



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0080098
(43) 공개일자 2010년07월08일

(51) Int. Cl.

A61K 31/7105 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0138725

(22) 출원일자 2008년12월31일

심사청구일자 2008년12월31일

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울 관악구 신림동 산 56-1

(72) 발명자

강수경

서울특별시 관악구 관악로 599 서울대학교

(74) 대리인

이원희

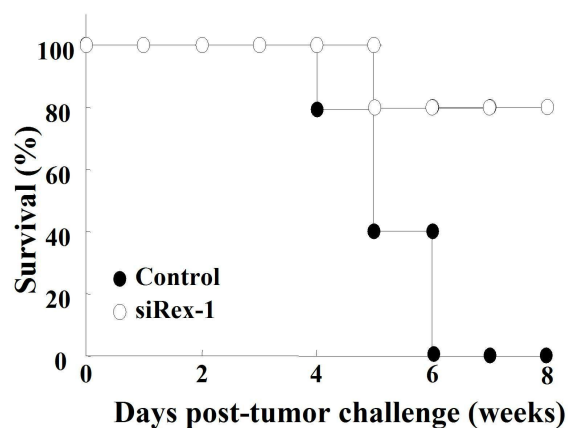
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) Rex-1 특이적인 siRNA를 유효성분으로 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 BCNU(1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, Carmustine)-내성 다형성 교모세포종 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 줄기세포 마커인 Rex-1(reduced expression-1)의 발현을 억제하는 상기 Rex-1에 특이적인 siRNA를 유효성분으로 포함함으로써 BCNU-내성 다형성 교모세포종의 세포사멸 및 종양성장 억제를 유도하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 BCNU와 병용투여함으로써 BCNU-내성 다형성 교모세포종의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SC5110

부처명 교육과학기술부

연구사업명 21세기프론티어연구개발사업/세포응용연구사업

연구과제명 성체 줄기세포 기능개발을 통한 줄기세포 활용 원천기술 개발

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2012년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA를 유효성분으로 포함하는 BCNU(1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, Carmustine)-내성 다형성 교모세포종 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 Rex-1의 표적서열은 서열번호 17 또는 서열번호 18인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 siRNA는 상기 표적서열에 상동인 독립적인 센스 RNA 가닥 및 이에 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하거나 상기 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥이 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 센스 RNA 가닥은 서열번호 17 또는 서열번호 18인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA 및 BCNU를 유효성분으로 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 Rex-1의 표적서열은 서열번호 17 또는 서열번호 18인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 siRNA는 상기 표적서열에 상동인 독립적인 센스 RNA 가닥 및 이에 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하거나 상기 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥이 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 센스 RNA 가닥은 서열번호 17 또는 서열번호 18인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA를 BCNU-내성 다형성 교모세포종에 투여하는 단계를 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 Rex-1의 표적서열은 서열번호 17 또는 서열번호 18인 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 siRNA는 상기 표적서열에 상동인 독립적인 센스 RNA 가닥 및 이에 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하거나 상기 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥이 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥인 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 센스 RNA 가닥은 서열번호 17 또는 서열번호 18인 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 13

제 9항에 있어서, 상기 BCNU-내성 다형성 교모세포종은 Rex-1 유전자를 발현하는 분리된 세포이거나 배양된 세포인 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 14

Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA 및 BCNU를 BCNU-내성 다형성 교모세포종에 병용투여하는 단계를 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 병용투여는 BCNU를 투여하기 수 시간 전에 siRNA를 처리하는 단계를 먼저 수행하는 방법인 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 16

Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA, BCNU 및 Erk1/2 억제제를 BCNU-내성 다형성 교모세포종에 병용투여하는 단계를 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, Erk1/2 억제제는 Erk1/2 특이 억제제 또는 Erk1/2 광역 억제제인 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, Erk1/2 특이 억제제는 PD98059인 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 19

제 17항에 있어서, Erk1/2 광역 억제제는 AG1478인 것을 특징으로 하는 치료방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 BCNU(1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, Carmustine)-내성 다형성 교모세포종 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 암에 대한 연구에서 암세포내에 지속적인 암형성 및 성장능력을 가진 소량의 세포군이 존재한다고 보고되었다. 이러한 세포들을 종양줄기세포(cancer stem cells, CSCs)라고 한다. 상기 종양줄기세포는 자기복제(self-renewal)와 다분화능(multi-potency) 등 정상적인 줄기세포와 유사한 능력을 가지고 있으며, 약물유출(drug efflux)을 담당하는 하는 다양한 수송체(transporters)를 발현하고 있다. 최근 몇몇 연구에 의하면 *Oct4*, *Nango* 및 *Rex-1(zfp42)*과 같은 유전적 줄기세포마커가 유방암, 난소암, 폐암, 및 신장암과 같은 다양한 종류의 암세포에서 발현된다고 보고하였다. 따라서 줄기세포생물학의 기본적 개념을 적용으로 종양줄기세포를 표적하는 방법은 전이성암의 치료를 향상시킬 것으로 간주된다. 그러나 *Oct4*, *Nango* 및 *Rex-1(zfp42)*가 종양줄기세포의 표지마커로 사용될 수 있을지라도, 이들 유전자들의 종양줄기세포내 작용에 대해서는 아직까지 불분명한 실정이다.

[0003] 지금까지 동정된 유전적 줄기세포 마커 중에서 *Rex-1(reduced expression-1)*은 전사인자 *zfp-42(zinc finger protein-42)* 패밀리의 한 종류로 F9 배아암종(embryonal carcinoma: EC) 세포에서 처음 발견되었다. *Rex-1* 유전자는 인간의 배아줄기세포 및 마우스 배아줄기세포에서 다분화능 정도를 나타내는 마커로 알려져 있다. 또한 *Rex-1* 유전자의 표적화 결손(targeted deletion)시 F9 EC 세포의 내배엽성 분화(endodermal differentiation)가 감소되고, *Rex-1* 유전자에 대한 RNA 간섭(interference)에 의한 유전자 침묵(gene silencing)은 배아줄기세포의 자기복제(self-renewal) 능력 상실을 초래한다고 보고되었다. 따라서 *Rex-1* 유전자 발현은 배아줄기세포의 다분화능 뿐만 아니라 분화력을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 예측된다. 뿐만 아니라 *Rex-1*은 다분화능을 가진 성체줄기세포 및 양수유래세포와 같은 다양한 줄기세포의 다분화능 마커로써 사용되고 있다. 아울러 최근의 보고는 *Rex-1*이 사람의 신장세포암에서 발현됨으로써 신세포암 줄기세포 마커로도 사용될 수 있음을 시사하였다. 따라서 종양줄기세포의 관점에서 볼 때, *Rex-1* 유전자의 표적치료는 종양치료에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

[0004] 사람의 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme, GBM)은 다른 뇌종양과 비교시 공격적 변이(aggressive variant)로 치료하지 않으면 몇 주 이내에 치명적인 결과를 초래한다. 따라서 외과적 처치 이외에 방사선 치료 및 화학약물 치료가 함께 수행된다. 다형성 교모세포종의 화학약물 치료제 중 BCNU(1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, Carmustine)는 뇌혈관장벽(blood-brain barrier)을 쉽게 통과하고 교차연결(cross-linking) DNA 가닥의 카르바모일화(carbamoylation)와 알킬화(alkylation)를 유발함으로써 자가사멸을 통해 종양세포를 죽이기 때문에, 인간의 다형성 교모세포종의 항암제로 가장 많이 사용되어지고 있다. 그러나 다형성 교모세포종은 BCNU 화학요법에 내성을 보이는 것으로 알려져 있어서, BCNU 화학요법은 사실상 다형성 교모세포종 환자의 평균 생존기간(median survival duaration)을 연장시키지 못한다. 뿐만 아니라 다형성 교모세포종의 임상연구를 통하여 BCNU 화학요법이 단독 방사선요법과 비교시 생존을 증대시키는 것을 알 수 있었다. 그러나 다형성 교모세포종의 경우 다형성 교모세포종은 BCNU 화학요법에 내성을 가지는 아세포군을 함유하고 있어, 다제내성 유전자(multidrug resistance genes), DNA 복구 활성(repair activity), 글루타치온 S-전이효소(glutathione S-transferase) 및 세포내 글루타치온 함량(intracellular glutathione content) 등의 변형으로 BCNU 화학요법에 내성을 보이며 지속적인 종양 재발을 초래한다. 최근의 연구에 의하면 다형성 교모세포종 내에 존재하는 종양 줄기세포에 의해서 종양이 재발되며, 또한 이들 종양줄기세포가 약물내성을 보인다고 보고하였다. 최근 테모졸로마이드(TMZ: temozolomide)가 BCNU-내성이 유발되는 동안에 O6-알킬구아닌(O6)-alkylguanine)에 의한 mismatch 복구(MMR: mismatch repair)를 증가시키기 때문에 BCNU-내성 뇌종양 환자에 대한 새로운 접근법으로 TMZ 화학요법이 제시되고 있다. TMZ가 환자생존을 2년이상 현저히 증가시켰음에도 불구하고, 장기간 생존은 아직

미비하며, 다형성 교모세포종은 약제내성(multidrug resistance, MDR) 유전자의 과발현과 관련된 종양줄기세포를 포함하고 있다고 알려져 있다. 따라서 종양줄기세포를 표적으로 하는 새로운 접근법의 개발이 다형성 교모세포종의 실질적인 치료법으로 간주 될 것이다. 따라서 약물내성을 가지는 종양줄기세포군의 표적 치료에 초점을 맞추는 종양치료에 대한 새로운 접근이 필요한 실정이다. 최근 본 발명자들은 Cl^- 채널(chloride channel)의 억제이 다형성 교모세포종 종양줄기세포의 세포사멸 및 BCNU 화학요법에 대한 감수성을 효과적으로 촉진하는 것을 보고한 바 있다(Kang MK & Kang SK, *Biochem Biophys Res Commun.* 373(4):539-544, 2008).

[0005] 이에, 본 발명자들은 Rex-1의 mRNA 및 단백질이 많이 발현되는 것으로 확인된 BCNU-내성 교모세포종에서, Rex-1 유전자 발현을 억제하기 위하여 *in vitro* 및 *in vivo*로 Rex-1 유전자에 대한 siRNA(small interfering RNA)와 BCNU를 이용한 복합치료법(combined-therapy)을 시도하여 다형성 교모세포종 종양줄기세포에서 Rex-1 유전자의 발현량 감소를 통해 세포사멸 및 종양성장 억제를 유도하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 Rex-1 특이적인 siRNA를 유효성분으로 포함하는 BCNU(1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, Carmustine)-내성 다형성 교모세포종 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 Rex-1 특이적인 siRNA를 이용한 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA를 유효성분으로 포함하는 BCNU(1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, Carmustine)-내성 다형성 교모세포종 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA 및 BCNU를 유효성분으로 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA를 BCNU-내성 다형성 교모세포종에 투여하는 단계를 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA 및 BCNU를 BCNU-내성 다형성 교모세포종에 병용투여하는 단계를 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA, BCNU 및 Erk1/2 억제제를 BCNU-내성 다형성 교모세포종에 병용투여하는 단계를 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료방법을 제공한다.

[0013] 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0014] 본 발명에서 용어, "siRNA"는 표적 유전자의 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNA 간섭(RNAi: RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 이중사슬 RNA를 의미하고, 표적유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법 또는 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

[0015] 문구 "유전자 발현 억제"는 본 발명의 siRNA의 Rex-1 유전자에 대한 유전자 침묵(silencing) 능력을 지칭한다. Rex-1 유전자의 발현 억제는 대조군에 기준한 시험 값이 약 90%, 바람직하게는 50%, 더욱 바람직하게는 25-0%인 경우 달성된다. 적합한 분석시험은 예를 들면, 당업자에게 공지된 기술, 예를 들면 도트 블롯, 노던 블롯, 인 시튜(*in situ*) 하이브리드화, ELISA, 면역 침전, 효소 기능, 뿐만 아니라 당업자에게 공지된 표현형 분석시험을

사용한 단백질 또는 mRNA 수준의 조사를 포함한다.

[0016] 본 발명에서, 용어 "특이적" 또는 "특이적인"은 세포내에서 다른 유전자에 영향을 미치지 않고 표적 유전자만 억제하는 능력을 의미하고, 본 발명에서는 Rex-1 특이적이다.

[0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명의 실시예에서도 확인한 바와 같이, 다형성 교모세포종인 U87MG와 A172를 대상으로 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BCNU를 처리하였을 때, 세포생존률이 현저하게 감소되었으나 소량의 세포가 생존하는 것을 관찰할 수 있었다. 3일 동안 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BCNU를 처리하였을 경우, U87MG와 A172 세포는 각각 22.45%와 29.03%의 낮은 생존률을 나타냈으며(도 1a 참조), 또한 이들 생존 교모세포종 세포에서 ABCG2, TAP1 및 SLCA42A와 같은 약물 수송체와 관련된 유전자 발현이 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(도 1b 참조). 상기 결과는 U87MG와 A172 세포주의 네스틴-양성인 부분 모집단(nestin-positive subpopulations)이 BCNU에 내성을 보이며 BCNU 화학요법후에도 생존하는 것을 나타낸다.

[0019] 상기 생존한 U87MG 및 A172 세포는 신경줄기세포(neural stem cells, NSC) 마커인 네스틴(Nestin)에 대한 높은 면역반응을 보인 반면, 성상교세포(astrocyte) 마커인 GFAP에 대한 낮은 면역반응을 나타냈다(도 1c 참조). 또한 이들 BCNU-내성 U87MG 및 A172 세포는 *in vitro* 분화에 의해서 GFAP의 발현이 증가되는 반면 네스틴의 발현이 감소되는 것이 관찰됨으로써(도 1d 참조), BCNU-내성 다형성교모세포종 세포는 아교세포(glial cells)의 표현형을 가지는 세포로 분화되는 것으로 나타내었다.

[0020] 아울러, U87MG 및 A172 유래 BCNU-내성 세포는 대조군 세포와 비교시 현저히 높은 이동 효율(migration efficiencies)을 나타냈다(도 1e 참조). 이러한 결과는 U87MG와 A172 세포 유래 BCNU-내성 세포가 다분화능력 및 높은 이동 효율을 가진 종양줄기세포라는 이전의 결과를 뒷받침하였다. 종양줄기세포의 경우, 상대적으로 높은 이동을 보이므로 높은 이동효율을 나타내는 BCNU-내성 세포가 종양줄기세포인 것을 의미한다.

[0021] 또한 본 발명의 구체적인 실시예에서 BCNU-내성 교모세포종의 종양줄기세포로서의 능력을 더욱 조사하기 위하여, 사람의 배아줄기세포와 성체줄기세포의 마커로 알려진 *Rex-1*, *Nanog*, *Sox2* 및 *Oct4*를 포함한 줄기성유전자(stemness genes) 특이적 발현 양상을 조사하였다. 대조군과 비교시 BCNU-내성 다형성 교모세포종 세포에서 *Rex1*, *Nango*, *Sox2* 및 *Oct4*의 mRNA 및 단백질 발현이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(도 2a 및 도 2b 참조). 또한 대조군 교모세포종 세포에서도 줄기성 유전자 및 단백질이 구성적으로(constitutively) 발현될 지라도, BCNU-내성 다형성교모세포종 아세포군에서 그 발현양이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 *Rex-1* 유전자의 발현은 U87MG 및 A172 유래 BCNU-내성 세포에서 현저하게 증가되었다. 이러한 결과는 다형성 교모세포종 유래 BCNU-내성 세포군이 종양줄기세포 특성을 가진다는 기존의 보고를 뒷받침하였다.

[0022] 교모세포종 종양줄기세포에서의 *Rex-1*과 항암제 내성과의 상관 관계를 조사하기 위하여, BCNU를 처리하기 전에 *Rex-1* siRNA(silencing RNA)를 처리하고 세포생존률을 조사하였다. *Rex-1* siRNA가 형질감염된 처리군의 다형성 교모세포종의 세포생존률은 현저히 감소되었고(도 3a 참조), *Rex-1* siRNA/BCNU 복합치리에 의해서 *Rex-1* 발현 및 세포생존률이 억제되었다(도 3b 및 도 3c 참조). 즉, RNA 간섭에 의한 *Rex-1* 유전자 침묵은 배아줄기세포의 자기복제 능력을 상실하게 하였고, 사람의 교모세포종 세포주인 U87MG와 A172세포에서 *Rex-1* siRNA/BCNU 복합치리는 BCNU-내성 종양줄기세포의 *in vitro* 생존을 효과적으로 억제하였다.

[0023] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서 다형성 교모세포종에서 *Rex-1* siRNA에 의한 성장 억제의 양상을 파악하기 위하여, *Rex-1* siRNA/BCNU 복합치리에 의한 자가사멸에 관련된 Bax, Bcl-2, 시토크롬 C, P53, P21 및 c-myc 단백질 발현량을 확인한 결과, Bcl-2 단백질 발현은 감소되었으나, Bax와 시토크롬 C 단백질 발현 및 c-myc 단백질과 연관된 p53 및 p21 단백질의 발현은 *Rex-1* 유전자 침묵에 의해서 증가함으로써 자가사멸을 유도하였다(도 4a 참조). 또한 카스파제-3(caspase-3) 활성도 *Rex-1* siRNA/BCNU 복합치리에 의해서 U87MG 및 A172 세포에서 각각 1.8배와 1.9배로 현저히 증가되었다(도 4b 참조). 상기 결과는 siRNA에 의한 *Rex-1* 유전자의 직접적인 억제가 BCNU 화학요법에 대한 감도를 증가시키고 다형성교모세포종 세포의 자가사멸을 촉진시키는 결과를 초래하는 것으로 예측된다.

[0024] 또한, 일반적으로 자가사멸 동안의 MAPKs(Mitogen-Activated Protein Kinases) 활성은 JNK(Jun kinase) 및 p38 MAPK에 의한 자가사멸 촉진 작용 및 Erk에 의한 자가사멸 억제 작용 등 서로 다르게 일어나는 것으로 알려져 있

다. 본 발명의 구체적인 실시예에서 *Rex-1* siRNA/BCNU 복합치료에 의해서 유도되는 자가사멸 기작을 이해하기 위하여 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과, 두 종류의 다형성 교모세포종에서 Erk1/2 인산화 활성이 현저히 감소된 반면, JNK 및 p38의 인산화 활성은 세포에 따라 다르게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(도 4c 참조). 상기 결과로부터 p38 및 JNK의 경우 세포주 특이적으로 다르게 활성화될지라도, *Rex-1* siRNA/BCNU 복합치료에 의해 유도되는 다형성 교모세포종의 세포사멸은 Erk1/2 불활성화와 관련이 있다는 것을 알 수 있었다.

[0025] 다형성 교모세포종에서 세포 성장저해와 Erk1/2 억제에 미치는 *Rex-1* siRNA 능력을 조사하기 위하여, U87MG 및 A172 유래 BCNU-내성 종양줄기세포에 Erk1/2 특이 억제제인 PD98059와 Erk1/2 광역 억제제인 AG1478 또는 *Rex-1* siRNA를 각각 처리하고 세포생존 및 *Rex-1* 발현 양상을 조사하였다. 그 결과, PD98059와 AG1478은 다형성 교모세포종 세포군의 세포생존을 감소시켰다(도 5a 참조). 이때, AG1478의 경우 PD98059와 비교시 BCNU-내성 교모세포종 종양줄기세포의 표적치료에 더욱 효과적이었다. 특히, *Rex-1* siRNA 형질감염 3일 후 대부분의 교모세포종 종양세포군의 세포사멸이 유도되는 것을 관찰할 수 있었다(도 5a 참조). 또한 억제제 및 siRNA에 의한 세포사멸율은 Erk1/2 단백질 및 *Rex-1* 유전자 발현 감소와 비례하였다(도 5b 참조). 결론적으로, BCNU-내성 다형성 교모세포종 종양줄기세포에서 높게 발현된 *Rex-1* 유전자가 *Rex-1* siRNA에 의해서 효과적으로 감소되었으며, 결국 Erk1/2 활성 감소에 의한 세포 생존감소를 초래하였다. 즉, *Rex-1* 유전자가 Erk1/2 활성을 유도함으로써 교모세포종 U87MG 및 A172 내에 존재하는 BCNU-내성 종양줄기세포의 세포 증식력을 유지한다고 예측되었다.

[0026] 본 발명의 구체적인 실시예에서 *Rex-1* 유전자 표적에 의한 성장억제에 대한 *in vitro* 결과가 *in vivo*에서의 변화를 나타낼 수 있는지 알아본 결과, *Rex-1* siRNA가 주입되지 않은 종양은 성장이 지속적으로 일어난 반면, *Rex-1* siRNA를 주입된 종양의 성장은 느리게 일어나는 것으로 관찰되었다(도 6a 참조). 또한 *Rex-1* siRNA를 종양내로 주입한 마우스의 생존이 연장되는 것을 관찰할 수 있었다(도 6b 참조).

[0027] 또한, *in vivo* 이종이식 종양 성장(xenograft tumor growth)에서의 *Rex-1* siRNA 역할을 알아보기 위하여 조직병리학적 관찰 및 하위 신호전달계를 조사하였다. 조직병리학적으로, 종양내(intratumoral) *Rex-1* siRNA가 주입된 마우스 유래 종양조직은 현저히 많은 세포파괴를 관찰할 수 있었다(도 6c 참조). 또한 Bax, 시토크롬 C, 분절형 카스파제-3와 PARP와 같은 자가사멸과 관련된 단백질 발현도 *Rex-1* siRNA가 주입된 마우스의 종양조직에서 현저히 증가함으로써 자가사멸을 유도하는 것을 관찰할 수 있었다(도 6d 참조). 또한 *Rex-1* siRNA가 주입된 종양에서 줄기성 유전자의 발현이 감소되었다(도 6e 참조). 또한 GFAP가 유도되며 *Rex-1* 및 네스틴 단백질이 현저히 감소되었다(도 6f 참조). 상기 결과로부터 *Rex-1* 유전자 발현 감소가 네스틴 및 줄기성 유전자가 발현되는 종양줄기세포의 세포생존 감소 및 자가사멸 유도를 초래함으로써 교모세포종의 성장을 억제한다고 예측된다. 결론적으로 *Rex-1* siRNA가 *in vivo*에서 종양줄기세포를 효과적으로 감소시킴으로써 종양성장을 현저히 지연시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0028] 이에, 본 발명의 *Rex-1* siRNA는 BCNU-내성 다형성 교모세포종의 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

[0029] 본 발명은 *Rex-1*의 표적서열에 특이적인 siRNA를 유효성분으로 포함하는 BCNU(1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, Carmustine)-내성 다형성 교모세포종 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 *Rex-1*의 표적서열은 서열번호 17 또는 서열번호 18인 것을 특징으로 한다. 상기 siRNA는 상기 표적서열에 상동인 독립적인 센스 RNA 가닥 및 이에 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하거나 상기 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥이 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥일 수 있다. 상기 센스 RNA 가닥은 서열번호 17 또는 서열번호 18인 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다.

[0031] 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고, 스템-루프(stem-loop)의 구조를 이루는 헤어핀 구조를 가질 수 있는데, 이를 특히 shRNA(short hairpin RNA)라 지칭한다. 한편, 상기 이중사슬 또는 스템 부위는 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수도 있다. 전체 길이는 10 내지 80 염기, 바람직하게는 15 내지 60 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 염기이다. 또한, 상기 루프 영역은 서열에 특별한 의미가 없으며, 단지 센스서열과 안티센스서열을 적당한 간격으로 연결하기 위하여 3-10 정도의 염기를 가지고 있으면 족하다. 종래에 siRNA의 루프 영역으로 많이 사용되어온 예들은 다음과 같다: AUG(Sui *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(8):5515-5520, 2002), CCC, CCACC 또는 CCACACC(Paul *et al.*, *Nature Biotechnology* 20:505-508, 2002), UUCG(Lee *et al.*, *Nature Biotechnology* 20:500-505), CTCGAG, AAGCUU(Editors of Nature Cell Biology Whither RNAi, *Nat Cell Biol.* 5:489-490, 2003), UUCAAGAGA(Yu *et*

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(9):6047-6052, 2002) 및 TTGATATCCG(www.genscript.com의 default spacer). siRNA 말단 구조는 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조(protruding structure)와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조가 모두 가능하고 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 표적유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[0032] 상기 siRNA는 보통 약학적 조성물로서 투여된다. 상기 투여는 핵산이 원하는 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 표적 세포로 도입되는, 알려진 방법에 의하여 수행될 수 있다. 이때, siRNA의 세포 내로 도입은 특별히 이에 제한되지 않으나, siRNA를 직접 합성한 뒤, 숙주세포 내로 직접 함입되거나, 또는 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-기반 siRNA 발현카세트 등으로 세포를 형질전환 또는 감염(infection)시켜서 수행하는 것이 바람직하며, 발현벡터는 특별히 이에 제한되지는 않는다. siRNA를 발현하는 벡터는 본 발명의 표적 서열을 siRNA로 발현할 수 있는 종래 알려진 어떤 siRNA 발현 벡터도 사용할 수 있다. 예컨대, Promega 제품으로 GeneClip™ U1 Hairpin Cloning System(Cat.#'s C8750, C8760, C8770, C8780, C8790), siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference System(Cat.# C7800), T7 RiboMAX™ Express RNAi System(Cat.# P1700), siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning Systems(Cat.#'s C7890, C7900, C7910, C7920) 및 siLentGene™ -2 U6 Hairpin Cloning Systems(Cat.#'s C7860, C8060, C8070, C8080) 등을 사용할 수 있으며, Genscript 제품으로 pRNA-U6.1(Cat.#'s SD1201, SD1202, SD1207), pRNATin-H1.2(Cat.#'s SD1223, 1224) 및 pRNA-H1.1/Adeno(Cat.# SD12009) 등을 사용할 수 있다.

[0033] 한편, 통상적으로 사용되는 표적 세포로의 유전자 도입 기법에는 칼슘 포스페이트, DEAE-덱스트란, 전기천공 및 미세주입법 및 바이러스 법이 포함된다(Graham, F.L. 및 van der Eb, A.J. (1973) *Virology* 52, 456; McCutchan, J.H. 및 Pagano, J.S. (1968), *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 35 1; Chu, G. 등 (1987), *Nucl. Acids Res.* 15, 1311; Fraley, R. 등 (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 10431; Capecchi, M.R. (1980), *Cell* 22, 479). 뉴클레오타이드를 세포내로 도입하는 이러한 기법들에 최근 추가된 것은 양이온성 리포솜을 사용하는 것이다(Felgner, P.L. 등 (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413). 상업적으로 구입할 수 있는 양이온성 지질 제제는 예를 들면, Tfx 50 (Promega) 또는 Lipofectamin 2000 (Life Technologies)이 있다. Rex-1 유전자와 상보적으로 잡종 결합할 수 있는 siRNA를 직접 세포에 함입시키는 방법은 특별히 이에 제한되지는 않으나, siRNA 1 µg 당 양이온성 리포솜을 2 내지 6 µg 혼합하여, 15 내지 40분간 리포펙션(lipofection)하여 수행함이 바람직하다.

[0034] 상기 약학적 조성물은 임의의 적당한 방식, 예를 들면, 주사, 경구, 국부(topical), 코, 직장 적용 등과 같은 방식으로 투여될 수 있다. 상기 담체는 임의의 적당한 약제학적 담체일 수 있다. 바람직하게는, 상기 RNA 분자가 표적-세포로 도입되는 효율을 증가시킬 수 있는 담체가 사용된다. 그러한 담체의 적당한 예는 리포솜, 특히 양이온성 리포솜이다. 더욱 바람직한 투여 방법은 주사 (injection)이다.

[0035] 상기 약학적 조성물은 인간 의약 또는 수의 의약으로 치료학적 적용을 위하여 사용될 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 주입가능한 용액과 같은 액체, 크림, 연고, 정, 현탁액 등과 같은 형태일 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 함유한다. 약학적으로 허용되는 부형제는 기술 분야에 알려져 있으며 약학적 활성 물질의 투여를 용이하게 해주는 비교적 불활성인 물질이다. 예컨대, 부형제는 형상이나 점도를 부여할 수 있고 또는 희석제 역할도 할 수 있다. 적절한 부형제로는 안정화제, 보습제, 및 유화제, 오스몰 농도를 변화시킬 수 있는 염류, 캡슐화제, 완충액, 피부침투 촉진제를 들 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 경구 및 비경구용 약물 전달용 부형제 및 포물레이션은 Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 제20판, Mack Publishing (2000)에 제시되어 있다.

[0037] siRNA의 유효농도는 원하는 효과, 예를 들면 siRNA의 부재 하에서 검출되는 정상 발현 수준에 비해 Rex-1 유전자의 발현의 감소를 제공하기에 충분한 양이다. siRNA는 세포 하나 당 적어도 하나의 카피의 전달을 허용하는 양으로 도입될 수 있다. 이중 가닥 물질의 도입량이 많을수록 (예컨대, 세포 하나 당 5개 이상, 10 개 이상, 100개 이상, 500개 이상 또는 1000개 이상의 카피), 억제 효율이 더 높아질 수 있고, 특이적인 응용에는 도입량이 적은 것이 유리할 수 있다.

- [0038] 또한, 본 발명은 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA 및 BCNU를 유효성분으로 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 실시예에서 BCNU-내성 다형성 교모세포종 종양줄기세포의 BCNU/Rex-1 siRNA 복합처리에 의해서 Rex-1 발현 및 세포생존률이 억제되었다(도 3b 및 도 3c 참조). 즉, RNA 간섭에 의한 Rex-1 유전자 침묵은 배아줄기세포의 자기복제 능력을 상실하게 하였고, Rex-1 siRNA/BCNU 복합치료는 BCNU-내성 종양줄기세포의 *in vitro* 생존을 효과적으로 억제하였다. 이에, 본 발명의 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA 및 BCNU의 복합처리는 BCNU-내성 다형성 교모세포종의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명은 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA를 BCNU-내성 다형성 교모세포종에 투여하는 단계를 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 구체적인 실시예에서 Rex-1 siRNA가 BCNU-내성 다형성 교모세포종 종양줄기세포에 형질감염된 처리군의 다형성 교모세포종의 세포생존률은 현저히 감소되었다(도 3a 참조). 즉, RNA 간섭에 의한 Rex-1 유전자 침묵은 배아줄기세포의 자기복제 능력을 상실하게 하였고, BCNU-내성 종양줄기세포의 *in vitro* 생존을 효과적으로 억제하였다. 이에, 본 발명의 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA는 BCNU-내성 다형성 교모세포종의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0042] 상기 Rex-1의 표적서열은 서열번호 17 또는 서열번호 18인 것을 특징으로 한다. 상기 siRNA는 상기 표적서열에 상동인 독립적인 센스 RNA 가닥 및 이에 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하거나 상기 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥이 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥일 수 있다. 상기 센스 RNA 가닥은 서열번호 17 또는 서열번호 18인 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 상기 BCNU-내성 다형성 교모세포종은 Rex-1 유전자를 발현하는 분리된 세포이거나 배양된 세포일 수 있고, 분리되지 않은 채로 포유동물 중에 포함될 수 있다. 포유동물의 예로는 비인간 포유동물(예컨대, 개, 고양이, 말, 돼지, 양, 소, 염소, 설치류; 햄스터, 마우스, 래트, 및 영장류) 및 인간을 들 수 있다. 본 발명에서는 표적유전자를 발현하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종으로 U87MG와 A172를 사용하였다.
- [0044] 본 발명에서, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 물질의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0045] 또한, 문구 "투여"는 본 발명의 siRNA를 Rex-1 유전자를 발현하는 세포로 "전신 전달" 또는 "국소 전달"하여 도입되는 것을 뜻한다. "전신 전달"은 유기체 내에 화합물의 광역 생체분포를 유발하는 전달을 지칭한다. 일부 투여 기술은 특정한 화합물에 전신 전달을 유발하고, 다른 것들에는 그렇지 않을 수 있다. 전신 전달은 유용한, 바람직하게는 치료적으로 유효한 양의 화합물이 신체의 대부분에 노출되는 것을 의미한다. 일반적으로, 광역 생체분포를 얻기 위해, 화합물이 투여 부위와 멀리 떨어진 질환 부위에 도달하기 전에 빠르게 분해되거나 제거되지 않도록(예를 들면, 최초 통과 기관(간, 폐 등)에 의해 또는 빠른 비특이적 세포 결합에 의해) 하는 혈액내 수명이 요구된다. 핵산-지질 입자의 전신 전달은 당업계에서 공지된 임의의 수단, 예를 들면 정맥내, 피하, 복막내를 포함하는 것들일 수 있고, 바람직한 실시양태에서, 핵산 입자의 전신 전달은 정맥내 전달에 의해 이루어진다. 본 명세서에 사용된 "국소 전달"은 유기체 내에서 표적 부위에 화합물을 직접 전달하는 것을 지칭한다. 예를 들면, 화합물은 질환 부위, 예를 들면 종양 또는 다른 표적 부위, 예를 들면 염증 부위 또는 표적 기관, 예를 들면 간, 심장, 췌장, 신장 등에 직접 주사함으로써 국소 전달될 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA 및 BCNU를 BCNU-내성 다형성 교모세포종에 병용투여하는 단계를 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료방법을 제공한다.
- [0047] 상기 "병용투여"는 BCNU를 투여하기 수 시간 전에 siRNA를 처리하는 단계를 먼저 수행하는 방법이 다. siRNA가 먼저 처리되어 Rex-1 유전자 발현이 억제되어야 다형성 교모세포종에서 BCNU 감수성(sensitivity)이 상승될 수 있기 때문이다.
- [0048] 본 발명의 구체적인 실시예에서 BCNU-내성 다형성 교모세포종 종양줄기세포의 BCNU/Rex-1 siRNA 복합처리에 의

해서 Rex-1 발현 및 세포생존률이 억제되었다(도 3b 및 도 3c 참조). 즉, RNA 간섭에 의한 *Rex-1* 유전자 침묵은 배아줄기세포의 자기복제 능력을 상실하게 하였고, *Rex-1* siRNA/BCNU 복합치료는 BCNU-내성 종양줄기세포의 *in vitro* 생존을 효과적으로 억제하였다. 이에, 본 발명의 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA 및 BCNU의 복합처리는 BCNU-내성 다형성 교모세포종의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명은 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA, BCNU 및 Erk1/2 억제제를 BCNU-내성 다형성 교모세포종에 병용투여하는 단계를 포함하는 BCNU-내성 다형성 교모세포종 치료방법을 제공한다.

[0050] 상기 Erk1/2 억제제는 Erk1/2 특이 억제제인 PD98059 또는 Erk1/2 광역 억제제인 AG1478이다.

[0051] 본 발명의 구체적인 실시예에서 BCNU-내성 종양줄기세포에 Erk1/2 특이 억제제인 PD98059와 Erk1/2 광역 억제제인 AG1478 또는 *Rex-1* siRNA를 각각 처리하고 세포생존 및 Rex-1 발현 양상을 조사하였다. 그 결과, PD98059와 AG1478은 다형성 교모세포종 세포군의 세포생존을 감소시켰다(도 5a 참조). 특히, *Rex-1* siRNA 형질감염 3일 후 대부분의 교모세포종 종양세포군의 세포사멸이 유도되는 것을 관찰할 수 있었다(도 5a 참조). 또한 억제제 및 siRNA에 의한 세포사멸율은 Erk1/2 단백질 및 Rex-1 유전자 발현 감소와 비례하였다(도 5b 참조). 결론적으로, BCNU-내성 다형성 교모세포종 종양줄기세포에서 높게 발현된 Rex-1 유전자가 *Rex-1* siRNA에 의해서 효과적으로 감소되었으며, 결국 Erk1/2 활성 감소에 의한 세포 생존감소를 초래하였다. 즉, Rex-1 유전자가 Erk1/2 활성을 유도함으로써 교모세포종 내에 존재하는 BCNU-내성 종양줄기세포의 세포 증식력을 유지한다고 예측되었다. 이에, 본 발명의 Rex-1의 표적서열에 특이적인 siRNA, BCNU 및 Erk1/2 억제제의 복합처리는 BCNU-내성 다형성 교모세포종의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

효 과

[0052] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 BCNU와 병용투여함으로써 BCNU-내성 다형성 교모세포종의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0054] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0055] <실시예 1> BCNU-내성 교모세포종의 특징 확인

[0056] <1-1> BCNU-내성 교모세포종의 BCNU 내성 생존률

[0057] 인간의 다형성 교모세포종 세포주인 U87MG 및 A172는 ATCC(USA)에서 구입하여 사용하였다. 상기 두 세포주는 10% FBS 및 100 units/ml 페니실린-스트렙토마이신이 들어있는 DMEM 배지(Gibco Laboratories, USA)에서 37℃/5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 모든 실험은 대수증식기인 70% 정도 컨플루언스(confluence)에 도달했을 때 시행하였다. 상기 두 암세포주의 약물 감수성을 조사하기 위하여, U87MG와 A172세포를 24-웰 플레이트에 배양하고 BCNU(33 μ g/ml; 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, Sigma Chemical Company, USA)를 처리한 후 37℃/5% CO₂ 조건에서 3일동안 추가로 배양하였다. 대조군은 BCNU 대신에 DMSO를 처리하였다. 세포생존률은 트리판 블루 색소 배제법(trypan blue dye exclusion)으로 조사하였으며, 모든 실험은 3회 반복 실시하였다. 모든 데이터는 3회 반복실험을 통하여 평균±표준편차(SD)로 나타내었으며, 양측검정 Student's *t*-test로 통계처리하였다 (*P*<0.05).

[0058] 그 결과, 도 1a에서 나타난 바와 같이 3일 동안 33 μ g/ml의 BCNU를 처리하였을 경우, U87MG와 A172 세포는 각각 22.45%와 29.03%의 낮은 생존률을 나타냈다.

[0059] <1-2> BCNU-내성 교모세포종의 BCNU 내성 특성 확인

[0060] 실시예 1-1에서 생존한 BCNU-내성 종양세포 및 대조군 BCNU-내성 종양세포에서의 ABCG2, TAP1 및 SLCA42A와 같

은 약물 수송체와 관련된 유전자 발현 양상을 확인하였다. 트리졸(Life Technologies, USA)을 이용하여 분리한 전체 RNA를 oligo-dT 프라이머를 이용하여 일차 cDNA로 역전사 시키고, 표 1의 20 pM의 유전자 특이적 프라이머 쌍을 이용하여 95℃에서 5분간 변성시킨 후, 95℃ 1분, 어닐링 온도 1분, 72℃ 1분의 조건으로 35회 반복하면서 증폭시켰다. 마지막 반응으로 72℃에서 7분간 더 반응시켰다. 각각의 프라이머에 대한 어닐링 온도는 ABCG2의 경우, 54℃, TAP1의 경우, 60℃, SLC4AZ의 경우, 55℃, GAPDH의 경우, 55℃로 실시하였다. 각각의 6 μ l의 유전자 산물을 1% 아가로스 겔에서 전기영동하였고 EtBr로 염색한 후 UV 선에서 관찰하였다. 이때, GAPDH를 내부 대조군으로 사용하였다.

그 결과, 도 1b에서 나타난 바와 같이 생존한 교모세포종 세포에서 ABCG2, TAP1 및 SLC42A와 같은 약물 수송체와 관련된 유전자 발현이 높게 나타나는 것으로 관찰되었다.

표 1

유전자명	정방향 프라이머		역방향 프라이머	
	서열번호	염기서열	서열번호	염기서열
ABCG2	서열번호 1	5'-caggaggccttgggatactt-3'	서열번호 2	5'-gctatagaggcctggggatt-3'
TAP1	서열번호 3	5'-gggctgttaagcagtgggaacc-3'	서열번호 4	5'-caaggccctccaagtgt aaggg-3'
SLC4AZ	서열번호 5	5'-tgactgccccagaaaagag-3'	서열번호 6	5'-atccccgataactatygagag-3'
GAPDH	서열번호 7	5'-catgaccacagtcacatgccatcact-3'	서열번호 8	5'-tgagggtccaccacctgttctgtat-3'

<1-3> BCNU-내성 교모세포종의 종양줄기세포 특성 확인

실시에 1-1에서 생존한 BCNU-내성 종양세포에서의 신경줄기세포 및 신경교세포 마커 단백질 발현 양상을 조사하기 위하여 상기 BCNU-내성 종양세포를 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 30분간 실온에서 고정하였다. PBS로 세척한 후 항-GFAP(1:1500, DAKO Cytomation, Denmark) 및 항-Nestin(1:200, Sigma, USA) 일차항체를 이용하여 4℃에서 배양하였다. 다시 PBS로 세포를 세척하고 FITC, Texas-Red, 또는 TRITC의 이차항체(1:250, Molecular Probe, USA)로 30분 동안 배양하였다. 세포핵은 DAPI(4-6'diamidino-2-phenylindoline; Vector laboratories, UK)로 염색한 후, Confocal Microscopy(Leica Microsystems, USA)로 조사하였다. 면역염색실험은 각각 3회 실시하였다.

그 결과, 도 1c에서 나타난 바와 같이 상기 생존한 U87MG 및 A172 세포는 신경줄기세포(neural stem cells, NSC) 마커인 네스틴(Nestin)에 대한 높은 면역반응을 보인 반면, 성상교세포(astrocyte) 마커인 GFAP에 대한 낮은 면역반응을 나타냈다.

<1-4> BCNU-내성 교모세포종의 종양줄기세포 특성 확인

실시에 1-1에서 생존한 BCNU-내성 종양세포를 PRO-PREP™ Protein Extraction Solution(iNTRON Biotechnology, Inc., USA)으로 파쇄하고 동량(40 μ g)의 단백질을 12% SDS-PAGE 겔로 전기영동한 후, 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membranes, Sigma, USA)으로 이동시키고, 5% 스킵 밀크(skim milk, Difco, USA)로 실온에서 2시간 동안 부동화시켰다. 항-GFAP(1:1500, DAKO, USA) 및 항-Nestin(1:200, Sigma, USA) 일차항체를 이용하여 4℃에서 항원항체반응을 유도한 후, HRP(horseradish peroxidase)가 부착되어있는 2차 항체(Cell Signaling Technology, USA)와 반응시키고 ECL 키트(enhanced chemiluminescence solution kit, Amersham, UK)를 사용하여 단백질 발현을 검출하였으며, Quantity-one 1-D 분석 소프트웨어(Bio-Rad, USA)를 이용하여 상대적인 단백질 발현정도를 조사하였다.

그 결과, 도 1d에서 나타난 바와 같이 상기 생존한 BCNU-내성 U87MG 및 A172 세포는 *in vitro* 분화에 의해서 GFAP의 발현이 증가되는 반면 네스틴의 발현이 감소되는 것이 관찰됨으로써, BCNU-내성 다형성교모세포종 세포는 아교세포(glial cells)의 표현형을 가지는 세포로 분화되는 것으로 나타내었다.

<1-5> BCNU-내성 교모세포종의 세포이동 분석

실시에 1-1에서 생존한 BCNU-내성 종양세포(5×10^5 세포)를 Costar transwell membranes(Corning, USA)에 주입한 후 6-웰 플레이트로 옮기고 37℃/CO₂ 배양기에서 하룻밤동안 배양하였다. 아래 챔버로 이동(migration)된

세포를 Harris 헤마톡실린(hematoxylin) 용액(Sigma, USA)으로 20분간 염색한 후 세척하였고, 광학현미경하에서 계수하였다($\times 200$).

[0071] 그 결과, 도 1e에서 나타난 바와 같이 U87MG 및 A172 유래 BCNU-내성 세포는 대조군 세포와 비교시 현저히 높은 이동 효율(migration efficiencies)을 나타냈다.

[0072] <실시예 2> BCNU-내성 교모세포종의 Rex-1 발현 확인

[0073] <2-1> 유전자 발현량 조사

[0074] 실시예 1-1에서 생존한 BCNU-내성 종양세포에서의 종양줄기세포로서의 능력을 더욱 조사하기 위하여, 사람의 배아줄기세포와 성체줄기세포의 마커로 알려진 *Rex-1*, *Nanog*, *Sox2* 및 *Oct4*를 포함한 줄기성유전자(stemness genes) 특이적 발현 양상을 표 2의 프라이머쌍을 이용하여 실시예 1-2와 유사한 방법으로 조사하였다. 각각의 프라이머에 대한 어닐링 온도는 *Rex1*의 경우 55°C, *Oct4*의 경우 53°C, *Sox2*의 경우 59°C, *Nanog*의 경우 59°C, *GAPDH*의 경우 55°C로 실시하였다.

[0075] 그 결과, 도 2a에서 나타난 바와 같이 대조군과 비교시 BCNU-내성 다형성 교모세포종 세포에서 *Rex1*, *Nango*, *Sox2* 및 *Oct4*의 mRNA 발현이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 *Rex-1* 유전자의 발현은 U87MG 및 A172 유래 BCNU-내성 세포에서 현저하게 증가되었다.

표 2

유전자명	정방향 프라이머		역방향 프라이머	
	서열번호	염기서열	서열번호	염기서열
<i>Rex1</i>	서열번호 9	5'-tgaaagccacatcctaacg-3'	서열번호 10	5'-caagctatcctcctgctttgg-3'
<i>Oct4</i>	서열번호 11	5'-cgcacaaactggcattgtcat-3'	서열번호 12	5'-ttctccttgatgtcacgcac-3'
<i>Sox2</i>	서열번호 13	5'-tacctcttctcctccactcca-3'	서열번호 14	5'-actctcctcttttgacacccc-3'
<i>NaNog</i>	서열번호 15	5'-gctgagatgcctcacacggag-3'	서열번호 16	5'-tctgtttcttgactgggaccttgtc-3'
<i>GAPDH</i>	서열번호 7	5'-catgaccacagtccatgccatcact-3'	서열번호 8	5'-tgagggtccaccacctgttgctgta-3'

[0077] <2-2> 단백질 발현량 조사

[0078] 실시예 1-1에서 생존한 BCNU-내성 종양세포에서의 줄기성유전자의 특이적 발현 양상을 *Rex1*(1:1000, Abcam, UK), *Nango*(1:1000, Abcam, UK), *Sox2*(1:1000, Chemicon, USA) 및 *Oct4*(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Germany) 특이적 일차항체를 이용하여 실시예 1-3과 유사한 방법으로 조사하였다.

[0079] 그 결과, 도 2b에서 나타난 바와 같이 대조군과 비교시 BCNU-내성 다형성 교모세포종 세포에서 *Rex1*, *Nango*, *Sox2* 및 *Oct4*의 단백질 발현이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 *Rex-1* 유전자의 발현은 U87MG 및 A172 유래 BCNU-내성 세포에서 현저하게 증가되었다.

[0080] 이러한 결과는 다형성 교모세포종 유래 BCNU-내성 세포군이 종양줄기세포 특성을 가진다는 기존의 보고를 뒷받침하였다.

[0081] <실시예 3> Rex-1 유전자의 표적치료법의 효과

[0082] <3-1> Rex1 siRNA로 형질감염

[0083] BCNU-내성 교모세포종 종양줄기세포에서의 *Rex-1*과 항암제 내성과의 상관 관계를 조사하기 위하여, BCNU를 처리하기 전에 *Rex-1* siRNA로 형질감염하였다.

[0084] 구체적으로, siRNA 형질감염은 LipofectAMINE 2000(Invitrogen, USA)를 이용하여 실시하였다. 사람의 교모세포종인 U87MG와 A172 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지(complete medium: 완전배지)에서 배양하고 60-70%의

컨플루언스에 도달하였을 때 6-웰 플레이트에 옮겨 배양하였다. 배양 24시간 후, FBS가 들어가 있지 않은 배지 (serum-free medium)로 교체하고 LipofectAMINE 2000을 이용하여 5 μ g의 siRNA(서열번호 17: 5'-GAAGATGGGAAGCGCCAAG-3'; 서열번호 18: 5'-CAGGGGUUGUGGUUAAGCUCUU-3'; (Dharmacon Inc., USA)를 형질감염하였다. 5시간 후에 완전배지로 교체하였고 33 μ g/ml의 BCNU를 처리하고 48시간 동안 37°C/5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 이때, 음성대조군으로는 scrambled siRNA(서열번호 19: 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3', Gima Biol Engineering Inc., China)를 사용하였다. 양성대조군은 BCNU 단독 처리군으로 하였다.

[0085] <3-2> Rex-1과 항암제 내성과의 상관 관계 조사

[0086] <3-2-1> 세포생존률 조사

[0087] 실시예 3-1의 형질감염된 세포의 세포생존률을 위상차 현미경(Nikon, Japan)을 이용하여 조사하였다.

[0088] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이 Rex-1 siRNA의 처리에 의해 다형성 교모세포종의 세포생존률이 현저히 감소되었다.

[0089] <3-2-2> Rex-1 발현량 조사

[0090] 실시예 3-1의 형질감염된 세포의 Rex-1의 mRNA 발현량을 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머쌍을 이용하여 실시예 1-2의 방법으로 조사하였다.

[0091] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이 Rex-1 siRNA가 형질감염된 다형성 교모세포종의 Rex-1의 mRNA 발현량이 억제되었다.

[0092] <3-3> 처리 기간에 따른 세포생존률 조사

[0093] 실시예 3-1의 형질감염된 세포를 1일, 2일 및 3일 째에 회수하여 세포생존률을 실시예 1-1의 방법으로 조사하였다.

[0094] 그 결과, 도 3c에서 나타난 바와 같이 Rex-1 siRNA가 형질감염된 다형성 교모세포종의 세포생존률이 억제되었다.

[0095] <실시예 4> 세포 성장 및 생존 신호의 억제 확인

[0096] <4-1> 성장 억제 특징의 확인

[0097] 실시예 3-1에서 형질감염된 BCNU-내성 종양세포에서의 줄기성유전자의 특이적 발현 양상을 Bax(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Germany), Bcl-2(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Germany), 시토크롬 C(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Germany), P53(1:500, Santa Cruz Biotechnology, Germany), P21(1:500, Santa Cruz Biotechnology, Germany), c-myc(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Germany) 및 GAPDH(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Germany)내부대조군) 특이적 일차항체를 이용하여 실시예 1-3과 유사한 방법으로 조사하였다.

[0098] 그 결과, 도 4a에서 나타난 바와 같이 Bcl-2 단백질 발현은 감소되었으나, Bax와 시토크롬 C 단백질 발현 및 c-myc 단백질과 연관된 p53 및 p21 단백질의 발현은 Rex-1 유전자 침묵에 의해서 증가되었다.

[0099] <4-2> 카스파제-3 활성 측정

[0100] 실시예 3-1의 형질감염된 세포를 HBSS(Hank's Balanced Salts, Modified) 완충용액으로 세척하였고, CytoBusterTM Protein Extraction Reagent(Novagen, USA)로 4°C에서 1시간 동안 용해하여 5분간 원심분리(12,000 rpm)하였다. 50 μ l 반응 완충용액에 카스파제-3 기질(Chelbiochem, Germany)을 첨가하였고, 37°C에서 2분간 배양하고 마이크로 리더기(Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 발색정도를 관찰하였다.

[0101] 그 결과, 도 4b에서 나타난 바와 같이 Rex-1 siRNA/BCNU 복합치료에 의해서 U87MG 및 A172 세포에서 각각 1.8배와 1.9배로 현저히 증가되었다.

[0102] <4-3> 자가사멸 기작 특징의 확인

[0103] 실시예 3-1의 형질감염된 BCNU-내성 종양세포에서의 MAPKs(Mitogen-Activated Protein Kinases) 관련 단백질의 발현 양상을 Erk1/2(1:1000, Cell Signaling Technology, USA), p38(1:1000, Cell Signaling Technology,

USA), SAPK/JNK(Stress-activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase: 1:1000, Cell Signaling Technology, USA) 및 GAPDH(내부대조군) 특이적 일차항체를 이용하여 실시예 1-3과 유사한 방법으로 조사하였다.

[0104] 그 결과, 도 4c에서 나타난 바와 같이 두 종류의 다형성 교모세포종에서 Erk1/2 인산화 활성이 현저히 감소된 반면, JNK 및 p38의 인산화 활성은 세포에 따라 다르게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

[0105] <실시예 5> 세포 생존신호 전달계 간접 확인

[0106] <5-1> 세포생존률 조사

[0107] 실시예 3-1의 형질감염된 BCNU-내성 종양세포 및 상기 형질감염 대신에 Erk1/2 특이 억제제인 PD98059(Sigma, USA)와 Erk1/2 광역 억제제인 AG1478(Chemicon, USA)을 각각 10 μ M 씩 주입한 후, 1일, 2일 및 3일 후에 실시예 1-1의 방법으로 세포생존률을 조사하였다.

[0108] 그 결과, 도 5a에서 나타난 바와 같이 Erk1/2 특이 억제제인 PD98059와 Erk1/2 광역 억제제인 AG1478은 다형성 교모세포종 세포군의 세포생존을 감소시켰다. 이때, AG1478의 경우 PD98059와 비교시 BCNU-내성 교모세포종 종양줄기세포의 표적치료에 더욱 효과적이었다. 특히, *Rex-1* siRNA 형질감염 3일 후 대부분의 교모세포종양세포군의 세포사멸이 유도되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0109] <5-2> Erk1/2 및 Rex-1 발현률 조사

[0110] 억제제 및 siRNA에 의한 세포사멸율과 Erk1/2 단백질 및 Rex-1 유전자 발현량과의 관계를 실시예 1-3의 방법 또는 실시예 1-2의 방법으로 조사하였다. 이때, 단백질량 조사를 위한 내부대조군으로 액틴에 특이적인 일차항체 (Santa Cruz Biotechnology, Germany)를 이용하였다.

[0111] 그 결과, 도 5b에서 나타난 바와 같이 억제제 및 siRNA에 의한 세포사멸율은 Erk1/2 단백질 및 Rex-1 유전자 발현 감소와 비례하였다.

[0112] 즉, BCNU-내성 다형성 교모세포종 종양줄기세포는 Rex-1 유전자 발현이 높게 일어나며, *Rex-1* siRNA 발현에 의해서 효과적으로 감소되었으며, 결국 Erk1/2 활성 감소에 의한 세포 생존감소를 초래하였다. 따라서, Rex-1 유전자가 Erk1/2 활성을 유도함으로써 교모세포종 U87MG 및 A172내에 존재하는 BCNU-내성 종양줄기세포의 세포 증식력을 유지한다고 예측된다.

[0113] <실시예 6> *in vivo* 종양발생 억제 확인

[0114] <6-1> 실험동물 준비

[0115] 암컷 누드 마우스(NOD/SCID mice, 5주령은 Charles River Laboratories(USA)에서 분양받아 1주간 동물실에서 순화시켰다. 순화기간 및 시험기간 중 마우스용 폴리카보네이트 케이지에 수용하였으며, 사료와 물은 자유로시 섭취시켰다. 모든 동물 실험은 "서울대학교 동물실험윤리규정"에 따라 실시하였다.

[0116] <6-2> Rex1 siRNA 치료 수행 및 효과 분석

[0117] Rex1 siRNA 치료의 유효성을 조사하기 위하여, U87MG 세포(2×10^6 cells/20 μ l DMEM)를 Matrigel(BD Bioscience, USA)과 혼합하여 암컷 누드 마우스의 등에 피하주사하였다. 주사 2주 후, 종양의 직경이 0.1 ~ 0.3 cm에 도달하였을 때, 9 μ g의 *Rex-1* siRNA를 10 μ l의 DMEM에 용해하여 3일 간격으로 종양 내 주사 (intratumoral injection)하였다. 이후, 상기 종양의 성장 및 마우스의 생존률을 관찰하였다.

[0118] 그 결과, 도 6a에서 나타난 바와 같이 *Rex-1* siRNA가 주입되지 않은 종양은 성장이 지속적으로 일어난 반면, *Rex-1* siRNA를 주입된 종양의 성장은 느린 것으로 관찰되었다. 또한, 도 6b에서 나타난 바와 같이 *Rex-1* siRNA를 종양내로 주입한 마우스의 생존이 연장되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0119] <6-3> 조직병리학적 관찰

[0120] Rex1 siRNA의 후-종양내 주사(post-intratumoral injection) 6주 후, 조직학적 분석을 위하여 종양 조직을 적출하여 4% 파라포름알데히드로 고정하고 냉각포매제[Tissue-Tek optimum cutting temperature(OCT) Compound;

Sakura Finetek, USA)에 포배하여 -20℃에서 동결하였다. 냉동용 마이크로톰(freezing microtome: CM3050, Leica Microsystems, German)을 이용하여 종양 조직을 10 μm로 동결절편으로 만들고 폴리-D-라이신-코팅된 슬라이드(Sigma, USA)에 옮겨 37℃에서 하룻밤동안 건조시켰다. 헤마톡실린과 에오신(eosin; Sigma, USA)으로 염색하고 광학현미경으로 검경하여 조직병리학적 관찰을 실시하였다.

[0121] 그 결과, 도 6c에서 나타난 바와 같이 종양내(intratumoral) *Rex-1* siRNA가 주입된 마우스 유래 종양조직은 현저히 많은 세포파괴를 관찰할 수 있었다.

[0122] <6-4> 하위 신호전달체계 조사

[0123] <6-4-1> 자가사멸과 관련된 단백질 발현량 조사

[0124] 실시예 6-2의 종양조직을 대상으로, Bax(1:1000, Santa Cruz, USA), Bcl-2(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Germany), 시토크롬 C(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Germany), 분절형 카스파제-3(Cell Signaling Technology, USA) 및 PARP(Cell Signaling Technology, USA)등의 자가사멸과 관련된 단백질의 일차항체를 이용하여 상기 단백질의 발현량을 실시예 1-3의 방법으로 조사하였다.

[0125] 그 결과, 도 6d에서 나타난 바와 같이 상기 자가사멸과 관련된 단백질 발현도 *Rex-1* siRNA가 주입된 마우스의 종양조직에서 현저히 증가되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0126] <6-4-2> 줄기성 유전자의 발현량 조사

[0127] 실시예 6-2의 종양조직을 대상으로, 줄기성 유전자의 발현량을 표 2의 프라이머쌍을 이용하여 실시예 1-2의 방법으로 조사하였다.

[0128] 그 결과, 도 6e에서 나타난 바와 같이 *Rex-1* siRNA가 주입된 종양에서 줄기성 유전자의 발현이 감소되었다.

[0129] <6-4-3> 신경줄기세포 마커의 발현량 조사

[0130] 실시예 6-2의 종양조직을 대상으로, *Rex-1*, 신경줄기세포 마커인 네스틴 및 GFAP 단백질의 일차항체를 이용하여 상기 단백질의 발현량을 실시예 1-3의 방법으로 조사하였다.

[0131] 그 결과, 도 6f에서 나타난 바와 같이 GFAP가 유도되며 *Rex-1* 및 네스틴 단백질이 현저히 감소되었다.

도면의 간단한 설명

[0132] 도 1은 인간의 다형성 교모세포종 세포의 BCNU 내성을 확인한 도이다:

[0133] a: BCNU 내성 생존율;

[0134] b: 약물 수송체와 관련된 유전자 발현;

[0135] c: 신경줄기세포(neural stem cells, NSC) 마커인 네스틴(Nestin) 및 성상교세포(astrocyte) 마커인 GFAP 단백질 발현(웨스턴 블랏);

[0136] d: 네스틴 및 GFAP 단백질 발현(면역화학 분석); 및,

[0137] e: BCNU-내성 교모세포종의 세포이동 분석.

[0138] 도 2는 BCNU-내성 교모세포종의 *Rex-1* 발현을 확인한 도이다:

[0139] a: RT-PCR; 및,

[0140] b: 웨스턴 블랏.

[0141] 도 3은 *Rex-1* 유전자의 표적치료법의 효과를 확인한 도이다:

[0142] a: *Rex-1* siRNA의 처리에 의한 다형성 교모세포종의 세포생존율 억제(위상차 현미경 관찰);

[0143] b: *Rex-1* siRNA의 처리에 의한 다형성 교모세포종의 *Rex-1*의 mRNA 발현량 억제; 및,

[0144] c: *Rex-1* siRNA의 처리에 의한 다형성 교모세포종의 세포생존율 억제.

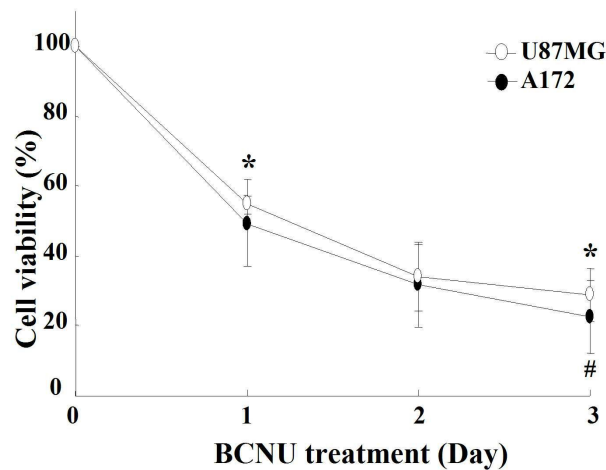
[0145] 도 4는 세포 성장 및 생존 신호의 억제를 확인한 도이다:

[0146] a: *Rex-1* siRNA의 처리에 의한 다형성 교모세포종의 줄기성유전자의 특이적 발현 양상(웨스턴 블랏);

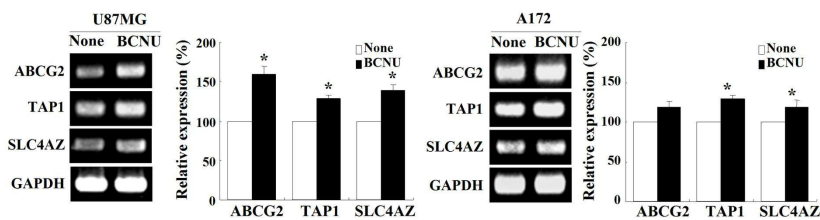
- [0147] b: *Rex-1* siRNA의 처리에 의한 다형성 교모세포종의 카스파제-3 활성 증가; 및,
- [0148] c: *Rex-1* siRNA의 처리에 의한 다형성 교모세포종의 MAPKs 관련 단백질의 발현 양상.
- [0149] 도 5는 세포 생존신호 전달계 간섭 확인을 확인한 도이다:
- [0150] a: Erk1/2 억제제에 의한 세포생존률 감소; 및,
- [0151] b: Erk1/2 억제제 및 *Rex-1* siRNA 복합처리에 의한 Erk1/2 단백질 및 *Rex-1* 유전자 발현 감소.
- [0152] 도 6은 *in vivo* *Rex1* siRNA 치료효과를 확인한 도이다:
- [0153] a: 종양 성장 억제;
- [0154] b: 마우스 생존 연장;
- [0155] c: 종양 조직에서의 세포파괴;
- [0156] d: 자가사멸과 관련된 단백질 발현 증가;
- [0157] e: 줄기성 유전자의 발현 감소; 및,
- [0158] f: GFAP 유도 및 *Rex-1* 및 네스틴 단백질 발현 감소.

도면

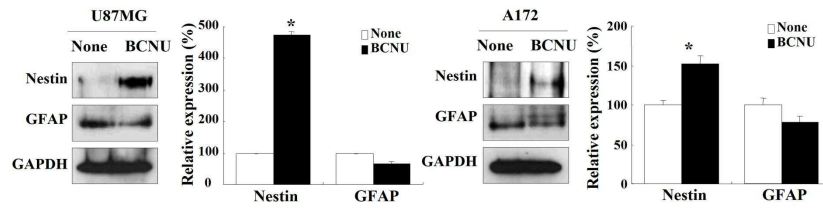
도면1a



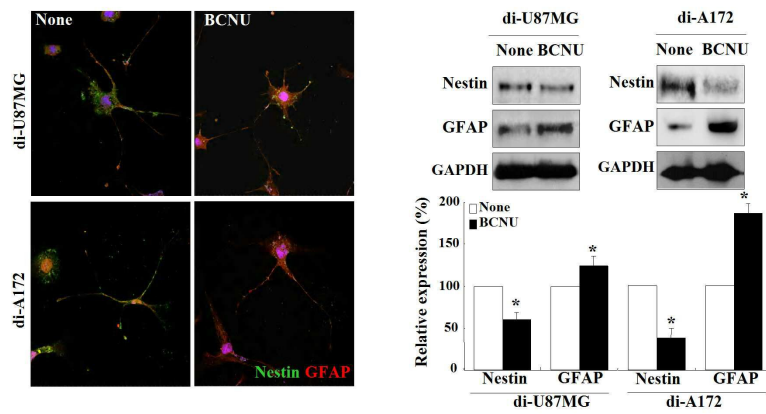
도면1b



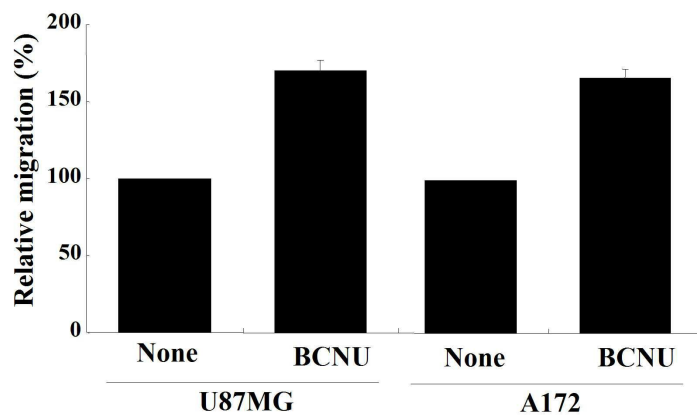
도면1c



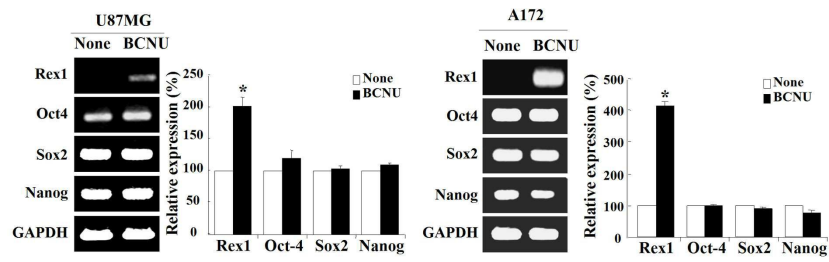
도면1d



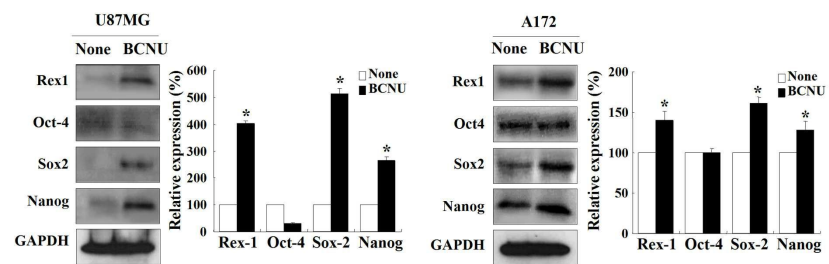
도면1e



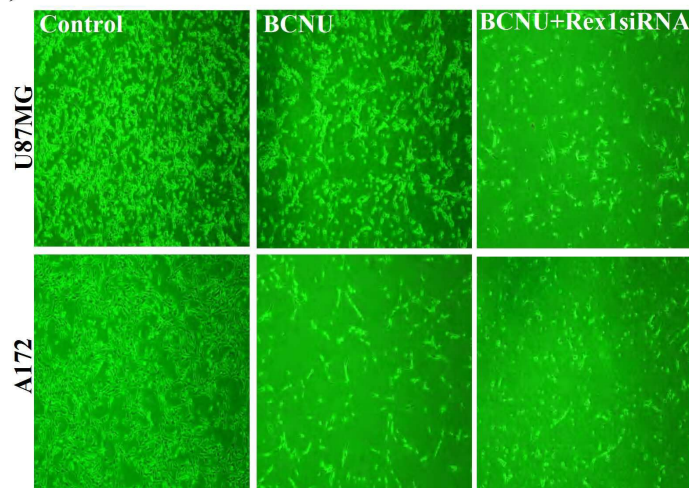
도면2a



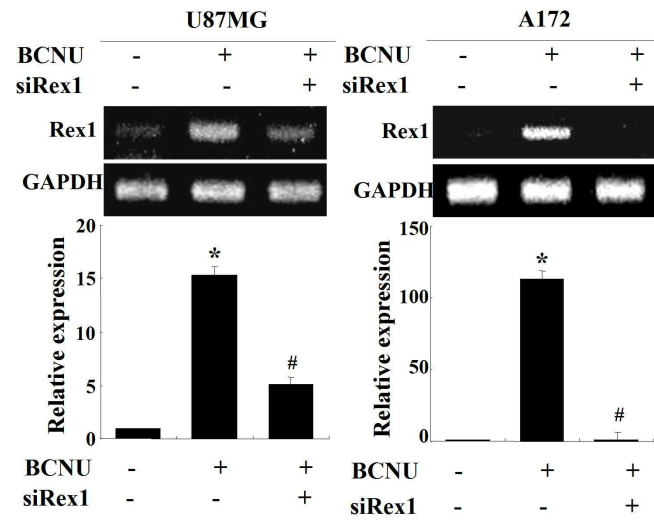
도면2b



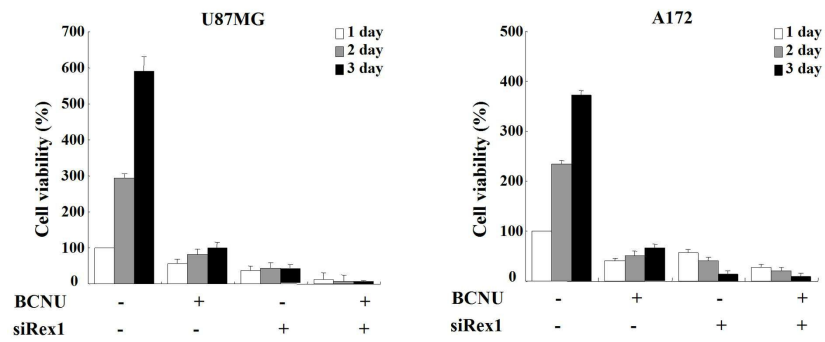
도면3a



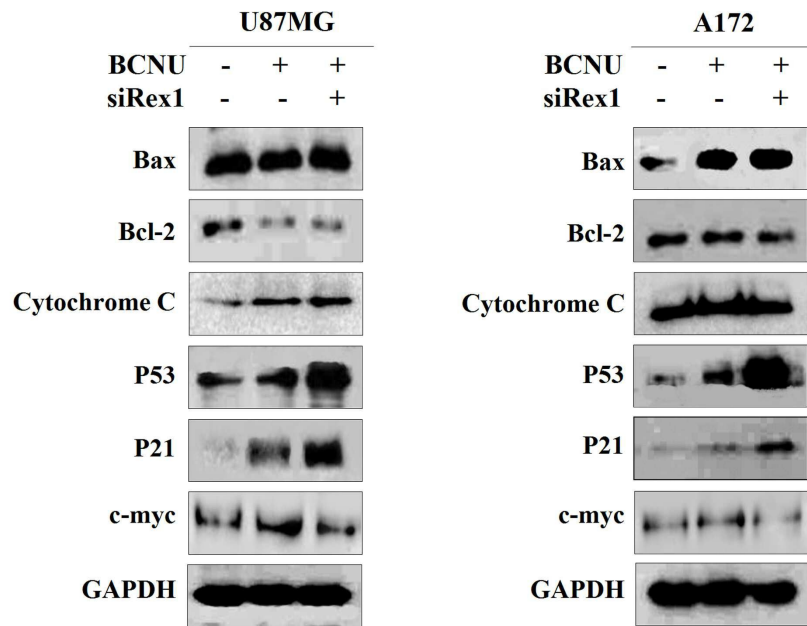
도면3b



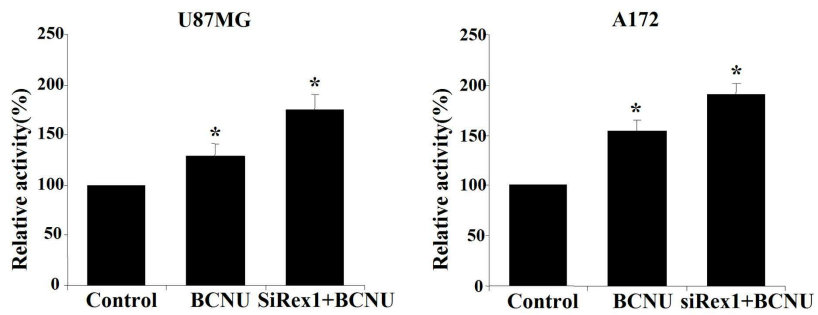
도면3c



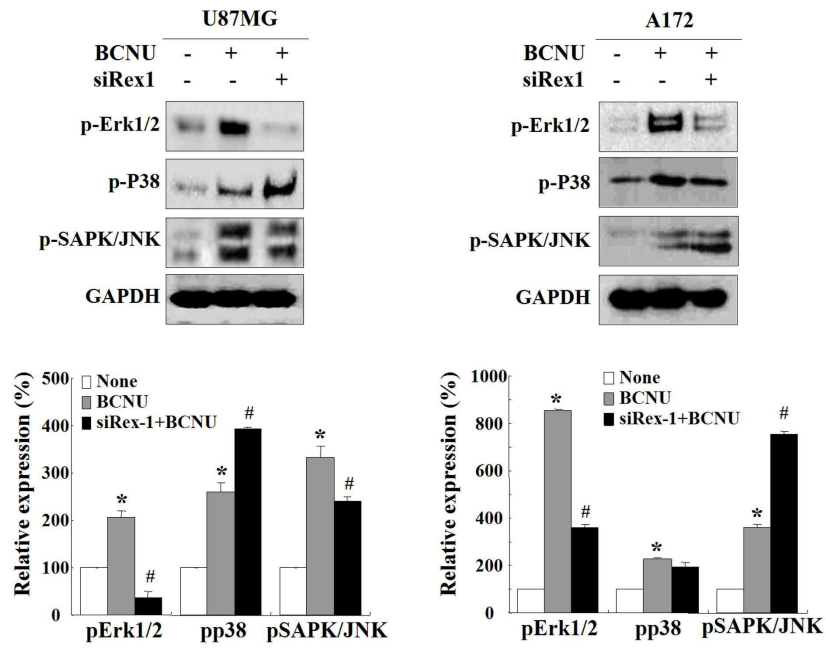
도면4a



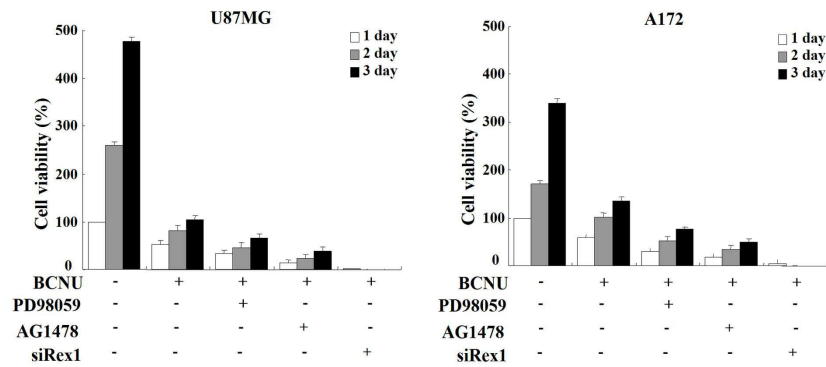
도면4b



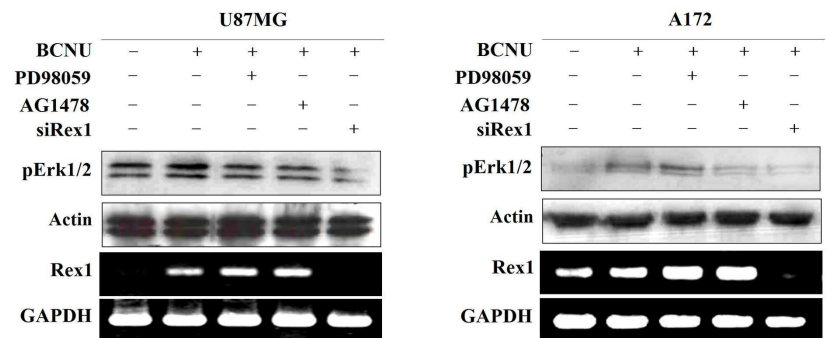
도면4c



도면5a



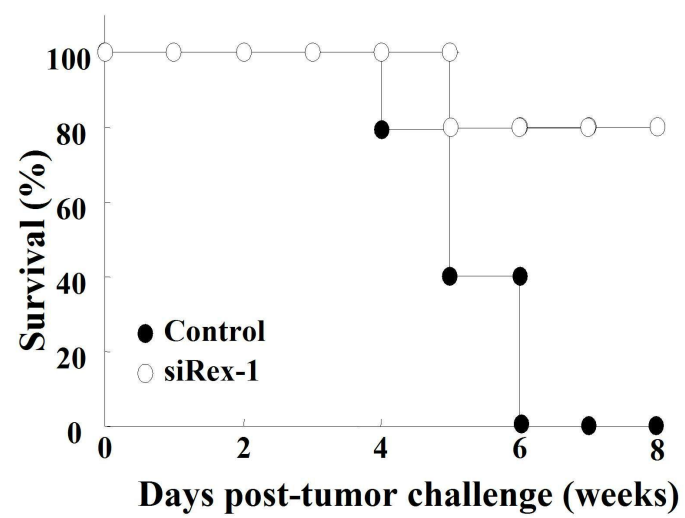
도면5b



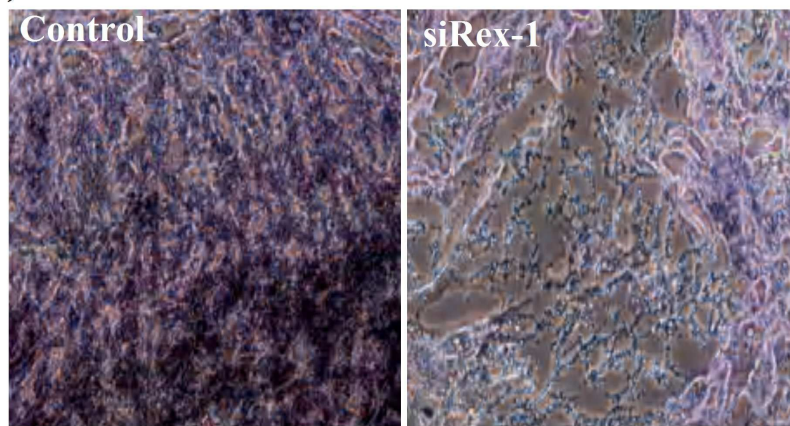
도면6a



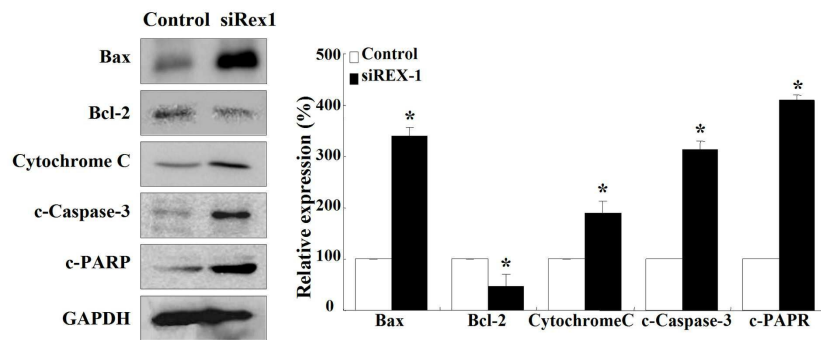
도면6b



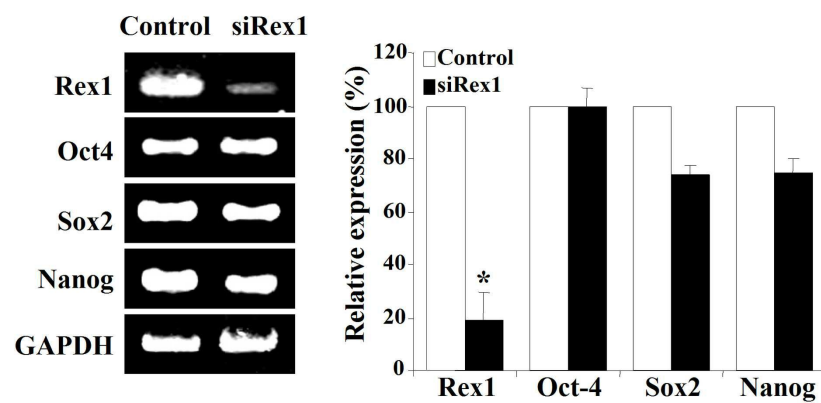
도면6c



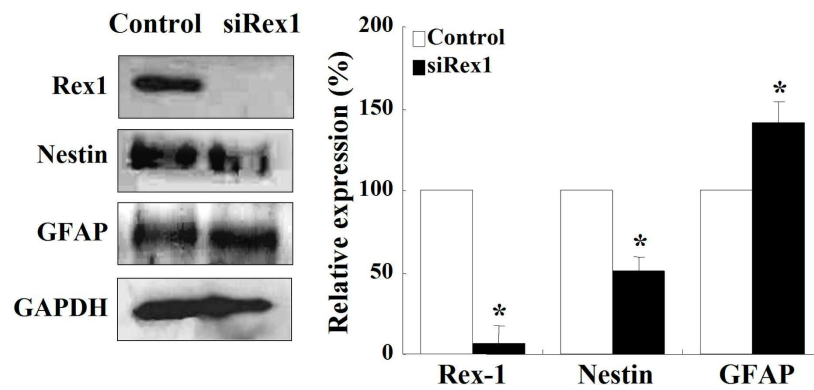
도면6d



도면6e



도면6f



서열 목록

<110> SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB Foundation
 <120> Pharmaceuticla composition comprising siRNA specific for reduced expression-1 for treating the BCNU-resistance glioblastoma multiforme

<130> 8P-12-05

<160> 19

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ABCG2 forward primer

<400> 1

caggagcct tgggatactt

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ABCG2 reverse primer

<400> 2

gctatagagg cctggggatt

20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TAP1 forward primer

<400> 3

gggctgtaag cagtgggaac c

21

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TAP1 reverse primer

<400> 4

caaggccctc caagtgaag gg

22

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SLC4AZ forward primer

<400> 5

tgactgcccc agaaaagag

19

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SLC4AZ reverse primer

<400> 6
 atccccgata actatyggag ag 22

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> GAPDH forward primer

<400> 7
 catgaccaca gtccatgccca tcaact 25

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> GAPDH reverse primer

<400> 8
 tgaggtccac caccctgttg ctgta 25

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Rex1 forward primer

<400> 9
tgaaagccca catcctaacg 20

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Rex1 reverse primer

<400> 10
caagctatcc tctgctttg g 21

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oct4 forward primer

<400> 11
cgcaactg gcattgtcat 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oct4 reverse primer

<400> 12
ttctccttga tgcacgcac 20

<210> 13

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sox2 forward primer

<400> 13
 taccttttc tccactcca 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sox2 reverse primer

<400> 14
 actctcctct ttgcacccc 20

<210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NaNog forward primer

<400> 15
 gctgagatgc ctcacacgga g 21

<210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NaNog reverse primer

<400> 16
tctgtttctt gactgggacc ttgtc 25

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA target sequence 1 of Rex-1

<400> 17
gaagatggga agcgccaag 19

<210> 18
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA target sequence 2 of Rex-1

<400> 18
caggggguug ugguuaagcu cuu 23

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> scrambled siRNA

<400> 19
ttctccgaac gtgtcacgt 19