(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0010003
(43) 공개일자 2012년02월02일

(51) Int. Cl.
C12N 15/12 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0071422
(22) 출원일자 2010년07월23일
심사청구일자 2010년07월23일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전 유성구 궁동 220 충남대학교
(72) 발명자
이증훈
대전광역시 유성구 엑스포로339번길 320, 싸이언스 빌리지 10동 402호 (원촌동)
김창덕
대전광역시 중구 문화동 문화마을 아파트 101동 101호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
황주명, 위병갑, 성정현

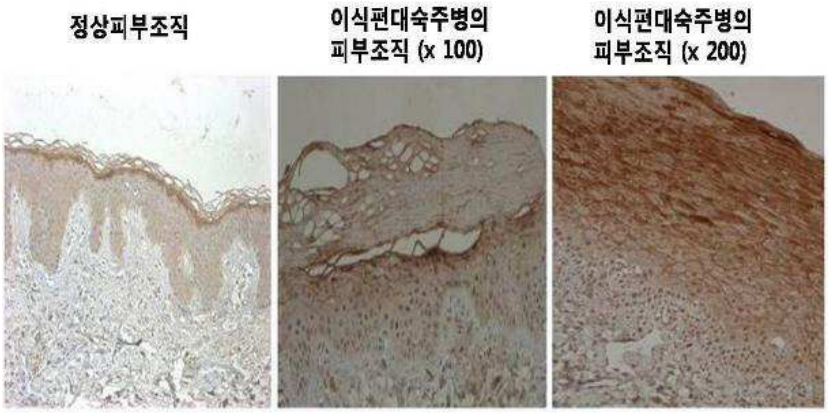
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 이식편대숙주병 진단용 마커로서의 Brn2의 용도

(57) 요 약

본 발명은 이식편대숙주병 진단용 마커로서의 Brn2의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 Brn2 유전자를 이용한 이식편대숙주병 진단용 마커, 이를 이용한 이식편대숙주병 진단용 조성물, 키트, 마이크로어레이 및 이식편대숙주병의 진단 방법에 관한 것이고, 또한 Brn2 유전자 또는 단백질의 발현을 억제하여 이식편대숙주병을 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 스크리닝하는 방법 및 상기 물질을 포함하는 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 Brn2 유전자는 정상적인 조직 또는 세포에 비해 이식편대숙주병의 조직 또는 세포에서 발현양이 증가되는 것으로 확인됨에 따라 Brn2 유전자를 이식편대숙주병 진단용 마커로 사용할 경우 이식편대숙주병을 조기에 신속하고 정확하게 진단 및 예측할 수 있는 효과가 있으며, 나아가 이식편대숙주병의 치료제 개발을 위한 표적으로 활용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

손경철

대전광역시 중구 문화동 목양마을 아파트 112동 1102호

시가

대전 중구 대사동 220-15번지 202호

김유진

대전광역시 서구 갈마로 262, 109동 1702호 (내동, 맑은아침아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 01-PJ3-PG6-01GN12-0001/E00152

부처명 한국보건산업진흥원/한국연구재단

연구관리전문기관

연구사업명 바이오보건기술개발사업/기초연구지원기초과학

연구과제명 한국인 아토피 피부염의 유전적 소인 규명을 위한 피부특이 유전자의 microarray 개발/각질형성세포 분화전자조절인자 기능연구

기여율

주관기관 충남대학교산학협력단

연구기간 2008년 4월 1일~2010년 3월 31일/2008년 7월 1일~2010년 6월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

Brn2 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 Brn2 단백질을 포함하는 이식편대숙주병 진단용 마커.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Brn2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 이식편대숙주병 진단용 마커.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Brn2 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 이식편대숙주병 진단용 마커.

청구항 4

Brn2 유전자의 mRNA 또는 Brn2 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 이식편대숙주병 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 Brn2 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 물질은 상기 Brn2 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 이식편대숙주병 진단용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 프라이머는 서열번호 3 및 4의 프라이머쌍인 것을 특징으로 하는 이식편대숙주병 진단용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 Brn2 단백질의 수준을 측정하는 물질은 상기 Brn2 단백질을 특이적으로 인식하는 항체인 것을 특징으로 하는 이식편대숙주병 진단용 조성물..

청구항 8

(a) 생물학적 시료에 존재하는 Brn2 유전자의 발현양 또는 단백질의 양을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 측정결과를 정상대조군 시료의 Brn2 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함하는 이식편대숙주병의 예측 및 진단 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이식편대숙주병의 예측 및 진단 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 Brn2 유전자의 발현양을 측정하는 방법은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 및 DNA 칩으로 이루어진 군 중에서 선택되는

어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 이식편대숙주병의 예측 및 진단 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 Brn2 단백질의 양을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 이식편대숙주병의 예측 및 진단 방법.

청구항 12

(a) Brn2 유전자 또는 Brn2 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 Brn2 유전자의 발현양, Brn2 단백질의 양 또는 Brn2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, Brn2 유전자의 발현양, Brn2 단백질의 양 또는 Brn2 단백질의 활성이 상기 시료를 접촉시키지 않은 대조군에 비해 감소되는 경우, 상기 시료를 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝 하는 방법.

청구항 13

Brn2 유전자의 염기서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 또는 siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이식편대숙주병(graft versus host disease, GVHD) 진단용 마커로서의 Brn2의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 이식편대숙주병을 조기에 효과적으로 진단 및 예측할 수 있는 신규한 이식편대숙주병 진단용 마커, 이식편대숙주병 진단용 조성물, 이식편대숙주병 진단용 키트, 마이크로 어레이, 이식편대숙주병의 진단 방법, 이식편대숙주병의 치료제를 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 이식편대숙주병은 이식편(공여자)의 면역적격세포(immunocompetent cell)가 면역이 억제된 숙주에 주입된 후 숙주세포를 항원으로 인식하여 공격함으로써 숙주의 여러 장기에 손상을 일으키는 질환으로서, 현재 동종조혈모세포 이식 후 장기 생존 환자의 60% 이상에서 발생하는 가장 중요한 합병증 중의 하나이다. 최근 고연령 환자에서의 이식의 확대와 비혈연간 이식의 증가 등 조혈모세포 이식의 범위가 넓어짐에 따라 이식편 대 숙주 질환의 빈도는 급증하고 있으나 확실한 예방요법은 아직 없는 실정이며 효과적인 치료법 역시 잘 알려져 있지 않다.

[0003] 또한, 이식편대숙주병은 인체의 다양한 장기를 독립적으로 또는 동시에 침범하기 때문에 그 임상 양상은 매우 다양하게 표현되지만, 주로 침범하는 장기는 피부, 위장관, 간, 골수 등이며 그중에서도 피부 증상이 가장 먼저 흔하게 나타난다. 이식편대숙주병의 피부 증상은 급성기에는 세포 독성형을 보이다가 만성으로 진행될 경우 태선양 병변과, 일부 경피증성 병변으로 나타난다. 특히 만성 이식편대숙주병의 경우 피부 중에서도 구강 점막이 가장 흔히 침범되는데 구강 점막 내에 흰색의 망상반이나 판을 형성하는 경우가 많아 구강 편평태선과의 감별이 흔히 요구된다. 조직학적으로는 표피와 진피 경계부의 T 림프구의 침윤과 표피 기저세포층의 액화 변성 및 괴사를 특징으로 하는 편평태선양 조직 반응(Lichenoid tissue reaction)의 형태를 보이고 있는데, 이와 구별하여 이식편대숙주병만을 특이적으로 정확하게 감별할 수 있는 진단 방법 및 진단 마커는 아직 개발되지 못하고 있다.

[0004] 나아가 이식편대숙주병은 이식 전 전처치 요법으로 인한 숙주의 조직 손상 및 이식된 T세포가 숙주의 MHC II형 항원제공세포(Antigen presenting cell)에 의해 제공된 숙주 항원을 인지후 활성화하는 것을 원인으로 발생한다. 이식편대숙주병의 가장 중요한 위험 인자는 주요 조직 적합성 불일치이나 주요 조직 적합성이 일치하는 경우에도 40%에서 이식편대숙주 질환이 나타나게 되는데, 이 경우 부조직적합체(minor histocompatibility complex)의 불일치, 이식편대숙주병 발생 전 면역억제제의 혈중 농도 감소를 비롯한 여러 가지 인자가 작용할

것이라 생각되나 아직 뚜렷한 원인이 밝혀져 있지 않다.

[0005] 한편, 이식편대숙주병의 치료를 위해 현재 여러 조혈성장인자와 다양한 면역억제제가 도입되고 있으며 약제간의 이상적인 조합에 대하여 많은 연구가 진행되고 있으나, 아직 만족할 만한 성과를 거두지 못하고 있어 이식편대숙주병은 감염성 합병증과 함께 이식과 관련된 사망에 가장 큰 요인으로 작용하고 있다.

[0006] 또한, 현재 수행되고 있는 이식편대숙주병의 진단은 피부 발진, 고빌리루빈혈증(hyperbilirubinemia), 설사 등과 같은 임상적 소견에 기반하여 수행되고, 이식편대숙주병을 다른 유사한 합병증(정맥 폐쇄, 바이러스 재활성화(viral reactivation), 치료 요법-관련 독성(treatment regimen-related toxicity) 등)과 구별할 수 있는 결정적 바이오 마커는 존재하지 않는다.

[0007] 따라서 생검과 같은 침습적 방법이 이식편대숙주병의 감별 진단(differential diagnosis)을 위해 요구되고 있으나, 이러한 생검은 침습적이고 주관적인 진단 방법이므로, 생검에 대한 의존 없이 이식편대숙주병을 조기에 정확하고 객관적으로 진단할 수 있는 새로운 진단 마커 및 진단 방법의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 이식편대숙주병의 진단 및 치료에 대한 기초적 단서 및 이론적 배경을 제공할 수 있는 새로운 진단 마커를 연구하던 중, Brn2 유전자가 정상대조군에 비해 이식편대숙주질환의 세포 및 조직에서 특이적으로 과발현되고 있다는 사실을 규명하였고, Brn2를 이식편대숙주질환의 진단을 위한 바이오 마커로 사용할 수 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 이식편대숙주질환을 진단할 수 있는 신규한 바이오마커를 제공하는 것이다.

[0010] 또한 본 발명의 다른 목적은 Brn2 유전자의 mRNA 또는 Brn2 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 이식편대숙주질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한 본 발명의 다른 목적은 이식편대숙주질환을 예측 및 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 또한 본 발명의 다른 목적은 이식편대숙주질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 나아가 본 발명의 다른 목적은 Brn2 유전자의 염기서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 또는 siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 이식편대숙주질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 Brn2 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 Brn2 단백질을 포함하는 이식편대숙주병 진단용 마커를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Brn2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Brn2 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 Brn2 유전자의 mRNA 또는 Brn2 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 이식편대숙주병 진단용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Brn2 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 물질은 상기 Brn2 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 3 및 4의 프라이머쌍일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Brn2 단백질의 수준을 측정하는 물질은 상기 Brn2 단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은,

[0022] (a) 생물학적 시료에 존재하는 Brn2 유전자의 발현양 또는 단백질의 양을 측정하는 단계; 및

[0023] (b) 상기 (a) 단계의 측정결과를 정상대조군 시료의 Brn2 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함하는 이식편대숙주병의 예측 및 진단 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Brn2 유전자의 발현양을 측정하는 방법은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 및 DNA 칩으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나를 이용하는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Brn2 단백질의 양을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나를 이용하는 것일 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은,

[0028] (a) Brn2 유전자 또는 Brn2 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계;

[0029] (b) 상기 Brn2 유전자의 발현양, Brn2 단백질의 양 또는 Brn2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및

[0030] (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, Brn2 유전자의 발현양, Brn2 단백질의 양 또는 Brn2 단백질의 활성이 상기 시료를 접촉시키지 않은 대조군에 비해 감소되는 경우, 상기 시료를 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공한다.

[0031] 나아가 본 발명은 Brn2 유전자의 염기서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 또는 siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0032] 본 발명에 따른 Brn2 유전자는 정상적인 조직 또는 세포에 비해 이식편대숙주병의 조직 또는 세포에서 발현양이 증가되는 것으로 확인됨에 따라 Brn2 유전자를 이식편대숙주병 진단용 마커로 사용할 경우 이식편대숙주병을 조기에 신속하고 정확하게 진단 및 예측할 수 있는 효과가 있으며, 나아가 이식편대숙주병의 치료제 개발을 위한 표적으로 활용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 정상피부조직과 이식편대숙주병의 피부조직에서의 Brn2 발현 정도를 면역화학염색을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 2는 각질형성세포에 TNF-a를 각 농도별로 처리한 후, Brn2 발현의 발현 정도를 RT-PCR(도 2a) 및 웨스턴 블럿(도 2b) 방법을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 각질형성세포에 TNF-α를 처리한 다음, 이식편대숙주병의 치료제인 사이클로스포린(cyclosporin) 및 스테로이드제제(dexamethasone)를 각 농도별로 처리한 다음 RT-PCR 방법을 통해 Brn2 발현 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 각질형성세포에서 Brn2 과발현시 이식편대숙주병과 관련된 사이토카인인 TNF-α 및 TNF-beta의 발현 변화를 RT-PCR 방법을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 T 림프구 세포를 대상으로 TNF-α를 처리한 다음, 사이클로스포린(cyclosporin), 스테로이드제제(dexamethasone) 및 자외선을 각각 처리한 후, Brn2에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블럿 방법으로 Brn2의 발현 양상을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명은 Brn2 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 Brn2 단백질을 포함하는 신규한 이식편대숙주병 진단용 마커를 제공함에 특징이 있다.

[0035] 기존에 이식편대숙주병 진단을 위해 사용되고 있는 대부분의 마커의 경우, 이식편대숙주병을 정확하게 진단하는 비율이 비교적 낮고 이식편대숙주병 이외의 다른 질병들과도 뚜렷한 구분을 보이지 않아 이식편대숙주병에 대한 예민도 및 특이도가 낮은 문제점이 있었다.

[0036] 이에 본 발명자들은 새로운 이식편대숙주병 진단용 마커를 발굴하기 위해 이식편대숙주병 조직 및 정상 조직에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 발굴하였는데, 신경세포의 분화와 코르티코트로핀 방출 호르몬(corticotrophin-releasing hormone)의 활성에 관여하는 유전자로서 알려져 있는 Brn2가 정상 조직에 비해 이식편대숙주병 조직에서 과발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0037] 본 발명에서 규명한 이식편대숙주병의 진단 마커인 Brn2 유전자는 POU domain의 전사인자로서 피부과 영역에서는 정상 멜라닌세포에 비해 흑색종 세포에서 Brn2 유전자가 더욱 많이 발현되어 흑색종세포의 증식과 흑색종의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 하지만 이러한 Brn2 유전자가 이식편대숙주병의 발병과 관련되어 있다는 사실은 본 발명에서 최초로 규명하였다.

[0038] 즉, 본 발명의 일실시예에 따르면 정상인의 피부조직 및 이식편대숙주병의 피부조직을 대상으로 Brn2 항체를 이용한 면역화학염색법을 수행한 결과, 정상 피부조직에 비해 이식편대숙주병 피부조직에서 Brn2 유전자의 발현이 현저하게 증가해 있는 것으로 나타났다(도 1a 및 1b 참조).

[0039] 또한 본 발명의 다른 일실시예에서는 이식편대숙주병의 주요 사이토카인인으로 알려진 TNF-α의 처리가 Brn2의 발현에 어떤 영향을 미치는지 조사하였는데, 그 결과, 이식편대숙주병의 병인 요인인 TNF-α를 처리하였을 경우, 처리하지 않은 대조군에 비해 Brn2의 발현이 증가하는 것으로 나타났고, Brn2의 발현 증가는 TNF-α의 처리양과 비례하는 것으로 나타났다(도 2 참조).

[0040] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 이식편대숙주병의 피부 조직에서는 정상조직에 비해 Brn2가 특이적으로 과발현되고 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0041] 나아가 본 발명자들은 종래 이식편대숙주병의 치료제로 알려진 사이클로스포린과 스테로이드를 처리하였을 경우, 피부세포에서 Brn2의 발현이 억제되는지를 조하였는데, 이를 위해 각질형성세포에 TNF-α를 처리하여 Brn2의 발현을 증가시킨 후, 사이클로스포린과 스테로이드를 각각 처리한 다음, RT-PCR을 수행하여 Brn2의 발현양상을 분석하였다. 그 결과, TNF-α에 의해 발현이 증가된 Brn2의 수준은 사이클로스포린과 스테로이드의 처리에 의해 발현이 현저하게 감소되는 것으로 나타났다(도 3 참조).

[0042] 이러한 결과를 본 발명의 Brn2가 이식편대숙주병의 직접적인 원인이 될 수 있다는 것을 시사하며, 따라서 본 발명자들은 Brn2의 발현을 억제할 경우 이식편대숙주병을 예방 및 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

[0043] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 이식편대숙주병을 매개하는 인자인 T 림프구에서의 Brn2 발현이 이식편대숙주병의 치료제 처리시 감소하는지를 조사하기 위해, T 림프구 세포주에 TNF-α를 처리하여 Brn2의 발현을 유도한 다음, 이식편대숙주병의 치료제인 사이클로스포린 및 스테로이드와 보조적 치료 방법인 자와선을 조사한 후, T 림프구 세포에서의 Brn2 발현양상을 웨스턴블럿을 통해 확인하였다.

[0044] 그 결과, TNF-α에 의해 증가되었던 T 림프구 세포에서의 Brn2 발현은 사이클로스포린, 스테로이드 및 자와선 조사시 감소하는 것으로 나타났다.

[0045] 따라서 본 발명자들은 본 발명에 따른 Brn2이 이식편대숙주병에서 특이적으로 과발현되고 있으며, 특히 이식편대숙주병의 주요 병인인자인 TNF-α에 의해 과발현된다는 사실을 알 수 있었고, 반면 이식편대숙주병 치료제의 처리시 Brn2의 발현이 현저하게 감소됨을 통해 Brn2가 이식편대숙주병의 발병기작에 직접적으로 관련된 유전자임을 알 수 있었다.

[0046] 뿐만 아니라 본 발명자들은 Brn2 유전자에 대한 발현 정도의 측정을 통하여 이식편대숙주병을 진단하거나 또는 이러한 유전자를 기지의 약물의 효능 판정을 위한 지표로 활용, 또는 새로운 피부질환치료제 및 예방제의 개발에 있어 타겟으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0047] 따라서 본 발명은 Brn2 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 Brn2 단백질로 이루어지는 이식편대숙주병 진단용 마커를 제공할 수 있다.

[0048] 본 발명에서, 상기 “진단”이라는 용어는 병리 상태를 확인하는 것을 의미하는 것으로서, 본 발명의 목적상 상기 진단은 이식편대숙주병 진단 마커의 발현 유무를 확인하여 이식편대숙주병의 발병 여부를 확인하는 것을 의미하며, 또한, 본 발명에서의 “진단”은 이식편대숙주병 진단 마커의 발현 유무 및 발현 정도를 확인하여 이식

편대숙주병의 발병여부, 발전 및 경감 등을 판단하는 것도 포함한다.

[0049] 또한, 상기 “진단용 마커(diagnosis marker)”란 이식편대숙주병의 세포를 정상 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질을 의미하며, 정상 세포에 비하여 이식편대숙주병의 세포에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예컨대, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체분자 등을 포함한다.

[0050] 본 발명에서 제공하는 이식편대숙주병 진단용 마커는 정상세포에 비해 이식편대숙주병의 세포에서 발현양이 증가하는 Brn2 유전자 또는 단백질일 수 있으며, 바람직하게 상기 Brn2 유전자는 서열번호 1로 기재된 염기서열을 가질 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명에 따른 상기 Brn2 단백질은 바람직하게 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 대해 기능적 동등물일 수 있다. 상기 '기능적 동등물'이란, 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로서 본 발명의 Brn2 와 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다. 여기서, '실질적으로 동질의 활성'이란 상기에서 기재한 Brn2의 활성을 의미한다. 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, 본 발명에 따른 Brn2의 아미노산 서열의 아미노산 중 일부가 치환되거나, 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함될 수 있다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환일 수 있으며, 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산 (Asp, Glu), 염기성 아미노산 (His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 본 발명의 Brn2의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치할 수 있다. 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 Brn2의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩티드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경 및 생리활성을 유지하면서 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합단백질 등이 이에 포함될 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명에 따른 상기 Brn2 단백질은 DNA 재조합 기술을 사용하여 제조될 수 있으며 이를 위하여 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 구체적으로 Brn2 단백질은 상기 Brn2 유전자를 사용하여 세균, 효모, 식물 세포주 및 동물 세포주 내에서 재조합 방식으로 주입하는 유전공학 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0053] 또한, 본 발명은 Brn2 유전자의 수준 또는 Brn2 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 이식편대숙주병 진단용 조성물을 제공할 수 있다.

[0054] 본 발명에서 상기 Brn2 유전자의 수준은, 바람직하게 Brn2 유전자가 발현된 mRNA 수준, 즉, mRNA의 양을 의미하며, 상기 수준을 측정할 수 있는 물질로는 Brn2 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 Brn2 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브는 서열번호 1로 나타내는 Brn2 유전자 전체 또는 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에 알려진 방법을 통해 디자인할 수 있다.

[0055] 본 발명에서 상기 “프라이머”란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 Brn2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 쌍일 수 있다.

[0056] 상기 “증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0057] 본 발명에서, 상기 “프로브”라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타켓 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브

는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티닐-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.또한, 본 발명에서 상기 Brn2 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질로는 Brn2 단백질, 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등의 “항체”를 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 기술한 바와 같이 이식편대숙주병을 진단할 수 있는 마커 단백질로서 Brn2 단백질이 규명되었으므로, 상기 단백질을 이용하여 항체를 생성하는 방법은 당해 기술분야의 일반적 기술자가 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대, 다클론 항체의 경우에는 Brn2 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있으며, 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조가능하다. 단일클론 항체의 경우에는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마(hybridoma) 방법(Kohler et al., *European Jounral of Immunology*, 6, 511-519, 1976)을 이용하여 제조할 수 있거나 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, *Nature*, 352, 624-628, 1991, Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

[0059] 또한, 본 발명은 Brn2 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 이식편대숙주병 진단용 조성물을 포함하는 이식편대숙주병 진단용 키트를 제공할 수 있다.

[0060] 본 발명의 이식편대숙주병 진단용 키트에 포함되는 이식편대숙주병 진단용 조성물은 Brn2 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함할 수 있으며, 이들의 정의는 앞서 기술된 바와 같다.

[0061] 본 발명의 이식편대숙주병 진단용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth), Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus literalis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 이식편대숙주병 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명은 Brn2 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 이식편대숙주병 진단용 조성물을 포함하는 이식편대숙주병 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

[0063] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, Brn2 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.

[0064] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명은 Brn2 유전자의 발현수준 또는 Brn2 단백질 수준을 측정하여 이식편대숙주병을 진단하는 방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은 (a) 생물학적 시료에 존재하는 Brn2 유전자의 발현양 또는 단백질의 양을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 측정결과를 대조군 시료의 Brn2 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 상기에서 Brn2 유전자의 발현수준 또는 Brn2 단백질 수준을 측정하는 방법은 공지의 기술을 이용하여 생물학적 시료로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다.

[0066] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"란 이식편대숙주병 발생 또는 진행 정도에 따른 상기 Brn2 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 수준이 정상 대조군과는 다른, 생체로부터 채취된 시료를 말하며, 상기 시료로는 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨 등이 포함될 수 있다.

[0067] 상기 Brn2 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블럿 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0068] 상기 Brn2 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 Brn2 마커 단백질과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블럿, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있다.

[0069] 따라서 본 발명은 상기와 같은 검출 방법들을 통하여, 정상대조군의 Brn2 mRNA 발현양 또는 단백질의 양과 이식편대숙주병 환자 또는 이식편대숙주병 의심환자에서의 Brn2 mRNA 발현양 또는 단백질의 양을 확인할 수 있고, 상기 발현양의 정도를 대조군과 비교함으로써 이식편대숙주병의 발병여부, 진행단계 또는 예후 등을 예측 및 진단할 수 있다.

[0070] 나아가 본 발명은 (a) Brn2 유전자 또는 Brn2 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 Brn2 유전자의 발현양, Brn2 단백질의 양 또는 Brn2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, Brn2 유전자의 발현양, Brn2 단백질의 양 또는 Brn2 단백질의 활성이 감소되는 경우에 상기 시료는 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공한다.

[0071] 본 발명의 방법에 따르면, 먼저 Brn2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킬 수 있다. 여기서 상기 “시료”는 Brn2 유전자의 발현양, Brn2 단백질의 양 또는 Brn2 단백질의 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오티드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이후, 시료가 처리된 세포에서 Brn2 유전자의 발현양, Brn2 단백질의 양 또는 Brn2 단백질의 활성을 측정할 수 있으며, 측정 결과, Brn2 유전자의 발현양, Brn2 단백질의 양 또는 Brn2 단백질의 활성이 감소되는 것이 측정되면 상기 시료는 이식편대숙주병을 치료 또는 예방할 수 있는 물질로 판정될 수 있다.

[0072] 상기에서 Brn2 유전자의 발현양, Brn2 단백질의 양 또는 Brn2 단백질의 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수행될 수 있는데, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블럿, 노던 블럿, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 등을 이용하여 수행할 수 있다.

[0073] 또한, 본 발명은 Brn2 유전자의 발현을 억제하거나 Brn2 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 유효성분으로 포함하는 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0074] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 화학물질, 뉴클레오티드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 또는 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 본 발명의 Brn2 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 또는 siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0075] 본 발명에서 상기 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 용어는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스 서열은 Brn2 mRNA에 상보적이고 Brn2 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하며, Brn2 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

[0076] 또한, 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5, 3, 343-55, 1995). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6(6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다맨탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노-카르보닐-옥시콜에스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오티드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

[0077] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 일예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0078] 본 발명에서 "siRNA"용어는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(국제공개특허번호 00/44895, 01/36646, 99/32619, 01/29058, 99/07409 및 00/44914 참조). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운(knock-down) 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다.

[0079] 본 발명의 siRNA 분자는, 센스 가닥(Brn2 mRNA 서열에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(Brn2 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 또한, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. 나아가 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 또한, siRNA 말단 구조는 Brn2 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하고, 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.

[0080] 또한, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오티드 서열이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-앤드-루프 구조는 인 비트로(In vitro) 또는 인 비보(on vivo)에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

[0081] siRNA를 제조하는 방법은 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 뒤, 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입시키는 방법과 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유래의 siRNA 발현 카세트 등을 세포

안으로 형질전환 또는 감염(infection)시키는 방법이 있다.

[0082] 또한, 유전자 특이적인 siRNA를 포함하는 본 발명의 조성물은 siRNA의 세포내 유입을 촉진시키는 제제를 포함할 수 있다. siRNA의 세포내 유입을 촉진시키는 제제에는 일반적으로 핵산 유입을 촉진하는 제제를 사용할 수 있으며, 이러한 예로는, 리포좀을 이용하거나 콜레스테롤, 콜레이트 및 데옥시콜산을 비롯한 다수의 스테롤류 중 1종의 친유성 담체와 함께 배합할 수 있다. 또한 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 스퍼민(spermine), 폴리실아잔(polysilazane), 폴리에틸레민(PEI: polyethylenimine), 폴리디하이드로이미다졸레늄(polydihydroimidazolenium), 폴리알리라민(polyallylamine), 키토산(chitosan) 등의 양이온성 고분자(cationic polymer)를 이용할 수도 있고, 숙실화된 PLL(succinylated PLL), 숙실화된 PEI(succinylated PEI), 폴리글루타믹산(polyglutamic acid), 폴리아스파틱산(polyaspartic acid), 폴리아크릴산(polyacrylic acid), 폴리메타아크릴산(polymethacylic acid), 덱스트란 설페이트(dextran sulfate), 헤파린(heparin), 히아루릭산(hyaluronic acid) 등의 음이온성 고분자(anionic polymer)를 이용할 수 있다.

[0083] 또한, 상기 Brn2 단백질의 발현 및 활성을 감소시키는 물질로서 Brn2 단백질에 특이적인 항체를 사용할 경우, 상기 항체는 기존의 치료제와 직접 또는 링커 등을 통하여 간접적으로 커플링(예를 들어, 공유결합)시킬 수 있다. 항체와 결합될 수 있는 치료제로는 이에 제한되지는 않으나, 131I, 90Y, 105Rh, 47Sc, 67Cu, 212Bi, 211At, 67Ga, 125I, 186Re, 188Re, 177Lu, 153Sm, 123I, 111In 등과 같은 방사성핵종(radionuclide); 메토트렉세이트(methotrexate), 아드리아마이신(adriamycin), 및 인터페론과 같은 림포카인(lympokine) 등의 생물학적 반응 변형체 또는 약물; 리신, 아브린, 디프테리아 등과 같은 독소; 이형기능성 항체(heterofunctional antibodies), 즉 다른 항체와 결합되어서 그 복합체가 암 세포와 효능 세포(예를 들면, T 세포와 같은 K 세포(killer cell) 모두에 결합하는 항체; 및 자연적인, 즉, 비-연관 또는 비-복합된 항체와 결합될 수 있다.

[0084] 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르 브산과 같은 항산화제가있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.

[0085] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있는데, 상기 “투여”란 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 물질의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0086] 또한, 상기에서 “유효량” 이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 환자의 질환 종류 및 중증도, 연령, 성별, 체중, 약물에 대한 민감도, 현재 치료법의 종류, 투여방법, 표적 세포 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 바람직하게는 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 1~10000㎍/체중kg/day, 더욱더 바람직하게는 10~1000㎎/체중kg /day의 유효용량으로 하루에 수회 반복 투여될 수 있다.

[0087] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위

한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0088] **<실시예 1>**

[0089] **이식편대숙주병 조직에서 Brn2의 발현 확인**

[0090] 본 발명자들은 이식편대숙주 질환의 피부조직에서 Brn2의 발현 양상을 조사하기 위해 정상인으로부터 수득한 피부조직 및 이식편대숙주 질환의 환자로부터 수득한 피부조직를 대상으로 면역조직 화학염색법을 통해 Brn2의 발현 양상을 조사하였다. 즉, 상기 수득한 피부조직들을 파라핀으로 포매한 후 절편을 제작하고 디왁싱(Dewaxing) 및 재수화(rehydration) 과정을 거친 후 내인성 퍼옥시다제 활성을 없애 주기 위하여 프로테아제 K (1 mg/ml)용액으로 37℃에서 5분간 처리한 다음, H_2O_2 용액을 10분간 처리하였다. 이어서 조직절편을 0.1% Tween-20, 1% bovine serum albumin (BSA)이 포함된 인산완충용액에서 30분간 반응시키고, anti-Brn2 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)와 4℃에서 하룻밤(overnight) 동안 반응시켰다. 조직절편을 세척한 후 페록시다아제 결합 2차 항체(peroxidase-conjugated secondary antibody)와 반응시킨 뒤 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하여 현미경으로 관찰하였다.

[0091] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, Brn2 유전자는 정상조직(도 1a)에 비해 이식편대숙주 질환의 조직(도 1 b)에서 현저하게 발현이 증가된 것으로 나타났으며, 따라서 상기 결과를 통해 Brn2 유전자는 이식편대숙주병에서 특이적으로 과발현되는 유전자로서 상기 유전자를 이식편대숙주 질환을 예측 및 진단할 수 있는 바이오 마커로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0092] **<실시예 2>**

[0093] **TNF-α에 의한 Brn2의 발현 양상 분석**

[0094] 이식편대숙주 질환은 병원성 사이토카인인 TNF-α에 의해 매개되는 질환으로 알려져 있다. 이에 본 발명자들은 피부표면 세포에서 TNF-α를 처리하였을 경우 Brn2의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 포경수술로부터 정상 피부조직을 획득한 후, 피부조직을 70% 에탄올에서 약 1 분간 멸균하였다. 이를 잘게 잘라 dispase 용액에 넣고 4℃에서 인큐베이션(incubation) 한 후 표피를 분리하였다. 분리된 표피를 0.05% 트립신(trypsin), 0.025% EDTA 용액에 넣고 37℃에서 15 분간 인큐베이션한 후 피펫팅(pipetting)을 통해 각질형성세포를 회수하였다. 각질형성세포의 배양은 bovine pituitary extract (BPE)와 epidermal growth factor (EGF)가 포함된 keratinocyte growth medium (KGM, Gibco BRL, Rockville, MD)을 이용하였으며, 각질형성세포주를 1.2mM의 칼슘 농도에서 14일 동안 배양한 후 배양한 각질형성세포에 이식편대숙주병의 주요한 사이토카인인 TNF-α를 각각 농도별로 처리하였고, 이후 상기 세포들을 용해한 후, Brn2에 대한 항체(SC-6029, Lot# K3009, Santa Cruz Biotechnology사) 및 Brn2를 증폭시킬 수 있는 하기 기재된 서열번호 3 및 4의 프라이머를 사용하여 각각 PCR 및 웨스턴 블럿을 수행하였으며, 이때 PCR에서 사용한 프라이머의 서열은 다음과 같으며, PCR 반응 조건은 다음과 같다. 즉 95℃에서 5분간 열변성 시킨 후, 95℃에서 30초, 56℃에서 30초,72℃에서 30초 및 4℃에서 5분의 반응을 35 사이클을 반복 수행하였다.

[0095] Brn2 F-프라이머(서열번호 3): 5 '-gcggatcaaactgggattta-3'

[0096] Brn2 R-프라이머(서열번호 4): 5 '-ggaggggtcatccttttctc-3'

[0097] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 이식편대숙주병을 유발인자인 병원성 사이토카인 TNF-α의 처리 농도가 높을수록 세포내에서 발현되는 Brn2 의 발현양도 증가하는 것으로 나타났다.

[0098] 따라서 상기 결과를 통해 TNF-α은 이식편대숙주 질환의 발병과정에서 Brn2의 발현을 증가시키는 사이토카인임을 알 수 있었으며, 이식편대숙주 질환의 경우 Brn2가 정상상태에 비해 현저하게 과발현되고 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0099] **<실시예 3>**

[0100] **이식편대숙주병 치료제의 처리에 따른 Brn2의 발현 억제 분석**

[0101] 본 발명자들은 이식편대숙주질환의 직접적인 발병요인이 Brn2의 과발현에 있는 것인지를 보다 명확히 규명하기 위해 종래 이식편대숙주질환의 치료제로 알려져 있는 사이클로스포린(cyclosporin, CsA)과 스테로이드 제제(dexamethasone, DEX)를 처리하였을 경우 세포내에서 Brn2 발현이 억제되는지를 조사하였다. 이를 위해 먼저 상기 실시예 2에서 수득한 각질형성세포에 TNF-α를 20ng/ml 처리하여 Brn2의 발현을 증가시켰다. 이후, 이식편대숙주병의 치료제인 사이클로스포린(cyclosporin, CsA)를 10^{-7}mol 및 10^{-8}mol의 양으로 각각 처리하고, 스테로이드 제제(dexamethasone, DEX)를 10ng/ml 및 20ng/ml로 각각 처리한 다음, 상기 세포들로부터 세포 용해물을 수득한 다음, 서열번호 3 및 4의 프라이머를 이용한 역전사중합효소반응을 통해 Brn2의 발현 양상을 분석하였다.

[0102] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, TNF-α의 처리에 의해 발현이 증가된 Brn2는 이식편대숙주질환의 치료제인 CsA 및 DEX을 처리함에 따라 그 발현양이 감소하는 것으로 나타났으며, 감소 정도는 처리한 치료제의 양에 비례하는 것으로 나타났다.

[0103] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 Brn2의 발현양이 이식편대숙주병의 치료제 처리에 의해 억제된다는 것을 알 수 있었고, 이러한 결과를 토대로 Brn2의 과발현이 이식편대숙주병의 발병에 직접적인 원인이 될 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0104] **<실시예 4>**

[0105] **Brn2 과발현에 따른 이식편대숙주병 요인의 사이토카인 발현양상 변화 분석**

[0106] 나아가 본 발명자들은 Brn2의 과발현이 이식편대숙주병의 발병요인이 되는 사이토카인의 발현에도 영향을 미치는지 조사하기 위해, 아데노바이러스를 이용하여 각질형성세포 내에서 Brn2를 과발현시킨 후 TNF-α와 TGF-β의 발현 여부를 역전사중합효소 연쇄반응을 통해 조사하였다. 즉 당업계에 사용되고 있는 아데노바이러스(adenovirus) 발현 벡터를 사용하여 GFP 및 Brn2 유전자가 삽입된 재조합 adeno-GFP-Brn2 바이러스를 제조하였고, 이때 대조군으로는 GFP(Green Fluorescent protein)만 삽입된 아데노바이러스(Ad-GFP)를 제조하였다. 이후 이들을 각질형성세포에 형질도입 시킨 후, Brn2는 상기 실시예 2에서 사용한 서열번호 3 및 4의 프라이머 사용하여 PCR을 수행하였고, TNF-α(서열번호 5 및 6의 프라이머) 및 TGF-β(서열번호 7 및 8의 프라이머)는 하기 기재된 프라이머들을 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 또한 PCR의 조건은 상기 실시예 2에서 수행한 조건과 동일하게 수행하였다.

[0107] TNF-α F-프라이머(서열번호 5): 5 '-acaggcttgtcactcggggt-3'

[0108] TNF-α R-프라이머(서열번호 6): 5 '-tcttcctctcacatactgac-3'

[0109] TNF-β F- 프라이머(서열번호 7): 5 '-ccacgtagtacacgatggc-3'

[0110] TNF-β R- 프라이머(서열번호 8): 5 '-catcaacgggttcactaccg-3'

[0111] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, Brn2를 과발현시킨 각질형성세포의 경우, Brn2가 발현되지 않은 대조군에 비해 TNF-α의 발현은 현저하게 증가한 것으로 나타난 반면, TGF-β의 발현은 감소하는 것으로 나타났다.

[0112] **<실시예 5>**

[0113] **T 림파구에서 이식편대숙주병 치료제의 처리에 의한 Brn2 발현 억제**

[0114] 이식편 대 숙주병의 주요 병원성 세포인 T 림파구 세포의 경우 Brn2 발현의 증가가 T 림파구 세포 매개에 의한 이식편대숙주병의 발생과 관련이 있는지 확인하기 위해 배양된 T 림프구 세포주(Jurkat 세포주)에 TNF-α를 20ng/ml의 농도로 처리하였다. 이후, 이식편대숙주질환의 치료제로 알려져 있는 사이클로스포린(cyclosporin, CsA; 10^{-7}mol)과 스테로이드 제제(dexamethasone, DEX; 20ng/ml)를 각각 처리한 후, Brn2에 대한 항체를 이용하

여 웨스턴 블럿을 수행하였으며, 상기 TNF-α가 처리된 Jurkat 세포주에 대해 이식편대숙주질환의 또 다른 치료 방법은 자외선을 각각 2, 5, 10, 20 및 30 mJ/cm^2 의 세기로 24시간 동안 처리한 다음, Brn2에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블럿을 수행하였다.

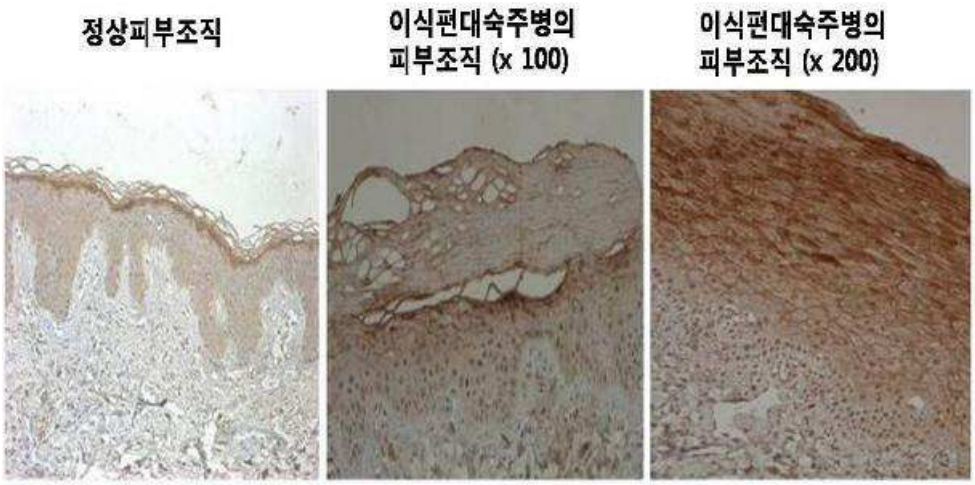
[0115] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, T 림프구에서도 TNF-α를 처리하지 않은 군에 TNF-α를 처리한 군에서 Brn2의 발현이 증가되는 것으로 나타났으며, 사이클로스포린과 스테로이드를 처리하였을 경우, 증가된 Brn2발현은 감소하는 것으로 나타났고, 이식편 대 숙주병의 피부 증상에 보조적인 치료 방법으로 이용되는 자외선 조사시에도 TNF-α 처리에 의해 증가되었던 T 림프구의 Brn2 발현이 감소되는 것으로 나타났다.

[0116] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 Brn2의 과발현이 이식편대숙주병의 직접적인 원인이 될 수 있다는 사실을 알 수 있었고, 따라서 Brn2의 발현양상을 분석하는 것이 이식편대숙주병을 진단하는 방법으로 사용될 수 있다는 것을 알 수 있었을 뿐 만이라 Brn2의 과발현을 억제할 경우 이식편대숙주병을 예방 및 치료할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

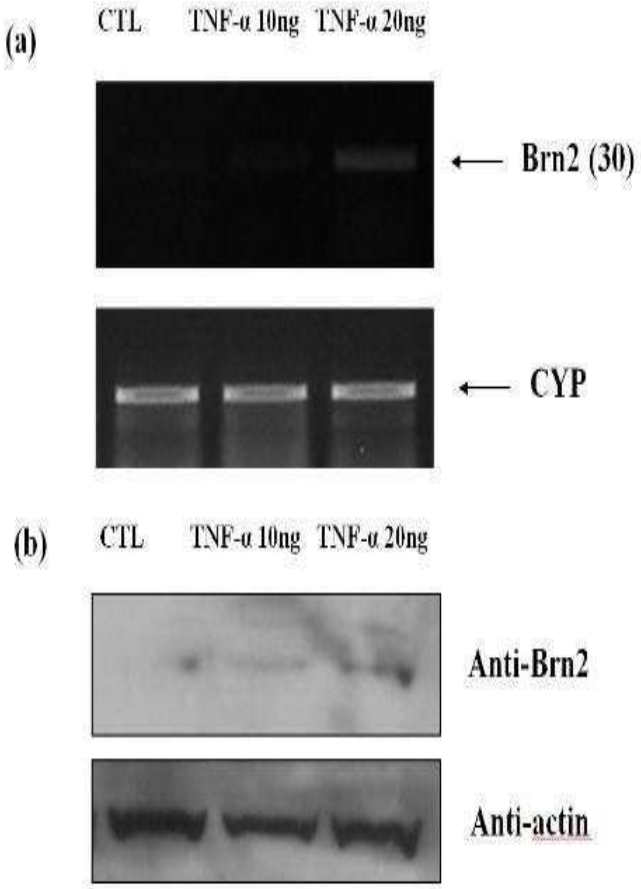
[0117] 상기한 바와 같이 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

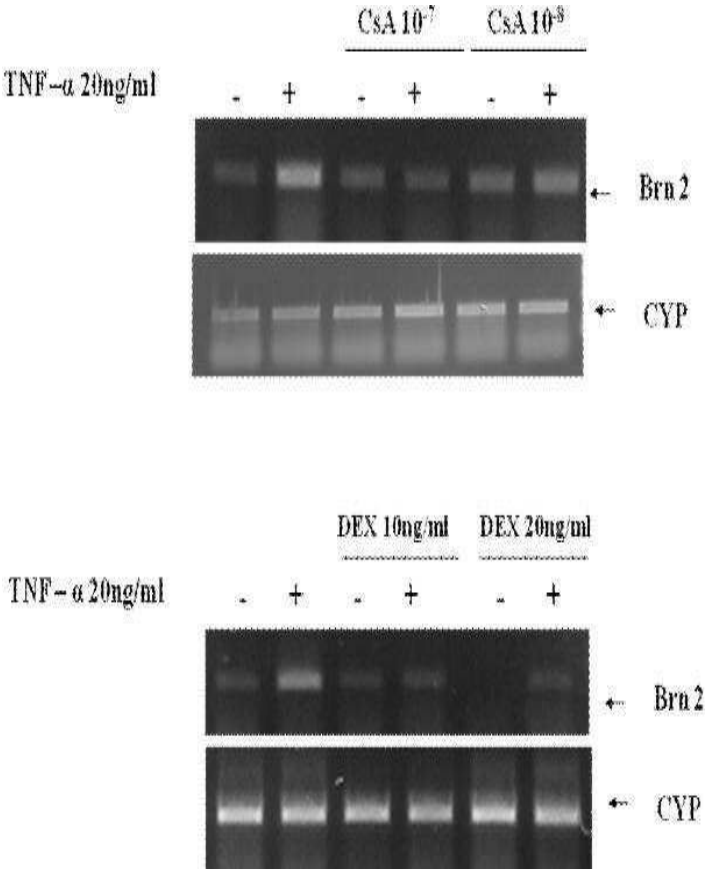
도면1



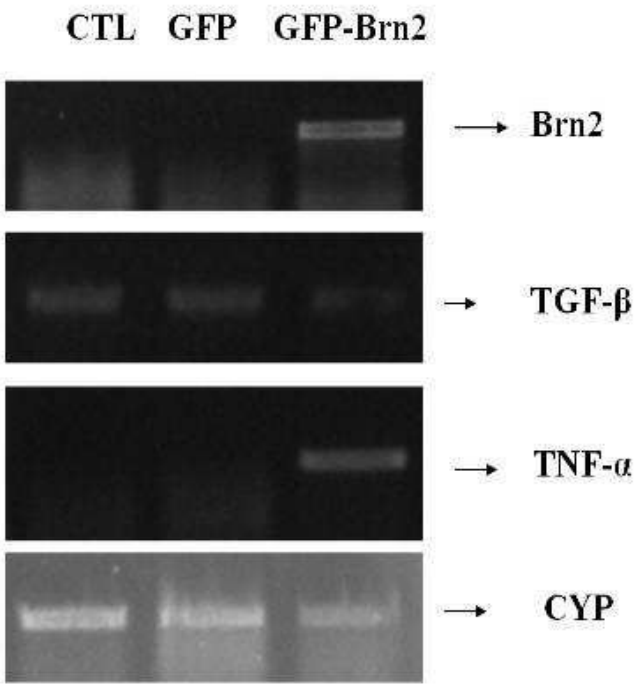
도면2


(a)
CTL
TNF-α 10ng
TNF-α 20ng
Brn2 (30)
CYP
(b)
CTL
TNF-α 10ng
TNF-α 20ng
Anti-Brn2
Anti-actin

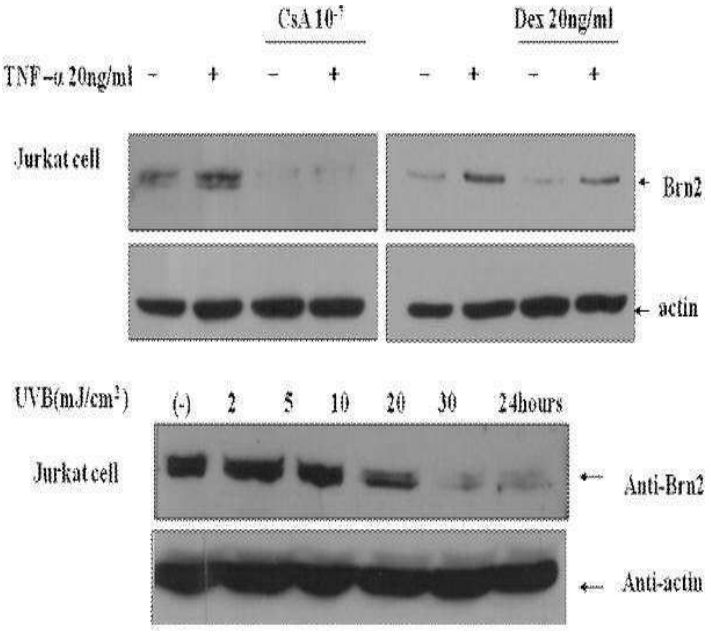
도면3


CsA 10-7
CsA 10-8
TNF-α 20ng/ml
- + - + - +
Brn2
CYP
DEX 10ng/ml
DEX 20ng/ml
TNF-α 20ng/ml
- + - + - +
Brn2
CYP

도면4


CTL
GFP
GFP-Brn2
Brn2
TGF-β
TNF-α
CYP

도면5



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Catholic University

<120> Use of Brn2 as a diagnostic marker for graft versus host disease

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 4172

<212> DNA

<213> Brn2 cDNA sequence

<400> 1

agtaatagca ggagcagcaa cagaaggcgt cggagcgggc gtcggagctg cccgctgtgg 60

gagagagagg agacagaaag agcgagcgag gagagggagc ccgaggcgaa aaagtaactg 120

tcaaatgcgc ggctccttta accggagcgc tcagtccggc tccgagagtc atggcgaccg 180

cagcgtctaa ccactacagc ctgctcacct ccagcgcctc catcgtgcac gccgagccgc 240

ccggcggcat gcagcagggc gcgggggggct accgcgaagc gcagagcctg gtgcagggcg 300

actacggcgc tctgcagagc aacggacacc cgctcagcca cgctcaccag tggatcaccg 360

cgctgtccca cggcggcggc ggcgggggcg gtggcggcgg cgggggggcc gggggcggcg 420

gcgggggcgg cggcgacggc tccccgtggt ccaccagccc cctgggccag ccggacatca 480

agccctcggt ggtggtgcag cagggcggcc gcggagacga gctgcacggg ccaggcgccc 540

tgcagcagca gcatcagcag cagcaacagc aacagcagca gcaacagcag caacagcagc 600

agcagcagca gcaacagcgg ccgccgcatc tggtgcacca cgccgctaac caccacccgg 660

gacccggggc atggcggagc gcggcggctg cagcgcacct cccaccctcc atgggagcgt 720

ccaacggcgg cttgctctac tcgcagccca gcttcacggt gaacggcatg ctgggcgccg 780

gcgggcagcc ggccgggctg caccaccacg gcctgcggga cgcgcacgac gagccacacc 840

atgccgacca ccacccgcac ccgcactcgc acccacacca gcagccgccg cccccgccgc 900

ccccgcaggg tccgcctggc cacccaggcg cgcaccacga cccgcactcg gacgaggaca 960

cgccgacctc ggacgacctg gagcagttcg ccaagcagtt caagcagcgg cggatcaaac 1020

tgggatttac ccaagcggac gtggggctgg ctctgggcac cctgtatggc aacgtgttct 1080

cgcagaccac catctgcagg tttgaggccc tgcagctgag cttcaagaac atgtgcaagc 1140

tgaagccttt gttgaacaag tggttggagg aggcggactc gtcctcgggc agccccacga 1200

gcatagacaa gatcgcagcg caagggcgca agcggaaaaa gcggacctcc atcgaggtga 1260

gcgtcaaggg ggctctggag agccatttcc tcaaatgccc caagccctcg gcccaggaga 1320

tcacctccct cgcggacagc ttacagctgg agaaggaggt ggtgagagtt tggttttgta 1380

acaggagaca gaaagagaaa aggatgaccc ctcccggagg gactctgccg ggcgccgagg 1440

atgtgtacgg ggggagtagg gacactccac cacaccacgg ggtgcagacg cccgtccagt 1500

gaactcgagc tgggggaggg gcagagcgcg gggctccccc tccccttcgg tccttggccc 1560

tttcccggcc ctcttgttcc ctctctaact tctgattgtt cttttatttt taattattat 1620

ttccccgtcc cttaaaaaga caaaaaaaat aaggcaaaag gaaagcaact aagacactgg 1680

actatccttt aaaggtagca ggtgtaatga tgtgttttga cctttgcagg cgagtaacca 1740

ggcaatggag tggagtgtct cctggagaga gtgaggagag tgtgtgatag ctagaaagag 1800

agagagacag agagatggca agcactgaga taaatacctg gcaaaactaa ataaattacc 1860

aaaaaggaaa aaaaatccac caaaccatga taaacacaaa atgcagcttc ctgatgctta 1920

gagttggcac atgctgctgt gtttatttat tgtggattcc catcaggaaa gaggaaaaaa 1980

tacacatgtt ctttcatata ggcaaaattt aaccacataa atttgcactg caagaaaatt 2040

gaagtttacg tgaacaaatt catgagcata ttttctcttt ctccccaccg ttaatttggg 2100

agttgccgtt ttgggggatt ttgttttgct ttgctttatt catcggagag agttgaagcc 2160

agctcttggc cactctccat ttctaatgtt cttgtgttgc cccttcttcg tactgtttgt 2220

gaactttggt taccttcaca ttccccttac gagggtgtaa catctatttg ttcctcttac 2280

caaagcaaaa ggattggctt catacaaaat agacaattct ctgatttcag gaaatgtgca 2340

tggtctaccc gctttatcga aggcaagaat ccggtttgga atataaaaat aagcattggt 2400

tgttcttacc agccacaaag taaacttcat tttcaggcag tgtttctggg ggaggttatg 2460

gagggaagaa aaaagaaaaa tcgatagtga gtgactgatt gcttcatttt atcaggcggg 2520

cccattgtga aagagctcag gggaaatgtg gaggttaaat atatttccag agttgtccag 2580

cagaaagaaa gtggcacttt gaagagaact agggaagtac atatcttcag atatccctat 2640

atagttctct accttcagtt ttagtaacaa ttatgaagaa ttatttgtgc tgacagcagc 2700

agttaaactt tgtttctcta atagcttttt ttttacataa aaaaagaccc aggaacttaa 2760

tagtgtatgc ataagactgt gttttttagc acacagatac ccacagcata cactgacgat 2820

ctccacgcag tagacaggtt ttgtcttcac tagctcattt gtttatcaag tcatatttag 2880

ggtcccacac cctcttttcc tgtaatttat tgcagaatac accactttga cttggacagc 2940

tttctgcccc ctctttcact aaggaaggca aatgaagtga aaaaaaaaaa tgccattttc 3000

aatccttcct ttctcccctt tgttaatagt tttaagtgaa tttttgacct tatcttaatg 3060

gaaaacggtt aactccaaac acaaaagact ctactggaaa gtgtaggtga aaaaacttgt 3120

aactgtattg aaaataaata ccattaaact gtgatcagtt aaaatttaaa agaaaaatca 3180

gcacaaaagg gcgctaaaag ggaaaacact ttttattaat cttaaaagtt tgggggtttt 3240

tttccagtta ggtattagat aaatttttat tttaaaaaat gaaagtctca ctaccataaa 3300

attatggttc agcatcagat tagcattgca ctcagtagtc tttaaggttt taggaaatat 3360

gctttatatt gtcttttcaa acacctgtga ttgtttcatt ttccatgttt ttgcaagata 3420

aatggtgact tataatgggc atatttattt gcctgtattt catttccccc aatgaatgtc 3480

acaaggagat gggcacggag ctgcttcggg tgcatcacgc tgctcgttcc tgaggtatgg 3540

gaactggcct ttagtgaagc tatccagagc agggcaaata gccactggta aagggaggaa 3600

atgaatttcc agatacttat taccaagtag gtaaggtcag aagctggagt tcagagaatg 3660

tgtctacagc ttctctgact cttataggtt tactaagatg aaagttacca ctgaacctta 3720

ccactatgta tatatgttta atatctgtct tttgaaatgc agaaatagtt taaatgtttc 3780

tttgtctatt tttctttttt tttaatgcta cccagggaaa tattttcata tcatttttaa 3840

gtggcctgcc tcaatgtata tttatttctt ttgaaacaaa aaggttctgg aaactgtttt 3900

tctgtagctt taaatgaata ggtgagcaaa atctatatgg gatgtaattt ttttgttcag 3960

tctcttaaaa aatactttgt tttggtacat ttggttgtgc ttgtggggaa aataaaaacg 4020

cagagatcct tatatattta tgttaaagta atattttatt atctacataa aacagaaatg 4080

cacaataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4140

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 4172

<210> 2

<211> 443

<212> PRT

<213> Brn2 amino acid sequence

<400> 2

Met Ala Thr Ala Ala Ser Asn His Tyr Ser Leu Leu Thr Ser Ser Ala
1 5 10 15

Ser Ile Val His Ala Glu Pro Pro Gly Gly Met Gln Gln Gly Ala Gly
20 25 30

Gly Tyr Arg Glu Ala Gln Ser Leu Val Gln Gly Asp Tyr Gly Ala Leu
35 40 45

Gln Ser Asn Gly His Pro Leu Ser His Ala His Gln Trp Ile Thr Ala
50 55 60

Leu Ser His Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Gly Ser Pro Trp Ser Thr Ser

85 90 95

Pro Leu Gly Gln Pro Asp Ile Lys Pro Ser Val Val Val Gln Gln Gly
100 105 110

Gly Arg Gly Asp Glu Leu His Gly Pro Gly Ala Leu Gln Gln Gln His
115 120 125

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
130 135 140

Gln Gln Gln Gln Gln Arg Pro Pro His Leu Val His His Ala Ala Asn
145 150 155 160

His His Pro Gly Pro Gly Ala Trp Arg Ser Ala Ala Ala Ala Ala His
165 170 175

Leu Pro Pro Ser Met Gly Ala Ser Asn Gly Gly Leu Leu Tyr Ser Gln
180 185 190

Pro Ser Phe Thr Val Asn Gly Met Leu Gly Ala Gly Gly Gln Pro Ala
195 200 205

Gly Leu His His His Gly Leu Arg Asp Ala His Asp Glu Pro His His
210 215 220
Ala Asp His His Pro His Pro His Ser His Pro His Gln Gln Pro Pro

225 230 235 240
Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gly Pro Pro Gly His Pro Gly Ala His His
245 250 255
Asp Pro His Ser Asp Glu Asp Thr Pro Thr Ser Asp Asp Leu Glu Gln
260 265 270
Phe Ala Lys Gln Phe Lys Gln Arg Arg Ile Lys Leu Gly Phe Thr Gln
275 280 285
Ala Asp Val Gly Leu Ala Leu Gly Thr Leu Tyr Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Phe Lys Asn
305 310 315 320
Met Cys Lys Leu Lys Pro Leu Leu Asn Lys Trp Leu Glu Glu Ala Asp
325 330 335
Ser Ser Ser Gly Ser Pro Thr Ser Ile Asp Lys Ile Ala Ala Gln Gly
340 345 350
Arg Lys Arg Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Val Ser Val Lys Gly Ala
355 360 365
Leu Glu Ser His Phe Leu Lys Cys Pro Lys Pro Ser Ala Gln Glu Ile

370 375 380
Thr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Gln Leu Glu Lys Glu Val Val Arg Val
385 390 395 400
Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Met Thr Pro Pro Gly
405 410 415
Gly Thr Leu Pro Gly Ala Glu Asp Val Tyr Gly Gly Ser Arg Asp Thr
420 425 430
Pro Pro His His Gly Val Gln Thr Pro Val Gln
435 440

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Brn2 F-primer

<400> 3

gcggatcaaa ctgggattta 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Brn2 R-primer

<400> 4

ggaggggtca tccttttctc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF alpha F-primer

<400> 5

acaggcttgt cactcggggt 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF alpha R-primer

<400> 6

tcttcctctc acatactgac 20

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF beta F-primer

<400> 7

ccacgtagta cacgatggc 19

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF beta R-primer

<400> 8

catcaacggg ttcactaccg 20