



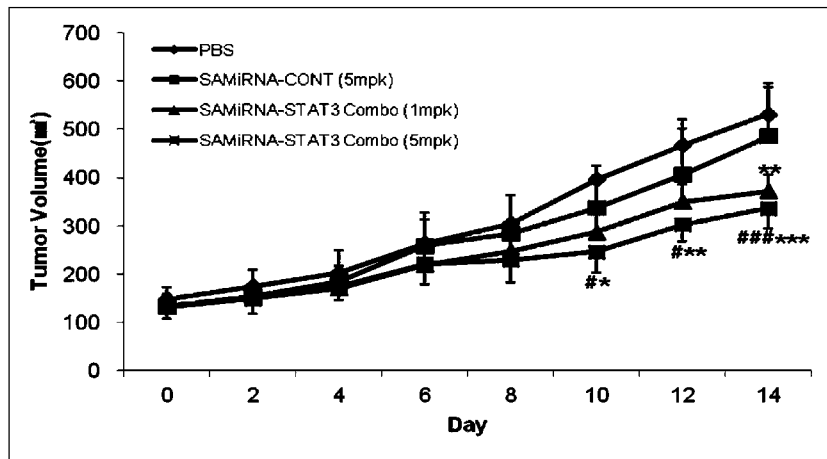
- (51) 국제특허분류:
C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006363
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 15일 (15.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0084397 2015년 6월 15일 (15.06.2015) KR
10-2016-0074570 2016년 6월 15일 (15.06.2016) KR
- (71) 출원인: (주)바이오니아 (BIONEER CORPORATION)
[KR/KR]; 34302 대전시 대덕구 문평서로 8-11, Daejeon (KR). 주식회사 유한양행 (YUHAN CORPORATION)
[KR/KR]; 06927 서울시 동작구 노량진로 74, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 윤평오 (YOON, Pyoung Oh); 34011 대전시 유성구 구죽로 25, 306-1205, Daejeon (KR). 김영호 (KO, Youngho); 07524 서울시 강서구 허준로 47, 206-606,

Seoul (KR). 김한나 (KIM, Han-Na); 55085 전라북도 전주시 완산구 거마평로 109, 103-1302, Jeollabuk-do (KR). 배선주 (BAE, Seonjoo); 31256 충청남도 천안시 동남구 병천면 충절로 1890, 101-1102, Chungcheongnam-do (KR). 이지영 (LEE, Jiyoung); 32837 충청남도 계룡시 두마면 사계로 101, 114-1002, Chungcheongnam-do (KR). 윤성일 (YUN, Sung Il); 34008 대전시 유성구 송강로 42 번길 61, 101-1006, Daejeon (KR). 박준홍 (PARK, Jun Hong); 34538 대전시 동구 한밭대로 1237 번길 52, 9-205, Daejeon (KR). 정준수 (JUNG, Jun Soo); 02418 서울시 동대문구 이문로 32 길 6-5, Seoul (KR). 최종덕 (CHOI, Jong Deok); 34008 대전시 유성구 봉산로 39, 205-508, Daejeon (KR). 권태우 (KWON, Taewoo); 34022 대전시 유성구 배울 1로 35, 405-1303, Daejeon (KR). 박한오 (PARK, Han Oh); 34049 대전시 유성구 엑스포로 448, 208-601, Daejeon (KR). 김태림 (KIM, Tae-Rim); 35217 대전시 서구 월평중로 50, 103-1505, Daejeon (KR). 배선주 (BAE, Seon Joo); 31252 충청남도 천안시 동남구 수진면 수진로 770-13, Chungcheongnam-do (KR).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: STAT3 GENE SPECIFIC SIRNA, DOUBLE-HELICAL OLIGO RNA STRUCTURE INCLUDING SIRNA, COMPOSITION CONTAINING SAME, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: STAT3 유전자 특이적 siRNA, 그러한 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체, 이를 포함하는 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to: a STAT3 gene specific siRNA; a highly efficient double-helical oligo RNA structure including the same; a pharmaceutical composition containing the same; and a use thereof and, more particularly, to: a STAT3 gene specific siRNA; a double-helical oligo RNA structure, which includes the same and has a structure in which hydrophilic materials and hydrophobic materials are bound to both ends of the double-helical RNA (siRNA), by using a simple covalent bond or a linker-mediated covalent bond, so as to be effectively transferred into a cell; nanoparticles capable of being produced, in an aqueous solution, by hydrophobic interactions between the double-helical oligo RNA structures; a method for producing the double-helical oligo RNA structure; and a pharmaceutical composition for preventing or treating cancers, especially breast cancer, skin diseases including psoriasis, or inflammatory diseases, containing the double-helical oligo RNA structure. According to the present invention, the STAT3 specific siRNA and the composition for treating cancers, skin diseases, or inflammatory diseases, containing the double-helical oligo RNA structure including the same can achieve a therapeutic effect on cancers, especially breast cancer, skin diseases including psoriasis, or inflammatory diseases by inhibiting the expression of STAT3 with high efficiency without causing side effects, and thus the present invention can be useful in treating breast cancer, skin diseases, or inflammatory diseases for which there currently is no suitable therapeutic agent.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



(74) **대리인: 이치영 (LEE, Cheo Young)** 등; 06133 서울시 강남구 테헤란로 123, 11 층, Seoul (KR).

(81) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 STAT3 유전자 특이적 siRNA 및 이를 포함하는 고효율 이중나선 올리고 RNA 구조체 및 이를 포함하는 약학적 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 STAT3 유전자 특이적 siRNA, 이를 포함하고, 세포 내로 효율적으로 전달되도록 하기 위하여 이중나선 RNA(siRNA)의 양 말단에 친수성 물질 및 소수성 물질을 단순 공유결합 또는 링커-매개(linker-mediated) 공유결합을 이용하여 접합된 형태의 구조를 가지는 이중나선 올리고 RNA 구조체, 수용액에서 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체들의 소수성 상호작용에 의해 생성될 수 있는 나노입자, 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조방법 및 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 암, 특히 유방암, 건선을 비롯한 피부질환 또는 염증성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA, 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 암, 피부질환 또는 염증성 질환 치료용 조성물은 부작용 없이 높은 효율로 STAT3의 발현을 억제하여 암, 특히 유방암, 건선을 비롯한 피부질환 또는 염증성 질환에 대한 치료효과를 거둘 수 있으므로, 현재 적절한 치료제가 없는 유방암, 피부질환 또는 염증성 질환의 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: STAT3 유전자 특이적 siRNA, 그러한 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체, 이를 포함하는 조성물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 STAT3 유전자 특이적 siRNA, 이를 포함하는 고효율 이중나선 올리고 RNA 구조체, 이를 포함하는 약학적 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 STAT3 유전자 특이적 siRNA, 이를 포함하고, 세포 내로 효율적으로 전달되도록 하기 위하여 이중나선 RNA(siRNA)의 양 말단에 친수성 물질 및 소수성 물질을 단순 공유결합 또는 링커-매개(linker-mediated) 공유결합을 이용하여 접합된 형태의 구조를 가지는 이중나선 올리고 RNA 구조체, 수용액에서 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체들의 소수성 상호작용에 의해 생성될 수 있는 나노입자에 관한 것이다.
- [2] 본 발명은 또한, 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조방법 및 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 약제학적 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

[3]

배경기술

- [4] 유전자의 발현을 억제하는 기술은 질병치료를 위한 치료제 개발 및 표적 검증에서 중요한 도구이다. 이 기술 중, 간섭 RNA(RNA interference, 이하 'RNAi'라고 한다)는 그 역할이 발견된 이후로, 다양한 종류의 포유동물 세포(mammalian cell)에서 서열 특이적 mRNA에 작용한다는 사실이 밝혀졌다 (Silence of the transcripts: RNA interference in medicine. J Mol Med (2005) 83: 764-773). 긴 사슬의 RNA 이중가닥이 세포로 전달되면, 전달된 RNA 이중가닥은 Dicer라는 엔도뉴클라아제(endonuclease)에 의하여 21 내지 23개의 이중가닥(base pair, bp)으로 프로세싱된 짧은 간섭 RNA (small interfering RNA, 이하 'siRNA'라고 한다)로 변환되며, siRNA는 RISC(RNA-induced silencing complex)에 결합하여 가이드(안티센스) 가닥이 타겟 mRNA를 인식하여 분해하는 과정을 통해 타겟 유전자의 발현을 서열 특이적으로 저해한다 (NUCLEIC-ACID THERAPEUTICS: BASIC PRINCIPLES AND RECENT APPLICATIONS. Nature Reviews Drug Discovery. 2002. 1, 503-514).
- [5] 베르트랑(Bertrand) 연구진에 따르면 동일한 타겟 유전자에 대한 siRNA가 안티센스 올리고뉴클레오티드(Antisense oligonucleotide, ASO)에 비하여 생체 내/외(*in vitro* 및 *in vivo*)에서 mRNA 발현의 저해효과가 뛰어나고, 해당 효과가 오랫동안 지속되는 효과를 포함하는 것으로 밝혀졌다(Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*. Biochem. Biophys.

- Res.Comm. 2002. 296: 1000-1004). 또한 siRNA의 작용 기작은 타겟 mRNA와 상보적으로 결합하여 서열 특이적으로 타겟 유전자의 발현을 조절하기 때문에, 기존의 항체 기반 의약품이나 화합물질 (small molecule drug)에 비하여 적용할 수 있는 대상이 획기적으로 확대될 수 있다는 장점을 가진다(Progress Towards *in vivo* Use of siRNAs. MOLECULAR THERAPY. 2006 13(4):664-670).
- [6] siRNA의 뛰어난 효과 및 다양한 사용범위에도 불구하고, siRNA가 치료제로 개발되기 위해서는 체내에서의 siRNA의 안정성(stability) 개선과 세포 전달 효율 개선을 통해 siRNA가 타겟 세포에 효과적으로 전달되어야 한다(Harnessing *in vivo* siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. Drug Discov Today. 2006 Jan; 11(1-2):67-73).
- [7] 상기 문제를 해결하기 위하여, 체내 안정성 개선을 위하여 siRNA의 일부 뉴클레오티드 또는 골격(backbone)을 핵산분해효소 저항성을 가지도록 변형(modification)하거나 바이러스성 벡터(viral vector), 리포좀 또는 나노입자(nanoparticle) 등의 전달체의 이용 등에 대한 연구가 활발하게 시도되고 있다.
- [8] 아데노바이러스나 레트로바이러스 등의 바이러스성) 벡터를 이용한 전달 시스템은 형질주입 효율(transfection efficiency)이 높지만, 면역원성(immunogenicity) 및 발암성(oncogenicity)이 높다. 반면에 나노입자를 포함하는 비바이러스성(non-viral) 전달 시스템은 바이러스성 전달 시스템에 비하여 세포전달효율은 낮은 편이지만, 생체 내(*in vivo*)에서의 안전성이 높고, 타겟 특이적으로 전달이 가능하며, 내포되어 있는 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 세포 또는 조직으로 흡수(uptake) 및 내재화(internalization) 등의 개선된 전달 효과가 높을 뿐 아니라, 세포독성 및 면역 유발(immune stimulation)이 거의 없다는 장점을 가지고 있어, 현재는 바이러스성 전달 시스템에 비해 유력한 전달방법으로 평가되어지고 있다 (Nonviral delivery of synthetic siRNA s *in vivo*. J Clin Invest. 2007 December 3; 117(12): 3623-3632).
- [9] 상기 비바이러스성 전달 시스템 중에서 나노전달체(nanocarrier)를 이용하는 방법은 리포좀, 양이온 고분자 복합체 등의 다양한 고분자를 사용함으로써 나노입자를 형성하고, siRNA를 이러한 나노입자(nanoparticle), 즉 나노전달체(nanocarrier)에 담지하여 세포에 전달하는 형태를 가진다. 나노전달체를 이용하는 방법 중 주로 활용되는 방법은 고분자 나노입자(polymeric nanoparticle), 고분자 미셀(polymer micelle), 리포플렉스(lipoplex) 등이 있는데, 이 중에서 리포플렉스를 이용한 방법은 양이온성 지질로 구성되어 세포의 엔도솜(endosome)의 음이온성 지질과 상호작용하여 엔도솜의 탈 안정화 효과를 유발하여 세포 내로 전달하는 역할을 한다(Proc. Natl. Acad. Sci. 15; 93(21):11493-8, 1996).
- [10] 또한, siRNA 패신저(passenger; 센스(sense)) 가닥의 말단 부위에 화합물질 등을

연결하여 증진된 약동력학(pharmacokinetics)적 특징을 갖도록 하여 생체 내(*in vivo*)에서 높은 효율을 유도할 수 있다는 것이 알려져 있다(Nature 11; 432(7014):173-8, 2004). 이 때 siRNA 센스(sense; 패신저(passenger)) 또는 안티센스(antisense; 가이드(guide)) 가닥의 말단에 결합된 화학 물질의 성질에 따라 siRNA의 안정성이 달라진다. 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG)과 같은 고분자 화합물이 접합된 형태의 siRNA는 양이온성 물질이 존재하는 조건에서 siRNA의 음이온성 인산기와 상호작용하여 복합체를 형성함으로써, 개선된 siRNA 안정성을 가진 전달체가 된다(J Control Release 129(2):107-16, 2008). 특히 고분자 복합체로 구성된 미셀(micelle)들은 약물 전달 운반체로 쓰이는 다른 시스템인, 미소구체(microsphere) 또는 나노입자(nanoparticle) 등에 비해 그 크기가 극히 작으면서도 분포가 매우 일정하고, 자발적으로 형성되는 구조이므로 제제의 품질 관리 및 재현성 확보가 용이하다는 장점이 있다.

- [11] 또한, siRNA의 세포 내 전달 효율성을 향상시키기 위해, siRNA에 생체 적합성 고분자인 친수성 물질(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG))을 단순 공유결합 또는 링커-매개(linker-mediated) 공유결합으로 접합시킨 siRNA 접합체를 통해, siRNA의 안정성 확보 및 효율적인 세포막 투과성을 위한 기술이 개발되었다(대한민국 등록특허 제883471호). 하지만 siRNA의 화학적 변형 및 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG)을 접합시키는 것(PEGylation)만으로는 생체 내에서의 낮은 안정성과 타겟 장기로의 전달이 원활하지 못하다는 단점은 여전히 가진다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 올리고뉴클레오타이드, 특히 siRNA와 같은 이중나선 올리고 RNA에 친수성 및 소수성 물질이 결합된 이중나선 올리고 RNA 구조체가 개발되었는데, 상기 구조체는 소수성 물질의 소수성 상호작용에 의하여 SAMiRNA™(self assembled micelle inhibitory RNA)라고 명명된 자가조립 나노입자를 형성하게 되는데(대한민국 등록 특허 제1224828호 참조), SAMiRNA™ 기술은 기존의 전달기술들에 비해 매우 사이즈가 작으면서도 균일한(homogenous) 나노입자를 수득할 수 있다는 장점을 가진다.

- [12] 한편, 우리나라에서는 인구 4명 중 1명이 암(사망원인 1위)으로 사망하고 있으며, 해마다 진단방법과 자료수집 방법의 발전과 인구의 고령화와 환경변화 등으로 인해 그 숫자가 현저히 증가하는 추세이다. 또한 세계적인 암 발생 및 암으로 인한 사망 역시 증가하는 추세에 있어 암 정복을 위한 예방, 진단 및 치료기술은 인류공통의 시급한 과제이다(BT 기술 동향 보고서, 주요 질환 별 신약개발 동향, 생명공학정책연구센터, 2007, 총서 제 72권).

- [13] 암은 전세계적으로 가장 많은 사망자를 내는 질병 중 하나로, 혁신적인 암 치료제의 개발은 이에 대한 치료 시 발생하는 의료비를 절감할 수 있음과 동시에 고부가가치를 창출할 수 있다. 암의 치료는 수술, 방사선치료, 화학요법, 생물학적 치료로 구분되는데, 이 중에 화학요법은 화학물질로서 암 세포의

증식을 억제하거나 죽이는 치료법으로 항암제에 의하여 나타나는 독성은 상당부분 정상세포에서도 나타나기 때문에 일정 정도의 독성을 나타내며, 항암제가 효과를 나타내다가도 일정 기간의 사용 후에는 효과가 상실되는 내성이 발생하기 때문에 암세포에 선택적으로 작용하고 내성이 생기지 않는 항암제의 개발이 절실하다(암 정보의 현주소 Biowave 2004. 6(19)). 최근 암에 대한 분자유전정보의 확보를 통해 암의 분자적 특성을 표적으로 한 새로운 항암제의 개발이 진행되고 있으며, 암세포만이 가지고 있는 특징적인 분자적 표적(molecular target)을 겨냥하는 항암제들은 약제 내성이 생기지 않는다는 보고도 있다. 따라서 암세포만 가지고 있는 특징적인 분자적 표적을 겨냥한 유전자 치료제의 개발을 통해 기존 항암제에 비하여 효과가 뛰어나고 부작용이 적은 치료제의 개발이 가능하다.

- [14] 건선은 각질세포 및 내피 세포의 표피 과증식, 및 염증 세포 축적 (예컨대 활성화된 T 세포)을 특징으로 하는 만성적 자가면역 염증성 피부 장애이다 (Griffiths CE, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2003, 17 Suppl 2:1-5; Creamer JD, et al., Clin. Exp. Dermatol. 1995, 20(1):6-9). 건선은 피부의 표피세포층의 비정상적이고 빠른 성장을 특징으로 하며 이러한 피부 세포의 비정상적인 생산으로 일반적으로 피부세포는 28~30일을 주기로 생성되나, 건선의 경우는 3~5일 주기로 교체된다. 이러한 변화는 덴드리틱 세포(dendritic cells), 대식세포(macrophage)와 T 세포를 포함하는 면역세포들이 내피세포에서 증가되어 미성숙된 케라티노사이트 (keratinocytes)를 증식하는 것이 주된 원인으로 보여지며, 내피세포부터 외피세포로 이동된 이러한 면역세포들은 티엔에프-알파 (TNF- α), 인터루킨-1베타 (interleukin-1 β , IL-1 β), 인터루킨-6 (IL-6), 인터루킨-36 (IL-36) 그리고 인터루킨-22 (IL-22)같은 다양한 사이토카인을 분비하고 이러한 사이토카인들이 케라티노사이트 (keratinocyte)의 증식을 자극하는 것으로 보고되었다 (Nestle FO et al., N Engl J Med. 2009; 361 (5): 496-509; Baliwag, Jaymie et al., Cytokine. 2015; 73 (2): 342-350). 특히 덴드리틱 세포 (dendritic cell)은 innate immune system과 adaptive immune system을 연결해주고 건선을 유발하는 T cell은 외피세포로 이동하여 인터루킨 -17 (IL-17)과 인터페론-감마 (IFN- γ)를 분비하고 인터루킨-23 (IL-23)은 인터루킨-22 (IL-22)와 인터루킨-17 (IL-17)의 생산을 자극하고, 이 인터루킨-22 (IL-22)는 인터루킨-17 (IL-17) 과 함께 케라티노사이트를 자극하여 건선을 악화시킬 수 있다 (Ouyang W., Cytokine Growth Factor Rev. 2010; 21 (6): 435-41; Mudigonda P et al., Dermatol Online J. 2012; 18 (10): 1).

- [15] 최근에는 STAT3 유전자가 건선의 발병에 결정적으로 관여한다고 보고 된 바 있다(Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model, Nature Medicine. Vol. 11, 2005. Pp. 43-49; Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a stat3 inhibitor, J. Invest. Dermatol. Vol. 131. 2011. pp. 108-117).

임상적으로, 건선의 주요 증상은, 적색이며 아래에 염증이 있는 피부상의 회색 또는 은색 판상 패치(flaky patch)이다.

- [16] 건선의 일반적인 치료에는 국소 투약, 광선 요법 및 내복 투약법이 있다. 국소 치료는 스테로이드, 콜타르, 안트라린, 비타민 D3 및 그의 유사체, 레티노이드 및 햇볕 등을 포함하는 치료이며, 이러한 국소 치료는 피부 얇아짐, 튼살, 화상, 자극 및 광과민증의 부작용이 있다.
- [17] 내복 투약에 쓰이는 약물은 면역 억제 또는 염증반응 억제를 통하여 건선을 치료하기 위한 것으로서, 현재까지 개발된 많은 건선치료제들이 건선을 근본적으로 치료하지 못하고 일시적인 증세의 경감 효과만을 제공할 뿐이며, 약물들의 작용기전이 인체의 면역을 억제하기 때문에 약물을 장시간 사용할 경우에 인체의 면역기능의 저하로 인하여 암, 결핵 등을 포함하여 여러 가지 감염증 등을 일으킬 수 있다는 단점이 있다.
- [18] 아토피라는 용어는 어원상 "이상한" 또는 "부적절한"이란 의미를 갖는 용어이다. 아토피성 피부염은 대부분 유아기나 소아 때 발생하여 호전과 악화를 반복하는 비교적 흔한 만성 염증성 피부질환으로, 아토피의 개인 또는 가족력, 심한 가려움증 및 습진의 3가지 특징으로 진단할 수 있으며 감염, 정신적인 스트레스, 계절과 기후변화, 자극 및 알레르기에 의해 악화될 수 있다. 아토피 피부염의 병인론은 아직 확실히 밝혀 있지 않지만, 현재까지의 연구에 의하면 IgE 항체의 증가에 따른 과감작 반응에 의하거나, 세포매개성 면역기능의 저하로 나타나는 T 림프구의 불균열 분화에 의한 기능적 결여, 피부에 존재하는 아드레날린 수용체의 차단 등이 발병의 원인이라는 설 등이 있다. 따라서, 아토피 피부염은 면역학적인 이상이 관여하는 유전적인 질환으로 생각되고 있다. 최근에는 STAT3 유전자가 아토피성 피부염의 발달에 영향을 미친다고 보고되었다(Diminished allergic disease in patients with STAT3 mutations reveals a role for STAT3 signaling in mast cell degranulation, J. Allergy and Clinical Immunology, Vol. 132, 2013. Pp. 1388-1396).
- [19] 아토피성 피부염의 치료 및 관리를 위해, 대부분의 피부과 진료 시 피부 표면의 수분을 유지시켜주는 보습제와 함께 염증반응을 호전시키기 위한 스테로이드 호르몬 즉, 국소 부신피질호르몬 제제를 동시에 처방하는 하는 것이 일반적이다. 하지만, 국소 부신피질호르몬을 장기간 사용하는 경우, 피부 위축, 혈관 확장, 색소 탈실 및 팽창 선조의 발생 등 다양한 피부 부작용을 야기 시킨다는 문제점이 있다. 또한, 심한 아토피 피부염 환자의 경우는 증상에 따라 적절한 자외선 치료와 같은 광선치료, 인터페론 감마, 사이클로스포린과 같은 면역 억제제, 면역글로불린 정맥 주사 등을 투여하는 경우도 있다. 따라서, 이러한 부작용을 나타내지 않으면서, 항염증 효능을 보유하는 아토피 치료용 원료나 제약의 개발 필요성이 꾸준히 대두되고 있는 상황이다.
- [20] 알레르기성 피부염은 만성으로 경과되는 강한 가려움을 수반한 재발성의 습진 병변이다. 발진은 얼굴이나 목, 팔꿈치나 무릎 등의 굴곡 부위에 나타나기 쉽고,

악화가 심해지면 전신으로 퍼지는 경우도 있다. 다양한 알레르겐이 증가하는 환경이 된 것이나 식생활의 변화 등에 따라서, 알레르기성 피부염의 환자수는 해마다 증가하고 있고, 그의 증상도 중증화 경향에 있다. 알레르기성 피부염의 치료는 주로 약물 요법으로, 부신 피질 스테로이드나 면역 억제제, 항히스타민약 등이 이용된다. 이들 약제로써는 증상이 완화되거나 염증이 침정화되지만 일시적인 것에 지나지 않는다. 또한 부신피질 스테로이드나 면역 억제제로써는 감염증이나 중독의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다.

- [21] 따라서, 현재의 알레르기성 피부염의 치료제는 효과 및 부작용 경감에 있어서 충분히 만족할 수 있는 것은 아니다.
- [22] 이외에도 STAT3 매개 염증성 질환으로 알려진 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염 (한국 공개번호 10-2014-0032925), 골다공증, 초면역글로불린 혈증, 빈혈, 신염, 만성 갑상선염, 크론병, 췌장염 등 (한국 공개번호 10-1416149) 등이 본 발명에 의한 예방 및 치료 대상이 될 수 있다.
- [23] RNA 간섭 현상을 이용하여 높은 특이성과 효율로 유전자 발현을 저해할 수 있음이 알려진 이후로 암에 대한 치료제로 다양한 유전자를 타겟으로 하는 siRNA 들이 연구되고 있다. 이들 유전자는 종양유전자(oncogene)을 비롯하여 항-세포자살물질(anti-apoptotic molecule), 텔로머레이즈(telomerase), 성장인자 수용체 유전자(growth factor receptor gene), 신호전달물질 (signaling molecule) 등으로 암세포의 생존에 필요한 유전자의 발현을 저해시키거나 세포자살을 유도하는 것이 주된 방향이다(RNA interference in cancer. Biomolecular Engineering. 2006; 23:17-34).
- [24] STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)는 세포외부의 다양한 성장인자(growth factor)와 사이토카인(cytokine)의 신호를 핵에 전달하여 전사를 촉진하는 전사조절인자(transcription factor)로, 세포질 내 비활성 상태에서 전사활성 도메인(transactivation domain)의 타이로신 잔기가 인산화되어 활성화되면 핵 안으로 유입된다 (STAT3 inhibitors for cancer therapy: Have all roads been explored- Jak-Stat. 2013; 1;2(1):e22882). 인산화된 STAT3(p-STAT3)는 핵의 DNA와 결합하여 세포의 성장(proliferation)과 분화(differentiation) 등의 종양형성(tumorigenesis)에 관련된 광범위한 표적유전자의 발현을 유도하며, 고형암 및 혈액암 환자의 약 70%에서 상시 활성화 되어있다 (Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. BioMed research international. 2013; 2013:421821).
- [25] 하지만 STAT3와 같은 전사인자들은 단백질의 3차 구조상, 활성을 저해할 수 있는 표적을 찾기 힘들기 때문에 전통적인 합성신약 개발 분야에서 난개발(undruggable)로 여겨졌다 (Transcription Factor STAT3 as a Novel Molecular Target for Cancer Prevention. Cancers. 2014; 16;6(2):926-57). 때문에 STAT3의 발현을 저해할 수 있는 siRNA 치료제 및 이의 전달기술에 대한 시장의 수요는 매우 높은 상황이다.

- [26] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, STAT3 유전자에 특이적인 siRNA가 STAT3 유전자의 활성을 특이적으로 저해할 수 있고, 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체 및 이를 포함하는 약제학적 조성물의 항암 효과, 피부질환 및 염증성 질환 치료 효과가 매우 뛰어난 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [27]
- [28] **발명의 요약**
- [29] 본 발명의 목적은 상기와 같은 기존의 문제점을 해결하고자, STAT3에 특이적이면서 매우 높은 효율로 그 발현을 저해할 수 있는 신규 siRNA 및 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체, 그리고 그러한 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [30] 본 발명의 다른 목적은 상기 STAT3 특이적 siRNA 또는 그러한 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [31] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 STAT3 특이적 siRNA 또는 그러한 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 이용하여 암, 피부질환 또는 염증성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [32]
- [33] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 200에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스가닥(sense strand)과 이에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는 STAT3 특이적 siRNA를 제공한다.
- [34] 본 발명에서의 “STAT3 특이적 siRNA”는 STAT3 단백질을 인코딩하는 유전자에 특이적인 siRNA를 의미한다.
- [35] 또한, STAT3에 대한 특이성이 유지되는 한, 상기 서열번호 1 내지 서열번호 200에 따른 서열을 포함하는 센스가닥 또는 이에 상보적인 안티센스 가닥에서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 또는 삽입된 서열을 포함하는 센스가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 STAT3 특이적 siRNA도 본 발명의 권리범위에 포함되는 것임은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명한 것이다.
- [36] 상기 서열번호 1 내지 서열번호 200은 STAT3 특이적 siRNA의 센스가닥 서열이다.
- [37] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA의 센스가닥 또는 안티센스 가닥은 siRNA의 기능을 수행할 수 있으면 뉴클레오타이드의 개수에는 제한이 없으나, 바람직하게는 19 내지 31개의 뉴클레오타이드로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있다.
- [38] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA는 바람직하게는 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 119, 137, 141, 166, 170, 171번에 따른 STAT3 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있고, 더욱 바람직하게는 서열번호 17, 42, 101,

119, 137번에 따른 STAT3 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 42, 101, 137번에 따른 STAT3 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [39] 본 발명에서 제공되는 STAT3 특이적 siRNA는 해당 유전자를 암호화하는 mRNA와 상보적으로 결합할 수 있도록 설계된 염기서열을 가지므로, 해당 유전자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 것이 특징이다. 또한, 상기 siRNA의 3' 말단에 하나 또는 두 개 이상의 비결합(unpaired)된 뉴클레오티드를 포함하는 구조인 오버행(overhang)을 포함할 수 있다.
- [40] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA는 생체 내 안정성 향상을 위해, 핵산 분해효소 저항성 부여 및 비 특이적 면역반응 감소를 위한 다양한 변형(modification)을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 siRNA의 변형은 하나 이상의 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(메틸), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F(불소), -O-2-메톡시에틸 -O-프로필(propyl), -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, -O-3-디메틸아미노프로필, -O-N-메틸아세트아미도 또는 -O-디메틸아미도옥시에틸로의 치환에 의한 변형; 뉴클레오티드 내 당(sugar) 구조 내의 산소가 황으로 치환된 변형; 또는 뉴클레오티드결합의 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 보라노포스페이트(boranophosphate), 메틸포스포네이트(methyl phosphonate) 결합으로의 변형에서 선택된 하나 이상의 변형이 조합되어 사용될 수 있으며, PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid) 또는 UNA(unlocked nucleic acid) 형태로의 변형도 사용이 가능하다(Ann. Rev. Med. 55, 61-65 2004; US 5,660,985; US 5,958,691; US 6,531,584; US 5,808,023; US 6,326,358; US 6,175,001; Bioorg. Med. Chem. Lett. 14:1139-1143, 2003; RNA, 9:1034-1048, 2003; Nucleic Acid Res. 31:589-595, 2003; Nucleic Acids Research, 38(17) 5761-5773, 2010; Nucleic Acids Research, 39(5) 1823-1832, 2011).
- [41] 본 발명에서 제공하는 STAT3 특이적 siRNA는 해당 유전자의 발현을 저해시킬 뿐만 아니라, 해당 단백질의 발현을 현저하게 저해시킨다. 또한, 암의 치료에 있어서 사용되는 암 특이적 RNAi와 전형적인 조합(combination)되는 치료방법인 방사선이나 화학요법의 감수성을 향상시키는 것으로 알려져 있으므로(The Potential RNAi-based Combination Therapeutics. Arch Pharm Res 34(1): 1-2, 2011), 본 발명의 STAT3 특이적 siRNA를 기존의 방사선 또는 화학요법과 병행 사용할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.
- [42] 본 발명의 다른 양태로서, 유방암 연관 유전자, 특히 STAT3 특이적 siRNA의 생체 내로의 효율적인 전달 및 안정성 향상을 위하여 siRNA의 양 말단에 친수성 물질 및 소수성 물질이 접합된 형태의 접합체를 제공한다.
- [43] siRNA에 친수성 물질 및 소수성 물질이 결합된 siRNA 접합체의 경우 소수성 물질의 소수성 상호작용에 의하여 자가조립 나노입자를 형성하게

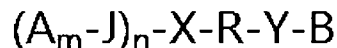
되는데(대한민국 특허 등록번호 제 1224828 호 참조), 이 나노입자는 체내로의 전달효율 및 체내에서의 안정성이 극히 우수할 뿐 아니라, 구조의 개선을 통해 입자 크기가 매우 균일하여 QC(Quality control)이 용이하므로 약물로서의 제조 공정이 간단하다는 장점이 있다 (WO2015002511 참조).

- [44] 하나의 바람직한 구체예로서, 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체는 하기 구조식 (1)과 같은 구조를 포함하는 것이 바람직하다.

[45]

[46] 구조식 1

[47]



[48]

- [49] 상기 구조식 (1)에서 A는 친수성 물질 단량체(monomer), B는 소수성 물질, J는 m개의 친수성 물질 단량체 간 또는 m개의 친수성 물질 단량체와 올리고뉴클레오타이드를 서로 연결하는 링커, n은 친수성 물질 단량체가 m개 반복된 친수성 물질 블록의 반복횟수, X와 Y는 각각 독립적으로 단순 공유결합 또는 링커(linker)가 매개된 공유결합, R은 STAT3 특이적 siRNA, 그리고 m은 1 내지 10의 정수이며 바람직하게는 6, n은 1 내지 10의 정수이며 바람직하게는 4이다.

- [50] 상기 STAT3 특이적 siRNA는 STAT3 특이성이 유지되는 한, siRNA의 안티센스가닥이 STAT3 유전자의 결합 부위와 100% 염기서열이 상보적인 경우, 즉 완전 일치(perfect match)하는 것뿐 아니라, 일부 염기서열이 일치하지 않는 경우, 즉 불완전 일치(mismatch)가 있는 것도 포함된다. 이러한 siRNA는 STAT3 유전자의 mRNA 서열의 일부에 대하여 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 100%의 상동성을 가지는 서열로 구성될 수 있다.

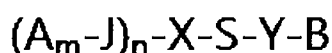
- [51] 이러한 siRNA는 듀플렉스일 수 있고 또한 단일분자 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있으나 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 microRNA(miRNAs)에 한정되지 않는 것은 아니다.

- [52] 보다 바람직하게는, 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체는 하기 구조식 (2)의 구조를 가진다.

[53]

[54] 구조식 2

[55]



AS

[56]

[57] 상기 구조식 (2)에서 A, B, J, m, n, X 및 Y는 상기 구조식 (1)에서의 정의와 동일하며, S는 STAT3 특이적 siRNA의 센스가닥, AS는 STAT3 특이적 siRNA의 안티센스 가닥을 의미한다.

[58] 보다 바람직하게는 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체는 하기 구조식 (3)의 구조를 가진다.

[59]

[60] 구조식 3

[61] $(A_m-J)_n-X-5' S 3'-Y-B$ 3' AS 5'-PO₄

[62]

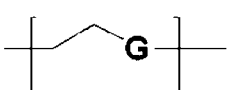
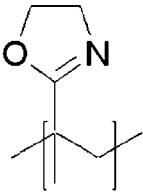
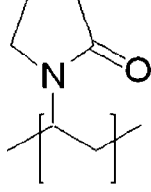
[63] 상기, 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 상기 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체의 안티센스 가닥의 5' 말단에 인산기(phosphate group)가 한 개 내지 세 개 결합될 수 있으며, siRNA 대신에 shRNA가 사용될 수도 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명한 것이다.

[64] 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 친수성 물질 단량체(A)는 비이온성 친수성 고분자의 단량체 중에서 본 발명의 목적에 부합하는 것이라면 어느 것이라도 제한없이 사용이 가능하며, 바람직하게는 표 1에 기재된 화합물 (1) 내지 화합물 (3)에서 선택된 단량체, 더욱 바람직하게는 화합물(1)의 단량체가 사용될 수 있으며, 화합물 (1)에서 G는 바람직하게는 CH₂, O, S 및 NH에서 선택될 수 있고, 더욱 바람직하게는 O가 사용된다.

[65]

[66] [표1]

본 발명에서의 바람직한 친수성 물질 단량체 구조

화합물 (1)	화합물 (2)	화합물 (3)
 G 는 CH₂, O, S 또는 NH		

[67]

[68] 상기 각 친수성 물질 블록 내에 포함되는 친수성 물질 단량체인 A와 링커인 J는 독립적으로 각 친수성 물질 블록간에 동일할 수도 있고, 상이할 수도 있다. 즉, 친수성 물질 블록이 3개 사용될 경우(n=3), 첫 번째 블록에는 화합물 (1)에 따른

친수성 물질 단량체가, 두 번째 블록에는 화합물 (2)에 따른 친수성 물질 단량체가, 세 번째 블록에는 화합물 (3)에 따른 친수성 물질 단량체가 사용되는 등, 모든 친수성 물질 블록 별로 다른 친수성 물질 단량체가 사용될 수도 있고, 모든 친수성 물질 블록에 화합물 (1) 내지 화합물 (3)에 따른 친수성 물질 단량체에서 선택된 어느 하나의 친수성 물질 단량체가 동일하게 사용될 수도 있다. 마찬가지로, 친수성 물질 단량체의 결합을 매개하는 링커 역시 각 친수성 물질 블록 별로 모두 동일한 링커가 사용될 수도 있고, 각 친수성 물질 블록 별로 상이한 링커가 사용될 수도 있다.

- [69] 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 소수성 물질(B)은 소수성 상호작용을 통해 구조식(1)에 따른 올리고뉴클레오타이드 구조체로 구성된 나노입자를 형성하는 역할을 수행한다.
- [70] 본 발명에 있어서, 상기 소수성 물질은 분자량이 250 내지 1,000인 것이 바람직하며, 스테로이드(steroid) 유도체, 글리세라이드(glyceride) 유도체, 글리세롤 에테르(glycerol ether), 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol), C₁₂ 내지 C₅₀의 불포화 또는 포화 탄화수소(hydrocarbon), 디아실포스파티딜콜린(diacylphosphatidylcholine), 지방산(fatty acid), 인지질(phospholipid), 리포폴리아민(lipopolyamine) 등이 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 목적에 부합하는 것이라면 어떠한 소수성 물질도 사용 가능하다는 점은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명한 것이다.
- [71] 본 발명에 있어서, 상기 스테로이드(steroid) 유도체는 콜레스테롤, 콜레스탄올, 콜산, 콜리스테릴포르메이트, 코테스타닐 포르메이트 및 콜리스타닐아민으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 글리세라이드 유도체는 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드 등에서 선택될 수 있는데 이때, 글리세라이드의 지방산은 C₁₂ 내지 C₅₀의 불포화 또는 포화 지방산이 바람직하다.
- [72] 특히, 상기 소수성 물질 중에서도 포화 또는 불포화 탄화수소나 콜레스테롤이 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 구조체의 합성 단계에서 용이하게 결합시킬 수 있는 장점을 가지고 있다는 점에서 바람직하다.
- [73] 상기 소수성 물질은 친수성 물질의 반대쪽 말단(distal end)에 결합되며, siRNA의 센스가닥 또는 안티센스 가닥의 어느 위치에 결합되어도 무방하다.
- [74] 본 발명에 따른 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 친수성 물질 또는 소수성 물질과 STAT3 특이적 siRNA는 단순 공유 결합 또는 링커가 매개된 공유결합(X 또는 Y)에 의해 결합된다. 상기 공유결합을 매개하는 링커는 친수성 물질, 또는 소수성 물질과 STAT3 특이적 siRNA의 말단에서 공유결합하며, 필요에 따라 특정 환경에서 분해가 가능한 결합을 제공하는 한 특별히 한정되는 것은 아니다. 따라서, 상기 링커는 본 발명에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조과정 중 STAT3 특이적 siRNA 및/또는 친수성 물질(또는 소수성 물질)을 활성화하기 위해 결합시키는 어떠한 화합물도 사용될 수 있다.

- [75] 본 발명에 있어서, 상기 공유결합은 비분해성 결합 또는 분해성 결합 중 어느 것이어도 무방하다. 이때, 비분해성 결합으로는 아미드 결합 또는 인산화 결합이 있고, 분해성 결합으로는 이황화 결합, 산분해성 결합, 에스테르 결합, 안하이드라이드 결합, 생분해성 결합 또는 효소 분해성 결합 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [76] 또한, 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 R(또는 S 및 AS)로 표시되는 STAT3 특이적 siRNA는 STAT3와 특이적으로 결합할 수 있는 특성을 지니는 siRNA라면 모두 제한 없이 사용가능하며, 바람직하게는 본 발명에서는 서열번호 1 내지 서열번호 200 에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스가닥(sense strand)과 그에 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [77] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA는 바람직하게는 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 119, 137, 141, 166, 170, 171번에 따른 STAT3 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함하며, 더욱 바람직하게는 서열번호 17, 42, 101, 119, 137번에 따른 STAT3 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함하고, 가장 바람직하게는 서열번호 42, 101, 137번에 따른 STAT3 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [78] 한편, 종양(tumor)의 조직은 매우 견고하여 정상 조직에 비하여 확산 제한(diffusion-limitation)을 갖는데, 이러한 확산 제한은 종양 성장에 필요한 영양분, 산소 및 이산화탄소 같은 노폐물의 이동에 악영향을 주기 때문에, 혈관신생(angiogenesis)을 통해 주변에 혈관을 형성함으로써 확산 제한을 극복한다. 혈관신생을 통해 형성된 종양 조직 내 혈관은 종양의 종류에 따라 100 nm 내지 2 um 가량의 틈을 가진 헐거운 혈관 구조(leaky and defective blood vessel)를 가진다. 따라서 나노입자는 정상조직의 조직화된 모세 혈관에 비하여 헐거운 혈관 구조를 포함하는 암 조직의 모세혈관 내피(capillary endothelium)를 잘 통과하게 되어 혈액 내 순환 과정 중에 종양 간질(tumor interstitium)에 접근이 용이해지고, 또한 종양 조직 안에는 림프관(lymphatic drainage)이 없어 약물이 축적되는 결과를 나타내는데, 이를 EPR(enhanced permeation and retention) 효과라고 한다. 나노입자가 이러한 효과에 의해 종양 조직 특이적으로 잘 전달되는 것을 수동적 타겟팅(passive targeting)이라고 한다(Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. Urol. Oncol. 2008 Jan-Feb; 26(1):57-64). 능동적 타겟팅(active targeting)은 표적물질(targeting moiety)이 나노입자에 결합된 경우로, 나노입자를 타겟 조직에서의 축적을 증진(preferential accumulation)시키거나, 타겟 세포 안으로 나노입자가 전달되는 내재화(internalization)를 개선하는 것이 보고되었다 (Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake Trends Biotechnol. 2008 Oct; 26(10):552-8. Epub 2008 Aug 21). 능동적 타겟팅은 타겟 세포 표면 특이적 또는 과발현되어있는 탄수화물(carbohydrate), 수용체(receptor), 항원 (antigen)와 결합할

수 있는 능력을 가진 물질(타겟팅 모이어티, targeting moiety)을 이용한다(Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. Mol Cancer Ther 2006; 5(8): 1909-1917).

- [79] 따라서 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체 및 이로부터 형성된 나노입자에 타겟팅 모이어티가 구비된다면, 효율적으로 타겟 세포로의 전달을 촉진하여, 비교적 낮은 농도의 투여량으로도 타겟 세포로 전달되어 높은 타겟 유전자 발현 조절 기능을 나타낼 수 있으며, 타겟 세포로의 비 특이적 STAT3 특이적 siRNA의 전달을 방지할 수 있다.
- [80] 이에 따라 본 발명은 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에 따른 구조체에 리간드(L), 특히 수용체 매개 내포작용(receptor-mediated endocytosis, RME)을 통해 타겟 세포 내재화(internalization)를 증진시키는 수용체와 특이적으로 결합하는 특성을 가진 리간드(ligand)가 추가적으로 결합된 이중나선 올리고 RNA, 구조체를 제공하며, 구조식 (1)에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체에 리간드가 결합된 형태는 하기 구조식 (4)와 같은 구조를 가진다.
- [81]
- [82] 구조식 4
- [83] $(\text{Li-Z})-(\text{A}_m\text{-J})_n\text{-X-R-Y-B}$
- [84]
- [85] 상기 구조식 (4)에서, A, B, J, m, n, X 및 Y는 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 정의와 동일하며, L은 수용체 매개 내포작용(receptor-mediated endocytosis, RME)을 통해 타겟 세포 내재화(internalization)를 증진시키는 수용체와 특이적으로 결합하는 특성을 가진 리간드를 의미하며, i는 1 내지 5의 정수, 바람직하게는 1 내지 3의 정수를 의미하고, Z는 단순 공유결합 또는 친수성 물질 블록 내의 친수성 물질 단량체와 리간드의 결합을 매개하는 링커이다.
- [86] 상기 구조식 (4)에서의 리간드는 바람직하게는 타겟세포 특이적으로 세포내재화 (internalization)을 증진시키는 수용체매개 세포내섭취(receptor-mediated endocytosis, RME)의 특성을 가진 타겟 수용체 특이적 항체나 앵타머, 펩타이드; 또는 엽산(Folate, 일반적으로 folate와 folic acid는 서로 교차 사용되고 있으며, 본 발명에서의 엽산은 자연 상태 또는 인체에서 활성화 상태인 folate를 의미한다), N-아세틸 갈락토사민(N-acetyl Galactosamine, NAG) 등의 헥소아민(hexoamine), 포도당(glucose), 만노스(mannose)를 비롯한 당이나 탄수화물(carbohydrate) 등의 화학물질 등에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 포도당이다.
- [87] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [88] 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하는 과정은 예를 들어,
- [89] (1) 고정지지체(solid support)를 기반으로 친수성 물질을 결합 시키는 단계;

- [90] (2) 상기 친수성 물질이 결합된 고형지지체를 기반으로 RNA 단일가닥을 합성하는 단계;
- [91] (3) 상기 RNA 단일가닥 5' 말단에 소수성 물질을 공유결합 시키는 단계;
- [92] (4) 상기 RNA 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 합성하는 단계;
- [93] (5) 합성이 완료되면 고형지지체로부터 RNA-고분자 구조체 및 RNA 단일가닥을 분리 정제하는 단계;
- [94] (6) 제조된 RNA-고분자 구조체와 상보적인 서열의 RNA 단일가닥의 어닐링을 통해 이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하는 단계;
- [95] 를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [96] 본 발명에서의 고형지지체(solid support)는 Controlled Pore Glass(CPG)가 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니며, CPG인 경우 직경은 40~180 μm 인 것이 바람직하며, 500Å~3000Å의 공극 크기를 가지는 것이 바람직하다. 상기 단계 (5) 이후, 제조가 완료 되면 정제된 RNA-고분자 구조체 및 RNA 단일가닥은 MALDI-TOF 질량분석기로 분자량을 측정하여 목적하는 RNA-고분자 구조체 및 RNA 단일가닥이 제조되었는지를 확인할 수 있다. 상기 제조방법에 있어서 (2) 단계에서 합성된 RNA 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 합성하는 단계 (4)는 (1) 단계 이전 또는 (1) 단계 내지 (5)단계 중 어느 한 과정 중에 수행되어도 무방하다.
- [97] 또한, (2)단계에서 합성된 RNA 단일가닥과 상보적 서열을 포함하는 RNA 단일가닥은 5' 말단에 인산기가 결합된 형태로 이용된 것을 특징으로 하는 제조방법도 될 수 있다.
- [98] 본 발명은 또한, STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체에 추가적으로 리간드가 결합된 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조방법을 제공한다.
- [99] 리간드가 결합된 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 올리고 RNA 구조체를 제조하는 방법은 예를 들어,
- [100] (1)s 기능이 결합되어 있는 고형지지체에 친수성 물질을 결합시키는 단계;
- [101] (2) 기능기-친수성 물질이 결합되어있는 고형지지체를 기반으로 RNA 단일가닥을 합성하는 단계;
- [102] (3) 상기 RNA 단일가닥의 5' 말단에 소수성 물질을 공유결합 시키는 과정으로 합성하는 단계;
- [103] (4) 상기 RNA 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 합성하는 단계;
- [104] (5) 합성이 완료되면 고형지지체로부터 기능기-RNA-고분자 구조체 및 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 분리하는 단계;
- [105] (6) 상기 기능을 이용하여 친수성 물질 말단에 리간드를 결합하여 리간드-RNA-고분자 구조체 단일가닥을 제조하는 단계;

- [106] (7) 제조된 리간드-RNA-고분자 구조체와 상보적인 서열의 RNA 단일가닥의 어닐링을 통해 리간드-이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하는 단계;
- [107] 를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [108] 상기 (6)단계 이후, 제조가 완료되면 리간드-RNA-고분자 구조체 및 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 분리 정제한 뒤 MALDI-TOF 질량 분석기로 분자량을 측정하여 목적하는 리간드-RNA-고분자 구조체 및 상보적인 RNA가 제조되었는지를 확인 할 수 있다. 제조된 리간드-RNA-고분자 구조체와 상보적인 서열의 RNA 단일가닥의 어닐링을 통해 리간드-이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조할 수 있다. 상기 제조방법에 있어서 (3) 단계에서 합성된 RNA 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 합성하는 단계 (4)는 독립적인 합성과정으로서 (1) 단계 이전 또는 (1) 단계 내지 (6) 단계 중 어느 한 과정 중에 수행되어도 무방하다.
- [109] 본 발명의 또 다른 양태로서, STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 나노입자를 제공한다.
- [110] 이미 앞서 설명한 바와 같이 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체는 소수성 및 친수성 물질을 모두 포함하고 있는 양친매성이며, 친수성 부분은 체내에 존재하는 물 분자들과 수소결합 등의 상호작용을 통해 친화력을 가지고 있어 바깥쪽으로 향하게 되고, 소수성 물질들은 그들 간의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)을 통해 안쪽으로 향하게 되어 열역학적으로 안정한 나노입자를 형성하게 된다. 즉, 나노입자의 중심에 소수성 물질이 위치하게 되고, STAT3 특이적 siRNA의 바깥쪽 방향에 친수성 물질이 위치하여 STAT3 특이적 siRNA를 보호하는 형태의 나노입자를 형성한다. 이렇게 형성된 나노입자는 STAT3 특이적 siRNA의 세포 내 전달 향상 및 siRNA 효능을 향상시킨다.
- [111] 본 발명에 따른 나노입자는 동일한 서열을 가지는 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체만으로 형성될 수도 있고, 서로 다른 서열을 포함하는 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 구성될 수도 있음을 특징으로 하는데, 본 발명에서의 서로 다른 서열을 포함하는 siRNA는 다른 타겟 유전자, 예를 들어 STAT3 특이적 siRNA일수도 있고, 동일한 타겟 유전자 특이성을 가지면서 그 서열이 다른 경우도 포함될 수 있다.
- [112] 또한, STAT3 특이적 siRNA 이외에 다른 암 특이적 타겟 유전자 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체가 본 발명에 따른 나노입자에 포함될 수도 있다.
- [113] 또한, 본 발명은 또 다른 양태로서, STAT3 특이적 siRNA, 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체 및/또는 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자를 포함하는 암, 피부질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [114] 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA, 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA

구조체 및/또는 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자를 유효성분으로 포함하는 조성물은 암세포의 증식 및 암세포의 사멸을 유도하거나, 각질 형성 세포의 증식 및 사멸을 유도하고 이에 따른 비 정상적인 면역세포의 활성을 유도하여, 암, 피부질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료효과를 나타낸다. 따라서 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 이를 포함하는 조성물은 해당 유전자가 과 활성화 되어있는 것으로 보고된 유방암을 비롯하여 위암, 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 전립선암, 난소암 및 신장암을 비롯한 다양한 암 또는 건선을 비롯한 피부질환과 염증성 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있다.

- [115] 특히, 본 발명에 있어서, 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에는 서열번호 1 내지 서열번호 200에서 선택된 어느 하나의 서열, 바람직하게는 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 119, 137, 141, 166, 170, 171번에 따른 서열에서 선택된 어느 하나의 서열, 더욱 바람직하게는 서열번호 17, 42, 101, 119, 137번에 따른 서열, 가장 바람직하게는 서열번호 42, 101, 137번에 따른 서열을 포함하는 센스가닥 및 이와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [116] 또한, STAT3 이외의 다른 암, 피부질환 또는 염증성 질환 특이적 타겟 유전자에 특이적인 siRNA 또는 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체가 본 발명에 따른 조성물에 추가적으로 포함될 수 있다.
- [117] 상기와 같이 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체와 함께, 추가적으로 STAT3 이외의 암, 피부질환 또는 염증성 질환 특이적 타겟 유전자에 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 모두 포함하는 암, 피부질환 또는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 함께 이용할 경우, 흔히 암, 피부질환 또는 염증성 질환 치료에 이용되는 병용 요법(combination therapy)과 같이 상승적인 효과를 거둘 수 있다.
- [118] 본 발명에 따른 조성물이 예방 또는 치료할 수 있는 암은 유방암, 위암, 대장암, 췌장암, 전립선암, 간암, 난소암, 신장암 및 폐암 등을 예시할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니고, 피부질환은 건선, 아토피, 백선 및 알레르기성 피부질환 등을 예시할 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니며, 염증성 질환은 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 초면역글로불린 혈증, 만성 갑상선염, 크론병 및 췌장염 등을 예시할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [119] 본 발명의 조성물에는 상기의 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 본 발명의 유효성분과 양립 가능하여야 하며, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 한 성분 또는 둘 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있고, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제,

분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형으로 제제화 할 수 있다. 특히, 동결건조(lyophilized)된 형태의 제형으로 제제화하여 제공하는 것이 바람직하다. 동결건조 제형 제조를 위해서 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 알려져 있는 방법이 사용될 수 있으며, 동결건조를 위한 안정화제가 추가될 수도 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 레밍톤 약학 과학(Remington's pharmaceutical Science, Mack Publishing company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질병에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[120] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분 등의 함량 및 투여방법은 통상의 환자의 증후와 질병의 심각도에 기초하여 본 기술분야의 통상의 전문가가 결정할 수 있다. 또한 산제, 정제, 캡슐제, 액제, 주사제, 연고제, 시럽제 등의 다양한 형태로 제제화 할 수 있으며 단위-투여량 또는 다-투여량 용기, 예를 들면 밀봉된 앰플 및 병 등으로 제공될 수도 있다.

[121] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 기관지, 구강, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 장관, 설하 또는 국소 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 방법, 배설을 또는 질병의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 본 기술분야의 통상의 전문가가 용이하게 결정할 수 있다. 또한, 임상 투여를 위해 공지된 기술을 이용하여 본 발명의 조성물을 적합한 제형으로 제제화할 수 있다.

[122] 본 발명에서는 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA, 상기 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체, 이를 포함하는 조성물 또는 나노입자를 암, 피부질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

[123] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체, 이를 포함하는 조성물 또는 나노입자를 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암, 피부질환 또는 염증성 질환의 예방 및 치료방법을 제공한다.

[124]

도면의 간단한 설명

[125] 도 1은 본 발명에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체로 구성된 나노입자의 모식도이다.

[126] 도 2는 본 발명에 따른 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170 또는 171번의 서열을 센스가닥으로 포함하는 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자의 크기(size) 및 PDI(polydispersity index)의 측정 그래프이다.

- [127] 도 3는 본 발명의 서열번호 1 내지 200번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 5 nM의 농도로 MCF-7 세포주에 형질전환시킨 후, 확인된 타겟 유전자(target gene)의 발현 저해량 그래프이다.
- [128] 도 4는 본 발명의 서열번호 1 내지 200번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 1 nM의 농도로 MCF-7 세포주에 형질전환시킨 후, 확인된 타겟 유전자(target gene)의 발현 저해량 그래프이다.
- [129] 도 5는 본 발명의 서열번호 12, 17, 42, 55, 91, 95, 101, 108, 111, 114, 116, 119, 137, 139, 141, 152, 166, 168, 170 또는 171번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 0.2 nM, 1nM 또는 5 nM 농도로 MDA-MB-231 세포주에 형질전환시킨 후, 확인된 타겟 유전자 발현 저해량 그래프이다.
- [130] 도 6은 본 발명의 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170 또는 171번 의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 1.6 pM, 8 pM, 40 pM, 200 pM, 1 nM 또는 5 nM의 농도로 MCF-7 세포주에 형질전환시킨 후, 확인된 타겟 유전자 발현 저해량 그래프이다.
- [131] 도 7은 본 발명의 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170 또는 171번 의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 1.6 pM, 8 pM, 40 pM, 200 pM, 1 nM 또는 5 nM의 농도로 MDA-MB-231 세포주에 형질전환시킨 후, 확인된 타겟 유전자 발현 저해량 그래프이다.
- [132] 도 8은 본 발명의 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170 또는 171번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA의 IC50(inhibition concentration 50%)를 분석한 그래프로서, A는 MCF-7 세포주이고 B는 MDA-MB-231 세포주이다.
- [133] 도 9는 본 발명의 서열번호 17, 42, 101, 119, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 5 nM 또는 50 nM 농도로 MDA-MB-231 세포주에 형질전환시킨 후, 확인된 타겟 유전자 발현 저해량과 그에 따른 세포 생존률(cell viability) 감소량 그래프로서, A는 타겟 유전자 발현 저해량이고, B는 세포 생존률 감소량이다.
- [134] 도 10은 본 발명의 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170 또는 171번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 이중나선 RNA 구조체를 포함하는 나노입자를 100 nM 또는 200 nM의 농도로 MDA-MB-231 세포주에 처리했을 때, 타겟 유전자의 발현 저해량을 나타내는 그래프이다.
- [135] 도 11은 본 발명에 따른 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 포함하는 siRNA를 모두 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자의 100 nM, 200 nM 또는 500 nM의 농도에서 리간드(포도당) 유무에 따른 타겟 유전자의 발현 억제량을 MDA-MB-231 세포주에서 비교 분석한 그래프이다.
- [136] 도 12는 본 발명에 따른 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 포함하는 siRNA를 모두 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진

나노입자(SAMiRNA-STAT3-Combo)와 동일 나노입자에 리간드로써 포도당을 포함하는 나노입자(Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo)의 크기(size) 및 PDI(polydispersity index)를 측정한 그래프이다.

- [137] 도 13는 본 발명의 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 이중나선 RNA 구조체를 모두 포함하는 나노입자(SAMiRNA-STAT3-Combo)의 마우스 유방암 이종이식모델 미정맥 투여에 따른 종양성장억제 효과를 확인하기 위해, 나노입자 미정맥 투여 후, 종양의 크기를 확인한 그래프이다. PBS, PBS(부형제) 투여 대조군; SAMiRNA-CONT, 서열번호 201번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 나노입자 5 mg/kg body weight 투여 대조군; SAMiRNA-STAT3, 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 나노입자(SAMiRNA-CONT-Combo)를 1 mg/kg body weight 또는 5 mg/kg body weight 투여한 실험군을 의미한다. 통계학적 유의성을 확인하기 위해 GraphPad PRISM5 software(La Jolla, CA)를 이용하여 Two-way ANOVA with Bonferroni posttests법을 사용하였으며, $p < 0.05$ 를 실험군 간의 유의성 있는 차이로 판정하였다. #, $p < 0.05$ versus PBS; ###, $p < 0.001$ versus PBS; *, $p < 0.05$ versus SAMiRNA-CONT(5 mpk); **, $p < 0.01$ versus SAMiRNA-CONT(5 mpk); ***, $p < 0.001$ versus SAMiRNA-CONT(5 mpk)
- [138] 도 14는 본 발명의 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 이중나선 RNA 구조체를 모두 포함하며, 리간드로써 포도당을 포함하는 나노입자(Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo)의 마우스 유방암 이종이식모델 미정맥 투여에 따른 종양성장억제 효과를 확인하기 위해, 나노입자 미정맥 투여 후, 종양의 크기를 확인한 그래프이다. PBS, PBS(부형제) 투여 대조군; Glucose-SAMiRNA-CONT, 서열번호 201번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 나노입자 5 mg/kg body weight 투여 대조군; Glucose-SAMiRNA-STAT3, 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 나노입자(Glucose-SAMiRNA-CONT-Combo)를 1 mg/kg body weight 또는 5 mg/kg body weight 투여한 실험군을 의미한다. 통계학적 유의성을 확인하기 위해 GraphPad PRISM5 software(La Jolla, CA)를 이용하여 Two-way ANOVA with Bonferroni posttests법을 사용하였으며, $p < 0.05$ 를 실험군 간의 유의성 있는 차이로 판정하였다. ###, $p < 0.001$ versus PBS; ##, $p < 0.01$ versus Glucose-SAMiRNA-CONT(5 mpk); ###, $p < 0.001$ versus Glucose-SAMiRNA-CONT(5 mpk)
- [139] 도 15와 도 16은 본 발명의 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 이중나선 RNA 구조체를 모두 포함하는 나노입자(SAMiRNA-STAT3-Combo, 도 15)와 동일 나노입자에 리간드로써 포도당을 부착한 나노입자(Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo, 도 16)의 마우스 유방암 이종이식모델 미정맥 투여에 따른 종양성장억제 효과를 확인하기 위해,

나노입자 미정맥 투여 후, 종양의 무게(도 15과 도 16의 각 A)와 체중 대비 종양무게 비율 백분율(도 15과 도 16의 각 B)을 확인한 그래프이다. PBS, PBS(부형제) 투여 대조군; SAMiRNA-CONT, 서열번호 201번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 나노입자 5 mg/kg body weight 투여 대조군; SAMiRNA-STAT3, 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 나노입자(SAMiRNA-CONT-Combo) 1 mg/kg body weight 또는 5 mg/kg body weight 투여 실험군; Glucose-SAMiRNA-CONT, 서열번호 201번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 나노입자 5 mg/kg body weight 투여 대조군; Glucose-SAMiRNA-STAT3, 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 나노입자(Glucose-SAMiRNA-CONT-Combo)를 1 mg/kg body weight 또는 5 mg/kg body weight 투여한 실험군을 의미한다. 통계학적 유의성을 확인하기 위해 GraphPad PRISM5 software(La Jolla, CA)를 이용하여 One-way ANOVA and Dunnett's Multiple comparison test법을 사용하였으며, $p < 0.05$ 를 실험군 간의 유의성 있는 차이로 판정하였다. ##, $p < 0.01$ versus PBS; *, $p < 0.05$ versus SAMiRNA-CONT(5 mpk); **, $p < 0.01$ versus SAMiRNA-CONT(5 mpk); ‡, $p < 0.05$ versus Glucose-SAMiRNA-CONT(5 mpk).

[140] 도 17은 본 발명의 서열번호 42의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 50, 100, 200, 500 nM 또는 1 μ M 의 농도로 HaCaT 세포주에 형질전환시킨 후, 확인된 타겟 유전자(target gene)의 발현 저해량 그래프이다.

[141]

[142] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현에

[143] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[144]

[145] 실시예 1. STAT3의 목표 염기서열 디자인 및 siRNA의 제조

[146] STAT3 유전자의 mRNA 서열(NM_213662)에 결합할 수 있는 목표 염기서열(센스가닥)을 200종 디자인하고, 상기 목표 염기서열의 상보적 서열인 안티센스 가닥의 siRNA 를 제조하였다. 우선, 바이오니아(주)에서 개발된 유전자 디자인 프로그램(Turbo si-Designer)을 사용하여, 해당 유전자들의 mRNA 서열에서 siRNA 가 결합할 수 있는 목표 염기서열을 디자인하였다. 본 발명의 STAT3 유전자에 대한 siRNA 는 19개의 뉴클레오티드로 구성된 센스 가닥과 이에 상보적인 안티센스 가닥으로 구성된 이중가닥 구조이다. 또한 어떠한 유전자의 발현을 저해하지 않는 서열의 siRNA인 siCONT(서열번호 201)을 제조하였다. 상기 siRNA 는 β -시아노에틸 포스포라미다이트(β -cyanoethyl phosphoramidite)를 이용하여 RNA 골격 구조를 이루는 포스포디에스터 결합을

연결하여 제조하였다 (Nucleic Acids Research, 12:4539-4557, 1984). 구체적으로, RNA 합성기(384 Synthesizer, BIONEER, 한국)를 사용하여, 뉴클레오티드가 부착된 고형 지지체 상에서, 차단제거(deblocking), 결합(coupling), 산화(oxidation) 및 캐핑(capping)으로 이루어지는 일련의 과정을 반복하여 원하는 길이의 RNA를 포함하는 반응물을 수득하였다. 상기 반응물을 Daisogel C18(Daiso, Japan) 칼럼이 장착된 HPLC LC918(Japan Analytical Industry, Japan)로 RNA를 분리 및 정제하고 이를 MALDI-TOF 질량 분석기(Shimadzu, Japan)를 이용하여 목표 염기서열과 부합하는지 확인하였다. 이후, 센스와 안티센스 RNA가닥을 결합시켜 목적하는 이중가닥 siRNA(서열번호 1 내지 201)을 제조하였다(표 2 참조).

[147]

[148] [표2]

본 발명에 따른 siRNA의 센스가닥 서열

SEQ ID No.	Target Gene	Sequence
1	STAT3	TGTTCTCTGAGACCCATGA
2	STAT3	TGAGACTTGGGCTTACCAT
3	STAT3	CCGAGCCAATTGTGATGCT
4	STAT3	CTATCTAAGCCCTAGGTTT
5	STAT3	GTGTCTAAAGGTCCCTCAT
6	STAT3	CGTGTCTAAAGGTCCCTCA
7	STAT3	GAATCCCGTGGGTTGCTTA
8	STAT3	CTCAGAGGATCCCGGAAAT
9	STAT3	GGAGGCATTCGGAAAGTAT
10	STAT3	TCACTACTAAAGTCAGGTT
11	STAT3	CTCAAGAGTCAAGGAGACA
12	STAT3	GAGTCAAGGAGACATGCAA
13	STAT3	CTACTAAAGTCAGGTTGCT
14	STAT3	ACGTGTCTGGTTGAGCTCA
15	STAT3	CAGATCATCTGAACTACT
16	STAT3	CTACTTTAACTTCCAGAAA
17	STAT3	CTTCAGACCCGTCAACAAA
18	STAT3	GGCCCAATGGAATCAGCTA
19	STAT3	GGGAAGAATCACGCCTTCT
20	STAT3	GCTGGAACAGATGCTCACT
21	STAT3	GTGCGTATGGGAACACCTA
22	STAT3	CCAGCAACACTCTTCAGTA
23	STAT3	CAGGCCACCTATAGCTACA
24	STAT3	CCTTAAGACATCTGAAGCT
25	STAT3	CATGCAGGGCAAAGGCTTA

[149]

26	STAT3	GCTTACCTACCTATAAGGT
27	STAT3	GACCAAGTTTATCTGTGTG
28	STAT3	CACCTTGCCCTCAGCTGATC
29	STAT3	GAGAAACAGGATGGCCCAA
30	STAT3	GAATCTCCAGGATGACTTT
31	STAT3	TTGTAATGGCGTCTTCATT
32	STAT3	TCTCCAACATCTGTCAGAT
33	STAT3	GAGTCAAGATTGGGCATAT
34	STAT3	GAGAGTGCAGGATCTAGAA
35	STAT3	GGATCCCGGAAATTTAACA
36	STAT3	CGAGCCAATTGTGATGCTT
37	STAT3	GACCGAGGTGTATCACCAA
38	STAT3	GACCAACAATCCCAAGAAT
39	STAT3	TGGGCTATAAGATCATGGA
40	STAT3	AGCAGCTTGACACACGGTA
41	STAT3	CACATGCCACTTTGGTGTT
42	STAT3	CGATGGAGTACGTGCAGAA
43	STAT3	GAAAACTGGATAACGTCAT
44	STAT3	GGAGGCGTCACTTTCCTT
45	STAT3	CTATAAGATCATGGATGCT
46	STAT3	GAGACTTGGGCTTACCATT
47	STAT3	TGGGAGAGATTGACCAGCA
48	STAT3	TCTACAGACTGCAGCCACT
49	STAT3	CCTTGCTGACATCCAAATA
50	STAT3	TCATGCAGGGCAAAGGCTT
51	STAT3	CAAATCCAATGTGTACTT
52	STAT3	CTCAACTTCAGACCCGTCA
53	STAT3	GAGAAGGACATCAGCGGTA
54	STAT3	GCTGCAGAAAGATACGACT
55	STAT3	GCCACTTTGGTGTTTCATA
56	STAT3	GGTGTCTCCACTGGTCTAT
57	STAT3	CTTCCTTCAGGCTGGTAAT

[150]

58	STAT3	GCCAGTTTCTTGGTGATAT
59	STAT3	CCGGATTTGGCAACTCAAA
60	STAT3	GGGCTTACCATTGGGTTTA
61	STAT3	GGTTGCTTACCTACCTATA
62	STAT3	AGCTTGACACACGGTACCT
63	STAT3	AGTTACAGGTTGGACATGA
64	STAT3	ACTTGTAATGGCGTCTTCA
65	STAT3	GTATCTACTTTAACTTCCA
66	STAT3	GATGGAGTACGTGCAGAAA
67	STAT3	CTACATACTCCTGGCATTG
68	STAT3	CTCCTTGCGTGTCTAAAGG
69	STAT3	GACTTGGGCTTACCATTGG
70	STAT3	GGTAGAGAATCTCCAGGAT
71	STAT3	CTTCCCTGATTGTGACTGA
72	STAT3	GGGCTATAAGATCATGGAT
73	STAT3	GGCTTACTGATAAACTTGA
74	STAT3	CTTGAGTCTGCCCTCGTAT
75	STAT3	GCCTCAGCTGATCAGAGTT
76	STAT3	GCAGATATTGTCAAGTTCA
77	STAT3	CTTAACTCTGATTGTAGCA
78	STAT3	AGCCTCCTTGGTGCTTTAA
79	STAT3	GCATGCCCATGCATCCTGA
80	STAT3	GTCCGTGGAACCATACACA
81	STAT3	CTTGAGAAGCCAATGGAGA
82	STAT3	CCCTCAAGAGTCAAGGAGA
83	STAT3	CTTGAGCACTAAGCCTCCA
84	STAT3	CCAAATAGAAGATAGGACT
85	STAT3	GGTAGCATGTATCTGGTCT
86	STAT3	TGTTCTCTATCAGCACAAT
87	STAT3	ACGAAGAATCAAGCAGTTT
88	STAT3	CCTATAGCTACATACTCCT
89	STAT3	CAGCACAATCTACGAAGAA

[151]

90	STAT3	CGGAAAGTATTGTCGGCCA
91	STAT3	CTCTATCAGCACAACTCTAC
92	STAT3	CAACAGATTGCCTGCATTG
93	STAT3	GAAGATAGGACTATCTAAG
94	STAT3	CAGCAACACTCTTCAGTAC
95	STAT3	AGTCGAATGTTCTCTATCA
96	STAT3	AGGAGGAGGCATTTCGAAA
97	STAT3	TACTAACTTTGTGGTTCCA
98	STAT3	GCGGTAAGACCCAGATCCA
99	STAT3	GGATGGCCCAATGGAATCA
100	STAT3	CTGACCAACAATCCCAAGA
101	STAT3	CCGTGGAACCATACACAAA
102	STAT3	GTTTGAGTCCCTCACCTTT
103	STAT3	GTGAGGCAGAACAGCTAGA
104	STAT3	CCTCAGCTGATCAGAGTTT
105	STAT3	GTCATGCAGAGCTCTTACT
106	STAT3	GGTGTTTCATAATCTCCTG
107	STAT3	GACATCTGAAGCTGCAACC
108	STAT3	AGAGAGTGCAGGATCTAGA
109	STAT3	TCTCTGAGACCCATGATCA
110	STAT3	GCTGAGAACGGAAGCTGCA
111	STAT3	TGGATTGAGAGTCAAGATT
112	STAT3	GTAATGTATTGGCCTTTTA
113	STAT3	CACTCTTCAGTACATAATA
114	STAT3	CGGCCAGCAAAGAATCACA
115	STAT3	GTGGGAAGAATCACGCCTT
116	STAT3	CAGTTCACTACTAAAGTCA
117	STAT3	GCTCAGGGAATATGGTTCT
118	STAT3	GAGGATCCCGGAAATTTAA
119	STAT3	GGTACATCATGGGCTTTAT
120	STAT3	CCTTCAGGCTGGTAATTTA
121	STAT3	GGCCTTTGGTGTTGAAATA

[152]

122	STAT3	GGCTTACCATTGGGTTTAA
123	STAT3	GCTTACCATTGGGTTTAAA
124	STAT3	AAGAATCACATGCCACTTT
125	STAT3	AAGAAGGAGGCGTCACTTT
126	STAT3	TAAGCCCTAGGTTTCTTTT
127	STAT3	AAGGTCCTCATCCTGTTT
128	STAT3	GGAGAAGGACATCAGCGGT
129	STAT3	TAACCTTGCTGACATCCAA
130	STAT3	TTAAGCATTCAGCTTCCTT
131	STAT3	TGGGTTGCTTACCTACCTA
132	STAT3	GTTGAAATAGGAAGGTTTA
133	STAT3	GACGTTGCAGCTCTCAGAG
134	STAT3	TTGTAATGTATTGGCCTTT
135	STAT3	TCCCGTGGGTTGCTTACCT
136	STAT3	GGAAGAATCACGCCTTCTA
137	STAT3	GCAGGATCTAGAACAGAAA
138	STAT3	GGAGTACGTGCAGAAAAC
139	STAT3	GGCGTCCAGTTCCTACTA
140	STAT3	GAAGGAGGCGTCACTTTCA
141	STAT3	CTACTTCTGCTATCTTTGA
142	STAT3	GGCCACCTATAGCTACATA
143	STAT3	CTAAGCCCTAGGTTTCTTT
144	STAT3	CTGGCCTTTGGTGTTGAAA
145	STAT3	GGCTGGGATACTTCTGATT
146	STAT3	GTCTCCTTGCGTGTCTAAA
147	STAT3	GGGCAAAGGCTTACTGATA
148	STAT3	CGGATTTGGCAACTCAAAA
149	STAT3	GGCCTTAGGTAGCATGTAT
150	STAT3	CATGTATCTGGTCTTAACT
151	STAT3	CTGGCCACTGCATTCAAAT
152	STAT3	CCACTGGTCTATCTCTATC
153	STAT3	TGGATGCTACCAATATCCT

[153]

154	STAT3	AGTTTGAGTCCCTCACCTT
155	STAT3	TCCTTGCGTGTCTAAAGGT
156	STAT3	ATGGGAACACCTAGCACGT
157	STAT3	CGGCGTCCAGTTCACTACT
158	STAT3	CATAGCCTTTCTGTATTTA
159	STAT3	CTTACCATTGGGTTTAAAT
160	STAT3	GAAGAATCCAACAACGGCA
161	STAT3	AGATCATCTGAAACTACTA
162	STAT3	CCCAATGGAATCAGCTACA
163	STAT3	GGAAGAGAGTGCAGGATCT
164	STAT3	GGAGAAGCATCGTGAGTGA
165	STAT3	GCAACAGATTGCCTGCATT
166	STAT3	GTCATTAGCAGAATCTCAA
167	STAT3	GCAGAATCTCAACTTCAGA
168	STAT3	GGTACAACATGCTGACCAA
169	STAT3	GTCTATCTCTATCCTGACA
170	STAT3	CAAGTTTATCTGTGTGACA
171	STAT3	CCATGTGAGGAGCTGAGAA
172	STAT3	GCCTGTTTCTGTAAGCAAA
173	STAT3	GCTACATACTCCTGGCATT
174	STAT3	CCTTGGTGCTTTAAGCATT
175	STAT3	GCTTCAGGTCAAACCCCTA
176	STAT3	CCTTATCAGGGCTGGGATA
177	STAT3	GTGATATCCAGTGGCACTT
178	STAT3	GCACTTGTAATGGCGTCTT
179	STAT3	GGCGTCTTCATTCA GTTCA
180	STAT3	GGCAACTCAAACCACCTT
181	STAT3	GGGTTGCTTACCTACCTAT
182	STAT3	CTCTACAGTGACAGCTTCC
183	STAT3	GAAACTACTAACTTTGTGG
184	STAT3	GTGCTTACAACCTTGACTC
185	STAT3	TGGTAGAGAATCTCCAGGA

[154]

186	STAT3	TGGTACAACATGCTGACCA
187	STAT3	ACTGTATCAGCATAGCCTT
188	STAT3	TGGCAACTCAAAACACCT
189	STAT3	TAGCATGTATCTGGTCTTA
190	STAT3	AGAGGATCCCGGAAATTTA
191	STAT3	CTCTCAGAGGATCCCGGAA
192	STAT3	CTCCATCAGCTCTACAGTG
193	STAT3	GAGAGTCAAGATTGGGCAT
194	STAT3	CATCTGCCTAGATCGGCTA
195	STAT3	CCAATTGTGATGCTTCCCT
196	STAT3	CCCTGATTGTGACTGAGGA
197	STAT3	CTTCAGTTAACAGCCTCCT
198	STAT3	GGCTTCAGGTCAAACCCTT
199	STAT3	GGTGATATCCAGTGGCACT
200	STAT3	GGCACTTGTAATGGCGTCT
201	Non-targeting sequence (CONT)	CUUACGCUGAGUACUUCGA

[155]

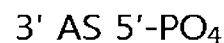
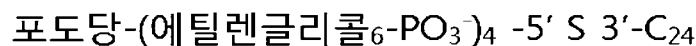
[156] 실시예 2. 이중나선 올리고 RNA 구조체의 합성

[157] 본 발명에서 제조한 이중나선 올리고 RNA 구조체는 하기 구조식 (5)와 같은 구조를 가진다.

[158]

[159] 구조식 5

[160]



[161]

[162] 상기 구조식 (5)에서, S는 siRNA의 센스가닥, AS는 siRNA의 안티센스 가닥, PO₄는 인산기, 에틸렌글리콜은 친수성 물질 단량체(monomer)로 구조식 (3)의 A, 친수성 물질 단량체의 반복횟수인 m은 6으로써 헥사에틸렌글리콜(hexa ethylene glycol)이 링커(J)인 인산기(PO₃⁻)를 통해 결합되고, 친수성 물질 블록의 반복횟수(n)로 4, C₂₄는 소수성 물질(B)로 이황화 결합이 포함되어 있는 테트라도코산(tetradocosane), 그리고 5' 및 3'은 이중나선 올리고 RNA의 말단 방향을 의미하며, 포도당은 수용체매개 세포내제화(RME)를 증진시키는

리간드이다.

- [163] 상기 구조식 (5)에서의 siRNA의 센스가닥은 기존 특허(WO2015002511)의 실시예 1에 기재된 방법에 따라 제조된 DMT-헥사에틸렌글리콜-CPG를 지지체로 하여 앞서 언급한 방식대로 β -시아노에틸포스포아미다이트를 이용하여 RNA 골격구조를 이루는 포스포디에스터 결합을 연결해가는 방법을 통해 3' 말단 부위에 헥사에틸렌글리콜이 결합된 센스가닥을 포함하는 올리고 RNA-친수성 물질 구조체를 합성한 뒤, 이황화 결합이 포함되어있는 테트라도코산을 5' 말단에 결합하여 원하는 RNA-고분자 구조체의 센스가닥을 제조하였다. 상기 가닥과 어닐링을 수행할 안티센스 가닥의 경우, 앞서 언급한 반응을 통해 센스가닥과 상보적인 서열의 안티센스 가닥을 제조하였다.
- [164] 합성이 완료되면 60°C의 온탕기(water bath)에서 28%(v/v) 암모니아(ammonia)를 처리하여 합성된 RNA 단일가닥과 RNA-고분자 구조체를 CPG로부터 떼어낸 뒤, 탈보호(deprotection) 반응을 통해 보호잔기를 제거하였다. 보호잔기가 제거된 RNA 단일가닥 및 RNA-고분자 구조체는 70°C의 오븐에서 엔-메틸피롤리돈(N-methylpyrrolidone), 트리에틸아민(triethylamine) 및 트리에틸아민트리하이드로플로라이드 (triethylaminetrihydrofluoride)를 부피비 10:3:4의 비율로 처리하여 2'TBDMS(tert-butyldimethylsilyl)를 제거하였다.
- [165] 상기 반응물을 Daisogel C18(Daiso, Japan) 칼럼이 장착된 HPLC LC918(Japan Analytical Industry, Japan)로 RNA를 분리 및 정제하고 이를 MALDI-TOF 질량 분석기(Shimadzu, Japan)를 이용하여 목표 염기서열과 부합하는지 확인하였다. 이후, 각각의 이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하기 위하여 센스가닥과 안티센스 가닥을 동량 혼합하여 1X 어닐링 버퍼(30 mM HEPES, 100 mM 칼륨 아세테이트(Potassium acetate), 2 mM 마그네슘 아세테이트(Magnesium acetate), pH 7.0~7.5)에 넣고, 90 °C 항온수조에서 3분 반응시킨 후 다시 37 °C에서 반응시켜, 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170, 171번 및 201번을 siRNA의 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체(이하 SAMiRNA-STAT3#12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170, 171 및 SAMiRNA-CONT라 함)를 각각 제조하였다. 제조된 이중나선 올리고 RNA 구조체는 전기영동을 통하여 어닐링 되었음을 확인하였다.
- [166]
- [167] 실시예 3. 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자(SAMiRNA)의 제조 및 크기와 다분산지수 측정
- [168] 상기 실시예 2에서 합성된 이중나선 올리고 RNA 구조체는 이중나선 올리고 RNA의 말단에 결합된 소수성 물질 간의 소수성 상호작용에 의하여 나노입자인 미셀(micelle)을 형성하게 된다(도 1 참조).
- [169] SAMiRNA-STAT3, SAMiRNA-CONT로 이루어진 나노입자의 크기(직경, d.nm)와 다분산지수(이하 PDI(polydispersity index)) 분석을 통해 해당 SAMiRNA로 구성된 나노입자의 형성을 확인하였다.

[170]

[171] 실시예 3-1. 세포 실험 용 나노입자의 제조

[172] 상기 실시예 2에서 합성된 SAMiRNA-STAT3#12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170, 171 및 SAMiRNA-CONT를 1.5 ml PBS(Phosphate Buffered Saline)에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 녹인 뒤, -75°C , 5mTorr 조건에서 48시간 동안 동결건조를 통해 나노입자 파우더를 제조한 뒤, 용매인 1.5 ml PBS에 녹여 균질화된 나노입자를 제조하여 세포 실험에 사용하였다.

[173]

[174] 실시예 3-2. 동물 실험 용 나노입자의 제조

[175] 상기 실시예 2에서 합성된 SAMiRNA-CONT를 1 ml PBS(Phosphate Buffered Saline)에 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 녹인 뒤, -75°C , 5mTorr 조건에서 6일간 동결건조를 통해 나노입자 파우더를 제조한 뒤, 용매인 0.2 ml PBS에 녹여 균질화된 나노입자를 제조하여 동물 실험에 사용하였다.

[176] 상기 실시예 2에서 합성된 SAMiRNA-STAT3#42, #101, #137을 동량 혼합하여, 1 ml PBS(Phosphate Buffered Saline)에 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 녹인 뒤, -75°C , 5mTorr 조건에서 6일간 동결건조를 통해 나노입자 파우더를 제조한 뒤, 용매인 0.2 ml PBS에 녹여 균질화된 나노입자를 제조하여 동물 실험에 사용하였다.

[177] 상기 제조된 SAMiRNA-CONT 균질화 액과 SAMiRNA-STAT3 균질화 액을 PBS에 1/25 희석하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 동물 실험 용 나노입자의 세포 형질전환 확인 실험에 사용하였다.

[178]

[179] 실시예 3-3. 나노입자의 크기 및 PDI 측정

[180] 동적 광산란 측정법(dynamic light-scattering method)을 통하여 상기 나노입자의 크기와 분산도를 측정하였다. 실시예 3-1 및 3-2에서 제조된 균질화된 나노입자는 동적 광산란 측정기(Nano-ZS, MALVERN, 영국)로 크기와 분산도를 측정하였는데, 물질에 대한 굴절률(Refractive index)은 1.459, 흡수율(Absorption index)은 0.000으로 하고, 용매인 PBS의 온도 25°C 및 그에 따른 점도(viscosity)는 1.0200 및 굴절률은 1.335의 값을 입력하여 측정하였다. 1회 측정은 15 번 반복으로 구성된 크기 측정으로 이루어졌고, 이를 6 회 반복하였다.

[181] 측정 결과 세포 실험 용 나노입자의 경우 평균 $98.7 \pm 26.4(\text{mean} \pm \text{SD}, n=6)$ d.nm의 크기와 $0.289 \pm 0.064(\text{mean} \pm \text{SD}, n=6)$ 의 다분산지수 값을(도 2 참조), 동물 실험 용 나노입자의 경우 평균 $79.4 \pm 6.3(\text{mean} \pm \text{SD}, n=6)$ d.nm의 크기와 $0.265 \pm 0.007(\text{mean} \pm \text{SD}, n=6)$ 의 다분산지수 값이(도 12 참조) 확인되었다.

[182] 다분산지수 값이 낮을수록 해당 입자가 고르게 분포하고 있음을 나타내는 수치로, 본 발명의 나노입자는 매우 균일한 크기로 형성됨을 알 수 있었다.

[183]

[184] 실시예 4. 인간 유방암 세포주, MCF-7에서 siRNA를 이용한 타겟 유전자의 발현억제 확인

- [185] 상기 실시예 1에서 제조된 서열번호 1번 내지 201번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 이용하여 인간 유방암 세포주, MCF-7을 형질전환시키고, 상기 형질전환된 세포주에서 타겟 유전자의 발현 양상을 분석하였다.
- [186]
- [187] 실시예 4-1. 인간 유방암 세포주, MCF-7의 배양
- [188] 미합중국 종균협회(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 입수한 인간 유방암 세포주, MCF-7은 RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute 1640) 배양배지(GIBCO/Invitrogen, USA, 10%(v/v) 우태아 혈청, 페니실린 100 units/ml 및 스트렙토마이신 100 $\mu\text{g/ml}$)에서 37 °C, 5%(v/v) CO₂의 조건 하에 배양하였다.
- [189]
- [190] 실시예 4-2. 인간 유방암 세포주, MCF-7에서 STAT3 siRNA 의 형질주입(transfection)
- [191] 상기 실시예 4-1에서 배양된 MCF-7 세포주를 12-웰 플레이트에 웰 당 1×10^5 의 세포수로 18시간 동안 RPMI 1640 배양배지에서 37°C, 5 %(v/v) CO₂의 조건으로 배양한 뒤, 배지를 제거한 후 각 웰 당 500 μl 의 Opti-MEM 배지(GIBCO, 미국)를 분주하였다.
- [192] 리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max, Invitrogen, 미국) 2 μl 와 Opti-MEM 배지 248 μl 를 혼합하여 혼합액을 제조하였고, 실온에서 5분간 반응시킨 다음, 상기 실시예 1에서 제조한 각각의 서열번호 1 내지 201번을 센스가닥으로 가지는 siRNA (1 pmole/ μl 농도) 1 μl 또는 5 μl 를 Opti-MEM 배지에 첨가하여 최종 250 μl 의 양에 농도가 4 nM 또는 20 nM인 siRNA 용액을 제조하였다. 상기 리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max) 혼합액과 siRNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 반응시켜 형질주입용 용액을 제조하였다.
- [193] Opti-MEM이 분주된 12-웰 플레이트의 종양세포주 각 웰 당 형질주입용 용액 500 μl 를 분주하고 6시간 동안 배양한 후, Opti-MEM 배지를 제거하고 웰 당 RPMI 1640 배양배지 1 ml을 분주한 다음 24 시간 동안 37°C, 5%(v/v) CO₂ 조건 하에서 배양하였다.
- [194]
- [195] 실시예 4-3. 타겟 유전자 mRNA의 정량분석
- [196] 상기 실시예 4-2에서 형질주입된 세포주로부터 전체 RNA를 추출하여 cDNA를 제조한 뒤, 실시간 PCR(real-time PCR)을 이용하여 타겟 유전자의 mRNA 발현량을 상대정량 하였다.
- [197]
- [198] 실시예 4-3-1. 형질주입된 세포로부터 RNA 분리 및 cDNA 제조
- [199] RNA 추출 키트(AccuPrep Cell total RNA extraction kit, BIONEER, 한국)를 이용하여, 상기 실시예 4-2에서 형질주입된 세포주로부터 전체 RNA를 추출하고, 추출된 RNA는 RNA 역전사 효소(AccuPower RocketScript Cycle RT Premix/dT20,

Bioneer, 한국)를 이용하여, 하기와 같은 방법으로 cDNA를 제조하였다.
구체적으로, 0.25 ml 에펜도르프 튜브에 담겨있는 AccuPower RocketScript Cycle RT Premix/dT20(Bioneer, 한국)에 한 튜브 당 추출된 1 μ g 씩의 RNA를 넣고 총 부피가 20 μ l가 되도록 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 증류수를 첨가하였다. 이를 유전자 증폭기(MyGenie™ 96 Gradient Thermal Block, BIONEER, 한국)로 37°C에서 30초 동안 RNA와 프라이머를 혼성화(primer annealing)하고, 48°C에서 4분간 cDNA를 제조(cDNA synthesis)한 후 55°C에서 30초 동안 변성(denaturation)하는 과정을 12회 반복한 뒤, 95°C에서 5분 동안 효소를 불활성화(inactivation)시켜 증폭 반응을 종료하였다.

[200]

[201] 실시예 4-3-2. 타겟 유전자 mRNA의 상대정량 분석

[202] 상기 실시예 4-3-1에서 제조된 cDNA를 주형으로 하여 실시간 PCR을 통해 STAT3 유전자 mRNA의 상대적인 양을 하기와 같은 방법으로 정량 하였다. 상기 실시예 4-3-1에서 제조된 cDNA를 증류수로 5배 희석하고, 희석된 cDNA 3 μ l와 2x GreenStar™ PCR master mix(BIONEER, 한국) 25 μ l, 증류수 16 μ l, STAT3 qPCR 프라이머(F, R 각각 10 pmole/ μ l의 혼합액, BIONEER, 한국, 표 3 참조) 6 μ l의 혼합액을 96-웰 PCR 플레이트에 넣었다. 한편, 타겟유전자 mRNA의 발현량을 비교보정하기 위해 하우스키핑 유전자(housekeeping gene, 이하 HK 유전자)인 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)를 표준 유전자로 하였다. 상기 혼합액이 담긴 96-웰 플레이트를 Exicycler™96 Real-Time Quantitative Thermal Block(BIONEER, 한국)을 이용하여 하기와 같은 반응을 수행하였다. 95°C에서 15분간 반응하여 효소의 활성화 및 cDNA의 이차구조를 없앤 뒤, 94 °C에서 30초 변성(denaturing), 58°C에서 30초 어닐링(annealing), 72°C에서 30초 연장(extension), SYBR 그린 스캔(SYBR green scan)의 4개의 과정을 42 회 반복 수행하고, 72°C에서 3분간 최종 연장을 수행한 뒤, 55°C에서 1분간 온도를 유지하고, 55°C에서 95°C까지 멜팅 커브(melting curve)를 분석하였다. PCR이 종료된 후, 각각 수득한 타겟유전자의 Ct(threshold cycle)값은 GAPDH 유전자를 통해 보정된 타겟유전자의 Ct 값을 구한 뒤, 유전자 발현저해를 일으키지 않는 컨트롤 서열의 siRNA(siCONT)가 처리된 실험군을 대조군으로 하여 Δ Ct값의 차이를 구했다. 상기 Δ Ct 값과 계산식 $2^{(-\Delta Ct)} \times 100$ 을 이용하여 STAT3 특이적 siRNA가 처리된 세포의 타겟 유전자의 발현량을 상대정량 하였다(도 3 참조, 5 nM 농도 siRNA 처리; 도 4 참조, 1 nM 농도 siRNA 처리). 고효율의 siRNA를 선별하기 위하여 1 nM 그리고 5 nM 처리농도에서 타겟 유전자에 대한 mRNA 발현량이 공통적으로 높게 감소된 siRNA 20종을 선택하였다(서열번호 12, 17, 42, 55, 91, 95, 101, 108, 111, 114, 116, 119, 137, 139, 141, 152, 166, 168, 170, 171번의 서열을 센스가닥으로 가짐).

[203]

[204] [표3]

qPCR primer 서열정보(F, Forward primer, R, Reverse primer)

name	Sequence	SEQ ID NO.
GAPDH-F	GGTGAAGGTCGGAGTCAACG	202
GAPDH-R	ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG	203
STAT3-F	ATCACGCCTTCTACAGACTGC	204
STAT3-R	CATCCTGGAGATTCTCTACCACT	205

[205]

[206] 실시예 5. 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231에서 siRNA를 이용한 타겟 유전자의 발현억제 확인.

[207] 상기 실시예 1에서 제조되었고, 실시예 4-3-2에서 선택된 서열번호 12, 17, 42, 55, 91, 95, 101, 108, 111, 114, 116, 119, 137, 139, 141, 152, 166, 168, 170, 171번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 이용하여 또 다른 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231을 형질전환시키고, 형질전환된 세포주에서 타겟 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

[208]

[209] 실시예 5-1. 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231의 배양

[210] 미합중국 종균협회(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 입수한 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231은 실시예 4-1과 동일한 조건에서 배양하였다.

[211]

[212] 실시예 5-2. 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231에서 STAT3 siRNA 의 형질주입(transfection)

[213] 상기 실시예 5-1에서 배양된 MDA-MB-231 세포주를 12-웰 플레이트에 웰 당 0.8×10^5 의 세포수로 18시간 동안 RPMI 1640 배양배지에서 37°C, 5 % (v/v) CO₂의 조건으로 배양한 뒤, 배지를 제거한 후 각 웰 당 500 μ l의 Opti-MEM 배지(GIBCO, 미국)를 분주하였다.

[214]

리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max, Invitrogen, 미국) 2 μ l와 Opti-MEM 배지 248 μ l를 혼합하여 혼합액을 제조하였고, 실온에서 5분간 반응시킨 다음, 상기 실시예 1에서 제조되었고, 실시예 4-3-2에서 선택된 서열번호 12, 17, 42, 55, 91, 95, 101, 108, 111, 114, 116, 119, 137, 139, 141, 152, 166, 168, 170, 171번을 센스가닥으로 가지는 siRNA (1 pmole/ μ l 농도) 0.2 μ l, 1 μ l 또는 5 μ l를 Opti-MEM 배지에 첨가하여 최종 250 μ l의 양에 농도가 0.8 nM, 4 nM 또는 20 nM인 siRNA 용액을 제조하였다. 상기 리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max) 혼합액과 siRNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 반응시켜 형질주입용 용액을 제조하였다.

[215] Opti-MEM이 분주된 12-웰 플레이트 각 웰의 종양세포주 당 형질주입용 용액

500 μ l를 분주하고 6시간 동안 배양한 후, Opti-MEM 배지를 제거하고 웰 당 RPMI 1640 배양배지 1 ml을 분주한 다음 24 시간 동안 37°C, 5%(v/v) CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

[216]

[217] 실시예 5-3. 타겟 유전자 mRNA의 정량분석

[218] 상기 실시예 4-3과 같은 방법으로 정량 분석을 수행하였다(도 5 참조). 결과를 바탕으로 0.2 nM, 1 nM 그리고 5 nM의 siRNA 농도 모두에서 높은 효율을 보이는 siRNA 12종을 선택하였다(서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170, 171번의 서열을 센스가닥으로 가짐).

[219]

[220] 실시예 6. 인간 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB-231)에서의 IC₅₀(inhibition concentration 50%) 측정

[221] 상기 실시예 1에서 제조되었고, 실시예 5-3에서 선택된 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170 및 171번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 이용하여 인간 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB-231)를 형질전환시키고, 상기 형질전환된 세포주에서 타겟 유전자의 발현량을 분석하여 IC₅₀값을 확인함으로써 siRNA의 정확한 효율을 분석하였다.

[222]

[223] 실시예 6-1. 인간 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB-231)의 배양

[224] 미합중국 종균협회(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 입수한 인간 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB-231)는 실시예 4-1과 동일한 조건에서 배양하였다.

[225]

[226] 실시예 6-2. 인간 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB-231)에서 목표 siRNA의 형질주입(transfection)

[227] 상기 실시예 4-1 및 5-1에서 배양된 MCF-7 세포주 및 MDA-MB-231 세포주는 37°C, 5%(v/v) CO₂의 조건하에 12-웰 플레이트에서 18시간 동안 RPMI 1640 배양배지에서 배양한 뒤, 배지를 제거한 후 각 웰 당 500 μ l의 Opti-MEM 배지(GIBCO, 미국)를 분주하였다.

[228]

리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max, Invitrogen, 미국) 2 μ l와 Opti-MEM 배지 248 μ l를 혼합하여 혼합액을 제조하였고, 실온에서 5분간 반응시킨 다음, 상기 실시예 1에서 제조되었고, 실시예 5-3에서 선택된 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 116, 119, 137, 141, 170 또는 171번을 센스가닥으로 가지는 siRNA 0.0016 μ l, 0.008 μ l, 0.04 μ l, 0.2 μ l, 1 μ l 또는 5 μ l를 Opti-MEM 배지에 첨가하여 최종 250 μ l의 양에 농도가 6.4 pM, 32 pM, 0.16 nM, 0.8 nM, 4 nM 또는 20 nM인 siRNA 용액을 제조하였다. 상기 리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max) 혼합액과 siRNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 반응시켜 형질주입용 용액을 제조하였다

- [229] 그 후, Opti-MEM이 분주된 종양세포주의 각 웰에 형질주입용 용액을 각각 500 μ l 분주하고 6시간 동안 배양한 후, Opti-MEM 배지를 제거하고 RPMI 1640 배양배지 1 ml을 분주한 다음 24 시간 동안 37°C, 5%(v/v) CO₂의 조건 하에서 배양하였다.
- [230]
- [231] 실시예 6-3. 타겟 유전자 mRNA의 정량분석
- [232] 상기 실시예 6-2에서 형질주입된 세포주로부터 전체 RNA를 추출하여 cDNA를 제조한 뒤, 실시간 PCR(real-time PCR)을 이용하여 실시예 4-3과 동일한 방법으로 타겟 유전자의 mRNA 발현량을 상대정량 하였다(도 6 참조, MCF-7 세포주; 도 7 참조, MDA-MB-231 세포주).
- [233]
- [234] 실시예 6-4. IC₅₀ 분석
- [235] 상기 실시예 6-3에서 확인된 결과를 바탕으로 IC₅₀값을 확인하기 위해 SoftMax Pro 프로그램 (Molecular Devices, USA)을 사용하였다. 타겟 유전자의 발현량 %값을 siRNA에 의한 발현저해율 %값으로 변환하고 이를 siRNA의 처리농도의 로그값에 대해 그래프를 나타낸 후 4-모수로지스틱스모형(4-parameter logistics model)에 대입하여 비선형 회귀분석을 통해 IC₅₀값을 확인하였다 (도 8 참조). 두 종의 유방암세포에서의 IC₅₀값을 통해 각 siRNA의 효능을 명확하게 확인할 수 있었으며 (표 4 참조, 서열번호 17, 42, 101, 119, 137번의 5개 서열을 선택하였다).
- [236]
- [237] [표4]

인간 유방암 세포주에서 STAT3 siRNA의 서열 별 IC₅₀값

siRNA#	IC50, pM	
	MDA-231	MCF-7
119	15	211
101	17	78
137	28	461
42	34	130
17	36	151
12	36	339
171	39	144
114	42	156
141	48	91
108	62	305
170	136	249
116	193	210

[238]

[239] 실시예 7. STAT3 특이적 siRNA에 의한 타겟 유전자의 발현 저해 및 세포성장저해 확인

[240] 상기 실시예 6-4에서 선택된 고효율의 siRNA인 서열번호 17, 42, 101, 119, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 5, 50 nM의 농도로 유방암 세포주, MDA-MB-231을 형질전환시킨 후 타겟 유전자의 발현저해 정도와 세포 성장 저해 정도를 확인하였다.

[241]

[242] 실시예 7-1. 인간 간암 세포주에서 목표 siRNA 의 형질주입(transfection)

[243] 상기 실시예 5-1에서 배양된 MDA-MB-231 세포주를 37°C에서 5 %(v/v) CO₂의 조건하에 12-웰 플레이트에서 웰 당 0.6×10⁵의 세포수로 18시간 동안 RPMI-1640 배양 배지에서 배양한 뒤, 배지를 제거한 후 각 웰 당 500 μ l의 Opti-MEM 배지(GIBCO, 미국)를 분주하였다. 한편, 리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max, Invitrogen, 미국) 2 μ l와 Opti-MEM 배지 248 μ l를 혼합하여 혼합액을 제조하였고, 실온에서 5분간 반응시킨 다음, 상기 실시예 1에서 제조되었고, 실시예 6-3에서 선택된 서열번호 17, 42, 101, 119, 137번을 센스가닥으로 가지는 siRNA (1 pmole/ μ l) 5 μ l 또는 50 μ l를 Opti-MEM 배지에 총량 250 μ l가 되도록 첨가하여 최종 농도가 각각 20 nM 또는 200 nM인 siRNA 용액을 제조하였다. 상기 리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max) 혼합액과 siRNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 반응시켜 형질주입용 용액을 제조하였다.

[244] 그 후, Opti-MEM이 분주된 종양세포주의 각 웰에 형질주입용 용액을 각각 500 μ l 씩 분주하고 6시간 동안 배양한 후, Opti-MEM 배지를 제거하였다. 여기에 RPMI 1640 배양배지 1 ml씩 분주한 다음 72시간 동안 37°C에서 5%(v/v) CO₂의 조건 하에서 배양하였다.

[245]

[246] 실시예 7-2. 타겟 유전자 mRNA의 정량분석

[247] 상기 실시예 4-3과 같은 방법으로 정량 분석을 수행하였다(도 9, A 참조).

[248]

[249] 실시예 7-3. 세포성장저해 확인

[250] 상기 실시예 7-1에서 형질전환된 세포를 웰 당 500 μ l의 DPBS로 두 번 세척한 후 웰 당 500 μ l의 TrypLE™ Express with Phenol Red(1X, Gibco, USA)를 37°C에서 5%(v/v) CO₂의 조건 하에서 2분간 처리하여 세포를 부유시켰다. 웰 당 500 μ l의 RPMI 1640 배양배지를 추가하여 반응을 멈춘 후, 그 중 100 μ l를 동량의 2x 트립판블루 용액(Trypan Blue Solution)과 섞은 후 10 μ l를 취해 LUNATM Automated Cell Counter(Logos Biosystems, USA)를 이용하여 세포의 수를 측정하였다. 측정은 3 반복 수행 하였다(도 9, B 참조).

[251] 세포 수 확인을 통해 세포성장 저해력(cell proliferation inhibitory effect)를 확인한 결과 농도 의존적으로 세포생존력이 감소함을 확인할 수 있었으며, 특히

서열번호 42, 101, 137번을 센스가닥으로 가지는 siRNA가 50 nM 처리된 실험군의 경우 *in vitro*에서 약 40%의 저해력을 갖는 것으로 확인됐다.

[252]

[253] 실시예 8. 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231에서 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진

나노입자(SAMiRNA-STAT3)를 이용한 타겟 유전자의 발현억제 확인

[254] 상기 실시예 3-1에서 제조되었고, 실시예 5-3에서 선택된 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 119, 137, 141, 166, 170, 171번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 나노입자(SAMiRNA-STAT3#12, 17, 42, 101, 108, 114, 119, 137, 141, 166, 170, 171)를 이용하여 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231에서의 타겟 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

[255]

[256] 실시예 8-1. 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231의 배양

[257] 미합중국 종균협회(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 입수한 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231은 실시예 5-1과 동일한 조건에서 배양하였다.

[258]

[259] 실시예 8-2. 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231에서 SAMiRNA-STAT3의 처리(treatment)

[260] 상기 실시예 5-1에서 배양된 MDA-MB-231 세포주를 12-웰 플레이트에 웰 당 0.6×10^5 의 세포수로 18시간 동안 RPMI 1640 배양배지에서 37°C, 5 % (v/v) CO₂의 조건으로 배양하였다.

[261] SAMiRNA 처리액(SAMiRNA treatment solution)을 제조하기 위해 각 973.4 μ l 또는 946.8 μ l의 OPTI-MEM 배지에 각 26.6 μ l 또는 53.2 μ l의 상기 실시예 3-1에서 제조되었고, 실시예 5-3에서 선택된 50 μ g/ml (13.3 uM)농도의 SAMiRNA-STAT3#12, 17, 42, 101, 108, 114, 119, 137, 141, 166, 170, 171 또는 SAMiRNA-CONT를 혼합하여 100 nM 또는 200 nM의 SAMiRNA 처리액을 제조했다.

[262] 배지를 제거한 후 각 웰 당 1 ml의 100 nM 또는 200 nM의 SAMiRNA 처리액을 하루 두 번, 이틀 간 처리하여 37°C, 5%(v/v) CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

[263]

[264] 실시예 8-3. 타겟 유전자 mRNA의 정량분석

[265] 상기 실시예 4-3과 같은 방법으로 정량 분석을 수행하였다(도 10 참조).

[266]

[267] 실시예 9. 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231에서 동물 실험 용 STAT3 특이적 siRNA를 모두 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자(SAMiRNA-STAT3-Combo)의 포도당(Glucose) 리간드 유무에 따른 타겟 유전자의 발현억제 비교 확인

[268] 상기 실시예 3-2에서 제조되었고, 실시예 7-3에서 선택된 서열번호 42, 101,

137번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 동물 실험 용 나노입자(SAMiRNA-STAT3-Combo)와 동일 나노입자에 리간드로써 포도당을 갖는 나노입자(Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo)에 의한 타겟 유전자 발현 억제를 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231에서 비교 분석하였다.

[269]

[270] 실시예 9-1. 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231의 배양

[271] 미합중국 종균협회(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 입수한 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231은 실시예 5-1과 동일한 조건에서 배양하였다.

[272]

[273] 실시예 9-2. 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231에서 나노입자의 처리(treatment)

[274] 상기 실시예 5-1에서 배양된 MDA-MB-231 세포주를 12-웰 플레이트에 웰 당 0.6×10^5 의 세포수로 18시간 동안 RPMI 1640 배양배지에서 37°C , 5 % (v/v) CO_2 의 조건으로 배양하였다.[275] SAMiRNA 처리액(SAMiRNA treatment solution)을 제조하기 위해 각 $973.4 \mu\text{l}$, $946.8 \mu\text{l}$ 또는 $867.0 \mu\text{l}$ 의 OPTI-MEM 배지에 각 $26.6 \mu\text{l}$, $53.2 \mu\text{l}$ 또는 $133.0 \mu\text{l}$ 의 상기 실시예 3-2에서 제조 후 희석된 $50 \mu\text{g/ml}$ ($13.3 \mu\text{M}$) 농도의 SAMiRNA-STAT3-Combo 또는 Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo를 혼합하여 100 nM, 200 nM 또는 500 nM의 SAMiRNA 처리액을 제조했다.[276] 배지를 제거한 후 각 웰 당 1 ml의 100 nM, 200 nM 또는 500 nM의 SAMiRNA 처리액을 하루 두 번, 이틀 간 처리하여 37°C , 5% (v/v) CO_2 조건 하에서 배양하였다.

[277]

[278] 실시예 9-3. 타겟 유전자 mRNA의 정량분석

[279] 상기 실시예 4-3과 같은 방법으로 정량 분석을 수행하였다(도 11 참조). 타겟 유전자의 발현 억제량을 분산에 대한 두 집단의 F-검정을 통해 등분산 가정집단임을 확인한 후, 등분산 가정 두 집단에 대한 t-검정을 수행한 결과, 500 nM 처리 농도에서 $p < 0.05$ 의 유의성으로 Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo 나노입자가 SAMiRNA-STAT3-Combo 보다 타겟 유전자의 발현을 보다 강하게 억제한다는 사실을 알 수 있었다.

[280]

[281] 실시예 10. 동물 종양모델에서 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자의 종양 성장 억제 효과 확인

[282] 상기 실시예 3-2에서 제조되었고, 실시예 7-3에서 선택된, 서열번호 42, 101, 137번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 동물 실험 용 나노입자(SAMiRNA-STAT3-Combo)와 동일 나노입자에 리간드로써 포도당을 갖는 나노입자(Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo)에 의한 마우스 유방암 이종이식 모델에서의 종양성장 억제 효과를 확인하였다.

[283]

[284] 실시예 10-1. 마우스 유방암 이종이식 모델(mouse breast cancer xenograft model)의 제작

[285] 상기 실시예 5-1에서 배양된 인간 유방암 세포주, MDA-MB-231, 3×10^6 cell 을 암컷 누드마우스(Balb/c nude mice)의 왼쪽 옆구리(left flank)에 피하주사(subcutaneous injection)하고, 2일 간격으로 종양크기를 측정하여, 종양세포의 생착 및 성장 유무를 확인하여 모델을 제작하였다.

[286]

[287] 실시예 10-2. STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자에 의한 체중 변화 확인

[288] 상기 실시예 3-2에서 제조된 서열번호 42, 101, 137번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 동물 실험 용 나노입자(SAMiRNA-STAT3-Combo)와 동일 나노입자에 리간드로서 포도당을 갖는

나노입자(Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo)의 동물모델 미정맥 투여에 의한 실험동물의 체중 변화를 확인하기 위해, 2일 간격으로 체중을 측정하였다(표 5 참조, SAMiRNA-STAT3-Combo 투여군; 표 6 참조, Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo 투여군). 그 결과 유의적인 체중 증가 또는 체중 감소 현상은 나타나지 않았으며, 이는 결과 해석에 영향을 줄 수 있는 외부 요인이 없었음을 의미한다.

[289]

[290] [표5]

SAMiRNA-STAT3-Combo 투여 실험군의 체중 측정치

Body Weight(g)	Day 0	Day 2	Day 4	Day 6	Day 8	Day 10	Day 12	Day 14
PBS	22.75±0.79	22.73±1.15	23.15±1.10	23.38±1.33	23.65±1.35	23.48±1.40	23.65±1.72	23.78±1.41
SAMiRNA-CONT (5mpk)	22.88±0.39	22.68±0.75	23.25±0.91	23.35±1.08	23.38±1.14	22.90±0.63	23.33±1.10	23.25±0.93
SAMiRNA-STAT3 Combo (1mpk)	22.72±0.86	22.68±0.65	22.82±0.53	23.10±0.47	22.90±0.34	22.72±0.98	23.06±0.93	22.64±1.05
SAMiRNA-STAT3 Combo (5mpk)	22.94±1.05	22.82±0.90	22.48±1.04	23.58±1.01	23.24±1.01	23.62±0.94	23.54±1.03	23.66±1.26

[291]

[292] [표6]

Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo 투여 실험군의 체중 측정치

Body Weight(g)	Day 0	Day 2	Day 4	Day 6	Day 8	Day 10	Day 12	Day 14
PBS	22.75±0.79	22.73±1.15	23.15±1.10	23.38±1.33	23.65±1.35	23.48±1.40	23.65±1.72	23.78±1.41
Glucose-SAMiRNA-CONT (5mpk)	23.53±0.82	23.13±0.99	23.20±1.01	23.48±1.02	23.88±0.70	23.48±0.68	23.75±1.12	23.88±0.50
Glucose-SAMiRNA-STAT3 Combo (1mpk)	22.30±2.15	21.95±2.55	21.90±2.54	22.30±2.45	21.95±2.22	21.80±2.38	21.68±2.04	22.05±2.29
Glucose-SAMiRNA-STAT3 Combo (5mpk)	22.60±0.62	22.25±0.58	22.68±0.29	23.15±0.83	22.65±0.51	22.50±0.84	23.25±0.54	23.15±1.03

[293]

[294] 실시예 10-3. STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로

이루어진 나노입자에 의한 종양 성장 억제 확인

- [295] 상기 실시예 3-2에서 제조되었고, 실시예 7-3에서 선택된 서열번호 42, 101, 137번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 동물 실험 용

나노입자(SAMiRNA-STAT3-Combo)와 동일 나노입자에 리간드로서 포도당을 갖는 나노입자(Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo)에 의한 마우스 유방암 이종이식 모델에서의 종양 성장 억제 효과를 확인하였다.

[296]

- [297] 실시예 10-3-1. 마우스 유방암 이종이식 모델의 실험군 구성

- [298] 상기 실시예 8-1에서 제작된 마우스 유방암 모델의 종양크기가 평균 140mm³가 되었을 때, 종양크기에 따라 실험군을 군당 6마리씩 편성하였다.

[299]

- [300] 실시예 10-3-2. STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자의 투여

- [301] 상기 실시예 3-2에서 제조되었고, 실시예 7-3에서 선택된 서열번호 42, 101, 137번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 동물 실험 용 나노입자(SAMiRNA-STAT3-Combo)와 동일 나노입자에 리간드로서 포도당을 갖는 나노입자(Glucose-SAMiRNA-STAT3-Combo)를 1mg/kg body weight 또는 5mg/kg body weight의 농도로, 투여량 100 μ l를 1ml 주사기(0.25mm $\times$ 8mm, 31Gauge, BD328820, USA)를 이용하여 2주간 1일 1회, 총 14회 연속으로 실시예 10-3-1에서 구성된 실험동물군에 미정맥 투여(intravenous injection)하였으며, 하기의 모든 투여군은 블라인드(Blind)로 진행되었다.

- [302] 투여군: PBS, PBS(부형제) 투여 대조군; SAMiRNA-CONT, 서열번호 201번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 나노입자 5 mg/kg body weight 투여 대조군; SAMiRNA-STAT3, 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 나노입자(SAMiRNA-CONT-Combo) 1 mg/kg body weight 또는 5 mg/kg body weight 투여 실험군; Glucose-SAMiRNA-CONT, 서열번호 201번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 나노입자 5 mg/kg body weight 투여 대조군; Glucose-SAMiRNA-STAT3, 서열번호 42, 101, 137번의 서열을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 모두 포함하는 나노입자(Glucose-SAMiRNA-CONT-Combo) 1 mg/kg body weight 또는 5 mg/kg body weight 투여 실험군

[303]

- [304] 실시예 10-3-3. 종양 크기 측정을 통한 효과 확인

- [305] 상기 실시예 10-3-2의 14일 연속 투여기간 중, 투여 후 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14일째에 종양의 크기를 측정하였다(도 13, 도 14 참조). 마지막 투여일인 14일째를 기준으로 부형제 대조군인 PBS에 대비하여 SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)은 30%, SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)은 37% 종양 성장 억제효과가 나타났으며, 음성 대조군인 SAMiRNA-CONT에 대비하여

SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)은 24%, SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)은 31%로 유의적인 종양 성장 억제효과가 나타났다. 또한, 부형제 대조군인 PBS에 대비하여 Glucose-SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)은 9%, Glucose-SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)은 46%, 음성 대조군인 Glucose-SAMiRNA-CONT에 대비하여 Glucose-SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)은 -15%, Glucose-SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)은 32%로 확인되어 Glucose-SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)로 인한 종양 성장 억제효과는 나타나지 않았으나 Glucose-SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)에서 유의적으로 종양 성장 억제효과가 나타났다.

[306]

[307] 실시예 10-3-4. 종양 무게 측정을 통한 효과 확인

[308] 마지막 투여인 14일째 투여 후 24시간이 경과한 시점에서 실험동물을 희생시켜 종양의 무게 및 체중 대비 종양무게 비율(%)을 확인하였다(도 15, 도 16 참조). 부형제 대조군인 PBS에 대비하여 SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)은 30%, 27%, SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)은 43%, 43%로 유의적인 항암효과가 나타났으며, 음성 대조군인 SAMiRNA-CONT에 대비하여 SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)은 32%, 30%, SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)은 45%, 46%로 유의적인 항암효과가 나타났다. 또한, 부형제 대조군인 PBS에 대비하여 Glucose-SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)은 -10%, -18%, Glucose-SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)은 40%, 39%로 확인되어 Glucose-SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)로 인한 항암효과는 나타나지 않았으나 Glucose-SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)에서 유의적인 항암효과가 나타났으며, 음성 대조군인 Glucose-SAMiRNA-CONT에 대비하여 Glucose-SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)은 -30%, -40%, Glucose-SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)은 30%, 28%로 확인되어 Glucose-SAMiRNA-STAT3(1mg/kg body weight)로 인한 종양 성장 억제효과는 나타나지 않았으나 Glucose-SAMiRNA-STAT3(5mg/kg body weight)에서 항암효과가 나타났다.

[309]

[310] 실시예 10-4. 실험동물의 취급, 관리 및 처리 규정

[311] 실험동물 취급, 관리, 및 처리에 관한 모든 방법은 (주)바이오니아 동물실험윤리위원회(Committee on Animal Research at Bioneer Corporation, AEC-20081229-0004) 승인 및 규정에 따라 수행하였다. 실험동물은 매일 활동성, 분변상태 등 건강상태를 육안으로 관찰하였으며, 식이 섭취량, 체중 변화 등을 확인하였다.

[312]

[313] 실시예 11. 인간 표피 케라틴 형성 세포주(각질 형성 세포주), HaCaT에서 STAT3 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진

- 나노입자(SAMiRNA-STAT3)를 이용한 타겟 유전자의 발현억제 확인
- [314] 실시예 3-1에서 제조되었고, 실시예 5-3에서 선택된 서열번호 42번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 나노입자(SAMiRNA-STAT3#42)를 이용하여 인간 케라틴 형성 세포주, HaCaT에서의 타겟 유전자의 발현 양상을 분석하였다.
- [315]
- [316] 실시예 11-1. 인간 표피 케라틴 형성 세포주(각질 형성 세포주), HaCaT의 배양
- [317] 미합중국 종균협회(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 입수한 인간 케라틴 형성 세포주, HaCaT은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배양배지(GIBCO/Invitrogen, USA, 10%(v/v) 우태아 혈청, 페니실린 100 units/ml 및 스트렙토마이신 100 $\mu\text{g/ml}$)에서 37 °C, 5%(v/v) CO₂의 조건 하에 배양하였다.
- [318]
- [319] 실시예 11-2. 인간 표피 케라틴 형성 세포주(각질 형성 세포주), HaCaT에서 SAMiRNA-STAT3의 처리(treatment)
- [320] 실시예 11-1에서 배양된 HaCaT 세포주를 12-웰 플레이트에 웰 당 0.6× 10⁵의 세포수로 18시간 동안 DMEM 배양배지에서 37°C, 5 %(v/v) CO₂의 조건으로 배양하였다.
- [321] SAMiRNA 처리액(SAMiRNA treatment solution)을 제조하기 위해 각 997, 994, 989, 972 μl 또는 944 μl 의 OPTI-MEM 배지에 각 2.8, 5.6, 11.2, 28.1 μl 또는 56.1 μl 의 실시예 3-1에서 제조되었고, 실시예 5-3에서 선택된 250 $\mu\text{g/ml}$ (17.8 μM)농도의 SAMiRNA-STAT3#42 또는 SAMiRNA-CONT를 혼합하여 50, 100, 200, 500 nM 또는 1 μM 의 SAMiRNA 처리액을 제조했다.
- [322] 배지를 제거한 후 각 웰 당 1 ml의 50, 100, 200, 500 nM 또는 1 μM 의 SAMiRNA 처리액을 하루 두 번, 이틀 간 처리하여 37°C, 5%(v/v) CO₂ 조건 하에서 배양하였다.
- [323]
- [324] 실시예 11-3. 타겟 유전자 mRNA의 정량분석
- [325] 실시예 4-3과 같은 방법으로 정량 분석을 수행하였다.
- [326] 그 결과, 인간 표피 케라틴 형성 세포주에서 타겟 유전자의 발현량이 siRNA의 농도에 따라 감소하는 것을 확인하였다(도 17).

[327]

산업상 이용가능성

- [328] 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA, 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 압, 피부질환 또는 염증성 질환 치료용 조성물은 부작용 없이 높은 효율로 STAT3의 발현을 억제하여 압, 특히 유방암, 건선을 비롯한 피부질환 또는 염증성 질환에 대한 치료효과를 거둘 수 있으므로, 현재 적절한 치료제가 없는 유방암, 피부질환 또는 염증성 질환의 치료에 매우 유용하게

사용될 수 있다.

[329]

서열목록 Free Text

[330]

전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 내지 서열번호 200에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스가닥(sense strand)과 이에 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는 STAT3 특이적 siRNA.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 siRNA의 센스가닥 또는 안티센스 가닥은 19 내지 31개의 뉴클레오타이드로 이루어진 것을 특징으로 하는 STAT3 특이적 siRNA.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 siRNA는 서열번호 12, 17, 42, 101, 108, 114, 119, 137, 141, 166, 170, 171번으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스가닥과 이에 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는 STAT3 특이적 siRNA.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 siRNA의 센스가닥 또는 안티센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하는 것을 특징으로 하는 STAT3 특이적 siRNA.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 화학적 변형은
뉴클레오타이드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(메틸), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F(불소), -O-2-메톡시에틸 -O-프로필(propyl), -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, -O-3-디메틸아미노프로필, -O-N-메틸아세트아미도 또는 -O-디메틸아미도옥시에틸로의 치환에 의한 변형;
뉴클레오타이드 내 당(sugar) 구조 내의 산소가 황으로 치환된 변형;
뉴클레오타이드결합의 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 보라노포스페이트(boranophosphate), 메틸포스포네이트(methyl phosphonate) 결합으로의 변형;
PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid) 또는 UNA(unlocked nucleic acid) 형태로의 변형;
으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 변형임을 특징으로 하는 STAT3 특이적 siRNA.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 siRNA의 안티센스 가닥의 5' 말단에 하나 이상의 인산기(phosphate group)가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 STAT3 특이적 siRNA.
- [청구항 7] 하기 구조식 (1)의 구조를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
구조식 1
(A_m-J)_n-X-R-Y-B

상기 구조식 (1)에서 A는 친수성 물질 단량체(monomer), B는 소수성 물질, J는 m개의 친수성 물질 단량체 간 또는 m개의 친수성 물질 단량체와 올리고뉴클레오타이드를 서로 연결하는 링커, n은 친수성 물질 단량체가 m개 반복된 친수성 물질 블록의 반복횟수, X와 Y는 각각 독립적으로 단순 공유결합 또는 링커(linker)가 매개된 공유결합, R은 STAT3 특이적 siRNA, m은 1 내지 10의 정수이며, n은 1 내지 10의 정수이다.

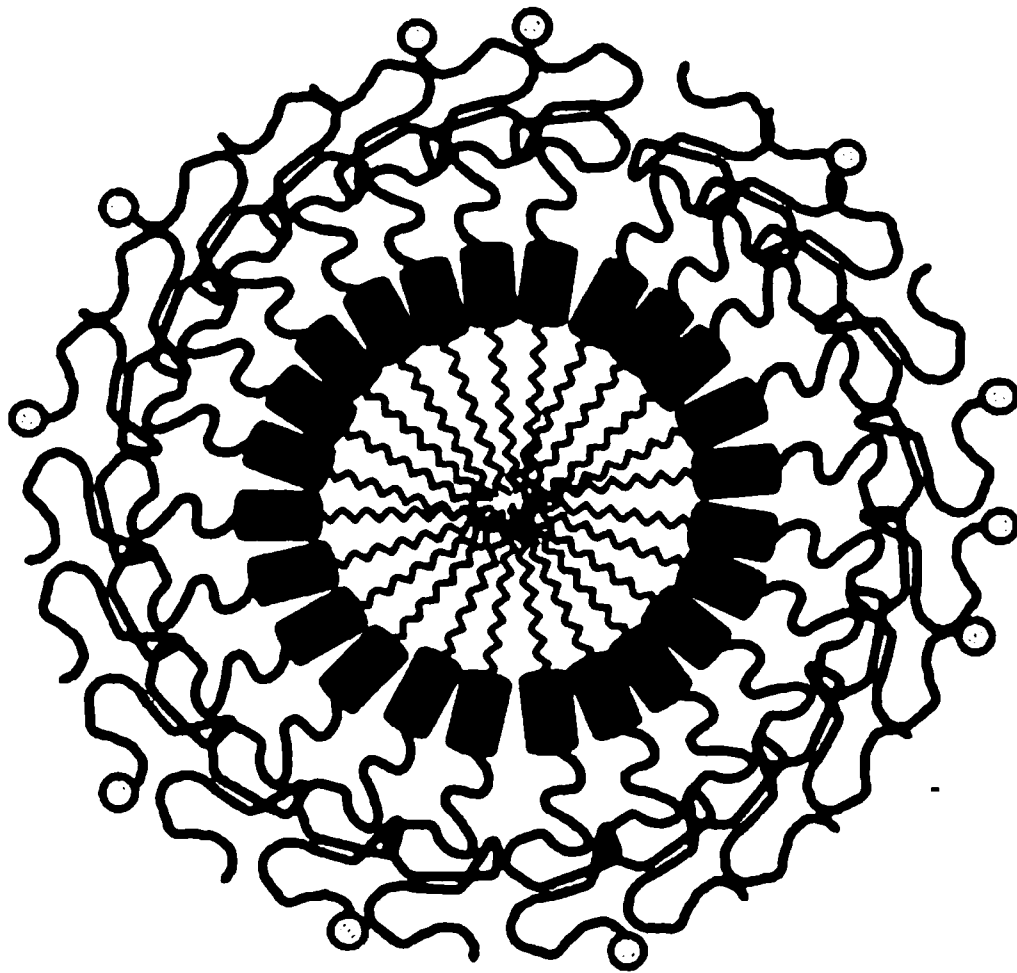
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 R은 제7항에 따른 siRNA의 센스가닥 및 안티센스가닥으로 구성되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 센스가닥 및 안티센스가닥의 5' 말단은 X와 연결되고, 3'말단은 Y와 연결되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 STAT3 특이적 siRNA는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 siRNA임을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 친수성 물질 단량체는 에틸렌 글리콜(EG), 폴리비닐피롤리돈 및 폴리옥사졸린으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 12] 제7항에 있어서,
상기 소수성 물질의 분자량은 250 내지 1,000인 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 소수성 물질은 스테로이드(steroid) 유도체, 글리세라이드(glyceride) 유도체, 글리세롤 에테르(glycerol ether), 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol), C₁₂ 내지 C₅₀의 불포화 또는 포화탄화수소(hydrocarbon),
디아실포스파티딜콜린(diacylphosphatidylcholine), 지방산(fatty acid), 인지질(phospholipid) 및 리포폴리아민(lipopolyamine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 스테로이드(steroid) 유도체는 콜레스테롤, 콜리스탄올, 콜산, 콜리스테릴포르메이트, 코테스타닐포르메이트 및 콜리스타닐아민으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 글리세라이드 유도체는 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

- [청구항 16] 제7항에 있어서,
상기 X 및 Y로 표시되는 공유결합은 비분해성 결합 또는 분해성 결합인 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 비분해성 결합은 아미드 결합 또는 인산화 결합인 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 18] 제16항에 있어서,
상기 분해성 결합은 이황화 결합, 산분해성 결합, 에스테르 결합, 안하이드라이드 결합, 생분해성 결합 또는 효소 분해성 결합인 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 19] 제7항에 있어서,
상기 RNA 구조체는, 친수성 물질에 수용체 매개 내포작용(receptor-mediated endocytosis, RME)을 통해 타겟 세포 내재화(internalization)를 증진시키는 수용체와 특이적으로 결합하는 특성을 가진 리간드(ligand)가 추가적으로 결합된 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 20] 제19항에 있어서,
상기 리간드는 타겟 수용체 특이적 항체나 앵타머, 펩타이드, 엽산(folate), N-아세틸 갈락토사민(N-acetyl Galactosamine, NAG), 포도당(glucose) 및 만노스(mannose) 로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.
- [청구항 21] 다음의 단계를 포함하는, 제7항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조방법:
(1) 고형지지체(solid support)를 기반으로 친수성 물질을 결합 시키는 단계;
(2) 상기 친수성 물질이 결합된 고형지지체를 기반으로 RNA 단일가닥을 합성하는 단계;
(3) 상기 RNA 단일가닥 5' 말단에 소수성 물질을 공유결합 시키는 단계;
(4) 상기 RNA 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 합성하는 단계;
(5) 합성이 완료되면 고형지지체로부터 RNA-고분자 구조체 및 RNA 단일가닥을 분리 정제하는 단계; 및
(6) 제조된 RNA-고분자 구조체와 상보적인 서열의 RNA 단일가닥의 어닐링을 통해 이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하는 단계.
- [청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 고형지지체는 CPG(Controlled Pore Glass)인 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 23] 제21항에 있어서, 상기 RNA 단일가닥 및 상보적인 서열을 포함하는 RNA 단일가닥은 5' 말단에 인산기가 결합된 형태인 것을 특징으로 하는

- 제조방법.
- [청구항 24] 제21항에 있어서, 상기 고형지지체는 기능이 추가로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 25] 제7항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 나노입자(nanoparticle).
- [청구항 26] 제25항에 있어서,
상기 나노입자는 서로 다른 서열을 포함하는 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체가 혼합되어 구성되는 것을 특징으로 하는 나노입자.
- [청구항 27] 제1항의 siRNA, 제7항의 이중나선 올리고 RNA 구조체, 또는 제24항의 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암, 피부질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.
- [청구항 28] 제27항에 있어서,
상기 암은 유방암, 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 전립선암, 유방암, 난소암, 신장암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 29] 제27항에 있어서,
상기 피부질환은 건선, 아토피 백선 및 알레르기성 피부질환으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 30] 제27항에 있어서,
상기 피부질환은 건선, 아토피 백선 및 알레르기성 피부질환으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 31] 제27항의 약학적 조성물을 포함하는 동결 건조된 형태의 제형.
- [청구항 32] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 siRNA, 제7항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체, 제24항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 나노입자, 또는 제27항 내지 제31항에 따른 조성물 또는 제형을 예방 또는 치료를 요하는 개체에게 투여하는 것을 특징으로 하는 암, 피부질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 33] 제32항에 있어서,
상기 암은 유방암, 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 전립선암, 난소암, 신장암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암, 피부질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 34] 제32항에 있어서,
상기 피부질환은 건선, 아토피 백선 및 알레르기성 피부질환으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암, 피부질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 35] 제32항에 있어서,
상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 골다공증, 초면역글로불린 혈증, 신염, 만성 갑상선염, 크론병 및 췌장염으로

이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암, 피부질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법.

[도1]



 Double stranded oilgo RNA molecules

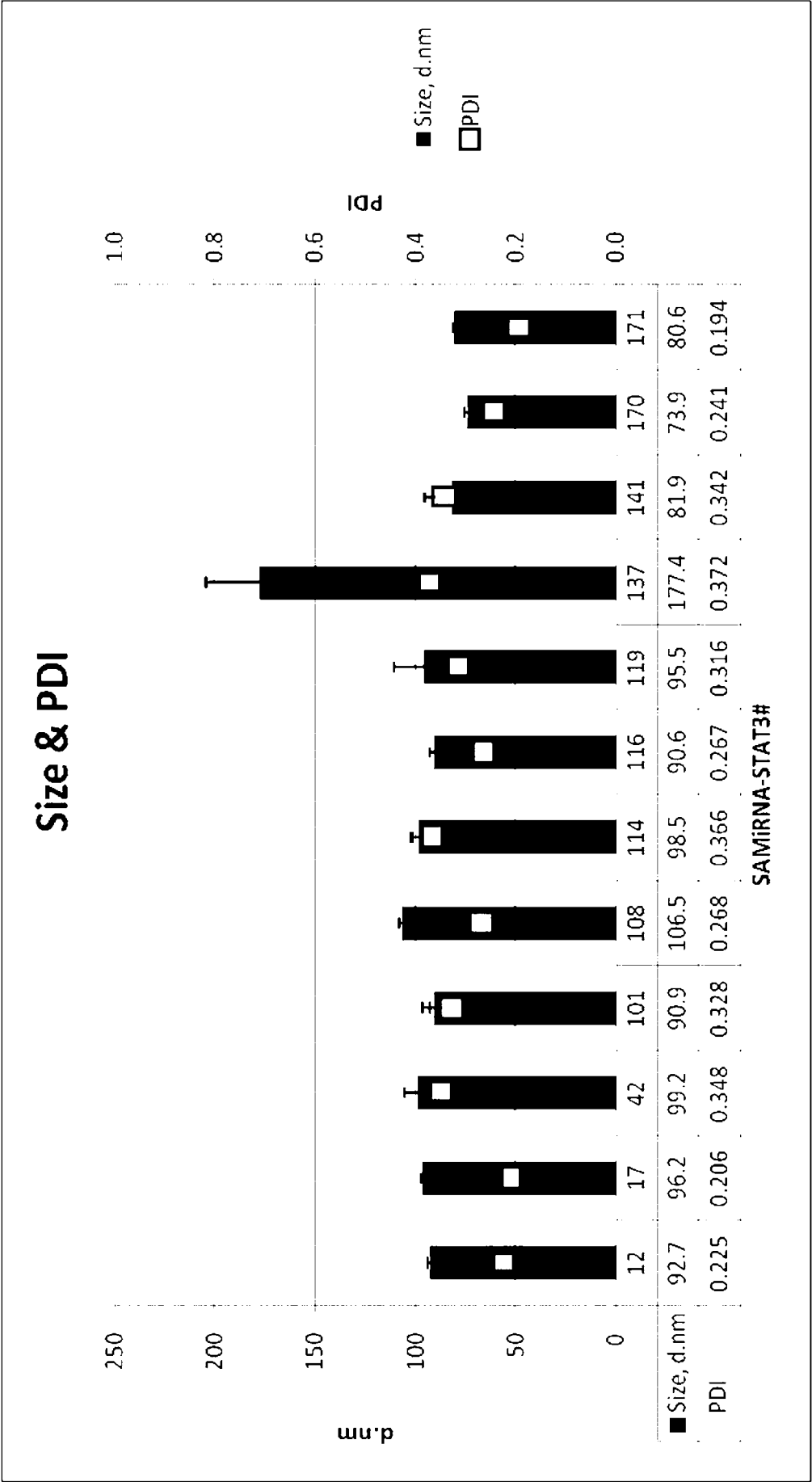
 Hydrophobic compound

 siRNA

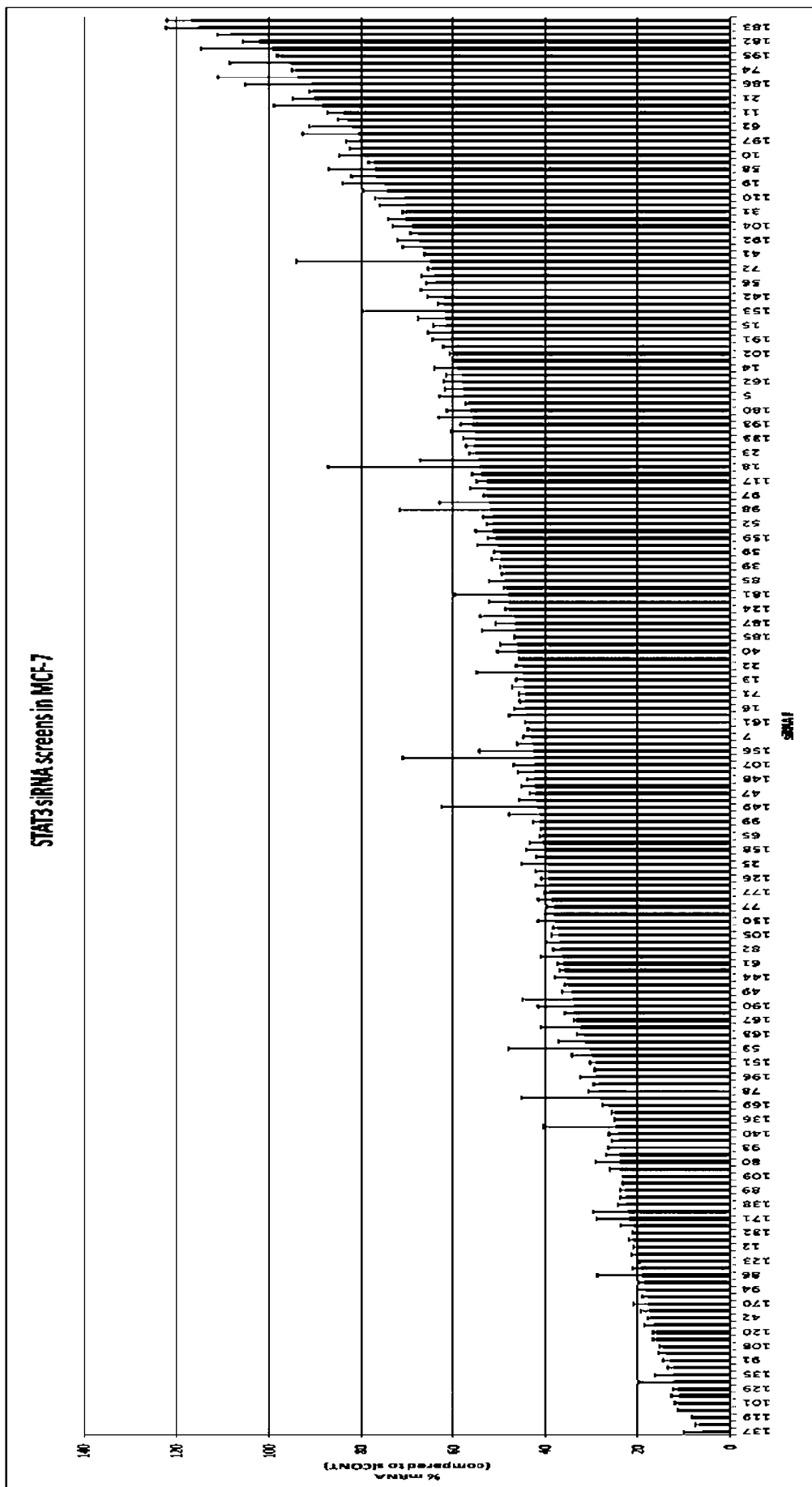
 Hydrophilic compound

 Hydrophilic compound

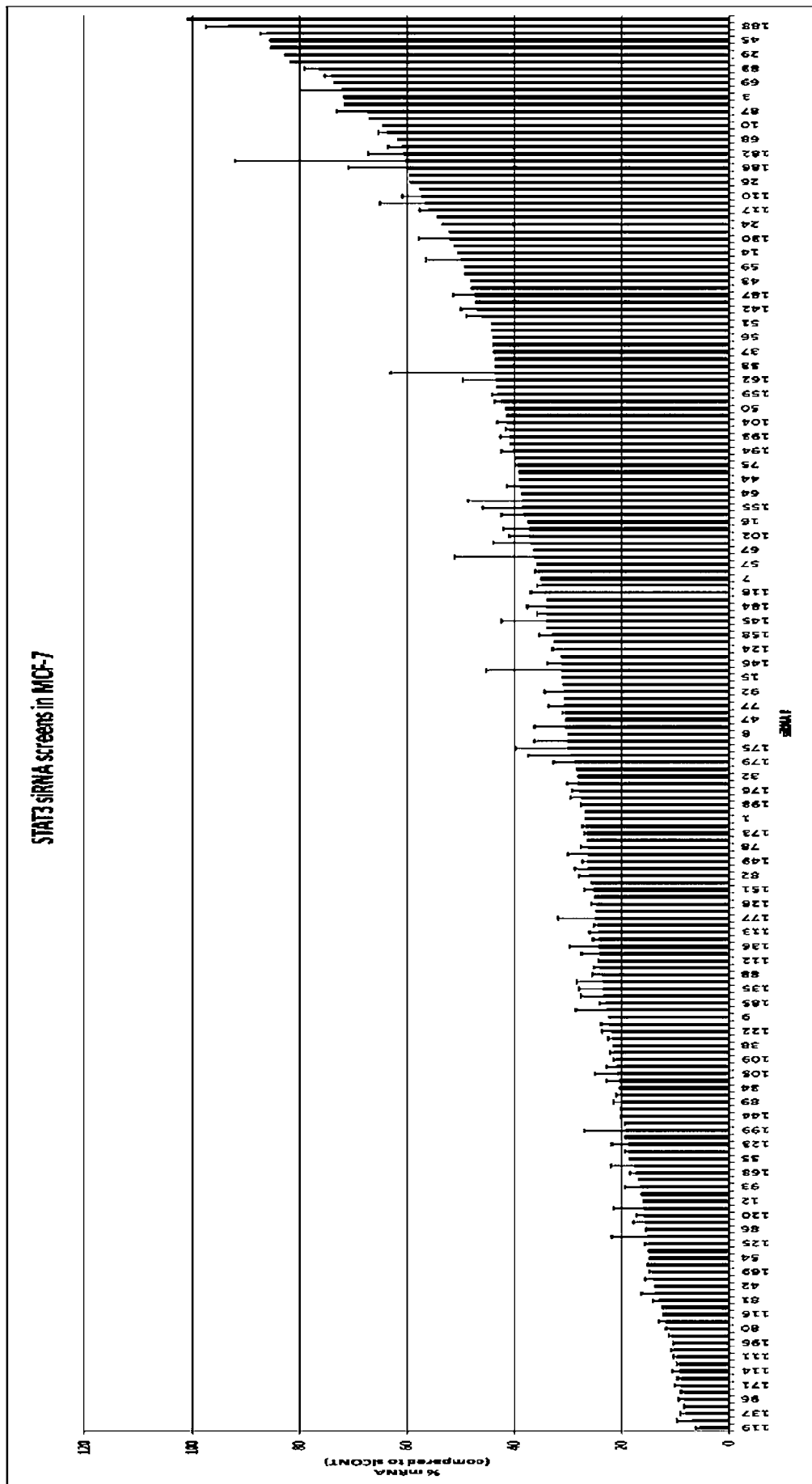
[도2]



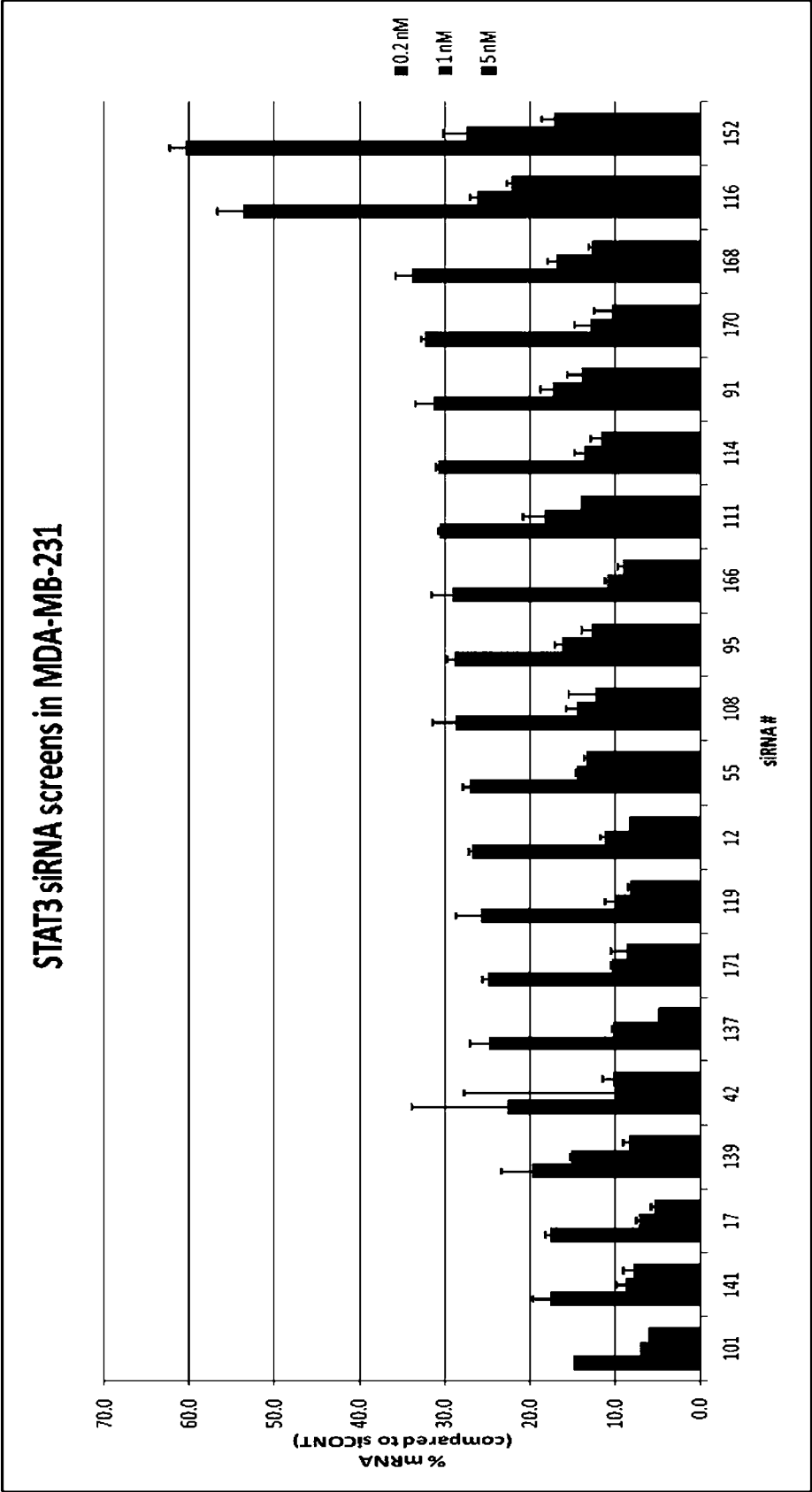
[도3]



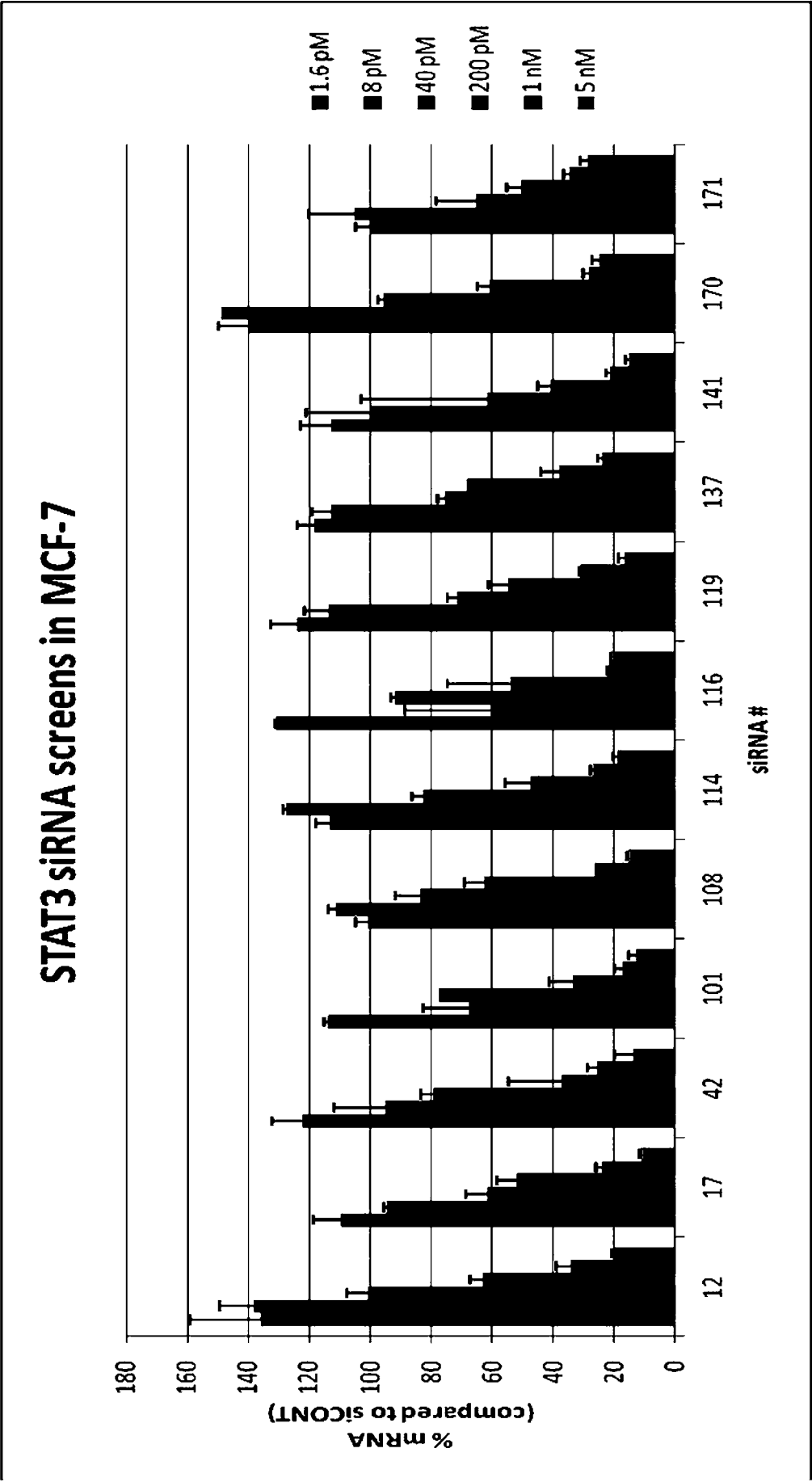
[도4]



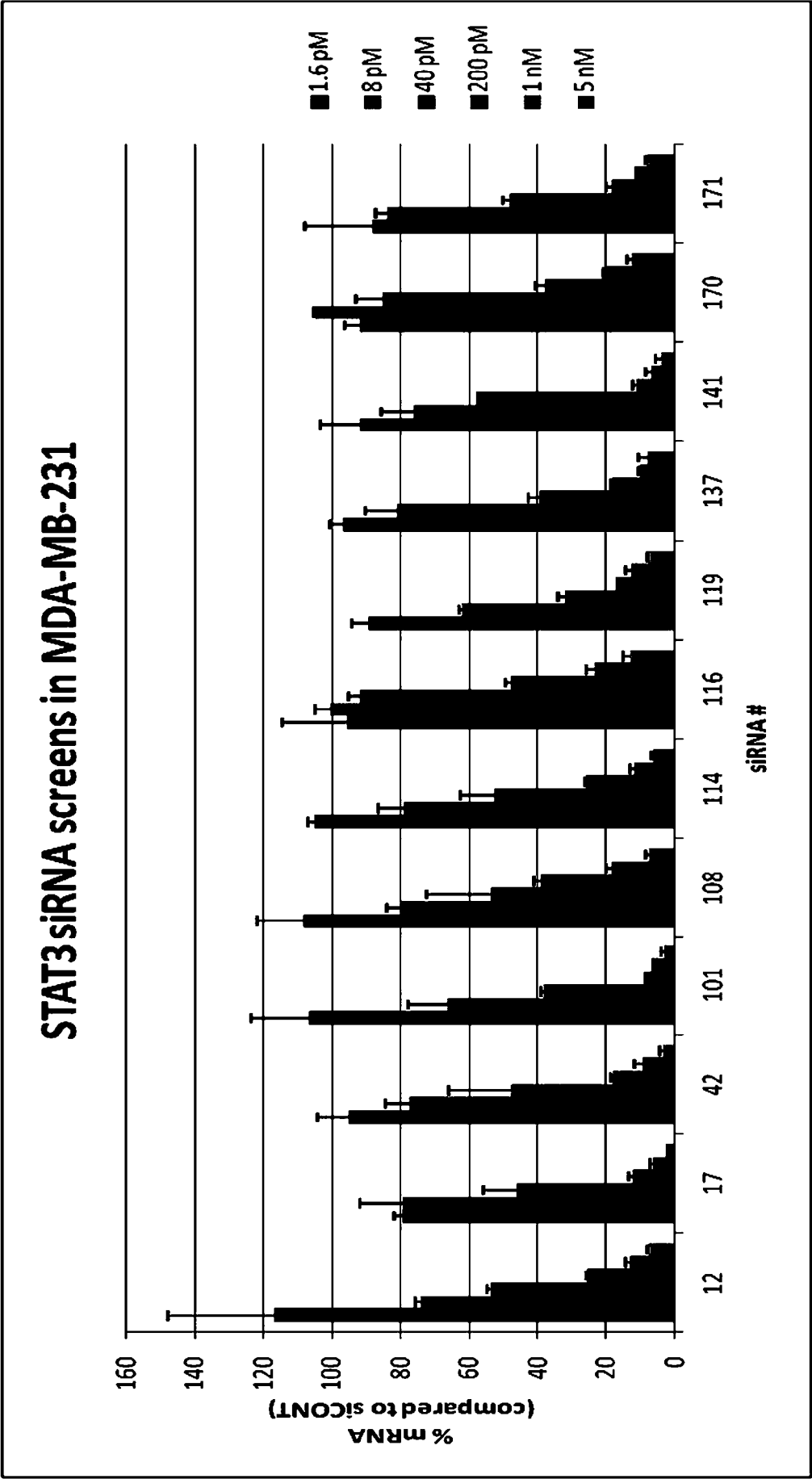
[도5]



[도6]

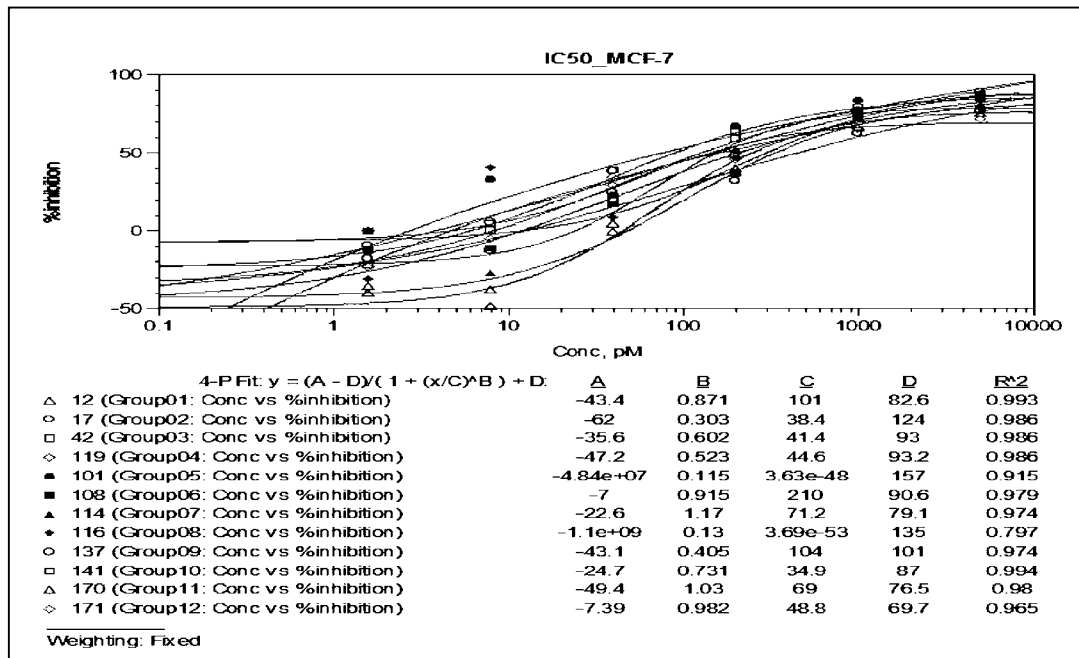


[도7]

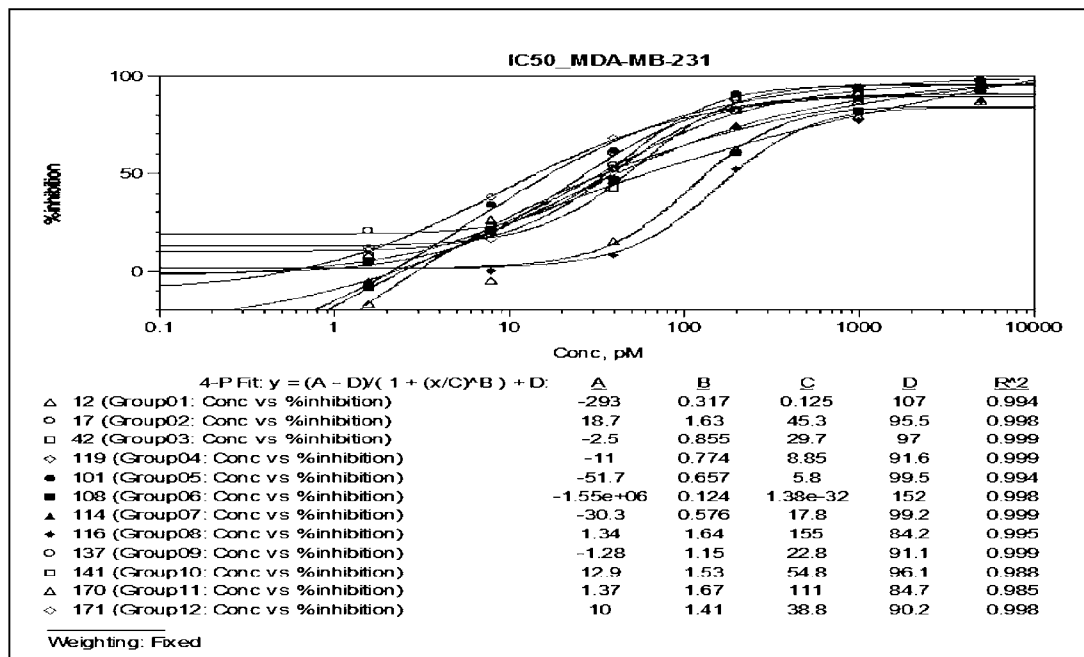


[도8]

A.

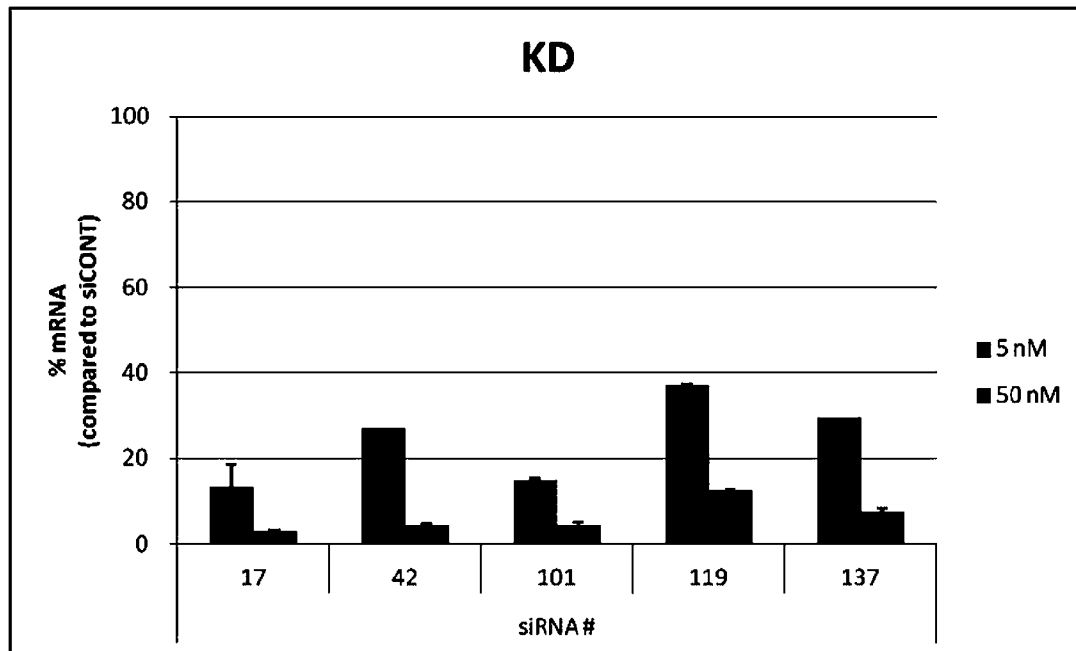


B.

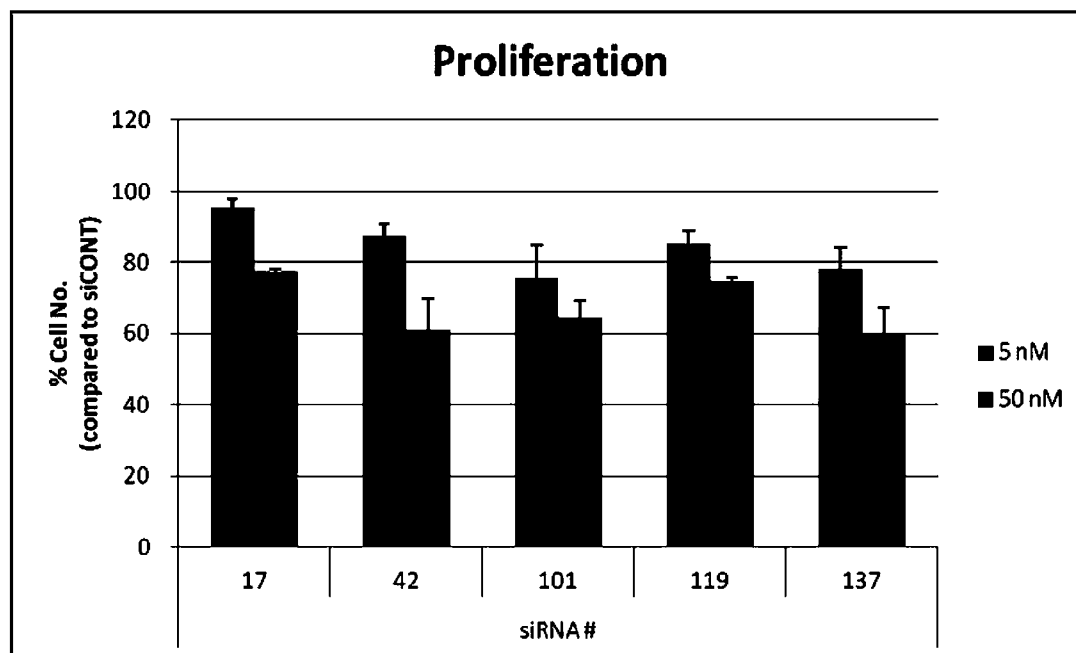


[도9]

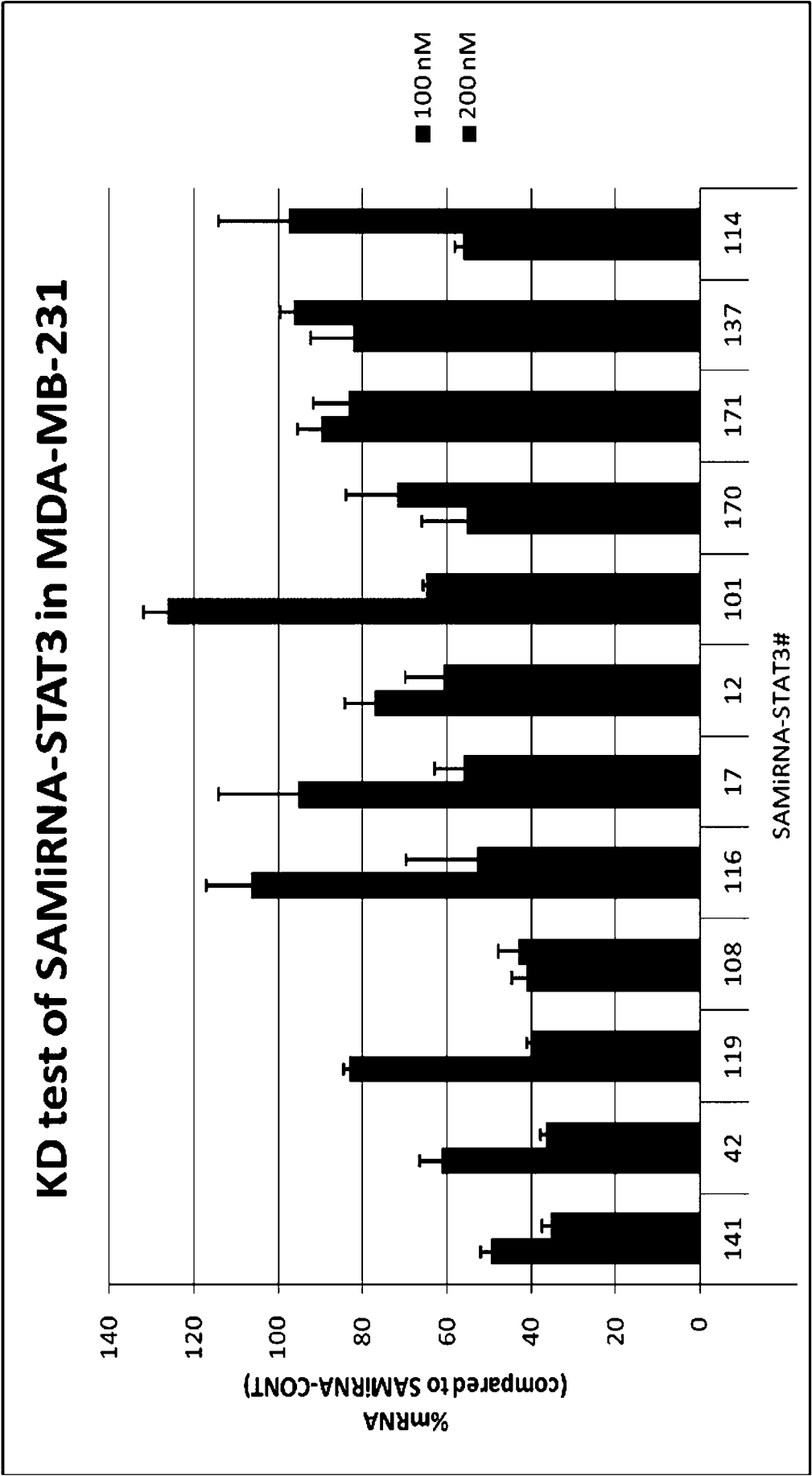
A.



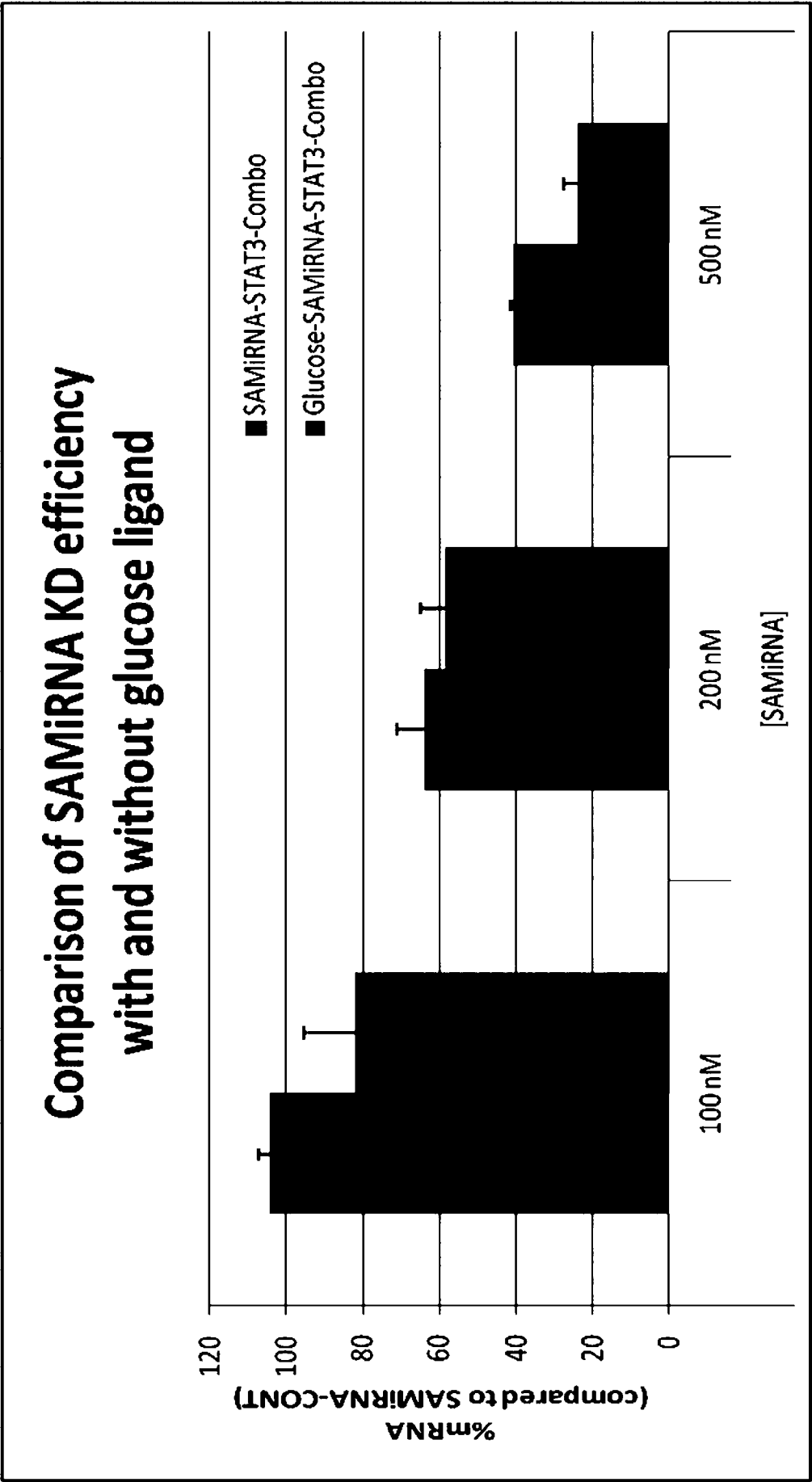
B.



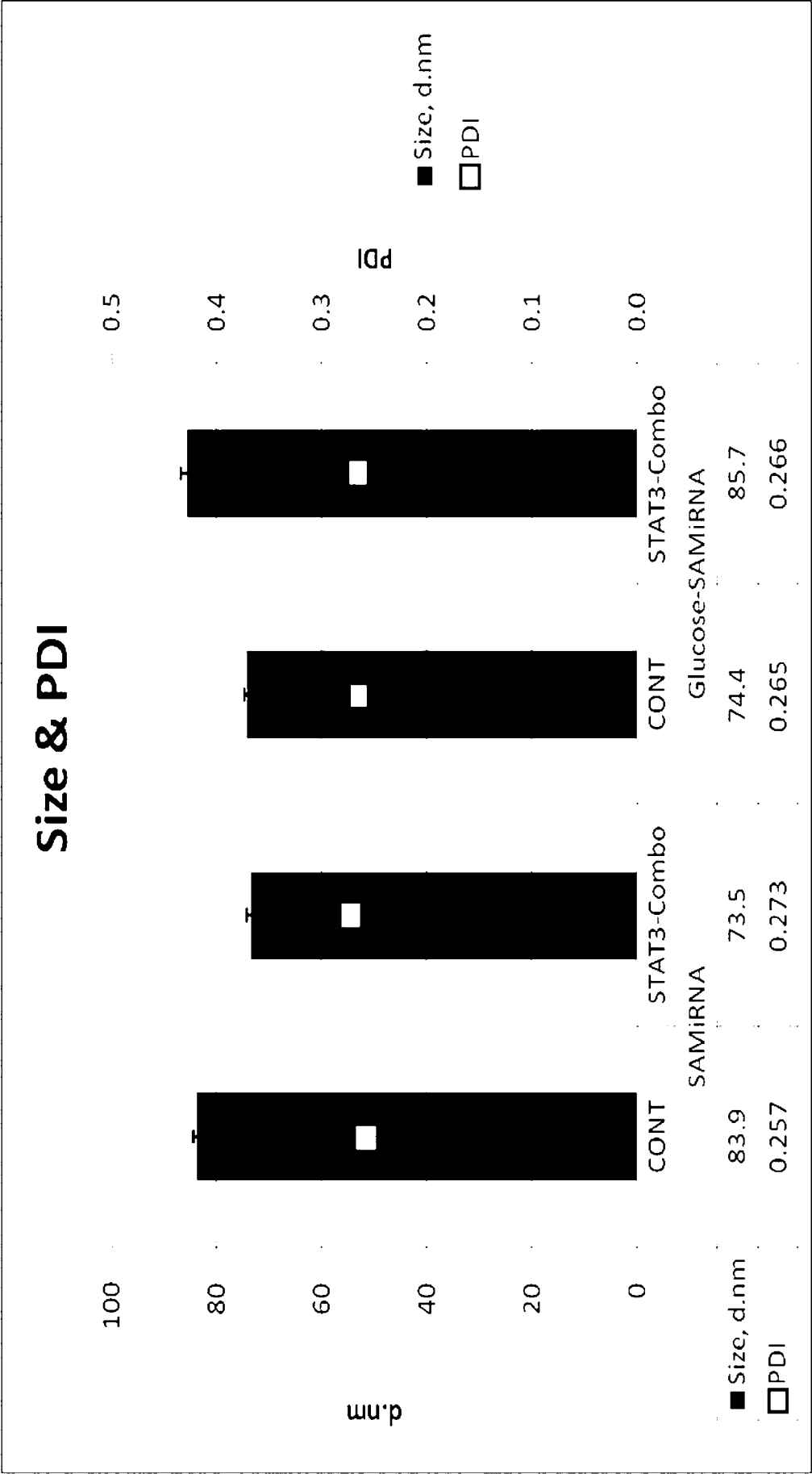
[도10]



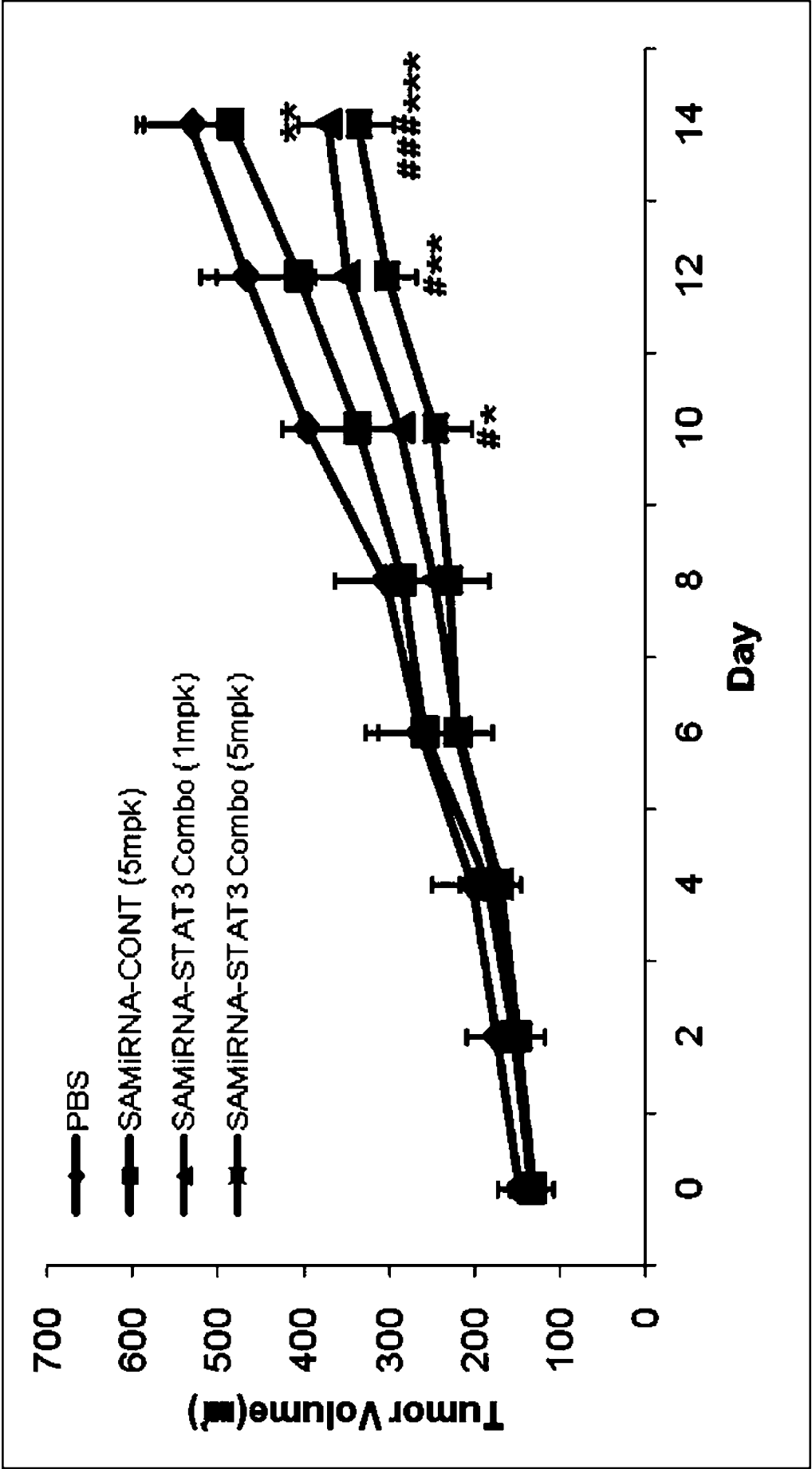
[도11]



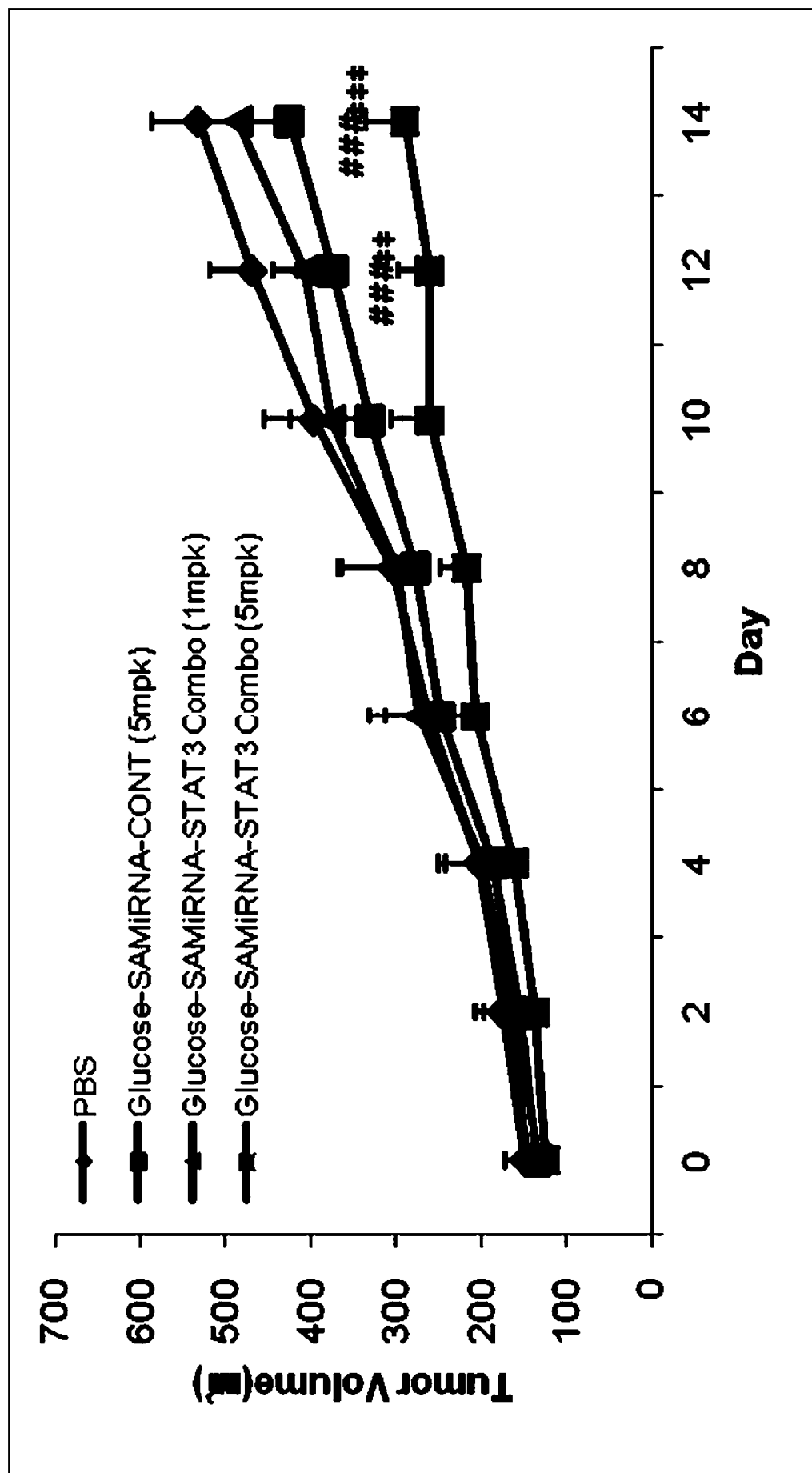
[도12]



[도13]

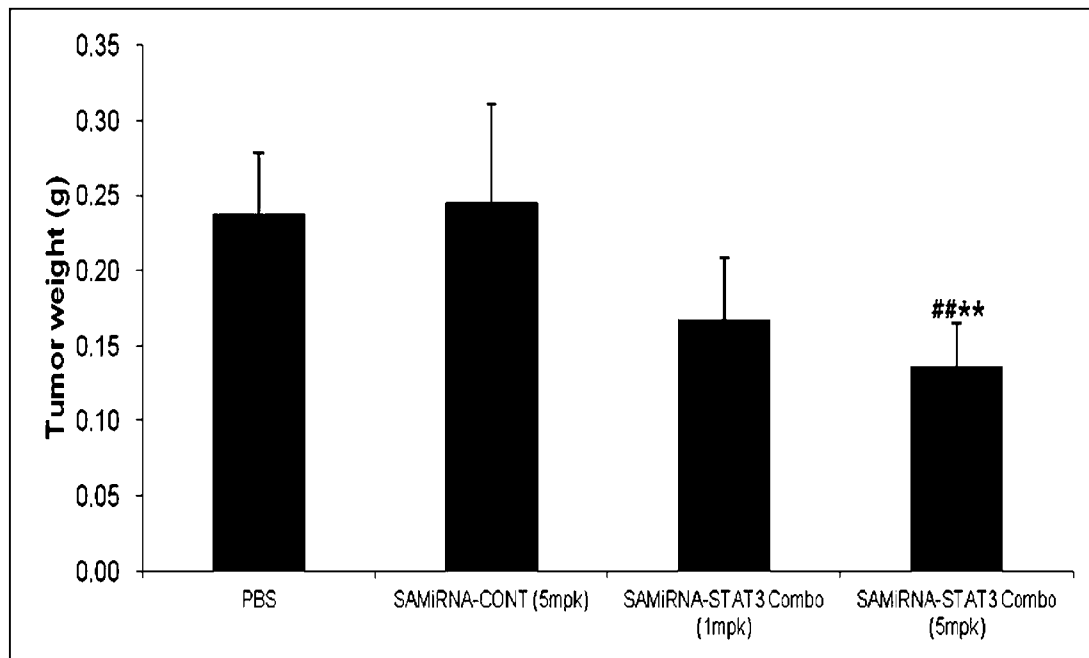


[도14]

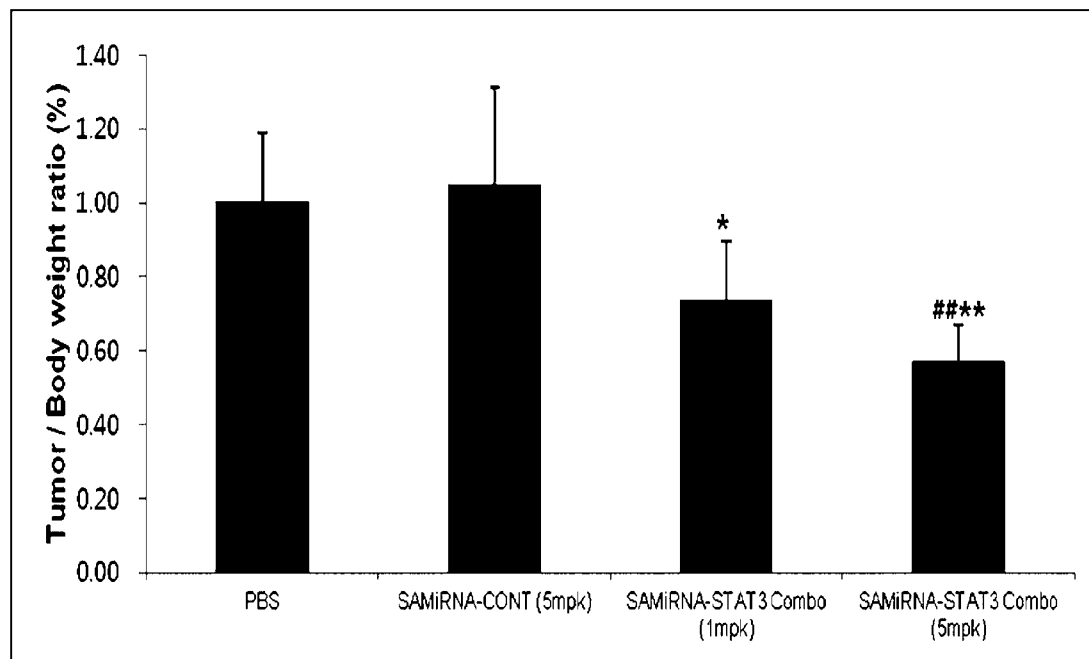


[도15]

A.

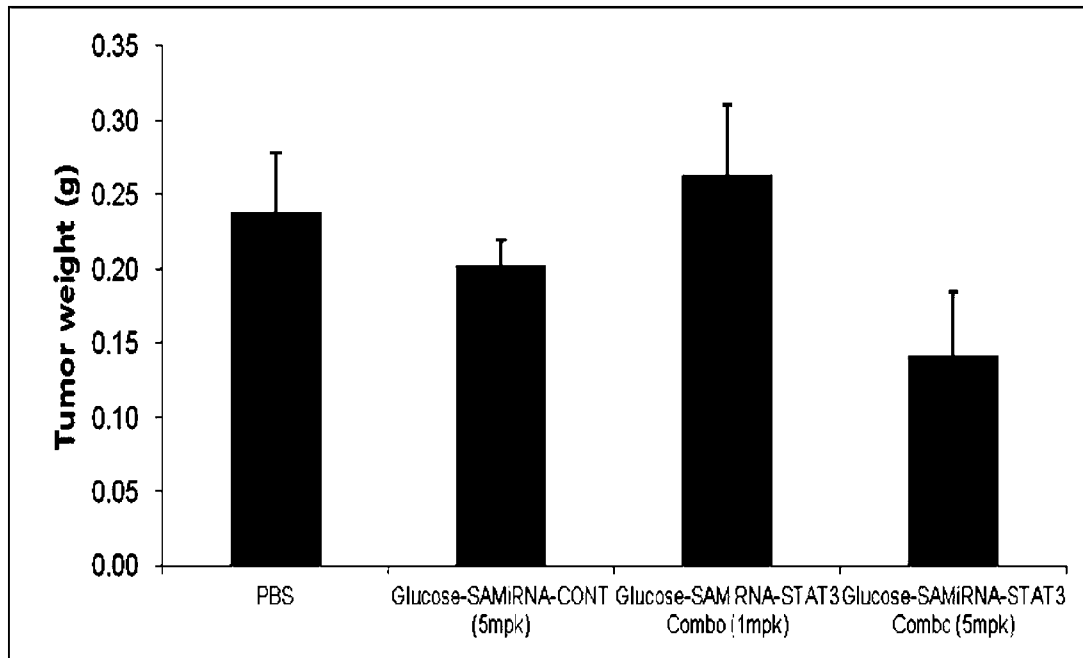


B.

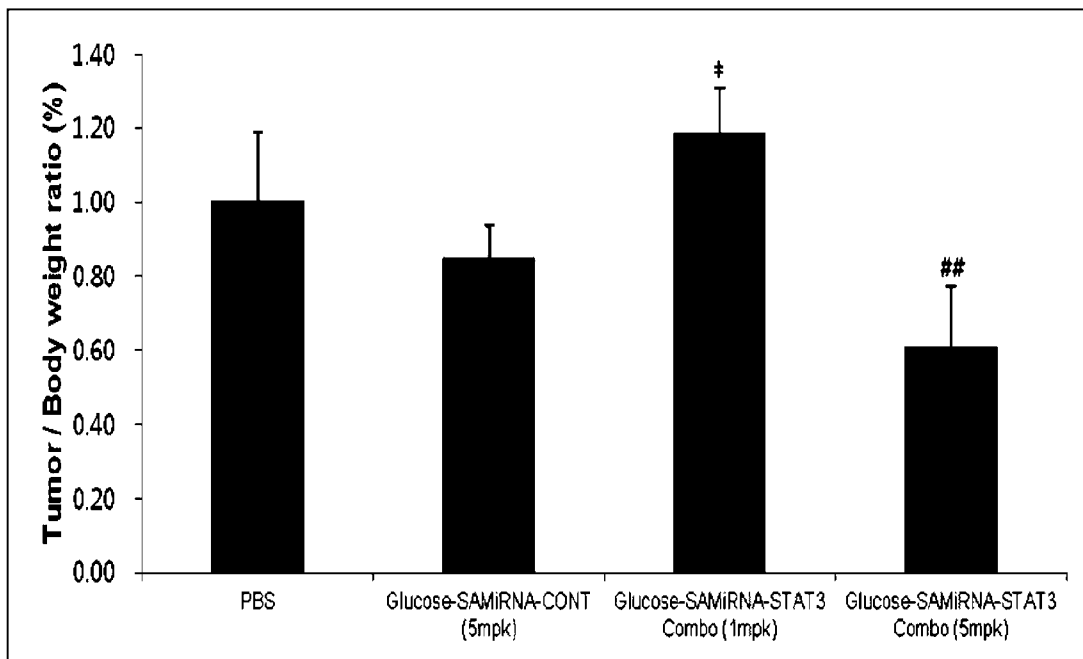


[도16]

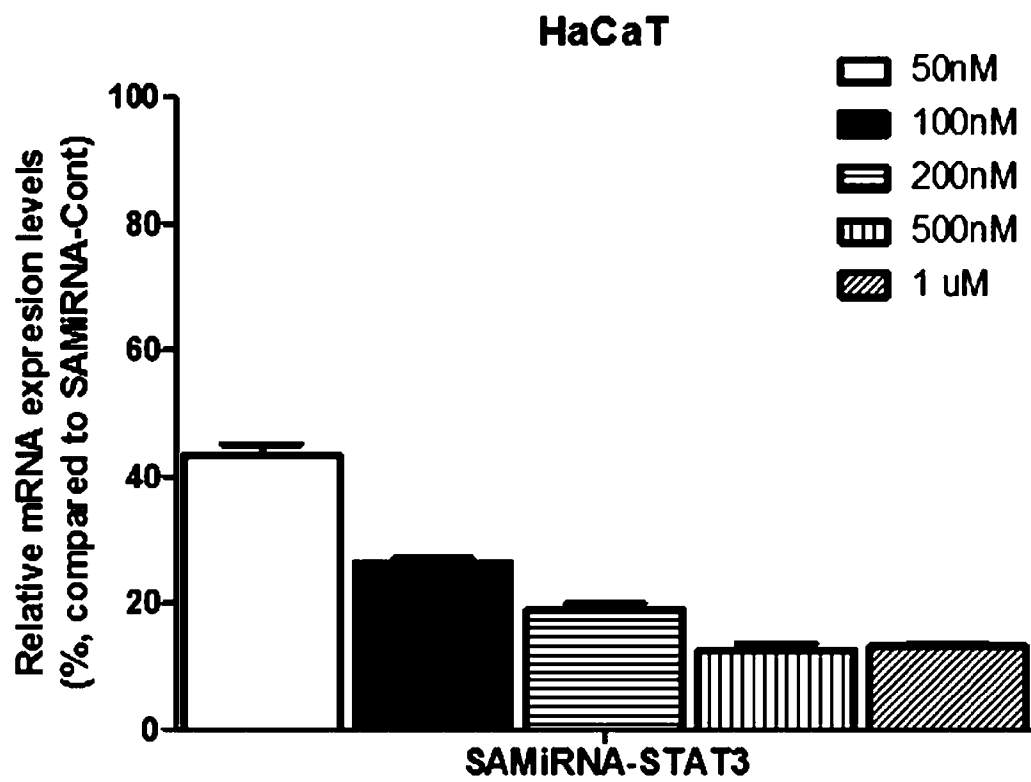
A.



B.



[도17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/006363

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **32-35**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 32-35 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.: **22-24, 26, 28-31, 33-35**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 22-24, 26, 28-31 and 33-35 refer to claims, which cannot be drafted since claims 22-24, 26, 28-31 and 33-35 do not meet the requirement of PCT Rule 6.4(a), and thus claims 22-24, 26, 28-31 and 33-35 are not clear.
3. ☒ Claims Nos.: **21, 25, 27, 32**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/006363**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/113(2010.01)i, A61K 9/19(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/113; A61P 35/00; A61K 48/00; C12N 15/11; C12Q 1/68; A61K 9/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: STAT3 gene, siRNA, double stranded oligo RNA structure

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6727064 B2 (KARRAS, James G.) 27 April 2004 See table 9; example 12; column 7, line 58-column 8, line 13.	1-3,6
Y		4-5
A		7-20
Y	KR 10-0861278 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 01 October 2008 See claims 1-2 and 18.	4-5
A	KR 10-2010-0123214 A (BIONEER CORPORATION) 24 November 2010 See claims 1-10.	1-20
A	KR 10-2012-0042645 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 03 May 2012 See abstract.	1-20
A	CN 1733916 A (PLA THIRD MILITARY MEDICAL UNIVERSITY) 15 February 2006 See claim 1.	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 OCTOBER 2016 (21.10.2016)

Date of mailing of the international search report

21 OCTOBER 2016 (21.10.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/006363

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 6727064 B2	27/04/2004	AU 2004-316504 A1	09/09/2005
		AU 2004-316504 B2	09/12/2010
		AU 2004-316504 B9	09/12/2010
		CN 1914335 A	14/02/2007
		EP 1165594 A1	02/01/2002
		EP 1165594 A4	03/07/2002
		EP 1718762 A1	08/11/2006
		EP 2468865 A1	27/06/2012
		EP 2468865 B1	03/09/2014
		EP 2527444 A2	28/11/2012
		EP 2527444 A3	06/03/2013
		JP 2002-541784 A	10/12/2002
		JP 2007-523074 A	16/08/2007
		JP 2012-213399 A	08/11/2012
		JP 5507617 B2	28/05/2014
		KR 10-0809166 B1	29/02/2008
		KR 10-2006-0116848 A	15/11/2006
		US 2001-029250 A1	11/10/2001
		US 2005-074879 A1	07/04/2005
		US 2006-217339 A1	28/09/2006
		US 2008-051359 A1	28/02/2008
		US 2011-054003 A1	03/03/2011
		US 6159694 A	12/12/2000
		US 7098192 B2	29/08/2006
		US 7307069 B2	11/12/2007
		US 8183363 B2	22/05/2012
		WO 00-61602 A1	19/10/2000
		WO 2005-083124 A1	09/09/2005
KR 10-0861278 B1	01/10/2008	NONE	
KR 10-2010-0123214 A	24/11/2010	CA 2761749 A1	18/11/2010
		CA 2871888 A1	18/11/2010
		CN 102439148 A	02/05/2012
		CN 102439148 B	01/07/2015
		CN 102888404 A	23/01/2013
		CN 102888404 B	17/06/2015
		CN 103233003 A	07/08/2013
		CN 103233003 B	16/09/2015
		EP 2463371 A2	13/06/2012
		EP 2463371 A4	16/01/2013
		EP 2463371 B1	26/08/2015
		EP 2626427 A2	14/08/2013
		EP 2626427 A3	21/08/2013
		EP 2682466 A1	08/01/2014
		EP 2682466 B1	20/07/2016
		JP 2012-526548 A	01/11/2012
		JP 2013-230148 A	14/11/2013
		JP 2015-107115 A	11/06/2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/006363

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 5758381 B2	05/08/2015
		JP 5797688 B2	21/10/2015
		KR 10-1224828 B1	22/01/2013
		US 2012-108803 A1	03/05/2012
		US 2013-096288 A1	18/04/2013
		US 2014-350232 A1	27/11/2014
		US 2014-350233 A1	27/11/2014
		US 8772472 B2	08/07/2014
		US 8779114 B2	15/07/2014
		US 9211343 B2	15/12/2015
		WO 2010-131916 A2	18/11/2010
		WO 2010-131916 A3	07/04/2011
KR 10-2012-0042645 A	03/05/2012	CA 2818662 A1	26/04/2012
		CN 103328633 A	25/09/2013
		EP 2631291 A2	28/08/2013
		EP 2631291 A4	14/01/2015
		JP 2013-544505 A	19/12/2013
		JP 5795072 B2	14/10/2015
		KR 10-1328568 B1	13/11/2013
		US 2013-273657 A1	17/10/2013
		WO 2012-053741 A2	26/04/2012
		WO 2012-053741 A3	14/06/2012
		WO 2012-053741 A9	02/08/2012
CN 1733916 A	15/02/2006	CN 100357436 C	26/12/2007
		CN 1778918 A	31/05/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/113(2010.01)i, A61K 9/19(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i																										
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/113; A61P 35/00; A61K 48/00; C12N 15/11; C12Q 1/68; A61K 9/19 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: STAT3 유전자, siRNA, 이중나선 올리고 RNA 구조체																										
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 6727064 B2 (KARRAS, JAMES G.) 2004.04.27 표 9; 실시예 12; 컬럼 7, 라인 58 - 컬럼 8, 라인 13 참조.</td> <td>1-3, 6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>4-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>7-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-0861278 B1 (고려대학교 산학협력단) 2008.10.01 청구항 1-2 및 18 참조.</td> <td>4-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2010-0123214 A ((주)바이오니아) 2010.11.24 청구항 1-10 참조.</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2012-0042645 A (성균관대학교산학협력단) 2012.05.03 요약 참조.</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1733916 A (PLA THIRD MILITARY MEDICAL UNIVERSITY) 2006.02.15 청구항 1 참조.</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	US 6727064 B2 (KARRAS, JAMES G.) 2004.04.27 표 9; 실시예 12; 컬럼 7, 라인 58 - 컬럼 8, 라인 13 참조.	1-3, 6	Y		4-5	A		7-20	Y	KR 10-0861278 B1 (고려대학교 산학협력단) 2008.10.01 청구항 1-2 및 18 참조.	4-5	A	KR 10-2010-0123214 A ((주)바이오니아) 2010.11.24 청구항 1-10 참조.	1-20	A	KR 10-2012-0042645 A (성균관대학교산학협력단) 2012.05.03 요약 참조.	1-20	A	CN 1733916 A (PLA THIRD MILITARY MEDICAL UNIVERSITY) 2006.02.15 청구항 1 참조.	1-20
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																								
X	US 6727064 B2 (KARRAS, JAMES G.) 2004.04.27 표 9; 실시예 12; 컬럼 7, 라인 58 - 컬럼 8, 라인 13 참조.	1-3, 6																								
Y		4-5																								
A		7-20																								
Y	KR 10-0861278 B1 (고려대학교 산학협력단) 2008.10.01 청구항 1-2 및 18 참조.	4-5																								
A	KR 10-2010-0123214 A ((주)바이오니아) 2010.11.24 청구항 1-10 참조.	1-20																								
A	KR 10-2012-0042645 A (성균관대학교산학협력단) 2012.05.03 요약 참조.	1-20																								
A	CN 1733916 A (PLA THIRD MILITARY MEDICAL UNIVERSITY) 2006.02.15 청구항 1 참조.	1-20																								
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																										
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																										
국제조사의 실제 완료일 2016년 10월 21일 (21.10.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 10월 21일 (21.10.2016)																								
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 조기훈 전화번호 +82-42-481-5655 																								

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 32-35
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 32-35는 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☒ 청구항: 22-24, 26, 28-31, 33-35
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 22-24, 26, 28-31 및 33-35는 PCT 규칙 6.4(a)의 규정을 충족하지 않아 부작성되는 청구항을 인용하고 있어서 청구하는 바가 불명확합니다.
3. ☒ 청구항: 21, 25, 27, 32
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 6727064 B2	2004/04/27	AU 2004-316504 A1 AU 2004-316504 B2 AU 2004-316504 B9 CN 1914335 A EP 1165594 A1 EP 1165594 A4 EP 1718762 A1 EP 2468865 A1 EP 2468865 B1 EP 2527444 A2 EP 2527444 A3 JP 2002-541784 A JP 2007-523074 A JP 2012-213399 A JP 5507617 B2 KR 10-0809166 B1 KR 10-2006-0116848 A US 2001-029250 A1 US 2005-074879 A1 US 2006-217339 A1 US 2008-051359 A1 US 2011-054003 A1 US 6159694 A US 7098192 B2 US 7307069 B2 US 8183363 B2 WO 00-61602 A1 WO 2005-083124 A1	2005/09/09 2010/12/09 2010/12/09 2007/02/14 2002/01/02 2002/07/03 2006/11/08 2012/06/27 2014/09/03 2012/11/28 2013/03/06 2002/12/10 2007/08/16 2012/11/08 2014/05/28 2008/02/29 2006/11/15 2001/10/11 2005/04/07 2006/09/28 2008/02/28 2011/03/03 2000/12/12 2006/08/29 2007/12/11 2012/05/22 2000/10/19 2005/09/09
KR 10-0861278 B1	2008/10/01	없음	
KR 10-2010-0123214 A	2010/11/24	CA 2761749 A1 CA 2871888 A1 CN 102439148 A CN 102439148 B CN 102888404 A CN 102888404 B CN 103233003 A CN 103233003 B EP 2463371 A2 EP 2463371 A4 EP 2463371 B1 EP 2626427 A2 EP 2626427 A3 EP 2682466 A1 EP 2682466 B1 JP 2012-526548 A JP 2013-230148 A JP 2015-107115 A	2010/11/18 2010/11/18 2012/05/02 2015/07/01 2013/01/23 2015/06/17 2013/08/07 2015/09/16 2012/06/13 2013/01/16 2015/08/26 2013/08/14 2013/08/21 2014/01/08 2016/07/20 2012/11/01 2013/11/14 2015/06/11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 5758381 B2	2015/08/05
		JP 5797688 B2	2015/10/21
		KR 10-1224828 B1	2013/01/22
		US 2012-108803 A1	2012/05/03
		US 2013-096288 A1	2013/04/18
		US 2014-350232 A1	2014/11/27
		US 2014-350233 A1	2014/11/27
		US 8772472 B2	2014/07/08
		US 8779114 B2	2014/07/15
		US 9211343 B2	2015/12/15
		WO 2010-131916 A2	2010/11/18
		WO 2010-131916 A3	2011/04/07
KR 10-2012-0042645 A	2012/05/03	CA 2818662 A1	2012/04/26
		CN 103328633 A	2013/09/25
		EP 2631291 A2	2013/08/28
		EP 2631291 A4	2015/01/14
		JP 2013-544505 A	2013/12/19
		JP 5795072 B2	2015/10/14
		KR 10-1328568 B1	2013/11/13
		US 2013-273657 A1	2013/10/17
		WO 2012-053741 A2	2012/04/26
		WO 2012-053741 A3	2012/06/14
		WO 2012-053741 A9	2012/08/02
CN 1733916 A	2006/02/15	CN 100357436 C	2007/12/26
		CN 1778918 A	2006/05/31