(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월01일
(11) 등록번호 10-2473092
(24) 등록일자 2022년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0273 (2013.01)
C12N 15/1137 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7010127
(22) 출원일자(국제) 2015년09월15일
심사청구일자 2020년09월15일
(85) 번역문제출일자 2017년04월13일
(65) 공개번호 10-2017-0120089
(43) 공개일자 2017년10월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/050178
(87) 국제공개번호 WO 2016/044271
국제공개일자 2016년03월24일
(30) 우선권주장
62/050,308 2014년09월15일 미국(US)
62/053,514 2014년09월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2007117081 A
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 8 항

(73) 특허권자
칠드런'즈 메디컬 센터 코포레이션
미국 매사추세츠 보스턴 새턱 스트리트 55 (우편번호:02115)
(72) 발명자
장 이
미국 메사추세츠주 02459 뉴톤 볼드페이트 힐 로드 144
마토바 소고
미국 메사추세츠주 02445 부르클린 에이피티. 217 워싱턴 스트리트 44
(74) 대리인
문두현

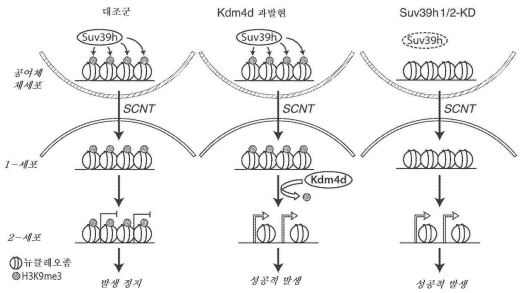
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 **히스톤 H3-리신 트리메틸화를 제거함으로써 체세포 핵 이식(SCNT) 효율을 증가시키는 방법 및 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 체세포 핵 이식(SCNT) 및 핵 이식 ESC(ntESC) 및 트랜스제닉 세포 및/또는 비-인간 동물의 후속 생산의 효율을 개선하기 위한 방법과 조성물을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 공여체 체세포의 핵 유전 물질 내의 재프로그래밍 저항성 영역(RRR) 내의 히스톤 H3-리신9의 트리메틸화(H3K9me3)가 효율적인 체세포 핵 재프로그래밍 또는 SCNT를 막는다는 발견에 관한 것이다. 본 발명은 디메틸라제 Kdm4 패밀리의 외인성 또는 과발현에 의해 및/또는 히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1 및/또는 Suv39h2를 억제하여 H3K9me3의 메틸화를 억제함으로써 SCNT의 효율을 개선하는 방법에서 H3K9me3을 감소시키기 위한 방법과 조성물을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 15/8509 (2013.01)
C12Y 201/01043 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
Mol Cell Biol. vol.33 no.5 pp.974-983 2013.
Cell Reprogram. vol.16 no.1 pp.40-53 2014.
Anim Reprod Sci. vol.147 no.1-2 pp.39-46 2014.
Reproduction Fertility and Development vol.25 no.1 pp.171-172 2012.

명 세 서

청구범위

청구항 1

Kdm4a mRNA를 포함하는 분리된 제핵 포유류 난모세포; Kdm4a mRNA를 포함하는 분리된 체세포 공여체 세포, 또는 Kdm4a mRNA를 포함하는 분리된 체세포 공여체 세포 핵을 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

분리된 제핵 포유류 난모세포 또는 분리된 체세포 공여체 세포는 분리된 인간 난모세포 또는 분리된 인간 체세포 공여체 세포이거나; 또는

분리된 제핵 포유류 난모세포 또는 분리된 체세포 공여체 세포는 비-인간 포유류로부터 유래되고, 여기서 비-인간 포유류는 가정용 또는 상업용 동물이거나, 반려 동물 또는 애완동물이거나, 멸종 위기의 포유류 종으로부터 유래되는, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 조성물을 생산하는 방법으로서, 방법은 상기 분리된 공여체 포유류 세포 또는 상기 분리된 제핵 포유류 난모세포에 Kdm4a mRNA를 주입하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, Kdm4a mRNA는:

a. 분리된 체세포 공여체 포유류 세포의 세포질 또는 분리된 체세포 공여체 포유류 세포의 핵에 접촉하거나,

b. 분리된 제핵 포유류 난모세포 내로 핵을 주입하기 적어도 24 시간 전에, 분리된 체세포 공여체 포유류 세포의 세포질 또는 분리된 공여체 포유류 세포의 핵에 접촉하거나,

c. 분리된 제핵 포유류 난모세포 내로 핵을 주입하기 전 적어도 24시간, 또는 적어도 48 시간, 또는 3일의 기간 동안, 분리된 체세포 공여체 포유류 세포의 세포질 또는 분리된 공여체 포유류 세포의 핵에 접촉하거나,

d. 분리된 공여체 포유류 세포로부터 핵을 제거하기 전에, 분리된 체세포 공여체 포유류 세포의 핵에 접촉하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 분리된 체세포 공여체 포유류 세포는:

최종 분화된 체세포이고;

배아 줄기 세포, 또는 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포, 또는 태아 세포, 또는 배아 세포가 아니며;

난구 세포, 상피 세포, 섬유아세포, 신경 세포, 각질세포, 조혈 세포, 멜라닌세포, 연골세포, 적혈구, 대식세포, 단핵구, 근육 세포, B 림프구, T 림프구, 태반 세포, 성체 세포; 및 유전적으로 변형된 체세포 공여체 포유류 세포로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 분리된 체세포 공여체 포유류 세포는:

최종 분화된 체세포이고;

배아 줄기 세포, 또는 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포, 또는 태아 세포, 또는 배아 세포가 아니며;

난구 세포, 상피 세포, 섬유아세포, 신경 세포, 각질세포, 조혈 세포, 멜라닌세포, 연골세포, 적혈구, 대식세포, 단핵구, 근육 세포, B 림프구, T 림프구, 태반 세포, 성체 세포; 및 유전적으로 변형된 체세포 공여

체 포유류 세포로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 분리된 공여체 포유류 세포 또는 분리된 제핵 포유류 난모세포는:

분리된 인간 공여체 세포 또는 분리된 제핵 인간 난모세포이거나,

분리된 비-인간 공여체 세포 또는 분리된 제핵 비-인간 난모세포이거나,

가정용 또는 상업용 동물로부터 유래되는 분리된 비-인간 공여체 세포이거나 또는 분리된 제핵 비-인간 난모세포이거나,

반려 동물 또는 애완동물로부터 유래되는 분리된 비-인간 공여체 세포 또는 분리된 제핵 비-인간 난모세포이거나,

멸종 위기의 포유류 종으로부터 유래되는 분리된 비-인간 공여체 세포 또는 분리된 제핵 비-인간 난모세포이며; 그리고/또는

동결되고 해동된, 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 분리된 공여체 포유류 세포 또는 분리된 제핵 포유류 난모세포는:

분리된 인간 공여체 세포 또는 분리된 제핵 인간 난모세포이거나,

분리된 비-인간 공여체 세포 또는 분리된 제핵 비-인간 난모세포이거나,

가정용 또는 상업용 동물로부터 유래되는 분리된 비-인간 공여체 세포이거나 또는 분리된 제핵 비-인간 난모세포이거나,

반려 동물 또는 애완동물로부터 유래되는 분리된 비-인간 공여체 세포 또는 분리된 제핵 비-인간 난모세포이거나,

멸종 위기의 포유류 종으로부터 유래되는 분리된 비-인간 공여체 세포 또는 분리된 제핵 비-인간 난모세포이며; 그리고/또는

동결되고 해동된, 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2014년 9월 15일에 출원된 미국 가특허출원 62/050,308호 및 2014년 9월 22일에 출원된 미국 가특허출원 62/053,514호의 우선권을 35 U.S.C. 119(e)하에서 주장하며, 각각의 내용은 그 전체가 참고로 본원에 통합된다.

[0002] 본 발명은 국립보건원(NIH)에 의해 제공되는 NIH U01DK089565하의 정부 지원으로 이루어졌다. 정보는 본 발명에서 소정의 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0003] 최종 분화된 체세포는 체세포 핵 이식(SCNT)에 의해 제핵 난모세포(enucleated oocytes)내로 이식될 경우 전능성 상태로 재프로그램화될 수 있다(Gurdon, 1962). SCNT는 분화된 체세포의 단일 핵으로부터 전체 동물의 생성을 가능하게 하므로, 농업, 생물의학산업 및 멸종위기종 보존에서 큰 잠재력을 갖는다(Yang et al., 2007). 사실상, 1997년의 양에서의 첫번째의 성공적인 포유류 복제(Wilmut et al., 1997) 이후, 20종류가 넘는 포유류 종이 SCNT를 통해 복제되었다 (Rodriguez-Osorio et al., 2012). 또한, 다능성 배아 줄기 세포가 SCNT-생성된 배반포로부터 확립될 수 있으므로(Wakayama et al., 2001), SCNT는 인간 치료에 있어서 큰 가능성을 가지고 있다(Hochedlinger and Jaenisch, 2003). 이러한 가능성은 첫번째 인간 핵 이식 배아 줄기 세포(ntESC)의 유도에서의 최근의 성공(Tachibana et al., 2013) 및 나이든 성인 또는 인간 환자 세포로부터 인간 ntESC의 생성(Chung et al., 2014; Yamada et al., 2014) 후 더 현실에 가까워졌다. 이들 ntESC는 *인 비트로* 질병 모델링을 위한 귀중한 세포 공급원으로서뿐만 아니라 재생 치료 및 세포/조직-대체 치료를 위한 세포 공급원으로서 작용할 수 있다.

[0004] 그 방대한 잠재성에도 불구하고, 여러가지 기술적인 문제들이 SCNT의 실제 사용을 막았으며, 특히, 복제된 동물 생산에서 극히 효율이 낮다. 예를 들어, 마우스 SCNT 배아의 대략 절반이 이식 전에 발생 중단을 나타내며, 대리모에 이식된 배아의 단지 1-2%만이 만삭까지 발생한다(Ogura et al., 2013). 생식용 복제 효율이 더 높은(5 내지 20%) 소 종을 제외하고, 모든 다른 종에서 전체적인 생식용 복제 효율은 매우 낮다(1 내지 5%)(Rodriguez-Osorio et al., 2012). 또한, 인간 ntESC 확립의 성공률 또한 그들의 빈약한 착상전 발생(배반포 단계까지 10 내지 25%; Tachibana et al., 2013; Yamada et al., 2014) 때문에 낮다.

[0005] SCNT의 적용 잠재성을 현실화하기 위하여, SCNT 복제 효율을 개선하기 위한 노력이 이루어졌다. 먼저, 트리코스타틴 A(TSA) 또는 스크립타이드와 같은 히스톤 디아세틸라제(HDAC) 억제제를 이용한 1-세포 SCNT 배아의 일시적 처리가 마우스(Kishigami et al., 2006; Van Thuan et al., 2009), 돼지(Zhao et al., 2009), 소(Akagi et al., 2011) 및 인간(Tachibana et al., 2013; Yamada et al., 2014)을 비롯한 다양한 포유류 종의 재프로그래밍 효율을 개선하는 것으로 보고되었다. 두번째로, Xist의 넉아웃 또는 넉다운이 마우스 SCNT 배아의 착상 후 발생을 개선하는 것으로 보고되었다(Inoue et al., 2010; Matoba et al., 2011). 하지만, 이들 방법의 어느 것도 비-인간 포유류의 생식적 복제를 위해 또는 치료적 복제 또는 재생 치료를 위한 인간 다능성 줄기 세포(예를 들어, 인간 ntESC)의 생성을 위해 SCNT가 유용할만큼 충분히 SCNT의 복제 효율을 개선하지 못한다.

[0006] SCNT 배아의 발생 결함은 마우스에서는 2-세포 단계 그리고 돼지, 소 및 인간에서는 4- 내지 8-세포 단계에서 일어나는 접합 유전자 활성화(ZGA) 시기에 나타나기 시작한다(Schultz, 2002). SCNT 배아는 공여체 세포의 게놈 내의 기존의 확실하지 않은 후성적(epigenetic) 장벽으로 인해 ZGA에서 어려움을 겪는다. 마우스 2-세포 SCNT 배아에서 (Inoue et al., 2006; Suzuki et al., 2006; Vassena et al., 2007), 그리고 후기 난할 단계 인간 SCNT 배아에서(Noggle et al., 2011) 많은 조절되지 않는(dysregulated) 유전자가 확인되었지만, "기존의 후성적 장벽"의 특성 및 SCNT 배아에서의 손상된 ZGA와의 그들의 관계는 알려져 있지 않다.

[0007] 따라서, 공여체 세포 핵의 게놈에서 그러한 후성적 장벽을 제거하여 포유류 복제 효율을 개선하여, SCNT 배아가 효율적으로 접합 유전자 활성화(ZGA)를 통해 진행되고 SCNT 배아가 발생 결함 또는 생존능 소실없이 2-, 4- 및 8-세포 단계를 통과해 배반포까지 진행할 수 있도록 하는 것이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 포유류 난모세포는 체세포를 전능성 상태로 재프로그램화하여, 체세포 핵 이식(SCNT)을 통한 동물 생식성 복제 또는 SCNT 배아로부터 발생한 배반포로부터 ES 세포주(ntESC)의 생산을 허용할 수 있다. 하지만, 대부분의 SCNT

배아는 확실하지 않은 재프로그래밍 결함으로 인하여 배반포로 또는 만삭까지 발생하지 못한다. 포유류 SCNT의 비효율성은 재생 의학 응용을 위한 환자-특이적 hESC 세포주의 개발에 중요한 한계이다.

[0009] 인간 공여체 체세포를 이용한 인간 SCNT-유도 인간 배반포의 생산이 보고되었으나, 배반포 품질 및 발생 효율은 인간 배아 줄기 세포주(인간 ntESC)의 생산을 허용할만큼 충분하지 않았다(French AJ *et al.*, Stem Cells 26, 485-493 (2008)). 인간 핵 이식 배아 줄기 세포(ntESC)(Tachibana et al., 2013) 및 나이든 성인 또는 인간 환자 세포로부터 인간 ntESC의 생성(Chung et al., 2014; Yamada et al., 2014)이 보고되었다. 하지만, 인간 ntESC 확립의 성공률은 빈약한 착상전 발생(배반포 단계까지 10 내지 25% 발생; Tachibana et al., 2013; Yamada et al., 2014) 때문에 매우 낮다. 따라서, 인간 SCNT 기술의 개선이 인간 SCNT 배아의 배반포 단계로의 발생을 개선시키고, SCNT를 위해 필요한 공여체 난모세포의 수를 감소시키고, 연구 및 세포 기반 치료법을 위한 인간 및 환자-특이적 동종동계 배아 줄기 세포주를 성공적으로 생산하기 위하여 중요하다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명에서 본 발명자들은 분화된 체세포의 공여체 핵의 게놈 내의 히스톤 H3 리신 9 트리메틸화(H3K9me3)가 SCNT에 의한 효율적인 재프로그래밍을 위한 주요한 기존의 후성적 장벽임을 발견하였으며, H3K9me3 메틸화 감소가 SCNT의 효율을 증가시킬 수 있으며, 특히, SCNT 배아의 2-세포, 4-세포 또는 배반포 단계로의 착상전 발생의 효율을 증가시킬 수 있음을 발견하였다. 보다 구체적으로, 비교 분석을 통하여, 본 발명자들은 SCNT 배아에서 접합 유전자 활성화(ZGA)에 저항성인 게놈 도메인을 발견하였다. 이들 재프로그래밍 저항성 영역(RRR)은 체세포에서 억제성 히스톤 변형 H3K9me3이 풍부하며, (i) 난모세포에서의 예를 들어, Kdm4d 또는 Kdm4 패밀리의 구성원과 같은 H3K9me3-특이적 디메틸라제의 발현 증가 및/또는 (ii) 체세포 공여체 핵에서의 예를 들어, Suv39h1 또는 Suv39h2 또는 둘 모두(즉, Suv39h1/2)와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 넉다운 또는 억제를 통해, 이 후성적 마크를 제거하는 것은, ZGA 결함을 약화시키고 RRR을 재활성화시킬 뿐만 아니라, SCNT의 효율을 크게 개선하며, 예를 들어, 2-세포, 4-세포 또는 배반포 단계로 발생하는 SCNT 배아의 %를 증가시킨다. 따라서, 본 발명자들은 Suv39h1/2-매개 H3K9me3이 SCNT의 "후성적 장벽"임을 발견하였으며 체세포 공여체 세포의 핵, 수용체 난모세포 또는 SCNT 배아에서 H3K9me3의 트리메틸화의 억제 및/또는 제거는 인간 SCNT 복제 및 다른 비-인간 포유류를 비롯한 포유류 세포의 SCNT 복제 효율을 상당히 개선할 수 있음을 입증하였다.

[0011] 따라서, 본 발명은 H3K9me3이 SCNT 배아의 생산에 사용되는 체세포의 RRR에서 풍부하며 체세포에서 H3K9me3 장벽이 Suv39h1/2에 의해 확립된다는 본 발명자들의 발견에 기초한다. 중요하게, 본 발명자들은 수용체 난모세포에서의 Kdm4d의 과발현에 의한(예를 들어, 외인성 Kdm4d mRNA 또는 cDNA의 도입에 의한) H3K9me3의 제거 및/또는 공여체 체세포의 핵에서 Suv39h1/2의 억제는 SCNT 복제의 효율에서 놀라울만큼 상당한 증가를 야기함을 입증하였다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 놀랍게도 H3K9me3의 제거가 SCNT의 효율을 배반포 단계로 진행하는 SCNT 배아가 약 80%를 초과하도록 예상치않게 상당히 증가시키는 반면, H3K9me3가 제거되지 않은 정상 SCNT 배아의 효율은 약 30%로 남아 있어서, SCNT의 배반포 단계로의 효율에서 예상치 못한 50% 증가를 입증함을 발견하였다. 더욱이, 본 발명자들은 또한 H3K9me3 제거가 SCNT 배아의 착상후 발생을 예상치 못하게 상당히 개선하여, 인공적인 H3K9me3 제거가 없는 경우에 비교하여 마우스 새끼 생성을 8배 넘게 증가시킴을 입증한다.

[0012] 따라서, 본 발명의 양태는 히스톤 H3-리신 9의 트리메틸화(H3K9me3)가 효율적인 체세포 핵 재프로그래밍 또는 SCNT를 막는다는 발견에 기초한다. 본 발명자들은 마우스 배아의 SCNT의 효율을 개선하기 위하여 두 가지 방법을 평가하였으며, (i) 디메틸라제 Kdm4d(Jmjd2d 또는 Jhdm3d로도 알려짐)의 과발현(즉, 외인성 발현)을 이용하여 H3K9me3의 탈메틸화를 촉진하는 것과 (ii)히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1 및/또는 Suv39h2를 억제하여 H3K9me3의 메틸화를 억제하는 것이다. 따라서, Kdm4d/Jmjd2d 유전자의 과발현 및/또는 Suv39h1/2 단백질 또는 유전자의 억제제는 세포 재프로그래밍, 특히 SCNT에서 후성적 장벽 제거에 유용하다.

[0013] 따라서, 본 발명의 양태는 (i) H3K9me3를 탈메틸화할 수 있는 히스톤 디메틸라제, 예를 들어, Jmjd2d/Kdm4d 또는 Jmjd2a/Kdm4a 또는 Jmjd2b/Kdm4b 또는 Jmjd2c/Kdm4c와 같은 그러나 이에 제한되지 않는 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 구성원의 발현 및/또는 (ii) H3K9me3의 메틸화에 관련되는 히스톤 메틸트랜스퍼라제의 억제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 중 어느 하나 또는 조합의 억제에 의해, H3K9me3 메틸화를 감소시킴으로써 SCNT 효율을 증가시키는 것에 관한 방법, 조성물 및 키트에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 제제는 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리 Kdm4d(Jmjd2d), 또는 Kdm4a(Jmjd2a), 또는 Jmjd2b/Kdm4b 또는 Jmjd2c/Kdm4c의 발현 또는 활성을 증가시킨다.

[0014] (Kdm4c/Jmjd2c에 의한) H3K9me3의 탈메틸화가 체세포 재프로그래밍(예를 들어, 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포의 생성(Sridharan et al., 2013)) 효율을 증가시키기 위해 사용되는 것으로 보고되었지만, 최종 분화된 체세포로

부터 SCNT의 효율을 증가시키기 위한 H3K9me3의 탈메틸화는 아직 보고되지 않았다. "Transient JMJD2B-Mediated Reduction of H3K9me3 Levels Improve Reprogramming of Embryonic Stem Cells in Cloned Embryos." Mol. Cell Biol., 2013; 33(5);974에서 안토니 등(Antony *et al.*)은 다능성 ES 세포로부터의 공여체 핵으로부터 유도된 SCNT에서 Kdm4b/Jmjd2b의 이용을 보고한다. 다능성 ES 세포는 최종 분화된 체세포와 동일하지 않은, 발생적으로 미성숙한 세포이다. 중요하게도, 분화된 체세포와 비교할 때 배아 줄기(ES) 세포 또는 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포의 전체적 후성적 상태는 상당한 차이가 있다. 다능성 ES 세포는 후성적 장벽이 적으며(예를 들어, 메틸화가 적으며, 특히 재프로그래밍 저항성 영역(RRR)에서 적다), 따라서 ES 세포 핵이 공여체 핵으로 사용될 경우 생산된 SCNT 배아의 효율이 최종 분화된 체세포로부터의 핵이 사용될 때 생산된 SCNT 배아의 효율과 매우 상이하다(Rideout *et al.*, 2000, *Nature Genetics*, *24*(2), 109-10).

[0015] 안토니 등에 의한 보고와 대조적으로, 본 발명자들은 본 명세서에서 최종 분화된 체세포 핵에서 H3K9me3 수준을 감소시키면 착상전 발생이 놀랍게 증가하여, H3K9me3의 탈메틸화가 감소될 경우 80%가 넘는 SCNT 배아가 성공적으로 배반포로 발생함(예를 들어, 난구 세포로부터의 핵이 사용될 경우 26%에서 89%까지 증가; 세르토리(Sertoli) 세포로부터의 핵이 사용될 경우 26%에서 81%로 증가 및 MEF 세포로부터의 핵이 사용될 경우 7%에서 82%로 증가)을 입증한다. 이 결과는 안토니 등이 ES-세포 유래 공여체 핵이 사용되는 경우에서도 착상전 발생의 사소한 개선(약 9% 개선)만을 보고한 것을 고려할 때 매우 예상치 못한 것이다.

[0016] 또한, 안토니 등이 Jmjd2b/Kdm4b 유도에 의한 착상 후 발생에서의 어떤 개선도 입증하지 못한 반면, 본 발명자들은 본 명세서에서 SCNT 배아로부터 마우스 새끼 생성의 8배가 넘는 증가를 입증한다. SCNT의 한 가지 목적이 비인간 포유류의 생식적 복제 및 개별 동물의 생성이며 이는 착상 후 발생의 완료를 요구함을 고려할 때, 안토니 등을 읽는 당업자는 공여체 세포의 핵내로 Kdm4b를 주입하는 것은 SCNT 효율을 개선할 수 없다고 결론지을 것이다. 더욱이, 안토니 등은 ES 세포에서 Suvh1/2를 억제하지 않는다.

[0017] 또한, 체세포를 초기 발생 단계로 재프로그래밍하는(예를 들어, 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포의 생성) 효율을 증가시키기 위하여 H3K9me3를 탈메틸화하는 많은 보고가 있었지만(예를 들어, 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 미국 특허 출원 2011/0136145호 및 2012/0034192호), iPS 세포의 생성을 위하여 체세포를 재프로그래밍하는 기전은 SCNT 배아의 생성을 위하여 체세포를 재프로그래밍하는 기전과 상당히 상이하다(Pasque *et al.*, 2011, Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12, 453-459; 및 Apostolou, E., and Hochedlinger, K., 2013; Chromatin dynamics during cellular reprogramming. Nature 502, 462-471에서 토의됨). 따라서, iPS 세포의 생성에서 H3K9me3의 탈메틸화로부터 배우는 것은 관련이 없으며 SCNT 배아의 성공적인 생성 및 SCNT 배아의 착상전 및 착상후 효율 둘 모두를 증가시키기 위한 방법에 전달될 수 없다.

[0018] 특히, SCNT 및 iPS 재프로그래밍 사이의 장벽에 관하여 주목할만한 차이가 존재한다. 먼저, 마우스 iPSC 재프로그래밍에서 H3K9me3-장벽은 주로Setdb1에 의해 확립된다(Chen et al., 2013; Sridharan et al., 2013). 반면, 본 발명자들의 결과는 SCNT 재프로그래밍을 위한 H3K9me3 장벽을 확립하는 중요한 효소로서 Setdb1이 아니라 Suv39h1/2를 명확히 가리킨다. 두번째로, 성공적인 iPSC 및 SCNT 재프로그래밍을 위해 필요한 다운스트림 유전자 네트워크가 상이하다. 예를 들어, iPSC 재프로그래밍에서, H3K9me3 장벽에 의해 억제되는, *Nanog* 및 *Sox2*와 같은 중요 핵심 다능성 네트워크 유전자는 재프로그래밍의 상대적 후기 단계 동안 발현된다(Chen et al., 2013; Sridharan et al., 2013). 대조적으로, SCNT 재프로그래밍에서는, H3K9me3에 의해 억제되는 중요 유전자가 2-세포 배아 단계에서 발현되고 중요한 기능을 갖는다(후술함). 이러한 차이는 대부분 각 맥락에서 성공적 재프로그래밍에 요구되는 전사 인자 세트에서의 차이로부터 생겨난다. 실제로, iPSC 재프로그래밍에 요구되는 핵심 전사 인자 *Oct4/Pou5f1* 는 SCNT 재프로그래밍에서는 없어도 되는 것으로 입증되었다(Wu et al., 2013). 따라서, H3K9m3이 iPS 세포 생성 및 성공적인 SCNT 둘 모두를 위해 공통된 재프로그래밍 장벽으로 보이지만, 그것의 침적(deposition) 및 그것이 재프로그래밍 과정에 어떻게 영향을 미치는지는 iPS 세포를 생성하기 위한 재프로그래밍 방법 또는 SCNT 배아를 생성하기 위한 재프로그래밍 방법에서 매우 상이하다.

[0019] 따라서, iPS 세포로 재프로그램된 체세포에서 H3K9me3 장벽의 제거가 입증되었다 하더라도, 상이한 재프로그래밍 유전자와 재프로그래밍 기전이 사용되므로, 그러한 방법이 SCNT 배아의 생성을 위한 체세포 재프로그래밍을 위해 작동할 것임을 나타내지는 않는다. 사실상, 미국 특허 출원 2011/0136145호와 2012/0034192호는 둘 모두 구체적으로 그들의 방법이 iPSC로의 체세포의 재프로그래밍에만 적용되며 전능성 세포의 생성 또는 SCNT 배아의 생산을 위해서는 적합하지 않음을 진술한다. 따라서, 미국 특허 출원 2011/0136145호 및 2012/0034192호 둘 모두 본 발명과는 다르게 교시하고 있다.

[0020] 더욱이, 하기의 표 1에 개시된, SCNT 배아의 생성에 비교할 때 iPSC의 생성에서 체세포 재프로그래밍을 위해 사용된 매우 상이한 기전과 마찬가지로, iPSC를 생산하기 위한 체세포 재프로그래밍으로부터 생산된 줄기 세포는 SCNT 배아로부터 수득한 줄기 세포와 매우 상이하다(Ma *et al.*, 2014, *Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms*. Nature, 511(7508), 177-183).

[0021] 표 1: SCNT- 및 iPS-매개 재프로그래밍 사이의 주요 차이의 요약

표 1

[0022]

재프로그래밍 특징	iPS	SCNT	공급원
속도	느림(수일 또는 수주)	빠름(수시간)	(Yamanaka & Blau, 2010)
효율	낮음	높음	(Pasque, Miyamoto, & Gurdon, 2010)
인자	Oct4, Sox2, Klf4	아직 확인되지 않음(Oct4 아님)	(Apostolou & Hochedlinger, 2013; Jullien, Pasque, Halley-Stott, Miyamoto, & Gurdon, 2011)
양상	확률적	결정성	(Jullien et al., 2011)
효력	다능성	전능성(totipotency)	(Mitalipov & Don Wolf, 2009)

[0023] 따라서, 상술한 바처럼, iPS 세포로의 체세포 재프로그래밍의 기전과 재프로그래밍 유전자는 SCNT로의 체세포 재프로그래밍의 기전 및 재프로그래밍 유전자와 매우 상이하므로, 그리고 생성되는 세포가 매우 상이하므로, iPSC를 생산하기 위한 재프로그래밍을 위해 작동하는 방법이 SCNT의 생성을 위한 재프로그래밍에 작동할 것이라고 믿을 징후 또는 이유가 없다.

[0024] 따라서, 본 발명의 일 양태는 공여체 포유류 체세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아(즉, 공여체 핵과 난모세포의 융합 후) 중 어느 하나를 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아에서 H3K9me3 메틸화를 감소시키는 제제와 접촉시켜, SCNT의 효율을 증가시키는 것, 예를 들어, SCNT 배아의 배반포로의 착상전 발생을 증가시키고/시키거나 배반포로부터 생존가능한 자손으로의 SCNT 배아의 착상후 발생을 증가시키는 것을 포함하는, 체세포 핵 이식(SCNT)의 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0025] 일부 실시형태에서, 본 발명은 공여체 포유류 체세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아를 (i)히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리 및/또는 (ii) H3K9 메틸트랜스퍼라제-억제제 중 적어도 하나와 접촉시켜, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아에서 H3K9me3 메틸화를 감소시켜, RRR에서 후성적 장벽을 제거하고 SCNT의 효율을 증가시키는 것을 포함하는, 체세포 핵 이식(SCNT)의 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0026] 일부 실시형태에서, 체세포 핵 이식(SCNT)의 효율을 증가시키는 것은 공여체 포유류 체세포를 (i)히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리 및/또는 (ii) H3K9 메틸트랜스퍼라제-억제제 중 적어도 하나와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 체세포 핵 이식(SCNT)의 효율을 증가시키는 것은 수용체 포유류 난모세포, 예를 들어, 유핵 또는 제핵 난모세포를 (i)히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리 및/또는 (ii) H3K9 메틸트랜스퍼라제-억제제 중 적어도 하나와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 체세포 핵 이식(SCNT)의 효율을 증가시키는 것은 SCNT 배아, 예를 들어, 적어도 5hpa, 또는 10-12 hpa 사이(즉, 1-세포 단계) 또는 약 20hpa (즉, 초기 2-세포 단계) 또는 20-28 hpa 사이(즉, 2-세포 단계) SCNT 배아를 (i)히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리 및/또는 (ii) H3K9 메틸트랜스퍼라제-억제제 중 적어도 하나와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0027] 일부 실시형태에서, H3K9me3 메틸화의 감소는 포유류 공여체 난모세포(핵 제거 전 또는 핵 제거 후) 또는 SCNT 배아(예를 들어, 활성화 후 적어도 5시간 후(5hpa) 또는 1-세포 단계 또는 2-세포 단계) 또는 공여체 포유류 체세포 중 어느 하나 또는 그 조합에서, Kdm4 유전자, 예를 들어, Kdm4d의 과발현 또는 외인성 발현에 의해 일어난다. 일부 실시형태에서, Kdm4 유전자, 예를 들어, Kdm4d의 외인성 발현은 포유류 공여체 난모세포에서 일어난다. 일부 실시형태에서, Kdm4 유전자, 예를 들어, Kdm4d의 외인성 발현은 제핵 포유류 공여체 난모세포에서 일어난다. 일부 실시형태에서, Kdm4 유전자, 예를 들어, Kdm4d의 외인성 발현은 5hpa, 10-12 hpa 사이(즉, 1-세포 단계), 약 20hpa (즉, 초기 2-세포 단계) 또는 20-28 hpa 사이(즉, 2-세포 단계) 중 어느 하나의 SCNT 배아에서 일어난다. 일부 실시형태에서, SCNT 배아가 H3K9me3을 억제하는 제제, 예를 들어, Kdm4 유전자, 예를 들어, Kdm4d(예를 들어, Kdm4d mRNA 또는 mod-RNA)의 외인성 발현을 증가시키는 제제와 접촉되는 경우, SCNT 배아의

각 세포(예를 들어, 2-세포 배아의 각 세포)는 Kdm4d 활성화 또는 과발현 제제가 주입된다.

[0028] 다른 실시형태에서, H3K9me3 메틸화의 감소는 포유류 공여체 난모세포(핵 제거 전 또는 핵 제거 후) 또는 SCNT 배아(예를 들어, 활성화 후 적어도 5시간 후(5hpa) 또는 1-세포 단계 또는 2-세포 단계) 또는 공여체 포유류 체세포 중 어느 하나 또는 그 조합에서, Suv39h1 및/또는 Suv39h2, 또는 둘 모두(Suv39h1/2)의 발현을 억제함으로써 일어난다. 일부 실시형태에서, Suv39h1 및/또는 Suv39h2, 또는 둘 모두(Suv39h1/2)의 억제는 공여체 체세포에서, 예를 들어, 제핵 포유류 공여체 난모세포에의 이식을 위해 핵의 제거 전, 예를 들어, 적어도 약 24시간 또는 적어도 약 48 시간 또는 적어도 약 3-일 또는 적어도 약 4-일 또는 4-일 초과에 일어난다. 일부 실시형태에서, Suv39h1 및/또는 Suv39h2, 또는 둘 모두(Suv39h1/2)의 발현의 억제는 siRNA에 의해서이며, 핵의 제거 이전 기간에 적어도 12시간, 또는 적어도 24시간 이상 동안 일어난다.

[0029] 본 발명의 다른 양태는 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아에서 H3K9me3 메틸화를 감소시키는 제제와 포유류 SCNT 배아를 접촉시켜, SCNT의 효율을 증가시키는 것을 포함하는, 체세포 핵 이식 (SCNT)의 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 수용체 포유류 난모세포는 최종 분화된 체세포로부터 수득한 공여체 핵의 주입 이전의 포유류 난모세포이다. 일부 실시형태에서, 수용체 포유류 난모세포는 제핵 포유류 난모세포이다. 일부 실시형태에서, SCNT 배아는 1-세포 단계 또는 2-세포 단계 SCNT 배아이다. 일부 실시형태에서, 제제는 최종 분화된 체세포로부터의 핵을 이용한 핵 이식 이전에 수용체 포유류 난모세포 또는 제핵 포유류 난모세포와 접촉한다.

[0030] 일부 실시형태에서, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아와 접촉하는 제제는 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 적어도 하나의 구성원, 예를 들어, Kdm4a, Kdm4b, Kdm4c 또는 Kdm4d로 이루어지는 Kdm4(Jmjd2) 패밀리의 적어도 하나의 구성원의 발현 또는 활성을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제는 Kdm4d(Jmjd2d) 또는 Kdm4a(Jmjd2a) 또는 Kdm4b 또는 Kdm4c의 발현 또는 활성을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 제제는 포유류 종으로부터의 Kdm4의 핵산 서열, 예를 들어, 인간 KDM4d (서열번호 1), 마우스 Kdm4d(서열번호 2), 래트 Kdm4d(서열번호 3), 토끼 Kdm4d (서열번호 4), 돼지 Kdm4d(서열번호 5), 소 Kdm4d(서열번호 6), 마카크 Kdm4d(서열번호 7) 및 침팬지 Kdm4d(서열번호 8) 또는 서열번호 1-8의 해당하는 서열과 비교할 때 유사하거나 더 큰 정도로 SCNT의 효율을 증가시키는(예를 들어, 적어도 약 110%, 또는 적어도 약 120%, 또는 적어도 약 130%, 또는 적어도 약 140%, 또는 적어도 약 150%, 또는 150% 초과 증가됨), 적어도 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성의 그의 생물학적 활성 단편 또는 상동체를 포함한다.

[0031] 일부 실시형태에서, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아와 접촉하는 제제는 서열번호 55의 인간 KDM4d 단백질의 발현을 증가시키고, 및/또는 서열번호 1의 해당하는 인간 KDM4d 핵산 서열 또는 서열번호 1의 핵산 서열과 비교할 때 유사하거나 더 큰 정도로 SCNT의 효율을 증가시키는(예를 들어, 적어도 약 110%, 또는 적어도 약 120%, 또는 적어도 약 130%, 또는 적어도 약 140%, 또는 적어도 약 150%, 또는 150% 초과 증가됨) 그의 생물학적 활성 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 Antony *et al.*, Nature, 2013에 개시된 대로, 서열번호 55의 아미노산 1-424를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 55의 아미노산 1-424의 C-말단 또는 N-말단에서 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50, 또는 적어도 50-100 아미노산이 결핍되거나, 서열번호 55의 아미노산 1-424의 C-말단 및 N-말단에서 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50, 또는 적어도 50-100 아미노산이 결핍된, 서열번호 55의 아미노산 1-424를 포함한다.

[0032] 대안적 실시형태에서, 공여체 포유류 세포, 예를 들어, 최종 분화된 세포의 공여체 핵과 접촉하는 제제는 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는, 전술한 Kdm4a, Kdm4b, Kdm4c 또는 Kdm4d로 이루어진 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시킨다.

[0033] 본 발명의 다른 양태는 공여체 포유류 세포, 예를 들어, 최종 분화된 체세포의 핵을 공여체 포유류 체세포의 핵에서 H3K9me3 메틸화를 감소시키는 제제와 접촉시켜, SCNT의 효율을 증가시키는 것을 포함하는, 체세포 핵 이식 (SCNT)의 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0034] 본 발명의 모든 양태의 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 체세포와 접촉하는 제제는 H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어 그러나 이로 제한되지 않는 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제이다. 일부 실시형태에서, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제 중 적어도 하나 또는 임의의 조합은 SCNT의 효율을 증가시키는 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제는 다양한 포유류 종, 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 소의 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 핵산 서열(예를 들어, 서열번호 9-14)의 발현,

또는 다양한 상이한 포유류, 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 소로부터의 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 단백질의 활성을 억제한다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제는 Setdb1의 억제제가 아니다.

[0035] 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제는 RNAi 제제, siRNA 제제, shRNA, 올리고뉴클레오티드, CRISPR/Cas9, 중화 항체 또는 항체 단편, 앱타머, 소분자, 단백질, 펩티드, 소분자, 아비디미르(avidimir) 및 그 기능성 단편 또는 유도체 등으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 RNAi 제제, 예를 들어, siRNA 또는 shRNA 분자이다. 일부 실시형태에서, 제제는 인간 SUV39H1(서열번호 9), 마우스 Suv39h1(서열번호 11), 래트 Suv39h1(서열번호 13) 또는 소 Suv39h1(서열번호 15)의 발현을 억제하기 위한 핵산 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 인간 SUV39H2(서열번호 10), 마우스 Suv39h2(서열번호 12), 래트 Suv39h2(서열번호 14) 또는 소 Suv39h2(서열번호 16)의 발현을 억제하기 위한 핵산 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 마우스 Suv39h1의 siRNA 억제제는 서열번호 18 또는 그의 적어도 10 연속 뉴클레오티드의 단편, 또는 서열번호 18에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)을 가진 핵산 서열이다. 일부 실시형태에서, siRNA 또는 다른 핵산 억제제는 전체적으로 또는 부분적으로 Suv39h1의 서열번호 17의 표적 서열에 하이브리드화한다. 일부 실시형태에서, 마우스 Suv39h2의 siRNA 억제제는 서열번호 20 또는 그의 적어도 10 연속 뉴클레오티드의 단편, 또는 서열번호 20에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%)을 가진 핵산 서열이다. 일부 실시형태에서, siRNA 또는 다른 핵산 억제제는 전체적으로 또는 부분적으로 Suv39h2의 서열번호 19의 표적 서열에 하이브리드화한다.

[0036] 일부 실시형태에서, 제제는 활성화 이전에 또는 활성화 후 5시간에 또는 SCNT 배아가 1-세포 단계에 있을 때 SCNT 배아와 접촉할 수 있다. 대안적 실시형태에서, 제제는 활성화 후 5시간 후에 또는 SCNT 배아가 2-세포 단계에 있을 때 SCNT 배아와 접촉할 수 있다. 일부 실시형태에서, 수용체 포유류 난모세포 또는 SCNT 배아는 예를 들어, 수용체 포유류 난모세포 또는 SCNT 배아의 핵 또는 세포질내로의 주입에 의해, 제제가 주입된다. 일부 실시형태에서, 제제는 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시킨다.

[0037] 일부 실시형태에서, 제제는 공여체 포유류 세포의 핵을 제핵 포유류 난모세포 내로 주입하기 이전에, 공여체 포유류 세포, 예를 들어, 최종 분화된 체세포의 핵 또는 세포질과 접촉한다. 일부 실시형태에서, 그러한 제제는 적어도 1시간 또는 적어도 2시간 이상 동안 공여체 포유류 체세포와 접촉하며, 이때 접촉은 공여체 포유류 체세포로부터의 핵을 제핵 포유류 난모세포내로 제거하기 이전에, 적어도 1 일(24시간), 또는 적어도 2일 또는 적어도 3 일 또는 3일 초과에 일어난다.

[0038] 본 발명의 모든 양태에서, SCNT 배아는 분화된 체세포(종종 최종 분화된 세포, 그러나 ES 세포 또는 iPSC는 아님)로부터의 공여체 체세포 핵을 제핵 난모세포내로 주입함으로써 생산되며, 이때 공여체 핵은 배아 줄기(ES) 세포 또는 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포 또는 태아 세포로부터 오지 않는다. 본 발명의 모든 양태에서, SCNT 배아는 최종 분화된 체세포로부터의 공여체 핵을 제핵 포유류 난모세포내로 주입함으로써 생성된다. 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 체세포는 수용체 난모세포가 유래되는 포유류 종과 상이한 포유류 종으로부터 유래된다.

[0039] 본 발명의 모든 양태에서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 인간 세포이며, 예를 들어, 인간 공여체 세포, 수용체 인간 난모세포 또는 인간 SCNT 배아이다. 본 발명의 양태에서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 비-인간 세포, 예를 들어, 비-인간 공여체 세포, 수용체 비-인간 난모세포 또는 비-인간 SCNT 배아이다.

[0040] 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 비-인간 포유류이며, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 소, 말, 돼지, 닭, 개, 고양이, 마카크, 침팬지 또는 가정용 또는 상업용 동물, 예를 들어, 소, 돼지, 말, 사슴, 들소, 라마, 노새, 토끼, 순록, 양, 물소, 야크, 가금류, 어류 및 음식, 섬유 및 노동과 같은 상품을 위한 농업 배경에서 길러진 다른 가축으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비-인간 포유류이다. 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 개, 고양이, 토끼, 기니피그 또는 말과 같은 반려 동물로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 동물원 동물, 예를 들어, 사자, 얼룩말, 기린, 코끼리, 코뿔소 등이다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 멸종이 가까운 동물을 생산하기 위하여 사용될 수 있으며, 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 멸종위기 종인 포유류 종으로부터 유래하며, 예를 들어, 멸종이 가까운 동물, 예를 들어, 자

이언트 판다, 북극곰, 사자, 자바코뿔소, 크로스강 고릴라, 수마트라 호랑이, 보르네오 피그미 코끼리 등으로부터 유래된다.

[0041] 따라서, 본 발명의 모든 양태에서, 본 방법은 H3K9me3 메틸화를 감소시키는 제제의 부재하에서 수행된 SCNT에 비교하여 SCNT의 효율을 적어도 30% 증가, 또는 적어도 50% 증가, 또는 50%-80% 증가, 또는 80% 초과 증가를 야기한다. 달리 말하면, 본 명세서에서 개시된 방법은 SCNT 배아의 착상전 발생 효율을 증가시키며, 이에 의해 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 80% 초과의 SCNT 배아가 살아남고 생존가능하며 배반포로 발생한다. 다른 실시형태에서, 본 방법은 SCNT 배아의 착상후 발생 효율을 증가시키며, 예를 들어, H3K9me3 메틸화를 감소시키는 제제의 부재하와 비교할 때 살아있는 동물을 생산하기 위한 SCNT 배아의 성공적인 착상후 발생을 적어도 3-배, 또는 적어도 4-배, 또는 적어도 5-배, 또는 적어도 약 6-배, 또는 적어도 약 7-배, 또는 적어도 약 8-배 또는 8-배 초과로 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에 의해 제공되는 SCNT 효율 증가는 SCNT 배아-유도 배아 줄기 세포(ntESC)의 생성의 증가를 말한다.

[0042] 본 발명의 다른 양태는 포유류 SCNT 배아, 수용체 포유류 난모세포 또는 배반포 중 적어도 하나 및 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리(Jmjd2)의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제 또는 (ii) H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 제제 중 적어도 하나를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0043] 일부 실시형태에서, 조성물은 최종 분화된 체세포로부터 수득한 공여체 핵의 주입 이전의 제핵 포유류 난모세포 또는 포유류 난모세포인 수용체 포유류 난모세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, SCNT 배아는 1-세포 단계, 또는 2-세포 단계 SCNT 배아이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 구성원을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자의 발현을 증가시키거나, 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 적어도 하나의 구성원, 예를 들어, Kdm4a, Kdm4b, Kdm4c 또는 Kdm4d의 활성을 증가시키는 제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 Kdm4d (Jmjd2d) 또는 Kdm4a(Jmjd2a)의 발현 또는 활성을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 제제는 다양한 상이한 포유류 종으로부터 선택된 Kdm4d의 핵산 서열, 예를 들어, 인간 Kdm4d(서열번호 1), 마우스 Kdm4d(서열번호 2), 래트 Kdm4d(서열번호 3), 토끼 Kdm4d(서열번호 4), 돼지 Kdm4d(서열번호 5), 소 Kdm4d(서열번호 6), 마카크 Kdm4d(서열번호 7), 및 침팬지 Kdm4d(서열번호 8), 또는 서열번호 1-8의 해당하는 서열과 비교하여 유사하거나 더 큰 정도로 SCNT의 효율을 증가시키는 그의 생물학적 활성 단편 또는 상동체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 서열번호 1에 해당하는 인간 KDM4 핵산 서열 또는 서열번호 1의 핵산 서열과 비교하여 유사하거나 더 큰 정도로 SCNT의 효율을 증가시키는 그의 생물학적 활성 단편을 포함한다.

[0044] 일부 실시형태에서, 조성물은 H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어 그러나 이에 제한되지 않는 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제인 제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제 중 적어도 하나 또는 임의의 조합은 SNCT의 효율을 증가시키기 위하여 본 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제는 다양한 포유류 종, 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 소의 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 핵산 서열(예를 들어, 서열번호 9-14)의 발현, 또는 다양한 상이한 포유류, 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 소로부터의 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 단백질의 활성을 억제한다.

[0045] 일부 실시형태에서, 조성물은 siRNA, shRNA, 중화 항체 또는 항체 단편, 앱타머, 소분자, 단백질, 펩티드, 소분자 등으로 이루어지는 군으로부터 선택된 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 Suv39h1 또는 Suv39h2 또는 Setdb1을 억제하는 siRNA 또는 shRNA 분자이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 인간 Suv39h1(서열번호 9), 마우스 Suv39h1(서열번호 11), 래트 Suv39h1(서열번호 13) 또는 소 Suv39h1(서열번호 15)의 발현을 억제하는 핵산 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 인간 Suv39h2(서열번호 10), 마우스 Suv39h2(서열번호 12), 래트 Suv39h2(서열번호 14) 또는 소 Suv39h2(서열번호 16)의 발현을 억제하는 핵산 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 서열번호 18에 해당하는 마우스 Suv39h1 또는 그의 적어도 10 연속 뉴클레오티드 단편 또는 서열번호 18에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)을 가진 핵산 서열의 siRNA 억제제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 Suv39h1의 서열번호 17의 표적 서열에 전체적으로 또는 부분적으로 하이브리드화하는 siRNA 또는 다른 핵산 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 서열번호 20에 해당하는 마우스 Suv39h2 또는 그의 적어도 10 연속 뉴클레오티드 단편 또는 서열번호 20에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%)을 가진 핵산 서열의 siRNA 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 Suv39h2의 서열번호 19의 표적 서열에 전체적으로 또는 부분적으로 하이브리드화하는 siRNA 또는 다른 핵산 억제제를 포함한다.

[0046] 일부 실시형태에서, 조성물은 1-세포 또는 2-세포 단계인 SCNT 배아를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 제핵 포유류 난모세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 인간 SCNT 배아, 수용체 인간 난모세포 또는 인간 배반포를 포함하며, 또는 대안적 실시형태에서, 조성물은 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 마우스, 래트, 토끼, 소, 말, 돼지, 닭, 개, 고양이, 마카크, 침팬지의 비-인간 포유류 SCNT 배아, 비-인간 수용체 포유류 난모세포 또는 비-인간 배반포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 반려동물, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 개, 고양이, 토끼, 기니피그 또는 말 또는 동물원 동물, 예를 들어, 사자, 얼룩말, 기린, 코끼리, 코뿔소 등으로부터의 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 멸종이 가까운 동물을 생산하기 위하여 본 명세서에서 개시된 방법에서 사용될 수 있다.

[0047] 다른 실시형태는 (i)히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제 또는 (ii)H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 제제를 포함하는 키트에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1a-1e는 1- 및 2-세포 단계에서 SCNT 배아의 비정상적인 유전자 발현을 보여준다. 도 1a는 실험 방법의 도식을 보여준다. RNA-seq를 위해 사용된 샘플은 점선의 직사각형으로 표시된다. 도 1b 및 1c는 1-세포 단계(도 1b) 및 2-세포 단계 (도 1c)에서 IVF와 SCNT 마우스 배아 사이의 유전자 발현 수준을 비교하는 산점도이다. IVF 배아에서 더 많이 발현된 유전자(FC > 3.0, IVF-고) 및 SCNT 배아에서 더 많이 발현된 유전자(FC > 3.0, SCNT-고)는 각각 적색과 청색으로 표시된다. 도 1d는 공여체 마우스 난구 세포, IVF 2-세포 및 SCNT 2-세포 배아 사이의 짝비교에 의해 수득한 상이하게 발현된 유전자(DEG)(각 반복물에서 FC>5.0, FPKM>5)를 보여주는 히트맵(heatmap) 도시이다. 자율 계층적 클러스터링(unsupervised hierarchical clustering)에 의해 총 3775 DEG가 5 그룹으로 분류된다. 도 1e는 (도 1d에서) 분류된 5 그룹의 유전자 존재론 분석의 결과를 보여준다.

도 2a-2e는 재프로그래밍 저항성 영역(RRR)이 체세포에서 H3K9me3이 풍부함을 보여준다. 도 2a는 IVF 및 SCNT 배아의 전사물의 히트맵 도시이다. 각 타일은 슬라이딩-윈도우 분석(sliding-window analysis)에 의해 수득한 영역 내의 피크의 평균을 나타낸다. 난구 유래 SCNT 배아에 비교하여 1-세포(12 h) 내지 2-세포(28 h) 단계 IVF 배아로부터 활성화되는 811개 영역이 나타난다. 이들 영역을 SCNT- 및 IVF 2-세포 배아 사이의 전사 수준에서의 배수-변화(FC)에 기초하여 세 그룹으로 분류하였다. FRR, PRR 및 RRR은 완전히 재프로그램된 영역(FRR)(FC <= 2), 부분적으로 재프로그램된 영역(PRR)(2 < FC <= 5) 및 재프로그래밍 저항성 영역(RRR)(FC > 5)을 각각 나타낸다. 도 2b는 2 MB 인접 영역과 비교할 때 FRR, PRR 및 RRR 내에서 나타난 MEF 세포에서의 6 히스톤 변형의 평균 ChIP-seq 강도를 보여준다. 판독값 카운트는 입력, 총 맵핑된 판독값 및 영역 길이에 의해 정규화된다. 도 2c는 염색체 7 상의 RRR의 대표적인 게놈 브라우저 뷰를 보여준다. 도 2d 및 2e는 상이한 체세포 타입에서 FRR, PRR 및 RRR 내의 H3K9me3-ChIP-seq(도 2d) 또는 DNaseI-seq(도 2e)의 평균 강도를 비교하는 상자 그림이다. (도 2b-2e)에 나타난ChIP-seq 및 DNaseI-seq 데이터세트는 ENCODE 프로젝트로(Bernstein et al., 2012; The Encode Consortium Project, 2011)부터 수득되었다. 약어: 완전히 재프로그램된 영역(FRR), 부분적으로 재프로그램된 영역(PRR) 및 재프로그래밍 저항성 영역(RRR).

도 3a-3f는 마우스 SCNT 배아내로의 Kdm4d mRNA의 주입이 Kmd4d의 외인성 발현을 야기하고 체세포의 공여체 핵으로부터 전달된 H3K9me3을 제거하고 2-세포 SCNT 배아에서 침묵된 유전자의 억제해제를 야기함을 보여준다. 도 3a는 실험 절차의 도식적 예시이다. 난구 세포로부터 유도된 SCNT 배아에 활성화 후 5시간(hpa)에 야생형 또는 촉매 결함 Kdm4d mRNA를 주입하였다. RNA-seq를 위해 사용된 샘플은 점선 직사각형으로 표시한다. 도 3b는 항-H3K9me3 및 DAPI로 염색된 1-세포 및 2-세포 단계 SCNT 배아의 대표적인 핵 이미지를 보여준다. 단일 난할구의 핵이 각 패널에 나타난다. 크기 바, 10 ㎛. 도 3c는 2-세포 단계에서 222개 RRR의 전사 수준을 비교하는 히트맵이다. 222개 RRR 중 184개의 발현 수준이 야생형 Kdm4d 주입에 대한 반응으로 상당히(FC > 2) 증가하지만, 촉매 돌연변이 Kdm4d 주입에 대해서는 그렇지 않다. 도 3D는 염색체 7 상의 RRR의 예의 게놈 브라우저 뷰를 보여준다. 도 3e는 이 연구에서 사용된 모든 샘플의 계층적 클러스터링을 보여준다. 야생형 Kdm4d가 주입된 2-세포 SCNT 배아가 그들의 전사체 분석에 기초하여 2-세포 IVF 배아와 함께 모였음을 보여준다. 도 3f는 Kdm4d 주입 후 IVF와 SCNT 2-세포 배아 사이의 상이하게 발현된 유전자(FC > 3)의 수가 감소됨을 보여주는 막대 그래프이다.

도 4a-4h는 Kdm4d mRNA의 주입이 SCNT 배아의 발생 잠재력을 개선함을 보여준다. 도 4a는 Kdm4d mRNA 주입이 SCNT 배아의 난구 공여체 세포, 세르토리 공여체 세포 및 MEF 공여체 세포로부터 유도된 배반포로의 착상전 발생을 크게 개선함을 보여준다. 표시된 단계에 도달하는 마우스 SCNT 배아의 백분율이 나타난다. XX 및 XY는 공

여체 마우스의 성별을 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다. 도 4b는 *인 비트로*에서 120시간 배양 후 SCNT 배아의 대표적 이미지를 보여준다. 스케일 바, 100㎛. 도 4c는 Kdm4d mRNA 주입이 트리코스타틴 A(TSA;15 nM)의 처리에 비하여 추가의 효과를 가짐을 보여준다. 96 hpa에서 배반포 단계에 도달한 배아의 백분율이 나타난다. * P <0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. ns, 유의하지 않음. 도 4d는 피더 세포(feeder cell)에의 부착 효율 및 마우스 SCNT 배반포의 ntESC 유도를 보여주는 막대 그래프이다. 도 4e는 마우스 ntESC 유도의 효율을 보여주는 막대 그래프이다. 효율은 SCNT 배아의 생성을 위해 사용된 MII 난모세포의 총 수에 기초하여 계산하였다. 도 4f는 착상률을 보여주며, 도 4g는 E19.5상의 제왕절개에 의해 검사된 SCNT 배아의 출생률을 보여준다. 도 4h는 Kdm4d mRNA가 주입된 난구 세포의 SCNT에 의해 유도된 성체 암컷 마우스 및 야생형 수컷과의 자연 교미를 통해 태어난 그 새끼의 이미지이다. 또한, 표 2-4를 참고한다.

도 5a-5d는 SCNT 배아의 빈약한 발생 표현형을 책임지는 후보 유전자를 보여준다. 도 5a는 SCNT 2-세포 배아에서 활성화되지 못한 유전자(도 1d 내의 그룹 3)와 SCNT 2-세포 배아에서 Kdm4d 효소 활성-의존적으로 억제해제된 유전자 사이의 중복을 보여주는 벤 다이어그램이다. 유전자 온톨로지(GO) 강화 분석을 49개 중복 유전자에서 수행하였다. 도 5b는 도 5a에서의 49개 중복 유전자의 발현 패턴을 보여주는 히트맵이다. 도 5c는 실험 절차의 도식적 예시이다. Zscan4d mRNA를 20 hpa (초기 2-세포 단계)의 SCNT 배아의 2-세포 난할구의 두 세포 모두내로 주입하였다. 도 5d는 세포 당 0, 20, 200 또는 2000 ng/㎕로 Zscan4d mRNA가 주입된 SCNT 배아의 착상전 발생률을 보여준다. 에러 바는 세 가지의 생물학적 반복물의 표준편차를 나타낸다. 또한 도 11 및 표 6을 참고한다.

도 6a-6d는 Suv39h1/2가 H3K9me3 장벽의 확립을 책임짐을 보여준다. 도 6a는 siRNA 형질감염된 MEF 세포를 이용하는 SCNT의 도식적 예시를 보여준다. 도 6b는 형질감염 6일에 항-H3K9me3 항체 및 DAPI로 염색된 MEF 세포의 대표적 이미지를 보여준다(상세한 것은 방법을 참고한다). 스케일 바, 10 ㎛. 도 6c는 상이한 넉다운 MEF 세포로부터 유도된 SCNT 배아의 착상전 발생률을 보여준다. 에러 바는 세 가지 생물학적 반복물의 표준편차를 나타낸다. 도 6d는 인 비트로에서 120시간 배양 후 SCNT 배아의 대표적 이미지를 보여준다. 스케일 바, 100 ㎛.

도 7은 H3K9me3 재프로그래밍 장벽이 어떻게 극복될 수 있는지를 보여주는 모델이다. 분화된 체세포 내의 Suv39h-침적 H3K9me3은 SCNT-매개 재프로그래밍을 위한 전사 장벽으로서 작용하여 정상 배아 발생에 영향을 주고 발생 중지를 야기한다(좌측). 외인성 Kdm4d의 발현(중간)에 의한 또는 Suv39h 억제 또는 Suv39h 넉다운에 의한 H3K9me3 확립 방지를 통한(우측) 이 장벽의 제거는 SCNT 배아에서 발생 조절자의 활성화를 야기하여, 성공적인 배아 발생을 야기하고 발생 중지를 방지할 수 있다.

도 8a-8b는 (도1에 관련되며) RNA-seq 정보의 요약을 보여준다. 도 8a는 이 연구에서 사용된 두 가지 생물학적 반복물을 가진 7가지 타입의 샘플의 각 샘플을 위한 전체 및 유일하게 맵핑된 판독값의 요약이다. 도 8b는 상이한 생물학적 반복물의 재현성의 산점도 평가를 보여준다.

도 9a-9e는(도 2에 관련되며) RRR이 체세포에서 이질염색질 특징을 보유함을 보여준다. 도 9a는 MEF 세포에서의 히스톤 변형의 ChIP-seq 데이터 및 2-세포 배아의 RNA-seq 데이터를 보여주는 염색체 13상의 RRR의 예의 게놈 브라우저 뷰를 보여준다. 이 RRR은 H3K9me3 피크의 큰 블록과 중복되며 유전자-빈약 영역 내에 위치됨을 주목한다. 도 9b는 FRR, PRR 및 RRR에서, 단백질 코딩 유전자의 밀도를 나타내는 엑손 서열의 평균 백분율을 비교하는 상자 그림이다. *** P < 0.001. 도 9c는 FRR, PRR 및 RRR 내의 반복 서열의 평균 백분율을 비교하는 상자 그림이다. *** P < 0.001. 도 9d는 거핵세포 및 전체 뇌 내의 H3K9me3을 위한 ChIP-seq의 평균 값을 비교하는 상자 그림이다. ChIP-seq 데이터는 ENCODE 프로젝트(Bernstein et al., 2012)로부터 수득하였다. H3K9me3은 FRR 및 PRR에 비교하여 RRR에서 상당히 풍부하다. 도 9e는 전체 뇌, T-조절 세포, Cell_416b 및 Mel 세포에서 DNaseI 처리 후 서열 강도의 평균 값을 비교하는 상자 그림이다. DNaseI-seq 데이터는 ENCODE 프로젝트(The Encode Consortium Project, 2011)로부터 수득하였다. RRR은 모든 4가지 타입의 세포/조직에서 FRR 또는 PRR보다 DNaseI에 상당히 덜 민감하다. ** P < 0.01, *** P < 0.001. 약어: 완전히 재프로그램된 영역(FRR), 부분적으로 재프로그램된 영역(PRR) 및 재프로그래밍 저항성 영역(RRR).

도 10a-10c는 (도 3에 관련되며) RRR의 전사가 Kdm4d mRNA 주입에 의해 회복될 수 있음을 보여준다. 도 10a는 염색체 7상의 대표적인 RRR의 게놈 브라우저 뷰를 보여준다. 도 10b는 염색체 13상의 RRR의 예의 게놈 브라우저 뷰를 보여준다. 도 10c는 Kdm4d WT 주입된 SCNT 2-세포 배아의 유전자 발현을 IVF 2-세포 배아의 것과 비교하는 산점도이다. IVF(IVF-고) 또는 SCNT(SCNT-고) 배아에서 더 많이 발현된 유전자(FC > 3)를 각각 회색과 검정색으로 채색하였다.

도 11은 (도 5에 관련되며) SCNT 배아의 빈약한 발생 표현형에 대해 잠재적으로 담당하는 후보 비-유전자 전사물의 발현 수준을 보여준다. 막대 그래프는 IVF 및 SCNT 배아에서 주요 위성 DNA 및 마우스 내인성 레트로트

랜스포존(retrotransposon) MERVL의 발현 수준(유일하게 맵핑된 판독값 수)을 나타낸다.

도 12a-12c는 (도 6에 관련되며) 넉다운 효율의 RT-qPCR 분석으로부터의 결과를 보여준다. 각 siRNA의 형질감염 후 48시간에 MEF 세포에서 Suv39h1(도 12a), Suv39h2(도 12b) 및 Setdb1(도 12c) mRNA 수준의 RT-qPCR 분석. 나타난 데이터는 Gapdh에 대한 평균 발현 값이다. 대조군의 값은 1.0으로 설정하였다. 에러 바는 세 가지 생물학적 반복물의 표준편차를 나타낸다. *** 스튜던츠(Student's) T-테스트에 의해P<0.001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 기본 과학 및 치료 용도 둘 모두를 위한 방대한 그 잠재력에도 불구하고, 체세포 핵 이식(SCNT)에 의한 포유류 복제 효율은 매우 낮게 남아 있다. SCNT 후 살아 있는 신생아의 출생률은 사용된 종, 공여체 세포 타입, 프로토콜 또는 기술에 관계없이 10% 미만이다. 유사하게, 복제된 배아의 발생률은 정상의 수정된 배아의 발생률보다 낮아서, 배반포로의 빈약한 발생 및 배반포에서 더 작은 세포수를 야기한다. 이들 결함은 또한 복제된 마우스 SCNT 배아로부터의 성공적인 ES 세포주 확립을 드물게 하여, 복제된 마우스 SCNT 배아로부터의 성공적인 ES 세포주 확립은 정상 배아가 사용될 경우의 약 30% 성공률에 비하여, 마우스 균주 또는 공여체 세포 타입에 관계없이 대략 5%이다. 복제된 배아의 무능함은 대부분 불완전한 핵 프로그래밍 및/또는 공여체 핵에서의 후성적 장벽으로 인한 것이다.

[0050] 본 발명은 공여체 세포의 핵 내의 재프로그래밍 저항성 영역(RRR) 상의 히스톤 H3-리신 9의 트리메틸화(H3K9me3)가 SCNT에 의한 효율적인 체세포 핵 재프로그래밍을 막는 후성적 장벽이라는 발견에 기초한다. 본 명세서에 개시된 바처럼, 본 발명자들은 먼저 디메틸라제 Kdm4d(Jmjd2d 또는 Jhdm3d로도 알려짐)의 외인성 또는 증가된 발현을 이용하여 H3K9me3의 탈메틸화를 촉진하고 및/또는 히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1 또는 Suv39h2를 억제하여 H3K9me3의 메틸화를 억제함으로써 SCNT의 효율을 개선하기 위한 두 가지 방법을 입증하였다. 따라서, 본 발명은 후성적 장벽을 제거하고 SCNT의 효율을 증가시키기 위하여 H3K9me3 히스톤 디메틸라제 활성화제, 예를 들어, Kdm4/Jmjd2 패밀리의 활성화제 및/또는 H3K9me3 메틸트랜스퍼라제 억제제, 예를 들어, Suv39h1 또는 Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제를 포함하는 방법, 조성물 및 키트에 관한 것이다. 이것은 공여체 체세포(예를 들어, 세포질 또는 핵에서) 및/또는 수용체 난모세포에서(예를 들어, 유핵 또는 제핵 난모세포) 및/또는 SCNT 배아(예를 들어, 5hpa, 또는 10-12hpa, 또는 20-28hpa, 1-세포 단계, 2-세포 단계 SCNT 배아) 중 어느 하나에서 이루어질 수 있다.

[0051] 따라서, 본 발명의 양태는 (i) H3K9me3을 탈메틸화할 수 있는 히스톤 디메틸라제, 예를 들어, 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 구성원, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 Jmjd2b/Kdm4b 또는 Jmjd2a/Kdm4a, 또는 Jmjd2c/Kdm4c 또는 Jmjd2d/Kdm4d를 발현시키거나 및/또는 (ii) H3K9me3의 메틸화에 관련되는 히스톤 메틸트랜스퍼라제의 억제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 중 어느 하나 또는 조합의 억제에 의해 H3K9me3 메틸화를 감소시킴으로써 SCNT 효율을 증가시키는 방법, 조성물 및 키트에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제는 Kdm4d (Jmjd2d), Kdm4c(Jmjd2c), Kdm4b(Jmjd2b) 또는 Kdm4a(Jmjd2a)의 발현 또는 활성을 증가시킨다.

[0052] 다른 양태는 제거되거나 생검되거나 및/또는 ES 세포(즉, ntESC)를 생성하기 위해 또는 비-인간 포유류의 생식적 복제를 위해 사용될 수 있는 하나 이상의 난할구로 발생시키기 위해 본 명세서에 개시된 방법과 조성물을 이용하여 생산된 SCNT-배아의 용도에 관한 것이다.

[0053] ***정의***

[0054] 편의상, 전체 출원(명세서, 실시예 및 청구의 범위 포함)에서 이용되는 소정의 용어들을 여기에 수집하였다. 달리 정의되지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0055] 또한 일반적으로 치료용 또는 생식적 복제로 불리는 어구 "체세포 핵 이식" 또는 "SCNT"는 체세포가 제핵 난모세포와 융합되는 과정이다. 체세포의 핵은 유전 정보를 제공하는 한편, 난모세포는 배아의 발생을 위해 필요한 영양분과 다른 에너지-생산 물질을 제공한다. 일단 융합이 일어나면, 세포는 전능성이며, 결국에는 배반포로 발생하고, 이 시점에 내세포 집단(inner cell mass)이 분리된다.

[0056] 본 명세서에 사용되는 용어 "핵 이식"(nuclear transfer)은 제핵 난모세포를 세포 핵 유전 물질 또는 체세포의 핵과 인공적으로 조합하여 동일한 특징과 품질을 획득할 수 있게 하는 유전자 조작 기술을 말한다. 일부 실시형태에서, 핵 이식 절차는 공여체 체세포로부터의 핵 또는 핵 유전 물질이 제핵 난자 또는 난모세포(핵/전핵이 제

거된 난자 또는 난모세포) 내로 이식되는 것이다. 공여체 핵은 체세포로부터 유래될 수 있다.

[0057] 용어 "핵 유전 물질"은 개체에 대한 정보를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, DNA)를 포함하는, 핵에서 발견되는 구조 및/또는 분자를 말한다. 핵 유전 물질은 염색체 및 염색질을 포함한다. 이 용어는 또한 모 세포의 딸 세포로의 분열과 같은 세포 분열에 의해 생산된 핵 유전 물질(예를 들어, 염색체)를 말한다. 핵 유전 물질은 미토콘드리아 DNA를 포함하지 않는다.

[0058] 용어 "SCNT 배아"는 체세포의 핵 또는 핵 유전 물질과 융합된 제핵 난모세포의 세포 또는 그의 전능성 자손을 말한다. SCNT 배아는 배반포로 발생하고 착상후 살아있는 자손으로 발생할 수 있다. SCNT 배아는 1-세포 배아, 2-세포 배아, 4-세포 배아, 또는 배반포가 되기 이전의 임의의 단계 배아일 수 있다.

[0059] 용어 "모(parental) 배아"는 단일 난할구가 제거되거나 생검된 SCNT 배아를 지칭하기 위해 이용된다. 생검 후, 나머지 모 배아(모 배아 - 생검된 난할구)는 난할구와 배양되어 난할구 증식의 촉진을 도울 수 있다. 나머지 생존가능한 모 SCNT 배아는 후속하여 장기간 또는 계속 저장을 위해 또는 미래 사용을 위해 동결될 수 있다. 대안적으로, 생존가능한 모 배아는 임신을 생성하기 위하여 이용될 수 있다.

[0060] 용어 "공여체 포유류 세포" 또는 "공여체 포유류 체세포"는 핵 수용자 또는 수용체로서의 수용체 난모세포내로 이식되는 체세포 또는 세포의 핵을 말한다.

[0061] 용어 "체세포"는 생식 세포 또는 생식 세포 전구체가 아닌 식물 또는 동물 세포를 말한다. 일부 실시형태에서, 분화된 세포는 배 세포(germ cell)가 아니다. 체세포는 다능성 또는 전능성 세포에 관한 것이 아니다. 일부 실시형태에서, 체세포는 "비-배아 체세포"이며, 이는 배아에 존재하지 않거나 배아로부터 수득되지 않으며 그러한 세포의 인비트로 증식으로부터 생성되지 않는 체세포를 의미한다. 일부 실시형태에서, 체세포는 "성체 체세포"이며, 이는 배아 또는 태아가 아닌 다른 유기체에 존재하거나 이로부터 수득되거나 인비트로에서 그러한 세포의 증식으로부터 생성되는 세포를 의미한다.

[0062] 본 명세서에서 사용되는 용어 "분화된 세포"는 체세포 계통으로 분화하는 과정에 있거나 최종 분화된 임의의 세포를 말한다. 예를 들어, 배아 세포는 장 내벽의 상피 세포로 분화할 수 있다. 분화된 세포는 예를 들어, 태아 또는 살아서 태어난 동물로부터 분리될 수 있다.

[0063] 세포 개체발생의 맥락에서, 부사 "분화된" 또는 "분화하는"은 "분화된 세포"가 그것이 비교되는 세포보다 발생 경로에서 더 아래로 진행한 세포임을 의미하는 상대적 용어이다. 따라서, 줄기 세포는 계통-한정 전구체 세포(예를 들어, 중배엽 줄기 세포)로 분화할 수 있으며, 전구체 세포는 경로상의 더 아래의 다른 타입의 전구체 세포(예를 들어, 심근세포 전구체)로 분화하고 이어서 최종-단계 분화된 세포로 분화할 수 있으며, 최종-단계 분화된 세포는 소정의 조직 타입에서 특징적인 역할을 하며 추가로 증식하는 능력을 보유하거나 보유하지 않을 수 있다.

[0064] 본 명세서에서 사용되는 용어 "난모세포"는 감수분열의 중기 II에 도달한 성숙한 난모세포를 말한다. 난모세포는 또한 생식에 관련된 암컷 배우자또는 배세포를 설명하기 위해 사용되며, 일반적으로 또한 난자로 불린다. 성숙한 난자는 한 세트의 모계 염색체(23, 인간 영장류에서 X)를 가지며 중기 II에서 중단된다. "하이브리드" 난모세포는 첫번째 영장류 난모세포("수용체"로 불림)로부터의 세포질을 갖지만 수용체의 핵 유전 물질을 갖지 않으며; "공여체"로 불리는 다른 난모세포로부터의 핵 유전 물질을 갖는다.

[0065] 본 명세서에서 사용되는 용어 "제핵 난모세포"는 그 핵이 제거된 난모세포를 말한다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 용어 "수용체 포유류 난모세포"는 그 원래 핵을 제거한 후 포유류 핵 공여체 세포로부터의 핵을 수용하는 포유류 난모세포를 말한다.

[0067] 본 명세서에서 사용되는 용어 "융합"은 핵 공여체 세포와 수용체 난모세포의 지질 막의 조합을 말한다. 예를 들어, 지질 막은 세포의 원형질막 또는 핵 막일 수 있다. 융합은 핵 공여체 세포와 수용체 난모세포가 서로 인접하게 위치되거나 핵 공여체 세포가 수용체 난모세포의 위란강내에 위치될 때 그들 사이에 전기 자극이 적용되면 일어날 수 있다.

[0068] 본 명세서에서 사용되는 용어 "활성화"는 핵 이식 이전, 그동안 또는 그 후에, 세포가 분열하도록 자극되는 것을 말한다. 바람직하게는, 본 발명에서, 활성화는 핵 이식 후 세포가 분열하도록 자극되는 것을 의미한다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는 용어 "살아있는 자손"은 자궁 밖에서 생존할 수 있는 동물을 의미한다. 바람직하게는, 1초, 1분, 1일, 1주, 1개월, 6개월 또는 1년 초과 동안 생존할 수 있는 동물이다. 동물은 생존을 위해 자궁내

환경을 요구하지 않을 수 있다.

[0070] 용어 "출생전"은 출생 이전에 존재하거나 일어남을 말한다. 유사하게, 용어"출생후"는 출생 후 존재하거나 일어남이다.

[0071] 본 명세서에서 사용되는 용어 "배반포"는 약 30-150 세포의 태반 포유류(마우스에서는 수정 후 약 3일, 인간에서는 수정 후 약 5일)의 착상전 배아를 말한다. 배반포 단계는 상실기에 이어지며, 그의 독특한 형태에 의해 구별될 수 있다. 배반포는 세포층(영양외배엽), 유체-충전 강(할강 또는 배반포 강) 및 내부의 세포 집단(내세포 집단 또는 ICM)으로 구성된 구로 이루어진다. 미분화 세포로 이루어진 ICM은 배반포가 자궁내에 착상되면 태아가 될 것이 생기게 한다. 이들 동일한 ICM 세포는, 배양액에서 성장하면, 배아 줄기 세포주가 될 수 있다. 착상시에는, 마우스 배반포는 약 70 영양아층 세포 및 30 ICM 세포로 구성된다.

[0072] 본 명세서에서 사용되는 용어 "포배"는 할강으로 불리는 유체-충전 강을 둘러싸는 세포들의 중공 구로 이루어지는 배아의 발생에서의 초기 단계를 말한다. 용어 포배는 때로는 배반포와 상호교환적으로 사용된다.

[0073] 용어 "난할구"는 착상전 배아로부터 수득한 적어도 하나의 난할구(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 등)을 지칭하기 위해 전체적으로 사용된다. 용어 "둘 이상의 난할구의 집단"은 난할구의 *인 비트로* 배양 동안 생성된 세포를 지칭하기 위하여 "난할구-유도 증식물"과 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어, 난할구가 SCNT 배아로부터 수득되어 처음으로 배양된 후, 난할구는 일반적으로 적어도 한번 분할하여 둘 이상의 난할구의 집단을 생성한다(난할구-유도 증식물로도 알려짐). 집단은 배아 또는 태아 세포와 추가로 배양될 수 있다. 궁극적으로는, 난할구-유도 증식물은 계속 분할할 것이다. 이들 구조체로부터, ES 세포, 전능성 줄기(TS) 세포 및 부분적으로 분화된 세포 타입이 배양 방법의 과정에 걸쳐 발생할 것이다.

[0074] 본 명세서에서 사용되는 용어 "세포핵(karyoplast)"은 핵제거에 의해 세포로부터 수득되며 세포질과 원형질막의 좁은 테에 의해 둘러싸인 세포 핵을 말한다.

[0075] 본 명세서에서 사용되는 용어 "세포 커플릿(cell couplet)"은 융합 및/또는 활성화 이전의 제핵 난모세포와 체세포 또는 태아 세포핵을 말한다.

[0076] 본 명세서에서 사용되는 용어 "난할 패턴"은 매우 초기 배아에서의 세포가 분열하는 패턴을 말하며; 각 유기체종은 현미경하에서 관찰될 수 있는 특징적인 난할 패턴을 나타낸다. 특징적 패턴으로부터 벗어나는 것은 보통 배아가 비정상임을 나타내며, 따라서 난할 패턴은 배아의 착상전 스크리닝을 위한 기준으로 사용된다.

[0077] 본 명세서에서 사용되는 용어 "클론"은 DNA 분자, 세포, 조직, 기관 또는 전체 식물 또는 동물의 정확한 유전자 복제품 또는 다른 유기체와 동일한 핵 게놈을 가진 유기체를 말한다.

[0078] 본 명세서에서 사용되는 용어 "복제된(또는 복제)"는 다른 개체 단위와 동일한 유전자 세트를 갖는 새로운 개체 단위를 제조하기 위한 유전자 조작 기술을 말한다. 본 발명에서, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "복제된"은 세포, 배아 세포, 태아 세포 및/또는 동물 세포가 다른 세포, 배아 세포, 태아 세포, 분화된 세포 및/또는 동물 세포의 핵 DNA 서열과 실질적으로 유사하거나 동일한 핵 DNA 서열을 가짐을 의미한다. 용어 "실질적으로 유사한" 및 "동일한"은 본 명세서에서 개시된다. 복제된 SCNT 배아는 하나의 핵 이식으로부터 생길 수 있으며, 또는 대안적으로는, 복제된 SCNT 배아는 적어도 하나의 재-복제 단계를 포함하는 복제 과정으로부터 생길 수 있다.

[0079] 본 명세서에서 사용되는 용어 "트랜스제닉(transgenic) 유기체"는 다른 유기체로부터의 유전 물질이 실험적으로 전달되어 숙주가 그 염색체 조성에서 전달된 유전자의 유전 형질을 획득하는 유기체를 말한다.

[0080] 본 명세서에서 사용되는 용어 "배아 분할(splitting)"은 초기-단계 배아가 동일한 유전적 구성을 가진 둘 이상의 배아로 분리되어, 본질적으로 동일한 쌍둥이 또는 그 이상의 다태아(세쌍둥이, 네쌍둥이 등)를 생성하는 것을 말한다.

[0081] 본 명세서에서 사용되는 용어 "상실배"는 수정 후 3-4일의 착상전 배아를 말하며, 그때 상실배는 12-32 세포(난할구)로 구성된 고형 덩어리이다. 8-세포 단계 후, 착상전 배아의 세포는 서로 더욱 단단히 부착하기 시작하여, "밀집되게" 된다. 생성되는 배아는 오디와 유사하며 상실배(라틴어:morus= 오디)라고 불린다.

[0082] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "제핵"은 세포의 핵 물질이 제거되어 세포질만 남게 되는 과정을 말한다. 난자에 적용될 경우, 제핵은 핵 막에 의해 둘러싸이지 않은 모계 염색체의 제거를 말한다. 용어 "제핵 난모세포"는 핵 물질 또는 핵이 제거된 난모세포를 말한다.

[0083] 용어 "배아 줄기 세포"(ES 세포)는 세포주로서 연속 계대된 배반포 또는 상실배의 내세포 집단으로부터 유도된 다능성 세포를 말한다. ES 세포는 난자 세포와 정자 또는 DNA의 수정, 핵 이식, 예를 들어, SCNT, 단위생식 등으로부터 유도될 수 있다. 용어 "인간 배아 줄기 세포"(hES 세포)는 인간 ES 세포를 말한다. 용어 "ntESC"는 SCNT로부터 생산된 배반포 또는 상실배의 내세포 집단으로부터 수득한 배아 줄기 세포를 말한다. ESC의 생성은 미국 특허 5843780호, 6200806호에 개시되며, 체세포 핵 이식으로부터 유도된 배반포의 내세포 집단으로부터 수득한 ESC는 미국 특허 5945577호, 5994619호, 6235970호에 개시되며, 이들의 전문은 본 명세서에서 참고로 포함된다. 배아 줄기 세포의 구별되는 특징은 배아 줄기 세포 표현형을 정의한다. 따라서, 세포는 배아 줄기 세포의 독특한 특징 중 하나 이상을 보유하여 그 세포가 다른 세포로부터 구별될 수 있다면, 그 세포는 배아 줄기 세포의 표현형을 갖는다. 예시적인 구별되는 배아 줄기 세포 특징은 제한없이 유전자 발현 프로파일, 증식 능력, 분화 능력, 핵형, 특정 배양 조건에 대한 반응 등을 포함한다.

[0084] 본 명세서에서 사용되는 용어 "다능성"은 상이한 조건하에서, 한가지 보다 많은 분화된 세포 타입으로 분화하며 바람직하게는 모든 세가지 배엽의 특징적인 세포 타입으로 분화하는 능력을 가진 세포를 말한다. 다능성 세포는 주로 그들이 예를 들어, 누드 마우스 기형종 형성 분석을 이용하여, 하나보다 많은 세포 타입, 바람직하게는 모든 세 배엽으로 분화하는 능력을 특징으로 한다. 그러한 세포는 hES 세포, 인간 배아-유래 세포(hEDC), 인간 SCNT-배아 유래 줄기 세포 및 성체-유래 줄기 세포를 포함한다. 다능성 줄기 세포는 유전적으로 변형되거나 유전적으로 변형되지 않을 수 있다. 유전적으로 변형된 세포는 그들의 확인을 촉진하기 위한 형광 단백질과 같은 마커를 포함할 수 있다. 다능성을 위한 바람직한 테스트는 세 가지 배엽의 각각의 세포로 분화하는 능력의 입증이지만, 다능성은 또한 배아 줄기(ES) 세포 마커의 발현에 의해 입증된다. 그러한 세포를 단순히 배양하는 것 자체가 그들을 다능성이 되게 하지는 않음을 주목해야 한다. 재프로그램된 다능성 세포(예를 들어, 그 용어가 본 명세서에서 정의된 바와 같은 iPS 세포)는 또한 일반적으로 배양에서 제한된 수의 분열 능력만을 가진 일차 세포 부모에 비하여, 성장 잠재력의 손실없이 계대 연장 능력의 특징을 갖는다.

[0085] SCNT 배아와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "전능성"은 살아서 태어난 동물로 발생할 수 있는 SCNT 배아를 말한다.

[0086] 본 명세서에서 사용되는 용어 "iPS 세포" 및 "유도된 다능성 줄기 세포"는 상호교환적으로 사용되며 비-다능성 세포, 전형적으로 성체 체세포로부터 예를 들어, 하나 이상의 유전자의 강제 발현을 유도함으로써 인공적으로 유도된(예를 들어, 유도되거나 완전한 역전에 의해) 다능성 줄기 세포를 말한다.

[0087] 본 명세서에서 사용되는 용어 "재프로그래밍"은 체세포의 분화 상태를 바꾸거나 역전시켜 핵의 발생 시계가 재설정되도록하는 과정을 말하며; 예를 들어, 성체 분화 세포 핵의 발생 상태를 재설정하여 초기 배아 세포 핵의 유전 프로그램을 수행할 수 있도록 하여 배아 발생에 필요한 모든 단백질을 제조하는 과정을 말한다. 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포는 SCNT에 의해 재프로그래밍 이전에 최종 분화된다. 본 명세서에서 개시된 대로 재프로그래밍은 체세포의 분화 상태를 다능성 또는 전능성 세포로 완전히 역전하는 것을 포함한다. 재프로그래밍은 일반적으로 접합자가 성체로 발생할 때 세포 분화 동안 일어나는 변화, 예를 들어, 핵산 변형의 유전성 패턴(예를 들어, 메틸화), 염색질 응축, 후성적 변화, 게놈 임프린팅 등 중 적어도 일부의 역전에 관련된다. 체세포 핵 이식(SCNT)에서, 수용체 난모세포 세포질의 성분은 체세포 핵이 배아 핵의 기능을 수행하도록 재프로그래밍함에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

[0088] SCNT 배아와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "배양"은 배양 배지내에 배아를 두는 것에 관련되는 실험 절차를 말한다. SCNT 배아는 SCNT 배아가 배지에서 정지상태이지만 기능성이도록 하거나 SCNT 배아가 배지에서 성장하도록 하기에 적절한 양의 시간 동안 배양 배지에 둘 수 있다. 배아를 배양하기에 적합한 배양 배지는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 1993년 5월 25일에 등록되고 발명의 명칭이 "소 배아의 인 비트로 배양(In vitro Culture of Bovine Embryos)"인 First et al.의 미국 특허 제5,213,979호 및 1992년 3월 17일에 등록되고 발명의 명칭이 "소 배아 배지(Bovine Embryo Medium)"인 Rosenkrans, Jr. et al.의 미국 특허 제5,096,822호를 참고하며, 모든 도면, 표 및 도안을 비롯한 그들 전체가 참고로 본원에 통합된다.

[0089] 용어 "배양 배지"는 "적합한 배지"와 상호교환적으로 사용되며 세포 증식을 허용하는 임의의 배지를 말한다. 적합한 배지는 최대 증식을 촉진할 필요가 없으며 단지 측정가능한 세포 증식을 촉진한다. 일부 실시형태에서, 배양 배지는 다능성 또는 전능성 상태에서 세포를 유지한다.

[0090] 본 명세서에서 개시된 SCNT 배아와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "착상"은 대리 암컷 동물을 본 명세서에 개시된 SCNT 배아로 임신시키는 것을 말한다. 이 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, Seidel and Elsden, 1997, Embryo Transfer in Dairy cattle, W. D. Hoard & Sons, Co., Hoards Dairyman를

참고한다. 배아는 자궁에서 발생하도록 할 수도 있으며, 대안적으로는, 태아를 분만 전에 자궁 환경으로부터 제거할 수 있다.

[0091] 본 명세서에서 사용되는 용어 "제제"는 소분자, 핵산, 폴리펩티드, 펩티드, 약물, 이온 등과 같은 그러나 이에 제한되지 않는 임의의 화합물 또는 물질을 의미한다. "제제"는 합성 및 자연-발생 단백질성 및 비-단백질성 물질을 제한없이 포함하는 임의의 화학적 물질 또는 모이어티(moiety)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제제는 단백질, 올리고뉴클레오티드, 리보자임, DNA자임, 당단백질, siRNA, 지질단백질, 앱타머 및 그의 변형 및 조합 등을 제한없이 포함하는, 핵산, 핵산 유사체, 단백질, 항체, 펩티드, 앱타머, 핵산 올리고머, 아미노산, 또는 탄수화물이다. 일부 실시형태에서, 제제는 화학적 모이어티를 가진 소분자이다. 예를 들어, 화학적 모이어티는 마크로리드, 렙토마이신 및 관련 천연 생성물 또는 그 유사체를 비롯한, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 방향족 또는 헤테로시클릴 모이어티를 포함한다. 화합물은 원하는 활성 및/또는 특성을 갖는 것으로 알려지거나 다양한 화합물 라이브러리로부터 선택될 수 있다.

[0092] 본 명세서에서 사용되는 용어 "접촉"(즉, 포유류 공여체 세포, 포유류 수용체 난모세포 또는 SCNT 배아를 제제와 접촉)은 제제와 세포, 난모세포 또는 SCNT-배아를 함께 *인 비트로*에서 인큐베이션하는 것(예를 들어, 배양액 또는 용기 내의 공여체 세포, 난모세포 또는 SCNT-배아에 제제를 추가하는 것)을 포함하는 것을 의도한다. 일부 실시형태에서, 용어 "접촉"은 개체에서 자연적으로 일어날 수 있는, 본 명세서에 개시된 제제에의 세포의 *인 비보* 노출(즉, 자연적인 생리학적 과정의 결과로서 일어날 수 있는 노출)을 포함하는 것을 의도하지 않는다. 포유류 공여체 세포, 포유류 수용체 난모세포 또는 SCNT 배아를 본 명세서에 개시된 제제와 접촉시키는 단계는 임의의 적합한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 포유류 공여체 세포, 포유류 수용체 난모세포 또는 SCNT 배아는 부착 배양 또는 현탁 배양으로 처리될 수 있다. 포유류 공여체 세포, 포유류 수용체 난모세포 또는 SCNT 배아는 본 명세서에 개시된 제제와 접촉될 수 있으며, 또한 세포를 안정화하기 위해 또는 세포를 추가로 분화시키기 위해 성장 인자 또는 다른 분화 제제 또는 환경과 같은 다른 제제와 동시에 또는 후속하여 접촉될 수 있다. 유사하게, 포유류 공여체 세포, 포유류 수용체 난모세포 또는 SCNT 배아는 본 명세서에 개시된 제제(예를 들어, Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제)와 접촉되고 이어서 본 명세서에 개시된 두번째 제제(예를 들어, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제)와 접촉되거나 그 역으로 접촉될 수 있다. 일부 실시형태에서, 포유류 공여체 세포, 포유류 수용체 난모세포, SCNT 배아는 본 명세서에 개시된 제제 및 본 명세서에 개시된 두번째 제제와 접촉되며 접촉은 시간적으로 분리된다. 일부 실시형태에서, 포유류 공여체 세포, 포유류 수용체 난모세포, SCNT 배아는 본 명세서에 개시된 하나 이상의 제제와 실질적으로 동시에 접촉된다(예를 들어, Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제 및 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제와 실질적으로 동시에 접촉된다).

[0093] 용어 "외인성"은 그 천연 공급원이 아닌 세포 또는 유기체에 존재하는 물질을 말한다. 예를 들어, 용어 "외인성 핵산" 또는 "외인성 단백질"은 사람의 손이 관련되는 과정에 의해 그것이 보통은 발견되지 않는 또는 그것이 더 낮은 양으로 발견되는 세포 또는 유기체와 같은 생물계내로 도입된 핵산 또는 단백질을 말한다. 물질이 세포 또는 그 물질을 물려주는 세포의 조상내로 도입되면 그 물질은 외인성으로 간주될 것이다. 대조적으로, 용어 "내인성"은 그 때에 생물계 또는 세포에 천연인 물질을 말한다. 예를 들어, "외인성 Kdm4d"는 그 때에 세포 또는 유기체에서 정상적으로는 발견되거나 발현되지 않는 Kdm4d mRNA 또는 cDNA의 도입을 말한다.

[0094] 용어 "발현"은 적용가능한 대로 RNA 및 단백질 생산에 관련된 세포 과정, 예를 들어, 전사, 번역, 폴딩(folding), 변형 및 프로세싱을 말한다. "발현 생성물"은 유전자로부터 전사된 RNA 및 유전자로부터 전사된 mRNA의 번역에 의해 수득된 폴리펩티드를 포함한다.

[0095] "유전적으로 변형된" 또는 "조작된" 세포는 외인성 핵산이 사람의 손에 관련된 과정에 의해 도입된 세포(또는 핵산의 적어도 일부를 물려받은 그러한 세포의 후손)을 말한다. 핵산은 예를 들어, 세포에 외인성인 서열을 함유할 수 있으며, 천연 서열(즉, 세포에서 자연적으로 발견되는 서열)을 비-자연 발생 배열로(예를 들어, 상이한 유전자로부터의 프로모터에 연결된 코딩 영역) 또는 천연 서열의 변화된 버젼 등을 함유할 수 있다. 핵산을 세포내로 전달하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 이루어질 수 있다. 적합한 기술은 인산칼슘 또는 지질-매개 형질감염, 전기천공 및 바이러스 벡터를 이용한 형질도입 또는 감염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 그 일부는 세포의 게놈 내로 도입된다. 핵산의 제거 또는 삭제가, 변형되지 않았지만 그외에는 동등한 세포에 비하여 세포에서 검출가능한 변화를 야기한다면, 핵산은 후속하여 게놈으로부터 제거되거나 삭제될 수 있다.

[0096] 용어 "동일성"은 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드의 서열이 동일한 정도를 말한다. 평가 윈도우에 대한, 예를 들어, 관심 서열의 길이에 대한, 관심 서열과 두번째 서열 사이의 퍼센트 동일성은 서열을 배열하고, 동일성을

최대화하기 위한 갭의 도입을 허용하는 동일한 잔기 맞은편의 평가 윈도우 내의 잔기 수(뉴클레오티드 또는 아미노산)를 결정하고, 윈도우 내에 해당하는 관심 서열 또는 두번째 서열(어느 것이든 더 큰 것)의 잔기 총 수로 나누고, 100을 곱하여 계산할 수 있다. 특정 퍼센트 동일성을 이루기 위해 필요한 동일한 잔기의 수를 계산할 때, 분수는 반올림된다. 퍼센트 동일성은 본 기술분야에 알려진 다양한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 계산될 수 있다. 예를 들어, BLAST2, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST, 등과 같은 컴퓨터 프로그램은 배열을 생성하고 관심 서열들 간의 퍼센트 동일성을 제공한다. Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993에서처럼 변형된 Karlin과 Altschul의 알고리즘 (Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:22264-2268, 1990)이 Altschul et al. (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램내로 통합된다. 비교 목적을 위한 갭을 가진 배열을 얻기 위하여, Altschul et al. (Altschul, et al. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997)에서 개시된 대로 Gapped BLAST가 이용된다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 경우, 각 프로그램의 디폴트 파라미터가 이용될 수 있다. PAM250 또는 BLOSUM62 매트릭스가 이용될 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생물공학 정보센터(the National Center for Biotechnology Information)(NCBI)를 통해 공중이 입수가능하다. 이들 프로그램을 위해서는 URL www.ncbi.nlm.nih.gov의 웹사이트를 참고한다. 구체적 실시형태에서, 퍼센트 동일성은 NCBI에 의해 제공되는 디폴트 파라미터로 BLAST2를 이용하여 계산된다. 일부 실시형태에서, 핵산 또는 아미노산 서열은 그 핵산 또는 아미노산 서열에 적어도 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0097] 본 명세서에서 사용되는 용어 "분리된" 또는 "부분 정제된"은 핵산 또는 폴리펩티드의 경우, 천연 공급원에서 발견되는 핵산 또는 폴리펩티드에서 존재하는 및/또는 세포에 의해 발현되거나 분비 폴리펩티드의 경우에는 분비된 핵산 또는 폴리펩티드에서 존재할, 적어도 하나의 다른 성분(예를 들어, 핵산 또는 폴리펩티드)으로부터 분리된 핵산 또는 폴리펩티드를 말한다. 화학적으로 합성된 핵산 또는 폴리펩티드 또는 인비트로 전사/번역을 이용하여 합성된 것은 "분리된" 것으로 간주된다. "분리된 세포"는 그것이 원래 발견된 유기체로부터 제거된 세포이거나 또는 그러한 세포의 후손이다. 선택적으로 세포는 인 비트로에서, 예를 들어, 다른 세포의 존재하에서 배양되었다. 선택적으로 세포는 두번째 유기체 내로 나중에 도입되거나 그 세포(또는 그 세포가 전해내려진 세포)가 분리되었던 유기체내로 재도입된다.

[0098] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 분리된 세포 집단과 관련하여 용어 "분리된 집단"은 혼합 또는 이질성 세포 집단으로부터 제거되고 분리된 세포 집단을 말한다. 일부 실시형태에서, 분리된 집단은 세포가 그로부터 분리되거나 농축된 이질성 집단에 비교할 때 실질적으로 순수한 세포 집단이다.

[0099] 특정 세포 집단과 관련하여, 용어 "실질적으로 순수한"은 전체 세포 집단을 구성하는 세포에 대하여, 적어도 약 75%, 바람직하게는 적어도 약 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90%, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 약 95% 순수한 세포 집단을 말한다. 재구성하면, 완성 내배엽(definitive endoderm) 세포 집단과 관련하여, 용어 "실질적으로 순수한" 또는 "본질적으로 정제된"은 본 명세서에서 그 용어에 의해 정의된 대로 완성 내배엽 세포 또는 그들의 후손이 아닌 세포를 약 20% 미만, 더욱 바람직하게는 약 15% 미만, 10%, 8%, 7%, 가장 바람직하게는 약 5% 미만, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 1% 미만 함유하는 세포 집단을 말한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 완성 내배엽 세포 집단을 확장하기 위한 방법을 포함하며, 완성 내배엽 세포의 확장된 집단은 완성 내배엽 세포의 실질적으로 순수한 집단이다. 유사하게, SCNT-유도 줄기 세포 또는 다능성 줄기 세포의 "실질적으로 순수한" 또는 "본질적으로 정제된" 집단은 본 명세서의 용어에 의해 정의된 줄기 세포 또는 그들의 자손이 아닌 세포를 약 20% 미만, 더욱 바람직하게는 약 15% 미만, 10%, 8%, 7%, 가장 바람직하게는 약 5% 미만, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 1% 미만 함유하는 세포 집단을 말한다.

[0100] 용어 "농축" 또는 "농축된"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며 한 가지 타입의 세포의 수율(분율)이 출발 배양물 또는 제제 내의 그 타입의 세포의 분율에 비하여 적어도 10%만큼 증가됨을 의미한다.

[0101] 용어 "재생" 또는 "자기-재생" 또는 "증식"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 줄기 세포가 장기간 및/또는 수개월에서 수년에 걸쳐 동일한 비-특화된 세포 타입으로 분열함으로써 스스로를 재생하는 능력을 칭하기 위해 사용된다. 일부 경우에, 증식은 단일 세포가 두 개의 동일한 딸 세포로 반복 분열하여 세포가 확장하는 것을 말한다.

[0102] 본 명세서에서 사용되는 용어 "계통"은 공통된 조상을 가진 세포 또는 공통된 발생 운명을 가진 세포를 설명한다. 내배엽 기원이거나 "내배엽 계통"인 세포의 맥락에서, 이것은 세포가 내배엽 세포로부터 유래되었으며 내배엽 계통 제한 경로, 예를 들어, 완성 내배엽 세포를 생성하고 이 세포는 간세포, 흉선, 췌장, 폐 및 장으로 분

화할 수 있는 하나 이상의 발생 계통 경로를 따라 분화할 수 있음을 의미한다.

[0103] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이종발생성"은 상이한 종으로부터 유래된 세포를 말한다.

[0104] 본 명세서에서 사용되는 용어 "마커"는 세포의 특징 및/또는 표현형을 설명하기 위해 사용된다. 마커는 관심 특징을 포함하는 세포의 선별을 위해 사용될 수 있다. 마커는 구체적 세포에 따라 변할 것이다. 마커는 특징이며, 구체적 세포 타입의 세포의 형태적, 기능적 또는 생화학적(효소적) 특징 또는 그 세포 타입에 의해 발현된 분자이다. 바람직하게는 그러한 마커는 단백질이며, 더욱 바람직하게는 본 기술분야에서 이용가능한 항체 또는 다른 결합 분자를 위한 에피토프를 보유한다. 하지만, 마커는 단백질(펩티드 및 폴리펩티드), 지질, 다당류, 핵산 및 스테로이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 세포에서 발견되는 임의의 분자로 이루어질 수 있다. 형태적 특징 또는 형질의 예는 모양, 크기 및 핵 대 세포질 비율을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 기능적 특징 또는 형질의 예는 특정 기질에 부착하는 능력, 특정 염료를 통합하거나 배제하는 능력, 특정 조건하에서 이동하는 능력 및 특정 계통을 따라 분화하는 능력을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 마커는 당업자에게 이용가능한 임의의 방법에 의해 검출될 수 있다. 마커는 또한 형태적 특징의 부재 또는 단백질, 지질 등의 부재일 수 있다. 마커는 폴리펩티드 및 다른 형태적 특징의 존재 및 부재의 독특한 특징들의 패널의 조합일 수 있다.

[0105] 용어 "조절하다"는 본 기술분야에서의 그 사용과 일치하게 사용되며, 즉, 관심 과정, 경로 또는 현상에서 정성적 또는 정량적 변화, 변경 또는 변형을 야기하거나 촉진함을 의미한다. 제한없이, 그러한 변화는 과정, 경로 또는 현상의 상이한 성분 또는 지선의 상대적 강도 또는 활성에서의 증가, 감소 또는 변화일 수 있다. "조절제"는 관심 과정, 경로 또는 현상에서 정성적 또는 정량적 변화, 변경 또는 변형을 야기하거나 촉진하는 제제이다.

[0106] 용어 "RNA 간섭" 또는 "RNAi"는 이중쇄 RNA(dsRNA)가 dsRNA의 쇄에 상보성을 갖는 상응하는 mRNA의 서열-특이적 분해 또는 번역 억제를 유발하는 현상을 칭하기 위하여 본 기술분야에서의 그 의미와 일치되게 본 명세서에서 사용된다. dsRNA 쇄와 mRNA 사이의 상보성이 100%일 필요는 없지만 유전자 발현의 억제(또한 "사일런싱(silencing)" 또는 "넉다운"으로 불림)를 매개하기에 충분하기만 하면 됨이 이해될 것이다. 예를 들어, 상보성 정도는 쇄가 (i) RNA-유도된 사일런싱 복합체(RISC)에서 mRNA의 절단을 가이드할 수 있거나 (ii) mRNA의 번역 억제를 야기할 수 있도록 하는 것이다. 일부 실시형태에서, RNA의 이중쇄 부분은 약 30 뉴클레오티드 미만 길이이며, 예를 들어, 17 내지 29 뉴클레오티드 길이이다. 포유류 세포에서, RNAi는 적합한 이중쇄 핵산을 세포 내로 도입하거나 핵산을 세포에서 발현시키고 이어서 세포내에서 프로세싱하여 그안에서 dsRNA를 생성함으로써 이루어질 수 있다. RNAi를 매개할 수 있는 핵산은 본 명세서에서 "RNAi 제제"로 불린다. RNAi를 매개할 수 있는 예시적인 핵산은 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 짧은 간섭 RNA(siRNA) 및 마이크로RNA 전구체이다. 이들 용어는 잘 알려져 있으며 본 기술분야에서의 그들의 의미와 일치하게 본 명세서에서 사용된다. siRNA는 전형적으로 서로 하이브리드화하여 듀플렉스(duplex)를 형성하는 두 개의 별도의 핵산을 포함한다. 그들은 예를 들어, 표준 핵산 합성 기술을 이용하여 인 비트로에서 합성될 수 있다. 그들은 매우 다양한 변형된 뉴클레오시드, 뉴클레오시드 유사체를 포함할 수 있으며 화학적으로 또는 생물학적으로 변형된 염기, 변형된 백본 등을 포함할 수 있다. 본 기술분야에서 RNAi를 위해 유용한 것으로 인식되는 임의의 변형이 이용될 수 있다. 일부 변형은 안정성, 세포 흡수, 성능 등의 증가를 야기한다. 일부 실시형태에서, siRNA는 약 19 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 및 데옥시리보뉴클레오티드로 구성될 수 있는 1-5 뉴클레오티드 길이의 3' 오버행(오버행) 하나 또는 둘을 포함한다. shRNA는 주로 비-자가상보성 영역에 의해 분리된 두 개의 상보성 부분을 함유하는 하나의 핵산 쇄를 포함한다. 상보성 부분은 하이브리드화하여 듀플렉스 구조를 형성하며 비-자가상보성 영역은 듀플렉스의 하나의 쇄의 3' 말단과 다른 쇄의 5' 말단을 연결하는 루프를 형성한다. shRNA는 세포내 프로세싱을 거쳐서 siRNA를 생성한다.

[0107] 용어 "선별가능한 마커"는 발현될 경우, 세포독성 또는 세포증식억제성 제제에 대한 내성(예를 들어, 항생제 내성), 영양 원영양성 또는 그 단백질을 발현하는 세포를 그렇지 않은 세포로부터 구별하기 위한 기초로 사용될 수 있는 특정 단백질의 발현과 같은, 선별가능한 표현형을 세포에 부여하는 유전자, RNA 또는 단백질을 말한다. 형광 또는 발광 단백질 또는 착색, 형광 또는 발광 물질("검출가능한 마커")을 생산하기 위해 기질에 작용하는 효소와 같은, 그 발현이 쉽게 검출될 수 있는 단백질은 선별가능한 마커의 서브세트를 구성한다. 정상적으로는 다능성 세포에서 선별적으로 또는 배타적으로 발현되는 유전자에 천연인 발현 조절 요소에 연결된 선별가능한 마커의 존재는 다능성 상태로 재프로그램된 체세포를 확인하고 선별하는 것을 가능하게 한다. 네오마이신 내성 유전자(neo), 퓨로마이신 내성 유전자(puro), 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(gpt), 다이하이드로폴레이트 환원효소(DHFR), 아데노신 디아미나제(ada), 퓨로마이신-N-아세틸트랜스퍼라제(PAC), 하이그로마이신 내성 유전자(hyg), 다중약물 내성 유전자(mdr), 티미딘 키나제(TK), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT) 및 hisD 유전자와 같은 다양한 선별가능한 마커 유전자가 사용될 수 있다. 검출가능한 마커는 녹색 형광 단백질

(GFP), 청색, 사파이어색, 황색, 적색, 오렌지색 및 청록색 형광 단백질 및 이들중 어느 하나의 변이체를 포함한다. 루시퍼라제(예를 들어, 반딧불이 또는 레닐라(Renilla) 루시퍼라제)와 같은 발광 단백질 또한 사용가능하다. 당업자에게 자명할 것처럼, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 "선별가능한 마커"는 유전자 또는 그 유전자의 발현 생성물, 예를 들어, 인코딩된 단백질을 지칭할 수 있다.

[0108] 용어 "소분자"는 다수의 탄소-탄소 결합을 가지며 분자량이 1500 달톤 미만인 유기 화합물을 말한다. 전형적으로 그러한 화합물은 단백질과의 구조적 상호작용, 예를 들어, 수소 결합을 매개하는 하나 이상의 기능성 기를 포함하며, 전형적으로 적어도 아민, 카르보닐, 하이드록실 또는 카르복실 기를 포함하며, 일부 실시형태에서 적어도 두 개의 기능성 화학 기를 포함한다. 소분자 제제는 사이클릭 탄소 또는 헤테로사이클릭 구조 및/또는 하나 이상의 화학 기능성 기 및/또는 헤테로원자로 치환된 방향족 또는 다중방향족 구조를 포함할 수 있다.

[0109] 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리펩티드"는 아미노산의 중합체를 말한다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 펩티드는 전형적으로 길이가 2 내지 60 아미노산인, 상대적으로 짧은 폴리펩티드이다. 본 명세서에서 사용되는 폴리펩티드는 전형적으로 단백질에서 가장 일반적으로 발견되는 20 L-아미노산과 같은 아미노산을 함유한다. 하지만, 본 기술분야에 알려진 다른 아미노산 및/또는 아미노산 유사체가 사용될 수 있다. 폴리펩티드 내의 하나 이상의 아미노산은 예를 들어, 탄수화물기, 포스페이트기, 지방산기, 접합을 위한 링커, 관능화 등과 같은 화학 물질의 추가에 의해 변형될 수 있다. 공유적으로 또는 비-공유적으로 연합된 비-폴리펩티드 모이어티를 가진 폴리펩티드 또한 "폴리펩티드"로 간주된다. 예시적인 변형은 당화 및 팔미토일화를 포함한다. 폴리펩티드는 천연 공급원으로부터 정제되거나, 재조합 DNA 기술을 이용하여 생산되거나, 종래의 고체상 펩티드 합성 등과 같은 화학적 수단을 통해 합성될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리펩티드 서열" 또는 "아미노산 서열"은 폴리펩티드 물질 자체 및/또는 폴리펩티드를 생화학적으로 특징짓는 서열 정보(즉, 아미노산 명칭을 위한 약자로서 사용되는 문자 또는 삼문자 코드의 연속)를 말할 수 있다. 본 명세서에서 제시되는 폴리펩티드 서열은 달리 표시되지 않으면 N-말단에서 C-말단 방향으로 제시된다.

[0110] 폴리펩티드 또는 핵산 서열을 지칭할 때 용어 "변이체"는 예를 들어, 전체 길이 폴리펩티드 또는 핵산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 또는 핵산 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, 변이체는 전체 길이 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, 변이체는 자연 발생 스플라이스(splice) 변이체일 수 있다. 변이체는 전체 길이 폴리펩티드 또는 전체 길이 핵산 서열의 적어도 50% 길이의 단편에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 또는 핵산 서열일 수 있으며, 이때 단편은 관심 활성을 가진 전체 길이 야생형 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 길이이다. 예를 들어, Kdm4d의 변이체는 SCNT의 효율을 Kdm4d 폴리펩티드 또는 Kdm4d 핵산 서열과 비교할 때 동일하거나 유사한 정도로 증가시키는 능력을 가진다.

[0111] 용어 "기능성 단편" 또는 "생물학적 활성 단편"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 그 단편이 유래된 폴리펩티드보다 크기가 작은 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드를 지칭하며, 기능성 단편 폴리펩티드는 그 단편이 유래한 폴리펩티드의 생물학적 작용의 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100%보다 큰, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과의 동일한 생물학적 작용을 갖는다. 기능성 단편 폴리펩티드는 항원성 감소, DNA 결합 증가(전사 인자에서처럼) 또는 RNA 결합 변화(RNA 안정성 또는 분해 조절에서처럼)를 포함할 수 있는 추가의 기능을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 생물학적 활성 단편은 그 단편이 유래한 폴리펩티드와 실질적으로 상동성이다. 이론에 구애됨 없이, Kdm4d의 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제의 기능성 단편의 예시적인 예는 서열번호 55의 단편(예를 들어, 단편은 서열번호 55의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 길이임)을 포함하며, 상기 단편은 동일한 방법을 동일한 조건하에서 이용하여, 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 Kdm4d 폴리펩티드에 비교할 때 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100%보다 큰, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 보다 큰 SCNT 효율 증가 능력을 가진다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 Antony *et al.*, Nature, 2013에 개시된 바처럼, 서열번호 55의 아미노산 1-424 을 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 55의 아미노산 1-424의 C-말단 또는 N-말단에서 또한 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50, 또는 적어도 50-100 아미노산이 결핍된 서열번호 55의 아미노산 1-424를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 55의 아미노산 1-424 의 C-말단 및 N-말단 둘 모두에서 또한 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50, 또는 적어도 50-100 아미노산이 결핍된 서열번호 55의 아미노산 1-424를 포함한다.

[0112] 핵산 서열과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "기능성 단편" 또는 "생물학적 활성 단편"은 그 단편이 유

래된 핵산 서열보다 크기가 작은 핵산 서열을 말하며, 이 핵산 서열은 이 단편이 유래된 생물학적 활성 단편의 생물학적 작용의 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100%보다 큰, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과의 동일한 생물학적 작용을 갖는다. 이론에 제한되지 않고, Kdm4d의 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제의 핵산 서열의 기능성 단편의 예시적인 예는 서열번호 1의 단편(예를 들어, 단편은 서열번호 1의 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 길이임)을 포함하며 이 단편은 동일한 방법을 동일한 조건하에서 이용하여, 서열번호 1의 Kdm4d 핵산 서열에 비교할 때 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100%보다 큰, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 보다 큰 SCNT 효율 증가 능력을 가진다.

[0113] 분리된 세포에 적용될 때, 용어 "처리하다", "처리하는", "처리", 등은 세포에서 임의의 종류의 조작 또는 절차를 수행하거나 세포를 임의의 종류의 과정 또는 조건에 처하게 하는 것을 포함한다. 개체에 적용될 경우, 이 용어는 개체에 의료적 또는 외과적 주의, 보호 또는 관리를 제공하는 것을 말한다. 개체는 보통 아프거나(질병 또는 의료적/외과적 주의를 요구하는 다른 질환을 앓고 있음) 부상당하거나 또는 집단 내의 평균 구성원에 비하여 아플 위험이 증가되고 그러한 주의, 보호 또는 관리를 필요로 한다. "개체"는 본 명세서에서 "대상"과 상호교환적으로 사용된다. 본 발명의 임의의 실시형태에서, "개체"는 인간, 예를 들어, 세포 치료법이 이용되는("적응된") 질병을 앓고 있거나 그 위험이 있는 인간이다.

[0114] 성주기와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "동기화된(synchronized)" 또는 "동기적"은 당업자에게 잘 알려진 보조 생식술을 말한다. 이들 기술은 이전 문단에서 인용된 참고문헌에서 완전히 개시된다. 전형적으로, 에스트로겐 및 프로게스테론 호르몬이 암컷 동물의 성주기를 배아의 발생 사이클과 동기화하기 위하여 이용된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "발생 사이클"은 본 발명의 배아 및 배아 내의 각 세포 분열 사이에 존재하는 기간을 말한다. 이 기간은 배아에 대해 예측가능하며, 수용체 동물의 성주기와 동기화될 수 있다.

[0115] 핵 DNA 서열과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "실질적으로 유사한"은 거의 동일한 두 가지 핵 DNA 서열을 말한다. 두 서열은 핵 DNA의 복제 동안 정상적으로 일어나는 카피 에러 차이만큼 상이할 수 있다. 실질적으로 유사한 DNA 서열은 바람직하게는 97% 보다 더 동일하며, 더욱 바람직하게는 98% 보다 더 동일하며, 가장 바람직하게는 99%보다 더 동일하다. 동일성은 두 서열에서 동일한 잔기의 수를 잔기의 총 수로 나누고 그 결과에 100을 곱하여 측정한다. 따라서, 정확히 동일한 서열의 두 카피는 100% 동일성을 갖는 한편, 덜 보존되며 결실, 부가 또는 치환을 가진 서열들은 동일성 정도가 더 낮다. 당업자는 몇몇 컴퓨터 프로그램이 서열 비교를 수행하기 위하여 그리고 서열 동일성을 결정하기 위하여 이용가능함을 인식할 것이다.

[0116] 용어 "더 낮은", "감소된", "감소" 또는 "감소하다" 또는 "억제하다"는 모두 통계적으로 유의한 양만큼의 감소를 의미하기 위하여 일반적으로 본 명세서에서 사용된다. 하지만, 의심을 피하기 위하여, "더 낮은", "감소된", "감소" 또는 "감소하다" 또는 "억제하다"는 기준 수준에 비하여 적어도 10%만큼 감소, 예를 들어, 기준 수준에 비하여 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 감소 또는 최대 100% 감소(즉, 기준 샘플에 비하여 존재하지 않는 수준), 또는 10-100% 사이의 임의의 감소를 의미한다.

[0117] 용어 "증가된" ,"증가" 또는 "향상시키다" 또는 "활성화하다"는 모두 통계적으로 유의한 양만큼의 증가를 일반적으로 의미하기 위하여 본 명세서에서 사용되며; 어떤 의심도 피하기 위하여, 용어 "증가된", "증가" 또는 "향상시키다" 또는 "활성화하다"는 기준 수준에 비하여 적어도 10%의 증가, 예를 들어, 기준 수준에 비하여 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 또는 최대 100% 증가 또는 10-100% 사이의 임의의 증가, 또는 기준 수준에 비하여 적어도 약 2-배, 또는 적어도 약 3-배, 또는 적어도 약 4-배, 또는 적어도 약 5-배 또는 적어도 약 10-배 증가 또는 2-배 내지 10-배 이상 사이의 임의의 증가를 의미한다.

[0118] 용어 "통계적으로 유의한" 또는 "상당히"는 통계적 유의성을 말하며 일반적으로 마커의 정상(normal)보다 2 표준편차(2SD) 미만이거나 또는 더 낮은 농도를 의미한다. 이 용어는 차이가 있다는 통계적 증거를 말한다. 이것은 귀무 가설이 사실상 진실일 때 귀무 가설을 거절하는 결정을 내릴 확률로서 정의된다. 결정은 종종 p-값을 이용하여 이루어진다.

[0119] 본 명세서에서 사용되는 용어 "포함하는" 또는 "포함하다"는 본 발명에 필수적인 조성물, 방법 및 그 각 성분과 관련하여 사용되지만, 필수적이든 아니든 특정되지 않은 요소를 포함하는 개방형으로 사용된다.

[0120] 본 명세서에서 사용되는 용어 "본질적으로 이루어지는"은 소정의 실시형태를 위해 요구되는 요소들을 말한다.

이 용어는 본 발명의 그 실시형태의 기본적이고 신규한 또는 기능적 특징(들)에 크게 영향을 주지 않는 추가의 요소의 존재를 허용한다.

[0121] 용어 "이루어지는"은 실시형태의 설명에서 언급되지 않은 임의의 요소를 배제하는, 본 명세서에 개시된 조성물, 방법 및 그 각각의 성분을 말한다.

[0122] 본 명세서 및 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 및 정관사는 문맥이 명백하게 다르게 나타내지 않으면 복수를 지칭하는 것도 포함한다. 따라서, 예를 들어, "방법"에 대한 언급은 본 명세서에 개시된 및/또는 본 명세서 등을 읽으면 당업자에게 자명하게 되는 타입의 하나 이상의 방법 및/또는 단계들을 포함한다.

[0123] 전술한 상세한 설명 및 하기의 실시예는 단지 예시이며 본 발명의 범위에 대한 제한으로 간주되어서는 안된다는 것이 이해된다. 개시된 실시형태에 대한 다양한 변화와 변형은 당업자에게 자명한 것으로, 본 발명의 사상과 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있다. 또한, 확인된 모든 특허, 특허 출원 및 간행물은 예를 들어, 본 발명과 관련하여 이용될 수 있는 그러한 간행물에 개시된 방법의 설명과 개시의 목적을 위하여 명백하게 참고로 본원에 포함된다. 이들 간행물은 본 출원의 출원일 이전의 그들의 개시에 대해서만 제공된다. 이와 관련하여 어떤 것도 본 발명자들이 선행 발명에 의해 또는 임의의 다른 이유로 그러한 개시내용을 선행할 자격이 없음을 인정하는 것으로 이해되어서는 안된다. 날짜에 관한 모든 진술 또는 이들 문헌의 내용에 관한 표시는 출원인에게 이용가능한 정보에 기초하며 이들 문헌의 날짜 또는 내용의 정확성에 관한 어떤 인정을 구성하는 것이 아니다.

[0124] ***Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제***

[0125] 일 양태에서, 본 발명은 공여체 포유류 세포 또는 SCNT 배아 또는 난모세포의 핵 또는 세포질을 히스톤 메틸화를 억제하는, 구체적으로, H3K9 메틸화를 억제하는, 구체적으로, H3H9me3 트리메틸화를 억제하는 제제와 접촉시키는 것을 포함하는, SCNT의 효율을 증가시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 제제는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제이다.

[0126] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 방법, 조성물 및 키트에서 유용한 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리를 인코딩하는 유전자의 발현을 증가시키거나, 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리, 예를 들어, Kdm4a, Kdm4b, Kdm4c 또는 Kdm4d의 활성을 증가시키는 제제이다. 일부 실시형태에서, 제제는 Kdm4d(Jmjd2d) 또는 Kdm4a(Jmjd2a)의 발현 또는 활성을 증가시킨다.

[0127] 일부 실시형태에서, 제제는 다양한 상이한 포유류 종으로부터 선택된 Kdm4d의 핵산 서열, 예를 들어, 인간 KDM4D(서열번호 1), 마우스 Kdm4d(서열번호 2), 래트 Kdm4d(서열번호3), 토끼 Kdm4d(서열번호 4), 돼지 Kdm4d (서열번호 5), 소 Kdm4d (서열번호 6), 마카크 Kdm4d(서열번호 7), 및 침팬지 Kdm4d(서열번호 8)을 포함하거나, 또는 서열번호 1-8의 해당하는 서열과 비교할 때 SCNT의 효율을 유사하거나 더 큰 정도로 증가시키는, 그에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)의 그의 생물학적 활성 단편 또는 상동체 또는 변이체이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 서열번호 1에 해당하는 인간 KDM4D 핵산 서열, 또는 서열번호 1의 핵산 서열과 비교할 때 SCNT의 효율을 유사하거나 더 큰 정도로 증가시키는, 그의 생물학적 활성 단편을 포함한다.

[0128] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법, 조성물 및 키트에 유용한 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 KDM4A 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 제제 또는 KDM4A 폴리펩티드 또는 그의 변이체 또는 생물학적 활성 단편이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 인간 Kdm4a 뉴클레오티드 서열은 Genbank 수탁 번호NM_014663.2에 해당하며, 서열번호 49를 말한다. KDM4A는 또한 리신(K)-특이적 디메틸라제 4A, JMJD2, JMJD2A, "주몬지 도메인 함유 (jumonji domain containing) 2", 또는 "주몬지 도메인 함유 2A"로도 알려져 있다. 인간 KDM4A 단백질은 Genebank 수탁번호 NP_055478.2(서열번호 50)에 해당한다. 따라서, KDM4A의 단백질 서열은 다음과 같다:

MASESETLNPSARIMTFYPTMEEFRNFSRYIAYIESQGAHRAGL
AKVVPPKEWKPRASYDDIDDLVIPAPIQQLVTGQSGLFTQYNIQKKAMTVREFRKIAN
SDKYCTPRYSEFEELERKYWKNLTFNPPIYGADVNGTLYEKHVDEWNIGRLRTILDLV
EKESGITIEGVNTPYLYFGMWKTSFAWHTEDMDLYSINYLHFGEPKSWYSVPPEHGKR

[0129]

LERLAKGFFPGSAQSCEAFLRHKMTLISPLMLKKYGIPFDKVTQEAGEFMITFPYGYH
AGFNHGFNCAESTNFATRRWIEYGKQAVLCSCRKDMVKISMDVFVRKFQPERYKLWKA
GKDNTVIDHTLPTPEAAEFLKESELPPRAGNEEECPEEDMEGVEDGEEGDLKTSLAKH
RIGTKRHRVCLEIPQEVSQSELFPKEDLSSEQYEMTECPAALAPVRPTHSSVRQVEDG
LTFPDYSDSTEVKFEELKNVKLEEEDEEEEQAAAALDLSVNPASVGGRLVFSGSKKKS
SSSLGSGSSRDSISSDSETSEPLSCRAQGQTGVLTVHSYAKGDGRVTVGEPCTRKKGS
AARSFSERELAEVADEYMFSLEENKKSKGRRQPLSKLPRHHPLVLQECVSDDETSEQL
TPEEEAEETEAWAKPLSQLWQNRPPNFEAEKEFNETMAQQAPHCAVCMIFQTYHQVEF
GGFNQNCGNASDLAPQKQRTKPLIPEMCFTSTGCSTDINLSTPYLEEDGTSILVSCKK
CSVRVHASCYGVPPAKASEDWMCSRCSANALEEDCCLCSLRGGALQRANDDRWVHVSC
AVAILEARFVNIAERSPVDVSKIPLPRFKLKCIFCKKRRKRTAGCCVQCSHGRCPTAF
HVSCAQAAGVMMQPDDWPFVVFITCFRHKIPNLERAKGALQSITAGQKVISKHKNGRF
YQCEVVRLTTETFYEVNFDDGSFSDNLYPEDIVSQDCLQFGPPAEGEVVQVRWTDGQV
YGAKFVASHPIQMYQVEFEDGSQLVVKRDDVYTLDEELPKRVKSRLSVASDMRFNEIF
TEKEVKQEKKRQRVINSRYREDYIEPALYRAIME (서열번호 50)

[0130]

[0131] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법, 조성물 및 키트에 유용한 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 KDM4B 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 제제 또는 KDM4B 폴리펩티드 또는 그의 변이체 또는 생물학적 활성 단편이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 인간 KDM4B 핵산 서열은 Genebank 수탁번호 NM_015015.2에 해당하며, 본 명세서에서 개시된 서열번호 51을 말한다. KDM4B는 또한 리신(K)-특이적 디메틸라제 4B, JMJD2B 또는 "주몬지 도메인 함유 2B", KIAA0876, TDRD14B, 또는 "투도르 도메인 함유(tudor domain containing) 14B로 알려져 있다. 인간 KDM4B 단백질은 Genebank 수탁번호 NP_055830.1(서열번호 52)에 해당한다. 따라서, KDM4B 단백질의 서열은 다음과 같다:

MGSEDHGAQNPSCKIMTFRPTMEEFKDFNKYVAYIESQGAHRAG
LAKIIPPKEWKPRQTYDDIDDVVIPAPIQQVVTGQSGLFTQYNIQKKAMTVGEYRRLA
NSEKYCTPRHQDFDDLERKYWKNLTFVSPIYGADISGSLYDDDVAQWNIGSLRTILDM
VERECGTIIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYLHFGEPKSWYAIPPEHGK
RLERLAIGFFPGSSQGCDAFLRHKMTLISPIILKKYGIPFSRITQEAGEFMITFPYGY
HAGFNHGFNCAESTNFATLRWIDYGKVATQCTCRKDMVKISMDVFVRILQPERYELWK
QGKDLTVLDHTRPTALTSPELSSWSASRASLKAKLLRRSHRKRSQPKKPKPEDPKFPG
EGTAGAALLEEAGGSVKEEAGPEVDPEEEEEEPQPLPHGREAEGAEEDGRGKLRPTKA
KSERKKKSFGLLPPQLPPPPAHFPSEEALWLPSPLEPPVLGPGPAAMEESPLPAPLNV
VPPEVPSEELEAKPRPIIPMLYVVPRPGKAAFNQEHVSCQQAFEHFAQKGPTWKEPVS
PMELTGPEDGAASSGAGRMETKARAGEGQAPSTFSKLKMEIKKSRRHPLGRPPTRSPL
SVVKQEASSDEEASPFSGEEDVSDPDALRPLLSLQWKNRAASFQAERKFNAAAARTEP
YCAICTLFYPYCQALQTEKEAPIASLGEGCPATLPSKSRQKTRPLIPEMCFTSGGENT
EPLPANSYIGDDGTSPLIACGKCCLQVHASCYGIRPELVNEGWTCSRCAAHAWTAECC
LCNLRGGALQMTTDRRWIHVICAIAVPEARFLNVIERHPVDISAIPEQRWKLKCVYCR
KRMKKVSGACIQCSYEHCSTSFHVTCAHAAGVLMEPDDWPYVVSITCLKHKSGGHAVQ
LLRAVSLGQVVITKNRNGLYYRCRVIGAASQTCYEVNFDDGSYSDNLYPESITSRDCV
QLGPPSEGELVELRWTDGNLYKAKFISSVTSHIYQVEFEDGSQLTVKRGDIFTLEEEL
PKRVRSRLSLSTGAPQEPAFSGEEAKAAKRPRVGTPLATEDSGRSQDYVAFVESLLQV
QGRPGAPF (서열번호 52)

[0132]

[0133] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법, 조성물 및 키트에 유용한 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 KDM4C 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 제제 또는 KDM4C 폴리펩티드 또는 그의 변이체 또는 생물학적 활성 단편이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 인간 KDM4C 핵산 서열은 본 명세서에 개시된 Genebank 수탁번호 NM_015061.3(서열번호 53)에 해당한다. KDM4C는 또한 리신(K)-특이적 디메틸라제 4C, JMJD2C 또는 "주몬지 도메인 함유 2C" GASC1, KIAA0780, TDRD14C 또는 "투도르 도메인 함유 14C로 알려져 있다. 인간 KDM4C 단백질은 Genebank 수탁번호 NP_055876.2(서열번호 54)에 해당한다. 따라서, KDM4C의 단백질 서열은 다음과 같다:

MEVAEVESPLNPSCKIMTFRPSMEEFREFNKYLAYMESKGAHRA
GLAKVIPPKEWKPRQCYDDIDNLLIPAPIQQMVTGQSGLFTQYNIQKKAMTVKEFRQL
ANSGKYCTPRYLDYEDLERKYWKNLTFVAPIYGADINGSIYDEGVDEWNIARLNTVLD
VVEEECGISIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYLHFGEPKSWYAIPPEHG
KRLERLAQGFFPSSSQGCDAFLRHKMTLISPSVLKKYGIPFDKITQEAGEFMITFPYG
YHAGFNHGFNCAESTNFATVRWIDYGKVAKLCTCRKDMVKISMDIFVRKFQPDRYQLW
KQGKDIYTIDHTKPTPASTPEVKAWLQRRRKVRKASRSFQCARSTSKRPKADEEEEVS
DEVDGAEVPNPDSVTDDLKVSEKSEAAVKLRNTEASSEEESSASRMQVEQNLSDHIKL
SGNSCLSTSVTEDIKTEDDKAYAYRSVPSISSEADDSIPLSSGYEKPEKSDPSELSWP
KSPESCSSVAESNGVLTEGEESDVESHGNGLEPGEIPAVPSGERNSFKVPSIAEGENK
TSKSWRHPLSRPPARSPMTLVKQQAPSDEELPEVLSIEEEVEETESWAKPLIHLWQTK
SPNFAAEQEYNATVARMKPHCAICTLLMPYHKPDSSNEENDARWETKLDEVVTSEGKT
KPLIPEMCFIYSEENIEYSPPNAFLEEDGTSLLISCAKCCVRVHASCYGIPSHEICDG
WLCARCKRNAWTAECCLCNLRGGALKQTKNNKWAHVMCAVAVPEVRFTNVPERTQIDV
GRIPLQRLKLKCIFCRHRVKRVSGACIQCSYGRCPASFHVTCAHAAGVLMEPDDWPYV
VNITCFRHKVNPNVKSKACEKVISVGQTVITKHRNTRYYSCRVMAVTSQTFYEVMFDD
GSFSRDTFPEDIVSRDCLKLGPPAEGEVVQVKWPDGKLYGAKYFGSNIAHMYQVEFED
GSQIAMKREDIYTLDEELPKRVKARFSTASDMRFEDTFYGADIIQGERKRQRVLSSRF
KNEYVADPVYRTFLKSSFQKKCQKRQ (서열번호 54)

[0134]

[0135] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법, 조성물 및 키트에 유용한 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 KDM4D 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 제제 또는 KDM4D 폴리펩티드 또는 그의 변이체 또는 생물학적 활성 단편이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 인간 KDM4D 핵산 서열은 Genebank 수탁번호 NM_018039.2에 해당하며, 본 명세서에 개시된 서열번호 1을 말한다. KDM4D는 또한 리신(K)-특이적 디메틸라제 4D, FLJ10251, JMJD2D 또는 "주몬지 도메인 함유 2D"로 알려져 있다. 인간 KDM4D 단백질은 Genebank 수탁번호 NP_060509.2"(서열번호 55)에 해당한다. 따라서, KDM4D의 단백질 서열은 다음과 같다:

METMKSKANCAQNPNCNIMIFHPTKEEFNDFDKYIAYMESQGAH
RAGLAKIIPPKEWKARETYDNISEILIATPLQQVASGRAGVFTQYHKKKKAMTVGEYR
HLANSKKYQTPPHQNFEDLERKYWKNRIYNSPIYGADISGSLFDENTKQWNLGHLGTI
QDLLEKECGVVIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYLHLGEPKTWYVVPPE
HGQRLERLARELFPGSSRGCGAFLRHKVALISPTVLKENGIPFNRITQEAGEFMVTFP
YGYHAGFNHGFNCAEAINFATPRWIDYGKMASQCSCGEARVTFSMDAFVRILQPERYD
LWKRGQDRAVVDHMEPRVPASQELSTQKEVQLPRRAALGLRQLPSHWARHSPWPMAAR
SGTRCHTLVCSSLPRRSAVSGTATQPRAAAVHSSKKPSSTPSSTPGPSAQIIHPSNGR
RGRGRPPQKLRAQELTLQTPAKRPLLAGTTCTASGPEPEPLPEDGALMDKPVPLSPGL
QHPVKASGCSWAPVP (서열번호 55)

[0136]

[0137] 일부 실시형태에서, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아와 접촉하는 제제는 서열번호 55의 인간 KDM4d 단백질의 발현을 증가시키거나, 및/또는 서열번호 1에 해당하는 인간 KDM4d 핵산 서열 또는 서열번호 1의 핵산 서열에 비교할 때 SCNT의 효율을 유사하거나 더 큰 정도로 증가시키는(예를 들어, 적어도 약 110%, 또는 적어도 약 120%, 또는 적어도 약 130%, 또는 적어도 약 140%, 또는 적어도 약 150%, 또는 150%보다 많이 증가됨) 그의 생물학적 활성 단편을 포함한다.

[0138] 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 Antony *et al.*, Nature, 2013에서 개시된 대로, 서열번호 55의 아미노산 1-424를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 55의 아미노산 1-424 의 C-말단 또는 N-말단에서 또한 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50, 또는 적어도 50-100 아미노산이 결핍된 서열번호 55의 아미노산 1-424를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 55의 아미노산 1-424의 C-말단 및 N-말단 둘 모두에서 또한 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50, 또는 적어도 50-100 아미노산이 결핍된 서열번호 55의 아미노산 1-424를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 64를 포함하며, 서열번호 64의 단백질 서열은 하기를 포함한다:

METMKSKANCAQNPNCNIMIFHPTKEEFNDFDKYIAYMESQGAH
RAGLAKIIPPKEWKARETYDNISEILIATPLQQVASGRAGVFTQYHKKKKAMTVGEYR
HLANSKKYQTPPHQNFEDLERKYWKNRIYNSPIYGADISGSLFDENTKQWNLGHLGTI
QDLLEKECGVVIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYLHLGEPKTWYVVPPE
HGQRLERLARELFPGSSRGCGAFLRHKVALISPTVLKENGIPFNRITQEAGEFMVTFP
YGYHAGFNHGFNCAEAINFATPRWIDYGKMASQCSCGEARVTFSMDAFVRILQPERYD
LWKRGQDRAVVDHMEPRVPASQELSTQKEVQLPRRAALGLRQLPSHWARHSPWPMAAR
SGTRCHTLVCSSLPRRSAVSGTATQPRAAAV (서열번호 64)

[0139]

[0140] 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 64의 C-말단에서 또한 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50 아미노산이 결핍된 서열번호 64의 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 64의 N-말단에서 또한 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50 아미노산이 결핍된 서열번호 64의 아미노산을 포함한다.

[0141] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 방법에서 사용하기 위한 히스톤 디메틸라제 활성화제는 임의의 포유류 KDM4A 폴리펩티드를 인코딩하거나 포유류 KDM4A 폴리펩티드의 변이체 또는 생물학적 활성 단편을 인코딩하는 핵산 제제로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 방법에서 사용하기 위한 히스톤 디메틸라제 활성화제는 임의의 포유류 KDM4A 폴리펩티드 또는 그러한 포유류 KDM4A 폴리펩티드의 변이체 또는 생물학적 활성 단편으로부터 선택된다. 당업자는 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물에서 사용하기 위한 인간 KDM4A 폴리펩티드의 적절한 포유류 상동체 및 그러한 포유류 상동체를 인코딩하는 핵산을 확인할 수 있음이 본 발명에서 포함된다.

[0142] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 방법에서 사용하기 위한 히스톤 디메틸라제 활성화제는 임의의 포유류 KDM4B 폴리펩티드를 인코딩하거나 포유류 KDM4B 폴리펩티드의 변이체 또는 생물학적 활성 단편을 인코딩하는 핵산 제제로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 방법에서 사용하기 위한 히스톤 디메틸라제 활성화제는 임의의 포유류 KDM4B 폴리펩티드 또는 그러한 포유류 KDM4B 폴리펩티드의 변이체 또는 생물학적 활성 단편으로부터 선택된다. 당업자는 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물에서 사용하기 위한 인간 KDM4B 폴리펩티드의 적절한 포유류 상동체 및 그러한 포유류 상동체를 인코딩하는 핵산을 확인할 수 있음이 본 발명에서 포함된다.

[0143] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 방법에서 사용하기 위한 히스톤 디메틸라제 활성화제는 임의의 포유류 KDM4C 폴리펩티드를 인코딩하거나 포유류 KDM4C 폴리펩티드의 변이체 또는 생물학적 활성 단편을 인코딩하는 핵산 제제로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 방법에서 사용하기 위한 히스톤 디메틸라제 활성화제는 임의의 포유류 KDM4C 폴리펩티드 또는 그러한 포유류 KDM4C 폴리펩티드의 변이체 또는 생물학적 활성 단편으로부터 선택된다. 당업자는 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물에서 사용하기 위한 인간 KDM4C 폴리펩티드의 적절한 포유류 상동체 및 그러한 포유류 상동체를 인코딩하는 핵산을 확인할 수 있음이 본 발명에서 포함된다.

[0144] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 방법에서 사용하기 위한 히스톤 디메틸라제 활성화제는 임의의 포유류 KDM4D 폴리펩티드를 인코딩하거나 포유류 KDM4D 폴리펩티드의 변이체 또는 생물학적 활성 단편을 인코딩하는 핵산 제제로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 방법에서 사용하기 위한 히스톤 디메틸라제 활성화제는 임의의 포유류 KDM4D 폴리펩티드 또는 그러한 포유류 KDM4D 폴리펩티드의 변이체 또는 생물학적 활성 단편으로부터 선택된다. 당업자는 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물에서 사용하기 위한 인간 KDM4D 폴리펩티드의 적절한 포유류 상동체 및 그러한 포유류 상동체를 인코딩하는 핵산을 확인할 수 있음이 본 발명에서 포함된다.

[0145] 일부 실시형태에서 사용되는 바처럼, 본 명세서에 개시된 방법에서 사용하기 위한 히스톤 디메틸라제 활성화제는 AOF(LSD1), AOF1(LSD2), FBXL11(JHDM1A), Fbxl10(JHDM1B), FBXL19(JHDM1C), KIAA1718(JHDM1D), PHF2(JHDM1E), PHF8 (JHDM1F), JMJD1A(JHDM2A), JMJD1B(JHDM2B), JMJD1C(JHDM2C), KDM4A(JMJD2A; JHDM3A), KDM4B(JMJD2B; JHDM3B), KDM4C(JMJD2C; JHDM3C), KDM4D(JMJD2D; JHDM3D), RBP2(JARID1A), PLU1(JARID1B), SMCX(JARID1C), SMCY(JARID1D), 주몬지(Jumonji)(JARID2), UTX(UTX), UTY(UTY), JMJD3(JMJD3), JMJD4(JMJD4), JMJD5(JMJD5), JMJD6(JMJD6), JMJD7(JMJD7), JMJD8(JMJD8)로 이루어지는 군의 어느 하나로부터 선택된다. 그러한 히스톤 디메틸라제 활성화제는 그 전체가 본 명세서에 참고로 인용되는 미국 특허출원 2011/0139145호에 개

시된다.

[0146] 일부 실시형태에서, KDM4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 전체 길이 폴리펩티드와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드 변이체 또는 폴리펩티드 변이체를 인코딩하는 핵산 서열 또는 서열번호 50, 52, 54, 55(인간 KDM4A-KDM4D)의 임의의 인간 Kdm4 폴리펩티드의 단편 또는 서열번호 1-8에 해당하는 핵산 서열 중 어느 하나에 의해 인코딩되는 임의의 인간 Kdm4 폴리펩티드의 단편이다.

[0147] 일부 실시형태에서, KDM4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 전체 길이 폴리펩티드와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드 변이체 또는 폴리펩티드 변이체를 인코딩하는 핵산 서열 또는 서열번호 50, 52, 54, 55(인간 KDM4A-KDM4D)의 Kdm4 폴리펩티드의 폴리펩티드의 단편이다. 일부 실시형태에서, Kdm4 히스톤 디메틸라제는 서열번호 50, 52, 54, 55(인간 KDM4A-KDM4D)의 적어도 20개 연속 아미노산의 단편, 또는 전체 길이 야생형 폴리펩티드의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 길이인 인간 KDM4A, KDM4B, KDM4C 또는 KDM4D의 단편 또는 관심 활성, 예를 들어, 서열번호 50, 52, 54, 55 (인간 KDM4A-KDM4D)의 단백질 각각의 효율에 비교할 때 SCNT이 효율을 증가시키는 능력의 적어도 80% 이상을 갖는 도메인이다.

[0148] 일부 실시형태에서, 인간 KDM4A의 생물학적 활성 단편은, 동일한 조건하에서 동일한 방법을 이용하여, 서열번호 50의 아미노산을 포함하는 KDM4A 폴리펩티드에 비교할 때, SCNT의 효율을 증가시키는 능력이 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100% 초과, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과인 서열번호 50의 단편(예를 들어, 단편은 서열번호 50의 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%임)을 포함한다.

[0149] 일부 실시형태에서, 인간 KDM4B의 생물학적 활성 단편은, 동일한 조건하에서 동일한 방법을 이용하여, 서열번호 52의 아미노산을 포함하는 KDM4B 폴리펩티드에 비교할 때, SCNT의 효율을 증가시키는 능력이 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100% 초과, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과인 서열번호 52의 단편(예를 들어, 단편은 서열번호 52의 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%임)을 포함한다.

[0150] 일부 실시형태에서, 인간 KDM4C의 생물학적 활성 단편은, 동일한 조건하에서 동일한 방법을 이용하여, 서열번호 54의 아미노산을 포함하는 KDM4C 폴리펩티드에 비교할 때, SCNT의 효율을 증가시키는 능력이 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100% 초과, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과인 서열번호 54의 단편(예를 들어, 단편은 서열번호 54의 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%임)을 포함한다.

[0151] 일부 실시형태에서, 인간 KDM4D의 생물학적 활성 단편은, 동일한 조건하에서 동일한 방법을 이용하여, 서열번호 55의 아미노산을 포함하는 KDM4D 폴리펩티드에 비교할 때, SCNT의 효율을 증가시키는 능력이 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100% 초과, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과인 서열번호 55의 단편(예를 들어, 단편은 서열번호 55의 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%임)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 Antony *et al.*, Nature, 2013에 개시된 대로, 서열번호 55의 아미노산 1-424를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 55의 아미노산 1-424의 C-말단 또는 N-말단에서 또한 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50, 또는 적어도 50-100 아미노산이 결핍된 서열번호 55의 아미노산 1-424를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 55의 아미노산 1-424의 C-말단 및 N-말단 둘 모두에서 또한 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50, 또는 적어도 50-100 아미노산이 결핍된 서열번호 55의 아미노산 1-424를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 64를 포함하며, 서열번호 64의 단백질 서열은 하기를 포함한다:

METMKSKANCAQNPNCNIMIFHPTKEEFNDFDKYIAYMESQGAH
RAGLAKIIPPKEWKARETYDNISEILIATPLQQVASGRAGVFTQYHKKKKAMTVGEYR
HLANSKKYQTPPHQNFEDLERKYWKNRIYNSPIYGADISGSLFDENTKQWNLGHLGTI
QDLLEKECGVVIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYLHLGEPKTWYVVPPE
HGQRLERLARELFPGSSRGCGAFLRHKVALISPTVLKENGIPFNRITQEAGEFMVTFP
YGYHAGFNHGFNCAEAINFATPRWIDYGKMASQCSCGEARVTFSMDAFVRILQPERYD
LWKRGQDRAVVDHMEPRVPASQELSTQKEVQLPRRAALGLRQLPSHWARHSPWPMAAR
SGTRCHTLVCSSLPRRSAVSGTATQPRAAAV (서열번호 64)

[0152]

[0153] 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 64의 C-말단에서 또한 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50 아미노산이 결핍된 서열번호 64의 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 생물학적 활성 단편은 서열번호 64의 N-말단에서 또한 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2-10, 또는 적어도 10-20, 또는 적어도 20-50 아미노산이 결핍된 서열번호 64의 아미노산을 포함한다.

[0154] 일부 실시형태에서, 인간 KDM4A의 생물학적 활성 변이체는, 동일한 조건하에서 동일한 방법을 이용하여, 서열번호 50의 아미노산을 포함하는 KDM4A 폴리펩티드에 비교할 때, SCNT의 효율을 증가시키는 능력이 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100% 초과, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과인, 서열번호 50에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)을 갖는 서열번호 50의 변이체(예를 들어, 변이체는 서열번호 50과 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일함)를 포함한다.

[0155] 일부 실시형태에서, 인간 KDM4B의 생물학적 활성 변이체는, 동일한 조건하에서 동일한 방법을 이용하여, 서열번호 52의 아미노산을 포함하는 KDM4B 폴리펩티드에 비교할 때, SCNT의 효율을 증가시키는 능력이 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100% 초과, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과인, 서열번호 52에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)을 갖는 서열번호 52의 변이체(예를 들어, 변이체는 서열번호 52와 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일함)를 포함한다.

[0156] 일부 실시형태에서, 인간 KDM4C의 생물학적 활성 변이체는, 동일한 조건하에서 동일한 방법을 이용하여, 서열번호 54의 아미노산을 포함하는 KDM4C 폴리펩티드에 비교할 때, SCNT의 효율을 증가시키는 능력이 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100% 초과, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과인, 서열번호 54에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)을 갖는 서열번호 54의 변이체(예를 들어, 변이체는 서열번호 54와 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일함)를 포함한다.

[0157] 일부 실시형태에서, 인간 KDM4D의 생물학적 활성 변이체는, 동일한 조건하에서 동일한 방법을 이용하여, 서열번호 55의 아미노산을 포함하는 KDM4D 폴리펩티드에 비교할 때, SCNT의 효율을 증가시키는 능력이 약 적어도 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100% 초과, 예를 들어, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과인, 서열번호 55에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)을 갖는 서열번호 55의 변이체(예를 들어, 변이체는 서열번호 55와 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일함)를 포함한다.

[0158] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시된 방법 및 조성물 및 키트에서 유용한 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 서열번호 50, 52, 54 또는 55의 폴리펩티드 또는 그의 생물학적 활성 변이체 또는 단편을 인코딩하는, 미국 특허 출원 US2012/03228640호에 개시된 RNA 또는 변형된 RNA(modRNA)와 같은 핵산 제제이다. 일부 실시형태에서, KDM4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 서열번호 1-8, 49, 51 또는 53, 또는 서열번호 1-8, 49, 51 또는 53에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)을 갖는 핵산 변이체 중 어느 하나로부터 선택되는 핵산 제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, KDM4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 서열번호 1-8, 49, 51 또는 53 중 어느 하나의 적어도 20 연속 아미노산의 단편, 예를 들어, 서열번호 1-8, 49, 51 또는 53의 적어도 20-, 또는 적어도 30- 또는 적어도 40- 또는 적어도 50 핵산의 단편인 핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법 및 조성물 및 키트에서 유용한 핵산 제제인 KDM4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터로부터 발현된다.

[0159] 대안적 실시형태에서, 본 발명에서의 사용을 위해 포함되는 KDM4 히스톤 디메틸라제 활성화제는 서열번호 1-8,

49, 51 또는 53을 인코딩하는 합성 변형 RNA(modRNA)이다. 합성 변형 RNA(modRNA)는 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 미국 특허 출원 US2012/03228640호; US2009/0286852호 및 US2013/0111615호 및 미국 특허 8,278,036호; 8,691,966호; 8,748,089호; 8,835,108호에 개시된다. 일부 실시형태에서, 합성 변형 RNA 분자는 벡터에서 발현되지 않으며, 합성 변형 RNA 분자는 네이키드(naked) 합성 변형 RNA 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 지질 복합체에 존재하는 적어도 하나의 합성 변형 RNA 분자를 포함할 수 있다.

[0160] 일부 실시형태에서, 합성 변형 RNA 분자는 적어도 두 개의 변형 뉴클레오시드를 포함하며, 예를 들어, 적어도 두 개의 변형 뉴클레오시드는 5-메틸시티딘(5mC), N6-메틸아데노신(m6A), 3,2'-O-다이메틸우리딘(m4U), 2-티오우리딘(s2U), 2' 플루오로우리딘, 슈도우리딘, 2'-O-메틸우리딘(Um), 2'데옥시우리딘(2' dU), 4-티오우리딘(s4U), 5-메틸우리딘(m5U), 2'-O-메틸아데노신(m6A), N6,2'-O-다이메틸아데노신(m6Am), N6,N6,2'-O-트리메틸아데노신(m62Am), 2'-O-메틸시티딘(Cm), 7-메틸구아노신(m7G), 2'-O-메틸구아노신(Gm), N2,7-다이메틸구아노신(m2,7G), N2, N2, 7-트리메틸구아노신(m2,2,7G) 및 이노신(I)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 합성 변형 RNA 분자는 추가로 5' 캡, 예를 들어, 5' 캡 유사체, 예를 들어, 5' 다이구아노신 캡을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서 사용하기 위한 합성 변형 RNA 분자는 5' 트리포스페이트를 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서 사용하기 위한 합성 변형 RNA 분자는 추가로 폴리(A) 테일(tail), 코작(Kozak) 서열, 3' 비번역 영역, 5' 비번역 영역 또는 임의의 그 조합을 포함하며, 일부 실시형태에서, 합성 변형 RNA 분자는 선택적으로 알카라인 포스파타제로 처리될 수 있다.

[0161] ***H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제.***

[0162] 일 양태에서, 본 발명은 공여체 포유류 세포 또는 SCNT 배아 또는 난모세포의 핵 또는 세포질을 히스톤 메틸화를 억제하는, 구체적으로, H3K9 메틸화를 억제하는, 구체적으로, H3H9me3 트리메틸화를 억제하는 제제와 접촉시키는 것을 포함하는, SCNT의 효율을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 제제는 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 제제는 히스톤 메틸트랜스퍼라제의 발현을 억제한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 억제제는 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제이다. 본 명세서에서 개시된 바처럼, 본 발명자들은 H3K9 메틸트랜스퍼라제 단백질의 억제가 SCNT의 효율을 증가시키기 위해 사용될 수 있음을 발견하였다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 단백질 억제제이며, 일부 실시형태에서, 억제제는 H3K9 메틸트랜스퍼라제 단백질의 기능 또는 그 유전자로부터 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 발현을 억제하는 임의의 제제이다.

[0163] 본 발명의 일부 실시형태에서, 제제는 히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1을 억제한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 제제는 히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h2를 억제한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 제제는 히스톤 메틸트랜스퍼라제 Ehmt1의 억제제이다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 제제는 히스톤 메틸트랜스퍼라제 Setdb1을 억제한다. 일부 실시형태에서, 적어도 두 H3K9 메틸트랜스퍼라제(예를 들어, 2, 3, 4, 등)가 억제된다. 본 발명의 일부 실시형태에서, Suv39h1 및 Suv39h2 둘 모두가 동일한 제제(예를 들어, Suv39h1/2 억제제)에 의해 또는 둘 이상의 별도의 제제에 의해 억제된다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 제제는 RNAi 제제, 예를 들어, 히스톤 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, 또는 Setdb1의 발현을 억제하는 siRNA 또는 shRNA이다.

[0164] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Suv39h1" 또는 "H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1"은 본 기술분야에서의 그의 일반적인 의미를 가지며 히스톤 H3의 Lys-9를 메틸화하는 히스톤 메틸트랜스퍼라제 "무늬형성 3-9 상동체 1(초파리)의 억제제"를 말한다(Aagaard L, Laible G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersorger A, Singh P B, Reuter G, Jenuwein T (June 1999). "Functional mammalian homologues of the Drosophila PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31". EMBO J 18 (7): 1923-38.). 상기 히스톤 메틸트랜스퍼라제는 또한 MG44, KMT1A, SUV39H, 히스톤-리신 N-메틸트랜스퍼라제 SUV39H1, H3-K9-HMTase 1, OTTHUMP00000024298, Su(var)3-9 상동체 1, 리신 N-메틸트랜스퍼라제 1A, 히스톤 H3-K9 메틸트랜스퍼라제 1, 위치-효과 무늬형성(position-effect variegation) 3-9 상동체, 히스톤-리신 N-메틸트랜스퍼라제, 또는 H3 리신-9 특이적 1로 알려져 있다. 용어는 SU(VAR)3-9와 같은 Suv39h1의 모든 오르소로그(ortholog)를 포함한다.

[0165] 본 발명에 따라, Suv39h1의 억제제는 H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1의 억제제; H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1 유전자 발현의 억제제로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0166] 용어 "H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1의 억제제"는 H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1에 의한 히스

톤 H3의 리신-9의 메틸화를 억제하는 능력을 가진, 천연 또는 천연이 아닌 임의의 화합물을 말한다. 용어 "H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h2의 억제제"는 H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h2에 의한 히스톤 H3의 리신-9의 메틸화를 억제하는 능력을 가진 천연 또는 천연이 아닌 임의의 화합물을 말한다.

[0167] 화합물의 억제 활성은 Greiner D. Et al. Nat Chem Biol. 2005 August; 1(3):143-5 또는 Eskeland, R. et al. Biochemistry 43, 3740-3749 (2004)에서 개시된 다양한 방법을 이용하여 결정할 수 있다.

[0168] 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제는 제제에 의해서이다. 핵산, 핵산 유사체, 펩티드, 파아지, 파아지미드, 폴리펩티드, 펩티드모방체(peptidomimetic), 리보좀, 앱타머, 항체, 작거나 큰 유기 또는 무기 분자 또는 임의의 그 조합과 같은 그러나 이에 제한되지 않는 임의의 제제를 이용할 수 있다.

[0169] 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제는 RNAi 제제, siRNA 제제, shRNA, 올리고뉴클레오티드, CRISPR/Cas9, 중화 항체 또는 항체 단편, 앱타머, 소분자, 단백질, 펩티드, 소분자, 아비디미르, 아비미르 및 그의 기능성 단편 또는 유도체 등으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. CRISPR/Cas9 시스템을 통해 Suv39h1 및/또는 Suv39h2를 넉아웃시키기 위한 구매가능한 서열은 오리진(Origene)(제품 번호 KN202428 및 KN317005) 및 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)(제품 번호: sc-401717)로부터 입수가능하며 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물에서의 사용을 위해 포함된다.

[0170] 본 명세서에서 개시된 방법에서 유용한 제제는 또한 유전자 발현을 억제할 수 있다(즉, 유전자의 발현을 금하고 및/또는 억압함). 그러한 제제는 본 기술분야에서 "유전자 사일런서(silencer)"로 불리며 당업자에게 일반적으로 알려져 있다. 그 예로는 RNA, DNA 또는 핵산 유사체를 위한 핵산 서열을 포함하며 이에 제한되지 않으며, 단일 또는 이중쇄일 수 있으며, 관심 단백질을 인코딩하는 핵산, 올리고뉴클레오티드, 핵산, 핵산 유사체, 예를 들어 그러나 이에 제한되지 않는 펩티드 핵산(PNA), 가짜-상보성 PNA(pc-PNA), 잠긴 핵산(LNA) 및 그 유도체 등을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 핵산 제제는 또한 예를 들어, 전사 억제자로서 작용하는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열, 안티센스 분자, 리보자임, 억제성 소 핵산 서열, 예를 들어 그러나 이에 제한되지 않는 RNAi, shRNAi, siRNA, 마이크로 RNAi(miRNA), 안티센스 올리고뉴클레오티드 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0171] 본 발명의 모든 양태의 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포와 접촉하는 제제는 H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어 그러나 이에 제한되지 않는 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제이다. 일부 실시형태에서, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제 중 적어도 하나 또는 임의의 조합은 SNCT의 효율을 증가시키기 위해 본 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제는 다양한 포유류 종, 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 소의 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 핵산 서열(예를 들어, 서열번호 9-14)의 발현 또는 다양한 상이한 포유류, 예를 들어, 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 소로부터의 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 단백질의 활성을 억제한다.

[0172] 본 발명의 맥락에서, H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1/2의 억제제는 바람직하게는 다른 분자에 비하여 H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1/2에 대해 선택적이다. "선택적"이란 억제제의 친화성이 다른 히스톤 메틸트랜스퍼라제에 대한 친화성보다 적어도 10-배, 바람직하게는 25-배, 더욱 바람직하게는 100-배, 더욱 바람직하게는 500-배 더 높음을 의미한다.

[0173] 전형적으로, H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1 및/또는 Suv39h2의 억제제는 유기 소분자이다. 용어 "유기 소분자"는 약학에서 일반적으로 사용되는 유기 분자들에 견줄만한 크기의 분자를 말한다. 이 용어는 생물학적 거대분자(예를 들어, 단백질, 핵산 등)을 제외한다. 바람직한 유기 소분자는 크기가 약 5000 Da, 더욱 바람직하게는 최대 2000 Da 및 가장 바람직하게는 최대 약 1000 Da 범위이다.

[0174] 특정의 실시형태에서, H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1의 억제제는 Greiner D, Bonaldi T, Eskeland R, Roemer E, Imhof A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. Nat Chem Biol. 2005 August; 1(3):143-5. Epub 2005 Jul. 17.; Weber, H. P., *et al.,* The molecular structure and absolute configuration of chaetocin. Acta Cryst., B28, 2945-2951 (1972); Udagawa, S., et al., The production of chaetoglobosins, sterigmatocystin, O-Methylsterigmatocystin, and chaetocin by Chaetomium spp. and related fungi. Can. J. microbiol., 25, 170-177 (1979).; Gardiner, D. M., et al., The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. Microbiol., 151, 1021-1032 (2005)에 의해 개시된 캐토신(chaetocin)(CAS 28097-03-2)이다. 예를 들어, 캐토신은 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)에서 상업적으로 시판중이다.

[0175] 다른 실시형태에서, H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1의 억제제는 앱타머이다. 앱타머는 분자 인식면에서 항체에 대한 대안을 나타내는 분자 부류이다. 앱타머는 사실상 높은 친화성과 특이성으로 임의의 부류의 표적 분자를 인식하는 능력을 가진 올리고뉴클레오티드 또는 올리고펩티드 서열이다. 그러한 리간드는 Tuerk C. and Gold L., 1990에 개시된 대로, 무작위 서열 라이브러리의 지수적 농축에 의한 리간드의 체계적 진화(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)(SELEX)를 통해 분리될 수 있다. 무작위 서열 라이브러리는 DNA의 조합 화학 합성에 의해 수득가능하다. 이 라이브러리에서, 각 구성원은 궁극적으로는 화학적으로 변형된, 독특한 서열의 선형 올리고머이다. 이 부류의 분자의 가능한 변형, 용도 및 이점은 Jayasena S. D., 1999에서 검토되었다. 펩티드 앱타머는 2 하이브리드 방법(Colas et al., 1996)에 의해 조합 라이브러리로부터 선택되는 이. 콜라이(E. coli) 티오레독신 A와 같은 플랫폼 단백질에 의해 나타내지는 형태적으로 억제된 항체 가변 영역으로 이루어진다.

[0176] 본 발명에서 사용하기 위한 발현 억제제는 안티-센스 올리고뉴클레오티드 구조체에 기초할 수 있다. 안티-센스 RNA 분자 및 안티-센스 DNA 분자를 비롯한 안티-센스 올리고뉴클레오티드는 H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1 또는 HP1α mRNA에 결합으로써 그들의 번역을 직접 차단하고 따라서 단백질 번역을 막거나 mRNA 분해를 증가시키고, 따라서 H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1 또는 HP1α의 수준 및 따라서 활성을 세포에서 감소시키도록 작용할 것이다. 예를 들어, 적어도 약 15 염기이고 H3K9-히스톤 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1을 인코딩하는 mRNA 전사물 서열의 유일한 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 종래의 포스포다이에스테르 기술에 의해 합성되고 예를 들어, 정맥 주사 또는 주입에 의해 투여될 수 있다. 그 서열이 알려진 유전자의 유전자 발현을 특이적으로 억제하기 위해 안티센스 기술을 이용하는 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 6,566,135호; 6,566,131호; 6,365,354호; 6,410,323호; 6,107,091호; 6,046,321호; 및 5,981,732호를 참고). Suv39h1의 억제제는 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 미국 특허 출원 2015/0038496호에 개시된다. 소분자인 베티실린은 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 미국 특허 출원 2014/0161785호에 개시된 대로 Suv39h1 및 Suv39h2 둘 모두를 위한 선택적 억제제로서 확인된다(즉, Suv39h1/2를 억제함).

[0177] Suv39h2의 억제제 및 그들의 확인 방법은 그의 전문에 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 US2014/0094387호에 개시되어 있다.

[0178] *H3K9 메틸트랜스퍼라제의 RNAi 억제제.*

[0179] 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 RNAi 제제, 예를 들어, siRNA 또는 shRNA 분자이다. Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및 PRDM2의 RNAi 제제는 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제는 RNAi 제제이다. 일부 실시형태에서, RNAi 제제는 본 명세서에서 개시된 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 단백질 중 어느 하나의 발현을 억제한다.

[0180] H3K9 메틸트랜스퍼라제 유전자의 억제는 당업자에게 일반적으로 알려진 방법에 따라 유전자 사일런싱 RNAi 분자에 의할 수 있다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 표 2로부터 선택된 siRNA 제제 중 어느 하나 또는 그 조합인 RNAi 제제이다.

[0181] 예를 들어, NM_003173.3(서열번호 43)에 해당하는 인간 Suv39h1에 특이적으로 표적화된 유전자 사일런싱 siRNA 올리고뉴클레오티드 듀플렉스는 Suv39h1 발현을 넉다운시키기 위해 쉽게 사용될 수 있다. Suv39h1 mRNA는 siRNA를 이용하여 성공적으로 표적화될 수 있으며; 다른 siRNA 분자는 표적 mRNA의 공지 서열에 기초하여 당업자가 쉽게 제조할 수 있다. 의심을 피하기 위하여, 인간 Suv39h1의 서열은 예를 들어, Genebank 수탁번호 NM_003173.3(서열번호 43)에서 제공된다 당업자는 단백질 인간 Suv39h1(서열번호 9), 마우스 Suv39h1(서열번호 11), 래트 Suv39h1 (서열번호 13) 또는 소 Suv39h1(서열번호 15)을 인코딩하는 mRNA의 발현을 억제하거나 임의의 다른 포유류 Suv39h1 단백질의 발현을 억제하는, 사용될 RNAi 제제를 선택할 수 있다.

[0182] 의심을 피하기 위하여, 인간 Suv39h1 cDNA의 서열은 예를 들어, Genebank 수탁번호 NM_003173.3(서열번호 43)에서 제공되며 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물에서 H3K9 메틸전달 억제제로서 사용하기 위해 인간 Suv39h1 mRNA 발현을 억제하는 유전자 사일런싱 RNAi 조절제를 고안하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, Suv39h1의 억제제는 siRNA 제제이며, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 GAAACGAGUCCGUAUUGAAtt(서열번호 17) 또는 GAAACGAGUCCGUAUUGAAtt(서열번호 18) 및 그의 적어도 80% 서열 동일성의 단편 또는 유도체이다.

[0183] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Suv39h1 단백질"은 본 명세서에 개시된 서열번호 9의 핵산 및 구조 또는 기능에 불리한 영향을 미치지 않는 보존적 치환, 부가, 결실을 그안에 포함하는 그의 상동체를 말한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, Suv39h1 단백질은 하기와 같은 인간 Suv39h1 전사물을 위한 핵산 서열(서열번

호 43)에 의해 인코딩된다:

```
 1 cgctcttctc gcgaggccgg ctaggcccga atgtcgttag ccgtggggaa agatggcgga
       61 aaatttaaaa ggctgcagcg tgtgttgcaa gtcttcttgg aatcagctgc aggacctgtg
      121 ccgcctggcc aagctctcct gccctgccct cggtatctct aagaggaacc tctatgactt
      181 tgaagtcgag tacctgtgcg attacaagaa gatccgcgaa caggaatatt acctggtgaa
      241 atggcgtgga tatccagact cagagagcac ctgggagcca cggcagaatc tcaagtgtgt
      301 gcgtatcctc aagcagttcc acaaggactt agaaagggag ctgctccggc ggcaccaccg
      361 gtcaaagacc ccccggcacc tggacccaag cttggccaac tacctggtgc agaaggccaa
      421 gcagaggcgg gcgctccgtc gctgggagca ggagctcaat gccaagcgca gccatctggg
      481 acgcatcact gtagagaatg aggtggacct ggacggccct ccgcgggcct tcgtgtacat
      541 caatgagtac cgtgttggtg agggcatcac cctcaaccag gtggctgtgg gctgcgagtg
      601 ccaggactgt ctgtgggcac ccactggagg ctgctgcccg ggggcgtcac tgcacaagtt
      661 tgcctacaat gaccagggcc aggtgcggct tcgagccggg ctgcccatct acgagtgcaa
      721 ctcccgctgc cgctgcggct atgactgccc aaatcgtgtg gtacagaagg gtatccgata
      781 tgacctctgc atcttccgca cggatgatgg gcgtggctgg ggcgtccgca ccctggagaa
      841 gattcgcaag aacagcttcg tcatggagta cgtgggagag atcattacct cagaggaggc
      901 agagcggcgg ggccagatct acgaccgtca gggcgccacc tacctctttg acctggacta
      961 cgtggaggac gtgtacaccg tggatgccgc ctactatggc aacatctccc actttgtcaa
     1021 ccacagttgt gaccccaacc tgcaggtgta caacgtcttc atagacaacc ttgacgagcg
     1081 gctgccccgc atcgctttct ttgccacaag aaccatccgg gcaggcgagg agctcacctt
     1141 tgattacaac atgcaagtgg accccgtgga catggagagc acccgcatgg actccaactt
     1201 tggcctggct gggctccctg gctcccctaa gaagcgggtc cgtattgaat gcaagtgtgg
     1261 gactgagtcc tgccgcaaat acctcttcta gcccttagaa gtctgaggcc agactgactg
     1321 agggggcctg aagctacatg cacctccccc actgctgccc tcctgtcgag aatgactgcc
     1381 agggcctcgc ctgcctccac ctgcccccac ctgctcctac ctgctctacg ttcagggctg
     1441 tggccgtggt gaggaccgac tccaggagtc ccctttccct gtcccagccc catctgtggg
     1501 ttgcacttac aaacccccac ccaccttcag aaatagtttt tcaacatcaa gactctctgt
     1561 cgttgggatt catggcctat taaggaggtc caaggggtga gtcccaaccc agccccagaa
     1621 tatatttgtt tttgcacctg cttctgcctg gagattgagg ggtctgctgc aggcctcctc
     1681 cctgctgccc caaaggtatg gggaagcaac cccagagcag gcagacatca gaggccagag
     1741 tgcctagccc gacatgaagc tggttcccca accacagaaa ctttgtacta gtgaaagaaa
     1801 gggggtccct gggctacggg ctgaggctgg tttctgctcg tgcttacagt gctgggtagt
     1861 gttggcccta agagctgtag ggtctcttct tcagggctgc atatctgaga agtggatgcc
     1921 cacatgccac tggaagggaa gtgggtgtcc atgggccact gagcagtgag aggaaggcag
     1981 tgcagagctg gccagccctg gaggtaggct gggaccaagc tctgccttca cagtgcagtg
     2041 aaggtaccta gggctcttgg gagctctgcg gttgctaggg gccctgacct ggggtgtcat
     2101 gaccgctgac accactcaga gctggaacca agatctagat agtccgtaga tagcacttag
     2161 gacaagaatg tgcattgatg gggtggtgat gaggtgccag gcactgggta gagcacctgg
     2221 tccacgtgga ttgtctcagg gaagccttga aaaccacgga ggtggatgcc aggaaagggc
     2281 ccatgtggca gaaggcaaag tacaggccaa gaattggggg tgggggagat ggcttcccca
```

[0184]

```
 2341 ctatgggatg acgaggcgag agggaagccc ttgctgcctg ccattcccag accccagccc
 2401 tttgtgctca ccctggttcc actggtctca aaagtcacct gcctacaaat gtacaaaagg
 2461 cgaaggttct gatggctgcc ttgctccttg ctccccccacc ccctgtgagg acttctctag
 2521 gaagtccttc ctgactacct gtgcccagag tgcccctaca tgagactgta tgccctgcta
 2641 tcagatgcca gatctatgtg tctgtctgtg tgtccatccc gccggccccc cagactaacc
 2641 tccaggcatg gactgaatct ggttctcctc ttgtacaccc ctcaacccta tgcagcctgg
 2701 agtgggcatc aataaaatga actgtcgact gaacaaaaaa aaaaaaaaaa aa
```

[0185]

[0186] 일부 실시형태에서, 제제는 (Suv39h1 억제제가 부재하는 경우에 비하여) 인간 Suv39h1(서열번호 9), 마우스 Suv39h1(서열번호 11), 래트 Suv39h1(서열번호 13) 또는 소 Suv39h1(서열번호 15)의 발현을 적어도 50%만큼 억제하거나 감소시키는 핵산 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 인간 Suv39h2(서열번호 10), 마우스 Suv39h2(서열번호 12), 래트 Suv39h2(서열번호 14) 또는 소 Suv39h2(서열번호 16)의 단백질 발현을 억제하거나 감소시키는 핵산 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 마우스 Suv39h1의 siRNA 억제제는 서열번호 18 또는 그의 적어도 10 연속 뉴클레오티드의 단편 또는 서열번호 18에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)을 가진 핵산 서열이다. 일부 실시형태에서, siRNA 또는 다른 핵산 억제제는 전체적으로 또는 부분적으로 Suv39h1의 서열번호 17의 표적 서열에 하이브리드화한다. 일부 실시형태에서, 마우스 Suv39h2의 siRNA 억제제는 서열번호 20 또는 그의 적어도 10 연속 뉴클레오티드의 단편 또는 서열번호 20에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%)을 가진 핵산 서열이다. 일부 실시형태에서, siRNA 또는 다른 핵산 억제제는 Suv39h2의 서열번호 19의 표적 서열에 전체적으로 또는 부분적으로 하이브리드화한다.

[0187] H3K9 메틸트랜스퍼라제 유전자의 억제는 당업자에 의해 일반적으로 알려진 방법에 따라 유전자 사일런싱 RNAi

분자에 의한 것일 수 있다. Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및 PRDM2의 억제는 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 RNAi 제제이며 표 2로부터 선택된 siRNA 제제 중 어느 하나 또는 그 조합이다.

[0188] 일부 실시형태에서, Suv39h1은 hsa-mir-98-5p(MIRT027407), hsa-mir-615-3p (MIRT040438), hsa-mir-331-3p (MIRT043442) 또는 그에 적어도 85% 서열 동일성의 miR 변이체에 의해 표적화되고 억제될 수 있다. 인간, 마우스 및 래트에서 Suv39h1 및/또는 Suv39h2를 억제하는 구매가능한 siRNA, RNAi 및 shRNA 제품은 오리진, 퀴아젠(Qiagen) 및 산타 크루즈 바이오테크놀로지로부터 입수가능하며, 당업자가 사용할 수 있다.

[0189] 예를 들어, NM_024670.3(서열번호 43)에 해당하는 인간 Suv39h2에 특이적으로 표적화된 유전자 사일런싱 siRNA 올리고뉴클레오티드 듀플렉스는 Suv39h2 발현을 넉다운시키기 위해 용이하게 사용될 수 있다. Suv39h2 mRNA는 siRNA를 이용하여 성공적으로 표적화될 수 있으며; 다른 siRNA 분자는 표적 mRNA의 공지 서열에 기초하여 당업자가 용이하게 제조할 수 있다. 의심을 피하기 위하여, 인간 Suv39h2의 서열은 예를 들어, Genebank 수탁번호 NM_024670.3(서열번호 44)에서 제공된다. 의심을 피하기 위하여, 인간 Suv39h2 cDNA의 서열은 예를 들어, Genebank 수탁번호 NM_024670.3(서열번호 44)에서 제공되며 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물에서 H3K9 메틸 전달 억제제로서 사용하기 위한 인간 Suv39h2 mRNA 발현을 억제하는 유전자 사일런싱 RNAi 조절제를 설계하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, Suv39h2의 억제제는 siRNA 제제이며, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 GCUCACAUGUAAAUCGAUUtt(서열번호 19) 또는 AAUCGAUUUACAUGUGAGCtt(서열번호 20) 및 그의 적어도 80% 서열 동일성의 단편 또는 유도체이다.

[0190] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Suv39h2 단백질"은 본 명세서에 개시된 서열번호 10의 핵산 및 구조 또는 기능에 불리한 영향을 미치지 않는 보존적 치환, 부가, 결실을 그안에 포함하는 그의 상동체를 말한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, Suv39h2 단백질은 하기와 같은 인간 Suv39h2 전사물을 위한 핵산 서열(서열번호 44)에 의해 인코딩된다:

```
   1 cggggccgag gcgcgaggag gtgaggctgg agcgcggccc cctcgccttc cctgttccca
  61 ggcaagctcc caaggcccgg gcggcggggc cgtcccgcgg gccagccaga tggcgacgtg
 121 gcggttcccc gcccgccgcg accccaactc cgggacgcac gctgcggacg cctatcctcc
 181 cccaggccgc tgacccgcct ccctgcccgg ccggctcccg ccgcggagga tatggaatat
 241 tatcttgtaa aatggaaagg atggccagat tctacaaata cttgggaacc tttgcaaaat
 301 ctgaagtgcc cgttactgct tcagcaattc tctaatgaca agcataatta tttatctcag
 361 gtaaagaaag gcaaagcaat aactccaaaa gacaataaca aaactttgaa acctgccatt
 421 gctgagtaca ttgtgaagaa ggctaaacaa aggatagctc tgcagagatg gcaagatgaa
 481 ctcaacagaa gaaagaatca taaaggaatg atatttgttg aaaatactgt tgatttagag
 541 ggcccacctt cagacttcta ttacattaac gaatacaaac cagctcctgg aatcagctta
 601 gtcaatgaag ctacctttgg ttgttcatgc acagattgct tctttcaaaa atgttgtcct
 661 gctgaagctg gagttctttt ggcttataat aaaaaccaac aaattaaaat cccacctggt
 721 actcccatct atgaatgcaa ctcaaggtgt cagtgtggtc ctgattgtcc caataggatt
 781 gtacaaaaag gcacacagta ttcgctttgc atctttcgaa ctagcaatgg acgtggctgg
 841 ggtgtaaaga cccttgtgaa gattaaaaga atgagttttg tcatggaata tgttggagag
 901 gtaatcacaa gtgaagaagc tgaaagacga ggacagttct atgacaacaa gggaatcacg
 961 tatctctttg atctggacta tgagtctgat gaattcacag tggatgcggc tcgatacggc
1021 aatgtgtctc attttgtgaa tcacagctgt gacccaaatc ttcaggtgtt caatgttttc
1081 attgataacc tcgatactcg tcttccccga atagcattgt tttccacaag aaccataaat
1141 gctggagaag agctgacttt tgattatcaa atgaaaggtt ctggagatat atcttcagat
1201 tctattgacc acagcccagc caaaaagagg gtcagaacag tatgtaaatg tggagctgtg
1261 acttgcagag gttacctcaa ctgaactttt tcaggaaata gagctgatga ttataatatt
1321 tttttcctaa tgttaacatt tttaaaaata catatttggg actcttatta tcaaggttct
1381 acctatgtta atttacaatt catgtttcaa gacatttgcc aaatgtatta ccgatgcctc
1441 tgaaaagggg gtcactgggt ctcatagact gatatgaagt cgacatattt atagtgctta
1501 gagaccaaac taatggaagg cagactattt acagcttagt atatgtgtac ttaagtctat
1561 gtgaacagag aaatgcctcc cgtagtgttt gaaagcgtta agctgataat gtaattaaca
1621 actgctgaga gatcaaagat tcaacttgcc atacacctca aattcggaga aacagttaat
1681 ttgggcaaat ctacagttct gtttttgcta ctctattgtc attcctgttt aatactcact
1741 gtacttgtat ttgagacaaa taggtgatac tgaattttat actgttttct acttttccat
1801 taaaacattg gcacctcaat gataaagaaa tttaaggtat aaaattaaat gtaaaaatta
1861 atttcagctt catttcgtat ttcgaagcaa tctagactgt tgtgatgagt gtatgtctga
1921 acctgtaatt cttaaaagac ttcttaatct tctagaagaa aaatctccga agagctctct
1981 ctagaagtcc aaaatggcta gccattatgc ttctttgaaa ggacatgata atgggaccag
2041 gatggttttt tggagtacca agcaagggga atggagcact ttaagggcgc ctgttagtaa
2101 catgaattgg aaatctgtgt cgagtacctc tgatctaaac ggtaaaacaa gctgcctgga
2161 gagcagctgt acctaacaat actgtaatgt acattaacat tacagcctct caatttcagg
2221 caggtgtaac agttcctttc caccagattt aatattttta tacttcctgc aggttcttct
2281 taaaaagtaa tctatatttt tgaactgata cttgttttat acataaattt tttttagatg
2341 tgataaagct aaacttggcc aaagtgtgtg cctgaattat tagacctttt tattagtcaa
```

[0191]

```
2401 cctacgaaga ctaaaataga atatattagt tttcaaggga gtgggaggct tccaacatag
2461 tattgaatct caggaaaaac tattctttca tgtctgattc tgagatttct aattgtgttg
2521 tgaaaatgat aaatgcagca aatctagctt tcagtattcc taatttttac ctaagctcat
2581 tgctccaggc tttgattacc taaaataagc ttggataaaa ttgaaccaac ttcaagaatg
2641 cagcacttct taatctttag ctctttcttg ggagaagcta gactttattc attatattgc
2701 tatgacaact tcactctttc ataatatata ggataaattg tttacatgat tggaccctca
2761 gattctgtta accaaaattg cagaatgggg ggccaggcct gtgtggtggc tcacacctgt
2821 gatcccagca ctttgggagg ctgaggtagg aggatcacgt gaggtcggga gttcaagacc
2881 agcctggcca tcatggtgaa accctgtctc tactgaaaat acaaaaatta gccgggcgtg
2941 gtggcacacg cctgtagtcc cagctactca ggaggctgag gcaggagaat cacttgaatt
3001 caggaggcgg aggttgcagt gagccaagat cataccactg cactgcagcc tgagtgacac
3061 agtaagactg tctccaaaaa aaaaaaaaaa aaa
```

[0192]

[0193] 일부 실시형태에서, 또는 본 명세서에 개시된 대로 서열번호 2의 mRNA 발현을 억제한다. 일부 실시형태에서, 당업자는 인간 Suv39h2(서열번호 10), 마우스 Suv39h2(서열번호 12), 래트 Suv39h2(서열번호 14) 또는 소 Suv39h2(서열번호 16)의 단백질을 인코딩하는 mRNA의 발현을 억제하거나 임의의 다른 포유류 Suv39h2 단백질의 발현을 억제하는, 사용될 RNAi 제제를 선택할 수 있다.

[0194] Suv39h1 및 Suv39h2를 위한 다른 예시적인 siRNA 서열은 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 미국 특허 출원 2012/0034192호에 개시된다.

[0195] 표 2: H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하기 위한 예시적인 siRNA 서열:

표 2

[0196]

유전자	서열번호	siRNA 서열
인간 Suv39h1	17	GAAACGAGUCCGUAUUGAAtt, (센스)
인간 Suv39h1	18	UUCAAUACGGACUCGUUUCtt (안티센스)
인간 Suv39h2	19	GCUCACAUGUAAAUCGAUUtt (센스)
인간 Suv39h2	20	AAUCGAUUUACAUGUGAGCtt (안티센스)
인간 Suv39h1	21	GGUGUACAACGUAUUCAUAtt (센스)
인간 Suv39h1	22	UAUGAAUACGUUGUACACCtg (안티센스)
인간 Suv39h1	23	GGUCCUUUGUCUAUAUCAAtt (센스)
인간 Suv39h1	24	UUGAUAUAGACAAAGGACCtt (안티센스)
인간 Suv39h2	25	GCUCACAUGUAAAUCGAUUtt (센스)
인간 Suv39h2	26	AAUCGAUUUACAUGUGAGCtt (안티센스)
인간 Suv39h2	27	GUGUCGAUGUGGACCUGAAtt (센스)
인간 Suv39h2	28	UUCAGGUCCACAUCGACACct (안티센스)
인간 Setdb1 (ESET)	29	GGACUACAGUAUCAUGACAtt (센스)
인간 Setdb1 (ESET)	30	UGUCAUGAUACUGUAGUCCca (안티센스)
인간 Setdb1 (ESET)	31	GGACGAUGCAGGAGAUAGAtt(센스)
인간 Setdb1 (ESET)	32	UCUAUCUCCUGCAUCGUCCga (안티센스)
인간 Setdb1 (ESET)	33	GGAUGGGUGUCGGGAUAAAtt (센스)
인간 Setdb1 (ESET)	34	UUUAUCCCGACACCCAUCCtt (안티센스)
인간 Ehmt1(GLP)	35	GCACCUUUGUCUGCGAAUAtt (센스)
인간 Ehmt1(GLP)	36	UAUUCGCAGACAAAGGUGCcc (안티센스)
인간 Ehmt1(GLP)	37	GAUCAAACCUGCUCGGAAAtt (센스)
인간 Ehmt1(GLP)	38	UUUCCGAGCAGGUUUGAUCca (안티센스)
인간 PRDM2/Riz1	39	GAAUUUGCCUUCUUAUGCAtt (센스)
인간 PRDM2/Riz1	40	UGCAUAAGAAGGCAAAUUCtt (안티센스)
인간 PRDM2/Riz1	41	GAGGAAUUCUAGUCCCGUAtt (센스)
인간 PRDM2/Riz1	42	UACGGGACUAGAAUUCCUCaa (안티센스)

[0197] 의심을 피하기 위하여, 인간 Setdb1 cDNA의 서열은 예를 들어, Genebank 수탁번호 NM_001145415.1(서열번호 45)에서 제공되며, 당업자는 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물에서 H3K9 메틸전달 억제제로서 사용하기 위한 인간 Setdb1 mRNA 발현을 억제하는 유전자 사일런싱 RNAi 조절제를 설계하기 위해 사용할 수 있다.

[0198] 의심을 피하기 위하여, 인간 Ehmt1 cDNA의 서열은 예를 들어, Genebank 수탁번호 NM_024757.4(서열번호 46)에서 제공되며, 당업자는 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물에서 H3K9 메틸전달 억제제로서 사용하기 위한 인간 Ehmt1 mRNA 발현을 억제하는 유전자 사일런싱 RNAi 조절제를 설계하기 위해 사용할 수 있다.

[0199] 의심을 피하기 위하여, 인간 PRDM2 cDNA의 서열은 예를 들어, Genebank 수탁번호 NM_012231.4(서열번호 47)에서 제공되며, 당업자는 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물에서 H3K9 메틸전달 억제제로서 사용하기 위한 인간 PRDM2 mRNA 발현을 억제하는 유전자 사일런싱 RNAi 조절제를 설계하기 위해 사용할 수 있다.

[0200] 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제는 RNAi 제제, siRNA 제제, shRNA, 올리고뉴클레오티드, CRISPR/Cas9, 중화 항체 또는 항체 단편, 앱타머, 소분자, 단백질, 펩티드, 소분자, 아비디미르, 아비미르 및 그의 기능성 단편 또는 유도체 등으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 RNAi 제제, 예를 들어, siRNA 또는 shRNA 분자이다. 일부 실시형태에서, 제제는 인간 Suv39h1(서열번호 9), 마우스 Suv39h1(서열번호 11), 래트 Suv39h1(서열번호 13) 또는 소 Suv39h1(서열번호 15)의 단백질 발현을 감소시키는 핵산 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 인간 Suv39h2(서열번호 10), 마우스 Suv39h2(서열번호 12), 래트 Suv39h2(서열번호 14) 또는 소 Suv39h2(서열번호 16)의 발현을 억제하기 위한 핵산 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 마우스 Suv39h1의 siRNA 억제제는 서열번호 18 또는 그의 적어도 10 연속 뉴클레오티드의 단편 또는 서열번호 18에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)을 가진 핵산 서열이다. 일부 실시형태에서, siRNA 또는 다른 핵산 억제제는 Suv39h1의 서열번호 17의 표적 서열에 전체적으로 또는 부분적으로 하이브리드화한다. 일부 실시형태에서, 마우스 Suv39h2의 siRNA 억제제는 서열번호 20 또는 그의 적어도 10 연속 뉴클레오티드의 단편 또는 서열번호 20에 적어도 80% 서열 동일성(또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약

90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성)을 가진 핵산 서열이다. 일부 실시형태에서, siRNA 또는 다른 핵산 억제제는 Suv39h2의 서열번호 19 또는 서열번호 44의 표적 서열에 전체적으로 또는 부분적으로 하이브리드화한다.

[0201] 상기 양태의 다른 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 SUV39H1, SUV39H2, G9A(EHMT2), EHMT1, ESET(SETDB1), SETDB2, MLL, MLL2, MLL3, SETD2, NSD1, SMYD2, DOT1L, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, EZH2, SETD7, PRDM2, PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT5, PRMT6, PRMT7, PRMT8, PRMT9, PRMT10, PRMT11, CARM1로 이루어진 군으로부터 선택된 상기 히스톤 메틸트랜스퍼라제 중 어느 하나를 억제한다.

[0202] 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1을 억제하는 제제는 핵산이다. H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 핵산 억제제는 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 RNA 간섭-유도(RNAi) 분자, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 siRNA, dsRNA, stRNA, shRNA 및 그의 변형 버젼을 포함하며, RNA 간섭(RNAi) 분자는 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 유전자 중 어느 하나로부터의 유전자 발현을 침묵시킨다.

[0203] 따라서, 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제는 당업자에게 일반적으로 알려진 임의의 "유전자 사일런싱" 방법에 의해 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 핵산 억제제는 안티-센스 올리고핵산 또는 핵산 유사체, 예를 들어 그러나 이에 제한되지 않는 DNA, RNA, 펩티드-핵산(PNA), 가짜-상보성 PNA(pc-PNA) 또는 잠긴 핵산(LNA) 등이다. 대안적 실시형태에서, 핵산은 DNA 또는 RNA, 및 핵산 유사체, 예를 들어, PNA, pcPNA 및 LNA이다. 핵산은 단일 또는 이중 쇄일 수 있으며, 관심 단백질을 인코딩하는 핵산, 올리고뉴클레오티드, PNA 등을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 그러한 핵산 서열은 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 전사 억제제로서 작용하는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열, 안티센스 분자, 리보자임, 작은 억제성 핵산 서열, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 RNAi, shRNAi, siRNA, 마이크로 RNAi (mRNAi), 안티센스 올리고뉴클레오티드 등을 포함한다.

[0204] 일부 실시형태에서, 진핵 세포에서 내인성으로 발견되는 RNA 형태인 단일쇄 RNA(ssRNA)는 RNAi 분자를 형성하기 위하여 이용될 수 있다. 세포 ssRNA 분자는 메신저 RNA(및 전구체 프리-메신저 RNA), 작은 핵 RNA, 작은 핵인 RNA, 트랜스퍼 RNA 및 리보좀 RNA를 포함한다. 이중쇄 RNA(dsRNA)는 크기-의존성 면역 반응을 유도하여, 30 bp 보다 큰 dsRNA는 인터페론 반응을 활성화시키는 반면, 더 짧은 dsRNA는 다이서(Dicer) 효소의 다운스트림의 세포의 내인성 RNA 간섭 기전내로 공급된다.

[0205] RNA 간섭(RNAi)은 선택된 표적 폴리펩티드의 발현을 억제하기 위한 강력한 접근법을 제공한다. RNAi는 선택적 분해를 위한 표적 폴리펩티드를 인코딩하는 메신저 RNA를 표적화하는 작은 간섭 RNA(siRNA) 듀플렉스를 이용한다. 유전자 발현의 siRNA-의존성 전사 후 사일런싱은 siRNA에 의해 가이드된 부위에서 표적 메신저 RNA 분자를 절단하는 것에 관련된다.

[0206] RNA 간섭(RNAi)은 표적 유전자와 동일하거나 매우 유사한 서열의 RNA의 발현 또는 도입이 그 표적화된 유전자로부터 전사된 메신저 RNA(mRNA)의 서열 특이적 분해 또는 특이적 전사 후 유전자 사일런싱(PTGS)을 야기하여 (Coburn, G. and Cullen, B. (2002) J. of Virology 76(18):9225 참고) 표적 유전자의 발현을 억제하는, 진화적으로 보존된 과정이다. 일 실시형태에서, RNA는 이중쇄 RNA(dsRNA)이다. 이 과정은 식물, 무척추동물 및 포유류 세포에서 개시되었다. 자연에서, RNAi는 긴 dsRNA가 siRNA로 불리는 이중쇄 단편으로 전진적으로 절단되는 것을 촉진하는, dsRNA-특이적 엔도뉴클레아제 다이서에 의해 개시된다. siRNA는 표적 mRNA를 인식하고 절단하는 단백질 복합체("RNA 유도된 사일런싱 복합체" 또는 "RISC"로 불림)내로 통합된다. RNAi는 또한 핵산 분자, 예를 들어, 합성 siRNAs 또는 RNA 간섭 제제를 도입하여 표적 유전자의 발현을 억제하거나 침묵시킴으로써 개시될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "표적 유전자 발현의 억제"는 RNA 간섭이 유도되지 않은 상황에 비교할 때 표적 유전자 또는 표적 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 발현 또는 단백질 활성 또는 수준의 임의의 감소를 포함한다. 감소는 RNA 간섭 제제에 의해 표적화되지 않은 표적 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 활성 또는 수준 또는 표적 유전자의 발현에 비하여 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 이상일 수 있다.

[0207] 본 명세서에서 "작은 간섭 RNA"로도 불리는 "짧은 간섭 RNA"(siRNA)는 예를 들어, RNAi에 의해, 표적 유전자의 발현을 억제하는 기능을 하는 제제로서 정의된다. siRNA는 화학적으로 합성되거나, 인비트로 전사에 의해 생산되거나 또는 숙주 세포내에서 생산될 수 있다. 일 실시형태에서, siRNA는 약 15 내지 약 40 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 약 15 내지 약 28 뉴클레오티드 길이, 더욱 바람직하게는 약 19 내지 약 25 뉴클레오티드 길이,

그리고 더욱 바람직하게는 약 19, 20, 21, 22, 또는 23 뉴클레오티드 길이의 이중쇄 RNA(dsRNA) 분자이며, 각 쇄에 약 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5 뉴클레오티드의 길이를 가진 3' 및/또는 5' 오버행(overhang)을 함유할 수 있다. 오버행의 길이는 두 쇄 사이에서 독립적이며, 즉, 일 쇄상의 오버행의 길이는 두번째 쇄상의 오버행의 길이에 의존하지 않는다. 바람직하게는 siRNA는 표적 메신저 RNA(mRNA)의 분해 또는 특이적 전사 후 유전자 사일런싱(PTGS)를 통해 RNA 간섭을 촉진할 수 있다.

[0208] siRNA는 또한 작은 헤어핀(스템 루프(stem loop)라고도 불림) RNA(shRNA)를 포함한다. 일 실시형태에서, 이들 shRNA는 짧은(예를 들어, 약 19 내지 약 25 뉴클레오티드) 안티센스 쇄, 이어서 약 5 내지 약 9 뉴클레오티드 및 유사한 센스 쇄로 이루어진다. 대안적으로, 센스 쇄는 뉴클레오티드 루프 구조에 앞서고 안티센스 쇄가 뒤따를 수 있다. 이들 shRNA는 플라스미드, 레트로바이러스 및 렌티바이러스에 함유되고 예를 들어, pol III U6 프로모터 또는 다른 프로모터(예를 들어, 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 Stewart, et al. (2003) RNA Apr;9(4):493-501 참고)로부터 발현될 수 있다.

[0209] RNA 간섭 제제의 표적 유전자 또는 서열은 세포 유전자 또는 게놈 서열, 예를 들어 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 유전자 서열의 H3K9 메틸트랜스퍼라제 유전자 서열일 수 있다. siRNA는 표적 유전자 또는 게놈 서열 또는 그 단편에 실질적으로 상동성일 수 있다. 본 맥락에서 사용되는 바처럼, 용어 "상동성"은 표적의 RNA 간섭을 일으키기 위하여, 표적 mRNA 또는 그 단편에 실질적으로 동일하거나, 충분히 상보적이거나 유사한 것으로 정의된다. 천연 RNA 분자에 더하여, 표적 서열의 발현을 억제하거나 간섭하기 위해 적합한 RNA는 RNA 유도체 및 유사체를 포함한다. 바람직하게는, siRNA는 그의 표적 서열과 동일하다.

[0210] siRNA는 바람직하게는 하나의 서열만을 표적화한다. siRNA와 같은 RNA 간섭 제제의 각각은 예를 들어, 발현 프로파일링에 의해 잠재적인, 표적을 벗어나는(off-target) 효과에 대해 스크리닝될 수 있다. 그러한 방법은 당업자에게 알려져 있으며 예를 들어, Jackson et al, Nature Biotechnology 6:635-637, 2003에 개시된다. 발현 프로파일링에 더하여, 또한 표적을 벗어나는 효과를 가질 수 있는 잠재적 서열을 확인하기 위하여 서열 데이터베이스 내의 유사한 서열들에 대해 잠재적인 표적 서열을 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, Jackson et al. (Id.) 15에 따라, 또는 아마도 겨우 11 인접 뉴클레오티드의 서열 동일성만으로도 비표적화된 전사물의 사일런싱을 지시하기에 충분하다. 따라서, BLAST와 같은 임의의 공지의 서열 비교 방법에 의한 서열 동일성 분석을 이용하여, 잠재적인, 표적을 벗어나는 사일런싱을 피하기 위하여, 제안된 siRNA를 처음에 스크리닝할 수 있다.

[0211] siRNA 분자는 RNA만을 함유한 분자로 제한될 필요가 없으며, 예를 들어, 추가로 화학적으로 변형된 뉴클레오티드 및 비-뉴클레오티드를 포함하며, 또한 리보스 당 분자가 다른 당 분자 또는 유사한 기능을 수행하는 분자로 치환된 분자를 포함한다. 더욱이, 뉴클레오티드 잔기 간의 비-천연 결합, 예를 들어, 포스포로티오에이트 결합이 이용될 수 있다. 예를 들어, RNA에서 발견되는 천연-발생 D-리보뉴클레오시드 대신 D-아라비노푸라노실 구조를 함유한 siRNA가 본 발명에 따라 RNAi 분자에서 사용될 수 있다(미국 특허 5,177,196호). 다른 예는 당과 뉴클레오시드의 헤테로사이클릭 염기 사이의 o-결합을 함유한 RNA 분자를 포함하며, 상기 결합은 뉴클레아제 저항성 및 2'-O-메틸 리보스, 아라비노스 및 특히 D-아라비노스를 함유한 올리고뉴클레오티드와 유사한 올리고뉴클레오티드 분자에의 상보적 쇄의 단단한 결합을 부여한다(미국 특허 5,177,196호).

[0212] RNA 쇄는 형광단과 같은, 리포터 기의 반응성 기능기로 유도체화될 수 있다. 특히 유용한 유도체는 RNA 쇄의 말단 또는 말단들에서, 전형적으로는 센스 쇄의 3' 말단에서 변형된다. 예를 들어, 3' 말단의 2'-하이드록실이 다양한 기로 쉽게 선택적으로 유도체화될 수 있다.

[0213] 다른 유용한 RNA 유도체는 2'O-알킬화 잔기 또는 2'-O-메틸 리보실 유도체 및 2'-O-플루오로 리보실 유도체와 같은 변형된 탄수화물 모이어티를 가진 뉴클레오티드를 포함한다. RNA 염기 또한 변형될 수 있다. 표적 서열의 발현을 억제하거나 간섭하기 위해 유용한 임의의 변형된 염기가 사용될 수 있다. 예를 들어, 5-브로모우라실 및 5-이오도우라실과 같은 할로겐화 염기가 포함될 수 있다. 염기는 또한 알킬화될 수 있으며, 예를 들어, 7-메틸구아노신이 구아노신 잔기 대신 통합될 수 있다. 성공적인 억제를 생성하는 비-천연 염기가 또한 포함될 수 있다.

[0214] 가장 바람직한 siRNA 변형은 2'-데옥시-2'-플루오로우리딘 또는 잠긴 핵산(LNA) 뉴클레오티드 및 포스포다이에스테르 또는 변하는 수의 포스포로티오에이트 결합을 함유한 RNA 듀플렉스를 포함한다. 그러한 변형은 당업자에게 알려져 있으며 예를 들어, Braasch et al., Biochemistry, 42: 7967-7975, 2003에 개시된다. siRNA 분자에의 유용한 변형의 대부분은 안티센스 올리고뉴클레오티드 기술을 위해 확립된 화학을 이용하여 도입될 수 있다. 바람직하게는, 변형은 최소의 2'-O-메틸 변형에 관련되며, 바람직하게는 그러한 변형을 배제한다. 변형은 또한 바람직하게는 siRNA의 자유 5'-하이드록실기의 변형을 배제한다.

[0215] 그들의 3'- 또는 그들의 5'-말단 또는 둘 모두에 공유적으로 부착된 다양한 "꼬리"를 가진 siRNA 및 miRNA 분자가 또한 본 기술분야에서 알려져 있으며 본 발명의 방법을 이용하여 전달된 siRNA 및 miRNA 분자를 안정화하기 위하여 사용될 수 있다. 일반적으로 말해서, RNA 분자의 3' 또는 5' 말단에 부착된 인터칼레이팅기(intercalating group), 다양한 종류의 리포터 기 및 친유성 기가 당업자에게 알려져 있으며 본 발명의 방법에 따라 유용하다. 본 발명에 따라 유용한 변형된 RNA 분자의 제조에 적용가능한 3'-콜레스테롤 또는 3'-아크리딘 변형된 올리고뉴클레오티드의 합성의 설명은 예를 들어, 논문 : Gamper, H. B., Reed, M. W., Cox, T., Virosco, J. S., Adams, A. D., Gall, A., Scholler, J. K., and Meyer, R. B. (1993) Facile Preparation and Exonuclease Stability of 3'-Modified Oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res. 21 145-150; 및 Reed, M. W., Adams, A. D., Nelson, J. S., and Meyer, R. B.,Jr. (1991) Acridine and Cholesterol-Derivatized Solid Supports for Improved Synthesis of 3'-Modified Oligonucleotides. Bioconjugate Chem. 2 217-225 (1993)에서 찾을 수 있다.

[0216] H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 유전자를 표적화하기 위해 유용한 다른 siRNA는 쉽게 설계하여 시험할 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 개시된 방법을 위해 유용한 siRNA는 특정 H3K9 메틸트랜스퍼라제 유전자, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 유전자에 상동성인, 약 15 내지 약 40 또는 약 15 내지 약 28 뉴클레오티드 길이의 siRNA 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 표적화 제제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 표적화 siRNA 분자는 길이가 약 25 내지 약 29 뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 표적화 siRNA, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 표적화 siRNA 분자는 약 27, 28, 29, 또는 30 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 표적화 RNAi, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 표적화 siRNA 분자는 또한 3' 하이드록실기를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 표적화 siRNA, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 표적화 siRNA 분자는 단일쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, 그러한 분자는 블런트(blunt) 말단을 가지거나 오버행 말단(예를 들어, 5', 3')을 포함할 수 있다. 구체적 실시형태에서, RNA 분자는 이중쇄이고 블런트 말단을 갖거나 오버행 말단을 포함할 수 있다.

[0217] 일 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 표적화 RNA 분자의 적어도 일 쇄는 약 0 내지 약 6 뉴클레오티드(예를 들어, 피리미딘 뉴클레오티드, 퓨린 뉴클레오티드) 길이의 3' 오버행을 갖는다. 다른 실시형태에서, 3' 오버행은 약 1 내지 약 5 뉴클레오티드, 약 1 내지 약 3 뉴클레오티드 및 약 2 내지 약 4 뉴클레오티드 길이이다. 일 실시형태에서, Suv39h1/2, Setdb1, Ehmt1 또는 PRDM2 표적화 RNA 분자는 이중쇄이며 - 일 쇄는 3' 오버행을 가지고 다른 쇄는 블런트-말단을 갖거나 오버행을 가질 수 있다. H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 또는 PRDM2 RNAi 제제가 이중쇄이고 두 쇄가 모두 오버행을 포함하는 실시형태에서, 오버행의 길이는 각 쇄를 위해 동일하거나 상이할 수 있다. 구체적 실시형태에서, 본 발명의 RNA는 짝을 이루며 RNA의 두 3' 말단 상에 약 1 내지 약 3, 구체적으로 약 2 뉴클레오티드의 오버행을 갖는 약 19, 20, 21, 또는 22 뉴클레오티드를 포함한다. 일 실시형태에서, 3' 오버행은 분해에 대하여 안정화될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, RNA는 아데노신 또는 구아노신 뉴클레오티드와 같은 퓨린 뉴클레오티드를 포함시킴으로써 안정화된다. 대안적으로는, 변형된 유사체에 의한 피리미딘 뉴클레오티드의 치환, 예를 들어, 2'-데옥시티미딘에 의한 우리딘 2 뉴클레오티드 3' 오버행의 치환이 용인되며 RNAi의 효율에 영향을 주지 않는다. 2' 하이드록실의 부재는 조직 배양 배지에서 오버행의 뉴클레아제 저항성을 상당히 향상시킨다.

[0218] 본 명세서의 실시예에서 기술되는 바와 같이, H3K9 메틸트랜스퍼라제 Suv39h1, Suv39h2 및 Setdb1에 대한 siRNA는 SCNT의 효율을 증가시키기 위하여 성공적으로 사용되었다. H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 또는 PRDM2의 유전자 사일런싱 RNAi가 구매가능하지 않은 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 또는 PRDM2의 억제를 표적화하는 유전자 사일런싱 RNAi 제제는 당업자에 의해 그리고 본 명세서에 기술된 방법에 따라 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 또는 PRDM2 mRNA 및/또는 단백질의 발현 및/또는 넉다운의 평가는 당업자에게 알려진 구매가능한 키트를 이용하여 결정할 수 있다. 다른 것은 당업자가 표적 mRNA의 공지 서열에 기초하여 용이하게 준비할 수 있다.

[0219] 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제는 Suv39h1, Suv39h2 Setdb1, Ehmt1 또는 PRDM2 mRNA 수준 중 어느 하나 이상을 하향조절하거나 감소시키며 25-nt 헤어핀 서열일 수 있는 유전자 사일런싱 RNAi 제제이다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 또는 PRDM2 중 어느 하나 이상의 shRNA 서열과 같은 유전자 사일런싱 RNAi이다.

[0220] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법에서 사용된 RNA 간섭 제제는 정맥내 주입, 예를 들어, 벡터를 사용

하지 않고 유체역학 주입 후 인 비보로 세포에 의해 능동적으로 흡수되어, RNA 간섭 제제, 예를 들어, 본 발명의 방법에서 사용된 siRNA의 효율적인 인 비보 전달을 보여준다.

[0221] RNA 간섭 제제, 예를 들어, 본 발명의 방법에서 사용된 siRNA 또는 shRNA의 전달을 위한 다른 전략, 예를 들어, 벡터, 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터에 의한 전달이 또한 사용될 수 있다. 그러한 벡터는 예를 들어, Xiao-Feng Qin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100: 183-188에 개시된 대로 사용될 수 있다. 다른 전달 방법은 RNA 간섭 제제를 염기성 펩티드, 예를 들어, TAT 펩티드의 단편과 접합시키거나 혼합하여 염기성 펩티드를 이용하거나, 양이온성 지질과 혼합하거나 입자내로 제제화하여, RNA 간섭 제제, 예를 들어, 본 발명의 siRNA 또는 shRNA를 전달하는 것을 포함한다.

[0222] 주지한 바와 같이, siRNA 또는 shRNA와 같은 dsRNA는 테트라사이클린 유도성 벡터와 같은 유도성 벡터를 이용하여 전달될 수 있다. 예를 들어, pTet-On 벡터(비디 바이오사이언시즈 클론텍(BD Biosciences Clontech), 캘리포니아주 팔로 알토)를 이용하는, Wang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5103-5106에 개시된 방법이 이용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터 또는 외래 서열의 삽입 및 진핵 세포 내로의 도입을 위해 적응된 임의의 다른 적합한 비히클일 수 있다. 벡터는 아고니스트 또는 아고니스트 핵산 분자의 DNA 서열이 RNA로 전사되도록 지시할 수 있는 발현 벡터일 수 있다. 바이러스 발현 벡터는 예를 들어, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스, 소 파필로마 바이러스, 아데노바이러스- 및 아데노-연합-기반 벡터 또는 상기 중 어느 것의 하이브리드 바이러스를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 벡터는 에피좀성이다. 적합한 에피좀 벡터의 사용은 길항체 핵산 분자를 개체에서 높은 카피수의 염색체 외 DNA로 유지하는 수단을 제공하여, 염색체 통합의 잠재적 효과를 제거한다.

[0223] 본 명세서에 기술된 방법에서 유용한 RNA 간섭 분자 및 핵산 억제제는 직접 화학 합성, 재조합 다이서 단백질 또는 초파리 배아 용해물에의 노출에 의한 더 긴 이중쇄 RNA의 프로세싱을 통해, S2 세포로부터 유도된 인 비트로 시스템을 통해, 파아지 RNA 폴리머라제, RNA-의존성 RNA 폴리머라제 및 DNA 기반 벡터를 이용하는 것과 같은 임의의 공지 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 세포 용해물 또는 인 비트로 프로세싱의 이용은 추가로 용해물 등으로부터의 짧은, 예를 들어, 약 21-23 뉴클레오티드의 siRNA의 후속 분리에 관련될 수 있다. 화학 합성은 보통 두 개의 단일쇄 RNA-올리고머를 만든 후 두 단일쇄 올리고머를 이중쇄 RNA로 어닐링시킴으로써 진행한다. 다른 예는 siRNA의 화학적 및 효소적 합성을 교시하는 WO 99/32619호 및 WO 01/68836호에 개시된 방법을 포함한다. 또한, 특정 siRNA를 고안하고 제조하기 위한 많은 상업적 서비스가 이용가능하다(예를 들어, 퀴아젠 인크.(QIAGEN Inc.), 캘리포니아주 발렌시아 및 앰비온 인크(AMBION Inc.), 텍사스주 오스틴) 참고).

[0224] 용어 "안티미르(antimir)" "마이크로RNA 억제제" 또는 "miR 억제제"는 동의어이며 특정 miRNA의 활성을 간섭하는 올리고뉴클레오티드를 말한다. 억제제는 단일쇄, 이중쇄(RNA/RNA 또는 RNA/DNA 듀플렉스) 및 헤어핀 디자인을 비롯한 다양한 형태를 취할 수 있으며, 일반적으로 마이크로RNA 억제제는 표적화될 miRNA의 성숙 쇄(또는 쇄들)과 상보적이거나 부분적으로 상보적인 하나 이상의 서열 또는 서열의 부분을 포함하며, 또한, miRNA 억제제는 성숙 miRNA의 역 보체인 서열에 대하여 5' 및 3'에 위치한 추가의 서열을 포함할 수 있다. 추가의 서열은 성숙 miRNA가 유래되는 프리-miRNA에서 성숙 miRNA에 인접한 서열의 역 보체일 수 있거나, 또는 추가 서열은 (A, G, C, U, 또는 dT의 혼합물을 가진) 임의 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, 추가 서열 중 하나 또는 둘 모두는 헤어핀을 형성할 수 있는 임의 서열이다. 따라서, 일부 실시형태에서, miRNA의 역 보체인 서열은 헤어핀 구조에 의해 5' 측 및 3' 측에서 인접된다. 이중쇄일 경우, 마이크로RNA는 반대 쇄 상의 뉴클레오티드 사이의 미스매치를 포함할 수 있다.

[0225] 일부 실시형태에서, 제제는 Suv39h1, Suv39h2 Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제 중 어느 하나 또는 조합의 발현을 억제하는 단백질 또는 폴리펩티드 또는 RNAi 제제이다. 그러한 실시형태에서 세포는 그러한 제제의 발현 증가를 제공하기 위해 변형될 수 있으며(예를 들어, 상동성 재조합에 의해), 예를 들어, 세포가 Suv39h1, Suv39h2 Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제, 예를 들어, 단백질 또는 RNAi 제제(예를 들어, 유전자 사일런싱-RNAi 제제)를 발현하도록 자연 발생 프로모터의 전체 또는 일부를 이종성 프로모터의 전부 또는 일부로 대체함으로써 변형될 수 있다. 전형적으로, 이종성 프로모터는 그것이 제제를 인코딩하는 원하는 핵산에 작동가능하게 연결되는 방식으로 삽입된다. 예를 들어, 트랜스캐리오틱 써라피즈, 인크(Transkaryotic Therapies, Inc.)의 PCT 국제 공개 WO 94/12650호, 셀 진시스, 인크.(Cell Genesys, Inc.)의 PCT 국제 공개 WO 92/20808호 및 어플라이드 리서치 시스템즈(Applied Research Systems)의 PCT 국제 공개 WO 91/09955호를 참고한다. 세포는 또한 유도성 조절 요소의 제어하에서 억제제 제제를 포함하는 내인성 유전자를 발현하기 위해 조작될 수 있으며, 이 경우 내인성 유전자의 조절 서열은 상동성 재조합에 의해 대체될 수 있다. 유전자 활성화 기술은 차펠(Chappel)의 미국 특허 5,272,071호; 셔윈(Sherwin)등의 미국 특허

5,578,461호; 셀던 등(Selden et al.)의 PCT/US92/09627호(WO93/09222호); 및 스쿨치(Skoultchi)등의 PCT/US90/06436호(WO91/06667호)에 개시된다. 제제는 miRNA를 발현하기에 적합한 배양 조건하에서 형질전환된 숙주 세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 수득되는 발현된 제제는 이어서 젤 여과 및 이온 교환 크로마토그래피와 같은 공지의 정제 과정을 이용하여 그러한 배양물로부터(즉, 배양 배지 또는 세포 추출물로부터) 정제될 수 있다. Suv39h1, Suv39h2 Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 펩티드 또는 핵산 제제 억제제의 정제는 또한 단백질에 결합할 제제를 함유한 친화성 컬럼; 콘카나발린 A-아가로즈, 헤파린-토요펄(HEPARIN-TOYOPEARL)™ 또는 시바크롬 블루(Cibacrom blue) 3GA 세파로즈와 같은 친화성 수지에 대한 하나 이상의 컬럼 단계; 페닐 에테르, 부틸 에테르 또는 프로필 에테르와 같은 수지를 이용한 소수성 상호작용 크로마토그래피에 관련된 하나 이상의 단계; 면역친화성 크로마토그래피 또는 상보성 cDNA 친화성 크로마토그래피를 포함할 수 있다.

[0226] 일 실시형태에서, Suv39h1, Suv39h2 Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 핵산 억제제(예를 들어, 유전자 사일런싱 RNAi 제제)는 합성하여, 예를 들어, 당업자에게 알려진 임의의 합성 방법에 의해 핵산을 화학적으로 합성하여 수득할 수 있다. Suv39h1, Suv39h2 Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 합성된 핵산 억제제는 이어서 본 기술분야에 알려진 임의의 방법에 의해 정제될 수 있다. 핵산의 화학 합성 방법은 포스포트리에스테르, 포스페이트 또는 포스포르아미다이트 화학 및 고체상 기술을 이용하거나 또는 데옥시뉴클레오시드 H-포스포네이트 중간체를 통한 인 비트로 화학 합성을 포함하지만 이에 제한되지 않는다(본글(Bhongle)의 미국 특허 5,705,629호 참고).

[0227] 일부 환경에서, 예를 들어, 핵산 억제제의 뉴클레아제 안정성 증가가 필요한 경우, 핵산 유사체 및/또는 변형된 뉴클레오시드간 결합을 가진 핵산이 이용될 수 있다. 변형된 뉴클레오시드간 결합을 함유한 핵산은 또한 본 기술분야에 잘 알려진 시약과 방법을 이용하여 합성될 수 있다. 예를 들어, 포스포네이트 포스포로티오에이트, 포스포로다이티오에이트, 포스포르아미데이트 메톡시에틸 포스포르아미데이트, 포름아세탈, 티오포름아세탈, 다이이소프로필실릴, 아세트아미데이트, 카르바메이트, 다이메틸렌-설파이드(-CH2-S-CH2), 다이메틸렌-설폭사이드(-CH2-SO-CH2), 다이메틸렌-설폰(-CH2-SO2-CH2), 2'-O-알킬 및 2'-데옥시-2'-플루오로' 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 결합을 함유한 핵산의 합성 방법이 본 기술분야에 잘 알려져 있다(Uhlmann et al., 1990, Chem. Rev. 90:543-584; Schneider et al., 1990, Tetrahedron Lett. 31:335 및 그안에 인용된 문헌들을 참고). 쿡 등(Cook, et al.)의 미국 특허 5,614,617호 및 5,223,618호, 아세베도 등(Acevedo, et al)의 5,714,606호, 쿡 등의 5,378,825호, 부르 등(Buhr, et al.)의 5,672,697호 및 5,466,786호, 쿡 등의 5, 777,092호, 데 메스마커 등(De Mesmacker, et al.)의 5,602,240호, 쿡 등의 5,610,289호 및 왕(Wang)의 5,858,988호 또한 뉴클레아제 안정성 및 세포 흡수 향상을 위한 핵산 유사체를 개시한다.

[0228] shRNA 분자를 비롯한 합성 siRNA 분자는 또한 당업자에게 알려진 많은 기술을 이용하여 쉽게 수득할 수 있다. 예를 들어, siRNA 분자는 적절하게 보호된 리보뉴클레오시드 포스포르아미다이트 및 종래의 DNA/RNA 합성기를 이용하는 것과 같은, 본 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성되거나 재조합하여 생산될 수 있다(예를 들어, Elbashir, S.M. et al. (2001) Nature 411:494-498; Elbashir, S.M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001) Genes & Development 15:188-200; Harborth, J. et al. (2001) J. Cell Science 114:4557-4565; Masters, J.R. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98:8012-8017; 및 Tuschl, T. et al. (1999) Genes & Development 13:3191-3197 참고). 대안적으로, 프로리고(Proligo)(독일 함부르크), 다마콘 리서치(Dharmacon Research)(미국 콜로라도주 라파예트), 피어스 케미컬(Pierce Chemical)(페르비오 사이언스(Perbio Science)의 일부, 미국 일리노이주 락포드), 글렌 리서치(Glen Research)(미국 버지니아주 스털링), 켐진스(ChemGenes)(미국 매사추세츠주 애쉬랜드) 및 크루아켐(Cruachem)(영국 글라스고우)를 포함하며 이에 제한되지 않는 여러 상업적 RNA 합성 공급체가 이용가능하다. 따라서, siRNA 분자는 합성하기가 과도하게 어렵지 않으며 RNAi에 적합한 품질로 쉽게 제공된다. 또한, dsRNA는 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 및 렌티바이러스에 의해 인코딩된 스템 루프 구조로 발현될 수 있다(Paddison, P.J. et al. (2002) Genes Dev. 16:948-958; McManus, M.T. et al. (2002) RNA 8:842-850; Paul, C.P. et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:505-508; Miyagishi, M. et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:497-500; Sui, G. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:5515-5520; Brummelkamp, T. et al. (2002) Cancer Cell 2:243; Lee, N.S., et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:500-505; Yu, J.Y., et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:6047-6052; Zeng, Y., et al. (2002) Mol. Cell 9:1327-1333; Rubinson, D.A., et al. (2003) Nat. Genet. 33:401-406; Stewart, S.A., et al. (2003) RNA 9:493-501). 이들 벡터는 일반적으로 dsRNA의 업스트림에 polIII 프로모터를 가지며 센스 및 안티센스 RNA쇄를 별도로 및/또는 헤어핀 구조로서 발현할 수 있다. 세포 내에서, 다이서는 짧은 헤어핀

RNA(shRNA)를 효과적인 siRNA로 가공한다.

[0229] 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제는 Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2 유전자 중 어느 하나를 표적화하며 구체적 실시형태에서, 개시 코돈의 약 25 내지 50 뉴클레오티드, 약 50 내지 75 뉴클레오티드 또는 약 75 내지 100 뉴클레오티드 다운스트림에서 시작하는, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 코딩 mRNA 서열을 표적화하는 유전자 사일런싱 siRNA 분자이다. 본 발명의 siRNA 분자를 고안하는 방법은 29 뉴클레오티드 서열 모티프 AA(N29)TT(여기서 N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)(서열번호 48)를 확인하고 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% G/C 함량을 가진 히트(hit)를 선별하는 것에 관련된다. 서열의 "TT" 부분은 선택적이다. 대안적으로, 그러한 서열이 발견되지 않으면, 모티프 NA(N21)(여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)를 이용하여 서치를 확장할 수 있다. 이 상황에서, 센스 siRNA의 3' 말단은 센스 및 안티센스 3' 오버행의 서열 조성에 관하여 대칭적 듀플렉스의 생성을 허용하기 위하여 TT로 전환될 수 있다. 안티센스 siRNA 분자는 그 후 23 뉴클레오티드 서열 모티프의 뉴클레오티드 위치 1 내지 21에 대한 보체로서 합성될 수 있다. 대칭적 3' TT 오버행의 사용은, 작은 간섭 리보뉴클레오단백질 입자(siRNP)가 대략 동일한 비율의 센스 및 안티센스 표적 RNA-절단 siRNP로 형성되도록 하기 위해 유익할 수 있다 (Elbashir et al. (2001) 상기 및 Elbashir et al. 2001 상기). NCBI, BLAST, Derwent 및 GenSeq 및 구매가능한 올리고합성 소프트웨어, 예를 들어, 올리고엔진(OLIGOENGINE)®을 비롯한 그러나 이에 제한되지 않는 서열 데이터베이스의 분석 또한 단지 하나의 유전자만이 표적화되도록 하기 위하여 EST 라이브러리에 대해 siRNA 서열을 선별하기 위해 사용될 수 있다.

[0230] 본 명세서에 개시된 방법에 유용한 siRNA는 길이가 약 15 내지 약 40 또는 약 15 내지 약 28 뉴클레오티드이며 Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제 중 어느 하나에 상동성인 siRNA 분자를 포함한다. 바람직하게는, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제 유전자에의 표적화 siRNA 분자는 약 19 내지 약 25 뉴클레오티드 길이이다. 더욱 바람직하게는, 표적화 siRNA 분자는 약 19, 20, 21, 또는 22 뉴클레오티드 길이이다. 표적화 siRNA 분자는 또한 3' 하이드록실기를 포함할 수 있다. 표적화 siRNA 분자는 단일쇄 또는 이중쇄일 수 있으며; 그러한 분자는 블런트 말단이거나 오버행 말단(예를 들어, 5', 3')을 포함할 수 있다. 구체적 실시형태에서, RNA 분자는 이중쇄이며 블런트 말단이거나 오버행 말단을 포함한다.

[0231] 일 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 RNAi 표적화 RNA 분자의 적어도 일 쇄는 약 0 내지 약 6 뉴클레오티드(예를 들어, 피리미딘 뉴클레오티드, 퓨린 뉴클레오티드) 길이의 3' 오버행을 갖는다. 다른 실시형태에서, 3' 오버행은 약 1 내지 약 5 뉴클레오티드, 약 1 내지 약 3 뉴클레오티드 및 약 2 내지 약 4 뉴클레오티드 길이이다. 일 실시형태에서 표적화 RNA 분자는 이중쇄이다 - 일 쇄는 3' 오버행을 가지고 다른 쇄는 블런트 말단을 갖거나 오버행을 가질 수 있다. 표적화 RNA 분자가 이중쇄이고 양 쇄가 오버행을 포함하는 실시형태에서, 오버행의 길이는 각 쇄를 위해 동일하거나 상이할 수 있다. 구체적 실시형태에서, 본 발명의 RNA는, 짝을 이루며 약 1 내지 약 3, 구체적으로 약 2 뉴클레오티드의 오버행을 RNA의 두 3' 말단에 갖는 약 19, 20, 21, 또는 22 뉴클레오티드를 포함한다. 일 실시형태에서, 3' 오버행은 분해에 대해 안정화될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, RNA는 아데노신 또는 구아노신 뉴클레오티드와 같은 퓨린 뉴클레오티드를 포함시킴으로써 안정화된다. 대안적으로는, 변형된 유사체에 의한 피리미딘 뉴클레오티드의 치환, 예를 들어, 2'-데옥시티미딘에 의한 우리딘 2 뉴클레오티드 3' 오버행의 치환이 용인되며 RNAi의 효율에 영향을 주지 않는다. 2' 하이드록실의 부재는 조직 배양 배지에서 오버행의 뉴클레아제 저항성을 상당히 향상시킨다.

[0232] 올리고뉴클레오티드 변형

[0233] 변형되지 않은 올리고뉴클레오티드는 일부 응용에서 적절하지 않을 수 있으며, 예를 들어, 변형되지 않은 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 세포 뉴클레아제에 의한 분해에 취약할 수 있다. 뉴클레아제는 핵산 포스포다이에스테르 결합을 가수분해할 수 있다. 하지만, 올리고뉴클레오티드의 서브유닛 중 하나 이상에의 화학적 변형은 개선된 특성을 부여할 수 있으며, 예를 들어, 올리고뉴클레오티드를 뉴클레아제에 대해 보다 안정하게 할 수 있다.

[0234] 변형된 핵산 및 뉴클레오티드 대용물은 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (i) 변화, 예를 들어, 비-결합 포스페이트 산소 중 하나 또는 둘 모두 및/또는 포스포다이에스테르 백본 결합 내의 결합 포스페이트 산소 중 하나 이상의 교체; (ii) 변화, 예를 들어, 리보스 당의 구성요소, 예를 들어, 리보스 당의 2' 하이드록실의 교체; (iii) 포스페이트 모이어티의 "데포스포(dephospho)" 링커로의 전체 교체; (iv) 자연 발생 염기의 비-천연 염기로의 변형 또는 교체; (v) 리보스-포스페이트 백본의 교체 또는 변형; (vi) 올리고뉴클레오티드의 3' 말단 또는

5' 말단의 변형, 예를 들어, 말단 포스페이트 기의 제거, 변형 또는 교체 또는 올리고뉴클레오티드의 3' 또는 5' 말단에의 모이어티, 예를 들어, 형광 표지된 모이어티의 접합; 및 (vii) 당(예를 들어, 6원 고리)의 변형.

[0235] 본 맥락에서 사용되는 바와 같이, 용어 교체, 변형, 변화 등은 임의의 과정 제한을 함축하지 않으며, 예를 들어, 변형은 기준 또는 자연 발생 리보핵산으로 시작해서 그것을 변형하여 변형된 리보핵산을 생산해야 함을 의미하는 것이 아니라, 변형은 단지 자연 발생 분자로부터의 차이를 나타낸다.

[0236] 올리고뉴클레오티드는 서브유닛 또는 단량체의 중합체이므로, 본 명세서에서 개시된 많은 변형이 올리고뉴클레오티드 내에서 반복되는 위치에서 일어날 수 있으며, 예를 들어, 핵염기, 당, 포스페이트 모이어티 또는 포스페이트 모이어티의 비-가교 산소의 변형일 수 있다. 주어진 올리고뉴클레오티드 내의 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없으며, 사실상 전술한 변형 중 둘 이상이 단일 올리고뉴클레오티드에 통합되거나 또는 심지어 올리고뉴클레오티드 내의 단일 뉴클레오시드에 통합될 수 있다.

[0237] 일부 경우에, 변형은 올리고뉴클레오티드 내의 대상 위치의 전부에서 일어날 것이지만, 많은 경우에 그리고 사실상 대부분의 경우에는 그렇지 않을 것이다. 예로서, 변형은 3' 또는 5' 말단 위치에서만 일어나거나, 내부 영역에서만 일어나거나, 말단 영역, 예를 들어 말단 뉴클레오티드상의 위치 또는 올리고뉴클레오티드의 마지막 2, 3, 4, 5, 또는 10 뉴클레오티드에서만 일어날 수 있다. 변형은 이중쇄 영역, 단일쇄 영역 또는 둘 모두에서 일어날 수 있다. 변형은 올리고뉴클레오티드의 이중쇄 영역에서만 일어나거나 또는 올리고뉴클레오티드의 단일쇄 영역에서만 일어날 수 있다. 예를 들어, 비-가교 산소 위치에서의 포스포로티오에이트 변형은 일 말단 또는 양 말단에서만 일어날 수 있거나, 말단 영역, 예를 들어, 말단 뉴클레오티드상의 위치 또는 쇄의 마지막 2, 3, 4, 5, 또는 10 뉴클레오티드에서만 일어나거나, 또는 이중쇄 및 단일쇄 영역, 특히 말단에서 일어날 수 있다. 5' 말단 또는 말단들이 인산화될 수 있다.

[0238] 본 명세서에서 개시된 변형은 유일한 변형 또는 다수의 뉴클레오티드 상에 포함된 유일한 타입의 변형일 수 있거나 또는 변형은 본 명세서에 개시된 하나 이상의 다른 변형과 조합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 변형은 또한 올리고뉴클레오티드 상에서 조합될 수 있으며, 예를 들어 올리고뉴클레오티드의 상이한 뉴클레오티드는 본 명세서에 개시된 상이한 변형을 갖는다.

[0239] 일부 실시형태에서, 예를 들어, 안정성을 향상시키거나, 오버행 내에 특정 핵염기를 포함시키거나, 단일쇄 오버행에, 예를 들어, 5' 또는 3' 오버행 또는 둘 모두에 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 대행물을 포함시키는 것이 특히 바람직하다. 예를 들어, 오버행에 퓨린 뉴클레오티드를 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시형태에서, 3' 또는 5' 오버행 내의 염기의 모두 또는 일부가 예를 들어, 본 명세서에 개시된 변형으로 변형될 것이다. 변형은 예를 들어, 리보스 당의 2' OH 기에서의 변형의 사용, 예를 들어, 리보뉴클레오티드 대신 데옥시리보뉴클레오티드, 예를 들어, 데옥시티미딘의 사용 및 포스페이트기의 변형, 예를 들어, 포스포티오에이트 변형을 포함할 수 있다. 오버행은 표적 서열과 상동성일 필요가 없다.

[0240] 올리고뉴클레오티드의 특이적 변형

[0241] 포스페이트기

[0242] 포스페이트기는 음으로 하전된 종이다. 전하는 두 개의 비-가교 산소 원자에 걸쳐 동일하게 분포된다. 하지만, 포스페이트기는 산소 중 하나를 상이한 치환기로 교체함으로써 변형될 수 있다. RNA 포스페이트 백본의 이러한 변형의 한 가지 결과는 핵산분해성 파괴에 대한 올리고리보뉴클레오티드의 저항성 증가일 수 있다. 따라서, 이론에 구애됨없이, 일부 실시형태에서 비하전된 링커 또는 비대칭 전하 분포를 가진 하전된 링커를 생성하는 변화를 도입하는 것이 바람직할 수 있다.

[0243] 변형된 포스페이트기의 예는 포스포로티오에이트, 포스포로셀레네이트, 보라노 포스페이트, 보라노 포스페이트 에스테르, 하이드로젠 포스포네이트, 포스포로아미데이트, 알킬 또는 아릴 포스포네이트 및 포스포트리에스테르를 포함한다. 일부 실시형태에서, 포스페이트 백본 모이어티 내의 비-가교 포스페이트 산소 원자 중 하나가 하기 중 어느 것에 의해 교체될 수 있다: S, Se, BR3(R은 수소, 알킬, 아릴임), C(즉, 알킬기, 아릴기 등), H, NR2(R은 수소, 알킬, 아릴임) 또는 OR (R은 알킬 또는 아릴임). 변형되지 않은 포스페이트기 내의 인 원자는 아키랄(achiral)이다. 하지만, 비-가교 산소 중 하나를 상기 원자 또는 원자들의 기 중 하나로 교체하면 인 원자가 키랄이 되게 하며; 다시 말하면, 이러한 방식으로 변형된 포스페이트기 내의 인 원자는 입체발생(stereogenic) 중심이다. 입체발생 인 원자는 "R" 형태(본 명세서에서 Rp) 또는 "S" 형태(본 명세서에서 Sp)를 보유할 수 있다.

[0244] 포스포로다이티오에이트는 황에 의해 교체된 두 비-가교 산소를 갖는다. 포스포로다이티오에이트 내의 인 중심

은 올리고리보뉴클레오티드 부분입체이성질체의 형성을 배제하는 아키랄이다. 따라서, 이론에 구애됨없이, 키랄 중심을 제거하는, 두 비-가교 산소의 변형, 예를 들어 포스포로다이티오에이트 형성은 그들이 부분입체이성질체 혼합물을 생산할 수 없다는 점에서 바람직할 수 있다. 따라서, 비-가교 산소는 독립적으로 S, Se, B, C, H, N, 또는 OR(R은 알킬 또는 아릴임) 중 어느 하나 일 수 있다.

[0245] 포스페이트 링커는 또한 가교 산소(즉, 포스페이트를 뉴클레오시드에 연결하는 산소)를 질소(가교된 포스포로아미데이트), 황(가교된 포스포로티오에이트) 및 탄소(가교된 메틸렌포스포네이트)로 교체함으로써 변형될 수 있다. 교체는 어느 한 연결 산소 또는 연결 산소 둘 모두에서 일어날 수 있다. 가교 산소가 뉴클레오시드의 3'-산소일 경우, 탄소로 교체하는 것이 바람직하다. 가교 산소가 뉴클레오시드의 5'-산소일 경우, 질소로 교체하는 것이 바람직하다.

[0246] 포스페이트기의 교체

[0247] 포스페이트기는 비-인 함유 연결체에 의해 교체될 수 있다. 이론으로 구속되지 않지만, 하전된 포스포다이에스테르기는 핵산분해에서 반응 중심이므로 중성 구조적 모방체로 이를 교체하는 것은 뉴클레아제 안정성을 향상시켜야 한다. 다시, 이론에 구애됨없이, 일부 실시형태에서, 하전된 포스페이트기가 중성 모이어티에 의해 교체되는 변화를 도입하는 것이 바람직할 수 있다.

[0248] 포스페이트기를 대신할 수 있는 모이어티의 예는 메틸 포스포네이트, 하이드록실아미노, 실록산, 카르보네이트, 카르복시메틸, 카르바메이트, 아미드, 티오에테르, 에틸렌 옥사이드 링커, 설포네이트, 설폰아미드, 티오포름아세탈, 포름아세탈, 옥심, 메틸렌이미노, 메틸렌메틸이미노, 메틸렌하이드라조, 메틸렌다이메틸하이드라조 및 메틸렌옥시메틸이미노를 포함한다. 바람직한 교체는 메틸렌카르보닐아미노 및 메틸렌메틸이미노기를 포함한다.

[0249] 포스페이트에 연결된 산소 중 적어도 하나가 교체되었거나 포스페이트기가 비-인 기에 의해 교체된, 변형된 포스페이트 결합은 또한 "비-포스포다이에스테르 백본 결합"으로도 불린다.

[0250] 리보포스페이트 백본의 교체

[0251] 포스페이트 링커와 리보스 당이 뉴클레아제 저항성 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 대용물에 의해 교체되는 올리고뉴클레오티드-모방 스캐폴드가 또한 제작될 수 있다. 이론에 구애됨없이, 반복적으로 하전된 백본의 부재는 폴리음이온을 인식하는 단백질(예를 들어, 뉴클레아제)에의 결합을 감소시킨다. 다시, 이론에 구애됨없이, 일부 실시형태에서, 중성 대용물 백본에 의해 염기가 묶이는 변화를 도입하는 것이 바람직할 수 있다. 예로는 모르폴리노, 시클로부틸, 피롤리딘 및 펩티드 핵산(PNA) 뉴클레오시드 대용물을 포함한다. 바람직한 대용물은 PNA 대용물이다.

[0252] 당 변형

[0253] 올리고뉴클레오티드는 핵산의 당 기의 전부 또는 일부의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 2' 하이드록실기(OH)는 많은 상이한 "옥시" 또는 "데옥시" 치환기로 변형되거나 교체될 수 있다. 이론에 구애됨없이, 하이드록실이 더이상 양성자제거되어 2'-알콕사이드 이온을 형성할 수 없으므로 안정성 향상이 예상된다. 2'-알콕사이드는 링커 인 원자에의 분자내 친핵성 공격에 의한 분해를 촉매할 수 있다. 다시, 이론에 구애됨없이, 일부 실시형태는 2' 위치에서의 알콕사이드 형성이 가능하지 않은 변화를 도입하는 것이 바람직할 수 있다.

[0254] "옥시"-2' 하이드록실기 변형의 예는 알콕시 또는 아릴옥시(OR, 예를 들어, R = H, 알킬, 시클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴 또는 당); 폴리에틸렌 글리콜(PEG), O(CH2CH2O)nCH2CH2OR; 2' 하이드록실이 예를 들어, 메틸렌 가교에 의해, 동일한 리보스 당의 4' 탄소에 연결되는 "잠긴" 핵산(LNA); O-아민(아민 = NH2; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로시클릴, 아릴아미노, 다이아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 다이헤테로아릴 아미노, 에틸렌 다이아민, 폴리아미노) 및 아미노알콕시, O(CH2)n아민, (예를 들어, AMINE = NH2; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로시클릴, 아릴아미노, 다이아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 다이헤테로아릴 아미노, 에틸렌 다이아민, 폴리아미노)를 포함한다. 메톡시에틸기(MOE) (OCH2CH2OCH3, PEG 유도체)만을 함유한 올리고뉴클레오티드가 강한 포스포로티오에이트 변형으로 변형된 것들에 견줄만한 뉴클레아제 안정성을 나타내는 것이 주목된다.

[0255] "데옥시" 변형은 수소(즉, 부분 dsRNA의 오버행 부분에 특히 관련되는 데옥시리보스 당); 할로(예를 들어, 플루오로); 아미노(예를 들어 NH2; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로시클릴, 아릴아미노, 다이아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 다이헤테로아릴 아미노, 또는 아미노산); NH(CH2CH2NH)nCH2CH2-아민(아민 = NH2; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로시클릴, 아릴아미노, 다이아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 다이헤테로아릴

아미노), -NHC(O)R(R = 알킬, 시클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴 또는 당), 시아노; 머캡토; 알킬-티오-알킬; 티오알콕시; 티오알킬; 및 예를 들어, 아미노 작용기로 선택적으로 치환될 수 있는, 알킬, 시클로알킬, 아릴, 알케닐 및 알키닐을 포함한다.

[0256] 당 기는 또한 리보스 내의 대응 탄소와 반대되는 입체화학 형태를 보유하는 하나 이상의 탄소를 함유할 수 있다. 따라서, 올리고뉴클레오티드는 당으로서 예를 들어, 아라비노스를 함유한 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 단량체는 당의 1' 위치에서 알파 결합을 가질 수 있으며, 예를 들어, 알파-뉴클레오시드일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 또한 C-1'에서 핵염기가 결핍된 "비염기성" 당을 포함할 수 있다. 이들 비염기성 당은 또한 추가로 구성 당 원자 중 하나 이상에서 변형을 함유할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 또한 L 형태인 하나 이상의 당을 함유할 수 있으며, 예를 들어, L-뉴클레오시드일 수 있다.

[0257] 바람직한 치환기는 2'-O-Me(2'-O-메틸), 2'-O-MOE(2'-O-메톡시에틸), 2'-F, 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 2'-S-메틸, 2'-O-CH2-(4'-C)(LNA), 2'-O-CH2CH2-(4'-C)(ENA), 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-다이메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-다이메틸아미노프로필(2'-O-DMAP) 및 2'-O-다이메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE)이다.

[0258] 말단 변형

[0259] 올리고뉴클레오티드의 3-프라임(3') 및 5-프라임(5') 말단이 변형될 수 있다. 그러한 변형은 분자의 3' 말단, 5' 말단 또는 양 말단 모두에서 있을 수 있다. 그들은 전체 말단 포스페이트 또는 포스페이트기의 원자 중 하나 이상의 변형 또는 교체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드의 3' 및 5' 말단이 라벨링 모이어티, 예를 들어, 형광단(예를 들어, 피렌, TAMRA, 플루오르세인, Cy3 또는 Cy5 염료) 또는 보호기(예를 들어, 황, 규소, 붕소 또는 에스테르 기반)와 같은 다른 기능성 분자 물질에 접합될 수 있다. 기능성 분자 물질은 포스페이트기 및/또는 링커를 통해 당에 부착될 수 있다. 링커의 말단 원자는 포스페이트기의 연결 원자 또는 당의 C-3' 또는 C-5' O, N, S 또는 C 기에 연결되거나 이를 대신할 수 있다. 대안적으로, 링커는 뉴클레오티드 대용물(예를 들어, PNA)의 말단 원자에 연결되거나 이를 대신할 수 있다.

[0260] 링커/포스페이트-기능성 분자 물질-링커/포스페이트 배열이 dsRNA의 두 쇄 사이에 개재될 경우, 이 배열은 헤어핀-타입 RNA 제제내의 헤어핀 RNA 루프를 대신할 수 있다.

[0261] 활성 조절을 위해 유용한 말단 변형은 포스페이트 또는 포스페이트 유사체를 이용한 5' 말단의 변형을 포함한다. 예를 들어, 바람직한 실시형태에서, dsRNA의 안티센스 쇄는 5' 인산화되거나 5' 프라임 말단에서 포스포릴 유사체를 포함한다. 5'-포스페이트 변형은 RISC 매개 유전자 사일런싱과 양립성인 것들을 포함한다. 5'-말단에서의 변형은 또한 개체의 면역계를 자극하거나 억제하는 데 있어서 유용할 수 있다. 적합한 변형은 5'-모노포스페이트 ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-다이포스페이트((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-트리포스페이트((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-구아노신 캡(7-메틸화되거나 메틸화되지 않음)(7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-아데노신 캡(Appp), 및 임의의 변형되거나 변형되지 않은 뉴클레오티드 캡 구조(N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-모노티오포스페이트(포스포로티오에이트; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-모노다이티오포스페이트(포스포로다이티오에이트; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-포스포로티오레이트((HO)2(O)P-S-5'); 산소/황 교체된 모노포스페이트, 다이포스페이트 및 트리포스페이트(예를 들어, 5'-알파-티오트리포스페이트, 5'-베타-티오트리포스페이트, 5'-감마-티오트리포스페이트, 등), 5'-포스포르아미데이트((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)P-O-5'), 5'-알킬포스포네이트(R=알킬=메틸, 에틸, 이소프로필, 프로필, 등, 예를 들어 RP(OH)(O)-O-5'-, (OH)2(O)P-5'-CH2-), 5'-알킬에테르포스포네이트(R=알킬에테르=메톡시메틸(MeOCH2-), 에톡시메틸, 등, 예를 들어 RP(OH)(O)-O-5'-)의 임의의 추가 조합을 포함한다. 다른 실시형태는 산소/황을 BH3, BH3- 및/또는 Se로 교체하는 것을 포함한다.

[0262] 말단 변형은 또한 분포를 모니터링하는데 유용할 수 있으며, 그러한 경우에 추가될 바람직한 기는 형광단, 예를 들어, 플루오르세인 또는 알렉사(ALEXA)® 염료, 예를 들어, 알렉사® 488을 포함한다. 말단 변형은 또한 흡수를 향상시키기 위해 유용할 수 있으며, 이를 위해 유용한 변형은 콜레스테롤을 포함한다. 말단 변형은 또한 RNA 제제를 다른 모이어티에 가교결합시키기 위해 유용할 수 있으며, 이를 위해 유용한 변형은 미토마이신 C를 포함한다.

[0263] 핵염기

[0264] 아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실은 RNA에서 발견되는 가장 일반적인 염기이다. 이들 염기는 개선된 특성을 가진 RNA를 제공하기 위해 변형되거나 교체될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레아제 저항성 올리고리보뉴클레오티드는

이들 염기로 또는 합성 및 천연 핵염기(예를 들어, 이노신, 티민, 잔틴, 하이포잔틴, 누부라린, 이소구아니신 또는 투베르시딘) 및 상기 변형 중 어느 하나로 제조될 수 있다. 대안적으로, 상기 염기 및 "유니버셜 염기(universal base)" 중 어느 것의 치환되거나 변형된 유사체가 이용될 수 있다. 예로는 2-(할로)아데닌, 2-(알킬)아데닌, 2-(프로필)아데닌, 2 (아미노)아데닌, 2-(아미노알킬)아데닌, 2 (아미노프로필)아데닌, 2 (메틸티오) N6 (이소펜테닐)아데닌, 6 (알킬)아데닌, 6 (메틸)아데닌, 7 (데아자)아데닌, 8 (알케닐)아데닌, 8-(알킬)아데닌, 8 (알키닐)아데닌, 8 (아미노)아데닌, 8-(할로)아데닌, 8-(하이드록실)아데닌, 8 (티오알킬)아데닌, 8-(티올)아데닌, N6-(이소펜틸)아데닌, N6 (메틸)아데닌, N6, N6 (다이메틸)아데닌, 2-(알킬)구아닌, 2 (프로필)구아닌, 6-(알킬)구아닌, 6 (메틸)구아닌, 7 (알킬)구아닌, 7 (메틸)구아닌, 7 (데아자)구아닌, 8 (알킬)구아닌, 8-(알케닐)구아닌, 8 (알키닐)구아닌, 8-(아미노)구아닌, 8 (할로)구아닌, 8-(하이드록실)구아닌, 8 (티오알킬)구아닌, 8-(티올)구아닌, N (메틸)구아닌, 2-(티오)시토신, 3 (데아자) 5 (아자)시토신, 3-(알킬)시토신, 3 (메틸)시토신, 5-(알킬)시토신, 5-(알키닐)시토신, 5 (할로)시토신, 5 (메틸)시토신, 5 (프로피닐)시토신, 5 (프로피닐)시토신, 5 (트리플루오로메틸)시토신, 6-(아조)시토신, N4 (아세틸)시토신, 3 (3 아미노-3 카르복시프로필)우라실, 2-(티오)우라실, 5 (메틸) 2 (티오)우라실, 5 (메틸아미노메틸)-2 (티오)우라실, 4-(티오)우라실, 5 (메틸) 4 (티오)우라실, 5 (메틸아미노메틸)-4 (티오)우라실, 5 (메틸) 2,4 (다이티오)우라실, 5 (메틸아미노메틸)-2,4 (다이티오)우라실, 5 (2-아미노프로필)우라실, 5-(알킬)우라실, 5-(알키닐)우라실, 5-(알릴아미노)우라실, 5 (아미노알릴)우라실, 5 (아미노알킬)우라실, 5 (구아니디늄알킬)우라실, 5 (1,3-다이아졸-1-알킬)우라실, 5-(시아노알킬)우라실, 5-(다이알킬아미노알킬)우라실, 5 (다이메틸아미노알킬)우라실, 5-(할로)우라실, 5-(메톡시)우라실, 우라실-5 옥시아세트산, 5 (메톡시카르보닐메틸)-2-(티오)우라실, 5 (메톡시카르보닐-메틸)우라실, 5 (프로피닐)우라실, 5 (프로피닐)우라실, 5 (트리플루오로메틸)우라실, 6 (아조)우라실, 다이하이드로우라실, N3 (메틸)우라실, 5-우라실 (즉, 슈도우라실), 2 (티오)슈도우라실, 4 (티오)슈도우라실, 2,4-(다이티오)슈도우라실, 5-(알킬)슈도우라실, 5-(메틸)슈도우라실, 5-(알킬)-2-(티오)슈도우라실, 5-(메틸)-2-(티오)슈도우라실, 5-(알킬)-4 (티오)슈도우라실, 5-(메틸)-4 (티오)슈도우라실, 5-(알킬)-2,4 (di티오)슈도우라실, 5-(메틸)-2,4 (다이티오)슈도우라실, 1 치환된 슈도우라실, 1 치환된 2(티오)-슈도우라실, 1 치환된 4 (티오)슈도우라실, 1 치환된 2,4-(다이티오)슈도우라실, 1 (아미노카르보닐에틸레닐)-슈도우라실, 1 (아미노카르보닐에틸레닐)-2(티오)-슈도우라실, 1 (아미노카르보닐에틸레닐)-4 (티오)슈도우라실, 1 (아미노카르보닐에틸레닐)-2,4-(다이티오)슈도우라실, 1 (아미노알킬아미노카르보닐에틸레닐)-슈도우라실, 1 (아미노알킬아미노-카르보닐에틸레닐)-2(티오)-슈도우라실, 1 (아미노알킬아미노카르보닐에틸레닐)-4 (티오)슈도우라실, 1 (아미노알킬아미노카르보닐에틸레닐)-2,4-(다이티오)슈도우라실, 1,3-(다이아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일, 1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일, 1,3-(다이아자)-2-(옥소)-펜티아진-1-일, 1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-펜티아진-1-일, 7-치환된 1,3-(다이아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일, 7-치환된 1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일, 7-치환된 1,3-(다이아자)-2-(옥소)-펜티아진-1-일, 7-치환된 1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-펜티아진-1-일, 7-(아미노알킬하이드록시)-1,3-(다이아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일, 7-(아미노알킬하이드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일, 7-(아미노알킬하이드록시)-1,3-(다이아자)-2-(옥소)-펜티아진-1-일, 7-(아미노알킬하이드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-펜티아진-1-일, 7-(구아니디늄알킬하이드록시)-1,3-(다이아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일,
7-(구아니디늄알킬하이드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일, 7-(구아니디늄알킬-하이드록시)-1,3-(다이아자)-2-(옥소)-펜티아진-1-일, 7-(구아니디늄알킬하이드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-펜티아진-1-일, 1,3,5-(트리아자)-2,6-(다이옥사)-나프탈렌, 이노신, 잔틴, 하이포잔틴, 누부라린, 투베르시딘, 이소구아니신, 이노시닐, 2-아자-이노시닐, 7-데아자-이노시닐, 니트로이미다졸릴, 니트로피라졸릴, 니트로벤즈이미다졸릴, 니트로인다졸릴, 아미노인돌릴, 피롤로피리미디닐, 3-(메틸)이소카르보스티릴일, 5-(메틸)이소카르보스티릴일, 3-(메틸)-7-(프로피닐)이소카르보스티릴일, 7-(아자)인돌릴, 6-(메틸)-7-(아자)인돌릴, 이미디조피리디닐, 9-(메틸)-이미디조피리디닐, 피롤로피리지닐, 이소카르보스티릴일, 7-(프로피닐)이소카르보스티릴일, 프로피닐-7-(아자)인돌릴, 2,4,5-(트리메틸)페닐, 4-(메틸)인돌릴, 4,6-(다이메틸)인돌릴, 페닐, 나프탈레닐, 안트라세닐, 페난트라세닐, 피레닐, 스틸베닐, 테트라세닐, 펜타세닐, 다이플루오로톨릴, 4-(플루오로)-6-(메틸)벤즈이미다졸, 4-(메틸)벤즈이미다졸, 6-(아조)티민, 2-피리디논, 5 니트로인돌, 3 니트로피롤, 6-(아자)피리미딘, 2 (아미노)퓨린, 2,6-(다이아미노)퓨린, 5 치환된 피리미딘, N2-치환된 퓨린, N6-치환된 퓨린, O6-치환된 퓨린, 치환된 1,2,4-트리아졸 또는 그의 임의의 O-알킬화 또는 N-알킬화 유도체를 포함한다.

[0265] 추가로 퓨린과 피리미딘은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 3,687,808호에 개시된 것들, the Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed.

John Wiley & Sons, 1990에 개시된 것들 및 Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613에 개시된 것들을 포함한다.

[0266] 양이온성 기

[0267] 올리고뉴클레오티드의 변형은 또한 당, 염기, 및/또는 포스페이트 또는 변형된 포스페이트 백본 모이어티의 인 원자에 하나 이상의 양이온성 기를 부착하는 것을 포함할 수 있다. 양이온성 기는 천연, 비천연 또는 유니버셜 염기상의 치환할 수 있는 임의의 원자에 부착될 수 있다. 바람직한 위치는 하이브리드화를 간섭하지 않는, 즉, 염기쌍형성에 필요한 수소결합 상호작용을 간섭하지 않는 것이다. 양이온성 기는 예를 들어, 당의 C2' 위치 또는 환형 또는 비환형 당 대용물내의 유사한 위치를 통해 부착될 수 있다. 양이온성 기는 예를 들어, O-아민(아민 = NH2; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로시클릴, 아릴아미노, 다이아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 다이헤테로아릴 아미노, 에틸렌 다이아민, 폴리아미노); 아미노알콕시, 예를 들어, O(CH2)n아민(예를 들어, 아민 = NH2; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로시클릴, 아릴아미노, 다이아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 다이헤테로아릴 아미노, 에틸렌 다이아민, 폴리아미노); 아미노 (예를 들어 NH2; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로시클릴, 아릴아미노, 다이아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 다이헤테로아릴 아미노, 또는 아미노산); 또는 NH(CH2CH2NH)nCH2CH2-아민(아민 = NH2; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로시클릴, 아릴아미노, 다이아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 다이헤테로아릴 아미노)로부터 유래된 양성자화된 아미노기를 포함할 수 있다.

[0268] 올리고뉴클레오티드 내의 배치

[0269] 일부 변형은 바람직하게는 특정 위치에서, 예를 들어, 쇄의 내부 위치 또는 올리고뉴클레오티드의 5' 또는 3' 말단에서, 올리고뉴클레오티드 상에 포함될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 상의 변형의 바람직한 위치는 제제에 바람직한 특성을 부여할 수 있다. 예를 들어, 특정 변형의 바람직한 위치는 최적의 유전자 사일런싱 특성 또는 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제 활성에 대한 저항성 증가를 부여할 수 있다.

[0270] 올리고뉴클레오티드의 하나 이상의 뉴클레오티드는 2'-5' 결합을 가질 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 하나 이상의 뉴클레오티드는 역전된 결합, 예를 들어 3'-3', 5'-5', 2'-2' 또는 2'-3' 결합을 가질 수 있다.

[0271] 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 5'-피리미딘-퓨린-3'(5'-PyPu-3') 다이뉴클레오티드를 포함할 수 있으며 이때 피리미딘은 2'-O-Me(2′ '-O-메틸), 2'-O-MOE(2'-O-메톡시에틸), 2'-F, 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 2'-S-메틸, 2'-O-CH2-(4'-C)(LNA) 및 2'-O-CH2CH2-(4'-C)(ENA)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 변형으로 변형된다.

[0272] 일 실시형태에서, 올리고뉴클레오티드 내의 서열 모티프 5'-피리미딘-퓨린-3' (5'-PyPu-3') 다이뉴클레오티드의 모든 발생에서 가장 5'의 피리미딘은 2''-O-Me(2'-O-메틸), 2'-O-MOE(2'-O-메톡시에틸), 2'-F, 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸](2'-O-NMA), 2'-S-메틸, 2'-O-CH2-(4'-C)(LNA) 및 2'-O-CH2CH2-(4'-C)(ENA)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형으로 변형된다.

[0273] 이중쇄 올리고뉴클레오티드는 우리딘이 2'-변형된 뉴클레오티드인 적어도 하나의 5'-우리딘-아데닌-3'(5'-UA-3') 다이뉴클레오티드, 또는 5'-우리딘이 2'-변형된 뉴클레오티드인 5'-우리딘-구아닌-3'(5'-UG-3') 다이뉴클레오티드, 또는 5'-시티딘이 2'-변형된 뉴클레오티드인 말단 5'-시티딘-아데닌-3'(5'-CA-3') 다이뉴클레오티드 또는 5'-우리딘이 2'-변형된 뉴클레오티드인 말단 5'-우리딘-우리딘-3' (5'-UU-3') 다이뉴클레오티드 또는 5'-시티딘이 2'-변형된 뉴클레오티드인 말단 5'-시티딘-시티딘-3'(5'-CC-3') 다이뉴클레오티드 또는 5'-시티딘이 2'-변형된 뉴클레오티드인 말단 5'-시티딘-우리딘-3'(5'-CU-3') 다이뉴클레오티드 또는 5'-우리딘이 2'-변형된 뉴클레오티드인 말단 5'-우리딘-시티딘-3'(5'-UC-3') 다이뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 이들 변형을 포함하는 이중쇄 올리고뉴클레오티드는 엔도뉴클레아제 활성에 대해 특히 안정화된다.

[0274] 일반 참고문헌

[0275] 본 발명에 따라 사용되는 올리고리보뉴클레오티드 및 올리고리보뉴클레오시드는 고체상 합성으로 합성될 수 있으며, 예를 들어, "Oligonucleotide synthesis, a practical approach", Ed. M. J. Gait, IRL Press, 1984; "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991 (특히 Chapter 1, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, Chapter 2, Oligoribonucleotide synthesis, Chapter 3, 2'-O--Methyloligoribonucleotide- s: synthesis and applications, Chapter 4, Phosphorothioate oligonucleotides, Chapter 5, Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates, Chapter 6, Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates, 및 Chapter 7,

Oligodeoxynucleotides containing modified bases)를 참고한다. 다른 특히 유용한 합성 절차, 시약, 차단기 및 반응 조건은 Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Beaucage, S. L. and Iyer, R. P., Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311 및 Beaucage, S. L. and Iyer, R. P., Tetrahedron, 1993, 49, 6123-6194, 또는 여기서 인용된 참고문헌에 개시되어 있다. WO 00/44895호, WO01/75164호, 또는 WO02/44321호에 개시된 변형이 본 발명에서 사용될 수 있다. 본 명세서에서 열거된 모든 간행물, 특허 및 공개된 특허 출원의 개시내용은 본 명세서에서 참고로 포함된다.

[0276] 포스페이트기 참고문헌

[0277] 포스피네이트 올리고리보뉴클레오티드의 제조는 미국 특허 5,508,270호에 개시된다. 알킬 포스포네이트 올리고리보뉴클레오티드의 제조는 미국 특허 4,469,863호에 개시된다. 포스포르아미다이트 올리고리보뉴클레오티드의 제조는 미국 특허 5,256,775호 또는 미국 특허 5,366,878호에 개시된다. 포스포트리에스테르 올리고리보뉴클레오티드의 제조는 미국 특허 5,023,243호에 개시된다. 보라노 포스페이트 올리고리보뉴클레오티드의 제조는 미국 특허 5,130,302호 및 5,177,198호에 개시된다. 3'-데옥시-3'-아미노 포스포로아미데이트 올리고리보뉴클레오티드의 제조는 미국 특허 5,476,925호에 개시된다. 3'-데옥시-3'-메틸렌포스포네이트 올리고리보뉴클레오티드의 제조는 An, H, et al. J. Org. Chem. 2001, 66, 2789-2801에 개시된다. 황 가교된 뉴클레오티드의 제조는 Sproat et al. Nucleosides Nucleotides 1988, 7,651 및 Crosstick et al. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 4693에 개시된다.

[0278] 당 기 참고문헌

[0279] 2' 변형에 대한 변형은 Verma, S. et al. Annu. Rev. Biochem. 1998, 67, 99-134 및 그 안의 모든 참고문헌에서 찾을 수 있다. 리보스의 구체적인 변형은 하기 참고문헌에서 찾을 수 있다: 2'-플루오로(Kawasaki et. al., J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841), 2'-MOE(Martin, P. Helv. Chim. Acta 1996, 79, 1930-1938), "LNA"(Wengel, J. Acc. Chem. Res. 1999, 32, 301-310).

[0280] 포스페이트기 교체 참고문헌

[0281] 본 명세서에서 MMI 연결된 올리고리보뉴클레오시드로도 확인되는 메틸렌메틸이미노 연결된 올리고리보뉴클레오시드, 본 명세서에서 MDH 연결된 올리고리보뉴클레오시드로도 확인되는 메틸렌다이메틸하이드라조 연결된 올리고리보뉴클레오시드 및 본 명세서에서 아미드-3 연결된 올리고리보뉴클레오시드로도 확인되는 메틸렌카르보닐아미노 연결된 올리고뉴클레오시드, 및 본 명세서에서 아미드-4 연결된 올리고리보뉴클레오시드로도 확인되는 메틸렌아미노카르보닐 연결된 올리고뉴클레오시드, 및 예를 들어, 교번하는 MMI 및 PO 또는 PS 결합을 갖는 혼합 백본 화합물은 미국 특허 5,378,825호, 5,386,023호, 5,489,677호 및 공개 PCT 출원 PCT/US92/04294호 및 PCT/US92/04305호(각각 WO 92/20822호 및 WO 92/20823호로 공개됨)에 개시된 대로 제조될 수 있다. 포름아세탈 및 티오포름아세탈 연결된 올리고리보뉴클레오시드는 미국 특허 5,264,562호 및 5,264,564호에 개시된 대로 제조될 수 있다. 에틸렌 옥사이드 연결된 올리고리보뉴클레오시드는 미국 특허 5,223,618호에 개시된 대로 제조될 수 있다. 실록산 교체는 Cormier,J.F. et al. Nucleic Acids Res. 1988, 16, 4583에 개시된다. 카르보네이트 교체는 Tittensor, J.R. J. Chem. Soc. C 1971, 1933에 개시된다. 카르복시메틸 교체는 Edge, M.D. et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1972, 1991에 개시된다. 카르바메이트 교체는 Stirchak, E.P. Nucleic Acids Res. 1989, 17, 6129에 개시된다.

[0282] 포스페이트-리보스 백본 교체 참고문헌

[0283] 시클로부틸 당 대용물 화합물은 미국 특허 5,359,044호에 개시된 대로 제조될 수 있다. 피롤리딘 당 대용물은 미국 특허 5,519,134호에 개시된 대로 제조될 수 있다. 모르폴리노 당 대용물은 미국 특허 5,142,047호 및 5,235,033호 및 다른 관련 특허 공보에 개시된 대로 제조될 수 있다. 펩티드 핵산(PNA)은 자체가 알려져 있으며 Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23에서 언급된 다양한 절차 중 어느 것에 따라 제조될 수 있다. 그들은 또한 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 미국 특허 5,539,083호에 따라 제조될 수 있다.

[0284] 말단 변형 참고문헌.

[0285] 말단 변형은 Manoharan, M. et al. Antisense and Nucleic Acid Drug Development 12, 103-128 (2002) 및 여기에서의 참고문헌에 기술되어 있다.

[0286] 핵염기 참고문헌

[0287] N-2 치환된 퓨린 뉴클레오시드 아미다이트는 미국 특허 5,459,255호에 개시된 대로 제조될 수 있다. 3-데아자 퓨린 뉴클레오시드 아미다이트는 미국 특허 5,457,191호에 개시된 대로 제조될 수 있다. 5,6-치환된 피리미딘 뉴클레오시드 아미다이트는 미국 특허 5,614,617호에 개시된 대로 제조될 수 있다. 5-프로피닐 피리미딘 뉴클레오시드 아미다이트는 미국 특허 5,484,908호에 개시된 대로 제조될 수 있다. 추가 참고문헌은 염기 변형에 대한 상기 섹션에 개시된다.

[0288] 올리고뉴클레오티드 생산

[0289] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 화합물은 용액-상 또는 고체-상 유기 합성을 이용하여 제조될 수 있다. 유기 합성은 비-천연 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 스트랜드가 쉽게 제조될 수 있는 이점을 제공한다. 본 기술분야에 알려진 그러한 합성을 위한 임의의 다른 수단이 부가적으로 또는 대안적으로 이용될 수 있다. 포스포로티오에이트, 포스포로다이티오에이트 및 알킬화 유도체와 같은 다른 올리고뉴클레오티드를 제조하기 위해 유사한 기술을 이용하는 것 또한 알려져 있다. 본 발명의 이중쇄 올리고뉴클레오티드 화합물은 2-단계 절차를 이용하여 제조될 수 있다. 먼저, 이중쇄 분자의 개별 스트랜드를 별도로 제조한다. 그 후, 성분 스트랜드를 어닐링시킨다.

[0290] 합성 방법에 관계없이, 올리고뉴클레오티드는 제제화를 위해 적절한 용액(예를 들어, 수성 및/또는 유기 용액)에서 제조될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 제제는 침전되고 순수한 이중-증류된 물에서 재용해되고, 동결건조될 수 있다. 건조된 올리고뉴클레오티드는 이어서 의도된 제제화 과정을 위해 적절한 용액에서 재현탁될 수 있다.

[0291] 특히 변형된 올리고뉴클레오티드의 합성에 관한 교시는 하기의 미국 특허 또는 계류중인 특허 출원에서 찾을 수 있다: 폴리아민 접합된 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 5,138,045호 및 5,218,105호; 키랄 인 결합을 가진 올리고뉴클레오티드의 제조를 위한 단량체에 관한 미국 특허 5,212,295호; 변형된 백본을 가진 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 5,378,825호 및 5,541,307호; 백본-변형된 올리고뉴클레오티드 및 환원 커플링을 통한 그들의 제조에 관한 미국 특허 5,386,023호; 3-데아자퓨린 고리 시스템에 기초한 변형된 핵염기 및 그의 합성 방법에 관한 미국 특허 5,457,191호; N-2 치환된 퓨린에 기초한 변형된 핵염기에 관한 미국 특허 5,459,255호; 키랄인 결합을 가진 올리고뉴클레오티드를 제조하기 위한 방법에 관한 미국 특허 5,521,302호; 펩티드 핵산에 관한 미국 특허 5,539,082호; β-락탐 백본을 가진 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 5,554,746호; 올리고뉴클레오티드의 합성을 위한 방법 및 재료에 관한 미국 특허 5,571,902호; 알킬티오기를 가지며, 그러한 기는 뉴클레오시드의 다양한 위치 중 어느 것에 부착된 다른 모이어티에의 링커로서 사용될 수 있는 뉴클레오시드에 관한 미국 특허 5,578,718호; 높은 키랄 순도의 포스포로티오에이트 결합을 가진 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 5,587,361호 및 5,599,797호; 2'-O-알킬 구아노신 및 2,6-다이아미노퓨린 화합물을 비롯한 관련 화합물의 제조를 위한 방법에 관한 미국 특허 5,506,351호; N-2 치환된 퓨린을 가진 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 5,587,469호; 3-데아자퓨린을 가진 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 5,587,470호; 접합된 4'-데스메틸 뉴클레오시드 유사체에 관한 미국 특허 5,223,168호 및 미국 특허 5,608,046호; 백본-변형된 올리고뉴클레오티드 유사체에 관한 미국 특허 5,602,240호 및 5,610,289호; 및 특히 2'-플루오로-올리고뉴클레오티드의 합성 방법에 관한 미국 특허 6,262,241호 및 5,459,255호.

[0292] RNA 간섭 제제의 전달:

[0293] RNAi 제제, 예를 들어, siRNA, 또는 RNAi 제제를 포함하는 벡터를 표적 세포(예를 들어, 폐 및/또는 호흡기관의 기저 세포 또는 세포들 또는 다른 원하는 표적 세포)에 전달하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제인 RNAi 제제(예를 들어, 유전자 사일런싱-RNAi 제제), 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2 중 어느 하나를 억제하는 RNAi 제제는 에어로졸 수단을 통해, 예를 들어, 네뷸라이저 등을 이용하여 개체에게 투여될 수 있다. 대안적 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2 중 어느 하나의 억제제인 RNAi 제제(예를 들어, 유전자 사일런싱-RNAi 제제)의 투여는 예를 들어, (i) RNA 간섭 제제, 예를 들어, siRNA를 함유한 조성물의 주사 또는 (ii) 세포(예를 들어, 공여체 포유류 세포, 수용체 난모세포 또는 SCNT 배아)를 RNAi 제제, 예를 들어, siRNA를 포함하는 조성물과 직접 접촉시키는 것을 포함한다.

[0294] 일부 실시형태에서, 세포, 난모세포 또는 배아의 투여는 단일 주사 또는 두번 이상의 주사에 의할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNAi 제제는 약학적으로 허용가능한 담체에서 전달된다. 하나 이상의 RNAi 제제는 동시에 사용될 수 있으며, 예를 들어 Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 하나 이상의 유전자 사일런싱 RNAi 제제 억제제가 함께 투여될 수 있다. RNA 간섭 제제, 예를 들어, Suv39h1,

Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM21의 억제제와 같은 siRNA H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 단독으로 또는 다른 RNA 간섭 제제, 예를 들어, 다른 세포 유전자에 지시된 siRNA와 같은 siRNA와 조합되어 전달될 수 있다.

[0295] 일부 실시형태에서, 특정 세포가 RNA 간섭으로 표적화되어, RNA 간섭의 비-특이적 표적화에 의해 야기되는 RNA 간섭의 잠재적 부작용을 제한한다. 상기 방법은 예를 들어, 세포 표적화 모이어티 및 세포내로 RNAi를 효과적으로 전달하기 위해 이용되는 RNA 간섭 결합 모이어티를 포함하는 융합 분자 또는 복합체를 이용할 수 있다. 예를 들어, siRNA와 혼합될 경우 항체-프로타민 융합 단백질은 siRNA에 결합하고 siRNA를 항체에 의해 인식되는 항원을 발현하는 세포 내로 선택적으로 전달하여, 항체에 의해 확인되는 항원을 발현하는 세포에서만 유전자 발현의 침묵화를 야기한다.

[0296] 일부 실시형태에서, siRNA 또는 RNAi 결합 모이어티는 단백질 또는 단백질의 핵산 결합 도메인 또는 단편이며, 결합 모이어티는 표적화 모이어티의 일부분에 유융합된다. 표적화 모이어티의 위치는 구조체의 카르복실-말단 또는 아미노-말단에 있거나 융합 단백질의 중앙에 있을 수 있다.

[0297] 일부 실시형태에서, 바이러스-매개 전달 기전 또한 Xia, H. et al. (2002) Nat Biotechnol 20(10):1006에 개시된 대로, siRNA, 예를 들어 Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 siRNA(예를 들어, 유전자 사일런싱 RNAi 제제) 억제제를 인 비트로로 세포에 전달하기 위해 이용될 수 있다. shRNA의 플라스미드- 또는 바이러스-매개 전달 기전 또한 Rubinson, D.A., et al. ((2003) Nat. Genet. 33:401-406) 및 Stewart, S.A., et al. ((2003) RNA 9:493-501)에 기술된 바와 같이 인 비트로 및 인 비보로 shRNA를 세포에 전달하기 위해 이용될 수 있다. 대안적으로, 다른 실시형태에서, RNAi 제제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 유전자 사일런싱-RNAi 제제 억제제는 또한 세포, 난모세포 또는 SCNT 배아를 RNAi 제제 억제제 단독과 또는 RNAi 제제를 발현하는 바이러스 벡터와 배양함으로써 세포 내로 도입될 수 있다.

[0298] 일반적으로, 핵산 분자를 전달하는 임의의 방법은 RNAi 간섭 분자와 사용하기 위해 적응될 수 있다(예를 들어, 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144; WO94/02595호 참고).

[0299] RNA 간섭 분자는 세포 흡수를 향상시키고 분해를 방지하기 위하여 콜레스테롤과 같은 친유성 기에 화학적으로 접합시켜 변형될 수 있다. 대안적 실시형태에서, RNAi 분자는 예를 들어, 나노입자, 덴드리머, 중합체, 리포좀 또는 양이온성 전달 시스템과 같은 약물 전달 시스템을 이용하여 전달될 수 있다. 양으로 하전된 양이온성 전달 시스템은 RNA 간섭 분자(음으로 하전됨)의 결합을 촉진하고 또한 음으로 하전된 세포막에서의 상호작용을 향상시켜 siRNA가 세포에 의해 효율적으로 흡수되도록 한다. 양이온성 지질, 덴드리머 또는 중합체는 RNA 간섭 분자에 결합되거나 또는 RNAi 분자를 감싸는 소낭 또는 미셀을 형성하도록 유도될 수 있다(예를 들어, Kim SH., et al (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116 참고). 소낭 또는 미셀의 형성은 추가로 전신적으로 투여될 경우 RNAi 분자의 분해를 방지한다. 양이온성-RNAi 복합체를 제조하고 투여하는 방법은 당업자의 능력 이내이다(예를 들어, 그 전체가 참고로 통합되는 Sorensen, DR., et al (2003) J. Mol. Biol 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) J. Hypertens. 25:197-205 참고).

[0300] 특정의 RNAi 제제의 투여량은 RNA 간섭, 예를 들어, H3K9 메틸트랜스퍼라제 유전자의 유전자 침묵화를 일으켜, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2 유전자 발현 수준과 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제 유전자 발현 수준의 감소 및 이어서 각 단백질 발현 수준의 감소를 유도하기에 필요한 양일 것이다.

[0301] RNAi 분자는 그들의 표적 서열에 완전히 매치할 필요가 없음이 또한 알려져 있다. 하지만, 바람직하게는, siRNA의 안티센스(가이드) 쇄의 5' 및 중간 부분은 Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2 유전자와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제 유전자의 표적 핵산 서열에 완벽하게 상보적이다.

[0302] 따라서, 본 명세서에서 개시된 Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 유전자 사일런싱-RNAi 제제 억제제로서 기능하는 RNAi 분자는 예를 들어, 짧은-시기(short-temporal) RNA(stRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 짧은-헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로RNA(miRNA), 이중쇄 RNA(dsRNA)를 비롯한 비변형 및 변형 이중쇄(ds) RNA 분자이지만 이로 제한되지 않는다(예를 들어 Baulcombe, Science 297:2002-2003, 2002 참고). dsRNA 분자, 예를 들어 siRNA는 또한 3' 오버행, 바람직하게는 3'UU 또는 3'TT 오버행을 함유할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 siRNA 분자는 약 30-40 염기보다 큰, 약 40-50 염기, 약 50 염기 이

상의 ssRNA를 포함하는 RNA 분자를 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 본 발명의 siRNA 분자는 그들의 길이의 약 25% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 90% 초과에 대해 이중쇄이다.

[0303] 일부 실시형태에서, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 유전자 사일런싱 RNAi 핵산 억제제는 H3K9 메틸트랜스퍼라제 유전자, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2 유전자에 결합하고 발현을 억제하는 임의의 제제이며, 각 메틸트랜스퍼라제 유전자의 발현이 억제된다.

[0304] 본 발명의 다른 실시형태에서, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제는 예를 들어, RNA 전사물을 절단하여 야생형 단백질의 생산을 방지할 수 있는 리보자임과 같은 촉매 핵산 구조체일 수 있다. 리보자임은 리보자임 촉매 부위에 인접한, 표적에 상보적인 서열의 두 영역에 의해 특정 서열을 표적화하고 어닐링한다. 결합 후, 리보자임은 부위 특이적 방식으로 표적을 절단한다. 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 절단을 위한, 본 명세서에 개시된 유전자 생성물의 서열을 특이적으로 인식하고 절단하는 리보자임의 고안 및 시험은 당업자에게 잘 알려진 기술에 의할 수 있다(예를 들어, 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 Lleber and Strauss, (1995) Mol Cell Biol 15:540.551).

[0305] ***H3K9 메틸트랜스퍼라제의 단백질 및 펩티드 억제제***

[0306] 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제 중 어느 하나의 단백질 및/또는 펩티드 억제제이며, 예를 들어, 돌연변이된 단백질; Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 치료 단백질 및 재조합 단백질 및 우성 음성 억제제(예를 들어, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 비-기능성 단백질 또는 H3K9 메틸트랜스퍼라제에 경쟁적으로 결합하는 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 비-기능성 리간드)가 있으나 이로 제한되지 않는다. 단백질 및 펩티드 억제제는 또한 예를 들어, 돌연변이된 단백질, 유전자 변형된 단백질, 펩티드, 합성 펩티드, 재조합 단백질, 키메라 단백질, 항체, 인간화 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 변형된 단백질 및 그 단편을 포함할 수 있다.

[0307] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 유전자 발현의 억제제 및/또는 Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1 단백질 기능의 억제제로서 본 방법에서 유용한 제제는 임의의 타입의 물질일 수 있으며, 예를 들어, 화학물질, 핵산 서열, 핵산 유사체, 단백질, 펩티드 또는 그 단편일 수 있으며 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 제제는 합성 및 자연-발생 비-단백질성 물질을 제한없이 포함하는 임의의 화학물질, 물질 또는 모이어티이다. 일부 실시형태에서, 제제는 화학적 모이어티를 가진 소분자이다.

[0308] 대안적 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법에서 유용한 제제는 H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 유전자 발현 또는 기능을 억제하는 단백질 및/또는 펩티드 또는 그 단편이다. 그러한 제제는 예를 들어, 단백질 변이체, 돌연변이된 단백질, 치료 단백질, 절단된 단백질 및 단백질 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 단백질 제제는 또한 돌연변이된 단백질, 유전자 조작된 단백질, 펩티드, 합성 펩티드, 재조합 단백질, 키메라 단백질, 항체, 미디바디(midibodies), 미니바디(minibodies), 트리아바디(triabodies), 인간화 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 변형된 단백질 및 그 단편을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0309] 대안적으로, 본 명세서에 개시된 방법에서 H3K9 메틸트랜스퍼라제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제로서 유용한 제제는 화학물질, 소분자, 큰 분자 또는 합성 및 자연-발생 비-단백질성 물질을 제한없이 포함하는 물질 또는 모이어티일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제제는 본 명세서에 개시된 화학적 모이어티를 가진 소분자이다.

[0310] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서 사용하기 위한 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 우성 음성 변이체, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2와 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 비-기능성 변이체이며, 예를 들어, 서열번호 9 또는 10의 단백질 또는 서열번호 9 또는 10의 적어도 약 50, 또는 적어도 약 60, 또는 적어도 약 70, 또는 적어도 약 80 또는 적어도 약 90 또는 90 초과 아미노산의 단편이다. 일부 실시형태에서, Suv39h1, Suv39h2, Setdb1, Ehmt1 및/또는 PRDM2 단백질과 같은 H3K9 메틸트랜스퍼라제 단백질의 우성 음성 억제제는 H3K9 메틸트랜스퍼라제 단백질의 가용성 세포외 도메인이다.

[0311] DBC1(결실 유방암 1) 유전자의 유전자 생성물 또는 단백질과 같은 단백질 억제제는 SUV39H1 촉매 도메인에 결합하고 *인 비트로* 및 인 비보로 히스톤 H3를 메틸화하는 그 능력을 억제하며(Lu et al., Inhibition of SUV39H1 Methyltransferase Activity by DBC1, JBC, 2009, 284; 10361-10366), 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서의 사용을 위해 포함된다.

[0312] *항체*

[0313] 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법에서 유용한 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 예를 들어, 단클론, 키메라 인간화 및 재조합 항체를 비롯한 항체 및 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중화 항체는 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제로서 사용될 수 있다. 항체는 항원으로 면역시켜 토끼 또는 마우스와 같은 동물에서 쉽게 생성된다. 면역된 마우스는 하이브리도마의 제조를 위한 B 세포의 공급원을 제공하는데 특히 유용하며, 하이브리도마는 이어서 배양되어 다량의 단클론 항체를 생산한다. Suv39h1 및/또는 Suv39h2의 구매가능한 항체 억제제가 본 발명에 사용하기 위해 포함되며, 예를 들어, 산타 크루즈 바이오테크놀로지 등으로부터 입수가능하다.

[0314] 본 발명의 일 실시형태에서, 본 명세서에서 확인된 유전자 생성물의 억제제는 항체 분자 또는 항체 분자의 에피토프-결합 모이어티 등일 수 있다. 항체는 광범위한 표적 항원과 합텐에 대한 높은 결합 친화성 및 독특한 특이성을 제공한다. 본 발명의 실시에서 유용한 단클론 항체는 전체 항체 및 그 단편을 포함하며 하이브리도마 합성, 재조합 DNA 기술 및 단백질 합성과 같은 종래 기술에 따라 생성된다.

[0315] 유용한 단클론 항체 및 단편은 임의의 종(인간 포함)으로부터 유래될 수 있거나 한 가지 보다 많은 종으로부터의 서열을 이용하는 키메라 단백질로서 형성될 수 있다. 인간 단클론 항체 또는 "인간화" 쥐 항체 또한 본 발명에 따라 이용된다. 예를 들어, 쥐 단클론 항체는 쥐 Fv 영역(즉, 항원 결합 부위를 함유) 또는 그의 상보성 결정 영역을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 인간 불변 도메인 영역 및 Fc 영역을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 유전적으로 재조합시킴으로써 "인간화"될 수 있다. 인간화된 표적화 모이어티는 숙주 수용체에서 항체 또는 폴리펩티드의 면역반응성을 감소시켜, 유럽 특허 출원 0,411,893 A2호에 개시된 것과 유사한 방식으로 반감기의 증가와 불리한 면역 반응의 가능성을 감소시키는 것으로 인식된다. 쥐 단클론 항체는 바람직하게는 인간화 형태로 이용되어야 한다. 항원 결합 활성은 항체의 가변 부분(Fv)의 경쇄 및 중쇄 상에 위치한 6개의 상보성 결정 영역(CDR)(각 세개)의 아미노산의 서열과 형태에 의해 결정된다. 짧은 펩티드 스페이서 서열을 통해 연결된 경쇄의 가변 영역(VL)과 중쇄의 가변 영역(VH)으로 구성된, 25-kDa 단일-쇄 Fv(scFv) 분자는 현재까지 개발된 가장 작은 항체 단편이다. 기술은 scFv를 위한 유전자를 함유하는 필라멘트성 파아지의 표면 상에 scFv 분자를 나타내도록 개발되었다. 광범위한 항원-특이성을 가진 scFv 분자가 scFv-파아지 라이브러리의 단일 대형 풀(pool) 내에 존재할 수 있다. 본 발명의 방법에서 유용한 고친화성 단클론 항체 및 그의 키메라 유도체의 일부 예는 유럽 특허 출원 EP 186,833호; PCT 특허 출원 WO 92/16553호; 및 미국 특허 6,090,923호에 개시된다.

[0316] 키메라 항체는 상이한 동물 종으로부터 유래된 둘 이상의 분절 또는 부분을 특징으로 하는 면역글로불린 분자이다. 일반적으로, 키메라 항체의 가변 영역은 쥐 단클론 항체와 같은 비-인간 포유류 항체로부터 유래되며, 면역글로불린 불변 영역은 인간 면역글로불린 분자로부터 유래된다. 바람직하게는, 두 영역 모두와 그 조합은 일상적으로 결정될 때 낮은 면역원성을 갖는다.

[0317] scFv 분자의 한 가지 한계는 표적 항원과의 그들의 1가 상호작용이다. 그의 표적 항원에의 scFv의 결합을 개선하는 가장 쉬운 방법 중 하나는 다량체의 생성을통해 그의 기능적 친화성을 증가시키는 것이다. 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디를 형성하기 위한 동일한 scFv 분자의 연합은 많은 동일한 Fv 모듈을 포함할 수 있다. 이들 시약은 따라서 다가이지만 일특이적이다. 각각 상이한 부모 Ig로부터 유래된 VH와 VL을 포함하는, 두 가지 상이한 scFv 분자의 연합은 완전히 기능적인 이특이적 디아바디를 형성할 것이다. 이특이적 scFv의 독특한 응용은 두 개의 (인접한) 표면 에피토프를 통하여 동일한 표적 분자 상의 두 부위에 동시에 결합하는 것이다. 이들 시약은 단일 scFv 또는 Fab 단편에 비하여 상당한 친화성 이점을 얻는다. 많은 다가 scFv-기반 구조가 제작되었으며, 예를 들어, 미니항체, 이량체 미니항체, 미니바디, (scFv)2, 디아바디 및 트리아바디를 포함한다. 이들 분자는 다양한 가수(valence)(2 내지 4 결합 부위), 크기(50 내지 120 kDa), 가요성 및 생산 용이성을 포괄한다. 단일쇄 Fv 항체 단편(scFv)은 VH 및 VL 도메인이 적어도 12 잔기의 폴리펩티드 링커에 의해 연결될 경우 주로 단량체이다. 단량체 scFv는 모든 조건하에서 12 및 25 아미노산 길이의 링커에서 열역학적으로 안정하다. 비공유적 디아바디 및 트리아바디 분자는 제작하기 용이하며 단일 scFv 분자의 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 연결하는 펩티드 링커를 단축시킴으로써 생산된다. scFv 이량체는 고도의 유연성을 제공하는 양친매성 헬릭스에 의해 연결되며 미니항체 구조는 이중 헬릭스를 통해 연결된 두 개의 미니항체(4개의 scFv 분자)를 함유하는 이량체 이특이적(DiBi) 미니항체를 생성하기 위해 변형될 수 있다. 유전자-융합된 또는 이황화 결합된 scFv 이량

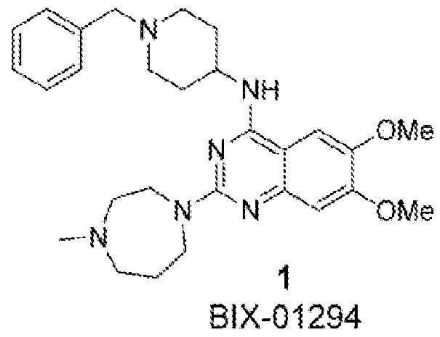
체는 중간 정도의 유연성을 제공하며 C-말단 Gly4Cys(서열번호 19) 서열을 추가하는 직접적인 클로닝 기술에 의해 생성된다. scFv-CH3 미니바디는 직접적으로(LD 미니바디) 또는 매우 유연한 힌지 영역을 통해(플렉스(Flex) 미니바디) IgG CH3 도메인에 연결된 두 개의 scFv 분자로 구성된다. 대략 80 kDa의 분자량으로, 이들 2가 구조체는 항원에 상당히 결합할 수 있다. 플렉스 미니바디는 마우스에서 인상적인 종양 국소화를 나타낸다. 이특이적 및 삼특이적 다량체는 상이한 scFv 분자의 연합에 의해 형성될 수 있다. 기능적 친화성의 증가는 Fab 또는 단일쇄 Fv 항체 단편(scFv) 단편이 이량체, 삼량체 또는 더 큰 응집체로 복합될 때 도달될 수 있다. 1가 scFv 및 Fab 단편에 비하여 다가 scFv의 가장 중요한 이점은 표적 항원에 대한 기능적 결합 친화성(결합 친화도)에서의 이득이다. 높은 결합 친화도는 scFv 다량체가 동시에 별도의 표적 항원들에 결합할 수 있는 것을 요구한다. scFv 단량체에 비하여 scFv 디아바디를 위한 기능적 친화성에서의 이득은 상당하며 주로 감소된 해리율(off-rate)에서 보여지며, 이는 둘 이상의 표적 항원에의 다중 결합으로부터 그리고 하나의 Fv가 해리할 때 재결합으로부터 야기된다. 그러한 scFv 분자가 다량체로 연합할 경우, 그들은 단일 표적 항원에의 높은 결합친화도를 갖거나 상이한 표적 항원들에의 다중 특이성을 갖도록 고안될 수 있다. 항원들에의 다중 결합은 Fv 모듈에서의 정확한 배열과 배향에 의존한다. 다가 scFv 표적에서의 완전한 결합친화도를 위하여, 항원 결합 부위는 동일한 방향을 향해 가리켜야 한다. 만일 다중 결합이 입체적으로 가능하지 않으면, 기능적 친화성에서의 명백한 이득은 확산 속도 및 항원 농도에 의존하는 재결합 증가의 효과로 인한 것일 것이다. 그들의 특성을 개선하는 모이어티와 접합된 항체 또한 본 발명을 위해 고려된다. 예를 들어, 인 비보로 그들의 반감기를 증가시키는 PEG와의 항체 접합체가 본 발명을 위해 사용될 수 있다. 순수한 또는 면역된 동물 또는 환자의 B 림프구로부터의 가변 항체 단편을 인코딩하는 유전자를 PCR 증폭시킴으로써 면역 라이브러리가 제조된다. 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자 패밀리에 대해 특이적인 올리고뉴클레오티드의 조합이 사용된다. 면역글로불린 배세포 유전자는 축퇴 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭되는 가변 단편의 상보성-결정 영역을 가진, 반합성 항체 레퍼토리를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 이들 단일-팟(single-pot) 라이브러리는 많은 항원에 대한 항체 단편이 하나의 단일 라이브러리로부터 분리될 수 있다는 이점을 갖는다. 파아지-디스플레이 기술을 이용하여 항체 단편의 친화성을 증가시킬 수 있으며, 무작위, 코돈-기반 또는 부위-지시된 돌연변이유발에 의해, 개별 도메인의 쇄를 순수한 레퍼토리로부터의 단편의 쇄들과 셔플링함에 의해 또는 세균 돌연변이유발유전자 균주를 이용함으로써, 새로운 라이브러리가 기존의 항체 단편으로부터 제조된다.

[0318] 대안적으로, SCID-hu 마우스, 예를 들어, 젠팜(Genpharm)에 의해 개발된 모델이 항체 또는 그 단편을 생산하기 위해 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 다가 상호작용의 효과를 활용하여 생성된, 펩타바디(peptabody)로 불리는 높은 결합친화도의 결합 분자의 새로운 타입이 고려된다. 짧은 펩티드 리간드가 반강체 힌지 영역을 통해 연골 올리고머 매트릭스 단백질의 또 꼬인-나선(coiled-coil) 조립 도메인과 융합되어 오량체 다가 결합 분자가 생성되었다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 리간드 및/또는 키메라 억제제는 예를 들어, 항-리간드 항체(Ab)와 특정 표적에 대해 지시된 Ab의 화학적 결합에 의해 생산된 이특이적 항체를 이용하여 조직- 또는 종양-특이적 표적에 표적화될 수 있다. 화학적 접합체의 한계를 피하기 위하여, 항체의 분자 접합체가 지시 리간드 및/또는 키메라 억제제를 세포 표면 분자로 보내는 재조합 이특이적 단일쇄 Ab의 생산을 위해 이용될 수 있다. 대안적으로, 표적화 모이어티에 부착된 둘 이상의 활성 제제 및/또는 억제제가 투여될 수 있으며, 각 접합체는 표적화 모이어티, 예를 들어, 상이한 항체를 포함한다. 각 항체는 (동일하거나 상이한 표적 부위 항원과 연합된) 상이한 표적 부위 에피토프와 반응성이다. 부착된 제제를 가진 상이한 항체는 원하는 표적 부위에서 부가적으로 축적된다. 항체-기반 또는 비-항체-기반 표적화 모이어티는 리간드 또는 억제제를 표적 부위로 전달하기 위해 이용될 수 있다. 바람직하게는, 비조절된 또는 질병 관련된 항원을 위한 천연 결합 제제가 이 목적을 위해 사용된다.

[0319] *소분자*

[0320] 상기 문단에서 기술된 출원들은 모두 본 명세서에서 참고로 포함된다. 일부 실시형태에서, 당업자는 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제로서 다른 제제를 이용할 수 있으며, 예를 들어, 항체, 미끼 항체 또는 RNAi는 본 명세서에 개시된 SCNT의 효율을 증가시키기 위한 방법, 화합물 및 키트에서 효과적이다.

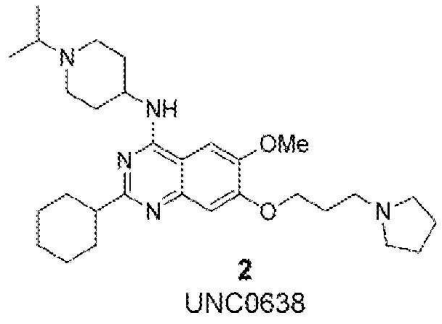
[0321] 일부 실시형태에서, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제는 글리오톡신 또는 관련된 에피폴리티오다이옥소피페라진 또는 BIX-01294(그 전체가 참고로 본원에 통합되는 Takahashi et al., 2012, J. Antibiotics 65, 263-265 또는 Shaabam et al., Chemistry & Biology, Volume 14, Issue 3, March 2007, Pages 242-244에 개시된 다이아제핀-퀴나졸린-아민 유도체)이다. BIX-01294는 하기 화학 구조를 갖는다:



1
BIX-01294

[0322]

[0323] UNC0638로도 알려진 퀴나졸린 또한 G9a를 억제하며, 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서의 사용을 위해 포함된다. UNC0638은 하기 구조를 갖는다:

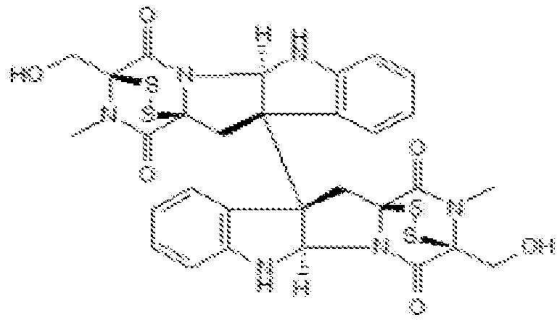


2
UNC0638

[0324]

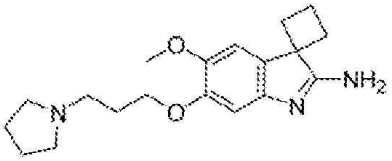
[0325] Suv39h1의 소분자 억제제는 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 미국 특허 출원 2015/0038496호에 개시된다. 소분자 베르티실린 A는 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 미국 특허 출원 2014/0161785호에 개시된 대로, Suv39h1 및 Suv39h2 둘 모두를 위한 선택적 억제제(즉, Suv39h1/2를 억제함)로서 확인되며, 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서의 사용을 위해 포함된다.

[0326] Suv39h1의 다른 소분자 억제제는 캐토신(화학명: (3*S*,3'*S*,5a*R*,5a*R*,10b*R*,10'b*R*,11a*S*,11'a*S*)-2,2',3,3',5a,5'a,6,6'-옥타하이드로-3,3'-비스(하이드록시메틸)-2,2'-다이메틸-[10b,10'b(11*H*,11'*H*)-바이3,11a-에피다이티오-11a*H*-피라지노[1',2':1,5]피롤로[2,3-*b*]인돌]-1,1',4,4'-테트론)(Bernhard *et al.*, FEBS Letts, 2011, 585 (22);3549-3554 참고)을 포함하며, 캐토신은 하기 화학 구조를 가지며 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서의 사용을 위해 포함된다.



[0327]

[0328] 화합물 A-366(CHEMBL3109630으로도 불림)(PubChem CID: 76285486)은 또한 3.3 nM의 IC_{50}으로, G9a로도 알려진 EHMT2 (진정염색질 히스톤 메틸트랜스퍼라제 2)의 강력한 억제제인 것으로 밝혀졌으며, 21가지의 다른 메틸트랜스퍼라제에 비하여 1000-배가 넘는 선택성을 가지며(Sweis *et al.*,. Discovery and development of potent and selective inhibitors of histone methyltransferase G9a. ACS medical Chem Letts, 2014; 5(2); 205-209), 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서의 사용을 위해 포함된다. 소분자 A-366은 하기 구조를 갖는다;

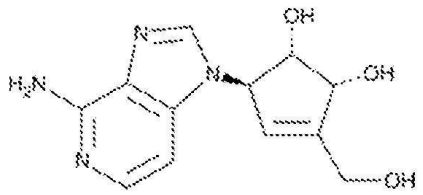


12
(A-366)

IC_{50}: 3.3 nM

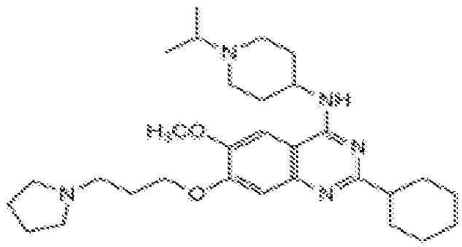
[0329]

[0330] 3-데아자네플라노신 A(DZNep)(CAS No: 102052-95-9)는 SetDB1 H3K9me3 HMT아제의 감소를 야기하고 H3K27me3 및 H3K9me3 둘 모두의 환원된 수준의 감소를 야기하며(Lee *et al.*, Biochem Biophys Res Comm, 2013, 438(4): 647-652), 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서의 사용을 위해 포함된다. DZNp는 하기 화학식을 갖는다:



[0331]

[0332] HMT아제 억제제 IV, UNC0638(칼바이오켐(Calbiochem)으로부터 입수가능)은 최소한으로 Suv39h2를 억제하며(IC_{50} >10 μM)(Vedadi, M., *et al.* 2011. Nat. Chem. Biol. 7, 566; 및 Liu, F., *et al.* 2011. J. Med. Chem. 54, 6139 참고), 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서 사용을 위해 포함된다. HMT아제 억제제 IV는 또한 동의어: 2-시클로헥실-N-(1-이소프로필피페리딘-4-일)-6-메톡시-7-(3-(피롤리딘-1-일)프로폭시)퀴나졸린-4-아민, DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제 III, DNA MT아제 억제제 III, EHMT1/GLP 억제제 II, EHMT2/G9a 억제제 IV에 의해 알려져 있으며 하기 화학식을 갖는다:



[0333]

[0334] *SCNT*

[0335] 본 발명의 목적은 SCNT의 효율을 증가시키고 SCNT를 이용하여 더욱 효율적으로 체세포를 복제하는 수단을 제공하는 것이다. 본 명세서의 방법은 포유류를 복제하기 위해, 전능성 또는 다능성 세포를 수득하기 위해 또는 포유류 세포를 재프로그래밍하기 위해 이용될 수 있다.

[0336] **수용체 포유류 난모세포**:

[0337] 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법, 키트 및 조성물에서 사용하기 위한 수용체 난모세포는 임의의 포유류 종으로부터 유래할 수 있다. 일부 실시형태에서, 냉동보존된 난모세포가 수용체 난모세포 세포로서 이용된다. 일부 실시형태에서, 수용체 난모세포는 인간이다. 난모세포의 냉동보존 및 해동은 당업자에게 알려져 있다(Tucker *et al.*, Curr Opin Obstet Gynecol. 1995 June; 7(3):188-92 참고). 일부 실시형태에서, 수용체 난모세포는 자발

적 암컷 공여체, 예를 들어, 난자 공여체로부터 수득된다. 일부 실시형태에서, 난모세포는 난소 자극 또는 난소의 과자극(즉, 배란 유도 또는 과배란 유도)를 겪은 암컷 포유류 개체로부터 수득된다. 과배란 유도 방법은 예를 들어, 미국 특허 8,173,592호 및 국제 특허 출원 WO2000/059542에 기술된 바와 같이 본 기술분야에 알려져 있으며, 그의 전문은 본 명세서에서 참고로 포함된다.

[0338] 일부 실시형태에서, 수용체 난모세포는 제핵 난모세포이다. 공여체 난모세포의 핵 제거는 본 명세서에 참고로 인용되는 미국 특허 4,994,384호에 개시된 것과 같은 공지 방법에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 중기 II(MII) 난모세포는 즉시 핵을 제거하기 위하여, 7.5 ㎍/ml의 사이토찰라신 B를 선택적으로 함유하는 HECM에 두거나, 또는 적합한 배지, 예를 들어, CR1aa 및 10% 발정기 소 혈청에 둔 후, 나중에 핵이 제거될 수 있다. 핵 제거는 또한 극체 및 인접한 세포질을 제거하기 위하여 마이크로피펫을 이용하여 미세수술적으로 이루어질 수 있다. 그 후 세포는 성공적으로 핵이 제거된 것들을 확인하기 위하여 스크리닝될 수 있다. 이 스크리닝은 HECM 중의 1 ㎍/ml 33342 훽스트 염료로 세포를 염색한 후 10초 미만 동안 자외선 조사하에서 세포를 봄으로써 이루어질 수 있다. 성공적으로 핵이 제거된 세포는 그 후 적합한 배양 배지내에 둘 수 있다.

[0339] 일부 실시형태에서, 예를 들어, 양서류로부터의 난모세포의 핵 제거를 위한 절차와 유사한, 난모세포 핵 제거를 위한 비침습적 방법이 이용될 수 있으며, 상기 방법에서는 자외선 조사가 일상적인 절차로서 이용된다(Gurdon Q. J. Microsc. Soc. 101 299-311 (1960)). 일부 실시형태에서, 포유류 난모세포의 난모세포 핵 제거는 DNA-특이적 형광색소를 이용하여 이루어질 수 있으며, 마우스 난모세포를 30초 초과동안 자외선에 노출하는 것은 세포의 발생 잠재력을 감소시켰다(Tsunoda *et al.,* J. Reprod. Fertil. 82 173 (1988)).

[0340] 일부 실시형태에서, 제핵 포유류 난모세포는 감수분열 축의 미세소관의 탈안정화(예를 들어, 탈중합화)를 통해 감수분열 축 장치를 파괴함에 의한 난모세포의 핵 제거를 일컫는 "유도된 제핵"을 거쳤다(그의 전문이 본 명세에서 참고로 인용되는 미국 특허 출원 2006/0015950호 참고). 미세소관의 탈안정화는 염색분체가 분리되는 것을 방지하며(예를 들어, 성공적인 핵분열을 방지함), 감수분열 성숙 동안 난모세포 게놈(예를 들어, 핵 염색질)이 불균등하게 분리하도록(예를 들어, 왜곡) 유도하여, 난모세포의 본질적으로 모든 내인성 염색질이 두번째 극체에 모이도록 한다.

[0341] 일부 실시형태에서, 난모세포 공여는 건강한 여성, 예를 들어, 건강한 인간 여성 난모세포 공여체로부터이다. 일부 실시형태에서, 인간 난모세포 공여체의 필요성을 피하기 위하여, 인간 공여체 체세포의 핵 재프로그래밍을 위해 비-인간 난모세포가 보고된 교차-종(cross-species) SCNT가 검토되었다(Chung *et al.,* Cloning and Stem Cells 11, 1-11(2009)). 따라서, 일부 실시형태에서, 공여체 난모세포는 소 또는 임의의 다른 비-인간 포유류 종이며, 이는 인간 공여체 체세포로부터 수득된 핵 또는 핵 유전 물질을 위한 수용체 난모세포일 수 있다.

[0342] 일부 실시형태에서, 난모세포는 미토콘드리아 질병을 갖지 않은 암컷 개체로부터 수득된다. 일부 실시형태에서, 난모세포는 미토콘드리아 질병을 가진 암컷 개체로부터 수득된다. 미토콘드리아 질병은 전형적으로 미토콘드리아 DNA(mtDNA)에 보유되며 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0343] 따라서, 일부 실시형태에서, 수용체 난모세포는 공여체 체세포가 수득되는 개체/개인과 상이한 개체 또는 개인이지만, 동일한 포유류 종인 개체 또는 개인으로부터 수득된다. 일부 실시형태에서, 수용체 난모세포는 공여체 체세포가 수득되는 개체/개인과 상이한 개체 또는 개인이며 상이한 포유류 종인 개체 또는 개인으로부터 수득된다. 일부 실시형태에서, 수용체 난모세포는 착상 후 발생을 위하여 SCNT 배아가 착상되는 동일한 개체로부터 수득된다.

[0344] 일부 실시형태에서, 암컷 개체가 미토콘드리아 DNA 결함 또는 mtDNA에서의 돌연변이를 가지면, 건강한 미토콘드리아 및 야생형 mtDNA를 가진 난세포질이 난세포질 전달이라고도 불리는 세포질 전달을 통해 수용체 난모세포내로 도입되어 이종조직성(heteroplasmy) 난모세포를 생성하도록 미토콘드리아 전달이 일어날 수 있다(Sterneckert *et al.,* Nat Reviews Genetics, Genetics 15, 625-639 (2014) 및 Ma *et al.*, 2015; *Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease,* Nature 524, 234-238 참고). 세포질 전달 방법은 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 참고로 그 전체가 본원에 통합되는 미국 특허 출원 2004/0268422호에 개시된다. 그러한 이종조직성 난모세포는 그 후 핵이 제거되고 공여체 체세포로부터의 핵 유전 물질의 주입을 위한 수용체 난모세포로서 사용될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 생성되는 SCNT 배아는 별도의 3 개인으로부터 유래될 수 있으며; 즉, 공여체 체세포로부터의 핵 유전 물질, 수용체 난모세포로부터의 세포질 및 세번째 개인 또는 공여체 개체로부터의 야생형 또는 돌연변이 mtDNA를 함유한다.

[0345] *공여체 포유류 세포*

[0346] 본 명세서에서 개시된 방법, 키트 및 조성물은 공여체 포유류 세포를 포함하며 그로부터의 핵이 제핵 난모세포 내로 주입되어 SCNT 배아를 생성한다. 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포는 최종 분화된 체세포이다. 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포는 배아 줄기 세포 또는 성체 줄기 세포 또는 iPS 세포가 아니다. 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포는 공여체 세포로부터의 핵이 제핵 난모세포 내로 이식되는 공여체 포유류 세포로서 본 명세서에 개시된 방법에 사용하기 위한 인간 또는 동물 세포이다. 일부 실시형태에서, 공여체 체세포는 수컷 포유류 개체, 예를 들어, XY 개체로부터 수득된다. 대안적 실시형태에서, 체세포의 공여체는 암컷 개체, XX 개체로부터 수득된다. 일부 실시형태에서, 체세포의 공여체는 XXY 개체로부터 수득된다.

[0347] 본 발명에서 유용한 인간 및 동물/포유류 공여체 체세포는 예를 들어, 상피, 신경 세포, 표피 세포, 각질세포, 조혈세포, 멜라닌세포, 연골세포, 림프구(B 및 T 림프구), 다른 면역 세포, 적혈구, 대식세포, 멜라닌세포, 단핵구, 단핵 세포, 섬유아세포, 심근세포, 난구 세포 및 다른 근육세포 등을 포함한다. 또한, 핵 이식을 위해 사용되는 인간 세포는 상이한 기관, 예를 들어, 피부, 폐, 췌장, 간, 위, 장, 심장, 생식기관, 방광, 신장, 요도 및 다른 비뇨기관 등으로부터 수득될 수 있다. 이들은 단지 적합한 포유류 공여체 세포의 일부 예이다. 적합한 공여체 세포, 즉, 본 발명에서 유용한 세포는 신체의 임의의 세포 또는 기관으로부터 수득될 수 있다. 이것은 모든 체세포 및 일부 실시형태에서, 배 세포, 예를 들어, 원시 배 세포, 정자 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 공여체 세포 또는 공여체 세포로부터의 핵(즉, 핵 유전 물질)은 활발하게 분열하는, 즉, 비-휴지기 세포이며, 이는 복제 효능을 향상시키는 것으로 보고되었다. 그러한 공여체 체세포는 G1, G2 S 또는 M 세포기의 세포를 포함한다. 대안적으로, 휴지기 세포가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 그러한 공여체 세포는 G1 세포 주기에 있을 것이다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 공여체 및/또는 수용체 세포는 2-세포 블록을 거치지 않는다.

[0348] 일부 실시형태에서, 포유류 공여체 체세포의 핵 유전 물질(즉, 핵)은 난구 세포, 세르토리 세포 또는 배아 섬유아세포 또는 성체 섬유아세포로부터 수득된다.

[0349] 일부 실시형태에서, 핵 유전 물질은 예를 들어, 유전자 돌연변이 또는 비정상을 바로잡기 위해 또는 유전자 변형을 도입하기 위해, 예를 들어, 질병 모델에서, 예를 들어, SCNT 배아로부터 수득된 ntESC에서 유전자 변형의 효과를 연구하기 위해, 유전적으로 변형된다. 일부 실시형태에서, 핵 유전 물질은 예를 들어, 체세포 공여체 세포내로 원하는 특징을 도입하기 위해 유전적으로 변형된다. 체세포를 유전적으로 변형시키는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에서 사용하기 위해 포함된다.

[0350] 일부 실시형태에서, 공여체 체세포는 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 미국 특허 출원 US2004/0025193호에 개시된 방법에 따라 선택되며, 상기 출원은 공여체 체세포내로 원하는 트랜스유전자를 도입하고 트랜스유전자를 가진 체세포를 선별한 후 수용체 난모세포내로의 주입을 위한 핵을 수득하는 것을 개시한다.

[0351] 일부 실시형태에서, 공여체 핵(예를 들어, 공여체 체세포로부터의 핵 유전 물질)은 표지될 수 있다. 세포는 녹색 형광 단백질(Yang, M., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:1206-1211), 또는 그의 유도체 중 하나와 같은 쉽게 가시화되는 단백질을 인코딩하는 트랜스유전자로 유전적으로 변형되거나, 또는 반딧불이(포티너스 피라리스(Photinus pyralis) 루시퍼라제 유전자(Fluc) 로부터 제작된 트랜스유전자로(Sweeney, T. J., et al. 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 12044-12049) 또는 바다 팬지(Sea Pansey)(레닐라 레니포르미스(Renilla reniformis)) 루시퍼라제 유전자(Rluc)로부터 제작된 트랜스유전자로(Bhaumik, S., and Ghambhir, S. S., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:377-382) 유전적으로 변형될 수 있다.

[0352] 공여체 체세포의 핵 유전 물질내로 도입된 하나 이상의 트랜스유전자는 트랜스유전자(들)이 높은 수준으로 많은 또는 모든 세포에서 발현되도록 "하우스-키핑(house-keeping) 유전자" 프로모터를 이용하여 구성적으로 발현되거나, 또는 특정 니치내에 위치하여 특정 조직 또는 세포 타입으로 발생한 특정 세포 계통 또는 세포만이 트랜스유전자(들)을 발현하고 (만일 트랜스유전자가 리포터 유전자라면)가시화되도록 트랜스유전자(들)이 조직 특이적 및/또는 특정 발생 단계 특이적 유전자 프로모터를 이용하여 발현될 수 있다. 추가의 리포터 트랜스유전자 또는 표지화 시약은 형광 단백질 유사체 및 바이오센서를 비롯한 발광 표지된 거대분자, 녹색 형광 단백질 및 그의 돌연변이로 형성된 것들을 비롯한 발광 거대분자 키메라, 생리학적 반응에 관련된 세포 항원과 반응하는 발광 표지된 일차 또는 이차 항체, 발광 염색, 염료 및 기타 소분자를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 모자이크 배반포로부터의 표지된 세포는 예를 들어, 유세포분석에 의해 분류되어 복제된 집단을 분리할 수 있다.

[0353] 일부 실시형태에서, 포유류 공여체 체세포는 건강한 공여체, 예를 들어, 건강한 인간, 또는 기존의 의학적 질환(예를 들어, 파킨슨병(PD) 및 연령 관련 황반 변성(AMD), 당뇨병, 비만, 낭포성 섬유증, 자가면역 질병, 신경퇴행성 질병, 유전적 또는 후천적 질병을 가진 임의의 개체)을 가진 공여체 또는 존재하는, 또는 기존의 또는 발

병중인 질환 또는 질병을 치료하기 위해 재생 치료법 또는 줄기 세포 이식을 필요로 하는 임의의 개체로부터 올 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 체세포는 SCNT-유도 인간 ES 세포(ntESC)의 줄기 세포 이식의 수용체인 개체로부터 수득되어, 환자-특이적 hES 세포의 자가 이식을 허용한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 방법과 조성물은 환자-특이적 동종동계 배아 줄기 세포주(즉, 동종동계 ntESC 주)의 생산을 허용한다.

[0354] 일부 실시형태에서, 공여체 체세포 또는 핵(즉, 핵 유전 물질)은 본 명세서에 개시된 방법에 따라 본 명세서에 개시된 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 또는 Setdb1의 억제제 중 어느 하나로 처리된다. 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포 또는 핵은 핵 이식 전에 전처리되지 않으며, SCNT 배아는 본 명세서에 개시된 방법에 따라 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제로 처리된다. 일부 실시형태에서, 공여체 세포 또는 핵은 핵 이식 또는 제핵 수용체 난모세포내로의 주입을 위한 유전 물질(또는 핵)의 수집 이전에 스페르민, 프로타민 또는 퓨트레신으로 전처리되지 않는다.

[0355] ***공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 SCNT를 H3K9me3 메틸화를 감소시키는 제제와 접촉시키기.***

[0356] 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 체세포는 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제로 처리되거나 이와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포의 핵(또는 핵 유전 물질)은 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제로 처리되거나 이와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포의 세포질 및/또는 핵은 본 명세서에 개시된 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제, 예를 들어, Suv39h1, Suv39h2 및/또는 Setdb1 중 어느 하나 또는 그 조합의 억제제로 처리되거나 접촉된다. 일부 실시형태에서, 접촉은 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제의 공여체 포유류 체세포의 세포질 및/또는 핵 내로의 미세주입이다.

[0357] 일부 실시형태에서, 공여체 체세포는 제핵 포유류 공여체 난모세포로의 이식을 위해 핵을 제거하기 전에 적어도 약 24시간, 또는 적어도 약 48 시간, 또는 적어도 약 3-일 또는 적어도 약 4-일 또는 4-일 초과 동안 Suv39h1 및/또는 Suv39h2, 또는 둘 모두(Suv39h1/2)의 억제제와 접촉된다. 일부 실시형태에서, Suv39h1 및/또는 Suv39h2, 또는 둘 모두(Suv39h1/2)의 억제제는 siRNA에 의해서이며 Suv39h1 및/또는 Suv39h2, 또는 둘 모두(Suv39h1/2)의 발현 억제는 수용체 난모세포 내로의 주입을 위해 핵을 제거하기 전에 적어도 12시간, 또는 적어도 24 시간 이상 기간 동안 일어난다. 일부 실시형태에서, Suv39h1 및/또는 Suv39h2, 또는 둘 모두(Suv39h1/2)의 억제는 제핵 포유류 공여체 난모세포에의 이식을 위한 핵의 제거 전에 예를 들어, 적어도 약 24시간, 또는 적어도 약 48 시간, 또는 적어도 약 3-일 또는 적어도 약 4-일 또는 4-일 초과 동안 공여체 체세포에서 일어난다. 일부 실시형태에서, Suv39h1 및/또는 Suv39h2, 또는 둘 모두(Suv39h1/2)의 발현의 억제는 siRNA에 의해서이며 핵의 제거 이전에 적어도 12시간, 또는 적어도 24 시간 이상동안 일어난다.

[0358] 일부 실시형태에서, 포유류 난모세포는 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제로 처리되거나 접촉된다. 일부 실시형태에서, 포유류 난모세포는 예를 들어, 제핵 난모세포의 세포질내로의 직접 주입에 의해, H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제로 처리되거나 접촉된 제핵 난모세포이다. 일부 실시형태에서, 포유류 난모세포, 또는 제핵 포유류 난모세포는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는, 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 구성원, 예를 들어, Kdm4A, Kdm4B, Kdm4C 또는 Kdm4D 중 어느 하나 또는 그 조합을 활성화시키는 제제로 처리되거나 접촉된다. 일부 실시형태에서, 제핵 난모세포는 공여체 핵 유전 물질이 주입되거나 수용되지 않았다.

[0359] 대안적 실시형태에서, 수용체 난모세포는 핵 이식 전에(즉, 공여체 핵 유전물질이 주입되기 전에) 약 40 시간의 기간 내에 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제로 처리될 것이다. 그러한 접촉은 핵 이식 전 약 40 시간에, 더욱 바람직하게는 핵 이식 전 약 12 또는 24 시간의 기간 내에, 그리고 가장 바람직하게는 핵 이식 전에 약 4 내지 9 시간의 기간 내에 일어날 수 있다. 일부 실시형태에서, 수용체 난모세포는 수용체 난모세포가 하이브리드 난모세포일 때(즉, 공여체 체세포로부터의 핵 유전 물질을 포함하지만, 아직 활성화되지 않음), H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제와 접촉된다. 그러한 접촉은 핵 이식 후 약 40 시간에, 또는 더욱 바람직하게는 핵 이식 후 약 1-4, 또는 4-12 또는 24시간 이내의 임의의 시간의 기간내에, 그리고 가장 바람직하게는 핵 이식 후 약 1-4, 또는 4 내지 9 시간의 기간 내에, 그러나 융합 또는 활성화 이전에 일어날 수 있다.

[0360] 수용체 난모세포는 핵 이식 전에, 이식과 동시에 또는 이식 후에 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제로 처리될 수 있다. 일반적으로, 수용체 난모세포는 핵 이식의 5 시간 이내에 또는 활성화 또는 융합의 5 시간 이내에(예를 들어, 5hpa; 활성화 후 5 시간) 처리될 것이다. 일부 실시형태에서, 활성화(또는 융합)는 공여체 체세포로부터의 유전 물질이 제핵 난모세포 내로 주입된 후 1-2 또는 2-4시간 이내에

일어나며, 그 경우에는 SCNT 배아는 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제와 접촉된다.

[0361] 일부 실시형태에서, SCNT 배아는 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제로 처리된다. SCNT 배아는 "하이브리드 난모세포"를 형성하기 위해 공여체 체세포로부터의 핵(예를 들어, 핵 유전 물질)을 제핵 수용체 난모세포로 주입하는 것으로부터 생성되며, 하이브리드 난모세포는 활성화되어(또한 융합되어) SCNT 배아를 생성한다. SCNT 배아는 수용체 난모세포의 세포질로 공여체 핵이 활성화(또는 융합으로 알려짐)된 후 생성된다. 일부 실시형태에서, 공여체 세포 및/또는 제핵 난모세포로부터의 세포질 또는 핵 중 하나 또는 둘 모두는 본 명세서에 개시된 대로 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제로 처리되거나 접촉되었다. 일부 실시형태에서, 공여체 세포 및/또는 제핵 난모세포 중 어느 것도 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제 및/또는 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제로 처리되지 않았다.

[0362] 일부 실시형태에서, 체세포 핵 이식 (SCNT)의 효율 증가는 SCNT 배아, 예를 들어, 적어도 5hpa, 또는 10-12 hpa 사이(즉, 1-세포 단계), 또는 약 20hpa(즉, 초기 2-세포 단계) 또는 20-28 hpa 사이(즉, 2-세포 단계)를 (i) 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리 및/또는 (ii) H3K9 메틸트랜스퍼라제-억제 제제 중 적어도 하나와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, Kdm4 유전자, 예를 들어, Kdm4d의 외인성 발현은 5hpa, 10-12 hpa 사이(즉, 1-세포 단계), 약 20hpa(즉, 초기 2-세포 단계) 또는 20-28 hpa 사이(즉, 2-세포 단계) 중 어느 하나에서의 SCNT 배아에서 일어난다. 일부 실시형태에서, SCNT 배아가 H3K9me3를 억제하는 제제, 예를 들어, Kdm4 유전자, 예를 들어, Kdm4d(예를 들어, Kdm4d mRNA 또는 mod-RNA)의 외인성 발현을 증가시키는 제제와 접촉되는 경우, SCNT 배아의 각 세포(예를 들어, 2-세포 배아의 각 세포)는 Kdm4d 활성화 또는 과발현 제제가 주입된다. 일부 실시형태에서, Kdm4 유전자, 예를 들어, Kdm4d의 외인성 발현이 5hpa, 10-12 hpa 사이(즉, 1-세포 단계), 약 20hpa(즉, 초기 2-세포 단계) 또는 20-28 hpa 사이(즉, 2-세포 단계) 중 어느 하나에서의 SCNT 배아에서 일어난다. 일부 실시형태에서, SCNT 배아가 H3K9me3를 억제하는 제제, 예를 들어, Kdm4 유전자, 예를 들어, Kdm4d, (예를 들어, Kdm4d mRNA 또는 mod-RNA)의 외인성 발현을 증가시키는 제제와 접촉되는 경우, SCNT 배아의 각 세포(예를 들어, 2-세포 배아의 각 세포)는 Kdm4d 활성화 또는 과발현 제제가 주입된다.

[0363] ***핵 이식 방법***

[0364] 본 발명의 한 가지 목적은 체세포를 보다 효율적으로 복제하는 수단을 제공하는 것이다. 본 명세서의 방법과 조성물은 포유류 (예를 들어, 인간 및 비-인간 포유류) 다능성 및 전능성 세포를 수득하기 위해 그리고 포유류 세포를 재프로그래밍하기 위해, 포유류, 예를 들어, 비-인간 포유류를 복제하기 위해 사용될 수 있다.

[0365] 핵 이식 기술 또는 핵 이식 기술은 문헌에 알려져 있다. 구체적으로, Campbell et al, Theriogenology, 43:181 (1995); Collas et al, Mol. Report Dev., 38:264-267 (1994); Keefer et al, Biol. Reprod., 50:935-939 (1994); Sims et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:6143-6147 (1993); WO 94/26884호; WO 94/24274호 및 WO 90/03432호를 참고하며, 이들의 전문은 본 명세서에서 참고로 포함된다. 또한, 미국 특허 4,944,384호 및 5,057,420호는 소 핵 이식을 위한 절차를 개시한다. 또한 Cibelli et al, Science, Vol. 280:1256-1258 (1998)를 참고한다.

[0366] 공여체 핵을 수용체 수정 배아에 이식하는 것은 미세주입 장치로 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵과 함께 최소의 세포질이 이식된다. 최소의 세포질의 이식은, 세포 융합 방법에 의한 이식과 대조적으로, 미세주입을 이용하여 핵이 이식될 경우 이룰 수 있다. 일 실시형태에서, 미세주입 장치는 압전 유닛을 포함한다. 전형적으로, 압전 유닛은 바늘에 진동을 부여하기 위하여 바늘에 작동가능하게 부착된다. 하지만, 바늘에 진동을 부여할 수 있는 임의의 형태의 압전 유닛이 본 발명의 범위 이내에 포함된다. 일부 경우에, 압전 유닛은 바늘이 목적물 내로 통과하는 것을 도울 수 있다. 일부 실시형태에서, 압전 유닛은 핵과 함께 최소의 세포이 이식되도록 하기 위해 이용될 수 있다. 그 목적에 적합한 임의의 압전 유닛이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 압전 유닛은 피에조 미세조작기 제어기(Piezo micromanipulator controller) PMM150(프라임테크(PrimeTech), 일본)이다.

[0367] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 공여체 핵을 제핵 난모세포와 융합시키는 단계를 포함한다. 세포질체와 핵의 융합은 폴리에틸렌 글리콜(Pontecorvo "Polyethylene Glycol (PEG) in the Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids" Cytogenet Cell Genet. 16(1-5):399-400 (1976) 참고), 핵의 직접 주입, 센다이 바이러스-매개 융합(미국 특허 4,664,097호 및 Graham Wistar Inst. Symp. Monogr. 9 19 (1969) 참고), 또는 전기융합과 같은 본 기술분야에 알려진 다른 기술을 비롯한 본 기술분야에 알려진 많은 기술을 이용하여 수행된다. 세포의 전기융합은 세포를 가까이 함께 인접시키고 그들을 교류 전기장에 노출시키는 것에 관련된다. 적절한 조건하에서,

세포는 함께 눌리며 세포막이 융합되고 이어서 융합체 세포(fusate cells) 또는 하이브리드 세포가 형성된다. 세포의 전기융합 및 전기융합을 수행하기 위한 장치는 예를 들어, 미국 특허 4,441,972호, 4,578,168호 및 5,283,194호, 국제 특허 출원 PCT/AU92/00473호[WO1993/05166호로 공개됨], Pohl, "Dielectrophoresis", Cambridge University Press, 1978 및 Zimmerman et al., Biochimica et Bioplzysica Acta 641: 160-165, 1981에 개시된다.

[0368] SCNT 및 수용체 난모세포의 세포질과의 공여체 핵 유전 물질의 활성화(즉, 융합)의 방법은 그 전체가 참고로 본원에 통합되는 미국 출원 2004/0148648호에 개시된다.

[0369] 난모세포 수집.

[0370] 난모세포 공여체는 이전에 개시된 대로(Gavin W.G., 1996) 동기화되고 과잉배란될 수 있으며, 48-시간 간격에 걸쳐 정관절제된 수컷과 교미되었다. 수집 후, 난모세포를 2 mM L-글루타민 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(10,000 I.U. 각각/ml)로 보충된 10% FBS를 가진 평형화된 M199에서 배양하였다. 핵 이식은 또한 *인 비보* 또는 *인 비트로*에서 성숙되었을 수 있는 난모세포를 이용할 수 있다. *인 비보* 성숙된 난모세포는 상기에서 설명한 대로 유도되며, *인 비트로* 성숙된 난모세포는 그들이 핵 이식에 사용하기 위해 수집되기 전에 특정 세포 단계까지 *인 비트로*에서 발생하도록 허용된다.

[0371] 세포질체 제조 및 핵 제거.

[0372] 난구 세포가 부착된 난모세포는 일반적으로 버려진다. 난구가 없는 난모세포를 두 그룹으로 나누었다: 중지된 중기-II(1 극체) 및 말기-II 프로토콜(명확하게 보이는 극체가 없거나 부분 돌출된 이차 극체 존재). 중지 중기-II 프로토콜 내의 난모세포는 먼저 핵이 제거된다. 활성화된 말기-II 프로토콜에 할당된 난모세포는 M199/10% FBS에서 2 내지 4시간동안 배양하여 제조하였다. 이 기간 후, 모든 활성화된 난모세포(부분 돌출된 이차 극체의 존재)를 배양-유도되고, 칼슘-활성화된 말기-II 난모세포(말기-II-Ca) 그룹으로 하고 핵을 제거하였다. 배양 기간 동안 활성화되지 않은 난모세포는 이어서 M199, 7% 에탄올을 함유한 10% FBS에서 5분 인큐베이션하여 활성화를 유도하고 추가 3시간 동안 10% FBS를 가진 M199에서 배양하여 말기-II에 도달시켰다(말기-II-EtOH 프로토콜). 모든 난모세포는 핵을 제거하기 전에 15 내지 30분에 사이토찰라신-B로 처리된다. 중기-II 단계 난모세포는 중기판을 제거하기 위하여 일차 극체 및 극체를 둘러싸는 인접 세포질(세포질의 ~ 30%)을 흡입하여 유리 피펫을 이용하여 핵을 제거하였다. 말기-II-Ca 및 말기-II-EtOH 난모세포는 일차 극체 및 부분 돌출 이차 극체를 함유한 주위 세포질(세포질의 10 내지 30%)을 제거하여 핵을 제거하였다. 핵을 제거한 후, 모든 난모세포를 즉시 재구성하였다.

[0373] 핵 이식 및 재구성

[0374] 공여체 세포 주입은 난모세포 제핵을 위해 사용된 것과 동일한 배지에서 수행되었다. 하나의 공여체 세포를 유리 피펫을 이용하여 투명대와 난세포질 막 사이에 두었다. 세포-난모세포 커플렛을 전기융합 및 활성화 절차 전에 30 내지 60분 동안 M199에서 인큐베이션하였다. 재구성된 난모세포를 융합 버퍼(300 mM 만니톨, 0.05 mM CaCl2, 0.1 mM MgSO4, 1 mM K2HPO4, 0.1 mM 글루타치온, 0.1 mg/ml BSA)에서 2분 동안 평형화시켰다. 전기융합 및 활성화를, 융합 배지로 충전된, "융합 슬라이드"(500 ㎛ 갭; BTX-젠트로닉스(Genetronics), 캘리포니아주 샌디에고)로 만들어진 2 스테인레스 스틸 전극을 가진 융합 챔버에서 실온에서 수행하였다.

[0375] 융합(예를 들어, 활성화)은 융합 슬라이드를 이용하여 수행된다. 융합 슬라이드는 융합 디쉬 내부에 위치되고, 디쉬는 융합 슬라이드의 전극을 덮기에 충분한 양의 융합 버퍼로 잠기게 하였다. 배양 항온기로부터 커플렛을 제거하고 융합 버퍼로 세척하였다. 입체현미경을 이용하여, 세포핵/세포질체 정션(junction)이 전극에 평행하도록, 커플렛을 전극 사이에 동일간격으로 두었다. 활성화와 융합을 촉진하기 위해 커플렛에 인가되는 전압 범위는 1.0 kV/cm 내지 10.0 kV/cm일 수 있음이 주목된다. 하지만, 바람직하게는 처음 한번의 동시의 융합 및 활성화 전기 펄스는 2.0 내지 3.0 kV/cm, 가장 바람직하게는 2.5 kV/cm의 전압 범위를 바람직하게는 적어도 20 μsec 기간 동안 갖는다. 이것은 BTX ECM 2001 전기세포 조작기(Electrocell Manipulator)를 이용하여 세포 커플렛에 가해진다. 마이크로펄스의 지속은 10 내지 80 μsec로 변할 수 있다. 그 과정 후, 처리된 커플렛은 전형적으로 소량의 신선한 융합 버퍼로 옮겨진다. 융합 처리된 커플렛을 평형화된 SOF/FBS로 세척하고, 그 후 사이토찰라신-B가 있거나 없는 평형화된 SOF/FBS로 옮겼다. 만일 사이토찰라신-B가 이용되면 그 농도는 1 내지 15 ㎍/ml, 가장 바람직하게는 5 ㎍/ml일 수 있다. 커플렛을 공기 중에 대략 5% CO2를 함유한 가습된 가스 챔버에서 37-39℃에서 인큐베이션하였다. 본 명세서에서 제공된 프로토콜 중 어느 것에서든 사이토찰라신-B 대신 만니톨이 사용될 수 있음이 주목된다(Ca+2 및 BSA를 가진 HEPES-완충된 만니톨(0.3 mm) 기반 배지). 융합 후 10 내지

90분에, 가장 바람직하게는 융합 후 30분에 시작하여, 실제 세포핵/세포질체 융합의 존재는 나중의 이식 또는 추가의 핵 이식 회차에서의 사용을 위한 트랜스제닉 배아의 발생에 대해 결정된다.

[0376] 시클로헥시미드 처리 후, 커플렛은 적어도 0.1% 소 혈청 알부민, 바람직하게는 적어도 0.7%, 바람직하게는 0.8% 및 100 U/ml 페니실린과 100 ㎍/ml 스트렙토마이신으로 보충된 평형화된 SOF 배지(SOF/BSA)로 완전히 세척한다. 커플렛을 평형화된 SOF/BSA로 옮기고, 24-48시간 동안 37-39℃에서 대략 6% O2, 5% CO2, 나머지 질소를 함유한 가습된 모듈 인큐베이션 챔버에서 방해없이 배양하였다. 적절한 발생 연령의 핵 이식 배아(24 내지 48시간에 1-세포 내지 최대 8-세포)를 대리모 동기화 수용체에 이식하였다.

[0377] 핵 이식 배아 배양 및 수용체에의 이식.

[0378] *SCNT 배아의 배양*

[0379] SCNT에 의해 유도된 배아는 배아가 일반적으로 (적어도 인 비보로)배양되는 것과는 다른 *인 비보* 배양 조건으로부터 이득을 얻거나 또는 심지어 이를 요구할 수도 있다고 제안되었다. 일상적인 소 배아의 증식에서, 재구성된 배아(그 중 다수는 한번에)는 (Willadsen, In Mammalian Egg Transfer (Adams, E. E., ed.) 185 CRC Press, Boca raton, Fla. (1982)에 개시된 대로) 5 내지 6일 동안 양 난관에서 배양되었다. 일부 실시형태에서, SCNT 배아는 이식 전에 한천과 같은 보호 배지에 매립된 후 임시 수용체로부터의 회수 후 한천으로부터 절개될 수 있다. 보호 한천 또는 다른 배지의 기능은 두 가지이다: 첫번째로, 이것은 투명대를 함께 유지함으로써 SCNT 배아를 위한 구조적 지지로 작용하며; 두번째로는 수용체 동물의 면역계의 세포에 대한 장벽으로 작용한다. 이 방법이 배반포를 형성하는 배아의 비율을 증가시킴에도 불구하고, 많은 배아가 소실될 수 있는 단점이 있다. 일부 실시형태에서, SCNT 배아는 50 ㎕ 액적 내의 단층의 피더 세포, 예를 들어, 일차 염소 난관 상피 세포 상에서 공동배양될 수 있다. 배아 배양물은 수용체 대리모로 배아가 이식되기 전에 48 시간 동안 5% CO_2를 가진 가습된 39 ℃ 항온기에서 유지될 수 있다.

[0380] SCNT 실험은 분화된 성체 체세포로부터의 핵이 전능성 상태로 재프로그램될 수 있음을 보여주었다. 따라서, 본 명세서에 개시된 방법을 이용하여 생성된 SCNT 배아는 전능성 또는 배아 줄기 세포 또는 줄기-유사 세포 및 세포 콜로니의 생성을 위하여 적합한 *인 비트로* 배양 배지에서 배양될 수 있다. 배아의 배양 및 성숙에 적합한 배양 배지는 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 소 배아 배양 및 유지를 위해 사용될 수 있는 공지 배지의 예는 햄(Ham's) F-10+10% 태아 소 혈청(FCS), 조직 배양 배지-199(TCM-199)+10% 태아 소 혈청, 타이로드-알부민-락테이트-피루베이트(TALP), 둘베코(Dulbecco's) 포스페이트 완충 염수(PBS), 이글 및 위튼(Eagle's and Whitten's) 배지를 포함한다. 난모세포의 수집과 성숙을 위해 사용되는 가장 일반적인 배지 중 하나는 TCM-199 및 태아 소 혈청, 신생아 혈청, 발정기 소 혈청, 양 혈청 또는 거세소 혈청을 비롯한 1 내지 20% 혈청 보충물이다. 바람직한 유지 배지는 얼스 염(Earl salts), 10% 태아 소 혈청, 0.2 Ma 피루베이트 및 50 ug/ml 젠타마이신 설페이트를 가진 TCM-199를 포함한다. 상기 중 어느 것이든 또한 과립막 세포, 난관 세포, BRL 세포 및 자궁 세포 및 STO 세포와 같은 다양한 세포 타입과의 공동배양에 관련될 수 있다.

[0381] 구체적으로, 자궁내막의 인간 상피 세포는 착상 전 및 착상 기간 동안 백혈병 억제 인자(LIF)를 분비한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 배양 배지에의 LIF의 첨가는 SCNT-유도 배아의 *인 비트로* 발생을 향상시키기 위해 포함된다. 배아 또는 줄기-유사 세포 배양을 위한 LIF의 사용은 참고로 본원에 통합되는 미국 특허 5,712,156호에 개시된다.

[0382] 다른 유지 배지는 본 명세서에 참고로 인용되는 로젠크란스, 쥬니어 등(Rosenkrans, Jr. et al.)의 미국 특허 5,096,822호에 개시된다. CR1으로 불리는 이 배아 배지는 배아를 지원하는데 필요한 영양 물질들을 함유한다. CR1은 1.0 mM 내지 10 mM, 바람직하게는 1.0 mM 내지 5.0 mM 범위의 양의 헤미칼슘 L-락테이트를 함유한다. 헤미칼슘 L-락테이트는 그위에 통합된 헤미칼슘 염을 가진 L-락테이트이다. 또한, 배양에서 인간 배아 줄기 세포를 유지하기 위한 적합한 배양 배지는 Thomson et al., Science, 282:1145-1147 (1998) 및 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:7844-7848 (1995)에서 개시된다.

[0383] 일부 실시형태에서, 피더 세포는 마우스 배아 섬유아세포를 포함할 것이다. 적합한 섬유아세포 피더 층의 제조 수단은 하기의 실시예에서 개시되며 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0384] 배반포-단계 SCNT 배아(또는 그의 등가물)로부터 ES 세포(예를 들어, ntESC)를 유도하는 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 그러한 기술은 SCNT 배아로부터 ES 세포를 유도하기 위해 사용될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, ES 세포는 발생의 초기 단계 동안 복제된 SCNT 배아로부터 유도될 수 있다.

[0385]

[0386] 적용

[0387] *전능성 세포의 수득.*

[0388] 일부 실시형태에서, SCNT 배아로부터 생성된 난할구는 전능성 세포를 수득하기 위하여 유리 피펫을 이용하여 분리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 분리는 0.25% 트립신의 존재하에서 일어날 수 있다(Collas and Robl, 43 BIOL. REPROD. 877-84, 1992; Stice and Robl, 39 BIOL. REPROD. 657-664, 1988; Kanka et al., 43 MOL. REPROD. DEV. 135-44, 1996).

[0389] 일부 실시형태에서, SCNT 배아로부터 생성된 배반포 또는 배반포-유사 집단은 배아 줄기 세포주, 예를 들어, 핵이식 ESC(ntESC) 세포주를 수득하기 위해 이용될 수 있다. 그러한 세포주는 예를 들어, 그 전문이 본 명세서에서 참고로 인용되는 Thomson et al., Science, 282:1145-1147 (1998) 및 Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:7544-7848 (1995)에 의해 보고된 배양 방법에 따라 수득될 수 있다.

[0390] 다능성 배아 줄기 세포는 또한 배아가 정상적으로 출생까지 발생하는 것을 간섭하지 않고 SCNT 배아로부터 제거된 단일 난할구로부터 생성될 수 있다. 2004년 11월 4일에 출원된 미국 특허 출원 60/624,827호; 2005년 3월 14일에 출원된 60/662,489호; 2005년 6월 3일에 출원된 60/687,158호; 2005년 10월 3일에 출원된 60/723,066호; 2005년 10월 14일에 출원된 60/726,775호; 2005년 11월 4일에 출원된 11/267,555호; 2005년 11월 4일에 출원된 PCT 출원 PCT/US05/39776호를 참고하며 이들의 전문은 본 명세서에서 참고로 포함되며; 또한 Chung et al., Nature, Oct. 16, 2005(인쇄 전에 전자문서로 공개됨) 및 Chung et al., Nature V. 439, pp. 216-219 (2006)를 참고하며 그의 전문은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0391] 본 발명의 일 양태에서, 상기 방법은 연구 및 치료법에서 SCNT 배아로부터 유래된 세포의 이용을 포함한다. 그러한 다능성 또는 전능성 세포는 피부, 연골, 뼈, 골격근, 심근, 신장, 간, 혈액 및 혈액 형성, 혈관 전구체 및 혈관 내피, 췌장 베타, 신경, 아교, 망막, 내이 모낭, 장, 폐, 세포를 제한없이 포함하는 신체 내 임의의 세포로 분화될 수 있다.

[0392] 본 발명의 다른 실시형태에서, SCNT 배아 또는 SCNT 배아로부터 수득된 배반포, 또는 다능성 또는 전능성 세포(예를 들어, ntESC)는 망막 색소 상피, 조혈 전구세포 및 혈액혈관 선조세포와 같은 다른 치료적으로 유용한 세포 및 외배엽, 중배엽 및 내배엽의 많은 다른 유용한 세포 타입을 생성하기 위해 하나 이상의 분화 유도제에 노출될 수 있다. 그러한 유도제는 사이토카인, 예를 들어, 인터루킨-알파 A, 인터페론-알파 A/D, 인터페론-베타, 인터페론-감마, 인터페론-감마-유도성 단백질-10, 인터루킨-1-17, 각질세포 성장 인자, 렙틴, 백혈병 억제 인자, 대식세포 콜로니-자극 인자 및 대식세포 염증 단백질-1 알파, 1-베타, 2,3 알파, 3-베타 및 단핵구 주화성 단백질 1-3, 6킨(kine), 액티빈 A, 앰피레귤린, 안지오제닌, B-내피 세포 성장 인자, 베타 셀룰린, 뇌-유래 신경영양 인자, C10, 카디오트로핀-1, 모양대(ciliary) 신경영양 인자, 사이토카인-유도 호중구 주화인자-1, 에오탁신, 표피 성장 인자, 상피 호중구 활성화 펩티드-78, 에리트로포이에틴, 에스트로겐 수용체-알파, 에스트로겐 수용체-베타, 섬유아세포 성장 인자(산성 및 염기성), 헤파린, FLT-3/FLK-2 리간드, 아교 세포주-유래 신경영양 인자, Gly-His-Lys, 과립구 콜로니 자극 인자, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자, GRO-알파/MGSA, GRO-베타, GRO-감마, HCC-1, 헤파린-결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 헤레귤린-알파, 인슐린, 인슐린 성장 인자 결합 단백질-1, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질-1, 인슐린-유사 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 II, 신경 성장 인자, 신경영양인자-3,4, 온코스타틴 M, 태반 성장 인자, 플레이오트로핀, 란테스, 줄기 세포 인자, 기질 세포-유래 인자 1B, 트로모포이에틴, 형질전환 성장 인자--(알파, 베타 1,2,3,4,5), 종양 괴사 인자(알파 및 베타), 혈관 내피 성장 인자 및 골 형성 단백질, 호르몬 및 호르몬 길항제, 예를 들어, 17B-에스트라디올, 부신피질자극 호르몬, 아드레노메듈린, 알파-멜라닌세포 자극 호르몬, 융모성 생식선 자극 호르몬, 코르티코스테로이드-결합 글로불린, 코르티코스테론, 덱사메타손, 에스트리올, 모낭 자극 호르몬, 가스트린 1, 글루카곤, 고나도트로핀, L-3,3',5'-트리이오도티로닌, 배란촉진 호르몬, L-티록신, 멜라토닌, MZ-4, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, PEC-60, 뇌하수체 성장 호르몬, 프로게스테론, 프로락틴, 세크레틴, 성 호르몬 결합 글로불린, 갑상선 자극 호르몬, 갑상선자극호르몬 방출 인자, 티록신-결합 글로불린 및 바소프레신의 발현을 바꾸는 효소, 세포외 기질 성분, 예를 들어, 피브로넥틴, 피브로넥틴의 단백질 분해 단편, 라미닌, 테나신, 트롬보스폰딘 및 프로테오글리칸, 예를 들어, 아그레칸, 헤파란 설페이트 프로테오글리칸, 콘트로이틴 설페이트 프로테오글리칸 및 신데칸을 포함하며 이에 제한되지 않는다. 다른 유도제는 본 발명의 재프로그램된 세포로부터 유도된 분화 세포에 유도성 신호를 제공하기 위해 이용되는 한정된 조직으로부터의 세포로부터 유래된 세포 또는 성분을 포함한다. 그러한 유도제는 인간, 비-인간 포유류 또는 조류로부터 유래될 수 있으며, 예를 들어, 특정 병원균이 없는

(SPF) 배아 또는 성체 세포이다.

[0393] 본 발명의 일부 실시형태에서, SCNT 배아로부터 수득된 다능성 또는 전능성 세포(예를 들어, ntESC)는 선택적으로 분화되고, 치료 유용성을 나타내기 위해 그들이 정상적으로 거주하는 조직 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, SCNT 배아로부터 수득된 다능성 또는 전능성 세포는 조직 내로 도입될 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, SCNT 배아로부터 수득된 다능성 또는 전능성 세포는 전신적으로 또는 치료 용도가 필요한 부위로부터 떨어진 곳에서 도입될 수 있다. 그러한 실시형태에서, SCNT 배아로부터 수득된 다능성 또는 전능성 세포는 원하는 부위에서 떨어져서 작용하거나 원하는 부위로 이동할 수 있다.

[0394] 본 발명의 일부 실시형태에서, SCNT 배아로부터 수득된 복제된 세포, 다능성 또는 전능성 세포는 다른 다능성 줄기 세포의 분화를 유도하는데 이용될 수 있다. 유전자 발현의 배아 패턴을 유지하면서 *인 비트로*에서 증식될 수 있는 단일 세포-유래 세포 집단의 생성은 다른 다능성 줄기 세포의 분화를 유도하는데 유용하다. 세포-세포 유도는 초기 배아에서 분화를 지시하는 일반적인 수단이다. 많은 잠재적으로 의료적으로 유용한 세포 타입이 척수 신경, 심장 세포, 췌장 베타 세포 및 최종적 조혈 세포를 비롯한 정상 배아 발생 동안 유도성 신호에 의해 영향을 받는다. 유전자 발현의 배아 패턴을 유지하면서 *인 비트로*에서 증식될 수 있는 단일 세포-유래 세포 집단은 다른 다능성 줄기 세포가 원하는 세포 또는 조직 타입이 되도록 분화를 유도하기 위하여 다양한 *인 비트로*, 또는 *인 오보* 또는 인 비보로 배양될 수 있다.

[0395] SCNT 배아로부터 수득된 다능성 또는 전능성 세포(예를 들어, ntESC)는 임의의 원하는 분화된 세포 타입을 수득하기 위해 이용될 수 있다. 그러한 분화된 인간 세포의 치료 용법은 비할 데가 없다. 예를 들어, 인간 조혈 줄기 세포는 골수 이식을 요하는 의료적 치료에서 이용될 수 있다. 그러한 절차는 많은 질병, 예를 들어, 난소암 및 백혈병과 같은 후기암 및 AIDS와 같은 면역계를 손상시키는 질병을 치료하기 위해 이용된다. 조혈 줄기 세포는 예를 들어, 암 또는 AIDS 환자의 공여체 성체 최종 분화된 체세포, 예를 들어, 상피 세포 또는 림프구를 수용체 제핵 난모세포, 예를 들어, 그러나 이로 제한되지 않는 소 난모세포와 융합시켜, 본 명세서에 개시된 방법에 따라 SCNT 배아를 수득하고 SCNT 배아를 이어서 이용하여 전술한 대로 다능성 또는 전능성 세포 또는 줄기-유사 세포를 수득하고, 그러한 세포를 조혈 줄기 세포가 수득될 때까지 분화에 유리한 조건하에서 배양함으로써 수득될 수 있다. 그러한 조혈 세포는 암과 AIDS를 비롯한 질병의 치료에서 사용될 수 있다. 본 명세서에서 토의된 바와 같이, 성체 공여체 세포 또는 수용체 난모세포 또는 SCNT 배아는 본 명세서에 개시된 방법에 따라 Kdm4 히스톤 디메틸라제 활성화제 및/또는 H3K9 메틸트랜스퍼라제 억제제로 처리될 수 있다.

[0396] 대안적으로, 공여체 포유류 세포는 신경 질환을 가진 환자로부터의 성체 체세포이고, 생성된 SCNT 배아는 신경 세포주를 생산하기 위한 분화 조건하에서 배양될 수 있는 다능성 또는 전능성 세포를 생산하기 위해 이용될 수 있다. 그러한 인간 신경 세포의 이식에 의해 치료가능한 구체적인 질병은 예를 들어, 다른 병중에서도 파킨슨병, 알츠하이머병, ALS 및 뇌성 마비를 포함한다. 파킨슨병의 구체적인 경우에, 이식된 태아 뇌 신경 세포가 주위 세포와 적절히 연결되어 도파민을 생산함이 입증되었다. 이것은 파킨슨병 증상의 장기 역전을 야기할 수 있다.

[0397] 일부 실시형태에서, SCNT 배아로부터 수득된 다능성 또는 전능성 세포(예를 들어, ntESC)는 흉터 형성을 야기하지 않고 재생할 수 있거나 고도로 탄성원성인 유전자 발현의 피부학적 출생전 패턴을 가진 세포로 분화될 수 있다. 특히 관절을 둘러싸는 영역에서처럼, 외피가 높은 수준의 탄성으로부터 이득을 얻는 영역에 해당하는, 포유류 태아 피부의 진피 섬유아세포는 수년 동안 턴오버없이 기능하는 탄성 소섬유의 복잡한 구성을 드 *노보*(*de novo*)로 합성하는 것을 담당한다. 또한, 초기 배아 피부는 흉터 형성없이 재생할 수 있다. SCNT 배아로부터 수득된 다능성 또는 전능성 세포로부터의 배아 발생에서 이 시점으로부터의 세포는 정상 엘라스틴 구성의 형성을 비롯한 피부의 흉터없는 재생을 촉진하는 데 유용하다. 이것은 정상 인간 노화 과정의 증상을 치료하는데 있어서 또는 광선 피부 손상에서 특히 유용하며, 이들 경우에는 피부의 심한 탄력섬유분해가 있어서 피부의 처짐과 주름을 비롯한 노화된 외관을 야기할 수 있다.

[0398] 분화된 세포의 특이적 선별을 가능하게 하기 위하여, 일부 실시형태에서, 공여체 포유류 세포는 유도성 프로모터를 통해 발현되는 선별 마커로 형질감염되어, 분화가 유도된 경우 특정 세포 계통이 선별되거나 농축되도록 할 수 있다. 예를 들어, CD34-neo는 조혈 세포의 선별을 위해, Pw1-neo는 근육 세포의 선별을 위해, Mash-1-neo는 교감 신경세포의 선별을 위해, Mal-neo는 대뇌피질의 회백질의 인간 CNS 신경세포의 선별을 위해 사용될 수 있다.

[0399] 본 발명의 큰 효과는 SCNT의 효율을 증가시킴으로써 동종동계 또는 동계 인간 세포, 특히 이식에 적합한, 유도된 다능성 줄기 세포가 아닌 다능성의 동종동계 또는 동계 인간 세포의 본질적으로 무제한 공급을 제공하는 것

이다. 일부 실시형태에서, 이들은 SCNT 배아로부터 수득된 환자-특이적 다능성 세포이며, 이때 공여체 포유류 세포는 다능성 줄기 세포 또는 그의 분화된 자손으로 치료될 개체로부터 수득되었다. 따라서, 현재의 이식 방법과 관련된 중요한 문제점, 즉, 숙주-대-이식편 또는 이식편-대-숙주 거부 때문에 일어날 수 있는 이식된 조직의 거부를 피할 것이다. 종래에, 거부는 사이클로스포린과 같은 항-거부 약물의 투여에 의해 방지되거나 감소된다. 하지만, 그러한 약물은 상당한 부작용, 예를 들어, 면역억제, 발암 특성을 가질 뿐만 아니라, 및 매우 비싸다. 본 발명은 사이클로스포린, 이물란, FK-506, 글루코코르티코이드 및 라파마이신 및 그 유도체와 같은 항-거부 약물의 필요성을 제거하거나 적어도 크게 감소시킨다.

[0400] 동종동계 세포 치료법에 의해 치료가능한 다른 질병 및 질환은 예를 들어, 척수 손상, 다발성 경화증, 근육성 이영양증, 당뇨병, 간 질병, 즉, 고콜레스테롤혈증, 심장병, 연골 치환, 화상, 발 궤양, 위장병, 혈관 질병, 신장 질병, 요로 질병 및 노화 관련 질병 및 질환을 포함한다.

[0401] *비-인간 동물의 생식적 복제*

[0402] 일부 실시형태에서, 본 방법과 조성물은 비-인간 포유류의 복제를 위한 SCNT 배아의 생산 효율을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법과 조성물로부터 유도된 SCNT 배아로부터 비-인간 포유류를 복제하는 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 포유류 복제를 위해 사용되는 두 가지 주요 절차는 로슬린법(Roslin method)과 호놀룰루법(Honolulu method)이다. 이들 절차는 스코틀랜드의 로슬린 연구소에서 1996년에 돌리 양의 생성(Campbell, K. H. et al. (1996) Nature 380:64-66) 및 호놀룰루의 하와이 대학에서 1998년에 쿠무리나 마우스의 생성(Wakayama, T. et al. (1998) Nature 394:369-374)을 따라 명명되었다.

[0403] 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법은 부모 배아로서 사용될 수 있는 복제된 난할 단계 배아 또는 상실기 배아를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 부모 배아는 ES 세포를 생성하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 난할구(1, 2, 3, 4 난할구)는 그러한 부모 배아로부터 제거되거나 생검될 수 있으며 그러한 난할구는 ES 세포를 유도하기 위해 사용될 수 있다.

[0404] 구체적으로, 본 발명은 소정의 원하는 형질 또는 특징, 예를 들어, 오랫동안 원했던 증가된 중량, 우유 함량, 우유 생산 부피, 수유 간격의 길이 및 질병 저항성을 가진 비-인간 포유류를 생성하기 위하여 SCNT를 이용하는 것에 적용가능하다. 전통적인 사육 과정은 일부 특별히 원하는 형질을 가진 동물을 생산할 수 있으나, 종종 이들 형질은 많은 원치않는 특징을 자주 수반하며, 시간이 걸리고 비용이 들고 신뢰성이 낮다. 더욱이, 이들 과정은 그렇지 않으면 문제의 종의 유전자 총체(genetic complement)에서 완전히 부재하는 원하는 단백질 치료제(즉, 소 우유에서 거미 실크 단백질)와 같은, 유전자 생성물을 특정 동물 계통이 생성하는 것을 완전히 허용할 수 없다.

[0405] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법과 조성물은 예를 들어, 도입된 원하는 특징을 갖거나 또는 특정 원치않는 특징이 없거나 부족한(예를 들어, 유전자 넉아웃에 의해), 트랜스제닉 비-인간 포유류를 생성하기 위해 이용될 수 있다. 트랜스제닉 동물을 생성할 수 있는 기술의 발달은 특정 형질을 보유하도록 조작되거나 소정의 단백질 또는 다른 분자 화합물을 발현하도록 고안된 동물의 생산에서 예외적으로 정밀한 수단을 제공한다. 즉, 트랜스제닉 동물은 발생의 초기 단계에서 체세포 및/또는 생식세포 내로 의도적으로 도입된 유전자를 보유하는 동물이다. 동물이 발생하고 자람에 따라 둥몰 내로 조작된 단백질 생성물 또는 특정 발생 변화가 나타나게 된다.

[0406] 대안적으로, 본 방법과 조성물은 비-인간 포유류를 복제하기 위해, 예를 들어, 특정 비-인간 포유류의 유전적으로 동일한 자손을 생산하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 방법은 예를 들어, 원하는 특징을 가진 산업적 또는 상업적 동물(예를 들어, 양질의 우유를 생산하고 및/또는 고기 생산을 위한 근육을 가진 암소/소)의 복제에서, 또는 유전적으로 동일한 반려 동물, 예를 들어, 애완동물 또는 멸종 위기 동물을 복제하거나 생산하는데에 유용하다.

[0407] 요약하면, 본 발명의 한 가지 효과는 선택된 형질에 대해 동형접합성인 트랜스제닉 비-인간 포유류의 생산 효율 증가를 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 비-인간 공여체 체세포가 비-인간 포유류 세포주를 원하는 유전자를 인코딩하는 적어도 하나의 DNA를 함유한 주어진 트랜스유전자 작제물로 형질감염시키고; 원하는 유전자가 세포 또는 세포주의 게놈 내로 삽입된 세포주를 선별하고; 핵 이식 절차를 수행하여 원하는 유전자에 대해 이종접합성인 트랜스제닉 동물을 생성하고; 이종접합성 트랜스제닉 동물의 유전자 조성을 규명하고; 선별 제제의 사용을 통해 원하는 트랜스유전자에 대해 동형접합성인 세포를 선별하고; 공지의 분자 생물학 방법을 이용하여 생존 세포를 규명하고; 핵 이식 또는 배아 이식의 두번째 회차에 사용할 생존 세포 또는 세포 콜로니를 골라내고; 원하

는 트랜스유전자에 대해 동형접합성인 동물을 생산함에 의해 유전적으로 변형되었다.

[0408] 본 발명에 따라 수행될 수 있는 추가 단계는 배양중인 세포 및/또는 세포주에서 이종접합성 동물로부터 수득된 세포주를 증식시키는 것이다. 본 발명에 따라 수행될 수 있는 추가 단계는 이형접합성 트랜스제닉 동물을 생검하는 것이다.

[0409] 대안적으로, 핵 이식 절차는 연구, 연속 복제(serial cloning) 또는 *인 비트로* 용도를 위해 유용한 트랜스제닉 세포 집단을 생성하기 위해 수행될 수 있다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 생존 SCNT 배아는 FISH, 서던 블롯, PCR을 제한없이 포함하는 여러 공지의 분자 생물학 방법 중 하나에 의해 규명된다. 상기 제공된 방법은 원하는 트랜스유전자(들)에 대해 동형접합성인 집단의 가속화된 생산을 허용하여 원하는 생물의약의 보다 효율적인 생산을 허용할 것이다.

[0410] 일부 실시형태에서, 본 발명은 유전적으로 원하는 가축 또는 비-인간 포유류의 생산을 가능하게 한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 트랜스제닉 세포주를 생산하기 위하여 SCNT 과정에 사용된 공여체 체세포의 게놈 내로 하나 이상의 다수 단백질이 통합될 수 있다. 추가의 관심 유전자/분자를 위한 추가의 DNA 트랜스유전자를 이용한 형질감염의 연속 라운드(예를 들어, 그렇게 생산될 수 있는 분자는 제한없이 항체, 생물의약을 포함한다). 일부 실시형태에서, 이들 분자는 상이한 생리학적 상태하에서 작동되거나 상이한 세포 타입에서의 생산을 야기하는 상이한 프로모터를 이용할 수 있다. 베타 카제인 프로모터는 유방 상피 세포에서 수유기 동안 켜지는 한가지 그러한 프로모터인 한편, 다른 프로모터는 다른 세포 조직에서 상이한 조건하에서 켜질 수 있다.

[0411] 또한, 본 발명의 방법은 특히 유익한 또는 중요한 유전자를 보유하는 하나 이상의 동형접합성 동물의 빠른 발생을 가능하게 하여, 집단의 규모 확대를 가능하게 하고 이전 방법보다 훨씬 더 빨리 원하는 단백질의 집단 수율을 잠재적으로 증가시킬 것이다. 유사하게, 본 발명의 방법은 또한 질병 또는 그들 자신의 사망률로 인해 소실된 특정 트랜스제닉 동물의 대체를 제공할 것이다. 또한, 원하는 생물의약의 생산을 최적화하고 비용을 낮추기 위하여 다양한 DNA 구조체로 제작된 트랜스제닉 동물의 생산을 촉진하고 가속화할 것이다. 다른 실시형태에서, 동형접합성 트랜스제닉 동물은 이종기관이식 목적을 위해 보다 빠르게 발생되거나 인간화 IgG 좌를 가지고 발생될 것이다.

[0412] 따라서, 본 발명의 일 양태는 SCNT 배아의 생산 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 체세포 핵 이식 (SCNT) 배아 중 적어도 하나를 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아에서 H3K9me3 메틸화를 감소시키는 적어도 하나의 제제와 접촉시키며, 이때 수용체 포유류 난모세포는 유핵 또는 제핵 난모세포이며; 포유류 난모세포가 유핵이면 수용체 포유류 난모세포의 핵을 제거하며; 공여체 포유류 세포로부터의 핵을 제핵 난모세포로 이식하며; 포유류 SCNT 배아를 형성하기에 충분한 시간동안 수용체 난모세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다.

[0413] *난할구 배양.* 일 실시형태에서, SCNT 배아는 난할구를 생성하기 위하여 사용될 수 있으며, SCNT 배아를 파괴하거나 다르게는 그들의 생존능을 상당히 변경하지 않고, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 SCNT 배아로부터 단일 난할구를 분리하기 위해 착상전 유전자 진단(PGD)에서 현재 사용되는 것들에 관련된 *인 비트로* 기술을 이용할 수 있다. 본 명세서에서 입증되는 바처럼, 다능성 인간 배아 줄기(hES) 세포 및 세포주는 배아가 출생까지 정상 발달하는 것을 간섭하지 않고 본 명세서에 개시된 SCNT 배아로부터 제거된 단일 난할구로부터 생성될 수 있다.

[0414] *치료적 복제*

[0415] "돌리"의 양 복제에서 윌무트 등(Wilmut *et al.)*(Wilmut, et al, Nature 385, 810 (1997))의 발견은 hESC의 유도에서 톰슨 등(Thomson et al.)(Thomson et al., Science 282, 1145 (1998))의 발견과 함께, SCNT-배아 또는 환자 자신의 핵으로부터 생성된 SCNT-조작된 세포 덩어리로부터 유도된 환자-특이적 hESC의 확립에 기초한 재생 세포 이식에 대한 상당한 열광을 일으켰다. 자가 이식을 통해 면역 거부를 피하는 것을 목표로 한 이 전략은 아마도 SCNT를 위한 가장 강한 임상적 이유이다. 동일한 징표에 의해, 복잡한 질병-특이적 SCNT-hESC의 유도는 질병 기전의 발견을 가속화할 수 있다. 세포 이식의 경우, 개별 마우스의 자신의 SCNT-유도 mESC를 이용한 쥐 SCID 및 PD 모델의 혁신적 치료는 고무적이다(Rideout et al, Cell 109, 17 (2002); Barberi, Nat. Biotechnol. 21, 1200 (2003)). 궁극적으로, 넓은 조직 적합성을 가진 SCNT-유도 줄기 세포 은행을 생성하는 능력은 새로운 난모세포의 지속적인 공급의 필요성을 감소시킬 것이다.

[0416] SCNT의 효율을 증가시키기 위한 본 명세서에 개시된 방법과 조성물은 줄기 세포 연구 및 발생 생물학 분야를 진전시킬 많은 중요한 용도를 갖는다. 예를 들어, SCNT 배아는 ES 세포, ES 세포주, 전능성 줄기(TS) 세포 및 세

포주를 생성하기 위해 사용될 수 있으며, 그로부터 분화된 세포는 기본적인 발생 생물학을 연구하기 위해 이용될 수 있으며, 많은 질병과 질환의 치료에서 치료적으로 사용될 수 있다. 부가적으로, 이들 세포는 이들 세포의 성장, 분화, 생존 또는 이동을 조절하기 위해 사용될 수 있는 인자와 조건을 확인하기 위한 스크리닝 분석에서 사용될 수 있다. 확인된 제제는 *인 비트로* 및 인 비보로 세포 거동을 조절하기 위해 사용될 수 있으며, 세포 또는 무세포 치료법의 기초를 형성할 수 있다.

[0417] 다능성 인간 배아 줄기 세포의 분리 및 포유류에서의 SCNT의 돌파구는 조직 회복 및 이식 의학에서의 잠재적인 응용을 가지고서, 연구에서의 사용을 위한 미분화 세포의 잠재적으로 무한한 공급원을 생성하기 위하여 인간 SCNT를 수행할 가능성을 야기하였다.

[0418] 때로는 "치료적 복제"로 불리는 이 개념은 체세포의 핵을 제핵 공여체 난모세포 내로 이식하는 것을 말한다(Lanza, et al., Nature Med. 5,975 (1999)). 이론에서는, 난모세포의 세포질은 체세포 유전자 모두를 침묵시키고 배아 유전자를 활성화시킴으로써 이식된 핵을 재프로그램할 것이다. ES 세포(즉, ntESC)는 복제된 착상전 단계 배아의 내세포 집단(ICM)으로부터 분리된다. 치료적 배경에 적용될 경우, 이들 세포는 환자의 핵 게놈을 보유할 것이며; 따라서, 지시된 세포 분화 후에, 세포는 (다른 것들 중에서도) 당뇨병, 골관절염 및 파킨슨병과 같은 퇴행성 질환을 치료하기 위하여 면역 거부없이 이식될 수 있음이 제안된다. 이전의 보고는 소 ES-유사 세포의 생성(Cibelli *et al.,* Nature Biotechnol. 16, 642 (1998)), 및 복제된 배반포의 ICM으로부터 마우스 ES 세포의 생성(Munsie et al., Curro Bio! 10, 989 (2000); Kawase, et al., Genesis 28, 156 (2000); Wakayama et al., Science 292, 740 (2001)) 및 복제된 인간 배아의 8- 내지 10-세포 단계 및 배반포로의 발생(Cibelli et al., Regen. Med. 26, 25 (2001); Shu, et al., Fertil. Steril. 78, S286 (2002))을 개시하였다. 여기서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 SCNT-조작된 세포 집단으로부터 인간, 환자-특이적 ES 세포를 생성하기 위해 이용될 수 있다. SCNT로부터 생성된 그러한 ES 세포는 본 명세서에서 "ntESC"로 불리며 환자-특이적 동종동계 배아 줄기 세포주를 포함할 수 있다.

[0419] hESC의 인간 세포주를 생산하기 위한 본 기술은 과량의 IVF 임상 배아를 이용하며, 환자-특이적 ES 세포를 생산하지 않는다. 환자-특이적인, 면역-매치된 hESC는 질병과 발생의 연구를 위해 생물의학적으로 매우 중요하며 치료적 줄기 세포 이식 방법을 진전시킬 것으로 기대된다. 따라서, 본 발명은 그의 핵이 공여된 제핵 난모세포 내로 삽입된다는 정보를 제공받은 공여체로부터의 인간 공여체 피부 세포, 인간 공여체 난구 세포 또는 다른 인간 공여체 체세포로부터 생성된 SCNT로부터 hESC 세포주를 확립하기 위해 사용될 수 있다. SCNT-유도 hESC의 이들 세포주는 동물 단백질이 없는 배양 배지에서 성장할 것이다.

[0420] 각 SCNT-유도된 hESC의 주 조직적합성 복합체 실체는 면역학적 적합성을 보여주기 위하여 환자 자신과 비교될 수 있으며, 이는 궁극적인 이식을 위해 중요하다. 이들 SCNT-유도 hESC의 생성에서, 유전적 및 후성적 안정성의 평가가 이루어질 것이다.

[0421] 많은 인간 부상 및 질병은 단일 세포 타입에서의 결함으로부터 생긴다. 만일 결함 세포가 적절한 줄기 세포, 전구 세포 또는 인 비트로에서 분화된 세포로 교체될 수 있다면, 그리고 이식된 세포의 면역 거부를 피할 수 있다면, 임상에서 세포 수준에서 질병과 부상을 치료하는 것이 가능할 수 있다(Thomson et al., Science 282, 1145 (1998)). 체세포 핵이 개인 환자로부터 얻어지는 인간 SCNT 배아 또는 SCNT-조작 세포 집단으로부터 hESC를 생성함으로써 - (미토콘드리아 DNA(mtDNA)는 아니지만) 핵 게놈이 공여체의 것과 동일한 상황 - 만일 이들 세포가 인간 치료를 위해 사용된다면 면역 거부 가능성은 제거될 수 있다(Jaenisch, N. Engl. Med. 351, 2787 (2004); Drukker, Benvenisty, Trends Biotechnol. 22, 136 (2004)). 최근에는, 중증복합면역결핍증(SCID) 및 파킨슨병(PD)의 마우스 모델(Barberi et al., Nat. Biotechnol. 21, 1200 (2003))이 치료적 복제로도 불리는 과정인, NT 배반포로부터 유도된 자가 분화 마우스 배아 줄기 세포(mESC)의 이식을 통해 성공적으로 치료되었다.

[0422] 본 명세서에 개시된 방법을 이용하여 생성된 인간 SCNT 배아 또는 SCNT-조작 세포 집단으로부터 hESC를 생성하는 것은 알카라인 포스파타제(AP), 단계-특이적 배아 항원 4(SSEA-4), SSEA-3, 종양 거부 항원 1-81(Tra-I-81), Tra-I-60, 및 옥타머-4(Oct-4)를 비롯한 hESC 다능성 마커의 발현에 대해 평가될 수 있다. 인간 짧은 탠덤-반복(tandem-repeat) 프로브를 이용한 DNA 핑거프린팅 또한 유도된 모든 NT-hESC 세포주가 포유류 체세포의 각 공여체로부터 기원하였으며 이들 세포주는 핵제거 실패 및 후속의 단위생식 활성화의 결과가 아니었음을 높은 확실성으로 보여주기 위해 이용될 수 있다. 줄기 세포는 자가-재생뿐만 아니라 모든 세 가지 배아 배엽: 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로부터 체세포로 분화하는 그들의 능력에 의해 정의된다. 분화는 적절한 동물 모델 내로의 IM 주입에 의해 입증되는 테라토마 형성 및 배양체(embryoid body)(EB) 형성 면에서 분석될 것이다.

[0423] 요약하면, SCNT의 효율을 증가시키기 위한 본 발명의 방법은 ES 세포를 유도하기 위한 현재의 방법에 대한 대안

을 제공한다. 하지만, 현재의 방법과는 달리, SCNT는 공여체 조직과 조직적합성인 ES 세포주를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생산된 SCNT 배아는 치료를 필요로 하는 특정 환자와 조직적합성인 세포 치료법을 개발하기 위하여 미래에 기회를 제공할 수 있다.

[0424] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법, 시스템, 키트 및 장치는 서비스 제공자에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들어, 조사자는 서비스 제공자에 의해 작동되는 실험실에서 본 명세서에 개시된 방법을 이용하여 생성된 SCNT 배아, 또는 SCNT 배아로부터 유도된 다능성 줄기 세포 또는 전능성 줄기 세포를 제공할 것을 서비스 제공자에게 요청할 수 있다. 그러한 실시형태에서, 공여체 포유류 세포를 수득한 후, 서비스 제공자는 SCNT 배아 또는 그러한 SCNT-배아로부터 유도된 배반포를 생산하기 위하여 본 명세서에 개시된 방법을 수행하고, SCNT 배아 또는 그러한 SCNT-배아로부터 유도된 배반포를 조사자에게 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, 조사자는 공여체 포유류 세포 샘플을 임의의 수단, 예를 들어, 우편, 속달우편 등을 통해 서비스 제공자에게 보낼 수 있으며, 또는 대안적으로, 서비스 제공자는 조사자로부터 공여체 포유류 세포 샘플을 수집하고 그들을 서비스 제공자의 진단 실험실에 수송하는 서비스를 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, 조사자는 서비스 제공자 실험실의 위치에서 SCNT 방법에서 사용될 공여체 포유류 세포 샘플을 둘 수 있다. 대안적 실시형태에서, 서비스 제공자는 스탑-바이 서비스(stop-by service)를 제공하며, 이 경우 서비스 제공자는 조사자의 실험실에 인력을 보내고 또한 조사자의 실험실에서 조사자의 원하는 공여체 포유류 세포의 본 명세서에 개시된 발명의 SCNT 방법과 시스템을 수행하기 위한 키트, 장치 및 시약을 제공한다. 그러한 서비스는 본 명세서에 개시된 대로 비-인간 포유류, 예를 들어, 반려 동물 및 동물의 생식적 복제를 위해 또는 치료적 복제를 위해, 예를 들어, SCNT-배아로부터의 배반포로부터 다능성 줄기 세포를 얻기 위해, 예를 들어, 재생 세포 또는 조직 치료법을 필요로 하는 개체내로 이식하기 위한 환자-특이적 다능성 줄기 세포를 얻기 위해 유용하다.

[0425] 조성물 및 키트.

[0426] 본 발명의 다른 양태는 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생산된 SCNT로부터 수득한 ntESC 집단에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, ntESC는 인간 ntESC, 예를 들어, 환자-특이적 ntESC, 및/또는 환자-특이적 동종동계 ntESC이다. 일부 실시형태에서, ntESC는 전능성 또는 다능성 상태로 ntESC를 유지하는 배양 배지와 같은 배양 배지에 존재한다. 일부 실시형태에서, 배양 배지는 냉동보존에 적합한 배지이다. 일부 실시형태에서, ntESC 집단은 냉동보존된다. 냉동보존은 예를 들어, 미래 사용을 위해, 예를 들어, 치료적 용도 또는 다른 용도, 예를 들어, 연구 용도를 위해 ntESC를 저장하기 위해 유용하다. ntESC는 증폭될 수 있으며 증폭된 ntESC의 일부는 사용되고 다른 일부는 냉동보존될 수 있다. ntESC를 증폭시키고 보존하는 능력은 상당한 유연성, 예를 들어, 다중 환자-특이적 인간 ntESC의 생산 및 SCNT 절차에서의 사용을 위한 공여체 체세포의 선택을 허용한다. 예를 들어, 조직적합성 공여체로부터의 세포는 하나 보다 많은 수용체에서 증폭되고 사용될 수 있다. ntESC의 냉동보존은 조직은행에 의해 제공될 수 있다. ntESC는 조직적합성 데이터와 함께 냉동보존될 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법을 이용하여 생산된 ntESC는 일상적인 절차에 따라 냉동보존될 수 있다. 예를 들어, 냉동보존은 적합한 증식 배지, 10% BSA 및 7.5% 다이메틸설폭사이드를 포함할 수 있는 "동결" 배지내의 약 1 내지 천만 세포에서 수행될 수 있다. ntESC는 원심분리된다. 성장 배지는 흡입되고 동결 배양 배지로 교체된다. ntESC는 구로서 재현탁된다. 세포는 예를 들어, -80℃의 용기에 둠으로써 천천히 동결된다. 동결된 ntESC는 37℃ 욕조에서 회전시킴으로써 해동되고, 신선한 줄기 세포 배지에 재현탁되고 전술한 대로 성장된다.

[0427] 일부 실시형태에서, ntESC는 공여체 체세포로부터의 핵 유전 물질을 수용체 난모세포의 세포질 내로 주입하여 생성된 SCNT 배아로부터 생성되며, 이때 수용체 난모세포는 세번째 공여체 개체로부터의 mtDNA를 포함한다.

[0428] 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생산된 SCNT 배아에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, SCNT 배아는 인간 배아이고, 일부 실시형태에서, SCNT 배아는 비-인간 포유류 배아이다. 일부 실시형태에서, 비-인간 포유류 SCNT 배아는 유전적으로 변형되며, 예를 들어, 적어도 하나의 트랜스유전자가 SCNT 절차 이전에(즉, 공여체 핵을 수집하고 수용체 난모세포의 세포질과 융합하기 전에) 공여체 핵의 유전 물질에서 변형되었다(예를 들어, 도입되거나 결실되거나 변화되었다). 일부 실시형태에서, SCNT 배아는 공여체 체세포로부터의 핵 DNA, 수용체 난모세포로부터의 세포질, 및 세번째 공여체 대상으로부터의 mtDNA를 포함한다.

[0429] 본 발명은 또한 포유류, 예를 들어, 비-인간 포유류의 생존가능한 또는 살아있는 자손에 관한 것이며, 이때 살아있는 자손은 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생산된 SCNT 배아로부터 발생된다.

[0430] 본 발명의 다른 양태는 포유류 SCNT 배아 또는 그의 배반포 또는 수용체 포유류 난모세포(유핵 또는 제핵) 중 적어도 하나 및 (i) 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제; 또는 (ii) H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 제제 중 적어도 하나를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0431] 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 방법의 실시를 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 다른 양태는 (i) 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제 및/또는 H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 제제 및 (ii) 포유류 난모세포를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함하는 키트에 관한 것이다. 키트는 수용체 난모세포, 및/또는 SCNT 배아를 위한 배양 배지 및 공여체 핵 유전 물질의 수용체 난모세포의 세포질과의 활성화(예를 들어, 융합)을 위한 하나 이상의 시약을 선택적으로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 포유류 난모세포는 제핵 난모세포이다. 일부 실시형태에서, 포유류 난모세포는 비-인간 난모세포 또는 인간 난모세포이다. 일부 실시형태에서, 난모세포는 동결되고/되거나 냉동보존 동결 배지에 존재한다. 일부 실시형태에서, 난모세포는 미토콘드리아 질병을 갖거나 mtDNA에서 돌연변이 또는 비정상을 가진 공여체 암컷 대상으로부터 수득된다. 일부 실시형태에서, 난모세포는 미토콘드리아 질병을 갖지 않거나 mtDNA에서 돌연변이를 갖지 않는 공여체 암컷 대상으로부터 수득된다. 일부 실시형태에서, 난모세포는 세번째 대상으로부터의 mtDNA를 포함한다.

[0432] 키트는 또한 선택적으로 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제 및/또는 빛 또는 다른 불리한 조건에 의해 H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 제제의 분해를 방지하기 위해 적절한 시스템(예를 들어, 불투명 용기) 또는 안정화제(예를 들어, 산화방지제)를 포함한다.

[0433] 키트는 선택적으로 SCNT 절차(예를 들어, 난모세포의 핵 제거, 및/또는 수용체 난모세포 내로의 공여체 체세포의 핵 유전 물질 주입 및/또는 융합/활성화, 및/또는 SCNT 배아 배양)를 수행하기 위한 지시(즉, 프로토콜), 및 공여체 체세포 및/또는 수용체 난모세포 및/또는 SCNT 배아 중 적어도 하나를 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제 및/또는 H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 제제와 접촉시키는 지시를 함유한 설명서를 포함할 수 있다.

[0434] 본 명세서에 개시된 발명을 충분히 이해될 수 있도록, 하기의 상세한 설명을 기술한다.

[0435] 본 발명의 일부 실시형태는 하기 번호의 절들 중 어느 하나에서 정의될 수 있다:

[0436] 1. 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아를 상기 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아에서 H3K9me3 메틸화를 감소시키는 제제와 접촉시켜 SCNT의 효율을 증가시키는 것을 포함하는, 체세포 핵 이식(SCNT)의 효율을 증가시키는 방법.

[0437] 2. (a) 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 체세포 핵 이식(SCNT) 배아 중 적어도 하나를 상기 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아에서 H3K9me3 메틸화를 감소시키는 적어도 하나의 제제와 접촉시키며, 수용체 포유류 난모세포는 유핵 또는 제핵 난모세포이며; (b)포유류 난모세포가 유핵이면 수용체 포유류 난모세포의 핵을 제거하며; (c)공여체 포유류 세포로부터의 핵을 제핵 난모세포에 이식하고; (d) 수용체 난모세포를 포유류 SCNT 배아를 형성하기에 충분한 시간 동안 인큐베이션하는 것을 포함하는, 포유류 체세포 핵 이식(SCNT) 배아의 생산 방법.

[0438] 3. 제1절 또는 제2절에 있어서, 상기 제제는 히스톤 디메틸라제의 Kdm4(Jmjd2) 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 방법.

[0439] 4. 제1절 내지 제3절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 Kdm4a(Jmjd2a), Kdm4b(Jmjd2b), Kdm4c(Jmjd2c) 또는 Kdm4d(Jmjd2d) 중 적어도 하나의 발현 또는 활성을 증가시키는 방법.

[0440] 5. 제1절 내지 제4절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 Kdm4d(Jmjd2D) 또는 Kdm4A(Jmjd2A)의 발현 또는 활성을 증가시키는 방법.

[0441] 6. 제1절 내지 제5절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 서열번호 1-8에 해당하는 핵산 서열 또는 서열번호 1-8의 해당 서열에 비교할 때 유사하거나 더 큰 정도로 SCNT의 효율을 증가시키는 그의 생물학적 활성 단편을 포함하는 방법.

[0442] 7. 제6절에 있어서, 상기 제제는 서열번호 1에 해당하는 핵산 서열 또는 서열번호 1의 핵산 서열과 비교할 때 유사하거나 더 큰 정도로 SCNT의 효율을 증가시키는 그의 생물학적 활성 단편을 포함하는 방법.

[0443] 8. 제1절 내지 제7절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제인 방법.

[0444] 9. 제8절에 있어서, 상기 H3K9 메틸트랜스퍼라제는 Suv39h1 또는 Suv39h2인 방법.

[0445] 10. 제8절에 있어서, 상기 H3K9 메틸트랜스퍼라제는 Setdb1인 방법.

[0446] 11. 제8절에 있어서, Suv39h1, Suv39h2 및 Setdb1 중 둘 이상이 억제되는 방법.

[0447] 12. 제8절에 있어서, H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 제제는 RNAi 제제, CRISPR/Cas9, 올리고뉴클레오티드, 중화 항체 또는 항체 단편, 앱타머, 소분자, 펩티드 억제제, 단백질 억제제, 아비디미르 및 그의 기능성 단편 또는 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

[0448] 13. 제12절에 있어서, 상기 RNAi 제제는 siRNA 또는 shRNA 분자인 방법.

[0449] 14. 제1절 내지 제13절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 서열번호 9, 11, 13 또는 15 중 어느 것의 발현을 억제하기 위한 핵산 억제제를 포함하는 방법.

[0450] 15. 제1절 내지 제13절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 서열번호 10, 12, 14 또는 16 중 어느 것의 발현을 억제하기 위한 핵산 억제제를 포함하는 방법.

[0451] 16. 제15절에 있어서, 상기 RNAi 제제는 서열번호 17 또는 서열번호 19의 적어도 일부에 하이브리드화하는 방법.

[0452] 17. 제16절에 있어서, 상기 RNAi 제제는 서열번호 18 또는 서열번호 20 또는 그의 적어도 10 연속 핵산의 단편, 또는 서열번호 18 또는 서열번호 20에 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 상동체를 포함하는 방법.

[0453] 18. 제1절 내지 제17절 중 어느 하나에 있어서, 상기 수용체 포유류 난모세포는 제핵 포유류 난모세포인 방법.

[0454] 19. 제1절 내지 제18절 중 어느 하나에 있어서, 상기 SCNT 배아는 1-세포 단계 SCNT 배아, 활성화 후 5시간의 SCNT 배아(5hpa), 활성화 후 10-12 시간 사이 SCNT 배아(10-12 hpa), 활성화 후 20-28시간 SCNT 배아(20-28hpa), 2-세포 단계 SCNT 배아 중 어느 것으로부터 선택되는 방법.

[0455] 20. 제1절 내지 제19절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 핵 이식 이전에 수용체 포유류 난모세포 또는 제핵 포유류 난모세포와 접촉하는 방법.

[0456] 21. 제1절 내지 제19절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 활성화 이전에 또는 활성화 후 5시간에 또는 SCNT 배아가 1-세포 단계일 때 SCNT 배아와 접촉하는 방법.

[0457] 22. 제1절 내지 제19절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 활성화 후 5시간 후에(5hpa) 또는 활성화 후 12시간 후에(12hpa) 또는 활성화 후 20시간 후에(20hpa) 또는 SCNT 배아가 2-세포 단계일 때, 또는 5hpa와 28hpa 사이의 어느 시간에 SCNT 배아와 접촉하는 방법.

[0458] 23. 제1절 내지 제22절 중 어느 하나에 있어서, 상기 수용체 포유류 난모세포 또는 SCNT 배아와 제제의 접촉은 수용체 포유류 난모세포 또는 SCNT 배아의 핵 또는 세포질 내로 제제를 주입하는 것을 포함하는 방법.

[0459] 24. 제1절 내지 제23절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 방법.

[0460] 25. 제1절 내지 제24절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 공여체 포유류 세포의 핵을 제핵 포유류 난모세포 내로 주입하기 전에 공여체 포유류 세포의 세포질 또는 공여체 포유류 세포의 핵과 접촉하는 방법.

[0461] 26. 제25절에 있어서, 공여체 포유류 세포는 제핵 포유류 난모세포 내로 공여체 포유류 세포의 핵을 주입하기 전 적어도 24 시간에 또는 주입하기 전 적어도 1일 동안 접촉되는 방법.

[0462] 27. 제25절에 있어서, 상기 제제는 제핵 포유류 난모세포 내로 공여체 포유류 세포의 핵을 주입하기 전에 적어도 24시간, 또는 적어도 48 시간, 또는 적어도 3일 동안 공여체 포유류 세포와 접촉하는 방법.

[0463] 28. 제25절 내지 제27절 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 방법.

[0464] 29. 제25절 내지 제28절 중 어느 하나에 있어서, H3K9 메틸트랜스퍼라제는 Suv39h1 또는 Suv39h2, 또는 Suv39h1 및 Suv39h2(Suv39h1/2)인 방법.

[0465] 30. 제1절 내지 제29절 중 어느 하나에 있어서, 공여체 포유류 세포는 최종 분화된 체세포인 방법.

[0466] 31. 제1절 내지 제30절 중 어느 하나에 있어서, 공여체 포유류 세포는 배아 줄기 세포 또는 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포 또는 태아 세포 또는 배아 세포가 아닌 방법.

[0467] 32. 제1절 내지 제32절 중 어느 하나에 있어서, 공여체 포유류 세포는 난구 세포, 상피 세포, 섬유아세포, 신경세포, 각질세포, 조혈 세포, 멜라닌세포, 연골세포, 적혈구, 대식세포, 단핵구, 근육 세포, B 림프구, T 림프구, 배아 줄기 세포, 배아 배 세포, 태아 세포, 태반 세포 및 성체 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는

방법.

[0468] 33. 제1절 내지 제32절 중 어느 하나에 있어서, 공여체 포유류 세포는 섬유아세포 또는 난구 세포인 방법.

[0469] 34. 제1절 또는 제33절 중 어느 하나에 있어서, 제제는 제핵 수용체 포유류 난모세포 내로 주입하기 위하여 공여체 포유류 세포로부터 핵을 제거하기 전에 공여체 포유류 세포의 핵과 접촉하는 방법.

[0470] 35. 제1절 내지 제34절 중 어느 하나에 있어서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 인간 공여체 세포, 수용체 인간 난모세포 또는 인간 SCNT 배아인 방법.

[0471] 36. 제1절 내지 제34절 중 어느 하나에 있어서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 비-인간 공여체 세포, 수용체 비-인간 난모세포 또는 비-인간 SCNT 배아인 방법.

[0472] 37. 제36절에 있어서, 공여체 비-인간 포유류 세포, 수용체 비-인간 포유류 난모세포 또는 비-인간 포유류 SCNT 배아는 마우스, 래트, 토끼, 소, 말, 돼지, 닭, 개, 고양이, 소, 마카크, 침팬지로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

[0473] 38. 제36절에 있어서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 가정용 또는 상업용 동물인 방법.

[0474] 39. 제38절에 있어서, 상기 가축은 알파카, 비손, 낙타, 고양이, 소, 사슴, 코끼리, 설치류, 개, 당나귀, 가얄, 염소, 기니피그, 라마, 말, 원숭이, 노새, 황소, 돼지, 비둘기, 비-인간 영장류, 토끼, 순록, 양, 물소 또는 야크로 이루어지는 군으로부터 선택된 작업 동물 또는 스포츠 동물, 또는 가축 동물 또는 실험실 동물인 방법.

[0475] 40. 제36절에 있어서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 반려 동물 또는 애완동물로부터 유래되는 방법.

[0476] 41. 제41절에 있어서, 반려 동물은 개, 고양이, 소, 햄스터, 파충류, 토끼, 설치류, 흰담비, 친칠라, 애완조류, 기니피그, 수생 애완동물 또는 말로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

[0477] 42. 제36절에 있어서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아는 멸종 위기의 포유류 종으로부터 유래되는 방법.

[0478] 43. 제1절 내지 제42절 중 어느 하나에 있어서, H3K9me3 메틸화를 감소시키는 제제의 부재하에서 수행된 SCNT에 비교할 때, 배반포 단계로의 SCNT 효율을 적어도 50% 증가시키는 방법.

[0479] 44. 제1절 내지 제43절 중 어느 하나에 있어서, H3K9me3 메틸화를 감소시키는 제제의 부재하에서 수행된 SCNT에 비교할 때, SCNT 효율을 50%-80% 증가시키는 방법.

[0480] 45. 제1절 내지 제44절 중 어느 하나에 있어서, H3K9me3 메틸화를 감소시키는 제제의 부재하에서 수행된 SCNT에 비교할 때, SCNT 효율을 80% 초과 증가시키는 방법.

[0481] 46. 제44절 또는 제45절에 있어서, SCNT 효율의 증가는 SCNT 배아의 배반포 단계로의 발생의 증가인 방법.

[0482] 47. 제44절 내지 제46절 중 어느 하나에 있어서, SCNT 효율의 증가는 SCNT 배아의 착상 후 발생의 증가인 방법.

[0483] 48. 제44절 내지 제47절 중 어느 하나에 있어서, SCNT 효율의 증가는 SCNT 배아-유도 배아 줄기 세포(ntESC)의 유도 증가인 방법.

[0484] 49. 제1절 내지 제48절 중 어느 하나에 있어서, 공여체 포유류 세포는 유전적으로 변형된 공여체 포유류 세포인 방법.

[0485] 50. 제2절에 있어서, 배반포를 형성하기 위하여 SCNT 배아를 인 비트로 배양하는 것을 추가로 포함하는 방법.

[0486] 51. 제50절에 있어서, SCNT 배아는 적어도 1-세포 SCNT 배아인 방법.

[0487] 52. 제50절에 있어서, SCNT 배아는 적어도 2-세포 SCNT 배아인 방법.

[0488] 53. 제50절에 있어서, 배반포로부터의 내세포 집단으로부터 세포를 분리하고; 미분화 상태의 내세포 집단으로부터의 세포를 배양하여 포유류 배아 줄기(ES) 세포를 형성하는 것을 추가로 포함하는 방법.

[0489] 54. 제1절 또는 제2절에 있어서, 공여체 포유류 세포, 수용체 포유류 난모세포 또는 포유류 SCNT 배아 중 어느 하나 이상이 동결되고 해동된 방법.

[0490] 55. 제1절 내지 제54절 중 어느 하나의 방법으로부터 생산된 포유류 SCNT 배아 유도 배아 줄기 세포(ntESC)의 집단.

[0491] 56. 제55절에 있어서, ntESC는 인간 ntESC인 포유류 ntESC의 집단.

[0492] 57. 제55절에 있어서, ntESC는 유전적으로 변형된 ntESC인 포유류 ntESC의 집단.

[0493] 58. 제55절에 있어서, ntESC는 다능성 줄기 세포인 포유류 ntESC의 집단.

[0494] 59. 제55절에 있어서, ntESC는 배양 배지에 존재하는 포유류 ntESC의 집단.

[0495] 60. 제59절에 있어서, 배양 배지는 다능성 또는 전능성 상태의 ntESC를 유지하는 포유류 ntESC의 집단.

[0496] 61. 제59절에 있어서, 배양 배지는 ntESC의 동결 또는 냉동보존을 위해 적합한 배지인 포유류 ntESC의 집단.

[0497] 62. 제61절에 있어서, 포유류 ntESC의 집단은 동결되거나 냉동보존되는 포유류 ntESC의 집단.

[0498] 63. 제1절 내지 제54절의 방법에 의해 생산된 포유류 SCNT 배아.

[0499] 64. 제63절에 있어서, 포유류 SCNT 배아는 유전적으로 변형되는 포유류 SCNT 배아.

[0500] 65. 제63절에 있어서, 포유류 SCNT 배아는 비-인간 포유류 SCNT 배아인 포유류 SCNT 배아.

[0501] 66. 제63절에 있어서, 포유류 SCNT 배아는 수용체 포유류 난모세포로부터 유래되지 않는 미토콘드리아 DNA를 포함하는 포유류 SCNT 배아.

[0502] 67. 제63절에 있어서, SCNT 배아는 배양 배지에 존재하는 포유류 SCNT 배아.

[0503] 68. 제67절에 있어서, 배양 배지는 포유류 SCNT의 동결 또는 냉동보존에 적합한 배지인 포유류 SCNT 배아.

[0504] 69. 제68절에 있어서, SCNT 배아는 동결되거나 냉동보존되는 포유류 SCNT 배아.

[0505] 70. (a) 공여체 비-인간 포유류 세포, 수용체 비-인간 포유류 난모세포 또는 비-인간 포유류 체세포 핵 이식(SCNT) 배아 중 적어도 하나를 공여체 비-인간 포유류 세포, 수용체 비-인간 포유류 난모세포 또는 비-인간 포유류 SCNT 배아에서 H3K9me3 메틸화를 감소시키는 적어도 하나의 제제와 접촉시키며, 수용체 비-인간 포유류 난모세포는 유핵 또는 제핵 난모세포이며; (b)포유류 난모세포가 유핵이면 수용체 비-인간 포유류 난모세포의 핵을 제거하며; (c)공여체 비-인간 포유류 세포로부터의 핵을 비-인간 포유류 제핵 난모세포에 이식하고 제핵 난모세포와 핵을 융합시키고 융합된 난모세포를 활성화시키며; (d) 수용체 난모세포를 비-인간 포유류 SCNT 배아를 형성하기에 충분한 시간 동안 인큐베이션하며; (e) 비-인간 포유류 SCNT 배아를 비-인간 대리모의 난관 내로 착상시키고 비-인간 포유류 SCNT가 비-인간 포유류 자손으로 발생하도록 하는 것을 포함하는, 체세포 핵 이식(SCNT) 배아로부터 비-인간 포유류 자손을 생산하는 방법.

[0506] 71. 제70절에 있어서, 비-인간 포유류 SCNT 배아는 1-세포 배아 단계, 2-세포 배아 단계, 4-세포 배아 단계, 상실배 또는 배반포 배아 단계에서 비-인간 대리모내로 착상되는 방법.

[0507] 72. 제71절에 있어서, 비-인간 대리모는 공여체 세포 또는 수용체 난모세포의 공급원이 아닌 방법.

[0508] 73. 제70절에 있어서, 비-인간 대리모가 SCNT 배아를 만삭까지 보유할 수 있도록 하는 것을 추가로 포함하는 방법.

[0509] 74. 제1절 내지 제47절 또는 제70절 내지 제73절 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 SCNT 배아로부터 생산된 비-인간 포유류 자손.

[0510] 75.포유류 SCNT 배아, 수용체 포유류 난모세포 또는 배반포 중 적어도 하나 및 (a) 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제; 또는 (b) H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 제제 중 적어도 하나를 포함하는 조성물.

[0511] 76. 제75절에 있어서, 히스톤 디메틸라제의 Kdm4(Jmjd2) 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제는 Kdm4a(Jmjd2a), Kdm4b(Jmjd2b), Kdm4c(Jmjd2c) 또는 Kdm4d(Jmjd2d) 중 적어도 하나의 발현 또는 활성을 증가시키는 조성물.

[0512] 77. 제76절에 있어서, 상기 제제는 Kdm4d(Jmjd2d) 또는 Kdm4a(Jmjd2a)의 발현 또는 활성을 증가시키는 조성물.

[0513] 78. 제77절에 있어서, 상기 제제는 서열번호 1-8에 해당하는 핵산 서열 또는 서열번호 1-8의 해당 서열에 비교

할 때 유사하거나 더 큰 정도로 SCNT의 효율을 증가시키는 그의 생물학적 활성 단편을 포함하는 조성물.

[0514] 79. 제75절에 있어서, 상기 제제는 서열번호 1에 해당하는 핵산 서열 또는 서열번호 1의 핵산 서열과 비교할 때 유사하거나 더 큰 정도로 SCNT의 효율을 증가시키는 그의 생물학적 활성 단편을 포함하는 조성물.

[0515] 80. 제75절에 있어서, H3K9 메틸트랜스퍼라제의 억제제는 Suv39h1, Suv39h2, 또는 Setdb1 중 적어도 하나 또는 임의의 조합을 억제하는 조성물.

[0516] 81. 제75절에 있어서, 포유류 SCNT 배아는 1-세포 또는 2-세포 단계인 조성물.

[0517] 82. 제75절에 있어서, 수용체 포유류 난모세포는 제핵 수용체 포유류 난모세포인 조성물.

[0518] 83. 제75절에 있어서, 포유류 SCNT 배아는 최종 분화된 체세포의 핵의 주입으로부터 생산되거나, 배반포는 최종 분화된 체세포의 핵을 제핵 포유류 난모세포 내로 주입하여 생산된 포유류 SCNT 배아로부터 발생되는 조성물.

[0519] 84. 제75절 내지 제83절 중 어느 하나에 있어서, 포유류 SCNT 배아, 수용체 포유류 난모세포 또는 배반포는 인간 SCNT 배아, 수용체 인간 난모세포 또는 인간 배반포인 조성물.

[0520] 85. 제75절 내지 제84절 중 어느 하나에 있어서, 포유류 SCNT 배아, 수용체 포유류 난모세포 또는 배반포는 비-인간 포유류로부터 유래되는 조성물.

[0521] 86. 제85절에 있어서, 비-인간 포유류는 마우스, 래트, 토끼, 소, 말, 돼지, 닭, 개, 고양이, 마카크, 침팬지로 이루어지는 군으로부터 선택되는 조성물.

[0522] 87. 제85절에 있어서, 비-인간 포유류는 가정용 또는 상업용 동물인 조성물.

[0523] 88. 제87절에 있어서, 가정용 또는 상업용 동물은 알파카, 비손, 낙타, 고양이, 소, 사슴, 코끼리, 설치류, 개, 당나귀, 가얄, 염소, 기니피그, 라마, 말, 원숭이, 노새, 황소, 돼지, 비둘기, 비-인간 영장류, 토끼, 순록, 양, 물소 또는 야크로 이루어지는 군으로부터 선택된 작업 동물 또는 스포츠 동물, 또는 가축 동물 또는 실험실 동물인 조성물.

[0524] 89. 제85절에 있어서, 비-인간 포유류는 반려 동물 또는 애완동물인 조성물.

[0525] 90. 제89절에 있어서, 반려 동물은 개, 고양이, 소, 햄스터, 파충류, 토끼, 설치류, 흰담비, 친칠라, 애완조류, 기니피그, 수생 애완동물 또는 말로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

[0526] 91. 제85절에 있어서, 비-인간 포유류는 멸종 위기의 포유류 종인 조성물.

[0527] 92. 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제 및/또는 H3K9 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 제제, 및 (ii) 포유류 난모세포를 포함하는 키트.

[0528] 93. 제92절에 있어서, 포유류 난모세포는 제핵 난모세포인 키트.

[0529] 94. 제92절에 있어서, 포유류 난모세포는 비-인간 난모세포인 키트.

[0530] 달리 정의되지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 개시된 것과 유사하거나 등가의 방법과 재료가 사용되지만, 적합한 방법과 재료가 하기에서 개시된다. 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시적이며 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0531] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허, 특허 공보 및 출원 및 다른 문서는 그 전체가 참고로 본원에 통합된다.

[0532] 상기에 요약한 바처럼, 본 발명은 배아를 반드시 파괴하지 않고, 초기 단계 배아의 단일 난할구로부터의 ES 세포, ES 세포주 및 분화된 세포 타입을 유도하기 위한 방법을 제공한다. 방법의 다양한 특징이 하기에서 상세히 개시된다. 상기 및 하기에서 상술한 본 발명의 다양한 양태 및 실시형태의 모든 조합이 고려된다.

[0533] **실시예**

[0534] 본 명세서에 제시된 실시예는 SCNT 배아 및/또는 공여체 핵에서 (i) 히스톤 디메틸라제의 Kdm4 패밀리의 발현 또는 활성을 증가시키거나 및/또는 (ii) 메틸 트랜스퍼라제 Suv39h1 또는 Suv39h2 또는 Setdb1 중 어느 하나를 억제함으로써 H3K9me3을 감소시킴으로써 SCNT의 효율을 증가시키는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 출원 전체에서, 다양한 간행물이 참고된다. 모든 간행물과 그러한 간행물 내에 인용된 참고문헌들의 내용은 본 발명이

관련되는 분야의 기술을 보다 충분히 설명하기 위하여 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 하기 실시예는 본 발명의 청구범위를 제한하고자 하는 것이 아니며, 오히려 일부 실시형태의 예시를 의도하는 것이다. 당업자에게 일어나는 예시된 방법의 임의의 변형은 본 발명의 범위 내에 속한다.

[0535] **실험 절차**

[0536] *동물*

[0537] C57BL/6J 암컷 마우스를 DBA/2J 수컷과 교미시켜 B6D2F1/J(BDF1) 마우스를 생산하였다. BDF1 및 CD-1(ICR) 성체 암컷을 수용체 난모세포 및 배아 이식 수용체의 수집을 위하여 각각 이용하였다. BDF1 마우스를 발생 분석을 위한 공여체 체세포의 수집을 위하여 이용하였다. (C57BL/6 x CAST/EiJ) F1 마우스를 RNA-seq를 위한 공여체 세포의 수집을 위하여 이용하였다. GOF18 델타-PE를 보유한 E13.5 배아(잭슨 래보래토리(Jackson Laboratory), 004654: Tg(Pou5f1-EGFP)2Mnn, C57BL/6J 배경)를 마우스 배아 섬유아세포(MEF)의 분리를 위하여 이용하였다. 모든 동물 실험은 하버드 의과 대학의 동물 보호 및 이용 위원회에 의해 허가받았다.

[0538] *공여체 세포의 제조*

[0539] 7.5 IU의 임신한 암말 혈청 성선자극호르몬(PMSG; 하버(Habor)) 및 7.5 IU의 인간 융모막 성선자극호르몬(hCG; 밀리포어(Millipore))를 주입시켜 과배란을 통해 성체 BDF1 암컷으로부터 난구 세포를 수집하였다. hCG 주입 후 15시간에, 난구-난모세포 복합체(COC)를 난관으로부터 수집하고, 분리된 난구 세포를 얻기 위하여 300 U/ml 소 고환 히아루로니다제(칼바이오켐(Calbiochem) # 385931)을 함유한 Hepes-완충된 포타슘 심플렉스-최적화 배지(Hepes-buffered potassium simplex-optimized medium)(KSOM)로 간단히 처리하였다. 개시된 대로(Matoba et al., 2011) 3- 내지 5-일령 BDF1 수컷 마우스의 고환으로부터 세르토리 세포를 수집하였다. 고환 덩어리를 0.1 mg/ml 콜라게나제(라이프 테크놀로지스(Life Technologies) # 17104-019)를 함유한 PBS에서 30분 동안 37℃에서 인큐베이션한 후, 1mM EDTA(라이프 테크놀로지스 # 25200-056)를 가진 0.25% 트립신으로 실온에서 5분 처리하였다. 3 mg/ml 소 혈청 알부민을 함유한 PBS로 4회 세척한 후, 분리된 세포를 Hepes-KSOM 배지에 현탁시켰다.

[0540] 일차 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 세포를 13.5 dpc에서 GOF18 델타-PE 마우스 배아로부터 확립하였다. 머리와 모든 기관을 제거한 후, 나머지 시체로부터의 갈린 조직을 1 mM EDTA를 가진 0.25% 트립신 500 ㎕에서 10분 동안 37℃에서 분리시켰다. 세포 현탁액을 10% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신(라이프테크놀로지스 # 15140-022)를 함유한 동량의 DMEM(라이프 테크놀로지스 # 11995-073)으로 희석시키고 20회 동안 상하로 피펫팅하였다. 세포 현탁액을 신선한 배지로 희석하고 100 mm 디쉬에 도말하고 37℃에서 배양하였다. 2일 후, MEF 세포를 수집하여 동결하였다. MEF 세포의 동결 저장액을 해동시키고 일 계대 후 실험을 위해 사용하였다.

[0541] *siRNA 형질감염에 의한 MEF 세포에서의 히스톤 메틸트랜스퍼라제의 넉다운*

[0542] 마우스 Suv39h1(라이프 테크놀로지스 # s74607), Suv39h2(라이프 테크놀로지스 # s82300) 및 Setdb1(라이프 테크놀로지스 # s96549)에 대한 siRNA를 50 μM 저장 용액에서 뉴클레아제가 없는 물에 희석시켰다. siRNA를 제조사의 프로토콜에 따라 리포펙타민 RNAi Max (라이프 테크놀로지스 # 35050-061)로 MEF에 도입하였다. 요약하면, 1 x 10^5 MEF 세포를 24-웰 플레이트 상에 접종하였다(0일; 도 5a 참고). 24시간 후, 5 pM siRNA를 리포펙타민 RNAi Max를 이용하여 MEF 세포내로 형질감염시켰다(1일). 첫번째 형질감염 후 24시간에, 배양 배지를 신선한 M293T 배지[10% FBS, 0.1 mM 비필수 아미노산(라이프 테크놀로지스 # 11140-050), 2 mM GlutaMAX (라이프 테크놀로지스 # 35050-079), 50 U/ml 페니실린/스트렙토마이신 및 0.1 mM 2-머캡토에탄올(라이프 테크놀로지스 # 21985-023)로 보충된 DMEM]로 교환하였다(2일). 3일에, MEF 세포를 1 x 10^5 세포 밀도로 24-웰 플레이트 상에 재접종하였다. 이어서 상술한 대로 형질감염을 한번 반복하였다(4일). 두번째 형질감염 후 48시간에(6일), MEF 세포를 면역염색, RT-qPCR 또는 SCNT를 위하여 이용하였다.

[0543] *SCNT 및 mRNA 주입*

[0544] 체세포 핵 이식은 이전에 기술된 바와 같이 수행하였다(Matoba et al., 2011). 요약하면, 수용체 MII 난모세포를 300 U/ml 소 고환 히아루로니다제(칼바이오켐)으로 간단히 처리하여 과배란된 성체 BDF1 암컷으로부터 수집하였다. 분리된 MII 난모세포를 7.5 ㎍/ml의 사이토찰라신 B(칼바이오켐 # 250233)을 함유한 Hepes-완충된 KSOM 배지에서 핵을 제거하였다. 공여체 난구 세포 또는 세르토리 세포의 핵을 압전-구동 미세조작기(프라임텍(Primetech) # PMM-150FU)을 이용하여 제핵 난모세포 내로 주입하였다. MEF 세포를 불활성화된 센다이 바이러스 외피(HVJ-E; 이시하라 산교(hihara Sangyo), 일본)에 의해 제핵 난모세포와 융합시켰다. KSOM에서 1시간 인큐베이션 후, 재구성된 SCNT 난모세포를 5 ㎍/ml 사이토찰라신 B를 함유한 무칼슘 KSOM에서 1시간 동안 인큐베이션

하여 활성화시키고, 사이토찰라신 B를 가진 KSOM에서 추가로 4시간 동안 배양하였다. 활성화된 SCNT 배아를 $SrCl_2$ 처리의 개시 후 5시간에(활성화 후 시간, hpa) 세척하고 5% CO_2의 가습 대기에서 KSOM에서 37.8℃에서 배양하였다. 일부 실험에서, SCNT 배아에 ~10 pl의 물(대조군), 1800 ng/㎕ 야생형 또는 돌연변이(H189A) Kdm4d mRNA를 5-6 hpa에서 압전-구동 미세조작기(프라임텍)를 이용하여 주입하였다. 일부 실험에서는, 트리코스타틴 A(TSA)를 활성화 시작부터 총 8시간 동안 15 nM로 배양 배지에 첨가하였다. 착상전 발생률은 스튜던츠 T-테스트에 의해 통계적으로 분석하였다. 공여체 세포 제조, 배아 이식, mRNA 제조 및 다른 절차에 대한 보다 상세한 사항은 확장 실험 절차에 포함된다.

[0545] *Kdm4d mRNA의 인 비트로 전사*

[0546] 전체 길이 Kdm4d mRNA의 *인 비트로* 전사를 위한 주형 플라스미드를 제조하기 위하여, 마우스 Kdm4d 개방 판독 프레임을 ES 세포로부터 유래된 cDNA 라이브러리로부터의 PCR에 의해 증폭시키고, 인-퓨젼(In-Fusion) 키트(클론텍 # 638909)를 이용하여 pcDNA3.1-poly(A)83 플라스미드(Inoue & Zhang, 2014) 내로 클로닝하였다. 촉매 결함 돌연변이 Kdm4d(H188A)는 프라임스타(PrimeSTAR) 돌연변이유발 기본 키트(타카라(TAKARA) # R045A)를 이용하여 생성하였다. mRNA는 제조사의 지시에 따라메세지 머신(mMESSAGE mMACHINE) T7 울트라 키트(라이프 테크놀로지스 # AM1345)를 이용하여 인 비트로 전사에 의해 선형화된 주형 플라스미드로부터 합성하였다. 합성된 mRNA는 리튬 클로라이드로 침전시키고 뉴클레아제가 없는 물에 용해시켰다. 나노드롭(NanoDrop) ND-1000 분광계(나노드롭 테크놀로지스(NanoDrop Technologies))에 의해 농도를 측정한 후, 분취액을 사용때까지 -80℃에 보관하였다.

[0547] *siRNA 형질감염에 의한 MEF 세포에서의 히스톤 메틸트랜스퍼라제의 넉다운*

[0548] 마우스 Suv39h1(라이프 테크놀로지스 # s74607), Suv39h2(라이프 테크놀로지스 # s82300) 및 Setdb1(라이프 테크놀로지스 # s96549)에 대한 siRNA를 50 μM 저장 용액에서 뉴클레아제가 없는 물에 희석시켰다. siRNA를 제조사의 프로토콜에 따라 리포펙타민 RNAi Max (라이프 테크놀로지스 # 35050-061)로 MEF에 도입하였다. 요약하면, 1 x 10^5 MEF 세포를 24-웰 플레이트 상에 접종하였다(0일; 도 5a 참고). 24시간 후, 5 pM siRNA를 리포펙타민 RNAi Max를 이용하여 MEF 세포내로 형질감염시켰다(1일). 첫번째 형질감염 후 24시간에, 배양 배지를 신선한 M293T 배지[10% FBS, 0.1 mM 비필수 아미노산(라이프 테크놀로지스 # 11140-050), 2 mM GlutaMAX (라이프 테크놀로지스 # 35050-079), 50 U/ml 페니실린/스트렙토마이신 및 0.1 mM 2-머캡토에탄올(라이프 테크놀로지스 # 21985-023)로 보충된 DMEM]로 교환하였다(2일). 3일에, MEF 세포를 1 x 10^5 세포 밀도로 24-웰 플레이트 상에 재접종하였다. 이어서 상술한 대로 형질감염을 한번 반복하였다(4일). 두번째 형질감염 후 48시간에(6일), MEF 세포를 면역염색, RT-qPCR 또는 SCNT를 위하여 이용하였다.

[0549] *역전사 및 실시간 PCR*

[0550] 제조사의 설명서에 따라 RNeasy 미니 키트(퀴아젠(Qiagen))을 이용하여 MEF 세포로부터 전체 RNA를 정제하였다. 올리고-dT 프라이머와 ImProm-II 역전사 시스템(프로메가(Promega))를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 쏘패스트 에바그린 수퍼믹스(Ssofast Evagreen Supermix)(바이오-라드(Bio-Rad))를 이용하여 CFX384 실시간 PCR 검출 시스템(바이오-라드)에서 실시간 PCR을 수행하였다. 상대적인 유전자 발현 수준은 비교 Ct 방법을 이용하여 분석하고 CFX 매니저 소프트웨어(바이오-라드)에서 Gapdh에 정규화하였다. 결과는 스튜던츠 T-테스트를 이용하여 통계적으로 분석하였다. 하기 프라이머를 사용하였다: Gapdh-F, 5'-catGGCCTTCCGTGTTCCTA-3' (서열번호 56); Gapdh-R, 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTT-3' (서열번호 57); Suv39h1-F, 5'-TGTGATGCCAGGCACTTGGT-3' (서열번호 58); Suv39h1-R, 5'-TGGGCTCCACCTTTGTGGTT-3' (서열번호 59); Suv39h2-F, 5'-TTGGAGTCCAGGCAGAGTG-3' (서열번호 60); Suv39h2-R, 5'-CACTGTcatCGGGGCTTGTG-3' (서열번호 61); Setdb1-F, 5'-TTTCTGGTTGGCTGTGACTG-3'(서열번호 62); Setdb1-R, 5'-GAGTTAGGGTTGACTTGGCC-3'(서열번호 63).

[0551] *배아 이식*

[0552] SCNT 또는 *인 비트로* 수정에 의해 생성된 2-세포 단계 배아를 가짜임신(E0.5) ICR 암컷의 난관에 이식하였다. 분만일(E19.5)에 제왕절개에 의해 새끼를 회수하고 수유 ICR 암컷에 의해 수유하였다.

[0553] *ntESC 확립*

[0554] 산 타이로드 처리에 의해 배반포를 노출시키고 미토마이신 처리된 MEF 피더 세포에서 그리고 5% FBS, 10% 넉아웃 혈청 교체액(라이프 테크놀로지스 #10828-028), 0.1 mM 비필수 아미노산, 2 mM GlutaMAX, 50 U/ml 페니실린-스트렙토마이신, 0.1 mM 2-머캡토에탄올 및 2000 U 백혈병 억제 인자(LIF, 밀리포어 #ESG1107)로 보충된 DMEM

에서 37℃ 5% CO2에서 배양하였다. 4 내지 5일 후, 부착된 배아로부터의 증식물을 0.25% 트립신으로 분리하고 모두 새로운 피더 세포상으로 계대하였다. 다음날, 배지를 N2B27-LIF 배지[0.1 mM 비필수 아미노산, 2 mM GlutaMAX, 50 U/ml 페니실린-스트렙토마이신, 0.1 mM 2-머캡토에탄올, 0.5x N2 보충물(라이프 테크놀로지스 # 17502-048), 0.5x B27 보충물(라이프 테크놀로지스 # 17504-044), 3μM CHIR99021(스템젠트(STEMGENT) #04-0004), 0.5μM PD0325901(스템젠트 #04-0006) 및 1000 U LIF로 보충된 DMEM/F12 (라이프 테크놀로지스 # 10565-042)]로 교체하였다. 5일 후, 증식된 세포를 확립된 ntESC로서 재접종하였다.

[0555] *면역염색*

[0556] 배아 또는 MEF 세포를 실온에서 20분 동안 3.7% 파라포름알데히드(PFA)로 고정시켰다. 10 mg/ml BSA를 함유한 PBS(PBS/BSA)로 세척 후, 고정된 배아 또는 세포를 0.5% Triton-X 100으로 15분 인큐베이션 하여 침투성으로 만들었다. 실온에서 1시간동안 PBS/BSA에서 차단한 후, 그들을 첫번째 항체의 혼합물에서 밤새 4℃에서 인큐베이션하였다. 항체는 마우스 항-H3K9me3(1/500: 앱캠(Abcam) # ab71604), 토끼 항-H3K9me3(1/500: 밀리포어 # 07-442), 토끼 항-H3K27me3(1/500: 밀리포어 # 07-449), 염소 항-Oct4(1/500: 산타 크루즈 # SC8628), 및 마우스 항-Cdx2(1/100: 바이오제넥스(BioGenex) # AM392-5M)를 포함하였다. PBS/BSA로 3회 세척 후, 배아 또는 세포를 플루오르세인 이소티오시아네이트-접합된 당나귀 항-마우스 IgG(1/400, 잭슨 임뮤노-리서치(Jackson Immuno-Research)), 알렉사 플로어(Alexa Flour) 568 당나귀 항-토끼 IgG(1/400, 라이프 테크놀로지스), 및/또는 알렉사 플로어 647 당나귀 항-염소 IgG(1/400, 라이프 테크놀로지스)를 포함하는 이차 항체와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 마지막으로, 그들에 4',6-다이아미디노-2-페닐인돌(DAPI)(벡터 래보래토리즈(Vector Laboratories) # H-1200)를 가진 벡타쉴드(Vectashield)를 올려두었다. 형광 신호는 레이저-스캐닝 공초점 현미경(자이스(Zeiss) LSM510) 및 EM-CCD 카메라(하마마추(Hamamatsu) ImagEM)을 이용하여 관찰하였다.

[0557] *RNA-서열결정 분석*

[0558] 스마터 울트라 로우 인풋(SMARTer Ultra Low Input) RNA cDNA 제조 키트(클론텍)을 이용하여 배아를 직접 용해시키고 cDNA 합성을 위해 이용하였다. 증폭 후, 코바리스(Covaris) 소니케이터(코바리스)를 이용하여 cDNA 샘플을 단편화시켰다. 제조사의 설명서에 따라 엔이비넥스트 울트라 DNA 라이브러리 프렙 키트 포 일루미나(NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina)(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))를 이용하여 단편화된 DNA로 서열결정 라이브러리를 만들었다. 단일 말단 50 bp 서열결정은 HiSeq 2500 시퀀서(일루미나)에서 수행하였다. 노보얼라인(Novoalign)V3.02.00)을 이용하여 서열결정 판독값을 마우스 게놈(mm9)에 맵핑하였다. 모든 프로그램은 (달리 특정되지 않으면) 디폴트 세팅으로 수행하였다. 유일하게 맵핑된 판독값(전체 판독값의 약 70%)을 이어서 커프링크스(Cufflinks) v2.0.2를 이용한 기준 주석(reference annotation)(UCSC 유전자 모델)에 의해 가이드된 전사물로 조립하였다. 각 유전자의 발현 수준은 정규화된 FPKM(단편/엑손 kb/맵핑된 단편 100만)으로 정량하였다. 상당히 상이한 전사물의 기능적 주석 및 농축 분석은 다비드(DAVID)로 수행하였다. 통계분석은 R(www.r-project.org/)로 수행하였다. R에서의 *wilcox.test* 함수를 이용하여 분포를 비교하기 위하여 독립 2-그룹 윌콕슨(Wilcoxon) 순위합검정을 이용하였다. 피어슨(Pearson's) r 계수는 디폴트 파라미터를 이용하여 *cor* 함수를 이용하여 계산하였다. 상이한 샘플에서의 전체 유전자 발현 패턴의 계층적 클러스터링 분석은 R에서의 *hearmap.2* 함수(gplots 패키지)를 이용하여 수행하였다.

[0559] *재프로그래밍 저항성 영역의 확인*

[0560] 슬라이딩 윈도우(크기 100kb, 스텝 크기 20kb)를 이용하여 1-세포 및 2-세포 배아의 유전체-전체 발현 수준을 평가하였다. 각 윈도우에 대하여, 발현 수준을 정규화된 RPM(판독값/유일하게 맵핑된 판독값 100만)으로 정량하였다. 1-세포 IVF 배아에 비하여 2-세포에서 상당히 활성화된 영역을 엄격한 기준으로 동정하였으며(2-세포 IVF 배아에서 FC > 5, 피셔 정확 검정(Fisher's exact test) p 값 < 0.01, RPM > 10), 중복 영역을 합쳤다. 이들 활성화된 영역을 SCNT 및 IVF 2-세포 배아에서 그들의 발현 차이에 기초하여 세 그룹으로 분류하였다.

[0561] *공개된 DNAi 및 ChIP-Seq 데이터 세트의 분석*

[0562] 도 2 및 S2에서의 히스톤 변형 및 DNaseI 과민감성 농축 분석을 수행하기 위하여, 하기의 공개된 ChIP-seq 및 DNaseI-seq 데이터 세트를 이용하였다: MEF 세포에서의 H3K9me3 및 H3K96me3(Pedersen et al., 2014); MEF 세포에서의 H3K4me2, H3K27me3(Chang et al., 2014); MEF 세포에서의 H3K4me1 및 H3K27ac(ENCODE/LICR 프로젝트); CH12, 적아세포, 거핵세포(ENCODE/PSU 프로젝트) 및 전뇌(ENCODE/LICR 프로젝트)에서의 H3K9me3; NIH3T3, CH12, MEL, Treg, 416B 및 전뇌(ENCODE/UW 프로젝트)에서의 DNaseI-seq. ChIP-seq 강도는 정규화된 FPKM으로 정량하였다. 서열결정 판독에 의한 게놈의 위치-방식 범위는 UCSC 게놈 브라우저에서의 커스텀 트랙으로서 결정

되고 가시화되었다.

[0563] **실시예 1**

[0564] ***2-세포 SCNT 배아에서의 비정상 ZGA***

[0565] 체외 수정(IVF) 및 SCNT를 통해 유도된 마우스 배아 사이의 가장 초기의 전사 차이를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 1-세포(활성화 후 12 시간:hpa), 및 후기 2-세포(28 hpa) 단계에서의 수집된 배아(25-40 배아/샘플)를 이용하여 RNA-seq 실험을 수행하였다(도 1a). 매우 재현성이 높은 각 샘플의 두 개의 생물학적 반복물을 이용하여, 각 샘플에 대하여 3천만이 넘는 유일하게 맵핑된 판독값을 수득하였다(도 8a 및 8b). 1-세포 단계 전사체의 분석은 SCNT 및 IVF 배아가 거의 동일한 전사체를 특징으로 함을 밝혔다(R =0.99; 도 1b). 구체적으로, 검출된 5517개 유전자 중에서(적어도 한 샘플에서 FPKM > 5), 단지 106개 유전자만이 SCNT와 IVF 배아 사이에서 3-배가 넘는 차이를 나타냈다(도 1b). 이것은 ZGA가 대부분 마우스 배아에서의 첫 번째 난할 후에 시작되며(Schultz, 2002) IVF 또는 SCNT에 관계없이, 1-세포 단계 배아에서 존재하는 전사물의 대부분이 모계 저장 전사물이라는 사실과 일치한다. 따라서, 본 발명자들은 주요 ZGA가 마우스 배아에서 명확해지는 후기 2-세포 단계에서의 그들의 분석에 집중하였다.

[0566] 2-세포 단계의 IVF와 SCNT 배아 사이의 전사체 비교는 3-배가 넘는 발현 차이를 나타낸 1212 유전자를 확인하였다(도 1c, 적어도 한 샘플에서 FPKM > 5). 공여체 난구 세포, 2-세포 IVF 및 2-세포 SCNT 배아의 전사체의 짝비교는 자율 계층적 클러스터 분석에 의해 5 그룹으로 분류될 수 있는 3775개의 상이하게 발현된 유전자[배수 변화(FC) > 5, FPKM > 5]를 확인하였다(도 1d). 이들 3775개의 상이하게 발현된 유전자 중에서, 1549개가 SCNT와 IVF 배아 둘 모두에서 활성화되었다(그룹 1과 2). 유전자 온톨로지(GO) 분석은 이들 유전자가 세포 주기 관련 생물학적 과정에서 상당히 풍부함을 밝혀냈으며(도 1e), 이는 SCNT 배아가 IVF 배아처럼 적절한 세포 주기 진행을 위해 전사적으로 준비됨을 입증한다. 공여체 난구 세포에서 높게 발현된 유전자의 일부가 여전히 2-세포 SCNT 배아에서 발현됨에도 불구하고(372개 유전자; 그룹 5), 이들 유전자의 대부분은 IVF 배아에서의 것들(1553개 유전자; 그룹 4)과 유사하게, SCNT 후 침묵되었다. 그룹 4의 유전자는 세포 대사 관련 생물학적 과정, 예를 들어, 산화/환원 및 전자 수송 사슬에서 상당히 풍부하여, 난구 세포-특이적 대사 과정이 SCNT 후에 빠르게 종결됨을 입증하였다. 흥미롭게도, 301개 유전자의 그룹은 IVF 배아에 비하여 SCNT 배아에서 적절히 활성화되지 못했다(그룹 3). GO 분석은 이들 유전자가 전사 또는 mRNA 프로세싱에서 풍부해졌음을 밝혀냈으며, 이는 SCNT 배아에서 발생학적으로 중요한 조절자의 활성화에서의 가능한 결함을 제시한다(도 1e). 2-세포 배아에서 접합성 유전자의 적절한 활성화가 배아 발생을 위해 중요한 것으로 생각된다는 점을 고려하여, 본 발명자들은 이 그룹의 유전자 및 관련 게놈 유전자좌에 대해 분석을 집중하였다.

[0567] **실시예 2**

[0568] ***2-세포 SCNT 배아에서 재프로그래밍 저항성 영역(RRR)의 확인***

[0569] 단백질 코딩 유전자에 더하여, 이전의 연구는 LTR 클래스 III 레트로트랜스포존 및 주요 위성 반복체와 같은 비-유전 반복 요소가 마우스 착상전 배아에서, 특히 2-세포 단계에서 고도로 발현됨을 밝혔다(Evsikov et al., 2004; Peaston et al., 2004; Probst et al., 2010). IVF와 SCNT 2-세포 단계 배아 사이의 전사체 차이를 완전히 규명하기 위하여, 본 발명자들은 검출가능한 전사물과 관련된 모든 게놈 영역을 확인하기 위해 슬라이딩 윈도우 전략을 적용하였다. 먼저, 본 발명자들은 2-세포 단계 IVF 배아에서 그리고 1-세포 단계 IVF 배아에 비교하여 상당히 활성화되는(피셔 정확 검정 p 값 < 0.01), 100 내지 800 kb 범위의 811개 게놈 영역을 확인하였다[도 2a, IVF 2-세포 배아에서 FC > 5, RPM(판독값/유일하게 맵핑된 판독값 100만) > 10]. 811개 게놈 영역 중에서, 342개 영역이 IVF 배아에서의 수준과 유사한 수준에서 SCNT 배아에서 활성화되었으며(FC <= 2 IVF를 SCNT 2-세포 배아와 비교), 이들 영역은 완전히 재프로그램된 영역(FRR)으로 불렸다. 본 발명자들은 또한 IVF 배아에 비하여 SCNT 배아에서 부분적으로 활성화된(FC > 2 및 FC <= 5), "부분적으로 재프로그램된 영역"(PRR)로 불리는 247개 영역을 확인하였다(도 2a). 흥미롭게도, 본 명세서에서 "재프로그래밍 저항성 영역"(RRR)로 불리는, 나머지 222개 영역은 SCNT 배아에서 활성화되지 못했다(FC > 5, 도 2a). 주목할만하게, RRR 이내에서 생성된 전사물은 염색체 13의 대표적 영역 내에 예시된 대로 대부분 주석이 없다(도 9a). 사실상, RRR은 FRR 및 PRR에 비하여 상대적으로 유전자가 빈약한 영역이다(도 9b). 하지만, RRR은 LINE 및 LTR과 같은 특정 반복 서열이 풍부하지만, SINE는 고갈된다(도 9c). 따라서, 비교 전사체 분석은 본 발명자들이 SCNT에 의해 생성된 2-세포 배아에서 전사 활성화에 저항성인 222개 RRR을 확인하도록 하였다.

[0570] ***RRR은 체세포에서 H3K9me3이 풍부하다***

[0571] RRR이 2-세포 SCNT 배아에서 전사 활성화에 대해 저항성이라는 사실은 RRR이 SCNT-매개 재프로그래밍에 대한 장벽으로서 작용하는 소정의 후성적 변형을 보유할 수 있음을 나타낸다. SCNT 배아의 발생학적 실패가 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 세포(Ono et al., 2001)를 비롯한 상이한 공여체 체세포 타입에서 관찰되었음을 고려하여, 본 발명자들은 SCNT-매개 재프로그래밍에 대한 그러한 후성적 장벽이 상이한 체세포 타입에 일반적인지를 평가하였다. MEF 세포는 방대한 히스톤 변형 데이터세트를 가진 소수의 체세포 타입 중 하나이므로(Bernstein et al., 2012; Chang et al., 2014; Pedersen et al., 2014), 본 발명자들은 6개의 주요 히스톤 변형 중 어느 것이 RRR에서 특히 풍부한지를 평가하였다. 본 발명자들은 분석된 어느 다른 변형도 아닌 H3K9me3이 RRR에서 특히 풍부한 한편, 어느 히스톤 변형의 명백한 풍부함도 FRR 또는 PRR에서 관찰되지 않았음을 발견하였다(도 2b). 사실상, 염색체 7 상의 대표적인 영역의 주의깊은 검사는 2-세포 SNCT 배아에서 활성화되지 못한 RRR이 명백하게 H3K9me3 마크가 풍부하며, H3K9me3-풍부한 영역 바깥의 영역은 2-세포 SCNT 배아에서 적절하게 활성화되었음을 나타냈다(도 2c). RRR에서의 H3K9me3의 유사한 풍부함이, ENCODE 프로젝트로부터의 H3K9me3 ChIP-seq 데이터세트의 분석 후(2d 및 9d) 4개의 다른 체세포- 또는 조직-타입(CH12, 적아세포, 거핵세포 및 전뇌)에서도 관찰되었으므로(Bernstein et al., 2012), 이 관찰은 MEF 세포에 유일한 것은 아니다. 따라서, 본 발명자들은 체세포에서의 RRR이 H3K9me3가 풍부한 것으로 결론짓는다.

[0572] 이전의 연구는 또한 H3K9me3이 일반적으로 소위 이질염색질 영역의 조밀하게-밀집된 큰 도메인에서 풍부함을 보여주었다(Lachner et al., 2001). RRR이 2-세포 SCNT 배아에서 활성화되지 못하는 것에 대한 한 가지 가능한 설명은 그들의 염색질 접근불가능성이다. 이 가능성을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 ENCODE 프로젝트로부터 유도된 데이터를 이용하여 6가지 상이한 체세포 타입의 DNaseI 과민감성을 분석하였다. 주목할만하게, 본 발명자들은 RRR이 분석된 모든 체세포- 또는 조직-타입에서 FRR 및 PRR에 비하여 DNaseI에 상당히 덜 민감함을 발견하였다(도 2e 및 9e). 종합하면, 이들 결과는 RRR이 일반적으로 체세포 타입에 존재하는 이질염색질의 특징을 보유함을 입증한다.

[0573] 실시예 3

[0574] ***Kdm4d에 의한 H3K9me3의 제거는 SCNT 배아에서 전사 재프로그래밍을 회복한다.***

[0575] RRR과 H3K9me3 풍부함 사이의 상관성을 확립한 후, 본 발명자들은 다음으로 H3K9me3의 제거가 SCNT 배아에서 RRR의 전사 재프로그래밍을 촉진할 수 있는지를 해결하기 위해 시도하였다. 이를 위하여, 본 발명자들은 H3K9me3-특이적 히스톤 디메틸라제, Kdm4d를 인코딩하는 mRNA(Krishnan and Trievel, 2013)를 합성하고, 5 hpa의 SCNT 배아 내로 mRNA를 주입하였다(도 3a). 면역염색은 야생형의 Kdm4d mRNA의 주입은 SCNT 배아에서 H3K9me3 수준을 크게 감소시켰으나 촉매 결함 돌연변이는 그렇지 않음을 밝혔다(도 3b).

[0576] 2-세포 SCNT 배아의 전사 결과에 대한 Kdm4d-매개 H3K9me3 제거의 효과를 검사하기 위하여, 본 발명자들은 SCNT에서 활성화되지 못한 222개 RRR에 초점을 맞춘 RNA-seq 분석을 수행하였다. 대조군 SCNT 배아에 비하여, 83%(184/222)의 RRR이 야생형 Kdm4d의 주입에 의해 활성화되었으나, 촉매 결함 돌연변이 Kdm4d에 의해서는 그렇지 않았다(도 3c, FC > 2). 이 결과는 H3K9me3의 제거가 RRR 내의 전사 활성화를 촉진함을 나타낸다. 도 3d에 예시된 바처럼, Zscan4 유전자 클러스터를 함유한 염색체 7 상의 RRR은 야생형 Kdm4d의 주입에 의해 활성화되었으나, 촉매 결함 돌연변이 Kdm4d에 의해서는 그렇지 않았다. 주목할만하게, 단백질 코딩 유전자 뿐만 아니라, RRR로부터의 비-주석 전사물의 대부분 또한 Kdm4d mRNA 주입시에 활성화되었다(도 10a 및 10b). 흥미롭게도, 계층적 클러스터링 전사체 분석은 야생형 Kdm4d가 주입된 SCNT 배아의 전사체는 대조군 SCNT 배아 또는 돌연변이 Kdm4d 주입 배아의 전사체보다 IVF 배아의 전사체와 더 유사함을 밝혔다(도 3e). 사실상, SCNT와 IVF 2-세포 배아 사이에서 상이하게 발현된 유전자(FC > 3)의 총 수는 Kdm4d 주입에 의해 1212개에서 475개로 감소하여(도 3f 및 10c), 이식된 체세포 핵으로부터 H3K9me3의 제거가 RRR의 전사 활성화를 회복할 뿐만 아니라 SCNT 배아의 전체 전사체를 회복함을 제안한다.

[0577] ***Kdm4d mRNA의 주입은 SCNT 배아의 발생을 크게 개선한다.***

[0578] Kdm4d 주입 후 SCNT 배아의 전사 회복의 생물학적 결과를 검사하기 위하여, 본 발명자들은 먼저 공여체 세포로서 난구 세포를 이용하여 Kdm4d mRNA 주입이 된 SCNT 배아의 발생 잠재력을 분석하였다. 대조군 SCNT 배아에서는, 첫번째 난할 후 발생률이 감소하기 시작하여 난할된 배아의 26.0%만이 배양 96시간 후에 배반포 단계로 발생하여(도 4a 및 4b, 및 표 S1), 이전의 연구와 일치하였다(Kishigami et al., 2006). 놀랍게도, 야생형 Kdm4d mRNA가 주입된 SCNT 배아는 2- 내지 4-세포 및 4-세포 내지 상실기 전이 동안 드물게 중지되며, 높은 효율로 배반포 단계로 발생한다(88.6%; 도 4a 및 4b, 및 표 3). 대조적으로, 촉매 결함 돌연변이 Kdm4d mRNA의 주입은 SCNT 배아의 발생률에 유의한 영향을 미치지 않아, SCNT 배아 발생에 대한 Kdm4d 주입의 개선이 그의 효소 활성

에 의존함을 나타낸다. RRR에서의 H3K9me3 풍부함이 상이한 체세포 타입들에서 일반적인 현상으로 보이는 것을 고려하여, SCNT 배아 발생에 대한 Kdm4d의 긍정적 효과는 다른 체세포 공여체 세포 타입으로 확장될 수 있어야 할 것으로 기대하였다. 사실상, Kdm4d mRNA 주입은 또한 세르토리 세포 또는 C57BL/6 배경 MEF 세포가 공여체 세포로 사용되었을 때 SCNT 배아의 발생 효율을 상당히 개선하였다(도 4a 및 4b, 표 3). 다함께, 이들 결과는 Kdm4d mRNA 주입에 의한 H3K9me3 제거가 체세포 공여체 세포 타입에 관계없이 SCNT 배아의 착상전 발생을 상당히 개선할 수 있음을 입증한다.

[0579] 표 3: Kdm4d mRNA가 주입된 SCNT 배아의 착상전 발생(도 4 및 6에 관련됨).

표 3

[0580]

공여체 세포			TSA 처리 (nM/h)	주입된 mRNA	공여체 세포에 처리된 siRNA	반복물 수	재구성된 1-세포 배아의 수	난할%/1-세포 ±SD	%4-세포/2-세포±SD	%상실배/2-세포 ±SD	%배반포/2-세포 ±SD
세포 유형	배경	성별									
난구 세포	BDF1	암컷	-	물	-	5	91	94.8±2.9	45.6±18.9	35.8±5.6	26.0±11.3
			-	Kdm4d WT	-	4	76	92.7±6.2	98.9±2.3*	96.5±4.4*	88.6±3.9*
			-	Kdm4d MUT	-	3	62	98.6±2.5	42.2±12.3	30.8±10.5	24.4±8.6*
			15/8	물	-	3	44	98.0±3.4	72.1±10.9*	60.8±6.8*	53.8±6.2*
			15/8	Kdm4d WT	_	3	51	94.1±0.0	95.8±0.0*	93.8±6.3*	87.5±12.5*
세르토리 세포	BDF1	수컷	-	물	-	3	72	87.6±4.3	52.6±8.0	36.8±8.2	26.4±6.3
			-	Kdm4d WT	-	4	102	89.3±8.4	95.3±3.6*	91.6±6.4*	81.2±7.5*
MEF	C57BL/6	수컷	-	물	대조군#	5	124	82.0±5.0	17.9±15.2	10.0±11.0	6.7±8.2
			-	Kdm4d WT	대조군#	4	56	86.9±8.8	95.4±5.5*	89.6±7.9*	82.0±10.3*
			-	-	Setdb1	3	77	84.7±6.6	12.5±11.9	4.8±8.2	3.2±5.5
			-	-	Suv39h1/h2	3	80	77.3±4.7	59.9±8.8*	53.8±9.6*	49.9=9.0*
			- _ _	- _ _	Suv39h1/h2 Setbl1	3	77	68.5±13.2	77.4±12.9*	74.1±15.8*	65.6±9.8*

[0581] 주입된 mRNA의 농도는 1800 ng/㎕였다. siRNA의 농도는 각각 5 pM이었다.

[0582] # 형질감염 시약 단독으로 처리됨

[0583] * 물-주입된 대조군에 비교하여 $P < 0.01$

[0584] 이전의 연구는 히스톤 디아세틸라제(HDAC) 억제제로 일시적으로 처리하면 또한 SCNT 배아의 발생 효율을 상당히 개선시킬 수 있음을 입증하였다(Kishigami et al., 2006; Van Thuan et al., 2009). HDAC 억제제와 Kdm4d 사이의 가능한 관련성을 알아보기 위하여, 본 발명자들은 HDAC 억제제, TSA, 및 Kdm4d를 이용하여 SCNT 배아의 조합 처리를 수행하였다. TSA 단독 처리는 이전의 보고(Kishigami et al., 2006)와 유사하게, 배반포 비율을 26.0%에서 53.8%로 개선하였다(도 4c 및 표 3). TSA와 조합된 Kdm4d mRNA 주입은 배반포 비율을 87.5%로 더 증가시켰으

며, 이는 Kdm4d 단독 주입과 통계적으로 유사하였다(88.6%; 도 4c 및 표 3). 이 결과는 TSA 처리 및 Kdm4d mRNA 주입이 적어도 착상전 단계에서 SCNT 재프로그래밍에 상승적 효과를 갖지 않으며 TSA 처리는 Kdm4d에 의한 것과 유사한 경로를 통하여 그 효과를 나타낼 수 있음을 입증한다.

[0585] 본 발명자들은 또한 배반포로부터 ntESC 유도의 효율을 검사하였다. 대조군 SCNT 배반포를 ES 세포 유도 배지를 가진 피더 MEF 세포상에서 배양한 경우, 피더 세포에 부착된 배반포의 71% 및 배반포의 50%가 결과적으로 확립된 ntESC 세포주가 되었다(도 4d 및 표 4). Kdm4d mRNA 주입, TSA 처리 또는 Kdm4d/TSA 조합을 통해 생성된 배반포는 대조군에 비교할 때 부착 또는 ntESC 유도 효율에서 어떤 큰 차이도 나타내지 않았다(도 4d 및 표 4). 중요하게, SCNT를 위해 사용된 MII 난모세포의 총 수에 기초하여 계산할 경우 효율은 Kdm4d 주입에 의해 크게 개선되었다(도 4e 및 표 4)

[0586] 표 4: Kdm4d가 주입된 SCNT 배아의 인 비보 발생(도 4에 관련됨).

표 4

[0587]

공여체 세포			TSA 처리 (nM/h)	주입된mRNA	MII 난모세포의 수	재구성된 1-세포 배아의 수	배반포의 수(%/1-세포)	ntESC 유도		
세포유형	배경	성별						피더 세포에 부착된 배반포의 수(%/배반포	확립된 ntESC 세포주의 수(%/배반포)	확립된 ntESC 세포주의 수(%/MII 난모세포)
난구세포	BDF1	암컷	-	물	69	62	14(22.6)	10(71.4)	7(50.0)	7(10.1)
			-	Kdm4d WT	20	19	18(94.7)	13(72.2)	1.(55.6_	10(50.0)
			15/8	물	44	39	20(51.3)	14(70.0)	8(40.0)	8(18.2)
			15/8	Kdm4d WT	25	22	21(95.5)	16(76.2)	11(52.3)	11(44.0)

[0588] 주입된 mRNA의 농도는 1800 ng/㎕였다.

[0589] 착상전 발생에 대한 Kdm4d의 긍정적 효과가 착상 후 발생 동안 유지될 수 있는지를 검사하기 위하여, 본 발명자들은 난구세포로부터 생성된 2-세포 단계 SCNT 배아를 가짜임신 암컷 마우스의 난관 내로 이식하였다. E19.5(분만일)에서의 제왕절개는 착상 부위에 의해 입증되는 것처럼, 착상률이 대조군 SCNT 배아(21.2%, 도 4f)에서보다 Kdm4d-주입된 SCNT 배아(63.0%)에서 3-배 더 높음을 밝혔다. 중요하게, 이식된 Kdm4d-주입된 2-세포 SCNT 배아의 7.6%(9/119)가 만삭까지 발생한 반면, 104개의 이식된 대조군 배아는 동일한 조건하에서 하나도 만삭까지 발생하지 못했다(도 4g 및 표 5). 세르토리 세포-유도 SCNT 배아를 이용한 유사한 실험 또한 착상률(21% vs 64%) 및 분만까지 발생률(1% vs 8.7%)에 대한 Kdm4d의 긍정적 효과를 입증하였다(도 4f, g 및 표 S3). 또한, Kdm4d-주입을 통해 생성된 SCNT 새끼는 정상적으로 성인으로 자랐으며 자연 교배에 의해 자손을 생산하였다(도 4h). 이들 결과는 체세포에서의 H3K9me3이 난모세포-매개 게놈 재프로그래밍의 장벽이며 SCNT 배아 발생의 매우 초기 단계에서 Kdm4d 주입에 의한 H3K9me3의 제거가 마우스 생식적 복제의 전체 효율을 크게 개선할 수 있음을 입증한다.

[0590] 표 5: Kdm4d가 주입된 SCNT 배아의 인 비보 발생(도 4에 관련됨).

표 5

[0591]

방법	공여체 세포			주입된 mRNA	수용체 수	이식된 2-세포 배아의 수	착상된 수 (%/ET)	새끼의 수 (%/ET)	출생시 체중	출생시 태반 무게 (g±SD)
	세포 유형	배경	성별							
SCNT	난구	BDF1	암컷	물	6	104	22(21.2)	0 (0.0)	N/A	N/A
				Kdm4d WT	8	119	75(63.0)	9 (7.6)	1.60±0.15	0.32±0.03
	세르토리	BDF1	수컷	물	5	99	21(21.2)	1 (1.0)	1.53	0.40
				Kdm4d WT	7	92	59(64.1)	8 (8.7)	1.48±0.11	0.26±0.10
IVF*					4	72	54(75.0)	41 (56.9)	1.47±0.11	0.10±0.02

[0592] 주입된 Kdm4d mRNA의 농도는 1800 ng/㎕였다.

[0593] N/A, 적용불가능

[0594] ET, 배아 이식

[0595] # IVF 배아는 BDF1 정자 및 난모세포로부터 생산되었다.

[0596] 실시예 4

[0597] **SCNT 배아의 빈약한 발생 표현형의 원인이 되는 후보 유전자.**

[0598] 본 발명자들은 다음으로 H3K9me3에 의해 억제되는 유전자 중 어느 것이 SCNT 배아의 빈약한 발생 표현형의 원인인지를 평가하였다. Kdm4d 과발현이 배반포 단계에 도달하는 SCNT 배아의 비율을 크게 증가시킴을 고려하여, 유책 유전자는 야생형 Kdm4d-주입 SCNT 배아에서 탈억제되어야 한다. 2-세포 SCNT 배아에서 활성화되지 못한 유전자(도 1d에서 그룹 3 유전자), 및 야생형 Kdm4d-주입에서는 탈억제되지만 돌연변이 Kdm4d-주입 2-세포 SCNT 배아에서는 그렇지 않은 유전자의 분석은, 49개의 공통 유전자의 확인을 허용하였다(도 5a 및 5b, FC > 5). GO 분석은 이 유전자 그룹이 전사 및 RNA 대사 과정에서 관련된 유전자가 풍부함을 나타냈다(도 5a). 착상전 발생에서 49개 유전자의 대부분의 기능이 미지인 반면, 2-세포 특이적 Zscan4 패밀리 구성원인 Zscan4d는 착상전 발생에 중요한 것으로 나타났다(Falco et al., 2007). 따라서, 본 발명자들은 외인성 Zscan4d mRNA의 보충이 SCNT 배아의 발생 효율을 향상시킬 수 있는지를 검사하였다.

[0599] 본 발명자들은 전체 길이 Zscan4d를 인코딩하는 mRNA를 내인성 Zscan4d의 발현 패턴을 따라 초기 2-세포 단계의 SCNT 배아(20 hpa: 도 5c)에 미세주입하였다. 하지만, Zscan4d mRNA의 주입은 농도에 관계없이, SCNT 배아의 빈약한 발생 표현형을 구하지 못했다(도 5d 및 표 6). 따라서, 2-세포 SCNT 배아에서 Zscan4d 활성화의 결함은 SCNT 배아의 빈약한 착상전 발생을 단독으로 책임질 가능성이 낮다. 오히려, 비-유전 반복 요소로부터 유래된 전사물을 비롯한 복잡한 유전자 네트워크(도 11)가 SCNT 배아 발생의 결함을 일으킬 수 있다.

[0600] 표 6: Zscan4d mRNA가 주입된 SCNT 배아의 착상전 발생(도 5에 관련됨). 모든 실험은 난구 세포 타입, BDF1 배경, 암컷 세포 공여체 세포인 공여체 세포에서 이루어졌다.

표 6

[0601]

주입된 Zscan4d mRNA의 농도 (ng/㎕)	반복물의 수	재구성된 1-세포의 수± SD	% 4-세포/2-세포%±SD	% 상실배/2-세포 ± SD	% 배반포/2-세포±
0	3	98.0 ±3.4	42.5±17.5	38.8±15.2	30.8±6.3
20	3	00.0 ±0.0	44.2±7.9	38.3±3.4	30.4±6.0
200	3	8.0 ±3.4	45.4±14.4	41.7±17.6	30.0±8.7
2000	3	8.2 ±3.0	60.3±11.1	48.9±7.3	39.9±4.6

[0602] 실시예 5

[0603] ***Suv39h1/2는 체세포에서 H3K9me3 장벽의 확립을 책임진다.***

[0604] H3K9me3이 SCTN-매개 재프로그래밍의 후성적 장벽임을 입증하였으며, 본 발명자들은 다음으로 체세포 게놈에서 RRR 내에 H3K9me3의 침적을 책임지는 히스톤 메틸트랜스퍼라제(들)를 확인하고자 하였다. 이전의 연구는 적어도 세 가지 히스톤 리신 메틸트랜스퍼라제(KMTs), Suv39h1, Suv39h2 및 Setdb1이 포유류 세포에서 H3K9me3의 생성을 촉매할 수 있음을 보고하였다(Matsui et al., 2010; Peters et al., 2001). 먼저, 본 발명자들은 Suv39h1, Suv39h2 및 Setdb1를 표적화하는 짧은 간섭 RNA(siRNA)의 혼합물을 형질감염시켜 MEF 세포에서 세 가지 H3K9me3 메틸트랜스퍼라제를 고갈시켰다(도 6a). RT-qPCR 분석은 형질감염 후 48시간에 80-60% 넉다운 효율이 이루어졌음을 확인하였다(도 12a-12b). 면역염색은 이들 siRNA의 형질감염(세포 배양의 6-일 이내에 두배)이 MEF 세포에서 H3K9me3 수준을 크게 감소시킬 수 있음을 보여주어(도 6a 및 6b), 체세포에서 H3K9me3 침적을 일으키는 인자로서, 다른 미확인 효소가 아니라 세 가지 H3K9me3 메틸트랜스퍼라제를 입증하였다. 공여체로서 삼중 KD MEF 세포를 이용하여, 본 발명자들은 SCNT 배아를 생성하고 그들의 착상전 발생을 검사하였다. 본 발명자들은 대조군 SCNT 배아의 단지 6.7%만이 96시간 배양 후 배반포 단계로 발생한 반면(도 6c, 6d, 및 표 3), 삼중 넉다운 MEF-유래 배아의 65.6%가 배반포 단계로 발생함을 발견하였다(도 6c, 6d 및 표 3). 이 결과는 체세포 H3K9me3이 SCNT-매개 재프로그래밍의 후성적 장벽임을 확인할 뿐만 아니라, 이들 세 가지 효소가 이 후성적 장

벽을 생성하는 것을 책임짐을 입증한다.

[0605] 본 발명자들은 다음으로 MEF 세포에서 그들을 개별적으로 고갈시킴으로써 세 가지 히스톤 메틸트랜스퍼라제 중 어느 것이 H3K9me3 재프로그래밍 장벽을 확립하는지를 검사하였다. Suv39h1 및 Suv39h2가 H3K9 트리메틸화에서 불필요한 기능을 가지므로(Peters et al., 2001), 본 발명자들은 동시에 두 유전자를 모두 넉 다운시켰다. 넉다운 6일에 면역염색은 Suv39 KD가 특히 함동원체 영역에서, 전체적인 H3K9me3 수준을 감소시킨 반면, Setdb1 넉다운은 H3K9me3 수준에서 전체적인 변화를 야기하지 않았음을 입증하였으며(도 6b), 이전의 보고(Matsui et al., 2010)와 일치한다. 이들 넉다운 MEF 세포를 SCNT 분석을 위한 공여체로 사용한 경우, 배반포 단계로의 발생률은 대조군에서의 6.7%에서 Suv39h KD MEF 그룹에서의 49.9%로 크게 개선되어, 삼중 넉다운 MEF 그룹의 발생률과 매우 근접하였다(도 6c, 6d, 및 표 3). 대조적으로, Setdb1의 넉다운은 발생률을 크게 변화시키지 않았다(도 6c, 6d, 및 표 3). 종합적으로, 이들 결과는 SCNT의 효율을 증가시키기 위해 Setdb1이 사용될 수 있는 반면, Suv39h1/2는 체세포에서 SCNT 배아의 게놈 재프로그래밍의 장벽으로서 기능하는 H3K9me3의 확립을 주로 책임지고 있음을 입증한다.

[0606] 실시예 6

[0607] 개구리 속 알에서 체세포 핵 이식을 통한 동물 복제의 첫번째 입증(Gurdon, 1962) 후 50년이 넘게 지났다. 방대한 노력에도 불구하고, 복제 효율은 대부분의 종에서 상대적으로 낮게 남아 있으며, SCNT 후 후성적 재프로그래밍의 기저의 기전은 잘 이해되지 않고 있다. 본 연구에서, 비교 전사체 및 통합 후성적 분석을 통해, 본 발명자들은 공여체 체세포의 Suv39h1/2-침적 H3K9me3가 인간 및 마우스 난모세포에서 체세포 핵 재프로그래밍의 후성적 장벽으로서 기능함을 발견하였다. IVF 배아의 전사체에 비교함으로써, 본 발명자들은 SCNT 배아에서 전사 재프로그래밍에 저항성인, RRR(재프로그래밍 저항성 영역)로 불리는 222개 게놈 영역을 발견하였다. RRR은 분석된 몇몇 체세포 타입에서 Suv39h1/2-침적 H3K9me3의 상당한 풍부함 및 낮은 DNase I 접근성을 특징으로 하며, 이들 둘 모두 이질염색질의 일반적 특징이다. RRR 내의 전사물의 효율적인 활성화는 SCNT 배아의 발생을 위해 중요한 것으로 보이며, 이는 Suv39h1/2 넉다운 또는 외인성 Kdm4d의 발현에 의한 H3K9me3의 제거가 RRR의 활성화 및 SCNT 배아의 발생의 상당한 개선을 야기하기 때문이다. 따라서, 본 발명자들은 체세포에서 Suv39h1/2-침적 H3K9me3이 난모세포에서의 발생학적으로 중요한 유전자의 활성화에 대한 장벽으로서 작용하여, SCNT 배아의 발생 중지를 유도하는 모델을 본 명세서에서 입증하였다(도 7). SCNT 후 외인성 Kdm4d에 의한 또는 공여체 세포 내의 Suv39h1/2의 고갈에 의한 이 후성적 장벽의 제거는 발생 유전자의 발현 및 SCNT 배아의 발생 개선을 허용한다(도 7).

[0608] H3K9me3은 어떻게 재프로그래밍을 방해하는가? 이전의 연구는 H3K9me3가 이질염색질 단백질, HP1에 의해 인식되고 결합될 수 있으며(Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001), 이는 이질염색질의 형성을 위한 핵을 제공할 수 있음을 보고하였다(Canzio et al., 2013). 이질염색질과 핵막하층 사이의 상호작용은 이질염색질을 핵 주변에 묶어두어 후성적인 사일런싱을 유도할 수 있다(Poleshko and Katz, 2014). 따라서, H3K9me3-개시된 이질염색질 조립은 재프로그래밍 및 전사 인자에의 접근을 막을 수 있으며, 그에 의해 RRR에서 발생학적으로 중요한 유전자의 활성화를 방지할 수 있다. 재프로그래밍 및 전사 인자 접근 방지에 더하여, H3K9me3은 본 발명자들이 이전에 입증한 것처럼(Wang et al., 2001), H3K9 아세틸화 및 H3K4 메틸화와 같은 활성화 마크의 후속 침적을 억제하는 것으로 보고되었다.

[0609] 본 발명자들은 본 명세서에서 H3K9me3-매개 이질염색질 형성이 일반적인 재프로그래밍 장벽으로서 기능함을 입증하며, 이것은 MEF 세포에서 H3K9me3 (Chen et al., 2013; Soufi et al., 2012) 및 HP1 (Sridharan et al., 2013) 둘 모두가 iPS 세포 생성을 억제한다는 보고와 일치한다. 그럼에도 불구하고, SCNT와 iPS 재프로그래밍 사이의 장벽에 관한 여러 중요한 차이가 존재한다. 먼저, 마우스 iPS 재프로그래밍에서 H3K9me3-장벽은 주로 Setdb1에 의해 확립된다(Chen et al., 2013; Sridharan et al., 2013). 대조적으로, 본 발명자들은 SCNT 재프로그래밍의 H3K9me3-장벽을 확립하는 중요 효소로서 Setdb1가 아니라 Suv39h1/2를 명백하게 보여준다. 두번째로, H3K9me3-장벽에 의해 억제되는, iPS 및 SCNT 재프로그래밍에서 성공적인 재프로그래밍에 필요한 다운스트림 유전자 네트워크가 매우 다르다. 구체적으로, iPS 재프로그래밍에서는, H3K9me3-장벽 내의 중요 다운스트림 인자가 Nanog 및 Sox2와 같은 핵심 다능성 네트워크 유전자이며, 이들은 재프로그래밍의 상대적으로 후기 단계에서 작동한다(Chen et al., 2013; Sridharan et al., 2013). 대조적으로, SCNT 재프로그래밍에서는, 2-세포 단계에서 중요한 기능을 하는 전사물이 (본 명세서에서 토의된 바처럼) H3K9me3에 의해 억제되는 중요 인자이다. 이러한 중요 차이는 iPS 및 SCNT 각각에서 성공적인 재프로그래밍에 요구되는 전사 인자 세트에서의 차이 때문이다. 사실상, iPS 재프로그래밍에 요구되는 핵심 전사 인자인 Oct4/Pou5f1은 SCNT 재프로그래밍에 없어도 되는 것으로 밝혀졌다(Wu et al., 2013). 따라서, H3K9m3가 iPS에서의 재프로그래밍에 중요한 것으로 나타나지

만, iPS 및 SCNT 재프로그래밍에서의 중요 기전 차이 때문에, iPS 재프로그래밍을 위해 작동하는 것을 SCNT 재프로그래밍에 적용할 수 없다.

[0610] 따라서, 본 명세서에서 토의된 바처럼, (Kdm4d/JmjdJmjd2D에 의한) H3K9me3의 탈메틸화가 체세포 재프로그래밍으로부터 iPS 세포의 생성 효율을 증가시키기 위해 이용되는 것으로 보고된 반면, ES 세포에 비하여 iPSC 세포의 생성 및 전체 후성적 상태에서의 많은 중요하고 상당한 차이가 있으며(표 1) SCNT 배아의 생성에서 세포를 재프로그래밍하는 기전에 비하여 iPS 세포의 생성에서 세포를 재프로그래밍하는 것은 상당히 상이한 기전이므로(표 1), 당업자는 iPS 세포의 생성에서 H3K9me3의 탈메틸화가 SCNT 배아의 성공적인 생성 및 착상 전 및 착상 후 효율을 위한 방법에 전달될 수 있음을 모를 것이다.

[0611] 본 발명자들은 SCNT 배아의 빈약한 발생 표현형을 잠재적으로 책임지는 49개의 후보 유전자를 열거하였다. 예상치 못하게, 후보 유전자 중 하나인 Zscan4d의 과발현은 배반포 비율을 개선하지 못했다. 또한 Suv39h1 및 Suv39h2가 SCNT의 효율을 증가시키지만, 다른 히스톤 리신 메틸트랜스퍼라제 Setdb1는 그렇지 않음은 놀라운 것이었다. 따라서, 당업자는 2-세포 단계 IVF 배아에서 활성화된 다른 인자가 SCNT 배아가 성공적으로 배반포 단계로 발생하기 위해 필요함을 생각할 수 있다. 본 명세서에 개시된 단백질 코딩 유전자에 더하여, 탈조절된 RRR은 또한 2-세포 SCNT 배아에서 그의 억제가 H3K9me3 의존성을 나타내는 많은 비주석 전사물 및 반복 서열을 보유한다. 예를 들어, 주요 위성 반복물의 발현은 2-세포 SCNT 배아에서 크게 억제되었으며, 이 억제는 야생형에 의해 완전히 회복되었으나, 촉매 돌연변이 Kdm4d 주입에 의해서는 회복되지 않았다(도 11). 유사하게, Kdm4d 주입은 또한 2-세포 SCNT 배아에서 MERVL과 같은 클래스 III 레트로트랜스포존 요소의 SCNT-유도 억제를 부분적으로 완화시켰다(도 11). 두 반복 서열의 활성화가 착상전 발생을 위해 중요함을 고려할 때(Kigami, 2003; Probst et al., 2010), 2-세포 SCNT 배아에서 이들 반복 서열의 전사 탈조절화는 또한 이들 배아에서 관찰된 발생 결함에 기여할 수 있다. 따라서, 체세포로부터 유전된 H3K9me3 마크를 보유한 단백질 코딩 유전자와 반복 서열의 활성화 결함은 종합적으로 SCNT 배아의 발생 실패에 책임이 있을 수 있다.

[0612] 본 발명자들은 본 명세서에 개시된 SCNT 효율을 증가시키기 위한 방법과 조성물이 일반적으로 다른 동물 및 포유류 종에 적용될 수 있음을 나타낸다. 마우스와 유사하게, SCNT 배아의 발생 결함은 토끼(Li et al., 2006), 돼지(Zhao et al., 2009), 소(Akagi et al., 2011) 및 인간 (Noggle et al., 2011)과 같은 다른 포유류 종에서 ZGA와 동시에 나타나며, 이들 종의 SCNT 배아에서 비정상 이질염색질 또는 H3K9me3 상태가 관찰된다(Pichugin et al., 2010; Santos et al., 2003; Yang et al., 2009). 따라서, H3K9me3 재프로그래밍 장벽이 다른 종에서 보존될 가능성이 높다. 따라서, Kdm4d mRNA 주입은 인간과 가축을 비롯한 광범위한 포유류에서 복제 효율을 향상시키고 개선하기 위해 사용될 수 있다. 중요하게도, 본 발명자들은 본 명세서에서 Kdm4d mRNA의 주입이 마우스에서 ntESC 유도 효율을 크게 향상시켰음을 입증한다. 따라서, Kdm4d mRNA는 인간 세포로부터 ntESC 유도 효율을 향상시켜, 인간 치료 복제를 위한 인간 세포의 중요한 공급원을 제공할 수 있다(Hochedlinger and Jaenisch, 2003; Yang et al., 2007). SCNT 동안 인간 난모세포 내로의 간단한 Kdm4d mRNA 주입은 당업자가 수행할 수 있다. 더욱이, 당업자는 대안적으로 인간 ntESC 유도 효율 및 인간 치료 복제를 위한 그들의 용도를 향상시키기 위해 제핵 난모세포 내로 핵을 이식하거나 주입하기 전에 공여체 세포와의 간단한 인큐베이션에서 Suv39h-특이적 억제제를 사용할 수 있다.

[0613] 참고 문헌

[0614] 본 명세서에 개시된 참고문헌은 그 전체가 참고로 본원에 통합된다.

[0615] Apostolou, E., & Hochedlinger, K. (2013). Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature*, *502*(7472), 462-71. doi:10.1038/nature12749

[0616] Chang, G., Gao, S., Hou, X., Xu, Z., Liu, Y., Kang, L., ...Tian, J. (2014). High-throughput sequencing reveals the disruption of methylation of imprinted gene in induced pluripotent stem cells. *Cell Research*, *24*(3), 293-306. doi:10.1038/cr.2013.173

[0617] Inoue, A., & Zhang, Y. (2014). Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes. *Nature Structural & Molecular Biology*, (June), 2-11. doi:10.1038/nsmb.2839

[0618] Jullien, J., Pasque, V., Halley-Stott, R. P., Miyamoto, K., & Gurdon, J. B. (2011). Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *12*(7), 453-9. doi:10.1038/nrm3140

[0619] Ma, H., Morey, R., O'Neil, R. C., He, Y., Daughtry, B., Schultz, M. D., Mitalipov, S. (2014).

Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature*, *511*(7508), 177-183. doi:10.1038/nature13551

[0620] Matoba, S., Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Mizutani, E., Ogonuki, N.,...Ogura, A. (2011). RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(51), 20621-6. doi:10.1073/pnas.1112664108

[0621] Mitalipov, S., & Don Wolf. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. In *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* (pp. 185-199).

[0622] Pasque, V., Miyamoto, K., & Gurdon, J. B. (2010). Efficiencies and mechanisms of nuclear reprogramming. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *75*, 189-200. doi:10.1101/sqb.2010.75.002

[0623] Pedersen, M. T., Agger, K., Laugesen, A., Johansen, J. V, Cloos, P. a C., Christensen, J., & Helin, K. (2014). The demethylase JMJD2C localizes to H3K4me3-positive transcription start sites and is dispensable for embryonic development. *Molecular and Cellular Biology*, *34*(6), 1031-45. doi:10.1128/MCB.00864-13

[0624] Rideout, W. M., Wakayama, T., Wutz, a, Eggan, K., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., ...Jaenisch, R. (2000). Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nature Genetics*, *24*(2), 109-10. doi:10.1038/72753

[0625] Sridharan, R., Gonzales-Cope, M., Chronis, C., Bonora, G., McKee, R., Huang, C., ...Plath, K. (2013). Proteomic and genomic approaches reveal critical functions of H3K9 methylation and heterochromatin protein-ɣ in reprogramming to pluripotency. *Nature Cell Biology*, *15*(7), 872-82. doi:10.1038/ncb2768

[0626] Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., ...Mitalipov, S. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, *153*(6), 1228-38. doi:10.1016/j.cell.2013.05.006

[0627] Yamada, M., Johannɣsson, B., Sagi, I., Burnett, L. C., Kort, D. H., Prosser, R. W., ...Egli, D. (2014). Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature*, *510*(7506), 533-6. doi:10.1038/nature13287

[0628] Yamanaka, S., & Blau, H. M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, *465*(7299), 704-12. doi:10.1038/nature09229

[0629] Akagi, S., Matsukawa, K., Mizutani, E., Fukunari, K., Kaneda, M., Watanabe, S., and Takahashi, S. (2011). Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. J. Reprod. Dev. *57*, 120-126.

[0630] Bannister, a J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E. a, Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature *410*, 120-124.

[0631] Bernstein, B.E., Birney, E., Dunham, I., Green, E.D., Gunter, C., and Snyder, M. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature *489*, 57-74.

[0632] Canzio, D., Liao, M., Naber, N., Pate, E., Larson, A., Wu, S., Marina, D.B., Garcia, J.F., Madhani, H.D., Cooke, R., et al. (2013). A conformational switch in HP1 releases auto-inhibition to drive heterochromatin assembly. Nature *496*, 377-381.

[0633] Chang, G., Gao, S., Hou, X., Xu, Z., Liu, Y., Kang, L., Tao, Y., Liu, W., Huang, B., Kou, X., et al. (2014). High-throughput sequencing reveals the disruption of methylation of imprinted gene in induced pluripotent stem cells. Cell Res. *24*, 293-306.

[0634] Chen, J., Liu, H., Liu, J., Qi, J., Wei, B., Yang, J., Liang, H., Chen, Y., Chen, J., Wu, Y., et al. (2013). H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. Nat. Genet. *45*, 34-42.

[0635] Chung, Y.G., Eum, J.H., Lee, J.E., Shim, S.H., Sepilian, V., Hong, S.W., Lee, Y., Treff, N.R., Choi, Y.H., Kimbrel, E. a, et al. (2014). Human Somatic Cell Nuclear Transfer Using Adult Cells. Cell Stem Cell 1-4.

[0636] Evsikov, a V, de Vries, W.N., Peaston, a E., Radford, E.E., Fancher, K.S., Chen, F.H., Blake, J. a, Bult, C.J., Latham, K.E., Solter, D., et al. (2004). Systems biology of the 2-cell mouse embryo. Cytogenet. Genome Res. *105*, 240-250.

[0637] Falco, G., Lee, S.-L., Stanghellini, I., Bassey, U.C., Hamatani, T., and Ko, M.S.H. (2007). Zscan4: a novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. Dev. Biol. *307*, 539-550.

[0638] Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. J. Embryol. Exp. Morphol. *10*, 622-640.

[0639] Hochedlinger, K., and Jaenisch, R. (2003). Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. N. Engl. J. Med. *349*, 275-286.

[0640] Inoue, A., and Zhang, Y. (2014). Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes. Nat. Struct. Mol. Biol. 2-11.

[0641] Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Hirose, M., Noda, S., Kim, J.-M., Aoki, F., Miyoshi, H., and Ogura, A. (2006). Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. J. Cell Sci. *119*, 1985-1991.

[0642] Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Sado, T., Ogonuki, N., Matoba, S., Shiura, H., Ikeda, R., Mochida, K., Fujii, T., et al. (2010). Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. Science *330*, 496-499.

[0643] Kigami, D. (2003). MuERV-L Is One of the Earliest Transcribed Genes in Mouse One-Cell Embryos. Biol. Reprod. *68*, 651-654.

[0644] Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N. Van, Wakayama, S., Bui, H.-T., and Wakayama, T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. Biochem. Biophys. Res. Commun. *340*, 183-189.

[0645] Krishnan, S., and Trievel, R.C. (2013). Structural and functional analysis of JMJD2D reveals molecular basis for site-specific demethylation among JMJD2 demethylases. Structure *21*, 98-108.

[0646] Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. Nature *410*, 116-120.

[0647] Li, S., Chen, X., Fang, Z., Shi, J., and Sheng, H.Z. (2006). Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer. Reproduction *131*, 1085-1090.

[0648] Matoba, S., Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Mizutani, E., Ogonuki, N., Nakamura, T., Abe, K., Nakano, T., Ishino, F., et al. (2011). RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 20621-20626.

[0649] Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I. a, Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M.C., and Shinkai, Y. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. Nature *464*, 927-931.

[0650] Noggle, S., Fung, H.-L., Gore, A., Martinez, H., Satriani, K.C., Prosser, R., Oum, K., Paull, D., Druckenmiller, S., Freeby, M., et al. (2011). Human oocytes reprogram somatic cells to a

pluripotent state. Nature *478*, 70-75.

[0651] Ogura, A., Inoue, K., and Wakayama, T. (2013). Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. Phil. Trans. R. Soc. B *368*, 20110329.

[0652] Ono, Y., Shimozawa, N., Ito, M., and Kono, T. (2001). Cloned Mice from Fetal Fibroblast Cells Arrested at Metaphase by a Serial Nuclear Transfer. Biol. Reprod. *64*, 44-50.

[0653] Peaston, A.E., Evsikov, A. V, Graber, J.H., de Vries, W.N., Holbrook, A.E., Solter, D., and Knowles, B.B. (2004). Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. Dev. Cell *7*, 597-606.

[0654] Pedersen, M.T., Agger, K., Laugesen, A., Johansen, J. V, Cloos, P. a C., Christensen, J., and Helin, K. (2014). The demethylase JMJD2C localizes to H3K4me3-positive transcription start sites and is dispensable for embryonic development. Mol. Cell. Biol. *34*, 1031-1045.

[0655] Peters, A., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., et al. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. Cell *107*, 323-337.

[0656] Pichugin, A., Le Bourhis, D., Adenot, P., Lehmann, G., Audouard, C., Renard, J.-P., Vignon, X., and Beaujean, N. (2010). Dynamics of constitutive heterochromatin: two contrasted kinetics of genome restructuring in early cloned bovine embryos. Reproduction *139*, 129-137.

[0657] Poleshko, A., and Katz, R.A. (2014). Specifying peripheral heterochromatin during nuclear lamina reassembly. Nucleus *5*, 32-39.

[0658] Probst, A. V, Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., and Almouzni, G. (2010). A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. Dev. Cell *19*, 625-638.

[0659] Rodriguez-Osorio, N., Urrego, R., Cibelli, J.B., Eilertsen, K., and Memili, E. (2012). Reprogramming mammalian somatic cells. Theriogenology *78*, 1869-1886.

[0660] Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W., and Dean, W. (2003). Epigenetic Marking Correlates with Developmental Potential in Cloned Bovine Preimplantation Embryos. Curr. Biol. *13*, 1116-1121.

[0661] Schultz, R.M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. Hum. Reprod. Update *8*, 323-331.

[0662] Soufi, A., Donahue, G., and Zaret, K.S. (2012). Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors's initial engagement with the genome. Cell *151*, 994-1004.

[0663] Sridharan, R., Gonzales-Cope, M., Chronis, C., Bonora, G., McKee, R., Huang, C., Patel, S., Lopez, D., Mishra, N., Pellegrini, M., et al. (2013). Proteomic and genomic approaches reveal critical functions of H3K9 methylation and heterochromatin protein-1γ in reprogramming to pluripotency. Nat. Cell Biol. *15*, 872-882.

[0664] Suzuki, T., Minami, N., Kono, T., and Imai, H. (2006). Zygotically activated genes are suppressed in mouse nuclear transferred embryos. Cloning Stem Cells *8*, 295-304.

[0665] Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanaudomchai, H., et al. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. Cell *153*, 1228-1238.

[0666] The Encode Consortium Project (2011). A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). PLoS Biol. *9*, e1001046.

[0667] Van Thuan, N., Bui, H.-T., Kim, J.-H., Hikichi, T., Wakayama, S., Kishigami, S., Mizutani, E.,

and Wakayama, T. (2009). The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. Reproduction *138*, 309-317.

[0668] Vassena, R., Han, Z., Gao, S., Baldwin, D. a, Schultz, R.M., and Latham, K.E. (2007). Tough beginnings: alterations in the transcriptome of cloned embryos during the first two cell cycles. Dev. Biol. *304*, 75-89.

[0669] Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, a C., Studer, L., and Mombaerts, P. (2001). Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. Science *292*, 740-743.

[0670] Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-bromage, H., Borchers, C., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001). Purification and Functional Characterization of a Histone H3-Lysine 4-Specific Methyltransferase. Mol. Cell *8*, 1207-1217.

[0671] Wilmut, I., Schnieke, A., McWhir, J., Kind, A., and Campbell, K. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature *385*, 810-813.

[0672] Yamada, M., Johannesson, B., Sagi, I., Burnett, L.C., Kort, D.H., Prosser, R.W., Paull, D., Nestor, M.W., Freeby, M., Greenberg, E., et al. (2014). Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. Nature.

[0673] Yang, C., Liu, Z., Fleurot, R., Adenot, P., Vignon, X., Zhou, Q., Renard, J., and Beaujean, N. (2009). Heterochromatin reprogramming in rabbit embryos after fertilization, intra-, and inter-species SCNT correlates with preimplantation development. Reproduction *145*, 149-159.

[0674] Yang, X., Smith, S.L., Tian, X.C., Lewin, H.A., Renard, J., and Wakayama, T. (2007). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. Nat. Genet. *39*, 295-302.

[0675] Zhao, J., Ross, J.W., Hao, Y., Spate, L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy, C.N., and Prather, R.S. (2009). Significant Improvement in Cloning Efficiency of an Inbred Miniature Pig by Histone Deacetylase Inhibitor Treatment after Somatic Cell Nuclear Transfer. Biol. Reprod. *81*, 525-530.

[0676] Bernstein, B.E., Birney, E., Dunham, I., Green, E.D., Gunter, C., and Snyder, M. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature *489*, 57-74

[0677] Chang, G., Gao, S., Hou, X., Xu, Z., Liu, Y., Kang, L., Tao, Y., Liu, W., Huang, B., Kou, X., et al. (2014). High-throughput sequencing reveals the disruption of methylation of imprinted gene in induced pluripotent stem cells. Cell Res. *24*, 293-306.

[0678] Inoue, A., and Zhang, Y. (2014). Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes. Nat. Struct. Mol. Biol. 2-11.

[0679] Matoba, S., Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Mizutani, E., Ogonuki, N., Nakamura, T., Abe, K., Nakano, T., Ishino, F., et al. (2011). RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 20621-20626.

[0680] Pedersen, M.T., Agger, K., Laugesen, A., Johansen, J. V, Cloos, P. a C., Christensen, J., and Helin, K. (2014). The demethylase JMJD2C localizes to H3K4me3-positive transcription start sites and is dispensable for embryonic development. Mol. Cell. Biol. *34*, 1031-1045.

[0681] The Encode Consortium Project (2011). A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). PLoS Biol. *9*, e1001046.

종	유전자	서열번호	CDS 서열 (코딩 서열)
인간	KDM4D	서열번호: 1	ATGGAAACTATGAAGTCTAAGGCCAACTGTGCCCAGAATCCAAATTGTAACATAATGATATTTCATCCAA CCAAAGAAGAGTTTAATGATTTTGATAAATATATTGCTTACATGGAATCCCAAGGTGCACACAGAGCTGG CTTGGCTAAGATAATTCCACCCAAAGAATGGAAAGCCAGAGAGACCTATGATAATATCAGTGAAATCTTA ATAGCCACTCCCCTCCAGCAGGTGGCCTCTGGGCGGGCAGGGGTGTTTACTCAATACCATAAAAAAAAGA AAGCCATGACTGTGGGGGAGTATCGCCATTTGGCAAACAGTAAAAAATATCAGACTCCACCACACCAGAA TTTCGAAGATTTGGAGCGAAAATACTGGAAGAACCGCATCTATAATTCACCGATTTATGGTGCTGACATC AGTGGCTCCTTGTTTGATGAAAACACTAAACAATGGAATCTTGGGCACCTGGGAACAATTCAGGACCTGC TGGAAAAGGAATGTGGGGTTGTCATAGAAGGCGTCAATACACCCTACTTGTACTTTGGCATGTGGAAAAC CACGTTTGCTTGGCATACAGAGGACATGGACCTTTACAGCATCAACTACCTGCACCTTGGGGAGCCCAAA ACTTGGTATGTGGTGCCCCCAGAACATGGCCAGCGCCTGGAACGCCTGGCCAGGGAGCTCTTCCCAGGCA GTTCCCGGGGTTGTGGGGCCTTCCTGCGGCACAAGGTGGCCCTCATCTCGCCTACAGTTCTCAAGGAAAA TGGGATTCCCTTCAATCGCATAACTCAGGAGGCTGGAGAGTTCATGGTGACCTTTCCCTATGGCTACCAT GCTGGCTTCAACCATGGTTTCAACTGCGCAGAGGCCATCAATTTTGCCACTCCGCGATGGATTGATTATG GCAAAATGGCCTCCCAGTGTAGCTGTGGGGAGGCAAGGGTGACCTTTTCCATGGATGCCTTCGTGCGCAT CCTGCAACCTGAACGCTATGACCTGTGGAAACGTGGGCAAGACCGGGCAGTTGTGGACCACATGGAGCCC AGGGTACCAGCCAGCCAAGAGCTGAGCACCCAGAAGGAAGTCCAGTTACCCAGGAGAGCAGCGCTGGGCC TGAGACAACTCCCTTCCCACTGGGCCCGGCATTCCCCTTGGCCTATGGCTGCCCGCAGTGGGACACGGTG CCACACCCTTGTGTGCTCTTCACTCCCAGCCGATCTGCAGTTAGTGGCACTGCTACGCAGCCCCGGGCT GCTGCTGTCCACAGCTCTAAGAAGCCCAGCTCAACTCCATCATCCACCCCTGGTCCATCTGCACAGATTA TCCACCCGTCAAATGGCAGACGTGGTCGTGGTCGCCCTCCTCAGAAACTGAGAGCTCAGGAGCTGACCCT CCAGACTCCAGCCAAGAGGCCCCTCTTGGCGGGCACAACATGCACAGCTTCGGGCCCAGAACCTGAGCCC CTACCTGAGGATGGGGCTTTGATGGACAAGCCTGTACCACTGAGCCCAGGGCTCCAGCATCCTGTCAAGG CTTCTGGGTGCAGCTGGGCCCCTGTGCCCTAA
마우스	Kdm4d	서열번호: 2	ATGAAGACGAAGTCCACATGTGCTCAGAATCCAAATTGCAGCATAATGATATTTCGTCCAACCAAAGAAG AGTTTAATGATTTTGACAAATACATTGCTTACATGGAGTCCCAAGGGGCACACCGAGCTGGACTGGCCAA GGTCATCCCACCAAAAGAATGGAGGGCCAGGCAGTCTTATGACAATATCAGCAACATCTTAATAGCAACT CCCCTGCAGCAAGTGGTCTCTGGGCAGGCAGGGGTGTTCACCCAATACCATAAGAAGAAGAAAGGCATGA CAGTGGGGGAGTACCGTGAGCTGGCCAACAGCAAAAAGTACCAGACACCCGCCACACCTGGATTTTGAAGA TTTGGAGCGAAAATACTGGAAGAATCGCCTGTATGAGTCACCGATTTATGGTGCTGACGTCAGCGGCTCC CTGTTTGATGGGAAGACTCAACAGTGGAATGTGGGTCACCTGGGAACAATTCAAGACCTATTGGAACAGG AATGTGGCATAGTGATTGAGGGCGTCAACACGCCCTACCTGTACTTTGGCATGTGGAAGACCACCTTTGC GTGGCACACGGAGGACATGGACCTGTACAGTATCAACTACCTACACTTTGGGCAGCCCAAGACCTGGTAT GCTGTGCCCCCTGAGCATGGCAGGGGCCTGGAGCGCCTGGCCAGGGAACTCTTCCCTGGCAGCTCCCAGG GCTGCCAGGCCTTCCTGAGGCACAAGGTGGCGCTCATCTCGCCCACTGTGCTTAAGGAGAATGGCATCCC CTTTGGTCGCATCACCCAGGAGGCTGGGGAGTTCATGGTCACCTTTCCCTATGGCTACCACGCGGGCTTC AACCATGGCTTCAACTGCGCAGAGGCCATCAATTTTGCCACCCCAAGGTGGATTGACTATGGCAAGGTGG CATCTCAGTGCAGCTGTGGGGAGGCCAGGGTGAGCTTCTCCATGGACGCCTTTGTGAGGATCTTGCAGCC TGAGCGATATGAACTGTGGAAACGTGGCCAAGATCAGGCAGTTGTGGACCACACAGAGACTATGGTGTCT ACCAGTCAGGAGCTCACCACCCGGCGGGTGACCAAAGCACCAAGAAAAACTTGGGGCTTGAAGCGTCTCC GGCTTCGCCAGGTCTCACGATCTCTTCTGCCTATAGCCACGGTAAGTAACGTTCCTTGCAACATGCAGGT GTGCCACACCTCCAGGCAACCATCAGATGTGAAAGGTGATGATGTCCAGAAGTCTGACTCAGCCAGAGCC TCACCACATCCTCTGAGTCTGCCTTCTTCTGGTCACATGTCAACTAGAAGATGTAGTCTTGGTCGTCGTC CTTGTGAACTAGGAGCTCAGGAGTCCTCCAATGGAGCTCCAGTCAAGAGGCAACTTCCAGCAGGCAGAGA TGACACAAGCCCCAGTCCAGAGCTTCAGCCCCAGGCTGTGAGTGGAGACTTAATAGTCGACTCAGGACTT GTGAACCCTGGCCCACAGCATCTTATGACAGCTTCTGAAGGGGGATTGACCTCCGACCCCTAA
래트	Kdm4d	서열번호: 3	ATGAAGACTAAGTCCACCTGTGCTCAGAATCCAAATTGCAGCATAATGATATTTCGTCCA ACCAAAGAAGAGTTTAACGACTTTGACAAATACATCGCCTACATGGAGTCCCAAGGGGCA CACAGAGCTGGACTGGCCAAGGTCATCCCGCCAAAAGAATGGAGGGCCAGGCAGTCTTAT GACAATATCAGTAACATCTTAATAGCAACTCCCCTGCAGCAAGTAGTCTCCGGGCAGGCA GGTGTGTTCACTCAATACCATAAGAAGAAGAAAGCCATGACAGTTGGGCAGTACCGGCAC CTGGCCAACAGTAAAAAATACCAAACCCCACCACACCTGGATTTTGAAGATTTGGAGAGA AAATACTGGAAGAATCGCCTGTATGAGTCACCAATTTATGGTGCTGACGTCAGTGGCTCC CTGTTTGATGGGAAGACTCAACAGTGGAATGTGGGCCACCTGGGAACAATTCAAGACCTA TTGGAACAGGAATGCGGCATAGTGATTGAGGGCGTCAACACGCCCTACCTGTACTTTGGC ATGTGGAAGACCTCCTTTGCGTGGCACACGGAGGACATGGACCTGTACAGTATCAACTAC CTGCACTTTGGACAGCCCAAGACCTGGTATGCTGTACCCCCTGAGCATGGCAGGCGCCTG GAGCTCCTAGCCAAGGAACTCTTCCCAGGCAGCTCCCAGGGCTGCCAGGCCTTCCTGAGG CACAAGGTGGCGCTCATCTCACCCACTGTGCTCAAGGAGAATGGCATCCCCTTTGGTCGA ATCACCCAGGAGGCTGGGGAGTTCATGGTCACCTTTCCCTATGGCTACCACGCGGGCTTC AACCATGGCTTCAACTGTGCAGAAGCCATCAATTTCGCCACGCCGAGGTGGATTGACTAT GGCAAGGTGGCATCTCAGTGCAGCTGTGGGGAGGCCAGGGTGAGCTTCTCCATGGATGCC TTTGTGAGGATCCTGCAGCCTGAGCGATATGAGATGTGGAAACGAGGTCAAGATCAGGCA GTTGTGGACCACACAGAGGCTATGGGGCCTACCAGTCAGGAGCTCACCACCTGGCGGGTG ATCCAGGCACCAAGAAAAACTTGGGGCCTGAAGCATCTCCGGCTTCGCCAGGTTTCACGC

[0682]

			TGTCTTCTGCCTGTAGCCACTGACAGTAACATTGCCAACAACACCCAGATGTGCCACACC TCCAGGCAAGCAGCAGATTCGAAAGGTGATGAGGTCCAGGAGTCTGACCCAGCCATAGCC CCACCATATCCTCTGGGTCTATCTTCTCCTGGCCACATGTCAACTGGAAAACGTGGTCTT GGTCGTCGCCCTTGTGAACTAGGAGTTCAGGAGTCCACCAATGGAGCTCCAGTCAAGAGG CGACTTCCAGAAGGCAGAGATGACAGAAGTCCCAGCCCAGAGCTTCAGTCCCAGTCCGTG ACTGGAGACTTAATAGTCAACTCAGACCTTGTAAATCCTGGGCCACAGCATCCTGTGACA GCTTCTGAAGGGGGATTGACCTCTGACCCCTAA
토끼	Kdm4d	서열번호: 4	ATGAAGTCTAAGGCCCATCGTGCTCAGAATCCAAATTGCAGCATAATGGTATTTCATCCA ACCAAAGAAGAGTTTAGTGATTTTGATAACTATATTGCTTACATGGAATCTCAGGGTGCA CACCGGGGAGGCCTGGCCAAGGTCATCCCACCCAAGGAGTGGAGGGCCAGACAGACCTAT GATGACATCGATGACATCTTAATAACTCGCCCCCTCCAGCAGGTGGCCTATGGCGGGGCA GGTGTCTTTACTCAATTCCATAAAAAGAGGAGAGCCATGACCCTGAGACAGTATCGCCAG CTGGCCACCAGCACAAAATACCAGACCCCAGCGCACCTGACTTTCGAAGAGTTGGAGCAA AAATACTGGAAAAACCGTCTCTACGATGCCCCAATCTATGGTGCTGATATCAGCGGCTCT CTGTTTGATGAAAACACGGCACACTGGAACCTCAGGCGCCTGGGCACCATTCAGGACCTG TTGGAGCAGGAATGTGGTGTCGTCATCGAGGGGGTCAACACGCCCTACCTGTACTTTGGC ATGTGGAAGACCACGTTCGCCTGGCACACGGAGGACATGGACCTGTACAGCATCAACTAC CTGCACTTCGGGGAGCCCAAGACGTGGTACGGCGGTGCCCCCGGAGCACGGGCGGCGCCTG GAGCGCCTGGCCGGGCAGCTGTTCCCGGGCAGTTCCCGCAGCTGCCAGGCCTTCCTGCGG CACAAGGTGGCCCTCATCTCGCCCAGCGTCCTGCGGCAGAACGGCATCCCCTTCCGCCGC ATCACTCAGCAGGCTGGCGAGTTCATGGTGACCTTTCCTTACGGCTACCACGCGGGGTTC AACCACGGCTTCAACTGCGCCGAAGCCATCAATTTCGCCACCCCGCGCTGGATCGAGTAT GGCAAAGTGGCCTCCCAGTGCAGCTGCGGGGAGGCCAGGGTCACCTTTTCCATGGATGCC TTCGTTCGTATCCTGCAACCCGAGCGCTACGAACTGTGGAAGTGCGGCCAAGACCGGAAG GCCGTGGACCACACGGAGCCTACGGCACGCACCAGCCCAGAGCTGACCAGGTGGAAGCAG GATCGCAGGCTCTGGAGGGCAGCCCGAGGCTTGGCCCCCAAACTCGCTAGGTCCCTGGCT GCAGGTGATGGTACTAGCTGCAAGGCTCCCAAGCGCCTACGGGCTGCCAGGGAATCTACA GCACAGCCAGGGGGCGTTGCCCACAGTTCCCGGAAACCTCACGCAGCCCCGCGGACTTCC CTGGGTCCCTGTGCCCCAGAGGTCCTCTCAACTGTCACACGTGGCTGTCGGCGTCGCTCT AGGGAACTGGGGGTGCAGGAGCCAAGCCTCCAATCTCCAGCAAAGAGGCGCCTCTCAGTC AGAACAGGGCGCACAGCTGCGCGCTCCAAGCCTCAGTCCTCACCTGAGCGTGGTATCTTG ATGGTCAATCCTGCACCAAGCCTGGGGCCGCAGCTCCCCGCTTAG
돼지	Kdm4d	서열번호: 5	ATGACGTCCAGGCCCTGTGGGGTCCAGAACCCAGGCTGTGCCATTATGACCTTCTACCCA ACCCTGGAAGAATTTGAAGACTTCAGCCAATATATCGCTTACATGGAATCGCAAGGGGCA CACCACGCTGGCCTGGCCAAGGTAATTCCCCCCAAAGGATGGAAAGCCAGACAGACTTAT GAGGATATCAGTGACATCGTAATAGCTGCCCCTCTCCAGCAGGTAGCCTTTGGGGAGGCA GGTGTGTTTACTCAGTACCACAGAAAGAAGAGCCATGACTGTGAGCCAGTATCACCAC CTCGCACATACTGTAAAATATCAAGCTCCACCACACTTGGATTTTGAGGACCTGGAGCAA ACATACTGGAAAACGCGCCTGTACGGTTCCCCCATCTACGGCGCGGATGTCAGTGGCTCG TTGTTCGATGAGAACACGAAGCAGTGGAACCTGGGCCACCTGGGCACCATCCAGGACCTG CTGGAGCAGGAGTGCGGAGTGGCCATCGACGGGGTCAACAGCCCGTACCTGTACTTCGGC ATGTGGAAGACCGGCTTCGCCTGGCACACGGAGGACATGGACCTTTACAGCCTCAACTTC CTGCACTTCGGGGAGCCCAAGACGTGGTACGCGGTGCCCCCTGCGCATGGCCGGGCGCCTG GAACGCCTGGCCAGGGAGCTGTTCCCTGGCCCCGCGCGGGGCTGCGAGGCCTTCCTGAGA CACAAGGTGGCGCTCATCTCGCCCACGGTCCTCAAGGCCCAGGGCATCCCCTTTGGCCGC GTCACGCAGGAGGCGGGCGAGTTCATGGTGACGTTTCCCTATGGCTACCACTCGGGCTTC AACCACGGCTTCAACTGCGCCGAAGCCATCAATTTCGCCACCCCGCGCTGGGTCGATTAT GGCAAAGTGGCGTCGCAGTGCAGCTGCGGGGAGGCGCGGGTGGTGTTCTCCATGGACGCG TTCGTGCGCATCCTGCAACCCGAGCGCTATGAGCTGTGGAAACGGGGCCAGGATCGGGTG GCGCTGGAACACACGGAGCACCTGTCCTCGCCTGGCAGCCTGGAGTTGAGTGCCTGGAGG GAGGTCCGCGAGCCTGCGGGGGCTGAACTTGGCCTGGGGCACAGCCCACCCCACACTGCC CGGGGTCGCGCTCTGGGTGGCAGGCCGTGGGATCCGCCGCCGAAACTCTGTGTGTTCGGTG TCTCGGTGCCCCTCGCCTACCTGGGGTTCTTCCTCCGCTGCCCAGTTCCAGGTTGCAACT CTCTGCAGCTCCCATGAGCCAGGACCCACCCCGCCGCTGTCACCAGGCTCCTCTGCTCTG GGTCTCCAATCAACTGGCAGACGTGGTCCTGTTCGATGTCGTAGGTCTCGACCCCATCGT CGTCCTCGGGTACAGGAGACTTTGGAGCCAACAGTCCAGGCTCCAGCTAAGAGGCTCCTC TCAGTAGGTACAGTGGCCACAGCTGCAGACTTGGAAGCTCATGTCCTTTTGGCCAAGGAA CCCTTGATAGACAGCCCTGCC
소	Kdm4d	서열번호: 6	ATGGAAGCTATGAAGCCCAGTTGTGCTCAGAACCCAAGTTGTAGCATAATGATATTTCAT CCAACCAAAGAAGAGTTTACTGATTTTGATAAATACATTGCTTACATAGAATCGCAAGGG GCCCACCGAGCAGGCTTGGCTAAGATAGTTCCACCCAAGGAATGGAAAGCCAGACAGACC TACGACGATATCAATGACATCTTAATAACCGCTCCGCTCCAGCAGGTGGTCTCTGGGCGG GCAGGTGTGTTTACTCAATACCACAAAAAGAAGAAAGCCATGACCGTGGCAGAGTACCGC CACTTAGCAAATACTGAAAAATACCAGACTCCATTCTACTCCGATTTTGAGGAATTGGAG CGAAAATATTGGAAAACCCGCCTCTTTGAGTCCCAATATACGGCGCGGACATCAGTGGC TCTTTATTTGATGAAAACACGAAGCAGTGGAACCTGGGACGCCTGGGGACCATCCAGGAC CTGCTGGAGCAGGAGTGCGGGGTGGTCATCGAGGGCGTCAACACCCCTACCTGTACTTC

			GGCATGTGGAAGACCGCCTTCGCCTGGCACACGGAGGACATGGACCTTTATAGCATCAAC TTCCTGCACTTCGGGGAGCCCAAGACCTGGTACGCGGTGCCGCCCGAGCACGGCCGGCGC CTGGAACGCCTGGCCGGCGCGCTCTTCCCGGGCAGCTCGCGGAGCTGCGAGGCCTTCCTG CGCCACAAGGCGGCGCTCATCTCGCCCACGGTGCTCCGGGACAACGGCATCCCCTTCGGT CGGGTCACGCAGGAGGCGGGCGAGTTCATGGTGACCTTCCCCTACGGCTACCACTCGGGC TTCAACCACGGCTTCAACTGCGCCGAGGCCATCAATTTCGCCACCCGCGCTGGATCGAT TATGGCAAAGTGGCCTCGCAGTGCAGCTGCGGCGAGGCGCAGGTGGCCTTCTCCATGGAC GCCTTCGTGGCATCCTGCAGCCCGAGCGCTATGAGCTGTGGAAGCGCGGGCAGGACCGG GCGGTGGTGAACCACGCCGAGCCCGCGGCGCGGGCGGCCAGGAGCTGAGAGCCTGGAAG GAGGTGCAGACGCTGGGCCCCAAGTACTTCCCGCCTCGCCGCTCCGCCCGCCTGGGTCAG CCCGTGTCCTCAAGCGAGGGCACTGACCCCAGAGCCCCTGTGCGGGCCGTGTCCCTGCGA CCCTTGCCTGCCCGGGGTTCCTGCTCGGCTTCCCAGTTTGACGCTGTCGCCGGCAGCAGC TCACGGAAGCCCAGCCAGACCCCTCCGCTGTTGCCAGGTCCGTCGGTGGCGTCGTGCCTC CACCCAGTTGGCAGATGTGGTTCTCGTCGTCGCCCTCAGGAAAAGGCACTCAAGAGCTG ACTGCCCCCATGGGAGCTAAGAGGGGCCTTGCCTTAGACCGCAAGGCTCAGGACCCCAAG GCTCAACCCCTGTCTGCAGAGGGACGGATGGACAATCCTGCCCCAACGAGCCCTGGACTC TAG
마카크	Kdm4d	서열번호: 7	ATGGAAACTATGAAGTCTAAGGCCAACTATGGCCAGAATCCAAATTGTAACATAATGATA TTTCATCCAACCAAAGAAGAGTTTAATGATTTTGATAAATATATTGCTTACATGGAATCC CAAGGTGCACACAGAGCTGGCTTGGCTAAGATAGTTCCACCCAAAGAATGGAAAGCCAGA GAGACCTATGATAACATCAGTGAAATCTTAATAGCCACTCCCCTCCAACAGGTGGCCTCT GGGCGGGCAGGGGTGTTTACTCAATACCATAAAAAAAAGAAAGCCATGACCGTGGGGGAG TATCGCCACTTGGCAAACAGTAAAAAATATCAAACTCCACCACACCAGAATTTCGAAGAT TTGGAGCGAAAATACTGGAAGAACCGCATCTATAATTCACCAATTTATGGTGCTGACATC AGTGGCTCCTTGTTTGATGAAAACACTAAACAGTGGAATCTTGGGCACCTGGGAACAATT CAGGACCTGTTGGAAAAGGAATGTGGGGTTGTCATAGAAGGCGTTAACACACCCTACTTG TACTTTGGCATGTGGAAGACCACATTTGCTTGGCACACGGAGGACATGGACCTTTACAGC ATCAACTACCTGCACCTCGGGGAGCCCAAAACTTGGTATGTGGTGCCCCCAGAGCATGGC CAGCGCCTGGAACGCCTGGCCAGGGAGCTCTTCCCAGGCAGTTCCCGGGGCTGTGGGGCC TTCCTGCGGCACAAGGTGGCCCTCATCTCGCCTACAGTTCTCAAGGAAAATGGGATCCCC TTCAATCGCATAACTCAGGAGGCTGGAGAGTTCATGGTGACCTTTCCCTATGGCTACCAT GCTGGCTTCAACCATGGTTTCAACTGTGCAGAGGCCATCAATTTTGCCACTCCACGATGG ATTGATTATGGCAAAATGGCCTCCCAGTGTAGCTGTGGGGAGGCCAGGGTGACCTTTTCC ATGGACGCCTTCGTGGCATCCTGCAACCTGAGCGCTATGAGCTGTGGAAACGTGGGCAA GACCGGGCAGTTGTGGACCACATGGAGCCCAGGGTACCAGCCAGCCAAGAGCTGAGCACC CAGAAGGAGGTCCAGTTGCCCAGGAGAGCAGCGCTGGGCCTGAGACAACTCCCTCCTCAC TGGGCCCGGCATTCCCCTTGGCCTCTGGCTGCCCGCAGTGGGACGCGCTGCCACACCCTT GTGTGCTCTTCACTCCCACGCCGATCTGCAGTTAGTGGCACTGCTACGCAGCCCCGGGCT GCTGCCGTCCACAGCTCTAGGAAGCCCAGCTCAACTCCATCATCCACCCCTGGTCCATCT GCACAGATTATCCACCCGTCAAATGGCAGACGTGGACGTGGTGCGCGTCCTCAGAAACTG AGAGCTCAGGAGCTGACCCTCCAGACTCCAGCCAAGAGGCTCCTCTTAGCGGGCACAACA TGCACAGTTTCAGGCCCAGAACCTGAGCCCCTACCTGAGGGTGGGGCTTTGATGGACAAG CCTGTACCACTGAATCCAGGGCTCCAGCATCCTGTAAAGGCTTCTAGGTGCAGCTGGGCC CCTGTGCCCTAA
침팬치	Kdm4d	서열번호: 8	ATGGAAACTATGAAGTCTAAGGCCAACTGTGCCCAGAATCCAAATTGTAACATAATGATA TTTCATCCAACCAAAGAAGAGTTTAATGATTTTGATAAATATATTGCTTACATGGAATCC CAAGGTGCACACAGAGCTGGCTTGGCTAAGATAATTCCACCCAAAGAATGGAAAGCCAGA GAGACCTATGATAATATCAGTGAAATCTTAATAGCCACTCCCCTCCAGCAGGTGGCCTCT GGGCGGGCAGGGGTGTTTACTCAATACCATAAAAAAAAGAAAGCCATGACCGTGGGGGAG TATCGCCATTTGGCAAACAGTAAAAAATATCAGACTCCACCACACCAGAATTTCGAAGAT TTGGAGCGAAAATACTGGAAGAACCGCATCTATAATTCACCGATTTATGGTGCTGACATC AGTGGCTCCTTGTTTGATGAAAACACTAAACAATGGAATCTTGGGCACCTGGGAACAATT CAGGACCTGCTGGAAAAGGAATGTGGGGTTGTCATAGAAGGCGTCAATACACCCTACTTG TACTTTGGCATGTGGAAAACCACGTTTGCTTGGCATACAGAGGACATGGACCTTTACAGC ATCAACTACCTGCACCTTGGGGAGCCCAAAACTTGGTATGTGGTGCCCCCAGAACATGGC CAGCGCCTGGAACGCCTGGCCAGGGAGCTCTTCCCAGGCAGTTCCCGGGGTTGTGGGGCC TTCCTGCGGCACAAGGTGGCCCTCATCTCGCCTACAGTTCTCAAGGAAAATGGGATTCCC TTCAATCGCATAACTCAGGAGGCTGGAGAGTTCATGGTGACCTTTCCCTATGGCTACCAT GCTGGCTTCAACCATGGTTTCAACTGCGCAGAGGCCATCAATTTTGCCACTCCACGATGG ATTGATTATGGCAAAATGGCCTCCCAGTGTAGCTGTGGGGAGGCAAGGGTGACCTTTTCC ATGGATGCCTTCGTGGCATCCTGCAACCTGAACGCTATGACCTGTGGAAACGTGGGCAA GACCGGGCAGTTGTGGACCACATGGAGCCCAGAGTACCAGCCAGCCAAGAGCTGAGCACC CAGAAGGAAGTCCAGTTACCCAGGAGAGCAGCGCTGGGCCTGAGACAACTCCCTTCCCAC TGGGCCCGGCATTCCCCTTGGCCTATGGCTGCCCGCAGTGGGACACGGTGCCACACCCTT GTGTGCTCTTCACTCCCACGCCGATCTGCAGTTAGTGGCACTGCTACGCAGCCCCGGGCT GCTGCTGTCCACAGCTCTAAGAAGCCCAGCTCAACTCCATCATCCACCCCTGGTCCATCT GCACAGATTATCCACCCGTCAAATGTTAGACGTGGTCGTGGTCGCCCTCCTCAGAAACTG AGAGCTCAGGAGCTGACCCTCCAGACTCCAGCCAAGAGGCCCCTCTTGGCGGGCACAACA

			TGCACAGCTTCGGGTCCAGAACCTGAGCCCCTACCTGAGAATGGGGCTTTGATGGACAAG CCTGTACCACTGAGCCCAGGGCTCCAGCAGCCTGTCAAGGCTTCTGGGTGCAGCTGGGCC CCTGTGCCCTAA
인간	SUV39H1	서열번호: 9	CGCGAGGCCGGCTAGGCCCGAATGTCGTTAGCCGTGGGGAAAGATGGCGGAAAATTTAAAAGGCTGCAGC GTGTGTTGCAAGTCTTCTTGGAATCAGCTGCAGGACCTGTGCCGCCTGGCCAAGCTCTCCTGCCCTGCCC TCGGTATCTCTAAGAGGAACCTCTATGACTTTGAAGTCGAGTACCTGTGCGATTACAAGAAGATCCGCGA ACAGGAATATTACCTGGTGAAATGGCGTGGATATCCAGACTCAGAGAGCACCTGGGAGCCACGGCAGAAT CTCAAGTGTGTGCGTATCCTCAAGCAGTTCCACAAGGACTTAGAAAGGGAGCTGCTCCGGCGGCACCACC GGTCAAAGACCCCCGGCACCTGGACCCAAGCTTGGCCAACTACCTGGTGCAGAAGGCCAAGCAGAGGCG GGCGCTCCGTCGCTGGGAGCAGGAGCTCAATGCCAAGCGCAGCCATCTGGGACGCATCACTGTAGAGAAT GAGGTGGACCTGGACGGCCCTCCGCGGGCCTTCGTGTACATCAATGAGTACCGTGTTGGTGAGGGCATCA CCCTCAACCAGGTGGCTGTGGGCTGCGAGTGCCAGGACTGTCTGTGGGCACCCACTGGAGGCTGCTGCCC GGGGGGGTCACTGCACAAGTTTGCCTACAATGACCAGGGCCAGGTGCGGCTTCGAGCCGGGCTGCCCATC TACGAGTGCAACTCCGCTGCCGCTGCGGCTATGACTGCCCAAATCGTGTGGTACAGAAGGGTATCCGAT ATGACCTCTGCATCTTCCGCACGGATGATGGGCGTGGCTGGGGCGTCCGCACCCTGGAGAAGATTCGCAA GAACAGCTTCGTCATGGAGTACGTGGGAGAGATCATTACCTCAGAGGAGGCAGAGCGGCGGGGCCAGATC TACGACGTCAGGGCGCCACCTACCTCTTTGACCTGGACTACGTGGAGGACGTGTACACCGTGGATGCCG CCTACTATGGCAACATCTCCCACTTTGTCAACCACAGTTGTGACCCCAACCTGCAGGTGTACAACGTCTT CATAGACAACCTTGACGAGCGGCTGCCCCGCATCGCTTTCTTTGCCACAAGAACCATCCGGGCAGGCGAG GAGCTCACCTTTGATTACAACATGCAAGTGGACCCCGTGGACATGGAGAGCACCGCATGGACTCCAACT TTGGCCTGGCTGGGCTCCCTGGCTCCCCTAAGAAGCGGGTCGGTATTGAATGCAAGTGTGGGACTGAGTC CTGCCGCAAATACCTCTTCTAGCCCTTAGAAGTCTGAGGCCAGACTGACTGAGGGGGCCTGAAGCTACAT GCACCTCCCCCACTGCTGCCCTCCTGTCGAGAATGACTGCCAGGGCCTCGCCTGCCTCCACCTGCCCCCA CCTGCTCCTACCTGCTCTACGTTCAGGGCTGTGGCCGTGGTGAGGACCGACTCCAGGAGTCCCCTTTCCC TGTCCCAGCCCCATCTGTGGGTTGCACTTACAAACCCCCACCCACCTTCAGAAATAGTTTTTCAACATCA AGACTCTCTGTCGTTGGGATTCATGGCCTATTAAGGAGGTCCAAGGGGTGAGTCCCAACCCAGCCCCAGA ATATATTTGTTTTTGCACCTGCTTCTGCCTGGAGATTGAGGGGTCTGCTGCAGGCCTCCTCCCTGCTGCC CCAAAGGTATGGGGAAGCAACCCCAGAGCAGGCAGACATCAGAGGCCAGAGTGCCTAGCCCGACATGAAG CTGGTTCCCCAACCACAGAAACTTTGTACTAGTGAAAGAAAGGGGGTCCCTGGGCTACGGGCTGAGGCTG GTTTCTGCTCGTGCTTACAGTGCTGGGTAGTGTTGGCCCTAAGAGCTGTAGGGTCTCTTCTTCAGGGCTG CATATCTGAGAAGTGGATGCCCACATGCCACTGGAAGGGAAGTGGGTGTCCATGGGCCACTGAGCAGTGA GAGGAAGGCAGTGCAGAGCTGGCCAGCCCTGGAGGTAGGCTGGGACCAAGCTCTGCCTTCACAGTGCAGT GAAGGTACCTAGGGCTCTTGGGAGCTCTGCGGTTGCTAGGGGCCCTGACCTGGGGTGTCATGACCGCTGA CACCACTCAGAGCTGGAACCAAGATCTAGATAGTCCGTAGATAGCACTTAGGACAAGAATGTGCATTGAT GGGGTGGTGATGAGGTGCCAGGCACTGGGTAGAGCACCTGGTCCACGTGGATTGTCTCAGGGAAGCCTTG AAAACCACGGAGGTGGATGCCAGGAAAGGGCCCATGTGGCAGAAGGCAAAGTACAGGCCAAGAATTGGGG GTGGGGGAGATGGCTTCCCCACTATGGGATGACGAGGCGAGAGGGAAGCCCTTGCTGCCTGCCATTCCCA GACCCCAGCCCTTTGTGCTCACCCTGGTTCCACTGGTCTCAAAAGTCACCTGCCTACAAATGTACAAAAG GCGAAGGTTCTGATGGCTGCCTTGCTCCTTGCTCCCCCACCCCCTGTGAGGACTTCTCTAGGAAGTCCTT CCTGACTACCTGTGCCCAGAGTGCCCCTACATGAGACTGTATGCCCTGCTATCAGATGCCAGATCTATGT GTCTGTCTGTGTGTCCATCCCGCCGACCCCCCAGACTAACCTCCAGGCATGGACTGAATCTGGTTCTCCT CTTGTACACCCCTCAACCCTATGCAGCCTGGAGTGGGCATCAATAAAATGAACTGTCGACTGAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAA
인간	SUV39H2	서열번호:10	CGGGGCCGAGGCGGAGGAGGTGAGGCTGGAGCGCGGCCCCCTCGCCTTCCCTGTTCCCAGGCAAGCTCC CAAGGCCCGGGCGGCGGGGCCGTCCCGCGGGCCAGCCAGATGGCGACGTGGCGGTTCCCGCCCGCCGCGG ACCCCAACTCCGGGACGCACGCTGCGGACGCCTATCCTCCCCCAGGCCGCTGACCCGCCTCCCTGCCCGG CCGGCTCCCGCCGCGGAGGATATGGAATATTATCTTGTAAAATGGAAAGGATGGCCAGATTCTACAAATA CTTGGGAACCTTTGCAAAATCTGAAGTGCCCGTTACTGCTTCAGCAATTCTCTAATGACAAGCATAATTA TTTATCTCAGGTAAAGAAAGGCAAAGCAATAACTCCAAAAGACAATAACAAAACTTTGAAACCTGCCATT GCTGAGTACATTGTGAAGAAGGCTAAACAAAGGATAGCTCTGCAGAGATGGCAAGATGAACTCAACAGAA GAAAGAATCATAAAGGAATGATATTTGTTGAAAATACTGTTGATTTAGAGGGCCCACCTTCAGACTTCTA TTACATTAACGAATACAAACCAGCTCCTGGAATCAGCTTAGTCAATGAAGCTACCTTTGGTTGTTCATGC ACAGATTGCTTCTTTCAAAAATGTTGTCCTGCTGAAGCTGGAGTTCTTTTGGCTTATAATAAAAACCAAC AAATTAAAATCCCACCTGGTACTCCCATCTATGAATGCAACTCAAGGTGTCAGTGTGGTCCTGATTGTCC CAATAGGATTGTACAAAAAGGCACACAGTATTCGCTTTGCATCTTTCGAACTAGCAATGGACGTGGCTGG GGTGTAAAGACCCTTGTGAAGATTAAAAGAATGAGTTTTGTCATGGAATATGTTGGAGAGGTAATCACAA GTGAAGAAGCTGAAAGACGAGGACAGTTCTATGACAACAAGGGAATCACGTATCTCTTTGATCTGGACTA TGAGTCTGATGAATTCACAGTGGATGCGGCTCGATACGGCAATGTGTCTCATTTTGTGAATCACAGCTGT GACCCAAATCTTCAGGTGTTCAATGTTTTCATTGATAACCTCGATACTCGTCTTCCCCGAATAGCATTGT TTTCCACAAGAACCATAAATGCTGGAGAAGAGCTGACTTTTGATTATCAAATGAAAGGTTCTGGAGATAT ATCTTCAGATTCTATTGACCACAGCCCAGCCAAAAAGAGGGTCAGAACAGTATGTAAATGTGGAGCTGTG ACTTGCAGAGGTTACCTCAACTGAACTTTTTCAGGAAATAGAGCTGATGATTATAATATTTTTTTCCTAA TGTTAACATTTTTAAAAATACATATTTGGGACTCTTATTATCAAGGTTCTACCTATGTTAATTTACAATT CATGTTTCAAGACATTTGCCAAATGTATTACCGATGCCTCTGAAAAGGGGGTCACTGGGTCTCATAGACT GATATGAAGTCGACATATTTATAGTGCTTAGAGACCAAACTAATGGAAGGCAGACTATTTACAGCTTAGT ATATGTGTACTTAAGTCTATGTGAACAGAGAAATGCCTCCCGTAGTGTTTGAAAGCGTTAAGCTGATAAT GTAATTAACAACTGCTGAGAGATCAAAGATTCAACTTGCCATACACCTCAAATTCGGAGAAACAGTTAAT TTGGGCAAATCTACAGTTCTGTTTTTGCTACTCTATTGTCATTCCTGTTTAATACTCACTGTACTTGTAT

			TTGAGACAAATAGGTGATACTGAATTTTATACTGTTTTCTACTTTTCCATTAAAACATTGGCACCTCAAT GATAAAGAAATTTAAGGTATAAAATTAAATGTAAAAATTAATTTCAGCTTCATTTCGTATTTCGAAGCAA TCTAGACTGTTGTGATGAGTGTATGTCTGAACCTGTAATTCTTAAAAGACTTCTTAATCTTCTAGAAGAA AAATCTCCGAAGAGCTCTCTCTAGAAGTCCAAAATGGCTAGCCATTATGCTTCTTTGAAAGGACATGATA ATGGGACCAGGATGGTTTTTTGGAGTACCAAGCAAGGGGAATGGAGCACTTTAAGGGCGCCTGTTAGTAA CATGAATTGGAAATCTGTGTCGAGTACCTCTGATCTAAACGGTAAAACAAGCTGCCTGGAGAGCAGCTGT ACCTAACAATACTGTAATGTACATTAACATTACAGCCTCTCAATTTCAGGCAGGTGTAACAGTTCCTTTC CACCAGATTTAATATTTTTATACTTCCTGCAGGTTCTTCTTAAAAAGTAATCTATATTTTTGAACTGATA CTTGTTTTATACATAAATTTTTTTTAGATGTGATAAAGCTAAACTTGGCCAAAGTGTGTGCCTGAATTAT TAGACCTTTTTATTAGTCAACCTACGAAGACTAAAATAGAATATATTAGTTTTCAAGGGAGTGGGAGGCT TCCAACATAGTATTGAATCTCAGGAAAAACTATTCTTTCATGTCTGATTCTGAGATTTCTAATTGTGTTG TGAAAATGATAAATGCAGCAAATCTAGCTTTCAGTATTCCTAATTTTTACCTAAGCTCATTGCTCCAGGC TTTGATTACCTAAAATAAGCTTGGATAAAATTGAACCAACTTCAAGAATGCAGCACTTCTTAATCTTTAG CTCTTTCTTGGGAGAAGCTAGACTTTATTCATTATATTGCTATGACAACTTCACTCTTTCATAATATATA GGATAAATTGTTTACATGATTGGACCCTCAGATTCTGTTAACCAAAATTGCAGAATGGGGGGCCAGGCCT GTGTGGTGGCTCACACCTGTGATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGTAGGAGGATCACGTGAGGTCGGGA GTTCAAGACCAGCCTGGCCATCATGGTGAAACCCTGTCTCTACTGAAAATACAAAAATTAGCCGGGCGTG GTGGCACACGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAATTCAGGAGGCGG AGGTTGCAGTGAGCCAAGATCATACCACTGCACTGCAGCCTGAGTGACACAGTAAGACTGTCTCCAAAAA AAAAAAAAAAAA
마우스	Suv39h1	서열번호: 11	GTTGTTAGCTGTGGAGAAAGATGGCGGAAAATTTAAAAGGTTGCAGTGTGTGCTGTAAATCTTCTTGGAA TCAACTGCAGGACCTGTGCCGACTAGCCAAGCTTTCTTGTCCTGCCCTTGGTGTTTCTAAGAAGAATCTG TATGACTTTGAAGTTGAATACCTGTGTGATTATAAGAAGATCCGTGAGCAGGAGTATTACCTGGTTAAGT GGCGTGGGTATCCCGACTCAGAAAACACCTGGGAGCCACGGCAGAATCTAAAATGTATACGAGTTCTTAA GCAGTTCCACAAGGACTTAGAAAGAGAGCTTGTCCGACGACACCGCCGGTCAAAGCCACCCAGGCATCTG GACCCAAACCTAGCCAATTACCTGGTGCAGAAGGCCAAGCAGAGGCGGGCACTTCAGCGTTGGGAACAAG AGCTCAATGCCAAGCGCAGCCACCTGGGGCGGATCACCGTGGAGAATGAGGTAGACCTGGATGGCCCTCC AAGGTCCTTTGTCTATATCAATGAGTATCGAGTTGGTGAGGGCATCACCCTCAACCAGGTAGCTGTTGGC TGTGAGTGCCAGGACTGTCTGTTGGCACCCACTGGAGGCTGTTGCCCTGGAGCATCCCTGCACAAGTTTG CCTACAATGACCAAGGCCAGGTGCGACTGAAAGCTGGGCAGCCCATCTACGAGTGCAACTCCCGCTGTTG CTGTGGCTATGACTGCCCAAACCGTGTAGTCCAGAAAGGCATCCGCTACGATCTCTGCATCTTCCGCACT AATGATGGCCGAGGCTGGGGTGTCCGCACGCTGGAAAAGATCCGAAAAAATAGCTTTGTTATGGAGTATG TGGGAGAGATTATTACCTCAGAGGAGGCAGAGCGGAGGGGCCAGATCTACGACCGCCAGGGCGCCACCTA CCTCTTTGACCTGGACTACGTGGAAGACGTATATACCGTGGATGCCGCTTATTATGGCAACATCTCTCAT TTTGTCAACCATAGTTGTGATCCCAACCTGCAGGTGTACAACGTATTCATAGACAACCTTGATGAGCGAC TACCCCGCATCGCATTCTTTGCCACAAGAACCATCTGGGCGGGCGAGGAGCTCACCTTTGATTACAACAT GCAAGTGGACCCCGTGGACATGGAGAGTACCCGAATGGACTCCAACTTTGGCCTGGCTGGGCTCCCCGGC TCCCCCAAGAAACGAGTCCGTATTGAATGCAAATGTGGGACAACGGCTTGCCGAAAATACCTCTTCTAGC CTTGAGAAGTCTGAGGCCAGACTAACTGAAGGGGCCTGAAGCCACCTTCCTCTCCTACAGCTACCCTCTT GTCAAGGATGACCATCAATCAGAGCCTTGTCTGCCTCCACTTGTCCTCACCTACCCTAACCTGCTCTAGG GTCAGGGCTGTTGTGAGGACTAACTCCGGGTACCCTTTTCCTGTTCCTTTCCCCCTGTTCCAGGCCCATC AGGCATTGCACTTAAAACTCCCAGCCCCATTTTCAGAAACATATTTTTCACATCATGATTCCCCTAGAGT TGGAATTCATGTCATATAATGGAGGTCCAGATTGAGGAACTCGGCTGTAAAACAGATTCTTTGTTTTGAC AGCATCTCTGCAGCTCTATGTAGTAAGTCTGGTGTTTGGACCGTTAATCTTCCTGTCTCAGCCTTCCTCA TGATGAGATTGTAGGTGTAAACCCAGCTAAGATTTTTGTTCTAATTGCATCTGCTTCTGCTTGGAGCTTG TGTGTGAACCTGTTGCAGGTCCTCTTCATTACTCTAATGGTATGAGGAAGCAACCCCCTGGCAGACAGAC TTCAGAGCTGAGATACCAGCCTAACATCAAGCTGGATCAGCAACCCCAGAGCCTTTGTACTCAGGAAAGA AAAGGCAATCTTCAGAGCTGGGAGATAAGGCTGGTTCCGCTCTTTGTGCTTTTGATGCTGGCTGGTATTA ACCTTAAGACCTATAGGGTCTCAACAGTTGCAAGTCTGAAAAGTAGTTGCCCAAATGCCATCAGAATGGG GATGGAGTAAATACCTCTTTGAAAGCCCCACAGAAAGGTTAGAACTAAGTTTTACCATCAGGAAGTACAG TGCTGGACTTGCTGGAAACCCAGCCTTGGCATTTGATGGCCACTAGAACTACTAGAAGCTGGAACCAAGA TCTAGGTATTCTTTAGATAGCACTTAAGACAGTAATGTGCATCGACTAGAAGGCGATGTGATGCCAGGCA CTTGGTAGAGCACCTGGTCCATACAGATTGTCTCAGGGAAGCCTTGAAAACCACAAAGGTGGAGCCCAGA AAAAAGCCCATGTGACAGAAGGCAATGTCTAGGCCAAAAATACTTGTCAGCTCAAGTATTCACCTGGGTC ACTTGTCTCAGTTAACTGCCTAGAAATGTACAAAAGGCAAAGATTCTGATGGCTGCCTTGCCCCCTGCTT CCCCACCTCCAGGAAGCCTTTCCTGACTTCCTGTGCCCAGAGTGCCCTATGTGAAACTCTGTACCCTGCT ACCAGATGCCAGGTCTGTGTGTGTATTTTGTATATATGTTTCCTGCCCATACTTCCCATACTTCCCAGGC TGACCTTCAGGCATGGACTGAATCTGGTTCTCTGTACCCCTCAGCCCTCCCTAGCCTGGAGTGCACACCA ATAAACTGTGTTGTTGAGTTA
마우스	Suv39h2	서열번호:12	GAATGAAAGCTCCGCAAGATGGCGACGGCCAGGGCCAAGGCACGGGGCAGTGAGGCAGGAGCGCGGTGTC ACCGGGCTCCAGGTCCGCCCCGAGGCCCAAGGCCAGGCGAACGGCGAGACGCCGCCGGCGCGGAGACCCT GACGGCGCGACGCTCGCGGCCGTCTGCGGGCGAGAGGCGCGCCGGCTCCCAGCGAGCGTGGTCCGGAGCT CCGCGGGCCGCGGTCTTTGGCGACGAGTGTGCACGAGGTGCCTTATTCAAGGCCTGGTGTGTGCCTTGCC TAGTTTCACTTGATACTCTCCAGGAATTATGTAGAAAAGAAAAGCTCACATGTAAATCGATTGGAATCAC CAAAAGGAATCTAAACAATTATGAGGTGGAGTACTTGTGTGACTACAAGGTAGCAAAGGGTGTGGAATAT TATCTTGTAAAATGGAAAGGATGGCCAGATTCTACAAACACCTGGGAGCCCTTGAGAAACCTCAGGTGTC CACAGCTCCTGCGGCAGTTCTCTGATGACAAGAAGACTTACTTAGCTCAGGAAAGGAAATGCAAGGCTGT CAATTCAAAATCCTTGCAACCTGCAATTGCTGAGTATATTGTACAGAAAGCTAAGCAAAGAATAGCTCTG

			CAGAGATGGCAAGATTACCTCAACAGAAGAAAGAACCATAAGGGGATGATATTTGTTGAAAACACTGTTG ACTTGGAGGGCCCACCTTTAGACTTCTACTACATTAACGAGTACAGGCCAGCTCCCGGGATCAGCATAAA CAGTGAAGCCACCTTTGGATGTTCATGTACAGACTGCTTCTTTGACAAGTGTTGTCCTGCTGAAGCTGGA GTTGTGTTGGCTTATAATAAGAAGCAACAAATTAAAATCCAACCAGGCACTCCCATCTACGAATGCAACT CAAGGTGTCGATGTGGACCTGAATGTCCCAATAGGATTGTACAAAAAGGCACACAATATTCACTGTGCAT CTTTAAAACTAGCAATGGCTGTGGTTGGGGTGTAAAAACCCTTGTGAAGATTAAAAGAATGAGTTTTGTC ATGGAATATGTTGGAGAGGTGATCACAAGTGAAGAGGCCGAGAGACGGGGACAGTTCTATGACAACAAAG GGATCACCTACCTCTTTGACCTGGACTACGAGTCTGATGAGTTCACAGTGGATGCAGCTCGATATGGAAA CGTATCCCATTTTGTGAATCATAGTTGTGACCCAAATCTTCAGGTGTTTAGTGTTTTCATCGATAACCTT GATACTCGGCTGCCCAGGATAGCATTGTTCTCTACAAGAACCATAAACGCTGGAGAAGAGCTGACTTTTG ACTATCAAATGAAAGGTTCTGGAGAAGCATCTTCAGACTCCATTGACCACAGCCCTGCCAAAAAAAGGGT CAGAACCCAATGTAAATGTGGAGCCGAGACTTGCAGAGGTTACCTCAACTGA
래트	Suv39h1	서열번호: 13	GTCGTTAGCTGTGGAGAAAGATGGCGGAAAATTTAAAAGGTTGCAGTGTGTGCTGTAAATCTTCCTGGAA TCAGCTGCAGGATCTGTGCCGACTAGCCAAGCTTTCTTGTCCTGCCCTTGGTGTTTCTAAGAAGAATCTG TATGACTTTGAAGTTGAATACCTGTGTGATTATAAGAAGATCCGTGAGCAGGAGTATTACCTGGTTAAAT GGCGTGGGTATCCTGACTCAGAGAACACCTGGGAGCCACGGCAGAATCTCAAATGTGTGCGCATTCTTAA GCAGTTCCACAAGGACTTAGAAAGAGAGCTTGTCCGGCGACACCGCCGGTCAAAGCCACCCAGGCATCTG GACCCAAACTTAGCCAATTACCTGGTGCAGAAGGCCAAGCAGAGGCGGGCACTGCAGCGTTGGGAACAAG AGCTCAATGCCAAGCGCAGCCATCTGGGGCGGATCACTGTGGAGAATGAGGTAGACCTGGATGGCCCTCC AAGGTCCTTTGTCTATATCAATGAGTATCGAGTTGGTGAGGGCATCACCCTCAACCAGGTAGCTGTTGGC TGTGAGTGCCAGGACTGTCTGTTGGCACCCACTGGAGGCTGTTGCCCTGGAGCATCCCTGCACAAGTTTG CCTACAATGACCAAGGCCAGGTGCGACTGAAAGCTGGGCAGCCCATCTACGAGTGCAACTCTCGCTGTTG CTGTGGCTATGACTGCCCAAACCGTGTAGTCCAGAAAGGCATCCGCTACAACCTCTGCATCTTCCGCACT GATGATGGCCGAGGCTGGGGTGTCCGCACGCTGGAAAAGATCCGCAAAAATAGCTTTGTTATGGAGTATG TGGGAGAGATTATTACCTCAGAGGAGGCAGAGCGGAGGGGCCAGATCTACGACCGCCAGGGCGCCACCTA CCTCTTTGACCTGGACTACGTGGAGGACGTATATACCGTGGATGCCGCCTATTATGGCAACATCTCTCAC TTTGTCAACCATAGTTGTGATCCCAACCTGCAGGTGTACAACGTATTCATAGACAACCTTGATGAGCGAC TACCCCGCATCGCATTCTTTGCCACAAGAACCATCTGGGCGGGCGAGGAGCTCACCTTTGATTACAACAT GCAAGTGGACCCCGTGGACATGGAGAGTACCCGAATGGACTCCAACTTTGGCCTGGCAGGGCTCCCCGGC TCCCCCAAGAAACGGGTCCGTATTGAATGCAAATGTGGGACAACAGCTTGCCGAAAATACCTCTTCTAGC CCTGAGAAGTCTGAGGCCAGACTAACTGAAGGGGCCTGAAGCCACCTTCCTCTTCTCTACTGCTACCCTC TTGTCAAGAATGACCATCAATCAGAGCCTTGTCTGCCTCCACTTGTCCTCACCTGCCCCAACCTGCTCCA GGGTCAGGGCTGTTGTGAGGACTAACTCCCGGTACCCTTTCCCTGTTCCTTTCCCCTATCCAGGCCCATC AGGCATTGCACTTAAAACTCCCAGCCCCATTTTCAGAAGCATATTTTTCACATCAGGATTCCCTAGATTT GGAATTCATGTCAATGGAGGTCCAAAGACTGAAAAGACTGAGCAACTCAGCCCCAAAGCAGATTTTTTTC TCTGCAGCTCTATGTAGTTAGTTCAGGCTGGCGTTGGACCTTTAATCCTCCTGTCTCAGCTTTCCTCATG ATGAAATTATAGGTGTAAACCCAGCTAATTGTATCTGCTAATTTTCTAATTGTATCTGCTTCAGCTCTGA GCCCGAGTGACCTGTTGCAGGCCTCTTCACTGCTCTATGAGGAAGCAACCCCTAGGCAGACAGACATCAG AGCTGAGATACCAGCCCAACATCAAACTGGATCAGCAACCACGGGGCCTTTGTACTCATGAAGAAAAGG CAATCTCCAGAAAGGCTGATTCTGCTCATTGTGCTTTTAATGCTGGCTAATACTAACCTTAAGACGCATA GGGTTGCAAAGAGAGTTGCAGGTCTGAAAAGTAGTTGCCCAAATCCCATCAGAATGGGAATGAAGTAAAT ACCTCTTTGAAAGCCCCTCAGAAGGGTTAGAACTAAGTTTTACCATCAGGAAGTAGAGTGCTGGGCTTAC TGGAAACCCAGCCATGGCATTTGATGGCCACTAGAATTAGAAGCTGGAACCAAGATCTAGGTATTCTGTA GAAAGCACTTAAAAAGACAATAACGTGCATCGATTAGAAGGTGATGTGATGCCAGGCACTTGGTAGAGCA CCTGGTCCATATGGATTGTCTCAGGGAAGCCTTGAAAACCACAGAGGTGGAGCCCAGGAAAAAGCCCATG TGACAGAAGGCAATGTCTAGGCCTAAAATACTTGTCAGCTCCAAGTATTCACCTGGGTCCACTTGTCTCA AAGTTAACTGCCTAGAGTTGTACAAAAGGCAAAGATTCTGATGGCTGCCTTGTCCCCTGCTTCCCCACCT CCAGGAAGCTTTTCCTGAGTTCCTATACCCAGAGTACCCCTTTGTGAAACTCTGTACCCTGCTACCAGAT GCCAGGTCTGTGTGTGTATTTTGTATATATGTGTCCTGCCCACACTCCCCAGGCTGACCTTCAGGCATGG ACTGAATCTGGTTTTCTGTGTACCCTCCTCAGCCCTCTCTAGCCTGGAGTGCACACCAATAAACTTTGTT GTTGAATTAATAAGCTGGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
래트	Suv39h2	서열번호: 14	TGAATGAAAGCTCCGCAAGATGGCGGCGGCCAGGGCCAAGGCACGGAGCGGTGAGGCCAGAGCGCGGTGT CACCGGGCTCCAGGTCCGCCCCAGAGGCCCAAACCCAGGCGAACGACGAGACGCTGCCGGCGCGGACACCG TGACGGCGCGACGCTCGCGGTCGTCTGCGGGCGGGAGACGCGCCGGCTCCAACCGAGCGAGGTCCAGAGC TCCGCGGGCCGCGGTCTTTGGCGGCGAGTGTGCACGAGGTGCCTCATTCAAGGCCTGGTGTGTGCCTTGC CTAGTTTCACTTGATACTCTCCAGGAATTATGTAGAAAAGAAAAGCTCACATGTAAATCGATTGGAATCA CCAAAAGGAATCTAAACAATTATGAGGTGGAGTACTTGTGTGACTACAAGGTAGTAAAGGGTGTGGAATA TTATCTTGTAAAGTGGAAAGGATGGCCAGACTCTACAAACACCTGGGAGCCCTTGTGGAACCTCAGGTGC CCACAGCTCCTGCAGCAGTTCTCTGACGACAAGAATACTTACTTATCCCAGGGAAGGAAACGCAAGGCCA TCACTTCAAAAGACAATAACAAATCCTTGCAACCTGCAGTTGCTGAGTATATTGTACAGAAAGCTAGGCA AAGAATAGCTCTGCAGAGATGGCAAGATTACCTCAACAGAAGAAAGAACCACAAAGGGATGATATTTGTT GAAAATACTGTTGACTTAGAGGGCCCACCTTCAGACTTCTACTACATCAATGAATACAGGCCAGCTCCTG GGATCACCTTAAACAGTGAAGCTACCTTTGGGTGTTCGTGTACAAACTGCTTCTTTGAAAAGTGTTGTCC TGCTGAAGCTGGAGTTGTTTTGGCTTATAATAAGAACCGACAAATTAAAATCCAACCAGGCACTCCCATC TATGAATGCAACTCAAGGTGCCGATGTGGACCTGATTGTCCCAATAGGATTGTACAGAAAGGCACACAGT ATTCCCTGTGCATCTTTAGAACTAGCAATGGCTGTGGCTGGGGTGTAAAAACCCTTGTGAAGATTAAAAG GATGAGTTTTGTCATGGAATATGTTGGAGAGGTGATCACCAGTGAAGAGGCTGAGAGACGGGGACAGCTC TATGACAACAAAGGGATCACCTACCTTTTGATCTGGACTATGAGTCTGATGAGTTCACAGTGGATGCAG

			CTCGATATGGAAATGTGTCTCATTTTGTGAATCATAGTTGTGACCCAAATCTTCAGGTGTTTAGTGTTTT CATCGATAACCTTGATACTCGGCTTCCCAGGATAGCATTGTTCTCCACAAGAACCATAAAGGCTGGAGAA GAGCTGACTTTTGACTATCAAATGAAAGGTTCTGGAGAACTGTCTTCAGACTCTATTGACTACAGCCCTG CCAGAAAAAGGGTCAGAACCCAATGCAAATGTGGAGCTGAGACGTGCAGAGGTTACCTCAACTGAAATTT CAGGAAGTGGAGCTCACGTTGTTTGTTTTTTTGTTTTGTTTGTCTTCTAACAACTGAAAAAAGTATTTGG GACTCCTTTCTATTACCTATGTATTGTATTATATGATGTTAATGTACAATTCATGGCTCAAGATATATGC CAAGTATATTACTATTGATTCTAAAAAGGACTGCAAGGCCATGTAAACAAGATGGTGGTTACATGGGAAG TGAACTGTATAAATCACTTGCTTACTCGAGAGTCGAAGTAGACAGTCGTCCCTTTAGTTTTGGAAGTGAG TCGACCACAGCTATTATTGAGCCTTTTATCCTGCCTCAAACAGAGAACTCACTTTAGGCAAATGTATAAA TTTTATTTTTTTACTATATTGTTTCTGTTTAATACTCACTGATCTTGTATCAGAGACAAATAAGTGACAC TGAATTTTTTTACTGTATTTTCTACTTTTACATTAAAACATTGGCATCTTAATGATATATTTCAGGTGTA AAAATGTGAAAGATTTACTTTTAGCTTGATCTTACTTTGAGGCAATAGATACCATTACAAAGGTATCTA AACCTGAAATTCTTAAAAGATGTTTTTACTCCCACAGAAGAAAAGTCTCTGATCACCTTCTCGGAATTCT GTAGTGCTGGCCACTGTGTTTCTGTGAACAGACAGACAGACAGAACAGTGACTGAGGACGCACTGGAGTG TCAGGCAGGAAAGGAGTACAGCGTAAGCCACTCAGCATGTGTGAGCACGACAGCACCGTGTCTCTCTCTC TCTCCGGAACAGGAGAGTGAGATCCCTGAGGGGCACAGGTCCCCAATGGCAGTGTAATTCACATCACATA CTGTCATCTCAAGGCAGTTTTAATTCCTACCCACTAAATTTCAATACTTTTGTATTTTGTGCATGCCCTT GAAAAGCAAGCTCTATTTGCCCTGATGCTTGTTTTATACAAGAGTTTTTAGATAGGATGAAACTTAGCTT GGCCAAAAGTCGGCCTGATTGAACTTTTATCACCTCTGGGGTTAGATGGGGCTTCCCCTGTGTAGTAAAA CCCAATAAAGAAAAAAACTTTCATTTTTCTGGGTCTGGGAGTTCTAATCGTGGTGTCCAATGTGAAGACA GAAACAAAATGCAGCAAATAAACAAAGCTTTTGGTATCCTAAGAGTTTCCTAAGCTCACTGCTCCAGGCT TGAATAACTGTAATAAGCTTAAGTAAAATGAACTGAATTCAAGAACTCAGTACTTCCTTTAACTTTCTAA CTCTTAACCTGTTTTGAGAGAAGCTACAATGTTATTCAGAATATTGCCTTCGGGGGCTACTTGTTCACAG TCATGCCTGCTACCCAAAACTTTCAGAATGTGTCAAGAAAAAATATAATTTTAAATGGTATTTCTTTTGT TTTTCTTTGAGAATCTTAAAAGCATCACAGGTCTGTTTTTCTCACACATACCTCCACCCCCACTGCAACC CTCCATGACCAAGCTCACTTTGAATTATTCTCAGGTTAAAAAATTAAAAAAAAAATGTTTGTCTAGATAT TTGGTCTTATTTACTGTTTAGGTTAAAAGGAAACTTAGGAGGGCAAGAAGAAAATGACTTGTGTTTAGTA AACGTGTGGCTTTGTTTTGTCTTACTAATAGAAATTTAATGGCCCTAAGGTTCTGTGGGAGTGGGTGGGC CTTCAGACAGTATCTTGTAGCTCAGGTTGGCCTTGAATTTGCTGTGTACCTGAGTGCTTTCTTGAACTCT TCAGTCCTCCTGCCTCTCCCTCCCAGTGCTGGGGTTGTGGGCCTGTGCCACCATGCCCTTTGACCTTTAA ACGCACACCAATTTCACTCGTGTTCCACACATGGACTGCATTACTCTCTCTCAGCATTCCCCCATTACTG TCCTCCAGTTCCTCTTCTGCTTTCACCTCATGAGAGCTGTCCATACAGCGGTGTGTGTATTTCCTTGTTG CTGTGATCAAAGCGATCAATTCAGCTCTGCCTTGATTCCTCAAATCACATGTTCTAAGTATGTCGTGTCT TCATGACATACTCAGCTCTGGGAGGTGATCATGACAGGAACTTTCCAGCAGAGGCTAGAACTGTGGAGCA CAGCTCACTGGCTGGCTCCCTGGCTCCCAGGCTCCCCTCAGCTAGGCGTTCCTACACAGCCCACCCGCCC AGGAATGGTGTAATGGTACCTAATAAGCGAGACCCTGCCACATCAGTTAGCCATCAAGAAAATCCGGGCC AATGGGACAGAGACAGTTCCTCAGAGGAGGTTGTTTCCCCAGGTAACCCCAGACTGTCAAGTATAAGGTA CATGCAACCATTTTGCATTTGACTGACATCTCTTAAAGGCTGGCCCGCCCTTAGGATTCTGGGATGTATT GTGACATTCCTAGACGTTTTTAACCTTTGCTAATCTGTAACTCTTGAATGAAGTAGCCACTATAGTTAGT CCTGCCTGTTTTCCTGCTGTCTGTATGGAGCTTCCCTCACACAGCCTAGATAACTCTGAAGCCCTGCTGC TTGCACCTGGATGCTGGCTGTGAGCTTACTAGCTGTGTGAACTAACCTGTGTGCCTTCCTGCCTACCTCA AAGTGCGCTTTCACAGACTAAAGCTTTATGAAGTGTGTGTGTTTTTAAATCACAGAATAAACACATAT GT
소	Suv39h1	서열번호: 15	GGAATGTCGTTAGCCGTGGGGAAAGATGGCGGAAAGTTTAAAAGGCTGCAGTGTGTGTTGCAAATCTTCT TGGAATCAGCTACAGGACCTGTGCCGCCTGGCCAAGCTCTCCTGCCCTGCCCTTGGCATCTCCAAGAGGA ACCTCTATGACTTTGAAGTCGAGTACCTGTGCGATTACAAAAAGATCCGCGAACAGGAGTATTACCTGGT AAAATGGCGTGGGTACCCAGACTCCGAGAGCACTTGGGAACCACGGCAGAATCTCAAGTGTGTGCGCATT CTCAAGCAGTTCCACAAGGACTTGGAAAGGGAGCTGCTCCGGCGGCACCACCGGTCAAAGCCACCCCGGC ACCTGGACCCAAGCCTGGCCAACTACCTGGTGCAGAAGGCCAAGCAGAGGCGGGCACTCCGGCGCTGGGA GCAGGAGCTCAATGCCAAGCGCAGCCACCTGGGACGCATCACCGTGGAGAACGAAGTGGACCTGGATGGC CCCCCACGGGCCTTCGTGTACATCAACGAGTACCGTGTTGGTGAGGGCATCACCCTCAACCAGGTGGCTG TGGGCTGCGAGTGCCAGGACTGTCTGTGGGCACCGGCCGGAGGCTGCTGCCCTGGGGCGTCACTGCACAA GTTTGCCTACAATGACCAGGGCCAGGTGCGCCTGCGAGCCGGGCTGCCCATCTATGAGTGCAACTCCGC TGCCGCTGTGGCTATGACTGCCCCAACCGCGTGGTACAGAAGGGCATCCGCTACGACCTCTGCATCTTCC GCACGGATGATGGACGCGGCTGGGGTGTCCGCACGCTGGAGAAGATCCGCAAGAACAGTTTCGTCATGGA GTACGTGGGCGAGATCATTACCTCAGAGGAGGCAGAGCGGCGGGGCCAGATCTATGACGCCAGGGTGCC ACCTACCTCTTCGACCTGGACTACGTGGAGGATGTGTACACTGTGGACGCCGCCTATTACGGCAACATCT CTCACTTTGTCAACCACAGTTGTGACCCCAACCTCCAGGTGTACAACGTCTTCATAGACAACCTTGATGA GCGGCTGCCCCGCATTGCTTTCTTTGCCACCAGAACCATCCGGGCAGGCGAGGAGCTCACCTTTGATTAC AACATGCAAGTGGACCCGGTGGACATGGAGAGCACACGCATGGACTCCAACTTTGGCCTGGCTGGGCTCC CCGGCTCTCCCAAGAAGCGGGTCCGCATTGAATGCAAGTGTGGGACTGAATCCTGCCGCAAATACCTCTT CTAGCCCCGTGAAGTCTGAGGCCAGACTGACCAAGGGAGGCTAAAAAGCTGCCCACCCCACCTACCCACT GCTGCCCTCCTGTTGAAGAACAACTGCCAGGGCCTCCTGCCTGCCTCCGCCTGCCCCCTGCTCAGGGCTG CATGGCCATGGGGAAGATGGACTCCAGGAGTCCCCTCTCCCTGTCCCAGCCCCATCCATGGGTTGCACTT ACAAACCCCTGCCCACCTTCAGAAGTGATTTTTCAACACCAGGACTTTCTGCAGTTGGGATTCATGGCCT AGCAAGGCGGTCTGAGGGCTGAGCCTCAGCCCATACCCAAAGTAGAAACGTTTGTTTTTGCACCTGCTTC TGGCCAGAGCTTGAAGGGTCTGCTGCAGGCCCTCTCCCTGCTGCCCCAAGGGTGTGAGGAAGCATTCCCA GGACAGGCTGACCCCAGAGCCCAGGATTCCCAGTCCATTCACCTCCCCTGCCACAGAAATGTGCTAGTGA AGTGGGGGGGGGGGCGGTCTTCAAGGGCTGCAGGCTGTGGCTGGGTCCTGCTCATGCTTGCATGCTGGCT

			GGTGTTGGCCTGACAGCTGTAGGGTCTCCTTTTCAAAGCTGTGCCTCTGAGAAGCAGACACCCACATGCC ACTAGAGGAGAGTGGATGCCCACAGCCTGTTGGCCAGTGAGAGGCAGCCCAGACTTTGCCTGTCCTTAAG GTGGGCAACCCACTCCAGTATTCTTGCCTGAAAAATCCCATGGACAGAGGAACCTGGTAGGCTACAGTCC ATGGGGTCACAAAGAGTTGGACATGACTAAGCGACTTCACTTCACTAAGGTGGGCTGGGACTCAGCTCTG CCTTTGCAACAGCTAGAAGGTGCCCAGGGCTCTTGAGCTCAAAGGATGCTGGGAGCCCTTAACCTGCAGC GTGAGGACTGCTGATAGCACCCAGAGCTGGGCCCAAGACCTAGCTAGGCTGTAGACAGCACTTAGACAAA ATGTGCATGGATGGGATACTGAGGAGGTGCCAGGCACTGGGCTGAGCACCTGGTCCACGTGGATCGTCTC AGGGAAGCCTTGAAAACTATGGAGGTGGATCCCAGGAAAGGGCCCGTGTGGCAGAAGGCAAAGCACAGAC CAAGAATGGGGTGGGGCTGGCTTACCCACCAGGGTGTGGCGAGGTGAGGGGAAGCCCCTGTCGCCTCCTA GCCCTCCAGCCCTTTGCACTCACCTTGGGTCCTCTGGTCTCAGTTCCCTGCCCACAAATGTATAAAAGGT GAAGGCGCTGATGGCTGCCTCATCCCTTGCTTCCCCTGTGAGGTCTTCTCTAGGAAGCCTTCCATCCCTG ACTACCTGTGCGCAGTGTCCCCACGTGAGACTGTGTGCCCTGCCAGCAGATGCCAGATCTGTGTGTCTGT TTTGTGTGTCTGTGCTCCCCACCCCCAGACTGACCTTCAGGCTTGTACTGAATCTGATTCTCCTCTTGT ATATCCCCTTGGCCCTCCCAGTCTGGGAATGGGCGTCAATAAAACAGGTTATTGACTGAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AGAAAAAAAAAAAAAAA
소	Suv39h2	서열번호: 16	GAGTTTGAATGAAAGCTCCTCAAGATGGCGGCGGCCGGGGCCGAGGCGCCAGGAGCTTGGTGTGTGCCTT GCCTAGTTTCACTTGATACTCTTCAGGAATTATGTAGAAAAGAAAAGCTCACATGTAAATCGATTGGAAT CACCAAAAGGAATCTAAACAATTATGAGGTGGAATACTTGTGTGACTACAAGGTAGTAAAGGATATGGAA TATTATCTTGTAAAATGGAAAGGATGGCCAGATTCTACAAATACTTGGGAACCTTTGCAAAATCTCAAGT GCCCATTACTACTTCAGCAGTTCTTTAATGACAAGCATAATTATTTATCTCAGGTAAAGAAAGGCAAAGC AATAACTCTAAAAGAAAATCACAGAGCCTTGAAACCTGCTGTTGCTGAATACATTGTAAAGAAGGCTAAA CAAAGGATAGCCCTGCAGAGATGGCAGGATGAACTCAACAGAAGGAAGACTCACAAAGGAATGATTTTTG TTGAAAATACTGTGGACTTAGAGGGGCCCCCTTCAGACTTCTACTACATTAATGAATACAAACCAGCTCC TGGAATCAGCTTAGTAAATGAAGCTACCTTTGGTTGTTCATGCACAGATTGCTTCTTTGAAAAATGTTGT CCTGCTGAAGCTGGAGTTCTTTTGGCTTATAATAAAAATCAACAAATTAAAATCCCACCTGGTACCCCCA TTTATGAGTGCAACTCAAGATGTCAATGTGGACCCGACTGTCCCAACAGGATCGTACAAAAAGGCACACA GTATTCACTTTGCATCTTTCGAACTAGCAATGGCTGTGGCTGGGGTGTAAAAACCCTTGTGAAGATTAAA AGAATGAGTTTTGTCATGGAATATGTTGGAGAGGTGATCACCAGTGAGGAAGCTGAGAGACGTGGCCAGT TATATGACAACAAAGGAATCACGTATCTCTTTGATCTGGACTATGAATCTGATGAATTCACAGTGGATGC AGCTCGATATGGAAATGTGTCTCATTTTGTGAATCACAGTTGTGACCCAAACCTTCAGGTGTTCAATGTT TTCATTGATAACCTCGATACCCGTCTTCCCCGAATAGCATTATTTTCCACGAGAACTATCAATGCTGGAG AAGAGCTCACTTTTGATTATCAAATGAAAGGTTCTGGAGATGTATCTTCAGATTCTATTGACCACAGCCC AGCCAAAAAGAGGGCCAGAACTGTGTGCAAATGTGGAGCTGTGACTTGCAGAGGTTACCTCAACTGAATT TTCAGGAAATAGAACTTATGACGATTATAGTGTTTTTTCTAATGTTAACATTTTAAAAGTATTTTGGACT CTTTTCATATTATCAAGATTATACACTACGTTGATTTACAATTTACCTTTCAGACTATTGACCAAATGCG TTACTGATCCTTTTGAAGAGAGGAACGTGGGGTCACATAGACTAATTCTACATATACATATTCAGTGGT TAGATACCAAACATGAAAGGAAAACTGTTTGCAAATCAACAACTATATACTTAACAGGAAGTCTATGTGA ATATAGAGAAATGCCTCCTTCAGTGTTTAAGTGTTAAACTGATGATGTAACAGTTGCTAAGATTGAACAT TCAATTTGCCATATACCTTGAATTTAGAATTGGACAAATACACAAGTTCTATTTTTGTTATTGTCATTCC TGTTTACCTACTTAACAACTCTTTGTACTTGTATTTGAGACAAATAGGTGATACTGAATTATACTCTATT TTCTACTTTCATTAAAACATTGGTATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAA
인간	SETDB1 (cDNA)	서열번호: 45	1 ggcactaaag gtttgcttcc gggcgtttct tttgcttccc cttccctctt tcacgcttcc 61 tcccctcccc ctcctccctt atcccttcgc tttcgctctt ttccgtcgag gccgacccct 121 gagttgtgag tctggggtct ggttggtgaa aaagagcccc tgaagctgga agacgggaga 181 ggacaaaagc atgtcttccc ttcctgggtg cattggtttg gatgcagcaa cagctacagt 241 ggagtctgaa gagattgcag agctgcaaca ggcagtggtt gaggaactgg gtatctctat 301 ggaggaactt cggcatttca tcgatgagga actggagaag atggattgtg tacagcaacg 361 caagaagcag ctagcagagt tagagacatg ggtaatacag aaagaatctg aggtggctca 421 cgttgaccaa ctctttgatg atgcatccag ggcagtgact aattgtgagt ctttggtgaa 481 ggacttctac tccaagctgg gactacaata ccgggacagt agctctgagg acgaatcttc 541 ccggcctaca gaaataattg agattcctga tgaagatgat gatgtcctca gtattgattc 601 aggtgatgct gggagcagaa ctccaaaaga ccagaagctc cgtgaagcta tggctgcctt 661 aagaaagtca gctcaagatg ttcagaagtt catggatgct gtcaacaaga agagcagttc 721 ccaggatctg cataaaggaa ccttgagtca gatgtctgga gaactaagca aagatggtga 781 cctgatagtc agcatgcgaa ttctgggcaa gaagagaact aagacttggc acaaaggcac 841 ccttattgcc atccagacag ttgggccagg gaagaaatac aaggtgaaat ttgacaacaa 901 aggaaagagt ctactgtcgg ggaaccatat tgcctatgat taccaccctc ctgctgacaa 961 gctgtatgtg ggcagtcggg tggtcgccaa atacaaagat gggaatcagg tctggctcta 1021 tgctggcatt gtagctgaga caccaaacgt caaaaacaag ctcaggtttc tcatttttct 1081 tgatgatggc tatgcttcct atgtcacaca gtcggaactg tatcccattt gccggccact 1141 gaaaaagact tgggaggaca tagaagacat ctcctgccgt gacttcatag aggagtatgt 1201 cactgcctac cccaaccgcc ccatggtact gctcaagagt ggccagctta tcaagactga 1261 gtgggaaggc acgtggtgga agtccgagtt tgaggaggtg gatggcagcc tagtcaggat 1321 cctcttcctg gatgacaaaa gatgtgagtg gatctatcga ggctctacac ggctggagcc 1381 catgttcagc atgaaaacat cctcagcctc tgcactggag aagaagcaag gacagctcag 1441 gacacgtcca aatatgggtg ctgtgaggag caaaggccct gttgtccagt acacacagga 1501 tctgaccggt actggaaccc agttcaagcc agtggaaccc ccacagccta cagctccacc 1561 tgccccacct ttcccacctg ctccacctct atcccccaaa gcaggtgaca gtgacttgga 1621 aagccagctt gcccagtcac ggaagcaggt agccaaaaag agcacgtcct ttcgaccagg 1681 atctgtgggc tctggtcatt cctcccctac atctcctgca ctcagtgaaa atgtctctgg

			1741 tgggaaacct gggatcaacc agacatatag atcaccttta ggctccacag cctctgcccc 1801 agcaccctca gcactcccgg ccctccagc acccccagtc ttccatggca tgctggagcg 1861 ggccccagca gagccctcct accgtgctcc catggagaag cttttctact tacctcatgt 1921 ctgcagctat acctgtctgt ctcgagtcag acctatgagg aatgagcagt accggggcaa 1981 gaaccctctg ctggtcccgt tactatatga cttccggcgg atgacagccc ggcgtcgagt 2041 taaccgcaag atgggctttc atgttatcta taagacacct tgtggtctct gccttcggac 2101 aatgcaggag atagaacgct acctttttcga gactggctgt gacttcctct tcctggagat 2161 gttctgtttg gatccatatg ttcttgtgga ccgaaagttt cagccctata agccttttta 2221 ctatattttg gacatcactt atgggaagga agatgttccc ctatcctgtg tcaatgagat 2281 tgacacaacc cctccacccc aggtggccta cagcaaggaa cgtatcccgg gcaagggtgt 2341 tttcattaac acaggccctg aatttctggt tggctgtgac tgcaaggatg ggtgtcggga 2401 caagtccaag tgtgcctgcc atcaactaac tatccaggct acagcctgta ccccaggagg 2461 ccaaatcaac cctaactctg gctaccagta caagagacta gaagagtgtc tacccacagg 2521 ggtatatgag tgtaacaaac gctgcaaatg tgacccaaac atgtgcacaa accggttggt 2581 gcaacatgga ctacaagttc ggctacagct attcaagaca cagaacaagg gctggggtat 2641 ccgctgcttg gatgacattg ccaaaggctc ttttgtttgt atttatgcag gcaaaatcct 2701 gacagatgac tttgcagaca aggagggtct ggaaatgggt gatgagtact ttgcaaatct 2761 ggaccatatc gagagcgtgg agaacttcaa agaaggatat gagagtgatg ccccctgttc 2821 ctctgacagc agtggtgtag acttgaagga ccaggaagat ggcaacagcg gtacagagga 2881 ccctgaagag tccaatgatg atagctcaga tgataacttc tgtaaggatg aggacttcag 2941 caccagttca gtgtggcgga gctatgctac ccggaggcag acccggggcc agaaagagaa 3001 cggactctct gagacaactt ccaaggactc ccacccccca gatcttggac ccccacatat 3061 tcctgttcct ccctcaatcc ctgtaggtgg ctgcaatcca ccttcctccg aagagacacc 3121 caagaacaag gtggcctcat ggttgagctg caatagtgtc agtgaaggtg gttttgctga 3181 ctctgatagc cattcatcct tcaagactaa tgaaggtggg gagggccggg ctgggggaag 3241 ccgaatggag gctgagaagg cctccacctc aggactaggc atcaaggatg agggagacat 3301 caaacaggcc aagaaagagg acactgacga ccgaaacaag atgtcagtag ttactgaaag 3361 ctctcgaaat tacggttaca atccttctcc tgtgaagcct gaaggacttc gccgcccacc 3421 tagtaagact agtatgcatc aaagccgaag actcatggct tctgctcagt ccaaccctga 3481 tgatgtcctg acactgtcca gcagcacaga aagtgagggg gaaagtggga ccagccgaaa 3541 gcccactgct ggtcagactt cggctacagc ggttgacagt gatgatatcc agaccatatc 3601 ctctggctct gaaggggatg actttgagga caagaagaac atgactggtc caatgaagcg 3661 tcaagtggca gtaaaatcaa cccgaggctt tgctcttaaa tcaacccatg ggattgcaat 3721 taaatcaacc aacatggcct ctgtggacaa gggggagagc gcacctgttc gtaagaacac 3781 acgccaattc tatgatggcg aggagtcttg ctacatcatt gatgccaagc ttgaaggcaa 3841 cctgggccgc tacctcaacc acagttgcag ccccaacctg tttgtccaga atgtcttcgt 3901 ggatacccat gatcttcgct tcccctgggt ggccttcttt gccagcaaaa gaatccgggc 3961 tgggacagaa cttacttggg actacaacta cgaggtgggc agtgtggaag gcaaggagct 4021 actctgttgc tgtggggcca ttgaatgcag aggacgtctt ctttagagga cagccttctt 4081 cccaaccctt cttgaactgt cgtttcctca ggaactgggt cttcctgatt gttgaaccct 4141 gacccgaagt ctctgggcta gctactcccc ccagctccta gttgatagaa atgggggttc 4201 tggaccagat gatcccttcc aatgtggtgc tagcaggcag gatcccttct ccacctccaa 4261 aggccctaaa gggtggggag agatcaccac tctaacctcg gcctgacatc cctcccatcc 4321 catatttgtc caagtgttcc tgcttctaac agactttgtt cttagaatgg agcctgtgta 4381 tctactatct ccagtttgta ttatttcttg aaagtctttt aacaatatga taaaactaag 4441 attgtgaaa
인간	진정염색질 히스톤-리신 N-메틸트랜스퍼라제 1 (EHMT1) (cDNA)	서열번호: 46	1 gcgcgggagg ggcggggcca cgctgcgggc ccgggccatg gccgccgccg atgccgaggc 61 agttccggcg agggggggagc ctcagcagga ttgctgtgtg aaaaccgagc tgctgggaga 121 agagacacct atggctgccg atgaaggctc agcagagaaa caggcaggag aggcccacat 181 ggctgcggac ggtgagacca atgggtcttg tgaaaacagc gatgccagca gtcatgcaaa 241 tgctgcaaag cacactcagg acagcgcaag ggtcaacccc caggatggca ccaacacact 301 aactcggata gcggaaaatg gggtttcaga aagagactca gaagcggcga agcaaaacca 361 cgtcactgcc gacgactttg tgcagacttc tgtcatcggc agcaacggat acatcttaaa 421 taagccggcc ctacaggcac agcccttgag gactaccagc actctggcct cttcgctgcc 481 tggccatgct gcaaaaaccc ttcctggagg ggctggcaaa ggcaggactc caagcgcttt 541 tccccagacg ccagccgccc caccagccac ccttggggag gggagtgctg acacagagga 601 caggaagctc ccggcccctg gcgccgacgt caaggtccac agggcacgca agaccatgcc 661 gaagtccgtc gtgggcctgc atgcagccag taaagatccc agagaagttc gagaagctag 721 agatcataag gaaccaaaag aggagatcaa caaaaacatt tctgactttg gacgacagca 781 gcttttaccc cccttcccat cccttcatca gtcgctacct cagaaccagt gctacatggc 841 caccacaaaa tcacagacag cttgcttgcc ttttgttta gcagctgcag tatctcggaa 901 gaaaaaacga agaatgggaa cctatagcct ggttcctaag aaaaagacca aagtattaaa 961 acagaggacg gtgattgaga tgtttaagag cataactcat tccactgtgg gttccaaggg 1021 ggagaaggac ctgggcgcca gcagcctgca cgtgaatggg gagagcctgg agatggactc 1081 ggatgaggac gactcagagg agctcgagga ggacgacggc catggtgcag agcaggcggc 1141 cgcgttcccc acagaggaca gcaggacttc caaggagagc atgtcggagg ctgatcgcgc 1201 ccagaagatg gacggggagt ccgaggagga gcaggagtcc gtggacaccg gggaggagga 1261 ggaaggcggt gacgagtctg acctgagttc ggaatccagc attaagaaga aatttctcaa 1321 gaggaaagga aagaccgaca gtccctggat caagccagcc aggaaaagga ggcggagaag 1381 tagaaagaag cccagcggtg ccctcggttc tgagtcgtat aagtcatctg caggaagcgc 1441 tgagcagacg gcaccaggag acagcacagg gtacatggaa gtttctctgg actccctgga 1501 tctccgagtc aaaggaattc tgtcttcaca agcagaaggg ttggccaacg gtccagatgt 1561 gctggagaca gacggcctcc aggaagtgcc tctctgcagc tgccggatgg aaacaccgaa 1621 gagtcgagag atcaccacac tggccaacaa ccagtgcatg gctacagaga gcgtggacca 1681 tgaattgggc cggtgcacaa acagcgtggt caagtatgag ctgatgcgcc cctccaacaa 1741 ggccccgctc ctcgtgctgt gtgaagacca ccggggccgc atggtgaagc accagtgctg 1801 tcctggctgt ggctactttct gcacagcggg taattttatg gagtgtcagc ccgagagcag 1861 catctctcac cgtttccaca aagactgtgc ctctcgagtc aataacgcca gctattgtcc 1921 ccactgtggg gaggagagct ccaaggccaa agaggtgacg atagctaaag cagacaccac 1981 ctcgaccgtg acaccagtcc ccgggcagga gaagggctcg gccctggagg gcagggccga 2041 caccacaacg ggcagtgctg ccgggccacc actctcggag gacgacaagc tgcagggtgc

			2101 agcctcccac gtgcccgagg gctttgatcc aacgggacct gctgggcttg ggaggccaac 2161 tcccggcctt tcccagggac cagggaagga aaccttggag agcgctctca tcgccctcga 2221 ctcggaaaaa cccaagaagc ttcgcttcca cccaaagcag ctgtacttct ccgccaggca 2281 aggggagctt cagaaggtgc tcctcatgct ggtggacgga attgacccca acttcaaaat 2341 ggagcaccag aataagcgct ctccactgca cgccgcggca gaggctggac acgtggacat 2401 ctgccacatg ctggttcagg cgggcgctaa tattgacacc tgctcagaag accagaggac 2461 cccgttgatg gaagcagccg aaaacaacca tctggaagca gtgaagtacc tcatcaaggc 2521 tggggccctg gtggatccca aggacgcaga gggctctacg tgtttgcacc tggctgccaa 2581 gaaaggccac tacgaagtgg tccagtacct gctttcaaat ggacagatgg acgtcaactg 2641 tcaggatgac ggaggctgga cacccatgat ctgggccaca gagtacaagc acgtggacct 2701 cgtgaagctg ctgctgtcca agggctctga catcaacatc cgagacaacg aggagaacat 2761 ttgcctgcac tgggcggcgt tctccggctg cgtggacata gccgagatcc tgctggctgc 2821 caagtgcgac ctccacgccg tgaacatcca cggagactcg ccactgcaca ttgccgcccg 2881 ggagaaccgc tacgactgtg tcgtcctctt tctttctcgg gattcagatg tcaccttaaa 2941 gaacaaggaa ggagagacgc ccctgcagtg tgcgagcctc aactctcagg tgtggagcgc 3001 tctgcagatg agcaaggctc tgcaggactc ggccccgac aggcccagcc ccgtggagag 3061 gatagtgagc agggacatcg ctcgaggcta cgagcgcatc cccatccct gtgtcaacgc 3121 cgtggacagc gagccatgcc ccagcaacta caagtacgtc tctcagaact gcgtgacgtc 3181 ccccatgaac atcgacagaa atatcactca tctgcagtac tgcgtgtgca tcgacgactg 3241 ctcctccagc aactgcatgt gcggccagct cagcatgcgc tgctggtacg acaaggatgg 3301 ccggctcctg ccagagttca acatggcgga gcctcccttg atcttcgaat gcaaccacgc 3361 gtgctcctgc tggaggaact gccgaaatcg cgtcgtacag aatggtctca gggcaaggct 3421 gcagctctac cggacgcggg acatgggctg gggcgtgcgg tccctgcagg acatcccacc 3481 aggcacctttgtctgcgagt atgttgggga gctgatttca gactcagaag ccgacgttcg 3541 agaggaagat tcttacctct ttgatctcga caataaggac ggggaggttt actgcatcga 3601 cgcgcggttc tacgggaacg tcagccggtt catcaaccac cactgcgagc ccaacctggt 3661 gcccgtgcgc gtgttcatgg cccaccagga cctgcggttc ccccggatcg ccttcttcag 3721 cacccgcctg atcgaggccg gcgagcagct cgggtttgac tatggagagc gcttctggga 3781 catcaaaggc aagctcttca gctgccgctg cggctccccc aagtgccggc actcgagcgc 3841 ggccctggcc cagcgtcagg ccagcgcggc ccaggaggcc caggaggacg gcttgcccga 3901 caccagctcc gcggctgccg ccgacccccc atgagacgcc gccggccagc ggggcgctcg 3961 ggagccaggg accgccgcgt cgccgattag aggacgagga ggagagattc cgcacgcaac 4021 cgaaagggtc cttcggggct gcgccgccgg cttcctggag gggtcggagg tgaggctgca 4081 gcccctgcgg gcgggtgtgg atgcctccca gccaccttcc cagacctgcg gcctcaccgc 4141 gggcccagtg cccaggctgg agcgcacact ttggtccgcg cgccagagac gctgggagtc 4201 cgcactggca tcaccttctg agtttctgat gctgatttgt cgttgcgaag tttctcgttt 4261 cttcctctga cctccgaggt ccccgctgca ccacggggtt gctctgttct cctgtccggc 4321 ccagactctt ctgtgtggcg ccgccgaagc caccgttagc gcgagctgct ccgttcgccc 4381 tgcccacggc ctgcgtggct ggggccgagt cccaggggcc gcacggaggg cacagtctcc 4441 tgtcaggctc ggagaggtca ggagaccgac cccaccacta actttggaga aaatgtgggt 4501 ttgcttttta aaggaatcct atatctagtc ctatatatca aacctctaac tgacgtttct 4561 tttcgaggaa gtggcttggt gggtgcagcc cccgccggtt ccgttgacgc tggcaccttc 4621 tgttgatttt ttaagccaca tgctatgatg aataaactga tttatttttct accattactg 4681 aacattagga caaacacaaa ataaaaaaca aaacacagac aacggtgctg attctggtgt 4741 ggtttctact caccacgtga aataaactat caactgtata aagagaacaa agtgatttta 4801 gaataaaatg caggaaaaac ttttttaaag atgttagtct tgtagcgtga ataaatttgc 4861 catcaccttt tgtgtggtgg cctggcaggt catatacttt tttttggcat atacctttt 4921 aaagactgta attagtgcag taacagtggg gtttttttttg tgcaactctt ctaaaaacat 4981 tcataatgca gtcatgttta ttttttttctg ttaaaatgtt tttgacagtt ttaagagcag 5041 tcttttggct ctgaccattt cttgttctgt ttccaatgaa atcaataaaa aaaaagaagt 5101 actttaaaaa aaaaaaaaaa aaa
인간	ZNF 도메인을 가진, PR 도메인 함유 2 (PRDM2), (cDNA)	서열번호: 47	1 gtaaaagtga cattctaaat gttcctcact ctgcgaggct tatttttag ggactttgct 61 ataattctga aagacttagt tttacagtac atctgaaagt aggagttttc agaagtatgg 121 ctcttgggat aaatttagat tcttaattgt gaagctctgt taccacttgt tagaaggcag 181 gtcagctcac ctgcttgggg aggtaaatat atgaatgcac tctcgagtaa tttaatggag 241 ccctacctca atgtacagaa tgacagtatc acagatcaag aatggagtac gagtgatttt 301 cggctatggt gggggtaggt aggtcacttg tcccctgttg tctcttacta tttgtaaagt 361 gaagactatg attagtcttt ttgatcggga tggtttgaga tgaataaaga ataggcaggc 421 aatttggata ctttaggctt ttcaagaaca ttagtaacat tttttcttag atatttctcc 481 taatacaatg agtgttgtga aataacatgg cagttattgt tgagagaaaa gccttcccag 541 ttatgtattg agtccttagg cgttttgacc ttccctccac tcttacagaa cttggtggaa 601 ggggccacta tgttttctac ctccttccgt gcctttcaca aagccacatc ctgcaccgtc 661 tacccttctc tgtggatatt tttccgcttg gcaatttcct ttcctgaggc acccacttgg 721 gacatctgaa tctccatctc catgttgatg gcccgtttgt gcttggacgt gttcttccac 781 ttgagactga gggttcatgt aatcaaagaa gtttctttgt tgtgtgtatc tttacagaac 841 acaacaggaa ttgaaaatga atcagaacac tactgagcct gtggcggcca ccgagaccct 901 ggctgaggta cccgaacatg tgctgcgagg acttccggag gaagtgaggc tttttccttc 961 tgctgttgac aagacccgga ttggtgtctg ggccactaaa ccaattttaa aaggcaaaaa 1021 atttgggcca tttgttggtg ataagaaaaa aagatctcag gttaagaata atgtatacat 1081 gtgggaggtg tattacccaa atttgggatg gatgtgcatt gatgccactg atccagagaa 1141 gggaaactgg ctgcgatatg tgaattgggc ttgctcagga gaagagcaaa atttattccc 1201 actggaaatc aacagagcca tttactataa aactttaaag ccaatcgcgc cgggcgagga 1261 gctcctggtc tggtacaatg gggaagacaa ccctgagata gcagctgcga ttgaggaaga 1321 gcgagccagc gcccggagca agcggagctc ccccaagagc cggaaaggga agaaaaaatc 1381 ccaggaaaat aaaaacaaag gaaacaaaat ccaagacata caactgaaga caagtgagcc 1441 agatttcacc tctgcaaata tgagagattc tgcagaaggt cctaaagaag acgaagagaa 1501 gccttcagcc tcagcacttg agcagccggc caccctccag gaggtggcca gtcaggaggt 1561 gcctccagaa ctagcaaccc ctgcccctgc ctgggagcca cagccagaac cagacgagcg 1621 attagaagcg gcagcttgtg aggtgaatga tttgggggaa gaggaggagg aggaagagga 1681 ggaggatgaa gaagaagaag aagatgatga tgatgatgag ttggaagacg agggggaaga 1741 agaagccagc atgccaaatg aaaattctgt gaaagagcca gaaatacggt gtgatgagaa

			1801 gccagaagat ttattagagg aaccaaaaac aacttcagaa gaaactcttg aagactgctc 1861 agaggtaaca cctgccatgc aaatccccag aactaaagaa gaggccaatg gtgatgtatt 1921 tgaaacgttt atgtttccgt gtcaacattg tgaaaggaag tttacaacca aacaggggct 1981 tgagcgtcac atgcatatcc atatatccac cgtcaatcat gctttcaaat gcaagtactg 2041 tgggaaagcc tttggcacac agattaaccg gcggcgacat gagcggcgcc atgaagcagg 2101 gttaaagcgg aaacccagcc aaacactaca gccgtcagag gatctggctg atggcaaagc 2161 atctggagaa aacgttgctt caaaagatga ttcgagtcct cccagtcttg ggccagactg 2221 tctgatcatg aattcagaga aggcttccca agacacaata aattcttctg tcgtagaaga 2281 gaatggggaa gttaaagaac ttcatccgtg caaatattgt aaaaaggttt ttggaactca 2341 tactaatatg agacggcatc agcgtagagt tcacgaacgt catctgattc ccaaaggtgt 2401 acggcgaaaa ggaggccttg aagagcccca gcctccagca gaacaggccc aggccaccca 2461 gaacgtgtat gtaccaagca cagagccgga ggaggaaggg gaagcagatg atgtgtacat 2521 catggacatt tctagcaata tctctgaaaa cttaaattac tatattgatg gtaaaattca 2581 aactaataac aacactagta actgtgatgt gattgagatg gagtctgctt cggcagattt 2641 gtatggtata aattgtctgc tcactccagt tacagtggaa attactcaaa atataaagac 2701 cacacaggtc cctgtaacag aagatcttcc taaagagcct ttgggcagca caaatagtga 2761 ggccaagaag cggagaactg cgagcccacc tgcactgccc aaaattaagg ccgaaacaga 2821 ctctgacccc atggtcccct cttgctcttt aagtcttcct cttagcatat caacaacaga 2881 ggcagtgtct ttccacaaag agaaaagtgt ttatttgtca tcaaagctca aacaacttct 2941 tcaaacccaa gataaactaa ctcctgcagg gatttcagca actgaaatag ctaaattagg 3001 tcctgtttgt gtgtctgctc ctgcatcaat gttgcctgtg acctcaagta ggtttaagag 3061 gcggaccagc tctcctccca gttctccaca gcacagtcct gcccttcgag actttggaaa 3121 gccaagtgat gggaaagcag catggaccga tgccgggctg acttccaaaa aatccaaatt 3181 agaaagtcac agcgactcac cagcatggag tttgtctggg agagatgaga gagaaactgt 3241 gagccctcca tgctttgatg aatataaaat gtctaaagag tggacagcta gttctgcttt 3301 tagcagtgtg tgcaaccagc agccactgga tttatccagc ggtgtcaaac agaaggctga 3361 gggtacaggc aagactccag tccagtggga atctgtctta gatctcagtg tgcataaaaa 3421 gcattgtagt gactctgaag gcaaggaatt caaagaaagt cattcagtgc agcctacgtg 3481 tagtgctgta aagaaaagga aaccaaccac ctgcatgctg cagaaggttc ttctcaatga 3541 atataatggc atcgatttac ctgtagaaaa ccctgcagat gggaccagga gcccaagtcc 3601 ttgtaaatcc ctagaagctc agccagatcc tgacctcggt ccgggctctg gtttccctgc 3661 ccctactgtt gagtccacac ctgatgtttg tccttcatca cctgccctgc agacaccctc 3721 cctttcatcc ggtcagctgc ctcctctctt gatccccaca gatccctctt cccctccacc 3781 ctgtcccccg gtattaactg ttgccactcc gcccctccc ctccttccta ccgtacctct 3841 tccagccccc tcttccagtg catctccaca cccatgcccc tctccactct caaatgccac 3901 cgcacagtcc ccacttccaa ttctgtcccc aacagtgtcc ccctctccct ctcccattcc 3961 tcccgtggag cccctgatgt ctgccgcctc acccgggcct ccaacacttt cttcttcctc 4021 ctcttcatct tcctcctcct cttcgttttc ttcttcatct tcctcctctt ctcctctctc 4081 acctcctctc tccgcaatat catctgttgt ttcctctggt gataatctgg aggcttctct 4141 ccccatgata tctttcaaac aggaggaatt agagaatgaa ggtctgaaac ccagggaaga 4201 gccccagtct gctgctgaac aggatgttgt tgttcaggaa acattcaaca aaaactttgt 4261 ttgcaacgtc tgtgaatcac cttttctttc cattaaagat ctaaccaaac atttatctat 4321 tcatgctgaa gaatggccct tcaaatgtga attttgtgtg cagcttttta aggataaaac 4381 ggacttgtca gaacatcgct ttttgcttca tggagttggg aatatctttg tgtgttctgt 4441 ttgtaaaaaa gaatttgctt ttttgtgcaa tttgcagcag caccagcgag atctccaccc 4501 agataaggtg tgcacacatc acgagtttga aagcgggact ctgaggcccc agaactttac 4561 agatcccagc aaggcccatg tagagcatat gcagagcttg ccagaagatc ctttagaaac 4621 ttctaaagaa gaagaggagt taaatgattc ctctgaagag ctttacacga ctataaaaat 4681 aatggcttct ggaataaaga caaaagatcc agatgttcga ttgggcctca atcagcatta 4741 cccaagcttt aaaccacctc catttcagta ccatcaccgt aaccccatgg ggattggtgt 4801 gacagccaca aatttcacta cacacaatat tccacagact ttcactaccg ccattcgctg 4861 cacaaagtgt ggaaaaggtg tcgacaatat gccggagttg cacaaacata tcctggcttg 4921 tgcttctgca agtgacaaga agaggtacac gcctaagaaa aacccagtac cattaaaaca 4981 aactgtgcaa cccaaaaatg gcgtggtggt tttagataac tctgggaaaa atgccttccg 5041 acgaatggga cagcccaaaa ggcttaactt tagtgttgag ctcagcaaaa tgtcgtcgaa 5101 taagctcaaa ttaaatgcat tgaagaaaaa aaatcagcta gtacagaaag caattcttca 5161 gaaaaacaaa tctgcaaagc agaaggccga cttgaaaaat gcttgtgagt catcctctca 5221 catctgccct tactgtaatc gagagttcac ttacattgga agcctgaata aacacgccgc 5281 cttcagctgt cccaaaaaac ccctttctcc tcccaaaaaa aaagtttctc attcatctaa 5341 gaaaggtgga cactcatcac ctgcaagtag tgacaaaaac agtaacagca accaccgcag 5401 acggacagcg gatgcggaga ttaaaatgca aagcatgcag actccgttgg gcaagaccag 5461 agcccgcagc tcaggcccca cccaagtccc acttccctcc tcatccttca ggtccaagca 5521 gaacgtcaag tttgcagctt cggtgaaatc caaaaaacca agctcctcct ctttaaggaa 5581 ctccagcccg ataagaatgg ccaaaataac tcatgttgag gggaaaaaac ctaaagctgt 5641 ggccaagaat cattctgctc agctttccag caaaacatca cggagcctgc acgtgagggt 5701 acagaaaagc aaagctgttt tacaaagcaa atccaccttg gcgagtaaga aaagaacaga 5761 ccggttcaat ataaaatcta gagagcggag tgggggcca gtcacccgga gccttcagct 5821 ggcagctgct gctgacttga gtgagaacaa gagagaggac ggcagcgcca agcaggagct 5881 gaaggacttc agctacagcc tccgcttggc gtcccgatgc tctccaccag cggccccgta 5941 catcaccagg cagtatagga aggtcaaagc tccagctgca gcccagttcc agggaccatt 6001 cttcaaagag tagacactct ggctgctccc tgacagcacc tgaagtgacc tggaatcagt 6061 gaagccaaag ggactggcag tctgccctgc agggagtacc gacctatccc agttgtgtga 6121 ggctgcgaga gaaagggagt gcatgtgcgc gcgtgcatgt gtgcgtgcgt gtgtgttcac 6181 gtgttctcgt gcgggcgcgt gagtggtctt caaacgaggg tcccgatccc cggggcggca 6241 ggaaggggcc cgactccacg ctgtcctttg ggatgatact tggatgcagc tcttgggacc 6301 gtgttctgca gcccagcctt cctgttgggg tggggcctct cctactatgc aatttttcaa 6361 gagctccttg accctgcttt ttgcttcttg agttgtcttt tgccattatg gggactttgg 6421 tttgacccag gggtcagcct taggaaggcc ttcaggagga ggccgagttc cccttcagta 6481 ccacccctct ctccccacct tccctctccc ggcaacatct ctgggaatca acagcatatt 6541 gacacgttgg agccgagcct gaacatgccc ctcggcccca gcacatggaa aacccccttc 6601 cttgcctaag gtgtctgagt ttctggctct tgaggcattt ccagacttga aattctcatc

			6661 agtccattgc tcttgagtct ttgcagagaa cctcagatca ggtgcacctg ggagaaagac 6721 tttgtcccca cttacagatc tatctcctcc cttgggaagg gcagggaatg gggacggtgt 6781 atggagggga gggatctcct gcgcccttca ttgccacact tggtgggacc atgaacatct 6841 ttagtgtctg agcttctcaa attagctgca ataggaaaaa aacaaattgg gaaatgaaaa 6901 aaaaatggga agattaaaaa gcacaggggg aagaagaaga gatttcggag gccatcctgc 6961 cagggcgcga cggggctgac tcctgctctc tggaggacgg tcagtccatg tctcggagaa 7021 acgggtgagc tgagcttggc gtttggaccc agttcagtga ggttcttggg ttttgtgcct 7081 ttggggcaga ccccaggcaa ggatgtctga gaccacttgg gcgctgtttt ctcagctcca 7141 atttcaagag tgagctatca aacccagagc ggaaggaggg agctctgatg agcacggttt 7201 gtcacacgat aaagggattt ttttttcag ggctactacg gttgatcttg caactctgta 7261 aatatgtatg tagacacttt taaaagcacg tatttatgtc cctgactgta aatgctccat 7321 ttttaaagtt ttataacttg tgttatttaa tgagtcagtc aatcggctgc agtatgggat 7381 ctgataagga tctaggagaa gggtctcatg cggaccctca catgggcaga aaaatggtgg 7441 tcattggccg acatcacagt tttcctgttt cccacccagc taaaaaccgt tgtttgcttt 7501 aaattttcat aaactggaat cctttcaccc gctcctacag ctaaccctca caagcatgaa 7561 gtgctgtggc tgttccttat cctaatgatg cgcttttgtc ccgtaaatgt taacactcat 7621 gaagcatacc ccggcctctc agttcttgag ggcctcccca ccgcagcagc aaggaaagct 7681 cacgaacccc aaacctggca agtcacctgc agcccatggt gagctctggg aagtgtggtt 7741 gaggccttgg ggtcactcct tttttgcatg tgcaaatgtg ctggtcaccc ttcaacgctc 7801 ccagacggtc aggaaaactg ttccaatcat gaaaaggggg gatgattttg taaaagtggc 7861 atttcctggt cagtggtggt cttcaagacg acagctctgt atctgccatg tgaagagaat 7921 taacaataaa agtgtgaaga gcgattgtga ggaacaaaaa aaaaaaaaaa
인간	KDM4A), mRNA	서열번호: 49	1 acggctgcgc agatgccgac tttagaggag gcggagtttc ggccttcgcc tgctggaaaa 61 gcagtaggat cggccagtgg cgacagcagg agctgagcct aagccctggc ggggctttgg 121 gctgtagatt cctgtctgac taaagggacc tcaaaaagga gggaaaatgg cttctgagtc 181 tgaaactctg aatcccagtg ctaggataat gacctttta ccaactatgg aagagttccg 241 aaacttcagt agatacattg cctacattga atcccaagga gctcatcggg cagggctagc 301 caaggttgtt cctccaaaag agtggaagcc acgagcatcc tatgatgaca ttgatgattt 361 ggtcattcct gccccattc aacagctggt gacggggcag tctggcctct ttactcagta 421 caacatacag aagaaagcca tgactgttcg agagttccgc aagatagcca atagcgataa 481 gtactgtacc ccacgctata gtgagtttga agagctcgag cggaaatact ggaaaaatct 541 tacattcaat cctccaatct atggtgcaga tgtgaatggt accctctatg aaaagcatgt 601 tgatgagtgg aatattggcc ggctgagaac aatcctggac ttggtggaaa aggagagtgg 661 gatcaccatt gagggtgtga acaccccata cctgtacttt ggcatgtgga agacatcctt 721 tgcttggcac actgaagaca tggacctcta cagcatcaac tacctgcact ttggagaacc 781 aaagtcctgg tactctgttc cacctgagca tggaaagcgg ttggaacgcc tcgccaaagg 841 ctttttccca ggaagtgctc aaagctgtga ggcatttctc cgccacaaga tgaccctgat 901 ttccccgtta atgctgaaga aatatggaat tccctttgac aaggtgactc aagaggctgg 961 agagtttatg atcactttcc cttatggtta ccatgccggc tttaaccatg gttttaactg 1021 tgcggagtct accaattttg ctacccgtcg gtggattgag tacggcaagc aagctgtgct 1081 gtgctcctgt agaaaggaca tggtgaagat ctccatggat gtgtttgtga gaaagttcca 1141 gccagaaagg tacaaacttt ggaaagctgg gaaggacaac acagttattg accatactct 1201 gcccacgcca gaagcagctg agtttcttaa ggagagtgaa ctgcctccaa gagctggcaa 1261 cgaggaggag tgcccagagg aggacatgga aggggtggag gatggagagg aaggagacct 1321 gaagacaagc ctggccaagc accgaatagg gacaaagagg caccgagttt gtcttgaaat 1381 accacaggag gtgagtcaga gtgagctctt ccccaaggag gatctgagtt ctgagcagta 1441 tgagatgacg gagtgcccgg cagccctcgc ccctgtgagg cccacccata gctctgtgcg 1501 gcaagttgag gatggtctta ccttcccaga ttattctgac tccactgaag tcaaatttga 1561 agagcttaaa aatgtcaaac tagaagagga ggatgaggag gaagaacaag cagcagctgc 1621 cttggatctt tctgtgaatc ctgcgtctgt agggggacgc cttgtcttct caggctccaa 1681 aaagaaatca tcttctagcc tgggctctgg ctcttcacgg gattctatct cttctgattc 1741 agaaactagt gagcctctct cctgccgagc ccaagggcaa acgggagttc tcactgtgca 1801 cagttatgcc aaaggggatg gcagggtcac tgtgggagag ccatgcacga ggaagaaagg 1861 aagcgccgct agaagtttca gtgagcggga gctggcagag gttgcagatg aatacatgtt 1921 ttccctagaa gagaataaga agtccaaggg acgccgtcag cctttaagca agctcccccg 1981 ccatcaccca cttgtgctgc aggagtgtgt cagtgatgat gagacatctg aacagctgac 2041 ccctgaggaa gaggctgagg agacagaggc ctgggccaag cctctgagcc aactgtggca 2101 gaaccgacct ccaaactttg aggctgagaa ggaattcaat gagaccatgg cccaacaggc 2161 ccctcactgc gctgtctgta tgatcttcca gacttatcat caggttgaat ttggaggctt 2221 taatcagaac tgtggaaatg cttcagattt agccccccag aagcagagga ccaagccatt 2281 gattccagaa atgtgcttca cttcgactgg ctgcagcacg gacatcaacc tttctactcc 2341 ttatcttgag gaggatggca ccagcatact cgtttcctgc aagaagtgca gcgtccgggt 2401 ccatgccagt tgctatgggg tccccctgc aaaggcttct gaagactgga tgtgttctcg 2461 gtgttcagcc aatgccctag aggaggactg ctgtttatgc tcattacgag gaggggccct 2521 gcagagagca aatgatgaca ggtgggtcca cgtttcatgt gctgtggcaa ttctggaagc 2581 aaggtttgtc aacattgcag aaagaagtcc ggtggatgtg agcaaaatcc ccctgccccg 2641 cttcaaactg aaatgtatct tctgtaagaa gcggaggaaa agaactgctg gctgctgtgt 2701 gcagtgttct cacggccgct gcccaactgc cttccatgtg agctgcgccc aggctgccgg 2761 tgtgatgatg cagcctgacg actggccttt tgtggtcttc attacctgct ttcggcacaa 2821 gattcctaat ttggagcgtg ccaaggggcc cttgcaaagc atcactgcag gccagaaagt 2881 cattagcaag cataagaacg ggcgcttcta ccagtgtgaa gtggtcaggc tcaccaccga 2941 gaccttctat gaagtcaact ttgatgatgg ctccttcagc gacaatcttt atcctgagga 3001 catagtgagc caggactgtc tccagtttgg tcctcctgct gaaggggaag tggtccaagt 3061 gagatggaca gacggccaag tctatggagc caagtttgtg gcctcccacc ctatccaaat 3121 gtaccaggtg gagtttgagg atggctcaca acttgtggtt aagagagatg atgtatacac 3181 actggatgaa gagcttccca agagagtcaa atctagactg tcagtagcct cagacatgcg 3241 cttcaatgag attttcacag agaaagaggt taagcaagaa aagaaacggc aacgagttat 3301 caactcaaga taccgggaag attatattga gcctgcacta taccgggcca tcatggagta 3361 ggtgcttcca gggtccaagg gattctcagc catccaggca agagcactct gggttccaca 3421 gcacagcaga catggaacgc tgaagtctct gaaagtgaag ttgtaaaaag aaaaggaatg 3481 aaataaccga cccatcatct tctcacccac cctcattgca ttccgctgta gtgaaaggac

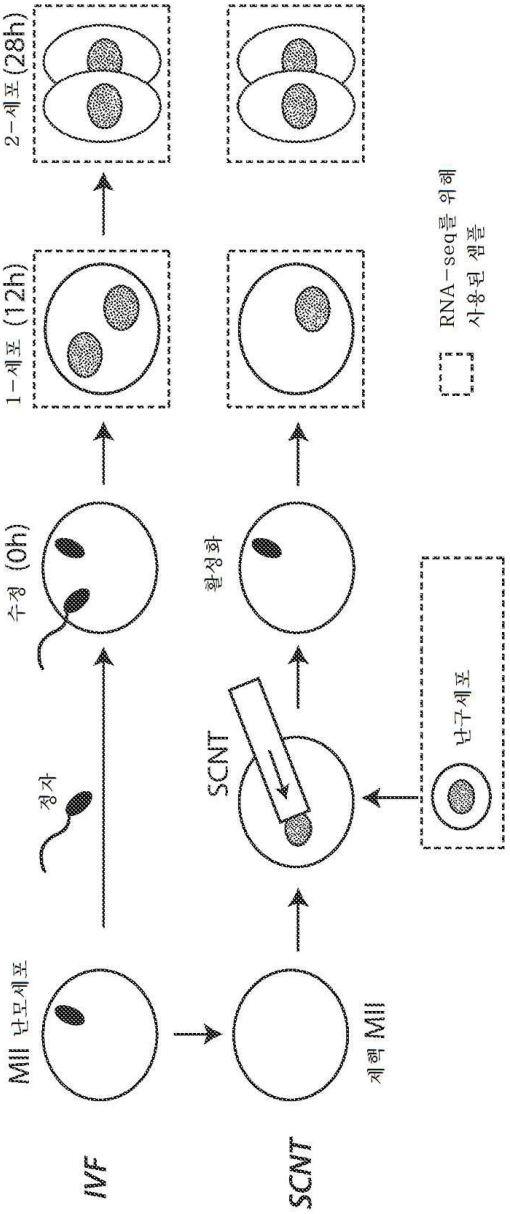
			3541 gagccatttc tgggcacgtg gcagcagtcg ctgatctccc agctgagggg ctgagcactg 3601 gaatgctgtg gctgcactgg ccccagtcca tagaggggtc aactatgctg gctggactgg 3661 ctgccttgtt cctggcctag gacttagctt cataactatc acctgcaccg actaggctga 3721 ggtgctggta cttgccccaa cccctacttt tgtatttata tgtgtgtgtg tgtgtgcgtg 3781 cgtgcgtgcg tgcgtgtatg tttggtctgg accagcttct gccagccccct ggcctttact 3841 ttcttccttg cctatgcagg gcaaacaaaa tgtgaaattc tgccctcagc tgagctgagt 3901 aagggctcct gggggttggc tggagatggg tgtggcatct gtccaggcct ggaaccgtct 3961 caagacagtg ctggcaaagc tgcagtattg agatgctaag gagctgatgc cacctctttg 4021 tcttccccta aaggagaaca tggggataac atgggtgtgt gcccacaaca ctctaggtgc 4081 agagcccctg tggcaaagta ttacagggtg tgggtgggga ttaccctgaa tcggggattt 4141 taatgatgga agcaggcaga gcctggtggg tgattctgtc aacagaaaat tgcaatcatg 4201 cagggctgg gagggttagg atgaaaaaac tggggccatt ggaggcccac tgtaggtggg 4261 agggagctga ttttgggggtg gggggtggga ctagagggca atactgaagg ggttaaacag 4321 gtttttgctc ctcaagaatt tgtttgcctg ggcccaggat tggagggctt cacaccaata 4381 ccctgtgtat acaagaatca gatttataat acttcccctt ttttgttacg tatgaacact 4441 ataaaccaaa ttatttttgaa aactggtgca tcaccttgtc cttagcaata aaatgtgttg 4501 agcagaggaa aaaaaaaaaa aaaaaa
인간	리신(K)-특이적 디메틸라제 4B(KDM4B), (mRNA)	서열번호: 51	1 agggctcggt cgccagcaac cgagcggggc ccggcccgag cggggcctgg gggtgcgacg 61 ccgagggcgg gggagagcgc gccgctgctc ccggaccggg ccgcgcacgc cgcctcagga 121 accatcactg ttgctggagg cacctgacaa atcctagcga atttttggag catctccacc 181 caggaacctc gccatccaga agtgtgcttc ccgcacagct gcagccatgg ggtctgagga 241 ccacggcgcc cagaacccca gctgtaaaat catgacgttt cgcccaacca tggaagaatt 301 taaagacttc aacaaatacg tggcctacat agagtcgcag ggagcccacc gggcgggcct 361 ggccaagatc atccccccga aggagtggaa gccgcggcag acgtatgatg acatcgacga 421 cgtggtgatc ccggcgccca tccagcaggt ggtgacgggc cagtcgggcc tcttcacgca 481 gtacaatatc cagaagaagg ccatgacagt gggcgagtac cgccgcctgg ccaacagcga 541 gaagtactgt accccgcggc accaggactt tgatgacctt gaacgcaaat actggaagaa 601 cctcaccttt gtctccccga tctacggggc tgacatcagc ggctctttgt atgatgacga 661 cgtggcccag tggaacatcg ggagcctccg gaccatcctg gacatggtgg agcgcgagtg 721 cggcaccatc atcgagggcg tgaacacgcc ctacctgtac ttcggcatgt ggaagaccac 781 cttcgcctgg cacaccgagg acatggacct gtacagcatc aactacctgc actttgggga 841 gcctaagtcc tggtacgcca tcccaccaga gcacggcaag cgcctggagc ggctggccat 901 cggcttcttc cccgggagct cgcaggggctg cgacgccttc ctgcggcata agatgaccct 961 catctcgccc atcatcctga agaagtacgg gatccccttc agccggatca cgcaggaggc 1021 cggggaattc atgatcacat ttccctacgg ctaccacgcc ggcttcaatc acgggttcaa 1081 ctgcgcagaa tctaccaact tcgccaccct gcggtggatt gactacggca aagtggccac 1141 tcagtgcacg tgccggaagg acatggtcaa gatctccatg gacgtgttcg tgcgcatcct 1201 gcagcccgag cgctacgagc tgtggaagca gggcaaggac ctcacggtgc tggaccacac 1261 gcggcccacg gcgctcacca gccccgagct gagctcctgg agtgcatccc gggcctcgct 1321 gaaggccaag ctcctccgca ggtctcaccg gaaacggagc cagcccaaga agccgaagcc 1381 cgaagacccc aagttccctg gggagggtac ggctggggca gcgctcctag aggaggctgg 1441 gggcagcgtg aaggaggagg ctgggccgga ggttgacccc gaggaggagg aggaggagcc 1501 gcagccactg ccacacggcc gggaggccga gggcgcagaa gaggacggga ggggcaagct 1561 gcggccaacc aaggccaaga gcgagcggaa gaagaagagc ttcggcctgc tgccccaca 1621 gctgccgccc ccgcctgctc acttcccctc agaggaggcg ctgtggctgc catccccact 1681 ggagccccgg gtgctgggcc caggccctgc agccatggag gagagccccc tgccggcacc 1741 ccttaatgtc gtgccccctg aggtgcccag tgaggagcta gaggccaagc ctcggcccat 1801 catccccatg ctgtacgtgg tgccgcggcc gggcaaggca gccttcaacc aggagcacgt 1861 gtcctgccag caggcctttg agcactttgc ccagaagggt ccgacctgga aggaaccagt 1921 ttcccccatg gagctgacgg ggccagagga cggtgcagcc agcagtgggg caggtcgcat 1981 ggagaccaaa gcccgggccg gagaggggca ggcaccgtcc acattttcca aattgaagat 2041 ggagatcaag aagagccggc gccatccccc gggccggccg cccacccggt ccccactgtc 2101 ggtggtgaag caggaggcct caagtgacga ggaggcatcc cctttctccg gggaggaaga 2161 tgtgagtgac ccggacgcct tgaggccgct gctgtctctg cagtggaaga acagggcggc 2221 cagcttccag gccgagagga agttcaacgc agcggctgcg cgcacggagc cctactgcgc 2281 catctgcacg ctcttctacc cctactgcca ggccctacag actgagaagg aggcacccat 2341 agcctccctc ggagagggct gcccggccac attaccctcc aaaagccgtc agaagacccg 2401 accgctcatc cctgagatgt gcttcacctc tggcggtgag aacacggagc cgctgcctgc 2461 caactcctac atcggcgacg acgggaccag ccccctgatc gcctgcggca agtgctgcct 2521 gcaggtccat gccagttgct atggcatccg tcccgagctg gtcaatgaag gctggacgtg 2581 ttcccggtgc gcggcccacg cctggactgc ggagtgctgc ctgtgcaacc tgcgaggagg 2641 tgcgctgcag atgaccaccg ataggaggtg gatccacgtg atctgtgcca tcgcagtccc 2701 cgaggcgcgc ttcctgaacg tgattgagcg ccaccctgtg gacatcagcg ccatccccga 2761 gcagcggtgg aagctgaaat gcgtgtactg ccggaagcgg atgaagaagg tgtcaggtgc 2821 ctgtatccag tgctcctacg agcactgctc cacgtccttc cacgtgacct gcgcccacgc 2881 cgcaggcgtg ctcatggagc cggacgactg gccctatgtg gtctccatca cctgcctcaa 2941 gcacaagtcg gggggtcacg ctgtccaact cctgagggcc gtgtccctag gccaggtggt 3001 catcaccaag aaccgcaacg ggctgtacta ccgctgtcgc gtcatcggtg ccgcctcgca 3061 gacctgctac gaagtgaact tcgacgatgg ctcctacagc gacaacctgt accctgagag 3121 catcacgagt agggactgtg tccagctggg acccccttcc gaggggagc tggtggagct 3181 ccggtggact gacggcaacc tctacaaggc caagttcatc tcctccgtca ccagccacat 3241 ctaccaggtg gagtttgagg acgggtccca gctgacggtg aagcgtgggg acatcttcac 3301 cctggaggag gagctgccca agagggtccg ctctcggctg tcactgagca cggggcacc 3361 gcaggagccc gccttctcgg gggaggaggc caaggccgcc aagcgcccgc gtgtgggcac 3421 cccgcttgcc acggaggact ccgggcggag ccaggactac gtggccttcg tggagagcct 3481 cctgcaggtg cagggccggc ccggagcccc cttctaggac agctggccgc tcaggcgacc 3541 ctcagcccgg cggggaggcc atggcatgcc ccgggcgttc gcttgctgtg aattcctgtc 3601 ctcgtgtccc cgaccccgga gaggccacct ccaagccgcg ggtgcccctt agggcgacag 3661 gagccagcgg gacgccgcac gcggccccag actcagggag cagggccagg cgggctcggg 3721 ggccggccag gggagcaccc cactcaacta ctcagaattt taaaccatgt aagctctctt 3781 cttctcgaaa aggtgctact gcaatgccct actgagcaac ctttgagatt gtcacttctg

			3841 tacataaacc acctttgtga ggctctttct ataaatacat attgtttaaa aaaaagcaag 3901 aaaaaaagga aaacaaagga aaatatcccc aaagttgttt tctagatttg tggctttaag 3961 aaaaacaaaa caaaacaaac acattgtttt tctcagaacc aggattctct gagaggtcag 4021 agcatctcgc tgttttttg ttgttgtttt aaaatattat gatttggcta cagaccaggc 4081 agggaaagag acccggtaat tggagggtga gcctcggggg gggggcagga cgccccggtt 4141 tcggcacagc ccggtcactc acggcctcgc tctcgcctca ccccggctcc tgggctttga 4201 tggtctggtg ccagtgcctg tgcccactct gtgcctgctg ggaggaggcc caggctctct 4261 ggtggccgcc cctgtgcacc tggccagggg aagcccgggg gtctggggcc tccctccgtc 4321 tgcgcccacc tttgcagaat aaactctctc ctggggtttg tctatctttg tttctctcac 4381 ctgagagaaa cgcaggtgtt ccagaggctt ccttgcagac aaagcacccc tgcacctcct 4441 atggctcagg atgagggagg cccccaggcc cttctggttg gtagtgagtg tggacagctt 4501 cccagctctt cgggtacaac cctgagcagg tcgggggaca cagggccgag gcaggccttc 4561 ggggcccctt tcgcctgctt ccgggcaggg acgaggcctg gtgtcctcgc tccacccacc 4621 cacgctgctg tcacctgagg ggaatctgct tcttaggagt gggttgagct gatagagaaa 4681 aaacggcctt cagcccaggc tgggaagcgc cttctccagg tgcctctccc tcaccagctc 4741 tgcacccctc tggggagcct tccccacctt agctgtctcc tgccccaggg agggatggag 4801 gagataattt gcttatatta aaaacaaaaa atggctgagg caggagtttg ggaccagcct 4861 gggctatata gcaagacccc atcactacaa atttttaca aattagctag gtgtggtggt 4921 gcgcacctgt ggtcccagct actcgggagg ctgtggtggg aggattgctt gagtccagga 4981 ggttgaggct gcagtcagct cagattgcac cactgcactc cagcctgggc aacagagcga 5041 gaccctgtct ccaaaaaaaa aaaaaagcaa tgtttatatt ataaaagagt gtcctaacag 5101 tccccgggct agagaggact aaggaaaaca gagagagtgt tacgcaggag caagcctttc 5161 atttccttgg tggggagggg gggcggttgc cctggagagg gccgggggtcg gggaggttgg 5221 ggggtgtcag ccaaaacgtg gaggtgtccc tctgcacgca gccctcgccc ggcgtggcgc 5281 tgacactgta ttcttatgtt gtttgaaaat gctatttata ttgtaaagaa gcgggcgggt 5341 gcccctgctg cccttgtccc ttgggggtca cacccatccc ctggtgggct cctgggcggc 5401 ctgcgcagat gggccacaga agggcaggcc ggagctgcac actctcccca cgaaggtatc 5461 tctgtgtctt actctgtgca aagacgcggc aaaacccagt gccctggttt ttccccaccc 5521 gagatgaagg atacgctgta ttttttgcct aatgtccctg cctctaggtt cataatgaat 5581 taaaggttca tgaacgctgc gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5641 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa
인간	리신(K)-특이적 디메틸라제4C (KDM4C), 전사물 변이체 1, mRNA	서열번호: 53	1 gccataggtg cgcgtcggcg cccaggagga cgtgtggcgc gtggactaca tcaggtccag 61 ccctgcggga ccccagccag cgcttccggg caaggttctg tgcacctgtt ttctccttct 121 acgcgagtat ctttcccctc cggaaagaat gggatatgcc tgtgtccaaa ggacaagaag 181 atgcgcgcca gcaagcctaa gttaaccaca gcgcggaagt tgagcccaaa gcaagagcgt 241 gccgggcacc tttaagctgt ttgtaagccc acgtgactca ccaagtgcgg gccccagcgg 301 tcacgtgacg gcgcgcgcgc cctcgcgcag ggagagccgg cggtgcgcgc gccttcgccg 361 ctgcctccca cccacccccc cgacgggagg gtgaggcgcg gcgcagtgat cgggcggccg 421 gggtcctgtg cgcgtgcgca gcgaacagct gtcacctagt gcggaacaag tctcccaaat 481 ttcccaaatc tccctgggcc ggaggccact gtcttctctt cctcctccac cgagtcgtgc 541 tctcgcccca acccgcgcgc cagacactgc cctaaccatc atggaggtgg ccgaggtgga 601 aagtcctctg aaccccagct gtaagataat gaccttcaga ccctccatgg aggagttccg 661 ggagttcaac aaataccttg catacatgga gtctaaagga gcccatcgtg cgggtcttgc 721 aaaggtgatt cctcctaagg agtggaagcc aagacagtgc tatgatgaca ttgataattt 781 gctcattcca gcaccaattc agcagatggt cacagggcag tcaggactgt tcactcagta 841 caacatccag aaaaaagcga tgactgtgaa ggagtttcagg cagctggcca acagtggcaa 901 atattgtact ccaagatact tggattacga agatttggag cgcaagtact ggaagaactt 961 aacttttgtg gcacctatct atggtgcaga tattaatggg agcatatatg atgagggtgt 1021 ggatgaatgg aacatagctc gcctcaatac agtcttggat gtggttgaag aagagtgtgg 1081 catttctatt gaggggtgtaa atacccata tctctatttt ggcatgtgga agaccacgtt 1141 tgcatggcac accgaagaca tggacctcta tagcattaat tatctccact ttggagagcc 1201 caagtcttgg tatgctatac ctccggagca tggaaaacga cttgaaagac tagctcaagg 1261 ttttttccca agcagctccc aagggtgtga tgcatttctt cgccacaaga tgacattgat 1321 ttctccatca gtattgaaga aatatggtat tccctttgac aagataaccc aggaggctgg 1381 agaattcatg atcactttcc catatggcta ccatgctggt tttaatcatg gtttcaactg 1441 tgcagaatct acaaattttg ctactgtcag atggattgac tatggaaaag ttgccaaatt 1501 gtgcacttgc aggaaagaca tggtgaagat ttcaatggat atctttgtga ggaaatttca 1561 gccagacaga tatcagcttt ggaaacaagg aaaggatata tacaccattg atcacacgaa 1621 gcctactcca gcatccaccc ctgaagtaaa agcatggctg cagaggagga ggaaagtaag 1681 aaaagcatcc cgaagcttcc agtgtgctag gtctacctct aaaaggccta aggctgatga 1741 ggaagaggaa gtgtcagatg aagtcgatgg ggcagaggtc cctaaccccg actcagtcac 1801 agatgacctc aaggtcagtg aaaagtcaga agcagcagtg aagctgagga acacagaagc 1861 atcttcagaa gaagagtcat ctgctagcag gatgcaggtg gagcagaatt tatcagatca 1921 tatcaaactc tcaggaaaca gctgcttaag tacatctgta acagaagaca taaaaactga 1981 ggatgacaaa gcttatgcat atagaagtgt accttctata tccagtgagg ctgatgattc 2041 cattccattg tctagtggct atgagaagcc cgagaaatca gacccatccg agctttcatg 2101 gccaaagtca cctgagtcat gctcatcagt ggcagagagt aatggtgtgt taacagaggg 2161 agaagagagt gatgtggaga gccatgggaa tggccttgaa cctggggaaa tcccagcggt 2221 ccccagtgga gagagaaata gcttcaaagt ccccagtata gcagagggag agaacaaaac 2281 ctctaagagt tggcgccatc cacttagcag gcctccagca agatctccga tgactcttgt 2341 gaagcagcag gcgccaagtg atgaagaatt gcctgaggtt ctgtccattg aggaggaagt 2401 ggaagaaaca gagtcttggg cgaaacctct catccacctt tggcagacga agtcccctaa 2461 cttcgcagct gagcaagagt ataatgcaac agtggccagg atgaagccac actgtgccat 2521 ctgcactctg ctcatgccgt accacaagcc agatagcagc aatgaagaaa atgatgctag 2581 atgggagaca aaattagatg aagtcgttac atcggagggа aagactaagc ccctcatacc 2641 agagatgtgt tttatttata gtgaagaaaa tatagaatat tctccaccca atgccttcct 2701 tgaagaggat ggaacaagtc tccttatttc ctgtgcaaag tgctgcgtac gggttcatgc 2761 aagttgttat ggtattcctt ctcatgagat ctgtgatgga tggctgtgtg cccggtgcaa 2821 aagaaatgcg tggacagcag aatgctgtct ctgcaatttg agaggaggtg ctcttaagca 2881 aacgaagaac aataagtggg cccatgtcat gtgcgccgtt gcggtcccag aagttcgatt

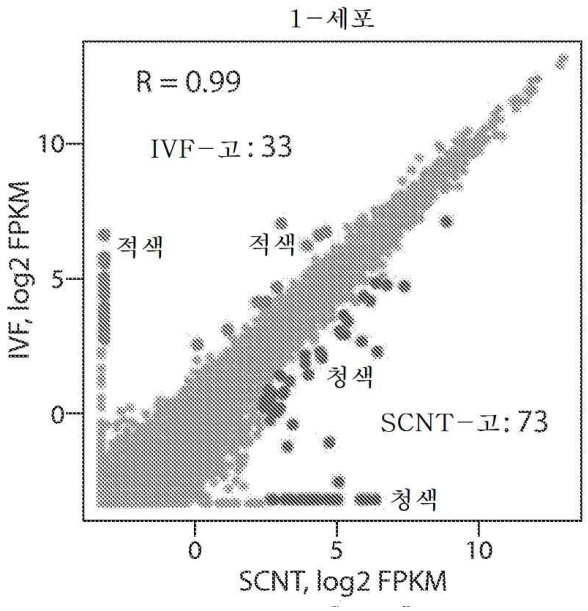
			2941 cactaatgtc ccagaaagga cacaaataga tgtaggcaga ataccttac agaggttaaa 3001 attgaaatgc atcttctgca gacaccgggt taagagggtc tctggagcct gcatccagtg 3061 ttcctacggt cgctgcccgg cctccttcca tgtcacttgt gcccatgctg ctggggtact 3121 gatggagcct gatgactggc cttatgtggt gaacattaca tgctttcgac ataaggtcaa 3181 ccccaacgtg aagtccaagg cttgcgagaa ggtcatttcc gtgggtcaaa cggtcatcac 3241 gaagcatcgg aacacccggt attacagttg cagagtgatg gctgtgacat cgcagacctt 3301 ctatgaggtc atgtttgatg atggctcctt tagcagagac acatttcctg aggatatcgt 3361 gagccgagac tgtctgaagc tgggcccacc tgctgaggga gaagtcgtcc aagtcaagtg 3421 gcccgatggc aaactctatg gagcaaaata ttttggatca aatattgccc acatgtacca 3481 ggttgagttt gaagatggat cccagatagc aatgaagaga gaggacatct acactttaga 3541 tgaagagtta cccaagagag tgaaagctcg attttccaca gcctctgaca tgcgatttga 3601 agacacgttt tatggagcag acattatcca aggggagaga aagagacaaa gagtgctgag 3661 ctccaggttt aagaatgaat atgtggccga ccctgtatac cgcacttttt tgaagagctc 3721 tttccagaag aagtgccaga agagacagta gtctgcatac atcgctgcag gccacagagc 3781 agcttgggtt ggaagagaga agatgaaggg acatccttgg ggctgtgccg tgagttttgc 3841 tggcataggt gacagggtgt gtctctgaca gtggtaaatc gggtttccag agtttggtca 3901 ccaaaaatac aaaatacacc caatgaattg gacgcagcaa tctgaaatca tctctagtct 3961 tgctttcact tgtgagcagt tgtcttctat gatcccaaag aagttttcta agtgaaagga 4021 aatactagtg aatcacccac aaggaaaagc cactgccaca gaggaggcgg gtccccttgt 4081 gcggcttagg gccctgtcag gaaacacacg gggacctctc tctctagctc cagcaggtgg 4141 cacctcggta cccagcgggt agggcgataa tttatatatt ttccacagtc agggaaggac 4201 tctcacttat ttgtttcaaa ttgcagtttt tataaaacat ttttaaaaca caaatggcat 4261 gtatgctaat gagatttacc cgtgtgctat ctgtatttcc cttgtacaga acttttacat 4321 ttttgaatat tcctattact tttgattgtg tctgatggga actgagttgt tggcctttgt 4381 gaaatgaaat ttttggctct tgagaaagaa ttcttatgaa ttgttatgcg aattttatat 4441 atttaaagag ggagatctgg ggctgttatt tttaaacact ttttttcata atacatattc 4501 cgagtagata tttataaaat atatgtttct ttcattatgt gtttgtaaaa ttagagttta 4561 aataaatatg ctttgatgca tagttttgaa ctaatgtaac atgatttttc ttttttaaaa 4621 cagcctgaaa atgtactagt gtttaaaaat aaagatttcc attttctcca aaaaaaaaaa 4681 aaaaaaa

도면

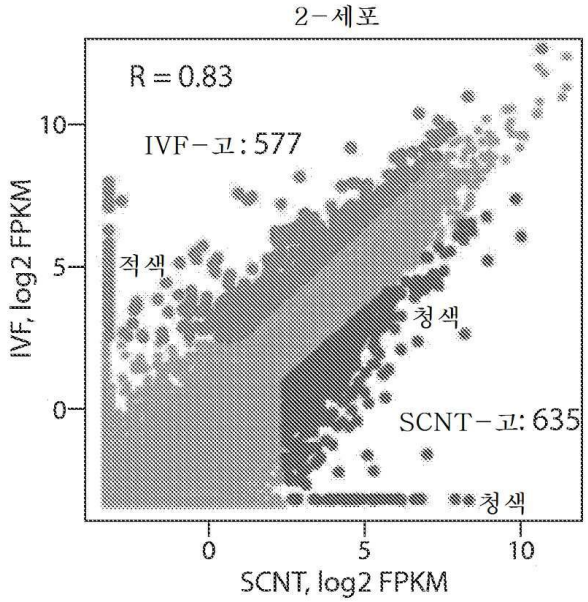
도면1a


IVF
SCNT
MII 난모세포
정자
수정 (0h)
1-세포 (12h)
2-세포 (28h)
제핵 MII
SCNT
활성화
난구세포
RNA-seq를 위해
사용된 샘플

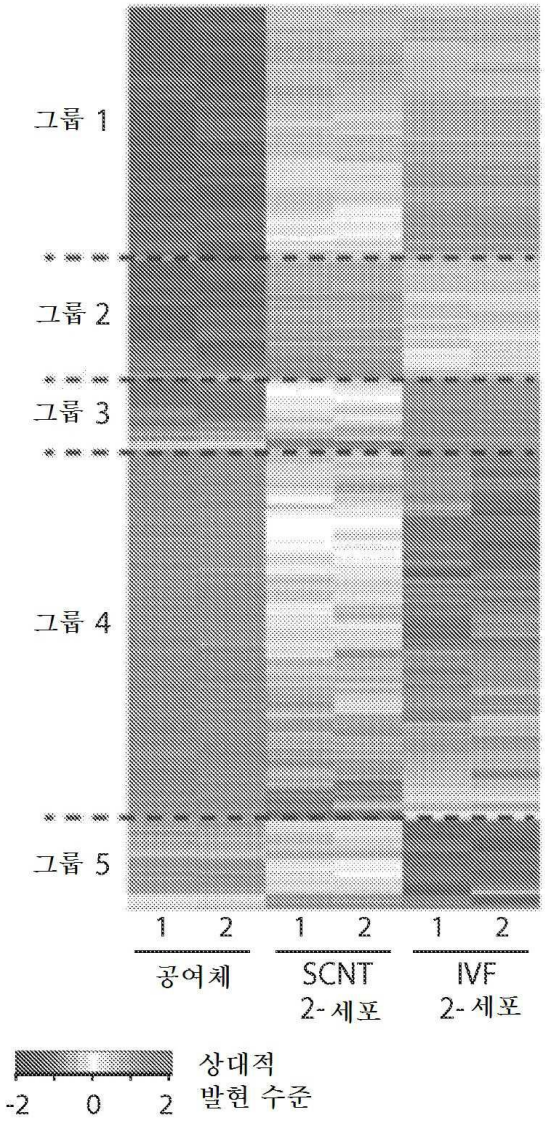
도면1b


1-세포
R = 0.99
IVF-고 : 33
적색
적색
청색
SCNT-고 : 73
청색
IVF, log2 FPKM
SCNT, log2 FPKM
0
5
10

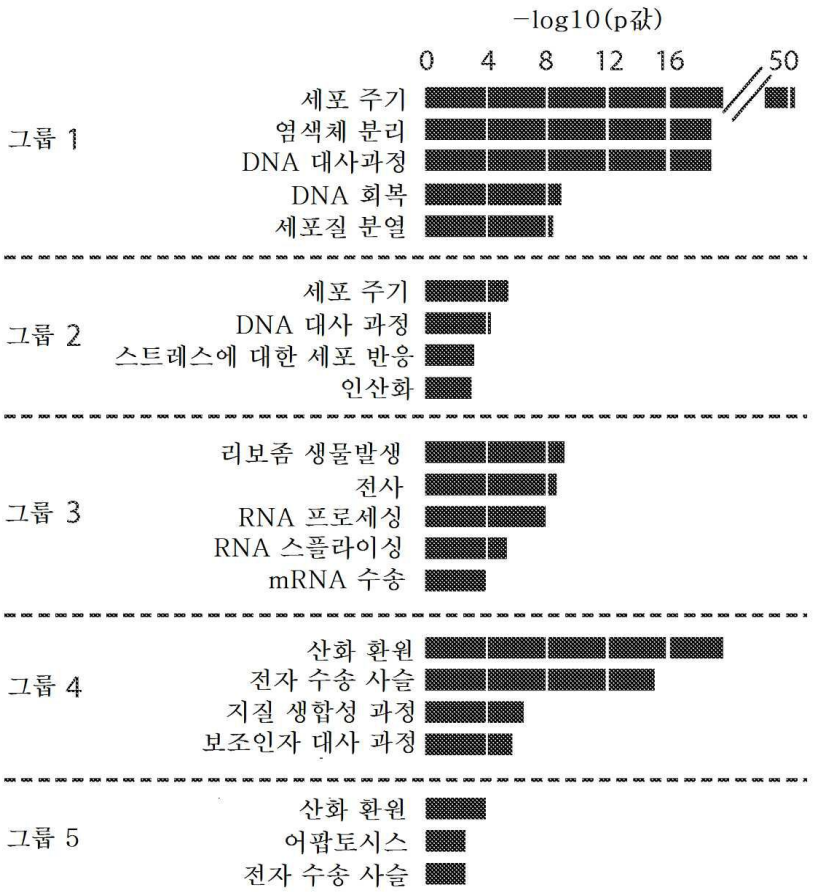
도면1c


2-세포
R = 0.83
IVF-고 : 577
적색
청색
SCNT-고: 635
청색
IVF, log2 FPKM
SCNT, log2 FPKM
0
5
10

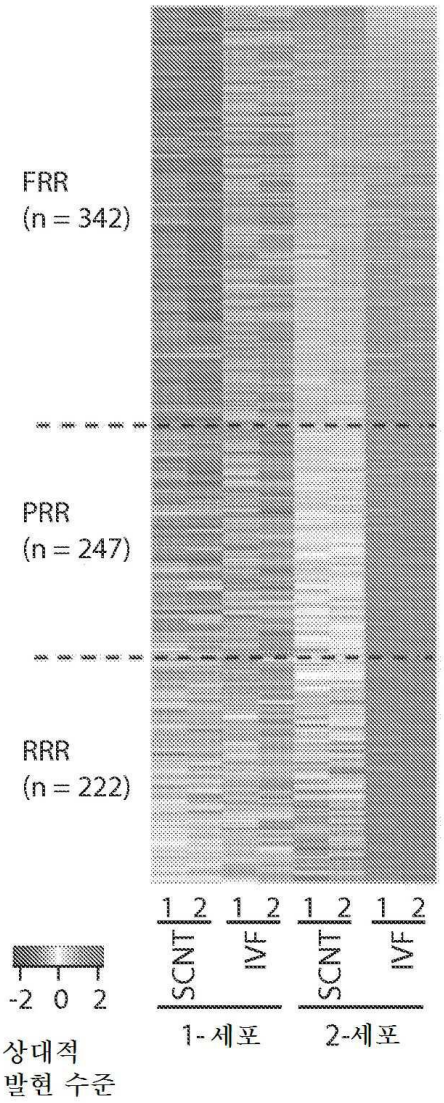
도면1d



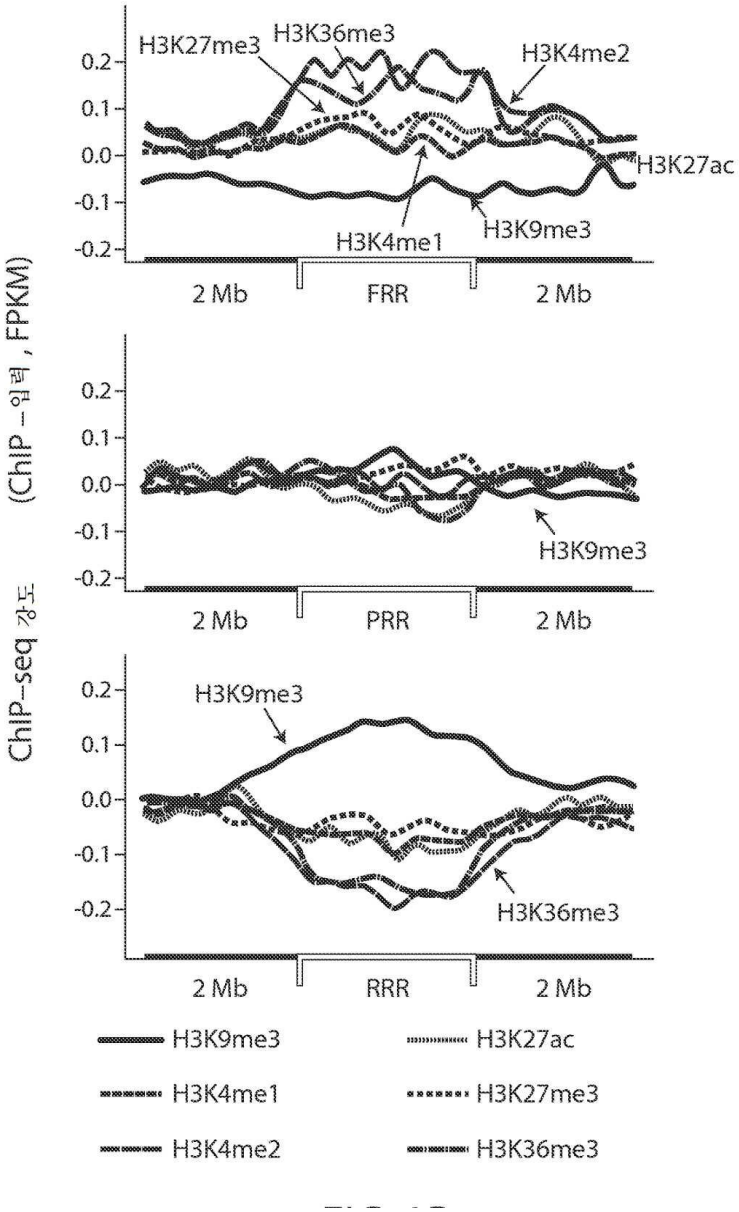
도면1e


−log10(p값)
0
4
8
12
16
50
그룹 1
세포 주기
염색체 분리
DNA 대사과정
DNA 회복
세포질 분열
그룹 2
세포 주기
DNA 대사 과정
스트레스에 대한 세포 반응
인산화
그룹 3
리보좀 생물발생
전사
RNA 프로세싱
RNA 스플라이싱
mRNA 수송
그룹 4
산화 환원
전자 수송 사슬
지질 생합성 과정
보조인자 대사 과정
그룹 5
산화 환원
어팝토시스
전자 수송 사슬

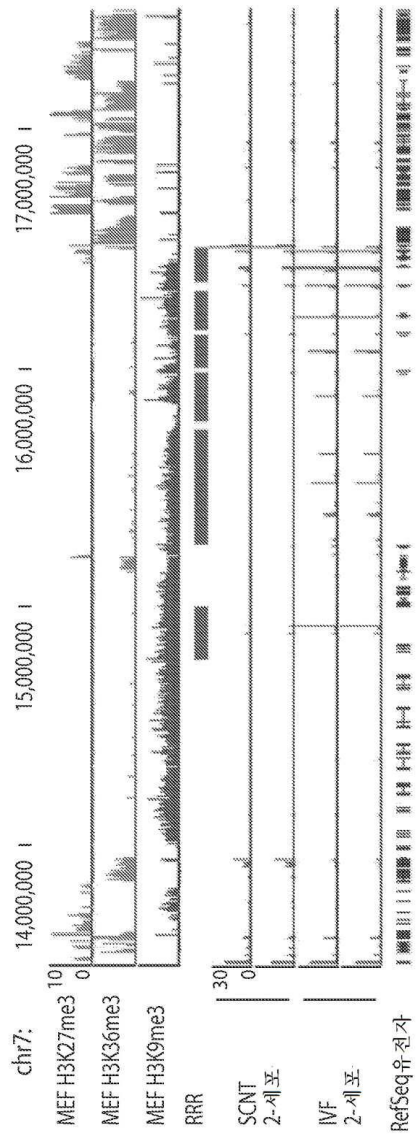
도면2a


FRR
(n = 342)
PRR
(n = 247)
RRR
(n = 222)
1 2 1 2 1 2 1 2
SCNT
IVF
SCNT
IVF
1-세포
2-세포
-2 0 2
상대적
발현 수준

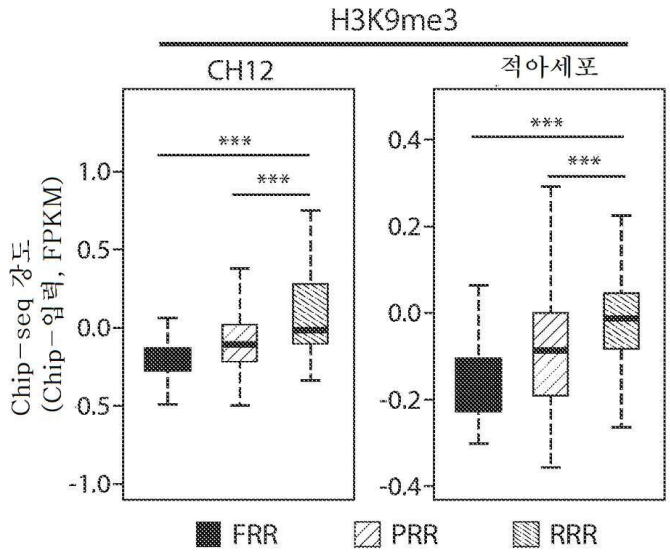
도면2b


ChIP-seq 강도 (ChIP – 입력 , FPKM)
H3K27me3
H3K36me3
H3K4me2
H3K27ac
H3K4me1
H3K9me3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
2 Mb
FRR
2 Mb
H3K9me3
PRR
H3K9me3
H3K36me3
RRR
H3K9me3
H3K27ac
H3K4me1
H3K27me3
H3K4me2
H3K36me3

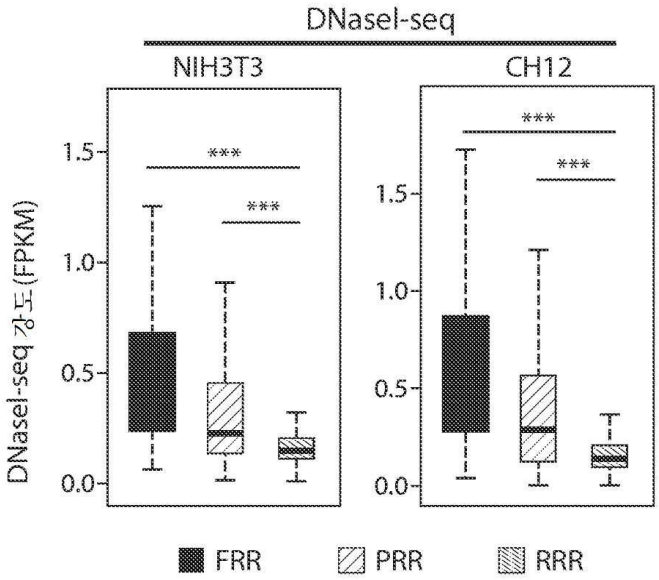
도면2c


chr7:
14,000,000
15,000,000
16,000,000
17,000,000
MEF H3K27me3
10
0
MEF H3K36me3
MEF H3K9me3
RRR
30
0
SCNT
2-세포
IVF
2-세포
RefSeq유전자

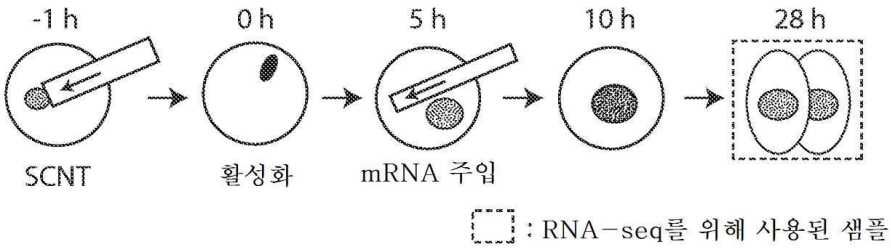
도면2d



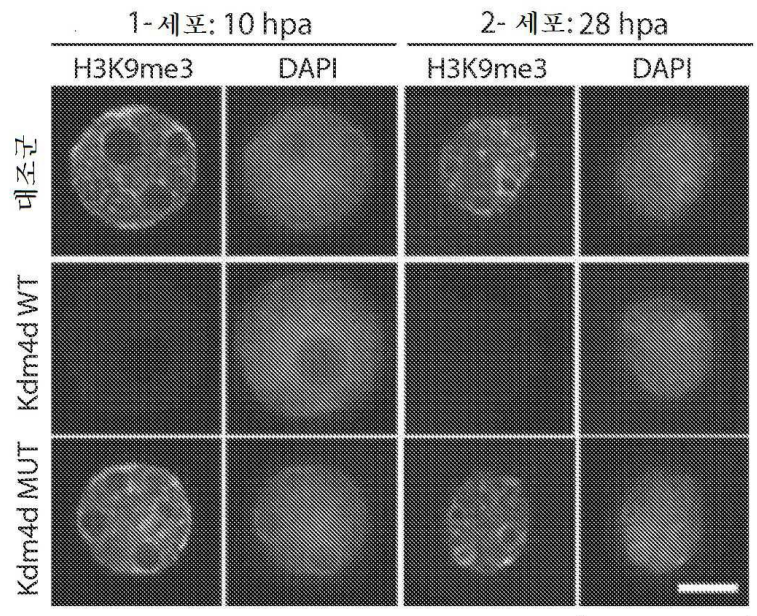
도면2e



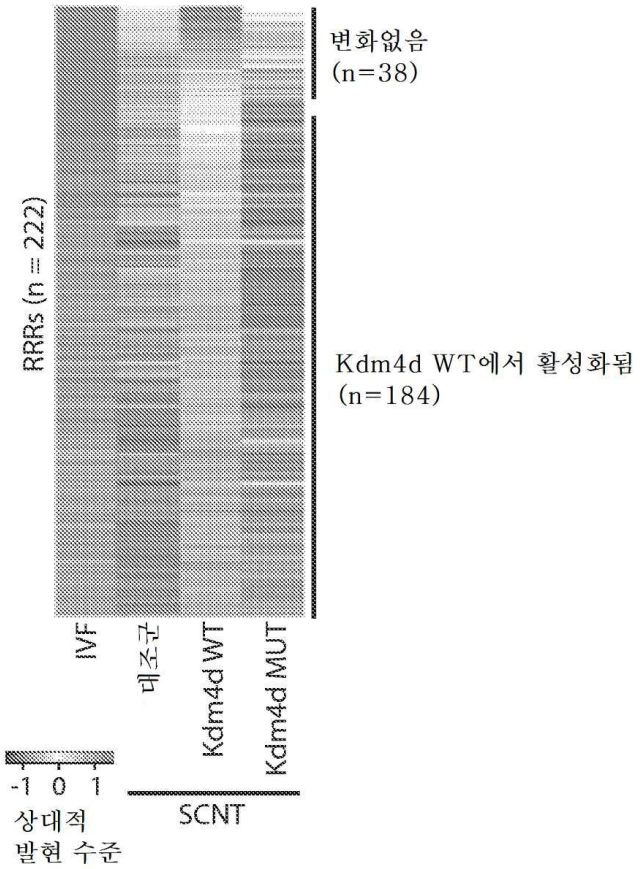
도면3a



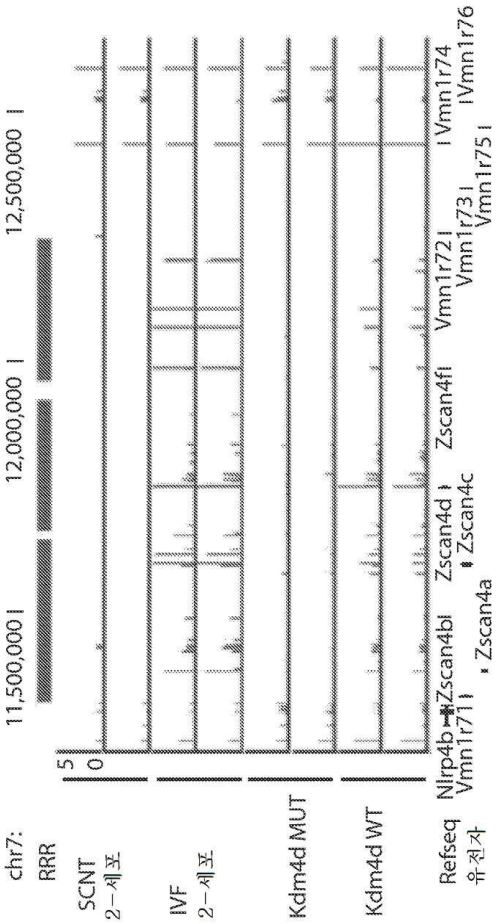
도면3b


1-세포: 10 hpa
2- 세포: 28 hpa
H3K9me3
DAPI
H3K9me3
DAPI
대조군
Kdm4d WT
Kdm4d MUT

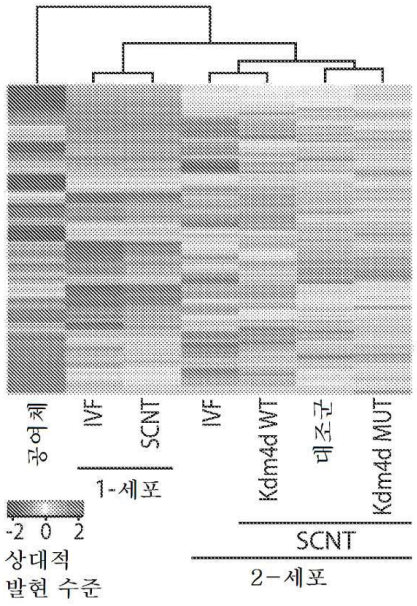
도면3c


변화없음
(n=38)
RRRs (n = 222)
Kdm4d WT에서 활성화됨
(n=184)
IVF
대조군
Kdm4d WT
Kdm4d MUT
-1 0 1
상대적
발현 수준
SCNT

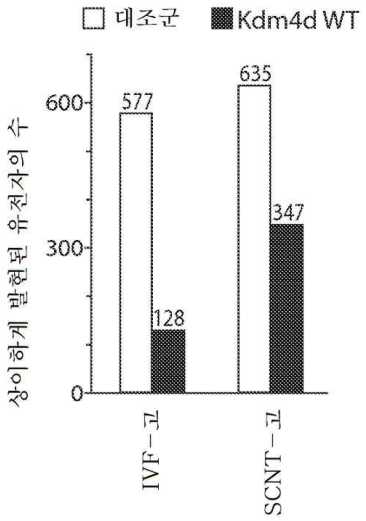
도면3d


chr7:
RRR
SCNT
2-세포
IVF
2-세포
Kdm4d MUT
Kdm4d WT
Refseq
유전자
11,500,000
12,000,000
12,500,000
5
0
Nlrp4b
Vmn1r71
Zscan4bl
Zscan4a
Zscan4d
Zscan4c
Zscan4fl
Vmn1r72
Vmn1r73
Vmn1r75
Vmn1r74
Vmn1r76

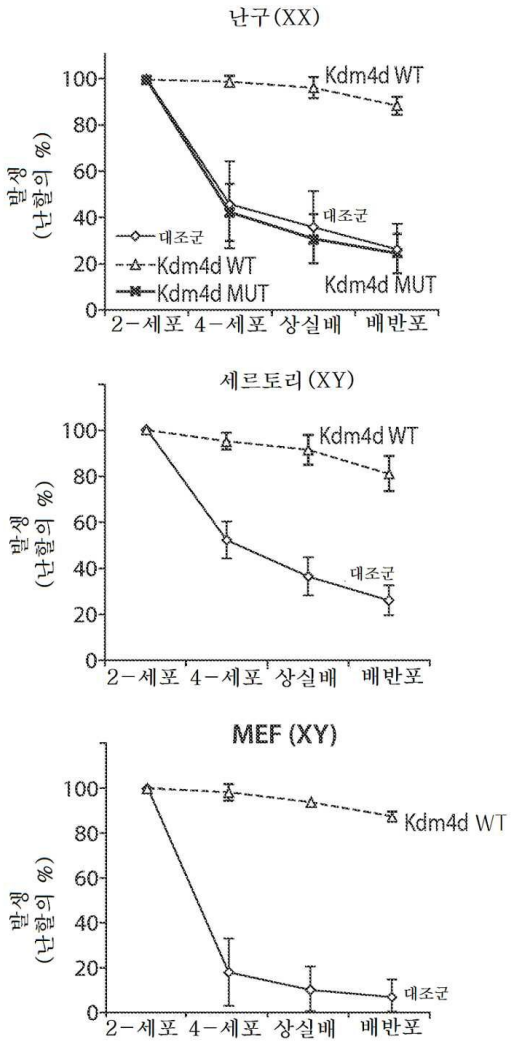
도면3e


공여체
IVF
SCNT
1-세포
IVF
Kdm4d WT
대조군
Kdm4d MUT
SCNT
2-세포
-2 0 2
상대적
발현 수준

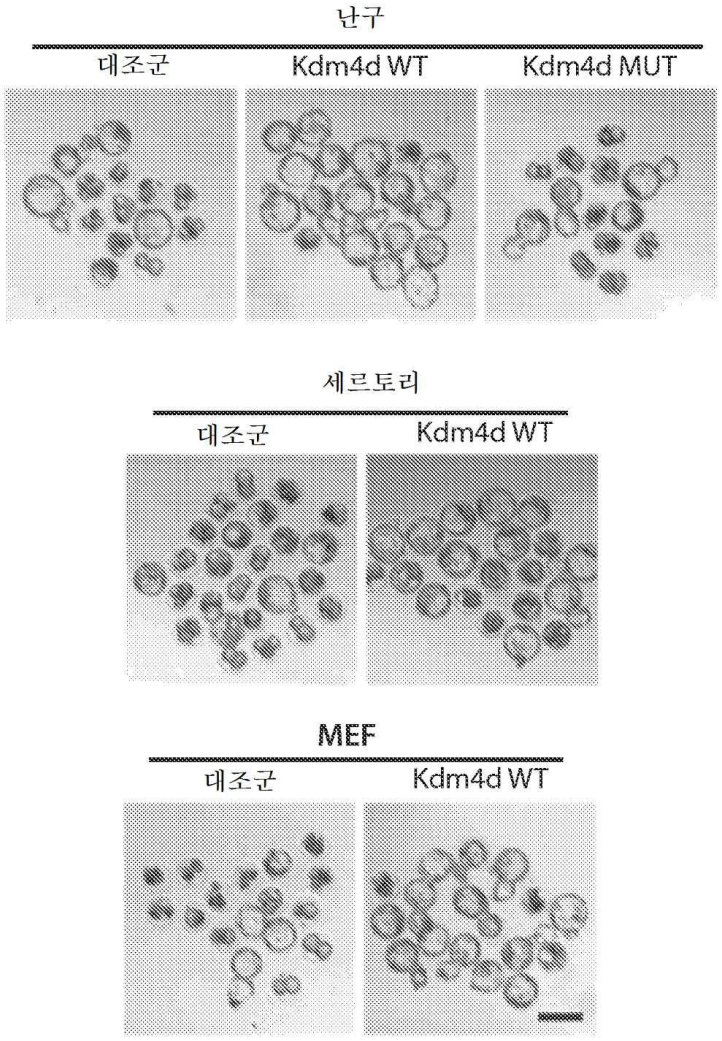
도면3f


대조군
Kdm4d WT
상이하게 발현된 유전자의 수
600
300
0
577
128
635
347
IVF-고
SCNT-고

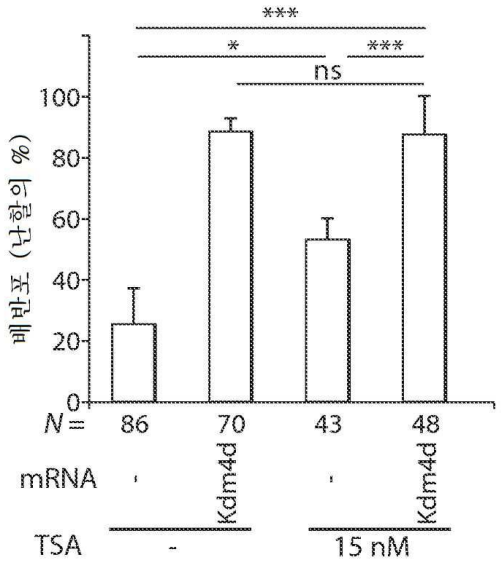
도면4a


난구(XX)
발생 (난할의 %)
100
80
60
40
20
0
Kdm4d WT
대조군
Kdm4d MUT
2-세포
4-세포
상실배
배반포
세르토리(XY)
MEF (XY)

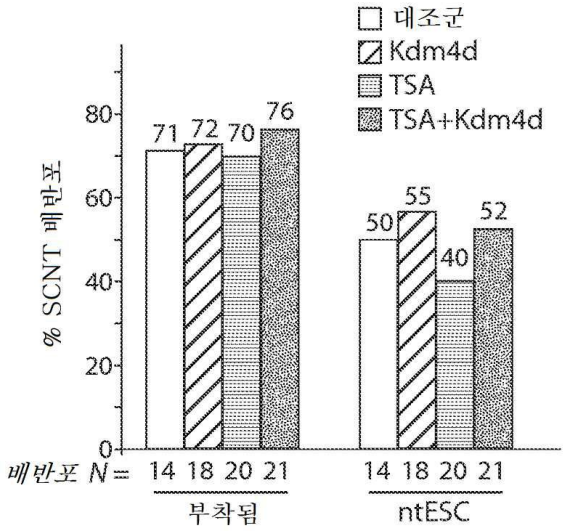
도면4b



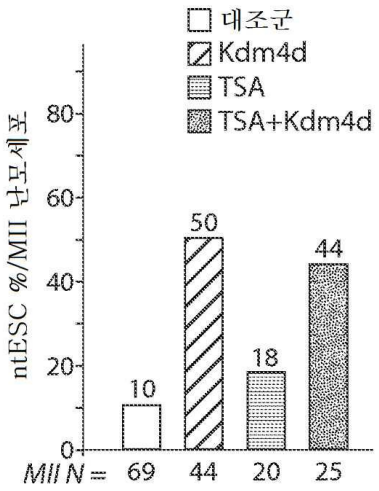
도면4c


***
*
***
ns
100
80
60
40
20
0
배반포 (난할의 %)
N = 86 70 43 48
mRNA - Kdm4d - Kdm4d
TSA - 15 nM

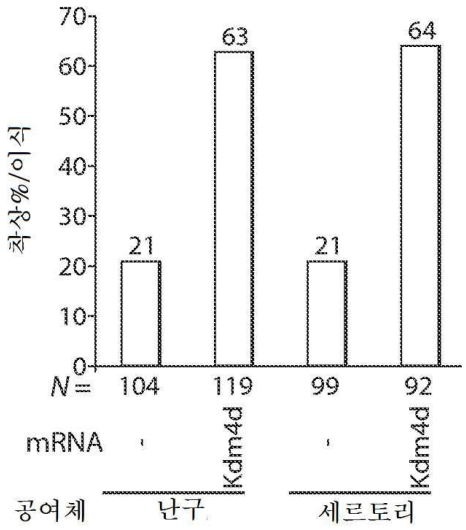
도면4d


대조군
Kdm4d
TSA
TSA+Kdm4d
% SCNT 배반포
80
60
40
20
0
71 72 70 76
50 55 40 52
배반포 N = 14 18 20 21 14 18 20 21
부착됨
ntESC

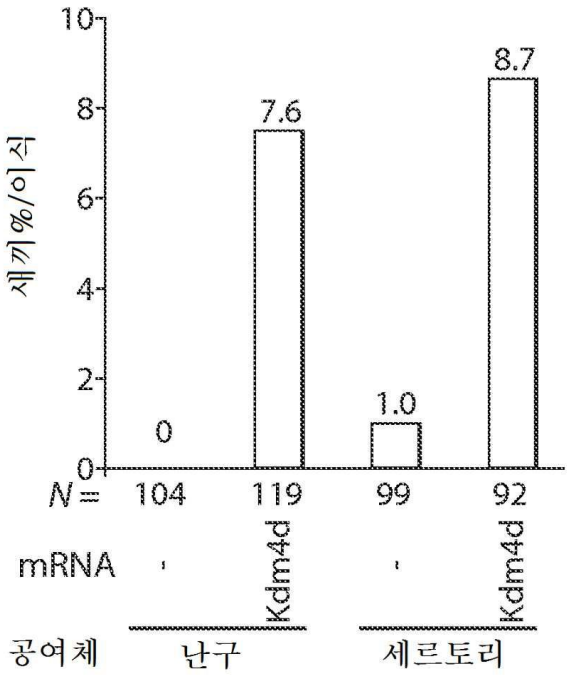
도면4e


대조군
Kdm4d
TSA
TSA+Kdm4d
ntESC %/MII 난모세포
80
60
40
20
0
50
44
18
10
MII N = 69 44 20 25

도면4f


착상%/이식
70
60
50
40
30
20
10
0
63
64
21
21
N = 104 119 99 92
mRNA
Kdm4d
Kdm4d
공여체
난구
세르토리

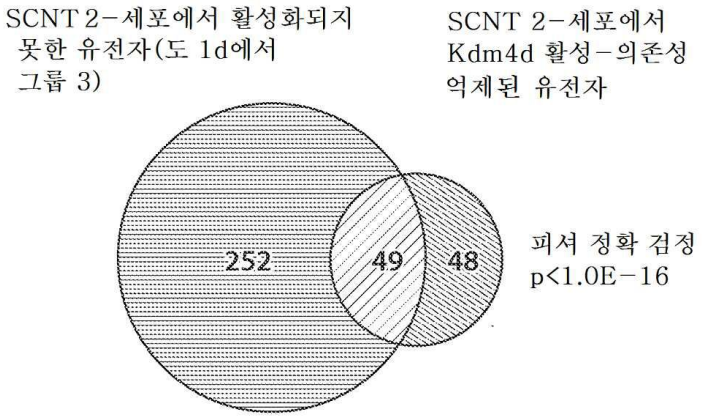
도면4g


10
8
6
4
2
0
새끼%/이식
0
7.6
1.0
8.7
N =
104
119
99
92
mRNA
Kdm4d
Kdm4d
공여체
난구
세르토리

도면4h

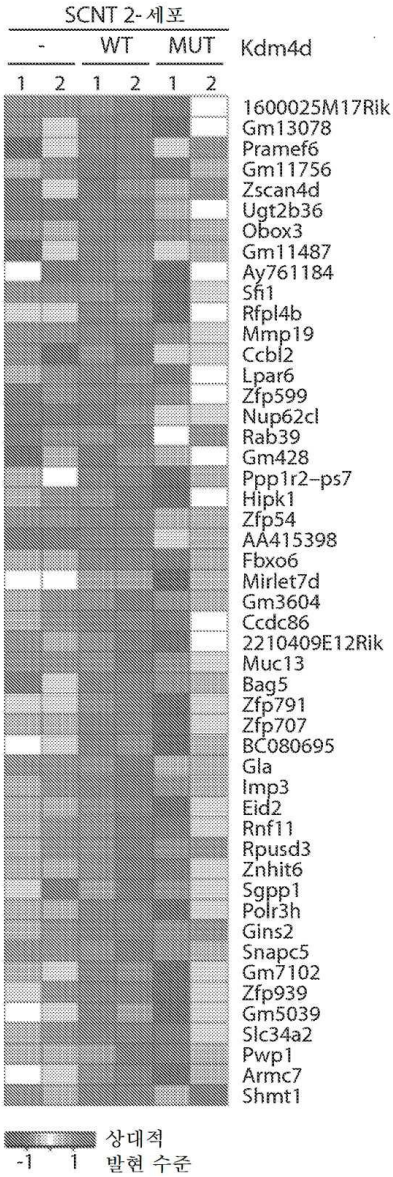


도면5a

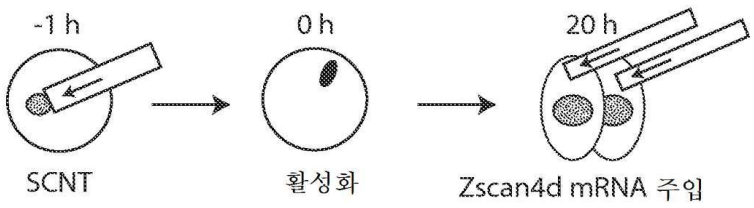


GO 용어	p 값
전사	3.1E-03
RNA 대사 과정의 조절	4.0E-03

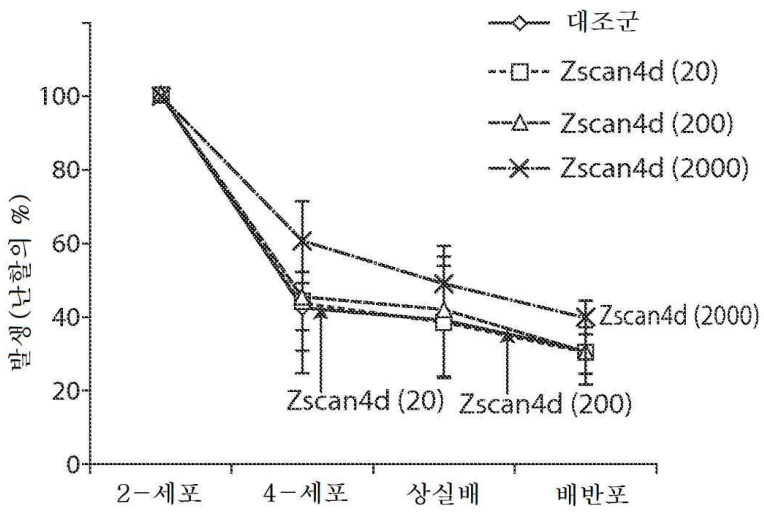
도면5b


SCNT 2-세포
-
WT
MUT
Kdm4d
1 2 1 2 1 2
1600025M17Rik
Gm13078
Pramef6
Gm11756
Zscan4d
Ugt2b36
Obox3
Gm11487
Ay761184
Sfi1
Rfpl4b
Mmp19
Ccbl2
Lpar6
Zfp599
Nup62cl
Rab39
Gm428
Ppp1r2-ps7
Hipk1
Zfp54
AA415398
Fbxo6
Mirlet7d
Gm3604
Ccdc86
2210409E12Rik
Muc13
Bag5
Zfp791
Zfp707
BC080695
Gla
Imp3
Eid2
Rnf11
Rpusd3
Znhit6
Sgpp1
Polr3h
Gins2
Snapc5
Gm7102
Zfp939
Gm5039
Slc34a2
Pwp1
Armc7
Shmt1
상대적
-1 1 발현 수준

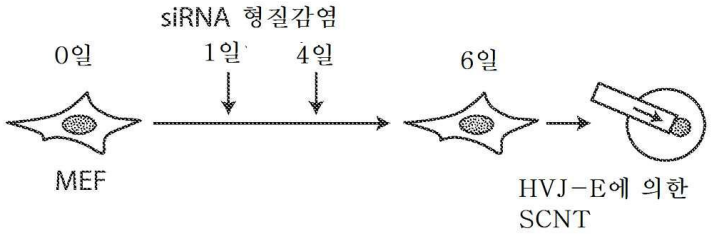
도면5c


-1 h
0 h
20 h
SCNT
활성화
Zscan4d mRNA 주입

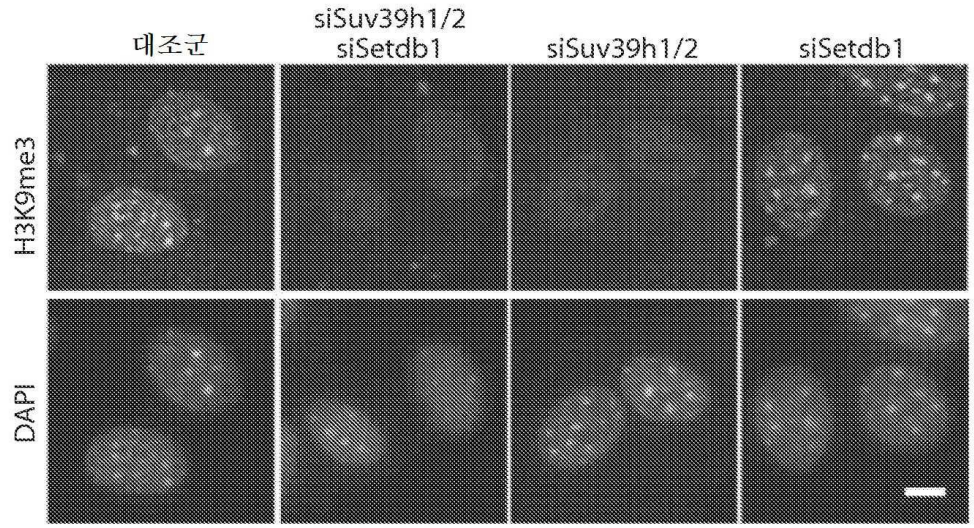
도면5d


대조군
Zscan4d (20)
Zscan4d (200)
Zscan4d (2000)
발생(난할의 %)
100
80
60
40
20
0
Zscan4d (2000)
Zscan4d (20)
Zscan4d (200)
2-세포
4-세포
상실배
배반포

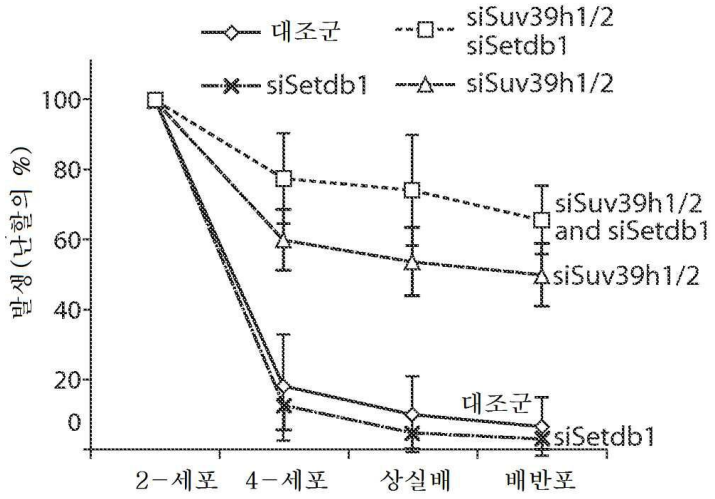
도면6a


siRNA 형질감염
0일
1일
4일
6일
MEF
HVJ-E에 의한
SCNT

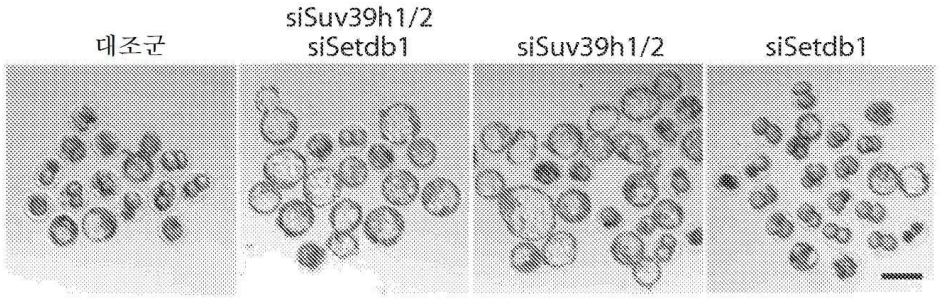
도면6b



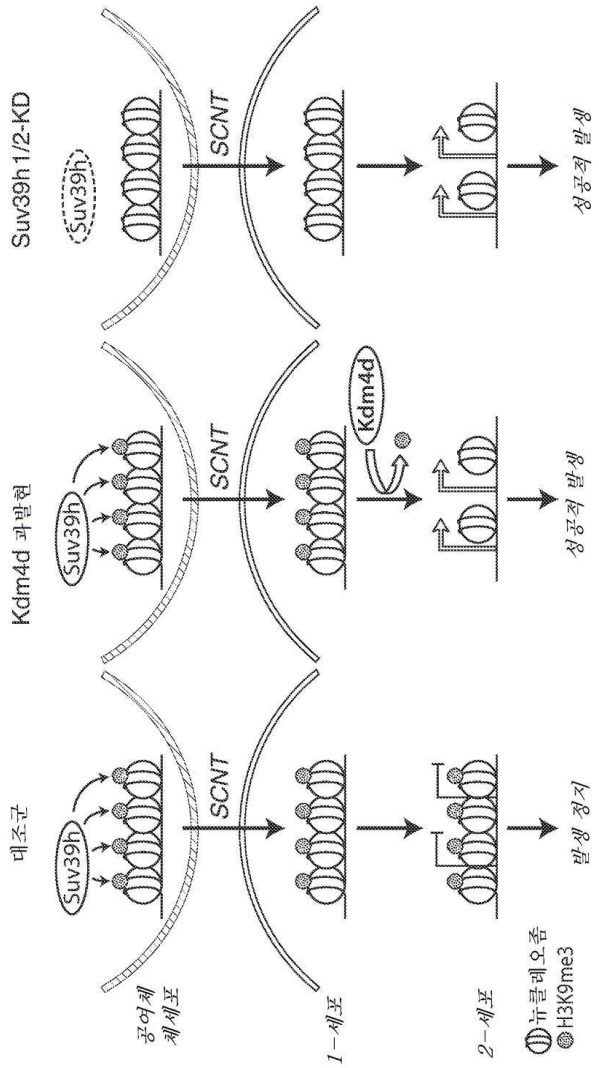
도면6c



도면6d



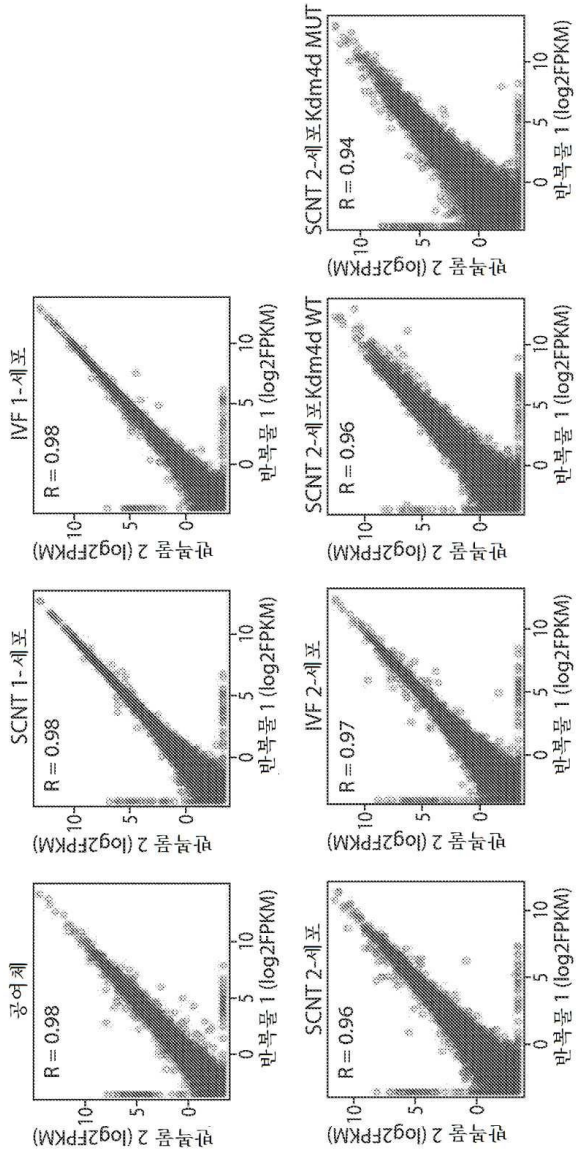
도면7


대조군
Kdm4d 과발현
Suv39h1/2-KD
Suv39h
Suv39h
Suv39h
SCNT
SCNT
SCNT
Kdm4d
공여체 체세포
1-세포
2-세포
발생 정지
성공적 발생
성공적 발생
뉴클레오좀
H3K9me3

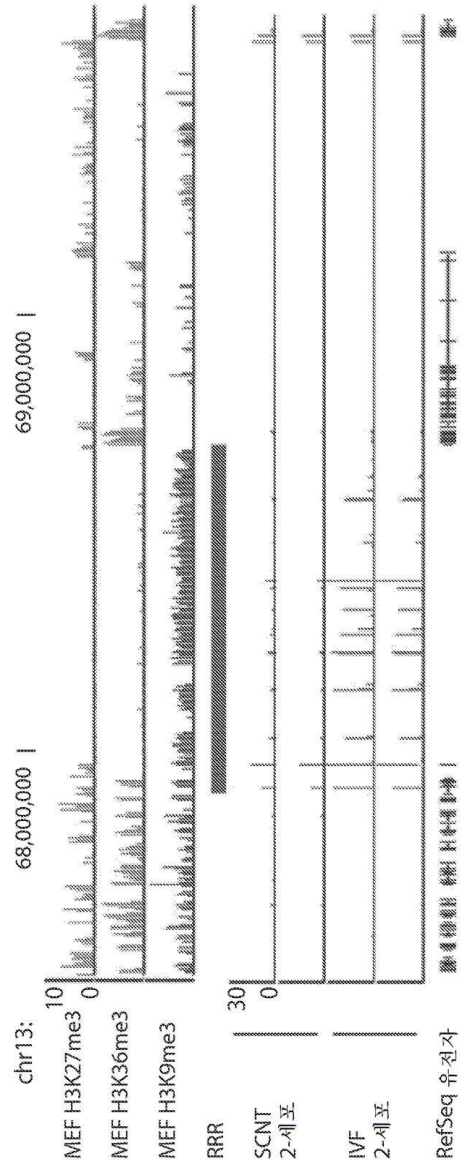
도면8a

샘플	반복물	총 판독값	유일하게 맵핑된 판독값	유일하게 맵핑된 비율
공여체	1	4.12E+07	3.21E+07	0.778
	2	4.03E+07	3.18E+07	0.789
IVF 1-세포	1	7.68E+07	5.43E+07	0.708
	2	7.14E+07	5.05E+07	0.707
SCNT 1-세포	1	7.47E+07	5.24E+07	0.702
	2	7.15E+07	5.00E+07	0.699
IVF 2-세포	1	6.40E+07	4.23E+07	0.661
	2	6.55E+07	4.31E+07	0.658
SCNT 2-세포	1	6.27E+07	4.42E+07	0.705
	2	6.65E+07	4.73E+07	0.711
SCNT 2-세포 Kdm4d WT	1	4.18E+07	2.76E+07	0.660
	2	3.36E+07	2.26E+07	0.672
SCNT 2-세포 Kdm4d MUT	1	3.91E+07	2.51E+07	0.642
	2	3.82E+07	2.70E+07	0.707

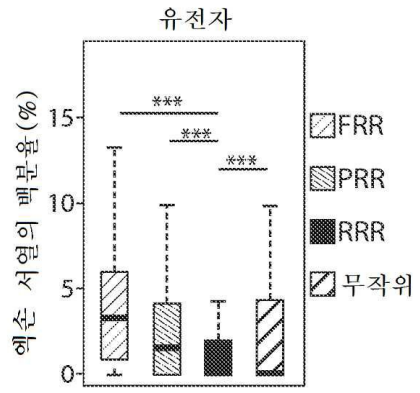
도면8b


공여체
R = 0.98
SCNT 1-세포
R = 0.98
IVF 1-세포
R = 0.98
SCNT 2-세포
R = 0.96
IVF 2-세포
R = 0.97
SCNT 2-세포Kdm4d WT
R = 0.96
SCNT 2-세포Kdm4d MUT
R = 0.94
반복물 1 (log2FPKM)
반복물 2 (log2FPKM)
0
5
10

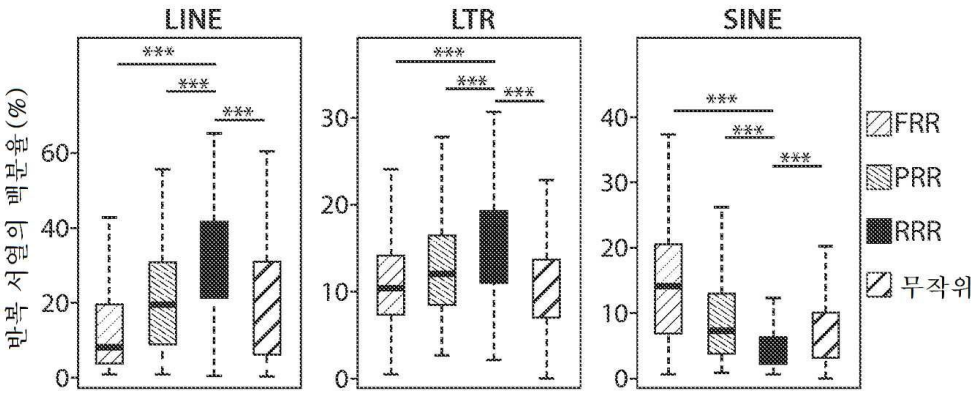
도면9a


chr13:
68,000,000
69,000,000
MEF H3K27me3
MEF H3K36me3
MEF H3K9me3
RRR
SCNT
2-세포
IVF
2-세포
RefSeq 유전자

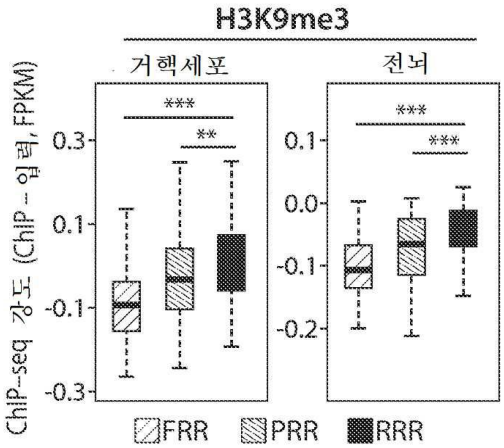
도면9b


유전자
엑손 서열의 빠분율(%)
FRR
PRR
RRR
무작위
***
***
***

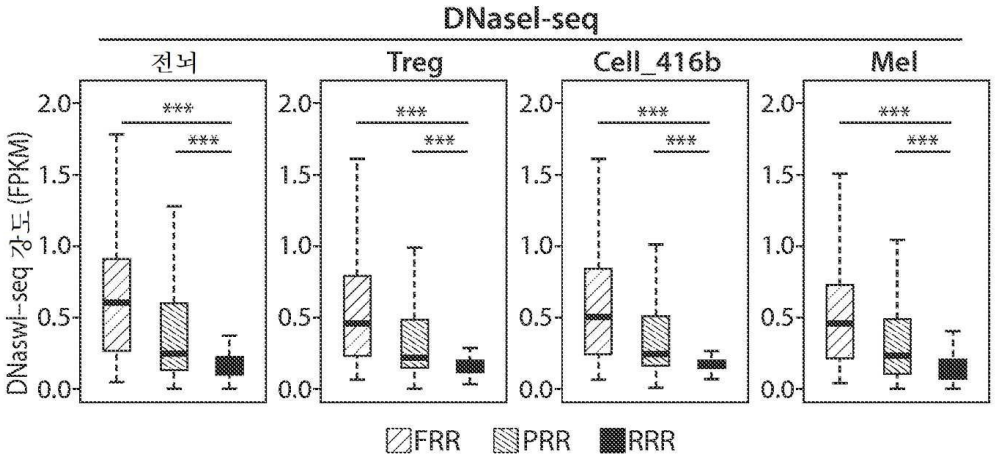
도면9c



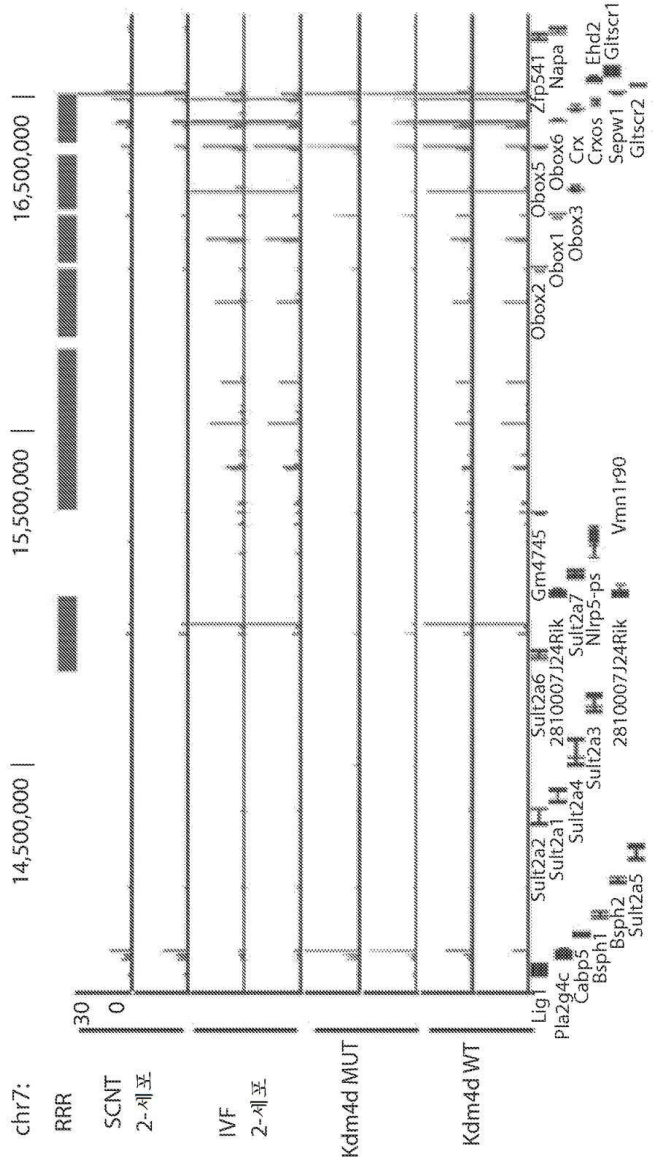
도면9d



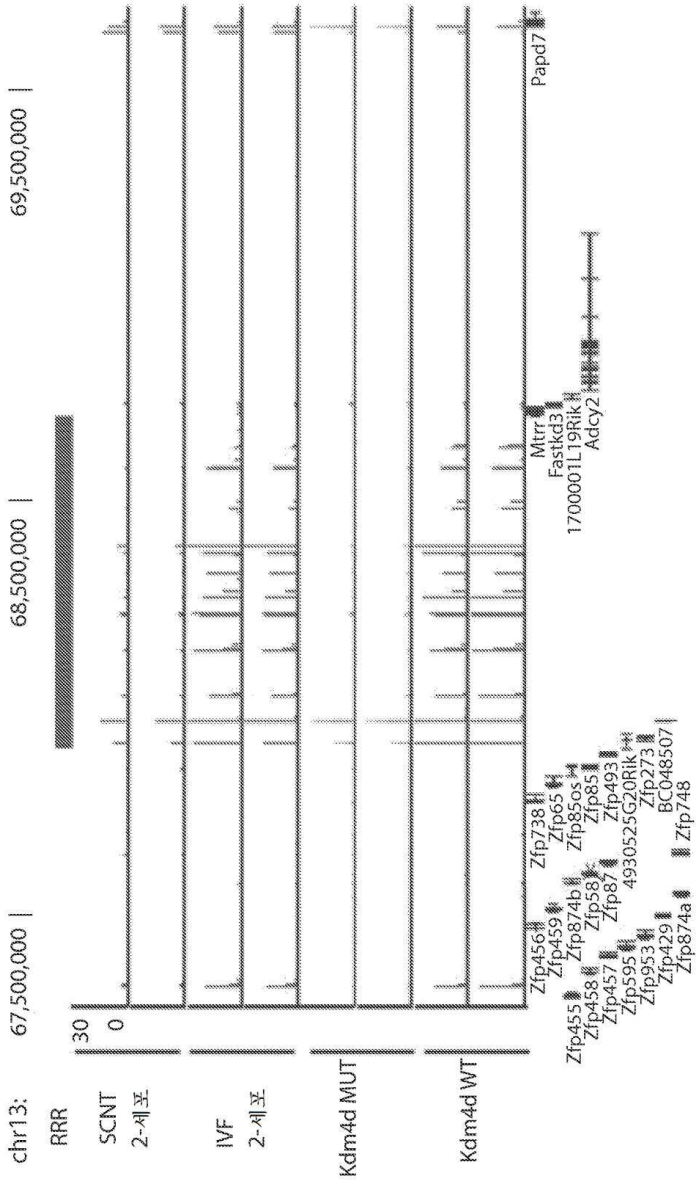
도면9e



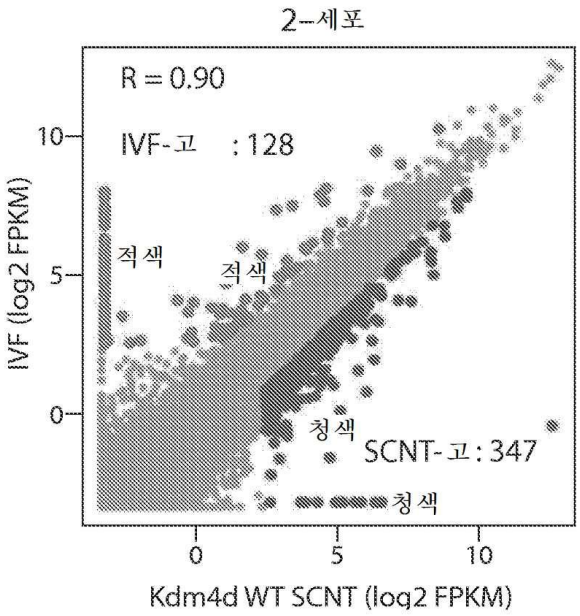
도면10a


chr7:
14,500,000
15,500,000
16,500,000
RRR
30
0
SCNT
2-세포
IVF
2-세포
Kdm4d MUT
Kdm4d WT
Lig1
Pla2g4c
Cabp5
Bsph1
Bsph2
Sult2a5
Sult2a2
Sult2a1
Sult2a4
Sult2a3
Sult2a6
2810007J24Rik
Gm4745
Sult2a7
Nlrp5-ps
Vmn1r90
2810007J24Rik
Obox2
Obox1
Obox3
Obox5
Obox6
Crx
Crxos
Sepw1
Gltscr1
Gltscr2
Zfp541
Napa
Ehd2

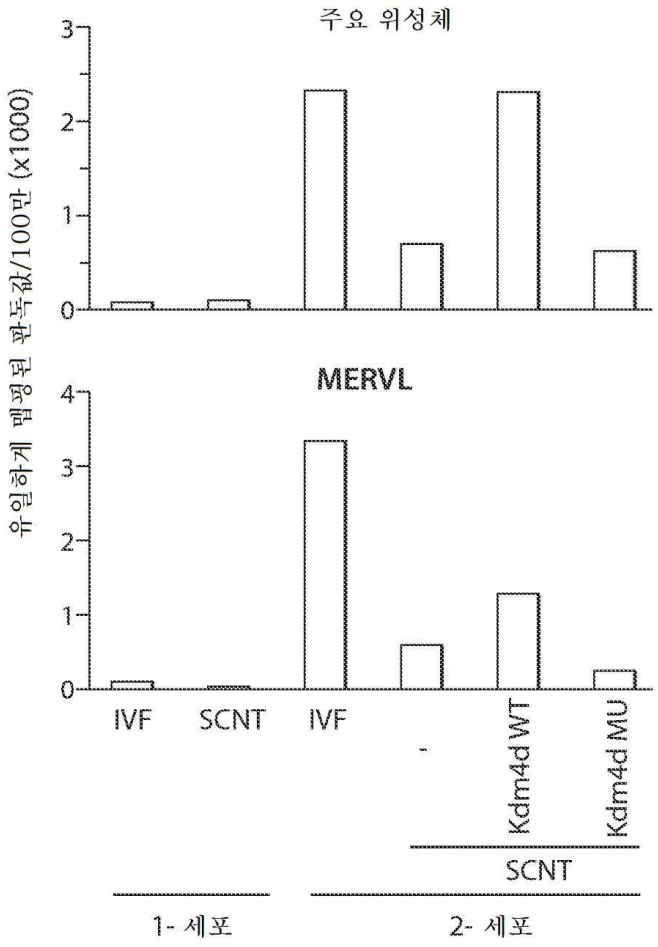
도면10b


chr13:
67,500,000
68,500,000
69,500,000
RRR
SCNT
2-세포
IVF
2-세포
Kdm4d MUT
Kdm4d WT
30
0
Papd7
Mtrr
Fastkd3
1700001L19Rik
Adcy2
Zfp738
Zfp65
Zfp85os
Zfp85
Zfp493
4930525G20Rik
Zfp273
BC048507
Zfp748
Zfp456
Zfp459
Zfp874b
Zfp58
Zfp87
Zfp455
Zfp458
Zfp457
Zfp595
Zfp953
Zfp429
Zfp874a

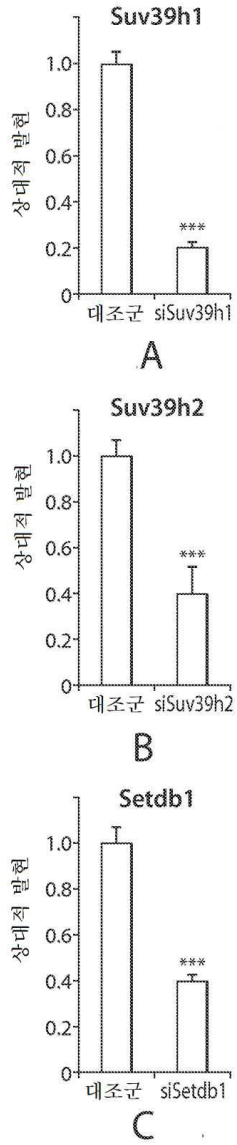
도면10c


2-세포
R = 0.90
IVF-고 : 128
적색
적색
청색
SCNT-고 : 347
청색
IVF (log2 FPKM)
Kdm4d WT SCNT (log2 FPKM)
0
5
10
0
5
10

도면11


주요 위성체
MERVL
유일하게 맵핑된 판독값/100만 (x1000)
0
1
2
3
4
IVF
SCNT
IVF
Kdm4d WT
Kdm4d MU
SCNT
1- 세포
2- 세포

도면12



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION

<120> METHODS AND COMPOSITIONS TO INCREASE SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER (SCNT) EFFICIENCY BY REMOVING HISTONE H3-LYSINE TRIMETHYLATION

<130> 701039-082282-PCT

<140> PCT/US2015/050178

<141> 2015-09-15

<150> 62/053,514

<151> 2014-09-22

<150> 62/050,308

<151> 2014-09-15

<160> 65

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1572

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggaaacta tgaagtctaa ggccaactgt gcccagaatc caaattgtaa cataatgata 60

tttcatccaa ccaaagaaga gtttaatgat tttgataaat atattgctta catggaatcc 120

caaggtgcac acagagctgg cttggctaag ataattccac ccaaagaatg gaaagccaga 180

gagacctatg ataatatcag tgaaatctta atagccactc ccctccagca ggtggcctct 240

gggcgggcag gggtgtttac tcaataccat aaaaaaaaga aagccatgac tgtgggggag 300

tatcgccatt tggcaaacag taaaaaatat cagactccac cacaccagaa tttcgaagat 360

ttggagcgaa aatactggaa gaaccgcatc tataattcac cgatttatgg tgctgacatc 420

agtggctcct tgtttgatga aaacactaaa caatggaatc ttgggcacct gggaacaatt 480

caggacctgc tggaaaagga atgtggggtt gtcatagaag gcgtcaatac accctacttg 540

tactttggca tgtggaaaac cacgtttgct tggcatacag aggacatgga cctttacagc 600

atcaactacc tgcaccttgg ggagcccaaa acttggtatg tggtgccccc agaacatggc 660

cagcgcctgg aacgcctggc cagggagctc ttcccaggca gttcccgggg ttgtggggcc 720

ttcctgcggc acaaggtggc cctcatctcg cctacagttc tcaaggaaaa tgggattccc 780

ttcaatcgca taactcagga ggctggagag ttcatggtga cctttcccta tggctaccat 840

gctggcttca accatggttt caactgcgca gaggccatca attttgccac tccgcgatgg 900

attgattatg gcaaaatggc ctcccagtgt agctgtgggg aggcaagggt gacctttcc 960

atggatgcct tcgtgcgcat cctgcaacct gaacgctatg acctgtggaa acgtgggcaa 1020

gaccgggcag ttgtggacca catggagccc agggtaccag ccagccaaga gctgagcacc 1080

cagaaggaag tccagttacc caggagagca gcgctgggcc tgagacaact cccttcccac 1140

tgggcccggc attccccttg gcctatggct gcccgcagtg ggacacggtg ccacaccctt 1200

gtgtgctctt cactcccacg ccgatctgca gttagtggca ctgctacgca gccccgggct 1260

gctgctgtcc acagctctaa gaagcccagc tcaactccat catccacccc tggtccatct 1320

gcacagatta tccacccgtc aaatggcaga cgtggtcgtg gtcgccctcc tcagaaactg 1380

agagctcagg agctgaccct ccagactcca gccaagaggc ccctcttggc gggcacaaca 1440

tgcacagctt cgggcccaga acctgagccc ctacctgagg atggggcttt gatggacaag 1500

cctgtaccac tgagcccagg gctccagcat cctgtcaagg cttctgggtg cagctgggcc 1560

cctgtgccct aa 1572

<210> 2

<211> 1533

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 2

atgaagacga agtccacatg tgctcagaat ccaaattgca gcataatgat atttcgtcca 60

accaaagaag agtttaatga ttttgacaaa tacattgctt acatggagtc ccaaggggca 120

caccgagctg gactggccaa ggtcatccca ccaaaagaat ggagggccag gcagtcttat 180

gacaatatca gcaacatctt aatagcaact cccctgcagc aagtggtctc tgggcaggca 240

ggcgtgttca cccaatacca taagaagaag aaaggcatga cagtgggggа gtaccgtgag 300

ctggccaaca gcaaaaagta ccagaccccg ccacacctgg attttgaaga tttggagcga 360

aaatactgga agaatcgcct gtatgagtca ccgatttatg gtgctgacgt cagcggctcc 420

ctgtttgatg ggaagactca acagtggaat gtgggtcacc tgggaacaat tcaagaccta 480

ttggaacagg aatgtggcat agtgattgag ggcgtcaaca cgccctacct gtactttggc 540

atgtggaaga ccacctttgc gtggcacacg gaggacatgg acctgtacag tatcaactac 600

ctacactttg ggcagcccaa gacctggtat gctgtgcccc ctgagcatgg caggcgcctg 660

gagcgcctgg ccagggaact cttccctggc agctcccagg gctgccaggc cttcctgagg 720

cacaaggtgg cgctcatctc gcccactgtg cttaaggaga atggcatccc ctttggtcgc 780

atcacccagg aggctgggga gttcatggtc acctttccct atggctacca cgcgggcttc 840

aaccatggct tcaactgcgc agaggccatc aattttgcca ccccaaggtg gattgactat 900

ggcaaggtgg catctcagtg cagctgtggg gaggccaggg tgagcttctc catggacgcc 960

tttgtgagga tcttgcagcc tgagcgatat gaactgtgga aacgtggcca agatcaggca 1020

gttgtggacc acacagagac tatggtgtct accagtcagg agctcaccac ccggcgggtg 1080

accaaagcac caagaaaaac ttggggcttg aagcgtctcc ggcttcgcca ggtctcacga 1140

tctcttctgc ctatagccac ggtaagtaac gttccttgca acatgcaggt gtgccacacc 1200

tccaggcaac catcagatgt gaaaggtgat gatgtccaga agtctgactc agccagagcc 1260

tcaccacatc ctctgagtct gccttcttct ggtcacatgt caactagaag atgtagtctt 1320

ggtcgtcgtc cttgtgaact aggagctcag gagtcctcca atggagctcc agtcaagagg 1380

caacttccag caggcagaga tgacacaagc cccagtccag agcttcagcc ccaggctgtg 1440

agtggagact taatagtcga ctcaggactt gtgaaccctg gcccacagca tcttatgaca 1500

gcttctgaag ggggattgac ctccgacccc taa 1533

<210> 3

<211> 1533

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 3

atgaagacta agtccacctg tgctcagaat ccaaattgca gcataatgat atttcgtcca 60

accaaagaag agtttaacga ctttgacaaa tacatcgcct acatggagtc ccaaggggca 120

cacagagctg gactggccaa ggtcatcccg ccaaaagaat ggagggccag gcagtcttat 180

gacaatatca gtaacatctt aatagcaact cccctgcagc aagtagtctc cgggcaggca 240

ggtgtgttca ctcaatacca taagaagaag aaagccatga cagttgggca gtaccggcac 300

ctggccaaca gtaaaaaata ccaaacccca ccacacctgg attttgaaga tttggagaga 360

aaatactgga agaatcgcct gtatgagtca ccaatttatg gtgctgacgt cagtggctcc 420

ctgtttgatg ggaagactca acagtggaat gtgggccacc tgggaacaat tcaagaccta 480

ttggaacagg aatgcggcat agtgattgag ggcgtcaaca cgccctacct gtactttggc 540

atgtggaaga cctcctttgc gtggcacacg gaggacatgg acctgtacag tatcaactac 600

ctgcactttg gacagcccaa gacctggtat gctgtacccc ctgagcatgg caggcgcctg 660

gagctcctag ccaaggaact cttcccaggc agctcccagg gctgccaggc cttcctgagg 720

cacaaggtgg cgctcatctc acccactgtg ctcaaggaga atggcatccc ctttggtcga 780

atcacccagg aggctgggga gttcatggtc acctttccct atggctacca cgcgggcttc 840

aaccatggct tcaactgtgc agaagccatc aatttcgcca cgccgaggtg gattgactat 900

ggcaaggtgg catctcagtg cagctgtggg gaggccaggg tgagcttctc catggatgcc 960

tttgtgagga tcctgcagcc tgagcgatat gagatgtgga aacgaggtca agatcaggca 1020

gttgtggacc acacagaggc tatggggcct accagtcagg agctcaccac ctggcgggtg 1080

atccaggcac caagaaaaac ttggggcctg aagcatctcc ggcttcgcca ggtttcacgc 1140

tgtcttctgc ctgtagccac tgacagtaac attgccaaca acacccagat gtgccacacc 1200

tccaggcaag cagcagattc gaaaggtgat gaggtccagg agtctgaccc agccatagcc 1260

ccaccatatc ctctgggtct atcttctcct ggccacatgt caactggaaa acgtggtctt 1320

ggtcgtcgcc cttgtgaact aggagttcag gagtccacca atggagctcc agtcaagagg 1380

cgacttccag aaggcagaga tgacagaagt cccagcccag agcttcagtc ccagtccgtg 1440

actggagact taatagtcaa ctcagacctt gtaaatcctg ggccacagca tcctgtgaca 1500

gcttctgaag ggggattgac ctctgacccc taa 1533

<210> 4

<211> 1485

<212> DNA

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 4

atgaagtcta aggcccatcg tgctcagaat ccaaattgca gcataatggt atttcatcca 60

accaaagaag agtttagtga ttttgataac tatattgctt acatggaatc tcagggtgca 120

caccggggag gcctggccaa ggtcatccca cccaaggagt ggagggccag acagacctat 180

gatgacatcg atgacatctt aataactcgc cccctccagc aggtggccta tggcggggca 240

ggtgtcttta ctcaattcca taaaaagagg agagccatga ccctgagaca gtatcgccag 300

ctggccacca gcacaaaata ccagacccca gcgcacctga ctttcgaaga gttggagcaa 360

aaatactgga aaaaccgtct ctacgatgcc ccaatctatg gtgctgatat cagcggctct 420

ctgtttgatg aaaacacggc acactggaac ctcaggcgcc tgggcaccat tcaggacctg 480

ttggagcagg aatgtggtgt cgtcatcgag ggcgtcaaca cgccctacct gtactttggc 540

atgtggaaga ccacgttcgc ctggcacacg gaggacatgg acctgtacag catcaactac 600

ctgcacttcg gggagcccaa gacgtggtac gcggtgcccc cggagcacgg gcggcgcctg 660

gagcgcctgg ccgggcagct gttcccgggc agttcccgca gctgccaggc cttcctgcgg 720

cacaaggtgg ccctcatctc gcccagcgtc ctgcggcaga acggcatccc cttccgccgc 780

atcactcagc aggctggcga gttcatggtg acctttcctt acggctacca cgcggggttc 840

aaccacggct tcaactgcgc cgaagccatc aatttcgcca ccccgcgctg gatcgagtat 900

ggcaaagtgg cctcccagtg cagctgcggg gaggccaggg tcacctttc catggatgcc 960

ttcgttcgta tcctgcaacc cgagcgctac gaactgtgga agtgcggcca agaccggaag 1020

gccgtggacc acacggagcc tacggcacgc accagcccag agctgaccag gtggaagcag 1080

gatcgcaggc tctggagggc agcccgaggc ttggcccca aactcgctag gtccctggct 1140

gcaggtgatg gtactagctg caaggctccc aagcgcctac gggctgccag ggaatctaca 1200

gcacagccag ggggcgttgc ccacagttcc cggaaacctc acgcagcccc gcggacttcc 1260

ctgggtccct gtgccccaga ggtcctctca actgtcacac gtggctgtcg gcgtcgctct 1320

agggaactgg gggtgcagga gccaagcctc caatctccag caaagaggcg cctctcagtc 1380

agaacagggc gcacagctgc gcgctccaag cctcagtcct cacctgagcg tggtatcttg 1440

atggtcaatc ctgcaccaag cctggggccg cagctccccg cttag 1485

<210> 5

<211> 1521

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 5

atgacgtcca ggccctgtgg ggtccagaac ccaggctgtg ccattatgac cttctaccca 60

accctggaag aatttgaaga cttcagccaa tatatcgctt acatggaatc gcaaggggca 120

caccacgctg gcctggccaa ggtaattccc cccaaaggat ggaaagccag acagacttat 180

gaggatatca gtgacatcgt aatagctgcc cctctccagc aggtagcctt tggggaggca 240

ggtgtgttta ctcagtacca cagaaagaag agagccatga ctgtgagcca gtatcaccac 300

ctcgcacata ctgtaaaata tcaagctcca ccacacttgg attttgagga cctggagcaa 360

acatactgga aaacgcgcct gtacggttcc cccatctacg gcgcggatgt cagtggctcg 420

ttgttcgatg agaacacgaa gcagtggaac ctgggccacc tgggcaccat ccaggacctg 480

ctggagcagg agtgcggagt ggccatcgac ggcgtcaaca gcccgtacct gtacttcggc 540

atgtggaaga ccggcttcgc ctggcacacg gaggacatgg acctttacag cctcaacttc 600

ctgcacttcg gggagcccaa gacgtggtac gcggtgcccc ctgcgcatgg ccggcgcctg 660

gaacgcctgg ccagggagct gttccctggc cccgcgcggg gctgcgaggc cttcctgaga 720

cacaaggtgg cgctcatctc gcccacggtc ctcaaggccc agggcatccc ctttggccgc 780

gtcacgcagg aggcgggcga gttcatggtg acgtttccct atggctacca ctcgggcttc 840

aaccacggct tcaactgcgc cgaagccatc aatttcgcca ccccgcgctg ggtcgattat 900

ggcaaagtgg cgtcgcagtg cagctgcggg gaggcgcggg tggtgttctc catggacgcg 960

ttcgtgcgca tcctgcaacc cgagcgctat gagctgtgga aacggggcca ggatcgggtg 1020

gcgctggaac acacggagca cctgtcctcg cctggcagcc tggagttgag tgcctggagg 1080

gaggtccgcg agcctgcggg ggctgaactt ggcctggggc acagcccacc ccacactgcc 1140

cggggtcggc tctgggtggc aggccgtggg atccgccgcc gaaactctgt gtgttcggtg 1200

tctcggtgcc cctcgcctac ctggggttct tcctccgctg cccagttcca ggttgcaact 1260

ctctgcagct cccatgagcc aggacccacc ccgccgctgt caccaggctc ctctgctctg 1320

ggtctccaat caactggcag acgtggtcct gttcgatgtc gtaggtctcg accccatcgt 1380

cgtcctcggg tacaggagac tttggagcca acagtccagg ctccagctaa gaggctcctc 1440

tcagtaggta cagtgggcac agctgcagac ttggaagctc atgtcctttt ggccaaggaa 1500

cccttgatag acagccctgc c 1521

<210> 6

<211> 1503

<212> DNA

<213> Bos taurus

<400> 6

atggaagcta tgaagcccag ttgtgctcag aacccaagtt gtagcataat gatatttcat 60

ccaaccaaag aagagtttac tgattttgat aaatacattg cttacataga atcgcaaggg 120

gcccaccgag caggcttggc taagatagtt ccacccaagg aatggaaagc cagacagacc 180

tacgacgata tcaatgacat cttaataacc gctccgctcc agcaggtggt ctctgggcgg 240

gcaggtgtgt ttactcaata ccacaaaaag aagaaagcca tgaccgtggc agagtaccgc 300

cacttagcaa atactgaaaa ataccagact ccattctact ccgattttga ggaattggag 360

cgaaaatatt ggaaaacccg cctctttgag tccccaatat acggcgcgga catcagtggc 420

tctttatttg atgaaaacac gaagcagtgg aacctgggac gcctggggac catccaggac 480

ctgctggagc aggagtgcgg ggtggtcatc gagggcgtca acacccccta cctgtacttc 540

ggcatgtgga agaccgcctt cgcctggcac acggaggaca tggaccttta tagcatcaac 600

ttcctgcact tcggggagcc caagacctgg tacgcggtgc cgcccgagca cggccggcgc 660

ctggaacgcc tggccggcgc gctcttcccg ggcagctcgc ggagctgcga ggccttcctg 720

cgccacaagg cggcgctcat ctcgcccacg gtgctccggg acaacggcat ccccttcggt 780

cgggtcacgc aggaggcggg cgagttcatg gtgaccttcc cctacggcta ccactcgggc 840

ttcaaccacg gcttcaactg cgccgaggcc atcaatttcg ccaccccgcg ctggatcgat 900

tatggcaaag tggcctcgca gtgcagctgc ggcgaggcgc aggtggcctt ctccatggac 960

gccttcgtgc gcatcctgca gcccgagcgc tatgagctgt ggaagcgcgg gcaggaccgg 1020

gcggtggtga accacgccga gcccgcggcg ccgggcggcc aggagctgag agcctggaag 1080

gaggtgcaga cgctgggccc caagtacttc ccgcctcgcc gctccgcccg cctgcgtcag 1140

cccgtgtcct caagcgaggg cactgacccc agagcccctg tgcgggccgt gtccctgcga 1200

cccttgcctg cccggggttc ctgctcggct tcccagtttg acgctgtcgc cggcagcagc 1260

tcacggaagc ccagccagac ccctccgctg ttgccaggtc cgtcggtggc gtcgtgcctc 1320

cacccagttg gcagatgtgg ttctcgtcgt cgccctcagg aaaaaggcac tcaagagctg 1380

actgccccca tcggagctaa gaggggcctt gccttagacc gcaaggctca ggaccccaag 1440

gctcaacccc tgtctgcaga gggacggatg gacaatcctg ccccaacgag ccctggactc 1500

tag 1503

<210> 7

<211> 1572

<212> DNA

<213> Macaca sp.

<400> 7

atggaaacta tgaagtctaa ggccaactat ggccagaatc caaattgtaa cataatgata 60

tttcatccaa ccaaagaaga gtttaatgat tttgataaat atattgctta catggaatcc 120

caaggtgcac acagagctgg cttggctaag atagttccac ccaaagaatg gaaagccaga 180

gagacctatg ataacatcag tgaaatctta atagccactc ccctccaaca ggtggcctct 240

gggcgggcag gggtgtttac tcaataccat aaaaaaaaga aagccatgac cgtgggggag 300

tatcgccact tggcaaacag taaaaaatat caaactccac cacaccagaa tttcgaagat 360

ttggagcgaa aatactggaa gaaccgcatc tataattcac caatttatgg tgctgacatc 420

agtggctcct tgtttgatga aaacactaaa cagtggaatc ttgggcacct gggaacaatt 480

caggacctgt tggaaaagga atgtggggtt gtcatagaag gcgttaacac accctacttg 540

tactttggca tgtggaagac cacatttgct tggcacacgg aggacatgga cctttacagc 600

atcaactacc tgcacctcgg ggagcccaaa acttggtatg tggtgccccc agagcatggc 660

cagcgcctgg aacgcctggc cagggagctc ttcccaggca gttcccgggg ctgtggggcc 720

ttcctgcggc acaaggtggc cctcatctcg cctacagttc tcaaggaaaa tgggatcccc 780

ttcaatcgca taactcagga ggctggagag ttcatggtga cctttcccta tggctaccat 840

gctggcttca accatggttt caactgtgca gaggccatca attttgccac tccacgatgg 900

attgattatg gcaaaatggc ctcccagtgt agctgtgggg aggccagggt gacctttcc 960

atggacgcct tcgtgcgcat cctgcaacct gagcgctatg agctgtggaa acgtgggcaa 1020

gaccgggcag ttgtggacca catggagccc agggtaccag ccagccaaga gctgagcacc 1080

cagaaggagg tccagttgcc caggagagca gcgctgggcc tgagacaact ccctcctcac 1140

tgggcccggc attccccttg gcctctggct gcccgcagtg ggacgcgctg ccacaccctt 1200

gtgtgctctt cactcccacg ccgatctgca gttagtggca ctgctacgca gccccgggct 1260

gctgccgtcc acagctctag gaagcccagc tcaactccat catccacccc tggtccatct 1320

gcacagatta tccacccgtc aaatggcaga cgtggacgtg gtcgccgtcc tcagaaactg 1380

agagctcagg agctgaccct ccagactcca gccaagaggc tcctcttagc gggcacaaca 1440

tgcacagttt caggcccaga acctgagccc ctacctgagg gtggggcttt gatggacaag 1500

cctgtaccac tgaatccagg gctccagcat cctgtaaagg cttctaggtg cagctgggcc 1560

cctgtgccct aa 1572

<210> 8

<211> 1572

<212> DNA

<213> Pan troglodytes

<400> 8

atggaaacta tgaagtctaa ggccaactgt gcccagaatc caaattgtaa cataatgata 60

tttcatccaa ccaaagaaga gtttaatgat tttgataaat atattgctta catggaatcc 120

caaggtgcac acagagctgg cttggctaag ataattccac ccaaagaatg gaaagccaga 180

gagacctatg ataatatcag tgaaatctta atagccactc ccctccagca ggtggcctct 240

gggcgggcag gggtgtttac tcaataccat aaaaaaaaga aagccatgac cgtgggggag 300

tatcgccatt tggcaaacag taaaaaatat cagactccac cacaccagaa tttcgaagat 360

ttggagcgaa aatactggaa gaaccgcatc tataattcac cgatttatgg tgctgacatc 420

agtggctcct tgtttgatga aaacactaaa caatggaatc ttgggcacct gggaacaatt 480

caggacctgc tggaaaagga atgtggggtt gtcatagaag gcgtcaatac accctacttg 540

tactttggca tgtggaaaac cacgtttgct tggcatacag aggacatgga cctttacagc 600

atcaactacc tgcaccttgg ggagcccaaa acttggtatg tggtgccccc agaacatggc 660

cagcgcctgg aacgcctggc cagggagctc ttcccaggca gttcccgggg ttgtggggcc 720

ttcctgcggc acaaggtggc cctcatctcg cctacagttc tcaaggaaaa tgggattccc 780

ttcaatcgca taactcagga ggctggagag ttcatggtga cctttcccta tggctaccat 840

gctggcttca accatggttt caactgcgca gaggccatca attttgccac tccacgatgg 900

attgattatg gcaaaatggc ctcccagtgt agctgtgggg aggcaagggt gacctttcc 960

atggatgcct tcgtgcgcat cctgcaacct gaacgctatg acctgtggaa acgtgggcaa 1020

gaccgggcag ttgtggacca catggagccc agagtaccag ccagccaaga gctgagcacc 1080

cagaaggaag tccagttacc caggagagca gcgctgggcc tgagacaact cccttcccac 1140

tgggcccggc attccccttg gcctatggct gcccgcagtg ggacacggtg ccacaccctt 1200

gtgtgctctt cactcccacg ccgatctgca gttagtggca ctgctacgca gccccgggct 1260

gctgctgtcc acagctctaa gaagcccagc tcaactccat catccacccc tggtccatct 1320

gcacagatta tccacccgtc aaatgttaga cgtggtcgtg gtcgccctcc tcagaaactg 1380

agagctcagg agctgaccct ccagactcca gccaagaggc ccctcttggc gggcacaaca 1440

tgcacagctt cgggtccaga acctgagccc ctacctgaga atggggcttt gatggacaag 1500

cctgtaccac tgagcccagg gctccagcag cctgtcaagg cttctgggtg cagctgggcc 1560

cctgtgccct aa 1572

<210> 9

<211> 2745

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

cgcgaggccg gctaggcccg aatgtcgtta gccgtgggga aagatggcgg aaaatttaaa 60

aggctgcagc gtgtgttgca agtcttcttg gaatcagctg caggacctgt gccgcctggc 120

caagctctcc tgccctgccc tcggtatctc taagaggaac ctctatgact ttgaagtcga 180

gtacctgtgc gattacaaga agatccgcga acaggaatat tacctggtga aatggcgtgg 240

atatccagac tcagagagca cctgggagcc acggcagaat ctcaagtgtg tgcgtatcct 300

caagcagttc cacaaggact tagaaaggga gctgctccgg cggcaccacc ggtcaaagac 360

cccccggcac ctggacccaa gcttggccaa ctacctggtg cagaaggcca agcagaggcg 420

ggcgctccgt cgctgggagc aggagctcaa tgccaagcgc agccatctgg gacgcatcac 480

tgtagagaat gaggtggacc tggacggccc tccgcgggcc ttcgtgtaca tcaatgagta 540

ccgtgttggt gagggcatca ccctcaacca ggtggctgtg ggctgcgagt gccaggactg 600

tctgtgggca cccactggag gctgctgccc gggggcgtca ctgcacaagt ttgcctacaa 660

tgaccagggc caggtgcggc ttcgagccgg gctgcccatc tacgagtgca actcccgctg 720

ccgctgcggc tatgactgcc caaatcgtgt ggtacagaag ggtatccgat atgacctctg 780

catcttccgc acggatgatg ggcgtggctg gggcgtccgc accctggaga agattcgcaa 840

gaacagcttc gtcatggagt acgtgggaga gatcattacc tcagaggagg cagagcggcg 900

gggccagatc tacgaccgtc agggcgccac ctacctcttt gacctggact acgtggagga 960

cgtgtacacc gtggatgccg cctactatgg caacatctcc cactttgtca accacagttg 1020

tgaccccaac ctgcaggtgt acaacgtctt catagacaac cttgacgagc ggctgccccg 1080

catcgctttc tttgccacaa gaaccatccg ggcaggcgag gagctcacct ttgattacaa 1140

catgcaagtg gaccccgtgg acatggagag cacccgcatg gactccaact ttggcctggc 1200

tgggctccct ggctccccta agaagcgggt ccgtattgaa tgcaagtgtg ggactgagtc 1260

ctgccgcaaa tacctcttct agcccttaga agtctgaggc cagactgact gagggggcct 1320

gaagctacat gcacctcccc cactgctgcc ctcctgtcga gaatgactgc cagggcctcg 1380

cctgcctcca cctgccccca cctgctccta cctgctctac gttcagggct gtggccgtgg 1440

tgaggaccga ctccaggagt ccccctttccc tgtcccagcc ccatctgtgg gttgcactta 1500

caaaccccca cccaccttca gaaatagttt ttcaacatca agactctctg tcgttgggat 1560

tcatggccta ttaaggaggt ccaaggggtg agtcccaacc cagccccaga atatatttgt 1620

ttttgcacct gcttctgcct ggagattgag gggtctgctg caggcctcct ccctgctgcc 1680

ccaaaggtat ggggaagcaa ccccagagca ggcagacatc agaggccaga gtgcctagcc 1740

cgacatgaag ctggttcccc aaccacagaa actttgtact agtgaaagaa agggggtccc 1800

tgggctacgg gctgaggctg gtttctgctc gtgcttacag tgctgggtag tgttggccct 1860

aagagctgta gggtctcttc ttcagggctg catatctgag aagtggatgc ccacatgcca 1920

ctggaaggga agtgggtgtc catgggccac tgagcagtga gaggaaggca gtgcagagct 1980

ggccagccct ggaggtaggc tgggaccaag ctctgccttc acagtgcagt gaaggtacct 2040

agggctcttg ggagctctgc ggttgctagg ggccctgacc tggggtgtca tgaccgctga 2100

caccactcag agctggaacc aagatctaga tagtccgtag atagcactta ggacaagaat 2160

gtgcattgat ggggtggtga tgaggtgcca ggcactgggt agagcacctg gtccacgtgg 2220

attgtctcag ggaagccttg aaaaccacgg aggtggatgc caggaaaggg cccatgtggc 2280

agaaggcaaa gtacaggcca agaattgggg gtgggggaga tggcttcccc actatgggat 2340

gacgaggcga gagggaagcc cttgctgcct gccattccca gaccccagcc ctttgtgctc 2400

accctggttc cactggtctc aaaagtcacc tgcctacaaa tgtacaaaag gcgaaggttc 2460

tgatggctgc cttgctcctt gctcccccac cccctgtgag gacttctcta ggaagtcctt 2520

cctgactacc tgtgcccaga gtgcccctac atgagactgt atgccctgct atcagatgcc 2580

agatctatgt gtctgtctgt gtgtccatcc cgccgacccc ccagactaac ctccaggcat 2640

ggactgaatc tggttctcct cttgtacacc cctcaaccct atgcagcctg gagtgggcat 2700

caataaaatg aactgtcgac tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 2745

<210> 10

<211> 3093

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

cggggccgag gcgcgaggag gtgaggctgg agcgcggccc cctcgccttc cctgttccca 60

ggcaagctcc caaggcccgg gcggcggggc cgtcccgcgg gccagccaga tggcgacgtg 120

gcggttcccc gcccgccgcg accccaactc cgggacgcac gctgcggacg cctatcctcc 180

cccaggccgc tgacccgcct ccctgcccgg ccggctcccg ccgcggagga tatggaatat 240

tatcttgtaa aatggaaagg atggccagat tctacaaata cttgggaacc tttgcaaaat 300

ctgaagtgcc cgttactgct tcagcaattc tctaatgaca agcataatta tttatctcag 360

gtaaagaaag gcaaagcaat aactccaaaa gacaataaca aaactttgaa acctgccatt 420

gctgagtaca ttgtgaagaa ggctaaacaa aggatagctc tgcagagatg gcaagatgaa 480

ctcaacagaa gaaagaatca taaaggaatg atatttgttg aaaatactgt tgatttagag 540

ggcccacctt cagacttcta ttacattaac gaatacaaac cagctcctgg aatcagctta 600

gtcaatgaag ctacctttgg ttgttcatgc acagattgct tctttcaaaa atgttgtcct 660

gctgaagctg gagttctttt ggcttataat aaaaaccaac aaattaaaat cccacctggt 720

actcccatct atgaatgcaa ctcaaggtgt cagtgtggtc ctgattgtcc caataggatt 780

gtacaaaaag gcacacagta ttcgctttgc atctttcgaa ctagcaatgg acgtggctgg 840

ggtgtaaaga cccttgtgaa gattaaaaga atgagttttg tcatggaata tgttggagag 900

gtaatcacaa gtgaagaagc tgaaagacga ggacagttct atgacaacaa gggaatcacg 960

tatctctttg atctggacta tgagtctgat gaattcacag tggatgcggc tcgatacggc 1020

aatgtgtctc attttgtgaa tcacagctgt gacccaaatc ttcaggtgtt caatgttttc 1080

attgataacc tcgatactcg tcttccccga atagcattgt tttccacaag aaccataaat 1140

gctggagaag agctgacttt tgattatcaa atgaaaggtt ctggagatat atcttcagat 1200

tctattgacc acagcccagc caaaaagagg gtcagaacag tatgtaaatg tggagctgtg 1260

acttgcagag gttacctcaa ctgaactttt tcaggaaata gagctgatga ttataatatt 1320

tttttcctaa tgttaacatt tttaaaaata catatttggg actcttatta tcaaggttct 1380

acctatgtta atttacaatt catgtttcaa gacatttgcc aaatgtatta ccgatgcctc 1440

tgaaaagggg gtcactgggt ctcatagact gatatgaagt cgacatattt atagtgctta 1500

gagaccaaac taatggaagg cagactattt acagcttagt atatgtgtac ttaagtctat 1560

gtgaacagag aaatgcctcc cgtagtgttt gaaagcgtta agctgataat gtaattaaca 1620

actgctgaga gatcaaagat tcaacttgcc atacacctca aattcggaga aacagttaat 1680

ttgggcaaat ctacagttct gtttttgcta ctctattgtc attcctgttt aatactcact 1740

gtacttgtat ttgagacaaa taggtgatac tgaattttat actgttttct acttttccat 1800

taaaacattg gcacctcaat gataaagaaa tttaaggtat aaaattaaat gtaaaaatta 1860
atttcagctt catttcgtat ttcgaagcaa tctagactgt tgtgatgagt gtatgtctga 1920
acctgtaatt cttaaaagac ttcttaatct tctagaagaa aaatctccga agagctctct 1980
ctagaagtcc aaaatggcta gccattatgc ttctttgaaa ggacatgata atgggaccag 2040
gatggttttt tggagtacca agcaagggga atggagcact ttaagggcgc ctgttagtaa 2100
catgaattgg aaatctgtgt cgagtacctc tgatctaaac ggtaaaacaa gctgcctgga 2160
gagcagctgt acctaacaat actgtaatgt acattaacat tacagcctct caatttcagg 2220

caggtgtaac agttcctttc caccagattt aatattttta tacttcctgc aggttcttct 2280
taaaaagtaa tctatatttt tgaactgata cttgttttat acataaattt tttttagatg 2340
tgataaagct aaacttggcc aaagtgtgtg cctgaattat tagacctttt tattagtcaa 2400
cctacgaaga ctaaaataga atatattagt tttcaaggga gtgggaggct tccaacatag 2460
tattgaatct caggaaaaac tattctttca tgtctgattc tgagatttct aattgtgttg 2520
tgaaaatgat aaatgcagca aatctagctt tcagtattcc taatttttac ctaagctcat 2580
tgctccaggc tttgattacc taaaataagc ttggataaaa ttgaaccaac ttcaagaatg 2640

cagcacttct taatctttag ctctttcttg ggagaagcta gactttattc attatattgc 2700
tatgacaact tcactctttc ataatatata ggataaattg tttacatgat tggaccctca 2760
gattctgtta accaaaattg cagaatgggg ggccaggcct gtgtggtggc tcacacctgt 2820
gatcccagca ctttgggagg ctgaggtagg aggatcacgt gaggtcggga gttcaagacc 2880
agcctggcca tcatggtgaa accctgtctc tactgaaaat acaaaaatta gccgggcgtg 2940
gtggcacacg cctgtagtcc cagctactca ggaggctgag gcaggagaat cacttgaatt 3000
caggaggcgg aggttgcagt gagccaagat cataccactg cactgcagcc tgagtgacac 3060

agtaagactg tctccaaaaa aaaaaaaaaa aaa 3093

<210> 11

<211> 2681

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 11

gttgttagct gtggagaaag atggcggaaa atttaaaagg ttgcagtgtg tgctgtaaat 60
cttcttggaa tcaactgcag gacctgtgcc gactagccaa gctttcttgt cctgcccttg 120
gtgtttctaa gaagaatctg tatgactttg aagttgaata cctgtgtgat tataagaaga 180

tccgtgagca ggagtattac ctggttaagt ggcgtgggta tcccgactca gaaaacacct 240

gggagccacg gcagaatcta aaatgtatac gagttcttaa gcagttccac aaggacttag 300

aaagagagct tgtccgacga caccgccggt caaagccacc caggcatctg gacccaaacc 360

tagccaatta cctggtgcag aaggccaagc agaggcgggc acttcagcgt tgggaacaag 420

agctcaatgc caagcgcagc cacctggggc ggatcaccgt ggagaatgag gtagacctgg 480

atggccctcc aaggtccttt gtctatatca atgagtatcg agttggtgag ggcatcaccc 540

tcaaccaggt agctgttggc tgtgagtgcc aggactgtct gttggcaccc actggaggct 600

gttgccctgg agcatccctg cacaagtttg cctacaatga ccaaggccag gtgcgactga 660

aagctgggca gcccatctac gagtgcaact cccgctgttg ctgtggctat gactgcccaa 720

accgtgtagt ccagaaaggc atccgctacg atctctgcat cttccgcact aatgatggcc 780

gaggctgggg tgtccgcacg ctggaaaaga tccgaaaaaa tagctttgtt atggagtatg 840

tgggagagat tattacctca gaggaggcag agcggagggg ccagatctac gaccgccagg 900

gcgccaccta cctctttgac ctggactacg tggaagacgt atataccgtg gatgccgctt 960

attatggcaa catctctcat tttgtcaacc atagttgtga tcccaacctg caggtgtaca 1020

acgtattcat agacaacctt gatgagcgac taccccgcat cgcattcttt gccacaagaa 1080

ccatctgggc gggcgaggag ctcacctttg attacaacat gcaagtggac cccgtggaca 1140

tggagagtac ccgaatggac tccaactttg gcctggctgg gctccccggc tcccccaaga 1200

aacgagtccg tattgaatgc aaatgtggga caacggcttg ccgaaaatac ctcttctagc 1260

cttgagaagt ctgaggccag actaactgaa ggggcctgaa gccaccttcc tctcctacag 1320

ctaccctctt gtcaaggatg accatcaatc agagccttgt ctgcctccac ttgtcctcac 1380

ctaccctaac ctgctctagg gtcagggctg ttgtgaggac taactccggg taccctttc 1440

ctgttccttt ccccctgttc caggcccatc aggcattgca cttaaaactc ccagccccat 1500

tttcagaaac atatttttca catcatgatt cccctagagt tggaattcat gtcatataat 1560

ggaggtccag attgaggaac tcggctgtaa aacagattct ttgttttgac agcatctctg 1620

cagctctatg tagtaagtct ggtgtttgga ccgttaatct tcctgtctca gccttcctca 1680

tgatgagatt gtaggtgtaa acccagctaa gatttttgtt ctaattgcat ctgcttctgc 1740

ttggagcttg tgtgtgaacc tgttgcaggt cctcttcatt actctaatgg tatgaggaag 1800

caacccccctg gcagacagac ttcagagctg agataccagc ctaacatcaa gctggatcag 1860

caaccccaga gcctttgtac tcaggaaaga aaaggcaatc ttcagagctg ggagataagg 1920

ctggttccgc tctttgtgct tttgatgctg gctggtatta accttaagac ctatagggtc 1980

tcaacagttg caagtctgaa aagtagttgc ccaaatgcca tcagaatggg gatggagtaa 2040

atacctcttt gaaagcccca cagaaaggtt agaactaagt tttaccatca ggaagtacag 2100

tgctggactt gctggaaacc cagccttggc atttgatggc cactagaact actagaagct 2160

ggaaccaaga tctaggtatt ctttagatag cacttaagac agtaatgtgc atcgactaga 2220

aggcgatgtg atgccaggca cttggtagag cacctggtcc atacagattg tctcagggaa 2280

gccttgaaaa ccacaaaggt ggagcccaga aaaaagccca tgtgacagaa ggcaatgtct 2340

aggccaaaaa tacttgtcag ctcaagtatt cacctgggtc acttgtctca gttaactgcc 2400

tagaaatgta caaaaggcaa agattctgat ggctgccttg ccccctgctt ccccacctcc 2460

aggaagcctt tcctgacttc ctgtgcccag agtgccctat gtgaaactct gtaccctgct 2520

accagatgcc aggtctgtgt gtgtattttg tatatatgtt tcctgcccat acttcccata 2580

cttcccaggc tgaccttcag gcatggactg aatctggttc tctgtacccc tcagccctcc 2640

ctagcctgga gtgcacacca ataaactgtg ttgttgagtt a 2681

<210> 12

<211> 1452

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 12

gaatgaaagc tccgcaagat ggcgacggcc agggccaagg cacggggcag tgaggcagga 60

gcgcggtgtc accgggctcc aggtccgccc ccgaggccca aggccaggcg aacggcgaga 120

cgccgccgcg cggagaccct gacggcgcga cgctcgcggc cgtctgcggg cgagaggcgc 180

gccggctccc agcgagcgtg gtccggagct ccgcgggccg cggtctttgg cgacgagtgt 240

gcacgaggtg ccttattcaa ggcctggtgt gtgccttgcc tagtttcact tgatactctc 300

caggaattat gtagaaaaga aaagctcaca tgtaaatcga ttggaatcac caaaaggaat 360

ctaaacaatt atgaggtgga gtacttgtgt gactacaagg tagcaaaggg tgtggaatat 420

tatcttgtaa aatggaaagg atggccagat tctacaaaca cctgggagcc cttgagaaac 480

ctcaggtgtc cacagctcct gcggcagttc tctgatgaca agaagactta cttagctcag 540

gaaaggaaat gcaaggctgt caattcaaaa tccttgcaac ctgcaattgc tgagtatatt 600

gtacagaaag ctaagcaaag aatagctctg cagagatggc aagattacct caacagaaga 660

aagaaccata aggggatgat atttgttgaa aacactgttg acttggaggg cccaccttta 720

gacttctact acattaacga gtacaggcca gctcccggga tcagcataaa cagtgaagcc 780

acctttggat gttcatgtac agactgcttc tttgacaagt gttgtcctgc tgaagctgga 840

gttgtgttgg cttataataa gaagcaacaa attaaaatcc aaccaggcac tcccatctac 900

gaatgcaact caaggtgtcg atgtggacct gaatgtccca ataggattgt acaaaaaggc 960

acacaatatt cactgtgcat ctttaaaact agcaatggct gtggttgggg tgtaaaaacc 1020

cttgtgaaga ttaaaagaat gagttttgtc atggaatatg ttggagaggt gatcacaagt 1080

gaagaggccg agagacgggg acagttctat gacaacaaag ggatcaccta cctctttgac 1140

ctggactacg agtctgatga gttcacagtg gatgcagctc gatatggaaa cgtatcccat 1200

tttgtgaatc atagttgtga cccaaatctt caggtgttta gtgttttcat cgataacctt 1260

gatactcggc tgcccaggat agcattgttc tctacaagaa ccataaacgc tggagaagag 1320

ctgacttttg actatcaaat gaaaggttct ggagaagcat cttcagactc cattgaccac 1380

agccctgcca aaaaaagggt cagaacccaa tgtaaatgtg gagccgagac ttgcagaggt 1440

tacctcaact ga 1452

<210> 13

<211> 2711

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 13

gtcgttagct gtggagaaag atggcggaaa atttaaaagg ttgcagtgtg tgctgtaaat 60

cttcctggaa tcagctgcag gatctgtgcc gactagccaa gctttcttgt cctgcccttg 120

gtgtttctaa gaagaatctg tatgactttg aagttgaata cctgtgtgat tataagaaga 180

tccgtgagca ggagtattac ctggttaaat ggcgtgggta tcctgactca gagaacacct 240

gggagccacg gcagaatctc aaatgtgtgc gcattcttaa gcagttccac aaggacttag 300

aaagagagct tgtccggcga caccgccggt caaagccacc caggcatctg gacccaaact 360

tagccaatta cctggtgcag aaggccaagc agaggcgggc actgcagcgt tgggaacaag 420

agctcaatgc caagcgcagc catctggggc ggatcactgt ggagaatgag gtagacctgg 480

atggccctcc aaggtccttt gtctatatca atgagtatcg agttggtgag ggcatcaccc 540

tcaaccaggt agctgttggc tgtgagtgcc aggactgtct gttggcaccc actggaggct 600

gttgccctgg agcatccctg cacaagtttg cctacaatga ccaaggccag gtgcgactga 660

aagctgggca gcccatctac gagtgcaact ctcgctgttg ctgtggctat gactgcccaa 720

accgtgtagt ccagaaaggc atccgctaca acctctgcat cttccgcact gatgatggcc 780

gaggctgggg tgtccgcacg ctggaaaaga tccgcaaaaa tagctttgtt atggagtatg 840

tgggagagat tattacctca gaggaggcag agcggagggg ccagatctac gaccgccagg 900

gcgccaccta cctctttgac ctggactacg tggaggacgt atataccgtg gatgccgcct 960

attatggcaa catctctcac tttgtcaacc atagttgtga tcccaacctg caggtgtaca 1020

acgtattcat agacaacctt gatgagcgac taccccgcat cgcattcttt gccacaagaa 1080

ccatctgggc gggcgaggag ctcacctttg attacaacat gcaagtggac cccgtggaca 1140

tggagagtac ccgaatggac tccaactttg gcctggcagg gctccccggc tcccccaaga 1200

aacgggtccg tattgaatgc aaatgtggga caacagcttg ccgaaaatac ctcttctagc 1260

cctgagaagt ctgaggccag actaactgaa ggggcctgaa gccaccttcc tcttctctac 1320

tgctaccctc ttgtcaagaa tgaccatcaa tcagagcctt gtctgcctcc acttgtcctc 1380

acctgcccca acctgctcca gggtcagggc tgttgtgagg actaactccc ggtacccttt 1440

ccctgttcct ttcccctatc caggcccatc aggcattgca cttaaaactc ccagccccat 1500

tttcagaagc atatttttca catcaggatt ccctagattt ggaattcatg tcaatggagg 1560

tccaaagact gaaaagactg agcaactcag ccccaaagca gatttttttc tctgcagctc 1620

tatgtagtta gttcaggctg gcgttggacc tttaatcctc ctgtctcagc tttcctcatg 1680

atgaaattat aggtgtaaac ccagctaatt gtatctgcta attttctaat tgtatctgct 1740

tcagctctga gcccgagtga cctgttgcag gcctcttcac tgctctatga ggaagcaacc 1800

cctaggcaga cagacatcag agctgagata ccagcccaac atcaaactgg atcagcaacc 1860

acggggcctt tgtactcatg aaagaaaagg caatctccag aaaggctgat tctgctcatt 1920

gtgcttttaa tgctggctaa tactaacctt aagacgcata gggttgcaaa gagagttgca 1980

ggtctgaaaa gtagttgccc aaatcccatc agaatgggaa tgaagtaaat acctctttga 2040

aagcccctca gaagggttag aactaagttt taccatcagg aagtagagtg ctgggcttac 2100

tggaaaccca gccatggcat ttgatggcca ctagaattag aagctggaac caagatctag 2160

gtattctgta gaaagcactt aaaaagacaa taacgtgcat cgattagaag gtgatgtgat 2220

gccaggcact tggtagagca cctggtccat atggattgtc tcagggaagc cttgaaaacc 2280

acagaggtgg agcccaggaa aaagcccatg tgacagaagg caatgtctag gcctaaaata 2340

cttgtcagct ccaagtattc acctgggtcc acttgtctca aagttaactg cctagagttg 2400

tacaaaaggc aaagattctg atggctgcct tgtcccctgc ttccccacct ccaggaagct 2460

tttcctgagt tcctataccc agagtacccc tttgtgaaac tctgtaccct gctaccagat 2520

gccaggtctg tgtgtgtatt ttgtatatat gtgtcctgcc cacactcccc aggctgacct 2580

tcaggcatgg actgaatctg gttttctgtg taccctcctc agccctctct agcctggagt 2640

gcacaccaat aaactttgtt gttgaattaa taagctggag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2700

aaaaaaaaaa a 2711

<210> 14

<211> 4132

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 14

tgaatgaaag ctccgcaaga tggcggcggc cagggccaag gcacggagcg gtgaggccag 60

agcgcggtgt caccgggctc caggtccgcc ccagaggccc aaacccaggc gaacgacgag 120

acgctgccgc gcggacaccg tgacggcgcg acgctcgcgg tcgtctgcgg gcgggagacg 180

cgccggctcc aaccgagcga ggtccagagc tccgcgggcc gcggtctttg gcggcgagtg 240

tgcacgaggt gcctcattca aggcctggtg tgtgccttgc ctagtttcac ttgatactct 300

ccaggaatta tgtagaaaag aaaagctcac atgtaaatcg attggaatca ccaaaaggaa 360

tctaaacaat tatgaggtgg agtacttgtg tgactacaag gtagtaaagg gtgtggaata 420

ttatcttgta aagtggaaag gatggccaga ctctacaaac acctgggagc ccttgtggaa 480

cctcaggtgc ccacagctcc tgcagcagtt ctctgacgac aagaatactt acttatccca 540

gggaaggaaa cgcaaggcca tcacttcaaa agacaataac aaatccttgc aacctgcagt 600

tgctgagtat attgtacaga aagctaggca aagaatagct ctgcagagat ggcaagatta 660

cctcaacaga agaaagaacc acaaagggat gatatttgtt gaaaatactg ttgacttaga 720

gggcccacct tcagacttct actacatcaa tgaatacagg ccagctcctg ggatcacctt 780

aaacagtgaa gctacctttg ggtgttcgtg tacaaactgc ttctttgaaa agtgttgtcc 840

tgctgaagct ggagttgttt tggcttataa taagaaccga caaattaaaa tccaaccagg 900

cactcccatc tatgaatgca actcaaggtg ccgatgtgga cctgattgtc ccaataggat 960

tgtacagaaa ggcacacagt attccctgtg catctttaga actagcaatg gctgtggctg 1020

gggtgtaaaa acccttgtga agattaaaag gatgagtttt gtcatggaat atgttggaga 1080

ggtgatcacc agtgaagagg ctgagagacg gggacagctc tatgacaaca aagggatcac 1140

ctacctttt gatctggact atgagtctga tgagttcaca gtggatgcag ctcgatatgg 1200

aaatgtgtct cattttgtga atcatagttg tgacccaaat cttcaggtgt ttagtgtttt 1260

catcgataac cttgatactc ggcttcccag gatagcattg ttctccacaa gaaccataaa 1320

ggctggagaa gagctgactt ttgactatca aatgaaaggt tctggagaac tgtcttcaga 1380

ctctattgac tacagccctg ccagaaaaag ggtcagaacc caatgcaaat gtggagctga 1440

gacgtgcaga ggttacctca actgaaattt caggaagtgg agctcacgtt gtttgttttt 1500

ttgttttgtt tgtcttctaa caactgaaaa aagtatttgg gactcctttc tattacctat 1560

gtattgtatt atatgatgtt aatgtacaat tcatggctca agatatatgc caagtatatt 1620

actattgatt ctaaaaagga ctgcaaggcc atgtaaacaa gatggtggtt acatgggaag 1680

tgaactgtat aaatcacttg cttactcgag agtcgaagta gacagtcgtc cctttagttt 1740

tggaagtgag tcgaccacag ctattattga gccttttatc ctgcctcaaa cagagaactc 1800

actttaggca aatgtataaa ttttatttt ttactatatt gtttctgttt aatactcact 1860

gatcttgtat cagagacaaa taagtgacac tgaatttttt tactgtattt tctactttta 1920

cattaaaaca ttggcatctt aatgatatat ttcaggtgta aaaaatgtga aagatttact 1980

tttagcttga tcttactttg aggcaataga taccattaca aaggtatcta aacctgaaat 2040

tcttaaaaga tgtttttact cccacagaag aaaagtctct gatcaccttc tcggaattct 2100

gtagtgctgg ccactgtgtt tctgtgaaca gacagacaga cagaacagtg actgaggacg 2160

cactggagtg tcaggcagga aaggagtaca gcgtaagcca ctcagcatgt gtgagcacga 2220

cagcaccgtg tctctctctc tctccggaac aggagagtga gatccctgag gggcacaggt 2280

ccccaatggc agtgtaattc acatcacata ctgtcatctc aaggcagttt taattcctac 2340

ccactaaatt tcaatacttt tgtattttgt gcatgccctt gaaaagcaag ctctatttgc 2400

cctgatgctt gttttataca agagttttta gataggatga aacttagctt ggccaaaagt 2460

cggcctgatt gaacttttat cacctctggg gttagatggg gcttcccctg tgtagtaaaa 2520

cccaataaag aaaaaaactt tcatttttct gggtctggga gttctaatcg tggtgtccaa 2580

tgtgaagaca gaaacaaaat gcagcaaata aacaaagctt ttggtatcct aagagtttcc 2640

taagctcact gctccaggct tgaataactg taataagctt aagtaaaatg aactgaattc 2700

aagaactcag tacttccttt aactttctaa ctcttaacct gttttgagag aagctacaat 2760

gttattcaga atattgcctt cgggggctac ttgttcacag tcatgcctgc tacccaaaac 2820

tttcagaatg tgtcaagaaa aaatataatt ttaaatggta tttcttttgt ttttctttga 2880

gaatcttaaa agcatcacag gtctgttttt ctcacacata cctccacccc cactgcaacc 2940

ctccatgacc aagctcactt tgaattattc tcaggttaaa aaattaaaaa aaaaatgttt 3000

gtctagatat ttggtcttat ttactgttta ggttaaaagg aaacttagga gggcaagaag 3060

aaaatgactt gtgtttagta aacgtgtggc tttgttttgt cttactaata gaaatttaat 3120

ggccctaagg ttctgtggga gtgggtgggc cttcagacag tatcttgtag ctcaggttgg 3180

ccttgaattt gctgtgtacc tgagtgcttt cttgaactct tcagtcctcc tgcctctccc 3240

tcccagtgct ggggttgtgg gcctgtgcca ccatgccctt tgacctttaa acgcacacca 3300
atttcactcg tgttccacac atggactgca ttactctctc tcagcattcc cccattactg 3360
tcctccagtt cctcttctgc tttcacctca tgagagctgt ccatacagcg gtgtgtgtat 3420
ttccttgttg ctgtgatcaa agcgatcaat tcagctctgc cttgattcct caaatcacat 3480
gttctaagta tgtcgtgtct tcatgacata ctcagctctg ggaggtgatc atgacaggaa 3540
ctttccagca gaggctagaa ctgtggagca cagctcactg gctggctccc tggctcccag 3600
gctcccctca gctaggcgtt cctacacagc ccacccgccc aggaatggtg taatggtacc 3660

taataagcga gaccctgcca catcagttag ccatcaagaa aatccgggcc aatgggacag 3720
agacagttcc tcagaggagg ttgtttcccc aggtaacccc agactgtcaa gtataaggta 3780
catgcaacca ttttgcattt gactgacatc tcttaaaggc tggcccgccc ttaggattct 3840
gggatgtatt gtgacattcc tagacgtttt taacctttgc taatctgtaa ctcttgaatg 3900
aagtagccac tatagttagt cctgcctgtt ttcctgctgt ctgtatggag cttccctcac 3960
acagcctaga taactctgaa gccctgctgc ttgcacctgg atgctggctg tgagcttact 4020
agctgtgtga actaacctgt gtgccttcct gcctacctca aagtgcgctt tcacagacta 4080

aagctttatg aagtgtgtgt gtgtttttaa atcacagaat aaacacatat gt 4132

<210> 15

<211> 2888

<212> DNA

<213> Bos taurus

<400> 15

ggaatgtcgt tagccgtggg gaaagatggc ggaaagttta aaaggctgca gtgtgtgttg 60
caaatcttct tggaatcagc tacaggacct gtgccgcctg gccaagctct cctgccctgc 120
ccttggcatc tccaagagga acctctatga ctttgaagtc gagtacctgt gcgattacaa 180
aaagatccgc gaacaggagt attacctggt aaaatggcgt gggtacccag actccgagag 240
cacttgggaa ccacggcaga atctcaagtg tgtgcgcatt ctcaagcagt tccacaagga 300

cttggaaagg gagctgctcc ggcggcacca ccggtcaaag ccaccccggc acctggaccc 360
aagcctggcc aactacctgg tgcagaaggc caagcagagg cgggcactcc ggcgctggga 420
gcaggagctc aatgccaagc gcagccacct gggacgcatc accgtggaga acgaagtgga 480
cctggatggc cccccacggg ccttcgtgta catcaacgag taccgtgttg gtgagggcat 540
caccctcaac caggtggctg tgggctgcga gtgccaggac tgtctgtggg caccggccgg 600

aggctgctgc cctggggcgt cactgcacaa gtttgcctac aatgaccagg gccaggtgcg 660

cctgcgagcc gggctgccca tctatgagtg caactcccgc tgccgctgtg gctatgactg 720

ccccaaccgc gtggtacaga agggcatccg ctacgacctc tgcatcttcc gcacggatga 780

tggacgcggc tggggtgtcc gcacgctgga gaagatccgc aagaacagtt tcgtcatgga 840

gtacgtgggc gagatcatta cctcagagga ggcagagcgg cggggccaga tctatgaccg 900

ccagggtgcc acctacctct tcgacctgga ctacgtggag gatgtgtaca ctgtggacgc 960

cgcctattac ggcaacatct ctcactttgt caaccacagt tgtgacccca acctccaggt 1020

gtacaacgtc ttcatagaca accttgatga gcggctgccc cgcattgctt tctttgccac 1080

cagaaccatc cgggcaggcg aggagctcac ctttgattac aacatgcaag tggacccggt 1140

ggacatggag agcacacgca tggactccaa ctttggcctg gctgggctcc ccggctctcc 1200

caagaagcgg gtccgcattg aatgcaagtg tgggactgaa tcctgccgca aatacctctt 1260

ctagccccgt gaagtctgag gccagactga ccaagggagg ctaaaaagct gcccacccca 1320

cctacccact gctgccctcc tgttgaagaa caactgccag ggcctcctgc ctgcctccgc 1380

ctgccccctg ctcagggctg catggccatg gggaagatgg actccaggag tcccctctcc 1440

ctgtcccagc cccatccatg ggttgcactt acaaacccct gcccaccttc agaagtgatt 1500

tttcaacacc aggactttct gcagttggga ttcatggcct agcaaggcgg tctgagggct 1560

gagcctcagc ccatacccaa agtagaaacg tttgtttttg cacctgcttc tggccagagc 1620

ttgaagggtc tgctgcaggc cctctccctg ctgccccaag ggtgtgagga agcattccca 1680

ggacaggctg accccagagc ccaggattcc cagtccattc acctcccctg ccacagaaat 1740

gtgctagtga agtgggggggg ggggcggtct tcaagggctg caggctgtgg ctgggtcctg 1800

ctcatgcttg catgctggct ggtgttggcc tgacagctgt agggtctcct tttcaaagct 1860

gtgcctctga gaagcagaca cccacatgcc actagaggag agtggatgcc cacagcctgt 1920

tggccagtga gaggcagccc agactttgcc tgtccttaag gtgggcaacc cactccagta 1980

ttcttgcctg aaaaatccca tggacagagg aacctggtag gctacagtcc atggggtcac 2040

aaagagttgg acatgactaa gcgacttcac ttcactaagg tgggctggga ctcagctctg 2100

cctttgcaac agctagaagg tgcccagggc tcttgagctc aaaggatgct gggagccctt 2160

aacctgcagc gtgaggactg ctgatagcac ccagagctgg gcccaagacc tagctaggct 2220

gtagacagca cttagacaaa atgtgcatgg atgggatact gaggaggtgc caggcactgg 2280

gctgagcacc tggtccacgt ggatcgtctc agggaagcct tgaaaactat ggaggtggat 2340

cccaggaaag ggcccgtgtg gcagaaggca aagcacagac caagaatggg gtggggctgg 2400

cttacccacc agggtgtggc gaggtgaggg gaagcccctg tcgcctccta gccctccagc 2460

cctttgcact caccttgggt cctctggtct cagttccctg cccacaaatg tataaaaggt 2520

gaaggcgctg atggctgcct catcccttgc ttcccctgtg aggtcttctc taggaagcct 2580

tccatccctg actacctgtg cgcagtgtcc ccacgtgaga ctgtgtgccc tgccagcaga 2640

tgccagatct gtgtgtctgt ttttgtgtgt ctgtgctccc caccccaga ctgaccttca 2700

ggcttgtact gaatctgatt ctcctcttgt atatcccctt ggccctccca gtctgggaat 2760

gggcgtcaat aaaacaggtt attgactgaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2820

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agaaaaaaaa 2880

aaaaaaaa 2888

<210> 16

<211> 1863

<212> DNA

<213> Bos taurus

<400> 16

gagtttgaat gaaagctcct caagatggcg gcggccgggg ccgaggcgcc aggagcttgg 60

tgtgtgcctt gcctagtttc acttgatact cttcaggaat tatgtagaaa agaaaagctc 120

acatgtaaat cgattggaat caccaaaagg aatctaaaca attatgaggt ggaatacttg 180

tgtgactaca aggtagtaaa ggatatggaa tattatcttg taaaatggaa aggatggcca 240

gattctacaa atacttggga acctttgcaa aatctcaagt gcccattact acttcagcag 300

ttctttaatg acaagcataa ttatttatct caggtaaaga aaggcaaagc aataactcta 360

aaagaaaatc acagagcctt gaaacctgct gttgctgaat acattgtaaa gaaggctaaa 420

caaaggatag ccctgcagag atggcaggat gaactcaaca gaaggaagac tcacaaagga 480

atgatttttg ttgaaaatac tgtggactta gaggggcccc cttcagactt ctactacatt 540

aatgaataca aaccagctcc tggaatcagc ttagtaaatg aagctacctt tggttgttca 600

tgcacagatt gcttctttga aaaatgttgt cctgctgaag ctggagttct tttggcttat 660

aataaaaatc aacaaattaa aatcccacct ggtaccccca tttatgagtg caactcaaga 720

tgtcaatgtg gacccgactg tcccaacagg atcgtacaaa aaggcacaca gtattcactt 780

tgcatctttc gaactagcaa tggctgtggc tggggtgtaa aaacccttgt gaagattaaa 840

agaatgagtt ttgtcatgga atatgttgga gaggtgatca ccagtgagga agctgagaga 900

cgtggccagt tatatgacaa caaaggaatc acgtatctct ttgatctgga ctatgaatct 960

gatgaattca cagtggatgc agctcgatat ggaaatgtgt ctcattttgt gaatcacagt 1020

tgtgacccaa accttcaggt gttcaatgtt ttcattgata acctcgatac ccgtcttccc 1080

cgaatagcat tattttccac gagaactatc aatgctggag aagagctcac ttttgattat 1140

caaatgaaag gttctggaga tgtatcttca gattctattg accacagccc agccaaaaag 1200

agggccagaa ctgtgtgcaa atgtggagct gtgacttgca gaggttacct caactgaatt 1260

ttcaggaaat agaacttatg acgattatag tgtttttttct aatgttaaca ttttaaaagt 1320

attttggact cttttcatat tatcaagatt atacactacg ttgatttaca atttaccttt 1380

cagactattg accaaatgcg ttactgatcc ttttgaagag aggaacgtgg gggtcacata 1440

gactaattct acatatacat attcagtggt tagataccaa acatgaaagg aaaactgttt 1500

gcaaatcaac aactatatac ttaacaggaa gtctatgtga atatagagaa atgcctcctt 1560

cagtgtttaa gtgttaaact gatgatgtaa cagttgctaa gattgaacat tcaatttgcc 1620

atataccttg aatttagaat tggacaaata cacaagttct atttttgtta ttgtcattcc 1680

tgtttaccta cttaacaact ctttgtactt gtatttgaga caaataggtg atactgaatt 1740

atactctatt ttctactttc attaaaacat tggtatctta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaaa aaaaaaaaaa 1860

aaa 1863

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 17

gaaacgaguc cguauugaat t 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

oligonucleotide

<400> 18

uucaauacgg acucguuuct t 21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 19

gcucacaugu aaaucgauut t 21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 20

aaucgauuua caugugagct t 21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 21

gguguacaac guauucauat t 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 22

uaugaauacg uuguacacct g 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 23

gguccuuugu cuauaucaat t 21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 24

uugauauaga caaaggacct t 21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 25

gcucacaugu aaaucgauut t 21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 26

aaucgauuua caugugagct t 21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 27

gugucgaugu ggaccugaat t 21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 28

uucaggucca caucgacacc t 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 29

ggacuacagu aucaugacat t 21

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 30

ugucaugaua cuguaguccc a 21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 31

ggacgaugca ggagauagat t 21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 32

ucuaucuccu gcaucguccg a 21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 33

ggaugggugu cgggauaaat t 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 34

uuuaucccga cacccaucct t 21

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 35

gcaccuuugu cugcgaauat t 21

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 36

uauucgcaga caaaggugcc c 21

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 37

gaucaaaccu gcucggaaat t 21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide
<400> 38
uuuccgagca gguuugaucc a 21
<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 39
gaauuugccu ucuuaugcat t 21
<210> 40
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 40
ugcauaagaa ggcaaauuct t 21
<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 41

gaggaauucu agucccguat t 21

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<400> 42

uacgggacua gaauuccuca a 21

<210> 43

<211> 2752

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

cgctcttctc gcgaggccgg ctaggcccga atgtcgttag ccgtggggaa agatggcgga 60

aaatttaaaa ggctgcagcg tgtgttgcaa gtcttcttgg aatcagctgc aggacctgtg 120

ccgcctggcc aagctctcct gccctgccct cggtatctct aagaggaacc tctatgactt 180

tgaagtcgag tacctgtgcg attacaagaa gatccgcgaa caggaatatt acctggtgaa 240

atggcgtgga tatccagact cagagagcac ctgggagcca cggcagaatc tcaagtgtgt 300

gcgtatcctc aagcagttcc acaaggactt agaaagggag ctgctccggc ggcaccaccg 360

gtcaaagacc ccccggcacc tggacccaag cttggccaac tacctggtgc agaaggccaa 420

gcagaggcgg gcgctccgtc gctgggagca ggagctcaat gccaagcgca gccatctggg 480

acgcatcact gtagagaatg aggtggacct ggacggccct ccgcgggcct tcgtgtacat 540

caatgagtac cgtgttggtg agggcatcac cctcaaccag gtggctgtgg gctgcgagtg 600

ccaggactgt ctgtgggcac ccactggagg ctgctgcccg ggggcgtcac tgcacaagtt 660

tgcctacaat gaccagggcc aggtgcggct tcgagccggg ctgcccatct acgagtgcaa 720

ctcccgctgc cgctgcggct atgactgccc aaatcgtgtg gtacagaagg gtatccgata 780

tgacctctgc atcttccgca cggatgatgg gcgtggctgg ggcgtccgca ccctggagaa 840

gattcgcaag aacagcttcg tcatggagta cgtgggagag atcattacct cagaggaggc 900

agagcggcgg ggccagatct acgaccgtca gggcgccacc tacctctttg acctggacta 960

cgtggaggac gtgtacaccg tggatgccgc ctactatggc aacatctccc actttgtcaa 1020

ccacagttgt gaccccaacc tgcaggtgta caacgtcttc atagacaacc ttgacgagcg 1080

gctgccccgc atcgctttct ttgccacaag aaccatccgg gcaggcgagg agctcacctt 1140

tgattacaac atgcaagtgg accccgtgga catggagagc acccgcatgg actccaactt 1200

tggcctggct gggctccctg gctcccctaa gaagcgggtc cgtattgaat gcaagtgtgg 1260

gactgagtcc tgccgcaaat acctcttcta gcccttagaa gtctgaggcc agactgactg 1320

agggggcctg aagctacatg cacctccccc actgctgccc tcctgtcgag aatgactgcc 1380

agggcctcgc ctgcctccac ctgcccccac ctgctcctac ctgctctacg ttcagggctg 1440

tggccgtggt gaggaccgac tccaggagtc ccctttccct gtcccagccc catctgtggg 1500

ttgcacttac aaacccccac ccaccttcag aaatagtttt tcaacatcaa gactctctgt 1560

cgttgggatt catggcctat taaggaggtc caaggggtga gtcccaaccc agccccagaa 1620

tatatttgtt tttgcacctg cttctgcctg gagattgagg ggtctgctgc aggcctcctc 1680

cctgctgccc caaaggtatg gggaagcaac cccagagcag gcagacatca gaggccagag 1740

tgcctagccc gacatgaagc tggttcccca accacagaaa ctttgtacta gtgaaagaaa 1800

gggggtccct gggctacggg ctgaggctgg tttctgctcg tgcttacagt gctgggtagt 1860

gttggcccta agagctgtag ggtctcttct tcagggctgc atatctgaga agtggatgcc 1920

cacatgccac tggaagggaa gtgggtgtcc atgggccact gagcagtgag aggaaggcag 1980

tgcagagctg gccagccctg gaggtaggct gggaccaagc tctgccttca cagtgcagtg 2040

aaggtaccta gggctcttgg gagctctgcg gttgctaggg gccctgacct ggggtgtcat 2100

gaccgctgac accactcaga gctggaacca agatctagat agtccgtaga tagcacttag 2160

gacaagaatg tgcattgatg gggtggtgat gaggtgccag gcactgggta gagcacctgg 2220

tccacgtgga ttgtctcagg gaagccttga aaaccacgga ggtggatgcc aggaaagggc 2280

ccatgtggca gaaggcaaag tacaggccaa gaattggggg tgggggagat ggcttcccca 2340

ctatgggatg acgaggcgag agggaagccc ttgctgcctg ccattcccag accccagccc 2400

tttgtgctca ccctggttcc actggtctca aaagtcacct gcctacaaat gtacaaaagg 2460

cgaaggttct gatggctgcc ttgctccttg ctcccccacc ccctgtgagg acttctctag 2520

gaagtccttc ctgactacct gtgcccagag tgcccctaca tgagactgta tgccctgcta 2580

tcagatgcca gatctatgtg tctgtctgtg tgtccatccc gccggccccc cagactaacc 2640

tccaggcatg gactgaatct ggttctcctc ttgtacaccc ctcaacccta tgcagcctgg 2700

agtgggcatc aataaaatga actgtcgact gaacaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2752

<210> 44

<211> 3093

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

cggggccgag gcgcgaggag gtgaggctgg agcgcggccc cctcgccttc cctgttccca 60

ggcaagctcc caaggcccgg gcggcggggc cgtcccgcgg gccagccaga tggcgacgtg 120

gcggttcccc gcccgccgcg accccaactc cgggacgcac gctgcggacg cctatcctcc 180

cccaggccgc tgacccgcct ccctgcccgg ccggctcccg ccgcggagga tatggaatat 240

tatcttgtaa aatggaaagg atggccagat tctacaaata cttgggaacc tttgcaaaat 300

ctgaagtgcc cgttactgct tcagcaattc tctaatgaca agcataatta tttatctcag 360

gtaaagaaag gcaaagcaat aactccaaaa gacaataaca aaactttgaa acctgccatt 420

gctgagtaca ttgtgaagaa ggctaaacaa aggatagctc tgcagagatg gcaagatgaa 480

ctcaacagaa gaaagaatca taaaggaatg atatttgttg aaaatactgt tgatttagag 540

ggcccacctt cagacttcta ttacattaac gaatacaaac cagctcctgg aatcagctta 600

gtcaatgaag ctacctttgg ttgttcatgc acagattgct tctttcaaaa atgttgtcct 660

gctgaagctg gagttctttt ggcttataat aaaaaccaac aaattaaaat cccacctggt 720

actcccatct atgaatgcaa ctcaaggtgt cagtgtggtc ctgattgtcc caataggatt 780

gtacaaaaag gcacacagta ttcgctttgc atctttcgaa ctagcaatgg acgtggctgg 840

ggtgtaaaga cccttgtgaa gattaaaaga atgagttttg tcatggaata tgttggagag 900

gtaatcacaa gtgaagaagc tgaaagacga ggacagttct atgacaacaa gggaatcacg 960

tatctctttg atctggacta tgagtctgat gaattcacag tggatgcggc tcgatacggc 1020

aatgtgtctc attttgtgaa tcacagctgt gacccaaatc ttcaggtgtt caatgttttc 1080

attgataacc tcgatactcg tcttccccga atagcattgt tttccacaag aaccataaat 1140

gctggagaag agctgacttt tgattatcaa atgaaaggtt ctggagatat atcttcagat 1200

tctattgacc acagcccagc caaaaagagg gtcagaacag tatgtaaatg tggagctgtg 1260

acttgcagag gttacctcaa ctgaactttt tcaggaaata gagctgatga ttataatatt 1320

tttttcctaa tgttaacatt tttaaaaata catatttggg actcttatta tcaaggttct 1380

acctatgtta atttacaatt catgtttcaa gacatttgcc aaatgtatta ccgatgcctc 1440

tgaaaagggg gtcactgggt ctcatagact gatatgaagt cgacatattt atagtgctta 1500

gagaccaaac taatggaagg cagactattt acagcttagt atatgtgtac ttaagtctat 1560

gtgaacagag aaatgcctcc cgtagtgttt gaaagcgtta agctgataat gtaattaaca 1620

actgctgaga gatcaaagat tcaacttgcc atacacctca aattcggaga aacagttaat 1680

ttgggcaaat ctacagttct gtttttgcta ctctattgtc attcctgttt aatactcact 1740

gtacttgtat ttgagacaaa taggtgatac tgaattttat actgttttct acttttccat 1800

taaaacattg gcacctcaat gataaagaaa tttaaggtat aaaattaaat gtaaaaatta 1860

atttcagctt catttcgtat ttcgaagcaa tctagactgt tgtgatgagt gtatgtctga 1920

acctgtaatt cttaaaagac ttcttaatct tctagaagaa aaatctccga agagctctct 1980

ctagaagtcc aaaatggcta gccattatgc ttctttgaaa ggacatgata atgggaccag 2040

gatggttttt tggagtacca agcaagggga atggagcact ttaagggcgc ctgttagtaa 2100

catgaattgg aaatctgtgt cgagtacctc tgatctaaac ggtaaaacaa gctgcctgga 2160

gagcagctgt acctaacaat actgtaatgt acattaacat tacagcctct caatttcagg 2220

caggtgtaac agttcctttc caccagattt aatattttta tacttcctgc aggttcttct 2280

taaaaagtaa tctatatttt tgaactgata cttgttttat acataaattt tttttagatg 2340

tgataaagct aaacttggcc aaagtgtgtg cctgaattat tagacctttt tattagtcaa 2400

cctacgaaga ctaaaataga atatattagt tttcaaggga gtgggaggct tccaacatag 2460

tattgaatct caggaaaaac tattctttca tgtctgattc tgagatttct aattgtgttg 2520

tgaaaatgat aaatgcagca aatctagctt tcagtattcc taatttttac ctaagctcat 2580

tgctccaggc tttgattacc taaaataagc ttggataaaa ttgaaccaac ttcaagaatg 2640

cagcacttct taatctttag ctctttcttg ggagaagcta gactttattc attatattgc 2700

tatgacaact tcactctttc ataatatata ggataaattg tttacatgat tggaccctca 2760

gattctgtta accaaaattg cagaatgggg ggccaggcct gtgtggtggc tcacacctgt 2820

gatcccagca ctttgggagg ctgaggtagg aggatcacgt gaggtcggga gttcaagacc 2880

agcctggcca tcatggtgaa accctgtctc tactgaaaat acaaaaatta gccgggcgtg 2940

gtggcacacg cctgtagtcc cagctactca ggaggctgag gcaggagaat cacttgaatt 3000

caggaggcgg aggttgcagt gagccaagat cataccactg cactgcagcc tgagtgacac 3060

agtaagactg tctccaaaaa aaaaaaaaaa aaa 3093

<210> 45

<211> 4449

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

ggcactaaag gtttgcttcc gggcgtttct tttgcttccc cttccctctt tcacgcttcc 60

tcccctcccc ctcctccctt atcccttcgc tttcgctctt ttccgtcgag gccgacccct 120

gagttgtgag tctggggtct ggttggtgaa aaagagccct tgaagctgga agacgggaga 180

ggacaaaagc atgtcttccc ttcctgggtg cattggtttg gatgcagcaa cagctacagt 240

ggagtctgaa gagattgcag agctgcaaca ggcagtggtt gaggaactgg gtatctctat 300

ggaggaactt cggcatttca tcgatgagga actggagaag atggattgtg tacagcaacg 360

caagaagcag ctagcagagt tagagacatg ggtaatacag aaagaatctg aggtggctca 420

cgttgaccaa ctctttgatg atgcatccag ggcagtgact aattgtgagt ctttggtgaa 480

ggacttctac tccaagctgg gactacaata ccgggacagt agctctgagg acgaatcttc 540

ccggcctaca gaaataattg agattcctga tgaagatgat gatgtcctca gtattgattc 600

aggtgatgct gggagcagaa ctccaaaaga ccagaagctc cgtgaagcta tggctgcctt 660

aagaaagtca gctcaagatg ttcagaagtt catggatgct gtcaacaaga agagcagttc 720

ccaggatctg cataaaggaa ccttgagtca gatgtctgga gaactaagca aagatggtga 780

cctgatagtc agcatgcgaa ttctgggcaa gaagagaact aagacttggc acaaaggcac 840

ccttattgcc atccagacag ttgggccagg gaagaaatac aaggtgaaat ttgacaacaa 900

aggaaagagt ctactgtcgg ggaaccatat tgcctatgat taccaccctc ctgctgacaa 960

gctgtatgtg ggcagtcggg tggtcgccaa atacaaagat gggaatcagg tctggctcta 1020

tgctggcatt gtagctgaga caccaaacgt caaaaacaag ctcaggtttc tcattttctt 1080

tgatgatggc tatgcttcct atgtcacaca gtcggaactg tatcccattt gccggccact 1140

gaaaaagact tgggaggaca tagaagacat ctcctgccgt gacttcatag aggagtatgt 1200

cactgcctac cccaaccgcc ccatggtact gctcaagagt ggccagctta tcaagactga 1260

gtgggaaggc acgtggtgga agtcccgagt tgaggaggtg gatggcagcc tagtcaggat 1320

cctcttcctg gatgacaaaa gatgtgagtg gatctatcga ggctctacac ggctggagcc 1380

catgttcagc atgaaaacat cctcagcctc tgcactggag aagaagcaag gacagctcag 1440

gacacgtcca aatatgggtg ctgtgaggag caaaggccct gttgtccagt acacacagga 1500

tctgaccggt actggaaccc agttcaagcc agtggaaccc ccacagccta cagctccacc 1560

tgccccacct ttcccacctg ctccacctct atccccccaa gcaggtgaca gtgacttgga 1620

aagccagctt gcccagtcac ggaagcaggt agccaaaaag agcacgtcct ttcgaccagg 1680

atctgtgggc tctggtcatt cctcccctac atctcctgca ctcagtgaaa atgtctctgg 1740
tgggaaacct gggatcaacc agacatatag atcaccttta ggctccacag cctctgcccc 1800
agcaccctca gcactcccgg cccctccagc acccccagtc ttccatggca tgctggagcg 1860
ggccccagca gagccctcct accgtgctcc catggagaag cttttctact tacctcatgt 1920
ctgcagctat acctgtctgt ctcgagtcag acctatgagg aatgagcagt accggggcaa 1980
gaaccctctg ctggtcccgt tactatatga cttccggcgg atgacagccc ggcgtcgagt 2040
taaccgcaag atgggctttc atgttatcta taagacacct tgtggtctct gccttcggac 2100

aatgcaggag atagaacgct acctttttcga gactggctgt gacttcctct tcctggagat 2160
gttctgtttg gatccatatg ttcttgtgga ccgaaagttt cagccctata agccttttta 2220
ctatattttg gacatcactt atgggaagga agatgttccc ctatcctgtg tcaatgagat 2280
tgacacaacc cctccacccc aggtggccta cagcaaggaa cgtatcccgg gcaagggtgt 2340
tttcattaac acaggccctg aatttctggt tggctgtgac tgcaaggatg ggtgtcggga 2400
caagtccaag tgtgcctgcc atcaactaac tatccaggct acagcctgta ccccaggagg 2460
ccaaatcaac cctaactctg gctaccagta caagagacta gaagagtgtc tacccacagg 2520

ggtatatgag tgtaacaaac gctgcaaatg tgacccaaac atgtgcacaa accggttggt 2580
gcaacatgga ctacaagttc ggctacagct attcaagaca cagaacaagg gctggggtat 2640
ccgctgcttg gatgacattg ccaaaggctc ttttgtttgt atttatgcag gcaaaatcct 2700
gacagatgac tttgcagaca aggagggtct ggaaatgggt gatgagtact ttgcaaatct 2760
ggaccatatc gagagcgtgg agaacttcaa agaaggatat gagagtgatg ccccctgttc 2820
ctctgacagc agtggtgtag acttgaagga ccaggaagat ggcaacagcg gtacagagga 2880
ccctgaagag tccaatgatg atagctcaga tgataacttc tgtaaggatg aggacttcag 2940

caccagttca gtgtggcgga gctatgctac ccggaggcag acccggggcc agaaagagaa 3000
cggactctct gagacaactt ccaaggactc ccacccccca gatcttggac ccccacatat 3060
tcctgttcct ccctcaatcc ctgtaggtgg ctgcaatcca ccttcctccg aagagacacc 3120
caagaacaag gtggcctcat ggttgagctg caatagtgtc agtgaaggtg gttttgctga 3180
ctctgatagc cattcatcct tcaagactaa tgaaggtggg gagggccggg ctgggggaag 3240
ccgaatggag gctgagaagg cctccacctc aggactaggc atcaaggatg agggagacat 3300
caaacaggcc aagaaagagg acactgacga ccgaaacaag atgtcagtag ttactgaaag 3360

ctctcgaaat tacggttaca atccttctcc tgtgaagcct gaaggacttc gccgcccacc 3420

tagtaagact agtatgcatc aaagccgaag actcatggct tctgctcagt ccaaccctga 3480

tgatgtcctg acactgtcca gcagcacaga aagtgagggg gaaagtggga ccagccgaaa 3540

gcccactgct ggtcagactt cggctacagc ggttgacagt gatgatatcc agaccatatc 3600

ctctggctct gaaggggatg actttgagga caagaagaac atgactggtc caatgaagcg 3660

tcaagtggca gtaaaatcaa cccgaggctt tgctcttaaa tcaacccatg ggattgcaat 3720

taaatcaacc aacatggcct ctgtggacaa gggggagagc gcacctgttc gtaagaacac 3780

acgccaattc tatgatggcg aggagtcttg ctacatcatt gatgccaagc ttgaaggcaa 3840

cctgggccgc tacctcaacc acagttgcag ccccaacctg tttgtccaga atgtcttcgt 3900

ggatacccat gatcttcgct tcccctgggt ggccttcttt gccagcaaaa gaatccgggc 3960

tgggacagaa cttacttggg actacaacta cgaggtgggc agtgtggaag gcaaggagct 4020

actctgttgc tgtggggcca ttgaatgcag aggacgtctt ctttagagga cagccttctt 4080

cccaaccctt cttgaactgt cgtttcctca ggaactgggt cttcctgatt gttgaaccct 4140

gacccgaagt ctctgggcta gctactcccc ccagctccta gttgatagaa atgggggttc 4200

tggaccagat gatcccttcc aatgtggtgc tagcaggcag gatcccttct ccacctccaa 4260

aggccctaaa gggtggggag agatcaccac tctaacctcg gcctgacatc cctcccatcc 4320

catatttgtc caagtgttcc tgcttctaac agactttgtt cttagaatgg agcctgtgta 4380

tctactatct ccagtttgta ttatttcttg aaagtctttt aacaatatga taaaactaag 4440

attgtgaaa 4449

<210> 46

<211> 5123

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

gcgcgggagg ggcggggcca cgctgcgggc ccgggccatg gccgccgccg atgccgaggc 60

agttccggcg agggggggagc ctcagcagga ttgctgtgtg aaaaccgagc tgctgggaga 120

agagacacct atggctgccg atgaaggctc agcagagaaa caggcaggag aggcccacat 180

ggctgcggac ggtgagacca atgggtcttg tgaaaacagc gatgccagca gtcatgcaaa 240

tgctgcaaag cacactcagg acagcgcaag ggtcaacccc caggatggca ccaacacact 300

aactcggata gcggaaaatg gggtttcaga aagagactca gaagcggcga agcaaaacca 360

cgtcactgcc gacgactttg tgcagacttc tgtcatcggc agcaacggat acatcttaaa 420

taagccggcc ctacaggcac agcccttgag gactaccagc actctggcct cttcgctgcc 480

tggccatgct gcaaaaaccc ttcctggagg ggctggcaaa ggcaggactc caagcgcttt 540
tccccagacg ccagccgccc caccagccac ccttggggag gggagtgctg acacagagga 600
caggaagctc ccggcccctg gcgccgacgt caaggtccac agggcacgca agaccatgcc 660
gaagtccgtc gtgggcctgc atgcagccag taaagatccc agagaagttc gagaagctag 720
agatcataag gaaccaaaag aggagatcaa caaaaacatt tctgactttg gacgacagca 780
gcttttaccc cccttcccat cccttcatca gtcgctacct cagaaccagt gctacatggc 840
caccacaaaa tcacagacag cttgcttgcc ttttgtttta gcagctgcag tatctcggaa 900

gaaaaaacga agaatgggaa cctatagcct ggttcctaag aaaaagacca aagtattaaa 960
acagaggacg gtgattgaga tgtttaagag cataactcat tccactgtgg gttccaaggg 1020
ggagaaggac ctgggcgcca gcagcctgca cgtgaatggg gagagcctgg agatggactc 1080
ggatgaggac gactcagagg agctcgagga ggacgacggc catggtgcag agcaggcggc 1140
cgcgttcccc acagaggaca gcaggacttc caaggagagc atgtcggagg ctgatcgcgc 1200
ccagaagatg gacggggagt ccgaggagga gcaggagtcc gtggacaccg gggaggagga 1260
ggaaggcggt gacgagtctg acctgagttc ggaatccagc attaagaaga aatttctcaa 1320

gaggaaagga aagaccgaca gtccctggat caagccagcc aggaaaagga ggcggagaag 1380
tagaaagaag cccagcggtg ccctcggttc tgagtcgtat aagtcatctg caggaagcgc 1440
tgagcagacg gcaccaggag acagcacagg gtacatggaa gtttctctgg actccctgga 1500
tctccgagtc aaaggaattc tgtcttcaca agcagaaggg ttggccaacg gtccagatgt 1560
gctggagaca gacggcctcc aggaagtgcc tctctgcagc tgccggatgg aaacaccgaa 1620
gagtcgagag atcaccacac tggccaacaa ccagtgcatg gctacagaga gcgtggacca 1680
tgaattgggc cggtgcacaa acagcgtggt caagtatgag ctgatgcgcc cctccaacaa 1740

ggccccgctc ctcgtgctgt gtgaagacca ccggggccgc atggtgaagc accagtgctg 1800
tcctggctgt ggctacttct gcacagcggg taattttatg gagtgtcagc ccgagagcag 1860
catctctcac cgtttccaca aagactgtgc ctctcgagtc aataacgcca gctattgtcc 1920
ccactgtggg gaggagagct ccaaggccaa agaggtgacg atagctaaag cagacaccac 1980
ctcgaccgtg acaccagtcc ccgggcagga gaagggctcg gccctggagg gcagggccga 2040
caccacaacg ggcagtgctg ccgggccacc actctcggag gacgacaagc tgcagggtgc 2100
agcctcccac gtgcccgagg gctttgatcc aacgggacct gctgggcttg ggaggccaac 2160

tcccggcctt tcccagggac cagggaagga aaccttggag agcgctctca tcgccctcga 2220

ctcggaaaaa cccaagaagc ttcgcttcca cccaaagcag ctgtacttct ccgccaggca 2280

aggggagctt cagaaggtgc tcctcatgct ggtggacgga attgacccca acttcaaaat 2340

ggagcaccag aataagcgct ctccactgca cgccgcggca gaggctggac acgtggacat 2400

ctgccacatg ctggttcagg cgggcgctaa tattgacacc tgctcagaag accagaggac 2460

cccgttgatg gaagcagccg aaaacaacca tctggaagca gtgaagtacc tcatcaaggc 2520

tggggccctg gtggatccca aggacgcaga gggctctacg tgtttgcacc tggctgccaa 2580

gaaaggccac tacgaagtgg tccagtacct gctttcaaat ggacagatgg acgtcaactg 2640

tcaggatgac ggaggctgga cacccatgat ctgggccaca gagtacaagc acgtggacct 2700

cgtgaagctg ctgctgtcca agggctctga catcaacatc cgagacaacg aggagaacat 2760

ttgcctgcac tgggcggcgt tctccggctg cgtggacata gccgagatcc tgctggctgc 2820

caagtgcgac ctccacgccg tgaacatcca cggagactcg ccactgcaca ttgccgcccg 2880

ggagaaccgc tacgactgtg tcgtcctctt tctttctcgg gattcagatg tcaccttaaa 2940

gaacaaggaa ggagagacgc ccctgcagtg tgcgagcctc aactctcagg tgtggagcgc 3000

tctgcagatg agcaaggctc tgcaggactc ggcccccgac aggcccagcc ccgtggagag 3060

gatagtgagc agggacatcg ctcgaggcta cgagcgcatc cccatcccct gtgtcaacgc 3120

cgtggacagc gagccatgcc ccagcaacta caagtacgtc tctcagaact gcgtgacgtc 3180

ccccatgaac atcgacagaa atatcactca tctgcagtac tgcgtgtgca tcgacgactg 3240

ctcctccagc aactgcatgt gcggccagct cagcatgcgc tgctggtacg acaaggatgg 3300

ccggctcctg ccagagttca acatggcgga gcctcccttg atcttcgaat gcaaccacgc 3360

gtgctcctgc tggaggaact gccgaaatcg cgtcgtacag aatggtctca gggcaaggct 3420

gcagctctac cggacgcggg acatgggctg gggcgtgcgg tccctgcagg acatcccacc 3480

aggcaccttt gtctgcgagt atgttgggga gctgatttca gactcagaag ccgacgttcg 3540

agaggaagat tcttacctct ttgatctcga caataaggac ggggaggttt actgcatcga 3600

cgcgcggttc tacgggaacg tcagccggtt catcaaccac cactgcgagc ccaacctggt 3660

gcccgtgcgc gtgttcatgg cccaccagga cctgcggttc ccccggatcg ccttcttcag 3720

cacccgcctg atcgaggccg gcgagcagct cgggtttgac tatggagagc gcttctggga 3780

catcaaaggc aagctcttca gctgccgctg cggctccccc aagtgccggc actcgagcgc 3840

ggccctggcc cagcgtcagg ccagcgcggc ccaggaggcc caggaggacg gcttgcccga 3900

caccagctcc gcggctgccg ccgacccccct atgagacgcc gccggccagc ggggcgctcg 3960

ggagccaggg accgccgcgt cgccgattag aggacgagga ggagagattc cgcacgcaac 4020

cgaaagggtc cttcggggct gcgccgccgg cttcctggag gggtcggagg tgaggctgca 4080

gcccctgcgg gcgggtgtgg atgcctccca gccaccttcc cagacctgcg gcctcaccgc 4140

gggcccagtg cccaggctgg agcgcacact ttggtccgcg cgccagagac gctgggagtc 4200

cgcactggca tcaccttctg agtttctgat gctgatttgt cgttgcgaag tttctcgttt 4260

cttcctctga cctccgaggt ccccgctgca ccacggggtt gctctgttct cctgtccggc 4320

ccagactctt ctgtgtggcg ccgccgaagc caccgttagc gcgagctgct ccgttcgccc 4380

tgcccacggc ctgcgtggct ggggccgagt cccaggggcc gcacggaggg cacagtctcc 4440

tgtcaggctc ggagaggtca ggagaccgac cccaccacta actttggaga aaatgtgggt 4500

ttgcttttta aaggaatcct atatctagtc ctatatatca aacctctaac tgacgtttct 4560

tttcgaggaa gtggcttggt gggtgcagcc cccgccggtt ccgttgacgc tggcaccttc 4620

tgttgatttt ttaagccaca tgctatgatg aataaactga tttatttttct accattactg 4680

aacattagga caaacacaaa ataaaaaaca aaacacagac aacggtgctg attctggtgt 4740

ggtttctact caccacgtga aataaactat caactgtata aagagaacaa agtgatttta 4800

gaataaaatg caggaaaaac ttttttaaag atgttagtct tgtagcgtga ataaatttgc 4860

catcaccttt tgtgtggtgg cctggcaggt catatacttt tttttggcat atacctttt 4920

aaagactgta attagtgcag taacagtggg gttttttttg tgcaactctt ctaaaaacat 4980

tcataatgca gtcatgttta tttttttctg ttaaaatgtt tttgacagtt ttaagagcag 5040

tcttttggct ctgaccattt cttgttctgt ttccaatgaa atcaataaaa aaaaagaagt 5100

actttaaaaa aaaaaaaaaa aaa 5123

<210> 47

<211> 7970

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

gtaaaagtga cattctaaat gttcctcact ctgcgaggct tatttttag ggactttgct 60

ataattctga aagacttagt tttacagtac atctgaaagt aggagttttc agaagtatgg 120

ctcttgggat aaatttagat tcttaattgt gaagctctgt taccacttgt tagaaggcag 180

gtcagctcac ctgcttgggg aggtaaatat atgaatgcac tctcgagtaa tttaatggag 240

ccctacctca atgtacagaa tgacagtatc acagatcaag aatggagtac gagtgatttt 300

cggctatggt gggggtaggt aggtcacttg tcccctgttg tctcttacta tttgtaaagt 360

gaagactatg attagtcttt ttgatcggga tggtttgaga tgaataaaga ataggcaggc 420

aatttggata ctttaggctt ttcaagaaca ttagtaacat tttttcttag atatttctcc 480

taatacaatg agtgttgtga aataacatgg cagttattgt tgagagaaaa gccttcccag 540

ttatgtattg agtccttagg cgttttgacc ttccctccac tcttacagaa cttggtggaa 600

ggggccacta tgttttctac ctccttccgt gcctttcaca aagccacatc ctgcaccgtc 660

taccttctc tgtggatatt tttccgcttg gcaatttcct ttcctgaggc acccacttgg 720

gacatctgaa tctccatctc catgttgatg gcccgtttgt gcttggacgt gttcttccac 780

ttgagactga gggttcatgt aatcaaagaa gtttctttgt tgtgtgtatc tttacagaac 840

acaacaggaa ttgaaaatga atcagaacac tactgagcct gtggcggcca ccgagaccct 900

ggctgaggta cccgaacatg tgctgcgagg acttccggag gaagtgaggc ttttcccttc 960

tgctgttgac aagacccgga ttggtgtctg ggccactaaa ccaattttaa aaggcaaaaa 1020

atttgggcca tttgttggtg ataagaaaaa aagatctcag gttaagaata atgtatacat 1080

gtgggaggtg tattacccaa atttgggatg gatgtgcatt gatgccactg atccagagaa 1140

gggaaactgg ctgcgatatg tgaattgggc ttgctcagga gaagagcaaa atttattccc 1200

actggaaatc aacagagcca tttactataa aactttaaag ccaatcgcgc cgggcgagga 1260

gctcctggtc tggtacaatg gggaagacaa ccctgagata gcagctgcga ttgaggaaga 1320

gcgagccagc gcccggagca agcggagctc ccccaagagc cggaaaggga agaaaaaatc 1380

ccaggaaaat aaaaacaaag gaaacaaaat ccaagacata caactgaaga caagtgagcc 1440

agatttcacc tctgcaaata tgagagattc tgcagaaggt cctaaagaag acgaagagaa 1500

gccttcagcc tcagcacttg agcagccggc caccctccag gaggtggcca gtcaggaggt 1560

gcctccagaa ctagcaaccc ctgcccctgc ctgggagcca cagccagaac cagacgagcg 1620

attagaagcg gcagcttgtg aggtgaatga tttgggggaa gaggaggagg aggaagagga 1680

ggaggatgaa gaagaagaag aagatgatga tgatgatgag ttggaagacg agggggaaga 1740

agaagccagc atgccaaatg aaaattctgt gaaagagcca gaaatacggt gtgatgagaa 1800

gccagaagat ttattagagg aaccaaaaac aacttcagaa gaaactcttg aagactgctc 1860

agaggtaaca cctgccatgc aaatccccag aactaaagaa gaggccaatg gtgatgtatt 1920

tgaaacgttt atgtttccgt gtcaacattg tgaaaggaag tttacaacca aacaggggct 1980

tgagcgtcac atgcatatcc atatatccac cgtcaatcat gctttcaaat gcaagtactg 2040

tgggaaagcc tttggcacac agattaaccg gcggcgacat gagcggcgcc atgaagcagg 2100

gttaaagcgg aaacccagcc aaacactaca gccgtcagag gatctggctg atggcaaagc 2160

atctggagaa aacgttgctt caaaagatga ttcgagtcct cccagtcttg ggccagactg 2220

tctgatcatg aattcagaga aggcttccca agacacaata aattcttctg tcgtagaaga 2280

gaatggggaa gttaaagaac ttcatccgtg caaatattgt aaaaaggttt ttggaactca 2340

tactaatatg agacggcatc agcgtagagt tcacgaacgt catctgattc ccaaaggtgt 2400

acggcgaaaa ggaggccttg aagagcccca gcctccagca gaacaggccc aggccaccca 2460

gaacgtgtat gtaccaagca cagagccgga ggaggaaggg gaagcagatg atgtgtacat 2520

catggacatt tctagcaata tctctgaaaa cttaaattac tatattgatg gtaaaattca 2580

aactaataac aacactagta actgtgatgt gattgagatg gagtctgctt cggcagattt 2640

gtatggtata aattgtctgc tcactccagt tacagtggaa attactcaaa atataaagac 2700

cacacaggtc cctgtaacag aagatcttcc taaagagcct ttgggcagca caaatagtga 2760

ggccaagaag cggagaactg cgagcccacc tgcactgccc aaaattaagg ccgaaacaga 2820

ctctgacccc atggtcccct cttgctcttt aagtcttcct cttagcatat caacaacaga 2880

ggcagtgtct ttccacaaag agaaaagtgt ttatttgtca tcaaagctca aacaacttct 2940

tcaaacccaa gataaactaa ctcctgcagg gatttcagca actgaaatag ctaaattagg 3000

tcctgtttgt gtgtctgctc ctgcatcaat gttgcctgtg acctcaagta ggtttaagag 3060

gcggaccagc tctcctccca gttctccaca gcacagtcct gcccttcgag actttggaaa 3120

gccaagtgat gggaaagcag catggaccga tgccgggctg acttccaaaa aatccaaatt 3180

agaaagtcac agcgactcac cagcatggag tttgtctggg agagatgaga gagaaactgt 3240

gagccctcca tgctttgatg aatataaaat gtctaaagag tggacagcta gttctgcttt 3300

tagcagtgtg tgcaaccagc agccactgga tttatccagc ggtgtcaaac agaaggctga 3360

gggtacaggc aagactccag tccagtggga atctgtctta gatctcagtg tgcataaaaa 3420

gcattgtagt gactctgaag gcaaggaatt caaagaaagt cattcagtgc agcctacgtg 3480

tagtgctgta aagaaaagga aaccaaccac ctgcatgctg cagaaggttc ttctcaatga 3540

atataatggc atcgatttac ctgtagaaaa ccctgcagat gggaccagga gcccaagtcc 3600

ttgtaaatcc ctagaagctc agccagatcc tgacctcggt ccgggctctg gtttccctgc 3660

ccctactgtt gagtccacac ctgatgtttg tccttcatca cctgccctgc agacaccctc 3720

cctttcatcc ggtcagctgc ctcctctctt gatccccaca gatccctctt cccctccacc 3780

ctgtcccccg gtattaactg ttgccactcc gccccctccc ctccttccta ccgtacctct 3840

tccagccccc tcttccagtg catctccaca cccatgcccc tctccactct caaatgccac 3900

cgcacagtcc ccacttccaa ttctgtcccc aacagtgtcc ccctctccct ctcccattcc 3960

tcccgtggag cccctgatgt ctgccgcctc acccgggcct ccaacacttt cttcttcctc 4020

ctcttcatct tcctcctcct cttcgttttc ttcttcatct tcctcctctt ctccttctcc 4080

acctcctctc tccgcaatat catctgttgt ttcctctggt gataatctgg aggcttctct 4140
ccccatgata tctttcaaac aggaggaatt agagaatgaa ggtctgaaac ccagggaaga 4200
gccccagtct gctgctgaac aggatgttgt tgttcaggaa acattcaaca aaaactttgt 4260
ttgcaacgtc tgtgaatcac cttttctttc cattaaagat ctaaccaaac atttatctat 4320
tcatgctgaa gaatggccct tcaaatgtga attttgtgtg cagctttta aggataaaac 4380
ggacttgtca gaacatcgct ttttgcttca tggagttggg aatatctttg tgtgttctgt 4440
ttgtaaaaaa gaatttgctt ttttgtgcaa tttgcagcag caccagcgag atctccaccc 4500

agataaggtg tgcacacatc acgagtttga aagcgggact ctgaggcccc agaactttac 4560
agatcccagc aaggcccatg tagagcatat gcagagcttg ccagaagatc ctttagaaac 4620
ttctaaagaa gaagaggagt taaatgattc ctctgaagag ctttacacga ctataaaaat 4680
aatggcttct ggaataaaga caaaagatcc agatgttcga ttgggcctca atcagcatta 4740
cccaagcttt aaaccacctc catttcagta ccatcaccgt aaccccatgg ggattggtgt 4800
gacagccaca aatttcacta cacacaatat tccacagact ttcactaccg ccattcgctg 4860
cacaaagtgt ggaaaaggtg tcgacaatat gccggagttg cacaaacata tcctggcttg 4920

tgcttctgca agtgacaaga agaggtacac gcctaagaaa aacccagtac cattaaaaca 4980
aactgtgcaa cccaaaaatg gcgtggtggt tttagataac tctgggaaaa atgccttccg 5040
acgaatggga cagcccaaaa ggcttaactt tagtgttgag ctcagcaaaa tgtcgtcgaa 5100
taagctcaaa ttaaatgcat tgaagaaaaa aaatcagcta gtacagaaag caattcttca 5160
gaaaaacaaa tctgcaaagc agaaggccga cttgaaaaat gcttgtgagt catcctctca 5220
catctgccct tactgtaatc gagagttcac ttacattgga agcctgaata aacacgccgc 5280
cttcagctgt cccaaaaaac ccctttctcc tcccaaaaaa aaagtttctc attcatctaa 5340

gaaaggtgga cactcatcac ctgcaagtag tgacaaaaac agtaacagca accaccgcag 5400
acggacagcg gatgcggaga ttaaaatgca aagcatgcag actccgttgg gcaagaccag 5460
agcccgcagc tcaggcccca cccaagtccc acttccctcc tcatccttca ggtccaagca 5520
gaacgtcaag tttgcagctt cggtgaaatc caaaaaacca agctcctcct ctttaaggaa 5580
ctccagcccg ataagaatgg ccaaaataac tcatgttgag gggaaaaaac ctaaagctgt 5640
ggccaagaat cattctgctc agctttccag caaaacatca cggagcctgc acgtgagggt 5700
acagaaaagc aaagctgttt tacaaagcaa atccaccttg gcgagtaaga aaagaacaga 5760

ccggttcaat ataaaatcta gagagcggag tgggggggcca gtcacccgga gccttcagct 5820

ggcagctgct gctgacttga gtgagaacaa gagagaggac ggcagcgcca agcaggagct 5880

gaaggacttc agctacagcc tccgcttggc gtcccgatgc tctccaccag cggccccgta 5940

catcaccagg cagtatagga aggtcaaagc tccagctgca gcccagttcc agggaccatt 6000

cttcaaagag tagacactct ggctgctccc tgacagcacc tgaagtgacc tggaatcagt 6060

gaagccaaag ggactggcag tctgccctgc agggagtacc gacctatccc agttgtgtga 6120

ggctgcgaga gaaagggagt gcatgtgcgc gcgtgcatgt gtgcgtgcgt gtgtgttcac 6180

gtgttctcgt gcgggcgcgt gagtggtctt caaacgaggg tcccgatccc cggggcggca 6240

ggaaggggggc cgactccacg ctgtcctttg ggatgatact tggatgcagc tcttgggacc 6300

gtgttctgca gcccagcctt cctgttgggg tggggcctct cctactatgc aatttttcaa 6360

gagctccttg accctgcttt ttgcttcttg agttgtcttt tgccattatg gggactttgg 6420

tttgacccag gggtcagcct taggaaggcc ttcaggagga ggccgagttc cccttcagta 6480

ccacccctct ctccccacct tccctctccc ggcaacatct ctgggaatca acagcatatt 6540

gacacgttgg agccgagcct gaacatgccc ctcggcccca gcacatggaa aacccccttc 6600

cttgcctaag gtgtctgagt ttctggctct tgaggcattt ccagacttga aattctcatc 6660

agtccattgc tcttgagtct ttgcagagaa cctcagatca ggtgcacctg ggagaaagac 6720

tttgtcccca cttacagatc tatctcctcc cttgggaagg gcagggaatg gggacggtgt 6780

atggagggga gggatctcct gcgcccttca ttgccacact tggtgggacc atgaacatct 6840

ttagtgtctg agcttctcaa attagctgca ataggaaaaa aacaaattgg gaaatgaaaa 6900

aaaaatggga agattaaaaa gcacaggggg aagaagaaga gatttcggag gccatcctgc 6960

caggggcgga cggggctgac tcctgctctc tggaggacgg tcagtccatg tctcggagaa 7020

acgggtgagc tgagcttggc gtttggaccc agttcagtga ggttcttggg ttttgtgcct 7080

ttggggcaga ccccaggcaa ggatgtctga gaccacttgg gcgctgtttt ctcagctcca 7140

atttcaagag tgagctatca aacccagagc ggaaggaggg agctctgatg agcacggttt 7200

gtcacacgat aaagggattt tttttttcag ggctactacg gttgatcttg caactctgta 7260

aatatgtatg tagacacttt taaaagcacg tatttatgtc cctgactgta aatgctccat 7320

ttttaaagtt ttataacttg tgttatttaa tgagtcagtc aatcggctgc agtatgggat 7380

ctgataagga tctaggagaa gggtctcatg cggaccctca catgggcaga aaaatggtgg 7440

tcattggccg acatcacagt tttcctgttt cccacccagc taaaaaccgt tgtttgcttt 7500

aaattttcat aaactggaat cctttcaccc gctcctacag ctaaccctca caagcatgaa 7560

gtgctgtggc tgttccttat cctaatgatg cgcttttgtc ccgtaaatgt taacactcat 7620

gaagcatacc ccggcctctc agttcttgag ggcctcccca ccgcagcagc aaggaaagct 7680

cacgaacccc aaacctggca agtcacctgc agcccatggt gagctctggg aagtgtggtt 7740

gaggccttgg ggtcactcct tttttgcatg tgcaaatgtg ctggtcaccc ttcaacgctc 7800

ccagacggtc aggaaaactg ttccaatcat gaaaaggggg gatgattttg taaaagtggc 7860

atttcctggt cagtggtggt cttcaagacg acagctctgt atctgccatg tgaagagaat 7920

taacaataaa agtgtgaaga gcgattgtga ggaacaaaaa aaaaaaaaaa 7970

<210> 48

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> modified_base

<222> (3)..(31)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 48

aannnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ntt 33

<210> 49

<211> 4526

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

acggctgcgc agatgccgac tttagaggag gcggagtttc ggccttcgcc tgctggaaaa 60

gcagtaggat cggccagtgg cgacagcagg agctgagcct aagccctggc ggggctttgg 120

gctgtagatt cctgtctgac taaagggacc tcaaaaagga gggaaaatgg cttctgagtc 180

tgaaactctg aatcccagtg ctaggataat gacctttat ccaactatgg aagagttccg 240

aaacttcagt agatacattg cctacattga atcccaagga gctcatcggg cagggctagc 300

caaggttgtt cctccaaaag agtggaagcc acgagcatcc tatgatgaca ttgatgattt 360

ggtcattcct gcccccattc aacagctggt gacggggcag tctggcctct ttactcagta 420

caacatacag aagaaagcca tgactgttcg agagttccgc aagatagcca atagcgataa 480

gtactgtacc ccacgctata gtgagtttga agagctcgag cggaaatact ggaaaaatct 540

tacattcaat cctccaatct atggtgcaga tgtgaatggt accctctatg aaaagcatgt 600

tgatgagtgg aatattggcc ggctgagaac aatcctggac ttggtggaaa aggagagtgg 660

gatcaccatt gagggtgtga acaccccata cctgtacttt ggcatgtgga agacatcctt 720

tgcttggcac actgaagaca tggacctcta cagcatcaac tacctgcact ttggagaacc 780

aaagtcctgg tactctgttc cacctgagca tggaaagcgg ttggaacgcc tcgccaaagg 840

cttttccca ggaagtgctc aaagctgtga ggcatttctc cgccacaaga tgaccctgat 900

ttccccgtta atgctgaaga aatatggaat tccctttgac aaggtgactc aagaggctgg 960

agagtttatg atcactttcc cttatggtta ccatgccggc tttaaccatg gttttaactg 1020

tgcggagtct accaattttg ctacccgtcg gtggattgag tacggcaagc aagctgtgct 1080

gtgctcctgt agaaaggaca tggtgaagat ctccatggat gtgtttgtga gaaagttcca 1140

gccagaaagg tacaaacttt ggaaagctgg gaaggacaac acagttattg accatactct 1200

gcccacgcca gaagcagctg agtttcttaa ggagagtgaa ctgcctccaa gagctggcaa 1260

cgaggaggag tgcccagagg aggacatgga aggggtggag gatggagagg aaggagacct 1320

gaagacaagc ctggccaagc accgaatagg gacaaagagg caccgagttt gtcttgaaat 1380

accacaggag gtgagtcaga gtgagctctt ccccaaggag gatctgagtt ctgagcagta 1440

tgagatgacg gagtgcccgg cagccctcgc ccctgtgagg cccacccata gctctgtgcg 1500

gcaagttgag gatggtctta ccttcccaga ttattctgac tccactgaag tcaaatttga 1560

agagcttaaa aatgtcaaac tagaagagga ggatgaggag gaagaacaag cagcagctgc 1620

cttggatctt tctgtgaatc ctgcgtctgt agggggacgc cttgtcttct caggctccaa 1680

aaagaaatca tcttctagcc tgggctctgg ctcttcacgg gattctatct cttctgattc 1740

agaaactagt gagcctctct cctgccgagc ccaagggcaa acgggagttc tcactgtgca 1800

cagttatgcc aaaggggatg gcagggtcac tgtgggagag ccatgcacga ggaagaaagg 1860

aagcgccgct agaagtttca gtgagcggga gctggcagag gttgcagatg aatacatgtt 1920

ttccctagaa gagaataaga agtccaaggg acgccgtcag cctttaagca agctcccccg 1980

ccatcaccca cttgtgctgc aggagtgtgt cagtgatgat gagacatctg aacagctgac 2040

ccctgaggaa gaggctgagg agacagaggc ctgggccaag cctctgagcc aactgtggca 2100

gaaccgacct ccaaactttg aggctgagaa ggaattcaat gagaccatgg cccaacaggc 2160

ccctcactgc gctgtctgta tgatcttcca gacttatcat caggttgaat ttggaggctt 2220

taatcagaac tgtggaaatg cttcagattt agcccccccag aagcagagga ccaagccatt 2280

gattccagaa atgtgcttca cttcgactgg ctgcagcacg gacatcaacc tttctactcc 2340

ttatcttgag gaggatggca ccagcatact cgtttcctgc aagaagtgca gcgtccgggt 2400

ccatgccagt tgctatgggg tccccccctgc aaaggcttct gaagactgga tgtgttctcg 2460

gtgttcagcc aatgccctag aggaggactg ctgtttatgc tcattacgag gaggggccct 2520

gcagagagca aatgatgaca ggtgggtcca cgtttcatgt gctgtggcaa ttctggaagc 2580
aaggtttgtc aacattgcag aaagaagtcc ggtggatgtg agcaaaatcc ccctgccccg 2640
cttcaaactg aaatgtatct tctgtaagaa gcggaggaaa agaactgctg gctgctgtgt 2700
gcagtgttct cacggccgct gcccaactgc cttccatgtg agctgcgccc aggctgccgg 2760
tgtgatgatg cagcctgacg actggccttt tgtggtcttc attacctgct ttcggcacaa 2820
gattcctaat ttggagcgtg ccaaggggggc cttgcaaagc atcactgcag gccagaaagt 2880
cattagcaag cataagaacg ggcgcttcta ccagtgtgaa gtggtcaggc tcaccaccga 2940

gaccttctat gaagtcaact ttgatgatgg ctccttcagc gacaatcttt atcctgagga 3000
catagtgagc caggactgtc tccagtttgg tcctcctgct gaaggggaag tggtccaagt 3060
gagatggaca gacggccaag tctatggagc caagtttgtg gcctcccacc ctatccaaat 3120
gtaccaggtg gagtttgagg atggctcaca acttgtggtt aagagagatg atgtatacac 3180
actggatgaa gagcttccca agagagtcaa atctagactg tcagtagcct cagacatgcg 3240
cttcaatgag attttcacag agaaagaggt taagcaagaa aagaaacggc aacgagttat 3300
caactcaaga taccgggaag attatattga gcctgcacta taccgggcca tcatggagta 3360

ggtgcttcca gggtccaagg gattctcagc catccaggca agagcactct gggttccaca 3420
gcacagcaga catggaacgc tgaagtctct gaaagtgaag ttgtaaaaag aaaaggaatg 3480
aaataaccga cccatcatct tctcacccac cctcattgca ttccgctgta gtgaaaggac 3540
gagccatttc tgggcacgtg gcagcagtcg ctgatctccc agctgagggg ctgagcactg 3600
gaatgctgtg gctgcactgg ccccagtcca tagaggggtc aactatgctg gctggactgg 3660
ctgccttgtt cctggcctag gacttagctt cataactatc acctgcaccg actaggctga 3720
ggtgctggta cttgccccaa cccctacttt tgtatttata tgtgtgtgtg tgtgtgcgtg 3780

cgtgcgtgcg tgcgtgtatg tttggtctgg accagcttct gccagcccct ggcctttact 3840
ttcttccttg cctatgcagg gcaaacaaaa tgtgaaattc tgccctcagc tgagctgagt 3900
aagggctcct gggggttggc tggagatggg tgtggcatct gtccaggcct ggaaccgtct 3960
caagacagtg ctggcaaagc tgcagtattg agatgctaag gagctgatgc cacctctttg 4020
tcttccccta aaggagaaca tggggataac atgggtgtgt gcccacaaca ctctaggtgc 4080
agagcccctg tggcaaagta ttacagggtg tgggtgggga ttaccctgaa tcggggattt 4140
taatgatgga agcaggcaga gcctggtggg tgattctgtc aacagaaaat tgcaatcatg 4200

caggggctgg gagggttagg atgaaaaaac tggggccatt ggaggcccac tgtaggtggg 4260

agggagctga ttttggggtg gggggtggga ctagagggca atactgaagg ggttaaacag 4320

gtttttgctc ctcaagaatt tgtttgcctg ggcccaggat tggagggctt cacaccaata 4380

ccctgtgtat acaagaatca gatttataat acttcccctt ttttgttacg tatgaacact 4440

ataaaccaaa ttattttgaa aactggtgca tcaccttgtc cttagcaata aaatgtgttg 4500

agcagaggaa aaaaaaaaaa aaaaaa 4526

<210> 50

<211> 1064

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Ala Ser Glu Ser Glu Thr Leu Asn Pro Ser Ala Arg Ile Met Thr
1 5 10 15

Phe Tyr Pro Thr Met Glu Glu Phe Arg Asn Phe Ser Arg Tyr Ile Ala
20 25 30

Tyr Ile Glu Ser Gln Gly Ala His Arg Ala Gly Leu Ala Lys Val Val
35 40 45

Pro Pro Lys Glu Trp Lys Pro Arg Ala Ser Tyr Asp Asp Ile Asp Asp
50 55 60

Leu Val Ile Pro Ala Pro Ile Gln Gln Leu Val Thr Gly Gln Ser Gly
65 70 75 80

Leu Phe Thr Gln Tyr Asn Ile Gln Lys Lys Ala Met Thr Val Arg Glu
85 90 95

Phe Arg Lys Ile Ala Asn Ser Asp Lys Tyr Cys Thr Pro Arg Tyr Ser
100 105 110

Glu Phe Glu Glu Leu Glu Arg Lys Tyr Trp Lys Asn Leu Thr Phe Asn
115 120 125

Pro Pro Ile Tyr Gly Ala Asp Val Asn Gly Thr Leu Tyr Glu Lys His
130 135 140

Val Asp Glu Trp Asn Ile Gly Arg Leu Arg Thr Ile Leu Asp Leu Val
145 150 155 160

Glu Lys Glu Ser Gly Ile Thr Ile Glu Gly Val Asn Thr Pro Tyr Leu

165 170 175

Tyr Phe Gly Met Trp Lys Thr Ser Phe Ala Trp His Thr Glu Asp Met

180 185 190

Asp Leu Tyr Ser Ile Asn Tyr Leu His Phe Gly Glu Pro Lys Ser Trp

195 200 205

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

210 215 220

Gly Phe Phe Pro Gly Ser Ala Gln Ser Cys Glu Ala Phe Leu Arg His

225 230 235 240

Lys Met Thr Leu Ile Ser Pro Leu Met Leu Lys Lys Tyr Gly Ile Pro

245 250 255

Phe Asp Lys Val Thr Gln Glu Ala Gly Glu Phe Met Ile Thr Phe Pro

260 265 270

Tyr Gly Tyr His Ala Gly Phe Asn His Gly Phe Asn Cys Ala Glu Ser

275 280 285

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

290 295 300

Leu Cys Ser Cys Arg Lys Asp Met Val Lys Ile Ser Met Asp Val Phe

305 310 315 320

Val Arg Lys Phe Gln Pro Glu Arg Tyr Lys Leu Trp Lys Ala Gly Lys

325 330 335

Asp Asn Thr Val Ile Asp His Thr Leu Pro Thr Pro Glu Ala Ala Glu

340 345 350

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

355 360 365

Cys Pro Glu Glu Asp Met Glu Gly Val Glu Asp Gly Glu Glu Gly Asp

370 375 380

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

385 390 395 400

Val Cys Leu Glu Ile Pro Gln Glu Val Ser Gln Ser Glu Leu Phe Pro

405 410 415

Lys Glu Asp Leu Ser Ser Glu Gln Tyr Glu Met Thr Glu Cys Pro Ala
420 425 430
Ala Leu Ala Pro Val Arg Pro Thr His Ser Ser Val Arg Gln Val Glu
435 440 445

Asp Gly Leu Thr Phe Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Thr Glu Val Lys Phe
450 455 460
Glu Glu Leu Lys Asn Val Lys Leu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu
465 470 475 480
Gln Ala Ala Ala Ala Leu Asp Leu Ser Val Asn Pro Ala Ser Val Gly
485 490 495
Gly Arg Leu Val Phe Ser Gly Ser Lys Lys Lys Ser Ser Ser Ser Leu
500 505 510

Gly Ser Gly Ser Ser Arg Asp Ser Ile Ser Ser Asp Ser Glu Thr Ser
515 520 525
Glu Pro Leu Ser Cys Arg Ala Gln Gly Gln Thr Gly Val Leu Thr Val
530 535 540
His Ser Tyr Ala Lys Gly Asp Gly Arg Val Thr Val Gly Glu Pro Cys
545 550 555 560
Thr Arg Lys Lys Gly Ser Ala Ala Arg Ser Phe Ser Glu Arg Glu Leu
565 570 575

Ala Glu Val Ala Asp Glu Tyr Met Phe Ser Leu Glu Glu Asn Lys Lys
580 585 590
Ser Lys Gly Arg Arg Gln Pro Leu Ser Lys Leu Pro Arg His His Pro
595 600 605
Leu Val Leu Gln Glu Cys Val Ser Asp Asp Glu Thr Ser Glu Gln Leu
610 615 620
Thr Pro Glu Glu Glu Ala Glu Glu Thr Glu Ala Trp Ala Lys Pro Leu
625 630 635 640

Ser Gln Leu Trp Gln Asn Arg Pro Pro Asn Phe Glu Ala Glu Lys Glu
645 650 655
Phe Asn Glu Thr Met Ala Gln Gln Ala Pro His Cys Ala Val Cys Met

660 665 670

Ile Phe Gln Thr Tyr His Gln Val Glu Phe Gly Gly Phe Asn Gln Asn

675 680 685

Cys Gly Asn Ala Ser Asp Leu Ala Pro Gln Lys Gln Arg Thr Lys Pro

690 695 700

Leu Ile Pro Glu Met Cys Phe Thr Ser Thr Gly Cys Ser Thr Asp Ile

705 710 715 720

Asn Leu Ser Thr Pro Tyr Leu Glu Glu Asp Gly Thr Ser Ile Leu Val

725 730 735

Ser Cys Lys Lys Cys Ser Val Arg Val His Ala Ser Cys Tyr Gly Val

740 745 750

Pro Pro Ala Lys Ala Ser Glu Asp Trp Met Cys Ser Arg Cys Ser Ala

755 760 765

Asn Ala Leu Glu Glu Asp Cys Cys Leu Cys Ser Leu Arg Gly Gly Ala

770 775 780

Leu Gln Arg Ala Asn Asp Asp Arg Trp Val His Val Ser Cys Ala Val

785 790 795 800

Ala Ile Leu Glu Ala Arg Phe Val Asn Ile Ala Glu Arg Ser Pro Val

805 810 815

Asp Val Ser Lys Ile Pro Leu Pro Arg Phe Lys Leu Lys Cys Ile Phe

820 825 830

Cys Lys Lys Arg Arg Lys Arg Thr Ala Gly Cys Cys Val Gln Cys Ser

835 840 845

His Gly Arg Cys Pro Thr Ala Phe His Val Ser Cys Ala Gln Ala Ala

850 855 860

Gly Val Met Met Gln Pro Asp Asp Trp Pro Phe Val Val Phe Ile Thr

865 870 875 880

Cys Phe Arg His Lys Ile Pro Asn Leu Glu Arg Ala Lys Gly Ala Leu

885 890 895

Gln Ser Ile Thr Ala Gly Gln Lys Val Ile Ser Lys His Lys Asn Gly

900 905 910

Arg Phe Tyr Gln Cys Glu Val Val Arg Leu Thr Thr Glu Thr Phe Tyr
915 920 925

Glu Val Asn Phe Asp Asp Gly Ser Phe Ser Asp Asn Leu Tyr Pro Glu
930 935 940

Asp Ile Val Ser Gln Asp Cys Leu Gln Phe Gly Pro Pro Ala Glu Gly
945 950 955 960

Glu Val Val Gln Val Arg Trp Thr Asp Gly Gln Val Tyr Gly Ala Lys
965 970 975

Phe Val Ala Ser His Pro Ile Gln Met Tyr Gln Val Glu Phe Glu Asp
980 985 990

Gly Ser Gln Leu Val Val Lys Arg Asp Asp Val Tyr Thr Leu Asp Glu
995 1000 1005

Glu Leu Pro Lys Arg Val Lys Ser Arg Leu Ser Val Ala Ser Asp
1010 1015 1020

Met Arg Phe Asn Glu Ile Phe Thr Glu Lys Glu Val Lys Gln Glu
1025 1030 1035

Lys Lys Arg Gln Arg Val Ile Asn Ser Arg Tyr Arg Glu Asp Tyr
1040 1045 1050

Ile Glu Pro Ala Leu Tyr Arg Ala Ile Met Glu
1055 1060

<210> 51

<211> 5675

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

agggctcggt cgccagcaac cgagcggggc ccggcccgag cggggcctgg gggtgcgacg 60

ccgagggcgg gggagagcgc gccgctgctc ccggaccggg ccgcgcacgc cgcctcagga 120

accatcactg ttgctggagg cacctgacaa atcctagcga atttttggag catctccacc 180

caggaacctc gccatccaga agtgtgcttc ccgcacagct gcagccatgg ggtctgagga 240

ccacggcgcc cagaacccca gctgtaaaat catgacgttt cgcccaacca tggaagaatt 300

taaagacttc aacaaatacg tggcctacat agagtcgcag ggagcccacc gggcgggcct 360

ggccaagatc atccccccga aggagtggaa gccgcggcag acgtatgatg acatcgacga 420

cgtggtgatc ccggcgccca tccagcaggt ggtgacgggc cagtcgggcc tcttcacgca 480

gtacaatatc cagaagaagg ccatgacagt gggcgagtac cgccgcctgg ccaacagcga 540

gaagtactgt accccgcggc accaggactt tgatgacctt gaacgcaaat actggaagaa 600

cctcaccttt gtctccccga tctacggggc tgacatcagc ggctctttgt atgatgacga 660

cgtggcccag tggaacatcg ggagcctccg gaccatcctg gacatggtgg agcgcgagtg 720

cggcaccatc atcgagggcg tgaacacgcc ctacctgtac ttcggcatgt ggaagaccac 780

cttcgcctgg cacaccgagg acatggacct gtacagcatc aactacctgc actttgggga 840

gcctaagtcc tggtacgcca tcccaccaga gcacggcaag cgcctggagc ggctggccat 900

cggcttcttc cccgggagct cgcagggctg cgacgccttc ctgcggcata agatgaccct 960

catctcgccc atcatcctga agaagtacgg gatccccttc agccggatca cgcaggaggc 1020

cggggaattc atgatcacat ttccctacgg ctaccacgcc ggcttcaatc acgggttcaa 1080

ctgcgcagaa tctaccaact tcgccaccct gcggtggatt gactacggca aagtggccac 1140

tcagtgcacg tgccggaagg acatggtcaa gatctccatg gacgtgttcg tgcgcatcct 1200

gcagcccgag cgctacgagc tgtggaagca gggcaaggac ctcacggtgc tggaccacac 1260

gcggcccacg gcgctcacca gccccgagct gagctcctgg agtgcatccc gggcctcgct 1320

gaaggccaag ctcctccgca ggtctcaccg gaaacggagc cagcccaaga agccgaagcc 1380

cgaagacccc aagttccctg gggagggtac ggctggggca gcgctcctag aggaggctgg 1440

gggcagcgtg aaggaggagg ctgggccgga ggttgacccc gaggaggagg aggaggagcc 1500

gcagccactg ccacacggcc gggaggccga gggcgcagaa gaggacggga ggggcaagct 1560

gcggccaacc aaggccaaga gcgagcggaa gaagaagagc ttcggcctgc tgcccccaca 1620

gctgccgccc ccgcctgctc acttcccctc agaggaggcg ctgtggctgc catccccact 1680

ggagcccccg gtgctgggcc caggccctgc agccatggag gagagccccc tgccggcacc 1740

ccttaatgtc gtgccccctg aggtgcccag tgaggagcta gaggccaagc ctcggcccat 1800

catccccatg ctgtacgtgg tgccgcggcc gggcaaggca gccttcaacc aggagcacgt 1860

gtcctgccag caggcctttg agcactttgc ccagaagggt ccgacctgga aggaaccagt 1920

ttcccccatg gagctgacgg ggccagagga cggtgcagcc agcagtgggg caggtcgcat 1980

ggagaccaaa gcccgggccg gagaggggca ggcaccgtcc acattttcca aattgaagat 2040

ggagatcaag aagagccggc gccatcccct gggccggccg cccacccggt ccccactgtc 2100

ggtggtgaag caggaggcct caagtgacga ggaggcatcc cctttctccg gggaggaaga 2160

tgtgagtgac ccggacgcct tgaggccgct gctgtctctg cagtggaaga acagggcggc 2220

cagcttccag gccgagagga agttcaacgc agcggctgcg cgcacggagc cctactgcgc 2280
catctgcacg ctcttctacc cctactgcca ggccctacag actgagaagg aggcacccat 2340
agcctccctc ggagagggct gcccggccac attaccctcc aaaagccgtc agaagacccg 2400
accgctcatc cctgagatgt gcttcacctc tggcggtgag aacacggagc cgctgcctgc 2460
caactcctac atcggcgacg acgggaccag ccccctgatc gcctgcggca agtgctgcct 2520
gcaggtccat gccagttgct atggcatccg tcccgagctg gtcaatgaag gctggacgtg 2580
ttcccggtgc gcggcccacg cctggactgc ggagtgctgc ctgtgcaacc tgcgaggagg 2640

tgcgctgcag atgaccaccg ataggaggtg gatccacgtg atctgtgcca tcgcagtccc 2700
cgaggcgcgc ttcctgaacg tgattgagcg ccaccctgtg gacatcagcg ccatccccga 2760
gcagcggtgg aagctgaaat gcgtgtactg ccggaagcgg atgaagaagg tgtcaggtgc 2820
ctgtatccag tgctcctacg agcactgctc cacgtccttc cacgtgacct gcgcccacgc 2880
cgcaggcgtg ctcatggagc cggacgactg gccctatgtg gtctccatca cctgcctcaa 2940
gcacaagtcg gggggtcacg ctgtccaact cctgagggcc gtgtccctag gccaggtggt 3000
catcaccaag aaccgcaacg ggctgtacta ccgctgtcgc gtcatcggtg ccgcctcgca 3060

gacctgctac gaagtgaact tcgacgatgg ctcctacagc gacaacctgt accctgagag 3120
catcacgagt agggactgtg tccagctggg acccccttcc gaggggggagc tggtggagct 3180
ccggtggact gacggcaacc tctacaaggc caagttcatc tcctccgtca ccagccacat 3240
ctaccaggtg gagtttgagg acgggtccca gctgacggtg aagcgtgggg acatcttcac 3300
cctggaggag gagctgccca agagggtccg ctctcggctg tcactgagca cgggggcacc 3360
gcaggagccc gccttctcgg gggaggaggc caaggccgcc aagcgcccgc gtgtgggcac 3420
cccgcttgcc acggaggact ccgggcggag ccaggactac gtggccttcg tggagagcct 3480

cctgcaggtg cagggccggc ccggagcccc cttctaggac agctggccgc tcaggcgacc 3540
ctcagcccgg cggggaggcc atggcatgcc ccgggcgttc gcttgctgtg aattcctgtc 3600
ctcgtgtccc cgacccccga gaggccacct ccaagccgcg ggtgcccccct agggcgacag 3660
gagccagcgg gacgccgcac gcggccccag actcagggag cagggccagg cgggctcggg 3720
ggccggccag gggagcaccc cactcaacta ctcagaattt taaaccatgt aagctctctt 3780
cttctcgaaa aggtgctact gcaatgccct actgagcaac ctttgagatt gtcacttctg 3840
tacataaacc acctttgtga ggctctttct ataaatacat attgtttaaa aaaaagcaag 3900

aaaaaaagga aaacaaagga aaatatcccc aaagttgttt tctagatttg tggctttaag 3960

aaaaacaaaa caaaacaaac acattgtttt tctcagaacc aggattctct gagaggtcag 4020

agcatctcgc tgtttttttg ttgttgtttt aaaatattat gatttggcta cagaccaggc 4080

agggaaagag acccggtaat tggagggtga gcctcggggg gggggcagga cgccccggtt 4140

tcggcacagc ccggtcactc acggcctcgc tctcgcctca ccccggctcc tgggctttga 4200

tggtctggtg ccagtgcctg tgcccactct gtgcctgctg ggaggaggcc caggctctct 4260

ggtggccgcc cctgtgcacc tggccagggg aagcccgggg gtctggggcc tccctccgtc 4320

tgcgcccacc tttgcagaat aaactctctc ctggggtttg tctatctttg tttctctcac 4380

ctgagagaaa cgcaggtgtt ccagaggctt ccttgcagac aaagcacccc tgcacctcct 4440

atggctcagg atgagggagg cccccaggcc cttctggttg gtagtgagtg tggacagctt 4500

cccagctctt cgggtacaac cctgagcagg tcgggggaca cagggccgag gcaggccttc 4560

ggggcccctt tcgcctgctt ccgggcaggg acgaggcctg gtgtcctcgc tccacccacc 4620

cacgctgctg tcacctgagg ggaatctgct tcttaggagt gggttgagct gatagagaaa 4680

aaacggcctt cagcccaggc tgggaagcgc cttctccagg tgcctctccc tcaccagctc 4740

tgcacccctc tggggagcct tccccacctt agctgtctcc tgccccaggg agggatggag 4800

gagataattt gcttatatta aaaacaaaaa atggctgagg caggagtttg ggaccagcct 4860

gggctatata gcaagacccc atcactacaa atttttaca aattagctag gtgtggtggt 4920

gcgcacctgt ggtcccagct actcgggagg ctgtggtggg aggattgctt gagtccagga 4980

ggttgaggct gcagtcagct cagattgcac cactgcactc cagcctgggc aacagagcga 5040

gaccctgtct ccaaaaaaaa aaaaaagcaa tgtttatatt ataaaagagt gtcctaacag 5100

tccccgggct agagaggact aaggaaaaca gagagagtgt tacgcaggag caagcctttc 5160

atttccttgg tgggggaggg gggcggttgc cctggagagg gccggggtcg gggaggttgg 5220

ggggtgtcag ccaaaacgtg gaggtgtccc tctgcacgca gccctcgccc ggcgtggcgc 5280

tgacactgta ttcttatgtt gtttgaaaat gctatttata ttgtaaagaa gcgggcgggt 5340

gcccctgctg cccttgtccc ttgggggtca cacccatccc ctggtgggct cctgggcggc 5400

ctgcgcagat gggccacaga agggcaggcc ggagctgcac actctcccca cgaaggtatc 5460

tctgtgtctt actctgtgca aagacgcggc aaaacccagt gccctggttt ttccccaccc 5520

gagatgaagg atacgctgta ttttttgcct aatgtccctg cctctaggtt cataatgaat 5580

taaaggttca tgaacgctgc gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5640

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 5675

<210> 52

<211> 1096

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Met Gly Ser Glu Asp His Gly Ala Gln Asn Pro Ser Cys Lys Ile Met
1 5 10 15

Thr Phe Arg Pro Thr Met Glu Glu Phe Lys Asp Phe Asn Lys Tyr Val
20 25 30

Ala Tyr Ile Glu Ser Gln Gly Ala His Arg Ala Gly Leu Ala Lys Ile
35 40 45

Ile Pro Pro Lys Glu Trp Lys Pro Arg Gln Thr Tyr Asp Asp Ile Asp
50 55 60

Asp Val Val Ile Pro Ala Pro Ile Gln Gln Val Val Thr Gly Gln Ser
65 70 75 80

Gly Leu Phe Thr Gln Tyr Asn Ile Gln Lys Lys Ala Met Thr Val Gly
85 90 95

Glu Tyr Arg Arg Leu Ala Asn Ser Glu Lys Tyr Cys Thr Pro Arg His
100 105 110

Gln Asp Phe Asp Asp Leu Glu Arg Lys Tyr Trp Lys Asn Leu Thr Phe
115 120 125

Val Ser Pro Ile Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Gly Ser Leu Tyr Asp Asp
130 135 140

Asp Val Ala Gln Trp Asn Ile Gly Ser Leu Arg Thr Ile Leu Asp Met
145 150 155 160

Val Glu Arg Glu Cys Gly Thr Ile Ile Glu Gly Val Asn Thr Pro Tyr
165 170 175

Leu Tyr Phe Gly Met Trp Lys Thr Thr Phe Ala Trp His Thr Glu Asp
180 185 190

Met Asp Leu Tyr Ser Ile Asn Tyr Leu His Phe Gly Glu Pro Lys Ser
195 200 205

Trp Tyr Ala Ile Pro Pro Glu His Gly Lys Arg Leu Glu Arg Leu Ala
210 215 220

```
Ile Gly Phe Phe Pro Gly Ser Ser Gln Gly Cys Asp Ala Phe Leu Arg

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

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

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

            420                 425                 430
Glu Ala Glu Gly Ala Glu Glu Asp Gly Arg Gly Lys Leu Arg Pro Thr
        435                 440                 445
Lys Ala Lys Ser Glu Arg Lys Lys Lys Ser Phe Gly Leu Leu Pro Pro
    450                 455                 460
Gln Leu Pro Pro Pro Pro Ala His Phe Pro Ser Glu Glu Ala Leu Trp
```

465 470 475 480

Leu Pro Ser Pro Leu Glu Pro Pro Val Leu Gly Pro Gly Pro Ala Ala

485 490 495

Met Glu Glu Ser Pro Leu Pro Ala Pro Leu Asn Val Val Pro Pro Glu

500 505 510

Val Pro Ser Glu Glu Leu Glu Ala Lys Pro Arg Pro Ile Ile Pro Met

515 520 525

Leu Tyr Val Val Pro Arg Pro Gly Lys Ala Ala Phe Asn Gln Glu His

530 535 540

Val Ser Cys Gln Gln Ala Phe Glu His Phe Ala Gln Lys Gly Pro Thr

545 550 555 560

Trp Lys Glu Pro Val Ser Pro Met Glu Leu Thr Gly Pro Glu Asp Gly

565 570 575

Ala Ala Ser Ser Gly Ala Gly Arg Met Glu Thr Lys Ala Arg Ala Gly

580 585 590

Glu Gly Gln Ala Pro Ser Thr Phe Ser Lys Leu Lys Met Glu Ile Lys

595 600 605

Lys Ser Arg Arg His Pro Leu Gly Arg Pro Pro Thr Arg Ser Pro Leu

610 615 620

Ser Val Val Lys Gln Glu Ala Ser Ser Asp Glu Glu Ala Ser Pro Phe

625 630 635 640

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

645 650 655

Ser Leu Gln Trp Lys Asn Arg Ala Ala Ser Phe Gln Ala Glu Arg Lys

660 665 670

Phe Asn Ala Ala Ala Ala Arg Thr Glu Pro Tyr Cys Ala Ile Cys Thr

675 680 685

Leu Phe Tyr Pro Tyr Cys Gln Ala Leu Gln Thr Glu Lys Glu Ala Pro

690 695 700

Ile Ala Ser Leu Gly Glu Gly Cys Pro Ala Thr Leu Pro Ser Lys Ser

705 710 715 720

```
Arg Gln Lys Thr Arg Pro Leu Ile Pro Glu Met Cys Phe Thr Ser Gly
                725                 730                 735
Gly Glu Asn Thr Glu Pro Leu Pro Ala Asn Ser Tyr Ile Gly Asp Asp

            740                 745                 750
Gly Thr Ser Pro Leu Ile Ala Cys Gly Lys Cys Cys Leu Gln Val His
        755                 760                 765
Ala Ser Cys Tyr Gly Ile Arg Pro Glu Leu Val Asn Glu Gly Trp Thr
    770                 775                 780
Cys Ser Arg Cys Ala Ala His Ala Trp Thr Ala Glu Cys Cys Leu Cys
785                 790                 795                 800
Asn Leu Arg Gly Gly Ala Leu Gln Met Thr Thr Asp Arg Arg Trp Ile

                805                 810                 815
His Val Ile Cys Ala Ile Ala Val Pro Glu Ala Arg Phe Leu Asn Val
            820                 825                 830
Ile Glu Arg His Pro Val Asp Ile Ser Ala Ile Pro Glu Gln Arg Trp
        835                 840                 845
Lys Leu Lys Cys Val Tyr Cys Arg Lys Arg Met Lys Lys Val Ser Gly
    850                 855                 860
Ala Cys Ile Gln Cys Ser Tyr Glu His Cys Ser Thr Ser Phe His Val

865                 870                 875                 880
Thr Cys Ala His Ala Ala Gly Val Leu Met Glu Pro Asp Asp Trp Pro
                885                 890                 895
Tyr Val Val Ser Ile Thr Cys Leu Lys His Lys Ser Gly Gly His Ala
            900                 905                 910
Val Gln Leu Leu Arg Ala Val Ser Leu Gly Gln Val Val Ile Thr Lys
        915                 920                 925
Asn Arg Asn Gly Leu Tyr Tyr Arg Cys Arg Val Ile Gly Ala Ala Ser

    930                 935                 940
Gln Thr Cys Tyr Glu Val Asn Phe Asp Asp Gly Ser Tyr Ser Asp Asn
945                 950                 955                 960
Leu Tyr Pro Glu Ser Ile Thr Ser Arg Asp Cys Val Gln Leu Gly Pro
```

965 970 975

Pro Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Leu Arg Trp Thr Asp Gly Asn Leu

980 985 990

Tyr Lys Ala Lys Phe Ile Ser Ser Val Thr Ser His Ile Tyr Gln Val

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

Phe Thr Leu Glu Glu Glu Leu Pro Lys Arg Val Arg Ser Arg Leu

1025 1030 1035

Ser Leu Ser Thr Gly Ala Pro Gln Glu Pro Ala Phe Ser Gly Glu

1040 1045 1050

Glu Ala Lys Ala Ala Lys Arg Pro Arg Val Gly Thr Pro Leu Ala

1055 1060 1065

Thr Glu Asp Ser Gly Arg Ser Gln Asp Tyr Val Ala Phe Val Glu

1070 1075 1080

Ser Leu Leu Gln Val Gln Gly Arg Pro Gly Ala Pro Phe

1085 1090 1095

<210> 53

<211> 4687

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

gccataggtg cgcgtcggcg cccaggagga cgtgtggcgc gtggactaca tcaggtccag 60

ccctgcggga ccccagccag cgcttccggg caaggttctg tgcacctgtt ttctccttct 120

acgcgagtat ctttcccctc cggaaagaat gggatatgcc tgtgtccaaa ggacaagaag 180

atgcgcgcca gcaagcctaa gttaaccaca gcgcggaagt tgagcccaaa gcaagagcgt 240

gccgggcacc tttaagctgt ttgtaagccc acgtgactca ccaagtgcgg gccccagcgg 300

tcacgtgacg gcgcgcgcgc cctcgcgcag ggagagccgg cggtgcgcgc gccttcgccg 360

ctgcctccca cccacccccc cgacgggagg gtgaggcgcg gcgcagtgat cgggcggccg 420

gggtcctgtg cgcgtgcgca gcgaacagct gtcacctagt gcggaacaag tctcccaaat 480

ttcccaaatc tccctgggcc ggaggccact gtcttctctt cctcctccac cgagtcgtgc 540

tctcgcccca acccgcgcgc cagacactgc cctaaccatc atggaggtgg ccgaggtgga 600

aagtcctctg aaccccagct gtaagataat gaccttcaga ccctccatgg aggagttccg 660

ggagttcaac aaataccttg catacatgga gtctaaagga gcccatcgtg cgggtcttgc 720

aaaggtgatt cctcctaagg agtggaagcc aagacagtgc tatgatgaca ttgataattt 780

gctcattcca gcaccaattc agcagatggt cacagggcag tcaggactgt tcactcagta 840

caacatccag aaaaaagcga tgactgtgaa ggagttcagg cagctggcca acagtggcaa 900

atattgtact ccaagatact tggattacga agatttggag cgcaagtact ggaagaactt 960

aacttttgtg gcacctatct atggtgcaga tattaatggg agcatatatg atgagggtgt 1020

ggatgaatgg aacatagctc gcctcaatac agtcttggat gtggttgaag aagagtgtgg 1080

catttctatt gagggtgtaa ataccccata tctctatttt ggcatgtgga agaccacgtt 1140

tgcatggcac accgaagaca tggacctcta tagcattaat tatctccact ttggagagcc 1200

caagtcttgg tatgctatac ctccggagca tggaaaacga cttgaaagac tagctcaagg 1260

ttttttccca agcagctccc aagggtgtga tgcatttctt cgccacaaga tgacattgat 1320

ttctccatca gtattgaaga aatatggtat tccctttgac aagataaccc aggaggctgg 1380

agaattcatg atcactttcc catatggcta ccatgctggt tttaatcatg gtttcaactg 1440

tgcagaatct acaaattttg ctactgtcag atggattgac tatggaaaag ttgccaaatt 1500

gtgcacttgc aggaaagaca tggtgaagat ttcaatggat atctttgtga ggaaatttca 1560

gccagacaga tatcagcttt ggaaacaagg aaaggatata tacaccattg atcacacgaa 1620

gcctactcca gcatccaccc ctgaagtaaa agcatggctg cagaggagga ggaaagtaag 1680

aaaagcatcc cgaagcttcc agtgtgctag gtctacctct aaaaggccta aggctgatga 1740

ggaagaggaa gtgtcagatg aagtcgatgg ggcagaggtc cctaaccccg actcagtcac 1800

agatgacctc aaggtcagtg aaaagtcaga agcagcagtg aagctgagga acacagaagc 1860

atcttcagaa gaagagtcat ctgctagcag gatgcaggtg gagcagaatt tatcagatca 1920

tatcaaactc tcaggaaaca gctgcttaag tacatctgta acagaagaca taaaaactga 1980

ggatgacaaa gcttatgcat atagaagtgt accttctata tccagtgagg ctgatgattc 2040

cattccattg tctagtggct atgagaagcc cgagaaatca gacccatccg agctttcatg 2100

gccaaagtca cctgagtcat gctcatcagt ggcagagagt aatggtgtgt taacagaggg 2160

agaagagagt gatgtggaga gccatgggaa tggccttgaa cctggggaaa tcccagcggt 2220

ccccagtgga gagagaaata gcttcaaagt ccccagtata gcagagggag agaacaaaac 2280

ctctaagagt tggcgccatc cacttagcag gcctccagca agatctccga tgactcttgt 2340

gaagcagcag gcgccaagtg atgaagaatt gcctgaggtt ctgtccattg aggaggaagt 2400

ggaagaaaca gagtcttggg cgaaacctct catccacctt tggcagacga agtcccctaa 2460

cttcgcagct gagcaagagt ataatgcaac agtggccagg atgaagccac actgtgccat 2520

ctgcactctg ctcatgccgt accacaagcc agatagcagc aatgaagaaa atgatgctag 2580

atgggagaca aaattagatg aagtcgttac atcggaggga aagactaagc ccctcatacc 2640

agagatgtgt tttatttata gtgaagaaaa tatagaatat tctccaccca atgccttcct 2700

tgaagaggat ggaacaagtc tccttatttc ctgtgcaaag tgctgcgtac gggttcatgc 2760

aagttgttat ggtattcctt ctcatgagat ctgtgatgga tggctgtgtg cccggtgcaa 2820

aagaaatgcg tggacagcag aatgctgtct ctgcaatttg agaggaggtg ctcttaagca 2880

aacgaagaac aataagtggg cccatgtcat gtgcgccgtt gcggtcccag aagttcgatt 2940

cactaatgtc ccagaaagga cacaaataga tgtaggcaga ataccttac agaggttaaa 3000

attgaaatgc atcttctgca gacaccgggt taagagggtc tctggagcct gcatccagtg 3060

ttcctacggt cgctgcccgg cctccttcca tgtcacttgt gcccatgctg ctggggtact 3120

gatggagcct gatgactggc cttatgtggt gaacattaca tgctttcgac ataaggtcaa 3180

ccccaacgtg aagtccaagg cttgcgagaa ggtcatttcc gtgggtcaaa cggtcatcac 3240

gaagcatcgg aacacccggt attacagttg cagagtgatg gctgtgacat cgcagacctt 3300

ctatgaggtc atgtttgatg atggctcctt tagcagagac acatttcctg aggatatcgt 3360

gagccgagac tgtctgaagc tgggcccacc tgctgaggga gaagtcgtcc aagtcaagtg 3420

gcccgatggc aaactctatg gagcaaaata ttttggatca aatattgccc acatgtacca 3480

ggttgagttt gaagatggat cccagatagc aatgaagaga gaggacatct acactttaga 3540

tgaagagtta cccaagagag tgaaagctcg attttccaca gcctctgaca tgcgatttga 3600

agacacgttt tatggagcag acattatcca aggggagaga aagagacaaa gagtgctgag 3660

ctccaggttt aagaatgaat atgtggccga ccctgtatac cgcacttttt tgaagagctc 3720

tttccagaag aagtgccaga agagacagta gtctgcatac atcgctgcag gccacagagc 3780

agcttgggtt ggaagagaga agatgaaggg acatccttgg ggctgtgccg tgagttttgc 3840

tggcataggt gacagggtgt gtctctgaca gtggtaaatc gggtttccag agtttggtca 3900

ccaaaaatac aaaatacacc caatgaattg gacgcagcaa tctgaaatca tctctagtct 3960

tgctttcact tgtgagcagt tgtcttctat gatcccaaag aagttttcta agtgaaagga 4020

aatactagtg aatcacccac aaggaaaagc cactgccaca gaggaggcgg gtccccttgt 4080

gcggcttagg gccctgtcag gaaacacacg gggacctctc tctctagctc cagcaggtgg 4140

cacctcggta cccagcgggt agggcgataa tttatatatt ttccacagtc agggaaggac 4200

tctcacttat ttgtttcaaa ttgcagtttt tataaaacat ttttaaaaca caaatggcat 4260

gtatgctaat gagatttacc cgtgtgctat ctgtatttcc cttgtacaga acttttacat 4320

ttttgaatat tcctattact tttgattgtg tctgatggga actgagttgt tggcctttgt 4380
gaaatgaaat ttttggctct tgagaaagaa ttcttatgaa ttgttatgcg aattttatat 4440
atttaaagag ggagatctgg ggctgttatt tttaaacact ttttttcata atacatattc 4500
cgagtagata tttataaaat atatgtttct ttcattatgt gtttgtaaaa ttagagttta 4560
aataaatatg ctttgatgca tagttttgaa ctaatgtaac atgatttttc ttttttaaaa 4620
cagcctgaaa atgtactagt gtttaaaaat aaagatttcc attttctcca aaaaaaaaaa 4680
aaaaaaa 4687

<210> 54
<211> 1056
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 54

Met Glu Val Ala Glu Val Glu Ser Pro Leu Asn Pro Ser Cys Lys Ile
1 5 10 15
Met Thr Phe Arg Pro Ser Met Glu Glu Phe Arg Glu Phe Asn Lys Tyr
20 25 30
Leu Ala Tyr Met Glu Ser Lys Gly Ala His Arg Ala Gly Leu Ala Lys
35 40 45
Val Ile Pro Pro Lys Glu Trp Lys Pro Arg Gln Cys Tyr Asp Asp Ile
50 55 60
Asp Asn Leu Leu Ile Pro Ala Pro Ile Gln Gln Met Val Thr Gly Gln
65 70 75 80
Ser Gly Leu Phe Thr Gln Tyr Asn Ile Gln Lys Lys Ala Met Thr Val
85 90 95
Lys Glu Phe Arg Gln Leu Ala Asn Ser Gly Lys Tyr Cys Thr Pro Arg
100 105 110
Tyr Leu Asp Tyr Glu Asp Leu Glu Arg Lys Tyr Trp Lys Asn Leu Thr
115 120 125
Phe Val Ala Pro Ile Tyr Gly Ala Asp Ile Asn Gly Ser Ile Tyr Asp
130 135 140

Glu Gly Val Asp Glu Trp Asn Ile Ala Arg Leu Asn Thr Val Leu Asp
145 150 155 160
Val Val Glu Glu Glu Cys Gly Ile Ser Ile Glu Gly Val Asn Thr Pro
165 170 175
Tyr Leu Tyr Phe Gly Met Trp Lys Thr Thr Phe Ala Trp His Thr Glu

180 185 190
Asp Met Asp Leu Tyr Ser Ile Asn Tyr Leu His Phe Gly Glu Pro Lys
195 200 205
Ser Trp Tyr Ala Ile Pro Pro Glu His Gly Lys Arg Leu Glu Arg Leu
210 215 220
Ala Gln Gly Phe Phe Pro Ser Ser Ser Gln Gly Cys Asp Ala Phe Leu
225 230 235 240
Arg His Lys Met Thr Leu Ile Ser Pro Ser Val Leu Lys Lys Tyr Gly

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

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

370 375 380
Ala Asp Glu Glu Glu Glu Val Ser Asp Glu Val Asp Gly Ala Glu Val

385 390 395 400

Pro Asn Pro Asp Ser Val Thr Asp Asp Leu Lys Val Ser Glu Lys Ser

405 410 415

Glu Ala Ala Val Lys Leu Arg Asn Thr Glu Ala Ser Ser Glu Glu Glu

420 425 430

Ser Ser Ala Ser Arg Met Gln Val Glu Gln Asn Leu Ser Asp His Ile

435 440 445

Lys Leu Ser Gly Asn Ser Cys Leu Ser Thr Ser Val Thr Glu Asp Ile

450 455 460

Lys Thr Glu Asp Asp Lys Ala Tyr Ala Tyr Arg Ser Val Pro Ser Ile

465 470 475 480

Ser Ser Glu Ala Asp Asp Ser Ile Pro Leu Ser Ser Gly Tyr Glu Lys

485 490 495

Pro Glu Lys Ser Asp Pro Ser Glu Leu Ser Trp Pro Lys Ser Pro Glu

500 505 510

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

515 520 525

Glu Ser Asp Val Glu Ser His Gly Asn Gly Leu Glu Pro Gly Glu Ile

530 535 540

Pro Ala Val Pro Ser Gly Glu Arg Asn Ser Phe Lys Val Pro Ser Ile

545 550 555 560

Ala Glu Gly Glu Asn Lys Thr Ser Lys Ser Trp Arg His Pro Leu Ser

565 570 575

Arg Pro Pro Ala Arg Ser Pro Met Thr Leu Val Lys Gln Gln Ala Pro

580 585 590

Ser Asp Glu Glu Leu Pro Glu Val Leu Ser Ile Glu Glu Glu Val Glu

595 600 605

Glu Thr Glu Ser Trp Ala Lys Pro Leu Ile His Leu Trp Gln Thr Lys

610 615 620

Ser Pro Asn Phe Ala Ala Glu Gln Glu Tyr Asn Ala Thr Val Ala Arg

625 630 635 640

Met Lys Pro His Cys Ala Ile Cys Thr Leu Leu Met Pro Tyr His Lys
645 650 655
Pro Asp Ser Ser Asn Glu Glu Asn Asp Ala Arg Trp Glu Thr Lys Leu
660 665 670
Asp Glu Val Val Thr Ser Glu Gly Lys Thr Lys Pro Leu Ile Pro Glu
675 680 685
Met Cys Phe Ile Tyr Ser Glu Glu Asn Ile Glu Tyr Ser Pro Pro Asn

690 695 700
Ala Phe Leu Glu Glu Asp Gly Thr Ser Leu Leu Ile Ser Cys Ala Lys
705 710 715 720
Cys Cys Val Arg Val His Ala Ser Cys Tyr Gly Ile Pro Ser His Glu
725 730 735
Ile Cys Asp Gly Trp Leu Cys Ala Arg Cys Lys Arg Asn Ala Trp Thr
740 745 750
Ala Glu Cys Cys Leu Cys Asn Leu Arg Gly Gly Ala Leu Lys Gln Thr

755 760 765
Lys Asn Asn Lys Trp Ala His Val Met Cys Ala Val Ala Val Pro Glu
770 775 780
Val Arg Phe Thr Asn Val Pro Glu Arg Thr Gln Ile Asp Val Gly Arg
785 790 795 800
Ile Pro Leu Gln Arg Leu Lys Leu Lys Cys Ile Phe Cys Arg His Arg
805 810 815
Val Lys Arg Val Ser Gly Ala Cys Ile Gln Cys Ser Tyr Gly Arg Cys

820 825 830
Pro Ala Ser Phe His Val Thr Cys Ala His Ala Ala Gly Val Leu Met
835 840 845
Glu Pro Asp Asp Trp Pro Tyr Val Val Asn Ile Thr Cys Phe Arg His
850 855 860
Lys Val Asn Pro Asn Val Lys Ser Lys Ala Cys Glu Lys Val Ile Ser
865 870 875 880
Val Gly Gln Thr Val Ile Thr Lys His Arg Asn Thr Arg Tyr Tyr Ser

885 890 895

Cys Arg Val Met Ala Val Thr Ser Gln Thr Phe Tyr Glu Val Met Phe

900 905 910

Asp Asp Gly Ser Phe Ser Arg Asp Thr Phe Pro Glu Asp Ile Val Ser

915 920 925

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

930 935 940

Val Lys Trp Pro Asp Gly Lys Leu Tyr Gly Ala Lys Tyr Phe Gly Ser

945 950 955 960

Asn Ile Ala His Met Tyr Gln Val Glu Phe Glu Asp Gly Ser Gln Ile

965 970 975

Ala Met Lys Arg Glu Asp Ile Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Leu Pro Lys

980 985 990

Arg Val Lys Ala Arg Phe Ser Thr Ala Ser Asp Met Arg Phe Glu Asp

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

Arg Val Leu Ser Ser Arg Phe Lys Asn Glu Tyr Val Ala Asp Pro

1025 1030 1035

Val Tyr Arg Thr Phe Leu Lys Ser Ser Phe Gln Lys Lys Cys Gln

1040 1045 1050

Lys Arg Gln

1055

<210> 55

<211> 523

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Met Glu Thr Met Lys Ser Lys Ala Asn Cys Ala Gln Asn Pro Asn Cys

1 5 10 15

Asn Ile Met Ile Phe His Pro Thr Lys Glu Glu Phe Asn Asp Phe Asp

20 25 30

Lys Tyr Ile Ala Tyr Met Glu Ser Gln Gly Ala His Arg Ala Gly Leu
35 40 45
Ala Lys Ile Ile Pro Pro Lys Glu Trp Lys Ala Arg Glu Thr Tyr Asp
50 55 60
Asn Ile Ser Glu Ile Leu Ile Ala Thr Pro Leu Gln Gln Val Ala Ser
65 70 75 80

Gly Arg Ala Gly Val Phe Thr Gln Tyr His Lys Lys Lys Lys Ala Met
85 90 95
Thr Val Gly Glu Tyr Arg His Leu Ala Asn Ser Lys Lys Tyr Gln Thr
100 105 110
Pro Pro His Gln Asn Phe Glu Asp Leu Glu Arg Lys Tyr Trp Lys Asn
115 120 125
Arg Ile Tyr Asn Ser Pro Ile Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Gly Ser Leu
130 135 140

Phe Asp Glu Asn Thr Lys Gln Trp Asn Leu Gly His Leu Gly Thr Ile
145 150 155 160
Gln Asp Leu Leu Glu Lys Glu Cys Gly Val Val Ile Glu Gly Val Asn
165 170 175
Thr Pro Tyr Leu Tyr Phe Gly Met Trp Lys Thr Thr Phe Ala Trp His
180 185 190
Thr Glu Asp Met Asp Leu Tyr Ser Ile Asn Tyr Leu His Leu Gly Glu
195 200 205

Pro Lys Thr Trp Tyr Val Val Pro Pro Glu His Gly Gln Arg Leu Glu
210 215 220
Arg Leu Ala Arg Glu Leu Phe Pro Gly Ser Ser Arg Gly Cys Gly Ala
225 230 235 240
Phe Leu Arg His Lys Val Ala Leu Ile Ser Pro Thr Val Leu Lys Glu
245 250 255
Asn Gly Ile Pro Phe Asn Arg Ile Thr Gln Glu Ala Gly Glu Phe Met
260 265 270

Val Thr Phe Pro Tyr Gly Tyr His Ala Gly Phe Asn His Gly Phe Asn

275 280 285

Cys Ala Glu Ala Ile Asn Phe Ala Thr Pro Arg Trp Ile Asp Tyr Gly

290 295 300

Lys Met Ala Ser Gln Cys Ser Cys Gly Glu Ala Arg Val Thr Phe Ser

305 310 315 320

Met Asp Ala Phe Val Arg Ile Leu Gln Pro Glu Arg Tyr Asp Leu Trp

325 330 335

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

340 345 350

Pro Ala Ser Gln Glu Leu Ser Thr Gln Lys Glu Val Gln Leu Pro Arg

355 360 365

Arg Ala Ala Leu Gly Leu Arg Gln Leu Pro Ser His Trp Ala Arg His

370 375 380

Ser Pro Trp Pro Met Ala Ala Arg Ser Gly Thr Arg Cys His Thr Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Gln Pro Arg Ala Ala Ala Val His Ser Ser Lys Lys Pro Ser Ser Thr

420 425 430

Pro Ser Ser Thr Pro Gly Pro Ser Ala Gln Ile Ile His Pro Ser Asn

435 440 445

Gly Arg Arg Gly Arg Gly Arg Pro Pro Gln Lys Leu Arg Ala Gln Glu

450 455 460

Leu Thr Leu Gln Thr Pro Ala Lys Arg Pro Leu Leu Ala Gly Thr Thr

465 470 475 480

Cys Thr Ala Ser Gly Pro Glu Pro Glu Pro Leu Pro Glu Asp Gly Ala

485 490 495

Leu Met Asp Lys Pro Val Pro Leu Ser Pro Gly Leu Gln His Pro Val

500 505 510

Lys Ala Ser Gly Cys Ser Trp Ala Pro Val Pro

515 520

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 56

catggccttc cgtgttccta 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 57

gcctgcttca ccaccttctt 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 58

tgtgatgcca ggcacttggt 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 59

tgggctccac ctttgtggtt 20

<210> 60

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 60

ttggagtcca ggcagagtg 19

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 61

cactgtcatc ggggcttgtg 20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 62

tttctggttg gctgtgactg 20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 63

gagttagggt tgacttggcc 20

<210> 64

<211> 423

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Met Glu Thr Met Lys Ser Lys Ala Asn Cys Ala Gln Asn Pro Asn Cys
1 5 10 15

Asn Ile Met Ile Phe His Pro Thr Lys Glu Glu Phe Asn Asp Phe Asp
20 25 30

Lys Tyr Ile Ala Tyr Met Glu Ser Gln Gly Ala His Arg Ala Gly Leu
35 40 45

Ala Lys Ile Ile Pro Pro Lys Glu Trp Lys Ala Arg Glu Thr Tyr Asp
50 55 60

Asn Ile Ser Glu Ile Leu Ile Ala Thr Pro Leu Gln Gln Val Ala Ser
65 70 75 80

Gly Arg Ala Gly Val Phe Thr Gln Tyr His Lys Lys Lys Lys Ala Met
85 90 95

Thr Val Gly Glu Tyr Arg His Leu Ala Asn Ser Lys Lys Tyr Gln Thr
100 105 110

Pro Pro His Gln Asn Phe Glu Asp Leu Glu Arg Lys Tyr Trp Lys Asn
115 120 125

Arg Ile Tyr Asn Ser Pro Ile Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Gly Ser Leu
130 135 140

Phe Asp Glu Asn Thr Lys Gln Trp Asn Leu Gly His Leu Gly Thr Ile
145 150 155 160

Gln Asp Leu Leu Glu Lys Glu Cys Gly Val Val Ile Glu Gly Val Asn
165 170 175

Thr Pro Tyr Leu Tyr Phe Gly Met Trp Lys Thr Thr Phe Ala Trp His
180 185 190

Thr Glu Asp Met Asp Leu Tyr Ser Ile Asn Tyr Leu His Leu Gly Glu
195 200 205

Pro Lys Thr Trp Tyr Val Val Pro Pro Glu His Gly Gln Arg Leu Glu
210 215 220

Arg Leu Ala Arg Glu Leu Phe Pro Gly Ser Ser Arg Gly Cys Gly Ala

225 230 235 240

Phe Leu Arg His Lys Val Ala Leu Ile Ser Pro Thr Val Leu Lys Glu

245 250 255

Asn Gly Ile Pro Phe Asn Arg Ile Thr Gln Glu Ala Gly Glu Phe Met

260 265 270

Val Thr Phe Pro Tyr Gly Tyr His Ala Gly Phe Asn His Gly Phe Asn

275 280 285

Cys Ala Glu Ala Ile Asn Phe Ala Thr Pro Arg Trp Ile Asp Tyr Gly

290 295 300

Lys Met Ala Ser Gln Cys Ser Cys Gly Glu Ala Arg Val Thr Phe Ser

305 310 315 320

Met Asp Ala Phe Val Arg Ile Leu Gln Pro Glu Arg Tyr Asp Leu Trp

325 330 335

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

340 345 350

Pro Ala Ser Gln Glu Leu Ser Thr Gln Lys Glu Val Gln Leu Pro Arg

355 360 365

Arg Ala Ala Leu Gly Leu Arg Gln Leu Pro Ser His Trp Ala Arg His

370 375 380

Ser Pro Trp Pro Met Ala Ala Arg Ser Gly Thr Arg Cys His Thr Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Gln Pro Arg Ala Ala Ala Val

420

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 65

Gly Gly Gly Gly Cys

1 5