



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0005609
(43) 공개일자 2023년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0086531
(22) 출원일자 2021년07월01일
심사청구일자 2021년07월01일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
황병희
인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 15, 230
4동 2701호
이재욱
인천광역시 연수구 먼우금로 123
(74) 대리인
차준용

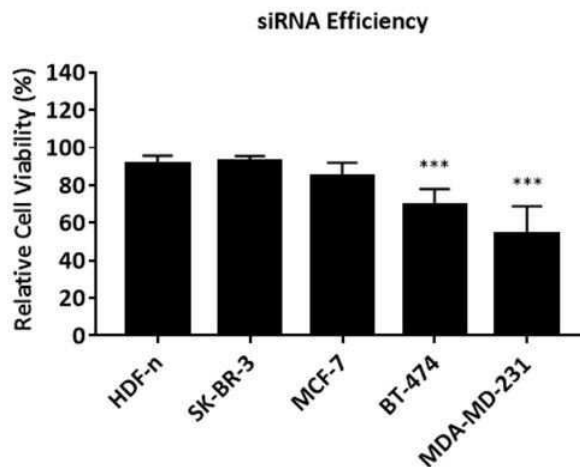
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 신규 특이적 항암 및 항염증 siRNA 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규 특이적 항암 및 항염증 siRNA 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 항암 및 항염증 siRNA를 포함하는 항암 및 항염증 약학적 조성물, 항암 및 항염증 보조제, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 서열목록의 염기서열을 갖는 항암 및 항염증 siRNA 및 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는 특이적 항암 및 항염증 조성물을 제공한다. 본 발명은 특정 유방암 세포주에 처리하였을 때 사멸이 일어나는 신규 항암 siRNA를 제공한다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711107748
과제번호	2019R1F1A1063316
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	암치료를 위한 비바이러스 정밀 유전자 치료 원천기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2019.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 중 3' 말단에서 2번째부터 8번째까지의 염기서열을 포함하는 항암 및 항염증 siRNA.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항암 및 항염증 siRNA는 상기 서열목록의 염기서열을 갖는 항암 및 항염증 siRNA.

청구항 3

서열목록 중 3' 말단에서 2번째부터 8번째까지의 염기서열을 포함하는 항암 및 항염증 siRNA를 유효성분으로 포함하는 특이적 항암 및 항염증 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 항암 및 항염증 siRNA는 상기 서열목록의 염기서열을 갖는 특이적 항암 및 항염증 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 항암 및 항염증 siRNA는 인간 피부 세포주인 HDF-n에 대하여 200 nM 이하의 농도에서 91% 이상의 세포 생존율을 나타내는 것을 특징으로 하는 특이적 항암 및 항염증 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 항암 및 항염증 siRNA를 삼중음성 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 대하여 처리한 경우, 100 nM 이상의 농도에서 특이적인 항암 효과가 나타나는 것을 특징으로 하는 특이적 항암 및 항염증 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 항암 및 항염증 siRNA를 삼중양성 유방암 세포주인 BT-474에 대하여 처리한 경우, 100 nM 이상의 농도에서 특이적인 항암 효과가 나타나는 것을 특징으로 하는 특이적 항암 및 항염증 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서,

상기 항암 및 항염증 siRNA를 ER/PR 양성 유방암 세포주인 MCF-7에 대하여 처리한 경우, 200 nM 이상의 농도에 서 특이적인 항암 효과가 나타나는 것을 특징으로 하는 특이적 항암 및 항염증 조성물.

청구항 9

상기 제3항 내지 제8항 중 어느 한 항의 특이적 항암 및 항염증 조성물을 포함하는 암 및 염증 치료 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 암 및 염증 치료 조성물로 치료 및 예방이 가능한 암은 유방암, 위암, 대장암, 췌장암, 전립선암, 간암, 난소암, 신장암, 뇌암, 혈액암 및 폐암 중의 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 및 염증 치료 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 암 및 염증 치료 조성물로 치료 및 예방이 가능한 염증은 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 조면역글로불린 혈증, 만성 갑상선염, 크론병, 폐렴 및 췌장염 중의 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 및 염증 치료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 특이적 항암 및 항염증 siRNA 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 항암 및 항염증 siRNA를 포함하는 항암 및 항염증 약학적 조성물, 항암 및 항염증 보조제, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 유전적 질환으로 비정상적인 분열을 통해 종양을 형성하며, 악화되면 악성종양이 되어 주변 조직으로 전이 되고 생명을 위협하게 된다. 암이 발생하는 주원인은 세포의 성장 및 분열과 관련된 유전자들의 비정상적인 과다발현이나 이를 제어하는 유전자에 돌연변이가 생겨 발생하게 된다. 암은 발생하는 기관에 따라 다양한 종류가 있으며 암의 한 종류인 유방암은 여성 발병률 1위이다. 유방암은 표면에 발현되는 수용체에 따라 여러 타입으로 나뉘어지며, 이로 인해 치료 방법 또한 타입에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어 대부분의 유방암은 에스트로겐 같은 호르몬에 의해 성장이 촉진되기 때문에 에스트로겐 호르몬 수용체를 억제하거나 호르몬 요법을 사용하면 치료할 수 있다. 하지만 유방암의 종류 중 하나인 삼중음성 유방암은 전체 유방암의 20% 정도를 차지하고, 공격적이기 때문에 예후가 좋지 않으나, 호르몬 수용체가 존재하지 않아 기존 치료법으로는 치료할 수 없으므로 새로운 치료법의 개발이 필요하다.

[0003] 유전자 치료는 질병을 치료하거나 예방하기 위해 유전자를 사용하는 기술로 암 등의 난치병 혹은 불치병의 치료 하기 위해 활발히 개발되고 있다. 암 치료 목적의 유전자 치료 기술 중 하나인 siRNA (small interfering RNA)는 21~23 bp 길이의 RNA 듀플렉스로 RISC 복합체를 구성하여 mRNA를 절단하는 방식으로 유전자 발현을 억제한다. siRNA를 이용하여 암 발생에 필수적인 유전자의 발현을 억제할 경우, 암세포의 성장억제 또는 암세포의 사멸을 통해 암을 치료할 수 있다. 그러므로 이러한 작용기작을 이용하면 삼중음성 유방암에 대한 새로운 치료법을 개발할 수 있다. 그러나 siRNA는 암세포 뿐만 아니라 일반 세포에도 전달될 수 있으며 그 경우 일반세포를 사멸시킬 수 있는 가능성이 존재하기 때문에 특이적으로 암을 사멸시킬 수 있는 siRNA를 개발할 필요가 있다.

[0004] 본 발명자들은 위와 같은 문제점을 해결하기 위해 일반 세포에 대한 독성이 낮고, 선택적으로 암세포에 대해 독성이 높은 새로운 항암 siRNA 서열을 찾고자 노력하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2012-0095263호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 위와 같은 문제점들을 해결하기 위해 일반 세포에 대한 독성이 낮고, 특이적으로 유방암 세포의 성장 억제 및 사멸이 가능한 새로운 항암 siRNA를 찾기 위해 노력하였다. 그 결과, 특정 유방암 세포주에 처리하였을 때 사멸이 일어나는 신규 항암 siRNA를 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 서열목록 중 3' 말단에서 2번째부터 8번째까지의 염기서열을 포함하는 항암 및 항염증 siRNA를 제공한다.

[0010] 상기 항암 및 항염증 siRNA는 서열목록의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명의 다른 실시형태에 따르면, 서열목록 중 3' 말단에서 2번째부터 8번째까지의 염기서열을 포함하는 항암 및 항염증 siRNA를 유효성분으로 포함하는 특이적 항암 및 항염증 조성물을 제공한다.

[0012] 상기 항암 및 항염증 siRNA는 인간 피부 세포주인 HDF-n에 대하여 200 nM 이하의 농도에서 91% 이상의 세포 생존율을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0013] 상기 항암 및 항염증 siRNA를 삼중음성 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 대하여 처리한 경우, 100 nM 이상의 농도에서 특이적인 항암 효과가 나타나는 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 항암 및 항염증 siRNA를 삼중양성 유방암 세포주인 BT-474에 대하여 처리한 경우, 100 nM 이상의 농도에서 특이적인 항암 효과가 나타나는 것을 특징으로 한다.

[0015] 상기 항암 및 항염증 siRNA를 ER/PR 양성 유방암 세포주인 MCF-7에 대하여 처리한 경우, 200 nM 이상의 농도에서 특이적인 항암 효과가 나타나는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시형태에 따르면, 상기 특이적 항암 및 항염증 조성물을 포함하는 암 및 염증 치료 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 암 및 염증 치료 조성물로 치료 및 예방이 가능한 암은 유방암, 위암, 대장암, 췌장암, 전립선암, 간암, 난소암, 신장암, 뇌암, 혈액암 및 폐암 중의 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0018] 상기 암 및 염증 치료 조성물로 치료 및 예방이 가능한 염증은 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 초면역글로불린 혈증, 만성 갑상선염, 크론병, 폐렴 및 췌장염 중의 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 신규 특이적 항암 및 항염증 siRNA를 포함하는 항암 및 항염증 조성물 및 이를 이용한 유방암 치료용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 항암 siRNA는 200 nM에서 일반세포인 HDF-n 세포의 생존율을 조금 감소시켰으나, 그 차이는 HER-2 양성 유방암 세포인 SK-BR-3과 비슷한 90% 이상이었으며, 반면에 ER/PR 양성 유방암 세포 MCF-7 (84.4%), 삼중양성 유방암 세포 BT-474 (69.4%), 삼중음성 유방암 세포 MDA-MB-231 (54.3%) 순으로 암세포의 생존율 감소가 더욱 커졌다.

[0021] 이는 일반적인 세포 적합성의 기준으로 생각하는 85% 이상의 세포 생존율을 기준으로 볼 때 일반 세포에는 적합

성을 확인할 수 있으며, 특정한 유방암 세포주인 BT-474, MDA-MB-231에 대해 특이적인 항암 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1a는 삼중음성 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 대한 농도별 항암 siRNA를 처리하였을 때 세포 생존률을 보여주는 그래프이다.
- 도 1b는 MDA-MB-231 유방암 세포에 대조군인 siPICH를 농도별로 처리하였을 때 세포 생존률을 보여주는 그래프이다.
- 도 2는 삼중양성 유방암 세포주인 BT-474에 대한 농도별 항암 siRNA를 처리하였을 때 세포 생존률을 보여주는 그래프이다.
- 도 3는 ER/PR 양성 유방암 세포주인 MCF-7에 대한 농도별 항암 siRNA를 처리하였을 때 세포 생존률을 보여주는 그래프이다.
- 도 4는 HER-2 양성 유방암 세포주인 SK-BR-3에 대한 농도별 항암 siRNA를 처리하였을 때 세포 생존률을 보여주는 그래프이다.
- 도 5는 인간 피부 세포주인 HDF-n에 대한 농도별 항암 siRNA를 처리하였을 때 세포 생존률을 보여주는 그래프이다.
- 도 6은 HDF-n, SK-BR-3, MCF-7, BT-474, MDA-MB-231 세포에 항암 siRNA를 처리하였을 때 세포 생존률을 종합하여 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 명세서에서 용어 "siRNA(small interfering RNA)"는 인 비보 상에서 단일 가닥 21개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNA 서열을 의미한다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 18 내지 30 염기, 바람직하게는 21 내지 23 염기이다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 "발현시키다"는 대상체가 외래(exogenous) 유전자를 발현하게 하거나 또는 내인성(endogenous) 유전자의 자연적 발현량을 증가시키기 위해 유전자 전달체를 이용하여 인위적으로 이를 도입함으로써 유전자가 대상체 세포 내에서 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 따라서, 용어 "발현"은 "형질전환(transformation)", "형질감염(transfection)" 또는 "형질도입(transduction)"과 동일한 의미이다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 "치료"는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물이 대상체에 투여되면 타겟 유전자의 발현 억제를 통해 유방암 세포의 증식 및 성장을 억제하여 유방암을 치료하는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 염증 또는 자가면역 질환의 치료 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 "투여" 또는 "투여하다"는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0029] 본 발명에서 용어 "치료적 유효량"은 본 발명의 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 "예방적 유효량"을 포함하는 의미이다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 "대상체"는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.

- [0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0034] **실시예**
- [0035] **실험방법**
- [0036] 세포 배양
- [0037] HDF-n, SK-BR-3, MCF-7, BT-474, MDA-MB-231 세포주들은 T-25 flask (SPL, Gyeonggi-do, Korea)에 10% Fetal Bovine Serum와 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Life Technologies, CA, USA)이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Corning, MA, USA)으로 37℃, 5% CO₂ incubator(ESCO, Changi, Singapore)에서 배양하였다. 계대 배양은 inverted microscopy(AE2000, Motic, Barcelona, Spain)를 통해 관찰하여, 세포의 컨플루언시가 70% 되었을 때 2-3일 간격으로 수행하였다. 계대배양은 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Sigma-Aldrich, MA, USA) 1 mL로 세척을 한 후, 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, MD, USA) 1 mL로 2분간 처리한다. 이후 DMEM을 5 mL 추가해 중성화시킨 후 15 mL 튜브에 옮겨서 원심분리기 (Cryste varispin, Novapro, Seoul, Korea)를 300 RCF로 이용하여 펠렛을 형성한 후, 세포의 컨플루언시가 30 ~ 40%가 되도록 T-25 flask에 분주한다.
- [0039] **항암 siRNA의 치료효과 확인**
- [0040] 서열목록의 항암 siRNA와 siPICH는 주식회사 제놀루션에서 각각 100 nmol, 10 nmol scale 로 합성되었으며, nuclease free water(IDT, Iowa, USA)에 100 μM, 20 μM 농도로 용해되었고, 사용 전까지 분주하여 -80℃의 딥프리즈에 보관하였다.
- [0041] 본 발명의 일 실시형태에 따른 항암 siRNA는 서열목록의 염기서열을 갖는다.
- [0042] 상기 염기서열을 갖는 항암 siRNA는 서열 상동성이 반드시 일치하는 것만을 한정하는 것은 아니며, 예를 들어 상기 항암 siRNA의 서열 상동성이 75% 이상인 경우라면, 유사한 서열로서 본 발명의 항암 siRNA에 포함되는 것으로 인정할 수 있다. 혹은 siRNA의 3' 말단에서 2번째부터 8번째까지의 염기서열을 seed 서열이라고 부르며 오프타겟 발생시 seed 서열 의존적인 유전자 발현 억제가 일어나기 때문에 (Kumiko et al. (2012), <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00101>) 이 부분에 대한 위치와 서열이 일치하는 siRNA들을 포함한다.
- [0043] 즉, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 항암 및 항염증 siRNA는 서열목록 중 3' 말단에서 2번째부터 8번째까지의 염기서열을 포함한다.
- [0044] 본 발명의 다른 실시형태에 따르면, 서열목록의 염기서열을 갖는 항암 및 항염증 siRNA를 유효성분으로 포함하는 특이적 항암 및 항염증 조성물을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 실시형태에 따르면, 상기 특이적 항암 및 항염증 조성물을 포함하는 암 및 염증 치료 조성물을 제공한다.
- [0046] 상기 암 및 염증 치료 조성물로 치료 및 예방이 가능한 암은 유방암, 위암, 대장암, 췌장암, 전립선암, 간암, 난소암, 신장암, 뇌암, 혈액암 및 폐암 중의 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0047] 상기 암 및 염증 치료 조성물로 치료 및 예방이 가능한 염증은 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 초면역글로불린 혈증, 만성 갑상선염, 크론병, 폐렴 및 췌장염 중의 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0048] 모든 세포주들을 위와 동일한 배지와 조건에서 배양 후 세포를 96-웰 플레이트에 5.0×10³ 세포/웰로 분주하여 하루 동안 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 항암 siRNA를 opti-MEM(Gibco, MD, USA)에 Lipofector-ext(AptaBio,Yongin, Korea)와 혼합하여 최종농도 50, 100, 200 nM로 희석하여 세포에 24시간마다 1회 100 μL 씩, 총 3회 처리한 후 D-PlusTM CCK cell viability assay kit(Donginbiotech, Seoul, Korea) 용액을 10 μL

넣고 2시간 동안 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0049] 본 발명에서는 항암 siRNA 전달체로서 Lipofector-ext를 사용하였으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니며, 다른 전달체를 사용할 수도 있다. 본 발명에서 항암 siRNA 전달체로서 Lipofector-ext 이외에, 마이셀, 리포솜, 펩타이드, 덴드리머, 나노튜브, 금나노입자, 폴리-L-아민, 키토산, 사이클로덱스트린 및 폴리에틸렌이민 등이 사용될 수 있다.

[0050] 세포생존률은 Microplate spectrophotometer (EPOCH2, BioTek, VT, USA)를 이용하여 450nm 파장에서 측정되었다. 대조군으로는 siPICH도 위와 동일한 방법으로 실행 후 결과를 비교하였다.

[0052] 실험결과

[0053] 항암 siRNA의 치료효과 확인

[0054] MDA-MB-231 세포에 농도별 항암 siRNA를 처리하였을 때 치료효과를 세포생존률 측정으로 확인하였다 (도 1a). 0, 50, 100, 200 nM의 항암 siRNA를 각각 처리한 결과를 0 nM로 상대비교하였을 때 세포생존률은 순서대로 100%, 102%, 75.7%, 54.3%였으며, *p*-value는 0.85, 0.0014, 3.16×10^{-7} 로 100 nM 이상의 농도에서 대조군과 통계적으로 유의미한 차이의 항암 치료효과를 확인하였다.

[0055] MDA-MB-231 세포에 농도별 siPICH를 처리하였을 때 치료효과를 세포생존률 측정으로 확인하였다 (도 1b). 0, 50, 100, 200 nM의 항암 siRNA를 각각 처리한 결과를 0 nM로 상대비교하였을 때 세포생존률은 순서대로 100%, 94.6%, 88.6%, 84.2%였으며, *p*-value는 0.34, 0.13, 0.04로 200 nM 이상의 농도에서 대조군과 통계적으로 유의미한 차이의 항암 치료효과를 확인하였다. 이 결과를 항암 siRNA와 비교하면 같은 200 nM의 농도에서 항암 siRNA는 54.3%, siPICH는 84.2%이고, *p*-value는 0.0014로 통계적으로 유의미한 차이의 우수한 항암 치료효과를 확인할 수 있었다.

[0056] BT-474 세포에 농도별 항암 siRNA를 처리하였을 때 치료효과를 세포생존률 측정으로 확인하였다 (도 2). 0, 50, 100, 200 nM의 항암 siRNA를 각각 처리한 결과를 0 nM로 상대비교하였을 때 세포 생존율은 순서대로 100%, 111%, 87.6%, 69.4%였으며, *p*-value는 0.39, 0.011, 6.1×10^{-7} 로 100 nM 이상의 농도에서 대조군과 통계적으로 유의미한 차이의 항암 치료효과를 확인하였다.

[0057] MCF-7 세포에 농도별 항암 siRNA를 처리하였을 때 치료효과를 세포생존률 측정으로 확인하였다 (도 3). 0, 50, 100, 200 nM의 항암 siRNA를 각각 처리한 결과를 0 nM로 상대비교하였을 때 세포생존률은 순서대로 100%, 104%, 95.1%, 84.4%였으며, *p*-value는 0.35, 0.28, 0.001로 200 nM의 농도에서 대조군과 통계적으로 유의미한 차이의 항암 치료효과를 확인하였다.

[0058] SK-BR-3 세포에 농도별 항암 siRNA를 처리하였을 때 치료효과를 세포생존률 측정으로 확인하였다 (도 4). 0, 50, 100, 200 nM의 항암 siRNA를 각각 처리한 결과를 0 nM로 상대비교하였을 때 세포생존률은 순서대로 100%, 106%, 99.4%, 92.7%였으며, *p*-value는 0.28, 0.93, 0.11로 대조군과 통계적인 차이를 보이지 않았다.

[0059] HDF-n 세포에 농도별 항암 siRNA를 처리하였을 때 치료효과를 세포생존률 측정으로 확인하였다 (도 5). 0, 50, 100, 200 nM의 항암 siRNA를 각각 처리한 결과를 0 nM로 상대비교하였을 때 세포생존률은 순서대로 100%, 92.1%, 92.7%, 91%였으며, *p*-value는 0.016, 0.062, 0.0089로 50 nM과 200 nM에서 대조군과 유의미한 통계적인 차이를 보였다.

[0060] HDF-n, SK-BR-3, MCF-7, BT-474, MDA-MB-231 세포주에서 항암 siRNA의 치료효과를 세포생존률 측정으로 확인하였다 (도 6). 200 nM의 항암 siRNA를 각각의 세포주에 처리한 결과, HDF-n을 대조군으로 100%로 상대비교하였을 때 SK-BR-3, MCF-7, BT-474, MDA-MB-231의 세포생존률은 순서대로 102%, 92.7%, 76.3%, 59.7%를 보였고, *p*-value는 0.52, 0.062, 2.3×10^{-5} , 9.2×10^{-7} 을 보였다. 이 중 BT-474와 MDA-MB-231에서 통계적으로 유의미한 차이의 항암 치료효과를 확인하였다.

[0062] 위 결과를 종합하면 항암 siRNA는 200 nM에서 일반세포인 HDF-n 세포의 생존률을 조금 감소시켰으나 그 차이는 HER-2 양성 유방암세포인 SK-BR-3와 비슷한 90%이상이었으며, 반면에 ER/PR 양성 유방암세포 MCF-7 (84.4%), 삼중양성 유방암세포 BT-474 (69.4%), 삼중음성 유방암세포 MDA-MB-231 (54.3%) 순으로 암세포의 생존률의 감소

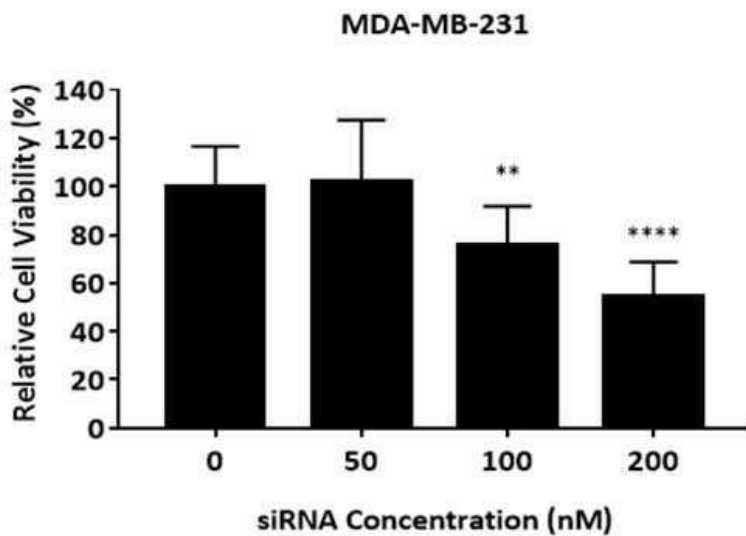
가 더욱 커졌다. 이는 일반적인 세포적합성의 기준으로 생각하는 85%이상의 세포생존률을 기준으로 볼 때 일반 세포에는 적합성을 확인할 수 있으나 특정한 유방암 세포주인 BT-474, MDA-MB-231에 대해 특이적인 항암효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0064]

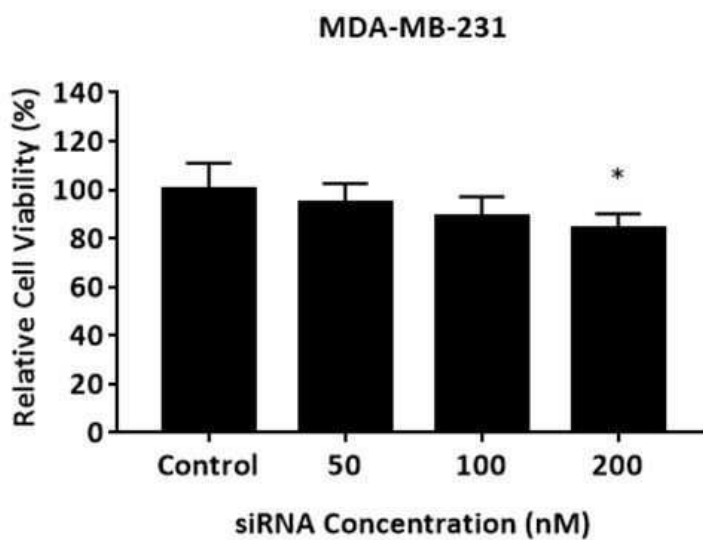
이상, 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.

도면

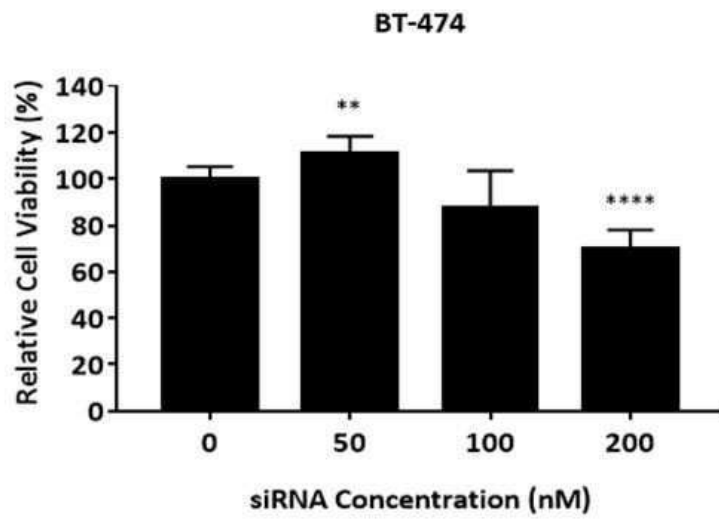
도면1a



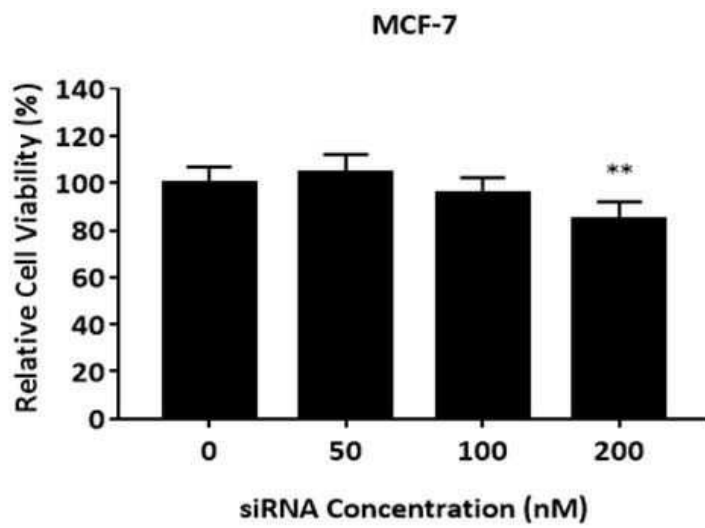
도면1b



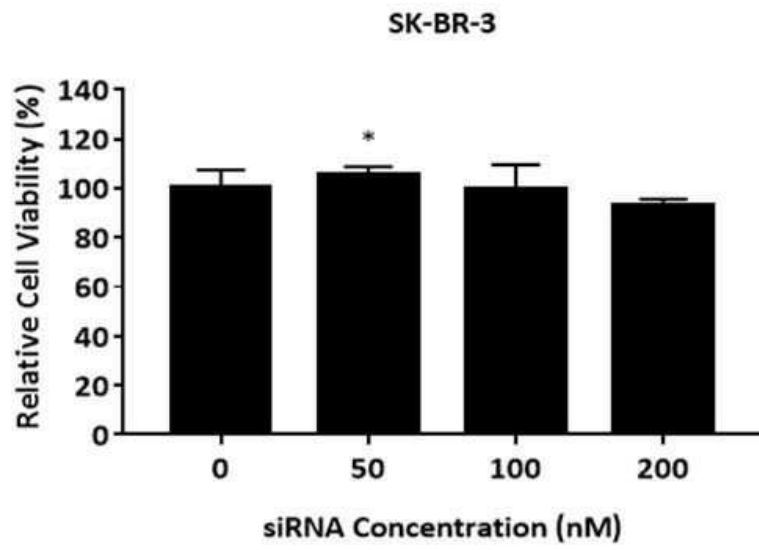
도면2



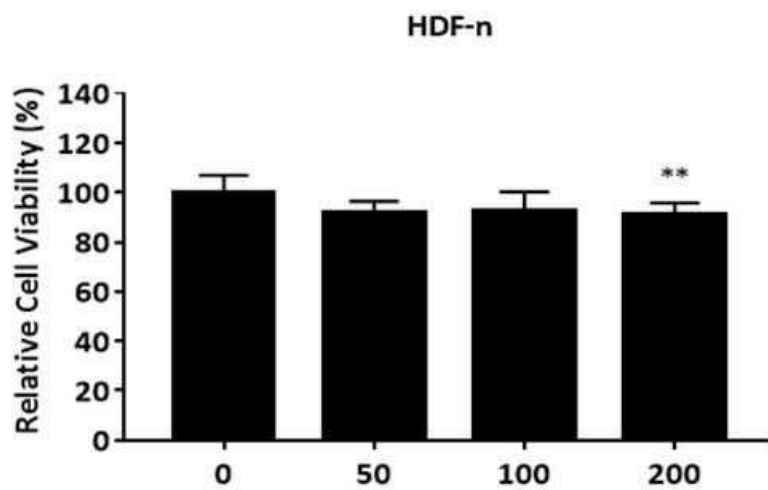
도면3



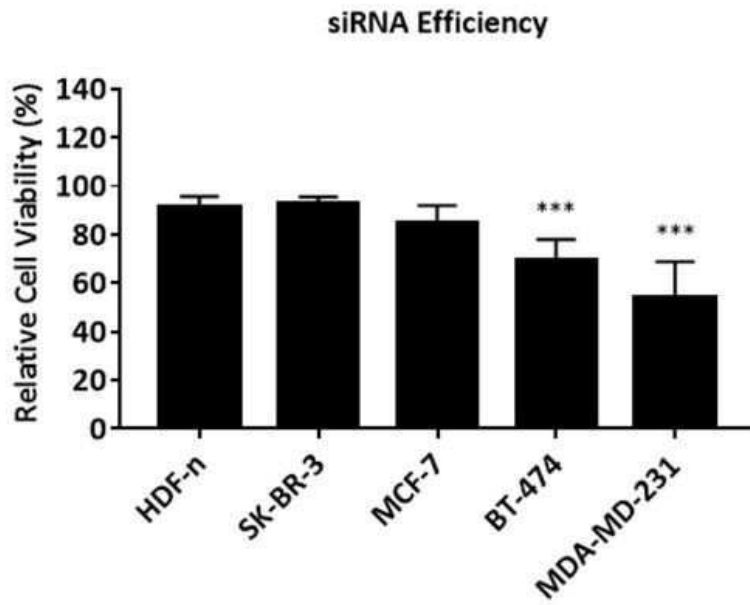
도면4



도면5



도면6



서열목록

<110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH BUSINESS FOUNDATION

<120> A novel specific anti-cancer and anti-inflammation siRNA and use thereof

<130> P21-0100

<160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 1

gacguaaaacg gccacaaguu c

21

<210> 2

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siPICH

<400> 2

acaagaucuc uccaguauaa auu

23