

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0139763

(43) 공개일자 2019년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0775 (2010.01) *A61K 35/28* (2015.01)*A61P 35/00* (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0663 (2013.01)*A61K 35/28* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0061081

(22) 출원일자 2019년05월24일

심사청구일자 2019년05월24일

(30) 우선권주장

1020180065944 2018년06월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

송재진

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 러들로 교수동 330호

최혜진

서울특별시 서대문구 독립문로 10, 101동 1702호 (영천동, 독립문삼호아파트)

최수진

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 임상의학연구센터 506호

(74) 대리인

특허법인다나

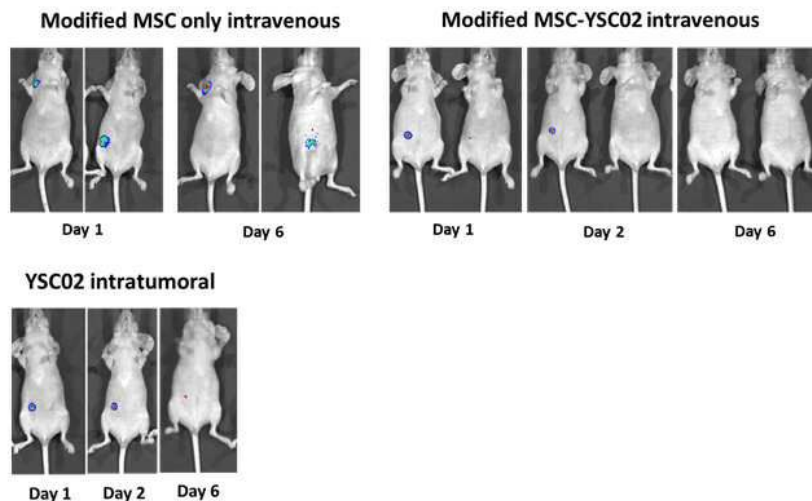
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 아데노바이러스의 감염 및 복제가 가능한 중간엽 줄기세포주

(57) 요약

본 발명은 아데노바이러스의 감염 및 복제가 현저히 증가한 중간엽 줄기세포주 및 GM-CSF, Flt3L-TRAIL, shTGF- β 및 shHSP 공동 발현용 유전자 전달체가 탑재된 중간엽 줄기세포주에 관한 것이다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 5/0665 (2013.01)

C12N 5/0667 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/531 (2013.01)

C12N 2710/10141 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 중간엽 줄기세포주.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

CAR와 E1B55kD를 동시에 발현하는 중간엽 줄기세포주.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

인간 유래 중간엽 줄기세포주.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

제대혈, 골수 또는 지방 유래인 중간엽 줄기세포주.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 아데노바이러스는 종양살상 아데노바이러스인 중간엽 줄기세포주.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

MSC-CAR-E1B55KD로 명명된 중간엽 줄기세포주 [KCLRF-BP-00434]

청구항 7

청구항 1의 중간엽 줄기세포주에,

과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; Flt3L-TRAIL 융합 유전자; TGF- β 발현을 억제하는 shRNA(shTGF- β) 및 HSP 발현을 억제하는 shRNA를 포함하는 유전자 전달체가 탑재된 중간엽 줄기세포주.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

항암 효과를 가지는 중간엽 줄기세포주.

청구항 9

제 8 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 중간엽 줄기세포주.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 GM-CSF 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 중간엽 줄기세포주.

청구항 11

제 9 항에 있어서,

상기 Flt3L-TRAIL 융합 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 중간엽 줄기세포주.

청구항 12

제 9 항에 있어서,

상기 shTGF- β 는 shTGF- β 1 또는 shTGF- β 2인 중간엽 줄기세포주.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 shTGF- β 1는 서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 중간엽 줄기세포주.

청구항 14

제 12 항에 있어서,

상기 shTGF- β 2는 서열번호 6 또는 서열번호 7로 표시되는 중간엽 줄기세포주.

청구항 15

제 9 항에 있어서,

상기 shHSP는 shHSP25 또는 shHSP27인 중간엽 줄기세포주.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 shHSP25는 서열번호 8로 표시되는 중간엽 줄기세포주.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

상기 shHSP27은 서열번호 9로 표시되는 중간엽 줄기세포주.

청구항 18

제 9 항에 있어서,

상기 유전자 전달체는 플라스미드, 재조합 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(Adenoassociated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 백시니아 바이러스, 리포좀 또는 니오솜인 중간엽 줄기세포주.

청구항 19

제 9 항에 있어서,

상기 유전자 전달체는 종양살상 아데노바이러스인 중간엽 줄기세포주.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아데노바이러스의 감염 및 복제가 현저히 증가한 중간엽 줄기세포주 및 GM-CSF, Flt3L-TRAIL, shTGF- β 및 shHSP 공동 발현용 유전자 전달체가 탑재된 중간엽 줄기세포주에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현재 시판 승인된 T-vec이나 JX-594 등은 각각 흑색종과 간암을 주요 타겟 암종으로 하는 바이러스 기반 면역항암제이다. 그러나 이들 매우 제한된 벡터를 제외하고는 광범할 만한 추가 바이러스 기반 항암제는 출현하고 있지 못하고 있다.

[0004] 가장 큰 이유는 종양 부위로의 바이러스 전달이 너무 낮다는 것이다. VSV(vesicular stomatitis virus)의 경우 마우스에 정맥 주사 시 도입된 양의 10,000분의 1 만이 24시간 후에 피하에 유도한 종양에 도달된다는 보고가 있다(비특허문헌 1). 혈관 내 주사 시 대부분의 바이러스들은 간의 Kupffer cells에 흡수되거나 mechanical deposition에 의해 재빨리 제거된다.

[0005] 두 번째 이유로 혈관 내 바이러스 중화항체와 complement에 의해 쉽게 파괴된다는 점이다.

[0006] 세 번째 이유로는 혈관 내 바이러스들이 종양 부위에서 유출되는 것이 매우 낮다는 점이다.

[0007] 이러한 이유들로 인하여 특히 아데노바이러스 단독을 정맥 주사로 도입하는 것은 효과를 기대할 수 없었다.

[0008] 이에, 바이러스의 유전적 변형을 일으키거나 나노기술을 도입하거나 종양 부위로의 tropism이 있는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)를 사용하는 연구가 진행 중이다. MSC를 사용하는 경우 빈약한 면역 원성(poor immunogenicity), 유전적 안정화(genetic stabilization), 윤리적 및 기술적 편리성(ethical and technical convenience) 등이 장점이긴 하나, MSC 같은 암 세포가 아닌 정상 세포의 경우에는 아데노바이러스의 감염은 그다지 높지 않으며 본 실험에 사용하는 종양살상 아데노바이러스(YSC-02)의 경우에도 복제는 미약하였다. 2011년 보고된 MSC의 경우 선택적 복제 가능 아데노바이러스의 carrier로서 그리고 amplifier로서 보고가 되었으나(비특허문헌 2), 아데노바이러스 감염과 복제가 일정 수준 이상으로 유지되지 못한 문제점이 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Silva et al., Double trouble for tumors: Exploiting the tumor microenvironment to enhance anticancer effect of oncolytic viruses. Cytokine & Growth factors 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

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구 노력한 결과, 유전적으로 변형시킨 아데노바이러스 감염 및 복제가 가능하도록 새로운 중간엽 줄기세포주를 개발하였으며, 더욱이 본 발명자들에 의해 개발된 GM-CSF, Flt3L-TRAIL, shTGF- β 및 shHSP 공동 발현용 유전자 전달체를 새로운 중간엽 줄기세포주에 탑재시킴으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0011] 따라서, 본 발명은 아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 중간엽줄기 세포주를 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0012] 또한, 본 발명은 GM-CSF, Flt3L-TRAIL, shTGF- β 및 shHSP 공동 발현용 유전자 전달체가 탑재된 중간엽 줄기세포주를 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 바이러스 단독에 의한 종양 치료 방식에서 제기되는 3가지 큰 어려움은 다음과 같다.
- [0015] 첫째, 종양살상 아데노바이러스(oncolytic adenovirus)에 대한 circulating antiviral 항체에 의한 파괴, 둘째, 간, spleen, 그리고 다른 비종양조직에 의한 비특이적 흡착, 셋째, 혈관으로부터 종양부위로의 바이러스 유출이 거의 일어나지 않는다는 점이다.
- [0016] 이러한 바이러스 치료(virotherapy)의 근본적인 문제를 극복하기 위해서 oncolytic virus의 systemic 혈액 내 운반을 용이하게 하기 위하여 중간엽 줄기세포를 cell carrier를 사용하였으며, 바이러스의 운반 이외에도 타겟 종양 부위로 이동 중 생산된 대량의 바이러스에 의한 효과적인 항종양 작용을 위해 유전적으로 변형시킨 중간엽 줄기세포주(MSC)를 개발하였다.
- [0017] 본 발명은 아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 중간엽 줄기세포주에 관한 것이다.
- [0018] 상기 중간엽 줄기세포주는 CAR(Coxsackievirus and Adenovirus Receptor)와 E1B55kD를 동시에 발현하는 것에 그 특징이 있다.
- [0019] 상기 CAR(Coxsackievirus and Adenovirus Receptor)는 아데노바이러스에 대한 대상세포의 주된 수용체이며, 인간 간로부터 유래된 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0020] 상기 E1B55kD는 아데노바이러스의 early gene product로서, 아데노바이러스 유래 유전자를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0021] 상기 중간엽 줄기세포주는 인간 유래인 것이 바람직하다.
- [0022] 상기 중간엽 줄기세포주는 골수, 제대혈 또는 지방 유래인 것이 바람직하다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예로서, 아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 골수 유래 인간 중간엽줄기세포주를 MSC-CAR-E1B55KD 로 명명하였으며, 이를 한국세포주연구재단에 2018년 5월 28일자로 기탁하여 기탁번호 KCLRF-BP-00434를 부여받았다.
- [0024] 또한, 본 발명자에 의해 특허 출원하여 등록된 제1860233호(2018.05.15)에 개시되어 있는, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; Flt3L-TRAIL 융합 유전자; TGF- β 발현을 억제하는 shRNA(shTGF- β) 및 HSP

발현을 억제하는 shRNA(shHSP)를 포함하는 GM-CSF, Flt3L-TRAIL, shTGF- β 및 shHSP 공동 발현용 유전자 전달체를 본 발명에서 개발한 변형된 중간엽줄기세포에 탑재시킴으로써 줄기세포 복제율이 증가할 뿐만 아니라 항암 효과도 우수함을 확인하였다.

- [0025] 따라서, 본 발명은 아테노바이러스 감염 및 복제가 가능한 중간엽 줄기세포주에,
- [0026] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; Flt3L-TRAIL 융합 유전자; TGF- β 발현을 억제하는 shRNA(shTGF- β) 및 HSP 발현을 억제하는 shRNA(shHSP)를 포함하는 유전자 전달체가 탑재된 항암용 중간엽 줄기세포주를 포함한다.
- [0027] TGF- β 발현을 억제하는 shRNA(shTGF- β) 및 HSP 발현을 억제하는 shRNA(shHSP) 공동 발현용 유전자 전달체를 이용하여 대상 세포에 형질도입시킬 경우, 각각의 유전자를 발현하는 경우나 심지어 GM-CSF, Flt3L-TRAIL가 발현하는 경우 보다 항종양 효과가 훨씬 개선되는 것을 확인하였다.
- [0028] GM-CSF 유전자, Flt3L-TRAIL 융합 유전자, shTGF- β 및 shHSP 공동 발현용 유전자 전달체를 이용하여 대상 세포에 형질도입시킬 경우, 각각의 유전자를 발현하는 경우 보다 특히 shTGF- β 및 shHSP 발현하는 경우 보다 항종양 효과가 더욱 뛰어난 것을 확인하였다.
- [0029] 특히, 본 발명자들은 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; Flt3L-TRAIL 융합 유전자, TGF- β 발현을 억제하는 shRNA(shTGF- β) 및 HSP27 발현을 억제하는 shRNA(shHSP27)들이 서로 매우 밀접하게 세포사멸과 생존요소 및 면역학적 요소가 연결되어 있으며, 이들을 효과적으로 조절하는 방식으로 조합하여 현재의 암 치료에서의 장애인 세포 내 상이한 신호 네트워크들 간의 혼선(Cross-talks between different signaling networks in a cell), 종양 세포와 면역 세포 간의 혼선(Cross-talk between tumor cells and immune cells) 그리고 종양 내 이질성(Intratumor heterogeneity)을 극복하여 광범위한 암 유형들의 범위에서 매우 효과적으로 궁극적인 암세포 제어가 가능한 것을 확인하였다.

[0030] 본 명세서에서, 용어 "과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)"는 실시예에 예시된 GM-CSF뿐만 아니라, 면역 증강반응을 유도하는 GM-CSF의 모든 유사체 (homologues)를 포함한다.

[0031] 마우스 GM-CSF 유전자는 Dr. Gerald C. O'Sullivan (Cork Cancer Research Centre, Mercy University Hospital and Leslie C. Quick Jnr. Laboratory, University College Cork, Cork, Ireland)로부터 입수하였으며, 염기서열은 Cancer Gene Therapy (2006) 13, 1061-10710에 나타난 바와 같고, 서열번호 1로 표시된다.

[0032] [서열번호 1]

[0033]	atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg	60
[0034]	cccacccgct caccatcac tgtcacccgg ccttggaagc atgtagagc catcaaagaa	120
[0035]	gccctgaacc tcttgatga catgcctgtc acgttgaatg aagaggtaga agtcgtctct	180
[0036]	aacgagtctt cttcaagaa gctaacatgt gtgcagaccc gcctgaagat attcgagcag	240
[0037]	ggtctacggg gcaatttcac caaactcaag ggcgccttga acatgacagc cagctactac	300
[0038]	cagacatact gcccccaac tccggaacg gactgtgaaa cacaagttac cacctatgcg	360
[0039]	gatttcatag acagccttaa aacctttctg actgatatcc ccttgaatg caaaaaacca	420
[0040]	ggccaaaaat ga	432

[0041] 인간 GM-CSF 유전자는 InvivoGen로부터 입수하였으며, 염기서열은 진뱅크 M11220에 나타난 바와 같고, 서열번호 2로 표시된다.

[0042] [서열번호 2]

[0043]	atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc	60
[0044]	cgctcgccca gcccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccg	120
[0045]	cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaacagt agaagtcac	180
[0046]	tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgccacaga cccgcctgga gctgtacaag	240

[0047]	cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggccctt tgacatgat ggccagccac	300
[0048]	tacaagcagc actgccctcc aaccccgaa acttctctgtg caaccagat tatcaccttt	360
[0049]	gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgtca tcccctttga ctgctgggag	420
[0050]	ccagtccagg agtga	435
[0051]	인간 Flt3L-TRAIL 유전자는 Flt3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand)의 1-181 아미노산을 코딩하는 유전자와 TRAIL(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)의 95-281 아미노산을 코딩하는 유전자가 루신 지퍼(leucine zipper)로 융합된 것으로, 진뱅크 U03858 (Flt3L)와 진뱅크 B032722 또는 U57059 (TRAIL)로 나타낸 바와 같이 서열번호 3으로 표시된다.	
[0052]	[서열번호 3]	
[0053]	atgacagtgc tggcgccagc ctggagccca acaacctatc tcctcctgct gctgctgctg	60
[0054]	agctcgggac tcagtgggac ccaggactgc tccttccaac acagcccat ctcctccgac	120
[0055]	ttcgtctgtca aaatccgtga gctgtctgac tacctgtctc aagattaccc agtcaccgtg	180
[0056]	gcctccaacc tgcaggacga ggagctctgc gggggcctct ggcggtggt cctggcacag	240
[0057]	cgctggatgg agcggctcaa gactgtcgtc gggtccaaga tgcaaggctt gctggagcgc	300
[0058]	gtgaacacgg agatacatt tgtcaccaaa tgtgccttcc agccccccc cagctgtctt	360
[0059]	cgcttcgtcc agaccaacat ctcccgcctc ctgcaggaga cctccgagca gctgggtggcg	420
[0060]	ctgaagccct ggatcactcg ccagaacttc tcccgggtgcc tggagctgca gtgtcagccc	480
[0061]	gactcctcaa cctgccacc cccatggagt ccccgccccc tggaggccac agccccgaca	540
[0062]	gccccggcta gcagaatgaa gcagatcgag gacaaaattg aggaaatcct gtccaaaatt	600
[0063]	taccacatcg agaacgagat cgcgccgatt aagaaactca ttggcgagag ggaattcacc	660
[0064]	tctgaggaaa ccattttctac agttcaagaa aagcaacaaa atattttcc cctagtgaga	720
[0065]	gaaagaggtc ctgagagagt agcagctcac ataactggga ccagaggaag aagcaacaca	780
[0066]	ttgtcttctc caaactccaa gaatgaaaag gctctgggcc gcaaaataaa ctctgggaa	840
[0067]	tcatcaagga gtgggcatcc attcctgagc aacttgact tgaggaatgg tgaactggtc	900
[0068]	atccatgaaa aagggtttta ctacatctat tcccaacat actttcgatt tcaggaggaa	960
[0069]	ataaaagaaa acacaaagaa cgacaacaaa atgggtccat atatttaca atacacaagt	1020
[0070]	tatcctgacc ctatattgtt gatgaaaagt gctagaata gttgttggtc taaagatgca	1080
[0071]	gaatatggac tctattccat ctatcaaggg ggaatatatt agcttaagga aatgacaga	1140
[0072]	atttttgttt ctgtaacaaa tgagcacttg atagacatgg accatgaagc cagttttttc	1200
[0073]	ggggcctttt tagttggcta a	1221
[0074]	Flt3L-TRAIL 융합 유전자의 경우에는 상기 인간 타입 유전자가 마우스에서도 활성을 가지기 때문에 마우스 Flt3L-TRAIL 융합유전자를 따로 제작하지 않고, 인간 Flt3L-TRAIL 융합 유전자를 사용하였다.	
[0075]	본 명세서에서, 용어 "TGF-β 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β)"는 TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β1) 또는 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2)를 의미한다.	
[0076]	상기 "TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β1)"는 국내 특허 공개 제2013-0012095호로 개시된 것을 사용하였으며(국내 특허 공개 제2013-0012095호에 개시된 서열은 RNA 서열로 표기되어 있음. DNA로 표시되는 경우에는 RNA 서열의 U를 T로 치환하면 되므로 동일한 것임), 상기 shTGF-β1은 마우스 shRNA의 경우 서열번호 4로 표시되며, 인간 shRNA의 경우에는 서열번호 5로 표시된다.	

- [0077] [서열번호 4]
- [0078] ccctctacaa ccaacacaac ccgggtctcc ccgggttggtg ttggtttag aggg 54
- [0079] [서열번호 5]
- [0080] accagaaata cagcaacaat tcctguctct ccaggaattg ttgctggtat ttctgggtt 59
- [0081] 상기 "TGF- β 2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF- β 2)"는 국내 특허 공개 제2013-0088792호로 개시된 것을 사용하였으며, 상기 shTGF- β 2는 마우스 shRNA의 경우 서열번호 6으로 표시되며, 인간 shRNA의 경우에는 서열번호 7로 표시된다. (RNA로 표시되는 경우에는 DNA서열의 T를 U로 치환하면 된다)
- [0082] [서열번호 6]
- [0083] ggattgaact gtatcagatc cttaatctct taaggatctg atacagttca atcc 54
- [0084] [서열번호 7]
- [0085] ggattgagct atacagatt ctcaatctct tgagaatctg atagatctca atcc 54
- [0086] 본 명세서에서, 용어 "HSP 발현을 억제하는 shRNA(shHSP)"는 마우스 shRNA에 해당되는 shHSP25 또는 인간 shRNA에 해당되는 shHSP27을 포함할 수 있으며, 상기 shHSP25는 서열번호 8로 표시되며, 상기 shHSP27은 국내 특허 공개 제2013-0123244호로 개시된 것을 사용하였으며, 서열번호 9로 표시된다. (RNA로 표시되는 경우에는 DNA서열의 T를 U로 치환하면 된다)
- [0087] [서열번호 8]
- [0088] gctac atctc tcggt gcttc a tctc t gaagc accga gagat gtage
- [0089] [서열번호 9]
- [0090] gatccgacga gcatggctac atctcccggt tctcaccggg agatgtagcc atgctcgtct
- [0091] 상기 유전자 전달체는 플라스미드, 재조합 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(Adenoassociated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 백시니아 바이러스, 리포좀 또는 니오솜인 것이 바람직하며, 종양살상 아데노바이러스인 것이 보다 바람직하다.
- [0092] 상기 4종 유전자 전달체에 대한 상세한 설명은 국내 특허 공고 제 1860233호에 기재된 바와 같다.
- [0093] 본 발명에 따른 항암용 줄기세포주는 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.

발명의 효과

- [0095] 항암용 줄기세포주가 되기 위한 1차적으로 해결해야 되는 과제는 MSC에 대한 아데노바이러스의 감염율이 낮은 문제점을 해결해야 한다는 점이다. 즉, GFP 발현하는 아데노바이러스를 MSC에 감염시켰을 때 50 MOI에 의한 MSC 감염 효율은 일반 암 세포주의 5 MOI 에서의 감염율과 비슷한 수준으로 약 10배 가량 낮았다. 참고로 일반 암 세포주에 대한 아데노바이러스의 감염율은 50 MOI에서 최소 80% 이상인데 반하여 같은 양의 아데노바이러스를 MSC에 감염시키면 감염율은 10% 미만이었다.
- [0096] 하지만, 본원발명에서 제작된 중간엽 줄기세포주를 이용할 경우, 감염율을 월등히 향상시킴으로써, 항암용 줄기 세포주로 사용 가능하다.
- [0097] 또한, virus carrier로서의 MSC의 연구 보고 미미한 이유는 MSC의 효율적 바이러스 복제공장으로서의 기능이 충분 하지 못하였기 때문이며, 본 발명에서와 같이 유전적으로 변형시킨 MSC 개발로 이러한 기능의 전환을 가능하게 함으로써 이 문제를 해결하였다.
- [0098] 특히, 본 발명자들에 의해 발명된 GM-CSF, Flt3L-TRAIL, shTGF- β 및 shHSP 공동 발현용 유전자 전달체(YSC-02)를 변형된 줄기세포주에 도입함으로써 복제율의 증가도 향상하는 부수적 효과 등 새로운 항암 치료제로 사용 가능하다.

[0099] 이러한 항암치료제는 전세계적으로 주목을 받고 있는 항암 면역치료제 분야에 전임상 연구를 통한 선도물질 선정을 완료하고 생산 및 공정 개발에 진입함으로써 관련 분야 제품 개발의 국산화를 위한 인프라 및 노하우 구축이 가능해진다. 무엇보다도 암 환자의 사망의 주된 원인인 전이성 종양을 바이러스기반 항암제로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0101] 도 1은 pLNCX 벡터 및 pLNCX-CAR 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.
 도 2는 pLNCX 벡터에 CAR 유전자가 삽입된 것을 확인한 것이다.
 도 3은 pcDNA3-E1B55KD 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.
 도 4는 pcDNA3 벡터에 E1B55KD 유전자가 삽입된 것을 나타낸 것이다.
 도 5는 pLNCX-E1B55KD 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.
 도 6은 pLNCX 벡터에 E1B55KD 유전자가 삽입된 것을 나타낸 것이다.
 도 7은 CAR와 E1B55kd가 동시에 발현되는 modified 중간엽줄기 세포(MSC-CAR-E1B55KD)에서 CAR와 E1B55kd의 발현을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 것이다.
 도 8은 중간엽줄기세포(MSC)에서의 아데노바이러스 감염율을 확인한 것이다[좌측: 위상차 현미경 우측: 형광사진].
 도 9는 CAR와 E1B55kd가 동시에 발현되는 중간엽줄기세포 MSC-CAR-E1B55KD 에서의 아데노바이러스 감염율을 확인한 것이다[좌측: 위상차 현미경 우측: 형광사진].
 도 10은 중간엽줄기세포에서 control과 YSC-02 두 종류의 종양살상 아데노바이러스의 바이러스 생산량을 나타낸 것이다.
 도 11은 CAR와 E1B55kd가 동시에 발현되는 중간엽줄기세포 MSC-CAR-E1B55KD 에서 control과 YSC-02 두 종류의 종양살상 아데노바이러스 생산량을 확인한 것이다.
 도 12는 누드마우스에 luciferase가 발현되는 인간 유래 유방암 세포인 MDAMB231을 복벽에 주입시켜 종양을 형성하게 한 후 modified MSC MSC-CAR-E1B55KD에 감염된 YSC-02를 누드마우스의 꼬리 정맥으로 주사하여 종양이 시간이 지남에 따라 사라지는 것을 확인한 것이다.
 도 13은 Modified MSC로부터 생성된 YSC-02의 항종양 효과 검증하기 위하여, 집락형성 분석법(clonogenic assay) 결과를 나타낸 것이다.
 도 14는 YSC-02 바이러스 감염 시 modified MSC의 종양원성 유무를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0102] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0104] 참조예 1: YSC-02 제작

[0105] 특허 출원 제 2016-0166171호의 참조예 19에 기재되었듯이 YSC-02를 제작하였다.

[0107] 실시예 1: 아데노바이러스의 감염능과 복제능이 향상된 중간엽 줄기세포주 MSC-CAR-E1B55KD [KCLRF-BP-00434] 제조

[0108] 중간엽줄기세포에 대한 아데노바이러스의 감염능과 복제능을 높이기 위하여, CAR와 E1B55KD 발현하는 retroviral vector 제작하였다.

- [0109] 마우스흑색종 세포주 제작에 사용한 pCDNA3.1-CAR[국내 출원 제2015-0044519호의 도 3 참조]에서 HindIII, Cla I 제한효소 site를 추가하여 PCR 프라이머를 제작하고 PCR 방법으로 CAR를 뽑아 pLNCX vector (Clontech, USA)에 삽입하였다.
- [0110] <CAR PCR 프라이머>
- [0111] Sense primer (Hind III) ccc aagctt atg gc g ctc ctg ctg tgc tt_(서열번호 10)
- [0112] Anti-sense primer (Cla I) CC ATCGAT CTATACTATAGACCCATCCT (서열번호 11)
- [0113] <CAR PCR 조건>
- [0114] 1: 95 °C 2 min; 2: 95 °C 30 sec;
- [0115] 3: 55 °C 30 sec; 4: 72 °C 1 min 20 sec;
- [0116] 5: step 2-4 40회 반복
- [0117] 6: 72 °C 5 min
- [0118] pLNCX vector와 PCR 산물 모두 HindIII, Cla I 로 자른 후 연결하여 pLNCX-CAR를 제작하였다[도 1].
- [0119] 이렇게 제작된 pLNCX-CAR에 CAR 유전자가 삽입되었음을 확인하기 위하여 pLNCX와 pLNCX-CAR을 앞서 사용한 CAR PCR 프라이머로 PCR하여 LNCX 벡터에 CAR가 삽입된 것을 확인하였으며, 그 결과는 도 2와 같다.
- [0120] E1B55KD는 pBSK-3484 (International J. Oncology 42: 1337, 2013 The effectiveness of the oncolytic activity induced by Ad5F35 adenoviral vector is dependent on the cumulative cellular conditions of survival and autophagy)에 포함되어 있는 E1B55KDa 이용하였다. E1B55KDa 역시 HindIII, Cla I 제한효소 site를 추가하여 PCR 프라이머를 제작하고 PCR를 수행하였다.
- [0121] <PCR 프라이머>
- [0122] sense primer (HindIII): 5'-CGC AAGCTT ATGGAGCGAAGAAACCCATC-3' (서열번호 12)
- [0123] antisense primer (XhoI): 5'- CGC cctcgag TCAATCTGTATCTTCATCG (서열번호 13)
- [0124] <PCR 조건>
- [0125] 1: 95 °C 2 min; 2: 95 °C 30 sec;
- [0126] 3: 55 °C 30 sec; 4: 72 °C 1 min 40 sec;
- [0127] 5: step 2-4 40회 반복
- [0128] 6: 72 °C 5min
- [0129] pcDNA3-CrmA (Addgene, USA)에서 HindIII/XhoI으로 CrmA 유전자를 제거한 자리에 상기 PCR 산물인 E1B55KD를 HindIII/XhoI 로 처리한 후 pcDNA3-E1B55KD를 제작하였다[도 3].
- [0130] 이렇게 제작된 pcDNA3-E1B55KD에 E1B55KD 유전자가 삽입되었음을 확인하기 위하여, 먼저 E1B55KD PCR 하여 증폭된 band의 DNA를 HindIII/XhoI으로 자르고 pcDNA3-CrmA도 HindIII/XhoI으로 잘라 서로 ligation 시킨후 얻은 bacterail colony 중에서 제대로 삽입된 pcDNA3-E1B55KD subcloning 여부를 plasmid DNA 추출 후 HindIII/XhoI 절단하여 확인하였다.
- [0131] 그 결과, 1~6 colony 에서 얻은 DNA 중 2, 4, 5, 6이 pcDNA3-E1B55KD 으로 치환된 것을 확인하였다[도 4].
- [0132] 상기 pcDNA3-E1B55KD 에서 Hpa I, Cla I 제한효소 site를 추가하여 PCR 프라이머를 제작하고 PCR 을 수행하여 PCR 산물을 얻었다.
- [0133] <E1B55KDa PCR 프라이머>
- [0134] Sense (Hpa I) CC GTT AAC ATG GAG CGA AGA AAC CCA TC (서열번호 14)
- [0135] Anti-sense (Cla I) CC ATC GAT TCA ATC TGT ATC TTC ATC GC (서열번호 15)
- [0136] <E1B55KD PCR 조건>

- [0137] 1: 95 °C 2 min; 2: 95 °C 30 sec;
- [0138] 3: 55 °C 30 sec; 4: 72 °C 1 min 40 sec;
- [0139] 5: step 2-4 40회 반복
- [0140] 6: 72 °C 5min
- [0141] 그 다음에 pLNCX vector(Clontech, USA)와 PCR 산물 모두 Hpa I, Cla I으로 자른 후 연결하여 pLNCX-E1B55KD를 제작하였다[도 5].
- [0142] 이렇게 제작된 pLNCX-E1B55KD에 E1B55KD 유전자가 삽입되었음을 확인하기 위하여 Hpa I, cla I 두 가지 제한효소를 이용하여 pLNCX vector와 DNA sample을 잘라서 비교하여 subcloning 여부를 확인하였다. 그 결과 1번과 2번 sample DNA plasmid가 E1B55KD 유전자가 삽입된 것을 확인하였다[도 6].
- [0144] Platinum-A retroviral packaging cell line (Cell Biolabs, USA)을 사용하여 두 종류의 서플벡터 pLNCX-CAR와 pLNCX-E1B55KD 를 동시에 감염시켜 얻은 soup을 사용하여 retroviral vector를 제작하였다.
- [0145] 이를 위하여 Platinum A cell (Retroviral Packaging Cell Line)에 pLNCX-CAR와 pLNCX-E1B55KD를 각각 1ug씩 co-transfection하고 48시간 뒤에 retroviral soup을 harvest하여 filtering한 뒤 골수 유래 MSC (Lonza, Swiss)에 infection하였다.
- [0146] 이때 수확한 soup의 retrovirus는 바이러스 생산 유무와 생산량의 확인을 위해 qPCR retrovirus titration kit(abm)로 측정하였다. 이때 측정된 titer는 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cfu/ml 이었다.
- [0147] 두 종류의 retrovirus로 감염된 MSC는 3일 뒤에 10cm dish로 옮겨서 G418 (Geneticin) 400ug/ml을 3일 마다 처리하였다. 이렇게 10일 정도 배양하여 selection된 10 cm dish에 있는 cell을 모두 pulling하여 CAR와 E1B55kd가 삽입된 modified-MSC를 제작하였다.
- [0148] CAR와 E1B55kd가 동시에 발현되는 modified-MSC에서 CAR와 E1B55kd의 발현을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과는 도 7에 나타내었다.
- [0149] 이렇게 제작된 modified-MSC는 MSC-CAR-E1B55KD 로 명명하였으며, 한국세포주연구재단에 2018년 5월 28일자로 기탁하여 기탁번호 KCLRF-BP-00434를 부여받았다.
- [0151] **실시예 2: 변형된 줄기세포주의 바이러스 감염율 증가 확인**
- [0152] 상기 CAR와 E1B55kd가 삽입된 modified-MSC세포주 MSC-CAR-E1B55KD 에서의 바이러스 감염율 증가를 확인하기 위하여 GFP를 발현하는 복제불능 아데노바이러스를 100 MOI로 변형 전 MSC와 변형 후 MSC에 감염시키고 2일 경과 후에 형광현미경으로 GFP를 발현하는 세포들을 관찰하였다.
- [0153] 그 결과, 변형 전 MSC 세포의 경우 100 MOI에서도 10% 미만 수준이었으나[도 8], 변형 후 MSC(modified-MSC)인 MSC-CAR-E1B55KD 의 경우 거의 100%에 이르렀다[도 9]. (이때 관찰된 형광세포의 형광된 비율을 정확하게 알기 위해 형광 현미경사진(우측)과 동일한 부위의 세포들을 위상차 현미경으로 찍은 사진(좌측)을 나타냄).
- [0155] **실시예 3: 변형된 줄기세포주 MSC-CAR-E1B55KD의 아데노바이러스 복제율 증가 확인**
- [0156] oncolytic control adenovirus(oncolytic NC)와 human type의 YSC-02을 (변형 전) MSC (1×10^4 cell)에 50~500 MOI 감염 2일 경과 후 생산된 바이러스 총 생산량을 plaque formation에 의한 virus titration 법으로 확인하였다.
- [0157] 그 결과, 100 MOI 혹은 500 MOI에서 oncolytic control virus(oncolytic NC)에 비하여 human type의 YSC-02 감염 시 5~10배 가량 증가함을 관찰하였다. 즉, 100 MOI에서 control virus에서는 0.6×10^4 pfu/ml인데 비하여 YSC-02에서는 4.0×10^5 pfu/ml 로 증가하였다[도 10].

[0158] oncolytic control adenovirus(oncolytic NC)와 human type의 YSC-02을 바이러스 감염과 증식에 관련 있는 유전자 도입된 변형된 MSC MSC-CAR-E1B55KD (1×10^4 cell)에 50~100 MOI 감염 2일 경과 후 생산된 바이러스 총 생산량은 약 10배 가량 증가함을 관찰하였다. 즉, 100 MOI에서 control virus에서는 1×10^8 pfu/ml인데 비하여 YSC-02에서는 1×10^9 pfu/ml로 증가하였다[도 11].

[0159] 유전자 도입된 변형된 MSC에서 YSC-02 감염에 의한 바이러스의 생성량은 (변형 전) MSC에 비하여 2,500배 이상 증가하였으며, YSC-02는 oncolytic control virus에 비하여 10배 이상 virus production을 유도하는 것으로 확인되었다[도 11]. 즉, virus 생산 증가 요인에는 유전자 도입된 변형된 MSC, 그리고 YSC-02의 탑재 유전자가 생산 증가 요인으로 작용하고 있음을 확인하였다.

[0161] 실시예 4: 항암 효과 확인

[0162] 유방암 세포인 MDAMB231에 luciferase gene을 도입시키기 위하여, pLXIN-luciferase (Addgene, USA)을 platinum A packaging cell에 transfection하여 $1-2 \times 10^6$ CFU/ml 수준의 레트로바이러스를 수확하여 MDAMB231에 감염시킨 후 G418 (1 mg/ml)을 3일 마다 처리하였다. 이렇게 10일 정도 배양하여 selection된 10 cm dish에 있는 cell clones을 24-well plate, 6 well-plate로 순차적으로 배양하면서 6 well plate에서 일정량의 clone 세포들을 Promega의 dual-luciferase reporter assay system를 이용하여 luciferase activity를 측정하여 activity가 높은 clone들을 확보하였다. 그런 다음 누드마우스에 MDAMB231-luciferase (5×10^5) 피하에 도입한 후 7일 경과 후 100 MOI로 YSC-02를 Modified MSC MSC-CAR-E1B55KD (2×10^4)에 감염시킨 다음 4시간이 지난 후 마우스의 꼬리정맥으로 주사하였다. 이때 5×10^7 pfu/50 μ l YSC-02를 종양 내 주사방식의 대조군으로 사용하였다. 감염 후 1일, 2일 그리고 6일째에 항종양 효과를 관찰하기 위하여 누드마우스 마리당 D-luciferin (PerkinElmer #760504) 150 μ l를 복강으로 주사하고 호흡 마친 후 약 10-15분 후에 IVIS bioluminescence imaging 장비로 사진을 찍었다.

[0163] 그 결과, modified MSC MSC-CAR-E1B55KD only (intravenous)에 비해 modified MSC MSC-CAR-E1B55KD/YSC-02 YSC-02 intratumoral 등에서 종양 regression 뚜렷하게 나타났다[도 12].

[0165] 실시예 5: Modified MSC로부터 생성된 YSC-02의 항종양 효과 검증

[0166] Modified MSC로부터 생성된 YSC-02의 항종양 효과 검증하기 위하여, 집락형성 분석법(clonogenic assay)를 실시하였다.

[0167] Modified MSC를 1×10^4 로 seeding하고 여기에 oncolytic NC (negative control) virus와 hYSC-02 virus를 각각 100 MOI로 infection하여 48 시간 후에 얻은 virus soup (modified MSC로부터 생산된 progeny virus를 포함하고 있는 soup을 의미함)을 하루 전에 1×10^5 으로 6 well plate에 칸 여러 종류의 인간 암 세포인 흑색종(melanoma) A375, 유방암(breast cancer) MDAMB231, 간암(liver cancer) SNU1079, 간암(liver cancer) SNU1196에 감염 후 다시 하루 후 재분배시키고 세포에 따라 7~10일 배양하게 하여 clone을 형성하게 하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 씻은 후 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 상온에서 10분간 고정한 후 0.05% crystal violet으로 1시간 염색한 다음 PBS로 세척하였다.

[0168] 그 결과, NC virus에 의한 세포생존율에 비하여 YSC-02 virus 감염 후 세포생존율이 현저히 감소하는 것을 확인하여 modified MSC로부터 생성된 YSC-02의 항종양 효과가 있음을 입증하였다[도 13 참조].

[0170] 실시예 6: YSC-02 바이러스 감염 시 modified MSC의 종양원성 유무 실험

[0171] In vivo에서 MSC와 비교하여 modified MSC에 YSC-02 바이러스를 탑재시켰을 때 이들 세포들에 의한 종양형성 가능성을 제거하는 것이 안전성 측면에서 매우 중요하다. MSC에 비하여 modified MSC의 경우 체내에서 바이러스 감염 및 복제 이후에 lysis가 대부분 일어나 종양원성 가능성이 현저히 낮아질 수 있음을 in vitro에서 확인하

고자 한 실험이다.

[0172] MSC와 modified MSC를 같은 세포 수 (1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 cell)로 seeding하고 그 다음날 hYSC-02 virus를 동일하게 100 MOI로 감염시킨 뒤 48 시간 후에 확인하였을 때, MSC는 바이러스에 대한 감염율 및 복제율이 낮으므로 감염되지 않은 세포들이 lysis 되지 않고 그대로 남아있는 반면, 바이러스에 대한 감염율 및 복제율이 증가된 modified MSC는 거의 모든 세포들이 감염 후 lysis 되어 사라지게 되므로 modified MSC에 의한 종양원성의 위험이 매우 낮을 가능성을 시사하였다[도 14 참조].

수탁번호

[0174]

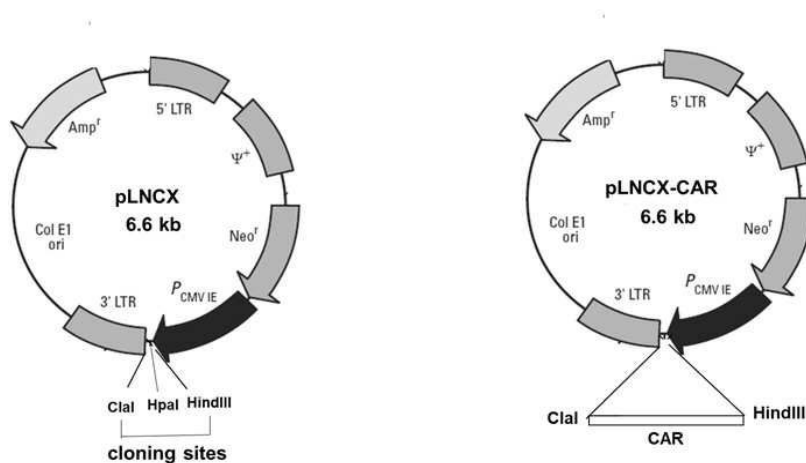
기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRFBP00434

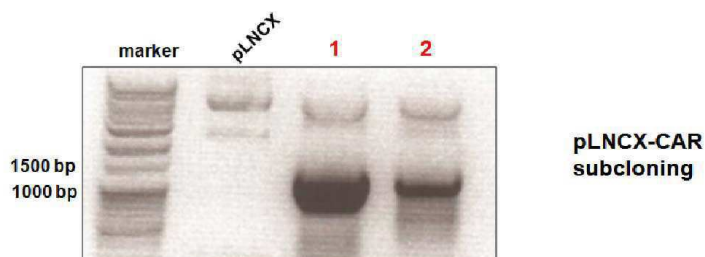
수탁일자 : 20180528

도면

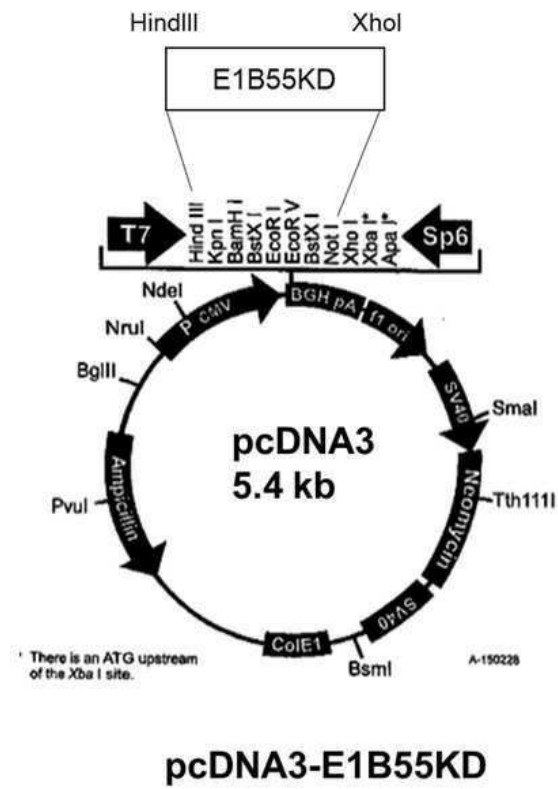
도면1



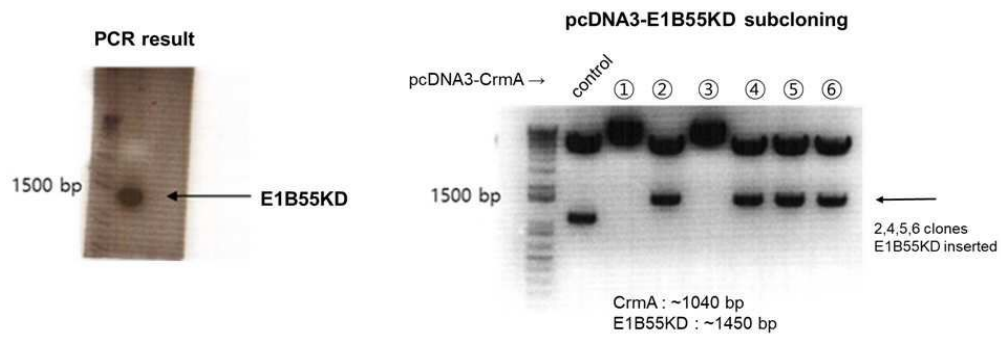
도면2



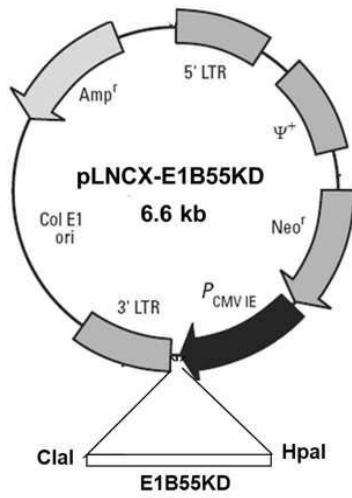
도면3



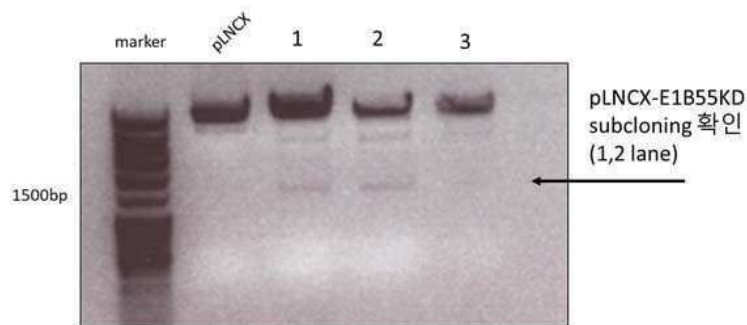
도면4



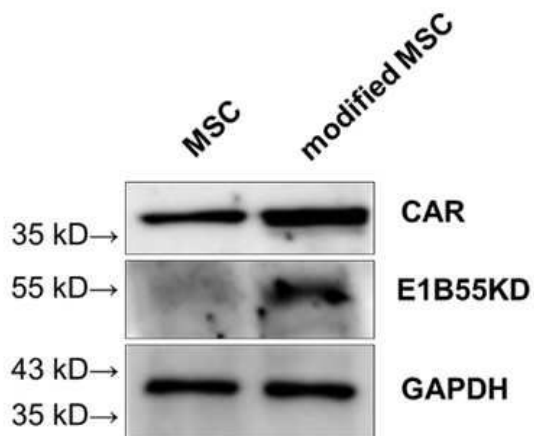
도면5



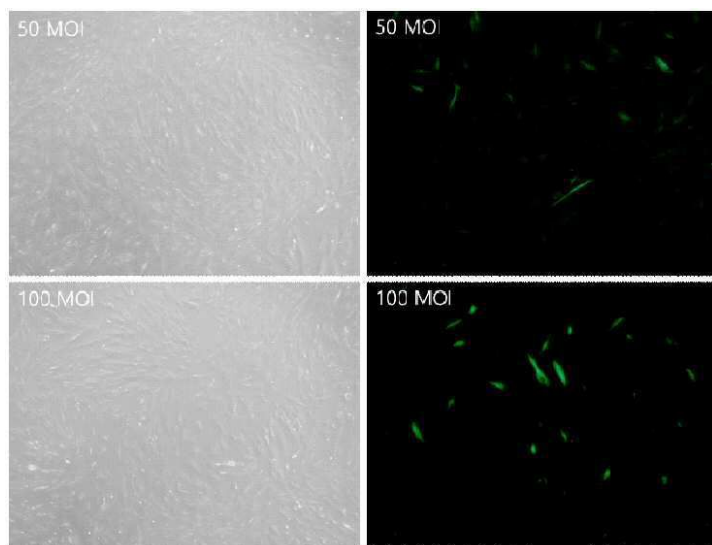
도면6



도면7

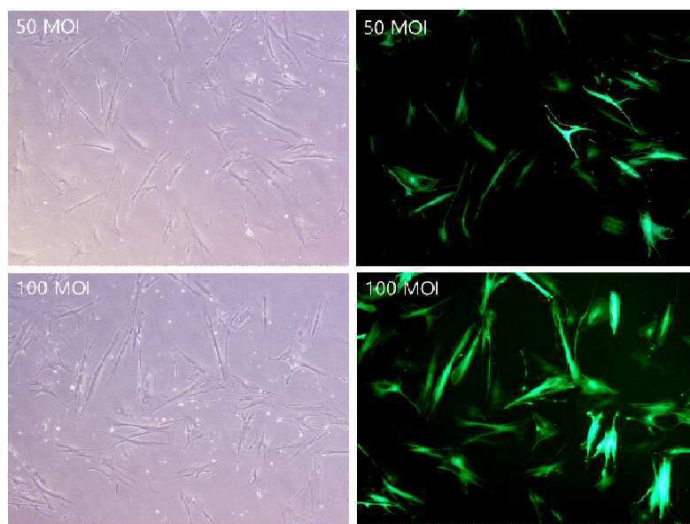


도면8



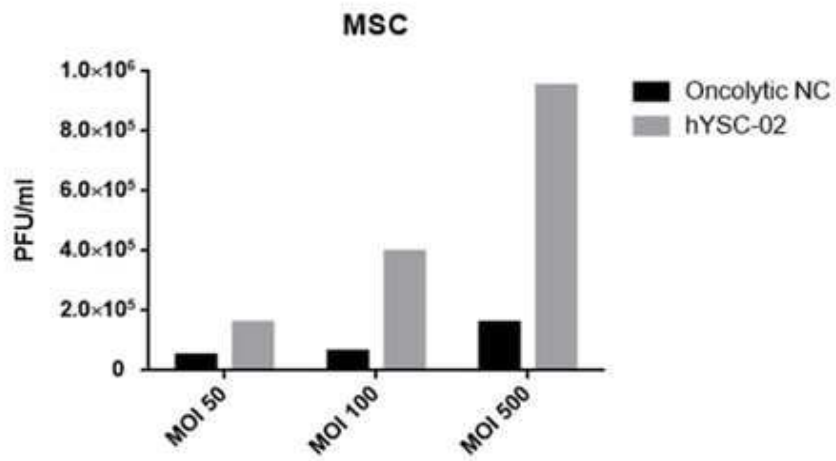
MSC

도면9

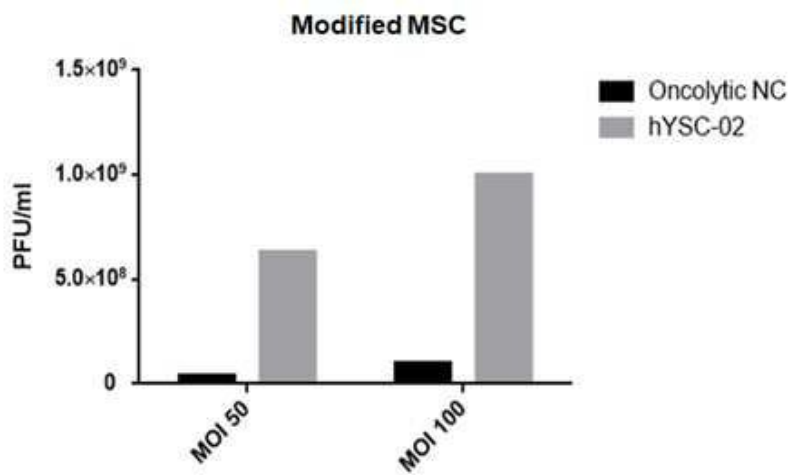


Modified MSC-CAR, E1B55kD

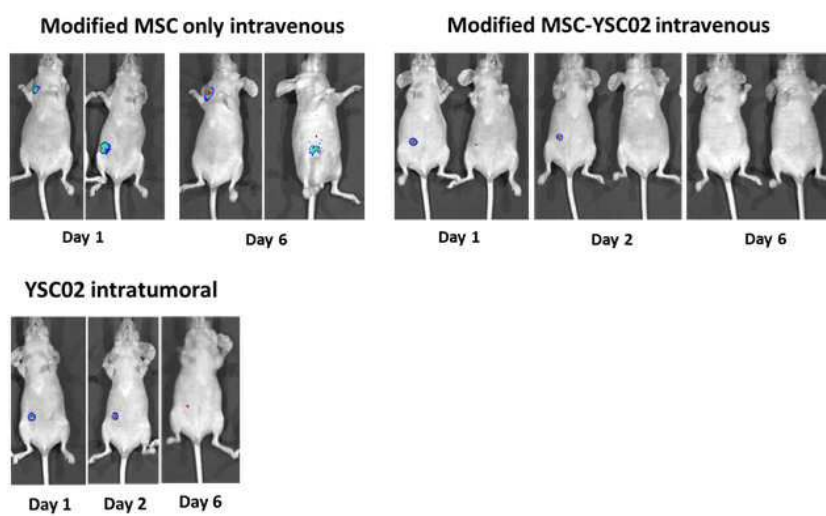
도면10



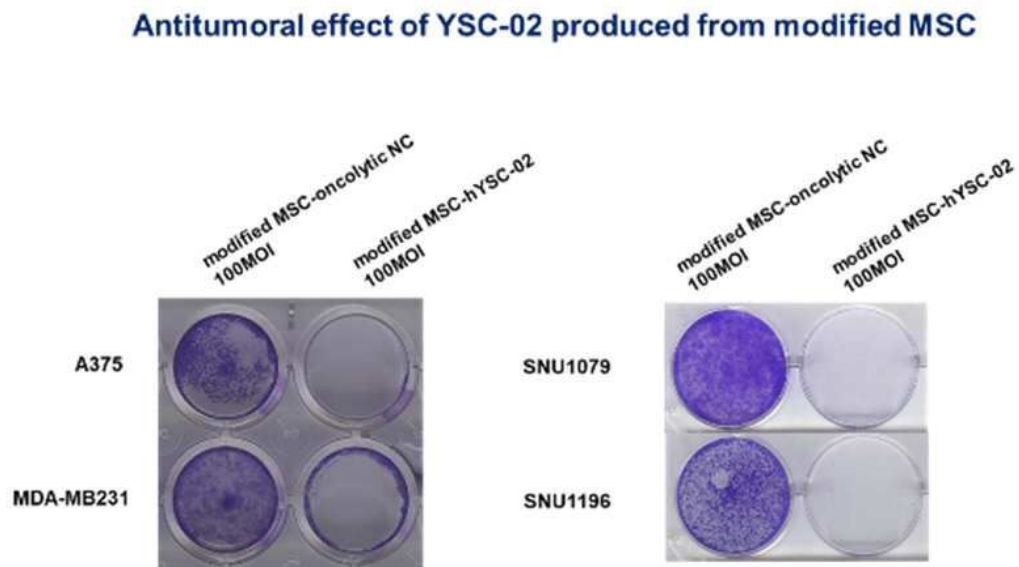
도면11



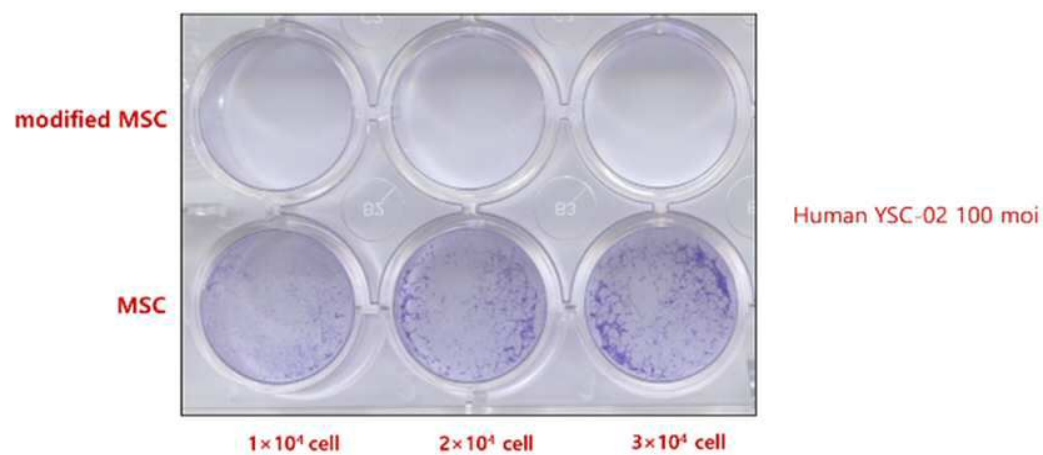
도면12



도면13



도면14



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Mesenchymal stem cell line capable of adenoviral infection and replication
- <130> P19U18C0243
- <150> KR 10-2018-0065944
- <151> 2018-06-08
- <160> 15
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 432
- <212> DNA

<213>	Mus musculus	
<400>	1	
atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatg gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg	60	
cccacccgct caccatcac tgcacccgg ccttggaagc atgtagaggc catcaaagaa	120	
gcctgaacc tcttgatga catgcctgtc acgttgaatg aagaggtaga agtcgtctct	180	
aacgagttct ccttcaagaa gctaacatgt gtgcagaccc gcctgaagat attcgagcag	240	
ggtctacggg gcaatttcac caaactcaag ggcgcttga acatgacagc cagctactac	300	
cagacatact gcccccaac tccgaaacg gactgtgaaa cacaagttac cacctatgcg	360	
gatttcatag acagccttaa aacctttctg actgatatcc cctttgaatg caaaaaacca	420	
ggccaaaaat ga	432	
<210>	2	
<211>	435	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	2	
atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc	60	
cgctcgccca gcccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccgg	120	
cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcac	180	
tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag	240	
cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggcccct tgacctgat ggccagccac	300	
tacaagcagc actgccctcc aaccccgaa acttctgtg caaccagat taccaccttt	360	
gaaagtcca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgta tccctttga ctgctgggag	420	
ccagtccagg agtga	435	
<210>	3	
<211>	1221	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Flt3L.TRAIL fusion gene	
<400>	3	
atgacagtgc tggcgccagc ctggagccca acaacctatc tctcctgct gctgctgctg	60	
agctcgggac tcagtgggac ccaggactgc tcctccaac acagcccat ctctccgac	120	
ttcgtgtgta aaatccgtga gctgtctgac tacctgttc aagattaccc agtcaccgtg	180	

gcctccaacc tgcaggacga ggagctctgc gggggcctct ggcggtggt cctggcacag	240
cgctggatgg agcggctcaa gactgtcgct gggccaaga tgcaaggctt gctggagcgc	300
gtgaacacgg agatacatt tgtcaccaaa tgtgccttcc agccccccc cagctgtctt	360
cgcttcgtcc agaccaacat ctcccgctc ctgcaggaga cctccgagca gctggaggcg	420
ctgaagccct ggatcactcg ccagaacttc tcccggtgcc tggagctgca gtgtcagccc	480
gactctcaa cctgccacc cccatggagt ccccgccccc tggaggccac agccccgaca	540
gccccggcta gcagaatgaa gcagatcgag gacaaaattg aggaaatcct gtccaaaatt	600
taccacatcg agaacgagat cgcccggtatt aagaaactca ttggcgagag ggaattcacc	660
tctgaggaaa ccattttctac agttcaagaa aagcaacaaa atattttctcc cctagtgaga	720
gaaagaggtc ctgagagagt agcagctcac ataactggga ccagaggaag aagcaacaca	780
ttgtcttctc caaactccaa gaatgaaaag gctctgggcc gcaaaataaa ctctgggaa	840
tcatcaagga gtgggcattc attctgagc aacttgact tgaggaatgg tgaactggtc	900
atccatgaaa aagggtttta ctacatctat tcccaacat actttcgatt tcaggaggaa	960
ataaaagaaa acacaaagaa cgacaaacaa atggtccaat atatttaca atacacaagt	1020
tatctgacc ctatattgtt gatgaaaag gctagaaata gttgttggtc taaagatgca	1080
gaatatggac tctattccat ctatcaagg ggaatatattg agcttaagga aaatgacaga	1140
atTTTTgttt ctgtaacaaa tgagcacttg atagacatgg accatgaagc cagttttttc	1200
ggggcctttt tagttggcta a	1221
<210> 4	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse shTGF-beta1	
<400> 4	
ccctctacaa ccaacacaa cgggtctcc cgggttgtg ttggtttag aggg	54
<210> 5	
<211> 59	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
><223> human shTGF-beta1	
<400> 5	

accagaaata cagcaacaat tcctguctct ccaggaattg ttgctggat ttctggttt	59
<210> 6	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse shTGF-beta2	
<400> 6	
ggattgaact gtatcagatc cttaatctct taaggatctg atacagttca atcc	54
<210> 7	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human shTGF-beta2	
<400> 7	
ggattgagct atatcagatt ctcaatctct tgagaatctg atatagctca atcc	54
<210> 8	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> shHSP25	
<400> 8	
gctacatctc tcggtgcttc atctctgaag caccgagaga tgtagc	46
<210> 9	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> shHSP27	
<400> 9	
gateccgacga gcatggctac atctcccggg tctcaccggg agatgtagcc atgctcgtct	60
	60
<210> 10	
<211> 29	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sense primer

<400> 10

cccaagctta tggcgctcct gctgtgctt 29

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-sense primer

<400> 11

ccatcgatct atactataga cccatcct 28

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer

<400> 12

cgcaagctta tggagcgaag aaacccatc 29

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer

<400> 13

cgccctcgag tcaatctgta tcttcatcg 29

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer

<400> 14

ccgttaacat ggagcgaaga aacccatc 28

<210> 15

<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Anti-sense primer
<400> 15

ccatcgattc aatctgtatc ttcacgc

28