



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0012095
(43) 공개일자 2013년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/711 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01) C12N 7/01 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0056965
(22) 출원일자 2011년06월13일
심사청구일자 2011년06월13일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)
(72) 발명자
송재진
서울특별시 서대문구 성산로 250 연세대 의과대학
암연구소 러들로 교수동 330
김주향
서울특별시 양천구 목동동로 339, 라 C-1207 (목동, 목동트윈빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 10 항

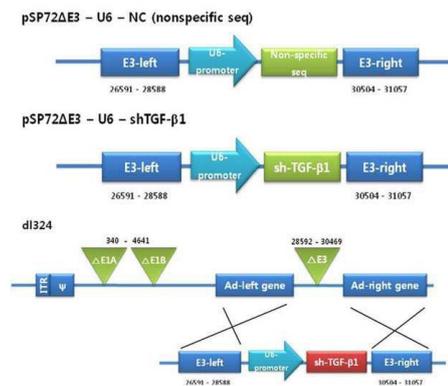
(54) 발명의 명칭 **TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA**

(57) 요약

본 발명은 TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA를 이용한 항종양 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

오세은

서울특별시 서대문구 성산로 250 연세대 의과대학
암센터 암연구소

김소영

서울특별시 서대문구 성산로 250 연세대 의과대학
암센터 암연구소

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열을 표적서열로 하고, TGF- β 1 발현을 억제하는 shRNA.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 shRNA.

청구항 3

제 1 항의 shRNA를 유효성분으로 함유하는 항종양 조성물.

청구항 4

제 1 항의 shRNA 발현하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

서열번호 5로 표시되는 탑 스트랜드(top strand)와, 서열번호 6으로 표시되는 바텀 스트랜드(bottom strand)를 포함하는 DNA를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

서열번호 7로 표시되는 탑 스트랜드(top strand)와, 서열번호 8로 표시되는 바텀 스트랜드(bottom strand)를 포함하는 DNA를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 7

제 4 항에 있어서,

U6 프로모터를 함유하는 벡터에 DNA를 재조합시켜 수득하는 재조합 발현벡터.

청구항 8

제 4 항에 있어서,

pSP72/E3-sh-human TGF- β 1 또는 pSP72/E3-sh-mouse TGF- β 1인 재조합 발현벡터.

청구항 9

제 4 항의 재조합 발현벡터를 유효성분으로 하는 항종양 조성물.

청구항 10

제 4 항의 재조합 발현벡터를 도입한 아데노바이러스.

명세서

기술분야

본 발명은 TGF- β 1 발현을 억제하는 shRNA 및 이를 포함하는 항종양 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0002] TGF-β1은 세포독성 T 세포, 자연살해 세포, 그리고 마크로파아지 등의 증식과 분화를 억제하여 점점 자라나고 있는 종양에 대한 면역 탐색을 저해. 뿐만 아니라 TGF-β1은 다기능의 분비단백질로 세포의 형태와 시기에 따라 증식 억제, 복제, 침윤, 전이, 세포사멸, 면역 탐색, 그리고 혈관 생성 등 다양한 역할을 수행한다[Jakowlew, Cancer Metastasis Rev. 25: 435, 2006]. TGF-β1 신호경로를 비활성화시키거나 혹은 세포주기의 비정상적 조절 등에 기인하여 TGF-β1에 의한 증식 억제 작용에 저항성이 생기게 되는 종양이 진행(progression)되는 후기에 이르게 되면 TGF-β1은 종양을 더욱 발전시키는 역할을 하게 된다. 따라서, 인체의 면역체계를 극복하고 증식한 종양세포들은 TGF-β1을 분비함으로써 면역감시로부터 자유로워지면서 동시에 증식과 침윤 전이 및 혈관 생성에 플러스 요인으로 작용하게 된다[Pardali and Moustakas, BBA, 1775: 21, 2007].

[0003] TGF-β1 관련 선행 기술로, 비특허문헌 1에서는 인간 TGF-β1의 코딩 서열 300-320번째 ggccgactactacgccaagga 와 974-994번째 ggcctgcccctacatttga 염기서열을 타겟으로 shRNA를 제작하여 발현 벡터에 도입하였으나, 이들의 TGF-β1 억제율은 저조하였다(20%도 되지 않음).

[0004] 또한, 비특허문헌 2에는 5'-GATCCCGTTTAACTTGAGCCTCAGCAGCGCAGCTTCAAGAGAGCTGCGTCTGCTGAGGCTCAAGTTAAATTTTTCCAAA-3' 과 같은 센스와 안티센스 서열을 이용하여 9개의 루프(loop)를 가지는 TGF-β1 shRNA를 만들어 MDA-MB-435 세포에서 안정한 세포주(stable cell line)를 만들어 TGF-β1의 침묵(silencing)을 유도하였으나 타겟 염기서열의 효능(efficacy)이나 비특이성 정도는 파악되지 않았다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) “Inhibition of TGF-β1 expression in human peritoneal mesothelial cells by pcDU6 vector-mediated TGF-β1 shRNA” Nephrology 11: 23-28, 2006
 (비특허문헌 0002) "Silencing of Transforming Growth Factor-β1 In situ by RNA Interference for Breast Cancer: Implications for Proliferation and Migration In vitro and Metastasis In vivo “ Clin Cancer Res2008Aug1;14(15):4961-70.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구 노력한 결과, 인간 TGF-β1 또는 마우스 TGF-β1의 침묵(silencing)을 효과적으로 유도하는 타겟을 선정하여 shRNA를 제작하고, 이를 아데노바이러스에 탑재시켜 기존 비바이러스성 제제에 의한 siRNA의 전달능력을 획기적으로 개선시킴으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명은 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열을 표적서열로 하고, TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0008] 본 발명은 또한, 상기 shRNA를 유효성분으로 함유하는 항종양 조성물을 제공하는데 다른 목적이 있다.

[0009] 본 발명은 또한, 상기 shRNA 발현하는 재조합 발현벡터를 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

[0010] 본 발명은 또한, 상기 재조합 발현벡터를 유효성분으로 하는 항종양 조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

[0011] 본 발명은 또한, 상기 재조합 발현벡터가 도입된 아데노바이러스를 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서,
- [0013] 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열을 표적서열로 하고, TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서,
- [0015] 상기 shRNA를 유효성분으로 함유하는 항종양 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서,
- [0017] 상기 shRNA 발현용 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [0018] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서,
- [0019] 상기 재조합 발현벡터를 유효성분으로 하는 항종양 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서,
- [0021] 상기 재조합 발현벡터가 도입된 아데노바이러스를 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명은 TGF-β1 발현을 억제하는 새로운 shRNA를 제작하고, 유전자 전달체로 아데노바이러스를 사용하여 감염율을 증가시킴으로써 종래 기술에 비해 특이성, 전달능 및 발현억제능을 크게 향상시켰다.
- [0023] 즉, 본 발명에 의해 TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA를 함유하는 항종양 조성물이 제공된다. 특히, 대부분의 암 세포에서 전달효율성이 뛰어난 아데노바이러스에 표적성을 부여함으로써 모든 암에 적용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 E3 서플 벡터인 pSP72/△E3/si-negative 벡터를 나타낸 것이다.
- 도 2는 TGF-β1 shRNA가 서플 벡터로 서브클로닝(subcloning)된 후 아데노바이러스 백본인 dl324와 상동 재조합하는 과정의 모식도이다.
- 도 3은 BJ5183 박테리아에서 상동 재조합된 콜로니의 선별을 PCR로 확인한 것이다.
- 도 4는 HindIII 소화 패턴(digestion pattern)으로 최종 재조합된 콜로니를 선별 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] RNA 간섭(RNA interference, RNAi)은 표적 유전자의 발현을 선택적으로 억제하는 천연의 매커니즘이다. 서열 특이적 mRNA 분해의 매개자는 보다 긴 ds RNA로부터 리보뉴클레아제 III의 절단에 의해 생산된 19~23 뉴클레오타이드의 작은 간섭 RNA이다. 세포질의 RISC(RNA-induced silencing complex)는 siRNA에 결합하고 그 siRNA 중 한 가닥에 상보적인 서열을 포함하는 mRNA의 분해를 지시한다. 포유동물에서 RNA 간섭의 적용은 치료 유전자 침묵(silencing)의 효능을 가지고 있다. siRNA의 장점에도 불구하고 siRNA는 시험관내에서 제조되어야 하고 녹다운 유전자를 통상적으로 6 내지 10일 동안 일시적 형질감염에 의해 전달되어야 한다는 점에서 임상 적용하는데 제한을 가지고 있다. 본 발명의 shRNA(small-hairpin RNA) 발현 시스템이 전술된 단점을 해결할 수 있다.
- [0026] shRNA는 1본쇄 RNA에서 부분적으로 회문상(回文狀)의 염기서열을 포함함으로써, 분자 내에서 2본쇄 구조를 가지고 헤어핀과 같은 구조가 되는 약 20염기 이상의 분자이다.
- [0027] 본 발명은 TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA에 관한 것으로, 하기 서열을 표적서열로 하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 마우스 표적서열: 5'-CCCTCTACAACCAACACAACCCGGG-3' [서열번호 1]
- [0029] 인간 표적서열: 5'-ACCAGAAATACAGCAACAATTCCTG-3' [서열번호 2]
- [0030] 본 발명에서 TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA는 TGF-β1 유전자의 일부에 상보적인 서열을 가지고, TGF-β1 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있다. 상보성이 80~90%인 경우에는 mRNA의 번역을 억제할 수 있고,

100%인 경우에는 mRNA를 분해시킬 수 있다.

- [0031] 따라서, 본 발명에서 TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA는 마우스 mRNA의 1022번째 뉴클레오타이드에, 인간 mRNA의 512번째 뉴클레오타이드에 대한 상보적인 서열에 대하여 80%, 바람직하게는 90%, 특히 바람직하게는 100% 상동성을 갖는 염기서열을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0032] 한 양태로서, 마우스 shRNA는 서열번호 1에 나타난 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지고, 인간 shRNA는 서열번호 2에 나타난 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어질 수 있다. 상기 각각의 염기서열과 그의 상보적인 염기서열은 4 내지 10 bp의 루프 영역에 의해 회문적으로(palindrom) 연결되어 헤어핀 구조를 형성하는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 shRNA의 구체적인 예로는 하기 서열을 포함할 수 있다:
- [0034] 서열번호 1의 마우스 표적서열으로 하는 shRNA: 5'-*CCUCUACAACCAACAACCCGGG*gucucCCC~~GGG~~UUGUGUUGGUUGUAGAGGG-3' [서열번호 3]
- [0035] 서열번호 2의 인간 표적서열을 위한 shRNA: 5'-*ACCAGAAUACAGCAACAAAUCCUG*gucucucCAGGAAUUGUGCUGGUAUUUCUGGUUU-3' [서열번호 4].
- [0036] RNAi에 의해 TGF-β1의 발현을 억제하는 물질로서는, 3'말단에 돌출부를 가지는 짧은 헤어핀 구조로 구성된 shRNA(short hairpin RNA)를 사용할 수도 있다.
- [0037] RNAi에 의해 TGF-β1의 발현을 억제하는 물질은, 인공적으로 화학 합성하여도 좋고, 센스가닥 및 안티센스가닥의 DNA 서열을 역방향으로 연결한 헤어핀 구조의 DNA를 T7 RNA 폴리머라제에 의해 실험실 조건(in vitro)에서 RNA를 합성하여 제작하여도 무방하다. 실험실 조건에서 합성하는 경우, T7 RNA 폴리머라제 및 T7 프로모터를 이용하여, 주형 DNA로부터 안티센스 및 센스 RNA를 합성할 수 있다. 이들을 실험실 조건에서 어닐링한 후, 세포에 도입하면 RNAi가 유발되어, TGF-β1의 발현이 억제된다. 세포에의 도입은 예를 들면, 인산칼슘법, 또는 각종 트랜스펙션 시약(예를 들면, oligofectamine, lipofectamine, 및 lipofection 등)을 이용한 방법에 의해 행할 수 있다.
- [0038] RNAi에 의해 TGF-β1의 발현을 억제하는 물질로서는, shRNA 또는 상기 DNA를 포함하는 발현벡터를 이용하여도 좋고, 상기 발현벡터를 함유하는 세포를 이용하여도 좋다. 상기 발현벡터나 세포의 종류는 특별히 한정되지 않으나, 이미 의약으로서 사용되고 있는 발현벡터나 세포가 바람직하다.
- [0039] 본 발명에서는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 표적서열로 하는 shRNA를 이용할 수 있다.
- [0040] 따라서, 본 발명은 상기 shRNA 발현용 재조합 발현벡터를 포함한다.
- [0041] 본 발명의 재조합 벡터는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 구성될 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 shRNA를 전달하기에 유용한 바이러스 (또는 바이러스 벡터)로는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노부속바이러스 등이 있으며, 종양에서와 같이 한시적인 발현 유도가 필요한 이유로 아데노바이러스가 바람직하다.
- [0043] 아데노바이러스에 상기 shRNA를 도입하기 위하여, shRNA 서열을 근거로 하여 하기 DNA를 제작할 수 있다.
- [0044] <마우스 표적서열에 대한 DNA>
- [0045] 탑 스트랜드: 5'-gatc GCTCTACAACCAACAACCCGGG tctc CCCGGGTGTGTTGGTTGTAGAGGG tttt-3' [서열번호 5]
- [0046] 바텀 스트랜드: 5'-agtcaaaa CCCTCTACAACCAACAACCCGGG gaga CCCGGGTGTGTTGGTTGTAGAGGG-3' [서열번호 6]
- [0047] <인간 표적서열에 대한 DNA>
- [0048] 탑 스트랜드: 5'-gatcc GCCAGAAATACAGCAACAATTCTCTG tctctc CAGGAATTGTTGCTGTATTCTCTGGT tttttt a-3' [서열번호 7]
- [0049] 바텀 스트랜드: 5'-agcctt aaaaaa ACCAGAAATACAGCAACAATTCTCTG gagaga CAGGAATTGTTGCTGTATTCTCTGGT g-3' [서열번호 8]
- [0050] 또한, 본 발명에서 shRNA를 전달하기에 유용한 비바이러스 벡터로는 전술한 바이러스 벡터를 제외한 통상적으로

유전자 요법에 사용되는 모든 벡터를 의미하며, 그러한 예로는 진핵세포에서 발현 가능한 다양한 플라스미드 및 리포솜 등이 있다.

- [0051] 한편, 본 발명에서 TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA는 전달된 세포에서 적절히 전사되기 위하여 적어도 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 것이 바람직하다. 상기 프로모터는 진핵세포에서 기능할 수 있는 프로모터라면 어떤 것이든지 무방하나, U6 프로모터가 RNA 중합효소 III로서 small size RNA를 생성하는데 유리한 이유로 특히 바람직하다. TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA의 효율적인 전사를 위하여 필요에 따라 리더 서열, 폴리아데닐화 서열, 프로모터, 인핸서(enhancer), 업스트림(upstream) 활성화 서열, 시그널 펩타이드 서열 및 전사 종결인자를 비롯한 조절서열을 추가로 포함할 수도 있다.
- [0052] 여기서, 이용된 용어 "작동 가능하게 연결된"이란 핵산 서열간의 결합이 기능적으로 연관되어 있는 것을 의미한다. 임의의 핵산서열이 작동 가능하게 연결된 경우는 임의의 핵산서열이 다른 핵산서열과 기능적으로 관련성을 가지도록 위치해 있는 경우이다. 본 발명에 있어서, 임의의 전사 조절서열이 shRNA의 전사에 영향을 미치는 경우, 상기 전사 조절서열이 상기 shRNA와 작동 가능하게 연결되어 있다고 말한다.
- [0053] 또한, 본 발명은 상기 서열번호 1 또는 2의 TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA, 서열번호 3의 센스 올리고뉴클레오티드와 서열번호 4의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 조합으로 구성되는 DNA 또는 서열번호 5의 센스 올리고뉴클레오티드와 서열번호 6의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 조합으로 구성되는 DNA 또는 이를 발현하는 재조합 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 항종양 조성물에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명의 항종양 조성물의 투여경로는 특별히 한정되지 않고, 경구 투여 또는 비경구 투여(예를 들면, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 점막 투여, 직장내 투여, 질내 투여, 환자예의 국소 투여, 피부투여 등)의 어느 하나의 투여경로에 의해 투여하여도 좋다. 경구 투여에 적당한 제제형태로서는 고형 또는 액체의 형태가 가능하고, 비경구 투여의 적당한 제제형태로서는 주사제, 점적제, 좌제, 외용제, 점안제, 점비제 등의 형태가 가능하다. 본 발명의 항종양 조성물은 그 제제형태에 의해, 필요에 따라 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 함유하여도 좋다. 약학적으로 허용 가능한 첨가제의 구체적인 예로서는, 예를 들면, 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 향산화제, 보존제, 안정화제, 등장화제, 착색제, 교미제, 희석제, 유화제, 현탁화제, 용매, 충전제, 증량제, 완충제, 송달 담체, 캐리어, 부형제 및/또는 약학적 어쥬번트 등을 들 수 있다.
- [0055] 경구용 고형제제 형태의 본 발명의 항종양 조성물로서는, 예를 들면, 유효성분에 부형제를 가하고, 아울러, 필요에 따라서, 결합제, 붕해제, 활택제, 착색제 또는 교미제 등의 제제용 첨가물을 가한 후, 통상의 방법에 따라, 정제, 과립제, 산제, 캡슐제로서 조제할 수 있다. 경구용 액체 제제형태의 본 발명의 항종양 조성물로서는, 유효성분에, 교미제, 안정화제, 또는 보존제 등의 제제용 첨가물 1종 또는 2종 이상을 가하고, 통상의 방법에 따라, 내복액제, 시럽제, 엘릭실제 등으로서 조제할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 항종양 조성물을 액체 제제로서 처방하기 위하여 사용되는 용매로서는, 수성 또는 비수성의 어느 것도 무방하다. 액체제제는 당해 분야에 주지된 방법에 의해 조제할 수 있다. 예를 들면, 주사제는 생리식염수, PBS와 같은 완충액, 멸균수 등의 용제에 용해시킨 후, 여과지 등으로 여과멸균하고, 이어서 멸균용기(예를 들면, 앰플 등)에 충전하여 조제할 수 있다. 이 주사제에는 필요에 따라, 관용의 약학적 캐리어를 포함하여도 무방하다.
- [0057] 또한, 비침습적인 카테터를 이용하는 투여방법을 사용하여도 좋다. 본 발명에서 사용할 수 있는 캐리어로서는, 중성, 완충화 생리식염수, 또는 혈청알부민을 포함하는 생리식염수 등을 들 수 있다.
- [0058] TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA 발현벡터 등 유전자 송달에 관해서는, 적용되는 세포 내에서 TGF-β1 발현을 억제하는 shRNA 또는 shRNA 발현벡터를 발현시키는 한, 특별히 방법은 한정되지 않으나, 예를 들면, 바이러스 벡터, 리포솜을 이용한 유전자 도입을 이용하는 것이 가능하다. 바이러스 벡터로서는, 예를 들면, 레트로바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 신린셈리키 바이러스 등의 동물바이러스를 들 수 있다.
- [0059] RNAi에 의해 TGF-β1 발현을 억제하는 물질은 세포에 직접 주입하여도 무방하다.
- [0060] 본 발명의 항종양 조성물의 유효성분은 치료학적 유효량으로 사용하며, 상기 조성물의 투여량은 사용 목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들면, 유효성분으로서 성인 1 kg 당 약 1×10^{10} particles 내지 1×10^{12} particles 이다. 본 발명의 항종양 조성물의 투여빈도는, 예를 들면, 1일 1회 내지 수개월에 1회이면 좋다.
- [0061] 본 발명의 shRNA는 TGF-β1 발현을 억제하므로, 본 발명의 약제학적 조성물은 종양과 관련된 다양한 질병 또는

질환, 예컨대 뇌암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 식도암, 췌장암, 방광암, 전립선암, 대장암, 결장암 및 자궁경부암 등의 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.

[0062] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0063] **실시예 1: shRNA 제조-TGF-β1의 침묵(silencing)을 효과적으로 유도하는 타겟 선정**

[0064] 본 발명은 TGF-β1의 침묵(silencing)을 유도하기 위하여, 센스 25 mer/안티센스 25~27 mer(4 개 혹은 6 개 염기를 가지는 루프를 가운데에 포함)에 근거한 shRNA를 제작하고 아데노바이러스에서 발현시키기 위해 서플렉터에 도입하고 상동 재조합(homologous recombination) 바이러스를 제작하였다.

[0065] shRNA TGF-β1의 특이성 검증을 위하여, 스크램블드(scrambled) shRNA를 가지는 서플렉터도 동시에 제작하였다. 종래 방법에 비하여 특이성과 발현억제능이 크게 향상되었다.

[0066] 이를 위해, TGF-β1의 shRNA 최소 10 nM에서 마우스의 TGF-β1 mRNA를 75% 이상 억제하는 효과가 있는 siRNA를 실시간 PCR 방법을 통해 확보하였다.

[0067] 이를 위해 마우스의 siRNA는 피부암세포인 NIH3T3, 인간의 siRNA는 자궁암세포인 HeLa 세포주를 사용하여 shRNA를 만든 다음, 트랜스펙션시키고 48시간이 지난 후 감소되는 정도를 조사하였다.

[0068] 실험방법은 다음과 같다.

[0069] 실시간 RT-PCR로 여러 가지 종류의 후보 shRNA 10nM을 NIH3T3에 트랜스펙션하고 48시간 배양 후, 확인(validation)을 통하여 마우스 TGF-β1에 대해 11개의 shRNA 스크리닝 결과 타겟에 해당되는 shRNA에서 76.51% 침묵(silencing) 효과를 확인하였다.

[0070] 실시간 RT-PCR을 위하여, 정방향 프라이머로는 5'-TTGCTCAGCTCCACAGAGA-3' [서열번호 9]과 역방향 프라이머로는 5'-TGGTGTAGAGGGCAAGGAC-3' [서열번호 10]이며, 반응조건은 다음과 같이 수행하였다.

[0071] 1 단계: 역전사(42 °C 5 min, 95 °C 10 sec),

[0072] 2 단계: PCR 반응 (95 °C 5 sec, 60 °C 20 sec) 50 cycles,

[0073] 3 단계: 분리(60 °C -> 95 °C)로 수행하였다.

[0074] 확인(validation) 실험 결과, 10개의 표적서열 후보 중 중 표 1에 근거하여 하기 타겟을 선정하였다.

[0075] 마우스 표적서열: 5'-CCCTCTACAACCAACACAACCCGGG-3' [서열번호 1]

표 1

[0076]

ShRNA	프라이머	ct ¹⁾	Δct ²⁾	ΔΔct ³⁾	2-ΔΔct ⁴⁾	발현억제율(% ⁵⁾
대조군- Trp53 ⁶⁾	actin	16.58				
	Trp53	26.50	9.92	2.30	0.20	79.69
	TGF-β1	27.05	10.47			
TGF-β1 shRNA	actin	16.41				
	TGF-β1	28.97	12.56	2.09	0.23	76.51

[0077] 1) ct: cycle threshold, saturation에 도달되는데 걸리는 cycle 수, 작을수록 원래 mRNA양이 많은 것임

[0078] 2) Δct: TGF-β1용 ct에서 actin용 ct를 뺀 값

[0079] 3) ΔΔct: TGF-β1 shRNA 처리 샘플의 Δct에서 대조군의 TGF-β1 Δct를 뺀 값

- [0080] 4) $2-\Delta\Delta ct$: 2의 마이너스 지수 $\Delta\Delta ct$ 값
- [0081] 5) 발현억제율: $2-\Delta\Delta ct$ 를 백분율로 표시한 것임
- [0082] 6) Trp53: positive control shRNA
- [0083] 상기 표적서열에 대하여 25/27 +4 루프를 가지는 shRNA를 합성하고 이들의 표적서열에 대한 억제 효과를 실시간 PCR로 확인하였다.
- [0084] 마우스 표적서열(5'-CCCTCTACAACCAACACAACCCGGG-3'으로 하는 shRNA: 5'-CCUCUACAACCAACACAACCCGGGucucCCCGGUUGUGUUGGUUAGAGGG-3' [서열번호 7]
- [0085] 앞서 설명한 실시간 PCR 에 의해 선정된 10번 염기서열을 아데노바이러스에서 발현시키기 위해 양 끝단에 BamHI 과 HindIII 염기 사이트를 삽입하고 중간에 tctc의 4개의 염기를 가지는 루프(loop)를 가지게끔 제작하였다. 즉, 마우스 shRNA의 기본적인 구조는 5'-25 mer- 루프(4 mer)-25mer-3'으로 구성되어 있다.
- [0086] 이에 근거하여 아데노바이러스에 도입시키기 위한 하기 2가닥의 DNA를 제작하였다.
- [0087] 탑 스트랜드: 5'-gatc GCCTCTACAACCAACACAACCCGGG tctc CCCGGGTGTGTTGGTTGTAGAGGG tttt - 3' [서열번호 3]
- [0088] 바텀 스트랜드: 5'-agtcaaaa CCCTCTACAACCAACACAACCCGGG gaga CCCGGGTGTGTTGGTTGTAGAGGG-3' [서열번호 4]
- [0089] 특히, 탑 스트랜드의 첫 siRNA 만 G로 치환하였다(전사체의 항상 목적, 최종 siRNA는 동일).
- [0090] 인간 TGF-β1 억제를 위한 실시간 PCR용 프라이머는 다음과 같다.
- [0091] 정방향 프라이머: 5'-CAAGGGCTACCATGCCAACT- 3' [서열번호 11]
- [0092] 역방향 프라이머: 5'-AGGGCCAGGACCTTGCTG- 3' [서열번호 12]
- [0093] 반응조건은 ~1 단계: 역전사(42 °C 5 min, 95 °C 10 sec),
- [0094] 2 단계: PCR 반응 (95 °C 5 sec, 60 °C 20 sec) 50 cycles,
- [0095] 3 단계: 분리(60 °C → 95 °C)로 수행하였다.
- [0096] 확인(validation) 실험 결과, 3개의 표적서열 후보 중 표 2에 근거하여 하기 타겟을 선정하였다
- [0097] 인간 표적서열: 5'-ACCAGAAATACAGCAACAATTCCTG-3' [서열번호 2]

표 2

ShRNA	프라이머	ct	Δct	$\Delta\Delta ct$	$2-\Delta\Delta ct$	발현억제율(%)
Luci ¹⁾	act in	19.4				
	vim	22.08	2.68			
	TGF-β 1	29.9	10.5			
vim ²⁾	act in	18.47				
	vim	25.25	6.78	4.1	0.058315	94.1685438
TGF-β 1 shRNA	act in	18.66				
	TGF-β 1	32.44	13.78	3.28	0.102949	89.70511228

- [0099] 1) Luci: negative control shRNA
- [0100] 2) vim: positive control shRNA
- [0101] 상기 표적서열에 대하여 25/27 +6 루프를 가지는 shRNA를 합성하고 이들의 표적서열 에 대한 억제 효과를 실시간 PCR로 확인하였다.
- [0102] 인간 표적서열(5'-ACCAGAAATACAGCAACAATTCCTG-3'을 위한 shRNA: 5'-ACCAGAAUACAGCAACA AUUCUGucucucCAGAAUUGUUGCUGGUUUUCUGGUUUU -3' [서열번호 8]

- [0103] 앞서 설명한 실시간 PCR 에 의해 선정된 2번 염기서열을 아데노바이러스에서 발현시키기 위해 양 끝에 BamHI 과 HindIII 염기사이트를 삽입하고 중간에 tctctc의 6개의 염기를 가지는 루프를 가지게끔 제작하였다. 즉, 인간 shRNA의 기본 구조는 5'-25 mer-루프(6 mer)-27mer-3'으로 구성되어 있다.
- [0104] 이에 근거하여 아데노바이러스에 도입시키기 위한 하기 2가닥의 DNA를 제작하였다.
- [0105] 탑 스트랜드: 5'-gatcc GCCAGAAATACAGCAACAATTCCTG tctctc CAGGAATTGTTGCTGTATTCTGGT tttttt a-3' [서열번호 5]
- [0106] 바텀 스트랜드: 5'-agcctt aaaaa ACCAGAAATACAGCAACAATTCCTG gagaga CAGGAATTGTTGCTGTATTCTGGT g-3' [서열번호 6]
- [0107] 특히, 탑 스트랜드의 첫 siRNA만 G로 치환하였다(전사체의 항상 목적, 최종 siRNA는 동일).
- [0108] **실시예 2: 타겟 서열에 대한 shRNA 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 벡터 제작**
- [0109] 실시간 RT-PCR을 통하여 확인된 가장 효과적으로 발현을 억제하는 siRNA 염기서열을 센스와 안티센스 서열이 tctc 혹은 tctctc를 사이에 두고 위치하게 하고, 양 끝에 BamHI 과 HindIII 제한효소 염기서열을 가진 염기로 구성된 올리고뉴클레오티드와 상보적인 올리고뉴클레오티드를 각각 합성하여 합체(annealing)시킨 뒤, E3 서플 벡터인 pSP72/ Δ E3/si-negative 벡터[도 1, pSP72 cloning 벡터(Promega)에 아데노바이러스 E3L(26591-28588)과 E3R(30504-31057)을 삽입한 플라스미드에 Ambion사의 psilencer 2.1-U6 hygrownd에서 -EcoRI-U6 promoter + -BamHI-nonsense shRNA 용 염기서열인 ggatcc actaccgttg ttataggtgt tcaagagaca cctataacaacggtagtttt ttggaaaagcctt-HindIII가 들어간 형태의 pSP72 deltaE3/si negative (scrambled)]를 먼저 BamHI과 HindIII 처리 후, 삽입시켜 pSP72/E3-sh-human TGF- β 1 또는 pSP72/E3-sh-mouse TGF- β 1을 제작하였다[도 2]. 음성 대조군 아데노바이러스로는 양끝에 BamHI과 HindIII를 가지게 하고 스크램블드(scrambled) 염기서열 (actaccgttgttataggtgt)과 loop(ttcaagaga) 제작하였다.
- [0110] 아데노바이러스의 E3 부위 PCR로 양성 클론(#1, 5, 8, 13, 14, 15)만을 선별한 후[도 3], 도 4에 보듯이 Hind III 소화패턴(digestion pattern)으로 최종 재조합체를 선별하였다.
- [0111] 상기의 방법으로 제작된 E3 서플 벡터들을 각각 XmnI 제한효소로 처리하여 단일가닥으로 만든 다음, SpeI 제한 효소를 처리하여 단일가닥이 된 복제 불능 아데노바이러스인 d1324와 함께 대장균 BJ5183에서 동시에 형질 전환시켜 유전자 상동 재조합을 유도하였다(복제 가능 아데노바이러스에 shRNA를 제작하는 경우에는 shRNA에 의한 억제 효과와 세포 lysis 효과가 혼재되어 있어 억제 효과만을 명확하게 확인하기 어렵기 때문에 복제 불능 아데노바이러스를 제작하였다).
- [0112] 상동 재조합된 플라스미드 DNA를 수득하여 HindIII 제한효소로 처리하여 DNA 패턴의 변화를 확인하고 최종적으로 서열 분석하여 상동 재조합 유무를 확인한 후, 확인된 플라스미드들을 PacI으로 절단한 뒤 293 세포주에 형질 전환하여 siRNA TGF- β 1를 발현하는 복제불능 아데노바이러스를 제작하였다. 이 아데노바이러스는 293세포주에서 증식시켜 CsCl 변화도(gradient)로 농축하여 한계 희석배양법(limiting dilution) 또는 용균반검사(plaque assay)로 바이러스의 역가를 결정하였다.
- [0113] 최종 바이러스 역가(virus titer)는 한계 희석 적정법(limiting dilution titration)에 의해 2.0×10^9 pfu/ml 이었다.
- [0114] **실시예 3: 암세포에서의 효과 확인-shRNA 발현하는 아데노바이러스에 의한 TGF- β 1 발현 억제 확인**
- [0115] 1) 실시간 RT-PCR로 확인
- [0116] TGF- β 1 발현 억제 확인은 마우스 피부암 세포인 B16F10에 100 moi와 500 moi로 감염시켜 2일 후, RNA를 뽑아 실시간 RT-PCR로 발현 억제 효과를 확인하였다.
- [0117] 마우스 TGF- β 1 억제를 위한 실시간 PCR용 프라이머는 정방향 프라이머: 5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3' [서열번호 9]과 역방향 프라이머: 5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3' [서열번호 10]를 사용하였으며, AB powerSYBR Green RNA-to-Ct 1step kit를 사용하여 RT enzyme mix(125X) 0.2 μ l, RT-PCR Mix(2x) 12.5 μ l, Forward Primer(100 pM) 0.5 μ l, reverse Primer(100 pM) 0.5 μ l, RNA(10ng/ μ l) 5 μ l, Nuclease-free water 6.3 μ l로 총 부피는

25 μ l가 되게 하였다.

[0118] 반응 조건은 다음 표 3과 같다.

표 3

[0119]

Step	Temp(°C)	Duration	Cycles
RT step	48	30min	Hold
Enzyme Activation	95	10min	Hold
Denature	95	15sec	40
Anneal/Extend	60	1min	

[0120] 마우스 TGF- β 1 shRNA 확인 결과, 500 moi에서 98%의 침묵(silencing) 효과를 관찰하였다[표 4].

표 4

[0121]

ShRNA	프라이머	ct	Δ ct	$\Delta \Delta$ ct	2- $\Delta \Delta$ ct	발현억제율(%)
Cell-1 ¹⁾	actin	15.45				
	Mouse TGF- β 1	28.66	13.21			
Nc-1 ²⁾ 100 moi	actin	15.27				
	Mouse TGF- β 1	28.42	13.15	-0.06	1.04246576	-4.24657608
Nc-1 500 moi	actin	15.12				
	Mouse TGF- β 1	28.48	13.36	0.15	0.90125046	9.87495374
Mouse TGF- β 1 shRNA 100 moi	actin	15.94				
	Mouse TGF- β 1	33.6	17.66	4.45	0.04575268	95.42473220
Mouse TGF- β 1 shRNA 500 moi	actin	15.52				
	Mouse TGF- β 1	34.49	18.97	5.76	0.01845301	98.15469897

[0122] 1) Cell-1: 바이러스를 처리하지 않은 세포

[0123] 2) Nc-1 : Scrambled shRNA sequence가 삽입된 아데노바이러스

[0124] TGF- β 1 발현 억제 확인은 인간 전립선암 세포인 DU-145에 1 내지 200 moi로 감염시켜 2일 후, 트리졸(Trizol)로 세포를 라이시스(lysis)시키고, 클로로포름, 이소프로판올, 에탄올 등을 연속적으로 처리하여 RNA를 수확한 후 TGF- β 1 mRNA 발현억제 정도를 실시간 PCR로 확인하였다

[0125] 인간 TGF- β 1 억제를 위한 실시간 PCR용 프라이머는 정방향 프라이머: 5'-CAAGGGCTACCATGCCAACT-3' [서열번호 11]과 역방향 프라이머: 5'-AGGGCCAGGACCTTGCTG-3' [서열번호 12]를 사용하였으며, AB powerSYBR Green RNA-to-Ct 1step kit를 사용하여 RT enzyme mix(125X) 0.2 μ l, RT-PCR Mix(2x) 12.5 μ l, Forward Primer(100 pM) 0.5 μ l, reverse Primer(100 pM) 0.5 μ l, RNA(10ng/ μ l) 5 μ l, Nuclease-free water 6.3 μ l로 총 부피는 25 μ l가 되게 하였다.

[0126] 반응 조건은 다음 표 5와 같다.

표 5

[0127]

Step	Temp(°C)	Duration	Cycles
RT step	48	30min	Hold
Enzyme Activation	95	10min	Hold
Denature	95	15sec	40
Anneal/Extend	60	1min	

[0128] 인간 TGF-β1 shRNA 확인 결과에서도 shRNA TGF-β1을 발현하는 200 moi의 아데노바이러스에서 98%의 침묵 (silencing) 효과를 관찰하였다[표 6].

표 6

[0129]

shRNA	프라이머	ct	Δct	Δ Δct	2-Δ Δct	발현억제율(%)
대조군	actin	19.25				
	human TGF-β1	25.45	6.2			
NC ¹⁾ 1moi	actin	19.55				
	human TGF-β1	25.66	6.11	-0.09	1.06437018	-6.43701825
NC 5moi	actin	19.21				
	human TGF-β1	25.35	6.14	-0.06	1.04246576	-4.24657608
NC 10 moi	actin	19.71				
	human TGF-β1	26.08	6.37	0.17	0.88884268	11.11573188
NC 50 moi	actin	19.85				
	human TGF-β1	57.75	5.9	-0.3	1.23114441	-23.11444133
NC 100 moi	actin	19.39				
	human TGF-β1	25.95	6.56	0.36	0.77916458	22.08354203
NC 200 moi	actin	19.99				
	human TGF-β1	26.46	6.47	0.27	0.82931955	17.06804542
human TGF-β1 shRNA 1 moi	actin	19.18				
	human TGF-β1	26.07	6.89	0.69	0.61985385	38.01461500
human TGF-β1 shRNA 5 moi	actin	18.98				
	human TGF-β1	26.65	7.67	1.47	0.36098230	63.90177011
human TGF-β1 shRNA 10 moi	actin	19.18				
	human TGF-β1	27.37	8.19	1.99	0.25173889	74.82611125
human TGF-β1 shRNA 50 moi	actin	19.28				
	human TGF-β1	28.25	8.97	2.77	0.1660437	85.33956313
human TGF-β1 shRNA 100 moi	actin	19.53				
	human TGF-β1	29.19	9.66	3.46	0.09087328	90.91267177
human TGF-β1 shRNA 200 moi	actin	19.24				
	TGF-β1	31.14	11.9	5.7	0.01923663	98.07633685

[0130] 1) NC: Scrambled shRNA sequence가 삽입된 아데노바이러스

[0131] 2) ELISA로 확인

[0132] 상기한 아데노바이러스 100 moi 와 500 moi 감염 후 2일 동안 마우스 흑색종 암 세포인 B16F10에 배양하면서 마지막 24 시간은 무혈청 배지로 분비된 TGF-β1 양을 측정하였다.

[0133] TGF-β1의 shRNA를 발현하는 아데노바이러스를 감염시켰을 때 대조군에 비해서 최대 20배 이상 분비되는 양이 감소하였다[표 7].

표 7

[0134]

샘플	Values ¹⁾	Outliers ²⁾	Result ³⁾	MeanResult ⁴⁾	Std.Dev. ⁵⁾	CV% ⁶⁾	*Dilution Factor*1.3 (pg/ml) ⁷⁾
Mouse adeno/shRNA TGF-β1 100 moi-1	0.026	Outlier	0.021	0.023	0.008	32.5	29.9
Mouse adeno/shRNA TGF-β1 100 moi-2	0.022	Outlier	0.017				
Mouse adeno/shRNA TGF-β1 100 moi-3	0.036		0.031				
Mouse adeno/shRNA TGF-β1 500 moi-1	0.018	Outlier	0.013	0.013	0.001	8.2	16.9
Mouse adeno/shRNA TGF-β1 500 moi-2	0.019	Outlier	0.014				
Mouse adeno/shRNA TGF-β1 500 moi-3	0.017	Outlier	0.012				
adeno/shRNA negative 100 moi-1	0.22		0.223	0.21	0.013	6	273
adeno/shRNA negative 100 moi-2	0.196		0.198				
adeno/shRNA negative 100 moi-3	0.207		0.209				
adeno/shRNA negative 500 moi-1	0.237		0.241	0.245	0.01	4.1	318.5
adeno/shRNA negative 500 moi-2	0.252		0.256				
adeno/shRNA negative 500 moi-3	0.234		0.238				
cell only-1	0.192		0.194	0.215	0.021	9.8	279.5
cell only-2	0.232		0.235				
cell only-3	0.198		0.2				
cell only-4	0.227		0.23				

[0135]

1) Value: TGF-β1 단백질이 0일 때의 optical density를 0로 했을 때의 optical density

[0136]

2) Outliers: standar curve를 위한 TGF-β1 단백질의 range 밖에 존재하는 경우

[0137]

3) result: standard curve에서 계산된 보정된 optical density

[0138]

4) mean value: 3회 값의 평균

[0139]

5) std Dev: 표준편차

[0140]

6) cv %: coefficient value

[0141]

7) dilution factor: 배지 내의 TGF-β1 활성시키기 위해 HCL 첨가 후 중성화 위해 HEPES 넣는 양의 비율 1.3(mouse) 만큼 곱해줌.

[0142]

마우스와 마찬가지로 인간 염기서열에 대한 아데노바이러스를 전립선 암세포인 DU-145에 5, 10, 50, 100 moi로 감염시킨 후 2일 동안 배양하면서 마지막 24 시간은 무혈청 배지로 분비된 TGF-β1 양을 측정하였다.

[0143]

아데노바이러스를 감염시켰을 때 대조군에 비해서 50 moi에서 최소 8배 감소하였고, 500 moi에서 거의 완전히 억제되어 측정이 불가하였다[표 8].

표 8

[0144]

샘플	Value	Result	Mean Result	SD	CV	Dilution factor *1.4 (pg/ml) ¹⁾	Ave ²⁾
adeno/shRNA negative 5 moi	0.256	0.127	0.217	0.127	58.6	165.1	
	0.547	0.307				399.1	294.2
	0.447	0.245	0.245	0	0	318.5	
adeno/shRNA negative 10 moi	0.523	0.292	0.307	0.026	8.5	379.6	
	0.522	0.291				378.3	398.7
	0.596	0.337				438.1	
adeno/shRNA negative 50 moi	0.546	0.306	0.244	0.055	22.5	397.8	
	0.403	0.218				283.4	316.3
	0.385	0.206				267.8	
adeno/shRNA negative 100 moi	0.444	0.243	0.243	0	0	315.9	
	0.445	0.244	0.254	0.015	5.7	317.2	325.9
	0.479	0.265				344.5	
human adeno/shRNA TGF-β 1 5 moi	0.341	0.179	0.152	0.025	16.1	232.7	
	0.265	0.132				171.6	197.2
	0.284	0.144				187.2	
human adeno/shRNA TGF-β 1 10 moi	0.218	0.103	0.098	0.004	4.5	133.9	
	0.208	0.097				126.1	127.4
	0.203	0.094				122.2	
human adeno/shRNA TGF-β 1 50 moi	0.085	0.021	0.02	0.001	6.8	27.3	
	0.082	0.019				24.7	40.4
	0.439	0.24	0.24	0	0	312	
human adeno/shRNA TGF-β 1 100 moi	0.046	-0.003	-0.003	0.004	128.5	-3.9	
	0.053	0.001				1.3	-4.3
	0.039	-0.008				-10.4	

[0145]

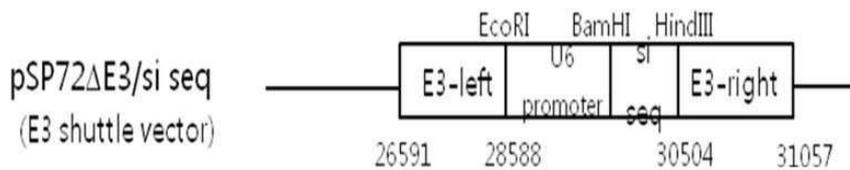
1) dilution factor: 배지 내의 TGF-β1 활성시키기 위해 HCL 첨가 후 중성화 위해 HEPES 넣는 양의 비율 1.4 (human) 만큼 곱해줌

[0146]

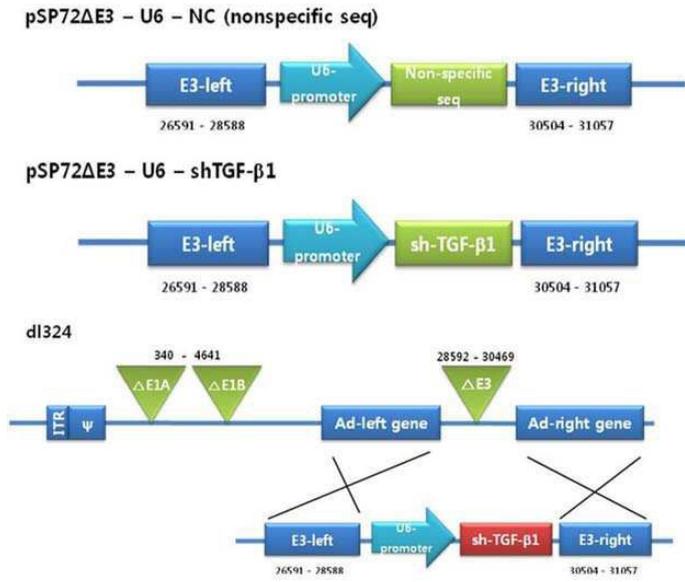
2) Ave: 평균 분비된 TGF-β1양

도면

도면1



도면2



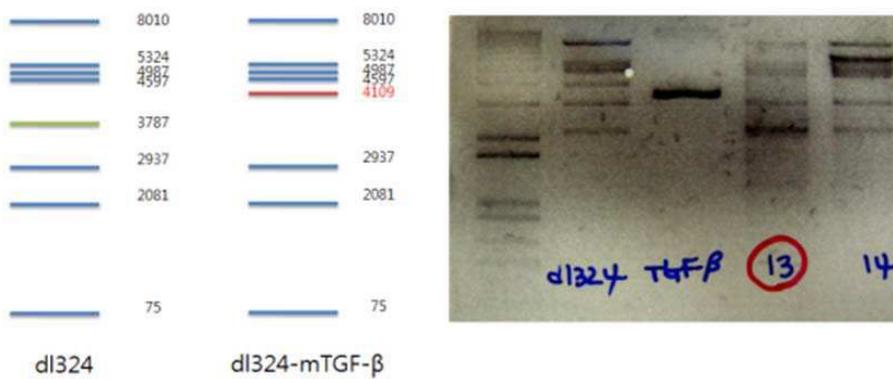
도면3

mTGFβ1 E3 PCR



도면4

HindIII Pattern



서열 목록

<110>	Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University	
<120>	The shRNA downregulating TGF-beta1 for treatment of tumor	
<160>	12	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse target sequence	
<400>	1	
	ccctctacaa ccaacacaac cggg	25
<210>	2	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	human target sequeunce	
<400>	2	
	accagaaata cagcaacaat tcctg	25
<210>	3	
<211>	54	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse shRNA	
<400>	3	
	cccucuacaa ccaacacaac ccgggucucc ccggguugug uugguuguag aggg	54
<210>	4	
<211>	59	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	human shRNA	
<400>	4	
	accagaaaua cagcaacaau uccugucucu ccaggaauug uugcugguau uucugguuu	59
<210>	5	

<211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse top strand
 <400> 5
 gatcgctct acaaccaaca caaccgggt ctccccgggt tgtgttggt gtagagggt 60

 tt 62
 <210> 6
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse bottom strand
 <400> 6
 agtcaaaacc ctctacaacc aacacaacc ggggagacc ggttgtgtt gttgtagag 60
 gg 62
 <210> 7
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human top strand
 <400> 7
 gatccgccag aaatacagca acaattctg tctctcagg aattgttct gttttctgg 60

 ttttttta 68
 <210> 8
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human bottom strand
 <400> 8
 agcttaaaaa aaccagaaat acagcaaca ttctggaga gacaggaatt gttgctgtat 60
 ttctggtg 68
 <210> 9
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse forward primer
 <400> 9
 ttgcttcagc tccacagaga 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse reverse primer
 <400> 10
 tggttgtaga gggcaaggac 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human forward primer
 <400> 11
 caagggtac catgccaact 20

<210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human reverse primer
 <400> 12
 agggccagga ccttgctg 18