

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0088445  
(43) 공개일자 2020년07월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/86* (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)  
*C12N 5/0775* (2010.01) *C12N 5/09* (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/86* (2013.01)  
*A61K 31/7088* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7017952  
(22) 출원일자(국제) 2018년11월21일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2020년06월22일  
(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/001439  
(87) 국제공개번호 WO 2019/102268  
국제공개일자 2019년05월31일  
(30) 우선권주장  
62/589,764 2017년11월22일 미국(US)
- (71) 출원인  
메조블라스트 인터내셔널 에스에이알엘  
스위스 메이린 1217 루트 드 프리-보아 20
- (72) 발명자  
브링크, 피터  
미국 뉴욕주 10017 씨/-505 5번가 3층  
코헨, 아이라  
미국 뉴욕주 10017 씨/-505 5번가 3층  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
이처영, 장제환

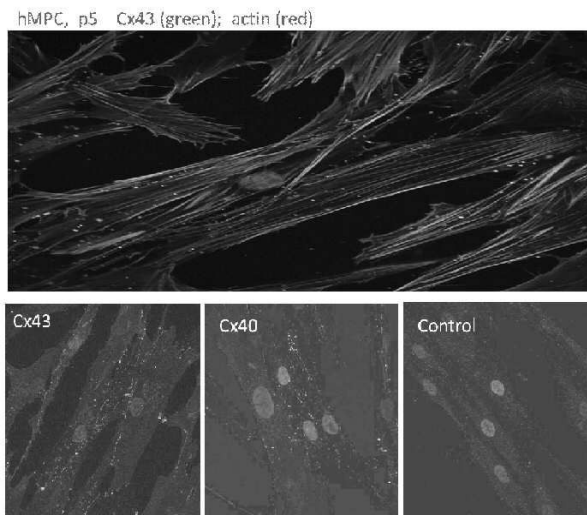
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 세포 조성물 및 치료 방법 I

## (57) 요약

본 발명은 핵산 또는 이를 발현하는 벡터를 도입하도록 변형된 세포 조성물에 관한 것이다. 이러한 조성물은 핵산을 표적세포에 전달하고 암과 같은 질병을 치료하는 데 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

**A61P 35/00** (2018.01)  
**C12N 15/113** (2013.01)  
**C12N 5/0663** (2013.01)  
**C12N 5/0693** (2013.01)  
**C12N 2310/14** (2013.01)  
**C12N 2501/65** (2013.01)  
**C12N 2750/14141** (2013.01)

(72) 발명자

**린, 리차드**

미국 뉴욕주 10017 씨/-505 5번가 3층

**도로닌, 세르게이**

미국 뉴욕주 10017 씨/-505 5번가 3층

**포타포바, 이리나**

미국 뉴욕주 10017 씨/-505 5번가 3층

**발리우나스, 버지니저스**

미국 뉴욕주 10017 씨/-505 5번가 3층

**드바인, 덴**

미국 뉴욕주 10017 씨/-505 5번가 3층

**샌드라사그라, 앤서니**

미국 뉴욕주 10017 씨/-505 5번가 3층

**로이조스, 닉**

미국 뉴욕주 10017 씨/-505 5번가 3층

**이테스쿠, 질비우**

호주, 빅토리아 3000, 멜버른, 55 콜린스  
스트리트, 레벨 38

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

표적세포를  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  및  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  및  $\beta 3$ 으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 중간엽 계통 전구체(mesenchymal lineage precursor) 또는 줄기세포와 접촉하는 단계를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 표적세포 내로 전달하는 방법으로서, 상기 세포는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 벡터를 도입하도록 변형되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 2

$\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  및  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  및  $\beta 3$ 으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 중간엽 계통 전구체(mesenchymal lineage precursor) 또는 줄기세포를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 세포는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 플라스미드를 도입하도록 변형되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 3

$\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  및  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  및  $\beta 3$ 으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 중간엽 계통 전구체(mesenchymal lineage precursor) 또는 줄기세포를 포함하는 조성물로서, 상기 세포는 억제성 올리고뉴클레오티드를 도입하도록 변형되거나 억제성 올리고뉴클레오티드를 발현하는 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 0.5 내지 5nM의 억제성 올리고뉴클레오티드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오티드를 포함하는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드의 길이는 약 12 내지 24개의 뉴클레오티드인 방법 또는 조성물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 RNA인 방법 또는 조성물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 안티센스 분자인 방법 또는 조성물.

#### 청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 shRNA, siRNA 또는 miRNA인 방법 또는 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 siRNA는 KIF11 siRNA 또는 PLK1 siRNA인 방법 또는 조성물.

#### 청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 5' 말단으로부터 800bp 내지 3,600bp 사이의 서열번호 1에 나타난 KIF11 mRNA 전사체에 결합하는 KIF11 siRNA인 방법 또는 조성물.

#### 청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 중 어느 하나에 나타난 핵산서열을 포함하는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드의 길이는 18 내지 22개의 뉴클레오타이드인 방법 또는 조성물.

#### 청구항 13

제8항에 있어서, 상기 miRNA는 miR-155, miR-155-inh, miR-181-B1, miR-15a, miR-16-1, miR-21, miR-34a, miR-221, miR-29a 및 let-7b로 구성된 군에서 선택되는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 14

제1항, 제2항 또는 제4항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 표적 세포를 사멸시키지만 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 생존력에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것을 발현하는 올리고뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입하도록 변형된 방법.

#### 청구항 15

제1항, 제2항 또는 제4항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 암 세포와 같은 표적세포에 억제성 올리고뉴클레오타이드를 전달하기 전에 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 사멸시키지 않는 것을 발현하는 억제성 올리고뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입하도록 변형된 방법.

#### 청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 또한 STRO-1을 발현하는 조성물 또는 방법.

#### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 실질적으로 STRO-1<sup>bri</sup>인 조성물 또는 방법.

#### 청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 다능성 세포(pluripotent cells)로부터 유래된 조성물 또는 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 다능성 세포는 유도만능줄기(induced pluripotent stem, iPS) 세포인 조성물 또는 방법.

#### 청구항 20

제1항에 있어서, 상기 접촉은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포가 표적세포와 간극 연결(gap junction)을 형성하는 것을 허용하는 조건 하에서 발생하고, 이에 의해 올리고뉴클레오타드는 간극 연결을 횡단함으로써 표적세포로 전달되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 간극 연결은 Cx40 또는 Cx43에 의해 형성되는 방법.

#### 청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드의 전달은 Cx43 이외의 메커니즘을 통해 이루어지는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 23

제1항 또는 제4항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적세포는 암 세포 또는 백혈구 세포인 방법.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 암 세포는 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 자궁경부암, 전립선암, 골육종 또는 흑색종 세포인 방법.

#### 청구항 25

제1항 또는 제4항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적세포는 세포융합 세포(syncytial cell)인 방법.

#### 청구항 26

제25항에 있어서, 상기 세포융합 세포는 심장근육 세포, 평활근 세포, 상피 세포, 결합조직 세포 또는 세포융합 암 세포인 방법.

#### 청구항 27

제3항 내지 제16항 또는 제22항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 암을 치료하는 방법.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 대상체의 암을 포함하는 암 세포에 의해 발현되는 코넥신(connexin)을 발현하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, 상기 코넥신(connexin)은 Cx40 또는 Cx43인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 30

제28항에 있어서, 대상체의 암을 포함하는 상기 암 세포는 Cx43을 발현하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 31

제2항, 제4항 내지 제16항 또는 제27항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 자궁경부암, 전립선암, 골육종 또는 흑색종으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 바이러스 벡터를 사용하여 올리고뉴클레오티드를 도입하도록 변형된 방법 또는 조성물.

#### 청구항 33

제32항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스(Lentivirus), 바쿨로바이러스(Baculovirus), 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus, AdV), 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated virus, AAV) 또는 이의 재조합 형태로 구성된 군에서 선택되는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 34

제32항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 AAV인 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 35

제32항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 재조합 AAV인 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 또한 CD46을 발현하는

것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 상에서 세포 표면 글리칸의 변형을 가져오도록 처리된 방법 또는 조성물.

#### 청구항 38

제37항에 있어서, 상기 처리는 중간엽 전구체 계통 세포 또는 줄기세포상의 세포-표면 글리칸을 변형시키는 조건 하에서 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 글리코실트라스페라제(glycosyltransferase)에 노출시키는 것을 포함하는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 외인성 글리코실트라스페라제(glycosyltransferase)에 노출되는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 40

제37항 또는 제38항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 글리코실트라스페라제(glycosyltransferase)를 암호화하는 핵산을 도입하도록 변형되었으며, 여기서 세포에서 글리코실트라스페라제의 발현은 생체 내 염증 부위에서 세포의 보유를 향상시키는 방법 또는 조성물.

#### 청구항 41

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 글리코실트라스페라제(glycosyltransferase)는 푸코실트라스페라제(fucosyltransferase), 갈락토실트라스페라제(galactosyltransferase) 또는 시알릴트라스페라제(sialyltransferase)인 방법 또는 조성물.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 상기 푸코실트라스페라제(fucosyltransferase)는 알파 1,3 푸코실트라스페라제 III, 알파 1,3 푸코실트라스페라제 IV, 알파 1,3 푸코실트라스페라제 VI, 알파 1,3 푸코실트라스페라제 VII 또는 알파 1,3 푸코실트라스페라제 IX와 같은 알파 1,3 푸코실트라스페라제인 방법 또는 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 핵산 또는 이를 발현하는 벡터를 도입하도록 변형된 세포 조성물에 관한 것이다. 이러한 조성물은 핵산을 표적세포에 전달하고 암과 같은 질병을 치료하는 데 사용될 수 있다.

#### 배경 기술

[0002] 단일 또는 이중가닥 또는 둘 다의 핵산은 코넥신(connexin) 단백질을 발현하도록 변형된 HeLa 세포 쌍에서 코넥신 단백질에 의해 형성된 간극 연결(gap junctions)을 통과하는 것으로 나타났다. 형광-태그된 올리고뉴클레오타이드의 공여세포(donor cell)로의 단일 전극 전달 및 간극 연결 매개 통신을 통해 표적세포로의 전달을 결정함

으로써 전달이 입증되었다.

[0003] 표적세포에 핵산을 전달하는 개선된 방법이 요구된다.

### 발명의 내용

[0004] 본 발명자들은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포가 표적세포로 높은 비율의 핵산 전달을 지시할 수 있음을 확인하였다. 본 발명자들은 또한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포가 암 세포에 핵산을 전달하여 암 세포 성장을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 놀랍게도, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 이러한 능력은 세포 사이에서 핵산의 전달에 관여하는 주요 단백질의 녹아웃에도 불구하고 유지된다.

[0005] 핵산을 표적세포로 전달하기 위해 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 사용하는 다른 이점은 세포가 표적조직을 향하도록 하는 능력이다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 이동 및 접착 능력은 그들을 이러한 목적에 특히 적합하게 만든다.

[0006] 따라서, 일 실시예에서, 본 발명은 올리고뉴클레오타이드를 표적세포 내로 전달하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 표적세포를  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  및  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  및  $\beta 3$ 으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 중간엽 계통 전구체(mesenchymal lineage precursor) 또는 줄기세포와 접촉하는 단계를 포함하며, 여기서, 상기 세포는 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 발현하는 벡터를 도입하도록 변형된다. 일 실시예에서, 접촉은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포가 표적세포와 간극 연결을 형성하는 것을 허용하는 조건 하에서 발생하고, 이에 의해 올리고뉴클레오타이드는 간극 연결을 횡단함으로써 표적세포로 전달된다. 일 실시예에서, 간극 연결은 Cx40 또는 Cx43에 의해 형성된다. 다른 실시예에서, 간극 연결은 Cx43에 의해 형성된다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드의 전달은 Cx43 이외의 메커니즘을 통해 이루어진다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 Cx40, Cx45, Cx30.3, Cx31 또는 Cx31.1에 의해 형성된 간극 연결을 횡단함으로써 전달될 수 있다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 엑소좀의 형성을 통해 전달될 수 있다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드의 전달은 세포 대 세포 접촉과 무관하다. 이 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드의 전달은 코넥신을 통해 발생하지 않는다.

[0007] 일 실시예에서, 표적세포는 암 세포 또는 백혈구이다. 예를 들어, 암 세포는 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 자궁경부암, 전립선암, 골육종 또는 흑색종 세포일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 세포융합 세포(syncytial cell)이다. 예를 들어, 세포융합 세포는 심장근육 세포, 평활근 세포, 상피 세포, 결합조직 세포 또는 세포융합 암 세포일 수 있다.

[0008] 다른 실시예에서, 본 개시는 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  및  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  및  $\beta 3$ 으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 중간엽 계통 전구체(mesenchymal lineage precursor) 또는 줄기세포를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 상기 세포는 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 발현하는 플라스미드를 도입하도록 변형된다.

[0009] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 대상체의 암을 포함하는 세포에 의해 또한 발현되는 코넥신을 발현한다. 일 실시예에서, 코넥신은 Cx40 또는 Cx43이다. 일 실시예에서, 대상체의 암을 포함하는 세포는 Cx43을 발현한다.

[0010] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 CD46을 발현한다.

[0011] 일 실시예에서, 암은 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 자궁경부암, 전립선암, 골육종 또는 흑색종으로 구성된 군에서 선택된다. 일 실시예에서, 상기 방법은 본 개시에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0012] 일 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 약 12-24개의 뉴클레오타이드 길이이다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 RNA이다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 분자이다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 shRNA이다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 siRNA이다. 일 실시예에서, siRNA는 KIF11 siRNA 또는 PLK1 siRNA이다. 다른 실시예에서, siRNA는 KIF11 siRNA이다.

[0013] 일 실시예에서, KIF11 siRNA는 서열번호 1(NCBI 참조번호 NM\_004523.3)에 나타난 바와 같이 KIF11 mRNA의 5'말단에 결합한다. 일 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 800bp 내지 3,600bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 900bp와 3,200bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 일 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 중 어느 하나에 나타난 바와



같은 핵산서열을 포함한다. 일 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 중 어느 하나에 나타난 바와 같은 핵산서열로 구성된다. 일 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 3에 나타난 바와 같은 핵산서열을 포함한다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 3에 나타난 바와 같은 핵산서열로 구성된다. 일 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 4에 나타난 바와 같은 핵산서열을 포함한다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 4에 나타난 바와 같은 핵산서열로 구성된다. 일 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 7에 나타난 바와 같은 핵산서열을 포함한다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 7에 나타난 바와 같은 핵산서열로 구성된다. 일 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 핵산을 포함한다. 서열번호 3, 4 또는 7 중 어느 하나에 나타난 바와 같은 핵산서열을 포함한다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 3, 4 또는 7 중 어느 하나에 나타난 바와 같은 핵산서열로 구성된다. 이들 실시예에서, 표적세포는 골암세포(bone cancer cell)일 수 있다. 일 실시예에서, 암은 육종일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 췌장암 세포일 수 있다. 일 실시예에서, 암은 췌장암일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 전립선암 세포일 수 있다. 일 실시예에서, 암은 전립선 암일 수 있다.

[0014] 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 중 어느 하나에 나타난 바와 같은 핵산서열을 포함한다. 일 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 중 어느 하나에 나타난 바와 같은 핵산서열로 구성된다. 일 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 8 또는 9에 나타난 바와 같은 핵산서열로 구성된다.

[0015] 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 18-22개의 뉴클레오타이드 길이이다. 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드는 miRNA이다. 일 실시예에서, miRNAs는 miR-155, miR-155-inh, miR-181-B1, miR-15a, miR-16-1, miR-21, miR-34a, miR-221, miR-29a, let-7b로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0016] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 표적세포를 사멸시키지만 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 생존력에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것을 발현하는 올리고뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입하도록 변형된다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 암 세포와 같은 표적세포에 억제성 올리고뉴클레오타이드를 전달하기 전에 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 사멸시키지 않는 것을 발현하는 억제성 올리고뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입하도록 변형된다.

[0017] 본 발명자들은 또한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포가 암 세포를 사멸 및/또는 암 세포 성장을 감소시키는 것으로 알려진 다양한 억제성 올리고뉴클레오타이드를 도입하도록 변형될 수 있음을 확인하였다. 놀랍게도, 이들 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 생존 가능하며 암 세포를 사멸 및/또는 세포 성장을 감소시키기에 충분한 수준으로 억제성 올리고뉴클레오타이드를 암 세포에 전달할 수 있다.

[0018] 따라서, 다른 실시예에서, 본 발명은  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  및  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  및  $\beta 3$ 으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 중간엽 계통 전구체(mesenchymal lineage precursor) 또는 줄기세포를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 상기 세포는 억제성 올리고뉴클레오타이드를 도입하도록 변형되거나 억제성 올리고뉴클레오타이드를 발현하는 벡터를 포함한다.

[0019] 일 실시예에서, 억제성 올리고뉴클레오타이드는 약 12-24개의 뉴클레오타이드 길이이다. 다른 실시예에서, 억제성 올리고뉴클레오타이드는 RNA이다. 다른 실시예에서, 억제성 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 분자이다. 다른 실시예에서, 억제성 올리고뉴클레오타이드는 shRNA이다. 다른 실시예에서, 억제성 올리고뉴클레오타이드는 siRNA이다. 다른 실시예에서, 억제성 올리고뉴클레오타이드는 18-22개의 뉴클레오타이드 길이이다. 다른 실시예에서, 억제성 올리고뉴클레오타이드는 miRNA이다. 일 실시예에서, miRNAs는 miR-155, miR-155-inh, miR-181-B1, miR-15a, miR-16-1, miR-21, miR-34a, miR-221, miR-29a, let-7b로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0020] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 또한 STRO-1을 발현한다. 따라서, 일 실시예에서, 본 발명은 올리고뉴클레오타이드를 표적세포 내로 전달하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 표적세포를 STRO-1 및  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  및  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  및  $\beta 3$ 으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포와 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 세포는 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 발현하는 벡터를 도입하도록 변형되었다. 다른 실시예에서, 본 개시는 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 STRO-1 및  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  및  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  및  $\beta 3$ 으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 세포는 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 발현하는 플라스미드를 도입하도록 변형되었다. 다른 실시예에서, 본 개시는 STRO-1 및  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  및  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  및  $\beta 3$ 으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 포함하는 조성물에 관한 것

으로, 상기 세포는 억제성 올리고뉴클레오타이드를 도입하도록 변형되거나 억제성 올리고뉴클레오타이드를 발현하는 벡터를 포함한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 실질적으로 STRO-1<sup>bri</sup>이다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 Cx40 또는 Cx43을 발현하도록 변형되지 않는다.

[0021] 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 예를 들어 암 세포와 같은 표적세포의 생존력을 감소시키기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 0.25 내지 5nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 0.5 내지 5nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 0.5 내지 4nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 0.5 내지 3.5nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0022] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 다능성 세포로부터 유래된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 유도만능줄기(induced pluripotent stem, iPS) 세포로부터 유래될 수 있다.

[0023] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 바이러스 벡터를 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 도입하도록 변형된다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 바콜로바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스(AdV), 아데노-관련 바이러스(AAV) 또는 이의 재조합 형태로 구성된 군에서 선택된다. 다른 실시예에서, 바이러스 벡터는 AAV이다. 다른 실시예에서, 바이러스 벡터는 재조합 AAV이다.

[0024] 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 상에서 세포 표면 글리칸의 변형을 가져오도록 처리되었다. 일 실시예에서, 처리는 중간엽 전구체 계통 세포 또는 줄기세포 상의 세포-표면 글리칸을 변형시키는 조건 하에서 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 글리코실트라스페라제(glycosyltransferase)에 노출시키는 것을 포함한다.

[0025] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 외인성 글리코실트랜스퍼라제(glycosyltransferase)에 노출된다.

[0026] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 글리코실트랜스퍼라제를 발현하도록 변형되었다. 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 글리코실트랜스퍼라제(glycosyltransferase)를 암호화하는 핵산을 도입하도록 변형되었으며, 여기서 세포에서 글리코실트랜스퍼라제의 발현은 생체 내 염증 부위에서 세포의 보유를 향상시킨다.

[0027] 일 실시예에서, 글리코실트랜스퍼라제는 푸코실트랜스퍼라제, 갈락토실트랜스퍼라제 또는 시알릴트랜스퍼라제이다. 일 실시예에서, 푸코실트랜스퍼라제는 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 III, 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 IV, 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 VI, 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 VII 또는 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 IX와 같은 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제이다.

[0028] 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원의 임의의 실시예는 다른 임의의 실시예에 필요한 부분만 약간 수정하여(*mutatis mutandis*) 적용되어야 한다.

[0029] 본 개시는 단지 예시의 목적으로 의도되었으며, 본 명세서에 기술된 특정 실시예에 의해 범위가 제한되지 않아야 한다. 기능적으로 동등한 생성물, 조성물 및 방법은 본원에 기술된 바와 같이 본 개시의 범위 내에 명확하게 포함된다.

[0030] 본 명세서 전체에서, 달리 구체적으로 언급되지 않거나 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성물, 단계의 군(group) 또는 물질의 조성물의 군(group)에 대한 언급은 하나 및 복수(즉, 하나 이상)의 그러한 단계들, 물질의 조성물들, 단계의 군들(groups) 또는 물질의 조성물들의 군을 포함하는 것으로 간주되어야 한다.

[0031] 이하에서, 비-제한적인 실시예 및 첨부 도면을 참조하여 본 개시를 설명한다.

## 도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 MPC (a) 및 MSC (b)가 간극 연결 단백질인 코넥신 Cx43 및 Cx40을 발현하는 것을 도시한다.

도 2는 패치 클램프(Patch clamp) 기술 - 기능적 간극 연결의 MPC 발현을 도시한다.

도 3은 스크리닝 패널(Screening Panel)의 중앙 라인에서 Cx43 발현을 도시한다.

도 4는 리포펙타민(1-1000nM 세포 외 농도)를 사용하여 시아닌 3 형광 표지된 siRNA로 형질주입된 MPC를 도시한다.

도 5는 (i) 간극 연결을 통한 Cy-5-MiR16의 (A) HeLa-Cx43 세포를 발현하는 GFP 및 (B) PANC-1 세포를 발현하는 GFP로의 Cy-5-MiR16의 MPCs 전달 및 (ii) PANC-1 세포를 발현하는 GFP로의 KIF11 siRNA의 MPC 전달을 도시한다.

도 6은 (a) KIF11 siRNA (100 nM) 로딩된 MPC 및 PANC-1 종양세포의 공동-배양 및 (b) KIF11 siRNA (500 nM) 로딩된 MPC 및 PANC-1 종양세포의 공동-배양을 도시한다.

도 7은 KIF11 siRNA (500 nM) 로딩된 MPC 및 SNUC2A 종양세포의 공동-배양을 도시한다.

도 8(a) 및 (b)는 KIF11 siRNA (500 nM) 로딩된 MPC 및 SAOS2 종양세포의 공동-배양을 도시한다.

도 9는 (A) Mir-16 (100 nM) 로딩된 MPC 및 PANC-1 종양세포의 공동-배양 및 (B) Mir-16 (100 nM) 로딩된 MPC 및 형질주입되지 않은 MPC의 공동-배양을 도시한다.

도 10은 (A) let7b (500 nM) 로딩된 MPC 및 PANC-1 (CRISP / Cas9 Cx43 KO) 또는 PANC-1의 공동-배양을 도시하며, let7b로 형질주입된 PANC-1 세포 및 형질주입되지 않은 PANC-1 세포의 성장을 또한 도시하고, (B) let7b로 형질주입된 MPC 및 형질주입되지 않은 MPC의 성장을 도시한다.

도 11은 (A) KIF11 siRNA (500 nM) 로딩된 MPC 및 PANC-1 (CRISP / Cas9 Cx43 KO) 또는 PANC-1의 공동-배양을 도시하며, 형질주입되지 않은 MPC와 PANC-1 (CRISP / Cas9 Cx43 KO) 세포의 성장을 또한 도시하고, (B) KIF11 siRNA (500 nM) 로딩된 MPC 및 형질주입되지 않은 MPC의 성장을 도시한다.

도 12는 KIF11 siRNA (500 nM) 로딩된 MPC 및 PANC-1 (CRISP / Cas9 Cx43 KO) 또는 PANC-1의 공동-배양, PANC-1 (CRISP / Cas9 Cx43 KO) 또는 PANC-1과 공동-배양된 형질주입되지 않은 MPC의 성장 및 KIF11로 형질주입된 PANC-1 (CRISP / Cas9 Cx43 KO)의 성장의 조합된 데이터를 도시한다.

도 13은 (A) Mir-34a (500 nM) 로딩된 MPC 및 PANC-1 (CRISP / Cas9 Cx43 KO) 또는 PANC-1의 공동-배양을 도시하며, 형질주입되지 않은 MPC와 PANC-1 세포 및 형질주입된 세포와 PANC-1 세포의 성장을 또한 도시하고, (B) Mir-34a (500 nM) 로딩된 MPC 및 형질주입되지 않은 MPC의 성장을 도시한다.

도 14는 (a) 5 일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 MPC의 사멸; 비표적화 siRNA, 사멸 siRNA, PLK1 siRNA 및 KIF11 siRNA로 형질주입된 MPC의 세포 수의 형광 분석, (b) 5 일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 MPC의 WST 분석을 도시한다.

도 15는 (a) 5 일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 PANC-1 세포의 사멸, (b) 5 일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 PANC-1 세포의 WST 분석을 도시한다.

도 16은 (a) 5 일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 PC3 세포의 사멸(II), (b) 5 일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 PC3 세포의 WST 분석을 도시한다.

도 17은 (a) 5 일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 SAOS2 세포의 사멸(II), (b) 5 일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 SAOS2 세포의 WST 분석을 도시한다.

도 18은 세포 사멸의 비교 분석 및 WST 분석 (MPC; PANC-1)을 도시한다.

도 19는 세포 사멸의 비교 분석 및 WST 분석 (PC3; SAOS2)을 도시한다.

도 20은 PC3 전립선 이종 이식편 종양 모델을 도시한다. 마우스는 KIF11에 대해 500nM siRNA를 로딩된 0.5 million MPC로(처리된) 또는 없는(대조군) 루시페라제를 발현하는 0.5 million PC3 세포로 전립선에 정위적으로(orthotopically) 이식되었다. 일주일 후, 마우스에 루시페린을 주사하고 종양을 시각화하기 위해 영상화하였다. 패널 (A)는 대조군 마우스를 나타내고 패널 (B)는 MPC 처리된 마우스를 나타낸다. 패널 (C)는 처리 및 처리되지 않은 마우스의 생존 곡선을 나타낸다.

도 21은 500 nM KIF11 (MPC / PANC-1 세포의 1/1 비율)로 형질주입된 MPC와의 공동-배양 후 총 (패널 A) 및 살

아있는 (패널 B) PANC-1 세포의 측정을 도시한다. 패널 A 및 B의 X 축은:

- PANC-1, 1 일: 배양 1 일 후 PANC-1 세포의 수 (PANC-1 세포는 단독으로 배양됨)
- PANC-1-KIF11 siRNA, 1 일: 배양 1 일 후 측정된 500 nM KIF11로 형질주입된 PANC-1의 수
- MPC-PANC-1, 1 일: MPC와의 공동-배양 1 일 후 PANC-1 세포의 수 (1/1 비율)
- MPC\_KIF11- PANC-1: KIF11로 형질주입된 MPC와의 공동-배양 1 일 후 PANC-1 세포의 수(500 nM; 1/1 비율)
- PANC-1, 6 일: 배양 6 일 후의 PANC-1 세포 수 (PANC-1 세포 단독 배양)
- PANC-1-KIF11 siRNA, 6 일: 배양 6 일 후에 측정된 500 nM KIF11로 형질주입된 PANC-1의 수.
- MPC-PANC-1, 1 일: MPC와의 공동-배양 6 일 후의 PANC-1 세포의 수 (1/1 비율)
- MPC\_KIF11- PANC-1: KIF11로 형질주입된 MPC와의 공동-배양 6 일 후 PANC-1 세포의 수(500 nM; 1/1 비율).

도 22는 공동-배양에서 MPC로부터 PANC-1 세포로의 KIF11 siRNA의 효과를 도시한다. 패널 A는 KIF11-siRNA (0 - 500 nM)가 로딩된 MPC와의 공동-배양에서 PANC-1 세포 성장의 시간 경과를 보여준다. 패널 B는 세포 배양 5 일째에 KIF11-siRNA (0 - 500 nM)가 로딩된 MPC와의 공동-배양에서 PANC-1 세포 성장의 용량-반응 곡선을 보여준다. 패널 C는 PANC-1과의 공동-배양에서 KIF11 siRNA (0 - 500 nM)로 형질주입 후 MPC 성장의 시간 경과를 보여준다. 결과는 3개의 독립적 측정의 평균을 나타낸다.

도 23은 KIF11 (직접 형질주입)에 의한 PANC-1 세포 생존력의 용량 의존적 억제를 도시한다.

도 24는 PANC-1 세포 성장에 대한 KIF11 siRNA의 효과를 도시한다. 패널 A는 KIF11 siRNA (0 - 500 nM)로 형질주입 후 PANC1 세포 성장의 시간 경과를 보여준다. 패널 B는 세포 배양 6 일째에 KIF11 siRNA (0 - 500 nM)로 형질주입 후 PANC-1 세포 성장의 용량-반응 곡선을 보여준다.

도 25는 MPC 세포 성장에 대한 KIF11 siRNA의 효과를 도시한다. 패널 A는 KIF11 siRNA (0 - 500 nM)로 형질주입 후 MPC 성장의 시간 경과를 보여준다. 패널 B는 세포 배양 6 일째에 KIF11 siRNA (0 - 500 nM)로 형질주입 후 MPC 세포 성장의 용량-반응 곡선을 보여준다.

도 26은 공동-배양에서 MPC로부터 PC3 세포로의 KIF11 siRNA의 효과를 도시한다. 패널 A는 KIF11 siRNA (0 - 500 nM)가 로딩된 MPC와의 공동-배양에서 PC3 세포 성장의 시간 경과를 보여준다. 패널 B는 세포 배양 5 일째에 KIF11-siRNA (0 - 500 nM)가 로딩된 MPC와의 공동-배양에서 PC3 세포 성장의 용량-반응 곡선을 보여준다. 패널 C는 PC3 세포와의 공동-배양에서 KIF11 siRNA (0 - 500 nM)로 형질주입 후 MPC 성장의 시간 경과를 보여준다. 결과는 3개의 독립적 측정의 평균을 나타낸다.

도 27은 PC3 세포 성장에 대한 KIF11 siRNA의 효과를 도시한다. 패널 A는 KIF11 siRNA (0 - 500 nM)로 형질주입 후 PC3 세포 성장의 시간 경과를 보여준다. 패널 B는 세포 배양 6 일째에 KIF11 siRNA (0 - 500 nM)로 형질주입 후 PC3 세포 성장의 용량-반응 곡선을 보여준다.

도 28은 KIF11 siRNA 로딩된 MPC 공여세포를 도시한다.

도 29는 MPC 공여세포 KIF11 siRNA가 종양세포로의 전달을 도시한다.

도 30은 KIF11 siRNA 형질주입된 세포에서 KIF11 mRNA 수준을 도시한다.

도 31은 KIF11 siRNA 로딩된 MPC와의 공동-배양 후 PANC-1 세포에서의 KIF11 mRNA 수준을 도시한다. MPC = KIF11 siRNA로 직접 형질주입된 MPC; MPC-Co = KIF11 siRNA로 직접 형질주입되고 PANC1과 공동-배양된 MPC; PANC1-Co = KIF11 siRNA로 형질주입된 MPC와 함께 24 시간 동안 공동-배양된 PANC1 세포; KIF11 발현은 형질주입 후 48 시간째에 분석되었다. qRT-PCR 데이터를 분석하기 위한 비교 Ct 방법 ( $\Delta \Delta Ct$  방법) - 1. 샘플 KIF11 평균 Ct-GAPDH 평균 Ct =  $\Delta Ct$  KIF11-GAPDH; 2.  $\Delta \Delta Ct$  =  $\Delta Ct$  처리 -  $\Delta Ct$  미처리; 3. 미처리에 대한 KIF11의 폴드 차이 =  $2^{-\Delta \Delta Ct}$ .

도 32는 인간 KIF11 mRNA 서열에 대한 siRNA의 정렬을 도시한다.

도 33은 MPC 및 종양세포 생존력에 대한 KIF11 siRNA의 효과를 도시한다.

도 34는 대조군과 비교하여 MPC 및 KIF11 siRNA로 형질주입된 MSC에서의 유전자 발현 분석을 도시한다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 서열목록의 핵심
- [0034] 서열번호 1: KIF11 mRNA (NCBI 조회번호(reference number) NM\_004523.3)
- [0035] 서열번호 2: Hs\_KIF11\_8 siRNA
- [0036] 서열번호 3: Hs\_KIF11\_9 siRNA
- [0037] 서열번호 4: Hs\_KIF11\_6 siRNA
- [0038] 서열번호 5: Hs\_KIF11\_12 siRNA
- [0039] 서열번호 6: Hs\_KIF11\_7 siRNA
- [0040] 서열번호 7: Hs\_KIF11\_4 siRNA
- [0041] 일반적인 기술 및 선택된 정의
- [0042] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다(예: 분자생물학, 세포 배양, 줄기세포 분화, 세포 치료법, 유전적으로 변형, 생화학, 생리학 및 임상 연구).
- [0043] 달리 지시되지 않는 한, 본 개시에 사용된 분자 및 통계 기술은 당업자에게 공지된 표준 절차이다. 이러한 기술은 자료(예: J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), and F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), and J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons(현재까지 모든 업데이트 포함))에 문헌 전체에 걸쳐 기재되고 설명되어 있다.
- [0044] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 및 단수형태의 용어 "a", "an" 및 "the"는 예를 들어, 내용이 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 임의로 포함한다. 따라서, 예를 들어, "피분석물(an analyte)"에 대한 언급은 임의로 하나 이상의 분석물을 포함한다.
- [0045] 본원에 사용된 용어 "약(about)"은 달리 언급되지 않는 한 지정된 값의 +/- 10%, 보다 바람직하게는 +/- 5%, 더 바람직하게는 +/- 1%를 지칭한다.
- [0046] 용어 "및/또는(and/or)", 예를 들어 "X 및/또는 Y(X and/or Y)"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해되며, 둘 다의 의미 또는 둘 중 하나의 의미에 대한 명백한 지지를 제공하기 위해 사용된다.
- [0047] 본 명세서에서, 용어 "포함하다(comprise)", 또는 "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹의 포함을 암시하는 것으로 이해될 것이며, 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹의 배제를 암시하지 않는다.
- [0048] 본원에 사용된 용어 "코넥신(connexin)"은 세포 간 통신 및 이온 및 작은 신호 전달 분자의 전달을 허용하고 간극 연결을 형성하도록 조립되는 막관통 단백질의 패밀리를 의미한다. 코넥신은 C 및 N 세포질 말단, 세포질 루프(CL) 및 2개의 세포 외 루프(extra-cellular loops)(EL-1) 및 (EL-2)를 갖는 4 패스 막관통 단백질이다. 코넥신은 6 개의 그룹으로 조립되어 헤미채널 또는 코넥손을 형성하고, 2개의 헤미채널은 각각의 세포에 하나씩 결합된 후 결합되어 2개의 세포 사이에 간극 연결을 형성한다. 용어 "코넥신"은 Cx 및 이를 암호화하는 유전자 Cx로 약칭된다.
- [0049] 본원에 사용된 용어 "간극 연결(gap junction)"은 세포 유형 사이의 특수한 세포 간 연결을 의미한다. 간극 연결은 2개의 세포의 세포질을 직접 연결하여, 핵산, 이온 및 전기 자극과 같은 다양한 분자가 세포 사이의 조절된 게이트를 직접 통과하게 한다.
- [0050] 다양한 대상체가 본 개시내용에 따른 세포 조성물을 투여받을 수 있다. 일 실시예에서, 대상은 포유동물이다.



포유동물은 개 또는 고양이와 같은 반려동물 또는 말 또는 소와 같은 가축동물일 수 있다. 다른 실시예에서, 대상은 인간이다. 용어 "대상체(subject)", "환자(patient)" 또는 "개체(individual)"은 문맥상 본 발명에서 상호교환적으로 사용될 수 있는 용어이다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "치료(treatment)"는 임상 병리 과정 동안 치료되는 개체 또는 세포의 자연 과정을 변경하도록 설계된 임상 개입을 지칭한다. 바람직한 치료 효과는 질병 진행률 감소, 질병 상태 개선 또는 완화, 및 예후 완화 또는 개선을 포함한다. 예를 들어, 질병과 관련된 하나 이상의 증상이 완화되거나 제거되는 경우, 개체는 성공적으로 "치료"된다.

[0052] "유효량(effective amount)"은 원하는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량 및 시간 동안 적어도 효과적인 양을 지칭한다. 유효량은 하나 이상의 투여에서 제공될 수 있다. 본 개시내용의 일부 실시예에서, 용어 "유효량"은 상기 기재된 바와 같이 질병 또는 질환의 치료에 영향을 미치는 데 필요한 양을 지칭하기 위해 사용된다. 유효량은 치료될 질병 또는 질환에 따라, 또한 체중, 연령, 인종 배경, 성별, 건강 및/또는 신체 상태 및 치료되는 포유동물과 관련된 다른 요인에 따라 달라질 수 있다. 전형적으로, 유효량은 의사의 일상적인 시험 및 실험을 통해 결정될 수 있는 비교적 넓은 범위(예: "투여량(dosage)"범위) 내에 속할 것이다. 유효량은 단일 용량으로 또는 치료 기간 동안 1회 또는 수회 반복된 용량으로 투여될 수 있다.

[0053] "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"은 특정 장애(예: 암)의 측정가능한 개선에 영향을 미치기 위해 요구되는 최소한의 농도이다. 본원의 치료적 유효량은 환자의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 요인, 및 세포 조성물이 개체에서 원하는 반응을 이끌어내는 능력에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 또한 조성물의 임의의 독성 또는 유해 효과가 치료적으로 유리한 효과 보다 작은 양이다. 암의 경우, 치료적 유효량은 암 세포의 수를 감소시킬 수 있으며; 원발성 종양 크기를 감소시키고; 말초 기관으로의 암 세포 침윤을 억제(즉, 어느 정도 느리게하고, 일부 예에서 정지)시키고; 종양 전이를 억제(즉, 어느 정도 느리게하고, 일부 예에서는 정지)시키고; 종양 성장 또는 종양 진행을 어느 정도까지 억제 또는 지연시키고; 및/또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도까지 경감시킨다. 본 개시내용에 따른 조성물이 기존 암 세포의 성장을 예방 및/또는 사멸시킬 수 있는 한, 세포증식억제(cytostatic) 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 치료법의 경우, 생체 내 효능은 예를 들어 생존 기간, 질병 진행 시간(TTP), 반응 속도(RR), 반응 기간 및/또는 삶의 질을 평가함으로써 측정될 수 있다.

[0054] 중간엽 계통 전구체(Mesenchymal lineage precursor, MPC) 또는 줄기세포

[0055] 본원에 사용된 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포(mesenchymal lineage precursor or stem cells)"는 다분화능을 유지하면서 자가 재생 능력 및 중간엽 기원(예: 조골세포, 연골세포, 지방세포, 간질세포, 섬유아세포 및 힘줄) 또는 비-중배엽(non-mesodermal) 기원(예: 간세포, 신경세포 및 상피세포)의 다수의 세포 유형으로 분화하는 능력을 갖는 미분화된 다분화성 세포를 의미한다.

[0056] 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포"는 모세포 및 그들의 미분화된 자손 둘 다를 포함한다. 이 용어는 또한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포(MPC), 다능성 간질세포, 중간엽 줄기세포, 혈관주위 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 및 이들의 미분화된 자손을 포함한다.

[0057] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 자가, 동종이계, 이종, 동계(syngeneic) 또는 동계(isogeneic)일 수 있다. 자가세포는 이식될 동일한 개체로부터 분리된다. 동종이계(Allogeneic)세포는 동일한 종의 공여자로부터 분리된다. 이종세포는 다른 종의 공여자로부터 분리된다. 동계(syngeneic) 또는 동계(isogeneic) 세포는 쌍둥이, 클론 또는 고도로 교배된 연구 동물 모델과 같은 유전적으로 동일한 유기체로부터 분리된다.

[0058] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 주로 골수에 존재하지만, 예를 들어 제대혈 및 제대, 성인 말초 혈액, 지방 조직, 섬유주 및 치아 펄프를 포함한 다양한 숙주 조직에 존재하는 것으로 나타났다.

[0059] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및 하나 이상의 인테그린을 발현한다. 인테그린은 세포-세포 및 세포-세포 외 매트릭스 부착 이벤트 둘 모두를 매개하는 세포 부착 수용체의 부류이다. 인테그린은 단일  $\alpha$  사슬 폴리펩티드가 단일  $\beta$  사슬과 비공유적으로 결합하는 이종이량체 폴리펩티드로 구성된다. 인테그린 패밀리의 세포 부착 수용체를 구성하는 약 16개의 별개의  $\alpha$  사슬 폴리펩티드 및 적어도 약 8개의 다른  $\beta$  사슬 폴리펩티드가 있다. 일반적으로, 상이한 결합 특이성 및 조직 분포는  $\alpha$  및  $\beta$  사슬 폴리펩티드 또는 인테그린 서브유닛의 독특한 조합으로부터 유래된다. 특정 인테그린과 관련된 패밀리는 일반적으로  $\beta$  서브유닛을 특징으로 한다. 그러나, 인테그린의 리간드 결합 활성화는  $\alpha$  서브유닛에 의해 크게 영향을 받는다.

[0060] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\beta 1$  (CD29) 사슬 폴리펩티드를

갖는 인테그린을 발현한다.

- [0061] 다른 실시예에서, 본 개시내용에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha 1$  (CD49a),  $\alpha 2$  (CD49b),  $\alpha 3$  (CD49c),  $\alpha 4$  (CD49d),  $\alpha 5$  (CD49e) 및  $\alpha v$  (CD51)로 구성된 군에서 선택되는  $\alpha$  사슬 폴리펩티드를 갖는 인테그린을 발현한다. 따라서, 일 실시예에서, 본 개시내용에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha 1$ 을 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha 2$ 를 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha 3$ 을 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha 4$ 를 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha 5$ 를 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha v$ 를 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1,  $\alpha 2$  및  $\alpha 3$ 을 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1,  $\alpha 2$  및  $\alpha 5$ 를 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1,  $\alpha 3$  및  $\alpha 5$ 를 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  및  $\alpha 5$ 를 발현한다.
- [0062] 다른 실시예에서, 본 발명은 STRO-1+ 및  $\alpha 1$  + 세포가 풍부한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 포함한다. 이 실시예에서,  $\alpha 1$  + 세포가 풍부한 집단은 적어도 약 3% 또는 4% 또는 5%  $\alpha 1$  + 세포를 포함할 수 있다.
- [0063] 다른 실시예에서, 본 발명은 STRO-1+ 및  $\alpha 2$  + 세포가 풍부한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 포함한다. 이 실시예에서,  $\alpha 2$  + 세포가 풍부한 집단은 적어도 약 30% 또는 40% 또는 50%  $\alpha 2$  + 세포를 포함할 수 있다.
- [0064] 다른 실시예에서, 본 발명은 STRO-1+ 및  $\alpha 3$  + 세포가 풍부한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 포함한다. 이 실시예에서,  $\alpha 3$  + 세포가 풍부한 집단은 적어도 약 40% 또는 45% 또는 50%  $\alpha 3$  + 세포를 포함한다.
- [0065] 다른 실시예에서, 본 발명은 STRO-1+ 및  $\alpha 4$  + 세포가 풍부한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 포함한다. 이 실시예에서,  $\alpha 4$  + 세포가 풍부한 집단은 적어도 약 5% 또는 6% 또는 7%  $\alpha 4$  + 세포를 포함한다.
- [0066] 다른 실시예에서, 본 발명은 STRO-1+ 및  $\alpha 5$  + 세포가 풍부한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 포함한다. 이 실시예에서,  $\alpha 5$  + 세포가 풍부한 집단은 적어도 약 45% 또는 50% 또는 55%  $\alpha 5$  + 세포를 포함한다.
- [0067] 다른 실시예에서, 본 발명은 STRO-1+ 및  $\alpha v$  + 세포가 풍부한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 포함한다. 이 실시예에서,  $\alpha v$  + 세포가 풍부한 집단은 적어도 약 5% 또는 6% 또는 7%  $\alpha v$  + 세포를 포함한다.
- [0068] 다른 실시예에서, 본 발명은 STRO-1,  $\alpha 1$  +,  $\alpha 3$  +,  $\alpha 4$  + 및  $\alpha 5$  + 세포가 풍부한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 포함한다.
- [0069] 다른 실시예에서, 본 개시내용에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  및  $\alpha 5\beta 1$ 로 구성된 군에서 선택되는 인테그린을 발현할 수 있다. 따라서, 일 실시예에서, 본 개시내용에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha 1\beta 1$ 을 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha 2\beta 1$ 을 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha 4\beta 1$ 을 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현한다.
- [0070] 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\beta 3$  (CD61) 사슬 폴리펩티드를 갖는 인테그린을 발현한다. 일 실시예에서, 본 발명은 STRO-1+ 및  $\beta 3$  + 세포가 풍부한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 포함한다. 이 실시예에서,  $\beta 3$  + 세포가 풍부한 집단은 적어도 약 8% 또는 10% 또는 15%  $\beta 3$  + 세포를 포함한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha v\beta 3$ 을 발현한다. 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\beta 5$  (ITGB5) 사슬 폴리펩티드를 갖는 인테그린을 발현한다. 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha v\beta 5$ 를 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및  $\alpha v\beta 6$ 을 발현한다.
- [0071] 상기 언급된 인테그린을 발현하는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 확인 및/또는 농축시키는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 일 실시예에서, 형광 활성화된 세포 분류(FACS)는 원하는 인테그린 폴리펩티드 사슬 또는 이들의 조합을 발현하는 세포를 확인하고 선택하기 위해 상업적으로 이용 가능한 항체(예: Thermofisher; Pharmingen; Abcam)를 이용하여 사용될 수 있다.
- [0072] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및 콕사키바이러스(coxsackievirus) 및 아데노바이러스 수용체를 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1, 콕사키 바이러스 및

아데노바이러스 수용체 및 하나 이상의 상기 언급된 인테그린을 발현한다.

- [0073] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1, 콕사키 바이러스 및 아데노바이러스 수용체,  $\alpha v\beta 3$  및  $\alpha v\beta 5$ 를 발현한다.
- [0074] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 그들의 세포 표면에서 하나 이상의 상기 언급된 인테그린 또는 콕사키바이러스 및 아데노바이러스 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형된다.
- [0075] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1 및 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현한다. 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 STRO-1, CAR,  $\alpha v\beta 3$  및  $\alpha v\beta 5$ 를 발현한다.
- [0076] 일 실시예에서, CAR를 발현하는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 T 세포 매개 면역 반응을 유발할 수 있다. 다른 실시예에서, CAR는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 암 세포에 부착시키는 수단으로서 작용한다. 다른 실시예에서, CAR는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 암 세포에 대한 풍부화된 접촉을 유발하는 수단으로서 작용한다.
- [0077] 일 실시예에서, CAR는 세포 외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 세포 내 도메인으로 구성된다. 일 실시예에서, 항원 결합 도메인은 하나 이상의 종양 항원에 대한 친화성을 갖는다. 예시적인 종양 항원은 HER2, CLPP, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, MAGE, GAGE, SAGE, b-catenin/m, bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CEA, CASP-8, CDK/4, CDC-27, Cyp-B, DAM-8, DAM-10, ELV-M2, ETV6, G250, Gp100, HAGE, HER-2/neu, EPV-E6, LAGE, hTERT, survivin, iCE, MART-1, tyrosinase, MUC-1, MC1-R, TEL/AML, 및 WT-1을 포함한다.
- [0078] 예시적인 세포 내 도메인은 CD3-zeta, CD28 및 4-1BB를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR는 CD3-zeta, CD28, 4-1BB, TLR-4의 조합을 포함할 수 있다.
- [0079] 예시적인 막관통 도메인은 T-세포 수용체, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, 35 CD 154의 알파, 베타 또는 제타 사슬로부터 유래될 수 있다(즉, 적어도 막관통 영역(들)을 포함함). 다른 실시예에서, 막관통 도메인은 합성될 수 있으며, 이 경우, 주로 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 포함할 수 있다.
- [0080] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 상기 언급되고 면역선택에 의해 풍부화된 것과 같은 숙주 조직으로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 대상체로부터 골수 흡인물(bone marrow aspirate)은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 선택을 가능하게 하기 위해 STRO-1 또는 TNAP에 대한 항체로 추가로 처리될 수 있다. 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 Simmons & Torok-Storb, 1991에 기술된 STRO-1 항체를 사용하여 풍부화될 수 있다.
- [0081] STRO-1+ 세포는 골수, 혈액, 치아 펄프 세포, 지방 조직, 피부, 비장, 췌장, 뇌, 신장, 간, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 내장, 폐, 림프절, 흉선, 뼈, 인대, 힘줄, 골격근, 진피 및 골막에서 발견되는 세포이며; 중배엽 및/또는 내배엽 및/또는 외배엽과 같은 생식선(germ line)으로 분화될 수 있다. 따라서, STRO-1+ 세포는 지방, 골, 연골, 탄성, 근육 및 섬유질 결합 조직을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 세포 유형으로 분화될 수 있다. 이들 세포가 들어가는 특정 계통-결정(lineage-commitment) 및 분화 경로는 기계적 영향 및/또는 내인성 생물 활성 인자(예: 성장 인자, 사이토카인 및/또는 숙주 조직에 의해 확립된 국소 미세환경 조건)로부터의 다양한 영향에 의존한다.
- [0082] 본원에 사용된 용어 "풍부한(enriched)"은 하나의 특정 세포 유형의 비율 또는 다수의 특정 세포 유형의 비율이 처리되지 않은 세포 집단(예: 천연 환경(native environment)의 세포)과 비교할 때 증가하는 세포 집단을 설명한다. 일 실시예에서, STRO-1+ 세포가 풍부한 집단은 적어도 약 0.1% 또는 0.5% 또는 1% 또는 2% 또는 5% 또는 10% 또는 15% 또는 20% 또는 25% 또는 30% 또는 50% 또는 75% STRO-1+ 세포를 포함한다. 이와 관련하여, 용어 "STRO-1+ 세포가 풍부한 세포의 집단(population of cells enriched for STRO-1+ cells)"은 용어 "X% STRO-1+ 세포를 포함하는 세포의 집단"에 대한 명백한 지지를 제공하기 위해 사용될 것이며, 여기서 X%는 본원에 언급된 백분율이다. STRO-1+ 세포는 일부 실시예에서 클론원성 집단(clonogenic colonies)을 형성할 수 있으며, 예를 들어, CFU-F (섬유아세포) 또는 그의 서브세트(예: 50% 또는 60% 또는 70% 또는 70% 또는 90% 또는 95%)가 이러한 활성을 가질 수 있다.
- [0083] 일 실시예에서, 세포 집단은 선택 가능한 형태로 STRO-1+ 세포를 포함하는 세포 제제로부터 풍부화된다. 이와 관련하여, 용어 "선택 가능한 형태(selectable form)"는 세포가 STRO-1+ 세포의 선택을 허용하는 마커(예: 세포 표면 마커)를 발현하는 것을 의미한다고 이해될 것이다. 마커는 STRO-1 일 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없다.



예를 들어, 본원에 기술 및/또는 예시된 바와 같이, STRO-2 및/또는 STRO-3 (TNAP) 및/또는 STRO-4 및/또는 VCAM-1 및/또는 CD146 및/또는 3G5를 발현하는 세포(예: MPC)는 또한 STRO-1을 발현한다(STRO-1bright도 가능). 따라서, 세포가 STRO-1+라는 표시는 세포가 STRO-1 발현에 의해 선택되는 것을 의미하지는 않는다. 일 실시예에서, 세포는 적어도 STRO-3 발현에 기초하여 선택되며, 예를 들어, 이들은 STRO-3+ (TNAP +)이다.

[0084] 세포 또는 이의 집단의 선택에 대한 언급이 반드시 특정 조직 공급원으로부터의 선택을 요구하는 것은 아니다. 본원에 기술된 바와 같이, STRO-1+ 세포는 매우 다양한 공급원으로부터 선택되거나 분리되거나 풍부화될 수 있다. 즉, 일부 실시예에서, 이들 용어는 STRO-1+ 세포를 포함하는 임의의 조직 또는 혈관내(vascularized) 조직 또는 주피세포(pericytes)(예: STRO-1+ 또는 3G5+ 주피세포)를 포함하는 조직 또는 본원에 언급된 임의의 하나 이상의 조직으로부터의 선택에 대한 지지를 제공한다.

[0085] 일 실시예에서, 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+ (HSP-90\*?), CD45+, CD146+, 3G5+로 구성된 군에서 개별적으로 또는 집합적으로 선택되는 하나 이상의 마커를 발현한다.

[0086] "개별적으로(individually)"는 본 개시내용이 인용된 마커 또는 마커 그룹을 별도로 포함하고, 개별 마커 또는 마커 그룹이 본원에 별도로 열거되지 않을 수 있음에도 불구하고, 첨부된 청구범위는 그러한 마커 또는 마커 그룹을 별도로 및 서로 나누어져서 정의할 수 있다.

[0087] "집합적으로(collectively)"는 본 개시가 인용된 마커 또는 마커 그룹의 임의의 수 또는 조합을 포함하고, 마커 또는 마커 그룹의 이러한 수 또는 조합이 본원에 구체적으로 열거되지 않을 수 있음에도 불구하고, 첨부된 청구범위는 이러한 조합 또는 하위 조합을 마커 또는 마커 그룹의 임의의 다른 조합과 별도로 및 나누어져서 정의할 수 있다.

[0088] 주어진 마커에 대해 "양성(positive)"으로 지칭되는 세포는 마커가 세포 표면에 존재하는 정도에 따라 마커의 낮은(낮음 또는 희미한 또는 둔한), 중간(중양) 또는 높은(밝은, 브리) 수준을 발현할 수 있으며, 상기 용어는 세포의 분류 과정 또는 세포의 유동 혈구 계산 분석(flow cytometric analysis)에 사용되는 형광의 강도 또는 다른 마커와 관련이 있다. 낮은(낮음 또는 희미한 또는 둔한), 중간(중양) 또는 높은(밝은, 브리)의 구별은 분류되거나 분석되는 특정 세포 집단에 사용되는 마커의 맥락에서 이해될 것이다. 주어진 마커에 대해 "음성(negative)"으로 지칭되는 세포가 반드시 그 세포에 완전히 존재하지는 않는다. 이 용어는 마커가 그 세포에 의해 상대적으로 매우 낮은 수준으로 발현되고, 검출가능하게 표지되거나 배경 수준, 예를 들어 이소형 대조군 항체를 사용하여 검출된 수준 이상으로 검출될 수 없을 때 매우 낮은 신호를 생성한다는 것을 의미한다.

[0089] 본원에 사용된 용어 "밝은(bright)"또는 브리(bri)는 검출가능하게 표지될 때 상대적으로 높은 신호를 생성하는 세포 표면상의 마커를 지칭한다. 이론에 의해 제한되기를 원하지 않지만, "밝은"세포는 샘플에서 다른 세포보다 더 많은 표적 마커 단백질(예: STRO-1 항체에 의해 인식되는 항원)을 발현하는 것이 제안된다. 예를 들어, STRO-1bri 세포는 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석에 의해 결정된 바와 같이 FITC-접합된 STRO-1 항체로 표지될 때 비-밝은 세포(STRO-1낮음/희미함/둔함/중간/중양) 보다 더 큰 형광 신호를 생성한다. 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 골수로부터 분리되고 STRO-1+ 세포의 선택에 의해 풍부화된다. 이 실시예에서, "밝은"세포는 출발 샘플에 함유된 가장 밝게 표지된 골수 단핵세포의 약 0.1% 이상을 구성한다. 다른 실시예에서, "밝은"세포는 출발 샘플에 함유된 가장 밝게 표지된 골수 단핵세포의 약 0.1% 이상, 약 0.5% 이상, 약 1% 이상, 약 1.5% 이상 또는 약 2% 이상을 구성한다. 일 실시예에서, STRO-1bright 세포는 "배경", 즉 STRO-1-인 세포에 비해 2log 크기 높은 STRO-1 표면 발현을 갖는다. 이에 비해, STRO-1낮음/희미함/둔함 및/또는 STRO-1중간/중양 세포는 2log 크기 미만의 STRO-1 표면 발현 발현, 전형적으로 약 1 log 또는 "배경"미만을 갖는다.

[0090] 일 실시예에서, STRO-1 + 세포는 STRO-1bright이다. 일 실시예에서, STRO-1bright 세포는 STRO-1낮음/희미함/둔함(lo/dim/dull) 또는 STRO-1 중간/중양(intermediate/median) 세포에 비해 우선적으로 풍부화된다.

[0091] 일 실시예에서, STRO-1bright 세포는 추가로 TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+ (HSP-90 $\beta$ ) 및/또는 CD146+ 중 하나 이상이다. 예를 들어, 세포는 상기 마커 중 하나 이상에 대해 선택되고 및/또는 상기 마커 중 하나 이상을 발현하는 것으로 나타난다. 이와 관련하여, 마커를 발현하는 것으로 나타난 세포는 구체적으로 시험될 필요가 없고, 오히려 이전에 풍부화된 또는 분리된 세포가 시험될 수 있고, 이어서 사용되며, 분리되거나 풍부화된 세포가 또한 동일한 마커를 발현하는 것으로 합리적으로 추정될 수 있다.

[0092] 일 실시예에서, STRO-1bright 세포는 혈관주위의(perivascular) 마커 3G5의 존재를 특징으로 하는 WO 2004/85630에 정의된 바와 같은 혈관주위의(perivascular) 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포다.

- [0093] 본원에 사용된 용어 "TNAP"은 조직 비특이적 알칼리성 포스파타제의 모든 이소형을 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 용어는 간 이소형(LAP), 골 이소형(BAP) 및 신장 이소형(KAP)을 포함한다. 일 실시예에서, TNAP는 BAP이다. 일 실시예에서, TNAP는 수탁번호(deposit accession number) PTA-7282 하에 부다페스트 조약의 규정에 따라 2005년 12월 19일 ATCC로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 STRO-3 항체에 결합할 수 있는 분자를 의미한다.
- [0094] 또한, 일 실시예에서, STRO-1+ 세포는 클론원성(clonogenic) CFU-F를 일으킬 수 있다.
- [0095] 일 실시예에서, 상당한 비율의 STRO-1+ 세포는 적어도 2개의 상이한 생식선(germ lines)으로 분화될 수 있다. 세포가 속할(committed) 수 있는 계통의 비제한적인 예는 골 전구체 세포; 담관(bile duct) 상피 세포 및 간세포에 대해 다분화성인 간세포 전구체; 희소돌기아교세포(oligodendrocyte) 및 성상세포로 진행되는 신경교세포 전구체를 생성할 수 있는 신경 제한 세포(neural restricted cells); 뉴런으로 진행되는 뉴런 전구체; 심장 근육 및 심근세포의 전구체, 포도당-반응성 인슐린 분비 췌장 베타 세포주를 포함한다. 다른 계통은 상아질모세포(odontoblasts), 상아질 생성세포(dentin-producing cells) 및 연골세포(chondrocytes) 및 다음과 같은 전구체 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 망막 색소 상피세포, 섬유아세포, 각질형성세포(keratinocytes)와 같은 피부세포, 수지상세포, 모낭세포, 신장 덕트(renal duct) 상피세포, 평활 및 골격근 세포, 고환 선조세포, 혈관 내피세포, 힘줄, 인대, 연골, 지방세포, 섬유아세포, 골수 기질, 심장 근육, 평활근, 골격근, 주피세포(pericyte), 혈관, 상피, 신경교, 신경, 성상세포 및 희소돌기아교세포(oligodendrocyte).
- [0096] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 MSC이다. MSC는 균질한 조성물이거나 MSC가 풍부한 혼합세포 집단일 수 있다. 균질한 MSC 조성물은 부착성 골수 또는 골막세포를 배양함으로써 수득될 수 있고, MSC는 독특한 단일클론항체로 확인되는 특정 세포 표면 마커에 의해 확인될 수 있다. MSC가 풍부한 세포 집단을 수득하는 방법은 예를 들어 US 5486359에 기재되어 있다. 통상적인 플라스틱 접착 분리에 의해 제조된 MSC는 CFU-F의 비특이적 플라스틱 접착 특성에 의존한다. STRO-1에 기초한 면역선택에 의해 골수로부터 분리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 다른 플라스틱 부착성 골수 집단이 없는 경우 골수 집단으로부터 클론원성 중간엽 전구체를 특이적으로 분리한다. MSC의 대체 공급원은 혈액, 피부, 체대혈, 근육, 지방, 뼈 및 연골막(perichondrium)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0097] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 유도만능줄기세포(iPS세포)와 같은 다능성(pluripotent) 세포로부터 유래된다. 일 구현예에서 다능성 세포는 인간 다능성 세포이다. 다능성 세포로부터 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 생성에 적합한 방법은 예를 들어 US 7,615,374 및 US 2014273211, Barberi *et al*; Plos medicine, Vol 2(6):0554-0559 (2005), 및 Vodyanik *et al*. Cell Stem cell, Vol 7:718-728 (2010)에 기재되어 있다.
- [0098] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 불멸화된다(immortalised). 불멸화된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 생성을 위한 예시적인 공정은 예를 들어, Obinata M., Cell, Vol 2:235-244 (1997), US 9,453,203, Akimov *et al*. Stem Cells, Vol 23:1423-1433 및 Kabara *et al*. Laboratory Investigation, Vol 94: 1340-1354 (2014)에 기재되어 있다.
- [0099] 본 개시내용의 바람직한 실시 양태에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 건강한 지원자의 골수로부터 풍부화된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포로부터 유래된 마스터 세포 은행으로부터 수득된다. 이러한 공급원으로부터 유래된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 사용은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 공여자로서 기능할 수 있는 적절한 가족 구성원이 없거나, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 생성하는 데 걸리는 시간 동안 즉각적인 치료가 필요하고, 재발, 질병 관련 쇠퇴 또는 사망의 위험이 높은 대상체에게 특히 유리하다.
- [0100] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 세포는 Cx43을 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 세포는 Cx40을 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 세포는 Cx43 및 Cx40을 발현한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 세포는 Cx45, Cx32 및/또는 Cx37을 발현한다. 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 세포는 특정 코넥신을 발현하도록 변형되지 않는다.
- [0101] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 세포는 STRO-1 및 CD46을 발현한다. 이 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 세포는 또한 상기 언급된 하나 이상의 인테그린을 발현할 수 있다.
- [0102] 분리 또는 풍부화된 중간엽 계통 전구체 세포는 시험관 내 배양에 의해 확장될 수 있다. 분리되거나 풍부화된 중간엽 계통 전구체 세포는 동결보존, 해동 및 후속적으로 시험관 내 배양에 의해 확장될 수 있다.

- [0103] 일 실시예에서, 분리되거나 풍부화된 중간엽 계통 전구체 세포는 배양 배지(무 혈청 또는 혈청-보충됨), 예를 들어 5% 소태아혈청(FBS) 및 글루타민이 보충되고 37℃ 20% O<sup>2</sup>에서 밤새 배양 용기에 부착되도록 허락된 알과 최소 필수 배지(αMEM)에서 50,000개의 생존 cells/cm<sup>2</sup>에 시딩된다. 이어서 배양 배지를 필요에 따라 교체 및/또는 변경하고 세포를 37℃, 5% O<sup>2</sup>에서 추가로 68 내지 72시간 동안 배양하였다.
- [0104] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 배양된 중간엽 계통 전구체 세포는 생체 내에서 세포와 표현형적으로(phenotypically) 상이하다. 예를 들어, 일 현예에서 이들은 하기 마커, CD44, CD46, NG2, DC146 및 CD140b 중 하나 이상을 발현한다. 배양된 중간엽 계통 전구체 세포는 또한 생체 내에서 세포와 생물학적으로 상이하며, 생체 내에서 대부분 비-사이클링(진행이 정지된(quiescent)) 세포와 비교하여 더 높은 증식 속도를 갖는다.
- [0105] Ang1 및 VEGF 수준
- [0106] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 Ang1을 적어도 0.1 μg/10<sup>6</sup> cells의 양으로 발현한다. 그러나, 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 적어도 0.2 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.3 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.4 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.5 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.6 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.7 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.8 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.9 μg/10<sup>6</sup> cells, 1 μg/10<sup>6</sup> cells, 1.1 μg/10<sup>6</sup> cells, 1.2 μg/10<sup>6</sup> cells, 1.3 μg/10<sup>6</sup> cells, 1.4 μg/10<sup>6</sup> cells, 1.5 μg/10<sup>6</sup> cells의 양으로 Ang1을 발현한다.
- [0107] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 약 0.05 μg/10<sup>6</sup> cells 미만의 양으로 VEGF를 발현한다. 그러나, 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 약 0.05 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.04 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.03 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.02 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.01 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.009 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.008 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.007 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.006 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.005 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.004 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.003 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.002 μg/10<sup>6</sup> cells, 0.001 μg/10<sup>6</sup> cells 미만의 양으로 VEGF를 발현한다.
- [0108] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 조성물 또는 배양에서 발현되는 세포성 Ang1 및/또는 VEGF의 양은 당업자에게 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 정량적 ELISA 분석법과 같은 정량적 분석법을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 이 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 배양물로부터의 세포 용해물이 ELISA 플레이트의 웰에 첨가된다. 웰은 Ang1 또는 VEGF에 대한 1차 항체, 단일클론 또는 다클론 항체(들)로 코팅될 수 있다. 이어서, 웰을 세척한 다음, 1차 항체에 대해 2차 항체, 단일클론 또는 다클론 항체(들)와 접촉시킨다. 2차 항체는 예를 들어 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)와 같은 적절한 효소에 접합된다. 이어서, 웰을 배양한 후, 배양 기간 후에 세척한다. 이어서, 웰을 하나 이상의 발색체(chromogen)와 같은 2차 항체에 접합된 효소에 대한 적절한 기질과 접촉시킨다. 사용될 수 있는 발색체는 과산화수소 및 테트라 메틸벤지딘을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 기질(들)을 첨가한 후, 웰을 적절한 시간동안 배양한다. 배양의 완료 후, "정지"용액을 웰에 첨가하여 효소와 기질(들)의 반응을 정지시킨다. 샘플의 광학 밀도(OD)가 측정된다. 시험되는 줄기세포의 배양에 의해 발현된 Ang1 또는 VEGF의 양을 결정하기 위해 샘플의 광학 밀도는 공지된 양의 Ang1 또는 VEGF를 함유하는 샘플의 광학 밀도와 상관된다.
- [0109] 다른 관점에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 약 2:1의 비율로 Ang1:VEGF를 발현한다. 그러나, 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 Ang1:VEGF를 적어도 약 10:1, 15:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1, 25:1, 26:1, 27:1, 28:1, 29:1, 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 50:1의 비율로 발현한다.
- [0110] Ang1:VEGF 발현 비율을 결정하는 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어 Ang1 및 VEGF 발현 수준은 상기 논의된 바와 같이 정량적 ELISA를 통해 정량될 수 있다. Ang1 및 VEGF의 수준을 정량화한 후, Ang1 및 VEGF의 정량화된 수준에 기초한 비율은 (Ang1의 수준/VEGF의 수준) = Ang1:VEGF 비율로 나타낼 수 있다.
- [0111] 일 실시예에서, 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 상기 예시된 수준 또는 비율로 Ang1 및/또는 VEGF를 발현하도록 유전적으로 변형되지 않는다. Ang1 및/또는 VEGF를 발현하도록 유전적으로 변형되지 않은 세포는 Ang1 및/또는 VEGF를 발현 또는 암호화하는 핵산으로 형질주입에 의해 변형되지 않았다. 의심의 여지를 피하기 위해, 본 개시의 맥락에서, Ang1 및/또는 VEGF를 암호화하는 핵산으로 형질주입된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 유전적으로 변형된 것으로 간주될 것이다. 본 개시내용의 맥락에서, Ang1 및/또는 VEGF를 발현하도록 유전적으로 변형되지 않은 세포는 Ang1 및/또는 VEGF를 암호화하는 핵산으로 형질주입 없이 Ang1 및/또

는 VEGF를 자연적으로 어느 정도 발현한다.

[0112] 핵산

[0113] 본 개시내용은 다양한 핵산의 사용을 포함한다. 용어 "핵산(nucleic acid)" 및 "핵산 분자(nucleic acid molecule)"는 본 개시내용 전체에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 예시적인 핵산은 DNA(예: 상보적 DNA(cDNA), 게놈 DNA(gDNA)), RNA(예: 메시지 RNA(mRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 짧은 억제성 RNA(siRNA), 리보솜 RNA(rRNA), tRNA, 마이크로 RNA), DNA 또는 RNA 유사체(예: 염기 유사체, 당 유사체 및/또는 비천연 백본(backbone) 등을 함유함), RNA/DNA 하이브리드 및 폴리아미드 핵산(PNA)을 포함하며, 이들 모두는 단일- 또는 이중-가닥 형태일 수 있다. 일 실시예에서, 핵산은 분리된다. 본원에 사용된 용어 "분리된 핵산(isolated nucleic acid)"은 인간의 개입을 통해 자연 상태에서부터 변경되거나 제거된 핵산을 의미한다.

[0114] 다른 예시적인 핵산은 올리고뉴클레오티드다. 본원에 사용된 용어 "올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)"는 짧은 DNA 또는 RNA 분자를 의미한다. 올리고뉴클레오티드는 서열-특이적 방식으로 이들의 각각의 상보적 올리고뉴클레오티드, DNA 또는 RNA에 용이하게 결합하여 이중체(duplexes)를 형성한다.

[0115] 일 실시예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 DNA 분자일 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 RNA 분자일 수 있다.

[0116] 다양한 실시예에서, 올리고뉴클레오티드의 길이는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 또는 그 이상의 뉴클레오티드이다.

[0117] 일 실시예에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 억제성 올리고뉴클레오티드다. 일 실시예에서, 용어 "억제성 올리고뉴클레오티드(inhibitory oligonucleotide)"는 하나 이상의 단백질의 생성, 발현 또는 생물학적 활성을 감소시키는 임의의 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 예를 들어, 억제성 올리고뉴클레오티드는 리보솜에서 단백질로의 mRNA의 번역을 방해할 수 있다. 다른 실시예에서, 억제성 올리고뉴클레오티드는 표적 유전자(들) 또는 mRNA에 결합하여(하이브리드화) 표적 단백질의 발현 또는 생물학적 활성을 감소시키기 위해 하나 이상의 단백질을 암호화하는 유전자 또는 mRNA에 충분히 상보적일 수 있다. 다른 실시예에서, 억제성 올리고뉴클레오티드는 단백질을 암호화하지 않는 세포 내 핵산의 생물학적 활성을 억제한다. 예를 들어, 억제성 올리고뉴클레오티드는 비-코딩 RNA의 생물학적 활성을 억제할 수 있다.

[0118] 예시적인 억제성 올리고뉴클레오티드는 분리 또는 합성 안티센스 RNA 또는 DNA, siRNA 또는 siDNA, miRNA, miRNA 모방체, shRNA 또는 DNA 및 키메라 안티센스 DNA 또는 RNA를 포함한다.

[0119] 본원에 사용된 용어 "안티센스(antisense)"는 코딩 서열에 상보적이고 따라서 코딩 서열에 결합할 수 있는 뉴클레오티드의 서열을 의미하며, 이는 전사되는 DNA 이중 나선의 가닥 또는 메신저 RNA 분자의 것일 수 있다. 안티센스 DNA는 이중 가닥 DNA에서 코딩 가닥에 상보적인 비 코딩 가닥이다. 안티센스 가닥은 메신저 RNA(mRNA) 합성의 주형으로 사용된다.

[0120] 용어 "짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA)" 또는 "shRNA"는 이중(duplex) 영역 및 루프 영역을 갖는 RNA 구조를 지칭한다.

[0121] 짧은 간섭 RNA 또는 침묵 RNA로도 알려진 용어 작은 간섭 RNA(siRNA)는 20-25개의 염기쌍 길이의 이중 가닥 RNA 분자의 클래스이다. 특정 단백질로의 번역을 억제 또는 방지하는 siRNA는 용어 siRNA와 결합된 단백질 이름으로 표시된다. 따라서 KIF11의 번역을 방해하는 siRNA는 "KIF11 siRNA"라는 표현으로 표시된다. 전형적으로, 다양한 구현예에서 siRNA는 2개의 뉴클레오티드 가닥을 포함하는 이중 가닥 핵산 분자이며, 각각의 가닥은 약 19 내지 약 28개의 뉴클레오티드(즉, 약 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28개의 뉴클레오티드)를 갖는다. 본 개시내용에 포함되는 예시적인 siRNA는 KIF11 siRNA, KRAS siRNA 및 PLK1 siRNA를 포함한다.

[0122] 용어 "마이크로 RNA"(약어 miRNA)는 식물, 동물 및 일부 바이러스에서 발견되는 작은 비-코딩 RNA 분자(약 22개의 뉴클레오티드 함유)이며, 유전자 발현의 RNA 침묵 및 전사 후 조절에 작용한다. 접두사 "miR" 다음에는 대시 및 숫자가 오며, 후자는 종종 명명 순서를 나타낸다. 1개 또는 2개의 뉴클레오티드를 제외하고 거의 동일한 서열을 갖는 상이한 miRNA는 추가의 소문자로 주석이 달린다. 수많은 miRNA가 당업계에 공지되어 있다(miRBase V.21 nomenclature; Kozomara et al. 2013; Griffiths-Jones, S. 2004). 인간 miRNAs의 예는 hsa-let-7d-3p, hsa-miR-101-5p, hsa-miR-106b-3p, hsa-miR-1179, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-217, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-371a-3p, hsa-miR-487b, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-605, hsa-let-7a-3p, hsa-



let-7a-5p, hsa-let-7b-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7e-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-1-3p, hsa-let-7f-2-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-3p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-1, hsa-miR-100-3p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-103a-2-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-103b, hsa-miR-105-5p, hsa-miR-106a-3p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-10a-3p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-3p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1178-3p, hsa-miR-1180, hsa-miR-1181, hsa-miR-1182, hsa-miR-1183, hsa-miR-1184, hsa-miR-1185-5p, hsa-miR-1204, hsa-miR-1207, hsa-miR-1208, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-1224, hsa-miR-1226, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1228-5p, hsa-miR-1229-3p, hsa-miR-1231, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-1245 a, hsa-miR-1246, hsa-miR-1249, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125b-1-3p, hsa-miR-125b-2-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1251, hsa-miR-1252, hsa-miR-1253, hsa-miR-1255 a, hsa-miR-1255b-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-1260b, hsa-miR-1262, hsa-miR-1263, hsa-miR-1265, hsa-miR-1268a, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-1270, hsa-miR-1272, hsa-miR-1273 a, hsa-miR-1275, hsa-miR-1276, hsa-miR-1277-3p, hsa-miR-1278, hsa-miR-128, hsa-miR-1285-3p, hsa-miR-1286, hsa-miR-1287, hsa-miR-129-2-3p, hsa-miR-1292-5p, hsa-miR-1293, hsa-miR-1301, hsa-miR-1302, hsa-miR-1303, hsa-miR-1305, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-130a-5p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-130b-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-132-5p, hsa-miR-1321, hsa-miR-1323, hsa-miR-1324, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-134, hsa-miR-135a-3p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-135b-3p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-137, hsa-miR-138-1-3p, hsa-miR-138-2-3p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-144-5p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-1468, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-147a, hsa-miR-147b, hsa-miR-148a-5p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-148b-5p, hsa-miR-149-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-1538, hsa-miR-1539, hsa-miR-154-3p, hsa-miR-154-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15b-3p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-1-3p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-17-3p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181a-2-3p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-181d, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-1827, hsa-miR-183-3p, hsa-miR-183-5p, hsa-miR-184, hsa-miR-185-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-186-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-187-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-18b-3p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-190a, hsa-miR-190b, hsa-miR-191-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-1915-3p, hsa-miR-192-3p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-195-3p, hsa-miR-196a-3p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-197-3p, hsa-miR-198, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19a-5p, hsa-miR-1909-3p, hsa-miR-191-1-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200a-5p, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-200c-5p, hsa-miR-202-3p, hsa-miR-202-5p, hsa-miR-203a, hsa-miR-203b-5p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-206, hsa-miR-208b, hsa-miR-20a-3p, hsa-miR-20b-3p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-21-1-5p, hsa-miR-2110, hsa-miR-212-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-214-5p, hsa-miR-215, hsa-miR-216a-5p, hsa-miR-218-1-3p, hsa-miR-218-5p, hsa-miR-219-1-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-22-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-222-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-224-3p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-2355-3p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-23b-5p, hsa-miR-24-1-5p, hsa-miR-24-2-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-26a-2-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-26b-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-27b-5p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-297, hsa-miR-298, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29a-5p, hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-29b-2-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-29c-5p, hsa-miR-2909, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-301b, hsa-miR-302a-5p, hsa-miR-302b-5p, hsa-miR-302c-5p, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-302d-5p, hsa-miR-302f, hsa-miR-3064-5p, hsa-miR-3065-3p, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-3074-3p, hsa-miR-3074-5p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30b-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-1-3p, hsa-miR-30c-2-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30d-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-3120-3p, hsa-miR-3120-5p, hsa-miR-3184-5p, hsa-miR-32-3p, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-323b-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-326, hsa-miR-328, hsa-miR-329, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-

331-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-335-3p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-33a-5p, hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-33b-5p, hsa-miR-340-3p, hsa-miR-340-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-345-5p, hsa-miR-346, hsa-miR-34a-3p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-34b-3p, hsa-miR-34b-5p, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-3591-3p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3613-5p, hsa-miR-3615, hsa-miR-3619, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-363-5p, hsa-miR-365a-3p, hsa-miR-365a-5p, hsa-miR-3653, hsa-miR-3656, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-367-5p, hsa-miR-3676-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-372, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-373-5p, hsa-miR-374a-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-374b-3p, hsa-miR-374b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-376a-2-5p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-376a-5p, hsa-miR-376b-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-377-3p, hsa-miR-377-5p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-378c, hsa-miR-378d, hsa-miR-379-3p, hsa-miR-379-5p, hsa-miR-380-3p, hsa-miR-380-5p, hsa-miR-381-3p, hsa-miR-382-3p, hsa-miR-382-5p, hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-3912, hsa-miR-3928, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411-3p, hsa-miR-411-5p, hsa-miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424-3p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-429, hsa-miR-4291, hsa-miR-431-5p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-433, hsa-miR-4421, hsa-miR-449a, hsa-miR-450a-5p, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-4505, hsa-miR-4510, hsa-miR-4516, hsa-miR-451a, hsa-miR-452-3p, hsa-miR-452-5p, hsa-miR-4533, hsa-miR-4539, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-454-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-4634, hsa-miR-4732-3p, hsa-miR-4732-5p, hsa-miR-4747-5p, hsa-miR-4792, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-489, hsa-miR-490, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493-3p, hsa-miR-493-5p, hsa-miR-494, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-496, hsa-miR-497-3p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-498, hsa-miR-499a-5p, hsa-miR-500a-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503-5p, hsa-miR-504, hsa-miR-505-3p, hsa-miR-505-5p, hsa-miR-506-3p, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-511, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-513b, hsa-miR-514a-3p, hsa-miR-514a-5p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516b-3p, hsa-miR-516b-5p, hsa-miR-517a-3p, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518e-3p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-518f-3p, hsa-miR-519a-5p, hsa-miR-519b-5p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-519d, hsa-miR-519e-5p, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-522-5p, hsa-miR-523-5p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-539-5p, hsa-miR-541, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-543, hsa-miR-545-3p, hsa-miR-545-5p, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548e, hsa-miR-548i, hsa-miR-548m, hsa-miR-549, hsa-miR-550a-3p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-551b-3p, hsa-miR-551b-5p, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-557, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-567, hsa-miR-569, hsa-miR-570-3p, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-580, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-583, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-585, hsa-miR-586, hsa-miR-589-3p, hsa-miR-589-5p, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-593-3p, hsa-miR-593-5p, hsa-miR-595, hsa-miR-598, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-606, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-616-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-623, hsa-miR-625-5p, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629-3p, hsa-miR-629-5p, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-641, hsa-miR-642a-3p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-643, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652-3p, hsa-miR-653, hsa-miR-654-3p, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-663a, hsa-miR-663b, hsa-miR-664a-3p, hsa-miR-664a-5p, hsa-miR-668, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-675-3p, hsa-miR-675-5p, hsa-miR-7-1-3p, hsa-miR-7-2-3p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-708-3p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-718, hsa-miR-744-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-761, hsa-miR-765, hsa-miR-766, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-874, hsa-miR-875, hsa-miR-876, hsa-miR-877-3p, hsa-miR-877-5p, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-887, hsa-miR-888-3p, hsa-miR-889, hsa-miR-890, hsa-miR-891a, hsa-miR-891b, hsa-miR-9-3p, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-92b-5p, hsa-miR-921, hsa-miR-922, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-935, hsa-miR-940, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-95, hsa-miR-96-3p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-99a-3p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-99b-3p, 및/또는 hsa-miR-99b-5p를 포함한다.

이들 miRNA의 서열은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 월드 와이드 웹 (world wide web)의 mirbase dot org에서 찾을 수 있다.

[0123] 상기 목록으로부터의 적합한 예의 miRNA는 hsa-miR-155, hsa-miR-155-inh, hsa-miR-181-B1, hsa-miR-15a, hsa-miR-16-1, hsa-miR-21, hsa-miR-34a, hsa-miR-221 및 hsa-miR-29a를 포함한다.

[0124] 일 실시예에서, "억제성 올리고뉴클레오타이드"는 하나 이상의 miRNA의 활성을 모방한다. 본원에 사용된 용어 "miRNA 모방체(miRNA mimic)"는 세포 내로 도입될 때 내인성 성숙 miRNA 분자를 모방하도록 설계된 작은 이중 가닥 RNA 분자를 지칭한다. miRNA 모방체는 Sigma Aldrich 및 Thermo Fisher Scientific과 같은 다양한 공급체로부터 수득할 수 있다.

[0125] 다른 실시예에서, "억제성 올리고뉴클레오타이드"는 하나 이상의 miRNA의 활성을 억제한다. 다양한 miRNA 종이 이러한 목적에 적합하다. 예는 안타고미르(antagomir), 간섭 RNA, 리보자임, miRNA 스폰지 및 miR-마스크를 포함하나 제한되는 것은 아니다. 용어 "안타고미르(antagomir)"는 본 발명의 맥락에서 표적 miRNA에 결합하고 miRNA가 그의 동족 유전자 표적에 결합하는 것을 방지함으로써 miRNA 기능을 억제하는 화학적으로 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 지칭하기 위해 사용된다. 안타고미르는 당업계에 공지된 임의의 염기 변형을 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 언급된 miRNA 종의 길이는 약 10 내지 50개의 뉴클레오타이드이다. 예를 들어, 안타고미르의 길이는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 뉴클레오타이드이다.

[0126] 일 실시예에서, miRNA 종은 각각 적어도 하나의 뉴클레오타이드로 구성된 둘 이상의 화학적으로 구별되는 영역을 함유하는 키메라 올리고뉴클레오타이드이다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 유리한 특성(예: 증가된 뉴클레아제 내성, 증가된 세포 내로의 흡수, 증가된 표적에 대한 결합 친화성)을 부여하는 변형된 뉴클레오타이드의 하나 이상의 영역 및 RNA:DNA 또는 RNA:RNA 하이브리드를 절단할 수 있는 효소의 기질인 영역을 전형적으로 함유한다.

[0127] 일 실시예에서, 본 개시내용에 포함되는 핵산은 합성이다. 용어 "합성 핵산(synthetic nucleic acid)"은 핵산이 자연 발생 핵산의 화학적 구조 또는 서열을 갖지 않음을 의미한다. 합성 뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA 분자와 같은 조작된 핵산을 포함한다. 그러나, 세포에 투여된 합성 핵산은 그 구조 또는 서열이 성숙 miRNA 서열과 같은 비합성 또는 자연 발생 핵산과 동일하도록 이후에 세포에서 변형 또는 변경될 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 합성 핵산은 전구체 miRNA의 서열과 상이한 서열을 가질 수 있지만, 그 서열은 세포에서 한번 내인성 가공된 miRNA와 동일하도록 변경될 수 있다. 결과적으로, 용어 "합성 miRNA(synthetic miRNA)"는 세포에서 또는 생리학적 조건 하에서 자연 발생 miRNA로서 기능하는 "합성 핵산"을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 다른 실시예에서, 핵산 구조는 또한 2' 산소 및 4' 탄소 사이에 메틸렌 브릿지를 갖는 잠금 핵산(LNA)으로 변형되어 핵산의 A-유형 형태에서 3'-엔도 (North) 형태의 리보스를 고정시킬 수 있다(Lennox et al 2011; Bader et al 2011). miRNA와 관련하여, 이 변형은 분자의 표적 특이성 및 혼성화 특성 둘 모두를 유의하게 증가시킬 수 있다.

[0128] 본원에 개시된 방법에 사용하기 위한 핵산은 필요에 따라 일상적인 방법을 사용하여 설계될 수 있다. 예를 들어, 억제성 올리고뉴클레오타이드와 관련하여, 시드 서열 내에서 5개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 스트레치를 포함하거나 그에 바로 인접한 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 길이의 표적 세그먼트는 유전자를 표적으로 하기에 적합한 것으로 간주된다. 예시적인 표적 세그먼트는 시드 서열 중 하나의 5'-말단으로부터 적어도 5개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 서열을 포함할 수 있다(나머지 뉴클레오타이드는 시드 서열의 5'-말단의 바로 상류에서 시작하여 핵산이 약 5 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 함유할 때까지 계속되는 동일한 RNA의 연속적인 신장이다). 다른 실시예에서, 표적 세그먼트는 시드 서열 중 하나의 3'-말단으로부터 적어도 5개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 RNA 서열로 표시된다(나머지 뉴클레오타이드는 표적 세그먼트의 3'-말단의 바로 하류에서 시작하여 핵산이 약 5 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 함유할 때까지 계속되는 동일한 RNA의 연속적인 신장이다). 용어 "시드 서열(seed sequence)"은 본 개시내용의 맥락에서 표적 특이성의 중요한 결정 요인인 miRNA의 5'-말단에서 처음 8 nt 내의 6-8 뉴클레오타이드(nt) 긴 서브 스트링(즉, 시드 서열)을 지칭하기 위해 사용된다. 하나 이상의 표적 영역, 세그먼트 또는 부위가 확인되면, 표적에 충분히 상보적인, 즉 원하는 효과를 제공하기에 충분히 잘 혼성화되고 충분한 특이성(즉, 다른 비-표적 핵산서열에 실질적으로 결합하지 않음)을 갖는 억제성 핵산 화합물이 선택된다.

[0129] 변형

- [0130] 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 상기 언급된 핵산을 도입하도록 변형될 수 있다. 용어 "도입됨(introduced)"은 본 개시내용의 맥락에서 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 핵 또는 세포질 내로 핵산의 도입을 지칭하기 위해 사용된다.
- [0131] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 핵산이 임의의 적합한 인공 조작 수단에 의해 세포 내로 전달되거나, 또는 세포가 핵산을 물려받은 원래 변경된 세포의 자손인 경우 "변형된(modified)" 것으로 간주된다.
- [0132] 용어 "유전적으로 변경된(genetically altered)", "형질주입된(transfected)", "형질도입된(transduced)" 또는 "유전적으로 형질전환된(genetically transformed)"은 또한 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 지칭하기 위해 본 발명의 맥락에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 안정하거나 일시적인 방식으로 변형될 수 있다.
- [0133] 일 실시예에서, 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 siRNA 또는 miRNA와 같은 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개의 핵산을 도입하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 KIF11 siRNA, KRAS siRNA, PLK1 siRNA 또는 이들의 조합을 도입하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 서열번호 1(NCBI 참조번호 NM\_004523.3)에 나타난 바와 같이 KIF11 mRNA의 5'말단에 결합하는 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형될 수 있다. 일 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 800bp 내지 3,600bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 900bp 내지 3,200bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 900bp 내지 2,500bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 3,200bp 전에 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 3,600bp 후에 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 4,000bp 후에 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 3,600bp 내지 5101bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 4,600bp 내지 5101bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다.
- [0134] 다른 실시예에서, 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 KIF11\_4 siRNA를 도입하도록 변형될 수 있다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 KIF11\_6을 도입하도록 변형될 수 있다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 KIF11\_9를 도입하도록 변형될 수 있다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 KIF11\_8, KIF11\_9, KIF11\_6, KIF11\_12, KIF11\_7 또는 KIF11\_4 중 하나 이상을 도입하도록 변형될 수 있다.
- [0135] 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 800bp 내지 4,800bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 900bp 내지 4,800bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 KIF11\_8, KIF11\_9, KIF11\_6, KIF11\_12, KIF11\_7, KIF11\_4, KIF11\_15 또는 KIF11\_13 중 하나 이상을 도입하도록 변형될 수 있다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 KIF11\_15 또는 KIF11\_13을 도입하도록 변형될 수 있다.
- [0136] 상기 언급된 KIF11 siRNA의 서열 세부사항은 하기 표 1에 제시되어 있다.

**표 1**

- [0137] KIF11 siRNA 서열

SEQ ID NO	KIF11 siRNA reference (#Qiagen product number)	서열(Sequence)
SEQ ID NO: 2	Hs_KIF11_8 (#SI03019793)	CTCGGGAAGCTGGAATATAA
SEQ ID NO: 3	Hs_KIF11_9 (#SI03104038)	GAGGGCGTACAAGAACATCTA
SEQ ID NO: 4	Hs_KIF11_6 (#SI02653693)	ACGGAGGAGATAGAACGTTTA
SEQ ID NO: 5	Hs_KIF11_12 (#SI04376358)	CAGGAATTGATTAATGTACTC
SEQ ID NO: 6	Hs_KIF11_7 (#SI02653770)	GCCGATAAGATAGAAGATCAA
SEQ ID NO: 7	Hs_KIF11_4 (#SI00064855)	CTAGATGGCTTTCTCAGTATA
SEQ ID NO: 8	Hs_KIF11_15 (#SI05064353)	CAGCTTGAGCTTACATAGGTA
SEQ ID NO: 9	Hs_KIF11_13 (#SI04435655)	TAAGCGATGGATAATACCTAA



- [0138] 다른 실시예에서, 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 has-miR-let7b, hsa-miR-155, hsa-miR-155-inh, hsa-miR-181-B1, hsa-miR-15a, hsa-miR-16-1, hsa-miR-21, hsa-miR-34a, hsa-miR-221, hsa-miR-29a 또는 이들의 조합을 도입하도록 변형될 수 있다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포와 비교하여 표적세포를 우선적으로 사멸시키는 것을 나타내는 올리고뉴클레오티드 또는 벡터를 도입하도록 변형된다.
- [0139] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 표적세포를 사멸시키지만 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 생존력에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것을 발현하는 올리고뉴클레오티드 또는 벡터를 도입하도록 변형된다.
- [0140] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 암 세포와 같은 표적세포에 올리고뉴클레오티드를 전달하기 전에 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 사멸시키지 않는 것을 발현하는 올리고뉴클레오티드 또는 벡터를 도입하도록 변형된다.
- [0141] 일 실시예에서, 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 상기 언급된 핵산을 발현하는 벡터를 도입하도록 변형될 수 있다. 세포에서의 발현을 위한 수많은 벡터는 당업계에 공지되어 있다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 올리고뉴클레오티드와 같은 핵산을 암호화하는 서열, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0142] 예시적인 발현 벡터는 플라스미드, 파지, 자율 복제 서열(ARS), 바이러스, 센트로미어, 인공 염색체, 염색체 또는 본 발명에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포에서 핵산을 발현할 수 있는 다른 구조를 포함한다.
- [0143] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포로 형질주입 시키기에 적합한 벡터 플라스미드는 US 5,578,475; 6,020,202; 및 6,051,429에 기재된 것과 같은 지질/DNA 복합체를 포함한다. DNA-지질 복합체를 제조하기에 적합한 시약은 리포펙타민 (Gibco/Life Technologies #11668019) 및 FuGENE제 6 (Roche Diagnostics Corp. #1814443); and LipoTAXI제 (Invitrogen Corp., #204110)를 포함한다.
- [0144] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 바이러스 발현 벡터를 사용하여 올리고뉴클레오티드를 도입하도록 변형된다. 예시적인 바이러스 발현 벡터는 렌티바이러스, 바칼로바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스(AdV), 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV)와 같은 재조합 형태를 포함하는 아데노-관련 바이러스(AAV) 및 자가 상보적 AAV(scAAV) 및 비-통합 AV와 같은 이의 유도체를 포함한다.
- [0145] 일 실시예에서, 바이러스 벡터는 복제 결함이다. 이 실시예에서, 복제 유전자는 결실되거나 높은 활성 프로모터를 갖는 발현 카세트에 대체된다. 예를 들어, AV와 관련하여, E1/E3 유전자는 결실되거나 대체될 수 있다. AAV와 관련하여, E1A 및 E1B 유전자는 결실되거나 대체될 수 있다. 예시적인 높은 활성의 프로모터는 CMV, EF1a, SV40, PGK1, Ubc, 인간 베타 액틴, CAG, TRE, UAS 및 Ac5를 포함한다.
- [0146] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 AV 벡터 또는 이의 재조합 형태를 사용하여 올리고뉴클레오티드를 도입하도록 변형된다. 다양한 AV 혈청형(serotype)은 올리고뉴클레오티드를 도입하기 위해 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 적합할 수 있다. 일 실시예에서, AV 혈청형 1(AV1)은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 사용된다. 다른 실시예에서, AV2는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 사용된다. 다른 실시예에서, AV3, AV4, AV7, AV8, AV9, AV10, AV11, AV12 또는 AV13은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 사용된다. 다른 실시예에서, AV5는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 사용된다. 다른 실시예에서, AV6은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 사용된다.
- [0147] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 AAV 벡터 또는 이의 재조합 형태를 사용하여 올리고뉴클레오티드를 도입하도록 변형된다. 다양한 AAV 혈청형은 또한 올리고뉴클레오티드를 도입하기 위해 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 적합할 수 있다.
- [0148] 일 실시예에서, AAV 혈청형 1(AAV1)은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 사용된다. 다른 실시예에서, AAV2는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 사용된다. 다른 실시예에서, AAV3, AAV4, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 또는 AAV13은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 사용된다. 다른 실시예에서, AAV5는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 사용된다. 다른 실시예에서, AAV6은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 변형시키는 데 사용된다.

- [0149] 최적의 벡터는 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 식별될 수 있다. 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 녹색 형광 단백질(GFP)을 발현하는 다양한 벡터와 접촉/형질주입될 수 있다. 이 실시예에서, 형질주입/형질도입 효율, GFP 발현 수준, 세포성 트로피즘(cellular tropism) 및/또는 GFP 발현의 지속성에 기초하여 최적 벡터가 식별될 수 있다.
- [0150] 바이러스 형질도입 방법은 당업계에 공지되어 있다(예: US 6,723,561; 6,627,442). Miltenyi Biotech (MACSductin), Sigma-Aldrich (ExpressMag) 및 Thermo Fisher Scientific (ViraPower)과 같은 상용 공급체로부터 다양한 바이러스 발현 벡터 시스템을 이용할 수 있다.
- [0151] 변형의 효율은 거의 100%가 아니며, 성공적으로 변형된 세포에 대한 집단을 풍부하게 하는 것이 일반적으로 바람직하다. 예를 들어, 변형된 세포는 새로운 유전자형의 기능적 특징을 이용함으로써 풍부화될 수 있다. 변형된 세포를 풍부하게 하는 하나의 예시적인 방법은 네오마이신과 같은 약물에 대한 내성을 사용하는 양성 선별이다.
- [0152] 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 표적세포의 생존력을 감소시키기에 충분한 수준의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시예에서, 표적세포는 암 세포이다. 따라서, 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 암 세포의 생존력을 감소시키기에 충분한 수준의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 적어도 0.25 nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 적어도 0.3 nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 적어도 0.4 nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 적어도 0.5 nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 적어도 1 nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 적어도 3 nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 0.25 내지 5 nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 0.5 내지 5 nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 0.5 내지 4 nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 0.5 내지 3.5 nM의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 표적세포로 전달하기에 충분한 수준의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0153] 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 100 nM 이상의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 200 nM 이상의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 300 nM 이상의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 400 nM 이상의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 500 nM 이상의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 600 nM 이상의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 700 nM 이상의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 1  $\mu$ M 이상의 억제성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0154] 표적세포로의 전달
- [0155] 본 발명자들은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포가 핵산을 표적세포로 옮길 수 있음을 확인하였다. 따라서, 일 실시예에서, 본 개시내용은 상기 참조된 핵산 또는 이를 발현하는 벡터를 도입하도록 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포와 접촉시킴으로써 상기 참조된 핵산을 표적세포에 전달하는 방법을 포함한다. 의심의 여지를 피하기 위해, 표적세포로 전달되는 핵산은 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포에 도입된 핵산이다.
- [0156] 용어 "접촉(contacting)"은 본 발명의 맥락에서 "직접(direct)" 또는 "간접(indirect)" 접촉을 지칭하기 위해 사용된다. "직접 접촉(Direct contact)"은 본 개시의 맥락에서 핵산의 전달을 용이하게 하는 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포와 표적세포 사이의 물리적 접촉을 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들어, 표적세포 및

변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 공통 코넥신(즉, 표적세포 및 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 둘 다에 의해 발현되는 코넥신)을 통해 직접 접촉할 수 있다. 이 실시예에서, 공통 코넥신은 간극 연결을 통해 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포로부터 표적세포로 핵산의 전달을 용이하게 한다. 따라서, 일 실시예에서, 접촉은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포가 표적세포와 간극 연결을 형성할 수 있게 하는 조건 하에서 발생하고, 이에 의해 핵산은 간극 연결을 횡단함으로써 표적세포로 전달된다. 일 실시예에서, 간극 연결은 Cx40에 의해 형성된다. 다른 실시예에서, 간극 연결은 Cx43에 의해 형성된다. 다른 실시예에서, 간극 연결은 Cx45, Cx32 및/또는 Cx37로 형성된다.

[0157] "간접 접촉(Indirect contact)"은 본 발명의 맥락에서 직접 접촉 없이 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포로부터 표적세포로 핵산의 전달을 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들어, 표적세포에 근접한 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 표적세포와 간접적으로 접촉할 수 있다. 일 실시예에서, 표적세포와 간접적으로 접촉하는 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 엑소좀을 통해 표적세포에 핵산을 전달할 수 있다.

[0158] 다른 실시예에서, 표적세포와 직접 접촉하는 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 공통 코넥신을 통해 및 간접적으로 엑소좀을 통해 표적세포에 핵산을 전달할 수 있다.

[0159] 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포로부터 핵산을 수용하는 표적세포는 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포에 의해 핵산의 전달을 용이하게 하기 위해 직접 또는 간접적으로 접촉할 수 있는 한 특별히 제한되지는 않는다. 예시적인 표적세포는 세포융합(syncytial) 조직의 세포를 포함한다. 용어 "세포융합(syncytial)"은 본 발명의 맥락에서 작용 전위에서 전기적으로 동기화되는 간극 연결을 갖는 특수화된 막에 의해 상호연결된 세포로 이루어진 조직을 지칭하기 위해 사용된다. 예시적인 세포융합 세포는 심장근육 세포, 평활근 세포, 상피 세포, 결합조직 세포 또는 세포융합 암 세포를 포함한다. 일 실시예에서, 표적세포는 면역 세포이다. 예를 들어, 표적세포는 백혈구일 수 있다.

[0160] 일 실시예에서, 표적세포는 암 세포이다. 예를 들어, 표적세포는 췌장암 세포일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 폐암 세포일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 자궁경부암 세포일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 대장암 세포일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 간암 세포일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 골암 세포일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 골육종 세포일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 전립선암 세포일 수 있다. 다른 실시예에서, 표적세포는 흑색종 세포일 수 있다.

[0161] 다른 실시예에서, 표적세포는 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포와 공통 코넥신을 갖는다. 일 실시예에서, 표적세포는 Cx40을 발현한다. 다른 실시예에서, 표적세포는 Cx43을 발현한다. 다른 실시예에서, 표적세포는 Cx45, Cx32 및/또는 Cx37을 발현한다.

[0162] 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포로부터 표적세포로 핵산의 전달은 시험관 내 또는 생체 내에서 촉진될 수 있다. 예를 들어, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포로부터 표적세포로 핵산의 전달은 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 표적세포와 공동-배양함으로써 시험관 내에서 촉진될 수 있다. 예를 들어, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포로부터 대상 세포로의 핵산의 전달은 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 대상체에게 투여함으로써 생체 내에서 촉진될 수 있다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 예를 들어 정맥 내, 동맥 내 또는 복강 내 투여와 같이 전신적으로 투여될 수 있다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 또한 비강 내, 근육 내 또는 심장 내 투여에 의해 투여될 수 있다. 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 주변 조직과 같은 표적세포에 근접한 부위에 투여된다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 표적세포를 포함하는 조직으로 직접 투여된다.

#### [0163] 치료방법

[0164] 일 실시예에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 암 치료를 위해 투여될 수 있다. 용어 "암(cancer)"은 일반적으로 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 설명한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병 또는 림프성 악성종양을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 구체적인 예는 편평세포 암(예: 상피 편평세포 암), 소세포 폐암을 포함한 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종(adenocarcinoma) 및 폐의 편평암종, 복막(peritoneum)암, 간세포암, 위장암 및 위장관 기질(gastrointestinal stromal)암을 포함하는 위(gastric) 또는 위(stomach)암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간세포암(hepatoma), 유방암, 결장암(colon cancer), 직장암, 대장암, 자궁내막암 또는 자궁암, 타액선 암종, 신장(kidney) 또는 신세포(renal)암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암(hepatic carcinoma), 항문암종, 음경암종, 흑색종, 표면 퍼짐 흑색종, 렌티고 악성 흑색종, 낭성 흑색종(acral

lentiginous melanomas), 결절 흑색종, 다발성 골수종 및 B-세포 림프종(낮은 등급/여포성 비호지킨 림프종 (NHL); 소 림프종(SL) NHL; 중간 등급/소포체 NHL; 중간 등급 확산 NHL; 높은 등급 면역아세포 NHL; 높은 등급 림프모구(lymphoblastic) NHL; 고급 등급 소형 비절단 세포 NHL; 부피가 큰 질병 NHL; 맨틀 세포 림프종; 에이즈 관련 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's Macroglobulinemia) 포함); 만성 림프구성 백혈병(CLL); 급성 림프모구(lymphoblastic) 백혈병(ALL); 모발 세포 백혈병; 만성 골수아구성 백혈병; 및 이식 후 림프증식성 장애(PTLD), 및 모반증(phakomatoses), 부종(예: 뇌종양과 관련된 것), Meigs 증후군, 뇌 및 두경부암 및 관련된 전이와 관련된 비정상적인 혈관 증식을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0165] 일 실시예에서, 암은 KRAS에서 발암성 G12D 돌연변이를 갖는다. 당업자는 G12D 돌연변이가 코돈 12에 존재하는 단일 뉴클레오타이드 점 돌연변이라는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 암은 결장암(colon cancer), 폐암, 흑색종, 간암 및 골육종으로 구성된 군에서 선택될 수 있으며, 상기 암은 KRAS에서 발암성 G12D 돌연변이를 갖는다.

[0166] 예를 들어, 암은 췌장암이다. 다른 실시예에서, 암은 폐암이다. 다른 실시예에서, 암은 자궁경부암이다. 다른 실시예에서, 암은 대장암이다. 다른 실시예에서, 암은 간암이다. 다른 실시예에서, 암은 골육종이다. 다른 실시예에서, 암은 전립선암이다. 다른 실시예에서, 암은 흑색종이다.

[0167] 다른 실시예에서, 본 발명에 따라 치료된 암은 본 발명에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포와 공통 코넥신을 공유하는 세포를 포함한다. 이 실시예에서, 공통 코넥신은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포에서 암 세포로 핵산의 이동을 용이하게 한다.

[0168] 일 실시예에서, 암은 Cx40을 발현하는 세포를 포함한다. 다른 실시예에서, 암은 Cx43을 발현하는 세포를 포함한다. 다른 실시예에서, 암은 Cx40 및 Cx43을 발현하는 세포를 포함한다.

[0169] 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 개선된 보존 및/또는 귀환

[0170] 한 관점에서, 본원에 정의된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 그의 세포-표면 글리칸을 변형시키기 위해 처리된다. CD44와 같은 세포 표면 단백질상의 글리칸의 변형은 염증 부위의 미세 혈관에서 생체 내 발현된 E-셀렉틴 분자에 결합할 수 있는 E-셀렉틴 리간드를 생성하는 것으로 나타났다. 이러한 방식으로, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포상의 세포-표면 글리칸의 변형은 생체 내 조직 손상 부위로의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 귀환을 개선시킨다.

[0171] 본 발명자들은 또한 세포-표면 글리칸의 글리코실트랜스퍼라제 매개 변형이 동결보존 후 세포 생존력을 개선한다는 것을 확인하였다(즉, 동결-해동 사이클 후에 더 많은 세포가 생존가능함). 따라서, 일 실시예에서, 본 발명은 세포상의 세포-표면 글리칸을 변형시키는 조건 하에서 글리코실트랜스퍼라제(E.C 2.4)로 처리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 동결보존된 집단을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 동결보존하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 세포상의 세포-표면 글리칸을 변형시키는 조건 하에서 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 글리코실트랜스퍼라제로 처리하는 단계 및 조성물에서 세포를 동결보존하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 치료 세포를 생산하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 세포상의 세포-표면 글리칸의 변형시키는 조건 하에서 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 글리코실트랜스퍼라제로 처리하는 단계 및 조성물에서 세포를 동결보존하는 단계를 포함한다.

[0172] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 "치료(treatment)"는 글리코실트랜스퍼라제가 효소 활성을 갖는 조건 하에서 세포를 글리코실트랜스퍼라제와 접촉시키는 것을 포함한다. 이 실시예에서, 글리코실트랜스퍼라제는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포상의 세포 표면 글리칸을 변형시킨다. 세포 표면 글리칸 변형의 예는 푸코실화이다. 일 실시예에서, CD44는 변형된다. 다른 실시예에서, CD14는 변형된다. 다른 실시예에서, CD44, CD14, CD3 및 CD19 중 하나 이상이 변형된다.

[0173] 일 실시예에서, 표면 글리칸 변형은 유세포 분석을 사용하여 식별된다. 이 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 미처리 중간엽 계통 전구체 세포보다 푸코실화된 세포 표면 글리칸(들)의 1 로그 크기 높은 발현을 갖는다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 미처리 중간엽 계통 전구체 세포보다 푸코실화된 세포 표면 글리칸(들)의 2 로그 크기 높은 발현을 갖는다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 미처리 중간엽 계통 전구체 세포보다 푸코실화된 세포 표면 글리칸(들)의 3 로그 크기 높은 발현을 갖는다. 예를 들어, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 미처리 중간엽 계통 전구체 세포보다 푸코실화된 CD14의 1 로그 크기 높은 발현을 가질 수 있다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 미처리 중간엽 계통 전구체 세포보다 푸코실화된 CD14의 2 log 크기 높은 발현을 갖는다.



다. 다른 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 미처리 중간엽 계통 전구체 세포보다 푸코실화된 CD14의 발현이 3 로그 크기 높은 발현을 갖는다.

[0174] 일 실시예에서, "치료(treatment)"는 뉴클레오타이드 당 공여체 기질의 존재 하에 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 글리코실트랜스퍼라제와 접촉시키는 것을 포함한다. 적합한 공여체 기질은 푸코스, 갈락토스, 시알산 또는 N-아세틸 글루코사민을 포함한다. 예를 들어, 기질은 GDP-푸코스일 수 있다.

[0175] 예를 들어, 치료는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 집단을 푸코실트랜스퍼라제와 같은 외인성 글리코실트랜스퍼라제와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 이 실시예에서, 글리코실트랜스퍼라제는 세포 배양 배지 또는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 포함하는 다른 생리학적으로 허용가능한 용액에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 글리코실트랜스퍼라제를 포함하는 배지에서 배양될 수 있다. 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 글리코실트랜스퍼라제를 포함하는 배양 배지에 현탁된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 글리코실트랜스퍼라제를 포함하는 적합한 배지에서 배양 및 재현탁으로부터 해리될 수 있다. 일 실시예에서, 세포는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 사용하여 해리될 수 있다. 다른 실시예에서, 세포는 EDTA와 조합된 트립신 단독 oFr과 같은 프로테아제를 사용하여 해리될 수 있다.

[0176] 일 실시예에서, 세포 배양 배지는 1.8  $\mu\text{g}$  이상의 글리코실트랜스퍼라제를 포함한다. 다른 실시예에서, 세포 배양 배지는 2.0  $\mu\text{g}$  이상의 글리코실트랜스퍼라제를 포함한다. 다른 실시예에서, 세포 배양 배지는 2.5 $\mu\text{g}$  이상의 글리코실트랜스퍼라제를 포함한다. 다른 실시예에서, 세포 배양 배지는 2 내지 15  $\mu\text{g}$ 의 글리코실트랜스퍼라제를 포함한다. 다른 실시예에서, 세포 배양 배지는 2 내지 10  $\mu\text{g}$ 의 글리코실트랜스퍼라제를 포함한다. 다른 실시예에서, 세포 배양 배지는 2 내지 5  $\mu\text{g}$ 의 글리코실트랜스퍼라제를 포함한다. 일 실시예에서, 세포 배양 배지는 1.8  $\mu\text{g}$  이상의 푸코실트랜스퍼라제를 포함한다. 다른 실시예에서, 세포 배양 배지는 2.0  $\mu\text{g}$  이상의 푸코실트랜스퍼라제를 포함한다. 다른 실시예에서, 세포 배양 배지는 2.5  $\mu\text{g}$  이상의 푸코실트랜스퍼라제를 포함한다. 다른 실시예에서, 세포 배양 배지는 2 내지 15  $\mu\text{g}$ 의 푸코실트랜스퍼라제를 포함한다. 다른 실시예에서, 세포 배양 배지는 2 내지 10  $\mu\text{g}$ 의 푸코실트랜스퍼라제를 포함한다. 다른 실시예에서, 2 내지 5  $\mu\text{g}$ 의 푸코실트랜스퍼라제가 세포 배양 배지에 첨가된다. 이들 실시예에서, 글리코실트랜스퍼라제는 약  $5 \times 10^5$  중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포에 30 $\mu\text{l}$ 의 반응 부피로 제공될 수 있다.

[0177] 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 엑소푸코실레이션(exofucosylation)으로 알려진 과정에서 외인성 글리코실트랜스퍼라제로 처리될 수 있다. 이 구현예에서, 글리코실트랜스퍼라제는 낮은 수준의 2가 금속 보조인자를 갖는 생리학적으로 허용가능한 용액으로 제공될 수 있다. 다양한 구현예에서, 생리학적으로 허용가능한 용액은 완충된다. 생리학적으로 허용가능한 용액은, 예를 들어 Hank's Balanced Salt Solution, Dulbecco's Modified Eagle Medium, a HEPES buffer, a 2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES) buffer, phosphate buffered saline (PBS)와 같은 a Good's buffer (N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T N. Conolly, S. Izawa and R. M. M. Singh, Biochemistry 5, 467 (1966); N. E. Good, S. Izawa, Methods Enzymol. 24, 62 (1972) 참조)일 수 있다.

[0178] 일 실시예에서, 생리학적으로 허용가능한 용액에는 글리세롤이 실질적으로 없다.

[0179] 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 글리코실트랜스퍼라제를 발현하도록 세포를 변형시킴으로써 글리코실트랜스퍼라제로 처리된다. 예를 들어, 글리코실트랜스퍼라제는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포에 의해 세포 내에서 생성될 수 있다. 이 구현예에서, 글리코실트랜스퍼라제를 암호화하는 핵산 분자(들)가 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포로 도입된다. 글리코실트랜스퍼라제는 이어서 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포에 의해 발현되어 그의 표면 글리칸의 변형에 영향을 미친다.

[0180] 글리코실트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산이 임의의 적합한 인공 조작 수단에 의해 세포 내로 전달되거나 세포가 글리코실트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산을 운반하는 원래 변형된 세포의 자손인 경우, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 "글리코실트랜스퍼라제를 발현하도록 유전적으로 변형된(genetically modified to express a glycosyltransferase)"것으로 간주된다. 글리코실트랜스퍼라제를 발현하도록 세포를 안정적으로 또는 일시적으로 변형시킬 수 있다.

[0181] 일 실시예에서, 유전적으로 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포에서 글리코실트랜스퍼라제의 발현은 생체 내 염증 부위에서 세포의 보유를 향상시킨다. 예를 들어, 유전적으로 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 종양 또는 이의 전이에 유지될 수 있다. 다른 실시예에서, 유전적으로 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 장기 이식 거부 부위에 유지될 수 있다. 다른 실시예에서, 유전적으로 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄

기세포는 경색된 심장과 같은 손상 부위에 유지될 수 있다. 유전적으로 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포가 생체 내 염증 부위에 유지되는지 여부를 결정하기 위한 다양한 방법이 이용 가능하다. 일 실시예에서, 세포는 방사성추적자 또는 다른 적합한 표지를 사용하여 생체 내에서 이미징된다.

[0182] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용하여 유전적으로 변형될 수 있다. 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 시험관 내 바이러스 벡터로 처리된다. 유전적으로 변형된 바이러스는 핵산을 세포로 전달하기 위해 널리 적용되어왔다. 본원에 기재된 세포의 유전적 변형을 위한 예시적인 바이러스 벡터는 감마 레트로바이러스 벡터와 같은 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스, 무린 백혈병 바이러스 (MLV 또는 MuLV) 및 아데노바이러스를 포함한다. 예를 들어, 바이러스는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 비-바이러스 방법도 사용될 수 있다. 예는 플라스미드 전달 및 인테그라제 또는 트랜스포사제 기술, 리조솜 또는 단백질 형질 도입 도메인 매개 전달 및 전기천공과 같은 물리적 방법의 사용을 통한 표적화된 유전자 통합의 적용을 포함한다.

[0183] 유전적 변형의 효율은 거의 100%가 아니며, 일반적으로 성공적으로 변형된 세포 집단을 풍부하게 하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 변형된 세포는 새로운 유전자형의 기능적 특징을 이용함으로써 풍부화될 수 있다. 변형된 세포를 풍부하게하는 하나의 예시적인 방법은 lacZ의 발현에 기초한 네오마이신과 같은 약물에 대한 내성 또는 비색(colorimetric) 선택을 이용한 양성 선택이다.

[0184] 다양한 구현예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 하나 이상의 글리코실트랜스퍼라제 및 그의 적절한 공여체 기질(예: 당)과 접촉된다. 예를 들어, 세포는 2개의 글리코실트랜스퍼라제와 동시에 또는 순차적으로 접촉되며, 각각은 (확장) 코어 글리칸 구조에 적절한 결합으로 별개의 당당류를 첨가한다. 다른 실시예에서, 유전적으로 변형된 세포는 2개의 글리코실트랜스퍼라제를 발현한다.

[0185] 일 구현예에서, 처리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 CD44, 예를 들어, 알파(2,3)시알화된 CD44를 발현한다. 다른 구현예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 CD34 또는 PSGL-1을 발현하지 않는다. 일 실시예에서, 처리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 E-셀렉틴 및/또는 L-셀렉틴에 결합한다. 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 P-셀렉틴에 결합하지 않는다.

[0186] 다른 실시예에서, CD14는 처리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포에서 푸코실화된다. 다른 실시예에서, CD14 및 CD3는 처리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포에서 푸코실화된다.

[0187] 일 구현예에서, 글리코실트랜스퍼라제는 37°C에서 pH 6.5에서 분당 1.0mmol의 당을 전달할 수 있다.

[0188] 일 실시예에서, 글리코실트랜스퍼라제는 푸코실트랜스퍼라제(L-푸코스 당의 촉매 전달)이다. 다른 실시예에서, 글리코실트랜스퍼라제는 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제(예: 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 III, 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 IV, 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 VI, 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 VII, 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 IX, 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 X, 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 XI). 예를 들어, 세포는 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 VII로 처리될 수 있다. 다른 실시예에서, 세포는 알파 1,3 푸코실트랜스퍼라제 VI로 처리될 수 있다. 이들 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 푸코실화는 처리된 세포가 E-셀렉틴과 같은 셀렉틴에 결합하는 능력의 증가 및/또는 당업계에 HECA-452를 포함하지만 이에 제한되지 않는 sLeX에 결합한다고 공지된 항체와 처리된 세포의 반응성의 증가를 검출함으로써 확인될 수 있다.

[0189] 다른 실시예에서, 글리코실트랜스퍼라제는 갈락토실트랜스퍼라제 (갈락토스의 전달을 촉매함)이다. 다른 실시예에서, 글리코실트랜스퍼라제는 시알틸트랜스퍼라제(시알산의 전달을 촉매함)이다.

#### [0190] 세포 조성물

[0191] 본 개시내용의 방법을 수행함에 있어서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 조성물의 형태로 투여될 수 있다.

[0192] 본 개시내용에 따른 예시적인 조성물은 siRNA 또는 miRNA 또는 이를 발현하는 벡터를 도입하도록 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 조성물은 KIF11 siRNA, KRAS siRNA, PLK1 siRNA, 이들의 조합 또는 이들 발현하는 벡터를 도입하도록 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 포함할 수 있다.

[0193] 일 실시예에서, 조성물은 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함하고, 여기서 KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 800bp 내지 3,600bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, 조성물은 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함하고, 여기서 siRNA는 5'말단으로부터 900bp 내지 3,200bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, 조성물은 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함하고,

여기서 siRNA는 5'말단으로부터 900bp 내지 2,500bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, 조성물은 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함하고, 여기서 siRNA는 5'말단으로부터 3,200bp 전에 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 이들 실시예에서, KIF11 mRNA 전사체는 서열번호 1에 나타난 바와 같다(NCBI 참조번호 NM\_004523.3).

- [0194] 일 실시예에서, 조성물은 KIF11\_4를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함한다. 다른 실시예에서, 조성물은 KIF11\_6을 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함한다. 다른 실시예에서, 조성물은 KIF11\_9를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함한다. 다른 실시예에서, 조성물은 KIF11\_8, KIF11\_9, KIF11\_6, KIF11\_12, KIF11\_7 또는 KIF11\_4 중 하나 이상을 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함한다.
- [0195] 다른 실시예에서, 조성물은 하나 이상의 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함하고, 여기서 siRNA는 5'말단으로부터 800bp 내지 4,800bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, 조성물은 하나 이상의 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함하고, siRNA는 5'말단으로부터 900bp 내지 4,800bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, 조성물은 하나 이상의 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함하고, 여기서 siRNA는 5'말단으로부터 3,600bp 전에 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, 조성물은 하나 이상의 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함하고, 여기서 siRNA는 5'말단으로부터 3,600bp 후에 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, 조성물은 하나 이상의 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함하고, siRNA는 5'말단으로부터 4,000bp 후에 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, KIF11 siRNA는 5'말단으로부터 3,600bp 내지 5101bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다. 다른 실시예에서, 조성물은 하나 이상의 KIF11 siRNA를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함하고, siRNA는 5'말단으로부터 4,600bp 내지 5101bp 사이의 KIF11 mRNA 전사체에 결합한다.
- [0196] 다른 실시예에서, 조성물은 KIF11\_8, KIF11\_9, KIF11\_6, KIF11\_12, KIF11\_7, KIF11\_4, KIF11\_15 또는 KIF11\_13 중 하나 이상을 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함한다. 다른 실시예에서, 조성물은 KIF11\_15 또는 KIF11\_13 중 하나 또는 둘 모두를 도입하도록 변형된 줄기세포를 포함한다.
- [0197] 상기 참조된 KIF11 siRNA의 서열 세부사항은 상기 표 1에 제시되어 있다.
- [0198] 다른 실시예에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 상기 언급된 miRNA, 이들의 조합 또는 이를 발현하는 벡터를 도입하도록 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용에 따른 조성물은 hsa-miR-let7b, hsa-miR-155, hsa-miR-155-inh, hsa-miR-181-B1, hsa-miR-15a, hsa-miR-16-1, hsa-miR-21, hsa-miR-34a, hsa-miR-221, hsa-miR-29, 이들의 조합 또는 이를 발현하는 벡터를 도입하도록 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 포함할 수 있다.
- [0199] 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 조성물은 적어도 하나의 유형의 암 세포와 같은 표적세포에 대한 억제성 올리고뉴클레오타이드가 전달하기 전에 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 사멸시키지 않는 억제성 올리고뉴클레오타이드 또는 이를 발현하는 벡터를 도입하도록 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 포함할 수 있다.
- [0200] 일 실시예에서, 이러한 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제를 포함한다.
- [0201] 용어 "담체(carrier)" 및 "부형제(excipient)"는 활성 화합물의 저장, 투여 및/또는 생물학적 활성을 용이하게 하기 위해 담체계에 통상적으로 사용되는 물질의 조성물을 지칭한다(예: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company (1980) 참조). 담체는 또한 활성 화합물의 임의의 바람직하지 않은 부작용을 감소시킬 수 있다. 적합한 담체는 예를 들어 안정한, 예를 들어 담체 중의 다른 성분과 반응할 수 없다. 일 실시예에서, 담체는 치료에 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 유의미한 국소 또는 전신 부작용을 일으키지 않는다.
- [0202] 본 개시내용에 적합한 담체는 통상적으로 사용되는 것(예: 물, 식염수, 수성 텍스트로스, 락토스, 링거액, 완충 용액을 포함하며, 히알루로난 및 글리콜이 특히 용액에 대한(등장성인 경우) 예시적인 액체 담체이다. 적합한 약학적 담체 및 부형제는 전분, 셀룰로오스, 글루코스, 락토오스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카 겔, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 염화나트륨, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올, 등을 포함한다.
- [0203] 다른 실시예에서, 담체는 예를 들어 세포가 성장 또는 현탁되는 배지 조성물이다. 이러한 배지 조성물은 그것이 투여되는 대상체에서 어떠한 부작용도 유발하지 않는다.
- [0204] 예시적인 담체 및 부형제는 세포의 생존력 및/또는 질병의 치료 또는 예방 능력에 악영향을 미치지 않는다.

- [0205] 일 실시예에서, 담체 또는 부형제는 세포 및/또는 가용성 인자를 적합한 pH로 유지하여 생물학적 활성을 발휘하는 완충 활성을 제공하는데, 예를 들어 담체 또는 부형제는 인산 완충 식염수(PBS)이다. PBS는 세포 및 인자와 최소한으로 상호작용하고 세포 및 인자의 신속한 방출을 허용하기 때문에 매력적인 담체 또는 부형제를 나타내며, 이러한 경우, 본 개시내용의 조성물은 예를 들어 주사에 의해 혈류 또는 조직 또는 조직을 둘러싸거나 인접한 조직에 직접 적용하기 위한 액체로서 제조될 수 있다.
- [0206] 본원에 기재된 세포 조성물은 단독으로 또는 다른 세포와의 혼합물로서 투여될 수 있다. 상이한 유형의 세포는 투여 직전 또는 직후에 본 발명의 조성물과 혼합될 수 있거나, 투여 전 일정 기간 동안 함께 공동-배양될 수 있다.
- [0207] 일 실시예에서, 조성물은 유효량 또는 치료적 유효량의 세포를 포함한다. 예를 들어, 조성물은 약  $1 \times 10^5$  세포 내지 약  $1 \times 10^9$  세포 또는 약  $1.25 \times 10^3$  세포 내지 약  $1.25 \times 10^7$  세포를 포함한다. 투여될 세포의 정확한 양은 대상체의 연령, 체중 및 성별, 및 치료되는 장애의 정도 및 심각도를 포함한 다양한 요인에 의존한다.
- [0208] 예시적인 투여량은 적어도 약  $1.2 \times 10^8$  내지 약  $8 \times 10^{10}$  세포, 예컨대 약  $1.3 \times 10^8$  내지 약  $8 \times 10^9$  세포, 약  $1.4 \times 10^8$  내지 약  $8 \times 10^8$  세포, 약  $1.5 \times 10^8$  내지 약  $7.2 \times 10^8$  세포, 약  $1.6 \times 10^8$  내지 약  $6.4 \times 10^8$  세포, 약  $1.7 \times 10^8$  내지 약  $5.6 \times 10^8$  세포, 약  $1.8 \times 10^8$  내지 약  $4.8 \times 10^8$  세포, 약  $1.9 \times 10^8$  내지 약  $4.0 \times 10^8$  세포, 약  $2.0 \times 10^8$  약  $3.2 \times 10^8$  세포, 약  $2.1 \times 10^8$  내지 약  $2.4 \times 10^8$  세포를 포함한다. 예를 들어, 용량(a dose)은 적어도 약  $1.5 \times 10^8$  세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 용량은 적어도 약  $2.0 \times 10^8$  세포를 포함할 수 있다.
- [0209] 달리 말하면, 예시적인 용량은 적어도 약  $1.5 \times 10^6$  cells/kg(80kg 대상체)을 포함한다. 일 실시예에서, 용량은 적어도 약  $2.5 \times 10^6$  cells/kg을 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 용량은 약  $1.5 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^9$  cells/kg, 약  $1.6 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^8$  cells/kg, 약  $1.8 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^7$  cells/kg, 약  $1.9 \times 10^6$  내지 약  $9 \times 10^6$  cells/kg, 약  $2.0 \times 10^6$  내지 약  $8 \times 10^6$  cells/kg, 약  $2.1 \times 10^6$  내지 약  $7 \times 10^6$  cells/kg, 약  $2.3 \times 10^6$  내지 약  $6 \times 10^6$  cells/kg, 약  $2.4 \times 10^6$  내지 약  $5 \times 10^6$  cells/kg, 약  $2.5 \times 10^6$  내지 약  $4 \times 10^6$  cells/kg, 약  $2.6 \times 10^6$  내지 약  $3 \times 10^6$  cells/kg을 포함할 수 있다.
- [0210] 일 실시예에서, 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 약 5 % 이상, 약 10 % 이상, 약 15 % 이상, 약 20 % 이상, 약 25 % 이상, 약 30 % 이상, 약 35 % 이상, 약 40 % 이상, 약 45 % 이상, 약 50 % 이상, 약 55 % 이상, 약 60 % 이상, 약 65 % 이상, 약 70 % 이상, 약 75 % 이상, 약 80 % 이상, 약 85 % 이상, 약 90 % 이상, 약 95 % 이상, 약 99 % 이상의 조성물의 세포 집단을 포함한다.
- [0211] 본 개시내용의 조성물은 동결보존될 수 있다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포의 동결보존은 당업계에 공지된 저속 냉각 방법 또는 '빠른' 동결 프로토콜을 사용하여 수행될 수 있다. 바람직하게는, 동결보존 방법은 동결되지 않은 세포와 비교하여 동결보존된 세포의 유사한 표현형, 세포 표면 마커 및 성장률을 유지한다.
- [0212] 동결보존된 조성물은 동결보존 용액을 포함할 수 있다. 동결보존 용액의 pH는 전형적으로 6.5 내지 8이고, 바람직하게는 7.4이다.
- [0213] 동결보존 용액은 멸균된 비발열성 등장성 용액, 예를 들어 PlasmaLyte ATM을 포함할 수 있다. 100mL의 PlasmaLyte ATM은 526mg의 염화나트륨, USP (NaCl); 502mg의 글루콘산 나트륨 (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NaO<sub>7</sub>); 368mg의 아세트산 나트륨 삼수화물, USP (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O); 37mg의 염화칼륨, USP (KCl); 및 30mg의 염화 마그네슘, USP (MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O)를 포함한다. 그것은 항균제를 포함하지 않는다. 수산화 나트륨으로 pH를 조정한다. pH는 7.4(6.5 내지 8.0)이다.
- [0214] 동결보존 용액은 Profreeze<sup>TM</sup>을 포함할 수 있다. 동결보존 용액은 추가로 또는 대안적으로 배양 배지, 예를 들어 αMEM을 포함할 수 있다.
- [0215] 동결을 용이하게하기 위해, 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)와 같은 동결보호제(cryoprotectant)가 동결보존 용액에 첨가된다. 이상적으로, 동결보호제는 세포 및 환자에 대해 비독성이어야하고, 비항원성, 화학적으로 불



활성이며 해동 후 높은 생존력을 제공하고 세척없이 이식을 허용해야 한다. 그러나 가장 일반적으로 사용되는 동결보존제인 DMSO는 세포독성을 나타낸다. 히드록시에틸전분(HES)은 동결보존 용액의 세포독성을 감소시키기 위해 DMSO와의 대체물로서 또는 함께 사용될 수 있다.

[0216] 동결보존 용액은 DMSO, 히드록시에틸전분, 인간 혈청 성분 및 다른 단백질 증량제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 동결보존된 용액은 약 5 % 인간 혈청 알부민 (HSA) 및 약 10 % DMSO를 포함한다. 동결보존 용액은 하나 이상의 메티셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및 트레할로스를 추가로 포함할 수 있다.

[0217] 일 구현예에서, 세포는 42.5% Profreeze™/50% αMEM/7.5% DMSO에 현탁되고 제어 속도 냉동고에서 냉각된다.

[0218] 동결보존된 조성물은 해동되고 대상체에게 직접 투여되거나 예를 들어 히알루론산을 포함하는 다른 용액에 첨가될 수 있다. 대안적으로, 동결보존된 조성물은 해동될 수 있고 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 투여 전에 대체 담체에 재현탁될 수 있다.

[0219] 일 실시예에서, 본원에 기술된 세포 조성물은 단일 용량으로 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 세포 조성물은 다중 용량에 걸쳐 투여된다. 예를 들어, 2회 이상, 3회 이상, 4회 이상, 5회 이상, 6회 이상, 7회 이상, 8회 이상, 9회 이상, 10회 이상의 용량이다.

[0220] 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 분리, 또는 분리 및 풍부화되고, 동결보존 전에 생체 외 또는 시험관 내에서 배양이 확장된다(culture expanded). 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 분리, 또는 분리 및 풍부화되고, 동결보존되고, 해동되고, 이어서 생체 외 또는 시험관 내에서 배양이 확장된다. 또 다른 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 냉동보존 전 및 후에 배양이 확장된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포를 해동한 후 배양을 확장시킬 수 있다. 다양한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포 배양 방법이 당업계에 공지되어 있다. 일 실시예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 투여 전에 무 혈청 배지에서 배양 확장된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포는 투여 전에 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회 또는 그 이상 통과될 수 있다.

[0221] 중간엽 전구체 세포는 예를 들어 정맥 내, 동맥 내 또는 복강 내 투여와 같이 전신적으로 투여될 수 있다. 중간엽 전구체 세포는 또한 비강 내, 근육 내 또는 심장 내 투여에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 중간엽 전구체 세포는 대상체의 종양으로 직접 투여된다.

## [0222] 실시예

### [0223] 실시예 1 - 중간엽 전구체 세포에 의한 MiR/siRNA의 세포 전달

[0224] 코넥신의 인간 중간엽 전구체 세포 (MPC) 발현을 면역조직화학(Immunohistochemistry) 및 웨스턴 블롯을 통해 평가하였다. 생성된 데이터는 MPC가 기능적 Cx43 및 Cx40을 발현하고 또한 공통 코넥신을 발현하는 표적세포 유형과 기능적 간극 연결을 생성함을 입증한다(도 1a). 코넥신의 인간 중간엽 줄기세포 (MSC) 발현은 면역조직화학 및 웨스턴 블롯을 통해 또한 평가되었다. Punctate Cx43 및 Cx40 염색은 hMSC에서 관찰되었다(도 1b). 기능적 간극 연결은 또한 패치 클램프 기술을 사용하여 MPC에서 입증되었다(도 2). 다양한 종양 세포는 또한 Cx43 (도 3) 및 Cx40(데이터는 나타내지 않음)을 발현한다.

[0225] 간극 연결 전달을 통한 표적세포로의 핵산의 MPC 매개 전달을 조사하였다. MPC의 지질 기반 로딩은 형광 표지된 MiR로 입증되었다. 지질 기반의 절단(Lipofectamine™; Thermo Fisher Scientific; 도 4)를 사용하여 miR 및 siRNA의 높은 수준의 세포 내 로딩을 달성했다.

[0226] Mir16의 HeLa-Cx43 및 PANC-1 종양 세포로의 전달을 나타내는 실험도 수행되었다. Cy-5 Mir16 (Red; 100nM)으로 형질주입된 MPC를 GFP 발현 HeLa-Cx43 및 GFP 발현 PANC-1 세포와 함께 24시간 동안 공동-배양하였다. 도 5a는 HeLa 세포(A) 및 PANC-1 세포(B) 둘 다로의 Cy-5-Mir16의 전달을 보여준다. 도 5b는 GFP 발현 PANC-1 세포로의 KIF11 siRNA의 전달을 보여준다.

[0227] 공동-배양 분석은 이후 종양 세포주에 대한 MPC-로딩된 miR 및 siRNA의 항증식성 및 세포독성 효과를 측정하기 위해 확립되었다. PANC-1 및 KIF11 siRNA 로딩된 MPC(100 nM)의 공동-배양의 결과는 도 6a에 도시되어 있다. PANC-1 및 KIF11 siRNA 로딩된 MPC(500 nM)의 공동-배양의 결과는 도 6b에 도시되어 있다. 이러한 결과는 PANC-1 세포 사멸이 KIF11 siRNA 로딩된 MPC(100 nM)의 존재 하에 유도되고 KIF11 siRNA의 고용량(500 nM)의 존재 하에 증가됨을 보여준다.

[0228] SNUC2A 세포 및 KIF11 siRNA 로딩된 MPC(500 nM)의 공동-배양의 결과는 도 7에 도시되어 있다. 이들 결과는

KIF11의 MPC 전달이 SNUC2A 종양 세포 사멸을 유도함을 보여준다.

- [0229] SAOS2 세포 및 KIF11 siRNA 로딩된 MPC(500 nM)의 공동-배양의 결과는 도 8(a) 및 (b)에 도시되어 있다. 이러한 결과는 KIF11의 MPC 전달이 SAOS2 종양 세포 사멸을 유도함을 보여준다.
- [0230] PANC-1 종양 세포주 및 Mir-16 로딩된 MPC(100 nM)의 공동-배양은 또한 종양 세포 사멸을 유도하였다(도 9a). 로드되지 않은 MPC를 갖는 Mir-16 로딩된 MPC의 공동-배양은 MPC 증식을 억제했지만 로드되지 않은 MPC의 생존력에는 크게 영향을 미치지 않았다(도 9b).
- [0231] Cx43의 CRISPR/CAS9 매개 녹아웃은 PANC-1 세포에서 후속적으로 수행되어 MPC로부터 표적세포로 핵산의 전달에서 간극 연결의 역할을 평가하였다.
- [0232] PANC-1 세포 및 let7b 로딩된 MPC(500 nM)의 공동-배양은 PANC-1 세포 성장을 억제하였다. 그러나, let7b 로딩된 MPC와 공동-배양될 때 Cx43 녹아웃 PANC-1 세포의 성장은 유의하게 영향을 받지 않았으며, 이는 let7b의 전달이 Cx43을 통해 발생한다는 것을 시사한다(도 10a). 도 10b는 MPC에서 let7b의 직접 형질주입이 PANC-1 세포에서 관찰된 바와 같이 세포 증식을 감소시키지만 세포 사멸을 증가시키지 않음을 보여준다.
- [0233] PANC-1 세포 및 KIF11 siRNA 로딩된 MPC의 공동-배양은 세포 사멸을 유도하였다. KIF11 siRNA 로딩된 MPC와 공동-배양될 때 Cx43 녹아웃 PANC-1 세포에서 감소된 수준의 세포 사멸이 관찰되었다. 그러나, 세포 성장의 MPC 지시된 억제는 놀랍게도 Cx43 녹아웃 PANC-1 세포에서 유지되었다(도 11a 및 12). 이는 siRNA의 전달이 코넥신 43뿐만 아니라 다른 코넥신(예: Cx40, Cx45, Cx30.3, Cx31 또는 Cx31.1) 또는 엑소좀 형성과 같은 다른 메커니즘을 통해서도 발생하고 있음을 시사한다. 도 11b는 MPC에서 KIF11 siRNA의 직접적인 형질주입이 PANC-1 세포에서 관찰된 바와 같이 세포 증식을 감소시키지만 세포 사멸을 증가시키지 않았음을 나타낸다.
- [0234] PANC-1 세포 및 Mir-34a 로딩된 MPC의 공동-배양은 또한 세포 사멸을 유도하였다. Mir-34a 로딩된 MPC와 공동-배양될 때 Cx43 녹아웃 PANC-1 세포에서 감소된 수준의 세포 사멸이 관찰되었다. 그러나, 세포 성장의 MPC 지시된 억제는 놀랍게도 Cx43 녹아웃 PANC-1 세포에서 유지되었다(도 13a). 다시, 이것은 Mir-34a의 전달이 코넥신 43을 통해서뿐만 아니라, 예를 들어 다른 코넥신 또는 엑소좀의 형성과 같은 다른 메커니즘을 통해서도 발생하고 있음을 시사한다. 도 13b는 MPC에서 Mir-34a의 직접적인 형질주입이 PANC-1 세포에서 관찰된 바와 같이 세포 증식을 감소시키지만 세포 사멸을 증가시키지 않았음을 나타낸다.
- [0235] 세포 사멸 및 세포 증식에 \*?\*대한 miRNA 및 siRNA의 효과를 MPC, PANC-1, PC3 및 SOAS2 세포에서 평가하였다. 세포를 96-웰 또는 3.5cm 세포 배양 플레이트 상에 ~ 25% 합류(confluency)로 플레이팅하고, 형질주입 시작으로서 Lipofectamine RNAiMax를 사용하여 100 nM siRNA 또는 miR-mimic로 형질주입시켰다. hsa-miR-15A, hsa-miR-16-1, hsa-miR-34a, hsa-miR-155, hsa-let7b, hs\_KIF11\_4 siRNA 및 hs\_PLK1\_2 siRNA의 효과를 평가하였다. 형질주입 5일 후 세포 사멸 및 세포 성장에 대한 siRNA 및 miRNA의 효과를 측정하였다(도 14 내지 17). 도 18 및 19에 도시된 세포 사멸 및 WST 분석의 비교 분석. 이들 데이터는 형질주입된 miR 및 siRNA가 다양한 암 세포의 성장을 사멸 및/또는 억제할 수 있음을 보여준다.
- [0236] **실시예 2: siRNA의 MPC 기반 전달의 생체 내 효능**
- [0237] KIF 11(24시간 전)에 대해 500 nM siRNA가 로딩된 0.5 백만 MPC와 함께 또는 없이, 루시페라제를 안정적으로 발현하는 0.5 백만 PC3 세포로 6개의 마우스를 전립선에 이소성 이식하였다. 주사량은 PBS에서 60ul이었다. 일주일 후, 마우스에 루시펜을 주사한 후 IVIS 영상 시스템으로 영상화하여 종양을 시각화하였다(도 20a 및 b). 35일 후, MPC-처리된 마우스에 KIF11에 대해 500 nM siRNA가 로딩된 1 백만 MPC를 주사하였다. 대조군 마우스에 식염수를 주사하였다. 도 20c에 도시된 바와 같이, 평균 생존 시간은 대조군의 경우 38일, MPC 처리된 그룹의 경우 57일, P=0.0067(Log-Rank 테스트)이었다.
- [0238] 이러한 결과는 KIF11 로딩된 MPC가 마우스 PC3 전립선 이종이식(xenograft) 종양 모델에서 생존 시간을 상당히 증가시켰음을 보여준다.
- [0239] **실시예 3: siRNA의 MPC 기반 전달 및 세포 생존력의 용량 의존적 감소**
- [0240] PANC-1 세포를 KIF11 siRNA 로딩된 MPC(500 nM KIF11)와 공동-배양하였다. 6일간의 공동-배양으로 PANC-1 세포의 생존력이 77% 감소했다(도 21). 세포 성장률의 약 80 % 감소가 또한 관찰되었다(도 22).
- [0241] 이어서 PANC-1 세포를 증가량의 KIF11 siRNA(0 - 3.3 nM)로 직접 형질주입시켰다. 형질주입 후 6 일에 PANC-1 세포의 생존력을 측정 하였다. 직접 형질주입 후 세포 생존력의 용량 의존적 감소가 관찰되었다(도 23). 특히,

3.3 nM에서의 PANC-1 생존력의 최대 감소는 76%로, 500nM-형질주입된 MPC와의 공동-배양 후의 것과 유사하다. 도 6(a) 및 6(b)에 도시된 바와 같이, 500nM KIF11 siRNA로 형질주입된 MPC는 100nM KIF11 siRNA로 형질주입된 MPC에 비해 PANC-1 증식을 30% 이상 억제하였다. 이러한 결과는 100 내지 500nM의 KIF11 siRNA의 농도로 형질주입된 MPC에 의한 PANC-1 생존력의 단계적 억제와 일치한다. PANC-1 생존력의 직접적인 올리고뉴클레오타이드 억제의 효과가 3.3에서 0.5nM로 대략 30% 감소되었기 때문에, 본 발명자들은 표적 종양 세포로의 올리고뉴클레오타이드의 MPC 매개된 전달이 0.5-3.3nM의 종양 세포 내부에서 올리고뉴클레오타이드의 농도를 초래하기에 충분한 수준에서 발생한다고 결론지었다.

[0242] 추가 실험에서, MPC 또는 PANC-1 세포의 배양은 증가량의 KIF11 siRNA (0 - 500 nM)로 직접 형질주입되었다. PANC-1 세포에 대한 용량 반응 곡선은 도 24에, MPC는 도 25에 도시되어 있다.

[0243] PC3 세포는 또한 KIF11 siRNA 로딩된 MPC(500 nM KIF11)와 공동-배양되었다. 6일간의 공동-배양으로 세포 성장률이 약 55% 감소했다(도 26). 이어서 PC3 세포를 증가량의 KIF11 siRNA(0 - 500 nM)로 직접 형질주입시켰다. 용량 반응 곡선은 도 27에 도시되어 있다.

#### [0244] 실시예 4: MPC 로딩 및 생존력

[0245] 3개의 공여세포로부터의 MPC를 리포펙타민 RNAiMax 형질주입 시약(15  $\mu$ l/웰)을 사용하여 KIF11-FITC-siRNA(0-1000nM)로 형질주입시켰다. 형질주입 24시간 후 MPC에서 형광 표지의 축적을 유세포 분석법으로 분석하였다(도 28). MPC로의 siRNA 로딩을 위한 최적 농도는 ~ 500nM인 것으로 결정되었다.

[0246] 이어서 KIF11-FITC-siRNA가 로딩된 MPC를 PANC-1 또는 PC3 세포와 공동-배양 하였다. 공동-배양 후 24시간 후에 KIF11-FITC-siRNA가 로딩된 MPC로부터 암 세포로의 siRNA의 전달을 측정하였다. 24시간 이내에, 대략 10%의 siRNA가 암 세포로 전달되어 MPC 공여체와 관련하여 생존력에 거의 변동이 없는 것으로 나타났다(도 29).

[0247] 이어서 MPC 및 PANC-1 세포를 6 웰 플레이트에서  $1.3 \times 10^5$  cells/well로 배양하였다. 세포는 리포펙타민 RNAiMax 형질주입 시약(15  $\mu$ l/웰)을 사용하여 상이한 농도(0 내지 500 nM 최종)로 siRNA로 형질주입시켰다. 형질주입 2일 후 세포로부터 RNA를 수확하고 qRT-PCR(Taqman 유전자 발현 분석; Applied Biosystems; 하우스키핑 유전자 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(GAPDH)에 대한 s03929097\_g1 및 KIF11에 대한 Hs00189698\_m1)을 사용하여 유전자 발현을 평가하였다. 도 30 및 31은 KIF11 siRNA 종이 MPC 및 종양 세포에서 그의 기능을 유지함을 나타낸다(즉, 형질주입되고 MPC로부터 종양세포로 전달된 siRNA는 KIF11 mRNA를 감소시킬 수 있음).

#### [0248] 실시예 5: MPC 및 종양 세포 생존력에 대한 KIF11 siRNA의 효과

[0249] MPC, SJSA1, PANC-1, PC3, SAOS2 및 SNUC2a 세포는 96 웰 플레이트에 25-50%의 합류로 플레이팅되었다(처리 그룹당 n=3 웰). 세포를 100 nM의 KIF11 siRNA 또는 대조군 siRNA로 형질주입시켰다(Lipofectamine; RNAiMax; 표 1에 나타낸 siRNA 서열 세부사항; 도 32에 요약된 KIF11 서열 표적). 형질주입 5일 후 세포 생존력을 측정하였고, 생존력 데이터를 대조군 세포 데이터를 사용하여 표준화하였다(도 33). 놀랍게도, KIF11 mRNA 전사체의 5' 말단을 표적으로 하는 KIF11 siRNA는 특히 PANC-1 및 SAOS2 주에서 종양 세포 생존력을 감소시키는 더 큰 효과를 가졌다. 예를 들어, KIF11 mRNA 전사체의 3' 말단을 표적으로 하는 KIF11\_13 및 KIF11\_15는 시험된 다른 KIF11 siRNA와 비교하여 종양 세포 생존력에 상대적으로 낮은 영향을 미쳤다(도 33). KIF11\_4, KIF11\_6 및 KIF11\_9 siRNA는 MPC 생존력에 최소한의 영향을 미치면서 종양 세포 생존력을 일관되게 감소시켰다는 사실이 또한 놀라웠다(그림 33).

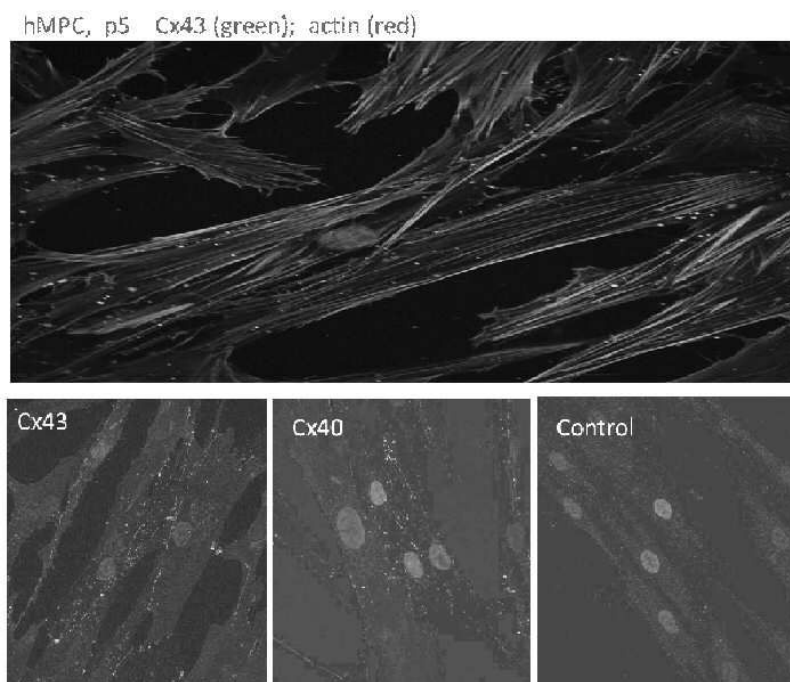
#### [0250] 실시예 6: MPC 및 MSC에서의 유전자 발현에 대한 KIF11 siRNA의 효과

[0251] MPC 및 MSC를  $1.25 \times 10^6$  cells/well로 6 웰 플레이트에 플레이팅하고 리포펙타민을 사용하여 KIF11 siRNA(100 nM)로 형질주입시켰다. 대조군 세포는 리포펙타민 단독으로 처리되었다. 세포 처리 48시간 후에 RNA를 수확하고 인간 Clariom S Assay (Affymetrix)를 사용하여 전체 유전자 발현을 분석하였다. 유전자 발현 분석은 MPC 및 MSC가 KIF-11 siRNA에 의해 하향조절되는 유전자와 관련하여 유사하다는 것을 나타내었다(도 34; 하향조절된 상위 10개의 유전자). KIF11 siRNA는 MPC에서 약 18배, MSC에서 약 20배인 KIF11 mRNA 수준을 감소시켰다. 상위 10개의 하향조절된 유전자를 살펴보면 FSTL1:MIR198, ALDH9A1, ELK3 & SYPL1 mRNAs도 MPC와 MSC 모두에서 감소했다. 상기 발견한 바와 함께, MPC 및 MSC 둘 다 Cx43 및 Cx40을 발현한다는 것을 주목하는 특히 실시예 1과 함께, 유전자 발현 분석은 MPC 및 MSC 둘 다 암 세포로의 올리고뉴클레오타이드 전달을 위한 비히클로서 사용될 수 있음을 추가로 지지한다.

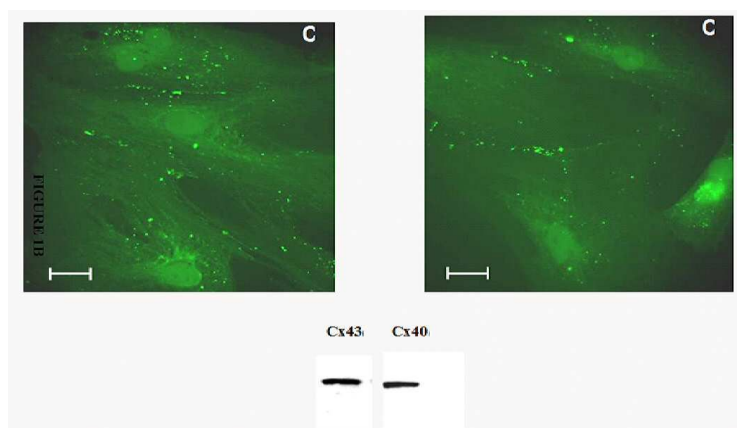
- [0252] 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면, 광범위하게 기술된 바와 같이 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어나지 않으면서 특정 실시예에 도식된 바와 같이 본 발명에 대한 다양한 변경 및/또는 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 그러므로, 본 실시예는 모든면에서 예시적이고 제한적이지 않은 것으로 간주되어야 한다.
- [0253] 본 출원은 2017년 11월 22일 출원된 62/589,764로부터 우선권을 주장하며, 그 개시내용은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0254] 위에서 논의된 모든 출판물은 그 전체가 본 명세서에 포함된다.
- [0255] 본 명세서에 포함된 문서, 법, 물질, 장치, 기사 등의 임의의 논의는 본 개시의 맥락을 제공하기 위한 목적일 뿐이다. 이들 문제의 일부 또는 전부가 종래 기술의 일부를 형성하거나 본 출원의 각 청구항의 우선권 날짜 이전에 존재하는 바와 같이 본 개시내용과 관련된 분야에서 일반적인 일반적인 지식인 것으로 인정되지 않아야 한다.
- [0256] **참고문헌**
- [0257] Ausubel et al. (editors) (1988, including all updates until present) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience.
- [0258] Bader et al. (2011) Gene Ther. 18:1121-6.
- [0259] Brown TA (editor) (1991) Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press.
- [0260] Coligan et al. (editors) (including all updates until present) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons.
- [0261] Glover and Hames (editors) (1995 & 1996) DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press.
- [0262] Griffiths-Jones, S. 2004 Nucl Acids Res, 32, D109-D111.
- [0263] Harlow and Lane (editors) (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory.
- [0264] Kozomara et al. 2013; Nucl Acids Res, 42, D68-D73.
- [0265] Lennox and Behlke (2011) Gene Ther. 18:1111-20.
- [0266] Perbal J (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons.
- [0267] Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- [0268] Simmons & Torok-Storb (1991) Blood. 78:55-62.

## 도면

### 도면1a

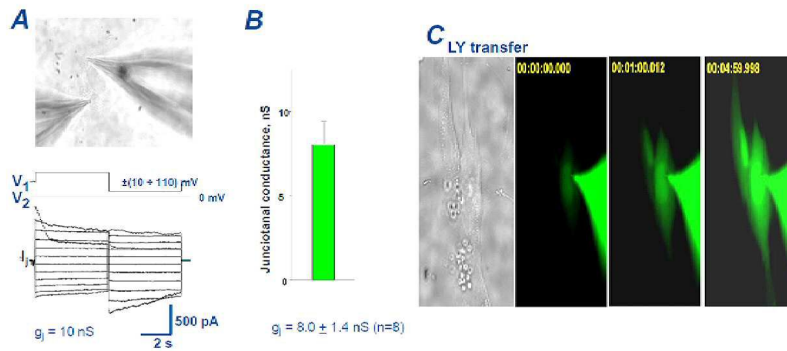


### 도면1b

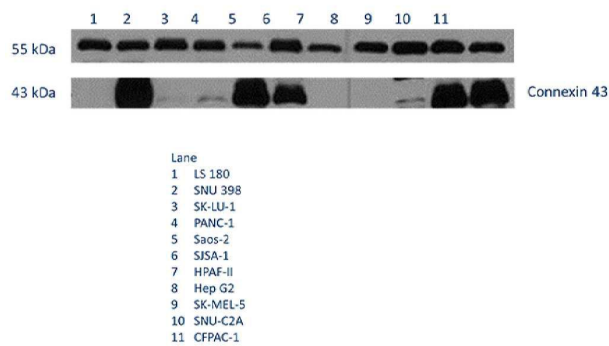




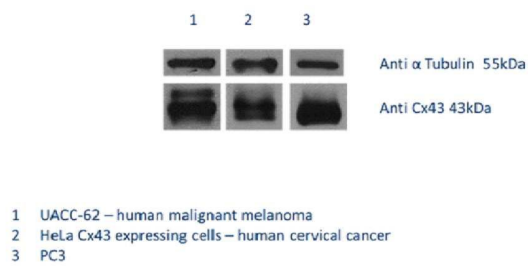
## 도면2



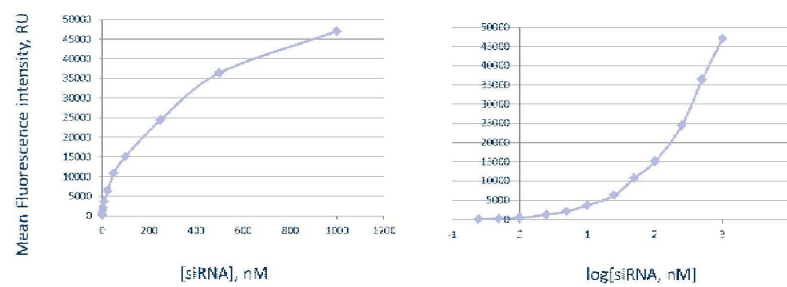
## 도면3a



## 도면3b



## 도면4

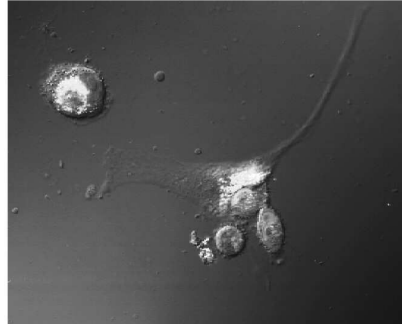


도면5a

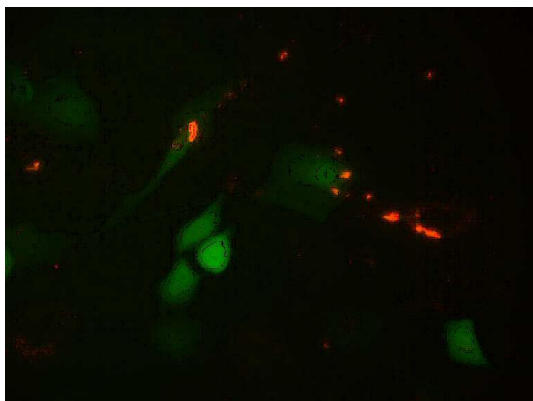
A MiR Transfer: MPC to HeLa-Cx43 Cell



B MiR Transfer: MPC to Panc-1 Tumor Cell

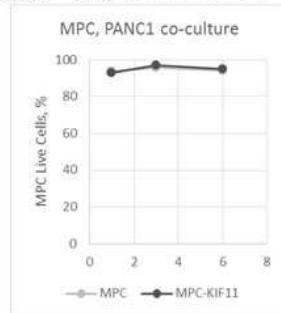
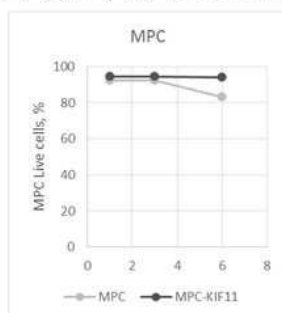


도면5b

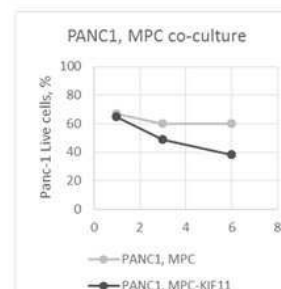
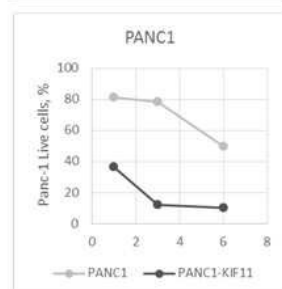
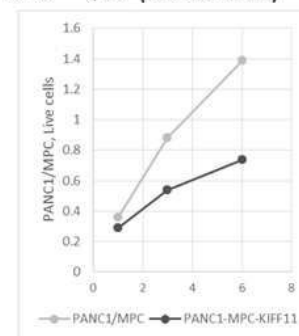


도면6a

직접 형질주입 (100 nM KIF11) 공동-배양 (100 nM KIF11)



공동-배양 (100 nM KIF11)

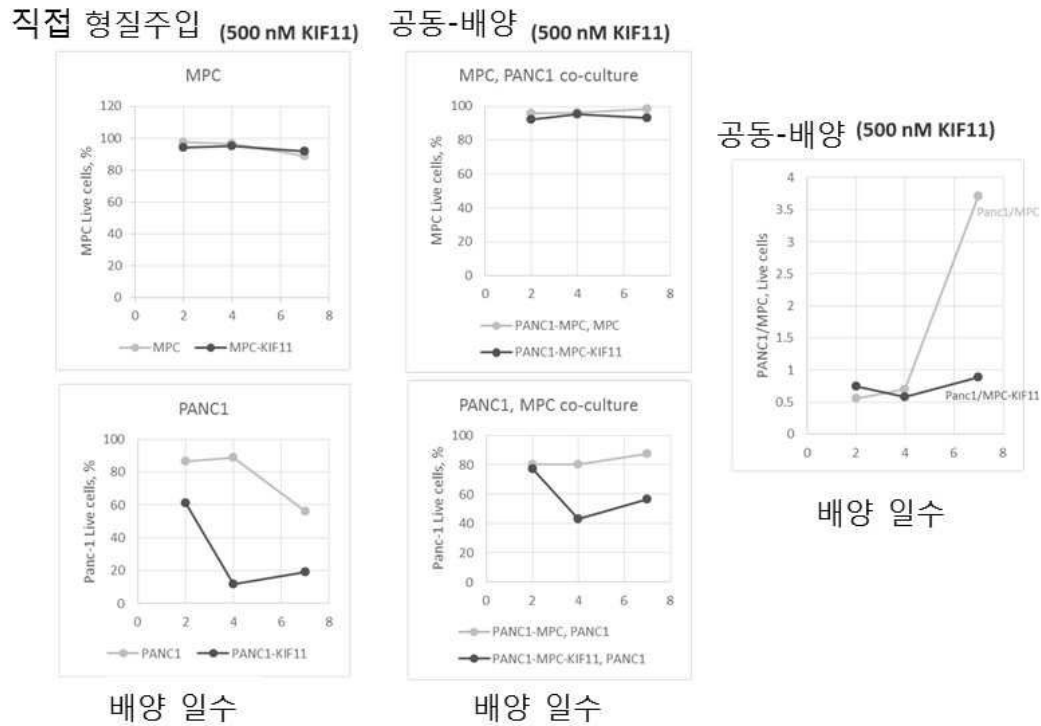


배양 일수

배양 일수

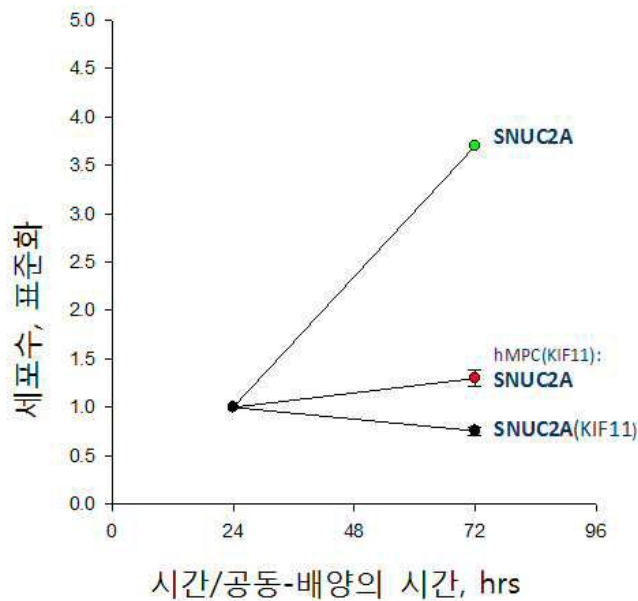
배양 일수

도면6b



도면7

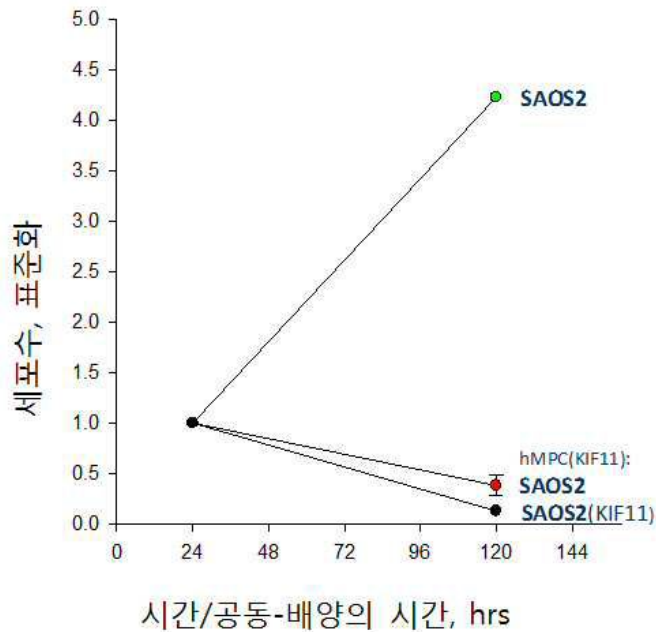
KIF11 (500 nM) 로딩된 MPC 및 SNUC2A 종양세포의 공동-배양:



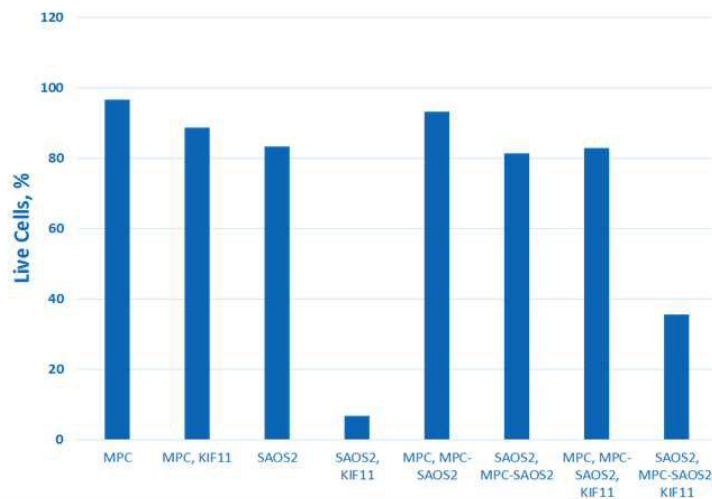


도면8a

KIF11 (500 nM) 로딩된 MPC 및 SAOS2 종양세포의 공동-배양:



도면8b



MPC: 단독 배양된 MPC 세포의 생존력

MPC, KIF-11: KIF-11로 직접 형질주입 후 MPC 세포의 생존력

SAOS2: 단독 배양된 SAOS2 세포의 생존력

SAOS2, KIF-11: KIF-11로 직접 형질주입 후 SAOS2 세포의 생존력

MPC, MPC-SAOS2: SAOS2 세포와 공동-배양된 MPC 세포의 생존력

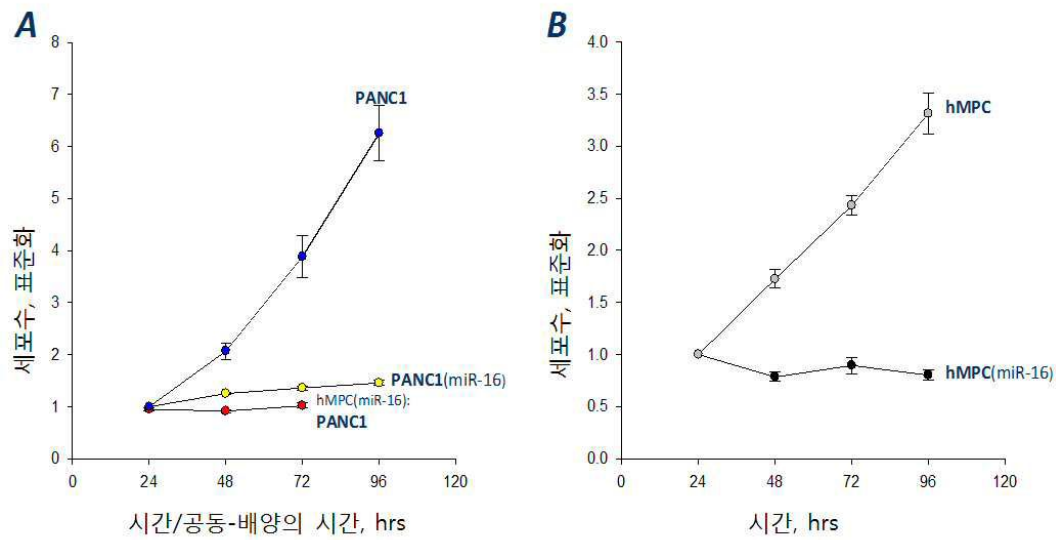
SAOS2, MPC-SAOS2: MPC 세포와 공동-배양된 SAOS2 세포의 생존력

MPC, MPC-SAOS2, KIF-11: KIF-11 로딩 및 SAOS2 세포와 공동-배양된 MPC 세포의 생존력

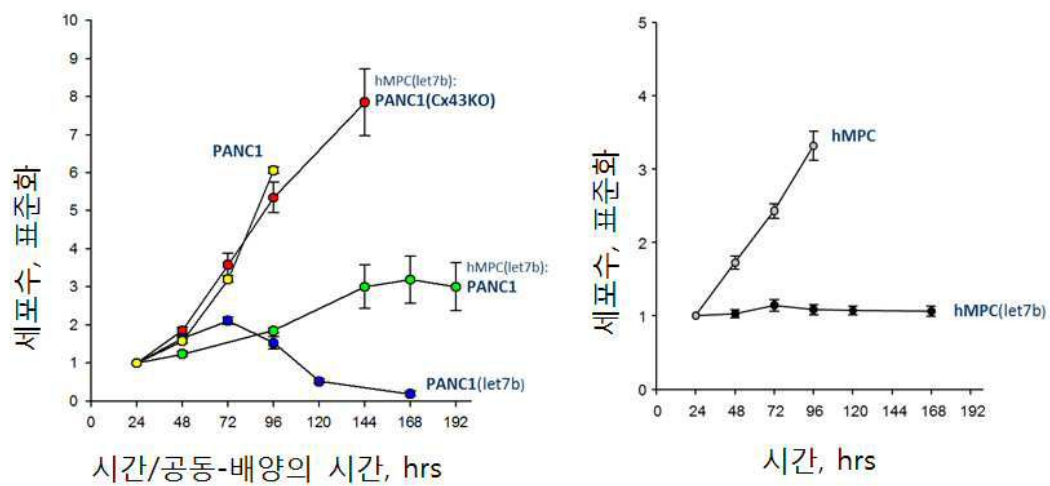
SAOS2, MPC-SAOS2, KIF-11: KIF-11 로딩된 MPC 세포와 공동-배양된 SAOS2 세포의 생존력

도면9

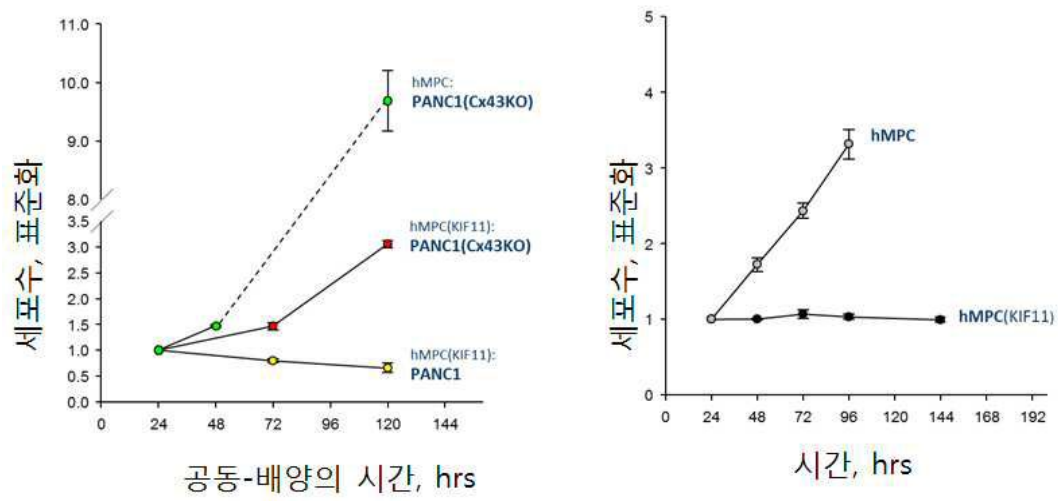
Mir-16 (100 nM) 로딩된 MPC 및 PANC-1 종양세포의 공동-배양:



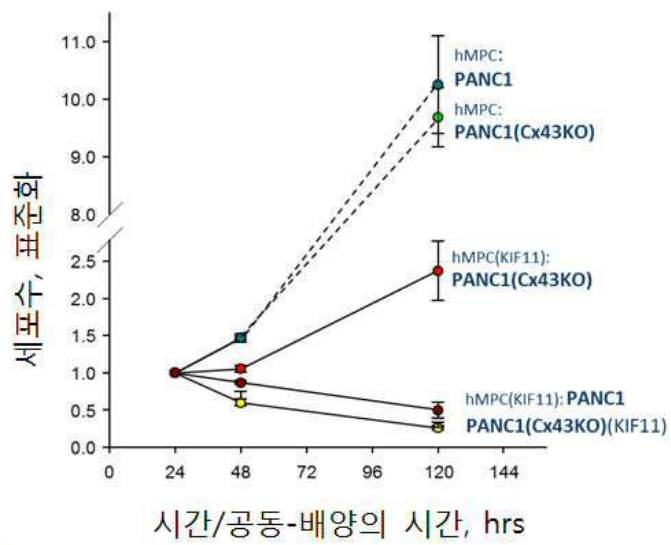
도면10



도면11

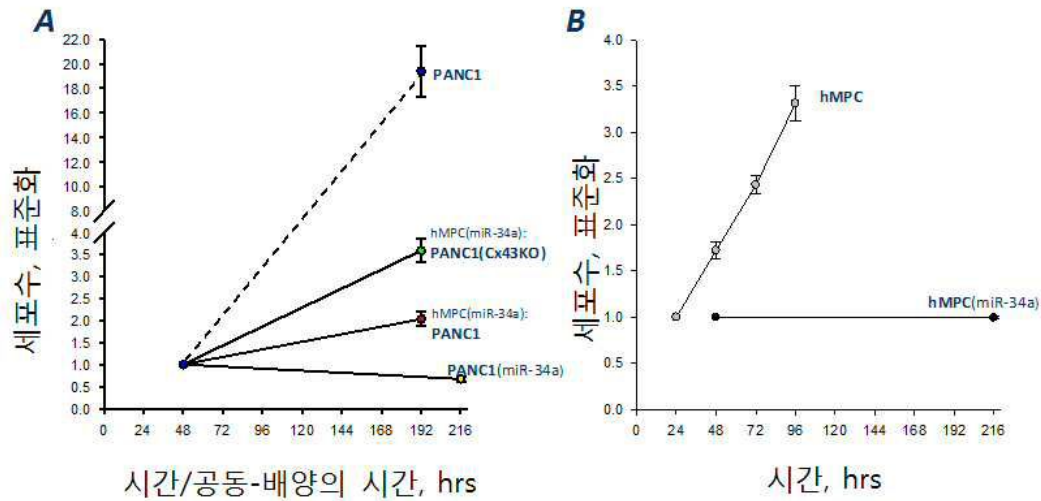


도면12



도면13

Mir-34a (500 nM) 로딩된 MPC 및 PANC1 종양세포의 공동-배양:

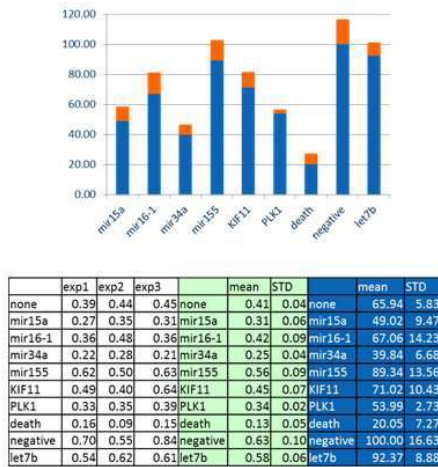


도면14a

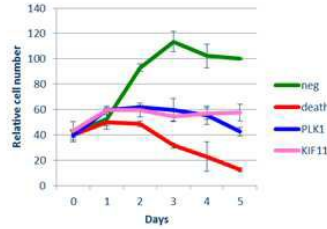


도면14b

5일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 MPC의 WST 분석

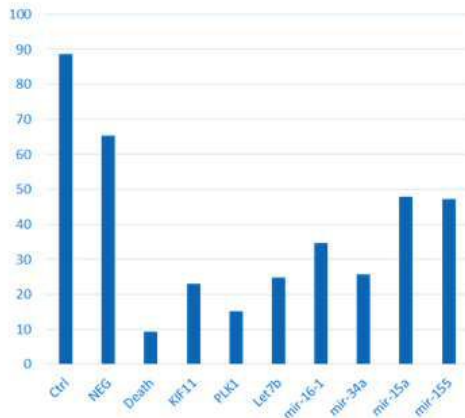


비표적화 siRNA, 사멸 siRNA, PLK1 siRNA 및 KIF11 siRNA로 형질주입된 MPC의 세포 수의 형광 분석

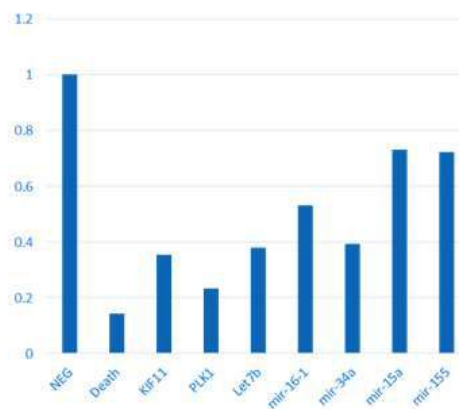


도면15a

살아있는 세포, %



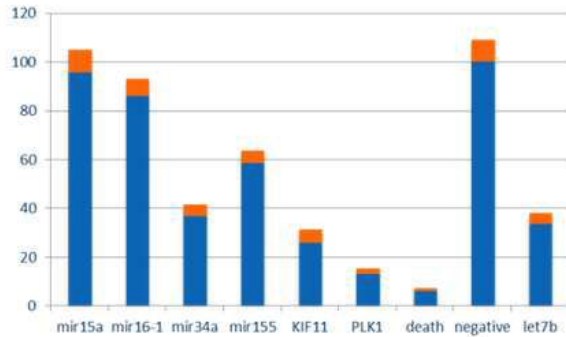
음성 대조군에 대한 표준화





도면15b

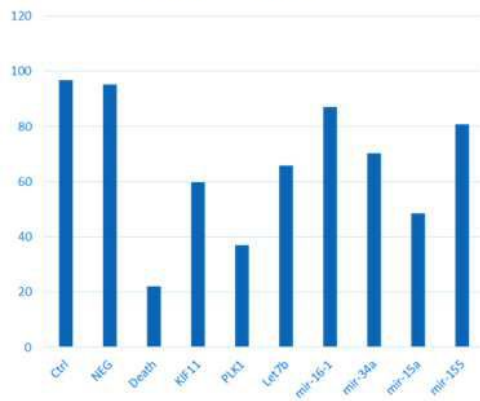
5일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 PANC-1 세포의 WST 분석



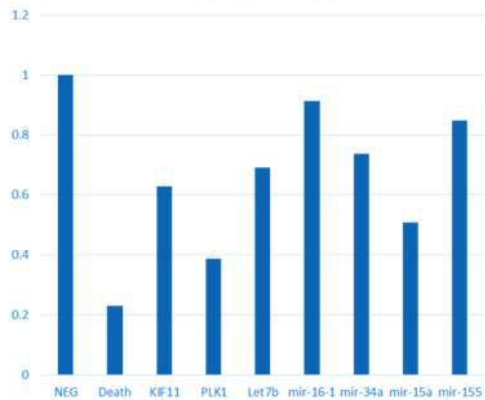
	exp1	exp2	exp3		mean	STD		mean	STD
none	1.69	1.65	1.70	none	1.68	0.03	none	128.59	2.17
mir15a	1.29	1.35	1.11	mir15a	1.25	0.12	mir15a	95.74	9.27
mir16-1	1.06	1.23	1.09	mir16-1	1.12	0.09	mir16-1	86.09	7.04
mir34a	0.42	0.47	0.54	mir34a	0.48	0.06	mir34a	36.67	4.79
mir155	0.69	0.82	0.77	mir155	0.76	0.07	mir155	58.45	5.13
KIF11	0.26	0.37	0.39	KIF11	0.34	0.07	KIF11	25.91	5.50
PLK1	0.15	0.15	0.20	PLK1	0.17	0.03	PLK1	12.96	2.22
death	0.09	0.06	0.09	death	0.08	0.02	death	5.95	1.34
negative	1.17	1.36	1.39	negative	1.31	0.12	negative	100.00	9.17
let7b	0.38	0.49	0.45	let7b	0.44	0.06	let7b	33.54	4.38

도면16a

살아있는 세포, %

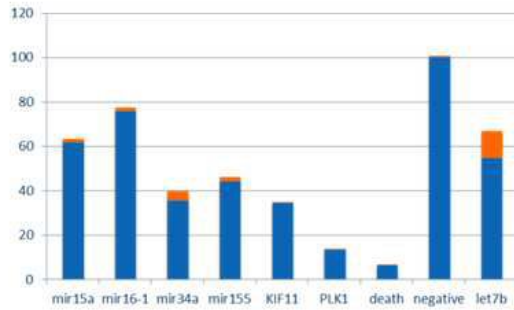


살아있는 세포, 음성 대조군에 대한 표준화



도면16b

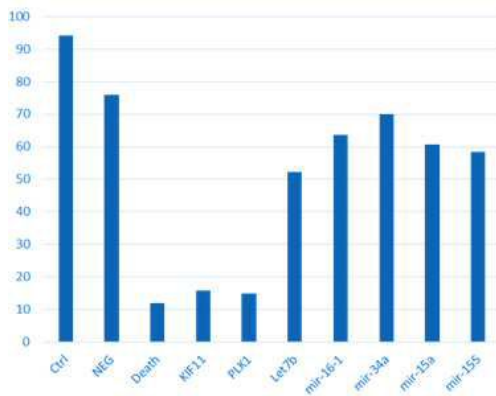
5 일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 PC3 세포의 WST 분석



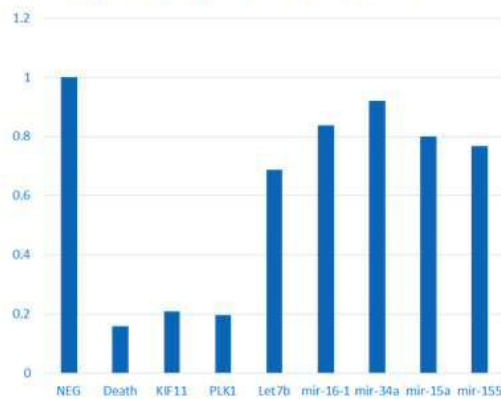
	exp1	exp2	exp3		mean	STD		mean	STD
none	1.83	1.90	1.82	none	1.87	0.05	none	101.2	1
mir15a	1.16	1.11	0.76	mir15a	1.14	0.03	mir15a	61.57	1.83
mir16-1	1.42	1.38	1.07	mir16-1	1.40	0.03	mir16-1	75.66	1.61
mir34a	0.71	0.60	0.69	mir34a	0.65	0.07	mir34a	35.49	4.06
mir155	0.79	0.84	0.61	mir155	0.81	0.04	mir155	44.12	1.95
KIF11	0.64	0.63	0.50	KIF11	0.64	0.01	KIF11	34.55	0.29
PLK1	0.24	0.25	0.17	PLK1	0.25	0.01	PLK1	13.30	0.49
death	0.12	0.11	0.03	death	0.11	0.01	death	6.17	0.35
negative	1.86	1.83	1.75	negative	1.85	0.02	negative	100.0	2
let7b	0.85	1.17	0.62	let7b	1.01	0.22	let7b	54.69	12.07

도면17a

살아있는 세포, %

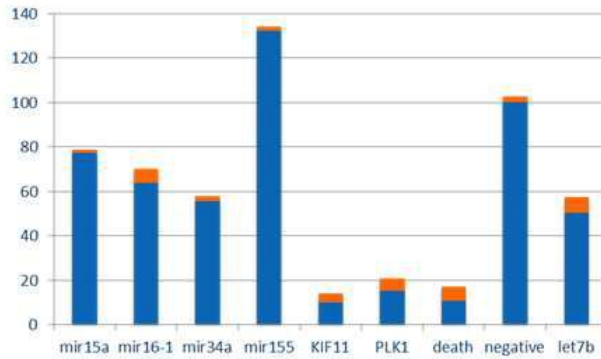


음성 대조군에 대한 표준화



도면17b

5일째에 mir-mimics, PLK1 siRNA 또는 KIF11 siRNA로 형질주입된 SAOS2 세포의 WST 분석



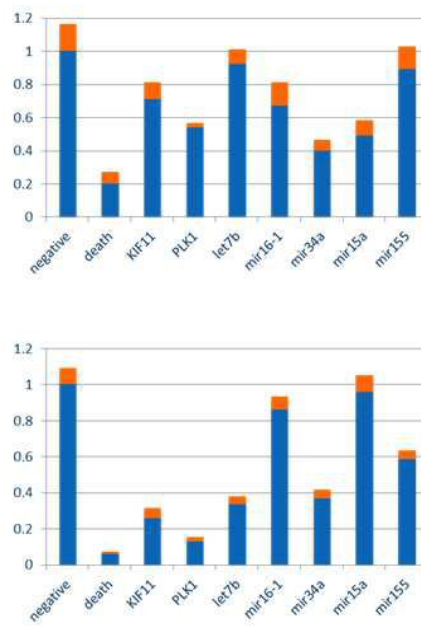
	exp1	exp2	exp3		mean	STD		mean	STD
none	1.20	1.19	0.98	none	1.19	0.01	none	129.00	1.26
mir15a	0.72	0.71	0.46	mir15a	0.72	0.01	mir15a	77.35	1.22
mir16-1	0.55	0.63	0.47	mir16-1	0.59	0.06	mir16-1	63.59	6.51
mir34a	0.50	0.53	0.53	mir34a	0.52	0.02	mir34a	55.64	1.99
mir155	1.21	1.24	0.96	mir155	1.22	0.02	mir155	132.05	1.99
KIF11	0.12	0.07	0.14	KIF11	0.09	0.04	KIF11	9.96	4.05
PLK1	0.18	0.11	0.10	PLK1	0.14	0.05	PLK1	15.20	5.42
death	0.14	0.06	0.07	death	0.10	0.06	death	10.60	6.59
negative	0.94	0.91	0.80	negative	0.93	0.02	negative	100.01	2.65
let7b	0.42	0.51	0.27	let7b	0.47	0.07	let7b	50.42	7.04

도면18

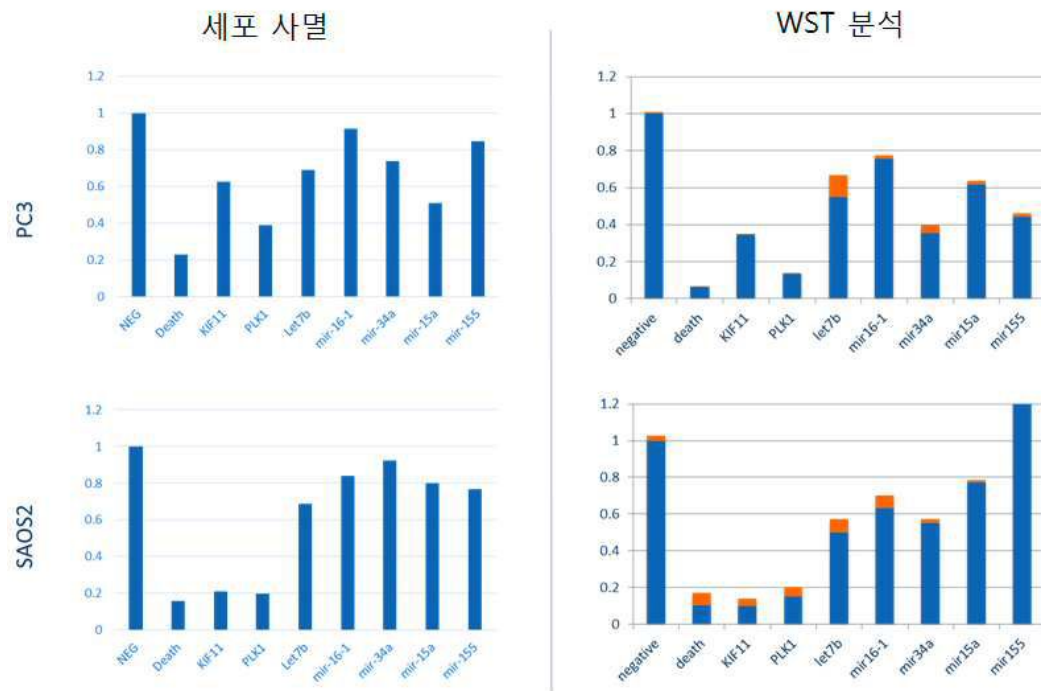
세포 사멸



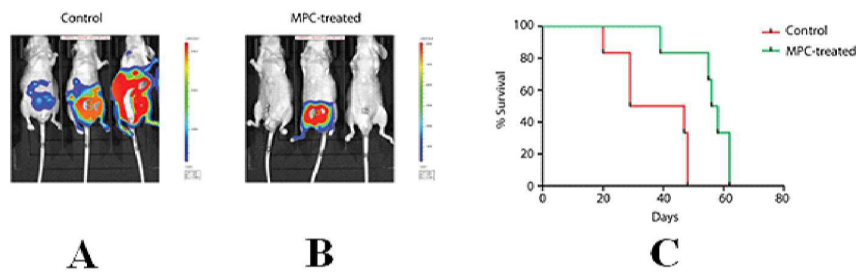
WST 분석



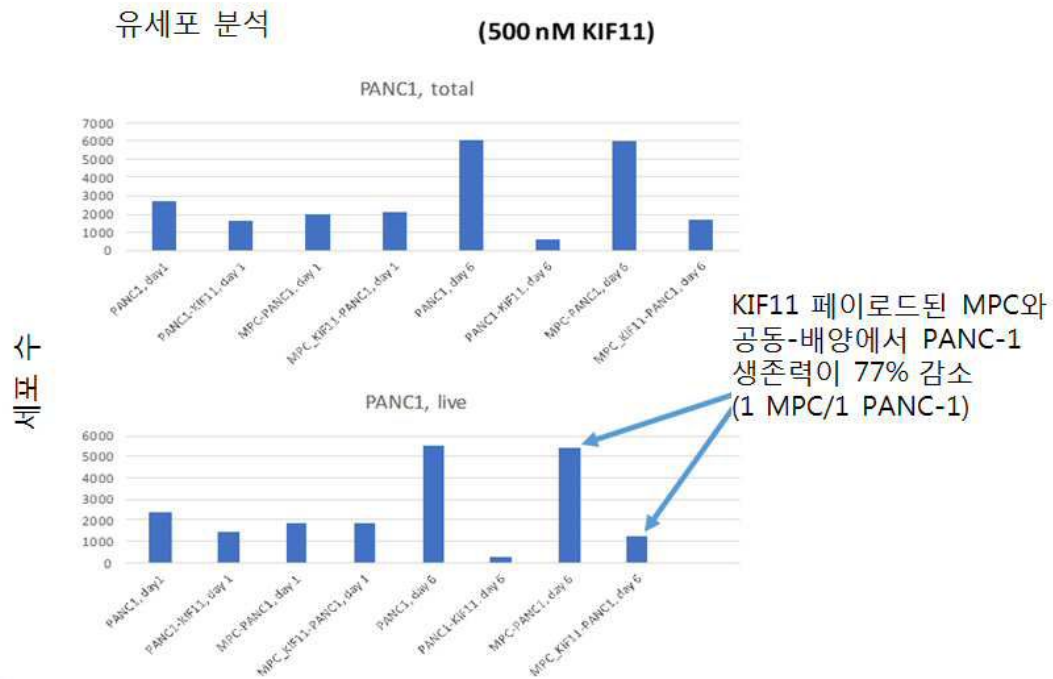
도면19



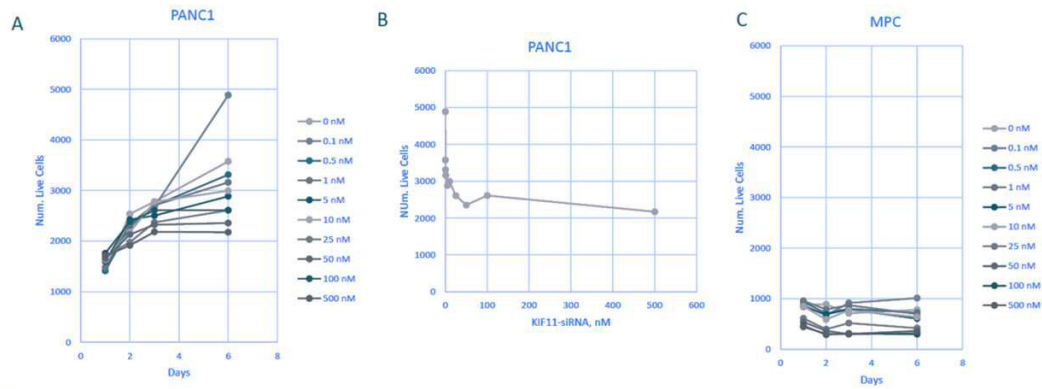
도면20



도면21

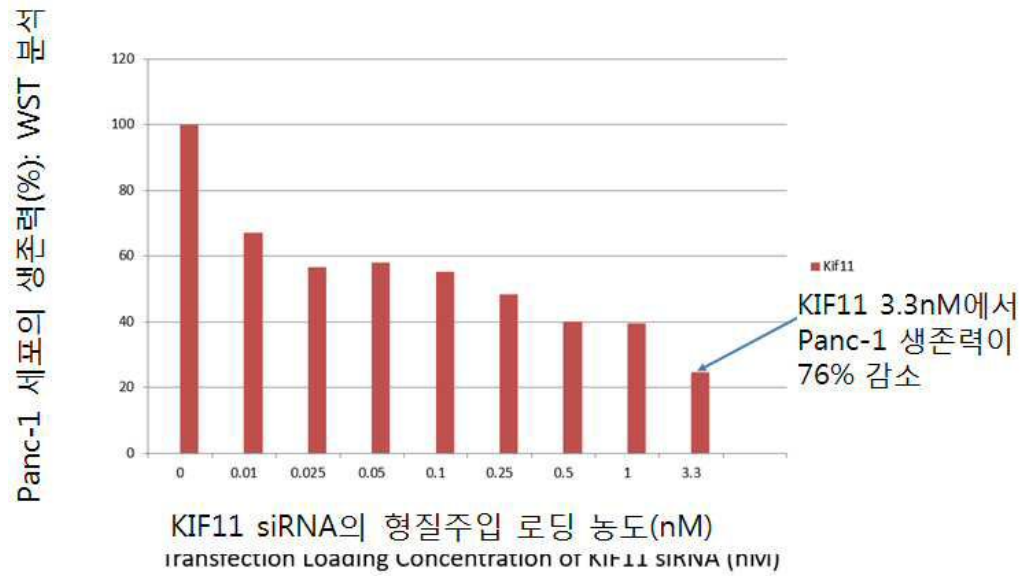


도면22

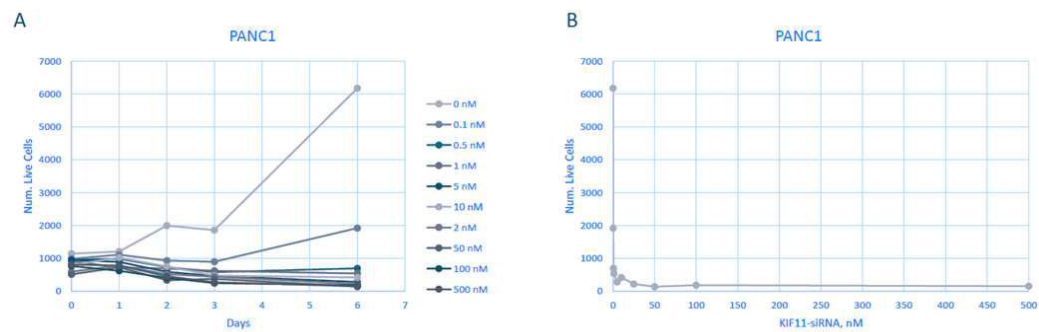




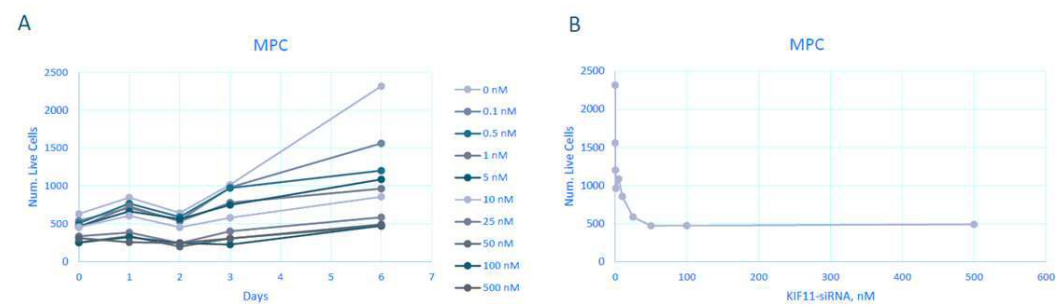
도면23



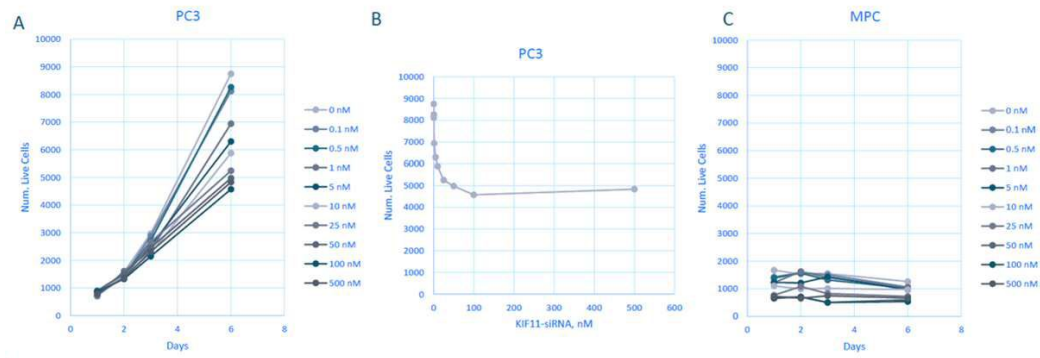
도면24



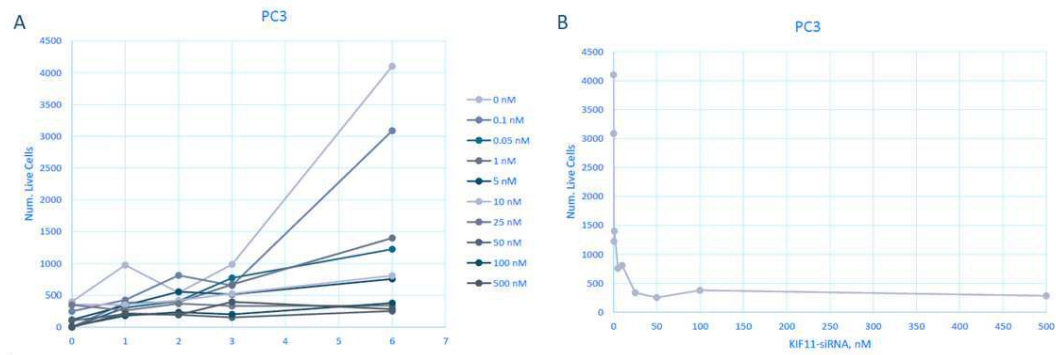
도면25



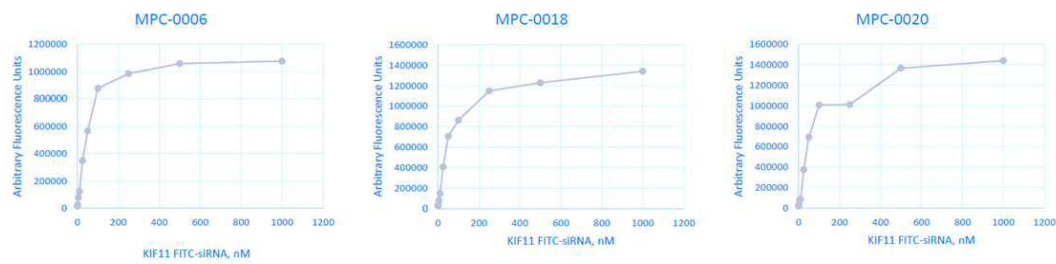
도면26



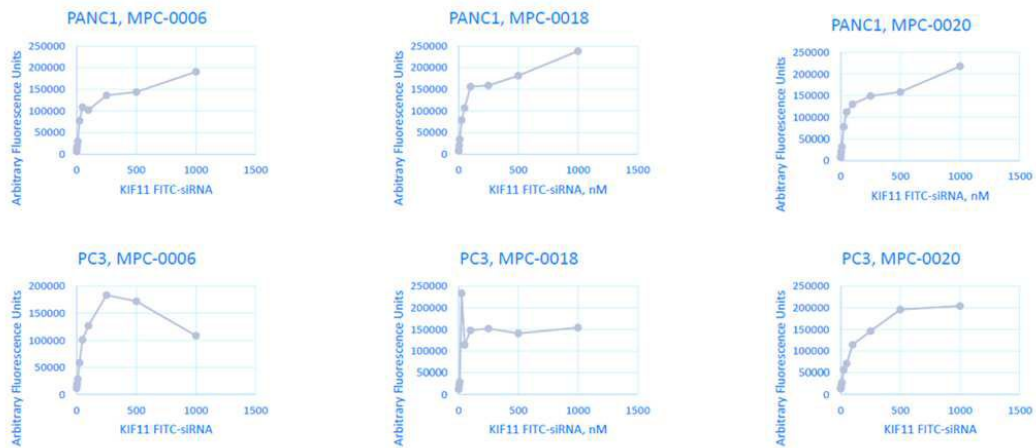
도면27



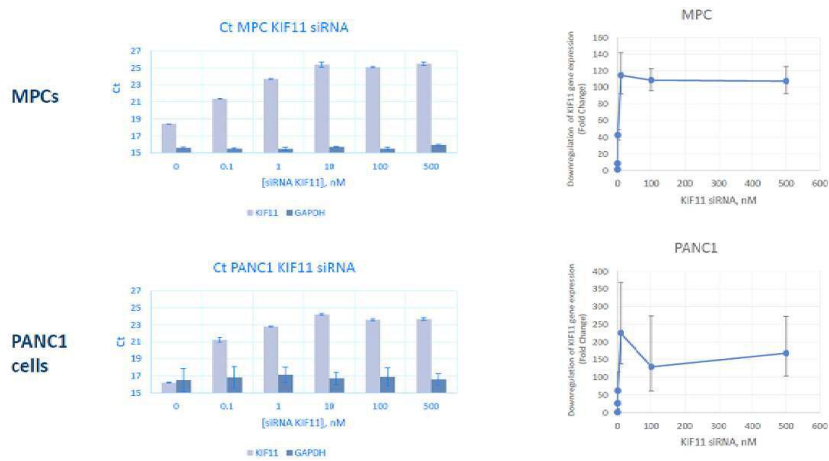
도면28



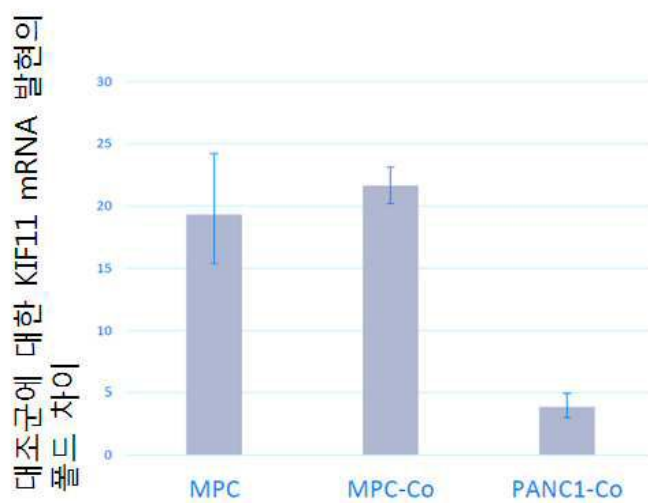
도면29



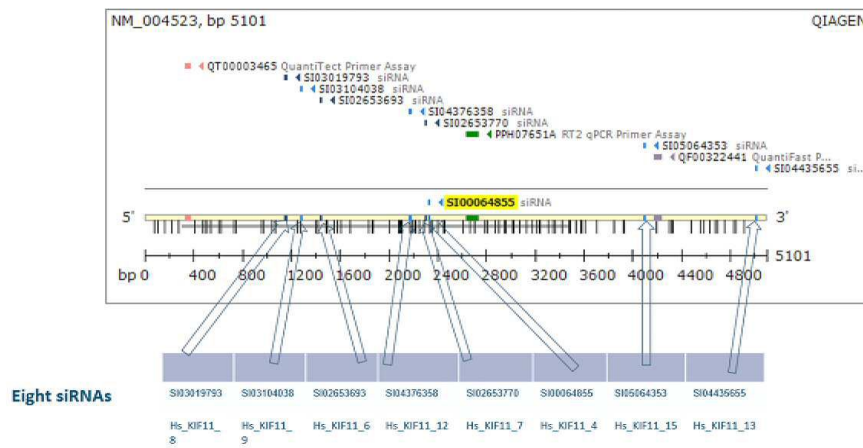
도면30



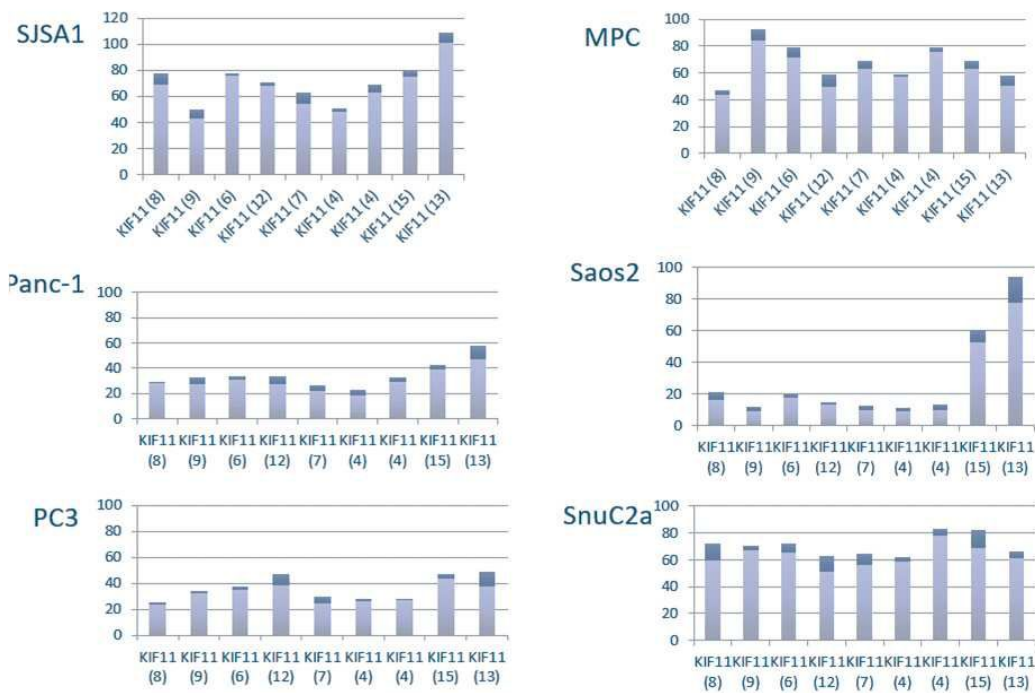
도면31



도면32



도면33



도면34

MPC에서 상위 10개의 하향조절된 유전자

ID	Trans Avg (log2)	Ctrl Avg (log2)	Trans Expressed	Ctrl Expressed	Fold Change	P-val	FDR P-val	Gene Symbol	Description
TC1000008471.hg.1	5.92	10.13	T	T	-18.47	3.77E-09	8.09E-05	KIF11	kinesin family member 11
TC0300012145.hg.1	13.24	14.93	T	T	-3.22	8.42E-06	0.0215	FSTL1; MIR198	folliculin like 1; microRNA 198
TC0100016260.hg.1	8.98	10.6	T	T	-3.07	0.0002	0.1311	ALDH9A1	aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1
TC1200008535.hg.1	9.68	11.28	T	T	-3.02	2.08E-06	0.0111	ELK3	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)
TC0700012180.hg.1	8.48	9.87	T	T	-2.63	6.56E-07	0.0047	SYPL1	synaptophysin-like 1
TC2000007016.hg.1	5.83	7.2	T	T	-2.58	0.0047	0.276	GIN51	GIN5 complex subunit 1 (Psf1 homolog)
TC0X00007937.hg.1	5.12	6.49	T	T	-2.58	0.0498	0.4747	DRP2	dystrophin related protein 2
TC0900010444.hg.1	8.32	9.55	T	T	-2.34	2.17E-05	0.0383	CARNMT1	carnosine N-methyltransferase 1
TC0200010264.hg.1	6.74	7.92	T	T	-2.27	0.0007	0.1658	MFSD6	major facilitator superfamily domain containing 6
TC0400012432.hg.1	9.4	10.51	T	T	-2.17	4.37E-06	0.0188	HMGB2	high mobility group box 2

MSC에서 상위 10개의 하향조절된 유전자

ID	Trans Avg (log2)	Ctrl Avg (log2)	Trans Expressed	Ctrl Expressed	Fold Change	P-val	FDR P-val	Gene Symbol	Description
TC1000008471.hg.1	5.19	9.51	T	T	-20.07	5.24E-08	0.0011	KIF11	kinesin family member 11
TC0300012145.hg.1	13.34	15.23	T	T	-3.71	7.13E-05	0.1386	FSTL1; MIR198	folliculin like 1; microRNA 198
TC0100009181.hg.1	5.52	7.28	T	T	-3.39	2.06E-06	0.0147	PLPPR4	phospholipid phosphatase related 4
TC0700012180.hg.1	8.23	9.96	T	T	-3.32	6.47E-05	0.1386	SYPL1	synaptophysin-like 1
TC1200008535.hg.1	9.21	10.84	T	T	-3.11	6.46E-06	0.0346	ELK3	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)
TC0400010132.hg.1	9.2	10.59	T	T	-2.61	0.0002	0.1399	TAPT1	transmembrane anterior posterior transformation 1
TC0100016260.hg.1	9.59	10.96	T	T	-2.58	1.42E-06	0.0147	ALDH9A1	aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1
TC0600008166.hg.1	5.45	6.73	T	T	-2.43	0.0039	0.3538	SLC25A27	solute carrier family 25, member 27
TC1700011121.hg.1	11.28	12.5	T	T	-2.34	0.0001	0.1386	TOB1	transducer of ERBB2, 1
TC1600008698.hg.1	10.68	11.89	T	T	-2.31	0.0392	0.4823	GSE1	Gse1 coiled-coil protein

서열 목록

- <110> Mesoblast International Sarl
- <120> CELLULAR COMPOSITIONS AND METHODS OF TREATMENT I
- <130> 526519PCT
- <160> 9
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 5101
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

agcgagccca ttggtccggc tactctgtct ctttttcaaa ttgaggcgcc gagtcgttgc      60
ttagtttctg gggattcggg cggagacgag attagtatt tggcggctcc gactggcgcg      120
ggacaaacgc cacggccaga gtaccgggta gagagcgggg acgccgacct gcgtgcgtcg      180
gtctccagg ccacgccagc gcccgagagg gaccaggagg actccggccc ctgtcggccg      240

ccaagccct cggccctca cagcggccag gtccgcggcc gggccttgat tttttggcgg      300
ggaccgtcat ggcgtcgag ccaaatcgt ctgcgaagaa gaaagaggag aagggaaga      360
acatccaggt ggtggtgaga tgcagacat ttaatttggc agagcggaaa gctagcgccc      420
attcaatagt agaattgat cctgtacgaa aagaagttag tgtacgaact ggaggattgg      480
ctgacaagag ctcaaggaaa acatacactt ttgatattgt gtttggagca tctactaac      540

```



agattgatgt ttaccgaagt gttgtttgtc caattctgga tgaagttatt atgggctata	600
attgcactat ctttgcgtat ggccaaactg gcactggaaa aacttttaca atggaagggtg	660
aaaggtcacc taatgaagag tatacctggg aagaggatcc cttggctggt ataattccac	720
gtacccttca tcaaattttt gagaaactta ctgataatgg tactgaattt tcagtcaaag	780
tgtctctgtt ggagatctat aatgaagagc tttttgatct tcttaatcca tcatctgatg	840
tttctgagag actacagatg tttgatgac cccgtaacaa gagaggagtg ataattaaag	900
gtttagaaga aattacagta cacaacaagg atgaagtcta tcaaatttta gaaaaggggg	960
cagcaaaaag gacaactgca gctactctga tgaatgcata ctctagtcgt tcccactcag	1020
ttttctctgt tacaatacat atgaaagaaa ctacgattga tggagaagag cttgttaaaa	1080
tcggaaagtt gaacttggtt gatcttgcag gaagtgaaaa cattggccgt tctggagctg	1140
ttgataagag agctcggaag gctggaaata taaatcaatc cctgttgact ttgggaaggg	1200
tcattactgc ccttgtagaa agaacacctc atgttcctta tcgagaatct aaactaacta	1260
gaatcctcca ggattctctt ggagggcgta caagaacatc tataattgca acaatttctc	1320
ctgcactctt caatcttgag gaaactctga gtacattgga atatgctcat agagcaaaga	1380
acataattgaa taagcctgaa gtgaatcaga aactcaccaa aaaagctctt attaaggagt	1440
atacgaggga gatagaacgt ttaaaacgag atcttgctgc agcccgtgag aaaaatggag	1500
tgtatatttc tgaagaaaat tttagagtca tgagtggaaa attaactgtt caagaagagc	1560
agattgtaga attgattgaa aaaattgggt ctgttgagga ggagctgaat agggttacag	1620
agttgtttat ggataataaa aatgaacttg accagtgtaa atctgacctg caaaataaaa	1680
cacaagaact tgaaccact caaaaacatt tgcaagaaac taaattacaa cttgttaaag	1740
aagaatatat cacatcagct ttggaaagta ctgaggagaa acttcatgat gctgccagca	1800
agctgcttaa cacagttgaa gaaactacaa aagatgtatc tggctccat tccaaactgg	1860
atcgtaagaa ggcagttgac caacacaatg cagaagctca ggatattttt ggcaaaaacc	1920
tgaatagtct gttaataat atggaagaat taattaagga tggcagctca aagcaaaagg	1980
ccatgctaga agtacataag accttatttg gtaatctgct gtcttccagt gtctctgcat	2040
tagataccat tactacagta gcacttggat ctctcacatc tattccagaa aatgtgtcta	2100
ctcatgtttc tcagattttt aatatgatac taaaagaaca atcattagca gcagaaagta	2160
aaactgtact acaggaattg attaattgtac tcaagactga tcttctaagt tcaactgaaa	2220
tgattttatc cccaactgtg gtgtctatac tgaaaatcaa tagtcaacta aagcatattt	2280

tcaagacttc attgacagtg gccgataaga tagaagatca aaaaaaggaa ctatgaggct	2340
ttctcagtat actgtgtaac aatctacatg aactacaaga aaataccatt tgttccttgg	2400
ttgagtcaca aaagcaatgt ggaaaccta cgaagacct gaagacaata aagcagaccc	2460
attcccagga acittgcaag ttaatgaatc ttggacaga gagattctgt gctttggagg	2520
aaaagtgtga aaatatacag aaaccactta gtagtgcca ggaaaatata cagcagaaat	2580
ctaaggatat agtcaacaaa atgacttttc acagtcaaaa attttgtgct gattctgatg	2640
gcttctcaca ggaactcaga aattttaacc aagaaggtag aaaattggtt gaagaatctg	2700
tgaaacactc tgataaactc aatggcaacc tggaaaaaat atctcaagag actgaacaga	2760
gatgtgaatc tcigaacaca agaacagttt atttttctga acagtgggta tcttccttaa	2820
atgaaagga acaggaactt cacaacttat tggaggttgt aagccaatgt tgtgaggctt	2880
caagttcaga catcactgag aaatcagatg gacgtaaggc agctcatgag aaacagcata	2940
acatttttct tgatcagatg actattgatg aagataaatt gatagcaca aatctagaac	3000
ttaatgaaac cataaaaatt ggtttgacta agcttaattg ctttctggaa caggatctga	3060
aactggatat cccaacaggt acgacaccac agaggaaaag ttatttatac ccatcaacac	3120
tggtagaac tgaaccagt gaacatctcc ttgatcagct gaaaaggaaa cagcctgagc	3180
tggtaatgat gctaaactgt tcagaaaaca acaaagaaga gacaattccg gatgtggatg	3240
tagaagaggc agttctgggg cagtatactg aagaacctct aagtaagag ccatctgtag	3300
atgctggtgt ggattgttca tcaattggcg gggttccatt tttccagcat aaaaaatcac	3360
atggaaaaga caaagaaaac agaggcatta acacactgga gaggtctaaa gtggaagaaa	3420
ctacagagca ctigggtiaca aagagcagat tacctctgcg agcccagatc aacctttaat	3480
tcacttgggg gttggcaatt ttatttttaa agaaaactta aaaataaac ctgaaacccc	3540
agaacttgag ccttgtgtat agattttaaa agaatatata tatcagccgg gcgcggtggc	3600
tcatgcctgt aatcccagca ctttgggagg ctgaggcggg tggattgctt gagcccagga	3660
gtttgagacc agcctggcca acgtggcaaa acctcgtctc tgttaaaaat tagccgggcg	3720
tgggtgcaca ctctgtaat ccagctact ggggaggctg aggcacgaga atcacttgaa	3780
cccaggaagc ggggttgtag tgagccaaag gtacaccact acactccagc ctgggcaaca	3840
gagcaagact cggctcctaaa aacaaaattt aaaaaagata taaggcagta ctgtaaatc	3900
agttgaattt tgatatctac ccatttttct gtcaccccta tagttcactt tgtattaaat	3960
tgggtttcat ttgggatttg caatgtaaat acgtatttct agttttcata taaagtagtt	4020

cttttataac aaatgaaaag tatttttctt gtatattatt aagtaatgaa tatataagaa 4080  
ctgtactctt ctcagcttga gcttacatag gtaaataatca ccaacatctg tccttagaaa 4140  
ggaccatctc atgttttttt tcttgctatg acttgtgtat tttcttgcat cctccctaga 4200  
cttccctatt tcgctttctc ctgggtcac tttctccctt tttatttttc accaaacctat 4260  
ttgtagagct acaaaaggta tcctttctta ttttcagtag tcagaatttt atctagaaat 4320  
cttttaacac ctttttagtg gttatttcta aaatcactgt caacaataaa tctaacccta 4380  
gttgatccc tcctttcagt attttccact tgttgcccca aatgtgaaag catttcattc 4440

ctttaagagg cctaactcat tcacctgac agagttcaca aaaagccac ttaagagtat 4500  
acattgctat tatgggagac caccagaca tctgactaat ggctctgtgc ccacactcca 4560  
agacctgtgc ctttagaga agctcacaat gatttaagga ctgtttgaaa cttccaatta 4620  
tgtctataat ttatattctt ttgtttacat gatgaaactt tttgtgttg cttgtttgta 4680  
tataatacaa tgtgtacatg tatctttttc tcgattcaaa tcttaaccct taggactctg 4740  
gtatttttga tctggcaacc atatttctgg aagttgagat gtttcagctt gaagaaccaa 4800  
aacagaagga atatgtacaa agaataaatt ttctgtcac gatgagtta gtgtgtaaag 4860

tttagagaca tctgacttg atagctaaat taaaccaaac cctattgaag aattgaatat 4920  
atgtacttc aagaaactaa attgatctcg tagaattatc ttaataaaat aatggctata 4980  
atttctctgc aaaatcagat gtcagcataa gcgatggata atacctaata aactgcctc 5040  
agtaaatcca tggtaataa atgtggtttc tacattaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5100  
a 5101

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 2

ctcggaagc tggaaatata a 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 3

gagggcgctac aagaacatct a	21
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 4	
acggaggaga tagaacgttt a	21
<210> 5	
<211> 21	
<212>	
DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 5	
caggaattga ttaatgtact c	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 6	
gccgataaga tagaatatca a	21
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial sequence	
<400> 7	
ctagatggct ttctcagtat a	21
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Artificial sequence

<400> 8

cagcttgagc ttacataggt a

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 9

taagcgatgg ataataccta a

21