

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0009095
(43) 공개일자 2023년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2021-0089718

(22) 출원일자 2021년07월08일

심사청구일자 2021년07월08일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

정재호

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 러
들로교수동 229호

김정민

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원
ABMRC 417호

(74) 대리인

파도특허법인유한회사

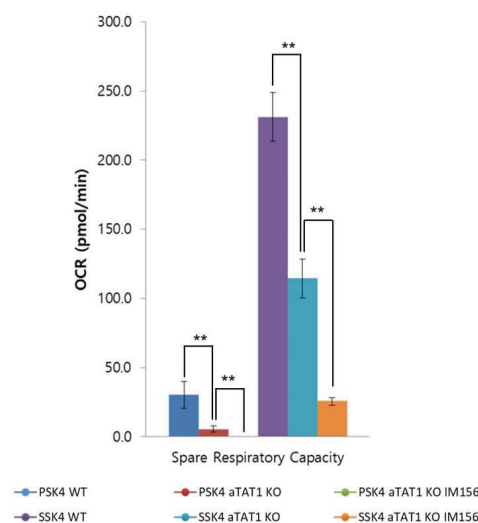
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 약제 내성 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명에 따른 조성물은 OXPHOS 억제제 내성을 내성을 극복하거나 OXPHOS 억제제 감수성을 증진시킴으로써 OXPHOS 억제제 내성 암의 성장을 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 다양한 암, 특히는 OXPHOS 억제제 내성 암의 예방, 개선 또는 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61P 43/00 (2018.01)

C12Q 1/6886 (2022.01)

C12Q 2600/106 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465033140
과제번호	HR14C0005040021
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성 (R&D)
연구과제명	제1유닛(4세부): 종양대사 조절 표적 항암 신약 개발 (Development of Novel therapeutics targeting cancer metabolism)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 세브란스병원
연구기간	2021.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711127658
과제번호	2018R1A5A2025079
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원 (R&D)
연구과제명	만성난치질환 시스템의학 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

MEC17(alpha Tubulin Acetyltransferase 1; aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는, 약제 내성 극복용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단백질의 활성 또는 발현을 감소시키는 제제는 MEC17 단백질 또는 그 일부 부위에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 MEC17 유전자 또는 그 일부 부위에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 약제는 OXPHOS(Oxidative Phosphorylation) 억제제인, 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 OXPHOS 억제제는 유비퀴논 환원 활성 억제제, 미토콘드리아 전자 수송 사슬 I 억제제 및 철 킬레이터로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 OXPHOS 억제제는 IM156, 메트포민(Metformin) 및 로테논(Rotenone)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 약제는 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 향문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 암을 치료하기 위한 용도로 사용되는 것인, 조성물.

청구항 8

MEC17(alpha Tubulin Acetyltransferase 1; aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상

기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는, 약제 감수성 증진용 약학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 약제는 OXPHOS(Oxidative Phosphorylation) 억제제인, 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 OXPHOS 억제제는 유비퀴논 환원 활성 억제제, 미토콘드리아 전자 수송 사슬 I 억제제 및 철 킬레이터로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 OXPHOS 억제제는 IM156, 메트포민(Metformin) 및 로테논(Rotenone)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 조성물.

청구항 12

제 8항에 있어서,

상기 약제는 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성 폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 향문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 암을 치료하기 위한 용도로 사용되는 것인, 조성물.

청구항 13

MEC17(alpha Tubulin Acetyltransferase 1; aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는, 약제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 약제는 IM156, 메트포민(Metformin) 및 로테논(Rotenone)으로 이루어진 군으로부터 선택된 OXPHOS 억제제인, 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성 폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 향문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 암인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 약제에 대한 감수성을 증진시켜, 약제에 대한 내성을 극복하거나 더 나아가서는 내성암의 성장을 억제할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망 원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 사망하고 있다. 지난 10년간 암 진단과 치료에 있어 다양한 항암 요법이 비약적으로 발전하고 있지만, 암 발병으로 인한 치사율은 여전히 높다. 또한 다양한 항암제 및 여러 항암 요법을 시도할 때 수반되는 부작용도 여전히 존재한다. 이러한 부작용을 줄이기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근 부작용이 적은 새로운 치료 요법으로 암 대사 과정을 조절하여 암을 치료하는 약제가 떠오르고 있다.

[0003] 항암 요법에 있어 효과적인 표적으로서 대사 과정과 관련이 있는 미토콘드리아가 부상되었으며(Trends Mol Med. 2004 Aug;10(8):372-8.), 이러한 미토콘드리아는 ATP 생성을 통해 세포 생존의 주요 구성 성분으로 기능할 뿐만 아니라, 미토콘드리아 막-의존적 세포 사멸 신호에 의해 세포 운명을 결정하기에 세포 사멸에 중요한 인자로 작용하는 것으로도 알려져 있다(Cell Death Differ. 2003 Aug;10(8):870-80.). 미토콘드리아에서 일어나는 전자 전달과 화학삼투를 통한 ATP의 합성 과정을 산화적 인산화(oxidative phosphorylation; OXPHOS)라고 하는데, 거의 모든 산소 호흡을 하는 생물들은 혐기성 발효 과정과 비교했을 때 보다 효율적으로 ATP를 합성하는 방법인 산화적 인산화를 수행한다. 이러한 산화적 인산화를 억제하는 약물을 OXPHOS 억제제라고 하며, 상기 억제제로는 IM156, 메트포르민(Metformin), 로테논(Rotenone), 메틸말론산(Methylmalonate), BAM 15, BAY 87-2243, 니트로프로피온산(3-Nitropropionic acid; 3NPA), 아토바쿠온(Atovaquone) 등이 존재한다. 이들 중에 항암 효과가 있는 것으로 밝혀진 항암 약물로는 IM156, 메트포르민(Metformin), 펜포르민(Phenformin), 로테논(Rotenone) 등이 있으나, 이러한 약물에 대해서 반응을 하지 않는 항암 내성을 가진 환자도 존재한다. 따라서 이러한 내성을 지닌 환자에게는 해당 약물로 치료한다 할지라도 치료의 효과를 보장할 수 없으므로, 임상 의사 및 환자들의 시간 및 비용이 불필요하게 소모되는 상황이 발생할 가능성이 존재하게 된다. 따라서 항암 치료를 시작할 시에는 개개인의 특성에 맞는 맞춤형 약제를 선택적으로 사용할 수 있도록 미리 치료 효율을 가늠할 수 있는 척도가 현실적으로 필요한 상황이다.

[0004] 이렇듯 약물에 대한 내성과 관련된 연구는 거의 없는 실정하기에 본 발명자들은 OXPHOS 억제제(oxidative phosphorylation inhibitor)에 내성이 있는 환자를 미리 선별하여 이를 극복할 수 있는 약제 내성 치료제를 개발하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 일 목적은 약제에 대한 내성 극복용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 약제 감수성 증진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 약제 내성암의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

- [0010] 명세서 내에 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0012] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 약제 내성을 극복하거나 약제 감수성을 증진시키는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명에서 상기 조성물은 MEC17(alpha Tubulin Acetyltransferase 1; aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명에서 상기 "MEC17(alpha Tubulin Acetyltransferase 1; aTAT1)"이란 알파 튜블린 아세틸트랜스퍼라제라는 ATAT1 유전자에 의해 인코딩되는 단백질로서, TAT, C6orf134, Nbla00487, alpha-TAT, 또는 alpha-TAT1으로도 불린다. 트랜스퍼라제 패밀리에 해당하며, 보다 구체적으로 아실 트랜스퍼라제에 속한다. 상기 ATAT1 유전자는 소포 형성에 중요한 역할을 하는 클라트린 단백질을 암호화하며, 라이신 40(lysine 40; K40) 상의 알파 튜블린을 아세틸화시킨다. 이 과정은 화학 주성(chemotaxis)과 실륜(cilium)을 형성하는 동안 미세소관의 성장에 있어 중요한 것으로 알려져 있다.
- [0015] 본 발명에서 상기 "MEC17 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자"의 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있고(Gene ID: 79969, NM_001031722.4), 상기 MEC17 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, MEC17 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비제한적인 예에서 상기 MEC17의 서열과 99% 이상 내지 100% 미만, 95% 이상 내지 99% 미만, 90% 이상 내지 95% 미만, 85% 이상 내지 90% 미만, 또는 80% 이상 내지 85% 미만의 상동성을 가지는 경우일 수 있으며, 당해 분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 목적하는 효과를 발휘한다는 것이 자명한 범위 내에서 이에 제한 없이 모두 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 상기 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제는 상기 단백질 또는 그 일부 부위에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 표적 MEC17 단백질에 직접적으로 작용하여 그의 활성 또는 발현이 저해되는 효과를 도출하는 수단에 해당하는 것으로 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법으로 공지된 기술에 의하여 용이하게 도출 가능한 것이라면 이에 제한되지 아니하고 모두 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 "펩티드 미메틱스 (Peptide Minetics)"는 AcAT의 활성 억제제를 이끄는 MEC17 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드이다. 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는 β -턴 디펩티드 코어(Nagai et al. Tetrahedron Lett 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류(Ewenson et al. J Med chem 29:295, 1986; 및 Ewenson et al. in Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce chemical co. Rockland, IL, 1985), 아제핀(Huffman et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 벤조디아제핀(Freidinger et al. in Peptides; chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), β -아미노알콜(Gordon et al. Biochem Biophys Res commun 126:419 1985) 및 치환 감마락탐환(Garvey et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)을 사용하여 생성할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 "앵타머 (Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앵타머는 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 앵타머 발굴 기술이 처음 개발된 이후(Ellington, AD and Szostak, JW., Nature 346:818-822, 1990), 저분자 유기물, 펩타이드, 막 단백질까지 다양한 표적분자에 결합할 수 있는 많은 앵타머들이 계속해서 발굴되었다. 앵타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 단일 항체와 비교가 되고, 특히 "화학 항체"라고 할 만큼 대체 항체로서의 높은 가능성이 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 "항체"는 상기 단백질 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다.
- [0020] 여기서, 상기 다클론 항체는 상기 단백질을 동물에 주사하고, 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청

을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 만들어질 수 있다.

[0021] 또한, 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포주 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다.

[0022] 또한, 상기 단백질에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')₂ 단편은 항체 분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로서, Fab 발현 라이브러리를 작게 하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질 (solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기관, 금속기관, 유리 섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.

[0024] 본 발명에서 상기 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제는 MEC17 단백질의 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 것일 수 있고, 바람직하게는 본 발명의 조성물은 상기 MEC17 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있으며, 여기서, 상기 항체는 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 상기 MEC17 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 상기 MEC17 단백질을 코딩하는 유전자, 바람직하게는 상기 유전자 또는 그 일부 부위에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA (short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (short hairpin RNA) 및 리보자임 (ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 표적 MEC17 단백질을 코딩하는 유전자에 직간접적으로 작용하여 그 발현이 저해되는 효과를 도출하는 수단에 해당하는 것으로 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법으로 공지된 기술에 의하여 용이하게 도출 가능한 것이라면 이에 제한되지 아니하고 모두 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 "안티센스 뉴클레오티드"는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다. 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포주흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.

[0027] 본 발명에서 상기 "shRNA" 및 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱 (silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 킥다운 (knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열 간의 결합에 의해 헤어핀 (hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이스 (dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 또한, siRNA는 이중 가닥 RNA(dsRNA)에 의해 타겟이 되는 mRNA를 변형시켜 RNA 간섭 현상(RNA interference; RNAi)을 유도하게 되는 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 이중 가닥의 RNA 단편에 해당하는 것을 말한다.

[0028] 본 발명에서 상기 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 MEC17 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 작용하여 MEC17의 유전자(예; mRNA 분자)를 절단하여 RNA 간섭(RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 MEC17의 발현을 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내 (in vitro) 전사를 이용한 siRNA

의 합성법, 시험관 내 (in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR (polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트 (cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에서 상기 "리보자임 (ribozyme)"은 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 말한다. 다양한 활성을 갖는 리보자임이 공지되어 있으며, MEC17 유전자의 리보자임은 공지된 또는 인공적으로 생성된 리보자임을 포함하며, 선택적으로 표적 특이적 RNA 절단 활성을 갖는 리보자임이 공지된 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 예시로 상기 MEC17 (aTAT1) 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제로서, 서열번호 3으로 표시되는 siRNA 및 서열번호 4로 표시되는 siRNA일 수 있으나, MEC17 단백질을 코딩하는 유전자를 타겟으로 하는 자리가 서열번호 7을 포함하는 경우에 해당하는 것이라면, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 다른 일 예시로 상기 MEC17 (aTAT1) 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제로서, 서열번호 5로 표시되는 siRNA 및 서열번호 6으로 표시되는 siRNA일 수 있으나, MEC17 단백질을 코딩하는 유전자를 타겟으로 하는 자리가 서열번호 7을 포함하는 경우에 해당하는 것이라면, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에서 상기 "약제 내성"이란 약물을 정량 반복적으로 사용했을 때 해당 약물의 효과가 감소하는 것을 말하며, 약제 내성이 있는 환자에게 이전에 경험한 동일한 효과를 얻기 위해서는 그 사용량을 늘리거나 사용 빈도를 증가시켜야 하거나 혹은 이전과 같은 용량의 물질을 투여해도 전과 똑같은 효과를 얻지 못하는 상태를 말한다.

[0033] 본 발명에서 상기 "내성 치료"란 약제를 정량 반복적으로 사용했을 때 해당 약물의 효과가 감소하거나, 약제 내성이 있는 환자에게 이전에 경험한 동일한 효과를 얻을 수 있도록 회복시키는 작용을 말한다. 보다 구체적으로 약제를 보다 적은 횟수 또는 보다 적은 용량을 적용하여도 동일한 항암 효과가 나타나게 만들거나 약제 내성이 발생하기 이전 상태로 되돌려 이전과 같은 용량 또는 이보다 적은 용량의 물질을 투여해도 같은 효과를 얻을 수 있는 상태로 만드는 작용을 말한다.

[0034] 본 발명에서 "약제" 또는 "항암 치료제"와 "항암제"는 혼용하여 사용될 수 있으며, 상기 약제는 미토콘드리아의 산화적 인산화를 억제하여 암 세포를 사멸시키는 새로운 기전을 갖는 항암제에 해당한다. 다양한 유형의 면역 세포는 세포 생존, 발달 및 기능을 유지하기 위해 특정한 세포 대사 과정을 이용하므로 상기 약제는 ATP 생성을 억제함으로써 암 치료 효과를 높이는 데에 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 상기 항암제는 OXPHOS 억제제, 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미드, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스쿰알bum, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙, 오조가마이신, 이브리투모맙, 헤파타라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토틱세이트, 우라실, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 칼티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물을 이용한 것일 수 있으며, 바람직하게는 OXPHOS 억제제일 수 있고, 보다 바람직하게는 OXPHOS 억제제의 예시로서 유비퀴논 환원 활성 억제제(ubiquinone reduction activity inhibitor), 미토콘드리아 전자 수송 사슬 I 억제제(mitochondrial electron transport chain I inhibitor) 또는 철 킬레이터(iron chelator)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 해당할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 상기 "OXPHOS 억제제"란 유비퀴논 환원 활성 억제제(ubiquinone reduction activity inhibitor), 미토콘드리아 전자 수송 사슬 I 억제제(mitochondrial electron transport chain I inhibitor) 또는 철 킬레이터(iron chelator)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으며, 미토콘드리아의 산화적 인산화를 억제하여 암 세포를 사멸시키는 기전을 가진 약물이라면 이에 제한되지 않고 모두 포함될 수 있다.

- [0037] 본 발명에서 상기 유비퀴논 환원 활성 억제제는 IACS-010759일 수 있으나, 미토콘드리아 내막에 존재하는 지용성 전자운반체인 유비퀴논의 활성에 영향을 미치는 약물에 해당한다면 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명에서 상기 미토콘드리아 전자 수송 사슬 I 억제제는 IM156, 메트포민(Metformin), 펜포르민(Phenformin) 및 로테논(Rotenone)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 IM156일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명에서 상기 철 킬레이터는 VLX 600일 수 있으나, 미토콘드리아 호흡을 억제하는 기능을 가진 화합물이라면 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에서 상기 "IM156 약물"은 CAS 번호가 1422365-94-3로, 이전에 HL156A로 알려진 새로운 비구아니드 유도체(biguanide derivative) 화합물의 일종으로 다른 비구아니드 약물과 유사하게 미토콘드리아 복합체 I(mitochondrial complex I)을 차단하는 작용을 하는 약물에 해당한다. 비구아니드에서 추출한 소분자 경구 약물로 강력한 산화성인산화(OXPHOS) 억제제로 알려져 있다. 최근 연구 결과에 따르면 IM156을 이용한 시험관내 배양된 쥐 복막 증피 세포 및 쥐 신장 근위관 세포의 치료 후, AMPK 활성은 메트포민과 같은 다른 AMPK (AMP-activated protein kinase)보다 효과가 더욱 좋다는 것이 밝혀져 있다(Am J Physiol Renal Physiol. 2016 Mar 1;310(5):F342-50.). 그러나 IM156 약물은 세포 유형에 따라 상이한 작용 방식으로 영향을 미치기 때문에 다양한 작용 기전에 관한 연구가 진행 중에 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 "로테논 약물"은 미토콘드리아 호흡 사슬 복합체 I(Mitochondrial Complex I)에 작용하여, 산화적 대사에 의존하는 종양 성장을 억제하는 기능을 하는 약물이다. 친유성을 띠며 콩과 식물인 론코카르푸스(Lonchocarpus) 및 데리스(Derris) 종의 뿌리와 줄기에서 자연적으로 발생하여 얻어지는 산물로 살충제로 널리 사용되었지만, 독성 효과가 있어 많은 국가에서 사용이 제한되기도 하였다. 또한, 로테논은 다양한 인간 암 세포주에서 세포 사멸을 일으켜 세포 증식을 억제하는 것으로 알려져 암 치료에 이용될 수 있도록 개발 중이다. 로테논 외 미토콘드리아 호흡 사슬 복합체 I에 작용하는 미토콘드리아 전자 수송 사슬 I 억제제의 예로는 IM156, 메트포민(Metformin), 펜포르민(Phenformin) 등이 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 조성물은 약제 내성을 극복하거나 약제 감수성 증진 효과를 높이기 위하여 항암제를 추가로 더 포함할 수 있고, 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리툽시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테오미드, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투즈렘오조가마이신, 이브리투모맙티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타디, 질산훈몰 키토산, 겐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 알티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비도렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 데모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라툼, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물을 이용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에서 "종양" 또는 "암"은 세포 주기가 조절되지 않아 세포 분열을 계속하는 질병으로서, 발생 부위에 따라 암종(Carcinoma)과 육종(Sarcoma)으로 나뉜다. 암종(Carcinoma)은 점막, 피부 같은 상피성 세포에서 발생한 악성 종양을 뜻하고, 육종(Sarcoma)은 근육, 결합 조직, 뼈, 연골, 혈관 등의 비상피성 세포에서 발생한 악성 종양을 뜻한다. 상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 종양의 분화 및/또는 증식 등 암의 진행이 본 발명에서 기술하는 암 세포 및/또는 암 줄기세포에 의존적인 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.

- [0045] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 약제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명의 상기 조성물은 MEC17 (aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 상기 MEC17의 단백질의 활성 또는 발현을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 알파튜블린 N-아세틸 트랜스퍼라제(Alpha-tubulin N-acetyltransferase; aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 억제제; 또는 상기 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 추가로 포함할 수 있으나, 아세틸화 튜블린 단백질의 아세틸화를 조절하는 기능을 가진 것이라면 이에 제한되지 아니하고 모두 포함될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 조성물은 약제 내성 암의 사멸 효과를 높이기 위하여 항암제를 추가로 더 포함할 수 있고, 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스큐알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크세이트, 우라실, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물을 이용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 상기 약제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서 MEC17 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자, 상기 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제 등에 대한 기재는 약제 내성 극복용 및 약제 감수성 증진용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0050] 본 발명의 상기 "예방"이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 약제 내성에 의해 암 세포의 제어되지 않은 성장 등에 의해 발생하는 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 상기 "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 약제 내성에 의해 암 세포의 제어되지 않은 성장 등에 의해 발생된 증상이 호전되거나 이롭게 되는 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서 (Elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[0054] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[0056] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 상기 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1 일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg 으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

발명의 효과

[0058] 본 발명은 항암 약제 중 특히 OXPHOS 억제제에 대한 내성을 치료하거나, OXPHOS 억제제에 대한 감수성을 증진시키고, 더 나아가서는 상기한 약제 내성 암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주인 SK4, MKN45, 및 AGS에서 측정된 MEC17(aTAT1) 유전자 발현 수준을 웨스턴블랏 분석을 통해 확인한 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, OXPHOS 억제제에 대한 감수성이 있는 세포주와 감수성이 없는 내성 세포주에 OXPHOS 억제제 약물인 로테논 또는 IM156의 약물 처리 전후 MEC17(aTAT1) 유전자 발현 수준의 변화량을 ImageJ로 정량화하여 비교 확인한 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, aTAT1-크리스퍼(CRSPR) Nick 아웃 후 타겟 유전자가 발현이 되지 않는 세포주 선별을 위해 웨스턴 블랏 분석으로 단백질 발현 수준을 확인한 도이다.

도 4 및 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 대조군(PSK4, SSK4 세포주)과 aTAT1-크리스퍼 Nick 아웃시킨 IM156 감수성 세포주 및 IM156 내성 세포주에 IM156 약물 처리 전, 후의 세포 호흡 과정에서의 산소 소모율(Oxygen Consumption Rate; OCR) 측정을 통하여 약제 감수성 변화를 비교 확인한 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 대조군(PSK4, SSK4 세포주)과 aTAT1-크리스퍼 Nick 아웃시킨 세포주(aTAT1 KO PSK4, aTAT1 KO SSK4 세포주)에 IM156 약물 처리 전, 후 세포 생존력(cell viability)을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0062] 실시예 1: 위암 세포주의 배양

[0063] 본 발명의 발명자들은 연세대학교 의과대학 평가위원회 (Institutional Review Board, IRB)의 승인을 얻어 모든 실험을 수행하였다. 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 인간 위암 세포주인 SK4, MKN45, 및

AGS 세포주를 수득하여 한국 세포주 은행의 가이드에 따라 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에 1 % 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco)을 추가하여 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터(incubator)(HERAcell 150i, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하여 실험에 이용하였다.

[0065] 실시예 2: OXPHOS 억제제 약물 저항성(약물 내성) 세포주에서의 MEC17(aTAT1) 발현 확인

[0066] 상기 실시예 1에서 배양한 세포주인 SK4 모세포를 이하 명세서 상에서 PSK4 세포 (SK4 parent cell; PSK4 cell)라고 칭하며, 상기 PSK4 세포로부터 글루코스가 없는 환경에서 30 일에 걸친 계대 배양을 과정을 거쳐 살아남은 세포(줄기세포성 암 세포; cancer stem cell; CSC)만을 일컬어 이하 명세서 상에서 SSK4 세포 (SK4 selected cell; SSK4 cell)라 칭한다. 아세틸화 단백질과 관련된 MEC17(aTAT1)의 유전자 발현과 OXPHOS 억제제인 로테논(Rotenone) 또는 IM156 약물로 인한 환자 예후의 상관관계를 확인하기 위하여 로테논과 IM156의 각 약물을 감수성이 있는 세포주(PSK4)와 감수성이 없는 내성 세포주(SSK4)에 처리하고, 동량의 세포에서 유전자 발현량의 변화를 분석하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었으며, 이를 보다 명확히 비교하기 위하여 ImageJ를 활용하여 상기 결과를 약물 처리 전 aTAT1 발현량을 기준으로 정량화(fold change)하여 도 2 및 표 1에 나타내었다.

표 1

aTAT1 발현 변화량	약물 처리 전	로테논(Rotenone) 약물	IM156 약물
PSK4	1.0	0.9375	1.0100
SSK4	1.0	1.5199	1.6454

[0068] 도 2와 표 1에서 보는 바와 같이, 내성 세포주인 SSK4 세포에서의 MEC17(aTAT1) 유전자의 발현이 약물 처리 후 50% 이상 확연하게 증가하였고, 약물 감수성 세포주인 PSK4 세포에서 MEC17(aTAT1) 유전자의 발현이 비슷한 수준으로 나타나거나 로테논 약물의 경우 되레 감소하는 경향을 띠는 것을 확인하였다. 이는 곧 MEC17(aTAT1) 유전자의 발현이 증가되는 경우에 상기 IM156 약물의 치료 반응성이 낮아 이후 환자의 예후가 좋지 않게 나타날 수 있음을 의미한다. 이처럼, 상기 약물 치료 후의 MEC17(aTAT1) 발현량이 대조군에 비하여 높게 나타난 경우 해당 약물에 내성이 생긴 것으로 볼 수 있고 이는 해당 약물에 대한 예후가 좋지 않을 것을 예측할 수 있다.

[0070] 실시예 3: OXPHOS 억제제 약물 저항성(약물 내성) 치료 가능성 확인

[0071] 상기의 위암 세포주인 SK4를 P 세포 (IM156 감수성 세포주)와 S 세포 (IM156 내성 세포주)로 분리하여 OXPHOS 억제제 약물 중 IM156의 내성이 극복되는지를 확인하고자 하였다. 크리스퍼 (Clusters of Regularly Interspaced Palindromic Repeats; CRISPR) 유전자 편집 기술을 이용한 추가 실험을 위하여 툴젠 (ToolGen) 업체에 아래의 표 2의 시퀀스를 제작 의뢰하여 실험을 수행하였다.

표 2

	시퀀스 (5'→3')	비고
1 st PCR	F: GCCTTTTGGTGACCTCTGA	서열번호 3
	R: GGATGATCGTGAGGCTCATA	서열번호 4
Adapt PCR	F: CCTAGGACCCGCTAATTAG	서열번호 5
	R: GATGGTATATAAGGGAGGCC	서열번호 6
MEC17(aTAT1) 표적 부위	TATGACCATTATAGTGAAGTGG	서열번호 7

[0073] 상기의 타겟 시퀀스가 들어있는 벡터로서 pRGEN_Human_ATAT1_U6_SG2 벡터와 Cas9을 발현하는 벡터인 pRGEN-Cas9-CMV/T7-Puro-RFP 벡터를 함께 48 시간 동안 형질 감염(transfection) 시킨 뒤 선별 마커 (selection marker)로 선별(도 3 참조)하여 타겟 유전자가 발현이 되지 않는 MEC17(aTAT1)이 녹 다운된 세포주를 만들어 실험에 사용하였다. 1) 대조군(PSK4 및 SSK4 세포주)에 IM156 약물 처리 후 세포 호흡 과정에서의 산소 소모율 (Oxygen Consumption Rate; OCR), 2) MEC17(aTAT1)-크리스퍼 녹 아웃시킨 PSK4 및 SSK4 세포주군(IM156 감수성 세포주 및 IM156 내성 세포주)에 IM156 약물 처리 전 세포 호흡 과정에서의 산소 소모율, 3) MEC17(aTAT1)-크리스퍼

스퍼 넥 아웃시킨 PSK4 및 SSK4 세포주군(IM156 감수성 세포주 및 IM156 내성 세포주)에 IM156 약물 처리 후 산소 소모율(OCR)을 비교 측정한 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

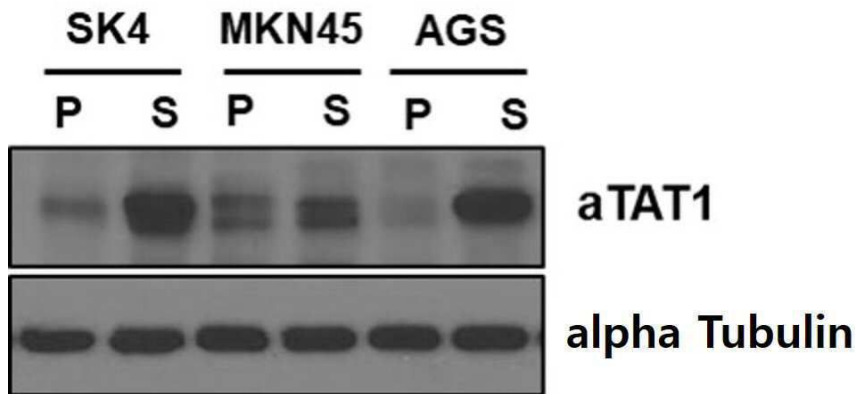
[0074] 실험 결과, PSK4 및 SSK4 세포주 모두 MEC17(aTAT1) 넥 아웃 후 IM156 처리에 의해 OCR 감소로 미토콘드리아 기능이 감소한 것을 확인하였으나, SSK4 세포주(IM156 내성 세포주)의 경우 IM156 처리 후 미토콘드리아 기능이 증가했던 이전 결과와는 반대로 MEC17(aTAT1) 넥 아웃 후 IM156 처리 시 OCR이 크게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 5 참조). 이는 곧 미토콘드리아 복합체 I 억제제(Mitochondrial complex I inhibitor)인 IM156 약물 내성을 획득한 경우 MEC17(aTAT1)의 저해를 통해 미토콘드리아 기능을 감소시킬 수 있음을 의미하는 것이다. 즉, 산소 소모율이 감소한 정도가 IM156 내성 세포주에 MEC17(aTAT1)을 넥 아웃 시켰을 시 가장 큰 폭으로 현저히 감소한 것을 통해 MEC17(aTAT1) 넥 아웃 시킬 경우 IM156 약물 감수성이 큰 폭으로 증가하는 것을 알 수 있다. 상기 결과를 검증하고자 추가 실험으로 세포 생존력을 측정하여 상기와 같이 미토콘드리아 기능 동일한 결과가 나타나는 지를 확인한 결과, 도 6에서와 같이 MEC17(aTAT1)을 CRSPR로 넥 아웃 시켰을 때 세포 생존력이 감소하였으며 이를 넥 아웃 시킴으로써 IM156 약물에 대한 반응성이 좋아지는 것을 다시금 확인할 수 있었다.

[0075] 이러한 결과를 종합할 때, MEC17(aTAT1) 유전자의 발현량을 통하여 OXPHOS 억제제 내성 세포주를 선별하였고, 더 나아가 상기 약물에 대한 내성을 치료하거나 상기 약물에 대한 감수성을 높여 OXPHOS 억제제 내성 암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있을 것으로 기대된다.

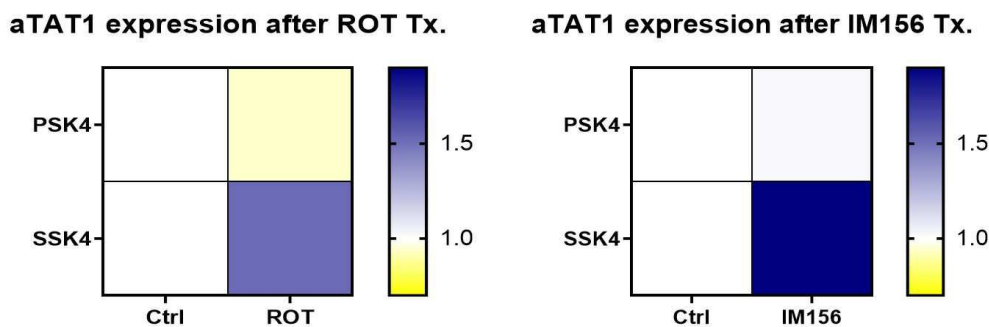
[0077] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

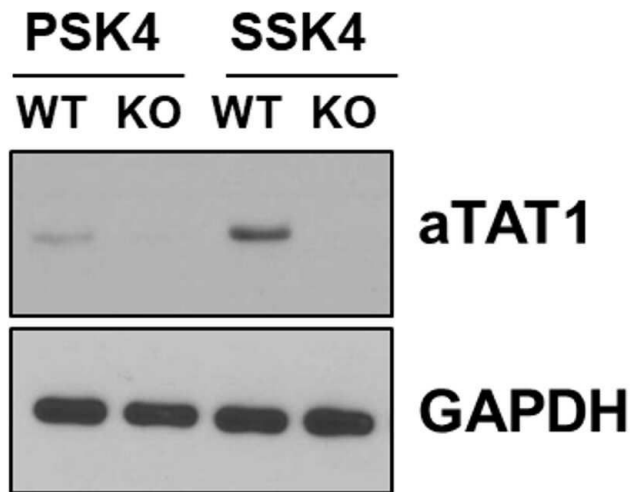
도면1



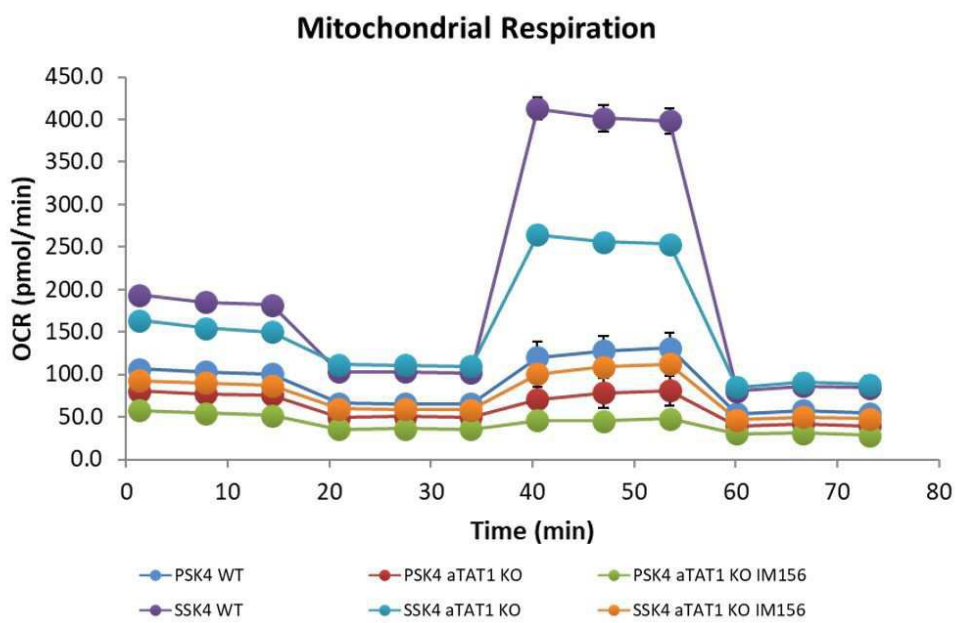
도면2



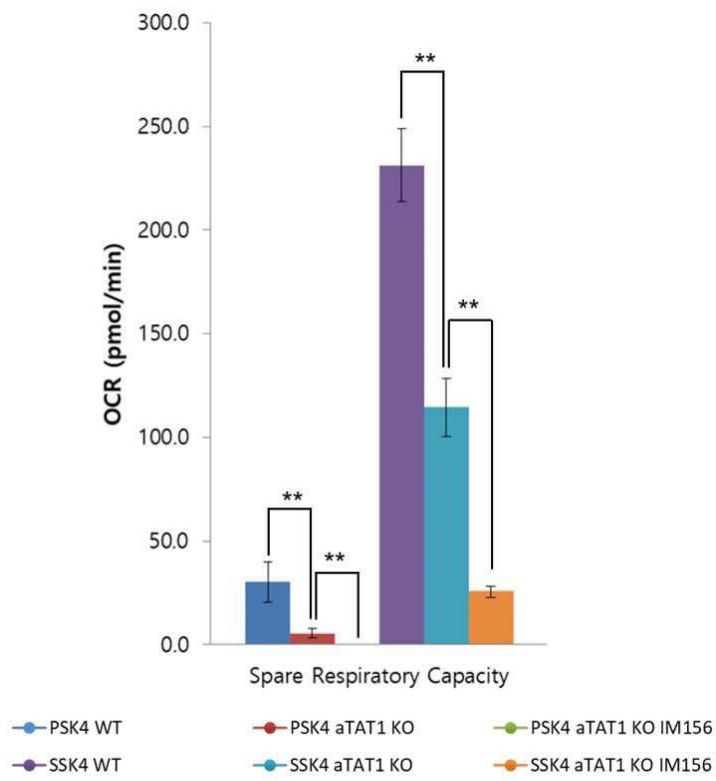
도면3



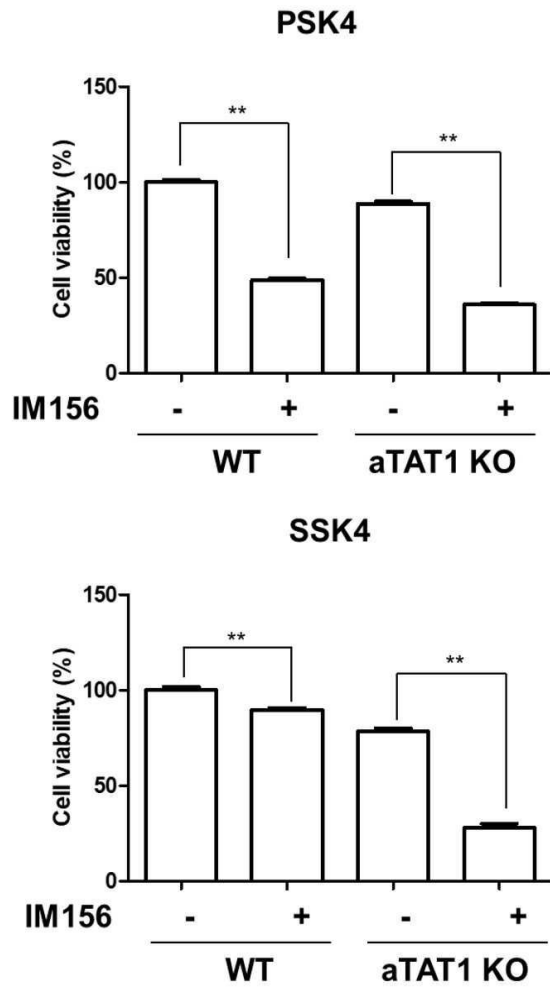
도면4



도면5



도면6



서열목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> A composition for treating drug resistance

<130> PDPB214114

<160> 7

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 421

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Phe Pro Phe Asp Val Asp Ala Leu Phe Pro Glu Arg Ile Thr

1 5 10 15

Val Leu Asp Gln His Leu Arg Pro Pro Ala Arg Arg Pro Gly Thr Thr

20 25 30
 Thr Pro Ala Arg Val Asp Leu Gln Gln Gln Ile Met Thr Ile Ile Asp
 35 40 45
 Glu Leu Gly Lys Ala Ser Ala Lys Ala Gln Asn Leu Ser Ala Pro Ile
 50 55 60
 Thr Ser Ala Ser Arg Met Gln Ser Asn Arg His Val Val Tyr Ile Leu
 65 70 75 80
 Lys Asp Ser Ser Ala Arg Pro Ala Gly Lys Gly Ala Ile Ile Gly Phe
 85 90 95
 Ile Lys Val Gly Tyr Lys Lys Leu Phe Val Leu Asp Asp Arg Glu Ala
 100 105 110
 His Asn Glu Val Glu Pro Leu Cys Ile Leu Asp Phe Tyr Ile His Glu
 115 120 125
 Ser Val Gln Arg His Gly His Gly Arg Glu Leu Phe Gln Tyr Met Leu
 130 135 140
 Gln Lys Glu Arg Val Glu Pro His Gln Leu Ala Ile Asp Arg Pro Ser
 145 150 155 160
 Gln Lys Leu Leu Lys Phe Leu Asn Lys His Tyr Asn Leu Glu Thr Thr
 165 170 175
 Val Pro Gln Val Asn Asn Phe Val Ile Phe Glu Gly Phe Phe Ala His
 180 185 190
 Gln His Arg Pro Pro Ala Pro Ser Leu Arg Ala Thr Arg His Ser Arg
 195 200 205
 Ala Ala Ala Val Asp Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Arg Lys Leu Pro
 210 215 220
 Pro Lys Arg Ala Glu Gly Asp Ile Lys Pro Tyr Ser Ser Ser Asp Arg
 225 230 235 240
 Glu Phe Leu Lys Val Ala Val Glu Pro Pro Trp Pro Leu Asn Arg Ala
 245 250 255
 Pro Arg Arg Ala Thr Pro Pro Ala His Pro Pro Pro Arg Ser Ser Ser
 260 265 270

Leu Gly Asn Ser Pro Glu Arg Gly Pro Leu Arg Pro Phe Val Pro Glu
 275 280 285
 Gln Glu Leu Leu Arg Ser Leu Arg Leu Cys Pro Pro His Pro Thr Ala
 290 295 300
 Arg Leu Leu Leu Ala Ala Asp Pro Gly Gly Ser Pro Ala Gln Arg Arg
 305 310 315 320

Arg Thr Arg Gly Thr Pro Pro Gly Leu Val Ala Gln Ser Cys Cys Tyr
 325 330 335
 Ser Arg His Gly Gly Val Asn Ser Ser Ser Pro Asn Thr Gly Asn Gln
 340 345 350
 Asp Ser Lys Gln Gly Glu Gln Glu Thr Lys Asn Arg Ser Ala Ser Glu
 355 360 365
 Glu Gln Ala Leu Ser Gln Asp Gly Ser Gly Glu Lys Pro Met His Thr
 370 375 380
 Ala Pro Pro Gln Ala Pro Ala Pro Pro Ala Gln Ser Trp Thr Val Gly

385 390 395 400
 Gly Asp Ile Leu Asn Ala Arg Phe Ile Arg Asn Leu Gln Glu Arg Arg
 405 410 415

Ser Thr Arg Pro Trp
 420

<210> 2

<211> 21182

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

aaatcttgag gctgagggcg ggtggtacag atgtgtatgg gaaaccccaa cccctatata 60

ttgtaaatag atgggctggg ctaaacattg ttgccgtttc atacttctac caactcagct 120

tttacacaat aaagctctac tgtctctggt ttgctttggg ctgtttccga tgaatgcat 180

tagcgggggg tgggctgagt gatggtcttt tcatataagc aattgggtga tgctgtgggg 240

agataagtgg tcaggcttaa gccagccttg cctgtgacgc ctgggactag aagccgggga 300

tgggcagctg tgccactctg tcaagatgcc ttgtggggcc cactccaca gcatggccca 360

ctgttcactg aggggataaa aggttgga gtagacact gggccaagga agactacgtt 420

gccatggcac tcactgccgt gggatgcagg gatggaaagg agtggcactg ctaggggcac	480
agctggtttg gcaagaaaaa cgggggccct gtcagttgcc aggacgctag ggggcaaggt	540
ctacaggcgg ggctcctgga aataaagact ccgagaggcg gtgcggcgag aggaggggcg	600
gaagtgacgt cgtgtggggc ggggtccgacc gcgcacaatg ggccatggag tccccgttcg	660
atgtggacgc gctgttcccc gagcggatca cgtgtctgga ccagcacctg aggccccag	720
ccgcccgcacc cggaaccaca acgcccggccc ggtgacagct caaaccacc ctctggccct	780
tttctcccgg ttctcttcca aacctgggtcc aggcaccacg cccctttctc actgactagt	840
gategcccc ttgatgtcc aggcctgcct ttttgggtgac ctctgaccct gggcctagt	900
ggattgatca gcgcttgat ctgtgacctt tcacccggg cccaaaatgt cccaatcaaa	960
ggatgtgggt gacctggcct ttctgcttcc tcacaataac ctttaaggag gagggagtgt	1020
gccaccttga aaggtgtgac agaagtttgg gtttcagaag ggtggggtgg gaaatcagat	1080
tggaagactc ccaggcaaag gcaggagacc ttcagtgtta aacctgggtt ggagtgtgg	1140
cccaggttcc caggactgac tgcctaggac ccgctaattt agtgagtatc tgactcttta	1200
tttcttctct ttctctagt ttgatctaca gcagcaaatt atgaccatta tagatgaact	1260
gggcaaggct tctgccaagg tactggagag tttttagatg gactaaaggg aggacctctg	1320
tggggatggt atataaggga ggccctgggtc ctctggagag acttgacaga agtctgactt	1380
aatcttccct gcaggcccag aatctttccg ctccatcac tagtgcacatc aggatgcaga	1440
gtaaccgcca tgttgtttat attctcaaag acagttcagc ccgaccgtga gtgccacatg	1500
ctcttccatc ccatacttaa ttcttctctt cctcagccct tcccccatct ttgactatct	1560
cttgacagata gataccacta gcctgttcat tattttcccc gtctacagg gctggaaaag	1620
gagccattat tggtttctac aaagttggat acaagaagct ctttgtactg gtgagtgtta	1680
ttggatgcta ggagtctgta taccttgggt tctgagaaca aaagtgtctg aggttagggg	1740
gcagcagaga tgccgggggt cctaaaacat ttttattgtt tctctcttag gatgatcgtg	1800
aggctcataa tgaggtagaa ccactttgca tcttggaact ttacatccat gagtctgtgc	1860
aacgccatgg ccatgggcga gaactcttcc agtatatgtt gcaggatatca ctgacctctt	1920
cactggttca tccaaactag gggctccttt gcctgagcc cttccagaag cctgcctcc	1980
caccccccat gttcccatgt cattctattc ctttccagg cttctggctt cctgttgga	2040
tgctttcccc atacttctc ctacctgag tctcttttc cctgcagaag gagcgagtgg	2100
aaccgcacca actggcaatt gaccgacct cacagaagct gctgaaattc ctgaataagc	2160
actacaatct ggagaccaca gtcccacagg ttagaggttt cagagaatag atccccactg	2220

agcattccca ttgaatttat ttgttattta tggcaaagaa gtagtgactt atttctatc	2280
acataggttt cattttctac aaccaggctc ttcttttctc ttgtggtacc atctctcatc	2340
ctgtagtgac ttcttttctc tctattttga tttttttttt tgagatggag tctcgccatg	2400
ctgcccaggc tggagtacag tggcgcaatc tcagctcact gcaacctcca ctctctggtt	2460
tcaagcgatt ctctgtctc agcctcctga gtagctggga ctacaggcac ccaccaccac	2520
accagctaa tttttatata tttagtggag acggagtac accatactgg ccaggtcgtt	2580
ctcaaaactc tgacctgtg atctgcccgc ctggcctcc caaaatgctg ggattacagg	2640
tgtgagccac cgcacttgac tttttttttt tttttttcaa agcagagtct cctgctgttg	2700
cccaagctgg agtgctatgg caggatcttg gctcactgca gcccaacctt ctgggctcaa	2760
gcgatactcc tcccttagcc tctgagtag ctgagactac aggcattcac caccatgcct	2820
ggctaatttt ttattttttg tagagatgag gtctcactat gttgcactgg gtggtcttga	2880
actcctggct caagagatcc acctgcctca gcctccaaa gtgctgggat tataggcgtg	2940
agccactgta ccagactta ttttgattct ttaccacaag ttgtttccta cacctaattt	3000
ttcttttttt tttttttgt gagatgtagc ctgtctccat cgtccaggct ggattgcagt	3060
ggcacgatca cagctcactg caacctctgc ctccggggtt caagtattc ttgtgcctca	3120
gcctcctgag tagtaggat tacaggcatg caccatcatg ccagctaat ttttgtattt	3180
ttagtagaga tggagtttca ccatgttga cagactggtc ctgaactcat ggctcaagt	3240
gatgtgccc cctcagctc ccaaaagtgc tgggattaca ggtgtgagcc accgcacaca	3300
accttatgc ctaatttttt tttagacag agtcgtctg tcaccaggc tggagtgcag	3360
tggcacgac tcagctcact gcaagctccg cctcccagg tccaggcatt ctctgcctc	3420
agcctcccga gtagctggga ctacagggtc ccaccaccat accagctaa tttttgtat	3480
ttttagtaga gatgggggtt caccgtgtta gccaggatgg tctagatctc ctgacctgt	3540
gatctgccc cctcggcctc ccaaagtgt gggattacag gcgtgagcca ccgtgcccga	3600
ccccttatga ctaattttca acccaaacat agccagctca tttcacctc ctgtttttca	3660
catagttcat tactcatctg gtcagtcagt attattaag ggtccagaat aatatgcatt	3720
ccctgtctc atggagcttt ggcctaatat agggaaggaa gtcttgttta taactaagt	3780
cagcaaatg ttactaatgc taccattca tccaataaac attgagtgc tggcagtgtt	3840
ctgggcacta ggaatgggtt actcaatgaa acagacaaca gcctgggcaa catagcgaaa	3900
ctctgtctct acaaaaaata caaaaaaaaa ttagccaggc gtggtggcac gacctgtag	3960

tcccagctac ttgggaggct gaaatgggag aatcgcttga gcctgggagg cagaggttgc	4020
agttagccaa gatcgcgcca ctgcattata gcctgggcaa cagagagaga ccctgtctcc	4080
aaaaatgaaa acaaaaacag aaaaaaaggc caggtgcggt gcggtggccc atgcccgtaa	4140
tcccagcact ttgggaggct gacgtgggcg aatcacttga ggtcaggagt ttgagaccag	4200
cctggtaac atggtaaac ccgctctcta ttaaaaatac aaaaattagc ggggcatgat	4260
ggtgggtacc tgtaatccca gctaccagg aggttaggc aggagaatca ctigaaccg	4320
ggaggcagag gttagcagtga accaagattg caccactgca ctccagcctg agcgacagag	4380
tgaggactcc atctcaaaaa agaaaaagaa aaagggccag gcatggtggc tcatgcctgt	4440
aatccccaca ctttgggagg ccaaggcagg aggatcacct gatatcagga gttagagatc	4500
agcatgtgga acatagtga accctgtctc tactaaaaat ataaaaatta actgggcatg	4560
atggcgtgcg cctgtaatcc cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat tgcttgaacc	4620
ccggaggcag aggttacagt gagccgaggt cctgtctacag cactccacc tgggggacga	4680
agcgagactc ttgtctcgga acaaaaaaaaa aaaacagaaa aagaaggga cagacaaaag	4740
tcctgtctt agtgggtggag cttatattct agctggagag acaaacaaac ataataaaca	4800
atatggttaa taagtgtctt ggaaaaatga gagcaagtaa gggtttggga gtactcaagt	4860
aaggtgggga tgggagtatg tgggattgca ggttgaaagg ggatcatcac tgagaaagt	4920
tcatttgagc aataactgaa aggaagtaag agtaaaaact ggccgggcac ggtggctcat	4980
gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccga ggcgcgcgga tcacgaggtc aggagatcta	5040
gaccatcctg gctaacatgg tgaaaccctg tctccactaa aaaaaataca aaaaaattag	5100
ctgggtgcct gtagtccag ctactcgga ggttaggca ggagaatggc gtgaacctgg	5160
gaggcagagc ttgcagttag ccgagatgc gccactgcac tccagcctgg gtgacagagc	5220
gagactccat ctcaaaaaaa aagaataaaa accaaggctg ggcgtggtga cttacatctg	5280
caatcctagt acttagggag gccgaggtgg gtggatcact tgagcccagg agttcgagac	5340
tagcctaggc aacatggtga aacccatct ctacaaaaaa cacaaaaatt agccaggtgt	5400
agtggcacgc acctgtggtc ccagctactt gggggtctga ggcaggagga ttgcttaagc	5460
ccaggaggtc gaagctgcag tgagccgaga tggtagcact gactgcagc ctgggtaaca	5520
acgtgagact gtctcaaaa aaacaacaa aaaaaaagag taagagccaa gaaatatctg	5580
gagagagagc atcccagaca gaaggtacca ccagtgtatg gccgtgaggt gggagtgtgc	5640
ctgaaagagc aaattggctg tgtccagagc agcatgagtc agcggaggag tatggtagga	5700
gatgagacca gagaggtaat gcggaggagg ggccttatag gctactgcaa agactggctt	5760
ttattttaag taaaaaataa gatcaggcca ggggtggcga ctcacacctg taatccagc	5820

actttgggag gccgaggtag gtggatcacc tgaggtctct actgaaaata ccaaattag	5880
ctgggtgtga tggcaggtgc ctgtaatccc agctgtttgg gagtctgagg caggagaatc	5940
actagaaccg ggaggcggag gttgcagtga gccgctgaaa ttgtaccact gcactcctgc	6000
ctgggcgaca gagcaagact ctttcttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaata gcgccaggtg	6060
tggtatctca ttcctgtaat cccagcattt tgggaggccc aggcaggtgg atcacaaggt	6120
caggagttcg agaccagcct ggccatatgg tgaacccca tctctactaa aaatacaaaa	6180
attagccggg tttgggtggc ggcacctgta gccccagcta cttgggaggc tgagatagaa	6240
gaatcgcttg aacctgggag gcagaggttg cagtgaactg agatcgact actgcactcc	6300
agcctggata acagaacgag actccatcaa agaaaaaaga aaaagatcat tttggctgtg	6360
atcttgattt tttctttttt aacaagatca ctttggctgt taagaacagg caatagccgg	6420
gcacagtggc tcacacctgt aatcctagca ctttgggagg ccgaggcagg tggattgcct	6480
gaggacttca agaccagtct ggctaacatg gtgaaacccc atctctacta aaaatagaaa	6540
aaaaaattag ccaggtgtgg tgggtctcgc ctgtaatccc agctactcgg gagactgagg	6600
caggggaatt gcttgaatca gggaggtaga ggttgcagtg agctgagatt gtgccactgc	6660
actgcactct agcctgggta cagagtaaga ccccatatca aaaaaaaaaa aaaaatggaa	6720
acggcaataa gggagccaga gtagaagcaa gtagactaat taggcagcaa caatcctggc	6780
gaaaaatggt ggtggctcag accaaggtgg tagcagtagt gatggtaaag agtggtaaaa	6840
ttttaaatat ttgaaggta aagcaagtaa gatttctga cagattgtat gtggagaaag	6900
aggactttag gacaatgcca aagcctgagc agctggaaga atgaagttgc tttaactgag	6960
atggttaggta gaccagcttt gggggaaata ctaggagtac atttttaata tgttaattgg	7020
agatgtctgt gatatgtcca ggtttgagta gacagttgga tacttccctg gagatcaggg	7080
aggaggtttg gggaggagag ttttcagcat acatctggta tctaaagcca acagacagga	7140
tgcgatcacc atagaaagat tatagataga gaagctgccc ctttgggccc tctttaagaa	7200
gtgaggaccc ccaactggct gctctgaaaa gccatctttg cattgttcct ggttcggtgt	7260
cctgtcacc acagccacct ccgccatgca cttcctctgc tgcctcagag tctggcagct	7320
taatcgacat agtcccaaaa ctctcacttt cttcttaatc ccttgcctcg gatcaccgt	7380
gtgccccacc atgtcagagg cagttgtgga cacaagctcc gtgatcacca ccaaggactt	7440
caaggagaag ttgtggagga ggcagaaagt ggaagagacg cccatgctaa cggaacgcct	7500
aatgaggaaa atggggagca ggagctgac aacgaggtag atgaagaaga ggaacagggt	7560
ggggagaaag aggagaagga agaggaaggt gatggtgaag aaaagaacgg agatgaaaac	7620
gaagcagctg aggcggtatg gacaaatggg cagctgatga tgatgaagat gacgatgttg	7680

ataccaagca gcagaaggcc agtgaggatg attagacagc aaaaaaagaa aagttaaact	7740
ttaaattaag gccaccgtga cctattcacc ctccacttcc catctcagaa tctaaacatg	7800
gttgccctcg agaggcctgc ttgccctcca cagacagtgc cactgcagat gacaggcact	7860
caccaccacc caacccaac cagagaattt gcaacagagg aggaaaaag aaccaaact	7920
tccaaggtct tgctctttta aaagtacttt aaaaaggaag ttgtttgtga ttttttattt	7980
acattttata tttttgtaca tattgttagg gtcatttttt ttttctttga gacggagtct	8040
agctctgtcg ccaggctcaa gtgcagtggc gcgatcttgg ctaccgcaa gctccacctc	8100
ctgggttcaa gtgattctcc tgccctagcc tctgagtag ctgggattac aggcgccgc	8160
caccacacc agctaatttt tgtattttta gcagagacag gctttacca ggttggccag	8220
gatggtttct atctcctgac cttgtgatcc acctacctcg gcctcccaa gtgctcgaat	8280
tacaggcgtg agccaccgcg gccagccag gttcagtcac ttttaatgat ctgagatgac	8340
caagccagcc ttggagggt tctctgtctt acttctgact ttacttgtgg tgtgaccata	8400
ttcattataa tctcaaagga ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaccttgttt aaaaaaaaaa	8460
aaaaagcctg ggcgcggtgg ctgcgcctg taatccagc actttgggag gccgaggtgg	8520
gtggatcacg aggtcagaag atcgagacca tcttggttaa catggtgaaa cccctgtct	8580
actaaaaata caaaaaatta gccaggcgtg gtggcgggag cctgtagtcc cagctacttg	8640
ggaggctgag gcaggagaat ggcgtgaacc cgggaggcag agcttgcagt gagccaagat	8700
tgtgccactg cactccagcc tgggcaacag agcgagacta catctcaaaa acaacaaca	8760
caacaaaaag tctcgttctg agcattccag tagcttcttt agtgtatgta gttagtgtga	8820
ccataagtag ttggtttgtg tgagatggtt aaaaaggcca aagataaat gtttcattta	8880
tttgcctttt ttgtctatga aatggctgct tatttattta ggcctatttg atgtatgtgt	8940
gaaacaatat tgtgcaaca taaacccaaa ttttattttg ctgagttgtt ctaacagcaa	9000
caaaaagaag ttaaggaaga gaagaagacc agcaaatgca accacagagt gactagtga	9060
gtagatgaaa actgaggccg ggtgtggtgg ctcacacctg taatccagc actttgggag	9120
gccgagtcgg gtggatcacc tgaggtcagg agttcaagac caacatggtg aaacccatc	9180
tctacaaaa atacaaaatt agccaggcga ggtggctcat gcctgtaatc ccagctactt	9240
gggaggctga ggcaggacaa tcaattgaat ctgggagggt gaggttgacg taagccgaga	9300
tcatgccatt gcactccagc ctgggcaaca aagcgaaact ccatctcaa aaaaaaaaaa	9360
aagaaaagaa aactgaaaag taaggtgacc tcaaaggcca ctgaagaaag tgtttccagg	9420

aggaaggaat ggtttacttg gtcaaatgct gctgatcaag gagcaaagag gtctgagaag	9480
ttaccattgg atttatctgc gttaggccat ttgtgatctt aatgagcagt ttgtgtgcag	9540
cgggtgtttgg aagcctggat gcagtgggtc ttgtagactg agaagctagg aacacagcaa	9600
gaataagcta ctcttttaaa tcctgcttta atgggaatag aaatagagca agagctggag	9660
agtgaagtgg atcaaaagag ttgatctttt gcagatggga gaacaaatag cattagaatg	9720
attcagtaga gagaaaatat tattatgtca gagaaagtgg ggagaactgt tgaagtgatg	9780
tcattgaatg ggcggcgggg gcgttgagat ttggttgaca agttagcctt ggataggaac	9840
atggacagtt aatccattgt aacatgattt gatagatgtg attacagagg aggcataagg	9900
acatggattt gagtgtctatc ttgggctggg ggttgggtaa agaaagatga catgtctaat	9960
cttgaaaggc aagtgtttgt cagggtggaca aaaggctaaa gtgcatttca tgtagaggaa	10020
caggcatgag caaaggcaga aaggtattaa accacctttc aggccaggcg tgggtggctca	10080
cacctgtaat cccagcactt tgggaggcca aggtaggcgg atcacaaggt caggagatcg	10140
agaccatcct ggctaacacg gtaaaacccc gtctctacta aaaatacaaa aaaaattagc	10200
tgggcgtggt ggcaggcgcc tgtagtccca gctaatacagg aggcctgaggc aggagaatgg	10260
cgtgaaccca ggaggcggag cttgcagtga gccagatca tgccactgca ctccagcctg	10320
ggcgacagag caagacactg tctcaaaaaa aataaataaa taaataaaaa taaaccacct	10380
ttcaggacac tacaagcagt gtggtgtggt ttgagtctg ggcatgtgct tgttgggggg	10440
tgggggtgat gaggatgggc tggtagacat tacaacaagg tcaaggcaag ggataggcag	10500
ggtcttcta cagtatatat ttccattaag aggcaacaga gagcagtgga aggagcacag	10560
ttttttttt ttgtttgtt tgtattttga gatggagtct cagtctgtcg cccaggctgg	10620
agtgcagtgg cacaatctca gctcactgga acctctgcct cctgagtcca agcaattctc	10680
ttgcctcagc ctctgagta gctgggatta gaggcgcca ccaccacacc tggctaattt	10740
ttgtgttgat gaggtttcac catgttggcc agacgtctcg aacttctgac ctcaagtgat	10800
ccgccacct cggctctcca aagtgtctacg attacagccg tgagccacca taccgggtcc	10860
tggagcacag tattcgatat gaaacacatt acccagttaa catgtaaggc cagagcagta	10920
tagagtgtaa ataataatc acatttcatg ggctctatgt ggtatctata tgcacatct	10980
cagtggattc ttgcacatct ttttgaggta ggtactatta ttaaacctat tttgggttta	11040
tacaaattaa tgacttaacc aaattcacac agccagtaaa tagtagagtc cacatttgaa	11100
cccatagcca ttgacacca gtgaactttt ttttttttt tctttttgag gcaaggctctt	11160
gtctgtttgc ctaggctgga gtgcagtggc acgatcacgg ctactgcag tctctacctc	11220
ctaggctcaa gagatcttcc ctaccagcct ggccaacatg gcgaacccc atctctatta	11280

aaaatacaaa aataagccgg gcgtgggtggc atgtgcctgt aatcccagct actcaggagg	11340
ctgagacagg agaagagctt gaacctggga ggtggaagtt gcaggagacc gagatgacac	11400
cattgcactc cagcatgggc aacagagtga gattccatgt taaaaaaaa aaaaggccgg	11460
acgcattggc tcgcgcctgt aaccccagca ctttgggaagg ccaaggcggg cggatcacga	11520
gggtcaagaga tcaagacat cctggccaac atggtgaaac cctgtctcta ctgaaaatac	11580
aaaaattagc tgggcatggt ggccgatgcc ttagtccca gctgctccg aggctgaggc	11640
aggagaatcg ctigaactca ggaggtggag gttgcagtga gctgagatct tgccactgaa	11700
gtccagcctg gcaacagagc gagactccat ctcaaaaaag atcttccac ctcaacctcc	11760
caagtagttg ggactacagg cgcccaccac tatggctggc tgattttttg tatttttagt	11820
agagacgggg tttcacctg ttagccaggg tggctcgtat ctctgacct cgtgatcggc	11880
ccgcctggc ctcccaaagt gctgggatta caggcttgag ccactgggcc cggcccacgc	11940
ctggctaatt tttaaaaata tttttgtaga gatgaggtct tgctatatg cccaggctgg	12000
tcttgaactc ctgggctcaa gctatccaca tgagccacca tgcccagccc ccattaaact	12060
ttttttttg agatggagtc tcaactgtc acccaggctg aagtacagt gtgcaatctc	12120
agctcactac agcctctccc tctgggggtc aatggattct cctgcctcag cctcctgagt	12180
agctaggatt acaggcgac gtcaccacac ccagctaatt tttgtatttt tagtagagac	12240
agggtctcga actcctgacc tcaagtgat caccgcctt ggccctccaa attgttggga	12300
ttacaggcgt gatccaccac gcctggcccc cgagtttttt ttttttttt gagacggagt	12360
ctctctctgt cgcccaggct ggagtgcagt gttgccaatc cggtcactg caagctctcc	12420
tcttgagtaa actcttaatg gctacactat tttcctggct aaaacactgc agctggaatc	12480
agaagtctga aagttgagc ccagccctgc cactttagc tacttggcat tggccaagcg	12540
aagccatgtc tccaagctg tatttcccc aaccttctt caaatagtga ctccaggat	12600
tgtgaaggcc aaattaaatg tgaaaatata atgaagtaac tctaaaatta atagttacta	12660
gttatcaaag tagcatcctg gcctccagca tgtcttcccc tgactttccc cacccttg	12720
aacctgtctg aattttttat ttatttttt atcctttgag acggagtctc attctcttgc	12780
ccaggctgga gtgcagtggc acgatctcag ctactgcaa cctccgctc ctgggttcaa	12840
gcgactctcc tgcctcagc tccaagtag ctaggattac aggtgcacac tgccatgcct	12900
ggctaatttt ttgtatttat aatagacaca gggtttcacc atcttggcca gaccggtctt	12960
gaactcctga cctcaagtga tgcctgccac agcctcccaa agtgcctggga ttacagggt	13020
gagccactga acctggactt tagcaccttt ttatgtgctt attggccatt tgtgtatctt	13080
ctttagagaa aagtttatac aagtcctttg tctgttctta aattgtgttc tttttgttc	13140

tgagagtttt tcatatatc tagatagaac gcacttatca gatgtatgac ttgcaaacat	13200
tttctcccat tctgtagatt gtcttttcac tttctttctt ttttttttt tttgagacgg	13260
agtcttgctc catcgcccag gctggagtgc agtggcacga tctcagctca ctgcaagctc	13320
tgctcccgg gticacgcca ttctgctgcc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc	13380
gccccccacc acatccggct aatttttttg tatttttagt agagatgggg tttcaccatg	13440
ttagccagga tggctcgcgt ctctgacct catgatccgc ccgctcggc ctcccaaagt	13500
gctgggatta caggcgtgag ccaccgcacc tgacctttac tgtaccttt ctgtgttgag	13560
gtatgttttag atacatcagc tgaaccatta tgttagaatt gcctacagct ggctgagcat	13620
ggtaggtcac gtctataatc ccaggacttt tggaggctga ggcagaagga tcacatgagc	13680
cctggagttt gagactggcc tgggcatcat agtgagacct ccatctctac aaaaagttaa	13740
aaaaaaatta gtagccagat gtggtggcat gcacctgtgg tcctagctac ttgggaggct	13800
gaggtgggag gatcatttaa gccagggttg atgctgcagt gagctgtgat ggcaccactg	13860
cactccagcc taggcaacag agcgagactc tgctctcaa aaaaaaaaa aaattgccta	13920
cagcattcag tacagtaaca tgctgtacag gttttagacc taggagcaat aggctgtatg	13980
atatagtctg ggtgtgtgt aggctatagi gtctaggttt gtgtaagtac actctgtgat	14040
gttcacacaa tgaatcacc caatgacgta tttctcagaa tgtatccca tcgttaagtg	14100
atgcatgatt gtattttgtt tgtttcatct tccaggtgaa caactttgtg atctttgaag	14160
gcttctttgc ccatcaacat cgtaagtttt tgcattttgt tggtcacgta gtcgggggta	14220
gggaaaggaa agagctggac tcttggtcct gccgaccct cactgagggg ccccgccgt	14280
tccttctca caggcccccc tgctccctct ctgagggcaa ctcgacactc tcgtgctgct	14340
gcagtcgac ccacgccgc tggtaaagcc tgtattgaag gggtggaact gtagtcagct	14400
gatggtact tactctagat gccacggggt acagtgccat ctgtgggcaa ttttgaaaa	14460
ttctaaagca acccaagtct ccagcagtc tgaactgttg cttttgccct catgggagct	14520
cagtgcattt tatatttgcc aagactttta actaagcaag ctcatggga gcctgtttga	14580
cagctgatat caatggacct tcttgccagt tcaggctcgt caacataggc cagagtcagg	14640
ctcctttgta aaccccagc ttctgttagc cagtgaggga caggctggtg caaacagccc	14700
ttccatttg agtcacagaa tagtgacaca aatggcccaa aatttaaatg ttacttttag	14760
aagataacac tcagagttaa taacatttcc aaccagataa tgaaattgat atggagaaac	14820
caaacctcag aggcactaaa atgctgtcca gattcccat cccatataca cacatacaca	14880

cacacacaca cacacaaaca cacttactga cagtctgagc cccactcctt cctcttcctc	14940
accacctcca ccttaccac ttttgacagc tgtacagtgc ttgcttgac agaagagccc	15000
ccttcctgag ctggctctgt ggccaggaaa ggatgtaacc accatccaaa cagcagtctg	15060
taaccagcta tgagcatcac agtgtcaggc actgagaggc acctcaactc gctttggttt	15120
ccaagcttc tccatttag cttgttcaga accacaggct gtgagaggga ctgagggccca	15180
acaaggatgg tgaggctca ggccctgcagg ggagggtgct gtggataaag ctttaagtga	15240
tttgcctgaga agtctttcat ttgccacaca tacatgatgg agaattctctt gagagggaaa	15300
gccgggagca agtagagaag tgaggagggg gaggtgaac tttggacatt acatcagcct	15360
cctgcttact ctgatatctc cctttcagat gcccatatctt attttctttt ttttttttaa	15420
cctaataaaa cttcagcttc tttccatttt cgtataggaa ggagagattg tgccctcctt	15480
ccaaacctcc cctgacctct ccagagcaat tctgattaa ccaagggtctt tgtccatctc	15540
atccagagga acccagggtc ctggttgcc cggtgggac cattccactg cccagaata	15600
ccagggggcc atgacagcac cactgacag taagagctca cttcccttgg ctgcccttct	15660
cctgcatctc ccaggccccc agagtctccc cttegatctt tctccctagc tctgtgtttg	15720
gcctactcct tctggcttcc ctcaacagtg ttccacattc cctcaaatt ccttttgg	15780
gtgctggcat tgccatggtg ctgctcctgc aagtctcag gaggaactgt ggtgtcagg	15840
agcagagggtt tggggttggg gtatagtggc tgggaggagg ggtgcaaagt atgtctcta	15900
acgttacc tgctatgtc cctccactg ccagctccag caaggaagct gccaccaag	15960
agagcagagg gagacatcaa gccatactcc tctagtacc gagaatgtaa gaggggcaag	16020
ggtcgggtgt ctgggcctgg ggtaccttaa cacaaggga gagaatgtc aggggaccca	16080
gggaaaggat tctttctc taaagactca gatttcttgg gctgggcatg gtggctcatg	16140
cctgtaatcc cagcactttg agaggctaag gcaggcagat cgctgagtc cagggttca	16200
agaccagcct ggccaacatg gtgaaacccc gtcttacta aaaatacaaa aattagctgg	16260
gcacggtggc acgtgcctgt aatcccagct acttgggagg ctgaggcagg agaattgctt	16320
gaaccagga ggcggaagt gcatgagcc aagatcgtgc cactgcactc cagcttgggt	16380
gacagagtga gactccgtct caaaaaagaa aaaaaaaaaa aagaaagact cagatttctc	16440
tttttttcta ccaaacctt tctgtcatg actctcttc tttttcttc tttttctgc	16500
ttgtcttca ttctccctgt cccagttct gaaggtagct gtggagctc cttggccct	16560
aaacagggcc cctcgccg cgccacctcc agccaccca ccccccgct ccagcagcct	16620
gggaaactca ccagaacgag gtccctccg cccctttgtg ccagagcagg agctgtgcg	16680
ttccttgcgc ctctgcccc cacacctac cgccgcctt ctgttggctg ctgacctgg	16740

gggcagccca gctcaacgtc gtcgcaccag gtaataggag ttgaagggtc aaggagcctc	16800
acagctataa aagaggatgt tagaaatggc aaagggaat ttgaatccat cagagagatg	16860
gatcaataag atgggtggct tggggggggt cctgaaacct ttcaagaaaa atatttgtgc	16920
aagtgatctg ggaaaaaaat gcagtgaagg agcagaatag gaccttatat ggagcctagg	16980
gaccctggct ttaatgtgag agttatgtgg aatggtagga agaacaccga gatccatcga	17040
gttgggggaa cagagccttc taagattggg aaaatcttcg ctttaacttt gctggggaag	17100
gggcagtgtc tgacagagag tgggaagcca ctggcttgtg tgccaagagt ccatcgcagc	17160
aggcagggag tgggcatttc ctttatttct ctccctttct cttcacctct gacttctctg	17220
tttttctctc ccccgcccc cgccatttcc catctccctt cctcccatcc ataacatcct	17280
tccacagctc ccttccccgc tctgaggaga gtcgatacta acagctaccc tctccctgcc	17340
ctgggagacc tggggtgggc aggggaacccc tccctgagaa cctcagaccc actcttccat	17400
tgcacctgt aggaccaggt ggaacctgac agagcccata ggattccctc ttctactttc	17460
ttagacagca gggatgtcag ggtctcaaac tgcctaacac tttgtagctt ttcttaacac	17520
aaaagcacc cttctctcct aacttgggtc ctgaatactt tcccaacagg aagtctgac	17580
tgttgccaga cttcttgggt agatggctca tacatttacc tagagaagca cactcttgtc	17640
tgtgtcaaa ctttagacca ccatggaagg tctaaggga tctgtgcca gggaaacttt	17700
ttaaggaatt ttatctatgg gataaacccc atattccctc tagtgtctac tgggtgctct	17760
aatactgctt tgtgtgctc gccacacttg ccttttgagc ctgcgaatgg ccgctagtga	17820
gcaagctctg cttcagagca gtctagttag gtagaacagg gacttaccag cttcccaaag	17880
ggatctactc accattgcca aactcttcat ttccacattt tgtgtagggtg tcagggaacc	17940
ccaaactggt gttgctttgg ggtctctaaa ggagattggc tgacaccacc atttcccca	18000
gatccagatt ctctgaggga ggttgtttct tgagagtaga tccagagtgt caaggatctg	18060
ttagatcctg gaatcccttc ttgcatccat cctccttg tagctaggtc ccgatatact	18120
cctgtcttgt gagattgtcg agatgagatg ggggaccact cttcctctgt ccttctctc	18180
tcctttctc catagcaagg acgaccttcc ctgctccatg cccagagtat agctagatec	18240
cttccctcc ctacctctg aatgtgtgct agatcagggtg cccactgtg tttcctgaaa	18300
tccttgggag ccggtctcc ccatctcccc tactactct tcccttttct tctctcagt	18360
ttgtctgaat aaagtgtgaa atcttttgtg ttttctaaat tgacattttc aatgaaaaaa	18420
agaatcacia aaaaaaaagt tgtcagcctc atttgtgcgt catcccttat tttcctggga	18480
tctcaggacc tctgtccctc tcatttctca cttctgagat ctgcacatct tttaccagg	18540
agcctcagag ctctgagtc tgggtgtctgc ctatcccat cttcactgtt agtcctcctg	18600

cagattctgt gtctcctttc atgtagggtc tggatccctg tgtgtgggct tccgtatcta	18660
ctccctcatt cctccagga acctccagct ctccccagtg acttctacce ttactctgg	18720
gcgtgccttt gccaaagtgt caaagcttac caacatctct ggatccacta attacctcct	18780
gcctcctgta ttctcttcc cactctgatt acctgacgtc tgctccacta aaccgtgga	18840
tctctctcaa gacaaacctt tacctccatt gagagtcaa cacagtctgt caccctattt	18900
acagaggccc cttccttttt cctcctaaat tcaaaattca gccttgtcac ttcctatttc	18960
cctctggctc aaggaatctt tttttttttt ttgagatgg agtcttgctc tgtcgccagg	19020
ctggagtga gtggcacaat ctacgtcac tgcaacctcc gcctcctggg ttcaagcgat	19080
tctcctgcct tagcctccca agtagctggg attacagaag tgcaccaccg tgcccagcta	19140
gtttgtgtat ttttagtaga gacagggttt caccatgttg gccaggttgg tctcgatctc	19200
ctgatcacgt gatctgcccc tcttggcctc ccaaagtgt gggattacaa gcctgagcca	19260
ccgcgccag ccgggtctaa ggaatcttat agttaaggta accctgtttt ccaaaccaaa	19320
caccagagta cccgatccaa cacatttttg accacatgtg agtctgttct tctgacatga	19380
tttggatcac acctagccat agatttaaca cattacctca actagaaaga atagagcaat	19440
aatcagaag cactccagaa aatcttgggt ataaaatgaa cttccccgc cttttctgg	19500
ggcacagctt tgattaaaac ctgttaggaa tgataattac ccccttctct ttgttcctgt	19560
gctattcctt ttactctct cctctgattc ctccataccc acccatcttt catccagtag	19620
cctctcccc atcatctccc atttcttcta cagggggact ccccaggctc tggtagccca	19680
aagctgctgc tacagccgcc atgggggggt gaattctca tcccccaata caggtaagta	19740
ttcactctc cctacctca aatcaagtag gccacattca ctgtctactc ctgccttccc	19800
attcatatgc ctgatattc cacaggcaac caagactcca agcagggaga acaggaaaca	19860
aagaataggt gaggtctaaa cccctccctt aacagctcc caccaccatc tgactccctt	19920
cctaacatca ttctcagta cttctactc ttaaatttta ttgtatgaac tggacaccag	19980
ctctccac aattcttct acctacatc ctgcaagccc ctttcccca caggttcaac	20040
tctggtaact ccttttgaa tacggattct ctgagagggt ttaaatttgg acatagcact	20100
aatggttcca gttcatacc catcatgtgt cctacattaa aacctggccc gagacctga	20160
agagtctgta atcttaattt cctctttagt attctataa cccactctcc atctccccac	20220
ctaccaggctc tgccagttag gagcaggcct tgtcacagga tgggtctggg gagaagccca	20280
tgcacacagc tctccacag gccccggccc cgccagccca gtcctggaca gtgggtgggg	20340

acatactcaa cgccaggttc attcgaaacc tgcaggaacg tgcgagcacc aggccttggt	20400
gaccgcagcc ccgtcaaaca tcttcaaagt attatttctc cctcactaca ggaaagagcc	20460
aaagcccaac cctcataata gatggataca ttcattcatt cattcattca gcaggcttat	20520
cagattcaag tcattttgtat cttttaacca gaccaataaa agtattttatt tttatcacia	20580
gagctgttga aaaatttgac tcattatttc agccgcctca cccctcactg tcgttgccacc	20640
cattcagcct tcagccctgt ttttgctcag ctttttgctc aaaggcctca gctgtgaata	20700
cagcgcttgg gggggcgggg gaggtgttaa cttgcgcaag cgcactcagg cagtctccga	20760
gccccggggc gcaggcgccg ttacagccga cagagcgctt cagccgcttc cctcgagcct	20820
gcagtgcga agcgcgggac atctccgttt cctccctca gccccttccc cccctacccc	20880
cccgccccgg cctcctttcc ctttcacgaa gccggctctg gggcgcgctc acccctgtga	20940
ggaggccgga ggtcggactc aggaggtccc ttctccactc ccggaagatc atgtaccagc	21000
ccagccgggg tcgsgcccg cgtctcggcc cttgcctgcg cgcctaccag gctcgacccc	21060
aggtgagcgg aggagaagag ggagggagga gagggggcgg ggagagaccc tcctcaaagc	21120
cgggtgcgtg ggcggagcgc gcgctgggtt ccgcgcaggc gcagagacac ccgccgcccc	21180
tt	21182
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> sense siMEC17	
<400> 3	
gccttttttg tgacctctga	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> anti-sense siMEC17	
<400> 4	
ggatgatcgt gaggtcata	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sense siMEC17	
<400>	5	
cctaggaccc	gctaatttag	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	anti-sense siMEC17	
<400>	6	
gatggtatat	aaggaggacc	20
<210>	7	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	7	
tatgaccatt	atagatgaac	23
tgg		