



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월23일
(11) 등록번호 10-2687278
(24) 등록일자 2024년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/761 (2015.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0667 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0144299
(22) 출원일자 2021년10월27일
심사청구일자 2021년10월27일
(65) 공개번호 10-2022-0056148
(43) 공개일자 2022년05월04일
(30) 우선권주장
1020200139918 2020년10월27일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020190139763 A*
KR1020170067667 A
WO2019093435 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
데이츠바이오 주식회사
서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 행정동 2층(신
촌동, 신촌세브란스병원)
(72) 발명자
송재진
서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 러틀로교수동
330호(신촌동)
최수진
서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 임상의학연구
센터동 506호(신촌동)
(뒤편에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 15 항

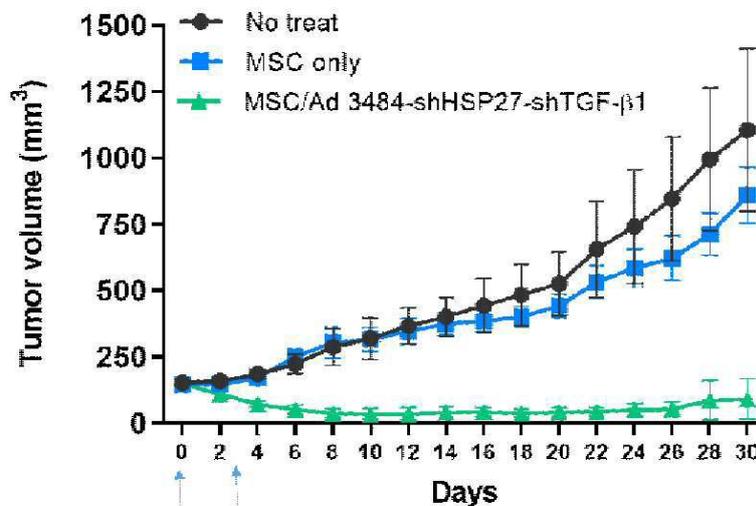
심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 **종양 타겟팅 향상 및 바이러스 대량 생산이 가능한 중간엽줄기세포**

(57) 요약

본 발명은 바이러스 전달체 및 바이러스 증식을 위한 중간엽 줄기세포로서, 종양 타겟팅 향상 및 바이러스 대량 생산을 가능하도록 바이러스 생산과 방출 시기 제어 가능한 중간엽 줄기세포 제작에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 중간엽 줄기세포는 원천적으로 종양원성을 차단할 수 있으며, 원하는 시점에서 바이러스 생산과 방출이 가능하게 조절함으로써 안전성이 확보되며, 항종양 효과를 극대화시킬 수 있다.

대표도 - 도39



- (52) CPC특허분류
 - A61K 35/761 (2013.01)
 - A61P 35/00 (2018.01)
 - C12N 7/00 (2013.01)
 - C12N 9/12 (2013.01)
 - C12N 2510/00 (2013.01)
 - C12N 2710/10032 (2013.01)

최혜진

서울특별시 중로구 송월길 99, 207동 504호(홍파동, 경희궁자이2단지)

- (72) 발명자
 - 홍정아**
 - 서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 임상의학연구센터동 506호(신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711094488
과제번호	2019M3E5D5064554
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	종양살상형 아테노바이러스에 기반한 sorafenib 저항성 극복 간암치료제
기여율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104591
과제번호	2019M3E5D5064554
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	종양살상형 아테노바이러스에 기반한 sorafenib 저항성 극복 간암치료제
기여율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711114676
과제번호	2020R1A2C1005245
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	동일유전자 발현양의 시간차 제어를 통한 종양살상형 바이러스의 종양타겟팅 및 항
종양효과 동시최적화	
기여율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

GRP78(Glucose regulated protein 78) 유전자가 도입된, 종양 표적능이 향상된 종양 살상 바이러스 전달용 중간엽 줄기세포.

청구항 2

삭제

청구항 3

GRP78(Glucose regulated protein 78) 유전자 및 E1B55K 유전자를 포함하며, 상기 E1B55K 유전자는 발현유도물질에 의해 발현되는 것인 종양 살상 바이러스 바이러스 전달용 중간엽 줄기세포.

청구항 4

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

TERT(telomerase reverse transcriptase) 유전자가 추가로 도입된 중간엽 줄기세포.

청구항 5

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기 종양 살상 바이러스는 종양 살상 아데노바이러스, 종양 살상 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses, AAV), 종양 살상 레트로바이러스, 종양 살상 렌티바이러스, 종양 살상 헤르페스 심플렉스 바이러스 또는 종양 살상 백시니아 바이러스인 중간엽 줄기세포.

청구항 6

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기 종양 살상 바이러스는 종양 살상 아데노바이러스인 중간엽 줄기세포.

청구항 7

제 3 항에 있어서,

E1B55K 유전자는 중간엽 줄기세포의 체내 도입 후 발현되는 것인 중간엽 줄기세포.

청구항 8

제 3 항에 있어서,

발현유도물질은 독시사이클린 또는 테트라사이클린인 중간엽 줄기세포.

청구항 9

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,
인간 유래 중간엽 줄기세포.

청구항 10

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,
제대혈, 골수 또는 지방 유래인 중간엽 줄기세포.

청구항 11

청구항 1 또는 청구항 3의 중간엽 줄기세포 및 종양 살상 바이러스를 포함하는 항암 유전자 전달용 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서,
상기 암은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 담도암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 신장암, 배수성암(polyploid carcinoma), 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암인 유전자 전달용 조성물.

청구항 13

청구항 1 또는 청구항 3의 중간엽 줄기세포 및 종양 살상 바이러스를 포함하는 항암용 억제학적 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서,
상기 암은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 담도암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 신장암, 배수성암(polyploid carcinoma), 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암인 억제학적 조성물.

청구항 15

청구항 1 또는 청구항 3의 중간엽 줄기세포 및 종양 살상 바이러스를 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서,
상기 암은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 담도암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 신장암, 배수성암(polyploid carcinoma), 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암인 암 진단용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 바이러스 전달체 및 바이러스 증식을 위한 중간엽 줄기세포의 종양 타겟팅 향상 및 바이러스 대량 생산을 가능하도록 바이러스 생산과 방출 시기 제어 가능한 중간엽 줄기세포 제작에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus)의 경우 정맥 투여 바이러스 (input virus) 대비 종양 타겟 도달율이 24시간 안에 0.01%로 보고되었듯이 [비특허문헌 1]. 바이러스 정맥 주사 시 타겟으로의 매우 낮은 전달효율이 가장 큰 제약 요소였다.

[0004] 암 환자의 사망율의 대다수는 전이성 종양에 기인하므로 투여된 바이러스 대비 종양으로의 향성(tropism) 및 충분한 양의 종양 살상(oncolytic) 바이러스가 종양에 전달되는 것이 필수적이다.

[0005] 하지만, 혈관 내 주사 시 대부분의 바이러스들은 간의 Kupffer cells에 흡수되거나 mechanical deposition에 의해 재빨리 제거되며, 혈관내 바이러스 중화항체와 complement에 의해 쉽게 파괴되며, 또한 혈관내 바이러스들이 종양 부위에서 방출되는 비율은 상당히 낮은 문제가 있다. 이러한 문제점으로 인하여 특히 아데노바이러스 단독을 정맥 주사로 도입하는 것은 효과를 기대할 수 없었다.

[0006] 해결책으로는 바이러스의 유전적 변형을 일으키거나 나노기술도입 그리고 종양 부위로의 향성(tropism)이 있는 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell)를 사용하는 것 등이 있다. 특히, 2010년을 전후로 중간엽줄기세포 등을 비롯한 종양 향성이 있는 세포들에 대한 연구가 수행되어 왔다[비특허문헌 2]. 하지만, 윤리적 기술적 편리성, 낮은 면역원성, 유전적 안정성 등에서 장점이 많은 중간엽줄기세포 (MSC)이지만 MSC에 대한 아데노바이러스의 감염율과 복제율 저하 문제가 대두되었다.

[0007] 종양 살상 아데노바이러스의 전달체(carrier)와 증식체(amplifier)가 되기 위해서는 MSC에 대한 감염과 복제가 일정 수준 이상으로 유지되어야 하는데 이러한 문제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 유전적으로 변형시킨 MSC를 제작하여 국내 특허 등록받은 바 있다[특허 문헌 2]. 하지만, 이 MSC 역시 그러나 계대 증식(passage extension)이 용이하지 않았으며 passage 경과함에 따라 세포주 상태가 나빠짐을 확인하였다.

[0008] 또한, 비특허문헌 3는 종양 살상 바이러스 전달용 MSC의 혈관내 전달은 다발성 뇌 종양 치료 접근 가능성을 확인하였으나, MSC의 종양성장 가능성 등의 문제가 있다.

[0009] 한편, 종양으로 이동 후 원하는 시점에 생산이 증가된 바이러스를 일시에 방출하는 플랫폼을 구축한 기술이 보고된 바 있다[비특허문헌 4] 이는 바이러스 전달체로서 MSC 사용 시 세포사멸을 유도하는 유전자를 탑재한 carrier 세포(MSC)가 종양 부위로 도달되기 전에 일찍 용해되어 바이러스를 방출함으로써 야기될 수 있는 다양한 문제들, 무엇보다도 안전성 문제 등이 제기되었다.

[0010] 따라서, 현실적으로 암에 의한 대부분의 사망이 재발 및 전이에 의해서 일어나는 현실에서 종양 살상 바이러스에 의한 종양 치료에 있어서 아직까지 해결되지 않는 주된 장애물들을 극복할 수 있는 기술이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 국내 등록 특허 제10-2169798호 (2020.10.26)

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Silva, N et al., Double trouble for tumors: Exploiting the tumor microenvironment to enhance anticancer effect of oncolytic viruses, Cytokine & Growth Factor Reviews 21: 135, 2010

(비특허문헌 0002) Xia, X et al, Mesenchymal stem cells as carriers and amplifiers in CRAd delivery to tumors, Molecular Cancer 10: 134, 2011

(비특허문헌 0003) Kerrigan BCP, Shimizu Y, Andreeff M, Lang FF. Mesenchymal stromal cells for the delivery of oncolytic viruses in gliomas. Cytotherapy 2017; 19:445-457

(비특허문헌 0004) Nakashima H, Kaur B, Chioocca EA. Directing systemic oncolytic viral delivery to tumors via carrier cells. Cytokine Growth Factor Rev 2010; 21:119-126

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구 노력한 결과, 바이러스 전달체 및 바이러스 증식을 위한 중간엽 줄기세포의 종양 타겟팅 향상 및 바이러스 대량 생산을 가능하도록 바이러스 생산과 방출 시기 제어 가능한 중간엽 줄기세포를 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0014] 따라서, 본 발명은 GRP78(Glucose regulated protein 78) 유전자가 도입된, 종양 표적능이 향상된 종양 살상 바이러스 전달용 중간엽 줄기세포를 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 발현유도물질에 의해 발현이 유도되도록 E1B55K 유전자가 도입된 종양 살상 바이러스 전달용 중간엽 줄기세포를 제공하는데 다른 목적이 있다.
- [0016] 또한, 본 발명은 GRP78(Glucose regulated protein 78) 유전자 및 E1B55K 유전자를 포함하며, 상기 E1B55K 유전자는 발현유도물질에 의해 발현되는 것인 종양 살상 바이러스 전달용 중간엽 줄기세포를 제공하는데 또 다른 목적이 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 중간엽 줄기세포 및 종양 살상 바이러스를 포함하는 항암 유전자 전달용 조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 중간엽 줄기세포 및 종양 살상 바이러스를 포함하는 항암용 억제학적 조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 중간엽 줄기세포 및 종양 살상 바이러스를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 치료상의 유효량의, 상기 중간엽 줄기세포 및 종양 살상 바이러스를 포함하는 억제학적 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0022] 바이러스 단독에 의한 종양 치료 방식에서 제기되는 3가지 큰 어려움은 다음과 같다.
- [0023] 첫째, 종양살상 아데노바이러스(oncolytic adenovirus)에 대한 circulating antiviral 항체에 의한 파괴, 둘째, 간, 비장 등의 다른 비종양 조직에 의한 비특이적 흡착, 셋째, 혈관으로부터 종양부위로의 바이러스 유출이 거의 일어나지 않는다는 점이다.
- [0024] 이러한 바이러스 치료(virotherapy)의 근본적인 문제를 극복하기 위해서 종양 살상 바이러스의 전신 혈액 내 운반을 용이하게 하기 위하여 중간엽 줄기세포를 세포 전달체(cell carrier)로 사용하였으며, 바이러스의 운반 이외에도 타겟 종양 부위로 이동 중 생산된 대량의 바이러스에 의한 효과적인 항종양 작용을 위해 유전적으로 변형시킨 중간엽줄기세포주 (MSC)를 개발하였다.
- [0025] 본 발명은 바이러스 전달체 및 바이러스 증식을 위한 중간엽 줄기세포의 종양 타겟팅 향상 및 바이러스 대량 생산을 가능하도록 바이러스 생산과 방출 시기 제어 가능한 중간엽 줄기세포 제작에 관한 것이다.
- [0026] 이하 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0027] 본 발명은 인간의 GRP78 (Glucose regulated protein 78) 유전자 (진뱅크 NM_005347)가 도입된, 종양 살상 바이러스 전달용 중간엽 줄기세포를 포함한다.
- [0028] 또한, 바이러스 전달체로 사용되는 중간엽 줄기세포에 GRP78 유전자를 도입함으로써 종양 표적능이 향상된 종양 살상 바이러스 전달용 중간엽 줄기세포를 제공한다.
- [0029] 상기 GRP78 유전자는 글루코오스 조절 단백질 78 유전자로서, 세포의 운동성(motility)을 증가시켜 세포 침윤을 증가시킨다는 역할에 대해서는 이미 알려져 있으며, 이 유전자 서열은 진뱅크 NM_005347 서열번호 1(인간)에 나

타낸 바와 같다. 본 발명에서는 종양 회귀 마커(tumor homing marker)로 종양 표적능을 향상시키는 역할을 한다.

[0030] [서열번호 1]

[0031] atg aagctctccc tgggtggccgc gatgctgctg ctgctcagcg cggcgccggc cgaggaggag gacaagaagg aggacgtggg cacgggtggtc
 ggcatcgacc tggggaccac ctactcctgc gtcggcgtgt tcaagaacgg ccgctggag atcatcgcca acgatcaggg caaccgcatc
 acgccgtcct atgtgcctt cactcctgaa ggggaacgtc tgattggcga tgcgccaaag aaccagctca cctccaacce cgagaacacg
 gtctttgacg ccaagcggct catcgccgc acgtggaatg acccgtctgt gcagcaggac atcaagtct tgccttcaa ggtggtttaa
 aagaaaacta aaccatacat tcaagttgat attggagggtg ggcaaacaaa gacatttct cctgaagaaa tttctgcat ggttctcact
 aaaatgaaag aaaccgctga ggcttatttg ggaagaagg ttaccatgc agttgttact gtaccagcct attttaatga tggccaacgc
 caagcaacca aagacgctgg aactattgct ggctaaatg ttatgaggat catcaacgag cctacggcag ctgctattgc ttatggcctg
 gataaagagg agggggagaa gaacatcctg gtgtttgacc tgggtggcgg aaccttcgat gtgtctcttc tcacattga caatggtgtc
 ttcaagtgt tggccactaa tggagatact catctgggtg gagaagactt tgaccagcgt gtcattggaac acttcatcaa actgtacaaa
 aagaagacgg gcaaatgt caggaagac aatagagctg tgcagaaact cggcgccgag gtgaaaaagg ccaaacgggc cctgtcttct
 cagcatcaag caagaattga aattgagtcc ttctatgaag gagaagactt ttctgagacc ctgactcggg ccaaatttga agagctcaac
 atggtatctg tccggtctac tatgaagccc gtccagaaaag tgttggaaaga ttctgatttg aagaagtctg atattgatga aattgttctt
 gttggtggct cgactcgaat tccaaagatt cagcaactgg ttaagagtt cttaatggc aaggaacat cccgtggcat aaaccagat
 gaagctgtag cgtatggtgc tgctgtccag gctggtgtgc tctctggtga tcaagataga ggtgacctgg tactgcttga tgtatgtccc
 cttacacttg gtattgaaac tgtgggagggt gtcattgacca aactgatcc aaggaacaca gtggtgcta ccaagaagt ccatgcttt
 tctacagctt ctgataatca accaactgtt acaatcaagg tctatgaagg tgaagacc ctgacaaaag acaatcatct tctgggtaca
 tttgatctga ctggaattcc tctgctcct cgtggggtcc cacagattga agtcacctt gagatagatg tgaatggtat tcttcgagtg
 acagctgaag acaagggtac agggaaacaaa aataagatca caatcacca tgaccagaat cgctgacac ctgaaagaaat cgaaaggatg
 gtaaatgatg ctgagaagt tgcagagaa gacaaaaagc tcaaggagcg cattgatact agaaatgagt tggaaagcta tgcctattct
 ctaaagaatc agattggaga taaagaaaag ctgggaggta aactttctc tgaagataag gagaccatgg aaaaagctgt agaagaaaag
 attgaatggc tggaaagcca ccaagatgct gacattgaag acttcaaagc taagaagaag gaactggaag aaattgttca accaattatc
 agcaactct atggaagtgc aggcctccc ccaactggtg aagaggatag agcagaaaaa gatgagttgt ag

[0032] 본 발명에서는 상기 GRP78 유전자로 인해 종양 향성이 향상되었음을 확인하였으며, 특히 종양 외에 다른 장기에 는 흡착 없이 종양 조직 부위로 바이러스가 전달되었다.

[0033] 이러한 특정 유전자 도입을 용이하도록 하기 위해 인간 중간엽 줄기세포의 경우 계대 증식이 용이하지 않으나, 이를 극복하기 위해 세포 증식을 유도하는 TERT(telomerase reverse transcriptase) 유전자를 추가로 도입할 수 있다.

[0034] 상기 TERT 유전자는 텔로머라제 역전사효소 유전자로서, 이 유전자 서열은 진뱅크 NM_198253, 서열번호 2(인 간)에 나타낸 바와 같다.

[0035] [서열번호 2]

[0036] atgccgcgcgc tccccgtgc cgagccgtgc gctccctgct ggcagccac taccgcgagg tgctgccgct ggccacgttc gtgcggcgcc
 tggggcccga gggctggcgg ctggtgcagc gcggggacc ccggcgttcc cgcgcgctgg tggcccagtg cctggtgtgc gtgcctggg
 acgcacggcc gcccccgcc gcccctcct tcccccaggt gtctgctg aaggagctgg tggcccagtg gctgcagagg ctgtgcgagc
 gcggcgcgaa gaacgtgctg gccttcggct tcgcgctgct ggacggggcc cgcgggggccc cccccaggg cttcaccacc agcgtgcgca
 gctacctgcc caacacggtg accgacgcac tgcgggggag cggggcgtgg gggctgctgc tgcgccgct gggcgacgac gtgctggttc
 acctgctggc acgctgcgcg ctctttgtgc tgggtggctcc cagctgcgcc taccaggtgt gcgggcccgc gctgtaccag ctcgcgctg
 ccaactcagge ccggcccccg ccacacgcta gtggaccccg aaggcgtctg ggatgcgaac gggcctggaa ccatagcgtc agggaggccg
 gggctcccct gggcctgcca gcccgggtg cgaggaggcg cgggggcagt gccagccgaa gtctgcccgt gcccagagg cccaggcgtg
 gcgctgcccc tgagccggag cggacgcccg ttgggcaggg gtcttggccc cccccggca ggacgcgtgg accgagtgc cgtggtttct
 gtgtggtgtc acctgccaga cccgccaag aagccactc tttggagggt gcgctctctg gcacgcgcca ctcccacca tccgtgggccc
 gccagacca cgcgggcccc ccatccacat cgcggccacc agtccctgg gacacgctt gtccccggt gtacgcccag accaagcact
 tctctactc ctacggcgac aaggagcagc tgcggccctc ctctactc agctctctga ggcccagcct gactggcgtc cggaggctcg
 tggagacat ctttctgggt tccaggcct ggatgccagg gactccccgc aggttggccc gcctgcccc ggcgtactgg caaatcgggc
 ccctgtttct ggagctgctt gggaaaccag cgcagtgcc ctacgggtg ctctcaaga gcactgccc gctgcgagct gcggtcacc
 cagcagccgg tgtctgtgcc cgggagaagc cccagggtc tgtggcgccc cccgaggagg aggacacaga cccccgctgc ctggtgcagc

tgctccgcca gcacagcagc ccctggcagg tgtacggctt cgtgctggcc tgcttgcgcc ggctgggtgcc cccaggcctc tggggctcca
ggcacaacga acgccgcttc ctcaggaaca ccaagaagt catctccctg gggaagcatg ccaagctctc gctgcaggag ctgactggga
agatgagcgt gcgggactgc gcttggctgc gcaggagccc aggggttggc tgtgtccgg ccgcagagca ccgtctgctg gaggagatcc
tggccaagt cctgactgg ctgatgagt tgtacgtcgt cgactgctc aggtctttct tttatgtcac ggagaccacg tttcaaaaga
acaggctctt tttctaccgg aagagtgtct ggagcaagt gcaaagcatt ggaatcagac agcacttgaa gagggtgcag ctgctgggagc
tgtcggaagc agaggtcagg cagcatcggg aagccaggcc cgccttctg acgtccagac tccgttcat ccccaagcct gacgggctgc
ggccgatgt gaacatggac tacgtcgtgg gagccagaac gttccgcaga gaaaagaggg ccgagcgtct cacctcgagg gtgaaggcac
tgttcagcgt gctcaactac gagcgggccc ggcccccgg cctctgggc gcctctgtgc tgggcctgga cgatatccac agggcctggc
gcaccttctg gctgctgtgt cgggcccagg acccgcccgc tgagctgtac tttgtcaagg tggatgtgac gggcgctac gacaccatcc
cccaggacag gctcacggag gtcacgcca gcatcatcaa accccagaac acgtactgag tgcgtcggta tgcctggctc cagaaggccc
cccatgggca cgtccgaag gcctcaaga gccacgtctc taccttgaca gacctcagc cgtacatgag acagtctgtg gctcacctgc
aggagaccag cccgctgagg gatgctgtc tcatcgagca gagctcctcc ctgaatgagg ccagcagtg cctctcgac gttctctac
gcttcatgtg ccaccacgcc gtgcatca ggggcaagtc ctactccag tgcagggga tcccgagggt cctcctcctc tccacgctgc
tctgcagcct gtgctacggc gacatggaga acaagctgtt tgcggggatt cggcgggacg ggctgctcct gcgtttgggt gatgatctt
tgttgggtgac acctcacctc acccagcga aaaccttct caggacctg gtccgaggtg tccctgagta tggctgctg gtgaacttgc
ggaagacagt ggtgaacttc cctgtagaag acgaggcctt ggggtggcagc gcttttgtc agatgccggc ccacggccta tcccttgg
gctgctgct gctggatacc cggacctgg aggtgcagag cgactactcc agctatgcc ggacctccat cagagccagt ctcacctca
accgctgct caagctggg aggaacatgc gtcgcaaaact cttggggctc ttgggctga agtgtcacag cctgtttctg gatttgcagg
tgaacagcct ccagacggtg tgcaccaaca tctacaagat cctctgctg caggcgtaca ggtttcacgc atgtgtgctg cagctccat
ttcatcagca agtttgaag aacccacat tttcctgctg cgtcatctc gacacggcct cctctgcta ctccatcctg aaagccaaga
acgcagggat gtgctgggg gccaagggcg ccgcccggcc tctgccctcc gaggcctgc agtggctgtg ccaccaagca ttctgctca
agctgactgc acacctgtc acctactgc cactcctggg gtcactcagg acagcccaga cgcagctgag tgggaagctc cgggggacga
cgtgactgc cctggaggcc gcagccaacc cggcactgcc ctcagacttc aagaccatcc tggactga

[0037] 본 발명에서 MSC-TERT-GRP78 세포주를 확립하였으며, 바이러스 전달체 및 바이러스 증식을 위한 중간엽 줄기세포의 종양 타겟팅 향상을 확인하였다. 따라서, 상기 중간엽줄기세포는 종양 진단 및 치료 모두에 사용될 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 발현유도물질에 의해 발현이 유도되도록 E1B55K 유전자가 도입된 종양 살상 바이러스 바이러스 전달용 중간엽 줄기세포를 제공한다.

[0039] 상기 E1B55K 유전자는 아데노바이러스의 수명 중 초기에 발현되는 E1B55K 단백질을 코딩하는 바이러스 유전자이다. 이 유전자 서열은 진뱅크 AC_000008, 서열번호 3에 나타난 바와 같다. (첫째 줄 밑줄 표시한 a는 원래 g였으나 치환하여 KpnI site 제거함. 열 네번째 줄 밑줄 표시한 t는 원래 a를 t로 치환하여 HindIII 부위 제거한 것임.)

[0040] [서열번호 3]

[0041] atggagcgaaga aacctctg agcggggagt acctgctgga ttttctggcc atgcatctgt ggagagcggg tgtgagacac aagaatcgcc
tgctactgtt gtcttccgtc cgcccggcga taataccgac ggaggagcag cagcagcagc aggaggaagc caggcggcgg cggcaggagc
agagcccatg gaaccgaga gccggcctgg acctcggga atgaatgttg tacagggtggc tgaactgtat ccagaactga gacgcatttt
gacaattaca gaggatgggc aggggctaaa gggggtaaag agggagcggg ggcttgtga ggctacagag gaggctagga atctagcttt
tagcttaatg accagacacc gtctgagtgt tattactttt caacagatca aggataatg cgctaatgag ctgatctgc tggcgcagaa
gtattccata gagcagctga ccaactactg gctgcagcca ggggatgatt ttgaggaggc tattagggtat tatgcaaagg tggcacttag
gccagattgc aagtacaaga tcagcaaaact tgtaaatatc aggaattgtt gctacatttc tgggaacggg gccgaggtgg agatagatac
ggaggatagg gtggccttta gatgtagcat gataaatatg tggccggggg tgcctggcat ggacgggggtg gttattatga atgtaagggt
tactggcccc aattttagcg gtacggtttt cctggccaat accaacctta tcctacacgg tgttagcttc tatgggttta acaatacctg
tgtggaagcc tggaccgatg taagggttcg gggctgtgcc tttfactgct gctggaaggg ggtggtgtgt cgcctcaaaa gcagggttc
aattaagaaa tgcctctttg aaaggtgtac cttgggtatc ctgtctgagg gtaactccag ggtgcgccac aatgtggcct ccgactgtgg
ttgcttcatg ctagtgaaaa gcgtggctgt gattaagcat aacatggtat gtggcaactg cgaggacagg gcctctcaga tgcctgacctg
ctcggacggc aactgtcacc tgcgaaagac catcaccgta gccagccact ctgcaaggc ctggccagtg tttgagcata acatactgac
ccgctgttcc ttgcatttgg gtaacaggag gggggtgttc ctaccttacc aatgcaattt gactcacact aagatattgc ttgagcccga
gagcatgtcc aaggtgaacc tgaacggggt gtttgacatg accatgaaga tctggaaggt gctgaggtac gatgagacc gcaccagggtg
cagacctgc gactgtggcg gtaaacatat taggaaccag cctgtgatgc tggatgtgac cgaggagctg aggcccgatc acttgggtgt

ggcctgcacc cgcgctgagt ttggctctag cgatgaagat acagattga

- [0042] 본 발명자들은 기출원된 골수 유래 인간 MSC로부터 인간 MSC-CAR-E1B55K 세포주 확립하였으며(특허문헌 1), 바이러스 생산 증가를 확인하였으나, 계대 증식이 용이하지 않았으며 passage 경과함에 따라 세포주 상태 나빠짐을 확인하였으며, 이로 인해 동물실험 및 master cell banking이 불가능함을 확인하고 그 원인 파악하는데 많은 시간 소요하였다. 특히 E1B55K의 새로운 기능을 확인하였다. 이는 E1B55K의 바이러스 증식 증가 유도 기능 외에도 세포주의 생존능 저하를 동시에 유도한다는 사실이다.
- [0043] MSC 세포주 대량 생산을 위해 불가피하게 도입된 TERT 유전자에 의한 종양원성 가능성 증가는 E1B55K가 바이러스 복제 증가 유도뿐만 아니라 MSC 세포의 전반적인 생존능 감소를 유도하는 것을 처음으로 규명함으로써 해결 방안을 마련할 수 있었다. 즉, E1B55K 유전자의 발현시점을 시간차 유도하여 MSC의 계대 증식을 가능하게 하여 cell banking을 통한 대량 생산 가능하게 함과 동시에 MSC의 종양원성(tumorigenesis)을 원천적으로 차단시킬 수 있었다.
- [0044] E1B55K 유전자의 발현시점을 시간차 유도하기 위하여, 즉 중간엽 줄기세포의 체내 도입 후 발현되도록 하기 위하여 실시예에서는 Tet-on system을 적용하였으나, 이 외에 시간차 유도 시스템이라면 모두 가능하다. 또한, 발현 유도 물질은 독시사이클린 또는 테트라사이클린 등이 바람직하다.
- [0045] 본 발명에서 MSC-TERT-tetoneE1B55K 세포주를 확립하였으며, 시간차를 통해 원하는 시점에 E1B55K를 발현시켜(종양 살상) 바이러스 대량 생산 및 MSC의 종양원성(tumorigenesis)을 원천적으로 차단시켰다.
- [0046] 또한, 본 발명은 GRP78(Glucose regulated protein 78) 유전자 및 E1B55K 유전자를 포함하며, 상기 E1B55K 유전자는 발현유도물질에 의해 발현되는 것인 종양 살상 바이러스 전달용 중간엽 줄기세포를 포함한다.
- [0047] 본 발명에서 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78 세포주를 확립하였으며, 바이러스 전달체 및 바이러스 증식을 위한 중간엽 줄기세포의 종양 타겟팅 향상 및 바이러스 대량 생산을 가능하도록 바이러스 생산과 방출 시기 제어 가능함을 확인하였다.
- [0048] 본원에서 사용된 중간엽 줄기세포주는 인간 유래인 것이 바람직하다. 상기 중간엽 줄기세포주는 골수, 체대혈 또는 지방 유래인 것이 바람직하다.
- [0049] 본원에서 사용된 종양 살상 바이러스는 종양 살상 아데노바이러스, 종양 살상 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses, AAV), 종양 살상 레트로바이러스, 종양 살상 렌티바이러스, 종양 살상 헤르페스 심플렉스 바이러스 또는 종양 살상 백시니아 바이러스일 수 있다.
- [0050] 또한, 상기 종양 살상 아데노바이러스는 본 발명자들에 의해 개발된 국내 특허 출원 제 2016-0166171호에 기재된 종양 살상 아데노바이러스일 수 있다.
- [0051] 본 발명은 또한, 상기 종양 살상 바이러스 전달용 중간엽 줄기세포 및 종양 살상 바이러스를 포함하는 항암 유전자 전달용 조성물을 포함한다.
- [0052] 본 발명의 유전자 전달용 조성물은 전신성 투여용 일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 바이러스를 탑재한 줄기세포(Ad-MSK)의 경우 암 특이적인 특성 외에, 면역 반응이 낮거나 없어, 전신 투여가 가능하고, 종양세포로 타겟성이 우수하며 독성을 유발하지 않는 효과가 있어, 유전자 전달 효율을 현저하게 높일 수 있다.
- [0054] 상기 중간엽 줄기세포는 골수, 체대혈, 지방 등에서 분리할 수 있고, 환자 자신 또는 혈액은행의 데이터베이스를 이용하여 동종의 중간엽 줄기세포를 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 아데노바이러스 탑재 줄기세포를 유전자 전달체로 이용하는 경우 자가 치료뿐 아니라 동종의 치료도 가능한 바, 유전자 치료의 단가를 더욱 낮출 수 있다.
- [0055] 본 발명의 유전자를 포함하는 아데노바이러스를 중간엽 줄기세포 내로 도입하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 구체적으로, 상기 유전자 도입은 당업계에 공지된 바이러스 감염 방법에 따라 수행될 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 사용된 용어 "항암 억제학적 조성물"은 "암 치료에서의 사용을 위한 의약 조성물"을 의미한다.
- [0057] 본 발명의 항암 억제학적 조성물에 유효성분으로 포함되는 중간엽 줄기세포는 상술한 본 발명의 중간엽 줄기세포와 동일한 것이므로, 중간엽 줄기세포에 대한 상세한 설명은 본 발명의 조성물에도 그대로 적용된다. 따라서,

본 명세서의 불필요한 반복 기재에 의한 과도한 복잡성을 피하기 위하여 공통 사항은 그 기재를 생략한다.

- [0058] 본 발명의 조성물에 포함되는 종양 살상 아데노바이러스는 상술한 바와 같이, 다양한 종양 세포에 대하여 살상 효능을 나타내므로, 본 발명의 약제학적 조성물은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 담도암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 신장암, 배수성암(polyploid carcinoma), 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암 등 암 치료에 이용될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 (i) 종양 세포 형성의 예방; (ii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 억제; 및 (iii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 경감을 의미한다. 따라서, 본 명세서에서 용어 "치료학적 유효량"은 상기한 약리학적 효과를 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0059] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 구산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다. 난소암에서 복강 내로 투여하는 경우 및 간암에서 문맥으로 투여하는 경우에는 주입 방법으로 투여할 수 있고, 간암, 흑색종 및 유방암의 경우에는 종양 매스에 직접 주사하여 투여할 수 있으며, 결장암의 경우에는 관장으로 직접 주사하여 투여할 수 있고, 방광암의 경우에는 카테터 내로 직접 주사하여 투여할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 약제학적 조성물은 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{15}$ pfu/ml의 종양 살상 바이러스를 포함하며, 통상적으로 1회 주사 시 MSC (1×10^6 세포수 기준) 감염시키는 바이러스의 양은 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ pfu이다.
- [0063] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 약제학적 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 화학 요법 또는 방사 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 암 치료를 할 수 있다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 화학 요법제는 겐시타빈(gemcitabine), 소라페닙(sorafenib), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 프로카르바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 비술판(bisulfan), 니트로소우레아(nitrosourea), 디악티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 탁목시펜(tamoxifen), 택솔(taxol), 트랜스플라티늄(transplatinum), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin) 및 메토티렉세이트(methotrexate) 등을 포함한다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 방사 요법은 X-선 조사 및 γ -선 조사 등이다.
- [0065] 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포는 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 담도암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 신장암, 배수성암(polyploid carcinoma), 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암에 대한 항암 효과를 나타낼 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명은 상기 중간엽 줄기세포 및 종양 살상 바이러스를 포함하는 바이러스/줄기세포 복합체를 포함하는 암 진단용 조성물을 포함할 수 있다.
- [0067] 본 명세서에서 사용된 용어 "진단"은 병태 생리의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 암의 발병 여부 및 경과를 확인하는 것이다.

- [0068] 상기 바이러스/줄기세포 복합체는 바이러스가 감염 또는 탑재된 줄기세포를 의미한다.
- [0069] 상기 바이러스/줄기세포 복합체는 영상을 통하여 암을 진단하기 위하여 발광물질, 형광체 또는 동위원소와 결합할 수 있다.
- [0070] 상기 발광 물질은 발광을 발생시키는 모든 물질을 말한다.
- [0071] 본 발명의 실시예에서는 MSC에 루시페라제를 발현하는 아데노바이러스를 감염시킨 후 마우스의 복강에 루시페린을 투여하여 발광을 영상으로 촬영하여 한 것을 확인하였다.
- [0072] 상기 형광체는 상기 NRP1에 특이적으로 결합하는 펩타이드와 결합할 수 있는 형광체, 형광 단백질 또는 기타 영상용 물질이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0073] 상기 형광체는 플루오레신(fluorescein), 보디피(BODIPY), 테트라메틸로드아민(Tertramethylrhodamine), 알렉사(Alexa), 시아닌(Cyanine), 알로피코시아닌(allopicocyanine) 또는 이들의 유도체가 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0074] 형광 단백질은 Dronpa 단백질, 형광 발색 유전자(EGFP), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, DsRFP), 근적외선 형광을 나타내는 시아닌 형광체인 Cy5.5 또는 기타 형광 단백질이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 기타 영상용 물질은 산화철, 방사성 동위원소 등이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, MR, PET과 같은 영상 장비에 응용될 수 있다.
- [0075] 본 발명은 또한, 치료상의 유효량의, 상기 중간엽 줄기세포 및 종양 살상 바이러스를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법을 포함한다.
- [0076] 상기 암 치료 방법과 관련하여 기술한 모든 내용이 상술한 본 발명의 중간엽 줄기세포 및 이를 포함하는 조성물에 그대로 적용 또는 준용될 수 있다.
- [0077] 상기 암은 구체적으로 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 담도암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 신장암, 배수성암(polyploid carcinoma), 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0078] 여기에서 사용된 용어 "대상체"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0079] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상외에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 치료방법에 있어서, $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{15}$ pfu/ml의 종양 살상 바이러스를 포함하며, 통상적으로 1회 주사 시 MSC (1×10^6 세포수 기준) 감염시키는 바이러스의 양은 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ pfu이다.
- [0080] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다.

발명의 효과

- [0082] 암 환자 사망율의 대다수는 전이성 종양에 기인하므로 투여된 바이러스 대비 종양으로의 이동성 및 충분한 양의 종양 살상 바이러스가 종양에 전달되도록 기존의 MSC에 대한 아데노바이러스의 복제율 저하를 획기적으로 개선하였으며, 동시에 종양타겟팅이 향상된 MSC를 개발하였다.
- [0083] 본 발명에 따른 MSC는 종양타겟팅의 현저한 개선 및 동시에 MSC를 기존 바이러스 생산 세포주에 맞먹는 효율로 바이러스의 생산 공장으로서 이용함으로써 IVP/VP (infectious virus particle/virus particle)의 현저한 증가에 따른 부작용은 최소화되면서 안전성 및 항암 효능의 획기적 개선이 가능하였다. 즉, 바이러스 기반 항암제의 가장 큰 난제인 종양원성, 종양 형성, 종양 이동능 및 바이러스의 적절한 시점에 생산/방출 조절 등을 해결하여,

중양살상 바이러스 탑재 MSC의 유효성 최대화 및 독성 최소화를 동시에 달성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0085]

- 도 1은 인간 지방(human adipose) MSC-TERT의 TERT 발현을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 것이다.
- 도 2는 인간 지방 MSC-TERT의 계대 증식이 passage 30에서도 유효한지를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 것이다.
- 도 3은 인간 지방 MSC-TERT의 아데노바이러스 감염능을 형광현미경으로 확인한 것이다.
- 도 4는 인간골수와 지방 MSC에서 E1B55K 발현 유도 시 p53 축적 및 생존관련신호 감소가 일어나는 것을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 것이다.
- 도 5는 Tet-One 유도 발현 시스템으로 독시사이클린 존재 하에 E1B55K의 발현으로 p53 프로모터 활성증가를 발광 강도로 확인한 것이다.
- 도 6은 E1B55K에 의한 p53 프로모터 활성증가가 E4orf6에 의해 저하되는 것을 발광 강도로 확인한 것이다.
- 도 7은 아데노바이러스 백본인 d1324-BstBI에서 E4orf6 유전자를 PCR로 증폭하여 pFlag-CMV2 벡터로 옮긴 후 서열 분석하여 100% 일치함을 확인한 것이다.
- 도 8은 아데노바이러스 셔틀벡터인 pCA14에 E1B55K 유전자를 삽입한 것을 DNA 전기영동으로 확인한 것이다.
- 도 9는 pCA14-E1B55K의 E1B55K 유전자 서열을 확인한 것이다.
- 도 10a는 E1B55K에 대한 다클론 항체(polyclonal antibody)에 의한 E1B55K 검출에 이상이 없음을 확인한 것이다.
- 도 10b는 정제된 E1B55K 발현하는 복제 불능 바이러스의 MOI별 검출 결과 정상적인 발현이 이루어지고 있음을 확인한 것이다.
- 도 11은 E1B55K 발현하는 플라스미드를 MSC-TERT에 트랜스펙션 도입시키고 중양 살상 아데노바이러스 감염 시 바이러스 생산이 향상되고 있음을 바이러스 titration으로 확인한 것이다.
- 도 12는 E1B55K 발현하는 복제불능 바이러스를 MSC-TERT에 MOI별 감염 후 중양 살상 아데노바이러스 추가 감염 시 바이러스 생산이 MOI 증가에 따라 향상되고 있음을 바이러스 titration으로 확인한 것이다.
- 도 13은 Tet-One 유도 발현 시스템의 프로토콜을 나타낸 것이다.
- 도 14는 pRetro-x-tetone-puro-E1B55K 제작 시 PCR 조건을 나타낸 것이다.
- 도 15는 In-fusion 방식의 외부 유전자 도입 방식으로 E1B55K가 pRetro-x-Tetone에 제대로 삽입된 construct 플라스미드를 확인한 것이다.
- 도 16은 제작에 사용된 pRetro-x-Tetone-puro-E1B55K 벡터의 개열지도이다
- 도 17은 pRetro-x-Tetone에 삽입된 E1B55K 플라스미드를 서열 분석하여 최종적으로 도입을 확인한 것이다.
- 도 18은 pRetro-x-Tetone에 삽입된 유전자인 E1B55K가 독시사이클린에 의해 단백질로 발현 유도되는지를 확인한 것이다.
- 도 19는 독시사이클린 처리 시 독시사이클린 양에 따른 pRetro-x-tetone-puro-E1B55K에서 E1B55K의 단백질 발현을 확인한 것이다
- 도 20은 인간 지방 MSC-TERT 에 pRetro-Tetone-E1B55K 트랜스펙션 후 중양 살상 아데노바이러스 감염 후 독시사이클린 처리 유무에 따른 바이러스 생산을 비교한 것이다
- 도 21은 MSC-TERT로부터 MSC-TERT-tetoneE1B55K 세포주 확립한 웨스턴 블랏팅 결과이다.
- 도 22는 MSC-TERT-tetoneE1B55K 세포주로부터 독시사이클린 (2.5 μg/ml) 존재한 조건에서 p53의 축적을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다
- 도 23은 MSC-TERT-tetoneE1B55K 세포주의 중양원성 제거 가능성을 확인한 것이다.
- 도 24a는 GRP78의 증가에 의해 MSC homing의 각 단계에 작용하는 인자들의 발현이 모두 증가하고 있음을 확인한

것이다.

도 24b는 GRP78 발현이 확실히 되고 있음을 확인하기 위해 인간 MSC-TERT 에 pcDNA3.1-GRP78 도입하여 GRP78의 mRNA 발현 증가를 확인한 것이다.

도 25는 pcDNA3.1-hygro 벡터에 GRP78 유전자 삽입 여부를 확인한 결과이다[C: pcDNA3.1-hygro].

도 26은 pcDNA3.1-GRP78 클론으로부터 얻은 플라스미드를 간암 세포주에 트랜스펙션 후 웨스턴 블랏팅으로 GRP78의 단백질 발현 증가를 확인하여 유전자 도입을 검증한 것이다.

도 27은 pcDNA3.1-GRP78 클론으로부터 얻은 플라스미드로부터 도입된 GRP78 유전자의 염기서열을 분석한 결과이다.

도 28은 LNCX 벡터의 제한효소 인식 부위를 증가시킨 LNCXneo 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.

도 29는 LNCXneo에 GRP78 유전자가 삽입된 플라스미드 클론들을 제한효소절단으로 스크리닝한 결과이다.

도 30은 MSC-TERT 세포주로부터 GRP78 유전자를 발현하는 레트로바이러스를 도입시켜 GRP78을 발현하는 클론들을 스크리닝한 결과이다.

도 31은 MSC-TERT-GRP78 도달 부위가 매우 빠른 시간 내에 다른 장기로의 흡착 없이 종양조직 부위로 모여든 것을 명확하게 확인한 결과이다.

도 32는 유전자 이입 완료된 최종 타입의 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78의 종양 타겟팅 검증 (종양으로의 신속 정확)을 폐암(a), 간암(b), 췌장암(c) 세포주에서 확인한 결과이다.

도 33은 최종 타입 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78의 종양 내 침투 (infiltration) 향상을 주사 24시간(a), 48시간(b) 및 72시간(c) 후 확인한 결과이다.

도 34는 최종 타입 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78에 종양 살상 바이러스가 감염되었을 때 독시사이클린 존재 하에 종양 조직 내 아데노바이러스 관련 단백질의 발현을 확인한 것이다.

도 35는 최종 타입 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78 세포주 클론 21, 24, 25, 26번 세포주를 확립한 결과이다.

도 36은 최종 클론 21번에서 독시사이클린에 의한 E1B55K 유도가 매우 낮은 농도에서도 누출이 전혀 없이 효과적으로 충분히 발현 유도되고 있음을 확인한 결과이다.

도 37은 최종 타입 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78에 종양 살상 바이러스가 감염되었을 때 독시사이클린 존재 시 또는 E4orf6 발현 시 에 따른 바이러스 생산 양을 나타낸 것이다.

도 38은 MSC-TERT의 계대 증가에 따른 종양 homing 마커 발현을 확인한 것이다.

도 39는 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78에 감염된 종양 살상 아데노바이러스의 항종양 효과를 마우스의 종양 크기 변화를 그래프로 확인한 것이다.

도 40a는 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78에 감염된 종양 살상 아데노바이러스의 항종양 효과를 마우스의 종양을 적출한 후 크기 변화로 확인한 것이다.

도 40b는 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78에 감염된 종양 살상 아데노바이러스의 항종양 효과를 마우스의 종양 크기 변화를 마우스 촬영사진으로 확인한 것이다.

도 41은 종양(a) 및 다른 장기로의 바이러스 흡착 비율을 나타낸 것이다[간(b), 폐(c), 비장(d), 신장(e) 및 심장(f)].

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0086] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0088] [실시예]

[0089] 참조예 1: 인간 종양 살상 아데노바이러스 YSC-02 제작

[0090] 특허 출원 제 2016-0166171호의 제조예 19에 기재되었듯이 YSC-02를 제작하였다.

- [0092] **참조예 2: 인간 종양 살상 아데노바이러스 d1324-3484-H1-shHSP27-U6-shTGF β1 제작**
- [0093] 특허 출원 제 2016-0166171호의 제조예 9에 기재되었듯이 d1324-3484-H1-shHSP27-U6-shTGF β1 를 제작하였다.
- [0095] **제조예 1: MSC 세포주의 대량 생산을 위한 TERT 유전자 도입**
- [0096] **1) 인간 지방(human adipose) MSC-TERT 단일 클론 발현 확인**
- [0097] MSC의 짧은 공급과 수명을 극복하는 특정 유전자 발현 유도하기 위하여, TERT 유전자 도입하였다. 인간 MSC의 경우 계대 증식(passage extension)이 용이하지 않다. 이를 극복하기 위하여 세포 증식을 유도하는 TERT (telomerase reverse transcriptase) 유전자 삽입하고 TERT를 높게 발현하는 클론을 선별하였다.
- [0098] TERT 유전자 도입방법은 다음과 같다.
- [0099] 플래티늄-A 패키징 세포(Cell Biolabs)에 레트로바이러스 벡터인 pBABE-hygro-hTERT를 Addgene에서 구입하여 1 μg 트랜스팩션하여 얻은 여과시킨 배지를 인간 지방 MSC에 감염시켜 히그로마이신(hygroscopic B Gold 200 μg/ml)에 저항성을 가지는 세포 클론들을 얻은 후 도 1과 같이 스크리닝하여 선별하였다. MSC 클론 22번을 최종 선별하였으며, 이후 실험에 사용된 인간 지방 MSC-TERT은 22번 클론을 사용하였다.
- [0100] **2) 계대 증식 확인**
- [0101] 도 2는 인간 MSC의 계대 증식을 확인한 것으로, 30 계대까지 증식되었다. 30 passage까지 확대 계대된 MSC로부터 TERT의 발현 양 증가가 여전히 매우 뚜렷하게 증가된 채 발현되고 있었으며 다른 MSC 관련 주요 마커들의 발현도 wild type 에 비교하여 유지 내지 증가된 결과를 확인하였다.
- [0102] **3) 아데노바이러스 감염능 확인**
- [0103] TERT가 발현되는 MSC 클론 (22번)에 RFP (red fluorescence protein)을 발현하는 복제불능 아데노바이러스를 20 MOI, 100 MOI로 감염시키고 48시간 후에 형광현미경으로 형광 염색된 세포들을 관찰하였다. 대조군인 wild type의 MSC와 비교한 결과, 인간 MSC-TERT 의 감염율이 대조군에 비하여 향상된 것을 확인하였으며, 최소 2배 이상 (20 MOI) 그리고 100 MOI에서 감염율이 90% 이상 충족되었다(도 3).
- [0105] **실시예 1: 아데노바이러스 유전자인 E1B55K 의 새로운 기능 확인**
- [0106] 임상용 대량 생산을 위한 세포주로 MSC를 사용하려는 경우 마스터 세포주은행 생산(master cell banking)을 해야 한다. 이를 위해서는 MSC의 passage extension이 무엇보다도 가능해야만 하는 것이 필수적이다. 그러나 한편으로는 extension 유도가 종양원성 가능성 증가에는 기여해서는 절대로 안 된다는 원칙을 또한 유지해야만 한다. 이 두 가지를 동시에 충족시켜야 하는 딜레마를 처음에는 불가능할 것으로 간주되었으나 본 실험실에서 MSC에 CAR와 E1B55K 유전자 도입한 안정한 MSC 세포주 제작하면서 처음으로 해결책을 제시하였다. 기출원된 골수 유래 인간 MSC로부터 인간 MSC-CAR-E1B55K 세포주 확립하였으며 바이러스 생산 증가 확인하였다[특허문헌 1]. 그러나 계대 증식이 용이하지 않았으며 계대 경과함에 따라 세포주 상태 나빠짐을 수 차례 확인하였다. 이로 인해 동물 실험 및 경우 마스터 세포주은행 생산이 불가능함을 확인하고 그 원인을 파악한 결과, E1B55K의 바이러스 증식 증가 유도 기능 외에도 세포주의 생존능 저하를 동시에 유도한다는 사실을 확인하였다 (도 4). 즉, 종양 억제 유전자 및 세포분열 억제 인자로 잘 알려진 p53을 뚜렷하게 축적하며 뿐만 아니라 E1B55K에 의해 세포의 생존과 관련된 인자들 (HSP27, HSP70, Daxx, phospho-p65, NF-κB, c-Met)의 발현이 감소되었음을 확인하였다.
- [0107] 이에 대한 실험 과정은 다음과 같다.
- [0108] 먼저 E1B55K를 pcDNA3.1 hygro(+)에 클로닝하였다. E1B55K 유전자가 포함되어 있는 pBSK-3484로부터 E1B55K 유전자를 빼내기 위해 프라이머 각각 BamHI과 NotI을 가지는 프라이머 (forward, 5'-GCGGATCCATGGAGCGAAGAAACCCATCT-3': 서열번호 4, reverse, 5'-GAG CGGCCGCTCAATCTGTATCTTCATCGCT-3': 서열번호 5)로 PCR (initial denaturing: 95℃ 2분 후, denaturing: 95℃ 30초, annealing: 58℃ 30초, extension: 72℃ 2분; 30 cycle) BamHI/NotI 절단 후 미리 BamHI/NotI 절단한 pcDNA3.1 hygro(+)(Invitrogen)에 도입시켜 제작하였다.
- [0109] E1B55K의 세포주 장기 발현은 세포주의 생존능력을 저하시킨다는 것을 E1B55K를 발현하는 플라스미드를 골수 유래 MSC와 지방 유래 MSC에 트랜스팩션하여 확인하였다. 즉, p53의 축적과 다양한 생존관련 신호들의 저하현상을 관찰하였다.

- [0110] E1B55K 발현에 의한 p53의 축적과 세포 생존신호 감소 및 세포사멸 유도가 어떻게 일어나는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 가정하였다. 즉, E1B55K의 기존에 잘 알려진 p53 degradation에 의한 세포 생존 유지는 E4orf6 단백질과의 complex를 통하여서만 일어나는 것으로 알려져 있었다. 따라서 MSC 세포에 E1B55K만을 발현 유도하면 E1B55K의 E4orf6에 대한 양적인 비교우위에 의하여 (stoichiometrically) 자유로운 단독의 E1B55K는 p53 전사를 촉진하는 전사활성인자로 작용하여 세포 생존능을 감소시킨다는 가설을 세우고 다음과 같이 실험을 진행하였다.
- [0111] MSC-TERT-tetoneE1B55K 세포주에 p53 프로모터 일정 부분(-344 내지 +12)이 루시페라제 코딩 유전자 (luciferase coding gene)가 삽입되어 있는 부위 앞쪽으로 위치하도록 제작된 pGL2-p53 프로모터 (pGL2-356bp, Addgene)와 E4orf6 유전자가 서브클로닝된 pFlag-CMV2-E4orf6 또는 대조군으로서 pFlag-CMV2 (Sigma)를 각각 1 µg씩 코트랜스펙션 후 독시사이클린 (1.25 µg/ml 48 h 동안) 유무에 따른 루시페라제 활성을 발광 강도로 확인하였다.
- [0112] 이때 사용한 분석방법은 프로메가의 듀얼-루시페라제 리포터 어세이 시스템을 사용하였다 (catalog number #E1910, 도 5).
- [0113] 독시사이클린 처리에 의하여 MSC-TERT-tetoneE1B55K 세포주에서 발현 유도된 E1B55K에 의하여 p53 프로모터에 직접적으로 혹은 간접적으로 결합하여 전사를 활성화시켜 루시페라제 활성에 의한 발광 강도를 4배 이상 증가시켰다(도 5). 반면에 E4orf6 발현이 E1B55K 발현되는 MSC에서 같이 일어나는 경우 발광 강도의 증가는 1.5배를 넘지 못함을 확인하였다. 이러한 결과는 E4orf6는 E1B55K와의 복합체 형성으로 E1B55K 단독의 작용을 간섭함과 동시에 오히려 p53 단백질의 분해를 촉진하는 기존의 알려진 역할을 보다 적극적으로 수행하는 것으로 보인다(도 6).
- [0114] 여기서 E4orf6 (진뱅크 AC_000008; E4 34K라고도 불림) 유전자의 서브클로닝은 아데노바이러스 백본인 d1324-BstBI으로부터 pFlag-CMV2 벡터로 E4orf6 유전자를 옮기는 것을 진행하였다. 이를 위해 E4orf6 PCR용 프라이머 (HindIII를 포함하는 forward 5'-GTACAAGCTTATGACTAC GTCCGGCGTTCC-3': 서열번호 6 및 XbaI을 포함하는 reverse 5'-CACCTCTAGACTACA TGGGGGTAGAGTCAT-3': 서열번호 7)를 사용하여 d1324-BstBI에서 PCR(initial denaturing: 95°C 2분 후, denaturing : 95°C 30초, annealing : 58°C 30초, extension : 72°C 1분 30초; 30 cycle) 로 E4orf6 코딩 유전자 부위를 증폭한 후 HindIII/XbaI 로 double digestion하고, HindIII와 XbaI로 절단시킨 pFlag-CMV2로 연결하였다. 서브클로닝이 제대로 되었는지를 코스모진텍의 universal 프라이머 중의 하나인 CMV30(5'-AATGTCGAATAACCCCGCCCGTTGACGC-3': 서열번호 8)로 서열 분석하여 100% 일치함을 확인하였다(도 7).
- [0115] 이상의 실험결과들로부터 E1B55K의 과대 발현 유도는 아데노바이러스 wild type 에서의 E1B55K의 주된 작용 (E4orf6과 복합체를 이루어 p53 단백질의 분해 유도)과는 상반된 p53 프로모터에 직접적으로 혹은 간접적으로 작용하여 전사유도를 통해 p53 축적을 유도하는 새로운 작용을 발견하였다. 그리고 E1B55K의 발현 증가에 따른 MSC 세포사멸 증가 및 생존 신호 감소가 MSC에서 바이러스 생산능에 어떻게 영향을 주는지를 확인하기 위하여, 아데노바이러스 전달체를 이용하여 E1B55K를 외부에서 공급하여 MSC에서 바이러스 생산능 증가 여부를 다시 확인하여 보기로 했다. 이를 위해 다음과 같이 E1B55K 발현하는 복제불능 아데노바이러스를 제작하였다.
- [0116] **1) E1B55K 발현하는 복제불능 아데노바이러스(pCA14-E1B55K) 제작**
- [0117] 아데노바이러스 서플벡터인 pCA14에 E1B55K 유전자를 클로닝하였다. E1B55K는 pBSK-3484 안에 포함되어 있으며 XbaI과 HindIII를 양 말단에 포함하는 형태로 프라이머 (sense 5'-TTCATCTAGAATGGAGCGAAGAAACCCATC-3'(XbaI): 서열번호 9, antisense 5'-GACGAAGCTTTCAATCTGTATCTTCATCGC -3 (HindIII): 서열번호 10)를 제작하여 PCR (initial denaturing: 95°C 2분 후, denaturing: 95°C 30초, annealing: 58°C 30초, extension: 72°C 2분; 30 cycle)로 증폭하고 XbaI/HindIII로 미리 절단된 pCA14 (Microbix, Canada) 안으로 연결하였다. 그 결과 pCA14 안으로 모든 E1B55K PCR 단편이 삽입된 것을 확인하였다 (도 8). 확인된 아데노바이러스 서플 벡터인 pCA14-E1B55K는 서열 확인 (도 9) 후 다시 XmnI 절단으로 선형화하며 아데노바이러스 벡터인 d1324-BstBI는 Bsp119I 절단으로 선형화하여 이 둘을 E. coli BJ5183에 동시형질전환(cotransformation)하여 상동재조합을 유도하여 E1B55K를 발현하는 아데노바이러스 벡터를 제작한 후 293A에 트랜스펙션 후 바이러스 생성을 유도하고 확대 생산하고 분리 정제 후 역가를 산출하였다.
- [0118] pCA14 서열분석 전용 프라이머 (자체 제작 forward (hCMV): 5'-GGG AGGCTATATAAGCAGAGCTCG-3': 서열번호 11, reverse (pCA14 SV40): 5'-CATGATCGATGCTAG ACGATCCAGA-3': 서열번호 12)로 정방향과 역방향으로 읽은 pCA14-

E1B55K 플라스미드 클론 1, 2, 3, 4 중 1, 2, 3 일치함을 확인하였고 여기서 도 9는 샘플 3번 클론 플라스미드 DNA의 서열 분석 결과이다. 도 9에서 보이는 중간에 일치되지 않는 정방향의 두 군데 (red) 서열은 기존의 wild adenovirus type 5의 E1B55K의 첫 번째 염기인 a가 진뱅크의 AC_000008의 2019번이고 2048번 forward 프라이머 g가 a로 일부러 치환하여 KpnI 부위(GGTACC→AGTACC)를 제거하였고 2084번 forward (reverse의 red와 overlap) a가 t로 치환하여 HindIII 부위 (AAGCTT→TAGCTT) 를 일부러 제거하였다 (100% 상동).

[0119] **2) E1B55K 발현하는 바이러스가 감염된 MSC의 lysate에서 E1B55K 발현 확인**

[0120] E1B55K 발현을 위해 E1B55K에 대한 특이 항체를 제작 의뢰하여 확보한 polyclonal antibody에 의한 E1B55K 검출에 이상이 없음을 확인(도 10a)한 후 생산 및 정제한 바이러스의 MOI별 검출 결과 정상적인 발현이 이루어지고 있음을 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다 (도 10b). 도 10a의 우측 도면은 좌측 도면의 raw data로서 Polyclonal 항체인 E1B55K의 정확한 크기와 밴드를 확인하고자 첨부하였다. 도 10a의 3번째 레인은 E1B55K를 발현하는 아데노바이러스 벡터 (d1324-E1B55K) DNA 3 µg을 PacI 절단 후 293A에 트랜스펙션하고 바이러스 생성 확인 후 수확한 soup을 인간 지방세포 유래 MSC-TERT에 감염시킨 것이며, 4번째 레인은 3번째 레인과 마찬가지로 진행시켜 얻은 soup과 플러스 세포를 냉동(freezing) 및 해동(thawing)하여 최종적인 soup을 감염시킨 것이고 5번째 레인은 처음 트랜스펙션 시 DNA 양을 2.5 µg으로 개시한 것이다. 도 10b는 5번째 레인의 조건으로 얻은 viral soup을 증폭하여 정제 후 바이러스의 감염능 입자를 계산하여 각 MOI별로 복제불능의 E1B55K를 발현하는 바이러스를 MSC-TERT에 감염시켰을 때 MOI가 증가함에 따라 E1B55K에 해당하는 band의 강도도 증가하고 있음을 확인함으로써 E1B55K에 대한 다클론 항체가 정상적으로 잘 작동되고 있음을 확인하였다.

[0121] E1B55K에 대한 특이 항체인 다클론 항체의 제작 과정은 다음과 같다.

[0122] 먼저, E1B55K의 N 말단 부위에 위치한 펩티드 서열 (MERRNPSERGVPAFGSGHASVESGC: 서열번호 13)을 합성하고 BSA (bovine serum albumin)을 면역원 carrier로 컨쥬게이션시킨 후 New Zealand White rabbits에 예방 접종 (immunization)시켜 혈청을 정제하여 얻었다 (GW Vitek, Korea).

[0123] **3) 인간 지방 MSC-TERT 에서 E1B55K 발현 정도에 따른 바이러스 생산 비교 → 유전자 이입에 따른 MSC의 바이러스 생산능 획기적 확대 검증**

[0124] 먼저, E1B55K 발현하는 플라스미드 (pcDNA3.1-E1B55K) 1µg을 인간 지방세포 유래 MSC-TERT에 트랜스펙션 (도 11) 또는 E1B55K 발현하는 복제 불능 defective 아데노바이러스를 MOI별로 감염 (도 12) 4시간 후 배지 교체하고 중앙 살상 아데노바이러스 (YSC-02)를 100 MOI로 감염 후 48시간이 지닌 다음에 배지와 세포들을 모두 수거한 후 냉동(freezing)과 해동(thawing) 하여 바이러스를 최대한 여기시킨 다음 원심분리하여 얻은 상등액 안에 감염능있는 바이러스의 적정(titration)을 진행한 결과를 보여주고 있다. 그 결과, E1B55K가 발현하는 MSC-TERT에서 중앙 살상 아데노바이러스 감염 후 대조군과 비교 시 바이러스 생산이 확연히 증가함을 확인하였다 (도 12).

[0126] **실시예 2: 획기적 바이러스 생산 증가 유도 및 탑재유전자 발현시점 조절, 및 원천적 중앙원성 제어 기술의 동시 실현은 E1B55K의 시간차 발현 조절 시스템 도입으로 가능해짐**

[0127] MSC 세포주 대량 생산을 위해 불가피하게 도입된 TERT 유전자에 의한 제어 중앙원성 가능성 증가는 E1B55K가 바이러스 복제 증가 유도뿐만 아니라 MSC 세포의 전반적인 생존능 감소를 유도하는 것을 처음으로 규명함으로써 해결 방안을 마련할 수 있었다. 즉, E1B55K 유전자의 발현시점을 시간차 유도하여 MSC의 계대 증식을 가능하게 하여 cell banking을 통한 대량 생산 가능하게 함과 동시에 MSC의 중앙원성(tumorigenesis)을 원천적으로 차단시키는 제어기술 개발하였다. 이로서 바이러스/MSC 치료제의 혁신적 전기를 마련했다는데 큰 의의가 있다.

[0128] Retro-X™Tet-One™ 유도 발현 시스템 (다카라 cat# 634307)은 도 13의 프로토콜을 참조하였다.

[0129] **1) pRetro-X-Tet-one-puro-E1B55K 제작**

[0130] Retro-X-Tet-one-puro vector 플라스미드에 E1B55K 유전자를 넣기 위해서는 양 말단에 각각 EcoRI과 BamHI 인식부위를 가져야 한다. 인식부위 가지는 E1B55K 제작 위해 pCA14-E1B55K를 주형으로 사용하였으며 E1B55K In-fusion EcoRI sense primer는 5'-CCCTCGTAAAGAATTCATGGAGCGAAGAAACCCATCTGAG-3' (서열번호 14)이며 E1B55K In-fusion BamHI antisense primer는 5'-GAGGTGGTCTGGATCCTCAATCTGTATCTTCATCGCTAGA-3' (서열번호 15)이다.

[0131] PCR 조건은 아래와 같다(도 14).

- [0132] Initial denaturing을 95℃ 2분으로 한 후 denaturing 95℃ 40초, annealing: 61℃ 40초, extension: 72℃ 1분 50초; 30 cycle을 진행하였다.
- [0133] PCR 진행은 Promega(#M750B) 제품 사용하였다.
- [0134] In-fusion 방식의 외부 유전자 도입 방식으로 E1B55K가 pRetro-X-Tet one에 제대로 삽입된 construct 플라스미드 (도 15의 sample pRetro-X-Tetone-E1B55K #13) 를 확보한 후 서열 분석하여 최종적으로 도입을 확인하였다 (도 17). 그 다음 독시사이클린에 의해 실제로 삽입된 유전자인 E1B55K 단백질이 발현 유도되는지 확인하였다 (도 18). 도 18의 5번째 레인에서와 같이 독시사이클린 (2.5 µg/ml) 존재 하에서만 pRetro-X-Tetone-E1B55K 플라스미드가 A549에 트랜스펙션되었을 때 E1B55K가 발현 유도되었으며, 독시사이클린이 존재하지 않은 경우의 동일한 플라스미드가 트랜스펙션되었을 경우에는 발현 유도가 되지 않음을 확인하였다. 즉, 전혀 leakage 현상이 일어나지 않았다. 맨 오른쪽 레인은 E1B55K가 constitutive 하게 발현하게 하여 E1B55K 발현을 확인한 positive condition이다.
- [0135] 제작에 사용된 pRetro-X-tetone-puro-E1B55K 벡터는 도 16에 나타내었다.
- [0136] **2) pRetro-X-tetone-puro-E1B55K 발현 확인**
- [0137] pRetro-X-Tetone-puro-E1B55K 플라스미드 트랜스펙션 후 독시사이클린 처리 시 독시사이클린 양에 따른 pRetro-X-tetone-puro-E1B55K에서 E1B55K의 발현을 확인하였다. tet one system으로 E1B55K의 시간차 발현 조절 제어가 가능한지를 알아보기 위하여 tet one system을 도입한 경우 독시사이클린 처리 전에는 E1B55K의 발현이 전혀 일어나지 않고 있음을 확인하였다(도 19). 즉, leakage 일어나지 않음을 확인하였다. 반면에 독시사이클린 0.05 µg/ml 라는 매우 적은 농도가 처리되더라도 즉시 E1B55K 발현이 유도되었다. 이것은 독시사이클린 처리 전에는 cell survival 유지가 가능하며, 종양 도달 후 독시사이클린 처리 후 즉시 발현 유도하게 할 수 있음을 의미한다.
- [0138] 시간 차 바이러스 방출 검증은 다음과 같이 2차 검증하였다.
- [0139] 인간 지방 MSC-TERT에 pRetro-tetone-E1B55K 플라스미드 트랜스펙션 후 (4시간) RFP (red florescence protein) 발현하는 종양 살상 아데노바이러스 감염 후 (4시간) 독시사이클린 처리 유무에 따른 바이러스 생산을 48시간 후 비교하였다.
- [0140] 그 결과, 독시사이클린 처리 시 바이러스 생산이 10배 이상 뚜렷하게 증가하는 것을 확인하였다 (도 20).
- [0141] **3) MSC-TERT-tetoneE1B55K 세포주 확립**
- [0142] 아데노바이러스의 early region 1B-55kDa인 E1B55K를 인코딩하는 유전자를 Retro-X-Tet-One inducible expression system (TAKARA Bio Inc.)에 도입한 후 MSC-TERT에 감염시켜 독시사이클린 존재 시 E1B55K 발현하는 클론들을 확보하였다. 이를 위해 GP2-293 패키징 세포에 pRetroX-TetOne-E1B55K과 막 단백질을 인코딩하는 pAmpho 벡터 (다카라 키트 안에 포함됨)를 같이 트랜스펙션하였다. 48시간 후 여과시킨 retroviral supernatant 를 타겟 세포인 MSC-TERT에 감염시켰다. 배양과정 중 puromycin으로 선별한 모든 클론들을 독시사이클린 (2.5 µg/ml) 존재한 조건에서 E1B55K의 발현 유도 (도 21)와 p53의 축적 (도 22)이 동시에 진행됨을 제차 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다.
- [0143] 이상의 결과로부터 탑재 유전자인 E1B55K의 발현시점을 독시사이클린 처리에 따라 조절함으로써 바이러스 생산 유도를 원하는 시점에 증가시킬 수 있게 됨을 의미하였다. (E1B55K 의 유전자 발현 유도가 진행되어야 하므로 독시사이클린 처리 후 최소 24시간 정도 경과후에 바이러스의 증가가 개시될 것으로 보인다.)
- [0144] **4) 원천적 종양원성 제어 기술 실현**
- [0145] 도 21의 클론 2번 또는 10번의 종양원성 제어가 가능한지를 확인하였다. 이를 위해 클론세포주가 분주된 6-well1 에 독시사이클린 처리 후 장기간(~14일) 배양을 실시하였다.
- [0146] 그 결과, 독시사이클린 처리 (1.25 µg/ml) 배양 2주가 경과하면 거의 대부분의 세포들의 생존능이 사라지는 것을 확인하였다(도 23). 이로써 종양 살상 바이러스 감염에 의한 용해(lysis) 이외 감염되지 않은 MSC라 할지라도 E1B55K 발현 레트로바이러스에 의해 감염되어 선별된 사용 세포주들은 결국에는 세포사멸에 이르게 되므로 종양원성의 가능성은 원천적으로 배제된다.
- [0147]

[0148] **실시예 3: 종양 타겟팅 획기적 증가 확립 - Tumor homing 향상 요인 발굴**

[0149] 인간 지방 MSC-TERT에 GRP78 추가 발현 유도함으로 종양 향성(tumor tropism) 관련 마커 발현을 확인하였다.

[0150] GRP78의 증가에 의해 MSC homing의 각 단계에 작용하는 인자들의 발현이 모두 증가하고 있음을 확인하였다 (도 24a).

[0151] GRP78 발현이 확실히 되고 있음을 확인하기 위해 인간 MSC-TERT에 pcDNA3.1-GRP78 (2 µg) 트랜스펙션하여 GRP78의 mRNA 발현 증가를 확인하였다 (도 24b).

[0152] **1) pcDNA3.1 hygro (+)로의 GRP78 클로닝**

[0153] GRP78 발현량이 높은 간암 세포주인 SNU449에서 Trizol로 RNA 추출하였다. 추출한 RNA는 invitrogen의 SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit를 이용하여 역전사하였다. 그리고 PCR 진행하기 위하여 사용한 프라이머는 정방향으로는 XhoI 부위를 추가하고 역방향으로는 XbaI 부위를 추가하여 서열 제작하였다. Forward (5'-GATTCTCGAGATGAAGCTCTCCCTGG-3': 서열번호 16), Reverse (5'-GGCCTCTAGACTACAACATCATCTTTT-3': 서열번호 17) 프라이머를 사용하여 PCR (initial denaturing 95°C 2분 후 denaturing: 95°C 40초, annealing: 58°C 40초, extension: 72°C 2분 30초; 30 cycle) 클로닝하였다. PCR하여 XhoI/XbaI로 절단 후, 백본인 pcDNA3.1-hygro 벡터 또한 XhoI/XbaI로 절단하여 연결하였다. 박테리아에 형질전환 후 얻은 콜로니들을 배양하였다. 이렇게 얻은 각각의 플라스미드들을 XhoI/XbaI로 동시 절단하여 삽입을 확인하여 5번 플라스미드에서 만 크기가 일치하는 삽입을 확인하였다 (도 25). 확인된 5번의 pcDNA3.1-GRP78을 간암 세포주인 SNU449에 트랜스펙션 후 웨스턴 블랏팅으로 GRP78의 단백질 발현 증가를 확인하였다 (도 26). 그리고 5번 샘플 플라스미드를 서열 분석한 결과 NCBI NM_005347과 100% 상동성을 보였다 (도 27).

[0154] **2) pLNCX neo로의 GRP78 클로닝**

[0155] GRP78 유전자를 MSC-TERT 또는 MSC-TERT-tetonE1B55K 에 도입하기 위하여 다음과 같이 수행하였다.

[0156] 레트로바이러스 벡터인 pLNCXneo에 GRP78을 도입하기 위하여 pcDNA3.1-GRP78 vector에서 XhoI/PmeI으로 절단하여 GRP78 부위를 빼내어 이를 미리 XhoI/PmeI으로 절단한 pLNCXneo에 연결하여 삽입하였다.

[0157] pLNCX neo는 기존의 LNCX 안의 cloning site인 HindIII-HpaI-ClaI에서 HindIII-PmlI-BstXI-NotI-XhoI-SalI-ApaI-PmeI-HpaI-ClaI으로 제한효소 인식부위 증가시켜 자체 제작하였다 (도 28).

[0158] 이때 strand sequence는 다음과 같다.

[0159] Top 5'-AGTTCACGTGCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCGACGGCCCGTTTAAACGTTAACAT-3', (서열번호 18)

[0160] Bottom 5'-CGATGTTAACGTTTAAACGGGCCCGTCGACTCGAGCGGCCCGCCACTGTGCTGGCACGTGA-3 (서열번호 19).

[0161] LNCXneo-GRP78 삽입 여부 확인은 대조구로 pLNCXneo (control)와 pcDNA3.1-GRP78 (GRP78 유전자 제공 플라스미드)를 각각 HindIII/PmeI으로 절단하여 선형화된 pLNCXneo와 pcDNA3.1-GRP78로부터 유래된 GRP78 단편을 연결하여 DH5 a competent cell에 형질전환 후 플라스미드를 획득하여 pLNCXneo-GRP78 후보 construct들 (샘플 1-24)을 동시 절단하여 2,5,9,11,12,20,21번 샘플에 삽입된 것을 확인하였다 (도 29).

[0162] **3) MSC-TERT-GRP78 세포주 제작**

[0163] 플라티늄-A 패키징 세포(Cell Biolabs)에 레트로바이러스 벡터인 pLNCXneo-GRP78을 트랜스펙션하여 48시간이 경과한 후 배지를 여과시켰다. 여과시켜 얻은 레트로바이러스를 포함한 배지 용액을 MSC-TERT에 감염시켜 G418 (500µg~600 µg/ml)에 저항성을 가지는 세포 클론들을 얻은 후 스크리닝하여 GRP78 및 MMP2 발현이 뚜렷한 클론 2번과 4번을 선별하였다 (도 30).

[0164] **4) 유전자 이입한 MSC의 종양 타겟팅: 매우 빠른 시간 내에 종양부위로만 특이적으로 도달 조건 확인**

[0165] **① MSC-TERT-GRP78의 종양타겟팅 검증**

[0166] 6주령의 BALB/c 홍신 누드 마우스의 어깨 부위에 2×10^6 개의 SNU398 세포 (간암 세포주)을 피하에 이식하고 7일 경과 후 꼬리 정맥으로 반딧불이 루시페라제를 발현하는 복제불능의 아데노바이러스를 감염시킨 1×10^6 개의 MSC-TERT-GRP78 주사하였다. 발광을 인식하는 IVIS (in vivo imaging system) 장치를 사용하기 위하여 마우스의 복강으로 마우스 kg 당 150 mg D-luciferin을 주사하였다. In vivo에서 루시페라제 발현하는 아데노바이러스

스 감염된 MSC-TERT-GRP78의 체내 분포를 꼬리정맥주사한지 6시간후 IVIS Spectrum System (PerkinElmer) 을 사용하여 영상 촬영하여 관찰하였다. 이 실험의 특징은 GRP78 유전자 이입한 MSC-TERT-GRP78가 종양 이동능이 얼마나 있는지를 정확하게 구별하기 위하여 간, 폐와 같은 내부장기와 구별하기 위해 어깨 쪽에 종양 형성하게 함으로써 MSC-TERT-GRP78의 도달 부위가 매우 빠른 시간 내에 다른 장기로의 흡착 없이 종양조직 부위로 모여든 것을 명확하게 확인하였다 (도 31).

[0167] ② 유전자 이입 완료된 최종 타입 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78의 종양 타겟팅 검증

[0168] 6주령의 BALB/c 홍선 누드 마우스의 어깨 부위에 8×10^6 개의 A549 세포 (폐암 세포주), 2×10^6 개의 SNU398 세포 (간암 세포주) 또는 2×10^6 개의 MiaPaCa-2 세포 (췌장암 세포주)를 피하에 이식하고 7일 경과 후 꼬리 정맥으로 반딧불이 루시페라제를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 감염시킨 1×10^6 개의 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78을 주사하였다. 발광을 인식하는 IVIS 장치를 사용하기 위하여 마우스의 복강으로 마우스 kg 당 150 mg D-luciferin을 주사하였다. In vivo에서 루시페라제를 발현하는 아데노바이러스 감염된 MSCs의 체내 분포를 IVIS Spectrum System (PerkinElmer)을 사용하여 6시간 또는 24시간 후 관찰하였다.

[0169] 그 결과, 앞의 타겟팅 실험 ①과 마찬가지로 간, 폐와 같은 내부장기와 구별하기 위해 어깨 쪽에 종양 형성하게 함으로써 MSC의 도달 부위가 매우 빠른 시간 내에 다른 장기로의 흡착 없이 종양 조직 부위로 모여든 것을 명확하게 확인하였다(도 32). 여기서 알 수 있듯이 GRP78 이 포함된 최종 타입의 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78에서 암중에 구별 없이 GRP78이 없는 MSC에 비하여 도 31과 같이 매우 빠른 시간 안에 종양 부위로 이동한 것을 볼 수 있으며, 그 차이는 루시페라제 활성 강도 수치로 비교할 때 확연하게 강도 차이가 있는 것을 확인할 수 있다 (종양에서의 발광 강도에 따라 최소 10배에서 최대 100 이상). 이는 종양 타겟팅이 매우 신속하고 정확하게 일어나고 있음을 알 수 있다. 여기서 E1B55K 는 독시사이클린을 먹이에 포함시키지 않았기 때문에 발현되지 않는다.

[0170] 이러한 종양으로의 루시페라제 발현하는 MSC-GRP78의 놀라우리만치 신속하고 정확한 trafficking 및 다양한 종양타입에 대한 타겟팅은 MSC-GRP78의 종양 진단에 활용할 수 있는 가능성을 매우 높인다. 마우스 1차 모델에서는 고형 암을 인위적으로 피하에 심어놓고 MSC-GRP78을 이동시키게 함으로써 종양 부위를 확인한 것이지만 체내 존재하는 전이형 모델에서도 같은 방식으로 종양 존재하면 종양 부위로 전달되어 발광하게 하거나 혹은 보다 resolution이 좋은 동위원소를 라벨링하여 종양을 검출 가능할 수 있게 된다. 이는 종양 진단에 응용 가능하며 장기적으로 종양 진단과 동시에 치료까지도 가능한 OV/MSC 복합체 제작이 가능해진다.

[0171] ③ 유전자 이입 완료된 최종 타입 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78의 종양 내 침투 (infiltration) 확인

[0172] 최종 타입의 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78가 종양 부위로 도달된 것을 확인하였고 실제로 도달된 MSC가 종양 조직 내로 침투하는지 확인하기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

[0173] 먼저, A549 세포를 마우스의 피하조직에 이식하여 종양을 형성시켰다. 그런 다음 최종 타입의MSC 세포 (MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78)를 fluorescent cell tracker probe (Invitrogen, C34565)로 라벨링시킨 후 마우스 꼬리 정맥으로 주사하였다. 주사 24시간, 48시간 및 72시간이 경과한 후 종양 조직을 적출하고 조직 section한 후 형광 현미경으로 형광 부위를 확인하였다. 도 33에서 보듯이, GRP78을 가지는MSC가 종양 내로 훨씬 많이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. GRP78이 없는 MSC의 경우 낮은 형광강도로 종양 경계면에 주로 머물러 있음을 관찰하였다.

[0174] ④ 종양 조직 내 아데노바이러스 관련 단백질의 발현 확인

[0175] 종양 조직 안에 침투한 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78로부터 바이러스가 방출되어 종양세포들을 감염시키고 바이러스 생산 후 일정기간 바이러스가 복제 및 유지되는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

[0176] 6주령의 BALB/c 홍선 누드 마우스의 옆구리 부위에 8×10^6 개의 A549 세포 (폐암 세포주)을 피하에 이식하고 종양 크기가 평균 150 mm³에 도달한 마우스들을 각각 2마리씩 꼬리 정맥으로 shHSP27-shTGF β 1을 발현하는 종양 살상 아데노바이러스로 감염된 1×10^6 개의 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78을 주사하였다. 그리고 3일 지난 후에 추가로 shHSP27-shTGF β 1을 발현하는 종양 살상 아데노바이러스가 감염된 1×10^6 개의 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78을 주사하였다. 그리고 두 번째 주사 후 7일째 각 그룹 마우스들의 종양을 적출하여 종양 section한 샘플들을adenovirus type 5 특이 항체 (Abcam, Cambridge, UK) 로 반응시켜 2차 항체로 DAB 발색 반

응시시키고 헤마톡실린 핵 염색으로 면역조직화학을 위한 대조염색을 진행하였다. 이때 모든 그룹에 독시사이클린 (625 mg/kg)이 포함된 먹이를 사료로 공급하였다.

[0177] 그 결과, 아데노바이러스 특이 단백질들은 확인된 대부분의 면적에서 확인되었다(도 34). 아데노바이러스가 최소 꼬리 정맥 주사 후 7일까지는 중앙 조직에서 MSC로부터 방출되어 복제, 증식과 퍼짐(spreading)이 반복적으로 일어나고 있음을 보여주며, 중앙 크기가 거의 0수준으로 줄어들고 있는 20일 전후까지는 바이러스가 잔존하고 있을 가능성을 확인하였다.

[0178] **5) 인간 지방MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78 세포주 확립- 독시사이클린 1.25µg/mL 48h 후 E1B55K 발현 여부 확인**

[0179] GP2-293 패키징 세포에 pRetroX-TetOne-E1B55K과 막 단백질을 인코딩하는 pAmpho 벡터를 cotransfection하여 얻은 retroviral soup 감염 후 puromycin selection(0.8 µg/ml~1.0 µg/ml)하고, 다시 플래티늄-A 패키징 세포에 레트로바이러스 벡터인 pLNCXneo-GRP78을 트랜스펙션하여 얻은 retroviral soup 감염 후 G418 selection(500 µg/ml~600 µg/ml)하고 독시사이클린 존재 (1.25 µg/ml) 하에 E1B55K 및 MMP2 단백질 발현이 뚜렷한 최종 클론들을 선별하였다 (도 35, 최종 클론 21,24,25,26).

[0180] 최종 클론 21번에서 독시사이클린에 의한 E1B55K 유도 농도는 사용하던 1.25 µg/ml의 1/10도 채 안되는 매우 낮은 농도에서도 효과적으로 충분히 누출이 전혀 없이 발현 유도되고 있음을 보여준다 (도 36). 이는 in vivo 에서 발현 유도 물질인 독시사이클린의 처리량에 크게 좌우되지 않고 단지 독시사이클린 존재 유무에 의해서 매우 민감하게 반응하므로 in vivo 에서 on/off를 확실하게 할 수 있어 바이러스의 생산을 원하는 시점에 유도할 수 있게 됨을 시사한다.

[0181] 인간 지방MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78 (클론 21번)의 바이러스 생산능은 shHSP27/shTGF β1 발현하는 종양 살상 아데노바이러스 감염 후 독시사이클린 처리 (1.25 µg/ml) 시 MSC에서 바이러스 생산 증가율을 48 시간 후 확인하였으며, 이때 E4orf6 유전자 발현에 따른 바이러스 생산량 차이도 확인하였다. 이 실험을 위해 클론 21번의 MSC에 E4orf6 유전자가 서브클로닝된 pFlag-CMV2-E4orf6 또는 대조군으로서 pFlag-CMV2를 각각 1 µg씩 트랜스펙션하고 shHSP27/shTGF β1 발현하는 종양 살상 아데노바이러스 추가 감염 후 독시사이클린 처리(1.25 µg/ml 48 h 동안) 한 다음 수확한 soup와 잔존 세포 안의 전체 바이러스 양을 titration 하여 측정하였다. 그 결과, 최종 클론 21번에서 독시사이클린 처리 시 바이러스 생산이 10배 가까이 증가하는 것을 확인하였으며, E4orf6 유전자 트랜스펙션 여부에 따라 바이러스의 생산량에 차이가 나타났다 (도 37). 즉, E4orf6 외부 발현 유도에 따라 바이러스의 생산량이 감소하였다. 이는 E1B55K 단독의 작용에 의한 바이러스 생산 증가를 E4ORF6에 의한 complex 형성으로 인한 바이러스 생산 저해요소로 작용하는 것으로 보인다. (E1B55K 단독에 의한 MSC의 세포사멸과정 유도는 바이러스 생산에 기여함을 확인한 것이다. E1B55K/E4orf6 복합체는 MSC의 세포사멸을 방해하여 결과적으로 바이러스 생산의 최적 시기를 놓치게 한다.)

[0182] **6) 인간 지방 MSC-TERT low passage와 high passage에서의 효능 유지 비교**

[0183] master cell bank 세포주 200 vial 이상 대량 생산 시 MSC 효능 유지 확인이 필수적이다. 즉, 최종 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78의 계대별 차이로 인한 MSC 특성인 tumor homing에 관련된 마커들로 알려진 바이오마커들의 유지 여부를 low passage (p13)과 high passage (p23)에서 획득한 세포 각각을 용해시킨 샘플로부터 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다.

[0184] 그 결과, passage가 20으로 증가하여도 tumor homing marker로 알려진 단백질들의 발현에는 차이가 없는 것을 확인하였다(도 38).

[0186] **실시예 4: MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78에 감염된 종양 살상 아데노바이러스의 항암 효능**

[0187] 6주령의 BALB/c 흥선 누드 마우스의 옆구리 부위에 8×10^6 개의 A549 세포 (폐암 세포주) 피하에 이식하고 중앙 크기가 평균 150 mm³에 도달한 마우스들을 각각 10마리씩 그룹 분리하였다. 마우스 꼬리 정맥으로 shHSP27-shTGF β1을 발현하는 종양 살상 아데노바이러스가 감염된 1×10^6 개의 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78을 주사하였다. 그리고 3일이 지난 후에 추가로 shHSP27-shTGF β1을 발현하는 종양 살상 아데노바이러스가 감염된 1×10^6 개의 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78을 정맥 주사하였다. 대조군으로는 종양 세포만 이식한 그룹(no treat)과 최종 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78를 주입한 그룹(MSC only)을 사용하였다. 이때 모든 그룹에 독시사이클린 (625 mg/kg)이 포함된 먹이를 사료로 공급하였다.

[0188] 그 결과, 종양 살상 바이러스 (Ad-3484-shHSP27-shTGF β 1)를 종양 내 직접 주사 시 얻은 항종양 효과 (대조군에 비하여 종양 크기 성장속도는 지연되었으나 종양 크기 자체가 감소되어 회귀되지 않는 상태) 비교했을 때 도 39 에서 보듯이 아무것도 처리하지 않은 종양이나 최종 타입의 MSC 만을 꼬리 정맥으로 주사한 대조군에 비하여 최종 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78에 종양 살상 바이러스 (Ad-3484-shHSP27-shTGF β 1)를 꼬리 정맥 주사하였을 때 몇 일 사이에 종양 크기가 현저히 줄어들어 거의 사라지는 것을 관찰하였으며 주사 후 20여일동안 종양은 거의 사라졌으며 그 이후 다시 몇몇 개체에서 종양이 약간씩 자라는 것을 알 수 있었다. 처음 OV/MSC 주사 후 한 달이 지난 후에 각 군별 마우스들의 개체 사진과 종양을 적출하고 나서 각 군별 찍은 적출된 종양 사진을 통하여 보다 확실히 최종 MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78에 종양 살상 바이러스 (Ad-3484-shHSP27-shTGF β 1)에 의한 항종양 효과를 확인할 수 있었다 (도 40).

[0190] **실시예 5: 종양 외 다른 장기로의 흡착 확인**

[0191] 종양 타겟팅은 매우 효율적으로 일어나고 있음을 확인 후 종양 이외 주요 장기 (폐, 간, 비장 등)에 포획된 양 그리고 종양 부위로의 이동 및 경과시간 등을 보다 자세하게 확인하기 위하여 종양을 포함한 주요 장기별 바이러스 양을 시간대별로 아데노바이러스 유전자 카피 수를 측정하였다. viral genomic 플라스미드 DNA를 standard 기지의 DNA로 정하여 standard curve를 그려 확인하였다 (현재 사용한 종양 살상 아데노바이러스의 viral DNA의 경우 1 copy 가 10³ pg 임).

[0192] 이를 위하여 복제 불능 defectvie E1B55K 바이러스 감염시킨 후 다시 참조예 1의 YSC-02 종양 살상 바이러스가 감염된 MSC-TERT-GRP78 (1 × 10⁶)를 꼬리로 IV 단회 투여를 진행하고 날짜별 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15일)로 샘플을 채취하였다. 채취한 조직 (종양, 폐, 간, 비장, 신장, 심장)은 바로 액체 질소에 보관하고 조직 샘플링이 끝나는 날에 같은 조건하에 조직별 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA를 이용하여 유전자 발현 유무를 확인하기 위하여 E4ORF 유전자의 프라이머를 사용하여 실시간 PCR을 진행하였다. 이때 사용된 E4 ORF 스크린용 프라이머는 다음과 같다.

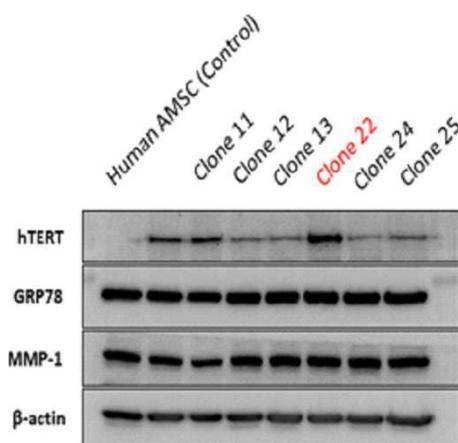
[0193] Forward 5'-CGTGGTCAAACCT CTACAGCC-3': 서열번호 20

[0194] Reverse 5'-GCATGAGCATGACTACGATG-3': 서열번호 21

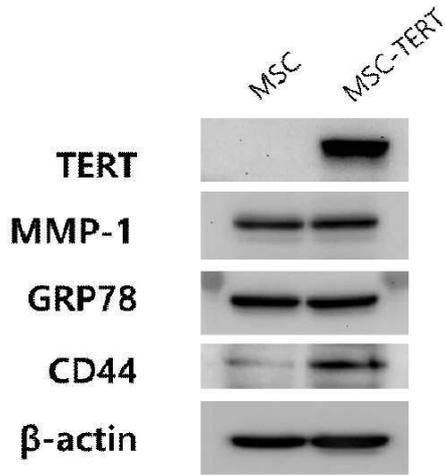
[0195] 도 41에서 볼 수 있듯이, 개체간 variation이 심하나 종양 조직에서 종양 살상 바이러스가 들어간 경우의 개체 조직에서는 그 범위가 10⁴ ~ 10¹⁰ copy 로 다른 모든 장기에서 발견되는 copy 수 ~ 10 개에 비하면, 거의 모든 바이러스가 흡착, 흡수되는 곳은 종양조직임을 알 수 있다.

도면

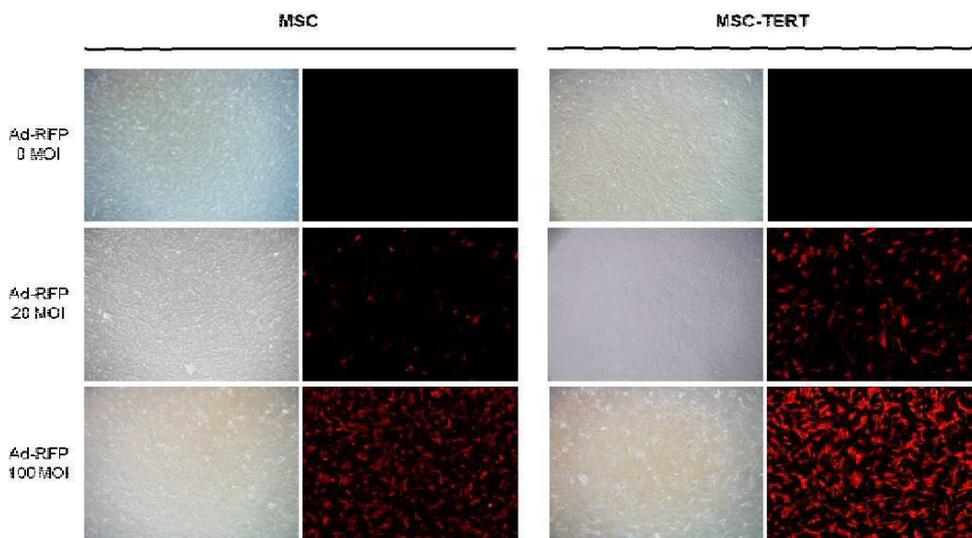
도면1



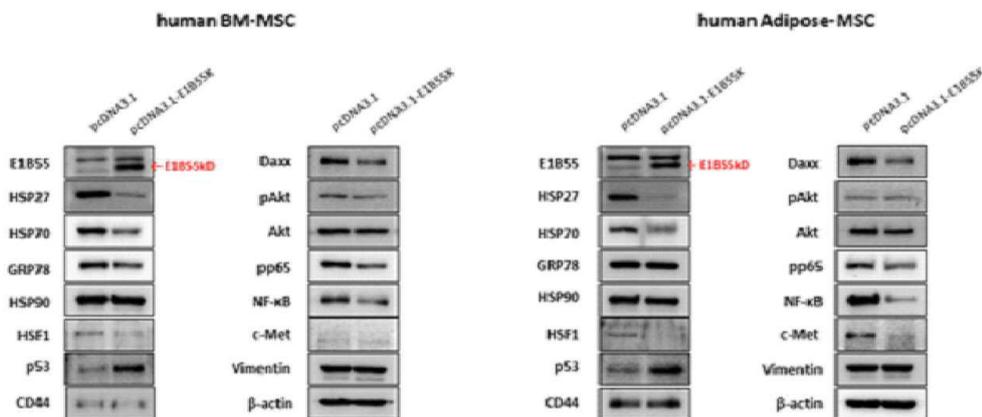
도면2



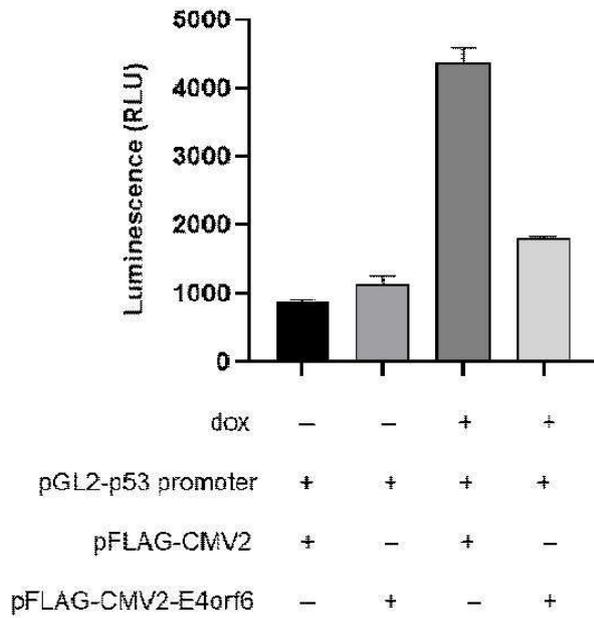
도면3



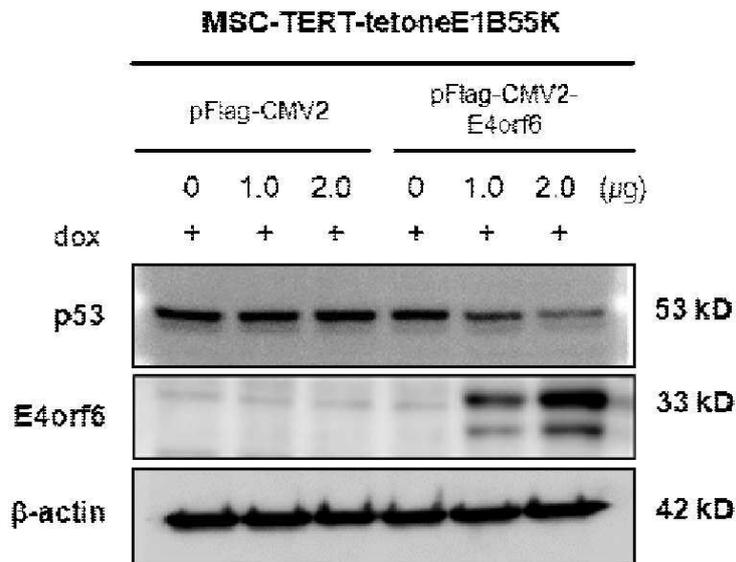
도면4



도면5



도면6



도면9b

E1B55K reverse

```

E1B55K      tttactggcccccaatttttagcggtaocggttttctcggccaatacccaacottatcctacac
pCA14-E1B55K TTTACTGCCCCCAATTTTAGCGGTACGGTTTTCTGCCCCAATACCCAACCTTATCCTACAC
.....

E1B55K      ggtgtaagcctctatggttttaacaatacctgctgtggaagcctggaccgatgtaagggtt
pCA14-E1B55K GGTGTTAGCTTCTATGGGTTTAAACAATACCTGTGTGGAAAGCCTGGACCGATGTAAGGGTT
.....

E1B55K      cggggcgtgdeettttaetgctgctggaaggggggtggtgtgtegeceaaaageagggt
pCA14-E1B55K CGGGCTGTGCCTTTACTGCTGCTGGAAGGGGGTGGTGTGTCGCCCAAAGCAGGGCT
.....

E1B55K      tcaattaaagaaatgocctcttgaaggggttaocttgggtataoctgtctgagggtaactcc
pCA14-E1B55K TCAATTAAAGAAATGCTCTTTGAAAGGTGTACCTTGGGTATCCTGTCTGAGGGTAACCTCC
.....

E1B55K      agggcggcccccaaatggtgacctcgaactggttggctcctatgctagtgaaaagcgtggct
pCA14-E1B55K AGGGTGGCCCCCAAAATGGTGCCTCGAAGCTGTGGTCTTCACTAGTGAAGGCGTGGCT
.....

E1B55K      gtgattaaagcataaactggtatggtgcaactggaggacaggccctctcagatgctgacc
pCA14-E1B55K GTGATTAAGCATAAAGTGTATGTGCCAAGTGGAGGACAGGGCCCTCTCAGATGCTGACC
.....

E1B55K      tgetoggacggcaactgtcaccctgctgaagaaccattcaagtacccagccactctccgaag
pCA14-E1B55K TGETOGGACGGCAACTGTCACCTGCTGAAGACCATTCAAGTAGCCAGCCACTCTCCGAAG
.....

E1B55K      gcoctggccagtgcttgagcataaacatactgaocogctgttoettgcaattgggtaacagg
pCA14-E1B55K GCCTGGCCAGTGTCTTGAGCATAAACATACTGAOCOGCTGTTOETTGCATTGGGTAACAGG
.....

E1B55K      aggggggtgttctcactaaccatgcaatttggagtcacaactaagatattgctgagccc
pCA14-E1B55K AGGGGGTGTCTCCTACCTACCAATGCAATTTGAGTCACACTAAGATATTGCTTGAGCCC
.....

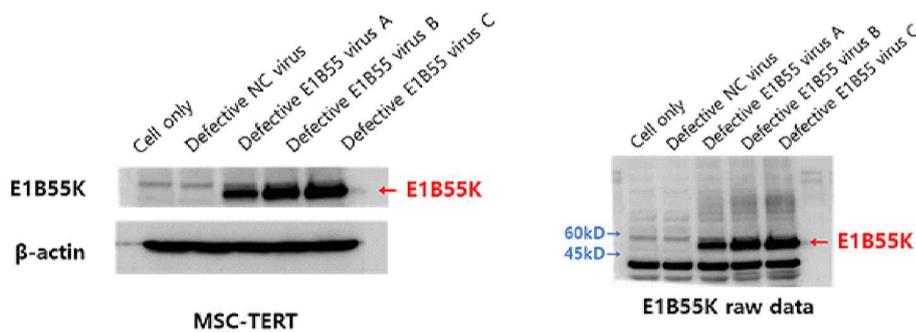
E1B55K      gagagaatgtccaaagtgaaactgaaaggggtgtttgcaatgaccatgaaatctggaag
pCA14-E1B55K GAGAGAATGTCCAAAGTGAACCTGAAAGGGGTGTTTGCAATGACCATGAAATCTGGAAG
.....

E1B55K      gtgctgaggtacgatgagacccgacccaggctgagaccctggagctgtggggtaaacat
pCA14-E1B55K GTGCTGAGGTACGATGAGACCCGACCCAGGCTGAGACCCTGGAGCTGTGGGGTAAACAT
.....

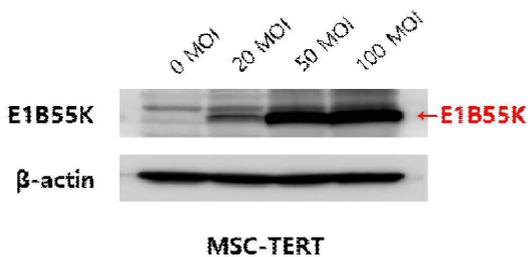
E1B55K      attagaaaccagcctgtgatgctggatgtgaccggaggagctgagggccgatcactgtgtg
pCA14-E1B55K ATTAGAAACCAGCCTGTGATGCTGGATGTGACCAGGAGGCTGAGGGCCGATCCTGTGTG
.....

E1B55K      ctggcctgaccccgctgagtttggctctagcagatgaagatacagattga-----
pCA14-E1B55K CTGGCCTGACCCCGCTGAGTTTGGCTCTAGCAGATGAAGATACAGATTGAAGCTTGTG
.....
    
```

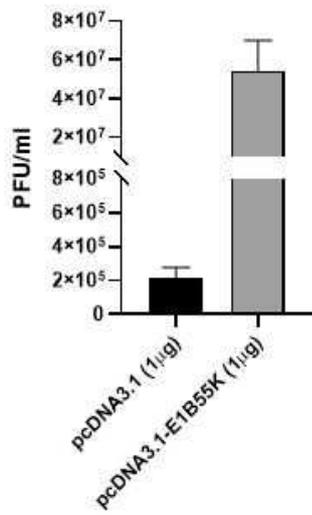
도면10a



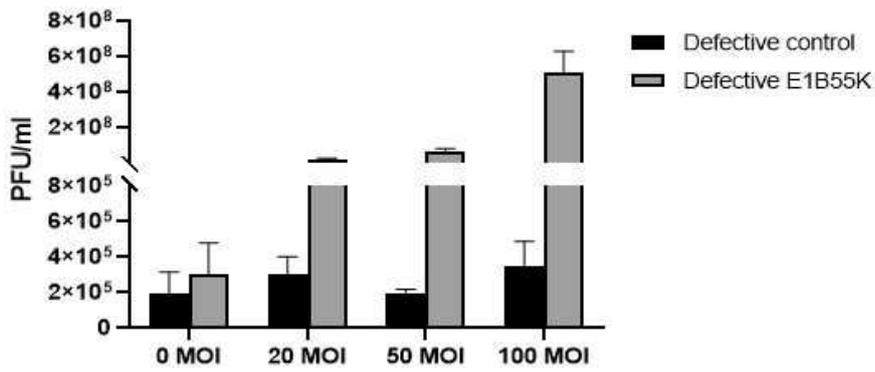
도면10b



도면11



도면12

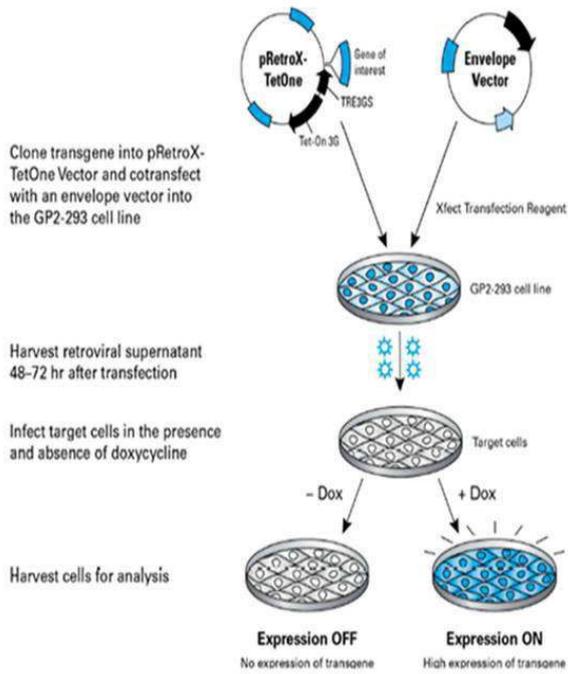


도면13

Protocol Summary

The following are the steps required to create a doxycycline-inducible expression system using retrovirus (see Figure 2).

1. Clone your gene of interest into the pRetroX-TetOne Vector using In-Fusion HD (Section V).
2. Pilot test Tet-based induction of your construct using transient transfection (Section VI).
3. Produce retroviral supernatants using the Retro-X Universal Packaging System (Section VII).
4. Transduce your target cells with TetOne virus (Section IX).

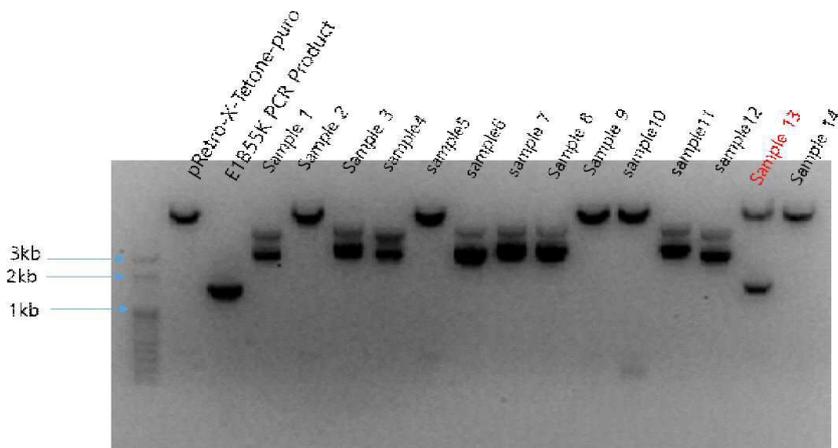


도면14

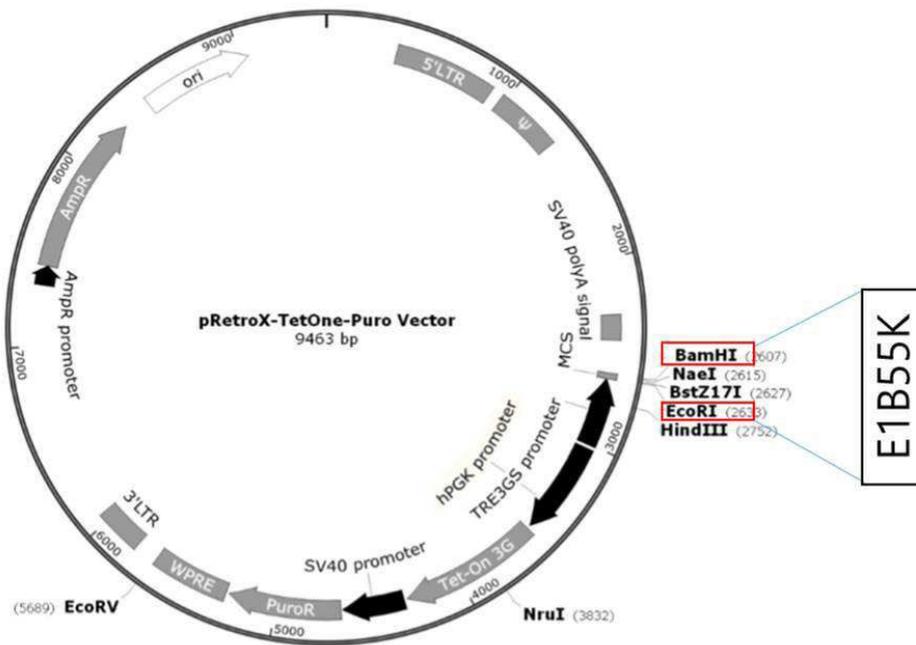
STEP	TEMP	TIME
Initial Denaturation	95°C	2min
30 cycle	95°C	40 seconds
	61°C	40 seconds
	72°C	1min 50seconds
Final Extension	72°C	5minutes

	실제 양
2x Master Mix	25µl
10 µM Forward primer	2µl
10 µM Reverse primer	2µl
DNA template	1µl
DW	20µl
증량	50µl

도면15



도면16



도면17b

Primer: E1B55K internal primer

```

E1B55K_sequence      ggtgttagcttctatgggtttaacaatacctgtgtggaagcctggaccgatgtaagggtt
sample_internal_primer -----ACCTGTAAATTTGTTTATTTGGCCGA
                        *           * * * * *

E1B55K_sequence      cggggctgtgccttttactgctgctggaaggggtggtgtgtgccccaaagcagggct
sample_internal_primer GGTCGGGCGTGCCTTTTACTGCTGCTGGAAGGGGTGGTGTGTGCCCCAAAAGCAGGGCT
                        * *           * * * * *

E1B55K_sequence      tcaattaagaaatgacctctttgaaaggtgtaccttgggtatcctgtctgagggtaactcc
sample_internal_primer TCAATTAAGAAATGACCTCTTTGAAAGGTGTACCTTGGGTATCCTGTCTGAGGGTAACCTCC
                        * * * * *

E1B55K_sequence      aggggtgcccacaatgtggcctccgactgtggttgccttcctgctagtgaagcgtggct
sample_internal_primer AGGGTGCGCCACAATGTGGCCTCCGACTGTGTTGCTTCATGCTAGTGAARAACGTGGCT
                        * * * * *

E1B55K_sequence      gtgattaagcataaacatggtatgtggcaactgagaggacagggcctctcagatgctgacc
sample_internal_primer GTGATTAAGCATAAACATGGTATGTGGCAACTGCGAGGACAGGGCCTCTCAGATGCTGACC
                        * * * * *

E1B55K_sequence      tgctggagggcaactgtcactgctgaaagaccattcactgagccagcactctcgcgaag
sample_internal_primer TGCTGGAGCGCAACTGTCACTGCTGAAGACCATTCACTGAGCCAGCCTCTCGCAAG
                        * * * * *

E1B55K_sequence      gcttggccagtgtttgagcataaacctactgaccggctgttccttgcatttgggttaecagg
sample_internal_primer GCTTGGCCAGTGTTTGAGCATAAACCTACTGACCCGCTGTTCCTTGCATTTGGGTAAECAGG
                        * * * * *

E1B55K_sequence      aggggggtgttccctacettaccaatgcaatttgagtcacactagatattgcttgagccc
sample_internal_primer AGGGGGGTGTTCCCTACCTTACCAATGCAATTTGAGTCACACTAGATATTGCTTGAGCCC
                        * * * * *

E1B55K_sequence      gagagcatgtccaagtgaaacctgaaaggggtgttggacatgacctgaagatctggaag
sample_internal_primer GAGAGCATGTCCAAGTGAACCTGAAAGGGGTGTTGGACATGACCTGAAGATCTGGAAG
                        * * * * *

E1B55K_sequence      gtgctgaggtacgatgagaccocgaccaggtgcagaccctgagagtggtggcggtaaacat
sample_internal_primer GTGCTGAGGTACGATGAGACCCOCACCAGGTGCAGACCCTGCGAGTGTGGCGGTAAACAT
                        * * * * *

E1B55K_sequence      attaggaaccagcctgtgatgctggatgtgaccgagggagctgagggcccgatcaactgggtg
sample_internal_primer ATTAGGAACCAACCCTGTGATGCTGGATGTGACCAGGAGCTGAGGGCCCAGTCACTTGGTG
                        * * * * *

E1B55K_sequence      ctggcctgcaccccgctgagtttggctctagcgtgagatcacagattga-----
sample_internal_primer CTGGCCTGCACCCCGCTGAGTTTGGCTCTAGCGATGAAGATACAGATTGAGGATCCAGA
                        * * * * *
    
```

도면17c

TTT→TTC
Phe(페닐알라닌)

Primer: E1B55K 5' near internal reverse primer

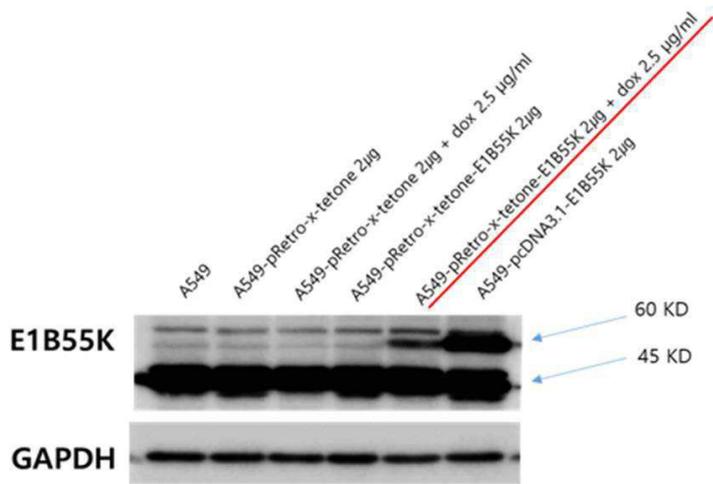
E1B55_sequence	-----atggagcgaagaaccatctgagcggggagtagctgctggattttctggc
sample_5'_near_reverse	AAAGAATTCATGGAGCGAAGAAACCCATCTGAGCGGGGAGTACCTGCTGGATTCTCTGGC *****
E1B55_sequence	catgcatctgtggagagcggttgtgagacacaagaatcgctgactgttcttccgt
sample_5'_near_reverse	CATGCATCTGTGGAGCGGTTGTGAGACACAAGAATCGCCTGCTACTGTTCTTCCGT *****
E1B55_sequence	ccgccggcgataataccgacggaggagcagcagcagcagcaggaggaagccagggcg
sample_5'_near_reverse	CCGCCGGCGATAATACCGACGGAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGGAAGCCAGGGCG *****
E1B55_sequence	gcggcaggagcagagcccataggaaccgagagcggcctggaccctgggaatgaatgtt
sample_5'_near_reverse	GCGGCAGGAGCAGAGCCCATGGAACCCGAGAGCCGGCCTGGACCTCGGAATGAATGTT *****
E1B55_sequence	gtacaggtggtgaactgtatccagaactgagcgcattttgacaattacagaggatggg
sample_5'_near_reverse	GTACAGGTGGCTGAACGTATCCAGAACTGAGACGCATTTGACAATTACAGAGGATGGG *****
E1B55_sequence	caggggctaaggggtaagaggggagcgggggcttgtgaggctacagaggaggctagg
sample_5'_near_reverse	CAGGGGCTAAGGGGTAAGAGGGGAGCGGGGGCTTGTGAGGCTACAGAGGAGGCTAGG *****
E1B55_sequence	aatctagcttttagcttaatgaccagacaccgtcctgagtgattacttttcaacagatc
sample_5'_near_reverse	AATCTAGCTTTTAGCTTAATGACCAGACCCGTCCTGAGTGATTACTTTTCAACAGATC *****
E1B55_sequence	aaggataattgcgctaatagagcttgatctgctggcgagcagaagtattccatagagcagctg
sample_5'_near_reverse	AAGGATAATTGCGCTAATGAGCTGATCTGCGCGAGACGCCAACAAAACAGAGTCCA ***** * * * * * * * *

도면17d

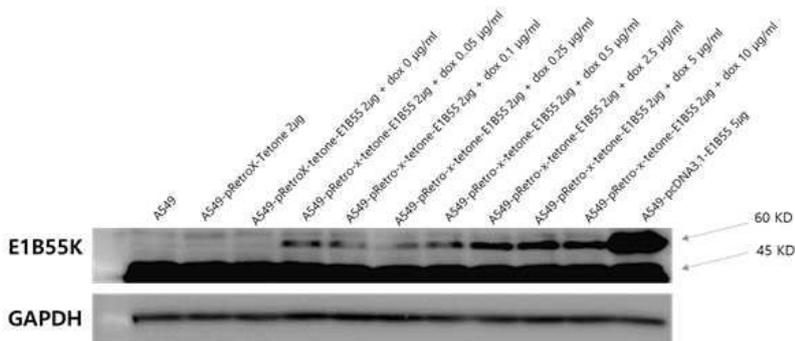
Primer:E1B55K In-fusion BamHI antisense

E1B55K_sequence	gctgaactgtatccagaactgagacgcattttgacaattacagaggatggggcggggccta
sample_reverse_primer	-----AAAGGAT==GGCAGGCT=
E1B55K_sequence	aagggggtaaagagggagcgggggcttctgaggctacagaggagctaggaatctagct
sample_reverse_primer	---AAAGGCTAAAGAGGACCGGGGCTTGGAGCCTACAGAGGACGCTAGGAATCTAGCT
E1B55K_sequence	tttagcttaatgaccagacccgctcctgagctgattacttttccacagatcaaggataat
sample_reverse_primer	TTTAGCTTAATGACCAGACCCGCTCCTGAGCTGATTAAGTTTTCAACAGATCAAGGATAAT
E1B55K_sequence	tggcttaatgagcttgatctgctgggctgaaagtattccatagagagctgaccactttag
sample_reverse_primer	TGGCTAATGAGCTTGATCTGCTGGGCTGAAAGTATTCCATAGAGAGCTGACCCTTAC
E1B55K_sequence	tggctgagccaggggagctgattttgaggagctattagggtatattgcaaggctggcactt
sample_reverse_primer	TGGCTGAGCCAGGGGAGCTGATTTTTGAGGAGCTATTAGGGTATATGCAAGGTGGCACTT
E1B55K_sequence	aggccagattgcaagtcacagatcagcaacttgaataatcaggaattggtgtacatt
sample_reverse_primer	AGGCCAGATTGCAAGTACAGATCAGCAACTTGAATAATCAGGAATTGTTGTACATC
E1B55K_sequence	tctgggaacggggccgaggtggagatagatacggagatagggtggcctttagatgtagc
sample_reverse_primer	TCTGGGAACGGGGCCGAGGTGGAGATAGATACGGAGATAGGTTGGCCTTTAGATGTAGC
E1B55K_sequence	atgataaataatgcccgggggctctggcatggcgggggcttattatgaatgaagy
sample_reverse_primer	ATGATAAATAATGCCCCGGGGCTCTGGCATGGCAGGGGCTTATTATGAATGAAGY
E1B55K_sequence	tttactggcccccaatttttaggggtacgggtttctctggcccaatacccaacttactctaac
sample_reverse_primer	TTTACTGGCCCCAATTTTTAGGGGTACGGTTFCTCTGGCCCAATACCAACTTACTCTAAC
E1B55K_sequence	ggtgttagcttctatgggttttaacaaatccctgtctgaaagcctggacgctgaaaggtt
sample_reverse_primer	GGTGTAGCTTCTATGGGTTTAAACAACTCTGTGAAAGCCTGGACGCTGAAGGTT
E1B55K_sequence	cggggctgtgctctttactgtgctgaggggggtggtgtgctgcccccaaggcgggct
sample_reverse_primer	CGGGGCTGTGCTCTTTACTGCTGCTGGAAGGGGTTGGTGTGTCGCCCCAAGCGGGCT
E1B55K_sequence	tcaattaaagaaatgctctcttgaaggtgtaccttgggtatcctgtctgagggttaactcc
sample_reverse_primer	TCAATTAAAGAAATGCTCTCTTGAAGGTGTACTTGGGTATCCTGTCTGAGGTTAACTCC
E1B55K_sequence	aggggtggccacaaatgggctccgactgtggttgcctcagctagtgaaggcgtggct
sample_reverse_primer	AGGGTGGCCACAAATGGGCTCCGACTGTGTTGCCTCAGCTAGTGAAGGCGTGGCT
E1B55K_sequence	gtgattaaagcatcaatggatgtggtggaactggaggaaggggctctcagatgtgaccc
sample_reverse_primer	GTGATTAAGCATCAATGGATGTGTTGGAACTGGAGGACAGGGGCTCTCAGATGTGACC
E1B55K_sequence	tgtctggacggcaactgtcactgtgtgaaagcattcagctagccagccactctggcaag
sample_reverse_primer	TGTCTGGACGGCAACTGTCACTGTGTGAAAGCATTCACTAGCCAGCCACTCTGCAAG
E1B55K_sequence	gctggcagtgctttagcataaacataactgaccctgttctctgacttgggttaacagg
sample_reverse_primer	GCTGGCAGTGTCTTAGCATAAACATAACTGACCCTGTTCTCTGACTTGGGTAAACAGG
E1B55K_sequence	aggggggtgttctcacttaccatgcaatttgagtcadactaagatattgctgagccc
sample_reverse_primer	AGGGGGTGTCTCCTACTTACCAATGCAATTTGAGTCACACTAAGATATTGCTGAGCCC
E1B55K_sequence	gagagcatgtccaggtgcaactgcaacggggtgtttgacatgacctgaagatctggaag
sample_reverse_primer	GAGAGCATGTCCAAGTGAACCTGCAACGGGGTGTTTGACATGACCTGAAGATCTGGAAG
E1B55K_sequence	gtgctgaggtacgatgagacccgaccagggtgcagaccctgcgagtggtggcgttaacat
sample_reverse_primer	GTGCTGAGGTACGATGAGACCCGACCAGGTCAGACCCTGCGAGTGTGGCGTTAAACAT
E1B55K_sequence	attaggaaccagcctgtgactgctggtgtgaccgagagctgaggcccgactcattggtg
sample_reverse_primer	ATTAGGAACCAAGCCTGTGACTGCTGGTGTGACCGAGGAGCTGAGGCCGATCATTGGTG
E1B55K_sequence	ctggcctgccccggcctgagtttagctctagcctgaaagatcagatgga
sample_reverse_primer	CTGGCCTGCCCGGCTGAGTTTAGCTCTAGCCTGAAAGATCAGATGGA

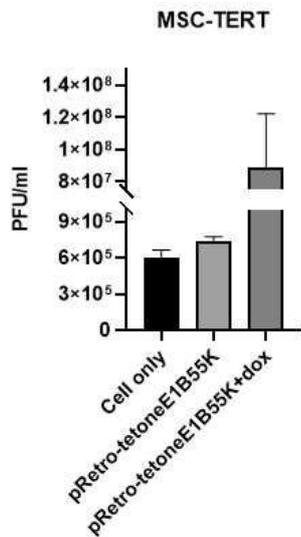
도면18



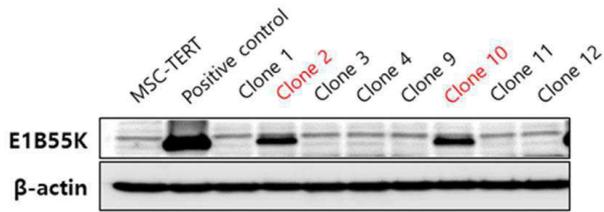
도면19



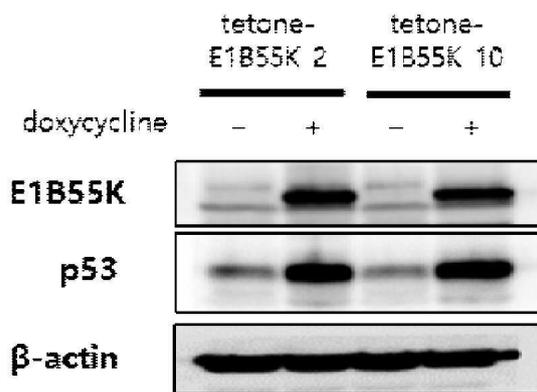
도면20



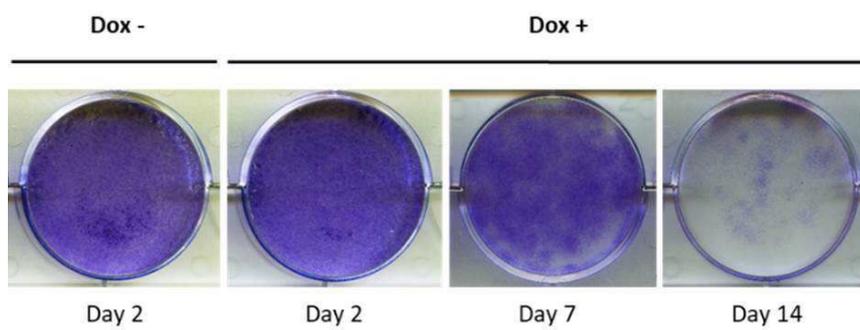
도면21



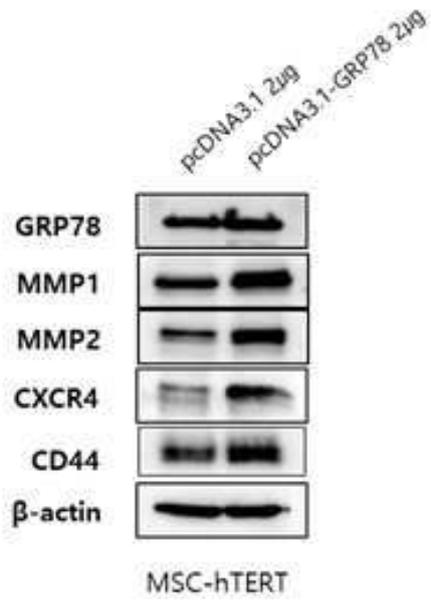
도면22



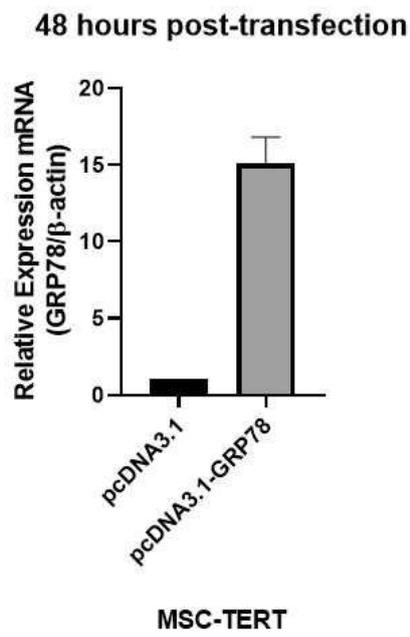
도면23



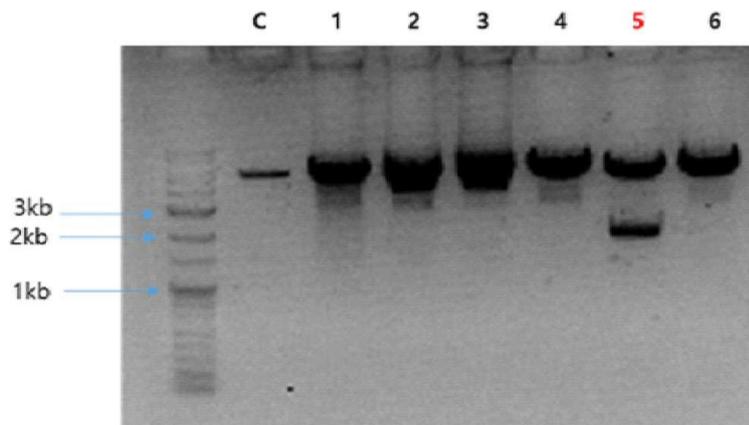
도면24a



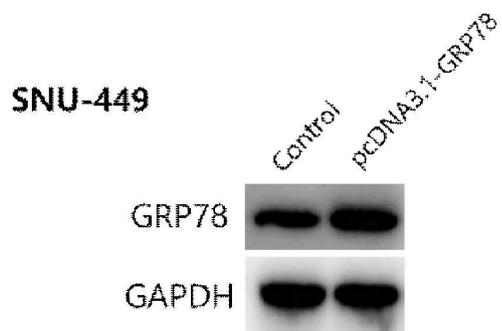
도면24b



도면25



도면26



도면27a

pcDNA3.1 GRP78 forward

```

NM_005347_GRP78 -----atgaagctctccctgg
pcDNA3.1_GRP78 TGGTGGAAATCTGCGAGATATCCAGCACAGTGGCGGCGCTCGAGATGAAGCTCTCCCTGG
*****

NM_005347_GRP78 tggcggcga t g c t g c t g c t c a g o g g y c o g g g c o a g g a g g a c a a g a a g g a g g
pcDNA3.1_GRP78 TGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCAGCGCGCGCGCGGCCAGGAGGAGGACAAAGAAAGGAGG
*****

NM_005347_GRP78 acgtggca c g g t g g t o g g c a t o g a o c t g g g a c o a o c t a o c t e o t g o g t o g g o g t t t c a
pcDNA3.1_GRP78 ACGTGGCACCGTGGTGGCATCGAAGCTGGGGACCACTACTCTGCTGCGCTGTTC
*****

NM_005347_GRP78 agaaogggcgg t g g a g a t c a t o g c c a a o g a t c a g g g c a a o g c a t c a o g o o g t o o t a t g
pcDNA3.1_GRP78 AGAAOGGCCGCGTGGAGATCATGCGCAACGATCAGGGCAACCGCATCACGCCGCTCCATG
*****

NM_005347_GRP78 t o g c o t t c a c t c o t g a a g g g a a g t t g a t t g g o g a t g c o g c a a g a a c o a g o t c a o c t
pcDNA3.1_GRP78 TCGCCTTCACTCCGAAAGGGAACTGCTGATTGGCGATGCCCAAGAACCAAGCTCACCT
*****

NM_005347_GRP78 c c a a c c o g a g a a o a g g t c t t t g a o g c a a g o g g t c a t o g y c o g c a o g t g a a t g a c c
pcDNA3.1_GRP78 CCAACCCGAGAACACCGCTCTTGAACGCGAAGCGGCTCATCGCGCACGTGGATGACC
*****

NM_005347_GRP78 o g t c t g t g a g o a g g a c a t o a a g t t o t t g o o g t t c a a g g t g g t g a a a g a a a c t a a a c
pcDNA3.1_GRP78 CGCTGTGCAAGCAAGGACATCAAGTCTTCCCGTCAAGGTGTTGAAAAGAAAACATAAC
*****

NM_005347_GRP78 c a t a c a t c a a g t t g a t a t t g g a g t g g g c a a a c a a g a c a t t g o t c o t g a g a a a t t t
pcDNA3.1_GRP78 CATACATCAAGTTGATATTTGAGGTGGCAACAAJAGACATTTGCTCTGAGAAATTT
*****

NM_005347_GRP78 c t g c c a t g g t t o t c a c t a a a a t g a a a g a a c o g t g a g g o t t a t t g g y a a g a a g g t t a
pcDNA3.1_GRP78 CTGCCATGGTTCACATAAAATGAAAGAAAACCGCTGAGGCTTATTTGGGAAAGAGGTTA
*****

NM_005347_GRP78 c c a t g c a g t t g t t a c t g t a c c a g c o t a t t t a a t g a t g c c a a o g c a a g o a a c o a a a g
pcDNA3.1_GRP78 CCCATGCAGTTGTTACTGTACCAGCCTATTTTAATGATGCCAAAGCCAAAGCAACCAAG
*****

NM_005347_GRP78 a c g t g g a a c t a t t g c t g g c o t a a t g t t a t g a g g a t c a t c a a c a g a g o c t a o g g a g e t g
pcDNA3.1_GRP78 ACGCTGGAACTATTGCTGGCTAAATGTTATGAGGATCATCAACGAGCCTACGGCAGCTG
*****

NM_005347_GRP78 c t a t t g o t t a t g o o c t g g a t a a g a g g a g g g g a g a a a c a t c o g t g t t t g a c o o t g g
pcDNA3.1_GRP78 CTATGCTTATGCGCTGGATAAGAGGGAGGGGAGAAAGAACATCCTGCTGTTGACCTGG
*****

NM_005347_GRP78 g t g g o g g a a c o t t o g a t g t g t o t t o t c a o c a t t g a c a a t g t g t o t t o g a a g t t g t g g
pcDNA3.1_GRP78 GTGGGGAACTTCGATGTGTCTCTTCCACCAATGACAAATGGTGTCTCGAAGTTGTTGG
*****

NM_005347_GRP78 c c a c t a a t g g a g a t a c t c a t c t g g t g g a g a a g a o t t g a c c a g o g t g t a t g g a a c a c t
pcDNA3.1_GRP78 CCACTAATGGAGATACTCATCTGGGTGGAGAGACTTGACCAGCGTGTATGGAACT
*****

NM_005347_GRP78 t o a t c a a a c t g t a c a a a a a g a a g a o g g g o a a a g a t g t o a g y a a g a c a a t a g a g o t g t g c
pcDNA3.1_GRP78 TCAATCAACTGTACAAJAJAGAGACGGCAAGATGTACGAAJAGCAATGAGACTGTGC
*****

NM_005347_GRP78 a g a a a c t c o g g c o g a g g t a g a a a g g c a a a o g g g c o c t g t c t o t c a g o a t c a a g c a a
pcDNA3.1_GRP78 AGAAACTCCGGCGAGGTAGAAAAGCCAAAAGGGCCCTGTCTTCAGCATCAAGCAA
*****

NM_005347_GRP78 g a a t t g a a t t g a g t o c t c t a t g a a g g a a g a c t t t t o t g a g a c o o t g a o t o g g g c o a
pcDNA3.1_GRP78 GAATGAAATGAGCTCTATGAGGGAGAGAC-----
*****
    
```

도면27b

pcDNA3.1 GRP78 reverse

```

NM_005347_GRP78      tctcagcatcaagcaagaattgaaattgagtcctctatatgaagggaagacttttttgag
pcDNA3.1_GRP78      -----TCTATGAAGGAGAGACTTTCTGAG
                       *****

NM_005347_GRP78      accctgactcgggccaatttgaagagctcaacatggatctgttcgggtctactatgaag
pcDNA3.1_GRP78      -----ACCCCTGACTCGGGCCAAATTTGAAGAGCTCAACATGGATCTGTCCGGTCTACTATGAAG
                       *****

NM_005347_GRP78      ccogtcacagaagtgctgggaagattctgatttgaagaagctgtgatattgataaattggtt
pcDNA3.1_GRP78      -----CCCCTCCAGAAAGTGCTGGAAAGATCTGATTTGAAGAACTGTGATATTGATGAAATGTGT
                       *****

NM_005347_GRP78      cttgtttggtggctogactogaattccaagaattoagcaactgggttaaagagtcttccaat
pcDNA3.1_GRP78      -----CTTGTTTGGTGGCTCGACTCGAATTCCAAAGATTCAGCAACTGGTTAAAGAGTTCCTCAAT
                       *****

NM_005347_GRP78      ggcgaaggaaccaatccctggcctaaaccagatgaagctgtagcgtatggctgtctgtct
pcDNA3.1_GRP78      -----GGCAAGGAACCATCCCTGGCATAAACCCAGATGAAGCTGTAGCGTATGGTCTGCTGTC
                       *****

NM_005347_GRP78      cagctgggtgtctctctctgggtgatcaagatacaggtgacctggtaactgtatgtatgt
pcDNA3.1_GRP78      -----CAGCTGGTGTGCTCTCTGGGTGATCAAGATAcAGGTGACCTGGTACTGCTGTATGTATGT
                       *****

NM_005347_GRP78      ccccttacacttggattgaaactgtgggaggtgctcatgaccaactgattccaaggaac
pcDNA3.1_GRP78      -----CCCCTTACACTTGGTATTGAAACTGTGGGAGGTGTCATGACCAAACGTATCCAAGGAAC
                       *****

NM_005347_GRP78      acagtggtgctcacaagaagctcagatctttctacagcttcgtataatacaaccaact
pcDNA3.1_GRP78      -----ACAGTGGTGCCTACCAAGAAGCTCAGATCTTTCTACAGCTTCGTATAATCAACCAACT
                       *****

NM_005347_GRP78      gttacaatcaaggtctatgaagtgaaagacccttcgacaaaagacaatcctctctgggt
pcDNA3.1_GRP78      -----GTTACAATCAAGGCTCTATGAAGGTGAAGACCCCTTGACAAAAGACAATCCTCTCTGGGT
                       *****

NM_005347_GRP78      acatttgatctgactggaattcctcctgctctctctgggttccacagattgaagtcacc
pcDNA3.1_GRP78      -----ACATTTGATCTGACTGGAATTCCTCCTGCTCTCTCTGGGTTCCACAGATTGAAGTCACC
                       *****

NM_005347_GRP78      tttgagatagatgtgaatggtattctctcagtgacagctgaagacaaggttacaggaac
pcDNA3.1_GRP78      -----TTTGAGATAGATGTGAATGGTATTCTCTCAGTGACAGCTGAAGACAAGGTACAGGGAAC
                       *****

NM_005347_GRP78      aaaaaaagatcaaatcaaccaatgaccagaatgocctgacacctgaagaaatogaag
pcDNA3.1_GRP78      -----AAAAAATAGATCACAATCAACCAATGACCAGAATCGCCTGACACCTGAAGAAATCGAAAGG
                       *****

NM_005347_GRP78      atggttaatgatgctgagaagtttgctgaggagaacaaaagctcaaggagcgcattgat
pcDNA3.1_GRP78      -----ATGTTAATGATGCTGAGAAGTTTGCTGAGGAGACAAAAGCTCAAGGAGCGCATTGAT
                       *****

NM_005347_GRP78      actagaatgagttggaagctatgcttattctctaaagaatcagattggagataaagaa
pcDNA3.1_GRP78      -----ACTAGAATGAGTTGGAAAGCTATGCTTATTCTCTCTAAAGAATCAGATTGGAGATAAAGAA
                       *****

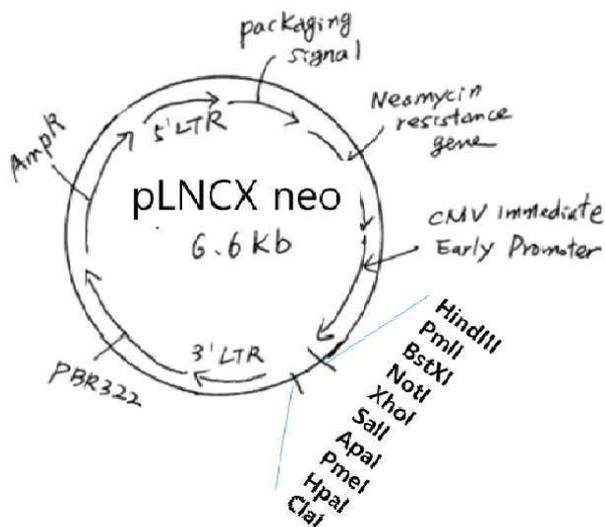
NM_005347_GRP78      aagctgggaggtaaacttctctgaaagataaggagaccatggaaaaagctgtagaagaa
pcDNA3.1_GRP78      -----AAGCTGGGAGGTAAACTTCTCTGAAAGATAAGGAGACCATGGAAAAAGCTGTAGAAGAA
                       *****

NM_005347_GRP78      aagattgaaatggctggaagccaccaagatgctgaacttgaagactcaaaagctaaaga
pcDNA3.1_GRP78      -----AAGATTGAATGGCTGGAAAGCCACCAAGATGCTGACATTGAAGACTCAAAAGCTAAAGA
                       *****

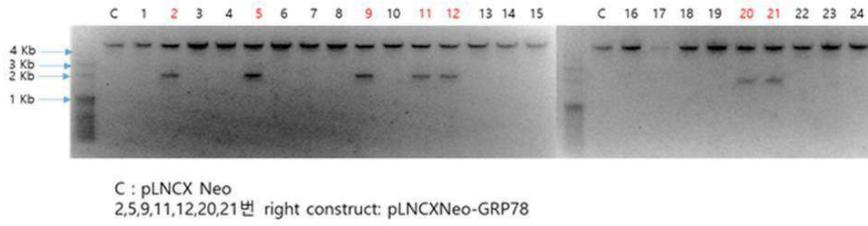
NM_005347_GRP78      aaggaactggaagaattgttcaaccaattatcagcaaaccttatggaagtgaggccct
pcDNA3.1_GRP78      -----AAGGAACGGAAAGAAATGTTCACCAATATCAGCAAACTCTATGGAAGTGCAGGCCCT
                       *****

NM_005347_GRP78      cccccactggtgaaaggagatacagcagaaaaagatgagttgtagcttagagctcccgtaa
pcDNA3.1_GRP78      -----CCCCCACTGGTGAAGGAGATACAGCAGAAAAAGATGAGTTGTAGCTTAGAGTCCCCTAA
                       *****
    
```

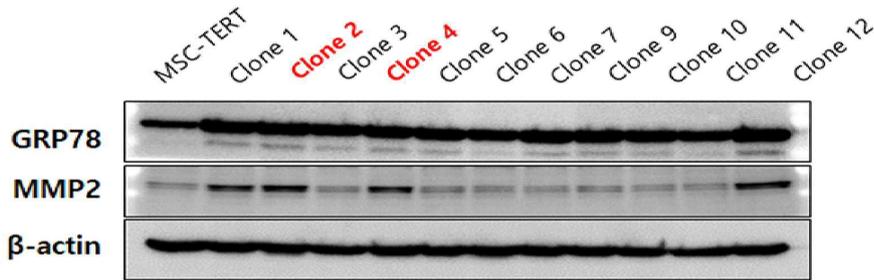
도면28



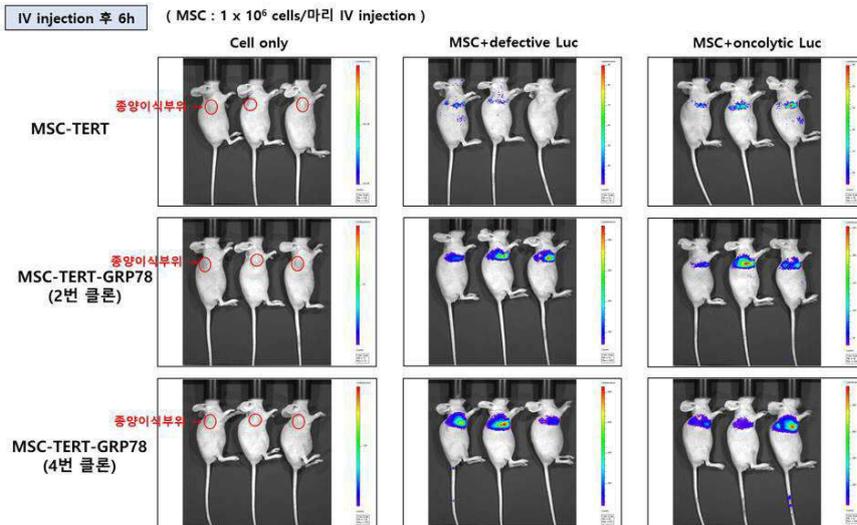
도면29



도면30



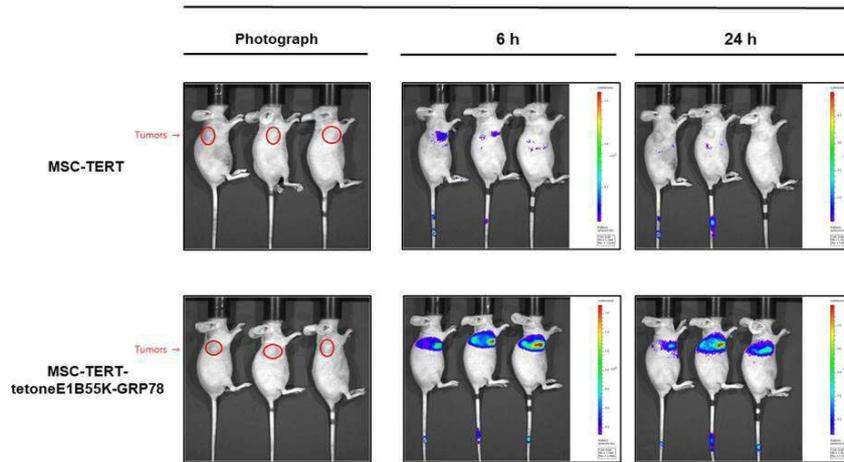
도면31



도면32a

A549

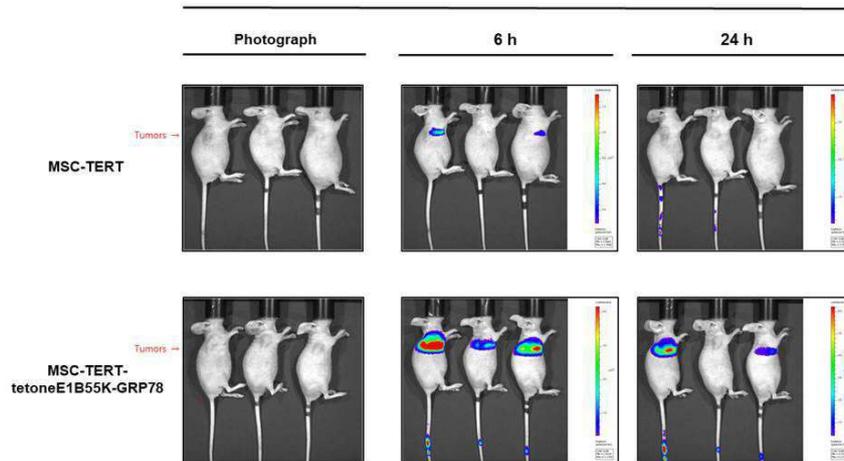
MSC + replication incompetent Luc virus



도면32b

SNU398

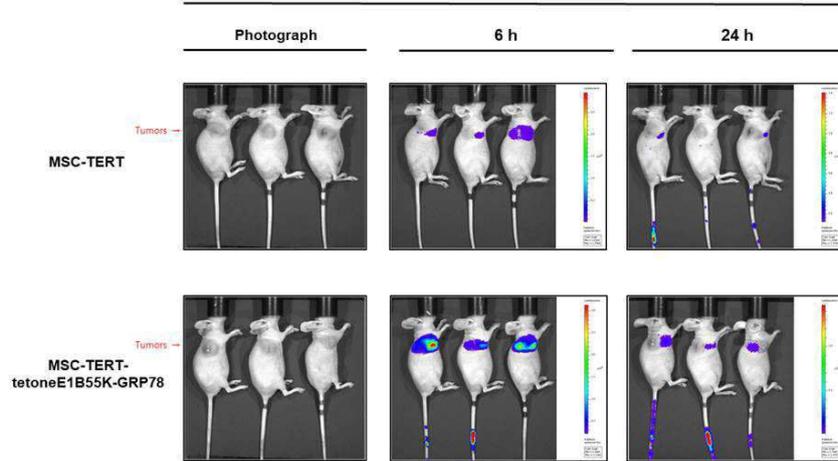
MSC + replication incompetent Luc virus



도면32c

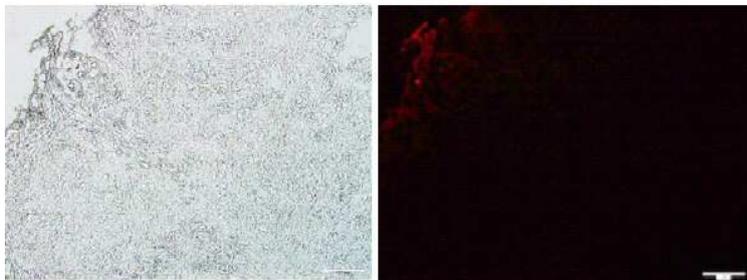
MiaPaCa-2

MSC + replication incompetent Luc virus

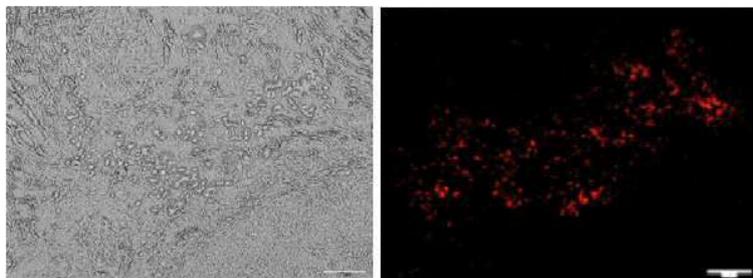


도면33a

IV injection 후 24 h



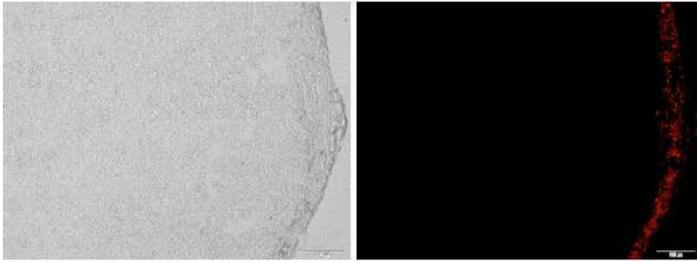
MSC-TERT



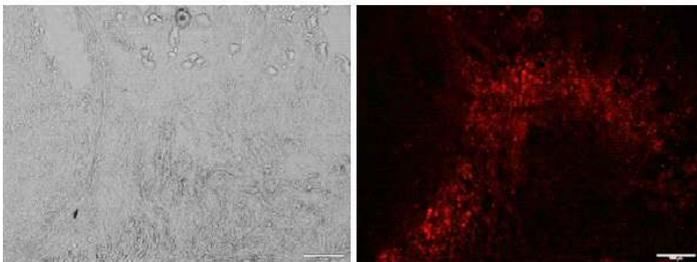
MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78

도면33b

IV injection 후 48 h



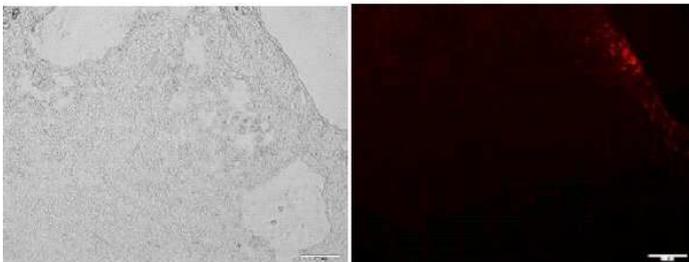
MSC-TERT



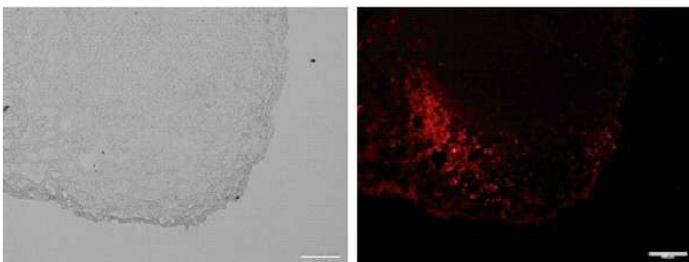
MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78

도면33c

IV injection 후 72 h

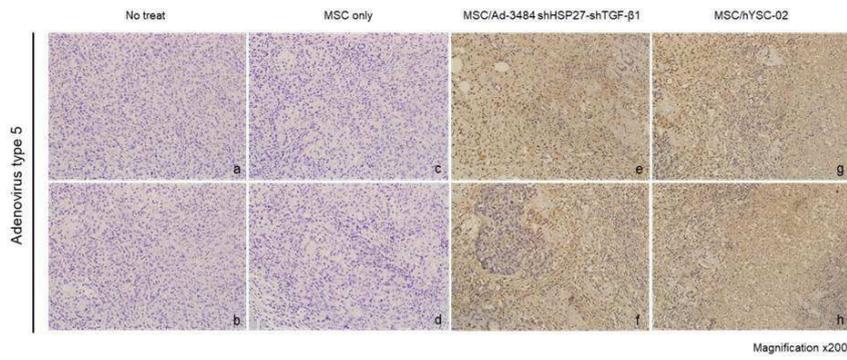


MSC-TERT

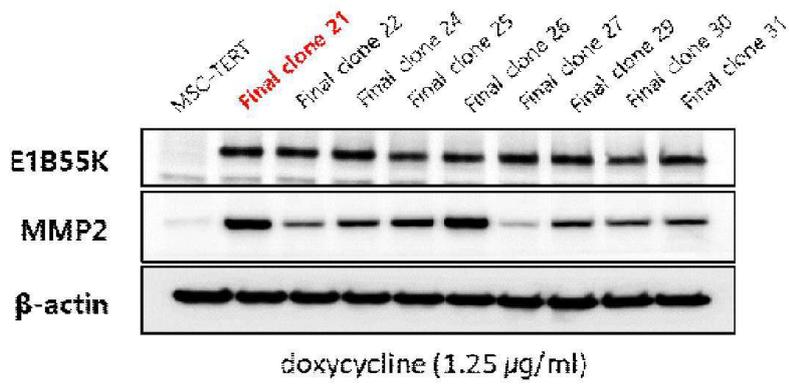


MSC-TERT-tetoneE1B55K-GRP78

도면34



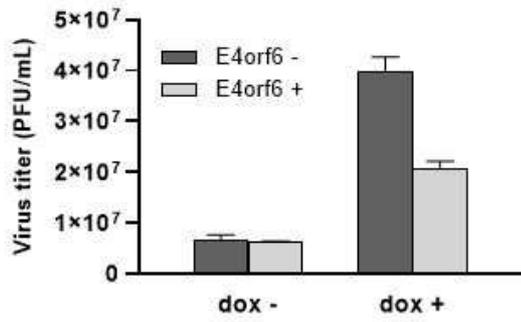
도면35



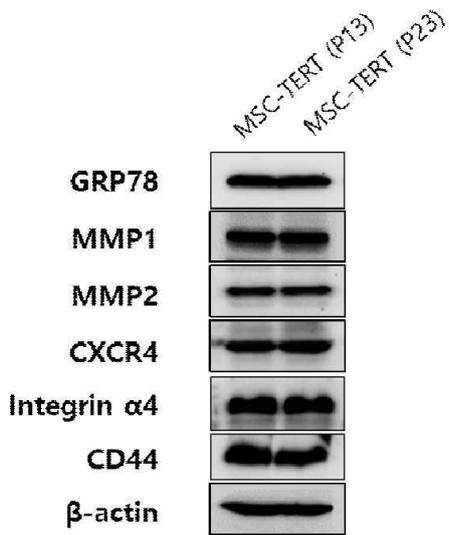
도면36



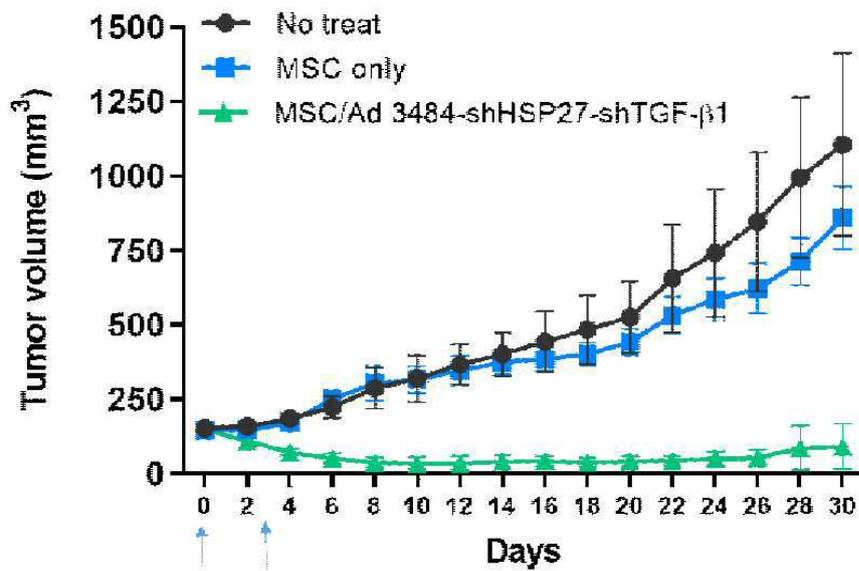
도면37



도면38

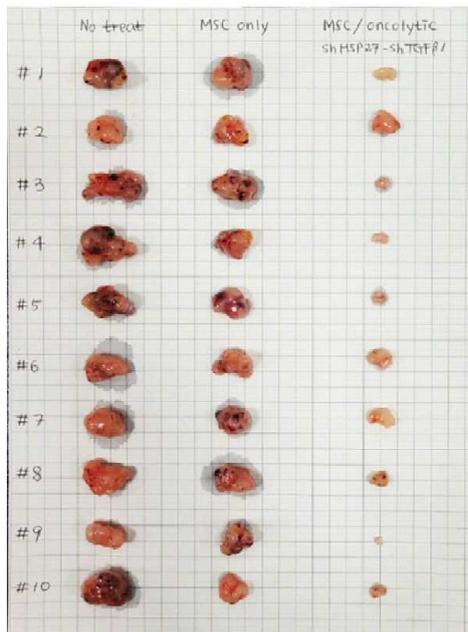


도면39



도면40a

각 그룹당 10마리 균분리후
OV/MSc 30일후 적출한 종양크기



도면40b

No treat



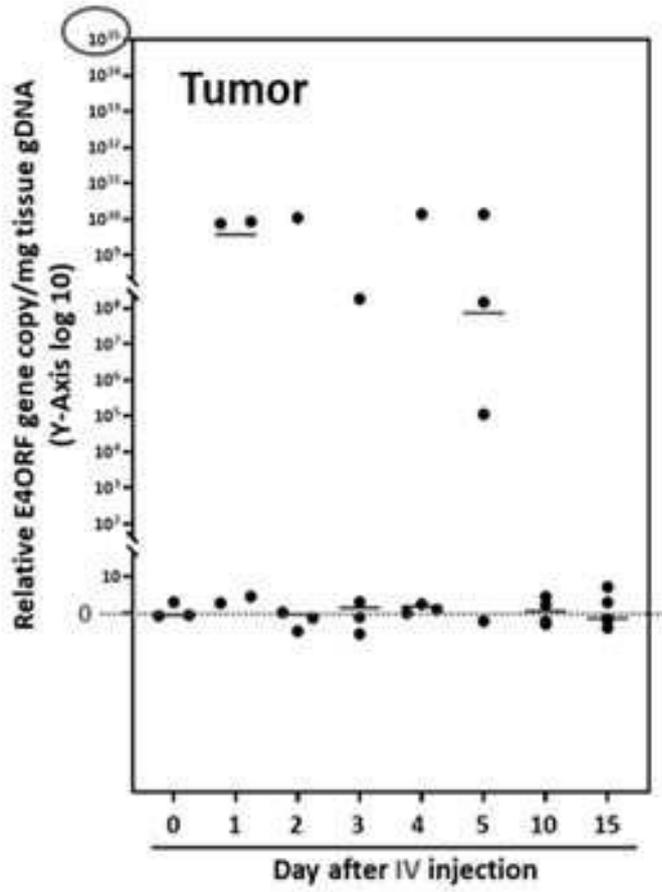
MSC only



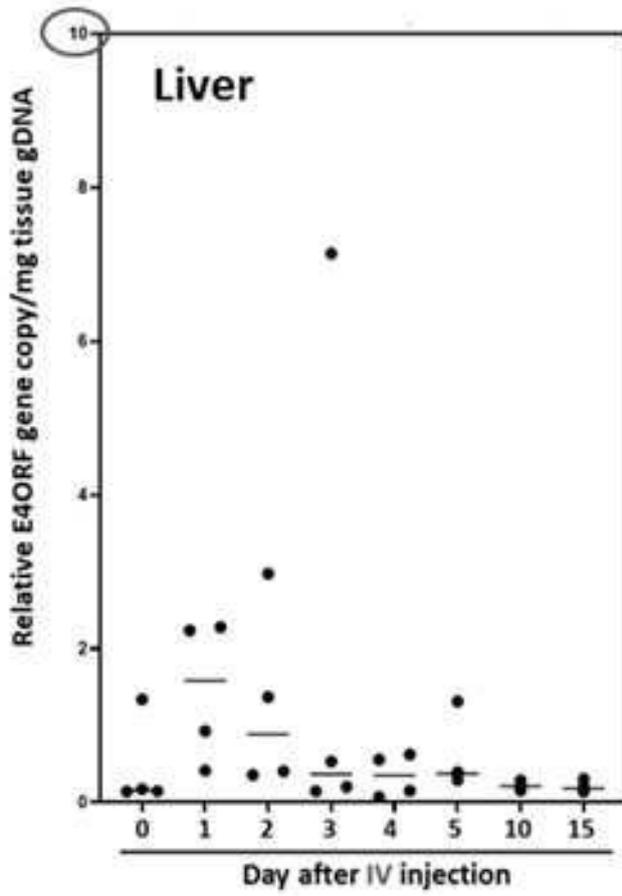
MSC/Ad-3484 shHSP27-shTGF-β1



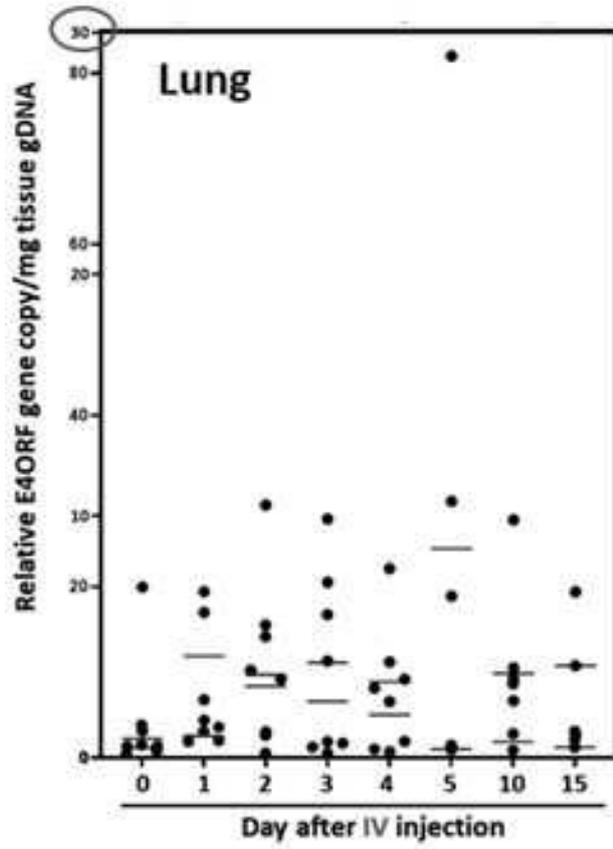
도면41a



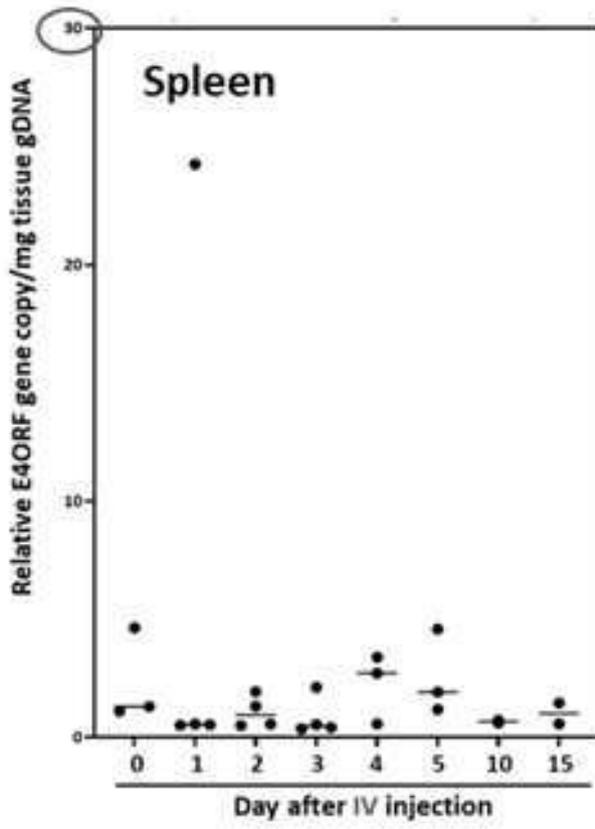
도면41b



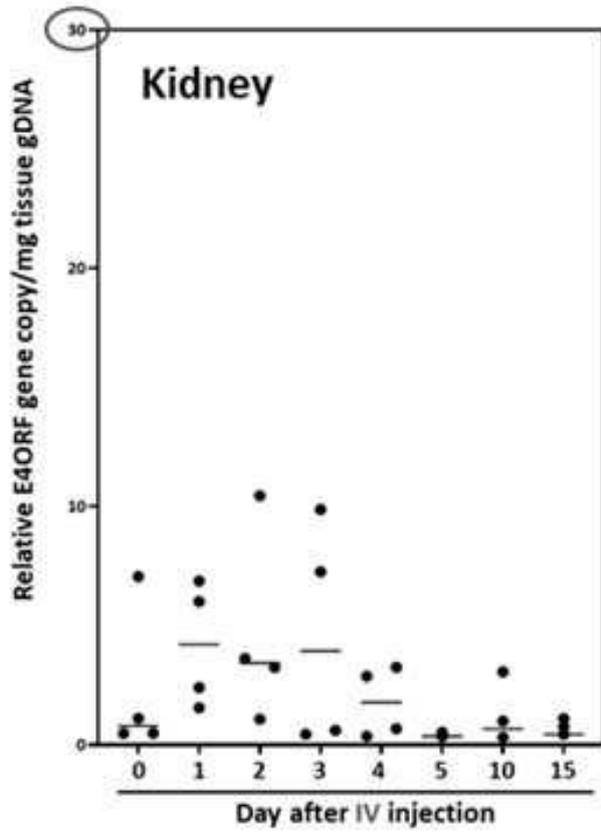
도면41c



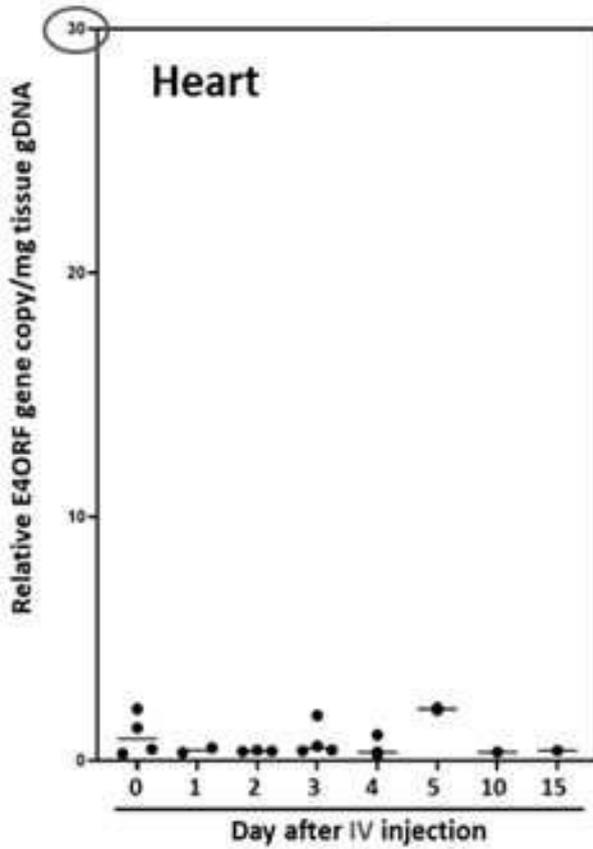
도면41d



도면41e



도면41f



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Mesenchymal stem cells capable of improving tumor targeting and mass production of viruses
- <130> P21U18C1147
- <150> KR 10-2020-0139918
- <151> 2020-10-27
- <160> 31
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1965
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

atgaagctct cctggtggc cgcgatgctg ctgctgctca ggcggcgcg ggccgaggag

60

gaggacaaga aggaggacgt gggcacggtg gtcggcatcg acctggggac cacctactcc 120

tgcgtcggcg tgttcaagaa cggcccgctg gagatcatcg ccaacgatca gggcaaccgc 180

atcacgccgt cciatgtcgc cttcactcct gaaggggaac gtcctgattgg cgatgccgcc 240

aagaaccagc tcacctcaa ccccgagaac acggtctttg acgccaagcg gctcatcggc 300

cgcacgtgga atgaccctgc tgtgcagcag gacatcaagt tcttgccgtt caaggtggtt 360

gaaaagaaaa ctaaaccata cattcaagt gatattggag gtgggcaaac aaagacattt 420

gctcctgaag aaatctcgc catggttctc actaaaatga aagaaccgc tgaggcttat 480

ttgggaaaga aggttaccca tgcagttgtt actgtaccag cctatittaa tgatgcccaa 540

cgccaagcaa ccaaagacgc tggaaactat gctggcctaa atgttatgag gatcatcaac 600

gagcctacgg cagctgctat tgcttatggc ctggataaga gggaggggga gaagaacatc 660

ctggtgtttg acctgggtgg cggaaccttc gatgtgtctc ttctcacat tgacaatggt 720

gtcttcgaag ttgtggccac taatggagat actcatctgg gtggagaaga ctttgaccag 780

cgtgtcatgg aacacttcat caaactgtac aaaaagaaga cgggcaaaga tgtcaggaaa 840

gacaatagag ctgtgcagaa actccggcgc gaggtagaaa aggccaaac ggccctgtct 900

tctcagcatc aagcaagaat tgaaattgag tccttctatg aaggagaaga cttttctgag 960

acctgactc gggccaaatt tgaagactc aacatggatc tgttccggtc tactatgaag 1020

cccgtccaga aagtgttggga agattctgat ttgaagaagt ctgatattga tgaattggt 1080

cttgttggtg gctcgactcg aattccaaag attcagcaac tggftaaaga gttcttcaat 1140

ggcaaggaac catccccggg cataaaccca gatgaagctg tagcgtatgg tgctgctgtc 1200

caggctggtg tgctctctgg tgatcaagat acaggtgacc tggactgct tgatgtatgt 1260

ccccttacac ttggtattga aactgtggga ggtgtcatga ccaaactgat tccaaggaac 1320

acagtggctc ctaccaagaa gtctcagatc tttctacag cttctgataa tcaaccaact 1380

gttacaatca aggtctatga aggtgaaaga ccctgacaa aagacaatca tcttctgggt 1440

acatttgatc tgactggaat tcctectgct cctcgtgggg tcccacagat tgaagtcacc 1500

tttgagatag atgtgaatgg tattcttcca gtgacagctg aagacaaggg tacaggaac 1560

aaaaataaga tcacaatcac caatgaccag aatcgctga cacctgaaga aatcgaagg 1620

atggttaatg atgctgagaa gtttctgag gaagacaaaa agctcaagga gcgcattgat 1680

actagaaatg agttggaag ctatgcctat tctctaaga atcagattgg agataaagaa 1740

aagctgggag gtaaacttc ctctgaagat aaggagacca tggaaaaagc tgtagaagaa 1800

aagattgaat ggctggaag ccaccaagat gctgacattg aagacttcaa agctaagaag 1860

aaggaactgg aagaaattgt tcaaccaatt atcagcaaac tctatggaag tgcaggccct 1920
 ccccaactg gtgaagagga tacagcagaa aaagatgagt tgtag 1965
 <210> 2
 <211> 3399
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

atgccgcgcg ctccccgctg ccgagccgtg cgctccctgc tgcgcagcca ctaccgcgag 60
 gtgctgccgc tggccacgtt cgtgcggcgc ctggggcccc agggctggcg gctgggtcag 120
 cgcggggacc cggcggcttt ccgcgcgctg gtggcccagt gcctgggtg cgtgccctgg 180

gacgcacggc cgcccccgcg cgccccctcc ttccgccagg tgtcctgcct gaaggagctg 240
 gtggccccgag tgctgcagag gctgtgagcg cgcggcgcga agaactgctt gcccttcggc 300
 ttccgctgct tggacggggc ccgccccggc cccccgagg ccttcaccac cagcgtgcgc 360
 agctacctgc ccaacacggt gaccagcga ctgcggggga gcggggcgtg ggggctgctg 420
 ctgcgccgcg tggcgacga cgtgctggtt cacctgctgg cacgctgcgc gctctttgtg 480
 ctggtggctc ccagctgcgc ctaccagggt tgcgggccgc cgctgtacca gctcggcgt 540
 gccactcagg cccggcccc gccacacgt agtggacccc gaaggcgtct gggatgcgaa 600

cgggcctgga accatagcgt cagggaggcc ggggtcccc tgggcctgcc agccccgggt 660
 gcgaggaggc gcgggggcag tgccagccga agtctgccgt tgccaagag gccaggcgt 720
 ggcgctgccc ctgagccgga gcggacgcc gtggggcagg ggtcctgggc ccacccgggc 780
 aggacgcgtg gaccagatga ccgtggtttc tgtgtggtgt cacctgccag acccgccgaa 840
 gaagccacct ctttgagggt tgcgtctctt ggcacgcgcc actcccacc atccgtgggc 900
 cgccagcacc acgcgggccc cccatccaca tcgcgccac cacgtccctg ggacacgcct 960
 tgtccccgg tgtacgccga gaccaagcac ttctctact cctcaggcga caaggagcag 1020

ctgcggccct cttctact cagctctctg agggccagcc tgactggcgc tcggaggctc 1080
 gtggagacca tctttctggg ttccaggccc tggatgccag ggactcccc caggttgccc 1140
 cgctgcccc agcgtactg gaaatgcgg ccctgtttc tggagctgct tgggaaccac 1200
 gcgcagtgcc cctacggggt gctctcaag acgcaactgc cgctgcgagc tcgggtcacc 1260
 ccagcagccg gtgtctgtgc ccgggagaag ccccaggct ctgtggcggc ccccaggag 1320
 gaggacacag accccgtcg cctggtgcag ctgctccgcc agcacagcag ccctggcag 1380
 gtgtacgct tcgtgcgggc ctgcctgcgc cgctggtgc ccccaggcct ctgggctcc 1440

aggcacaacg aaccccgtt cctcaggaac accaagaagt tcatctccct ggggaagcat 1500
 gccaaagtct cgctgcagga gctgacgtgg aagatgagcg tgcgggactg cgcttgctg 1560
 cgaggagcc caggggttgg ctgtgttccg gccgcagagc accgtctgcg tgaggagatc 1620
 ctggccaagt tcctgactg gctgatgagt gtgtacgtcg tcgagctgct caggtctttc 1680
 ttttatgtca cggagaccac gtttcaaaag aacaggtctt ttttctaccg gaagagtgtc 1740
 tggagcaagt tgcaaagcat tggaatcaga cagcacttga agagggtgca gctgcgggag 1800
 ctgtcgggaag cagaggtcag gcagcatcgg gaagccaggc ccgcctgct gacgtccaga 1860

 ctccgttca tcccgaagc tgacgggctg cggccgattg tgaacatgga ctacgtcgtg 1920
 ggagccagaa cgttccgag agaaaagagg gccgagcgtc tcacctgag ggtgaaggca 1980
 ctgttcagcg tgctcaacta cgagcgggcg cggcgccccg gcctcctggg cgctctgtg 2040
 ctgggcctgg acgatatcca cagggcctgg cgcaccttgc tgcctcgtgt ggggcccag 2100
 gaccccccgc ctgagctgta ctttgtcaag gtggatgtga cgggcgcgta cgacaccatc 2160
 ccccaggaca ggctcacgga ggtcatcgcc agcatcatca aacccagaa cacgtactgc 2220
 gtgcgtcggg atgccgtggt ccagaaggcc gcccatgggc acgtccgcaa ggccttcaag 2280

 agccacgtct ctacctgac agacctccag ccgtacatgc gacagtctgt ggctcacctg 2340
 caggagacca gcccgtgag ggatgccgtc gtcacgagc agagctctc cctgaatgag 2400
 gccagcagtg gectcttca cgtcttctca cgttctatgt gccaccacgc cgtgcgcatc 2460
 aggggcaagt cctacgtcca gtgccagggg atcccgcagg gctccatcct ctccacgtg 2520
 ctctgcagcc tgtgtacgg cgacatggag aacaagctgt ttgcggggat tcggcgggac 2580
 gggctgctcc tgcgtttggt ggatgatttc ttgttggtga cacctcacct caccacgcg 2640
 aaaaccttcc tcaggacct ggtccgaggt gtcctgagt atggctgctg ggtgaacttg 2700

 cggaagacag tggatgaact ccctgtagaa gacgaggccc tgggtggcac ggcttttgtt 2760
 cagatgccgg cccacggcct attcccctgg tgcggcctgc tgctggatac ccggacctg 2820
 gaggtgcaga gcgactactc cagctatgcc cggacctcca tcagagccag tctcacctc 2880
 aaccgcgct tcaaggtgg gaggaacatg cgtcgcaaac tctttggggt cttgcggctg 2940
 aagtgtcaca gcctgtttct ggatttgcag gtgaacagcc tccagacggt gtgcaccaac 3000
 atctacaaga tctctctgct cgaggcgtac aggtttcag catgtgtgct gcagctcca 3060
 tttcatcagc aagtttgaa gaaceccaca ttttctctgc gcgtcatctc tgacacggcc 3120

 tccctctgct actccatct gaaagccaag aacgcagga tctcgtggg gccaagggc 3180
 gccgccggcc ctctgcctc cgaggcctg cagtggctgt gccaccaagc attcctgctc 3240
 aagctgactc gacaccgtg cacctactg ccactcctgg ggtcactcag gacagcccag 3300

acgcagctga gtcggaagct cccggggacg acgctgactg ccctggaggc cgcagccaac 3360
 ccggcactgc cctcagactt caagaccatc ctggactga 3399
 <210> 3
 <211> 1491
 <212> DNA
 <213> Human adenovirus type 5
 <400> 3
 atggagcgaa gaaacccatc tgagcgggga gtacctgctg gattttctgg ccatgcatct 60

 gtggagagcg gttgtgagac acaagaatcg cctgctactg ttgtcttccg tccgcccggc 120
 gataataccg acggaggagc agcagcagca gcaggaggaa gccaggcggc ggcggcagga 180
 gcagagccca tggaacccga gagccggcct ggaccctcgg gaatgaatgt tgtacaggtg 240
 gctgaactgt atccagaact gagacgcatt ttgacaatta cagaggatgg gcaggggcta 300
 aagggggtaa agagggagcg gggggcttgt gaggctacag aggaggctag gaatctagct 360
 tttagcttaa tgaccagaca ccgtcctgag tgtattactt ttcaacagat caaggataat 420
 tgcgctaata agcttgatct gctggcgcag aagtattcca tagacagct gaccacttac 480

 tggctgcagc caggggatga ttttgaggag gctattaggg tatatgcaa ggtggcactt 540
 aggccagatt gcaagtacaa gatcagcaaa cttgtaaata tcaggaattg ttgctacatt 600
 tctgggaacg gggccgaggt ggagatagat acggaggata ggggtgcctt tagatgtagc 660
 atgataaata tgtggccggg ggtgcttggc atggacgggg tgggtattat gaatgtaagg 720
 tttactggcc ccaattttag cggtacgggt ttcttgcca ataccaacct taccctacac 780
 ggtgttagct tctatgggtt taacaatacc tgtgtggaag cctggaccga tgaagggtt 840
 cggggctgtg ccttttactg ctgctggaag ggggtggtgt gtcgcccga aagcagggct 900

 tcaattaaga aatgcctctt tgaaagggtg accttgggta tcctgtctga ggtaactcc 960
 aggggtgcgc acaatgtggc ctccgactgt ggttgcctca tgctagttaa aagcgtggct 1020
 gtgattaage ataacatggt atgtggcaac tgcgaggaca gggcctctca gatgctgacc 1080
 tgctcggacg gcaactgtca cctgctgaag accattcacg tagccagcca ctctcgaag 1140
 gcctggccag tgtttgagca taacatactg acccgtggtt ccttgcatth ggtaaacagg 1200
 aggggggtgt tctacctta ccaatgcaat ttgagtcaca ctaagatatt gcttgagccc 1260
 gagagcatgt ccaaggtgaa cctgaacggg gtgtttgaca tgaccatgaa gatctggaag 1320

 gtgctgaggt acgatgagac ccgcaccagg tgcagaccct gcgagtgtgg cggtaaacat 1380
 attaggaacc agcctgtgat gctggatgtg accgaggagc tgaggcccga tcaacttggtg 1440

ctggcctgca cccgcgctga gtttgctct agcgatgaag atacagattg a 1491
 <210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BamHI/NotI forward primer
 <400> 4
 gcggatccat ggagcgaaga aacctatct 29
 <210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BamHI/NotI reverse primer
 <400> 5
 cggccgctca atctgtatct tcatcgct 28
 <210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HindIII forward primer
 <400> 6
 gtacaagctt atgactacgt ccggcgttcc 30
 <210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> XbaI reverse primer
 <400> 7
 cacctctaga ctacatgggg gtagagtcac 30
 <210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CMV30
 <400> 8
 aatgtcgtaa taaccccgcc ccgttgacgc 30
 <210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> XbaI sense primer
 <400> 9
 ttcatctaga atggagcgaa gaaacccatc 30
 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HindIII antisense primer
 <400> 10

 gacgaagctt tcaatctgta tcttcatcgc 30
 <210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCMV forward primer
 <400> 11
 gggaggtcta tataagcaga gctcgc 25
 <210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pCA14 SV40 reverse primer
 <400> 12
 catgatcgat gctagacgat ccaga 25
 <210> 13
 <211> 25

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N terminus of E1B55K
 <400> 13
 Met Glu Arg Arg Asn Pro Ser Glu Arg Gly Val Pro Ala Gly Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly His Ala Ser Val Glu Ser Gly Cys
 20 25
 <210> 14
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> E1B55K In-fusion EcoRI sense primer
 <400> 14
 ccctcgtaaa gaattcatgg agcgaagaaa cccatctgag 40

 <210> 15
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> E1B55K In-fusion BamHI antisense primer
 <400> 15
 gaggtggctt ggatcctcaa tctgtatctt catcgctaga 40

 <210> 16
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> XbaI Forward primer
 <400> 16
 gattctcgag atgaagctct ccctgg 26

 <210> 17
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> XbaI Reverse primer

<400> 17
 ggctctaga ctacaactca tctttt 26

<210> 18
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> pLNCX neo Top strand

<400> 18
 agcttcacgt gccagcacag tggcggccgc tcgagtcgac gggcccgttt aaacgttaac 60
 at 62

<210> 19
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> pLNCX neo Bottom strand

<400> 19
 cgatgttaac gtttaaacgg gcccgtcgac tcgagcggcc gccactgtgc tggcactgta 60
 60

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> E4 ORF Forward primer

<400> 20
 cgtggtcaaa ctctacagcc 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> E4 ORF Reverse primer

<400> 21
 gcatgagcat gactacgatg 20

<210> 22
 <211> 912

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Flag-E4orf6

<400> 22
 gactacaaag acgatgacga caagcttatg actacgtccg gcgttccatt tggcatgaca 60
 ctacgaccaa cacgatctcg gttgtctcgg cgcactccgt acagtaggga tcgtctacct 120
 ccttttgaga cagaaacccg cgctaccata ctggaggatc atccgctgct gcccgaaatgt 180
 aacactttga caatgcacaa cgtgagttac gtgcgaggtc ttcctgcag tgtgggattt 240
 acgctgattc aggaatgggt tgttcctgg gatatggttc taacgcggga ggagcttgta 300
 atcctgagga agtgtatgca cgtgtgcctg tgttgtcca acattgatat catgacgagc 360

 atgatgatcc atggttacga gtcctgggct ctccactgtc attgttccag tcccgttcc 420
 ctgcagtgta tagccggcgg gcaggttttg gccagctggt ttaggatggt ggtggatggc 480
 gccatgttta atcagaggtt tatatggtac cgggaggtgg tgaattacaa catgccaaaa 540
 gaggtaatgt ttatgtccag cgtgtttatg aggggtcgcc acttaatcta cctgcgcttg 600
 tggtatgatg gccacgtggg ttctgtggtc cccgccatga gctttggata cagcgccttg 660
 cactgtggga tttgaacaa tatttggtg ctgtgctgca gttactgtgc tgatttaagt 720
 gagatcaggg tgcgctgctg tgcccggagg acaaggcgcc ttatgctgcg ggcggtgcca 780

 atcatcgctg aggagaccac tgccatgttg tattcctgca ggacggagcg gcggcggcag 840
 cagtttattc gcgcgctgct gcagcaccac cgcctatcc tgatgcacga ttatgactct 900
 accccatgt ag 912

<210> 23
 <211> 1196
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sample 2-Fig. 7

<400> 23
 aaccgtcaga attgatctac catggactac aaagacgatg acgacaagct tatgactacg 60
 tccggcgttc catttggcat gacactacga ccaacacgat ctcggttgtc tcggcgcact 120

 ccgtacagta gggatcgtct acctcctttt gagacagaaa cccgcgctac catactggag 180

gatcatccgc tgctgcccg atgtaacact ttgacaatgc acaacgtgag ttacgtgcga 240
 ggtcttcctt gcagtgtggg atttacgtg attcaggaat gggttgttcc ctgggatatg 300
 gttctaacgc gggaggagct tgtaatcctg aggaagtga tgcacgtgtg cctgtgttgt 360
 gccaacattg atatcatgac gagcatgatg atccatggtt acgagtcctg ggctctccac 420
 tgtcattgtt ccagtcccgg ttccctgcag tgtatagccg gcgggcaggt ttggccagc 480
 tggtttagga tgggtgtgga tggcgccatg tttaatcaga ggtttatatg gtaccgggag 540

gtggtgaatt acaacatgcc aaaagaggta atgtttatgt ccagcgtgtt tatgagggtt 600
 cgccacttaa tctacctgcg cttgtggat gatggccacg tgggttctgt ggtccccgcc 660
 atgagctttg gatacagcgc cttgcactgt gggattttga acaatattgt ggtgctgtgc 720
 tgcagttact gtgctgattt aagtgagatc aggggtgcct gctgtgcccg gaggacaagg 780
 cgcttatgc tgcggggcgt gcgaatcacc gctgaggaga ccaactgcat gttgtattcc 840
 tgcaggacgg agcggcgccg gcagcagttt attcgcgcg tgctgcagca ccaccgcctt 900
 atcctgatgc acgattatga ctctacccc atgtagtcta gaggatccc ggtggcatcc 960

ctgtgacccc tcccagtgct ctctctggc cctggaagtt gccactccag tgcccaccag 1020
 ccttgccta ataaaattaa gttgcatcat tttgtctgac taggtgtcct tctataatat 1080
 tatgggtgg agggggggg tatggaacca aggggcaagt tgggaaaaa acctgaaggg 1140
 cctcggggtc ttattgggaa ccaactggg agtgagtggt accaattttg ggttcc 1196

<210> 24
 <211> 960
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pCA14-E1B55K forward
 <400> 24

aagacaccgg gaccgatcca gcctgggat cttcgagtcg agggatccct cgagtctaga 60

atggagcgaa gaaaccatc tgagcgggga gtacctgctg gattttctgg ccatgcatct 120
 gtggagagcg gttgtgagac acaagaatcg cctgctactg ttgtcttccg tccgcccgcc 180
 gataataccg acggaggagc agcagcagca gcaggaggaa gccaggcggc ggcggcagga 240
 gcagagccca tggaaccga gagccggcct ggaccctcgg gaatgaatgt tgtacaggtg 300
 gctgaactgt atccagaact gagacgcat ttgacaatta cagaggatgg gcaggggcta 360
 aagggggtaa agaggagcg gggggcttgt gaggctacag agggagctag gaatctagct 420
 tttagcttaa tgaccagaca ccgtcctgag tgtattactt ttcaacagat caaggataat 480

tgcgctaag agcttgatct gctggcgcag aagtattcca tagagcagct gaccacttac 540
 tggctgcagc caggggatga ttttagggag gctattaggg tataatgcaa ggtggcactt 600
 agccagatt gcaagtacaa gatcagcaaa cttgtaaata tcaggaattg ttgctacatt 660
 tctgggaacg gggccgaggt ggagatagat acggaggata ggggtgcctt tagatgtagc 720
 atgataaata tgtggccggg ggtgcttggc atggacgggg tggttattat gaatgtaagg 780
 tttactggcc ccaatthtag cggtagggtt ttcttgcca ataccaacct tatectacac 840
 ggtgttagct tctatgggtt taacaatacc tgtgtggaag cctggaccga tgtaagggtt 900

cggggctgtg cctthtactg ctgctggaag ggggtggtgt gtcgccccaa aagcagggtc 960
 960

<210> 25

<211> 1017

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCA14-E1B55K-reverse

<400> 25

tttggccaac ccgggatga ttttaggggg cthttgggtt tttcaaaagg tgccttagg 60
 ccagattgca attacaaaa cagcaaacct gtaaatthca ggaattgttg ctacatttct 120
 gggaacgggg ccgaggtgga gatagatacg gaggataggg tggcctthtag atgtagcatg 180

ataaatatgt ggccgggggt gcttggcatg gacggggtgg ttattatgaa tgtaaggtht 240
 actggcccca atthtagcgg tacgthtttc ctggccaata ccaaccttat cctacacggt 300
 gttagcttct atgggtthaa caatacctgt gtggaagcct ggaccgatgt aagggttcgg 360
 ggctgtgcct tttactgctg ctggaagggg gtggtgtgtc gccccaaaag cagggtthca 420
 attaagaaat gcctctthga aagggtgacc ttgggtatcc tgtctgaggg taactccagg 480
 gtgcgccaca atgtggcctc cgactgtggt tgcttcatgc tagtgaaaag cgtggctgtg 540
 attaagcata acatggtatg tggcaactgc gaggacaggg cctctcagat gctgacctgc 600

tggacggca actgtcacct gctgaagacc atthcacgtag ccagccactc tcgcaaggcc 660
 tggccagtgt ttgagcataa catactgacc cgctgttctt tgcattthggg taacaggagg 720
 ggggtgttcc taccttacca atgcaatthg agthcacacta agatattgct tgagcccgag 780
 agcatgtcca aggtgaaact gaacgggggtg tthgacatga ccatgaagat ctggaagggtg 840
 ctgaggtacg atgagaccg caccaggtgc agaccctgcg agtgtggcgg taaacatatt 900
 aggaaccagc ctgtgatgct ggatgtgacc gaggagctga ggcccgatca cthggtgctg 960

gcctgcaccc gcgctgagtt tggctctagc gatgaagata cagattgaaa gcttgtc 1017

<210> 26

<211> 1172

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer E1B55K In-fusion EcoRI sense

<400> 26

ccggggggca gtacctgctg gattctctgg ccatgcatct gtggagagcg gttgtgagac 60

acaagaatcg cctgctactg ttgtcttccg tccgcccggc gataataccg acggaggagc 120

agcagcagca gcaggaggaa gccaggcggc ggccggcagga gcagagccca tgaacccga 180

gagccggcct ggaccctcgg gaatgaatgt tgtacagtg gctgaactgt atccagaact 240

gagacgcatt ttgacaatta cagaggatgg gcaggggcta aagggggtaa agagggagcg 300

gggggcttgt gaggctacag aggaggctag gaatctagct tttagcttaa tgaccagaca 360

ccgtcctgag tgtattactt ttcaacagat caaggataat tgcgctaag agcttgatct 420

gctggcgtag aagtattcca tagagcagct gaccacttac tggctgcagc caggggatga 480

ttttgaggag gctattaggg tatatgcaaa ggtggcactt aggccagatt gcaagtacaa 540

gatcagcaaa ctigttaaata tcaggaattg ttgctacatc tctgggaacg gggccgaggt 600

ggagatagat acggaggata ggggtggcctt tagatgtagc atgataaata tgtggccggg 660

ggtgcttggc atggacgggg tggttattat gaatgtaagg tttactggcc ccaattttag 720

cggtacggtt ttcttgcca ataccaacct taccctacac ggtgttagct tctatgggtt 780

taacaatacc tgttggaag cctggaccga tgtaagggtt cggggctgtg ccttttactg 840

ctgctggaag ggggtggtgt gtcgcccaaa aagcagggt tcaattaaga aatgcctctt 900

tgaaaggtgt accttgggta tctgtctga gggtaactcc aggggtgcgc acaatgtggc 960

ctccgactgt ggttgcttca tgctagttaa aagcgtggct gtgattaagc ataacatggt 1020

atgtggcaac tgcgaggaca gggcctctca gatgctgacc tgctcggagc gcaactgtca 1080

cctgctgaag acattcacgt agccagccct ttcgaaggc tggccagggt tgagcatacc 1140

tactgacccc ctgttcttg ctttgggaaa aa 1172

<210> 27

<211> 686

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer: E1B55K internal primer

<400> 27

acctgtaatt tgtttatttg ggcgtaggtc gggcgtgctt ttactgctgc tggaggggg 60

tgggtgtgctg ccccaaaagc agggcttcaa ttaagaaatg cctctttgaa aggtgtacct 120

tgggtatcct gtctgagggt aactccaggg tgcgccacaa tgtggcctcc gactgtggtt 180

gcttcatgct agtgaaaagc gtggctgtga ttaagcataa catggtatgt ggcaactgcg 240

aggacagggc ctctcagatg ctgacctgct cggacggcaa ctgtcacctg ctgaagacca 300

ttcacgtage cagccactct cgcaaggcct ggccagtgtt tgagcataac atactgacct 360

gctgttcctt gcatttgggt aacaggaggg ggggttcctt acctaccaa tgcaatttga 420

gtcacactaa gatattgctt gagcccgaga gcatgtccaa ggtgaacctg aacggggtgt 480

ttgacatgac catgaagatc tggagggtgc tgaggtagca tgagaccgc accaggtgca 540

gaccctgcga gtgtggcggg aaacatatta ggaaccagcc tgtgatgctg gatgtgacct 600

aggagctgag gcccgatcac ttggtgctgg cctgcaccgc cgctgagttt ggctctagcg 660

atgaagatac agattgagga tccaga 686

<210> 28

<211> 483

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E1B55K 5' near internal reverse primer

<400> 28

aaagaattca tggagcgaag aaacctatct gagcggggag tacctgctgg attctctggc 60

catgcatctg tggagagcgg ttgtgagaca caagaatcgc ctgctactgt tgtcttccgt 120

ccgcccgcg ataataccga cggaggagca gcagcagcag caggaggaag ccaggcggcg 180

gcggcaggag cagagcccat ggaacccgag agccggcctg gaccctcggg aatgaatggt 240

gtacaggtgg ctgaactgta tccagaactg agacgcattt tgacaattac agaggatggg 300

caggggctaa agggggtaaa gagggagcgg ggggcttgtg aggctacaga ggaggctagg 360

aatctagctt ttagcttaat gaccagacac cgtcctgagt gtattacttt tcaacagatc 420

aaggataatt gcgctaata gctgatctgc gcgcagacgc gccaacaaaa caagagtcca 480

gtc 483

<210> 29

<211> 1246

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer:ElB55K In-fusion BamHI antisense

<400> 29

```

aaaggatggc agggctaaag gggtaaagag gagcgggggc ttggaggcta cagaggaggc      60
taggaatcta gcttttagct taatgaccag acaccgtcct gagtgtatta cttttcaaca      120
gatcaaggat aattgcgcta atgagcttga tctgctggcg cagaagtatt ccatagagca      180
gctgaccact tactggctgc agccagggga tgattttgag gaggctatta gggatatgc      240
aaaggtgga cttaggccag attgcaagta caagatcagc aaacttgtaa atacaggaa      300
ttgttgctac atctctggga acggggccga ggtggagata gatacggagg atagggtggc      360
ctttagatgt agctctggga acggggccga ggtggagata gatacggagg atagggtggc      420

ctttagatgt agctctggga acggggccga ggtggagata gatacggagg atagggtggc      480
ctttagatgt agctttactg gcccgaattt tagcggtagc gttttcctgg ccaatacaca      540
ccttatccta cacggtgta gcttctatgg gtttaacaat acctgtgtgg aagcctggac      600
cgatgtaagg gttcggggct gtgcctttta ctgctgctgg aagggggtgg tgtgtcgcce      660
caaaagcagg gcttcaatta agaaatgcct ctttgaagg tgtaccttgg gtatcctgtc      720
tgagggtaac tccagggtgc gccacaatgt ggcctccgac tgtggttgc tcatgctagt      780
gaaaagcgtg gctgtgatta agcataacat ggtatgtggc aactgcgagg acagggcctc      840

tcagatgctg acctgctcgg acggcaactg tcacctgctg aagaccattc acgtagccag      900
ccactctcgc aaggcctggc cagtgtttga gcataacata ctgaccgct gttccttgea      960
tttgggtaac aggagggggg tgttctacc ttaccaatgc aatttgagtc aactaagat      1020
attgcttgag cccgagagca tgtccaaggt gaacctgaac ggggtgtttg acatgacat      1080
gaagatctgg aagggtctga ggtacgatga gaccgcacc aggtgcagac cctgcgagtg      1140
tggcggtaaa catattagga accagcctgt gatgctggat gtgaccgagg agctgaggcc      1200
cgatcacttg gtgctggcct gcaccgcgc tgagtttggc ccccg      1246

```

<210> 30

<211> 995

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pcDNA3.1 GRP78 forward

<400> 30

```

tggtggaatt ctgcagatat ccagcacagt ggcggccgct cgagatgaag ctctccctgg      60

```

tggcccgcat gctgctgctg ctcagcgcgg cgcgggccga ggaggaggac aagaaggagg 120
 acgtgggcac ggtggctggc atcgacctgg ggaccaccta ctctgcgctc ggcgtgttca 180
 agaacggccg cgtggagatc atcgccaacg atcagggcaa ccgcatcacg cegtctatg 240
 tcgccttcac tctgaaggg gaacgtctga ttggcgatgc cgccaagaac cagctcacct 300

 ccaaccccga gaacacggtc tttgaccca agcggctcat cggccgcacg tggatgacc 360
 cgtctgtgca gcaggacatc aagtcttgc cgttcaaggt ggttgaaaag aaaactaac 420
 cataattca agttgatatt ggaggtgggc aaacaaagac atttctcct gaagaaattt 480
 ctgccatggt tctcactaaa atgaaagaaa ccgctgaggc ttatttggga aagaaggtta 540
 cccatgcagt tgttactgta ccagcctatt ttaatgatgc ccaacgcaa gcaaccaaag 600
 acgtggaac tattgctggc ctaaagtta tgaggatcat caacgacct acggcagctg 660
 ctattgctta tggcctggat aagagggagg gggagaagaa catcctggtg tttgacctgg 720

 gtggcggaaac cttcgatgtg tctcttctca ccattgacaa tgggtcttc gaagtgtgg 780
 ccactaatgg agatactcat ctgggtggag aagacttga ccagcgtgct atggaacact 840
 tcatcaaact gtacaaaaag aagacgggca aagatgtcag gaaagacaat agagctgtgc 900
 agaaactccg gcgcgagga gaaaaggcca aacgggcct gtcttctcag catcaagcaa 960
 gaattgaaat tgagtccttc tatgaaggag aagac 995

 <210> 31
 <211> 1046
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pcDNA3.1 GRP78 reverse
 <400
 > 31
 tctatgaagg agaagacttt tctgagacc tgactcgggc caaatttga gagctcaaca 60
 tggatctggt ccggtctact atgaagcccg tccagaaagt gttggaagat tctgattga 120
 agaagtctga tattgatgaa attgttcttg ttgggtggctc gactcgaatt ccaaagattc 180
 agcaactggt taaagagttc ttcaatggca aggaaccatc ccgtggcata aaccagatg 240
 aagctgtagc gtatggtgct gctgtccagg ctggtgtgct ctctggtgat caagatacag 300
 gtgacctggt actgcttgat gtatgtcccc ttacacttgg tattgaaact gtgggaggtg 360
 tcatgaccaa actgattcca aggaacacag tggcgcctac caagaagtct cagatctttt 420

 ctacagcttc tgataatcaa ccaactgtta caatcaaggt ctatgaaggt gaaagacccc 480
 tgacaaaaga caatcatctt ctgggtacat ttgatctgac tggaaattcct cctgctcctc 540

gtgggtccc acagattgaa gtcacctttg agatagatgt gaatggtatt cttcgagtga	600
cagctgaaga caaggttaca gggaacaaaa ataagatcac aatcaccaat gaccagaatc	660
gcctgacacc tgaagaaatc gaaaggatgg ttaatgatgc tgagaagttt gctgaggaag	720
acaaaaagct caaggagcgc attgatactia gaaatgagtt ggaaagctat gcctattctc	780
taaagaatca gattggagat aaagaaaagc tgggaggtaa actttcctct gaagataagg	840
agaccatgga aaaagctgta gaagaaaaga ttgaatggct ggaaagccac caagatgctg	900
acattgaaga ctccaagct aagaagaagg aactggaaga aattgttcaa ccaattatca	960
gcaaactcta tggaagtgca ggcctcccc caactggtga agaggataca gcagaaaaag	1020
atgagttgta gtctagagtc ccgtaa	1046