



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월08일
(11) 등록번호 10-1865025
(24) 등록일자 2018년05월31일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/282 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0013661
(22) 출원일자 2017년01월31일
심사청구일자 2017년01월31일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
KR1020160106507 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
(주)큐리진
서울특별시 동대문구 회기로23다길 19, 1층(회기동)</p> <p>(72) 발명자
최진우
서울특별시 동작구 사당로2가길 102 101동 302호(사당동, 사당자이아파트)</p> <p>(74) 대리인
위병갑</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **mTOR 유전자 및 STAT3 유전자의 발현을 동시에 억제하는 핵산**

(57) 요약

본 발명은 mTOR 유전자 및 STAT3 유전자의 발현을 동시에 억제하는 핵산 분자와, 이를 포함하는 항암용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, siRNA의 표적 특이성으로 인한 치료 효과가 높지 않은 단점을 극복하기 위하여, 암과 관련된 mTOR 유전자 및 STAT3 유전자의 발현을 동시에 억제하도록 설계된 본원발명의 이중 가닥 siRNA는 암세포의 사멸을 촉진하고, 항암제와의 병용 처리에서 암세포 사멸을 시너지적으로 향상시키는 효과가 있으므로, 다양한 암종에 항암용 조성물 또는 항암보조제로서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A61K 31/337 (2013.01)
- A61K 31/7105 (2013.01)
- A61K 31/713 (2013.01)
- C12N 15/1137 (2013.01)
- C12N 15/86 (2013.01)
- C12N 2310/122 (2013.01)
- C12N 2310/14 (2013.01)
- C12N 2310/531 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2014R1A1A1002431
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	연구재단
연구사업명	신진연구지원사업
연구과제명	구강 및 두경부암에서 인유두종바이러스 음성과 양성환자 사이 구분된 신호전달 네트워크
분석 및 그에 따른	고효율 치료방법 제안
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교
연구기간	2014.06.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

mTOR(mammalian target of rapamycin) 유전자 및 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 유전자를 동시에 억제하고 서열번호 1 및 2의 염기서열로 표시되는 핵산 분자.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산 분자는 RNA 간섭에 의해 mTOR(mammalian target of rapamycin) 유전자 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 핵산 분자.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 핵산 분자는 RNA 간섭에 의해 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 유전자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 핵산 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 siRNA(small interfering RNA) 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 siRNA가 부분적으로 상보적 결합을 이루고 있는 이중 가닥(double strand) siRNA인 것을 특징으로 하는, 핵산 분자.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 shRNA(short hairpin RNA)인 것을 특징으로 하는, 핵산 분자.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 shRNA는 서열번호 8 또는 서열번호 9의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 핵산 분자.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열과 서열번호 2의 염기서열이 부분적으로 상보적 결합하여 헤어핀 구조를 이루는 것을 특징으로 하는, 핵산 분자.

청구항 9

제1항의 서열번호 1 및 2의 염기서열로 표시되는 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 10

제 9항의 재조합 발현 벡터를 도입한 바이러스.

청구항 11

제1항의 서열번호 1 및 2의 염기서열로 표시되는 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는, 항암용 약학적 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 핵산 분자는 항암제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 항암용 약학적 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 항암제는 시스플라틴 또는 파클리탁셀인 것을 특징으로 하는, 항암용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 mTOR 유전자 및 STAT3 유전자의 발현을 동시에 억제하는 핵산 분자와, 이를 포함하는 항암용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 전세계적으로 가장 많은 사망자를 내는 질병 중 하나로, 혁신적인 암 치료제의 개발은 이에 대한 치료시 발생하는 의료비를 절감할 수 있음과 동시에 고부가가치를 창출할 수 있다. 또한, 2008년의 통계에 따르면, 기존항암제 내성을 극복 할 수 있는 분자 치료제는 주요 7개국(US, Japan, France, Germany, Italy, Spain, UK)에서 \$17.5 billion을 차지했고, 2018년의 경우 약 \$45 billion 정도의 market size를 차지하여, 2008년 대비 9.5%의 성장률을 보일 것이라 예측되고 있다. 암의 치료는 수술, 방사선치료, 화학요법, 생물학적 치료로 구분 되는데, 이 중에 화학요법은 화학물질로서 암 세포의 증식을 억제하거나 죽이는 치료법으로 항암제에 의하여 나타나는 독성은 상당부분 정상세포에서도 나타나기 때문에 일정 정도의 독성을 나타내며, 항암제가 효과를 나타내다가도 일정 기간의 사용 후에는 효과가 상실되는 내성이 발생하기 때문에 암세포에 선택적으로 작용하고 내성이 생기지 않는 항암제의 개발이 절실하다 (암 정복의 현주소 Biowave 2004. 6(19)). 최근 암에 대한 분자유전정보의 확보를 통해 암의 분자적 특성을 표적으로 한 새로운 항암제의 개발이 진행되고 있으며, 암세포만이 가지고 있는 특징적인 분자적 표적(molecular target)을 겨냥하는 항암제들은 약제 내성이 생기지 않는다는 보고도 있다.

[0003] 유전자의 발현을 억제하는 기술은 질병치료를 위한 치료제 개발 및 표적 검증에서 중요한 도구이다. 간섭 RNA(RNA interference, 이하 ‘RNAi’ 라고 한다)는 그 역할이 발견된 이후로, 다양한 종류의 포유동물세포 (mammalian cell)에서 서열 특이적 mRNA에 작용한다는 사실이 밝혀졌다 (Silence of the transcripts: RNA interference in medicine. J Mol Med (2005) 83: 764773). RNAi는 21-25개의 뉴클레오타이드 크기의 이중나선 구조를 가진 작은 간섭 리보핵산 짧은 간섭 RNA (small interfering RNA, 이하 ‘siRNA’ 라고 한다)이 상보적인 서열을 가지는 전사체(mRNA transcript)에 특이적으로 결합하여 해당 전사체를 분해함으로써 특정 단백질의 발현을 억제하는 현상이다. 세포 내에서는 RNA 이중가닥이 Dicer라는 엔도뉴클라아제(endonuclease)에 의해 프로세싱되어 21 내지 23개의 이중가닥(base pair, bp)의 siRNA로 변환되며, siRNA는 RISC(RNA-induced silencing complex)에 결합하여 가이드(안티센스) 가닥이 타겟 mRNA를 인식하여 분해하는 과정을 통해 타겟 유전자의 발현을 서열 특이적으로 저해한다 (NUCLEIC-ACID THERAPEUTICS: BASIC PRINCIPLES AND RECENT APPLICATIONS. Nature Reviews Drug Discovery. 2002. 1, 503-514). 베르트랑(Bertrand) 연구진에 따르면 동일한 타겟 유전자에 대한 siRNA가 안티센스 올리고뉴클레오타이드(Antisense oligonucleotide, ASO)에 비하여 생체 내/외(in vitro 및 in vivo)에서 mRNA 발현의 저해효과가 뛰어나고, 해당 효과가 오랫동안 지속되는 효과를 포함하는 것으로 밝혀졌다 (Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. 296: 1000-1004). siRNA를 포함하는 RNAi 기술 기반 치료제 시장은 향후 세계 시장규모가 2020년경에 총 12조원 이상을 형성하는 것으로 분석되었으며, 해당 기술을 적용할 수 있는 대상이 획기적으로 확대되어 기존의 항체, 화합물 기반 의약품으로 치료하기 어려운 질병을 치료할 수 있는 차세대 유전자 치료기술로 평가되고 있다. 또한 siRNA의 작용 기작은 타겟 mRNA와 상보적으로 결합하여 서열 특이적으로 타겟 유전자의 발현을 조절하기 때문에, 기존의 항체 기반 의약품이나 화합물질(small molecule drug)이 특정한 단백질 표적에 최적화되기까지 오랜 동안의 개발 기간 및 개발 비용이 소요되는 것에 비하여, 적용할 수 있는 대상이 획기적으로 확대될 수 있고, 개발 기간이 단축되면서, 의약화가 불가능한 표적 물질을 포함한 모든 단백질 표적에 대하여 최적화된 리드 화합물을 개발할 수 있다는 장점을 가진다 (Progress Towards in Vivo Use of siRNAs. MOLECULAR THERAPY. 2006 13(4):664-670). 이에, 최근 이 리보핵산 매개 간섭현상이 기존의 화학합성 의약 개발에서 발생하는 문제의 해결책을 제시하면서 전사체 수준에서 특정 단백질의 발현을 선택적으로 억제하여 각종 질병 치료제, 특히 중양 치료제 개발에 이용하려는 연구가 진행되고 있다. 또한, siRNA 치료제는 기존 항암제와 달리 표적이 명확하여 부작용이 예측 가능하다는 장점이 있으나, 이러한 표적 특이성은 다양한

유전자의 문제에 의해 발생하는 질병인 종양의 경우, 오히려 이러한 표적 특이성은 치료 효과가 높지 않은 원인이 되기도 한다.

[0004] mTOR(포유동물의 라파마이신 표적; mammalian Target of rapamycin)은 사이토카인-자극 세포 증식, 세포주기의 G1 위상을 조절하는 몇몇 중요 단백질을 위한 mRNA의 번역(translation), 및 인터루킨-2(IL-2) 유도 전사(transcription)를 포함하는, 다양한 신호 전환 경로에 있어서 중요한 효소이다. mTOR의 억제제는 세포주기의 G1 으로부터 S까지의 진행의 억제를 야기한다. mTOR 억제제는 면역억제, 항증식 및 항암 활성을 나타내므로, 이러한 질환의 치료를 위하여 mTOR이 표적으로 되고 있다 (Current Opinion in Lipidology, 16: 317-323, 2005). 또한, mTOR은 자가소화(autophagy) 조절에 중요한 인자로서, 자가소화 경로를 조절하는 mTOR을 표적으로 하여 다양한 질환 예를들어, 암, 신경변성 질환, 심장질환, 노화, 면역질환, 감염 질환 및 크론병 등을 치료할 수 있다(Immunology, 7:767-777; Nature 451: 1069-1075, 2008).

[0005] STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)는 세포 외부의 다양한 성장인자(growth factor)와 사이토카인(cytokine)의 신호를 핵에 전달하여 전사를 촉진하는 전사조절인자(transcription factor)로, 세포질 내 비활성 상태에서 전사활성 도메인(transactivation domain)의 타이로신 잔기가 인산화되어 활성화되면 핵 안으로 유입된다 (STAT3 inhibitors for cancer therapy: Have all roads been explored Jak-Stat. 2013;1;2(1):e22882). 인산화된 STAT3(p-STAT3)는 핵의 DNA와 결합하여 세포의 성장(proliferation)과 분화(differentiation) 등의 종양형성(tumorigenesis)에 관련된 광범위한 표적유전자의 발현을 유도하며, 고형암 및 혈액암 환자의 약 70%에서 상시 활성화 되어있다 (Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. BioMed research international. 2013; 2013:421821). 하지만 STAT3와 같은 전사인자들은 단백질의 3 차 구조상, 활성을 저해할 수 있는 표적을 찾기 힘들기 때문에 전통적인 합성 신약 개발 분야에서 난개발(undruggable)로 여겨져 왔다 (Transcription Factor STAT3 as a Novel Molecular Target for Cancer Prevention. Cancers. 2014; 16;6(2):926-57). 따라서 STAT3의 발현을 저해할 수 있는 siRNA 치료제 및 이의 전달기술에 대한 시장의 수요는 매우 높은 상황이다.

[0006] 즉, Stat3 및 mTOR 는 발현 정도에 따라 폐암, 전립선암, 두경부 암 등에서 예후가 결정되는 주요한 암 관련 유전자로, 항암제 개발에 타겟이 되고 있지만, 세포질에 존재하므로 기존에 많이 사용되는 항체치료제로는 접근이 불가하고, 또한 약물로 전달하기에는 시스템릭한 부작용이 예상되어 이들을 억제하기 위한 신약 개발이 어려운 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명에서는 siRNA의 표적 특이성으로 인한 치료 효과가 높지 않은 단점을 극복하기 위하여, 암과 관련된 mTOR 유전자 및 STAT3 유전자의 발현을 동시에 억제하는 siRNA 및 shRNA를 제작하였으며, 이의 항암 활성 및 항암제와의 시너지적 항암 활성을 확인함으로써 이를 암 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 mTOR 및 STAT3 유전자의 발현을 동시에 억제하는 핵산 분자를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 제조합 발현 벡터를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 제조합 발현 벡터를 도입한 바이러스를 제공한다.

[0011] 아울러, 본 발명은 상기 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는, 항암용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 본원발명의 이중 가닥 siRNA는 센스 가닥은 mTOR 유전자의 발현을 억제하고 안티센스 가닥은 STAT3 유전자의 발현 억제하여, 각각의 siRNA를 따로 처리하지 않아도 두 유전자를 동시에 억제할 수 있으며, 이를 통해 암세포의 사멸을 촉진하고, 항암제와의 병용 처리에서 암세포 사멸을 시너지적으로 향상시키는 효과가 있으며, siRNA는 국소 전달이 가능하고, 선택성이 뛰어나므로, 다양한 암종에 항암용 조성물 또는 항암보조제로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013]

도 1은 본 발명의 이중 표적 이중 가닥(double strand) siRNA의 서열과 구조를 나타낸 도이다:

Antisense_mTOR: mTOR 유전자 또는 mRNA서열을 표적화하는 siRNA; 및

Antisense_STAT3: STAT3 유전자 또는 mRNA서열을 표적화하는 siRNA.

도 2는 서열번호 1의 siRNA (본 발명의 siRNA의 이중 가닥 중 mTOR에 대한 안티센스 가닥)가 mTOR의 mRNA 서열 중에서 결합하는 표적 위치를 붉은 글씨로 표기한 도이다.

도 3은 서열번호 2의 siRNA (본 발명의 siRNA의 이중 가닥 중 STAT3에 대한 안티센스 가닥)가 STAT3의 mRNA 서열 중에서 결합하는 표적 위치를 붉은 글씨로 표기한 도이다.

도 4는 본 발명의 이중 가닥의 siRNA 서열을 루프 서열과 함께 한 가닥에 포함하는 shRNA들을 세포 내에서 발현하기 위한 벡터의 맵을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 이중 표적의 이중 가닥 siRNA에 의한 mTOR 또는 STAT3 유전자 발현 억제 효과를 확인한 도이다:

ANC: 대조군 siRNA; 및

AMTORSTAT3: 본 발명의 이중 표적 siRNA.

도 6은 mTOR 유전자 및 STAT3 유전자의 발현이 상호간에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, mTOR 유전자 또는 STAT3 유전자에 대한 siRNA를 각각 또는 함께 처리하여 mTOR와 STAT2의 발현량을 확인한 도이다:

nc2: 대조군 siRNA;

simTOR: mTOR만을 표적화하는 siRNA;

siSTAT3: STAT3만을 표적화하는 siRNA; 및

simTOR&STAT3: mTOR 표적화 siRNA 및 STAT3 표적화 siRNA 병용 처리.

도 7은 mTOR를 단독으로 억제하였을 때, STAT3을 단독으로 억제하였을 때, 또는 본 발명의 이중 표적 siRNA로 mTOR 및 STAT3를 동시에 억제하였을 때의 인간 폐암세포주 A549 세포의 세포 생존율을 확인한 도이다:

control: 대조군 siRNA;

mTOR: mTOR만을 표적화하는 siRNA;

STAT3: STAT3만을 표적화하는 siRNA; 및

Dual: mTOR 및 STAT3를 동시에 표적화하는 본 발명의 siRNA.

도 8은 시스플라틴 처리 후, mTOR를 단독으로 억제하였을 때, STAT3을 단독으로 억제하였을 때, 또는 본 발명의 이중 표적 siRNA로 mTOR 및 STAT3를 동시에 억제하였을 때의 인간 폐암세포주 A549 세포의 세포 생존율을 확인한 도이다:

control: 시스플라틴 처리 후 대조군 siRNA 처리;

mTOR: 시스플라틴 처리 후 mTOR만을 표적화하는 siRNA 처리;

STAT3: 시스플라틴 처리 후 STAT3만을 표적화하는 siRNA 처리; 및

Dual: 시스플라틴 처리 후 mTOR 및 STAT3를 동시에 표적화하는 본 발명의 siRNA 처리.

도 9는 파클리탁셀 처리 후, mTOR를 단독으로 억제하였을 때, STAT3을 단독으로 억제하였을 때, 또는 본 발명의 이중 표적 siRNA로 mTOR 및 STAT3를 동시에 억제하였을 때의 인간 폐암세포주 A549 세포의 세포 생존율을 확인한 도이다:

control: 파클리탁셀 처리 후 대조군 siRNA 처리;

mTOR: 파클리탁셀 처리 후 mTOR만을 표적화하는 siRNA 처리;

STAT3: 파클리탁셀 처리 후 STAT3만을 표적화하는 siRNA 처리; 및

Dual: 파클리탁셀 처리 후 mTOR 및 STAT3를 동시에 표적화하는 본 발명의 siRNA 처리.

도 10은 서열번호 8의 TTGGATCCAA 루프 shRNA 서열 또는 서열번호 9의 TTCAAGAGAG 루프 shRNA를 포함하는 벡터에 의한 mTOR 및 STAT3의 발현량을 shRNA의 DNA 양에 따라 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0016] 일 측면에서, 본 발명은 mTOR 유전자 및 STAT3 유전자의 발현을 동시에 억제하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0017] 일 구현예에서, 상기 핵산 분자는 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0018] 일 구현예에서, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산 분자는 RNA 간섭에 의해 mTOR 유전자 발현을 억제할 수 있고, 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 핵산 분자는 RNA 간섭에 의해 STAT3 유전자의 발현을 억제할 수 있어, 본원발명의 핵산 분자는 mTOR 유전자와 STAT3 유전자의 발현을 동시에 억제할 수 있다.
- [0019] 일 구현예에서, 상기 핵산 분자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 siRNA 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 siRNA가 부분적으로 상보적 결합을 이루고 있는 이중 가닥(double strand) siRNA일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 siRNA (mTOR 유전자에 대한 안티센스 가닥) 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 siRNA (STAT3 유전자에 대한 안티센스 가닥)가 도 1과 같이 21mer 중 18mer가 상보적으로 결합되어 이중 가닥의 siRNA를 이루도록 제작하였고, 이중 가닥의 siRNA가 각각 mTOR 및 STAT3 유전자를 표적화하여 발현을 억제함을 확인함으로써 이중 표적 siRNA 세트임을 확인하였다.
- [0020] 일 구현예에서, 상기 핵산 분자는 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 shRNA(short hairpin RNA)일 수 있으며, 상기 shRNA는 서열번호 8 또는 서열번호 9의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0021] 일 구현예에서, 상기 shRNA는 서열번호 1의 염기서열과 서열번호 2의 염기서열이 부분적으로 상보적 결합하고 루프 영역에 의해 회문적으로 연결되어 헤어핀 구조를 형성할 수 있으며, 본원발명의 일 실시예에서는 헤어핀 구조의 루프 부분 염기서열에 따라 TTGGATCCAA loop shRNA (서열번호 8) 또는 TTCAAGAGAG loop shRNA (서열번호 9)로 기재하였다.
- [0022] 본 발명에서 mTOR 또는 STAT3를 표적으로 하는 siRNA는 인간(*Homo sapiens*)의 mTOR 유전자 또는 STAT3 유전자의 일부와 100% 상보적인 서열을 가지고, mTOR 유전자 또는 STAT3 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어, “발현 억제”란 표적 유전자의 발현 또는 번역 저하를 야기하는 것을 의미하며, 바람직하게는 이에 의해 표적 유전자 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어, “siRNA(small interfering RNA)”란 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 일반적으로 siRNA는 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되나, 본 발명의 이중 가닥 siRNA는 센스 RNA 가닥이 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 siRNA (mTOR 유전자에 대한 안티센스 가닥)이고, 안티센스 RNA 가닥이 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 siRNA (STAT3 유전자에 대한 안티센스 가닥)이므로, 이중 가닥의 siRNA가 각각 동시에 mTOR 및 STAT3 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 너다운(knock-down) 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.
- [0025] 일 측면에서, 본 발명은 본원발명의 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0026] 일 구현예에서, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 siRNA 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 siRNA를 포함할 수 있으며, 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 shRNA 또는 서열번호 9의 염기서열의 염기서열을 포함하는 shRNA를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 재조합벡터는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있으며, 일 실시예에서는 pE3.1

벡터를 이용하였다.

- [0028] 본 발명에서 mTOR에 대한 siRNA를 전달하기에 유용한 비바이러스 벡터로는 통상적으로 유전자 요법에 사용되는 모든 벡터를 포함하며, 예를 들어 진핵세포에서 발현 가능한 다양한 플라스미드 및 리포좀 등이 있다.
- [0029] 본 발명에서 mTOR 및 STAT3를 표적으로 하는 이중 가닥 siRNA가 전달된 세포에서 적절히 전사되게 하기 위해서는 이를 포함하는 shRNA, 특히, 서열번호 8의 염기서열 또는 서열번호 9의 염기서열로 이루어지는 shRNA를 적어도 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것이 바람직하다. 상기 프로모터는 진핵세포에서 기능할 수 있는 프로모터라면 어떤 것이든지 무방하나, 서열번호 7로 기재한 U7 프로모터가 보다 바람직하다. mTOR 및 STAT3를 표적으로 하는 이중 가닥 siRNA 또는 shRNA의 효율적인 전사를 위하여 필요에 따라 리더 서열, 폴리아데닐화 서열, 프로모터, 인핸서, 업스트림 활성화 서열, 신호펩타이드 서열 및 전사 종결인자를 비롯한 조절서열을 추가로 포함할 수도 있다.
- [0030] 본 발명에서 mTOR 및 STAT3에 대한 siRNA 또는 shRNA를 전달하기에 유용한 바이러스 또는 바이러스 벡터로는 바쿨로비리디에(baculoviridae), 파르보비리디에(parvoviridae), 피코르노비리디에(picornoviridae), 헤레페스비리디에(herpesviridae), 폭스비리디에(poxviridae), 아데노비리디에(adenoviridae) 등이 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 일 측면에서, 본 발명은 본원발명의 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는, 항암용 약학적 조성물에 대한 것이다.
- [0032] 일 구현예에서, 본 발명의 항암용 약학적 조성물은 항암제를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 시스플라틴(cisplatin), 파클리탁셀(paclitaxel), 빈크리스틴(vincristine), 토폠테칸(topotecan), 도세탁셀(docetaxel), 5-플루오로우라실(5-FU), 글리벡(gleevec), 카보플라틴(carboplatin), 두아노루비신(daunorubicin), 발루비신(valrubicin), 플로타미드(flutamide), 젬시타빈(gemcitabine)로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 시스플라틴 또는 파클리탁셀인 것이 더욱 바람직하다.
- [0033] 일 구현예에서, 상기 암은 대장암, 유방암, 자궁암, 자궁경부암, 난소암, 전립선암, 뇌종양, 두경부암종, 흑색종, 골수종, 백혈병, 림프종, 위암, 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 골암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부흑색종, 안구내흑색종, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직육종, 요도암, 음경암, 중추신경계(central nervous system; CNS) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수종양, 다형성교모세포종 및 뇌하수체선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 다형성교모세포종(Glioblastoma multiforme, GBM)인 것이 가장 바람직하다.
- [0034] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본원발명의 핵산을 포함하는 조성물의 투여로 암세포의 사멸 또는 암의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0035] 일 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효용성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방

법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 단백질을 0.0001 내지 10 중량 %로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량 %를 포함한다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0041] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.

[0042] 본 발명의 약학 조성물은 암 및 이의 합병증의 예방 또는 치료에 이용될 수 있으며, 항암보조제로도 사용될 수 있다.

[0044] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0046] **실시예 1. 이중 표적 siRNA 제작**

[0047] STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 및 mTOR(mammalian target of rapamycin)를 동시에 억제할 수 있는 이중 표적 siRNA (double strand)를 하기 표 1의 서열로 제작하였다 (Bioneer, Daejeon, Korea).

표 1

siRNA	서열 (5'→3')	서열번호
antisense_mTOR	gactgtggcatccacctgcat	1
antisense_STAT3	atgcaggtaggcgcctcagtc	2

[0049] 상기 서열번호 1 및 2로 이루어진 21mer의 siRNA는 21mer 중 18mer가 상보적이며 (도 1의 구조), 두 서열이 double strand 형태로 세포 내로 들어간 뒤, 서열번호 1의 siRNA (antisense_mTOR)가 mTOR mRNA(gi|206725550|ref|NM_004958.3| Homo sapiens mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase) (MTOR), mRNA)의 표적 부위 (도 2의 붉은 글씨로 표기된 핵산 부위)에 상보적으로 결합하고, 서열번호 2의 siRNA (antisense_STAT3)가 STAT mRNA(gi|47080104|ref|NM_139276.2| Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor) (STAT3), transcript variant 1, mRNA)의 표적 부위 (도 3의 붉은 글씨로 표기된 핵산 부위)에 상보적으로 결합하여 mTOR 및 STAT3 유전자 발현을 감소시킨다.

[0051] **실시예 2. 이중 표적 siRNA를 포함하는 shRNA 제작**

[0052] 상기 실시예 1에서 제작한 이중 표적 siRNA를 세포 내에서 발현할 수 있게 하기 위하여, 상기 siRNA 이중 가닥의 서열과 루프 서열을 포함하는 shRNA들 (TTGGATCCAA 루프 shRNA 및 TTCAAGAGAG 루프 shRNA)을 제작하였다 (표 2). 제작한 shRNA들을 각각 pE3.1 벡터 (도 4)의 제한효소 Pst I 및 EcoRV 절단 위치에 U7 프로모터 (서열번호 7) 이후에 오도록 배치하여, mTOR 및 STAT3를 표적으로 하는 이중 표적 siRNA를 포함하는 두 종의 shRNA를

세포 내에서 발현할 수 있는 제조합 발현 벡터를 제작하였다.

표 2

[0053]	mTOR 및 STAT3 이중 표적 shRNA	서열 (5'→3')	서열번호
	TTGGATCCAA loop shRNA	gactgtggcatccacctgcatTTGGATCCAAatgcaggtaggcgcctcagtcTT	8
	TTCAAGAGAG loop shRNA	gactgtggcatccacctgcatTTCAAGAGAGatgcaggtaggcgcctcagtcTT	9

[0054]

[0055] 실험예 1. 이중 표적 siRNA의 mTOR 및 STAT3 유전자 발현 억제 효과 확인

[0056] 12웰 플레이트에 Hela 세포를 분주한 뒤, 세포 confluent가 50%가 될 때까지 10% FBS (Hyclone 사)가 첨가된 RPMI 배지 (Hyclone 사)에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 그 후, 상기 세포에 상기 실시예 1에서 제작한 이중 표적 siRNA를 lipofectamine3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 트랜스펙션하여 mTOR 및 STAT3를 동시에 낮추었다. 트랜스펙션 48시간 후, 세포를 과쇄하여 GeneJET RNA Purification Kit (Invitrogen)로 총 RNA를 추출하였다. 추출한 총 RNA를 주형으로 사용하여 RevoScript™ RT PreMix (iNTRON BIOTECHNOLOGY)로 역전사 반응을 수행하였다. 역전사된 cDNA를 25 내지 200ng 함유한 시료 20μl와 AmpONE taq DNA polymerase (GeneA11) 및 TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems)를 이용하여 mTOR (Hs00234522_m1), STAT3 (Hs01047580_m1) 및 GAPDH (Hs02758991_g1)에 대하여 Real-time PCR 반응을 수행하였다. Real-time PCR 반응 조건은 [50℃에서 2분, 95℃에서 10분, 및 95℃에서 15초 및 60℃에서 60초의 두 단계 사이클]을 총 40 사이클로 수행하였다. 모든 반응은 3회씩 반복수행되고 이들의 평균값이 취해졌다. 이렇게 얻은 결과들은 하우스키핑 유전자인 GAPDH의 mRNA 값에 대해 정규화하였다.

[0057] 그 결과, 이중 표적 siRNA에 의해 mTOR는 잔여 발현이 약 30%, STAT3는 잔여 발현이 약 10% 정도인 결과 확인되어, 이중 표적 siRNA가 두 유전자 모두 동시에 발현 억제하는 것을 알 수 있었다 (도 5).

[0059] 실험예 2. mTOR 및 STAT3의 유전자 상호 발현 영향성 확인

[0060] 인간 폐암세포주 A549에 상기 실험예 1에서와 같이, lipofectamine3000을 이용하여 하기 표 3의 mTOR siRNA (bioneer, 1058906) (서열번호 3 및 4), STAT3 siRNA (bioneer, 1145658) (서열번호 5 및 6) 또는 mTOR siRNA 와 STAT3 siRNA를 동시에 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 48시간 후 상기 실험예 1에서와 같이 Real time PCR (Taqman)을 이용하여 mTOR 및 STAT3 유전자의 발현 감소 비율을 확인하였다.

표 3

[0061]		서열 (5'→3')	서열번호	
	mTOR siRNA	sense strand	GUGGAAACAGGACCCAUGA(dTdT)	3
		antisense strand	UCAUGGGUCCUGUUCCAC(dTdT)	4
	STAT3 siRNA	sense strand	UGUUCUCUGAGACCCAUGA(dTdT)	5
		antisense strand	UCAUGGGUCUCAGAGAACA(dTdT)	6

표 4

	mTOR	std dev	STAT3	std dev
nc2	1.0000	0.318658	1.0000	0.287738516
simTOR	0.1980	0.076805	1.0705	0.251995803
siSTAT3	1.0507	0.40253	0.6074	0.120361215
simTOR&S	0.3174	0.046248	0.4022	6.7987E-17

[0062]

[0063] 그 결과, 각각의 siRNA에 의해 mTOR 및 STAT3의 발현이 감소하였으며, 이 결과를 두 siRNA를 동시에 처리한 경우와 비교한 결과, mTOR 유전자 및 STAT3 유전자의 발현은 상호간에 영향을 주지 않았다 (도 6 및 표 4).

[0065] **실험예 3. 이중 표적 siRNA에 의한 암세포 사멸 효과 확인**

[0066] 본원발명의 이중 표적 siRNA에 의한 암세포에 대한 사멸 효과를 확인하기 위하여, 인간 폐암세포주 A549 세포를 96-웰 플레이트에 5×10^3 cell/웰로 분주한 뒤, lipofectamine3000으로 mTOR siRNA, STAT3 siRNA 및 이중 표적 siRNA (mTOR 및 STAT3 동시 낙다운)을 각각 세포에 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 48시간 후, 추가로 24시간 뒤에 5mg/mL MTT (Promega, Ltd.)를 세포에 처리하고 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 배지를 제거하고 가용화 용액(solubilization solution) 및 정지 용액(stop solution) 150 μ l을 처리하고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 인큐베이션 하였다. 반응 용액의 흡광도를 570nm에서 측정하고 하기 수학적식을 이용하여 세포 생존율을 계산하였다.

수학적식 1

[0067] **세포생존율 = 실험군 흡광도 (570nm) / 대조군 흡광도 (570nm) × 100 (%)**

[0068] 그 결과, mTOR를 단독으로 억제하였을 때, 세포 생존율이 약 17% 감소하였으며, STAT3을 단독으로 억제하였을 때, 세포 생존율이 약 21% 감소하였으며, 본원발명의 이중 표적 siRNA로 mTOR 및 STAT3를 동시에 억제하였을 때, 세포 생존율이 약 30% 감소하여 두 유전자를 동시에 억제할 때 암세포 사멸효과가 향상된 것을 확인하였다 (도 7).

[0070] **실험예 4. 이중 표적 siRNA와 항암제 병용 처리에 의한 암세포 사멸 효과 확인**

[0071] 4-1. 시스플라틴(cisplatin)과의 병용 처리

[0072] 인간 폐암세포주 A549 세포를 96-웰 플레이트에 5×10^3 cell/웰로 분주한 뒤, lipofectamine3000으로 mTOR siRNA, STAT3 siRNA 및 이중 표적 siRNA (mTOR 및 STAT3 동시 낙다운)을 각각 세포에 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 48시간 후, 시스플라틴 10 μ M을 처리하고 12시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 상기 실험예 3에서와 같이 MTT 반응을 수행하고, 이의 흡광도를 570nm에서 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

[0073] 그 결과, 시스플라틴과의 병용 처리에서, mTOR의 단독 억제시, 세포 생존율이 약 33% 감소하였고, STAT3의 단독 억제에서는, 세포 생존율이 약 42% 감소하였으며, 본원발명의 이중 표적 siRNA에 의해 mTOR 및 STAT3가 동시에 억제 되었을 때에는 세포 생존율이 약 65%까지 감소하여, 항암제와의 병용 처리에서도 두 유전자를 동시에 억제 할 때 세포사멸효과가 현저히 향상되는 것을 알 수 있었다 (도 8).

[0075] 4-2. 파클리탁셀(paclitaxel)과의 병용 처리

[0076] 인간 폐암세포주 A549 세포를 96-웰 플레이트에 5×10^3 cell/웰로 분주한 뒤, lipofectamine3000으로 mTOR siRNA, STAT3 siRNA 및 이중 표적 siRNA (mTOR 및 STAT3 동시 낙다운)을 각각 세포에 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 48시간 후, 파클리탁셀 0.25 μ M을 처리하고 12시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 상기 실험예 3에서와 같이 MTT 반응을 수행하고, 이의 흡광도를 570nm에서 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

[0077] 그 결과, 파클리탁셀과의 병용 처리에서, mTOR의 단독 억제시, 세포 생존율이 약 50% 감소하였고, STAT3의 단독 억제시, 세포 생존율이 약 48% 감소하였으며, 본원발명의 이중 표적 siRNA에 의해 mTOR 및 STAT3가 동시에 억제 되었을 때에는 세포 생존율이 약 70%까지 감소하여, 파클리탁셀과의 병용 처리에서도 두 유전자를 동시에 억제 할 때 세포사멸효과가 현저히 향상되는 것을 알 수 있었다 (도 9).

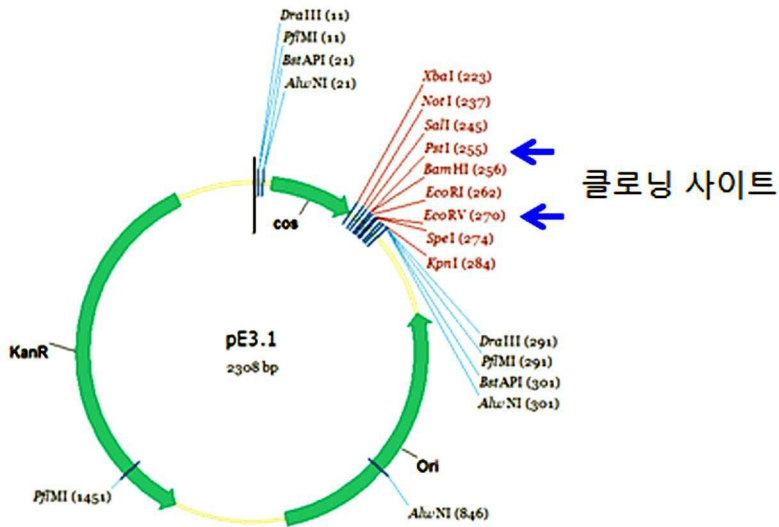
[0079] **실험예 5. 이중 표적 siRNA를 포함하는 shRNA의 mTOR 및 STAT3 억제 효과**

[0080] 상기 실시예 2에서 제작한 서열번호 8의 TTGGATCCAA 루프 shRNA 서열 또는 서열번호 9의 TTCAAGAGAG 루프 shRNA를 포함하는 벡터를 lipofectamine3000을 이용하여 A549 세포에 각각 0, 1 및 2 μ g씩 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 48시간 후, 실험예 1에 기재된 Real time PCR 분석 방법을 이용하여 mTOR와 STAT3의 유전자 발현 감소 정도를 확인하였다.

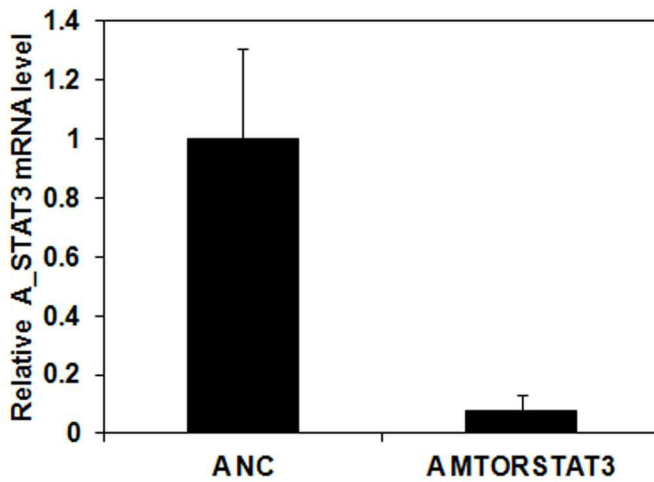
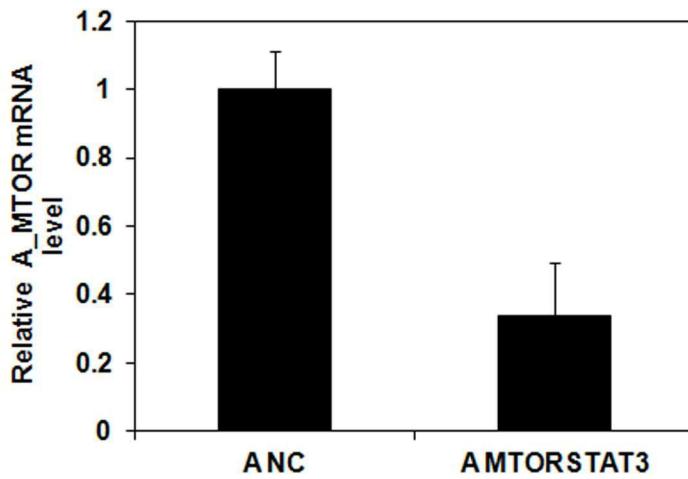
[0081] 그 결과, mTOR 및 STAT3의 발현은 본원발명의 이중 표적 siRNA를 포함하는 두 종의 shRNA 모두에서 감소하였으며, shRNA의 DNA 양에 비례하여 20% 정도까지 감소하는 경향을 나타냈다 (도 10).

[0083]

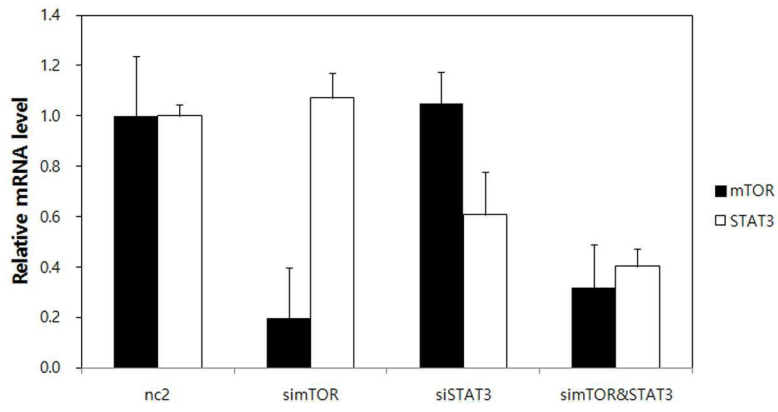
도면4



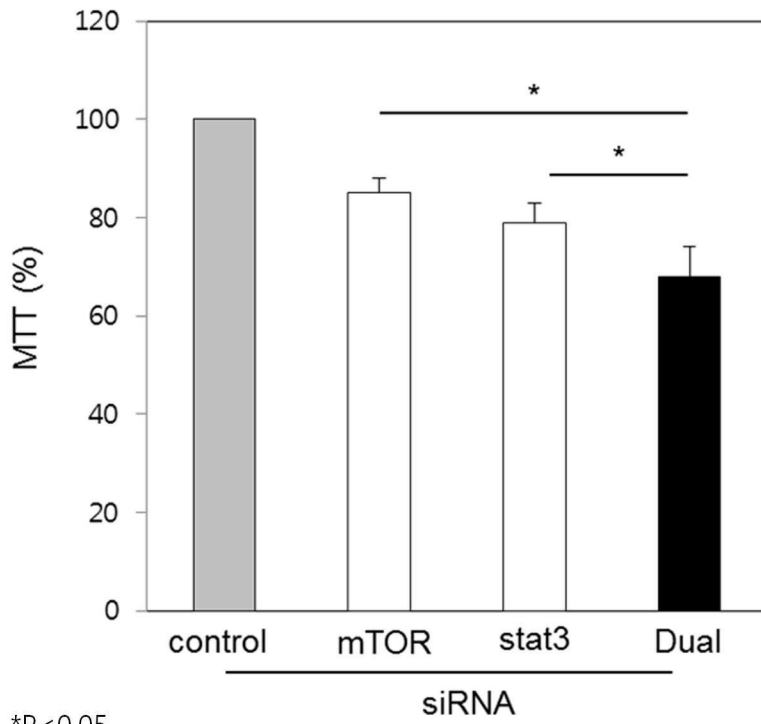
도면5



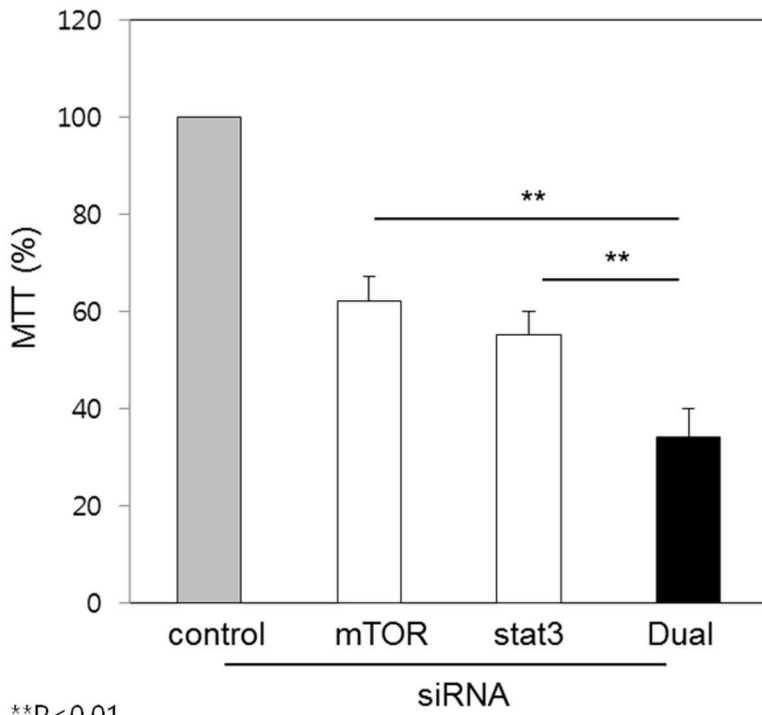
도면6



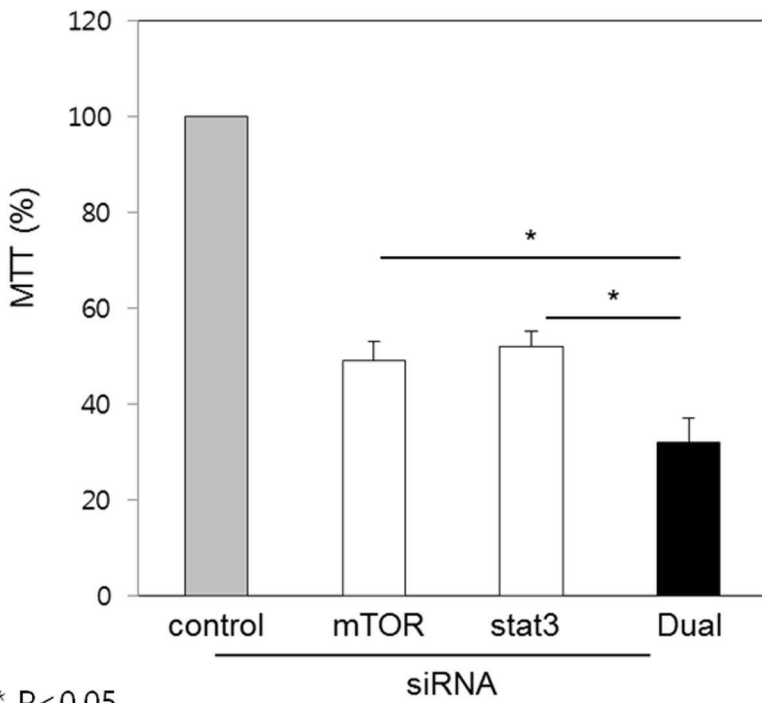
도면7



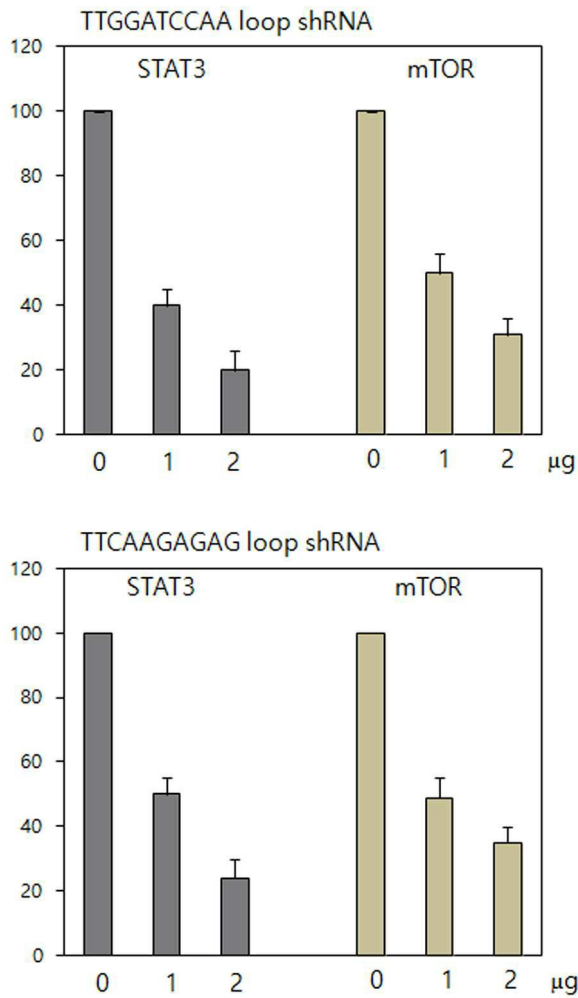
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Nucleic acids for simultaneous inhibition of mTOR gene and STAT3 gene
- <130> PN1612-467-
- <160> 9
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> antisense_mTOR
- <400> 1
- gactgtggca tccacctgca t
- <210> 2

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense_STAT3

 <400> 2
 atgcaggtag ggcctcagt c 21
 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTOR siRNA_sense strand
 <400> 3
 guggaaacag gacccaugad tdt 23
 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTOR siRNA_antisense strand
 <400> 4
 ucaugggucc uguuuccacd tdt 23
 <210> 5

 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> STAT3 siRNA_sense strand
 <400> 5
 uguucucuga gacccaugad tdt 23
 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> STAT3 siRNA_antisense strand
 <400> 6

ucaugggucu cagagaacad tdt 23
 <210> 7
 <211> 276
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> U7 promotor
 <400> 7

cctagagtgc aactagata acaacatagg agctgtgatt ggctgttttc agccaatcag 60
 cactgactca ttgcatagc ctttacaagc ggtcacaaac tcaagaaacg agcggtttta 120
 atagtctttt agaatattgt ttatcgaacc gaataaggaa ctgtgctttg tgattcacat 180
 atcagtggag ggggtgtggaa atggcacctt gatctcacc tcatcgaaag tggagttgat 240
 gtccttcctt ggctcgtac agacgcactt ccgcaa 276
 <210> 8
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TTGGATCCAA loop shRNA
 <400> 8

gactgtggca tccacctgca ttggatcca aatgcaggta ggcgcctcag tctt 54
 <210> 9
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TTCAAGAGAG loop shRNA
 <400> 9

gactgtggca tccacctgca tttcaagaga gatgcaggta ggcgcctcag tctt 54