



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0116658

(43) 공개일자 2024년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0008982

(22) 출원일자 2024년01월19일

심사청구일자 없음

(30) 우선권주장

1020230008908 2023년01월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

주식회사 토르 테라퓨틱스

대전광역시 유성구 대학로 99, 701호(궁동, 충남대학교 산학연교육연구관)

(72) 발명자

김진국

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)

박민성

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 15 항

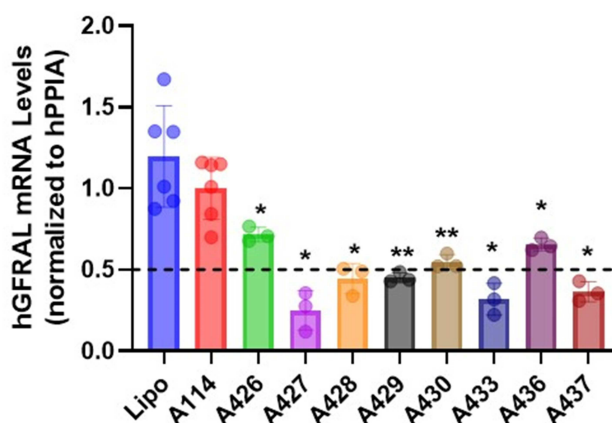
(54) 발명의 명칭 GFRAL을 표적으로 하는 안티센스 올리고머 및 이의 용도

### (57) 요약

본 발명은 GFRAL(GDNF family receptor alpha like) 유전자를 표적으로 하는 GFRAL 특이적 안티센스 올리고머 및 이를 포함하는 비만, 당뇨, 식욕부진 또는 악액질 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 안티센스 올리고머가 생체 내 GFRAL 발현을 효과적으로 억제하며, 암 악액질 동물모델에서 개선 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, GFRAL 발현 억제를 통해 비만 또는 악액질 치료제로서 적용가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3a

### hGFRAL



(52) CPC특허분류

**A61P 3/04** (2018.01)  
**A61P 35/00** (2018.01)  
**C12N 2310/3125** (2013.01)  
**C12N 2310/315** (2013.01)  
**C12N 2310/321** (2013.01)  
**C12N 2310/322** (2013.01)  
**C12N 2310/3341** (2013.01)  
**C12N 2310/3525** (2013.01)

(72) 발명자

**송민호**

대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 306동 1202호  
 (문화동, 센트럴파크3단지아파트)

**장준영**

대전광역시 중구 대둔산로386번길 11, 501호 (산성  
 동, 만년빌라)

**주상현**

대전광역시 서구 동서대로1030번길 32 (변동)

**홍현정**

대전광역시 동구 용운로 80, 306동 1403호 (용운동, 용방마을아파트)

**이현승**

대전광역시 중구 서문로 96, 206동 1404호 (문화동, 센트럴파크2단지아파트)

**이민희**

대전광역시 유성구 노은서로 222, 102동 502호 (지족동, 열매마을아파트1단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                       |
|-------------|-------------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711164799                                            |
| 과제번호        | 2020H1D3A2A03100215                                   |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                             |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                                |
| 연구사업명       | 교육인력양성사업                                              |
| 연구과제명       | (N01220071)(통합EZ)회귀질환 자원, 진단 및 환자맞춤형 신약개발 허브 구축(2022년 |

도)

|         |                         |
|---------|-------------------------|
| 과제수행기관명 | 한국과학기술원                 |
| 연구기간    | 2022.01.01 ~ 2022.12.31 |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호      | 1711125366              |
| 과제번호        | G04200030               |
| 부처명         | 과학기술정보통신부               |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국과학기술원                 |
| 연구사업명       | KAIST자체연구사업             |
| 연구과제명       | 회귀질환의 유전체적 발병기작 규명      |
| 과제수행기관명     | 한국과학기술원                 |
| 연구기간        | 2020.03.01 ~ 2020.12.31 |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호      | 1711169001              |
| 과제번호        | 2021R1A4A1031198        |
| 부처명         | 과학기술정보통신부               |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                  |
| 연구사업명       | 집단연구지원                  |
| 연구과제명       | 교모세포종 침습 제어 연구실         |
| 과제수행기관명     | 한국과학기술원                 |
| 연구기간        | 2022.03.01 ~ 2023.02.28 |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                           |
|-------------|-------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1425178454                                |
| 과제번호        | 00239221                                  |
| 부처명         | 중소벤처기업부                                   |
| 과제관리(전문)기관명 | 중소기업기술정보진흥원                               |
| 연구사업명       | 팁스(TIPS) 기술창업기업                           |
| 연구과제명       | 암환자의 악액질 치료를 위한 First-in-class 약물개발 및 사업화 |
| 과제수행기관명     | 주식회사 토르 테라퓨틱스                             |
| 연구기간        | 2023.04.01 ~ 2025.03.31                   |

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1로 표시되는 인간 GFRAL(GDNF family receptor alpha like) 유전자의 전체 pre-mRNA에서 적어도 13개의 연속된 뉴클레오타이드와 왓슨-크릭 염기쌍(Watson-Crick pairing) A:T 또는 G:C 또는 유동 염기쌍(wobble pairing) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 통한 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 올리고머.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 올리고머는 서열번호 3 내지 서열번호 18로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 핵산서열에 포함된 적어도 13개의 연속된 뉴클레오타이드와 왓슨-크릭 염기쌍(Watson-Crick pairing) A:T 또는 G:C 또는 유동 염기쌍(wobble pairing) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 통한 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 올리고머.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 올리고머는 서열번호 8 내지 서열번호 11, 서열번호 14, 서열번호 17 및 서열번호 18로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 핵산서열에 포함된 적어도 13개의 연속된 뉴클레오타이드와 왓슨-크릭 염기쌍(Watson-Crick pairing) A:T 또는 G:C 또는 유동 염기쌍(wobble pairing) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 통한 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 올리고머.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 올리고머는 서열번호 8 내지 서열번호 11로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 핵산서열에 포함된 적어도 13개의 연속된 뉴클레오타이드와 왓슨-크릭 염기쌍(Watson-Crick pairing) A:T 또는 G:C 또는 유동 염기쌍(wobble pairing) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 통한 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 올리고머.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 올리고머는 서열번호 8 또는 서열번호 11의 핵산서열에 포함된 적어도 13개의 연속된 뉴클레오타이드와 왓슨-크릭 염기쌍(Watson-Crick pairing) A:T 또는 G:C 또는 유동 염기쌍(wobble pairing) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 통한 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 올리고머.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 올리고머는 변형된 뉴클레오타이드 간 연결기, 변형된 핵염기(nucleobase) 또는 변형된 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 올리고머.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 변형된 핵염기는 5'-methyl-cytosine인 것을 특징으로 하는 올리고머.

**청구항 8**

제6항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오시드는 2'-O-메틸(methyl), 2'-O-메톡시(methoxy), 2'-O-메톡시에틸(methoxyethyl), 2'-아미노(amino), 2'-알릴(allyl), 2'-플루오로(fluoro), 2'-아라비노(arabino)-플루오로(fluoro), 2'-OCH<sub>2</sub>C(=O)-NHCH<sub>3</sub>(NMA), 2'-O-벤질(benzyl), 2'-O-메틸(methyl)-4-피리딘(pyridine), 4'-O-메틸(methyl), 5'-메틸(methyl), 5'-비닐(vinyl) 및 5'-메톡시(methoxy)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 치환체가 도입된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드; 또는 LNA(locked nucleic acid) 또는 cEt(constrained ethyl) 중 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함하는 바이사이클릭(bicyclic) 뉴클레오시드인 것을 특징으로 하는 올리고머.

**청구항 9**

제6항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오시드 간 연결기는 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 포스포로다이티오에이트(phosphorodithioate), 포스포트리에스테르(phosphotriester), 포스포르아미데이트(phosphoramidate), 메실 포스포르아미데이트(mesyl phosphoramidate), 메틸포스포네이트(methylphosphonate), 메톡시프로필-포스포네이트(methoxypropyl-phosphonate) 및 보라노포스페이트(boranophosphate)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 간 연결기인 것을 특징으로 하는 올리고머.

**청구항 10**

제6항에 있어서, 상기 올리고머는 연결된 데옥시뉴클레오시드로 구성된 겹 세그먼트, 연결된 뉴클레오시드로 구성된 5' 윙 세그먼트 및 연결된 뉴클레오시드로 구성된 3' 윙 세그먼트를 포함하며,

상기 겹 세그먼트는 5' 윙 세그먼트 및 3' 윙 세그먼트 사이에 위치하고, 각각의 윙 세그먼트의 뉴클레오시드는 변형된 당 모이어티 또는 당 대용물을 포함하는 것을 특징으로 하는 올리고머.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 올리고머는 8개 내지 10개의 연결된 데옥시뉴클레오시드로 이루어진 겹 세그먼트; 3개 내지 7개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어진 5' 윙 세그먼트; 및 3개 내지 7개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어진 3' 윙 세그먼트를 포함하고, 각 윙 세그먼트의 각각의 뉴클레오시드는 변형된 당 모이어티 또는 당 대용물을 포함하는 것을 특징으로 하는 올리고머.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 상기 올리고머는 하기 화학식 (I) 또는 화학식 (II)의 구조를 포함하는 것을 특징으로 하는 올리고머:

G\*GTATA\*8\*8\*8\*7\*5\*8\*5\*7\*5\*AGAAC\*C                      화학식 (I);

C\*ACAA\*5\*5\*5\*7\*6\*6\*5\*5\*6\*5\*TCTG\*G                      화학식 (II),

여기서, A는 2'MOE-A, C는 2'MOE-5'-methyl-C, G는 2'MOE-G, T는 2'MOE-T, 5는 DNA-A, 6은 DNA-5'-methyl-C, 7은 DNA-G, 8은 DNA-T, \*는 PS(phosphorothioate), 2'MOE는 2'-O-methoxyethyl을 의미함.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 올리고머를 포함하는 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환은 비만, 당뇨, 식욕부진 또는 악액질(cachexia)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

**청구항 15**

제13항에 있어서, 상기 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환은 암 악액질(cancer cachexia)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

**발명의 설명****기술 분야**

[0001] 본 발명은 GFRAL(GDNF family receptor alpha like) 유전자를 표적으로 하는 GFRAL 특이적 안티센스 올리고머 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 특정 염기서열을 포함하는 GFRAL 특이적 안티센스 올리고머 및 이를 포함하는 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 악액질(cachexia)은 복합적인 대사 이상으로 근육 소실이 특징이며, 지방 조직의 감소를 흔히 동반하고 적절한 칼로리 보충에 의해서도 회복되지 않는 비가역적인 질병상태를 의미한다. 악액질은 식욕 부진, 체중 감소, 지방 조직 및 근육 소실, 우울증을 동반하여 삶의 질이 낮으며 생존을 저하의 원인이 된다. 악액질은 만성질환(만성 호흡기질환, 심부전, 신부전, 만성감염 등) 및 암에 의해서 흔히 발생된다. 암을 비롯한 만성질환에서 발생하는 악액질의 치료에 있어서, 원인 교정 이외에는 식욕 촉진 약물 투여, 운동, 염증 억제 약물 투여 등으로 회복되지 않는다(Baracos et al., Nat Rev Dis Primers, Jan 18;4:17105, 2018). 따라서 악액질은 진행을 억제하고 회복하는 치료제가 없는 미충족 의료 수요로 남아있다.

[0004] 특히 암환자에서 나타나는 악액질은 폐암, 췌장암 및 위 식도암을 비롯하여 모든 유형의 암에서 발생할 수 있다(Baracos et al., Nat Rev Dis Primers, Jan 18;4:17105, 2018). 악액질은 암 환자의 50% 이상에서 발생되며, 암 환자의 20%는 악액질이 직접적인 사망의 원인이 된다. 암환자에서 악액질의 진단 기준은 6개월 동안 5% 이상의 체중감소 또는 BMI가  $20\text{kg/m}^2$  미만인 환자에서 2% 이상의 체중감소, 근감소증을 동반한 2% 이상의 체중감소로 정의된다(Featonetal et al., Lancet Oncol, May;12(5):489-95, 2011).

[0005] GDF15(Growth differentiating factor-15)은 악액질을 동반하는 만성질환(만성호흡기질환, 심부전, 신부전, 만성감염 등) 및 암 환자의 혈액내에서 증가되어 악액질의 발생에 관여한다. 정상인에서 GDF15은 낮은 혈청농도( $0.2 - 1.2 \text{ ng/dl}$ )를 나타내지만 만성질환 및 암 환자에서는 ~10 혹은 1000배 이상 증가되어 식욕억제, 구역, 구토, 지방 및 근육 소실 등 악액질 소견을 유발한다. 따라서, 혈청 GDF15은 악액질 유발 질병의 중증도에 의해서 증가하기 때문에 진단적 유용성을 가지고 있다(Breit et al., Annu Rev Physiol. 2021 Feb 10;83:127-151). 암에서 증가하는 GDF15은 암 악액질의 발생과 직접적인 관련성이 있으므로 GDF15 활성을 억제하는 중화항체는 암 악액질 마우스 모델에서 체중 증가와 근육, 지방 조직의 손실을 완화하여 악액질 개선 효과를 보인다(Lerner et al., Journal of cachexia, sarcopenia and muscle 2016; 7: 467-482)

[0006] GDF15의 수용체는 후뇌(Hindbrain)의 AP(Area postrema, 최종야), NTS(Nucleus tractus solitarius, 고립로핵) 영역에서 특이적으로 발현되는 GFRAL(GDNF family receptor alpha like)이며 GDF15에 의한 GFRAL 수용체 활성화는 암 악액질을 유발한다(Mullican et al., Nature 2017, Hsu et. al., Nature 2017). GDF15은 GFRAL과 결합 후 Ret 신호전달을 통하여 GFRAL 뉴런의 활성화를 초래하여 식욕의 억제와 체중의 감소를 초래한다(Goldman A et al., Nature 2017).

[0007] 암 악액질의 증상을 개선 및 억제하기 위하여 GDF15/GFRAL/Ret 복합체의 신호전달 과정에 관한 연구가 주목 받고 있다. GDF15 dimer는 GFRAL의 domain 2에 결합하여 Ret의 CLD1, 2, 3 결합면을 통하여 세포 신호를 활성화한다. Ret은 인산화하여 하위신호인 PI3K/AKT, PLC/PKC, MEK/ERK 신호를 활성화하는 것으로 알려져 있다

(Mullican et al., Trends Endocrinol Metab. 2018 Aug;29(8):560-570).

[0008] 암환자의 악액질 발생 원인을 교정하는 효과적인 치료법은 아직 개발이 미미한 실정이며, 이에 따라 효과적인 치료법에 대한 개발이 절실한 상황이다. 이에 따라, 본 발명자들은 후뇌에서 GFRAL에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 역할 및 효과를 규명하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 인간 GFRAL(GDNF family receptor alpha like) 유전자의 발현을 억제하는 올리고머를 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 올리고머를 포함하는 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 예방 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 올리고머의 용도 및 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 올리고머의 사용을 제공하는 데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 인간 GFRAL(GDNF family receptor alpha like) 유전자의 전체 pre-mRNA에서 적어도 13개의 연속된 뉴클레오타이드와 왓슨-크릭 염기쌍(Watson-Crick pairing) A:T 또는 G:C 또는 유동 염기쌍(wobble pairing) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 통한 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 올리고머를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 올리고머를 포함하는 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 올리고머를 이용한 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 올리고머의 용도 및 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 올리고머의 사용을 제공한다.

### 발명의 효과

[0021] 본 발명에서는 GFRAL 발현을 조절하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보물질들을 발굴하였으며, 상기 후보물질들이 생체 내 GFRAL 발현을 효과적으로 억제하며, 암 악액질 동물모델에서 개선 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GFRAL 발현 억제를 통해 비만 또는 암 악액질 치료제로서 적용가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들을 200nM 농도로 24시간 동안 HEK293 GFRAL 및

RET cDNA 과발현 세포에 형질감염 시켰을 때 GFRAL mRNA 발현양 억제 가능성 확인 시험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2a는 본 발명에 따른 16종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들을 100nM 농도로 24시간 동안 HEK293 GFRAL 및 RET cDNA 과발현 세포에 형질감염 시켰을 때 GFRAL mRNA 발현양 억제 가능성 확인 시험 결과를 나타낸 그래프이다. 도 2b는 48시간 동안 HEK293 GFRAL 및 RET cDNA 과발현 세포에 형질감염 시켰을 때 GFRAL 단백질 발현양 억제 가능성 확인 시험 결과를 나타낸 것이다.

도 3a는 본 발명에 따른 8종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들을 50nM 농도로 24시간 동안 HEK293 GFRAL 및 RET cDNA 과발현 세포에 형질감염 시켰을 때 GFRAL mRNA 발현양 억제 가능성 확인 시험 결과를 나타낸 그래프이다. 도 3b는 8종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들을 50nM 농도로 48시간 동안 HEK293 GFRAL 및 RET cDNA 과발현 세포에 형질감염 시켰을 때 세포독성 확인 시험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4a는 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들을 50nM 농도로 48시간 동안 HEK293 GFRAL 및 RET cDNA 과발현 세포에 형질 감염시켰을 때 GFRAL 단백질 발현양 억제 가능성 확인 시험 결과를 나타낸 것이다. 도 4b는 도 4a의 GFRAL 단백질 발현양을 정량화 한 그래프이다.

도 5a는 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들의 생체 내 독성 확인 시험을 위한 개요도이다. 도 5b는 독성 음성 대조군과 독성 양성 대조군, 4종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들을 실험 동물에 투여 후 7일 경과시점까지의 생존율을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보의 생체 내 투약 1주 후 GFRAL 단백질 발현을 정제된 항체를 사용하여 염색한 결과이다. 각 투여 그룹별 그림의 화살표는 GFRAL positive neuron을 의미한다. Area postrema(AP)의 형광 강도 측정과 AP 내의 GFRAL positive neuron의 수를 확인하여 그래프로 나타냈다.

도 7a는 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들의 생체 내 투약 2주 후 A427 probe 염색 기법을 이용하여 뇌 내의 ASO 분포 결과를 나타낸 것이다. 도 7b는 뇌 내의 ASO 분포를 정량화 한 그래프이다.

도 8a는 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들의 생체 내 투약 2주 후 GFRAL 유전자 발현을 염색한 결과이다. 도 8b는 Area postrema(AP)의 형광 강도 측정과 AP(Area postrema), NTS(Nucleus tractus solitarius)내의 GFRAL positive neuron의 수를 확인한 결과이다.

도 9a는 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 암 악액질 치료 효과를 검증하기 위한 동물실험 스케줄을 나타내는 개요도로, 암 악액질 동물 모델 제작 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 실험 계획을 포함하고 있다. 도 9b는 상기 실험 동물에서 분리한 혈청내 GDF15의 농도를 측정한 그래프이다.

도 10a는 상기 실험의 동물 모델에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 투여 1주 경과 후 수행된 근육 조직의 무게를 측정한 결과이다. 도 10b는 상기의 조직에서 Atrogin-1과 MuRF1의 단백질 발현을 western blot으로 확인한 결과와 그 결과를 정량화 한 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0026] 본 명세서에서, 용어 "GFRAL", "GDNF family receptor alpha like", "GDNF 패밀리 수용체 알파형", "성장 분화 인자 15 수용체" 또는 "GFRAL 단백질" 및 유사 용어는, 별도로 언급되지 않는 한, 영장류(예를 들어, 인간, 시노몰거스 원숭이(시노)), 개 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함한 척추동물 공급원으로부터의 폴리펩타이드("폴리펩타이드" 및 "단백질"은 본원에서 혼용된다) 또는 임의의 천연(native) GFRAL을 말하고, 특정 실시양태에서는, 관련된 GFRAL 폴리펩타이드를 포함하고, 그의 SNP 변이체를 포함한다. GFRAL은 또한 "C6orf144", "Chromosome 6 Open reading Frame 144", "BA360D14.1", "IVFI9356", 및 "UNQ9356"으로서 당업계에 알려져 있다.

[0027] 안티센스 올리고뉴클레오타이드(anti-sense oligonucleotide, ASO) 기술은 단일가닥의 RNA 또는 DNA 가닥을 통해 mRNA의 중간대사(metabolism)를 변경함으로써 유전자로부터 단백질로의 정보전달을 조절하는 기술이다. 즉, 충분히 상보적, 특이적으로 혼성화하는 염기서열을 선택하여 목표 단백질의 바람직한 발현억제가 이루어지도록

하는 것이다. ASO의 결합은 목표 유전자에 서열 특이적으로 결합하므로 목표 유전자 이외의 다른 유전자 발현에 영향을 주지 않는다. 따라서 ASO 기술은 특정 단백질의 생체 내 역할의 분석에서 유용한 도구일 뿐만 아니라, 특정 질병에 대한 유전자치료법으로 활용 가능성을 가진다(FASEBJ. 9, 1288-1296, 1995).

- [0028] 안티센스 DNA는 목표 mRNA와 결합하여 RNA/DNA 이중나선을 형성하며, 이 RNA/DNA 이중나선구조는 생체 내에 존재하는 RNase H(RNase H; 리보핵산분해효소의 한 종류로서 RNA/DNA 혼성 이중나선이 형성되어 있는 mRNA를 특이적으로 분해하는 효소)의 공격을 받아 분해가 유발된다. 안티센스 RNA는 RNA/RNA 이중나선을 형성하며, RNase L의 공격을 받아 목표 mRNA의 분해가 유발된다. RNase L은 이중나선 RNA 가닥 주변의 단일가닥 RNA를 우선적으로 분해하는 리보핵산분해효소이다(Pharmacol. Toxicol.32, 329-376,1992).
- [0030] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1로 표시되는 인간 GFRAL(GDNF family receptor alpha like) 유전자의 전체 pre-mRNA에서 적어도 13개의 연속된 뉴클레오타이드와 왓슨-크릭 염기쌍(Watson-Crick pairing) A:T 또는 G:C 또는 유동 염기쌍(wobble pairing) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 통한 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 올리고머에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명에 따른 안티센스 올리고머(안티센스 올리고뉴클레오타이드)는 인간 GFRAL을 코딩하는 유전자, 구체적으로 mRNA(pre-mRNA 또는 mature mRNA)의 발현을 억제할 수 있다. 본 발명에 따른 안티센스 올리고머(안티센스 올리고뉴클레오타이드)는 인간 GFRAL을 코딩하는 mRNA와 상보적인 서열을 포함한다.
- [0032] "안티센스 활성"은 그의 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 혼성화에 기여하는 임의의 검출가능한 또는 측정 가능한 활성을 의미한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 활성은 표적 핵산 또는 이러한 표적 핵산에 의해 암호화된 단백질의 양 또는 발현에 있어서의 감소이다. 본 발명에 따른 안티센스 활성은 GFRAL을 코딩하는 표적 핵산에 작용하여, 암호화된 GFRAL 단백질의 양 또는 발현을 감소시킨다.
- [0033] "표적화", "표적하는" 또는 "표적된"은 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하여 바람직한 효과를 유도하는 것을 의미한다.
- [0034] "표적 핵산", "표적 RNA" 및 "표적 RNA 전사체"는 모두 안티센스 올리고머에 의해 표적될 수 있는 핵산을 의미한다.
- [0035] 본 발명은 수소 결합을 통해 표적 핵산에 대한 혼성화를 수행할 수 있는 올리고머를 포함한다.
- [0036] "억제"는 안티센스 올리고머 부재 시에 표적 핵산 수준 또는 표적 단백질 수준과 비교하여 표적 핵산에 상보적인 안티센스 화합물의 존재 시에 표적 핵산 수준 또는 표적 단백질 수준의 감소를 의미한다.
- [0037] "안티센스 올리고머"는 표적 핵산의 대응하는 부위 또는 분절에 혼성화를 가능케 하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 올리고머는 인간 GFRAL 유전자의 전체 pre-mRNA(whole pre-mRNA)에서 적어도 13개의 연속된 뉴클레오타이드와 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 상기 인간 GFRAL 유전자의 전체 pre-mRNA는 서열번호 1의 핵산서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 서열번호 1은 GenBank Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p14 Primary Assembly NC\_000006.12 REGION: 55327469..55402493이다.
- [0040] 본 발명에 따른 올리고머는 상기 핵산서열 중 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개 또는 적어도 18개의 연속된 뉴클레오타이드와 혼성화가 가능하다.
- [0041] 혼성화에서, 엄격한 특정 수준을 달성하기 위하여 사용되는 조건은 혼성화 되는 핵산의 성질에 따라 다양하다. 예를 들면, 혼성화 되는 핵산 부위의 길이, 상동성 정도, 뉴클레오타이드 서열 조성(예를 들면, GC/AT 조성비) 및 핵산 타입(예를 들면, RNA, DNA)등이 혼성화 조건을 선택하는데 고려된다. 추가적인 고려 조건은 핵산이 예를 들면, 필터 등에 고정화되어 있는지의 여부이다.
- [0042] 매우 엄격하게 진행되는 조건의 예를 들면 다음과 같다: 실온의 2X SSC/0.1% SDS(혼성화 조건); 실온의 0.2X SSC/0.1% SDS(엄격성이 낮은 조건); 42℃에서의 0.2X SSC/0.1% SDS(보통의 엄격성을 가지는 조건); 68℃에서 0.1X SSC(높은 엄격성을 가지는 조건). 세척 과정은 이들 중 한가지 조건을 사용하여 수행할 수 있고, 예를 들

면 높은 엄격성을 가지는 조건, 또는 상기 조건을 각각 사용할 수 있으며, 상기 기재된 순서대로 각각 10~15분씩, 상기 기재된 조건을 전부 또는 일부 반복하여 수행할 수 있다. 그러나 상기에 기술한 바와 같이, 최적 조건은 포함된 특별한 혼성화 반응에 따라 다양하며, 실험을 통하여 결정할 수 있다. 일반적으로, 중요한 프로브의 혼성화에는 높은 엄격성을 가지는 조건이 사용된다.

- [0043] 상기 혼성화를 이루는 염기쌍 중에 최소한 하나가 유동 염기쌍(wobble pair) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 올리고머는 서열번호 3 내지 서열번호 18로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 핵산 서열에 포함된 적어도 13개의 연속된 뉴클레오타이드와 혼성화가 가능하며, 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 올리고머는 15 내지 25개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 올리고머로, 서열번호 3 내지 서열번호 18로 구성된 군에서 선택되는 핵산서열 중 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개 또는 적어도 18개의 연속된 뉴클레오타이드와 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 올리고머인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0046] 구체적으로, 서열번호 3 내지 서열번호 18로 구성된 군에서 선택되는 서열 중 19개 이상, 20개의 연속된 뉴클레오타이드와 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 올리고머를 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 올리고머는 서열번호 8 내지 서열번호 11, 서열번호 14, 서열번호 17 및 서열번호 18로 구성된 군에서 선택되는 하나의 핵산서열 중 적어도 13개의 연속된 뉴클레오타이드와 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 올리고머는 서열번호 8 내지 서열번호 11로 구성된 군에서 선택되는 핵산서열 중 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개 또는 적어도 18개의 연속된 뉴클레오타이드와 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 올리고머를 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 올리고머는 13 내지 35 nt의 길이를 갖거나, 16 내지 25 nt의 길이를 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 올리고머는 16nt, 17nt, 18nt, 19nt, 20nt, 21nt, 22nt, 23nt, 24nt 또는 25nt의 길이를 가질 수 있다.
- [0050] 상기 혼성화를 이루는 염기쌍 중에 최소한 하나가 유동 염기쌍(wobble pair) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 올리고머는 서열번호 8 또는 서열번호 11의 핵산서열 중 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개 또는 적어도 18개의 연속된 뉴클레오타이드와 혼성화가 가능하며 13 내지 35 nt의 길이를 갖는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 혼성화를 이루는 염기쌍 중에 최소한 하나가 유동 염기쌍(wobble pair) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 포함할 수 있다.
- [0052] "연속된 뉴클레오타이드"는 서로에 바로 인접한 뉴클레오타이드를 의미한다. "뉴클레오타이드간 연결"은 뉴클레오타이드들 사이의 화학적 결합을 지칭한다. "연결된 뉴클레오타이드"는 함께 결합된 인접한 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0053] "핵산"은 단량체 뉴클레오타이드로 이루어진 분자를 지칭한다. 핵산에는 리보핵산(RNA), 데옥시리보핵산(DNA), 단일-가닥 핵산, 이중-가닥 핵산, 소분자 간섭 리보핵산(siRNA), 및 마이크로RNAs(miRNA)가 포함된다. 핵산은 또한 단일 분자 내에 이들 요소들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0054] "뉴클레오타이드"는 다른 핵산의 염기와 짝짓기를 할 수 있는 헤테로사이클릭 모이티어를 의미한다.
- [0055] "뉴클레오타이드 서열"은 임의의 당, 연결, 또는 뉴클레오타이드 변형과 무관한 연속된 뉴클레오타이드의 순서를 의미한다.
- [0056] "뉴클레오타이드"는 당에 연결된 뉴클레오타이드를 의미하고, "뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드의 당 부분에 공유적으로 연결된 인산기를 갖는 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0057] "올리고머"는 핵산 분자의 영역에 혼성화할 수 있는 연결된 단량체 소단위의 중합체를 의미한다.
- [0058] "올리고뉴클레오타이드"는 각각이, 서로 독립적으로, 변형되거나 비변형될 수 있는, 연결된 뉴클레오타이드의 중합체를 의미한다.

- [0059] "단일-가닥 올리고뉴클레오타이드"는 상보적 가닥에 혼성화되지 않는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0060] 상기 혼성화를 이루는 염기쌍 중에 최소한 하나가 유동 염기쌍(wobble pair) G:U, I:A, I:C 또는 I:U를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 안티센스 올리고머는 예를 들어, 서열번호 19 내지 서열번호 34로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.
- [0061] 구체적으로, 서열번호 19 내지 서열번호 34로 구성된 군에서 선택되는 서열과 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 상동성을 나타내는 서열을 포함할 수 있다.
- [0062] 본 발명에 따른 안티센스 올리고머는 예를 들어, 서열번호 24 내지 서열번호 27, 서열번호 30, 서열번호 33 및 서열번호 34로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.
- [0063] 구체적으로, 서열번호 24 내지 서열번호 27, 서열번호 30, 서열번호 33 및 서열번호 34로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 서열과 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 상동성을 나타내는 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 안티센스 올리고머는 서열번호 24 내지 서열번호 27, 서열번호 30, 서열번호 33 및 서열번호 34로 구성된 군에서 선택되는 서열 중 하나의 서열을 포함할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 안티센스 올리고머는 예를 들어, 서열번호 24 또는 서열번호 27의 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.
- [0065] 구체적으로, 서열번호 24 또는 서열번호 27의 서열과 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 상동성을 나타내는 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 안티센스 올리고머는 예를 들어, 서열번호 24 또는 서열번호 27의 서열을 포함할 수 있다.
- [0066] 본 명세서에서 사용되는 "상동성"은 폴리뉴클레오타이드 모이티 사이의 동일성 퍼센트를 의미한다. "동일성"은 비교창(comparison window)을 통해 폴리뉴클레오타이드 서열에 기반하여 서열이 기능적 또는 구조적으로 동일한 정도를 의미한다. 서열 상동성은 표준 소프트웨어를 사용, 예를 들면 BLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873-5877, 1993)에 기초하여 개발된 BLASTN 이나 BLASTX라 불리는 프로그램에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 실시예에서, 본 발명에 따른 안티센스 올리고머는 20개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0068] 본 명세서에서 상보적인 서열은 GFRAL을 코딩하는 mRNA에 대하여 발현을 억제할 수 있을 정도에 대응하는 일부 염기 결손 및 불완전한 상보성도 포괄하는 의미이다.
- [0069] 본 발명의 일 실시예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GFRAL을 암호화하는 유전자의 핵산 염기서열에서 하나 이상의 표적 부위를 선택하고, 상기 표적과 충분히 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 선택하여, 표적 부위와 충분히 특이적으로 혼성화됨으로서, GFRAL의 발현 조절에 대한 소기의 효과를 얻을 수 있다.
- [0070] 본 명세서에서, "혼성화(hybridization)"는 상보적 뉴클레오타이드나 뉴클레오타이드 염기 간 왓슨-크릭(Watson-Crick), 후그스틴(Hoogsteen) 또는 역 후그스틴(Hoogsteen) 수소결합일 수 있는 수소결합을 의미한다. 예를 들면, 아데닌과 티민은 수소결합을 형성하여 쌍을 이루는 상보적인 핵산 염기다.
- [0071] 본 명세서에서 "혼성화 가능한" 또는 "상보적" 또는 "실질적으로 상보적"의 의미는, 온도 및 용액 이온 세기의 적절한 인 비트로 및/또는 인 비보 조건하에 핵산(예를 들면, RNA, DNA)이 다른 핵산에 서열-특이적, 역평행(antiparallel) 방식(즉, 핵산이 상보적 핵산에 특이적으로 결합)으로 비-공유적으로 결합하는, 즉 아데닌(A)과 티민(T)의 페어링, 아데닌(A)과 우라실(U)의 페어링, 및 구아닌(G)과 시토신(C)의 페어링을 형성하거나, "어닐링(anneal)"하거나, 또는 "혼성화(hybridization)" 할 수 있는 뉴클레오타이드의 염기서열을 포함하는 것을 의미한다.
- [0072] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 혼성화는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 GFRAL을 암호화하는 유전자의 핵산 염기서열 사이에서 일어난다. 혼성화의 가장 통상적인 메커니즘은 핵산 분자의 상보적인 핵산 염기 간 수소결합을 수반한다.
- [0073] 혼성화는 다양한 조건에서 발생할 수 있다. 가혹한 조건(stringent condition)은 서열에 의존하고, 혼성화되는 핵산 분자의 성질과 조성에 따라 결정된다. 서열이 표적 핵산과 특이적으로 혼성화할 수 있는지 확인하는 방법

은 당업계에 공지되어 있다.

- [0074] 본 명세서에서, "상보적(complementary)"이라는 용어는 두 뉴클레오타이드 간 정교하게 쌍을 이룰 수 있는 특성을 말한다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드의 두 가지 서로 다른 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드의 염기서열이 5'에서 3' 방향으로 기재되어 있는 경우, 하나의 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드의 일정 부분의 염기서열을 반대방향으로 정렬했을 때, 나머지 하나의 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드의 일정 부분과 비-공유적으로 결합하는, 즉, 아데닌(A)과 티민(T)의 페어링, 아데닌(A)과 우라실(U)의 페어링, 및 구아닌(G)과 시토신(C)의 페어링을 형성하는 경우, 두 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 상보적이라고 한다.
- [0075] 따라서, "특이적으로 혼성화할 수 있는(specifically hybridizable)"과 "상보적(complementary)"은 올리고뉴클레오타이드와 DNA 또는 RNA 표적 사이에서 안정한 특이 결합이 발생할 수 있게 하는 상보성 또는 정교한 쌍 형성의 충분한 정도를 나타내는 데 이용되는 용어로 해석될 수 있다. 당업계에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 서열은 특이적으로 혼성화되는 표적 핵산의 서열과 100% 상보적일 필요는 없는 것으로 알려져 있다.
- [0076] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적 DNA 또는 RNA와의 결합이 특이적으로 혼성화되어 표적 DNA 또는 RNA의 정상적인 기능을 저해할 수 있으며, 특이적 결합이 바람직한 조건에서, 즉, 인 비보 분석 또는 치료의 경우 생리적 조건 하에, 인 비트로 분석의 경우 분석 수행 조건 하에, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 비-표적 서열과의 비특이 결합을 방지하는 데 충분한 정도의 상보성이 있는 것으로 해석된다.
- [0077] 즉, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산과 특이적으로 혼성화할 수 있으면, 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산 사이의 비상보적인 핵산 염기는 용인될 수 있다. 나아가, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 개재 또는 인접 부분이 혼성화에 관여하지 않도록 하나 이상의 핵산 부분과 혼성화될 수 있다(예를 들어, 루프 구조, 미스매치 또는 헤어핀 구조).
- [0078] 본 명세서에서, "완전히 상보적(fully complementary)"은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 각 핵산 염기가 표적 핵산의 대응 핵산 염기와 정교한 염기 쌍을 이룰 수 있음을 의미한다.
- [0079] 본 발명의 일 실시예에서, 비상보적인 핵산 염기의 위치는 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 또는 3' 말단에 위치할 수 있다. 또는, 비상보적 핵산 염기나 핵산 염기들은 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 내부에 위치할 수 있다. 2 이상의 비상보적 핵산 염기가 존재하는 경우, 이들은 인접(즉, 결합)하거나 인접하지 않을 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 비상보적 핵산 염기는 갭머(gapmer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 윙(wing) 부분에 위치할 수 있다.
- [0080] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GFRAL을 암호화하는 유전자의 핵산 염기 서열 부분에 상보적인 것들을 포함할 수 있다. 본 명세서에서, "부분(portion)"은 표적 핵산의 영역이나 부분 내에 인접(즉, 결합)하는 소정의 핵산 염기 수를 의미한다. 상기 부분은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 인접하는 핵산 염기의 일정 수를 의미하기도 한다. 일 실시예에 따르면, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적 부분의 적어도 8개의 핵산 염기 부분과 상보적일 수 있고, 적어도 12개의 핵산 염기 부분과 상보적일 수 있으며, 적어도 15개의 핵산 염기 부분과 상보적일 수 있다. 표적 부분의 적어도 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 그 이상이나 이들 값들 중에서 두 개의 값으로 정의되는 범위의 핵산 염기 부분에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드도 상기 범위에 포함되는 것으로 해석된다.
- [0081] 본 명세서에서, "뉴클레오타이드(nucleotide)"는 핵염기(nucleobase), 당 모이어티(sugar moiety) 및 인산 그룹(phosphate group)의 결합으로 이루어진 핵산을 구성하는 단위체 분자를 의미하는 것으로, 상기 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 비-천연 뉴클레오타이드, 비-표준 뉴클레오타이드 등과 같이 핵염기, 당 모이어티 및/또는 인산 그룹의 비변형 또는 변형을 모두 포함하는 개념으로 해석될 수 있다.
- [0082] 본 명세서에서, "뉴클레오시드(nucleoside)"는 뉴클레오타이드에서 인산 그룹을 제외한 부분으로 간주되는 글리코실아민(glycosylamine)으로, 핵염기 및 당 모이어티로 구성된 단위체 분자를 의미하며, 상기 뉴클레오시드는 뉴클레오타이드와 마찬가지로 핵염기 "G/또는 당 모이어티가 변형되거나, 변형되지 않은 뉴클레오시드를 모두 포함하는 개념으로 해석될 수 있다.
- [0083] 본 명세서에서, "올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)"는 리보핵산(ribonucleic acid, RNA) 또는 데옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid, DNA) 또는 이들 유사체의 저중합체나 중합체를 의미하는 것으로, 상기 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 생체 내에 존재하는 핵염기, 당 및 뉴클레오시드(골격)간 공유 결합으로 구성되는 올리고뉴클레오타이드뿐만 아니라, 이와 유사하게 작용하는 뉴클레오타이드 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 비-천연 뉴클레오타이드, 비-표준 뉴클레오타이드로 이루어진 변형 또는 치환된 올리고뉴클레오타이드를

포함한다. 이러한 변형 또는 치환된 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제 존재 하에, 변형 또는 치환되지 않은 올리고뉴클레오타이드보다 세포 흡수 증진, 핵산 표적 친화성 증진 및 안정성 증가 등의 특성을 갖는다.

[0084] 본 명세서에서, "안티센스 올리고뉴클레오타이드(anti-sense oligonucleotide, ASO)"는 수소결합에 의해 표적 핵산 서열과 혼성화(hybridization)할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것으로 해석된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산 서열과 혼성화하여 그의 발현을 조절하는 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 유사체, 올리고뉴클레오타이드 모사체, siRNA, 단일가닥 siRNA(ss siRNA), 작은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA, shRNA), 마이크로 RNA 모방체, 리보자임(ribozyme), 외부 가이드 서열(external guide sequence) 올리고뉴클레오타이드 및 기타 올리고뉴클레오타이드를 포함하지만, 이에 제한되지 않으며, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 단일가닥 및 이중가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 개념으로 해석된다.

[0085] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로 기재되어 있는 경우, 표적화되는 표적 핵산 서열의 표적 부분의 역 상보를 포함하는 핵산 염기서열을 갖는다. 바람직하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GFRAL을 암호화하는 유전자의 핵산 염기서열에 상보적으로 결합할 수 있다. 상기 GFRAL을 암호화하는 유전자는 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적이 되는 핵산으로서, mRNA 및 인트론, 엑손 및 비번역 영역을 포함하는 프리(pre)-mRNA로부터 선택될 수 있다.

[0087] 본 발명에 있어서, 상기 올리고머는 변형된 뉴클레오시드 간 연결기, 변형된 핵염기(nucleobase) 또는 변형된 뉴클레오시드의 화학적 변형을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0088] 구체적으로, 상기 변형된 핵염기는 5'-methyl-cytosine인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0089] 구체적으로, 상기 뉴클레오시드간 연결이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate) 연결일 수 있다.

[0090] 본 발명에 따른 뉴클레오시드간 연결은 sooooooooooooo의 연결일 수 있다. s는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이고, o는 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결일 수 있다.

[0091] 상기 뉴클레오시드가 다음의 변형된 당을 포함할 수 있다:

[0092] 당 구조의 2' 탄소 위치에서 2'-O-메틸(2'-O-Me), 2'-O-메톡시에틸(2'MOE), 2'-O-메톡시에틸-5' 메틸, 2'-O-아미노에틸, 5'-메틸, 2'-O-프로필(propyl), 2'-메틸티오에틸(methylthioethyl), 또는 2'-플로로(2'-Fluoro)로 치환의 변형.

[0093] 상기 뉴클레오시드는 예를 들어, 뉴클레오시드간 연결이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate) 연결; 및 당 구조의 2' 탄소 위치에서 2'-O-메틸(2'-O-Me), 2'-O-메톡시에틸(2'MOE), 2'-O-메톡시에틸-5' 메틸, 2'-O-아미노에틸, 5'-메틸, 2'-O-프로필(propyl), 2'-메틸티오에틸(methylthioethyl), 또는 2'-플로로(2'-Fluoro)로 치환의 변형을 포함할 수 있다.

[0094] 상기 뉴클레오시드는 예를 들어, 다음으로 구성된 군에서 선택된 변형을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 변형은 당 모이어티의 변형 예를 들어, 뉴클레오타이드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 변형 구체적으로, 2'-O-메틸(2'-O-Me), 2'-O-메톡시에틸(2'MOE), 2'-O-메톡시에틸-5' 메틸, 2'-O-아미노에틸, 5'-메틸, 2'-O-프로필(propyl), 2'-메틸티오에틸(methylthioethyl), 또는 2'-플로로(2'-Fluoro)로 변형; 뉴클레오타이드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형; PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid) 또는 UNA(unlocked nucleic acid) 형태로의 변형; 및 인산기(phosphate group) 포함할 수 있다.

[0095] "2'-O-메톡시에틸"(또한, 2'-MOE 및 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>)은 퓨로실 고리의 2' 위치에서의 O-메톡시-에틸 변형을 의미한다.

[0096] "2'-O-메톡시에틸 뉴클레오타이드"는 2'-O-메톡시에틸 변형된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미한다.

[0097] "변형된 당"은 천연 당으로부터의 치환 또는 변화를 지칭한다.

[0098] "5-메틸시토신"은 5' 위치에 부착된 메틸기로 변형된 시토신을 의미한다. 5-메틸시토신은 변형된 뉴클레오타이드이다.

[0099] "변형된 뉴클레오시드간 연결"은 자연 발생적인 뉴클레오시드간 결합으로부터의 치환 또는 임의의 변화를 의미

한다.

- [0100] "변형된 뉴클레오타이드"는 아데닌, 시토신, 구아닌, 티미딘, 또는 우라실의 뉴클레오타이드를 의미한다. "변형된 뉴클레오타이드"는 퓨린 염기 아데닌 (A) 및 구아닌 (G)과, 피리미딘 염기 티민 (T), 시토신 (C), 및 우라실 (U)을 의미한다.
- [0101] "변형된 뉴클레오타이드"는, 독립적으로, 변형된 당 모이어티, 변형된 뉴클레오타이드간 연결, 또는 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 뉴클레오타이드를 의미한다. "변형된 뉴클레오타이드"는, 독립적으로, 변형된 당 모이어티 또는 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0102] "변형된 올리고뉴클레오타이드"는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고머를 의미한다.
- [0103] 본 발명에 따른 안티센스 올리고머는 2'-O-메톡시에틸(2'MOE), 2'-O-메톡시에틸-5'메틸, 5'-메틸 또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 결합으로의 변형을 포함할 수 있다.
- [0105] 당 모이어티(sugar moiety)의 변형
- [0106] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 비-바이시클릭 변형 당 모이어티 및/또는, 바이시클릭 또는 트리시클릭 당 모이어티, 및/또는 당 대용물 또는 당 모사체 등으로 변형된 당 모이어티를 포함하는 변형된 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0107] 본 발명에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 예를 들어, 2'-O-메틸(methyl)과 같은 2'-O-알킬(alkyl), 2'-O-메톡시(methoxy)와 같은 2'-O-알콕시(alkoxy), 예를 들어, 2'-O-메톡시에틸(methoxyethyl)과 같은 2'-O-알콕시알킬(alkoxyalkyl), 2'-아미노(amino), 2'-알릴(allyl), 2'-플루오로(fluoro), 2'-아라비노(arabino)-플루오로(fluoro), 예를 들어, 2'-OCH<sub>2</sub>C(=O)-NHCH<sub>3</sub>(NMA)와 같은 2'-O-N-치환 아세트아미드, 2'-O-벤질(benzyl) 및 2'-O-메틸(methyl)-4-피리딘(pyridine), 4'-O-메틸(methyl), 5'-메틸(methyl), 5'-비닐(vinyl) 및 5'-메톡시(methoxy)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 치환체가 도입된 당 모이어티일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0108] 본 발명에 따른 안티센스 올리고머는 선택적으로 치환 또는 변형된 당 모이어티를 갖는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 당 모이어티의 변형은 상기 올리고머에 뉴클레아제 안정성, 결합 친화성이나 기타 유리한 생물학적 특성을 부여한다. 상기 천연 뉴클레오타이드의 (펜토)후라노실((pento)furanosyl) 당 고리는 치환기의 부가(특히, 2' 위치); 바이시클릭 핵산(BNA)을 형성하는 두 개의 다른 자리 고리 원자의 가교; 및 4'-위치의 고리 산소에 -S-, -N(R)- 또는 -C(R1)(R2) 등의 원자나 기의 치환을 포함하는 다양한 방법으로 변형될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 변형된 당 모이어티는 치환 당, 특히, 2'-F, 2'-OCH<sub>2</sub>(2'-OMe) 또는 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>(2'-O-메톡시에틸 또는 2'-MOE) 치환기를 갖는 2'-치환 당; 및 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-2'(n=1 또는 n=2) 가교를 갖는 바이시클릭 변형 당(BNA)을 포함하지만, 이에 한정하지 않는다. 이러한 변형된 당의 제조 방법은 당업계에서 공지되어 있다. 변형된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드에서 염기 부분은 표적 핵산과 혼성화하도록 유지될 수 있다.
- [0109] 본 발명에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2' 위치에서 F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S- 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알키닐; O-알킬-O-알킬; O-알킬-O-알킬-N(디알킬); 또는 O-알킬-카르복실아미드 중 하나를 포함한다(여기서, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 치환되지 않은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알킬 또는 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알케닐 및 알키닐이다). O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub> CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N[(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(=O)-NHCH<sub>3</sub> 및 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>가 특히 바람직하다(여기서, n과 m은 0 내지 약 10이다).
- [0110] 바람직하게는, 상기 변형은 2'-메톡시에톡시(2'-O-(2'-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로도 알려져 있는 2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)(Martin et al., HeIv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), 즉, 알콕시알콕시기를 포함할 수 있으며, 상기 변형은 2'-다이메틸아미노옥시에톡시(즉, 2'-DMAOE로도 알려져 있는 (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 기), 및 2'-다이메틸아미노에톡시에톡시[즉, 2'-O-다이메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE로도 알려져 있는 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 기]를 포함할 수 있다.
- [0111] 상기 바이시클릭 또는 트리시클릭 당 모이어티는 예를 들어, 잠금 핵산(locked nucleic acid, LNA), 컨스트레인

에틸 바이시클릭 핵산(constrained ethyl bicyclic nucleic acid, cEt), 2'-O,4'-C-에틸렌-브릿지 핵산(2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acid, ENA) 및 트리시클로(tricyclo)-DNA로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0112] 일 구체예에 따르면, 상기 변형된 뉴클레오시드는 6원 고리 또는 무고리 모이어티를 갖는 당 대용물을 포함할 수 있다. 상기 당 대용물은 예를 들어, 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(phosphorodiamidate morpholino oligomer, PMO)와 같은 모르폴리노 고리, 사이클로헥세닐 고리, 사이클로헥실 고리 및 예를 들어, 헥시톨, 아니톨, 만니톨, 플루오르 헥시톨과 같은 테트라하이드로피라닐 고리로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 따른 안티센스 올리고머로 도입되는 뉴클레오시드를 변형하는 데 이용될 수 있는 기타 다양한 이환 및 삼환 당 치환 고리계는 당업계에 공지되어 있다. 이러한 고리계는 다양한 치환과정을 통해 활성이 증진될 수 있다.

[0113] 또한, 상기 당 대용물은 예를 들어, 비잠금 핵산(unlocked nucleic acid, UNA) 또는 펩타이드 핵산(peptide nucleic acid, PNA)과 같은 무고리 모이어티일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0114] 펩타이드 핵산(Peptide nucleic acid, PNA)은 핵염기가 인산 결합이 아닌 펩타이드 결합으로 연결된 핵산 유사체의 일종으로, 포스포다이에스터 결합이 펩타이드 결합(peptide bond)으로 대체되어 있으며, 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신과 같은 핵염기를 가지고 있어, 특이적으로 핵산과 혼성화 반응을 일으킬 수 있다. PNA는 자연계에서는 발견되지 않고, 인공적으로 화학적인 방법으로 합성되며, 상보적인 염기서열의 핵산과 혼성화 반응을 통해 이중가닥을 형성할 수 있다. 또한, PNA는 전기적으로 중성이기 때문에 화학적으로 안정할 뿐만 아니라, 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다는 특징을 가지고 있다. PNA는 N-아미노에틸글리신 골격이 가장 널리 사용되지만, 당업계에 공지된 바에 따라, 변형된 골격을 갖는 PNA도 사용될 수 있다 (P.E. Nielsen and M. Egholm "An Introduction to PNA" in P.E. Nielsen (Ed.) "Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications" 2nd Ed. Page 9 (Horizon Bioscience, 2004)).

[0115] 비잠금 핵산(unlocked nucleic acid, UNA)은 리보스(ribose)의 C2'-C3' 결합을 갖지 않는 변형된 뉴클레오시드로서, 개방 사슬 구조로 인하여 입체적 배치가 구속되지 않고, 올리고뉴클레오타이드의 유연성을 조절할 수 있다. 올리고머 내에 UNA가 포함되는 경우, Tm 값을 5°C 내지 10°C 정도 저하시킬 수 있으며, 오프타겟을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.

#### [0117] 핵염기(nucleobase)의 변형

[0118] 본 발명에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오시드는 슈도유리딘(psudouridine), 2'-티오유리딘(thiouridine), N6'-메틸아데노신(methyladenosine), 5'-메틸시티딘(methylcytidine), 5'-플루오로-2'-디옥시유리딘(deoxyuridine), N-에틸피페리딘 7'-EAA 트리아졸 변형 아데닌(N-ethylpiperidine 7'-EAA triazol modified adenine), N-에틸피페리딘 6'-트리아졸 변형 아데닌(N-ethylpiperidine 6'-triazol modified adenine), 6'-페닐피롤로시토신(6'-phenylpyrrolocytosine), 2',4'-디플루오로톨루리보뉴클레오시드(2',4'-difluorotolulyribonucleoside) 및 5'-니트로인돌(5'-nitroindole)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 변형된 핵염기(nucleobase)를 포함하는 변형된 뉴클레오시드인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0119] 변형되지 않은 또는 자연 핵산 염기는 퓨린 염기인 아데닌(A) 및 구아닌(G), 및 피리미딘 염기인 티민(T), 시토신(C) 및 우라실(U)을 의미한다.

[0120] 상기 변형된 뉴클레오시드는 핵염기 변형 또는 치환도 포함할 수 있다. 핵염기 변형 또는 치환은 구조적으로 구별되는 형태이지만, 자연 발생적이나 합성 변형되지 않은 핵염기와 기능적으로 서로 교환될 수 있다. 자연 발생 핵염기와 변형된 핵염기는 수소 결합에 참여할 수 있다. 이러한 핵염기 변형은 상기 안티센스 올리고머에 뉴클레아제 안정성, 결합 친화성 또는 기타 유리한 생물학적 특성을 부여한다. 예를 들어, 5'-메틸시토신 치환과 같은 특정한 핵염기 치환은 0.6-1.2°C까지 핵산 듀플렉스 안정성을 높이는 것으로 알려져 있어 표적 핵산에 대한 안티센스 올리고머의 결합 친화성을 증진하는 데 특히 유용할 수 있다.

[0121] 예를 들어, 상기 변형된 핵염기는 5'-히드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2'-아미노아데닌, 아데닌과 구아닌의 6'-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌과 구아닌의 2'-프로필 및 기타 알킬 유도체, 2'-티오우라실, 2'-티오티민 및 2'-티오시토신, 5'-할로우라실 및 시토신, 5'-프로피닐(-C≡C-CH3) 우라실 및 시토신 및 피리미딘 염기의 타 알킬 유도체, 6'-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5'-우라실(유사 우라실), 4'-티오우라실, 8'-할

로, 8'-아미노, 8'-티올, 8'-티오알킬, 8'-히드록시 및 기타 8'-치환된 아데닌 및 구아닌, 5'-할로(특히, 5'-브로모), 5'-트라이플루오로메틸 및 기타 5'-치환된 우라실 및 시토신, 7'-메틸구아닌 및 7'-메틸아데닌, 2'-F-아데닌, 2'-아미노-아데닌, 8'-아자구아닌 및 8'-아자아데닌, 7'-데아자구아닌 및 7'-데아자아데닌 및 3'-데아자구아닌 및 3'-데아자아데닌, 페녹사진 사이티딘(1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조옥사진-2(3H)-온), 페노티아진 사이티딘(1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조티아진-2(3H)-온) 등 삼환 피리미딘, 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조옥사진-2(3H)-온), 카바졸 사이티딘(2H-피리미도[4,5-b]인돌-2-온), 피리도인돌 사이티딘(H-피리도[3',2':4,5]피롤로[2,3-d]피리미딘-2-온)과 같은 치환 페녹사진 사이티딘 등의 G-클램프를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0122] 상기 변형된 핵염기는 미국 특허 제3,687,808호, 문헌[The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613], 및 문헌[Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B. ed., CRC Press, 1993]에 개시되어 있는 핵염기를 포함한다.

[0124] 변형된 뉴클레오시드 간 연결기

[0125] 본 발명에 있어서, 상기 안티센스 올리고머에서, 변형된 뉴클레오시드 간 연결기는 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 포스포로다이트오에이트(phosphorodithioate), 포스포트리에스테르(phosphotriester), 포스포르아미데이트(phosphoramidate), 메실 포스포르아미데이트(mesyl phosphoramidate), 메틸포스포네이트(methylphosphonate), 메톡시프로필-포스포네이트(methoxypropyl-phosphonate) 및 보라노포스페이트(boranophosphate)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 간 연결기인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0126] 당업계에서 공지되어 있는 바와 같이, 뉴클레오시드는 핵염기와 당 모이어티의 조합이다. 뉴클레오타이드는 뉴클레오시드의 당 모이어티와 공유 결합하는 인산기를 더 포함한다. 펜토푸라노실 당을 포함하는 뉴클레오타이드에 있어서, 인산기는 결합 당의 2', 3' 또는 5' 히드록시기와 결합할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 형성에 있어, 인산기는 서로 인접하는 뉴클레오시드와 공유 결합하여 선형 중합체 화합물을 형성한다. 차례로, 선형 중합체 구조의 각 말단도 결합하여 원형 구조를 형성하지만, 개방형 선형 구조가 일반적으로 바람직하다. 올리고뉴클레오타이드 구조에서, 인산기는 통상적으로 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오시드 간 골격을 형성하며, RNA와 DNA의 자연 발생적인 결합과 골격은 3' 내지 5' 포스포다이에스테르(phosphodiester) 결합이다. 일 구체예에 따른 안티센스 올리고머는 자연 발생적 뉴클레오시드 간의 결합 이외에 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 간 결합을 포함할 수 있는데, 이는 세포 흡수 증진, 표적 핵산 친화성 증진, 뉴클레아제 존재 하 안정성 증가 등의 특성으로 인하여 자연 발생적 뉴클레오시드 간 결합을 포함하는 안티센스 올리고머보다 자주 선택된다.

[0127] 본 발명에서 이용될 수 있는 바람직한 안티센스 올리고머의 일 구체예로는 변형된 골격이나 비자연적 뉴클레오시드 간 결합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드다. 상기 정의한 바와 같이, 변형된 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 골격에 인 원자를 함유하는 뉴클레오타이드와 골격에 인 원자를 포함하지 않는 뉴클레오타이드를 포함한다. 아울러, 당업계에서 원용되는 바와 같이, 본 명세서에서는 뉴클레오시드 간 골격에 인 원자를 포함하지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드도 올리고뉴클레오타이드인 것으로 해석된다.

[0128] 일 실시예에 따른 안티센스 올리고머에서 뉴클레오시드 간 변형된 결합은 인산을 보유하는 뉴클레오시드 사이의 결합뿐만 아니라 인산을 포함하지 않는 뉴클레오시드 사이의 결합을 포함할 수 있다. 대표적인 인산 함유 뉴클레오시드 사이의 결합은 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로다이트오에이트, 포스포트라이에스테르, 아미노알킬포스포트라이에스테르, 3'-알킬렌 포스포네이트, 5'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 기타 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 이들의 정상적인 3'-5' 결합, 2'-5' 결합 유사체를 갖는 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트, 메실 포스포르아미데이트, 티오노포스포아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트라이에스테르, 세레노포스페이트 및 보라노포스페이트를 포함하는 포스포아미데이트 및 하나 이상의 뉴클레오타이드간 결합이 3'-3', 5'-5' 또는 2'-2' 결합인 반대의 극성을 갖는 화합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0130] 본 발명에 있어서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 연결된 데옥시뉴클레오시드로 구성된 겹 세그먼트, 연

결된 뉴클레오타이드로 구성된 5'윙 세그먼트 및 연결된 뉴클레오타이드로 구성된 3'윙 세그먼트를 포함하며, 상기 갭 세그먼트는 5'윙 세그먼트 및 3'윙 세그먼트 사이에 위치하고, 각각의 윙 세그먼트의 뉴클레오타이드는 변형된 당 모이어티 또는 당 대용물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0131] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 8개 내지 10개의 연결된 데옥시뉴클레오타이드로 이루어진 갭 세그먼트; 3개 내지 5개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어진 5' 윙 세그먼트; 및 3개 내지 5개의 연결된 뉴클레오타이드로 이루어진 3' 윙 세그먼트를 포함하고, 각 윙 세그먼트의 각각의 뉴클레오타이드는 변형된 당 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0132] 갭머에서, RNaseH 절단을 지원하는 다수의 뉴클레오타이드를 가지는 내부 영역은 내부 영역의 뉴클레오타이드와 화학적으로 상이한 다수의 뉴클레오타이드를 가지는 외부 영역 사이에 위치한다. 갭머 모티프를 가지는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우, 갭(gap) 세그먼트는 표적 핵산의 분해를 지원하는 반면, 윙(wing) 세그먼트는 안정성, 친화성 및 엑소뉴클레아제 내성을 향상시키기 위한 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0133] 필요에 따라서는, 상기 갭 세그먼트 역시 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드간 연결기, 변형된 당 모이어티를 포함하는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 및 변형된 핵염기를 포함하는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있으며, 각각의 변형에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[0135] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 안티센스 올리고머는 바람직하게는, 서열번호 19 내지 서열번호 34로 표시되는 염기서열을 포함하며, 표 2의 화학적 변형을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0136] 본 발명에 있어서, 상기 올리고머는 가장 바람직하게는, 하기 화학식 (I) 또는 화학식 (II)의 구조를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다:

[0137]  $G*GTATA*8*8*8*7*5*8*5*7*5*AGAAC*C$  화학식 (I);

[0138]  $C*ACAA*5*5*5*7*6*6*5*5*6*5*TCTG*G$  화학식 (II),

[0139] 여기서, A는 2'MOE-A, C는 2'MOE-5'-methyl-C, G는 2'MOE-G, T는 2'MOE-T, 5는 DNA-A, 6은 DNA-5'-methyl-C, 7은 DNA-G, 8은 DNA-T, \*는 PS(phosphorothioate), 2'MOE는 2'-O-methoxyethyl을 의미한다.

[0141] 본 발명에 있어서, 올리고머의 사용을 용이하게 하기 위해, 예를 들어, 분해를 최소화하거나, 전달 및/또는 흡수를 용이하게 하거나, 또는 제형에서 올리고뉴클레오타이드에 대해 또 다른 유익한 성질을 제공하는 제형을 이용하여 올리고뉴클레오타이드를 대상체 또는 세포 환경으로 전달할 수 있는 다양한 제형이 개발되었다.

[0142] 본 발명에 있어서, GFRAL의 발현을 감소시키기 위한 안티센스 올리고머는 표적 세포의 직면한 환경으로 또는 전신으로 대상에게 투여될 때, 올리고머의 충분한 부분이 세포에 들어가서 GFRAL의 발현을 감소시키도록 적합하게 제형화될 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 안티센스 올리고머는 완충제 용액, 예를 들어, 인산염 완충 식염수 용액, 리포솜, 미셀 구조체 또는 캡시드의 형태로 제형화될 수 있다. 또한, 물 또는 수성 용액(예를 들어, pH가 조정된 물) 또는 염기성 완충된 수성 용액(예를 들어, PBS) 내에서 제형화될 수 있다.

[0143] 본 발명에 있어서, 양이온성 지질을 갖는 올리고머의 제형을 이용하여 올리고머가 세포에 도입되는 것을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 양이온성 지질, 예를 들어, 리포펙션, 양이온성 글리세롤 유도체, 및 다가 양이온성 분자(예를 들어, 폴리리신)를 이용할 수 있으며, 적합한 지질에는 올리고펙타민, 리포펙타민(Life Technologies), NC388(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.), 또는 퓨진(FuGene) 6 (Roche))이 포함될 수 있으며, 이는 모두 제조자의 프로토콜에 따라 사용될 수 있다. 이러한 제형에는 지질 나노입자를 포함할 수 있다.

[0144] 또한, 상기 제형은 부형제를 포함할 수 있다. 부형제는 리포솜, 지질, 지질 복합체, 미세구, 미세입자, 나노구, 또는 나노입자를 포함하거나, 또는 그를 필요로 하는 대상체의 세포, 조직, 기관 또는 신체에 투여하기 위해 달리 제형화될 수 있다(예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd edition, Pharmaceutical Press, 2013 참고). 부형제는 조성물에게 활성성분의 개선된 안정성, 개선된 흡수, 개선된 가용성 및/또는 치료적 증강을 부여한다. 또한, 부형제는 완충제(예를 들어, 시트르산나트륨, 인산나트륨, 트리스염

기, 또는 수산화나트륨) 또는 비히클(예를 들어, 완충된 용액, 바셀린, 디메틸 술폰시드, 또는 광유)일 수 있다.

[0145] 일 실시예에서, 올리고머는 그의 보관 수명을 연장시키기 위해 동결건조된 다음, 사용하기 전에 용액으로 만들어질 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 올리고머를 포함하는 조성물 중의 부형제는 동결건조보호제(예를 들어, 만니톨, 락토스, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 폴리비닐 피롤리돈), 또는 붕괴 온도 조정제(예를 들어, 텍스트란, 피콜 또는 젤라틴)가 사용될 수 있다.

[0146] 주사 용도에 적합한 약학적 조성물은 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위해 멸균 수성 용액 (수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함할 수 있다. 정맥내 또는 피하 투여의 경우, 적합한 담체에는 생리식염수, 정균수, 크레모포어(Cremophor) EL.TM. (BASF) 또는 인산염 완충된 식염수 (PBS)가 포함될 수 있다. 또한, 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리에틸렌(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 여러 경우에, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알콜(예를 들어, 만니톨, 소르비톨) 및 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 멸균 주사 용액은 선택된 용매 중에 필요한 양의 올리고뉴클레오타이드를 필요에 따라 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 그들의 조합물과 함께 도입시킨 후에, 멸균 여과시킴으로써 제조될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 적어도 약 0.1%의 치료제(예를 들어, WFDC2의 발현을 감소시키기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드) 또는 그 이상의 용량을 함유할 수 있지만, 활성 성분의 백분율은 총 조성물의 중량 또는 부피의 약 1% 내지 약 80%인 것이 바람직하다. 이는 가용성, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 보관 수명, 뿐만 아니라 다른 약리학적 고려사항과 같은 인자가 제형의 제조에 고려될 것이다.

[0148] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 올리고머를 포함하는 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0149] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 올리고머를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[0150] 본 발명은 또 다른 관점에서, GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 올리고머의 용도에 관한 것이다.

[0151] 본 발명은 또 다른 관점에서, GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 올리고머의 사용에 관한 것이다.

[0152] 본 명세서에서, 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, “치료”는 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환의 발진의 억제, 증상의 경감 또는 제거를 의미한다.

[0153] 본 발명에 있어서, 상기 GDF15의 증가에 따른 GFRAL의 활성화와 관련된 질환은 비만, 당뇨, 식욕부진 또는 악액질(cachexia)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0154] 구체적으로는, 상기 질환은 암 악액질(cancer cachexia)일 수 있다.

[0155] 악액질은 암, AIDS, 만성 심부전(또한, 울혈성 심부전으로도 알려짐), 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 만성 신장 질환, 결핵, 패혈증 및 기타 형태의 전신성 염증을 포함하는 다수의 질환에 관련된 약화 대사 증후군이다. 특히, 악액질은 비자발적 체중 소실에 관련된 소모성 장애이고, 전신성 염증 및/또는 급성 염증 반응과 연관될 수도 있다. 근육 질량의 소실뿐 아니라, 지방 질량의 소실은 종종 악액질의 주요한 임상적 특징이다. 근육 질량의 감소에 의한 근육감소증은 힘의 소실, 넘어지는 경향의 증가 및 자율성의 소실을 포함하는 기능적인 손상을 야기할 수 있다. 호흡 기능 역시 손상될 수 있어서 감소된 폐활량을 나타낼 수 있다. 근육감소증은 대개 노인성 질환이지만, 근육감소증의 발달은 근육의 불용 및 영양부족과 연관될 수도 있고, 악액질과 동시에 일어날 수 있다. 악액질은 전악액질, 악액질 및 불용성 악액질로 명명된 단계를 거쳐 진행될 수 있다.

[0156] 다수의 악성 암(특히, 침습성 뇌암, 흑색종, 폐암, 위장 종양, 결장암, 췌장암, 전립선암 및 유방암의 경우) 혈청에서 증가된 레벨로 GDF15가 발현된다. 마찬가지로, 화학내성은 높은 GDF15 발현과 상관관계가 있을 수 있고, 높은 GDF15 발현 레벨과 암의 예후 사이에 상관관계가 역시 보고된 바 있다. TGF- $\beta$  슈퍼패밀리의 구성원인 GDF15를 매개로 다양한 질환에 의해 유발되는 악액질의 매개자임이 보고된 바 있다. GFRAL은 GDF15에 대한 고친화성 수용체인 바, 본 발명에 따른 안티센스 올리고머는 GDF15-유발 암 악액질의 예방 또는 치료 용도로 사용될

수 있다.

- [0157] 본 발명에 있어서, “암”과 “종양”은 동일한 의미로 사용되며, 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 의미한다.
- [0158] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 치료 유효량의 안티센스 올리고머를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0159] 상기 “약제학적으로(제약상) 허용되는 담체”는 제제를 제제화하거나 또는 안정화시키는 것을 돕기 위해서 활성 성분에 추가될 수 있는 물질이고, 환자에게 유의한 해로운 독성 효과를 야기하지 않는다. 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0160] 상기 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0161] 본 발명의 용어 “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학 조성물은 경구투여 또는 비경구로 투여할 수 있고, 예컨대 주입(infusion), 정맥내 투여(intravenous injection), 근육내 투여(intramuscular injection), 피하 투여(subcutaneous injection), 복강내 투여(intraperitoneal injection), 직장내 투여(Intrarectal administration), 국소 투여(topical administration), 비내 투여(intranasal injection) 등으로 투여될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0162] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 명세서에서 용어 “약제학적 유효량”은 비만, 당뇨, 식욕부진 또는 악액질의 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0163] 본 발명에 따른 약학 조성물은 종래의 치료제와 병용하여 사용하는 용도로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 안티센스 올리고머 및 이를 포함하는 약학 조성물은 기존의 항암제 등의 치료제와 동시에 투여되거나, 순차적 또는 역순으로 투여될 수 있음을 의미하는 것으로, 통상의 기술자의 범위 내 적절한 유효량의 조합으로 투여될 수 있다.
- [0165] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0167] **실시예 1: GFRAL 표적 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 개발**
- [0168] 표적 특이성 및 안정성을 고려하여, GFRAL 유전자(pre-mRNA 서열) 및 GFRAL mature-RNA 서열(서열번호 1 내지 2)로부터 GFRAL mRNA 타겟 서열 16종(서열번호 3 내지 18)을 개발하였으며, 이에 대해 안티센스 서열 16종(서열번호 19 내지 34)을 개발하였다(표 1).
- [0169] 또한, 표 1의 상보결합서열 16종에 대해 화학적 변형을 적용한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 16종을 개발하였다(표 2). 안티센스 올리고뉴클레오타이드 구조로는 종래에 안정적이면서도 효과적인 것으로 알려진, 내부의 10nt의 DNA nucleotide들로 구성된 “갭(gap)” 부분 및 5'-말단 및 3'-말단에 각각 2'-MOE(2'-Methoxyethyl) 변형 골격을 갖는 각 4-6nt의 2'MOE nucleotide들로 구성되는 “윙(wing)” 부분을 포함하는 “갭머(gapmer)”를 사용하였다. 상기 갭머 중 두 DNA nucleoside들을 연결하는 부분이나 DNA nucleoside와 2'MOE nucleoside를 연결하는 결합으로 통상의 포스포디에스터 결합(PO bond) 대신 포스포로티오에이트 결합(PS bond)이 사용되었고, 2'MOE nucleotide들로 구성된 윙 부분의 서열 마지막 양끝에 위치한 결합들에 대해서만 PS 결합이 사용되었으며, 나머지 부분은 PO 결합이 사용되었다. 한편, 모든 시토신(C)은 메틸화 시토신으로 치환되었고, RNA 부분에 포함되는 우라실(U)은 모두 티민(T)으로 대체되었으며, 이는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 안정

성을 더 높이고 호스트 면역반응을 줄이기 위함이다.

[0170] 예를 들어, A427의 경우 G\*GTATA\*8\*8\*8\*7\*5\*8\*5\*7\*5\*AGAAC\*C(A=2'MOE-A, C=2'MOE-5'-methyl-C, G=2'MOE-G, T=2'MOE-T, 5=DNA-A, 6=DNA-5'-methyl-C, 7=DNA-G, 8=DNA-T, \*=PS)의 서열 및 화학적 변형을 가지고 있다.

[0172] 서열번호 1 (GenBank Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p14 Primary Assembly NC\_000006.12 REGION: 55327469..55402493)

[0173] TTATTCTGGACAGTTACTCTTAAGAAAGTTGTCAGAAGAAACGCATCTGCCTTTTTTCCAGGTGAAGTCCGTGAGTTGTCCAGCATGATAGTGTATTTTCTTTGGGTAAGTGAATGGTGCTTCTGGTTTATCTGAATTATTCATAATACTAATTCTTTGTAACTGAATACCATCACACTTAAGCTTAACAGGGGCTTATAATATGAAGTACCAAGTAAATTACAAATTTATGCTTTAACATGGTTTATCTTCTTGCAAAAAATGTACACTCACTTTTACTCACTTATTTCTAACTCTATAGATAATGCAGCATGTGAAAATTGTATTAATCTCTCAGCTTGTTTCTGTTTTATTGTATAGAATGACCAATGACTTTGAGTTACTTATTAGGATTAATGGAATCACACATGTGTTAGAACCTTTTAGAAAATAAAAAATAAACCTTCCAGTATCTATTTACAAGTTATAAGATGAAAAATTTCAAAGTGTATCTATTTTATTATTTTGCTTTGAAATTAACAAAAATAAGATTAATTTAAAAACATTCATTTACCTACAGTGTTAATTTGTCTAACTAGAAAGTAATTTAGTGAAGTAAACCACTTAACACCATATCAGAATGCTTCATATTTTCATTAATTTTATGACCTAGAAGTCAAGTGTGGACTTACTTCTTGTTATTGGATCCGATGAATGTATTATAGATGTGTAGAAAAATAATTTATTTTATTAATGTAGAATCCATGAATCTATTTGCTAGATGTGTGACTGGAGAATATTTTATATCTTCTTTAGCATTGTAGAATCTATAAACTGAATTCAGAAAAGGAATAATTGTAAGTGTAGCTAGATTGTAATTTTAAAAATATGGCATTATGTTTAAAGCTAATATATACTTGAATAAAGGCATAATTATGGCCAGAAAGCAAAGAAGTTACTTTAAATTTGTATCGAACATAAAGGAGAGTCATATCAAGTCAAGGAAACAAGTTAAGAAGGAGAGAAATCCCTATATTTTCAGTTTCTTTTGTGTTAAGTAATATTTTCCATTGTTCATAATTTTGCTTTTGTAAATTTATCTCTAAATATTTTCTTATTTTTATAAAGATTGTTAATTTCTTTAGTCTTTTGTGTATAAAGAGAAATATAGGAACTTTAATTTTATAGATCAGGCAGCAATATAATGAAGCTCACAAAATACATTACAGACTCATTATGACCTCAGTTGAAAAGCAATGGCTCTTATTTTCATCTTTTACTTCTAAATTAAGTACACAGGTTGCATGAAGGAGGAAATAACTTCTTAACATTGTTAGAACTAAAATTATACTATTGATATGTTGTACCAACATTTCCCATATTATATTTTGAATGCTTGTGTTGACATTATCTAAATAGGTCTTATAATGAGGAAAATGCTGTTGGTAAAGAAATGTGGAAAACATGAATTTTAAATCTCAGAACATTTAGTAGGATAATAAGCCCATACATCTTTAAACACTGATATAATTTGCAGCATTATCCATCTTATTAATTTAAAAATAGAAGTTATTTTTCATTGAGTATTACAGGAAAATCTTGAAAAATCCTAGGTTAAATACAAAACCACAAGTCATAGTTTGAATGAATAAGACAGATTTTGAGAGGTAATACATCTTGATTCTTGTTGACCAAAATCATTGAGGTGGTTTTCTTAGTTGAGTCAATATTTTGTGTAGTAGGAAGTGTGAAAAATCCTATAAAATAATCTATTAAGAAGCTTGTTCACCAAAAACTGAAAATGTGAAGGAAAGTAAACATTAATAACTGAAAATGTGAAGGAAGTAAACATATTTGGGAAGACAACATGTAGTATTTCTAAGTGATTATTACTCTGAAGTACTGATGAAGTTTGTATATATCTGGGATATTATCACTTATAAGATTCTTGAAGGGCTTTTACAAGATATAATGATTAATGGCAAATAAAATACCATTTTCTTAAGTTGAGTTTATGACTTCAATTTCTATTTCTGGGCTTTTGAAAACCTGGATTGACCAAGTAAATTTGTGCTAGGATCAAAAGAGTCTCTTTTCTTTCTTTGGGCTAGCCAAATAAGGAGTACAAGGGCTTGCTAGATGAGGTTGTCCATGAACACATGAGAAAACAGAAAGCTGATATGTCCATTTCCACTCCAGCCCTCAGCAAGAAAAATGTTACCAAGCTACACCATGGGCCTAATCTCAAATGCAGTGACCCAGCAAGTAGTACACATGGTCCAATCAGTTGTCTTGGAATCTCTTTATAAGATGAGATTTGCAAAGAGGTAAGATTTAAAAAAGAGAGATTTCAAGCCCTTACTTGAAGCCTATCACTCTACATTGTACAGGTGATTCAATTAACAACAGCATTAAAAATTCAAATAATTTGGCTCTTATTTAGTTATAGCTTGACTCTCTTGATGACAGTTACTACAAGTGTCTCTGTAACACAATTCAATCCCTGTATTTTCTATTAATTGATTGGCTAGTGTCACTTCATATGTTTGAGAATCAATTTGACTAACTTGCGTAACATATTAATTAACATTGCTATTTCTTGATTGTTTTAGAAAACCTTGCTGGATTTCTCTCTAGCAAAAGTAACTTGTAATATCTGGAAGGTATTATTTTATAGATGTTATCAGTTATTTATATATCTTATATATAAATCTAATAAATCTGGGTATAAGCCAATATTCATTTATGAATACCTATACTGCATCACTGTGTTTGGTGACAAAAATACAGTTATAAATATCTTAATGTCTGTGGGTAAAGCTGTACAATCCAGTGGTGAGACAGGCACATGAATATATACTACAGAACAGTAAATCTGTAATTGCGGATCCCCACAGTTCTAGTAAATGGATGGAAGATGTCAAATTCATTTGAGTGTGAAAAAGGGGAGTATAGAATTCAAGTAAAGTTTCCAGAAAATAGCTAATGATTGTGTTTCAGTTTAAACAACAAAAAGGGTTATTCAGAAGAAAAAGAAAATACTTATCAGGGATCAGACAGTAGGTATGCAGAGGTAGAAGACAGCATGGATCATTCGGGAAACGATAAATGCTTGAGACCTCCAGATTGCACATGGTGAGGAATATGAGAGCCCTGATATGAGAAATAGTTTAAAGGATATAAACAGAAAAATGGCAAGACTAGAAATAGTACATCAGGTAGATTAGGGGTTACAAAGAACCTATCTGAATAAGGTTCTGAATAAGATTCAAAGTGGAGGCAGACTGACTAATAAGTTAAACAAATGCTCAAAGTGAAGTCAATAAATTTAGCAAGAATGAATATGGGAGAGTGAAGTTGAGGATGAAAAATAGTCTACCACAAAACCAAGATTTCTAGTTTGTGTTCTCATGTTAATGTGGCATGTGAATGAAGTAGTGGTCCACAGTGAACAATGATGATGAAGATCCTGTGAAAGTGTCTGAAACATTCAAGTAGAGATAACAATTACGTACCTATGACAGGAACGCTGGAAATACTGAGATTAAATTATACATTTGAGAATCATCAGACTAACATTTTAGTTCAAACCATAAGAGTACATGGAATTTTCTGCAGAGAATGTATAAAATGAAAATAGAAAAGGCTGAGAAGAGAACCTAAGCTAAAATTATACTTTACTAGAAAGATAAATATGATCCTGGGAATAATTTTAGCTATGGTCAGAAAATACAAAGTGGATAAATATCAAGAGAACAGAGGGAGGGCTGGCAAGGAAGAGTTTCAAAACAAAAAGTCAACAAATGGTCAATGGTGAGATAAAGTTTAAACCATTAAAGTTAGATTTTAAAGGGGTAATTAGAGACTTTTAAAGAGCAGTTTAAATGGAATAATAGTAATAAAAAATAAATTATAAGTTGAGGAATAAATAGATGATGAGACGTCAAAATGAGCAAAATTTAAATATTCAATTTAAGAATCTATAAAAAAGAAATACAGATCTACAGCTAGAGAGGAGTTAAGGTTATTTCCACCATCAATTTTCACTACATGTTATTTCCATAATTCTGCTCTTTATCATTAATAACTTAGATTTGAAGAAAATGGATGCCAAATTTATATTACAACCTTGTTTTGTTGTTGTTATTCAAGCTATGGGGTTAAGCTTGGAAAATGAATACACTTCCCAACCAATAATTTGCACATATTTAAGAGAGCAATGCTTACGTGATGCAATGGATGTAACATGCTTGGAGAGTAATGGAAGATGCCTGCAATGATTCAGGTAAA



GTGTTAACTATAGTCTCCCTACTGTACTATCAAGTACTAGAACTTATTCCTTCTATGTTAATGTATATTTGTATCCGTTAACCAACTTCTCTCCATTTCTCC  
TCCCCCGTGTCTGCCAAGCTTGATCACAATTTTTCTTTAGTTTTTATATGGCGAAATTCATTATTTGATTTTTTACTGTGTGCCAGCCCTCATTTC  
AGGCTAAATCTGTCAATCATGGTGTATTATCTTTTTGTATTCTGGATTCAACTGCTAATATTTGTTTAAAAAACTATGTTCAAAAGTATATTGGCA  
TGTGATTTGTTTTCTTAATAGTCTTTGGTTTGGTATCTAAGTTATGCTGGCCTGTAAAATCAACTGGGAAGTATTTCTCTCTTCAATATTCTGAAAA  
GCACAAAAAGAAATGGTGTCAATTCCTTCCTTACATGATCTATTTCAATTAACAGTAAAGATATCTGGCCCATGCTTCATTAAGAAAGATTGAAAAATATAAT  
TCAATGTGTTAACTGTGTGAAGACTATTCTGTATCTATTTCTTCATGAGTGAGCTTTGGTAATTTGTGTCTTCCATTTGTCTGAATTTATGTTGGATTT  
TATCCTTAAAGTTTTAGTTTTACTGTTTTCTTTTGGTTTCTATCTCCCTACAAAATGCTCCTAGTATTTCTAATGTCTTTTTAATATCTGTAGCAGTT  
GCAGTGATGCTTTTTATGTTTACATATTGATAATTTGTATAATTTGTGCTCTTCAATTTTACTATTTCATTGTTTCTTTATGTGTATGTCTGATTTGATT  
TTAATGTGTTCTCCATTTTCTTGCTTCTAACATAAAACCTTGAGCCACTGATTTGAGATTTTATCTTTCTCTCATATAAGCATTAACTATGAATTTCC  
TTCCAAGTACTGATTTAGCTATAGCCACACATTTCTGATATGTAGTTTTAATTTAAATTTATGTCAAAATATTTTCTCTTTTCTTTGTGACTTCCACTTTGT  
TATGATTTATTTTATTATTATTATATTTTGGAGCAGAGTCTCTCTCTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGAGTGATCTCAGCTCACTGCAAACTCCTT  
CTCCTGGGTTCAAGCTATTCCTCTGCCTCAGCCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGTGCTTGCCACCACACCTGGCTGATTTTTGTATTTTGTAGTAGACAT  
GGTTTTGCCATGTTGTCCAGGCTGGTCTTGAGCTCCTGACCTCAGGTGATCTGCCAGCATCAAACTTCCAAAGTGTGGGATAACAGGCATGAGCCACCATG  
CCGAGCCAGAAGGTTATTTAATTTCTAATATCTGAGATTTCTCAGATATCTTCATTATTGATTTCTAGTTTAAATTTTCAATATCATAATATAACATATTTG  
GATGATCTCAATTTCTCAATTTCTAATTTAAATAATAATTTGCCAAATATCACCTATACAATGTGATACAGTCTACACACATAATAAGGACACACACATACACA  
CACAGACAAAGTACTAGAAGCCATAGAGTAAAAATAATGGTGACTCAGAAGACTTCACAGAATTTGTAGACTTGGGCCTTTTAGGGTAAGTTGGTTTCATT  
AGGTAGGCAAAACAAAATGGATAATTTAAGCAGAAGAAACAGAATGAAGTGGGAGCATTGTTGGGAGCAACAATTCCTTGTTAAGCTGGATACTAGAATGG  
AAAAGATTTTAACTGGAAGAAATCAGCTATTTATGAAAAGGAGGAAGGCTGAATTTACATATCTTTCTAAAGAGATTAGACTTTAAACCGTTGCTATGA  
GGAGCTATTACATATTTTAAATAGAGGAATGTATCATCAGTTTCTCAAAAGTTATCAGAGCAATAACGTAGAGAGGATGGAATGGGAGGCAAGAAAGATG  
CAGGTCAAGAATATCAGTTAAAAAGCCATCAAAATAATTTAAGAGAGAGGTAATGCATGCCTGAACCTAAGGCACCGGCTCTGAGAATTATAATAAAATATAT  
ACTTAAGGTATATTTATGAATAATAATCAATAGGAATGGTGACCAGTTGGATATGAGGAATTTAAATGTATTAAGCGTAATCTCCAGGTGGCTGGCTTGG  
GACAAGGGGATTGCTATACATTGAGCCAAGAAATGAAAAATGTACAGGACTGGGGACGAAAGTGATGAGTTGTATTCTGAAAAACATTTCTATCTGAGGCATG  
CTTTGGAATATTCGAGTTAGGAATGTTGGTATTTTTTTCTAAATTTGCAATGATAAAAAAATAGTCTAAAAATGTAAAGGAGCATGCCTCATCAAGCTGGC  
ATTGGGAAGCAGGATCTTGAGGAGAGAAATCTAAACAGAGATATAGAGGTTTATGAGTAGATAAAAAACATAAAGGAGAGTAAGACTGCCTGGGAAAAAC  
ACAAAGGGAGGAGAAAGATATTTTCAAGAAGATTTTATGACCTATTTGAAGAAACCAAAAGAAAGTTTTTAAATAGGAAAAGAACTACAGAGAGTGAAT  
TTTTGAAGCAATGAAAGAGAGGACATGAAGAAAAATGTCAAAATTTCTGAAAAGTCAAAAAAGATAGGGACTGATAATGGCATTAAATTTGCTACTTAGTAGA  
TATTACTAGTTTTAGATTAATTAGGCTGAAATGTTAGCATGCTGAAATGCTTATTAATAATTTTAGTGAGTTTTTTCAAGATGGTAAGACATCTGAACCTAA  
TAGCCTAAATTGCCACTTTTAGCATATCAAAATTTTGACAAAATATTGTATATCAACAGAAGTATACATATTTAGAGCAGTTAAGTTGAAATCAGTTTACATA  
CTAAACTATTTTTTCCACAATAGAAATTTATTAATGCTGTTATGTGGAATATTGATGAATCAGGCATACAAAAACCTTGCACTCGATGAGAGTTTCATA  
TGGACAAGACCTAAAGGAGAAAGCCTAAATATTCAGGAGTGGACTTCGTAAGGACCTGACCTGGATTTTGTGTTTACAGAAAGCATTCAGCTGATTTATTAT  
AATTCATGACAAAGAATTATAAGAAATTTGATAATTTAAATATGAGAAAGACATGATAATTTAAATCTTACCATTCTTCTATGTCAACTGCAGCATCCTC  
CACAGACCTTCTAATCATCACTTCAACAAAATGGTTTTCTCTCCATGCTTTGCATTTCCAAAATATTCTCCAGAGTACACAGACATGCATTTTCTATTCTC  
AAGAAAATCAGTTTTGTATTCTTTTAAAAAATATGCTAAAGCACCAGCAGAATACCTGACGCTTAGCAAAATATTAGTAAATATATAACGTAAATATTT  
TTCATTAACATAATATTGAGCATCTCCATGATGTATCCATTAATAAAATATTATGTGTAACCCCTGGAGAATATAAGAGCATCATCAATGAAATGAGCA  
AACAAAAGTGGTTGGCAGCAGTTCCAAGATGGCAGAATAGGAACAGCTCCAGTCTACAGTCCCAGCCTGAGTGATGCAGAAGACGAGTGATTTCCACATTT  
CCAAGTGAAGTACCAGTTTCTCTACTGGGCTTGTGACAGTGGGGGAGGATAGTGGGTGACGCCTACTGAGCGTGAGCTGAAGCAGGGTGAGGCATT  
GCCTCACCCGGGAAGCACAGGGGTGAGGAATTCCTTTACTAGCCAAGGGAAGTGGTGACGGATGGCACCTGGAAAATCGGGTCACTCTCACCTAATAC  
TGCATTTTCCAGTGGTCTTAGCAATGGCACACAGGAGATTATCCCGTGCTGGCTTGGAGGGTCCCACGCCATGGAGCCTCGTCAATTCCTAGCGC  
AGCAGTCTGAGATCAAACTGCAAGGCAGCAGCGAGGCTGAGGGAGGACGCCTGTCAATTGCTGAGGCTTGAGAAGGTAGACAAAGCAGCTGGGAACTCAAA  
CTGGGTGGAGCCATCGCAGCTCAAGGAGGCTGCTTGATCTGTAGACTCCACCTCTGTGGGCAGGGCATAGCCGAACAAAAGACAGCAGAAACCTCTGCA  
GACTTAAATGTCCCTGTTTGACAGTTTTGAAGAGAAATAGTGGTTCTCGCAGCACAGAGTTTGAAATCTAAGAATGAACATACTGCCTTCTCAAGTGGGTCCC  
TGACCCCAAGTAGCTAAGTGGGAGGCACCTCCAGTAGGGGCAGACTGACACCTCACACAGCTGGGTACCCCTGTGAGACGAAGCTTCCAGAGGAACGAT  
CAGACAACAATTTGCTGTTTCAAGATATTGCTGTTCTGCAACCTCTGCTTCTGACACCCAGTCAAAACAGGGTCTGGAGTGGACCTCCAGCAAGTCCAA  
CAGACCTGCAGCTGAGGGTCTGACTGTTAGAAGGAAAACTAACAAACAGAAAGGACATCCACACCAAAACCCATCTATACATCACCATCATGAAGACCA  
AAGGTAGATAAAACCAAGATGGGGAAAAACAGAGCAGAAAAGCTGAGAATTTAAAAATCAGAGCAACTCTCCCTCCAAAGGAATGCAACACCTCG  
CCAGCAATGGAACAAAGCTGGATGGAGAATGACTTTGACGAGTTACAGAGAATAAGGTTTCAGATGATCAAACTTCTCTGAGCTAAAGGAGGATGTTGCAACC  
CATTGAAAAGAAGCTAAAAACCTGAAAAAAGATTAGACAATGGTTAACTAGAATAAACAGTATAGAGAAGTCTTAAATGAGCTGATGGAGCTGAAAACC  
ATGGCACGAGAACTACATGATGAATGCACAAGCTTCAGTAGCCGATTGATCAACTGGAAGAAAGAGTATCAGTGATTGAAGATTAAACAAATGAAAGGAAG  
CGAGAAGAGAAGTTTAGAGAAAAAAGAGTAAAAAGAAATGAACAAAGCCTCCAAGAAATATGGGACTATATGAAAAGACCAAACTACATCTGATTGGTGT  
ACCTGAAAGTGATGGGAAAAATGGAACCAAGTTGGAACCACTCTGACAGGATACTATCCAGGAGAACTTCCCAATCTAGCAAGGCAGACCAACATTCAAA  
TCAGGAAATACAGAGAATGCCACAAAGATATTCCTTGAGAAGAGCAACTCCAAGACACATAATTGTGATTCACCAAGTTGAAATGAAGAAAAAATGTT

AAGGGCAGCCAGAGAGAAAGGTTGGGTTACCCACAAAGGGAGGCCAGCAGACTAACAGCAGATCTCTCGGCAGAACTCTACAAGCCAGAAGAGAGTGGGG  
ACCAATATTCAACATTCTTAAAGAAAAGAATTTTCAAACCAGAATTTTCATATCCAGCCAACTAAGCTTCATAAGTGAAGGAGAAATAAAATAGTTTACAGA  
AAAGCAAATGCTGAGAGATTTTGTCACTAGGCTGCCCCAAAAGAGCTCCTGAAGGAAGCACTAAACATGGAAAGGACAACCGGTACCCAGCCACTGA  
AAAATCATGCCAAATTTGAAAGACATCGATGTTAGGAAGAACTGCATCAACCAAGCAGCAAAATAACCAGCTAACATCATAATGACAGGATCAAATTC  
CACATAACAATATTAACCTTAAATGTAAATGGGCTAAATGTCTCAATTTAAAGACACAGACTGGCAAAATTGGATAAAGAGTCAAGACCCATCAGTGTGCTGT  
ATTGAGGAGACCCATCTCAGTGCAGAGACACATAGGCTCAAAATAAAAGGATGGAGGAAGATCTACCAAGCAAATGGAAAAACAAAAAAGGCAGGGGTT  
GCAATCCTAGTCTCTGATAAAACAGACTTTAAACAACAAGATCAAAAGAGAGAAAGAAGGCCATTACATAATGGTAAAGGGATCAATTGAACAAGAAGAG  
CTAATATCTAAATATATATGCACCAATACAGGAGCAGCCAGATTCTAAAGCAAGTCACTAGAGACCTACAAAGAGACTTAGACTCCCACTCAATAATA  
ATGGGAGATTTTAACACCCCACTGTCAACATTAGACAGATCAATGAGACAGGAAGGTAACAAGGATATCCAGGAATTGAACTCAGCTCTGCACCAAGCAGAC  
CTAATAGACATCTACAGAACTCTCCACCCGAAATCAACAGAATATACATTCTCTCAGCACCATATCACACTTATTCGAAAATTGACCACATAGTTGGAAGT  
AAAGCACTCCTTGGCAACGTAAGAAACACAAATTATAACAACTGTCTCTCAGACCACCGTGCAATCAAACTAGAAGTCAAGGATTAAGAACTCACTCCA  
AACCGCTCAATTACATGGAACTGAACAACCTGCTCGTGAATGACTGCTGGGTACATAATTAATGAAGGCAGAAATAAGATGTTCTTTGAAAACAATGAG  
AACAAAGTCACAACATACCAGAATCTCTAGGACACATTTAAAGCAGTGTGTAGAGGGAAATTTATAGCACTAAATGCCCAAAAAGAAAGCAGGAAAGATCT  
AAAATTGACACCCTAACATCACAATTTAAAGAACTAGAGAAGCAAGAGCAACACATTCAAAAGCTAGCAGAAGGCAAGAAATAACTAAAAATCAGAGCAGAA  
CTGAAGGAAATAGAGACAAAAAACCTTCAAAAAATCAATGAATCCAGTAAGTGGTTTTTTGAAAAGATCAACAAATTTGACAGACTGCTAACAAAGACTA  
ATAAGAAGAAAAAGAGAAGATCAATAGAGCAATAAAAAATGATAAAGGGGATATCACCATTAAATACAGAAATACATCCACAGAAATACAAGTAC  
CATCAGAGAATAAACACCTCTACACAATAAACAGAAAATCAACAAGAAATGGATAAATTCCTGGATGCATACACTCTACCAAGACTAAACAGGAAAAAG  
TTGAATCCCTGCATAGACCAATAACAAGCTCTGAAATTAAGGCAGTAATTAATAGCCTACCAACCAAAAAAGTCCAGGACCAGATGGATTCACAGTTGA  
ATTCTAGCAGAAATACAACAGGAGCTGGTACCATTCTCTGAACTATTCCAATCAATAGAAAAGAGGGAATGCTCCCTAACTCATTTTATGAGACCAG  
CATCAACCTGATAACAAAGCCTGGCAAGACACAACAAAAAGAGAATTTAGACCAATATCCCTGATGAACATTGATGCAAAAACTCTCAATAAAATACT  
GGCAACCGAATCCAGCAGCAGATCAAAAAGCTTATCCACCATGATCAAGTGGGCTTCATCCCTGGGATTCAAGGCTGGTTCAAGGCATACGCAATCAATA  
AACATAACCCAGCATATAAACAGAACCAAGACAAAAACCATGATCATCTCAATAGATGCAGAAAAGGCCCTTGACAAGATTAAACAACGCTTCATGCTA  
AAAATCTCAATAAAATTAGGTATGATGGGATGTATCTCAAAATAATAAGAGCTATTATGACAAACCCACAGTCAATATCATACTGGATGGGCAAAACTG  
GAAGCATTCCCTTTGAAAAGTGGCACAAGACAGGGATGCCCTCTCTCACCCTCTTCAACATAGTGTGGAAGTTCTGGCCAGCGCAATCAGGCAGGAG  
AAAGAAATAAAGGATTTCAATTAGGAAAAGAGAAAGTCAAAATGTCCCTGTTGAGATGACATGACTGTATATTTAGAAAATCCCATCATCTCAGCCCAA  
AATCTCCTTAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAAGTCTCAGGATACAAAATCAATGTGCAAAAAATCACAAGCATTCTTATACCAATAATAGACAAACAGAG  
AGCCAAATCATGAGTGAAGTCCCATTCACAATTGTTTCAAAGAGAATAAAATACTTAGGAATCCAAGTACAAGGGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAGGAC  
TACAAACCACTGTGAACAGAATAAAGAGGACACAACAAATCGAAGAGCATTCCATGTTGATGGATAGGAAGAACCAATATCATGAAAATGGCCATACTG  
CCCAAGGTAATTTATAGATTCAATGCCATCCCCATCAAGCTACCAATGACTTCTTCACAGAATTGGAAAAACTACTTTAAAAAGTTTATATGGAACCAAA  
AAAGGGCCCGCATTTGCCAAGACAATCTAAGCCAAAAGAACAAAGTGGAGGCATCTTGCTACCTGACTTCAAACTATACTACAAGGCAGTAGTAACCAAAA  
CAGCATGGTACTGGTACCAAAACAGAGATATAGACTAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAATAATACCACACATCTACAACCATCTGATCTTTGACAAAC  
CTGACAAAAACATGAAATCGGGAAGGATTCCCTGTTGAATAACTGGTGTGGGAAAAGTGGCTAGCCATATGTGGAAGGTGAACTGGATTCCCTTCTTA  
CACCTTATACAAAAATTAAGTCAAGATGGATTAAAGACTTACATGTTAGACCTACAACCAATAAAACCCCTAGAAAGAAACCTAGGCAATACCATTACAGGAGA  
TAGGCACGGCAAGGACTTCATGTCTAAAATACCAAAAACAAATGGCAACAAAAGCCAAAATTGACAAATGGGATCTAATTAAGTAAAGAGCTTCTGTACAG  
CAAAAGAAACTACCATCAGAGTGAACAGGCAACCTACAGAATGGGAGAAAATTTTGAATCTACCCATCTGACAAAGGGTACTACCCAGAATCTACAAAG  
AACTCAAAACAAATTTACAAGAAAAAACACCCCATCAAAAAGTGAAGTGAAGGATATGAACAGACACTTCTCAAAAGAAGACATTTATGCAGCCAAGTACACA  
CATGAAAAATGCTCACTATCACTGGCCATCAGAGAAATGCAAAATCAAAACCAATGAGATACCATCTCACACCAGTTAGAATGGCGATCATTAAAAATC  
AGGAAACAACAGGTGTCTGGAGAGGATGTGGAGAAATAGGAACACTTTTACACTGTTGGTGGGACTGTAACTAGTTACGCCATTGTGGAAGACAGTGTGGCG  
ATTCTCAGGGATCTAGAACTAGAAATACCATTGACCCAAACATCCCATACCAGGTATATACCCAAAGGATTACAAATCATGCTGCTATAAAGACACATG  
CACACGTATGTTTACTGCAACACTATTACAAATAGCAAAGACTTGAACCAACCCAAATGTCCATCAATGATAGACTTGATTAAGGAAATGTGGCAGATATA  
CACCATGAAATACTATGCAGCCATAAAAAAGGATGAGTTTATGCTCTTTGTAGGACATGGATGAAGCTGGAAACCATCTTCTCAGCAAACTATCCCAAG  
ACAAAAAACCAACACCGCATATTGTCACTCATAGGTGGGAATTGAACAATGAGAACACTTGGACACAGGGAGGGGAACATCACACACCGGGGCTGTCTGT  
GGGTGGTAGGAGGGGGAGGGATAGCATTAGGAGATATACCTAATGTAAATGATGAGTTAATGGATGCAGCACCAACATGGCGCATGTATACATATGTA  
ACCAACCTGCAGTTGTGCACATGTACCCTAGAAGTTAAAGTATAAAAGTAAAGAAAAAAGTTGACCATATGTTGAGTCAAAGCAATATCAACAAAT  
TTCAAGCACTGAAATAATTAGAAACATGTAATTTTATCTGTGTGGAATAAAGTATGATATCAGTACAAAAATAAACAAGAAATCCCCCCCCCAAAAA  
AAGAAAAACAAAGTAAGTGATGAAGAAAAATACCAAAAGAAATGAACATTAACTATTATGTTGTTCTATAACCTGTAATATTGGTGGTAATTAATTTT  
TTAATTTGTTGGGATGCTAGTTAAGTTGATGTTGACTTTTCTGTGAGAAAAACAAACAGTATAAATGAGCAGATAAACCCTCAGTAAAAATTTATAGGG  
TTGGAGTTTATAGAGAATCACGGGAAAGTAAAGAAAGAAAGGACGAAAAGACAATAACAAGAACTGTTCTTTATCTGAATGGGTGAGTGATATAGGCTG  
GAAAGAGTCTATGAATCCAGGAGATGATGCTAAGATTGGGAGTGAATAAAAGATGAAAGTTCTGGAGGTATATGTGCATGAAATAATCAAGAAATGTGAA  
GCTTTGGAAGCGAGTAAGATAAGTAATTTTGAATTTGAAAGAGAGAGAACTTCATGTCAATGTGAGGTCTAGAAGTCGATCATTGGTGTGGCAGATGTTGGA  
GTGTCGGTGAAGTCATAAGAGCTATGGTTAAGGAATTCGAATTAAGGGTGAAGATGGTTTTGTCCCAAAAGACATAGAGATAACTTAGCACAATGACAA



TATGAAATCTAAGATGGAGTCTTTTTTGGAGTTACTTATGTCAAGGATGCTCTATACAAGTAGGATTTGGACATCCCTAGCACACATGTATGCTATGACCAT  
AGAAATGTATTCTCTCTCTTTCTAACCTCACACCTTTAATTATTGGGGGAGTAATGTTAGTCGTTTATTTATTAATTCAAAAAAATTTATCAAGCACC  
TACTACTACTCTAGGCAATGGCGAATAAGGAAAACAAATGCCTATGGATCTTATAGTCCAGAGAGAAGACAGATATTAATTAATAATGTATGTGTGTTT  
AAGGCAAAACAACACTAGGCAACAGTAGATACTGAGAGAGGAGATATTAAGCAAACTGACCAGCCAGTGCTTAGGAAAACATGTATGTGGCATTTTAGAAAA  
GCAGTGAGGGTAGAGTGTGCAAGGGGAGAGAAATAGGAGCGAGATAAGAGAGTTAATTGAGTGGGTGTGAACAGGCCTATATCATATGAGGGCTTGAAGGA  
CACTGCCTAGGGCTTCGGACATGTAGGTGGCTTAGTGTGTGATTGTGCATATTTGTCCCCTTGTTTCAACTACTGGCAAAAAAACACAAAAAGTAATGATAT  
CAACTTCCTGAAGGTCTTAGTAAAATTCTCTCTTTTAGCTTTTAACTATGTCTACTCTTATTTTCAGTCACTCTAACTGGCAAAGTAGTCCAGATCTTG  
TAAACATTTGTTAAAAAGAACTGCTTCCCTATAGCACACATTCTATGAAATAAGTGGTAAAGAGCTAAGCAGAGTCTAGAGCATTGACATATTTTCGTCAAC  
TTATAGGATATCAAGGTTCTTAAAAATGTATTCAAGAATTTTTCATGCAAAATGTGTGAGTTATTTAAGGCTTATTATTTATTTTCTTGAGTGAATAAGGC  
ATTGACAAAATACCTTTTATAATGCAATTTAGGTTTTTCAAACCTATTATCATCTCAAAAATCCTTATTAGAGAAATACTACATTTCAATTGATTCTAAGAT  
GCAATTTCTTTTACACATTTTAACTCTCTGACATATTTTAAATAAATTTTAAAGTCAATAACAAAGACATTTGTGCATAATTTAAGTCCAGCAGGTGTT  
TTTTGTGTATTGTGTGTACATAAAATAATGGTATCTCTGAAATCAATGAAATATGAAATCAATGAAATATCAACACATGTGATTACACTACTTTTC  
TCACCTCAAAATGAACTAAAATACTATTCTGCTTTTCTAACTATCATATTCCTACATCAACAATGAAACCTAATAATATTTTAAACAGCCAGGGCCAGG  
GGCACCATTGTTTCAATAGCAAAATCACTATAAAAAATATCAGATTTATTCACAGATGGGTACCCAGCTTTGCCTGATTCCAGTGCCAGGGCTTTTCGATATGC  
TATCTAATTATCTGGAAGCCATTAGCATTCAACCTTCAAAGCATGGTATTTCTGAGCATCCACATCAAGAAAATATTTTAAATAGCAAGTGGTGGCTCTGCT  
GCTATAGTCCTTGAGAATTCCTGTGATAGACTCTGAAGCACACACTCTTACACTAACCTCCCCTTGGTATCAACACCTTCTCAGATGGACTGGCACAGAGTT  
GATGATTTTCTCAACAAGGACCCCCAGCTTTAACCACCTTTTCAAATGTTTGGTGTGGGGTCTGGAGTGGGATAAGCACTCAAAAAACGTCATCTCCCTT  
CCTCTCACTTTTGAATATTGTACACTTAATGTGTATATTTTAGTATACATATATGTATTTCTTCTCATGTAATTTATTTCTTAGATTAGTTCAAGTGAAGG  
ACTGTGTGCTTCAATTTCTTTCACTATGTGCAATAGTCCCTTAATCAGTACTTTATAGAGGTGATGGAAATGTTATATAATATTAGTAGTCAATGTGAA  
AAGACAAATCCTATCATTTTCTGAGCACATTTGCCTTAGGGAGATTCCAGCTTTTATATTAATTTATGTTAATGTAATTCAGATGAAAAACAAATCTC  
CAAAATGGAAGAACCTTCTTCAATGAGAATATTAAGCCCTTTATGATACTTATCTTTTTTGCAGAAGAGCCTGTACATAGGCAAAACAGGGCACCTTCAGTTT  
TAAAAACAATTTCTGTCCCTGTTCCAAATTTTCAATTCAGATGGGCTTTGAAATTCCTTTATTTTTTAACTGCCAAGAGAACAATTTAAGGGCCATTT  
CTCAATTACCTTTCTCTAGTACCGACACCCTCAGGGAGGTGAGATTATGTCTTGCCAATTTACAAAAAGTCTGGGTATTTACAGAAAAATTATAATACATTAT  
ATTTTTATATATTAACCTAAAAAGTAATGACAAGGTATTTGCTTAGGAAATATTCTAAATACTTTTAAATATGTATGCATTATTTAATTGATTTAAACAG  
ATGACATCATATTATATACTTCTCTATATATGTTTGTGTTTTTTCCTAAATGTGGATTAAAGATCTTTCCATAATTGCATATAAGAAAAATTCACACAT  
CAGGGTCTGTTAGGGAGTCGGGGGCGAGGGGAGGGAACCTAGAGGACAGGTCAATAGGTGCAGCAACAACCATGGCTCATGCGTACCTATGTAATAAACCT  
GCACGTTCTGCACATCTATCTCATTTTCTTAGAATAAAATTAAGGAAATTTCTCAATGTTTGAATGGCTATAGAGTATGCCATTGCATGGATGTAG  
CTTAATTAATTTGCTTAGTCTTTTTTGGACATTTAGACATATTTCCAAGTATCTTATTTTATTTGTAGCTATTGTAAATGGGACTACTTTGAAGATTGTGTTT  
TCAGATTGCTTGCTGTAGCATATAGAAATGCTACTGATTTTTGTATGTTAATTTTATATCTTGCAACTTTACTGAATTTGTGTATCAGTTCTAAGAGTTCC  
TTGGTGGAGTCTTTGGGTCTTTTCAAATATAAAATATATAATCTGCAAAACAAATTTTCTACCTTTCTAATTTGGATGCCCCCTTTTCTTTTCTCTCT  
TGTCTAATTGCTGGGCTAGGACTTCCAGCACTATGTTGAATAATAGTGATGAAAGTAGGCATCCTTGTCTCATTACAGATCATAGAGGAAAAGCTTTCAGTT  
TTTCCCATTATATATGATACTAGCTATTGGTCTGCTCTGTCATATATGGCATTATTTCTGTTGAGGTATATTCCTCTATATCCTGGTTTTGAGGCTTTTA  
TCATGAAGGAACGTAGAGAACTTTAGCAATGCTTTTTCAGCATCAATTGAAAAGATCATGTTTTATGTCCTTCAATTTTGTGATATGATGATCAAACTGA  
TTGATTTTCAATATATTGAACCATCCTGTATCACTAGGATAAATCCACGTGGTCATGATGAAAAATCTAATGTGTTGTTGCATTGTTTGGTATGAGATT  
TGTTGAGGATTTTGCATTAATGTTCTTCAGGAAATTTGCTGTAGTTTACTTTTCTTGGTATGCTTGTGCTGGTTTTGGTATTAGGGTGATACTGGCCTC  
AAAGAATGAGTTTGAAGTATTCCTCTCTATTGTTGGAATATTTTTTAGTAGAATTGGTATTAGTTCTCTCTAAGTGTGTTGGTAAAAATTCAGCATCATG  
TCCCAGGTTTTCCCTTGCTGGGAGACTTTCTATTATAGCTTCGATCTCATTACTTGTATTGGTCTGTTTCAGGATTGGACTTCTTTATAGTTCAATCTTGG  
TAGGTTGTGCTACAAATTTATTCACCTATCCATTTTAGATTTTCTGATGATTGGCATATATTTGCTCATAGTAGGCTTCAATGATCCTTCGAATTTCTGT  
GGCATCATTTGTAATATTTCTTTTAACTCTGATTTCAATTTATTGAGGTCTTCTGTTCTTTTATTAGCCTAGCTGATGGTTTGGAGATTTTATCTTTC  
CAAAAGACCAACTTTTCATTTTGTAAATCTTTTGAATTTTTTTTGTTCACCTTTCATTTATTTCTGCTCTGAAGTTTATTTTCTACTATTAATTTTGGGTTT  
AGTTTGTCTTGCTTTTCTAGTTCTTTAAGATGCGTTGCTAAGTTGTTTATTGAAGTTTTTCTACTTTTTTGATGTAGGTGCTTATTCTATAAACTTTTC  
TCTTAATACTGCTTTTTCCATATCCACAGGTTTTGGTATGTTGTTCTTCCATTTTCATTGTTTTAATACACCTCTAAATTTTACTCTTAATTTCTTTATTT  
GCACACTGGACAATCAGGAGCATATTGTTTAAATTTCCATGATTTTGTATAGTTTTCAAAGTTCCTCTTGTCATTGATTCTAGTTTTATTCATTGTCATCA  
GAGAAAAACTTGATATGATTTCAAGTTTTTGAATTTTAAAGACTTGCTTTTATAGTAACATATGGGTTACCATTGACAACGATCTGCGTGTGAGGAGAA  
TAATGTGTATTCTTCAGCTATTGTATGAAATGTCCGTGAAATATCTATTAGGTACATTTTATCTATAGTGCAGATTAAGACTGATGTTTCTTTGTGATTTT  
CTGTCTGAATGATCTGTCAATGCTGAAAGTGAGATGTTGAAGTCTCTCTCTTAGGTCTAATACTATTTGCTTTACATGTCTAGGTACTGCAGTGTGGGT  
GCATATATATTTACAATTTGTTATATCTTCTGTGAGTTGAATCTGTTATCATTATATAATCACCTTCTTTATCTTTTTTATAGTTTTTTTCTTGAAATCTAT  
TTTGTCTAATTAAGTATAGCTACTCTGCTTCTTTTTTGGTTCCATTGGCATAGAATATCTTTTTCCATCCCTTTATTTTCAATCTATGTGTTTCTTTA  
TAGATGATGTATGCTTCTTAGAGGTAACAGATCATTGGCTCGTTTTATTTTAAATCCGTTTAAATCCATTACGCCATACTATGCTTTTAAATGGAGACTTTA  
GTCCATTTACATTTCAAATAATTTTGAATCCAGGTGACAAAGTAGTATTTATTTTAAATTAATATTTCTTTAGTTTCATCATTTTGGCAAAATTTTCATGG  
TGTTTTCTGAGTGAAAATTTATCTACTTATGTATAAGTAGATAAACCATGCAATTTAAACTTAGTAAAACATATTTAAAAATGAATAAATAGCATGTAGGT

ACAGATGTAGTCTCTATCTGAATGACAATCAATACTTCCAAAACCTTACATTTAGAAGATATCTTATATGTAACCCCTTAACAGCATTGAAGGAATATGTTTGT  
TCTTCTGACCTAATAATTACATGTTTCAGAAAATTTGCAGTATTTCCCTTTATTATAAAATTTAATATACATGAATTAATCTTCATTATTATATTTAAAGCTTA  
TCCTTTAAGATGAGTTAAATATTTAATTATTTAAAAACAATGTGACTTTGGTTTTTTAACATAGCAGCATCCATGTGGACAAAATAACTTCATGAAAAATGTCAT  
GTACTTATAGGGCTTTCATACATGTTTGTATGTCACCTATTCAAGAAGAGTAAAAAGCAATTTTCGGTGACAAACATTAATTTGAAATAATTTTATTCTTGC  
ATTCTTAATAAAAAATATATTCTTATTGTAAAAAATTCAAAAATGAAATTAGTGTACATTATCCAGACTTTTTTTCAATTTTATTACAGCAATAATCAAAAT  
ACATACAGAAAATTTTATACCTCACACATATTTGTAATTTCTAATTAGTCTGTTTAGTCTCTTGAGAAAAGTATAAAGCGCCTCCCATCCTGTGGGATAACTGA  
CTTGAAAAGTCAAAATACCTTACTTGAAATCACTTGGTGTGACACAGTGGCCAAAGGCTAGCCACAAAACCTATATTGGAATAAAAAATTGCCAATAAATCTC  
TGAAGCAGTTCATGCCTCAAATAGTCATACATTGGAATAAAATTAGTAATAAAGGAAAAATCCATCCGTGGAATCCTCAACTAACTGCTGTCTTTCATCACA  
AAAAAGGGACAATAATTCACAAATTTACTCTACAATTTCTTCCACACTACCTATGGTGATTTTCAAATCACAAAATTTACTTTTCAACTATGTACTGGCATC  
TCGAAGGCATTGTGTTCTATGCTTTTCAATTAGGTGAGGGGGGATCACATGTTAATGTGAAATAACACTATTCAAACTAATTTATTTTCTTCACTCTTTCTC  
TAGGAGGCATATAGAACATTTCACTGCAAAATGCTGGCAGCGTGTGACTAGAAAAGTGCCATGAAGATGAGAATTGCATTAGCACCTTAAGCAAAACAGGACCT  
CACTTGTTCAGGAAGTGATGACTGCAAGCTGCTTACATAGATATCCTTGGGACGGTCTTCAAGTGCAATGTACCTGTAGGACCATTACACAAAGTGAGGA  
ATCTTTGTGTAAGATTTTCCAGCACATGCTTCATAGAAAATCATGTTTCAGTAAGTTCCCAAAATAAAATATCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT  
ATCTATCTATCTATTTTGTTTTTGCTTATACAGTAAAGAGGTAATCCAGCAGACACATTTTGTGTTTGGTATGCAATTTGAAAATTTGCTTTCTGATTAT  
GTTCTGTGATTTTGTCTATTTTACTCACTTACTTGAAAATAGTACATTTTAAAAATTTATATGATAGGTCACTCTTAATTATCATTTATTGATTTCAATATCA  
AAAGCATAGAAGGTTTATTTCTATCAGATAAATGGATATATCAAGTATCAATTTGCTGCATAACAAACCATAAGTATCTATACTAAGTAACAAAAAATGGCTT  
AAAACGATAACCATTTATTTGCTCACAATTTGTCACATTTGGACTTGGCTCAGCTGGATGGCTCTTCCGATGGTCTTTTGGGGGCTCACTCATGTGCCTATAG  
TCATCTGGTATCTTTAGGCTCGGCTGAGGCTGTTTGGTCCAAGGTGGTATTAGCAGACACCATTTTCTGGTGTGGTGTGGTCACTTCAATATGACATCTTC  
AGCAATATAGCCAAAACTCTTATGTGGAAGCAGAAGAGTTCCTAATGGCTAAACCCCATTTGTGTAGCTGTCTAGTATCTGTCTACTGTCACATTTGTAATTA  
TTTCACTGAACAAAGCAAATCACAATGGCCAACTCAGAGTCACTGTGGGAGTGACTACATAAGGATATGAATATTCAGGTCAGATTAAATCAAGGATCAT  
TACTTAACAACCTACTATGATTGGCTGTCTGGCTATGTACAATATATTCACCTCTCAATTTAGTTTTCTCCCTTGGTCTTAAACATGTCTGTGATC  
AACCTATAATGATGAAATGGAAGACATATTTCCGAAGTTATTGTTTAAATTTAGGGACAAGAAAATGATATTTAGGAATTTAAATAATTTGTTTCAGCATCT  
CAAAGTGAGCTAATGGTCAAGAAGGACTTTTATGAGTCTTAAGGAAACAACCTAAGGATGTGATCATGTAATAATTCAAAACCTCTCTATTATCCATCTTCA  
GGGTTAGACCATGCAACCTTCGACGTCCCAAACTTCCCAAGGCCCTACCCCTAGATCCCTAGCTGTAACCTACCATACTGCAGGTACTGTTTCTAGAAGG  
AAGTAATGGATATTTACTGTTTCATAGCAAAACCAATCTTTATATTTATTGAAAATGTTTGACAGACATAGATCTATATCTACATCTATATCTATATCTATA  
TCTGTATCTATATCTATATACAGATGCATATTTACACATTTATATTTCTATTTTCTTTACAGATACTTAGGAGATGCACATTAGCCAATGTGCTAAAAAT  
GTGATTTGTTGTATATTATGTAATAGGCATACAGCTCAGAGTTTATGGTTTTGATTTTCGACAGTGTTTTCTGTGGAATATCCACAATTTCTATAATTAACAC  
TACAGATATATTTCAACTGAAATCAGATACAGAGAAGAATTGAAGTGTATATAAGTCATATTCTCTAATTTTCTCTCTTATTAACATTAGTTCGTGTTGA  
AACTGAAAATACTTATAATGAATGGCTCATATGATTACAGCAGGAAAAATACCAATAACCAATTTGGTATTAACCAAACTAACTTATAGTAATATATACAG  
TTATATAATAATGGTTATTTATAGGTTCTTTCTAATATTACAAGGTATGAAGAAAAATGTTGATTCTACAGGTTAATAATGATTCAATTTATTTGGCAAAAA  
TTCTCTAAAAATACAGGTCTAAACATCCTAATTTCTAGTTCTAAACATGTTTTCTCAAATATAATAACAATTGTGTTCAATTTTCATAGTGTGTGCTTACTA  
TAACCTTTTCAGAGCAAAAAATTTGCAGAGGCACTAAAGATAGACATTTAAATTTGTGTAATATTAAGTTCTGTATGAATGCTTTAAAGAATGAAAATTC  
AAAATGATTTCACTTTTCTTACTACCTAGGAAGAGGAAGTTTTGTCTCAAATATTACCTACTAAGACTAGGAATTTCAAATGACAGGATTATAGAATTA  
AAGGAACCTCAAAGGCTTTGGTCACAGTCTTGGTAGAATTGTCCCTTGGTATCCATGGGGAATTGGTTCCAGGACTCAAATGGACACCAAAATTTGTTC  
TGTTCAAGTCCCTGATATAAAATGGTGTAGTATTTGCATATAACCTATGTATATCCTCCCATATACTTTAAATAATATCTAGAATACTTATAATATCTAATA  
CATGATTTACATATAAATGTCATGTAATTTAGTGTATAATGTATCTTTTATATTATATATATTTATCATTTTGTGTTTTTTTAAAAATATTTTTTTTC  
TCTCAAATATTTGATCCAAAGTTGGTTGAGTCGAGGGGTGCAGAACTCACAGGTATGGAGTGATGACTATACTTGAATTAATAGGAAAAATTCCAAACAAA  
ACCAGAAACCAATCCTTAGGCTTGCTAATTTCTAACAACCTTTATCCATTGCCTCAAATATATGAAAGTAGCACAAGGACATTTGCTGAAGGAAGTATGT  
CTCTCATATTGCCCCGACTTCTCACATCAGCCTAGCACTCTCATGAATTTTCAAAGATCGGTCAATTACAGTATGTTTCTAAACCCCTTAGCTTCTGCTT  
TCTTTACTTGAAAGGGTCAGAACTGAGTGGAAGTGAAGGAGGCTTTTCACTTTGTGACATTTGCTTAAATTAATGCATTGTTTCTCAAAC  
TCATTTGAGCTTAGGCCACAGTAAGTAATATATGTTTATATTAGCACTGTACTCTCATTTTTATGCAACATACTCTGTTTGTAAACATTTTATTGCTTTA  
TTCTATTGTTCCCAATGCTGACCCTACCCCTAAATTTTAAAGACTTACTAACATGTTGTTCACTGAAGTTTCAAAAACACTTTCTTGAACAAAAAT  
TTTTCTGAAAATAAATTTATGAGATTAATAGCTTGCCAGGGTTCTACATTGGGTGTGGTATAGTCATGACCTGGCTGGTTGACTTGGAGCCCGCTATGT  
TCTCCTGTTTGTGAAATGATAATGAAAAAAGAGCAACAACAAAACAAAACAAAACAAAACCTTATATCTGTTCCATATGCTCCAAAGTCTTATT  
AGTCTGAACTTCATAGTTCTGTTCTGAGAACTAAGCTTGAAAAATGCACTGAAGAGCCCTTATCTGGTCTGTGTGCAGGACTAGACTCAGGCAGAAAGAGCA  
TCCTGAACAAACCATGTATTCTGTACCAACCTCCACTTACCTACTAACCTATGGATTACACAACAACTTACTTGTCTGTGATAATCTGTAGCACAGAACAA  
ATTTGTGGCCCTTAGAGCTAATAGGGAATGAGAGCCATGGAAGAGAGAGAAGTTGGTTAAGAGACAGAGGACCATCAACACGGGAAGGATTAAAGGATCCA  
TTATTGTTTTCACTCCATTATACCGAAGGAGTGAGAGGGTATACCTTAAGCTGACAGAAATGTTCTTTTGCATTTCCAGAGCTTTTTTTTATTAAATAC  
CAGTTATATAGTCAACTAAAAGAGATATGAAATACCACCATTTGACCCAAAATATTAGATCCTCCATGTGGATAATTAAGAAAAAGGAGAAAGAAAG  
GAGGAAGAGGAAAAGGAAGGGGAGGAAGGGAGAGGAAGAGAAAACAGGAAGGAAGAGTAGGAGAAAGTAGGAGGAGAGAAAGGAGAGGAGGAGAA  
GGGGGAGGAGGGAGGAAGAAGAGGAACAGGAAGGAGGAAAAGAACAGGAAGGAAGTAGGAGACAAAAGAGGGAAGGTAGAGGAGGAGGAGGAGAAAGA

GGATTAAGAAAAAGCAGAAAACCTCTGTTTAGTAAATTCTACAAGAGATGGAACATAGCAATACAAAAAAGCATGTGATACATGCTTAAACAAATT  
TAAAGAATACAGAAATAATCCCATTTCTCAAGAGAGAGCCAATGTTTCAAGGTTGGTGATATTTCTTTGAACTTTTCTTTACTTGAATACATACATACT  
TTGAATACCTTGTATATACCCAAACATGTCTCCTTTACTCTGATACACACACATTTTTTAAGGCAATCAAACATACTTATGCTTTACAGGTTCCCTTT  
TAACTTAAAAATATATGGTAGACCATTTCCAAGTATTTACATACATGGTAGCTTAATTTCTTTTTTTTTTAATTATACTTTAAGTTTATAGGTACAC  
TGTGCACATTGTGCAGGTTAGTTACATATGTATACATGTCCATGTGGTGCGCTGAACCCACTAAATCGTCATCTAGCATTAGGTATATCTCCCGATGCTA  
TCCCTCCCCCTCCCCACCCACCTCAGTCCCCAGAGTGTGATATCCCCCTTCTGTGTCATGTGATCTCACTGTCAATTCCCACCTATGAGTGAGAA  
TATGCGGTGTTTGGTTTTTGTCTTTCGATAGTTTACTGAGAATGATGATTCCAATTTTCATCCATGTCCCTACAAAGGACATGAACATCCTTTTTTAT  
GGCTGCATAGTATTCATGGTGCATATGTGCCACATTTTCTAATCCAGTCTATCATTGTTGGACATTTGGGTTGGTTCCAAGTCTTTGCTATTGTGAATAA  
TGTGCAATAAACATACGTGTGCATGTGTCTTTATAGCAGCATGATTTATAGTCCTTTGGGTATATACCCAGTAATGGGATGGCTGGGTCAAATGGTATTTT  
CAGTTCTAGATCCCTGAGGAATCGCCACACTGACTTCCACAATGGTTGAAGTACTTTACTGTCCCAACAGTGTAAAGTGTTCCTATTTCTCCACATCC  
TCTCCAGTACCTGTGTTTCTGCTTTTTAATGATTGCCATTCTAAGTGGTGTGAGATGGTATCTCATTGTGGTTTTGATTGTCATTTCTCTGACGGCCAG  
TGATGATGAGCATTTTTTCATGTGTTTTTGGCTGCATAAATGCTTCTTTTGAGAAGTGTCTGTTCATGTCTTCCGCCACTTTTTGTTGGGATTGTTGT  
TTTTTCTTGTAAATTTGTTTTAGTTTCTGATTTCTGGATATTAGCCCTTTGTGCGATGAGTAGGTGCGAAAAATTTCTCCCATTTTGTAGGTGCTT  
GTTCACTCTGATGGTAGTTCTTTTGTGTGTCAGAACTCTTTAGTTTAATTAGATCCCATTTGTCAATTTTGTCTTTTGTGCCATTGCTTTTGGTGCTT  
AGACATGAAGTCTTGCCCATGCCTATGTCTGAATGGTAATGCCTAGGTTTTCTTCTAGGGTTTTATGGTTTTAGGTCTAACGTTAAGTCTTAATCCA  
TCTTGAATTGATTTTTGTATAAGGTGTAAGGAAGGATTGAGTTTCACTTTCTACATATGGCTAGCCAGTTTTCCAGCACCATTAAATAAATAGGGAATC  
CTTTCCCATTTGCTGTTTTTCTCAGGTTTGTCAAAGATCAGATAGTTGTAGATATGCGCGTGATTTCTGAGGGCTCTGTTCTGTTCATTGATCTATATC  
TCTGTTTTGGTACCAGTACCATGCTGTTTTGTTTACTGTAGCCTGTAGTATAGTTGAAGTCAGGTAGCGAGATGCCTCCAGCTTTGTTCTTTGGCTGAG  
GATTGACTTGGTGATGCGGGCTCTTTTTGTTTCCATGAACCTTAAAGTAGTTTTTCCAATTTCTGTGAAGAAAGTCATTGGTAGCTTGATGGGGATGGC  
ATTGAATCTGTAAATTACCTTGGGCAGTATGGCCATTTTACAATATTGATTCTTCTACCCATGAGCATGGAATGTTCTTCATTGTTTTGTATCCTCTTT  
TATTTCTTGAGGAGTGGTTGTAGTTCTCCTTGAAGAGTCTTTCACATCCCTTGAAGTGGGATTCTAGGTATTTTATCTCTTTGAAGCAATTGTGAA  
TGGGAGTTCACTCTGATTGGCTCTCTGTTGTCTGTTGTGGTGATAAAGTCTGTGATTTTGTACATTGATTTGTATCCTGAGACTTTGCTGAA  
GTTGCTTATCAGCTTAAAGATTTTGGGCTGAGACAATGGGGTTTTCTAGATATACAATCATGTCTGCAAAACAGGGACAATTGACTTCCTCTTTTCC  
TAATTGAATACCTTTATTTCTTCTCTGCCTAATTGCCCTGGCCAGAATTTCAACACTATGTTGAATAGGAGTGGTGAGAGAGGCATCCCTGTCTGT  
GCCAGTTTTCAAAGGAATGCTTCCAGTTTTTGCCATTGATGATATTGGCTGTGGGTTGTCTAGATAGCTCTTATTTTGAATATGTCATC  
AATACCTAATTTATTGAGAGTTTTAGCATGAAGGTTGTTGAATTTGTCAAAGGCTTTTTCTGCATCTATTGAGATAATCATGTGGTTTTGCTTTTGGC  
TCTGTTTATATGCTGGATTACATTTATTGATTGTGTATATTGAACAGCCTTGCATCCAGGGATGAAGCCACTTGATCATGGTGGATAAGCTTTGGAT  
GTGCTGCTGGATTCAATTTGCCAGTATTTATTGAGGTTTTTGCATCAATGTTTCATCAAGGATATTGGTCTAAAATCTCTTTTTTGTGTGTCCTGCC  
TGGCTTTGGTATTAGAATGATGCTGGCCTCATAAATGAGTTAGGGAGGATTCCCTCTTTTTCTATTGATTGGAATAGTTTCAAGGAATGGTACCAGTTC  
CTCCTGTACCTCTGGTAGAATTCGGCTGTGAATCCATCTGGTCTTACTCTTTTTGTTGGTAAGCTATTGATTATTGCCACAATTTACGCTCCTGTAT  
TGGTCTATTGAGAGTTCAACATCTTCTGGTTTAGTCTTGGGAGAGTGTATGTGTCGAGGAATTTATCCATTTCTCTAGATTTCTAGTTTATTGTGTA  
GAGGTGTTGTAGTATTCTCTGATAGATTGTATTCTATGGGATCGGTAGTGACATCCCTTTATCATTTTTTATTGCATCTATTGATTCTGCTCTTT  
TTTTTCTTTATTAGTCTGTAGTGGTCTATCAATTTTGTGATCCTTTCAAAAAACAGCTCCTGGATTCAATTTTTTGAAGGGTTTTTGTGTCTC  
TATTTCTTCACTCTGCTGATTTTAGTTATTTCTTGCTTCTGCTAGCTTTGAATGTGTTGCTCTGCTTTTCTAGTTCTTTAATTGCGATGTAG  
GGTGTCACTTTGGATCTTCTGCTTTCTCTGTGGGCATTTAGTCTATAAATTTCCCTTACACACTGCTTTGAATGTGTCAGAGATTCTGGTATGT  
TGTGTCTTTGTTCTGGTTGGTTTCAAAGAATCTTTATTTCTGCTTCATTTCTGTATGTACCCAGTAGTCATTGAGGAGCAGGTTGTTCACTTTCCATGT  
AGTTGAGTGGTTTTGAGTGAGATTCTAATCCTGAGTTCTAGTTGATTGCACTGTGGTCTGAGAGATAGTTGTTATAATTTCTGTTCTTTACATTTGCT  
GAAGAGAGCTTTACTTCAAGTATGTGGTCAATTTTGAATAGGTGTGGTGTGGTGTGAAAAAATGTATATTCTGTTGATTGGGGTGAGAGTTCTGTGA  
GATGTCTATTAGGTCCGCTTGGTGCAGAGCTGAGTTCAATTTCTGGGTATCCTGTTGACTTTCTGTCTCGTTGATCTGTCTAATGTTGACAGTGGGGTGT  
AAAGTCTCCCATTTAATGTGTGGGAGTCTAAGTCTCTTTGTAGGTCACTCAGGACTTGCTTTATGAATCTTGGTGTCTCTGATTGGGTGCATATATATT  
TAGGATAGTTAGCTCTTCTGTTGAATTGATCCCTTTACCATTATGTAATGGCTCTTCTCTCTTTTGATCTTTGTTGGTTTAAAGTCTGTTTTATCAGA  
GACTAGGATTGCAACCCCTGCCTTTTTTGTTTTCCATTGTCTGGTAGATCTTCTCCATCCTTTTATTTGAGCCTATGGGTGTCTCTGCACGTGAGATG  
GGTTTCTGAATACAGCAGCTGATGGGTCTTGAATCTTGAATCAATTTGCCAGTCTGTGTTTTTAAATTGGAGCATTTAGTCCATTTACATTTAAAGTTAA  
TATTGTTATGTGTGAATTTGATCCTGTCAATATGATGTTAGTGGTTATTTTGTCTGTTAGTTGATGCACTTTCTTCTAGTCTCGATGGTCTTTACATTTT  
GGCATGATTTGACAGAGCTGGTACCGGTTGTTCTTTCCATGTTTAGTGTCTTCTCAGGAACCTTTGAAGGCAGGCTGGTGGTGACAAAATCTCTCAG  
CATTTGCTTGTCTGTAAAGTATTTTATTTCTTCTCACTTATGAAGCTTAGTTTGGCTGGATATGAAATCTGGGTGAAAAATCTTTTCTTTAAGAATGTT  
GAATATTGGCCCCACTCTCTTGGCTTGTAGGGTTTCTGCCAAGAGATCCGCTCTTAGTCTGATGGCGTTCCCTTTGAGGGTAACCCGACCTTTCTCTCT  
GGCTGCCCTTAACATTTTTCTTCTCATTTCACTTTGGTGAATCTGACAATTATGTGTCTTGGAGTTGCTCTTCTCGAGGAGTATCTTTGTGGCGTTCTCTG  
TATTTCTGAATCTGAACGTTGGCTGCCCTTCTAGATTGGGAAGTTCTCTGGATAATATCCTGCAGAGTGTTCCTCACTTGGTTCCATTTCTCCCATC  
ACTTTGAGGTACCAATCAGATGTAGATTTGGTCTTTTACATAGTCCCATATTTCTGGAGGCTTTGCTCATTTCTTTTTTATCTTTTTTCTCTAAACTT  
CCCTTCTCACTTCATTTCACTTCATTTCTCCATCGTGATACCTTTCTTCTAGTTGATCGCATCAGCTCCTGAGGCTTCTGCATTCTTCACTAGTTC

TCGAGCCTTGTTTTTCAGCTCCATCAGCTCCTTTAAGCACTTCTCTGTATTGGTTATTCTAGTTATACATTCTTCTAAATTTTTTCAAAGTTTTCAACTTC  
TTTTGCTTTGGTTTGAATGTCCTCCCGTAGCTCAGAGTAATTTGATCGTTTGAAGCCTTCTTCTCAGCTCGTCAAAGTCATTCTCCGTCCAGCTTTGTTT  
CGTTGCTGGTGAGGAAGTGCCTTCTTGGAGGAGGAGAGGCACTCTGCTTTTTAGAGTTTCCAGTTTTCTGCTCTGTTTTTCCCCATCTTTGTGGTTTT  
ATCTACTTTTGGTCTTTGATGATGGTGATGTACAGATGGGTTTTTGGTGTGGATGTCCTTTCTGTTGTAGTTTTCTTCTAACAGAGAGGACCTCAGCT  
GCAGATCTGTTGGAGTACCCTGCCCTGTGAGGTGTCAGTCTGCCCTGCTGGGGGTGCCTCCAGTTAGGCTGCTGGGGGTGAGGGTCAGGGACCCACC  
TGAGGAGGCAGTCTGCCATTCTCAGATCTGCAGCTGCGTGCTGGGGGAACCACTGCTCTCTCAAAGCTGTGACAGAGGACATTTAAGTCTGCAGAGGTT  
ACTGCTGTCTTTTTGTTTGTCTGTGCCCTGACCCGGAGGTGGAGCCTACAGAGGCAGGCAGGCCTCCTTGAGCTGTGGTGGCTCCACCCAGTTGGAGCTT  
CCCGGTGCTTTGTTTACCTAAGCAAGCCTGGGCAATGGCGGGCGCCCTACCCAGCCTGGCTGCTGCCCTTGAGTTGATCTCAGACTGCTGTGCTAGCA  
ATCAGCGAGACTCCGTGGGCGTAGGACCTCCGAGCCAGGTGCTGGATAGAATCTCATGGTGCGCGTTTTTAAAGCCGTCGGAAGGCGCAGTATCGGG  
TGGGAGTGACCCGATTTTCCAGGTGCCGTCCGTCACCCCTTTCTTTGACTCAGAAAGGGAATCCCTGACCCCTTGCGCTTCCCAAGTGAGGCAATGCCTCG  
CCCTGCTTCGGCTCAGCAAGGTGCGCGCACCCACTGACCTGCGCCTACTGTCTGGCACTCCCTAGTGAGATGAACCCGGTACCTCGGATGGAATGCAGAA  
ATCACCCATCTTCTGCGTCGCTCAGGCTCGGAGCTGTAGACCGAGCTGTCTTATTCGGCCATCTTGCTCCTCCCTGCTTAATCTTTTTAAAGGTCATA  
TCATATCTTATAGTAGAGCTATATCATAATTGTTAACTAATCTCCTGTTAATGTGGATATTTGTTGAATGCAATTGTTTTTACAGACATTGTGCAATAA  
ATGTTATTGCACGTATGTACTGGCATTGAATAGAGTAAGTTTCAAATAGTGAATTACTAGACCATAAGATTGTGCATTTTTAAATTTGGTAGACACTGA  
AAAAAACAGTTTTGTTTCTGTTACATTTAATGAGAAAGTTTCAATATTTTTAATTTGTATTTTTATTATAAATAATATGGAACATCTTTTCAGTGACTTG  
TTGGAGATATTCTGTTTCTTCTTACCTACTCCTGTACTGTGCTTAAATATCCTGCTTCTTAGTCTCAGTAAATGACACTTTTGTGCTGTGTCAGCTGT  
TTGTGTGGATATGTGAAGACTCATTGATCTGCATACCTCCTTAATGATCCTGATCAGAAAGTGATGACCTGGTGGGTCATAGCCTTGGGCTTGAAGTGGAC  
CCTACTATGTGTTATCTGAGTGATGTAAAGAGCAAAGTTTTAAATCATTTTTTGAATATTAACCACTTCTCCTCAACTGGATAATTTCCATTGCTTTTTG  
AAAGGATAATTTTCACTACATGATTAATAGTCAGAAAACAAAATTTATAATATAAATAAATTATGAAAAATAATTATATTTATCATTAGTTAAAGAAAA  
TAACATTGTCATGATTTTTGAAGTTCTTTAAGTGCTCTCAACATCACATTCTTTCTTTCCCAATACAGAAATTAGTGTGATTAAATCCTTGCTTCCCT  
TTCTAATTTTGCCACATTAATAAAAAATCCAATCAATATATTGTTTAGTTTTTCATGTTTTGAGCATTATATAAATGGAATCACATTTTTTGGCCCTTAGT  
ATCCTGAAATGAAGCATGTTGTGATGTAGAACTAGTGACTATTTTTTACTGCTATGTAATATTCTATTGCAAAATACATCTATTTATTCTATAGCTGGCAT  
ATGTTAGGATTTTTCCATTTTAAAAAATGTAAATAGTGTAGCTTGATCATCTTAGTACATTTTTCTTGATACACACATGCAAGATAAATCTCTAGGGAGCA  
GTTCTCAATCTTTGCTAAACGTGAGAATCATTGAGAGATAAAAATTCATGTCCAATAAAACCAATAAAATCACATTATATAATGGCAGGACGTGACAGTA  
GGACAGCTTCATGGACATGTGGCAATGTAGTTACATAGGCCCTGTGCTCAGAAGAATCCAGATCTGGGGTTAATGCTCTGCAGTCATTGTGCAAAATTC  
TTAATAATTTCTTTTGCTTTGTTTTGAAATTCATGAAATAATAAAGCACACAAGAGGTGGCTTGGAGCCTCAGCACATGTGTGTTTCTGTGCTTGGC  
ATTTGCGATCTTCTAGGGGCAAGCAAGTTCTCAGCTGCCTGCTCCCATCCTCTGATGTGGGCCCTGCCCCAACCCCTTCACTTCGCCATCCTGCAACT  
GCTGCCAGACATTTGTCTATTTTCTAAAAAGTGATATTGAGCCTTCCAATCCACAGATATATATTTTTTCTTCTGCTTATAATAAATTTTTGTTACTT  
TCACAATGAAAGTAATTTCTAAATAAATTTTTTCATAACTTTTGCTATCTATAATTATTTCTAGGTATGGCCCAATATTACAATTGCTATTGAAAGTCAT  
ATTTTCTCAGGATTATACGTCAAACCTTTCATGGTTGAACATATAGAAATTCATTTGATTCTACACATAAAATTCATGTGTAGCAAAGTTGTTAAACACTCA  
TAGATTTTGACAATTTATGGAATTTATTTGTCTTCTTTTAGCTAACCATATACTCGTCAATAATCACAGTTTGTGTTCTTTGTTCATGCTCATGCTTT  
TTTTTAATCCTCCCACCACTTCTATAACATCTAGGACCTACAGAAAAAAGTGAAATATAAATGGTGATAGTGAGCACCCTTGCTTGTCTGATCTTG  
AAGAGAATTATCTCATCATTTACCATTAAAGTCTGACATTTGTCAAGTTTTTTGTAGATACTGCAGATTGGAATAAAGAAGTTATCTTCTATTCTATGGAAT  
GCAATCACTTTTAAACAACAAATGAATGCTGAATTTTATTAATGCTACTATACATTTGAAGATCTCATCTGAAATTTGTTCACTACTTTTGTAGTCATTGT  
CTGTGGTAGAGTGATTGTGTCATGGTTCTAATATTGTTAGACTATCAGAAATAGAACTAAAGTATTCATTTAAACACATTCAGAATCTCTATTGTACAAA  
AAGGAAAAAAGACAGACAAATAAACCCCACTTATTCATTAGCACCATGTCTTTTCCCTTTCACAGACAAATTTCCAGAAGAGTTGCCTGGGTTTATTG  
TTTCAATTTCTTTTCTCTAACAGGTTGATCCACCTTTCCAGTCTGGCTTCTGGGTATAGATCCACTCACAAAGCAGCTTTCCCATAGGTTATCAACAAC  
ATCCATTTCAGAGGGCTGGAGGTCTTGCTTATTTGGATTTTAAAGTACCTTCAAGAACAAATGATATACTTTTCTTCTTGATATACTCCCTCACACC  
TAGCTCCTATTCTCTGATCACCCTGAATGCTCCTCTTATTTCTACTTTGTAGGCTTATCCAATTGGCTAATTAATATTTGTGTTTCAAGACTCAGCTGTA  
GATTCTCTACTAAAGTACTGCTATAATCTTCCCAAGGAGATCCCATCCATGCCATAGCATCATCACTTCTTATAATGACTTACAATCTTCAAGGAGACCT  
CTTTTCTAAGATTCCAACCAATTGCCTGTCTCTACTTGTATATTTCTTTAGGATTTTGTAGATTGTGATATAACAAATAAGCTCCAGAAGCTCAGTGGCT  
TTACAGAATGGAAGTTTATTTCTGGGAGCATTAAAGTCCAATCAGCATTAAACATTGGTCATTTAGAGGACTAGCCTCTTCTACATGCAGCTCTACCTCAG  
CATAGGACCTCTAAGTCTTCCCTACTCAGCAGAGGATAGGAAAAATAAAAAATGTGGTTTGGCTCACAGTCATAAAGGAGCATTTTATGTTTCGATGGTGCA  
ACAGTGATATCACACACTCATGTCCACTGGCCCCAACTCAGTCACACGGCCACACTTATCTCCAGGGAGACAGGGAACATAGTCTAGCTTTGTGCCA  
GGAGGAAAGGCAATTGTAATTGTTAATCAACAAATAAGTCTCTGCAACAATTTACCTTCTCTTAGCAAATTTCCGTGTCATTTTCTCTTACACAGAGA  
ATATGCTTATTCCTTCTCCATTGGAGACATCTTAATGTTTTTCAAATTTTTTATTCAGCATCAGCCGGAACCTCAAAGCCCTGAATGTTAAAGATGTGCAAG  
CTAAATGTTGTGGCACCTTGTAATAGACAGGAAACCCACTGCCATCTTCCGACACAGACACCAAACTAACACACCCAAACCCCACTATAAACCTACAT  
ATAGTATCAGGGACAGCAAAACCTCAAAAAAAAAAAAAAATCTTATTCAAAATCAGGAAAAATGGGAGAACATAACACACAGTGAGATCCTATACTATAG  
GCATTGTGCAGCCTCTCTGGCAGTGTTGATTTCAGTAAGGAGAACCTGAATCAGATATCTGTGAAGAACCACCTTCTGTGGCTCCTATTTATCCTCTGAAA  
GGTCTTCTCTTGACCGTATTTTTCCACGGCCATATCTGAAATAGGTTTGGCGGAGTACACCTCCTCGGGGAACATGGAATGTTATAGCCAAATCCTGTTC  
ATAGAGTTTGAAGGACTGAAAGTTGTTTTAAAGTTTAAAGTTCACAGTACAGACTTTTGCAAGCAGACTGGTGGCTCCTTTGGCAATATAATCTCTTAAAAATGTGT

TAGATTTCATGTACTTGCTTTTTATCAGTTACATGTGCCAGTATTACAATAAAAAATTTTCTTGACTTAGTTCCCAAGTTGCCTTATTTCTTTCTCT  
CCTCACCTCTGTGCCTCTCTCTCTCATTTAATAATTTAAGCTAATCTAAACAATAGACTGTGTAATAAGGTAATACTCTTAATCTGAGATTTGCTCCATC  
ATTGAATCAATTTATTTAACTTAGAAATACTAGGCCTTTTATGACTGGAGATATTTCTTTGTTTTCTTCAACTTTTTTTTTTAAGTTCTGGGATACATG  
TGCAGGATATACGGTTTGTACATAGGTAATGCATGCCATAGTGGTTTGTGTCACAGATCATCCCATCACCTAGGTATTAAGCCCAGCATCCATTAGCTAT  
TCTTCTGATGCTCTCCCTCCTCCACCAGCCACCTGACAGGCTGCAGCATTGTTGTTCCCACTGTGTGTCCATGTGTTCTCATCTTCTGCTCCCACTTA  
TAAGTGAGCACATGCAGTGTTCGGTTTTCTGCTCCTGTGTAGTTGTGTCAGGATAATGGCTTCCAATCCATCCATTTCTGAAAAGGATATGATCTCAT  
TCCTTTTTATGGCTGCATAGTATCCCATGGTATATATGTACCACATTTCTTTATCCAGTCTATCATTGATGGTTATTTAGGCTGATCCCATGTCTTCTACTA  
TTGTGAATAGTGTGCAGTGAACATATCCATGCACATATCTTTATAATACAATGATTATATTCCTTTGAGTATATACCCAGTAGTGGGATTGCTGGGTCAA  
ATGGTATCTCTGCTTCTAGATCCTTGAGGAATTGCCACACTGTCTTACAATGGTCGCATGTTAGTTTGGATTGCAATTTCTTAATGATCAGTGATGTTAA  
GCTTTTTTTCATATGTTTGTGGCCACATGAATGCTTCTTTTGAGAAGTGTCACTCCTTTCCCTTTACCCACTTTTTAATAGTGTGCTGTTTTTTTTCTT  
TTCAATTTGTTAAGTTACTTGTAGATTCTGGATATTAGATCTTTGCCAAATGGAAAGATTGCAAAAGTTTTCTTCCACTATGTAGGTTGCTGTCTCACTCT  
GATGATAGTTTATTTTGTGTGCAAAAGGCTTTAGTTTAGATCTCATTGTCAATTTTGTCTTTGTTGCAATTGCTGTGGTGTTTTCATCATGAAAATT  
TTGCCGTGCTATATCTGAATGGTATTGCTAGATTTTCTTCTAGGATTTTCATAGTTTGGGTTTTACATTTGTCTTTAAGCCATCTTGAGTTAATTTT  
TGTATATGGTGTAAGGAAGGGATCCAGTTTCAATTTCTGCATATGCTAACCAGCACTCCAGGCATCATTATTAATAGGGATTCTTTCCCACTGCTTG  
TTTTTGCTAGGTTTGTCAAAGATCAGATGGTTGTAGCTGCGTGGTCTTATTTTGTAGCTCTCTATTCTCTCTGTGTATCTATGTGTATGTTCTTATACCAG  
TATCATACTGTTTTGGTTACTGTAGCCTCACAGTATAGTTGAAGTTGGGTAGCGTGATACCTCCAGATTGTTCCCTTTGCTTAGGACTGTCTGGCTATT  
TCGCTCTTTTTTGTCTCCATATGAATTTTAAATAGCTTTTTCTAATCTGTGAAGAATGTCAATGGTAGTTAATGGGAATAGCATTGAACATATAAATT  
ACTTTGGGCAGAATGACCATTTTCATGATATTGATTTTCTATCCATGAGCATGGAATGTTTCTTCATTGTTTGCATCCTCTCTGATTCTCTGAGCAGT  
GGTTTGTAGTTCTCTTGATGATGTCTTCACTTCCCTTTGTAGCTGTATTCTAGATATTTGTCTTTTTGTAGCAGTTGTAATGCGAGTTTGTTCATA  
ATTTGGCTCTCTGCTGTCTGTTGTTGTGTATAGGAATGCTAGTGATTTTGCACATTGATTTTGTATCCTGAGACTTTGCTGAAGTTGCTTATTAGCTTA  
AGAAGCCTTTGGGCTCAGTCAATGGTGTTCCTAGATATAGGATCGTATCATCTGCCAACACAGATAGTTGACTTCCATTTGAATACACTTTATTTCCCTT  
CTCTTGCCCAATTGCTCTGGCCAAAACCTCCAATACTATGTTGAATAGGAGTGCTAAGAAAGGGCAACCTTGTCTTGTGTCACTTTGCACATTAATCTTATA  
TCCTGAGACTTTGCTGAAGTTGCTTATCAGCTTAAGATGCTTTTGGGCTAAAACAATGGGGTTTTCTAGATACAGGATCATGTCTTCTACAAAGATAATTG  
ACTTCTCTTTTCTATCTGAATACCTTTATTCGTTCCCTTGCTGATTTCCCTGGCCAGAAATTCCAATAGTATGTTGAATAGGAGTGGTGAGAAAGGG  
CATCCTTATCTGTGCTGGTGTCAAGGGGAATGCCTCCAGCTTTGCACATTCAGTATAATATTGGTTGTGGATTGTGCATAGACGGCTCTTATTATTTTG  
AGGTATGTTCTTCAATAACTAGTTTATTGAGAGTTTTAACATGAAGCGATGTGCATTTTATCAAAGGCCTTTTCTGCAACTATTGAGATAATCATGTGG  
TTTTTGTCTTTAGTTCTGTTTATGTAATGAATCATATTTATTGACTGGGCTGTATTGAACCAACTTGCAACCCAGACATGAAGCAACTTGATCGTGGTGG  
ATAAGATTTTTTTGTGCTGCTGGATTCCGGTTTGCCAATATTTAATTGAAGATTTTGCATCGATGTTCAAGAATATTGGCCTGAAGTTTCTTATTTT  
TGTTGCATCTCTTTCAGGTTTTGGTATCAGGATGATTTTGTGCTCATAGAGTAAGTTAGGGAGGAGTCTTTCCTTTTCAATTTTTTGAATAGTTTCAGTAG  
AAATGGTACCAGCTCTCTTTGTACCTCTGGTAGGATTCAGGTGTTAATACCATCTTGCTTGGTAGGCTATTTTACTGCTCAATTTCAAGAACTCATTAT  
TGGTCTATTTAGAGATTCAGTTTCTTCTCGTTTCAGTCTCGGGAGGGTGAAGGTGTCCAGGAATTTGTCTATTTCTTCTGGATTTTCTAGTTTATGTGCATA  
GAGGTGTTTATAGTATTCTGAATGTTTGTGATTTCTCTGGGGTCACTGGTGATTTCCCTTATTTATTTCTGATTGTGTCTATTTGATTCTTCTTTCT  
TTTTCTTCTTTACTAGCTAGCTAGCTAGCTATTTATCTAAAAAATGGCTACTGGATTTATTGATTTTTTGAAGGATTTTCATGTCTCTATCTTCTTCAA  
TTTATCTTGATCTTGGTTATTTCTTGTCTTCTGCTAGCTTTGGGGTTTATTGCTCTTGATATTTTCAATCTTATCTTTTACTATTTGGGACCTACAAG  
TAGTCGGCTTTTTCAATGTTAGGGATCCTTATTTAATGCCTAATCTTTGCTTGACAACCAATTTCTACCTGAGCTCATGTCTTTTTGTAAAACCTG  
CTCAAGCAGCAAGAGTGAGCCATTCATACTATCACTCCAGTTCTTTCAAACCACCACATGTAGTGCTACTGGCTGGGTGGATATCTGATCTCCTTTGCAAA  
TTGTACCAATAAATTTGCCAATTCACAATTTAAAAACGGTCTCCATCTTTCCAGCCCCCAATAGGCAGTTTCTCACCACCTGACTGCTAAGACAATTTCCA  
TATTTTAACTGTGGCAGCTGCCTACTTCAAGGTGTCAATTTTATATAGGCTAGGCATCACTAAGCCATCACCATAACACATCAAATACCAGTAGGCCA  
AAACAATAGTTAATTTCTGACTCACATGAAATTTAATTCAGAGGGAAGAGGTGGGATGGGTGAGTGAGTTAGAGGAATTTAGGTGTTATACAGCTATTTA  
GTGATTCCAAATGTTTCTACCGTATGGCCACACCCTCTTCTAAGTTTACAGATGCTTCTTCAATTCATCTGCAGATTGAGAAAAGACATTACACTGGAGAT  
TTTTAGGGGCCAGTCATAAGTGCAATTCACATGTACTTCTGTTTCTACTTATCTGTGGGGAGGCTGGGAAATATAGTTTAGCTCGATACCTTGAGGAAGAA  
AAGTGAATTTGGTGAGTGGCTTGCCAGTCTTTGCCACAGTATTTCACAAAGCATGTAATCTGTCTCCCTAAAACTAGTCTATTTAATTATCATTTGTAC  
CACTCTATTATAGATAGATACTGAAAGATCCAAAATTTTGAATATGGCCAGTACATATAACAGAGAACAAGCATAAAGCAATGACTTTTGTGCAGTA  
GTTTATCTGGGAGCATGTAAAGGAGATGGGGTGTCAAGAGTCAGTAAAAAGATGCAATACTGAGTTGTTTTCTAATTCAGGTAAGTGAAGTTTCTTCTT  
TGGGGACCTTCTAAGATGCTTTGTGAAATACATCACTGAACTTTATTCATAGGAGAAGAAAGGGGAAATCATTGACCTTTGGATCCTGTCCCTCACTGATT  
TGGGGTGACCCCACTAGCCTTGATTCCCTCAAACTCGCATACAGTGATGCATGAGTGTGAGTGGGTCCCACTTTCTGTCTTCACTGTCAGAAAAGTAC  
TGGGAAAAGAAAAATGAAAAGCATGGTACAATGTCCAAGATGAAGCACTCTTAGGTTGCAGCTGCATAAAAAAAGATTAGGCATCTATGAAGAATTTTGAT  
GGTGGGAAGGAAGGCAATTCATATCCAAAGTAAGTATAAATCTAGTTGGAAGCATCACTACCTCTTCAAGTAGAAAGGTTACGGTATTATAAATCTG  
CCATCAACCTGTCTAAAATAAGATCTTGGTATAGGTATCAGTTGTTGTGGAAGGTTTGCCATTGAGCATTGGTAGAACCTAACT  
GATCAGCCTTATGGAGAGGAAATCCATTCTGTGTCAGGCCATGCATAGCTGCCATCTTGCCACCATAGCTACATTCTTCAAGCTCACTGCAAACTATGGTC  
ATGGAGGGTCTTCTCTGTGGTAGATACTCTGTGCTGGCAAAAATCTGAGACAGAAAAATTTGCCACGCTTGCCACTACCATGGGTACTTCCACAAGTCTT

TTTCCCTCATTCCCTTTTCTACAGTCTTCCAAGTCTGCTGTTTTTTTAAATCCCTTTGACCAAGCAATTTACCACTGACCATGAGTCTTACTTCTAGCCACT  
 TGTCTTTCCATACAAAGTGAACAGTCAAGAGTACTGCTCATGTTCTGCCTCTGGGAAGGATTTCCCTTTTACCCTGGCTTCTAGAGCCACCTCTGTGAGTGT  
 TTGTAGTCATCTGTGCATGGACAGTAAACACTGATATACTGGGTTCGCTTTCTGGGAATCATTTACTTAACAGATCCGATAATATCCAATAGGTGCTAAAT  
 TTCAAATGGCAAGGAGTATTCTACTGCAGATGGAATGGTTTTGCTTCAGAGCCCAAGGTGCTGTGTTGTAATCTCCTATTAAGTTCTTGCCAGAGACTCC  
 ATATACCAACCTGAGAGCTTGAATGAGATTAAAGTGATAAAAGTACTATTAAATAGCAAATATTGTGTATATGTTACACACTGTGCCTTTATTTTTATATTT  
 TTAACTTTTATTTTAGGTTTGGGGGTACATGTGAAGGTTTGTACGTAGGTAACATGTGTCATGGGGATTGTTGTACATATTATTTTCATCACCAGGTAT  
 TAAGCCAGTACCAAGAGTTATCTTTTCTGCTCCTCTCCCTCCTCCTCCCCATCAGGGAGACCCAGTGTCTGTTGTTTCTCTTTAACACTCTG  
 CCTTTAAACCATATTATGTTGATTGGATTAGAATTGAACCATTAGGCTTCTTTATTTGATGCCTTACAAAGACTATAGTGAATACTGCTACACATTTTTC  
 AGAATTTATTTTTATGTTTGTCTTTTCCCCAAATTTATATATTTTTTAAATGATATAAAAAATTATATGATTTACCATATGCAAGATGATGTTTGTAAA  
 TACACACACACACACACACAACTGTGGAATGGTTAAATCTAGCTAATTTACACACACATAACCTCACATAGTTATCATTTTTGTGGTGAGAACCTT  
 TGCATTCACCTCTCTCAGCATTTTCAAGAATGTAATATATCATCATTAACATATAGTCACCATGTTGTACAATACATCTCCTGAATTTTTCTCTCTATCTAA  
 CTGTAGTTATGCATCCTTTGACCAATATCTCCCAACAACCTTGCTTTTAATAATCATCCCTCTATTCTCTGTATCTATGAGATCAACATTTTTAGATTCC  
 GCATACAAGTGAGATCATGTGGTATTGTCTCTCTGTGCCTGGCATTTCGTTTCAGCACAATGTTATACAGTTTCATCCATGTTGTTGCAAAATAAAAAAT  
 TCATTTTTTCCATGGTTGAATAGTATGTCATTGTGTATGTATATCACATTTTCTTAGGTTGATTCCATATCTTGGCTGTTGTGAACAGTGTGCAATAAAC  
 ATGGAATGCAGATATATCTTCAGCACACTAATTTCACTTCTCTTGGATGTATGCCAGCAATGGGATTGCTAGGTCATTGTTGTTAGTTCTAGTTTAAATTTT  
 AGAGGAACTTCATACTGTTTTCCATAATGGCTGCCCTAATTTATTTCCACCAACAGTGTGCTAGGGGTTCTATATTAAGGTTTTACTAAAGCCAGCTGGT  
 TCCCCAACTCTATTAGTAACAATCTTCCACTATTAATGAAGAAACATGGTCAAAAGACAGCCCAAACTATTGAGGAGTATTACTGGACATTAATTTTT  
 GGTTCCTAAATCTGGCTAATCCTCAGAAATATATACAGAGTGTGTTGAAATATAGGTATTTAGCCCTAACCCAGTAATTTCTAATTCAGTAGGCTGGGAT  
 AGAGTTCAGCAACATGTATTTAAAAAGTTATCCAGGTGGTTTTGATTTTCAAGCAAGTCTGGGAACCACTTCTCTAATCCACATTTGGGAAAACCCAGTCAC  
 CAGCCATAGGTCCAGATCCTCTTTTCACTTACACCTCTCAGGGAATAAGAAAAGTCTGTGCTCAGAAGGGAAAGACCAATAAGACTAATACCATGCAGCTC  
 CCAAGGTGGCTGCTTCACTCCAGTGCCCAAAACAATGTTGGTACACATTAGCCACTCAATAAGTAGTGAATGAATGAATGAGTAAATGAATGAAAGTCAA  
 CCATAGTTCTATGTCAGCACTGTTCTTGAATTCATAGCTTTTCTTGCTTTATTGGAAGTATCCTAATACTGCTTCTCTATTTAGAGCCTCAATTTCTTTAT  
 GTTCCACTCAAGCTGGAATTTTAATTCAAATATTGAGCAAAAGAATCAGGAATTAACAAGACCAGGCTGCTACTGCTCACTTTAATAAAAAACATTTCAA  
 GCTCCTGTATTTTCCAACACTTTTCTTTTTATAGATCTGCTCTCAAAAGTTTGAGTAGTAGGAAATAATTTTACAGTTGATCCTTCAGTGGTGTATCA  
 TTGCAAAATAAGCAATTGATCCTAACACATTTTGTCTTAAATGTGTGCTTCTTAAATGACTGATATGGTTAGCCCTATCTGTGAATGACAGAAGATTGT  
 TCCCACTGATTTCCAGAACCAGCTGGCTTTTGTGAAATATTAACATAAAACCTCCTCAAAATGTATATAGTCTTTTTCAAGAAGCTTTAGAAAAGAGCCTT  
 TCCGTACCTGTTTCTACCATTTCACTTTTATAGCCATACTTCTCACCATCTGTCTATCGATCCCTCATGTTAGATGTCAAGATGCTAGTAAGATTGG  
 TTTATTCATCTTACTGTCTGCATTCAATGGATAGATGATTATTTGGCTGCATTTTCATCCTGCCTTACAACATTTTCATCTGTCTACTCCAGTGAAGGTCT  
 GGGTTTTAAAAATAACATTCCATTAGCGAGCATTTTTATAGAAAGTACTTTGAATACACTCATTTATATATGGAGGTGCATGATACATAGTCTTACATTTTTT  
 TCCTTAAGTACATAAAATTTTAACTTAATTTTACCAAAATAATGCAAGAGTGTGTAATGACTTAATAAAAGGTTGCAACTCACTTTTGTAAATTACATGT  
 TATAATTTTTACTATTATCTGATCACTGACTGTCTGAAGAAAGATTACAGACTATAAATAAAACACTGAGCTAAGTGAATTGTGAAAGACATTTCCCTGCA  
 AAACTCCTCTCTCTCTCTTTCTTTCCCTGTCTTATGCACACAGATATACATACCGTATACATAAATGCACATACATCACCTTCTAGTATAGCCAATTC  
 AAATAAATTAGTATTTTCAAGGAGCTTTATGTTAAGTTTGGCTTTAAATAAATCACTTCATCTAGCCAAAACCACTGACTTTTTCTTGGTTTCTACACAAAAC  
 TCTAATTCAGTCTAGTTTCCCTTCAAATTCAGTCCAGGTGCTAAAAAGCTTCTTGGTTTTCCAAGGAACATTCAACAGAATTTCTCTACTCTGTATTCTATA  
 TTTATATCATAGCCTCTAAACAGTCCAGTATTGTTGTTTCTGGATTAATGTTTCCATGGTGAATTTGTAGTCCATTGGATTCTAGACATTCACCTTAT  
 AAATGTTTGTGTTTTCTCTTAGAAAATAAGTATTATCTTAAAGGATCTGTGTTTTTATTATTTGCATTGTTTTGAATTCGTAGAGAACAGGCATATGTGT  
 TTTAAGTTAGCAATAAAGAGAATAATAACAAATAAACTGTTTCTTTAAATTAATTTAAATACCATCCAATGTAAAAATGTTGATTATAATAAACTCTACA  
 ACTTTTAGGTTTTATGCTATTTAATATATACACTTAGAATTTAGATATTTCTTGGGTTGGGTCCTCAGGAAAAAGTCAGTGTATTTAACCATTATTAGCT  
 TTCAAATTTAAAAATATAATAGTGCCCTTCTTCCACTCTCTCTCAGCCTGACTCTTACATTTTGTATTAATAAACAATAATCAGCAACAATGACTCTAG  
 AAGTCAAATTCGTGCTTGGAAATGTAAATAGACCTTATTACAGAGCACAGCCATAGAGAGGCAACATAGCACCAATGTGTCTGGGTTCAAATAATTTTTCC  
 ATCATTTACAAGATAAGTAACCATAACAAGTTACTTCTCTCACTTTCCCTCAATTTCCAGTCTGTGAAATGAAAAACACAATAAACATTTCTAACTAAGAA  
 TGTTGGTACAAAAATTATATCAGTAAAGAAATATCTGAAACATAGTAAACTCAGTAAATACTACTTTTTATCACAGATTTTGGGGGTTTGAATAATCAGG  
 CAAATCAATACTTTTTGAATAATTATGATGTTAAACATGTAATATGGGTAGAAAAATTTCTGGAAGATCTAAGGCATATTTCTTAGAATAAGTGACTTCTTA  
 AGTATGGTGTATCTTTGAATAATTTTAGGGTAGATAATCAACTGGGGCTATTAGTTGCAAACTTCATTGTTCTAAGAATCATAGGTTTCCAGTTAAAAAT  
 CCAGATTCTGATTCAATAGGTCTGGGGTAGGGCCTGAGATATGCATTTCTACAAGCAACTAGGTGAGGCTGATGCTGTGTTGTTAAGGATCACATTTTAAAT  
 AGCAATTACCTCTAAGGATCACATTTTAAATAGCAATTACCTCAACAATTTCTTGAGGACATTTTAAAGAGACATGAATTTACTATCCAATCTCATATACAA  
 TTATGCACTGCATAATGATGTTTCTGTCAAAGTCAGACTGCATAATGATGGTGGTCCATAAAAAATTATAACATCGTATTTTTACTGTGTTATACTTTGTAT  
 ACTGTGTTTTACCTTCTCTATGTTTAGGTACACAAATACCATTGTGTTACACGTTGACTACAGTATTCAGTATTCAGTAACATGCTGTACGGGTTGTAGCC  
 TAGGAGCAACAGGCTAGACCATATAGCCTAGATCTGTAGTAGGCTATACCACCTAAGTTTGTGTACATTTCTGTATTTGCAACAACAAATCTCCTAATGA  
 TGCATTTCTCAGAATGTATCTGGTCTGATCATTAAGCTACACATGATTGTACATACCTTCCTGCCGTCTACTGGGAAATAGACTAACCTGATTGACATGA  
 TGCACTTCTAATCCAATGGGCTGAAAACCTGGGGCATTACATTTAGGACAAGTCCCAGGTGATGCTGAAATGCTGTGTCAGGTACCACACTCCATGAA



TTTCTCTTTTTCATTTCCAAAATCATGAGTTTTCCTTTCTACCAATGGTCTACATCCTGACTGTATAGATATATGCTTTACATGTTTTGTGTTTATTATT  
TTAAAAATTTTATGTTAAGTTCAGGGGTACATGTGCAGATTGTTATACAGGTAGACTTATGTGCATGGGGGTTTGTATACAGATTATTTTCATCACCCAGGT  
ATTAAGCCTAGTACCCATTAGTTATTTTCTGATCCTCTCTCTCTCTTTCACCTCCACTCTTCAAAAGGTCCCAGCCAGCATGTGTGTTCCCTCTATGTG  
TCTGACCATATATTGAAAGGGTATAGAAAAGTATTTGAAATTATGAAAGCCTAGTACTTATCTCTACTTTTCCCTTGCCCTATTAAATCAAAACGTACAGCA  
ATAGAACCCAGAAATCTCTCATTGTCTCATAGGTAATACTAATGTGTAACCACTAGCAAAACATAATTTCTTACTTTAAAAAAAATAGCTCCTGTTGTATGT  
TTACCTCTGCAAGTTACCTTACATGCCTTGCCCTCATTTAATCCTCACAAAAAACAGTAAATATTATTATCCTAAAAATTTCTAGGATAGAAAACCTGGAGC  
ATCAATGAGTCAGAAAAAGAAGGAAAAACAAAAGTACAAATTTTAGAGCAAGGTCTTCAATCCATGATTGGAAGTCAAAGGCTGACCCCTTTCTACTATGC  
TACACTACTCCTCACTCCACTCTATTATCTATGTTTACTAGTATTTTTATTTCTAATTCTCATTATGTTTGTGTATATGTAAAGTGACAAATCAGCTG  
GAAAAATCCACATTTACAAAAGGTGCTAATACCTCATATGGTAATGCAGTACTGTAAGATGTTTATGAATAAAAGGAATGTGGCCCTGACTGACGTGGAATAA  
TTAAATCTCAGTAGAGATAATGATGCTGCATCCCATACTTACTTTTGAGAATATGGTGGACTTTAAATAAAGTGTGCTGATAATAAATAGGAGTACTG  
CAATTAATGCATACCTCACTGCCTAAGGTTTCCCAAAAGAGAAGGGAAGCCTTCTCTATTTCAGGTGGGAATGTTCTTCAACGCTCTCTGACCTTTCTC  
CAGTTTCTCTCTTTCTACCTTTCTTTAAACCTTTTCACTTTTCTCTCTTTTCACTGCAAGTCTATTGACAGGTAAAGTGAAGAAGAGAAAAAGAAAA  
GCTAGTATTTATTAAGCACCTGCAATCTGTCAAAAATTTTCATTAGTGGTATATTATAACCCCTGAATTAGCTTTTGTCTATGTTATACACTAACATGCAA  
TTGTCAAATTCAGTGGCATACAAAAACAAAGATTGATTCTAGGTGATGCCACATGTAGGCAGCTGGGTCTGCTTCCCATTTCTAGACTCAGGCTGAAGG  
CACAGTTGCCATTGGGAACATGCCATTTTATGGAAGATAAAAAACAGCAACAAGATCACTCTTAAATATCTGCATGAATATAATATATGTCCTTTCTTT  
CTTACATTTTTCAGAAATGCAAGTCAAAGTGAGCCCAATATCAGTGGAGTAGTAAATATTGACCTCCCATAGAAAAGTAGTGTCTAGGCCAGGCGTGGTGGC  
TCACACCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGACCAAGGCGGGCGGATCACGAGGTGAGCAGTTTGAAGCAGCCTGACCAACATGGTGAACCCCGTCTCTACT  
AAAAATACAAAAATCAGCCAGGATGGTGGCGAGCGCTGTAATCCAGCTACTCAGGAGGTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCTGGGAGGCAGAGATTG  
CAGTGAGCCAAGATCGCGCCATTGCACTCCAGCCTCGGCGACAGAGCGAGACTCCATCTCACACACATACACACACACACACACACACACACACACAC  
ACACAAGTAGTGGTCTAACTCACAGGCATTGGATGGTGCATGCATATATTTTACAGCAAAATAGAAGTGAATCTTTATAAAAAAATATAATCTATCGCAA  
TACCTTTTATATAGGGGAAACATGAGGCTCAGAGGTTAAATTAACGTGCAAGAGTAGTGCATCTAGTGGACGACTCATTTAAGATTGTAGTCAAGTTT  
TTCTAATTCTACAGCCACTGTTCTTGATTGTCATAGCCAAGTTGAAGAGAGGGGAGACAGACTAGTCTCTCTCTTCTATTATTTTAAATCTTTCATTCCA  
AATATTTTCTAAACATCAGCTACCTTAAGGATCTAGGAATAATCTTTGATTAAATCCTCTTCATTTTTTCATATTAATAAAACCTACATTGTCTAATG  
CTTAATAATGATACAATTTTGTAGCACTTAACTTGTGCCAAACACTATTTCAAACCTCTCTTACATACTGTTTTATTTAATTTTGAACCATAGTTTGTG  
GTAGGCATCATATCACTTTAAAGACAAAGGGCTACACATAGTGCTCATCCATGTAATCCTAGAGCTTTGGGAGGCCAAGGTAAGAGGATTGCTTGAGGCCG  
GGAGTTTGAAGCCAGCCTGGGCAATAATAGCAAGGCCTTGTCTCTAGAAAAATAAAAAATAGTAGGGCATGGTGACATGCCCTGTAGTCTAGCTACTCA  
GGAGGCTGAGACAGGAGGATTGCTTGAGCCAGGAGTTCAAAGTTGCAAGTGAAGTATGATTGTGTAACTGGGCAACAAAGCAAGAAGCTTATCTCAATAAAA  
AAGGATAAAAAACATTGAGGAAAAATCTCAATAACTTGCCATAAATGACTGACTGGGAGTGAAGTAGAGCTGGTTTTTAATCCATATCTGATGTTAACACTT  
GTGCTCTATGCTCTGCATCATTCTGCTTTCTAATGAAATCTCTGTTTTAAATATATCCTACACTTCTCTCTCTCGTCTCCAGCTTCTATTGCCTATGTT  
TAGTTTTATCTTGTTAAGCCTAAATTTCTGCTGTGCTTTCTAGTTAGATTCACTCATGAAACCAACCTATATACCAAGACTAGACTAATCTTAAACTC  
TGCCTTGATCACTTTTGTGTGAGAAGACATTCTGCTCTCCCTTCTCTCTACTTTTCATCCTTCCCTCATATAAACTCCTTCATCTGATTTCAGGACAC  
CCAGAGTGCAAAATATTCTTATTTCCCACTAGTCTCAAAGTGTAACATTTACCTGGTTGTCCTTATTGATTCAACCTTGCTTTATTTACATTTTCCCT  
TACTGAAAATAGATCAAGAACCTTACGGGAGCAAGGTCATGCATCATTTTATGAATATCTCTCCATATTGATTGTCAATTATGCTAGCTTTGAAGTAGGAAG  
TAATTAATTACATAGGTAACCTTTACTTGGGTCCAAATATGGTGCTTTTTCATCACATTGTTATGTGGACATTTACAGGTAACCTAGGAATAAATGATCCATGA  
ATTCAATTTCTGGTTCTGCTGTAATGGGTCTCCTGAATAGACAGCAGATTCTAAATCTCCATATCTCATGGGACATGTTGGGAAATTGAAGAATGCCAGAT  
TAACTGGCAGCAAAAGTGGGATTGATGTTGCATCACATCGCCCTCTCTAAGCAACAATAAGAATAGCACTTGAAGGTGAGGCATCTTTCAAACCTCAGGGT  
GAAAAGTTTGCTTGAACACATGGACAAATAGAGGGGAACAACACTTGGGGGCTGCTAGAGGTGAGGGTGGGAGGAGGAGGATTAAAAAATAAC  
TAATGGATACTAGGTTTAATACCTGGGCGATAAAATAATTTGCACAACAACCTCCATGACACAAGTTCACTATGTAACAAACCTACACATGTACCCTTGA  
ACTTAAAAATTAACAAAATAGAATAACATAATATAAAATAAATAACTGAAAAAGAAAAAGGAAAGAAAAATTTGCTTGGCTCCCAGAAAAACATATGAAG  
AGAAATGTGCTACATAGCGTTTGCATATACGTGTGTCTAGTAGAGGTAAGGATTATAAATTAGTACTTACATTTATCAACACACAATGTTTTCTAGTGTGGT  
GTTCTCTGCTTCCATTGACTAAGCAAAAAATAAGATCCTCAATGAACATCTTATGCCTGCACACATTTTATAAATCCTTGCCATTTAATCACATATATCC  
ATGTTTTCCAATTTGTTTTCTGATTCTAAATATATCCCTGGAGAAAGTAAATTTAGGTAATGTATGCCACTATATTATGTCAAAAAAATGAAAAATTA  
CTTGCAACTAAAAATGCATATATTACATCTAACCCTAAATTTTCTAAAGTCATTTACTTATGGGATCTTTTGTGTCCTAACCCATAAAAGTATTCTGTAGAA  
CCAGTGTTTTATGGAACATAATTTCAAAAACTCTGCCTCTTCTAAAAAGACGTTGAATTTACTGTGTCCCTTGAAAAATAGAGAATGACAGATGGTTCTAC  
TTGAGTAAAAATGGCTGAGAAAACTTTTCCAGAGGTGGTCTTTAGGCAGACACCTGAAGAAAGAGAAGGAGTCTGTCTAGGAAGAGGCAATAGCAAGGG  
TTGAGTGCTCCAGCAGTAAAGAAAAATGTTAATGTGTTTGGCAAACTAAAAGGAAGTAAAGAGAAAGAGGAAGGAAGGAAAGGCAAGGGGGAGGAAAGA  
AGCCTCTGGTGGCTGGAATGAAATGGGCAAGACGAGATTAAATATACCAAGAGATTGCTAGAGTTTAGATCATGTGGGACTTCTAGACATGATAGAGG  
CTTTAGGATTTCAATTAAGTTCAAGTGAAGGCTATTAAAGATTGAAGTAGGGGAAATTAATGATTTTCAATTTGGATGTTTAAATAGATAATCCTGATTGCTT  
TCCTGTAGTCAGGCAGAAAGTAAAAACAGGAAAAAGTTGAGATTACTGGGGTATTTTATGAAGCACCTATGCTGGAATATGATGATCACTTTAGCTAGTT  
CAGTGCAGTTTGCAATGAGGAAGAATAAAGATACCTATTATGTAAAAATCAACAAGCAAACTGGCTAATGGGATATACGATTGAAAGAAGGGAAAAATCT  
AGGATAATTTCCAGATTACCTGAATAATATAGATGGCCATTTCATTTACTGAGATGAGAAACACAGTGAGAGAAGTAAGTATAGTAAGAGGAAACCTACAT

TTAGTTTAGAACTTGTTAAATATGAGATGGTTATAAGATATGCAAGCAAAAATATCAAGAAGGTAGCTTGAATGAATCTGTAGTTTACTTAAATCATTGG  
 AAAACTGAGATCACTCAGTAAGATTATTAGGTTTCTTCTTACTTAAAGGGAGGGGCAGGACTGAATCTTATTAAGGGAAGGGCCAGGACTGAATCCAGCC  
 TTTAGAAGTTGAAGACAGCAGAAGAAGCCAGTGAAGAAGAATATTTGAAATGACCAAGTAGGCCTTAGCTGATCTTGAATAATAATTTTCAGTGGACTAGTG  
 AAGCAAAACCTGTTTGGAAATGTAAAGTGAATGGGTTGAGGATCAGAGACAATTATCAAGACAATTTTCAAGACATTTGGCTATTGAAGGATAGTCAG  
 AAAAGGTGGAAGGTAGTTGTATATTGACAGTTTAAATGCAGTAGTGTGGGATCTTTTCAAGATGGCTTGAATAATGACTAATGAGAAAAGGAGGAGAAGTAG  
 AGGTAACAAAATGGTTCCTGAGTCGTCAGCTTTTAAAGTGGTCTTTGGGTAATGACTGCAAGACATCAAAATCTGGTGTATTTTCACACCACATTCAACAATA  
 CTGAAAAATTACAGTGGATCACTTTTTAAAAAATCTCCACTGTCTATTAATAGTAAATGCTCACTAAATACTTTTGGAGAAAGATAGGAATGAGAGAAGG  
 AGGAGAAGGAGGAGAGAAAAGAAAAATGAGAAAAGGAGCCAAAAAGAAATCCCATATTTTATCCTGTGTTTCCCTTCTACTCTCACTACAATTGTGCATTCTT  
 TCTGATGGAGGTTCCCCATTTTCACTAAGTACATATAAACTTTTCTGGATTGTCTCATCTATTGCAATGACTGTGAACACTCTCCAAAAGAGTGTCTC  
 TTTCTTTTATTTTCTTAACTCTCCCTGTGTTTCAATCAGCCTATGAAAAAATATATATATATATATATAGCCAGCTAGGTAATTTT  
 TACACATTTTCCAAAGGTTAGCCATAAGTGAGTTATTCAATGTCAAATGAAGACATCAAAACCTGTCTGGACAATCAGTGGTAATGTCAATTATATATTTT  
 TCATTGAAAGTATTCATACACTGAAACCTCCACATATGAAATATAAGTCTTGAAATTTATAAATTATAGTACAACTATTTTCATTATCTTTCATTGTGTC  
 TTATTTATTACAACTTGCTAGTGTGTGAATATAATTCAAGGTAATAATTTACTGTTCAATTTTGTGAACCTATTTTTCATGAACTCATTCTAG  
 ATACAGGCATTTTTCCTCCAACTGACTCTTCTAAATGTGCTTTAATTAAATGAAATGAAGGTTTATAAATTTGCAGTTTGTGATATGTTAAATCCCTG  
 TTTCAAATTATATCTCAAGTATTCTGACATTTATTTCTAAATCATTACTTTGCTCTGATCAACCATAACTTTTACAATGCATTACTGTTTCATGTGAATT  
 ATATAAGCAGAGTTTCAGTCCCATGAACTCTCAACTACTGTTGCACAAGGATTTTGGAAAAAAGAAAAAGAAACAGTAATGCTCACCTCTCC  
 ATAGCTCATTGGGAGAAATATTACCTAAATTTGTCTCAATGCAAGATTGAAATTAATCTTGATTTCCTCATCAAGGATTTTACAATATAGTTC  
 ATAATCGTGTTAATTTCTCCAGGTTACAAGTTAAGATAAACAAGTCACTGACAGTGTATCTATAAATAGAGCAGATGGTCTGGGCTGAGGTTAGTTAT  
 CAACTTTTCTGACTTTAATTTTCATGTTTATAAACGCTGTAAACCTCACTGTTTATAAAGGCAGGGAAGGAACTCCAGTGGGCTCAGTAGCCAGAAACC  
 CTCAGTAACATTAATCTTTCTAAGTATTCGGTATCCTCCTAGGGTGCAATTTTAAGATTGTGGAGTGATTGCTAGACAAATTTAAATTTTCTAGGGA  
 TAATTAGCTAACATTTCTGTCACTGATCTATTATAACGTTGTTAATGAGTCCATGTGAGAGAAATTTAGTAAATGAGATGATTCTTTCTAACTCTGCTAG  
 GTGAGTGTATAACAATTAAGGCAGTTACATATCTAAAAAAGCCTTTTTCTTTTCAAAATAATACCTTTTTCTTCTGCAAGATGAACTGTAATACCCAACT  
 AGACTAAATGTACTTAGGGATAGAATTTTATAAGGAAAAACCATAGCATCTTAAATAATTAATAATCATCTAATGTATATTGTATATACTTAGGCCATGA  
 ATCCAGCTACAGCTTTTTTTTAAAAAGGCCATAGAATCTAAAAAGAAGTAAACTATTGATTCTTCATATTCTGAATTGATTAAATACACAATTTTATTG  
 TGATCATTTATTTTGCTAAAGGTCTGTATGATCAATGTGATTAAAAATTAATTTTTTCAAGGACCCCTTATTAAGGAGTATTATTTAAATTTCTCATT  
 TTTCCCTTGCAACTTTATAGTGAATATAAAAGTAATTTTACAATCACAAAAGTAAAAATAATTCACAAGTTCTACCTCTATTACTTTTACATCTTAAGT  
 GGTATTTTGTGATTCTAACAGGGGGAAGCTTTTTTTTTTTTTTCTGGAGTCAGAGTCTTGGTGTTCACCCAGGCTGGAGTGTAGTGGCTGTATCA  
 CAGCTACGTCAATCTGGAATGCCTGGGCTCAAGTGATCCTCACACCTCAGCCTCCAGAGAAGTTTGGACTACAGGTGTGACACCACCATGCCAGCTAATCTT  
 TAACTTTTTAGAGATGGGCTCTGCTATGTGGCCAGGCTGGCTTCAAACCTCTGGGCTCAAGTGATCTTCCCACTTAGCCTTCCAAAGTGCTGGTTTTA  
 CAGGCATCAGCCACATTGGAGGTTTCTTAAATAGATGGTAATCCAATATGCAAAATGGAGACTAAACTATTTTAAAAAATGCCGCCGGCGCGGTGGCT  
 CACGCCTGTAAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTGATCATGAGGTGAGGATCGAGACCATCCTGGCTAACAAAGGTGAAACCCCGTCTCTACTA  
 AAAATACAAAAATTAGCCGGCGCAGTGGCGGGCGCTGTAGTCCAGCTACTCGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCGTGAACCCGGGAAGCGGAGCTTG  
 CAGTGAGCCGAGATTGCGCCACTGCAGTCCGAGTCCGGCTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGCCTTAAC  
 TGTATTGTAGTTCAGACTCCCTGAGAATGAGTTTCTAATGACAAAATCCTCACTTTTCTAGTCTGTGTGGGCTGTGCTTTCTGACCCACTCTGGGAGG  
 TTTACTACTGGTCTGAACTCCAATCTATCTCTACTGATTATTGTTAACACAGTGCTCAAATCTTGGCTCCAATAAGCTGTCTTCTGAATAGCAGCAGC  
 CCTAGGTGGAGAGATACTGAATGGAACATTGCTAATAAAGTCATGTACCTCGTAAGGACATTCTGGTCAATGACAGACAGACAGACTATACATCAGTGGT  
 CCCATAAGATTATAATACCGTATTTTTATAGTATCTTTCTATGTTTATATGCTTAAATATGCAATATTTACCATTGCATTAAAGTTGCCTAAAGTATTT  
 AGTACAATAGCACACACTGTGCATGTTGTAACTAAAAACAAAGGCTATATTATATAGCCTAGGCATGTGGTAGGCTATACCACCCAGGTTGGTGAAGTA  
 CACTCTATGATGTTACACAAGCACAAAATCGACTAAGCATGCATTTTTCAGTGCATATCCCATCATTAAGCAATGCATGACTGTAGATTTTCTTATCTCC  
 CTTCCTGCTCAGAGTCTGTGTCACTAGTTTTCATCGGATGTAATATCCCACTGTTTGATACATTCATTTTGTAAACAAGTGTCTACTCATAGTTAGTGTG  
 AGGTCTCAAAAATGCAGGAAGCATCTATAACAGAAGACCGCAACCTCTCTAAATGGGAGCTTTATCTCATTTTCTTACTGCCTCAAAACCAGCTTTCATT  
 ACATAAATGGTTACTAACTATTGGTATGTTTGACATTCATATTGTGTACAATTACTCAAACTCGGAGTGATTTCATTAAAGTTATTGATAAAAAATC  
 ACCTAAAAGAGATCTATCAGTTAATTGTAACAATTGCATCTTTCTGTTGTTAAAGTAGAAAAGCCAGAGAAAAGATTGTCCTCACAGGGAAGATTGTTTT  
 TATGAACTGGTCACTCTAAAGCATGATTCTTAAATTTGTGAGCTATTGGAACTGGTGGGAATGTATTTCTCAGAAACATGGCCAAGAAGACTAGCACCTCA  
 GAATGGCCAGGAATAGCTCTGAAGGGAGGCAAAAATAGGTAACAGGAGAACTGAAGTTTAGCTAATAGAGAGAAAAAGAGAACAAAGGAAAAAGCAAAA  
 CTAGGTATCCAGTATCTGAGTGCAGAGGTACATTAATAAATCACTTTTGTAAAGAAAGGATCTTTTCAATATCCCAAGATGGCTAAAGTAACCATCT  
 TTTATTTTCTGTCTGTATATAAGATACAATGATTATGTTATAAATATAATCATTGTACTAATCTTGGTTTGCAAAAAATAAAGCTTATACCGGAAA  
 TTACCTGATTAAAAGGGGAAAAACAGGCTGTAAAAATTTAAGAAAATGTTCTAGTTTATTCAAATCTATCAGATTAAAAATAATGTAATGGAATAAATT  
 GCTGCCTTAAAGATAAGCAAAATTGTAATCCATAAAATTAATAATAGTATGATATGTAACATAATCTCATTTTATGATTTTCTTTCAGATTATCCAACCC  
 TGTCTAATGTCAAAGGATGGCATTGTATACAAGAAAACATGCAACAAAATCACTTTAACTGGATTTCATTCCCTTCAATGGTCAGTTAAAAATCAATC  
 CTCTATAATATTTATATTATTTATTTCTCTAAAAATCCAGTGACTATTATTCTTAATCTTTTTCTTTTCTAGGAGAAGTAATCTATGTGCCATGTGCA

[illegible]

CAACACCCTATTCCATCTGTCATCGAGAAAGAAAATGTTAAATAGACTTAAAAATATTGCTTTGTTACATATAATAATATGGCATGATGATGTTATTTTTT  
TCTTAATACTCAAGAAAAATATATGGTGGTATCTTTTACAACACTGGAACAGAAATAAAGTTTCCCTTGAAGGC

## 표 1

[0178]

GFRAL 유전자 타겟 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열

| 서열번호 | 타겟 서열 (5' to 3')       | 서열번호 | 안티센스 서열 (5' to 3')     |
|------|------------------------|------|------------------------|
| 3    | UGUAGGGGAUGUGGUCUGUA   | 19   | TACAGACCACATCCCCTACA   |
| 4    | UGGUCUGUAAUGCACAGUUG   | 20   | CAACTGTGCATTACAGACCA   |
| 5    | GUCUGUAAUGCACAGUUGGC   | 21   | GCCAACTGTGCATTACAGAC   |
| 6    | CUUACCUUAAAGCUUGCUCU   | 22   | TGAGCAAGCTTTAAGGTAAG   |
| 7    | GGUUCUUCUAUAAAAUUAU    | 23   | ATATTTTGATAGAAGAACC    |
| 8    | GGUUCUUCUAUAAAAUUAUACC | 24   | GGTATATTTTGATAGAAGAACC |
| 9    | UUCUUCUAUAAAAUUAUACCU  | 25   | AAGGTATATTTTGATAGAAGAA |
| 10   | CCCAGAUUUGGCUUUUUGU    | 26   | ACAAAAAGCCAACATCTGGG   |
| 11   | CCAGAUUUGGCUUUUUGUG    | 27   | CACAAAAAGCCAACATCTGG   |
| 12   | CAGAUUUGGCUUUUUGUGA    | 28   | TCACAAAAAGCCAACATCTG   |
| 13   | AGAUGUUGGCUUUUUGUGAC   | 29   | GTCACAAAAAGCCAACATCT   |
| 14   | AAUGAUGAAUUAUGCAGGA    | 30   | TCCTGCATAATTCATCATTT   |
| 15   | GAAAGUGCCAUGAAGAUGAG   | 31   | CTCATCTTCATGGCACTTTC   |
| 16   | AAAGUGCCAUGAAGAUGAGA   | 32   | TCTCATCTTCATGGCACTTT   |
| 17   | AUUUCCAGCACAUAGCUUCA   | 33   | TGAAGCATGTGCTGGAATAA   |
| 18   | UUUCCAGCACAUAGCUUCAU   | 34   | ATGAAGCATGTGCTGGAATAA  |

## 표 2

[0180]

화학적 변형을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열

| 서열번호 | ASO ID | ASO 서열 (5' to 3')                   |
|------|--------|-------------------------------------|
| 19   | A422   | T*ACAG*5*6*5*6*5*8*6*6*CTAC*A       |
| 20   | A423   | C*AACT*7*8*7*6*5*8*8*5*6*5*GACC*A   |
| 21   | A424   | G*CCAA*6*8*7*8*7*6*5*8*8*5*CAGA*C   |
| 22   | A425   | T*GAGC*5*5*7*6*8*8*8*5*5*7*GTAA*G   |
| 23   | A426   | A*TAT*8*8*8*7*5*8*5*7*5*5*GAAC*C    |
| 24   | A427   | G*GTATA*8*8*8*8*7*5*8*5*7*5*AGAAC*C |
| 25   | A428   | A*AGGTA*8*5*8*8*8*7*5*8*5*GAAGA*A   |
| 26   | A429   | A*CAAA*5*5*7*6*6*5*5*6*5*8*CTGG*G   |
| 27   | A430   | C*ACAA*5*5*5*7*6*6*5*5*6*5*ICTG*G   |
| 28   | A431   | T*CACA*5*5*5*5*7*6*6*5*5*6*ATCT*G   |
| 29   | A432   | G*TCAC*5*5*5*5*5*7*6*6*5*5*CATC*T   |
| 30   | A433   | T*CCTG*6*5*8*5*5*8*8*6*5*8*CATT*T   |
| 31   | A434   | C*TCAT*6*8*8*6*5*8*7*7*6*5*CTTT*C   |
| 32   | A435   | T*CTCA*8*6*8*8*6*5*8*7*7*6*ACTT*T   |
| 33   | A436   | T*GAAG*6*5*8*7*8*7*6*8*7*7*AAAA*T   |
| 34   | A437   | A*TGAA*7*6*5*8*7*8*7*6*8*7*GAAA*A   |

A=2'MOE-A, C=2'MOE-5'-methyl-C, G=2'MOE-G, T=2'MOE-T, 5=DNA-A, 6=DNA-5'-methyl-C, 7=DNA-G, 8=DNA-T, \*=PS

[0182]

실험예 1: 1차 스크리닝

[0183]

상기 표 1에 기재된 바와 같이 GFRAL mRNA를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보물질들을 도출한 후, 이를 Chemgenes사(USA)에 의뢰하여 제조하였다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드들을 GFRAL 및 RET

cDNA가 과발현된 HEK293 세포에 리포펙타민(Invitrogen, USA) 시약을 이용하여 200nM 농도로 처리하여 형질감염시킨 후 24시간 경과 후, RNA 추출 kit(Bioneer, Korea) 및 DNA 분해 효소(NEB, USA)를 처리하여 RNA를 정제하고, RT-프리믹스(Applied Biosystems, USA)를 사용하여 역전사 반응을 수행하였다. 그 다음 qRT-PCR을 수행하여 GFRAL 유전자 발현 수준을 측정하였다. qRT-PCR에는 다음의 프라이머 및 프로브 서열이 사용되었다:

GFRAL: predesigned qPCR Assay (Hs.PT.58.21179605, IDT, USA)

GAPDH:

forward: 5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA-3' (서열번호 35)

reverse: 5'-GAGTCCTTCCACGATACCAAAG-3' (서열번호 36)

probe: 5'-AGATCATCAGCAATGCCTCCTGCA-3' (서열번호 37)

그 결과 도 1에서 확인되는 바와 같이, 1차 스크리닝을 통하여 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 GFRAL 유전자 발현이 억제되는 것을 확인하였다.

## 실험예 2: 2차 스크리닝

GFRAL 및 RET cDNA를 발현시킨 HEK293 세포주에서, 16종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 대상으로 리포펙타민(Invitrogen, USA) 시약을 이용하여 100nM의 ASO를 투여하여 GFRAL 유전자의 녹다운이 가능한지 반복 관찰하였다. 먼저 24시간 동안 ASO를 형질감염시킨 후 세포를 lysis 및 RT kit로 용해시키고 역전사 반응을 수행하였다. 그 다음 Taqman probe와 qRT-PCR 프리믹스(Applied Biosystems, USA)를 이용한 qRT-PCR을 수행하여, GFRAL 유전자 발현 수준을 측정하였다. 그 결과 도 2a에서 확인되는 바와 같이, 100nM의 농도에서 8종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 녹다운 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

또한, 48시간 동안 ASO를 형질감염시킨 후 western blot assay를 실시하여 GFRAL 유전자 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과 도 2b에서 확인되는 바와 같이, 8종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보에서 단백질 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 도 1 및 도 2의 결과를 토대로 A426, A427, A428, A429, A430, A433, A436, A437 중 8종을 후보로 선정하였다.

## 실험예 3: 3차 스크리닝

실험예 1, 2에서 선정된 8종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 대상으로 실험예 1, 2와 동일한 방법을 사용하여 50nM의 ASO를 투여하여 3차 스크리닝을 진행하였다. 그 결과 도 3a에서 확인되는 바와 같이, 8종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 모두 50nM의 농도에서 매우 우수한 녹다운 효과를 나타냈다. 48시간 동안 ASO를 형질감염시킨 후 Quantimax wst-8 cell viability assay kit(Abcam, UK)를 이용하여 세포독성을 측정하였고, 동일 조건으로 western blot assay를 실시하여 GFRAL 유전자 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과 도 3b에서 확인되는 바와 같이, 8종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보 모두 세포 생존율이 감소하지 않는 것을 확인하였다.

또한 도 4a, 도 4b에서 확인되는 바와 같이, A427, A428, A429, A430에서 반복적으로 단백질 발현 억제를 확인하였다. 이에, 도 1, 도 2, 도 3 및 도 4의 결과를 종합하여, A427, A428, A429, A430을 최종 후보물질로 선정하였다.

## 실험예 4: 생체 내 독성 시험

실험예 1, 2 및 3의 세포 실험결과를 바탕으로 4종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들의 안정성을 검증하기 위해 3회에 걸쳐서 동물 독성 실험을 수행하였다.

생후 0~2일의 C57BL/6J 야생형 생쥐에 실시예의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 두뇌 좌반구에 2  $\mu$ l (20  $\mu$ g)을 뇌실 내(ICV) 주사로 투여하고, 7일 경과 후 생존율을 측정하였다(도 5a).

그 결과, 도 5b에서 확인되는 바와 같이, 음성 대조군으로 사용된 PBS, A114는 12두 중 폐사한 실험동물이 없었고, 독성 양성 대조군으로 사용한 A386이 투여된 개체는 6시간 이내에 12두 중 11두가 폐사하여 상당한 독성이 있음을 확인하였다. 실험군인 A427이 투여된 개체는 7두 중 1두가 폐사했고, A428, A429, A430이 투여된 개체는

모두 전원 생존하여 생체 내 투여 시 상대적으로 안전한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보물질임이 확인되었다.

#### [0204] 실험예 5: 생체 내 GFRAL 단백질 발현 조절 분석

[0205] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들의 약리효과를 검증하기 위해 다음의 동물실험을 수행하였다.

[0206] 8주령의 웅성 C57BL/6N 야생형 생쥐에 안티센스 올리고뉴클레오타이드(A114, A427) 8.5  $\mu$ l(500  $\mu$ g)를 뇌실 내(ICV) 주사로 투여하고 1주 경과 후에 생리식염수(염화나트륨, 관류제; JW Pharmaceutical corporation, Korea)와 4% 파라포름알데히드(FUJIFILM, Japan)를 차례대로 대동맥을 통해 관류하여 뇌 조직을 1차 고정하였다. 뇌 조직을 적출하여 24시간동안 동일 고정액에서 2차 고정하였다. 4℃에서 30% 수크로스를 함유한 인산 완충용액으로 2번 세척한 후 냉동시키고 저온유지장치에서 30 $\mu$ m로 절편을 제작하였다. 5% 당나귀 혈청(Jackson immunoresearch, USA)이 포함된 0.1% PBST(triton-x100)를 이용하여 1시간 동안 블로킹한 후, 정제한 1차 항체로 24시간 반응시켰다. 2차 항체로 2시간 반응 후 면역조직화학(IHC) 형광 염색기법을 사용하여 GFRAL 유전자 단백질의 발현양 변화를 확인하였다.

[0207] 그 결과, 도 6에서 확인되는 바와 같이, A427 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 투약한 경우 GFRAL 유전자 단백질의 형광 신호 세기가 감소하고, 전체 신경 세포(neuron) 중 GFRAL 유전자 발현 신경 세포(neuron)의 비율이 감소하는 것을 확인하였다.

#### [0209] 실험예 6: 생체 내 ASO 분포 분석

[0210] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들의 약리효과를 검증하기 위해 다음의 동물실험을 수행하였다.

[0211] 8주령의 웅성 C57BL/6N 야생형 생쥐에 안티센스 올리고뉴클레오타이드(A114, A427, A428) 8.5  $\mu$ l(500  $\mu$ g)를 뇌실 내(ICV) 주사로 투여하고 2주 경과 후에 생리식염수(염화나트륨, 관류제)와 4% 파라포름알데히드를 차례대로 대동맥을 통해 관류하여 뇌 조직을 1차 고정하였다. 뇌를 적출하여 24시간동안 동일 고정액에서 2차 고정하였다. 4℃에서 30% 수크로스를 함유한 인산 완충용액으로 2번 세척한 후 냉동시키고 저온유지장치에서 10  $\mu$ m로 절편을 제작하였다. RNAscope™ Plus smRNA-RNA HD Reagent kit(ACD bio, USA)로 ASO probe를 염색한 후, Fluorescence in situ hybridization(FISH) 기법을 사용하여 ASO probe의 생체내 분포를 관찰하였다.

[0212] 그 결과, 도 7a 및 도 7b에서 확인되는 바와 같이, A427은 AP(Area postrema)와 NTS(Nucleus tractus solitarius)를 포함하는 후뇌(Hindbrain)에 분포되는 것을 확인하였다.

#### [0214] 실험예 7: 생체 내 GFRAL RNA 발현 조절 분석

[0215] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보들의 약리효과를 검증하기 위해 다음의 동물실험을 수행하였다.

[0216] 8주령의 웅성 C57BL/6N 야생형 생쥐에 안티센스 올리고뉴클레오타이드(A114, A427, A428, A429, A430) 8.5  $\mu$ l(500  $\mu$ g)를 뇌실 내(ICV) 주사로 투여하고 2주 경과 후에 생리식염수(염화나트륨, 관류제)와 4% 파라포름알데히드를 차례대로 대동맥을 통해 관류하여 뇌 조직을 1차 고정하였다. 뇌 조직을 적출하여 24시간동안 동일 고정액에서 2차 고정하였다. 4℃에서 30% 수크로스를 함유한 인산 완충용액으로 2번 세척한 후 냉동시키고 저온유지장치에서 10 $\mu$ m로 절편을 제작하였다. RNAscope™ Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 Kit(ACD bio, USA)로 GFRAL RNA를 염색한 후, Fluorescence in situ hybridization(FISH) 기법을 사용하여 GFRAL RNA의 발현양 변화를 확인하였다.

[0217] 그 결과, 도 8a 및 도 8b에서 확인되는 바와 같이, A427, A428, A429, A430 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 투약한 경우 GFRAL RNA의 형광 신호 세기가 감소하고, 전체 신경 세포(neuron) 중 GFRAL 유전자 발현 신경 세포(neuron)의 비율이 감소하는 것을 확인하였다.

#### [0219] 실험예 8: 암 악액질 모델에서 ASO의 효능확인

[0220] 8주령의 웅성 C57BL/6J 야생형 생쥐에 Colon cancer cell(MC38)을 복강내 주사(intraperitoneal injection, IP

injection) 기법을 이용하여 체내 주입하고, 2주 경과 후 안티센스 올리고뉴클레오타이드(A427, A430) 500  $\mu$ g을 뇌실 내 주사를 통해 투여하였다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 투여 1주 후, Quantikine ELISA kit(R&D Systems, USA)를 이용하여 암 악액질의 진단적 유용성을 가진 혈청내 GDF15의 농도를 측정하였다(도 9a).

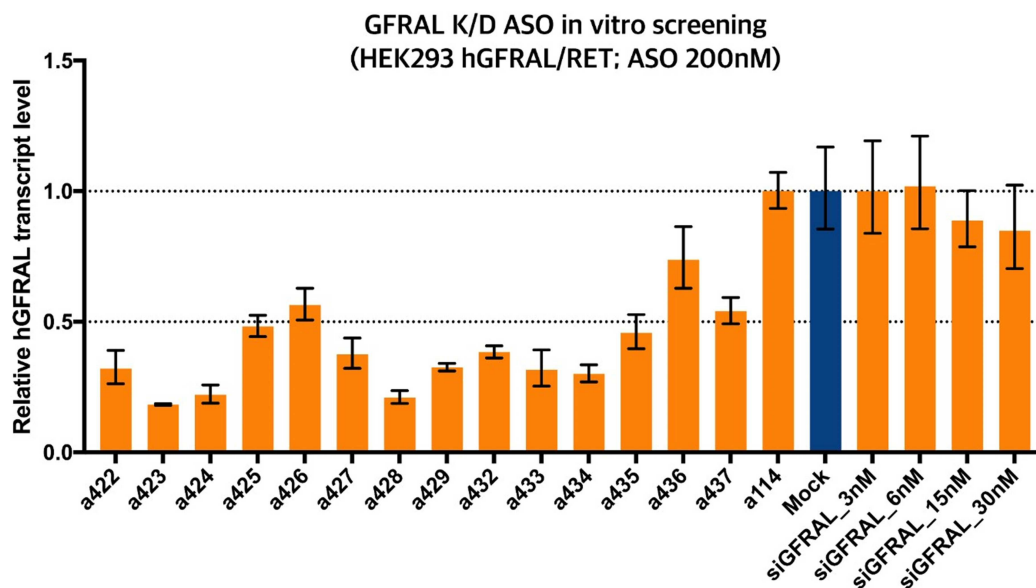
[0221] 도 9b에서 확인되는 바와 같이, MC38이 투여된 그룹에서 GDF15의 혈청내 농도가 1000배 이상 증가하였으며, 이는 암 악액질 모델이 잘 생성되었음을 시사한다.

[0222] 도 10a에서 확인되는 바와 같이, 상기의 암 악액질 동물 모델에서 A427을 투여한 그룹이 음성 대조군(PBS) 보다 근육조직(gastrocnemius)의 무게가 증가되는 것을 관찰하였다. 또한, 근육조직(gastrocnemius)에서 western bolt assay를 통하여, 근육위축증의 주요한 분자 마커인 Atrogin-1와 MuRF1 단백질 발현을 측정하였다. Atrogin-1의 단백질 발현 ASO에 의해 유의하게 감소되는 것을 확인하였다(도 10b).

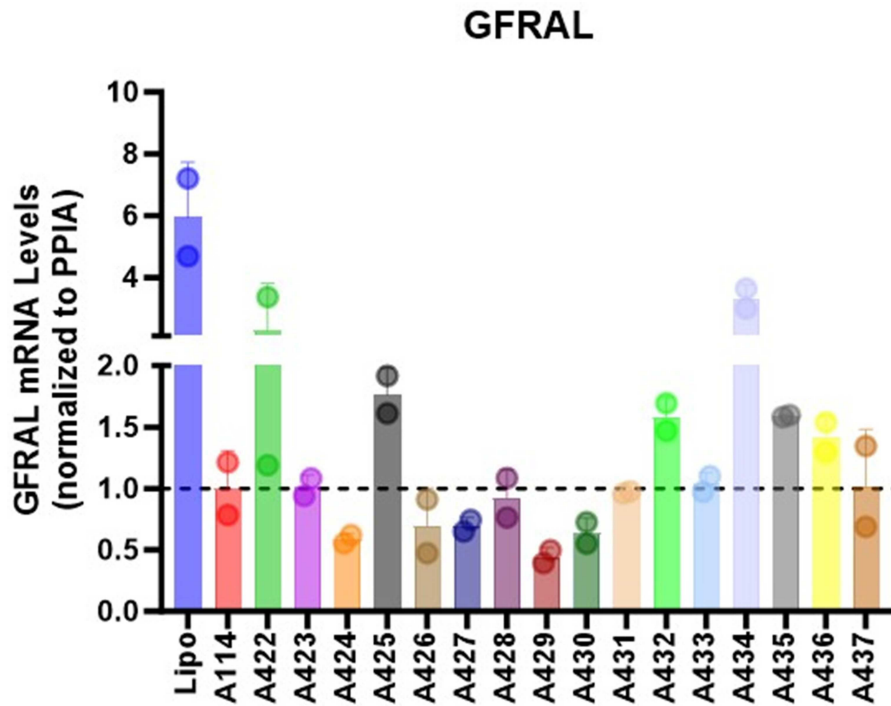
[0224] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

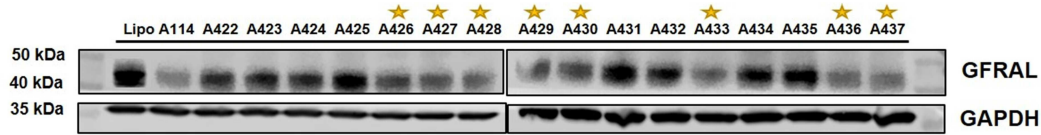
### 도면1



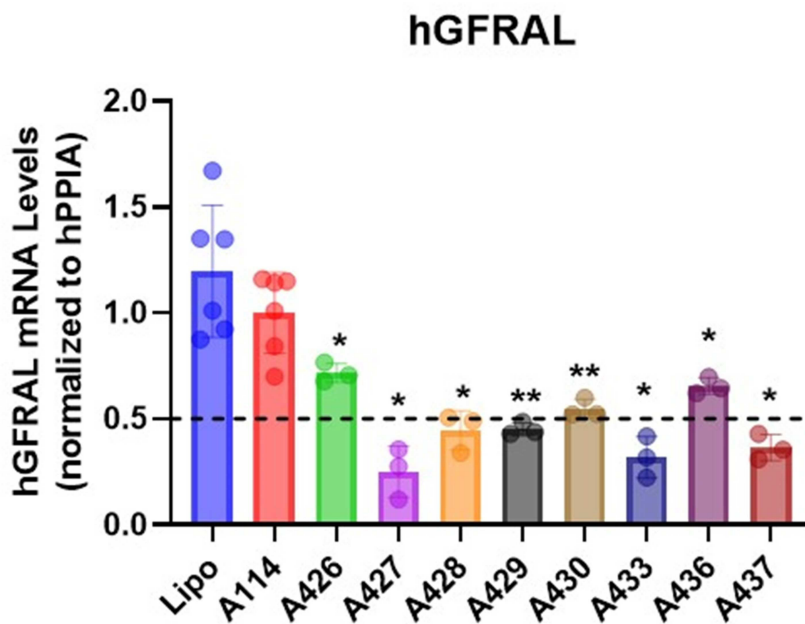
도면2a



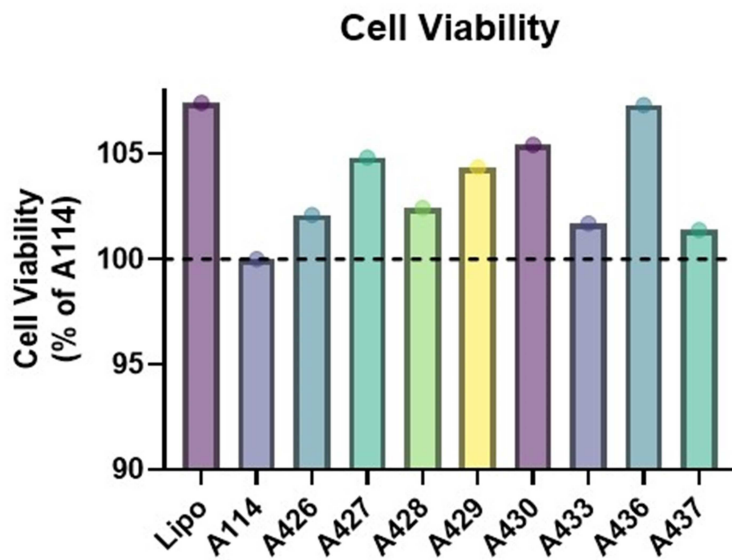
도면2b



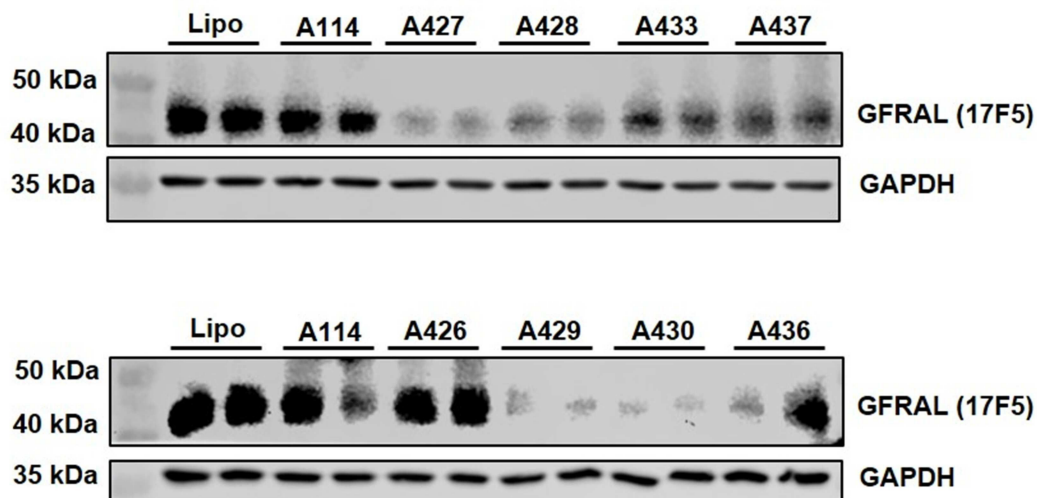
도면3a



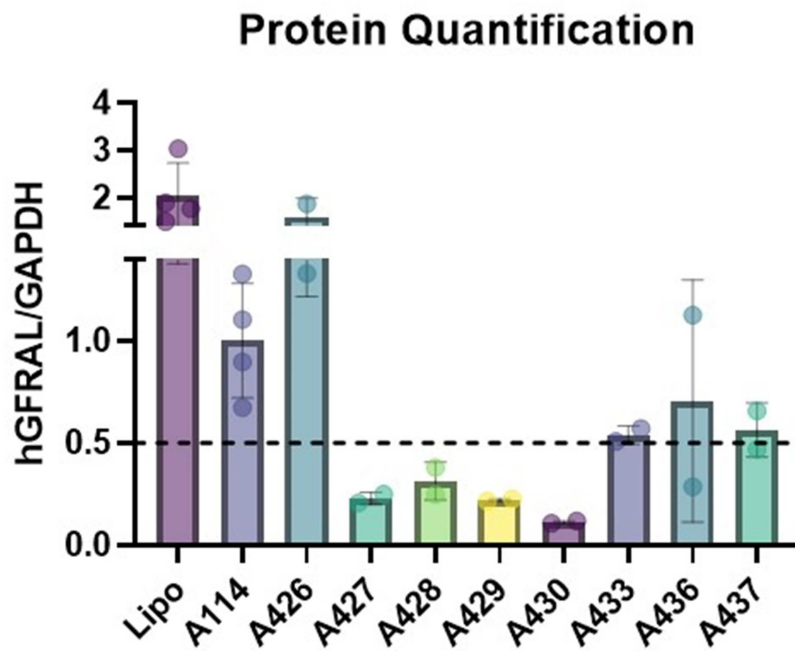
도면3b



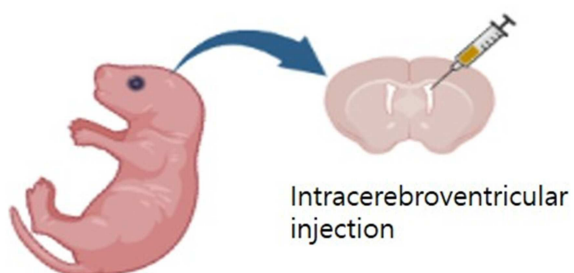
도면4a



도면4b



도면5a



Single injection 2  $\mu$ l  
 ASO Concentration: 10  $\mu$ g/ $\mu$ l (20  $\mu$ g)  
 Toxic Control: A386  
 Control: A114  
 GFRL ASO: A427, A428, A429, A430

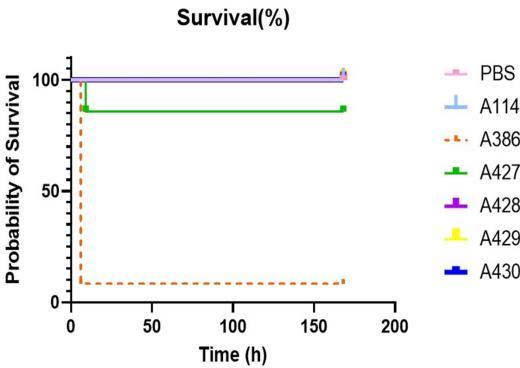
도면5b

Table of Experimental Conditions for Pups

| Treatment | Female 1 | Female 2 | Female 3 | Total (Died) |
|-----------|----------|----------|----------|--------------|
| PBS       | 1        | 1        | 2        | 4            |
| A114      | 1        | 2        | 1        | 4            |
| A386      | 2 (1)*   | 1*       | 1*       | 4 (3)        |
| A427      | 2        | 2        | 3 (1)**  | 7 (1)        |

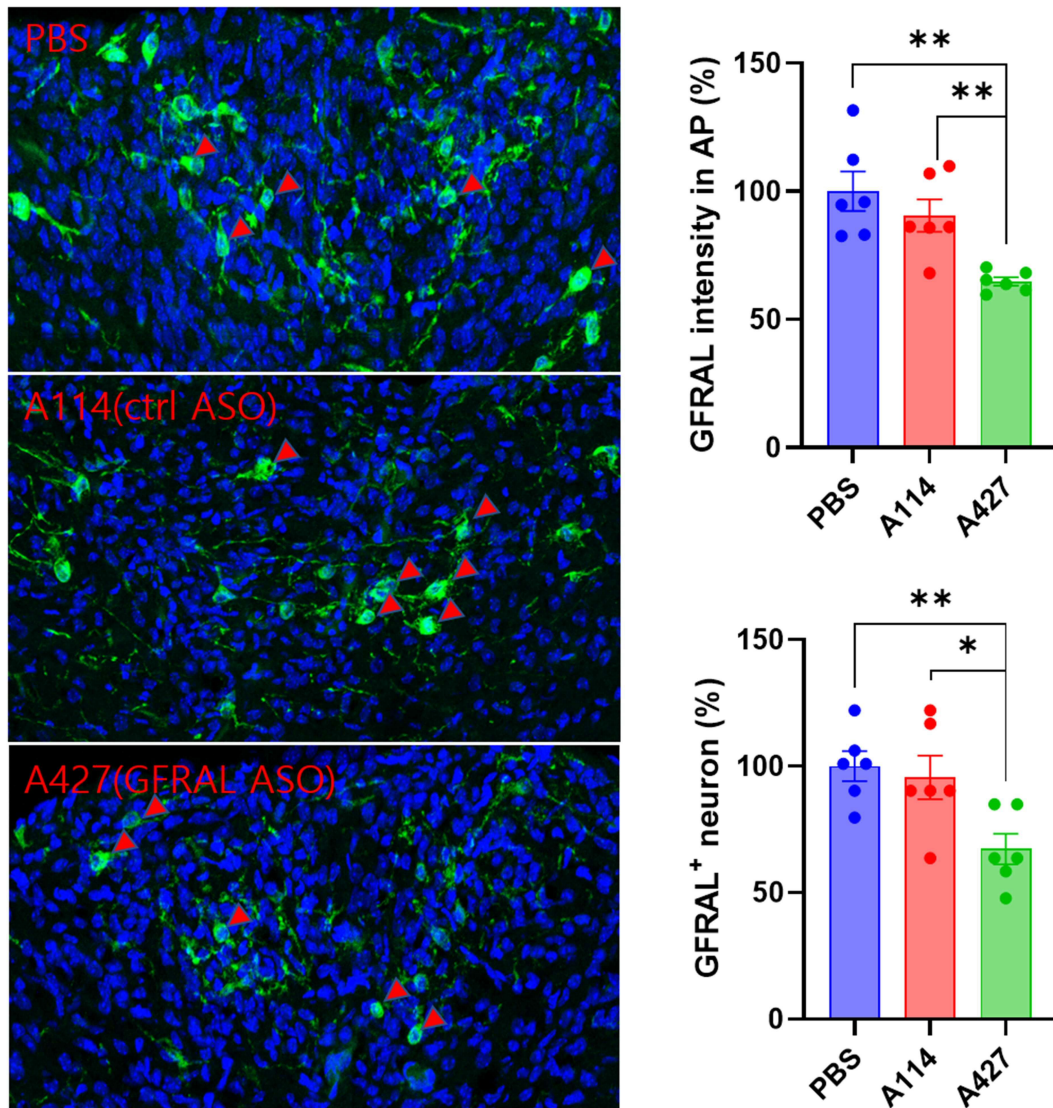
| Treatment | Female 1 | Female 2 | Female 3 | Total (Died) |
|-----------|----------|----------|----------|--------------|
| PBS       | 1        | 2        | 1        | 4            |
| A114      | 2        | 1        | 1        | 4            |
| A386      | 1 (1)*   | 1(1)*    | 2(2)*    | 4 (4)        |
| A430      | 2        | 2        | 2        | 6            |

| Treatment | Female 1 | Female 2 | Female 3 | Female 5 | Total (Died) |
|-----------|----------|----------|----------|----------|--------------|
| PBS       | 1        | 1        | 1        | 1        | 4            |
| A114      | 1        | 1        | 1        | 1        | 4            |
| A386      | 1(1)*    | 1(1)*    | 1(1)*    | 1(1)*    | 4(4)*        |
| A428      | 3        | 3        | 3        | 1        | 10           |
| A429      | 3        | 2        | 4        | 1        | 10           |

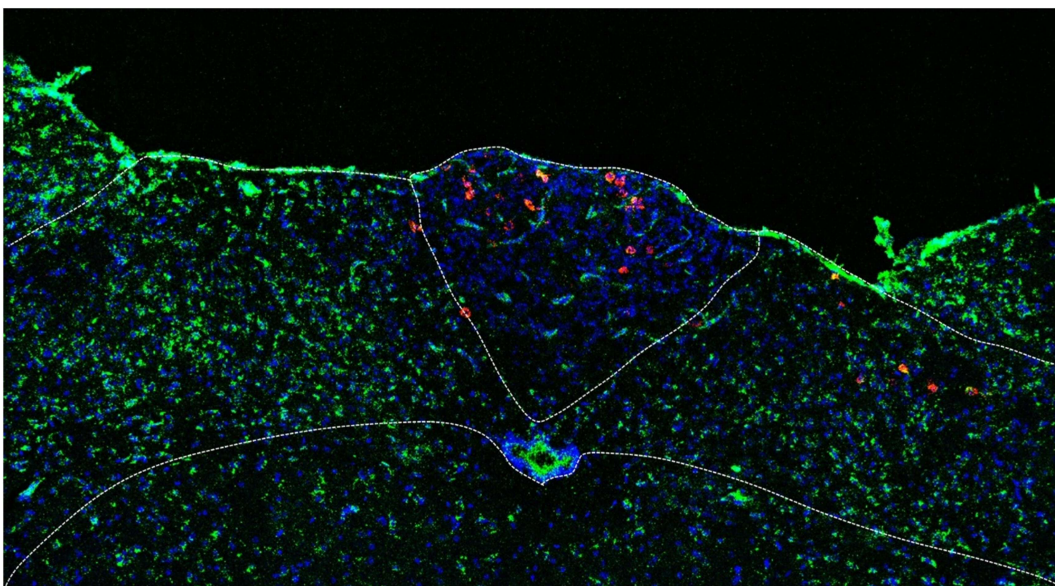


\*: Died within 6 hrs  
Numbers depict pups

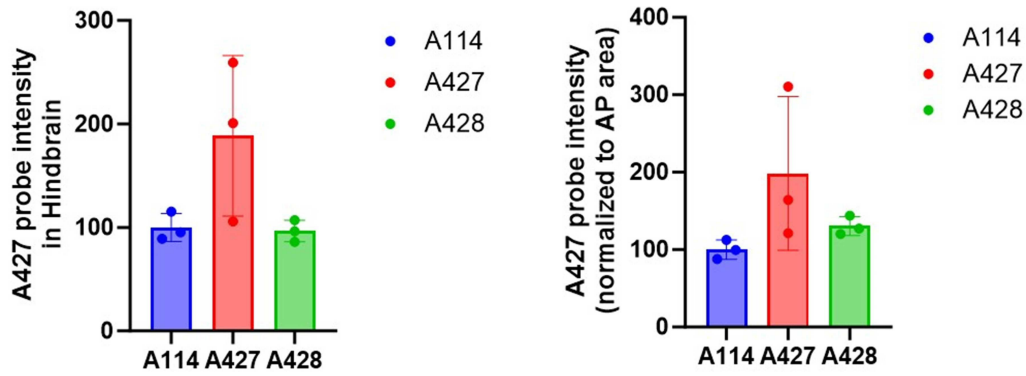
도면6



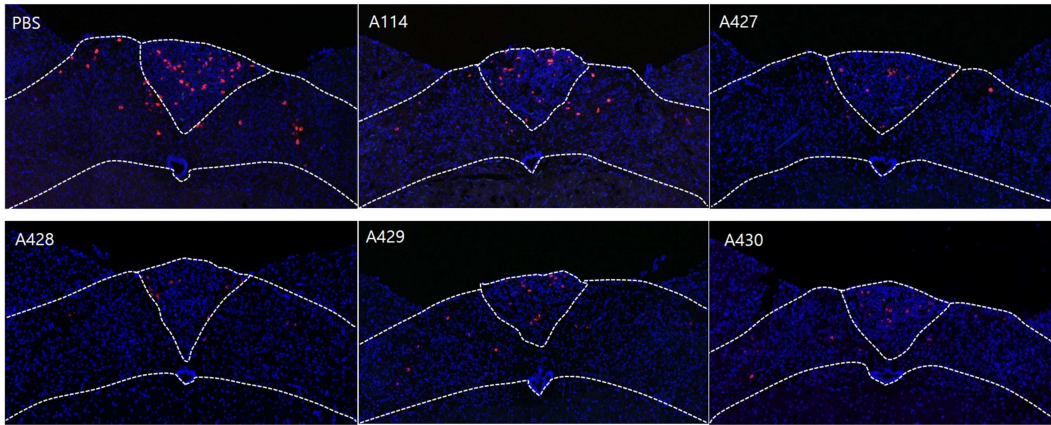
도면7a



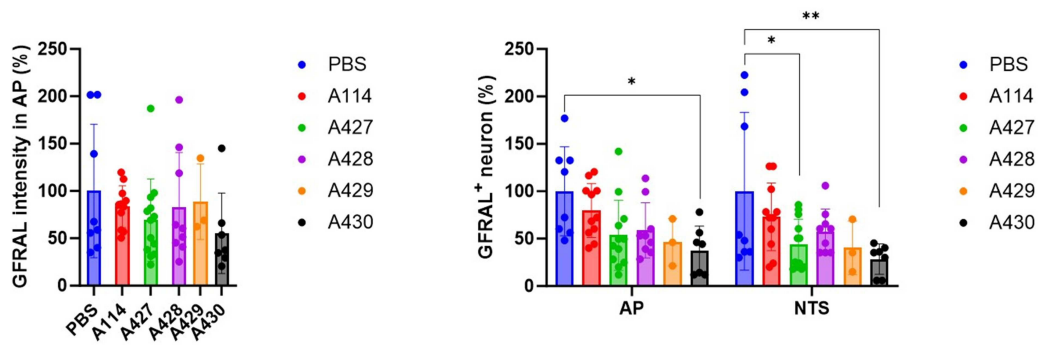
도면7b



도면8a



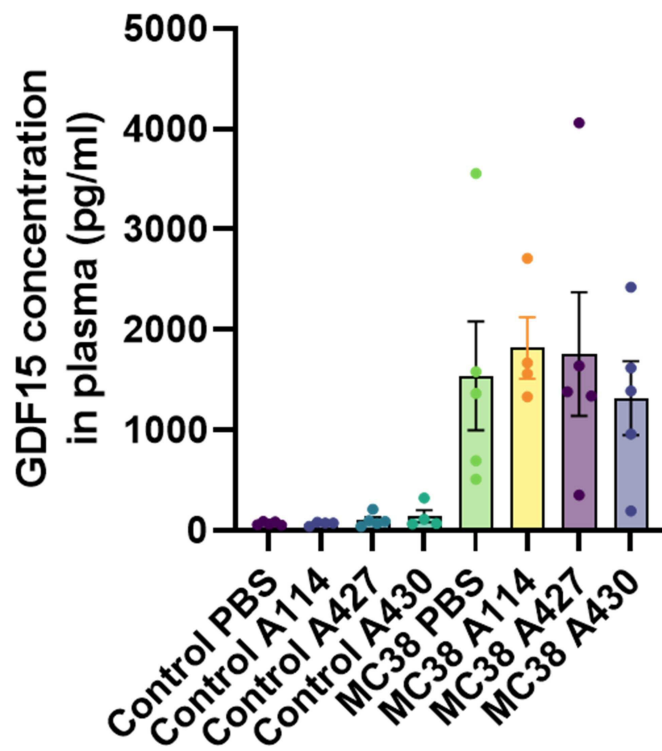
도면8b



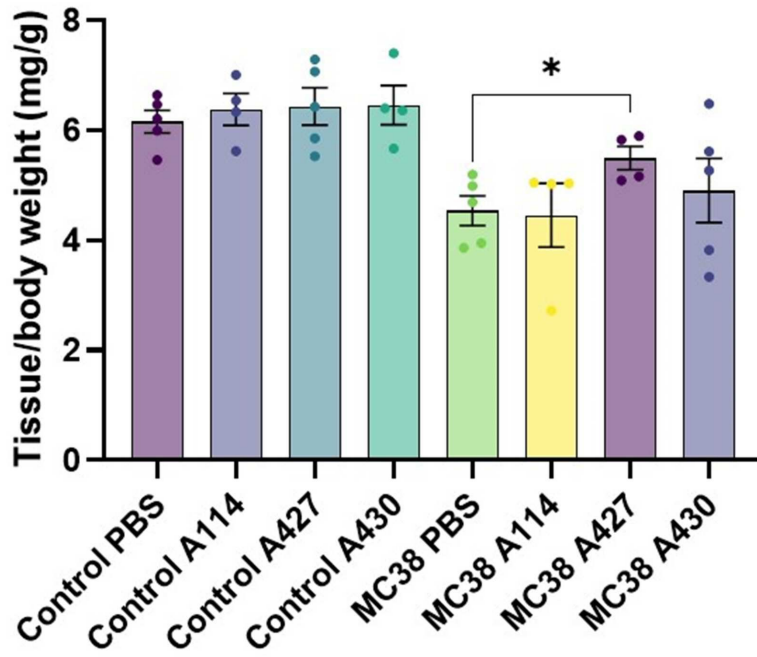
도면9a



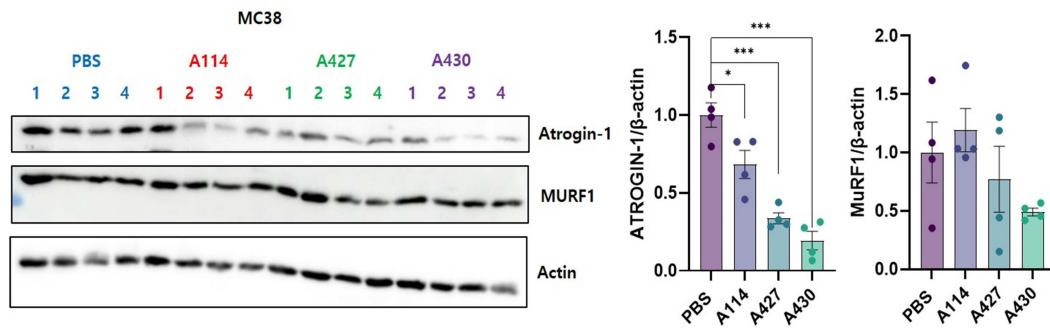
도면9b



도면10a



도면10b



## 서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.