 화학발광 검출 후, 멤브레인은 다시 제거되었고 액틴에 대한 항체로 다시 프로브되었다. 도 63 참조.

또다른 실험에서 사상판 세포주 #506 및 #517은 siRNA 100nM로 트랜스펙트되었다. 2개의 대조 siRNAs(siRNA #5(서열번호 34) 및 GAPDH에 대해 타겟된 것) 및 eIF-5A1에 대해 타겟된 4개의 siRNAs(siRNA #1~#4)(서열번호 30~34)로 총 6개의 siRNAs가 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 72시간 후 세포 추출물은 채취되어 각 샘플로부터 단백질 5  $\mu$ g이 SDS-PAGE 겔 위에서 분리되어 PVDF 멤브레인으로 옮겨져 eIF-5A1에 대한 항체로 웨스턴 블롯되었다. 화학발광 검출 후, 멤브레인은 제거되었고 액틴에 대한 항체로 다시 프로브되었다. 도 64 참조.

또다른 실험에서 사상판 세포주 #506은 siRNA 100 nM로 트랜스펙트되었다. 2개의 대조 siRNAs(siRNA #5(서열번호 34) 및 GAPDH에 대해 타겟된 것) 및 eIF-5A1에 대해 타겟된 4개의 siRNAs(siRNA #1~#4)(서열번호 30~34)로 총 6개의 siRNAs가 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 48시간 후 배지는 캄포테신 50  $\mu$ M 및 TNF- $\alpha$  10 ng/ml를 함유한 배지로 교체되었다. 24시간 후, 아포토틱 세포의 핵분율은 Hoescht로 세포를 표지하는 것으로 결정되었다. 도 65 참조.

또다른 실험에서 사상판 세포주 #506은 siRNA 100nM로 트랜스펙트되었다. 2개의 대조 siRNAs(siRNA #5(서열번호 34) 및 GAPDH에 대해 타겟된 것) 및 eIF-5A1에 대해 타겟된 4개의 siRNAs(siRNA #1~#4)(서열번호 30~34)로 총 6개의 siRNAs가 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 72시간 후 배지는 캄포테신 50  $\mu$ M 및 TNF- $\alpha$  10 ng/ml를 함유한 배지로 교체되었다. 24시간 후, 아포토틱 세포의 핵분율은 Hoescht로 세포를 표지하는 것으로 측정되었다. 도 66 참조.

또다른 실험에서 사상판 세포주 #506은 트랜스펙트되지 않은 채로 있거나 siRNA 100 nM로 트랜스펙트되었다. 2개의 대조 siRNAs(siRNA #5(서열번호 34) 및 GAPDH에 대해 타겟된 것) 및 eIF-5A1에 대해 타겟된 4개의 siRNAs(siRNA #1~#4)(서열번호 30~34)로 총 6개의 siRNAs가 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 72시간 후 배지는 캄포테신 50  $\mu$ M 및 TNF- $\alpha$  10 ng/ml를 함유한 배지로 교체되었다. 신선한 배지는 처리되지 않은 대조 세포인 트랜스펙트되지 않은 것에도 첨가되었다. 48시간 후, 아포토틱 세포의 핵분율은 Hoescht로 세포를 표지하는 것으로 측정되었다. 도 67 참조.

실험으로부터 siRNA로 트랜스펙트되고 캄포테신 및 TNF- $\alpha$ 로 처리된 Hoescht-염색된 사상판 세포주 #506의 사진은 도 67 및 실시예 13에 설명되어 있다. 도 68 참조.

#### (실시예 14)

본 실험은 아포토시스 인자 5A에 대해 영향을 미치는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 지닌 인간 세포주를 처리하는 것은 세포가 TNF- $\alpha$ 를 덜 생산하게 한다는 것을 나타낸다.

HepG2 세포는 총 2일 동안 대조 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 eIF-5A1 #2 2.5  $\mu$ M로 처리되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함유한 신선한 배지는 24시간 후에 첨가되었다. 추가된 세포는

2일 동안 처리되지 않은 채로 있었다. 처리가 시작된 24시간 후 세포는 6시간 동안 신선한 배지에서 IL-1 $\beta$ (1000 pg/ml)로 처리되었다. 실험의 끝에 배지는 TNF- $\alpha$  수량화를 위해 수집되었고 냉동되었다(-20°C). 배지 내로 방출된 TNF- $\alpha$ 는 ELISA 에세이(Assay Designs Inc.)로 측정되었다. 도 69 참조.

(실시예 15)

HT-29 세포(인간 콜론 선암)는 eIF-5A1에 대한 siRNA 또는 역서열을 지닌 대조 siRNA로 트랜스펙트되었다. 사용된 siRNA는 다음과 같다:

위치 690(3'UTR)% G/C=48

5' AAGCUGGACUCCUCCUACAC 3'(서열번호 79)

사용된 대조 서열은 다음과 같다:

% G/C=39

5' AAACACAUCCUCCUCAGGUCG 3'(서열번호 80)

48시간 후 세포는 16시간 동안 인터페론-감마(IFN- $\gamma$ )로 처리되었다. 16시간 후 세포는 신선한 배지로 세척되었고 리포폴리사카라이드(LPS)로 8시간 또는 24시간 동안 처리되었다. 각 시점(8시간 또는 24시간)에서 세포 배양 배지는 세포로부터 제거되어 냉동되었고 배지에 존재하는 TNF- $\alpha$ 는 ELISA에 의해 수량화되었다. 세포 용해질 역시 채취되어 단백질에 대해 수량화되었으며 pg/mg 단백질에 대한 TNF- $\alpha$ 값의 조절에 사용되었다(다른 웰에서의 세포 수 차이에 대해 조절하기 위해). 웨스턴 블롯 및 ELISA의 결과는 도 74a 및 b에 나타나 있다. 도 75는 높은 밀도에서의 세포를 제외한 동일한 실험의 결과를 나타낸다.

(실시예 16)

#### U-937 세포주의 조직 배양 조건

U-937은 부유되어 성장하고 PMA(ATCC No. CRL-1593.2)의 자극으로 대식세포 내로 부착되거나 분화하는 인간 단핵세포 세포주이다(TACC로부터 직접 수득된 세포는 아님). 세포는 37°C의 CO<sub>2</sub>(5%) 내 L-글루타민 2 mM, 중탄산나트륨 1.5 g/L, 글루코스 4.5 g/L, HEPES 10 mM, 피루브산나트륨 1.0mM 및 FBS(fetal bovine serum) 10%를 지닌 RPMI 1640 배지에서 유지되었다. 세포는 일주일에 두 번 신선한 배지 내로 분배되었고(1:4 또는 1:5의 분배비율) 세포 밀도는 항상 10<sup>5</sup> 세포/ml 및 2 x 10<sup>6</sup> 세포/ml 사이에서 유지되었다. 세포는 조직 배양-처리 플라스틱 T-25 플라스크 내에서 부유되어 배양되었고 실험은 24-웰 플레이트에서 수행되었다.

#### 시간 경과 실험

실험 시작 2일 전, 세포 밀도는 3 x 10<sup>5</sup> 세포/ml 배지로 조절되었다. 실험 당일 세포는 성장기(log phase)로 채취되었다. 세포 부유는 15ml의 튜브로 옮겨졌고 실온에서 10분 동안 400 x g에서 원심분리되었다. 상청액은 흡입되었고 세포 펠렛은 신선한 배지로 세척/재현탁되었다. 세포는 다시 10분 동안 400 x g에서 원심분리되었고 상청액은 흡입되고 세포 펠렛은 최종적으로 신선한 배지에서 재현탁되었다. 세포 현탁액과 트리판(trypan) 블루 용액(PBS 내 트리판 블루 염료 0.4%)이 같은 부피로 혼합되었고 살아있는 세포는 헤모사이토미터(hemocytometer) 및 현미경을 이용하여 계산되었다. 세포는 4 x 10<sup>5</sup> 세포/ml로 희석되었다.

24-웰 플레이트는 각각의 웰에 PMA 또는 DMSO(용액 조절)를 첨가하는 것으로 준비되었다. 각각의 웰이 400,000개의 세포, 0.1% DMSO +/- 162nM PMA를 함유하기 위해 세포 현탁액 1 ml가 각각의 웰에 첨가되었다. 세포는 37°C CO<sub>2</sub>(5%) 인큐베이터에서 유지되었다. 세포의 각각의 웰은 0, 24, 48, 72, 96, 99 및 102 시간에 채취되었다. 실험 시간 시점 및 추가의 개요에 대해서는 도 76 참조.

배지는 72시간에서 교체되었다. 어떤 세포들이 부착되었고 다른 것들은 현탁되어 있었기 때문에 부착된 세포의 분리를 막기 위해 주의가 요구되었다. 각각의 웰의 배지는 상응하는 마이크로원심분리관 내로 조심스럽게 옮겨졌고 튜브는 3분 동안 14,000 x g에서 원심분리되었다. 튜브는 흡입되었고 세포 펠렛은 신선한 배지(1 ml, (-)DMSO, (-)PMA)에서 재현탁되었고 원래의 웰로 돌려놓았다. 세포는 PMA 없는 신선한 배지에서 움직이지 않게 되었다. 96시간에, LPS(100ng/ml)가 첨가되었고 세포는 3시간 후(99시간) 및 6시간 후(102시간)에 채취되었다.

이 시점에서 부유된 세포 및 배지는 각각의 웰에서 마이크로원심분리관으로 옮겨졌다. 세포는 3분 동안 14,000 x g에서 펠렛되었다. 배지(상청액)는 깨끗한 튜브로 옮겨졌고 ELISA/사이토카인 분석을 위해 저장되었다(-20℃). 웰에 남아있는 세포는 PBS(1 ml, 37℃)로 세척되었고 이 PBS는 또한 상응하는 마이크로원심분리관에서 세포 펠렛을 세척하는데도 이용되었다. 세포는 다시 3분 동안 14,000 x g에서 펠렛되었다. 세포는 끓는 세포용해 완충액(50 mM Tris pH 7.4 및 2% SDS)에서 세포용해되었다. 각각의 웰에 부착한 세포 및 현탁된 세포는 풀(pool)되었다. 샘플은 끓여진 후 -20℃에서 저장되었다.

각각의 세포 샘플 내의 단백질 농도는 기준 단백질로써 BSA(보빈 혈청 알부민)를 사용하여 BCA(bicinchoninic acid)법으로 결정되었다. 단백질 샘플(총 단백질 5μg)은 12% SDS-PAGE 전기영동으로 분리되었고 PVDF 멤브레인으로 옮겨졌다. 멤브레인은 폴리비닐알콜(1μg/ml, 30초)와 PBS-t(1시간) 내 5% 스킵 우유로 차단되었다. 멤브레인은 인간 eIF-5A(BD Biosciences cat #6119761; 5% 스킵 우유 내 1:20,000, 1시간)에 대해 야기되는 마우스 단일클론성 항체로 프로브되었다. 멤브레인은 3 x 10 분 동안 PBS-t로 세척되었다. 2차 항체는 양고추냉이 퍼옥시다제-컨쥬게이트된 항마우스 항체였다(Sigma, 1% 스킵 우유 내 1:5000, 1시간). 멤브레인은 3 x 10 분 동안 PBS-T로 세척되었다. 단백질 띠는 화학 발광에 의해 가시화되었다(ECL 검출 시스템, Amersham Pharmacia Biotech).

각 젤 레인에 로드된 유사한 양의 단백질을 설명하기 위해 멤브레인은 제거되었고 액틴에 대해 다시 프로브되었다. 멤브레인은 제거되었고(100 mM 2-머캅토에탄올, 2% SDS, 62.5 mM Tris-Hcl pH 6.7; 50℃에서 30분 동안) 세척되어 상기와 같이 차단되었다. 멤브레인은 액틴 1차 항체로 프로브되었다(마우스에서 제조된 액틴 단일클로 항체; Oncogene, Ab-1; 5% 스킵 우유 내 1:20,000). 2차 항체는 상기와 동일한 방법으로 세척되고 검출되었다.

도 77은 단일세포(U-397) 분화 및 이어서 일어나는 TNF-α 분비 동안 상향조절되는 eIF-5A를 나타낸다.

(실시예 17) eIF-5A siRNA에 의해 인터페론 감마에 반응하는 IL-8 생성의 억제

HT-29(인간 콜론 선암) 세포는 아포토시스 eIF-5A에 영향을 미치는 siRNA로 트랜스펙트되었다. 트랜스펙트 약 48시간 후 배지는 테스트 샘플의 일부가 인터페론 감마를 지닌 배지를 지니고 샘플의 일부가 인터페론 감마가 없는 배지를 지니게 하기 위해 교체되었다. 인터페론 감마 첨가 16시간 후 세포는 세척되었고 TFN-α가 있거나 또는 없는 배지는 세포 위로 위치하였다. 배지(IL-8의 ELISA 검출에 사용되는) 및 세포 용해질은 8시간 및 24시간 후에 채취되었다.

도 79 및 도 80은 인터페론에 반응해서 뿐 아니라 TNF-α에도 반응하여 생성되는 IL-8을 나타낸다. TNF 처리에 앞서서 인터페론 감마로 세포를 프라임(priming)하는 것은 세포가 어느 쪽 하나로 처리하는 것 보다 더 많은 IL-8을 생성하게끔 한다. 이것은 인터페론에 반응하는 TNF 수용체 1의 알려진 상향조절 때문일 수도 있다. 따라서 세포를 인터페론으로 '프라임'하는 것은 세포가 더 많은 수용체를 갖기 때문에 세포가 TNF에 더 잘 반응하도록 해준다. eIF-5A에 대한 siRNA는 단지 TNF에만 반응하는 IL-8 생성에는 효과가 없지만(이전의 실험), siRNA는 인터페론과 TNF를 결합하여 처리한 결과로써 생성된 IL-8의 상당한 양뿐만 아니라 인터페론에 반응하여 생성된 대부분의 IL-8을 차단한다. 이러한 결과는 본 발명자들이 TNF 경로는 차단하지 못했지만 아포토시스 eIF-5A에 대해 영향을 미치는 siRNAs를 사용하는 것으로 IL-8을 야기하는 인터페론 신호전달 경로를 차단했다는 것을 보여준다. 도 81은 HT-29 세포에서 인터페론 감마에 반응하여 아포토시스 eIF-5A의 상향조절(8시간에서 4배)을 나타내는 웨스턴 블롯을 나타낸다.

(실시예 18)

#### 인간 사상관 배양

캐나다 온타리오 디비전의 Eye Bank로부터 사후 48시간 이내의 한 쌍의 인간의 안구를 준비하였다. 시신경 유두(부착된 전극으로)는 제거되었고 항생물질/항진균, 글루타민 및 10% FBS를 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's 배지(DMEM) 내에 3시간 동안 두었다. 시신경 유두(OH) 버튼은 각 조직 샘플로부터 회수하였고 정밀한 해부 가위로 4개의 작은 조각으로 잘게 썰었다. 외식편은 DMEM 배지에서 12.5cm<sup>2</sup> 플라스틱 배양 플라스크에서 배양되었다. 생존 가능한 외식편에서

한달 이내에 성장이 관찰되었다. 세포가 한번 90% 합류에 도달하면 세포는 트립시나이즈되고(trypsinize) 사상판(LC) 및 정상세포 개체를 생성하기 위해 특이적인 2차 배양을 필요로 하게 된다. 구체적으로는 LC 세포는 젠타마이신, 글루타민 및 10% FBS를 함유한 DMEM에서 25cm<sup>2</sup>에서 2차 배양되었고 반면 정상세포는 FBS없이 EBM 완전 배지(Clonetics)를 함유하는 25cm<sup>2</sup> 플라스크에 전개되었다. 세포는 이러한 절차에 의하여 부양되었고 2차 배양되었다.

특이적인 2차 배양에 의해 얻어진 세포 개체의 확인 및 개체 순도는 8-웰 배양 슬라이드에서 특이적인 형광 항체 염색을 이용하여 특징지어졌다. 세포는 10% 포르말린 용액으로 고정되었고 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)로 3번 세척되었다. DPBS에서 무지방 우유 2%로 블로킹(blocking)한 후 항체는 DPBS내 1% BSA에서 희석되었고 6 웰에서 세포에 적용되었다. 남아있는 두 개의 웰은 오직 1% 소 형청 알부민(BSA) 용액만으로 처리되었고 대조군으로써 1차 항체는 없었다. 세포는 실온에서 1시간 동안 1차 항체로 인큐베이트되었고 그후 DPBS로 3번 세척되었다. 적절한 2차 항체는 DPBS내 1% BSA에서 희석되었고 각 웰에 첨가되었으며 1시간 동안 인큐베이트되었다. DPBS로 세척한 후 슬라이드는 물에서 세척되었고 공기 건조되었으며 플루오로마운트(Vector Laboratories)로 뒤덮였었다. 면역형광 염색은 적절한 필터로 형광 현미경으로 관찰되었고 1차 항체로 처리되지 않은 대조 웰과 비교되었다. 모든 1차 항체는 특별히 언급하지 않는 한 Sigma로부터 얻어졌다. 모든 2차 항체는 Molecular Probes로부터 얻어졌다. LC 세포를 확인하기 위해 사용된 1차 항체는 다음과 같다: 항-콜라겐 I, 항-콜라겐 IV, 항-라미닌(laminin), 항-세포 피브로넥틴(cellular fibronectin), 항-GFAP(glial fibrillary acidic protein) 및 항-알파-평활근 액틴. 세포 개체가 만약 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 라미닌, 세포 피브로넥틴, 알파 평활근 액틴에 대해서는 양성으로 염색되었고 글리아섬유상(GFAP)에 대해서는 음성으로 염색되었다면 세포 개체는 LC 세포로 구성되는 것으로 결정되었다. 본 연구에서는 두 세트의 인간 안구가 배양을 개시하는데 이용되었다. LC 세포주 #506 및 #517는 각각 83세 남성과 17세 남성의 시신경 유두로부터 얻어졌다. 모든 LC 세포주는 충분히 특징지어졌고 90% LC 세포보다 더 많이 포함하는 것으로 밝혀졌다.

#### LC 세포의 처리

아포토시스는 50μM 캄포테신(Sigma)과 10ng/ml TNF-α(Leinco Technologies)의 화합물을 이용하여 사상판 세포내로 유도되었다. 캄포테신과 TNF-α의 화합물이 캄포테신 또는 TNF-α를 단독으로 이용할 때보다 아포토시스 유도에 있어서 훨씬 효과적이라는 것이 발견되었다.

#### siRNAs의 구축 및 트랜스펙션

인간 eIF-5A1에 대해 영향을 미치는 siRNAs(small inhibitory RNAs)는 사상판 세포에서 eIF-5A1의 발현을 특히 억제하기 위해 사용되었다. 6개의 siRNAs는 *Silencer*<sup>TM</sup> siRNA 구축 키트(Ambion Inc.)를 이용하여 생체 내 전사에 의해 발생되었다. 4개의 siRNAs는 인간 eIF-5A에 대해 발생되었다(siRNAs #1 ~ #4). 2개의 siRNAs는 대조군으로써 이용되었다; 키트내로 공급된 GAPDH에 영향을 미치는 siRNA, 그 자신은 eIF-5A를 타겟으로 하지 않지만 eIF-5A-특이적 siRNA #1의 역서열을 갖는 siRNA(siRNA #5). 이 siRNAs는 제조업자의 프로토콜에 따라 발생되었다. eIF-5A 및 대조 siRNA 타겟은 서열은 다음과 같았다: siRNA #1 5' AAAGGAATGACTTCCAGCTGA 3' (서열번호 81); siRNA #2 5' AAGATCGTCGAGATGTCTACT 3'(서열번호 82); siRNA #3 5' AAGGTCCATCTGGTTGGTATT 3'(서열번호 83); siRNA #4 5' AAGCTGGACTCCTCCTACACA 3'(서열번호 84); siRNA #5 5' AAAGTCGACCTTCAGTAAGGA 3'(서열번호 85). 사상판 세포는 LipofectAMINE 2000을 이용하여 siRNA로 트랜스펙트되었다. 사상판 세포는 세포 합류가 40~70%인 때에 트랜스펙트되었고 트랜스펙션에 앞서 3일 동안 웰 당 7500개의 세포로 8-웰 배양 슬라이드 위에서 일반적으로 뿌려졌다. 8-웰 배양 슬라이드의 하나의 웰에 대한 트랜스펙션 배지의 충분한 양은 Opti-Mem(Sigma) 내에서 siRNA 25.5 pmole을 최종 부피가 21.2 μl가 될 때까지 희석하는 것으로 준비되었다. 0.425 μl 리포펙타민 2000은 Opti-Mem 내에서 최종 부피가 21.2 μl가 될 때까지 희석되었고 실온에서 7~10분 동안 인큐베이트되었다. 희석된 리포펙타민 2000 혼합물은 그 후 희석된 siRNA 혼합물에 첨가되었고 실온에서 20~30분 동안 인큐베이트되었다. 세포는 세포에 혈청-없는 배지 135μl를 첨가하고 트랜스펙션 배지 42.4 μl로 덮여지기 전에 혈청-없는 배지로 한번 세척되었다. 세포는 4시간 동안 다시 성장 챔버에 놓여졌다. 인큐베이션 후 혈청-없는 배지 65μl + FBS 30%가 세포에 첨가되었다. 웨스턴 블롯 분석에 사용되기 위한 세포 내로 siRNA의 트랜스펙션은 부피가 2.3배 증가된 것을 제외하고는 8-웰 슬라이드에서의 트랜스펙션과 동일한 조건을 이용하여 24-웰 플레이트에서 수행되었다. 트랜스펙션 후, 사상판 세포는 아포토시스를 유발시키기 위해 50μM 캄포테신(Sigma) 및 10ng/μl TNF-α(Leinco Technologies)로 처리에 앞서 72시간 동안 인큐베이트되었다. 세포 용해질은 그 후 웨스턴 블롯을 위해 채취되거나 아포토시스를 위해 실험되었다.

#### 아포토틱 세포의 검출

24시간 동안 TNF- $\alpha$  및 캄포테신으로 처리된 트랜스펙트된 세포는 아포토시스를 겪는 세포의 백분율을 결정하기 위해 Hoescht 33258로 염색되었다. 간단히 말하면, 세포는 순수한 메탄올 및 결정 아세트산이 3 : 1의 비율로 구성된 혼합물로 고정되었고 그 후 Hoescht 염색(PBS 내의 0.5  $\mu$ g/ml Hoescht 33258)으로 인큐베이트되었다. 암조건에서 10분간 인큐베이션 후 염색된 용액은 버려졌고 배양 슬라이드의 웰을 분리하는 챔버는 제거되었고 슬라이드는 탈이온수로 1분 동안 3번 세척되었다. 세척 후 McIlvaine 완충액(0.021 M 시트르산, 0.058 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; pH 5.6)가 세포에 몇 방울 첨가되었고 커버슬립으로 덮여졌다. 염색된 세포는 UV 필터를 사용하여 형광 현미경으로 관찰되었다. 밝게 염색되거나 파괴된 핵을 갖는 세포는 아포토틱으로 기록되었다. 웰 당 최소 200개의 세포가 계산되었다. DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL(Promega)은 아포토틱 세포의 특유한 특징인 DNA 파괴를 검출하기 위해 사용되었다. Hoescht 염색 후 배양 슬라이드는 증류수로 간단하게 세척되었고 PBS(137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)에서 5분 동안 두 번 슬라이드를 담구는 것에 의해 더욱 세척되었고 두 번의 세척 사이에 종이 타월 위에 슬라이드를 블롯(blot)하였다. 세포는 5분 동안 PBS 내 0.2% Triton X-100 내에 적셔지는 것에 의해 투수되었다(permeabilize). 세포는 그 후 PBS에서 5분 동안 두 번 슬라이드를 담구는 것에 의해 다시 세척되었고 두 번의 세척 사이에 종이 타월 위에 슬라이트를 블롯하였다. 평형 완충액[200 mM 카고딜레이트칼(pH 6.6), 25 mM Tris-HCl(pH 6.6), 0.2 mM 디티오프레이톨, 0.25 mg/ml 소 혈청 알부민 및 2.5 mM 염화코발트] 25  $\mu$ l를 웰 당 첨가하였고 5~10분 동안 인큐베이트하였다. 평형 완충액, 뉴클레오타이드 믹스[50  $\mu$ M 플루오레세인-12-dUTP, 100  $\mu$ M dATP, 10 mM Tris-HCl(pH 7.6) 및 1 mM EDTA] 및 말단 디옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 효소(terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme, Tdt, 25 U/ $\mu$ l)가 각각 45:5:1의 비율로 혼합된 반응 혼합물 30  $\mu$ l이 평형 동안 각 웰에 대해 준비되었다. 평형 완충액 안에서의 인큐베이션 후 반응 혼합물 30  $\mu$ l이 웰 당 첨가되었고 커버슬립으로 덮여졌다. 반응은 1시간 동안 37°C의 암조건에서 계속되었다. 반응은 2 X SSC[0.3M NaCl 및 30 mM 구연산 나트륨(pH 7.0)]에서 슬라이드를 담구는 것에 의해 종결되었고 15분 동안 인큐베이트하였다. 슬라이드는 그 후 5분 동안 세 번 PBS에 담구는 것에 의해 세척되었다. PBS는 Kim wipe로 웰 주변을 빨아들이는 것으로 제거되었고 마운팅 배지 한 방울(Oncogene research project, JA1750-4ML)은 각각의 웰에 첨가되었고 슬라이드는 커버슬립으로 덮여졌다. 세포는 Hoescht-염색된 핵의 수를 세기 위해 UV 필터(UV-G 365, 필터 세트 487902)를 이용하여 형광 현미경으로 관찰되었다. 밝게 염색되거나 파괴된 핵을 갖는 어떠한 세포도 아포토틱으로 계산되었다. 동일한 시야에서 세포는 그 후 플루오레세인 필터를 이용하여 관찰되었고(녹색 H546, 필터 세트 48915) 밝은 녹색으로 형광된 어떠한 핵도 아포토틱으로 계산되었다. 시야에서 아포토틱 세포의 백분율은 플루오레세인 필터를 이용하여 계산된 밝은 녹색 핵의 수를 UV 필터 하에서 계산된 총 핵의 수로 나누는 것에 의해 계산되었다. 웰 당 최소 200개의 세포가 계산되었다.

### 단백질 추출 및 웨스턴 블롯 분석

단백질은 24-웰 플레이트 상에서 성장된 사상관 세포로부터 PBS(8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 0.24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 내에서 세포를 2회 세척한 후 세포용해 완충액[2% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] 50  $\mu$ l를 첨가함으로써 웨스턴 블롯으로 분리되었다. 세포 용해액은 마이크로원심분리관에 수집되었고, 5분간 끓이고, 사용되기 전까지 -20°C에서 보관되었다. 단백질 농도는 Bicinchoninic Acid Kit(BCA; Sigma)를 이용하여 측정되었다. 웨스턴 블롯에 대해 총 단백질의 5  $\mu$ g이 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리되었다. 분리된 단백질은 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인으로 옮겨졌다. 멤브레인은 블러킹 용액(PBS 내의 스킵 우유 분말, 0.02% 아지드화나트륨)으로 1시간 동안 인큐베이트되었고 PBS-T(PBS + 0.05% Tween-20) 내에서 15분간 3회 세척되었다. 멤브레인은 4°C에서 PBS-T 내에 밤새 보관되었다. 다음날 상온으로 데워진 후 멤브레인은 1  $\mu$ g/ml 폴리비닐 알코올로 30초간 블록되었다. 멤브레인은 탈이온수에서 5회 헹궈진 후 PBS 내 5% 우유 용액 내에서 30분간 블록되었다. 1차 항체는 멤브레인과의 인큐베이션에 앞서 PBS 내 5% 우유 용액 내에서 30분간 예비 인큐베이트되었다. 사용된 1차 항체는 1 : 20,000의 항-eIF-5A(BD Transduction Laboratories) 및 항- $\beta$ -액틴(Oncogene)이었다. 멤브레인은 PBS-T로 3회 세척되었고 PBS 내의 1% 우유 내에서 희석된 적당한 HRP-컨쥬게이트 2차 항체로 1시간 동안 인큐베이트되었다. 블롯은 세척되었고 ECL Plus Western blotting detection kit(Amersham Pharmacia Biotech)가 퍼옥시다제-컨쥬게이트 결합된 항체를 검출하는데 사용되었다.

### 결과

2개의 사상관(LC) 세포주가 83세(#506)부터 17세(#517)까지의 연령에 걸친 남성 제공자로부터 수득된 시신경 유두로부터 수득되었다. 인간 사상관으로부터 분리된 세포는 다른 연구에서 관찰된 돌기 핵(prominent nucleus)과 동일하게 넓고 평평한 형태를 지녔다(Lambert *et al.*, 2001). 다른 그룹의 특성과 일치하게 LC 세포는 세포 프브로텍틴(도 82b), 라미닌(도 82c), 콜라겐 I 및 콜라겐 IV(데이터는 나타나지 않음)을 포함한 많은 세포의 매트릭스 단백질뿐만 아니라 알파 평활근 액틴(도 82a)에 대한 면역반응성을 나타내었다(Clark *et al.*, 1995; Hernandez *et al.*, 1998; Hernandez and Yang,



2000; Lambert *et al.*, 2001). 신경교원섬유산단백질(GFAP)와의 LC 세포의 음성적 면역반응성도 앞선 발견과 일치하게 관찰되었다(도 82d)(Lambert *et al.*, 2001). 이들 발견은 시신경 유두 성장세포보다는 LC 세포로서 분리된 세포의 동정을 지지한다.

TNF- $\alpha$ 가 녹내장 과정 동안 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지기 때문에 TNF- $\alpha$ 의 세포독성 효과에 대한 LC 세포의 민감성이 조사되었다. 융합성 LC 세포가 캄포테신 및 TNF- $\alpha$  또는 캄포테신과 TNF- $\alpha$ 의 결합에 48시간 동안 노출되었다(도 83). Hoesht 염색은 TNF- $\alpha$  단독으로는 LC 세포에 세포독성적이지 않음을 나타내었다. 캄포테신의 처리는 LC 세포의 약 30% 세포 사멸을 유발하였다. 그러나 아포토시스 내의 상승적 증가는 LC 세포가 캄포테신과 TNF- $\alpha$  모두로 처리될 때 관찰되었고, 이러한 처리는 48시간까지 LC 세포의 45%의 사멸을 유발하였다. 이들 결과는 LC 세포가 캄포테신에 의해 아포토시스에 대해 프라임될 때 TNF- $\alpha$ 의 세포독성 효과에 반응할 수 있음을 나타낸다.

EIF-5A는 세포 분열에 필요한 것으로 알려진 핵세포질성 서틀 단백질이고, 최근 아포토시스에도 관련되는 것으로 제안되었다. 캄포테신 또는 캄포테신 플러스 TNF- $\alpha$ 에 의해 아포토시스를 진행하도록 유도된 LC 세포 내에서 eIF-5A 단백질 발현을 조사하였다. eIF-5A의 발현은 다소 감소된 것을 제외하고는 캄포테신으로의 처리시 유의적으로 변화되지 않았다(도 84A). 그러나 eIF-5A 단백질의 유의적인 상향조절은 캄포테신 플러스 TNF- $\alpha$  처리의 8 및 24시간 후 관찰되었다(도 84B). 이들 결과는 eIF-5A 발현이 TNF- $\alpha$ 으로의 노출에 의해 특이적으로 유도되고, 발현이 아포토시스의 유도에 상호관련됨을 나타낸다. 이는 TNF- $\alpha$  수용체 결합의 아포토시스 경로 다운스트림 내에서의 eIF-5A의 역할을 지적한다.

LC 세포 내에서 TNF- $\alpha$ -유도된 아포토시스 동안 eIF-5A 발현의 중요성을 조사하기 위해 eIF-5A를 타겟하는 4개의 siRNAs 시리즈(siRNAs #1~#4)가 고안되었고 시험관 내 전사에 의해 합성되었다. eIF-5A 단백질 발현의 억제에 있어서의 siRNA의 유효성을 측정하기 위해 LC 세포주 #506 및 #517이 각각의 siRNAs로 트랜스펙트되었고 세포 용해질 내의 eIF-5A 단백질 발현이 72시간 후 조사되었다(도 85). 또한 비교를 위해 세포는 siRNA #1과 동일한 화학 조성을 지니나 eIF-5A를 인식하지 않는 GAPDH에 대한 siRNA 및/또는 대조군 siRNA(siRNA #5)으로 트랜스펙트되었다. eIF-5A에 대해 지시된 모든 siRNA는 LC 세포주 모두에서 eIF-5A 발현을 유의적으로 억제시킬 수 있었다. GAPDH siRNA가 단순히 siRNA #1의 역서열을 지니나 세포 타겟을 지니지 않는 대조군 siRNA #5와 달리 그의 타겟 단백질 GAPDH의 발현을 억제할 수 있는 활성적 siRNA이기 때문에 GAPDH siRNA는 추가적 대조군으로서 사용되었다(데이터는 나타나지 않음). 또한 eIF-5A에 대한 4개 siRNA 모두는 TNF- $\alpha$ 와 캄포테신으로의 24시간 처리에 의해 유도된 아포토시스로부터 트랜스펙트된 LC 세포(#506)를 보호할 수 있었다(도 86). 세포 사멸을 검출하는 Hoesht 염색을 이용하여 siRNA(siRNAs #1~#4)는 59%(siRNA #1), 35%(siRNA #2), 50%(siRNA #3) 및 69%(siRNA #4)까지 LC 세포의 아포토시스를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 흥미롭게도, GAPDH에 대한 siRNA도 42%까지 LC 세포의 아포토시스를 감소시킬 수 있었다(도 86). GAPDH는 소뇌 뉴런의 아포토시스 동안의 제안된 기능을 포함하여 당분해 효소로서 역할 외에 세포적 기능을 지니는 것으로 알려져 있다(Ishitani and Chung, 1996; Ishitani *et al.*, 1996a; Ishitani *et al.*, 1996b). 유사한 실험에서 siRNA #1은 TNF- $\alpha$ 와 캄포테신에 반응하여 53%까지 LC 세포주 #517의 아포토시스를 감소시킬 수 있고 이는 eIF-5A siRNA가 다른 시신경 유두로부터 분리된 LC 세포에 대해 보호적임을 나타냄을 증명하였다(도 87). 이들 결과는 eIF-5A가 아포토시스 동안 기능을 지니고 LC 세포 내에서 TNF- $\alpha$ -유도된 아포토시스를 이끄는 경로 내 중요한 매개물임을 나타낸다.

TNF- $\alpha$ 와 캄포테신에 노출된 LC 세포가 일반적인 아포토시스에 의해 죽는 것을 확인하기 위해 DNA 단편화가 말단 디옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제-매개 dUPT-디작시게닌(digoxigenin) Nick(니크) 말단 표지(TUNEL) 방법을 이용하여 원위 치에서 평가되었다. LC 세포(#506)은 eIF-5A siRNA(siRNA #1) 또는 대조군 siRNA(siRNA #5)로의 트랜스펙션 3일 후 TNF- $\alpha$ 와 캄포테신으로 24시간 동안 처리되었다. 또한 세포는 핵의 시각화를 촉진시키기 위해 Hoescht로 염색되었다. 대조군 siRNA로 트랜스펙트된 LC 세포의 46%가 TUNEL 염색에 양성인 반면 eIF-5A siRNA #1으로 트랜스펙트된 LC 세포의 8%만이 양성적으로 표지되어 이는 eIF-5A siRNA가 아포토시스로부터 80% 이상의 보호를 제공하였음을 나타내었다(도 88). 유사한 결과가 대조군 siRNA에 대해 아포토시스로부터 60% 이상의 보호를 제공한 eIF-5A siRNA #4로 수득되었다(데이터는 나타나지 않음).

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1.

아포토시스 인자 5A1의 발현을 감소시킬 수 있는 약제를 투여하는 것을 포함한 세포 내 사이토카인의 수준을 감소시키는 방법에 있어서, 상기 아포토시스 인자 5A1 발현의 감소는 상기 사이토카인의 발현을 감소시켜 세포 내 사이토카인의 수준을 감소시킴을 특징으로 하는 방법

## 청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 사이토카인은 전-염증성(pro-inflammatory) 사이토카인임을 특징으로 하는 방법

## 청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-1, IL-18, IL-6 또는 TNF- $\alpha$ 임을 특징으로 하는 방법

## 청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 약제는 아포토시스 인자 5A1에 상보적인 서열을 지닌 안티센스 뉴클레오타이드를 포함함을 특징으로 하는 방법

## 청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 약제는 아포토시스 인자 5A1에 상보적인 서열을 지닌 siRNA를 포함함을 특징으로 하는 방법

## 청구항 6.

제 4항에 있어서, 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 서열번호: 35, 37 및 39로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 지님을 특징으로 하는 방법

## 청구항 7.

제 4항에 있어서, 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 서열번호: 35, 37 및 39로 구성된 군으로부터 선택된 서열에 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이저함을 특징으로 하는 방법

## 청구항 8.

제 5항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호: 30, 31, 32 및 33으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 지님을 특징으로 하는 방법

## 청구항 9.

제 5항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호: 30, 31, 32 및 33으로 구성된 군으로부터 선택된 서열에 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이저함을 특징으로 하는 방법

## 청구항 10.

서열번호: 35, 37 및 39로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 지닌 폴리뉴클레오타이드

#### 청구항 11.

서열번호: 30, 31, 32 및 33으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 지닌 siRNA

#### 청구항 12.

아폽토시스 인자 5A1의 발현 감소를 가능하게 하는 약제를 투여하는 것을 포함한 p53 발현의 감소 방법에 있어서, 상기 아폽토시스 인자 5A1의 발현 감소는 p53의 발현을 감소시킴을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 13.

아폽토시스 인자 5A1의 발현 감소를 가능하게 하는 약제를 투여하는 것을 포함한 Bcl-2 발현의 증가 방법에 있어서, 상기 아폽토시스 인자 5A1의 발현 감소는 p53의 발현을 증가시킴을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 14.

제 6항 또는 제 7항의 안티센스 폴리뉴클레오타이드를 환자에게 투여하는 것을 포함한 환자의 TNF-알파 수준을 감소시키는 방법

#### 청구항 15.

제 8항 또는 제 9항의 siRNA를 환자에게 투여하는 것을 포함한 환자의 TNF-알파 수준을 감소시키는 방법

#### 청구항 16.

인자 5a1의 발현을 감소시키는 약제를 증가된 IL-1, TNF-알파 또는 IL-6에 의해 특성화된 병리학적 상태를 지닌 포유류에 투여하는 것을 포함한 상기 병리학적 상태의 치료 방법

#### 청구항 17.

제 16항에 있어서, 상기 병리학적 상태는 관절염-류마티스 및 골관절염, 천식, 알레르기, 동맥염증, 크론씨 병, 염증성 장 질환(ibd), 궤양성 대장염, 관상동맥성 심장질환, 낭포성섬유증, 당뇨병, 낭창, 다발성 경화증, 그레이브스 병, 치근막염, 녹내장 및 황반변성, 원추각막을 포함하는 안구표면 질병, 기관 허혈-심장, 신장, 재관류 손상, 패혈증, 다발성 골수증, 기관 이식거부, 건선 및 습진으로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 18.

제 1항에 있어서, 상기 세포는 상피 세포임을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 19.

아폽토시스 인자 5A1의 발현 감소를 가능하게 하는 약제를 투여하는 것을 포함한 단핵세포 분화의 저해 또는 제거 방법에 있어서, 상기 아폽토시스 인자 5A1의 발현 감소는 단핵세포 분화를 저해하거나 제거함을 특징으로 하는 방법

## 청구항 20.

제 19항에 있어서, 상기 약제는 아폽토시스 인자 5a1에 상보적인 서열을 지닌 안티센스 뉴클레오타이드를 포함함을 특징으로 하는 방법

## 청구항 21.

제 19항에 있어서, 상기 약제는 아폽토시스 인자 5a1에 상보적인 서열을 지닌 siRNA를 포함함을 특징으로 하는 방법

## 청구항 22.

제 20항에 있어서, 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 서열번호: 35, 37 및 39로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 지님을 특징으로 하는 방법

## 청구항 23.

제 20항에 있어서, 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 서열번호: 35, 37 및 39로 구성된 군으로부터 선택된 서열에 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징함을 특징으로 하는 방법

## 청구항 24.

제 21항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호: 30, 31, 32 및 33으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 지님을 특징으로 하는 방법

## 청구항 25.

제 21항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호: 30, 31, 32 및 33으로 구성된 군으로부터 선택된 서열에 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징함을 특징으로 하는 방법

## 청구항 26.

망막 신경절 세포 내의 아폽토시스-특이적 eIF-5A1 발현을 억제시키는 것을 포함한 녹내장 안구 내 망막 신경절 세포 사멸의 방지 방법

## 청구항 27.

제 26항에 있어서, 상기 아폽토시스-특이적 eIF-5A1의 발현 억제는 상기 망막 신경절 세포로의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 투여를 포함하고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 인간 아폽토시스-특이적 eIF-5A1에 대해 타겟됨을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 28.

제 27항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 26 또는 27임을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 29.

제 28항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 26 또는 서열번호: 26에 상보적인 서열에 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 30.

제 28항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 27 또는 서열번호: 27에 상보적인 서열에 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 31.

인간 아폽토시스-특이적 eIF-5A1에 대해 타겟된 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 사상관 세포를 트랜스펙트하는 것으로 포함한 사상관 세포 내 아폽토시스-특이적 eIF-5A1 발현의 억제 방법에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상기 세포 내의 아폽토시스-특이적 eIF-5A1의 발현을 억제함을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 32.

제 31항에 있어서, 상기 사상관 세포는 인간임을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 33.

제 31항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 26 또는 서열번호: 26에 상보적인 서열에 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 34.

제 31항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 27 또는 서열번호: 27에 상보적인 서열에 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 35.

인간 아폽토시스-특이적 eIF-5A1에 대해 타겟된 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 정상세포를 트랜스펙트하는 것으로 포함한 정상세포 내 아폽토시스-특이적 eIF-5A1 발현의 억제 방법에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상기 세포 내의 아폽토시스-특이적 eIF-5A1의 발현을 억제함을 특징으로 하는 방법

#### 청구항 36.

제 35항에 있어서, 상기 정상세포는 인간임을 특징으로 하는 방법

도면

도면1

TCGAAGACCGGTAAGCACGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTGATATTTTACTGGGAAGAAATAT  
S K T G K H G H A K V H L V G I D I F T G K K Y  
GAAGATATCTGCCCGTCGACTCATAACATGGATGTCCCAACATCAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGC  
E D I C P S T H N M D V P N I K R N D F Q L I G  
ATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTGCCTGAGGGA  
I Q D G Y L S L L Q D S G E V R E D L R L P E G  
GACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCCATG  
D L G K E I E Q K Y D C G E E I L I T V L S A M  
ACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAATAACTGGCTTCCAGGGTGGCGGTGGTGGCAGCA  
T E E A A V A I K A M A K  
GTGATCCATGAGCCTACAGAGGCCCTCCCCAGCTCTGGCTGGGCCCTTGGCTGGACTCCTATCCAATTTA  
TTTGACGTTTTATTTTGGTTTTCTCACCCCTTCAAAGTGTGGGGAGACCCTGCCCTTCACTAGCTCCCT  
TGGCCAGGCATGAGGGAGCCATGGCCTTGGTGAAGCTACCTGCCTCTTCTCTCGCAGCCCTGATGGGGGAAA  
GGGAGTGGGTACTGCCTGTGGTTAGGTTCCCTCTCCCTTTTCTTTTAAATTCATTTGGAATCAGAAAG  
CTGTGGATTCTGGCAAATGGTCTTGTGTCTTTATCCCACTCAAACCATCTGGTCCCTGTTCTCCATAGT  
CCTTCACCCCCAAGCACTGACAGACTGGGGACCAGCCCCCTTCCCTGCCTGTGTCTTCCCCAAACCCC  
TCTATAGGGGTGACAAGAAGAGGAGGGGGGAGGGGACACGATCCCTCCTCAGGCATCTGGGAAGGCCTTGC  
CCCCATGGGCTTTACCTTTCTGTGGGCTTTCTCCCTGACACATTTGTTAAAAATCAAACCTGAATAAAAC  
TACAAGTTTAATATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
(972 NT, 109 aa)

도면2

CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAAGCCTCTTAAATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGG  
M A D D L D F E T G D A G  
CCTCAGCCACCTTCCCAATGCAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGGCCAT  
A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P  
GTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTG  
C K I V E M S T S K T G K H G H A K V H L V G I  
ATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCGTCGACTCATAACATGGATGTCCCAACATCAAAA  
D I F T G K K Y E D I C P S T H N M D V P N I K  
GGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAG  
R N D F Q L I G I Q D G Y L S L L Q D S G E V R  
AGGACCTTCGTCTGCCTGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCC  
E D L R L P E G D L G K E I E Q K Y D C G E E I  
TGATCACAGTGCTGTCCGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCTCGAG  
L I T V L S A M T E E A A V A I K A  
(488 NT, 151 aa)

도면3

CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAAGCCTCTTAAAAATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGG  
M A D D L D F E T G D A G 13  
CCTCAGCCACCTTCCCAATGCAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGGCCAT 144  
A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P  
GTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTG  
C K I V E M S T S K T G K H G H A K V H L V G I 61  
ATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCGTCGACTCATAACATGGATGTCCCAACATCAAAA  
D I F T G K K Y E D I C P S T H N M D V P N I K 288  
GGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAG  
R N D F Q L I G I Q D G Y L S L L Q D S G E V R 109  
AGGACCTTCGTCGCTGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCC 432  
E D L R L P F G D L G K E I E Q K Y D C G E E I  
TGATCACAGTGCTGTCCGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAATAACTGGCTT  
L I T V L S A M T E E A A V A I K A M A K \* 154  
CCAGGGTGGCGGTGGTGGCAGCAGTGATCCATGAGCCTACAGAGGCCCTCCCCAGCTCTGGCTGGGCCCT 576  
TGGCTGGACTCCTATCCAATTTATTTGACGTTTTATTTGGTTTTCTCACCCCTTCAAACTGTGGGGAGA  
CCCTGCCCTTACCTAGCTCCCTTGGCCAGGCATGAGGGAGCCATGGCCTTGGTGAAGCTACCTGCCTCTTC  
TCTCGCAGCCCTGATGGGGGAAAGGAGTGGGTACTGCCTGTGGTTAGGTTCCCTCTCCCTTTTTCTTTT  
TAATTCATTTGGAATCAGAAAGCTGTGGATTCTGGCAATGGTCTTGTGTCTTTATCCCACTCAAAACCA 864  
TCTGGTCCCTGTTCTCCATAGTCCTTACCCCCAAGCACCCTGACAGACTGGGGACCAGCCCCCTTCCCT  
GCCTGTGTCTCTTCCAAACCCCTCTATAGGGGTGACAAGAAGAGGAGGGGGGAGGGGACACGATCCCTCC 1008  
TCAGGCATCTGGGAAGGCCTTGGCCCATGGGCTTTACCCTTTCTGTGGGCTTTCTCCCTGACACATTTGT  
TAAAAATCAAACTGAATAAACTACAAGTTTAAATATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1139

(1139 NT, 154 aa)

도면4

GCTGTGTATTATTGGGCCATAAGAACCACATACCTGTGCTGAGTCTGCACTCACAGACGGCTCACTGGGT  
A V Y Y W A H K N H I P V L S P A L T D G S L G  
GACATGATCTTTTTCCATTCTATAAAAACCCAGGCTTGGTCTGGACATCGTTGAAGACCTGCGGCTCATC  
D M I F F H S Y K N P G L V L D I V E D L R L I  
AACATGCAGGCCATTTTCGCAAGCGCACTGGGATGATCATCTGGGTGGAGGCGTGGTCAAGCACCACATC  
N M Q A I F A K R T G M I I L G G G V V K H H I  
GCCAATGCTAACCTCATGCGGAATGGAGCTGACTACGCTGTTTATATCAACACAGCCAGGAGTTTGATGGC  
A N A N L M R N G A D Y A V Y I N T A Q E F D G  
TCAGACTCAGGAGCCCGCCAGATGAGGCTGTCTCCTGGGGCAAGATCCGGATGGATGCACAGCCAGTAAAG  
S D S G A R P D E A V S W G K I R M D A Q P V K  
GTCTATGCTGATGCATCTCTGGTTTTCCCTTGTGTTGGCTGAGACATTCGCCCCAAAGGCAGATGCCCTTC  
V Y A D A S L V F P L L V A E T F A Q K A D A F  
AGAGCTGAGAAGAATGAGGACTGAGCAGATGGGTAAGACGAGGCTTCTGCCACACCTTTATTATTATT  
R A E K N E D  
GCATACCAACCCCTCCTGGGCCCTCTCCTTGGTCAGCAGCATCTTGAGAATAAATGGCCTTTTTGTTGGTTT  
CTGTAAAAAAGGACTTTAAAAAAAAAAAAA

(606 NT, 151 aa)









도면8

랫 vs. 인간 (BC000751 or NM\_001970) 100.0% 동일성

	10	20	30	40	50	60
랫	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	.....					
인간	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
랫	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDQFLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	.....					
인간	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDQFLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150			
랫	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA A VAIKAMAK					
	.....					
인간	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA A VAIKAMAK					
	130	140	150			

도면9

랫 vs. 인간 (NM\_020390) 82.5% 동일성

	10	20	30	40	50	60
랫	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	.....					
인간	MADEIDFTTG DAGASSTYPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
랫	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDQFLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	.....					
인간	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDYQLICIQDGYLSLLTETGEVREDLKLPEGELG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150			
랫	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA A VAIKAMAK					
	.....					
인간	KEIEGKYNAGEDVQVSVMCAMSEY A VAIKP-CK					
	130	140	150			

도면10

랫 vs. 마우스 (BC003889)100.0% 동일성

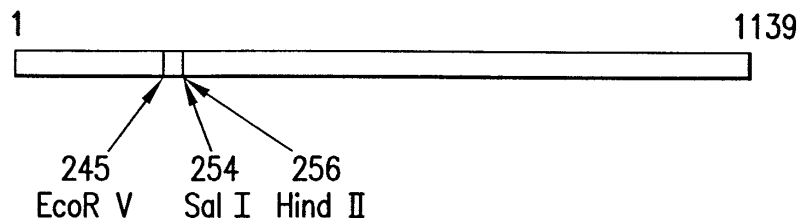
	10	20	30	40	50	60
랫	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	::					
마우스	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
랫	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	::					
마우스	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150			
랫	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA AVAIKAMAK					
	::					
마우스	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA AVAIKAMAK					
	130	140	150			

도면11

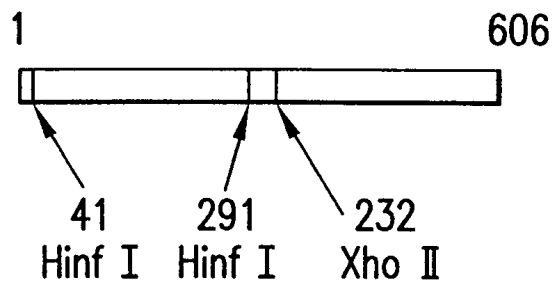
랫 vs. 인간 (BC000333) 87.4% 동일성 (코딩)

	10	20	30	40	50	60
랫	GCTGTG	TATTAT	TGGGCC	CATAAG	AACCAC	ATACCT
인간	TCCGTG	TATTAT	TGGGCC	CAGAAG	AACCAC	ATCCCT
	70	80	90	100	110	120
랫	GGCTCA	CTGGGT	GACATG	ATCTTT	TCCATT	CCTATA
인간	GGCTCG	CTGGGC	GACATG	ATCTTT	TCCATT	CCTACA
	130	140	150	160	170	180
랫	ATCGTT	GAAGAC	CTGCGC	TCAATG	CAGGCC	ATTTTC
인간	ATCGTT	GAGGAC	CTGAGG	CTCATC	AACACAG	GCCATCT
	190	200	210	220	230	240
랫	ATCATC	CTGGTG	GAGGCG	TGGTCA	AGCACC	ACATCG
인간	ATCATT	CTGGGC	GGGCGT	GGTCAAG	CACCAC	ATTGCC
	250	260	270	280	290	300
랫	GGAGCT	GACTAC	GTGTTT	ATATCA	AACACAG	CCAGGAG
인간	GGGGCC	GACTAC	GTGTTT	ATATCA	AACACAG	CCAGGAG
	310	320	330	340	350	360
랫	GCCCGG	CCAGAT	GAGGCT	GTCTCT	CTGGGG	CAAGAT
인간	GCCCGA	CCAGAC	GAGGCT	GTCTCT	CTGGGG	CAAGAT
	370	380	390	400	410	420
랫	GTCTAT	GCTGAT	GCATCT	CTGGTT	TCCCCT	TGCTGG
인간	GTCTAT	GCTGAC	GCCTCC	TGGTCT	TCCCCT	TGCTGG
	430	440	450			
랫	GCAGAT	GCCTTC	AGAGCT	GAGAAG	AATGAG	GAC
인간	ATGGAT	GCCTTC	ATGCAT	GAGAAG	AACGAG	GAC

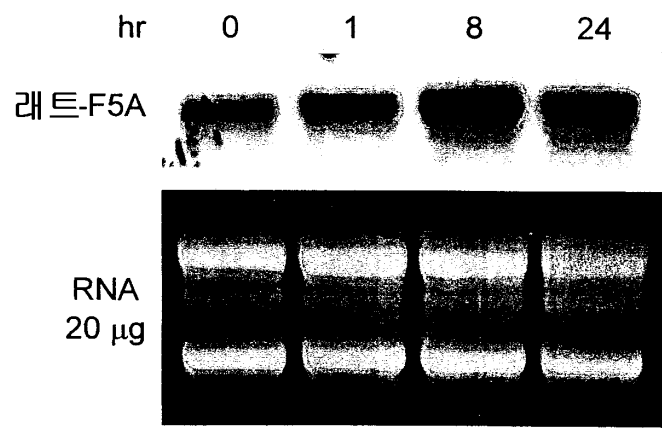
도면12



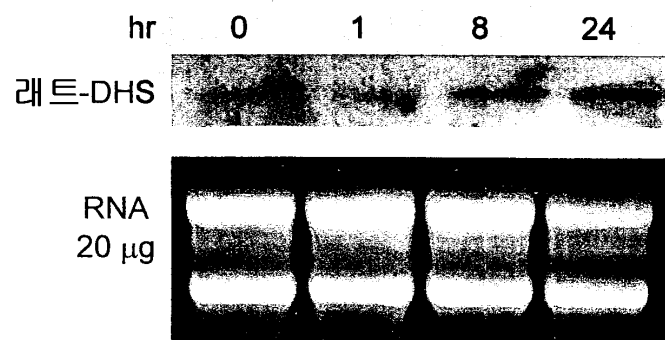
도면13



도면14



도면15





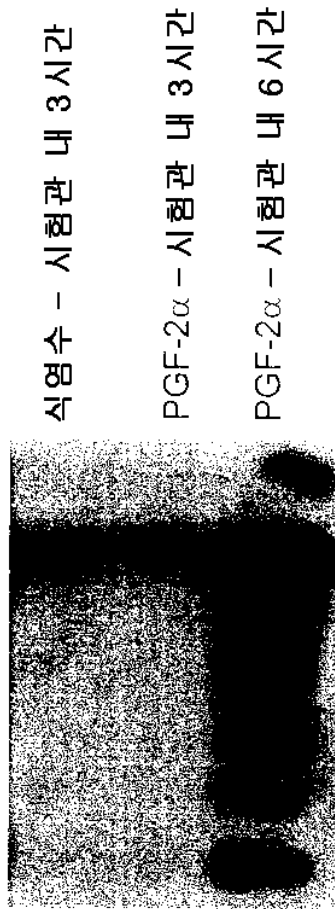
도면16

PGF-2 $\alpha$  처리후 시간

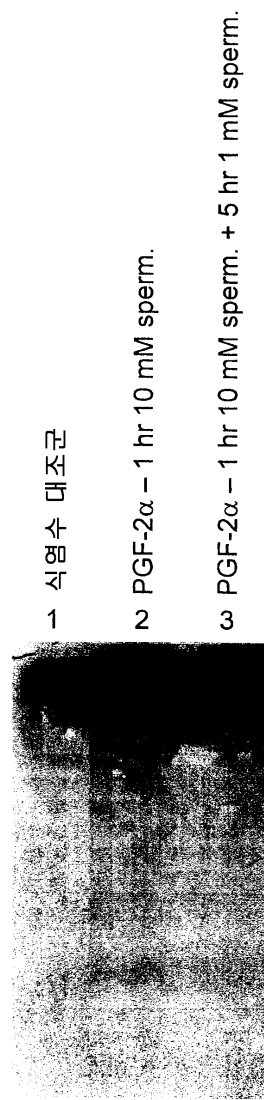
0 1 24



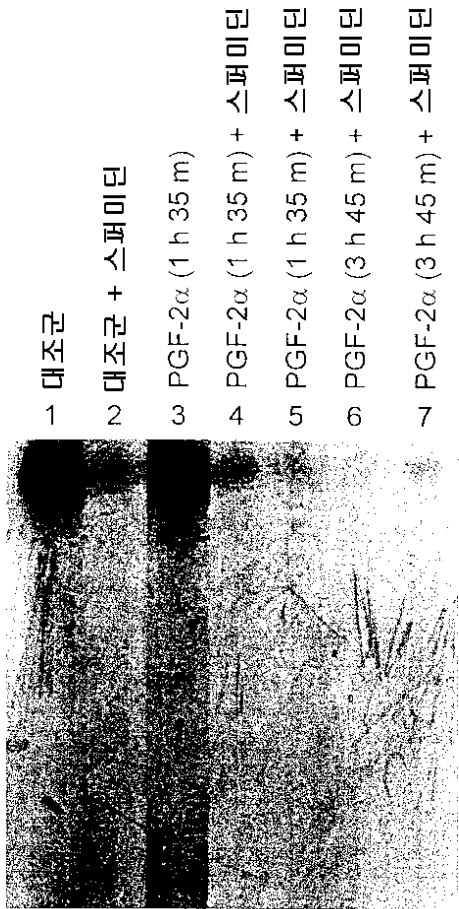
도면17



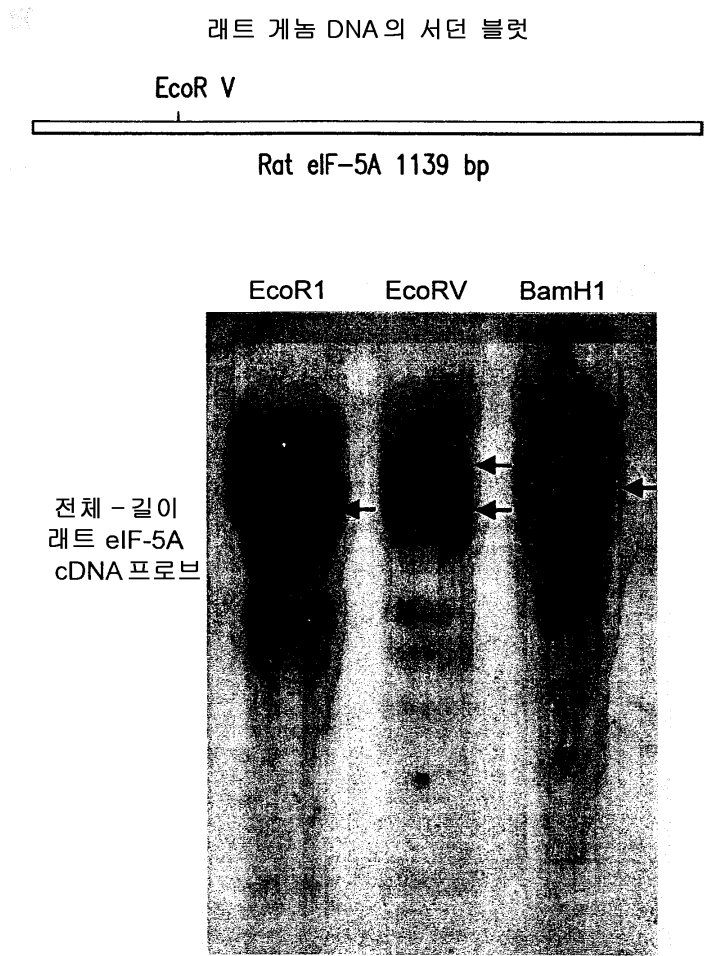
도면18



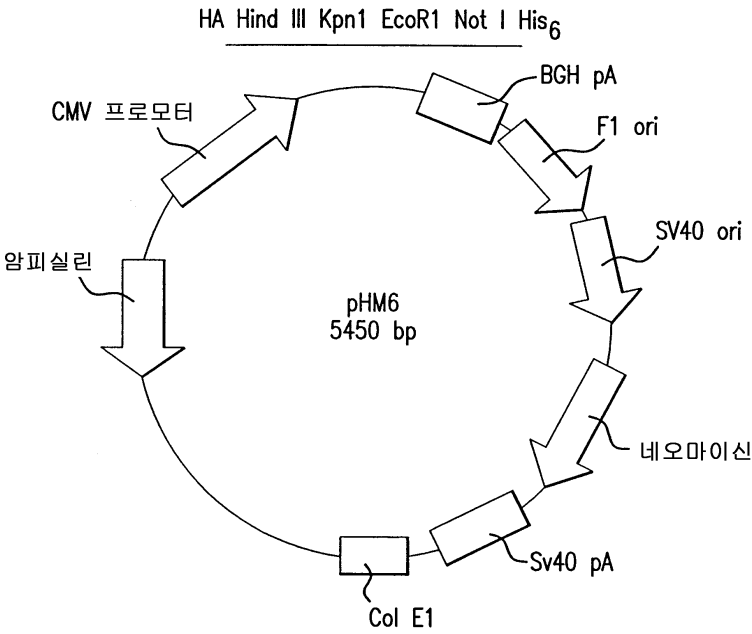
도면19



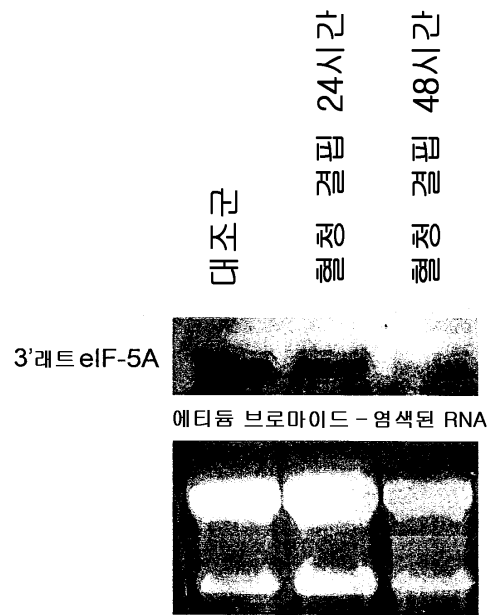
도면20



도면21

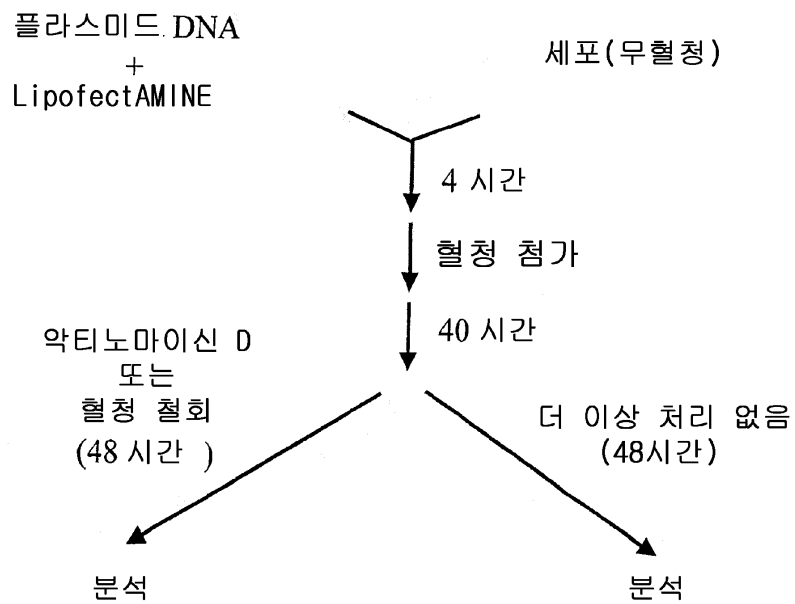


도면22

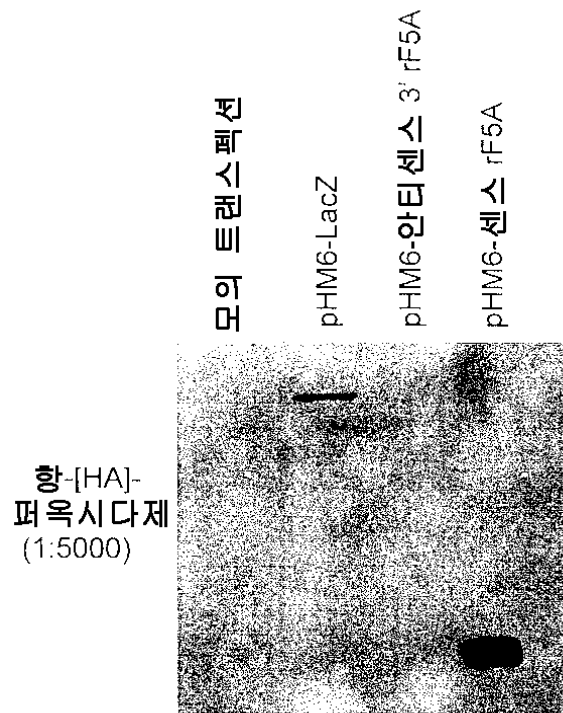


도면23

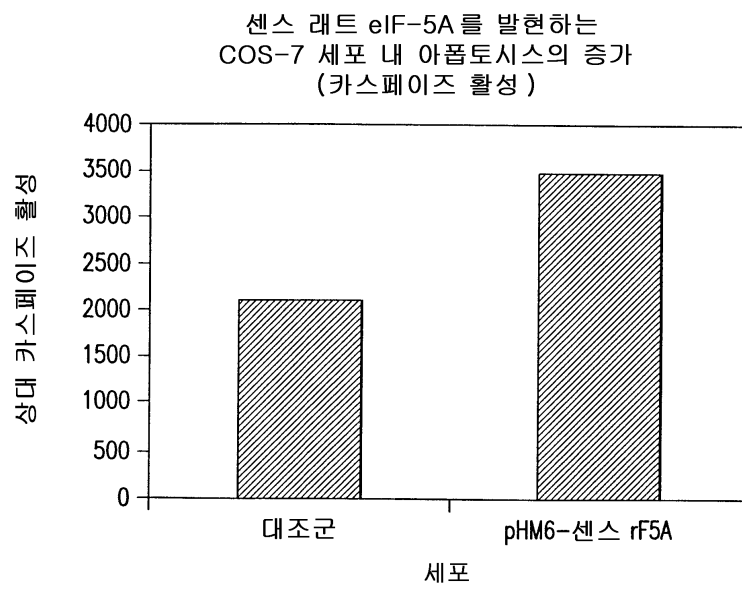
### 순간적 트랜스펙션



도면24

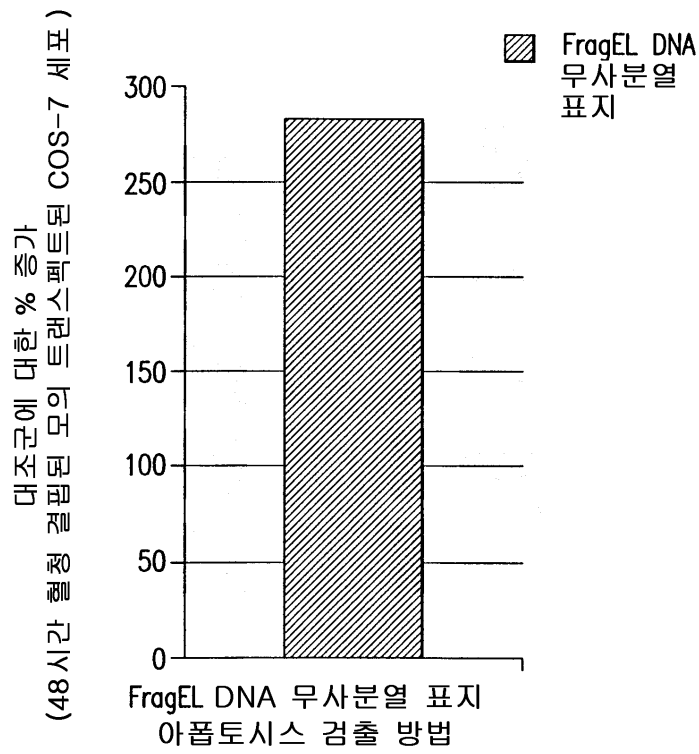


도면25



도면26

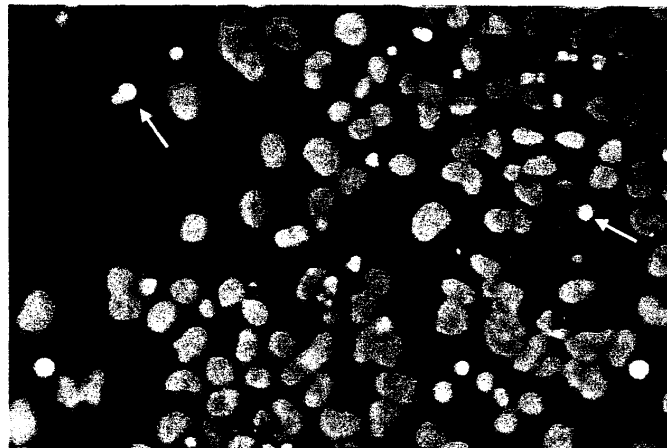
트랜스펙트된 COS-7 세포 혈청의  
아포토시스 세포 수의 증가 퍼센트



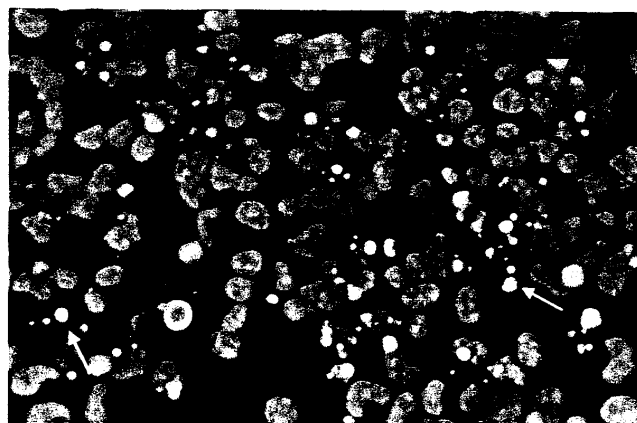


도면27

혈청 결핍된 형질전환 COS-7  
세포의 Hoescht 염색

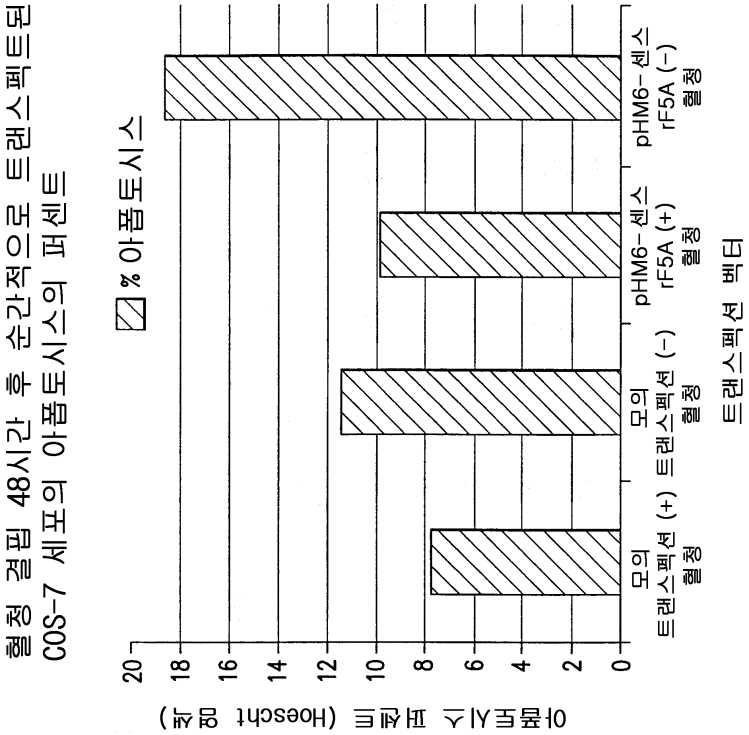


모의 형질전환

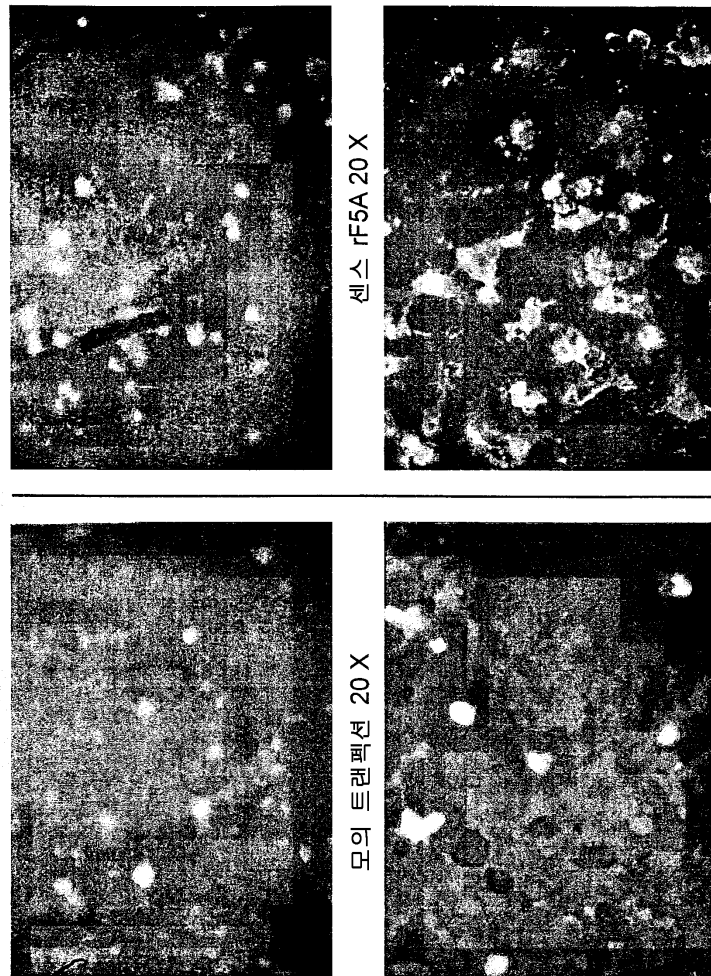


pHm6-센스 래트 F5A

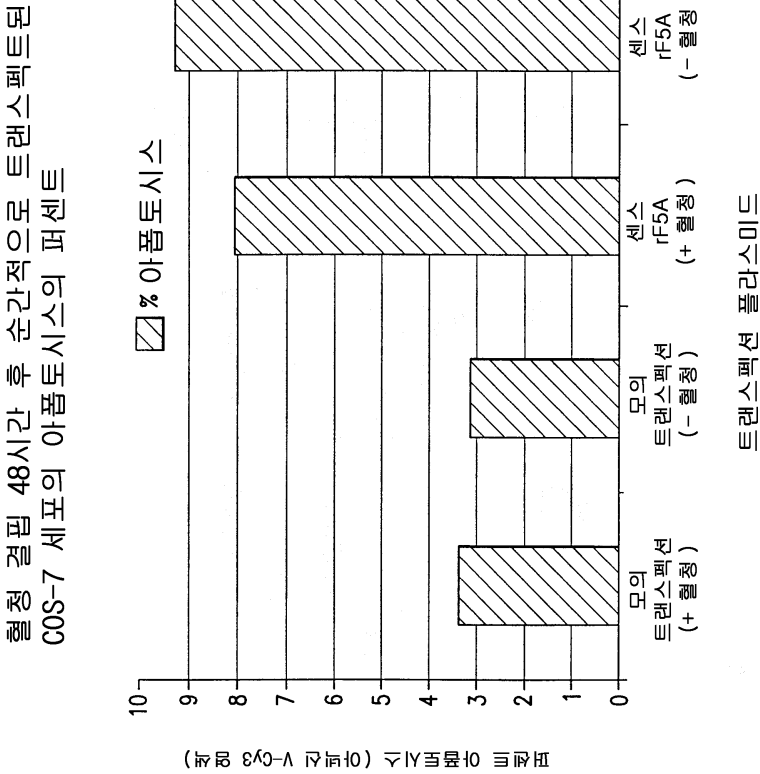
도면28



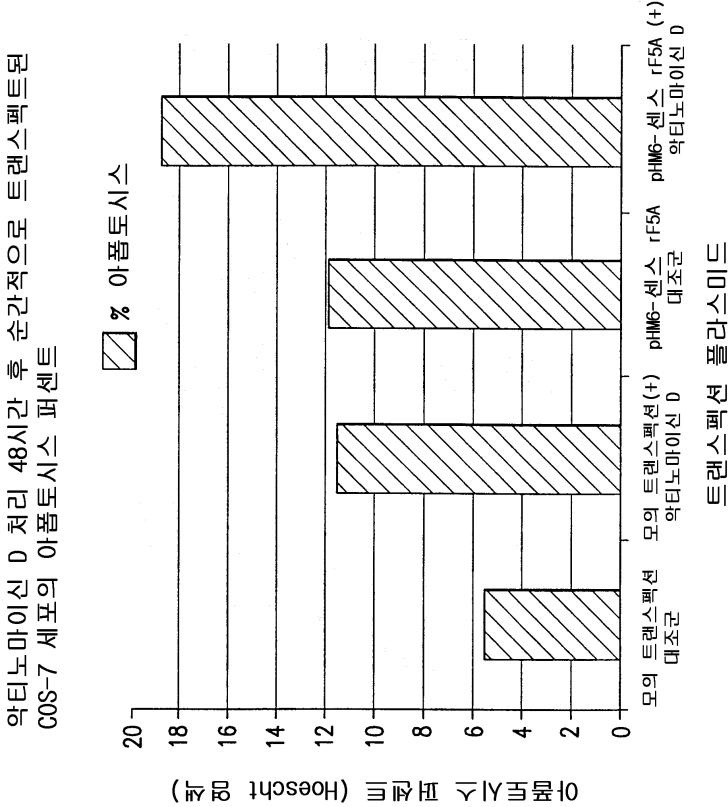
도면29



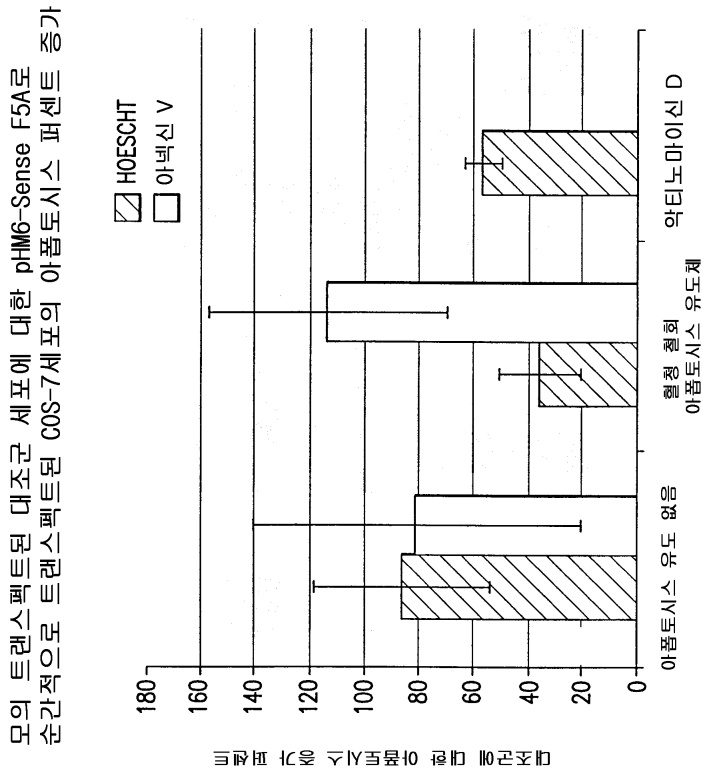
도면30



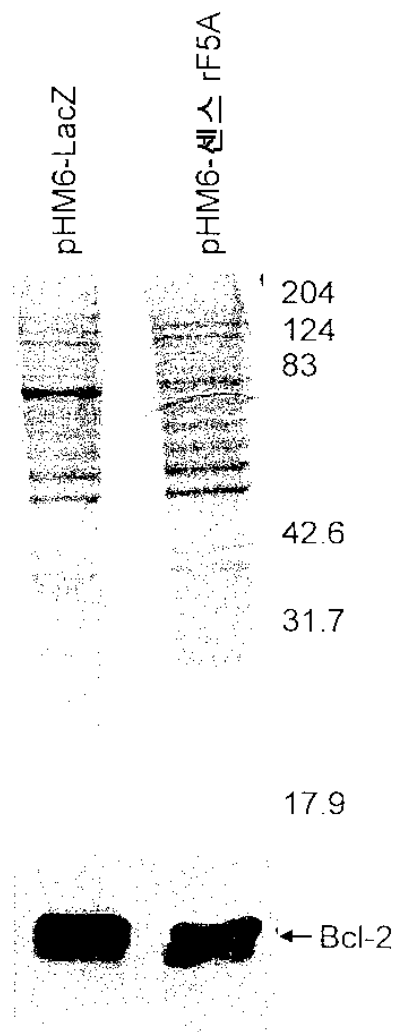
도면31



도면32

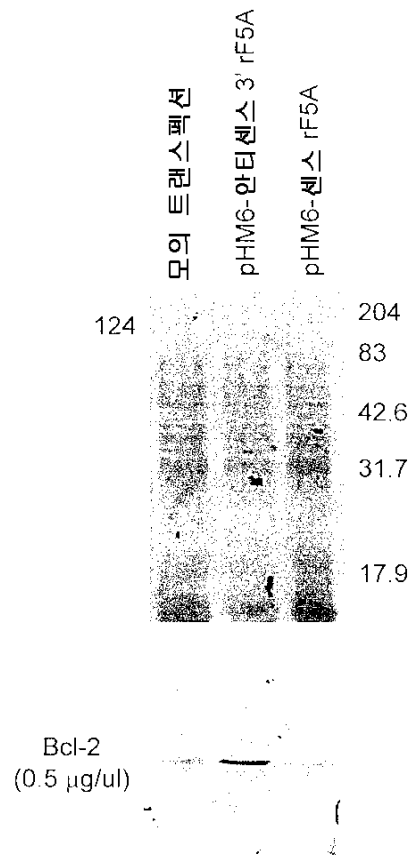


도면33

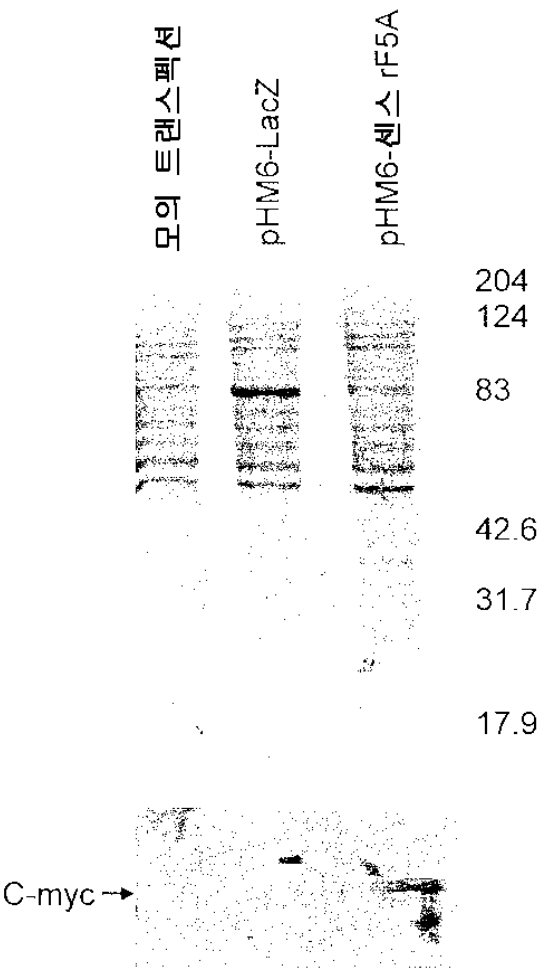


도면34

48 시간 혈청-결핍된 순각적으로 트랜스펙트된  
COS-7 세포 내 Bcl-2 발현 수준

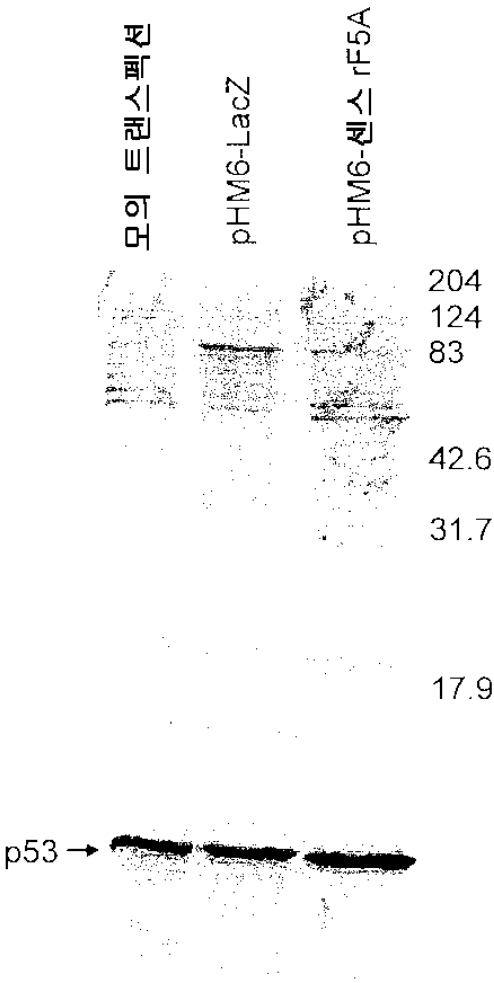


도면35

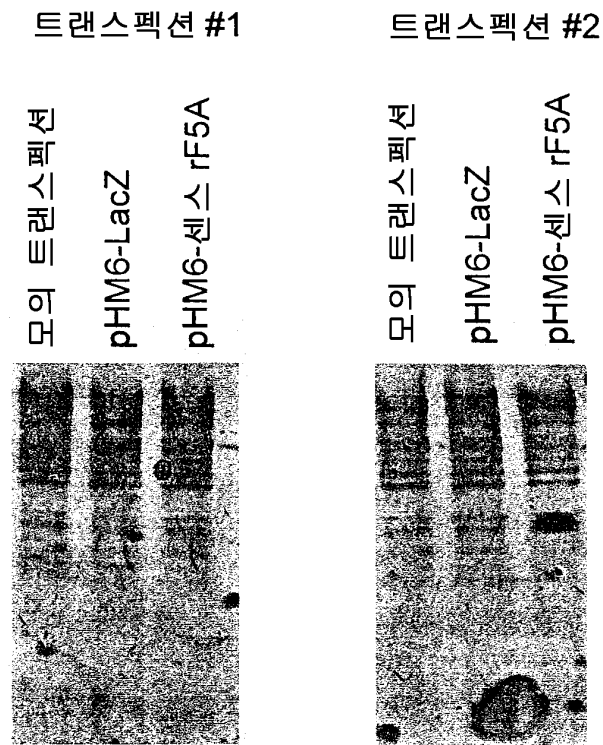




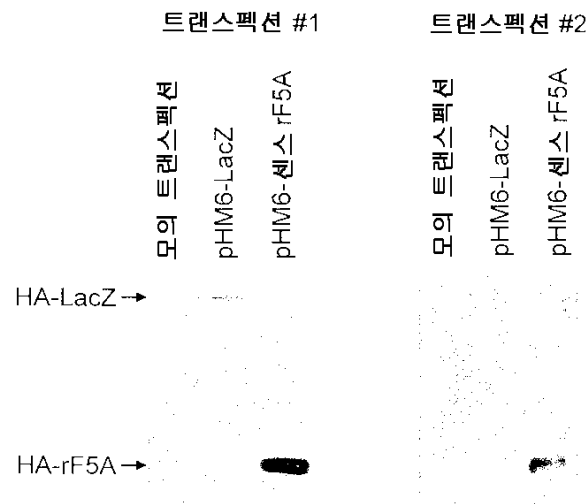
도면36



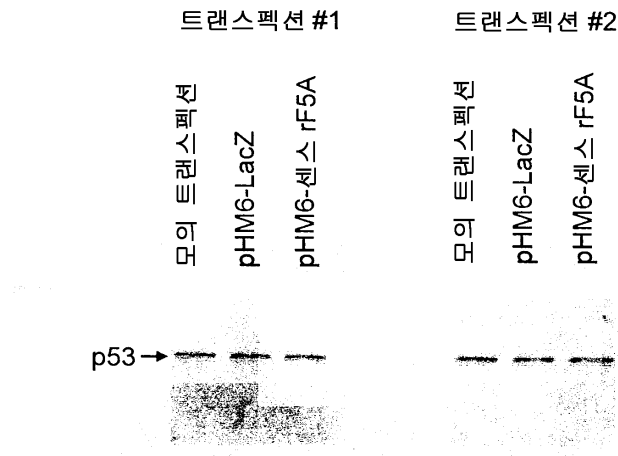
도면37a



도면37b



도면37c



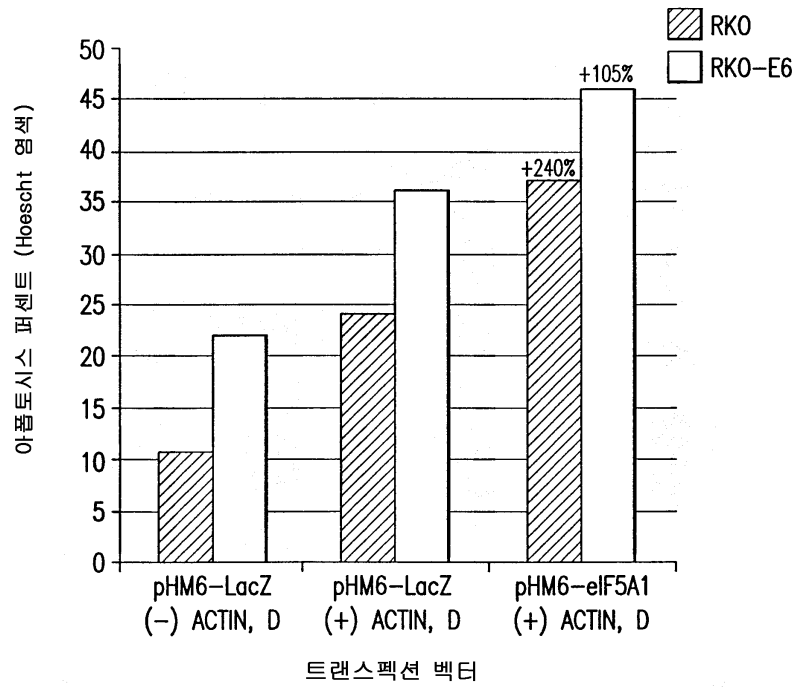
도면38

RK0 세포로부터 분리된 인간 eIF5A2 서열과  
유전자 은행 내 인간 eIF5A2 서열(접근번호 XM\_113401)의 정렬

XM_113401	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRKNGF	VVLKGRPCKI	VEMSTSKTGK
PCR	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRKNGF	VVLKGRPCKI	VEMSTSKTGK
Consensus	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRKNGF	VVLKGRPCKI	VEMSTSKTGK
	51				
XM_113401	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHNMD	VPNIKRNDYQ	LICIQDGYLS
PCR	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHNMD	VPNIKRNDYQ	LICIQDGCLS
Consensus	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHNMD	VPNIKRNDYQ	LICIQDGcLS
	101				
XM_113401	LLTETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSMCA	MSEYAVAIK
PCR	LLTETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSMCA	MSEYAVAIK
Consensus	LLTETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSMCA	MSEYAVAIK
	151				
XM_113401	PCK				
PCR	PCK				
Consensus	PCK				

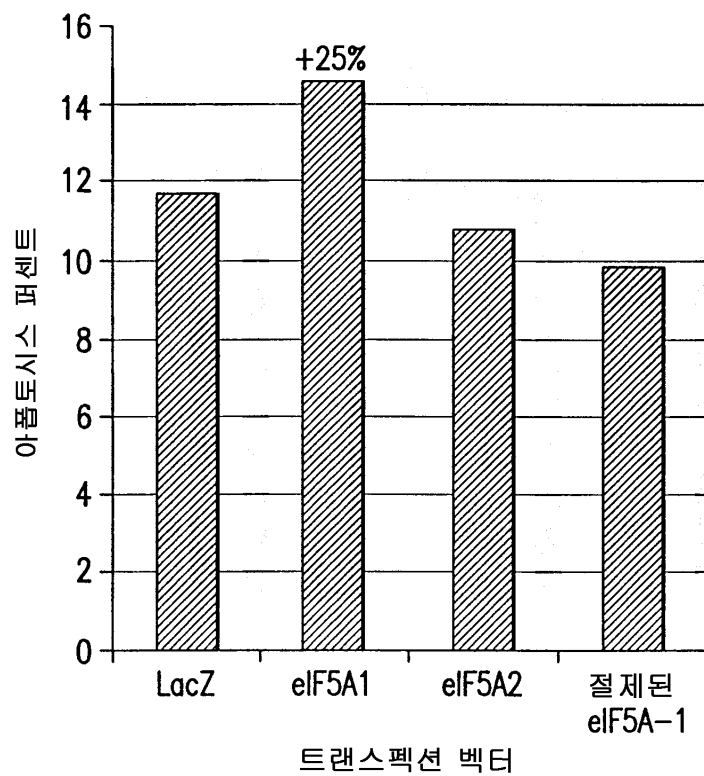
도면39

악티노마이신 D로 처리된 순간적으로 트랜스펙트된 RK0  
및 RK0-E6 세포의 아폽토시스 퍼센트



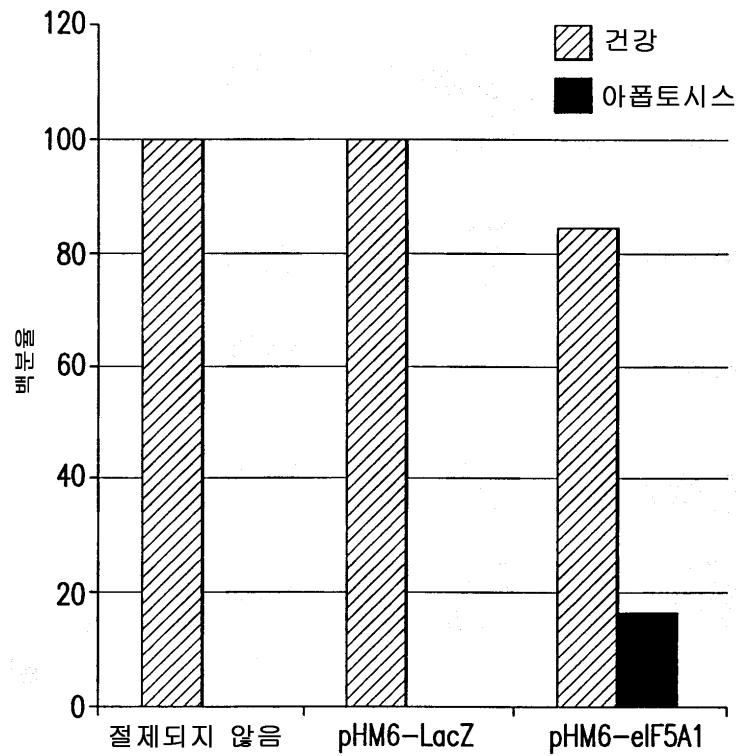
도면40

순간적으로 트랜스펙트된 RK0 세포의  
아폽토시스 퍼센트



도면41

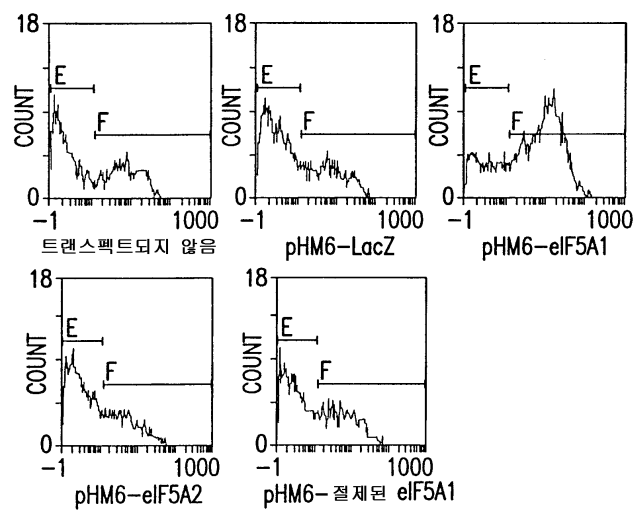
트랜스펙션 48시간 후 건강 및 아포토시스 RK0세포의 백분율



트랜스펙션 벡터  
트랜스펙션 효율 = 30%

도면42a

트랜스펙션 벡터

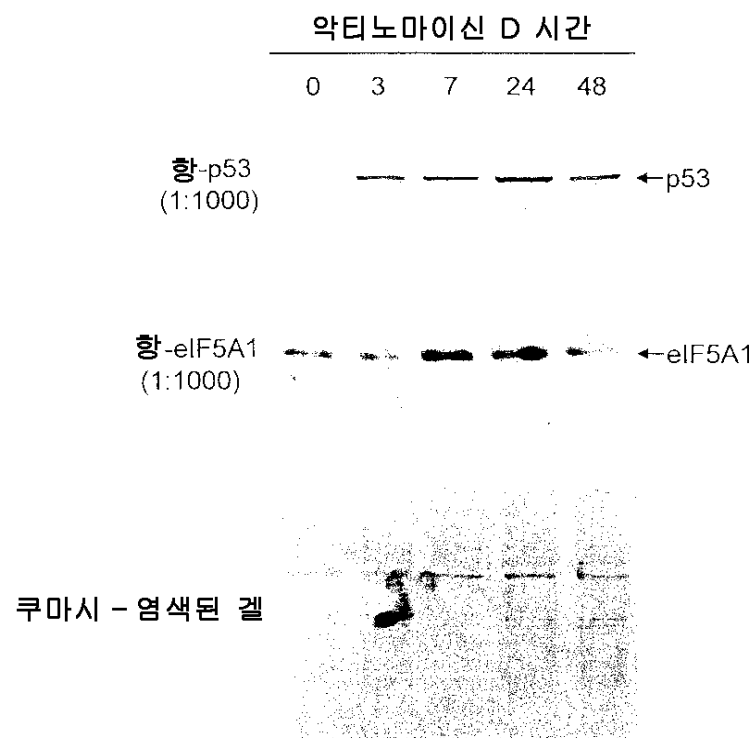


도면42b

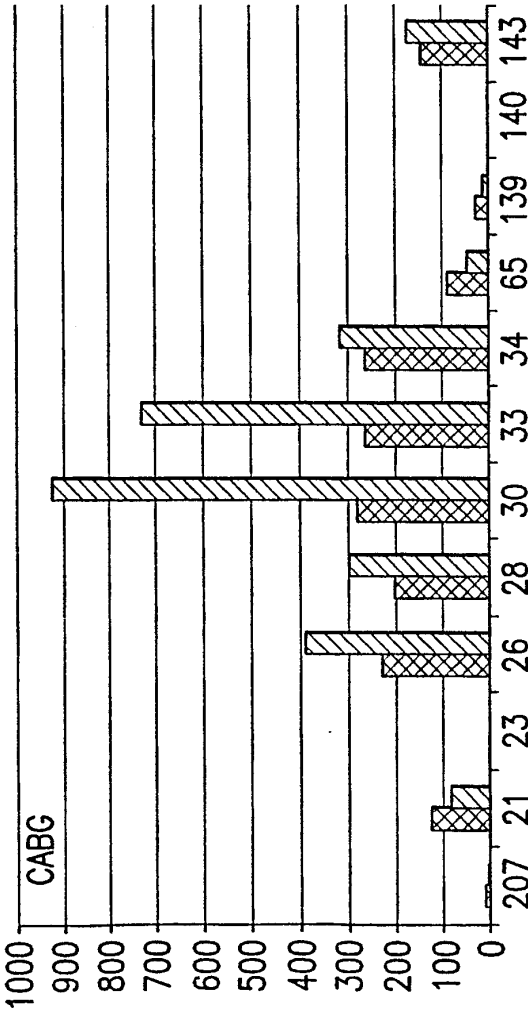
트랜스펙트된 플라스미드	아포토시스 퍼센트
트랜스펙트되지 않음	21.2 %
pHM6-Lac Z	21.7 %
pHM6-eIF5A1	60.7 % (80%)*
pHM6-eIF5A2	20.5 %
pHM6-절제된 eIF5A1	24.1 %

\* 트랜스펙트된 세포 내 백그라운드 아포토시스 및 트랜스펙션 효율에 대해 보정됨

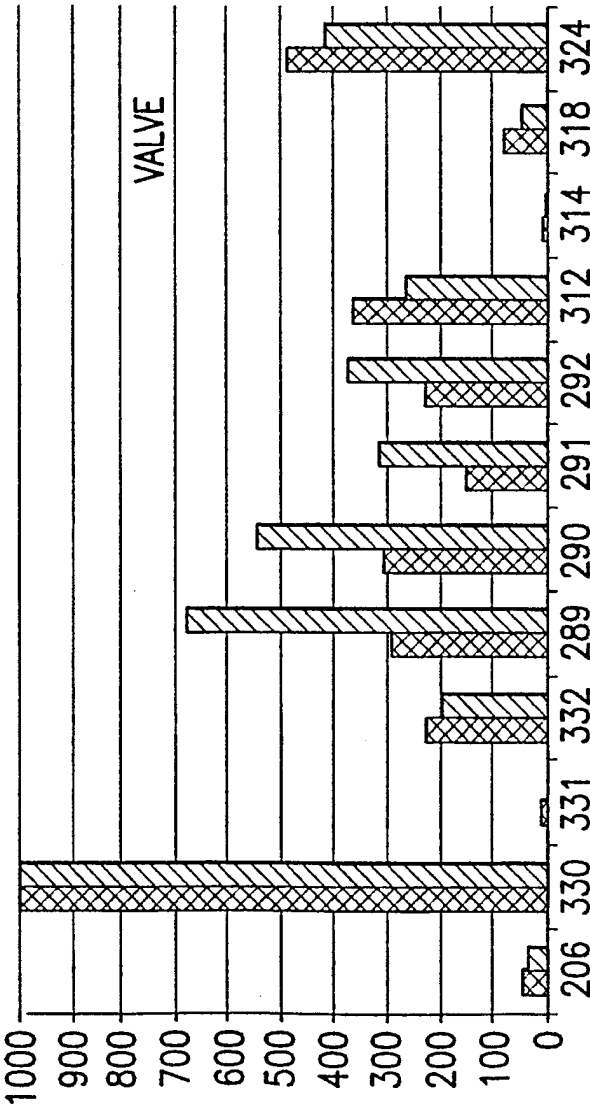
도면43



도면44

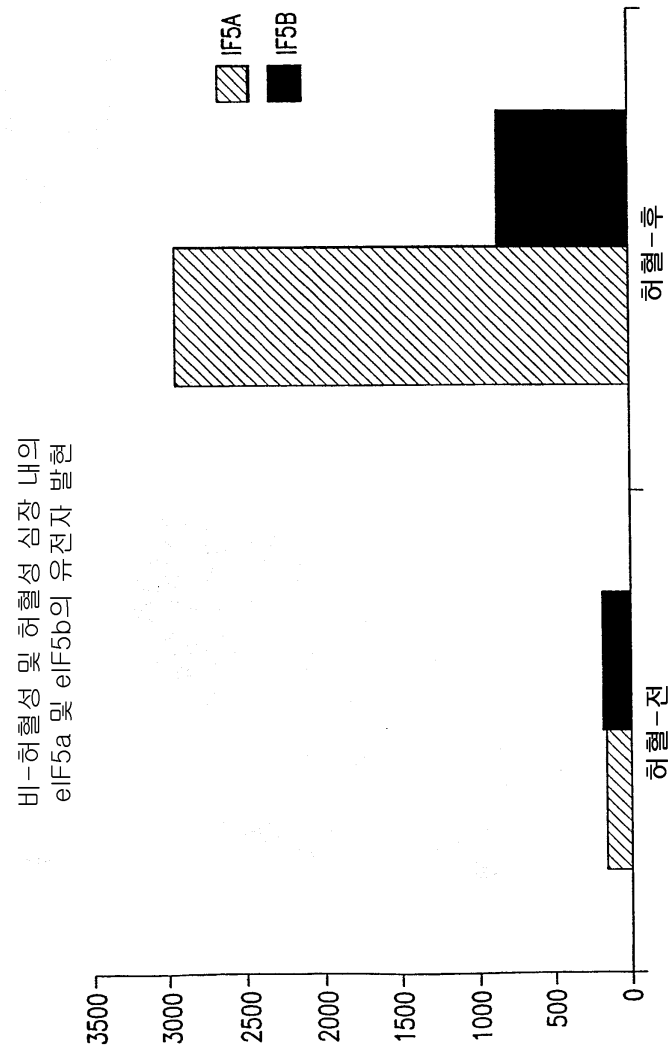


도면45

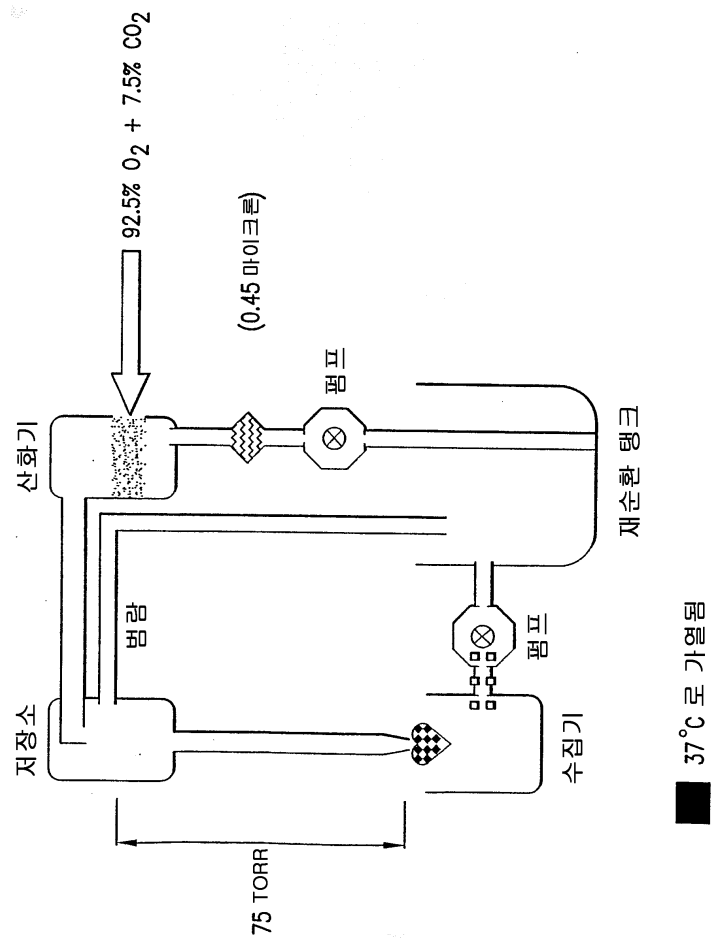




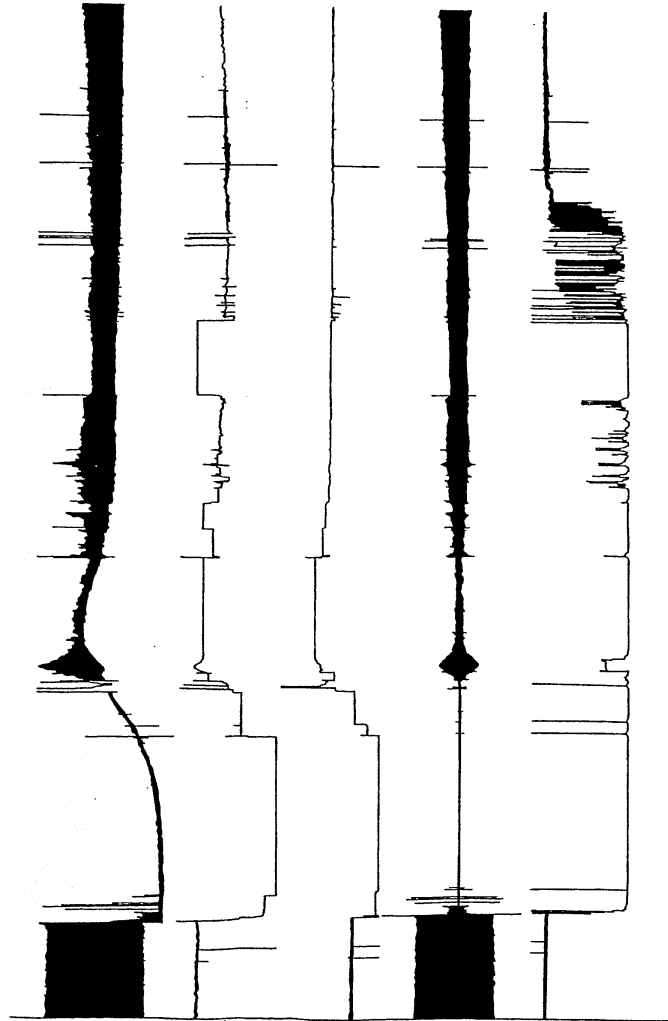
도면46



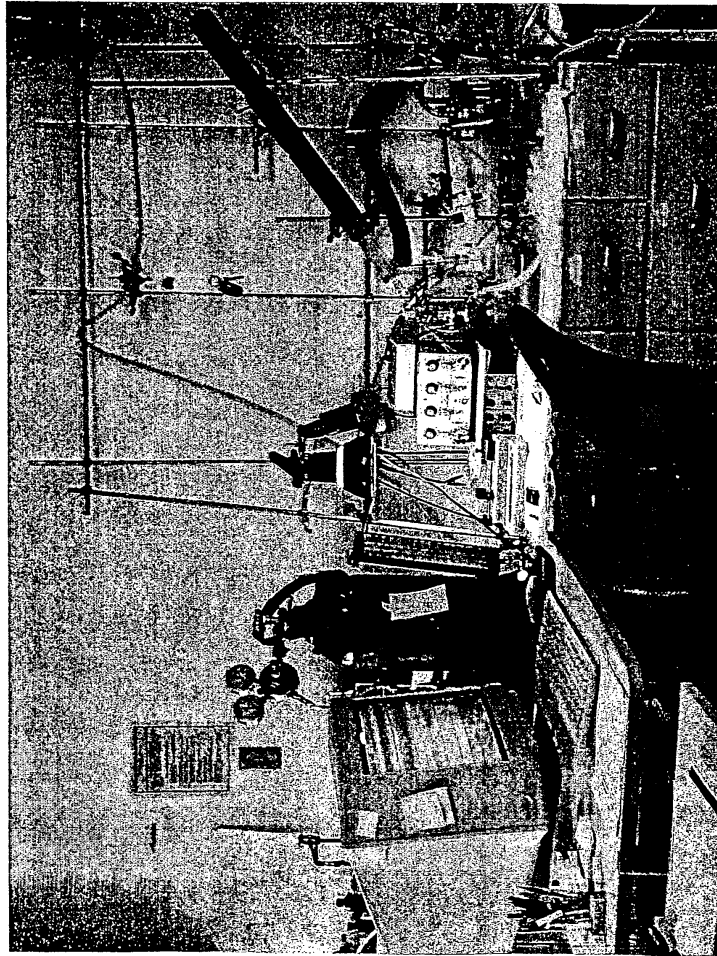
도면47



도면48



도면49



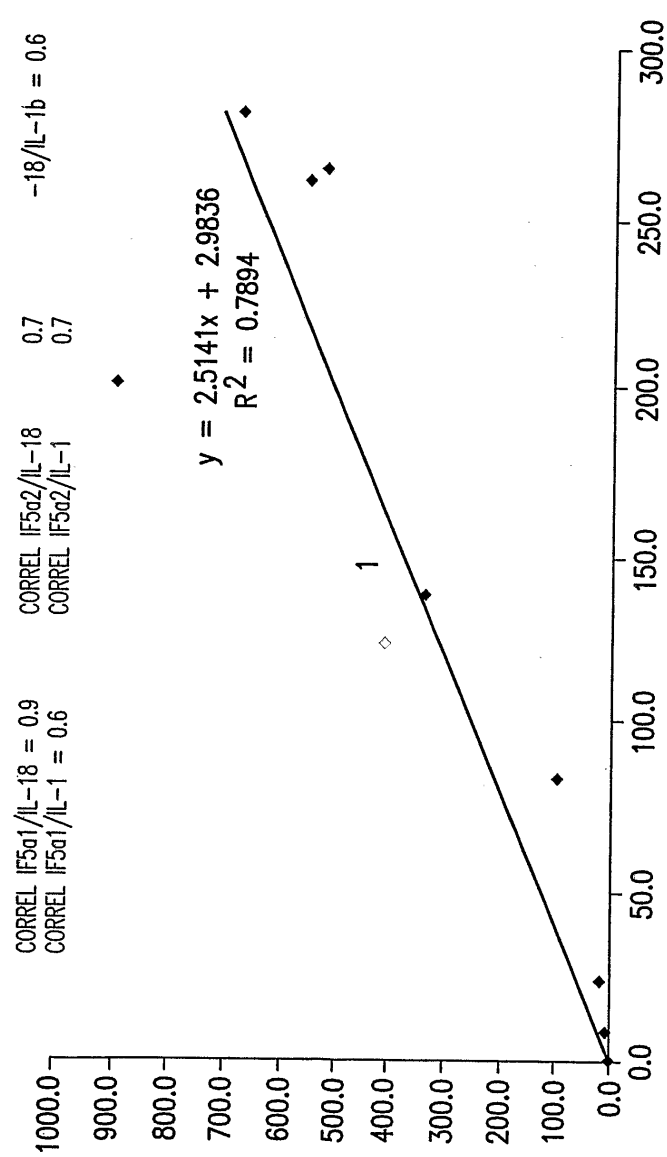
도면50a

환자	Ds	IF5a1 pg/ng rRNA	IF5a2 pg/ng rRNA	0.5	2.0	IL-18 pg/ng rRNA	IL-1b pg/ng rRNA
207	CABG	9.0	2.4	3.8	0.3	10.1	7.2
21	CABG	123.2	81.6	1.5	0.7	405.9	41.5
23	CABG	0.1	0.0	11.0	0.1	0.0	0.0
26	CABG						
28	CABG	200.4	294.6	0.7	1.5	894.1	49.7
30	CABG	279.4	921.2	0.3	3.3	669.8	71.0
33	CABG	260.1	723.9	0.4	2.8	545.6	105.1
34	CABG	263.4	309.3	0.9	1.2	520.0	19.9
65	CABG	82.9	43.1	1.9	0.5	98.2	20.2
139	CABG	23.9	7.0	3.4	0.3	22.7	57.3
140	CABG	0.9	0.0	#DIV/0!	0.0	0.1	0.0
143	CABG	137.7	169.5	0.8	1.2	338.7	77.9

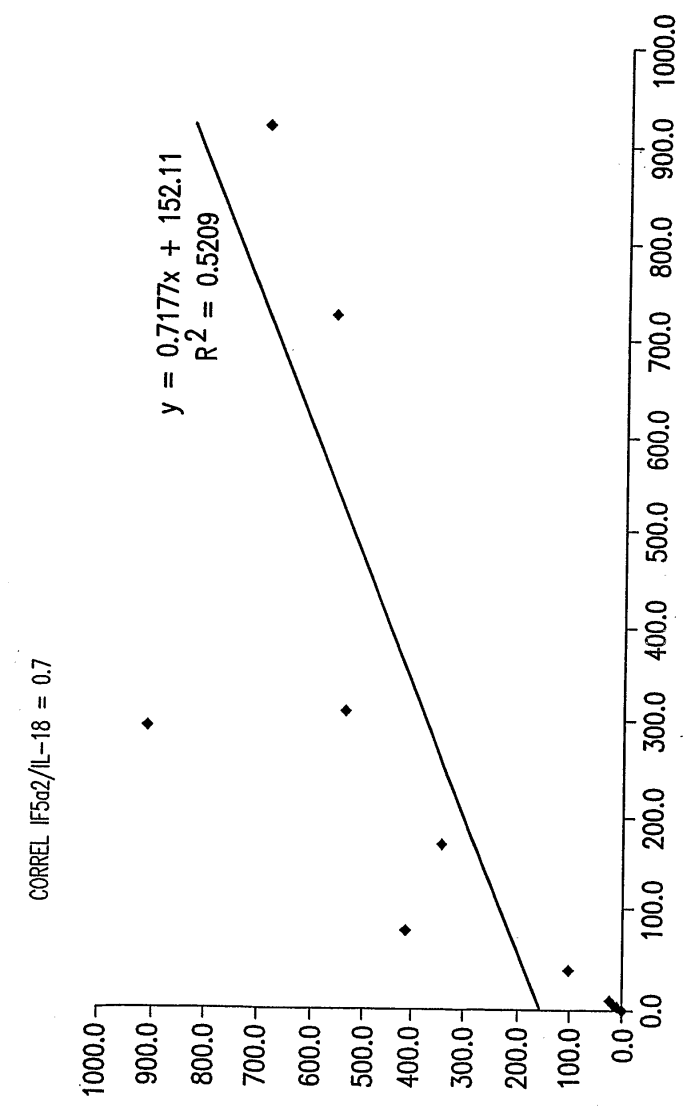
도면50b

환자	Ds	IF5a1		IF5a2		0.5		2.0		IL-18		IL-1b	
		pg/ng	rRNA	pg/ng	rRNA	pg/ng	rRNA	pg/ng	rRNA	pg/ng	rRNA	pg/ng	rRNA
206	VALVE	44.4		33.1	1.3			0.7		50.0		67.2	
330	VALVE												
331	VALVE	11.3		0.2	68.9	0.0		0.1		0.0		0.0	
332	VALVE	224.5		194.0	1.2	0.9		510.5		37.2			
289	VALVE	286.3		674.1	0.4	2.4		888.0		167.5			
290	VALVE	303.9		540.4	0.6	1.8		545.8		20.6			
291	VALVE	148.1		311.8	0.5	2.1		229.2		31.1			
292	VALVE	221.1		367.2	0.6	1.7		280.8		55.0			
312	VALVE	361.1		262.5	1.4	0.7		198.0		44.2			
314	VALVE	6.5		1.6	4.0	0.2		74.7		18.6			
318	VALVE	83.3		48.5	1.7	0.6		69.3		13.3			
324	VALVE	485.9		414.1	1.2	0.9		584.9		98.6			

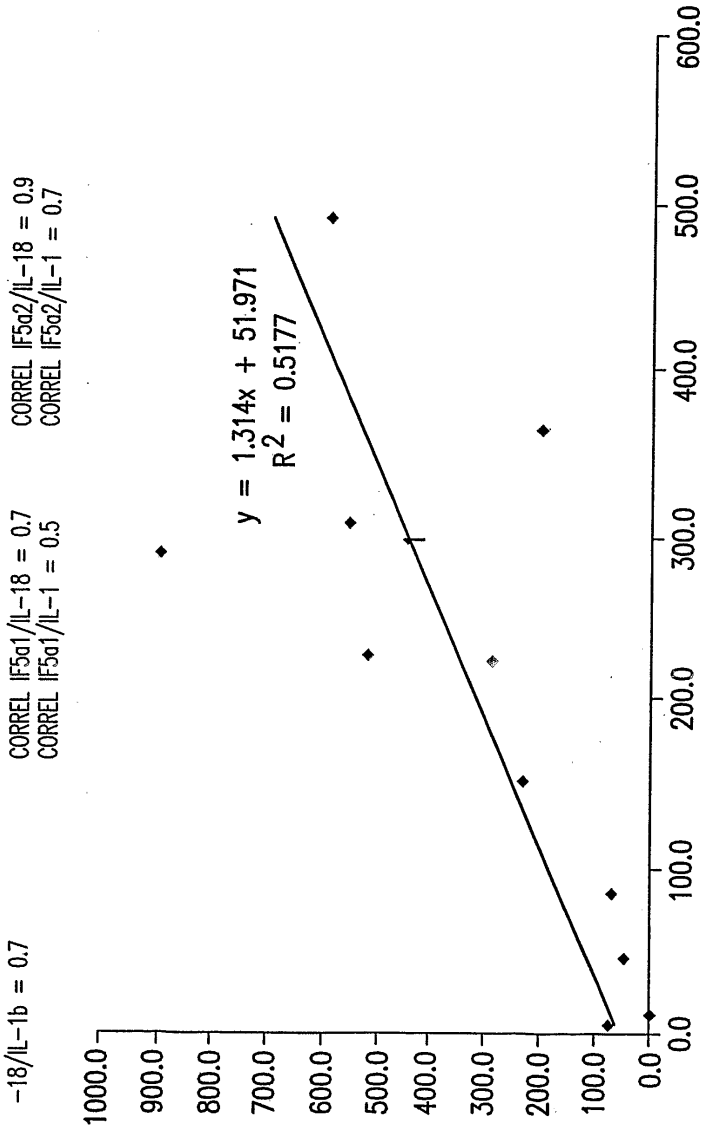
도면50c



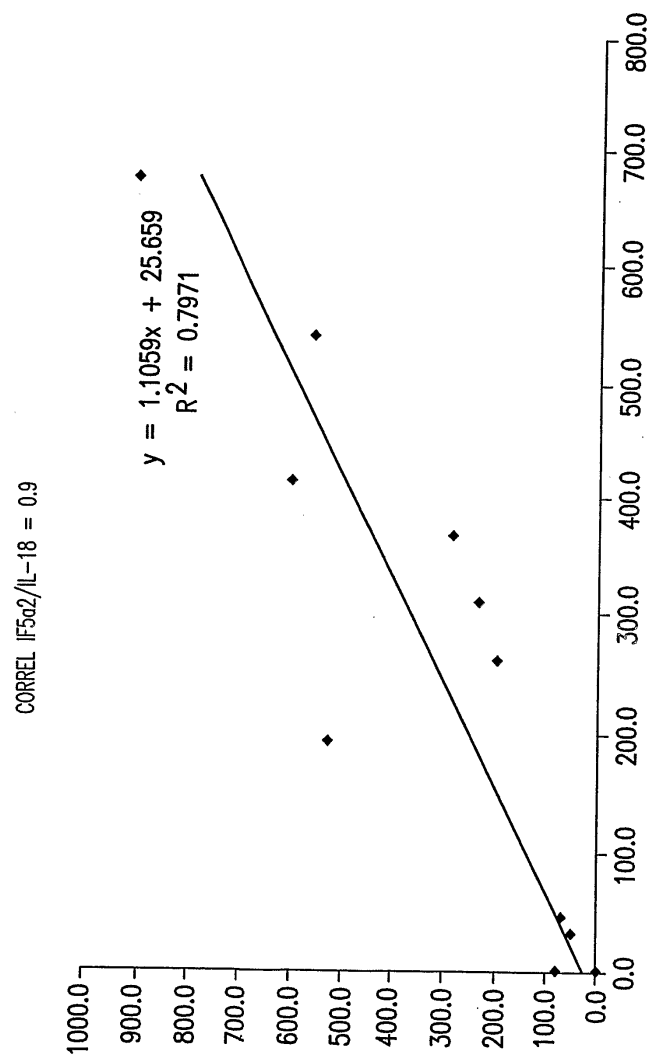
도면50d



도면50e



도면50f





도면51a

실험 #	연령	성별	DM	불안정 엔진	수술	Misc....	날짜 RNA
19	61	M	Y	N	CABG	Metoprolol, Lovastatin, NTG	
20	72	M	Y	N	CABG	Metoprolol, Lipitor	
21	55	M	N	N	CABG	CYA, Imuran, Prednisone, Lasix, INS, Metoprolol	7/30/02
23	71	M	N	N	CABG	Imipramine, Isordil, NTG, Metoprolol	7/30/02
24	75	M	Y	Y	CABG	Lisinopril, Glipizide, Metoprolol, NTG	
?	61	M	N	N	CABG	Lisinopril, digoxin, Lasix, NTG, ASA	
26	57	M	N	N	CABG	Atenolol, Norvasc, HCTZ, NTG, ASA	7/30/02
28	48	F	N	N	CABG	Atenolol, INS, Lisinopril	9-Aug
29	64	M	N	N	MVR	Lasix, Lisinopril	
30	76	M	N	N	CABG		9-Aug
31	65	M	Y	N	CABG		
33	54	M	N	N	CABG	Simvastatin, metoprolol	9-Aug
34	63	M	N	N	CABG	Lisinopril, Felodipine, NTG	9-Aug
35	74	M	Y	N	CABG	Amlodipine, Glyburide, Prazosin	
36	62	M	Y	N	CABG	Simvastatin, INS, Felodipine, Spironolactone, Metoprolol, Lisinopril,	
37	63	M	N	N	CABG	Famotidine, Atenolol, Fosinopril, Procordia, Zocor, NTG	
38	63	M	N	N	CABG	A-fib, Dig, Atenolol, Zocor, Coumadin	

도면51a-1

연속

39	77	M	N	N	CABG	Coumadin, Cozar, Zocor, HCTZ, Cortioarone	
41	74	F	N	Y	AVR/CABG	Dig, Zestril	
42	59	M	Y	N	CABG	Statin, Atenolol, Glucotrol, Lisinopril	
44	64	M	Y	N	CABG	Atenolol, NTG, Lisinopril, Simvastatin, Verapamil	
47	64	M	N	N	CABG	NTG, Lisinopril, Synthroid, simvastatin	
48	56	M	Y	Y	CABG	NTG, Metoprolol, Glipizide, Simvastatin	
52	70	M	Y	N	CABG	Fosinopril, Glipizide, HCTZ, Felodipine, Metoprolol,	
53	55	M	Y	N	CABG	Lasix, Lisinopril, Glyburide, Nifedipine	
54	48	M	Y	Y	CABG	Lisinopril, Metoprolol, NTG, Lasix, ASA<Simvastatin, INS	
55	67	M	N	N	CABG	ASA, prednisone, Atenolol	
56	71	M	Y	N	CABG	ASA, Simvastatin, Atenolol, Lisinopril, NTG	
58	70	M	Y	N	CABG	Coumadin, Synthroid, NTG, Glyburide	
59	55	M	Y	N	CABG	Lisinopril, NTG, Glyburide, metoprolol, Simvastatin	
60	55	M	Y	N	CABG	Metformin, Glyburide, ASA, Atenolol, Lisinopril, Simvastatin	
61	68	M	Y	N	CABG	Atenolol, Lasix, Fosinopril, Simvastatin, Glyburide	
61	68	M	Y	N	CABG	Atenolol, Lasix, Fosinopril, Simvastatin, Glyburide	
62	76	M	N	N	CABG	Genfibrozil, ASA, Metoprolol, NTG	
64	61	M	N	N	MVR		

연속

도면51b

연속

64	61	M	N	N	M/R		
65	72	M	N	Y	CABG	ASA, NTG	12-Sep
67	69	M	Y	N	CABG		
138	75	M	Y	N	CABG	Lisinopril, Simvastatin, metoprolol, Metformin, glyburide	
139	71	M	N	Y	CABG	Metoprolol, Dyazide, Lipitor, Cardura, Lotrol	12-Sep
140	86	M	N	Y	CABG	Metoprolol, Amlodipine, NTG, Heparin	12-Sep
141	65	M	Y	N	CABG	ASA, Clopidogril, Glipizide, Lisinopril, INS,	
142	75	F	Y	N	CABG	Glyburide, Atenolol, Lisinopril, Maxide, Methyl dopa	
141	44	M	N	N	CABG	Atenolol, Lisinopril, Simvastatin,	12-Sep
144	57	M	N	N	AVR	Allopurinol, Colchicine, Minoxidil, Atenol, Lasix, Prednisone, Simvastatin	
145	67	M	N	N	CABG	Lipitor, Metoprolol, NTG, ASA	
146	42	M	N	N	CABG	Atenolol, Norvasc, NTG	
147	71	M	N	N	M/R	Dig, Verapamil, Coumadin	
148	71	F	N	N	CABG		
150	70	M	Y	N	CABG	Felodipine, HCTZ, INS, Synthroid, Losartin, Simvastatin, Atenolol,	
151	78	F	Y	N	CABG	Dig, NTG, Lisinopril, Cavedolol, INS	

연속

도면51c

연속

152	50	M	N	N	CABG	Lisinopril, NTG, Lasix, Metoprolol	
153	48	M	N	N	AVR		
154	67	M	N	N	CABG	Simvastatin, Lisinopril, Atenolol	
155	59	M	N	N	CABG	Lisinopril, ASA, Metoprolol, Simvastatin	
156	62	M	Y	N	CABG	NTG, Glyburide, Atorvastatin, Atenolol	
161	56	M	Y	N	MWR	INS, Metoprolol, NTG, Simvastatin, Lisinopril	
162	23	F	N	N	MWR		
163	72	M	N	N	AVR	Simvastatin, Felod연속, Cimetidine	
164	65	F	N	N	MWR	Multi valve Dz. A-fib Metoprolol, DIG, Coumadin	
166	57	F	N	N	MWR	Synthroid	
173	60	M	N	N	AVR		
177	66	F	N	N	MWR	Severe MR, Lisinopril	
184	46	M	N	N	MWR	Vasotec	
185	75	M	N	Y	CABG, MWR	Tropolol, Capoten, Plavix, Synthroid	
201	50	M	N	N	AVR	Lasix, Incubated in ICE prior to D/C	

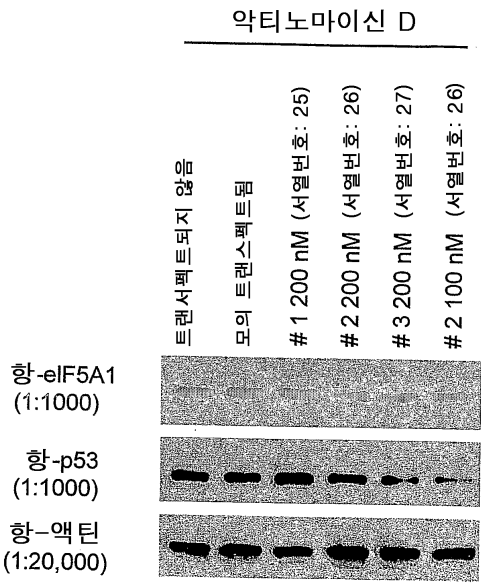
연속

도면51d

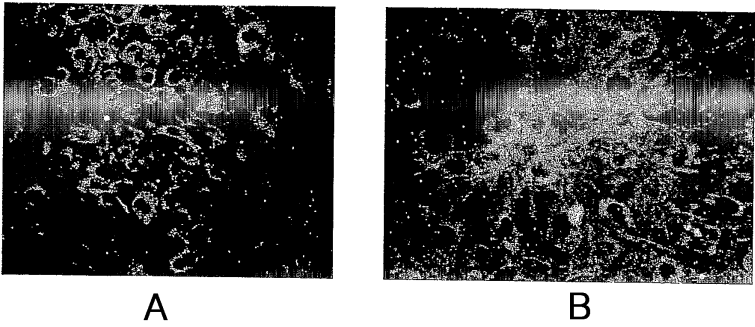
연속

206	58	M	N	N	N	AVR	Vasotec		
207	68	M	M	N	N	CABG	Simvastatin, Atenolol		
211	51	M	M	N	N	AVR	EF<20%		
289	45	M	M	N	N	AVR		9-Aug	
290	77	M	M	N	N	MVR		9-Aug	
291	55	F	F	N	N	AVR		9-Aug	
292	39	M	M	N	N	MVR		9-Aug	
310	67	F	F	N	N	AVR/MY			
312	72	F	F	N	N	AVR		12-Sep	
314	75	F	F	N	N	AVR		12-Sep	
318	62	M	M	N	N	AVR		12-Sep	
329	70	M	M	N	N	AVR		12-Sep	
330	67	M	M	N	N	AVR		7/30/02	
331	58	M	M	N	N	AVR		7/30/02	
339	69	M	M	N	N	AVR		7/30/02	

도면52

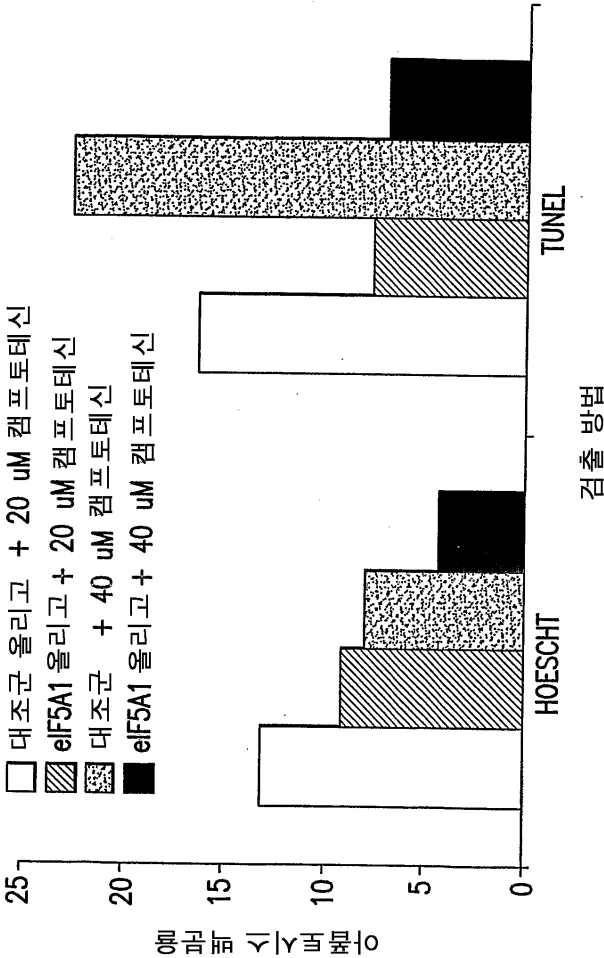


도면53



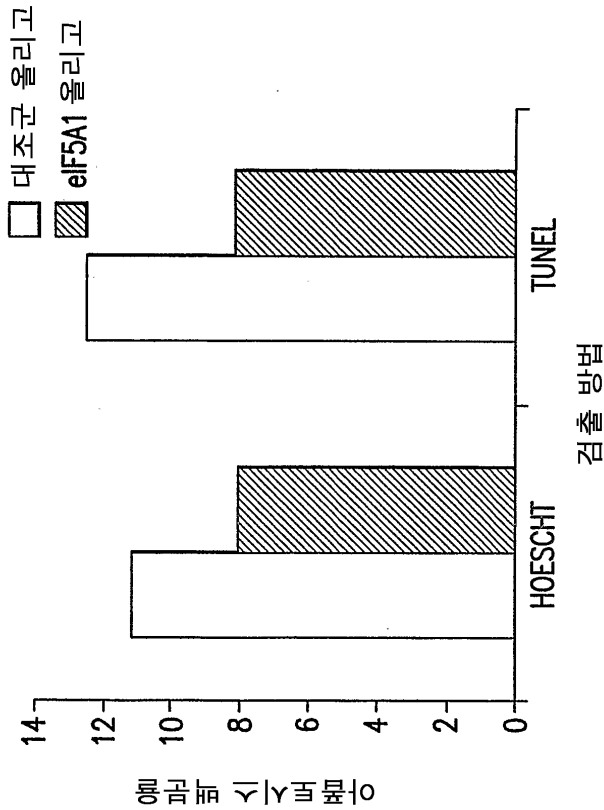
도면54

안티센스 올리고뉴클레오타이드로 4일간 및 캄프테신으로 2일간 처리 후  
# 506 사상판 세포의 아폴토시스 백분율



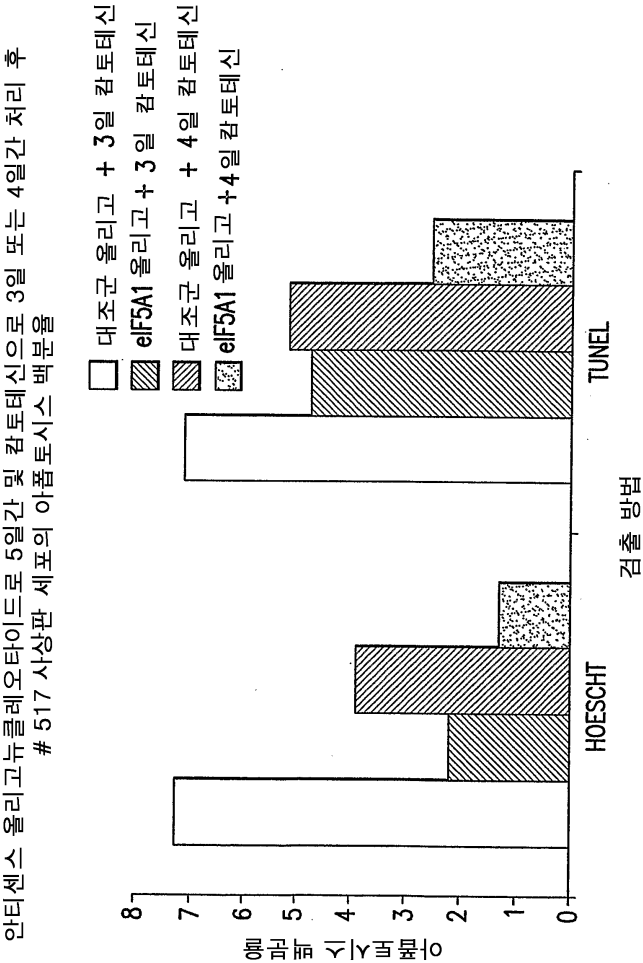
도면55

안티센스 올리고뉴클레오타이드로 2일간 및 캄토테신으로 3일간 처리 후  
# 506 사상판 세포의 아플토시스 백분율



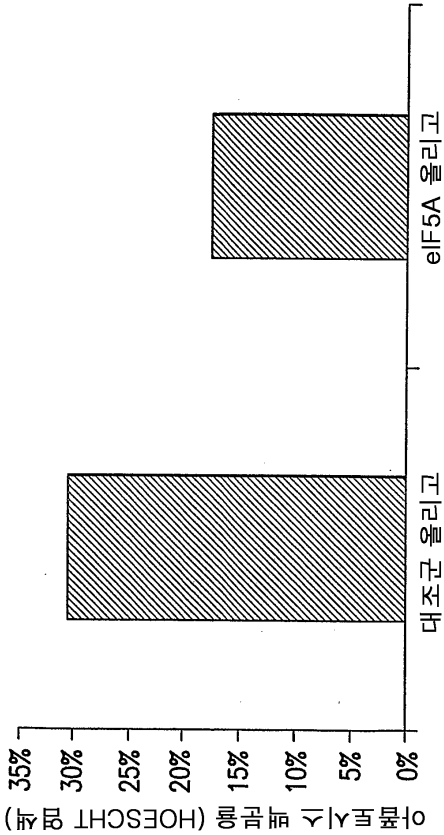


도면56

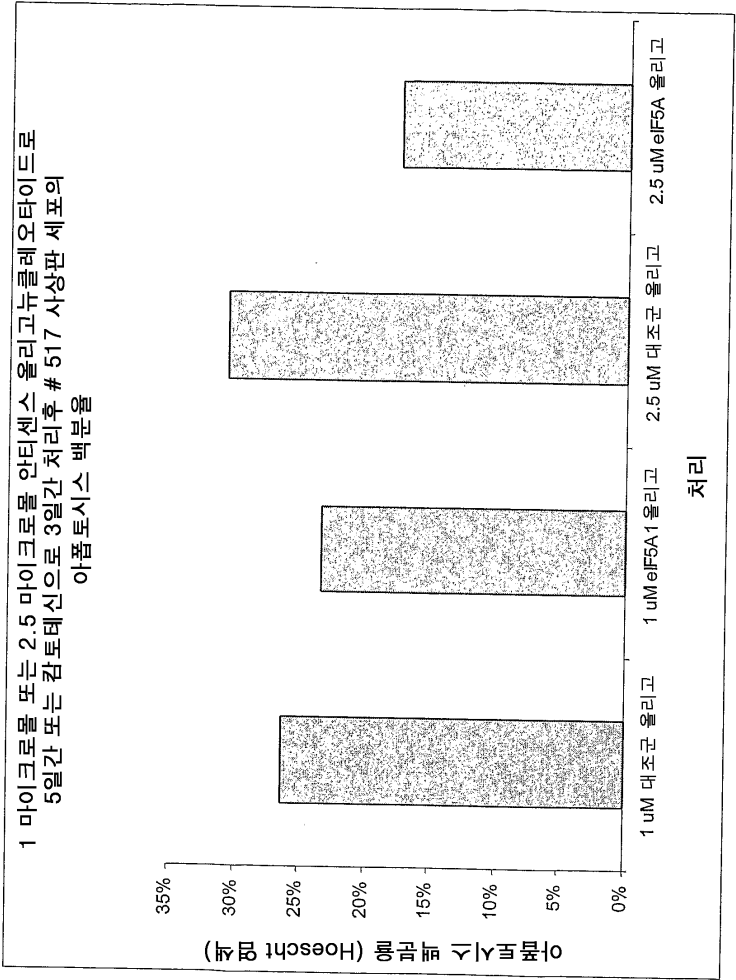


도면57

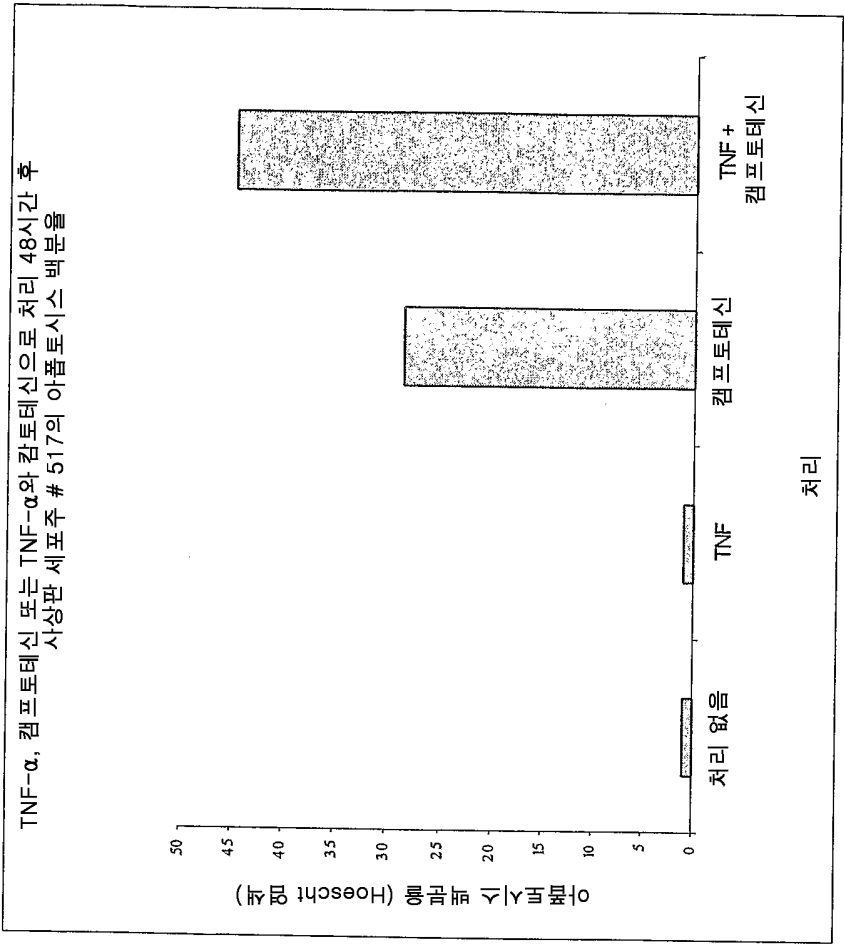
안티센스 올리고뉴클레오타이드로 5일간 및 캄토테신으로 3일간  
처리후 # 517 사상판 세포의 아플토퍼시스 백분율



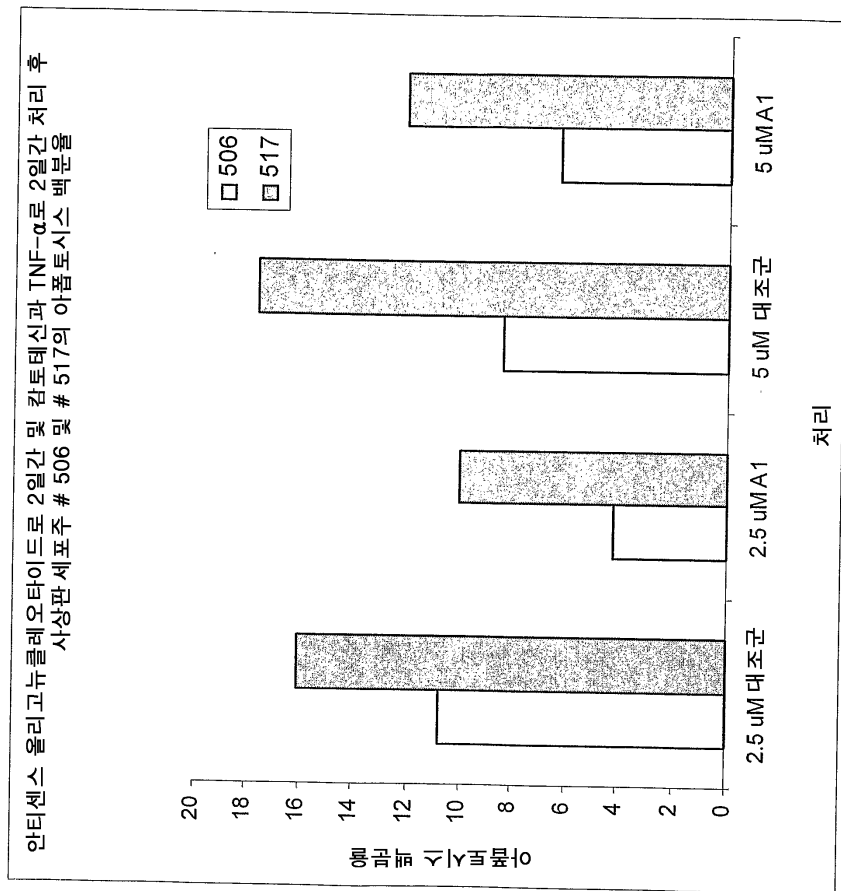
도면58



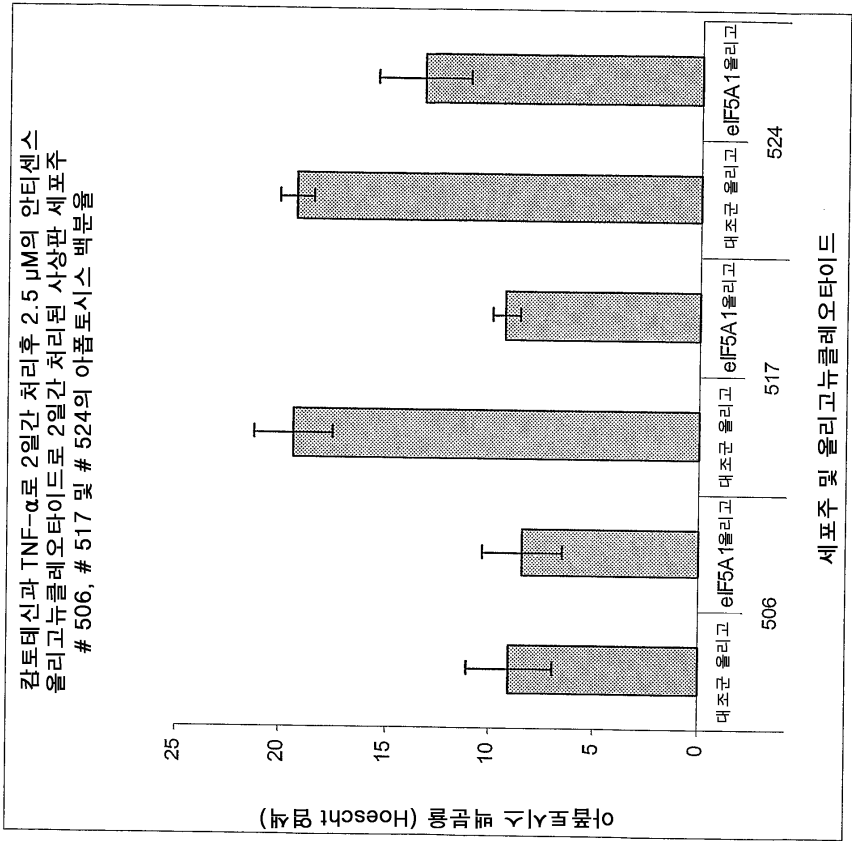
도면59



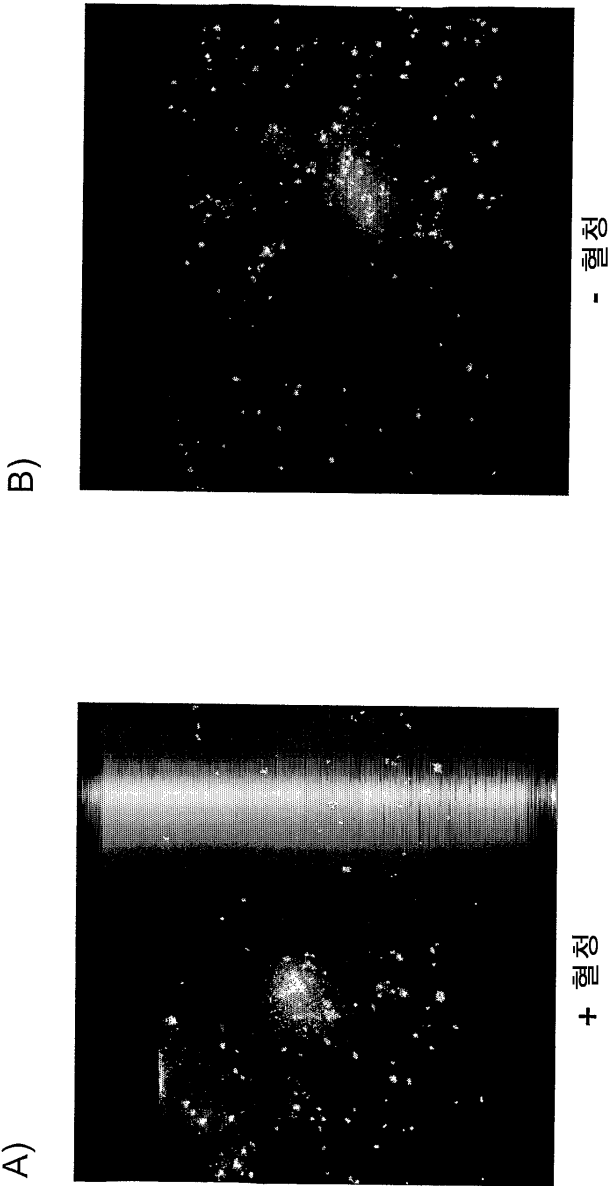
도면60



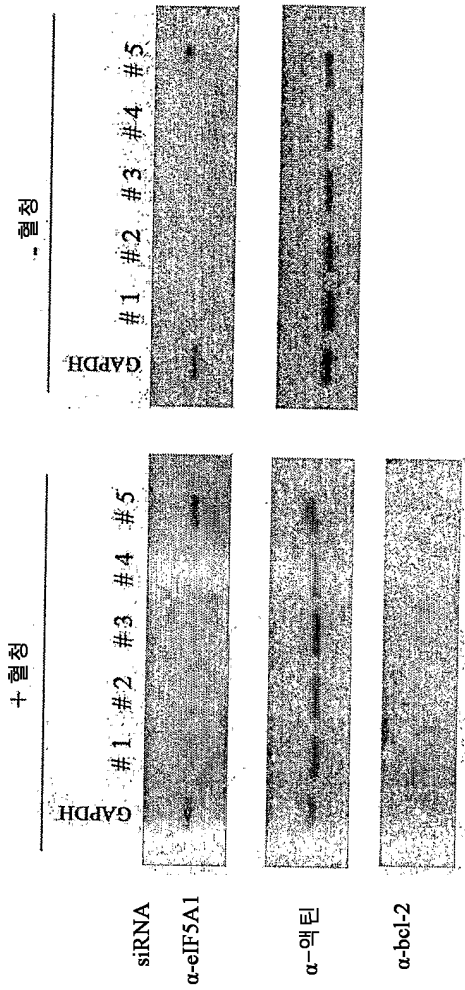
도면61



도면62

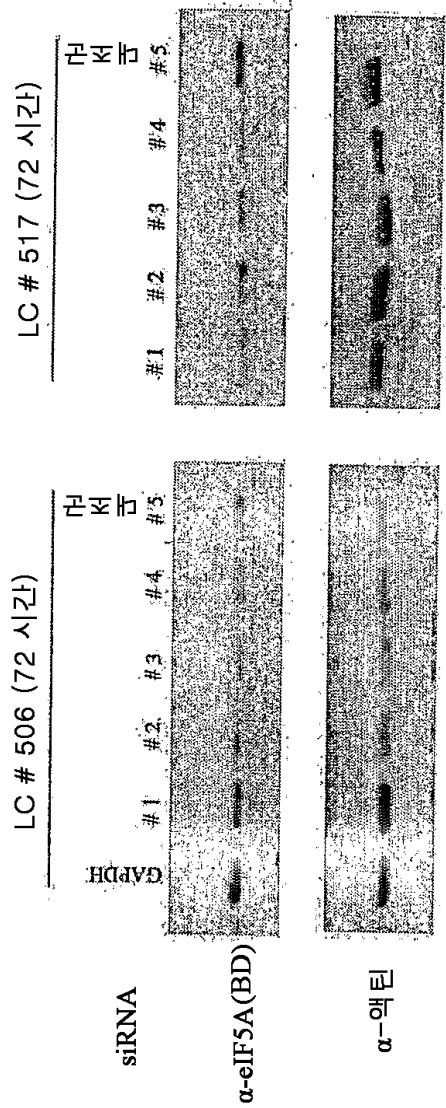


도면63

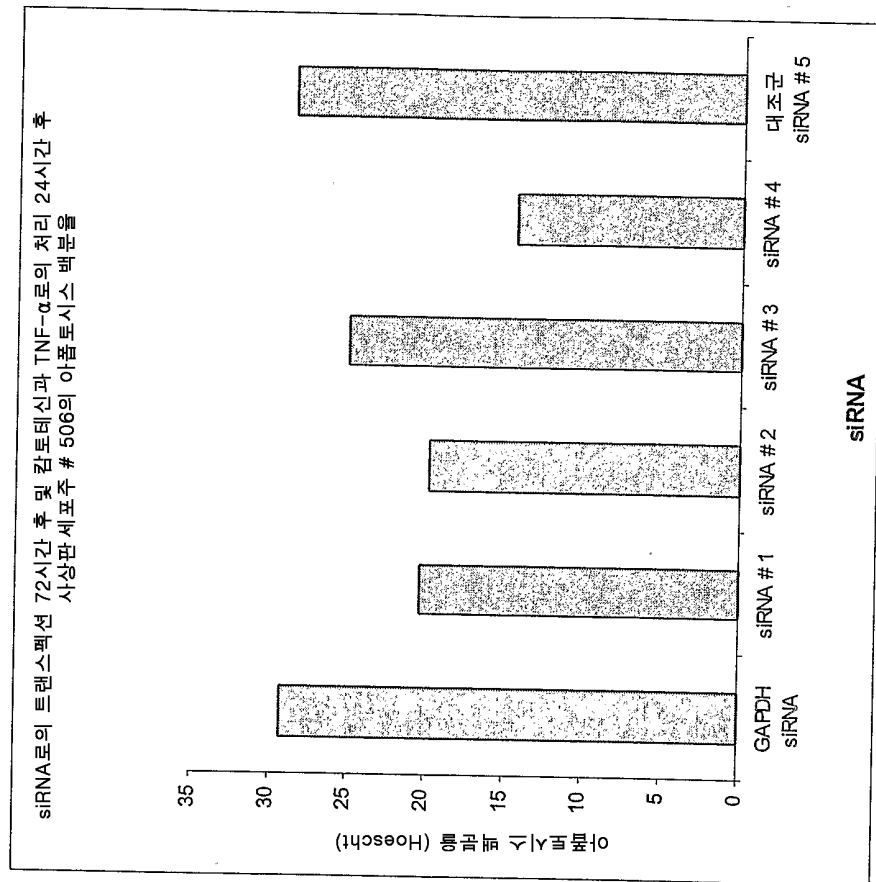




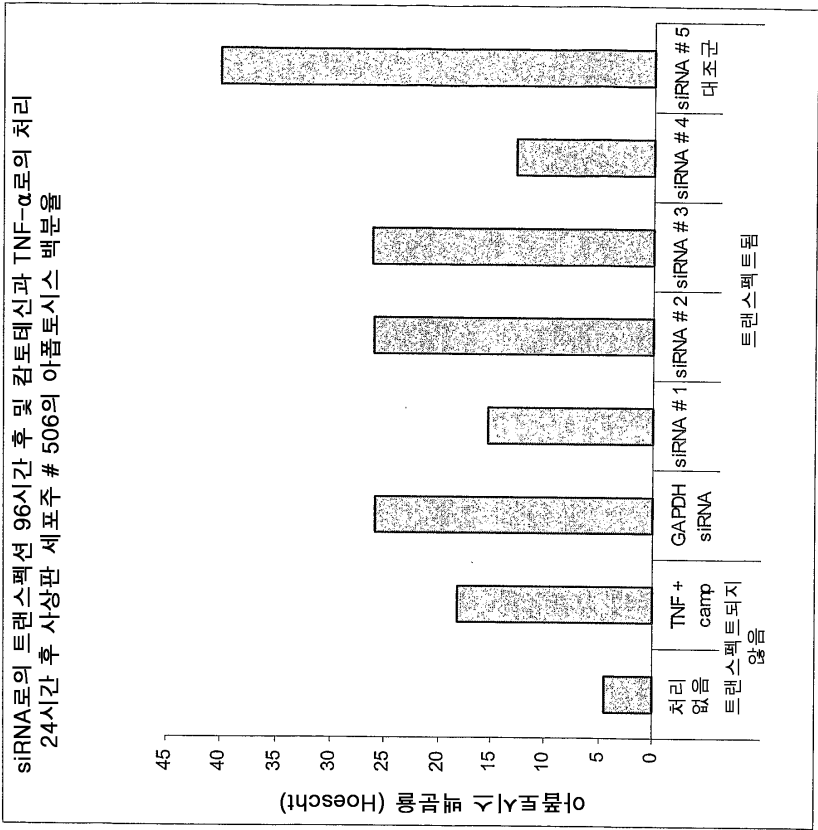
도면64



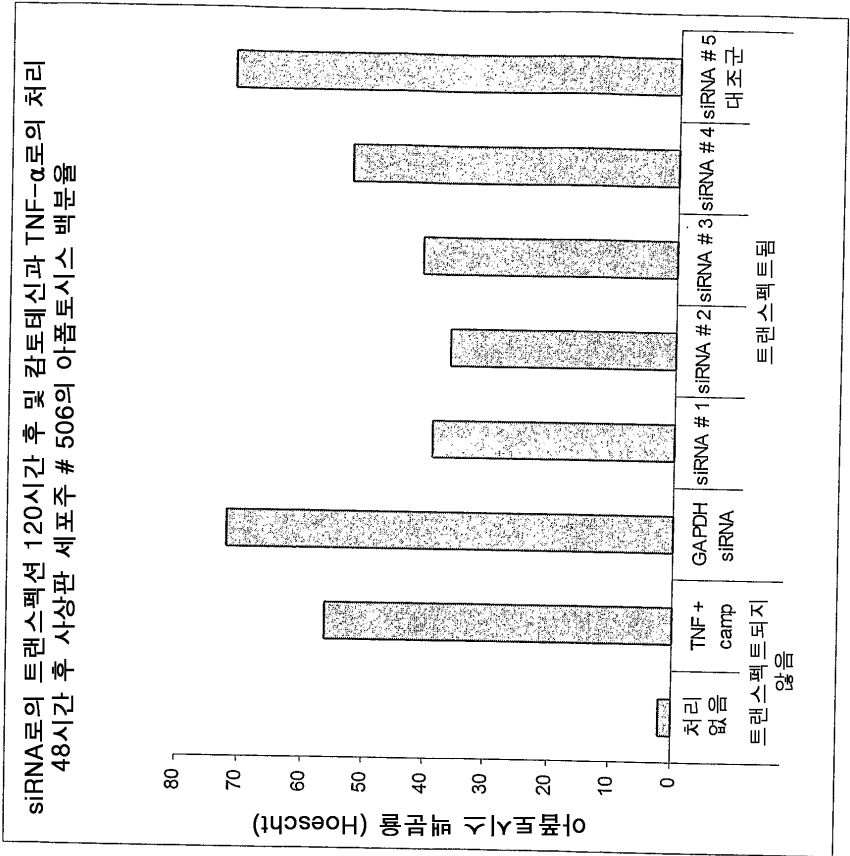
도면65



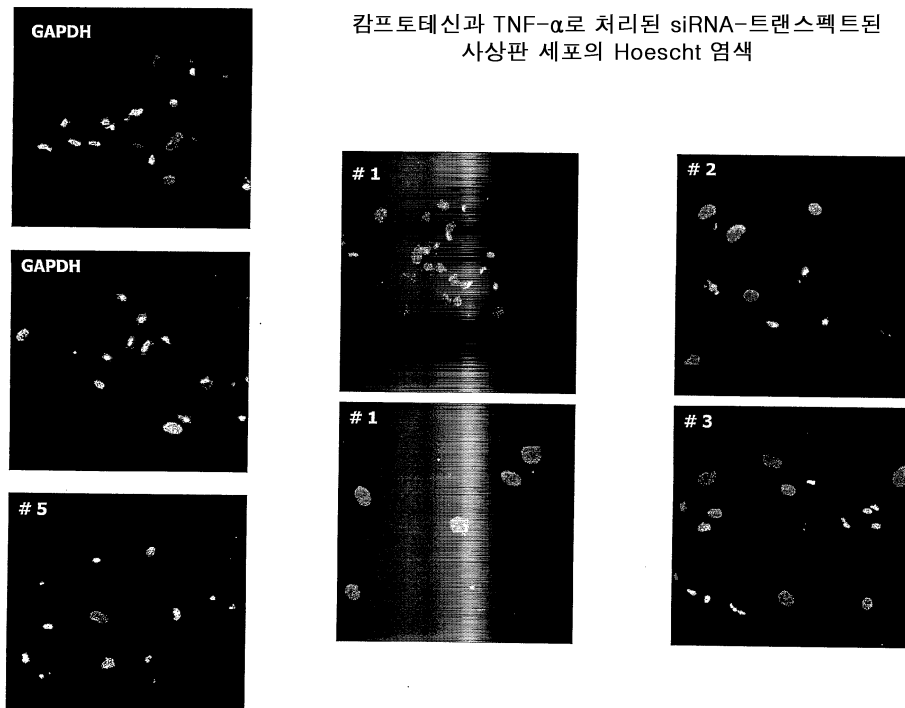
도면66



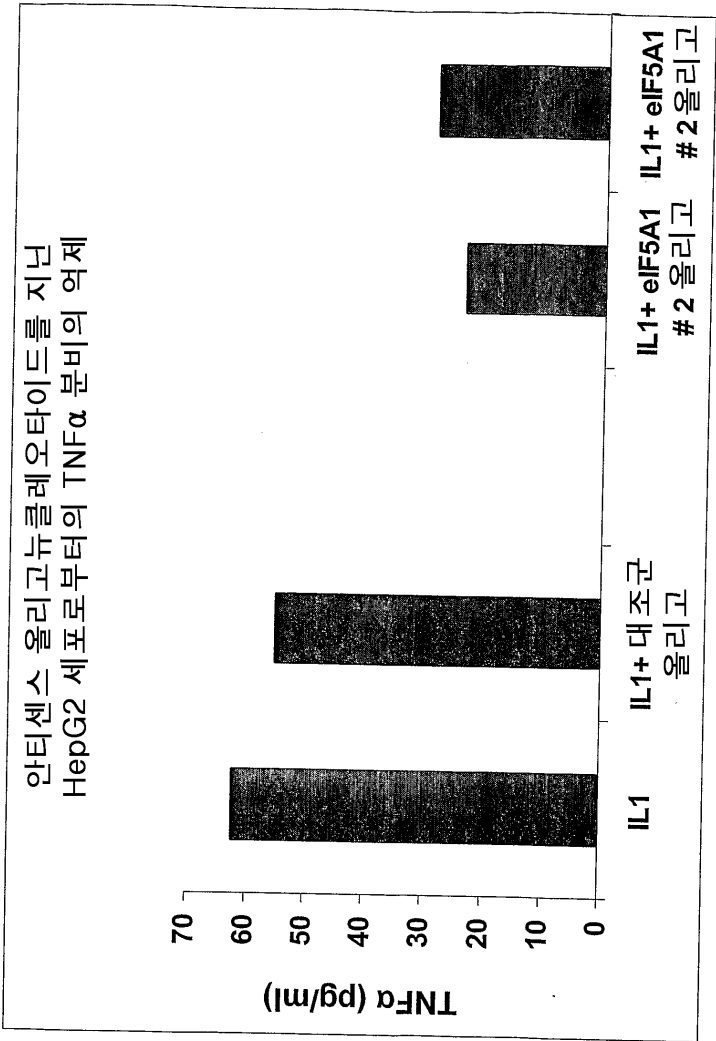
도면67



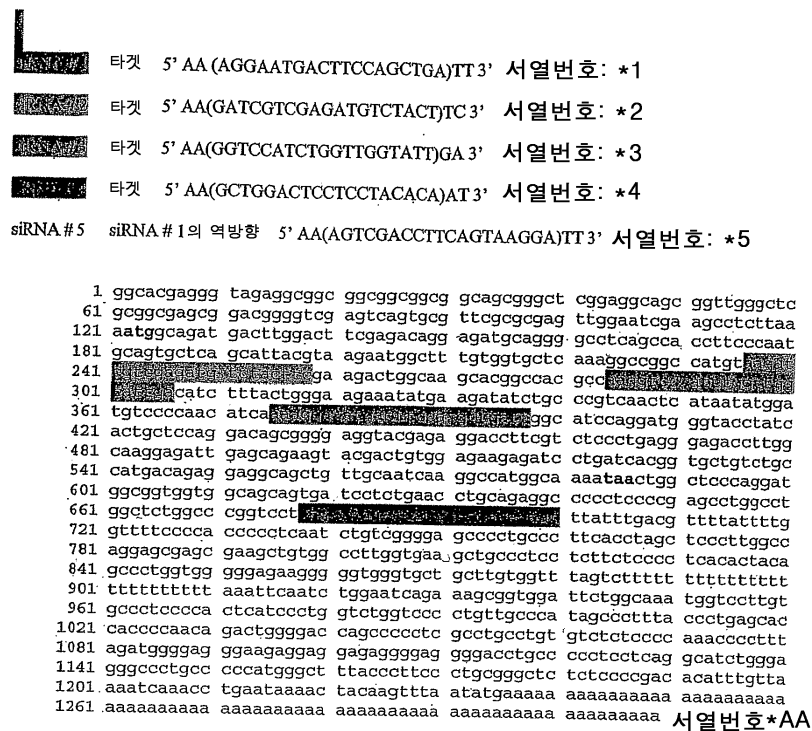
도면68



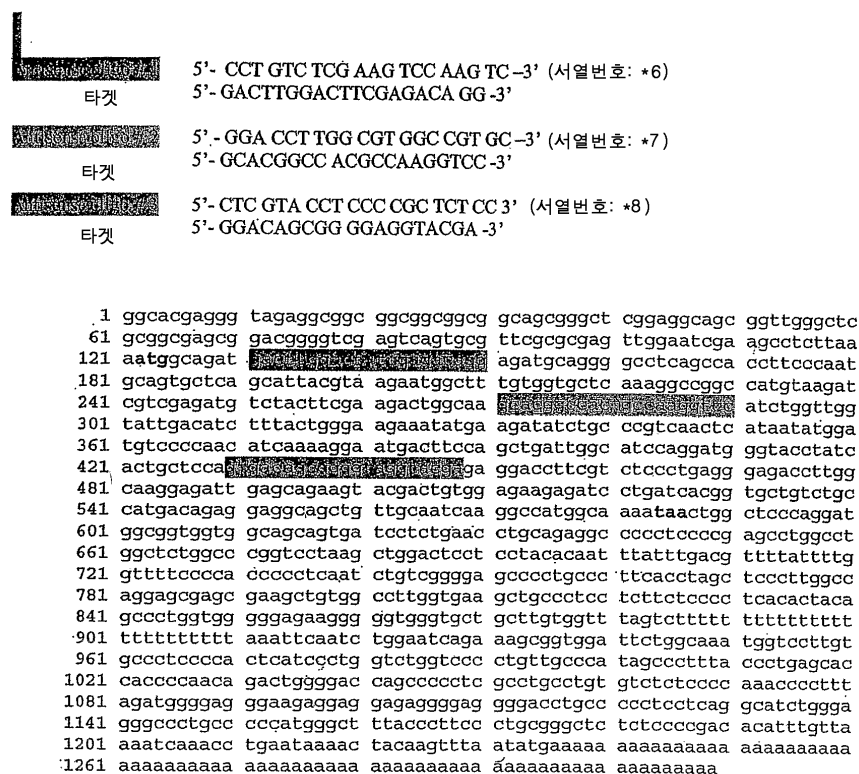
도면69



도면70



도면71





도면73a

인간 eIF5A1 (접근번호 001970) 및 인간 eIF5A2 (접근번호 020390)의 뉴클레오타이드 정렬

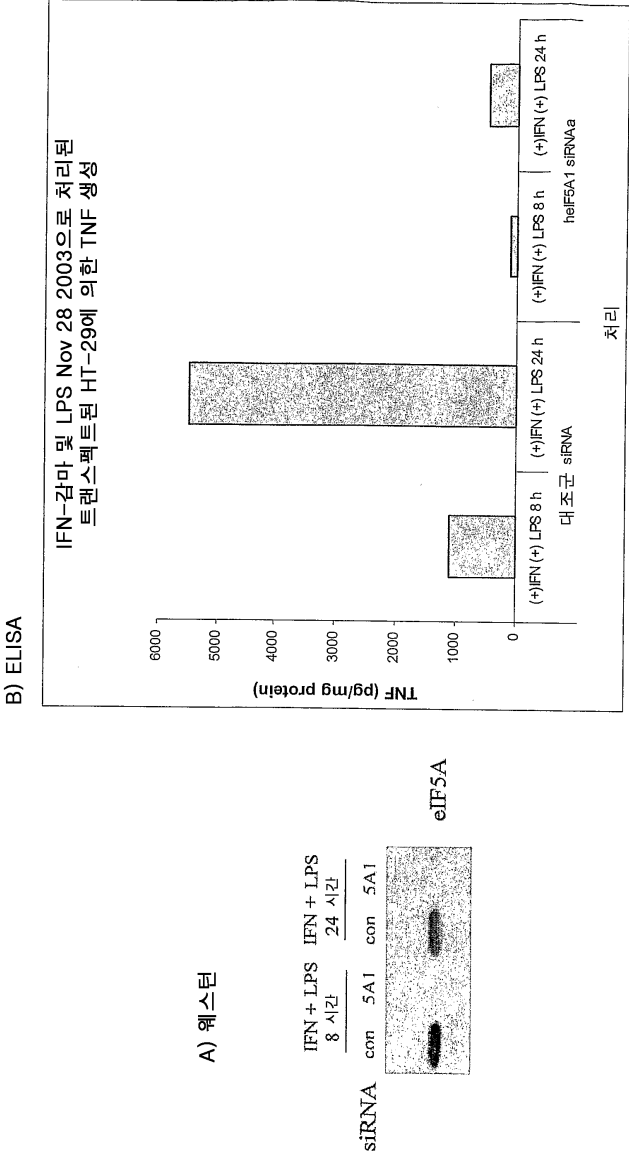
eIF5a1	1	ATGGCAGATG	ACTTGGACTT	CGAGACAGGA	GATGCAGGGG	CCTCAGCCAC
eIF5a2	1	ATGGCAGACG	AAATTGATTT	CACACTGTGA	GATGCCGGGG	CTTCCAGCAC
eIF5a1	51	CTTCCCAATG	CAGTGCTCAG	CATTACGtAA	GAATGGCTTT	GTGGTGCTCA
eIF5a2	51	TTACCCCTATG	CAGTGCTCGG	CCTTGCGcAA	AAACGGCTTC	GTGGTGCTCA
eIF5a1	101	AAGGCCGGCC	ATGtAAGATC	GTGAGATGT	CTACTTCGAA	GACTGGCAAG
eIF5a2	101	AAGGACGACC	ATGcAAAA	GTGGAGATGT	CAACTTCCAA	AACTGGAAAG
eIF5a1	151	CACGGCCACG	CCAAGGTCCA	TCTGGTTGGT	ATTGACATCT	TtACTGGGAA
eIF5a2	151	CAtGGTCATG	CCAAGGTTCA	CCTTGTGGGA	ATTGATATTT	TcACGGGCAA
eIF5a1	201	GAATATGAA	GATATCTGCC	CGTCAACTCA	tAATATGGAT	GTCCCCAACA
eIF5a2	201	AAATATGAA	GATATTTGTC	CTTCTACTCA	cAATATGGAT	GTTCCAATA
eIF5a1	251	TCAAAAGGAA	TGACTtcCAG	CTGATTGGCA	TCCAGGATGG	GTACCTATCA
eIF5a2	251	TTAAGAGAAA	TGATTatCAA	CTGATATGCA	TTCAAGATGG	TTACCTTTCC
eIF5a1	301	CTGCTccagG	ACAGCGGGGA	GGTACGAGAG	GACCTTCGTC	TcCCTGAGGG
eIF5a2	301	CTGCTgacag	AAACTGGTGA	AGTTCGTGAG	GATCTTAAAC	TgCCAGAAGG
eIF5a1	351	AGACCTTGGC	AAGGAGATTG	AGcagAAGTA	CGACTGTGGA	GAAGAGATCC
eIF5a2	351	TGAACCTAGGC	AAAGAAATAG	AGggaAAATA	CAATGCAGGT	GAAGATGTAC
eIF5a1	401	TGATCACGGT	GCTGTcTGCC	ATGACAGAGG	AGGCAGCTGT	TGCAATCAAG
eIF5a2	401	AGGTGTCTGT	CATGTgTGCA	ATGAGTGAAG	AATATGCTGT	AGCCATAAAA
eIF5a1	451	GCCatgGCAA	ATAAa			
eIF5a2	451	CCct--GCAA	ATAA-			



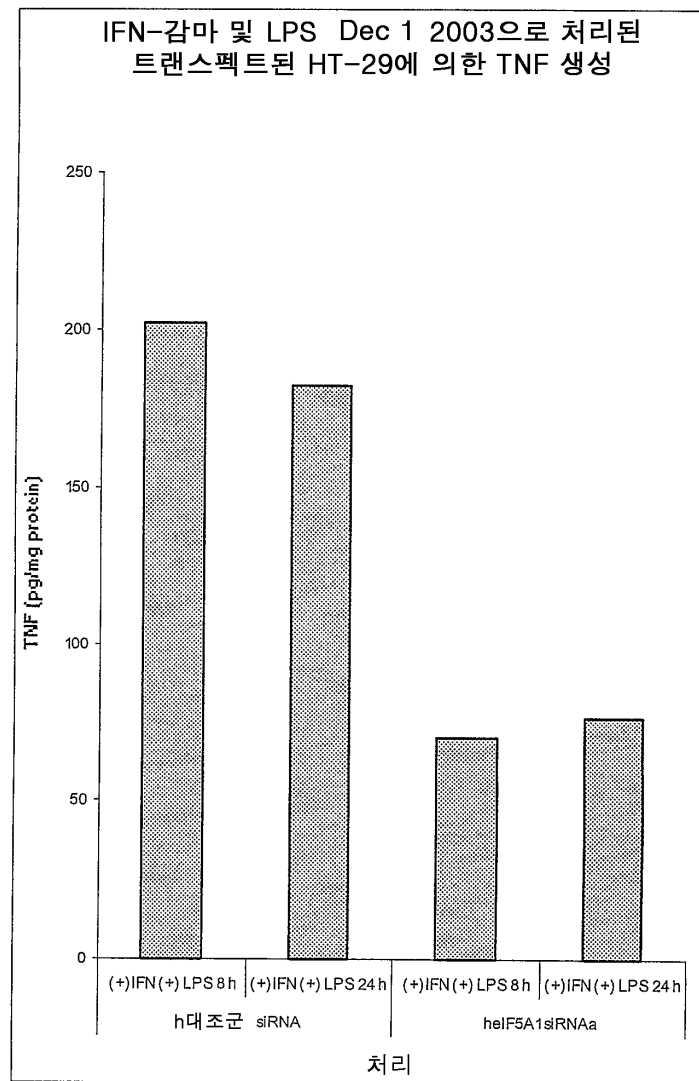
도면73b

인간 eIF5A1 (접근번호 001970) 및 인간 eIF5A2 (접근번호 020390)의 아미노산 정렬		
eIF5a1		MADDLDFETG DAGASATFPM QCSALRKNGF VVLKGWPKI VEMSASKTGK
eIF5a2	1	MADEIDFTTG DAGASSTYPM QCSALRKNGF VVLKGWPKI VEMSTSKTGK
eIf5a1	51	HGHAKVHLVG IDIFTGKKYE DICPSTHMD VPNIKRNDFO LIGIQDGYLS
eIF5a2	51	HGHAKVHLVG IDIFTGKKYE DICPSTHMD VPNIKRNDYQ LICIQDGYLS
eIf5a1	101	LLQDSGEVPE DLRLPEGDLG KEIEQKYDCG EEILITLLSA MTEEAATAIK
eIF5a2	101	LLTETGEVRE DLKLPEGELG KEIEGKYNAG EDVQVSMCA MSEEYATAIK
eIf5a1	151	amak
eIF5a2	151	pck-

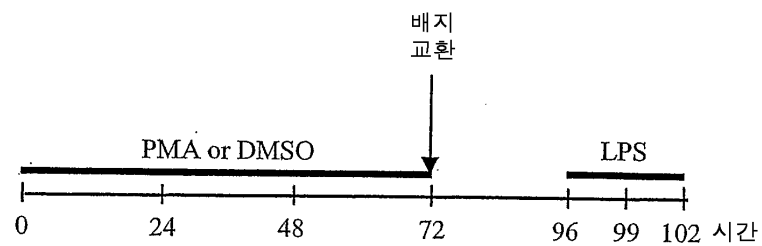
도면74



도면75

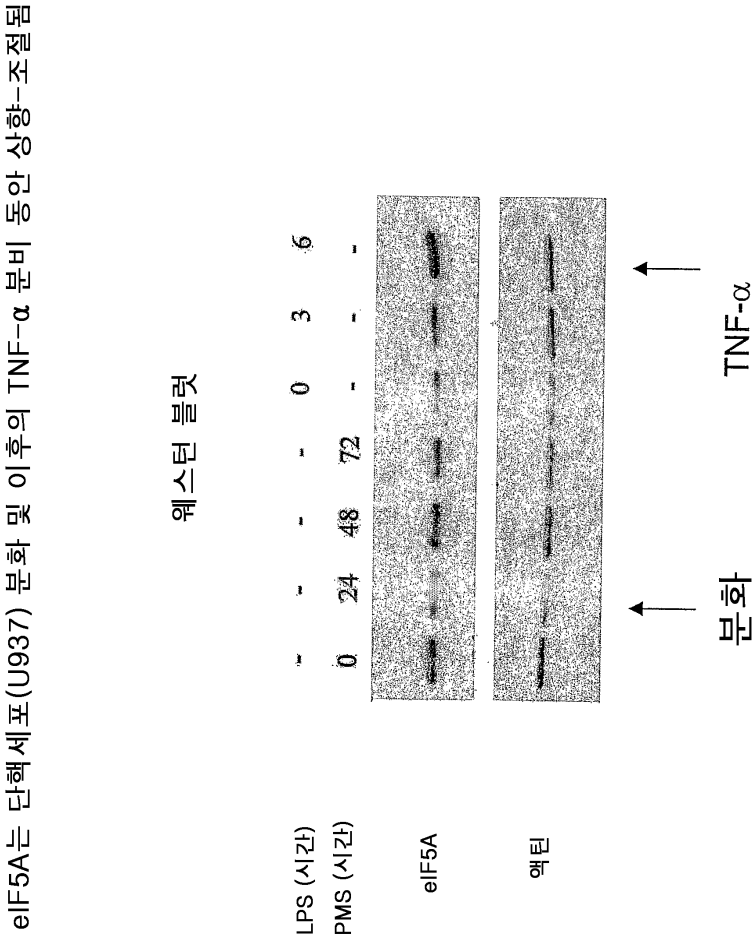


도면76

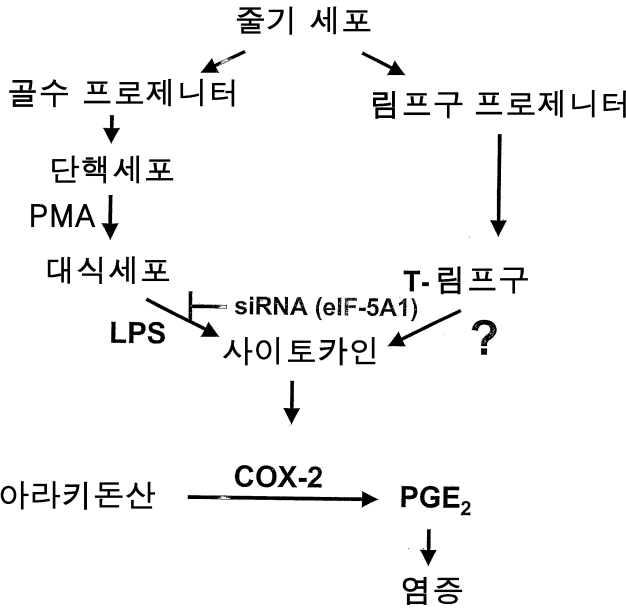


U-937 분화 실험의 시간 추이

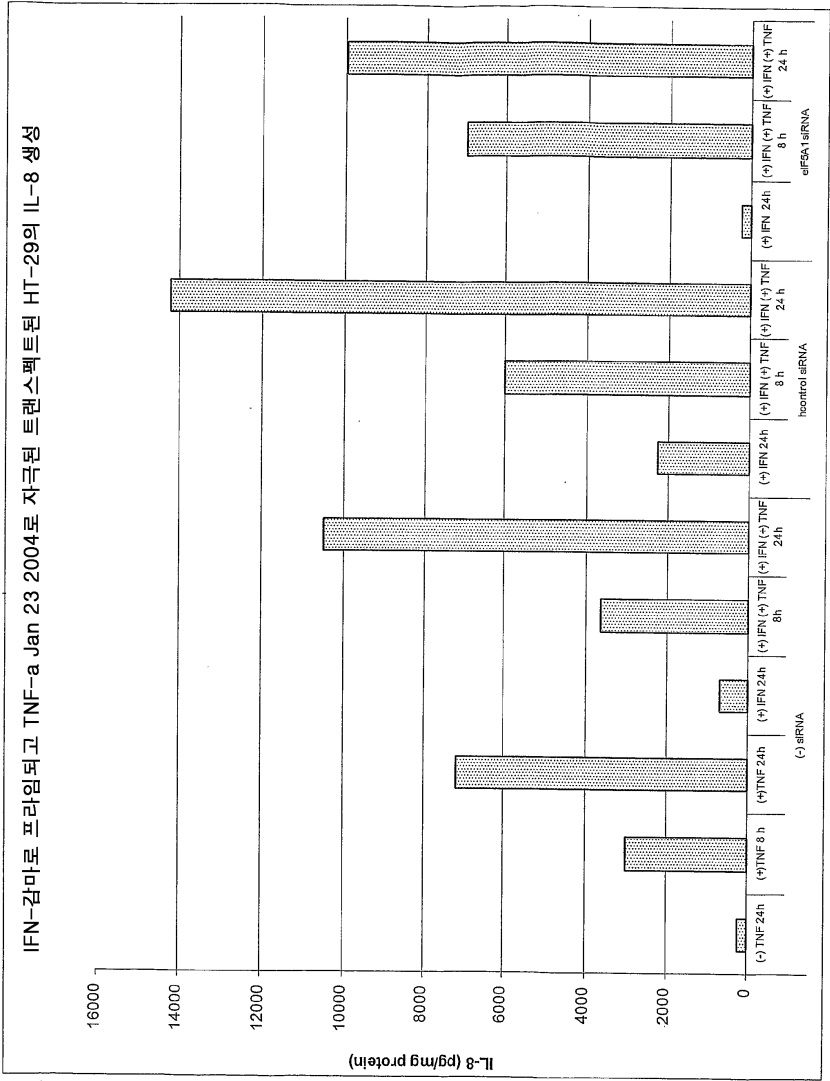
도면77



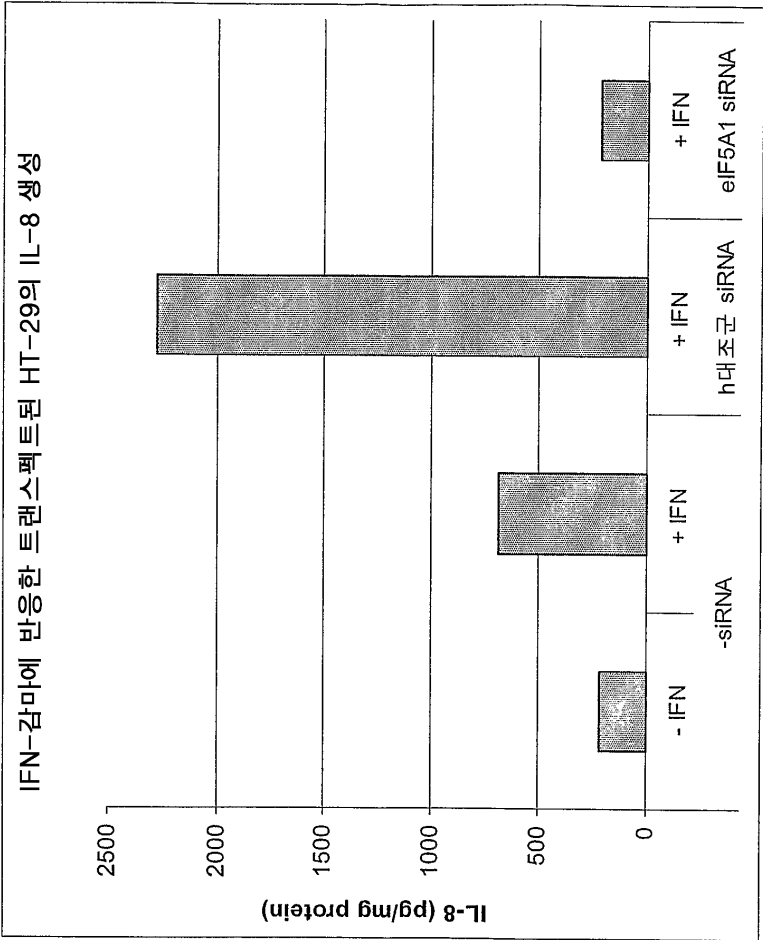
도면78



도면79

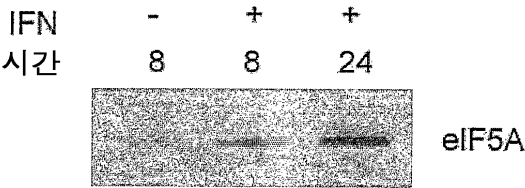


도면80

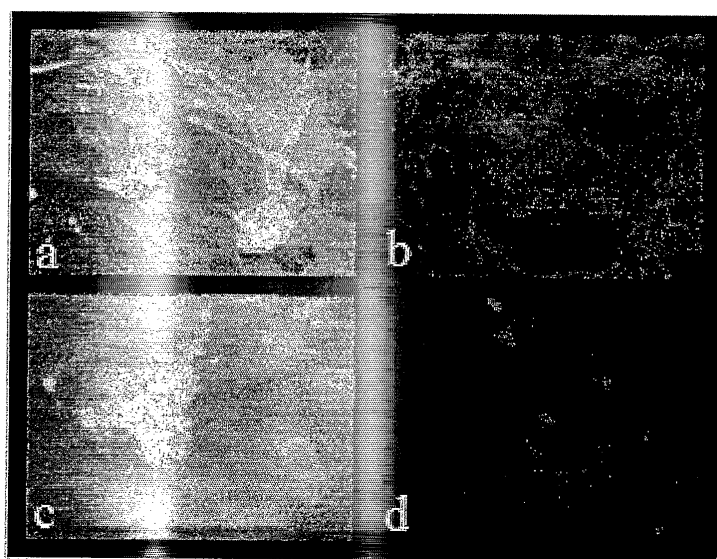


도면81

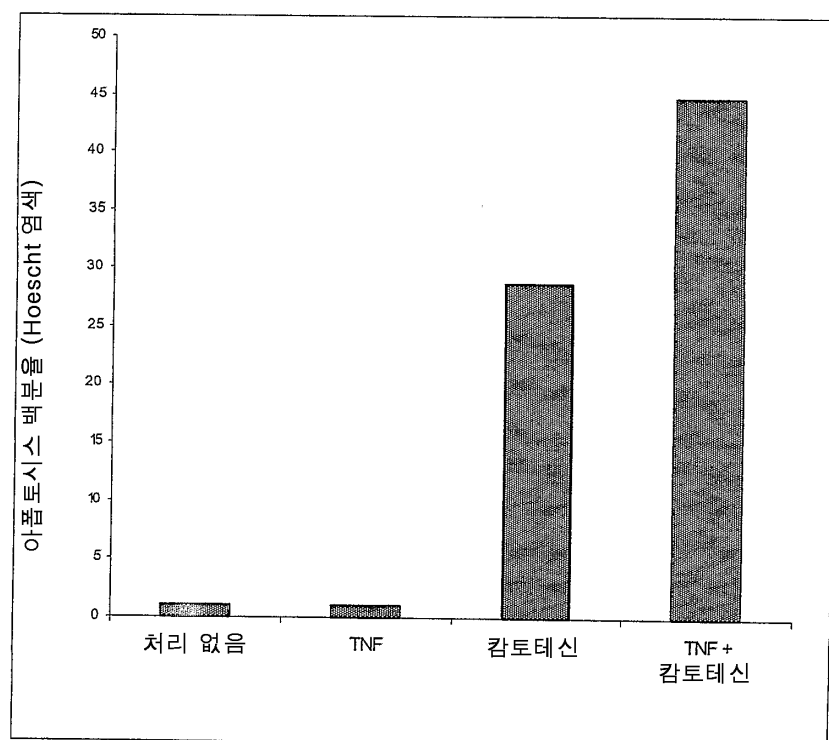
C) IFN-감마로 8 또는 24시간 처리된 HT-29 세포의 웨스턴 블럿



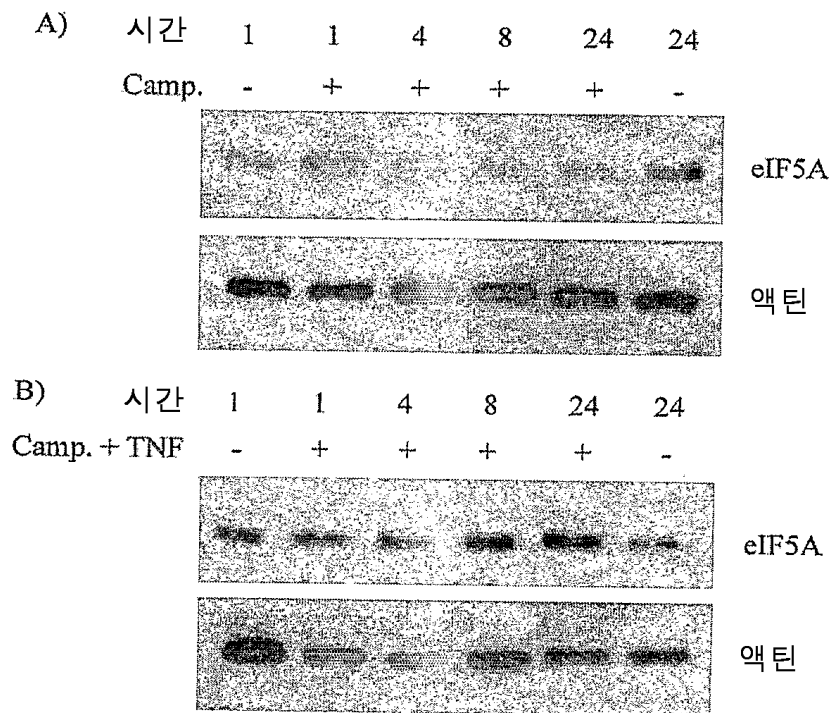
도면82



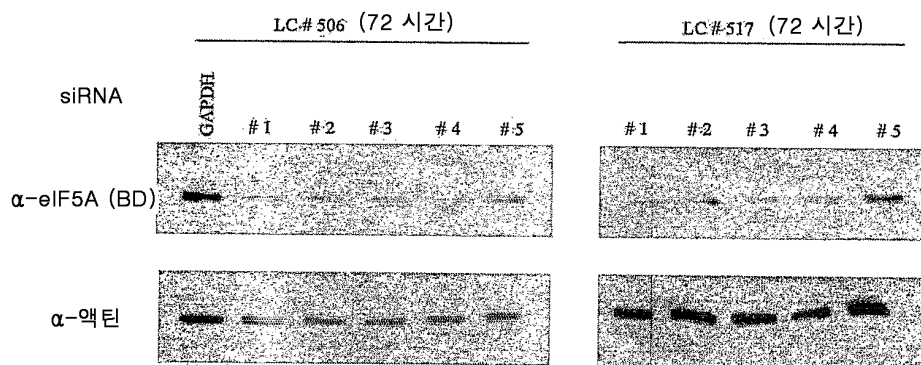
도면83



도면84

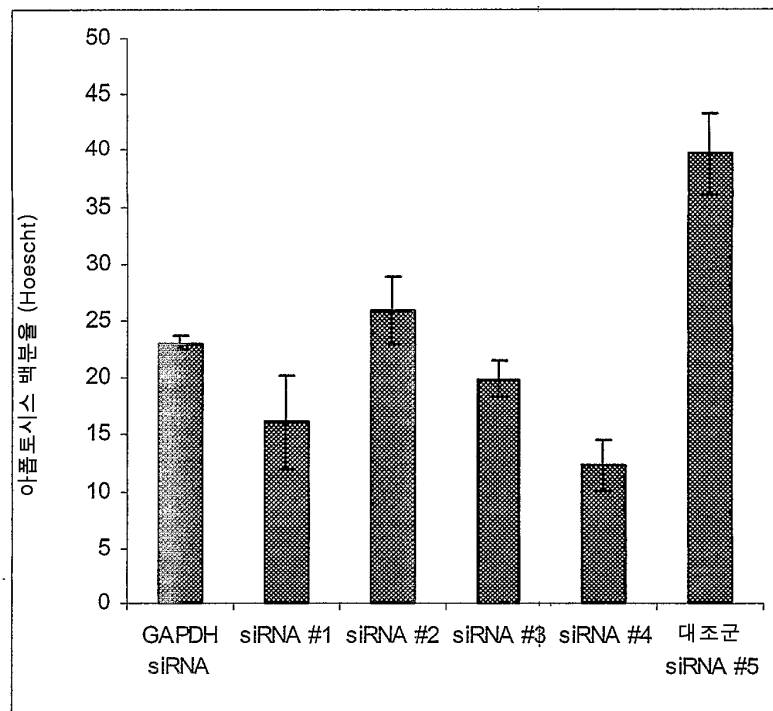


도면85

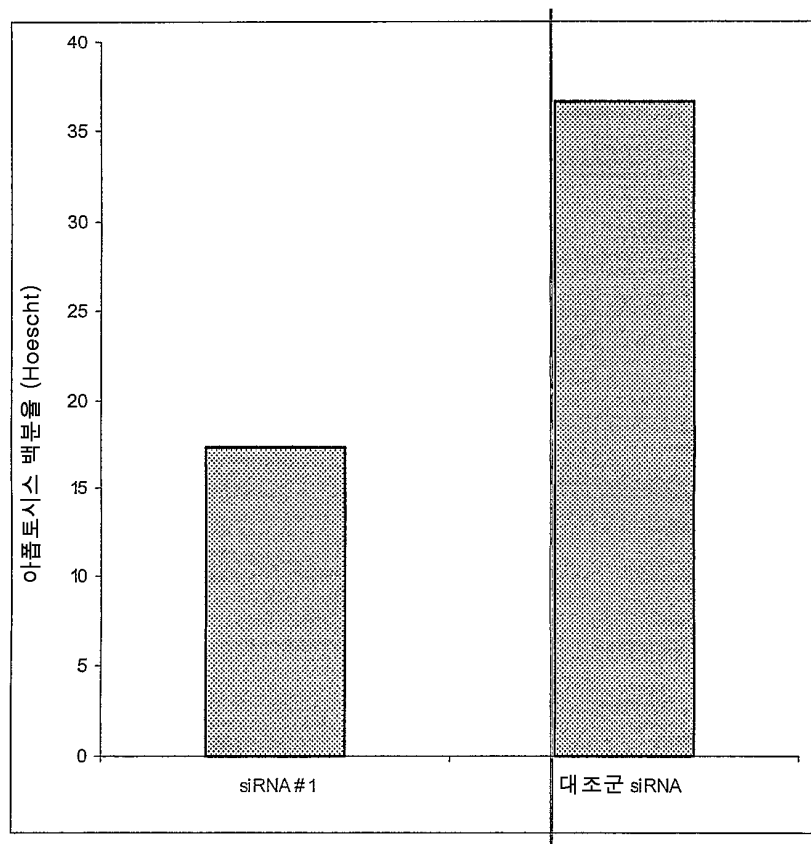




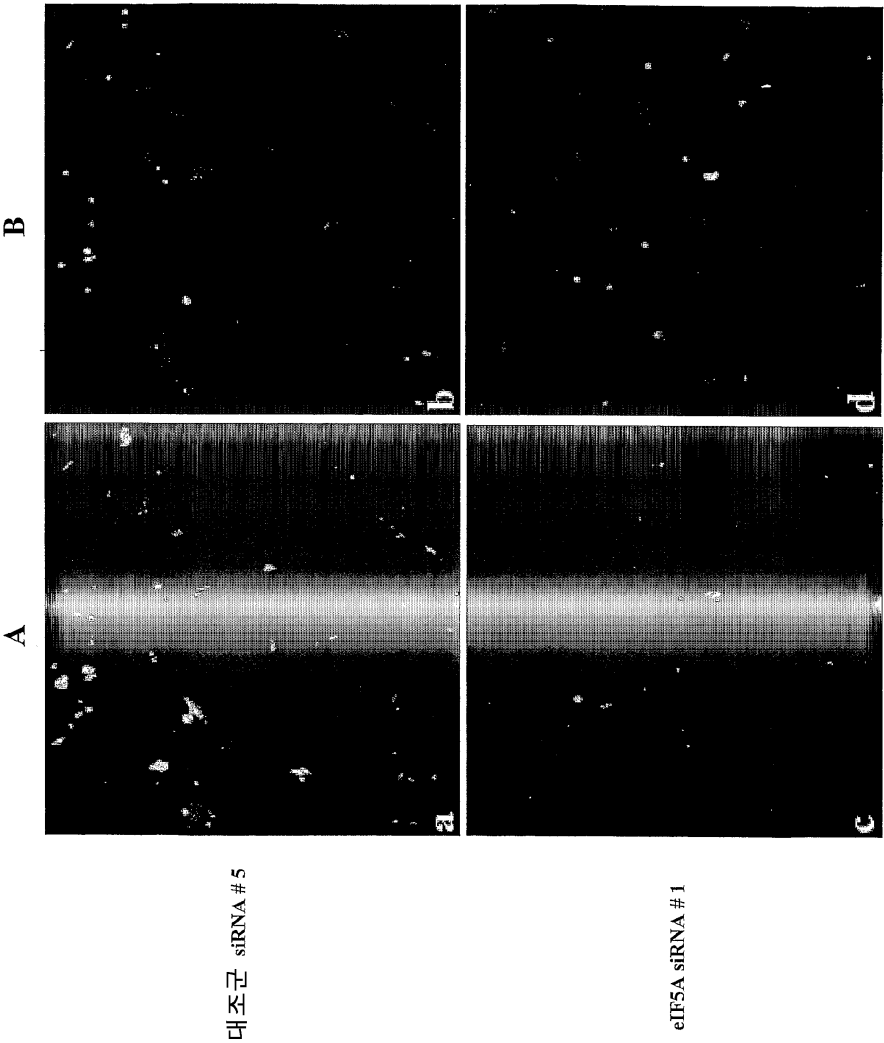
도면86



도면87



도면88



도면89

eIF5A1에 대한 siRNAs의 디자인

eIF5A1 mRNA 내의 siRNAs의 위치

\* 번역 시작 및 종료는 굵은체 및 밑줄쳐 있음.

```

1  ggcaagaggg tagaggcgcc ggccggcgcc gcagcgggct cggaggcagc ggttgggctc
61  gcggcgagcg gacggggctcg agtcagtgcc ttgcgcgagc ttggaatcga agcctcttaa
121  aatggcgagat gacttggaact tgcagacagg agatgcaggg gcctcagcca ccttcccaat
181  gcagtgctca goattacgta agaattggctt tgtggtgctc aaaggccggc catgtaagat
241  cgtcgagatg tctacttcga agactggcaa gcacggccac gccagggtcc atctgggttg
301  tattgacatc tttactggga agaaatatga agatatctgc ccgtcaactc ataatatgga
361  tgtccccaac atcaaaagga atgacttcca gctgatctgc atccaggatg ggtacctatc
421  actgctccag gacagcgggg aggtacgaga ggaacctcgt ctccctgagg gagaccttgg
481  caaggagatt gagcagaagt acgactgtgg agaagagatc ctgatcacgg tgcgtgtctg
541  catgacagag gaggcagctg ttgcaatcaa ggccatggca aaataactgg ctcccaggat
601  ggccgtgggtg gcagcagtgga tctctgaac ctgcagaggc cccctccccg agcctggcct
661  ggctctggccg cggctctaaa ctggactccc cctacacaaat ttatttgacg ttttattttg
721  gttttcccca cccctccaat ctgtcgggga gcccttgccc ttcaactagc tcccttggcc
781  aggagcgagc gaagctgttg ccttggtgaa gctgccctcc tcttctcccc tcaactaca
841  gccctggtgg gggagaaggg ggtgggtgct gcttggtggt tagtcttttt tttttttttt
901  tttttttttt aaattcaatc tggaaatcga aagcgggtga ttctggcaaa tggctcctgt
961  gccctcccca ctcacctctg gtctggtccc ctggttgcca tagcccttta ccttgagcac
1021 caccccaaca gactggggac cagcccccct gccctgctgt gtctctcccc aaaccccttt
1081 agatggggag ggaagaggag gagaggggag gggacctgcc cctctctcag gcactctggg
1141 gggccctgcc cccatgggct ttacccttcc ctgcgggctc tctccccgac acatttggtt
1201 aaatcaaaac tgaataaaac tacaagttta atatgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1261 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

siRNA # 1 타겟  
siRNA # 2 타겟  
siRNA # 3 타겟  
siRNA # 4 타겟

siRNA 타겟 및 서열의 위치 및 BLAST 결과

siRNA # 1 target position 375 to 395 bp (position 254 to 274 bp relative to start) % G/C = 39.1 BLAST = none but eIF5A

target 5' AA(AGGAATGACTTCCAGCTGA) 3'

siRNA 5' AAAGGAAUGACUCCAGCUGAdTdT 3'  
3' dTdTUUUCCUUACUGAAGGUCGACU 5'

siRNA # 2 target position 236 to 256 (115 to 135 bp relative to start) % G/C = 43.4 BLAST = identical to hypothetical protein in rat

target 5' AA(GATCGTCGAGATGTCTACT) 3'

siRNA 5' AAGAUUCGUCGAGAUGUCUACUdTdT 3'  
3' dTdTUUUCUAGCAGCUCUACAGAUGA 5'

siRNA # 3 target position 284 to 304 (163 to 183 bp relative to start) % G/C = 43.4 BLAST = none but eIF5A

target 5' AA(GGTCCATCTGGTTGGTATT) 3'

siRNA 5' AAGGUCCAUCUGGUUGUAUdTdT 3'  
3' dTdTUUCACAGGAGACCAACCAUAA 5'

siRNA # 4 target position 678 to 698 (3' UTR; position 557 to 577 bp relative to start) % G/C = 48 BLAST = none but eIF5A

target 5' AA(GCTGGACTCCTCTACACA) 3'

도면89-1

siRNA  
5' AAGCUGGACUCCUCCUACACAdTdT 3'  
3' dTdT UUCGACCUGAGGAGGAUGUGU 5'

siRNA # 5 대조군 ; siRNA # 1의 역서열

% G/C = 39.1 BLAST = good, no more than 17/23 % identity

타겟 5' AA(AGTCGACCTTCAGTAAGGA) 3'

siRNA 5' AAAGUCGACCUUCAGUAAGGAdTdT 3'  
3' dTdTUUUCAGCUGGAAGUCAUUCU 5'

<120> Use of antisense oligonucleotides or siRNA to suppress expression  
of eIF-5A1

<150> US 60/451,677  
<151> 2003-03-05

<150> US 10/383,614  
<151> 2003-03-10

<150> US 60/476,194  
<151> 2003-06-06

<150> US 60/504,731  
<151> 2003-09-22

<160> 85

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1  
<211> 1139  
<212> DNA  
<213> Rattus sp.

<220>  
<221> CDS  
<222> (33)..(494)

<400> 1  
cagggtctaga gttggaatcg aagcctctta aa atg gca gat gat ttg 47  
Met Ala Asp Asp Leu  
1 5

gac ttc gag aca gga gat gca ggg gcc tca gcc acc ttc cca atg cag 95  
Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala Thr Phe Pro Met Gln  
10 15 20

tgc tca gca tta cgt aag aat ggt ttt gtg gtg ctc aag ggc cgg cca 143  
Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val Leu Lys Gly Arg Pro  
25 30 35

tgt aag atc gtc gag atg tct act tcg aag act ggc aag cat ggc cat 191  
Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His  
40 45 50

gcc aag gtc cat ctg gtt ggt att gat att ttt act ggg aag aaa tat 239  
Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr  
55 60 65

gaa gat atc tgc ccg tcg act cat aac atg gat gtc ccc aac atc aaa 287  
Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys  
70 75 80 85

```

agg aat gat ttc cag ctg att ggc atc cag gat ggg tac cta tcc ctg      335
Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu
          90                      95                      100

ctc cag gac agt ggg gag gta cga gag gac ctt cgt ctg cct gag gga      383
Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly
          105                      110                      115

gac ctt ggc aag gag att gag cag aag tat gac tgt gga gaa gag atc      431
Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile
          120                      125                      130

ctg atc aca gtg ctg tcc gcc atg aca gag gag gca gct gtt gca atc      479
Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile
          135                      140                      145

aag gcc atg gca aaa          taactg gcttccaggg tggcgggtggt ggcagcagtg      530
Lys Ala Met Ala Lys
150

atccatgagc ctacagaggc ccctccccc gctctggctg ggcccttggc tggactccta      590

tccaatttat ttgacgtttt attttggttt tcttcacccc ttcaaactgt cggggagacc      650

ctgcccttca cctagctccc ttggccaggc atgagggagc catggccttg gtgaagctac      710

ctgcctcttc tctcgcagcc ctgatggggg aaagggagtg ggtactgcct gtggtttagg      770

ttcccctctc cctttttctt ttttaattcaa tttggaatca gaaagctgtg gattctggca      830

aatggtcttg tgtcctttat cccactcaaa cccatctggt cccctgttct ccatagtcct      890

tcacccccaa gcaccactga cagactgggg accagccccc ttccctgcct gtgtctcttc      950

ccaaaccctt ctataggggt gacaagaaga ggaggggggg aggggacacg atccctcctc     1010

aggcatctgg gaaggccttg ccccatggg ctttaccctt tctgtgggc tttctccctg     1070

acacatttgt taaaaatcaa acctgaataa aactacaagt ttaatatgaa aaaaaaaaaa     1130

aaaaaaaaa                                                                1139

```

<210> 2  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> Rattus sp.

<400> 2  
 Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala  
       1                  5                  10                  15

Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val  
20 25 30

Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr  
35 40 45

Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe  
50 55 60

Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp  
65 70 75 80

Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp  
85 90 95

Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu  
100 105 110

Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp  
115 120 125

Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu  
130 135 140

Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys  
145 150

<210> 3  
<211> 462  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
atggcagatg acttggactt cgagacagga gatgcagggg cctcagccac cttcccaatg 60  
cagtgtcag cattacgtaa gaatggcttt gtggtgtc aaggccggcc atgtaagatc 120  
gtcgagatgt ctacttcgaa gactggcaag cacggccacg ccaaggtcca tctggttggt 180  
attgacatct ttactgggaa gaaatatgaa gatatctgcc cgtcaactca taatatggat 240  
gtccccaaca taaaaggaa tgacttccag ctgattggca tccaggatgg gtacctatca 300  
ctgctccagg acagcgggga ggtacgagag gaccttcgtc tccctgaggg agaccttggc 360  
aaggagattg agcagaagta cgactgtgga gaagagatcc tgatcacggt gctgtctgcc 420  
atgacagagg aggcagctgt tgcaatcaag gccatggcaa aa 462

<210> 4  
 <211> 460  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 atggcagacg aaattgattt cactactgga gatgccgggg cttccagcac ttaccctatg 60  
 cagtgtctcg ccttgcgcaa aaacggcttc gtggtgctca aaggacgacc atgcaaaata 120  
 gtggagatgt caacttccaa aactggaaag catgggtcatg ccaaggttca ccttggttga 180  
 attgatattt tcacgggcaa aaaatatgaa gatatttgtc cttctactca caacatggat 240  
 gttccaaata ttaagagaaa tgattatcaa ctgatatgca ttcaagatgg ttacctttcc 300  
 ctgctgacag aaactgggtga agttcgtgag gatcttaaac tgccagaagg tgaactaggc 360  
 aaagaaatag agggaaaata caatgcaggt gaagatgtac aggtgtctgt catgtgtgca 420  
 atgagtgaag aatatgctgt agccataaaa ccttgcaaat 460

<210> 5  
 <211> 462  
 <212> DNA  
 <213> Rattus sp.

<400> 5  
 atggcagatg atttggaactt cgagacagga gatgcagggg cctcagccac cttcccaatg 60  
 cagtgtctcag cattacgtaa gaatggtttt gtggtgctca aaggccggcc atgtaagatc 120  
 gtcgagatgt ctacttcgaa gactggcaag catggccatg ccaaggtcca tctgggttggc 180  
 attgacattt ttactgggaa gaaatatgaa gatatctgcc cgtcgactca taatatggat 240  
 gtccccaaca tcaaacggaa tgacttocag ctgattggca tccaggatgg gtacctatcc 300  
 ctgctccagg acagtgggga ggtacgagag gaccttcgtc tgctgaagg agaccttggc 360  
 aaggagattg agcagaagta tgactgtgga gaagagatcc tgatcacagt gctgtctgcc 420  
 atgacagagg aggcagctgt tgcaatcaag gccatggcaa aa 462

<210> 6  
 <211> 606  
 <212> DNA  
 <213> Rattus sp.

<220>  
 <221> CDS

<222> (1) .. (453)

<400> 6

gct gtg tat tat tgg gcc cat aag aac cac ata cct gtg ctg agt cct 48  
Ala Val Tyr Tyr Trp Ala His Lys Asn His Ile Pro Val Leu Ser Pro  
1 5 10 15

gca ctc aca gac ggc tca ctg ggt gac atg atc ttt ttc cat tcc tat 96  
Ala Leu Thr Asp Gly Ser Leu Gly Asp Met Ile Phe Phe His Ser Tyr  
20 25 30

aaa aac cca ggc ttg gtc ctg gac atc gtt gaa gac ctg cgg ctc atc 144  
Lys Asn Pro Gly Leu Val Leu Asp Ile Val Glu Asp Leu Arg Leu Ile  
35 40 45

aac atg cag gcc att ttc gcc aag cgc act ggg atg atc atc ctg ggt 192  
Asn Met Gln Ala Ile Phe Ala Lys Arg Thr Gly Met Ile Ile Leu Gly  
50 55 60

gga ggc gtg gtc aag cac cac atc gcc aat gct aac ctc atg cgg aat 240  
Gly Gly Val Val Lys His His Ile Ala Asn Ala Asn Leu Met Arg Asn  
65 70 75 80

gga gct gac tac gct gtt tat atc aac aca gcc cag gag ttt gat ggc 288  
Gly Ala Asp Tyr Ala Val Tyr Ile Asn Thr Ala Gln Glu Phe Asp Gly  
85 90 95

tca gac tca gga gcc cgg cca gat gag gct gtc tcc tgg ggc aag atc 336  
Ser Asp Ser Gly Ala Arg Pro Asp Glu Ala Val Ser Trp Gly Lys Ile  
100 105 110

cgg atg gat gca cag cca gta aag gtc tat gct gat gca tct ctg gtt 384  
Arg Met Asp Ala Gln Pro Val Lys Val Tyr Ala Asp Ala Ser Leu Val  
115 120 125

ttc ccc ttg ctg gtg gct gag aca ttc gcc caa aag gca gat gcc ttc 432  
Phe Pro Leu Leu Val Ala Glu Thr Phe Ala Gln Lys Ala Asp Ala Phe  
130 135 140

aga gct gag aag aat gag gac tgagcag atgggtaaag acggaggctt 480  
Arg Ala Glu Lys Asn Glu Asp  
145 150

ctgccacacc tttatatttatt atttgcatac caaccctctc tgggccctct ccttggtcag 540

cagcatcttg agaataaatg gccttttttgt tggtttctgt aaaaaaagga ctttaaaaaa 600

aaaaaa 606

<210> 7

<211> 151

<212> PRT



<213> Rattus sp.

<400> 7

Ala Val Tyr Tyr Trp Ala His Lys Asn His Ile Pro Val Leu Ser Pro  
1 5 10 15

Ala Leu Thr Asp Gly Ser Leu Gly Asp Met Ile Phe Phe His Ser Tyr  
20 25 30

Lys Asn Pro Gly Leu Val Leu Asp Ile Val Glu Asp Leu Arg Leu Ile  
35 40 45

Asn Met Gln Ala Ile Phe Ala Lys Arg Thr Gly Met Ile Ile Leu Gly  
50 55 60

Gly Gly Val Val Lys His His Ile Ala Asn Ala Asn Leu Met Arg Asn  
65 70 75 80

Gly Ala Asp Tyr Ala Val Tyr Ile Asn Thr Ala Gln Glu Phe Asp Gly  
85 90 95

Ser Asp Ser Gly Ala Arg Pro Asp Glu Ala Val Ser Trp Gly Lys Ile  
100 105 110

Arg Met Asp Ala Gln Pro Val Lys Val Tyr Ala Asp Ala Ser Leu Val  
115 120 125

Phe Pro Leu Leu Val Ala Glu Thr Phe Ala Gln Lys Ala Asp Ala Phe  
130 135 140

Arg Ala Glu Lys Asn Glu Asp  
145 150

<210> 8

<211> 453

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

tccgtgtatt actgggccca gaagaaccac atccctgtgt ttagtcccgc acttacagac 60

ggctcgctgg gcgacatgat cttcttccat tcctacaaga acccgggcct ggtcctggac 120

atcgttgagg acctgaggct catcaacaca caggccatct ttgccaagtg cactgggatg 180

atcattctgg gcggggggcgt ggtcaagcac cacattgcca atgccaacct catgcggaac 240

ggggccgact acgctgttta catcaacaca gccaggaggt ttgatggctc tgactcaggt 300

gcccgaccag acgaggctgt ctcttggggc aagatccggg tggatgcaca gcccgtaag 360

gtctatgctg acgcctccct ggtcttcccc ctgcttgtgg ctgaaacctt tgcccagaag 420

atggatgcct tcatgcatga gaagaacgag gac 453

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (12)  
<223> a, t, c or g

<400> 9  
tcsaarachg gnaagcaygg 20

<210> 10  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer

<400> 10  
gcgaagcttc catggctcga gttttttttt tttttttttt tt 42

<210> 11  
<211> 972  
<212> DNA  
<213> Rattus sp.

<220>  
<221> CDS  
<222> (1) .. (327)

<400> 11  
tcg aag acc ggt aag cac ggc cat gcc aag gtc cat ctg gtt ggt att 48  
Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile  
1 5 10 15

gat att ttt act ggg aag aaa tat gaa gat atc tgc ccg tcg act cat 96  
Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His

20	25	30	
aac atg gat gtc ccc aac atc aaa agg aat gat ttc cag ctg att ggc			144
Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly			
35	40	45	
atc cag gat ggg tac cta tcc ctg ctc cag gac agt ggg gag gta cga			192
Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg			
50	55	60	
gag gac ctt cgt ctg cct gag gga gac ctt ggc aag gag att gag cag			240
Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln			
65	70	75	80
aag tat gac tgt gga gaa gag atc ctg atc aca gtg ctg tcc gcc atg			288
Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met			
85	90	95	
aca gag gag gca gct gtt gca atc aag gcc atg gca aaa		taa	330
Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys			
100	105		
ctggcttcca ggggtggcggg ggtggcagca gtgatccatg agcctacaga ggcccctccc			390
ccagctctgg ctggggccctt ggctggactc ctatccaatt tatttgacgt tttatttttg			450
ttttcctcac cccttcaaac tgtcggggag accctgcctt tcacctagct cccttggcca			510
ggcatgaggg agccatggcc ttgggtgaagc tacctgcctc ttctctcgca gccctgatgg			570
gggaaaggga gtgggtactg cctgtggttt aggttcccct ctcccttttt ctttttaatt			630
caatttggaa tcagaaaagct gtggattctg gcaaattggtc ttgtgtcctt tatcccactc			690
aaacccatct ggtcccctgt tctccatagt ccttcacccc caagcaccac tgacagactg			750
gggaccagcc cccttccctg cctgtgtctc ttcccaaacc cctctatagg ggtgacaaga			810
agaggagggg gggagggggac acgatccctc ctcaggcatc tgggaaggcc ttgccccat			870
gggctttacc ctttcctgtg ggctttctcc ctgacacatt tgttaaaaat caaacctgaa			930
taaaactaca agtttaatat gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa			972

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 12

Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile

1                      5                      10                      15  
 Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His  
                     20                      25                      30  
 Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly  
                     35                      40                      45  
 Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg  
                     50                      55                      60  
 Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln  
                     65                      70                      75                      80  
 Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met  
                     85                      90                      95  
 Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys  
                     100                      105

<210>      13  
 <211>      24  
 <212>      DNA  
 <213>      Artificial Sequence

<220>  
 <223>      Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer

<400>      13  
 caggtctaga gttggaatcg aagc                      24

<210>      14  
 <211>      30  
 <212>      DNA  
 <213>      Artificial Sequence

<220>  
 <223>      Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer

<400>      14  
 atatctcgag ccttgattgc aacagctgcc                      30

<210>      15  
 <211>      489  
 <212>      DNA  
 <213>      Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (33) .. (485)

<400> 15

caggctctaga gttggaatcg aagcctctta aa atg gca gat gat ttg 47  
Met Ala Asp Asp Leu  
1 5

gac ttc gag aca gga gat gca ggg gcc tca gcc acc ttc cca atg cag 95  
Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala Thr Phe Pro Met Gln  
10 15 20

tgc tca gca tta cgt aag aat ggt ttt gtg gtg ctc aag ggc cgg cca 143  
Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val Leu Lys Gly Arg Pro  
25 30 35

tgt aag atc gtc gag atg tct act tcg aag act ggc aag cat ggc cat 191  
Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His  
40 45 50

gcc aag gtc cat ctg gtt ggt att gat att ttt act ggg aag aaa tat 239  
Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr  
55 60 65

gaa gat atc tgc ccg tcg act cat aac atg gat gtc ccc aac atc aaa 287  
Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys  
70 75 80 85

agg aat gat ttc cag ctg att ggc atc cag gat ggg tac cta tcc ctg 335  
Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu  
90 95 100

ctc cag gac agt ggg gag gta cga gag gac ctt cgt ctg cct gag gga 383  
Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly  
105 110 115

gac ctt ggc aag gag att gag cag aag tat gac tgt gga gaa gag atc 431  
Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile  
120 125 130

ctg atc aca gtg ctg tcc gcc atg aca gag gag gca gct gtt gca atc 479  
Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile  
135 140 145

aag gct cgag 489  
Lys Ala  
150

<210> 16

<211> 151

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 16

Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala  
1 5 10 15

Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val  
20 25 30

Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr  
35 40 45

Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe  
50 55 60

Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp  
65 70 75 80

Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp  
85 90 95

Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu  
100 105 110

Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp  
115 120 125

Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu  
130 135 140

Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala  
145 150

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer

<400> 17

gtctgtgtat tattgggccc

20

<210> 18

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer

<400> 18  
gcgaagcttc catggctcga gttttttttt tttttttttt tt 42

<210> 19  
<211> 1299  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 19  
ggcacgaggg cggcggcggc ggtagaggcg ggcggcgcg cggcagcggg ctcgagggca 60  
gcggttgggc tcgcggcgag cggacggggg cgagtcagtg cgttcgcgcg agttggaatc 120  
gaagcctctt aaaatggcag atgacttgga cttcgagaca ggagatgcag gggcctcagc 180  
caccttcca atgcagtgt cagcattacg taagaatggc tttgtggtgc tcaaaggccg 240  
gccatgtaag atcgtcgaga tgtctacttc gaagactggc aagcacggcc acgccaaggt 300  
ccatctggtt ggtattgaca tctttactgg gaagaaatat gaagatatct gcccgtcaac 360  
tcataatatg gatgtcccca acatcaaaag gaatgacttc cagctgattg gcatccagga 420  
tggttaccta tctactgtcc aggacagcgg ggaggtacga gaggaccttc gtctccctga 480  
gggagacctt ggcaaggaga ttgagcagaa gtacgactgt ggagaagaga tcctgatcac 540  
ggtgctgtct gccatgacag aggaggcagc tgttgcaatc aaggccatgg caaaataact 600  
ggctcccagg atggcggttg tggcagcagt gatcctctga acctgcagag gccccctccc 660  
cgagcctggc ctggctctgg cccggtccta agctggactc ctctacaca atttatttga 720  
cgttttatth tggttttccc caccctccta atctgtcggg gagccctgc cttcaccta 780  
gctcccttgg ccaggagcga gcgaagctgt ggccttggtg aagctgccct cctcttctcc 840  
cctcacacta cagccctggt gggggagaag ggggtgggtg ctgcttgttg tttagtcttt 900  
tttttttttt tttttttttt tttaaattca atctggaatc agaaagcggg ggattctggc 960  
aaatggtcct tgtgccctcc ccaactcatcc ctgggtctggt ccctgttgcc ccatagccct 1020  
ttaccctgag caccacccca acagactggg gaccagcccc ctgcctgcc tgtgtctctc 1080  
cccaaaccct tttagatggg gaggaagag gaggagaggg gaggggacct gccccctcct 1140  
caggcatctg ggaggggcct gcccccatgg gctttaccct tccctgcggg ctctctcccc 1200

gacacatttg ttaaaatcaa acctgaataa aactacaagt ttaatatgaa aaaaaaaaaa 1260  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1299

<210> 20  
 <211> 462  
 <212> DNA  
 <213> Rattus sp.

<400> 20  
 atggcagatg atttggactt cgagacagga gatgcagggg cctcagccac cttcccaatg 60  
 cagtgtcag cattacgtaa gaatggtttt gtggtgctca agggccggcc atgtaagatc 120  
 gtcgagatgt ctacttcgaa gactggcaag catggccatg ccaaggtcca tctggttggt 180  
 attgatattt ttactgggaa gaaatatgaa gatatctgcc cgctcgactca taacatggat 240  
 gtccccaaca tcaaaaggaa tgatttccag ctgattggca tccaggatgg gtacctatcc 300  
 ctgctccagg acagtgggga ggtacgagag gaccttcgtc tgcctgaggg agaccttggc 360  
 aaggagattg agcagaagta tgactgtgga gaagagatcc tgatcacagt gctgtccgcc 420  
 atgacagagg aggcagctgt tgcaatcaag gccatggcaa aa 462

<210> 21  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val  
 20 25 30  
 Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr  
 35 40 45  
 Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe  
 50 55 60  
 Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp  
 65 70 75 80  
 Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp  
 85 90 95  
 Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu



100 105 110  
 Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp  
 115 120 125  
 Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu  
 130 135 140  
 Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys  
 145 150

<210> 22  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22  
 Met Ala Asp Glu Ile Asp Phe Thr Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ser  
 1 5 10 15

Thr Tyr Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val  
 20 25 30

Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr  
 35 40 45

Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe  
 50 55 60

Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp  
 65 70 75 80

Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Tyr Gln Leu Ile Cys Ile Gln Asp  
 85 90 95

Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Thr Glu Thr Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu  
 100 105 110

Lys Leu Pro Glu Gly Glu Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gly Lys Tyr Asn  
 115 120 125

Ala Gly Glu Asp Val Gln Val Ser Val Met Cys Ala Met Ser Glu Glu  
 130 135 140

Tyr Ala Val Ala Ile Lys Pro Cys Lys  
 145 150

<210> 23  
 <211> 154  
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala  
1 5 10 15

Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val  
20 25 30

Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr  
35 40 45

Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe  
50 55 60

Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp  
65 70 75 80

Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp  
85 90 95

Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu  
100 105 110

Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp  
115 120 125

Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu  
130 135 140

Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys  
145 150

<210> 24

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Ala Asp Glu Ile Asp Phe Thr Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Tyr Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val  
20 25 30

Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr  
35 40 45

Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe  
50 55 60

Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp

65	70	75	80
Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Tyr Gln Leu Ile Cys Ile Gln Asp			
	85	90	95
Gly Cys Leu Ser Leu Leu Thr Glu Thr Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu			
	100	105	110
Lys Leu Pro Glu Gly Glu Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gly Lys Tyr Asn			
	115	120	125
Ala Gly Glu Asp Val Gln Val Ser Val Met Cys Ala Met Ser Glu Glu			
	130	135	140
Tyr Ala Val Ala Ile Lys Pro Cys Lys			
145	150		

<210> 25  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 25  
 gacttggact tcgagacagg 20

<210> 26  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 26  
 gcacggccac gccaaaggtc 19

<210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 27

ggacagcggg gaggtacgag

20

<210> 28

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Illustrative consensus sequence

<400> 28

Met Ala Asp Glu Ile Asp Phe Thr Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Tyr Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val  
20 25 30

Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr  
35 40 45

Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe  
50 55 60

Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp  
65 70 75 80

Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Tyr Gln Leu Ile Cys Ile Gln Asp  
85 90 95

Gly Cys Leu Ser Leu Leu Thr Glu Thr Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu  
100 105 110

Lys Leu Pro Glu Gly Glu Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gly Lys Tyr Asn  
115 120 125

Ala Gly Glu Asp Val Gln Val Ser Val Met Cys Ala Met Ser Glu Glu  
130 135 140

Tyr Ala Val Ala Ile Lys Pro Cys Lys  
145 150

<210> 29

<211> 1309

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

ggcacgaggg tagaggcggc ggcggcggcg gcagcgggct cggaggcagc ggttgggctc	60
gcggcgagcg gacggggtcg agtcagtgcg ttcgcgcgag ttggaatcga agcctcttaa	120
aatggcagat gacttggact tcgagacagg agatgcaggg gcctcagcca ccttcccaat	180
gcagtgtca gcattacgta agaatggctt tgtgggtgctc aaaggccggc catgtaagat	240
cgtcgagatg tctacttcga agactggcaa gcacggccac gccaaaggctc atctggttgg	300
tattgacatc tttactggga agaaatatga agatatctgc ccgtcaactc ataatatgga	360
tgtccccaac atcaaaaagga atgacttcca gctgattggc atccaggatg ggtacctatc	420
actgctccag gacagcgggg aggtacgaga ggaccttcgt ctccctgagg gagaccttg	480
caaggagatt gagcagaagt acgactgtgg agaagagatc ctgatcacgg tgctgtctgc	540
catgacagag gaggcagctg ttgcaatcaa ggccatggca aaataactgg ctcccaggat	600
ggcgggtggtg gcagcagtga tcctctgaac ctgcagaggc cccctccccg agcctggcct	660
ggctctggcc cggtcctaag ctggactcct cctacacaat ttatttgacg ttttattttg	720
gttttcccca cccctcaat ctgtcgggga gcccctgccc ttcacctagc tcccttggcc	780
aggagcgagc gaagctgtgg ccttgggtgaa gctgccctcc tcttctcccc tcacactaca	840
gccctggtgg gggagaaggg ggtgggtgct gcttgtggtt tagtcttttt tttttttttt	900
tttttttttt aaattcaatc tggaatcaga aagcggtgga ttctggcaaa tggtccttgt	960
gccctcccca ctcatccctg gtctgggtccc ctggtgccc tagcccttta ccctgagcac	1020
cacccaaca gactggggac cagccccctc gcctgcctgt gtctctcccc aaacccttt	1080
agatggggag ggaagaggag gagaggggag gggacctgcc cctcctcag gcattctggga	1140
gggcctgcc cccatgggct ttacccttcc ctgcgggctc tctccccgac acatttgta	1200
aatcaaac tgaataaac tacaagttta atatgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1260
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1309

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

aaaggaatga cttccagctg att

23

<210>	31	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	31	
aagatcgtcg agatgtctac ttc		23
<210>	32	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	32	
aaggtccatc tggttggtat tga		23
<210>	33	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	33	
aagctggact cctcctacac aat		23
<210>	34	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	34	
aaagtcgacc ttcagtaagg att		23
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	35	
cctgtctcga agtccaagtc		20
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	36	
gacttggact tcgagacagg		20

<210>	37	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	37	
	ggaccttggc gtggccgtgc	20
<210>	38	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	38	
	gcacggccac gccaaggtcc	20
<210>	39	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	39	
	ctcgtacctc cccgctctcc	20
<210>	40	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	40	
	ggacagcggg gaggtacga	19
<210>	41	
<211>	465	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	41	
	atggcagatg acttggactt cgagacagga gatgcagggg cctcagccac cttcccaatg	60
	cagtgtcag cattacgtaa gaatggcttt gtggtgctca aaggccggcc atgtaagatc	120
	gtcgagatgt ctacttcgaa gactggcaag cacggccacg ccaaggtcca tctggttggt	180
	attgacatct ttactgggaa gaaatatgaa gatatctgcc cgtcaactca taatatggat	240

gtccccaaca tcaaaaggaa tgacttccag ctgattggca tccaggatgg gtacctatca 300  
 ctgctccagg acagcgggga ggtacgagag gaccttcgtc tccctgaggg agaccttggc 360  
 aaggagattg agcagaagta cgactgtgga gaagagatcc tgatcacggt gctgtctgcc 420  
 atgacagagg aggcagctgt tgcaatcaag gccatggcaa aataa 465

<210> 42  
 <211> 462  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 42  
 atggcagacg aaattgattt cactactgga gatgccgggg cttccagcac ttaccctatg 60  
 cagtgtcgg ccttgcgcaa aaacggcttc gtggtgctca aaggacgacc atgcaaaata 120  
 gtggagatgt caacttccaa aactggaaag catgggtcatg ccaaggttca ccttgttgga 180  
 attgatattt tcacgggcaa aaaatatgaa gatatttgtc cttctactca caacatggat 240  
 gttccaaata ttaagagaaa tgattatcaa ctgatatgca ttcaagatgg ttacctttcc 300  
 ctgctgacag aaactgggtga agttcgtgag gatcttaaac tgccagaagg tgaactaggc 360  
 aaagaaatag agggaaaata caatgcaggt gaagatgtac aggtgtctgt catgtgtgca 420  
 atgagtgaag aatatgctgt agccataaaa ccctgcaa at aa 462

<210> 43  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 43  
 Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val  
 20 25 30  
 Leu Lys Gly Trp Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Ala Ser Lys Thr  
 35 40 45  
 Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe  
 50 55 60  
 Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp  
 65 70 75 80



Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp  
85 90 95

Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Pro Glu Asp Leu  
100 105 110

Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp  
115 120 125

Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Leu Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu  
130 135 140

Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys  
145 150

<210> 44  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 44  
aaaggaatga cttccagctg a 21

<210> 45  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>  
<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide

<400> 45  
aaaggaauga cuuccagcug att 23

<210> 46  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide

<400> 46  
 ucagcuggaa gucauuccuu utt 23

<210> 47  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 47  
 aagatcgtcg agatgtctac t 21

<210> 48  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide

<400> 48  
 aagaucgucg agaugucuac utt 23

<210> 49  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide

<400> 49  
 aguagacauc ucgacgaucu utt 23

<210> 50  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 50  
 aaggtccatc tggttggtat t 21

<210> 51  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide

<400> 51  
 aagguccauc ugguugguau utt 23

<210> 52  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide

<400> 52  
aauaccaacc agauggaccu utt 23

<210> 53  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 53  
aagctggact cctcctacac a 21

<210> 54  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>  
<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide

<400> 54  
aagcuggacu ccuccuacac att 23

<210> 55  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>  
<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide

<400> 55  
uguguaggag gaguccagcu utt 23

<210> 56  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
  
 <400> 56  
 aaagtcgacc ttcagtaagg a 21  
  
  
 <210> 57  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
  
 <220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
 oligonucleotide  
  
 <400> 57  
 aaagucgacc uucaguaagg att 23  
  
  
 <210> 58  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
  
 <220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
 oligonucleotide  
  
 <400> 58  
 uccuuacuga aggucgacuu utt 23  
  
  
 <210> 59

<211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 59  
 gccaaagctta atggcagatg atttgg 26

<210> 60  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 60  
 ctgaattcca gttatatttgc catgg 25

<210> 61  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 61  
 aatgaattcc gccatgacag aggaggc 27

<210> 62  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 62  
 gcgaagcttc catggctcga gttttttttt tttttttttt tt 42

<210> 63

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 63  
 cctgtctcga agtccaagtc 20  
  
 <210> 64  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 64  
 ggaccttggc gtggccgtgc 20  
  
 <210> 65  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 65  
 ctcgtacctc cccgctctcc 20  
  
 <210> 66  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 66  
 cgtaccggtg cggttccagg 20  
  
 <210> 67

<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 67  
ggaccttggc gtggccgtgc 20

<210> 68  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 68  
Cys Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr  
1 5 10 15

Asp

<210> 69  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 69  
aaaggaatga cttccagctg acctgtctc 29

<210> 70  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 70  
aatcagctgg aagtcattcc tcctgtctc 29



<210> 71  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 71  
 aagatcgtcg agatgtctac tcctgtctc 29

<210> 72  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 72  
 aaagtagaca tctcgacgat ccctgtctc 29

<210> 73  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 73  
 aaggtccatc tggttggtat tcctgtctc 29

<210> 74  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 74  
 aaaataccaa ccagatggac ccctgtctc 29

<210> 75  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 75  
 aagctggact cctcctacac acctgtctc 29  
  
 <210> 76  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 76  
 aatgtgtagg aggagtccag ccctgtctc 29  
  
 <210> 77  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 77  
 aaagtcgacc ttcagtaagg acctgtctc 29  
  
 <210> 78  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 78  
 aatccttact gaaggtcgac tcctgtctc 29

<210> 79  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 79  
 aagcuggacu ccuccuacac 20  
  
 <210> 80  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 80  
 aaacacaucc uccucagguc g 21  
  
 <210> 81  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 81  
 aaaggaatga cttccagctg a 21  
  
 <210> 82  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 82  
 aagatcgtcg agatgtctac t 21

<210>	83	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400>	83	
aaggtccatc	tggttggtat t	21
<210>	84	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400>	84	
aagctggact	cctcctacac a	21
<210>	85	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400>	85	
aaagtcgacc	ttcagtaagg a	21