



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0091920
(43) 공개일자 2016년08월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 5/09 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A61K 31/505 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7015240
- (22) 출원일자(국제) 2014년11월17일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년06월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/065997
- (87) 국제공개번호 WO 2015/073990
국제공개일자 2015년05월21일
- (30) 우선권주장
61/905,819 2013년11월18일 미국(US)

- (71) 출원인
예일 유니버시티
미국 코네티컷주 06510 뉴 헤이븐 휘트니 애비뉴 투
- (72) 발명자
수, 티안
미국, 코네티컷 06437, 길퍼드, 149 플래그마쉬 로드
첸, 펑
미국, 코네티컷 06511, 뉴 헤이븐, 아파트 이2, 137 코티지 스트리트
란드레테, 션
미국, 코네티컷 06450, 메리던, 185 프레스턴 드라이브
- (74) 대리인
손민

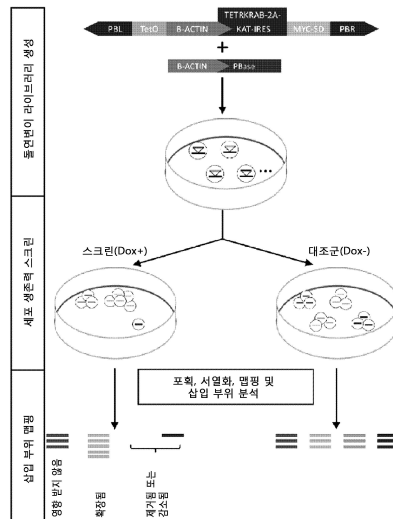
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **트랜스포존 조성물 및 이의 이용 방법**

(57) 요약

본 발명은 트랜스포존을 이용하는 조성물 및 방법들을 제공한다. 한 측면에서, 삽입 돌연변이유발 스크린에서 음성적으로 선별된 유전자들을 식별해내는데 유용한 방법들이 공개된다. 또 다른 측면에서, 종양유발 RAS를 발현시키는 종양 세포의 증식을 감소시키는 조성물은 WNT 경로의 활성자를 포함한다. WNT 경로의 활성자의 유효량을 개체의 종양 세포에 투여함으로써, 종양 세포의 증식을 감소시킬 필요가 있는 개체에서 이를 감소시키기 위한 약학 조성물이 또한 공개된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/55 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

C12N 5/0693 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

C12N 2501/724 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

암 세포에서 종양유발 Ras의 발현을 특징으로 하는 암 치료에 사용하기 위한, WNT 경로의 하나 이상의 멤버의 작용제인 제1 물질을 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 제2 물질을 더 포함하고, 이때 제2 물질은 종양유발 Ras의 길항제인, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 물질은 LRP6, α -카테닌, δ -카테닌, TCF7L1, CSNK1G1, CCNY, PCDH15, GNG7, INO80, SMARCC1, PRKCA, 및 MED13으로 구성된 그룹에서 선택된 하나 이상의 WNT 경로 유전자들의 단백질 생성물의 작용제인, 조성물 또는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 물질은 WNT 경로의 소분자 작용제인, 조성물 또는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 물질은 글리코젠 합성효소 키나제 (GSK) 억제제, 2-아미노-4-(3,4-(메틸렌디옥시)벤질아미노)-6-(3-메톡시페닐)피리미딘, LiCl, 케파올론 및 6-브로모인디루빈-30-옥심 (BIO), 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 유사체 및 유도체들로 구성된 그룹에서 선택되는, 조성물 또는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 암 세포는 종양유발 HRAS, 종양유발 NRAS 및 종양유발 KRAS로 구성된 그룹에서 선택된 종양유발 RAS를 발현시키는, 조성물 또는 방법.

청구항 7

암 세포에서 종양유발 Ras의 발현을 특징으로 하는 암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 암을 가진 개체에게 WNT 경로의 하나 이상의 멤버의 작용제인 제1 물질의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하고, 이로 인하여 개체에서 상기 암을 치료하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 제2 물질을 더 포함하고, 이때 제2 물질은 종양유발 Ras의 길항제인, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 조성물을 투여하는 단계는 폐, 간, 위장, 결장, 췌장, 및 피부 암중 적어도 하나에 상기 조성물을 전달하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 10

삽입 돌연변이유발 스크린에서 음성적으로 선별된 유전자들을 식별해내는, 다음을 포함하는 방법:

관심 세포에서 *piggyBac* 트랜스포존의 전위를 유도하고;

상기 전위된 세포의 일부분을 선택적 압박에 노출시켜 상기 *piggyBac* 트랜스포존의 발현을 유도하고;

선택적 압박에 노출된 전위된 세포와 선택적 압박에 노출되지 않은 전위된 세포의 게놈 DNA에서 삽입 부위들을 비교하고; 및

하나 이상의 삽입 부위들을 보유하는 유전자들을 식별해내고, 이때 삽입 부위들을 가진 이들 유전자는 상기 선택적 압박에 노출되지 않은 전위된 세포와 비교하여 상기 선택적 압박에 노출된 전위된 세포 안에 차등적으로 존재한다.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 *piggyBac* 트랜스포존은 유도성 항생제 내성 유전자를 포함하는, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 관심 세포는 종양 세포인, 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 전위를 유도하는 단계는 상기 전위된 관심 세포를 증식시키는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 삽입 부위들을 비교하는 단계는 상기 삽입 부위들의 서열화를 포함하는, 방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 삽입 부위들은 상기 유전자의 인트론, 엑손, 및 프로모터 영역 중 적어도 하나에 위치되는, 방법.

청구항 16

제10항에 있어서, 상기 유전자는 선택적 압박에 노출된 전위된 세포로부터는 결실되고, 선택적 압박에 노출되지 않은 전위된 세포에는 존재하는, 방법.

청구항 17

제10항에 있어서, 상기 유전자는 관심 세포의 성장 또는 생존을 손상시키는, 방법.

청구항 18

종양유발 RAS를 발현시키는 종양 세포의 증식을 감소시키기 위한, WNT 경로의 활성화자를 포함하는 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 활성화자는 글리코겐 합성효소 키나제 (GSK) 억제제인, 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 활성화자는 2-아미노-4-(3,4-(메틸렌디옥시)벤질아미노)-6-(3-메톡시페닐)피리미딘, LiCl, 켈파울론 및 6-브로모인디루빈-30-옥심 (BIO)으로 구성된 그룹에서 선택되는, 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 활성화자는 WNT 경로의 소분자 작용제인, 조성물.

청구항 22

제18항에 있어서, 상기 종양유발 RAS는 종양유발 HRAS, 종양유발 NRAS 및 종양유발 KRAS로 구성된 그룹에서 선택되는, 조성물.

청구항 23

제18항에 있어서, 상기 종양 세포는 폐, 간, 위장, 결장, 췌장, 및 피부 종양 세포중 적어도 하나인, 조성물.

청구항 24

제9항의 조성물과 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 25

제18항에 있어서, 폐, 간, 위장, 결장, 췌장, 및 피부 종양중 적어도 하나로 전달되도록 더 제형화되는, 약학적 조성물.

청구항 26

종양 세포의 증식을 감소시킬 필요가 있는 개체에서 이를 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 WNT 경로의 활성화자를 포함하는 조성물의 유효량을 개체의 종양 세포에 투여하고, 이로 인하여 종양 세포의 증식을 감소시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 활성화자는 글리코겐 합성효소 키나제 (GSK) 억제제인, 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 활성화자는 2-아미노-4-(3,4-(메틸렌디옥시)벤질아미노)-6-(3-메톡시페닐)피리미딘, LiCl, 켈파울론 및 6-브로모인디루빈-30-옥심 (BIO)으로 구성된 그룹에서 선택되는, 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 이때 상기 활성화자는 WNT 경로의 소분자 작용제인, 방법.

청구항 30

제26항에 있어서, 상기 종양 세포는 종양유발 HRAS, 종양유발 NRAS 및 종양유발 KRAS로 구성된 그룹에서 선택된 종양유발 RAS를 발현하는, 방법.

청구항 31

제26항에 있어서, 상기 조성물을 투여하는 단계는 폐, 간, 위장, 결장, 췌장, 및 피부 종양중 적어도 하나에 상기 조성물을 전달하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 32

개체에서 종양유발 RAS를 발현시키는 암 및/또는 이와 연관된 증상을 감소 또는 개선시키는 방법으로서, 상기 방법은 WNT 경로의 활성화자 투여를 포함하는, 방법.

청구항 33

종양유발 RAS 종양의 치료에 사용하기 위한, WNT 경로의 활성화자를 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)에 근거하여 2013년 11월 18일자로 제출된 U.S. 가특허출원 61/905,819에 대한 우선권을 주장하며, 이의 전문은 본원에 참고자료로 편입된다.

배경 기술

[0003] 서열화 기술의 최근 발전으로 인하여 개별 종양에서 특이적 돌연변이의 식별이 가능하게 되며, 이로써 특정 종양에 대한 표적화된 치료법의 개발 가능성이 높아진다. 기능유전체학은 인간의 생물학 및 질환 과정의 근원적인 구동자를 밝힐 수 있는 강력한 도구가 될 수 있음이 증명되었다. CRISPR-Cas9 및 shRNA 라이브러리는 단백

질-코딩 유전자들을 녹아웃 또는 녹다운시키는 효과적인 스크리닝 도구로 제시된다. 종양 세포에서 특이적 종양유발 변이(alteration) 및 경로의 표적화는 *HER2* 증폭된 유방암 및 급성 전골수세포 백혈병이 포함된 일부 암의 치료에 매우 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나, *RAS* 활성화 및 *TP53*의 상실을 포함하는 많은 흔한 돌연변이의 경우, 종양유발 변이 또는 경로를 직접적으로 표적화하는 방법은 어려운 것으로 증명되었다. 더욱이, 유전자 과발현 또는 유전자 활성의 비정상적인 상승에 의해 많은 질환 및 생물학적 표현형이 야기된다. 따라서, 종양 세포에서 종양유발 돌연변이와 종합적인 치사 상호작용에 대한 인간 게놈에 대한 정보를 얻는데 앞선 유전적 스크린을 이용하는 것이 매우 바람직할 것이다. 종합적인 치사 표적(synthetic lethal target)에 대하여 shRNA 라이브러리를 이용하여 암 세포 상에 기능 상실(loss-of-function) 스크린은 성공적으로 응용되었지만, 음성적으로 선별된 유전자들에 대한 게놈-범위의 기능 획득(gain-of-function) 스크린은 부족하다.

[0004] 따라서, 특히 암으로 이어지는 흔한 종양유발 변이의 경우에 있어서 음성적으로 선별된 유전자들을 식별해내기 위한 개선된 방법이 당분야에서 여전히 요구된다.

발명의 내용

[0005] 하기에서 설명되는 바와 같이, 본 발명은 삽입 돌연변이유발 스크린에서 유전자들을 음성적으로 선별함으로써, 암 세포에 특이적인 치료 표적들과 경로들을 식별하는 방법 및 조성물을 포함한다.

[0006] 본 발명의 한 측면은 삽입 돌연변이유발 스크린에서 음성적으로 선별된 유전자들을 식별해내는 방법을 포함하는데, 이 방법은 관심 세포에서 *piggyBac* 트랜스포존의 전위를 유도하고; 상기 전위된 세포를 선택적 압박(pressure)에 노출시켜 상기 *piggyBac* 트랜스포존의 발현을 유도하고; 선택적 압박에 노출되지 않은 전위된 세포와 상기 선택적 압박에 노출된 전위된 세포의 게놈 DNA에서 삽입 부위들을 비교하고; 및 하나 이상의 삽입 부위들을 갖는 유전자들을 식별해내는 것을 포함하고, 이때 삽입 부위들을 가진 유전자들은 선택적 압박에 노출된 전위된 세포와 선택적 압박에 노출되지 않은 전위된 세포에 차등적으로 존재한다.

[0007] 본 발명의 또 다른 측면은 종양유발 RAS를 발현시키는 종양세포의 증식을 감소시키는, WNT 경로의 활성화자(activator)가 포함된 조성물을 포함한다.

[0008] 여전히 본 발명의 또 다른 측면은 본원에서 설명된 조성물과 약학적으로 허용가능한 담체가 포함된 약학 조성물을 포함한다.

[0009] 여전히 본 발명의 또 다른 측면은 종양 세포의 증식을 감소시킬 필요가 있는 개체에서 이를 감소시키는 방법을 포함하고, 이 방법은 WNT 경로의 활성화자가 포함된 조성물의 유효량을 개체의 종양 세포에 투여하고, 이로 인하여 종양 세포의 증식을 감소시키는 것을 포함한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 측면은 개체에서 종양유발 RAS를 발현시키는 암 및/또는 이와 연관된 증상을 감소 또는 개선시키는 방법을 포함하는데, 이 방법은 WNT 경로의 활성화자 투여를 포함한다.

[0011] 여전히 본 발명의 또 다른 측면은 종양유발 RAS 종양 치료에 사용하는 조성물을 포함하는데, 이 조성물은 WNT 경로의 활성화자를 포함한다.

[0012] 상기 측면들 또는 본원에서 기술된 임의의 다른 측면들의 다양한 구현예들에 있어서, *piggyBac* 트랜스포존은 유도성 항생제 내성 유전자를 포함한다. 한 구현예에서, 상기 관심 세포는 종양 세포이며, 이러한 종양 세포는 폐, 간, 위장, 결장, 췌장, 및 피부 종양 세포중 적어도 하나이다. 또다른 구현예에서, 전위를 유도하는 단계는 상기 전위된 관심 세포를 증식시키는 것을 더 포함한다. 여전히 또다른 구현예에서, 삽입 부위들을 비교하는 단계는 상기 삽입 부위들을 서열화시키는 것을 포함한다. 여전히 또다른 구현예에서, 상기 삽입 부위들은 이 유전자의 인트론, 엑손, 및 프로모터 영역 중 적어도 하나에 위치된다. 여전히 또다른 구현예에서, 이들 유전자는 선택적 압박에 노출된 전위된 세포에서는 결실되고, 선택적 압박에 노출되지 않은 전위된 세포에서는 존재한다. 또다른 구현예에서, 이들 유전자는 상기 관심 세포의 성장 또는 생존을 손상시킨다.

[0013] 한 구현예에서, 상기 활성화자는 글리코젠 합성효소 키나제 (GSK) 억제제다. 또다른 구현예에서, 상기 활성화자는 2-아미노-4-(3,4-(메틸렌디옥시)벤질아미노)-6-(3-메톡시페닐)피리미딘, LiCl, 켄파울론(Kenpaullone) 및 6-브로모인디루빈-30-옥심 (BIO)으로 구성된 그룹에서 선택된다. 또다른 구현예에서, 상기 활성화자는 WNT 경로의 소분자 작용제이다.

[0014] 또다른 구현예에서, 상기 종양유발 RAS는 종양유발 HRAS, 종양유발 NRAS 및 종양유발 KRAS로 구성된 그룹에서 선택된다.

- [0015] 여전히 또다른 구현예에서, 본 발명의 조성물은 폐, 간, 위장, 결장, 췌장, 및 피부 종양중 적어도 하나로 전달 되도록 더 제형화된다.
- [0016] 따라서, 일부 구현예들에서, 암 세포에서 종양유발 Ras의 발현을 특징으로 하는 암 치료에 사용하기 위한 조성물은 WNT 경로의 하나 이상의 멤버의 작용제인 제1 물질을 포함한다. 일부 구현예들에서, 상기 조성물은 종양유발 Ras의 길항제인 제2 물질을 포함한다.
- [0017] 일부 구현예들에서, 암 세포에서 종양유발 Ras의 발현을 특징으로 하는 암을 치료하는 방법은 상기 암을 가진 개체에게 WNT 경로의 하나 이상의 멤버의 작용제인 제1 물질의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하고, 이로 인하여 개체에서 상기 암을 치료하는 것을 포함한다. 일부 구현예들에서, 상기 방법은 종양유발 Ras의 길항제인 제2 물질의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예들에서, 상기 제1 물질 및/또는 제2 물질의 유효량은 상기 암 세포의 증식을 억제하는데 효과적인 양이다.
- [0018] 일부 구현예들에서, 상기 제1 물질은 LRP6, α -카테닌, δ -카테닌, TCF7L1, CSNK1G1, CCNY, PCDH15, GNG7, INO80, SMARCC1, PRKCA, 및 MED13으로 구성된 그룹에서 선택된 하나 이상의 WNT 경로 유전자들의 단백질 생성물 작용제다. 일부 구현예들에서, 상기 제1 물질은 WNT 경로의 소분자 작용제이다. 일부 구현예들에서, 상기 제1 물질은 글리코젠 합성효소 키나제 (GSK) 억제제, 2-아미노-4-(3,4-(메틸렌디옥시)벤질아미노)-6-(3-메톡시페닐)피리미딘, LiCl, 켄과올론 및 6-브로모인디루빈-30-옥심 (BIO), 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 유사체들, 및 이의 유도체들로 구성된 그룹에서 선택된다.
- [0019] 일부 구현예들에서, 상기 암 세포는 종양유발 HRAS, 종양유발 NRAS 및 종양유발 KRAS로 구성된 그룹에서 선택된 종양유발 RAS를 발현시킨다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 성장 및/또는 생존을 손상시키는 돌연변이를 식별해내기 위한 PB 트랜스포존 기능 획득 스크린의 계획을 보여주는 도표다;
- 도 2는 Dox로 간단한 유도 후, 세포-분류(sorting)에 의해 수집된 Katushka-양성 돌연변이 세포의 영상을 보여준다. 그 다음 돌연변이 세포는 스크리닝용 Dox+ 풀(pool)과 대조군으로 이용되는 Dox- 풀로 균등하게 분할되었다. 삽입 부위들을 맵핑하고, 판독(reads)을 카운팅한 후, 모든 삽입 부위에 대한 Dox- 풀과 Dox+ 풀의 log2 판독 비율이 산출되었다;
- 도 3은 RAS 길항하는 유전자들을 식별해내기 위한 분석을 보여준다. TCF7L1은 음성적으로 선별된 유전자들을 식별해내기 위한 생물통계학(biostatistic) 분석을 설명하는데 이용되었다. 제1 이항식 테스트(binomial test)를 이용하여 총 150개 유전자들이 선별되었고, 제2 이항식 테스트를 이용하여 95개 후보(candidate) 유전자들이 식별되었다;
- 도 4는 WNT 경로에서 상기 스크린에 의해 식별된 후보 유전자들을 보여주는 예시다;
- 도 5a는 Dox 유도와 함께(적색), 또는 유도 없이(청색) 3일 동안 LRP6, TCF7L1, β -카테닌, 또는 δ -카테닌을 조건적으로 과발현시키는 AML-RAS 안정적인 세포주상에서 Alamarblue 분석을 이용한 생존가능 세포 정량화를 보여주는 막대그래프다.
- 도 5b는 Dox 유도와 함께(적색), 또는 유도 없이(청색) 3일 동안 LRP6, TCF7L1, β -카테닌, 또는 δ -카테닌을 조건적으로 과발현시키는 TRI-102 안정적인 세포주상에서 Alamarblue 분석을 이용한 생존가능 세포 정량화를 보여주는 막대그래프다.
- 도 6은 비히클 (위) 또는 20mM LiCl (아래)로 처리 24 시간 후 표시된 세포의 DIC (20x) 영상을 보여준다;
- 도 7은 GSK3 억제제, 20mM LiCl, 5uM 켄과올론 또는 2uM BIO로 처리 후 3일 차에 생존가능 세포의 백분율을 보여주는 막대그래프다, *** p<0.001;
- 도 8a는 비히클 (위) 또는 20mM LiCl 처리된 (아래) AML-RAS 세포의 연한천(soft agar) 분석에 관한 대표적인 영상이다;
- 도 8b는 콜로니 수의 정량화를 보여주는 막대그래프다;
- 도 9a는 28일에 걸쳐 비히클 (마름모) 또는 LiCl (사각)에 의한 종양 크기 변화 백분율을 보여주는 선

그래프다;

도 9b는 28일에 걸쳐 비히클 (마름모) 또는 LiCl (사각)에 의한 이종이식편(xenografts)에서 평균 체중을 보여주는 선 그래프다;

도 9c는 28일 시점에서 제거된 종양의 대표적인 영상이다;

도 10은 RAS 종양 세포의 패널에서 GSK3 억제제의 활성을 보여주는 막대그래프다. LiCl (좌측 막대), 켈과울론 (중간 막대), 또는 BIO (우측 막대)로 처리된 표시된 흑색종, 폐, 결장, 및 췌장 암 세포에서 비히클 대조군과 비교하였을 때, 생존가능 세포의 백분율. 형질변환되지 않은 대조군: 인간 유방 상피 세포;

도 11a는 Dox 유도과 함께(우측 막대) 또는 유도없이(좌측 막대) LRP6, TCF7L1, β -카테닌, 또는 δ -카테닌을 조건적으로 과발현시키는 H1792 (위) 안정적인 세포주에서 생존가능 세포 정량화를 보여주는 막대그래프다. *** p<0.001, * p<0.05;

도 11b는 Dox 유도과 함께(우측 막대) 또는 유도없이(좌측 막대) LRP6, TCF7L1, β -카테닌, 또는 δ -카테닌을 조건적으로 과발현시키는 A549안정적인 세포주에서 생존가능 세포 정량화를 보여주는 막대그래프다, *** p<0.001, * p<0.05;

도 12a는 비히클 (위) 또는 20mM LiCl 처리된 A549 (좌) 또는 H1792 (우) 세포 상의 연한천 분석에 관한 대표적인 영상이다;

도 12b는 콜로니 수의 정량화를 보여주는 막대그래프다;

도 13a는 TRI-102 및 AML-RAS 세포의 성장 곡선을 보여주는 선 그래프다. 4일 동안 Celltiter-Glo에 의해 TRI-102(수평에 더 가까운 선) 또는 AML-RAS(수직에 더 가까운 선)에 대한 생존가능 세포들이 측정되었다;

도 13b는 TRI-102 및 AML-RAS 세포 (우측)의 연한천 분석에서 부착(anchorage) 성장에 관한 콜로니 수의 정량화를 보여주는 막대그래프다.

도 14는 PB 삽입 맵핑을 위한 포획 기반 PCR 방법의 도표다. 게놈 DNA는 AluI로 절단되었다. PB 아암에 연결된 (PBR, 회색 막대) 게놈 DNA 단편 (삽입 부위, 검은 선)이 증폭되었고, SPE 반응을 통하여 바이오티닐화된 프라이머 (점)로 표지되었다. 스트렙타아비딘-자석 비드에 의해 바이오틴-표지된 삽입 단편들이 풍부해졌다 (enriched). 폴리 G 꼬리 (Gs) 다음에 삽입 단편들은 어댑터 서열 (회색 막대)과 함께 연결되었고, Illumina 고-처리량(high-throughput) 서열화를 거치고; 및

도 15는 PB 트랜스포존 삽입 부위들의 게놈 분포를 보여주는 막대 그래프다. PB 인지 부위, TTAA를 가진 총 4,362,271개의 서열이 UCSC hg18 데이터베이스에 맵핑되었고, 270,257개의 삽입 부위들을 되찾았다. PB 삽입 분포가 설명된다.

도 16은 성장 및/또는 생존을 손상시키는 돌연변이를 식별해내기 위한 PB 트랜스포존 기능 획득 스크린의 계획을 보여주는 도표다.

도 17은 Dox로 간단한 유도 후 세포-분류에 의해 수집된 Katushka-양성 돌연변이 세포를 보여주는 일련의 예시이다. 그 다음 돌연변이 세포는 유전자 유도용 Dox+ 풀과 대조군으로 이용되는 Dox- 풀로 균등하게 분할되었다. 삽입 부위들을 맵핑하고, 판독을 카운팅한 후, 모든 삽입 부위에 대한 Dox- 풀과 Dox+ 풀의 log2 판독 비율이 산출되었다;

도 18은 RAS 길항하는 유전자들을 식별해내기 위한 분석을 보여주는 영상 패널이다. TCF7L1을 이용하여 결실된 삽입 (적색, 2fold Dox-부위, M) 및 풍부해진 삽입 (녹색, 2fold Dox+부위, P)의 분류를 설명하였다. 정준 WNT 경로에서 후보 유전자들은(음영화된) PB 스크린으로부터 식별되었다.

도 19는 Human BodyMap 2.0을 통하여 340개 단백질 코딩 표적들과 259개의 긴 넌코딩 표적들 간에 Pearson Correlation Coefficient Analysis의 히트맵(heatmap)을 보여주는 영상이다.

도 20은 4가지 풍부해진 RBP, 즉, 이어맞추기복합체(spliceosome)의 성분들인 EIF4A3, SRSF1, FUS 및 U2AF2를 보여주는 영상이다. 대표적인 넌코딩 표적 유전자들은 대응하는 타원 안에 열거된 RBP에 대한 결합 부위들을 포함한다. p-값은 초기하 테스트(hypergeometric test)에 의해 산출된다.

도 21은 PB 트랜스포존 삽입 부위들의 게놈 분포를 보여주는 막대 그래프다. 총 422,746개의 삽입 부위들이

UCSC hg19 데이터베이스에 맵핑되었다. PB 삽입 분포가 설명된다.

도 22는 후보 유전자들을 식별해내기 위한 생물통계학 분석을 보여주는 예시이다.

도 23은 PB 기능 획득 스크린의 후보 유전자들 목록이다.

도 24는 키놈(kinome) siRNA 스크린의 후보 유전자들 목록이다.

도 25는 4가지 풍부해진 RNA 결합 단백질(RBP)에 대한 네크딩 후보 유전자들의 목록이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 정의

[0022] 명시적으로 다른 언급이 없는 한, 본원에서 이용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업계 숙련자들에 의해 공통적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 비록 본 발명의 실시 또는 테스트에 있어서 본원에서 설명된 것들과 유사한 또는 대등한 임의의 방법 및 재료들이 이용될 수 있지만, 본원에서 바람직한 방법들과 재료들이 설명된다. 본 발명을 설명하고 청구함에 있어서, 다음의 용어들이 사용될 것이다.

[0023] 본원에서 이용된 용어는 단지 특정 구현예를 설명하기 위한 목적이며, 제한하기 위한 의도는 없는 것으로 또한 이해한다.

[0024] 본원에서 이용된 바와 같이, 단수 관사(“a” 및 “an”)는 하나 또는 하나 이상(가령, 적어도 하나)의 물품의 문법적 대상을 지칭할 때 이용된다. 예를 들면, “요소”는 하나의 요소 또는 한 개 이상의 요소를 의미한다.

[0025] 본원에서 이용된 바와 같이, 측정가능한 값, 가령, 양, 시간적 기간 및 이와 유사한 것을 언급할 때, 용어 “약”은 $\pm 20\%$ 변이 또는 명시된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01%를 포괄한다는 의미가 되는데, 그 이유는 공개된 방법을 실행함에 있어서 이러한 변이는 적절하기 때문이다. 내용으로부터 명시적으로 다른 언급이 없는 한, 본원에서 제공되는 모든 수치 값은 용어 약에 의해 변형된다.

[0026] 구절 “차등적으로 존재하는(differentially present)”이란 대조군 시료와 비교하였을 때, 전위된 세포 안에 존재하는 삽입 부위의 양의 차이 및/또는 빈도의 차이를 말한다. 유전자 삽입 부위들은 양, 빈도 또는 양과 빈도 모두에서 차등적으로 존재할 수 있다. 두 시료 사이에서 가령, 기준이 되는 다른 시료에 있는 삽입 부위 빈도와 통계학적으로 유의미적으로 차등적으로 삽입 부위가 존재한다면, 두 시료 간에 유전자 삽입 부위들은 차등적으로 존재한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 전위된 세포에서 삽입 부위 탐지 빈도가 대조 세포보다 통계학적으로 유의미적으로 더 높거나 또는 더 낮다면, 하나 이상의 유전자 삽입 부위들은 두 시료 세트 간에 차등적으로 존재한다. 하나의 시료 안에 존재하는 유전자 삽입 부위가 또다른 시료에서 탐지불가능한 경우, 이 부위는 차등적으로 존재한다.

[0027] 용어 “트랜스포존”은 이 계층 안에서 이의 위치를 변화시킬 수 있는 DNA 서열을 지칭하는데, 이는 때로 돌연변이를 만들거나 또는 역전시키고 및 세포의 계층을 변경시킨다. 용어 “*piggBac* 트랜스포존” 또는 “PB”는 “잘라 붙이기(cut and paste)” 기전을 통하여 벡터와 염색체 사이의 순서를 바꾸는 이동 유전 요소를 말한다. 전위 동안, 상기 PB 전위효소(transposase)는 트랜스포존 벡터의 양단에 위치하는 트랜스포존-특이적 역전된 말단 반복 서열(ITR)을 인지하고, 원래 부위들로부터 내용물을 효과적으로 이동시키고, 및 TTAA 염색체의 부위들로 통합시킨다. 생성된 형질변환된 세포 또는 세포의 그룹은 안정적인 형질전환체다.

[0028] “벡터”는 관심 대상의 핵산을 포함하는 물질 조성물이다. 일부 구현예들에서, 벡터는 *piggBac* 트랜스포존을 포함하고, 및 세포의 내부로 *piggBac* 트랜스포존을 운반하는데 이용될 수 있다. 일부 구현예들에서, 벡터는 표적 유기체 또는 세포의 계층 안으로 외부 서열을 이동시킬 수 있는 *piggBac* 단부들이 포함된 임의의 플라스미드를 지칭한다. “발현 벡터”는 관심 핵산이 발현되도록 조작된 벡터를 지칭한다. 일부 구현예들에서, 발현 벡터는 *piggBac* 트랜스포존 또는 *piggBac* 전위효소 및 발현되는 *piggBac* 트랜스포존 또는 *piggBac* 전위효소에 작동가능하도록 연결된 발현 조절 서열을 포함한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 *cis*-작용 요소들을 포함하며; 발현을 위한 다른 요소들은 숙주 세포 또는 시험관내 발현 시스템에 의해 공급될 수 있다. 발현 벡터는 당 분야에 공지된 모든 것들을 포함하는데, 이를 테면, 코스미드, 플라스미드 (가령, 네이키드 또는 리포솜 안에 포함된) 및 재조합 폴리뉴클레오티드를 통합시키는 바이러스(가령, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-연관된 바이러스)를 포함한다. 일부 구현예들에서, 발현 벡터는 본원에서 공개된 단백질 또는 경로(가령, WNT 경로)의 작용제를 발현시키도록 조작될 수 있다. 예를 들면, 발현 벡터는 다음 유전자들중 하나 또는 그 이상을 발현시키도록 조작될 수 있다: LRP6, α -카테닌, δ -카테닌, TCF7L1, CSNK1G1, CCNY,

PCDH15, GNG7, INO80, SMARCC1, PRKCA, 및 MED13. “이종(heterogenous) DNA” 는 삽입 위치에 대하여 비-고유한 DNA를 말한다. 외인성 DNA는 유전적으로 변형된 유전자들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들면, *piggyBac* 트랜스포존은 숙주 DNA를 절단하고, 외인 DNA를 상기 삽입 부위로 삽입한다. 이러한 외인성 DNA는 키메라 유전자들과 같이, 숙주 세포에서 발현을 위하여 조작된 유전자들을 포함한다.

[0029] 용어 "WNT 경로 작용제(pathway agonist)" 은 WNT 경로를 활성화시키는 물질을 말한다. 일부 구현예들에서, WNT 경로 작용제는 소분자, 펩티드, 또는 이의 단편이다. 상기 WNT 경로 작용제는 WNT 경로에서 하나 이상의 유전자들, 이를 테면 LRP6, α -카테닌, δ -카테닌, TCF7L1, CSNK1G1, CCNY, PCDH15, GNG7, INO80, SMARCC1, PRKCA, 및 MED13을 활성화시킬 수 있다. 일부 구현예들에서, 상기 WNT 경로 작용제는 글리코젠 합성효소 키나제 (GSK) 억제제, 2-아미노-4-(3,4-(메틸렌디옥시)벤질아미노)-6-(3-메톡시페닐)피리미딘, LiCl, 켄과올론 및 6-브로모인디루빈-30-옥심 (BIO), 또는 약학적으로 허용가능한 염, 이의 유사체들, 및 이의 유도체들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] “선택적 압박(selective pressure)” 이란 선택적 물질에 집단을 노출시킴으로써, 이 집단 안에 하나 이상의 유전자들의 상대적 빈도에 대한 선택 효과를 의미한다. 예를 들면, 돌연변이된 세포 또는 전위된 세포를 선택적 물질, 이를 테면 항생제에 노출시키면, 트랜스포존의 발현이 유도된다. 선택적 압박에 대하여 세포 적응도 (fitness)가 감소된 돌연변이된 또는 전위된 세포는 시간이 경과함에 따라 결실되며, 한편, 선택적 압박에 대하여 세포 적응도가 증가된 돌연변이된 또는 전위된 세포는 시간이 경과함에 따라 많아진다.

[0031] “선택적 물질(selective agent)” 이란 선택적 유전자를 발현시키는 세포 안에 풍부해지도록 전위된 세포에서 선별 압박을 일으키는 물질을 말한다. 항생제, 이를 테면 퓨로마이신, 테트라사이클린, 블라스티시딘, 및 네오마이신이 예가 된다.

[0032] “선택적 유전자” 는 선택적 압박 존재하에 성장할 수 있는 저항성, 무감응 또는 능력을 제공하는 유전자를 의미한다. 선택적 유전자들의 예로는 항생제에 저항성 유전자, 이를 테면 퓨로마이신, 테트라사이클린, 블라스티시딘, 및 네오마이신 저항 유전자들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] “종양유발(oncogenic) Ras” 는 Ras를 영구적으로 활성화시키는 하나 이상의 돌연변이를 말한다. 과다활성 Ras 는 암에서 가장 흔한 종양유전자다. 일부 구현예들에서, 종양유발 Ras의 발현을 특징으로 하는 병태, 장애 또는 질환은 종양유발 Ras 단백질을 발현시키는 세포 (가령, 암 세포)의 존재를 특징으로 하는 병태, 장애 또는 질환을 말한다. 일부 구현예들에서, 종양유발 Ras의 발현을 특징으로 하는 병태, 장애 또는 질환은 특정 유형의 암 (가령, 폐, 간, 위장, 결장, 췌장, 및 피부 종양)을 포함한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 Ras는 Ras 슈퍼패밀리의 임의의 멤버를 지칭하는데, 인간 HRAS, KRAS, 또는 NRAS 유전자들의 유전자 또는 단백질 생성물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예들에서, 종양유발 Ras 유전자 또는 단백질은 활성화 돌연변이, 이를 테면 Ras 단백질에서 G12V 및/또는 Q61K 아미노산 변화를 초래하는 것을 특징으로 한다.

[0034] 본 내용에서, 포함하다, 포함하는, 함유하는 및 보유하는 및 이와 유사한 것들은 미국 특허법에서 이들을 설명하는 의미를 갖고, 및 내포하다 및 내포하는의 의미를 가질 수 있으며, 유사하게 ~로 필수적으로 구성된 또는 필수적으로 구성된 미국 특허법에서 간주되는 의미를 가지며, 이들 용어는 개방형(open-ended)으로, 언급된 기본적인 또는 신규한 특징이 언급된 것보다 더 많이 존재함으로써 변화되지 않는 한, 언급된 것 이상의 존재를 허용하지만, 선행 기술 구현에는 배제된다.

[0035] "유효량"이란 치료를 받지 않은 환자와 비교하여 질환의 적어도 한 가지 증상을 감소 또는 개선시키는데 요구되는 양을 의미한다. 질환의 치료적 처리에 이용된 활성 화합물(들)의 유효량은 투여 방식, 환자의 연령, 체중 및 전반적인 건강에 따라 변화된다.

[0036] 본원에서 이용된 용어 “발현” 은 특정 뉴클레오티드 서열이 이의 프로모터에 의해 구동되는 전사 및/또는 해독으로 정의된다.

[0037] "단편"은 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 분자의 일부분을 의미한다. 이 부분은 참고 핵산의 전장의 바람직하게는, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 포함한다. 단편은 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 또는 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1500개, 2000개 또는 2500개의 뉴클레오티드(및 이들 사이의 임의의 정수 값)을 포함할 수 있다. 핵산 분자에 적용되는 상기 단편은 더 큰 핵산의 하위 서열을 지칭한다. 핵산 분자의 “단편” 은 길이가 적어도 약 15개 뉴클레오티드일 수 있는데; 예를 들면, 적어도 약 50개 뉴클레오티드 내지 약 100개 뉴클레오티드; 적어도 약 100개 내지 약 500개 뉴클레오티드, 적어도 약 500개 내지 약 1000개 뉴클레오티드, 적어도

약 1000개 뉴클레오티드 내지 약 1500개 뉴클레오티드; 또는 약 1500개 뉴클레오티드 내지 약 2500개 뉴클레오티드; 또는 약 2500개 뉴클레오티드 (및 이들 사이의 임의의 정수 값)이다.

- [0038] 용어 “삽입 부위”는 DNA에서 전위 위치를 지칭한다. DNA 트랜스포존의 삽입 부위는 짧은 방향 반복(short direct repeat)에 이어 전위효소에 의한 절단에 중요한 일련의 역전된 반복(inverted repeat)에 의해 식별될 수 있다. 상기 *piggyBac* 트랜스포존의 인지 서열은 TTAA이다.
- [0039] 용어 "단리된", "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한(biologically pure)"이란 자연 상태에서 발견될 때 이물질에 통상적으로 수반되는 성분들이 다양한 정도로 존재하지 않는, 물질을 지칭한다. "단리되다"는 원천 또는 주변으로부터 분리 정도를 나타낸다. "정제되다"는 상기 단리보다는 더 높은 분리 정도를 나타낸다. "정제된" 또는 "생물학적으로 순수" 단백질은 임의의 분쇄물이 해당 단백질의 생물학적 성질에 물질적으로 영향을 주지 않거나 또는 다른 반대 결과를 초래하지 않을 정도로 다른 이물질이 존재하지 않는다는 것을 의미한다. 즉, 핵산 또는 펩티드가 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 때 세포 물질, 바이러스 물질 또는 배양 배지가 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구물질 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없다면, 핵산 또는 펩티드는 정제된 것이다. 순도 및 균질성은 통상의 분석 화학 기술, 예를 들면, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 통상적으로 결정된다. 용어 "정제된"이란 전기영동 겔에서 기본적으로 하나의 밴드를 만드는 핵산 또는 단백질을 말할 수 있다. 변형, 예를 들면, 인산화 또는 당화, 다른 변형을 거치게 되는 단백질은 상이한 단리된 단백질이 될 수 있으며, 이는 별도로 정제될 수 있다.
- [0040] “약학적으로 허용가능한”이란 약학/독성학 관점에서 환자가 수용할 수 있고 및 조성물, 제형, 안정성, 환자 수용성 및 생물이용성에 대한 물리/화학적 관점에서 제약사가 수용할 수 있는 성질 및/또는 물질을 말한다. “약학적으로 허용가능한 담체”는 활성 성분(들)의 생물학적 활성 효과를 간섭하지 않고, 및 투여되는 숙주에게 독성이 없는 매체를 지칭한다.
- [0041] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 “약학 조성물” 또는 “약학적으로 허용가능한 조성물”은 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 본 발명에 유용한 적어도 한 가지 화합물 또는 분자의 혼합물을 지칭한다. 약학 조성물은 환자에게 이 화합물 또는 분자의 투여를 용이하게 한다. 화합물 또는 분자의 다양한 투여 기술이 당분야에 존재하는데, 정맥내, 구강, 에어로졸, 비장관(parenteral), 안구, 폐 및 국소 투여가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 “약학적으로 허용가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)”는 본 발명 안에서 유용한 화합물 또는 분자를 의도된 기능을 수행하도록 환자에게 또는 환자 안으로 나르는 또는 운송하는데 관여하는 약학적으로 허용가능한 물질, 조성물 또는 담체, 이를 테면 액체 또는 고체 충전물, 안정화제, 분산 물질, 현탁 물질, 희석제, 부형제, 농후제, 용매 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 전형적으로, 이러한 작제물(construct)은 하나의 장기 또는 신체의 일부분으로부터 신체의 또다른 장기 또는 부분으로 운반 또는 이송된다. 각 담체는 본 발명에 유용한 화합물이 포함된 제형의 다른 성분들과 양립가능한 관점에서 “허용가능”해야 하거나 또는 환자에게 해를 주지 않아야 한다. 약학적으로 허용가능한 담체로 작용할 수 있는 물질의 일부 예로는 다음을 포함한다: 당, 이를 테면 락토오스, 포도당 및 슈크로스; 전분, 이를 테면 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로오스 및 이의 유도체들, 이를 테면 소듐 카복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트; 분말화된 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 활성; 부형제, 이를 테면 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 이를 테면 땅콩유, 목화씨유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 이를 테면 프로필렌 글리콜; 폴리올, 이를 테면 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 이를 테면 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 이를 테면 수산화 마그네슘 및 수산화 알루미늄; 계면 활성제; 알긴산; 발열원 없는 물; 등장성 염수; Ringer 용액; 에틸 알코올; 인산염 완충 용액; 및 약제에 이용되는 기타 비독성 양립가능한 물질. 본원에서 이용된 바와 같이, “약학적으로 허용가능한 담체”는 코팅, 향균 및 향진균제, 및 흡수 지연제 및 본 발명에서 유용한 화합물의 성분과 양립가능한 물질 및 환자에게 생리학적으로 허용가능한 임의의 및 모든 물질을 또한 포함한다. 보충 활성 화합물 또한 상기 조성물에 혼합될 수 있다. “약학적으로 허용가능한 담체”는 본 발명에 유용한 화합물 또는 분자의 약학적으로 허용가능한 염을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 실시예 이용된 약학 조성물에 포함될 수 있는 기타 추가 성분들은 공지되어 있으며, 예를 들면 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA: 이는 참고 자료에 편입된다]에 설명되어 있다.
- [0043] “참고(referenc)”란 표준 또는 대조군을 말한다. "참고"는 비교의 기반으로 이용되는 정의된 표준 또는 대조군이다.

- [0044] 본원에서 이용된 바와 같이, "시료" 또는 "생물학적 시료"는 상기 스크리닝 방법 또는 처리가 필요한 관심 세포(가령, 암 또는 이의 종양 세포)가 포함된 임의의 것을 말한다. 시료는 생물학적 시료, 이를 테면 생물학적 유체 또는 생물학적 조직이 될 수 있다. 한 구현예에서, 생물학적 시료는 폐 동맥 내피 세포가 포함된 조직 시료다. 이러한 시료는 다양한 세포, 단백질, 및 유전 물질을 포함할 수 있다. 생물학적 조직의 예로는 또한 장기, 종양, 림프구, 동맥 및 개별 세포(들)을 또한 포함한다. 생물학적 유체의 예로는 소변, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 정액, 대변, 가래, 뇌 척수 유체, 눈물, 점액, 양수 또는 이와 유사한 것을 포함한다.
- [0045] 본원에서 이용된 바와 같이, "개체" 또는 "환자"는 인간 또는 비-인간 포유류다. 비-인간 포유류는 예를 들면, 가축 및 애완동물, 이를 테면 양, 소, 돼지, 개, 고양이, 및 뮌 포유류를 포함한다. 바람직하게는, 상기 개체는 인간이다.
- [0046] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료하는", "치료" 및 이와 유사한 것들은 장애 및/또는 이와 연관된 증상을 감소 또는 개선시키는 것을 의미한다. 비록 배제되지는 않지만, 장애 또는 병태의 치료는 이러한 장애, 병태 또는 이와 연관된 증상이 완전하게 경감 또는 제거되어야 하는 것은 아님을 인지할 것이다.
- [0047] 일부 구현예들에서, "치료", "치료하는" 또는 "치료하다"라는 것은 질환, 병태 또는 장애와 싸우기 위한 목적으로 환자를 관리하고 돌보는 것과 관련되며, 질환, 병태 또는 장애의 증상 또는 여병을 완화시키기 위하여, 또는 질환, 병태 또는 장애를 제거하기 위하여, 본 발명의 화합물 또는 조성물 (가령, WNT 경로 작용제)를 투여하는 것을 포함한다.
- [0048] 본원에서 이용된 바와 같이, "예방", "예방하는" 또는 "예방하다"는 이 질환, 병태 또는 장애의 증상 또는 여병의 개시를 감소 또는 제거하는 것을 설명하며, 이 질환, 병태 또는 장애의 증상의 개시, 발달 또는 재발을 감소시키기 위하여, 본 발명의 화합물 또는 조성물 (가령, WNT 경로 작용제)를 투여하는 것을 포함한다.
- [0049] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "완화하다"의 의미는 장애의 증상 또는 징후의 심각성을 감소시키는 과정을 의미한다. 중요한 것은, 신호 또는 증상은 제거되지 않고, 완화될 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 발명의 화합물 또는 조성물 (가령, WNT 경로 작용제)의 투여는 신호 또는 증상의 제거로 이어지지만, 그러나, 제거가 요구되지는 않는다. 효과적인 투여량은 신호 또는 증상의 심각성을 감소시키는 것으로 기대된다.
- [0050] 본원에서 이용된 바와 같이 용어 "증상"은 질환, 질병, 손상 또는 신체에 좋지 않은 것들로 정의된다. 증상은 이 증상을 겪는 개인에 의해 느껴지거나 주지되지만, 다른 이들은 용이하게 인지하지 못할 수도 있다. 기타 다른 것들은 비-의료 전문인에 의해 정의된다.
- [0051] 본원에서 이용된 바와 같이 용어 "신호(sign)" 또한 신체에 좋지 않은 징조로 정의된다. 그러나, 신호는 의사, 간호사 또는 다른 의료 전문인에 의해 확인될 수 있는 것으로 정의된다.
- [0052] 본 발명의 장애, 질환 또는 병태의 치료로 인하여 종양 크기가 감소될 수 있다. 종양 크기의 감소는 "종양 퇴행(regression)"으로 지칭될 수 있다. 일부 구현예들에서, 치료 후, 종양 크기는 치료 전과 비교하여 그 크기가 5% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 종양 크기가 10% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 20% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 30% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 40% 또는 그 이상 감소되거나; 더 더욱 바람직하게는, 50% 또는 그 이상 감소되고; 및 가장 바람직하게는, 75% 또는 그 이상 감소된다. 종양 크기는 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양 크기는 상기 종양의 직경으로 측정될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 장애, 질환 또는 병태의 치료에 의해 종양 용적이 감소될 수 있다. 일부 구현예들에서, 치료 후, 종양 용적은 치료 전과 비교하여 그 용적은 5% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 종양 용적은 10% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 20% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 30% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 40% 또는 그 이상 감소되거나; 더 더욱 바람직하게는, 50% 또는 그 이상 감소되고; 및 가장 바람직하게는, 75% 또는 그 이상 감소된다. 종양 용적은 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 장애, 질환 또는 병태의 치료에 의해 종양 수가 감소될 수 있다. 일부 구현예들에서, 치료 후, 종양 수는 치료 전과 비교하여 그 수가 5% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 종양 수는 10% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 20% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 30% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 40% 또는 그 이상 감소되거나; 더 더욱 바람직하게는, 50% 또는 그 이상 감소되고; 및 가장 바람직하게는, 75% 이상 감소된다. 종양 수는 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다.

종양 수는 육안으로 또는 명시된 확대 비율 하에 눈에 보이는 종양을 카운트함으로써 측정될 수 있다. 일부 구현예들에서, 명시된 확대는 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 또는 50x이다.

[0055] 본 발명의 장애, 질환 또는 병태의 치료로 원발 종양 부위로부터 떨어져 있는 다른 조직 또는 장기에 있는 전이 병소의 수의 감소를 초래할 수 있다. 일부 구현예들에서, 치료 후, 전이 병소의 수는 치료 전과 비교하여 전이 병소의 수가 5% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 전이 병소의 수는 10% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 20% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 30% 또는 그 이상 감소되거나; 더욱 바람직하게는, 40% 또는 그 이상 감소되거나; 더 더욱 바람직하게는, 50% 또는 그 이상 감소되고; 및 가장 바람직하게는, 75% 이상 감소된다. 전이 병소의 수는 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 전이 병소의 수는 육안으로 또는 명시된 확대 비율 하에 눈에 보이는 전이 병소를 카운트함으로써 측정될 수 있다. 일부 구현예들에서, 명시된 확대는 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 또는 50x이다.

[0056] 본 발명의 장애, 질환 또는 병태의 치료에 의해 담체만을 제공받은 집단과 비교하여 치료된 개체 집단의 평균 생존 시간을 증가시킬 것이다. 일부 구현예들에서, 평균 생존 시간은 30 일 이상 증가되며; 더욱 바람직하게는, 60 일 이상 증가되며; 더욱 바람직하게는, 90 일 이상 증가되며; 및 가장 바람직하게는, 120 일 이상 증가된다. 집단의 평균 생존 시간 증가는 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 집단의 평균 생존 시간 증가는 예를 들면, 활성 화합물로 치료를 시작한 후, 이 집단에 대한 생존 평균 길이를 산출함으로써 측정될 수 있다. 집단의 평균 생존 시간 증가는 예를 들면, 활성 화합물로 1차 치료를 완료한 후 이 집단에 대한 생존 평균 길이를 산출함으로써 또한 측정될 수 있다.

[0057] 본 발명의 장애, 질환 또는 병태의 치료에 의해 치료받지 않은 개체 집단과 비교하여 치료된 개체 집단의 평균 생존 시간의 증가를 초래할 수 있다. 일부 구현예들에서, 평균 생존 시간은 30 일 이상 증가되며; 더욱 바람직하게는, 60 일 이상 증가되며; 더욱 바람직하게는, 90 일 이상 증가되며; 및 가장 바람직하게는, 120 일 이상 증가된다. 집단의 평균 생존 시간 증가는 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 집단의 평균 생존 시간 증가는 예를 들면, 활성 화합물로 치료를 시작한 후 이 집단에 대한 생존 평균 길이를 산출함으로써 측정될 수 있다. 집단의 평균 생존 시간 증가는 예를 들면, 활성 화합물로 1차 치료를 완료한 후 이 집단에 대한 생존 평균 길이를 산출함으로써 또한 측정될 수 있다.

[0058] 본 발명의 장애, 질환 또는 병태의 치료에 의해 종양 성장률이 감소될 수 있다. 일부 구현예들에서, 치료 후, 처리전과 비교하여 종양 성장률은 적어도 5% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 종양 성장률은 적어도 10% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 20% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 30% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 40% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 50% 감소되며; 더 더욱 바람직하게는, 적어도 50% 감소되며; 및 가장 바람직하게는, 적어도 75% 감소된다. 종양 성장률은 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양 성장률은 단위 시간당 종양 직경의 변화에 의해 측정될 수 있다.

[0059] 본 발명의 장애, 질환 또는 병태의 치료에 의해 종양 재성장이 감소될 수 있다. 일부 구현예들에서, 치료 후, 종양 재성장은 5% 미만이 되며; 더욱 바람직하게는, 종양 재성장은 10% 미만이 되며; 더욱 바람직하게는, 20% 미만이 되며; 더욱 바람직하게는, 30% 미만이 되며; 더욱 바람직하게는, 40% 미만이 되며; 더욱 바람직하게는, 50% 미만이 되며; 더 더욱 바람직하게는, 50% 미만이 되며; 및 가장 바람직하게는, 75% 미만이 된다. 종양 재성장은 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양 재성장은 예를 들면, 치료 후 기존 종양 수축 후, 종양의 직경 증가를 측정함으로써, 측정된다. 종양 재성장의 감소는 치료를 중단한 후 종양의 재발 실패를 나타낸다.

[0060] 본 발명의 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방으로 세포 증식율이 감소될 수 있다. 일부 구현예들에서, 치료 후, 세포 증식율은 적어도 5% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 10% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 20% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 30% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 40% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 50% 감소되며; 더 더욱 바람직하게는, 적어도 50% 감소되며; 및 가장 바람직하게는, 적어도 75% 감소된다. 상기 세포 증식율은 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 상기 세포 증식율은 예를 들면, 단위 시간 당 조직 시료 안에서 세포 분할 수를 측정함으로써, 측정될 수 있다.

[0061] 본 발명의 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방에 의해 증식하는 세포 비율이 감소될 수 있다. 일부 구현예들에서, 치료 후, 증식하는 세포의 비율은 적어도 5% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 10%; 더욱 바람직하게는, 적어도 20%; 더욱 바람직하게는, 적어도 30%; 더욱 바람직하게는, 적어도 40%; 더욱 바람직하게는, 적어도 50%; 더 더욱 바람직하게는, 적어도 50%; 및 가장 바람직하게는, 적어도 75% 감소된다. 증식하는 세포의 비율은 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 일부 구현예들에서, 증식하는 세포의 비율은 예를 들면,

조직 시료에서 비분할 세포의 수와 비교하여 분할하는 세포의 수를 정량화함으로써, 측정된다. 증식하는 세포의 비율은 유사분열지수(mitotic index)와 대등할 수 있다.

- [0062] 본 발명의 장애, 질환 또는 병태의 치료에 의해 병든 세포 집단, 가령, 암 세포 집단에서 세포독성 효과 (가령, 아포토시스 증가, 증가된 괴사)가 초래될 수 있다. 일부 구현예들에서, 세포독성 치료는 병든 세포 집단 크기를 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 그 이상으로 감소시킨다. 세포 집단의 크기는 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 상기 세포 집단의 크기는 이 집단 또는 이의 시료의 수로 측정될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방으로 세포의 증식 면적 또는 영역의 크기가 감소될 수 있다. 일부 구현예들에서, 치료 후, 세포의 증식 면적 또는 영역의 크기는 처리전의 크기와 비교하여 적어도 5% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 10% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 20% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 30% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 40% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 50% 감소되며; 더 더욱 바람직하게는, 적어도 50% 감소되며; 및 가장 바람직하게는, 적어도 75% 감소된다. 세포의 증식 면적 또는 영역의 크기는 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 세포의 증식 면적 또는 영역의 크기는 세포의 증식 면적 또는 영역의 직경 또는 폭으로 측정될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방으로 비정상적 외양 또는 형태를 갖는 세포의 수 또는 비율이 감소될 수 있다. 일부 구현예들에서, 치료 후, 비정상적 형태를 갖는 세포의 수는 치료 전 크기와 비교하여 적어도 5% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 10% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 20% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 30% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 40% 감소되며; 더욱 바람직하게는, 적어도 50% 감소되며; 더 더욱 바람직하게는, 적어도 50% 감소되며; 및 가장 바람직하게는, 적어도 75% 감소된다. 비정상적 세포의 외양 또는 형태는 임의의 반복가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 비정상적 세포의 형태는 현미경, 가령, 역전된 조직 배양물 현미경을 이용하여 측정될 수 있다. 비정상적 세포의 형태는 핵 다형성 (pleiomorphism) 형태를 취할 수 있다.
- [0065] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 “선택적으로”란 또다른 집단보다는 한 집단에서 더 높은 빈도로 발생하는 경향을 의미한다. 상기 비교된 집단은 세포 집단, 예를 들면, 병든 세포 집단 (가령, 종양 세포 집단 또는 증식성 장애를 갖는 세포 집단)과 정상 세포 집단일 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, “정상 세포”란 “세포 증식성 장애”의 일부분으로 분류될 수 없는 세포다. 정상 세포는 원치 않는 병태 또는 질환의 발달로 이어질 수 있는 제어되지 않은 성장 또는 비정상적 성장, 또는 이 둘 모두가 없다. 일부 구현예들에서, 정상 세포는 정상적으로 기능을 하는 세포 주기 점검 조절 기전을 보유한다. 일부 구현예들에서, 집단 B와 비교하였을 때, 집단 A에서 2배 이상 더 빈번하게 발생하는 사건의 경우, 집단 B와 비교하여 집단 A에서 이 사건은 선택적으로 발생된다. 집단 A에서 5배 이상 더 빈번하게 발생하는 사건의 경우, 사건은 선택적으로 발생된다. 집단 B와 비교하였을 때, 집단 A에서 10배 이상 더 빈번하게 발생하는 사건의 경우, 사건은 선택적으로 발생된다; 일부 구현예들에서, 50배; 더 더욱 바람직하게는, 100 배 이상; 및 일부 구현예들에서, 1000 배 이상 발생된다. 예를 들면, 세포 사멸의 경우, 정상 세포와 비교하였을 때, 병든 또는 과다-증식 세포에서 2배 이상 더 크게 발생하는 경우, 세포 사멸은 병든 또는 과다-증식 세포에서 선택적으로 발생된다고 말할 수 있다.
- [0066] 본원에서 제공되는 범위는 이 범위 안의 모든 값에 대한 속기로 이해되어야 한다. 예를 들면, 1 내지 50의 범위란 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50로 구성된 그룹에서 임의의 수, 수의 조합 또는 하위-범위를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0067] 본원의 가변 또는 측면의 구현예의 언급에는 임의의 단일 구현예 또는 임의의 다른 구현예 또는 이의 일부분과의 조합이 포함된다.
- [0068] 본원에서 제공되는 임의의 조성물 또는 방법은 본원에서 제공되는 하나 이상의 임의의 다른 조성물 및 방법과 복합될 수 있다.
- [0069] **삼입 부위 식별**
- [0070] 생물학적 과정에 양성적으로 영향을 주는 유전자들의 유전자 스크리닝이 흔히 이용된다. 그러나, 과정, 이를테면 성장 또는 종양형성(tumorigenicity)에 음성적으로 영향을 주는 유전자들의 스크리닝은 이러한 유전자들의 발현을 품고 있는 세포에 대한 결실 및 선별로 인하여 식별이 더 어렵다.
- [0071] 본 발명은 음성적으로 선별된 유전자들을 식별하기 위한 스크리닝 방법의 개발을 설명한다. 상기 스크리닝 방

법은 "잘라 붙이기" 기전을 통하여 트랜스포존 벡터와 염색체 간에 DNA 서열을 이동시키는 이동성 유전적 요소인, *piggyBac* 또는 PB 트랜스포존을 이용한다. *piggyBac* 트랜스포존 기전 (U.S. 특허 6,218,815 참고)은 트랜스포존-특이적 역전된 말단 반복 서열 (ITR) 또는 트랜스포존 벡터의 양단에 위치되고, 숙주 세포의 게놈 안에 있는 전위 인지 서열 TTAA를 인지하고, 이를 특이적으로 절단하고, 트랜스포존 벡터의 안에 발견되는 이중 DNA 서열을 숙주 세포의 게놈 안으로 삽입한다.

[0072] 일부 구현예들에서, 삽입 돌연변이 유발 스크린에서 음성적으로 선별된 유전자들을 식별해내는 방법을 포함하는데, 이 방법은 관심 세포에서 *piggyBac* 트랜스포존의 전위를 유도하고; 상기 전위된 세포를 선택적 압박에 노출시켜 상기 *piggyBac* 트랜스포존의 발현을 유도하고; 선택적 압박에 노출되지 않은 전위된 세포와 상기 선택적 압박에 노출된 전위된 세포의 게놈 DNA에서 삽입 부위들을 비교하여; 및 하나 이상의 삽입 부위들을 갖는 유전자들을 식별해내는 것을 포함하고, 이때 삽입 부위들을 가진 유전자들은 선택적 압박에 노출된 전위된 세포와 선택적 압박에 노출되지 않은 전위된 세포에 차등적으로 존재한다.

[0073] 일부 구현예들에서, *piggyBac* 트랜스포존은 유도성 유전자 작제물을 포함한다. 한 구현예에서, 트랜스포존에서 유도성 유전자 작제물 발현 유도로 인하여 트랜스포존의 삽입 부위에서 내인성(endogenous) 유전자의 과발현이 초래된다. 일부 구현예들에서, 트랜스포존의 발현 유도는 트랜스포존에서 유도성 유전자의 발현을 유도하고, 숙주 세포의 게놈에서 트랜스포존 삽입 부위에 인접된 내인성 유전자의 과발현을 포함한다 [예를 들면, 트랜스포존에서 유도된 유전자로부터 전사성 관독초과(read-through)에 의해]. 또다른 구현예에서, 트랜스포존에서 유전자의 과발현으로 *piggyBac* 트랜스포존을 품고 있는 세포가 음성적으로 선별된다. 트랜스포존에서 유전자는 세포독성일 수 있고, 음성적 선별을 초래한다. 그러나, 일부 구현예들에서, 트랜스포존에서 유전자의 과발현 자체가 음성적 선택을 초래하지 않는다. 이러한 구현예에서, 상기 유전자는 예를 들면, IRES 제어하에서 탐지 가능한 표지 (가령, 형광 또는 생물발광 표지)를 포함할 수 있다.

[0074] 또다른 구현예에서, *piggyBac* 트랜스포존은 선택적 유전자, 이를 테면 유도성 항생제 내성 유전자를 포함한다. 일부 구현예들에서, 상기 트랜스포존은 유도성 유전자를 포함한다. 상기 유도성 유전자는 유도성 프로모터, 이를 테면 항생제에 노출됨으로써 유도되는 프로모터 (가령, 테트라사이클린 또는 테트라사이클린의 유도체, 예를 들면 독시사이클린)를 포함할 수 있다. 그러나, 다른 유도성 프로모터들도 이용될 수 있음을 인지할 것이다. 상기 선택적 압박은 유도성 프로모터를 유도하는 조건 (가령, 물질, 예를 들면 항생제에 노출)이다. 이로써 하나 이상의 내인성 유전자의 과발현이 초래되며, 이들중 일부는 트랜스포존 함유 세포에서 과발현이 세포정균 또는 세포독성이기 때문에 이에 대하여 선별될 수 있다. 일부 구현예들에서, *piggyBac* 트랜스포존은 항생제의 추가에 의해 유도되는, 그러나 항생제 내성을 요구하지 않는 유도성 프로모터를 포함한다. 일부 구현예들에서, 상기 선택적 유전자를 이용하여 트랜스포존을 품고 있는 세포 또는 트랜스포존에서 유도성 유전자의 발현을 유도하는 음성적 선택 물질을 품고 있는 세포를 선별하는데 이용되는데, 이로 인하여 인접 내인성 유전자의 발현이 증가된다 (가령, 트랜스포존의 유도성 프로모터의 전사 번역초과에 의해).

[0075] 예를 들면, *piggyBac* 트랜스포존은 벡터, 이를 테면 액틴-Katushka 적색 형광 융합 단백질을 생산하는 독시사이클린 유도성 키메라 유전자를 유도하는 *PB[Mut-tetO-KAT-TETKRAB]*로부터 발현된다. 상기 선택적 유전자는 다양한 항생제, 이를 테면 퓨로마이신, 테트라사이클린, 볼라스티시딘, 및 네오마이신에 대한 저항성을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 상기 트랜스포존은 외인성 DNA, 이를 테면 키메라 유전자의 발현을 더 유도할 수 있다. 상기 외인성 DNA 키메라 유전자는 유전적으로 변형된 유전자들을 포함할 수 있다. 예를 들면, *piggyBac* 트랜스포존은 숙주 DNA를 절단하고, 외인성 DNA를 상기 삽입 부위로 삽입한다. 이러한 외인성 DNA는 키메라 유전자들과 같이, 숙주 세포에서 발현을 위하여 조작된 유전자들을 포함할 수 있다.

[0076] 또다른 구현예에서, 관심 세포는 *piggyBac* 트랜스포존과 전위효소 *PBase*에 의해 공동-형질감염되어, 트랜스포존 돌연변이된 세포가 만들어진다. 상기 관심 세포는 하나 이상의 유전자들, 이를 테면 암 또는 종양 세포의 파괴 후 특정 표현형이 분석될 수 있는 임의의 세포를 포함한다. 상기 세포는 특정 표현형을 포함할 수 있고, 이 표현형을 파괴하는 유전적 스크리닝이 관심대상일 수 있다. 예를 들면, 세포 성장이 손상되거나 부족하고, 잠재적, 비-전이, 아포토시스 돌연변이된 또는 전위된 암 세포는 감소된 세포 생존을 가지거나, 및/또는 휴지상태(equiescent)이며, 전위에 의해 영향을 받은 관심 유전자들을 보유한다.

[0077] 당분야에 공지된 방법을 이용하여 트랜스포존과 전위효소의 유전자 전달이 이루어질 수 있다. 예를 들면, 시험관내 형질감염과 관련된 비-바이러스적 수단이 이용된다. 이러한 방법은 인산칼슘염, DEAE 텍스트란, 전기천공, 및 원형질체 융합의 이용을 포함한다. 리포솜은 DNA를 세포 안으로 전달하는데 잠재적으로 유용하게 이용될 수 있다. 추가적으로, 비-바이러스성 기반의 운반은 나노-기반 또는 에어로졸화된 것일 수 있다.

- [0078] 한 구현예에서, 돌연변이된 또는 전위된 세포는 증식되어, 돌연변이된 또는 전위된 세포 집단은 확장된다. 트랜스포존 또는 트랜스포존에 의해 삽입된 외인성 DNA의 유도에 대한 선별없이 세포는 배양물에서 성장된다. 외인성 DNA가 선택적 물질로 유도되는 구현예에서, 삽입된 외인성 DNA가 성장할 수 있는 임의의 효과는 이의 유도가 없다면 최소화된다. 따라서, 돌연변이된 또는 전위된 세포는 숫자적으로 확장될 수 있다.
- [0079] 여전히 또다른 구현예에서, 돌연변이된 또는 전위된 세포의 일부분이 선택적 압박에 노출된다. 상기 선택적 압박을 이용하여 관심 세포 집단을 풍부하게 한다. *piggyBac* 트랜스포존이 숙주 DNA 안으로 유도성 선택적 유전자를 삽입시키는 구현예들에 있어서, 전위된 세포를 선택적 물질에 노출시키면 상기 선택적 유전자를 발현시키는 세포가 풍부해진다. 예시적인 구현예에 있어서, 돌연변이된 또는 전위된 세포의 일부분은 돌연변이된 또는 전위된 세포를 상기 선택적 압박에 노출시킴으로써, 선택적 유전자의 발현에 대해 풍부해지고, 한편 농축 없이 혼합 세포 집단을 유지시키기 위하여 세포의 일부는 선택적 압박에 노출시키지 않는다. 돌연변이된 또는 전위된 세포의 일부를 상기 선택적 압박에 노출시키고, 및 일부의 돌연변이된 또는 전위된 세포는 노출시키지 않으므로써, 삽입된 외인성 DNA가 성장할 수 있는 임의의 효과는 선택적 압박하에 있는 세포에서 강화되지만, 선택적 압박이 없이 증식된 세포에서는 강화되지 않는다.
- [0080] 예를 들면, *KRAS*^{G12V} 돌연변이를 가진 급성 골수성 백혈병 세포 (AML-RAS 세포) 돌연변이는 상기 키메라 유전자의 유도 후 손상된 성장 또는 생존에 대하여 분석되었고, 동일한 조건하에, 그러나 다만, 키메라 유전자의 유도 없이 배양된 대조 세포와 비교된다. 양쪽 세포 집단으로부터 게놈 DNA가 단리되고, 각 게놈에서 트랜스포존 삽입 부위들을 비교하였다. 삽입 돌연변이가 AML-RAS 세포의 성장 또는 생존에서 변화를 야기하는 경우, 이러한 변화는 돌연변이된 또는 전위된 세포와 대조 세포 사이에 특이적 삽입 부위의 존재로 인한 차이를 반영할 것이다. 세포 적응도에서 전반적인 감소를 유도하는 삽입 부위들은 연속 세포 계대에 의해 고갈될 것이다. 유사하게, 세포 적응도의 증가, 더 빠른 세포 성장률 등을 가진 세포를 유도하는 삽입 부위들은 연속 세포 계대에 의해 강화될 것이다. 따라서, 전위된 세포 안에 차등적으로 존재하는 삽입 부위들 또는 삽입 부위들을 가진 유전자들의 결실 또는 강화는 상기 종양유발 표현형에 반작용을 하는데 관련된 유전자로써 흥미롭다. 일부 구현예들에서, 세포의 고갈은 종양유발 세포, 가령, 돌연변이된 RAS를 갖는 세포에 대하여 세포독성이 될 수 있는 유전자를 식별해낸다.
- [0081] 당분야에 공지된 방법을 이용하여 삽입 부위들을 품고 있는 유전자들이 식별될 수 있다. 이러한 방법에는 PCR 포획 및 서열화가 포함된다. 예를 들면, 게놈 DNA는 돌연변이된 또는 전위된 세포의 상이한 집단으로부터 제조된다. 게놈 DNA가 절단되고, 상기 삽입 인지 서열 및 트랜스포존 서열에 특이적인 프라이머와 함께 PCR에 의해 증폭된다. 상기 삽입 인지 서열과 트랜스포존 서열의 측면에 있는 숙주 서열의 서열 분석에 의해 이 트랜스포존이 삽입된 게놈 안의 위치가 식별된다. 돌연변이된 또는 전위된 두가지 세포 집단, 선택적 압박에 노출된 전위된 세포와 상기 선택적 압박에 노출되지 않은 전위된 세포 사이에 차등적으로 존재하는 삽입 부위를 가진 유전자들의 후속적 식별로 인하여 돌연변이된 또는 전위된 세포의 하나 이상의 표현형, 이를 테면 전반적인 성장 적응도, 종양유발성 또는 종양형성의 변화에 관련된 유전자들이 식별된다.
- [0082] 종양유발성 또는 종양형성에 대한 세포 적응도의 변화에 관련된 유전자의 식별을 통하여, 잠재적 치료 표적들과 물질들은 광범위한 병태, 질환 또는 장애, 이를 테면 암, 특히 효과적인 치료가 없는 병태에 대해 신속하게 식별된다.
- [0083] **조성물**
- [0084] 본 발명은 한 측면으로써, 상기 삽입 부위 식별에 의해 수집한 정보를 이용하여, 병태, 질환 또는 장애의 적어도 한 가지 증상을 개선 또는 감소시키기 위한 조성물을 더 제공한다. 종양유발 RAS, 이를 테면 종양유발 HRAS, 종양유발 NRAS 및 종양유발 KRAS를 발현시키는 관심 세포를 스크리닝함으로써, 관심 세포의 성장 또는 생존에 영향을 주는 유전자들이 치료에 표적화될 수 있다. 따라서, 종양유발 RAS를 발현시키는 종양 또는 암 세포의 증식을 감소시키는, WNT 경로의 활성화가 포함된 조성물이 공개된다.
- [0085] 특정 구현예들에서, 종양유발 RAS를 발현시키는 종양 세포의 증식을 감소시키기 위하여, WNT 경로의 활성화자를 포함하는 조성물이 공개된다. 더욱 특정한 구현예에서, 상기 활성화자는 글리코겐 합성효소 키나제 (GSK) 억제제, 2-아미노-4-(3,4-(메틸렌디옥시)벤질아미노)-6-(3-메톡시페닐)피리미딘, LiCl, 켄파울론 및 6-브로모인디루빈-30-옥심 (BIO), 및/또는 WNT 경로의 소분자 작용제이다.
- [0086] 일부 구현예들에서, 조성물은 상기 WNT 경로를 활성화시키고, 종양유발 RAS를 발현시키는 종양 세포를 감소시키는 물질을 포함할 수 있는데, 이때 상기 물질은 상기 WNT 경로의 소분자 활성화자 또는 작용제, 상기 WNT 경로를

활성화시키는 단백질을 발현시킬 수 있는 유전자, 이를 테면 코딩 유전자, 상기 WNT 경로의 활성화에 영향을 주는 유전자, 이를 테면 난-코딩 유전자, RNA 분자 이를 테면 RNAi 분자, 및 이의 임의의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 상기 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 전달함으로써, WNT 경로의 소분자 활성화자 또는 작용제, 코딩 유전자의 발현, 또는 난-코딩 유전자의 발현을 통하여 상기 WNT 경로가 활성화된다. 따라서, 상기 종양 또는 암이 있는 개체는 치료될 수 있다. 유전자가 상기 조성물에 포함된 구현예들에 있어서, *Piggyback* 트랜스포존을 갖는 음성적 스크린을 통하여 유전자는 식별된다.

[0087] 약학 조성물

[0088] 본 발명은 또한 본 발명의 방법을 실행함에 있어서 이용되는 본 발명의 약학 조성물도 포괄한다. 이러한 약학 조성물은 개체에게 투여하는데 적당한 형태로 제공될 수 있으며, 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 하나 이상의 추가 성분, 또는 이들중 일부의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명의 적어도 한 가지 조성물은 생리학적으로 허용가능한 염, 이를 테면 본 발명에서 고려되는 화합물과 생리학적으로 허용가능한 양이온 또는 음이온과 복합을 포함할 수 있는데, 이것들은 당분야에 공지되어 있다.

[0089] 본 발명의 방법에 유용한 약학 조성물은 흡입, 경구, 직장, 질, 장관외, 국소, 경피, 폐, 비강, 볼, 안구, 척추강내, 정맥내 또는 또다른 투여 경로용으로 적절하게 개발될 수 있다. 고려되는 다른 제형은 사출되는 나노입자, 리포솜 제제, 활성 성분이 포함된 제밀봉된 적혈구, 및 면역학적 기반의 제형을 포함한다. 투여 경로(들)는 당업자에게 자명할 것이며, 치료되는 질환의 유형 및 심각성, 치료되는 수의학적 개체 또는 인간 환자의 유형 및 나이, 및 이와 유사한 것들이 포함된 임의의 수의 인자들에 따라 달라질 것이다.

[0090] 본원에서 설명된 약학 조성물의 제형은 임의의 공지된 방법 또는 약학 분야에서 이후 개발되는 방법에 의해 준비될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제형은 활성 성분이 담체 또는 하나 이상의 다른 보조 성분들과 연관되는 단계, 그 다음 필요하거나 또는 바람직한 경우, 상기 생성물은 원하는 단일 또는 다중 투여 단위로 모양을 만들거나 또는 포장하는 것을 포함한다.

[0091] 한 구현예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 제약적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 이용하여 제형화된다. 한 구현예에서, 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 적어도 한 가지 화합물의 치료 유효량과 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 유용한 약학적으로 허용가능한 담체는 글리세롤, 물, 염수, 에탄올 및 기타 약학적으로 허용가능한 염 용액, 이를 테면 인산염 및 유기산의 염이 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 및 다른 약학적으로 허용가능한 담체의 예들은 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences (1991, Mack Publication Co., New Jersey)]에 설명된다.

[0092] 다른 언급이 없는 한, 본 발명의 실시는 분자 생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적 기술을 이용하며, 이는 당업자의 이해범위 안에 있다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명된다, 예를 들면, 문헌[참조: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", fourth edition (Sambrook, 2012); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1997); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002); "Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting", (Babar, 2011); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002)]. 이들 기술은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 생산에 적용되며, 마찬가지로, 본 발명의 실시 및 실행에서 고려될 수 있다. 특정 구현예에 대하여 특별히 유용한 기술은 다음에 이어지는 구간에서 논의될 것이다.

[0093] 치료 방법

[0094] 본 발명은 개체에서 종양 세포의 증식을 감소 또는 개체에서 종양유발 RAS를 발현시키는 암 및/또는 암과 연관된 증상을 감소 또는 개선시키기 위한 방법들을 포함한다. 본원에서 설명된 바와 같이, 상기 WNT 경로의 활성화는 종양유발 RAS를 발현시키는 암 세포의 증식을 손상시키거나 및/또는 생존을 감소시킨다. 따라서, WNT 경로의 활성화가 포함된 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것은 상기 암 또는 종양 세포의 증식을 감소시키는 수단을 제공하는 것이다.

[0095] 한 측면에서, 종양 세포의 증식을 감소시킬 필요가 있는 개체에서 이를 감소시키는 방법은 WNT 경로의 활성화가 포함된 조성물의 유효량을 개체의 종양 세포에 투여하고, 이로 인하여 종양 세포의 증식을 감소시키는 것을 포함한다. 예시적인 구현예에 있어서, 상기 방법은 종양유발 RAS, 이를 테면 종양유발 HRAS, 종양유발 NRAS 및 종양유발 KRAS를 발현시키는 종양 세포에 효과적이다. 상기 종양 또는 암 세포는 폐, 간, 위장, 결장, 췌장,

및 피부 종양을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또다른 구현예에서, 상기 활성화자는 글리코겐 합성효소 키나제 (GSK) 억제제 또는 WNT 경로의 소분자 작용제, 이를 테면 2-아미노-4-(3,4-(메틸렌디옥시)벤질아미노)-6-(3-메톡시페닐)피리미딘, LiCl, 켄파올론 및 6-브로모인디루빈-30-옥심 (BIO)이다. 또다른 구현예에서, 상기 물질은 상기 WNT 경로의 소분자 활성화자 또는 작용제, 상기 WNT 경로를 활성화시키는 단백질을 발현시킬 수 있는 유전자, 이를 테면 코딩 유전자, 상기 WNT 경로의 활성화에 영향을 주는 유전자, 이를 테면 닌-코딩 유전자, RNA 분자 이를 테면 RNAi 분자, 및 이의 임의의 조합을 포함할 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0096] 또다른 측면에서, 종양유발 RAS를 발현시키는 암 및/또는 이와 연관된 증상을 감소 또는 개선시키는 방법은 WNT 경로의 활성화자 투여를 포함한다. 종양유발 RAS 종양의 치료용 약물 제조에 조성물의 용도가 또한 포함된다. 상기 치료는 개체에서 종양유발 RAS 및/또는 증상을 발현시키는 암 또는 종양을 감소시키거나 개선시키는 것을 포함한다.

[0097] 다음의 실시예들은 본 발명이 본 발명의 분석, 스크리닝, 및 치료 방법이 어떻게 만들어지고, 이용되는지에 대한 완벽한 공개 및 설명을 당업계 숙련자들에게 제시하기 위하여 제공되는 것이며, 발명자들이 이들의 발명으로 간주하는 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니다.

[0098] **실시예**

[0099] 본 발명은 다음의 실험적 실시예들을 참고하여 더 설명된다. 이들 실시예는 오로지 설명을 위한 것이며, 다른 언급이 없는 한, 본 발명의 범위를 제한시키는 것으로 간주되어서는 안된다. 따라서, 본 발명은 어떠한 경우에도 다음의 실시예들로 제한되는 것으로 간주되지 않아야 하며, 오히려 본원에서 제공되는 교시의 결과로써 자명하게 되는 임의의 및 모든 변이를 포괄하는 것으로 간주되어야 한다.

[0100] 추가 설명없이도, 당업자는 전술한 설명 및 다음의 예시적인 실시예를 이용하여 본 발명의 화합물을 만들고 이용하며, 청구된 방법을 실시할 수 있을 것이다. 따라서, 다음의 작업 실시예는 본 발명의 구현예를 특이적으로 지적하며, 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0101] 본원에서 공개된 실시예 1에서 설명된 실험에 이용된 재료 및 방법이 지금 설명된다.

[0102] *스크린의 요약(Summary of Screen.)* *PB[Mut-tetO-KAT-TETKRAB]*는 *Luc-PB[Mut]*을 변형하여 만들었다. TRI-102 세포는 Rothberg Institute에서 구하였다. AML-RAS 세포는 TRI-102로부터 pBabe-Puro- KRAS^{G12V}로부터 만들어진 레트로바이러스를 이용하여 감염되고, 2 µg/mL 퓨로마이신에 의해 선별되어, 생성되었다. 기능 획득 스크린을 실행하기 위하여, 전위효소 플라스미드 *ACT-PBase*과 공동-형질감염에 의해 *PB[Mut-tetO-KAT-TETKRAB]*는 2x10⁵ 개의 AML-RAS 세포 안으로 도입되었다. 트랜스포존 전위 후 4일차에, 돌연변이된 세포는 24시간 동안 Dox를 이용하여 일시적으로 유도되며, 그 다음 KAT 양성 세포가 세포-분류에 의해 수집되었다. 분류된 세포는 3 일 동안 확장되었고, 그 다음 균등하게 2개 풀로 분리되었다. 각 풀에는 3x10⁶ 개의 세포가 포함되며, 상기 스크린 풀은 5일간 2ug/ml Dox로 처리되고, 대조군 풀은 비히갈 대조군 ddH₂O로 처리되었다.

[0103] 5 일차 스크린후, 두 풀로부터 게놈 DNA를 추출하였다. *PB* 삽입 부위들은 포획 기반의 PCR 방법 (도 14)에 의해 우선적으로 풍부해지고, 그 다음 Illumina 고-처리량 서열화를 거쳤다. 미가공 Illumina 서열화 데이터는 우선 Galaxy 플랫폼에 이입시켰다. 삽입 부위 맵핑, 관독 정량화, 및 삽입 부위 분포 분석은 Galaxy 소프트웨어를 이용하여 모두 처리되었다. 2회의 이항식 테스트에 의해 유전자들이 선별되었다. 양쪽 필터에 대하여 p-값 < 0.01을 근거로 하여 후보 표적들이 선택되었다.

[0104] 종양유발 RAS 돌연변이 세포에 대한 다양한 약물 처리 효과를 결정하기 위하여, AlamarBlue 분석 (Invitrogen)을 실행하여 세포 생존력이 관찰되었다. 생체내 WNT 경로의 활성화는 연한천 분석 및 AML-RAS 세포 이종이식편 모델에서 또한 실행되었다.

[0105] *벡터 및 클로닝* *PB[Mut-tetO-KAT-TETKRAB]*는 *Luc-PB[Mut]*을 변형하여 만들었다. tetO는 pHUD10-3에서 구하였고, CAG 프로모터의 상류에 클론되었다. *Katushka* 적색 형광 단백질은 pTurboFP636-C (Evrogen)로부터 증폭되었다. 2A 펩티드를 통하여 KAT에 연결된 TetR-KRAB (Addgene Plasmid 11642)는 중첩 PCR에 의해 만들어졌고, ACT 프로모터의 3'에 클론되었다. 블라스티시딘 카세트는 pCDNA6 (Invitrogen)로부터 증폭되었고, tetO의 상류 NheI 부위로 클론되었다. *ACT-PBase*는 이미 설명되었다. *LRP6* 및 β -카테닌의 전장 cDNA 클론은 Addgene (27242 및 19286)로부터 구하였고, 한편 *TCF7L1* 및 δ -카테닌은 DF/HCC DNA Resource Core (HsCD00339336 및 HsCD0082615)로부터 구하였다. 전장의 cDNA는 PB 벡터, *PBJ[BRT]* 안으로 서브클론되었고, 이 벡터는 블라스티

시던 선별 카세트가 포함된 Tet-On 벡터다.

- [0106] 세포 배양물 및 안정적인 세포주 생성. TRI-102 세포는 Rothberg Institute에서 구하였다. AML-RAS 세포를 만들기 위하여, TRI-102는 pBabe-Puro- KRAS^{G12V}로부터 만들어진 레트로바이러스를 이용하여 감염시키고, 2 µg/mL 퓨로마이신에 의해 선별되었다. LRP6, TCF7L1, β-카테닌 또는 δ-카테닌의 조건적 과발현을 위하여 안정적인 세포주를 만들기 위하여, TRI-102 또는 AML-RAS는 *PBJ[BRT]* 및 *ACT-PBase*에 있는 상응하는 유전자로 공동-형질 감염되고, 2주 동안 5 µg/mL 블라스티시딘으로 선별되었다. 모든 TRI-102 및 AML-RAS 세포주는 10% FBS이 보충된 F12-DMEM에서 유지되었다.
- [0107] 종양유발 RAS 흑색종 세포주 YUDOSO, YUTICA 및 YUGASP는 Dr. David Stern가 기부한 것이었다. 이들 세포주는 10% FBS이 보충된 MEM에서 유지되었다. 폐암 세포주 H358, H441, H460, H1734, H1792 및 A549는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구하였고, 10% FBS이 보충된 RPMI-1640에서 유지되었다. 결장암 세포주 DLD-1, HCT116, SW1116 및 췌장 암 AsPc1, Capan2, MiaPaCa2, Panc1은 ATCC에서 구하였고, 10% FBS이 보충된 DMEM에서 유지되었다. LRP6, TCF7L1, β-카테닌 또는 δ-카테닌의 조건적 과발현을 위하여 안정적인 세포주를 만들기 위하여, 폐암 세포주 A549 및 H1792는 *PBJ[BRT]* 및 *ACT-PBase*에 있는 상응하는 유전자로 공동-형질 감염되고, 2주 동안 5 µg/mL 블라스티시딘으로 선별되었다.
- [0108] PB 기능 획득 스크린. 전위효소 플라스미드 *ACT-PBase*과 공동-형질 감염에 의해 *PB[Mut-tetO-KAT-TETRKAB]*는 2×10^5 개의 AML-RAS 세포 안으로 도입되었다. 트랜스포존 전위 후 4일차에, 돌연변이된 세포는 24시간 동안 Dox를 이용하여 일시적으로 유도되며, 그 다음 KAT 양성 세포가 세포-분류에 의해 수집되었다. 분류된 세포는 3일 동안 확장되었고, 그 다음 균등하게 2개 풀로 분리되었다. 각 풀에는 3×10^6 개의 세포가 포함되며, 상기 스크린 풀은 5일간 2 µg/ml Dox로 처리되고, 대조군 풀은 비히클 대조군 ddH₂O로 처리되었다.
- [0109] 게놈 DNA 제조, 포획 기반 PCR 및 Illumina 서열화 (도 14). 게놈 DNA 추출을 위하여, 10mM Tris-HCl pH8.0, 2mM EDTA, 200mM NaCl, 0.2%SDS, 200 µg/ml RNAse A 및 800 µg/ml 단백질분해효소 K가 포함된 완충액에 세포를 재현탁시키고, 및 55°C 수조 안에서 하룻밤 동안 (>12h) 항온처리하고, 그 다음 5M NaCl를 추가하였다. 10000g 원심분리 후, 게놈 DNA를 이소프로판올에 의해 침전시키고, 이어서 75% 에탄올로 세척하였다. DNA 펠렛은 0.1% EDTA와 함께, 10mM Tris-HCl pH 8.0에서 재현탁되었다. 그 다음 게놈 DNA는 AluI로 하룻밤 동안(>12h) 절단되었다. 절단된(digested) 게놈 DNA는 1/10 용적의 3M NaAc와 1/2 용적의 이소프로판올을 추가하여 침전시키고, 최대 속도에서 20분동안 원심분리시켰다. 절단된 게놈 DNA 펠렛은 0.1% EDTA와 함께, 10mM Tris-HCl pH 7.4에서 재현탁되었다.
- [0110] 포획 기반 PCR은 단일 프라이머 연장 반응(SPE)에 의해 우선 실행되었으며, 이때 이 반응물 100 µl 용적에는 25 µg 절단된 게놈 DNA, 300 µM dNTP, 300 nM 바이오틴-PBR-F 프라이머 (CCCZTTAGTGAGGGTZAATTAGCTCCAAGCGGCGACTGAGA, 2개의 이테리체 T는 바이오틴-dT로 대체된다), 1X Kapa HF 완충액, 2 µl Kapa 중합효소를 포함한다. SPE를 위한 PCR 조건은 95 °C, 5분, 40 사이클(98 °C 20초, 60 °C 30초, 72 °C 1분), 및 최종 연장 단계는 72 °C 5분이다. SPE 산물은 Qiagen PCR 정제 키트에 의해 정제된다. 정제된 SPE 산물은 자석 비드 (Promega, cat# Z5481)와 함께 혼합된다. 바이오티닐화된 삽입 부위 단편들은 제조업자의 프로토콜에 따라 바이오틴-스트렙타아비딘 결합 반응에 의해 다른 게놈 DNA로부터 분리된다. 그 다음, 말단 전달효소 (NEB, cat#M0315S)를 이용하여 비드 상에서 3 프라이머 dG 테일링 반응이 시작되었다.
- [0111] 그 다음 삽입 부위 단편들은 Illumina 고-처리량 서열화를 위한 어댑터 서열의 추가를 위하여 PCR 반응을 거쳤다. PCR 반응물은 5 µl 주형, 5 µl 5X Kapa HF 완충액, 0.75 µl의 ILP11:
- [0112] (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTCACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT), 0.75 µl의 Idx6I: (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATGGCGTGAAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT)
- [0113] 또는 0.75 µl의 Idx12: (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACAAGGTGACTGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT), 0.75 µl의 dNTP, 0.5 µl의 Kapa 및 12.25 µl의 dH₂O를 포함하였고, 및 SPE를 위한 PCR 조건은 95 °C, 5분, 15 사이클(98 °C 20초, 60 °C 30초, 72 °C 1분), 72 °C 5분으로 설정되었다. PCR 산물은 Qiagen PCR 정제 키트에 의해 정제되고, Illumina 서열화를 거친다.
- [0114] 데이터 분석. 미가공 Illumina 서열화 데이터는 우선 Galaxy 플랫폼에 이입시켰다. 삽입 부위 맵핑, 판독 정량화, 및 삽입 부위 분포 분석은 Galaxy 소프트웨어를 이용하여 모두 처리되었다. 각 유전자에 대한 총 삽입 부

위들 (Ti), 2fold Dox- 부위들(Mi), 2fold Dox+ 부위들(Pi), 및 비편향(unbiased) 부위들이 포함된 기록을 생성한 후, 모든 기록은 엑셀로 다운받았다. 이들 유전자를 식별해내기 위하여, 2개-필터 통계 분석이 실시되었다. 성장 또는 생존을 손상시키는 유전자들은 오직 무작위 기회에 의해 예상되는 것 이상으로 통계학적으로 유의미한 2fold Dox- 부위들의 강화된 삽입 탑재량(burden)을 품을 것이라고 우선 가정하였다. 대부분 세포의 경우, 하나의 삽입을 제외한 모두 방관자적(bystander) 삽입일 것이며, 이는 세포의 적응도에 영향을 주지 않을 것으로 추정하였다. 실시간 PCR에서 클론당 평균 16개의 삽입이 있었던 것으로 드러났다. 트랜스포존 복사 수

$$\frac{\sum_{i=1}^n M_i}{\sum_{i=1}^n T_i} \times \left(1 - \frac{1}{16}\right) = 0.41$$

에 관한 지식을 이용하여 배경 돌연변이 비율을 산출하였다(). 이 배경 돌연변이 율에 근거하여, 모든 개별 유전자에 대한 이항식 테스트 p-값을 산출하였다

$p - value = \sum_{M_i}^{T_i} C_{T_i}^{M_i} 0.41^{M_i} (1 - 0.41)^{T_i - M_i}$
 ($p - 값 = \sum_{M_i}^{T_i} C_{T_i}^{M_i} 0.41^{M_i} (1 - 0.41)^{T_i - M_i}$). 그 다음 성장 또는 생존을 손상시키는 유전자들은 2fold Dox+ 부위들 (Mi>Pi)보다는 증가된 빈도의 2fold Dox- 부위들을 가질 것이라고 가정하였다. 제 2 이항식 테스트 p-값을 산출하였다 .

$p - value = \sum_{M_i}^{M_i + P_i} C_{M_i + P_i}^{M_i} 0.5^{M_i} (1 - 0.5)^{P_i}$
 ($p - 값 = \sum_{M_i}^{M_i + P_i} C_{M_i + P_i}^{M_i} 0.5^{M_i} (1 - 0.5)^{P_i}$). 양쪽 필터에 대하여 p-값 < 0.01을 근거로 하여 후보 유전자들이 선택되었다.

[0115]

키놈 siRNA 스크린. 779개 인간 키나제를 표적으로 하는 키놈(kinome) siRNA 라이브러리는 Dharmacon에서 구입하였다. AML-RAS 세포는 96-웰 포맷에서 역-형질감염되었다(reverse-transfected). 형질감염 3일 후, 세포 생존력은 Celltiter-Glo (Promega) Assay를 이용하여 측정되었다. 각 개별 유전자들의 루시퍼라제 관독은 플레이트 내부 대조군으로 표준화되었다. 3개의 독립적 스크린중 2개에서 루시퍼라제 신호가 20% 감소된 녹다운된 유전자들이 후보로 선별되었다.

[0116]

세포 생존력 분석. 종양유발 RAS 돌연변이 세포에 있어서 다양한 약물 처리 효과를 결정하기 위하여, AlamarBlue 분석 (Invitrogen)이 실행되었다. 2500개 세포는 약물 처리 하루 전 96-웰 플레이트에서 삼중으로 파종되었다. TRI-102 및 AML-RAS 세포의 경우, 약물 추가 후 72시간 시점에서 형광이 측정되었다. 다른 종양유발 RAS 세포의 경우, 약물 추가 후 120시간 시점에서 형광이 측정되었다.

[0117]

연한천 분석(Softagar assay.) 6-웰 플레이트에서 삼중으로 연한천 분석이 실행되었다. 각 웰에는 성장 배지 안에 1% 한천이 포함된 바닥 층이 추가되었다. 그 다음 성장 배지 안에 0.5% 한천에 10,000개 세포가 도달되었다. 성장 배지가 각 웰에 추가되었고, 3일마다 교체하였다. 3-4 주 후 콜리니를 카운트하였다.

[0118]

이종이식편. 10⁶ AML-RAS 세포는 PBS에 재현탁되었고, 6-주령의 암컷 누드 마우스 (Charles River Laboratory)의 양쪽 옆구리 피하에 접종시켰다. 이식 후 7일 차에, 동물에게 LiCl (340 mg/kg 체중), 또는 동일한 용적의 비히클 (PBS)을 2일에 한번씩 복강내 주사하였다. 종양 용적 (mm³) 및 체중(g)은 2일마다 측정되었다. 종양 용적은 식 W²xL/2 (L은 상기 종양의 길이, W는 상기 종양의 폭)에 근거하여 칼리퍼 측정을 이용하여 추정되었다. 모든 실험은 프로토콜 번호 2008-10230에 따라 Yale Animal Resources Center and the Institutional Animal Care and Use Committee에 승인받고, 이에 따라 실행되었다.

[0119]

본원에서 공개된 실시예 2에 이용된 재료 및 방법이 지금 설명된다.

[0120]

삽입 돌연변이유발 스크린. PB[*Mut-tetO-KAT-TETKRAB*]는 *Luc-PB[Mut]*을 변형하여 만들었다. TRI-102 세포는 Rothberg Institute에서 구하였다. AML-RAS 세포는 TRI-102로부터 pBabe-Puro-KRAS^{G12V}로부터 만들어진 레트로 바이러스를 이용하여 감염되고, 2 μg/mL 퓨로마이신에 의해 선별되어, 생성되었다. 기능 획득 스크린을 실행하기 위하여, 전위효소 플라스미드 *ACT-PBase*과 공동-형질감염에 의해 PB[*Mut-tetO-KAT-TETKRAB*]는 2x10⁵ 개의 AML-RAS 세포 안으로 도입되었다. 트랜스포존 전위 후 4일차에, 돌연변이된 세포는 24시간 동안 Dox를 이용하여 일시적으로 유도되며, 그 다음 KAT 양성 세포가 세포-분류에 의해 수집되었다. 분류된 세포는 3 일 동안 확장되었고, 그 다음 균등하게 2개 풀로 분리되었다. 각 풀에는 3x10⁶ 개의 세포가 포함되며, 상기 스크린 풀은 5

[0121]

일간 2ug/ml Dox로 처리되고, 대조군 풀은 비히클 대조군 ddH₂O로 처리되었다. 5 일후, 2 풀로부터 게놈 DNA를 추출하였다. PB 삽입 부위들은 포획 기반의 PCR 방법 (도 14)에 의해 우선적으로 풍부해지고, 그 다음 Illumina 고-처리량 서열화를 거쳤다. 미가공 Illumina 서열화 데이터는 인간 게놈 hg19에 맵핑되었고, 삽입 부위들은 GENCODE v19로 주석을 달았다. 2회의 이항식 테스트에 의해 유전자들이 선별되었다.

- [0122] 세포 생존력 및 형질변환 분석. 종양유발 RAS 돌연변이 세포에 대한 다양한 약물 처리 효과를 결정하기 위하여, AlamarBlue 분석 (Invitrogen)을 실행하여 세포 생존력이 관찰되었다. 연한천 분석 및 AML-RAS 세포 이중이식편 모델을 이용하여 종양형성에 있어서 WNT 경로 활성화의 효과를 확인하였다.
- [0123] 벡터 및 클로닝. PB[*Mut-tetO-KAT-TETKRAB*]는 *Luc-PB[Mut]*을 변형하여 만들었다. tetO는 pHUD10-3에서 구하였고, CAG 프로모터의 상류에 클론되었다. Katushka 적색 형광 단백질은 pTurboFP636-C (Evrogen)로부터 증폭되었다. 2A 펩티드를 통하여 KAT에 연결된 TetR-KRAB (Addgene Plasmid 11642)는 중첩 PCR에 의해 만들어졌고, ACT 프로모터의 3'에 클론되었다. 블라스티시딘 카세트는 pCDNA6 (Invitrogen)로부터 증폭되었고, tetO의 상류 NheI 부위로 클론되었다. ACT-PBase는 이미 설명되었다⁹. LRP6 및 β-카테닌의 전장 cDNA 클론은 Addgene (27242 및 19286)로부터 구하였고, 한편 TCF7L1 및 δ-카테닌은 DF/HCC DNA Resource Core (HsCD00339336 및 HsCD00082615)로부터 구하였다. 전장의 cDNA는 PB 벡터, PBJ[BRT] 안으로 서브클론되었고, 이 벡터는 블라스티시딘 선별 카세트가 포함된 Tet-On 벡터다.
- [0124] 세포 배양물 및 안정적인 세포주 생성. TRI-102 세포는 Rothberg Institute에서 구하였다. AML-RAS 세포를 만들기 위하여, TRI-102는 pBabe-Puro- KRAS^{G12V}로부터 만들어진 레트로바이러스를 이용하여 감염시키고, 2 μg/mL 퓨로마이신에 의해 선별되었다. LRP6, TCF7L1, β-카테닌 또는 δ-카테닌의 조건적 과발현을 위하여 안정적인 세포주를 만들기 위하여, TRI-102 또는 AML-RAS는 PBJ[BRT] 및 ACT-PBase에 있는 상응하는 유전자로 공동-형질 감염되고, 2주 동안 5 μg/mL 블라스티시딘으로 선별되었다. 모든 TRI-102 및 AML-RAS 세포주는 10% FBS이 보충된 F12-DMEM에서 유지되었다.
- [0125] 종양유발 RAS 흑색종 세포주 YUDOSO, YUTICA 및 YUGASP는 Dr. David Stern가 기부한 것이었다.. 이들 세포주는 10% FBS이 보충된 MEM에서 유지되었다. 폐암 세포주 H358, H441, H460, H1734, H1792 및 A549는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구하였고, 10% FBS이 보충된 RPMI-1640에서 유지되었다. 결장암 세포주 DLD-1, HCT116, SW1116 및 췌장 암 AsPc1, Capan2, MiaPaCa2, Panc1은 ATCC에서 구하였고, 10% FBS이 보충된 DMEM에서 유지되었다. LRP6, TCF7L1, β-카테닌 또는 δ-카테닌의 조건적 과발현을 위하여 안정적인 세포주를 만들기 위하여, 폐암 세포주 A549 및 H1792는 PBJ[BRT] 및 ACT-PBase에 있는 상응하는 유전자로 공동-형질 감염되고, 2주 동안 5 μg/mL 블라스티시딘으로 선별되었다.
- [0126] PB 기능 획득 스크린. 전위효소 플라스미드 ACT-PBase과 공동-형질감염에 의해 PB[*Mut-tetO-KAT-TETKRAB*]는 2x10⁵ 개의 AML-RAS 세포 안으로 도입되었다. 트랜스포존 전위 후 4일차에, 돌연변이된 세포는 24시간 동안 Dox를 이용하여 일시적으로 유도되며, 그 다음 KAT 양성 세포가 세포-분류에 의해 수집되었다. 분류된 세포는 3 일 동안 확장되었고, 그 다음 균등하게 2개 풀로 분리되었다. 각 풀에는 3x10⁶ 개의 세포가 포함되며, 상기 스크린 풀은 5일간 2ug/ml Dox로 처리되고, 대조군 풀은 비히클 대조군 ddH₂O로 처리되었다.
- [0127] 게놈 DNA 제조, 포획 기반 PCR 및 Illumina 서열화 (도 S2). 게놈 DNA 추출을 위하여, 10mM Tris-HCl pH8.0, 2mM EDTA, 200mM NaCl, 0.2%SDS, 200ug/ml RNase A 및 800ug/ml 단백질분해효소 K가 포함된 완충액에 세포를 재현탁시키고, 및 55°C 수조 안에서 하룻밤 동안 (>12h) 항온처리하고, 그 다음 5M NaCl를 추가하였다. 10000g 원심분리 후, 게놈 DNA는 이소프로판올에 의해 침전되고, 이어서 75% 에탄올로 세척하였다. DNA 펠렛은 0.1% EDTA와 함께, 10mM Tris-HCl pH 8.0에서 재현탁되었다. 그 다음 게놈 DNA는 AluI로 하룻밤 동안(>12h) 절단되었다. 절단된(digested) 게놈 DNA는 1/10 용적의 3M NaAc와 1/2 용적의 이소프로판올을 추가하여 침전되었고, 최대 속도에서 20분동안 원심분리되었다. 절단된 게놈 DNA 펠렛은 0.1% EDTA와 함께, 10mM Tris-HCl pH 7.4에서 재현탁되었다.
- [0128] 포획 기반 PCR은 단일 프라이머 연장 반응(SPE)에 의해 우선 실행되었으며, 이때 이 반응물 100ul 용적에는 25ug 절단된 게놈 DNA, 300uM dNTP, 300nM 바이오틴-PBR-F 프라이머 (X-AGCTCCAAGCGGCGACTGAGA, X는 5'-바이오 틴), 1X Kapa HF 완충액, 2ul Kapa 증합효소를 포함한다. SPE를 위한 PCR 조건은 95°C, 5분, 40 사이클(98°C 20초, 60 °C 30초, 72°C 1분), 및 최종 연장 단계는 72°C 5분이다. SPE 산물은 Qiagen PCR 정제 키트에 의해 정제된다. 정제된 SPE 산물은 자석 비드 (Promega, cat# Z5481)와 함께 혼합된다. 바이오티닐화된 삽입 부위 단편

들은 제조업자의 프로토콜에 따라 바이오틴-스트렙타아비딘 결합 반응에 의해 다른 게놈 DNA으로부터 분리된다. 그 다음, 말단 전달효소 (NEB, cat#M0315S)를 이용하여 비드 상에서 3 프라임 dG 테일링 반응이 시작되었다.

[0129] 그 다음 삽입 부위 단편들은 Illumina 고-처리량 서열화를 위한 어댑터 서열의 추가를 위하여 PCR 반응을 거쳤다. PCR 반응물은 5ul 주형, 5ul 5X Kapa HF 완충액, 0.75ul의 ILP11(AATGATACGGCGACCACCGAGATCTTACTTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT), 0.75ul의 Idx6I: (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTGGCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT)

[0130] 또는 Idx12: (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACAAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT), 0.75ul의 dNTP, 0.5ul의 Kapa 및 12.25ul의 dh20를 포함하였고, 및 SPE를 위한 PCR 조건은 95°C, 5분, 15 사이클(98°C 20초, 60°C 30초, 72°C 1분), 72 °C 5분으로 설정되었다. PCR 산물은 Qiagen PCR 정제 키트에 의해 정제되고, Illumina 서열화를 거친다.

[0131] 데이터 분석. 미가공 Illumina 서열화 데이터는 인간 게놈 hg19에 맵핑되었고, GENCODE v19로 주석을 달았다. 각 유전자의 경우, 총 삽입 부위들(Ti)은 2fold Dox- 부위들(Mi), 2fold Dox+ 부위들(Pi), 또는 미편향된 부위들로 분류되었다. 후보 유전자들을 식별하기 위하여, 2회 통계학적 분석이 수행되었다. 성장 또는 생존을 손상시키는 유전자들은 오직 무작위 기회에 의해 예상되는 것 이상으로 통계학적으로 유의미한 2fold Dox- 부위들의 강화된 삽입 탑재량(burden)을 품을 것이라고 가정하였다. 대부분 세포의 경우, 하나의 삽입을 제외하고 모두 방관자적(bystander) 삽입일 것이며, 이는 세포의 적응도에 영향을 주지 않을 것으로 추정하였다. 실시간 PCR에서 클론당 평균 16개의 삽입이 있었던 것으로 드러났다. 트랜스포존 복사 수에 관한 지식을 이용하여 배경 돌

$$\frac{\sum_{i=1}^n M_i}{\sum_{i=1}^n T_i} \times \left(1 - \frac{1}{16}\right) = 0.41$$

연변이 비율을 산출하였다(). 이 배경 돌연변이율에 근거하여, 모든 개별 유전자에 대한 이항식 테스트 p-값을 산출하였다

$$p - value = \sum_{M_i}^{T_i} C_{T_i}^{M_i} 0.41^{M_i} (1 - 0.41)^{T_i - M_i}$$

($p - value = \sum_{M_i}^{T_i} C_{T_i}^{M_i} 0.41^{M_i} (1 - 0.41)^{T_i - M_i}$). 그 다음 성장 또는 생존을 손상시키는 유전자들은 2배성 Dox+ 부위들 (Mi>Pi)보다는 증가된 빈도의 2배성 Dox- 부위들을 가질 것이라고 가정하였다. 제 2 이항식 테스트 p-값을 산출하였다

$$p - value = \sum_{M_i}^{M_i + P_i} C_{M_i + P_i}^{M_i} 0.5^{M_i} (1 - 0.5)^{P_i}$$

$$p - value = \sum_{M_i}^{M_i + P_i} C_{M_i + P_i}^{M_i} 0.5^{M_i} (1 - 0.5)^{P_i}$$

양쪽 필터에 대하여 p-값 < 0.0005를 근거로 하여 후보 유전자들이 선택되었다. 넌코딩 유전자들은 코딩 유전자들보다 유전자당 삽입 돌연변이를 적게 가지기 때문에, 상대적인 완화(relax) 임계치, p<0.01를 이용하여 넌코딩 후보 유전자들을 선택하였다. RNA 및 RNA 결합 단백질 (RBP) 상호작용은 starBase V2.0를 이용하여 식별하였다.

[0132] 키놈 siRNA 스크린. 779개 인간 키나제를 표적으로 하는 키놈 siRNA 라이브러리는 Dharmacon에서 구입하였다. AML-RAS 세포는 96-웰 포맷에서 역-형질감염되었다. 형질감염 3일 후, 세포 생존력은 Celltiter-Glo (Promega) Assay를 이용하여 측정되었다. 각 개별 유전자들의 루시퍼라제 판독은 플레이트 내부 대조로 표준화되었다. 3개의 독립적 스크린중 2개에서 루시퍼라제 신호가 20% 감소된 녹다운된 유전자들이 후보로 선별되었다.

[0133] 세포 생존력 분석. 종양유발 RAS 돌연변이 세포에 대한 다양한 약물 처리 효과를 결정하기 위하여, AlamarBlue 분석 (Invitrogen)이 수행되었다. 2500개 세포는 약물 처리 하루 전 96-웰 플레이트에서 삼중으로 파종되었다. TRI-102 및 AML-RAS 세포의 경우, 약물 추가 후 72시간 시점에서 형광이 측정되었다. 다른 종양유발 RAS 세포의 경우, 약물 추가 후 120시간 시점에서 형광이 측정되었다.

[0134] 연한천 분석. 6-웰 플레이트에서 삼중으로 연한천 분석이 수행되었다. 각 웰에는 성장 배지 안에 1% 한천이 포함된 바닥 층이 추가되었다. 그 다음 성장 배지 안에 0.5% 한천에 10,000개 세포가 도말되었다. 성장 배지가 각 웰에 추가되었고, 3일마다 교체되었다. 3-4 주 후 콜리니를 카운트하였다.

[0135] 이종이식편. 10⁶ 개의 AML-RAS 세포는 PBS에 재현탁되었고, 6-주령의 암컷 누드 마우스 (Charles River Laboratory)의 양쪽 옆구리 피하에 접종시켰다. 이식 후 7일 차에, 동물에게 LiCl (340 mg/kg 체중), 또는 동일

한 용적의 비히클 (PBS)을 2일에 한번씩 복강내 주사하였다. 종양 용적 (mm³) 및 체중(g)은 2일마다 측정되었다. 종양 용적은 식 $W^2 \times L / 2$ (L은 상기 종양의 길이, W는 상기 종양의 폭)에 근거하여 칼리퍼 측정을 이용하여 추정되었다. 모든 실험은 프로토콜 번호 2008-10230에 따라 Yale Animal Resources Center and the Institutional Animal Care and Use Committee에 승인받고, 이에 따라 실행되었다.

[0136] 본원에서 공개된 실시예 1의 결과가 지금 설명된다.

[0137] **실시예 1: PB 기능 획득 스크린**

[0138] 독시사이클린 (Dox)-유도성 시스템이 포함된 PB 트랜스포존은 삽입 (PB[*Mut-tetO-KAT-TETKRAB*], 도 1)시 내인성 유전자 과다 발현이 구동되도록 만들어졌다. 돌연변이된 세포는 Katushka (KAT) 형광 표지의 공동-발현에 의해 또한 표지되었다. 이를 *KRAS*^{G12V} 형질변환된 세포주, AML-RAS에 적용하였는데, 이 계통은 종양유발 *KRAS*^{G12V} 를 환자로부터 유도된 TSC2-결핍 혈관근지방종 세포주, TRI-102에 도입시킴으로써 생성되었다. TRI-102는 연한천에서 콜로니를 형성할 수 없는 느리게 성장하는 양성 종양 세포주이다. *KRAS*^{G12V}를 이들 세포 안으로 도입시키면, 증식은 증가되며, 및 부착-독립적 성장이 허용되고 (도 13a 및 13b), 활성화된 RAS 돌연변이를 갖는 환자로부터 유도된 암 세포에 의해 형질변환된 특징들이 흔히 나타났다. 따라서, AML-RAS 및 TRI-102는 RAS 종합적인 치사 돌연변이에 대한 스크리닝하기 위하여 이상적인 실험 세포 및 대조군 세포주를 제공한다.

[0139] AML-RAS 세포의 성장 또는 생존을 손상시키는 돌연변이를 스크리닝하기 위하여, PB[*Mut-tetO-KAT-TETKRAB*] 및 전위효소 *PBase*의 공동-형질감염에 의해 트랜스포존 돌연변이된 세포들이 수집되었다 (도 1). 돌연변이된 세포를 풍부하게 하기 위하여, 트랜스포존 전위 후 4일 차에, KAT-융합 전사체 발현의 간단한 Dox-유도 후 세포-분류에 의해 KAT-양성 세포가 수집되었다(도 2). 그 다음, 돌연변이된 세포는 Dox 유도 없이 증식되었고, 2개 풀로 균등하게 분배되었다. 상기 스크린 풀에서, 상기 세포는 5일 동안 Dox 존재하에 배양이 지속되었고 (Dox+ 풀), 이로써 돌연변이된 내인성 유전자들의 과발현이 지속되었고, 성장 또는 생존을 손상시키는 돌연변이를 갖는 *KRAS*^{G12V} 세포는 고갈된다(도 1). 나란하게, 대조군 세포 풀은 동일한 조건하에, 단 배지에 Dox 없이 배양되었다(Dox- 풀).

[0140] 2개 풀로부터 게놈 DNA가 추출되었고, 트랜스포존 삽입 부위들의 단편들은 바이오틴-스트렙타아비딘 포획 프로토콜에 이어 Illumina 고-처리량 서열화에 의해 풍부해졌다 (도 14). 2개 풀로부터 총 4,362,271개의 서열 관독은 게놈을 따라 270,257개 부위에 정렬되었다(도 15). 이들 부위는 PB 전위 인지 서열, TTAA를 포함하며, 이는 이것들이 게놈 안에 트랜스포존 삽입 부위라는 것을 나타낸다.

[0141] 20,387개의 공지된 코딩 유전자들중 13,872안에 위치한 175,944개의 삽입 부위의 분석이 실행되었다. 삽입 돌연변이가 세포 클론의 성장 또는 생존에서 변화를 야기하는 경우, 이 변화는 특이적 삽입 부위에 대한 서열화 관독 수에 의해 반영될 것이다 (도 1). 상기 분석은 트랜스포존 의존적 유전자 발현의 유도시 고갈된 또는 풍부해진 삽입에 집중되었다. 구체적으로, Dox 유도시 적어도 50% 고갈된(log2 비율>1, 2fold Dox- 부위, Mi) 또는 적어도 200% 증가된(log2 비율<-1, 2fold Dox+ 부위, Pi) 삽입이 분석되었다 (도 3). 더욱이 각 세포 클론은 다수의 트랜스포존 삽입을 포함하며, 이들중 오직 하나만 원인을 제공하는 역할을 하는 것으로 추정된다. 따라서, 방관적 삽입은 원인 제공 삽입에 의해 공동-고갈되거나 또는 풍부해질 것이며, 및 배경 잡음이 유입될 것이다. 유전자들이 과발현될 때, 유전자는 적응도를 감소시키고, 무작위 기회에 의해 예상되는 것보다 더 많은 고갈된 삽입 부위들 (2fold Dox- 부위)을 포함할 것으로 가정하였다. 따라서, 각 유전자들에 대한 모든 삽입 부위들의 결실 또는 풍부화가 분석되었다. 이러한 추정에 근거하여, 배경 돌연변이율에 근거하여 예상된 것보다 더 많은 결실된 삽입 부위를 포함하였던 150개 유전자를 식별해내었다 (도 3). 그 다음 이들 유전자는 풍부해진 삽입 부위들과 비교하여 결실된 삽입 부위의 빈도가 증가되어야 한다고 가정하였다 (Mi > Pi). 이러한 두번째 필터를 데이터에 적용시켰고, 최종적으로 95개의 후보 유전자가 식별되었다 (도 3 및 표 1).

표 1

PB 기능 획득 스크린의 후보 유전자들 목록

[0142]

유전자 ID	유전자 기호	유전자 설명
uc002izo.1	MED13	매개체복합 소단위 13
uc003hsz.2	GRID2	글루탐산염 수용체, 이온성, 델타 2
uc003smx.1	SDK1	사이드킥(sidekick) 1 아이소폼 1
uc003dgm.1	SFMBT1	4개의 mbt 도메인 1을 가진, Scm-유사

uc002vgo.1	AK090954	호모 사피엔스 cDNA FLJ14199 fis, 클론 NT2RP3002713.
uc002veg.1	ERBB4	v-erb-a 적모혈구 백혈병 바이러스성 종양유전자
uc002vgn.1	AK024261	호모 사피엔스 cDNA FLJ14199 fis, 클론 NT2RP3002713.
uc002uiw.2	BC046497	호모 사피엔스 cDNA FLJ11228 fis, 클론 PLACE1008329.
uc010izf.1	RGNEF	Rho-구아닌 뉴클레오티드 교환 인자
uc003olo.1	MAPK14	미토겐-활성화된 단백질 키나제 14 아이소폼 3
uc002kyg.1	MAPRE2	미소관-연관된 단백질, RP/EB 패밀리를,
uc003pdx.1	PRIM2	DNA 프리마제 폴리펩티드 2
uc003yta.1	ASAP1	발생 및 분화 강화 인자
uc004dby.2	IL1RAPL1	인터루킨 1 수용체 부속 단백질-유사 1
uc002jfl.1	CCDC46	46개 아이소폼 a를 포함하는 코일드-코일 도메인
uc002mlt.1	ZNF121	아연 핑커 단백질 121
uc010hyf.1	MAP3K13	미토겐-활성화된 단백질 키나제 키나제 키나제
uc003pqk.1	ASCC3	활성화 신호 공동통합자 1 복합체 소단위
uc001iyu.2	CCNY	시클린 Y 아이소폼 2
uc010dav.1	KIAA1267	가상 단백질 LOC284058
uc001cym.2	C1orf168	가상 단백질 LOC199920
uc010hjs.1	FKSG52	호모 사피엔스 FKSG52 (FKSG52) mRNA, 완전한 cds.
uc004enz.1	COL4A5	유형 IV 콜라겐 알파 5 아이소폼 2 전구물질
uc003ewz.2	CP	세룰로플라스민 전구물질
uc003xzm.2	STAU2	스타우펜 호모로그 2
uc001uqv.1	WASF3	WAS 단백질 패밀리를, 멤버 3
uc001xip.1	FUT8	퓨코실전달효소 8 아이소폼 a
uc003srz.1	PHF14	PHD 핑거 단백질 14 아이소폼 1
uc003cdu.2	SLC4A7	용질 담체 패밀리를 4, 중탄산염나트륨
uc003ndc.1	CDKAL1	CDK5 조절 소단위 연관된 단백질
uc002soy.1	TCF7L1	HMG-박스 전사 인자 TCF-3
uc003khn.1	DKFZp564C0362	HSPC116.
uc003weu.1	CNTNAP2	세포 인지 분자 Caspr2 전구물질
uc002rqx.1	HNRPLL	이질성 핵 리보핵산단백질 L-유사
uc002qxf.1	KIAA1106	KIAA1106 단백질의 호모 사피엔스 mRNA, 부분적 cds.
uc003vjd.1	CFTR	낭성섬유증 막경유 전도도
uc001uus.1	KL	klotho
uc003mag.2	LOC100131897	가상 단백질 LOC100131897
uc001ymb.1	RCOR1	REST 코리프레서 1
uc001svw.1	SYT1	시냅토타그민 I
uc001dpg.2	FAM69A	가상 단백질 LOC388650
uc003zoe.2	MLLT3	골수성/림프구 또는 혼합된 계통 백혈병
uc001rgd.2	BCAT1	가지화된 쇠 아미노전달효소 1, 세포핵
uc002rpl.1	VIT	비트린
uc002dby.2	SNX29	소탕 백신 29
uc002rgr.1	DTNB	디스트로브레빈, 베타 아이소폼 2
uc003etm.1	CLSTN2	칼시네틴 2
uc002rso.1	MTA3	전이 연관된 1 패밀리를, 멤버 3
uc003vfq.1	IMMP2L	IMP2 내층 미토콘드리아 막 단백질분해효소-유사
uc001csy.1	OSBPL9	옥시스테롤 결합 단백질-유사 9 아이소폼 a
uc001xbu.1	FBXO34	F-박스 유일한 단백질 34
uc001hxt.1	ERO1LB	세포질세망 산화환원 1-L베타
uc001tsp.1	ACAD10	아실-코엔자임 A 탈수소효소 패밀리를, 멤버 10
uc001uur.1	klotho	호모 사피엔스 klotho mRNA, 완전한 cds.
uc003dpm.1	CNTN3	콘택틴 3
uc009vxf.1	KLF17	아연 핑커 단백질 393
uc001zvw.1	SEMA6D	세마포린 6D 아이소폼 1 전구물질
uc001wwj.2	MDGA2	MAM 도메인 내포 1 아이소폼 1
uc003jfa.1	CTNND2	카테닌 (카드헤린-연관된 단백질), 델타 2
uc003hrq.1	ABCG2	ATP-결합 카세트, 하위-패밀리를 G, 멤버 2
uc003jpe.2	NDUFS4	NADH 탈수소효소 (유비퀴논) Fe-S 단백질 4
uc002dmc.1	PRKCB	단백질 키나제 C, 베타 아이소폼 2

uc002cyq.1	BC108660	호모 사피엔스 cDNA 클론 IMAGE:5244947, **** WARNING: 키메라 클론 ****.
uc001rah.2	LRP6	저밀도 지질단백질 수용체-관련된 단백질
uc001loj.2	SIRT3	시르투인 3 아이소폼 b
uc001clo.1	BC031250	호모 사피엔스 cDNA, FLJ98406.
uc001ynk.2	C14orf153	염색체 14 개방 해독틀 153
uc002glu.2	PIK3R5	포스포이노시티드3-키나제 조절 소단위 5 (PI3-키나제 조절 소단위 5) (PI3-키나제 p101 소단위) (PtdIns-3-키나제 p101) (p101-PI3K) (포스파티딜이노시톨-4,5-비스포스페이트 3-키나제 조절 소단위) (PtdIns-3-키나제 조절 소단위) (단백질 FOAP-2).
uc003edq.2	GPR156	G 단백질-결합된 수용체 156
uc001gww.1	NAV1	뉴런 네비게이터 1
uc001tvz.1	C12orf49	가상 단백질 LOC79794
uc002ckj.1	LMF1	리파제 성숙 인자 1
uc004deo.2	BCOR	BCL-6 상호작용 코리프레서 아이소폼 b
uc003dwd.1	CBLB	Cas-Br-M (뮤린) 동종지향성 레트로바이러스성
uc002agx.1	RORA	RAR-관련된 올판 수용체 A 아이소폼 a
uc002lmi.1	ZNF236	아연 핑커 단백질 236
uc002tpr.1	UGCG1	UDP-포도당 세라미드 글루코실전달효소-유사 1
uc001rts.1	TUBA1C	튜블린 알파 6
uc001xzm.1	SMEK1	SMEK 호모로그 1, mek1의 억제인자
uc002qgw.1	ZNF606	아연 핑커 단백질 606
uc003emz.2	TMCC1	막경유 및 코일드-코일 도메인 패밀리 1
uc001znl.1	CHP	칼슘 결합 단백질 P22
uc001asd.1	FRAP1	FK506 결합 단백질 12-라파마이신 연관된
uc003cdr.1	NEK10	NIMA (유사분열 유전자 a에 절대 없는)-관련된 키나제 10.
uc002qtb.2	SLC27A5	호모 사피엔스 매우 긴-쇄 아실-CoA 합성효소 호모로그 2 mRNA, 완전한 cds.
uc001lol.2	PSMD13	프로테아좀 26S 비-ATPase 소단위 13 아이소폼 1
uc001eeg.1	DCLRE1B	DNA 가교 복구 1B (PSO2 호모로그, S.
uc002jhm.1	PRKAR1A	cAMP-의존적 단백질 키나제, 조절
uc002qnz.1	ZIM3	아연 핑커, 각인된 3
uc004bfu.1	SUSD1	스시 도메인 함유 1
uc001xuz.2	C14orf145	가상 단백질 LOC145508
uc002cne.1	C16orf73	가상 단백질 LOC254528
uc002qqv.1	AK000879	호모 사피엔스 cDNA FLJ10017 fis, 클론 HEMBA1000508.
uc001zmq.1	FAM82A2	서열 유사성 82, 멤버 A2를 갖는 패밀리
uc001eeb.2	AP4B1	어댑터-관련된 단백질 복합체 4, 베타 1

[0143]

흥미로운 것은, 식별된 유전자들중 5개, *CCNY*, *LRP6*, δ -카테닌, *MED13* 및 *TCF7L1* 를 포함하는 유전자는 WNT 경로의 공지 성분에 속한다(도 4). RAS와 WNT 시그널링 경로 사이의 상관관계는 명확하게 이해되지 않았지만, 길항작용과 상승작용 모두 보고되었다. 상기 WNT 경로의 활성화 만으로 종양유발 RAS 세포의 성장을 손상시킬 수 있다는 것을 증명하기 위하여, Dox 유도시에 *LRP6*, *TCF7L1*, β -카테닌 또는 δ -카테닌을 조건적으로 과발현시키는 안정적인 AML-RAS와 TRI-102 세포주를 만들었다. 유전자 스크린의 결과를 확인하는데, 이들 유전자들중 임의의 유전자의 유도된 과발현으로 특이적으로 AML-RAS 세포의 성장이 저해되지만, TRI-102 세포의 성장은 저해되지 않는다 (도 5a 및 5b). 이들 데이터로부터 트랜스포존 삽입-유도된 또는 전이유전자 과발현에 의한 WNT 경로 활성화로 인하여 AML-RAS 세포 성장이 길항되는 점이 제시된다. 나란하게, AML-RAS 세포 성장의 손상에 대한 779개의 키나제 유전자들의 키놈 siRNA 스크린이 실행되었으며, WNT 시그널링을 저해하는 것으로 이미 나타난 9개 유전자가 확인되었으며 (표 2), *PB* 트랜스포존 기능 획득 스크린 방법의 독립적 증명으로 제시된다.

표 2

키놈 siRNA 스크린으로부터 후보 유전자 목록

[0144]

유전자 기호	설명	WNT 시그널링의 음성 조절자
CHEK1	CHK1 체크포인트 호모로그 (<i>S. pombe</i> (<i>S. pombe</i>))	
CINP	CDK2-상호작용 단백질	

CLK1	CDC-유사 키나제 1	X
ADRB2	아드레날린, 베타-2-, 수용체, 표면	
TEX14	교환 발현된 14	
WEE1	WEE1 호모로그 (<i>S. pombe</i>)	X
BRAF	v-raf 뮤린 육종 바이러스성 종양유전자 호모로그 B1	X
C6ORF199	염색체 6 개방 해독물 199	X
CAMK1D	칼슘/칼모둘린-의존적 단백질 키나제 ID	
CDADC1	시티딘 및 dCMP 탈아미노효소 도메인 함유 1	
CDC42BPA	CDC42 결합 단백질 키나제 알파 (DMPK-유사)	
COPB2	코타머 단백질 복합체, 소단위 베타 2 (베타 프라임)	
CSNK2A2	카세인 키나제 2, 알파 프라임 폴리펩티드	X
DGKB	디아실글리세롤 키나제, 베타 90kDa	
DGKI	디아실글리세롤 키나제, 이오타	
DGKQ	디아실글리세롤 키나제, 세타 110kDa	
DGKZ	디아실글리세롤 키나제, 제타 104kDa	
EPHA6	EPH 수용체 A6	
DLG3	디스크, 큰 호모로그 3 (신경내분비-dlg, 초파리)	
DMPK	이영양증 근긴장-단백질 키나제	
DUSP1	이중 특이성 포스파타제 1	
DUSP8	이중 특이성 포스파타제 8	
RAPGEF3	Rap 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자 (GEF) 3	
ETNK2	에탄올아민 키나제 2	
TPRXL	테트라-펩티드 반복 호메오박스-유사	
FYB	FYN 결합 단백질 (FYB-120/130)	
GALK2	갈락토키나제 2	
GRK7	G 단백질-결합된 수용체 키나제 7	X
GSK3A	글리코젠 합성효소 키나제 3 알파	X
ILK	인테그린-연결된 키나제	
INSR	인슐린 수용체	
MGC26597		
MINK	미사켄-유사 키나제 1 (제브라피쉬)	
MYLK	미오신, 경쇄 키나제	X
NAGK	N-아세틸글루코사민키나제	
NEK11	NIMA (유사분열 유전자 a에 절대 없는)-관련된 키나제 11	
PCTK3	PCTAIRE 단백질 키나제 3	X
PDGFRB	혈소판-유도된 성장 인자 수용체, 베타 폴리펩티드	
PLK1	폴로-유사 키나제 1 (초파리)	
PRKAG3	단백질 키나제, AMP-활성화된, 감마 3 비-촉매성 소단위	
PRKCH	단백질 키나제 C, 에타	
RPS6KA5	리보솜 단백질 S6 키나제, 90kDa, 폴리펩티드 5	

[0145] 트랜스포존 기능 획득과 siRNA 기능 상실 스크린 모두에 의해 다수의 WNT 시그널링 유전자들이 식별될 수 있다는 사실은 상기 WNT 경로가 종양유발 RAS에 대한 주요 길항 신호이며, 잠재적 치료 표적라는 것을 강력하게 보여준다.

[0146] AML-RAS 세포에 있어서 WNT 경로의 약학적 활성자의 효과가 분석되었다. 우선, 양극성 장애에 대한 약물이며, WNT 시그널링의 활성자인 GSK3 억제제, 염화리튬 (LiCl)이 이용되었다. 20mM LiCl로 치료하면 AML-RAS 세포의 성장은 손상되지만, TRI-102 세포의 성장은 손상되지 않았다 (도 6 및 7). 그 다음 다른 2가지 소분자 GSK3 억제제, 퀴나올론과 BIO를 테스트하였다. 다시, 이들 두 화합물은 특이적으로 AML-RAS 세포의 성장을 저해하지만, TRI-102 세포의 성장을 저해하지는 않는다 (도 7). RAS-유도된 종양유발 성질에 있어서 WNT 경로 활성화 효과를 더 검사하기 위하여, 연한천 분석을 통하여 LiCl의 효과를 테스트하였고, AML-RAS 세포의 부착-독립적 성장이 저지된다 것을 알았다 (도 8a 및 8b). 끝으로, AML-RAS 이종이식편에서 LiCl의 생체 효과를 검사하였으며, 종양 성장이 급격하게 억제된다는 것이 밝혀졌다 (도 9a-9c). 추가적으로, 상기 종양-억제 투여량의 약물을 제공받은 마우스의 건강은 영향을 받지 않았다 (도 9a-9c). AML-RAS 세포에 대한 이와 같은 시험관 내 및 생체내 결과에서 WNT 시그널링의 약학적 활성화는 종양유발 RAS 돌연변이를 가진 암에 대항하여 잠재적

치료효과를 제공함을 나타낸다.

- [0147] 3가지 약학적 GSK 억제제 LiCl, 켄과울론 및 BIO를 이용한 17명의 환자로부터 유도된 암 세포 패널이 테스트되었다. 이들 암 세포는 폐, 결장, 췌장, 및 흑색종 암이 포함된 내인성 종양유발 RAS 돌연변이를 공통적으로 품고 있는 상이한 종양 유형을 나타낸다. AML-RAS와 유사하게, WNT의 약리학적 활성화는 G12 또는 KRAS내 다른 위치에서 내인성 종양유발 돌연변이를 품고 있는 환자로부터 유도된 암 세포의 성장을 억제한다(도 10). 더욱이, NRAS 및 HRAS에서 종양유발 돌연변이를 갖는 암세포의 성장 또한 억제되었다 (도 10). 이러한 길항작용은 검사된 모든 유형의 종양에서 나타난다. 그러나, WNT 활성화에 의해 유의적으로 이의 성장이 억제되지 않은 한 가지 예외적으로, A549 폐 암 세포가 발견되었다. 흥미로운 것은, A549 세포는 상기 WNT 경로의 활성화 표적 유전자들에게 필요한 SWI/SNF 크로마틴 재구성 복합체 성분인 *SMARCA4*에서 프레임 이동 결실을 포함한다. 이것과 일관되게, *SMARCA4* 돌연변이를 품고 있지 않은 H1792 폐암 세포와 대조적으로, 상기 WNT 경로의 상류 활성화자의 과발현은 A549세포의 성장을 억제시키지 못하였다(도 11a 및 11b). 더욱이, LiCl는 H1792 세포의 부착-독립적 성장을 완전하게 저해하였지만, A549 세포를 저해하지는 못하였다 (도 12a 및 12b). 이와 함께, 상기 WNT 경로의 활성화는 종양유발 RAS 돌연변이를 품고 있는 종양 세포에 대하여 광범위한 길항 효과를 가진다는 것이 이들 데이터로부터 설명된다. 게다가, 상기 WNT 경로의 활성화는 상이한 유형의 종양에 대해서도 유리한 예후와 관련되어 있었다.
- [0148] 요약하면, 인간 세포에서 앞으로의 유전자 스크린을 위한 새로운 조건적 기능 획득 삽입 돌연변이유발 방법이 확립되었다. 이 기술은 음성적으로 선별된 돌연변이에 관한 스크리닝을 가능하고 하고, RAS 암 세포의 성장 및 생존을 선택적으로 손상시키는 변이 및 경로에 대한 계놈에 관한 정보를 허용한다. 원리의 증명으로써, 상기 WNT 경로의 활성화는 종양유발 RAS를 길항한다는 것이 발견되었고, 효과적인 치료가 부족한 광범위한 암에 대하여 잠재적 치료 표적들 및 물질을 제공한다. 이와 같은 비용-효과적이고 강력한 유전적 방법은 확장가능하고, 상당한 변통성이 있어, 특이적 돌연변이 조성물을 갖는 종양에 대하여 치료 표적을 연구자들이 신속하게 확인할 수 있도록 하며, 이는 개별화된 약물에 특히 매력적이다.
- [0149] 본원의 실시예 2의 결과를 지금 설명한다.
- [0150] 실시예 2: *PB* 트랜스포존-기반의 조건적 돌연변이유발 스크린.
- [0151] 많은 수의 넢코딩 유전자들에 대하여 기능적으로 정보를 얻는 앞으로의 유전적 방법이 필요하다. 인간 계놈에서 넢코딩 유전자들의 대체 스플라이싱 및 제한된 특징화가 복잡되어, 전체 계놈 정보화를 실행하기 위한 전체적인 유전자 활성화 방법이 설명된다. 고-처리량 서열화 분석과 결합된 *piggyBac* (*PB*) 트랜스포존 돌연변이유발-기반의 조건적 발현 시스템을 이용한 스크리닝 방법이 개발되었다. 이 방법을 이용하여, 종양유발 *KRAS*를 발현시키는 암 세포의 성장 및/또는 생존을 손상시키는 유전자들에 대한 음성적 선별 스크리닝이 실행되었다. 1회의 *PB* 돌연변이유발에서 18,032개 단백질-코딩 유전자들, 10,362개 긴 넢코딩 RNA (lncRNA)와 8,683개의 가상유전자(pseudogene)들이 성공적으로 정보화되었다. 흥미로운 것은, 상기 WNT 시그널링 경로의 단백질-코딩 및 넢코딩 성분들 모두 종양유발 RAS를 특이적으로 길항하는 것으로 나타났다. 더욱이, WNT 시그널링의 유전적 및 약리학적 활성화는 종양 유형에 따라 상이한 종양유발 RAS 돌연변이를 갖는 환자로부터 유도된 암 세포에 있어서 광범위하게 효과가 있었다는 것이 밝혀졌다. 본원에서 제공된 *PB* 돌연변이유발 스크리닝 방법으로 라이브러리 생성 및 유지와 관련된 비용 없이 단백질-코딩 및 넢코딩 유전자들 모두를 기능적으로 정보화시키는 전체 계놈 분석 플랫폼이 허용된다. 이러한 특징은 질환 및 생물학 연구를 위한 광범위한 응용이 가능하게 되며, 개별특화된 치료법을 위한 경로 및 표적을 식별해내기 위하여 개별 환자로부터 유도된 종양 세포에서 일상적으로 실시될 수 있는 스크리닝에 대한 가능성도 열린다.
- [0152] 트랜스포존은 하등 유기체에서 기능적 계놈 도구로 광범위하게 이용되어 왔었다. *PB* 트랜스포존은 인간과 마우스 계놈에 효과적으로 동원될 수 있다. 더욱이, *PB* 삽입 돌연변이유발은 암 구동자와 약물 저항 유전자들을 식별해내는데 이용되어 왔었다. 이의 적용을 확장시키기 위하여, 단일 형질감염에 의해 삽입 돌연변이 고-범위 계놈-범위 라이브러리를 만들고, 이를 인간 세포 계놈에 대한 신속한 정보화를 위하여 고-처리량 서열화에 복합되는 *PB*의 능력이 테스트되었다. 라이브러리-기반 기술과 비교하기 위하여, 트랜스포존 벡터에 의한 무작위 삽입 돌연변이유발은 라이브러리 생산 및 유지에 대한 비용 및 노동력을 회피할 뿐만 아니라 단백질-코딩 유전자들에 추가하여 넢코딩 계놈의 정보화에 대한 능력도 제공한다.
- [0153] 돌연변이를 유도하는 많은 흔한 암은 직접적으로 표적화하는 것이 어렵다. 종양유발 RAS 돌연변이를 품고 있는 종양 세포의 성장 및 생존을 특이적으로 손상시키는 유전자들과 경로를 식별해내기 위한 이러한 *PB* 돌연변이 유발 응용성이 측정되었다. 이러한 목적을 위하여, 음성적으로 선별된 유전자를 식별해내는데 이용될 수 있는 유

도성 트랜스포존 (*PB[Mut-tetO-KAT-TETKRAB]*, 도 16)이 기획되었다. *PB[Mut-tetO-KAT-TETKRAB]*는 Katushka (KAT) 형광 표지의 공동-발현에 의한 트랜스포존 유도된 유전자들을 포함하는 세포의 삽입 및 표지 시에 내인성 유전자의 상향조절을 구동하는 독시사이클린 (Dox)-유도성 시스템을 이용한다. 종양유발 RAS를 품고 있는 세포를 특이적으로 손상시키는 유전자들을 식별해내기 위하여, 동종동계 세포 쌍 세포, TRI-102, 환자로부터 유도된 TSC2-결핍 혈관근지방종 세포주, 및 AML-RAS, *KRAS*^{G12V} 형질변환된 TRI-102 세포가 이용되었다. AML-RAS 세포는 증가된 증식 및 정착-독립적 성장 (도 13a 및 13b)을 나타내었고, 활성화된 RAS 돌연변이를 가진 환자로부터 유도된 암 세포에 의해 공통적으로 나타나는 특징을 변환시켰다.

[0154] 스크린을 실행하기 위하여, *PB[Mut-tetO-KAT-TETKRAB]* 및 전위효소 *PBase*의 공동-형질감염에 의해 코딩 게놈 및 넌-코딩 게놈에 걸쳐 트랜스포존 삽입을 품고 있는 다양한 세포 풀을 만들었다(도 16). 그 다음 트랜스포존 유도된 유전자들을 내포하는 세포들은 KAT-양성 세포에 대한 세포 분류에 의해 풍부해졌다 (도 17). 그 다음, 이들 돌연변이된 세포는 확장되었고, 균등하게 두개 풀로 분할되었다. 음성적으로 선별된 유전자들을 식별해내기 위하여, 하나의 풀은 Dox없이 배양되었고 (Dox- 풀), 다른 하나의 풀은 유전자 발현을 유도하기 위하여 Dox 존재하에서 (Dox+ 풀) 연속적으로 배양되었다 (도 16). 5 일 후, 2개 풀로부터 게놈 DNA가 추출되었고, 트랜스포존 삽입 부위들의 DNA 단편들은 바이오틴-스트렙타아비딘 포획 프로토콜에 이어 Illumina 고-처리량 서열화에 의해 회수되었다 (도 14). 끝으로, 트랜스포존 의존적 유전자 발현 (\log_2 Dox-/Dox+) 유도시 적어도 2배 결실된 또는 풍부해진 부위들을 식별해내기 위하여 이들 두 풀 간의 각 삽입 부위에 대한 서열화 판독을 비교하였다 (도 1).

[0155] 1회의 돌연변이유발에서 총 422,746개의 트랜스포존 삽입 부위가 회수되었으며, 맵핑되었고, 이때 326,511개는 18,032개 단백질-코딩 유전자들 안에 위치되었으며, 121,344개는 10,362개 lncRNAs에 맵핑되었고, 8,683는 가상 유전자들이었다 (도 21). 평균적으로, 각 단백질-코딩 유전자는 18개의 상이한 삽입 돌연변이를 내포하였고, 한편 각각의 긴 넌코딩 표적은 6개를 품고 있었다. 상기 삽입은 우선 결실된 부위들 (\log_2 비율>1, 2fold Dox- 부위, Mi) 또는 풍부해진 부위들 (\log_2 비율<-1, 2fold Dox+ 부위, Pi)로 분류되었고, 그 다음 각 유전자 안에 모든 부위의 결실 또는 풍부를 분석하였다 (도 18). 유전자가 세포 적응도를 감소시킨다면; 풍부해진 삽입 부위들 (Pi)보다는 결실된 삽입 부위 (Mi)를 더 많이 내포하고 있어야 한다고 가정하였다 (도 18). Bernoulli 분포에 근거하여, 각 유전자에 대한 *p*-값이 산출되었고, 340개의 단백질-코딩 후보 유전자들 (*p*<0.0005) 및 259개의 lncRNAs 및 가상유전자들 (*p*<0.01) (도 22 및 23)이 식별되었다. 이들 후보 유전자중에서, MAPK14 및 BRAP가 포함된 RAS의 확립된 음성적 조절물질은 상기 스크린에 의해 종양유발 RAS를 길항하는 유전자들이 성공적으로 식별되었다는 증거를 제공한다.

[0156] 그 다음, RAS 세포 증식 및 생존을 손상하는 주요 경로를 식별해내기 위하여 후보 유전자들에 대하여 생물정보 분석이 실행되었다. PANTHER 경로 분석이 단백질 후보 유전자들에 적용되었고, 식별된 경로의 12개 성분(LRP6, α -, δ -카테닌, TCF7L1, CSNK1G1, CCNY, PCDH15, GNG7, INO80, SMARCC1, PRKCA, 및 MED13; 도 18)에 의해 상기 WNT 시그널링 경로가 가장 의미적으로 풍부해진 것으로 드러났다. 넌코딩 유전자들의 경우, 식별된 단백질-코딩 유전자들에 의한 발현 프로파일은 Human BodyMap 2.0를 이용하여 우선 비교되었는데, 이 프로파일은 16개의 상이한 조직으로부터 발현 데이터를 포함한다. Pearman 상관 계수 분석에서 식별된 단백질-코딩과 넌코딩 유전자들은 유사한 생물학적 과정에서 공동-조절 및 관련을 나타내는, 일치되는 발현 패턴을 보이는 것으로 드러났다 (도 19). 그 다음, 넌코딩 유전자들중에서 RNA 결합 단백질 (RBP) 네트워크가 분석되었고, EIF4A3, FUS, SRSF1 및 U2AF2 결합 부위들의 풍부성이 식별되었다 (*p*<0.0001; 도 20 및 25). 흥미로운 것은, 이들 RBP는 이어맞추기복합체의 성분이며, 이들중 3개는 WNT 시그널링을 조절하는 것으로 드러났다. 더욱이, 식별된 넌코딩 유전자들중 2개, MIAT 및 lncRNA-hLALR1은 이들 RBP에 대한 결합 부위들을 보유하고, 뿐만 아니라 WNT 시그널링을 촉진시키는 것으로 보고되었다. 이와 함께, 코딩 게놈 및 넌-코딩 게놈의 정보화에서 WNT 경로 활성화는 종양유발 RAS에 대항하였다.

[0157] RAS와 WNT 시그널링 경로 간의 상호작용이 명확히 이해되지는 않았는데, 이들 길항작용과 상승작용 모두 보고되었고; 그러나 길항적 상관관계는 키놈 siRNA 스크린에서 독립적으로 증명되었다 (도 24). 이러한 대립을 더 증명하기 위하여, WNT 경로의 4개 성분, *LRP6*, *TCF7L1*, β -카테닌 또는 δ -카테닌을 조건적으로 과발현시키는 안정적인 AML-RAS 및 TRI-102 세포주가 확립되었다. 상기 스크린의 결과와 일관되게, 이들 유전자들중 임의의 유도된 과발현으로 AML-RAS 세포의 성장이 특이적으로 저해되었다 (도 5a 및 5b).

[0158] 트랜스포존 기능 획득과 siRNA 기능 상실 스크린 모두에 의해 다수의 WNT 시그널링 유전자들이 식별될 수 있다는 사실은 상기 WNT 경로가 종양유발 RAS에 대한 주요 길항 신호이며, 잠재적 치료 표적라는 것을 강력하게 암

시한다. 따라서 WNT 경로의 약학적 활성자의 효과가 검사되었다. WNT 시그널링의 공지의 GSK3 억제제와 활성자인 20mM 염화리튬 (LiCl)으로 처리하면 AML-RAS 세포의 성장은 손상되지만, TRI-102 세포의 성장은 손상되지 않았다 (도 6 및 7). 다른 2가지 소분자 GSK3 억제제, 켄파울론과 BIO 또한 AML-RAS 세포의 성장을 특이적으로 저해하였다(도 7). RAS-종양 세포에 있어서 WNT 경로 활성화의 효과는 확립된 형질변환 분석에서 추가 검사되었다. LiCl은 연한천 분석에서 (도 8a 및 8b) 및 생체내 이중이식편 실험 (도 9a-9c)에서 RAS 종양 세포를 상당히 억제시켰다.

[0159] 이들 시험관내 및 생체내 결과에서 WNT 시그널링의 약학적 활성화는 종양유발 RAS 돌연변이를 가진 암에 대하여 잠재적 치료효과를 부여함을 나타낸다. 폐, 결장, 췌장, 및 흑색종 암이 포함된 내인성 종양유발 RAS 돌연변이를 공통적으로 품고 있는 상이한 종양 유형을 나타내는 환자로부터 유도된 17가지 암 세포 패널이 테스트되었다. WNT의 약리학적 활성화는 한 가지를 제외하고, 환자로부터 유도된 모든 암 계통의 성장을 억제하였다 (도 10). 비-반응성 세포, A549 폐 암 세포는 상기 WNT 경로의 활성화 표적 유전자들에게 필요한 *SMARCA4*에서 프레임 이동 결실을 포함한다. 더욱이, WNT 상류 활성자의 과발현 또는 LiCl 처리는 A549 세포의 부착 독립성 성장을 억제하지 못하였지만, H1792 세포를 강력하게 억제함으로써, WNT 경로 활성화가 주요 신호임을 강조하였다 (도 11a-11b 및 12a-12b). 중요한 것은, WNT 시그널링 활성화에 의한 성장 억제는 KRAS에서 G12 또는 다른 잔기에서의 종양유발 돌연변이에 제한되지 않으며, 뿐만 아니라 NRAS 및 HRAS에서 종양유발 돌연변이를 가진 세포에도 효과가 있었다 (도 10). 이와 함께, 상기 WNT 경로의 활성화는 종양유발 RAS 돌연변이를 품고 있는 종양 세포에 대하여 광범위한 길항 효과를 가진다는 것을 이들 데이터는 보여준다.

[0160] 요약하면, 인간 세포에서 앞으로의 유전자 스크린을 위한 *PB* 트랜스포존-기반의 조건적 돌연변이유발 방법이 확립되었다. 이 기술은 코딩 유전자들과 넢코딩 유전자들 모두에 대한 전체 게놈 정보화를 가능하게 하는 첫번째 플랫폼을 제공하였다. 원리의 증명으로써, 상기 WNT 경로의 활성화는 종양유발 RAS를 길항하였고, 효과적인 치료가 부족한 광범위한 암에 대하여 잠재적 치료 전략을 제공한다. 이러한 효과적인 접근방법은 확장가능하고, 상당한 변통성이 있으며, 라이브러리-기반 기술보다 상당히 저렴하고, 질환 및 생물학적 경로의 전체 게놈 기능적 정보화를 연구자들이 실행할 수 있도록 한다. 중요한 것은 이의 질이 개별 환자로부터 유도된 암세포에 특이적인 치료 표적과 경로를 확인하는데 이 방법을 일상적으로 이용할 수 있다는 점이다.

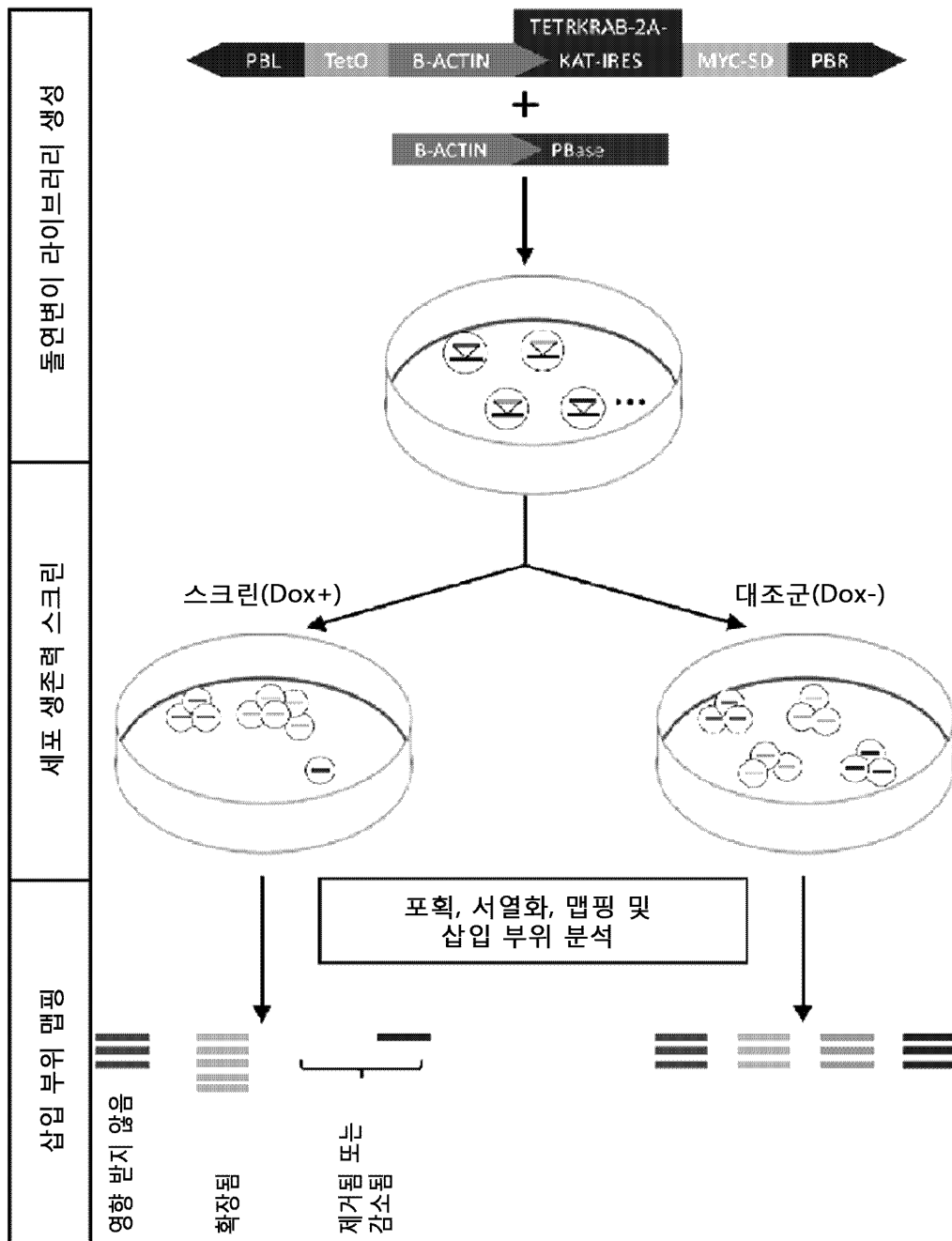
[0161] 기타 구현예들

[0162] 본원에서 임의의 가변적 정의에서 열거된 요소들의 언급은 열거된 임의의 단일 요소 또는 이의 조합(또는 준조합)으로써 변이의 정의를 포함한다. 본원의 구현예의 언급에는 임의의 단일 구현예 또는 임의의 다른 구현예 또는 이의 일부분과의 조합이 포함된다.

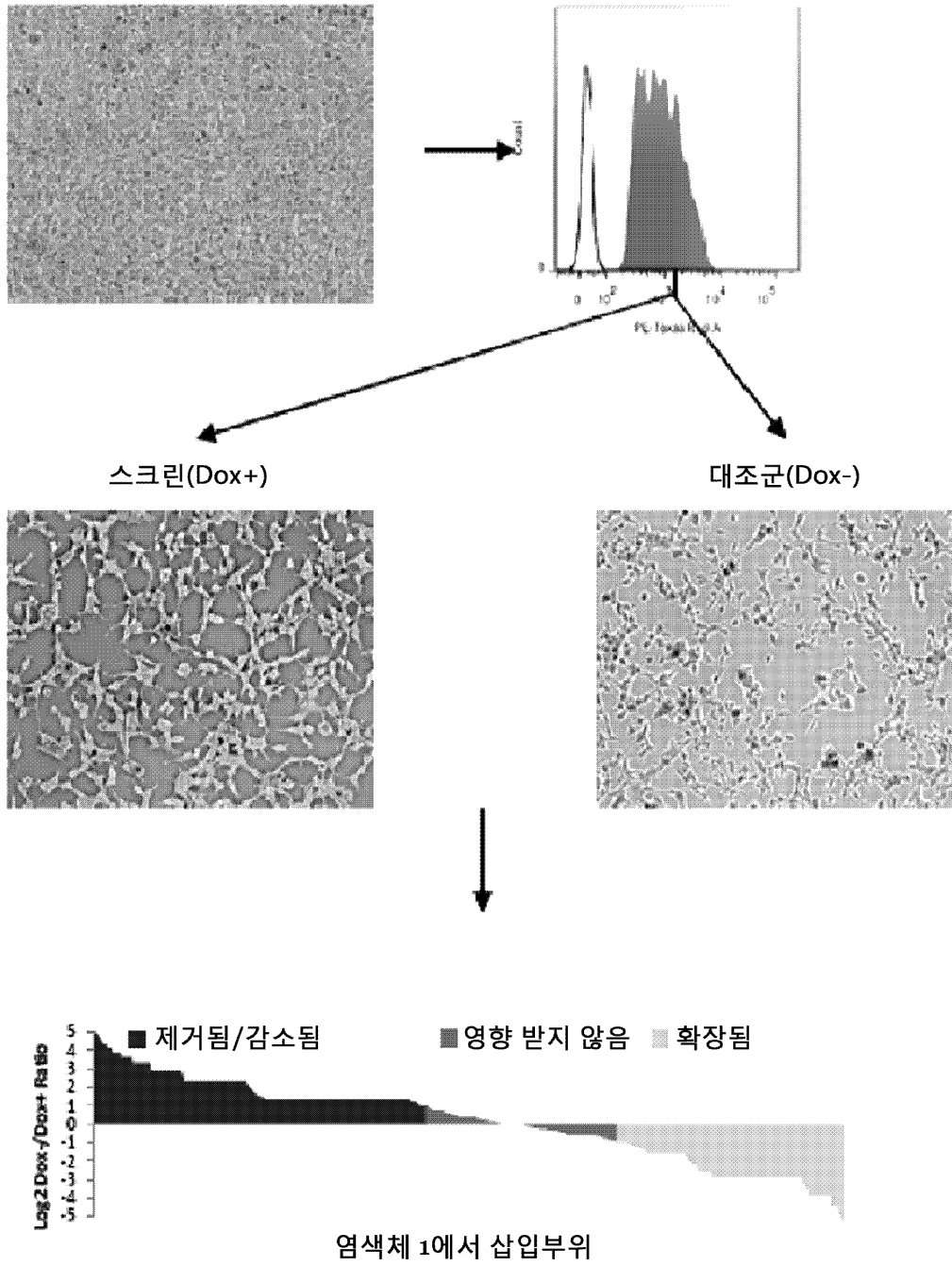
[0163] 본원에서 언급된 모든 개별 특허, 특허 출원 및 공개들은 이들의 전문이 참고자료에 편입된다. 본 발명은 특정 구현예를 참고하여 개시되었지만, 본 발명의 다른 구현예들 및 변이는 본 발명의 실질 사상 및 범위를 벗어나지 않고 당업자에 의해 고안될 수 있음이 자명하다. 첨부된 청구범위는 이러한 모든 구현예들과 등가의 변이를 포함하는 것으로 간주되어야 한다.

도면

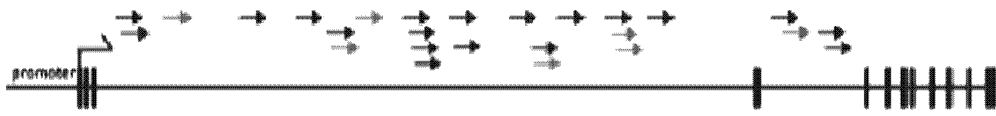
도면1



도면2

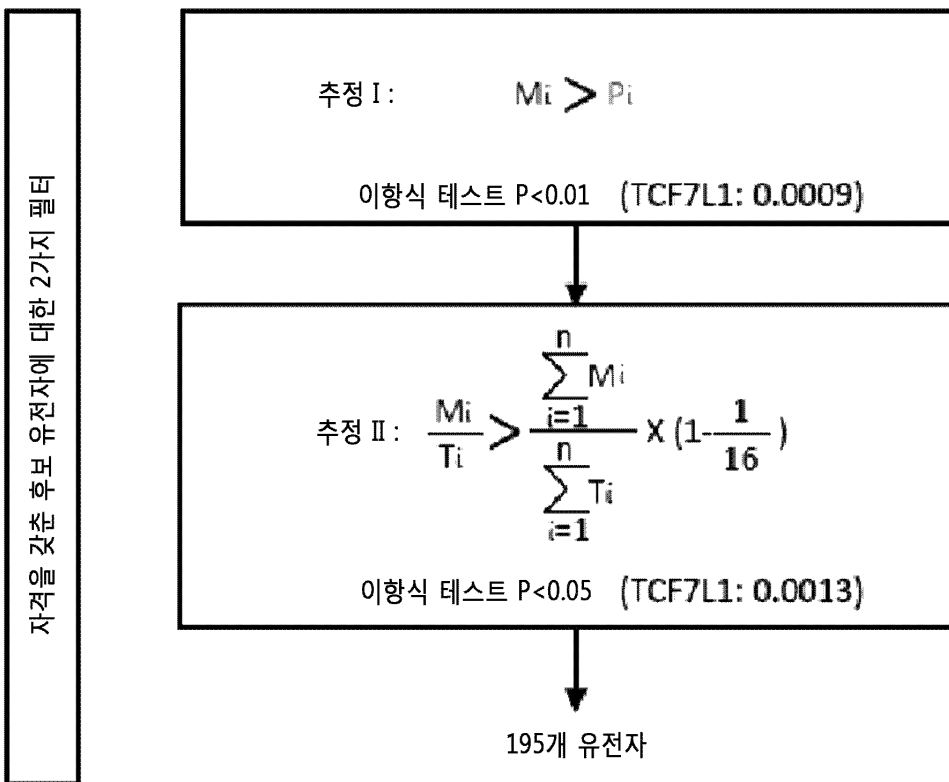


도면3

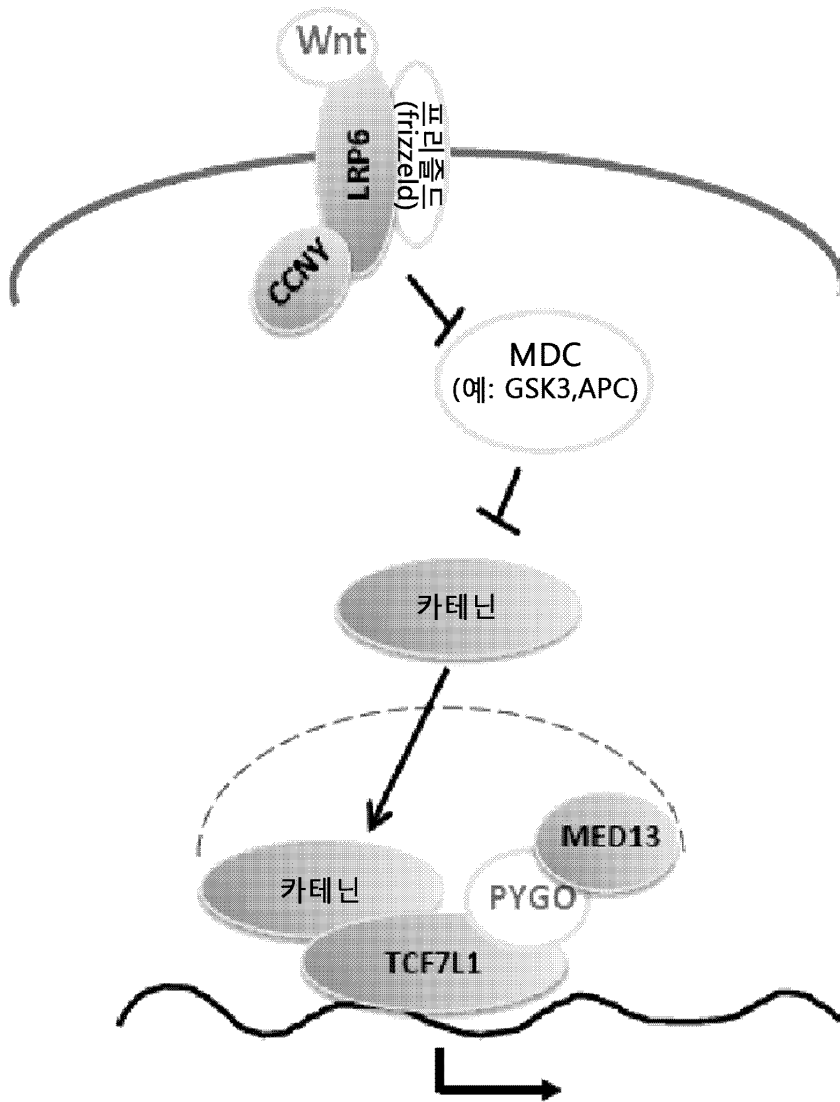


유전자 기호	유전자 ID	2fold Dox-부위(M)	2fold Dox+부위(P)	비편향 부위	총 삽입 부위(T)
TCF7L1	uc002soy.1	19	4	3	23

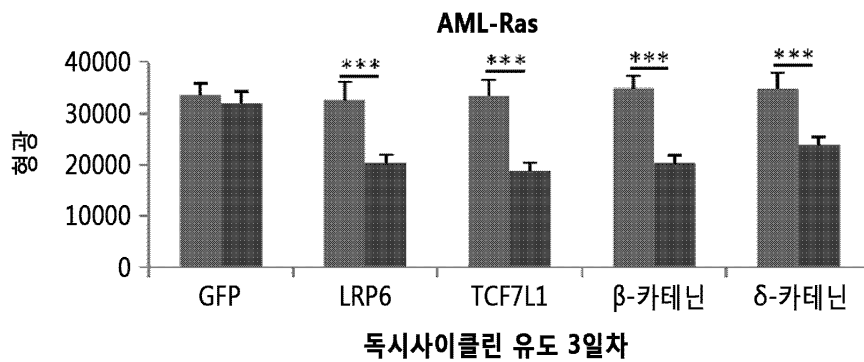
PB-유도된 과발현시 결손되는 유전자를 식별하기 위한 생물통계학적 분석



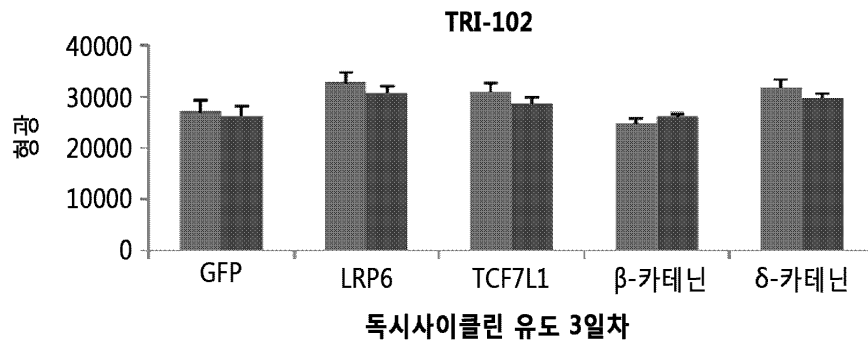
도면4



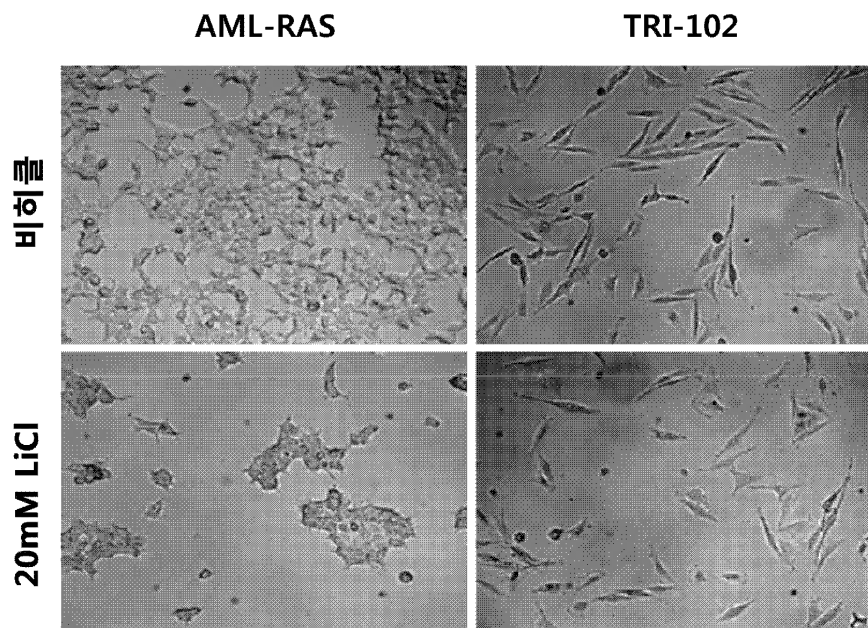
도면5a



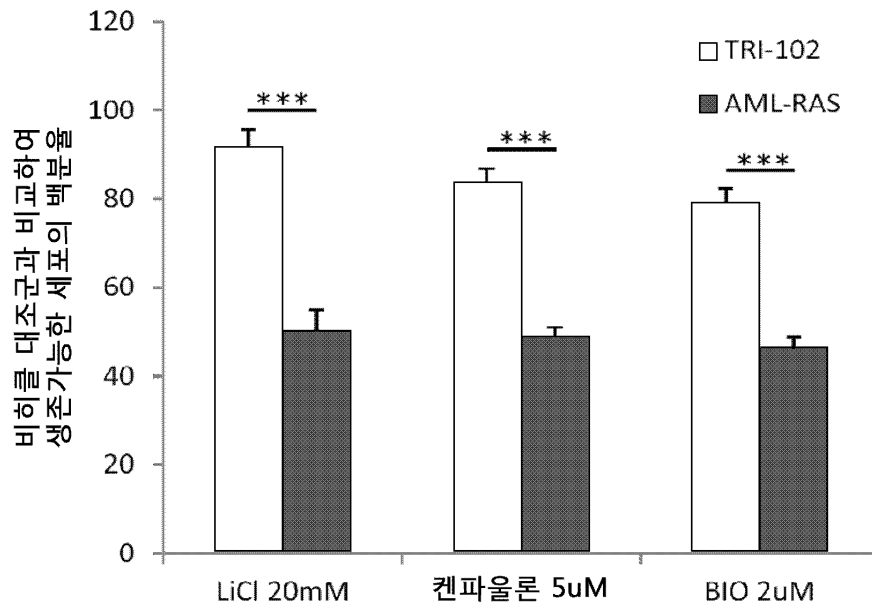
도면5b



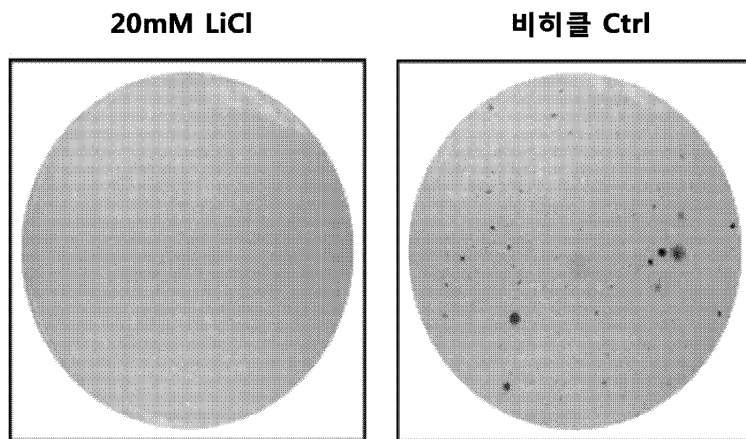
도면6



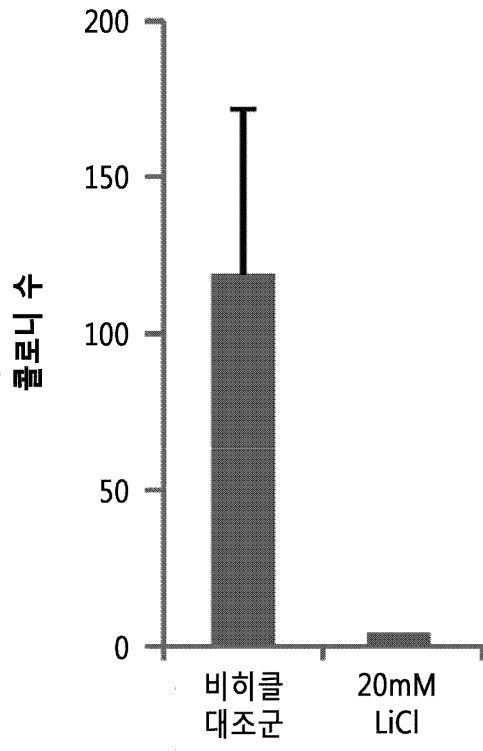
도면7



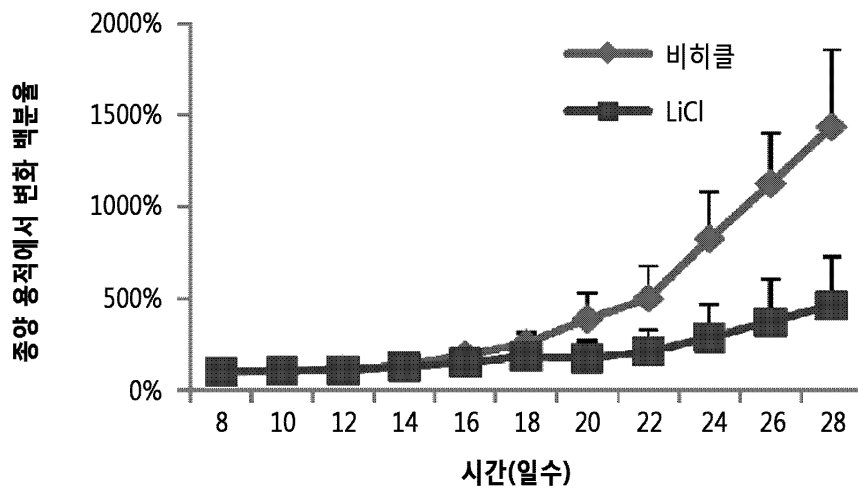
도면8a



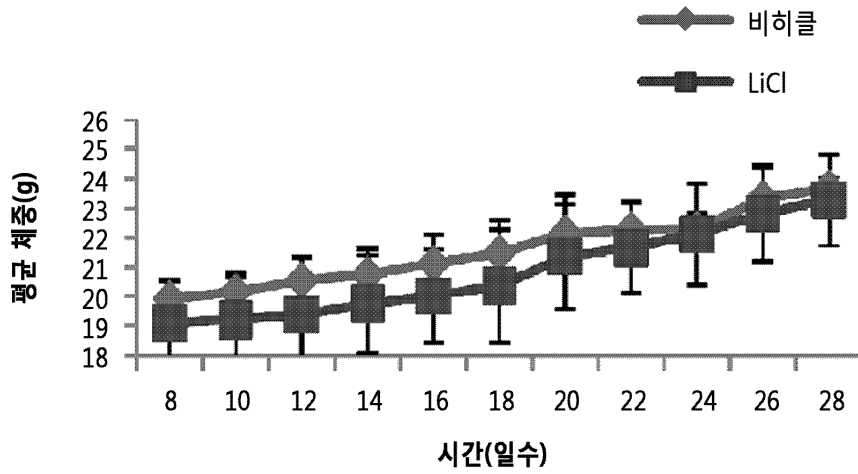
도면8b



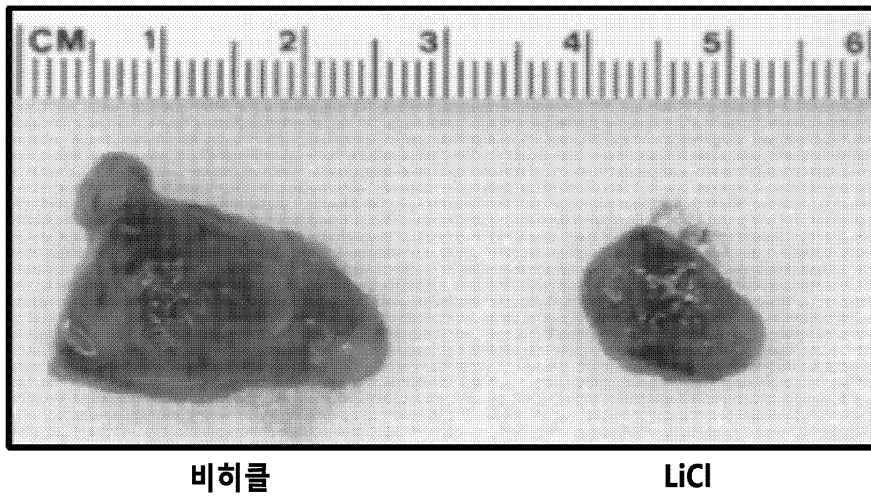
도면9a



도면9b



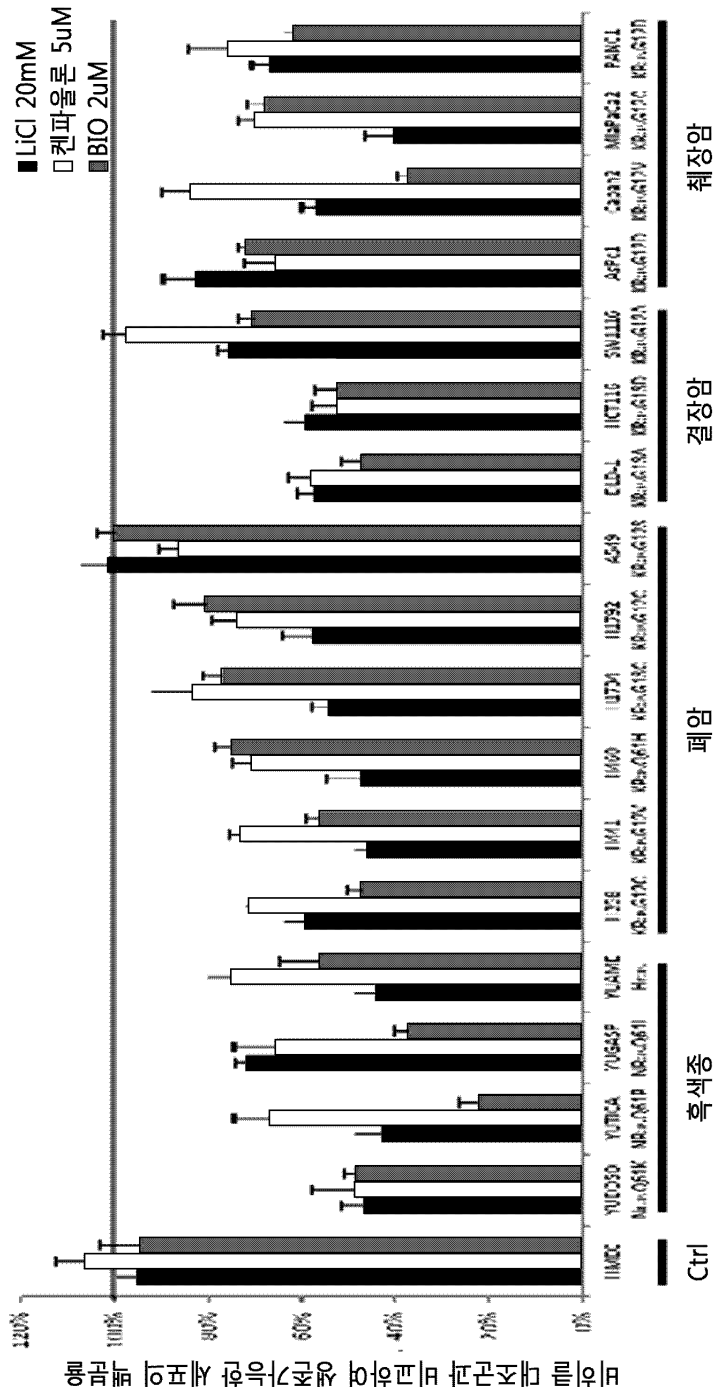
도면9c



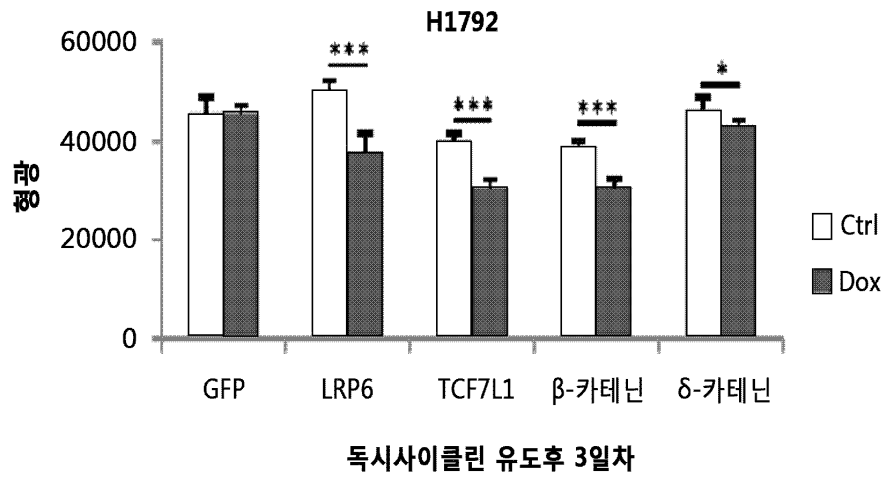
비히클

LiCl

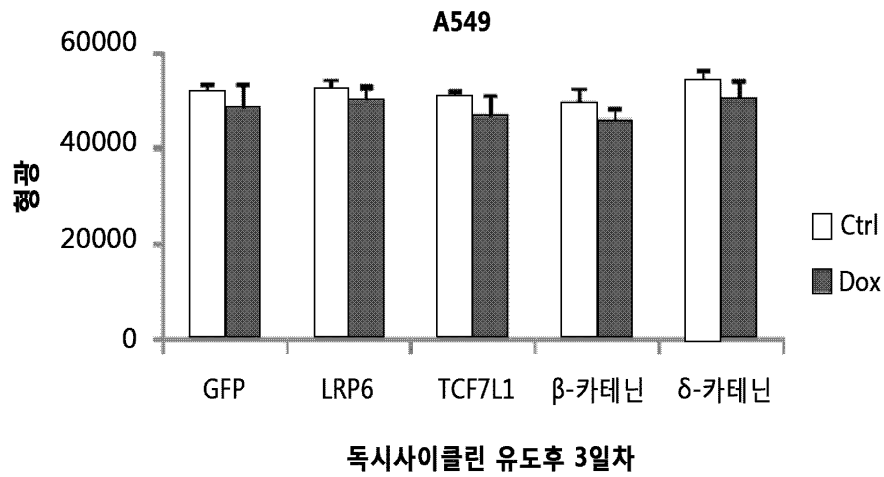
도면10



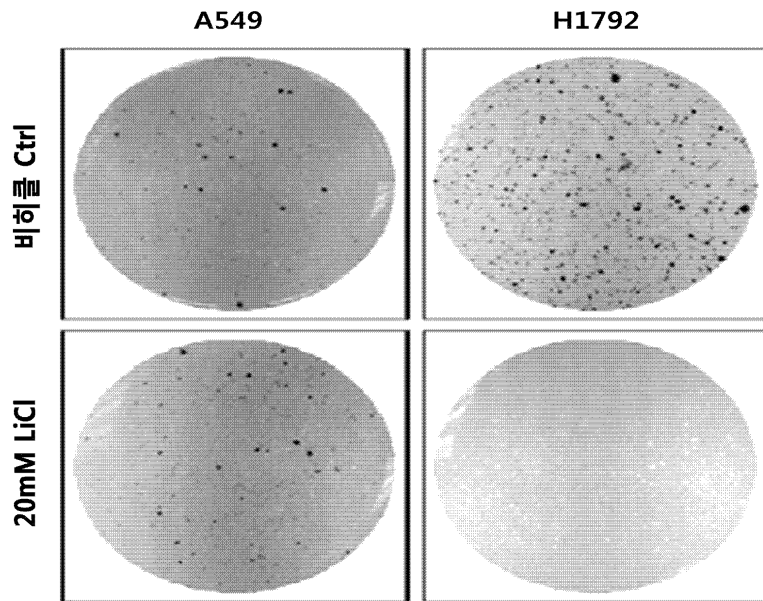
도면11a



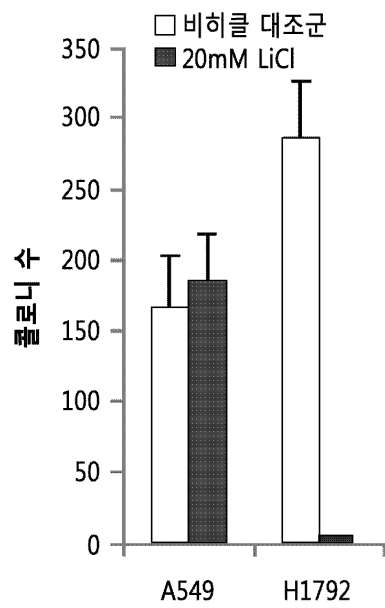
도면11b



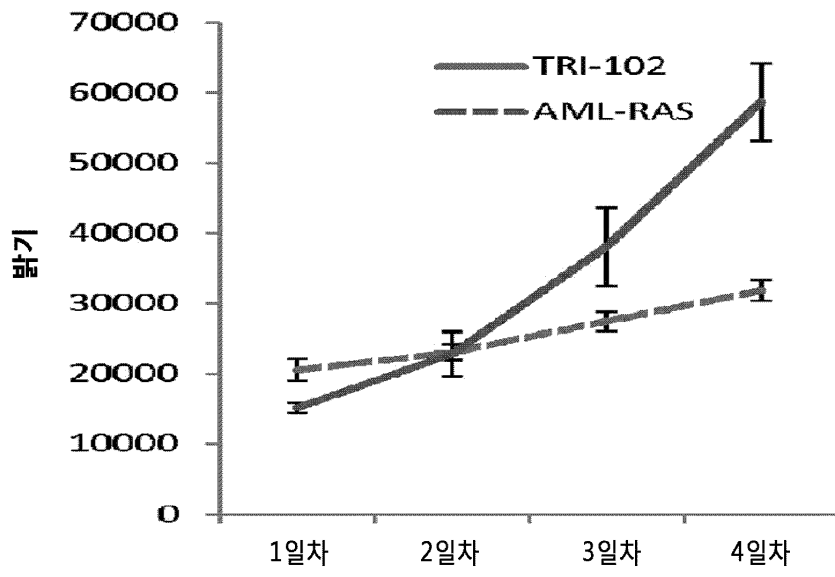
도면12a



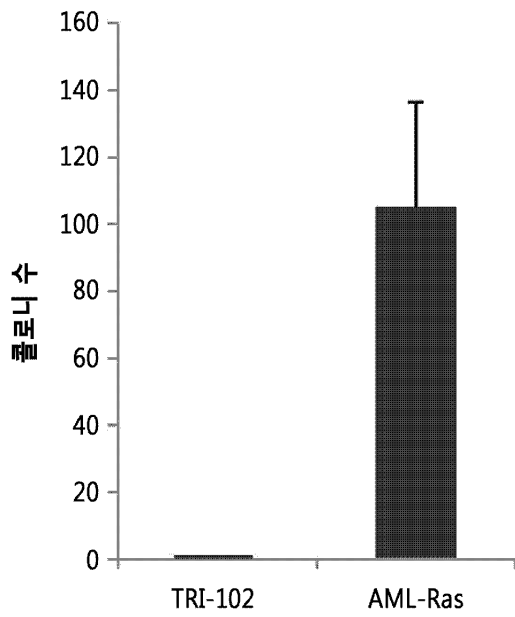
도면12b



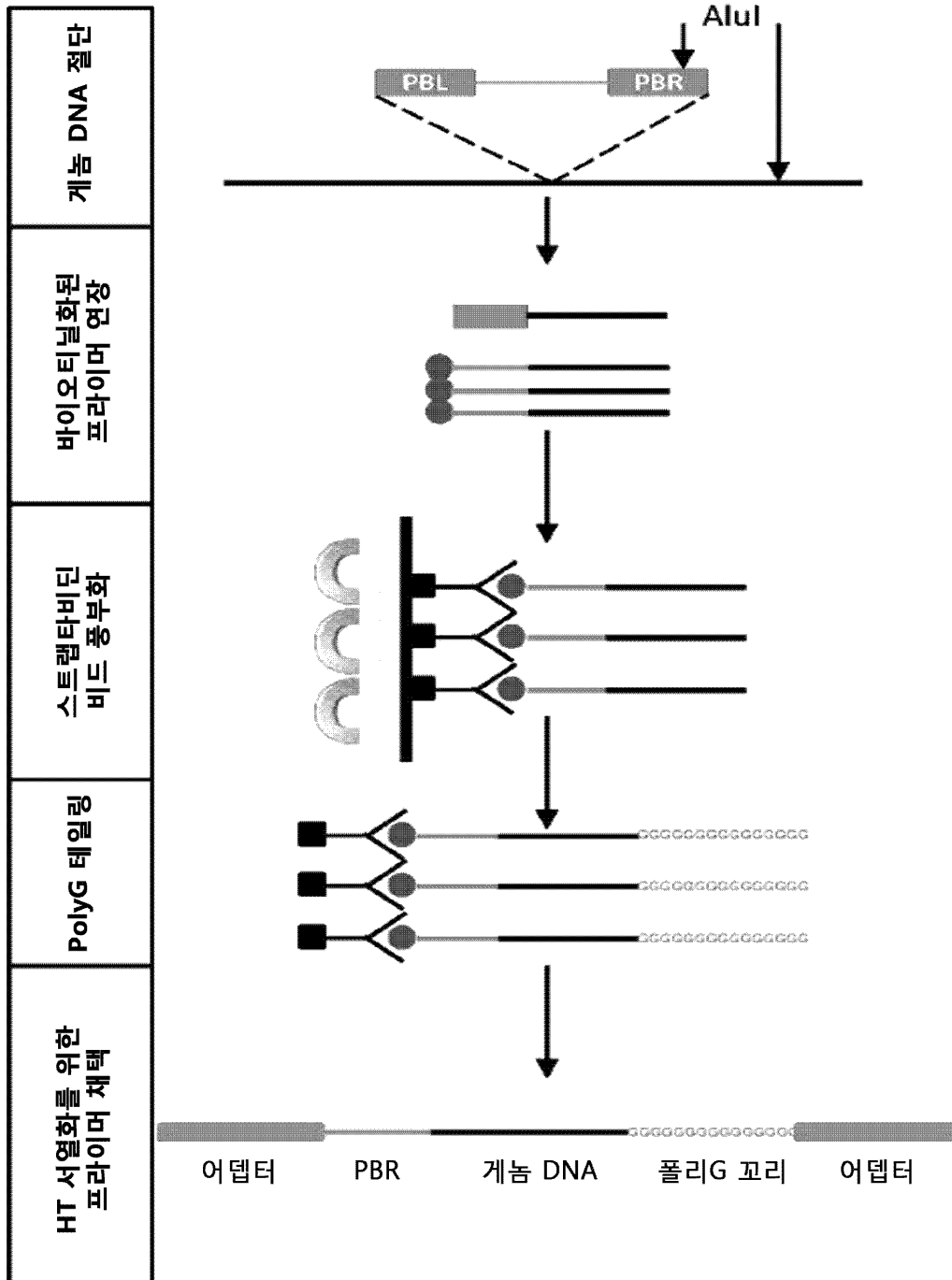
도면13a



도면13b

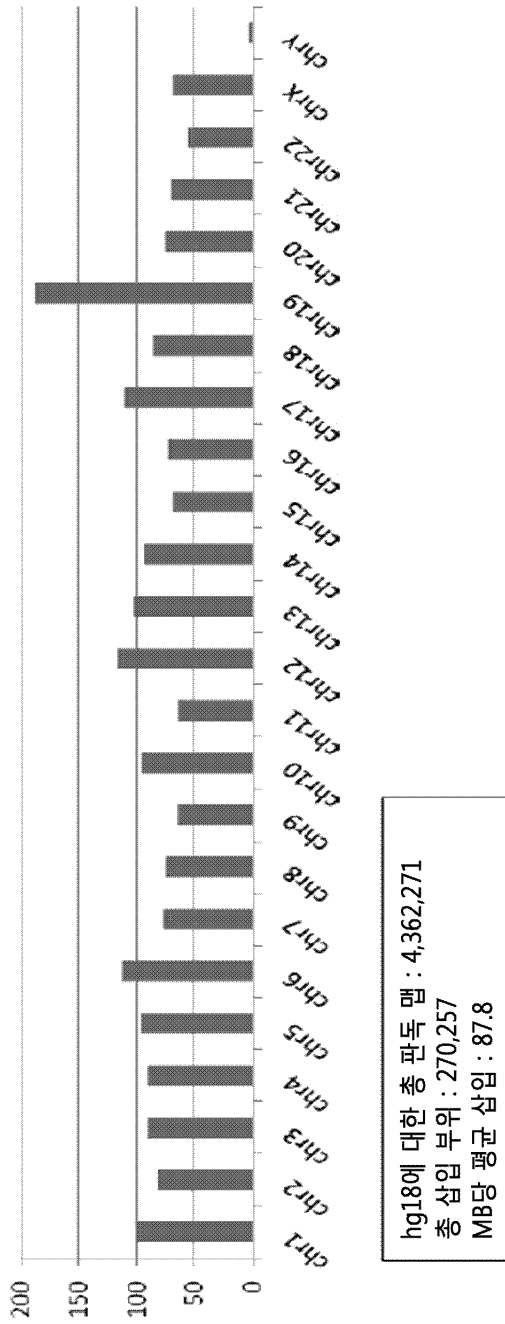


도면14

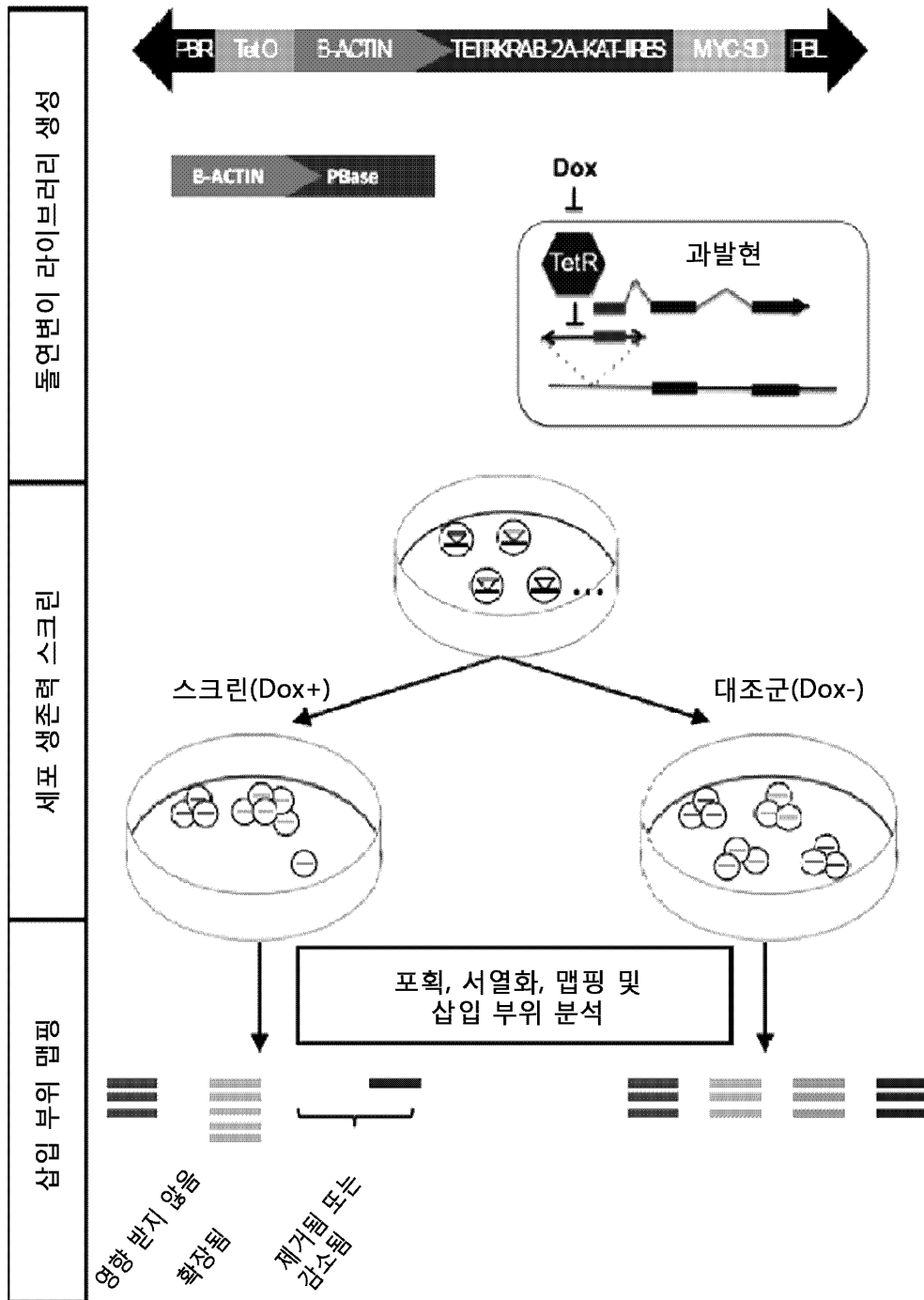


도면15

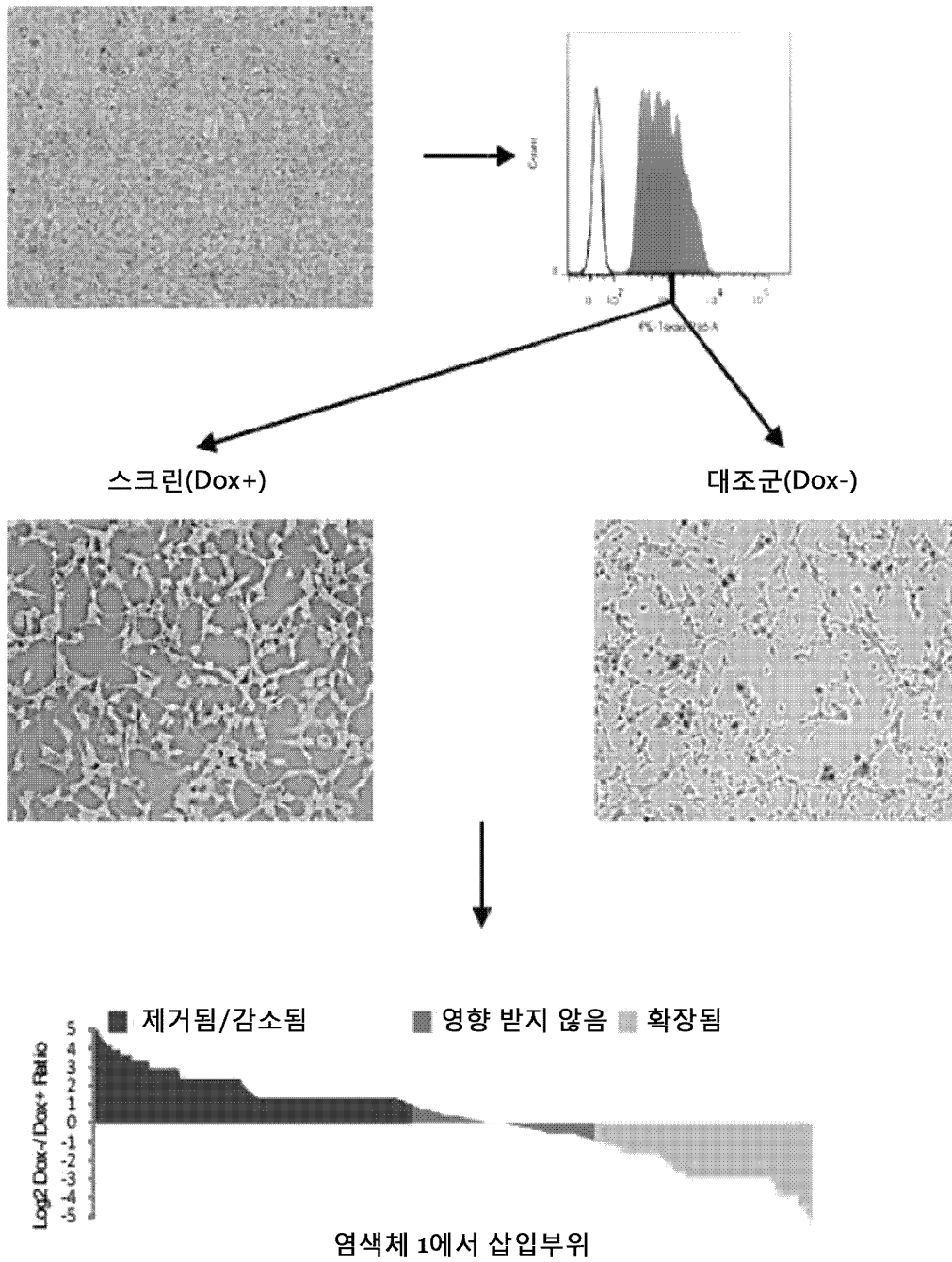
PB 삽입 부위 분포



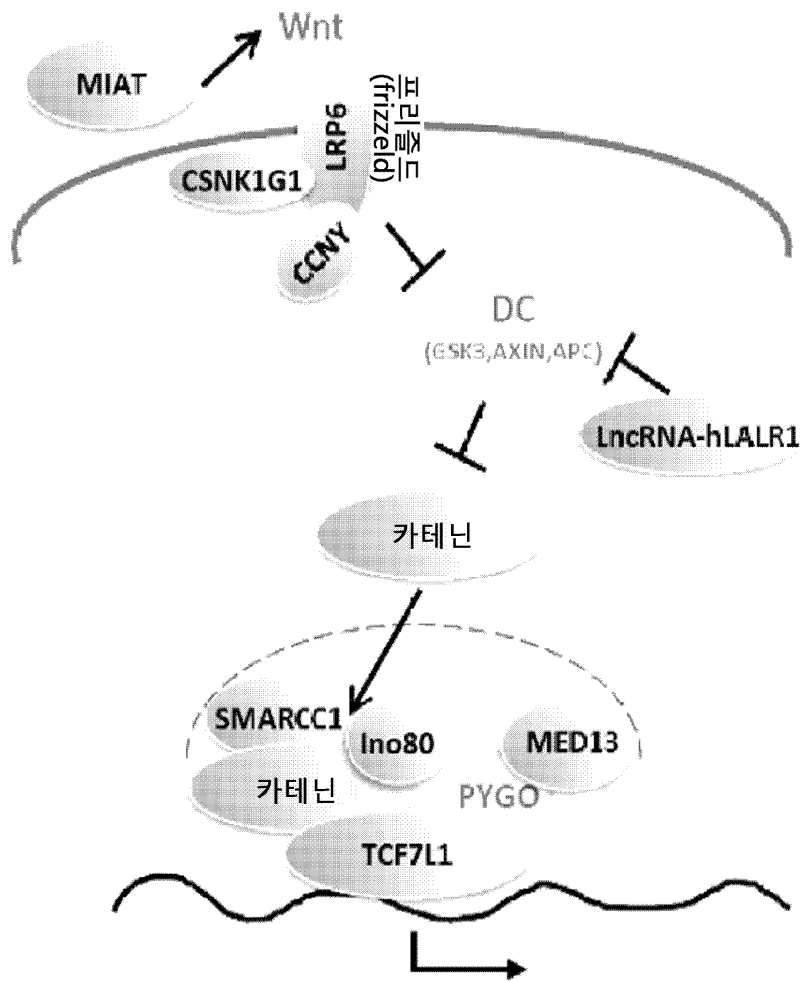
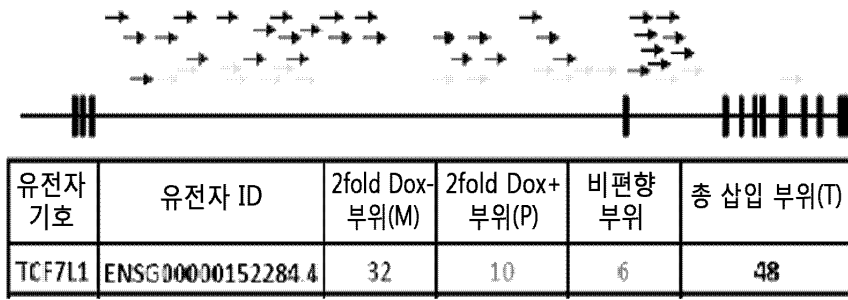
도면16



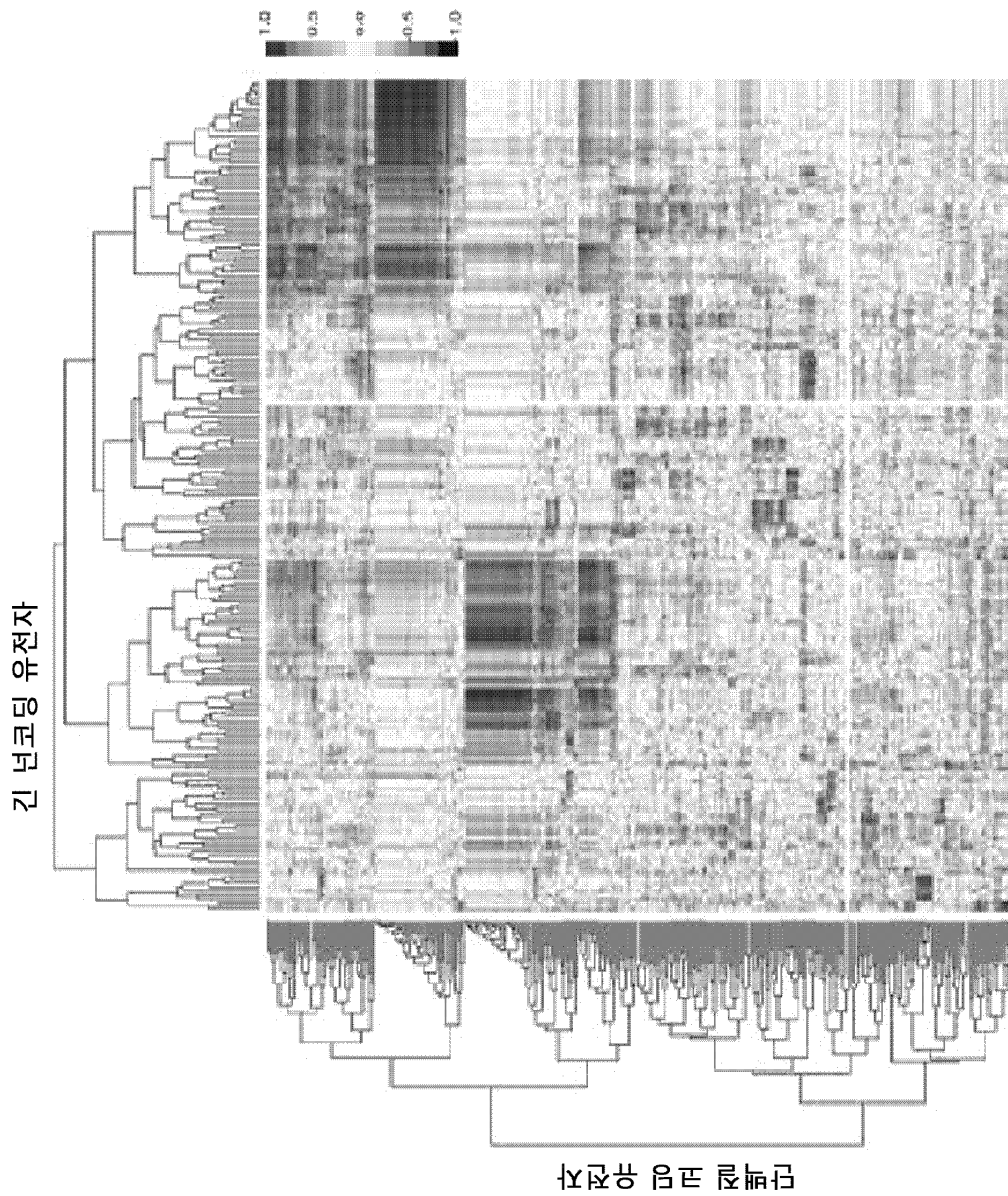
도면17



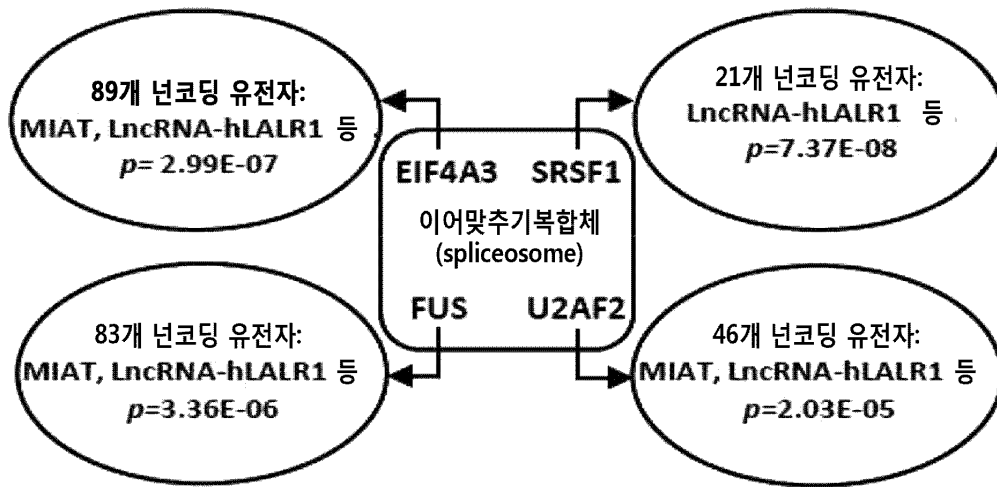
도면18



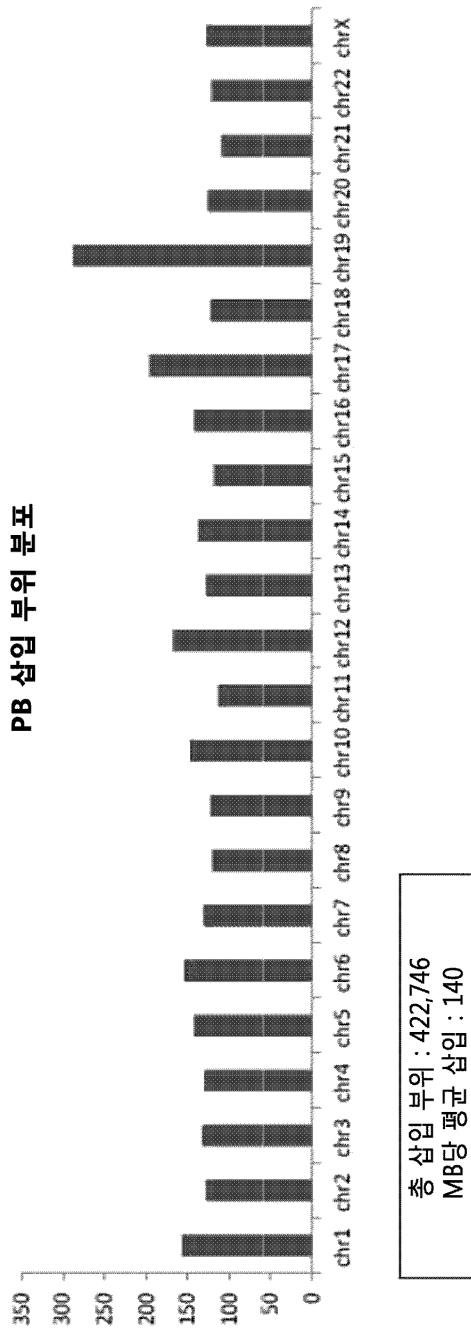
도면19



도면20

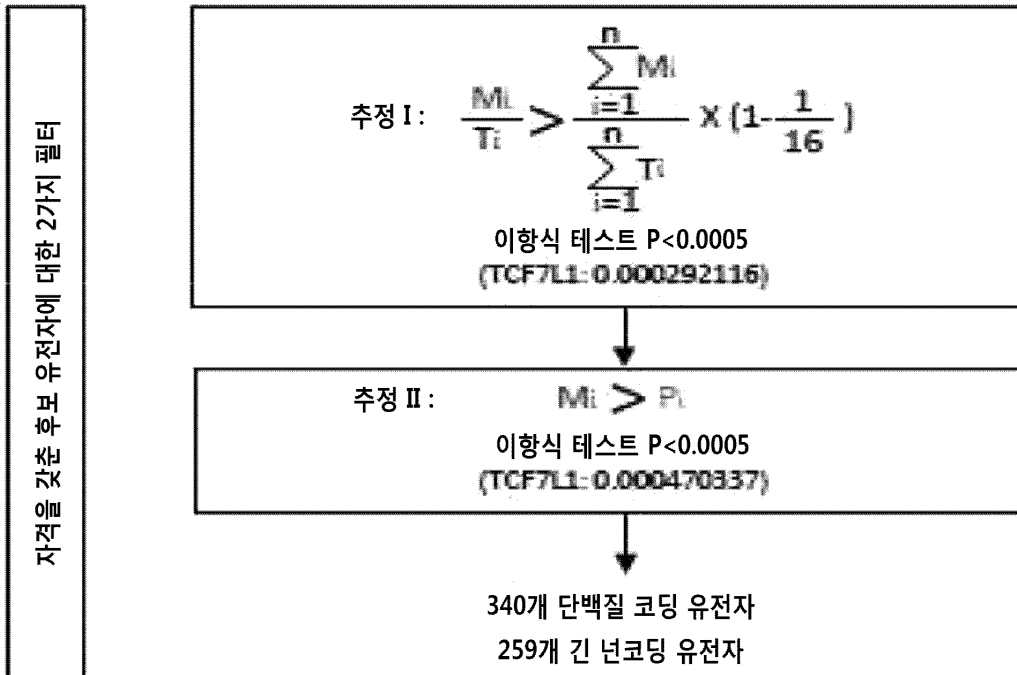


도면21



도면22

PB-유도된 과발현시 결손되는 유전자를 식별하기 위한 생물통계학적 분석



도면23a

유전자 ID	총 Hit	2fold Dax-	2fold Dax+	값 (배경)	값 (50% 분포)	유전자 유형
RP11-73M18.2	82	55	23	1.676E-06	0.000188806	코딩
AKNAD1	84	44	14	6.71815E-06	5.02483E-05	코딩
SYT1	80	48	20	0.000469171	0.000457195	코딩
UBAP2	38	28	8	4.51918E-05	9.75628E-05	코딩
MTA3	89	59	18	1.29328E-06	1.52753E-06	코딩
CUX1	103	73	23	8.34371E-10	1.55512E-07	코딩
SNTG1	91	58	13	1.01854E-05	3.13471E-08	코딩
SLOC44A5	105	84	25	2.96524E-05	2.16078E-05	코딩
GPC8	220	125	55	1.63055E-06	9.59412E-08	코딩
KDM4C	69	47	13	4.90256E-06	6.07335E-06	코딩
BRAP	20	17	2	6.88302E-05	0.000364304	코딩
PTPRG	141	85	37	3.05357E-06	8.24482E-06	코딩
SNRPN	18	15	1	0.000297459	0.000256399	코딩
NLP188	15	13	0	0.000373252	0.00012207	코딩
KIAA0558	47	32	10	0.000180368	0.000470337	코딩
RNF38	59	39	13	8.69779E-05	0.000204771	코딩
MLTK	53	35	10	0.000204106	0.000123544	코딩
MAGT1	28	21	3	4.06492E-05	0.000138581	코딩
NUP210L	81	51	18	5.48705E-05	4.38433E-05	코딩
C14orf37	81	50	18	0.000134535	6.54194E-05	코딩
ZIM3	19	16	1	0.000143694	0.000137329	코딩
PTPRJ	74	48	15	2.97763E-05	1.88031E-05	코딩
TBC1D16	28	22	3	6.21044E-06	7.82609E-05	코딩
LARP1	22	21	1	9.98103E-08	5.48363E-06	코딩
RANBP10	34	26	6	2.8481E-05	0.000267526	코딩
NEK9	21	17	2	0.000222302	0.000364304	코딩
FRMD4A	173	95	45	0.000153761	1.43879E-05	코딩
TLL5	74	47	18	7.76536E-05	0.000211065	코딩
LPPR1	40	31	5	2.8876E-06	6.45674E-06	코딩
EYS	334	177	99	6.47804E-06	1.54791E-06	코딩
RP11-813M10.9	84	53	19	3.63948E-05	3.77791E-05	코딩
ZNF532	30	23	5	7.81046E-05	0.000456117	코딩
TMCC1	72	47	19	2.7789E-05	0.000378054	코딩
ETF1	20	17	2	6.88302E-05	0.000364304	코딩
ANKRD26	30	24	3	1.51934E-05	2.46167E-05	코딩
PHLPP1	59	38	13	0.000241448	0.000310522	코딩
PRCDH2	11	11	0	5.50326E-05	0.000488281	코딩
PARK2	217	121	58	8.21749E-06	1.4322E-06	코딩

도 23

도면23b

ZNF008	41	28	5	0.000379219	3.30938E-05	코딩
DAR1	184	100	48	0.000178848	4.61842E-08	코딩
DMD	274	147	84	1.8418E-05	2.03968E-05	코딩
GRID2	188	117	48	1.4278E-09	1.2718E-08	코딩
DTNB	89	47	15	4.90258E-08	2.88919E-05	코딩
OSBPL1A	83	57	28	8.30613E-05	0.000438778	코딩
ERCC1	34	27	5	5.84688E-08	5.85371E-05	코딩
L1RAPL1	128	81	30	3.00601E-07	8.88934E-07	코딩
USP4	25	22	4	8.2044E-06	0.000289701	코딩
MARK4	72	50	20	1.00277E-08	0.000220143	코딩
MYT1L	47	34	7	1.30511E-05	1.28804E-05	코딩
SYCP2L	57	39	13	2.8415E-05	0.000204771	코딩
ZNF254	84	40	13	0.000402383	8.00013427	코딩
OSBPL8	70	48	14	8.00514E-05	8.71420E-06	코딩
WASF3	32	25	5	2.11301E-05	0.000162457	코딩
RYR2	104	65	27	7.80688E-08	4.63202E-05	코딩
PRFSP1	40	29	7	5.40952E-05	0.000158278	코딩
RGS20	51	35	8	8.11388E-05	2.09871E-05	코딩
WWP2	82	43	14	5.80882E-08	7.80445E-05	코딩
ZMYM8	88	42	12	0.000103718	2.80472E-05	코딩
LAMA2	137	81	34	1.40992E-05	6.60017E-08	코딩
L1RAPL2	183	98	44	3.1184E-08	6.57161E-08	코딩
TTC28	214	115	55	0.000114298	2.43513E-08	코딩
TNRC8B	89	58	25	2.40154E-05	0.000378083	코딩
CCSER1	258	141	79	8.80897E-08	1.75077E-05	코딩
KDM2B	91	55	23	0.000143422	0.000188898	코딩
AK5	48	32	5	8.40512E-05	3.71377E-08	코딩
ZNF341	28	23	5	1.0402E-05	0.000458117	코딩
ERBB4	161	87	21	2.44433E-07	4.80154E-07	코딩
SVOP1	30	23	4	7.8048E-05	0.000155374	코딩
AKAP14	20	18	2	7.80226E-06	0.000201225	코딩
TFST1	53	38	12	8.80381E-05	0.000358635	코딩
ADRBK2	35	27	2	1.50002E-05	8.12113E-07	코딩
SNX29	112	75	28	8.6314E-09	3.71952E-07	코딩
PRKD2	13	13	0	9.20103E-08	8.00012207	코딩
FRMD4B	110	64	29	0.000206783	0.000162888	코딩
CTD-2116N17.1	74	49	17	1.00051E-05	5.07388E-05	코딩
TACC2	57	39	13	2.8415E-05	0.000204771	코딩
C22orf43	11	11	0	5.50329E-05	0.000488281	코딩
EIF2B5	87	63	24	1.00006E-06	1.73998E-05	코딩
STAG1	147	84	37	5.7525E-05	1.15822E-05	코딩

도 23 (계속)

도면23c

BIRC6	68	43	15	0.000178641	0.000153474	코딩
ZNF721	166	93	37	6.70416E-05	4.85097E-07	코딩
GNG7	74	46	17	0.000184269	0.000168355	코딩
PRKCA	92	57	21	4.05858E-05	2.78556E-05	코딩
SCN8A	47	32	10	0.000160368	0.000470337	코딩
TMEM181	32	23	6	0.000401662	0.000456117	코딩
ADCY3	21	19	1	3.44292E-06	2.00272E-05	코딩
CALCOO2	42	31	7	1.66402E-05	5.80835E-05	코딩
NRG1	86	59	21	2.14302E-07	1.26456E-05	코딩
TBC1D5	204	109	63	0.000226568	0.000289727	코딩
MLXIP	26	20	3	0.000215914	0.000244141	코딩
GPC5	220	124	59	3.11451E-06	8.7673E-07	코딩
CLIP1	66	44	17	6.80621E-05	0.000364952	코딩
HIATL1	56	36	10	0.000141968	3.08462E-05	코딩
JUP	61	39	14	0.000252218	0.000401166	코딩
CDC46	12	12	0	2.26636E-05	0.000244141	코딩
TIAM1	146	82	36	0.000113767	1.37916E-05	코딩
AUTS2	242	133	64	6.26728E-06	4.96638E-07	코딩
EXT1	83	50	16	0.000315418	1.66412E-05	코딩
EIF2B3	45	31	8	0.00014481	0.000147038	코딩
MARCH1	110	73	28	7.03781E-08	4.31789E-06	코딩
RERE	178	99	48	5.87917E-05	6.37526E-06	코딩
RAD51B	256	137	71	2.78754E-05	2.77157E-06	코딩
EXOC8B	96	60	27	1.75579E-05	0.000262177	코딩
ACACA	87	53	18	0.000140746	1.94238E-05	코딩
PCSK5	51	35	11	6.17389E-05	0.000267793	코딩
CEP112	101	64	26	4.82514E-06	3.82854E-05	코딩
EPHB1	42	31	9	1.66402E-05	0.000339774	코딩
VWA8	96	60	19	1.75579E-05	2.09702E-06	코딩
PRTG	37	27	6	6.20494E-05	0.000162032	코딩
ZNRF3	54	39	9	3.35206E-06	7.61091E-06	코딩
RNF103-CHMP3	87	57	19	3.41934E-06	7.41845E-06	코딩
SPDR	150	83	39	0.000277174	4.2037E-05	코딩
CNNM2	47	33	6	4.87181E-05	7.14963E-06	코딩
C2orf42	68	46	17	6.21979E-06	0.000168355	코딩
LRP6	67	42	11	0.000279264	1.12378E-05	코딩
FHAD1	54	41	8	1.96899E-07	2.80705E-06	코딩
GATAD2B	66	46	17	1.48542E-05	0.000168355	코딩
DAG1	20	17	2	6.88302E-05	0.000364304	코딩
MGRN1	16	17	1	2.88337E-06	7.24792E-05	코딩
ERC2	132	76	33	6.00044E-05	2.32779E-05	코딩

도 23 (계속)

도면23d

SEC14L1	46	35	9	7.49718E-06	5.30223E-05	코딩
ANKHD1	80	48	17	0.000469171	7.60533E-05	코딩
SIPA1L3	122	82	25	4.58736E-09	1.45405E-08	코딩
SKI	22	19	2	1.54462E-05	0.000113629	코딩
HABP4	20	17	2	6.88302E-05	0.000364304	코딩
BCL2L13	44	32	8	2.0183E-05	9.10829E-05	코딩
TMEM132D	85	56	17	3.20221E-06	2.63434E-06	코딩
MDGA2	90	58	23	6.13739E-06	6.33056E-05	코딩
RNF4	78	52	20	4.20525E-06	0.000103858	코딩
NBEAL1	73	48	15	0.000121778	4.41876E-05	코딩
AVL9	157	88	45	0.000101027	0.00017973	코딩
ESR2	89	56	18	2.48154E-05	5.54557E-06	코딩
PSEN1	25	21	3	1.2891E-05	0.000138581	코딩
GAB3	19	16	1	0.000143694	0.000137329	코딩
DMSDH	83	54	20	8.37001E-06	4.80649E-05	코딩
ZNF343	36	28	5	7.84504E-06	3.30938E-05	코딩
FOXN3	128	75	36	4.48511E-05	0.000135909	코딩
UVRAG	67	44	17	3.98111E-05	0.000364952	코딩
SDK1	163	102	34	2.31564E-08	2.18957E-09	코딩
ARHGAP8	37	29	6	4.07465E-06	5.84206E-05	코딩
C22orf24	16	14	1	0.000173756	0.000483281	코딩
INO80	32	24	6	9.96576E-05	0.000273056	코딩
RBM20	37	28	6	1.95788E-05	9.75628E-05	코딩
SHROOM2	30	23	4	7.81046E-05	0.000155374	코딩
SUPT3H	164	93	44	3.56008E-05	1.71966E-05	코딩
CACNA1A	106	65	27	1.95504E-05	4.63202E-05	코딩
SCML4	22	18	2	0.000110448	0.000201225	코딩
EDEM2	62	49	10	1.13828E-09	1.35314E-07	코딩
NDRG3	45	31	8	0.00014461	0.000147038	코딩
SMARCC1	72	50	18	1.00277E-06	1.66412E-05	코딩
CSMD1	151	96	35	1.87352E-08	4.69766E-08	코딩
PCDH15	283	150	88	3.05386E-05	3.52192E-05	코딩
ATP8A2	96	59	20	4.21832E-05	6.48354E-06	코딩
TRAPPC9	75	50	20	6.36983E-06	0.000220143	코딩
MTJS2	52	36	12	3.61697E-05	0.000358635	코딩
PRIM2	144	82	37	8.24469E-05	2.26257E-05	코딩
SLC4A7	36	26	4	0.00014765	2.97381E-05	코딩
CCDC101	21	20	1	2.30815E-07	1.04904E-05	코딩
PIBF1	76	50	14	1.12551E-05	3.53474E-06	코딩
CAMK1D	130	83	30	1.2834E-07	3.15336E-07	코딩
FKBP5	44	32	9	2.0183E-05	0.000215429	코딩

도 23 (계속)

도면23e

CLVS1	55	38	12	0.000217354	0.000358835	코딩
PALM2-AKAP2	79	50	20	5.31641E-05	0.000220143	코딩
DNAH12	53	35	11	0.000204106	0.000267763	코딩
TENM2	111	65	29	0.000142916	0.000130842	코딩
ZNF236	34	26	5	2.8461E-05	9.60976E-05	코딩
PDI3	12	11	0	0.000412196	0.000488281	코딩
MAL2	17	15	1	8.02773E-05	0.000259369	코딩
DNAH10	27	21	3	0.000112685	0.000138561	코딩
C14orf182	15	14	1	3.51225E-05	0.000488281	코딩
WDR60	34	26	5	2.8461E-05	9.60976E-05	코딩
HOMER2	36	28	3	7.84594E-06	2.32458E-05	코딩
SLC26A8	59	40	13	2.91783E-05	0.00013427	코딩
CNTNAP2	253	148	78	1.54823E-08	1.87323E-06	코딩
C8orf203	22	18	2	0.000110448	0.000201225	코딩
SAE1	35	25	5	0.000263206	0.000162457	코딩
NAA25	28	21	2	0.000275635	3.3021E-05	코딩
TMEM220	15	14	0	3.51225E-05	6.10852E-05	코딩
RAB11FIP1	32	23	5	0.000401682	0.000456117	코딩
ATE1	36	27	4	3.64623E-05	1.69766E-05	코딩
FBXL20	77	47	18	0.000307483	0.000211065	코딩
ANKHD1- EIF4EBF3	80	48	17	0.000489171	7.60533E-05	코딩
DNAH9	52	37	11	1.05045E-05	0.000111122	코딩
PLA2G4C	38	28	5	0.00014765	9.60976E-05	코딩
PIGL	92	55	23	0.000214799	0.000189896	코딩
TTC27	52	37	8	1.05045E-05	7.68705E-06	코딩
RB1	38	27	6	0.000172518	0.000162032	코딩
UBE3D	47	32	9	0.000180368	0.000215429	코딩
CKM	13	12	0	0.000182313	0.000244141	코딩
UPK3B	93	56	23	0.000144356	0.000131818	코딩
CLSTN2	46	36	7	2.92884E-07	4.48152E-05	코딩
CHMP3	87	57	19	3.41934E-06	7.41845E-06	코딩
RIMKB	33	24	5	0.000223665	0.000273056	코딩
MYH9	28	23	5	1.01402E-05	0.000456117	코딩
HOOK2	49	36	9	4.14938E-06	3.28733E-05	코딩
DNAH11	74	46	17	0.000194269	0.000168355	코딩
ALK	59	40	11	2.91783E-05	2.85191E-05	코딩
CHCHD6	41	29	7	0.000113126	0.000156276	코딩
EIF4G3	120	71	32	4.5579E-05	7.66169E-05	코딩
RNGTT	76	50	17	1.12551E-05	3.38896E-05	코딩
SORCS2	43	29	8	0.000415326	0.000375448	코딩
ACOXL	51	39	14	0.000252216	0.000401165	코딩

도 23 (계속)

도면23f

RAPGEF6	81	39	13	0.000262216	0.000204771	코딩
DNMT3A	24	19	3	0.000160109	0.000427723	코딩
CLYBL	72	44	15	0.000455423	0.000101881	코딩
CACNA1B	40	29	5	5.44952E-05	1.92791E-06	코딩
DOC	80	56	15	1.48878E-07	5.20701E-07	코딩
DLG2	180	107	56	4.70391E-07	3.97285E-05	코딩
TUBA1C	56	36	10	0.000398913	7.82086E-05	코딩
FHACTR2	82	57	18	1.69473E-07	7.62829E-07	코딩
SLC12A8	42	29	6	0.000222223	0.000378449	코딩
VEPH1	68	45	8	2.44014E-05	1.18418E-07	코딩
APOPT1	38	31	4	3.85391E-07	1.73273E-08	코딩
ABAT	23	19	3	5.4397E-05	0.000427723	코딩
MED13	40	29	6	5.44952E-05	5.94209E-05	코딩
RF11-483D19.2	88	55	18	3.86564E-05	8.45681E-06	코딩
ZDHHC9	18	17	1	1.6806E-05	7.24792E-05	코딩
CCNY	100	67	20	1.37417E-07	2.15298E-07	코딩
SMG1	44	31	6	7.42177E-05	2.06288E-05	코딩
SLC39A11	80	54	14	1.53447E-06	5.54883E-07	코딩
MARCH10	31	23	5	0.000184818	0.000458117	코딩
FAM171A1	39	29	7	2.46831E-05	0.000158278	코딩
FAF1	170	101	44	1.00328E-06	1.2453E-06	코딩
DPP10	112	67	23	4.54972E-05	1.89752E-06	코딩
MTHFD1L	66	45	17	4.23023E-05	0.000248548	코딩
SHISA9	36	29	3	1.45393E-06	1.27801E-06	코딩
ZNF709	113	66	21	0.000141889	7.05039E-07	코딩
WDR47	29	22	2	0.000147512	1.7941E-06	코딩
MICU1	97	57	23	0.000313948	9.15683E-05	코딩
DOCK3	199	110	53	3.36584E-05	4.7332E-06	코딩
MAPK14	34	24	4	0.000464523	8.99956E-05	코딩
TBXAS1	34	24	4	0.000464523	8.99956E-05	코딩
ANKRD36	75	47	18	0.000125466	0.000211085	코딩
TP53BP1	27	21	3	0.000112685	0.000138581	코딩
THSD4	141	80	34	0.000117951	9.79818E-06	코딩
BTBD2	25	22	3	1.56803E-06	7.82606E-05	코딩
USP34	77	48	20	0.000128819	0.000457195	코딩
LRP1B	234	123	63	0.000252998	8.45158E-06	코딩
YWHAH	17	15	1	8.02773E-05	0.000259399	코딩
PTPN4	46	31	6	0.000269759	2.06288E-05	코딩
WSCD1	50	36	9	8.95347E-06	3.28733E-05	코딩
TTL1	21	17	2	0.000222302	0.000364304	코딩
WBSCR17	70	49	17	8.8236E-07	5.07386E-05	코딩

도 23 (계속)

도면23g

ABCG2	51	34	9	0.000190133	8.50776E-05	코딩
TBC1D22A	47	34	6	1.34511E-05	4.18226E-06	코딩
SAF130	31	24	5	4.0987E-05	0.000273066	코딩
LUC7L3	29	23	5	2.96727E-05	0.000456117	코딩
OSBP13	70	45	16	7.14521E-05	0.000132139	코딩
UNC13B	51	34	8	0.000190133	3.43856E-05	코딩
SH3GLB2	11	11	0	5.50329E-05	0.000488281	코딩
FUT8	92	54	24	0.000463473	0.000450502	코딩
CASK	107	64	25	6.66809E-05	2.16076E-05	코딩
GREB1L	112	65	27	0.000204739	4.63202E-05	코딩
ACAD10	32	25	6	2.13301E-05	0.000439955	코딩
RCOR1	72	53	16	2.05831E-08	4.54753E-06	코딩
AKAP2	79	50	20	5.31641E-05	0.000220143	코딩
C14orf164	41	29	8	0.000113128	0.000378449	코딩
DEC1	19	16	1	0.000143694	0.000137329	코딩
TMEM120B	33	27	5	1.9155E-06	5.65371E-05	코딩
APOBEC1	12	11	0	0.000412196	0.000488281	코딩
CLDN11	81	49	20	0.000313435	0.000319066	코딩
MKL1	86	53	22	9.13138E-05	0.000224824	코딩
AK2	44	33	7	4.92851E-06	2.11385E-05	코딩
GRM7	89	55	15	6.06844E-05	8.2626E-07	코딩
STX8	129	78	34	6.50148E-06	1.95527E-05	코딩
CDC42SE2	87	52	21	0.00031756	0.00018567	코딩
CTNNA1	88	58	19	1.53669E-05	1.12148E-05	코딩
MAX	27	21	4	0.000112885	0.00045526	코딩
CROCC	70	43	16	0.00049228	0.000292182	코딩
CDKAL1	168	100	42	1.00194E-06	8.21504E-07	코딩
RBM6	82	42	11	1.91103E-05	1.12376E-05	코딩
TYW1	83	41	13	9.84114E-05	8.75834E-05	코딩
STPG2	147	82	36	0.000211114	1.37916E-05	코딩
MAST2	92	56	24	9.54044E-05	0.000225759	코딩
DSCAM	80	57	16	4.25872E-08	7.62826E-07	코딩
TLN2	53	37	12	2.10273E-05	0.000234879	코딩
TCP11L1	32	25	4	2.13301E-05	5.18579E-05	코딩
FGD3	25	19	3	0.00040669	0.000427723	코딩
MARCH8	32	24	3	9.96578E-05	2.46167E-05	코딩
BRP1	51	35	8	6.17388E-05	2.09871E-05	코딩
PTFRD	193	114	53	3.22222E-07	1.34849E-06	코딩
BNIP3L	32	23	4	0.000401682	0.000155374	코딩
SUSD1	46	32	9	8.43512E-05	0.000215429	코딩
GPM6A	47	34	10	1.34511E-05	0.000194065	코딩

도 23 (계속)

도면23h

COL4A5	84	42	16	6.07605E-05	0.000430891	코딩
PTK2	87	56	16	1.16778E-06	4.83745E-07	코딩
ZSWIM5	115	67	29	0.000140731	6.61111E-05	코딩
NLGN1	180	99	52	0.000104709	8.12146E-05	코딩
SLC27A9	75	48	16	4.91701E-05	3.88854E-05	코딩
KLC1	83	55	24	2.96378E-06	0.000319699	코딩
MDGA2	90	58	23	6.13739E-06	6.33056E-05	코딩
KANSL1	92	57	23	4.05856E-05	9.15583E-05	코딩
CLSPN	18	16	1	3.6941E-05	0.000137329	코딩
FAM186A	54	38	10	0.000123943	7.82086E-05	코딩
FBFOX1	132	88	36	2.36317E-09	1.68696E-06	코딩
CNTN4	88	42	16	0.00044161	0.000430891	코딩
PRRC2B	34	25	5	0.000123307	0.000162457	코딩
GABPB2	43	30	8	0.000129001	0.000235963	코딩
TARBP1	16	14	0	0.000173756	6.10352E-05	코딩
FBXO34	26	22	1	6.21044E-06	2.86102E-06	코딩
LIN52	81	40	12	9.26239E-05	6.37894E-05	코딩
DNMT1	51	35	10	6.17388E-05	0.000123544	코딩
MACROD1	25	22	3	1.56803E-06	7.82806E-05	코딩
DTL	28	21	4	0.000275985	0.00045526	코딩
TCF7L1	48	32	10	0.000292116	0.000470337	코딩
PITPNM2	26	21	4	4.06492E-05	0.00045526	코딩
SASH1	77	55	18	6.37168E-06	8.45891E-06	코딩
C5	37	27	5	8.26494E-05	5.85371E-05	코딩
ULK4	122	74	29	9.44248E-06	5.35283E-06	코딩
KL	15	14	0	3.51225E-05	6.10352E-05	코딩
PHKA2	23	19	3	5.4397E-05	0.000427723	코딩
FAM101A	84	41	15	0.000185528	0.000342782	코딩
PTH2R	88	58	17	2.10882E-06	1.09116E-06	코딩
C7orf80	31	23	2	0.000184818	9.71556E-06	코딩
SNX8	42	30	6	6.42199E-05	3.48008E-05	코딩
RUNX1	155	87	42	0.000103148	4.60331E-05	코딩
UNC13A	34	30	3	1.46913E-06	7.00587E-07	코딩
NEDD4	50	33	10	0.000313309	0.000303053	코딩
ITGAE	28	23	4	2.96727E-05	0.000155374	코딩
LIMS1	50	34	10	0.000104537	0.000194066	코딩
PPP5D1	45	35	5	5.82424E-07	6.91306E-07	코딩
CDK19	70	47	14	8.96275E-06	1.35959E-05	코딩
TAOK3	88	56	20	1.53668E-05	2.18447E-05	코딩
VPS13B	183	101	52	7.46703E-05	4.58623E-05	코딩
RGS7	56	41	7	1.0421E-06	3.1202E-07	코딩

도 23 (계속)

도면23i

MVP	18	15	1	0.000297459	0.000259369	코딩
FAM135B	41	29	7	0.000113128	0.000158278	코딩
KAA132B	115	87	26	0.000140731	1.28291E-05	코딩
CSNK1G1	85	43	16	3.72378E-05	0.000282182	코딩
CTNND2	80	50	19	8.54213E-05	0.000122169	코딩
HMGCL	23	20	1	7.24807E-06	1.04904E-05	코딩
DNAH14	112	65	29	0.000204739	0.000130842	코딩
NRG3	102	62	25	4.36773E-05	4.5304E-05	코딩
ASH1L	91	55	23	0.000143422	0.000188866	코딩
CAMKMT	81	51	17	5.46705E-05	2.22672E-05	코딩
MAML2	82	51	19	8.75921E-05	8.30209E-05	코딩
SFMBT1	87	43	14	0.000108718	7.69445E-05	코딩
COL23A1	88	48	14	8.21979E-06	2.11185E-05	코딩
GRK1	42	31	7	1.66402E-05	5.80836E-05	코딩
PRR5-ARHGAP8	37	29	8	4.07465E-06	5.84209E-05	코딩
CASP8AP2	34	24	9	0.000484523	0.000765463	긴 비코딩 RNA
LINC00470	16	12	1	0.008213799	0.001708964	긴 비코딩 RNA
LINC00266-1	19	14	3	0.004027185	0.008362915	긴 비코딩 RNA
AC104389.28	30	21	6	0.001253931	0.002982306	긴 비코딩 RNA
RP11-121M2.1	18	14	1	0.001703841	0.000489281	긴 비코딩 RNA
LINC00469	9	8	0	0.004587377	0.00390625	긴 비코딩 RNA
SNX2BP2	73	45	17	0.000298584	0.000248546	긴 비코딩 RNA
AC006496.1	71	48	21	5.40E-06	0.000775158	긴 비코딩 RNA
LINC00982	12	10	1	0.003495999	0.005853375	긴 비코딩 RNA
RP11-417J8.6	47	32	11	0.000180388	0.000959981	긴 비코딩 RNA
AC007277.3	27	20	5	0.000510855	0.002038658	긴 비코딩 RNA
RP11-414H17.5	7	7	0	0.001947543	0.0078125	긴 비코딩 RNA
AF000318.2	24	19	4	0.000180109	0.001289739	긴 비코딩 RNA
AC091878.1	26	19	4	0.000935282	0.001289739	긴 비코딩 RNA
RP11-426L16.8	17	14	2	0.000609988	0.002090454	긴 비코딩 RNA
RP11-249G5.8	40	27	9	0.000640719	0.001983587	긴 비코딩 RNA
AC002463.3	13	11	1	0.001678555	0.003173828	긴 비코딩 RNA
ENTPD3-AS1	37	25	8	0.000990683	0.000438955	긴 비코딩 RNA
AC007091.1	48	33	10	9.45E-05	0.000303053	긴 비코딩 RNA
RP11-383C5.4	36	23	8	0.004671685	0.00533862	긴 비코딩 RNA
RP11-327I22.5	10	9	0	0.00209578	0.001953125	긴 비코딩 RNA
AC073321.3	7	7	0	0.001947543	0.0078125	긴 비코딩 RNA
RP11-413P11.1	9	9	0	0.000327382	0.001953125	긴 비코딩 RNA
AC064871.3	11	9	0	0.007194054	0.001953125	긴 비코딩 RNA
LAMTOR5-AS1	14	11	1	0.0049091	0.003173828	긴 비코딩 RNA
RP11-	16	12	2	0.008213799	0.008469727	긴 비코딩 RNA

도 23 (계속)

도면23j

555M15.1						
LINC00393	71	40	19	0.008479478	0.00432075	긴 뉴코딩 RNA
AC083818.1	20	14	3	0.008397966	0.008362915	긴 뉴코딩 RNA
RFPL1S	17	13	2	0.003277923	0.003992627	긴 뉴코딩 RNA
RP11-341A22.2	24	17	4	0.003020226	0.00359869	긴 뉴코딩 RNA
MIAT	15	12	2	0.002481753	0.008469727	긴 뉴코딩 RNA
TRMT2B-AS1	25	19	4	0.00040959	0.001299739	긴 뉴코딩 RNA
AC016582.2	39	24	5	0.00769839	0.000273058	긴 뉴코딩 RNA
RP11-872F9.1	16	12	2	0.008213799	0.008469727	긴 뉴코딩 RNA
AC018356.1	43	28	10	0.001211916	0.002548822	긴 뉴코딩 RNA
SPANXA2-OT1	28	20	5	0.001098158	0.002038658	긴 뉴코딩 RNA
LINC00348	23	17	4	0.001425324	0.00359869	긴 뉴코딩 RNA
RP11-202G18.1	31	20	7	0.008988646	0.009579645	긴 뉴코딩 RNA
STEAP2-AS1	38	24	9	0.004820202	0.008765463	긴 뉴코딩 RNA
RP3-323P13.2	87	40	14	0.00154264	0.000267718	긴 뉴코딩 RNA
GU5BP11	25	17	4	0.005843202	0.00359869	긴 뉴코딩 RNA
RP3-400N23.8	20	15	2	0.002186851	0.001174927	긴 뉴코딩 RNA
RP4-784O22.2	19	15	3	0.000874076	0.003769921	긴 뉴코딩 RNA
RP4-583F4.2	10	10	0	0.000134227	0.000979563	긴 뉴코딩 RNA
RP11-368K2.12	14	12	1	0.000794662	0.001708964	긴 뉴코딩 RNA
RP5-857K21.4	84	53	23	3.84E-05	0.000382291	긴 뉴코딩 RNA
RP11-80C4.2	13	10	1	0.00956081	0.005859375	긴 뉴코딩 RNA
AL022476.2	15	13	1	0.000373252	0.000915527	긴 뉴코딩 RNA
LINC00278	78	44	19	0.004293572	0.001113766	긴 뉴코딩 RNA
RP11-517P14.2	24	16	4	0.009905533	0.005909966	긴 뉴코딩 RNA
FTX	106	61	25	0.000431126	6.52E-05	긴 뉴코딩 RNA
RP5-1198O20.4	21	17	3	0.000222302	0.001288414	긴 뉴코딩 RNA
RP3-408P24.3	8	7	0	0.009990894	0.0078125	긴 뉴코딩 RNA
RP11-417J8.3	59	40	14	2.92E-05	0.000267718	긴 뉴코딩 RNA
RP11-389K14.3	21	15	4	0.004709308	0.009805408	긴 뉴코딩 RNA
AC00592.2	85	42	14	0.000103715	0.000117223	긴 뉴코딩 RNA
RP5-965F8.2	32	21	7	0.00427444	0.008270476	긴 뉴코딩 RNA
AC010976.2	10	9	0	0.00208578	0.001953125	긴 뉴코딩 RNA
AC007682.1	127	77	30	6.44E-06	3.14E-06	긴 뉴코딩 RNA
RP11-14N7.2	12	10	1	0.003495999	0.005859375	긴 뉴코딩 RNA
RP11-40F3.2	123	72	37	6.58E-05	0.000519468	긴 뉴코딩 RNA
RP11-344E13.3	51	30	9	0.007886021	0.00053251	긴 뉴코딩 RNA
RP1-209A9.1	40	25	6	0.004038927	0.000438955	긴 뉴코딩 RNA
RP11-218D6.4	7	7	0	0.001947543	0.0078125	긴 뉴코딩 RNA
RP4-799D16.1	21	15	4	0.004709308	0.009805408	긴 뉴코딩 RNA
AC007131.2	47	28	12	0.007789152	0.008294502	긴 뉴코딩 RNA

도 23 (계속)

도면23k

KRTAF5-AS1	14	13	1	8.02E-05	0.000915527	긴 변코딩 RNA
RP11-308D16.4	33	21	6	0.007241972	0.002862308	긴 변코딩 RNA
RP11-308N19.4	12	11	0	0.000412196	0.000488281	긴 변코딩 RNA
AC012376.3	8	7	0	0.009990894	0.0078125	긴 변코딩 RNA
RP11-148I2.1	44	27	11	0.005097742	0.008925483	긴 변코딩 RNA
RP4-537K23.4	38	24	9	0.004820202	0.008765463	긴 변코딩 RNA
AC093415.2	19	14	3	0.004027185	0.009382915	긴 변코딩 RNA
RP11-357C3.3	74	44	21	0.00103562	0.002959217	긴 변코딩 RNA
AC011247.3	17	14	1	0.000609988	0.000488281	긴 변코딩 RNA
COX10-AS1	53	39	18	0.007045239	0.009917163	긴 변코딩 RNA
DIAPH2-AS1	80	43	13	1.48E-06	3.87E-05	긴 변코딩 RNA
LINC00854	11	10	1	0.000926183	0.005859375	긴 변코딩 RNA
AC018890.6	53	33	10	0.001445385	0.000303053	긴 변코딩 RNA
AC007040.8	19	14	1	0.004027185	0.000488281	긴 변코딩 RNA
INTS6-AS1	29	19	5	0.008674968	0.003305376	긴 변코딩 RNA
ANKRD44-IT1	13	11	1	0.001676555	0.003173828	긴 변코딩 RNA
WASF3-AS1	13	11	1	0.001676555	0.003173828	긴 변코딩 RNA
AL163953.3	91	53	24	0.000673515	0.000631613	긴 변코딩 RNA
RP11-206L10.9	18	15	3	0.000297459	0.003768921	긴 변코딩 RNA
LINC00407	14	12	1	0.000794652	0.001708964	긴 변코딩 RNA
AC113607.1	13	11	1	0.001676555	0.003173828	긴 변코딩 RNA
HTR3E-AS1	10	9	0	0.00208578	0.001953125	긴 변코딩 RNA
AC006312.1	16	14	1	0.000173756	0.000488281	긴 변코딩 RNA
CTD-2021J15.1	22	17	4	0.000802804	0.00359889	긴 변코딩 RNA
RP11-446H18.5	28	20	6	0.001098158	0.004677653	긴 변코딩 RNA
RP1-184J9.2	24	19	4	0.0007688	0.002171755	긴 변코딩 RNA
CTC-340A15.2	133	75	35	0.000244805	8.82E-05	긴 변코딩 RNA
RP11-457K10.1	37	23	8	0.007591243	0.00533692	긴 변코딩 RNA
RP11-340E8.1	14	12	1	0.000794652	0.001708964	긴 변코딩 RNA
RP11-489J4.3	8	8	0	0.000798493	0.00390625	긴 변코딩 RNA
AC005082.2	31	20	6	0.006988846	0.004677653	긴 변코딩 RNA
RP11-550I24.2	54	38	9	1.21E-06	1.25E-05	긴 변코딩 RNA
RP11-382A9.3	8	8	0	0.000798493	0.00390625	긴 변코딩 RNA
AC016221.4	7	7	0	0.001947543	0.0078125	긴 변코딩 RNA
CTB-111H4.1	59	35	12	0.002204818	0.000644289	긴 변코딩 RNA
IL12A-AS1	57	38	15	8.09E-05	0.001095069	긴 변코딩 RNA
RP11-85M11.2	80	37	13	0.000989801	0.000469111	긴 변코딩 RNA
SAP30L-AS1	21	16	4	0.001149888	0.005903966	긴 변코딩 RNA
RP11-179A16.1	89	40	19	0.003282401	0.00432075	긴 변코딩 RNA
STARD4-AS1	33	23	6	0.000811123	0.00115785	긴 변코딩 RNA
PDX1-AS1	16	13	2	0.001237737	0.003692627	긴 변코딩 RNA

도 23 (계속)

도면231

NR2F2-AS1	51	34	10	0.000190133	0.000194065	긴 변코딩 RNA
TMEM161B-AS1	43	27	11	0.00321766	0.008629463	긴 변코딩 RNA
RP3-510L3.1	22	15	2	0.009209458	0.001174927	긴 변코딩 RNA
RP11-556I14.2	43	27	10	0.00321766	0.003818039	긴 변코딩 RNA
RP11-328F4.1	37	24	9	0.002894583	0.005765463	긴 변코딩 RNA
RP11-596F7.1	8	7	0	0.009990894	0.0078125	긴 변코딩 RNA
UGDH-AS1	38	28	8	4.52E-05	0.003593621	긴 변코딩 RNA
LINC01080	38	27	8	0.000172518	0.000939113	긴 변코딩 RNA
RP11-25H12.1	35	24	6	0.00060376	0.000715453	긴 변코딩 RNA
AC091989.1	72	42	20	0.002232945	0.003574367	긴 변코딩 RNA
RP11-281P23.2	25	17	5	0.005843202	0.00845027	긴 변코딩 RNA
CTC-329D1.2	25	21	2	1.29E-05	3.30E-05	긴 변코딩 RNA
PVT1	52	39	9	6.78E-07	7.81E-06	긴 변코딩 RNA
RP11-381K20.2	32	21	6	0.00427444	0.002962306	긴 변코딩 RNA
RP11-8L2.1	75	45	22	0.000696025	0.003370724	긴 변코딩 RNA
CTD-2066L21.3	58	38	12	4.46E-05	0.000152932	긴 변코딩 RNA
RP11-1348G14.4	15	12	2	0.002481753	0.008489727	긴 변코딩 RNA
CTD-2532K18.1	24	17	5	0.003020226	0.00845027	긴 변코딩 RNA
RP11-1149M10.2	7	7	0	0.001947543	0.0078125	긴 변코딩 RNA
RP11-941H18.3	28	19	6	0.003727483	0.007318649	긴 변코딩 RNA
LINC00534	35	23	7	0.002747308	0.00281144	긴 변코딩 RNA
RP11-624C23.1	52	38	14	0.001004474	0.00059758	긴 변코딩 RNA
RP11-1080G15.1	27	18	4	0.00020497	0.002171755	긴 변코딩 RNA
RP11-317N12.1	49	33	11	0.000175519	0.000630017	긴 변코딩 RNA
CTC-535M15.2	43	31	9	3.81E-05	0.000339774	긴 변코딩 RNA
RP11-1084E5.1	20	14	3	0.008367668	0.008362915	긴 변코딩 RNA
RP11-723D22.3	8	8	0	0.000798493	0.00390625	긴 변코딩 RNA
RP11-124B13.1	29	21	6	0.000613048	0.002962306	긴 변코딩 RNA
RP11-881L8.1	50	30	12	0.005176447	0.003857949	긴 변코딩 RNA
RP11-30J20.1	38	24	8	0.001859614	0.003500183	긴 변코딩 RNA
RP11-120I21.2	30	20	7	0.004020879	0.008578845	긴 변코딩 RNA
CTC-367J11.1	16	12	1	0.008213799	0.001708964	긴 변코딩 RNA
RP11-452H21.1	30	21	5	0.001253931	0.001248959	긴 변코딩 RNA
RP11-460B17.3	30	20	7	0.004020879	0.008578845	긴 변코딩 RNA
RP11-463D19.1	21	16	3	0.001149888	0.002212524	긴 변코딩 RNA
RP11-820L6.1	22	17	3	0.000602804	0.001289414	긴 변코딩 RNA
AP006621.8	7	7	0	0.001947543	0.0078125	긴 변코딩 RNA
RP11-626H12.1	8	7	0	0.009990894	0.0078125	긴 변코딩 RNA
RP11-304M2.3	41	27	10	0.001145044	0.003818039	긴 변코딩 RNA

도 23 (계속)

도면23m

RP11-293G6.5	24	18	3	0.0007666	0.00074482	긴 뉴코딩 RNA
PXN-AS1	8	7	0	0.039690894	0.0078125	긴 뉴코딩 RNA
RP11-405A12.2	25	17	5	0.035843202	0.00945027	긴 뉴코딩 RNA
RP11-293G6.4	32	21	5	0.00427444	0.001246959	긴 뉴코딩 RNA
RP11-114G22.1	56	33	15	0.035114365	0.008641641	긴 뉴코딩 RNA
RP11-818F20.4	8	7	0	0.039690894	0.0078125	긴 뉴코딩 RNA
RP11-108O32.1	13	11	1	0.001679555	0.003173928	긴 뉴코딩 RNA
RP11-977G19.11	18	15	1	0.000297459	0.000259399	긴 뉴코딩 RNA
RP11-811E13.2	62	39	14	0.000411678	0.000401185	긴 뉴코딩 RNA
RP11-114H23.1	100	59	27	0.000213882	0.000365885	긴 뉴코딩 RNA
RP11-202H2.1	43	27	8	0.00321796	0.000939113	긴 뉴코딩 RNA
RP11-497G19.3	10	9	0	0.00206578	0.001953125	긴 뉴코딩 RNA
RP11-148B3.2	8	7	0	0.039690894	0.0078125	긴 뉴코딩 RNA
RP11-517O13.1	18	16	0	3.68E-05	1.53E-05	긴 뉴코딩 RNA
RP11-102G19.5	21	16	2	0.001149888	0.000659128	긴 뉴코딩 RNA
RP11-7F17.4	14	12	1	0.000794952	0.001708984	긴 뉴코딩 RNA
RP11-111A21.1	11	9	0	0.007194054	0.001953125	긴 뉴코딩 RNA
RP11-19B13.1	29	19	6	0.036674958	0.007318649	긴 뉴코딩 RNA
RP11-99E15.2	20	15	4	0.002168851	0.000665408	긴 뉴코딩 RNA
RP11-517O13.3	11	10	0	0.000626163	0.000976563	긴 뉴코딩 RNA
RP11-81F13.1	11	9	0	0.007194054	0.001953125	긴 뉴코딩 RNA
RP11-85K15.2	35	23	7	0.002747306	0.00281144	긴 뉴코딩 RNA
RP11-1152H15.1	17	13	1	0.003277923	0.000915527	긴 뉴코딩 RNA
RP11-7F17.3	7	7	0	0.001947543	0.0078125	긴 뉴코딩 RNA
RP11-33N16.3	180	106	46	9.98E-07	6.26E-07	긴 뉴코딩 RNA
RP11-82L7.4	8	7	0	0.039690894	0.0078125	긴 뉴코딩 RNA
RP11-624L4.1	39	24	9	0.00799839	0.006765493	긴 뉴코딩 RNA
RP11-382A20.5	62	40	13	0.000159175	0.00013427	긴 뉴코딩 RNA
RP11-382A20.4	74	42	14	0.00447784	0.000117223	긴 뉴코딩 RNA
RP11-77K12.8	15	12	2	0.002481753	0.006469727	긴 뉴코딩 RNA
MIR4519	22	16	2	0.002609238	0.000656128	긴 뉴코딩 RNA
RP11-19N8.4	48	31	8	0.000827422	0.000147038	긴 뉴코딩 RNA
RP11-756H20.1	20	14	3	0.008367966	0.006362915	긴 뉴코딩 RNA
RP11-420N3.2	184	114	43	1.52E-13	6.80E-09	긴 뉴코딩 RNA
RP11-525K10.1	12	10	1	0.003495999	0.005859375	긴 뉴코딩 RNA
RP11-196M3.2	22	18	4	0.000110448	0.002171755	긴 뉴코딩 RNA
RP11-524O1.4	15	13	1	0.000373252	0.000915527	긴 뉴코딩 RNA
LA16c-395F10.2	15	13	1	0.000373252	0.000915527	긴 뉴코딩 RNA
LA16c-444G7.1	9	8	0	0.004667377	0.00390825	긴 뉴코딩 RNA

도 23 (계속)

도면23n

RP11-2C15.1	7	7	0	0.0C1947543	0.0078125	긴 변코딩 RNA
RP11-106M3.3	19	16	3	0.0C0143894	0.002212524	긴 변코딩 RNA
RP11-18E23.3	12	11	1	0.0C0412196	0.003173828	긴 변코딩 RNA
DYX1C1-CCPG1	89	41	19	0.0C1539849	0.003108801	긴 변코딩 RNA
RP11-10O17.3	12	10	1	0.0C3495999	0.005859375	긴 변코딩 RNA
RP11-333E1.1	50	33	9	0.0C0313309	0.00013577	긴 변코딩 RNA
CTD-31955.4	8	7	0	0.0C9990894	0.0078125	긴 변코딩 RNA
AP005530.2	30	20	3	0.0C4020879	0.000244141	긴 변코딩 RNA
CTC-297N7.5	16	13	2	0.0C1237737	0.003662627	긴 변코딩 RNA
RP11-79F17.1	21	15	3	0.0C4709308	0.003768921	긴 변코딩 RNA
RP11-927P21.1	13	10	1	0.00958061	0.005859375	긴 변코딩 RNA
RP11-587L7.6	31	22	9	0.0C0713756	0.003062401	긴 변코딩 RNA
RP11-80A24.3	17	16	1	6.98E-06	0.000137328	긴 변코딩 RNA
RP11-101C21.1	13	12	0	0.0C0182313	0.000244141	긴 변코딩 RNA
RP11-325K19.1	20	15	4	0.0C2186851	0.009605408	긴 변코딩 RNA
CTB-21J4.1	13	10	1	0.00958061	0.005859375	긴 변코딩 RNA
RP11-879F14.1	21	15	4	0.0C4709308	0.009605408	긴 변코딩 RNA
CTC-280E8.6	81	47	19	0.0C1472293	0.000378054	긴 변코딩 RNA
RP11-638C21.1	15	13	1	0.0C0373252	0.000915527	긴 변코딩 RNA
CTD-2285O21.3	11	10	0	0.0C0926183	0.000979563	긴 변코딩 RNA
CTC-559E9.4	60	35	13	0.0C5017435	0.001044054	긴 변코딩 RNA
CTB-55O6.4	12	12	0	2.26E-05	0.000244141	긴 변코딩 RNA
CTC-439O9.3	9	8	0	0.0C4587377	0.00390625	긴 변코딩 RNA
CTC-518B2.10	10	9	0	0.00208578	0.001953125	긴 변코딩 RNA
CTC-457E21.9	48	29	6	0.0C5188444	5.84E-05	긴 변코딩 RNA
CTD-2525I3.5	18	13	2	0.0C7370534	0.003662627	긴 변코딩 RNA
CTB-180A7.3	20	16	2	0.0C0443151	0.003656128	긴 변코딩 RNA
RP11-444A22.1	79	44	23	0.0C5881905	0.000969938	긴 변코딩 RNA
RP11-19C24.1	13	11	0	0.0C1676555	0.000489261	긴 변코딩 RNA
AP000320.7	59	36	17	0.0C1514199	0.008330168	긴 변코딩 RNA
RP11-514F8.8	39	27	7	0.0C0341544	0.000410688	긴 변코딩 RNA
RP11-517H2.8	29	22	4	0.0C0147512	0.000269761	긴 변코딩 RNA
RP11-98K19.5	17	13	1	0.0C3277923	0.000915527	긴 변코딩 RNA
RP11-398A8.4	7	7	0	0.0C1947543	0.0078125	긴 변코딩 RNA
LncRNA-HLALR1	7	7	0	0.0C1947543	0.0078125	긴 변코딩 RNA
RFS4KP21	7	7	0	0.0C1947543	0.0078125	위유전자(Pseudogene)
RP11-927P21.12	9	8	0	0.0C4587377	0.00390625	위유전자(Pseudogene)
RPS20P35	10	9	0	0.00208578	0.001953125	위유전자(Pseudogene)
MTMR9LP	10	9	0	0.00208578	0.001953125	위유전자(Pseudogene)
RP11-763B22.9	52	35	8	0.00011438	2.10E-05	위유전자(Pseudogene)

도 23 (계속)

도면23o

UBE2V1P8	8	7	0	0.00990894	0.0078125	위유전자(Pseudogene)
CCDC75P1	8	8	0	0.000798493	0.00390625	위유전자(Pseudogene)
RP11-18E23.4	11	10	1	0.000926183	0.00585375	위유전자(Pseudogene)
NBR2	11	9	0	0.007194054	0.001953125	위유전자(Pseudogene)
MTX1P1	10	9	0	0.00206578	0.001953125	위유전자(Pseudogene)
LUZF4P1	8	8	0	0.000798493	0.00390625	위유전자(Pseudogene)
UBE2Q2P1	20	14	3	0.008367966	0.006362915	위유전자(Pseudogene)
CTD-2302E22.1	7	7	0	0.001947543	0.0078125	위유전자(Pseudogene)
BAK1P1	11	11	0	5.50E-05	0.000488261	위유전자(Pseudogene)
TPTE2P2	29	20	7	0.00217818	0.00679645	위유전자(Pseudogene)
CTC-360J11.6	12	11	0	0.000412196	0.000488261	위유전자(Pseudogene)
AC125634.1	7	7	0	0.001947543	0.0078125	위유전자(Pseudogene)
RP11-720N19.1	8	7	0	0.00990894	0.0078125	위유전자(Pseudogene)
UBE2CP1	9	8	0	0.004567377	0.00390625	위유전자(Pseudogene)
RP11-538P18.1	7	7	0	0.001947543	0.0078125	위유전자(Pseudogene)
RP5-862G5.2	26	19	4	0.000935282	0.001298739	위유전자(Pseudogene)
DPY19L1P1	80	36	17	0.002300797	0.008330168	위유전자(Pseudogene)
RP11-98J23.2	34	25	7	0.000123307	0.001051201	위유전자(Pseudogene)
CTD-2561J22.2	9	8	0	0.004567377	0.00390625	위유전자(Pseudogene)
AC027612.3	26	19	5	0.000935282	0.003305376	위유전자(Pseudogene)
HNRNPA1P1	8	7	0	0.00990894	0.0078125	위유전자(Pseudogene)
GTF2H2B	22	17	5	0.000602604	0.00845027	위유전자(Pseudogene)
NDUFA9P1	8	7	0	0.00990894	0.0078125	위유전자(Pseudogene)
XXbac-BPGBP63418.1	8	7	0	0.00990894	0.0078125	위유전자(Pseudogene)
RP11-492D8.3	33	22	8	0.002578708	0.008062401	위유전자(Pseudogene)
LINC00974	13	10	1	0.00958061	0.00585375	위유전자(Pseudogene)
SEPT7P2	9	8	0	0.004567377	0.00390625	위유전자(Pseudogene)
HSD17B7P2	12	10	1	0.003495999	0.00585375	위유전자(Pseudogene)
C3P1	9	8	0	0.000327382	0.001953125	위유전자(Pseudogene)
RP11-867F9.1	18	14	3	0.001703841	0.006362915	위유전자(Pseudogene)
EGFEM1P	91	53	17	0.000673515	9.80E-06	위유전자(Pseudogene)
GTF2IRD2P1	13	11	1	0.001676555	0.003173828	위유전자(Pseudogene)
RP11-487G5.4	8	7	0	0.00990894	0.0078125	위유전자(Pseudogene)
RP11-111G23.1	12	11	1	0.000412196	0.003173828	위유전자(Pseudogene)

도 23 (계속)

도면24

유전자 기호	설명	WNT 시그널링의 음성 조절자
CHEK1	CHK1 체크포인트 호모로그 (<i>S. pombe</i>)	
CINP	CDK2-상호작용 단백질	
CLK1	CDC-유사 키나제 1	X
ADRB2	아드레날린, 베타-2-, 수용체, 표면	
TEX14	교환 발현된 14	
WEE1	WEE1 호모로그 (<i>S. pombe</i>)	X
BRAF	v-raf 유린 육종 바이러스성 종양유전자 호모로그 B1	X
C8ORF199	염색체 6 개방 리딩프레임 199	X
CAMK1D	칼슘/칼모둘린-의존적 단백질 키나제 ID	
CDADC1	시티딘 및 dCMP 탈아미노효소 도메인 함유 1	
CDC42BPA	CDC42 결합 단백질 키나제 알파 (DMPK-유사)	
COPB2	코타머 단백질 복합체, 소단위 베타 2 (베타 프라임)	
CSNK2A2	카세인 키나제 2, 알파 프라임 폴리펩티드	X
DGKB	디아실글리세롤 키나제, 베타 90kDa	
DGKI	디아실글리세롤 키나제, 이오타	
DGKQ	디아실글리세롤 키나제, 세타 110kDa	
DGKZ	디아실글리세롤 키나제, 제타 104kDa	
EPHA6	EPH 수용체 A6	
DLG3	디스크, 큰 호모로그 3 (신경내분비-dlg, 초파리)	
DMPK	이영양증 근긴장-단백질 키나제	
DUSP1	이중 특이성 포스파타제 1	
DUSP8	이중 특이성 포스파타제 8	
RAPGEF3	Rap 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자 (GEF) 3	
ETNK2	에탄올아민 키나제 2	
TPRXL	테트라-펩티드 반복 호메오박스-유사	
FYB	FYN 결합 단백질 (FYB-120/130)	
GALK2	갈락토키나제 2	
GRK7	G 단백질-결합된 수용체 키나제 7	X
GSK3A	글리코겐 합성효소 키나제 3 알파	X
ILK	인테그린-연계된 키나제	
INSR	인슐린 수용체	
MGC28597		
MINK	미사켄-유사 키나제 1 (제브라피쉬)	
MYLK	미오신, 경쇄 키나제	X
NAGK	N-아세틸글루코사민키나제	
NEK11	NIMA (유사분열 유전자 a에 절대 없는)-관련된 키나제 11	
PCTK3	PCTAIRE 단백질 키나제 3	X
PDGFRB	혈소판-유도된 성장 인자 수용체, 베타 폴리펩티드	
PLK1	폴로-유사 키나제 1 (초파리)	
PRKAG3	단백질 키나제, AMP-활성화된, 감마 3 비-촉매성 소단위	
PRKCH	단백질 키나제 C, 에타	
RFS8KA5	리보솜 단백질 S6 키나제, 90kDa, 폴리펩티드 5	

도면25a

EIF4A3	FUS	SRSF1	U2AF2
AC005592.2	AC005592.2	FTX	AC019221.4
AC007131.2	AC007131.2	LAMTOR5-AS1	AC091879.1
AC013582.2	AC007277.3	LINC00286-1	AC093415.2
AC019221.4	AC007682.1	LINC00286-1	AC113007.1
AC091878.1	AC018890.0	PVT1	AP000318.2
AC093415.2	AC093415.2	PXN-AS1	CASP3AP2
AC093918.1	AC104389.28	RFFL1S	COX10-AS1
AC104389.28	AL163953.3	RP11-206L10.9	CTC-367J11.1
AL183953.3	ANKRD44-IT1	RP11-417J8.3	DYX1C1-CCPG1
ANKRD44-IT1	AP000318.2	RP5-857K21.4	ENTPD3-AS1
AP000318.2	AP006621.8	SNX29P2	FTX
AP009821.9	CASP8AP2	TMEM161B-AS1	INTS6-AS1
CASP8AP2	CTC-297N7.5	RPS4XP21	LAMTOR5-AS1
COX10-AS1	CTC-340A15.2	RPS20P36	LINC00470
CTB-6506.4	DIAPH2-AS1	RP11-10E23.4	MIAT
CTD-2021J15.1	DYX1C1-CCPG1	NBR2	PVT1
CTD-2285O21.3	ENTPD3-AS1	UBE2Q2P1	PXN-AS1
DYX1C1-CCPG1	FTX	HNRNPA1P1	RP11-100M3.2
ENTPD3-AS1	INTS6-AS1	GTF2H2B	RP11-1348G14.4
FTX	LA18c-444G7.1	SEPT7P2	RP11-18E23.3
INTS3-AS1	LAMTOR5-AS1	LncRNA-hLALR1	RP11-206L10.9
LAMTOR5-AS1	LINC00286-1		RP11-3C8D16.4
MAT	LINC00286-1		RP11-33J20.1
MIR4519	LINC00489		RP11-333E1.1
NR2F2-AS1	LINC00470		RP11-33N16.3
PVT1	MIAT		RP11-367C3.3
PXN-AS1	MIR4519		RP11-361K20.2
RFPL1S	NR2F2-AS1		RP11-417J8.3
RP11-1028J19.5	PVT1		RP11-498J4.3
RP11-100M3.2	PXN-AS1		RP11-611E13.2
RP11-1084E5.1	RFPL1S		RP11-77K12.8
RP11-10C17.3	RP11-1028J19.5		RP11-73F17.1
RP11-111A21.1	RP11-106M3.2		RP11-820L6.1
RP11-14N7.2	RP11-106M3.3		RP1-184J9.2
RP11-16E23.3	RP11-121M22.1		RP11-827P21.1
RP11-206L10.9	RP11-16N8.4		RP5-1168O20.4
RP11-308D16.4	RP11-202G18.1		STARD4-AS1
RP11-325K19.1	RP11-206L10.9		TMEM161B-AS1
RP11-333E1.1	RP11-283G8.5		MTMR9LP
RP11-33N16.3	RP11-308D16.4		RP11-18E23.4
RP11-340E6.1	RP11-317N12.1		NBR2
RP11-357C3.3	RP11-333E1.1		UBE2Q2P1
RP11-381K20.2	RP11-341A22.2		NDUFA9P1
RP11-389C5.4	RP11-344E13.3		LINC00674
RP11-398K22.12	RP11-357C3.3		SEPT7P2
RP11-405A12.2	RP11-381K20.2		LncRNA-hLALR1
RP11-417J8.3	RP11-383C5.4		
RP11-448H18.5	RP11-398K22.12		
RP11-466J4.3	RP11-417J8.3		
RP11-617Q13.3	RP11-417J8.6		
RP11-624Q1.4	RP11-420N3.2		
RP11-650I24.2	RP11-448H18.5		
RP11-611E13.2	RP11-598F7.1		
RP11-624L4.1	RP11-611E13.2		
RP11-77K12.8	RP11-624L4.1		
RP11-7F17.3	RP11-626H12.1		
RP11-820L6.1	RP11-636O21.1		
RP1-184J9.2	RP11-77K12.8		
RP11-85K15.2	RP11-99E15.2		
RP11-827P21.1	RP3-510L6.1		
RP11-917G19.11	RP5-857K21.4		
RP3-323F13.2	SNX29P2		
RP3-400N23.0	STARD4-AS1		
RP3-408P24.3	STEAP2-AS1		
RP4-537K23.4	TMEM161B-AS1		
RPS-1128O20.4	MTMR9LP		
SNX29P2	RP11-763B22.9		
STARD4-AS1	RP11-16E23.4		
TMEM161B-AS1	MTX1P1		

도면25b

UGDH-AS1	UBE2Q2P1		
RPS4XP21	BAK1P1		
MTMR8LP	RP11-720N19.1		
RP11-16E23.4	RP11-98J23.2		
NBR2	CTD-2561J22.2		
UBE2Q2P1	AC027612.3		
RP11-720N19.1	NDUFA9P1		
RP5-892G5.2	LINC00674		
CTD-2561J22.2	SEPT7P2		
AC027612.3	HSD17B7P2		
GTF2H2B	C3P1		
XXbac-BPG8PG348.1	GTF2IRD2P1		
RP11-462D6.3	RP11-111G23.1		
LINC00674	LncRNA-hLALR1		
SEPT7P2			
HSD17B7P2			
C3P1			
EGFEM1P			
GTF2IRD2P1			
LncRNA-hLALR1			

도 25 (계속)

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Yale University

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF USING TRANSPOSONS

<130> IPA160437-CN

<140> PCT/US2014/065997

<141> 2014-11-17

<150> 61/905,819

<151> 2013-11-18

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered sequence

<400> 1

cccttagtg agggtaatt agctccaage ggcgactgag a

41

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized

<400> 2

aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttcctac acgacgtct tccgatct 58
 <210> 3
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically synthesized
 <400> 3
 caagcagaag acggcatacg agatattggc gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg 60
 atct 64
 <210> 4
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically synthesized
 <400> 4
 caagcagaag acggcatacg agattacaag gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg 60

 atct 64
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically synthesized
 <400> 5
 agctccaagc ggcgactgag a 21