

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0000366 (43) 공개일자 2011년01월03일
(51) Int. Cl. C12N 15/87 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01) C12N 13/00 (2006.01) C07H 21/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0057826 (22) 출원일자 2009년06월26일 심사청구일자 2009년06월26일	(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천 남구 용현동 253 인하대학교 (72) 발명자 김동일 인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남119호 전수환 인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 산학협력단 기술이전센터 (뒷면에 계속) (74) 대리인 김순웅	

전체 청구항 수 : 총 11 항

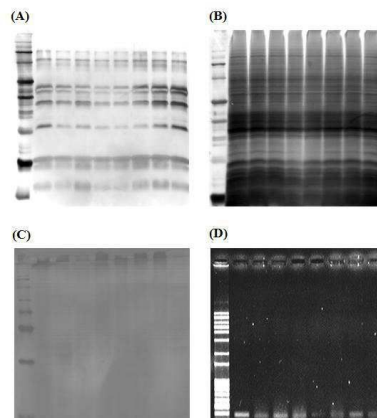
(54) 식물세포의 유전자 전달용 siRNA와 친수성 고분자 접합체 및 상기 접합체를 이용한 식물세포내로의 유전자 전달방법

(57) 요약

본 발명은 식물세포의 유전자 전달체로 기능할 수 있는 siRNA (short interference RNA) 와 친수성 고분자 접합체 및 상기 접합체를 이용한 식물세포내로의 유전자 전달방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 PEI, PVP, PEG 또는 PVA와 siRNA가 특정 비율로 결합된, 식물세포내로의 유전자 전달을 위한 안정성을 확보한 접합체 및 초음파 처리를 통하여 유전자 전달효율을 증대시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 siRNA와 친수성 고분자 접합체는 세포벽이 존재하는 식물세포에 유전자를 전달할 수 있으며, 초음파의 병행 처리는 식물세포 투수성을 증진시켜 유전자 전달 효율을 극대화할 수 있기 때문에, 본 발명에 따르면, 식물세포 내에서의 특정 유전자의 발현을 조절을 통하여 저비용 고효율로 식물세포 특정 유전자의 기능을 확인할 수 있게 된다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

권준영

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

최용수

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

전혜경

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 하이테크센터
1201호 HCI 연구실

특허청구의 범위

청구항 1

siRNA-친수성 고분자가 1: 10 내지 1: 100의 비율로 결합된 접합체로서, 상기 친수성 고분자는 PEI, PVP, PEG 또는 PVA에서 선택되는 것을 특징으로 하는 접합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 친수성 고분자는 분자량 100 내지 200,000 인 것을 특징으로 하는 접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 친수성 고분자는 PVP이며, siRNA-친수성 고분자는 1:10의 비율로 결합되는 것을 특징으로 하는 접합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 접합체를 포함하는 식물세포 유전자 전달용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 유전자 전달용 조성물은 식물세포 내에서 유전자 발현을 조절하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물은 초음파와 병행하여 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

(a)소정의 siRNA를 선택하는 단계;

(b)(a)단계의 siRNA와 PEI, PVP, PEG 또는 PVA에서 선택되는 친수성 고분자 (를 1: 10 내지 1: 100의 비율로 결합시켜 siRNA-친수성 고분자 접합체를 제조하는 단계; 및

(c) (b) 단계의 접합체를 초음파를 처리하며 식물세포내로 전달시키는 단계를 포함하는 식물세포 내로의 유전자 전달 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 초음파는 40 kHz 및 419 W에서 10초 처리 및 5초 미처리의 조건으로 90초간 처리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 (b) 단계의 siRNA-친수성 고분자 접합체는 siRNA와 PVP가 1:10의 비율로 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 식물세포는 벼, 옥수수, 밀 또는 보리인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 식물세포는 당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합벡터로 형질전환된 형질전환 식물세포인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 식물세포의 유전자 전달체로 기능할 수 있는 si RNA와 친수성 고분자 접합체 및 상기 접합체를 이용한 식물세포내로의 유전자 전달방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일상생활에서 필요로 하는 단백질을 대량으로 수득하기 위하여 목적세포를 발현백터로 형질전환하여 원하는 재조합 단백질을 대량생산하는 시스템이 존재한다. 일반적으로 동물세포와 미생물에의 형질전환을 통한 재조합 단백질 수득 시스템이 구축되어 왔으나, 최근 대량생산에서의 비용 문제 및 FDA 허가 시 동물유래 바이러스나 독소(toxin) 등의 감염 문제가 발생할 수 있기 때문에 식물세포와 식물체 배양을 통한 연구와 산업화가 활발히 진행 중에 있다.

[0003] 식물세포에서 재조합 단백질을 생산하는 것은 식물세포에서 발현할 수 있는 프로모터 및 목적유전자를 포함하는 발현백터로 식물세포를 형질전환 하는 것으로서, 식물세포배양에 사용할 수 있는 기본배지로는 AA, MS, N6, WHITE 및 SH 배지 등이 있으며, (Ge, X. *et al.*, *Plant cell Rep.*, 25: 392-402, 2006; Terashime *et al.*, *Biochem. Eng. J.*, 4: 31-36, 1999). 식물세포배양은 동물세포배양에 비해 동물유래의 바이러스와 독소 등을 포함하지 않으며, 동물세포배양에 비해 그 정제과정이 간단하고 경제적이란 점(Doran, P. M., *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 199-204, 2000), 저비용 고효율 생산이 가능하다는 점 및 미생물에 비하여 동물과 유사한 단백질 생성 후 수식(post-translational modification)등의 장점을 바탕으로 식물세포를 통한 재조합 단백질 생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Larrick, J. W. and W. T. David, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 411-418, 2001). 특히 유전자 재조합된 식물 세포는 재조합 미생물 발효에 의한 생산에서 불가능한 단백질 생성 후 수식(post-translational modification)이 가능하므로, 식물 유래 생물의약(plant-derived pharmaceuticals (PDPs)) 단백질을 생산할 수 있는 중요한 모델 시스템으로서 연구되고 있다.

[0004] 최근 형질전환 식물세포배양을 이용한 외래단백질 생산에 벼, 담배, 애기 장대 등이 주로 이용되고 있으며, 대표적인 예로서, 벼세포에서 RAmY3D 프로모터를 이용해 재조합 단백질인 granulocyte-colony stimulating factor (Hong *et al.* 2006), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (Shin *et al.* 2003),), serum albumin (Huang *et al.* 2005), alpha-1-antitrypsin (McDonald *et al.* 2005), interferon-gamma (Chen *et al.* 2004) 및 hCTLA4Ig 등을 생산하고 있다(Hellwig, S., *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 22: 1415-1422, 2004).

[0005] 식물세포 배양 시스템의 활용 중요도가 높아짐에 따라 식물세포의 특정 유전자의 기능규명을 통한 배양의 최적화 및 단백질 기능연구에 관한 관심도 높아지고 있다. siRNA는 전사 후 유전자의 발현을 저해시킬 수 있는 강력한 도구로서, 이들의 높은 활성과 정밀한 유전자 선택성을 바탕으로 생물학 및 생명공학 분야에서 활발하게 연구되고 있는 물질이다. siRNA는 RNA silencing을 유도할 수 있으며, RNA silencing은 식물체에서는 post-transcriptional gene silencing (PTGS), 포유동물에서는 RNA interference (RNAi), 균류에서는 quelling이라고도 알려져 있다(Schmidt, 2005; Mittal, 2004).

[0006] siRNA는 19개에서 23개 정도의 뉴클레오티드로 구성된 짧은 이중 나선의 RNA 가닥으로, RNA silencing pathway를 유도하며, 즉, 이들과 염기서열이 상보적인 유전자의 mRNA를 표적으로 삼아 RISC (RNA-induced silencing complex)와 결합하여 굉장히 높은 특이성으로 mRNA 분해 및 번역 억제를 수행함으로써 시험관 내(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*)에서 유전자 발현을 억제시킬 수 있으며, 이를 활용하여 특정 유전자의 기능을 규명할 수 있다.(Waterhouse and Helliwell, 2003). 더욱이 siRNA는 안티센스 올리고 뉴클레오티드에 비해 4~10배 정도 적은 양으로도 유전자 발현을 저해할 수 있어서 세포 독성이 적고 유전자에 대한 선택적 발현 저해가 뛰어난 것으로 밝혀졌다. 특정 유전자의 발현억제 능력을 가진 siRNA는 화학합성, 시험관 내 전사(*in vitro* transcription), siRNA발현백터 및 PCR 발현 카세트(expression cassettes)등의 방법으로 제조될 수 있으며, 상기 화학적 합성방법은 높은 수율 및 재현성을 가지고 이중 나선 siRNA를 제조할 수 있는 장점을 가진다.

[0007] 그러나, siRNA는 안정성이 낮아 생체 내에서 단시간에 분해되며, siRNA가 가지는 음이온성으로 인해 같은 음전하를 띠는 세포막을 쉽게 투과하기가 어려워 결과적으로 세포내로의 전달성이 떨어지게 된다는 문제점이 있다(Celia M. & Henry, *Chemical and Engineering News* December, 22, 32-36, 2003). 또한, siRNA가 이중가닥으로 구성되어 있다하더라도, RNA로서, RNA를 구성하는 리보스당의 결합은 DNA를 구성하는 디옥시리보스당의 결합에 비해 화학적으로 매우 불안정하여 대부분이 생체 내에서 빠르게 분해된다.

[0008] 따라서, siRNA를 포함한 유전자의 세포내(생체 내) 전달을 위한 안전하고 효율적인 전달기술이 개발되어 왔으며, 대표적으로 아데노바이러스, 레트로바이러스 등 바이러스를 이용한 유전자 전달기술과, 리포좀과 양이온성 지질, 그리고 양이온성 고분자 등을 이용한 비바이러스성 벡터(nonviral vector)를 이용한 유전자 전달기술들이 개발되어 왔다. 현재까지 전체 연구의 80% 정도가 바이러스 벡터개발이 차지하고 있으나, 바이러스 자체를 유전자 치료제의 전달체로 이용하는 방법은, 현재까지의 기술로는 전달된 유전자가 숙주의 면역체에 이입되어 숙주 유전자의 정상기능에 이상을 유도하거나 발암 유전자를 활성화시킬 수 있는 위험성 및 삽입가능 DNA의 제한, 다양한 세포에 표적화되어 특정세포에 대한 특이성 결여, 안전성/독성/대량생산의 문제점 등의 여러 가지 한계점을 가진다. 또한, 바이러스 유전자가 적은 양이라도 계속 발현되고 있을 경우 자가면역증을 유발하거나, 이러한 바이러스 전달체로부터 변형된 형태의 바이러스 감염이 유발될 경우 효율적인 방어면역을 일으키지 못할 수도 있다. 따라서, 바이러스성 벡터를 사용하는 방법 대신 리포좀에 유전자를 융합시키는 방법이나 지질-DNA 접합체(Lipoplex)와 폴리머-DNA 접합체(Polyplex) 등이 그들 각각의 단점을 개량하는 방향으로 연구되고 있다. 이들 비바이러스성 벡터들은 바이러스성 벡터보다는 그 효율성에 있어 많이 뒤떨어지지만, 생체 내 안전성과 경제성을 고려해 볼 때 부작용이 적고 생산 가격이 저렴해 질 수 있다는 장점이 있다.

[0009] 그러나, 생체내로 약물을 전달하기 위한 전달체에 사용되는 고분자는 생분해성을 갖고 있어야 하며, 폴리머-DNA 접합체에서 유전자 전달체로 활용되어온 양이온성 고분자물질들(pLL, pEI, pDMAEMA)의 가장 큰 단점인 체내 축적에 따르는 세포독성 문제를 해결하기 위하여 생분해성 폴리머의 이용에 관한 연구가 활발하게 수행되어 왔다.

[0010] 본 발명자들은 유용한 제조할 단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 식물세포시스템을 연구하던 중, 배양 중에 특정 유전자의 기능을 연구할 수 있는 비독성이며, 생분해성을 가지는 친수성 고분자 siRNA 접합체를 제조하고, 상기 접합체를 효율적으로 식물세포 내로 전달할 수 있는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 식물세포의 유전자 전달체로 기능할 수 있는 siRNA와 친수성 고분자 접합체 및 이를 포함하는 식물세포 유전자 전달용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 접합체를 이용한 식물세포내로의 유전자 전달방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 siRNA-친수성 고분자가 결합된 접합체를 제공한다. 상기 친수성 고분자는 분자량 100 내지 200,000 인 비이온성 고분자이며, 바람직하게는 PEI(polyethyleneimine), PEG(polyethylene glycol), PVP10(polyvinyl pyrrolidone) 또는 PVA(polyvinyl alcohol), 보다 바람직하게는 PVA 또는 PVP10이다. 상기 친수성 고분자의 기능기는 본 발명의 목적을 달성하는 범위 내에서 필요에 따라 다른 기능기로 치환될 수 있으며, 다양한 작용기를 추가할 수 있다.

[0014] 본 발명의 접합체는 siRNA-친수성 고분자가 바람직하게는 1: 10 이상의 비율로, 보다 바람직하게는 1: 10 내지 1: 100의 비율로, 가장 바람직하게는 1: 10의 비율로 결합할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에서, siRNA와 PVP간의 최적혼합 비율을 gel retardation assay를 통해 확인하였다. siRNA가 PVP와 혼합(complex or conjugation)형성 되었을 경우, EtBR 염색시 PVP의 간섭효과로 인해 siRNA가 관찰되지 않으며, siRNA:PVP가 1:0.001, 1:0.01, 1:0.05, 1:0.1, 1:0.5, 의 비율로 결합된 경우 siRNA와 결합이 완전하지 않았으며(도 1b), 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100의 혼합비율에서 siRNA와 PVP 접합체가 형성되며, 1:10 비율이상에서는 유전자 발현억제 효과가 높음을 확인함으로써(도 1a), siRNA와 PVP 혼합은 1:10 비율이상이 바람직함을 알 수 있다.

[0016] 또한 본 발명에 따른 siRNA-친수성 고분자 접합체의 경우, 본 발명의 일 실시예에서 siRNA-PVP(1:10) 접합체가 증류수, HEPES buffer(pH 5.8, 7.4), AA medium, pH가 변화된(pH 4-9)AA medium 등 다양한 환경조건에서 안정적으로 접합이 유지됨을 확인하였고(도 2), 배양에 쓰이지 않은 AA medium(fresh medium)과 배양에 쓰인 AA medium(spent medium, 배양 중 세포내 물질이 세포외 배지로 분비된 상태)에서도 안정성을 유지함을 실험적으로 확인함으로써(도 3), siRNA-친수성 고분자 접합체, 바람직하게는 siRNA-PVP(1:10) 접합체가세포외로 분비될 수 있는 ribonuclease 등의 해로운 물질로부터 안정성이 있으며, 식물세포의 유전자 전달에 높은 안정성을 가지는

유전자 전달체가 될 수 있음을 알 수 있다.

- [0017] 본 발명은 또한 siRNA와 친수성 고분자 접합체를 포함하는 식물세포 유전자 전달용 조성물을 제공한다. 상기 친수성 고분자는 분자량 100 내지 200,000인 비이온성 고분자이며, 바람직하게는 PEI(polyethyleneimine), PEG(polyethylene glycol), PVP10(polyvinyl pyrrolidone) 또는 PVA(polyvinyl alcohol), 보다 바람직하게는 PVA 또는 PVP10이다. 상기 친수성 고분자의 기능기는 본 발명의 목적을 달성하는 범위 내에서 필요에 따라 다른 기능기로 치환될 수 있으며, 다양한 작용기를 추가할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 접합체는 siRNA-친수성 고분자가 바람직하게는 1: 10 이상의 비율로, 보다 바람직하게는 1: 10 내지 1: 100의 비율로, 가장 바람직하게는 1: 10의 비율로 결합할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 식물세포는 벼, 옥수수, 밀 또는 보리이며, 바람직하게는 당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 형질전환 식물세포일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에서, siRNA-친수성 고분자 접합체가 세포벽이 있는 식물세포내로 전달될 수 있음을 확인하기 위해, 형광 염료(dye)인 Cy3를 siRNA에 붙인 후, 안정성을 확인하였다. siRNA가 형광 염료를 붙인 후, PVP에 완전히 혼합될 수 있음을 확인할 수 있으며(도 4, Lane 3), 형광 염료와 PVP가 붙은 siRNA 접합체에 초음파(ultrasound)를 조사하는 경우에도 형광염료-siRNA-PVP 접합체가 안정적임을 알 수 있다. (도 4, Lane 5)
- [0021] 본 발명의 siRNA-친수성 고분자 접합체가 식물세포 내에서 특정 유전자의 발현을 억제할 수 있는 지를 확인하기 위해, (a), (b) SDS-PAGE와 (c) Western blotting (d) RT-PCR을 통해서 siRNA 혼합체의 전달율과 억제율을 확인하였다. 본 발명의 목적 유전자는 종래의 식물세포에는 존재하지 않고, 형질전환된 본 발명의 식물세포에만 특이적으로 존재하는 hCTLA4Ig를 대상으로 하였으며, PVP10 또는 PVA를 사용한 경우, hCTLA4Ig의 발현이 크게 억제됨에 따라, (도 5, Lane 5, 6) 본 발명의 siRNA-친수성 고분자 접합체, 바람직하게, siRNA-PVP10(1:10) 및 siRNA-PVA접합체가 식물세포 유전자 전달용 조성물로서 기능할 수 있음을 알 수 있다.
- [0022] 또한 다양한 종류의 siRNA-친수성 고분자 접합체의 식물세포내 전달 정도를 형광현미경을 통해 확인한 결과, siRNA-PEI(도 6) 및 siRNA-PVP(도 7)가 모두 식물세포내로 전달됨을 알 수 있으며, siRNA-친수성 고분자 접합체의 식물세포 내 전달 시 초음파(사용 조건)를 병행하여 사용한 경우, siRNA-PEI(도 8) 및 siRNA-PVP(도 9)가 보다 높은 효율로 식물세포내로 전달됨을 알 수 있다.
- [0023] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 siRNA-친수성 고분자 접합체를 이용한 식물세포 내로의 유전자 전달방법을 제공한다.
- [0024] (a)소정의 siRNA를 선택하는 단계;
- [0025] (b)(a)단계의 siRNA와 PEI, PVP, PEG 또는 PVA에서 선택되는 친수성 고분자 (를 1: 10 내지 1: 100의 비율로 결합시켜 siRNA-친수성 고분자 접합체를 제조하는 단계; 및
- [0026] (c) (b) 단계의 접합체를 초음파를 처리하며 식물세포내로 전달시키는 단계.
- [0027] 상기 친수성 고분자는 분자량 100 내지 200,000 인 비이온성 고분자이며, 바람직하게는 PEI(polyethyleneimine), PEG(polyethylene glycol), PVP10(polyvinyl pyrrolidone) 또는 PVA(polyvinyl alcohol), 보다 바람직하게는 PVA 또는 PVP10이다. 상기 친수성 고분자의 기능기는 본 발명의 목적을 달성하는 범위 내에서 필요에 따라 다른 기능기로 치환될 수 있으며, 다양한 작용기를 추가할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 접합체는 siRNA-친수성 고분자가 바람직하게는 1: 10 이상의 비율로, 보다 바람직하게는 1: 10 내지 1: 100의 비율로, 가장 바람직하게는 1: 10의 비율로 결합할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 초음파는 주파수가 20KHz를 넘는 음파를 의미하며, 본 발명에서는 바람직하게는 40 kHz 및 419 W에서 10초 on시키고, 그 후 5초 off를 반복적으로 수행하여 전체 90초 동안 수행될 수 있다. 본 발명에서 식물세포는 벼, 옥수수, 밀 또는 보리이며, 바람직하게는 당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 형질전환 식물세포일 수 있으며, 대표적인 형질전환 식물세포들은 유용한 목적단백질을 생산할 수 있는 G-CSF, GM-CSF, SA, AAT, INF-gamma 또는 사람 CTLA4Ig등의 유전자를 포함한다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서 hCTLA4Ig로 형질전환된 벼 세포를 사용하였으며, hCTLA4Ig는 벼세포에서 유일하므로, off-target없이 siRNA가 특정 유전자(hCTLA4Ig)의 발현을 억제하는 것을 쉽게 확인할 수 있을 뿐만 아니라, ELISA 방법에 의해 쉽게 그 억제 정도를 확인 할 수 있다.

[0031] 실험결과 siRNA-PVP의 경우 대조군(control)과 비교 시 72%의 유전자 발현억제를 확인할 수 있었으며, siRNA-PVP(1:10)에 초음파가 병행처리된 경우, 대조군인 control과 비교시, intracellular인 경우 97.8% 억제를 하였고 extracellular인 경우 98% 발현억제함을 확인함으로써 본 발명에 따른 유전자전달 방법이 식물세포 내로 유전자를 고효율로 전달할 수 있는 효율적인 방법임을 입증하였다.

표 1

구분	Intracellular hCTLA4Ig(ng/g FCW)	Extracellular hCTLA4Ig(mg/L)
Control	36	30
siRNA only	35	27
siRNA+PEI	16	10
siRNA+PVP10	10	6
siRNA+PEI+Ultrasound	5	3
siRNA+PVP10+Ultrasound	0.8	0.6

효 과

[0033] 본 발명의 siRNA와 친수성 고분자 접합체는 세포벽이 존재하는 식물세포에 유전자를 전달할 수 있으며, 초음파의 병행 처리는 식물세포 투수성을 증진시켜 유전자 전달 효율을 극대화할 수 있기 때문에, 본 발명에 따르면, 식물세포 내에서의 특정 유전자의 발현을 조절을 통하여 저비용 고효율로 식물세포 특정 유전자의 기능을 확인할 수 있게 된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명은 식물세포의 유전자 전달체로 기능할 수 있는 si RNA와 친수성 고분자 접합체 및 이를 포함하는 식물세포 유전자 전달용 조성물을 제공한다.

[0035] 또한 본 발명은 상기 접합체를 이용한 식물세포내로의 유전자 전달방법을 제공한다.

[0036] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 형질전환 식물체 제작 및 실험방법

1-1. 세포 배양 및 배지

[0039] 본 실시예에 사용된 세포주는 도 10의 발현벡터(전북대학교, 보령제약, 대한민국)로 형질전환된 재조합 hCTLA4Ig 단백질을 생산하는 형질전환 벼(Oryza sativa L. Dongjin) 세포주이다. 여기에는 벼의 아밀라제 유전자군인 RAmY3D 유도 프로모터를 particle-bombardment 방법(Lee, S. J. *et al.*, *Protein Expres. Purif.* 51: 293-302, 2007)을 이용하여 벡터에 삽입시켜 형질전환하였고, 상기 프로모터는 수크로스가 고갈된 상태에서 작동된다. 성장배지로는 amino acid(AA) 기본배지(Terashima 등, 1999)를 사용하였으며, 탄소원으로는 30 g/L sucrose를 사용하였고, 성장조절제로는 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)와 0.02 mg/L kinetin을 사용하였다. pH를 5.8로 맞춘 뒤, 500 mL의 Erlenmeyer flask에 분주한 다음, 121℃ 1기압에서 가압증기 멸균하였으며, 아미노산 혼합용액(1.0 mM glycine, 6.0 mM glutamine, 2.0 mM aspartic acid, 1.3 mM arginine)을 농축한 다음 0.1 mg/L gibberellin (GA), 50 mg/L hygromycin을 첨가하여 0.22 μ m membrane filter로 여과 멸균하였다. Shaking 배양기에서 28℃, 120 rpm, 암 조건에서 10일 간격으로 계대 배양을 수행하였다. 멸균된 100 mL Erlenmeyer flask에 0.22 μ m membrane filter로 여과된 배지혼합용액을 30 mL씩 분주하여 실험을 수행하였으며, 생장시와 같은 조성의 배지를 이용하였다. 목적단백질을 생산하기 위해서 유도(induction) 배지로는 생장배지에서 sucrose만을 제거한 배지를 사용하였으며, 28℃, 120 rpm, 암 조건에서 2일 간격으로 시료를 취하였다.

[0040] **1-2. 세포중량 측정**

[0041] 세포의 생장을 측정하기 위해서 세포생체량(FCW, fresh cell weight)과 세포건체량(DCW, dry cell weight)을 각각 측정하였다. 100 mL Erlenmeyer flask 배양한 현탁세포는 Buchner funnel(OMG사, 대한민국)을 이용해 Whatman No. 1 여과지상에서 세포와 배양액을 분리하였다. 배지는 추가적인 분석을 위해 따로 저장한 뒤, 여과지 상의 세포는 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고, 미리 무게를 측정한 weighing dish(OMG사, 대한민국)에 세포를 담고 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후, 2일 동안 60°C의 drying oven에서 건조시킨 뒤 세포건체량을 측정하였다.

[0042] **1-3. 세포 생존도 측정**

[0043] 세포생체량(FCW) 0.1 g에 1.5% TTC(triphenyl tetrazolium chloride, pH 9) 용액 1.6 mL을 첨가한 뒤, 20° C에서 24시간 동안 반응시켰다. 15° C, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 다음, 상등액은 버리고 95% 에탄올을 1 mL 첨가하였다. 완전히 vortexing 한 뒤, 60° C에서 30분 동안 반응시킨 뒤 세포 내에 생성된 red formazan을 추출하였다. 4° C, 15,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후, 상등액 0.6 mL을 취하고, Agilent 8453 spectrophotometer (Agilent Technologies 사, 미국)을 이용하여 485 nm에서 O.D. 값을 측정하였다. Blank로는 95% 에탄올을 이용하였다.

[0044] **<실시예 2> siRNA-친수성 고분자 접합체 제작 및 초음파 처리 방법**

[0045] **2-1. siRNA Design and Synthesis**

[0046] siRNA 는 siRNA TargetFinder를 사용하여 디자인 되었으며, 그 서열은 표 2에 나타내었다.

[0047] siRNA 3' 에 dTdT overhang을 구비하는 21 뉴클레오티드로, hCTLA4Ig유전자 서열의 418 위치에 존재하고, 38.1% GC 함량을 가진다. 벼세포에서 오프 타겟 사일런싱(off-target silencing)을 회피하기 위하여, BLAST (basic local alignment search tool) 탐색을 수행하였으며, 디자인된 siRNA 는 Ambion, Inc. (미국)에서 합성되었다.

표 2

[0048] hCTLA4Ig의 siRNA 서열

구분	서열	서열번호
Sense strand siRNA	CGGAACCCAGAUUUUAUGUatt	1
Antisense strand siRNA	UACAUAUUUCUGGGUUCGgt	2

[0049] **2-2. 초음파 처리(Sonoporation Treatment)**

[0050] 초음파 처리는 Branson 5210 sonicator(Branson Ultrasonics Corp., 미국)을 사용하여 수행하였다. 40 kHz 및 419 W에서 10초 on시키고, 그 후 5초 off를 반복적으로 수행하여 전체 90초 동안 수행하였으며, 솔루션에서, 고압과 저압의 교대를 일으킬 수 있어, 수백만개의 마이크로 버블이 형성된다(cavitation).

[0051] **<실시예 3> siRNA와 PVP의 최적 혼합비율 확인**

[0052] siRNA와 PVP간의 최적혼합 비율을 확인하기 위해 비율(siRNA:PVP, 1:0.001, 1:0.01, 1:0.05, 1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100)로 하여 결합정도를 확인하였다. 분석은 gel retardation assay를 통해서 실시하였으며, siRNA가 PVP와 혼합(complex or conjugation)형성 되었을 경우, EtBR 염색시 PVP의 간섭효과로 인해 siRNA가 관찰되지 않는다. 저농도의 PVP인 경우, siRNA와 결합이 완전하지 않았으며, siRNA와 PVP 혼합(complex)은 1:10 비율 이상에서 완전히 형성됨을 확인하였다.

[0053] <실시예 4> 다양한 환경에서 siRNA와 PEG 혼합체 안정성확인

[0054] 4-1. buffer 및 pH 환경 변화에 따른 siRNA와 PEG 혼합체 안정성확인

[0055] 다양한 환경에서 1:10으로 형성된 siRNA 혼합체(siRNA+PVP, siRNA complex)의 안정성을 확인하였다. 다양한 환경을 만들기 위해, 증류수, HEPES buffer(pH 5.8, 7.4), AA medium에서와 AA medium에 pH를 변화시켜(pH 4-9) siRNA 혼합체의 안정성을 확인하였다. 최적 조건으로 만들어진 1:10 비율의 siRNA는 다양한 조건에서 안정성이 있음을 측정하였다.

[0056] 4-2 동일배지 내 시간변화에 따른 siRNA와 PVP 혼합체 안정성확인

[0057] 다양한 환경에서 1:10으로 형성된 siRNA 혼합체(siRNA+PVP, siRNA complex)의 안정성을 확인하였다. 배양에 쓰이지 않은 AA medium(fresh medium)와 배양에 쓰인 AA medium(spent medium, 배양 중 세포내 물질이 세포외 배지로 분비됨)에서 siRNA 혼합체의 안정성을 확인하였다. 최적 조건으로 만들어진 1:10 비율의 siRNA 혼합체는 세포외로 분비될 수 있는 ribonuclease 등의 해로운 물질로부터 안정성이 있음을 확인하였다.

[0058] <실시예 5>세포내 siRNA 전달 확인을 위한 형광 dye와 siRNA 결합

[0059] siRNA 혼합체(complex or conjugate)가 세포벽이 있는 식물세포내로 전달될 수 있음을 확인하기 위해, 형광 dye인 Cy3를 siRNA에 붙인 후, 안정성을 확인하였다. Lane 1은 siRNA만 단독으로 확인했을 경우이며, Lane 2는 형광 dye를 붙인 후이며, Lane 3은 PVP를 혼합한 후의 결과이다. Lane 3을 통해 siRNA가 형광 dye를 붙인 후, PVP에 완전히 혼합될 수 있음을 확인하였다. Lane 5는 형광 염료와 PVP가 붙은 siRNA 혼합체(complex)에 초음파(ultrasound)를 조사하여, 초음파에도 혼합체가 안정적임을 확인하였다.

[0060] <실시예 6>형광 dye를 이용한 세포내 siRNA 전달 확인

[0061] siRNA 혼합체(complex or conjugate)가 세포벽이 있는 식물세포내로 전달될 수 있음을 확인하기 위해, 형광 dye인 Cy3를 siRNA에 붙인 후, 안정성을 확인하였다. Cy3-레이블된 siRNA 접합체의 세포내 전달은 형광현미경을 통하여 관찰되었다.

[0062] 0.4 mL rice suspension cell(0.01 g cells/0.5 mL medium)을 15분 동안 ice에 보관한 후, 3 μ L Cy3-siRNA 첨가하여, 상온에서 mild mixing을 통하여 2시간 이상 반응시켜 세포내 전달을 수행하였다. 실험군은 다음과 같다.

[0063] 1) Cy3-siRNA only

[0064] 2) Cy3-siRNA + PVA or PVP (1시간 반응)

[0065] 3) Cy3-siRNA + ultrasound (90초)

[0066] 4) Cy3-siRNA + PVA or PVP + ultrasound (1시간 반응 + 90 초)

[0067] 5) Cy3-CTLA1g siRNA 전기영동

[0068] 1600g, 4℃에서 5 분 동안 세포를 원심분리 후, 상등액을 제거하고 펠렛세포들은 냉장보관 된 AA 배지(Dye free medium)로 3회 세척하여 세포 표면에 잔류하는 Cy3-레이블된 siRNA를 제거하였다. 세척 후, 상온 AA 배지로 재현탁한 후, 형광현미경을 통하여 관찰하였다.

[0069] 실험결과, Lane 1은 siRNA만 단독으로 확인했을 경우이며, Lane 2는 형광 dye를 붙인 후이며, Lane 3은 PVP를

혼합한 후의 결과이다. Lane 3을 통해 siRNA가 형광 dye를 붙인 후, PVP에 완전히 혼합될 수 있음을 확인하였다. Lane 5는 형광 염료와 PVP가 붙은 siRNA 혼합체(complex)에 초음파(ultrasound)를 조사하여, 초음파에도 혼합체가 안정적임을 확인하였다. (도 4)

[0070] 또한 Cy3-레이블된 다양한 종류의 siRNA-친수성 고분자 접합체의 식물세포내 전달 정도를 형광현미경을 통해 확인한 결과, siRNA-PEI(도 6) 및 siRNA-PVP(도 7)가 모두 식물세포내로 전달됨을 알 수 있으며, siRNA-친수성 고분자 접합체의 식물세포 내 전달 시 초음파(사용 조건)를 병행하여 사용한 경우, siRNA-PEI(도 8) 및 siRNA-PVP(도 9)가 보다 높은 효율로 식물세포내로 전달됨을 알 수 있다.

[0071] <실시예 7>hCTLA4Ig 유전자 발현 억제 확인

[0072] 효과적인 siRNA 전달을 확인하기 위해 세포 배지를 당이 없는 배지로 교환 후, 생산시기 12일 동안 hCTLA4Ig의 발현억제양을 관찰하였다.

[0073] 배지로 분비된 hCTLA4Ig의 양은 ELISA 분석법을 이용하여 정량하였다. Capture 항체로 Goat anti-human IgG (KPL, USA)를 사용하였으며, capture 항체와 coating 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)를 1 : 1000으로 희석하여 well당 100 mL씩 분주하여 4℃ overnight한 후, blocking 버퍼 (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KH₂PO₄, 1.15 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L KCl, 2% FBS, pH 7.4)를 well당 200 mL씩 분주하여 1~2시간 상온에서 incubation 시켰다. Standard는 human IgG (Pierce, USA)를 사용하여 assay diluent를 well당 100 mL씩 분주하고 시료 및 standard 200 mL씩 넣고 1/2씩 희석하여 상온에서 2시간 incubation 시켰다. Detection 항체인 peroxidase labeled goat anti-human IgG (KPL, USA)와 assay diluent를 1 : 5000으로 혼합하여 well당 100 mL씩 분주하고 상온에서 1시간 incubation한 후, ABTS peroxidase substrate (KPL, USA)를 well당 100 mL씩 분주하여 상온에서 20분 동안 incubation 시켰다. 그 후, stop 버퍼를 well당 100 mL씩 분주하여 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

[0074] 실험결과, siRNA 혼합체가 특정 유전자(hCTLA4Ig)의 발현을 억제할 수 있는 지를 확인하기 위해, (A), (B) SDS-PAGE와 (C) Western blotting (D) RT-PCR을 통해서 siRNA 혼합체의 전달율과 억제율을 확인하였다. 특히, Lane 5에서 보는 바와 같이 PEI, PEG 보다 PVP 및 PVA가 형질전환된 벼세포배양에 효과적임을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 siRNA와 PVP간의 최적혼합 비율을 확인하기 위하여 gel retardation assay를 수행한 것으로,

[0076] (A) Lane 1 : control(siRNA only), Lane 2: SDS 1: 10, Lane 3-7: siRNA:PVP 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100);

[0077] (B) Lane 11-5 :siRNA:PVP, 1:0.001, 1:0.01, 1:0.05, 1:0.1, 1:0.5) 이며,

[0078] 도 2 Buffer 및 pH 환경 변화에 따른 siRNA:PVP접합체의 안정성 실험의 결과로서, 도 2(A)는 다양한 용매에서의 안정성을 시험한 것으로,

[0079] Lane 1 : control(siRNA only, 증류수),

[0080] Lane 2 : (siRNA:PVP, 증류수),

[0081] Lane 3 : (siRNA:PVP, HEPES buffer(pH 7.4))

[0082] Lane 4 : (siRNA:PVP, HEPES buffer(pH 5.8))

[0083] Lane 5 : (siRNA:PVP, AA medium)이며,

[0084] 도 2(B)는 AA medium에 pH를 변화시켜(pH 4-9) siRNA 혼합체의 안정성을 확인한 것으로,

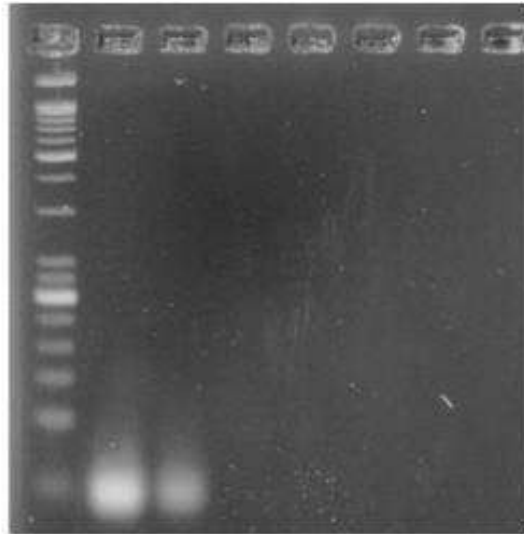
[0085] Lane 1 : control(siRNA only, AA medium(pH 5.8)),

- [0086] Lane 2 : (siRNA:PVP, AA medium(pH 4)),
- [0087] Lane 3 : (siRNA:PVP, AA medium(pH 5))
- [0088] Lane 4 : (siRNA:PVP, AA medium(pH 6))
- [0089] Lane 5 : (siRNA:PVP, AA medium(pH 7))
- [0090] Lane 6 : (siRNA:PVP, AA medium(pH 8))
- [0091] Lane 7 : (siRNA:PVP, AA medium(pH 9))이며,
- [0092] 도 3은 동일배지 내 시간변화에 따른 siRNA:PVP(1:10)의 안정성을 확인한 것으로,
- [0093] Lane 1 : control(siRNA only, 1h),
- [0094] Lane 2-4 : (siRNA only in fresh AA medium, 2h, 4h, 8h)
- [0095] Lane 5-7 : (siRNA:PVP(1:10) in spent AA medium, 2h, 4h, 8h)이며,
- [0096] 도 4는 형광 dye인 Cy3를 siRNA에 붙인 후, 안정성을 확인한 것으로,
- [0097] Lane 1 : control(siRNA only),
- [0098] Lane 2 : Cy3-siRNA
- [0099] Lane 3 : Cy3-siRNA+PVP
- [0100] Lane 4 : Cy3-siRNA+Ultrasound(90초)
- [0101] Lane 5 : Cy3-siRNA+PVP+Ultrasound(90초)이며,
- [0102] 도5는 siRNA 혼합체가 특정 유전자(hCTLA4Ig)의 발현 억제를 확인한 것으로, (A) extracellular hCTLA4Ig (B) Intracellular hCTLA4Ig의 SDS-PAGE를 나타내며, (C)는 Intracellular hCTLA4Ig의 Western blotting 결과이고, 도 5(D)는 siRNA:polymer(1:10)접합체의 hCTLA4Ig 의 유전자 억제 정도를 RT-PCR을 통해서 확인한 것이며,
- [0103] Lane 1 : control(no siRNA),
- [0104] Lane 2 : (siRNA only),
- [0105] Lane 3 : (siRNA+lipofectamine),
- [0106] Lane 4 : (siRNA+PEI),
- [0107] Lane 5 : (siRNA+PVP10),
- [0108] Lane 6 : (siRNA+PVA),
- [0109] Lane 7 : (siRNA+PEG8000),
- [0110] Lane 8 : (siRNA+PEG20000)이고,
- [0111] 도 6 및 도 7은 각각 siRNA-PEI, siRNA-PVP로 형성된 접합체의 식물세포내 전달 정도를 형광현미경을 통해 확인한 것이고,
- [0112] 도 8 및 도 9는 각각 siRNA-PEI, siRNA-PVP로 형성된 접합체에 초음파를 가했을 경우 식물세포내 전달 정도를 형광현미경을 통해 확인한 것이고,
- [0113] 도 10은 본 발명에 사용된 재조합 CTLA4Ig 단백질을 생산하도록 벼세포에 형질전환된 발현백터를 도식한 것이다.

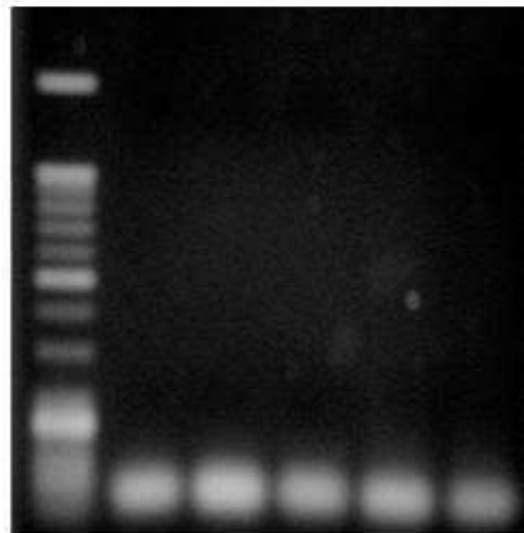
도면

도면1

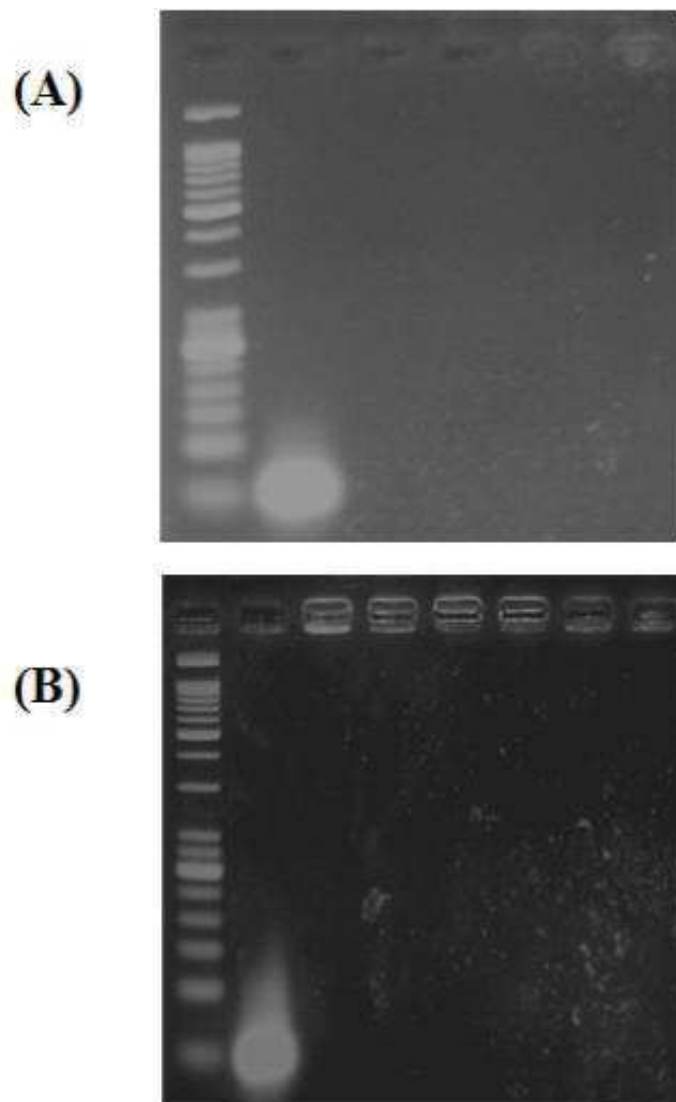
(A)



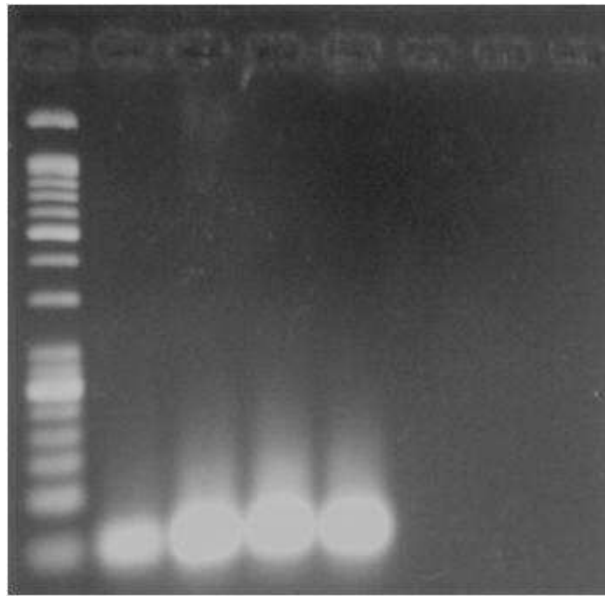
(B)



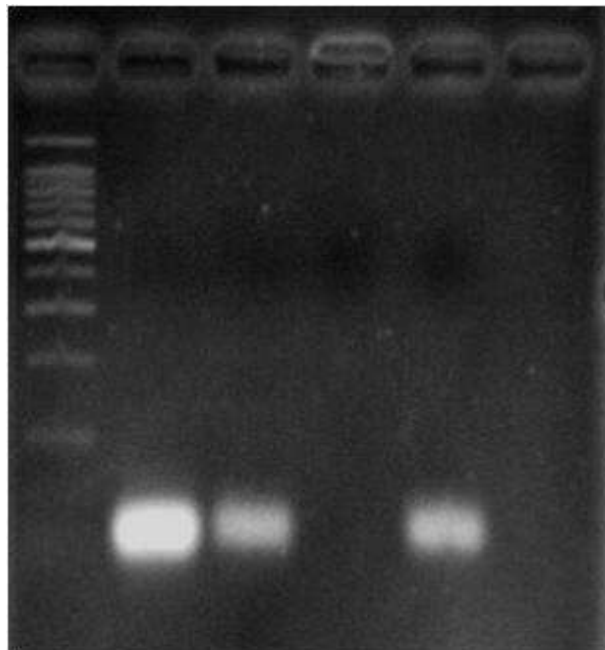
도면2



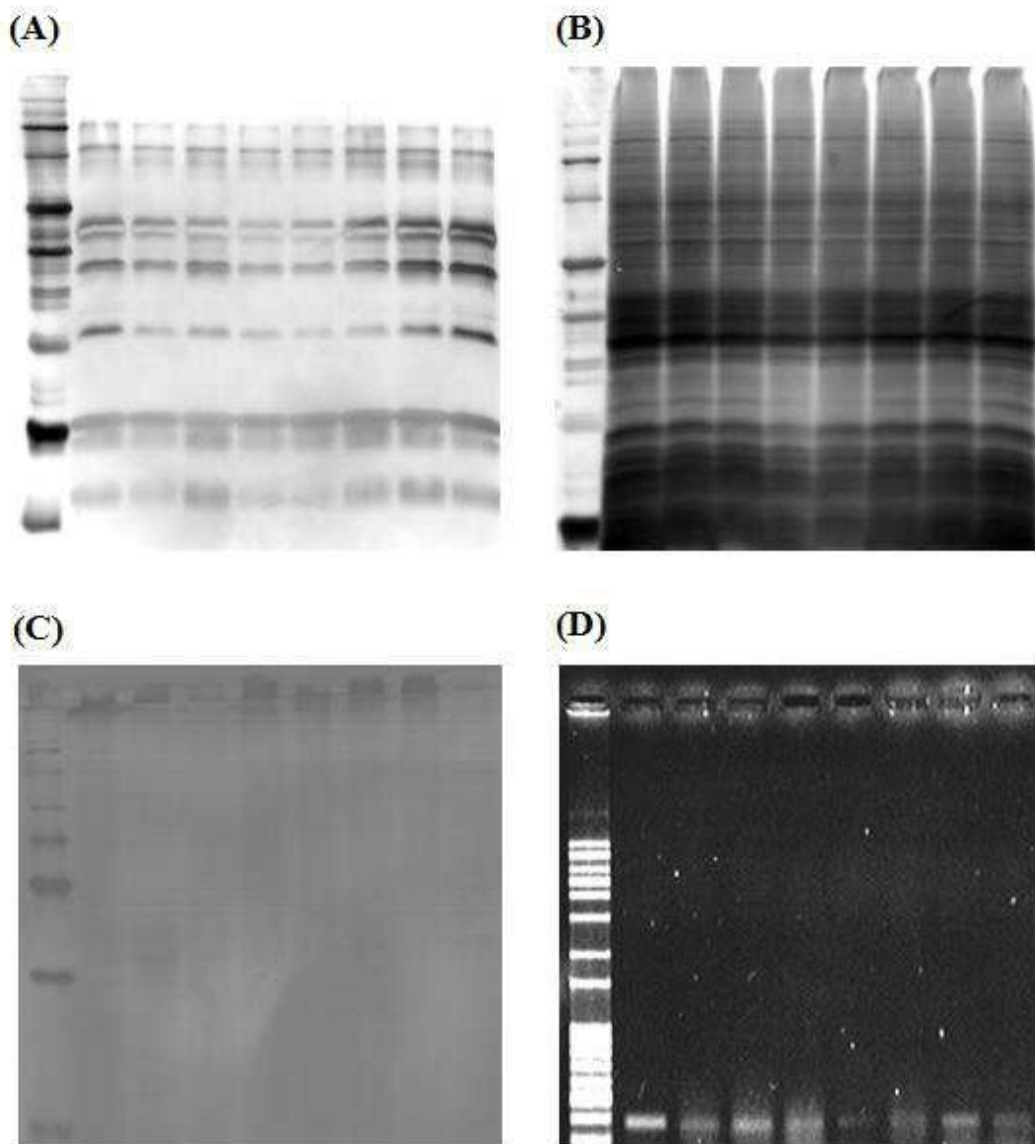
도면3



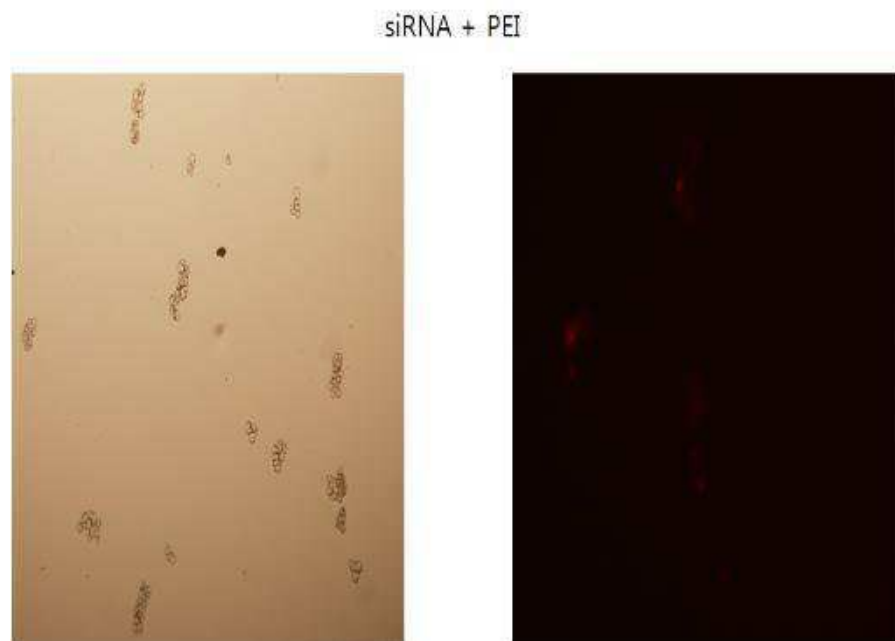
도면4



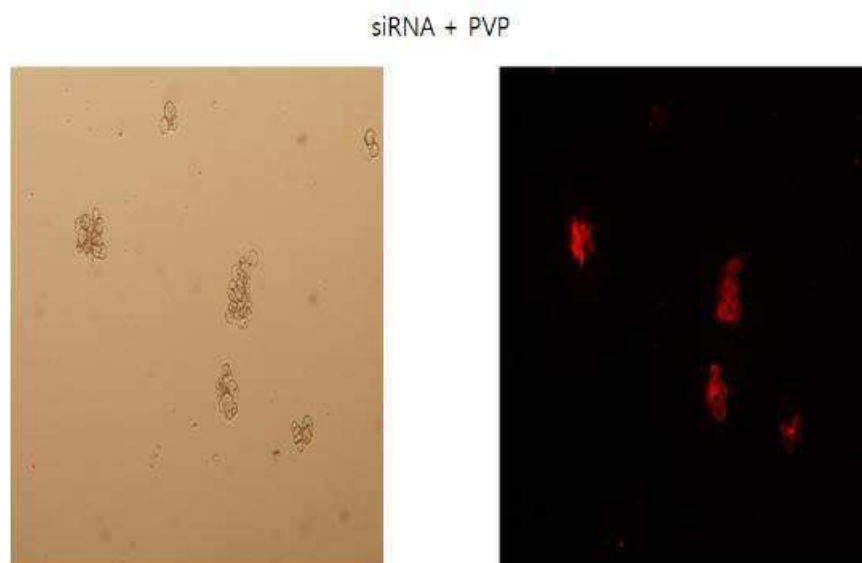
도면5



도면6

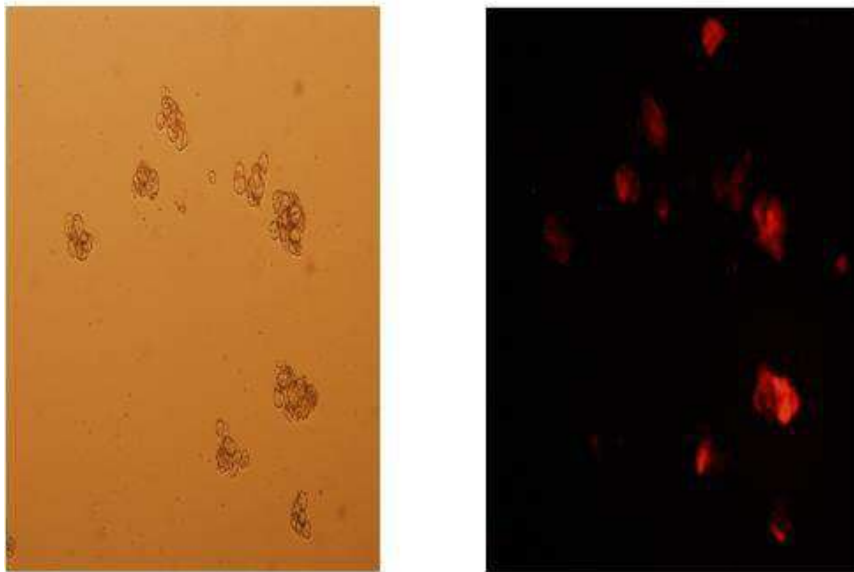


도면7



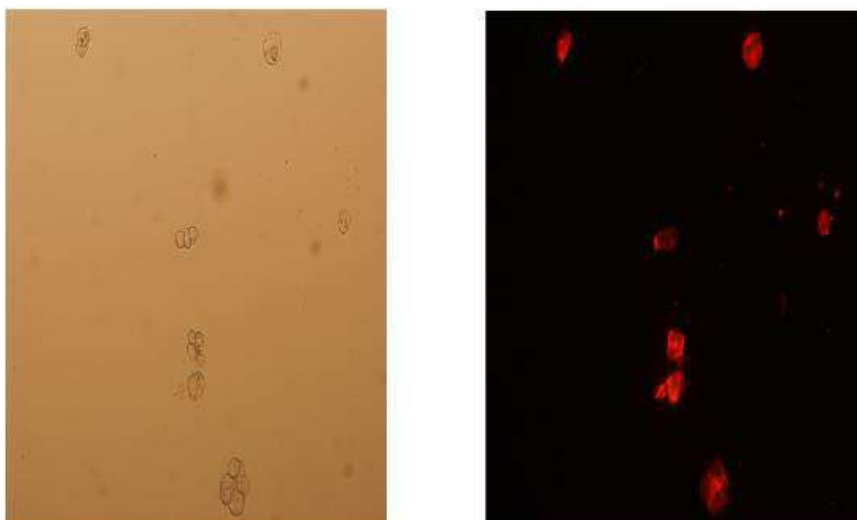
도면8

siRNA + PEI + Ultrasound

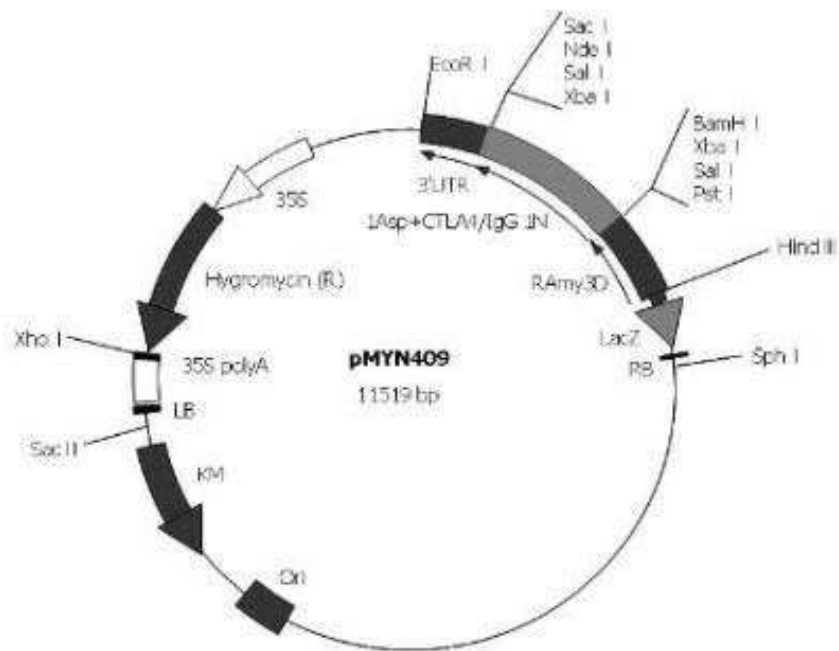


도면9

siRNA + PVP + Ultrasound



도면10



서열 목록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
 <120> si RNA-Hydrophilic Polymer Conjugates for gene delivery to plant cells and Method for gene delivery to plant cells using the same

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> hCTLA1g siRNA SENSE STRAND

<220>
 <223> siRNA

<400> 1
 cggaacccag auuuuauquat t

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> hCTLA4g siRNA ANTISENSE STRAND

<220>
 <223> siRNA

<400> 2
 uacauaaauc ugguuccgt t

21