



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월21일

(11) 등록번호 10-2501406

(24) 등록일자 2023년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/113 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0172887

(22) 출원일자 2020년12월11일

심사청구일자 2020년12월11일

(65) 공개번호 10-2021-0074226

(43) 공개일자 2021년06월21일

(30) 우선권주장

1020190164837 2019년12월11일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020150055037 A

BMC CANCER 2014, 14:582, P.1_20

EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, 2015, VOL. 15(5), P. 723_734

ELIFE, 2017;6:E23382. P.1_25

(73) 특허권자

한양대학교 에리카산학협력단

경기도 안산시 상록구 한양대학로 55

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

채영규

경기도 안산시 상록구 해양1로 11, 604동 603호 (사동, 안산고잔6차푸르지오)

최해인

경기도 안산시 상록구 삼리로 24 (사동, 숲속마을아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 6 항

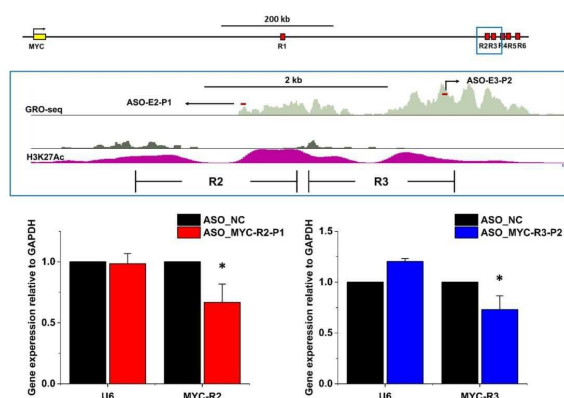
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 MYC 인핸서 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 간암세포에서 MYC 발현을 조절하는 신규 인핸서 영역을 제공하고, 상기 인핸서 영역의 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오타이드를 제공함으로써 MYC-의존성 암의 진행을 막아, 궁극적으로는 간암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도



(73) 특허권자

국립암센터

경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

강원대학교 산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자

안가영

경기도 안산시 상록구 학사2길 4, 304호 (사동)

김락균

서울특별시 강남구 삼성로57길 42, 202호 (대치동, 라이프라인)

김태수

서울특별시 성북구 북악산로 844, 101동 1304호 (돈암동, 브라운스톤 돈암 아파트)

최선심

강원도 춘천시 영서로 2169, 104동 1604호(퇴계동, 퇴계이안아파트)

이연수

경기도 김포시 김포한강3로 290-16, 802동 401호(장기동, 고창마을 이니스더원)

이용선

경기도 고양시 일산동구 일산로 241, 103동 402호(마두동, 백마마을1단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105267
과제번호	2017M3A9G7073033
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업 원천기술개발사업
연구과제명	eRNomics 기반 간암 특이적 발병기전 연구 및 신규 바이오마커 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.02.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711083951
과제번호	2017R1A2B4012905
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업 / 중견연구자지원사업 / 중견연구(총연구비1.5억초과~3억이하)

연구과제명 미세아교세포에서 신경염증 반응 유전자 발현에 관련된 enhancer RNA (eRNA)에 대한

기 여 율	1/2
과제수행기관명	한양대학교(ERICA캠퍼스)
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

20~50 bp 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,
상기 올리고뉴클레오타이드는 R2-3 또는 R3-2 영역의 일부와 전부 상보적이고,
상기 R2-3 영역은 서열번호 7의 염기서열로 이루어져 있으며,
상기 R3-2 영역은 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 9의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 조성물은 간암 세포에서 MYC의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,
상기 조성물은 PVT1의 발현을 억제하지 않는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,
상기 조성물은 암세포의 증식능 및 sphere 형성능을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 MYC 유전자의 신규 인핸서 영역을 발견하고, 상기 인핸서 영역의 발현 억제를 통해 MYC 유전자 발현 감소와 암세포의 증식능 및 sphere 형성능 감소 효과를 확인하여, MYC 인핸서 발현 억제제를 간암의 예방 또는 치료 용도에 제공하는 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되

고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 사망하고 있다. 이러한 암을 유발하는 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 요인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 다르다. 현재 치료제로 사용되는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있으며, 암세포만을 선택적으로 제거하지 못하므로, 암의 발생 후 이의 치료뿐 아니라, 암의 발생을 예방하기 위한 독성이 적고 효과적인 항암제의 개발이 절실히 필요하다.

[0004] 지난 수십 년간 암을 정복하기 위해 세포주기나 세포사멸(apoptosis)의 조절과 발암유전자나 종양억제유전자를 포함하는 새로운 표적을 모색함에 있어서 눈에 띄는 발전을 거듭해 왔음에도 불구하고 암의 발생률은 문명이 발달됨에 따라 증가하고 있다.

[0005] 한편, MYC은 여러 세포의 성장 촉진 신호경로들의 교차지점에 놓여있어서, 여러 리간드-막수용체 복합체들의 하류 유전자에 대해 즉각적으로 반응하여 세포의 성장과 증식을 조절하는 원발암유전자로서, 암세포에서 과발현되는 것이 보고되었다. MYC의 발현은 그 발현 수준이 그 근위 프로모터 부위 내에 있는 여러 전사 조절 모티프가 포함되는 다양한 기전에 의해 정교하게 조절되는데, BET(bromodomain and extraterminal domain protein) 억제제를 통한 MYC 조절 시도가 있었다. BET 억제제로서 JQ1, GSK525762, Birabresib (OTX-015) 및 ABBV-075 등이 보고되었고, JQ1 및 OTX-015는 MYC 발현 감소와 함께 항암효과가 있음이 보고되었으나 그 부작용으로 인해 암 치료에 제한적으로 사용되고 있는 실정이다.

[0006] MYC 유전자의 발현을 조절하는 인핸서 영역은 조직 특이적(tissue-specific)인 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 간암 세포에서 MYC 유전자의 발현을 효과적으로 조절하는 신규 인핸서 영역을 발굴하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Trends Cancer. 2018 December ; 4(12): 810-822 "The MYC enhancer-ome: Long-range transcriptional regulation of MYC"

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 간암세포에서 MYC 발현을 조절하는 인핸서 영역을 새롭게 발굴하여 완성된 것으로서, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 상기 인핸서 영역의 발현을 억제하는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 R2 또는 R3 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 20~50 bp 길이의 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 R2 영역은 서열번호 2의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있고, 상기 R3 영역은 서열번호 3의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 R2영역 중에서도 R2-3 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 20~50 bp 길이의 올리고뉴클레오타이드일 수 있으며, 구체적으로 MYC-R2-P1일 수 있다. 상기 R2-3 영역은 서열번호 7의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있으며, MYC-R2-P1는 서열번호 9의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 R3영역 중에서도 R3-2 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 20~50 bp 올리고뉴클레오타이드일 수 있고, 구체적으로 MYC-R3-P2일 수 있다. 상기 R3-2 영역은 서열번호

호 8의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있으며, MYC-R2-P1는 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 간암 세포에서 MYC의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 PVT1의 발현을 억제하지 않는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 암세포의 증식능력 및 구 형성능력을 감소시키는 것일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 R2 또는 R3 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 20~50 bp 길이의 올리고뉴클레오타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간암 치료 방법을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 간암 치료 약제 제조를 위한 R2 또는 R3 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 20~50 bp 길이의 올리고뉴클레오타이드의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 간암에서 MYC 발현을 조절하는 강력한 인핸서 영역을 제공하고, 상기 인핸서 영역의 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오타이드를 제공함으로써 암의 진행을 막아, 궁극적으로는 간암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 MYC enhancer 후보 영역과 루시페라아제 활성 분석을 통해 확인된 MYC enhancer 영역을 나타낸 도면이다.

도 2는 JQ1, OTX-015, C646 또는 DRB를 처리한 간암세포의 MYC mRNA 발현 수준을 비교확인한 도면이다.

도 3은 JQ1, OTX-015, C646 또는 DRB를 처리한 간암세포에서 MYC enhancer RNA 발현 수준을 비교확인한 도면이다.

도 4는 MYC enhancer 영역의 발현 억제를 위해 설계된 올리고 뉴클레오타이드(ASO) 처리에 따른 MYC enhancer RNA 발현 감소를 확인한 도면이다.

도 5는 설계된 ASO 처리에 따라 간암세포의 MYC 발현 감소 및 증식능력 감소를 확인한 도면이다.

도 6은 설계된 ASO 처리가 MYC 유전자의 TAD에 포함된 lncRNA 발현과 MYC에 의해 발현이 조절되는 유전자(FAM49B, CCAT1, CDKN2B, ICAM1, 및 IRF2) 발현에 미치는 영향을 확인한 도면이다.

도 7은 설계된 ASO 처리에 따라 간암세포의 sphere 형성능력 감소를 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명자들은 부작용 없이 MYC 유전자 발현 감소를 유도하여 암의 치료가 가능한 방법에 대해 예의 연구하여, 간암세포에서 MYC의 발현을 촉진하는 인핸서 영역을 발굴하고, 본 발명을 완성하였다.

[0025] 본 발명자들은 구체적인 실험을 통해 발굴된 MYC enhancer 영역에 상보적으로 결합할 수 있는 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide: ASO)를 설계하고 설계된 ASO가 타겟 enhancer RNA (eRNA)의 발현을 효과적으로 억제함을 확인하였다. 또한, 설계된 ASO는 타겟 eRNA 뿐만 아니라 MYC mRNA의 발현도 현저하게 감소시켰으며, 암세포의 증식능력과 sphere 형성능 감소에 각별한 효과가 있음을 확인하였다.

[0026] 이에, 본 발명은 MYC enhancer 영역에 상보적으로 결합할 수 있는 ASO를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명에서 ASO(antisense oligonucleotide)는 단일가닥의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드로서, 타겟 RNA와 상보적인 서열을 포함하며, 타겟 RNA와 상보적으로 결합하여 microRNA와 동일한 기능을 수행할 수 있다. 본 명세서에서 MYC enhancer 발현 감소를 위해 제공되는 올리고뉴클레오타이드는 MYC enhancer RNA와 상보적으로 결합할 수 있다는 의미에서 ASO로 표시할 수 있으며, 특별한 사정이 없는 한 본 명세서에서 올리고 뉴클레오타이드는 본 발명이 발굴한 신규 MYC enhancer 영역의 RNA와 상보적으로 결합할 수 있는 ASO를 의미한다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 '항암'은 암세포의 증식을 억제하거나 사멸하는 작용 및 암세포의 전이를 억제하거나 차단하는 작용을 의미하는 것으로, 암의 예방 및 치료 모두를 의미하며, 특히, 상기 암은 간암을

의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 '예방'은 조성물의 투여로 암 형성을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하는 것이며, '치료'란 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하는 것이다.

[0029] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 DNA 및 DEAE-텍스트란의 복합체, DNA 및 핵 단백질의 복합체, DNA 및 지질의 복합체 등의 다양한 형질전환 기술을 이용하여 세포 내로 도입시킬 수 있는데, 이를 위해 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 내로의 효율적인 도입을 가능하게 하는 전달체 내에 포함된 형태일 수 있다. 상기 전달체는 바람직하게는 벡터이며, 바이러스 벡터 및 비-바이러스 벡터 모두 사용 가능하다. 바이러스 벡터(viral vector)로서, 예를 들면, 렌티바이러스(lentivirus), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 허피스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipox virus) 벡터 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 렌티바이러스 벡터이지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 렌티바이러스는 레트로바이러스의 일종으로 핵공(nucleopore)이나 완전한 핵막으로의 능동 도입을 가능하게 하는 사전-통합 복합체(바이러스"셸(shell)")의 친핵성으로 인해 분열 세포뿐만 아니라 미분열 세포도 감염시킬 수 있는 특징이 있다.

[0030] 본 발명의 상기 올리고뉴클레오타이드는 표준 분자 생물학 기술, 예를 들어 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법을 이용하여 분리 또는 제조하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0031] 한편, 본 발명의 항암 조성물 내 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포에 도입된 형태로 제공될 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 용어 '도입'은 형질감염(트랜스펙션; transfection) 또는 형질도입(트랜스덕션; transduction)에 의해 외래 DNA를 세포로 유입시키는 것을 의미한다. 형질감염은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-텍스트란-매개 형질감염법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포솜 융합법, 리포펙틴 및 원형질체 융합법 등의 해당분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 형질 도입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 또는 바이러스 벡터 입자를 사용하여 세포 내로 유전자를 전달시키는 것을 의미한다. 본 명세서에서 형질감염 및 형질도입은 외래 유전자를 세포로 유입시키는 의미로서 혼용될 수 있다.

[0033] 이러한 방법을 통해 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 도입된 세포는 MYC-enhancer 발현 억제하는 안티센스 올리고 뉴클레오타이드를 높은 수준으로 발현할 수 있게 되며, 이러한 세포를 암조직에 이식함으로써 암세포의 세포 사멸을 유도하고 암의 침윤 및 전이를 억제시킬 수 있다. 그러므로, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 도입된 세포를 포함하는 본 발명의 조성물은 암 치료를 위한 세포치료제로 이용될 수 있다.

[0034] 한편, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 항암 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 '약학적으로 허용가능한 담체'란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0035] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 항암 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 볼 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.

[0036] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화할 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.

[0037] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사

등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 재료 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제형화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.

[0038] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 암세포에 처리하는 방법으로는 대개 올리고뉴클레오타이드를 세포에 도입시킬 수 있는 바이러스성 또는 비-바이러스성 운반 기술을 이용할 수 있다. 바이러스 운반 메카니즘은 렌티바이러스(lentivirus), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 헤르페스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipox virus) 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비-바이러스성 운반 메카니즘은 지질 매개 트랜스팩션, 리포솜, 면역리포솜, 리포펙틴, 양이온성 표면 양친매물질 및 이의 조합물을 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분으로서 MYC 인핸서 발현 억제제 이외에 공지된 항암제 또는 혈관신생 저해제를 추가로 포함할 수 있고, 암의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다. 다른 치료에는 화학요법, 방사선 치료, 호르몬 치료, 골수 이식, 줄기-세포 대체 치료, 다른 생물학적 치료, 면역치료 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 항암제의 예시에는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agents)로 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부칠(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin); 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)로 닥티노마이신(dactinoMYCin: actinoMYCin D), 독소루비신(doxorubicin: adriaMYCin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토크산트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicaMYCin), 마이토마이신(mitoMYCin) 및 C 브레오마이신(C BleoMYCin); 및 식물 알칼로이드(plant alkaloids)로 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 토포테칸(topotecan) 및 이리도테칸(iridotecan) 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 혈관신생 저해제의 예시에는 안지오스타틴(angiotatin)(플라스미노겐 절편); 항-안지오제닉 항트롬빈 III; 안지오자임(angiozyme); ABT-627; Bay 12-9566; 베네피(benefin); 베바시주마브(bevacizumab); BMS-275291; 연골-유래 억제제(cartilage-derived inhibitor, CDI); CAI; CD59 보체 절편; CEP-7055; Col 3; 콤브레타스타틴(combretastatin) A-4; 엔도스타틴(endostatin)(콜라겐 XVIII 절편); 피브로넥틴 절편; 그로-베타(Gro-beta); 할로퓨리논(halofuginone); 헤파리나제; 헤파린 헥사사카라이드 절편; HMV833; 인간 융모막 고나드트로핀(hCG); IM-862; 인터페론 알파/베타/감마; 인터페론 유도 단백질(IP-10); 인터루킨-12; 크링글(Kringle) 5(플라즈미노겐 절편); 마리마스타트(marimastat); 텍사메타손; 금속단백분해효소(metalloproteinase) 억제제(TIMF); 2-메톡시에스트라디올; MMI 270(CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; 네오바스타트(neovastat); NM-3; 판젼(Panzem); PI-88; 태반 리보뉴클레아제 억제제; 플라즈미노겐 활성화제 억제제; 혈소판 인자-4(PF4); 프리노마스타트(prinomastat); 프로락틴 16kD 절편; 프로리페린(proliferin)-관련 단백질(PRP); PTK 787/ZK 222594; 레티노이드 소리마스타트; 스쿠알라민; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; 테트라하이드로코티솔-S; 테트라티오몰리브데이트(tetrathiomolybdate); 탈리도마이드; 트롬보스폰딘(Thrombospondin)-1(TSP-1); TNP-470; 형질전환(transforming) 성장인자-베타(TGF- β); 바스쿨로스타틴(vasculostatin); 바소스타틴(칼레티쿨린(calreticulin) 절편); ZD6126; ZD6474; 파네실(farnesyl) 트랜스페라제 억제제(FTI); 및 비스포스포네이트(예를 들어, 알렌드로네이트, 에티드로네이트(etidronate), 파미드로네이트, 리세드로네이트, 이반드로네이트, 졸레드로네이트(zoledronate), 올파드로네이트(olpadronate), 이칸드로네이트 또는 네리드로네이트(neridronate)) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0045] [실험 방법]

[0046] 1. 간암 세포 배양

[0047] 간암세포주(HepG2 및 Huh7)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank: KCLB)에서 구입하여 최소 필수 배지 또는 10 % 소태아혈청 (fetal bovine serum: FBS) 및 penicillin (100 units/ml)/streptomycin (100 mg/ml) (Life Technologies, USA)을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 배지는 3~4일 마다 교체하였으며, 세포는 5% CO₂, 37 ° C 조건 하의 가습 인큐베이터에서 배양하였다.

[0048] JQ1 및 DRB(5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside)는 Tocris Bioscience (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고, JQ1, OTX-015, C646 및 DRB는 10mM의 농도로 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 희석하여 세포에 처리하였다.

[0050] 2. 루시페라아제 리포터 분석 (Luciferase reporter assay)

[0051] 프라이머를 이용하여 BglIII 및 HindIII 부위가 형성된 인헨서 영역 (R1 ~ R6)을 LongAmp® Taq 2X Master Mix (New England BioLabs)로 증폭하고, 각각 KpnI 및 XhoI로 절단하여 pGL4.26에 삽입하였다. 24-well plate에 세포를 분주하고 Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)을 이용하여 상기 인헨서 영역이 삽입된 pGL4.26로 형질감염 시켰다. 루시페라아제 활성은 제조사의 지침에 따라 Dual-Glo® Luciferase Assay 키트 (Promega, Fitchburg, WI)를 사용하여 측정하였고, PRL-TK (Renilla luciferase 발현 구조; Promega)를 내부 대조군으로 사용하였다. 루시페라아제 활성은 Renilla luciferase와 대조군(empty vector)으로 정규화하였다.

[0053] 3. RT-qPCR(real-time quantitative PCR)

[0054] 간암세포의 총 RNA를 RNAiso Plus (Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 추출하고, PrimeScript 역전사 효소 (Takara, Shiga, Japan)을 이용하여 cDNA를 제작하였다. 제작된 cDNA는 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara, Shiga, Japan)로 증폭하였다. 내부 대조군으로는 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 사용하였다. 각 데이터는 독립적인 3회의 실험 결과를 나타낸다 (n=3). PCR 수행 이후 결과는 ABI 7500 소프트웨어를 이용하여 ΔCT (critical threshold)과 ΔΔCT (comparative critical threshold) 방법으로 분석하였다.

표 1

[0055]

qPCR	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
MYC	GGCTCCTGGCAAAAGGTCA	AGTTGTGCTGATGTGTGGAGA
DUSP9	CAGCCGTTCTGTCACCGTC	CAAGCTGCGCTCAAAGTCC
VEGFA	TTATGCGGATCAACCTCACC	GAAGCTCATCTCTCCTATGTGC
MYC-R2-S	ACTGCAGCCACACTTCTGTT	TCTGCTGCAATCCAGAGGG
MYC-R3-S	GCACTGTTCCTACCTCCGC	ATGTAGTGGGACCATCACCC
PVT1-3'	GCCCCCTTCTATGGGAATCACTA	GGGGCAGAGATGAAATCGTAAT
CCAT1	GGGCTGGTACAGACTAGGGA	TAAGCAGGTCAGAAAGGGCG
FAM49B	CTCAAGATGACAAATCCTGC	CCGGTACATTGTTAATCCTC
ICAM1	ATGCCAGACATCTGTGTCC	GGGGTCTCTATGCCCAACAA
IRF2	AATGCTGCCCTATCAGAACG	CAGGACCGCATACTCAGGAGA
TERT	AAATGCGGCCCTGTTTCT	CAGTGGTCTTGAGGAGCA

[0056] 4. R2 및 R3 eRNA 억제를 위한 ASO(antisense oligonucleotide) 설계 및 처리

[0057] ASO를 이용하여 유전자 발현의 억제를 유도하였다. 구체적으로 간암세포를 분주하고 제조사의 지침에 따라 RNAiMax (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 이용하여 ASO와 스크램블 ASO(ASO-NC)으로 형질감염시켰다. 각각의 ASO는 Qiagen사에서 구입하였고, 성장배지에서 48시간 동안 125pmol 농도로 사용하였다.

[0059] 5. 세포 증식능력 및 생존력 분석(WST-1 assay)

[0060] 세포의 수는 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (MK400, Takara)을 이용하여 측정하였다. 간암세포(1 x 10³ cells/well)를 96-웰 플레이트에 분주하고 20시간 동안 배양한 후 JQ1 (5μM)을 처리하였다. 이어서,

0, 24, 48, 72, 또는 96 시간 동안 배양하고 37° C에서 4시간 동안 WST-1 (10 μ L/well)을 처리하고 450nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장률을 결정하였다. 각 세포 성장률은 9개 웰의 평균 흡광도를 24시간 동안 성장한 세포 결과에 대한 상대적인 백분율로 표시하였다.

6. 구 형성 분석(Sphere formation assay)

24-웰 초저부착 배양접시(24-well ultra-low attachment culture dishes)에 1000 cells/well 밀도로 세포를 분주하고, 2 mM L-glutamine, 1% sodium pyruvate (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin, and 100 ug/ml streptoMYCin, 20 ng/ml epithelial growth factor (Invitrogen), 10 ng/ml fibroblast growth factor-2 (Invitrogen), N2 (R&D system), 및 B27 (Invitrogen)이 포함된 DMEM/F12 serum-free medium (Gibco) 배지에서 배양하였다. 세포는 CO2 배양기에서 1~2주 동안 배양되었고, 100 μ m 이상의 직경을 갖는 oncosphere 세포를 JuLITMBr (NanoEnTek)를 이용하여 계수하였다.

7. 통계 분석

데이터는 평균 \pm S.D로 분석되었습니다. 데이터는 SPSS 17.0 프로그램 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용하여 일원 분산 분석을 사용한 후 Tukey의 HSD test를 이용하여 분석하였다(p < 0.05).

[실험 결과]

실시예 1. 간암 세포주에서 MYC 유전자의 인핸서 영역 선정

UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>)에 간암세포주의 H3K27A-seq 데이터를 분석하여 MYC의 유전자 발현을 조절하는 인핸서 영역의 후보로 R1~R6를 선정하였다. R1~R6 영역의 구체적인 정보는 하기 표 2에 나타났다.

표 2

R1	서열번호 1	>hg19_dna range= chr8: 129197046-129198471 (1425 bp)
R2	서열번호 2	>hg19_dna range= chr8: 129566391-129568191 (1800 bp)(E2-1 416 bp, E2-2 400 bp, E2-3 429 bp, E2-4 404 bp, E2-5 451 bp)
R3	서열번호 3	>hg19_dna range= chr8: 129568305-129569922 (1594 bp)(E3-1 401 bp, E3-2 394 bp, E3-3 404 bp, E3-4 488 bp)
R4	서열번호 4	>hg19_dna range= chr8: 129594870-129596100 (1230 bp)
R5	서열번호 5	>hg19_dna range= chr8: 129596820-129598027 (1207 bp)
R6	서열번호 6	>hg19_dna range= chr8: 129613863-129615792 (1929 bp)

이어서, 선정된 후보 인핸서 부분을 pGL4.2 벡터에 삽입하고 HepG2 세포에 형질감염시켜 루시퍼라아제 분석을 수행하였다.

그 결과, R2 및 R3 부분의 루시퍼라아제 활성이 가장 높게 확인되었다. 이어서, R2와 R3 부분을 500bp 크기로 잘라서 동일한 실험을 수행한 결과 R2-3와 R3-2 부분의 루시퍼라아제 활성이 가장 높게 나타났다(도 1). 이에, R2 및 R3 영역을 MYC 유전자의 인핸서 영역으로 선정하였다.

표 3

R2-3	서열번호 7	>hg19_dna range=chr8: 129567608-129568037
R3-2	서열번호 8	>hg19_dna range=chr8: 129569085-129569479

실시예 2. MYC 유전자의 발현 억제 약물 처리에 따른 인핸서 RNA(enhancer RNA: eRNA) 발현 감소 확인

2-1. MYC 발현 억제 약물 확인

BRD1~4는 BET(bromodomain and extraterminal domain)의 subfamily로서, 간암 세포는 BRD4(bromodomain-containing protein 4)가 과발현됨이 알려져 있다. BET의 억제제로 알려진 JQ-1 및 OTX-015과, Histone Acetyltransferase p300의 억제제인 C646 및 RNA polymerase II의 억제제로 알려진 DRB(5,6-dichlorobenzimidazole 1- β -d-ribofuranoside)을 각각 HepG2 세포에 처리하고 MYC, DUSP9, VEGFA의 유전자의 발현을 분석한 결과 MYC의 발현이 감소함을 확인하였다(도 2).

[0079] 2-2. 약물 처리에 따른 eRNA 발현 감소 확인

[0080] 실시예 1에서 선정한 인핸서 영역(R2~3)이 MYC 유전자 발현 조절 영역임을 검증하기 위하여, 상기 MYC 발현 감소 약물 처리에 따른 R2 및 R3 영역의 eRNA 발현 수준을 확인하였다. 구체적으로, MYC 발현 감소 약물(JQ-1, OTX-015, C646, 또는 DRB)을 HepG2 세포에 처리하고 total RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 RT-qPCR을 수행하여 eRNA 발현량을 확인하였다.

[0081] 그 결과, JQ1 및 OTX-015 처리시 R2 및 R3 영역의 eRNA의 발현이 감소되고, DRB 처리시 R3 영역의 eRNA 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다(도 3).

[0083] **실시예 3. R2 또는 R3 eRNA 발현 억제에 따른 효과 확인**

[0084] R2 및 R3 영역의 eRNA 발현 억제를 통해 MYC 유전자의 발현 감소를 유도하고 간암세포의 성장을 억제할 수 있는지 확인하고자, R2 및 R3 영역의 eRNA 발현 억제용 ASO(antisense oligonucleotide)를 합성하고, 리포펙틴을 이용하여 HepG2 세포에 주입시켰다. ASO의 구체적인 정보는 하기 표 4와 같다.

표 4

[0085] ASO	No.	Sequence (5'-3')
MYC-R2-P1	서열번호 9	CCTTCAAAGCATCACG
MYC-R3-P2	서열번호 10	CTAGTTTCCACTGACA

[0087] 3-1. R2 및 R3 eRNA 발현 감소 확인

[0088] R2 eRNA 발현 억제를 위해 설계된 ASO는 MYC-R2-P1로 명명하였으며, R3 eRNA 발현 억제를 위해 설계된 ASO는 MYC-R3-P2로 명명하였다. 각 ASO의 서열은 상기 표 2와 같다. ASO를 처리한 HepG2 세포의 R2 및 R3 eRNA의 발현 수준을 확인한 결과, 설계된 ASO는 각각 R2 eRNA와 R3 eRNA의 발현을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다(도 4).

[0090] 3-2. MYC mRNA 발현 및 세포증식력 감소 확인

[0091] 상기 실시예 3-1에서 각 eRNA 발현을 억제할 수 있음이 확인된 ASO를 처리한 HepG2 세포의 MYC mRNA 발현 수준을 측정하고 WST-1 assay 수행한 결과, ASO 처리에 따라 간암세포에서 MYC의 발현이 감소하고 간암 세포의 성장이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다(도 5).

[0092] 한편, 상기 ASO를 처리한 HepG2 세포에서 MYC 발현이 감소되는 것과 달리, MYC 유전자의 TED에 포함된 long noncoding RNA (lncRNA) PVT1의 발현은 변화가 없었고, MYC에 의해 발현이 조절되는 FAM49B와 CCAT1의 발현은 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한, ASO 처리시 MYC에 의해 발현이 감소하는 CDKN2B, ICAM1, IRF2의 유전자의 발현은 증가함을 확인하였다(도 6).

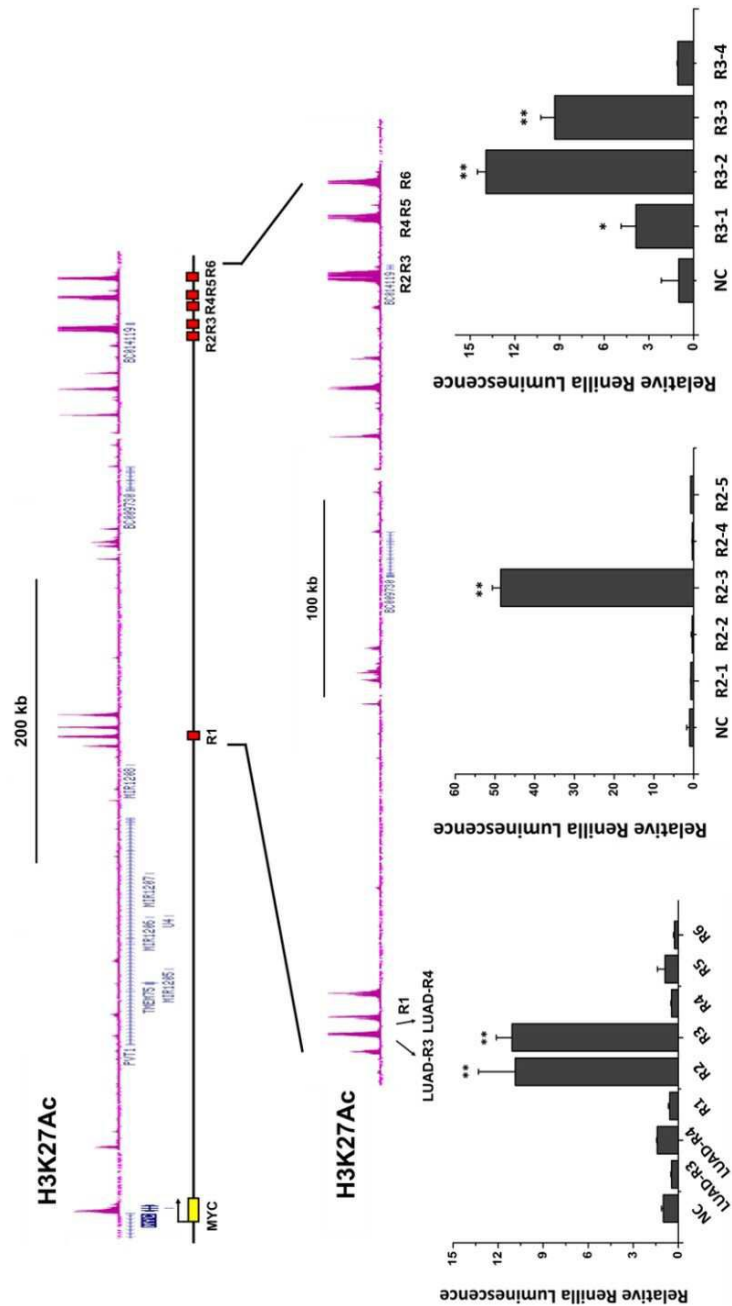
[0094] 3-3. Sphere 형성능 감소 확인

[0095] 이어서, ASO 처리 후 간암 세포의 sphere 형성능을 분석한 결과 MYC-R2 eRNA와 MYC-R3 eRNA의 발현이 감소하면 NC ASO 처리한 세포에 비해 sphere 형성능이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다(도 7).

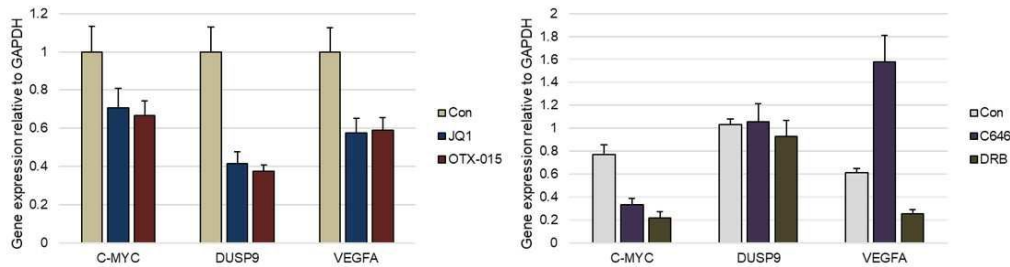
[0097] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

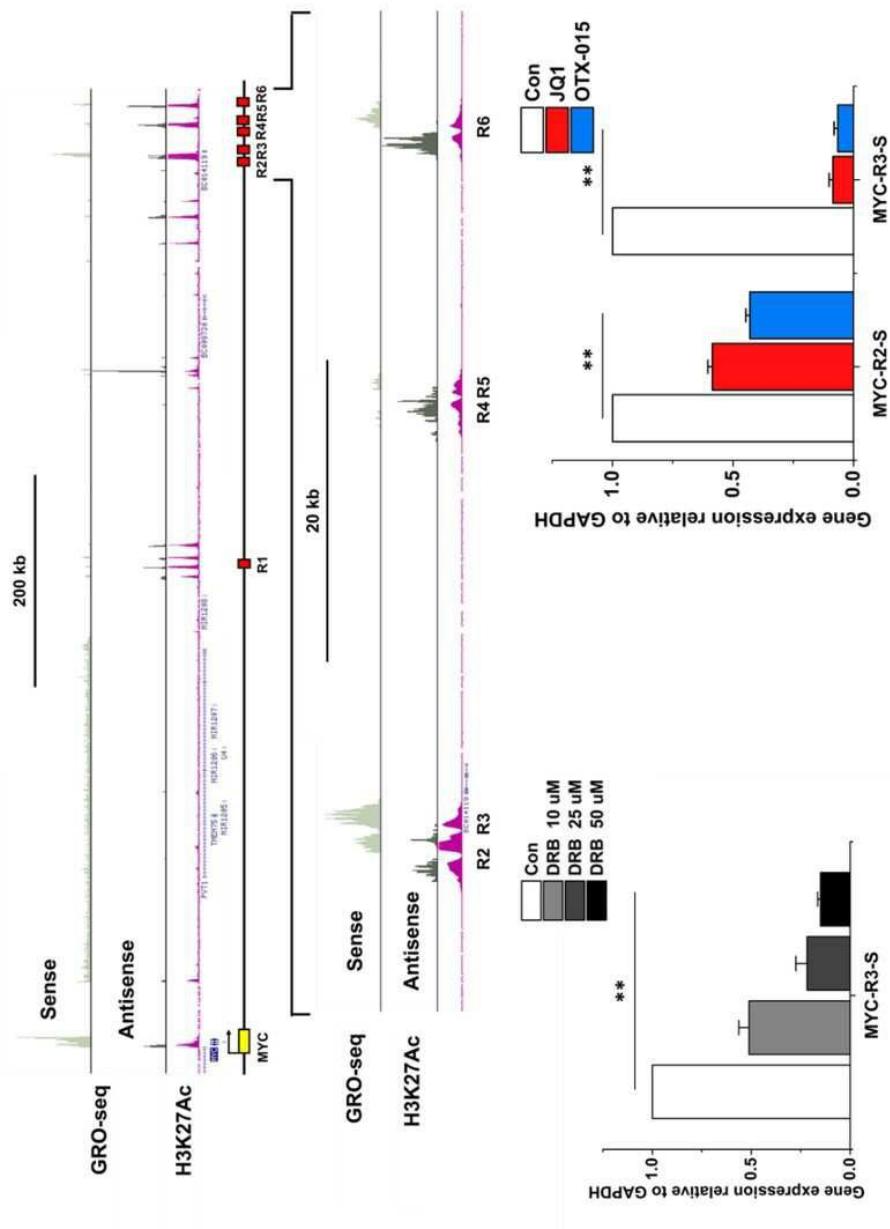
도면1



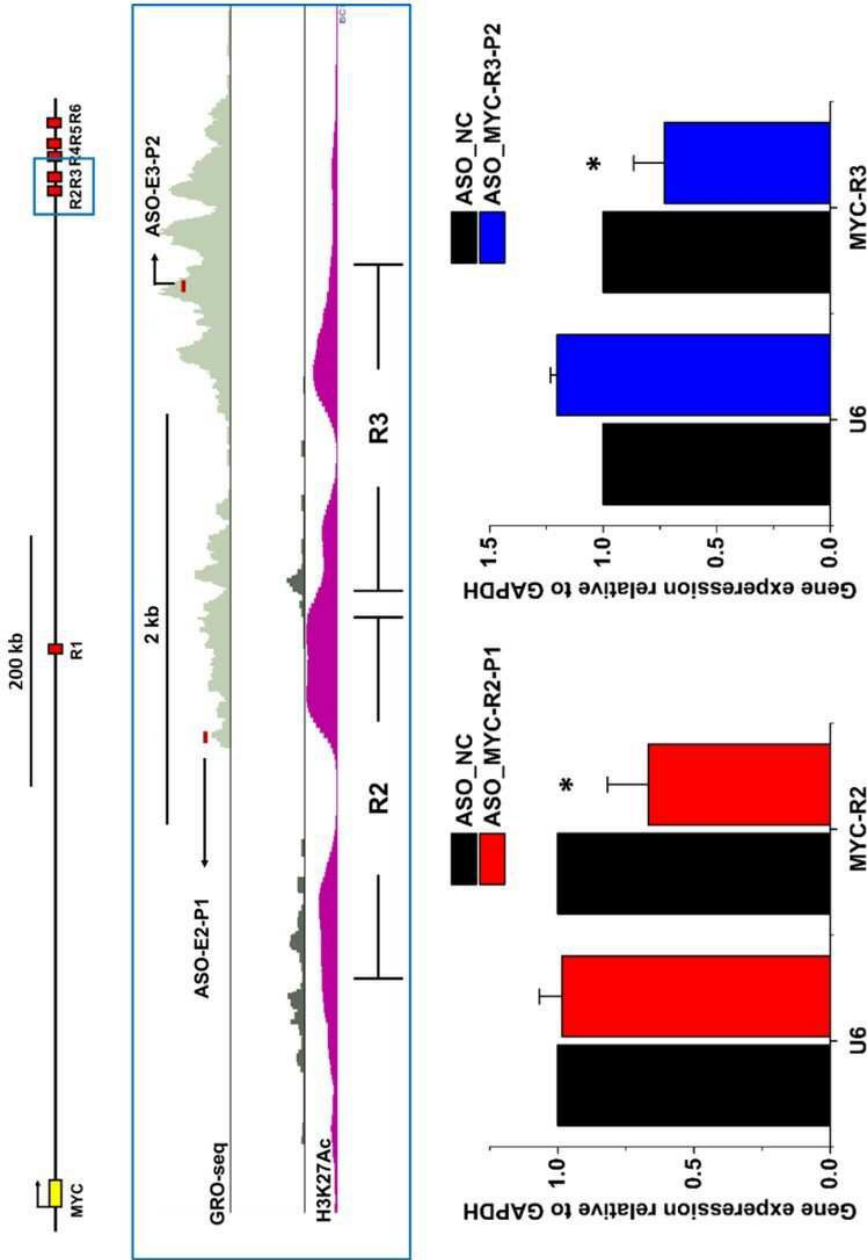
도면2



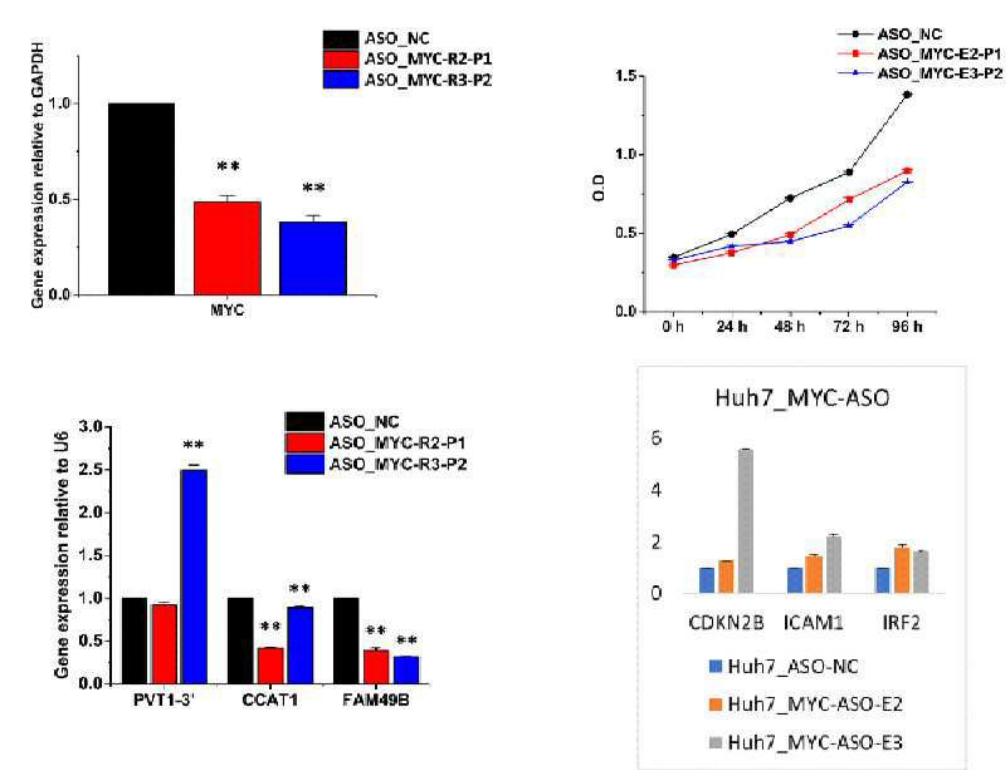
도면3



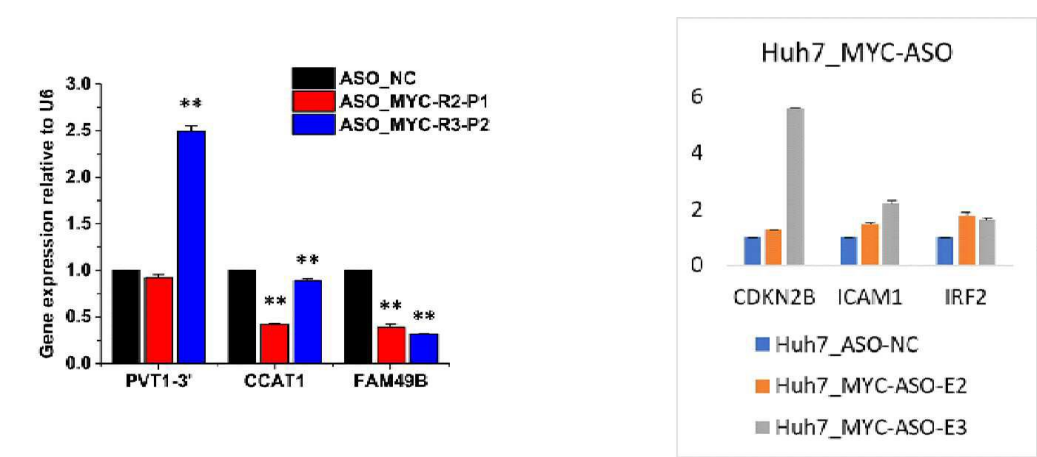
도면4



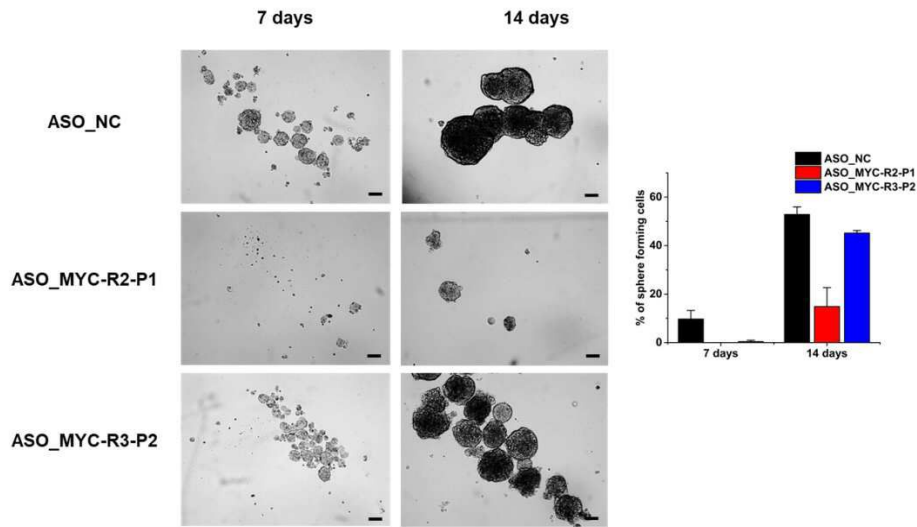
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Hanyang University ERICA Campus
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating liver cancer comprising an inhibitor of MYC enhancer expression as an active ingredient
- <130> DHP19-737-P1
- <150> KR 10-2019-0164837
- <151> 2019-12-11
- <160> 10
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1425
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

gcgtttcctg aaacaccacc attgatgagt cagtccttta ggttatatca ttgctagata 60

aaacaaaaca aaacacactt tagtagtgat ttgcatgttc atacaagttt gctaaatagc 120

agtgtttagt tctagacctt taaatagatc ttgttcagcc ctgacattca agacaattga 180

aatattctgt gagcagaact gtgaccacaa ctataataag gtttaagtga tccatatttg 240

gggatagttc ttctgaggc tggctggttg tgtctagtga agaggacca caaaagccct 300

ggagaagggg caagtttagc cactggaagg ggcaaggtca agggcagtta cacaacagaa 360

ctcccagagt taactcatat ctttccctac tgttccctaat ctatttcct cccctccca 420

cgtaacacgga tgtgcccttt aaatatattat ttgccacacct ttgcagtgtg cggtagactt 480

tgtctcaciaa gtcagcttga tccctttgaa ggtgtttact aattaaatca ggctgggagg 540

ttaggaaagt tcagatatat ttatcctgta taaagtagtc cctggacca ggaccctaa 600

acagccctag ggaggtcagc tacagtttcc ctgcttactt tctttgttgg aggaagtcct 660

aatcattgcc caattaagct gaataacgct gcttcttttt ctaccattgg ctcttgccac 720

aattctaaga cagacatcgg aatggctgga gccagaaagc taaatgctct taacaagtat 780

gtttatgggc cagtttccca cacagccgta tgaaattctc actcagtaac acagcatctg 840

agccacagac actgactcaa atacaatatt ggcttggaag gaagagtgtc gctgtagcac 900

aggctatttc ccictaatat tttaaaatag tatttgtttc agaagaatct gtgcacattc 960

atggatgtat gtgtctgagt gtatatgagt agtgccctgtg tgtatgtgtt tgtatatatc 1020

ttcagctaag agagctttct gaagaggcga aacacaaagt gagtgggaga tctctgttgt 1080

attgggtctt agggcagcct ctgcctcaat acaactccat tgtattaagt tcaggcttat 1140

ttgattccct tcattcactt tgttcatttt cactggctctg atagagagtg agaaatagct 1200

gatcatgatt acatgaaatg tctggttttg gtctcagga atccccttag agattcttgt 1260

cttaaaggct tcatttagtt ccaacagcaa ggccaaccac ttccatttc tggagcagtg 1320

gcatgaagca cttgggggtg cctgaaagca cactgagaat catgcagtta gcaactgtac 1380

aaagctgtgg gtgcccatgg gcttttctag gcatggcctt cctct 1425

<210> 2

<211> 1800

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

aggttaatgc agagcctcct cccacccccg ctctgaaat ggtgcttctc ctgggctctg 60

ggcagtagcc atccattcac atgacaacc acttttgttt tgcaggcaca taggtttttc 120

atttattctg tagaacaatc atgcatgtca gacaaggatt gacagctcca ttttatgggt 180

agagaaactg actcagagag cttagataac ctgccaagc tgatggatgat actcagaggt 240

taacctaatc agaaagtaat taacctcctt ctactetaat acatctctac aaataatccc 300

aattcacttt catccttgat gaaaatctga tttctatgaa gctttgacta aaacttcttt 360

aactttactt catttcatga tccattccat ttatatgcct cggtttctc atctaataaa 420

aaagcaaaaa gtaattagc tgagttacct atgcttggtc tgttgaagta gtttgaattt 480

ttctgaatca ggatgaatgc aaattgcctc attatttcac taattaataa tgtctgcttg 540

gaaatgcaac tatcagtga caataaatga taaagcttat aattatagat gagagcaatt 600
gcttcttttt ttgttcttac cttcatttca gtttatcttc ctgagctata gctacctctg 660

taagggttag gaaaacattt aaaatatcta aacagtgatt cctttctcaa gcgttcggaa 720
attgatgaat catcttactc tgcagcattc aaagtaactg tgtgcttgac acataggagg 780
aaaagtgggc tctttgaaat gtgagcagag caccgatcgt gtcacctgcc cggcgctga 840
cctgttactt ttccacctga ccctctgtgc ccaatgtcac ctggagcctg aaacctggaa 900
gggaaaagtc ctigactgga gtcagtggag agaaaatcat cacctgcttg ggcacaaaca 960
tgcttggtga ctgcgtcact gtctgttaag tgggatcagc taatagttgc acagcgggcc 1020
ttcaaagcat cacggcagaa ctgatgaagt tctgtaatg cattccctgt gtgaaggcct 1080

tggacttttag agctcaagtg cgccaggagc attttgagct tgccgacagg ctctcccatg 1140
gattctattt gggtatacgg cagtggaaaa gaattgactt tcattttcgt cactctctgc 1200
ctgagctctc cgactgcagc cacacttctg ttccccgtat attgcatagg ctattccctc 1260
tacctgggac accctccctt ctggattgca gcaagatttg cttctatgtt tcaactcagtt 1320
atctacttac aaatcacctc cttagggacc ttgcaggctg ctctctttct ctttacctgg 1380
cttcattttc cttcacagca cctgatacta ttacacatat ttacttagtt agtagtccat 1440
gctttttctt cccactgga ccataagttc tctgaaggca agagccacat ttgtgttttt 1500

ccactgatct gtccctcagt tctacaatag tactcaaccc acaatataac cttgagaaac 1560
atttcttaaa gaagtgaata aatgaacgag tgaaggagtg atttttttct cattttacaa 1620
atgaaacaag tcaaaaacaa agaggggaag taagctagtc cagctctaca accatttagt 1680
ggcacagcta gtattaacat ttgatttcc taactcacia tctaggattt tattttcgtt 1740
ttattccata caacactgtt ctccagaaat ttggcaactc agacggcact tgacttttca 1800
1800

<210> 3
<211> 1594
<212> DNA

<213> Homo sapiens
<400> 3

ccctttcaag ggcaaagacg attgaaaatt agttatacaa ttacattttt aaaacatttt 60
tgagtataat gattttaagc atttgttgta taaagggtgga tatgcataaa gaacaggtaa 120
aaataataat cattataatc atatatagaa gtcgtcttgg tacattttta acatatttaa 180
caattggaat cctgctgtat gccgagtttt ctatctctgt ttatacacat tatattttta 240

acatttttct aatgtcacta aaactaacat tgttttaggg atagtatttc aatataaag 300
 tgtgtcaciaa ttccacagtt ttagttgatc attttcctct tatttatcat taagattgtt 360
 tccacttttt atttattggg ttcttaggtt ttagtccttc atatttctgg gttcagttat 420

tctataaaca ttttcaaac tatgcagaaa ataaattgtc caagtttgta cttaaagtgc 480
 tacaaataat ctaaaaaaaaa aatcaggggt tcaagctcaa agcttctctt caaatcaata 540
 actgttgaag atttcactta ttgcatTTTT tagtctttga ggtttagagt ggagggtagg 600
 gatccggggg cagtagggaca ggaaacattg accaatttga gaacaaatag aggcttggaa 660
 aatttgttta cattctgttc tatgtgtgat tctggccttt gtaacaagga ggataaaaag 720
 ccagaactca ctttggtagc gcctgcagac cctgcactg taatgacacg agtgcaagct 780
 gcactgggtg caagtcagca tgactcagcc accctcccca cggggtgaga ggaagcagtg 840

gtggaaggcc agcacttggt cctacctccg catgtacagt ggtgaagaga aggctcacia 900
 agggtttctc aatctgagaa ggaaccctgt attcagagtg cagcttaacc caatgggata 960
 ttccagctat aattctaata agggtagtgg tccactaca tacctagcat atttatgaat 1020
 ctcaaattga tgccacctct tgtaccttgc acaagtaata atcactgcca ttgatctggc 1080
 acctctacg tgacagctta ctaacctagg cactttcagc tggtaacta atttaattct 1140
 caaaacaagt ttgccaggca agtattattg gctgcatttt ccagataaag acattgaagt 1200
 ttctaataaa cttcaggtaa agtttattcc agataaactt cactgaggtt catgctgtcc 1260

aaagtcacac agcgctggga ttttaactg gtctatttgt cttcaaagcc tatgcattac 1320
 tgcacaccta tgaggttctg cagagaaaag gtctctctt ctgctcagta cctgcaattc 1380
 tagggacagt tgcatggaa aaaactgtat tagaataatc tattgatcaa taatctcatt 1440
 gactagctat ttaatgagca cttactttgt gccaggtct ctactagttt cactgacag 1500
 agttgaatag aacacatttc tgatcataaa acgggaggag ggcgagattc gaagggcagg 1560
 attgtgagat acataagcct ccactctcag gaca 1594

<210> 4
 <211> 1230
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <400> 4

cgtctcagtt tccagagggt tctcttttta ctctctttca gcaatgaagc ttgttggttt 60
 tgatgcttct aagaaaactag attagcctaa ttcaacccca gtttaacatt ttttaaatgt 120
 cagctctcct ttctcttatt aacactaaat ttttttatt ctttatgac tcactttaca 180

gggcagtcca ctatagatag taatagaatc tccaagttt catcttggat agaacaaaag 240
attcagaagt caacatgctg ttagtatatt ttatttggtt caaactggtg ggaaacttag 300
cttgtcttta ttaagtattt gtaattgtag atactttgtt catattgtac tgctgacaag 360
tatgctctga agccagaact atagtttttc atgtctgtgg agttctcagc aagtgggtgc 420

atgctaatta ctttgtcttc tgtaagccca aatatattaat ggataatagg ttaaggatcc 480
cagcgaaaa atactggcaa gacttcttac ctattatgac atttttattt agctcgggtc 540
ttattttcca atctacttcc tttagagtta ctcatgtaa gagtttatta ttcatagtaa 600
gaacattttt tttttcctgt ggcagagaga gtagtctaga gatttcagtt gatgcaaggg 660
caaattcaaa agcaatccaa gtagactctg gcctctgtgt agagccaaat ccatcaaaca 720
gaggagatga gacagcaaaa tgtactcttt cattagtttc taccacaga gagtgggttt 780
taagggggga gggaacactt gggtgcttta taaaagtgc ttcttgtctc tccaggattt 840

ccgtttgcct tgaggaaaat ttgtttgttt gcagattagg tctattcttg ttttaatttg 900
atagaaattt taaagtaggt gtttttaaaa aatccttttt agagacctca ttacttaca 960
cattcacaag gctggactcc aaggccttca aagagcaaaa agtacctta attattattc 1020
agagtttata tagctcctag catagtttcc agcatatagt aagggtcttc taagtgtttg 1080
taagtgaag aatggatgaa tcaatgtgtg aataagtaaa taaagtaaat tagtaaatat 1140
ttttctacc tgaatattga taataagaaa ttaataattc tatttgcata attatttgaa 1200
tgtatctcaa ctccctgtct caatctaaga 1230

<210> 5
<211> 1207
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5

taggttgcct gccctagtag tggttgtgaa ggttcttcta agagtcattt ggtgactctt 60
tttcacctgc aatcttaaac ctgacattta cgtctgcctc caaagaaaag cactgggggt 120
cttaggcaga agcccagcca gctctctcca tgtatccaaa catcttctct tcttttgaga 180
gaatgctgaa catatttatt gagctttcat tgcattgttag gcagcagttt ttacaggcag 240
caattaacce tgiatgttct atatatagg gtggacttta ggcatcaagg tgcaggttca 300
tgcctcagtt tccctccctg taatgtggag gtacatactc tttggtgacg gagaagtaga 360

atattttgtt taaatacagt gtagatatgt attcactcaa atacacaacc cacttttaat 420
ggactcttga taccaggaat agaagaataa gaacagtttag atctagcgtt tactgagatt 480

ctttcatgtg ccagggcctt atatttggta ttagtcagct gttgttgcaa taatgctgca	540
taaaagggaaa caaactcaaa caaaaggcct atgatcaaca ataatttgtt ctaggggtca	600
tggggttgca ctaccactta gctgattgag gctgagcttg ggggggggct ttgcttcaag	660
ctgtaggttt gctgggcttt gctccaagag tatgctcagt acatatttgc tttttgtatg	720
tttgtttggg ggccagggat gaaaaggcca aagctacctg aaacactctc ctccgaggga	780
aaacacaccc cctacactgt gattctatgg tgtttcttgc tcttctccat cataatctgc	840
ctataattac atagcaggtg tttgtttacc agagcttttg agggacaata agtcctttta	900
cctgagcttt tgagaagcaa ttcactcatt tctgaatcca atacttcaga aatttcatgg	960
cacacagaag gagctcaata aatgtttttg agttaacaga tgcataagtg aataaaatct	1020
ttatagatct gtactaatac cttctaaaag ggttgtgcta aaatgatgaa tggttgagtt	1080
acaatttgta attaggacaa gcttgacctg ctgggcagt cactgaatct tttgaagtcg	1140
acatcatgga acacaagtga caaatgatcc tttcatgtca gcattggtgc tgtacaccgg	1200
gtagaat	1207
<210> 6	
<211> 1929	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 6	
ctttctgcca ggcaacatgc tttataatca aacaaaaaca ttgtcagttt tcacagatcc	60
ttctagagga tgagataaag tataataaaa caaccacaca aataattttt aaatagcaaa	120
tgtaattgca tgctactaag gcagctatga gttgttagga gaacatgaat acattcattt	180
actaattcaa tagttattgg ttgaacccta atgtgtaata ggcaactagcg atatatatat	240
aaggtttagtg caaaaataac tgcagtgttt gcaatataaa ataatggcca aaatcgcaat	300
tacttttgca ccaatctaata acacacacac acactcacac acacacacac acacacacac	360
acacacatat atatataatg tagctcatgc aaagggtgata tattagcttt tggtaaataag	420
gaaaagggat aggagtgcaa aggaggtcat gatttttagac aaagtagcct ggaaaggaag	480
aattcagtgg gaaggttaact ttaagtaggt gaaaaaagcc atctatttag gctttctctc	540
tcctgcatct caatgcataa cactttaaga aaccagggtt gttgcgatga tcaaatgaga	600
taacataaga gaaacctctt aaactaggac ctggagtcag ttcccaactg aatgaatcta	660
ttccctggat tcagaagagg tgctgaaatg tggtectcat atgcctacat attctcttcc	720
ttgttcacc caacttctaa aacaataaaa tcagcctccc caactcattc ttaatgtgat	780

aagttgtatt tgcttggaac tactactttt gtacctaggc ttgctcctgt tcattcaact 840
cttttacctc tgcagtgtcg cagaagccag acttgcaata tactcttggt ttttctatgc 900
attgcttgag gcctatagaa aggtaagaca aataacattc agtggcagtt ctaggtcaga 960
atgcaaaaca ccctggacaa atttccttgt gtgggttaca gtgtctgtag ctagtcttag 1020
cagattggat agcgctcagt ttgtggggca acttttgtaa gatgcatacc ctttttaaac 1080
ctgtcttctc agccgcaaaa caagaagaaa gctaaccctt tctgaccctc tcaaacata 1140

aagagagggg aataagttaa tgtttggaaa ggctgtgtg acccttgaag ccaagacatt 1200
atcaaagtac aaagtaaatt acaagaactg ttgctatcc cattagtaac tcaaatagta 1260
caaggggctc cacctgtcaa atcctagtta ggctttagt gcacacttgc ttgtctcatg 1320
aggataaaaa tggaaataaa agagttggaa actctcattg ggctcatttt tagaaagttt 1380
tgcgatagaa atccttatag gcacagacag gttctcttcc ataggtgcat ttagccccag 1440
tcccttcaat gagccttggg gcctggaaat aaggtaagga ttggagcttg gaaccagag 1500
acaagatgtg aggacttttg tgactgtagt ctagtcttct agaaccacg gttctctatc 1560

tctggacgtg taaaatgaga atcatcatca ccaacatcat aattactttt tggttatgat 1620
gtctctttaa cataattaaa tagctaaaat atatggactg ttaactctta ccatgttaat 1680
cactctatta tactatctcc ttaaatcccc aaaaaacttt atgagatgtg gcttattatt 1740
atccttaatt ttacacaaa aaaatgaggc agtgaaaggt tgaataaatt accccatta 1800
acagctctca aaagcaggga gcatgagatt cctttcccca caaatctgct gagctgactg 1860
aaaaatgaag ccctacctct ctgagttcca ttgccttta tataactag aactggcatg 1920
gagtgggtca 1929

<210> 7
<211> 429
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 7

tcctttctca agcgttcgga aattgatgaa tcatttact ctgcagcatt caaagtaact 60
gtgtgcttga cacataggag gaaaagtggg ctctttgaaa tgtgagcaga gcaccgatcg 120
tgtcacctgc ccggcgcgtg acctgttcc tttccacctg accctctgtg cccaatgtca 180
cctggagcct gaaacctgga agggaaaagt ccttgactgg agtcagtgga gagaaaatca 240
tcacctgctt gggcacaaac atgcctggtg actgcgtcac tgtctgttaa gtgggatcag 300
ctaatagttg cacagcgggc cttcaaagca tcacggcaga actgatgaag ttcctgtaat 360

gcattccctg tgtgaaggcc ttggacttta gagctcaagt gcgccaggag catTTtgagc 420
 ttgccgaca 429
 <210> 8
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 tgggtttcta ggTTTTtagtc cttcatattt ctgggttcag ttattctata aacattttca 60
 aaactatgca gaaaataaat tgtccaagtt tgtacttaaa gtgctacaaa taatctaaaa 120
 aaaaaatcag ggtttcaagc tcaaagcttc tcttcaaate aataactgtt gaagatttca 180
 cttatttgca ttttttagtct ttgaggttta gagtggaggg tggggatccg ggggcagtgg 240

 gacaggaac attgaccaat ttgagaacaa atagaggctt ggaaaatttg ttacattct 300
 gttctatgtg tgattctggc ctttgaaca aggaggataa aaagccagaa ctcactttgg 360
 tggcgctgc agacctctgc actgtaatga cacg 394
 <210> 9
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ASO_MYC-R2-P1
 <400> 9
 ctttcaaagc atcacg 16
 <210> 10
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > ASO_MYC-R3-P2
 <400> 10
 ctagtttcca ctgaca 16