



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104245936 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201380007620. 1

C12N 15/63(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 01. 31

A61K 31/7105(2006. 01)

C12N 7/01(2006. 01)

(30) 优先权数据

10-2012-0009811 2012. 01. 31 KR

10-2013-0010233 2013. 01. 30 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/000791 2013. 01. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/115579 KO 2013. 08. 08

(71) 申请人 延世大学校产学协力团

地址 韩国首尔

(72) 发明人 宋在真 金周恒 吴世恩

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

代理人 黎艳 万志香

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2006. 01)

权利要求书1页 说明书13页

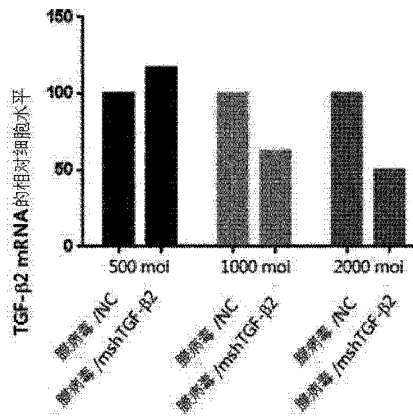
序列表4页 附图12页

(54) 发明名称

用于抑制 TGF-β 2 表达的 shRNA

(57) 摘要

本发明涉及用于抑制 TGF-β 2 表达的 shRNA。本发明提供一种抗肿瘤组合物,该组合物使用用于抑制 TGF-β 2 表达的 shRNA。



1. 用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA,其靶序列为 SEQ ID NO :1 或 2 所示的碱基序列。
2. 根据权利要求 1 所述的 shRNA,其特征在于,所述 shRNA 如 SEQ ID NO :3 或 4 所示。
3. 一种抗肿瘤组合物,其包含作为活性成分的权利要求 1 所述的 shRNA。
4. 重组表达载体,其能够表达权利要求 1 所述的 shRNA。
5. 根据权利要求 4 所述的重组表达载体,其特征在于,所述重组表达载体包含含有 SEQ ID NO :5 所示的上游链和 SEQ ID NO :6 所示的下游链的 DNA。
6. 根据权利要求 4 所述的重组表达载体,其特征在于,所述重组表达载体包含含有 SEQ ID NO :7 所示的上游链和 SEQ ID NO :8 所示的下游链的 DNA。
7. 根据权利要求 4 所述的重组表达载体,其特征在于,通过重组含有 U6 启动子的载体和 DNA 来获得所述重组表达载体。
8. 根据权利要求 4 所述的重组表达载体,其特征在于,所述重组表达载体为 pSP72 Δ E3-sh- 人 TGF- β 2 或 pSP72 Δ E3-sh- 小鼠 TGF- β 2。
9. 一种抗肿瘤组合物,其包含作为活性成分的权利要求 4 所述的重组表达载体。
10. 腺病毒,其特征在于,在所述腺病毒中导入有权利要求 4 所述的重组表达载体。

用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA

技术领域

[0001] 本发明涉及用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA 及包含该 shRNA 的抗肿瘤组合物。

背景技术

[0002] 转化生长因子 β 2 (TGF- β 2) 与转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 相同, 都是通过抑制细胞毒性 T 细胞、自然杀伤细胞以及巨噬细胞等的增殖及分化来阻碍对肿瘤的免疫监测, 而且作为多功能分泌蛋白质, 根据细胞类型 (type) 和时期, 将起到抑制增殖、复制、侵袭、转移、细胞凋亡、免疫监测以及生成血管等多种作用, 不仅如此, 与 TGF- β 1 一样, 还能成为对信号通路的非活化或细胞周期内的非正常调节的起因, 对抑制增殖的作用出现耐受性的肿瘤在发展的后期, TGF- β 2 反而起到促使肿瘤发展的作用。因此, 克服人体免疫机制而进行增殖的肿瘤细胞分泌 TGF- β 2, 从而能够逃逸人体免疫监测, 同时成为增强对增殖和侵袭转移、以及血管生成的作用。TGF- β 2 与 TGF- β 1 之间的显著差异性在于, TGF- β 2 会诱导 Foxp3 来显著地诱使抑制免疫, 而且影响肿瘤的转移、新生血管的生成及增殖等, 从而诱导肿瘤发展成为恶性肿瘤。

[0003] 关于 TGF- β 2 的在先研究有, 如非专利文献 1 (Schlingensiepen et al, Transforming growth factor-beta2 gene silencing with trabedersen (AP 12009) in pancreatic cancer, Cancer Sci 102:1193-1200, 2011.), 其中使用了对人 TGF- β 2 的编码序列的 18-mer 硫代反义寡聚核苷酸 (phosphothioate antisense oligonucleotide) 合成, 而且观察到肿瘤免疫抑制的解除、肿瘤尺寸的减小、向淋巴结的转移及血管形成的减少等, 然而无法发挥效果。

[0004] 在非专利文献 2 (Chenyu Zhang et al, Transforming growth factor- β 2 is a molecular determinant for site-specific melanoma metastasis in the brain, Cancer Res. 2009 February 1; 69(3):828-35.) 中公开了, 制备相对于鼠科动物的 TGF- β 2 的 shRNA TGCTGTTGACAGTGAGCGGTTGATATAAATCGAGACCAAATTAGTGTGAAGCCAC AGATGTATTTGGTCTCGATTTATACACCTTGCCCCTACTGCCTCGGA (靶), 此外还制备能够产生 TGF- β 2 shRNA 的慢病毒 (lentivirus), 通过将慢病毒整合到染色体来消除肿瘤, 然而消除癌症后其将继续转移至正常细胞内, 从而副作用让人堪忧。

发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 基于此, 本发明人为解决上述问题经过努力研究结果, 完成了本发明, 即筛选能够有效地诱导人 TGF- β 2 或小鼠 TGF- β 2 沉默 (silencing) 的靶, 从而制备 shRNA, 使之导入腺病毒 (adenovirus) 内, 从而大幅改善根据现有非病毒性制剂的 shRNA 的转移能力。因此, 本发明在于提供用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA, 其靶序列为 SEQ ID NO: 1 或 2 所示的碱基序列。

[0007] 进一步, 本发明在于提供包含作为活性成分的所述 shRNA 的抗肿瘤组合物。

- [0008] 进一步,本发明在于提供用于表达 shRNA 的重组表达载体 (vector)。
- [0009] 进一步,本发明在于提供包含作为活性成分的所述重组表达载体的抗肿瘤组合物。
- [0010] 进一步,本发明在于提供导入有所述重组表达载体的腺病毒。
- [0011] 技术方案
- [0012] 为解决上述问题,本发明提供用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA,其靶序列为 SEQ ID NO:1 或 2 所示的碱基序列。
- [0013] 为解决上述问题,本发明在于进一步提供包含作为活性成分的所述 shRNA 的抗肿瘤组合物。
- [0014] 为解决上述问题,本发明在于进一步提供用于表达 shRNA 的重组表达载体。
- [0015] 为解决上述问题,本发明在于进一步提供包含作为活性成分的所述重组表达载体的抗肿瘤组合物。
- [0016] 为解决上述问题,本发明在于进一步提供导入有所述重组表达载体的腺病毒。
- [0017] 有益效果
- [0018] 本发明通过制备用于抑制 TGF- β 2 表达的新型 shRNA 并使用作为基因转移体的腺病毒来提高感染率,从而与现有技术相比大幅提高特异性、转移能力及表达抑制能力。
- [0019] 亦即,通过本发明,可提供包含用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA 的抗肿瘤组合物。特别地,将靶定位于在大部分癌细胞中具有优异转移效率的腺病毒上,从而可适用于所有癌。

附图说明

- [0020] 图 1 展示了作为穿梭载体 (shuttle vector) 的 pSP72 Δ E3/si- 阴性载体。
- [0021] 图 2 为将 TGF- β 2 shRNA 亚克隆成穿梭载体后使之与腺病毒骨架 (backbone) d1324 同源重组的过程模拟图。
- [0022] 图 3 展示了以下结果,即为了在实际上容易重组的细菌中筛选经同源重组的克隆,(a) 展示了腺病毒 E3 部位的 PCR 结果,(b) 展示了腺病毒 IX 基因部位的 PCR 结果,(c) 展示了确认经同源重组的腺病毒基因组 DNA 是否能够转染的经 PacI 切割后产生片段 DNA 的结果。
- [0023] 图 4 为确认并通过 Hind III 酶切图谱筛选最终重组成的克隆的结果。
- [0024] 图 5 为分析经图 4 筛选的克隆是否具有 shRNA hTGF- β 2 碱基序列的结果。
- [0025] 图 6 为通过实施例 2 的能够表达人 TGF- β 2 shRNA 的腺病毒,以时间-PCR 方式确认 TGF- β 2 表达抑制能力的结果。
- [0026] 图 7 为通过实施例 2 的能够表达小鼠 TGF- β 2 shRNA 的腺病毒,以时间-PCR 方式确认 TGF- β 2 表达抑制能力的结果。
- [0027] 图 8 为通过实施例 2 的能够表达小鼠 TGF- β 2 shRNA 的穿梭载体,以时间-PCR 方式确认 TGF- β 2 表达抑制能力的结果。
- [0028] 图 9 为通过实施例 2 的能够表达人 TGF- β 2 shRNA 的腺病毒,用 ELISA 确认 TGF- β 2 表达抑制能力的结果。
- [0029] 图 10 展示了 pBSK II -3484 载体 (a)、pCA14-3484 载体 (b)、pCA14-CMV-3484 载体

(c) 和 pCA14-CMV-3484- Δ E1B55 载体 (d)。

[0030] 图 11 为展示从 d1324 腺病毒制备 d1324-CMV-3484-shTGF- β 2 腺病毒的过程模拟图。

[0031] 图 12 展示了包含小鼠 shTGF- β 2 的同源重组的过程, (a) 通过 E3 筛选, 筛选并确认经同源重组的克隆, (b) 筛选并确认通过 Hind III 酶切图谱的经同源重组的克隆 (1, 2, 4), (c) 用 PacI 切割上述克隆 1、2、4 的 DNA 时可确认只有克隆 1 完成同源重组【C:对照组, d1324- Δ E3-sh-mTGF β 2】、【S:穿梭载体 pCA14-CMV-3484- Δ E1B55, 1~6:经同源重组的克隆】。

[0032] 图 13 展示了包含人 shTGF- β 2 的同源重组的过程, (a) 筛选并确认通过 Hind III 酶切图谱的经同源重组的克隆, (b) 最终筛选并确认通过 PacI 切割后的经同源重组的克隆【C:对照组, d1324- Δ E3-sh-mTGF β 2, 1~3:经同源重组的克隆】。

[0033] 图 14 为在实施例 4 中能够选择性复制肿瘤的腺病毒的癌细胞中确认细胞溶血的过程。

[0034] 图 15 为根据时间-PCR 结果比较通过表达人 TGF- β 2 shRNA 的腺病毒和表达 TGF- β 1 shRNA 的腺病毒的 hTGF- β 1, 2, 3 表达抑制能力的结果。

[0035] 图 16 为根据 ELISA 结果比较通过表达人 TGF- β 2 shRNA 的腺病毒和表达 TGF- β 1 shRNA 的腺病毒的 hTGF- β 1, 2, 3 表达抑制能力的结果。

具体实施方式

[0036] RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是有选择地抑制靶基因表达的天然机制。用于降解序列特异性 mRNA 的引物为, 将较长的 dsRNA 用核糖核酸酶 III 的切割而生成的 19~23 核苷酸的小干扰 RNA。细胞质的 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 与 siRNA 结合, 命令该 siRNA 中一个链降解包含互补序列的 mRNA。将 RNA 干扰使用于哺乳动物时, 能够带来治疗基因的沉默的作用。尽管 siRNA 具有这些优点, 然而其需在试管内进行制备, 而且通常要在 6~10 天内将 knock down 基因通过瞬时转染来进行转移, 从而在临床应用上受到限制。然而, 本发明的 shRNA (短发夹 RNA) 表达系统能够解决上述缺点。

[0037] shRNA 为由于在部分单链 RNA 上包含回文结构的碱基序列而具有双链结构的、结构如同发夹结构的具有约 20 个或以上碱基的分子。

[0038] 本发明涉及用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA, 其特征在于, 其靶序列为如下。

[0039] 小鼠靶序列: 5'-GGATTGAACTGTATCAGATCCTTAA-3' 【SEQ ID NO:1】。

[0040] 人靶序列: 5'-GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA-3' 【SEQ ID NO:2】。

[0041] 本发明的用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA 具有与部分 TGF- β 2 基因互补的序列, 而且可降解 TGF- β 2 基因的 mRNA 或抑制其翻译。互补性为 80-90% 时, 能够抑制 mRNA 的翻译, 达到 100% 时能够降解 mRNA。

[0042] 因此, 本发明的用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA 包含, 相对于与小鼠 mRNA 的 494~518 核苷酸、人 mRNA 的 578~602 核苷酸互补的序列具有 80% 或以上, 优选为 90% 或以上, 更优选为 100% 同源性的碱基序列。

[0043] 根据一个实施例, 小鼠 shRNA 可由 SEQ ID NO:1 (靶序列) 所示的碱基序列及其

互补性碱基序列组成,人 shRNA 可由 SEQ ID NO :2(靶序列)所示的碱基序列及其互补性碱基序列组成。上述碱基序列及其互补碱基序列可通过 4~10bp 茎环区、以回文形式 (palindrom) 相连接而形成发夹结构。

[0044] 本发明的 shRNA 的具体例子包括以下序列:

[0045] 用于 SEQ ID NO :1 小鼠靶序列的 shRNA:

[0046] 5'-GGATTGAACTGTATCAGATCCTTAA tetc

[0047] TTAAGGATCTGATACAGTTCAATCC-3'【SEQ ID NO :3】。

[0048] 用于 SEQ ID NO :2 人靶序列的 shRNA:

[0049] 5'-GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA tetc

[0050] TTGAGAATCTGATATAGCTCAATCC-3'【SEQ ID NO :4】。

[0051] 通过 RNAi 而抑制 TGF- β 2 表达的物质,可在使用在 3' 末端具有突起部的、形成短发夹结构的 shRNA。

[0052] 通过 RNAi 而抑制 TGF- β 2 表达的物质,是可通过人工化学合成进行制备的,或者在 T7 RNA 聚合酶、实验室条件(体外)下使通过反方向连接正义链及反义链的 DNA 序列而形成发夹结构的 DNA 合成 RNA 来进行制备的。在实验室条件下进行合成时,利用 T7 RNA 聚合酶和 T7 启动子,从模板 DNA 合成反义及正义 RNA。在实验室条件下进行退火处理后,通过导入细胞内来诱发 RNAi,从而诱导 TGF- β 2 mRNA 的降解。向细胞内的导入是,通过如磷酸钙法、或各种转染试剂(如,阳离子脂质体 (oligofectamine)、脂质体和脂质体转染等)来实施的。

[0053] 通过 RNAi 而抑制 TGF- β 2 表达的物质,可使用包含 shRNA 或上述 DNA 的表达载体,或者包含所述表达载体的细胞。所述表达载体和细胞种类不受特别限制,可优选使用已应用于医药中的表达载体或细胞。

[0054] 在本发明中,可使用将 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 所示的碱基序列作为靶序列的 shRNA。

[0055] 因此,本发明包含用于所述 shRNA 表达的重组表达载体。

[0056] 可根据本领域所公知的重组 DNA 方法,制备本发明的重组表达载体。

[0057] 在本发明中,有益地用于转移 shRNA 的病毒(病毒载体)可以为腺病毒、逆转录病毒、慢病毒、腺相关病毒等,由于如同肿瘤,需要诱导瞬时表达,从而优选地使用腺病毒。

[0058] 为了将所述 shRNA 导入腺病毒内,可基于 shRNA 序列设计以下 DNA。

[0059] <相对于小鼠靶序列的 DNA >

[0060] 上游链:5'-gatcc GGATTGAACTGTATCAGATCCTTAA tetc

[0061] TTAAGGATCTGATACAGTTCAATCC tttt a-3'【SEQ ID NO :5】

[0062] 下游链:5'-agctt aaaa GGATTGAACTGTATCAGATCCTTAA gaga

[0063] TTAAGGATCTGATACAGTTCAATCC g-3'【SEQ ID NO :6】

[0064] <相对于人靶序列的 DNA >

[0065] 上游链:5'-gatcc GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA tetc

[0066] TTGAGAATCTGATATAGCTCAATCC tttt a-3'【SEQ ID NO :7】

[0067] 下游链:5'-agctt aaaa GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA gaga

[0068] TTGAGAATCTGATATAGCTCAATCC g-3'【SEQ ID NO :8】

[0069] 进一步,在本发明中,有益地用于转移 shRNA 的非病毒载体可以为,除上述病毒载体之外常用于遗传疗法中的所有载体,如能在真核细胞中进行表达的各种质粒和脂质体等。在本发明的一方面,为了在转入细胞中能够被适当地转录,优选地,用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA 与启动子之间的连接至少能被启动。所述启动子可以为,能在真核细胞中发挥作用的任何启动子,特别优选为,有利于产生小尺寸 RNA 的、作为 RNA 聚合酶 III 的 U6 启动子。为了有效地转录用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA,根据需要还可以进一步包含如前导序列、多核苷酸序列 (polynucleotide sequence)、启动子、增强子、上游活化序列、信号肽序列和转录终止因子的调控序列。

[0070] 这里使用的术语“连接能被启动”是指,核算序列之间的结合是功能性相关的。任一核算序列之间可启动地相连接时,意味着任一核算序列所处的位置是与另一核算序列在功能上相关联的。在本发明中,当任一转录调控序列影响 shRNA 的转录时,意味着所述转录调控序列与所述 shRNA 的连接是能被启动的。

[0071] 进一步,本发明涉及一种抗肿瘤组合物,该抗肿瘤组合物包含作为活性成分的 SEQ ID NO :3 或 4 所示的用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA、包含 SEQ ID NO :5 所示的上游链和 SEQ ID NO :6 所示的下游链的 DNA 或包含 SEQ ID NO :7 所示的上游链和 SEQ ID NO :8 所示的下游链的 DNA、或者用于表达该 shRNA 的重组表达载体。

[0072] 本发明的抗肿瘤组合物的给药途径不受特别限制,可通过口服或肠胃外给药(如,静脉内给药、肌肉给药、皮下给药、皮内给药、粘膜给药、直肠内给药、阴道内给药、向患者的局部给药、皮肤给药等)中的一种途径进行给药。适当的用于口服的制剂可以为固体或液体,用于肠胃外给药的制剂可以为注射剂、滴剂、栓剂、外用制剂、滴眼剂、滴鼻剂等。根据制剂类型及需要,本发明的抗肿瘤组合物可包含药学上可接受的添加剂。药学上可接受的添加剂的具体例子为,如赋形剂、结合剂、崩解剂、润滑剂、抗氧化剂、储存剂、稳定剂、张力剂、着色剂、矫味剂、稀释剂、乳化剂、悬浮剂、溶剂、填料剂、增量剂、缓冲剂、输送载体、载体、赋形剂和 / 或药学上可接受的佐剂等。

[0073] 本发明的用于口服的固体制剂形式的抗肿瘤组合物可以为,如在活性成分中加入赋形剂,同时根据需要可加入结合剂、崩解剂、润滑剂、着色剂或矫味剂等制剂用添加剂,然后通过常用方法制成片剂、颗粒剂、胶囊剂。本发明的用于口服的液体制剂形式的抗肿瘤组合物可以为,在活性成分中加入选自矫味剂、稳定剂或存储剂等制剂用添加物中的至少一种添加剂,然后通过常用方法制成内服液体、糖浆、酏剂 (Elixir) 等。

[0074] 用于处方的本发明的液体形式的抗肿瘤组合物可以为水性或非水性制剂中的一种。液体制剂可通过本领域所公知的方法进行制得。例如,注射剂是通过在如生理盐水、PBS 的缓冲液、灭菌水等溶剂内溶解后利用过滤纸进行过滤灭菌,随之装入灭菌容器(如安瓿等)来制备的。根据需要,所述注射剂可包含惯用的药学上可接受的载体。

[0075] 进一步,可使用通过非侵入式导管的给药方。在本发明中可使用的载体为,如中性、缓冲生理盐水、或包含血清白蛋白的生理盐水等。

[0076] 对于用于抑制 TGF- β 2 表达的 shRNA 表达载体等基因的转移,只要所适用的细胞内的用于 TGF- β 2 表达的 shRNA 或用于表达 shRNA 的载体能够得到表达,就不会特别限制其方法,如可以使用通过利用细菌载体、脂质体的基因导入。细菌载体可以为,如逆转录病毒、痘病毒、腺病毒等动物病毒。

[0077] 通过 RNAi 的用于抑制 TGF- β 2 表达的物质可直接注入细胞内。

[0078] 本发明的抗肿瘤组合物的活性成分可使用治疗有效量,本领域技术人员可根据使用目的、疾病的严重程度、患者的年龄、体重、性别、病历或作为活性成分的物质种类来确定所述组合物的给药剂量。例如,作为活性成分,对于成年人的治疗有效量为每公斤约 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ 颗粒。本发明的抗肿瘤组合物的给药频率为,如一天一次~数月一次。本发明的 shRNA 由于能够抑制 TGF- β 2,本发明的药物组合物可用于预防或治疗与肿瘤相关的各种疾病或病患,如癌症,具体为脑癌、胃癌、肺癌、乳房癌、卵巢癌、肝癌、支气管癌、鼻咽癌、喉癌、食道癌、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、大肠癌、结肠癌和宫颈癌等。本发明中使用的“治疗”是指,(i) 预防肿瘤细胞的形成;(ii) 通过消除肿瘤细胞抑制与肿瘤相关的疾病或病患;以及(iii) 通过消除肿瘤细胞减轻与肿瘤相关的疾病或病患。因此,本发明中使用的“治疗有效量”是指,能够达到上述药理效果所需要的充分量。

[0079] 实施例

[0080] 下面,通过本发明的实施例更为详细地描述本发明,但本发明的范围不会受以下实施例的限制。

[0081] 实施例 1:制备 shRNA- 筛选有效诱导 TGF- β 2 沉默的靶

[0082] 本发明为了诱导 TGF- β 2 沉默,基于 25mer 正义 /25mer 反义(中间包含具有 4 个碱基的茎环)制备 shRNA,使之导入穿梭载体,而制备同源重组病毒,以在腺病毒内进行表达。

[0083] 为鉴定 shRNA TGF- β 2 的特异性,可同时制备具有错义(scrambled) shRNA 的穿梭载体。相比现有方法,其特异性及表达抑制能力得到大幅提高。

[0084] 为此,通过实时 PCR 方法获得在至少 10nM TGF- β 2 的 shRNA 上具有能够抑制 75% 小鼠 TGF- β 2 mRNA 的效果的 shRNA。

[0085] 为此,将小鼠用 shRNA 转染至皮肤癌细胞 B16F10 内,待 24 小时后检测所减少的程度。实验方法为如下。

[0086] 通过实时 RT-PCR,用 10nM 的各种候选 shRNA 转染 30% B16F10,待培养 24 小时后,通过验证,筛选出 5 个相对于小鼠 TGF- β 2 的 shRNA 的结果,在靶相关 shRNA 上鉴定出 73.75% 沉默的效果。

[0087] 为进行实时 RT-PCR,正向引物(primer)为 5'-GTGAATGGCTCTCCTTCGAC-3'【SEQ ID NO:9】,反向引物为 5'-CCTCGAGCTCTTCGCTTTTA-3'【SEQ ID NO:10】,并在以下反应条件下进行反应。

[0088] 第一步:逆转录(在 42°C 下 5 分钟,在 95°C 下 10 秒);

[0089] 第二步:PCR 反应(在 95°C 下 5 秒,在 60°C 下 20 秒)50 循环;

[0090] 第三步:进行分离(60°C \rightarrow 95°C)。

[0091] 小鼠靶序列:5'-GGATTGAACTGTATCAGATCCTTAA-3'【SEQ ID NO:1】

[0092] 表 1

[0093]

shRNA	引物	ct	Δ ct	$\Delta\Delta$ ct	2- $\Delta\Delta$ ct	表达抑制率 (%)
错义 shRNA (阴性对照组)	肌动蛋白	15.83				
	Trp53	25.45	9.62			
	mTGF- β 2	24.32	8.49			
Trp53 (阳性对照组)	肌动蛋白	15.61				
	mTGF- β 2	27.6	11.99	2.37	0.193446	80.6554376
mTGF- β 2 shRNA	肌动蛋白	16.08				
	mTGF- β 2	26.5	10.42	1.93	0.262429	73.7570829

[0094] 备注：

[0095] ct :达到循环阈值饱和度所需要的循环数,其值越小表明原先 mRNA 的量较多。

[0096] Δ ct :TGF- β 2 用 ct 中减去肌动蛋白用 ct 而获得的值。

[0097] $\Delta\Delta$ ct :TGF- β 2 shRNA 处理样品的 Δ ct 中减去对照组的 TGF- β 2 Δ ct 而获得的值。

[0098] 2- $\Delta\Delta$ ct :2 减去指数 $\Delta\Delta$ ct 而获得的值。

[0099] 表达抑制率 :2- $\Delta\Delta$ ct 以百分比表示的值。

[0100] 针对上述靶序列,合成具有 25/25+4 茎环的 shRNA,通过实时 PCR 确认对于靶序列的抑制效果。

[0101] 用于小鼠靶序列 (SEQ ID NO :1) 的 shRNA :

[0102] 5'-GGATTGAACTGTATCAGATCCTTAA tctc

[0103] TTAAGGATCTGATACAGTTCAATCC-3' 【SEQ ID NO :3】

[0104] 为了在腺病毒内表达经过上述实时 PCR 所筛选的 SEQ ID NO :3 碱基序列,如下设计 shRNA :在两段插入 BamHI 和 Hind III 碱基位点 (site),并在中间形成具有 4 个 tctc 碱基的茎环。亦即,小鼠 shRNA 的基本结构由 5'-25mer- 茎环 (4mer)-25mer-3' 组成。

[0105] 基于此,通过设计用于导入腺病毒内的两条 DNA 来诱导形成 shRNA。

[0106] 上游链 :5'-gatcc GGATTGAACTGTATCAGATCCTTAA tctc

[0107] TTAAGGATCTGATACAGTTCAATCC tttt a-3' 【SEQ ID NO :5】

[0108] 下游链 :5'-agctt aaaa GGATTGAACTGTATCAGATCCTTAA gaga

[0109] TTAAGGATCTGATACAGTTCAATCC g-3' 【SEQ ID NO :6】

[0110] 用于抑制人 TGF- β 2 的实时 PCR 用引物为如下。

[0111] 正向引物 :5'-GCTGCCTACGTCCACTTTACAT-3' 【SEQ ID NO :11】

[0112] 反向引物 :5'-ATATAAGCTCAGGACCCTGCTG-3' 【SEQ ID NO :12】

[0113] 反应条件为如下:第一步:逆转录(在42℃下5分钟,在95℃下10秒);第二步:PCR反应(在95℃下5秒,在60℃下20秒)50循环;第三步:进行分离(60℃→95℃)。经过验证实验结果,在3个候选靶序列中根据表2中内容筛选以下靶。

[0114] 表2

[0115]

shRNA	引物	ct	Δ ct	$\Delta\Delta$ ct	2- $\Delta\Delta$ ct	表达抑制率 (%)
错义 shRNA (阴性对照组)	肌动蛋白	20.98				
	波形蛋白	20.19	-0.79			
	hTGF- β 2	26.94	5.96			
波形蛋白 (Vimentin) (阳性对照组)	肌动蛋白	20.78				
	hTGF- β 2	24.09	3.31	4.1	0.058315	94.1685438
hTGF- β 2 shRNA	肌动蛋白	20.19				
	hTGF- β 2	29.71	9.52	3.56	0.084788	91.521223

[0116]

[0117] 相对于上述靶序列,合成具有25/25+4茎环的shRNA,通过实时PCR鉴定对于靶序列的抑制效果。

[0118] 用于人靶序列(SEQ ID NO:2)的shRNA:

[0119] 5'-GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA tctc

[0120] TTGAGAATCTGATATAGCTCAATCC-3'【SEQ ID NO:4】

[0121] 为了在腺病毒内表达经如上所述的实时PCR所筛选的SEQ ID NO:4碱基序列,如下设计shRNA:在两段插入BamHI和Hind III碱基位点(site),并在中间形成具有4个tctc碱基的茎环。亦即,人shRNA的基本结构由5'-25mer-茎环(4mer)-25mer-3'组成。

[0122] 基于此,设计用于导入腺病毒内的两条DNA链。

[0123] 上游链:5'-gatcc GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA tctc

[0124] TTGAGAATCTGATATAGCTCAATCC tttt a-3'【SEQ ID NO:7】

[0125] 下游链:5'-agctt aaaa GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA gaga

[0126] TTGAGAATCTGATATAGCTCAATCC g-3'【SEQ ID NO:8】

[0127] 实施例2:用于表达相对于靶序列的shRNA的不可复制性腺病毒载体的制备

[0128] 通过实时RT-PCR所确认的能够最有效地抑制表达的shRNA碱基序列的正义和反

义序列由 tctc 或 tctctc 相隔而位于两边,在两端分别合成由具有 BamHI 和 Hind III 限制性内切酶序列的碱基组成的寡核苷酸和互补性寡核苷酸,退火后,制备作为 E 穿梭载体的 pSP72 Δ E3/si- 阴性载体【图 1, pSP72 Δ E3/si- 阴性 (错义) :vpSP72 克隆载体 (Promega) 内插入腺病毒 E3L(26591-28588) 和 E3R(30504-31057), 并插入有 Ambion 公司 psilencer 2.1-U6 hygro 中的用于 -EcoRI-U6 promoter+-BamHI-nonsense shRNA 的碱基序列 actaccgttggttataggtgttcaagagacacctataacaacggtagttttttggaa-Hind III】。

[0129] 为了导入人或小鼠的 shRNA TGF- β 2, 首先用 BamHI 和 Hind III 处理所述 pSP72 Δ E3/si- 阴性质粒, 然后插入人或小鼠的 shRNA TGF- β 2, 而制备出 pSP72 Δ E3-sh- 人 TGF- β 2 或 pSP72 Δ E3-sh- 小鼠 TGF- β 2 (图 2)。阴性对照组的腺病毒的两端具有 BamHI 和 Hind III, 并设计错义碱基序列 (actaccgttggttataggtg) 和茎环 (ttcaagaga)。

[0130] 在腺病毒的 E3 位点上, 通过 PCR 仅筛选阳性克隆 (#1、2、5、6、7、8、9) 后【图 3(a) : 同源重组 d1324/IX 腺病毒骨架基因组 DNA 和 pSP72-sh-hTGF- β 2 穿梭载体, 然后筛选包含 sh-hTGF- β 2 的克隆的 PCR 结果; 图 3(b) : 同源重组 d1324/IX 腺病毒骨架基因组 DNA 和 pSP72-sh-hTGF- β 2 穿梭载体, 然后根据有无 IX 基因, 在图 3(a) 中得到鉴定的包含 sh-hTGF- β 2 的克隆中再次筛选进一步包含基因组 DNA 的克隆的 PCR 结果】, 如图 3(c) 所示, 通过 Hind III 酶切图谱, 最终筛选重组体 (图 4)。

[0131] 图 3 和图 4 的具体说明为如下。

[0132] 在图 3(a) 中, d1324/IX 道为 d1324 骨架; 穿梭道为 pSP72-sh-hTGF- β 2。道 1-10 展示了 d1324 骨架与 pSP72-sh-hTGF- β 2 进行同源重组后从细菌克隆中所获的质粒有扩增 E3 位点, 出现约 2kb 相当的条带时才能表明阳性。对 E3 位点进行 PCR 时, 在无 E3 位点的 d1324 骨架中未展示出 2kb 相当的条带, 而在 E3 部位上有插入 U6 启动子和 sh-hTGF- β 2 的短发夹结构 (sh construct) 的穿梭载体, 对其处理 PCR 后, 产物尺寸显示为 2kb, 由此判断是否完成同源重组。

[0133] 在图 3(b) 中, d1324/IX 道为 d1324 骨架; 穿梭载体为 pSP72-sh-hTGF- β 2。图 3(b) 是相继图 3(a) 进行的连续性实验, 即通过在图 3(a) 中得到鉴定的包含 sh-hTGF- β 2 的克隆中 (#1、2、5、6、7、8、9) 再次筛选出进一步包含基因组 DNA 的克隆的 PCR 结果, 可鉴定有无同源重组, 该实验能够表明两端的阳性克隆有完成同源重组。对 IX 基因部分进行 PCR 时, 通过利用具有 IX 基因的 d1324 骨架与不具有 IX 基因的穿梭载体之间的差异, 可鉴定有无同源重组。结果发现, 只再筛选出 #1、2、6、7。

[0134] 图 3(c) 为, 通过用与骨架或样品之间的 Hind III 进行切割时的图谱差异来最终鉴定是否完成同源重组。道 1-3 为所述 #1 克隆源 DNA, 道 4-6 为使从 #2 克隆中获得的 DNA 在称之为 DH5a 的感受态细胞中进行再次转化而得的子克隆, 道 7-9 为使从 #6 克隆中获得的 DNA 在称之为 DH5a 的感受态细胞中进行再次转化而得的子克隆, 而在源自母克隆的各 3 个的 DNA 中, 只有 #1 克隆展示了与现有 d1324-IX (从左数第一个道) 不同的 Hind III 图谱。这表明, 腺病毒骨架 DNA 与穿梭载体完成同源重组, 因此, 本发明是基于 #1 克隆完成的。

[0135] 图 4 为, 通过用 PacI 切割插入于质粒 pPoly2 中的 PacI 位点上的 Ad-d1324-IX-sh-hTGF- β 2 并确认 pPoly2 是否断裂来确定病毒生产中所需的最终结构的实验。当用 PacI 切断属于在图 3(c) 中得到鉴定的 #1 克隆中的 3 个 DNA 时, 总约有 2kb 相

当的 pPoly2 骨架 DNA 都被分离出来。通过测序,确认这些是否具有 shRNA hTGF- β 2 碱基序列,结果鉴定出所有克隆都具相同的 shRNA hTGF- β 2 碱基序列(图 5)。然后,用 PacI 切割,一同转染至 293A 细胞中,从而生产腺病毒。

[0136] 亦即,通过上述方法制得的 E3 穿梭载体分别经过 XmnI 限制性内切酶处理而形成单链,再经过 SpeI 限制性内切酶的处理后,与形成单链的不可复制性腺病毒 d1324 一起同时在大肠菌 BJ5183 内被转化,从而诱导基因同源重组。获得经同源重组的质粒 DNA 后,对其处理 Hind III 限制性内切酶而确认 DNA 模型变化,最终通过测序来鉴定有无同源重组,将得到鉴定的质粒用 PacI 切割,然后在 293 细胞株内进行转化,从而制备能够表达 shRNA TGF- β 2 的不可复制性腺病毒(在可复制性腺病毒中制备 shRNA 时,由于同时存在由 shRNA 引起的抑制效果和细胞溶解效果,从而导致无法只对抑制效果进行鉴定,因此制备不可复制性腺病毒)。所述腺病毒在 293 细胞株中进行增殖,通过 CsCl 梯度浓缩,并利用有限稀释法(limiting dilution)或空斑测定法(plaque assay)来测定病毒滴度。通过有限稀释滴定法(limiting dilution titration),最终病毒滴度为 2.5×10^9 pfu/ml。

[0137] 实施例 3:确认在癌细胞内的效果 - 鉴定通过能够表达 shRNA 的腺病毒的对 TGF- β 2 表达的抑制

[0138] 1) 通过实时 RT-PCR 确认

[0139] 为了鉴定对 TGF- β 2 表达的抑制,对于人,使人前列腺癌细胞 DU-145 感染 1-100moi 实施例 2 的腺病毒,待两天后,用 Trizol 溶解(lysis)细胞,然后连续对其处理氯仿、异丙醇、乙醇等,从而收获 RNA,然后通过实时 PCR 鉴定对 TGF- β 2 mRNA 表达的抑制程度。

[0140] 对于小鼠,使小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 分别感染 100、500、1000moi 的实施例 2 的腺病毒,之后的步骤与上述相同。

[0141] 用于抑制人 TGF- β 2 的实时 PCR 用引物可使用正向引物:

[0142] 5'-GCTGCCTACGTCCACTTTACAT-3'【SEQ ID NO:11】及反向引物:

[0143] 5'-ATATAAGCTCAGGACCCTGCTG-3'【SEQ ID NO:12】,利用 AB powerSYBR Green RNA-to-Ct 1step kit,并通过添加 0.2 μ l 逆转录酶混合物(125X)、12.5 μ l RT-PCR 混合物(2x)、0.5 μ l 正向引物(100pM)、0.5 μ l 反向引物(100pM)、5 μ l RNA(10ng/ μ l)、6.3 μ l 无核酸酶水使总体积成为 25 μ l,而且反应条件如表 3 所示。

[0144] 用于抑制小鼠 TGF- β 2 的实时 PCR 用引物可使用正向引物:

[0145] 5'-GTGAATGGCTCTCCTTCGAC-3'【SEQ ID NO:9】及反向引物:

[0146] 5'-CCTCGAGCTCTTCGCTTTTA-3'【SEQ ID NO:10】,利用 AB powerSYBR Green RNA-to-Ct 1step kit,并通过添加 0.2 μ l 逆转录酶混合物(125X)、12.5 μ l RT-PCR 混合物(2x)、0.5 μ l 正向引物(100pM)、0.5 μ l 反向引物(100pM)、5 μ l RNA(10ng/ μ l)、6.3 μ l 无核酸酶水使总体积成为 25 μ l,而且反应条件如表 3 所示。

[0147] 表 3

[0148]

步骤	温度 (°C)	持续时间	循环数
RT 步骤	48	30 分钟	保持 (hold)
酶活化	95	10 分钟	保持 (hold)
变性	95	15 秒	40
退火 / 延伸	60	1 分钟	

[0149] 通过鉴定人 TGF- β 2 的 shRNA 的结果,观察到在 1moi 腺病毒中出现 73% 沉默效果,而在 50moi 腺病毒中出现 90% 或以上的对 TGF- β 2 表达的抑制 (表 4、图 6)。

[0150] 表 4

[0151]

区分		表达抑制率 (%)
NC	0 moi	0
	1 moi	0
	5 moi	0
	10 moi	0
	50 moi	0
	100 moi	0
hTGF- β 2	0 moi	0
	1 moi	73.6554
	5 moi	80.34303
	10 moi	83.30102
	50 moi	91.61075
	100 moi	90.1877

[0152] 备注:NC 为插入有错义 shRNA 序列的腺病毒。

[0153] 通过鉴定小鼠 TGF- β 2 的 shRNA 结果,观察到在 1000moi 腺病毒中出现 50% 沉默效果 (图 7)。相比于人,出现相对较低抑制率是由于腺病毒对小鼠细胞的感染率较低而导致的。对此是通过以下方式进行鉴定的,即通过转染能够表达小鼠 shTGF- β 2 的引物而表达出的 shRNA 可有效地抑制 TGF- β 2 mRNA (图 8)。

[0154] 通过 ELISA 的鉴定

[0155] 感染 1、5、10、50moi 所述腺病毒后,在实施例 2 的人前列腺癌细胞内培养 2 天,在最后 24 小时内测定分泌到无血清培养基内的 TGF- β 2 量。

[0156] 只要感染 1moi 的能够表达 TGF- β 2 的 shRNA 的腺病毒,就几乎无法检测出一天内

所分泌的 TGF- β 2 (表 5, 图 9)。这表明, TGF- β 2 的 shRNA 可有效地降解 TGF- β 2 的 mRNA。

[0157] 表 5

[0158]

区分		检测量 (pg/ml, 平均值 \pm 平均偏差)
NC	0 moi	330.2 \pm 18.2
	1 moi	442 \pm 13.75791
	5 moi	471.9 \pm 6.878953
	10 moi	426.4 \pm 28.95237
	50 moi	425.1 \pm 51.80463
hTGF- β 2	0 moi	431.6 \pm 10.4
	1 moi	0
	5 moi	0
	10 moi	0
	50 moi	0

[0159] 实施例 4 :选择性溶解肿瘤的腺病毒的制备

[0160] 在不可复制性腺病毒中鉴定完 shRNA 对 TGF- β 2 的效果后, 制备能够表达该 shRNA 且还能有选择地溶解肿瘤细胞的腺病毒。在制备能够有选择地溶解肿瘤的可复制性腺病毒之前, 为了制备出能够在腺病毒的 E1A 位点上插入各种基因的穿梭载体, 制备了在 pBSKII 引物 (Stratagene, 美国) 中包含 E1A 和 E1B55kDa 基因并包含各种酶位点 (Enzyme site) 的 pBSK II -3484 合成基因 (图 10(a))。为了将合成基因改变成能够导入到用于容易鉴定同源重组的 pCA14 穿梭载体中的形式, 用 PCR 处理 pBSK II -3484, 并对 Fsp I 处理限制性酶, 然后钝化酶制备平端 (blunt end), 而后再用 BamH I 处理。对 Ssp I 通过限制性内切酶处理切割 pCA14 (Microbix Biosystems Inc, 加拿大), 再用钝化酶制备平端, 然后处理 Bgl II, 通过同裂酶 (Isoschizomer) BamH I 和 Bgl II 及两端上的平端, 插入合成基因, 从而制备穿梭载体 pCA14-3484 (图 10(b))。此后, 使 CMV 启动子基因向 Kpn I 和 Xho I 插入于 pCA14-3484 中, 从而制备 pCA14-CMV-3484 (图 10(c))。此外, 通过限制性内切酶 EcoRI 和 SalI 从 pCA14-CMV-3484 中切出 E1B55kDa 部分, 然后进行钝化, 从而获得重新连接上的 pCA14-CMV-3484- Δ E1B55 (图 10(d))。将制成的穿梭载体 pCA14-CMV-3484- Δ E1B55 用 XmnI 切割, 并进行线性化 (linearization) 后, 将无 IX 基因的 d1324-BstB I - 人 shTGF- β 2 (或 d1324-BstB I - 小鼠 shTGF- β 2) 用 BstBI 切割, 然后使两者同时在大肠菌 BJ5183 内进行转化, 从而诱导同源重组。

[0161] 获得经同源重组的质粒 DNA 后, 用限制性内切酶 Hind III 处理, 检测 DNA 模型的变化, 最终通过测序来鉴定有无同源重组, 用 PacI 切割经鉴定的质粒, 然后在 293 细胞株中进行转化, 从而制备能够有选择地溶解肿瘤并抑制人 (或小鼠) TGF- β 2 表达的 d1324-CMV-3484-shTGF- β 2 腺病毒 (图 11)。

[0162] 图 12 展示了为了制备包含小鼠 shTGF- β 2 的肿瘤选择性的可复制性腺病毒的同源重组的过程, (a) 经过 E3 筛选结果, 克隆 1、2、4、5、6 被首选为阳性克隆, (b) 通过 Hind III 酶切图谱筛选经同源重组的克隆, 将克隆 1、2、4 均与对照组进行图谱对比的结果, 鉴定出有完成重组, (c) 经 PacI 切后, 在克隆 1、2、4 中只有克隆 1 有被 PacI 切断, 并确定有出现 2kb 相当的条带, 从而鉴定出克隆 1 的 DNA 为经同源重组的 d1324-CMV-3484- Δ E1B55- Δ E3-sh-mTGF- β 2 的 DNA。

[0163] 图 13 展示了为了制备包含人 shTGF- β 2 的肿瘤选择性的可复制性腺病毒的同源重组的过程, (a) 通过 Hind III 酶切图谱筛选经同源重组的克隆 (1、2、3), (b) 将所述克隆 1、2、3 的 DNA 用 PacI 切后, 发现克隆 1、2、3 的 DNA 均被切断并能确认有出现 2kb 相当的条带, 从而能够鉴定出克隆 1、2、3 的 DNA 为经同源重组的

[0164] d1324-CMV-3484- Δ E1B55- Δ E3-sh-hTGF- β 2 的 DNA。

[0165] 实施例 5 : 细胞溶血的鉴定

[0166] 为了鉴定可复制性腺病毒的溶细胞能力, 在 24 孔板上将各类细胞按细胞尺寸, 即从 4×10^4 至 1×10^5 , 进行倾倒 (pour) 培养, 在第二天, 具有 Survivin 启动子和 CMV 启动子的可复制性选病毒按 MOI 实施感染, 在作为对照组的 293A 细胞株中具有最低 MOI 的细胞被病毒杀死后, 终止实验, 用水晶紫将活着的细胞进行染色。用 3.7% 多聚甲醛在常温下将细胞固定 5 分钟, 然后对比肿瘤溶解效果的结果, 显示出根据启动子的溶解效果并无太大差异, 并鉴定出两者都具有优异的肿瘤选择性。

[0167] 图 14 在肿瘤选择性的可复制性腺病毒 (通过无法表达 CMV 启动子和 E1B 55KDa 的 d1324-CMV-3484 与 Survivin 启动子而具有选择性能力的、能表达 55KDa 的 d1324-hSurvivin-3484) 在正常细胞 (BJ 细胞) 中没有进行复制, 然而其在各种人癌细胞中能够进行复制并展示细胞溶血现象。

[0168] 实施例 6 : 在癌细胞内的效果的鉴定

[0169] 向 A375 黑色素瘤细胞株, 感染 1、5、10、50、100moi 能够表达人 sh-TGF- β 1 或 sh-TGF- β 2 的实施例 2 的不可复制性腺病毒, 然后通过实时 PCR 实施细胞内存在的 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 mRNA 的水平。

[0170] 结果显示, 表达 TGF- β 1 的 shRNA 时, 虽然能够减少细胞内的 TGF- β 1 mRNA, 然而 TGF- β 2 mRNA 或 TGF- β 3 mRNA 会趋于增多。反之, 表达 TGF- β 2 的 shRNA 时, 不仅能够有效地减少 TGF- β 2 mRNA, 同时 TGF- β 2 mRNA 或 TGF- β 3 mRNA 也会趋于减少 (图 15)。这表明, 在表达 TGF- β 2 的 shRNA 时至少不会出现因细胞内互补效果而引起的功效的降低, 而且还能抑制 TGF- β 的其他亚型, 从而具有附加效果, 由此展示其优点。通过利用 ELISA 而降低 TGF- β 蛋白质表达所获得的效果类型也与实时 PCR 类似 (图 16)。

[0171] 这表明, 能够表达相对于 TGF- β 2 的 shRNA 的腺病毒与能够表达相对于 TGF- β 1 的 shRNA 的腺病毒具有更优秀的表达抑制效果。

[0001]

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> The shRNA downregulating TGF-beta2 for treatment of tumor
- <150> KR10-2012-0009811
- <151> 2012-01-31
- <150> KR10-2013-0010233
- <151> 2013-01-30
- <160> 12
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> mouse target sequence
- <400> 1
- ggattgaact gtatcagatc ctaa 25
- <210> 2
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> human target sequence
- <400> 2
- ggattgagct atatcagatt ctcaa 25
- <210> 3
- <211> 54
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> mouse shRNA
- <400> 3
- ggattgaact gtatcagatc ctaaactctct taaggatctg atacagttca atcc 54

[0002]

<210>	4		
<211>	54		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	human shRNA		
<400>	4		
	ggattgagct atatcagatt ccaatctct tgagaatctg atatagctca atcc	54	
<210>	5		
<211>	64		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	top strand		
<400>	5		
	gatccggatt gaactgatc agatccttaa tctcttaagg atctgatata gttcaatcct	60	
	tta		64
<210>	6		
<211>	64		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	bottom strand		
<400>	6		
	agcttaaaag gattgaactg tatcagatcc ttaagagatt aaggatctga tacagttcaa	60	
	tccg		64

[0003]

<210>	7		
<211>	64		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	top strand		
<400>	7		
	gatccggatt gagctatatc agattctcaa tctcttgaga atctgatata gctcaatcct	60	
	ttta		64
<210>	8		
<211>	64		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	bottom strand		
<400>	8		
	agcttaaaag gattgagcta ttcagattc tcaagagatt gagaatctga tatagctcaa	60	
	tccg		64
<210>	9		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	forward primer		
<400>	9		
	gtgaatggct ctcttcgac		20
<210>	10		

[0004]

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	reverse primer	
<400>	10	
	cctcgagctc ttcgcttta	20
<210>	11	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	forward primer	
<400>	11	
	gctgcctacg tccactttac at	22
<210>	12	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	reverse primer	
<400>	12	
	atataagctc aggaccctgc tg	22

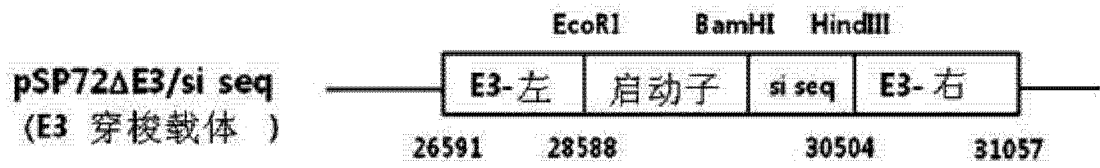


图 1

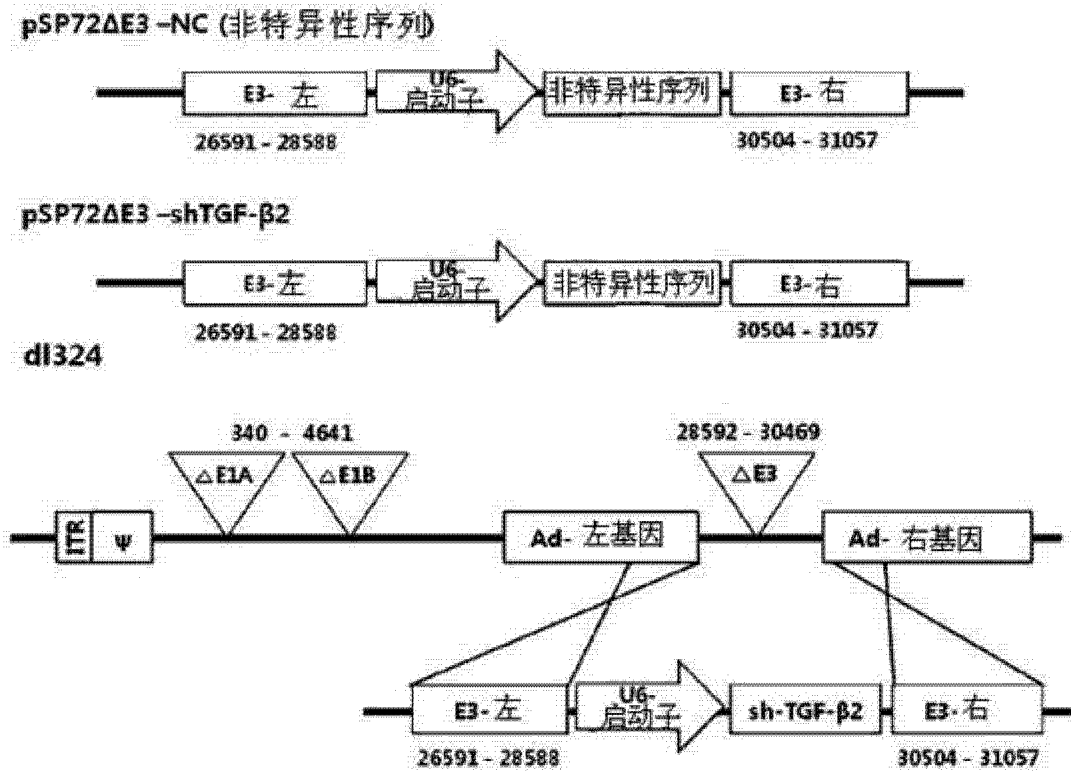
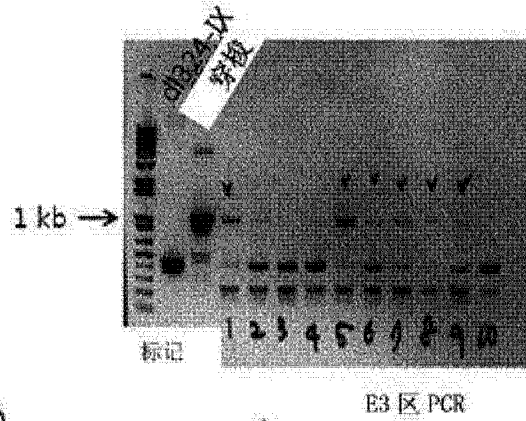
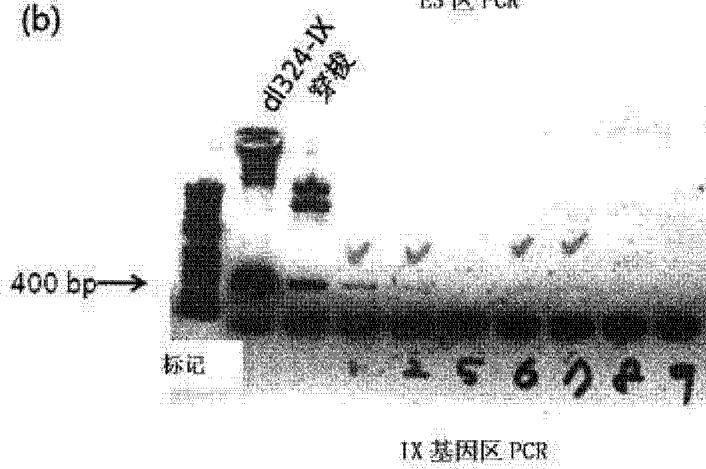


图 2

(a) 筛选人 TGF-β 2 的 shRNA



(b)



(c)

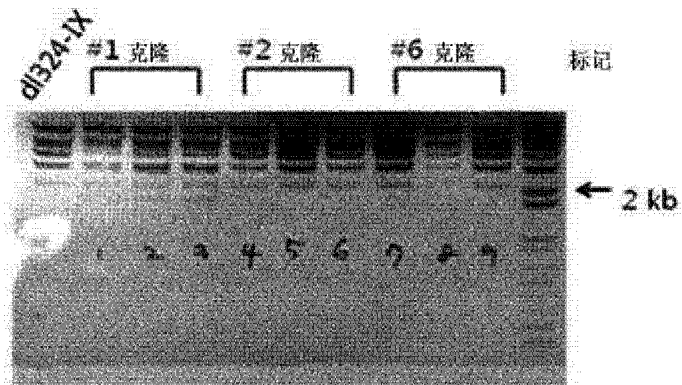


图 3

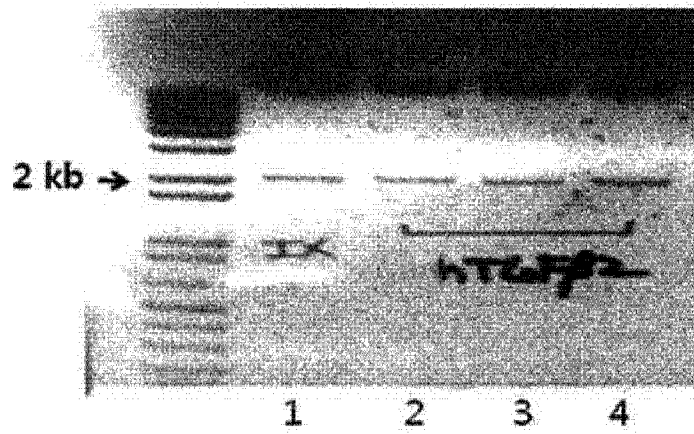


图 4

```

sh-TGF-beta2 -----
#1-1      TCTTGGGTAGTTTGCAGTTTAAAAATATGTTTAAAAATGGACTATCATATGCTTACCGT 240

sh-TGF-beta2 -----GATCCG 6
#1-1      AACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTGGGTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGCGGGATCCG 300
                *****

sh-TGF-beta2 GATTGAGCTATATCAGATTCTCAATCTCTTGAGAACTCGATATAGCTCAATCCTTTTA-- 64
#1-1      GATTGAGCTATATCAGATTCTCAATCTCTTGAGAACTCGATATAGCTCAATCCTTTTAAG 360
                *****

sh-TGF-beta2 -----
#1-1      CTTGTCGACTTCGAGCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG 420

sh-TGF-beta2 -----
#1-2      GGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGGTTTATATATCTT 390

sh-TGF-beta2 -----GATCCGGATTGAGCTATATCAGATTCTCAATCTCTTGAGAACTCG 45
#1-2      GTGGAAAGGACGCGGGATCCGGATTGAGCTATATCAGATTCTCAATCTCTTGAGAACTCG 420
                *****

sh-TGF-beta2 ATATAGCTCAATCCTTTTA----- 64
#1-2      ATATAGCTCAATCCTTTTAAGCTTGTGCAGCTTCGAGCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAA 490
                *****

sh-TGF-beta2 -----
#1-2      TGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTFTTTTCACTGCA 540

sh-TGF-beta2 -----
#1-3      CTTGGGTAGTTTGCAGTTTAAAAATTATGTTTAAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTA 240

sh-TGF-beta2 -----GATCCGG 7
#1-3      ACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTCGGGTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGCGGGATCCGG 300
                *****

sh-TGF-beta2 ATTGAGCTATATCAGATTCTCAATCTCTTGAGAACTCGATATAGCTCAATCCTTTTA--- 64
#1-3      ATTGAGCTATATCAGATTCTCAATCTCTTGAGAACTCGATATAGCTCAATCCTTTTAAGC 360
                *****

sh-TGF-beta2 -----
#1-3      TTGTCGACTTCGAGCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC 420

```

图 5

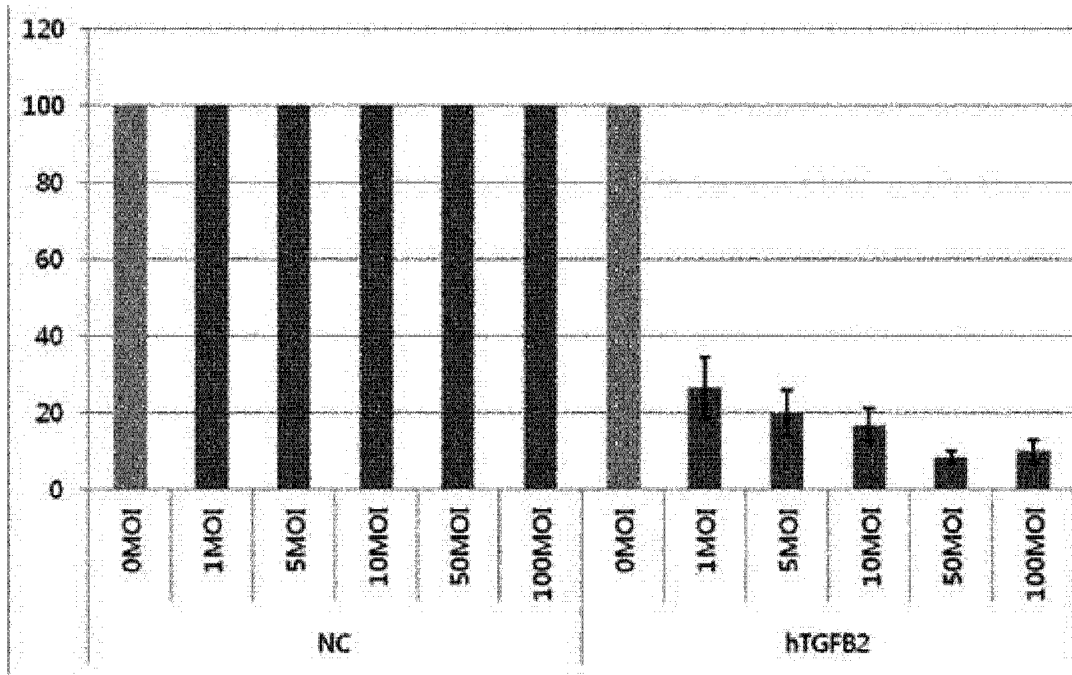


图 6

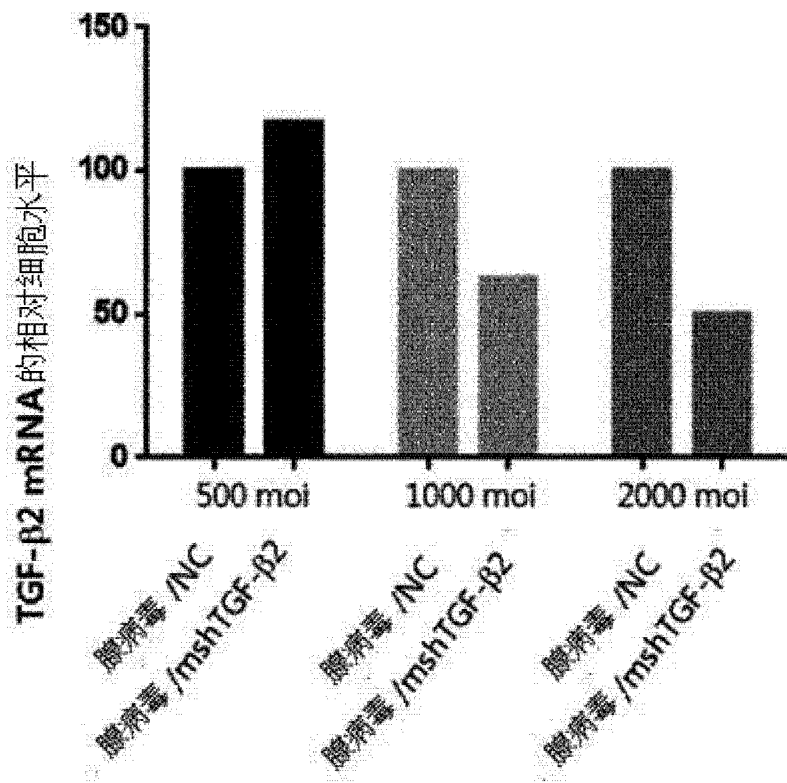


图 7

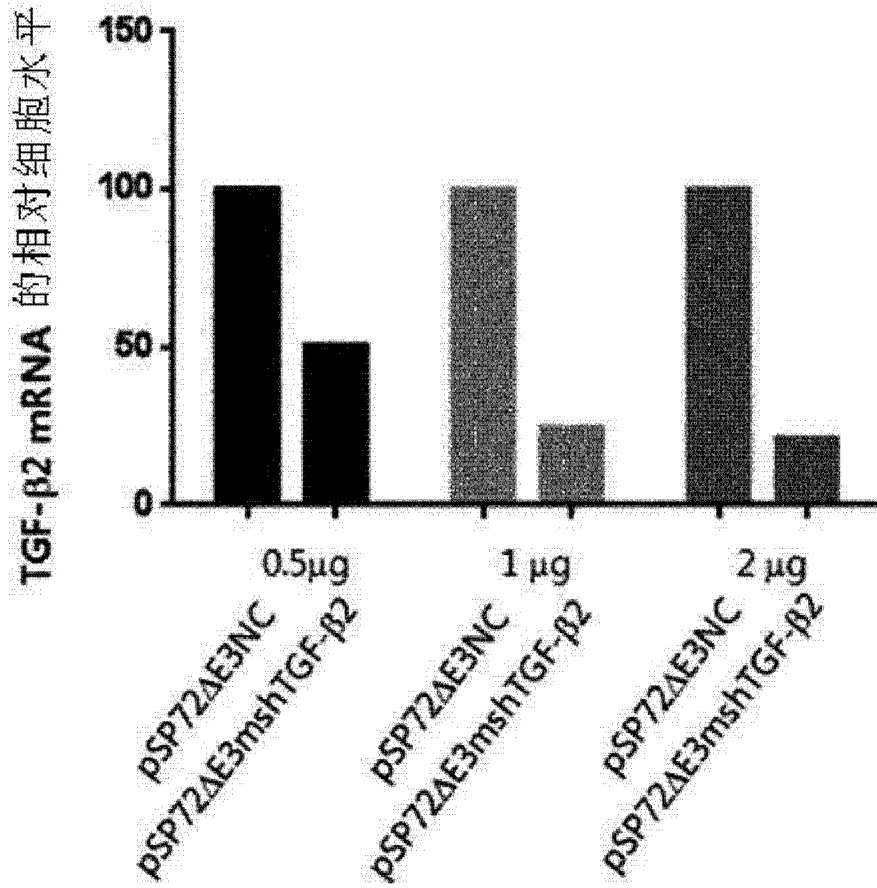


图 8

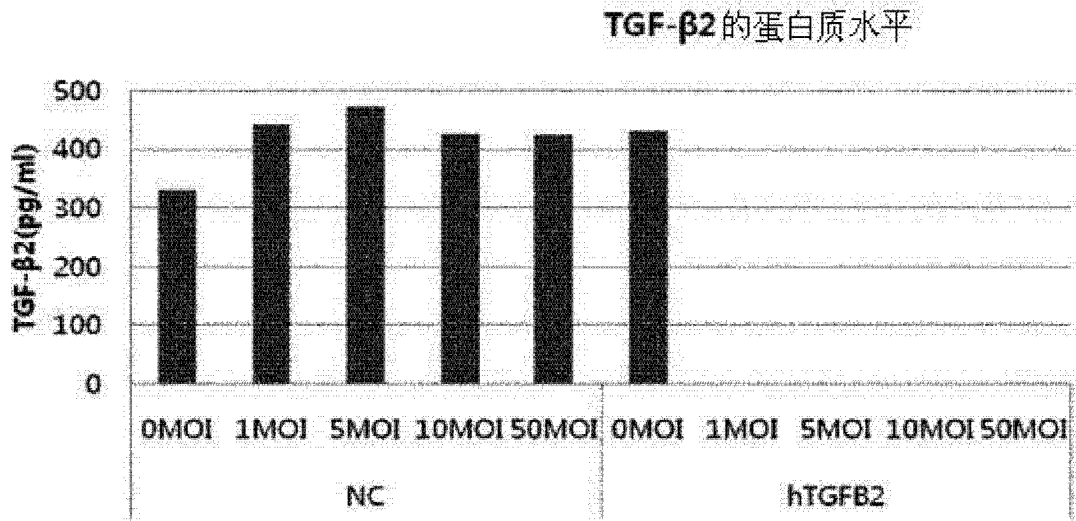


图 9

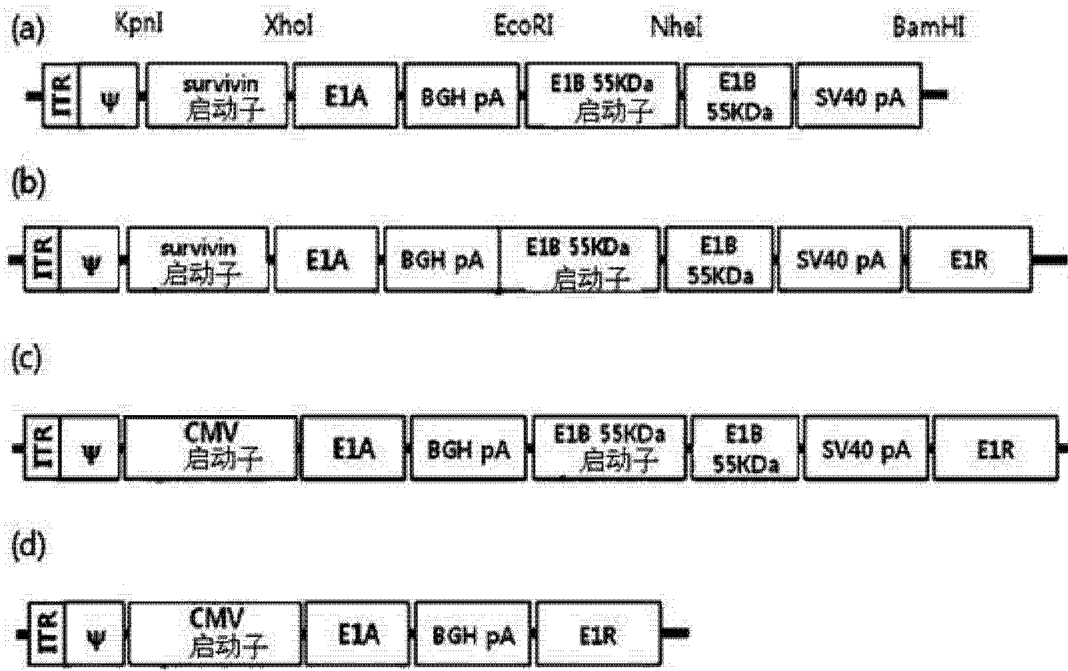


图 10

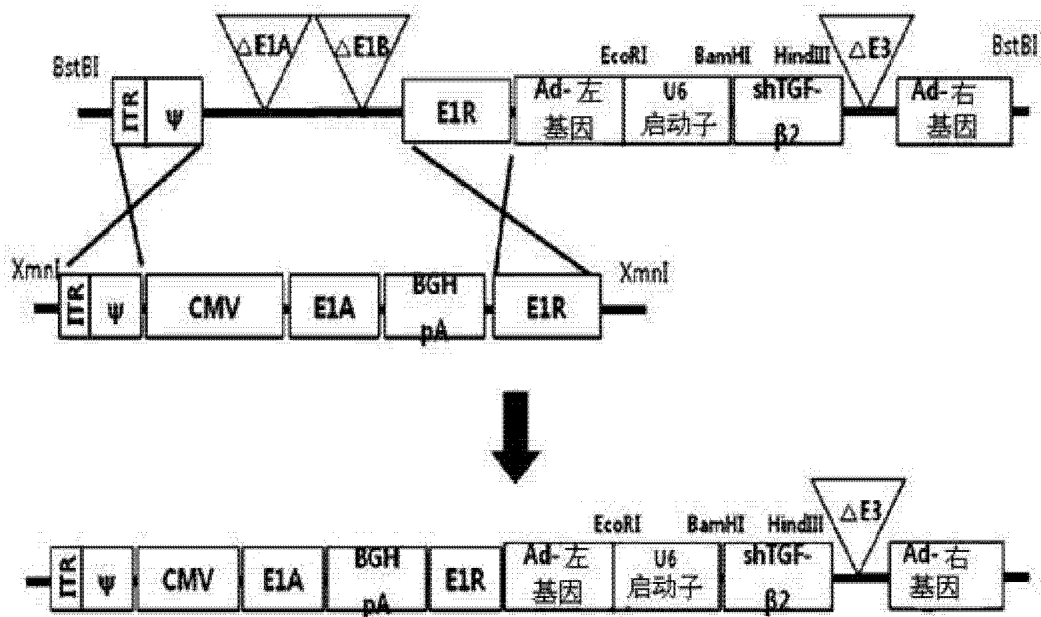


图 11

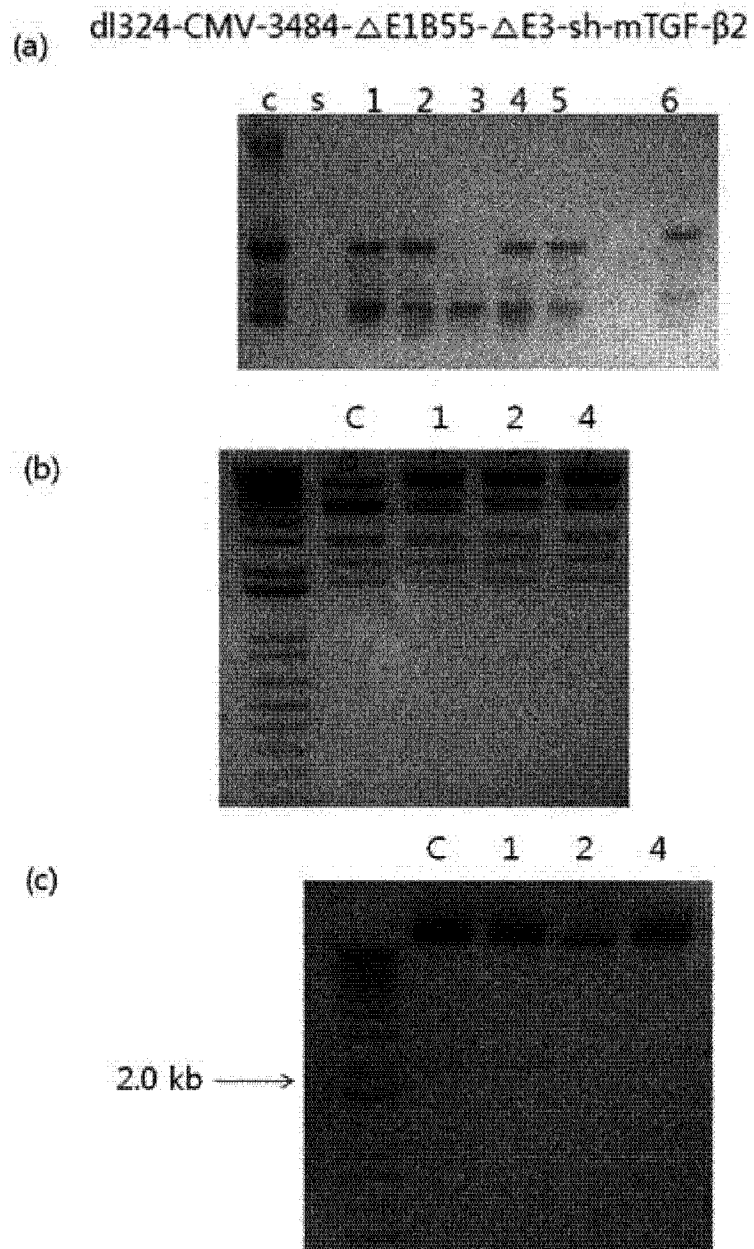


图 12

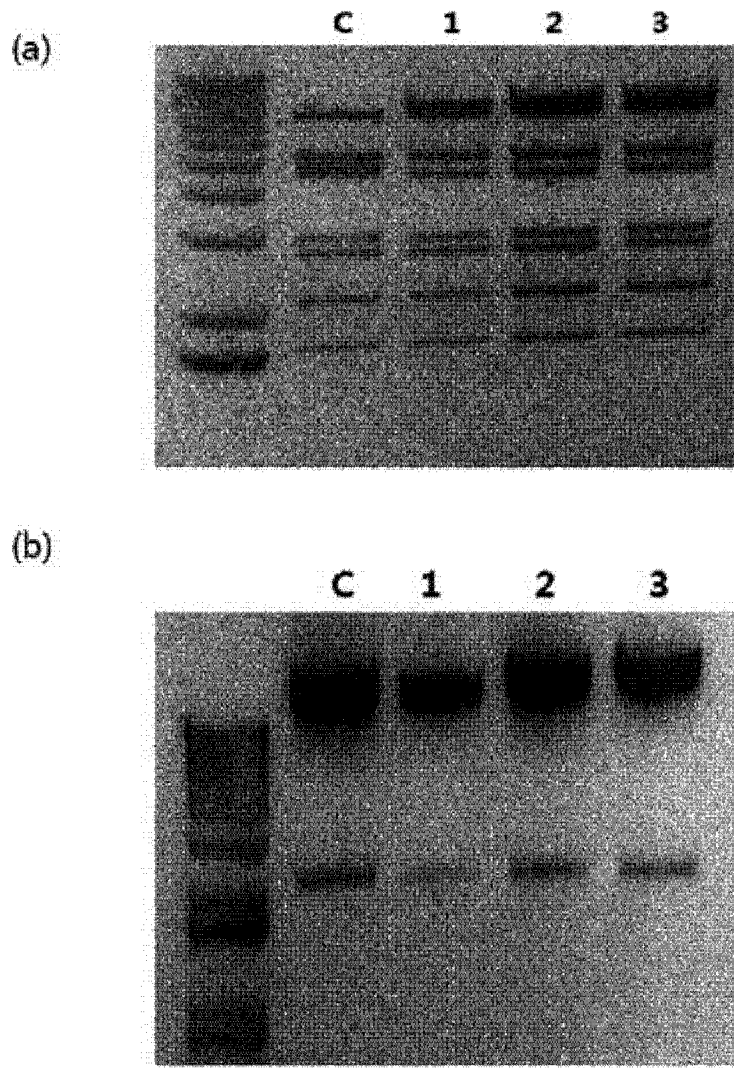


图 13

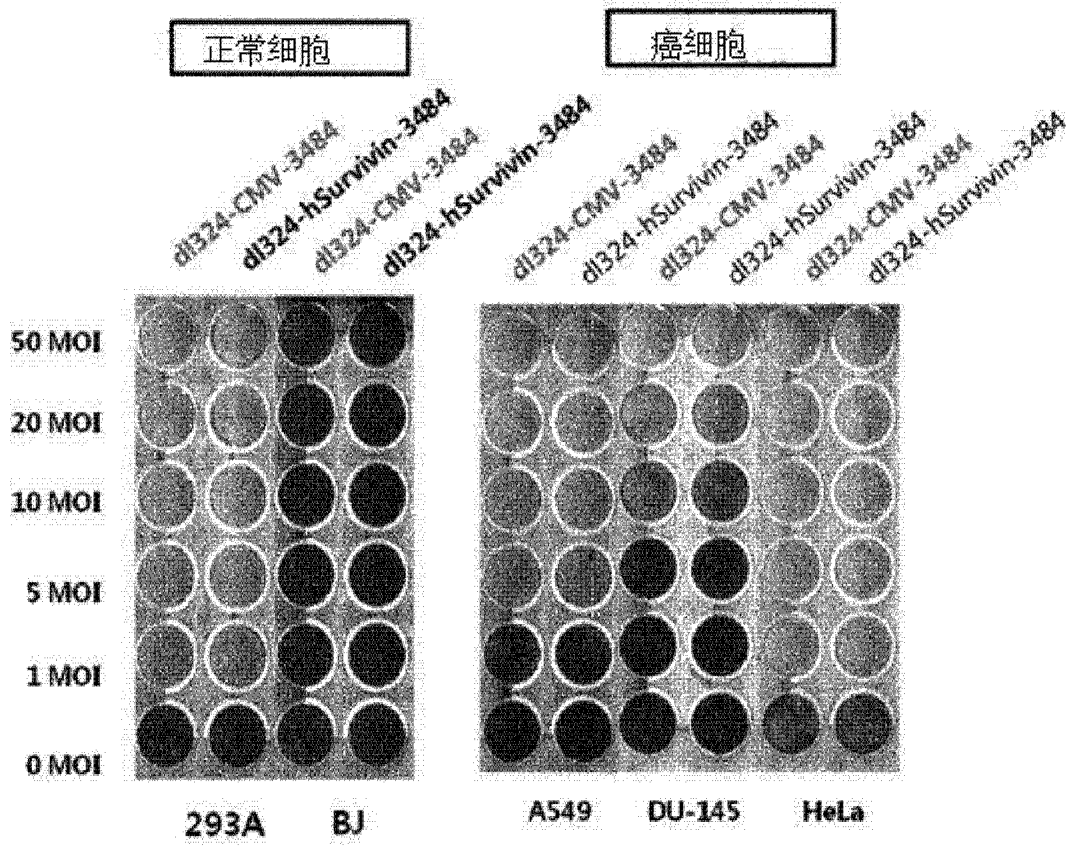


图 14

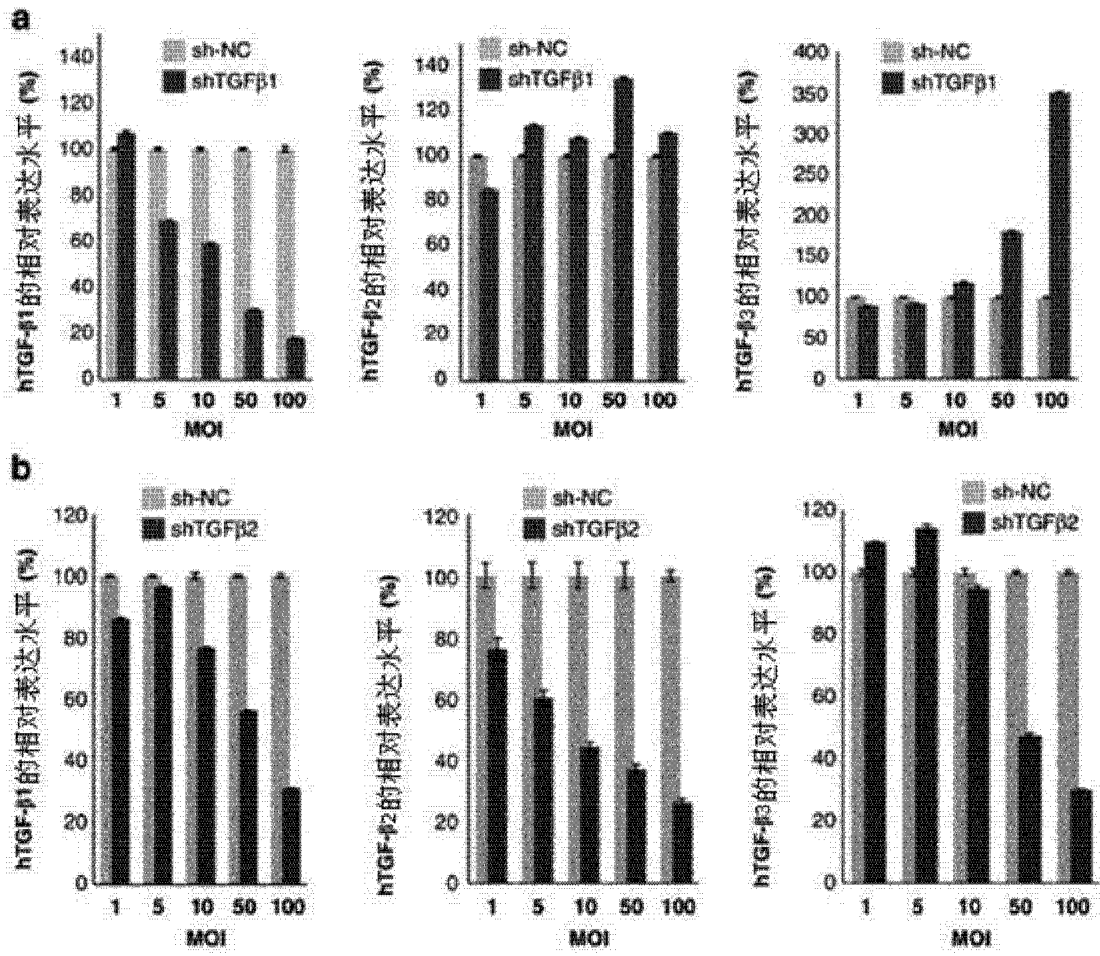


图 15

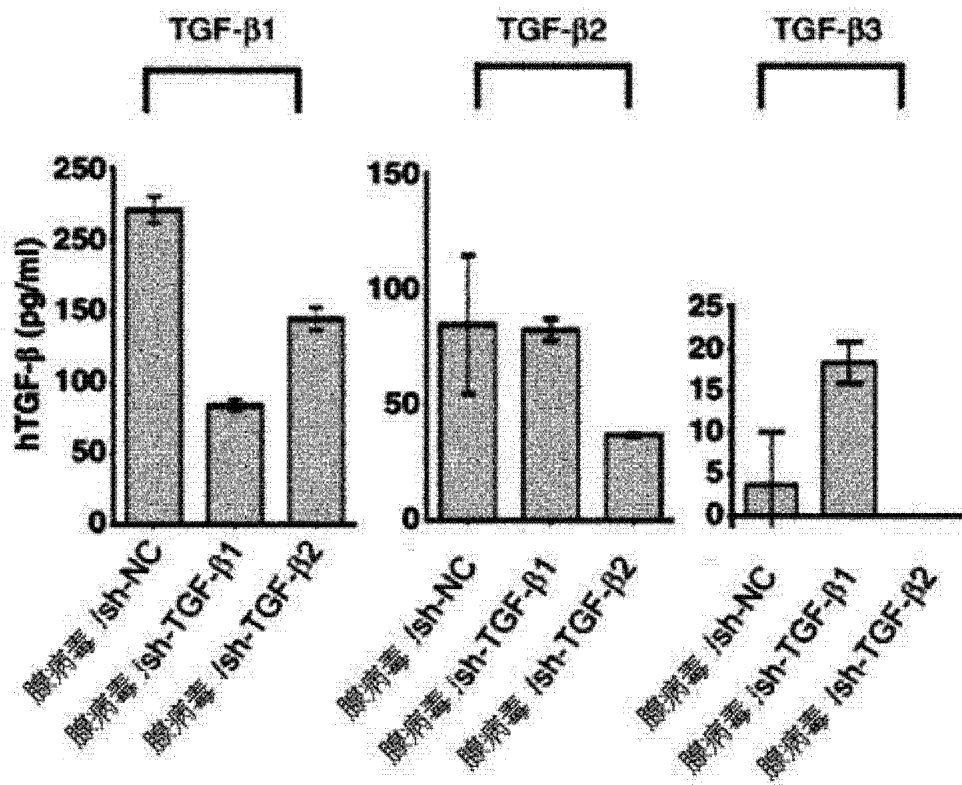


图 16