



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0084704
(43) 공개일자 2023년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0172686

(22) 출원일자 2021년12월06일

심사청구일자 2021년12월06일

(71) 출원인

주식회사 엑소퍼트

서울특별시 동대문구 왕산로 15, 4층 (신설동, 남서울빌딩)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

홍성희

서울특별시 광진구 아차산로70길 62, 305동 1401호(광장동, 광장현대3단지아파트)

정혜선

경기도 하남시 덕풍남로 11, 103동 704호(덕풍동, 하남풍산아이파크1단지)

최연호

서울특별시 강남구 선릉로 221, 405동 603호(도곡동, 도곡텍슬아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

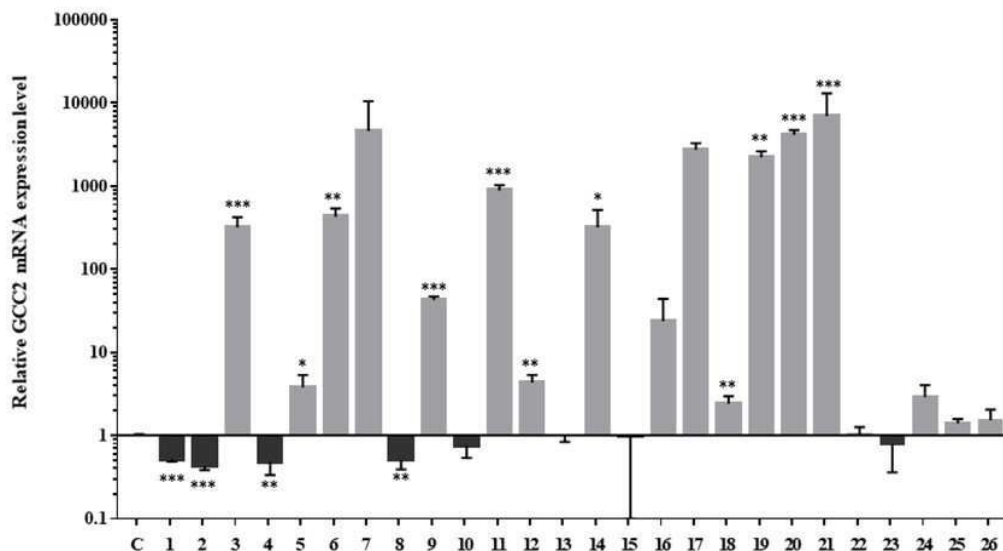
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 GCC2 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 GCC2 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 본 발명은 폐암 특이적으로 많이 분비되는 GCC2의 발현을 억제함으로써, 폐암 치료제로의 가능성을 확인하였다. 그 결과, in vitro 및 in vivo에서, 침습, 전이, 중간엽세포의 성질 상실, 종양형성능 저하 및 종양 세포의 사멸을 유도하여 폐암 치료의 가능성을 확인하였다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 31/7105 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 GCC2 발현 억제제는 GCC2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 GCC2 활성 억제제는 GCC2 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 26으로 표시되는 염기서열 중에서 선택된 어느 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 각 뉴클레오타이드가 2'-O-메톡시에틸화(2'-O-Methoxyethyl; 2'-MOE)되거나, 또는 상기 하나 이상의 각 뉴클레오타이드는 LNA(Locked nucleic acids)이거나, 또는 상기 뉴클레오타이드의 백본을 구성하는 화학결합 중 하나 이상은 포스포로티오에이트(Phosphorothioate; PS)인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 26으로 표시되는 염기서열에서 5' 말단 및 3' 말단의 각 3개의 뉴클레오타이드는 LNA(Locked nucleic acids)로 치환되고, 중앙의 뉴클레오타이드는 2'-MOE로 치환되고, 각 뉴클레오타이드의 연결은 PS로 결합되어 변형된 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 서열번호 1로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 27로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 2로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 28로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 3으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 29로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 4로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 30으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 5로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 31로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 6으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 32로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 7로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 33로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 8로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 34로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 9로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 35로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 10으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2

mRNA 내에 존재하는 서열번호 36으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 11로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 37로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 12으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 38로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 13으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 39로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 14로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 40으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 15로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 41로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 16으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 42로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 17로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 43으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 18로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 44로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 19로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 45로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 20으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 46으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 21로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 47로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 22로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 48로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 23으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 49로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 24로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 50으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 25로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 51로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 26으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 52로 표시되는 표적 부위에 결합하는 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 shRNA는 서열번호 53 내지 서열번호 56으로 표시되는 염기서열 중에서 선택된 어느 하나 이상의 shRNA인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폐암은 비소세포성 폐암인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 10

GCC2 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 종양(tumor)은 세포가 세포 성장과 사멸에 관한 조절 능력을 잃고 비정상적인 세포성장의 결과이며, 종양이 침윤 및 전이성, 과도한 증식성을 가지면 악성종양(malignant tumor), 즉 암으로 분류한다. 암을 치료하기 위해서 전통적인 치료법 외에 면역 치료법, 표적 치료법 등이 있다. 표적 치료법은 분자 치료제를 이용하여 암의 성장과 발생을 특이적으로 억제할 수 있는 치료법을 의미한다. 표적 치료법을 위해 사용되는 물질은 단클론항체, 소분자물질 등이 있다.

[0003] 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide)는 10-20bp 길이로 이루어져 있으며 핵과 세포질에 있는 RNA에 상보적으로 결합하여 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 프리-mRNA는 번역 전 단계로 스플라이싱되어 mRNA를 형성한다. 엑손은 mRNA에 속하며 인트론은 mRNA에 포함되지 않는 프리-mRNA에 속한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 스플라이스 부위에 결합하여 mRNA 형성을 방해한다. 이외에도 유전자 발현을 조절할 수 있

는 다양한 화합물이 있으며 shRNA, siRNA 등이 대표적으로 사용되고 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한 shRNA, siRNA 등의 유전자 발현 조절 기술은 mRNA에 상보적으로 결합하여 번역 과정을 막는다.

[0004] 암 치료를 위해, 보다 효과적인 표적 치료법의 개발이 요구되는 실정이나, 현재까지 암 치료에 있어서, 종양 억제 효과를 유도하고, 생체 내에서도 치료 효과가 우수한 표적 치료제의 개발은 미미한 수준이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2080887호 (2020.02.18. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명에서는 GCC2 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 GCC2 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 GCC2 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 GCC2 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 본 발명은 폐암 특이적으로 많이 분비되는 GCC2의 발현을 억제함으로써, 폐암 치료제로의 가능성을 확인하였다. 그 결과, in vitro 및 in vivo에서, 침습, 전이, 중간엽세포의 성질 상실, 종양형성능 저하 및 종양 세포의 사멸을 유도하여 폐암 치료의 가능성을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명의 shRNA를 이용한 scratch assay 결과를 나타낸다. 24시간 뒤 대조군인 CD63-H1299와 달리 shRNA로 GCC2의 발현을 억제한 실험군에서 세포의 이동 능력이 저하된 것을 보여준다.

도 2는 본 발명의 shRNA를 이용하여 유전자 발현을 억제한 세포의 콜로니 형성 능력 실험 결과를 나타낸다. 7일 간의 배양 후 1mm 이상의 콜로니를 세어 평균을 내본 결과 실험군이 대조군에 비해 절반만 콜로니 형성이 된 것을 확인하였다.

도 3은 본 발명의 shRNA를 형질주입한 세포의 침습(invasion)과 전이(migration)의 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 막을 통과한 세포의 수가 줄어든 것을 확인할 수 있으며 통계적 결과에서도 유의미하게 줄어든 것을 확인하였다.

도 4는 본 발명의 shRNA를 형질주입한 세포의 사멸사를 TUNEL assay로 분석한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 녹색 형광이 발현하고 있는 세포가 발견되는 것을 볼 수 있으며 이는 세포사멸이 일어나고 있음을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 shRNA를 형질주입한 세포와 그렇지 않은 세포를 마우스의 피하에 주입하여 종양이 형성되는 것을 확인한 결과를 나타낸다. 형질주입한 세포는 12일 이후 종양의 부피가 0에 가까워지는 반면 대조군은 종양 크기가 점점 더 증가함을 확인하였다.

도 6은 본 발명의 shRNA를 형질주입한 세포와 그렇지 않은 세포를 쥐의 피하에 주입한 이후 대조군의 종양이 1cm 이상 도달하였을 때 마우스를 희생하여 실험한 결과를 나타낸다. 적출한 종양의 무게를 측정한 결과 실험군은 하나의 개체를 제외하고 모두 종양이 소실되었다.

도 7은 본 발명의 안티센스 뉴클레오타이드를 형질주입하였을 때 유전자 발현량의 변화를 realtime PCR을 통해 분석한 결과를 나타낸다. 특정 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용했을 때 발현량이 억제된 것을 확인할 수 있었다.

도 8은 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 농도를 달리해서 형질주입 후 같은 시기에 RNA를 회수하여 발현량을 확인한 결과를 나타낸다. 적정 농도의 조건이 있음을 확인하였다.

도 9는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 농도를 고정하고 시간에 따른 GCC2 발현량 차이를 확인한 결과를 나타낸다. 일정 시간 이후 발현량이 회복됨을 확인하였다.

도 10은 본 발명에서 변형한 형태의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입하였을 때의 결과를 나타낸다. 도 8에 비해 낮은 농도에서 억제 효율이 뛰어난 것을 확인하였다.

도 11은 본 발명에서 변형한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 농도를 고정하여 형질주입후 시간을 달리해서 발현량 차이를 확인한 결과를 나타낸다. 도 9와 같이 시간에 따른 발현량 차이를 보였다.

도 12는 본 발명의 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 형광 FAM을 태깅하여 세포 내에 잔존능력을 확인한 결과를 나타낸다. 3일간 높은 수준으로 잔존해 있으며 10일까지도 세포 내에 남아 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 확인하였다.

도 13은 본 발명의 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입하여 세포의 scratch assay를 확인한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 세포의 이동 능력이 저하됨을 확인하였다.

도 14는 본 발명의 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입한 세포의 콜로니 형성능력을 확인한 결과를 나타낸다. 대표 사진이 나타내는 것과 같이 콜로니 형성 능력이 저하됨을 확인하였다.

도 15는 본 발명의 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입한 세포의 전이(migration) 능력을 확인한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 세포의 전이 능력이 저하됨을 확인하였다.

도 16은 본 발명의 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입한 세포와 그렇지 않은 세포를 마우스의 피하에 주입하여 종양이 형성되는 것을 확인한 결과를 나타낸다. 세포 이식 후 6일차부터 실험군의 종양 크기가 감소하는 것을 확인하였다.

도 17은 본 발명의 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입한 세포와 그렇지 않은 세포를 피하에 이식한 쥐를 대조군의 종양이 1cm 이상 도달하였을 때 종양을 적출하여 실험한 결과를 나타낸다. 무게를 측정한 결과 실험군은 일정한 무게를 유지하고 있는 것을 확인하였다.

도 18은 마우스의 피하에 종양을 이식 후 8일차부터 PBS와 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 피하에 주사한 결과를 나타낸다. 그 결과 대조군에 비해 실험군에서 종양의 형성 속도가 둔화된 것을 확인하였다.

도 19는 본 발명의 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 피하 주사한 마우스와 PBS를 주사한 마우스를 대조군의 종양이 1cm를 넘었을 때 마우스를 희생하여 종양을 적출하여 실험한 결과를 나타낸다. 무게를 측정한 결과 대조군의 8마리 중 2마리가 400mg을 넘긴 반면 실험군은 모두 87mg의 평균적인 수치를 보이며 종양 성장이 억제됨을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명은 GCC2 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0012] 상세하게는, 상기 GCC2 발현 억제제는 GCC2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)일 수 있고, 상기 GCC2 활성 억제제는 GCC2 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 26으로 표시되는 염기서열 중에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0014] 바람직하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 각 뉴클레오타이드가 2'-O-메톡시에틸화(2'-O-Methoxyethyl; 2'-MOE) 되거나, 또는 상기 하나 이상의 각 뉴클레오타이드

는 LNA(Locked nucleic acids) 이거나, 또는 상기 뉴클레오타이드의 백본을 구성하는 화학결합 중 하나 이상은 포스포로티오에이트(Phosphorothioate; PS)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 보다 바람직하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 26으로 표시되는 염기서열에서 5' 말단 및 3' 말단의 각 3개의 뉴클레오타이드는 LNA(Locked nucleic acids)로 치환되고, 중앙의 뉴클레오타이드는 2'-MOE로 치환되고, 각 뉴클레오타이드의 연결은 PS로 결합되어 변형될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 보다 바람직하게는, 상기 서열번호 1로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 27로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 2로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 28로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 3으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 29로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 4로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 30으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 5로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 31로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 6으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 32로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 7로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 33로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 8로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 34로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 9로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 35로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 10으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 36으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 11로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 37로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 12으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 38로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 13으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 39로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 14로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 40으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 15로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 41로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 16으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 42로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 17로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 43으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 18로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 44로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 19로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 45로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 20으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 46으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 21로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 47로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 22로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 48로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 23으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 49로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 24로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 50으로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 25로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 51로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 26으로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 52로 표시되는 표적 부위에 결합할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 보다 바람직하게는, 상기 shRNA는 서열번호 53 내지 서열번호 56으로 표시되는 염기서열 중에서 선택된 어느 하나 이상의 shRNA일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 바람직하게는, 상기 폐암은 비소세포성 폐암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 약학 조성물은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 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.

[0020] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 증, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 조성물은 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1mg/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1mg/kg~10g/kg, 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01mg/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 GCC2 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0022] 상세하게는, 상기 GCC2 발현 억제제는 GCC2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)일 수 있고, 상기 GCC2 활성 억제제는 GCC2 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 또는 천연물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 바람직하게는, 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 26으로 표시되는 염기서열 중에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 바람직하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 각 뉴클레오타이드가 2'-O-메톡시에틸화(2'-O-Methoxyethyl; 2'-MOE) 되거나, 또는 상기 하나 이상의 각 뉴클레오타이드는 LNA(Locked nucleic acids) 이거나, 또는 상기 뉴클레오타이드의 백본을 구성하는 화학결합 중 하나 이상은 포스포로티오에이트(Phosphorothioate; PS)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 보다 바람직하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 26으로 표시되는 염기서열에서 5' 말단 및 3' 말단의 각 3개의 뉴클레오타이드는 LNA(Locked nucleic acids)로 치환되고, 중앙의 뉴클레오타이드는 2'-MOE로 치환되고, 각 뉴클레오타이드의 연결은 PS로 결합되어 변형될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 바람직하게는, 상기 폐암은 비소세포성 폐암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

[0028] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0029] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0031] <실시예 1> shRNA를 이용한 in vitro에서의 억제 효과

[0032] H1299 또는 H460을 35mm dish에 1.2×10^5 개의 세포를 하루 전날 배양한다. 다음날 lipofectamine 2000 (Thermo fisher) 4ul과 GCC2 shRNA plasmid (TRC lentiviral shRNA, horizon) 8ug을 제조사에서 제공하는 프로토콜에 따라 전처리 과정을 거친 이후 세포에 플라스미드를 전달하였다. 5시간 동안 형질주입을 진행한 직후 콜로니 형성 능력과 이동성 평가 및 침습/전이 능력을 평가하였다. 콜로니 형성 능력을 평가하기 위해 형질주입된 세포를 35mm dish 또는 6 well dish에 각각 500-1,000개씩 분주한다. 이후 최대 열흘간 키운 이후 100개 이상의 세포가 군집한 콜로니의 개수를 센다. 이동성 평가는 200ul tip으로 바닥을 긁어 일정한 시간 간격으로 빈 공간으로 세포가 이동하는 비율을 확인한다. 침습/전이 평가는 corning 사의 transwell의 upper chamber에 전이는 형질주입한 세포를 그대로 분주하고 침습 평가는 matrigel과 배양액을 5:1 ~ 10:1로 희석한 용액을 넣어 굳힌 후 세포를 분주한다. 2일 이후 분주한 세포가 upper chamber의 아랫면으로 얼마나 이동했는지를 trypan blue 염색을 통해 확인한다. 그 결과 암의 악성도와 관련된 상기 능력이 모두 저하된 것을 확인하였다(도 1 내지 도 4).

[0033] <실시예 2> shRNA로 GCC2를 억제한 세포의 동물 모델에서 종양 형성 억제 효과

[0034] 종양 형성 실험을 위해 BALB/c nude 마우스를 사용했으며 모두 수컷 5주차를 이용하였다. 4주차의 마우스는 일주일 간의 안정기를 거친 이후, 실시예 1에서 설명한 바와 같이 형질주입된 세포, H460을 5×10^6 개씩 matrigel과 배양액 1:1 혼합액 50ul에 섞어 마우스의 피하에 주사한다. 이후 2일 간격으로 종양의 성장을 확인하였다. 그 결과 암세포가 종양을 형성하는 능력이 소실되었음을 확인하였다(도 5 및 도 6).

[0035] <실시예 3> GCC2를 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화합물

[0036] 하기 표 1의 올리고뉴클레오타이드를 이전에 보고된 표준 기술을 이용하여 합성하였다. 또한, 현재까지 개발되어진 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 변형 기술 중 Locked nucleic acids (LNA), 2'-O-Methoxyethyl (2'-MOE), Phosphorothioate (PS)를 이용하여 변형하였다. 변형은 5'과 3' 말단 세 개의 서열을 LNA로 중앙 뉴클레오타이드는 2'-MOE로 치환하며 뉴클레오타이드간 연결은 PS로 치환하였다(도 7).

표 1

[0037]

#	ASO (5'>3')
서열번호 1	CTCTTCACCTTAGAT
서열번호 2	CCCAATACCTGTACA
서열번호 3	TGATCTGAGTTCTTC
서열번호 4	GTGCATCTCCCATCT
서열번호 5	CTGCCATCAACTCATT
서열번호 6	CTTTTCATCAGTGGT
서열번호 7	GCATTGAGGTGGCT
서열번호 8	GTCTTCCCGTTCATG
서열번호 9	TCTCTGTTATGCTGT
서열번호 10	GCTTCTTGCTTTTCT
서열번호 11	AAGCAGTTCTGAGCT
서열번호 12	GGTATCTCTTTGACT
서열번호 13	ACTACACTCTCTTCT
서열번호 14	GCAGGGCCTCTTTT
서열번호 15	GTTCTAGTAGTGGCT
서열번호 16	CTTGTAAGGTCTTCA
서열번호 17	TTTGTGCTTCTCTG
서열번호 18	GTTCCCTTCTTGTT
서열번호 19	GTTCCGCCTCTTTGG
서열번호 20	CTCGTTCTGGGATGT
서열번호 21	GGTCGGTTCATTCTT
서열번호 22	GTCTGTGTTTCTCCT
서열번호 23	CTCTTCCCGGTTAC
서열번호 24	GTGTGTATGTGCTGG
서열번호 25	GTGGTTTTATTCTGG
서열번호 26	TTCCAGTTGGTATGG

[0038] <실시예 4> in vitro에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화학물의 농도별 효과

[0039] 하루 전날 H1299 세포 1.2×10^5 개의 세포를 35mm dish에 분주한다. 다음날 안티센스 올리고뉴클레오타이드 50, 100, 200, 400, 800pmol과 lipofectamine 2000 4ul를 제조사 제공 프로토콜에 따라 준비하여 5시간 동안 형질주입을 하였다. 5시간의 형질주입이 끝난 직후 세포를 Trizol (Thermo fisher)를 이용하여 RNA를 회수했다. 회수한 RNA는 RT-PCR을 진행하여 cDNA로 변환(conversion)했다. cDNA는 sybr green (KAPA)을 이용한 Realtime PCR 기술을 통해 GCC2의 mRNA의 발현량을 확인하였다. 그 결과 농도에 따라 유전자 발현 억제 능력이 다르며 400pmol에서 안정적인 발현억제가 이뤄지는 것을 확인하였다(도 8).

[0040] <실시예 5> in vitro에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화학물의 시간별 효과

[0041] 실시예 4와 같은 순서로 세포를 준비하고, 다음날 안티센스 올리고뉴클레오타이드 400pmol과 lipofectamine 2000을 이용하여 형질주입을 하였다. 형질주입을 시작한 시간을 기준(0시간)으로 5시간, 10시간, 15시간, 24시간 후의 GCC2 발현량을 확인한다. 발현량은 실시예 4와 같은 방식으로 realtime PCR로 확인하였다. 그 결과 시간에 따른 발현 억제 효과는 5시간일 때 가장 효과적인 것으로 확인하였다(도 9).

[0042] <실시예 6> 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 발현 억제 효과

[0043] 실시예 3에서 설명한 바와 같이, 가장 효과가 좋았던 뉴클레오타이드를 LNA, 2'-MOE, PS를 조합하여 변형하였다. 이를 실시예 4, 실시예 5와 같은 방법으로 진행하여 효과를 확인하였다. 그 결과 변형된 형태가 더 낮은 농도 100pmol일 때 효과가 좋게 나타났으며 시간은 5시간일때가 가장 효과가 좋았다(도 10 내지 도 12).

[0044] <실시예 7> 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화합물의 in vitro에서의 효과

[0045] 실시예 1과 같은 방법으로 진행되며 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드 100pmol을 각각 lipofectamine 2000 4ul과 혼합하여 사용했다. 그 결과 콜로니 형성 능력 저하, 침습/전이 능력 저하, 이동성 저하의 결과가 확인되었다(도 13 내지 도 15).

[0046] <실시예 8> 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화합물로 GCC2를 억제한 세포의 동물 모델에서의 종양 형성 억제 효과

[0047] 실시예 2와 같은 방법으로 진행되었으며, 변형 안티센스 올리고뉴클레오타이드 100pmol과 lipofectamine 2000으로 형질주입한 세포를 BALB/c nude 마우스 피하에 주사하였다. 그 결과 6일차 이후 형질주입한 세포는 종양의 크기가 감소하는 반면, H460 세포는 계속 크기가 증가함을 확인하였다(도 16 및 도 17).

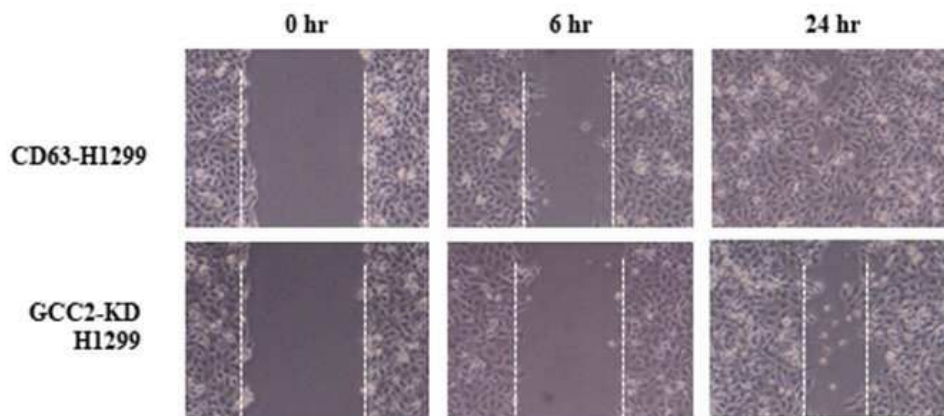
[0048] <실시예 9> 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화학물의 마우스 모델 피하 주사 투여

[0049] 4주령 수컷 BALB/c nude 마우스를 일주일간 안정화를 진행한 이후 각 마우스의 피하에 H460 5×10^6 개를 matrigel 혼합액과 섞어 주사하였다. 8일 동안 종양이 안정적으로 자리 잡는 것을 기다렸다. 8일차부터 대조군은 PBS를 실험군에는 변형 올리고뉴클레오타이드를 5mg/kg 기준으로 2일 간격으로 피하 주사하였다. 그 결과 4일차부터 종양 크기의 차이가 벌어지기 시작했으며, 대조군은 8마리 중 2마리가 직경 1cm 이상, 무게 400mg 이상의 큰 종양으로 성장했지만 실험군은 8마리 모두 평균 83mg 성장으로 그쳤다. 이는 피하 주사를 통한 안티센스 뉴클레오타이드의 전달이 종양의 성장을 억제하는 것을 나타낸다(도 18 및 도 19).

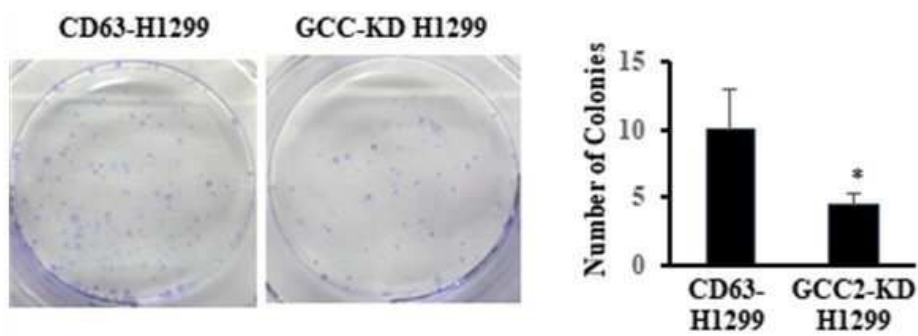
[0050] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

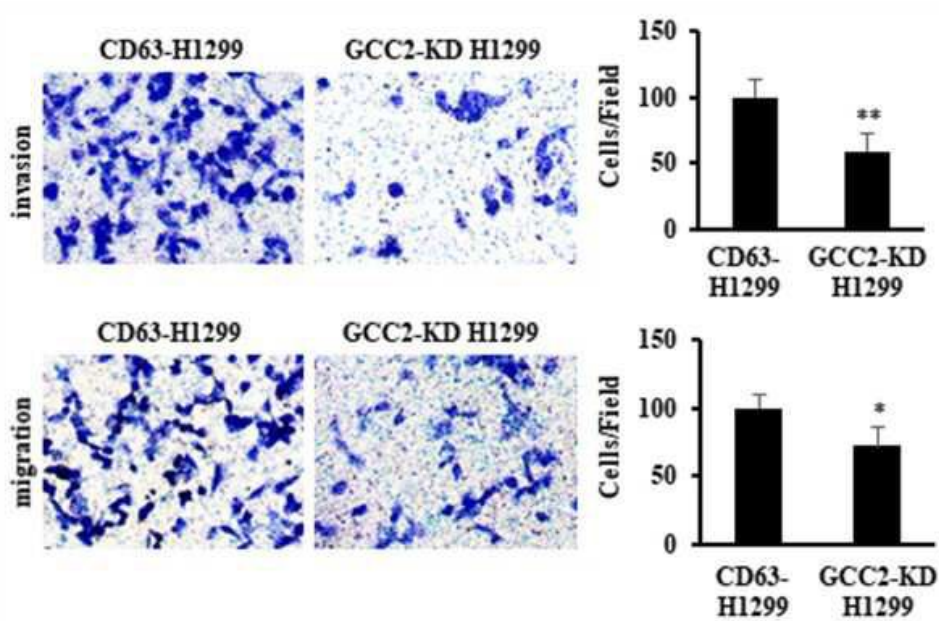
도면1



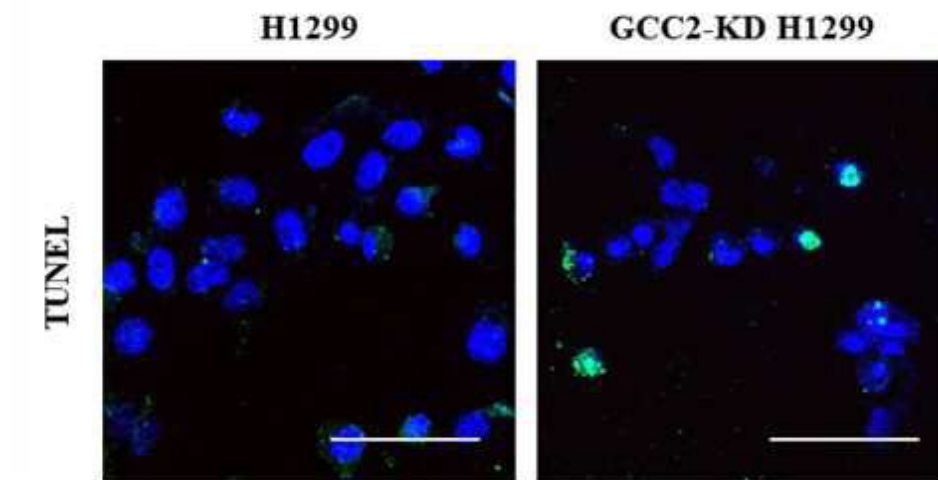
도면2



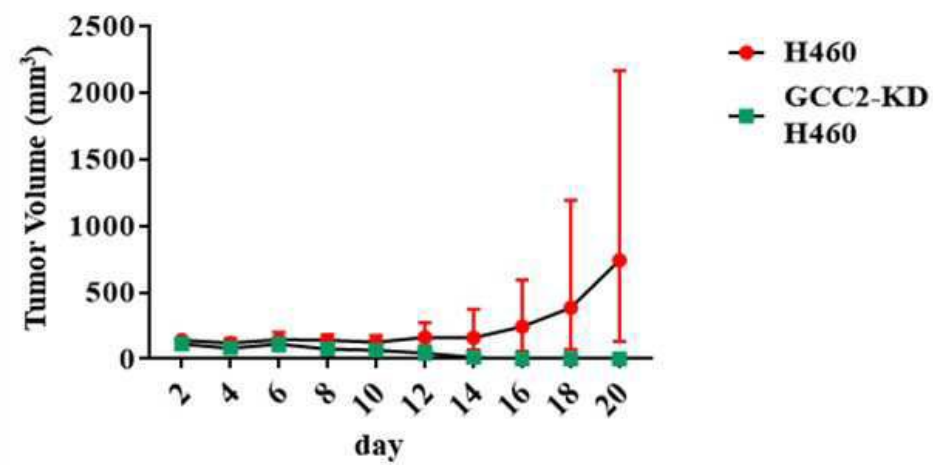
도면3



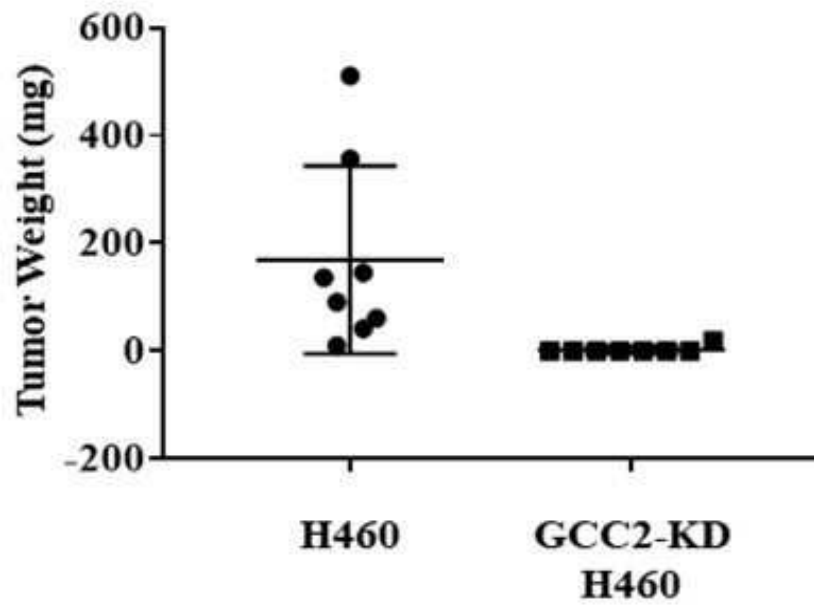
도면4



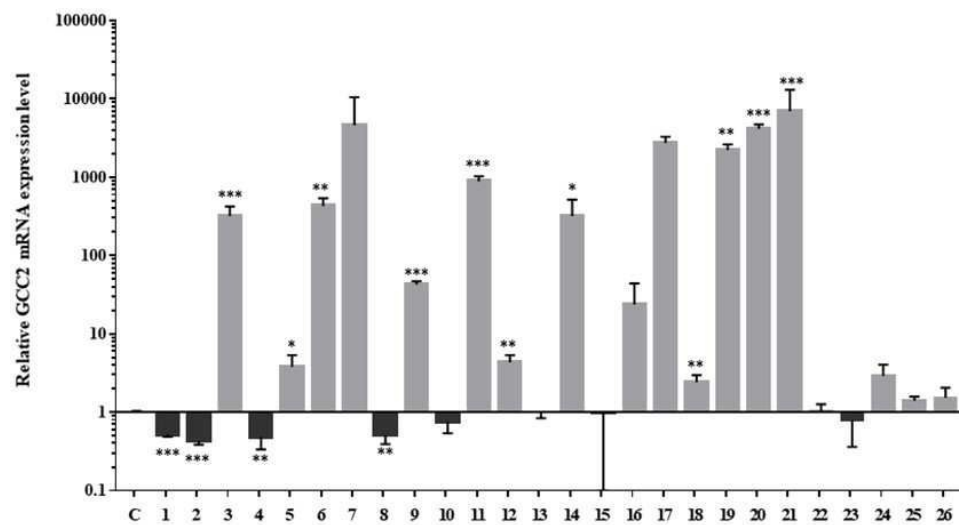
도면5



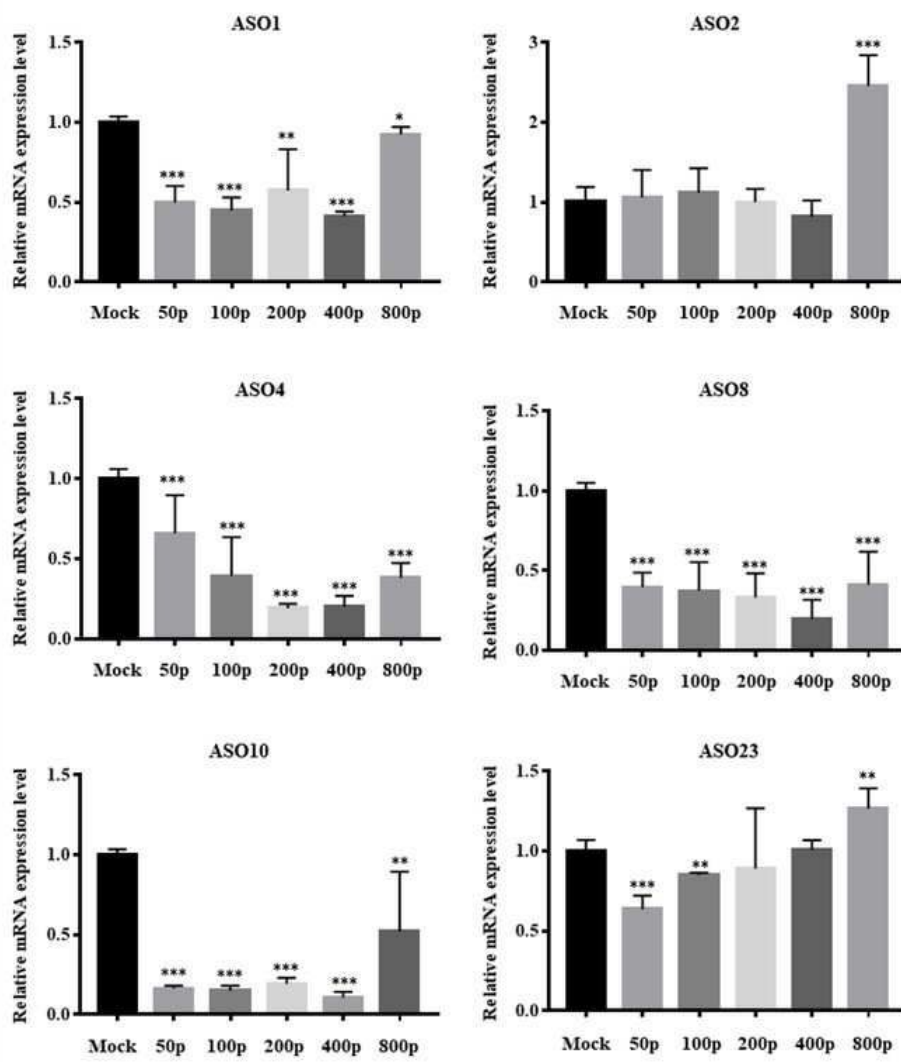
도면6



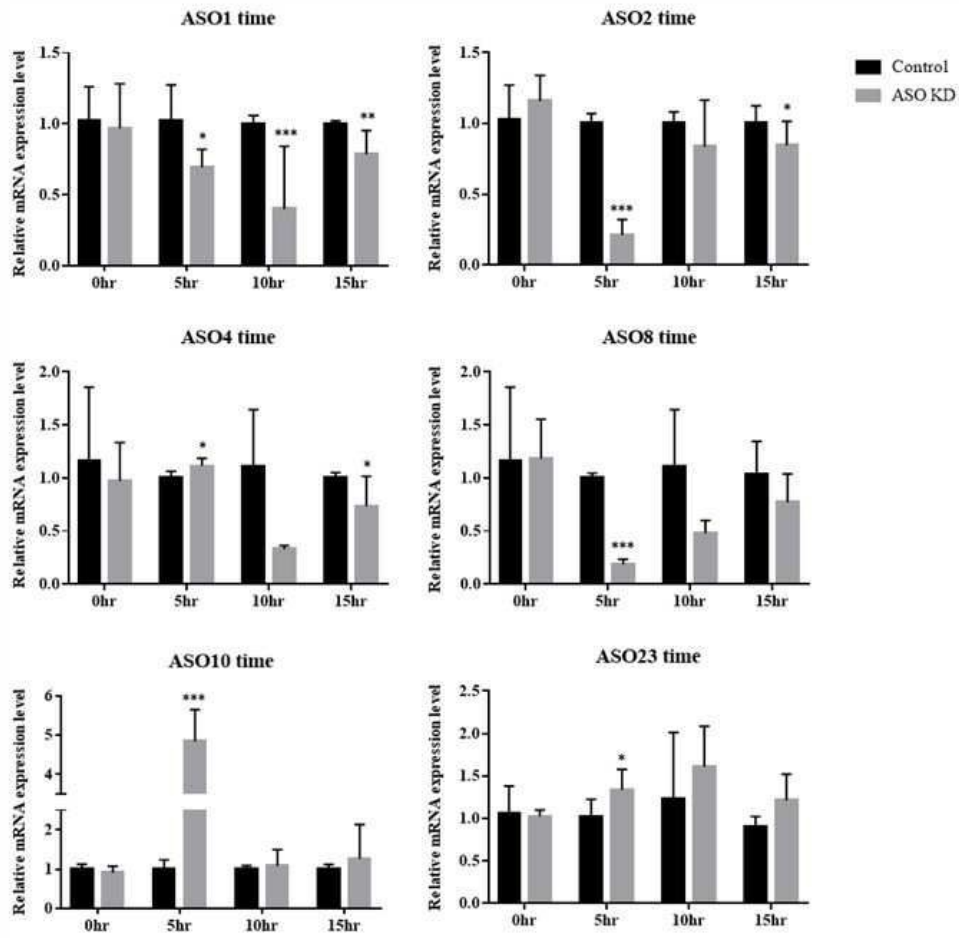
도면7



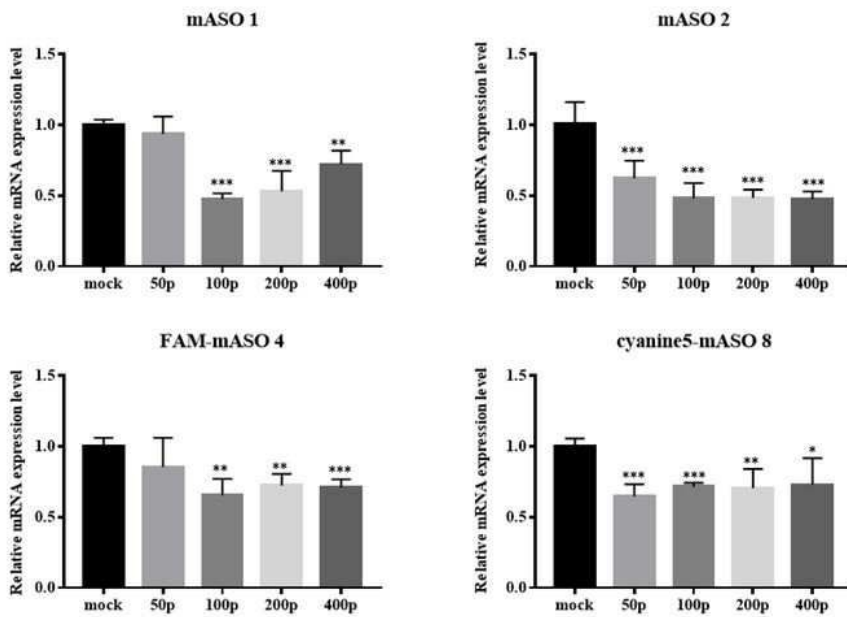
도면8



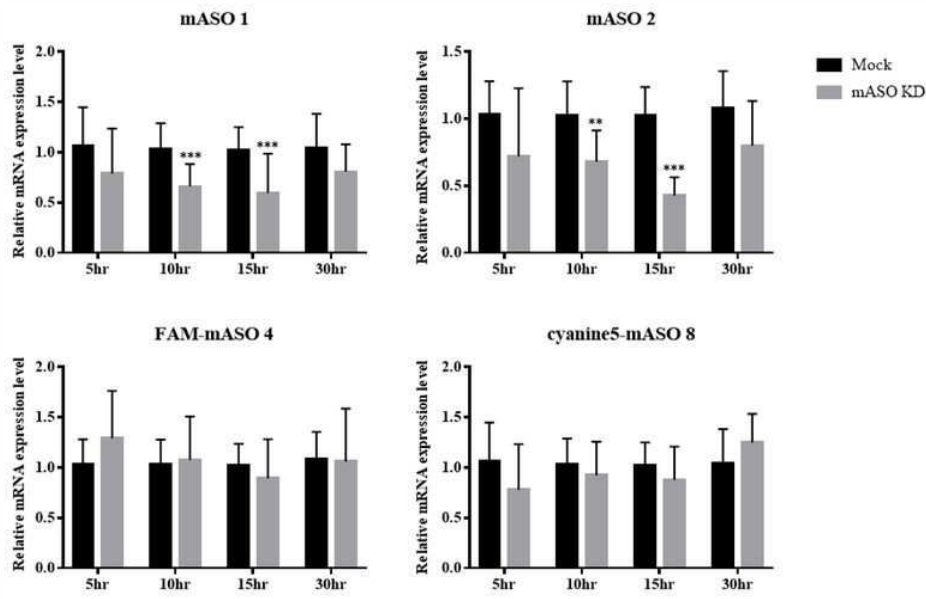
도면9



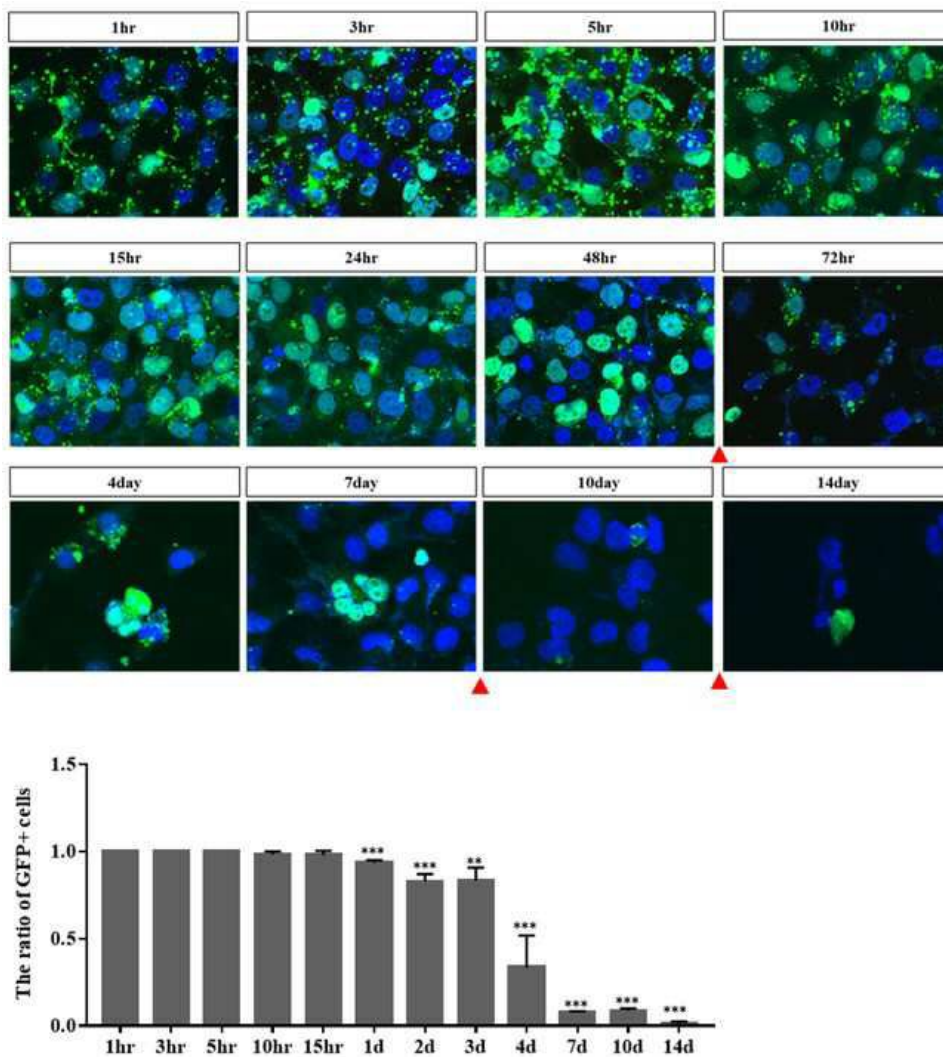
도면10



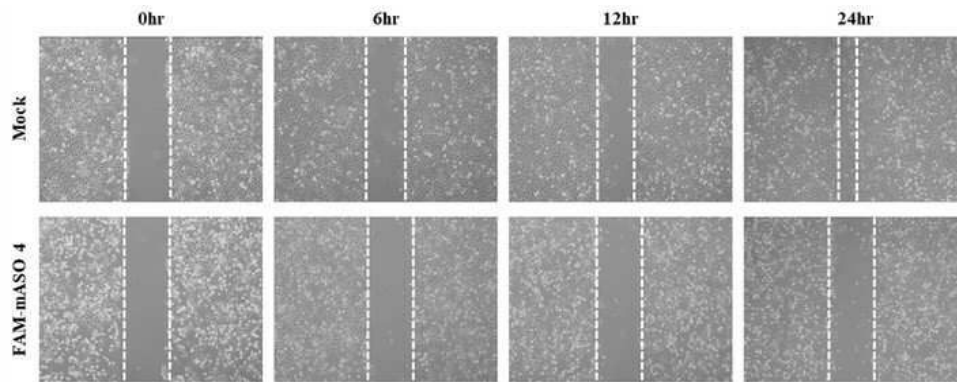
도면11



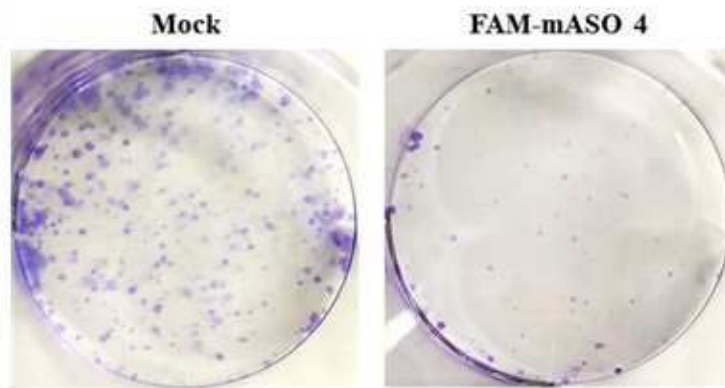
도면12



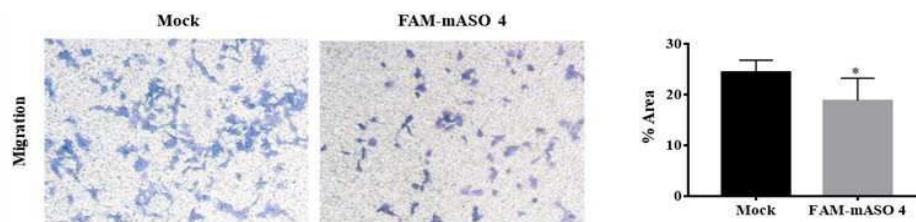
도면13



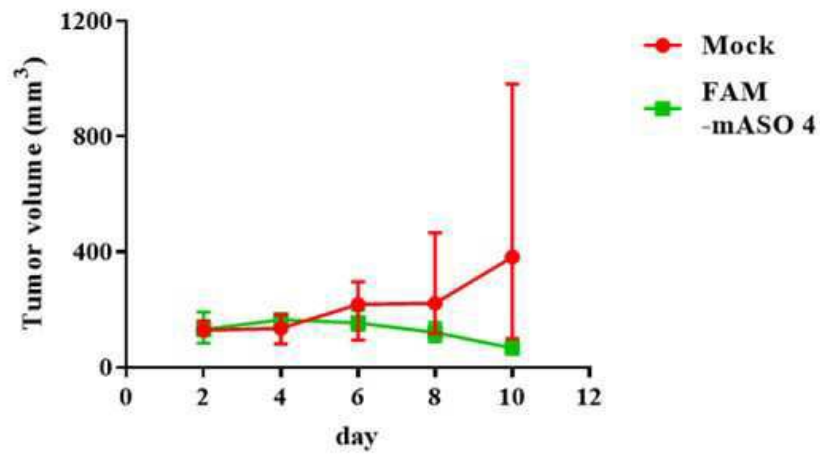
도면14



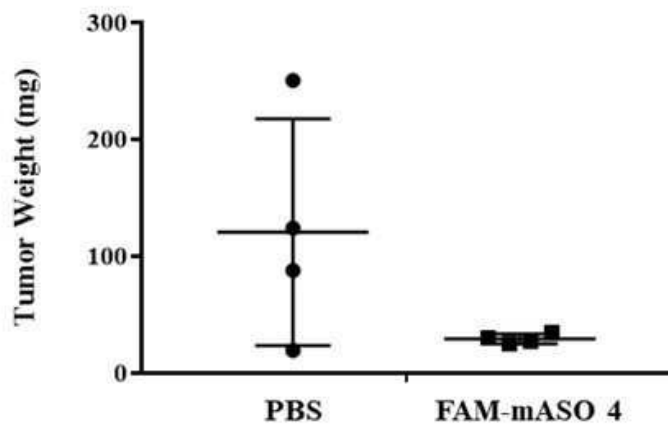
도면15



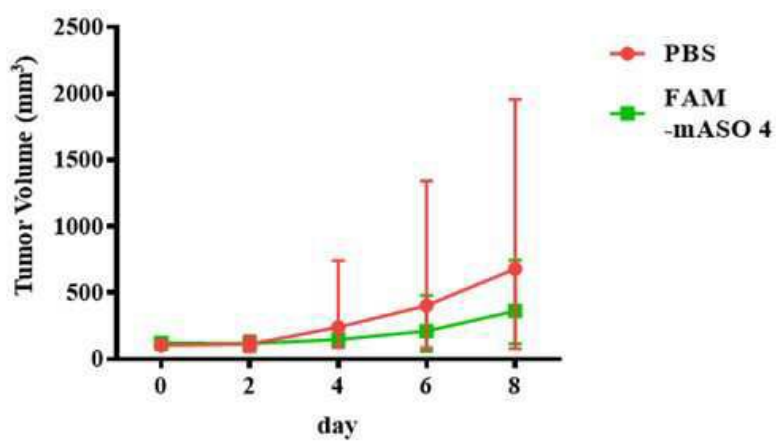
도면16



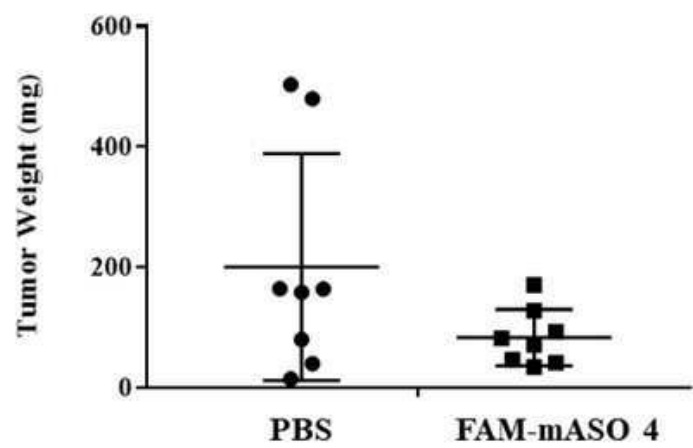
도면17



도면18



도면19



서열 목록

<110>	EXoPERT CORPORATION	
	Korea University Research and Business Foundation	
<120>	Composition for preventing or treating lung cancer comprising	
	GCC2 inhibitors	
<130>	DP-2021-0254	
<160>	56	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS01	
<400>	1	
	ctcttcacct tagat	15
<210>	2	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS02	
<400>	2	
	cccaatacct gtaca	15
<210>	3	

<211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AS03
 <400> 3
 tgatctgagt tcttc 15
 <210> 4
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AS04
 <400> 4
 gtgcatctcc catct 15
 <210> 5
 <211> 16
 <
 212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AS05
 <400> 5
 ctgccatcaa ctcatt 16
 <210> 6
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AS06
 <400> 6
 cttttcatca gtggt 15
 <210> 7
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AS07
 <400> 7

gcatttgagg tggct	15
<210> 8	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AS08	
<400> 8	
gtcttcccgt tcatg	15
<210> 9	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AS09	
<400> 9	
tctctgttat gctgt	15
<210> 10	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AS010	
<400> 10	
gcttcttgct tttct	15
<210> 11	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AS011	
<400> 11	
aagcagttct gagct	15
<210> 12	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	AS012	
<400>	12	
ggtatctctt	tgact	15
<210>	13	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS013	
<400>	13	
actacactct	cttct	15
<210>	14	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS014	
<400>	14	
gcagggcctc	ttttt	15
<210>	15	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS015	
<400>	15	
gttctagtag	tggt	15
<210>	16	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS016	
<400>	16	
cttgtaaggt	cttca	15
<210>	17	
<211>	15	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS017	
<400>	17	
	ttttgtgctt ctctg	15
<210>	18	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS018	
<400>	18	
	gttccctttc ttgtt	15
<210>	19	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS019	
<400>	19	
	gttccgcctc tttgg	15
<210>	20	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS020	
<400>	20	
	ctcgttcttg gatgt	15
<210>	21	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS021	
<400>	21	
	ggtcggttca ttctt	15
<210>	22	

<211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AS022
 <400> 22
 gtctgtgttt ctcct 15

<210> 23
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AS023
 <400> 23
 ctcttcccgg gttac 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AS024
 <400> 24
 gtgtgtatgt gctgg 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AS025
 <400> 25
 gtggttttat tctgg 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AS026
 <400> 26

ttccagttgg tatgg	15
<210> 27	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 27	
atctaaggtg aagag	15
<210> 28	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 28	
tgtacaggta ttggg	15
<210>	
> 29	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 29	
gaagaactca gatca	15
<210> 30	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 30	
agatgggaga tgcac	15
<210> 31	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 31	
aatgagttga tggcag	16
<210> 32	
<211> 15	

<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	32	
accactgatg aaaag		15
<210>	33	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	33	
agccacctca aatgc		15
<210>	34	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	34	
catgaacggg aagac		15
<210>	35	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	35	
acagcataac agaga		15
<210>	36	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	36	
agaaaagcaa gaagc		15
<210>	37	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	37	

agctcagaac tgctt	15
<210> 38	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 38	
agtcaaagag atacc	15
<210> 39	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 39	
agaagagagt gtagt	15
<210> 40	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 40	
aaaaagaggc cctgc	15
<210> 41	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 41	
agccactact agaac	15
<210> 42	
<211> 15	
<212>	
DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 42	
tgaagacctt acaag	15
<210> 43	
<211> 15	

<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	43	
cagagaagca caaaa		15
<210>	44	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	44	
aacaagaaag ggaac		15
<210>	45	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	45	
ccaaagaggc ggaac		15
<210>	46	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	46	
acatcccaga acgag		15
<210>	47	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	47	
aagaatgaac cgacc		15
<210>	48	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	48	

aggagaaaca cagac	15
<210> 49	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 49	
gtaacccggg aagag	15
<210> 50	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 50	
ccagcacata cacac	15
<210> 51	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 51	
ccagaataaa accac	15
<210> 52	
<211> 15	
<212>	
DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 52	
ccataccaac tggaa	15
<210> 53	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GCC2 shRNA	
<400> 53	
ttaaccagct ctaattcttg c	21
<210> 54	

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GCC2 shRNA
 <400> 54
 aatagtatca actctgctct c 21

 <210> 55
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GCC2 shRNA
 <400> 55
 aactaaactc ttcatgtcag c 21
 <210> 56
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GCC2 shRNA
 <400> 56
 taaagcctaa attccagttg g 21