(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0131253
(43) 공개일자 2016년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0063184
(22) 출원일자 2015년05월06일
심사청구일자 2015년05월06일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
이재선
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 22동 106호 (서초동, 삼풍아파트)
정승희
서울특별시 마포구 마포대로20길 26, 103동 703호 (공덕동, 삼성래미안공덕2차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

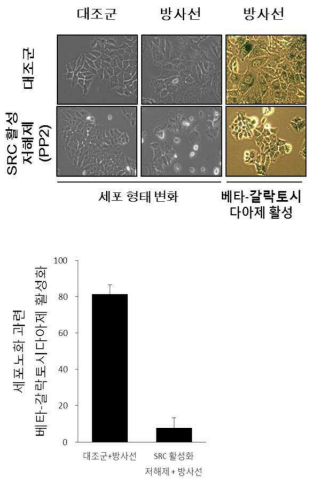
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **Src 억제제를 포함하는 종양세포 노화 억제용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 Src 억제제를 포함하는 종양세포 노화 억제용 조성물 및 상기 억제제를 이용한 종양세포의 노화 조절 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 종양세포에서 Src의 발현 또는 활성을 억제하여 방사선에 의해 유도된 종양 세포의 노화를 억제할 수 있다. 따라서 특정 물질이 Src의 발현 또는 활성에 미치는 영향을 분석함으로써 방사선에 대한 종양세포의 민감성 증진과 관련된 항암 기작의 연구가 가능하다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
(72) 발명자
이민영
서울특별시 중랑구 신내역로1길 85, 113동 502호
(신내동, 신내우디안1단지)
이정화
서울특별시 동작구 장승배기로4길 9, 104동 102호
(상도동, 상도 더 샵 아파트)
박헌주
서울특별시 서초구 서초대로74길 30, 502동 902호
(서초동, 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012M2B2B1055637
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 미래연구 및 인력기반 확충
연구과제명 방사선유도 암노화 제어 및 분비체 연구
기 여 율 50/100
주관기관 인하대학교 의학전문대학원
연구기간 2014.12.01 ~ 2015.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014009392
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초의약학(MRC)
연구과제명 (국고)저산소 미세환경 제어기전 연구
기 여 율 50/100
주관기관 인하대학교 의학전문대학원
연구기간 2014.05.01 ~ 2015.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

Src 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 포함하는 종양세포 노화 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 억제제는 Src 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA) 및 리보자임으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 종양세포 노화 억제용 조성물.

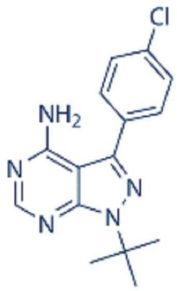
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 억제제는 Src 단백질에 상보적으로 결합하거나 이의 활성을 억제하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 앱타머, 기질유사체 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 종양세포 노화 억제용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 PP2인 것을 특징으로 하는, 종양세포 노화 억제용 조성물.

[화학식 1]



청구항 5

제1항에 있어서, 상기 종양세포는 유방암 또는 폐암 세포인 것을 특징으로 하는, 종양세포 노화 억제용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 노화는 방사선에 의해 유도된 것을 특징으로 하는, 종양세포 노화 억제용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 방사선은 감마선인 것을 특징으로 하는, 종양세포 노화 억제용 조성물.

청구항 8

종양세포에 Src 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 처리하는 단계를 포함하는, 종양세포의 노화 조절 방법.

청구항 9

(a) 종양세포에 시료를 처리한 후, Src 단백질의 인산화 정도를 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 종양세포에서 Src 단백질의 인산화 정도가 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 증가한 시료를 선별하는 단계를 포함하는 항암 또는 항암보조제 후보물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Src 억제제를 포함하는 종양세포 노화 억제용 조성물 및 상기 억제제를 이용한 종양세포의 노화 조절 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 종양세포 조기 노화는 스트레스-유도 조기 노화라고도 하며, 다양한 자극에 의해 종양세포에서 발생하는 노화를 의미한다. 종양세포는 일정한 횟수만큼만 분열하고 노화되는 정상세포와 달리, 암화 과정에서 복제성 노화의 특성이 변화되어 무한정 분열하는 세포들이므로, 종양세포는 세포 노화과정이 진행되지 않을 것이라는 개념이 일반적이었다. 그러나 최근 종양세포도 다양한 자극에 의해 세포 노화가 급격히 유도됨이 알려지게 되었고 이를 스트레스-유도 조기 노화 (stress-induced premature senescence)라 한다(Sugrue et al., Proc. Natl. Acad.Sci.USA, 94:9648-9653, 1997; Mason et al., Oncogene, 23;9238-9246, 2004). 종양세포의 노화를 유도할 수 있는 스트레스원으로는 유전적 독성 화학물질 (예, etoposide, cyclophophamide), 방사선, 자외선 등이 보고되었다(Hemann and Narita, Genes & Dev., 21:1-5, 2007; Chang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:389-394,2002).

[0003] 최근 스트레스 유도 조기 노화를 이용한 종양세포의 노화 및 이의 증식 억제가 암 환자 치료를 위한 효율적인 기전으로 제시되었으며 (Roninson et al., Drug Resist Updates, 4:303-313, 2001; Campisi, Science, 309:886-887, 2005), 세포 노화 유도 기전 연구를 통한 암 치료의 효율성 증대가 필수적임이 제안되었다(Narita 및 Lowe, Nature Medicine, 11:920-922, 2005).

[0004] 또한, 종양의 악성화가 저지된 암 환자의 조직 분석 결과, 종양세포 노화가 효율적으로 유도되었음이 보고되었고(Collado et al., Nature, 436:642, 2005), 종양 억제 단백질 p53이 작용해 세포 노화를 통해 종양 조직이 효율적으로 제거됨이 종양 모델 동물 실험에서 입증되었다(Wue et al., Nature, 445:656-660, 2007). 이는 종양 치료에 세포 노화가 유용하게 활용될 수 있음을 제시하는 것이다. 실질적으로 종양세포의 노화 기전 활성화는 세포사멸 기전 활성화보다 낮은 용량의 항암제나 방사선 투여를 가능하게 함으로써 암 치료 부작용을 개선할 수 있고, 세포사멸에 대한 저항성을 획득한 종양 세포의 암 치료 저항성 극복에 이용될 수 있다(Rebbaa, Cencer Lett, 219:1-13, 2005).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 종양세포 조기 노화와 관련된 연구를 계속하던 중, 방사선 유도 종양세포 노화 반응에서 Src의 인산화가 필수적이며, Src의 발현을 억제할 경우 종양세포 노화 반응이 현저하게 저해됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 본 발명의 목적은 Src 억제제를 포함하는 종양세포 노화 억제용 조성물 및 상기 억제제를 이용한 종양세포의 노

화 조절 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 Src 단백질의인산화 정도를 이용한 항암제 또는 항암보조제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Src 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 포함하는 종양세포 노화 억제용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 종양세포에 Src 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 처리하는 단계를 포함하는, 종양세포의 노화 조절 방법을 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 (a) 종양세포에 시료를 처리한 후, Src 단백질의 인산화 정도를 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 종양세포에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 Src 단백질의 인산화 정도가 증가한 시료를 선별하는 단계를 포함하는 항암 또는 항암보조제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 조성물은 종양세포에서 Src의 발현 또는 활성을 억제하여 방사선에 의해 유도된 종양 세포의 노화를 억제할 수 있다. 따라서 특정 물질이 Src의 발현 또는 활성에 미치는 영향을 분석함으로써 방사선에 대한 종양세포의 민감성 증진과 관련된 항암 기작의 연구가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 폐암 세포에 방사선을 조사하고 3일 후, 세포 형태(A) 및 베타갈락토시다아제 활성(B)을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 유방암 세포에 방사선을 조사한 후, 시간에 따른 Src 의 인산화 정도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 폐암 세포에 Src si RNA를 주입하고 방사선을 조사한 후, 세포 형태를 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 폐암 세포에 Src si RNA를 주입하고 방사선을 조사한 후, 시간에 따른 Src의 인산화 정도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 폐암 세포에 Src 패밀리 키나아제 억제제인 PP2를 처리하고 방사선을 조사한 후, 세포 형태 및 베타갈락토시다아제 활성을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 Src 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 포함하는 종양세포 노화 억제용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 종양세포에 Src 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 처리하는 단계를 포함하는, 종양세포의 노화 조절 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 “Src”는 약 60kDa 크기의 단백질로 다양한 막 수용체 단백질에 의해 인산화되며, 활성화된 Src 단백질은 세포 신호 전달에 관여하여 세포 증식, 분화, 골격 유지 등 다양한 세포 내 반응을 매개한다.

[0016] 본 발명에서 Src 유전자는 바람직하게는 인간 유래의 것이다.

[0017] 본 발명에서 Src 유전자는 서열번호 1 (NCBI 등록번호 NM_005417.4) 또는 서열번호 2 (NCBI 등록번호 NM_198291.2)의 염기서열로 이루어진 뉴클레오티드 및 상기 뉴클레오티드와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(염기의 결실, 치환 또는 삽입)를 포함한다. 상기 서열은 예시일 뿐 이에 한정되는 것이 아님은 당업자에게 자명하며, 상기 서열에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0018] 본 발명에서 Src 유전자가 암호화하는 단백질은 서열번호 3 (NCBI 등록번호 NP_005408.1) 또는 서열번호 4 (NCBI 등록번호 NP_938033.1)의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. 상기 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을

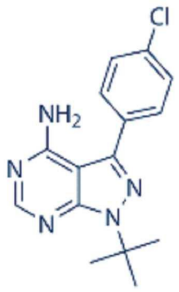
갖는 것으로, 상기 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

[0019] 본 발명에서 Src 유전자의 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA) 또는 리보자임 등일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 상기 siRNA는 Src 유전자의 mRNA의 염기서열 내에서 선택되는 15 내지 30머(mer)의 센스 서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되며, 예를 들어, 서열번호 5의 센스서열 및 이에 상보적인 서열번호 6의 안티센스 서열로 이루어진 이중가닥siRNA 일 수 있다. 상기 siRNA는 센스서열 및/또는 안티센스 서열의 3' 말단에 티민2 염기(dTdT)가 결합된 형태일 수 있다. 상기 서열은 예시일 뿐 이에 한정되는 것이 아님은 당업자에게 자명하며, 상기 서열에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0020] 본 발명에서 Src 유전자가 암호화하는 단백질의 억제제는 상기 단백질에 상보적으로 결합하거나, 이의 활성을 억제할 수 있는 모든 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체 (mimetics), 기질유사체, 앱타머 또는 항체일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 상기 화합물은 바람직하게는 하기 화학식 1로 표시되는 PP2이다.

화학식 1

[0022] 

[0023] 상기 항체는 상기 Src 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 단일클론 항체, 다클론항체, 또는 재조합 항체 등을 포함한다. 상기 항체는 당업자에게 알려진 공지의 방법으로 제작할 수 있으며, 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 종양세포는 암세포일 수 있다. 상기 암은 간암, 위암, 유방암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 대장암, 폐암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 골육종 또는 중추신경계 종양 등을 포함하며, 바람직하게는 상기 암세포는 유방암 또는 폐암세포일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명에서 노화는 바람직하게는 방사선에 의해 유도된 것이며, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 상기 방사선은 바람직하게는 감마선이며, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 종양세포 노화 억제용 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제한다.

[0028] 또한 본 발명은 (a) 종양세포에 시료를 처리한 후, Src 단백질의 인산화 정도를 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 종양세포에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 Src 단백질의 인산화 정도가 증가한 시료를 선별하는 단계를 포함하는 항암 또는 항암보조제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 일실시예에서는 방사선 유도 종양세포 노화 반응에서 Src 단백질의 인산화가 필수적임을 확인하였다. 따라서 특정 시료가 Src 단백질의 인산화를 증가시킬 경우 종양세포의 노화 반응이 촉진되는바, 상기 특정 시료는 방사선에 대한 종양세포의 민감성을 증진시키고, 항암제의 치료 효과를 증진시킬 수 있는 항암 또는 항암보조제의 후보물질로 판별될 수 있다.

[0030] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0031] **실시예 1. 방사선에 의한 종양세포 노화 유도**

[0032] 방사선에 의해 종양세포의 노화 유도가 가능한지 확인하기 위하여, 인간 폐암세포주 A549에 방사선(감마선) 6 Gy를 조사하고, 세포 형태 및 베타갈락토시다아제 활성도를 분석하였다.

[0033] 보다 구체적으로, 폐암세포를 ^{137}Cs 감마선 방출기 (Atomic Energy of Canada Ltd., Mississauga, Ontario, Canada)로부터 방출되는 6 Gy의 감마-방사선에 3.81 Gy/분의 용량으로 노출시킨 후, 5% CO_2 농도의 37℃ 항온 배양기에서 3일간 배양하고, 현미경(ECLIPSE TE300, Nikon)으로 세포 형태를 관찰하였다.

[0034] 다음으로, 상기 폐암세포를 PBS로 2번 세척하고 3% 포름알데히드로 실온에서 3-5분간 고정한 후, 고정된 세포를 PBS로 다시 한 번 세척하였다. 상기 폐암세포에 β-갈락토시다아제 활성 염색 용액(1 mg/ml의 X-Gal, 40 mM 시트르산 /소듐 포스페이트(pH 6.0), 5 mM 포타슘 페로시아니드, 5 mM 포타슘 페리시아니드, 150 mM 염화클로라이드, 2 mM 마그네슘 클로라이드) 5 ml를 첨가하고, 37℃ 항온 배양기에서 12-16시간 동안 반응시켰다. 반응을 진행하는 동안 빛이 들어가지 않도록 은박 호일로 배양 접시를 싸서 배양하였다. 베타-갈락토시다아제 활성 정도는 위상차 현미경(ECLIPSE TE300, Nikon)을 사용하여 관찰하였으며, 염색된 세포의 수를 측정하여 베타-갈락토시다아제 양성을 보이는 세포의 비율을 정량화하였다.

[0035] 이상의 실험 결과를 도 1에 나타내었다.

[0036] 도 1A에 나타낸 바와 같이, 방사선에 노출되지 않은 대조군과 달리 방사선을 조사한 폐암세포는 세포의 크기가 커지며 편평해지는 등 노화된 세포의 특징이 나타남을 확인하였다.

[0037] 또한, 도 1B에 나타낸 바와 같이, 방사선에 노출되지 않은 대조군에 비해 방사선을 조사한 폐암세포는 노화-관련 베타-갈락토시다아제의 양성을 보이는 세포의 비율이 현저하게 증가함을 확인하였다.

[0038] **실시예 2. 방사선에 의한 종양세포 노화 과정에서 Src의 인산화 정도 분석**

[0039] 2-1. 인간 유방암 세포주에서 Src의 인산화 정도 분석

[0040] 인간 유방암 세포주 MCF 7 에 선량 6 Gy의 감마-방사선을 조사하고, 1시간, 6시간, 24시간 동안 5% CO_2 농도의 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다. 상기 유방암 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 2번 세척한 후, 세포 용해 완충액(50 mM Tri-HCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 0.2 mM Na_3VO_4, 10 μg/ml 아프로티닌, 2 μg/ml 루펩틴)을 사용하여 세포를 녹였다. 이를 11,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액만 취하여 세포에서 추출된 단백질을 분리하였으며, Fullmoon BioSystems (USA)의 막 및 막 하위 신호전달 인산화 단백질의 항체마이크로어레이(Phospho Explorer Antibody Microarray)를 이용하여 1,318 종의 인산화 단백질에 대한 방사선 반응성을 분석하였다. 그 중 유의한 차이가 나타난 Src의 인산화 정도를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0041]

인산화 잔기	방사선 유도 세포노화 과정에서의 인산화 정도 (방사선 조사군/대조군)		
	1 시간	6 시간	24 시간
Src (Tyr418)	1.643	0.95	0.91

[0042] 표 1에 나타낸 바와 같이, 유방암 세포를 방사선에 노출시켜 세포 노화를 유도한 결과, 1시간 후 Src의 인간화가 나타남을 확인하였다.

[0043] 2-1. 인간 폐암 세포주에서 Src의 인산화 정도 분석

[0044] 인간 폐암 세포주 A549에 선량 6 Gy의 감마-방사선을 조사하고, 0.5시간, 1시간, 6시간 동안 5% CO_2 농도의 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다. 상기 폐암세포를 PBS로 세척한 후 세포 용해 완충액(50 mM Tri-HCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 0.2 mM Na_3VO_4, 10 μg/ml 아프로티닌, 2 μg/ml 루펩틴)을 사용하여 세포를 녹였다. 이를 11,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액만 취하여 세포에서 추출된 단백질을 분리하였으며, 브래드포드법{bradford, M., Anal. Biochem. 72:248-254(1976)}을 이용하여 정량하였다. 20 μg의 단백질에 2X SDS 로딩 버퍼(60 mM Tris-Cl (pH 6.8), 25% 글리세롤, 2% SDS, 14.4 mM 머캅토에탄올, 0.1% 브로모페놀 블루)를 가한 후, 95℃에서 5분간 가열하고, 8% 내지 10% SDS 폴리아크릴 아마이드 젤에서 80V로 2시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 분리된 단백질을 나이트로셀룰로오즈 멤브레인(Whatman 사)으로 전이시켰다. 단백질이 전이되어 있는 멤브레인을 5% 탈지분유가 함유된 PBS 용액에 넣고 실온에서 1시간 동안 방치하여 블록킹(blocking)하고, 1:500 ~ 1:1000으로 희석한 1차 항체들을 넣은 후 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 다클론 항-p21 항체(polyclonal anti-p21 Ab, Santa Cruz 사), 다클론 항-액틴 항체 (polyclonal anti-actin Ab, Santa Cruz 사), Src의 타이로신 잔기 중 인산화된 아미노산 418 만을 특이적으로 인지하는 단클론 항 p-Src 항체(Santa-Cruz 사)를 사용하였으며, 2차 항체는 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 복합 항-토끼 또는 항-쥐 항체 (HRP conjugated goat anti-rabbit IgG, HRP conjugated goat anti-mouse IgG, Santa Cruz 사)를 이용하였다. 최종 단백질 발현은 ECL(enhanced chemiluminescence) 시약(Amersham 사)으로 확인하였다. 이때 세포노화 특이적 발현 단백질인 p21은 노화 유도가 정상적으로 이루어졌는지를 확인하기 위하여 이용되었으며, 모든 세포에서 동일한 수준으로 발현되는 유전자(housekeeping gene)인 액틴(actin)은 동량의 단백질에 대한 결과임을 확인하기 위해 이용되었다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0045] 도 2에 나타낸 바와 같이, 폐암세포를 방사선에 노출시켜 세포 노화를 유도한 결과, Src의 인산화가 나타남을 확인하였다.

[0046] **실시예 3. siRNA를 이용하여 종양세포의 노화 과정에서의 Src의 기능 분석**

[0047] 인간 폐암 세포주 A549 을 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS,㈜ 웰진)과 항생제 (Gibco BRL 사)가 포함된 RPMI 배양 배지에서 배양하고 작은간섭 RNA(siRNA)의 주입 하루 전, 60 mm 배양접시에서 계대배양하였다. 2 μl의 RNAiMAX (invitrogen, Cat#13778-075)와 OptiMEM-I 배양배지(Invitrogen, Cat#31985)를 섞고 Src 유전자에 대한 siRNA {Src si ; 5'-(GAG AAC CUG GUG UGC AAA G(서열번호 5)-dTdT-3') 및 5'-(CTT TGC TCT CCT GGT TCT C(서열번호 6)-dTdT-3'), 각각의 서열 3' 말단에 티민 2 염기(dTdT)가 결합된 상태임}를 100 nM의 농도로 세포에 처리하였다. 6시간 후 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS, ㈜ 웰진)과 항생제인 스트렙토마이신 100 ug/ml 및 페니실린 100 U/ml (Gibco BRL 사)이 포함된 RPMI 배양 배지로 교환한 후, 5% CO_2 농도의 37℃ 항온 배양기에서 1 일간 배양하였다. 상기 세포를 ^{137}Cs 감마선 방출기 (Atomic Energy of Canada Ltd., Mississauga, Ontario, Canada)로부터 방출되는 6 Gy의 감마-방사선에 3.81 Gy/분의 용량으로 노출시킨 후, 5% CO_2 농도의 37℃ 항온 배양기에서 다시 3일간 배양하고, 현미경(ECLIPSE TE300, Nikon)으로 세포 형태를 관찰하였다(도 3).

[0048] 또한, 상기 방법과 동일하게 인간 폐암 세포에 Src siRNA를 100 nM로 처리한 후, 5% CO_2 농도의 37℃ 항온 배양

기에서 1 일간 배양하였다. 상기 세포에 방사선 6Gy를 조사하고 0.5시간, 1시간, 6시간 동안 5% CO_2 농도의 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다. 방사선 노출 시간 대별로 세포를 수득한 후, PBS로 세척하고, 세포 용해 완충액(50 mM Tri-HCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 0.2 mM Na_3VO_4, 10 μg/ml 아프로티닌, 2 μg/ml 루펩틴)을 사용하여 세포를 녹였다. 이를 11,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액만 취하여 세포에서 추출된 단백질을 분리하였으며, 브래드포드법{bradford, M., Anal. Biochem. 72:248-254(1976)}을 이용하여 정량하였다. 다음으로 20 μg의 단백질에 2X SDS 로딩 버퍼(60 mM Tris-Cl (pH6.8), 25% 글리세롤, 2% SDS, 14.4 mM 머캅토에탄올, 0.1% 브로모페놀 블루)를 가한 후, 95℃에서 5분간 가열하고 8% 내지 10% SDS 폴리아크릴 아마이드 젤에서 80V로 2시간동안 전기영동하였다. 전기영동 후 분리된 단백질을 나이트로셀룰로오즈 멤브레인(Whatman 사)으로 전이시켰다. 단백질이 전이되어 있는 나이트로셀룰로오즈 멤브레인을 5% 탈지분유가 함유된 PBS 용액에 넣고 실온에서 1시간 동안 방치하여 블록킹(blocking)하고 1:500 ~ 1:1000으로 희석한 1차 항체들을 넣고 4℃에서 16시간동안 반응시켰다. 1차 항체는 다클론 항-p21 항체(polyclonal anti-p21 Ab, Santa Cruz 사), 다클론 항-actin 항체 (polyclonal anti-actin Ab, Santa Cruz 사), 다클론 항-Src 항체 (polyclonal anti-Src Ab, cell signal transduction 사), Src의 타이로신 잔기 중 인산화된 아미노산 418 만을 특이적으로 인지하는 항 단클론 p-Src 항체 (monoclonal anti-pSrc Ab, cell signal transduction사)를 사용하였으며, 2차 항체는 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 복합 항-토끼 또는 항-쥐 항체 (HRP conjugated goat anti-rabbit IgG, HRP conjugated goat anti-mouse IgG, Santa Cruz 사)를 이용하였다. 최종 단백질 발현은 ECL(enhanced chemiluminescence) 시약 (Amersham 사)으로 확인하였다 (도 4).

[0049] 한편, 상기 실험에서는 비특이적 작은 간섭 RNA{Control si; 5'-CCU ACG CCA CCA AUU UCG U(서열번호 7)dTdT-3' 및 5'-ACG AAA UUG GUG GCG UAG G(서열번호 8)dTdT-3') 각각의 서열 3' 말단에 티민 2 염기(dTdT)가 결합된 상태임}를 동일한 농도로 주입한 세포주를 대조군으로 이용하였다.

[0050] 실험에 사용된 siRNA는 모두 바이오니아(대한민국)에 의뢰하여 제작하였다. 보다 구체적으로, β-시아노에틸 포스포라미다이트(β-cyanoethyl phosphoramidite)를 이용하여 DNA 구조의 골격을 이루는 포스포디에스터 결합을 연결해가는 방법을 사용하여 siRNA를 합성하였다(참조: Sinha et al., Nucleic Acids Research, 12:4539-4557, 1984). 즉, RNA 합성기(Perseptive Biosystems 8909, PE Biosystems, USA)를 사용하여, 뉴클레오티드가 부착된 고형지지체 상에서, 차단제거(deblocking), 결합(coupling), 산화(oxidation) 및 캐핑(capping)으로 이루어지는 일련의 과정을 반복하여 원하는 길이의 RNA를 포함하는 반응물을 수득하였다. 이어, 전기 반응물을 Daisogel C18(Daiso, Japan)을 사용한 HPLC LC918(Japan Analytical Industry, Japan)에 적용하여, RNA를 분리하고 이를 MALDI-TOF 질량 흡광분석기(Shimadzu, Japan)에 적용하여, 합성하고자 하는 염기서열과 부합하는지 확인하였다. 그런 다음, 센스와 안티센스 RNA가닥을 결합시켜서, 목적하는 이중가닥 siRNA를 각각 제조하였다.

[0051] 이상의 실험 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0052] 도 3에 나타낸 바와 같이, 폐암 세포에 Src siRNA를 주입하고 방사선에 노출시킬 경우, 노화 특이적 세포 형태의 변화가 나타나지 않음을 확인하였다.

[0053] 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, 폐암 세포에 Src siRNA를 주입하고 방사선에 노출시킬 경우, Src 발현이 효과적으로 억제되며, 세포 노화 특이적 발현 단백질인 p21의 발현량이 현저하게 감소함을 확인하였다.

[0054] **실시예 4. Src 활성화 저해제를 이용하여 종양세포의 노화 과정에서 Src의 기능 분석**

[0055] 인간 폐암 세포주 A549를 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS, ㈜ 웰진)과 항생제(Gibco BRL 사)가 포함된 RPMI 배양 배지 및 5% CO_2 농도의 37℃ 항온 배양기에서 1일 동안 배양하였다. 상기 세포에 Src 활성화 저해제인 PP2 (sigma 사) (농도 기입 요청) 10 uM을 처리한 후 다시 5% CO_2 농도의 37℃ 항온 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 세포에 ^{137}Cs 감마선 방출기로 방사선 6Gy를 조사한 후 5% CO_2 농도의 37℃ 항온 배양기에서 다시 3일 동안 배양하고, 현미경(ECLIPSE TE300, Nikon)으로 세포 형태를 관찰하였다. 다음으로, 상기 세포를 PBS로 2번 세척하고 3% 포름알데히드로 실온에서 3-5분간 고정한 후, 고정된 세포를 PBS로 다시 한 번 세척하였다. 상기 세포에 β-갈락토시다아제 활성 염색 용액(1 mg/ml의 X-Gal, 40 mM 시트르산 /소듐 포스페이트(pH 6.0), 5 mM 포타슘 페로시아니드, 5 mM 포타슘 페리시아니드, 150 mM 염화클로라이드, 2 mM 마그네슘 클로라이드) 5 ml를 첨가하고, 37℃ 항온 배양기에서 12-16시간 반응시켰다. 반응을 진행하는 동안 빛이 들어가지 않도록 은박 호일로 배양접시를 싸서 배양하였다. 베타-갈락토시다아제 활성 정도는 위상차 현미경 (ECLIPSE TE300,

Nikon)을 사용하여 관찰하였으며, 염색된 세포의 수를 측정하여 베타-갈락토시다아제 양성을 보이는 세포의 비율을 정량화하였다.

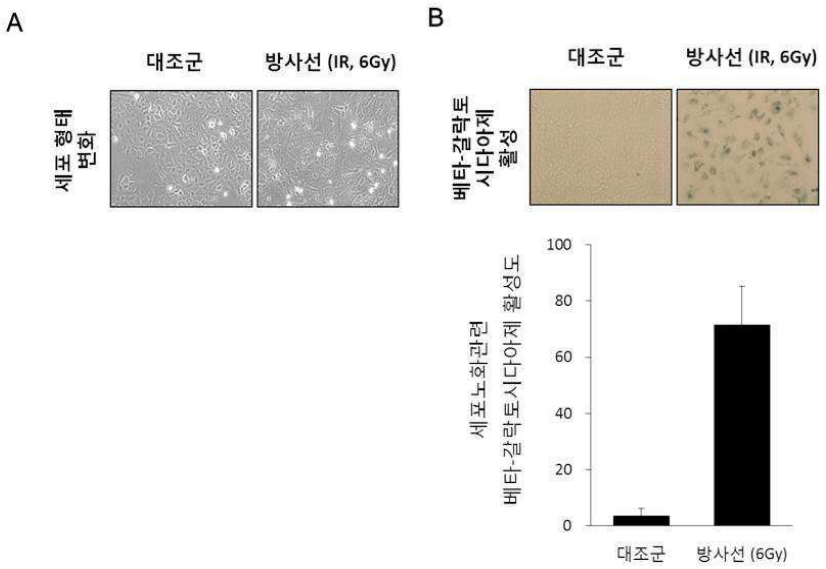
[0056] 이상의 실험 결과를 도 5에 나타내었다.

[0057] 도 5에 나타낸 바와 같이, 폐암 세포에 PP2를 처리하고 방사선에 노출시킬 경우, 노화 특이적 세포 형태의 변화가 나타나지 않으며, 대조군에 비해 노화-관련 베타-갈락토시다아제의 양성을 보이는 세포의 비율이 현저하게 감소하는 등 종양세포 노화 반응이 현저하게 저해됨을 확인하였다.

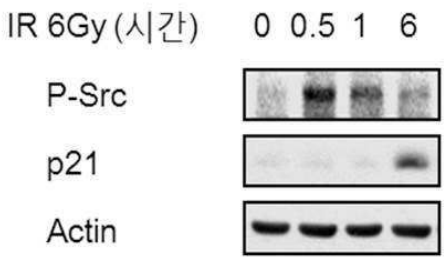
[0058] 이상의 실험 결과를 통하여, 방사선에 의해 유도된 종양세포 노화 과정에서 Src의 인산화가 필수적이며, Src의 발현 또는 활성을 억제할 경우 종양세포 노화 반응이 현저하게 저해됨을 확인하였다.

도면

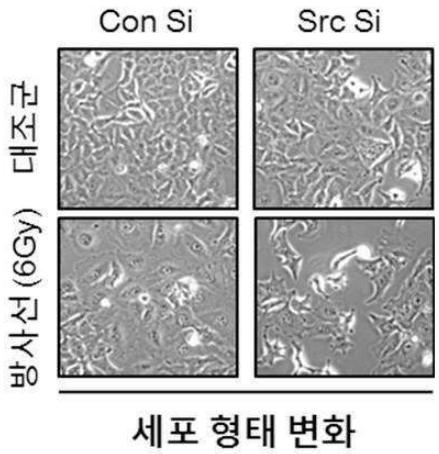
도면1



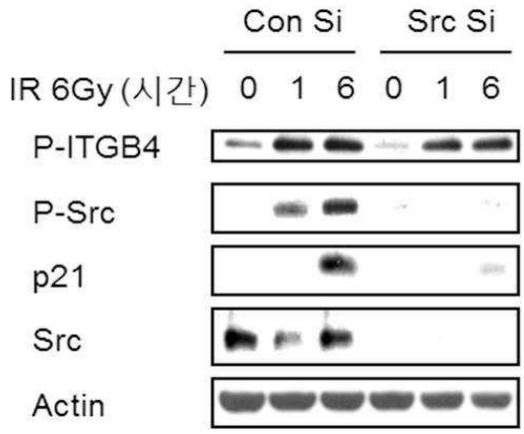
도면2



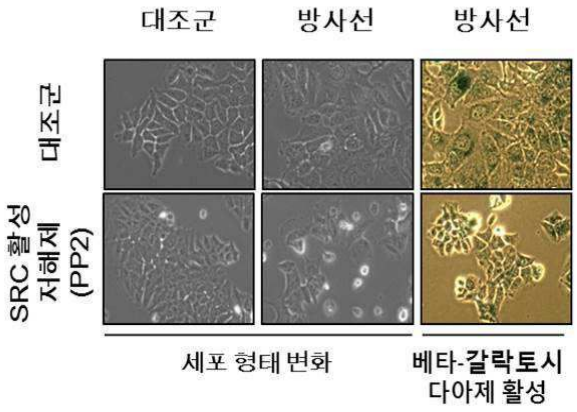
도면3

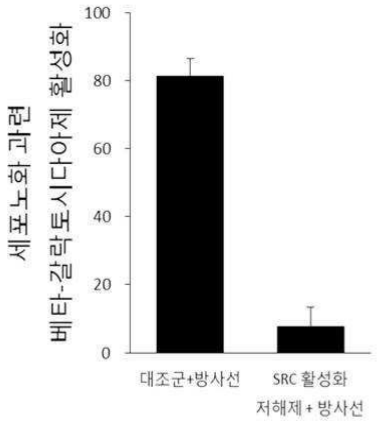

Con Si
Src Si
대조군
방사선 (6Gy)
세포 형태 변화

도면4


Con Si
Src Si
IR 6Gy (시간) 0 1 6 0 1 6
P-ITGB4
P-Src
p21
Src
Actin

도면5





서 열 목 록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE

<120> Composition for inhibiting tumor cell senescence comprising Src inhibitor

<130> 160P

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 4131

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

caaacaagtg cggccatttc accagcccag gctggcttct gctgttgact ggctgtggca 60

cctcaagcag ccccttccc ctctagcctc agtttatcac cgcaagagct accattcatc 120

tagcacaacc tgaccatcct cacactggtc agttccaacc ttcccaggaa tcttctgtgg 180

ccatgttcac tccggtttta cagaacagag aacagaagct cagagaagtg aagcaacttg 240

cccagctatg agagacagag ccaggatttg aaaccagatg aggacgctga ggcccagaga 300

gggaaagcca cttgcctagg gacacacagc ggggagaggt ggagcagggc ctctatttcg 360

agacccctga ctccacacct ggtgtttgtg ccaagacccc aggctgcctc ccaggtcctc 420

tgggacagcc cctgccttct accaggacca tgggtagcaa caagagcaag cccaaggatg 480

ccagccagcg gcgccgcagc ctggagcccg ccgagaacgt gcacggcgct ggcgggggcg 540

ctttccccgc ctcgcagacc cccagcaagc cagcctcggc cgacggccac cgcggcccca 600

gcgcggcctt cgcccccgcg gccgccgagc ccaagctgtt cggaggcttc aactcctcgg 660

acaccgtcac ctccccgcag agggcgggcc cgctggccgg tggagtgacc acctttgtgg 720

ccctctatga ctatgagtct aggacggaga cagacctgtc cttcaagaaa ggcgagcggc 780

tccagattgt caacaacaca gagggagact ggtggctggc ccactcgctc agcacaggac 840

agacaggcta catccccagc aactacgtgg cgccctccga ctccatccag gctgaggagt 900

ggtattttgg caagatcacc agacgggagt cagagcggtt actgctcaat gcagagaacc 960

cgagagggac cttcctcgtg cgagaaagtg agaccacgaa aggtgcctac tgcctctcag 1020

tgtctgactt cgacaacgcc aagggcctca acgtgaagca ctacaagatc cgcaagctgg 1080

acagcggcgg cttctacatc acctcccgca cccagttcaa cagcctgcag cagctggtgg 1140

cctactactc caaacacgcc gatggcctgt gccaccgcct caccaccgtg tgccccacgt 1200

ccaagccgca gactcagggc ctggccaagg atgcctggga gatccctcgg gagtcgctgc 1260

ggctggaggt caagctgggc cagggctgct ttggcgaggt gtggatgggg acctggaacg 1320

gtaccaccag ggtggccatc aaaaccctga agcctggcac gatgtctcca gaggccttcc 1380

tgcaggaggc ccaggtcatg aagaagctga ggcatgagaa gctggtgcag ttgtatgctg 1440

tggtttcaga ggagcccatt tacatcgtca cggagtacat gagcaagggg agtttgctgg 1500

actttctcaa gggggagaca ggcaagtacc tgcggctgcc tcagctggtg gacatggctg 1560

ctcagatcgc ctcaggcatg gcgtacgtgg agcggatgaa ctacgtccac cgggaccttc 1620

gtgcagccaa catcctggtg ggagagaacc tggtgtgcaa agtggccgac tttgggctgg 1680

ctcggctcat tgaagacaat gagtacacgg cgcggcaagg tgccaaattc cccatcaagt 1740

ggacggctcc agaagctgcc ctctatggcc gcttcaccat caagtcggac gtgtggtcct 1800

tcgggatcct gctgactgag ctcaccacaa agggacgggt gccctaccct gggatggtga 1860

accgcgaggt gctggaccag gtggagcggg gctaccggat gccctgcccg ccggagtgtc 1920

ccgagtccct gcacgacctc atgtgccagt gctggcggaa ggagcctgag gagcggccca 1980

ccttcgagta cctgcaggcc ttcctggagg actacttcac gtccaccgag ccccagtacc 2040

agcccgggga gaacctctag gcacaggcgg gcccagaccg gcttctcggc ttggatcctg 2100

ggctgggtgg cccctgtctc ggggcttgcc ccactctgcc tgcctgctgt tggtcctctc 2160

tctgtggggc tgaattgcca ggggcgaggc ccttcctctt tggtggcatg gaaggggctt 2220

ctggacctag ggtggcctga gagggcggtg ggtatgcgag accagcacgg tgactctgtc 2280

cagctcccgc tgtggccgca cgcctctccc tgcactccct cctggagctc tgtgggtctc 2340

tggaagagga accaggagaa gggctggggc cggggctgag ggtgcccttt tccagcctca 2400

gcctactccg ctcactgaac tccttcccca cttctgtgcc acccccggtc tatgtcgaga 2460

gctggccaaa gagcctttcc aaagaggagc gatgggcccc tggccccgcc tgcctgccac 2520

cctgcccctt gccatccatt ctggaaacac ctgtaggcag aggctgccga gacagaccct 2580

ctgccgctgc ttccaggctg ggcagcacaa ggccttgcct ggcctgatga tggtgggtgg 2640

gtgggatgag taccccctca aaccctgccc tccttagacc tgagggaccc ttcgagatca 2700

tcacttcctt gcccccattt cacccatggg gagacagttg agagcgggga tgtgacatgc 2760

ccaaggccac ggagcagttc agagtggagg cgggcttgga acccggtgct ccctctgtca 2820

tcctcaggaa ccaacaattc gtcggaggca tcatggaaag actgggacag cccaggaaac 2880

aaggggtctg aggatgcatt cgagatggca gattcccact gccgctgccc gctcagccca 2940

gctgttggga acagcatgga ggcagatgtg gggctgagct ggggaatcag ggtaaaaggt 3000

gcaggtgtgg agagagaggc ttcaatcggc ttgtgggtga tgtttgacct tcagagccag 3060

ccggctatga aagggagcga gcccctcggc tctggaggca atcaagcaga catagaagag 3120

ccaagagtcc aggaggccct ggtcctggcc tccttccccg tactttgtcc cgtggcattt 3180

caattcctgg ccctgttctc ctccccaagt cggcaccctt taactcatga ggagggaaaa 3240

gagtgcctaa gcgggggtga aagaggacgt gttacccact gccatgcacc aggactggct 3300

gtgtaacctt gggtggcccc tgctgtctct ctgggctgca gagtctgccc cacatgtggc 3360

catggcctct gcaactgctc agctctggtc caggccctgt ggcaggacac acatggtgag 3420

cctagccctg ggacatcagg agactgggct ctggctctgt tcggcctttg ggtgtgtggt 3480

ggattctccc tgggcctcag tgtgcccatc tgtaaagggg cagctgacag tttgtggcat 3540

cttgccaagg gtccctgtgt gtgtgtatgt gtgtgcatgt gtgcgtgtct ccatgtgcgt 3600

ccatatttaa catgtaaaaa tgtccccccc gctccgtccc ccaaacatgt tgtacatttc 3660

accatggccc cctcatcata gcaataacat tcccactgcc aggggttctt gagccagcca 3720

ggccctgcca gtggggaagg aggccaagca gtgcctgcct atgaaatttc aacttttcct 3780

ttcatacgtc tttattaccc aagtcttctc ccgtccattc cagtcaaatc tgggctcact 3840

caccccagcg agctctcaaa tccctctcca actgcctaag gccctttgtg taaggtgtct 3900

taatactgtc ctttttttt ttttaacagt gttttgtaga tttcagatga ctatgcagag 3960

gcctggggga cccctggctc tgggccgggc ctggggctcc gaaattccaa ggcccagact 4020

tgcgggggt gggggggtat ccagaattgg ttgtaaatac tttgcatatt gtctgattaa 4080

acacaaacag acctcagaat ctgatcaaca gttaaaaaaa aaaaaaaaaa a 4131

<210> 2

<211> 4056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggcccggaat ccattccggc ctgggagccg gagcggccag gccgccgtct gcccgtcccg 60

ctggacgtcc cgcggtccgc cctcccgtgc gtccgtctgc cggtgagccc gcccgcccgc 120

cggcccagaa cagagaacag aagctcagag aagtgaagca acttgcccag ctatgagaga 180

cagagccagg atttgaaacc agatgaggac gctgaggccc agagagggaa agccacttgc 240

ctagggacac acagcgggga gaggtggagc agggcctcta tttcgagacc cctgactcca 300

cacctggtgt ttgtgccaag accccaggct gcctcccagg tcctctggga cagcccctgc 360

cttctaccag gaccatgggt agcaacaaga gcaagcccaa ggatgccagc cagcggcgcc 420

gcagcctgga gcccgccgag aacgtgcacg gcgctggcgg gggcgctttc cccgcctcgc 480

agacccccag caagccagcc tcggccgacg gccaccgcgg ccccagcgcg gccttcgccc 540

ccgcggccgc cgagcccaag ctgttcggag gcttcaactc ctcggacacc gtcacctccc 600

cgcagagggc gggcccgctg gccggtggag tgaccacctt tgtggccctc tatgactatg 660

agtctaggac ggagacagac ctgtccttca agaaaggcga gcggctccag attgtcaaca 720

acacagaggg agactggtgg ctggcccact cgctcagcac aggacagaca ggctacatcc 780

ccagcaacta cgtggcgccc tccgactcca tccaggctga ggagtggtat tttggcaaga 840

tcaccagacg ggagtcagag cggttactgc tcaatgcaga gaacccgaga gggaccttcc 900

tcgtgcgaga aagtgagacc acgaaaggtg cctactgcct ctcagtgtct gacttcgaca 960

acgccaaggg cctcaacgtg aagcactaca agatccgcaa gctggacagc ggcggcttct 1020

acatcacctc ccgcacccag ttcaacagcc tgcagcagct ggtggcctac tactccaaac 1080

acgccgatgg cctgtgccac cgcctcacca ccgtgtgccc cacgtccaag ccgcagactc 1140

agggcctggc caaggatgcc tgggagatcc ctcgggagtc gctgcggctg gaggtcaagc 1200

tgggccaggg ctgctttggc gaggtgtgga tggggacctg gaacggtacc accagggtgg 1260

ccatcaaaac cctgaagcct ggcacgatgt ctccagaggc cttcctgcag gaggcccagg 1320

tcatgaagaa gctgaggcat gagaagctgg tgcagttgta tgctgtggtt tcagaggagc 1380

ccatttacat cgtcacggag tacatgagca aggggagttt gctggacttt ctcaaggggg 1440

agacaggcaa gtacctgcgg ctgcctcagc tggtggacat ggctgctcag atcgcctcag 1500

gcatggcgta cgtggagcgg atgaactacg tccaccggga ccttcgtgca gccaacatcc 1560

tggtgggaga gaacctggtg tgcaaagtgg ccgactttgg gctggctcgg ctcattgaag 1620

acaatgagta cacggcgcgg caaggtgcca aattccccat caagtggacg gctccagaag 1680

ctgccctcta tggccgcttc accatcaagt cggacgtgtg gtccttcggg atcctgctga 1740

ctgagctcac cacaaaggga cgggtgccct accctgggat ggtgaaccgc gaggtgctgg 1800

accaggtgga gcggggctac cggatgccct gcccgccgga gtgtcccgag tccctgcacg 1860

acctcatgtg ccagtgctgg cggaaggagc ctgaggagcg gcccaccttc gagtacctgc 1920

aggccttcct ggaggactac ttcacgtcca ccgagcccca gtaccagccc ggggagaacc 1980

tctaggcaca ggcgggccca gaccggcttc tcggcttgga tcctgggctg ggtggcccct 2040

gtctcggggc ttgccccact ctgcctgcct gctgttggtc ctctctctgt ggggctgaat 2100

tgccaggggc gaggcccttc ctctttggtg gcatggaagg ggcttctgga cctagggtgg 2160

cctgagaggg cggtgggtat gcgagaccag cacggtgact ctgtccagct cccgctgtgg 2220

ccgcacgcct ctccctgcac tccctcctgg agctctgtgg gtctctggaa gaggaaccag 2280

gagaagggct ggggccgggg ctgagggtgc ccttttccag cctcagccta ctccgctcac 2340

tgaactcctt ccccacttct gtgccacccc cggtctatgt cgagagctgg ccaaagagcc 2400

tttccaaaga ggagcgatgg gcccctggcc ccgcctgcct gccaccctgc cccttgccat 2460

ccattctgga aacacctgta ggcagaggct gccgagacag accctctgcc gctgcttcca 2520

ggctgggcag cacaaggcct tgcctggcct gatgatggtg ggtgggtggg atgagtaccc 2580

cctcaaaccc tgccctcctt agacctgagg gacccttcga gatcatcact tccttgcccc 2640

catttcaccc atggggagac agttgagagc ggggatgtga catgcccaag gccacggagc 2700

agttcagagt ggaggcgggc ttggaacccg gtgctccctc tgtcatcctc aggaaccaac 2760

aattcgtcgg aggcatcatg gaaagactgg gacagcccag gaaacaaggg gtctgaggat 2820

gcattcgaga tggcagattc ccactgccgc tgcccgctca gcccagctgt tgggaacagc 2880

atggaggcag atgtggggct gagctgggga atcagggtaa aaggtgcagg tgtggagaga 2940

gaggcttcaa tcggcttgtg ggtgatgttt gaccttcaga gccagccggc tatgaaaggg 3000

agcgagcccc tcggctctgg aggcaatcaa gcagacatag aagagccaag agtccaggag 3060

gccctggtcc tggcctcctt ccccgtactt tgtcccgtgg catttcaatt cctggccctg 3120

ttctcctccc caagtcggca ccctttaact catgaggagg gaaaagagtg cctaagcggg 3180

ggtgaaagag gacgtgttac ccactgccat gcaccaggac tggctgtgta accttgggtg 3240

gcccctgctg tctctctggg ctgcagagtc tgccccacat gtggccatgg cctctgcaac 3300

tgctcagctc tggtccaggc cctgtggcag gacacacatg gtgagcctag ccctgggaca 3360

tcaggagact gggctctggc tctgttcggc ctttgggtgt gtggtggatt ctccctgggc 3420

ctcagtgtgc ccatctgtaa aggggcagct gacagtttgt ggcatcttgc caagggtccc 3480

tgtgtgtgtg tatgtgtgtg catgtgtgcg tgtctccatg tgcgtccata tttaacatgt 3540

aaaaatgtcc cccccgctcc gtcccccaaa catgttgtac atttcaccat ggccccctca 3600

tcatagcaat aacattccca ctgccagggg ttcttgagcc agccaggccc tgccagtggg 3660

gaaggaggcc aagcagtgcc tgcctatgaa atttcaactt ttcctttcat acgtctttat 3720

tacccaagtc ttctcccgtc cattccagtc aaatctgggc tcactcaccc cagcgagctc 3780

tcaaatccct ctccaactgc ctaaggccct ttgtgtaagg tgtcttaata ctgtcctttt 3840

ttttttttta acagtgtttt gtagatttca gatgactatg cagaggcctg ggggacccct 3900

ggctctgggc cgggcctggg gctccgaaat tccaaggccc agacttgcgg ggggtggggg 3960

ggtatccaga attggttgta aatactttgc atattgtctg attaaacaca aacagacctc 4020

agaatctgat caacagttaa aaaaaaaaaa aaaaaa 4056

<210> 3

<211> 536

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gly Ser Asn Lys Ser Lys Pro Lys Asp Ala Ser Gln Arg Arg Arg

1 5 10 15

Ser Leu Glu Pro Ala Glu Asn Val His Gly Ala Gly Gly Gly Ala Phe

20 25 30

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

35 40 45

Gly Pro Ser Ala Ala Phe Ala Pro Ala Ala Ala Glu Pro Lys Leu Phe

50 55 60

Gly Gly Phe Asn Ser Ser Asp Thr Val Thr Ser Pro Gln Arg Ala Gly

65 70 75 80

Pro Leu Ala Gly Gly Val Thr Thr Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu

85 90 95

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

100 105 110

Ile Val Asn Asn Thr Glu Gly Asp Trp Trp Leu Ala His Ser Leu Ser

115 120 125

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

130 135 140

Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg Glu

145 150 155 160

Ser Glu Arg Leu Leu Leu Asn Ala Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu

165 170 175

Val Arg Glu Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Ser Val Ser

180 185 190

Asp Phe Asp Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile Arg

195 200 205

Lys Leu Asp Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Asn

210 215 220

Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu

225 230 235 240

Cys His Arg Leu Thr Thr Val Cys Pro Thr Ser Lys Pro Gln Thr Gln

245 250 255

Gly Leu Ala Lys Asp Ala Trp Glu Ile Pro Arg Glu Ser Leu Arg Leu

260 265 270

Glu Val Lys Leu Gly Gln Gly Cys Phe Gly Glu Val Trp Met Gly Thr

275 280 285

Trp Asn Gly Thr Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Pro Gly Thr

290 295 300

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

305 310 315 320

Arg His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro

325 330 335

Ile Tyr Ile Val Thr Glu Tyr Met Ser Lys Gly Ser Leu Leu Asp Phe

340 345 350

Leu Lys Gly Glu Thr Gly Lys Tyr Leu Arg Leu Pro Gln Leu Val Asp

355 360 365

Met Ala Ala Gln Ile Ala Ser Gly Met Ala Tyr Val Glu Arg Met Asn

370 375 380

Tyr Val His Arg Asp Leu Arg Ala Ala Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn

385 390 395 400

Leu Val Cys Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Ile Glu Asp

405 410 415

Asn Glu Tyr Thr Ala Arg Gln Gly Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp Thr

420 425 430

Ala Pro Glu Ala Ala Leu Tyr Gly Arg Phe Thr Ile Lys Ser Asp Val

435 440 445

Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Thr Glu Leu Thr Thr Lys Gly Arg Val

450 455 460

Pro Tyr Pro Gly Met Val Asn Arg Glu Val Leu Asp Gln Val Glu Arg

465 470 475 480

Gly Tyr Arg Met Pro Cys Pro Pro Glu Cys Pro Glu Ser Leu His Asp

485 490 495

Leu Met Cys Gln Cys Trp Arg Lys Glu Pro Glu Glu Arg Pro Thr Phe

500 505 510

Glu Tyr Leu Gln Ala Phe Leu Glu Asp Tyr Phe Thr Ser Thr Glu Pro

515 520 525

Gln Tyr Gln Pro Gly Glu Asn Leu

530 535

<210> 4

<211> 536

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Ser Asn Lys Ser Lys Pro Lys Asp Ala Ser Gln Arg Arg Arg
1 5 10 15

Ser Leu Glu Pro Ala Glu Asn Val His Gly Ala Gly Gly Gly Ala Phe
20 25 30

Pro Ala Ser Gln Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ser Ala Asp Gly His Arg
35 40 45

Gly Pro Ser Ala Ala Phe Ala Pro Ala Ala Ala Glu Pro Lys Leu Phe
50 55 60

Gly Gly Phe Asn Ser Ser Asp Thr Val Thr Ser Pro Gln Arg Ala Gly
65 70 75 80

Pro Leu Ala Gly Gly Val Thr Thr Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu
85 90 95

Ser Arg Thr Glu Thr Asp Leu Ser Phe Lys Lys Gly Glu Arg Leu Gln
100 105 110

Ile Val Asn Asn Thr Glu Gly Asp Trp Trp Leu Ala His Ser Leu Ser
115 120 125

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

130 135 140

Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg Glu
145 150 155 160

Ser Glu Arg Leu Leu Leu Asn Ala Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu
165 170 175

Val Arg Glu Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Ser Val Ser
180 185 190

Asp Phe Asp Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile Arg
195 200 205

Lys Leu Asp Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Asn

210 215 220

Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu
225 230 235 240

```
Cys His Arg Leu Thr Thr Val Cys Pro Thr Ser Lys Pro Gln Thr Gln
                245                 250                 255
Gly Leu Ala Lys Asp Ala Trp Glu Ile Pro Arg Glu Ser Leu Arg Leu
            260                 265                 270
Glu Val Lys Leu Gly Gln Gly Cys Phe Gly Glu Val Trp Met Gly Thr

        275                 280                 285
Trp Asn Gly Thr Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Pro Gly Thr
    290                 295                 300
Met Ser Pro Glu Ala Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Met Lys Lys Leu
305                 310                 315                 320
Arg His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro
                325                 330                 335
Ile Tyr Ile Val Thr Glu Tyr Met Ser Lys Gly Ser Leu Leu Asp Phe
            340                 345                 350

Leu Lys Gly Glu Thr Gly Lys Tyr Leu Arg Leu Pro Gln Leu Val Asp
        355                 360                 365
Met Ala Ala Gln Ile Ala Ser Gly Met Ala Tyr Val Glu Arg Met Asn
    370                 375                 380
Tyr Val His Arg Asp Leu Arg Ala Ala Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn
385                 390                 395                 400
Leu Val Cys Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Ile Glu Asp
                405                 410                 415
Asn Glu Tyr Thr Ala Arg Gln Gly Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp Thr

            420                 425                 430
Ala Pro Glu Ala Ala Leu Tyr Gly Arg Phe Thr Ile Lys Ser Asp Val
        435                 440                 445
Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Thr Glu Leu Thr Thr Lys Gly Arg Val
    450                 455                 460
Pro Tyr Pro Gly Met Val Asn Arg Glu Val Leu Asp Gln Val Glu Arg
465                 470                 475                 480
Gly Tyr Arg Met Pro Cys Pro Pro Glu Cys Pro Glu Ser Leu His Asp
```

485 490 495

Leu Met Cys Gln Cys Trp Arg Lys Glu Pro Glu Glu Arg Pro Thr Phe
500 505 510
Glu Tyr Leu Gln Ala Phe Leu Glu Asp Tyr Phe Thr Ser Thr Glu Pro
515 520 525
Gln Tyr Gln Pro Gly Glu Asn Leu
530 535

<210> 5
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Src siRNA sense
<400> 5
gagaaccugg ugugcaaag 19

<210
> 6
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Src siRNA antisense
<400> 6
ctttgctctc ctggttctc 19
<210> 7
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Control siRNA sense
<400> 7
ccuacgccac caauuucgu 19
<210> 8
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Control siRNA antisense

<400

> 8

acgaaauugg uggcguagg 19