



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0132162
(43) 공개일자 2018년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61K 38/43* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/7105 (2013.01)
A61K 38/43 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7034630(분할)
(22) 출원일자(국제) 2008년12월26일
심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2017-7023558
원출원일자(국제) 2008년12월26일
심사청구일자 2017년09월22일
(85) 번역문제출일자 2018년11월29일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2008/004025
(87) 국제공개번호 WO 2009/084232
국제공개일자 2009년07월09일
(30) 우선권주장
JP-P-2007-336518 2007년12월27일 일본(JP)

(71) 출원인
가부시끼가이샤 스텔릭 사이세이 이카가꾸 젠큐쇼
일본 106-0044 도쿄도 미나토구 히가시아자부 1-
쵸메 9-15

(72) 발명자
요네야마, 히로유키
일본 106-0044 도쿄도 미나토구 히가시아자부 1-
쵸메 9-15 가부시끼가이샤 스텔릭 사이세이 이카
가꾸 젠큐쇼 내

코야마, 준
일본 106-0044 도쿄도 미나토구 히가시아자부 1-
쵸메 9-15 가부시끼가이샤 스텔릭 사이세이 이카
가꾸 젠큐쇼 내

후지, 마사토
일본 106-0044 도쿄도 미나토구 히가시아자부 1-
쵸메 9-15 가부시끼가이샤 스텔릭 사이세이 이카
가꾸 젠큐쇼 내

(74) 대리인
장수길, 박보현

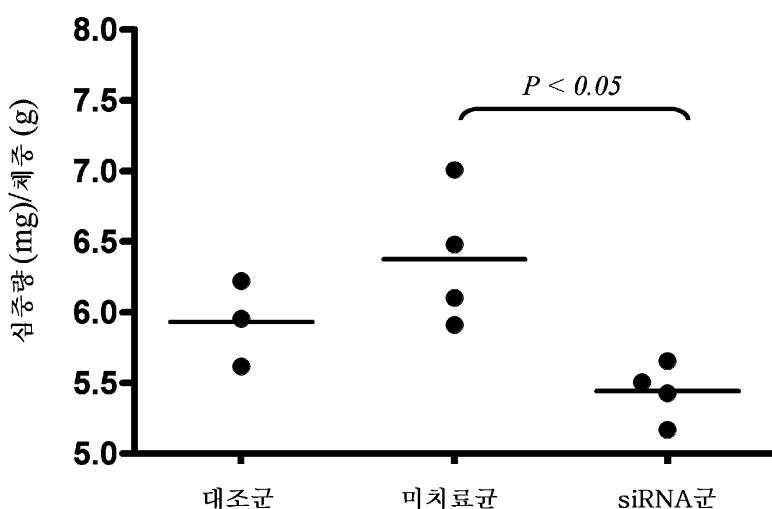
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 당췌 관련 유전자, 및 그의 이용

(57) 요약

본 발명자는 예의 연구의 결과, 당췌를 구성하는 당 중의 하나인 GalNAc의 4 위치 또는 6 위치의 황산화를 저해함으로써 생체 레벨에 있어서 조직의 섬유 형성을 억제할 수 있는 것을 처음으로 발견하는 것에 성공하였다. 또한 본 발명자는 GalNAc의 4 위치 또는 6 위치의 황산화 인히비터가 다양한 질환 모델 동물을 이용한 연구로부터, 조직의 섬유 형성에 기인하는 질환(조직 섬유 형성성 질환)에 대하여 치료 효과를 갖는 것을 실증하는 것에 성공하였다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/1137 (2013.01)

C12N 9/13 (2013.01)

C12Q 1/48 (2013.01)

C12Q 1/485 (2013.01)

G01N 33/5023 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

황산기 전이 효소의 유전자 발현을 억제하는 siRNA의 섬유 형성성 질환 치료 또는 예방 용도.

청구항 2

이하의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법.

(a) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소와, 피검 화합물을 접촉시키는 공정

(b) 상기 효소의 황산기 전이 활성을 측정하는 공정

(c) 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우와 비교하여 상기 활성을 저하시키는 화합물을 선택하는 공정

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 당쇄 관련 유전자 저해에 의한 생체 조직 레벨의 섬유 형성의 억제제에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

종래, 혼란과 단백질에 대해서는 정력적인 연구가 이루어져 많은 것이 판명되어 왔다. 그러나 반대로 인간의 유전자가 약 2만 2000개 정도에 불과한 것이나, 단백질의 번역 후 수식이 생체 내에서는 중요한 것도 또한 분명 해져서, 종래의 연구 어프로치의 한계도 또한 나타나게 된 것이다. 최근 들어, 포스트게놈, 포스트프로테오믹스의 추세 중에서 당쇄의 중요성이 재인식되고 있다(Nature지 446호:2007년 4월 26일 발행(비특허문현 1 내지 7)에서도 당쇄 특집이 대대적으로 편성되었음). 당쇄에 대해서는 구조 해석이 곤란한 등의 이유로부터 종래 그다지 해석되고 있지 않고, 암, 염증, 면역, 바이러스 감염 등에 관한 가능성이 생각되고 있지만, 현 단계에서 그 역할 등을 불명한 부분이 많아, 그 해명이 기대된다.

[0003]

당쇄를 구성하는 당(단당)으로서는 지금까지 다양한 당이 알려져 있다. 예를 들면, 글루코오스(Glc), 갈락토오스(Gal), 만노오스(Man), 글루쿠론산(GlcUA), 이드우론산(IdoA), 푸코스(Fuc), 글루코사민(GlcN), N-아세틸글루코사민(GlcNAc), N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 크실로오스(Xyl), 시알산(SA) 등이 알려져 있다.

[0004]

또한, 당쇄를 구성하는 당은 여러가지 화학 수식을 받는 것이 보고되어 있다. 예를 들면, 메틸화, 아세틸화, 포르밀화, 미리스토일화, 아미드화, 유비퀴틴화, 아실화, 인산화, 에피머화, 황산화 등이 알려져 있다. 또한, 시알화, 아시알로화, 푸코실화, 글리코실화, 갈락토실화, 락토실화, 만난화 등의 화학 수식을 예시할 수 있다.

[0005]

당에 있어서, 이들 화학 수식을 받는 부위는 복수 존재한다. 예를 들면, GlcNAc에서는, 1 위치 내지 6 위치의 탄소의 모두가 화학 수식을 받는 것이 알려져 있다. 그 밖의 당에 있어서도, 여러 부위에 있어서 화학 수식을 받는 것이 보고되어 있다.

선행기술문헌

비특허문현

[0006]

(비)특허문현 0001) Danica P. Galonic and David Y. GiN, Nature 446: 1000-1007 (2007)

(비)특허문현 0002) Christopher J. Thibodeaux et. Al., Nature 446: 1008-1016 (2007)

(비)특허문현 0003) Gerald W. Hart et. Al., Nature 446: 1017-1022 (2007)

(비)특허문현 0004) Ajit Varki, Nature 446: 1023-1029 (2007)

- (비)특허문현 0005) Joseph R. Bishop et. Al., Nature 446: 1030-1037 (2007)
- (비)특허문현 0006) Christopher N. et. Al., Nature 446: 1038-1045 (2007)
- (비)특허문현 0007) Peter H. Seeberger and Daniel B. Werz, Nature 446: 1046-1051 (2007)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 당쇄에 관련하는 유전자에 대한 연구에 의해서 새롭게 발견된 지견에 기초하는 것이다. 본 발명은 당쇄 관련 유전자의 새로운 용도의 제공을 과제로 한다. 구체적으로는, 당쇄 관련 유전자의 기능을 저해하는 것에 의한 생체 조직 레벨의 섬유 형성을 억제하는 약제, 및 상기 약제의 스크리닝 방법의 제공을 과제로 한다.
- [0008] 당쇄의 생체 내에서의 역할은 매우 중요한 것이 시사되어 있지만, 당쇄의 생체 내에서의 기능에 대해서는 불명한 부분이 많다.
- [0009] 상술한 바와 같이, 당쇄를 구성하는 당에는 복수의 종류가 알려져 있고, 당은 복수의 부위에 있어서 다양한 화학 수식을 받는 것에 의해 생체 내에서 중요한 생리 작용을 담당하는 것이라고 생각되고 있다.
- [0010] 상술한 바와 같이, 당쇄를 구성하는 당의 종류, 당을 표적으로 하는 화학 수식의 종류 및 그의 화학 수식되는 부위는 다수 존재하는 점에서, 당쇄는 무수한 베리에이션을 포함하는 것으로 생각된다. 따라서, 어떤 역할을 담당하는 당쇄의 구조를 특정하는 것은 매우 곤란하고, 또한, 어떤 질환에 기인하는 병의 용태와, 당쇄의 구체적인 작용과의 관련성을 발견하는 것은 매우 곤란함을 수반하는 것이다.
- [0011] 본 발명자는 예의 연구의 결과, 당쇄를 구성하는 당 중의 하나인 GalNAc의 4 위치 또는 6 위치의 황산화를 저해함으로써 생체 레벨에 있어서 조직의 섬유 형성을 억제할 수 있는 것을 발견하는 것에 처음으로 성공하였다. 또한 본 발명자는 GalNAc의 4 위치 또는 6 위치의 황산화 인히비터가 다양한 질환 모델 동물을 이용한 연구로부터, 조직의 섬유 형성에 기인하는 질환(조직 섬유 형성성 질환)에 대하여 치료 효과를 갖는 것을 실증하였다.
- [0012] 본 발명은 당쇄 관련 유전자의 기능을 저해하는 것에 의한 생체 조직 레벨의 섬유 형성을 억제하는 약제, 및 상기 약제의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는,
- [0013] [1] N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화 인히비터를 성분으로 하는 조직 섬유 형성 억제제,
- [0014] [2] 생체 조직의 섬유 형성에 대하여 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, [1]에 기재된 약제,
- [0015] [3] 상기 인히비터가 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소의 기능을 저해하는 활성을 가지는, [1] 또는 [2]에 기재된 약제,
- [0016] [4] 상기 인히비터가 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소 유전자의 발현을 억제하는 siRNA인, [3]에 기재된 약제,
- [0017] [5] 상기 인히비터가 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기의 탈황산화 효소인, [1] 또는 [2]에 기재된 약제,
- [0018] [6] 섬유 형성성 질환의 치료용 또는 예방용의, [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 기재된 약제,
- [0019] [7] 당쇄를 구성하는 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화를 저해하는 화합물을 선택하는 공정을 포함하는 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법,
- [0020] [8] 이하의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법,
- [0021] (a) N-아세틸갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민을 함유하는 당쇄와, 피검 화합물을 접촉시키는 공정
- [0022] (b) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치에 대해서 황산화의 정도를 측정하는 공정
- [0023] (c) 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우와 비교하여 황산화의 정도를 저하시키는 화합물을 선택하는 공정

- [0024] [9] 이하의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법,
 [0025] (a) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소와, 피검 화합물을 접촉시키는 공정
 [0026] (b) 상기 효소의 황산기 전이 활성을 측정하는 공정
 [0027] (c) 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우와 비교하여 상기 활성을 저하시키는 화합물을 선택하는 공정
 [0028] [10] 이하의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법,
 [0029] (a) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는 세포에 피검 화합물을 접촉시키는 공정
 [0030] (b) 상기 세포에서의 유전자의 발현량을 측정하는 공정
 [0031] (c) 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우와 비교하여 상기 유전자의 발현량을 저하시키는 화합물을 선택하는 공정
 [0032] [11] 이하의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법,
 [0033] (a) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역과 리포터 유전자가 기능적으로 결합한 구조를 갖는 DNA를 포함하는 세포 또는 세포 추출액과, 피검 화합물을 접촉시키는 공정
 [0034] (b) 상기 리포터 유전자의 발현량을 측정하는 공정
 [0035] (c) 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우와 비교하여 상기 리포터 유전자의 발현량을 저하시키는 화합물을 선택하는 공정
 [0036] [12] 이하의 공정 (a) 및 (b)를 포함하는, 섬유 형성성 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약 조성물의 제조 방법,
 [0037] (a) 피검 시료로부터 [7] 내지 [11] 중 어느 하나에 기재된 방법에 의해 조직 섬유 형성 억제제를 선택하는 공정
 (b) 상기 약제와 의약적으로 혼용되는 담체를 혼합하는 공정
 [0039] 을 제공하는 것이다.
 [0040] 또한 본 발명은 이하에 관한 것이다.
 [0041] [13] N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화 인히비터를 개체에 투여하는 공정을 포함하는, 조직 섬유 형성을 억제하는 방법.
 [0042] [14] N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화 인히비터의, 조직 섬유 형성 억제제의 제조에서의 사용.
 [0043] [15] 조직 섬유 형성 억제에 있어서의 사용을 위한 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화 인히비터.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 DOX 기관 내 투여에 의해 유도된 심근증 모델 마우스의 유전자 발현에 대해서 정량 역전사 PCR법을 이용하여 검토한 결과에 대해서 나타낸 결과의 도면이다. 검토 항목은 siRNA의 표적 유전자인 Ga1NAc4S-6ST, 섬유 형성 마커인 α -SMA와 I형 콜라겐으로 하였다. 그래프는 목적 유전자와 하우스키핑 유전자(house keeping Gene)(리보솜 18S)의 상대비를 나타내고 있다. * P<0.001(t-검정)
- 도 2는 염산독소루비신(DOX: 교와학꼬사 제조) 복강 내 투여에 의해 유발된 심근증 모델 마우스에 있어서의 심 중량·체중비에 대해서 해석한 결과에 대해서 도시하고 있는 도면이다. * P<0.05(t-검정)
- 도 3은 DOX 기관 내 투여에 의해 유도된 심근증 모델 마우스에 있어서의 siRNA 치료군의 I형 콜라겐 침착의 억제 효과를 나타내는 조직 소견을 나타내는 사진이다. 배율 100배.
- 도 4는 DOX 기관 내 투여에 의해 유도된 심근증 모델 마우스에 있어서의 siRNA 치료군의 III형 콜라겐 침착의

억제 효과를 나타내는 조직 소견을 나타내는 사진이다. 배율 100배.

도 5는 DOX 기관 내 투여에 의해 유도된 심근증 모델 마우스 siRNA 치료군의 섬유아세포의 집적 억제 효과에 대해서 나타낸 사진이다. 배율 50배.

도 6은 DSS에 의해 유도된 마우스 장관 섬유 형성 모델의 임상상을 나타내는 그래프이다. GalNAc4S-6ST siRNA 투여에 의해 임상 스코어(좌측), 대장 길이의 단축(우측) 모두 유의하게 억제되어 있다.

도 7은 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 섬유 형성 관련 유전자의 발현을 나타내는 그래프이다. 대장 조직에 있어서의 GalNAc4S-6ST 및 섬유 형성 마커인 α -SMA와 I형 콜라겐을 검토하였다. 그래프는 목적 유전자와 하우스키핑 유전자(리보솜 18S)의 상대비를 나타내고 있다. GalNAc4S-6ST siRNA의 사일런싱 효과(상측)에 의해 I형 콜라겐(하좌측), α -SMA(하우측)의 발현 증강이 유의하게 억제된다.

도 8은 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 콜라겐의 조직 침착을 나타내는 사진이다. 대장 조직의 마송(Masson) 염색상(청색). X100. GalNAc4S-6ST siRNA에 콜라겐의 조직 침착이 경감한다.

도 9는 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 섬유아세포 침윤을 나타내는 사진이다. 대장 조직의 섬유아세포 염색상(갈색). X100. GalNAc4S-6ST siRNA에 의해 섬유아세포의 전증성의 침윤이 억제된다.

도 10은 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 마크로파지 침윤상을 나타내는 사진이다. 대장 조직의 마크로파지 염색상(갈색). X100. GalNAc4S-6ST siRNA에 의해 마크로파지의 전증성의 침윤이 억제된다.

도 11은 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 대장 길이를 나타내는 그래프이다. GalNAc4ST siRNA에 의해 대장의 단축이 유의하게 억제된다.

도 12는 PPE에 의해 유도된 마우스 폐기종 모델의 임상상을 나타내는 사진이다. C6ST-1 siRNA 투여에 의해 조직학적인 폐포벽 파괴가 현저하게 억제되어 있다. X100.

도 13은 마우스 폐기종 모델에 있어서의 섬유 형성 관련 유전자의 발현을 나타내는 그래프이다. 폐 조직에 있어서의 C6ST-1 및 섬유 형성 마커인 α -SMA와 I형 콜라겐을 검토하였다. 그래프는 목적 유전자와 하우스키핑 유전자(리보솜 18S)의 상대비를 나타내고 있다. C6ST-1 siRNA의 사일런싱 효과(좌측)에 의해 I형 콜라겐(중앙), α -SMA(우측)의 발현 증강이 유의하게 억제된다.

도 14는 마우스 폐기종 모델에 있어서의 섬유아세포 침윤을 나타내는 사진이다. 폐 조직의 섬유아세포 염색상(갈색). X200. C6ST-1 siRNA에 의해 섬유아세포의 폐포 간질에 있어서의 침윤이 억제된다.

도 15는 마우스 폐기종 모델에 있어서의 마크로파지 침윤상을 나타내는 사진이다. 폐 조직의 마크로파지 염색상(갈색). X200. C6ST-1 siRNA에 의해 마크로파지의 폐포 간질에 있어서의 침윤이 억제된다.

도 16은 마우스 폐기종 모델에 있어서의 정적폐탄성(static lung compliance)(Cst)를 나타내는 그래프이다. C6ST-1 siRNA에 의해 Cst는 유의하게 저하된다.

도 17은 마우스 폐기종 모델에 있어서의 우폐의 용량(μ l)을 나타내는 그래프이다. C6ST-1 siRNA에 의해 폐 용량은 유의하게 저하된다.

도 18은 마우스 폐기종 모델에 있어서의 섬유 형성 관련 유전자의 발현을 나타내는 그래프이다. 폐 조직에 있어서의 섬유 형성 마커인 α -SMA, I형 콜라겐 및 TGF- β 를 검토하였다. 그래프는 목적 유전자와 하우스키핑 유전자(리보솜 18S)의 상대비를 나타내고 있다. GalNAcST siRNA의 사일런싱에 의해 각 섬유 형성 마커의 발현 증강이 유의하게 억제된다.

도 19는 마우스 폐기종 모델에 있어서의 정적폐탄성(Cst)를 나타내는 그래프이다. GalNAcST siRNA에 의해 Cst는 유의하게 저하된다.

도 20은 마우스 폐기종 모델에 있어서의 우폐의 용량(μ l)을 나타내는 그래프이다. GalNAcST siRNA에 의해 폐 용량은 유의하게 저하된다.

도 21은 마우스 2형 당뇨병 모델에 있어서의 비만의 추이를 나타내는 그래프이다. C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA에 의해 비만 억제 경향을 나타낸다. C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA에 대해서는 유의한 항비만 효과를 나타낸다.

도 22는 마우스 2형 당뇨병 모델에 있어서의 인슐린 저항성을 나타내는 그래프이다. C4ST-1 siRNA, C4ST-2

siRNA, C4ST-3 siRNA에 의해 인슐린 저항성이 유의하게 개선된다.

도 23은 마우스 2형 당뇨병 모델에 있어서의 췌장 조직의 유전자 발현을 나타내는 사진이다. C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA에 의해 췌장 조직의 C4ST-1, C4ST-2, C4ST-3 유전자 발현이 억제된다.

도 24는 마우스 2형 당뇨병 모델에 있어서의 췌장 소도(islet)에의 APP 침착을 나타내는 사진이다. C4ST-2 siRNA에 의해 소도의 APP(녹색) 침착이 억제된다. 세포핵(적색), x400.

도 25는 마우스 2형 당뇨병 모델에 있어서의 췌장 소도에의 섬유아세포 침윤을 나타내는 사진이다. C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA에 의해 소도에의 섬유아세포(갈색) 침윤이 억제된다. X200.

도 26은 마우스 2형 당뇨병 모델에 있어서의 췌장 소도에의 마크로파지 침윤을 나타내는 사진이다. C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA에 의해 소도에의 마크로파지(갈색) 침윤이 억제된다. X200.

도 27은 마우스 2형 당뇨병 모델에 있어서의 인슐린 저항성을 도시한 도면이다. GalNAcST siRNA 투여에 의해 인슐린 부하 후의 혈당 강하가 양호하게 행해지는, 즉, 인슐린 저항성이 개선되어 있는 것을 나타낸다.

도 28은 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 섬유아세포의 신장 조직 간질 집적을 나타내는 그래프 및 사진이다. C4ST-1 siRNA에 의해 섬유아세포(갈색)의 집적이 유의하게 억제된다. X200.

도 29는 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 마크로파지의 신장 조직 간질 집적을 나타내는 그래프 및 사진이다. C4ST-1 siRNA에 의해 마크로파지(갈색)의 집적이 유의하게 억제된다. X200.

도 30은 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 α SMA 양성 세포의 신장 조직 간질 집적을 나타내는 사진이다. C4ST-1 siRNA에 의해 α SMA 양성 세포(갈색)의 집적이 유의하게 억제된다. X200.

도 31은 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 항섬유 형성 효과를 나타내는 그래프이다. GalNAc4S-6ST(G#1)siRNA의 투여에 의해 신장 조직에 있어서의 GalNAc4S-6ST(G#1), α SMA, TGF β 의 발현 증강이 유의하게 억제된다. ARB; 안지오텐신 수용체 길항제(발사르탄).

도 32는 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 섬유아세포의 신장 조직 간질 집적을 나타내는 사진 및 그래프이다. GalNAc4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 섬유아세포(갈색)의 집적이 유의하게 억제된다. X200.

도 33은 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 마크로파지의 신장 조직 간질 집적을 나타내는 사진 및 그래프이다. GalNAc4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 마크로파지(갈색)의 집적이 유의하게 억제된다. X200.

도 34는 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 IV형 콜라겐의 축적을 나타내는 사진 및 그래프이다. GalNAc4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 IV형 콜라겐(갈색) 양성으로 확인할 수 있는 사구체 기저막의 비후가 유의하게 억제된다. X400.

도 35는 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 신장 보호 작용을 나타내는 그래프이다. GalNAc4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 신장 조직의 안지오텐시노겐 및 ACE의 발현 증강이 유의하게 억제된다.

도 36은 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 신장 기능 보호 작용을 나타내는 그래프이다. GalNAc4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 혈청 크레아티닌의 증가 즉 신장 기능 저하가 억제된다.

도 37은 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 유전자 발현을 나타내는 그래프이다. GalNAcST siRNA에 의해 신장 조직에 있어서의 GalNAc4ST-1, GalNAc4ST-2, GalNAc4S-6ST의 발현 증강이 유의하게 억제된다.

도 38은 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 항섬유 형성 효과를 나타내는 그래프이다. GalNAcST siRNA에 의해 신장 조직에 있어서의 CTGF, α SMA, I형 콜라겐, ACE의 발현 증강이 유의하게 억제된다.

도 39는 마우스 약제성 간질성 신장염에 있어서의 유전자 발현을 나타내는 그래프이다. GalNAc4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 신장 조직의 GalNAc4S-6ST(G#1)의 발현 증강이 유의하게 억제된다.

도 40은 마우스 약제성 간질성 신장염에 있어서의 콜라겐 침착을 나타내는 사진이다. GalNAc4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 신장 간질에의 I형 콜라겐(갈색)의 침착이 명확히 감소한다. X200.

도 41은 마우스 UUO 섬유 형성 모델에 있어서의 항섬유 형성 효과를 나타내는 그래프이다. C6ST siRNA에 의해 신장 조직에 있어서의 C6ST-2(G#10), TGF β , α SMA, I형 콜라겐, CTGF의 발현 증강이 유의하게 억제된다.

도 42는 마우스 UUO 섬유 형성 모델에 있어서의 섬유아세포의 간질 집적을 나타내는 그래프 및 사진이다. C6ST

siRNA에 의해 섬유아세포(갈색)의 방사구체로부터 간질에 있어서의 집적이 유의하게 억제된다. X200.

도 43은 마우스 UUO 섬유 형성 모델에 있어서의 마크로파지의 간질 집적을 나타내는 그래프 및 사진이다. C6ST siRNA에 의해 마크로파지(갈색)의 방사구체로부터 간질에 있어서의 집적이 유의하게 억제된다. X200.

도 44는 마우스 UUO 섬유 형성 모델에 있어서의 콜라겐의 침착을 나타내는 그래프 및 사진이다. C6ST siRNA에 의해 IV형 콜라겐(갈색)으로 확인되는 사구체 기저막의 비후가 유의하게 억제된다. X400.

도 45는 마우스 UUO 섬유 형성 모델에 있어서의 조직 집적 섬유아세포의 활성화를 나타내는 사진이다. C6ST siRNA에 의해 α SMA 양성 세포(갈색)의 방사구체로부터 간질에 있어서의 집적이 유의하게 억제된다. X400.

도 46은 마우스 UUO 섬유 형성 모델에 있어서의 ACE 생산 세포의 간질 집적을 나타내는 사진이다. C6ST siRNA에 의해 ACE 생산 세포(갈색)의 방사구체로부터 간질에 있어서의 집적이 유의하게 억제된다. X400.

도 47은 마우스 당뇨병성 망막증 모델에 있어서의 IV형 콜라겐의 조직 축적을 나타내는 사진이다. GalNac4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 IV형 콜라겐(갈색)의 집적이 억제된다. X200. GCL; 신경절 세포층, INL; 내과립층, ONL; 외과립층.

도 48은 마우스 당뇨병성 망막증 모델에 있어서의 CSPG의 조직 축적을 나타내는 사진이다. GalNac4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 CSPG(갈색)의 집적이 억제된다. 특히 GCL, ONL로부터 색소 상피 세포층에 있어서의 억제 효과가 현저하다. X200.

도 49는 마우스 당뇨병성 망막증 모델에 있어서의 GFAP 양성 세포를 나타내는 사진이다. GalNac4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 GFAP 양성 세포(갈색)가 INL로부터 GCL에 걸쳐서 현저하게 증가하고 있다. X200.

도 50은 마우스 당뇨병성 망막증 모델에 있어서의 신경절 세포수를 나타내는 그래프이다. GGL에서의 신경절 세포수의 카운트. GalNac4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 신경절 세포수의 감소를 유의하게 억제할 수 있다.

도 51은 마우스 당뇨병성 망막증 모델에 있어서의 시신경 재생 효과를 나타내는 그래프이다. GalNac4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 눈 조직의 GS의 발현이 유의하게 상승한다.

도 52는 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 유전자 발현을 나타내는 그래프이다. GalNAc4S-6ST의 간장 조직에 있어서의 발현 증강과, GalNAcST siRNA에 의한 유의한 억제.

도 53은 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 섬유 형성 관련 유전자 발현을 나타내는 그래프이다. I형 콜라겐, α SAM의 간장 조직에 있어서의 발현 증강과, GalNAcST siRNA에 의한 유의한 억제.

도 54는 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 섬유 형성 세포 침윤을 나타내는 사진이다. GalNAcST siRNA에 의해 섬유아세포(갈색)의 간장 조직에 있어서의 브릿지형 집적이 억제되어 있다. X100.

도 55는 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 임상적 섬유 형성 스코어를 나타내는 그래프이다. GalNAcST siRNA에 의해 간장 조직의 섬유 형성 스코어의 상승이 유의하게 억제되어 있다.

도 56은 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 마크로파지 침윤을 나타내는 사진이다. GalNAcST siRNA에 의해 마크로파지(갈색)의 간장 조직에 있어서의 집적이 억제되어 있다. X100.

도 57은 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 지질 대사 관련 유전자 발현을 나타내는 그래프이다. GalNAcST siRNA에 의해 간장 조직에 있어서의 ChREBP, ACC2의 발현 상승이 유의하게 억제된다.

도 58은 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 섬유 형성 세포 침윤을 나타내는 사진이다. C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA에 의해 섬유아세포(갈색)의 간장 조직에 있어서의 브릿지형 집적이 억제되어 있다. X100.

도 59는 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 임상적 섬유 형성 스코어를 나타내는 그래프이다. C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA에 의해 간장 조직의 섬유 형성 스코어의 상승이 유의하게 억제되어 있다.

도 60은 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 임상적 간 장해를 나타내는 그래프이다. C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA에 의해 간세포 장해의 지표인 ALT의 상승이 억제되어 있다.

도 61은 마우스 간 섬유증 모델에 있어서의 섬유아세포 침윤을 나타내는 사진이다. C6ST siRNA에 의해 섬유아세포(갈색)의 간장 조직에 있어서의 집적이 억제되어 있다. X50.

도 62는 마우스 간 섬유증 모델에 있어서의 임상적 섬유 형성 스코어를 나타내는 그래프이다. C6ST siRNA에 의해 간장 조직의 섬유 형성 스코어의 상승이 유의하게 억제되어 있다.

도 63은 마우스 간 섬유증 모델에 있어서의 항섬유 형성 효과를 나타내는 그래프이다. C6ST siRNA에 의해 어떤 α SMA, I형 콜라겐, CTGF, TGF β 의 발현이 유의하게 억제된다.

도 64는 마우스 파킨슨병 모델에 있어서의 항섬유 형성 효과를 나타내는 그래프이다. Ga1NAc4S-6ST siRNA에 의해 뇌 조직의 Ga1NAc4S-6ST, TGF β , I형 콜라겐, α SMA의 발현이 유의하게 억제된다.

도 65는 마우스 파킨슨병 모델에 있어서의 섬유아세포 집적을 나타내는 사진이다. Ga1NAc4S-6ST siRNA에 의해 섬유아세포(갈색)의 뇌 조직 집적이 격감한다. X200.

도 66은 마우스 파킨슨병 모델에 있어서의 신경 보호 작용을 나타내는 그래프이다. Ga1NAc4S-6ST siRNA에 의해 GDNF, Nurr1의 발현이 유의하게 증강한다.

도 67은 마우스 파킨슨병 모델에 있어서의 도파민 신경 재생 효과를 나타내는 사진이다. Ga1NAc4S-6ST siRNA에 의해 TH 양성 도파민 신경(녹색)의 손실이 억제된다. X200.

도 68은 마우스 파킨슨병 모델에 있어서의 도파민 신경 재생 효과를 나타내는 사진이다. Ga1NAc4ST siRNA에 의해 TH 양성 도파민 신경(녹색)의 손실이 억제된다. X200.

도 69는 2형 당뇨병성 망막증 모델 마우스에 있어서의, C4-술파타제의 CSPG의 감소약화 효과를 나타내는 사진이다. 2형 당뇨병 모델 마우스 망막에 있어서의 CSPG(CS56) 염색상(갈색, 화살표)을 나타낸다.

도 70은 2형 당뇨병성 망막증 모델 마우스에 있어서의, C4-술파타제의 혈관 증생 억제 효과를 나타내는 사진이다. 2형 당뇨병 모델 마우스 망막에 있어서의 혈관 내피 세포(CD31) 염색상(갈색, 화살표)을 나타낸다.

도 71은 2형 당뇨병성 망막증 모델 마우스에 있어서의, C4-술파타제의 콜라겐 증생 억제 효과를 나타내는 사진이다. 2형 당뇨병 모델 마우스 망막에 있어서의 IV형 콜라겐 염색상(갈색, 화살표)을 나타낸다.

도 72는 마우스 2형 당뇨병 모델의 간장에 있어서의 C4-술파타제의 섬유아세포의 집적 억제 효과에 대해서 나타낸 사진이다. 배율 50배와 100배.

도 73은 마우스 2형 당뇨병 모델의 간장에 있어서의 마크로파지 침윤 억제 효과에 대해서 나타낸 사진이다. 배율 50배와 100배.

도 74는 마우스 2형 당뇨병 모델의 혈청 중의 생화학 검사(AST, ALT, TG)의 결과에 대해서 나타내는 그래프이다. 그래프 중, 미치료군은 unt, 대조군은 nor, C4-술파타제는 C4sul로 표기한다.

도 75는 뇌 조직에 있어서의 CSPG의 국재를 나타내는 사진이다. 해당 사진은 뇌 조직 중에 있어서의 CSPG의 발현 동태에 대해서 효소 항체 면역 염색법을 이용하여 해석을 행한 결과이다. 일차 항체는 CS-56(세이가가꾸 고교사 제조), 마우스 스테인 키트를 이용하여 염색을 행하였다.

도 76은 뇌 조직 중에 있어서의 도파민 작동성 신경의 국재를 나타내는 사진이다. 형광 면역 염색법을 이용하여 해석을 행한 결과이다.

도 77은 실시간 PCR법에 의한 TNF- α 의 유전자 발현 해석의 결과를 나타내는 그래프이다. 그래프는 섬유화 마커인 TGF- β , 마크로파지 침윤에 수반하는 염증의 지표인 TNF- α 의 발현에 대해서 실시간 PCR로 검토한 결과에 대해서 나타내고 있다.

도 78은 실시간 PCR법에 의한 Nurr1 유전자 발현 해석의 결과를 나타내는 그래프이다. 그래프는 뇌 조직 중에 있어서의 Nurr1의 유전자 발현에 대해서 사이버 프리미스 키트(Cyber premix kit)(다카라 바이오사 제조)와 실시간 PCR 써멀 사이클러 DICE(다카라 바이오사 제조)를 이용하여 행하였다. 또한, 그래프는 Nurr1과 하우스키핑 유전자(β -액틴)의 상대비를 나타내고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0046] 본 발명은 당췌를 구성하는 당 중의 하나인 N-아세틸갈اكت오사민에 있어서, 그 4 위치 또는 6 위치의 부위의 황산화를 저해하는 것을 기서로 하는 조직 섬유 형성 억제제에 관한 것이다.

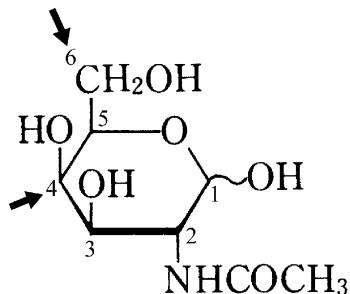
[0047] 즉 본 발명은 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화 인히비터(본 명세서에 있어서, 「본 발명의 인히비터」 또는 단순히 「인히비터」라고 기재하는 경우가 있음)를 성분으로 하는 조직 섬유 형성 억제제를 제공한다.

[0048] 본 발명의 「N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine; GaINAc)」이란 핵소사민의 일종인 갈락토사민의 N-아세틸체이다.

[0049] 또한, N-아세틸갈락토사민은 1 내지 6 위치의 부위가 화학 수식을 받는 것이 알려져 있다.

[0050] 본 발명은 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 부위의 황산화를 저해하는 것을 특징으로 한다.

[0051] 본 발명의 인히비터에 의해서 저해되는 부위는 구체적으로는 하기의 GaINAc의 화학식에 있어서 화살표로 표시되는 부위이다.



[0052]

본 발명의 인히비터에 있어서 황산화가 저해되는 GaINAc 상의 부위는 4 위치 또는 6 위치인데, 4 위치와 6 위치의 쌍방의 황산화가 저해되는 경우도 본 발명에 포함된다. 또한, 본 발명의 GaINAc는 바람직하게는 콘드로이틴 황산 프로테오글리칸(CSPG) 중에 포함되는 당이다.

[0054]

본 발명에 있어서 황산화가 저해된다란 GaINAc 상의 4 위치 또는 6 위치의 부위에 황산기가 전이되는 것을 저해하는 것, 또는 이미 황산화된 부위로부터 황산기가 제거되는, 또는 별도의 화학 수식으로 치환되는 것 등을 의미한다.

[0055]

본 발명에 있어서의 조직 섬유 형성 억제제(본 명세서에 있어서, 「본 발명의 약제」라고 기재하는 경우가 있음)는 바람직하게는 생체 조직(in vivo)에 있어서의 섬유 형성에 대하여 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 한다.

[0056]

본 발명의 약제에 의해서 섬유 형성이 억제되는 조직으로서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면, 심장 조직, 소화관 조직, 폐 조직, 췌장 조직, 신장 조직, 눈 조직, 간장 조직, 뇌신경 조직, 또는 피부 조직 등을 들 수 있다.

[0057]

본 발명에 있어서 「섬유 형성」은 「피브로제네시스(Fibrogenesis)」라고 표현할 수도 있다. 또한, 「조직 상의 섬유 형성성 병변」, 「섬유 형성성 조직 변화」, 「조직 섬유 신생」 등과 같은 표현을 이용하여 표시할 수 있다.

[0058]

본 발명의 인히비터로서는 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화를 저해하는 작용을 갖는 물질이면 특별히 한정되지 않는다.

[0059]

본 발명에 있어서의 인히비터의 바람직한 양태로서는 예를 들면 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소의 기능을 저해하는 활성을 갖는 물질을 들 수 있다.

[0060]

상기 물질의 바람직한 양태로서는, 예를 들면 이하의 (a) 내지 (c)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 화합물(핵산)을 들 수 있다.

[0061]

(a) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 산물 또는 그의 일부에 대한 안티센스 핵산

[0062]

(b) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 산물을 특이적으로 개열하는 리보자임 활성을 갖는 핵산

[0063]

(c) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의

해 저해하는 작용을 갖는 핵산(황산기 전이 효소 유전자의 발현을 억제하는 siRNA)

- [0064] 또한 「황산화 저해 작용을 갖는 물질」로서는, 예를 들면 이하의 (a) 내지 (c)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 화합물을 들 수 있다.
- [0065] (a) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소와 결합하는 항체
- [0066] (b) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소 변이체
- [0067] (c) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소와 결합하는 저분자 화합물
- [0068] 본 발명의 인히비터의 다른 양태로서는, 예를 들면 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기를 탈황산화시키는 작용을 갖는 물질을 들 수 있다. 상기 물질로서는 예를 들면 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기를 탈황산화시키는 효소(탈황산화 효소)를 들 수 있다.
- [0069] N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기의 「탈황산화」란 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기가 제거되는 것을 가리킨다.
- [0070] 탈황산화 효소로서는 예를 들면 콘드로이틴-4-sulfatase(C4-술파타제), 콘드로이틴-6-술파타제 등을 들 수 있다.
- [0071] 본 발명에 있어서의 황산기 전이 효소로서는, GalNAc의 4 위치 또는 6 위치에 황산기를 전이하는 활성을 갖는 효소이면 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면, 이하의 효소를 들 수 있다.
- [0072] 1) GalNAc4ST-1: N-아세틸갈락토사민 4-술포트랜스퍼라제-1
- [0073] 별칭 CHST8: 탄수화물 (N-아세틸갈락토사민 4-0) 술포트랜스퍼라제 8
- [0074] 2) GalNAc4ST-2
- [0075] 별칭 CHST9: 탄수화물 (N-아세틸갈락토사민 4-0) 술포트랜스퍼라제 9
- [0076] 3) C4ST-1: 콘드로이틴-4-0-술포트랜스퍼라제-1
- [0077] 별칭 CHST11: 탄수화물 (콘드로이틴4) 술포트랜스퍼라제 11
- [0078] 4) C4ST-2
- [0079] 별칭 CHST12
- [0080] 5) C4ST-3
- [0081] 별칭 CHST13
- [0082] 6) C6ST-1: 콘드로이틴-6-0-술포트랜스퍼라제-1
- [0083] 별칭 CHST3: 탄수화물 (콘드로이틴 6) 술포트랜스퍼라제 3
- [0084] 7) GalNAc4S-6ST: N-아세틸갈락토사민 4-술페이트 6-0 술포트랜스퍼라제
- [0085] 8) D4ST-1: 더마탄 4 술포트랜스퍼라제 1
- [0086] 9) C6ST-2: 콘드로이틴-6-0-술포트랜스퍼라제-2
- [0087] 별칭 CHST7: 탄수화물 (콘드로이틴 6) 술포트랜스퍼라제 7
- [0088] 또한, 이러한 특징을 공유하는 효소군은 반드시 게놈 DNA 상의 한 유전자에게 대응하는 것은 아니다. 예를 들면, 콘드로이틴-4-술파타제, 콘드로이틴-6-술파타제는 모두 게놈 데이터 베이스 상의 복수의 액세션 번호로 참조되는 서열(예를 들면 진뱅크(Genbank) 액세션 번호 NT_039500(그의 일부는 액세션 번호 CAAA01098429(서열번호: 1)로서 나타내어짐), NT_078575, NT_039353, NW_001030904, NW_001030811, NW_001030796, NW_000349)로서 공공 유전자 데이터 베이스 진뱅크로부터 취득할 수 있다.
- [0089] 본 발명에 있어서의 황산기 전이 효소의 공공 유전자 데이터 베이스 진뱅크에서의 액세션 번호, 염기 서열, 아미노산 서열로서는 이하를 예시할 수 있다.
- [0090] GalNAc4ST-1(액세션 번호 NM_175140, 염기 서열의 서열번호: 2, 아미노산 서열의 서열번호: 3)

- [0091] GaINAc4ST-2(액세션 번호 NM_199055, 염기 서열의 서열번호: 4, 아미노산 서열의 서열번호: 5)
- [0092] C4ST-1(액세션 번호 NM_021439, 염기 서열의 서열번호: 6, 아미노산 서열의 서열번호: 7)
- [0093] C4ST-2(액세션 번호 NM_021528, 염기 서열의 서열번호: 8, 아미노산 서열의 서열번호: 9)
- [0094] C4ST-3(액세션 번호 XM_355798, 염기 서열의 서열번호: 10, 아미노산 서열의 서열번호: 11)
- [0095] D4ST(액세션 번호 NM_028117, 염기 서열의 서열번호: 12, 아미노산 서열의 서열번호: 13)
- [0096] C6ST-1(액세션 번호 NM_016803, 염기 서열의 서열번호: 14, 아미노산 서열의 서열번호: 15)
- [0097] C6ST-2(액세션 번호 AB046929, 염기 서열의 서열번호: 16, 아미노산 서열의 서열번호: 17)
- [0098] GaINAc4S-6ST(액세션 번호 NM_015892, 염기 서열의 서열번호: 18, 아미노산 서열의 서열번호: 19)
- [0099] 상기 이외의 단백질이어도, 예를 들면 서열 목록에 기재된 서열과 높은 상동성(통상 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상)을 갖고, 또한 상기 단백질이 갖는 기능(예를 들면 세포 내의 구성 성분과 결합하는 기능 등)을 갖는 단백질은 본 발명의 상기 단백질에 포함된다. 상기 단백질이란 예를 들면 서열번호: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열에 있어서, 1 이상의 아미노산이 부가, 결실, 치환, 삽입된 아미노산 서열로 이루어지는 단백질로서, 통상 변화하는 아미노산 수가 30개 아미노산 이내, 바람직하게는 10개 아미노산 이내, 보다 바람직하게는 5개 아미노산 이내, 가장 바람직하게는 3개 아미노산 이내이다.
- [0100] 본 발명에 있어서의 상기 유전자에게는 예를 들면 서열번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 중 어느 하나에 기재된 염기 서열로 이루어지는 DNA에 대응하는 다른 생물에 있어서의 내재성의 유전자(인간의 상기 유전자의 호모로그 등)이 포함된다.
- [0101] 또한, 서열번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 중 어느 하나에 기재된 염기 서열로 이루어지는 DNA에 대응하는 다른 생물의 내재성의 DNA는 일반적으로 각각 서열번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 중 어느 하나에 기재된 DNA와 높은 상동성을 갖는다. 높은 상동성이란 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상(예를 들면, 95% 이상, 나아가서는 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상)의 상동성을 의미한다. 이 상동성은 mBLAST 알고리즘(Altschul et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 5873-7)에 의해서 결정할 수 있다. 또한, 상기 DNA는 생체 내에서 단리한 경우, 각각 서열번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16에 기재된 DNA와 엄격한 조건 하에서 혼성화한다고 생각된다. 여기서 「엄격한 조건」으로서는 예를 들면 「2×SSC, 0.1% SDS, 50 °C」, 「2×SSC, 0.1% SDS, 42°C」, 「1×SSC, 0.1% SDS, 37°C」, 보다 엄격한 조건으로서 「2×SSC, 0.1% SDS, 65°C」, 「0.5×SSC, 0.1% SDS, 42°C」 및 「0.2×SSC, 0.1% SDS, 65°C」의 조건을 들 수 있다.
- [0102] 당업자는 상기한 높은 상동성을 갖는 단백질로부터, 상기한 단백질에 기능적으로 동등한 단백질을 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 탈황산화 작용 또는 황산화 저해 작용의 활성 측정 방법을 이용함으로써 적절하게 취득할 수 있다.
- [0103] 또한 당업자에게 있어서는, 다른 생물에 있어서의 상기 유전자에게 상당하는 내재성의 유전자를 상기 유전자의 염기 서열을 기초로 적절하게 취득하는 것이 가능하다. 또한, 본 명세서에 있어서는, 인간 이외의 생물에 있어서의 상기 단백질 및 유전자에 상당하는 상기 단백질 및 유전자, 또는 상술한 단백질 및 유전자와 기능적으로 동등한 상기 단백질 및 유전자도 단순히 상기한 명칭으로 기재하는 경우가 있다.
- [0104] 본 발명의 상기 단백질은 천연의 단백질로서의 외에, 유전자 재조합 기술을 이용한 재조합 단백질로서 제조할 수 있다. 천연의 단백질로서는, 예를 들면 상기 단백질이 발현하고 있다고 생각되는 세포(조직)의 추출액에 대하여 상기 단백질에 대한 항체를 이용한 친화-크로마토그래피를 이용하는 방법에 의해 제조하는 것이 가능하다. 한편, 재조합 단백질은 예를 들면 상기 단백질을 코딩하는 DNA로 형질 전환한 세포를 배양함으로써 제조하는 것이 가능하다. 본 발명의 상기 단백질은 예를 들면 후술된 스크리닝 방법에 있어서 바람직하게 이용된다.
- [0105] 본 발명에 있어서의 「핵산」이란 RNA 또는 DNA를 의미한다. 또한 소위 PNA(peptide nucleic acid) 등의 화합성 핵산 유사체도 본 발명의 핵산에 포함된다. PNA는 핵산의 기본 골격 구조인 오단당·인산 골격을 글리신을 단위로 하는 폴리아미드 골격으로 치환한 것으로서, 핵산에 많이 유사한 3차원 구조를 갖는다.
- [0106] 특정한 내재성 유전자의 발현을 저해하는 방법으로서는 안티센스 기술을 이용하는 방법이 당업자에 잘 알려져

있다. 안티센스 핵산이 표적 유전자의 발현을 저해하는 작용으로서는 이하와 같은 복수의 요인이 존재한다. 즉, 삼중쇄 형성에 의한 전사 개시 저해, RNA 폴리머라아제에 의해서 국부적으로 개상 루프 구조가 만들어진 부위와의 혼성 형성에 의한 전사 저해, 합성이 진행하고 있는 RNA와의 혼성 형성에 의한 전사 저해, 인트론과 엑손의 접합점에서의 혼성 형성에 의한 스플라이싱 저해, 스플라이시오솜 형성 부위와의 혼성 형성에 의한 스플라이싱 저해, mRNA와의 혼성 형성에 의한 핵으로부터 세포질로의 이행 저해, 캡핑 부위나 폴리(A) 부가 부위와의 혼성 형성에 의한 스플라이싱 저해, 번역 개시 인자 결합 부위와의 혼성 형성에 의한 번역 개시 저해, 개시 코돈 근방의 리보솜 결합 부위와의 혼성 형성에 의한 번역 저해, mRNA의 번역 영역이나 폴리솜 결합 부위와의 혼성 형성에 의한 웨티드쇄의 신장 저해, 및 핵산과 단백질과의 상호 작용 부위와의 혼성 형성에 의한 유전자 발현 저해 등이다. 이와 같이 안티센스 핵산은 전사, 스플라이싱 또는 번역 등 다양한 과정을 저해함으로써 표적 유전자의 발현을 저해한다(히라시마 및 이노우에, 신생 화학 실험 강좌 2 핵산 IV 유전자의 복제와 발현, 일본 생화학회 편, 도쿄 가가꾸 도진, 1993, 319-347.).

[0107] 본 발명에서 이용되는 안티센스 핵산은 상기한 어느 하나의 작용에 의해 상술한 황산기 전이 효소 중 어느 하나를 코딩하는 유전자의 발현 및/또는 기능을 저해할 수도 있다.

[0108] 하나의 양태로서는, 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 mRNA의 5'단 근방의 비번역 영역에 상보적인 안티센스 서열을 설계하면 유전자의 번역 저해에 효과적이라고 생각된다. 또한, 코딩 영역 또는 3'측의 비번역 영역에 상보적인 서열도 사용할 수 있다. 이와 같이, 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 번역 영역 뿐만아니라, 비번역 영역의 서열의 안티센스 서열을 포함하는 핵산도 본 발명에서 이용되는 안티센스 핵산에 포함된다. 사용되는 안티센스 핵산은 적당한 프로모터의 하류에 연결되고, 바람직하게는 3'측에 전사 종결 시그널을 포함하는 서열이 연결된다. 이와 같이 하여 제조된 핵산은 공지된 방법을 이용함으로써 원하는 동물(세포)로 형질 전환할 수 있다. 안티센스 핵산의 서열은 형질 전환되는 동물(세포)가 갖는 내재성의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자 또는 그의 일부와 상보적인 서열인 것이 바람직한데, 유전자의 발현을 유효하게 억제할 수 있는 한에 있어서 완전히 상보적이 아닐 수도 있다. 전사된 RNA는 표적 유전자의 전사 산물에 대하여 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상보성을 갖는다. 안티센스 핵산을 이용하여 표적 유전자의 발현을 효과적으로 저해하기 위해서는, 안티센스 핵산의 길이는 적어도 15 염기 이상 25 염기 미만인 것이 바람직한데, 본 발명의 안티센스 핵산은 반드시 이 길이에 한정되는 것은 아니고, 예를 들면 100 염기 이상, 또는 500 염기 이상일 수도 있다.

[0109] 본 발명의 안티센스 핵산은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 C4ST-1(진뱅크의 액세션 번호 NM_021439, 서열 번호: 6), C4ST-2(진뱅크의 액세션 번호 NM_021528, 서열번호: 8), C4ST-3(진뱅크의 액세션 번호 XM_355798, 서열번호: 10) 등을 바탕으로 제조할 수 있다.

[0110] 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 발현의 저해는 리보자임, 또는 리보자임을 코딩하는 DNA를 이용하여 행하는 것도 가능하다. 리보자임이란 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 가리킨다. 리보자임에는 다양한 활성을 갖는 것이 존재하는데, 그 중에서도 RNA를 절단하는 효소로서의 리보자임에 촛점을 맞춘 연구에 의해 RNA를 부위 특이적으로 절단하는 리보자임의 설계가 가능해졌다. 리보자임에는 그룹 I 인트론형이나 RNase P에 포함되는 M1 RNA와 같이 400 뉴클레오티드 이상의 크기의 것도 있지만, 해머헤드형이나 헤어핀형이라고 불리는 40 뉴클레오티드 정도의 활성 도메인을 갖는 것도 있다(고이즈미 마코또 및 오오쓰카 에이코, 단백질 핵산 효소, 1990, 35, 2191.).

[0111] 예를 들면, 해머헤드형 리보자임의 자기 절단 도메인은, G13U14C15라는 서열의 C15의 3'측을 절단하는데, 그 활성에는 U14와 A9의 염기쌍 형성이 중요하게 되어, C15 대신에 A15 또는 U15에서도 절단될 수 있는 것이 나타내어져 있다(Koizumi, M. et al., FEBS Lett, 1988, 228, 228.). 기질 결합 부위가 표적 부위 근방의 RNA 서열과 상보적인 리보자임을 설계하면, 표적 RNA 중의 UC, UU 또는 UA라는 서열을 인식하는 제한 효소적인 RNA 절단 리보자임을 만들어낼 수가 있다(Koizumi, M. et al., FEBS Lett, 1988, 239, 285., 고이즈미 마코또 및 오오쓰카 에이코, 단백질 핵산 효소, 1990, 35, 2191., Koizumi, M. et al., Nucl Acids Res, 1989, 17, 7059.).

[0112] 또한, 헤어핀형 리보자임도 본 발명의 목적으로 유용하다. 이 리보자임은 예를 들면 담배 링스풀 바이러스의 위성 RNA의 마이너스쇄에 발견된다(Buzayan, JM., Nature, 1986, 323, 349.). 헤어핀형 리보자임으로부터도, 표적 특이적인 RNA 절단 리보자임을 만들어낼 수 있는 것이 나타내어져 있다(Kikuchi, Y. and Sasaki, N., Nucl Acids Res, 1991, 19, 6751., 기쿠치 요우, 화학과 생물, 1992, 30, 112.). 이와 같이, 리보자임을 이용하여 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 산물을 특이적으로 절단함으로써 상기 유전자의 발현을 저해할 수 있다.

- [0113] 내재성 유전자의 발현의 억제는 또한 표적 유전자 서열과 동일 또는 유사한 서열을 갖는 2개쇄 RNA를 이용한 RNA 간섭(RNA interference, 이하 「RNAi」라고 약칭함)에 의해서도 행할 수 있다.
- [0114] 최근의 게놈 프로젝트의 완료에 의해서 인간의 전체 염기 서열이 해독되어 수많은 질환 관련 유전자가 왕성하게 동정되어 있는 현재, 특정한 유전자를 표적으로 한 치료법, 치약 개발이 왕성하게 실시되고 있다. 그 중에서도 특이적 전사 후 억제 효과를 발휘하는 작은 간섭(small interfering) RNA(siRNA)의 유전자 치료에의 응용이 주목받고 있다.
- [0115] RNAi는 1998년에 파이어(Fire) 등에 의해서 발견된 현상(Fire A, *Nature* (1998) 391, : 806-811)으로, 2개쇄 RNA(double strand RNA)가 상동인 표적 유전자의 발현을 강력히 억제한다고 하는 것이다. 종래의 박테 등을 이용하는 유전자 도입법에 비하여 간편하고, 표적에 대한 특이성이 높고, 유전자 치료에 대한 응용이 가능하다고 하는 것으로 인해 최근 주목받고 있다. 또한 포유류 세포에 있어서는, 단쇄 dsRNA(siRNA)를 이용함으로써 RNAi를 유도하는 것이 가능하고, RNAi는 녹아웃(knockout) 마우스와 비교하여 효과가 안정적이고, 실험이 용이하고, 비용이 저렴하다는 등, 많은 이점을 갖고 있다.
- [0116] RNAi 효과에 의한 저해 작용을 갖는 핵산은 일반적으로 siRNA 또는 shRNA라고도 불린다. RNAi는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열로 이루어지는 센스 RNA와 이것과 상보적인 서열로 이루어지는 앤티센스 RNA로 이루어지는 단쇄 2개쇄 RNA(이하, 「dsRNA」라고 약칭함)를 세포 등에 도입함으로써 표적 유전자 mRNA에 특이적이고 또한 선택적으로 결합하여 파괴를 유도하여, 해당 표적 유전자를 절단함으로써 표적 유전자의 발현을 효율적으로 저해하는(억제하는) 현상이다. 예를 들면, dsRNA를 세포 내에 도입하면 그 RNA와 상동 서열의 유전자의 발현이 억제(녹다운)된다. 이와 같이 RNAi는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 종래의 번잡하고 효율이 낮은 상동재조합에 의한 유전자 파괴 방법을 대체할 간이한 유전자 녹아웃 방법으로서, 또는 유전자 치료에 응용 가능한 방법으로서 주목받고 있다.
- [0117] 본 발명에 있어서, RNAi에 이용하는 RNA는 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자의 부분 영역과 반드시 완전히 동일할 필요는 없지만, 완전한 상동성을 갖는 것이 바람직하다. 또한, 말단부는 2 염기 정도의 오버행을 가질 수도 있다.
- [0118] siRNA의 설계에 있어서는, 타겟으로서는 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자이면 특별히 한정되는 것은 아니고, 임의의 영역을 전부 타겟 후보로 하는 것이 가능하다.
- [0119] 예를 들면, C4ST-1 유전자의 염기 서열(서열번호: 6), C4ST-2 유전자의 염기 서열(서열번호: 8), C4ST-3 유전자의 염기 서열(서열번호: 10) 등을 바탕으로 제조할 수 있다. 보다 구체적으로는, 그 서열의 일부의 영역을 타겟 후보로 하는 것이 가능하고, 예를 들면, C4ST-1 유전자의 염기 서열의 일부 영역(서열번호: 20), C4ST-2 유전자의 염기 서열의 일부 영역(서열번호: 21), C4ST-3 유전자의 염기 서열의 일부 영역(서열번호: 22), C6ST-1 유전자의 염기 서열의 일부 영역(서열번호: 23), C6ST-2 유전자의 염기 서열의 일부 영역(서열번호: 24), 등을 바탕으로 제조할 수 있다. 더욱 구체적으로는, 본 명세서에 의해서 구체적으로 나타내어진 DNA 서열(서열번호: 25, 26, 35 내지 50, 55 내지 65, 82 내지 88)을 표적으로 하는 siRNA를 예시할 수 있다.
- [0120] siRNA를 세포에 도입하기 위해서는, 시험관내로 합성한 siRNA를 플라스미드 DNA에 연결하고 이것을 세포에 도입하는 방법, 2개의 RNA를 어닐링하는 방법 등을 채용할 수 있다.
- [0121] 또한 상기 2개의 RNA 분자는 여기서 한쪽의 끝이 단한 구조의 분자, 예를 들면, 헤어핀 구조를 갖는 siRNA(shRNA)일 수도 있다. shRNA란 쇼트 헤어핀 RNA(short hairpin RNA)라고 불리고, 1개쇄의 일부의 영역이 다른 영역과 상보쇄를 형성하기 위해서 스템루프(stem-loop) 구조를 갖는 RNA 분자이다. 즉, 분자 내에서 2개쇄 RNA 구조를 형성할 수 있는 분자도 또한 본 발명의 siRNA에 포함된다.
- [0122] 또한 본 발명의 바람직한 양태로서는, C4ST-1, C4ST-2, C4ST-3 등의 발현을 RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 RNA(siRNA)로서, 본 명세서에 의해서 구체적으로 나타내어진 DNA 서열(서열번호: 25, 26, 35 내지 50, 55 내지 65, 82 내지 88)을 표적으로 하는 siRNA에서, 예를 들면, 1 또는 소수의 RNA가 부가 또는 결실된 구조의 2개쇄 RNA이어도 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 기능을 갖는 것이면 본 발명의 siRNA에 포함된다.
- [0123] RNAi(siRNA)를 위해 사용되는 RNA는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자의 부분 영역과 완전히 동일(상동)할 필요는 없지만, 완전한 동일(상동)성을 갖는 것이 바람직하다.
- [0124] RNAi 기구의 상세에 대해서는 아직도 불명한 부분도 있지만, DICER라고 칭해지는 효소(RNase III 핵산 분해 효

소 패밀리의 일종)가 2개쇄 RNA와 접촉하여, 2개쇄 RNA가 작은 간섭 RNA 또는 siRNA라고 불리는 작은 단편으로 분해되는 것이라고 생각되고 있다. 본 발명에 있어서의 RNAi 효과를 갖는 2개쇄 RNA에는 이와 같이 DICER에 의해서 분해되기 전의 2개쇄 RNA도 포함된다. 즉, 그대로의 길이로는 RNAi 효과를 가지지 않는 장쇄의 RNA이거나, 세포에 있어서 RNAi 효과를 갖는 siRNA로 분해되는 것이 기대되기 때문에, 본 발명에 있어서의 2개쇄 RNA의 길이는 특별히 제한되지 않는다.

[0125] 예를 들면, 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 mRNA의 전체 길이 또는 거의 전체 길이의 영역에 대응하는 장쇄 2개쇄 RNA를 예를 들면 미리 DICER로 분해시키고, 그 분해 산물을 본 발명의 약제로서 이용하는 것이 가능하다. 이 분해 산물에는 RNAi 효과를 갖는 2개쇄 RNA 분자(siRNA)가 포함되는 것이 기대된다. 이 방법에 따르면, RNAi 효과를 갖는 것이 기대되는 mRNA 상의 영역을 특별히 선택하지 않아도 된다. 즉, RNAi 효과를 갖는 본 발명의 상술한 유전자의 mRNA 상의 영역은 반드시 정확하게 규정될 필요는 없다.

[0126] 본 발명의 상기 「RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 2개쇄 RNA」는 당업자에게 있어서는 상기 2개쇄 RNA의 표적이 되는 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 염기 서열을 기초로 적절하게 제작할 수 있다. 일례를 나타내면, 서열번호: 25에 기재된 염기 서열을 바탕으로 본 발명의 2개쇄 RNA를 제작할 수 있다. 즉, 서열번호: 25에 기재된 염기 서열을 바탕으로, 상기 서열의 전사 산물인 mRNA의 임의의 연속하는 RNA 영역을 선택하고, 이 영역에 대응하는 2개쇄 RNA를 제작하는 것은 당업자에게 있어서는 통상의 시행의 범위 내에서 적절하게 행할 수 있는 것이다. 또한, 상기 서열의 전사 산물인 mRNA 서열로부터 보다 강한 RNAi 효과를 갖는 siRNA 서열을 선택하는 것도 당업자에게 있어서는 공지된 방법에 의해서 적절하게 실시하는 것이 가능하다. 또한, 한쪽의 쇄가 판명되어 있으면, 당업자에게 있어서는 용이하게 다른쪽의 쇄(상보쇄)의 염기 서열을 알 수 있다. siRNA는 당업자에게 있어서는 시판되고 있는 핵산 합성기를 이용하여 적절하게 제작하는 것이 가능하다. 또한, 원하는 RNA의 합성에 대해서는 일반적인 합성 수탁 서비스를 이용할 수 있다.

[0127] 또한, 본 발명에 있어서의 siRNA는 반드시 표적 서열에 대한 일조의 2개쇄 RNA일 필요는 없고, 표적 서열을 포함한 영역에 대한 복수조의 2개쇄 RNA의 혼합물일 수도 있다. 여기서 표적 서열에 대응한 핵산 혼합물로서의 siRNA는 당업자에게 있어서는 시판되고 있는 핵산 합성기 및 DICER 효소를 이용하여 적절하게 제조하는 것이 가능하고, 또한 원하는 RNA의 합성에 대해서는 일반적인 합성 수탁 서비스를 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 siRNA에는 소위 「각테일 siRNA」가 포함된다.

[0128] 또한, 본 발명에 있어서의 siRNA는 반드시 모든 뉴클레오티드가 리보뉴클레오티드(RNA)가 아닐 수도 있다. 즉, 본 발명에 있어서, siRNA를 구성하는 1 또는 복수의 리보뉴클레오티드는 대응하는 태옥시리보뉴클레오티드일 수도 있다. 이 「대응한다」란 당 부분의 구조는 다르지만, 동일한 염기종(아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 (우라실))인 것을 가리킨다. 예를 들면, 아데닌을 갖는 리보뉴클레오티드에 대응하는 태옥시리보뉴클레오티드란 아데닌을 갖는 태옥시리보뉴클레오티드를 말한다. 또한, 상기 「복수」란 특별히 제한되지 않지만, 바람직하게는 2 내지 5 개 정도의 소수를 가리킨다.

[0129] 또한, 본 발명의 상기 RNA를 발현할 수 있는 DNA(벡터)도 또한 본 발명의 상술한 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 억제할 수 있는 화합물의 바람직한 양태에 포함된다. 예를 들면, 본 발명의 상기 2개쇄 RNA를 발현할 수 있는 DNA(벡터)는 상기 2개쇄 RNA의 한쪽의 쇄를 코딩하는 DNA, 및 상기 2개쇄 RNA의 다른쪽의 쇄를 코딩하는 DNA가 각각 발현할 수 있도록 프로모터와 연결된 구조를 갖는 DNA이다. 본 발명의 상기 DNA는 당업자에게 있어서는 일반적인 유전자 공학 기술에 의해 적절하게 제작할 수 있다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 RNA를 코딩하는 DNA를 공지된 다양한 발현 벡터에 적절하게 삽입함으로써 본 발명의 발현 벡터를 제작하는 것이 가능하다.

[0130] 또한, 본 발명의 발현 저해 물질에는 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 발현 조절 영역(예를 들면, 프로모터 영역)과 결합함으로써 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 저해하는 화합물이 포함된다. 상기 화합물은 예를 들면 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 프로모터 DNA 단편을 이용하여, 상기 DNA 단편과의 결합 활성을 지표로 하는 스크리닝 방법에 의해 취득하는 것이 가능하다. 또한 당업자에게 있어서는, 원하는 화합물에 대해서 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 저해하는가 아닌가의 판정을 공지된 방법, 예를 들면 리포터 에세이법 등에 의해 적절하게 실시할 수 있다.

[0131] 또한, 본 발명의 상기 RNA를 발현할 수 있는 DNA(벡터)도 또한 본 발명의 상술한 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 저해할 수 있는 화합물의 바람직한 양태에 포함된다. 예를 들면 본 발명의 상기 2개쇄 RNA를 발현할 수 있는 DNA(벡터)는 상기 2개쇄 RNA의 한쪽의 쇄를 코딩하는 DNA, 및 상기 2개쇄 RNA의 다른쪽의 쇄를 코딩하는 DNA가 각각 발현할 수 있도록 프로모터와 연결된 구조를 갖는 DNA이다. 본 발명의 상기 DNA는 당업자

에게 있어서는 일반적인 유전자 공학 기술에 의해 적절하게 제작할 수 있다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 RNA를 코딩하는 DNA를 공지된 다양한 발현 벡터에 적절하게 삽입함으로써 본 발명의 발현 벡터를 제작하는 것이 가능하다.

[0132] 본 발명의 상기 벡터의 바람직한 양태로서는, C4ST-1, C4ST-2, C4ST-3 등의 발현을 RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 RNA(siRNA)를 발현하는 벡터를 들 수 있다.

[0133] 상술한 황산기 전이 효소에 결합하는 항체는 당업자에게 공지된 방법에 의해 제조하는 것이 가능하다. 폴리클로날 항체이면, 예를 들면, 다음과 같이 하여 얻을 수 있다. 천연의 상술한 단백질, 또는 GST와의 융합 단백질로서 미생물에 있어서 발현시킨 리콤비넌트(재조합) 단백질, 또는 그의 부분 펩티드를 토끼 등의 작은 동물에게 면역하여 혈청을 얻는다. 이것을, 예를 들면, 황산암모늄 침전, 프로테인 A, 프로테인 G 칼럼, DEAE 이온 교환 크로마토그래피, 상술한 황산기 전이 효소나 합성 펩티드를 커플링한 친화성-칼럼 등에 의해 정제함으로써 제조한다. 또한, 모노클로날 항체이면, 예를 들면 상술한 황산기 전이 효소나 그의 부분 펩티드를 마우스 등의 작은 동물에게 면역을 행하고, 동일 마우스로부터 비장을 적출하고, 이것을 으깨어 세포를 분리하고, 상기 세포와 마우스 미엘로마 세포를 폴리에틸렌글리콜 등의 시약을 이용하여 융합시키고, 이에 의해 생긴 융합 세포(하이브리도마) 중으로부터 상술한 황산기 전이 효소에 결합하는 항체를 생산하는 클론을 선택한다. 이어서, 얻어진 하이브리도마를 마우스 복강 내에 이식하고, 동일 마우스로부터 복수를 회수하고, 얻어진 모노클로날 항체를 예를 들면 황산암모늄 침전, 프로테인 A, 프로테인 G 칼럼, DEAE 이온 교환 크로마토그래피, 상술한 황산기 전이 효소의 단백질이나 합성 펩티드를 커플링한 친화성-칼럼 등에 의해 정제함으로써 제조하는 것이 가능하다.

[0134] 본 발명의 항체는 본 발명의 상술한 황산기 전이 효소에 결합하는 것이면 특별히 제한은 없고, 상기 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체의 이외에 인간 항체, 유전자 재조합에 의한 인간형화 항체, 또한 그 항체 단편이나 항체 수식물일 수도 있다.

[0135] 항체 취득의 감작 항원으로서 사용되는 본 발명의 단백질은 그 유래가 되는 동물종에 대해서 제한되지 않지만, 포유 동물, 예를 들면 마우스나 인간 유래의 단백질이 바람직하고, 특히 인간 유래의 단백질이 바람직하다. 인간 유래의 단백질은 당업자에게 있어서는 본 명세서에 개시되는 유전자 서열 또는 아미노산 서열을 이용하여 적절하게 취득할 수 있다.

[0136] 본 발명에 있어서, 감작 항원으로서 사용되는 단백질은 완전한 단백질 또는 단백질의 부분 펩티드일 수도 있다. 단백질의 부분 펩티드로서는 예를 들면 단백질의 아미노기(N) 말단 단편이나 카르복시(C) 말단 단편을 들 수 있다. 본 명세서에 있어서의 「항체」란 단백질의 전체 길이 또는 단편에 반응하는 항체를 의미한다.

[0137] 또한, 인간 이외의 동물에게 항원을 면역시켜 상기 하이브리도마를 얻는 외에, 인간 림프구, 예를 들면 EB 바이러스에 감염된 인간 림프구를 시험관내로 단백질, 단백질 발현 세포 또는 그 용해물로 감작하고, 감작 림프구를 인간 유래의 영구 분열능을 갖는 미엘로마 세포, 예를 들면 U266와 융합시켜, 단백질에의 결합 활성을 갖는 원하는 인간 항체를 생산하는 하이브리도마를 얻을 수도 있다.

[0138] 본 발명의 상술한 황산기 전이 효소에 대한 항체는 상기 단백질과 결합함으로써 상기 단백질의 발현 또는 기능을 저해하는 효과가 기대된다. 얻어진 항체를 인체에 투여하는 목적(항체 치료)으로 사용하는 경우에는, 면역 원성을 저하시키기 위해서 인간 항체나 인간형화 항체가 바람직하다.

[0139] 또한 본 발명은 상술한 황산기 전이 효소의 기능을 저해할 수 있는 물질로서, 상술한 황산기 전이 효소에 결합하는 저분자량 물질(저분자 화합물)도 함유한다. 상기 저분자량 물질은 천연 또는 인공의 화합물일 수도 있다. 통상, 당업자에게 공지된 방법을 이용함으로써 제조 또는 취득 가능한 화합물이다. 또한 본 발명의 화합물은 후술된 스크리닝 방법에 의해서 취득하는 것도 가능하다.

[0140] 또한 본 발명의 상술한 황산기 전이 효소의 발현 또는 기능을 저해할 수 있는 물질로서 상술한 황산기 전이 효소에 대하여 우성-음성(dominant-negative)의 성질을 갖는 변이체(우성-음성 단백질)을 들 수 있다. N-아세틸 갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소에 대하여 우성-음성의 성질을 갖는 상기 단백질 변이체란 N-아세틸 갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자를 발현시킴으로써 내재성의 야생형 단백질의 활성을 소실 또는 저하시키는 기능을 갖는 단백질을 가리킨다.

[0141] 본 발명의 약제인 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화 인히бит터는 섬유 형성성 질환의 치료 또는 예방 효과를 갖는다. 따라서, 본 발명의 약제의 바람직한 양태로서는 섬유 형성성 질환의 치료용 또는 예방 용이다.

- [0142] 여기서 「치료 또는 예방」이란 조직 섬유 형성을 나타내는 장기, 조직에 대하여 반드시 완전한 치료 효과 또는 예방 효과를 가질 필요는 없고, 부분적인 효과를 갖는 경우일 수도 있다.
- [0143] 본 발명의 조직 섬유 형성 억제제는 섬유 형성의 원인인 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화를 저해함으로써 섬유 형성을 억제하는 작용을 갖는다. 따라서, 본 발명의 바람직한 양태로서는 예를 들면 본 발명의 조직 섬유 형성 억제제를 유효 성분으로 하는 조직 섬유 형성성 질환 치료제 또는 예방제를 제공한다.
- [0144] 또한 본 발명의 「조직 섬유 형성성 질환 치료제」는 「조직 섬유 형성성 질환 개선제」, 「항조직 섬유 형성제」 등으로 표현하는 것도 가능하다. 또한, 본 발명에 있어서의 약제는 「의약품」, 「의약 조성물」, 「치료용 의약」 등으로 표현할 수도 있다.
- [0145] 또한, 본 발명에 있어서의 「치료」에는 섬유 형성의 발생을 미리 억제할 수 있는 예방적인 효과도 포함된다. 또한, 섬유 형성성의 장기(조직)에 대하여 반드시 완전한 치료 효과를 갖는 경우에 한정되지 않고, 부분적인 효과를 갖는 경우일 수도 있다.
- [0146] 본 발명의 약제는 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 희석제 등과 혼합하고, 의약 조성물로서 경구, 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 경구제로서는 과립제, 산제, 정제, 캡슐제, 용제, 유제, 또는 혼탁제 등의 제형으로 할 수 있다. 비경구제로서는, 주사제, 점액제, 외용약제, 흡입제(nebulizer) 또는 좌제 등의 제형을 선택할 수 있다. 주사제에는, 피하 주사제, 근육 주사제, 복강 내 주사제, 두개 내 투여 주사제, 또는 비강 내 투여 주사제 등을 나타낼 수 있다. 외용약제에는 경비 투여제, 또는 연고제 등을 나타낼 수 있다. 주성분인 본 발명의 약제를 포함하도록 상기한 제형으로 하는 제제 기술은 공지이다.
- [0147] 예를 들면, 경구 투여용의 정제는 본 발명의 약제에 부형제, 붕괴제, 결합제, 및 활택제 등을 가하여 혼합하고, 압축 정형함으로써 제조할 수 있다. 부형제에는, 젖당, 전분, 또는 만니톨 등이 일반적으로 이용된다. 붕괴제로서는 탄산칼슘이나 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘 등이 일반적으로 이용된다. 결합제에는 아라비아 고무, 카르복시메틸셀룰로오스, 또는 폴리비닐피롤리돈이 이용된다. 활택제로서는, 탈크나 스테아르산마그네슘 등이 공지이다.
- [0148] 본 발명의 약제를 포함하는 정제는 마스킹이나, 장용성 제제로 하기 위해서 공지된 코팅을 실시할 수 있다. 코팅제에는 에틸셀룰로오스나 폴리옥시에틸렌글리콜 등을 사용할 수 있다.
- [0149] 또한 주사제는 주성분인 본 발명의 약제를 적당한 분산제와 함께 용해, 분산매에 용해, 또는 분산시킴으로써 얻을 수 있다. 분산매의 선택에 따라 수성 용제와 유성 용제 중의 어느쪽의 제형으로 할 수도 있다. 수성 용제로 하기 위해서는 중류수, 생리식염수, 또는 링거액 등을 분산매로 한다. 유성 용제로서는 각종 식물유나 프로필렌글리콜 등을 분산매로 이용한다. 이 때, 필요에 따라서 파라벤 등의 보존제를 첨가할 수도 있다. 또한 주사제 중에는 염화나트륨이나 포도당 등의 공지된 등장화제를 가할 수 있다. 또한, 염화벤즈알코늄이나 염산프로카인과 같은 무통화제를 첨가할 수 있다.
- [0150] 또한, 본 발명의 약제를 고형, 액상, 또는 반고형상의 조성물로 함으로써 외용제로 할 수 있다. 고형, 또는 액상의 조성물에 대해서는 먼저 진술한 것과 동일한 조성물로 함으로써 외용제로 할 수 있다. 반고형상의 조성물은 적당한 용제에 필요에 따라서 증점제를 가하여 제조할 수 있다. 용제에는, 물, 에틸알코올, 또는 폴리에틸렌글리콜 등을 사용할 수 있다. 증점제에는 일반적으로 벤토나이트, 폴리비닐알코올, 아크릴산, 메타크릴산, 또는 폴리비닐피롤리돈 등이 이용된다. 이 조성물에는 염화벤즈알코늄 등의 보존제를 가할 수 있다. 또한, 담체로서 카카오 버터와 같은 유성 기재, 또는 셀룰로오스 유도체와 같은 수성겔 기재를 조합함으로써 좌제로 할 수도 있다.
- [0151] 본 발명의 약제를 유전자 치료제로서 사용하는 경우에는 본 발명의 약제를 주사에 의해 직접 투여하는 방법 외에, 핵산이 조립된 벡터를 투여하는 방법을 들 수 있다. 상기 벡터로서는 아데노바이러스 벡터, 아데노 수반바이러스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 들 수 있으며, 이를 바이러스 벡터를 이용함으로써 효율적으로 투여할 수 있다.
- [0152] 또한, 본 발명의 약제를 리포솜 등의 인지질 소포체에 도입하고, 그 소포체를 투여하는 것도 가능하다. siRNA나 shRNA를 보유시킨 소포체를 리포펙션(lipofection)법에 의해 소정의 세포에 도입한다. 그리고, 얻어지는 세포를 예를 들면 정맥 내, 동맥 내 등에 전신 투여한다. 섬유 형성 조직 등에 국소적으로 투여할 수도 있다. siRNA는 시험관내에서는 매우 우수한 특이적 전사 후 억제 효과를 나타내는데, 생체내에서는 혈청 중의 뉴클레아제 활성에 의해 빠르게 분해되어 버리기 때문에 지속 시간이 한정되기 때문에 보다 최적이고 효과적인 전달

시스템 개발이 요구되어 왔다. 하나의 예로서는 문헌 [Ochiya, T 등의 *Nature Med.*, 5: 707-710, 1999, *Curr. Gene Ther.*, 1 : 31-52, 2001]로부터 생체 친화성 재료인 아텔로콜라겐이 핵산과 혼합하여 복합체를 형성시키면, 생체 중의 분해 효소로부터 핵산을 보호하는 작용이 있어 siRNA의 캐리어로서 매우 적합한 캐리어라고 보고되어 있지만, 본 발명의 약제의 도입의 방법은 이것에는 한정되지 않는다.

[0153] 본 발명의 약제는 안전하다고 되어 있는 투여량의 범위 내에 있어서, 인간을 포함하는 포유 동물에 대하여 필요량(유효량)이 투여된다. 본 발명의 약제의 투여량은 제형의 종류, 투여 방법, 환자의 연령이나 체중, 환자의 증상 등을 고려하여, 최종적으로는 의사 또는 수의사의 판단에 따라 적절하게 결정할 수 있다. 일례를 나타내면, 연령, 성별, 증상, 투여 경로, 투여 횟수, 제형에 따라서 다르지만, 예를 들면 아데노바이러스의 경우의 투여량은 1일 1회당 10^6 내지 10^{13} 개 정도이고, 1주 내지 8주 간격으로 투여된다.

[0154] 또한, siRNA 또는 shRNA를 목적으로 하는 조직 또는 기관에 도입하기 위해서 시판되고 있는 유전자 도입 키트(예를 들면 아데노익스프레스: 클론텐크사)를 이용할 수도 있다.

[0155] 본 발명의 약제의 치료 또는 예방의 대상이 되는 질환은 조직의 섬유 형성에 기인하는 질환이면 특별히 제한되지 않지만 바람직하게는 심 질환, 소화관 질환, 간 질환, 폐 질환, 신장 질환, 뇌신경 질환, 눈 질환, 췌장 질환 등을 들 수 있다.

[0156] 본 발명의 「섬유 형성에 기인하는 질환」의 구체예로서는 특별히 한정되지 않지만, 피부를 비롯한 외피 및 상피 조직에 있어서의 탄성 섬유증, 강피증, 만성 복막염, 후복막강섬유화증 등, 결합 조직 등의 지지 조직, 근육에 있어서의 다발성근염, 피부근염, 결절성다발동맥염, 연조직 섬유증, 만성 관절 류마티스, 수장섬유증, 건염, 건초염, 아킬레스건염, 족균종 등, 골수, 심장 등의 혈액 조직, 맥관계에서의 골수섬유증, 비기능항진증, 맥관염, 서맥성부정맥, 동맥 경화, 폐색성혈전성혈관염, 결절성 섬유증, 협심증, 확장형울혈성심근증, 심부전, 구속형 심근증, 미만성비폐색성심근증, 폐색성심근증, 폐성심, 승모판막 협착, 대동맥판막 협착, 만성심막염, 심내막섬유증, 심내막심근섬유증 등, 간장 등의 소화기계에서는 만성췌염, 클론병, 케양성 대장염, 알코올성 간염, 만성 B형 간염, 만성 C형 간염, 월슨병, 간경변, 바이러스성 간염, 고서병, 당원병, α 항트립신 결손, 헤모크로마토시스, 티로신혈증, 과당혈증, 갈락토오스혈증, 젤웨거 증후군, 선천성 간섬유증, 문맥압항진증, 간육아종증, 베드-키아리 증후군, 원발성경화성담관염, 지방간, 비알코올성 간염, 간섬유증, 선천성 간섬유증, 알코올성 간경변, 바이러스성 간경변, 기생충성 간경변, 중독성 간경변, 영양 장해성 간경변, 울혈성 간경변, 간경화증, 샤르코 간경변, 토드 간경변, 속발성담즙성 간경변, 단엽성 간경변, 만성비화농성파괴성담염으로부터 이행한 간경변, 폐색성 간경변, 담세관성 간경변, 담즙성 간경변, 위축성 간경변, 괴사후성 간경변, 간염후 간경변, 결절성 간경변, 혼합형 간경변, 소결절성 간경변, 대상성 간경변, 비대상성 간경변, 대결절성 간경변, 중격성 간경변, 돌발성 간경변, 문맥주위성 간경변, 문맥성 간경변, 원발성담즙성 간경변 등, 폐 등의 호흡계에서의 콕시디오이데스증, 블라스토마이세스증, 알데르기성 기관지 폐 아스퍼질러스증, 굿페스처 증후군, 성인 호흡 촉박 증후군에 있어서의 폐섬유증, 만성폐색성 폐질환, 무기폐, 폐렴, 규폐증, 석면폐증, 과민성폐렴, 특발성폐섬유증, 림프구성 간질성 폐렴, 랑게르한스 세포육아종증, 낭포성섬유증, 농포성섬유증, 폐섬유증, 섬유화성폐포격염, 간질성섬유증, 미만성폐섬유증, 만성간질성폐렴, 기관지확장증, 세기관지염섬유증, 기관지 주위 섬유증, 흉막섬유증 등, 신장 등의 비뇨기, 생식기계에서의 남성성선기능 저하증, 근강직성 디스트로피, 폐이로니병 등에 의한 섬유증, 만성뇨세관간질성 신장염, 상엽색체열성낭포신, 골수종신, 수신증, 급속진행성사구체신장염, 신독성 질환, 황색육아종성신우신장염, 겹상적혈구신증, 신성뇨봉증, 상엽색체우성다발성낭포신장 질환, 만성사구체신장염, IgA신증, 신경화증, 소상사구체경화증(focal glomerulosclerosis), 막성 신장염, 막증식성사구체신장염, 만성신우신장염, 신아밀로이도시스, 다발성낭포신, 후복막섬유증, 루푸스신장염 등 교원병에 수반하는 신병변, 당뇨병성 신증, 만성전립선염, 주혈흡출증에 의한 방광염, 유선섬유증, 유선섬유선증 등, 척수 등의 신경계에서의 선천성사경, 강직성척추염, 신경섬유종이나 척수 손상 후의 신경 기능 결손 등의 척수 질환, 파킨슨병이나 알츠하이머병 등의 뇌신경 질환, 안구에 있어서의 후부수정체섬유화증, 중식성 망막증 등, 또한 전신에 병변이 생기는 샤르코이도시스, 전신성 에리테마토데스(systemic lupus erythematosus)에 의한 섬유증이나 전신성강피증, 다발성근염, 피부근염 등을 들 수 있는데, 본 발명에 있어서의 「섬유 형성에 기인하는 질환」은 이들에 한정되는 것이 아니고, 피부나 장기 등 각 생체 조직에 있어서의 섬유 형성에 의해서 생기는 질환을 포함한다.

[0157] 또한 본 발명은 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화의 정도를 지표로 하는 것에 의한, 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법(본 명세서에 있어서 「본 발명의 방법」이라고 기재하는 경우가 있음)에 관한 것이다.

[0158] 본 발명의 방법의 바람직한 양태로서는 당쇄를 구성하는 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화를

저해하는 화합물을 선택하는 공정을 포함하는 방법이다.

- [0159] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해서 조직 섬유 형성 억제제 또는 섬유 형성성 질환 치료 또는 예방제를 위한 후보 화합물을 효율적으로 취득할 수 있다.
- [0160] 본 발명의 스크리닝 방법의 바람직한 양태는 이하의 (a) 내지 (c)를 포함하는 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법이다.
- [0161] (a) N-아세틸갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민을 함유하는 당쇄와, 피검 화합물을 접촉시키는 공정
- [0162] (b) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치에 대해서 황산화의 정도를 측정하는 공정
- [0163] (c) 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우와 비교하여 황산화의 정도를 저하시키는 화합물을 선택하는 공정
- [0164] 이하, 본 발명의 스크리닝 방법의 양태를 예시한다. 또한, 이하에 기재된 양태에 있어서는, 이용되는 N-아세틸갈락토사민, 황산기 전이 효소, 탈황산화 효소 등의 유래로서는, 인간, 마우스, 래트 등에서 유래되는 것을 들 수 있지만, 이들에 특별히 제한되지 않는다.
- [0165] 또한 이하에 기재된 양태에 이용하는 피검 화합물로서는, 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면, 천연 화합물, 유기 화합물, 무기 화합물, 단백질, 웨티드 등의 단일 화합물, 및 화합물 라이브러리, 유전자 라이브러리의 발현산물, 세포 추출물, 세포 배양 상청, 발효 미생물 생산물, 해양 생물 추출물, 식물 추출물 등을 들 수 있다.
- [0166] 또한 본 발명의 방법에 있어서 피검 화합물에의 「접촉」은, 통상, N-아세틸갈락토사민, 황산기 전이 효소, 또는 탈황산화 효소를 피검 화합물과 혼합함으로써 행하는데, 이 방법에 한정되지 않는다. 예를 들면, 이들 단백질 또는 그의 일부를 발현하는 세포를 피검 화합물과 접촉시킴으로써 상기 「접촉」을 행할 수 있다.
- [0167] 또한 이하에 기재된 양태에 있어서의 「세포」의 유래로서는, 인간, 마우스, 래트 등에서 유래되는 세포를 들 수 있지만, 이들에서 유래되는 세포에 특별히 제한되지 않고, 각각의 양태에 있어서 이용되는 단백질을 발현하도록 형질 전환된 대장균, 효모 등의 미생물 세포를 이용하는 것도 가능하다. 예를 들면, 「N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는 세포」로서는, 내재성의 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자를 발현하고 있는 세포, 또는 외래성의 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어, 상기 유전자가 발현하고 있는 세포를 이용할 수 있다. 외래성의 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자가 발현한 세포는 통상 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자가 삽입된 발현 벡터를 숙주 세포에 도입함으로써 제작할 수 있다. 상기 발현 벡터는 일반적인 유전자 공학 기술에 의해서 제작할 수 있다.
- [0168] 또한, 본 발명의 방법에 있어서의 황산화의 정도의 측정은 당업자에게 공지된 방법에 의해서 행할 수 있다. 예를 들면, N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치, 또는 그의 일부의 황산화 구조에 결합하는 표지된 화합물, 또는 항체 등을 이용하여, 표지량을 측정함으로써 검출할 수 있다. 또한, 크로마토그래피법이나 질량 분석법 등을 이용하여 검출할 수도 있다.
- [0169] 당업자이면 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화의 정도를 예를 들면 이하의 공지된 방법에 의해서 적절하게 평가할 수 있다.
- [0170] (1) 표지 색소(1-9-디메틸메틸렌 블루)를 이용한 정량적 색소 결합에 의한 방법(Nature. 1998 Feb26; 391(6670): 908-11)
- [0171] (2) (³²P) 3',5'-ABP에 의한 광친화성 표지에 의한 방법(Mandon, E.C., Milla, M.E., Kempner, E., and Hirschberg, C.B. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 10707-10711)
- [0172] (3) 3'-(³²P)-βmethyleneb PAPS에 의한 광친화성 표지에 의한 방법(Ozeran, J.D., Wesley, J., and Schwarz, N.B. (1996) Biochemistry, 35, 3695-3703)
- [0173] (4) 음이온 교환 수지(황산화당단백질의 분리법)에 의한 방법(Vol. 16, No. 2(19860430) pp. 69-72, 기따사또 대학 ISSN: 03855449)
- [0174] (5) 알시안 블루(Alcian blue)에 의한 sGAG 비색염색(Anal Biochem. 1998 Feb15; 256(2): 229-37)
- [0175] 또한, 임의의 물질이 본 발명의 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화 인히비터인가 아닌가에 대

해서는 당업자이면 상기 방법 등에 의해 용이하게 평가할 수 있다.

[0176] 본 발명의 스크리닝 방법의 다른 양태로서는, N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 활성을 저하시키는 물질(화합물)을 선택하는 공정을 포함하는 방법을 들 수 있다.

[0177] 본 발명의 상기 방법은 예를 들면 이하의 공정을 포함한다.

[0178] (a) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소와, 피검 화합물을 접촉시키는 공정

[0179] (b) 상기 효소의 황산기 전이 활성을 측정하는 공정

[0180] (c) 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우와 비교하여 상기 활성을 저하시키는 화합물을 선택하는 공정

[0181] 상기 방법에 있어서는 우선, N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소에 피검 화합물을 접촉시킨다.

[0182] 본 방법에 있어서는 이어서, 상기 효소의 황산기 전이 활성을 측정한다. 이어서, 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우(대조)와 비교하여 상기 활성을 저하시키는 화합물을 선택한다. 저하시키는 화합물은 섬유 형성 억제제 또는 섬유 형성성 질환 치료를 위한 약제가 된다.

[0183] 피검 화합물이 상기 황산기 전이 활성을 갖고 있는지의 여부에 대해서 평가(측정) 가능한 방법으로서는 예를 들면 이하의 방법을 들 수 있다.

[0184] N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산화를 촉진하는 세포, 세포주를 일정 시간 배양하는 과정에서 각종 피검 화합물을 혼합하고, 배양 전후의 황산화의 정도를 예를 들면 4 위치 황산화를 검출하는 항체(클론; LY111, 2H6)나 6 위치 황산화를 검출하는 항체(클론; MC21C, M0225, CS-56, 모두 세이가가꾸 고교사 제조)로 간편하게 확인할 수 있다. 형광 표지 항체를 이용하여, 배양 전후의 형광수치를 비교할 수도 있고, 배양 전후로 2-B-6이나 3-B-3 항체를 사용한 검출법을 행할 수도 있다. 세포 배양 후의 황산화의 증가(LY111이나 MC21C의 형광 수치 증가)를 억제하는 화합물, 또는 세포 배양 후의 탈황산화의 진행(2-B-6이나 3-B-3의 형광 수치 증가)을 촉진하는 화합물이 본 발명의 방법에 있어서 목적으로 하는 후보 화합물로서 선택된다.

[0185] 또한, 보다 선택적으로는, 예를 들면 C4ST-1이나 C6ST-1 등의 황산기 전이 효소의 유전자를 CHO 세포나 L 세포 등에 주지의 방법으로 도입하고, 항상적으로 발현시킨 세포주를 제조하는 것이 가능하다. 이러한 항상적으로 황산기를 부가하는 세포주를 사용함으로써 보다 클리어하게 치료 후보 화합물을 판정할 수 있다.

[0186] 본 발명의 다른 바람직한 양태는 본 발명의 N-아세틸갈락토사민의 황산기 전이 효소의 유전자의 발현량을 저하시키는 화합물을 선택하는, 이하의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법이다.

[0187] (a) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는 세포에 피검 화합물을 접촉시키는 공정

[0188] (b) 상기 세포에서의 유전자의 발현량을 측정하는 공정

[0189] (c) 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우와 비교하여 상기 유전자의 발현량을 저하시키는 화합물을 선택하는 공정

[0190] 상기 방법에 있어서는 우선 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는 세포에 피검 화합물을 접촉시킨다.

[0191] 본 방법에 있어서는 이어서 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 발현량을 측정한다. 여기서 「유전자의 발현」에는 전사 및 번역의 쌍방이 포함된다. 유전자의 발현량의 측정은 당업자에게 공지된 방법에 의해서 행할 수 있다.

[0192] 예를 들면, 상기 어느 하나의 단백질을 발현하는 세포로부터 mRNA를 정법에 따라서 추출하고, 이 mRNA를 주형으로 한 노던 혼성화법, RT-PCR법, DNA 어레이법 등을 실시함으로써 상기 유전자의 전사량의 측정을 행할 수 있다. 또한, 상기 어느 하나의 단백질을 코딩하는 유전자를 발현하는 세포로부터 단백질 분획을 회수하고, 상기 어느 하나의 단백질의 발현을 SDS-PAGE 등의 전기 영동법으로 검출함으로써 유전자의 번역량의 측정을 행할 수도 있다. 또한, 상기 어느 하나의 단백질에 대한 항체를 이용하여, 웨스턴 블로팅법을 실시함으로써 상기 단백질의 발현을 검출함으로써 유전자의 번역량의 측정을 행하는 것도 가능하다. 상기 단백질의 검출에 이용하는 항체로서는 검출 가능한 항체이면 특별히 제한은 없지만, 예를 들면 모노클로날 항체, 또는 폴리클로날 항체의

양쪽을 이용할 수 있다.

[0193] 본 방법에 있어서는, 이어서 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우(대조)와 상기 유전자의 발현량을 비교한다.

[0194] 본 방법에 있어서는, 이어서 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우와 비교하여 상기 유전자의 발현량을 저하(억제)시키는 화합물을 선택한다. 저하(억제)시키는 화합물은 조직 섬유 형성 억제제 또는 섬유 형성성 질환 치료를 위한 후보 화합물이 된다.

[0195] 또한, 본 발명의 스크리닝 방법의 일 양태로서는, 본 발명의 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 발현량(레벨)을 저하시키는 화합물을 리포터 유전자의 발현량(레벨)을 지표로서 선택하는 방법이다. 본 발명의 상기 방법은 예를 들면 이하의 공정 (a) 내지 (c)를 포함한다.

[0196] (a) N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역과 리포터 유전자가 기능적으로 결합한 구조를 갖는 DNA를 포함하는 세포 또는 세포 추출액과, 피검 화합물을 접촉시키는 공정

[0197] (b) 상기 리포터 유전자의 발현량(레벨)을 측정하는 공정

[0198] (c) 피검 화합물을 접촉시키지 않는 경우와 비교하여 상기 리포터 유전자의 발현량(레벨)을 저하시키는 화합물을 선택하는 공정

[0199] 본 방법에 있어서는 우선, N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역과 리포터 유전자가 기능적으로 결합한 구조를 갖는 DNA를 포함하는 세포 또는 세포 추출액과, 피검 화합물을 접촉시킨다.

[0200] 여기서 「기능적으로 결합한」이란 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역에 전사 인자가 결합함으로써 리포터 유전자의 발현이 유도되도록, N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역과 리포터 유전자가 결합하고 있는 것을 말한다. 따라서, 리포터 유전자가 다른 유전자와 결합하고 있고, 다른 유전자 산물과의 융합 단백질을 형성하는 경우에도 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역에 전사 인자가 결합함으로써 상기 융합 단백질의 발현이 유도되는 것이면, 상기 「기능적으로 결합한」의 의미에 포함된다. N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 cDNA 염기 서열에 기초하여 당업자에게 있어서는, 계놈 중에 존재하는 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역을 주지의 방법에 의해 취득하는 것이 가능하다.

[0201] 본 방법에 이용하는 리포터 유전자로서는, 그 발현이 검출 가능하면 특별히 제한은 없고, 예를 들면, CAT 유전자, lacZ 유전자, 루시페라아제 유전자, 및 GFP 유전자 등을 들 수 있다. 「N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역과 리포터 유전자가 기능적으로 결합한 구조를 갖는 DNA를 포함하는 세포」로서, 예를 들면, 이러한 구조가 삽입된 벡터를 도입한 세포를 들 수 있다. 이러한 벡터는 당업자에 주지의 방법에 의해 제작할 수 있다. 벡터의 세포에의 도입은 일반적인 방법, 예를 들면, 인산칼슘 침전법, 전기 펄스 천공법, 리포펙션법, 마이크로인젝션법 등에 의해서 실시할 수 있다. 「N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역과 리포터 유전자가 기능적으로 결합한 구조를 갖는 DNA를 포함하는 세포」에는 염색체에 상기 구조가 삽입된 세포도 포함된다. 염색체에의 DNA 구조의 삽입은 당업자에 일반적으로 이용되는 방법, 예를 들면, 상동 재조합을 이용한 유전자 도입법에 의해 행할 수 있다.

[0202] 「N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역과 리포터 유전자가 기능적으로 결합한 구조를 갖는 DNA를 포함하는 세포 추출액」이란, 예를 들면, 시판되고 있는 시험관내 전사 번역 키트에 포함되는 세포 추출액에 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역과 리포터 유전자가 기능적으로 결합한 구조를 갖는 DNA를 첨가한 것을 들 수 있다.

[0203] 여기서 「접촉」은 「N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자의 전사 조절 영역과 리포터 유전자가 기능적으로 결합한 구조를 갖는 DNA를 포함하는 세포」의 배양액에 피검 화합물을 첨가하는, 또는 상기 DNA를 포함하는 상기한 시판된 세포 추출액에 피검 화합물을 첨가함으로써 행할 수 있다. 피검 화합물이 단백질인 경우에는 예를 들면 상기 단백질을 발현하는 DNA 벡터를 상기 세포에 도입함으로써 행하는 것도 가능하다.

- [0204] 본 방법에 있어서는, 이어서 상기 리포터 유전자의 발현 레벨을 측정한다. 리포터 유전자의 발현 레벨은 상기 리포터 유전자의 종류에 따라서 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다. 예를 들면, 리포터 유전자가 CAT 유전자인 경우에는, 상기 유전자 산물에 의한 클로람페니콜의 아세틸화를 검출함으로써 리포터 유전자의 발현량을 측정할 수 있다. 리포터 유전자가 lacZ 유전자인 경우에는, 상기 유전자 발현 산물의 촉매 작용에 의한 색소 화합물의 발색을 검출함으로써, 또한 루시페라아제 유전자인 경우에는, 상기 유전자 발현 산물의 촉매 작용에 의한 형광 화합물의 형광을 검출함으로써, 또한 GFP 유전자인 경우에는, GFP 단백질에 의한 형광을 검출함으로써 리포터 유전자의 발현량을 측정할 수 있다.
- [0205] 본 방법에 있어서는, 이어서 측정한 리포터 유전자의 발현량(레벨)을 피검 화합물의 비존재 하에서 측정한 경우(대조)와 비교한다. 상기 리포터 유전자가 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 코딩하는 유전자와 기능적으로 결합하고 있는 경우에는, 상기 리포터 유전자의 발현 레벨이 대조와 비교하여 저하(억제)시키고 있는 화합물을 선택한다. 저하(억제)시키는 화합물은 조직 섬유 형성 억제를 위한 약제 또는 섬유 형성성 질환 치료를 위한 후보 화합물이 된다.
- [0206] 본 발명의 스크리닝 방법에서 발견되는 조직 섬유 형성 억제제는 바람직하게는 섬유 형성성 질환의 치료용 또는 예방용으로 이용된다.
- [0207] 또한 본 발명은 섬유 형성성 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약 조성물의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 상기 제조 방법은 예를 들면 이하의 공정 (a) 및 (b)를 포함한다.
- [0208] (a) 피검 시료로부터 상기 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법에 의해 조직 섬유 형성 억제제를 선택하는 공정
- [0209] (b) 상기 약제와 의약적으로 혼용되는 담체를 혼합하는 공정
- [0210] 본 방법에 있어서는, 우선 피검 시료로부터 상기 조직 섬유 형성 억제제의 스크리닝 방법에 의해 조직 섬유 형성 억제제를 선택한다.
- [0211] 본 방법에 있어서는 이어서, 상기 선택된 약제와, 의약적으로 혼용되는 담체를 혼합한다. 의약적으로 혼용되는 담체로서는, 예를 들면 상술한 담체를 사용할 수 있다.
- [0212] 또한 본 발명은 본 발명의 스크리닝 방법을 실시하기 위해서 이용되는 각종약제·시약 등을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0213] 본 발명의 키트는 예를 들면 본 발명의 상술한 각종 시약 중에서 실시하는 스크리닝 방법에 맞추어서 적절하게 선택할 수 있다. 예를 들면 본 발명의 키트는 본 발명의 N-아세틸갈락토사민의 4 위치 또는 6 위치의 황산기 전이 효소를 구성 요소로 할 수 있다. 본 발명의 키트에는 또한 본 발명의 방법에서 사용되는 각종 시약, 용기 등을 포함시킬 수 있다. 예를 들면, 항체, 프로브, 각종 반응 시약, 세포, 배양액, 대조 샘플, 완충액, 사용 방법을 기재한 지시서 등을 적절하게 포함시킬 수 있다.
- [0214] 또한 본 발명은 본 발명의 약제를 개체(예를 들면, 환자 등)에 투여하는 공정을 포함하는, 섬유 형성성 질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0215] 본 발명의 예방 또는 치료 방법의 대상이 되는 개체는 섬유 형성성 질환을 발병할 수 있는 생물이면 특별히 제한되지 않지만, 바람직하게는 인간이다.
- [0216] 개체에의 투여는 일반적으로는 예를 들면 동맥 내 주사, 정맥 내 주사, 피하 주사 등 당업자에게 공지된 방법에 의해 행할 수 있다. 투여량은 환자의 체중이나 연령, 투여 방법 등에 따라 변동하는데, 당업자(의사, 수의사, 약제사 등)이면 적당한 투여량을 적절하게 선택하는 것이 가능하다.
- [0217] 또한 본 발명은 본 발명의 약제의, 조직 섬유 형성 억제제의 제조에서의 사용에 관한 것이다.
- [0218] 또 본 명세서에 있어서 인용된 모든 선행기술문헌은 참조로서 본 명세서에 편입된다.
- [0219] [실시예]
- [0220] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 단, 본 발명의 기술적 범위는 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0221] 또한, 본 명세서에 있어서 siRNA의 구조(서열)을 타겟이 되는 유전자의 DNA 영역을 기재함으로써 표현하는 경우

가 있다. 당업자이면 타겟 서열로서 기재된 DNA 서열의 정보에 기초하여, 해당 DNA 서열에 대응하는 2개쇄 RNA로 이루어지는 siRNA의 구조를 인식하는 것은 용이하다.

[0222] [심장 조직]

[0223] 실시예 1: 마우스 심근증 모델에 있어서의 표적 당쇄 유전자의 siRNA 뉴다운 효과의 검토와, 유전자 레벨에 있어서의 항섬유 형성 효과의 검토

[0224] 이 실시예 및 이하의 실시예에서는 마우스 심근증 모델로서 표준화되어 있는, 염산독소루비신(DOX: 교와학꼬사 제조) 복강 내 투여 모델을 사용하였다. 이 마우스 모델은 고전적이지만 재현성이 우수하고, 간편한 점에서 심근증 모델로서 병의 용태 해명이나, 신규 치료 실험 등에 폭넓게 사용되고 있다(Longhu Li, Circulation. 2006; 113: 535-543, Xiaoming Yi, Am J Physiol Heart Circ Physiol 290: H1098-H1102, 2006, Kang YJ, J Biol Chem. 2000 May 5; 275(18): 13690-8, Nozaki N, Circulation. 2004; 110: 2869-2874, Fisher PW, Circulation. 2005; 111:1601-1610).

[0225] 조직학적으로는 심근간질의 섬유 형성을 나타내는 점에서, 확장형 심근증, 구속형 심근증, 비대형 심근증, 부정맥원생우실심근증(ARVC)에 추가로, 급성심근경색·안정협심증·불안정협심증·심근염·심장변막증·부정맥·고혈압증에 속발하는 좌실 리모델링에 공통되는 소견이고, 상술한 질환에 기초하는 만성심부전의 심근기능 장해의 책임이 되는 병리 소견이다(Jugdutt BI, Circulation. 108: 1395-1403, 2003).

[0226] 처음에, 마우스 모델의 제작에 대해서인데, C57BL6/J 마우스(수컷, 8주령, 낫본 클레아사 제조)에, DOX(15 mg/kg; 교와학꼬사 제조)를 복강 내 투여한다. 투여 후 1주간 사육하여 심장 조직을 채취하였다. 대조군은 동일한 마우스로 DOX를 투여하지 않고, 동일 시기에 구입·사육한 것을 이용하였다.

[0227] GalNac4S-6ST siRNA약은 DOX 투여의 24 시간 전에 마우스 1 마리당, GalNac4S-6ST siRNA 1 μ g(홋카이도 시스템 사이언스사 제조)와, 매체인 1% 아텔로콜라겐(고켄사 제조) 200 μ L를 혼합한 것을 복강 내 투여하였다. 본 실시예에 이용한 GalNac4S-6ST siRNA약의 염기 서열에 대해서 이하에 나타내었다. 서열은 반드시 본 예에만 한정되는 것은 아니다.

[0228] [인간 GalNac4-6STSsiRNA](진뱅크 액세션 번호 NM_015892)

[0229] (홋카이도 시스템 사이언스사 제조)

[0230] 5'-ggagcagagcaagaugaaucaauc-ag-3'(서열번호: 25)

[0231] 3'-ua-ccucgucucguacuuauuguag-5'(서열번호: 26)

[0232] 심근증 모델 마우스로부터 적출한 장기(심장) 50 mg당에 대하여 RNA iso (다카라 바이오사 제조) 1 mL를 가하고, 전동 균질기(DIGITAL HOMOGENIZER, AS ONE사 제조)로 분쇄시킨 후, 클로로포름 200 μ L(Sigma Aldrich Japan사 제조)를 가하고 천천히 혼합한 후, 약 5분 빙냉하고, 12,000 rpm, 4°C, 15 분간 원심분리기(Centrifuge 5417R, eppendorf사 제조)를 이용하여 원심 분리를 행하였다. 원심 분리 후의 상청액 500 μ L를 별도의 에펜도르프 튜브에 옮기고, 상청액과 동등량의 이소프로판을 500 μ L(Sigma Aldrich Japan사 제조)를 가하여 혼합한 후, 1 μ L의 글리코겐(Invitrogen사 제조)을 가하고, 15 분간 빙냉하였다. 빙냉 15분 후, 12,000 rpm, 4°C, 15 분간 원심하고, 그 후, 75 % 에탄올 1000 μ L(Sigma Aldrich Japan사 제조)로 3회 세정하여 얻어진 RNA 침전물을 30 분간 내지 1 시간 자연 건조시킨 후, 오오쓰카 증류수 50 μ L(오쓰카 세이야꾸사 제조)에 용해시키고, 또한 오오쓰카 증류수(오쓰카 세이야꾸사 제조)로 100배 희석하고, UV 플레이트(코닝 코스타사 제조) 상에서 플레이트리더(POWER Wave XS, BIO-TEK사 제조)에 의해 추출한 샘플 중의 RNA 농도를 산출하였다.

[0233] 다음으로, 역전사 반응(cDNA 합성)을 행하기 위해서 이하의 절차를 행하였다. 산출하여 얻어진 RNA 샘플을 500 ng/20 μ L의 농도로 조정하고, 68°C, 3 분간, 블록 인큐베이터(ASTEC 제조)에서 가온하고, 10 분간 빙냉하였다. 빙냉 후, 미리 제조하고 있었던 RT 프리 믹스액(조성: 25 mM MgCl₂ 18.64 μ L(Invitrogen사 제조), 5×완충액 20 μ L(Invitrogen사 제조), 0.1 M DTT 6.6 μ L(Invitrogen사 제조), 10 mM dNTP 믹스 10 μ L(Invitrogen사 제조), RNase 인히비터 2 μ L(Invitrogen사 제조), MMLV 역전사 효소 1.2 μ L(Invitrogen사 제조), 랜덤 프라이머 2 μ L(Invitrogen사 제조), 멸균 증류수 19.56 μ L(오오쓰카 증류수: 오쓰카 세이야꾸사 제조)를 80 μ L 가하고 블록 인큐베이터(ASTEC사 제조)에서 42°C, 1 시간, 가온 반응시키고, 1 시간 후, 블록 인큐베이터(ASTEC사 제조)에서 99°C, 5 분간, 가열한 후, 빙냉하여 구하는 cDNA 100 μ L를 제작하고, 합성하여 얻어진 cDNA를 이용하여 이하의 조성으로 정량 PCR 반응을 행하였다. 정량 PCR에 대해서는 SYBR 프리믹스 키트(다카라 바이오사

제조)와 실시간 PCR 써멀 사이클러 DICE(다카라 바이오사 제조)를 이용하여 행하였다. PCR 반응의 조건은 95°C를 10초, 95°C를 5초와 60°C를 30초의 40 사이클로 하고, 마지막으로 용해 곡선 분석을 하였다. 정량 PCR에 이용한 프라이머의 염기 서열에 대해서는 이하에 나타내었다.

- [0234] [정량 PCR 프라이머 서열]
- [0235] *마우스 GalNac4S-6ST(다카라 바이오사 제조)
- [0236] 전방향 : 5'-GTGAGTTCTGCTGCGGTCCA-3'(서열번호: 27)
- [0237] 역방향 : 5'-AGTCCATGCTGATGCCAGAG-3'(서열번호: 28)
- [0238] *마우스 procollagen Type 1 alpha 2(다카라 바이오사 제조)
- [0239] 전방향 : 5'-ACCCGATGGCAACAATGGA-3'(서열번호: 29)
- [0240] 역방향 : 5'-ACCAGCAGGGCCTTGTTC AC-3'(서열번호: 30)
- [0241] *마우스 α -SMA(다카라 바이오사 제조)
- [0242] 전방향 : 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'(서열번호: 31)
- [0243] 역방향 : 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'(서열번호: 32)
- [0244] *마우스 r리보솜 18S(다카라 바이오사 제조)
- [0245] 전방향 : 5'-TTCTGGCCAACGGTCTAGACAAAC-3'(서열번호: 33)
- [0246] 역방향 : 5'-CCAGTGGTCTGGTGTGCTGA-3'(서열번호: 34)
- [0247] 도 2에 도시된 바와 같이, GalNac4S-6ST, I형 콜라겐, α -SMA의 유전자 발현에 대해서 검토한 결과, GalNac4S-6ST siRNA 치료군에서는 미치료군에 비하여 유의($P<0.001$, vs 미치료군)하게 GalNac4S-6ST의 발현의 억제가 보였다. 또한, 심근증의 병의 용태로서 중요한 섬유 형성의 지표로서 α -SMA, I형 콜라겐의 유전자 발현을 각각 검토한 결과, GalNac4S-6ST siRNA 치료군에서는 미치료군에 비하여 유의한 발현의 저하($P<0.001$ vs 미치료군)가 확인되었다. 이들 결과를 고찰하면, GalNac4S-6ST siRNA의 타겟 녹다운 효과에 따라, 심근의 섬유 형성의 진행이 유전자 발현 레벨에서 억제되는 것이 분명해졌다.
- [0248] 본 발명의 약제는 예를 들면 심근섬유 형성 억제제로서 유용하다.
- [0249] 실시예 2: 마우스 심근증 모델에 있어서의 GalNac4S-6ST siRNA의 심비대의 억제 효과
- [0250] 이 실시예에서는 심근증 모델 마우스의 심중량(mg)과 체중(g)을 측정하고, 심비대의 지표가 되는 심중량·체중비를 산출하고, GalNac4S-6ST (GalNac) siRNA 심비대 억제 효과에 대해서 비교 검토를 행하였다. 심비대는 조직의 섬유성 변화를 나타내는 지표이기도 하다.
- [0251] 도 1은 siRNA 치료군($n=4$) 및 미치료군($n=4$)의 심중량(mg)·체중(g)비에 대해서 산출한 결과에 대해서 나타내고 있다. 이 결과, 미치료군에서의 비의 값은 6.376 ± 0.484 이고, siRNA 치료군의 값은 5.442 ± 0.203 이었다. 이 결과, 미치료군에 비하여 siRNA 치료군에서는 유의하게 값의 감소가 보였다($p<0.05$: t 검정). 이것은, GalNac4S-6ST siRNA가 병적인 심비대를 억제하는 효과를 갖는 것을 나타낸 결과이다.
- [0252] 본 발명의 약제는 예를 들면 심비대 억제제(심비대 치료제)로서 유용하다.
- [0253] 실시예 3: 마우스 심근증 모델에 있어서의 GalNac4S-6ST siRNA의 I형 콜라겐 침착 억제 효과의 검토
- [0254] 이 실시예에서는 심근증 모델 마우스의 심장 샘플을 사용하여 GalNac4S-6ST siRNA의 I형 콜라겐 침착(섬유 형성의 지표)의 억제 효과에 대해서 비교 검토를 행하였다. 실시예 1과 동일한 마우스로부터 채취된 심장의 조직 샘플을 동결용 포매제 OCT 컴파운드(Miles사 제조)에 포매(包埋)하고, 크라이오스ಟ(칼 자이스사 제조)에 의해 슬라이스하고, 얇어진 절편을 아세톤(시그마알드리치 재팬사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 또한 일차 항체로서 항I형 콜라겐토끼 항혈청(토끼 폴리클로날 항체, 1:2000 희석; LSL사 제조)을 첨가하고, 실온에서 한시간 반응시켰다. 계속해서, 이차 항체인 페옥시다아제 표지 염소 유래 항토끼 IgG(1:200 희석; cappel사 제조)를 첨가하고, 실온에서 30분 반응시켰다. 반응 후의 샘플에 DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하였다. 이 표본을 광학현미경(레이카사 제조)을 이용하여 관찰하였다.
- [0255] 조직 소견을 도 3에 도시하였다. 미치료군에 있어서는, 심근 섬유 사이에 매우 강한 I형 콜라겐의 양성 시그널

을 확인할 수 있었다. 이에 비하여 siRNA 치료군에서는 I형 콜라겐의 양성 시그널은 미치료군에 비하여 훨씬 약하였다. 이상의 I형 콜라겐의 면역 염색의 결과를 고찰하면, GalNac4S-6ST siRNA가 심근 조직에 있어서의 I형 콜라겐의 과잉 침착에 대하여 억제 효과를 갖는 것이 분명해졌다. 이 결과는 실시예 1에 나타낸 정량 PCR의 결과와 상관하는 것이었다.

[0256] 본 발명의 약제는 예를 들면 심근 조직에 있어서의 I형 콜라겐 침착 억제제로서 유용하다.

[0257] 실시예 4: 마우스 심근증 모델에 있어서의 GalNac4S-6ST siRNA의 III형 콜라겐 침착 억제 효과의 검토

이 실시예에서는 심근증 모델 마우스의 심장 샘플을 사용하여 GalNac4S-6ST siRNA의 III형 콜라겐 침착(섬유 형성의 활동성의 지표)의 억제 효과에 대해서 비교 검토를 행하였다. 실시예 3과 동일한 방법으로 얻어진 조직 절편을 아세톤(시그마알드리치 재팬사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 또한 일차 항체로서 항III형 콜라겐 토키 항혈청(토끼 폴리클로날 항체, 1:2000 희석; LSL사 제조)을 첨가하고, 실온에서 한 시간 반응시켰다. 계속해서, 이차 항체인 페옥시다아제 표지 염소 유래 항토끼 IgG(1:200 희석; cappe1사 제조)를 첨가하고, 실온에서 30분 반응시켰다. 반응 후의 샘플에 DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하였다. 이 표본을 광학현미경(레이카사 제조)을 이용하여 관찰하였다.

[0259] 조직 소견을 도 4에 도시하였다. 미치료군에 있어서는, 심근 섬유 사이에 다소 강화된 III형 콜라겐의 양성 시그널을 확인할 수 있었다. 이에 비하여 siRNA 치료군에서는 III형 콜라겐의 양성 시그널은 대조군과 동일 정도였다. 이상의 III형 콜라겐의 면역 염색의 결과를 고찰하면, GalNac4S-6ST siRNA가 심근 조직에 있어서의 III형 콜라겐의 침착을 억제하는 효과, 즉 활동적인 콜라겐의 침착에 대해서도 유효적인 억제 효과를 갖는 것이 분명해졌다.

[0260] 본 발명의 약제는 예를 들면 심근 조직에 있어서의 III형 콜라겐 침착 억제제로서 유용하다.

[0261] 실시예 5: 마우스 심근증 모델에 있어서의 GalNac4S-6ST siRNA의 섬유아세포의 침윤 억제 효과에 대한 검토

이 실시예에서는 DOX 투여에 의해 심근증 모델 마우스의 심근 조직 내에 침윤하여 오는 섬유아세포의 동태에 대한 GalNac4S-6ST siRNA의 약리 효과에 대해서 검토하였다. 실시예 3과 동일한 방법으로 얻어진 조직 절편을 아세톤(시그마알드리치 재팬사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 또한 일차 항체로서 항마우스 섬유아세포 항체(ER-TR7: 래트 모노클로날 항체, 1:400 희석; BMA 바이오메디컬즈사 제조)를 첨가하고, 실온에서 한 시간 반응시켰다. 계속해서, 이차 항체인 페옥시다아제 표지 염소 유래 항래트 면역 글로불린 항체(1:200 희석; 바이오 소스사 제조)를 첨가하고, 실온에서 30 분 반응시켰다. 반응 후의 샘플에 DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하였다. 이 표본을 광학현미경(레이카사 제조)을 이용하여 관찰하였다.

[0263] 조직 소견을 도 5에 도시하였다. 사진은 심실 격벽 부분을 포커스한 것이다. 미치료군에 있어서는, 대조군에 비하여 다수의 섬유아세포의 침윤을 나타내었다. 이에 비하여 siRNA 치료군에서는 미치료군에 비하여 섬유아세포의 침윤의 정도가 적었다. 이 결과는, GalNac4S-6ST siRNA가 심근 조직에 있어서의 섬유아세포의 침윤을 억제하는 약리 효과를 갖고, 이 효과가 항섬유 형성 작용의 일관된 것을 나타내는 것이었다.

[0264] 본 발명의 약제는 예를 들면 심근 조직에 있어서의 섬유아세포 침윤 억제제로서 유용하다.

[0265] [소화관 조직]

[0266] 실시예 6: 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 GalNac4S-6ST의 임상적 섬유 형성 억제 효과

C57BL/6J 마우스(♀, 6주령, 낫본 클레아사 제조)에 텍스트란황산나트륨(DSS; 와코사 제조)를 3% 함유하는 고염소수를 8일간 자유 음수시킴으로써 대장염 모델을 제조하였다. 본 DSS 유도성 대장염 모델은 재현성이 우수하고, 마우스 궤양성 대장염이나 클론병이라는 염증성 장질환의 표준적 실험 모델로서 널리 이용되고 있는 외에, 장관 협착의 조직학적 특징인 전층성의 염증·섬유성 변화 및 근층의 비후를 나타내는 모델이기도 하다 (Sasaki N, J Inflamm. 2005 2: 13, 총설: Pucilowska JB et al. Am J Physiol Gastroenterol Liver Physiol. 279: G653-G659, 2000). 따라서, 염증성 장질환에 추가로, 조직 상의 장관 협착을 나타내는 병의 용태, 즉, 장관 베체트(단순성 궤양), 과민성 장증후군, 허혈성 장염, 약제성 장염, 방사선성 장염, 식도 아칼라시아, 강피증에 수반하는 식도 협착, SLE(전신성 에리테마토데스: systemic lupus erythematosus)에 수반하는 장관 협착, 히르쉬스프룽병, 장관 적출 후의 협착(수술 후 협착), 소화관계의 암(설암, 상인두암, 후두암, 식도암, 위암, 소장암, 대장암, 직장암)에 대한 내시경적 점막 절제 수술 후의 장관 협착, 장폐색과 같은 질병에 폭넓게 공통되는 조직학적 소견이다.

[0268] 3% DSS 물을 급수함과 동시에, 마우스에게는 실시예 1과 동일한 GaINAc4S-6ST siRNA(1 μ g/마리)를, 미리 PBS로 10배 희석한 아텔로콜라겐(코켄사 제조)에 혼합하여 200 μ l를 복강 내에 주사하였다. 이 처치를 행한 마우스군을 GaINAc4S-6ST siRNA군, GaINAc4S-6ST siRNA를 혼합하지 않고 아텔로콜라겐만의 처치를 행한 군을 대조군이라고 명명하고, 3% DSS 물을 음수시키면서 7일간 체중과 질환의 활동성 인덱스(DAI) 스코어를 기록하였다 (Kihara M, Gut. 2003 52: 713-9). DAI의 평가 기준은 이하와 같다.

표 1

인덱스	체중 감소	변 굳기	분변 혈
0	없음	정상	정상
1	1~5%		잠재 혈뇨 (+)
2	5~10%	묽은 변	잠재 혈뇨 (++)
3	10~20%		잠재 혈뇨 (+++)
4	>20%	설사	육안적 출혈

[0269]

[0270] DSS수 급수 첫날(day 0)을 1로 하고, 개개의 마우스의 DAI를 기록한 결과를 도 6에 도시하였다. 3일째에는 대조군에 비하여 GaINAc4S-6ST siRNA 투여군쪽이 유의하게 낮은 값을 나타내었다($p<0.001$, t 검정). 이 결과로부터, GaINAc4S-6ST 유전자의 발현 억제는 비교적 조기에서 염증의 활동성을 억제하는 효과를 가져오는 것이 나타내어졌다.

[0271] 또한, 5일째에 마우스 도살 후에 대장 길이를 측정한 바, GaINAc4S-6ST siRNA 투여군에서 유의($p<0.005$, t 검정)하게 대장의 단축이 억제되어 있었다(도 6). 대장 길이는 장관 섬유 형성 또는 협착을 반영하는 결정적인 지표이다. 따라서, GaINAc4S-6ST siRNA 투여군에서는 임상적으로도 장관 섬유성 변화를 강하게 억제하는 것이 분명해졌다.

[0272] 본 발명의 약제는 예를 들면 장관 섬유성 변화 억제제로서 유용하다.

실시예 7: 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 GaINAc4S-6ST siRNA에 의한 장관 섬유 형성 억제 효과

[0274] 이 실시예에서는 GaINAc4S-6ST siRNA 투여에 의한 대장 국소의 섬유 형성 관련 유전자 발현을 실시간 정량 PCR법에 의해 검토하였다.

[0275] 실시예 6과 동일한 방법으로 장관 섬유 형성 모델을 제조하고, 7일째에 마우스를 도살하였다. 채취한 대장의 일부를 1.5 ml 튜브에 나누어 담고, 액체 질소로 동결하였다. 실시예 1과 동일한 방법으로 cDNA 합성을 행하고, 정량적 PCR을 행하였다. 프라이머의 서열, PCR 사이클도 동일하다.

[0276] 결과를 도 7에 도시하였다. 본 모델에서는 GaINAc4S-6ST 유전자의 발현이 증강하여 오는데, GaINAc4S-6ST siRNA 치료에 의해서 유의($p<0.001$, t 검정)하게 높다운되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 섬유 형성의 지표인 I형 콜라겐 및 α -SMA의 발현 증강도, GaINAc4S-6ST siRNA에 의해 유의(모두 $p<0.001$, t 검정)하게 억제되었다. 본 결과는 GaINAc4S-6ST의 발현을 억제함으로써 대장의 섬유성 변화의 증강을 효과적으로 억제할 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0277] 본 발명의 약제는 예를 들면 대장에 있어서의 섬유성 변화 억제제로서 유용하다.

실시예 8: 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 GaINAc4S-6ST siRNA의 조직적 섬유 형성 억제 효과

[0279] 실시예 6과 동일한 방법으로 장관 섬유 형성 모델을 제조하고, 7일째에 마우스를 도살하였다. 채취한 대장을 실시예 3과 동일한 방법으로 동결 블록 및, 조직 절편을 제조하였다. 대장 조직 절편의 마송 염색상을 도 8에 도시하였다. 마송 염색은 콜라겐 섬유를 시각화하는, 조직의 섬유성 변화를 평가하기 위한 지표이다. GaINAc4S-6ST siRNA 투여군에 있어서는, 대조군에 비하여, 전층성(점막 고유층, 점막 하층, 근층)의 콜라겐 섬유의 침착이 명확하게 억제되어 있었다.

[0280] 본 발명의 약제는 예를 들면 전층성(점막 고유층, 점막 하층, 근층)의 콜라겐 섬유 침착 억제제로서 유용하다.

실시예 9: 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 GaINAc4S-6ST siRNA의 조직학적 섬유아세포 침윤 억제 효과

- [0282] 실시예 6과 동일한 방법으로 장관 섬유 형성 모델을 제조하고, 7일째에 마우스를 도살하였다. 채취한 대장을 실시예 3과 동일한 방법으로 동결 블록 및, 조직 절편을 제조하였다. 얻어진 절편을 아세톤(와코사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 항ER-TR7 항체(래트 모노클로날 항체, 1 μ g/ml, BMA사 제조)을 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 페옥시다아제 표지 항래트 IgG(1:200 희석)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 첨가하여 발색시켰다. 그 후 릴리-메이어 혈마독실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.
- [0283] 그 결과, GalNAc4S-6ST siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 섬유아세포의 전층성의 침윤이 명확하게 억제되어 있었다(도 9). 따라서, GalNAc4S-6ST 유전자 발현 억제에 의해 조직 병변 국소의 섬유아세포의 침윤 및 정착을 억제함으로써 섬유성 변화의 증강을 경감하고 있는 것이 판명되었다.
- [0284] 본 발명의 약제는 예를 들면 섬유아세포 침윤 억제제 또는 섬유아세포 정착 억제제로서 유용하다.
- [0285] 실시예 10: 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 GalNAc4S-6ST siRNA의 조직학적 마크로파지 침윤 억제 효과
- [0286] 실시예 6과 동일한 방법으로 장관 섬유 형성 모델을 제조하고, 7일째에 마우스를 도살하였다. 채취한 대장을 실시예 3과 동일한 방법으로 동결 블록 및, 조직 절편을 제조하였다. 얻어진 절편을 아세톤(와코사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 항F4/80 항체(클론 A3-1, 래트 모노클로날 항체, 2 μ g/ml: CALTAG LABORATORIES사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 페옥시다아제 표지 항래트 IgG(1:200 희석)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 첨가하여 발색시켰다. 그 후 릴리-메이어 혈마독실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.
- [0287] 그 결과, GalNAc4S-6ST siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 마크로파지의 전층성의 침윤이 명확하게 억제되어 있었다(도 10). 따라서, GalNAc4S-6ST 유전자 발현 억제에 의해서, 마크로파지와 섬유아세포와 같은 섬유성 변화를 지속·증강시키는 책임 세포군의 침윤을 억제하여, 종합적으로 조직의 섬유성 변화를 억제하고 있는 것이 판명되었다.
- [0288] 본 발명의 약제는 예를 들면 마크로파지 또는 섬유아세포의 침윤 억제제로서 유용하다.
- [0289] 실시예 11: 마우스 장관 섬유 형성 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 조직학적 마크로파지 침윤 억제 효과
- [0290] GalNAc4S-6ST는 4 위치가 황산화된 N-아세틸갈락토사민의 6 위치에 황산기를 전이하는 효소이다. 본 실시예에서는 4 위치 황산 전이 효소인 GalNAc-4ST1, GalNAc-4ST2와 같은 패밀리의 역할을 검토하였다. 실시예 6과 동일한 방법으로 장관 섬유 형성 모델을 제조하였다. 7일째에 마우스를 도살하였다. 본 실시예에서는 GalNAc4S-6ST siRNA뿐만 아니라, GalNAc4ST-1과 GalNAc4ST-2(Gene world사 제조)를 혼합하여 마우스 1 마리당 1 μ g을, 매체인 1% 아텔로콜라겐(고켄사 제조) 200 μ L를 혼합한 것을 복강 내 투여하였다. 본 siRNA 투여군을 GalNAc ST siRNA 투여군이라고 표현한다. 대조군은 실시예 6과 동일하다. 본 실시예에 이용한 GalNAc4S-6ST siRNA, GalNAc4ST-1, GalNAc4ST-2의 염기 서열에 대해서 이하에 나타내었다. 서열은 반드시 본 예에만 한정되는 것은 아니다.
- [0291] [GalNAc4ST-1 siRNA 칵테일 서열](진뱅크 액세션 번호 NM_175140)
- [0292] (Gene world사 제조)
- [0293] 5'-ACCCCCAACTCGAACGATGCGGCT-3' (서열번호: 35)
- [0294] 5'-TGCATGTTCTCGTCCATCCTGCTG-3' (서열번호: 36)
- [0295] 5'-CGCCACCGTGTACTGTACTGTGAAGT-3' (서열번호: 37)
- [0296] 5'-AGGCT GCTCCAACTG GAAAGAGGGTG-3' (서열번호: 38)
- [0297] [GalNAc4ST-2 siRNA 칵테일 서열](진뱅크 액세션 번호 NM_199055)
- [0298] (Gene world사 제조)
- [0299] 5'-ATATAGTATCTAGGATATATGTAG-3' (서열번호: 39)
- [0300] 5'-GAAGTACCAAAAGCTGGCTGCTCTA-3' (서열번호: 40)

- [0321] 5'-ggttcagcctggtctaccgtgatgtc-3'(서열번호: 49)
- [0322] 5'-gcagttgttgctatgcgacctgtat-3'(서열번호: 50)
- [0323] 채취한 우폐 조직을 동결용 포매체 OCT 컴파운드(Miles사 제조)에 포매하고, 액체 질소를 이용하여 동결 블록을 제작하였다. 그 동결 블록으로부터 크라이오스텍(Microm사 제조)를 이용하여 두께 6 μm 의 절편을 제작하였다.
- [0324] 얻어진 절편을 1% 글루타르알데히드(나칼라이 테스크사 제조)로 10 분간 고정한 후, 또한 포르몰칼슘액으로 10 분간 고정하였다. 인산 완충액으로 세정한 후, 릴리-메이어 혈마톡실린액(시그마알드리치 재팬사 제조)으로 실온에서 5 분간 염색하고 탈색액(0.5% HCl 함유 70% 에탄올, 모두 나칼라이 테스크사 제조의 시약을 이용하여 제작)으로 가볍게 세정하였다. 그 후 10 분간 수세를 행하였다. 에오신 알코올로 실온에서 5 분간 염색하고 10 분간 수세를 행하였다. 100% 에탄올로 가볍게 세정한 후, 3 분간 정치하였다. 또한 크실렌(나칼라이 테스크사 제조)으로 가볍게 세정한 후, 10 분간 정치하였다. 이 표본을 광학현미경(레이카사 제조)을 이용하여 관찰하여 조직의 모습을 확인하였다.
- [0325] 얻어진 조직도를 도 12에 도시하였다. 대조군(PPE 미투여 마우스)의 소견으로서는 벌집 모양의 폐포 격벽이 특징적인 정상적인 폐 실질의 조직 소견을 확인할 수 있다. 그러나, 중앙의 사진이 나타내는 미치료군(PPE 투여, C6ST-1 siRNA 미투여)에서는 폐기종에 특징적인 소견인 폐포 격벽의 파괴 소실과 기강의 확대에 따른 기종성 병변을 관찰할 수 있다. 이에 비하여 효소 치료군(PPE 투여, C6ST-1 siRNA 투여)에서는 약간의 폐포 격벽의 소실과 기종성 병변이 보이지만, 그 정도는 대폭 개선되어 있는 것을 관찰할 수 있는 소견이었다.
- [0326] 실시예 13: 마우스 폐기종 모델에 있어서의 C6ST-1 siRNA에 의한 폐간질 섬유화 억제 효과
- [0327] 이 실시예에서는 C6ST-1 siRNA 투여에 의한 폐포 간질의 섬유화 관련 유전자 발현을 실시간 정량 PCR법에 의해 검토하였다.
- [0328] 실시예 12와 동일한 방법으로 COPD 모델을 제조하였다. 채취한 폐 조직의 일부를 1.5 ml 투브에 나누어 담고, 액체 질소로 동결하였다. 실시예 1과 동일한 방법으로 cDNA 합성을 행하여 정량적 PCR을 행하였다. I형 콜라겐과 α -SMA의 프라이머의 서열, PCR 사이클은 동일하다. C6ST-1의 프라이머의 서열을 이하에 나타내었다.
- [0329] [정량 PCR 프라이머 서열]
- [0330] *마우스 C6ST-1(다카라 바이오사 제조)
- [0331] 전방향 : 5'-TGTTCCCTGGCATTGTGGTCATA-3'(서열번호: 51)
- [0332] 역방향 : 5'-CCAACTC GCTCAGGGACAAGA-3'(서열번호: 52)
- [0333] 결과를 도 13에 도시하였다. 본 모델에서는 C6ST-1 유전자의 발현이 증강하여 오지만, C6ST-1 siRNA 치료에 의해서 유의($p<0.01$, t 검정)하게 녹다운되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 섬유화의 지표인 I형 콜라겐 및 α -SMA의 발현 증강도, C6ST-1 siRNA에 의해 유의(모두 $p<0.01$, t 검정)하게 억제되었다. 본 결과는 C6ST-1의 발현을 억제함으로써 폐간질의 섬유성 변화의 증강을 효과적으로 억제할 수 있는 것을 나타내고 있다.
- [0334] 본 발명의 양제는 예를 들면 폐간질의 섬유성 변화 억제제로서 유용하다.
- [0335] 실시예 14: 마우스 폐기종 모델에 있어서의 C6ST-1 siRNA의 조직학적 섬유아세포 침윤 억제 효과
- [0336] 실시예 12와 동일한 방법으로 장관 섬유 형성 모델을 제조하였다. 채취한 폐 조직을 실시예 3과 동일한 방법으로 동결 블록 및, 조직 절편을 제조하였다. 얻어진 절편을 아세톤(와코사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 항ER-TR7 항체(래트 모노클로날 항체, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BMA사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 퍼옥시다아제 표지 항래트 IgG(1:200 희석)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 첨가하여 발색시켰다. 그 후 릴리-메이어 혈마톡실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.
- [0337] 그 결과, 대조군에서는 폐포 격벽이 파괴된 간질에 섬유아세포가 강한 집적을 나타내었다(도 14, 대조군의 도면 좌측). 또한, 폐포 격벽이 파괴되고 있는 부위의 간질에 있어서도 다수의 집적을 나타낸(도 14, 대조군의 도면 우측) 것으로부터, COPD와 같은 병의 용태에 있어서, 섬유아세포의 과잉 집적으로부터 폐포벽의 파괴 과정에 이른다는 예상 밖의 결과를 얻었다. 한편, C6ST-1 siRNA 치료군에서는 섬유아세포의 폐포 조직 간질에의 침윤이

명확하게 억제되어 있었다(도 14). 따라서, C6ST-1 유전자 발현 억제에 의해 폐포 조직 간질의 섬유아세포의 침윤 및 정착을 억제함으로써 섬유성 변화의 증강을 경감하고 있는 것이 판명되었다.

[0338] 본 발명의 약제는 예를 들면 폐포 조직 간질의 섬유아세포 침윤 또는 정착 억제제로서 유용하다.

[0339] 실시예 15: 마우스 폐기종 모델에 있어서의 C6ST-1 siRNA의 조직학적 마크로파지 침윤 억제 효과

[0340] 실시예 12와 동일한 방법으로 COPD 모델을 제조하였다. 채취한 폐 조직을 실시예 3과 동일한 방법으로 동결 블록 및, 조직 절편을 제조하였다. 얻어진 절편을 아세톤(와코사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 항F4/80 항체(클론 A3-1, 래트 모노클로날 항체, 2 μ g/ml: CALTAG LABORATORIES사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 페옥시다아제 표지 항래트 IgG(1:200 희석)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 첨가하여 발색시켰다. 그 후 릴리-메이어 헤마톡실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.

[0341] 그 결과, C6ST-1 siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 마크로파지의 폐포 간질에의 침윤이 명확하게 억제되어 있었다(도 15). 따라서, C6ST-1 유전자 발현 억제에 의해서 마크로파지와 섬유아세포와 같은 섬유성 변화를 지속·증강시키는 책임 세포군의 침윤을 억제하여, 종합적으로 조직의 섬유성 변화를 억제하고 있는 것이 판명되었다.

[0342] 본 발명의 약제는 예를 들면 폐포 간질에의 마크로파지 침윤 억제제로서 유용하다.

[0343] 실시예 16: 마우스 폐기종 모델에 있어서의 C6ST-1 siRNA의 호흡 기능 보존 효과

[0344] 본 실시예에서는 C6ST-1 siRNA의 폐기종 모델 마우스에 있어서의 임상 효과를 검토하기 위해서 정적폐탄성(static compliance: Cst)를 지표로 하여 호흡 기능에 제공하는 영향에 대해서 평가하였다. Cst는 폐 조직이 신장하기 쉬움을 나타내고 있지만, 폐포역의 조직 파괴를 수반하는 질환인 폐기종은 Cst가 상승한다.

[0345] 실시예 12에서 기술되어 온 방법과 동일한 절차로 폐기종 모델 마우스를 제작하여, C6ST-1 siRNA로 치료를 행하였다. 이들의 마우스의 자발 호흡을 마취약으로 정지시킨 후 플렉시벤트(FlexiVent)(SCIREQ사 제조) 호흡 기능 해석 장치의 P-V 루프 모드를 이용하여 Cst를 측정하였다. 마우스와 플렉시벤트의 접속은 마우스의 자발 호흡 정지 후에 정중 절개를 행하고, 기관 내에 전용 캐뉼리를 삽관하고 기관지 주위를 결찰하는 방법으로 행하였다.

[0346] 본 실시예의 결과에 대해서 도 16에 도시하였다. 대조군에서는 $42.62 \pm 2.25 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ 이었지만, 미치료군에서 $51.22 \pm 5.2 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ (vs 대조군 $P=0.03$ t 검정)로 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 또한, C6ST-1 siRNA 투여군에 있어서의 Cst는 $42.92 \pm 1.82 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ (vs 미치료군 $P=0.03$ t 검정)로, 미치료군에 대하여 유의하게 저하하고 있었다.

[0347] 따라서, C6ST-1 siRNA 투여군에서는 PPE의 기관 내 투여에 의해 유도되는 폐기종에 수반하는 Cst의 증가를 유의하게 억제하는 것이 분명해졌다. 또한, 본 실시예에 나타내어진 결과는, C6ST-1의 유전자 발현을 억제함으로써 폐 조직의 간질 섬유성 변화에 수반하는 폐포 파괴를 억제할 뿐만 아니라 실제의 임상 증상(호흡 상태)를 개선하는 효과를 갖는 것을 시사하는 것이었다.

[0348] 본 발명의 약제는 예를 들면 폐포 파괴 억제제로서 유용하다.

[0349] 실시예 17: 마우스 폐기종 모델에 있어서의 C6ST-1 siRNA의 조직 보존 효과

[0350] 폐포의 기강 확대를 특징적인 병리상으로서 나타내는 폐기종에서는 기종성 병변의 진행에 따라서 폐 용량이 증가한다. 본 실시예에서는 C6ST-1 siRNA의 치료 효과가 세포 레벨에서의 파괴를 억제할 뿐만 아니라 장기의 형태 유지·보존의 효과에까지 미치는 것을 입증하는 것을 목적으로 하여 행해졌다.

[0351] 본 실시예에서 사용한 폐 조직은 실시예 12에서 사용한 폐 조직의 우폐를 사용하여 행하고 있다. 마우스로부터 적출한 폐 조직을 인산 완충액으로 가볍게 세정한 후, 동일하게 유리 용기에 채운 인산 완충액에 담그었다. 인산 완충액을 채운 유리 용기의 중량을 미리 측정하여 두고, 폐 조직을 용기에 가한 후에 증가한 중량을 액량으로 환산하여 폐 용량으로 하였다.

[0352] 본 실시예의 결과에 대해서 도 17에 도시하였다. 대조군에 있어서의 폐 용량은 $277.5 \pm 61.85 \mu\text{L}$ 인데, 미치료군에서 $413.33 \pm 77.67 \mu\text{L}$ (vs 대조군 $P=0.024$ t 검정)로 통계학적으로 유의한 폐 용량의 증가를 나타내었다.

또한, C6ST-1 siRNA 치료군에 있어서의 폐 용량은 $292.5 \pm 51.23 \mu\text{L}$ (vs 미치료군 $P=0.027$ t 검정)로 미치료군에 대하여 유의하게 폐 용량의 저하를 나타내었다.

[0353] 이들 결과를 정리하면, C6ST-1의 유전자 발현을 억제함으로써 PPE의 기관 내 투여에 의해 유도되는 폐기종에 수반하는 폐 용량의 증가를 효과적으로 억제하는 것이 분명해졌다. 따라서, 세포 레벨에서의 파괴를 억제할 뿐만 아니라, 장기의 형태 유지 · 보존의 효과, 또는 파괴된 조직의 수복 효과를 함께 갖고 있는 것을 나타내는 것이었다.

[0354] 본 발명의 약제는 예를 들면 폐기종에 수반하는 폐 용량 증가 억제제로서 유용하다.

[0355] 실시예 18: 마우스 폐기종 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA에 의한 폐간질 섬유화 억제 효과

[0356] 4 위치 및 6 위치 황산화가 중요한 것을 또 하나의 실시예에서 나타낸다. 본 실시예에서는 실시예 11과 동일한 방법으로 GalNAcST siRNA 투여에 의한 폐포 간질의 섬유화 관련 유전자 발현을 실시간 정량 PCR법에 의해 검토하였다. siRNA의 서열은 실시예 11과 동일하다.

[0357] 실시예 12와 동일한 방법으로 폐기종 모델을 제조하였다. 채취한 폐 조직의 일부를 1.5 ml 투브에 나누어 담고, 액체 질소로 동결하였다. 실시예 1과 동일한 방법으로 cDNA 합성을 행하고, 정량적 PCR을 행하였다. 프라이머의 서열, PCR 사이클은 실시예 1 및 13과 동일하다. TGF- β 의 서열은 이하에 나타내었다.

[정량 PCR 프라이머 서열]

*마우스 TGF- β (다카라 바이오사 제조)

전방향 : 5'-GTGTGGAGCAACATGTGAACTCTA-3'(서열번호: 53)

역방향 : 5'-TTGGTTCAGCCACTGCCGTA-3'(서열번호: 54)

[0362] 결과를 도 18에 도시하였다. 본 실시예에 있어서도, 섬유화의 지표인 I형 콜라겐, α -SMA, 및 TGF- β 의 발현 증강이 GalNAcST siRNA에 의해 유의(모두 $p<0.01$, t 검정)하게 억제되었다. 본 결과는 GAINAc4ST-1, GAINAc4ST-2 및 GAINAc4S-6ST의 발현을 억제함으로써 폐간질의 섬유성 변화의 증강을 효과적으로 억제할 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0363] 본 발명의 약제는 예를 들면 폐간질의 섬유성 변화 억제제로서 유용하다.

[0364] 실시예 19: 마우스 폐기종 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 호흡 기능 보존 효과

[0365] 본 실시예에서는 GAINAcST siRNA의 폐기종 모델 마우스에 있어서의 임상 효과를 검토하기 위해서 정적폐탄성(static compliance: Cst)를 지표로 하여 호흡 기능에 제공하는 영향에 대해서 평가하였다.

[0366] 실시예 12에서 기술되어 온 방법과 동일한 절차로 폐기종 모델 마우스를 제작하고, GAINAcST siRNA로 치료를 행하였다. 이들의 마우스의 자발 호흡을 마취약으로 정지시킨 후 플렉시벤트(SCIREQ사 제조) 호흡 기능 해석 장치의 P-V 루프 모드를 이용하여 Cst를 측정하였다. 마우스와 플렉시벤트와의 접속은 마우스의 자발 호흡 정지 후에 정중 절개를 행하고, 기관 내에 전용 캐뉼러를 삽관하고 기관지 주위를 결찰하는 방법으로 행하였다.

[0367] 본 실시예의 결과에 대해서 도 18에 도시하였다. 대조군에서는 $42.62 \pm 2.25 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ 인데, 미치료군에서 $51.22 \pm 5.2 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ (vs 대조군 $P=0.03$ t 검정)로 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 또한, C6ST-1 siRNA 투여군에 있어서의 Cst는 $44.15 \pm 2.29 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ (vs 미치료군 $P=0.0018$ t 검정)과, 미치료군에 대하여 유의하게 저하하고 있었다.

[0368] 따라서, GalNAcST siRNA 투여군에서는 PPE의 기관 내 투여에 의해 유도되는 폐기종에 수반하는 Cst의 증가를 유의하게 억제하는 것이 분명해졌다. 또한, 본 실시예에 나타내어진 결과는 GAINAc4ST-1, GAINAc4ST-2 및 GAINAc4S-6ST의 유전자 발현을 억제함으로써 폐 조직의 간질 섬유성 변화에 수반하는 폐포 파괴를 억제할 뿐만 아니라 실제의 임상 증상(호흡 상태)을 개선하는 효과를 갖는 것을 시사하는 것이었다.

[0369] 본 발명의 약제는 예를 들면 폐포 파괴 억제제 또는 호흡 상태 개선제로서 유용하다.

[0370] 실시예 20: 마우스 폐기종 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 조직 보존 효과

[0371] 본 실시예에서는 GalNAcST siRNA의 치료 효과가 세포 레벨에서의 파괴를 억제할 뿐만 아니라 장기의 형태 유지 · 보존의 효과에까지 미치는 것을 입증하는 것을 목적으로 하여 행해졌다.

- [0372] 본 실시예에서 사용한 폐 조직은 실시예 12에서 사용한 폐 조직의 우폐를 사용하여 행하고 있다. 마우스로부터 적출한 폐 조직을 인산 완충액으로 가볍게 세정한 후, 동일하게 유리 용기에 채운 인산 완충액에 담그었다. 인산 완충액을 채운 유리 용기의 중량을 미리 측정하여 두고, 폐 조직을 용기에 가한 후에 증가한 중량을 액량으로 환산하여 폐 용량으로 하였다.
- [0373] 본 실시예의 결과에 대해서도 20에 도시하였다. 대조군에 있어서의 폐 용량은 $277.5 \pm 61.85 \mu\text{L}$ 인데, 미치료군에서 $413.33 \pm 77.67 \mu\text{L}$ (vs 대조군 $P=0.024$ t 검정)로 통계학적으로 유의한 폐 용량의 증가를 나타내었다. 또한, GaINAcST siRNA 치료군에 있어서의 폐 용량은 $315 \pm 51.96 \mu\text{L}$ (vs 미치료군 $P=0.049$ t 검정)로 미치료군에 대하여 유의하게 폐 용량의 저하를 나타내었다.
- [0374] 이들 결과를 정리하면, GaINAc4ST-1, GaINAc4ST-2 및 GaINAc4S-6ST의 유전자 발현을 억제함으로써 PPE의 기관내 투여에 의해 유도되는 폐기종에 수반하는 폐 용량의 증가를 효과적으로 억제하는 것이 분명해졌다. 따라서, 세포 레벨에서의 파괴를 억제할 뿐만 아니라, 장기의 형태 유지·보존의 효과, 또는 파괴된 조직의 수복 효과를 함께 갖고 있는 것을 나타내는 것이었다.
- [0375] 본 발명의 약제는 예를 들면 폐의 형태 유지제, 또는 폐의 형태 보존제로서 유용하다.
- [0376] [췌장 조직]
- [0377] 이하의 실시예에서는 생후 2일째 C57BL/6JcL 마우스(암컷, 낫본 클레아사 제조)의 스트랩토조토신 투여에 의해 2형 당뇨병 모델을 제작하고, C4ST-1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1) siRNA, C4ST-2(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2) siRNA, C4ST-3(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3) siRNA 쳐치에 의한 제종 변동, 혈당치 변동, 유전자 발현이나 췌장 조직에 있어서의 섬유성 변화를 검토하였다. 각 siRNA의 투여법에 대해서는 실시예 1과 동일한 방법으로 행하였다. 서열을 이하에 나타내었다.
- [0378] *[C4ST-1 siRNA 칵테일 서열]
- [0379] C4ST1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1)
(진뱅크 액세션 번호 NM_021439)
- [0380] 5'-ACAAAGCCATGAAGCCGGCGCTGCTGGAAGTGTGAGGATGAACAGAATT-3' (서열번호: 55)
- [0381] 5'-CAACCTGAAGACCCCTAACCAAGTACA-3' (서열번호: 56)
- [0382] 5'-GCATCCCAGAGATCAACCACCGC TTG-3' (서열번호: 57)
- [0383] *[C4ST-2 siRNA 칵테일 서열]
- [0384] C4ST2(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2)
(진뱅크 액세션 번호 NM_021528)
- [0385] 5'-GCCAGGAGTGGGCCAGCCCAGGGC-3' (서열번호: 58)
- [0386] 5'-ATGACCAAGCCGGCTTCCGGCTG-3' (서열번호: 59)
- [0387] 5'-AGAGCCTGCTGGACCGGGCAGCCCCCTA-3' (서열번호: 60)
- [0388] 5'-GAGACCCCTGGACATCCCCGGGAACA-3' (서열번호: 61)
- [0389] *[C4ST-3 siRNA 칵테일 서열]
- [0390] C4ST3(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3)
(진뱅크 액세션 번호 XM_355798)
- [0391] 5'-ATGACTGTCGCGCTGCCACGCGTGCCA-3' (서열번호: 62)
- [0392] 5'-CAGCATGGGAAGACGCTCCTGTTGCA-3' (서열번호: 63)
- [0393] 5'-TCCAAGCGCAATCCCTGCGCACGAGGCG-3' (서열번호: 64)
- [0394] 5'-GCCTGGCCTGCTGCCCTCGCTGGCC-3' (서열번호: 65)

- [0398] 우선, 샘플 제조하기 위해서 이하과 같이 행하였다.
- [0399] 실시예 21: 스트렙토조신 유발성 C57BL/6JcL 2형 당뇨병 모델 마우스에 의한 C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA 처치에 있어서의 항비만 효과의 검토
- [0400] 임신 14일째 C57BL/6JcL 마우스(낫본 클레아사 제조)를 사육, 출산시키고, 출생 후 2일령 C57BL/6JcL 마우스 암컷, 각각에 스트렙토조신 10 mg/mL(SIGMA사 제조) 20 μ L/head에 피하 주사하고, 4주령까지 CE-2(낫본 클레아사 제조)의 사료, 멸균수를 제공하여 사육하고, 4주령부터 고지방 다이어트식(낫본 클레아사 제조), 멸균수를 제공하고, 2주간 사육시켰다. 2주간째에 siRNA C4ST-1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1), C4ST-2(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2), C4ST-3(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3) 1 μ g(GeneWorld사 제조)를 siRNA 매체인 1 % 아텔로콜라겐(고켄사 제조)과 혼합시킨 것을 1회/1주간 200 μ L 복강 내 투여(1회/1주간)의 2회(2주간) 처치를 행하였다. 실험 14일째에 BrdU 5 mg/mL(ZyMED Laboratory, Inc사 제조) 100 μ L를 꼬리 정맥 내 투여 처치하고, 1 시간 후, 해부하여, 간장, 췌장, 신장, 정소, 난소, 근육을 적출하여 면역 염색용 샘플, 유전자 발현 해석용 샘플을 얻었다. 체중 변동에 대해서는 실시예 기간 중, 14일간 경시적으로 측정을 행하였다.
- [0401] 도 21에 결과를 나타내었다. 종축에 체중(g)을 횡축에 측정 일수(days)를 나타내었다. 도 21로부터 대조군과 비교하여 C4ST-1 siRNA 처치군, C4ST-2 siRNA 처치군, C4ST-3 siRNA 처치군에 있어서 처치 10일째 이후, 체중 증가가 억제되는 경향을 나타내었다. C4ST-2 siRNA 처치군, C4ST-3 siRNA 처치군에 있어서는, 처치 18일째에 유의하게(모두 $p<0.05$) 체중 증가가 억제되었다. 본 결과는 C4ST-1, C4ST-2, C4ST-3의 발현을 억제함으로써 2형 당뇨병에 수반하는 비만을 억제할 수 있는 것을 나타내고 있다.
- [0402] 본 발명의 약제는 예를 들면 체중 증가 억제제, 또는 2형 당뇨병에 수반하는 비만 억제제로서 유용하다.
- [0403] 실시예 22: 스트렙토조신 유발성 C57BL/6JcL 2형 당뇨병 모델 마우스에 의한 C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA 처치에 있어서의 인슐린 저항성의 검토
- [0404] 해부 전날에 인슐린 저항성 테스트(Insulin-tolerance test)로서 인간 결정 인슐린(0.75 U/kg)을 복강 내 투여 처치하고, 0분 후, 15분 후, 60분 후의 혈당치를 글루-테스트 에이스 혈당치 측정기(봄비스 야꾸힝사 제조)를 이용하여 측정을 행하여 평가를 실시하였다. siRNA 처치 후, 0분 후, 15분 후, 60분 후의 혈당치의 변동을 도 22에 도시하였다. 종축에 혈당치(mg/dL), 횡축에 인슐린 저항성 테스트 후, 0분 후, 15분 후, 60분 후를 나타내었다.
- [0405] 도 22로부터 대조군과 비교하여 C4ST-1 siRNA 처치군, C4ST-2 siRNA 처치군, C4ST-3 siRNA 처치군에 있어서 처치 후, 0분 후, 15분 후에 있어서는 유의한 혈당치의 감소는 보이지 않았지만, 60분 후에 C4ST-1 siRNA 처치군, C4ST-2 siRNA 처치군, C4ST-3 siRNA 처치군 각각에서 유의한 혈당치의 감소가 보였다. 본 결과는 C4ST-1, C4ST-2, C4ST-3의 발현 억제에 의해 2형 당뇨병의 본질적인 기능 장해인 인슐린 저항성을 효과적으로 개선할 수 있는 것을 나타내고 있다.
- [0406] 본 발명은 예를 들면, 2형 당뇨병의 인슐린 저항성 개선제로서 유용하다.
- [0407] 실시예 23: 스트렙토조신 유발성 C57BL/6JcL 2형 당뇨병 모델 마우스에 의한 C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA 처치에 있어서의 췌장 조직 유전자 발현의 검토
- [0408] 스트렙토조신 유발성 C57BL/6JcL 마우스, 암컷으로부터 적출한 장기(췌장) 50 mg당에 대하여 실시예 1과 동일하게 cDNA를 조정하고, 이하의 조성으로 PCR 반응을 행하였다.
- [0409] PCR 완충액 2 μ L[조성: 166 mM (NH₄)₂SO₄(Sigma Aldrich Japan사 제조), 670 mM 트리스 pH8.8(Invitrogen사 제조), 67 mM MgCl₂ · 6H₂O(Sigma Aldrich Japan 제조), 100 mM 2-미캡토에탄올](WAKO사 제조)], 25 mM dNTP 믹스 0.8 μ L(Invitrogen사 제조), DMSO 0.6 μ L(Sigma Aldrich Japan사 제조), 프라이머 전방향(Primer Forward) 0.2 μ L(GeneWorld사 제조), 프라이머 역방향(Primer Reverse) 0.2 μ L(GeneWorld사 제조), 오오쓰카 증류수 15.7 μ L(오쓰카 세이야꾸사 제조), Taq 폴리머라제 0.1 μ L(Perkin Elmer사 제조), 상기로부터 얻어진 cDNA 1 μ L를 혼합시켜 공인된(Authorized) 씨밀 사이클러(eppendorf사 제조)에 의해 94°C 45 초, 56°C 45 초, 72°C 60 초 35 사이클 반응시켰다. 반응 종료 후, 얻어진 PCR 산물에 2 μ L 로딩 다이(Loading Dye)(Invitrogen사 제조)를 가하고, 1.5% 울트라퓨어 아가로스(UltraPure Agarose)(Invitrogen사 제조)겔을 제작하고, 무피드 (Mupid)-2 플러스(ADVANCE사 제조)에 의해 100 V, 20 분간 전기 영동을 행하였다. 영동 후, 1×LoTE[조성: 3

mM 트리스-HCl(pH7.5)(Invitrogen사 제조), 0.2 mM EDTA(pH7.5)(Sigma Aldrich Japan사 제조)]로 10000배 희석 브롬화 에티디움(Invitrogen사 제조) 염색액 중에서 20 분간 내지 30 분간 진탕시킨 후, I-스코프(Scope) WD(ADVANCE 제조)에 설치한 EXILIM(CASIO사 제조)로 겔 촬영하여 유전자 발현의 확인을 행하였다.

[0410] 이번에, 이용한 프라이머(전방향, 역방향)(GeneWorld사 제조)를 이하에 열기한다.

[0411] [프라이머 서열]

[0412] * GAPDH

[0413] 전방향 : 5'-CTGCCAAGTATGACATCA-3'(서열번호: 66)

[0414] 역방향 : 5'-TACTCCTTGGAGGCCATGTAG-3'(서열번호: 67)

[0415] * C4ST1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1)

[0416] 전방향 : 5'-gtggatgaggaccacgact-3'(서열번호: 68)

[0417] 역방향 : 5'-ctttcaagcggtggat-3'(서열번호: 69)

[0418] * C4ST2(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2)

[0419] 전방향 : 5'-acctcctagaccacacacg-3'(서열번호: 70)

[0420] 역방향 : 5'-ggatgttggcaaaccagtct-3'(서열번호: 71)

[0421] * C4ST3(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3)

[0422] 전방향 : 5'-atgagccctt caacgaacac-3'(서열번호: 72)

[0423] 역방향 : 5'-tggtagaaagggctgatgtc-3'(서열번호: 73)

[0424] 결과를 도 23에 도시하였다. RT-PCR에 의해 양성 대조인 GAPDH의 발현이 대조군, C4ST1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1), C4ST2(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2), C4ST3(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3)에 있어서 각각 보이고, 대조군과 비교하여 C4ST1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1) siRNA, C4ST2(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2) siRNA, C4ST3(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3) siRNA 처치군에서는 발현 감소가 나타나고, 아텔로콜라겐 매체 C4ST1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1) siRNA, C4ST2(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2) siRNA, C4ST3(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3) siRNA 투여에 의해 C4ST1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1), C4ST2(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2), C4ST3(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3) 유전자의 녹다운이 확인되었다.

[0425] 실시예 24: 스트렙토조신 유발성 C57BL/6Jcl 2형 당뇨병 모델 마우스에 의한 C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA 처치에 있어서의 췌장 아밀로이드 전구 단백질 축적의 검토

[0426] 본 실시예에서는 2형 당뇨병 모델 마우스의 췌장 조직 샘플을 사용하여, C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA의 아밀로이드 전구 단백질(APP: Amyloid precursor protein) 침착 억제 효과에 대해서 비교 검토를 행하였다. β 세포가 존재하는 소도에서의 APP, 아밀로이드 섬유의 침착은 2형 당뇨병이 중요한 병리 조직 소견인 것은 옛부터 알려져 있지만, 최근에는 알츠하이머병과의 관계도 판명되어 있다(Johnson KH et al. N Eng J Med 321: 513, 1989., Rhodes CJ. Science 307: 380, 2005., Haan MN. Nat Clin Pract Neurol 3: 159, 2006., Prentki M et al. J Clin Invest 116: 1802, 2006.).

[0427] 얻어진 조직 샘플 절편을 실시예 3과 동일한 방법으로 항아밀로이드 전구체 단백질 염소 항체(calbiochem 사)를 이용하여 염색을 행하여, 조직 레벨의 발현을 평가, 검토하였다. 도 24에 정상 마우스(Normal)군, 대조군, C4ST-2 siRNA 처치군의 조직 화상을 나타내었다. 2형 당뇨병 모델 마우스의 소도에서는 APP의 침착이 증강하여 오지만, 대조군과 비교하여 C4ST-2 siRNA 처치군에서는 명확히 억제되어 있는 것이 확인되었다.

[0428] 본 발명의 약제는 예를 들면 아밀로이드 섬유 침착 억제제로서 유용하다.

[0429] 실시예 25: 스트렙토조신 유발성 C57BL/6Jcl 2형 당뇨병 모델 마우스에 의한 C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA,

C4ST-3 siRNA 처치에 있어서의 조직학적 섬유아세포 침윤 억제 효과

[0430] 채취한 췌장 조직을 실시예 3과 동일한 방법으로 동결 블록 및, 조직 절편을 제조하였다. 얻어진 절편을 아세톤(와코사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 항ER-TR7 항체(래트 모노클로날 항체, 1 μ g/ml: BMA사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 페옥시다아제 표지 항체 IgG(1:200 희석)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 첨가하여 발색시켰다. 그 후 릴리-메이어 혜마톡실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.

[0431] 그 결과, C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA 각 치료군에서는 대조군에 비하여 섬유아세포의 췌장 소도에의 침윤이 명확하게 억제되어 있었다(도 25). 따라서, C4ST-1, C4ST-2, C4ST-3 유전자 발현 억제에 의해서, β 세포의 국재하는 소도에의 섬유아세포 침윤과 정착을 억제함으로써 조직의 섬유성 변화의 증강을 경감하고 있는 것이 판명되었다.

[0432] 본 발명의 약제는 예를 들면 소도에의 섬유아세포 침윤 억제제로서 유용하다.

실시예 26: 스트렙토조신 유발성 C57BL/6JcL 2형 당뇨병 모델 마우스에 의한 C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA 처치에 있어서의 조직학적 마크로파지 침윤 억제 효과

[0434] 채취한 췌장 조직을 실시예 3과 동일한 방법으로 동결 블록 및, 조직 절편을 제조하였다. 얻어진 절편을 아세톤(와코사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 항F4/80 항체(클론 A3-1, 래트 모노클로날 항체, 2 μ g/ml: CALTAG LABORATORIES사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 페옥시다아제 표지 항체 IgG(1:200 희석)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 첨가하여 발색시켰다. 그 후 릴리-메이어 혜마톡실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.

[0435] 그 결과, C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA 각 치료군에서는 대조군에 비하여 마크로파지의 췌장 소도에의 침윤이 명확하게 억제되어 있었다(도 26). 따라서, C4ST-1, C4ST-2, C4ST-3 유전자 발현 억제에 의해서, 마크로파지와 섬유아세포와 같은 섬유성 변화를 지속·증강시키는 책임 세포군의 침윤을 억제하여, 종합적으로 조직의 섬유성 변화를 억제하고 있는 것이 판명되었다.

[0436] 본 발명의 약제는 예를 들면 췌장 소도에의 마크로파지 침윤 억제제로서 유용하다.

실시예 27: 스트렙토조신 유발성 C57BL/6JcL 2형 당뇨병 모델 마우스에 의한 GalNAcST siRNA 처치에 있어서의 인슐린 저항성의 검토

[0438] 4 위치 및 6 위치 황산화가 중요한 것을 나타내기 위한 또 하나의 실시예를 기술한다. 본 실시예에서는 실시예 11, 실시예 18과 동일한 방법으로 GalNAcST siRNA 투여에 의한 인슐린 저항성의 개선을 검토하였다. 실시예 21과 동일한 방법으로 2형 당뇨병 모델을 제조하고, 실시예 22와 동일한 방법으로 인슐린 저항성을 검사하였다. 결과를 도 27에 도시하였다.

[0439] GalNAcST siRNA 투여에 의해 인슐린 부하 후의 양호한 혈당 강하 작용이 나타났다. 본 결과는 GalNAc4ST-1, GalNAc4ST-2, GalNAc4S-6ST의 발현을 억제함으로써 췌장 조직 소도의 섬유성 변화에 따른 인슐린 저항성을 효과적으로 개선할 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0440] 본 발명의 약제는 예를 들면 혈당 강하제, 또는 췌장 조직의 인슐린 저항성 개선제로서 유용하다.

[신장 조직]

[0442] 신장 조직의 섬유성 변화는 모든 신장 질환의 엔드포인트라고 생각되고 있다. 고전적으로는 1) 간질성 신장 질환(tubulointerstitial disease)이 신장 섬유 형성의 대표적 질환이라고 되어 왔다. 이것에는 약제성, 감염성, 방사선성, 중금속성 간질성 신장 장애 외에, 쇼그伦 증후군이나 이식 거절 반응(chronic allograft nephropathy 등), 이식 편대 숙주 반응(Graft-versus-host disease 등) 등도 포함된다. 다음으로, 2) 혈관성 신장 질환을 들 수 있다. 이른바 고혈압에 수반하는 신경화증 외에, 최근에는 동맥 경화증, 메타볼릭 증후군에 수반하는 섬유 형성도 포함된다. 나아가서는, 사구체원발 질환에서도, 단백뇨 등의 결과, 간질의 섬유 형성을 초래하여 만성신부전으로 이어지는 점에서, 3) 원발성사구체 질환, 및 4) 속발성사구체 질환에 있어서의 신장 섬유성 변화가 있다. 3)에는 IgA신증, 미소 변화형 네프로시스 증후군, 막성신증, 막성증식성 신장염, 소상사구체경화증

(FGFS: focal segmental glomerulosclerosis)이, 4)에는 당뇨병성 신증, SLE(systemic lupus erythematosus)에 수반하는 루푸스신장염, 만성관절류마티스에 수반하는 신증, 아밀로이드신증, B형 간염이나 C형 간염에 수반하는 신증 등이 포함된다. 마지막으로, 5) 요로 폐색에 수반하는 간질성 신장 질환을 들 수 있고, 요로 결석, 종양, 신경인성 방광 등이 포함된다.

[0443] 최근 들어, 신장 기능의 정도에 따라 분류·진단되는 임상적인 질환 개념으로서, 이를 질환군을 만성 신장 질환 (CKD: chronic kidney disease)으로 총칭하도록 되었다. CKD는 간질의 섬유성 변화에 의해 서서히 진행하여, 만성 신부전, ESRD(end-stage renal disease)에 이른다. 종래, ESRD에 대해서는 인공 투석 외에 결정적인 치료법이 없었다. 안지오텐신계의 강압제의 사용에 의해 ESRD에의 진행을 더디게 할 가능성도 시사되어 있지만, 신장 섬유 형성 그 자체를 표적으로 한 치료법은 확립되어 있지 않다. CKD에 대한 신규 치료가 절실하게 요구되지만, 그 병의 용태 진행 프로세스로부터, 섬유성 변화를 치료 표적으로 하는 것이, 원발 질환의 종류에 상관없이 공통된 치료 전략으로서 결정적인 의의를 갖는다. CKD는 전세계에서 5억명의 환자가 존재한다고 보고되어 있는 점, 생활 습관의 변화에 수반하여 앞으로도 한층 환자수의 증가가 예측되는 점, 또한 인공 투석에 이르기 까지 심혈관 장해로 사망할 리스크가 매우 높은 것이 대규모 시험으로 분명해졌다는 점으로부터, CKD를 21세기 형 질환으로서 파악하여, 적극적인 치료를 행하는 것이 의료계의 중대한 과제로 되어있다(Sergio A et al. Hypertension 38: 635, 2001., Weiner DE et al. JASN 15: 1307, 2004., Anavekar NS et al. N Eng J Med 351:1285, 2004., Remuzzi G et al. J Clin Invest 116: 288, 2006., Tonelli M et al. BMJ 332: 1426, 2006., Khwaja A et al. Kidney International doi: 10.1038/sj.ki.5002489).

[0444] 본 실시예에서는 신장 간질의 조직학적인 섬유성 변화에 대한, 4 위치 및 6 위치 황산기를 수식하는 당쇄유전자 저해에 의한 변화를 검토하였다.

실시예 28: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 C4ST-1 siRNA의 항섬유 형성 효과의 검토

[0446] 실시예 21과 동일한 방법으로 2형 당뇨병 모델을 제조하였다. 임신 14일째 C57BL/6JcL 마우스(닛본 클레아사 제조)를 사육, 출산시키고, 출생 후 2일령 C57BL/6JcL 마우스에게 스트렙토조토신(STZ: 시그마사 제조)를 투여하여 STZ 유발당뇨병 모델을 제조하였다. 마우스에게 STZ(10 mg/ml) 20 μ l를 피하에 주사하고, 이것을 2일간 계 3회 행하여, 합계 60 μ l 투여하였다. 이것을 4주령까지 부모 마우스와 함께 통상 사료로 사육하고, 만 4주령에 이유시킨 후부터 고지방 다이어트(닛본 클레아사 제조)를 사료 공급하여, 2주간 사육시켰다. 2주간째에 C4ST-1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1) siRNA 1 μ g(GeneWorld사 제조)를 siRNA 매체인 0.1% 아텔로콜라겐(고켄사 제조)과 혼합시킨 것을 1회/1주간 200 μ L 복강 내 투여(1 shot/1주간)의 2회(2주간) 처치를 행하였다. 실험 14일째에 해부하고, 신장을 적출하여, 면역 염색용 샘플을 얻었다. 유전자 발현이나 체중, 인슐린 저항성에 관한 효과는 실시예 21, 22, 23에 기재된 바와 같다.

[0447] 얻어진 신장 조직 샘플 절편을 아세톤(와코사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 항ER-TR7 항체(래트 모노클로날 항체, 1 μ g/ml, BMA사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 페옥시다아제 표지 항래트 IgG(1:200 희석)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 첨가하여 발색시켰다. 그 후 릴리-메이어 혈마독실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.

[0448] 그 결과, C4ST-1 siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 신피질 및 수질에 있어서의 섬유아세포(ER-TR7 양성 세포)의 침윤이 적었다(도 28, 원 도면은 컬러). 또한 염증성 세포의 섬유 형성을 정량화하기 위해서 ER-TR7 양성 세포를 카운트하였다. 각각의 표본을 현미경 하에서 400배로 10 시야 관찰하여, 양성 세포수를 카운트하여 대조군과 C4ST-1 siRNA 투여군을 비교하였다. 그 결과, 대조군과 비교하여 C4ST-1 siRNA 치료군에서는 ER-TR7의 양성율이 유의하게 저하되었다($p<0.001$).

실시예 29: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 C4ST-1 siRNA의 마크로파지 침윤 효과의 검토

[0450] 얻어진 신장 조직 샘플 절편을 아세톤(와코사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 항F4/80 항체(클론 A3-1, 래트 모노클로날 항체, 2 μ g/ml, CALTAG LABORATORIES사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 페옥시다아제 표지 항래트 IgG(1:200 희석)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 첨가하여 발색시켰다. 그 후 릴리-메이어 혈마독실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.

- [0451] 그 결과, C4ST-1 siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 신피질 및 수질에 있어서의 마크로파지(F4/80 양성 세포)의 침윤이 적었다(도 29, 원 도면은 첨부). 또한, 실시예 28과 같이 조직 병변을 정량화하면, 대조군과 비교하여, C4ST-1 siRNA 치료군에서는 마크로파지의 양성을 유의하게 저하하고 있었다($p<0.001$).
- [0452] 실시예 30: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 C4ST-1 siRNA의, 조직에 있어서의 섬유아세포 활성화의 검토
- [0453] 신장 조직 샘플 절편을 아세톤(와코사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 항인간 평활근섬유 액틴 항체(α SMA : 마우스 모노클로날 항체, 1:100, DACO사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1시간 반응시켰다. 계속해서, 히스토파인 마우스 스테인 키트(니치레이 바이오사이언스사 제조)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 첨가하여 발색시켰다. 그 후 릴리-메이어 혈마록실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.
- [0454] 그 결과, C4ST-1 siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 방사구체 및 간질에 있어서의 α SMA 양성 세포의 정착이 명확히 감소하고 있었다(도 30, 원 도면은 첨부). α SMA는 섬유아세포 활성화의 기능적인 마커이고, 본 결과는 C4ST-1의 유전자 발현을 억제함으로써 조직에 침윤하고 있는 섬유아세포의 활성화가 억제되어 있는 것을 나타내고 있다.
- [0455] 본 발명의 약제는 예를 들면 섬유아세포 활성화 억제제로서 유용하다.
- [0456] 실시예 31: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 Ga1NAc4S-6ST siRNA의, 조직에 있어서의 섬유성 변화의 검토
- [0457] 실시예 28과 동일한 방법으로 당뇨병성 신증 모델을 제조하고, Ga1NAc4S-6ST siRNA의 효과를 검토하였다. 본 실시예에서는 경과를 보다 장기간에 걸쳐 관찰하였다. Ga1NAc4S-6ST siRNA의 서열은 실시예 1과 동일하고, 8주령 및 9주령의 시점에 각 1회 복강 내 투여를 실시하였다. 또한, 비교 대상으로서 안지오텐신 II 수용체 저해제(ARB)인 발사르탄을 30 mg/kg의 용량으로 경구 투여를 동일 스케줄로 행하였다. 10주령에 면역 조직학적 검사와 유전자 발현 검사를 위한 신장 조직을 채취하였다. 실시예 1과 동일한 방법으로 신장 조직의 정량적 PCR을 행하여, 유전자 발현을 검토하였다. 본 실시예에서는 내부 대조로서 36B4를 사용하고 있고, 그 서열을 이하에 나타내었다.
- [0458] [정량 PCR 프라이머 서열]
- [0459] *마우스36B4(다카라 바이오사 제조)
- [0460] 전방향 : 5'-TTCCAGGCTTGGGCATCA-3'(서열번호: 74)
- [0461] 역방향 : 5'-ATGTTCAGCATGTTCAGCAGTGTG-3'(서열번호: 75)
- [0462] 결과를 도 31에 도시한다(또한, Ga1NAc4S-6ST는 도면 중에서는 G#1로 표기함). 당뇨병성 신증 모델에 있어서는, 신장 조직의 Ga1NAc4S-6ST의 발현이 증강하는데, Ga1NAc4S-6ST siRNA의 투여에 의해 신장 조직에서의 Ga1NAc4S-6ST 유전자 발현이 유의하게 억제되어 있었다. 또한, 섬유화의 마커인 α SMA와 TGF β 의 발현 증강이 유의하게 억제되어 있었다. ARB와 치료 효과를 비교 검토하면, TGF β 에 대해서는 양군 모두 억제 효과를 나타내고, 유의차는 나오지 않았지만, α SMA에 대해서는 Ga1NAc4S-6ST siRNA 투여군이 ARB 투여군에 비하여 유의한 억제 효과를 나타내었다. 본 결과는 Ga1NAc4S-6ST의 유전자 발현을 억제함으로써 신장 조직에 있어서의 섬유성 변화를 나타내는 마커를 억제할 수 있었던 것을 나타내고 있다. 또한, 섬유아세포의 활성화(α SMA의 증강)에 대해서는 Ga1NAc4S-6ST siRNA의 효과가 두드러지게 우수한 것도 나타내어졌다.
- [0463] 실시예 32: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 Ga1NAc4S-6ST siRNA의 섬유아세포 침윤에 있어서의 검토
- [0464] 섬유아세포의 신장 조직 내 침윤의 정도는 실시예 28과 동일한 방법으로 면역 조직학적 검토를 가하여 정량적 평가를 행하였다. 결과를 도 32에 도시하였다. Ga1NAc4S-6ST siRNA 투여에 의해 섬유아세포의 신장 간질 내 침윤은 유의하게 억제되었다. 간질 전체적인 정량적 검색에서는 ARB와의 유의차를 나타내지 않았지만, 방사구체 영역에 침윤하는 섬유아세포에 한정한 검토에서는, Ga1NAc4S-6ST siRNA 투여군이 도면과 같이 명확한 억제 효과를 나타내었다.
- [0465] 본 발명의 약제는 예를 들면 섬유아세포의 신장 간질 내 침윤 억제제로서 유용하다.
- [0466] 실시예 33: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 Ga1NAc4S-6ST siRNA의 마크로파지에 있어서의 검토
- [0467] 섬유아세포의 신장 조직 내 침윤의 정도는 실시예 29와 동일한 방법으로 면역 조직학적 검토를 가하여 정량적

평가를 행하였다. 결과를 도 33에 도시하였다. GalNAc4S-6ST siRNA 투여에 의해 마크로파지의 신장 간질 내 침윤은 유의하게 억제되었다. 간질 전체적인 정량적 검색에서는 ARB와의 유의차를 나타내지 않았지만, 방사구체 영역에 침윤하는 마크로파지에 한정한 검토에서는, GalNAc4S-6ST siRNA 투여군이 도면과 같이 명확한 억제 효과를 나타내었다.

[0468] 본 발명의 약제는 예를 들면 마크로파지의 신장 간질 내 침윤 억제제로서 유용하다.

[0469] 실시예 34: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 GalNAc4S-6ST siRNA의 사구체 기저막 비후에 있어서의 검토

[0470] 실시예 32, 33과 동일한 방법으로 IV형 콜라겐의 면역 염색을 행하였다. 일차 항체로서 항마우스 IV형 콜라겐 토끼 항혈청(LSL사 제조)을 침가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 페옥시다아제 표지 항래빗 IgG(1:200 희석)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 침가하여 발색시켰다. 그 후 텔리-메이어 혈마특실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.

[0471] IV형 콜라겐의 축적을 정량화하기 위해서 사구체 주위에 갈색의 시그널로 가시화된 콜라겐의 두께를 측정하였다. 각각의 표본을 사구체 15 내지 20개에 있어서 사구체 주위에서 가장 비후하고 있는 부분의 두께를 모니터 상에서 노기스(vernier caliper)를 이용하여 계측하였다. 그 결과, 대조군에 비하여, GalNAc4S-6ST siRNA 투여군에서 유의하게 사구체 기저막(GBM)의 비후가 억제되어 있었다(도 34). ARB와 비교한 경우, GalNAc4S-6ST siRNA 투여군에서 비후를 보다 우세하게 억제하는 경향을 나타내었다.

[0472] 본 발명의 약제는 예를 들면 사구체 기저막 비후 억제제로서 유용하다.

[0473] 실시예 35: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 GalNAc4S-6ST siRNA의 안지오텐신 경로에 있어서의 검토

[0474] 당뇨병성 신증의 섬유 형성에 있어서는 안지오텐신 II의 관여가 보고되어 있다. 본 실시예에서는 신장 조직의 정량적 PCR에서 안지오텐신 경로의 검토를 행하였다. 본 모델에 있어서는 안지오텐시노겐 및 안지오텐신 변환 효소(ACE)의 발현에 증강이 나타나고(도 35), 이것이 신장 국소의 안지오텐신 II를 증강시키는 요인이라고 생각되었다. GalNAc4S-6ST siRNA 투여군에 있어서는 안지오텐시노겐과 ACE의 억제 효과를 나타내었다(도 35). 본 결과에 의해 GalNAc4S-6ST의 유전자 억제에 의해서 섬유아세포의 침윤·활성을 억제함으로써, 안지오텐신 경로에 있어서도 개선 효과를 나타내는 것이 판명되었다.

[0475] 본 발명의 약제는 예를 들면 안지오텐시노겐 발현 억제제, 또는 안지오텐신 변환 효소 억제제로서 유용하다.

[0476] 실시예 36: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 GalNAc4S-6ST siRNA의 혈청 크레아티닌 농도에 있어서의 검토

[0477] 당뇨병성 신증으로부터 ESRD에 이르는 과정에서, 신장 기능의 저하에 수반하여 혈청 크레아티닌 농도가 상승하기 때문에, 임상적으로 가장 범용되는 신장 기능 마커이다. 그러나, 혈청 크레아티닌이 상승한 시점에서는 이미 기능적 네프론의 50%의 기능 저하를 초래하고 있는 것이 분명해져 있고, 어떻게 크레아티닌 상승 전에 신장 기능을 보호할지가 임상적으로는 큰 과제이다.

[0478] 본 모델에 있어서도 이미 조직학적 섬유 형성이 진행한 18주령에 있어서 겨우 혈청 크레아티닌 농도의 상승을 나타내었다(도 36). 대조군에 비하여, GalNAc4S-6ST siRNA 투여군에 있어서는, 혈청 크레아티닌의 상승을 억제하였다(도 36). 본 결과는 GalNAc4S-6ST의 유전자 억제에 의해 신장 조직의 섬유성 변화를 억제함으로써 혈청 크레아티닌의 상승 즉 신장 기능의 저하를 억제한다는 매우 유효한 신장 보호 작용을 하는 것을 나타내고 있다.

[0479] 본 발명의 약제는 예를 들면 신장 기능 저하 억제제, 또는 신장 보호제로서 유용하다.

[0480] 실시예 37: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 항섬유화 효과의 검토

[0481] 4 위치 및 6 위치 황산화가 중요한 것을 또 하나의 실시예에서 나타낸다. 실시예 11과 동일한 방법으로, GalNAcST siRNA 투여에 의한 신장 간질의 섬유성 변화를 검토하였다. GalNAcST siRNA의 투여 스케줄은 실시예 28과 동일하다. 실시예 31과 동일한 방법으로, 신장 조직을 이용한 정량적 PCR을 행하였다. 본 실시예에서는 내부 대조에 β 액틴을 사용하고 있고, 그 서열을 이하에 나타내었다.

[0482] [정량 PCR 프라이머 서열]

[0483] *마우스 β 액틴 (다카라 바이오사 제조)

- [0484] 전방향 : 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC -3' (서열번호: 76)
- [0485] 역방향 : 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA -3' (서열번호: 77)
- [0486] 도 37에 도시한 바와 같이, 당뇨병성 신증 모델의 신장 조직에 있어서는, GalNAc4ST-1, GalNAc4ST-2, GalNAc4S-6ST의 발현 증강을 나타냈지만, GalNAcST siRNA 투여에 의해 모든 유전자 발현이 유의하게 억제되었다.
- [0487] 실시예 38: 마우스 당뇨병성 신증 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 항섬유 형성 및 신장 보호 작용의 검토
- [0488] GalNAcST siRNA 투여군에 있어서는, 대조군과 비교하여, 신장 조직에 있어서의 섬유 형성의 마커인 α SMA, TGF β , CTGF의 발현 증강도 유의하게 억제되었다(도 38). 또한, ACE의 발현 증강도 유의하게 억제되었다. 본 결과는 GalNAc4ST-1, GalNAc4ST-2, GalNAc4S-6ST의 발현을 억제함으로써 신장 조직의 섬유 형성을 억제하고, 신장 보호를 위해 기능하는 것을 나타내고 있다. 실시예 35의 결과와 결합하면, 어느쪽의 유전자를 억제하더라도 ACE의 저하가 현저한 점에서, 혈압 저하 작용을 갖는 것도 또한 분명하다.
- [0489] 본 발명의 약제는 예를 들면 강압제로서 유용하다.
- [0490] 실시예 39: 마우스 약제성 간질성 신장염 모델에 있어서의 GalNAc4S-6ST siRNA의 유전자 발현에 있어서의 검토
- [0491] 본 실시예에서는 전형적인 약제성 간질성 신장염에 있어서의 GalNAc4S-6ST siRNA의 효과를 검토하였다. 처음에, 마우스 모델의 제작에 대해서인데, C57BL6/J 마우스(수컷, 8주령, 낫본 클레아사 제조)에, 아드리아마이신(15 mg/kg; 교와학꼬사 제조)를 복강 내 투여한다. 투여 후 1주간 사육하고, 신장 조직을 채취하였다. 대조군은 동일한 마우스로 아드리아마이신을 투여하지 않고, 동일 시기에 구입·사육한 것을 이용하였다.
- [0492] GalNAc4S-6ST siRNA는 실시예 1과 동일한 방법으로 아드리아마이신 투여의 24 시간 전에, 마우스 1 마리당, GalNAc4S-6ST siRNA 1 μ g(홋카이도 시스템 사이언스사 제조)과, 매체인 1% 아텔로콜라겐(고켄사 제조) 200 μ L를 혼합한 것을 복강 내 투여하였다. 본 실시예에 있어서의 전형적인 약제성 간질성 신장염의 모델에 있어서도, 신장 조직에 있어서의 GalNAc4S-6ST의 발현 증강을 나타내고(도 39), GalNAc4S-6ST siRNA 투여에 의해 그 발현은 유의하게 억제되었다.
- [0493] 실시예 40: 마우스 약제성 간질성 신장염 모델에 있어서의 GalNAc4S-6ST siRNA의 유전자 발현에 있어서의 검토
- [0494] 본 실시예에서는 실시예 34와 동일한 방법으로 I형 콜라겐의 면역 염색을 행하였다. 일차 항체로서 항래트 I형 콜라겐 토끼 항혈청(LSL사 제조)을 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 페옥시다아제 표지 항체 IgG(1:200 희석)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이 바이오사이언스사 제조)을 첨가하여 발색시켰다. 그 후 릴리-메이어 혜마톡실린(무토 가가꾸사 제조)에 의해 핵염색을 행하고, 광학현미경(래이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하였다.
- [0495] 결과를 도 40에 도시하였다. 대조군에서는 방사구체로부터 간질에 걸쳐서 넓게 I형 콜라겐의 침착을 나타내는데 비하여, GalNAc4S-6ST 투여군에서는 현저하게 침착이 억제되어 있었다. 본 결과는 약제성 간질성 신장염에 있어서도, GalNAc4S-6ST의 발현을 억제함으로써 신장 조직의 섬유성 변화를 억제할 수 있는 것을 나타내고 있다.
- [0496] 본 발명의 약제는 예를 들면 신장 조직의 섬유성 변화 억제제로서 유용하다.
- [0497] 실시예 41: 편측요관결찰술(UUO)에 의한 신장 섬유화 모델 마우스에 있어서의 C6ST siRNA의 항섬유화 효과의 검토
- [0498] 우선, 마우스 신장 섬유화 모델의 제작에 대해서인데, C57BL/6JcL 마우스(♀, 8주령, 낫본 클레아사 제조)에 편측요관결찰술(UUO)을 행하여 신장 섬유화 모델을 제작하였다. 이 신장 섬유증 모델 마우스는 재현성이 우수하여, 마우스의 신장 섬유증의 실험계에서 널리 이용되고 있다(American journal of pathology 2003 163; 4 1261-1273). 마우스를 케탈라/크실라진 마취 하에서 개복하여, 요관을 노출시키고, 우측 요관을 4-0호 수술용 실로 2개소 결찰하고, 1-0호 수술용 실로 복막, 피부를 봉합하였다.
- [0499] 신장 섬유화 모델 마우스의 전형예로서 편측요관결찰술(UUO)에 의한 신장 섬유화 모델 마우스를 이용하여 C6ST siRNA 투여에 의한 C6ST 발현의 억제 효과를 PCR법에 의해 확인하였다. C57BL/6JcL 마우스(♀, 8주령, 낫본 클레아사 제조)에 UUO를 시술하여 신장 섬유화 모델을 제작하였다. 또한, UUO를 시술하기 직전에, 마우스에게는 C6ST-1 siRNA, C6ST-2 siRNA 혼합물(1 μ g/마리, 진월드사 제조), 또는 PBS를 siRNA 매체인 0.1% 아텔로콜라

겐(고켄사 제조)에 혼합하여 200 μ l를 복강 내에 주사하였다. 이 쳐치를 행한 마우스군을 C6ST siRNA군, 대조군이라고 명명하였다. 실험 8일째에 해부하여, UUO 시술 신장을 적출하여, 면역 염색용 샘플, 유전자 발현 해석용 샘플을 얻었다. 실시예 1과 동일한 방법으로 정량적 PCR을 행하였다.

[0500] 이번에, 이용한 C6ST-1 siRNA, C6ST-2 프라이머(전방향, 역방향)(GeneWorld사 제조)를 이하에 나타내었다.

[0501] [프라이머 서열]

[0502] * C6ST1(Chondroitin 6-sulfotransferase-1)

[0503] 전방향 : 5'-tgtgtggacacacaccccta-3'(서열번호: 78)

[0504] 역방향 : 5'-cttcaaaggccccttcctc-3'(서열번호: 79)

[0505] * C6ST2(Chondroitin 6-sulfotransferase-2)

[0506] 전방향 : 5'-cagcttgagccattcaaca-3'(서열번호: 80)

[0507] 역방향 : 5'-gggtgagg cccttaggaaac-3'(서열번호: 81)

[0508] [C6ST-1 칵테일 서열](진뱅크 액세션 번호 NM_016803)

[0509] (Gene world사 제조)

[0510] 5'-gcgcgcctctccatggagaaag-3'(서열번호: 82)

[0511] 5'-gcttcgcctcaggattccggacc-3'(서열번호: 83)

[0512] 5'-ggttcagcctggctaccgtgtat-3'(서열번호: 84)

[0513] 5'-gcagttgttgctatgcgacctgtat-3'(서열번호: 85)

[0514] [C6ST-2 칵테일 서열](진뱅크 액세션 번호 NM_021715)

[0515] (Gene world사 제조)

[0516] 5'-tggggagagtgaggattcggtgaa-3'(서열번호: 86)

[0517] 5'-cggacgtggactcgtcgaggacaaag-3'(서열번호: 87)

[0518] 5'-cgaaagtacctgcccggcgttcgc-3'(서열번호: 88)

[0519] 그 결과, 신장에 있어서의 C6ST-2(G#10)의 발현 증강이 나타났다(도 41, C6ST-2를 G#10으로 표기함). C6ST siRNA 치료군에서는 발현 감소가 나타나고, 아텔로콜라겐 매체 C6ST siRNA 투여에 의해 C6ST-2 유전자의 녹다운이 확인되었다(도 41). 또한, TGF β , α SMA, I형 콜라겐, CTGF와 같은 섬유 형성 마커의 발현 증강도 C6ST siRNA 투여에 의해 유의하게 억제되었다.

[0520] 실시예 42: 편측요관결찰술(UUO)에 의한 신장 섬유 형성 모델 마우스에 있어서의 C6ST siRNA의 섬유아세포 침윤에 있어서의 검토

[0521] 적출한 조직을 동결용 포매제 OCT 컴파운드(사쿠라사 제조)에 포매하고, 액체 질소로 동결 블록을 제조하고, 크리오스ಟ(마이크로엣지사 제조)을 이용하여 두께 6 μ m의 절편을 제조하였다. 얻어진 절편을 실시예 28과 동일한 방법으로 항ER-TR7 항체를 이용하여 면역 염색을 행하였다. 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 관찰하여, 정량화를 행하였다.

[0522] 그 결과, UUO 시술 신장에 있어서, C6ST siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 신장 간질에 있어서의 섬유아세포의 집적이 유의하게 억제되어 있었다(도 42).

[0523] 본 발명의 약제는 예를 들면 신장 간질에 있어서의 섬유아세포 집적 억제제로서 유용하다.

[0524] 실시예 43: 편측요관결찰술(UUO)에 의한 신장 섬유 형성 모델 마우스에 있어서의 C6ST siRNA의 마크로파지 침윤에 있어서의 검토

[0525] 실시예 42와 같이, 항F4/80 항체로 면역 염색, 정량화를 행하였다. 그 결과, UUO 시술 신장에 있어서, C6ST siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 신장 간질에 있어서의 마크로파지의 집적이 유의하게 억제되어 있었다(도 43).

- [0526] 본 발명의 약제는 예를 들면 신장 간질에 있어서의 마크로파지 집적 억제제로서 유용하다.
- [0527] 실시예 44: 편측요관결찰술(UUO)에 의한 신장 섬유 형성 모델 마우스에 있어서의 C6ST siRNA의 콜라겐 축적에 있어서의 검토
- [0528] 실시예 42와 같이, 항IV형 콜라겐 항체로 면역 염색을 행하고, 실시예 34와 같이 정량화를 행하였다. 그 결과, UUO 시술 신장에 있어서, C6ST siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 사구체 기저막의 섬유성 비후가 유의하게 억제되어 있었다(도 44). 이것으로부터, C6ST-2의 유전자 발현을 억제함으로써 염증성 세포의 침윤, 섬유 형성을 억제할 수 있는 것이 나타났다.
- [0529] 본 발명의 약제는 예를 들면 염증성 세포 침윤 억제제로서 유용하다.
- [0530] 실시예 45: 편측요관결찰술(UUO)에 의한 신장 섬유 형성 모델 마우스에 있어서의 C6ST siRNA의 섬유아세포 활성화에 있어서의 검토
- [0531] 실시예 30와 같이 항αSMA 항체로 면역 염색을 행하였다. 그 결과, UUO 시술 신장에 있어서, C6ST siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 간질 특히 방사구체 영역에서의 αSMA 양성 세포가 분명한 감소를 나타내었다(도 45). 본 결과는 C6ST-1 및 C6ST-2의 유전자 발현을 억제함으로써, 신장 간질에 집적하고 있는 섬유아세포의 활성화가 억제되는 것을 나타내고 있다.
- [0532] 본 발명의 약제는 예를 들면 신장 간질에 있어서의 섬유아세포 활성화 억제제로서 유용하다.
- [0533] 실시예 46: 편측요관결찰술(UUO)에 의한 신장 섬유화 모델 마우스에 있어서의 C6ST siRNA의 ACE 발현에 있어서의 검토
- [0534] 마찬가지로, 항인간 ACE 토끼 항체(산타 크루즈사 제조)를 이용하여 면역 염색을 행하였다. 그 결과, UUO 시술 신장에 있어서, C6ST siRNA 치료군에서는 대조군에 비하여 간질 특히 방사구체 영역에서의 ACE 양성 세포가 분명한 감소를 나타내었다(도 46). 본 결과는 C6ST-2의 유전자 발현을 억제함으로써, 신장 간질에 집적하고 있는 섬유아세포의 활성화가 억제되고, 그에 따라 ACE의 발현도 억제되는 것을 나타내고 있다. ACE 억제는 혈압 저하 작용을 가지기 때문에, 본 결과에 있어서도 혈압 강하 또는 동맥 경화 억제 작용을 갖는 것으로 강하게 생각되었다.
- [0535] 본 발명의 약제는 예를 들면 동맥 경화 억제제로서 유용하다.
- [0536] [눈 조직]
- [0537] 눈 조직에 있어서도 다른 장기와 마찬가지로, 다양한 원인에 의한 침습에 대하여 섬유성 변화가 생겨, 시력의 저하·손실을 초래한다. 주요한 질환으로서, 당뇨병 망막증, 망막정맥폐색증, 미숙아 망막증, 가령횡반변성증, 망막 색소 변성증 등을 들 수 있는데, 각막의 염증에 수반하여 생기는 섬유 형성, 녹내장에 수반하는 섬유 형성, 백내장에 수반하는 섬유 형성도 포함된다(총설: Fiedlander M. J Clin Invest 117: 576-586, 2007, Harada T et al. Genes and Dev. 21: 367-378, 2007). 병리 조직학적으로는 섬유 형성에 수반하는 시세포의 손상·감소가 시력 저하의 큰 요인이 되기 때문에, 눈 조직의 섬유 형성을 억제하는 것은 모든 눈 질환의 시력 저하를 막기 위한 새로운 치료 전략으로서 기대되고 있다.
- [0538] 본 실시예에서는 당뇨병성 망막증의 모델에 있어서의, 망막의 섬유 형성과 그에 따른 시세포의 손실을 중심으로 검토를 하였다.
- [0539] 실시예 47: 마우스 당뇨병성 망막증 모델에 있어서의 GalNAc4S-6ST (G#1)siRNA의 콜라겐 집적에 있어서의 검토:
- [0540] 임신 14일째 C57BL6J/Jcl 마우스(낫본 클레아사 제조)를 사육, 출산시키고, 출생 후 2일령 C57BL6J/Jcl 마우스 암컷(낫본 클레아사 제조), 각각에 스트렙토조신 10 mg/mL(SIGMA사 제조) 20 μL/헤드에 피하 주사하고, 4주령 까지 CE-2(낫본 클레아사 제조)의 사료, 멸균수를 제공하여 사육하고, 4주령부터 고지방 다이어트식(낫본 클레아사 제조), 멸균수를 제공하여, 2주간 사육시켰다. 8주간째과 9주간째에 실시예 11과 동일한 방법으로 GalNAc4S-6ST(G#1)siRNA(홋카이도 시스템 사이언스사 제조)를 마우스 1 마리당 1 μg을 매체인 1% 아텔로콜라겐(고켄사 제조) 200 μL를 혼합한 것을 복강 내 투여하였다. 18주간째에 GalNAc4S-6ST(G#1)siRNA의 효과를 검토하기 위해서 양군 마우스의 안구를 적출하여 면역 조직학적 검토를 하였다.
- [0541] 적출 눈으로 동결 블록·절편을 제조하였다. 절편을 아세톤(시그마알드리치 재팬사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 또한 일차 항체로서 토끼 유래 항IV형 콜라겐 항혈청(1:2000 희석; LSL사 제

조)을 첨가하고, 실온에서 한시간 반응시켰다. 계속해서, 이차 항체인 퍼옥시다아제 표지 항토끼 IgG(1: 25희석; Cappel사 제조)를 첨가하고, 실온에서 30분 반응시킨 후, DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하여 효소 색소 반응을 행하였다. 이 표본을 광학현미경(레이카사 제조)을 이용하여 관찰하였다.

[0542] 얻어진 망막의 조직상을 도 47에 도시하였다. 대조군에서는 시력에 중요한 시신경절 세포층(GCL: ganglion cell layer)으로부터 내과립층(INL: inner nuclear layer)에 걸쳐서 IV형 콜라겐의 침착이 증가하고 있었던 데에 비교하여, GalNac4S-6ST(G#1)siRNA 투여군에서는 특히 GCL에서의 콜라겐 증생이 현저하게 억제되어 있었다.

[0543] 본 발명의 약제는 예를 들면 시신경절 세포층에 있어서의 콜라겐 증생 억제제로서 유용하다.

[0544] 실시예 48: 마우스 당뇨병성 망막증 모델에 있어서의 GalNac4S-6ST(G#1)siRNA의 콘드로이틴황산 나트륨 프로테오글리칸 집적에 있어서의 검토:

[0545] 실시예 47과 동일한 방법으로 망막의 면역 조직학적 검토를 행하였다. 일차 항체로서 항콘드로이틴황산 프로테오글리칸(CSPG) 항체(클론 CS56, 마우스 모노클로날 항체, 1:100; 세이가가꾸 고교사 제조)를 첨가하고, 실온에서 한시간 반응시켰다. 계속해서, 히스토파인 마우스 스테인 키트(니치레이사 제조; 마우스 모노클로날 항체에 대하여 사용)를 이용하여 이차 항체 반응을 행하였다.

[0546] 도 48에 도시된 바와 같이, 대조군에 있어서는, 망막의 GCL 및 외과립층(ONL: outer nuclear layer)으로부터 망막 색소 상피 세포층에 걸친 절편에 CS56 양성 소견이 현저한 증강을 나타내었다. 이에 비하여 GalNac4S-6ST(G#1)siRNA 투여군에서는 CS56 강도가 현저하게 감소약화해져 있었다. 그에 수반하여, GCL층에 있어서의 신경절 세포 및 망막 색소 상피 세포의 형태가 매우 양호하게 유지되어 있었다.

[0547] 이상으로부터, 본 모델 마우스에 있어서 유도되는 망막 조직에 있어서의 CSPG의 침착은 GalNac4S-6ST(G#1)siRNA의 생체 내 투여에 의해 현저하게 억제되는 것이 분명해졌다. CSPG는 콜라겐과 동시에 섬유 형성 병변 형성에 중요하다고 생각되는 외에, 신경절 세포가 축색을 신장하는 과정을 저해한다고 보고되어 있다(Brittis PA et al. *Science* 255: 733, 1992). 기보(既報)에서는 시험관내의 실험 결과 및 발생 과정의 보고 밖에 없고, 생체 내 병변에서의 역할은 전혀 미지인데, 본 결과에 의해 처음으로 병변 조직에 있어서의 역할이 시사되었다.

[0548] 실시예 49: 마우스 당뇨병성 망막증 모델에 있어서의 GalNac4S-6ST(G#1)siRNA의 글리아 세포 집적에 있어서의 검토:

[0549] 망막 손상 시에 있어서의 생체 방어 기구의 일환으로서 시신경의 재생이 보고되어 왔는데, 그와 같은 상해 후 재생에 관한 시신경 전구 세포는 글리아 세포인 것이 보고되어 있다(Fischer AJ et al. *Nature neuroscience* 4: 247, 2001, Ooto S et al. *PNAS* 101:13645, 2004). 본 실시예에서는 글리아 세포의 마커로서 항GFAP 엔소 항체(산타 크루즈사 제조)를 이용하여, 실시예 47과 동일한 방법으로 면역 염색을 행하였다.

[0550] 결과를 도 49에 도시하였다. 정상군, 대조군에서는 GFAP 양성 글리아 세포수에 변화는 없지만, GalNac4S-6ST(G#1)siRNA 투여군에서는 INL로부터 GCL에 걸쳐서 현저한 세포수의 증가를 나타내었다. 시신경의 재생은 INL로부터 GCL로 향해서 발생한다고 보고되어 있는 것으로부터, 본 결과는 GalNac4S-6ST(G#1)siRNA에 의해 시신경의 재생이 활발히 행해지고 있는 과정을 나타낸다고 생각된다.

[0551] 본 발명의 약제는 예를 들면 시신경 재생제로서 유용하다.

[0552] 실시예 50: 마우스 당뇨병성 망막증 모델에 있어서의 GalNac4S-6ST(G#1)siRNA의 신경절 세포에 있어서의 검토:

[0553] 실시예 47에 제작한 샘플을 이용하여 신경절 세포의 수를 정량화하였다. 그 결과, 당뇨병성 망막증 모델에 있어서도 GCL에서의 신경절 세포의 감소가 나타났지만, GalNac4S-6ST(G#1)siRNA 투여에 의해 이러한 손실이 유의하게 회복하는 것이 분명해졌다(도 50).

[0554] 실시예 51: 마우스 당뇨병성 망막증 모델에 있어서의 GalNac4S-6ST(G#1)siRNA의 유전자 발현에 있어서의 검토:

[0555] 실시예 1과 동일한 방법으로 눈 조직의 RNA를 추출하여, 정량적 PCR을 행하였다. 물러(Muller) 세포의 마커인 글루타메이트 신테타제(GS)의 발현의 변화를 해석함으로써 시신경 재생 능력에 검토를 하였다. PCR 프라이머 서열을 이하에 기재한다.

[0556] [정량 PCR 프라이머 서열]

[0557] *마우스 GS(다카라 바이오사 제조)

- [0558] 전방향 : 5'-CTGTGAGCCCAAGTGTGTGGA-3'(서열번호: 89)
- [0559] 역방향 : 5'-GTCTCGAACATGGCAACAGGA-3'(서열번호: 90)
- [0560] 결과를 도 51에 도시하였다. GalNac4S-6ST(G#1)siRNA 투여에 의해 눈 조직의 GalNAc4S-6ST의 발현 증강을 유의하게 억제할 수 있었다. 이에 수반하여, GalNac4S-6ST(G#1)siRNA 투여군에서는 눈 조직에 있어서의 GS의 발현이 유의하게 상승하고 있었다. 본 결과는 GalNac4S-6ST(G#1)siRNA 투여에 의해 물러 세포의 재생 즉 시신경의 회복을 유도하는 것을 나타내고 있다.
- [0561] 본 실시예에 의해 GalNAc4S-6ST의 유전자 발현을 억제함으로써 망막 조직의 섬유성 변화를 억제할 수 있고, 결과로서 신경절 세포의 재생에 기초하는 시세포 손실의 회피로 이어지는 것이 판명되었다. 이러한 조직학적 소견은 녹내장이나 당뇨병성 망막증을 비롯하여, 폭넓은 눈 섬유화 병변에 공통되는 소견이다.
- [0562] 본 발명의 약제는 예를 들면 물러 세포 재생제, 또는 신경절 세포 재생제로서 유용하다.
- [0563] [간장 조직]
- [0564] 간장에 있어서의 조직의 섬유성 변화는 모든 간 질환의 진행상 또는 종말상이다. 바이러스성 간염(A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, G형 간염 바이러스) 유래의 간섬유 형성뿐만 아니라, 알코올성 간 장해, 비알코올성 지방성 간 장해(NAFLD 및 NASH), 대사성 간 장해, 약제성 간 장해, 특발성 문맥압 항진증, 베드-키아리 증후군, 자기면역성 간염, 원발성 담즙성 간경변, 원발성 경화성 담관염, 담도계 질환(담도폐쇄증이나 담도확장증을 포함함), 종양 등의 췌장 질환에 의한 담도 폐쇄, 이식편대 숙주 반응, 만성 거절 반응 등, 다방면에 걸치는 (Bataller R et al. J Clin Invest 115: 209, 2005. Iredale JP. J Clin Invest 117: 539, 2007). 본 실시예에서는 간장 조직 레벨의 섬유성 변화의 검토를 행하였다.
- [0565] 실시예 52: 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 유전자 발현에 있어서의 효과의 검토
- [0566] 임신 14일째 C57BL/6JcL 마우스(닛본 클레아사 제조)를 사육, 출산시키고, 출생 후 2일령 C57BL/6JcL 마우스에게 스트렙토조토신(STZ: 시그마사 제조)를 투여하였다. 마우스에게 STZ(10 mg/ml) 20 μl를 피하에 주사하고, 이것을 2일간 계 3회 행하여, 합계 60 μl 투여하였다. 이것을 4주령까지 부모 마우스와 함께 통상 사료로 사육하고, 만 4주령에 이유시킨 후부터 고지방 다이어트(닛본 클레아사 제조)를 사료 공급하여, 2주간 사육시켰다. 2주간째에 실시예 11에 기재된 GalNAcST siRNA를 1회/1주간 200 μL 복강 내 투여(1샷/1주간)의 2회(2주간) 처치를 행하였다. 실험 14일째에 해부하여, 간장을 적출하여, 유전자 발현 해석 및 면역 염색용 샘플을 얻었다.
- [0567] 본 실시예에서는 실시예 1과 동일한 방법으로, 간장 조직의 정량적 PCR을 행하였다. 결과를 도 52에 도시하였다. 본 모델의 간장 조직에서는 GalNac4S-6ST의 발현이 증강하는데, GalNAcST siRNA 투여에 의해 유의하게 억제되었다.
- [0568] 실시예 53: 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 항섬유 형성 효과의 검토
- [0569] 실시예 52와 동일한 방법으로 간장 조직의 섬유 형성 마커의 발현을 검토하였다. 본 모델에 있어서는, I형 콜라겐 및 αSMA의 발현이 유의하게 상승하였다(도 53). 따라서, 간장 조직에 있어서의 섬유성 변화가 증강하고 있는 것이 나타내어졌다. 이에 비하여 GalNAcST siRNA 투여에 의해 이들 섬유 형성 마커의 증강이 유의하게 억제되었다.
- [0570] 실시예 54: 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 섬유아세포 침윤에 있어서의 검토
- [0571] 다음으로, 실시예 3과 동일한 방법으로 간장 조직의 면역 염색을 행하였다. 일차 항체로서 래트 항마우스 섬유아세포 항체(클론 ER-TR7; 1:500 희석; BMA사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 이차 항체로서 퍼옥시다아제 표지 항래트 IgG(1:200 희석; 바이오 소스사 제조)를 첨가하고, 실온에서 30분 더 반응시킨 후, DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하였다. 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 확인하였다.
- [0572] 얻어진 간장 조직의 면역 염색상의 예를 도 53에 도시하였다. 대조군에서는 섬유아세포의 집적이 명확하고, 가교 결합을 형성하고 있는 조직상을 나타내었다. 이것에 비교하여, GalNAcST siRNA 투여군에서는 섬유아세포의 집적을 거의 나타내지 않았다.

- [0573] 실시예 55: 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 섬유 형성 스코어의 검토
- [0574] 실시예 54에서 행한 면역 조직학적 염색에 기초하여 각 시료의 간섬유 형성의 정도를 기보(Dai K, et al. World J Gastroenterol. 31: 4822-4826, 2005, Hillebrandt S, et al. Nature Genetics 37: 835-843, 2005)에 따라서 섬유 형성 도수로 평가하였다. 섬유 형성 도수의 평가 기준은 이하와 같다. 0도: 정상, 1도: 중심 정맥으로부터의 소량의 콜라겐 신장이 나타남, 2도: 중심 정맥으로부터의 명백한 콜라겐 신장이 나타나지만, 간장 전체를 둘러싸지 않을 정도임, 3도: 중심 정맥으로부터가 명백한 콜라겐 신장이 나타나고, 간장 전체를 둘러싸는 정도임, 4도: 간장 전체의 미만성 콜라겐 신장이 나타나고, 가성 소엽을 형성하고 있다.
- [0575] 결과를 도 55에 그래프로 나타낸다. 각 바는 각 군에 있어서의 섬유 형성 도수의 평균치±표준편차를 나타내고 있다. 대조군과 비교하면, GalNAcST siRNA 투여군($p<0.01$, t 검정)에서 통계학적으로 유의하게 섬유 형성이 경감되어 있었다. 이상으로부터, GalNAcST siRNA의 투여는 임상적으로도 우수한 간섬유 형성 억제 효과를 발휘하는 것이 나타내어졌다.
- [0576] 실시예 56: 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 마크로파지 침윤에 있어서의 검토
- [0577] 다음으로, 실시예 54와 동일한 방법으로 간장 조직의 면역 염색을 행하였다. 일차 항체로서 래트 항마우스 F4/80 항체(클론 A3-1; 2 μ g/ml; CALTAG LABORATORIES사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 이차 항체로서 페옥시다아제 표지 항래트 IgG(1:200 희석; 바이오 소스사 제조)를 첨가하고, 실온에서 30분 더 반응시킨 후, DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하였다. 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 확인하였다.
- [0578] 얻어진 간장 조직의 면역 염색상의 예를 도 56에 도시하였다. 대조군에서는 마크로파지의 집적이 명확하고, 염증집족충을 형성하고 있는 조직상을 나타내었다. 이것에 비교하여, GalNAcST siRNA 투여군에서는 마크로파지의 파이ning 집적을 나타내지 않았다.
- [0579] 실시예 57: 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 GalNAcST siRNA의 간지질 대사에 있어서의 검토
- [0580] 실시예 52와 동일한 방법으로 간장의 지질 대사 관련 유전자의 발현을 검토하였다. ChREBP(carbohydrate response element-binding protein) 및 ACC2(Acetyl-CoA carboxylase-2)의 발현이 증강했었지만, GalNAcST siRNA 투여군에서 유의하게 억제되었다(도 57). 본 결과는 GAINAc4ST-1, GAINAc4ST-2 및 GAINAc4S-6ST의 유전자 발현을 억제함으로써 간장 조직의 섬유성 변화를 억제할 수 있고, 결과로서 당지질 대사를 개선할 수 있는 것을 나타내고 있다.
- [0581] 본 발명의 약제는 예를 들면 당지질 대사 개선제로서 유용하다.
- [0582] 실시예 58: 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA의 섬유아세포 집적에 있어서의 검토
- [0583] 실시예 52와 동일한 방법으로 지방성 간 장해 모델을 제조하고, 동일한 투여 프로토콜로 실시예 21에 기재된 C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA를 투여하여, 간장 조직을 채취하였다.
- [0584] 다음으로, 실시예 3과 동일한 방법으로 간장 조직의 면역 염색을 행하였다. 일차 항체로서 래트 항마우스 섬유아세포 항체(클론 ER-TR7; 1:500 희석; BMA사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 이차 항체로서 페옥시다아제 표지 항래트 IgG(1:200 희석; 바이오 소스사 제조)를 첨가하고, 실온에서 30분 더 반응시킨 후, DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하였다. 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 확인하였다.
- [0585] 얻어진 간장 조직의 면역 염색상의 예를 도 58에 도시하였다. 대조군에서는 섬유아세포의 집적이 명확하고, 가교 결합을 형성하고 있는 조직상을 나타내었다. 이것에 비교하여, C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA 투여군에서는 모든 군에 있어서 섬유아세포의 집적을 나타내지 않았다.
- [0586] 실시예 59: 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA의 섬유 형성 스코어에 있어서의 검토
- [0587] 실시예 58에서 행한 면역 조직학적 염색에 기초하여, 각 시료의 간섬유 형성의 정도를 섬유 형성 도수로 평가하였다. 결과를 도 59에 도시하였다. 각 바는 각 군에 있어서의 섬유 형성 도수의 평균치±표준편차를 나타내고 있다. 대조군과 비교하면, C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA 투여군($p<0.001$, t 검정)에서 모두 통계학적으로 유의하게 섬유 형성이 경감되어 있었다. 이상으로부터, C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3

siRNA의 투여는 임상적으로도 우수한 간섬유 형성 억제 효과를 발휘하는 것이 나타내어졌다.

[0588] 실시예 60: 마우스 지방성 간 장해 모델에 있어서의 C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA의 간세포 장해에 있어서의 검토

[0589] 실시예 58의 프로토콜로 마우스 도살 시에 채혈을 실시하고, 혈청 중 ALT(알라닌트랜스페라아제)값을 SRL사에 위탁하여 측정하였다. 결과를 도 60에 도시하였다. 혈청 ALT치는 간세포의 파괴를 나타내는 임상적으로 가장 범용되는 지표이다. 대조군에서는 혈청 ALT치의 상승을 나타낸 데 비하여, C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA 투여군에서는 평균치로 50% 이하의 저하를 나타내었다(도 60). 본 결과는 C4ST-1, C4ST-2, C4ST-3의 유전자 발현을 억제함으로써 간장 조직의 섬유성 변화를 억제할 수 있고, 결과로서 간세포 장해를 경감할 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0590] 본 발명의 약제는 예를 들면 간세포 장해 경감제로서 유용하다.

[0591] 실시예 61: 마우스 간 섬유증 모델에 있어서의 C6ST siRNA의 항섬유 형성 효과의 검토

[0592] 본 실시예에서는 실험적으로 가장 범용되는 마우스 사염화탄소 유도 간경변 모델을 이용하여 실험을 행하였다. 우선 마우스 모델의 제조인데, C57BL6/J 마우스(암컷, 5 내지 6주령, 낫본 클레아사 제조)에 사염화탄소(25 μ L/100 g 체중; Sigma-Aldrich사 제조)를 주 2회씩 4주간에 걸쳐서(8회), 복강 내에 주사하여 간섬유증을 야기하였다. 또한 사염화탄소를 주 2회씩 2주간에 걸쳐 추가 투여하여 (총계 12회) 간경변을 유도하였다. 간경변이 유도된 마우스를 도살하고, 그 간장을 채취하였다(경변 간). 한편, 대조 실험에서는 사염화탄소의 투여를 행하고 있지 않은 동일 주령의 C57BL6/J 마우스(암컷, 낫본 클레아사 제조)로부터 간장을 채취하였다(정상 간).

[0593] 사염화탄소의 추가 투여(9회째부터 12회째까지의 합계 4회)와 동일하게, 합계 4회, 실시예 41과 동일한 C6ST siRNA와 그 대조를 복강 내 투여하였다. 추가 투여 종료 후, 양군의 마우스를 도살하고, 간장 조직 절편을 제조하고, 면역 조직학적 검토를 행하였다. 일차 항체로서 래트 항마우스 섬유아세포 항체(클론 ER-TR7; 1:500 회석; BMA사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 계속해서, 이차 항체로서 페옥시다아제 표지 항래트 IgG(1:200 회석; 바이오 소스사 제조)를 첨가하고, 실온에서 30분 더 반응시킨 후, DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하였다. 광학현미경(레이카사 제조) 하에서 시료를 관찰하여, 갈색의 시그널로 가시화된 항체 결합을 확인하였다.

[0594] 얻어진 간장 조직의 면역 염색상의 예를 도 61에 도시하였다. 대조군에서는 섬유아세포의 집적이 명확하고, 가교 결합을 형성하고 있는 조직상을 나타내었다. 이것에 비교하여, C6ST siRNA 투여군에서는 모든 군에 있어서 섬유아세포의 집적을 나타내지 않았다.

[0595] 실시예 62: 마우스 간 섬유증 모델에 있어서의 C6ST siRNA의 섬유 형성 스코어의 검토

[0596] 실시예 61에서 행한 면역 조직학적 염색에 기초하여, 각 시료의 간섬유 형성의 정도를 섬유 형성 도수로 평가하였다. 결과를 도 62에 도시하였다. 각 바는 각 군에 있어서의 섬유 형성 도수의 평균치±표준편차를 나타내고 있다. 대조군과 비교하면, C6ST siRNA 투여군($p<0.05$, t 검정)에서 모두에 통계학적으로 유의하게 섬유 형성이 경감되어 있었다. 이상으로부터, C4ST-1 siRNA, C4ST-2 siRNA, C4ST-3 siRNA의 투여는 임상적으로도 우수한 간섬유 형성 억제 효과를 발휘하는 것이 나타내어졌다.

[0597] 실시예 63: 마우스 간 섬유증 모델에 있어서의 C6ST siRNA의 항섬유 형성 효과의 검토

[0598] 실시예 1과 동일한 방법으로 간장 조직으로부터 RNA를 추출하여 정량적 PCR을 행하였다. 결과를 도 63에 도시하였다. 대조군에서는 섬유 형성 마커인 α SMA, I형 콜라겐, CTGF, TGF β 의 발현 증강을 나타냈지만, C6ST siRNA 투여군에 있어서는 유의하게 억제되어 있었다. 본 결과는 C6ST-1, C6ST-2의 유전자 발현 억제에 의해 간장 조직의 섬유성 변화를 억제할 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0599] [뇌신경 조직]

[0600] 본 실시예에서는 파킨슨병 마우스 모델로서 기본적인, MPTP 유도 파킨슨병 모델을 사용하였다. 이 모델은 고전적이지만 재현성이 우수하고, 간편한 점에서 파킨슨병 모델로서 범용되고 있다. 조직학적으로는 뇌실질 조직 내에의 염증 세포의 침윤과, 도파민 생산 뉴런의 감소를 특징으로 한다. 이러한 병변에 있어서의 뉴런의 감소의 원인으로서, 고전적으로는 신경원섬유성 변화가 생각되고 있다.

[0601] 따라서, 신경이 장해되는 병의 용태, 즉, 파킨슨병, 진행성핵상성 마비, 대뇌피질기저핵 변성증, 알츠하이머병, 폴리글루타민병, 근위축성측삭경화증(ALS), 척수성진행성근위축증, 구척수성근위축증, 헌팅턴병, 다발성경화증

등의 대표적인 신경변성 질환뿐만 아니라, 다계통위축증(선조체후질 변성증, 올리브교소뇌위축증, 샤이-드레거증후군), 부신백질 디스트로피, 길랑-바레 증후군, 중증근무력증, 피셔증후군, 만성염증성탈수성다발신경염, 루이스-섬네 증후군, 크로우-푸카세 증후군, 정상압수두증, 척수공동증, 프리온병(크로이츠펠트-야콥병, 글게르스트만-슈트로이슬러-샤인커병, 치사성 가족성 불면증), 아급성 경화성 전뇌염(SSPE), 진행성 다소성 백질뇌증(PML), 척수소뇌 변성증 등을 포함한다. 또한, 뇌외상 후유증, 뇌혈관 장해(뇌경색, 뇌출혈) 후유증, 바이러스성뇌염 후유증, 세균성수막염 후유증, 척수 손상 후유증이나, 척수 신경, 말초 신경, 청신경, 시신경 등에 있어서의 신경원섬유성 변화도 포함된다. 특히 상기한 후유증은 억울 상태 등의 정신 질환의 기반이 되는 것이라는 생각이 옛부터 있기 때문에, 신경원섬유성 변화는 정신 증상의 원인으로서도 중요하다.

[0602] 실시예 64: MPTP 유발성 C57BL/6JcL 파킨슨병 모델 마우스에 의한 GalNAc4S-6ST siRNA 처치에 있어서의 항섬유형성 효과의 검토

[0603] 본 실시예에서는 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6 테트라히드로파리딘(MPTP)에 의해 도파민 뉴론을 선택적으로 변성시킨 파킨슨병의 마우스 모델을 제조(Amende et al. (2005) Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation 2(20) 1-13)하여 GalNAc4S-6ST siRNA를 투여하고, 치료 후의 유전자 발현과 조직의 모습을 비교 검토하였다.

[0604] 임신 14일째 C57BL/6JcL 마우스(낫본 클레아사 제조)를 사육, 출산시키고, 8주령 C57BL/6JcL 마우스 암컷(낫본 클레아사 제조), 각각에 실시예 1과 동일한 GalNAc4S-6ST siRNA 1 μ g(GeneWorld사 제조)를 siRNA 매체인 1% 아델로콜라겐(고겐사 제조)과 혼합시킨 것 200 μ L 복강 내 투여하였다. 그 후, 2일, 3일 그리고 4일 후의 세 번에 걸쳐서 도파민 뉴론만을 선택적으로 파괴하는 MPTP(Sigma Aldrich Japan사 제조)를 30 mg/kg로 체내에 투여한 것을 사육하였다. 실험 8일째에 BrdU 5 mg/mL(ZyMED Laboratory.Inc사 제조) 100 μ l를 꼬리 정맥 내 투여 처치하고, 1 시간 후, 해부하여, 뇌를 적출하여, 면역 염색용 샘플, 유전자 발현 해석용 샘플을 얻었다.

[0605] 유전자 발현은 실시예 1과 동일한 방법으로, 정량적으로 검토를 행하였다. 결과를 도 64에 도시하였다. 본 파킨슨병 모델에 있어서는, 뇌 조직의 GalNAc4S-6ST 및 섬유 형성 마커인 TGF β , I형 콜라겐, α SMA의 발현이 증강하는데, GalNAc4S-6ST siRNA 투여에 의해 이들 발현이 유의하게 억제되었다. 따라서, GalNAc4S-6ST의 발현을 억제함으로써, 뇌 조직에 있어서의 섬유성 변화를 억제할 수 있는 것이 분명해졌다.

[0606] 본 발명의 약제는 예를 들면 뇌 조직에 있어서의 섬유성 변화 억제제로서 유용하다.

[0607] 실시예 65: MPTP 유발성 C57BL/6JcL 파킨슨병 모델 마우스에 의한 GalNAc4S-6ST siRNA 처치에 있어서의 섬유아세포 집적의 검토

[0608] 실시예 3과 마찬가지로 뇌 조직의 샘플을 이용하여 뇌 내의 신경 세포에 있어서의 섬유 형성에 대하여 GalNAc4S-6ST 생체 내 투여에 의해 얻어지는 조직 소견을 비교하였다. 얻어진 절편을 4% PFA 인산 완충액(나칼라이 테스크사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 탈이온수로 세정하고, 일차 항체로서 섬유아세포 항체(ER-TR7; 1:100 희석; BMA사 제조)를 첨가하고, 4°C에서 밤새 반응시켰다. 다음으로 이차 항체인 알렉사(Alexa)488 표지 항체 IgG 염소 항체(1:200 희석; Invitrogen 사)를 첨가하고, 실온에서 30분 반응시켰다.

[0609] 이상의 수법으로 얻어진 조직상을 도 65에 도시하였다. 미치료군에서의 강한 양성 시그널은 뇌량팽대후부과립피질 부근에서 대조군에 비해 뇌 내에서의 섬유아세포의 침윤을 보이고 있는 결과였다. 또한, GalNAc4S-6ST siRNA 치료군에 있어서는, 섬유아세포의 양성 소견은 격감하고 있었다. 이상의 결과로부터, 파킨슨병 마우스 모델의 유도되는 뇌 조직에 있어서의 ER-TR7의 양성 시그널의 소견은 GalNAc4S-6ST siRNA 생체 내 투여에 의해 현저하게 억제되는 것이 분명해졌다.

[0610] 실시예 66: MPTP 유발성 C57BL/6JcL 파킨슨병 모델 마우스에 의한 GalNAc4S-6ST siRNA 처치에 있어서의 신경 보호 효과의 검토

[0611] 다음으로, 상기한 섬유 형성이 신경 세포의 감소에 수반하고 있는가를 조사하기 위해서 실시예 64와 동일한 방법으로 신경 재생 관련 유전자의 뇌 조직에 있어서의 발현을 정량화한. 도파민 신경의 생존과 분화를 제어하여, 재생을 촉진하는 인자 GDNF, 및 도파민 신경을 형성하는 인자인 Nurr1의 발현이 GalNAc4S-6ST siRNA 투여에 의해 증강하고 있었다(도 66). 본 결과는 GalNAc4S-6ST의 발현을 억제함으로써 뇌 조직에 있어서의 도파민 신경의 재생을 촉진할 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0612] 본 발명의 약제는 예를 들면 뇌 조직에 있어서의 도파민 신경 재생 촉진제로서 유용하다.

[0613] 실시예 67: MPTP 유발성 C57BL/6JcL 파킨슨병 모델 마우스에 의한 GalNAc4S-6ST siRNA 처치에 있어서의 신경

보호 효과의 검토

- [0614] 이상의 실시예에서 나타나어진 결과를 최종적으로 밝히기 위해서 얻어진 조직 샘플 절편을 도파민 뉴론의 마커로 하는 항티로신하이드록실라아제 항체로 도파민 뉴론을 염색하고, 조직 소견을 비교 검토하였다. 이 티로신하이드록실라아제(TH: tyrosine hydroxylase)는 도파민 전구체를 도파민으로 전환하는 효소이다. 실시예 64와 동일한 방법으로 얻어진 절편을 4% PFA 인산 완충액(나칼라이 테스크사 제조)로 10 분간 고정한 후, 탈이온수로 세정하고, 일차 항체로서 래빗 폴리클로날 항티로신하이드록실라아제 항체(1:50 희석; Calbiochem사)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 다음으로 이차 항체인 알렉사488 표지 항래빗-당나귀 항체(1:200 희석; Invitrogen 사)를 첨가하고, 실온에서 30분 반응시켰다.
- [0615] 도 67에 대조군, 미치료군, GaINAc4S-6ST siRNA, 처치군 각각의 조직 화상을 나타내었다(원 도면은 컬러임). 중뇌상구 부근에서, 대조군에서는 정상적으로 티로신하이드록실라아제가 발현하고 있는 것을 확인할 수 있지만 미치료군에 있어서는 음성의 시그널로서 나타났다. 이것은, MPTP에 의해 선택적으로 도파민 뉴론이 파괴된 것이 시사되는 소견이다. 한편, GaINAc4S-6ST siRNA 처치를 행한 군에 있어서의 시그널은 미치료군에 비하여 강하게 나타나고 있는 것을 확인할 수 있었다. 즉, GaINAc4S-6ST siRNA의 생체 내 투여에 의해서 신경유성 변화의 억제에 수반하여 도파민 뉴론의 기능 회복을 기대할 수 있는 결론이 얻어졌다.
- [0616] 본 발명의 약제는 예를 들면 도파민 뉴론 기능 회복제로서 유용하다.
- [0617] 실시예 68: MPTP 유발성 C57BL/6JcL 파킨슨병 모델 마우스에 의한 GaINAcST siRNA 처치에 있어서의 신경 보호 효과의 검토
- [0618] 실시예 64와 같이, 임신 14일째 C57BL/6JcL 마우스(닛본 클레아사 제조)를 사육, 출산시키고, 8주령 C57BL/6JcL 마우스 암컷(닛본 클레아사 제조), 각각에 GaINAcST(GaINAc4ST-1, GaINAc4ST-2와 GALNAC4S-6ST의 각테일 서열을 혼합한 것) siRNA 1 μ g(GeneWorld사 제조)를 siRNA 매체인 1% 아델로콜라겐(고켄사 제조)과 혼합시킨 것 200 μ L 복강 내 투여하였다. 그 후, 2일, 3일, 그리고 4일 후의 세번에 걸쳐서 도파민 뉴론만을 선택적으로 파괴하는 MPTP(Sigma Aldrich Japan사 제조)를 30 mg/kg에서 체 내에 투여한 것을 사육하였다. 실험 8일째에 BrdU 5 mg/mL(ZyMED Laboratory.Inc사 제조) 100 μ l를 꼬리 정맥 내 투여 처치하고, 1 시간 후, 해부하여, 뇌를 적출하여, 면역 염색용 샘플, 유전자 발현 해석용 샘플을 얻었다.
- [0619] 실시예 67과 같이, 얻어진 절편을 항TH 항체로 면역 염색을 행하였다. 결과를 도 68에 도시하였다. GaINAcST siRNA 처치를 행한 군에 있어서는, TH 양성 도파민 신경 세포의 감소가 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 즉, GaINAc4ST-1, GaINAc4ST-2, GaINAc4S-6ST의 발현 억제에 의해서, 실시예 67과 같이, 신경원섬유성 변화를 억제하여, 도파민 뉴론의 기능 회복을 기대할 수 있는 결론이 얻어졌다.
- [0620] 본 발명의 약제는 예를 들면 신경원섬유성 변화 억제제로서 유용하다.
- [0621] 실시예 69: 스트렙토조토신 유발성 2형 당뇨병성 망막증 모델 마우스에 있어서의 C4-술파타제의 효과: 황산화 CSPG의 감소약화
- [0622] 임신 14일째 C57BL/6JcL 마우스(닛본 클레아사 제조)를 사육, 출산시키고, 출생 후 2일령 C57BL/6JcL 마우스 암컷(닛본 클레아사 제조), 각각에 스트렙토조신 10 mg/mL(SIGMA사 제조) 20 μ L/헤드에 피하 주사하고, 4주령까지 CE-2(닛본 클레아사 제조)의 사료, 멸균수를 제공하여 사육하고, 4주령부터 고지방 다이어트식(닛본 클레아사 제조), 멸균수를 제공하여, 2주간 사육시켰다. 2주간째에 콘드로-4-탈황산화 효소(C4-술파타제)(20 단위/mL; 세이가가꾸 고교사 제조)를 4 단위/헤드에서, 및 용매(인산 완충액)을 2회/1주간, 복강 내 투여(1 샷/1주간)의 4회(2주간) 처치를 행하였다. 14일째에 C4-술파타제의 효과를 검토하기 위해서 양군 마우스의 안구를 적출하여 면역 조직학적 검토를 하였다.
- [0623] 적출 눈으로 동결 블록 · 절편을 제조하였다. 절편을 아세톤(시그마알드리치 재팬사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산 완충액으로 세정하고, 또한 일차 항체로서 항콘드로이틴황산 프로테오글리칸(CSPG) 항체(클론 CS56, 마우스 모노클로날 항체, 10 μ g/mL; 세이가가꾸 고교사 제조)를 첨가하고, 실온에서 한시간 반응시켰다. 계속해서, 히스토파인 마우스 스테인 키트(니치레이사 제조; 마우스 모노클로날 항체에 대하여 사용)를 이용하여 이차 항체 반응을 행한 후, DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하여 효소 색소 반응을 행하였다. 이 표본을 광학현미경(레이카사 제조)을 이용하여 관찰하였다.
- [0624] 얻어진 조직상을 도 69에 나타었다(원 도면은 컬러임). 미치료군에서는 망막의 유리체측에 신규로 CS56 양성 소견을 나타내게 된다. 이에 비하여 효소 치료군에서는 CS56 강도가 감소약화되어 있다. CS56은 황산기를 인

식하는 항체이고, 이 감소약화는 4 위치 황산기의 감소약화를 반영하고 있는 것으로 시사된다. 이상으로부터, 본 모델 마우스에 있어서 유도되는 망막 조직에 있어서의 CSPG의 침착은 C4-술파타제의 생체 내 투여에 의해 수식을 받아 억제되는 것이 분명해졌다.

[0625] C4-술파타제는 GalNAc의 4 위치의 황산기를 탈황산화하는 효소이다. 따라서, GalNAc의 4 위치의 황산화를 저해함으로써 생체 레벨에 있어서 조직의 섬유 형성을 억제할 수 있는 것이 나타내어졌다. 즉, GalNAc의 4 위치의 황산기의 탈황산화 효소는 조직 섬유 형성 억제제로서 유용하다.

[0626] 실시예 70: 스트렙토조토신 유발성 2형 당뇨병성 망막증 모델 마우스에 있어서의 C4-술파타제의 효과: 혈관 내 피 세포 증생의 억제

[0627] 실시예 69와 동일한 방법으로 얻어진 절편을 아세톤(시그마알드리치 재팬사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 래트 유래 항혈관 내피 세포 항체(CD31; 1:200 희석; 파민젠사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 다음으로 이차 항체인 페옥시다아제 표지 당나귀 유래 항래트 IgG(1:200 희석; 바이오 소스사 제조)를 첨가하고, 실온에서 30분 반응시켰다. 반응 후의 샘플에 DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하였다. 이 표본을 광학현미경(레이카사 제조)을 이용하여 관찰하였다. 얻어진 조직상을 도 70에 도시하였다(원 도면은 컬러임). 미치료군에서는 망막 유리체측에 있어서의 CD31 양성 세포의 수가 증가하고 있어, 일부 유리체에 돌출하여 있는 상도 나타내었다. 이것은, 본 모델이 당뇨병성 망막증의 전증식 망막증의 단계를 반영하고 있다고 생각되고, 모델의 유효성을 나타내는 것이다. 이에 비하여 효소 치료군에서는 동일 부위의 CD31 양성 세포의 수가 분명히 감소하고 있었다. 이상의 결과로부터, 2형 당뇨병 모델에 있어서는 망막 유리체측의 혈관 내피 세포수가 증가하여 오지만, C4-술파타제 투여에 의해 그와 같은 혈관 증생을 억제시키는 것이 시사되었다.

[0628] 즉, GalNAc의 4 위치의 황산기의 탈황산화 효소는, 혈관 증생 억제제로서 유용하다.

[0629] 실시예 71: 스트렙토조토신 유발성 2형 당뇨병성 망막증 모델 마우스에 있어서의 C4-술파타제의 효과: 콜라겐 증가성 변화의 억제

[0630] 실시예 69와 동일한 방법으로 얻어진 절편을 아세톤(시그마알드리치 재팬사 제조)으로 10 분간 고정한 후, 인산완충액으로 세정하고, 일차 항체로서 토끼 유래 항IV형 콜라겐 항체(1:250 희석; Sigma사 제조)를 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 다음으로 이차 항체인 페옥시다아제 표지 항토끼 IgG(1:200 희석; Jackson ImmunoResearch사 제조)를 첨가하고, 실온에서 30분 반응시켰다. 반응 후의 샘플에 DAB 기질(니치레이사 제조)을 첨가하였다. 이 표본을 광학현미경(레이카사 제조)을 이용하여 관찰하였다.

[0631] 얻어진 조직상을 도 71에 도시하였다(원 도면은 컬러임). 미치료군에서는 망막 유리체측에 있어서의 IV형 콜라겐 양성 소견의 증가와 동시에, 망막 내 경계막에 평행하여 연속해 있는 소견을 나타내었다. 이것은, 정맥 형태의 이상과 함께, 콜라겐의 증생, 즉 섬유화 변화를 시사하는 것이다. 이에 비하여 효소 치료군에서는 동일 부위의 IV형 콜라겐의 증생이 현저하게 억제되어 있었다. 이상의 결과로부터, 2형 당뇨병 모델에 있어서는 망막 콜라겐 증생을 나타내는데, C4-술파타제 투여에 의해 억제시키는 것이 분명해졌다.

[0632] 즉, GalNAc의 4 위치의 황산기의 탈황산화 효소는 2형 당뇨병성 망막증의 치료제로서 유용하다.

[0633] 실시예 72 2형 당뇨병 모델 마우스의 간장에 있어서의 섬유아세포의 국재

[0634] 실시예 72에서는, 상술한(실시예 69 내지 71) 2형 당뇨병 모델 마우스로부터 채취한 간장을 이용하여, C4-술파타제의 간장에 있어서의, 항섬유화 효과(섬유아세포의 조직 침윤을 지표)에 대해서 비교·검토하였다. 동결 블록의 제작, 면역 염색의 수법 등은 전부 상술한 방법으로 행하였다. 도 72에 도시된 바와 같이, 미치료군에 있어서는, 다수의 섬유아세포의 침윤을 나타내었다. 이에 비하여 C4-술파타제 치료군에서는 미치료군에 비교하여, 섬유아세포의 침윤의 정도는 적었다. 이 결과는 C4-술파타제가 섬유아세포의 침윤을 억제하는 약리작용을 갖고, 이 효과가 항섬유화 작용의 일관인 것을 나타내는 것이었다.

[0635] 즉, GalNAc의 4 위치의 황산기의 탈황산화 효소는 섬유아세포 침윤 억제제로서 유용하다.

[0636] 실시예 73 2형 당뇨병 모델 마우스의 간장에 있어서의 마크로파지의 국재

[0637] 실시예 73에서는, 상술한(실시예 69 내지 71) 2형 당뇨병 모델 마우스로부터 채취한 간장을 이용하여 C4-술파타제의 간장에 있어서의, 항염증 효과(마크로파지의 조직 침윤을 지표)에 대해서 비교·검토하였다. 동결 블록의 제작, 면역 염색의 수법 등은 전부 상술한 방법으로 행하였다. 도 73에 도시된 바와 같이, 미치료군에 있어서

는, 스폷의 형성을 수반하는 다수의 마크로파지의 침윤을 나타내었다. 이에 비하여 C4-술파타제 치료군에서는 미치료군에 비교하여 마크로파지의 침윤의 정도는 적었다. 이 결과는, C4-술파타제가 마크로파지의 침윤을 억제하는 약리 작용을 갖고, 이 효과가 항염증 작용의 일환인 것을 나타내는 것이었다.

[0638] 즉, GalNAc의 4 위치의 황산기의 탈황산화 효소는 마크로파지 침윤 억제제, 또는 항염증제로서 유용하다.

[0639] 실시예 74 2형 당뇨병 모델 마우스의 혈청 생화학 검사 소견

[0640] 실시예 74는 실시예 72와 실시예 73의 결과를 보충하는 목적으로 해석을 행하였다. 본 실시예에서는 상술한 (실시예 69 내지 71) 2형 당뇨병 모델 마우스로부터 채취한 혈청을 이용하여, 간 기능의 지표인 아스파라긴산아미노기 전이 효소(AST), 알라닌아미노기 전이 효소(ALT), 지질 대사의 지표인 트리아실글리세롤(TG)을 측정하였다. 도 74에는 그 결과를 도시하고 있다. 생화학 검사는 검사수탁 업자에게 측정을 의뢰하였다. 미치료군(unt)으로서는 대조군(nor)에 비하여, AST, ALT, TG의 어느쪽의 값도 상승 경향이었다. 한편, C4-술파타제 치료군(C4sul)에서는 AST, ALT, TG의 검사치의 상승은 미치료군(unt)에 비하여 억제되는 경향이 있었다. 이들 결과는 실시예 72와 실시예 73의 결과를 지지하는 것이고, C4-술파타제의 항섬유화 효과와, 항염증 효과에 의해서 간 기능이 유지되고 있는 것을 나타내고 있다.

[0641] 즉, GalNAc의 4 위치의 황산기의 탈황산화 효소는 간 기능 질환에 대한 치료제로서 유용하다.

[0642] 실시예 75 MPDP 유발성 과킨슨 모델 마우스의 뇌 조직에 있어서의 CSPG의 발현의 비교

[0643] 본 실시예에서는 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6 테트라히드로페리딘(MPTP)의 대사 산물인 MPDP를 이용하여 모델을 제조한 본 실험을 수행하였다.

[0644] 8주령 C57BL/6JcL 마우스 암컷(닛본 클레아사 제조), 각각에 C4-술파타제(세이가가꾸 고교사 제조) 4 U/ml 100 μ l 헤드로, day 0, day 2에 복강 내 투여하고, siRNA에 대해서는 GALNAC4S-6ST siRNA(홋카이도 시스템 사이언스사 제조) 1 μ g/1% 아델로콜라겐/200 μ l를 day 0로 전투여하였다. day 2, day 3, day 4에서, MPDP (Sigma Aldrich Japan사 제조)를 (30 mg/kg)로 연일 투여를 행하였다.

[0645] 본 실시예에 이용한 마우스 GalNac4S-6ST siRNA의 염기 서열에 대해서 이하에 나타내었다. 서열은 반드시 본 예에만 한정되는 것은 아니다.

[0646] [마우스 GalNac4-6STsiRNA](진뱅크 액세션 번호 NM_029935)

(홋카이도 시스템 사이언스사 제조)

5'-gcagcccgagcaagaugaauaagauc-ag-3'(서열번호: 91)

3'-ua-cgucggucguucuacuuauucuag-5' (서열번호: 92)

[0647] Day 8에 있어서, BrdU 5 mg/mL(ZyMED Laboratory.Inc사 제조) 100 μ l를 꼬리 정맥 내 투여 처치하고, 1 시간 후, 해부하여, 뇌를 적출하여, 면역 염색용 샘플, 유전자 발현 해석용 샘플을 얻었다. 이상으로부터 적출한 장기(뇌) 50 mg당에 대하여 RNA-Bee(TEL-TEST사 제조) 1 mL를 가하고, 전동 균질기(DIGITAL HOMOGENIZER, ASONE 사 제조)로 분쇄시킨 후, 클로로포름 200 μ l(Sigma Aldrich Japan사 제조)를 가하여 천천히 혼합한 후, 약 5분 빙냉하여, 12,000 rpm, 4°C, 15 분간 원심분리기(Centrifuge 5417R, eppendorf사 제조)를 이용하여 원심 분리를 행하였다. 원심 분리 후의 상청액 500 μ L를 별도의 에펜도르프 튜브에 옮기고, 상청액과 동등량의 이소프로판을 500 μ L(Sigma Aldrich Japan사 제조)를 가하고 혼합 후, 1 μ L의 글리코겐(Invitrogen사 제조)을 가하고, 15 분간 빙냉하였다. 빙냉 15분 후, 12,000 rpm, 4°C, 15 분간 원심하고, 그 후, 75% 에탄올 1000 μ l(Sigma Aldrich Japan사 제조)로 3회 세정하여 얻어진 RNA 침전물을 30 분간 내지 1 시간 자연 건조시킨 후, 오오쓰카 증류수 50 μ l(오쓰카 세이야꾸사 제조)에 용해시키고, 또한 오오쓰카 증류수(오쓰카 세이야꾸사 제조)로 100배 희석하고, UV 플레이트(Corning Costar사 제조) 상에서 플레이트리더(POWER Wave XS, BIO-TEK사 제조)에 의해 추출한 샘플 중의 RNA 농도를 산출하였다.

[0648] 다음으로, RT 반응(cDNA 합성)을 행하기 위해서 이하의 절차를 행하였다. 산출하여 얻어진 RNA 샘플을 500 ng/20 μ l의 농도로 조정하고, 68°C, 3 분간, 블록 인큐베이터(ASTEC 제조)에서 가온하고, 10 분간 빙냉하였다. 빙냉 후, 미리 제조하고 있었던 RT 프리 믹스액(조성: 25 mM MgCl₂ 18.64 μ l(Invitrogen사 제조), 5×완충액 20 μ l(Invitrogen사 제조), 0.1 M DTT 6.6 μ l(Invitrogen사 제조), 10 mM dNTP 믹스 10 μ l(Invitrogen사 제조), RNase 인히비터 2 μ l(Invitrogen사 제조), MMLV 역전사 효소 1.2 μ l(Invitrogen사 제조), 랜덤 프라이머 2 μ l(Invitrogen사 제조), 멸균 증류수 19.56 μ l(오오쓰카 증류수: 오쓰카 세이야꾸사 제조)를 80 μ l 가

하고 블록 인큐베이터(ASTEC사 제조)에서 42°C, 1 시간, 가온 반응시키고, 1 시간 후, 블록 인큐베이터(ASTEC사 제조)에서 99°C, 5 분간, 가열한 후, 빙냉하여 구하는 cDNA 100 μl를 제작하고, 합성하여 얻어진 cDNA를 이용하고, 이하의 조성으로 PCR 반응을 행하였다.

[0652] PCR 완충액 2 μl [조성: 166 mM (NH₄)₂SO₄(Sigma Aldrich Japan사 제조), 670 mM 트리스 -HCl pH8.8(Invitrogen사 제조), 67 mM MgCl₂ · 6H₂O(Sigma Aldrich Japan사 제조), 100 mM 2-머캅토에탄올](WAKO사 제조), 25 mM dNTP 믹스 0.8 μl(Invitrogen사 제조), DMSO 0.6 μl(Sigma Aldrich Japan사 제조), 프라이머 전방향 0.2 μl(GeneWorld사 제조), 프라이머 역방향 0.2 μl(GeneWorld사 제조), 오오쓰카 종류수 15.7 μl (오쓰카 세이야꾸사 제조), Taq 폴리머라제 0.1 μl(Perkin Elmer사 제조), 상술한 바와 같이 하여 얻어진 cDNA 1 μl를 혼합시켜 공인된 씨멀 사이클러(eppendorf사 제조)에 의해 94°C 45 초, 55°C 45 초, 72°C 60 초 30 사이클 반응시켰다. 반응 종료 후, 얻어진 PCR 산물에 2 μl 로딩 다이(Invitrogen사 제조)를 가하고, 1.5% 울트라퓨어 아가로스(Invitrogen사 제조)겔을 제작하고, 무페드-2 플러스(ADVANCE사 제조)에 의해 100 V, 20 분간 전기 영동을 행하였다. 영동 후, 1×LoTE[조성: 3 mM 트리스-HCl(pH7.5)(Invitrogen사 제조), 0.2 mM EDTA(pH7.5)(Sigma Aldrich Japan사 제조)]로 10000배 희석 브롬화 에티디움(Invitrogen사 제조) 염색액 중에서 20 분간 전탕시킨 후, I-스코프 WD(ADVANCE사 제조)에 설치한 EXILIM(CASIO사 제조)로 겔 촬영하여 유전자 발현의 확인을 행하였다. 또한, 동결 블록의 제작, 면역 염색의 수법 등을 전부 상술한 방법으로 행하였다.

[0653] MPDP 유도성 파킨슨 모델에 있어서의 CSPG 발현에 대해서 CS-56 항체(항 CSPG 항체: 세이가가꾸 고교사 제조 1:100 희석)을 이용한 면역 염색으로 검토한 결과에 대해서 도 75에 도시하였다. 도 75에 도시한 바와 같이, 미치료군에서는 CSPG 양성의 시그널이 강하게 발현하고 있다. 이에 비하여 C4-술파타제 치료군, 유전자 치료군에서는 양성의 시그널의 발현은 저하고 있었다.

[0654] 실시예 76 MPDP 유발성 파킨슨 모델 마우스의 뇌 조직에 있어서의 도파민 뉴론의 국재

[0655] C4-술파타제와, GaINAc4S-6ST siRNA의 도파민 작동성 신경에 대한 약리 효과를 밝히는 목적으로, MPDP 유도성 파킨슨 모델에 있어서의 도파민 작동성 신경의 국재를 항티로신수산화 효소(tyrosine hydroxylase, TH 1:20 희석) 항체, 이차 항체는 알렉사-488 표지 항토끼 IgG 항체(Invitrogen사 제조의 1:200 희석)을 이용한 형광 면역 염색을 이용하여 해석을 행하였다. 도 76에 도시된 바와 같이, 뇌 조직에 도파민 작동성 신경의 국재는 미치료군에서는 다른 군에 비하여, 양성의 시그널이 약하게 발현하고 있다. 이에 비하여 C4-술파타제 치료군, 유전자 치료군에서는 양성의 시그널의 발현은 대조군과 큰 차이는 보이지 않았다. C4-술파타제 투여, siRNA 투여에 의한 도파민 작동성 신경의 보호 작용, 또는 재생 · 수복 촉진 작용이 나타내어지는 결과가 되었다.

[0656] 즉, GaINAc의 4 위치 또는 6 위치의 인히비터(GaINAc의 4 위치의 황산기의 탈황산화 효소, 및 GaINAc4S-6ST siRNA)는 도파민 작동성 신경 보호제, 또는 재생 · 수복 촉진제로서 유용하다.

[0657] 실시예 77 MPDP 유발성 파킨슨 모델 마우스의 뇌 조직에 있어서의 염증 관련 유전자의 발현 해석

[0658] C4-술파타제와, GaINAc siRNA의 항염증 효과를 비교하는 목적으로, 실시예 75, 실시예 76에서 사용한 조직 절편과 마찬가지의 샘플로부터 상술한 방법으로 추출한 전체 RNA를 이용하여 TNF-α의 발현에 대해서 정량 PCR법으로 해석하였다. 정량 PCR에 대해서는 SYBR 프리믹스 키트(다카라 바이오사 제조)와 실시간 PCR 씨멀 사이클러 DICE(다카라 바이오사 제조)를 이용하여 행하였다. PCR 반응의 조건은 95°C를 10초, 95°C를 5초와 60°C를 30초의 40 사이클로 하고, 마지막으로 용해 곡선 분석을 하였다. 이용한 프라이머의 염기 서열에 대해서 이하에 나타내었다.

[0659] 마우스 β 액틴(다카라 바이오사 제조)

[0660] 전방향 : 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'(서열번호: 93)

[0661] 역방향 : 5'-ATGGAGGCCACCGATCCACA -3' (서열번호: 94)

[0662] 총양 괴사 인자 (TNF-α): (다카라 바이오사 제조)

[0663] 전방향 : 5'-CAGGAGGGAGAACAGAACTCCA-3(서열번호: 95)

[0664] 역방향: 5'-CCTGGTTGGCTGCTTGCTT-3' (서열번호: 96)

[0665] 도 77에 도시하는 바와 같이 미치료군과 비교하여 C4-술파타제 치료군에서는 TNF-α의 발현이 억제되어 있었다. 유전자 치료군에서는 발현 억제의 경향을 나타내는 것에 머물렀다. 이를 결과로부터, C4-술파타제가 염증을 억

제하는 작용을 갖는 것이 나타내어졌다.

[0666] 즉, GaINAc의 4 위치의 황산기의 탈황산화 효소는 항염증제로서 유용하다.

[0667] 실시예 78 MPDP 유발성 파킨슨 모델 마우스의 뇌 조직에 있어서의 염증 관련 유전자의 발현 해석

[0668] 이 실시예에서는 실시예 77의 결과를 보충하는 목적으로, 도파민 작동성 신경의 발현에 관여하는 유전자인 Nurr1를 마커로 하여 검토를 행하였다. C4-술파타제와 GaINAc4S-6ST가 미치는 영향에 대해서 상술한 정량 PCR 법을 이용하여 검토한 결과에 대해서 나타낸다. 이용한 프라이머의 염기 서열에 대해서 이하에 나타내었다.

[0669] 뉴클레아 수용체 서브페밀리 4 그룹A 멤버2 (Nurr1) : (다카라 바이오사 제조)

[0670] 전방향 : 5'-CTGCCCTGGCTATGGTCACA-3' (서열번호: 97)

[0671] 역방향 : 5'-AGACAGGTAGTTGGGTCGGTCA-3' (서열번호: 98)

[0672] 도 78에 도시된 바와 같이, C4-술파타제 치료군, 유전자 치료군에서는 미치료군에 비하여 Nurr1의 유전자 발현이 유의($P < 0.001$)하게 증가하고 있었다. 이 결과는 실시예 76의 결과를 지지하는 것이고, C4-술파타제 투여, siRNA 투여에 의한 도파민 작동성 신경의 보호 작용, 또는 재생·수복 촉진 작용이 나타내어지는 결과가 되었다.

[0673] 즉, GaINAc의 4 위치 또는 6 위치의 인히비터(GaINAc의 4 위치의 황산기의 탈황산화 효소, 및 GaINAc4S-6ST siRNA)은 도파민 작동성 신경 보호제, 또는 재생·수복촉진제로서 유용하다.

산업상 이용가능성

[0674] 본 발명은 당췌 관련 유전자의 기능을 저해하는 것에 의한 생체 조직 레벨의 섬유 형성을 억제하는 약제를 제공한다. 상기 약제는 조직 섬유 형성성 질환의 치료 또는 예방에 유용하다.

[0675] 만성의 조직 섬유 형성(섬유 형성성 조직 변화)은 전신 장기에 발생할 수 있는 것으로서, 장기 기능 부전에 의해 개체를 죽음에 이르게 하는 질환군의 총칭인 (총설: Wynn TA, J. Clin. Invest. 117: 524-529, 2007).

[0676] 섬유 형성성 질환은 만성 염증의 종말상이라고 생각되고, 전신의 장기에 발생하여 해당 장기의 기능 부전 나아가서는 개체를 죽음에 이르게 하는 질환의 총칭이다. 심혈관 질환, 뇌혈관 질환 등 종래 사망율이 높았던 질환의 본질은 조직 레벨에서의 섬유 형성과 그에 수반하는 기능 부전이라는 인식이 계속 이루어지고 있고, 구미 사인의 45%는 섬유 형성에 기인한다는 견해가 있다. 이 새로운 견해에 따르면, 개체의 병적인 사망은 암, 감염증, 섬유 형성이라는 3가지로 집약되게 된다. 종래의 개념인 간경변, 폐섬유증, 신경화증에만 머무르지 않고, 암·감염증 이외의 매우 다채로운, 주로는 만성 질환이 「섬유 형성성 질환」이라고 정의될 수 있다. 특히 최근의 생활 습관의 변화(흔히 말하는 구미화)에 수반하여, NASH(비알코올성 지방성 간염)이나 CKD(만성 신장 질환)라는 생명을 위협하는 새로운 질환(질환 개념)이 급증하고 있고, 이들이 조직의 섬유 형성에 기인한다는 지견은 「섬유 형성성 질환」 치료제 확립의 긴급성을 나타내고 있다. 그러나, 현재, 이식이나 인공 장기 밖에 대응책이 없고, 근본적인 치료 방법이 없다는 결정적인 과제를 안고 있었다.

[0677] 본 발명은 최근에 막 동정되었고, 기능이 미지이던 당췌유전자를 표적으로 한다는, 전혀 새로운 방법으로 섬유 형성성 질환(조직의 섬유 형성성 병변 및 그에 수반하는 기능 부전)을 억제하는 기술을 제공한다.

[0678] 임상적으로도 난치성 기능 부전을 나타내는 섬유 형성성 질환은 사망의 결정적 요인이 될 뿐만아니라, 일상의 QOL(quality of life)을 현저하게 저해하는 질환이기도 하다. 조직 섬유 형성 억제제의 확립은 그렇기 때문에 매우 중요한데, 현재 시장에 나와 있는 약제는 없다. 실험적으로도 TGF- β 저해제를 중심으로, 안지오텐신 저해제, 염증성 사이토카인 저해제, TLR 저해제, MMP 저해제 등 정력적으로 연구가 진행되고 있지만, 아직 유효성이 확립된 방법이라고는 할 수 없다(총설: Wynn TA, J. Clin. Invest. 117: 524-529, 2007).

[0679] 본 발명자는 다양한 장기의 섬유 형성성 질환 모델 동물에 있어서, 피검체에 표적 당췌유전자 저해제를 투여하여, 섬유 형성성 병변 경감 및 장기 기능 회복을 도모하였다.

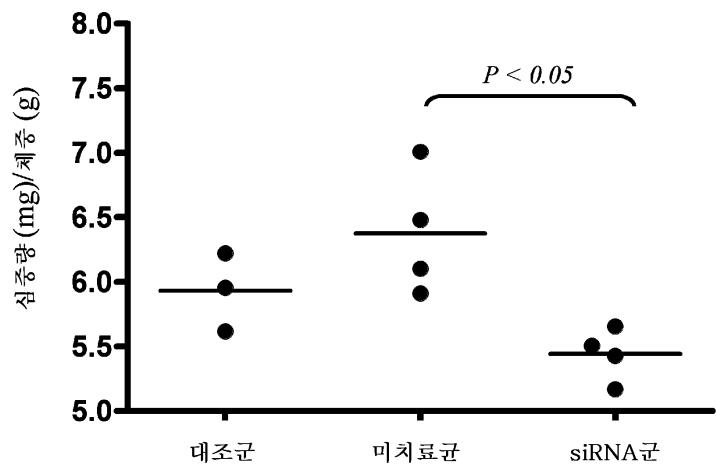
[0680] 섬유 형성성 질환의 확인은 결정적으로 병리상(섬유아세포나 콜라겐의 면역 염색, 마송 염색을 포함함)으로 행하였다. 치료 효과(섬유 형성 저해 효과)는 병리상 외에, 임상 증상, 각 장기에 있어서의 콜라겐 발현량으로 결정하였다.

[0681] 기술적 수법으로서는 당췌유전자에 대한 핵산 의약(siRNA)으로 직접적인 유전자 녹다운법에 의해 치료 효과를

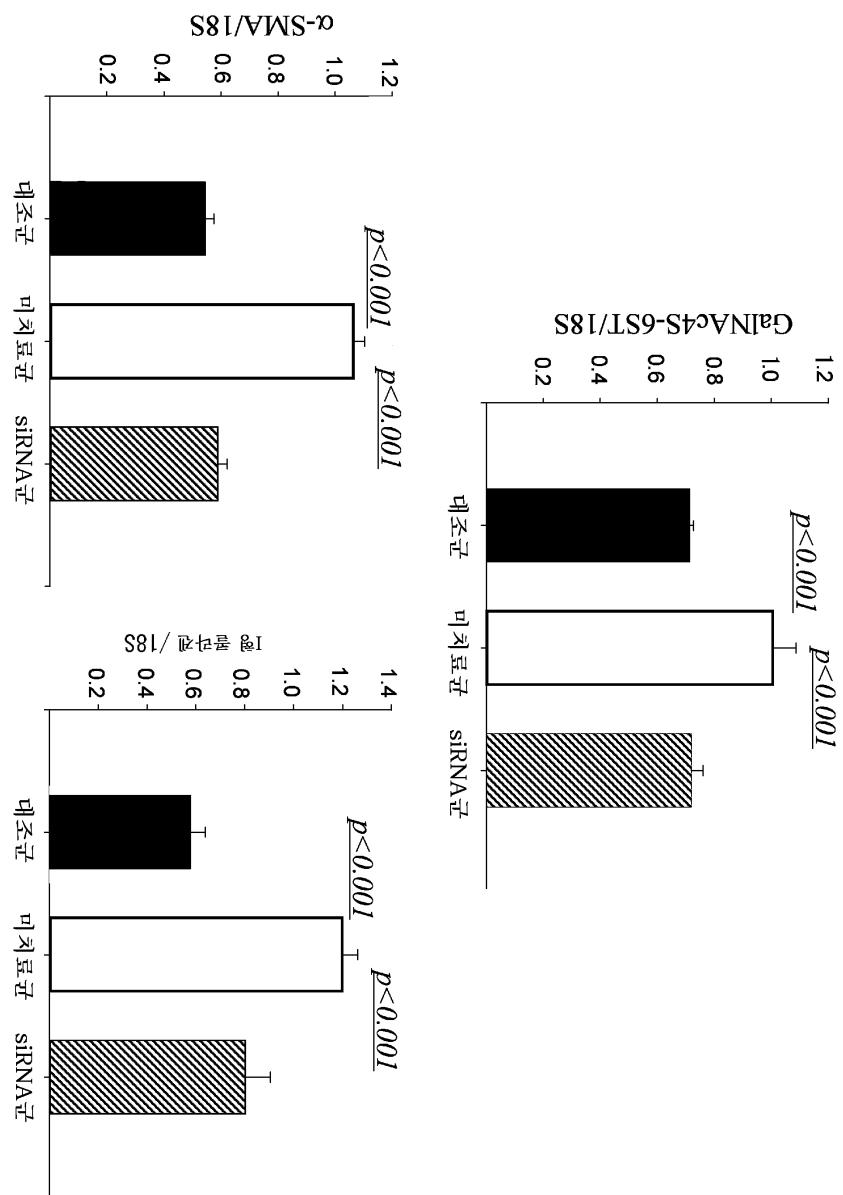
증명하였다.

도면

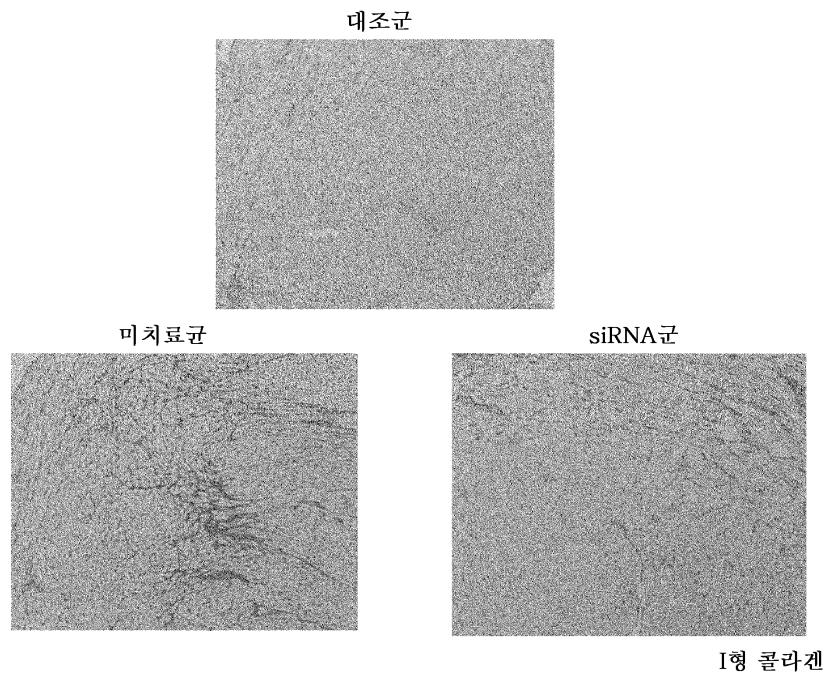
도면1



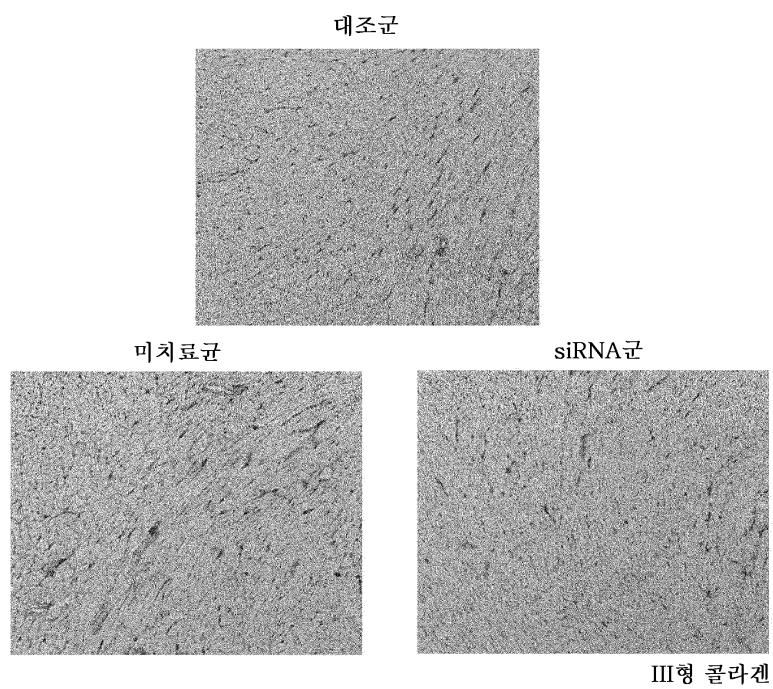
도면2



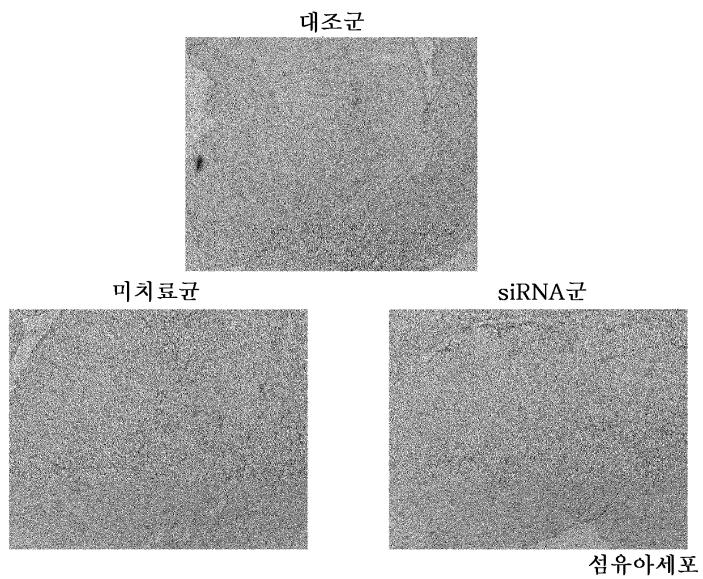
도면3



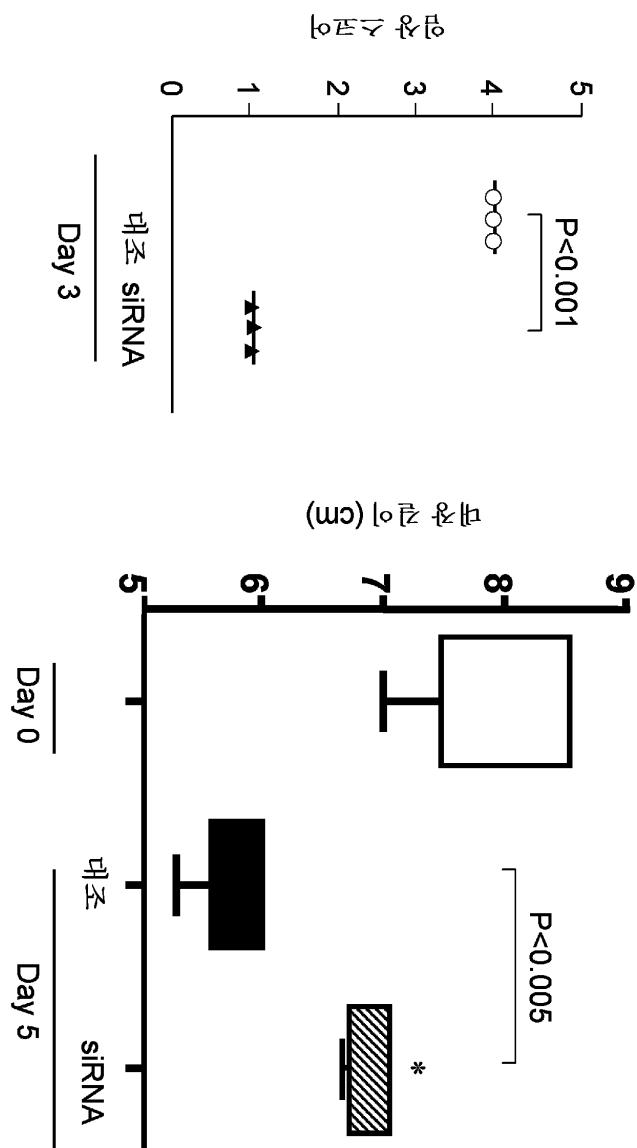
도면4



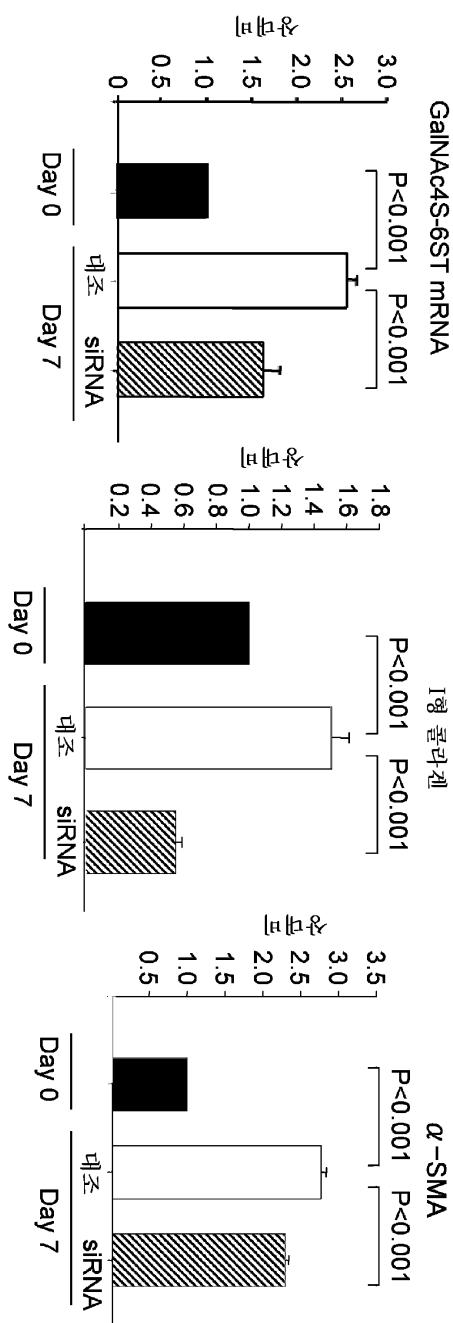
도면5



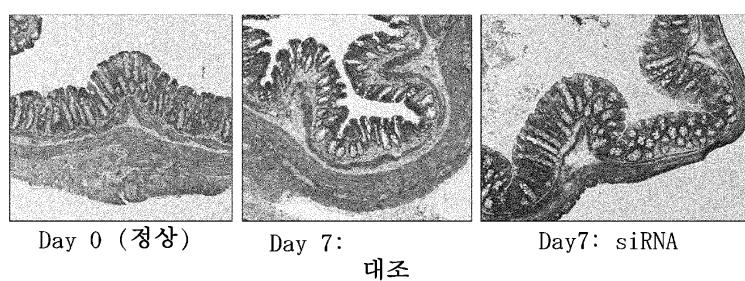
도면6



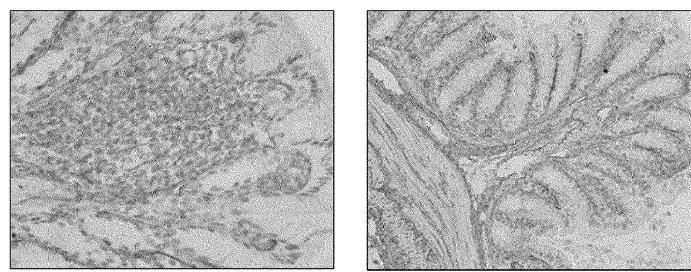
도면7



도면8



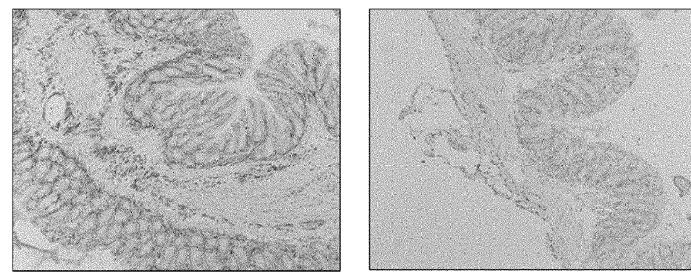
도면9



Day 7: 대조

Day7: siRNA

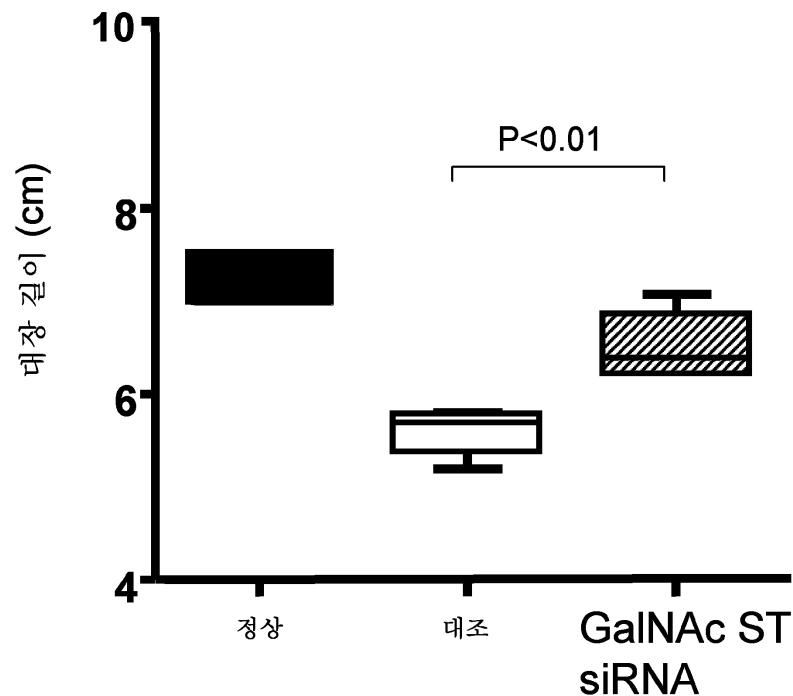
도면10



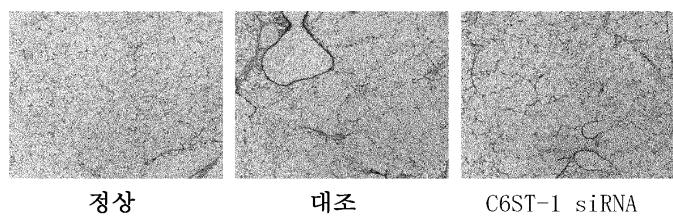
Day 7: 대조

Day7: siRNA

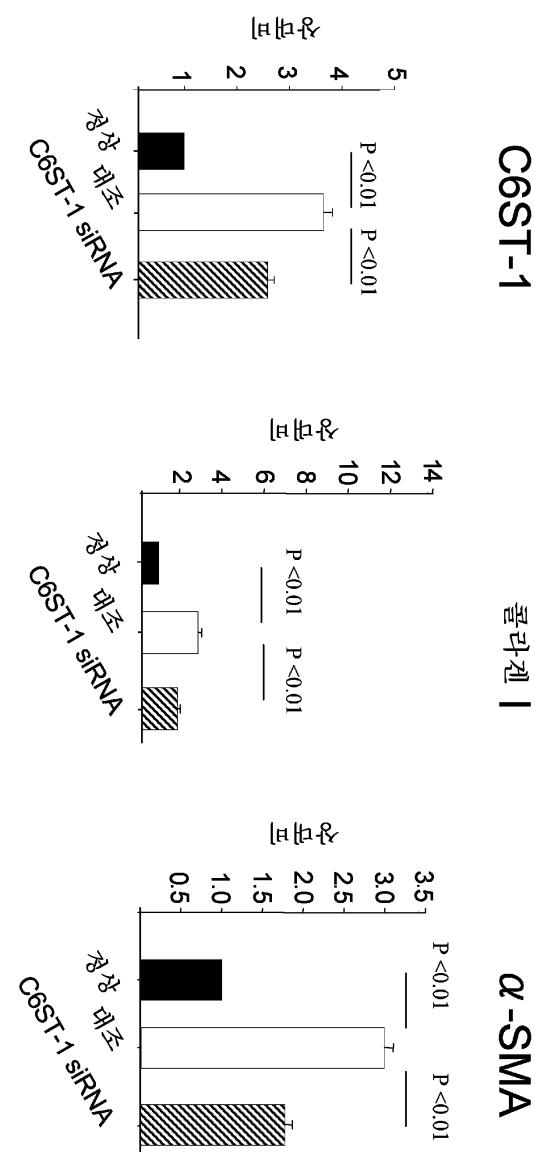
도면11



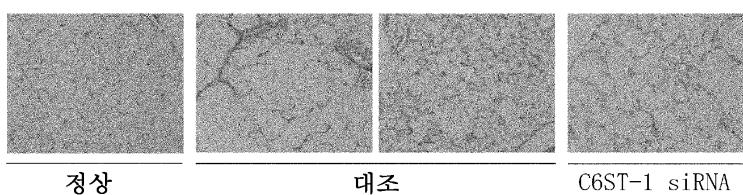
도면12



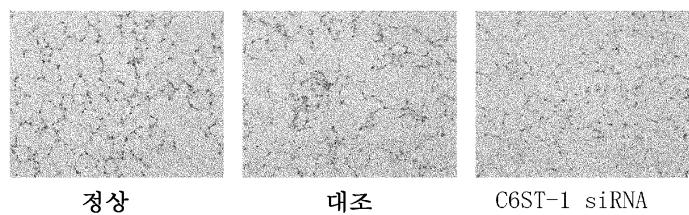
도면13



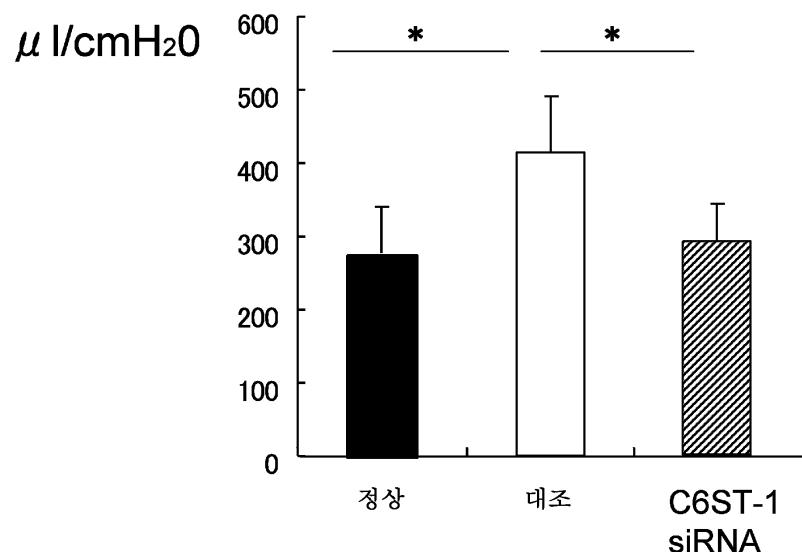
도면14



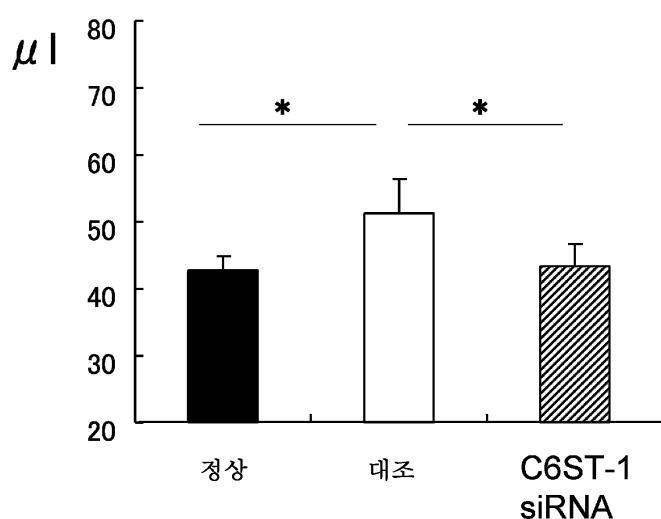
도면15



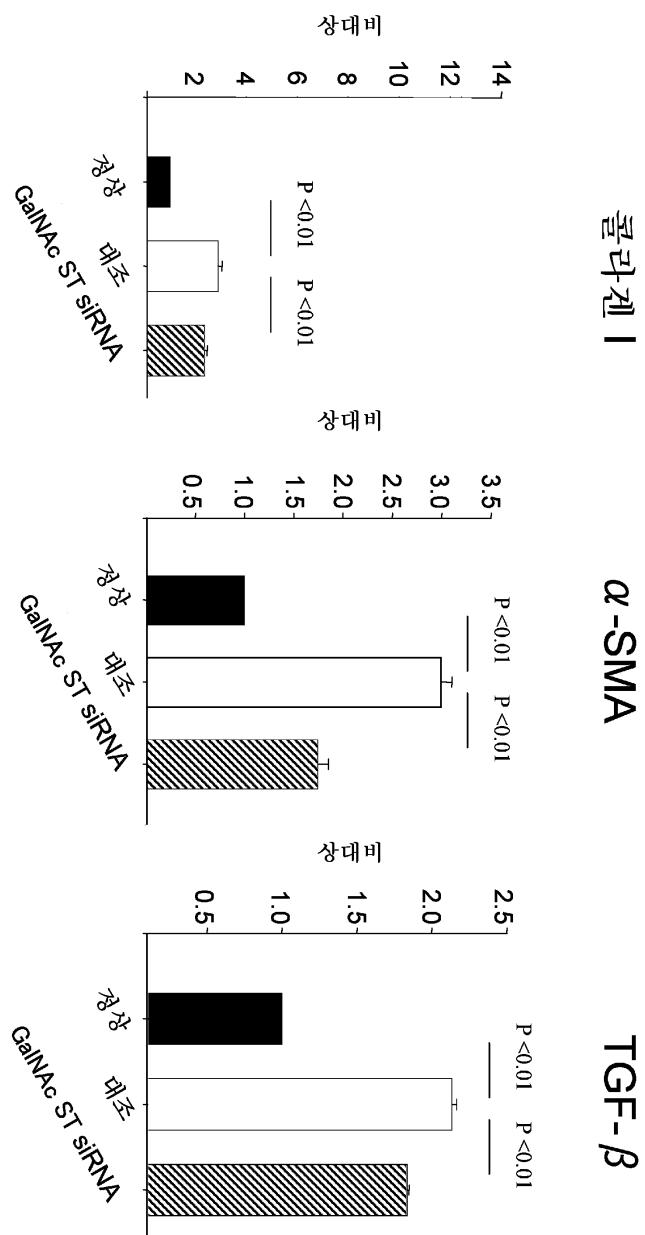
도면16



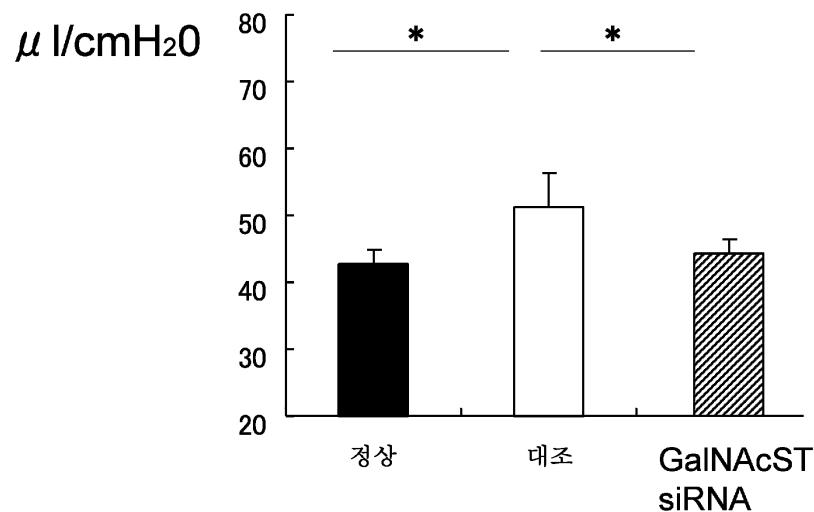
도면17



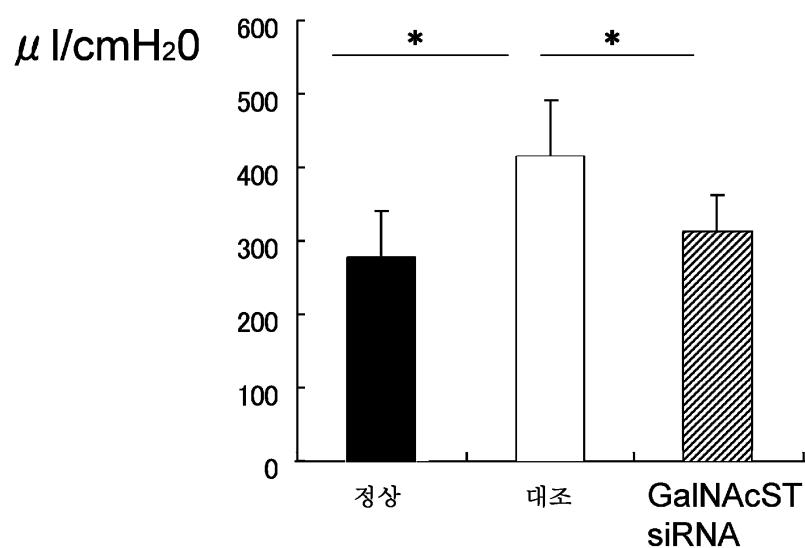
도면18



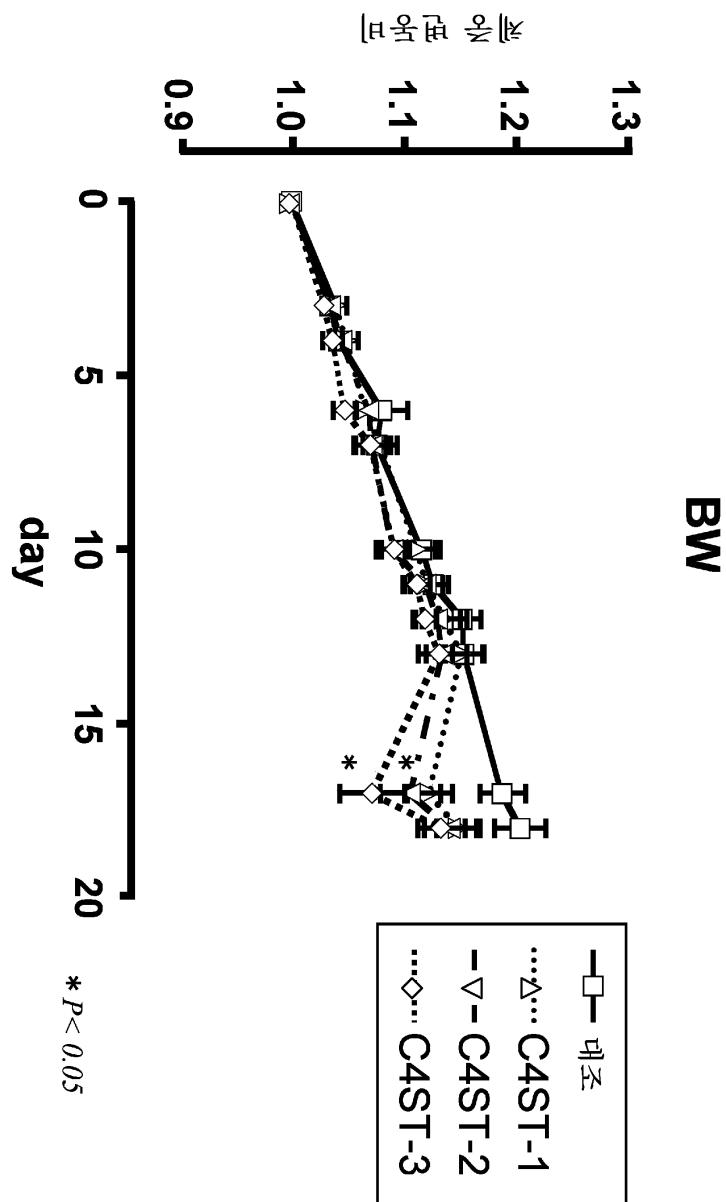
도면19



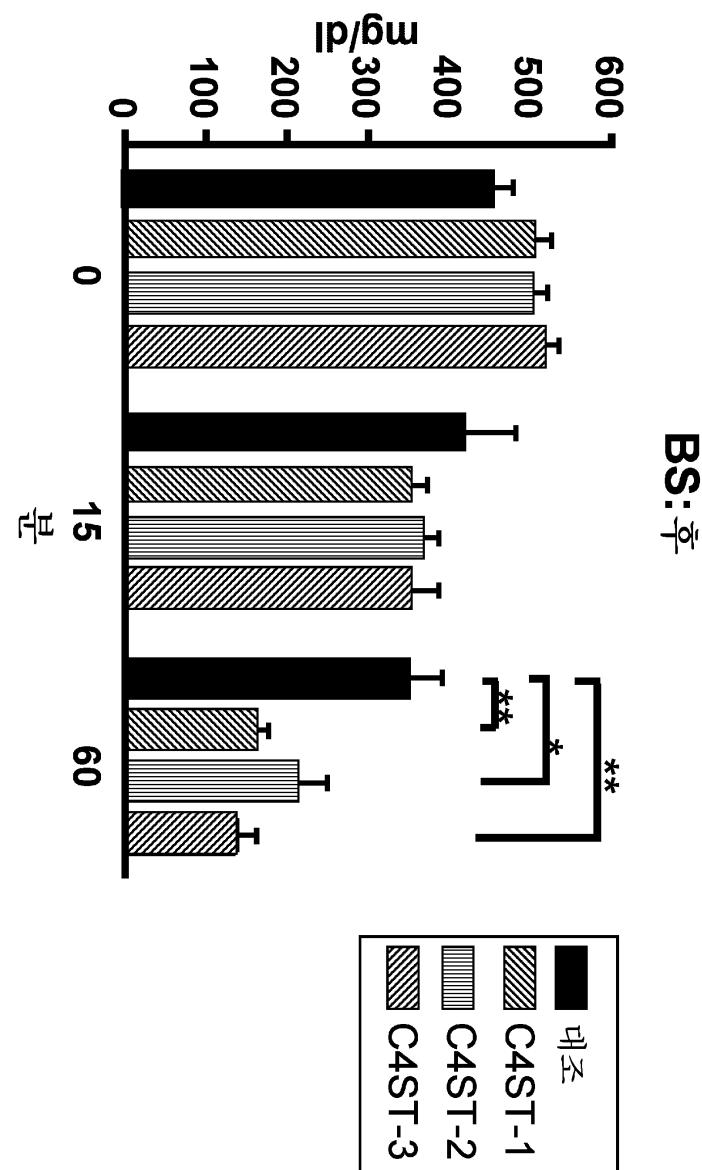
도면20



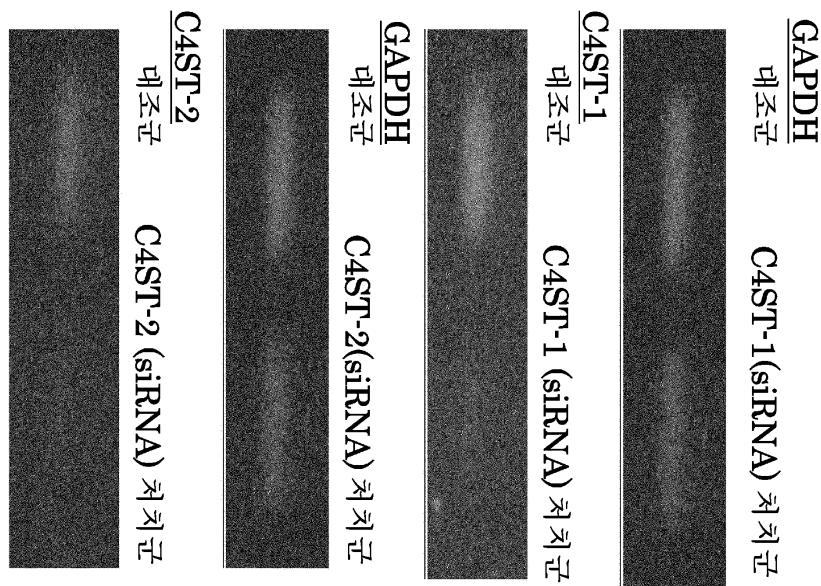
도면21



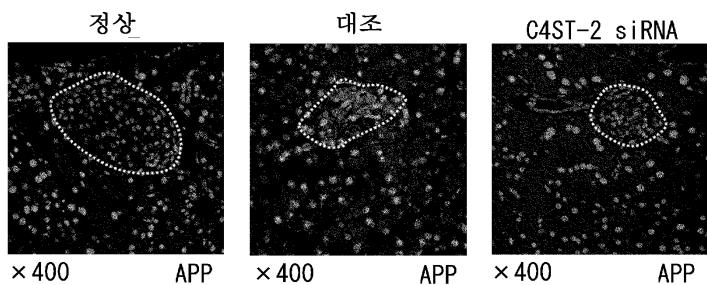
도면22



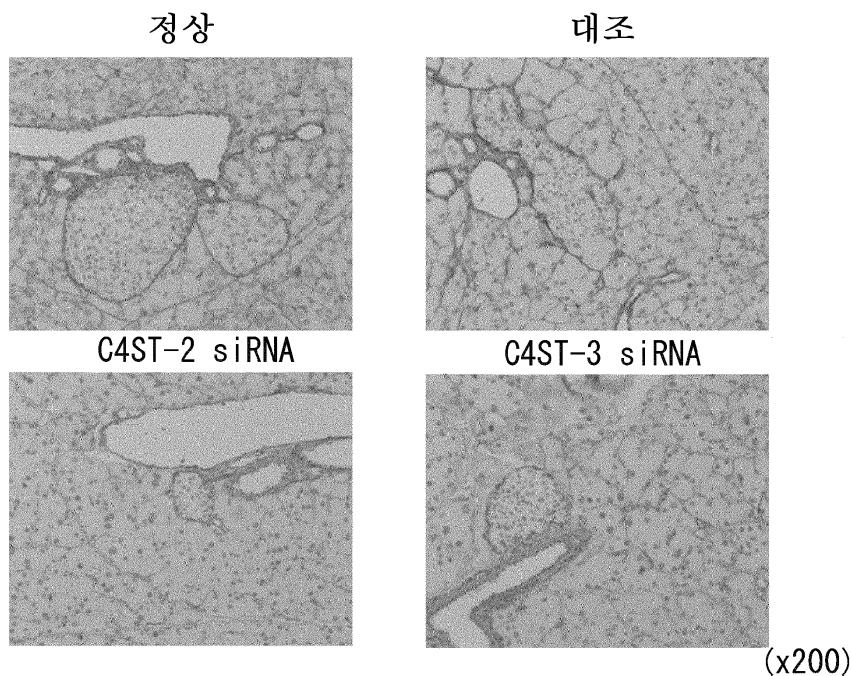
도면23



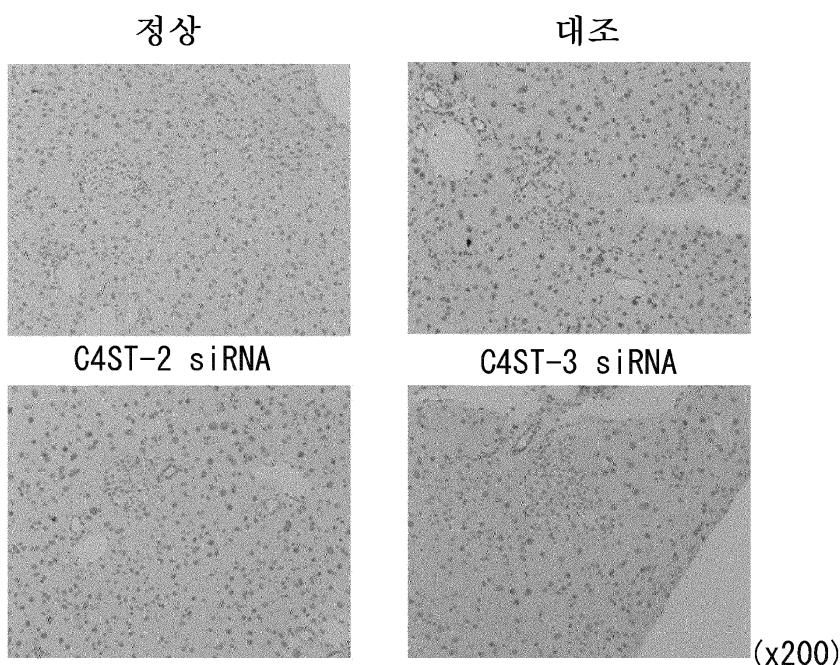
도면24



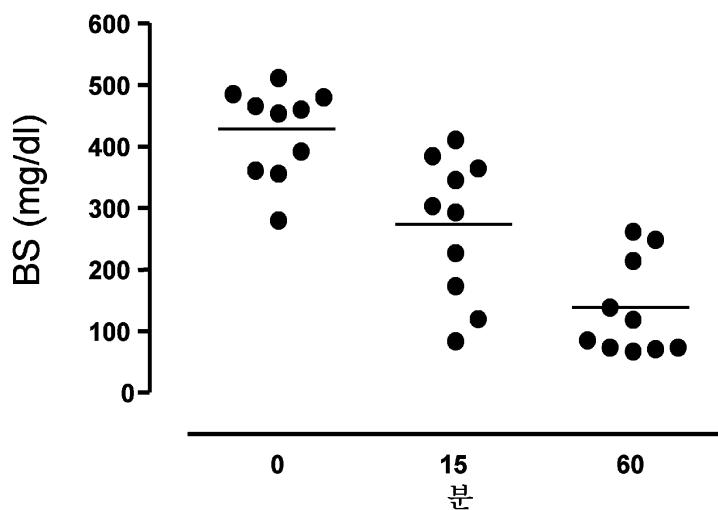
도면25



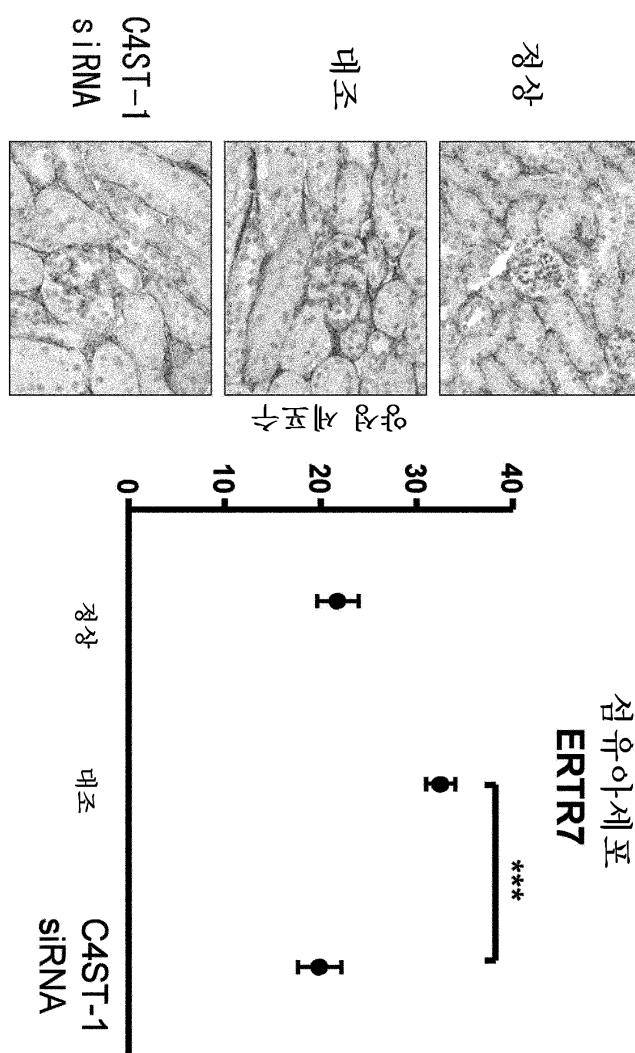
도면26



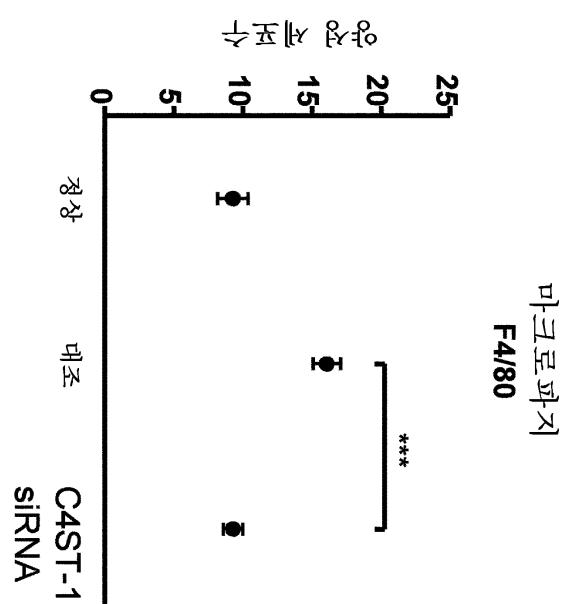
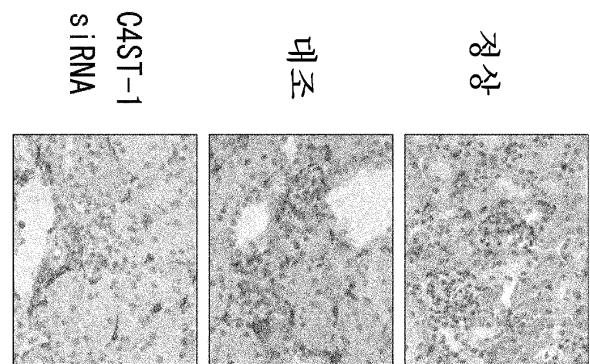
도면27



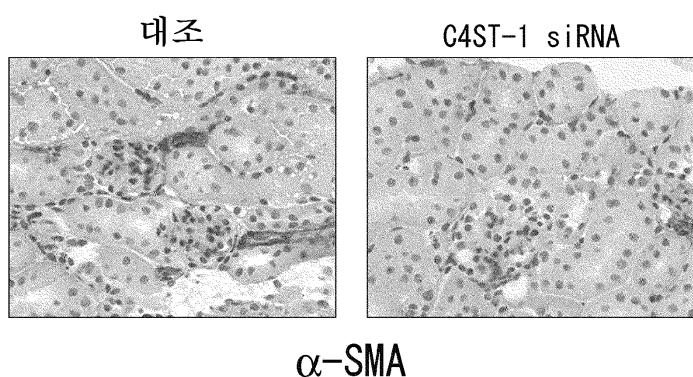
도면28



도면29

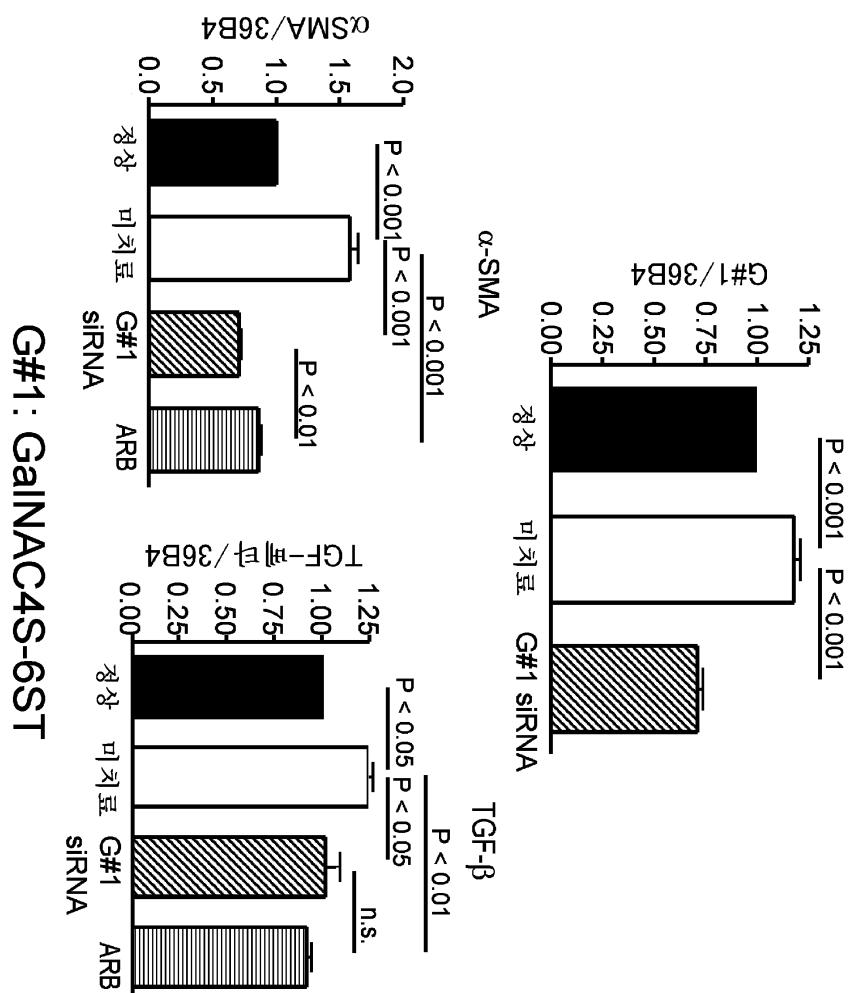


도면30



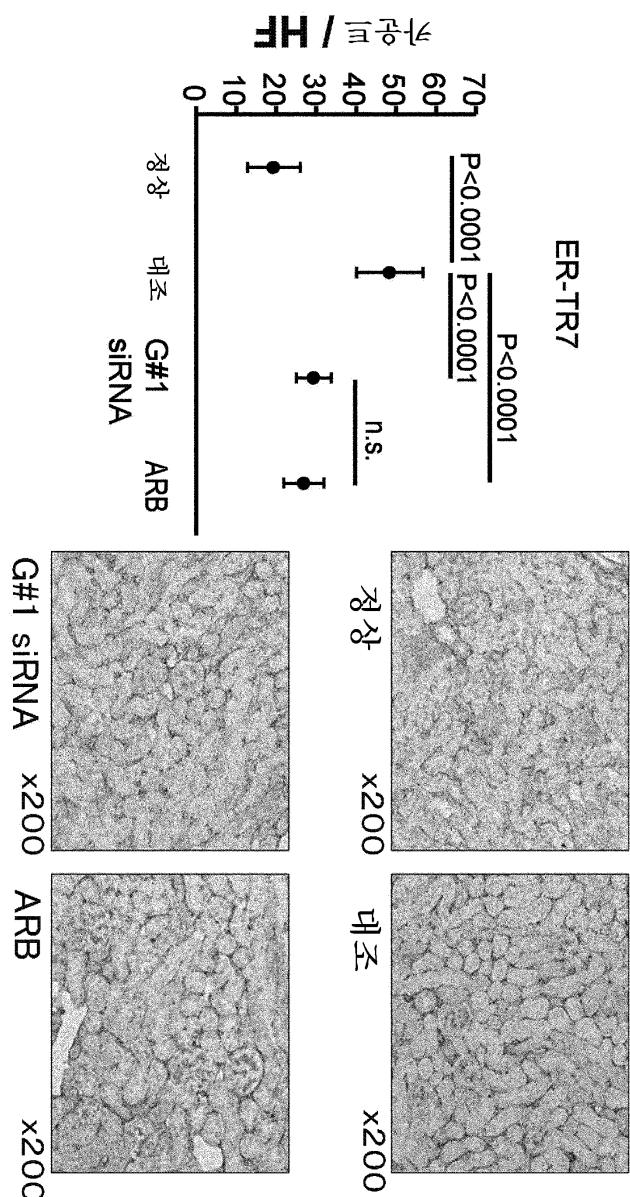
α -SMA

도면31

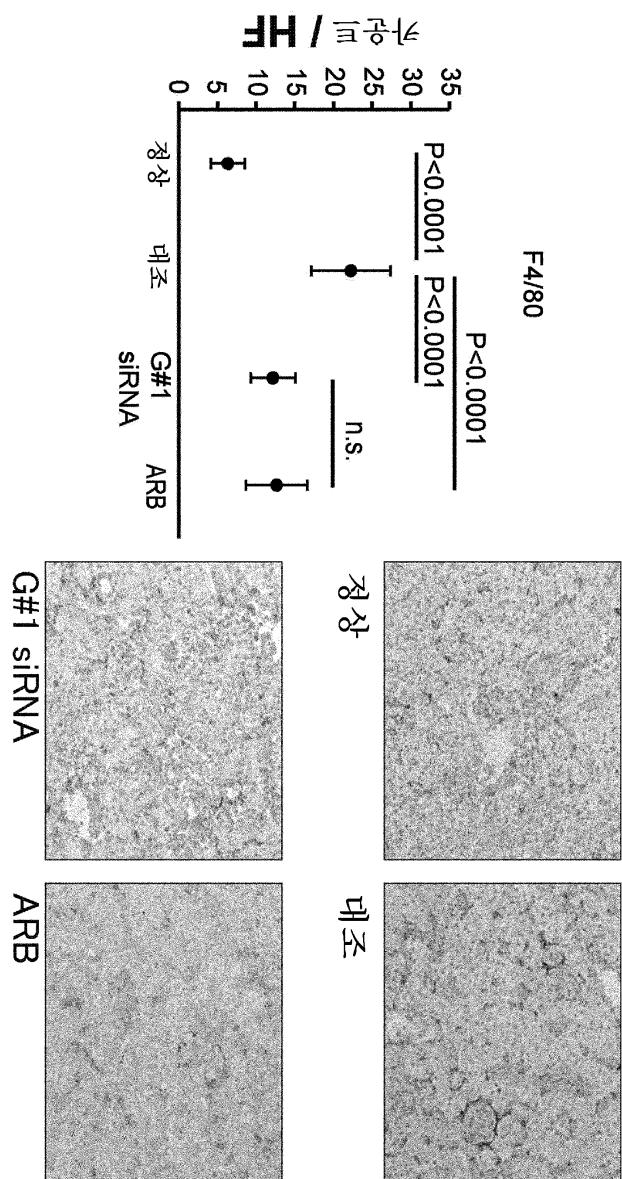


G#1: GalNAC4S-6ST

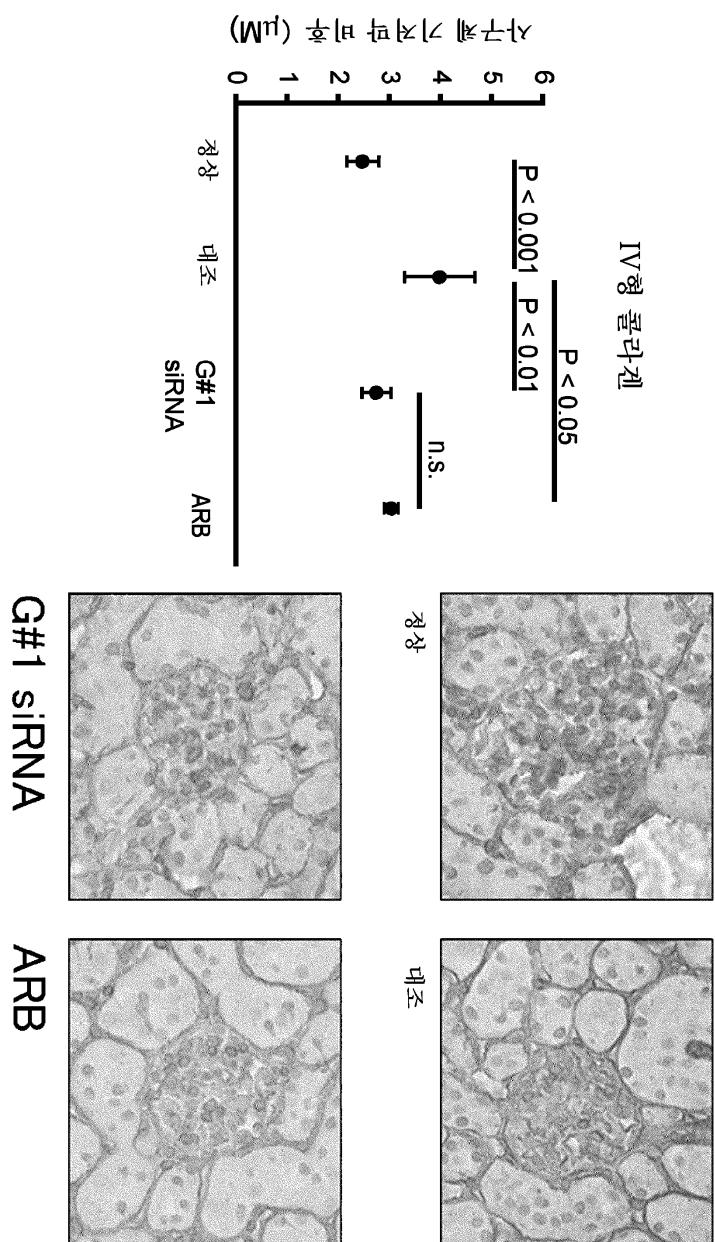
도면32



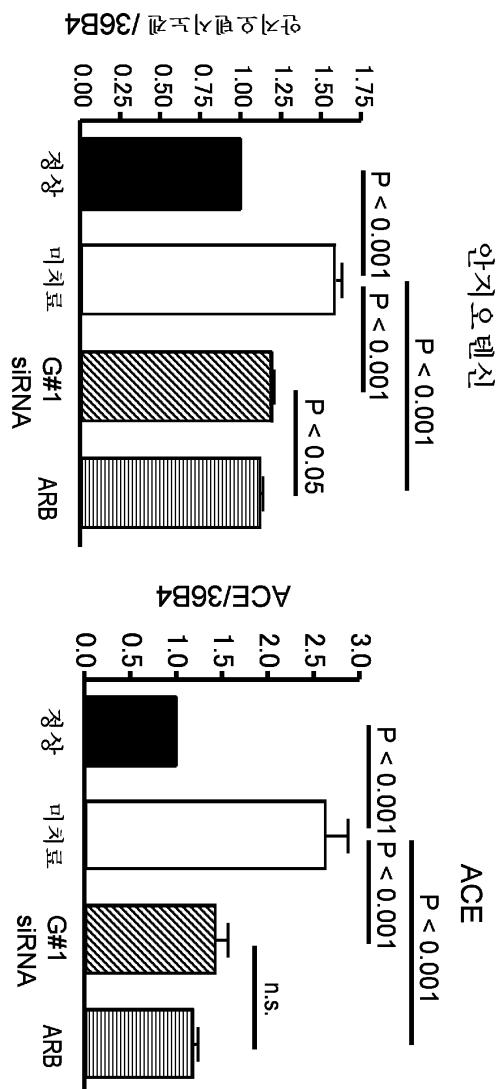
도면33



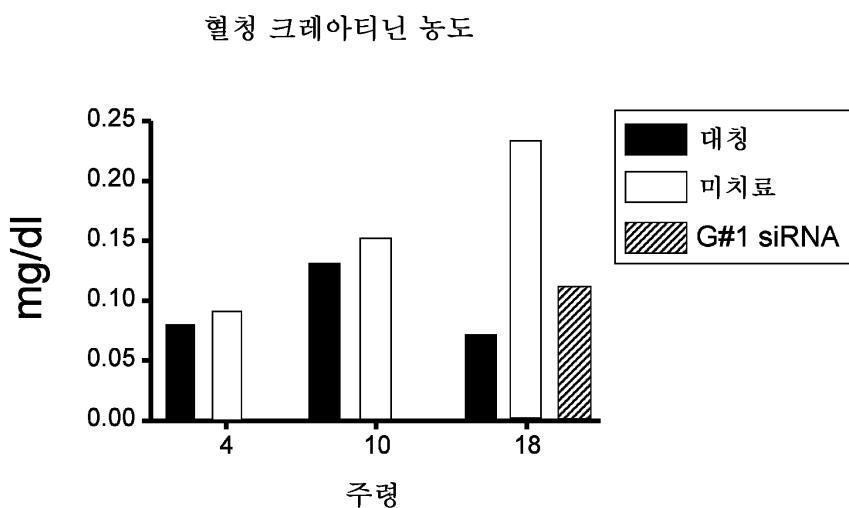
도면34



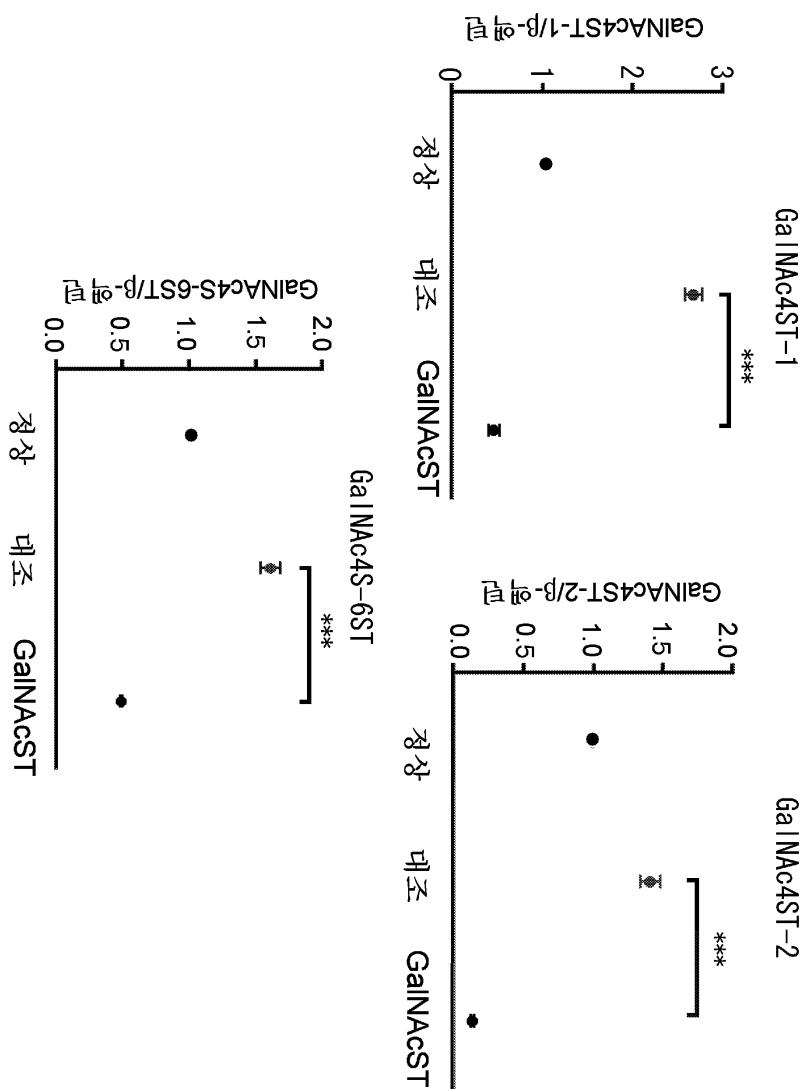
도면35



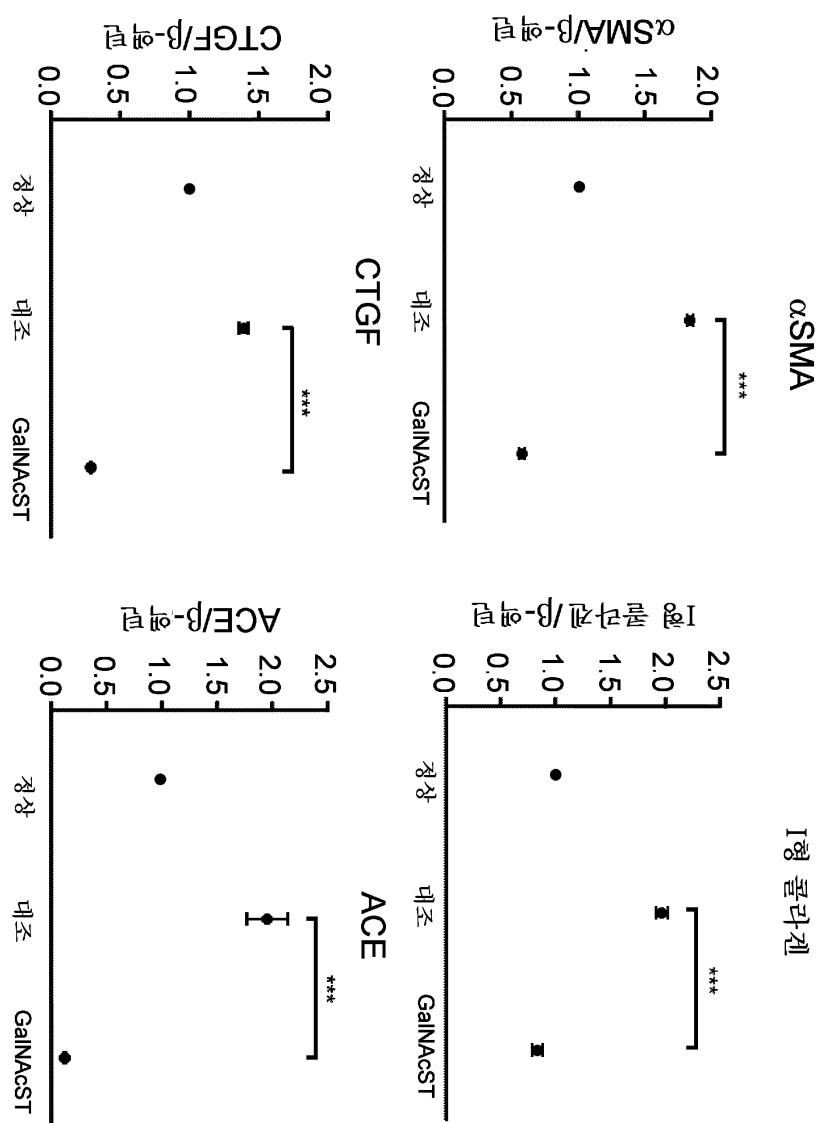
도면36



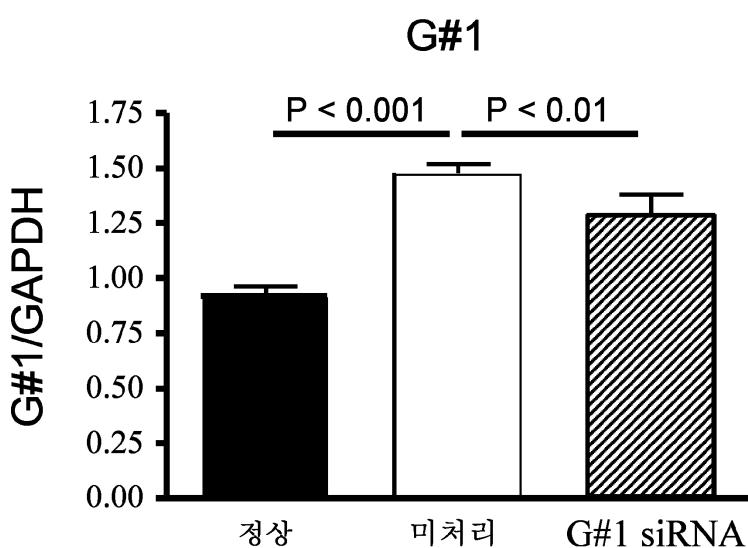
도면37



도면38

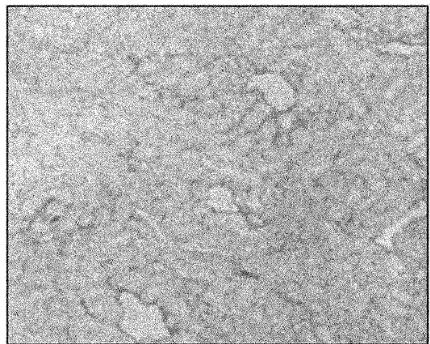


도면39

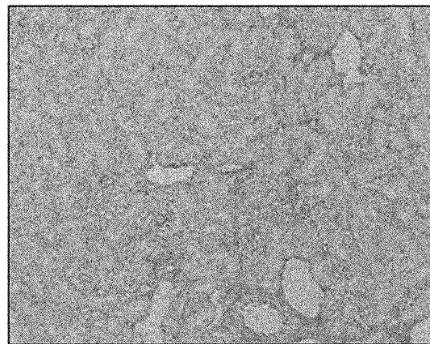


도면40

대조

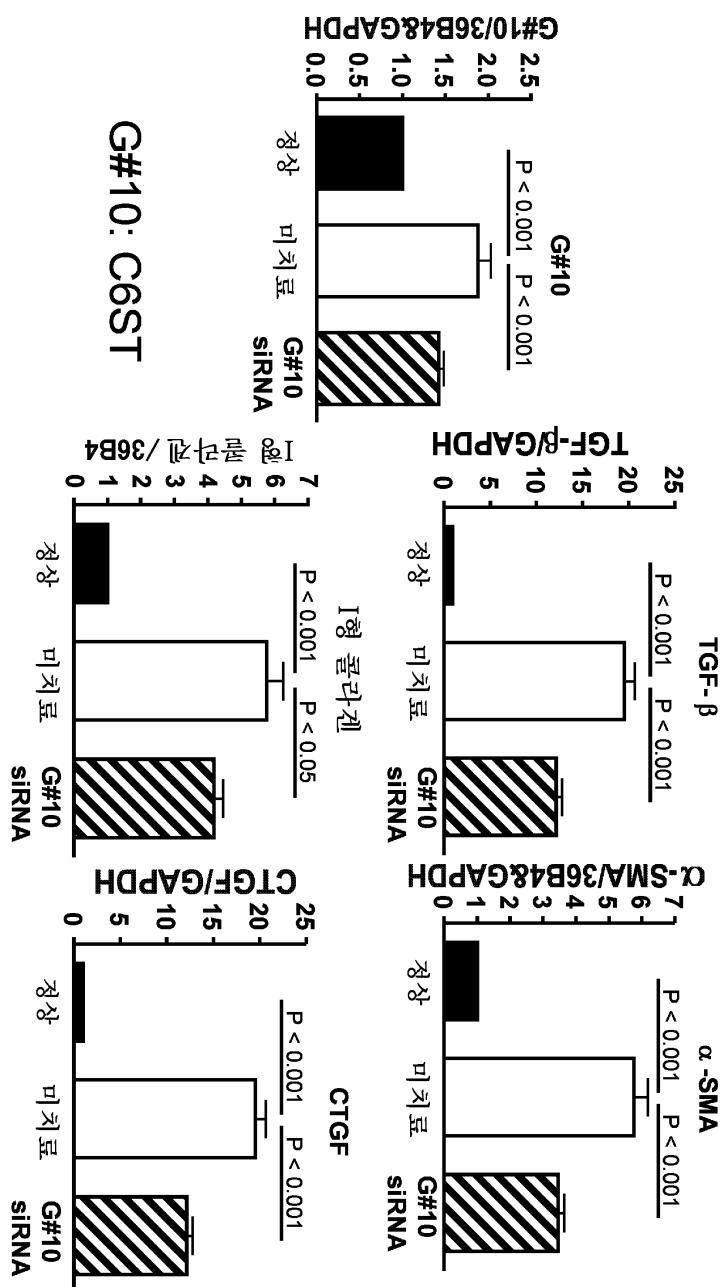


G#1 siRNA

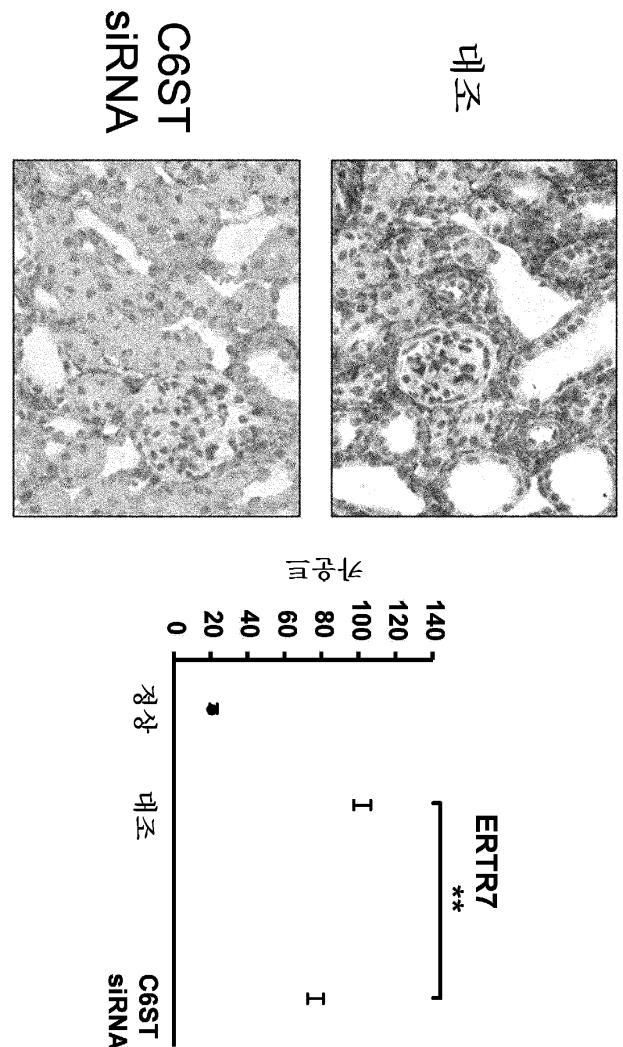


콜라겐 I

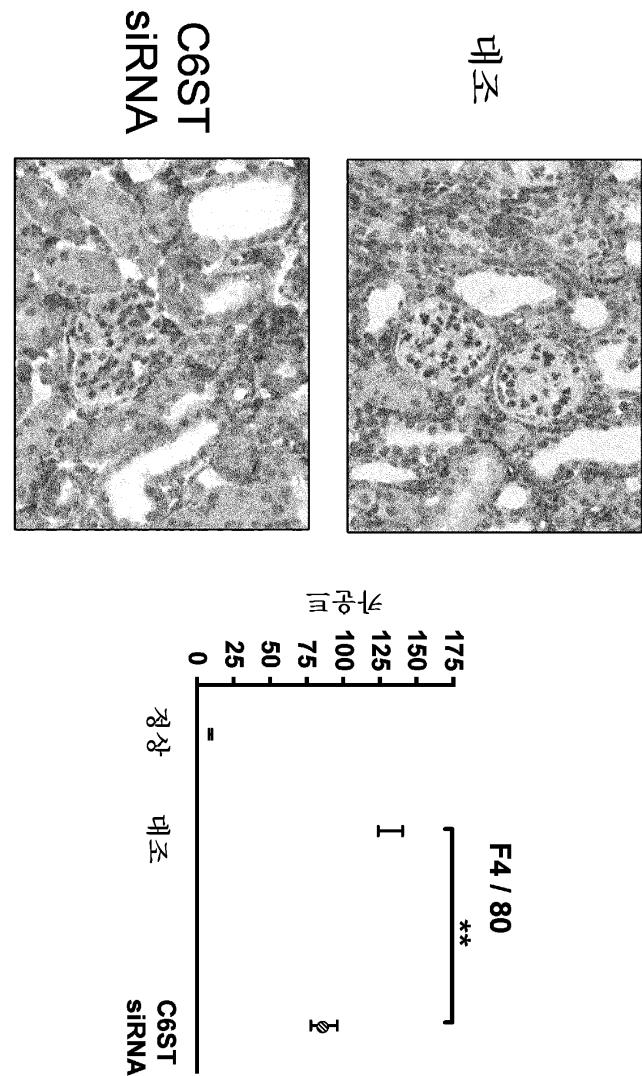
도면41



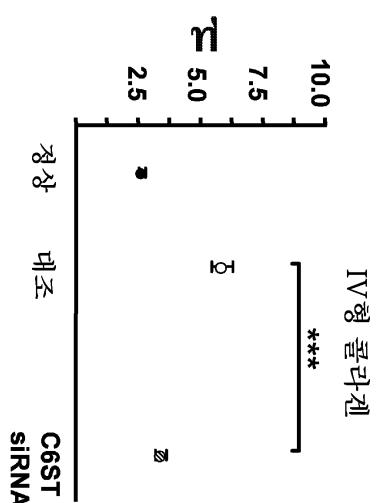
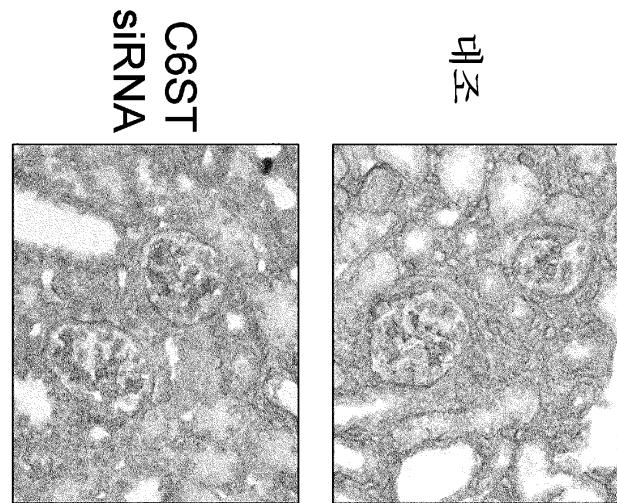
도면42



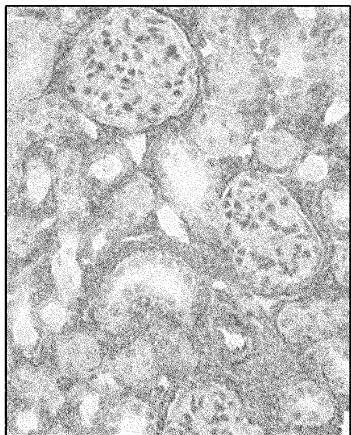
도면43



도면44

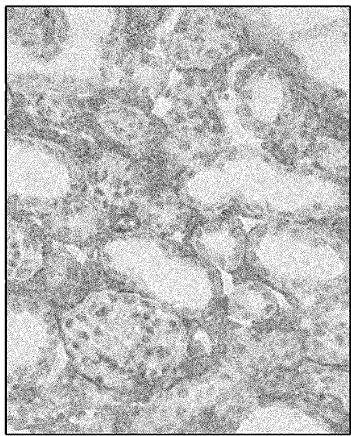


도면45



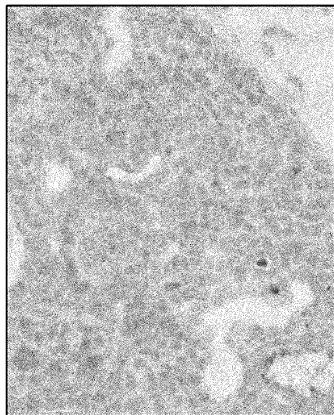
대조

α -SMA



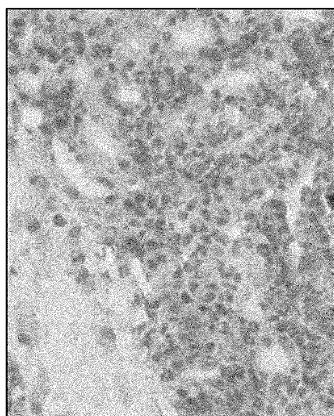
C6ST siRNA

도면46



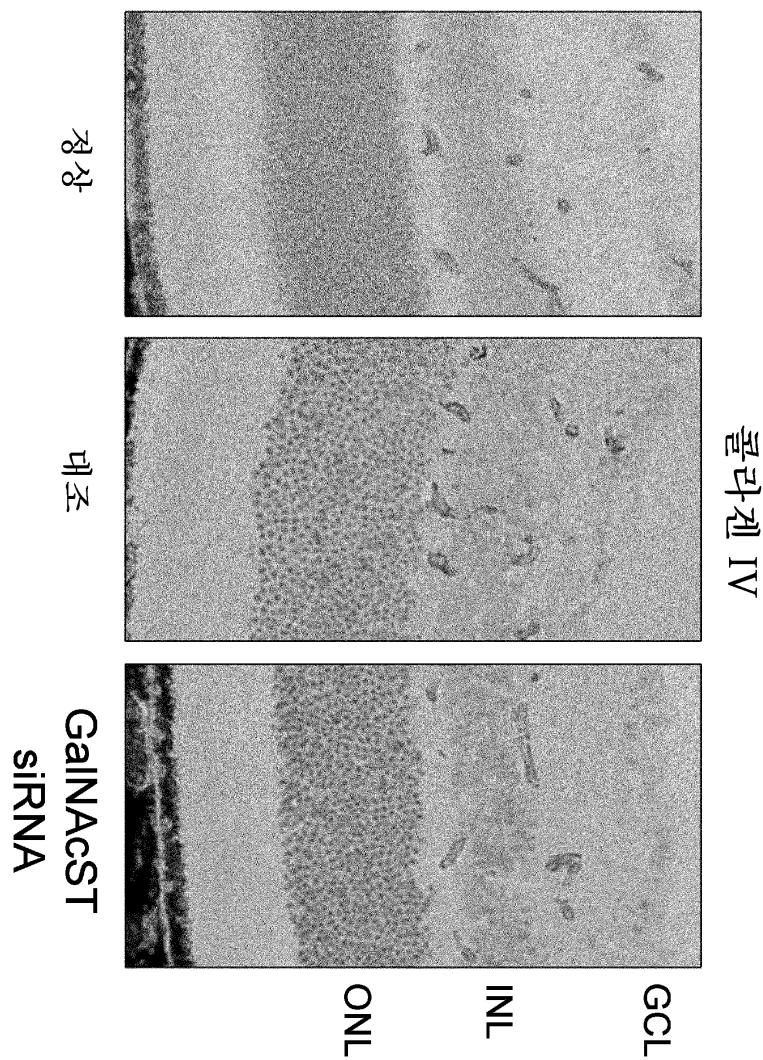
대조

ACE

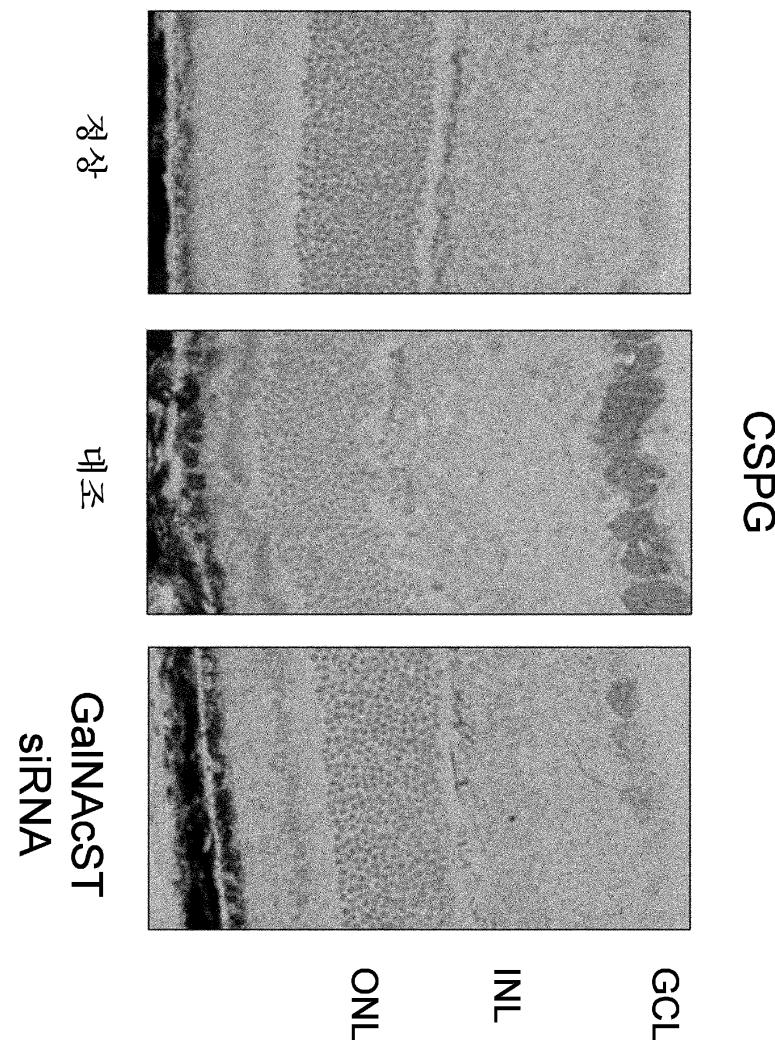


C6ST siRNA

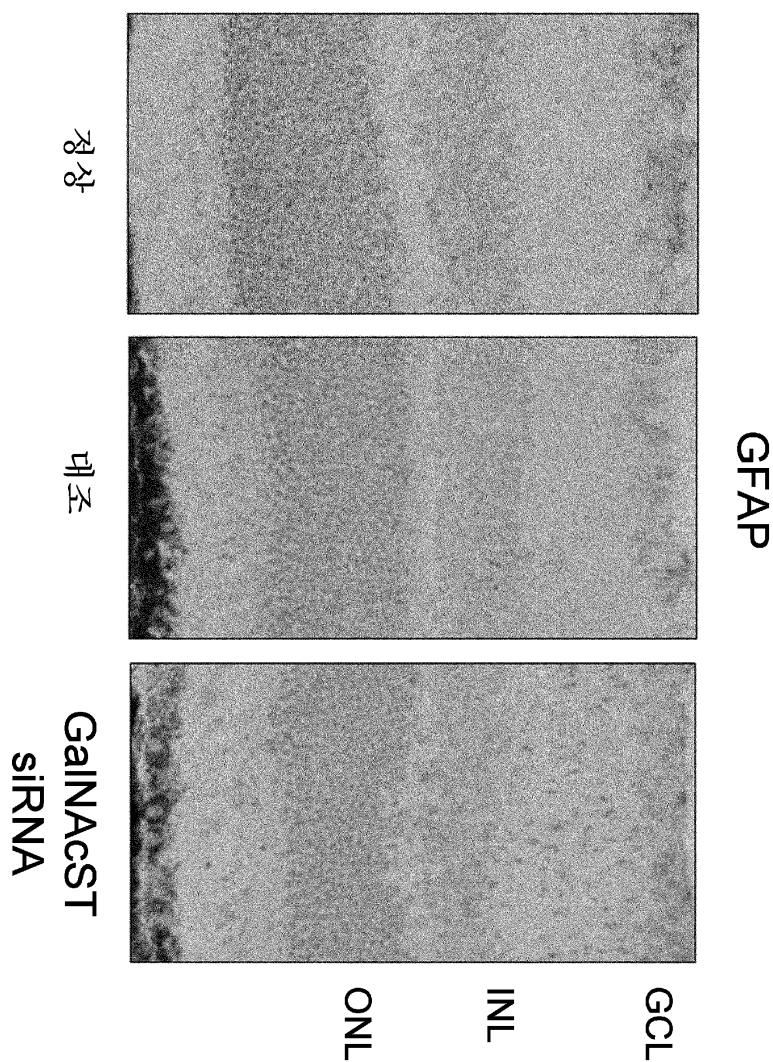
도면47



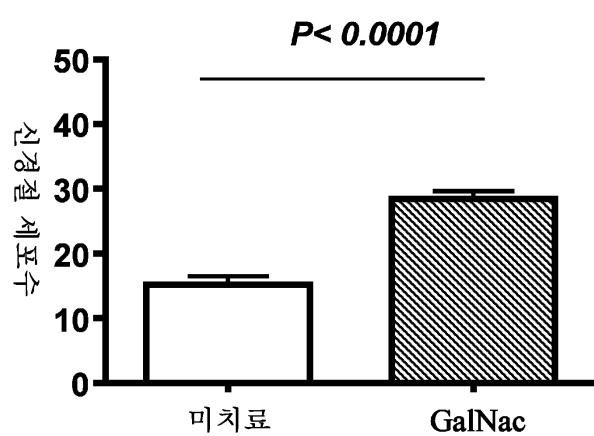
도면48



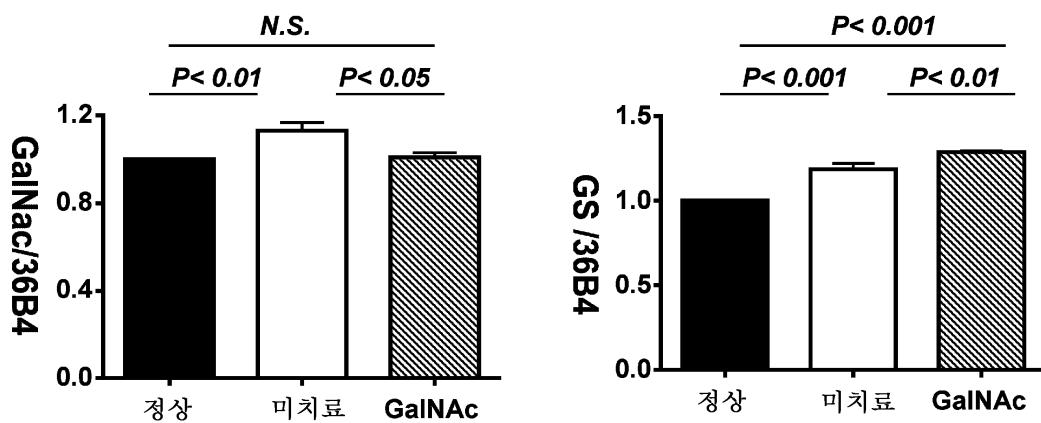
도면49



도면50

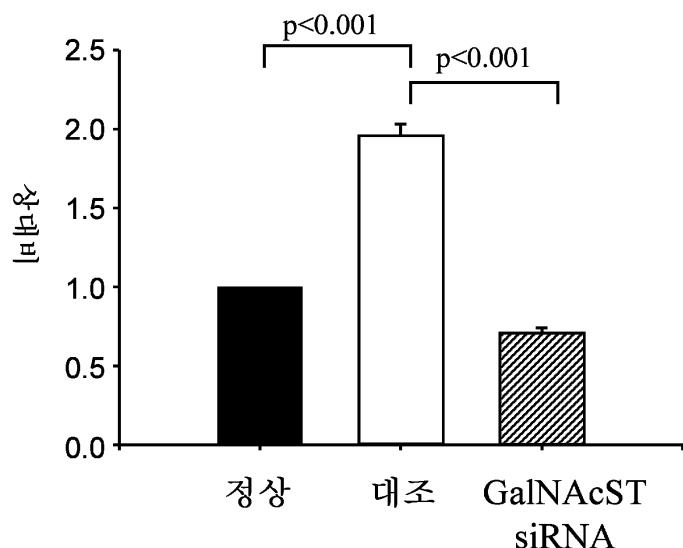


도면51

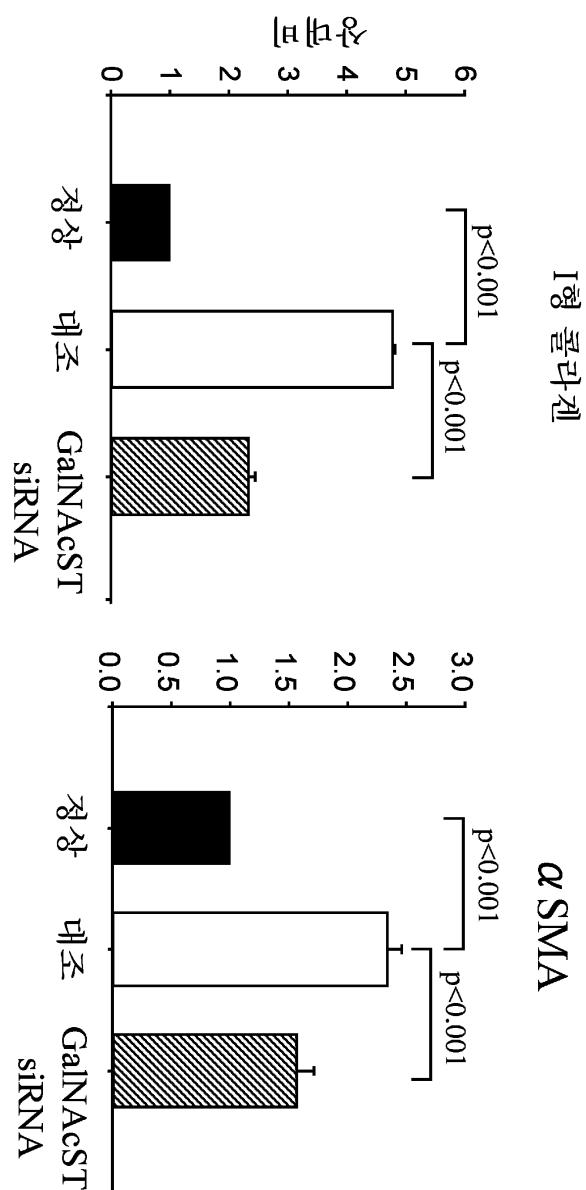


도면52

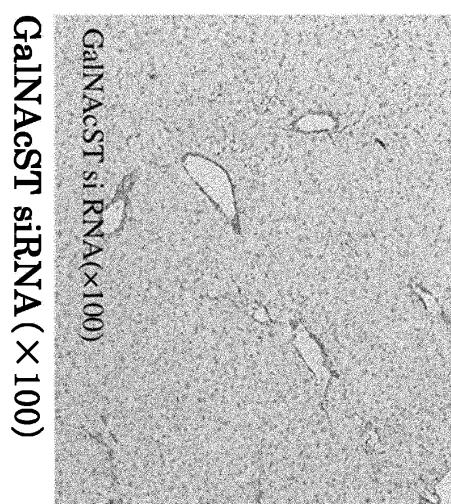
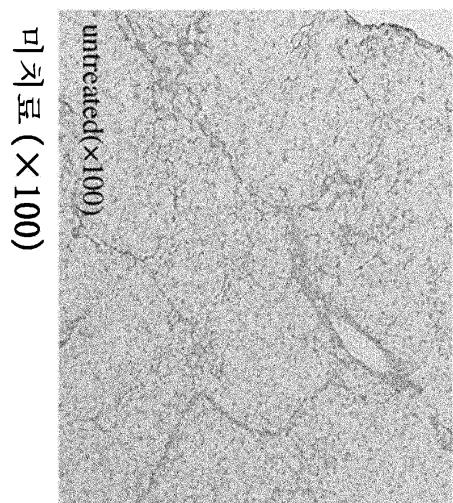
GalNAc4ST-6ST



도면53



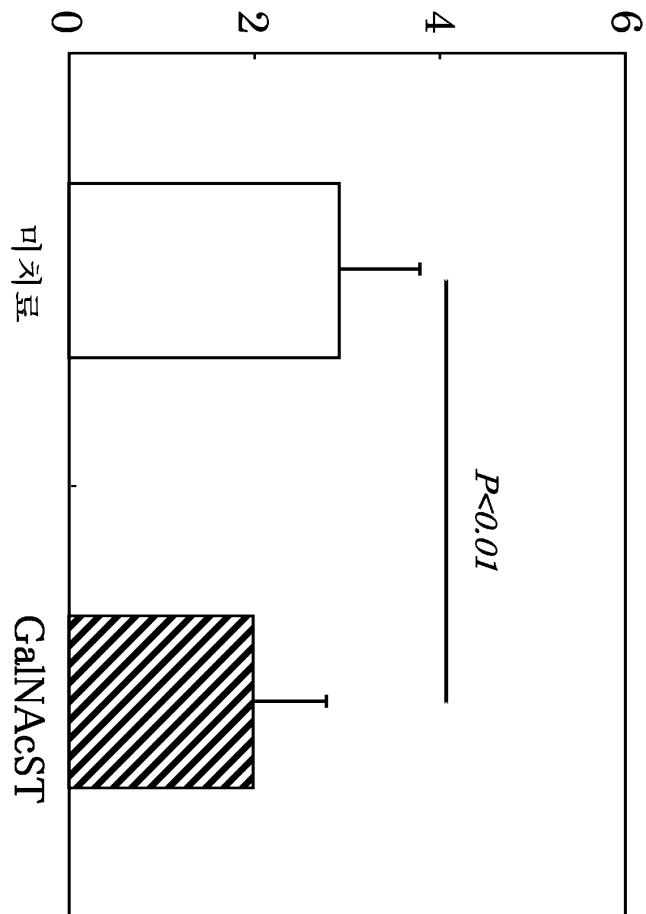
도면54



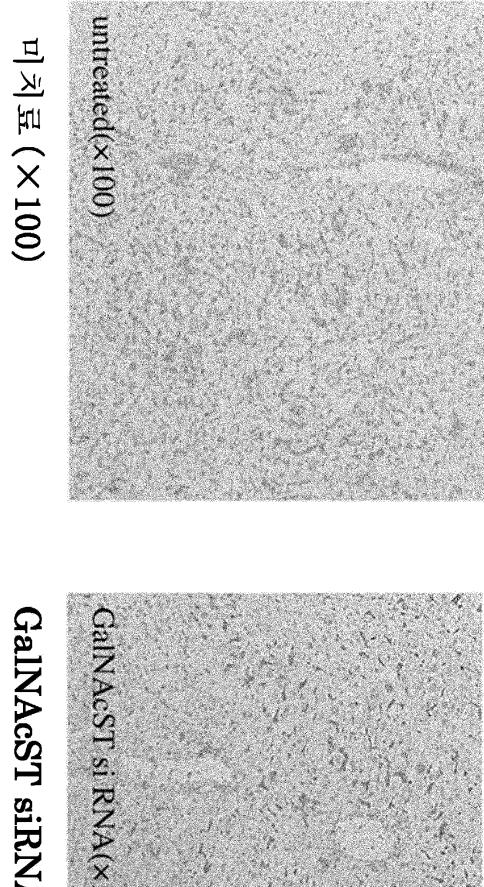
미경(×100)

GalNAcST siRNA(×100)

도면55



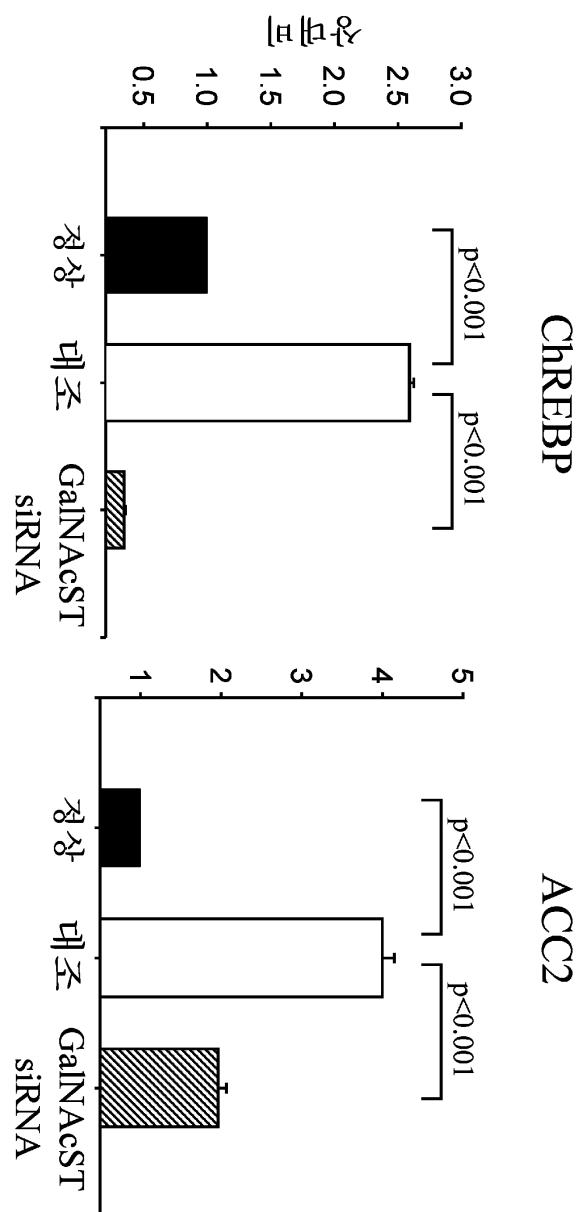
도면56



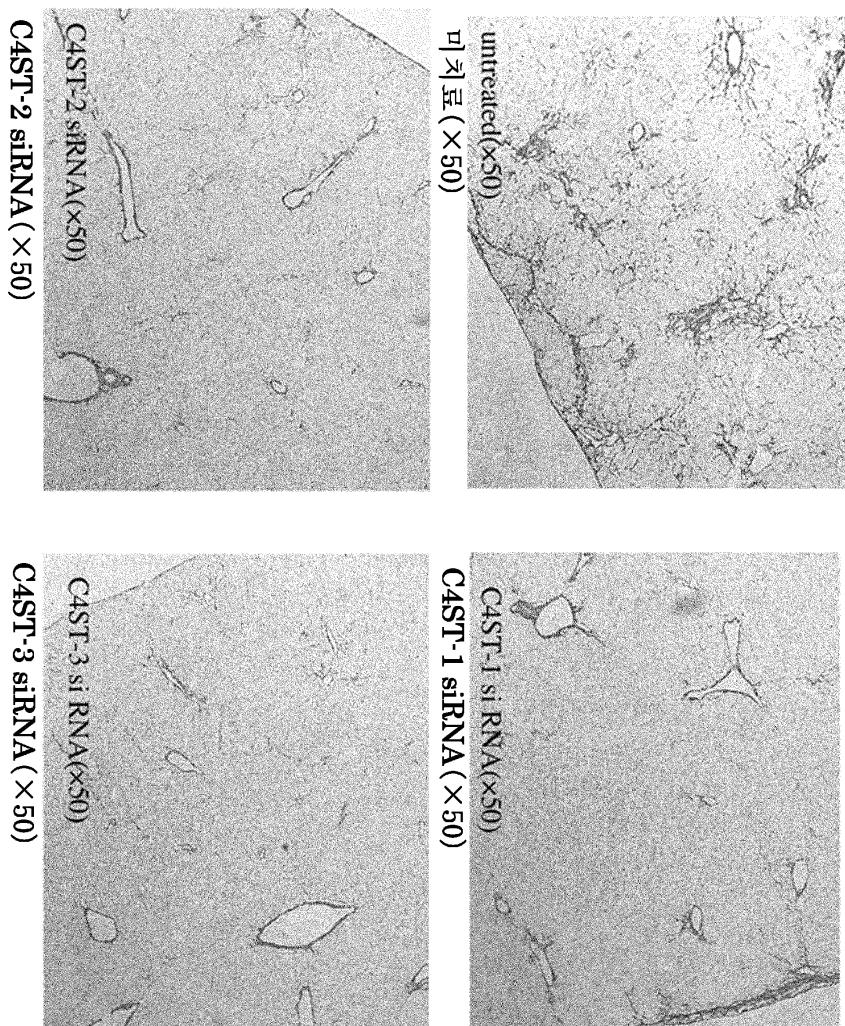
미치료 (×100)

GalNAcST siRNA(×100)

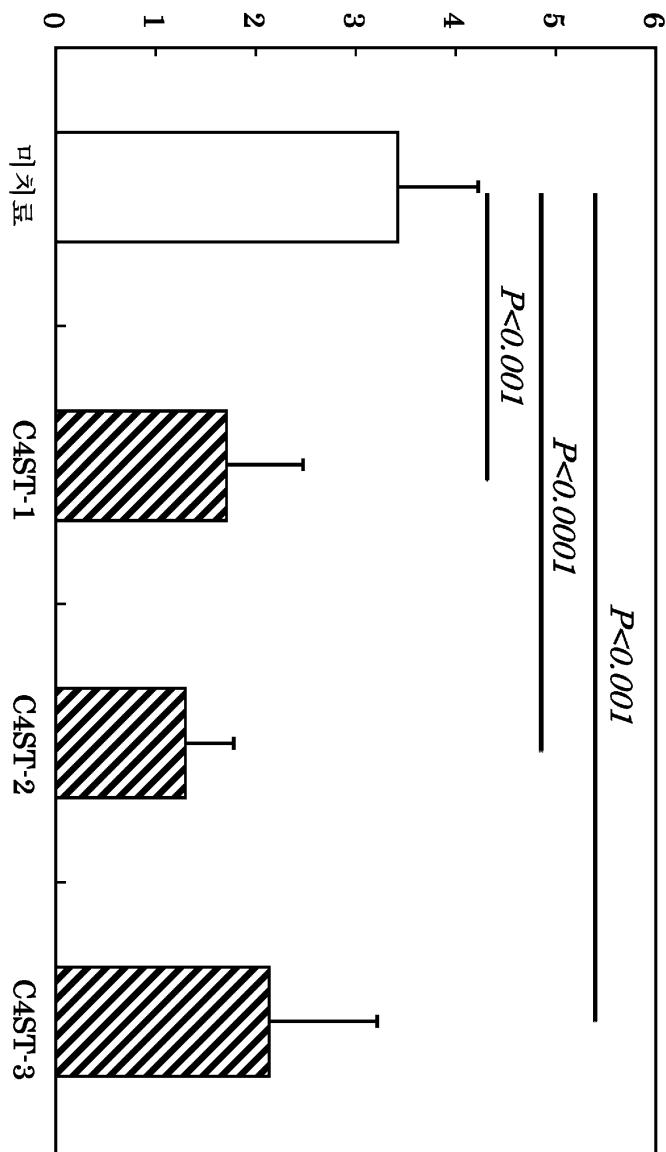
도면57



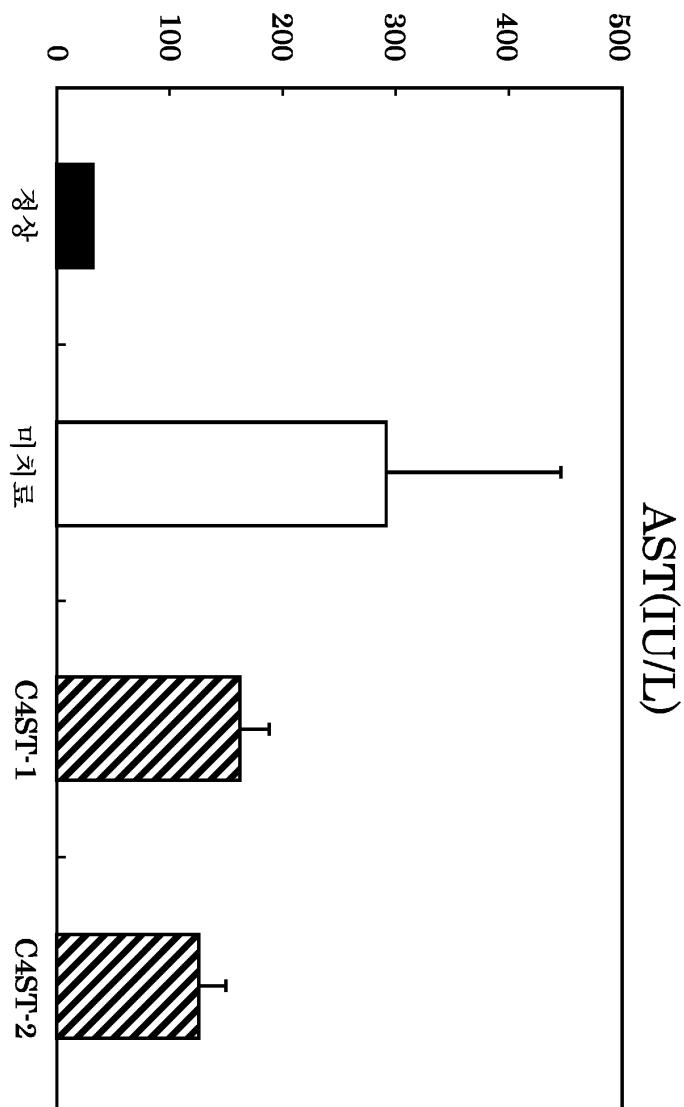
도면58



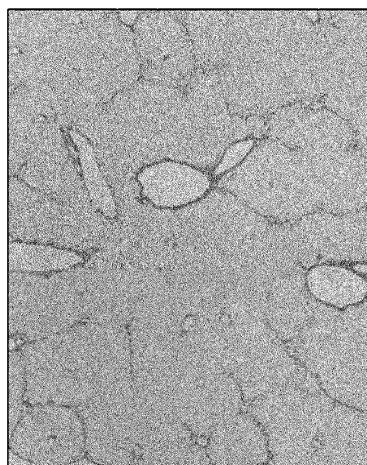
도면59



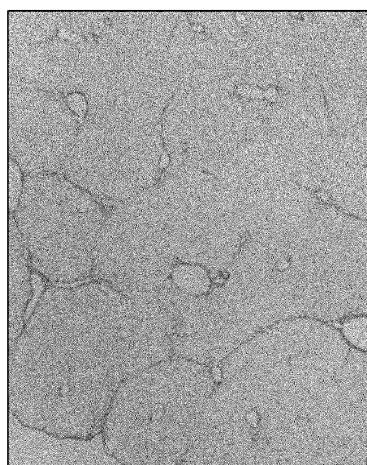
도면60



도면61

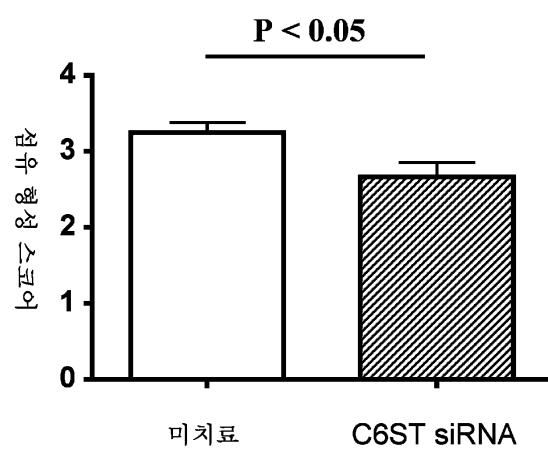


미 치료

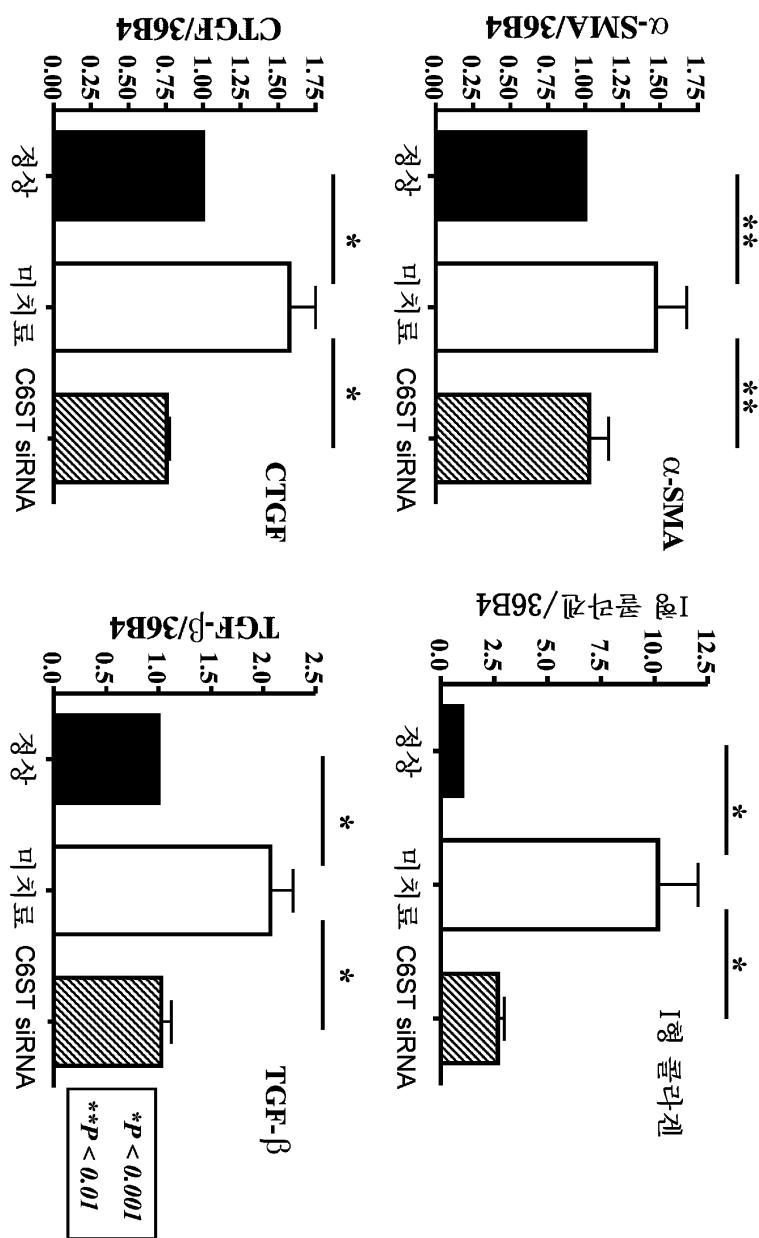


C6ST siRNA

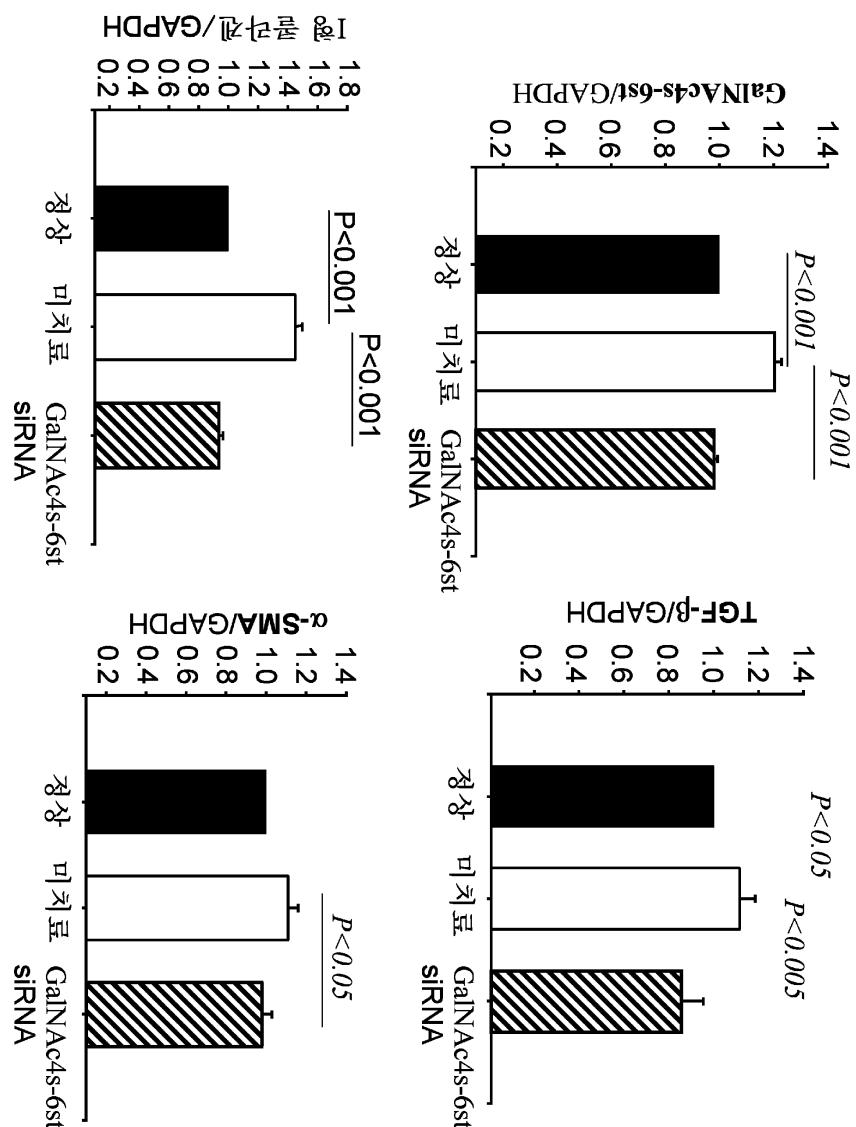
도면62



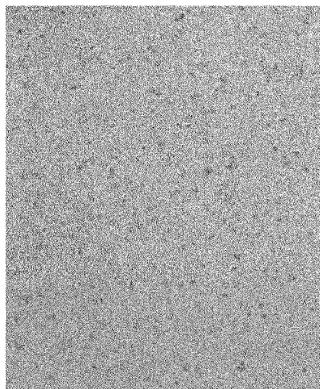
도면63



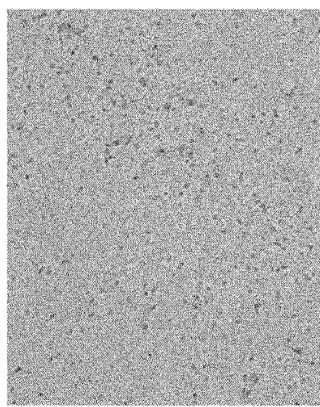
도면64



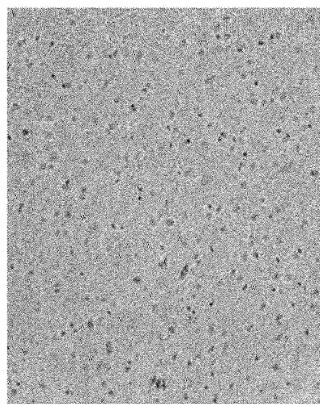
도면65



증상

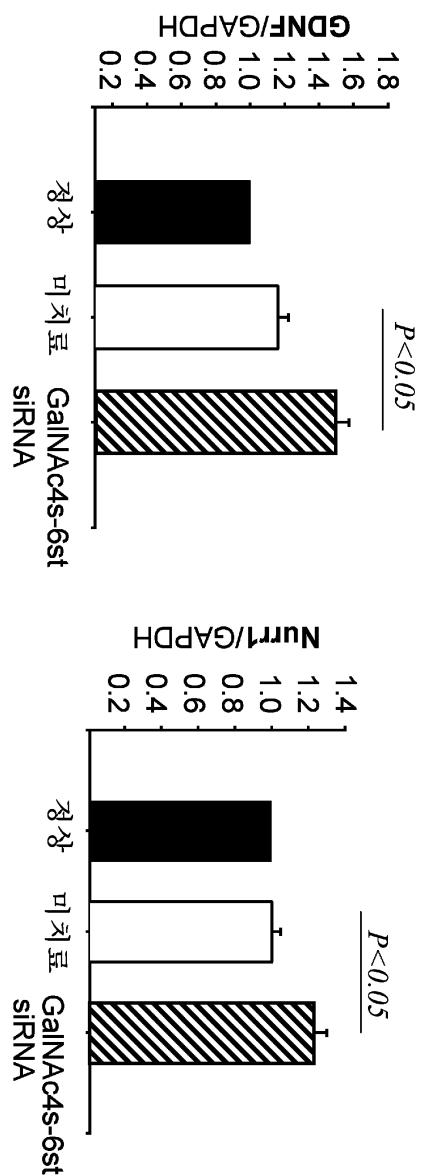


미치료

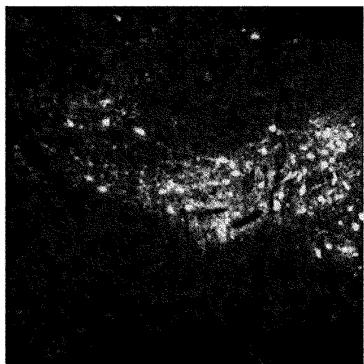


GalNAc4S-6ST siRNA

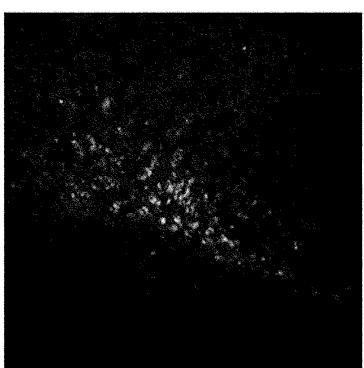
도면66



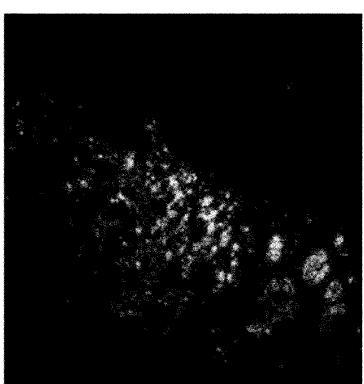
도면67



정상

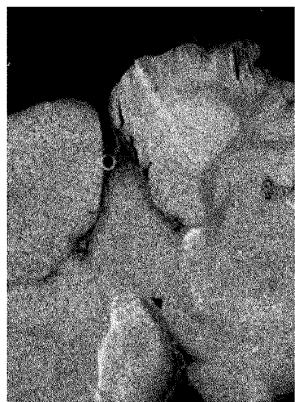


미 치료

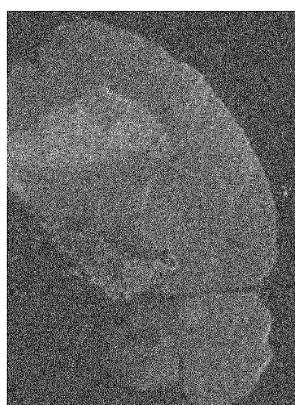


GalNAc 4S-6ST siRNA

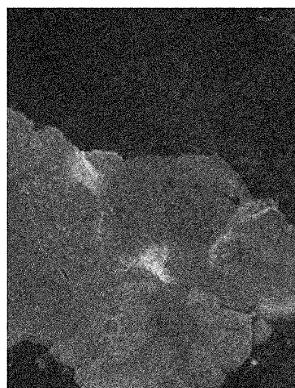
도면68



정상

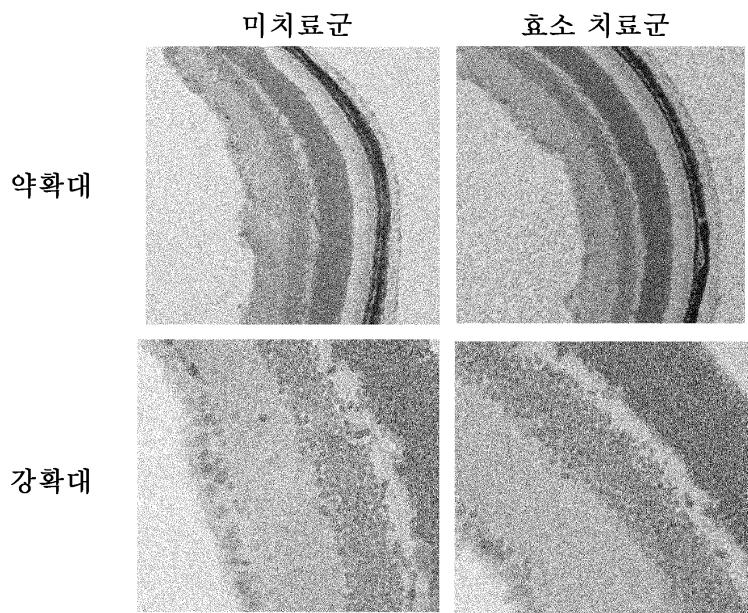


미치료

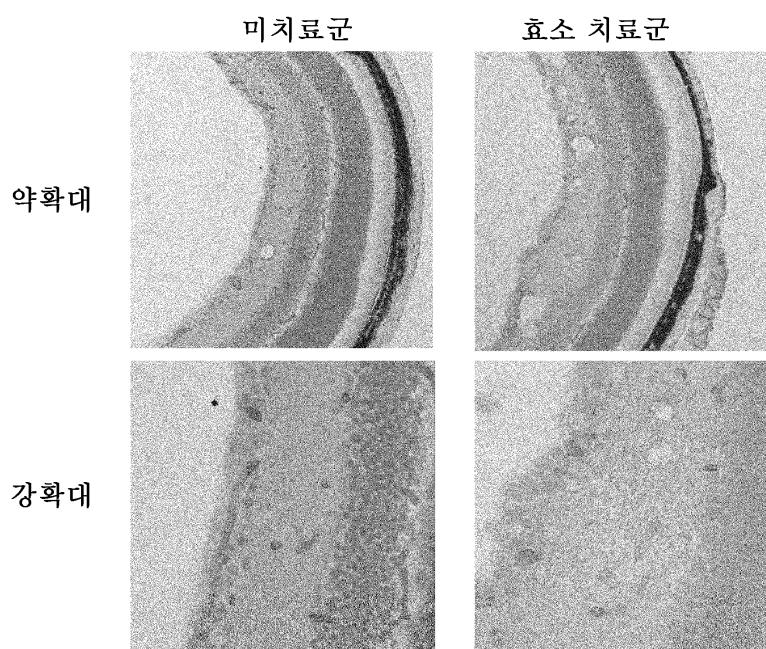


GalNAc ST siRNA

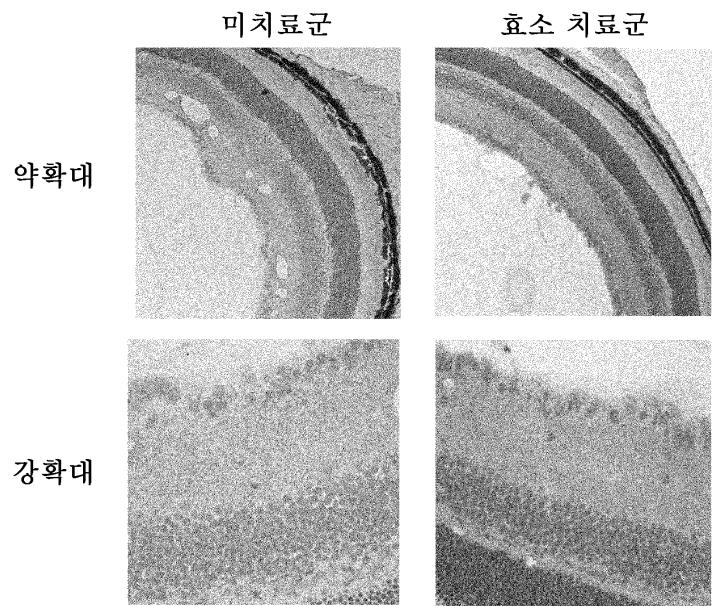
도면69



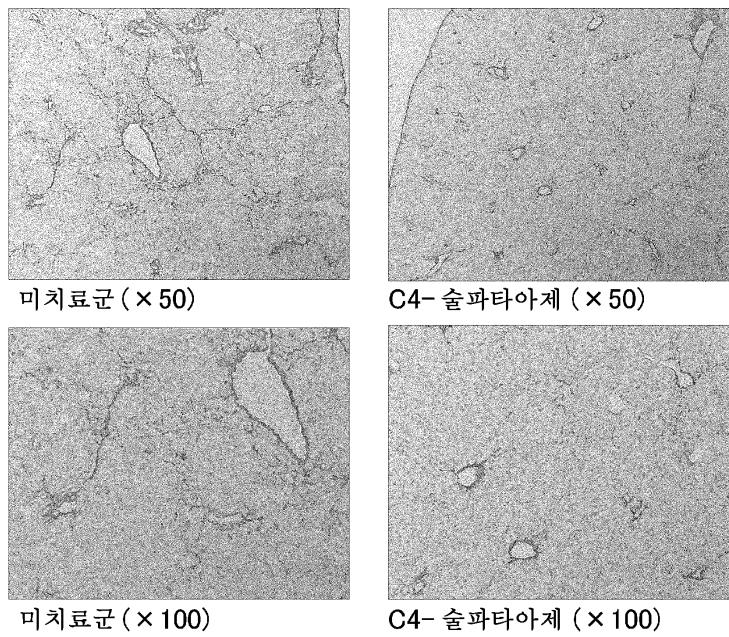
도면70



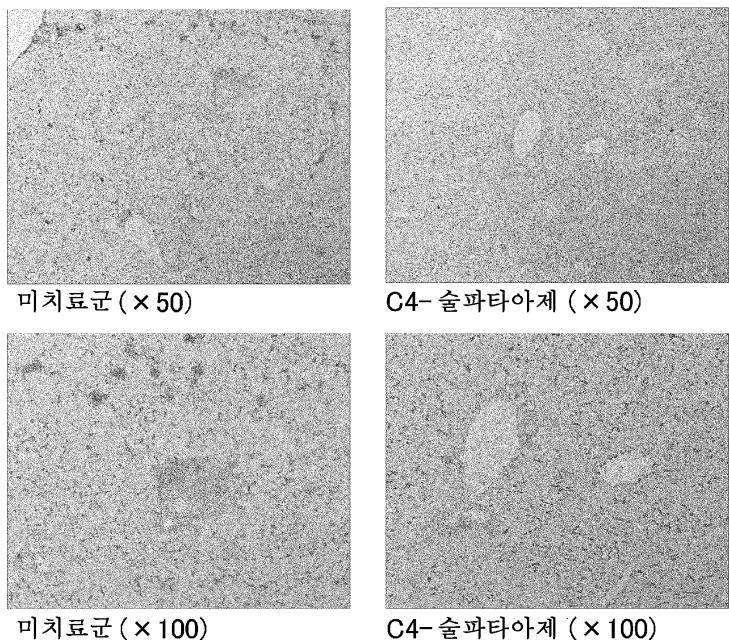
도면71



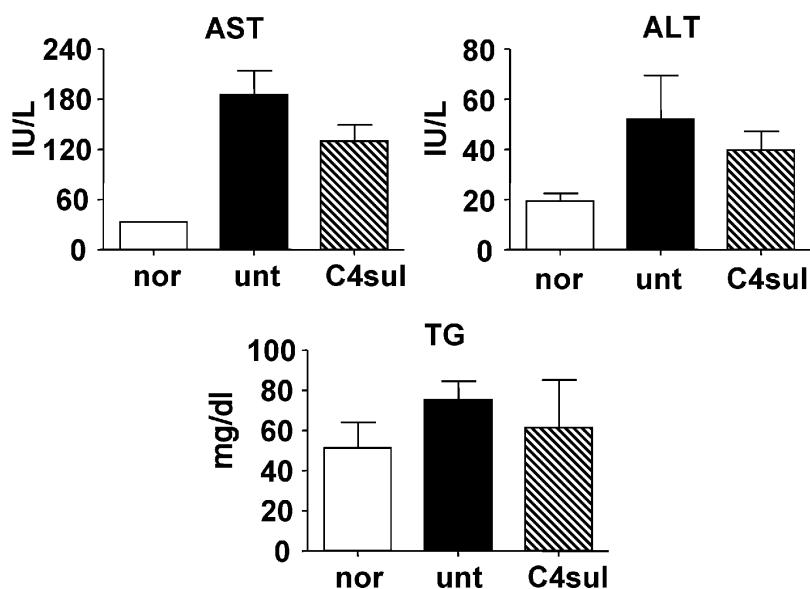
도면72



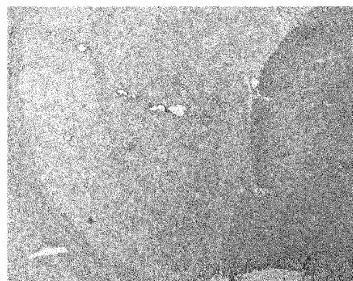
도면73



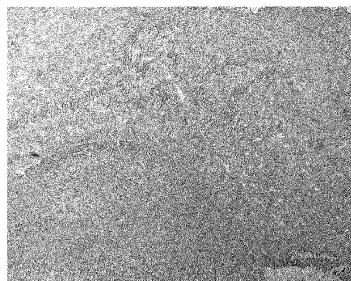
도면74



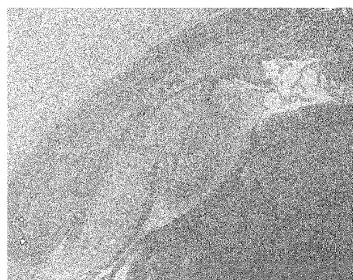
도면75



대조군



미치료군

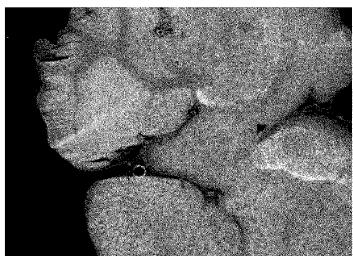


C4-술파타아제

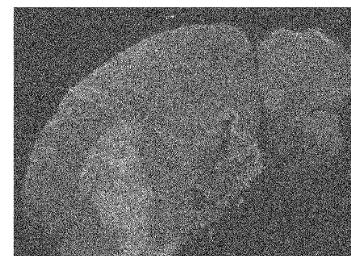


유전자 치료군

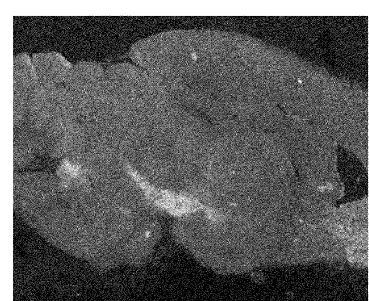
도면76



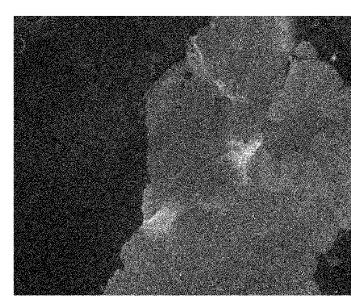
대조군



미치료군

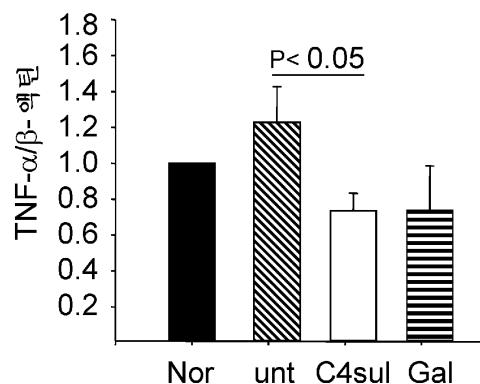


C4-술파타아제

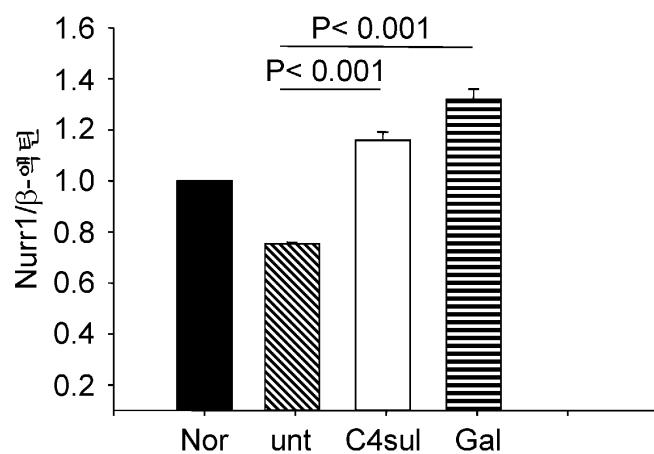


유전자 치료군

도면77



도면78



서 롤 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> STELIC INSTITUTE OF REGENERATIVE MEDICINE

STELIC INSTITUTE & CO.

<120> Sugar chain-related gene and use thereof

<130> S10-A0703P

<150> JP 2007-336518

<151> 2007-12-27

<160> 98

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 9120

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 1

tgtatatctg agtatctgtg tatgtgcata tatgtgtgc tatgtgtatg tgtgggttt	60
tgcatgtgtc tctgtgtta catgtctgtg tgtctgtg tgtgtctgt tatgtgttt	120
tacatgtgtg tgtgtgttc tgtgtggacg catgtgtatg tgtctccgtg tgcctgcata	180
tgttttgt tatgtgtgt ggcatgagta catcatggta tacatgtaga aattgagaga	240
gactctggg tgggttctc atctcccacc atatctgaag taaatgtctt attcacacca	300
ctgtgcacat cagaaagcta gccttgacct ccaaggaact ctgtctgt ctcctgtt	360
atttaggtt cctggggttt ataaggctat gctgctgcat atggcttcac ttgggttctg	420
gggatttcaa cttaggtcct cacagttta gggcaagcat ttatttact gaacaatctc	480
ccatgatccc tagagtttat tgtaggcaac ttaacctta gtcgtcatig agatttagca	540
ttgatttcag ttccagttgtt attctgatgt tgagcgctac agcagaggtt cccagggact	600
gctgatttc tggggccatg aatcctctag tgattaataa attcatcat aatgttctgt	660
ttatttctaa atgtccagac aactctaatt tcaaattaat ctcatctaa acagcacagg	720
ataaaagtta cagattgtcc tatcttcatt catgtgatgc ctcaaatcag atgttaatc	780
cttagtcag ttatttgcata aacggaaacct aattacacac actcgcatgc gcgtgcgcgc	840
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac actttagat ttgcccacac	900
agctgcttaa gcaatttggaa gcaaatgttag aaatattatg aaatttcaca taaaaatggg	960
tttcctctg tcttcttgag aaatgtgtga gtttcaatat gacagtaatc ttctgggtt	1020
ggactataac cacttgaacc cctgaggtac taagtgtgtt cctactacgt gcctggattc	1080
catcatttc ctacttat aagcttctcc atcctgtaga tcagcactgt gtaatggagt	1140
aacacaagtc attgaatcat gcaatcattt aatcaatttta attggcactt ctgataagag	1200
aagtggcac atatttagtt gtgtttgcag cctgtgtat gtcattttc tctatata	1260
cttaagatt ttttctttt ttccatttac gggggggggg ttattccatt taatttacat	1320
gcttaatgac atataatttgcatcatcaggt gttccttct ttagagttaa cttcttttag	1380
gaccattgtt tataatggat gtatcatc cctaaattaa atcagccatt gtctacttaa	1440
cacaccagtt tctctgatgt ccctctggct cttcccttc tgaggttcta gttataggaa	1500
agtctggcat ttgtatgttt ttccatggct tcgtgggcctc tgatcatcca cttacagtgt	1560
actttcatct ctgtctaca aactgcata catctattga tctgcgttca aggctactac	1620
atttcatgc aattccactt tgctgttaaa cctttctat gatccgttt tataacttata	1680
aacaatccaa gtgtgtact ctgggtat aaatgttctg tatttcacag gtcttaactt	1740
ctttcagac tatacaaaga aagattttctt atttttta tttgttgtat gcattttatg	1800

catttagcac tgggatttcc ataacaggca gttaagatca ttgaatacat actttgttg	1860
gtaaatataa tacggcttat ttgattctcc cccttaaaat gctccatct tctcagtcat	1920
gtcaggttgc tatggagtcc accctgagca ccatgagtgt gatgctgtac agacactcct	1980
gatatgcctt ctgttatttg aactccacct gcaagtttc attcaagcat agctcctaatt	2040
cccattcagt gtgcactttt ctaattgtat ttgctggtag agagctatata gtaagcatgg	2100
cttagcatca aattgaactt ttcctctcc ctagtttttcc tccagtatata tcttcctcac	2160
cttcatcaga ttttgggtc ttgagatcta aacccatgt ttacaatttg cagagatacc	2220
aggatctcta tcagacttga tgtgtctcca tgtaattcta gtatcagcct ttcataagat	2280
aattgcaaaa tatagaaccc cccctcttc cttttgacta ttacagcttt gtttctcc	2340
caagttataa cagatgtatg caaatcaact aagaaaagca aacactgaat gggataaggaa	2400
gctatactca aaagaaaagct tgcagttgga gttcaataa cacaagtgg accaagagta	2460
tctgcacagc atcagactca ctgtgctcag gatggaatcc atagcaaccc cccataactg	2520
agaggatgtg agccctttt aaagggaaaa tcaaataagc agtatttatata taaccacatg	2580
atgtgtatata tcaatgtaga ttggctgca ccgaagttat gattttagta atgagtttt	2640
ctccttgggt tttttctgg accaccctgg ttttcctttt aaaaatagta aaatagcagc	2700
aatgactgct tcttttaaaa tctgaacaac acagagcaact tcagcatctt ttcaacctat	2760
ctaaatccat ttagacccctg cactgacttg ctgtgagctt ttgtgtcaca actatttttg	2820
tagctaaaca ccttgaattt tcaaagctgc tctggactgt gtcttcctttt agaattaaac	2880
ttgctaaaga tattggactc tgagatgtttt attcaccact ttctataaaa gagtaaggat	2940
gacaatgctt tgtagtagaa aagattgcat acgagggtac cagcatgtca ttatgtcccc	3000
agcagtcagt aaagtaagga tccagtgtatg gtagagttat tatgtccatt atgaaactaa	3060
tgtaaatgtt tatcaatgac tagaatggct gtaatcacca atccttagac aagtgtgagt	3120
aacatcatgc tctttctta taataataga tagtcacaca caccatggc ttaaacat	3180
cattttgatt tttctctttt tgcgtgtttt ttgcgtaccc tactccactt acctgagcc	3240
tcagctaggg ctccccaag acggcagtca cagtagtgc gaggataattt ctcatatggaa	3300
gacctgaagc agaataaccc tcttccaagg aaacccaaaat cctagtcacat atcttctcca	3360
ctctttggttt atttattttt atttcttattt ctatttgcc atttaagaat ttttaactc	3420
ttttctgtttt tcttataatatttctt ttacaactttt tgatattctt tatcaaataatgaa	3480
tttatcccat tgccttcct cctgcagctt tctgtgagttt tagcatggat tatttagat	3540

acaattggaa attatgaagg tcgaataaaa gttctctaag agccaggacc tcactagcct	3600
agtttagttgc ttatgttcta atataaggca tggtttatct cctactgtat ggccttaaa	3660
tccactagac atctgttggc ttccaacagc atacaattgc tgctattgtat tgtttagta	3720
tatatittta tgaaacacta tattctgatt ggtgttcatt ctccatgtat agggaaagat	3780
tttattgcct gctcaaattc aagtcagtcc ttttgagta gacaaagggtt gtccaatctt	3840
gctaaaccct tttttttt gcttgggaa tttctttagg gaaaattctc aaccatgaac	3900
caaggctaga gattgataat agctgaaggc agagtagcca gtcttagtaa gggatgagag	3960
aaagactgac caaagactga ataggaaatg gttgatagca ttcattggga ctagacaata	4020
aagtttagcta ccccaacatg ggcaaatgaa gaaaatgggg agagtcatat ggataittag	4080
ggaggagaag aaaggaaggg gtgagttga agtatggaag agccttaaa gcattgtaa	4140
gattgttaag aaaaagctt tgagagacag agtattacct gccttcaaatt cccttcaatt	4200
actgtcccta caagacatac ctgtgcttag ctgctttgg accacaaggg ggcctaagag	4260
catgtttgtc tccctgtctt tatacaggct tctcatctgt atttctcaaa cgtaaataca	4320
aatgggggag ataacaaatg atatttctaa gtggtacaca ggtatgagaa ctgcacacaa	4380
tctattata tgtataatgg ccagagctc cagcaggaa cagaggaagc ctaggttaact	4440
cctgctccag agcatgtctg tatggagacc tcagttcagc aactatgaaa tctgtgttca	4500
aagggtcatc actggaaaca gtttctggaa tagcagacat attcattctc tctctctc	4560
tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctgtctg tctctgtctc	4620
tctctgtctg tctgtctgc tctcccttct gtcagggtt tgcatacatg ggctggaaat	4680
tctatctcc ctgcctgctg tctttgggtct ctcctaaatg tggtgccatg tttacttaac	4740
ctgtctgaaa tggaggataa cctctggct gataactgtc aagttactga aatgtcaggg	4800
aattgtgaat gaaccctct gaatgctggg cagatgtttt gggcacgtgg gtatccatag	4860
atttttttt cagcaggatt tccttctta atatattgtg ggaacgaaac attgaagttt	4920
ccaacactaa gaaaagcaat gctctgggtt tgcaaagaag tctccaaagc tgtggagag	4980
gcaatggctt tgcctcacaa aggtgatct gatttgattt ggggtttcct cagtcctcc	5040
catcctttgt ttgtggacca aacctctgtt caaataatca gtatacagac aagtactgac	5100
tgactcctgt cactgtttcc catgtaaattt ctcaaccatg tgtgtcagaa ttgtttgagt	5160
catcaaagtt ccgtgtatgtc caggatgggtt aataccagaa actgaagtct gaaatccat	5220
ttggcccttc tcgggcactg taaactgagt gcaaatgtgc ccagttccct cgtggcccat	5280
ttatagcaca ataacacagt gcttgcttac aaaaatctagt cccgattttttt gtattttttt	5340
aaagttgctt tagacaataa tatttctaaa tggaaggatg aaacagaaag aatattccaa	5400

ctgtacagtc tatatttgt ttctaaaaat ttttattaga attctgactt ttagaaaaca	5460
aatagatatt caaaaactac ttcttaatt aaataataac atcattatag acattctcca	5520
gccattnaga agtagcatga ttacaaagca ttcatgttcc ctttgggg tgaaacagaa	5580
gtatTTTAT gacaaataaa aagcaaaaat ctcataatg tgatagctat agatgcattg	5640

ataggaatta aatthaatca aaaagaactt ttaatggcaa taatgtggct actaacttca	5700
ttgtttgtaa taatgctgca aatgttaat gaaaactgtt actaacaata caggagaaga	5760
ttacagatat gattaggctg ttttataga aatggaaaga gaaaggtcac tcactaccc	5820
agccacagaaa cttgagggat gtgtgagggt ttttgaggaa aaaagagaac aatgtaacat	5880
cacagcaaca tcttaatctg aaagttagacg acaaagggtt cagagttaggg gatcagaaat	5940
ttaagtatgc agagaagcaa ggcataatcg gcttagacaa tgtatgaaga acagcagcag	6000
acagcaagtg aaagaatca cagtcacat ggaaatcaca cagaccacag tgtgcacaca	6060

gagacagaaaa tcagcaaggg acacacggct tccagttatg aaagtttagac agcaaaatt	6120
aagttgtccc acctaaaaca tgcgttatcg tctctcaa at ggggaagggg aaggagcagc	6180
aaacatctgg atatgtctaa aacccacag agaacatctg ggatcttgc atttctccct	6240
ctgactttct caaatatgtta gctacttcta gatagttca ataatggtct ctaattgact	6300
atggagagac aggtctcatg tatgtgaaca tccttaacca ggagatggaa tgtgtttcct	6360
tgtcaactcat tttctaagga agtgaattcc ttctgcattg cccaggattg gatgttacgt	6420
gaaaactaaaa atcattgatt aaaaagaat gtcatcattacca cagttgggtt gaatcaatca	6480

tgtatgttt catgtgtatg tagcatatgt atatgcatgt gtgtgtctgt gtgtgtaa	6960
atgtatttac taagaaaaaa tcagttctc tagctaata gtcattgaag tgaagaaacc	7020
ttacgctatc acattactat gttccagca taaattgcaa tatcagtaag acattcccc	7080
tcataactta atggacactt agattaggc atgcagcagt aaattatgaa agcgtctatg	7140
ctgagctgag gtgggaaatc gtcttcctg cctccttcct cctgttctt ctctaaagg	7200
ccctcatctt ctttctcccc ttcccttctt taaaatatt ctatcattga tccaaaggtaa	7260

ctaacccttc ctttgctcac atgtgacctg cccagaggaa tctatttata gtcaacaata	7320
acaggccaag gacatgcgaa caaatgactt tacttagccc cacttggta atctattggg	7380
tgaataggtt aggggttatt tataggagct tgactgactg gcacagctgt atctctgaaa	7440
agtccccaa agcatcatgg gtgggaacta aggaagccg gaaatgctgg agctggaatc	7500
ccaacctgca gtggctacat gatgaatgtg ttccttcc tactaaat ttaagactct	7560
ggcaggctg gttagtcgt taaaagtctt gtgggttct ggagtccctgg gaggctcact	7620
gtccctgcag aagttgtta ttattgtata taaaaagaaag tgctcaacac tgagtcaaa	7680
aagaagcccc cgagaatcgg tggcagaggt ggaaatagaa gaatccgatg cagttccgaa	7740
ggcaagagtt gatcctctcc atggtgacaa gaaaacaaga gccacagaag cctgaaggct	7800
aagactatga cctgtgaggt ttcctctcc taggacttga atgcacttaa ctctgaggc	7860
tagcagggca gagattcagg agcgttctca gaggttgcc ttctccttg tatgattcta	7920
ggagaagctc agtgcattttc cagaagtgc aaactctaac acattaaccc acatcctgaa	7980
ttgtttata tcaattgttt tataactaca tgtttaact ttgttttg ttttgaatt	8040
ttgtttgttt gtttgttttc tattttcat atgtgtcat gtgagccaga agacaggta	8100
agggactctg ttctctctt ccagcatgtg gtttcaggg atcaaagtta ggtcccaagg	8160
cttcaactggg caacgggacc cttagcctct gaggcatctt cttaatctt ttctttgaaa	8220
cttttcatt acattgtgtc agtgcacaca cacacacaca cacacatgca tatacatcca	8280
catgcatata catccacatg ccatatgtca tggcacatgt gtggaaagaa atgggtgcct	8340
tgagggaaatc agtttcttc ttccatcaag tggatctt gacttcaggta accccatctc	8400
tgctccccaa gcatggctac aagcatttac ctgccaagtc atccctgg ctcccacatt	8460
aatttataat aatacaccct ttccagcttag agagatgact cagtggttaa gaactctggc	8520
tgtgcttcag aaggttctga gttcaattcc cagcagctat aagggtggctc acaactatct	8580
ctaattttgtt ttctgtctt cttctggcat gcacttggat gtgcagatag agtacttata	8640
tgcataaataa aatataaataa cattaataat ctttaaaaaa gaaggaaaga taaaaagaac	8700
aatacaccct ttcttttaag taagaaaaca tgcttagtat atagaataaa tgctgggttt	8760
gaaaggtgaa attcagaaga aattataggt tggaaatatt tgaactctt tgtgtcaaac	8820
caaattggtaa agatgatgtg ataataaggt aaggtttctt tccacacat atacttgttt	8880
aataaccagt ataagactat gaggtaacat aactaaaaat acatgaaaaa aaactatttt	8940
aaaaaaaaacat cacttcaga tgactctggt gaaactcact gataaccagc aatcttttg	9000

atagaccaga gtgtccagtc tgaagttaat tctttgctt tattctcaaa caatgttca 9060
 gaagtatcaa ccatagtata aagatacact gtccacatata gcacctggcc tgacttgt 9120
 <210> 2
 <211> 2105
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220><221> CDS
 <222> (418)..(1671)
 <400> 2

gagccttccc ggccgtgag ccggatccgg tggcaccgcg gggaaagagac aggaccggc 60
 ggtggcggca gagacagggg gacgcacccg gtgcagaaga tccaaatagga gcacgccc 120
 gcaacctctc ccgcgcgctc cggtcgcccga ctctacgcgcg atcgcccaact cccgcac 180
 tggactacac cggaaaaaag acgcagcctg gcccgaactg gggcggagat ctttttgct 240

tcccaagagc tcgggaggga agattctccc gccgcccaga accccgcgg actggaggaa 300
 cccgtggcct ggagagcgcgt ggctgtgcca gaccccgacc tcatggatgt ctgggtgtg 360
 taatgaggga agaacgtgcc ttttacaccc aagagggtgac cccggagcgt gccccgg 417
 atg acc cca caa ctc gga acg atg cgg cta gcc tgc atg ttc tcg tcc 465
 Met Thr Pro Gln Leu Gly Thr Met Arg Leu Ala Cys Met Phe Ser Ser
 1 5 10 15
 atc ctg ctg ttt gga gct gcg ggc ctg ctc ctc ttc atc agc ctc cag 513

Ile Leu Leu Phe Gly Ala Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Ser Leu Gln
 20 25 30
 gac cct ata gag ctc agc ccc cag caa gtt cca ggt ata aag ttc agc 561
 Asp Pro Ile Glu Leu Ser Pro Gln Gln Val Pro Gly Ile Lys Phe Ser
 35 40 45
 atc agg ccc cag caa ccc cag cat gat agc cac ttg agg ata tcc aca 609
 Ile Arg Pro Gln Gln Pro Gln His Asp Ser His Leu Arg Ile Ser Thr
 50 55 60
 gaa aag ggc aca cga gat tca ccc agc ggg tcg cca aga ggc ctc cag 657
 Glu Lys Gly Thr Arg Asp Ser Pro Ser Gly Ser Pro Arg Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 ctg caa gcg cct gac caa cct cga ccc cac ccg aag gca gcg gga tct 705

Leu Gln Ala Pro Asp Gln Pro Arg Pro His Pro Lys Ala Ala Gly Ser

85 90 95

cct ttg cgc ctc cgg cag cgc agg cggtt ctc atc aaa aag atg 753

Pro Leu Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Arg Leu Leu Ile Lys Lys Met

100 105 110

cca gcc gca ggg act aac caa ggc aac aac tcg tcc gaa acc ttt atc 801

Pro Ala Ala Gly Thr Asn Gln Gly Asn Asn Ser Ser Glu Thr Phe Ile

115 120 125

cag ccg aga ccc cgc acc atg gac agt cgt tgg gtc agc ctg cac cag 849

Gln Pro Arg Pro Arg Thr Met Asp Ser Arg Trp Val Ser Leu His Gln

130 135 140

acc caa cag gag cgc aag cgt gtg atg cga gaa gcc tgc gct aaa tac 897

Thr Gln Gln Glu Arg Lys Arg Val Met Arg Glu Ala Cys Ala Lys Tyr

145 150 155 160

agg gcc agc agc cgc aga gct gtc act ccc cgc cac gtc tcc cgc 945

Arg Ala Ser Ser Arg Arg Ala Val Thr Pro Arg His Val Ser Arg

165 170 175

atc ttc gtg gag gac cgc cac cgt gta ctg tac tgt gaa gta ccc aag 993

Ile Phe Val Glu Asp Arg His Arg Val Leu Tyr Cys Glu Val Pro Lys

180 185 190

gca ggc tgc tcc aac tgg aag agg gtg ctc atg gtg ctg gca ggg tta 1041

Ala Gly Cys Ser Asn Trp Lys Arg Val Leu Met Val Leu Ala Gly Leu

195 200 205

gcc tca tcc acg gca gat atc caa cac aac acc gtc cac tat ggc agc 1089

Ala Ser Ser Thr Ala Asp Ile Gln His Asn Thr Val His Tyr Gly Ser

210 215 220

gcc ctt aag cgc ctg gat act ttt gac cgg cag ggc ata gtg cac cgc 1137

Ala Leu Lys Arg Leu Asp Thr Phe Asp Arg Gln Gly Ile Val His Arg

225 230 235 240

ctc	agt	acc	tac	acc	aag	atg	ctc	ttt	gtc	cg	gaa	ccc	ttt	gag	cg	1185			
Leu Ser Thr Tyr Thr Lys Met Leu Phe Val Arg Glu Pro Phe Glu Arg																			
245		250		255															
ctg	gtc	tct	gct	ttc	cga	gac	aag	ttt	gag	cat	cct	aac	agc	tac	tat	1233			
Leu Val Ser Ala Phe Arg Asp Lys Phe Glu His Pro Asn Ser Tyr Tyr																			
260		265		270															
cat	cct	gtc	ttt	g	gc	aag	g	c	t	ctg	g	cc	tac	cg	cc	1281			
His Pro Val Phe Gly Lys Ala Ile Leu Ala Arg Tyr Arg Ala Asn Ala																			
275		280		285															
tcg	cg	gag	g	ca	ctg	cg	act	gg	c	tcc	gg	t	gt	ca	g	1329			
Ser Arg Glu Ala Leu Arg Thr Gly Ser Gly Val Gln Phe Pro Glu Phe																			
290		295		300															
gtc	cag	ta	c	tg	tt	g	at	gt	c	cc	gt	gg	at	g	ac	1377			
Val Gln Tyr Leu Leu Asp Val His Arg Pro Val Gly Met Asp Ile His																			
305		310		315		320													
tgg	gac	ca	tt	ag	cg	ct	tg	ca	cc	t	gc	ct	at	g	ac	1425			
Trp Asp His Val Ser Arg Leu Cys Ser Pro Cys Leu Ile Asp Tyr Asp																			
325		330		335															
ttt	gt	g	gc	a	ag	t	tc	ga	g	a	ca	ac	tt	tc	ct	1473			
Phe Val Gly Lys Phe Glu Ser Met Glu Asp Asp Ala Asn Phe Phe Leu																			
340		345		350															
cgt	ctc	atc	ca	tg	cg	cc	gg	aa	ct	ac	tt	cc	gg	tt	aa	ga	1521		
Arg Leu Ile His Ala Pro Gly Asn Leu Thr Phe Pro Arg Phe Lys Asp																			
355		360		365															
agg	ca	t	cc	ga	g	g	gc	cg	ac	ca	tc	ag	at	cc	ca	tg	1569		
Arg His Ser Glu Glu Ala Arg Thr Thr Ser Arg Ile Thr His Gln Tyr																			
370		375		380															
ttc	g	c	t	cc	t	cg	ct	cg	ca	g	ca	cc	tac	g	ac	tt	tc	ta	1617
Phe Ala Gln Leu Ser Ser Leu Gln Arg Gln Arg Thr Tyr Asp Phe Tyr																			

385	390	395	400	
tac atg gat tac ctg atg ttc aac tac tcc aaa cct ttc tcg gac ctg				1665
Tyr Met Asp Tyr Leu Met Phe Asn Tyr Ser Lys Pro Phe Ser Asp Leu				
405	410	415		
tac tga gggcgggccc tgctggtcag gggcggggtc tgccggcat gcccactcac			1721	
Tyr				

ctgcgcata g cggccctccg gggactgagc tctgaggatg tgaggccttg tggctgtggc	1781
cctagggtgg gccacagagg cccagacaat ggaccttgcac cttgtccca caccatttc	1841
ctcattgggt tggctgagtt tgagacggag cacgactcgat atggatgctt taagaactca	1901
gctgagctat gctgagctat gctgtccagg gaagcctgag acccagaaga gggcccccagc	1961
gtcgaggat gtcctacatc cccttatcct ttgccttgta ccaaaccacg tggtttgctg	2021
ctttctatg acccagggtc atctgaataa agcacatggt tttcagagca aaaaaaaaaaa	2081
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaa	2105

<210> 3

<211> 417

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Thr Pro Gln Leu Gly Thr Met Arg Leu Ala Cys Met Phe Ser Ser

1 5 10 15

Ile Leu Leu Phe Gly Ala Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Ser Leu Gln

20 25 30

Asp Pro Ile Glu Leu Ser Pro Gln Gln Val Pro Gly Ile Lys Phe Ser

35 40 45

Ile Arg Pro Gln Gln Pro Gln His Asp Ser His Leu Arg Ile Ser Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ala Pro Asp Gln Pro Arg Pro His Pro Lys Ala Ala Gly Ser

85 90 95

Pro Leu Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Leu Leu Ile Lys Lys Met

100	105	110
Pro Ala Ala Gly Thr Asn Gln Gly Asn Asn Ser Ser Glu Thr Phe Ile		
115	120	125
Gln Pro Arg Pro Arg Thr Met Asp Ser Arg Trp Val Ser Leu His Gln		
130	135	140
Thr Gln Gln Glu Arg Lys Arg Val Met Arg Glu Ala Cys Ala Lys Tyr		
145	150	155
160		
Arg Ala Ser Ser Ser Arg Arg Ala Val Thr Pro Arg His Val Ser Arg		
165	170	175
Ile Phe Val Glu Asp Arg His Arg Val Leu Tyr Cys Glu Val Pro Lys		
180	185	190
Ala Gly Cys Ser Asn Trp Lys Arg Val Leu Met Val Leu Ala Gly Leu		
195	200	205
Ala Ser Ser Thr Ala Asp Ile Gln His Asn Thr Val His Tyr Gly Ser		
210	215	220
Ala Leu Lys Arg Leu Asp Thr Phe Asp Arg Gln Gly Ile Val His Arg		
225	230	235
240		
Leu Ser Thr Tyr Thr Lys Met Leu Phe Val Arg Glu Pro Phe Glu Arg		
245	250	255
Leu Val Ser Ala Phe Arg Asp Lys Phe Glu His Pro Asn Ser Tyr Tyr		
260	265	270
His Pro Val Phe Gly Lys Ala Ile Leu Ala Arg Tyr Arg Ala Asn Ala		
275	280	285
Ser Arg Glu Ala Leu Arg Thr Gly Ser Gly Val Gln Phe Pro Glu Phe		
290	295	300
Val Gln Tyr Leu Leu Asp Val His Arg Pro Val Gly Met Asp Ile His		
305	310	315
320		
Trp Asp His Val Ser Arg Leu Cys Ser Pro Cys Leu Ile Asp Tyr Asp		
325	330	335
Phe Val Gly Lys Phe Glu Ser Met Glu Asp Ala Asn Phe Phe Leu		
340	345	350

Arg Leu Ile His Ala Pro Gly Asn Leu Thr Phe Pro Arg Phe Lys Asp

355 360 365

Arg His Ser Glu Glu Ala Arg Thr Thr Ser Arg Ile Thr His Gln Tyr

370 375 380

Phe Ala Gln Leu Ser Ser Leu Gln Arg Gln Arg Thr Tyr Asp Phe Tyr

385 390 395 400

Tyr Met Asp Tyr Leu Met Phe Asn Tyr Ser Lys Pro Phe Ser Asp Leu

405 410 415

Tyr

<210> 4

<211> 1369

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (40)..(1281)

<400> 4

attcagacat gaagagagac acagtggctc gaagtggtc atg aaa gcc aaa caa 54

Met Lys Ala Lys Gln

1 5

gtc ttc ttt tct gtc ctg ctg ttt ggg aca gca ggg ctt ctg ctc ttc 102

Val Phe Phe Ser Val Leu Leu Phe Gly Thr Ala Gly Leu Leu Leu Phe

10 15 20

atg tac ttg caa gca tgg att gaa gaa cat cat aca ggg aaa ata gag 150

Met Tyr Leu Gln Ala Trp Ile Glu Glu His His Thr Gly Ile Glu

25 30 35

aag aaa agg gat cag aaa gga gta tcg gtg act acg gga aaa atc cag 198

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

40 45 50

aaa cag atc acg aat cag aac tct gag gtt cac atg cct gaa gat ctg 246

Lys Gln Ile Thr Asn Gln Asn Ser Glu Val His Met Pro Glu Asp Leu

55	60	65	
aag aag aaa ggg gga gat ctg ctc aac cta ggg agt cca aca agg gtt			294
Lys Lys Lys Gly Gly Asp Leu Leu Asn Leu Gly Ser Pro Thr Arg Val			
70	75	80	85
tta agg aag atc agc cat tca caa agg gag aac gga gct tac aga tca			342
Leu Arg Lys Ile Ser His Ser Gln Arg Glu Asn Gly Ala Tyr Arg Ser			
90	95	100	
act gaa gca cat caa gga gct aaa att gaa gtt ttt cag aaa ccc atc			390
Thr Glu Ala His Gln Gly Ala Lys Ile Glu Val Phe Gln Lys Pro Ile			
105	110	115	
cag atg gac tgg cca ctg gtc act cag ccc tta aac aaa agt ttg gtc			438
Gln Met Asp Trp Pro Leu Val Thr Gln Pro Leu Asn Lys Ser Leu Val			
120	125	130	
caa ggc aac aaa tgg aag aaa gca gat gca acc caa gag aag cgt cgg			486
Gln Gly Asn Lys Trp Lys Lys Ala Asp Ala Thr Gln Glu Lys Arg Arg			
135	140	145	
tca ttc ctt cat gag ttt tgc aag aaa tat ggt aga gta aat gat ccc			534
Ser Phe Leu His Glu Phe Cys Lys Tyr Gly Arg Val Asn Asp Pro			
150	155	160	165
aag ttc aac ctt ttt cat ata gta tct agg ata tat gta gaa gac aaa			582
Lys Phe Asn Leu Phe His Ile Val Ser Arg Ile Tyr Val Glu Asp Lys			
170	175	180	
cac aaa atc ctg tac tgt gaa gta cca aaa gct ggc tgc tct aat tgg			630
His Lys Ile Leu Tyr Cys Glu Val Pro Lys Ala Gly Cys Ser Asn Trp			
185	190	195	
aaa aga att ctg atg gtc cta aat gga ttg gct tcc tct gca tac aat			678
Lys Arg Ile Leu Met Val Leu Asn Gly Leu Ala Ser Ser Ala Tyr Asn			
200	205	210	
atc tcc cat gat act gtg cac tat ggg aag cat ctg aaa aca ctg gat			726

Ile Ser His Asp Thr Val His Tyr Gly Lys His Leu Lys Thr Leu Asp
 215 220 225
 agt ttt gac tta aaa gga gta cac atg cgt ttg aat aca tat acc aaa 774
 Ser Phe Asp Leu Lys Gly Val His Met Arg Leu Asn Thr Tyr Thr Lys
 230 235 240 245
 gct gtg ttt gtt aga gat ccc atg gaa aga tta gtc tcc gca ttt agg 822
 Ala Val Phe Val Arg Asp Pro Met Glu Arg Leu Val Ser Ala Phe Arg

 250 255 260
 gat aaa ttt gag cat ccc aat agt tac tac cat ccg gtg ttt gga aag 870
 Asp Lys Phe Glu His Pro Asn Ser Tyr Tyr His Pro Val Phe Gly Lys
 265 270 275
 gca att atc aag aaa tat cga cca aat gcc tct gca gaa gca tta aat 918
 Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Arg Pro Asn Ala Ser Ala Glu Ala Leu Asn
 280 285 290

 aat gga tct gga gtc aaa ttc aaa gaa ttc gcc tac tat ttg ctg gat 966
 Asn Gly Ser Gly Val Lys Phe Lys Glu Phe Ala Tyr Tyr Leu Leu Asp
 295 300 305
 gct cac cgt cca gta gga atg gat att cac tgg gaa aga gtc agc aaa 1014
 Ala His Arg Pro Val Gly Met Asp Ile His Trp Glu Arg Val Ser Lys
 310 315 320 325
 ctg tgt tat ccg tgt ttg atc aac tat gac ttt gta ggg aag ttt gag 1062

 Leu Cys Tyr Pro Cys Leu Ile Asn Tyr Asp Phe Val Gly Lys Phe Glu
 330 335 340
 acc tta gga gag gat gcc aat tac ttt cta cag ttg att ggt gct cca 1110
 Thr Leu Gly Glu Asp Ala Asn Tyr Phe Leu Gln Leu Ile Gly Ala Pro
 345 350 355
 aaa gag ttg aca ttt cca aac ttt aag gat agg cac tcc tct gat gaa 1158
 Lys Glu Leu Thr Phe Pro Asn Phe Lys Asp Arg His Ser Ser Asp Glu

 360 365 370
 aga acc aat gcc cac gtg gta agg cag tat tta aag gac ctg agc aca 1206
 Arg Thr Asn Ala His Val Val Arg Gln Tyr Leu Lys Asp Leu Ser Thr

375	380	385	
gcc gaa aga cag ctc atc tat gac ttc tat cac ttg gac tat ttg atg			
Ala Glu Arg Gln Leu Ile Tyr Asp Phe Tyr His Leu Asp Tyr Leu Met			
390	395	400	405
ttt aat tac aca act cca cat ttg taa tttgcattca ttttctaaa			
1301			
Phe Asn Tyr Thr Thr Pro His Leu			
410			
gccttacata gatttaatga tgatggcctc aaataagcta ctgttaattgt cctacaattc			
1361			
tctgtatg			
1369			
<210> 5			
<211> 413			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 5			
Met Lys Ala Lys Gln Val Phe Phe Ser Val Leu Leu Phe Gly Thr Ala			
1	5	10	15
Gly Leu Leu Leu Phe Met Tyr Leu Gln Ala Trp Ile Glu Glu His His			
20	25	30	
Thr Gly Lys Ile Glu Lys Lys Arg Asp Gln Lys Gly Val Ser Val Thr			
35	40	45	
Thr Gly Lys Ile Gln Lys Gln Ile Thr Asn Gln Asn Ser Glu Val His			
50	55	60	
Met Pro Glu Asp Leu Lys Lys Gly Gly Asp Leu Leu Asn Leu Gly			
65	70	75	80
Ser Pro Thr Arg Val Leu Arg Lys Ile Ser His Ser Gln Arg Glu Asn			
85	90	95	
Gly Ala Tyr Arg Ser Thr Glu Ala His Gln Gly Ala Lys Ile Glu Val			
100	105	110	
Phe Gln Lys Pro Ile Gln Met Asp Trp Pro Leu Val Thr Gln Pro Leu			
115	120	125	
Asn Lys Ser Leu Val Gln Gly Asn Lys Trp Lys Lys Ala Asp Ala Thr			

130	135	140
Gln Glu Lys Arg Arg Ser Phe Leu His Glu Phe Cys Lys Lys Tyr Gly		
145	150	155
Arg Val Asn Asp Pro Lys Phe Asn Leu Phe His Ile Val Ser Arg Ile		
165	170	175
Tyr Val Glu Asp Lys His Lys Ile Leu Tyr Cys Glu Val Pro Lys Ala		
180	185	190
Gly Cys Ser Asn Trp Lys Arg Ile Leu Met Val Leu Asn Gly Leu Ala		
195	200	205
Ser Ser Ala Tyr Asn Ile Ser His Asp Thr Val His Tyr Gly Lys His		
210	215	220
Leu Lys Thr Leu Asp Ser Phe Asp Leu Lys Gly Val His Met Arg Leu		
225	230	235
Asn Thr Tyr Thr Lys Ala Val Phe Val Arg Asp Pro Met Glu Arg Leu		
245	250	255
Val Ser Ala Phe Arg Asp Lys Phe Glu His Pro Asn Ser Tyr Tyr His		
260	265	270
Pro Val Phe Gly Lys Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Arg Pro Asn Ala Ser		
275	280	285
Ala Glu Ala Leu Asn Asn Gly Ser Gly Val Lys Phe Lys Glu Phe Ala		
290	295	300
Tyr Tyr Leu Leu Asp Ala His Arg Pro Val Gly Met Asp Ile His Trp		
305	310	315
Glu Arg Val Ser Lys Leu Cys Tyr Pro Cys Leu Ile Asn Tyr Asp Phe		
325	330	335
Val Gly Lys Phe Glu Thr Leu Gly Glu Asp Ala Asn Tyr Phe Leu Gln		
340	345	350
Leu Ile Gly Ala Pro Lys Glu Leu Thr Phe Pro Asn Phe Lys Asp Arg		
355	360	365
His Ser Ser Asp Glu Arg Thr Asn Ala His Val Val Arg Gln Tyr Leu		
370	375	380

Lys Asp Leu Ser Thr Ala Glu Arg Gln Leu Ile Tyr Asp Phe Tyr His
 385 390 395 400

Leu Asp Tyr Leu Met Phe Asn Tyr Thr Thr Pro His Leu
 405 410

<210> 6

<211> 5532

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (369)..(1427)

<400> 6

ccagtgcacg gccgcggcgg cacttcctt ctcgcattcc ggtgcggccgg cccgtgagga 60
 ggcagcggcg gccgcaggcg ccagcagagg aggccggcga gcatcgagca gaggcgaggc 120
 ggaccggcag gagcgcgcgg ccggagccac gcatttcac acttgacac caacttcgc 180
 gccttcacc ctctagacca gagtcggggc ctccggagac ctccgtgaag ctacggggag 240

ccagctccgg agcccgacca gctctgttct gagcctcccc ggtgctggta ccccccggc 300
 ggggtccccg ctctgcgcct cgggacgcgc ctccggaca gccgggtccc cgcggccagg 360
 acaaagcc atg aag ccg gcg ctg ctg gaa gtg atg agg atg aac aga att 410

Met Lys Pro Ala Leu Leu Glu Val Met Arg Met Asn Arg Ile
 1 5 10
 tgc cgg atg gtg ctg gcc act tgc ttc gga tcc ttt atc ttg gtc atc 458
 Cys Arg Met Val Leu Ala Thr Cys Phe Gly Ser Phe Ile Leu Val Ile

15 20 25 30
 ttc tat ttc caa agt atg ttg cac cca gtc atg cgg agg aac ccc ttc 506
 Phe Tyr Phe Gln Ser Met Leu His Pro Val Met Arg Arg Asn Pro Phe
 35 40 45
 ggt gtg gac atc tgc tgc cgg aag gga tcg aga agt ccc ctg cag gag 554
 Gly Val Asp Ile Cys Cys Arg Lys Gly Ser Arg Ser Pro Leu Gln Glu
 50 55 60

ctc tac aat ccc atc cag ctg gag cta tcc aac act gcc atc ctg cac 602
 Leu Tyr Asn Pro Ile Gln Leu Glu Leu Ser Asn Thr Ala Ile Leu His

65	70	75		
cag atg aga cgg gac cag gtg aca gac acc tgc cgg gcc aac agt gcc			650	
Gln Met Arg Arg Asp Gln Val Thr Asp Thr Cys Arg Ala Asn Ser Ala				
80	85	90		
atg agc cgc aag cgc agg gtg ctg acc ccc aac gac ctg aag cac ctg			698	
Met Ser Arg Lys Arg Arg Val Leu Thr Pro Asn Asp Leu Lys His Leu				
95	100	105	110	
gtg gtg gat gag gac cac gaa ctc atc tac tgc tat gtg ccc aag gta			746	
Val Val Asp Glu Asp His Glu Leu Ile Tyr Cys Tyr Val Pro Lys Val				
115	120	125		
gcg tgc acc aac tgg aag agg ctc atg atg gtc ctg agt ggc cgg ggc			794	
Ala Cys Thr Asn Trp Lys Arg Leu Met Met Val Leu Ser Gly Arg Gly				
130 135 140				
aag tac agc gat ccc atg gag atc cca gcc aac gaa gcc cac gtg tcg			842	
Lys Tyr Ser Asp Pro Met Glu Ile Pro Ala Asn Glu Ala His Val Ser				
145	150	155		
gcc aac ctg aag acc ctt aac cag tac agc atc cca gag atc aac cac			890	
Ala Asn Leu Lys Thr Leu Asn Gln Tyr Ser Ile Pro Glu Ile Asn His				
160	165	170		
cgc ttg aaa agc tac atg aag ttc ctg ttc gtg cgg gaa ccc ttc gag				938
Arg Leu Lys Ser Tyr Met Lys Phe Leu Phe Val Arg Glu Pro Phe Glu				
175	180	185	190	
agg ctg gtg tct gcc tac cgc aac aag ttc acg cag aag tac aac acc			986	
Arg Leu Val Ser Ala Tyr Arg Asn Lys Phe Thr Gln Lys Tyr Asn Thr				
195	200	205		
tcc ttc cac aag cgc tac ggc acc aag atc atc cga cgc cag cgg aag			1034	
Ser Phe His Lys Arg Tyr Gly Thr Lys Ile Ile Arg Arg Gln Arg Lys				
210	215	220		
aac gcc acg cag gag gcc ctg cgc aag ggg gac gat gtc aag ttc gag			1082	
Asn Ala Thr Gln Glu Ala Leu Arg Lys Gly Asp Asp Val Lys Phe Glu				
225	230	235		

gag ttc gtg gcc tac ctc atc gac ccc cac acc cag cgg gag gag ccc 1130

240	245	250	
ttc aac gag cac tgg cag acg gtc tac tct ctc tgc cac ccg tgc cac			1178
Phe Asn Glu His Trp Gln Thr Val Tyr Ser Leu Cys His Pro Cys His			
255	260	265	270
atc cac tac gac ctc gtg ggc aag tat gag aca ctg gag gag gac tcc			1226
Ile His Tyr Asp Leu Val Gly Lys Tyr Glu Thr Leu Glu Glu Asp Ser			
275	280	285	

aat tac gta ctg cag ctg gcc gga gtg agc ggc tac ctg aag ttc ccc	1274	
Asn Tyr Val Leu Gln Leu Ala Gly Val Ser Gly Tyr Leu Lys Phe Pro		
290	295	300
acc tat gca aag tcc acc cga act acc gac gag atg acc acg gag ttc	1322	
Thr Tyr Ala Lys Ser Thr Arg Thr Thr Asp Glu Met Thr Thr Glu Phe		
305	310	315
ttc cag aac atc agc gcc gag cac cag aca cag ctg tac gaa gtc tac	1370	

ggagagaatc ctgcttttta atttaagatt tttatttgc aaaaagaattc tatggagact	1527
gggttatttt gtaagttaat atgtcttcgg gggagatgct gcgagcggca tggtaagaat	1587
ttatTTaaaa attctccacg gggaggaca gctgtcttg caggggagcgc gggtgttgaata	1647
tccctgtttt tagaagtggta tactgcaaca ctgtctccaa ggtgtccttg tttctggtg	1707
aagtccacaa actgcattcc ataaagtcta atgaatctta tttatagttt tttaaacgtg	1767

gtctgtggca gcagcctgct cctgtctgtc cagaggagag tacagtcgt gcttcgtgg 1827

ctatggctca ttgggggagg ggagggggtt atctccccca ctgaccgtgt gtagaatccc 1887
 atggtgacag ctgcgggatg tgtgcctgtc gccattcaag aaaccctgtc agaaagaagt 1947
 caattgtcct tgcactaaga aacaggatg agactggttc aaaccgattt ctagcaaccc 2007
 caaagtccct ttagttaaag aatgcaat ttttttaacc caagaagaga gcagatgata 2067
 gcgatttctc ttaccgaaa ttagcaggct ataagaatag gctttctgtc gaaatctta 2127
 agtggcactt tccagtgcata gcgaaggcag aataatggtt gttttctgtt caataagtat 2187
 tgagcatcta ctattctcca ggcttgactg cagatagcac attgagtgaa accaggagcc 2247

ttggccttca gcaagctta tgtgaacaca gggcatccag ctcaacagt aaccaacacc 2307
 cccatccctt tggcctcac acagacttta gactattctc aagtggcca gagggtccag 2367
 gaccctagca aatttgcgtt tttctacagt tcaaatttga aagccacaca tttggatcag 2427
 gccacttaac tagctaagta gttcattgcc caacacaaga aatgacagaa accctttga 2487
 tcatgtatat ctatgtcagt gtcttcata tagaaggcata taagccacaa tattctcaa 2547
 gcgcaaggat ggaggactgc tgtgattgt tagtgatgtc tgccttgact aagggaaaggg 2607
 aggaacattt ctcaagggcc tcctactgtc atctccagtc cacatctgt cctgcctgcc 2667

acttaaaaca gtgcactgca tacatttggaa gactggcgga gttcaagtgt gaaggtaaaa 2727
 ggtggagtgt tggtaacccac aggcacatgc ccaccctcca tgtcctgcata tggcagagca 2787
 tccaggacct ccctctcctc cagaagggtt gaaatttgc tttccctgtt ctttgctgat 2847
 caatgccaa acctatttctt catttcttagt tgtttctgtat actttgcgtt tgacatttga 2907
 gcccattcc catgacagcc agtgtccggg tacgttagcag atgctgtaca tagttctgtat 2967
 gataagggag ctggtaggtc gttaatttttgc tttttgtt ttttggggg ttttggggg 3027
 tttgtatgcag tatagagtga agggggtaag aatattctga aaaacataaaa attgagtaat 3087

ttattcacag aaactattaa aatggatttgc ttaggctcac aaggaggctg ggggcagcgg 3147
 taactgtcac actgtctcgc agaggaaattt attttattta atgtgagaga aatgtgagcc 3207
 agagtggctg cctgaggctt ttataaaac gcaggtaccc tcccccaattt ctctccctc 3267
 gcctttaata aatagattta tgtcatgtgt gtgaccaaga acagtgcacat atcttgctg 3327
 tccctggaaat agagaggcag tcatgggtctt caggccctgg gcgtgggtt gctgtatgc 3387
 gtccaccga gcccaggctc tccaaggcat cagtttgggg tcaacatatcc tttagaaaaca 3447
 aaatataagtc agttccctgtt ctgcaggatgtt tcagagcc ttgaatacat agtctgcctt 3507

gtgaaactgg gagaatgtag catttctggg ctgcatgacc taggtatcct gtatggcaga	3567
ccatgtctta gctggtttt cacacagtag ccttcagtgaa gggtgatcta gcctgtctga	3627
ggtctgcaaa gattgacagc tgcttcctag atcctccac aaatcagcag aaacagtgtc	3687
catctggaa cttagatgaga gtgttgctt acctatggg ggtgtttca tctggatact	3747
gccccagaga gtgatcccggt ccctccaagc acagcggagg gaagcctagg gtgttatgga	3807
gtggggcagg tggcttaagg acaccttaaa ggccacttgg tggggataat ggcctcggtt	3867
ggatactcct cacttccacc cacagttgg aactgttacac tgtgtgtttc aggagttta	3927
aatggagatt cggttgatt tccatggtcc gcatctgtt gtcttcgtc tgtggccag	3987
tgctgtgtc agatggact tactccctt ctctcttta cagggagaaa gactgtcctt	4047
ctggggagag tggatcaata cgcttccaga atgagggagt ctttctcctg tcttgggttc	4107
acacttccta gtgacaattt tcaaaatatg tatcggcttg actgtttatt gttagagtgt	4167
gaaaggtttc tgggttcctg gctaaagaca tccattggtg aaatgtgctt ggaaatccaa	4227
gtgtttctta ctgagggaaaa aaaaatgttggaaaagctt ctctgtcatg cctttgtgc	4287
ttagctagaa agggagctg ccagcgtccc agctctgagc cactgttcaa aggtgcagct	4347
gtgttttagg actaggtaca ggcagagtga taaggacatg cctgcttagt gtactcattt	4407
atcgagaaag tttagactat gagccacagg ggtccctgcc tgcaatccctt atagcctccc	4467
cctgccccag tgccttcctc agctggcttg ggaatcaggg cagccatttgggggctc	4527
agacaaccct ttcttcctgg ttctggagt aaggcttct ctgcagccac aaggagaaca	4587
tggaaaccag aaacttctct ttggtcagcc cttctgagca cacagtttgc gccatgctc	4647
caagaatgct cctgagcatt gtataagccc cttaggactt tagctcatgt gataatgatt	4707
gcattactat cctgctttaa ctgacaaaac cacagagaat tttgcttgcttccctactct	4767
cttcctctgc ccaggcctcc tccatacgtta tacatacaca catggcatg tatacacaca	4827
catgcacaat agacatgcac acacacatgc acacatgggt atacatatac acacatgcac	4887
aatagacatg catatataca tatacatgca cacattgata ggcatacaca catgcacagt	4947
agacatgcac acatgggtat acatagacac acatgcacag acatgcatac acacacatgc	5007
acacataaat gtcacacac acatacacaatttgcacag cctgtgcact cctggatccc	5067
atgtcccatc ctggccacc tctttgtcag caggactgac tccatcactc cctcaggttt	5127
tgcccaccag caccccccag ctttccccca gcagagctaa acagccctc tgaatagaca	5187
acaggacctt ctagaaacag ctgaaccctt ggacagcagc aggcagattt tgatctgtct	5247
tcatcaggta caaaagggtgg tatccgtatt ctcttcgtag catgctcagt aagcatatgg	5307
acatagaatt taacatctct gtggagtggtg tgtttttac atatttgtat gcagtcgagg	5367

agggcctgtt gtagaattct ctccctgtat cttactatac tgtaaagaa gctgaattct 5427
 atgttgccaa cagatgcgtg aatgttcct ccagggaaag ccatcaagc ctgatttattt 5487
 ttcttaagtaa cttaattaa attgaagaag aaaaaaaaaa aaaaa 5532

<210> 7

<211> 352

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400>

> 7

Met Lys Pro Ala Leu Leu Glu Val Met Arg Met Asn Arg Ile Cys Arg

1 5 10 15

Met Val Leu Ala Thr Cys Phe Gly Ser Phe Ile Leu Val Ile Phe Tyr

20 25 30

Phe Gln Ser Met Leu His Pro Val Met Arg Arg Asn Pro Phe Gly Val

35 40 45

Asp Ile Cys Cys Arg Lys Gly Ser Arg Ser Pro Leu Gln Glu Leu Tyr

50 55 60

Asn Pro Ile Gln Leu Glu Leu Ser Asn Thr Ala Ile Leu His Gln Met

65 70 75 80

Arg Arg Asp Gln Val Thr Asp Thr Cys Arg Ala Asn Ser Ala Met Ser

85 90 95

Arg Lys Arg Arg Val Leu Thr Pro Asn Asp Leu Lys His Leu Val Val

100 105 110

Asp Glu Asp His Glu Leu Ile Tyr Cys Tyr Val Pro Lys Val Ala Cys

115 120 125

Thr Asn Trp Lys Arg Leu Met Met Val Leu Ser Gly Arg Gly Lys Tyr

130 135 140

Ser Asp Pro Met Glu Ile Pro Ala Asn Glu Ala His Val Ser Ala Asn

145 150 155 160

Leu Lys Thr Leu Asn Gln Tyr Ser Ile Pro Glu Ile Asn His Arg Leu

165 170 175

Lys Ser Tyr Met Lys Phe Leu Phe Val Arg Glu Pro Phe Glu Arg Leu

180	185	190
Val Ser Ala Tyr Arg Asn Lys Phe Thr Gln Lys Tyr Asn Thr Ser Phe		
195	200	205
His Lys Arg Tyr Gly Thr Lys Ile Ile Arg Arg Gln Arg Lys Asn Ala		
210	215	220
Thr Gln Glu Ala Leu Arg Lys Gly Asp Asp Val Lys Phe Glu Glu Phe		
225	230	235
240		
Val Ala Tyr Leu Ile Asp Pro His Thr Gln Arg Glu Glu Pro Phe Asn		
245	250	255
Glu His Trp Gln Thr Val Tyr Ser Leu Cys His Pro Cys His Ile His		
260	265	270
Tyr Asp Leu Val Gly Lys Tyr Glu Thr Leu Glu Glu Asp Ser Asn Tyr		
275	280	285
Val Leu Gln Leu Ala Gly Val Ser Gly Tyr Leu Lys Phe Pro Thr Tyr		
290	295	300
Ala Lys Ser Thr Arg Thr Thr Asp Glu Met Thr Thr Glu Phe Phe Gln		
305	310	315
320		
Asn Ile Ser Ala Glu His Gln Thr Gln Leu Tyr Glu Val Tyr Lys Leu		
325	330	335
Asp Phe Leu Met Phe Asn Tyr Ser Val Pro Asn Tyr Leu Lys Leu Asp		
340	345	350
<210> 8		
<211> 1785		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<220><221> CDS		
<222> (149)..(1408)		
<400> 8		
ggcgatttcg gctgcagaat cagcatcacc agcaacagca gcagcggcgg tgactgtggc 60		
ggcgctagg tccgtctctt agggaccatg tcccagctgt gcacaaggct gaagtgaagg 120		
gccaggagtg gccccagccc agggcagc atg acc aag ccg cgg ctc ttc cgg 172		

	Met	Thr	Lys	Pro	Arg	Leu	Phe	Arg								
	1			5												
ctg	tgg	ctg	gta	cta	ggg	tcg	gct	ctc	atg	atc	ctt	ttg	atc	att	gta	220
Leu	Trp	Leu	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	Leu	Met	Ile	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	
10		15			20											
tat	tgg	gac	aac	gtg	gga	acc	gcc	cac	ttc	tat	ctg	cac	acg	tct	ctc	268
Tyr	Trp	Asp	Asn	Val	Gly	Thr	Ala	His	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Ser	Leu	
25		30			35			40								
tcc	agg	cca	cac	atc	cta	gaa	ccc	ctt	ccc	acc	cag	gga	ttg	gtg	gag	316
Ser	Arg	Pro	His	Ile	Leu	Glu	Pro	Leu	Pro	Thr	Gln	Gly	Leu	Val	Glu	
45		50			55											
gag	aac	gtg	ttc	aca	tct	gac	gtg	gat	gag	ttt	ttg	gat	act	ctc	ctt	364
Glu	Asn	Val	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Asp	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	
60		65			70											
agt	tct	gac	gcg	aag	cac	aac	gac	ctt	tcc	agg	aga	aaa	act	gag	cag	412
Ser	Ser	Asp	Ala	Lys	His	Asn	Asp	Leu	Ser	Arg	Arg	Lys	Thr	Glu	Gln	
75		80			85											
ccc	ccg	gcg	ccc	gcc	ccc	agc	aag	cca	gtc	ttg	agc	cac	atg	gag	gag	460
Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Lys	Pro	Val	Leu	Ser	His	Met	Glu	Glu	
90		95			100											
aac	gtg	aga	ggc	tac	gac	tgg	tcc	act	cat	gat	gcc	cat	cag	aac	cct	508
Asn	Val	Arg	Gly	Tyr	Asp	Trp	Ser	Thr	His	Asp	Ala	His	Gln	Asn	Pro	
105		110			115			120								
gac	cg	gac	agg	cag	cag	gcc	gag	agg	agg	agc	ctg	ctg	aga	gac	ttc	556
Asp	Arg	Asp	Arg	Gln	Gln	Ala	Glu	Arg	Arg	Ser	Leu	Leu	Arg	Asp	Phe	
125		130			135											
tgt	gcc	aac	gcc	agc	ctg	gca	ttc	ccc	acc	aag	gac	cgc	tct	ttt	gac	604
Cys	Ala	Asn	Ala	Ser	Leu	Ala	Phe	Pro	Thr	Lys	Asp	Arg	Ser	Phe	Asp	
140		145			150											
gac	atc	ccc	aac	tac	gaa	ctg	aac	cac	ctg	atc	gtg	gac	gac	cgc	cac	652
Asp	Ile	Pro	Asn	Tyr	Glu	Leu	Asn	His	Leu	Ile	Val	Asp	Asp	Arg	His	

155	160	165	
ggg gtc atc tac tgc tac gtg ccc aag gtg gcc tgc acc aac tgg aag			700
Gly Val Ile Tyr Cys Tyr Val Pro Lys Val Ala Cys Thr Asn Trp Lys			
170	175	180	
cga gtg atg atc gtg ctg agc gag agc ctg ctg gac cgg ggc agc ccc			748
Arg Val Met Ile Val Leu Ser Glu Ser Leu Leu Asp Arg Gly Ser Pro			
185	190	195	200
tac cga gac ccc ctg gac atc ccc cgg gaa cac gtg cac aac acc agc			796
Tyr Arg Asp Pro Leu Asp Ile Pro Arg Glu His Val His Asn Thr Ser			
205	210	215	
acg cac ctc acc ttc aac aag ttc tgg cgc cgc tac gga aag ttc tcc			844
Thr His Leu Thr Phe Asn Lys Phe Trp Arg Arg Tyr Gly Lys Phe Ser			
220	225	230	
cgt cac ctc atg aag gtg aag ctg aag aag tac acc aag ttc ctg ttc			892
Arg His Leu Met Lys Val Lys Leu Lys Tyr Thr Lys Phe Leu Phe			
235	240	245	
gtg cgc gac ccc ttt gtg cgc ctc atc tca gcc ttc cgc agc aag ttc			940
Val Arg Asp Pro Phe Val Arg Leu Ile Ser Ala Phe Arg Ser Lys Phe			
250	255	260	
gag ctg gag aac gaa gag ttt tac cgc aag ttc gcg gtg ccc atg ctc			988
Glu Leu Glu Asn Glu Glu Phe Tyr Arg Lys Phe Ala Val Pro Met Leu			
265	270	275	280
cga ctg tac gcc aac cac acc agc ctg ccc gcc tcg gtg agt gag gct			1036
Arg Leu Tyr Ala Asn His Thr Ser Leu Pro Ala Ser Val Glu Ala			
285	290	295	
ttc agc gcc ggg ctc aag gtc tcc ttc gcc aac ttc atc cag tac ctc			1084
Phe Ser Ala Gly Leu Lys Val Ser Phe Ala Asn Phe Ile Gln Tyr Leu			
300	305	310	
cta gac cca cac acg gag aag ctg gcg cct ttc aac gag cac tgg cga			1132
Leu Asp Pro His Thr Glu Lys Leu Ala Pro Phe Asn Glu His Trp Arg			

315

320

325

cag gtg tac cgc ctc tgc cac ccg tgc cag ata gac tat gac ttc gtg 1180

Gln Val Tyr Arg Leu Cys His Pro Cys Gln Ile Asp Tyr Asp Phe Val

330

335

340

ggg aag ctg gag acg ctc gat gag gac gct gcc cag ctc ctg agg ttc 1228

Gly Lys Leu Glu Thr Leu Asp Glu Asp Ala Ala Gln Leu Leu Arg Phe

345 350 355 360

ctc aag gta gac tcc cag ctc cac ttc ccc ccc agt tat cgg aac agg 1276

Leu Lys Val Asp Ser Gln Leu His Phe Pro Pro Ser Tyr Arg Asn Arg

365

370

375

acg gcc agc agc tgg gag gaa gac tgg ttt gcc aac atc ccc ctg gca 1324

Thr Ala Ser Ser Trp Glu Glu Asp Trp Phe Ala Asn Ile Pro Leu Ala

380

385

390

tgg agg caa cag ctc tat aaa ctc tac gag gcc gac ttt gtt ctc ttt 1372

Trp Arg Gln Gln Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Ala Asp Phe Val Leu Phe

395

400

405

ggc tac ccc aag cca gaa aac ctg ctc agg gac tga gccccagaa 1418

Gly Tyr Pro Lys Pro Glu Asn Leu Leu Arg Asp

410

415

gcctcacgc tgccccaac aaattgaatg gctgtccat gaggccgtcc tttgaggatg 1478

ggacctgtg gcctctggg ttctctctg gcttccttg ctccctggg tgacaggcag 1538

aggattccac gccccccct cgcattctgga gaccgtggta cagccaagac cgaagcacct 1598

cactctccag agtttgcgc tccccacccc cgccctttg caatctggat ttgtttactc 1658

cacagcctgt attcatggaa cactgtgtt aatactgttt tctaagatta atatattca 1718

gatatatcta atacgaaagt gggaggaagc tggagtaaag tgtggccccc gaaaaaaaaa 1778

aaaaaaaaa 1785

<210> 9

<211> 419

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Met Thr Lys Pro Arg Leu Phe Arg Leu Trp Leu Val Leu Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Leu Met Ile Leu Leu Ile Ile Val Tyr Trp Asp Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 His Phe Tyr Leu His Thr Ser Leu Ser Arg Pro His Ile Leu Glu Pro
 35 40 45
 Leu Pro Thr Gln Gly Leu Val Glu Glu Asn Val Phe Thr Ser Asp Val
 50 55 60
 Asp Glu Phe Leu Asp Thr Leu Leu Ser Ser Asp Ala Lys His Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Ser Arg Arg Lys Thr Glu Gln Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ser Lys
 85 90 95
 Pro Val Leu Ser His Met Glu Glu Asn Val Arg Gly Tyr Asp Trp Ser
 100 105 110
 Thr His Asp Ala His Gln Asn Pro Asp Arg Asp Arg Gln Gln Ala Glu
 115 120 125
 Arg Arg Ser Leu Leu Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ala Ser Leu Ala Phe
 130 135 140
 Pro Thr Lys Asp Arg Ser Phe Asp Asp Ile Pro Asn Tyr Glu Leu Asn
 145 150 155 160
 His Leu Ile Val Asp Asp Arg His Gly Val Ile Tyr Cys Tyr Val Pro
 165 170 175
 Lys Val Ala Cys Thr Asn Trp Lys Arg Val Met Ile Val Leu Ser Glu
 180 185 190
 Ser Leu Leu Asp Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Asp Pro Leu Asp Ile Pro
 195 200 205
 Arg Glu His Val His Asn Thr Ser Thr His Leu Thr Phe Asn Lys Phe
 210 215 220
 Trp Arg Arg Tyr Gly Lys Phe Ser Arg His Leu Met Lys Val Lys Leu
 225 230 235 240
 Lys Lys Tyr Thr Lys Phe Leu Phe Val Arg Asp Pro Phe Val Arg Leu

Ile Ser Ala Phe Arg Ser Lys Phe Glu Leu Glu Asn Glu Glu Phe Tyr	245	250	255	
Arg Lys Phe Ala Val Pro Met Leu Arg Leu Tyr Ala Asn His Thr Ser	260	265	270	
	275	280	285	
Leu Pro Ala Ser Val Ser Glu Ala Phe Ser Ala Gly Leu Lys Val Ser	290	295	300	
Phe Ala Asn Phe Ile Gln Tyr Leu Leu Asp Pro His Thr Glu Lys Leu	305	310	315	320
Ala Pro Phe Asn Glu His Trp Arg Gln Val Tyr Arg Leu Cys His Pro	325	330	335	
Cys Gln Ile Asp Tyr Asp Phe Val Gly Lys Leu Glu Thr Leu Asp Glu	340	345	350	
Asp Ala Ala Gln Leu Leu Arg Phe Leu Lys Val Asp Ser Gln Leu His	355	360	365	
Phe Pro Pro Ser Tyr Arg Asn Arg Thr Ala Ser Ser Trp Glu Glu Asp	370	375	380	
Trp Phe Ala Asn Ile Pro Leu Ala Trp Arg Gln Gln Leu Tyr Lys Leu	385	390	395	400
Tyr Glu Ala Asp Phe Val Leu Phe Gly Tyr Pro Lys Pro Glu Asn Leu	405	410	415	
Leu Arg Asp				

<210> 10
<211> 1728
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220><221> CDS
<222> (1)..(1116)
<400> 10
atg act gtc gcc tgc cac gcg tgc cag gca cag cat ggg aag acg ctc 48
Met Thr Val Ala Cys His Ala Cys Gln Ala Gln His Gly Lys Thr Leu

1	5	10	15	
ctg ttg cag gcg gcc ctt gcc ggt ggc aag tct ggg tgc tgc act				96
Leu Leu Gln Ala Ala Leu Ala Gly Gly Lys Ser Gly Cys Cys Thr				
20				25
cct gct cct gtg cgc cct gcg tcc cggt gta acc aca gga aag gat gcc				144
Pro Ala Pro Val Arg Pro Ala Ser Arg Val Thr Thr Gly Lys Asp Ala				
35				40
cag gac act gaa tgg cag ggc tcc cca aaa gcc ctt ttg ggg gtt ccg				192
Gln Asp Thr Glu Trp Gln Gly Ser Pro Lys Ala Leu Leu Gly Val Pro				
50				55
aca ttt gaa aat aaa gct ctg ggc tcc agc tgg ttc ggt gga gtg agg				240
Thr Phe Glu Asn Lys Ala Leu Gly Ser Ser Trp Phe Gly Gly Val Arg				
65				70
aag agt ccc cta cag ctg ttg cgt gac ctg gac cag ggt cca cgc tcc				288
Lys Ser Pro Leu Gln Leu Leu Arg Asp Leu Asp Gln Gly Pro Arg Ser				
85				90
gcg atg gcc gag gtg cac cag cgg cgt gag ctg ctg cgc cgg gcc				336
Ala Met Ala Glu Val His Gln Gln Arg Arg Glu Leu Leu Arg Arg Ala				
100				105
tgc agc cgc cac acg cga cgc caa cgc ctg ctg cag ccg gag gac ctg				384
Cys Ser Arg His Thr Arg Arg Gln Arg Leu Leu Gln Pro Glu Asp Leu				
115				120
cgt cac gtg ctg gtg gac gac gcg cac cgg ctg ctg tac tgc tac gtg				432
Arg His Val Leu Val Asp Asp Ala His Arg Leu Leu Tyr Cys Tyr Val				
130				135
cct aag gtg gcc tgc acc aac tgg aag cgt gtg atg ctg gcg ttg cgc				480
Pro Lys Val Ala Cys Thr Asn Trp Lys Arg Val Met Leu Ala Leu Arg				
145				150
ggc cgt ggg gat cca agc gca atc cct gcg cac gag gcg cat gcg cct				528
Gly Arg Gly Asp Pro Ser Ala Ile Pro Ala His Glu Ala His Ala Pro				

165 170 175

ggc ctg ctg ccc tcg ctg gcc gac ttt gcg ccg gct gag gtc aac tgg 576

Gly Leu Leu Pro Ser Leu Ala Asp Phe Ala Pro Ala Glu Val Asn Trp

180 185 190

cgg ctg cgc gac tac ctg acc ttt ctc ttc gtg ccg gag ccc ttc gag 624

Arg Leu Arg Asp Tyr Leu Thr Phe Leu Phe Val Arg Glu Pro Phe Glu

195 200 205

cgc ctg gcg tca gcc tac cgc aac aag ctg gcg ccg cca cac agc gcg 672

Arg Leu Ala Ser Ala Tyr Arg Asn Lys Leu Ala Arg Pro His Ser Ala

210 215 220

gcc ttc cag cgg cgc tat ggc aca cgc atc gtg cgt cgc cta cga cca 720

Ala Phe Gln Arg Arg Tyr Gly Thr Arg Ile Val Arg Arg Leu Arg Pro

225 230 235 240

cac gcg cag ccc gat gcg ctg gcc cgc ggc cac gac gtg cgc ttc gcc 768

His Ala Gln Pro Asp Ala Leu Ala Arg Gly His Asp Val Arg Phe Ala

245 250 255

gag ttc ctg gcc tac ctg ctc gac ccg cgc acg cgc cgt cat gag ccc 816

Glu Phe Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Arg Thr Arg Arg His Glu Pro

260 265 270

ttc aac gaa cac tgg gag cgc gca cac gcg ctg tgc cat ccg tgc cta 864

Phe Asn Glu His Trp Glu Arg Ala His Ala Leu Cys His Pro Cys Leu

275 280 285

gtg cgc tat gat gta gtg ggc aag ttt gag acg ata gca gat gat gct 912

Val Arg Tyr Asp Val Val Gly Lys Phe Glu Thr Ile Ala Asp Asp Ala

290 295 300

gcc ttc gtg ctg gac ctg gtg ggt gag cct ggg cta cgt ttc cct gct 960

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

305 310 315 320

cca ccg ctg agg cca gag aag gac ctt acg cgt gag cag gcc cgg cgc 1008

Pro Pro Leu Arg Pro Glu Lys Asp Leu Thr Arg Glu Gln Ala Arg Arg
 325 330 335
 ctt ttc cag gac atc agc ccc ttc tac cag cgt cgc ctc ttt aac ctc 1056
 Leu Phe Gln Asp Ile Ser Pro Phe Tyr Gln Arg Arg Leu Phe Asn Leu
 340 345 350
 tat aag atg gac ttt ctg ctc ttc aat tac tct gcc cct tcc tac ctg 1104
 Tyr Lys Met Asp Phe Leu Leu Phe Asn Tyr Ser Ala Pro Ser Tyr Leu

 355 360 365
 cga ctg caa taa ggggttggg tgcaatagag ccagtggctg ctgtgaccag 1156
 Arg Leu Gln
 370
 gagggccacca ggaggctctgg aacgaacctg gttgtgtgga ttggagacct tatccagtgg 1216
 gcctgaccaa gagtctggcc actggtcaca ctcattccga ctggtaggg tacaggttgc 1276
 ttttaggtgac cataaccttg tcagggcgtt tctgctgtta gtttgatgtg tgtctttcc 1336

 tcccaactctg cagatgtcag gtttcttctt aggactccag gttttagtgc ttgggtttg 1396
 gttttagagg ccatttctca gtcttgcgtg tgttagaacct gtccgtggca tgggtctaca 1456
 agacagaatg tcatggcttg gttcagtgtg gcctaaggc ttgtcagcat ttactgctta 1516
 ggagtttaca ttagctgcct gccacccctt cagtcacagg atggtagca ctaccactcc 1576
 acatctaccc ggcgtatcta ctttgcgtt cagccttgc agaggctggaa tcttccctg 1636
 tgcagcaaa gccaagatg caatactgtg gcagctttt cagctcaactt ttatttttt 1696
 tgggtttttt taaaataaat atgttttgc ac 1728

 <210> 11
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11

 Met Thr Val Ala Cys His Ala Cys Gln Ala Gln His Gly Lys Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Gln Ala Ala Leu Ala Gly Gly Lys Ser Gly Cys Cys Thr
 20 25 30
 Pro Ala Pro Val Arg Pro Ala Ser Arg Val Thr Thr Gly Lys Asp Ala
 35 40 45

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

50	55	60
Thr Phe Glu Asn Lys Ala Leu Gly Ser Ser Trp Phe Gly Gly Val Arg		
65	70	75
Lys Ser Pro Leu Gln Leu Leu Arg Asp Leu Asp Gln Gly Pro Arg Ser		
85	90	95
Ala Met Ala Glu Val His Gln Gln Arg Arg Glu Leu Leu Arg Arg Ala		
100	105	110
Cys Ser Arg His Thr Arg Arg Gln Arg Leu Leu Gln Pro Glu Asp Leu		
115	120	125
Arg His Val Leu Val Asp Asp Ala His Arg Leu Leu Tyr Cys Tyr Val		
130	135	140
Pro Lys Val Ala Cys Thr Asn Trp Lys Arg Val Met Leu Ala Leu Arg		
145	150	155
Gly Arg Gly Asp Pro Ser Ala Ile Pro Ala His Glu Ala His Ala Pro		
165	170	175
Gly Leu Leu Pro Ser Leu Ala Asp Phe Ala Pro Ala Glu Val Asn Trp		
180	185	190
Arg Leu Arg Asp Tyr Leu Thr Phe Leu Phe Val Arg Glu Pro Phe Glu		
195	200	205
Arg Leu Ala Ser Ala Tyr Arg Asn Lys Leu Ala Arg Pro His Ser Ala		
210	215	220
Ala Phe Gln Arg Arg Tyr Gly Thr Arg Ile Val Arg Arg Leu Arg Pro		
225	230	235
His Ala Gln Pro Asp Ala Leu Ala Arg Gly His Asp Val Arg Phe Ala		
245	250	255
Glu Phe Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Arg Thr Arg Arg His Glu Pro		
260	265	270
Phe Asn Glu His Trp Glu Arg Ala His Ala Leu Cys His Pro Cys Leu		
275	280	285
Val Arg Tyr Asp Val Val Gly Lys Phe Glu Thr Ile Ala Asp Asp Ala		

290	295	300	
Ala Phe Val Leu Asp Leu Val Gly Glu Pro Gly Leu Arg Phe Pro Ala			
305	310	315	320
Pro Pro Leu Arg Pro Glu Lys Asp Leu Thr Arg Glu Gln Ala Arg Arg			
325	330	335	
Leu Phe Gln Asp Ile Ser Pro Phe Tyr Gln Arg Arg Leu Phe Asn Leu			
340	345	350	
Tyr Lys Met Asp Phe Leu Leu Phe Asn Tyr Ser Ala Pro Ser Tyr Leu			
355	360	365	
Arg Leu Gln			
370			

<210> 12

<211> 2073

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (129)..(1259)

<400> 12

ccggccctgg	tcctgcctg	cacccggga	gctggccacc	cactatccct	ccctcccgaa	60
gacctccagc	ccctgctgca	gtcacccccc	ctgcagccctc	gagggtggcg	agggtctggcc	120
gcagcacc	atg ttt ccc	cgc cct	ctg acc cca	ctg gct	gcc ccg aaa	170
Met Phe Pro Arg Pro Leu Thr Pro Leu Ala Ala Pro Lys Ser						
1	5	10				
gcg gag acc ctg ggc cgc acg cca agg cgg gcc cca ttg ggc cgg gcc						218

Ala Glu Thr Leu Gly Arg Thr Pro Arg Arg Ala Pro Leu Gly Arg Ala

15	20	25	30		
cgg gct ggg ctc ggg ggg ccg ccc ctg ctg ctg ccg tcc atg ctg atg					266
Arg Ala Gly Leu Gly Gly Pro Pro Leu Leu Leu Pro Ser Met Leu Met					
35	40	45			
ttc gct gta atc gtg gcc tcc agc gga ctg ctg ctc atg atc gag cga					314
Phe Ala Val Ile Val Ala Ser Ser Gly Leu Leu Leu Met Ile Glu Arg					

50	55	60	
ggc atc cta tcg gag atg aaa ccc ctt ccc ctg cac cct ccc agc cac			362
Gly Ile Leu Ser Glu Met Lys Pro Leu Pro Leu His Pro Pro Ser His			
65	70	75	
aaa ggc gcg gcc tgg agc ggg aca gat cct aag cct aga ggc cta tcc			410
Lys Gly Ala Ala Trp Ser Gly Thr Asp Pro Lys Pro Arg Gly Leu Ser			
80	85	90	
ttg gat gct ggg gac tcg gac ttg caa gtg agg gag gac atc cga aac			458
Leu Asp Ala Gly Asp Ser Asp Leu Gln Val Arg Glu Asp Ile Arg Asn			
95	100	105	110
cg acc ttg agg gcc gtg tgc gga caa cca ggc atg ccc cgg gac ccc			506
Arg Thr Leu Arg Ala Val Cys Gly Gln Pro Gly Met Pro Arg Asp Pro			
115	120	125	
tgg gac ttg ccg gtg gga cag cgg cgc acc ctg ctg cgc cac att ctc			554
Trp Asp Leu Pro Val Gly Gln Arg Arg Thr Leu Leu Arg His Ile Leu			
130	135	140	
gta agt gac cgc tac cgc ttc ctc tac tgc tat gtc ccc aaa gtg gcc			602
Val Ser Asp Arg Tyr Arg Phe Leu Tyr Cys Tyr Val Pro Lys Val Ala			
145	150	155	
tgc tct aac tgg aaa cgt gtg ctg aag gtg ctg gct ggc gtc ctg aac			650
Cys Ser Asn Trp Lys Arg Val Leu Lys Val Leu Ala Gly Val Leu Asn			
160	165	170	
aac gtg gat gtc cgc ctc aag atg gac cac ccc agt gac ttg gtg ttt			698
Asn Val Asp Val Arg Leu Lys Met Asp His Pro Ser Asp Leu Val Phe			
175	180	185	190
ctg gca gac ctg cgg cct gag gag att cgc tac cgt ctg cag cac tac			746
Leu Ala Asp Leu Arg Pro Glu Glu Ile Arg Tyr Arg Leu Gln His Tyr			
195	200	205	
ttc aag ttc ctg ttt gtg cga gac ccc ttg gaa cgc ctc ctg tct gct			794
Phe Lys Phe Leu Phe Val Arg Asp Pro Leu Glu Arg Leu Leu Ser Ala			
210	215	220	

tac	cgt	aac	aag	ttt	gga	gag	atc	cga	gag	tac	cag	cga	tat	ggg	842
Tyr Arg Asn Lys Phe Gly Glu Ile Arg Glu Tyr Gln Gln Arg Tyr Gly															
225		230		235											
gcc gaa att gtc agg cgc tac agg gct gga gct ggt ccc agc cct gca 890															
Ala Glu Ile Val Arg Arg Tyr Arg Ala Gly Ala Gly Pro Ser Pro Ala															
240		245		250											
ggg gac gat gtc acc ttc cca gag ttc ctg aga tac ctg gtg gat gag 938															
Gly Asp Asp Val Thr Phe Pro Glu Phe Leu Arg Tyr Leu Val Asp Glu															
255		260		265		270									
gat cct gaa cat atg aat gag cat tgg atg cct gtg tac cac ctg tgc 986															
Asp Pro Glu His Met Asn Glu His Trp Met Pro Val Tyr His Leu Cys															
275		280		285											
caa cca tgt gct gtg cac tac gac ttc gtg ggt tcc tat gag agg ctg 1034															
Gln Pro Cys Ala Val His Tyr Asp Phe Val Gly Ser Tyr Glu Arg Leu															
290		295		300											
gag gct gat gcc aac cag gtg ctg gag tgg gtg cgg gcc cca ccc cat 1082															
Glu Ala Asp Ala Asn Gln Val Leu Glu Trp Val Arg Ala Pro Pro His															
305		310		315											
gtc cgg ttc cca gct cgc cag gcc tgg tac cgg cca gcc agc cca gaa 1130															
Val Arg Phe Pro Ala Arg Gln Ala Trp Tyr Arg Pro Ala Ser Pro Glu															
320		325		330											
agt ctg cat tac cac ttg tgc aat gtt cca cgg gcc ctg ctt caa gat 1178															
Ser Leu His Tyr His Leu Cys Asn Val Pro Arg Ala Leu Leu Gln Asp															
335		340		345		350									
gtg cta cct aag tat atc ctg gac ttc tcc ctc ttt gct tac cca ctg 1226															
Val Leu Pro Lys Tyr Ile Leu Asp Phe Ser Leu Phe Ala Tyr Pro Leu															
355		360		365											
ccc aat gtc acc aag gaa gcc tgt cac caa tga cagtaggcca gcacctttg 1279															
Pro Asn Val Thr Lys Glu Ala Cys His Gln															
370		375													
gagttgggt ttaatgatat cagcttggg atgtcttca gagaaaactcc tggctctgg 1339															

tggcttcctg gttctctag gtgtctccat atctcagtggtt taaggactgt ccttggaggt 1399

ccttgtccac agtggctcg aggacagagc tagaaaggag gcctgctgct ttcactgggt 1459
 aactgcctct ctagggcc tgtggtatcc gtgtctgcag ggcaccagt gttattaaag 1519
 ccatatgttt gatcgaaaga ctgacttcag cccctggct gctgggtcta tgcatgtccac 1579
 ctggctgtt gtaatttaac ctgtggccaa atccaaata tgacacttagc caagcacatg 1639
 atcatgccta ggaccaatgg ctgtgacccc ctattcaccc atccatgga cctcaggact 1699
 ggagttagt gttgtgcctt agaaatgaaa tgtgtcaat tctactccag acttttacat 1759
 ttccctctct tgcttaggtct gaatcatttt tctaaggaaa gagaacgga agtggggccc 1819

ttacctcgaa gctctaaagc ccagccctc aagcatccaa agacgcctgt gcctgaccc 1879
 ttcccttagggc tcctggagca tcttcaataa gcctccctc cctacaaacc tttggagact 1939
 atgtgagact gtatggccca tataatctggc tgtcaattgt ctaatgcatt tattaaat 1999
 gtgtatattt taataggatc ctgttaaggg ctgacttttataaagctttt ttcataataca 2059
 aaaaaaaaaa aaaa 2073

<210> 13

<211> 376

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Met Phe Pro Arg Pro Leu Thr Pro Leu Ala Ala Pro Lys Ser Ala Glu

1 5 10 15
 Thr Leu Gly Arg Thr Pro Arg Arg Ala Pro Leu Gly Arg Ala Arg Ala

20 25 30

Gly Leu Gly Gly Pro Pro Leu Leu Leu Pro Ser Met Leu Met Phe Ala

35 40 45

Val Ile Val Ala Ser Ser Gly Leu Leu Leu Met Ile Glu Arg Gly Ile

50 55 60

Leu Ser Glu Met Lys Pro Leu Pro Leu His Pro Pro Ser His Lys Gly

65 70 75 80
 Ala Ala Trp Ser Gly Thr Asp Pro Lys Pro Arg Gly Leu Ser Leu Asp

85 90 95

Ala Gly Asp Ser Asp Leu Gln Val Arg Glu Asp Ile Arg Asn Arg Thr

100	105	110
Leu Arg Ala Val Cys Gly Gln Pro Gly Met Pro Arg Asp Pro Trp Asp		
115	120	125
Leu Pro Val Gly Gln Arg Arg Thr Leu Leu Arg His Ile Leu Val Ser		
130	135	140
Asp Arg Tyr Arg Phe Leu Tyr Cys Tyr Val Pro Lys Val Ala Cys Ser		
145	150	155
Asn Trp Lys Arg Val Leu Lys Val Leu Ala Gly Val Leu Asn Asn Val		
165	170	175
Asp Val Arg Leu Lys Met Asp His Pro Ser Asp Leu Val Phe Leu Ala		
180	185	190
Asp Leu Arg Pro Glu Glu Ile Arg Tyr Arg Leu Gln His Tyr Phe Lys		
195	200	205
Phe Leu Phe Val Arg Asp Pro Leu Glu Arg Leu Leu Ser Ala Tyr Arg		
210	215	220
Asn Lys Phe Gly Glu Ile Arg Glu Tyr Gln Gln Arg Tyr Gly Ala Glu		
225	230	235
Ile Val Arg Arg Tyr Arg Ala Gly Ala Gly Pro Ser Pro Ala Gly Asp		
245	250	255
Asp Val Thr Phe Pro Glu Phe Leu Arg Tyr Leu Val Asp Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu His Met Asn Glu His Trp Met Pro Val Tyr His Leu Cys Gln Pro		
275	280	285
Cys Ala Val His Tyr Asp Phe Val Gly Ser Tyr Glu Arg Leu Glu Ala		
290	295	300
Asp Ala Asn Gln Val Leu Glu Trp Val Arg Ala Pro Pro His Val Arg		
305	310	315
Phe Pro Ala Arg Gln Ala Trp Tyr Arg Pro Ala Ser Pro Glu Ser Leu		
325	330	335
His Tyr His Leu Cys Asn Val Pro Arg Ala Leu Leu Gln Asp Val Leu		
340	345	350

Pro Lys Tyr Ile Leu Asp Phe Ser Leu Phe Ala Tyr Pro Leu Pro Asn

355 360 365

Val Thr Lys Glu Ala Cys His Gln

370 375

<210> 14

<211> 6000

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (496)..(1914)

<400> 14

cttagccact gaaccatctc tccagcctct gtttgggtt gttgtttga gacagaatca	60
aaaggctggta ctaaagtaca tattgttagct aaagatggct tccaaactctc gcctgcctc	120
cagagtgtta ggggtgtgacc tttaaatgac ctattaaaga aaccccaaca ggtgttagagt	180
acaccgtgtta tcccagctct taggagggtt gacagatgga taaagagggtc caggtgtccc	240
ggactacata gagagaccct atctcaaaag agaggcgaag acttaggttt tgagagtggg	300
cctgagggtct ctcttcaaaa gtttataga aagatgtctc tggccctgt ctatgaacac	360
ggatggcctg agcacctgtc tttcacagg atcagagtgt ccccacctg aagagggtcg	420

attgggtccc aagctatgct cctgagctga gtgcctgcag ccagtctgag gaactccatg	480
gcgcgcgcgc tccttccccc atg gag aaa gga ctc gct ttg cct cag gat ttc cgg	531
Met Glu Lys Gly Leu Ala Leu Pro Gln Asp Phe Arg	

1 5 10

gac ctt gta cac agc cta aag att cga ggc aga tac gtc ttg ttc ctg	579
Asp Leu Val His Ser Leu Lys Ile Arg Gly Arg Tyr Val Leu Phe Leu	

15 20 25

gca ttt gtg gtc ata gtt ttt atc ttc att gaa aag gaa aat aaa atc	627
Ala Phe Val Val Ile Val Phe Ile Phe Glu Lys Glu Asn Lys Ile	

30 35 40

ata tcc agg gtc tcc gac aag ctg aag cag atc cct cat ttt gtg gca	675
Ile Ser Arg Val Ser Asp Lys Leu Lys Gln Ile Pro His Phe Val Ala	

45 50 55 60

gat gcc aac agc act gac cca gcc ctg ctc tta tcg gag aat gca tct 723

 Asp Ala Asn Ser Thr Asp Pro Ala Leu Leu Leu Ser Glu Asn Ala Ser
 65 70 75
 ctc ttg tcc ctg agc gag ttg gat tcc acc ttt tcc cat ctg cgg agc 771
 Leu Leu Ser Leu Ser Glu Leu Asp Ser Thr Phe Ser His Leu Arg Ser
 80 85 90
 cgc ctg cac aac ctg agc ctg cag ctg ggc gtg gag cca gca atg gag 819
 Arg Leu His Asn Leu Ser Leu Gln Leu Gly Val Glu Pro Ala Met Glu

 95 100 105
 agc cag gag gct ggg gca gag aag cca tcc cag cag gct gga gca ggg 867
 Ser Gln Glu Ala Gly Ala Glu Lys Pro Ser Gln Gln Ala Gly Ala Gly
 110 115 120
 acc cgg cgc cac gtg ctt ctc atg gcc acc acc cgc acg ggt tcc tcg 915
 Thr Arg Arg His Val Leu Leu Met Ala Thr Thr Arg Thr Gly Ser Ser
 125 130 135 140

 ttc gtg ggc gag ttc ttc aac cag cag ggc aat atc ttc tac ctc ttc 963
 Phe Val Gly Glu Phe Phe Asn Gln Gln Gly Asn Ile Phe Tyr Leu Phe
 145 150 155
 gag cca ctg tgg cac atc gag cgc acc gtg ttc ttc cag cag cga ggc 1011
 Glu Pro Leu Trp His Ile Glu Arg Thr Val Phe Phe Gln Gln Arg Gly
 160 165 170
 gcc agc gcg gct ggt tca gcc ttg gtc tac cgt gat gtc ctc aag cag 1059

 Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Leu Val Tyr Arg Asp Val Leu Lys Gln
 175 180 185
 ttg ttg cta tgc gac ctg tat gtg ctg gag ccc ttc atc agc cct ccg 1107
 Leu Leu Leu Cys Asp Leu Tyr Val Leu Glu Pro Phe Ile Ser Pro Pro
 190 195 200
 ccc gag gac cac ttg act cag ttc ctg ttc cgc cgg gga tcc agc cgt 1155
 Pro Glu Asp His Leu Thr Gln Phe Leu Phe Arg Arg Gly Ser Ser Arg

205	210	215	220	
tca ctc tgc gag gat ccg gtg tgc aca ccc ttc gtc aag aag gtc ttt				1203
Ser Leu Cys Glu Asp Pro Val Cys Thr Pro Phe Val Lys Lys Val Phe				
225	230	235		
gag aag tac cac tgc agg aac cgt cgc tgc ggg cca ctc aac gtg acc				1251
Glu Lys Tyr His Cys Arg Asn Arg Arg Cys Gly Pro Leu Asn Val Thr				
240	245	250		
255	260	265		
ttg gcg ggc gag gcc tgc cgc cgc aag gac cac gtg gcc ctc aag gct				1299
Leu Ala Gly Glu Ala Cys Arg Arg Lys Asp His Val Ala Leu Lys Ala				
270	275	280		
gtg cgc atc cgt cag ctg gag ttc ctg cag ccg cta gtt gag gac ccg				1347
Val Arg Ile Arg Gln Leu Glu Phe Leu Gln Pro Leu Val Glu Asp Pro				
285	290	295	300	
agg ttg gat cta cga gtc att cag ctg gtg cgc gac ccc cgg gcc gtg				1395
Arg Leu Asp Leu Arg Val Ile Gln Leu Val Arg Asp Pro Arg Ala Val				
305	310	315		
ctg gct tca cgc ata gtg gcc ttt gcg ggc aag tat gag aac tgg aag				1443
Leu Ala Ser Arg Ile Val Ala Phe Ala Gly Lys Tyr Glu Asn Trp Lys				
320	325	330		
aag tgg ctg tcc gag ggg cag gac cag ctg agc gag gat gag gtg cag				1491
Lys Trp Leu Ser Glu Gly Gln Asp Gln Leu Ser Glu Asp Glu Val Gln				
335	340	345		
cga ttg cgg ggc aac tgt gag agc atc cgc ctg tct gca gag ctg ggc				1539
Arg Leu Arg Gly Asn Cys Glu Ser Ile Arg Leu Ser Ala Glu Leu Gly				
350	355	360		
ttg cgg cag cca gcc tgg ctg cgc ggt cgt tac atg ctg gtg cgc tat				1587
Leu Arg Gln Pro Ala Trp Leu Arg Gly Arg Tyr Met Leu Val Arg Tyr				
365	370	375	380	
gag gat gtg gca cgc agg cca ctg cag aag gcc cga gag atg tac agc				1635
Glu Asp Val Ala Arg Arg Pro Leu Gln Lys Ala Arg Glu Met Tyr Ser				

ttt	gct	ggc	atc	ccc	ttg	acc	ccg	cag	gtg	gag	gac	tgg	atc	cag	aag	1683
Phe Ala Gly Ile Pro Leu Thr Pro Gln Val Glu Asp Trp Ile Gln Lys																
385	390	395														
aac	acg	cag	gct	aca	cgc	gac	agc	agc	gat	gtc	tac	tcc	act	cag	aaa	1731
Asn Thr Gln Ala Thr Arg Asp Ser Ser Asp Val Tyr Ser Thr Gln Lys																
400	405	410														
aac	tct	tct	gag	cag	ttt	gag	aag	tgg	cgc	ttc	agc	atg	cct	ttc	aag	1779
Asn Ser Ser Glu Gln Phe Glu Lys Trp Arg Phe Ser Met Pro Phe Lys																
415	420	425														
ctg	gca	cag	gtg	gta	cag	gct	gcc	tgt	ggc	ccg	acc	atg	cac	ctc	ttt	1827
Leu Ala Gln Val Val Gln Ala Ala Cys Gly Pro Thr Met His Leu Phe																
430	435	440														
ggc	tac	aag	ttg	gcc	agg	gat	gcc	gcc	tca	ctc	acc	aac	cgc	tcc	atc	1875
Gly Tyr Lys Leu Ala Arg Asp Ala Ala Ser Leu Thr Asn Arg Ser Ile																
445	450	455	460													
agc	ctg	ctg	gag	gag	cgg	ggc	acc	ttc	tgg	gtc	acg	tag	tggggatgt		1924	
Ser Leu Leu Glu Glu Arg Gly Thr Phe Trp Val Thr																
465	470															
ctgggaccct	tggaactcct	tcttgtaaa	ggctggccct	gttccctca	cacc	cagecct										1984
ggcagtgaga	catagccctg	gcagaaagt	aaaatggg	gcgtatgg	gaacat	agcc										2044
cctggctgta	gccccgtggc	cccctgccc	ctagactccc	cagagcagct	acag	cttaggg										2104
ccttgggctc	ctctgaggac	accctgtctc	cttagtgta	ctggcataa	ggtgtc	ctca										2164
ccctatgacc	tgcagtgtcc	cgagcagg	tc aaggtaggtt	cctgtgtgt	gacacac	ctc										2224
cctagcttt	tctcacacag	tctacacgaa	gcctgtaaag	gcctgttagt	tgtgtgg	ctca										2284
ggagtccaag	tat	ttaa	ccaa	ccaga	agg	gg	tgt	agcc	ctgc	agg	cctc	tc	agac	ctcc		2344
tactgttata	agtgttaacc	tctccgctc	tgagt	cagag	aag	ctgg	gtt	ggat	ctgg	gtt	gag					2404
cctggaaagg	aggaggac	cctagg	gtga	gga	agg	ggac	c	ttt	gaag	c	tct	cagg	aa			2464
cagtggctgt	gtacc	agg	ctc	at	agaa	aaat	gt	ttt	gtat	cg	tgtt	ctgt	cat	gag		2524
tatcaatcag	cctgtt	gtat	gca	agacaca	caa	agt	gtc	tgtt	aaac	aca	ca	agg	ccagg			2584
ggtgtggctc	agcggtaa	ag	cccttgc	c	tct	cat	gccc	agg	ccct	gtgt	gatt	tc				2644
tagcactata	aatata	agg	aaaataa	agcc	at	aca	ta	gtc	ag	gtc	ag	aca	gag	gaca		2704

gaaaagcgta ataaacattc cccctctca taagcacacg ctctgcctct gtctctgtct	2764
ctgtctctct ctgtctctgt ctctctctgt ctctctctct cactctctct ctctctctct	2824
ctctctaca cacacacaca cacacacaca cacaaacaca cacacacaca ctggtacaga	2884
aaagcttccc ttctccactc ttatgctca ccatgtttt aggattttgg tttgtttgtt	2944
ttgtttggg ttcttatata tctaaacaag gagccttaaa ttacatctt ttgggattac	3004
gtggcgaggg ggagcagcag ggagcatttgc ttctggtaa aaggatagac cagaaaggac	3064
ttcccttgg atgatcggag tcatgcagag cccccaggtt cccacatgtt ctgtgtgaac	3124
ttcatgtgga atgactcaca gaagtgacta ccttaggcgc tcgctctgta gctcaatgtg	3184
cgtagagttt gtctattgta taggaagccc tgggtctgt gcccgtcccc acaccatata	3244
ggtagatgg cgtgtaccca tatccagca ttccagaaat caaagggtgg cggtcaaaag	3304
ttcaagggtgc agctatgtat ctttgagat gtccgagtttcttataaagctccc tctactgaga	3364
gctgctagta ttccctctca agaacaggtt atttggaaat ctcttctgt aagcccaac	3424
atttggggga ggggaggatg ggggaactct tgactgagca gctagtttc cccaagcaga	3484
agttcttctc tcccaagtgc agctgaggtt tagtgcctcg gctagcctcg gaactggctc	3544
agtgggggtt ggcacgctga cttcctggac aattgctgca tctgacactg tgagcgcacca	3604
ggacaccgga tgttagcat ggatgtggc ctagcacagg tgtgaaagag gacagttagg	3664
acactcactg ttgggttttgc ttatccacct gttcagccgc cgggtcccac acataggta	3724
tcttcgtca ctcaagccgg cctctgttt tgatttaac aatccaagag caagtgtgt	3784
ggggacaaag agacaccagc tcttcataact tgatggagac cgggacagga tgctgcaggc	3844
aggctcggga gtgcattatc gtttctctg agctttcat ccaggccata ttccctttc	3904
tgcacatgcac ctgggggtggg aggggctgag ctggagttt ccgtccttct tccctgtgg	3964
ggtgggagat ggggctcaag gtctccatct ctggctccc tgaggacaga acccccacag	4024
tggacctttg ggcctctca ggacattgac aatgttgtgt gcactgcaag ttgactttat	4084
ttatggta gaaaaagag atggattatc ttagcaggat ctgaaactgt accctagtc	4144
agaagtacaa ttaataacat tattataat aacaattggg atgattcaaa ggtcacacac	4204
acaccagacc accaagaac cattagggat atgaggcga gccaggtcat ggaagccag	4264
aatgctacag agattctgtg ggtctattat tgatcagaaa atacaacatg gggggccctt	4324
ttctatggca taactcaggat gtctgcaaag acagagcagc tcaggtgggt ggataggcag	4384
gcagatggag cttgaatca catccctga ggctcagcca gccagtgca atcctcaagg	4444

ttcggaaagg gacagtgtag cgccaaacta ctggcatct tctctgatgc ttagaggctc	4504
ttaccaagg gcttgatgga gaaagtggcc atgtgggtt catggacaa ctgctcaccc	4564
aacttcaaag atcaaaggc acccaggtgg cctatgacag tgacacttt tcctaccatt	4624
aggggtgtct gcccccactg aaagccatga aatttctggc cctaaagggg taggaaggac	4684
ttaggagtag cagatggttt gatccatcc cccacacaca cacacacaca tccctcagct	4744
gtctccaca ttagagccac ttcaagtgtc catggacttgc tccctttagt acatcctgga	4804
ttttgaagga tagaaacatc cccaaagatgg tctcgtgtt aatcccacaac agaggcagaa	4864

gggtcataact gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagaggagtg gggccagac	4924
cctcaagaag ccaagtgggt ctggcaacc tgcacatg agaaggagg aacatcaacta	4984
aaatcaggc ctggctggt gtgtgttgg tgagatcccg tggagtggct ggctagatata	5044
ggatgagttt tctgagcatg ctcacacacc cccaaacttca cattcttaga aatagcaca	5104
ccataatgcc ttacctaataa aggtgaggc aaagcttgc attaattccc agtgcgtgaa	5164
gacctccggg atcctttagt ctgtgtgtcc ttgtcagttt acgggacag gctccttagg	5224
tattcctgac atagaggtaa ggtgctgccc ttgctgcctt gcataagctg tgacaagctt	5284

cttactgggc acatagaacg gctctgtcat ctgcttccac taaatttggg cttggacttt	5344
gcctcctgcc aaatctccat ctctgctgga tagtctagtc cctagggtct aaccaccacc	5404
ctccacttcc tggtgggtcc tacaagcgct gtcttgc cagtaccgg atgggtgcct	5464
gcctcatggc taaatgttac aggacatctt cccagactga gtggcatgg catgtgcata	5524
tatgttcatg agtacatgca tgggtgtgg gggtgatgg gtgcattctg ttctgcttct	5584
ggtgcagcta cacagccaca acctcttct gtcattgacc ttcttggct tctttagcc	5644
acagataatc ttccaatgcc cgattctgtt gttctcatct gagagctgac aaccagcgc	5704

tcagagtata gttcatgacc taggaaaccc ttctcctggt agcttactga acttatttaa	5764
ttaaaaacga acatataggg gttggagaga tgggtcatg gttaaagagca cggcgtgttt	5824
ttgcaaagga cctgagttca aatcccagca accatatggt ggcttacaac catctgtat	5884
gagttctggt gccctttctt ggcattgcagg tgcattgtca gatagagcac tcctatgtat	5944
aaaataaata aatcttttaa ataaataaat aatgaacat gaaaaaaaaaaa aaaaaaa	6000

<210> 15

<211> 472

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Met Glu Lys Gly Leu Ala Leu Pro Gln Asp Phe Arg Asp Leu Val His

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Arg Gly Arg Tyr Val Leu Phe Leu Ala Phe Val Val

20 25 30

Ile Val Phe Ile Phe Ile Glu Lys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Arg Val

35 40 45

Ser Asp Lys Leu Lys Gln Ile Pro His Phe Val Ala Asp Ala Asn Ser

50 55 60

Thr Asp Pro Ala Leu Leu Ser Glu Asn Ala Ser Leu Leu Ser Leu

65 70 75 80

Ser Glu Leu Asp Ser Thr Phe Ser His Leu Arg Ser Arg Leu His Asn

85 90 95

Leu Ser Leu Gln Leu Gly Val Glu Pro Ala Met Glu Ser Gln Glu Ala

100 105 110

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

115 120 125

Val Leu Leu Met Ala Thr Thr Arg Thr Gly Ser Ser Phe Val Gly Glu

130 135 140

Phe Phe Asn Gln Gln Gly Asn Ile Phe Tyr Leu Phe Glu Pro Leu Trp

145 150 155 160

His Ile Glu Arg Thr Val Phe Phe Gln Gln Arg Gly Ala Ser Ala Ala

165 170 175

Gly Ser Ala Leu Val Tyr Arg Asp Val Leu Lys Gln Leu Leu Leu Cys

180 185 190

Asp Leu Tyr Val Leu Glu Pro Phe Ile Ser Pro Pro Pro Glu Asp His

195 200 205

Leu Thr Gln Phe Leu Phe Arg Arg Gly Ser Ser Arg Ser Leu Cys Glu

210 215 220

Asp Pro Val Cys Thr Pro Phe Val Lys Lys Val Phe Glu Lys Tyr His

225 230 235 240

Cys Arg Asn Arg Arg Cys Gly Pro Leu Asn Val Thr Leu Ala Gly Glu

245	250	255
Ala Cys Arg Arg Lys Asp His Val Ala Leu Lys Ala Val Arg Ile Arg		
260	265	270
Gln Leu Glu Phe Leu Gln Pro Leu Val Glu Asp Pro Arg Leu Asp Leu		
275	280	285
Arg Val Ile Gln Leu Val Arg Asp Pro Arg Ala Val Leu Ala Ser Arg		
290	295	300
Ile Val Ala Phe Ala Gly Lys Tyr Glu Asn Trp Lys Lys Trp Leu Ser		
305	310	315
Glu Gly Gln Asp Gln Leu Ser Glu Asp Glu Val Gln Arg Leu Arg Gly		
325	330	335
Asn Cys Glu Ser Ile Arg Leu Ser Ala Glu Leu Gly Leu Arg Gln Pro		
340	345	350
Ala Trp Leu Arg Gly Arg Tyr Met Leu Val Arg Tyr Glu Asp Val Ala		
355	360	365
Arg Arg Pro Leu Gln Lys Ala Arg Glu Met Tyr Ser Phe Ala Gly Ile		
370	375	380
Pro Leu Thr Pro Gln Val Glu Asp Trp Ile Gln Lys Asn Thr Gln Ala		
385	390	395
400		
Thr Arg Asp Ser Ser Asp Val Tyr Ser Thr Gln Lys Asn Ser Ser Glu		
405	410	415
Gln Phe Glu Lys Trp Arg Phe Ser Met Pro Phe Lys Leu Ala Gln Val		
420	425	430
Val Gln Ala Ala Cys Gly Pro Thr Met His Leu Phe Gly Tyr Lys Leu		
435	440	445
Ala Arg Asp Ala Ala Ser Leu Thr Asn Arg Ser Ile Ser Leu Leu Glu		
450	455	460
Glu Arg Gly Thr Phe Trp Val Thr		
465	470	
<210> 16		
<211> 2080		

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (147)..(1601)

<400> 16

caccggccgg	ctgctccact	ccgctccacc	caacatttag	ggagacccga	agaggccgga	60
gccgaggact	ttgggctggg	tttctggac	agaaccagca	ggcgcctact	ctgctctggg	120
tgggagagt	gaggattcgg	tgaact	atg aag ggc	cgg cgg cgg	cgc cga	173
Met Lys Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg						

1 5

aag tat tgc aag ttc acg ctg ctc ttg gcg	ctg tac acg ctt ttg cta	221
Lys Tyr Cys Lys Phe Thr Leu Leu Leu Ala	Leu Tyr Thr Leu Leu Leu	
10 15 20 25		
ctt ctt gtc ccc tct gta ctg gac agc cac	agc gag cag gag aag ggc	269
Leu Leu Val Pro Ser Val Leu Asp Ser His	Ser Glu Gln Asp Lys Gly	
30 35 40		

agg aac tgc ccc ggc ctg cag cgc agc ttg ggt	gtg tgg agc ctg gag	317
Arg Asn Cys Pro Gly Leu Gln Arg Ser Leu Gly	Val Trp Ser Leu Glu	
45 50 55		
gcg gcg gcg gcc ggg gaa cgt gag cag ggc gct	gag gtg cgg tcc ctg	365
Ala Ala Ala Ala Gly Glu Arg Glu Gln Gly	Ala Glu Val Arg Ser Leu	
60 65 70		
gcc gaa gga aac ccg gat cga tcc ccc ggg tcc	ccc ggc aac ctc agc	413

Ala Glu Gly Asn Pro Asp Arg Ser Pro Gly Ser	Pro Gly Asn Leu Ser	
75 80 85		
gcc gtc ggt gag gcg gtg acc cag gaa aag caa	cac atc tat gtg cat	461
Ala Val Gly Glu Ala Val Thr Gln Glu Lys Gln	His Ile Tyr Val His	
90 95 100 105		
gcc acc tgg cgc acc ggc tcg tcc ttc ttg ggc	gaa ctc ttc aac cag	509
Ala Thr Trp Arg Thr Gly Ser Ser Phe Leu Gly	Glu Leu Phe Asn Gln	

110 115 120

cac	ccg	gac	gtt	ttc	tac	ttg	tac	gac	ccc	atg	tgg	cat	ctg	tgg	cag	557
His Pro Asp Val Phe Tyr Leu Tyr Asp Pro Met Trp His Leu Trp Gln																
125	130	135														
gca	ctg	tat	ccg	ggc	gac	gcg	gag	agc	ctg	cag	ggc	gca	cta	aga	gac	605
Ala Leu Tyr Pro Gly Asp Ala Glu Ser Leu Gln Gly Ala Leu Arg Asp																
140	145	150														
atg	ctg	cgc	tcc	ctc	ttc	cgc	tgt	gat	ttc	tct	gtg	ctg	cgc	ctg	tac	653
Met Leu Arg Ser Leu Phe Arg Cys Asp Phe Ser Val Leu Arg Leu Tyr																
155	160	165														
gcg	cag	cct	ggg	gac	cct	ggg	gag	cga	gca	ccg	gac	tcg	gcc	aac	ctc	701
Ala Gln Pro Gly Asp Pro Gly Glu Arg Ala Pro Asp Ser Ala Asn Leu																
170	175	180	185													
acc	acg	gcc	atg	ctt	ttc	cgc	tgg	cg	acc	aac	aag	gtc	atc	tgc	tcg	749
Thr Thr Ala Met Leu Phe Arg Trp Arg Thr Asn Lys Val Ile Cys Ser																
190	195	200														
ccg	cct	ctg	tgc	ccc	gcc	gcg	ccc	cg	gca	cgc	gcg	gac	gtg	gga	ctc	797
Pro Pro Leu Cys Pro Ala Ala Pro Arg Ala Arg Ala Asp Val Gly Leu																
205	210	215														
gtc	gag	gac	aaa	gcc	tgc	gaa	agt	acc	tgc	ccg	ccc	gtt	tcg	ctc	cgc	845
Val Glu Asp Lys Ala Cys Glu Ser Thr Cys Pro Pro Val Ser Leu Arg																
220	225	230														
gcc	ctg	gag	gcc	gag	tgc	cgc	aag	tac	ccg	gtg	gtg	gtc	atc	aaa	gac	893
Ala Leu Glu Ala Glu Cys Arg Lys Tyr Pro Val Val Val Ile Lys Asp																
235	240	245														
gtg	cgg	cta	ctg	gac	ctg	gga	gtg	ctg	gtc	cct	ctg	cgt	gac	cca	941	
Val Arg Leu Leu Asp Leu Gly Val Leu Val Pro Leu Leu Arg Asp Pro																
250	255	260	265													
ggc	ctc	aac	cta	aag	gtg	gtg	caa	ctc	ttc	cga	gac	cct	cg	gcc	gtg	989
Gly Leu Asn Leu Lys Val Val Gln Leu Phe Arg Asp Pro Arg Ala Val																
270	275	280														
cac	aac	tcg	cgc	ctc	aag	tcg	agg	cag	gga	ctg	ctg	cgc	gaa	agc	atc	1037

His Asn Ser Arg Leu Lys Ser Arg Gln Gly Leu Leu Arg Glu Ser Ile
 285 290 295
 cag gtg ctg cgc acg cgc cag agg ggc gac cac ttc cac cgg gtg ctg 1085

 Gln Val Leu Arg Thr Arg Gln Arg Gly Asp His Phe His Arg Val Leu
 300 305 310
 ctg gcg cat gga gtg gat gcc cgt ccg gga ggc cag gcc cgg gct ctg 1133
 Leu Ala His Gly Val Asp Ala Arg Pro Gly Gly Gln Ala Arg Ala Leu
 315 320 325
 ccc tcg gcg cca cgc gct gat ttc ttc tta acc agc gcg ctt gag gtg 1181
 Pro Ser Ala Pro Arg Ala Asp Phe Phe Leu Thr Ser Ala Leu Glu Val

 330 335 340 345
 atc tgt gaa gcg tgg ctt cgc gac ctg cta ttc acc cgc ggc gcg ccc 1229
 Ile Cys Glu Ala Trp Leu Arg Asp Leu Leu Phe Thr Arg Gly Ala Pro
 350 355 360
 gcc tgg ctg agg cgt cgc tac ctg cgg ctg cgt tat gag gac ctg gtg 1277
 Ala Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Arg Leu Arg Tyr Glu Asp Leu Val
 365 370 375

 tgg cag ccc caa gcc cag ctg cgc cgc ctg ctc cgc ttc tct ggg ttg 1325
 Trp Gln Pro Gln Ala Gln Leu Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Gly Leu
 380 385 390
 cgg aca ctc gcc gcg ctt gat gcc ttc gca ttc aat atg acg cgg ggc 1373
 Arg Thr Leu Ala Ala Leu Asp Ala Phe Ala Phe Asn Met Thr Arg Gly
 395 400 405
 tcg gcc tac ggc gcc gat cgt ccc ttc cac ttg tct gcg cgg gac gcc 1421

 Ser Ala Tyr Gly Ala Asp Arg Pro Phe His Leu Ser Ala Arg Asp Ala
 410 415 420 425
 cga gag gct gtg cac gcc tgg cgc gaa cgt ctg agc caa gag cag gtg 1469
 Arg Glu Ala Val His Ala Trp Arg Glu Arg Leu Ser Gln Glu Gln Val
 430 435 440
 cgc caa gtg gaa acc gcc tgc gcc cct gcc atg cgt ctg ctt gcc tac 1517

Arg Gln Val Glu Thr Ala Cys Ala Pro Ala Met Arg Leu Leu Ala Tyr

445	450	455	
cct cga agt ggg gac gaa cgc gac agg aag acc gtc agg gaa ggg gag			1565
Pro Arg Ser Gly Asp Glu Arg Asp Arg Lys Thr Val Arg Glu Gly Glu			
460	465	470	
aca cca ctg gag acc aag gcc aat tgg gct gtg taa taccctgatc			1611
Thr Pro Leu Glu Thr Lys Ala Asn Trp Ala Val			
475	480		

cctgaaccct gccccggggc gtattcaggt cagtggccat aaaaaggtga actcagcatg	1671
ctgccccgc actggagagg ctgcacggtg gaggcgatct atcacactgt gagacactgg	1731
gactgatttgc gatcaactg ctgtgccatt ctccctggtca ggagcatcac aagctgttaa	1791
gtaatgacag acacccctggc ttagatgaag tttccagaaa ggaagtaaca gtgcaatgt	1851
gatatttgc accacaacat aggaaaagct gtactccca ggctgaactt ggctcagtt	1911
gagccatttc aacaaggcat cctcacaata atgaagagat gtgatctgg ttccttcac	1971
atcagccaag atgtctggac aaaaccatca atgtgaataa gggccaagtg cagttgtgtc	2031

tctcttgatt aaattacttc atattaaata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2080
--	------

<210> 17

<211> 484

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Met Lys Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Tyr Cys Lys Phe Thr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Leu Ala Leu Tyr Thr Leu Leu Leu Leu Val Pro Ser Val Leu

20	25	30
----	----	----

Asp Ser His Ser Glu Gln Asp Lys Gly Arg Asn Cys Pro Gly Leu Gln

35	40	45
----	----	----

Arg Ser Leu Gly Val Trp Ser Leu Glu Ala Ala Ala Gly Glu Arg

50	55	60
----	----	----

Glu Gln Gly Ala Glu Val Arg Ser Leu Ala Glu Gly Asn Pro Asp Arg

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85 90 95

Gln Glu Lys Gln His Ile Tyr Val His Ala Thr Trp Arg Thr Gly Ser

100 105 110

Ser Phe Leu Gly Glu Leu Phe Asn Gln His Pro Asp Val Phe Tyr Leu

115 120 125

Tyr Asp Pro Met Trp His Leu Trp Gln Ala Leu Tyr Pro Gly Asp Ala

130 135 140

Glu Ser Leu Gln Gly Ala Leu Arg Asp Met Leu Arg Ser Leu Phe Arg

145 150 155 160

Cys Asp Phe Ser Val Leu Arg Leu Tyr Ala Gln Pro Gly Asp Pro Gly

165 170 175

Glu Arg Ala Pro Asp Ser Ala Asn Leu Thr Thr Ala Met Leu Phe Arg

180 185 190

Trp Arg Thr Asn Lys Val Ile Cys Ser Pro Pro Leu Cys Pro Ala Ala

195 200 205

Pro Arg Ala Arg Ala Asp Val Gly Leu Val Glu Asp Lys Ala Cys Glu

210 215 220

Ser Thr Cys Pro Pro Val Ser Leu Arg Ala Leu Glu Ala Glu Cys Arg

225 230 235 240

Lys Tyr Pro Val Val Val Ile Lys Asp Val Arg Leu Leu Asp Leu Gly

245 250 255

Val Leu Val Pro Leu Leu Arg Asp Pro Gly Leu Asn Leu Lys Val Val

260 265 270

Gln Leu Phe Arg Asp Pro Arg Ala Val His Asn Ser Arg Leu Lys Ser

275 280 285

Arg Gln Gly Leu Leu Arg Glu Ser Ile Gln Val Leu Arg Thr Arg Gln

290 295 300

Arg Gly Asp His Phe His Arg Val Leu Leu Ala His Gly Val Asp Ala

305 310 315 320

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

325	330	335
Phe Phe Leu Thr Ser Ala Leu Glu Val Ile Cys Glu Ala Trp Leu Arg		
340	345	350
Asp Leu Leu Phe Thr Arg Gly Ala Pro Ala Trp Leu Arg Arg Arg Tyr		
355	360	365

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

Arg Glu Arg Leu Ser Gln Glu Gln Val Arg Gln Val Glu Thr Ala Cys			
435	440	445	
Ala Pro Ala Met Arg Leu Leu Ala Tyr Pro Arg Ser Gly Asp Glu Arg			
450	455	460	
Asp Arg Lys Thr Val Arg Glu Gly Glu Thr Pro Leu Glu Thr Lys Ala			
465	470	475	480
Asn Trp Ala Val			

<210> 18

<211> 4713

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (514)..(2199)

<400> 18

ggaaatctgg catttttaa agtttgcgcc ccacaaagag gaaatattcc aaaggtactc	60
aggatgtaaa agggagatc ttcacagatg cctccgtgga tggcatggca atccatccat	120
caatgagaag accatgattt cttaattt tctgtgttt tccacattcc ccagtggaa	180
ttctccacc ttttttgtaa ccatggaaa aacctgaagg gcaggcagag ctgctccga	240

120	125	130	135		
				966	
cac caa tcc tct gta aat aat att tca tac atg aag gac tat cca agc					
His Gln Ser Ser Val Asn Asn Ile Ser Tyr Met Lys Asp Tyr Pro Ser					
140	145	150			
att aaa tta att atc aac agc atc aca act agg att gag ttc acg acc				1014	
Ile Lys Leu Ile Ile Asn Ser Ile Thr Thr Arg Ile Glu Phe Thr Thr					
155	160	165			
aga cag ctc cca gac tta gaa gac ctt aag aag cag gag ttg cat atg				1062	
Arg Gln Leu Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Lys Gln Glu Leu His Met					
170	175	180			
ttt tca gtc atc ccc aac aaa ttc ctt cca aac agt aag agc ccc tgt				1110	
Phe Ser Val Ile Pro Asn Lys Phe Leu Pro Asn Ser Lys Ser Pro Cys					
185	190	195			
tgg tac gag gag ttc tcg ggg cag aac acc acc gac ccc tac ctc acc				1158	
Trp Tyr Glu Glu Phe Ser Gly Gln Asn Thr Thr Asp Pro Tyr Leu Thr					
200	205	210	215		
aac tcc tac gtg ctc tac tcc aag cgc ttc cgc tcc acc ttc gac gcc				1206	
Asn Ser Tyr Val Leu Tyr Ser Lys Arg Phe Arg Ser Thr Phe Asp Ala					
220	225	230			
ctg cgc aag gcc ttc tgg ggc cac ctg gcg cac gac cac ggg aag cac				1254	
Leu Arg Lys Ala Phe Trp Gly His Leu Ala His Ala His Gly Lys His					
235	240	245			
ttc cgc ctg cgc tgc ctg ccg cac ttc tac atc ata ggg cag ccc aag					1302
Phe Arg Leu Arg Cys Leu Pro His Phe Tyr Ile Ile Gly Gln Pro Lys					
250	255	260			
tgc ggg acc aca gac ctc tat gac cgc ctg cgg ctg cac cct gag gtc				1350	
Cys Gly Thr Thr Asp Leu Tyr Asp Arg Leu Arg Leu His Pro Glu Val					
265	270	275			
aag ttc tcc gcc atc aag gag cca cac tgg tgg acc cgg aag cgc ttt				1398	

Lys Phe Ser Ala Ile Lys Glu Pro His Trp Trp Thr Arg Lys Arg Phe
 280 285 290 295
 gga atc gtc cgc cta aga gat ggg ctg cga gac cgc tat ccc gtg gaa 1446
 Gly Ile Val Arg Leu Arg Asp Gly Leu Arg Asp Arg Tyr Pro Val Glu
 300 305 310
 gat tat ctg gac ctc ttt gac ctg gcc gca cac cag atc cat caa gga 1494
 Asp Tyr Leu Asp Leu Phe Asp Leu Ala Ala His Gln Ile His Gln Gly

 315 320 325
 ctg cag gcc agc tct gca aag gag cag agc aag atg aat aca atc att 1542
 Leu Gln Ala Ser Ser Ala Lys Glu Gln Ser Lys Met Asn Thr Ile Ile
 330 335 340
 atc ggg gag gcc agt gcc tcc acg atg tgg gat aat aat gcc tgg acg 1590
 Ile Gly Glu Ala Ser Ala Ser Thr Met Trp Asp Asn Asn Ala Trp Thr
 345 350 355

 ttc ttc tac gac aac agc acg gat ggc gag cca ccg ttt ctg acg cag 1638
 Phe Phe Tyr Asp Asn Ser Thr Asp Gly Glu Pro Pro Phe Leu Thr Gln
 360 365 370 375
 gac ttc atc cac gcc ttt cag cca aat gcc aga ctg att gtc atg ctc 1686
 Asp Phe Ile His Ala Phe Gln Pro Asn Ala Arg Leu Ile Val Met Leu
 380 385 390
 agg gac cct gtg gag agg ttg tac tca gac tat ctc tac ttt gca agt 1734

 Arg Asp Pro Val Glu Arg Leu Tyr Ser Asp Tyr Leu Tyr Phe Ala Ser
 395 400 405
 tcg aat aaa tcc gcg gac gac ttc cat gag aaa gtg aca gaa gca ctg 1782
 Ser Asn Lys Ser Ala Asp Asp Phe His Glu Lys Val Thr Glu Ala Leu
 410 415 420
 cag ctg ttt gaa aat tgc atg ctt gat tat tca ctg cgc gcc tgc gtc 1830
 Gln Leu Phe Glu Asn Cys Met Leu Asp Tyr Ser Leu Arg Ala Cys Val

 425 430 435
 tac aac aac acc ctc aac aac gcc atg cct gtg agg ctc cag gtt ggg 1878
 Tyr Asn Asn Thr Leu Asn Asn Ala Met Pro Val Arg Leu Gln Val Gly

440	445	450	455	
ctc tat gct gtg tac ctt ctg gac tgg ctc agc gtt ttt gac aag caa				1926
Leu Tyr Ala Val Tyr Leu Leu Asp Trp Leu Ser Val Phe Asp Lys Gln				
460	465	470		
cag ttt ctc att ctt cgc ctg gaa gat cat gca tcc aac gtc aag tac				1974
Gln Phe Leu Ile Leu Arg Leu Glu Asp His Ala Ser Asn Val Lys Tyr				
475	480	485		
acc atg cac aag gtc ttc cag ttt ctg aac cta ggg ccc tta agt gag				2022
Thr Met His Lys Val Phe Gln Phe Leu Asn Leu Gly Pro Leu Ser Glu				
490	495	500		
aag cag gag gct ttg atg acc aag agc ccc gca tcc aat gca cgg cgt				2070
Lys Gln Glu Ala Leu Met Thr Lys Ser Pro Ala Ser Asn Ala Arg Arg				
505	510	515		
ccc gag gac cgg aac ctg ggg ccc atg tgg ccc atc aca cag aag att				2118
Pro Glu Asp Arg Asn Leu Gly Pro Met Trp Pro Ile Thr Gln Lys Ile				
520	525	530	535	
ctg cgg gat ttc tac agg ccc ttc aac gct agg ctg gcg cag gtc ctc				2166
Leu Arg Asp Phe Tyr Arg Pro Phe Asn Ala Arg Leu Ala Gln Val Leu				
540	545	550		
gcg gat gag gcg ttt gcg tgg aag acg acg tga gagctgaatt gttgctgcac				2219
Ala Asp Glu Ala Phe Ala Trp Lys Thr Thr				
555	560			
gtgctggcc cgccaatgcc gtcatcatca ggatttaca aatcttttg cggggactg				2279
tttcactcat ggtatggaaa accccaggac tctgccactc taggcacaca tgaattataa				2339
ccattttggaa atttccttcg tcatgttcga gagctcagca atggaccct cacagagctc				2399
ctctatccga ggcatttggaa gacccaggat tctcaagaat tcaagctctgc tctgagcgtc				2459
ctggagcttg gggatgcagc cagctggct gcactgggtg tggagagaac acctaggaa				2519
ggcagcctgg ccctgcccgc ctccgccttc tggagaggct ctgggttctg agtcagcaag				2579
ccagaggta tggccacaggc ctggctggaa cttacacttc acgttccctt ttttcccccc				2639
tagagatggg gtctcgccgt gttgcacaga ctgtctgtat tcaatggcta tcttcacagg				2699
tgtgatcata ccacattcac ttctgaaaca ctctgttgc gatcgtaac ctcactggaa				2759

cagagaacct	cagtccat	ttttttct	ctttactcca	2819													
aactcagccc	tccagttct	tca	gatgtaa	accctgtta	cgtcactgtt	tccaaaagga	2879										
aaaaaaaataag	tcagttttg	gcagcac	tttgc	catcttctg	acccctc	attctgtc	2939										
tgtggactta	tgttaacat	agaaaatgaa	tgcg	ttaaa	acaaaaccac	tttgc	2999										
taaccagtcc	tggctctc	tctgtgc	cttcata	actgtt	tttcaaga	acttc	3059										
ataattggaa	gagaaat	tttgc	tgttaat	gccagaatga	gcaac	tttgc	3119										
acttcttgaa	aaatcttagt	aattcaagcc	ctcatc	agg	ttacaagatc	atc	3179										
cagaggattt	taat	tttgc	ggccgg	ctacagg	ctc	catttc	3239										
					3299												
gaaaatagtt	tattccaca	tttccactg	cgtgtggtca	aagt	ttcc	cccagcaagg	3299										
gactatagat	actcg	gtgtcc	caattccaaa	aca	aatgc	caagctga	3359										
cgtggcgtgt	ttagatttg	aatgagg	tttgc	ctaa	gagccg	tgttctcat	3419										
aggccacttg	gcagcttg	ttacc	gatgg	atgg	ctaga	gatcttgc	3479										
gtcacaggga	agattgaaga	gaacg	cttga	gcac	cttgg	caacagccca	3539										
gatgaagct	ttgcactcaa	gtattgt	caa	ggaa	gcttc	ctgtga	3599										
gccaagg	tct	cgcc	ccac	aa	agcc	agaa	3659										
					3719												
gtatgtgtga	gacagacc	gac	ttcg	gggg	tagg	aggatc	tgca	gatgtt	cagccgtt	3719							
tctgc	tg	tgc	tttct	gc	catc	agac	agg	acaca	ccgtt	3779							
agagg	gtc	gtc	ct	gac	ccagg	atgg	ccagg	ctgtt	ttgc	3839							
tgaactccca	cttgc	agg	cact	cgttccac	tttgc	tata	gttgc	actgttgc	actgttgc	3899							
ccagcagg	aatctgg	cgttgc	ccat	gac	ccat	agg	atgtt	agg	atgttgc	3959							
gtgtatattt	attgc	atgt	gcgc	gtgt	gtgt	gtgt	gtgt	gtgt	gtgt	4019							
gagtgcgtct	tctg	gat	gggg	ttct	gttca	ttg	ctgt	aatga	ggcc	ctctgg	4079						
					4139												
aacc	ttta	tagat	tttgc	aa	ttaact	tttgc	at	tttca	gttca	catat	tttac	4139					
tattcc	acac	caac	ata	ata	aca	aca	gg	ttt	tttgc	at	gcact	ct	atgc	atgt	ga	4199	
ataacatgt	gt	gt	ta	tttca	tttca	tttca	tttca	tttca	tttca	tttca	tttca	tttca	tttca	tttca	tttca	tttca	4259
ttat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	4319
caat	gc	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	ccat	4379
ctgc	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	4439
ggc	gg	gt	gt	gt	gt	gt	gt	gt	gt	gt	gt	gt	gt	gt	gt	gt	4499

tggtattgaa	gttcctttt	gttctcaaaa	gttgtgaccg	tgtaaattt	tactcccta	4559		
gtcctgtt	gtatgtt	tgatcgac	ttacgtgt	cttttattt	tatttaacat	4619		
aattaaagat	ggaccataa	gagtgacgcc	tgtggagcgc	gtgctttcc	tctgcagcca	4679		
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaa			4713		
<210> 19								
<211> 561								
<212> PRT								
<213> Homo sapiens								
<400> 19								
Met Arg His Cys Ile Asn Cys Cys Ile Gln Leu Leu Pro Asp Gly Ala								
1	5	10	15					
His Lys Gln Gln Val Asn Cys Gln Gly Gly Pro His His Gly His Gln								
						20	25	30
Ala Cys Pro Thr Cys Lys Gly Glu Asn Lys Ile Leu Phe Arg Val Asp								
35	40	45						
Ser Lys Gln Met Asn Leu Leu Ala Val Leu Glu Val Arg Thr Glu Gly								
50	55	60						
Asn Glu Asn Trp Gly Gly Phe Leu Arg Phe Lys Lys Gly Lys Arg Cys								
65	70	75	80					
Ser Leu Val Phe Gly Leu Ile Ile Met Thr Leu Val Met Ala Ser Tyr								
						85	90	95
Ile Leu Ser Gly Ala His Gln Glu Leu Leu Ile Ser Ser Pro Phe His								
100	105	110						
Tyr Gly Gly Phe Pro Ser Asn Pro Ser Leu Met Asp Ser Glu Asn Pro								
115	120	125						
Ser Asp Thr Lys Glu His His Gln Ser Ser Val Asn Asn Ile Ser								
130	135	140						
Tyr Met Lys Asp Tyr Pro Ser Ile Lys Leu Ile Ile Asn Ser Ile Thr								
145	150	155	160					
Thr Arg Ile Glu Phe Thr Thr Arg Gln Leu Pro Asp Leu Glu Asp Leu								
165	170	175						
Lys Lys Gln Glu Leu His Met Phe Ser Val Ile Pro Asn Lys Phe Leu								

180	185	190
Pro Asn Ser Lys Ser Pro Cys Trp Tyr Glu Glu Phe Ser Gly Gln Asn		
195	200	205
Thr Thr Asp Pro Tyr Leu Thr Asn Ser Tyr Val Leu Tyr Ser Lys Arg		
210	215	220
Phe Arg Ser Thr Phe Asp Ala Leu Arg Lys Ala Phe Trp Gly His Leu		
225	230	235
Ala His Ala His Gly Lys His Phe Arg Leu Arg Cys Leu Pro His Phe		
245	250	255
Tyr Ile Ile Gly Gln Pro Lys Cys Gly Thr Thr Asp Leu Tyr Asp Arg		
260	265	270
Leu Arg Leu His Pro Glu Val Lys Phe Ser Ala Ile Lys Glu Pro His		
275	280	285
Trp Trp Thr Arg Lys Arg Phe Gly Ile Val Arg Leu Arg Asp Gly Leu		
290	295	300
Arg Asp Arg Tyr Pro Val Glu Asp Tyr Leu Asp Leu Phe Asp Leu Ala		
305	310	315
Ala His Gln Ile His Gln Gly Leu Gln Ala Ser Ser Ala Lys Glu Gln		
325	330	335
Ser Lys Met Asn Thr Ile Ile Ile Gly Glu Ala Ser Ala Ser Thr Met		
340	345	350
Trp Asp Asn Asn Ala Trp Thr Phe Phe Tyr Asp Asn Ser Thr Asp Gly		
355	360	365
Glu Pro Pro Phe Leu Thr Gln Asp Phe Ile His Ala Phe Gln Pro Asn		
370	375	380
Ala Arg Leu Ile Val Met Leu Arg Asp Pro Val Glu Arg Leu Tyr Ser		
385	390	395
Asp Tyr Leu Tyr Phe Ala Ser Ser Asn Lys Ser Ala Asp Asp Phe His		
405	410	415
Glu Lys Val Thr Glu Ala Leu Gln Leu Phe Glu Asn Cys Met Leu Asp		
420	425	430

Tyr Ser Leu Arg Ala Cys Val Tyr Asn Asn Thr Leu Asn Asn Ala Met

435 440 445

Pro Val Arg Leu Gln Val Gly Leu Tyr Ala Val Tyr Leu Leu Asp Trp

450 455 460

Leu Ser Val Phe Asp Lys Gln Gln Phe Leu Ile Leu Arg Leu Glu Asp

465 470 475 480

His Ala Ser Asn Val Lys Tyr Thr Met His Lys Val Phe Gln Phe Leu

485 490 495

Asn Leu Gly Pro Leu Ser Glu Lys Gln Glu Ala Leu Met Thr Lys Ser

500 505 510

Pro Ala Ser Asn Ala Arg Arg Pro Glu Asp Arg Asn Leu Gly Pro Met

515 520 525

Trp Pro Ile Thr Gln Lys Ile Leu Arg Asp Phe Tyr Arg Pro Phe Asn

530 535 540

Ala Arg Leu Ala Gln Val Leu Ala Asp Glu Ala Phe Ala Trp Lys Thr

545 550 555 560

Thr

<210> 20

<211> 536

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 20

acaaagccat	gaagccggcg	ctgctggaag	tgatgaggat	gaacagaatt	tgccggatgg	60
tgctggccac	ttgcttcgga	tcctttatct	tggtcatctt	ctatttccaa	agtatgttgc	120
acccagtcat	gcggaggaac	cccttcggtg	tggacatctg	ctgcccgaag	ggatcgagaa	180
gtcccttgca	ggagctctac	aatccatcc	agctggagct	atccaaact	gccatcctgc	240

accagatgag	acgggaccag	gtgacagaca	cctgccggc	caacagtgcc	atgagccca	300
agcgcagggt	gctgacccccc	aacgacactga	agcacctgg	ggggatgag	gaccacgaac	360
tcatctactg	ctatgtgcc	aaggttagcgt	gcaccaactg	gaagaggctc	atgatggtcc	420
tgagtggccg	gggcaagtac	agcgatccca	tggagatccc	agccaaacgaa	gcccacgtgt	480
cggccaaacct	gaagaccctt	aaccagtaca	gcatcccaga	gatcaaccac	cgcttg	536

<210> 21

<211> 660

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

gccaggagtg gccccagccc agggcagcat gaccaagccg cggtctttcc ggctgtggct 60

ggtaactaggg tcggctctca tgcattttt gatcattgtt tattggaca acgtggaaac 120

cgcccaacttc tatctgcaca cgtctcttc caggccacac atcctagaac cccttccac 180

ccagggattt gttggaggaga acgtgttac atctgacgtt gatgaggttt tggatactct 240

ccttagttct gacgcgaagc acaacgaccc ttccaggaga aaaactgagc agccccggc 300

gcccccccccc agcaagccag tcttgagcca catggaggag aacgtgagag gctacgactg 360

gtccactcat gatgcccattt agaaccctgtt ccgggacagg cagcaggccg agaggaggag 420

cctgctgaga gacttctgtt ccaacgccc cctggcatc cccaccaagg accgcctttt 480

tgacgacatc cccaactacg aactgaacca cctgatcgtt gacgaccgc acggggcat 540

ctactgttac gtgcacaagg tggctgcac caactggaaag cgagtgtatgt tcgtgcttag 600

cgagagcctt ctggaccggg gcagccccca ccgagacccc ctggacatcc cccggaaaca 660

<210> 22

<211> 600

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

atgactgtcg cctgccacgc gtgccaggca cagcatggga agacgcttctt gttgcaggcg 60

gcccttgcgg gtggggcaaa gtctgggtgc tgcactcttgc ctctgtgcg ccctgcgtcc 120

cggtaacca cagggaaagga tgcccaggac actgaatggc agggctcccc aaaagccctt 180

ttgggggttc cgacatttga aaataaagct ctgggttcca gctgggttgg tggagtggagg 240

aagagtcccc tacagctgtt gcgtgacctt gaccagatgt ttggcagctt tgagctatgg 300

gtagtcagtg gggagccggca gaaagtgggtt ccacgctccg cgtggccga ggtgcaccag 360

cagccggctt agctgctgcg ccggcccttc agccggccaca cggacgcacca acgcctgttgc 420

cagccggagg acctgttca cgtgtgggg gacgacgcgc accggctgtt gtactgttac 480

gtgcctttaagg tggctgcac caactggaaag cgtgtatgtc tggcgttgcg cggccgtgg 540

gatccaaggcg caatcccttc gcacgaggcg catgcggcttgc gcctgttgc ctcgtggcc 600

<210> 23

<211> 600

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 23

gcgc(ccc)tc tccccatgga gaaaggactc gcttgcctc aggattccg ggaccttgta	60
cacagcctaa agattcgagg cagatacgtc ttgttcctgg catttgggtt catagtttt	120
atcttcattt gaaaaggaaaa taaaatcata tccagggtct ccgacaagct gaagcagatc	180
cctcattttg tggcagatgc caacagcact gacccagccc tgctcttata ggagaatgca	240
tctctcttgtt ccctgagcga gtggattcc acctttccc atctgggag ccgcctgcac	300
aacctgagcc tgcagctggg cgtggagcca gcaatggaga gccaggaggc tggggcagag	360

aaggccatccc agcaggctgg agcaggggacc cggcgccacg tgcttctcat ggccaccacc	420
cgcacgggtt cctcggtcgt gggcgagtcc ttcaaccagc agggcaatat ctttacctc	480
ttcgagccac tggcacat cgagcgcacc gtgttcttcc agcagcggagg cgccagcgcg	540
gctggttcag cttggctata ccgtgatgtc ctcaaggagt tggctatg cgacctgtat	600

<210> 24

<211> 720

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 24

tggggagagt gaggattcgg tgaactatga agggccggcg gcccggcgcc cgagagtatt	60
gcaagttcac gctgcttttgcgctgtaca cgcttttgc acttcttgc ccctctgtac	120

tggacagcca cagcgagcag gacaagggca ggaactgccc cggcctgcag cgccatgtgg	180
gtgtgtggag cctggaggcg gcccggccg gggaaacgtga gcagggcgct gaggtgcgg	240
ccctggccga aggaaacccg gatcgatccc cgggtcccc cggcaacccctc agcggcg	300
gtgaggcggt gaccaggaa aagcaacaca tctatgtca tgccacctgg cgacccggct	360
cgtccttctt gggcgaactc ttcaaccagc acccggacgt ttctacttg tacgagccca	420
tgtggcatct gtggcaggca ctgtatccgg gcgacgcggaa gaggctgcag ggcgcactaa	480
gagacatgtc ggcgtccctc ttccgctgtt atttctctgt gctgcgcctg tacgcgcagc	540

ctggggaccc tggggagcga gcacggact cggccaaacct caccacggcc atgccttcc	600
gctggcggac caacaagggtc atctgctcgc cgcctctgtt cccggccgccc cccgggcac	660
gcgccggacgt gggactcggtc gaggacaaag cctgcgaaag tacctgccc cccgtttcgc	720

<210> 25
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 25
 ggagcagagc aagaugaaua caaucag 27
 <210> 26
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 26
 gauuguauuc aucuugcucu gcuccau 27
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 27
 gtgagttctg ctgcggc 20
 <210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 28
 agtccatgtc gatgccaga g 21
 <210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 29	
accggatggc aacaatgga	19
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 30	
accaggcaggg ccttgttcac	20
<210> 31	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 31	
catccgtaaa gacctctatg ccaac	25
<210> 32	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 32	
atggagccac cgatccaca	19
<210> 33	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 33	
ttctggccaa cggtctagac aac	23
<210> 34	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 34

ccagtggct tgggtgtgctg a 21

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 35

acccccaact cggAACGATG CGGCT 25

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 36

tgcATGTTCT CGTCCATCCT GCTG 24

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 37

cGCCACCGTG TACTGTACTG TGAAGT 26

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 38

aggCTGCTCC AACTGGAAAGA GGGTG 25

<210> 39

<211> 24

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 39	
atatagtatc taggatata t gtag	24
<210> 40	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 40	
gaagttaccaa aagctggctg ctcta	25
<210> 41	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 41	
ttctatcaact tggactat ttt gatgtt	26
<210> 42	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 42	
tacacaactc cacatttgta atttg	25
<210> 43	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 43	
ccagaagcca agctcattgt t atg	24

<210> 44
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 44
 ctgtggagag gttgtactca gacta 25
 <210> 45
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 45
 atttgcctgg aagacaacgt gagagc 26
 <210> 46
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 46
 gtcccttctg cagaagctgg gcccaact 27
 <210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 47
 gcgcgcgcgc tcggatggaa 25
 <210> 48
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 48

gctttgcctc	aggatttccg	ggacc	25
<210>	49		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223> an artificially synthesized sequence			
<400>	49		
gtttcagcct	tggtctaccg	tgatgtc	27
<210>	50		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223> an artificially synthesized sequence			
<400>	50		
gcagtttgttgc	ctatgcgacc	tgtat	25
<210>	51		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223> an artificially synthesized primer sequence			
<400>	51		
tgttcctggc	atttgtggtc	ata	23
<210>	52		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223> an artificially synthesized primer sequence			
<400>	52		
ccaactcgct	cagggacaag	a	21
<210>	53		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 53

gtgtggagca acatgtggaa ctcta 25

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 54

ttggttcagc cactgccgt 20

<210> 55

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 55

acaaggccat gaagccggcg ctgctggaag tgatgaggat gaacagaatt 50

<210> 56

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 56

caacctgaag accctaacc agtaca 26

<210> 57

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 57

gcatcccaga gatcaaccac cgcttg 26

<210> 58

<211> 25

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 58	
gccaggagtg ggcccagccc agggc	25
<210> 59	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 59	
atgaccaagc cgccgtt ccggctg	27
<210> 60	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 60	
agagcctgct ggaccggggc agccccta	28
<210> 61	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 61	
gagacccctt ggacatcccc cggaaaca	28
<210> 62	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 62	
atgactgtcg cctgccacgc gtgccca	26

<210> 63	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 63	
cagcatggga agacgctcct gttgca	26
<210> 64	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 64	
tccaaagcga atccctgcgc acgaggcg	28
<210> 65	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 65	
gcctggcctg ctgccctcgc tggcc	25
<210> 66	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 66	
ctgccaagta tgacatca	18
<210> 67	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 67	

tactccttgg aggccatgta g	21
<210> 68	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 68	
gtggatgagg accacgaact	20
<210> 69	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 69	
ctttcaagc ggtggttgat	20
<210> 70	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 70	
acctcctaga cccacacacg	20
<210> 71	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized primer sequence	
<400> 71	
ggatgttggc aaaccagtct	20
<210> 72	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 72

atgagcctt caacgaacac 20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 73

tggtagaagg ggctgatgtc 20

<210> 74

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 74

ttccaggcct tggcatca 19

<210> 75

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 75

atgttcagca tttcagcag tgtg 24

<210> 76

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 76

catccgtaaa gaccttatg ccaac 25

<210> 77

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 77

atggagccac cgatccaca 19

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 78

tgtgtggaca cacccctcta 20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 79

cttcaaaggc cccttccctc 20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 80

cagcttgagc catttcaaca 20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 81

gggtgaggcc tttaggaaac 20

<210> 82	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 82	
gcgcggccctc tccccatgga gaaag	25
<210> 83	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 83	
gctttgcctc aggattccg ggacc	25
<210> 84	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 84	
ggttcagcct tggcttaccg tcatgtc	27
<210> 85	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 85	
gcagtttgttgcatgcgacc tgtat	25
<210> 86	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> an artificially synthesized sequence	
<400> 86	

tggggagagt	gaggattcg	tgaa	24
<210>	87		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223> an artificially synthesized sequence			
<400>	87		
cggacgtggg actcgctgag gacaaag			
		27	
<210>	88		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223> an artificially synthesized sequence			
<400>	88		
cgaagtacc tgccggccg tttcgc			
		26	
<210>	89		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223> an artificially synthesized primer sequence			
<400>	89		
ctgtgagccc aagtgtgtgg a			
		21	
<210>	90		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223> an artificially synthesized primer sequence			
<			
400>	90		
gtctcgaaac atggcaacag ga			
		22	
<210>	91		
<211>	27		
<212>	RNA		
<213>	Artificial		

<220><223> An artificially synthesized siRNA sequence
<400> 91
gcagccccagc aagaugaaua agaucag 27
<210> 92
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial
<220><223> An artificially synthesized siRNA sequence
<400> 92
gaucuuauuc auciugcugg gcugcau 27
<210> 93
<211> 25
<
212> DNA
<213> Artificial
<220><223> An artificially synthesized primer sequence
<400> 93
catccgtaaa gacctctatg ccaac 25
<210> 94
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> An artificially synthesized primer sequence
<400> 94
atggagccac cgatccaca 19
<210> 95
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> An artificially synthesized primer sequence
<400> 95
caggaggag aacagaaact cca 23
<210> 96
<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 96

cctggttggc tgcttgctt

19

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 97

ctgccctggc tatggtcaca

20

<210> 98

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 98

agacaggttag ttgggtcggt tca

23