



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월05일

(11) 등록번호 10-1514281

(24) 등록일자 2015년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0102409

(22) 출원일자 2014년08월08일

심사청구일자 2014년08월08일

(56) 선행기술조사문헌

US7601344B2

KR10-1064603B1

Oncogene (2005) 24, 4549-4558

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자

강중순

대전광역시 유성구 과학로 125

강무림

대전광역시 유성구 과학로 125

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 9 항

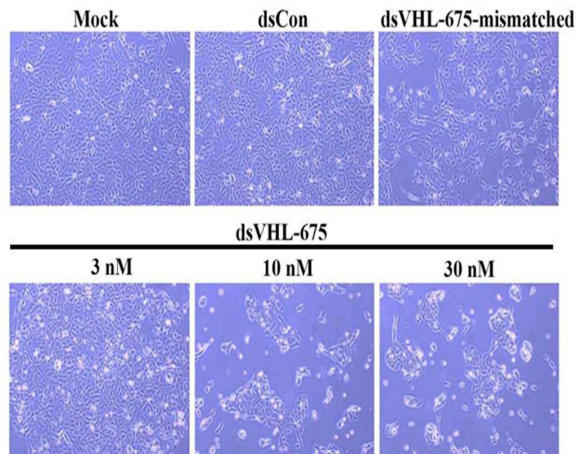
심사관 : 조현경

(54) 발명의 명칭 **VHL 유전자의 프로모터 부위에 상보적인 dsRNA를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 VHL(Von Hippel-Lindau) 유전자의 전사활성 유도 및 암 세포 성장을 억제하는 dsRNA(double strand RNA)에 관한 것으로, VHL 유전자의 프로모터 부위에 상보적인 dsRNA는 암세포주에서 종양억제 유전자인 VHL 유전자의 전사활성 및 단백질 합성을 증가시키고, 암세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유의적으로 유도함으로써, 상기 VHL 유전자의 프로모터 부위에 상보적인 dsRNA를 암 예방 및 치료용 조성물에 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이창우

대전광역시 유성구 과학로 125

오수진

대전광역시 유성구 과학로 125

윤지은

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM4211433

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 기초기술연구회

연구사업명 주요사업(연구개발과제)

연구과제명 바이오평가 기반구축 및 지원 사업

기여율 60/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 BGM0791422

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 암, 당뇨/비만 및 관절염 치료제 후보물질 효능/약리 평가를 위한 *invivo* animal model 기반 구축

기여율 40/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2014.04.01 ~ 2015.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 기재된 센스(sense)서열 및 서열번호 2로 기재되는 안티센스(anti-sense) 서열로 구성된 VHL(von Hippel-Landau) 유전자의 프로모터에 상보적인 dsRNA(double strand RNA).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 VHL 유전자의 프로모터는 서열번호 15로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 dsRNA.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 dsRNA는 VHL 유전자의 전사활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 dsRNA.

청구항 4

제 1항의 dsRNA를 유효성분으로 함유하는 신장암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1항의 dsRNA의 센스 또는 안티센스 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 신장암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 벡터는 비바이러스성 벡터 또는 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는 신장암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 바이러스성 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스를 포함하는 레트로바이러스 벡터, 아데노-부속 바이러스 벡터 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 신장암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1항의 dsRNA를 숙주세포에 도입한 형질전환 세포를 유효성분으로 포함하는 신장암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 숙주세포는 769-P 세포, A549 세포, HEK-293E세포, CHO(chinese hamster ovary) 세포, BHK(baby hamsterkidney) 세포, NIH-3T3 세포, HEK-293T 세포 또는 COS-7 세포인 것을 특징으로 하는 신장암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 VHL(von Hippel-Landau) 유전자의 프로모터 부위에 상보적인 dsRNA(double strand RNA)를 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 인류의 지난 수십 년간의 부단한 노력에도 불구하고 난치병 중의 하나로 여전히 남아 있다. 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서 세포가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고, 비 조절적 방식으로 증식 및 불사화되어 발생하는 질병이다. 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되어 그에 따른 치료제가 개발되어 오고 있으나, 아직까지 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있다. 이에 따라 암과 관련된 다양한 생체 내 분자의 동정 및 상기 분자를 표적으로 하는 약물의 개발에 대한 요구가 계속되고 있으며, 상기 약물 중 일부를 조합하여 암의 치료 효과를 증진하기 위한 노력 또한 계속되고 있다. 최근에 암세포생물학, 의학 화학 등의 제반 학문의 눈부신 발전과 더불어 탁솔, 라파마이신 및 17-알릴아미노젤다나마이신(17-allylaminogeldanamycin; 17-AAG)과 같은 다수의 항암제들이 개발되었으며, 글리벡(Gleevec)과 같은 새로운 작용 기전을 가진 항암제가 개발되고 있다.

[0003] 신장세포암(Renal cell carcinoma, RCC)은 신장에 생기는 악성종양의 가장 일반적인 형태로서 30% 이상의 환자에게서 암 전이가 쉽게 일어난다(Bukowski et al. 1997). 또한, 신장세포암은 방사선이나 약물 치료에 저항성을 나타내며, 인터페론과 같은 사이토카인(cytokine) 치료제에 반응성을 상실하면 5년 이상 생존율이 2% 미만일 정도로 환자의 예후가 매우 나쁘다(Yagoda et al. 1990).

[0004] VHL(von Hippel-Landau)은 암 억제 유전자로 잘 알려져 있으며, VHL의 불활성화는 신장세포암 같은 유전적 결함을 통해 야기되는 암에 관여한다(Kaelin et al. 2002). VHL의 변이는 신장암, 증추신경계 및 망막의 혈관모세포종(hemangioblastoma)의 발생과 밀접하게 연계되어 있다(Kaelin WG Jr., Nat Rev Cancer 2, 673-682, 2002; Curr Opi Gen Dev 13, 56-60, 2003; Trends Mol Med 10, 146-149, 2004; Trends Mol Med 10, 466-472, 2004). 암 세포에 VHL을 과발현시키면, 암 세포의 성장이 저해된다(Gene Ther 10, 2081-2089, 2003).

[0005] VHL 단백질은 유비퀴틴-리가제 복합체의 일부로서 폴리-유비퀴틴화 및 단백질 분해(proteosomal degradatation)를

통해 HIF-1 α 를 하향 조절한다(Kaelin, W.G., Jr. Nat RevCancer 8, 865-73 (2008)). 신장 선암세포에서, VHL은 FLICE 억제 단백질(c-FLIP), 서바빈(survivin), 세포사멸-1 억제자(inhibitor of apoptosis-1, c-IAP-1) 및 c-IAP-2와 같은 NF- κ B-타겟 항-세포사멸 유전자를 억제함으로써 NF- κ B 활성을 하향조절하며, VHL은 세포가 종양괴사인자(TNF) 유도 독성에 민감하도록 한다(Qi, H. & Ohh, M. Cancer Res 63, 7076-80 (2003)). VHL에 의한 NF- κ B억제 기작은 잘 알려져 있으나, VHL의 감소가 어떻게 NF- κ B의 활성을 유도하는 지에 관해서는 알려져 있지 않다. 또한, VHL 유전자의 결실, 돌연변이 또는 프로모터의 메틸레이션에 의한 VHL 조절은 잘 알려져 있으나(Tischoff, I. & Tannapfel, A. Z Gastroenterol 46, 1202-6 (2008). Cowey, C.L. & Rathmell, W.K. Curr Oncol Rep 11, 94-101 (2009). Curtis, C.D. & Goggins, M. Methods Mol Med 103, 123-36 (2005)), 단백질 수준에서 VHL 조절 기작은 아직 설명되어 있지 않다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 VHL(Von Hippel-Lindau) 유전자의 프로모터(promoter) 부위 중 전사개시부위(TSS)로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 이중가닥 RNA(double strand RNA; dsRNA), 즉 dsVHL-675를 이용하여 암세포 내 도입을 통한 암세포 성장 억제를 확인하고, 암세포 내에서 VHL 유전자의 전사활성 및 단백질 합성을 향상시키고 암세포의 세포사멸사(apoptosis) 유도를 확인함으로써 암의 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 VHL(von Hippel-Lindau) 유전자의 프로모터 부위에 상보적인 dsRNA(double strand RNA)를 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 서열번호 1로 기재된 센스(sense)서열 및 서열번호 2로 기재되는 안티센스(anti-sense) 서열로 구성된 VHL(von Hippel-Lindau) 유전자의 프로모터에 상보적인 dsRNA(double strand RNA)를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 dsRNA를 유효성분으로 포함한 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 dsRNA의 센스 또는 안티센스 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 dsRNA를 숙주세포에 도입한 형질전환 세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 상기 dsRNA를 유효성분으로 함유하는 항암 보조제를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 VHL(Von Hippel-Lindau) 유전자의 전사활성 유도 및 암 세포 성장을 억제하는 dsRNA(double strand RNA)에 관한 것으로, VHL 유전자의 프로모터 부위에 상보적인 dsRNA는 암세포주에서 종양억제 유전자인 VHL 유전자의 전사활성 및 단백질 합성을 증가시키고, 암세포의 세포사멸사(apoptosis)를 유의적으로 유도함으로써, 상기 VHL 유전자의 프로모터 부위에 상보적인 dsRNA를 암 예방 및 치료용 조성물에 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은, 인간 3번 염색체 내에 존재하는 VHL(von Hippel-Lindau) 유전자 프로모터 부위 중 전사개시부위(TSS)로

부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 이중결합 RNA(dsRNA)인 dsVHL-675 디자인을 나타낸 도이다.

도 2는, 인간 신장암 세포주 769-P에서 dsVHL-675에 의한 암세포 성장 억제를 나타낸 도이다:

Mock: RNAiMAX외에 아무것도 첨가하지 않은 군;

dsCon: 어떤 인간 유전자 상에도 상보적이지 않은 dsRNA;

dsVHL-675-mismatched: dsVHL-675의 3' 말단 5개 염기서열을 임의로 변경한 dsRNA; 및

dsVHL-675: 인간 3번 염색체 내에 존재하는 VHL 유전자 프로모터 부위 중 전사개시부위(TSS)로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 dsRNA.

도 3은, 인간 신장암 세포주 769-P에서 dsVHL-675에 의한 암세포 성장 정도를 XTT 분석을 통해 나타낸 도이다:

Mock: RNAiMAX외에 아무것도 첨가하지 않은 군;

dsCon: 어떤 인간 유전자 상에도 상보적이지 않은 dsRNA;

dsVHL-675-mismatched: dsVHL-675의 3' 말단 5개 염기서열을 임의로 변경한 dsRNA; 및

dsVHL-675: 인간 3번 염색체 내에 존재하는 VHL 유전자 프로모터 부위 중 전사개시부위(TSS)로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 dsRNA.

도 4는, 인간 신장암 세포주 769-P에서 dsVHL-675에 의한 VHL 유전자의 전사활성 및 단백질 발현을 나타낸 도이다:

Mock: RNAiMAX외에 아무것도 첨가하지 않은 군;

dsCon: 어떤 인간 유전자 상에도 상보적이지 않은 dsRNA;

dsVHL-675-mismatched: dsVHL-675의 3' 말단 5개 염기서열을 임의로 변경한 dsRNA; 및

dsVHL-675: 인간 3번 염색체 내에 존재하는 VHL 유전자 프로모터 부위 중 전사개시부위(TSS)로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 dsRNA.

도 5는, 인간 신장암 세포주 769-P에서 dsVHL-675에 의한 VHL 유전자의 지속(long term)발현 증가를 격일로 나타낸 도이다.

도 6은, 인간 신장암 세포주 769-P에서 dsVHL-675에 의한 VHL 유전자 프로모터 부위의 탈메틸화 효과를 나타낸 도이다:

Mock: RNAiMAX외에 아무것도 첨가하지 않은 군;

dsCon: 어떤 인간 유전자 상에도 상보적이지 않은 dsRNA;

dsVHL-675-mismatched: dsVHL-675의 3' 말단 5개 염기서열을 임의로 변경한 dsRNA; 및

dsVHL-675: 인간 3번 염색체 내에 존재하는 VHL 유전자 프로모터 부위 중 전사개시부위(TSS)로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 dsRNA.

도 7은, 인간 신장암 세포주 769-P에서 dsVHL-675에 의한 annexin V 양성반응 세포인 초기 자멸 세포(early apoptotic cell)와 프로피듐 요오드화물(propidium iodide) 양성반응 세포인 후기 자멸 세포(late apoptotic cell)를 나타낸 도이다:

Mock: RNAiMAX외에 아무것도 첨가하지 않은 군;

dsCon: 어떤 인간 유전자 상에도 상보적이지 않은 dsRNA;

dsVHL-675-mismatched: dsVHL-675의 3' 말단 5개 염기서열을 임의로 변경한 dsRNA; 및

dsVHL-675: 인간 3번 염색체 내에 존재하는 VHL 유전자 프로모터 부위 중 전사개시부위(TSS)로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 dsRNA.

도 8은, 인간 신장암 세포주 769-P에서 dsVHL-675에 의한 초기 자멸 세포(early apoptotic cell)와 후기 자멸 세포(late apoptotic cell) 결과를 나타낸 도이다:

Mock: RNAiMAX외에 아무것도 첨가하지 않은 군;

dsCon: 어떤 인간 유전자 상에도 상보적이지 않은 dsRNA;

dsVHL-675-mismatched: dsVHL-675의 3' 말단 5개 염기서열을 임의로 변경한 dsRNA; 및

dsVHL-675: 인간 3번 염색체 내에 존재하는 VHL 유전자 프로모터 부위 중 전사개시부위(TSS)로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 dsRNA.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0016] 본 발명은 서열번호 1로 기재된 센스(sense)서열 및 서열번호 2로 기재되는 안티센스(anti-sense) 서열로 구성된 VHL(von Hippel-Landau) 유전자의 프로모터에 상보적인 dsRNA(double strand RNA)를 제공한다.
- [0017] 상기 프로모터(또는 프로모터 서열)는 유전자의 전사개시부위를 결정하고 또는 그 빈도를 직접적으로 조절하는 DNA 상의 영역이며 통상 RNA 폴리머라제가 결합되어 전사를 시작하는 염기 서열인 것이 바람직하다. 상기 프로모터 영역은 DNA 분석용 소프트웨어를 사용하여 게놈 염기 서열 중의 단백질 코드화 영역을 예측할 수 있으며 프로모터 영역을 추정할 수 있고, 추정 프로모터 영역은 구조 유전자에 따라 변화되지만 통상 구조 유전자의 상류(upstream)에 있으나 이에 한정하는 것은 아니고 구조 유전자의 하류(downstream)에서 얻을 수도 있다.
- [0018] 상기 용어 "상보적인"은 동일하지 않지만 관련된 다수개의 서열을 정의하는데 사용되는 뉴클레오타이드 서열로서, 상보적 서열의 각각의 위치는 실제 서열의 그 위치에서 가장 빈번하게 발견되는 뉴클레오타이드를 나타낸 것이다.
- [0019] 상기 VHL 유전자의 프로모터는 서열번호 15로 기재되는 염기서열인 것이 바람직하고, 인간 3번 염색체 내에 존재하는 것이 바람직하며, 상기 dsRNA는 상기 VHL 유전자의 프로모터 부위 중 전사개시부위로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 것이 바람직하다.
- [0020] 상기 dsRNA는 VHL 유전자의 전사활성 및 단백질 합성을 향상시키고 암세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 것이 바람직하다.
- [0021] 또한 본 발명은 상기 서열번호 1로 기재된 센스서열 및 서열번호 2로 기재되는 안티센스서열로 구성된 VHL 유전자의 프로모터에 상보적인 dsRNA를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 암은 폐암, 난소암, 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 자궁암, 결장암, 방광암, 결핵암 및 췌장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 인간의 3번 염색체 내에 존재하는 VHL 유전자 프로모터(promoter)상에 상보적으로 결합할 수 있는 19개의 염기서열로 이루어진 이중가닥 RNA를 스크리닝하여 암세포 성장억제 및 VHL 전사를 활성화 시키는 dsVHL-675를 고안하였다(도 1 참조).
- [0024] 또한 본 발명자들은, dsVHL-675가 형질주입된 인간 신장암 세포의 성장을 확인하였으며, 그 결과 인간 신장암 세포주 769-P에 dsVHL-675를 형질 주입 96시간 후 암세포의 성장이 억제되는 것을 확인하였다(도 2 참조). 또한, dsRNA들을 신장암 세포에 형질주입한 후 1에서 5일 동안 세포 성장 정도를 XTT kit를 이용하여 측정한 결과 dsVHL-675를 처리했을 때 농도 및 시간 의존적으로 암세포 성장이 억제되는 것을 확인하였다(도 3 참조).
- [0025] 또한 본 발명자들은, dsVHL-675가 형질주입된 인간 신장암 세포 내에서 VHL 유전자의 발현을 확인하였으며, 그 결과 인간 신장암 세포주 769-P에 dsVHL-675를 형질주입한 96시간 후 세포 내 VHL 유전자 전사 활성 및 단백질 발현이 dsVHL-675 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 4 참조).
- [0026] 또한 본 발명자들은, dsVHL-675가 형질주입된 인간 신장암 세포 내에서 VHL 유전자의 지속적인 발현을 확인하였으며, 그 결과 최초 4일 이후에 발현이 증가한 후 14일까지 발현이 증가함을 확인하였다(도 5 참조).

- [0027] 또한 본 발명자들은, dsVHL-675에 의한 VHL 유전자의 CpG 섬(island) 상의 메틸화(methylation)를 확인하기 위하여 메틸화 특이적 PCR(methylation specific PCR, MSP)법을 이용하였으며, 그 결과 인간 신장암 세포주 769-P에 30nM의 dsVHL-675를 처리하여 세포 내 CpG 부위의 탈메틸화를 확인하였다. 또한, dsVHL-675를 처리한 결과는 5-Aza-C 처리한 결과와 유사하게 원래 메틸화된 부위가 탈메틸화된 것을 확인하였다(도 6 참조).
- [0028] 또한 본 발명자들은, dsVHL-675가 형질주입된 인간 신장암 세포 내에서 세포자멸사(apoptosis)를 확인하였으며, 그 결과 인간 신장암 세포주 769-P에 dsVHL-675를 처리하여 annexin V 양성반응 세포인 초기 자멸 세포(early apoptotic cell)와 프로피듐 요오드화물(propidium iodide) 양성반응 세포인 후기 자멸 세포(late apoptotic cell) 모두 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였으(도 7 및 도 8 참조).
- [0029] 따라서, 본 발명의 VHL 유전자의 프로모터 부위 중 전사개시부위로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 이중가닥 RNA(dsVHL-675)가 암세포 내에서 암세포 성장을 억제시키고 VHL 유전자의 전사활성 및 단백질 합성을 향상시키며, 암세포의 세포자멸사를 유도하는 것을 확인함으로써 암의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량% 포함한다.
- [0031] 본 발명의 치료용 조성물은 상기 유효성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 치료용 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 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, 파립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술 분야의 적정한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), MackPublishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0033] 상기 조성물은 추가적으로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다.
- [0034] 상기 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사, 자궁 내 경막주사, 뇌혈관 내 주사 또는 흉부 내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0035] 상기 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0036] 상기 조성물의 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하나 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 또한 본 발명은 상기 VHL 유전자의 프로모터에 상보적인 dsRNA의 센스 또는 안티센스 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0039] 상기 벡터는 목적의 폴리뉴클레오타이드의 서열을 목적 세포에 삽입시킬 수 있는 것을 말하며 이와 같은 벡터는

원핵생물세포, 효모, 동물세포, 식물세포, 곤충세포, 동물개체 및 식물개체 등의 숙주세포에 있어서 자율 복제가 가능한 것이 바람직하다.

- [0040] 상기 벡터는 비바이러스성 벡터 또는 바이러스성 벡터인 것이 바람직하며, 상기 바이러스성 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스를 포함하는 레트로바이러스 벡터, 아데노-부속 바이러스 벡터 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 상기 암은 폐암, 난소암, 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 자궁암, 결장암, 방광암, 결핵암 및 췌장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0042] 이에, 본 발명의 VHL 유전자의 프로모터 부위 중 전사개시부위로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 이중가닥 RNA(dsVHL-675)가 암세포 내에서 암세포 성장을 억제시키고 VHL 유전자의 전사활성 및 단백질 합성을 향상시키며, 암세포의 세포자멸사를 유도하는 것을 확인함으로써 암의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0043] 또한 본 발명은 상기 서열번호 1로 기재된 센스서열 및 서열번호 2로 기재되는 안티센스서열로 구성된 VHL 유전자의 프로모터에 상보적인 dsRNA를 숙주세포에 도입한 형질전환 세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0044] 상기 숙주세포는 769-P 세포, A549 세포, HEK-293E세포, CHO(chinese hamster ovary) 세포, BHK(baby hamsterkidney) 세포, NIH-3T3 세포, HEK-293T 세포 또는 COS-7 세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 상기 도입은 리포펙타민(Lipofectamine), 도진도(Dojindo)사의 힐리맥스(Hilymax), 퓨젠(Fugene), 제트 피이아이(jetPEI), 이펙텐(Effectene) 및 드림펙트(DreamFect)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 상용화된 형질도입용 시약; 칼슘-인산(calcium-phosphate), 양전하성 고분자, 리포솜, 나노입자, 뉴클레오펙션(nucleofection), 전기천공법(electroporation), 열 충격(heat shock), 마그네토펙션(magnetofection)을 이용하는 방법; 및 레트로 바이러스를 이용하는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 이용하여 수행될 수 있다.
- [0046] 상기 암은 폐암, 난소암, 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 자궁암, 결장암, 방광암, 결핵암 및 췌장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 이에, 본 발명의 VHL 유전자의 프로모터 부위 중 전사개시부위로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 이중가닥 RNA(dsVHL-675)가 암세포 내에서 암세포 성장을 억제시키고 VHL 유전자의 전사활성 및 단백질 합성을 향상시키며, 암세포의 세포자멸사를 유도하는 것을 확인함으로써 암의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0048] 또한 본 발명은 상기 서열번호 1로 기재된 센스서열 및 서열번호 2로 기재되는 안티센스서열로 구성된 VHL 유전자의 프로모터에 상보적인 dsRNA를 유효성분으로 함유하는 항암 보조제를 제공한다.
- [0049] 상기 암은 폐암, 난소암, 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 자궁암, 결장암, 방광암, 결핵암 및 췌장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 이에, 본 발명의 VHL 유전자의 프로모터 부위 중 전사개시부위로부터 -675 bp 떨어진 위치에 상보적으로 결합하는 이중가닥 RNA(dsVHL-675)가 암세포 내에서 암세포 성장을 억제시키고 VHL 유전자의 전사활성 및 단백질 합성을 향상시키며, 암세포의 세포자멸사를 유도하는 것을 확인함으로써 암의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0051] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0052] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] <실시예 1> dsVHL-675 디자인

[0054] 본 발명에서는 도 1에 나타낸 바와 같이 인간의 3번 염색체 내에 존재하는 VHL 유전자 프로모터(promoter)(서열 번호 15)상에 상보적으로 결합할 수 있는 19개의 염기서열로 이루어진 이중가닥 RNA를 스크리닝하여 암세포 성장억제 및 VHL 전사를 활성화 시키는 dsVHL-675를 고안하였으며 상기 dsRNA들의 서열은 하기 표 1과 같다(도 1).

표 1

dsRNA	서열 (5' -3')		
dsVHL-675	센스	GGUACAUAGUAGGGCCUUA [dT][dT]	서열번호 1
	안티센스	UAAGGCCCUACUAUGUACC [dT][dT]	서열번호 2
dsCon	센스	ACUACUGAGUGACAGUAGA [dT][dT]	서열번호 3
	안티센스	UCUACUGUCACUCAGUAGU [dT][dT]	서열번호 4
dsVHL-675-mismatched	센스	GGUACAUAGUAGGGUGGCC [dT][dT]	서열번호 5
	안티센스	GGCCACCUACUAUGUACC [dT][dT]	서열번호 6

[0056] (dsVHL-675-mismatched : dsVHL-675의 3' 말단 5개 염기서열을 임의로 변경함.)

[0057] <실시예 2> 세포배양 및 형질주입(transfection)

[0058] dsVHL-675를 형질주입하기 위해 본 연구에 사용한 세포주는 인간 신장암 세포주인 769-P(CRL-1933, ATCC) 세포를 사용하였다.

[0059] 구체적으로, 상기 세포의 배양에는 10% fetal bovine serum, 100 U/ml의 페니실린(penicillin)과 100 µg/ml의 스트렙토마이신(streptomycin)이 포함된 RPMI-1640(Gibco)을 이용하였다. 모든 세포를 37°C, 95% humidified air/5% CO₂ incubator에서 배양하였으며 2~3일마다 새로운 배양액으로 계대 배양하여 세포를 유지하였다. dsRNA의 세포 내 도입을 위한 형질주입(transfection)은 lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)를 이용하였다. RNAiMAX외에 아무것도 첨가하지 않은 것을 Mock, 30 nM의 dsCon(어떤 인간 유전자와도 상보적이지 않은 이중가닥 RNA 컨트롤), dsVHL-675의 3' 말단 5개 염기서열을 임의로 변경한 dsVHL-675-mismatched, 그리고 3, 10, 30 nM의 dsVHL-675를 3 µl의 lipofectamine RNAiMAX와 250 µl의 Opti-MEM(invitrogen)을 배지에 첨가하여 1.5 x 10⁵ cells/well(6-well format)의 세포에 각각 처리하여 24시간 배양 후 새로운 배지로 바꾸어 72시간 더 배양시켜 실험하였다.

[0060] <실시예 3> dsVHL-675에 의한 암세포 성장 억제 확인

[0061] dsVHL-675가 형질주입된 인간 신장암 세포의 성장을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 하였다.

[0062] 구체적으로, dsRNA들을 신장암 세포에 형질주입 96 시간 후에 사용하였고, 인간 신장암 세포주인 769-P 세포를 1 x 10³ cells/well로 96-well plate에 분주한 후 다음날 RNAiMAX외에 아무것도 첨가하지 않은 Mock, dsCon, dsVHL-675-mismatched 그리고 dsVHL-675를 상기 <실시예 2>에 나타낸 바와 같이 각각의 농도로 0.3 µl lipofectamine RNAiMAX와 10 µl의 Opti-MEM(invitrogen)을 배지에 첨가하여 세포에 각각 처리하고 적정시간까지 배양하였다. 세포성장판은 Cell Proliferation Kit II(Roche Applied Science)를 사용하여 XTT를 수행하였다. sodium 3' -[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate와 N-methylidibenzopyrazime methyl sulfate를 50:1로 희석하여 혼합액을 만들어 각 well에 50 µl씩 첨가하여 1시간 30분 동안 반응시킨 후 495 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0063] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이 인간 신장암 세포주 769-P에 dsVHL-675를 형질 주입 96시간 후 암세포

포의 성장이 억제되는 것을 확인하였다(도 2). 또한, dsRNA들을 신장암 세포에 형질주입한 후 1에서 5일 동안 세포 성장 정도를 XTT kit를 이용하여 측정된 결과 dsVHL-675를 처리했을 때 농도 및 시간 의존적으로 암세포 성장이 억제되는 것을 확인하였다(도 3).

[0064] <실시예 4> dsVHL-675에 의한 VHL 유전자의 발현 증가 확인

[0065] <4-1> VHL 유전자 및 단백질 발현 증가 확인

[0066] dsVHL-675가 형질주입된 인간 신장암 세포 내에서 VHL 유전자의 발현을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 하였다.

[0067] 구체적으로, dsRNA들을 신장암 세포에 형질주입 96 시간 후에 사용하였고, 양적 역전사 증합효소 연쇄반응(quantitative reverse transcription PCR; qRT-PCR)을 실시하기 위해, 트립신처리(Trypsinization)하여 세포를 수확한 후 차가운 PBS로 2회 세척하고 QIAzol lysis 용액으로 세포를 용해하였고 RNeasy Plus mini kit(74134, QIAGEN)의 컬럼(column)을 이용해 총 RNA를 준비하였다. 준비된 RNA와 PrimeScript™ RT reagent Kit(RR037, TaKaRa)을 이용해 제공된 실험법에 따라 cDNA를 합성한 후 RT-PCR을 이용하여 VHL 및 actin 전사활성을 확인하였다. 이때 사용된 프라이머(primer) 서열은 하기 표 2와 같다.

[0068] 또한, 신장암 세포 내 VHL 단백질을 분석하기 위해 웨스턴 블랏(western blot)을 실시하였으며 총 20ug 의 단백질을 12% SDS-PAGE gel을 이용해서 단백질을 크기 별로 분류하였고 PVDF 멤브레인(membrane)에 트랜스퍼(transfer)하였다. 트랜스퍼된 멤브레인은 블러킹 버퍼(blocking buffer, 20 mM Tris-Cl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20으로 제조된, TBST에 3% nonfat dried milk 포함)로 상온에서 1시간 블러킹(blocking) 한 후, TBS-T 버퍼로 5분 간격으로 5회 세척하였다. 1차 항체는 각 회사가 정해놓은 프로토콜에 따라 넣어준 후 상온에서 2시간 반응 시킨 후 TBS-T 버퍼로 5분 간격으로 5회 세척하였다. 2차 항체는 정해진 프로토콜에 따라 희석하여 1시간 반응시켰다. 결과는 enhanced chemiluminescent protein(ECL) detection system(Millipore)을 사용하여 VHL 및 GAPDH 발현을 확인하였다.

[0069] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 인간 신장암 세포주 769-P에 dsVHL-675를 형질주입하여 96시간 후 세포 내 VHL 유전자 전사 활성 및 단백질 발현이 dsVHL-675 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 4).

표 2

primer	서열 (5' -3')		
VHL	센스	CTGCCCGTATGGCTCAACTT	서열번호 7
	안티센스	AGCCAAAGGTGACCTCGGTA	서열번호 8
β-actin	센스	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA	서열번호 9
	안티센스	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG	서열번호 10

[0071] <4-2> VHL 유전자의 지속(long term) 발현 효과 확인

[0072] dsVHL-675가 형질주입된 인간 신장암 세포 내에서 VHL 유전자의 지속적인 발현을 확인하기 위해 하기와 같이 실험하였다.

[0073] 구체적으로, 인간 신장암 세포주 769-P에 30 nM의 dsVHL-675를 한번 형질주입한 후 격일로 세포에서 RNA를 추출하여 VHL 유전자 발현을 상기 실시예 <4-1>과 같이 RT-PCR로 확인하였다.

[0074] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 최초 4일 이후에 발현이 증가한 후 14일까지 발현이 증가함을 확인하였다(도 5). 이러한 지속(long term) 발현은 RNA 활성(RNA activation, RNAa)의 주요한 특징 중 하나이다.

[0075] <실시예 5> dsVHL-675에 의한 VHL 유전자 프로모터 부위의 탈메틸화 효과 확인

[0076] dsVHL-675에 의한 VHL 유전자의 CpG 섬(island) 상의 메틸화(methylation)를 확인하기 위하여 메틸화 특이적 PCR(methylation specific PCR, MSP)법을 이용하였다.

[0077] 구체적으로, dsRNA들을 신장암 세포에 형질주입 96 시간 후에 사용하였고, 탈메틸화를 일으키는 물질로 알려진 5-Aza(5-aza-2'-deoxycytidine) 10 uM을 48시간 처리하여 양성대조군으로 사용하였다. Qiasm DNA mini

kit(QIAGEN)을 이용하여 세포의 지노믹(genomic) DNA를 추출하였고 500 ng의 gDNA의 CpG 부위를 제외한 모든 염기서열 내 C를 T로 바꾸어주는 키트(EZ DNA methylation kit, zymo Research)를 이용하여 CT 전환(conversion)시키고, PCR을 통해 메틸화와 탈메틸화를 확인하였다. PCR을 확인하기 위해 1.5% 아가로스 젤(agarose gel)로 전기영동하여 밴드를 확인하였다. PCR에 사용된 프라이머는 하기 표 3과 같다.

[0078]

그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 인간 신장암 세포주 769-P에 30nM의 dsVHL-675를 처리하여 세포 내 CpG 부위의 탈메틸화를 확인하였다. 또한, dsVHL-675를 처리한 결과는 5-Aza-C 처리한 결과와 유사하게 원래 메틸화된 부위가 탈메틸화된 것을 확인하였다(도 6).

표 3

[0079]

primer	서열 (5' -3')		
VHL-unmethylation	센스	TGAGATTAGTTAGGTAATATAGTGA	서열번호 11
	안티센스	ACCTTAACCTCCCTAACTCAAACA	서열번호 12
VHL-methylation	센스	CGAGATTAGTTAGGTAATATAGCGA	서열번호 13
	안티센스	CTTAACCTCCCTAACTCAAACGAT	서열번호 14

[0080]

<실시예 6> dsVHL-675에 의한 세포자멸사(apoptosis) 증가 확인

[0081]

dsVHL-675가 형질주입된 인간 신장암 세포 내에서 세포자멸사(apoptosis)를 확인하기 위해 하기와 같이 실험하였다.

[0082]

구체적으로, dsRNA들을 신장암 세포에 형질주입 96 시간 후에 사용하였고, 세포자멸(Apoptosis)은 FITC annexin V apoptosis detection kit II(BD pharmigen)을 이용하여 실시하였다. 트립신처리(trypsinization)하여 세포를 수확(cell harvest)한 뒤에 차가운 PBS로 2회 세척하고 1X10⁵ cell을 1X annexin V binding buffer 100 ul에 넣어준 후 5 ul의 FITC-annexin V 와 PI(propidium iodide staining solution)로 이중 염색시켜 15분 반응시킨 후 FACS calibur(BD bioscience)로 세포자멸을 분석하였다. FITC 양성반응 세포는 초기 세포자멸(early apoptosis)이 일어난 세포이며, FITC와 PI가 동시에 양성반응인 세포는 후기 세포자멸(late apoptosis)이 일어난 세포이다.

[0083]

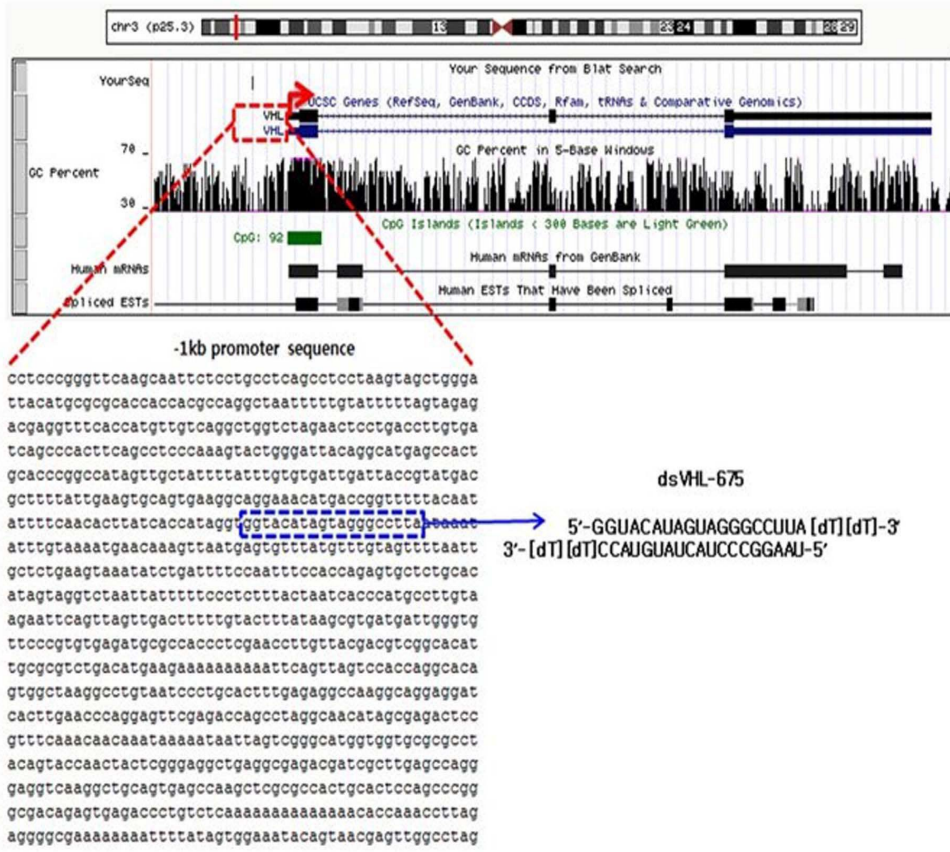
모든 결과는 평균±표준편차(mean±SD)에 따라 표현하였으며 Graphpad Prism(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 일원분산분석(One-way ANOVA, Dunnett's t-test)를 수행해 p value 값을 얻었다. P값이 0.05 이하일 때 *, P값이 0.01 이하일 때 ** 그리고 P값이 0.001 이하일 때 ***로 표기하였으며 통계적으로 유의한 결과임을 나타낸다.

[0084]

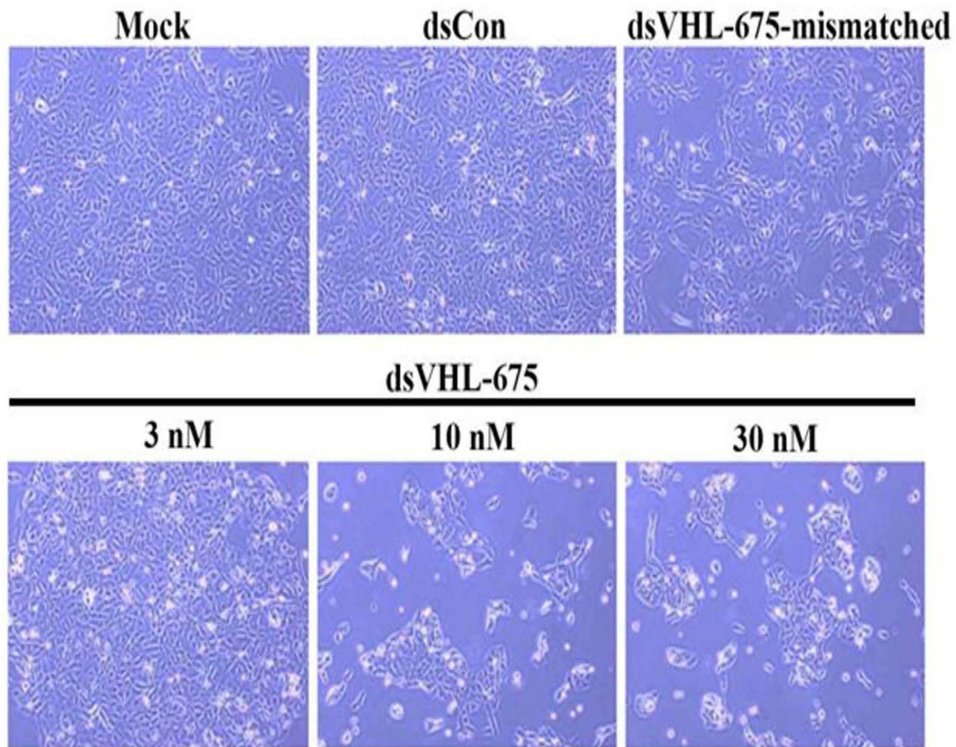
그 결과, 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이 인간 신장암 세포주 769-P에 dsVHL-675를 처리하여 annexin V 양성반응 세포인 초기 자멸 세포(early apoptotic cell)와 프로피듐 요오드화물(propidium iodide) 양성반응 세포인 후기 자멸 세포(late apoptotic cell) 모두 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였으며(도 7), 초기 세포자멸(early apoptosis)과 후기 세포자멸(late apoptosis) 결과를 도표로 나타내었다(도 8).

도면

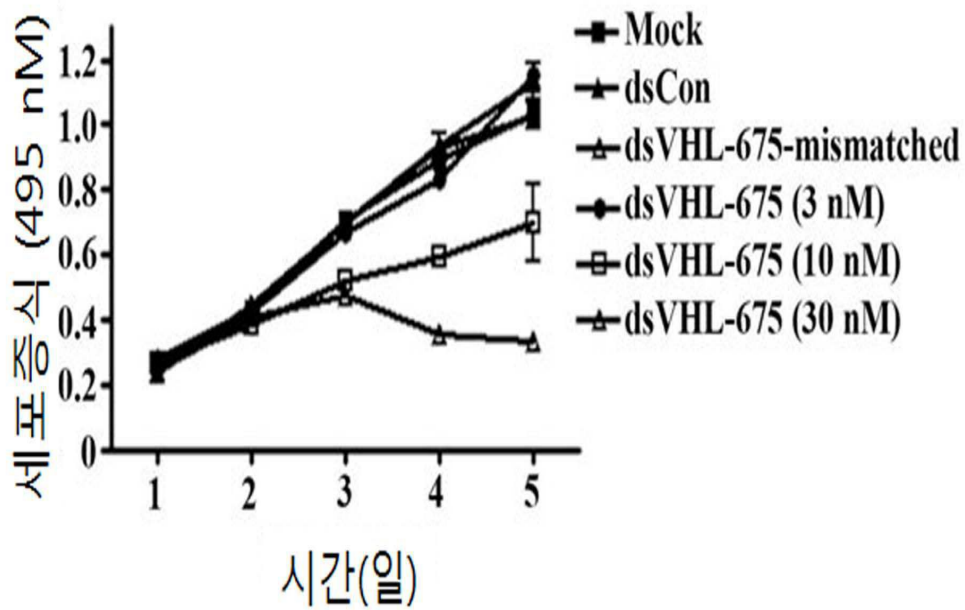
도면1



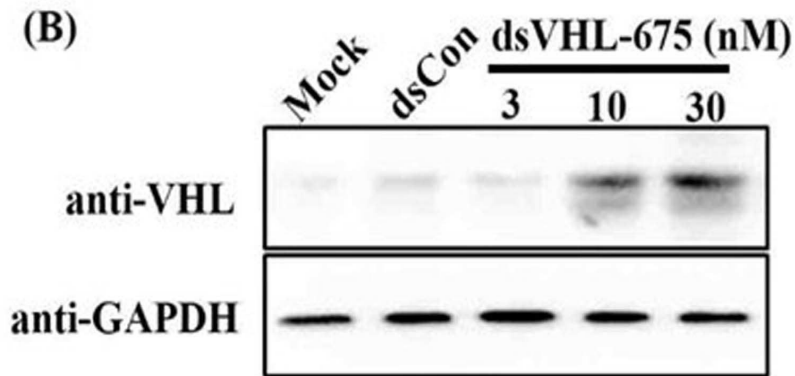
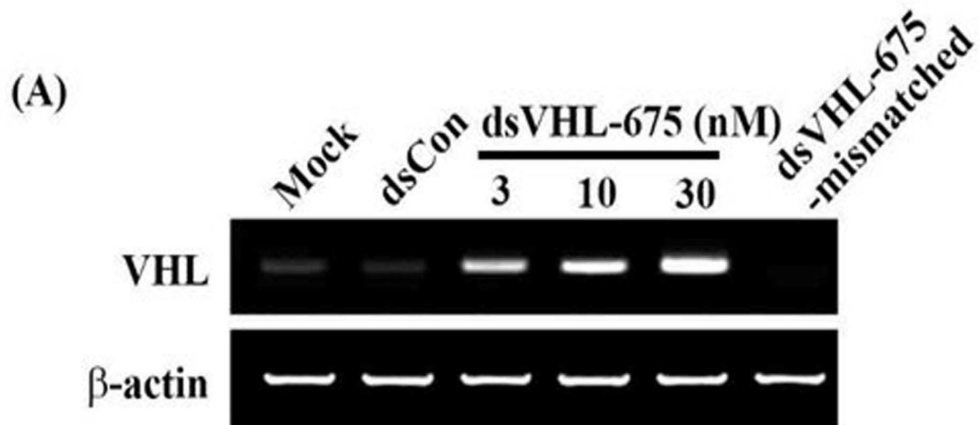
도면2



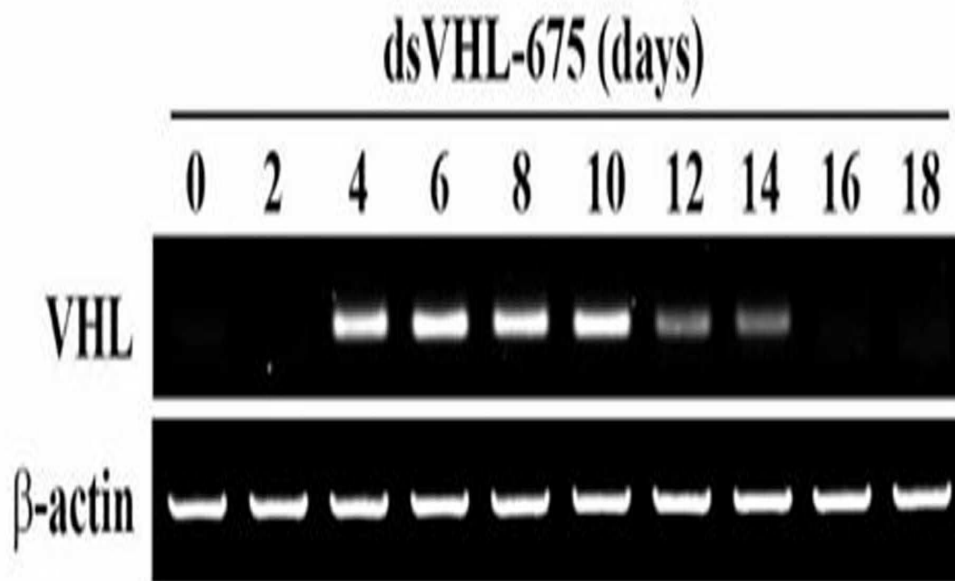
도면3



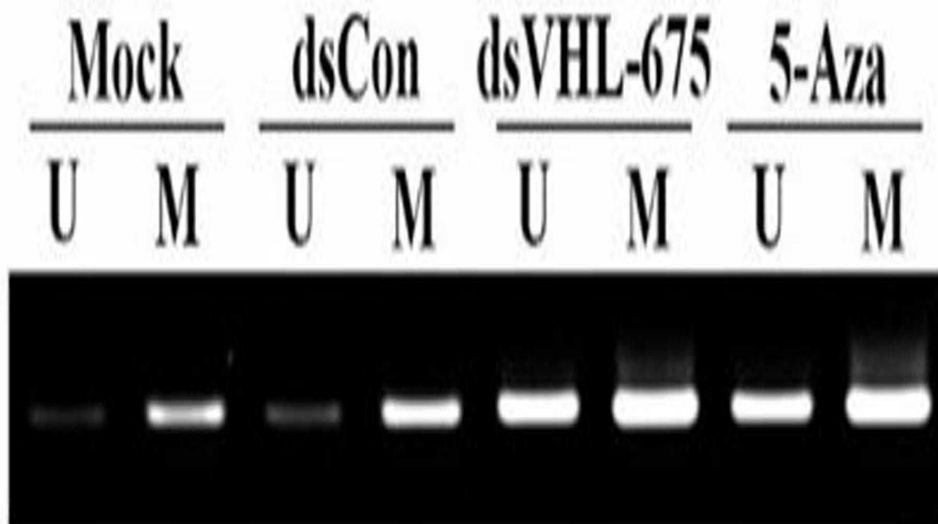
도면4



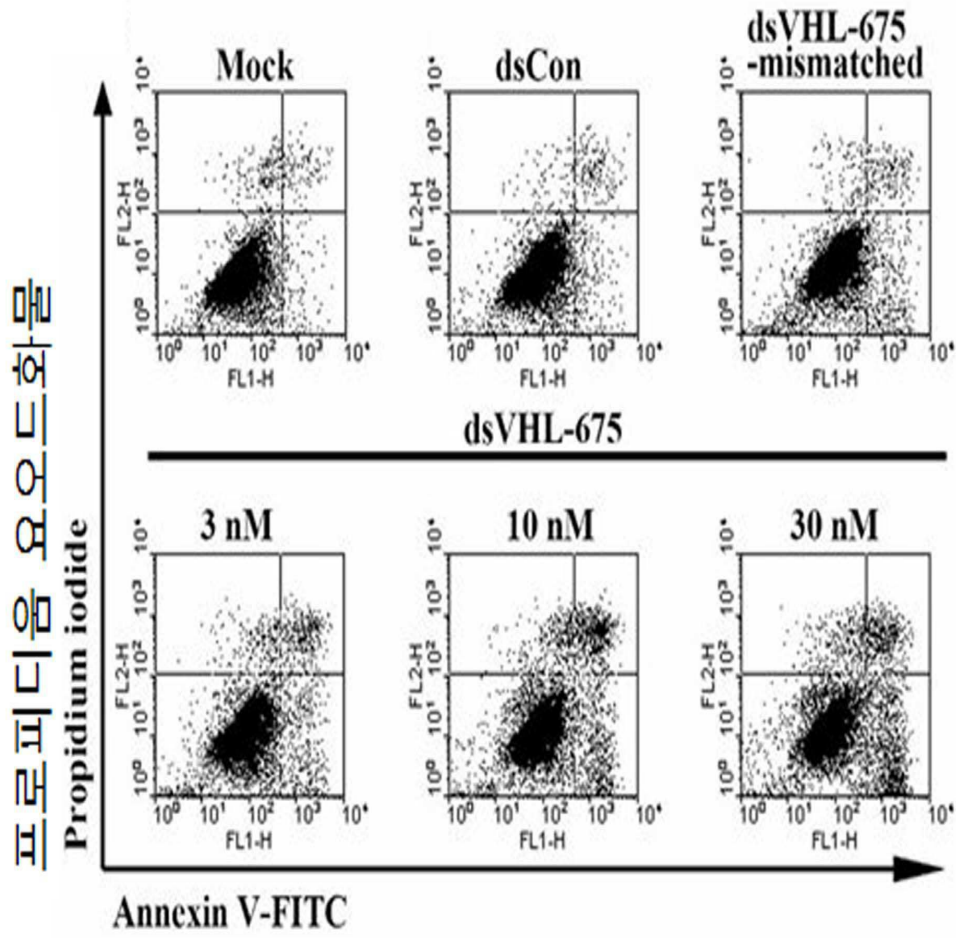
도면5



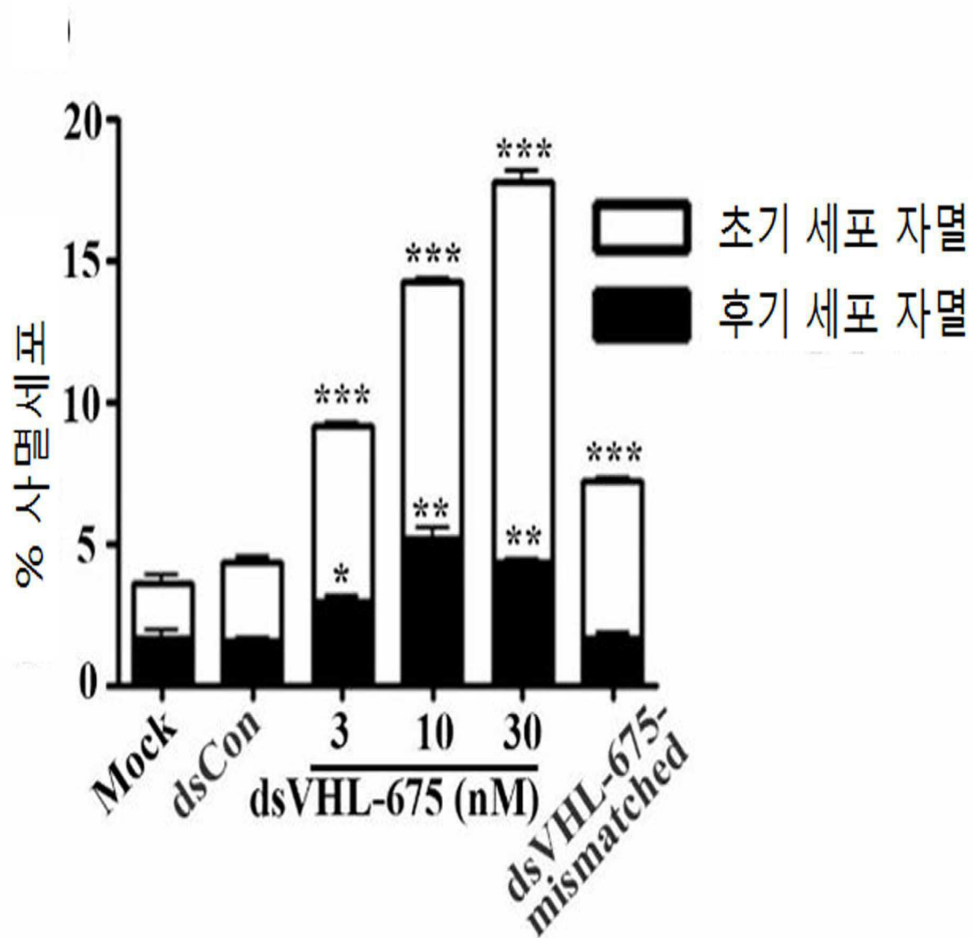
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology
- <120> Pharmaceutical composition for the prevention or treatment of cancer comprising complementary dsRNA to the promoter region of VHL gene
- <130> 2014P-06-034
- <160> 15
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> dsVHL-675_F
- <400> 1

gguacauagu agggccuua 19
 <210> 2
 <211> 19

 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> dsVHL-675_R
 <400> 2
 uaaggccua cuaaguacc 19
 <210> 3
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> dsCon_F
 <400> 3
 acuacugagu gacaguaga 19
 <210> 4
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> dsCon_R
 <400> 4
 ucuacuguca cucaguagu 19

 <210> 5
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> dsVHL-675-mismatched_F
 <400> 5
 gguacauagu aggguggcc 19
 <210> 6
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> dsVHL-675-mismatched_R
 <400> 6
 ggccaccua cuauguacc 19
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHL_F
 <400> 7

 ctgcccgat ggctcaactt 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHL_R
 <400> 8
 agccaaaggT gacctcggta 20
 <210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> betaactin_F
 <400> 9
 tgacggggtc acccactg tgccatcta 30
 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> betaactin_R
 <400> 10
 ctagaagcat ttgcggtgga cgatggaggg 30
 <210> 11
 <211> 26

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHL-unnmethylation_F
 <400> 11
 tgagattagt ttaggtaata tagtga 26
 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHL-unnmethylation_R
 <400> 12
 accttaacct ccctaactca aaca 24

 <210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHL-methylation_F
 <400> 13
 cgagattagt ttaggtaata tagcga 26
 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHL-methylation_R
 <400> 14
 cttaacctcc ctaactcaaa cgat 24
 <210> 15
 <211> 1000
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 cctcccgggt tcaagcaatt ctectgctc agcctcctaa gtagctggga ttacatgcgc 60

 gcaccaccac gccaggctaa tttttgtatt tttagtagag acgaggtttc accatgttgt 120

cagctggtc tagaactcct gaccttgtga tcagccact tcagcctccc aaagtactgg	180
gattacaggc atgagccact gcacccggcc atagttgcta ttttatttgt gtgattgatt	240
accgtatgac gcttttattg aagtgcagtg aaggcaggaa acatgaccgg tttttacaat	300
atittcaaca cttatcacca taggtggtac atagtagggc cttataaat atttgtaaaa	360
tgaacaaagt taatgagtgt ttatgtttgt agttttaatt gctctgaagt aaatatctga	420
ttttccaatt tccaccagag tgctctgcac atagtaggtc taattatfff tccctcttta	480
ctaatacccc atgccttcta agaattcagt tagttgactt tttgtacttt ataagcgtga	540
tgattgggtg ttcccgtgtg agatgcgcca ccctcgaacc ttgttacgac gtcggcacat	600
tgcgctctg acatgaagaa aaaaaaatt cagttagtcc accaggcaca gtggctaagg	660
cctgtaatcc ctgcactttg agaggccaag gcaggaggat cacttgaacc caggagttcg	720
agaccagcct aggcaacata gcgagactcc gtttcaaca acaataaaa ataattagtc	780
gggcatggtg gtgcgcgct acagtaccaa ctactggga ggctgaggcg agacgatcgc	840
ttgagccagg gaggtcaagg ctgcagttag ccaagctcgc gccactgcac tccagcccgg	900
gcgacagagt gagaccctgt ctcaaaaaa aaaaaaacac caaaccttag aggggcgaaa	960
aaaaatttta tagtggaat acagtaacga gttggcctag	1000