(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0099470
(43) 공개일자 2009년09월22일

(51) Int. Cl.
A61L 27/38 (2006.01) *A61L 27/04* (2006.01)
A61F 2/82 (2006.01) *A61L 27/34* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0021568
(22) 출원일자 2009년03월13일
심사청구일자 2009년03월13일
(30) 우선권주장
1020080024361 2008년03월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
강상원
서울특별시 강남구 신사동 631-15
최철희
대전광역시 유성구 도룡동 현대아파트 103동 402호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

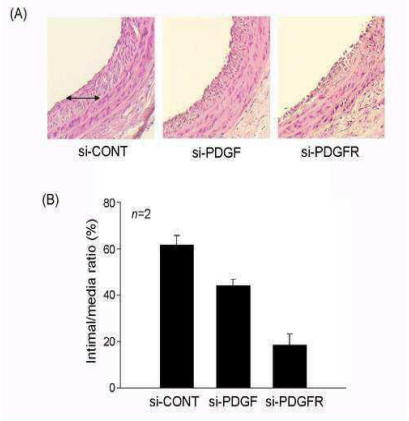
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 혈관 재협착방지 스텐트 코팅용 조성물 및 이를 이용해 제조된 스텐트

(57) 요 약

본 발명은 혈관재협착을 유발하는 유전자에 선택적인 siRNA와 형질전환제(transfection reagent)를 포함하는 혈관재협착 방지 스텐트용 코팅 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 상기 조성물이 코팅된 스텐트, 그 제조방법 및 나아가 이를 혈관 내막에 직접 적용하는 단계를 포함하는 혈관재협착을 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 스텐트에 코팅된 후 국소부위에서 siRNA를 효율적으로 안정하게 세포 내로 도입시키므로 독성이 없이 혈관재협착을 방지할 수 있는 작용효과를 나타낸다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

권기환

서울특별시 강남구 압구정2동 한양아파트 55동 702호

강동훈

경기도 성남시 분당구 야탑동 탑마을아파트 609-701

특허청구의 범위

청구항 1

혈관재협착을 유발하는 유전자에 대한 siRNA 및 형질전환제(transfection reagent)를 함유하는 혈관 재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 siRNA는 혈소판 유래 성장 인자 수용체(PDGFR) 유전자에 대한 siRNA, 내막 두께 수용체(ITR) 유전자에 대한 siRNA, IL-1수용체 유전자에 대한 siRNA, α(v)β(3)-인테그린 수용체 유전자에 대한 siRNA, 저밀도 지단백 수용체(LDLR) 유전자에 대한 siRNA, 안지오텐신 II형 I 수용체 유전자에 대한 siRNA, 리보뉴클레오타이드 환원효소 유전자에 대한 siRNA, 씨클로옥시게네이즈-2유전자에 대한 siRNA, 혈소판 당단백 IIb/IIIa 수용체 유전자에 대한 siRNA, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 혈관재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 siRNA는 PDGFR 유전자에 대한 siRNA인 혈관재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 1 내지 8 중 어느 하나인 혈관재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 형질전환제는 폴리아민 함유 제제 (polyamine), 리피드 제제 (lipoplex), 양이온성 리포좀 (cationic liposome), 및 양이온성 폴리머 (cationic polymer)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 혈관재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 함유하는 제1코팅액이 코팅된 혈관 재협착 방지용 스텐트.

청구항 7

제 6항에 있어서 코팅되어지는 스텐트는 금속 스텐트, 헤파린이 코팅된 금속 스텐트, 및 포스포콜린이 코팅된 금속 스텐트로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 혈관 재협착 방지용 스텐트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 형질전환제는 리피드 제제이고, 상기 스텐트는 포스포콜린 코팅된 금속 스텐트인 혈관 재협착 방지용 스텐트.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 형질전환제는 폴리아민 제제이고, 상기 스텐트는 금속 스텐트 또는 포스포콜린 코팅된 금속스텐트인 혈관 재협착 방지용 스텐트.

청구항 10

제6항에 있어서, 생분해성 고분자 또는 비생분해성 고분자를 포함하는 제2코팅액이 추가로 코팅된 혈관 재협착 방지용 스텐트.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 생분해성 고분자 또는 비생분해성 고분자는 젤라틴(gelatin), 폴리글리콜산/폴리락트산 (polyglycolic acid/ polylactic acid, PGLA), 폴리카프로락톤 (polycaprolactone, PCL), 폴리히드록시부티레이트발레레이트 (polyhydroxybutyrate valerate, PHBV), 폴리오르쏘에스테르 (polyorthoester, POE), 및 폴리에틸렌옥사이드/폴리부틸렌테레프탈레이트 (polyethyleneoxide/ polybutylene terephthalate, PEO/PBTP), 폴리

우레탄 (polyurethane, PUR), 실리콘 (silicone, SIL), 및 폴리에틸렌테레프탈레이트 (polyethylene terephthalate, PETP)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 혈관 재협착 방지용 스텐트.

청구항 12

제10항에 있어서, 제2코팅액은 0.1 ~ 5%의 상기 생분해성 고분자 또는 비생분해성 고분자 용액인 혈관 재협착 방지용 스텐트.

청구항 13

제10항에 있어서, 코팅되어지는 스텐트는 포스포콜린 코팅된 금속 스텐트인 혈관 재협착 방지용 스텐트.

청구항 14

a) 제1항 내지 제5항의 조성물을 제조하는 단계; b)상기 조성물을 포함하는 제1코팅액으로 스텐트를 코팅하는 단계; c) 건조하는 단계를 포함하는 혈관 재협착 방지용 스텐트 제조방법.

청구항 15

제12항에 있어서, d) 건조된 코팅층에 제2코팅액으로 추가 코팅하는 단계; 및 e) 건조하는 단계를 포함하는 혈관 재협착 방지용 스텐트 제조방법.

청구항 16

제6항 내지 제13항의 스텐트를 혈관내막에 적용시키는 단계를 포함하는 혈관 재협착을 예방하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 혈관 재협착방지 스텐트 코팅용 조성물, 이를 이용해 제조된 혈관재협착 방지용 스텐트, 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 동맥경화(Atherosclerosis)는 만성 염증 질환으로 수십년 이상 진행되는 질병이다. 이 질병의 초기 징후는 동맥의 혈관은 정상처럼 보이지만 지방괴(fatty streak)라 불리는 지방침착이 혈관의 내막(intima)에 쌓여있게 되는 것이다. 지방괴는 내피세포층을 자극함으로써 단핵세포들을 내막부분으로 끌어 모으고 이 단핵세포들이 마크로파지로 분화되어 지방적을 삼켜버린다. 과도한 지방을 흡수한 일부 대식세포는 거품세포(foam cell)로 바뀌어 혈관 평활근세포(smooth muscle cell, SMC)의 성장을 자극하고 평활근세포가 혈관내막으로 이동하도록 자극하는 인자들을 분비한다. 이런 연속적인 일련의 과정들이 혈관폐색을 일으킨다. 혈관 강(lumen)으로 노출된 평활근세포는 혈소판을 끌어 모으고 동시에 혈전증을 촉진하게 되며 결국 상처 부위의 플라그 형성을 유도한다. 관상동맥은 종종 죽상동맥경화증에 의해 병증을 일으키기 쉬운 부분이다. 관상동맥의 플라그형성은 심장근육으로 흐르는 혈류를 감소시켜 결국 협심증, 심근경색, 그리고 죽음에까지 이르게 한다.

<3> 폐색된 혈관구조를 회복하는 방법은 관상동맥 이식 수술 방법과, 가장 일반적으로 쓰이는 경피적 혈관 성형술(percutaneous transluminal angioplasty, PTA), 경피적 관상동맥 성형술(percutaneous coronary angioplasty, PCTA)을 이용하여 질병부위 혈관 내에 스텐트를 삽입하는 방법이다. 후자의 경우 삽입구 쪽의 풍선(balloon) 부분과 반대편에는 액체를 삽입하는 매니폴드(manifold) 부분으로 이루어진 가늘고 긴 모양의 풍선 카테터(balloon catheter)가 혈관 내 스텐트와 같은 고형체를 이식하기 위해 이용 된다. 그러나, 역설적으로 풍선 카테터를 이용한 혈관 성형술은 플라그를 제거함과 동시에 손상된 혈관 구조의 범위를 확장시킨다. 시술을 하는 동안 질병 부위나 가까운 주변의 내피세포층은 항상 손상을 받는다. 내피세포층이 없는 경우, 금속이나 폴리머 같은 합성물질의 이식, 삽입은 혈전 형성에 이은 혈소판의 재공급과 응집을 포함하는 복잡한 과정을 촉진한다. 응집된 혈소판은 혈소판 유래 성장 인자(Platelet-derived growth factor, PDGF) 라는 주요 인자를 방출하는데 이 성장 인자는 평활근 세포의 증식과 이동을 유도한다. 결과적으로 내막부분의 과증식(intimal hyperplasia)은 SMC의 증식과, 세포외 기질 축적으로 일어난다. 이러한 혈관구조의 새로운 증상은 몇 개월 안에

30~40%까지 나타나며 혈관 재성형 수술의 실패를 가져온다. 이러한 내막(intima) 과대증가 증상에 의한 혈관 재성형 과정을 혈관재협착(restenosis)이라 한다.

<4> 그 동안 혈관재협착 방지를 위해 혈관 내막 과형성 (intimal hyperplasia)을 줄이거나 억제할 수 있는 방법의 개발을 위해 많은 노력을 해 왔다. 혈관평활근세포의 성장을 방해하는 약물이나 물질을 방출하는 개선된 스텐트는 성공적으로 개발되어 임상에서 사용되어 왔다. 혈소판 응집과 혈전증, PDGF 작용기 효소를 방해하는 화학물질(예. 아스피린, 아라키돈산, 프로스타그란딘, 헤파린, 저분자량 헤파린, typhostins, 글리벡 등)과 PDGF나 CD144에 대한 항체들이 시험되어 왔다. 가장 효과적인 화학물질은 라파마이신으로 라파마이신은 mTOR(mammalian target of rapamycin)을 억제한다. mTOR은 PI3-K/Akt 경로의 하부에서 작용하는 신호전달 물질이다. PI3-K/Akt 경로가 주요 생존 신호의 하나이기 때문에 mTOR의 억제는 세포의 죽음을 일으킨다. 비록 라파마이신이 독성있는 물질이지만 스텐트 삽입부위의 국소적인 주입은 그리 치명적이지 않다. 따라서 라파마이신을 방출하는 스텐트를 혈관내에 이식하는 것은 혈관평활근세포의 죽음을 효과적으로 일으키고 내막 과형성을 막게 된다.

<5> 그러나 이러한 약물방출 스텐트에 대한 우려들이 최근에 증가하고 있으며 동시에 현실로 나타나고 있다. 스텐트에서 방출된 물질들이 동시에 내피세포의 회복도 방해하기 때문이다. 그 결과 스텐트 삽입 후 건강한 혈관 내피세포가 스텐트 표면을 덮어 스텐트의 금속 표면이 혈소판과 직접 접촉하지 못하게 하는 과정이 억제된다. 이는 스텐트 삽입 이후에 지속적으로 스텐트내의 혈전에 의한 갑작스런 혈류의 차단 위험이 상존한다는 의미이며, 최근의 보고들에서 사실로 확인되고 있다 (FDA Public Health Web Notification 2003, http://www.fda.gov/cdrh/safety /cypher3.html; Joner M, et al., *J Am Coll Cardiol*, 48, 193-202, 2006; Babinska A, et al., *Nephrol Dial Transplant*, 13, 3153-9, 1998). 그렇기 때문에 지금부터는 혈관평활근세포의 성장은 선택적으로 억제하면서 내피세포층은 회복할 수 있게 하는 연구가 요구된다. 화학물질 약물은 부작용을 일으키며 비가역적인 반면, 항체를 포함하는 단백질 약물은 세포에 침투할 수 있다. 따라서 혈관재협착의 내막과형성을 다루는 치료 방법의 관점이 변해야 한다.

<6> 한편, siRNA(small-interfering RNA)는 microRNA의 일종이며 20 ~ 28 의 리보뉴클레오타이드 염기로 되어 있는 RNA로 세포 내로 도입(transfection)되면 상보적인 서열을 가진 mRNA에 결합하여 mRNA를 분해시킴으로써 효과적으로 표적 유전자 발현을 막는다. siRNA는 기존의 안티센스 올리고DNA에 비하여 상대적으로 서열이 길고 mRNA를 분해시키는 작용이 매우 염기서열 특이적이기 때문에 원하는 유전자만 매우 선택적으로 억제할 수 있다. 따라서, 혈관평활근세포의 성장을 선택적으로 억제하는 유전자에 대한 siRNA와 내피세포의 성장을 촉진하는 유전자에 대한 siRNA를 혼합 처리하면, 혈관평활근세포의 성장을 억제하는 동시에 내피세포의 성장을 촉진할 수 있다.

<7> 그러나 siRNA의 문제점은 혈류에 도입되었을 때 혈액속의 RNase로 인해 혈 중에서 안정적이지 못하고 세포막도 쉽게 통과할 수 없기 때문에 정맥 내 주입이나 경구투여가 제한적일 수 밖에 없다는 점이다(Scherer LJ, et al., *Nat. Biotech.* 21, 1457-1465, 2003; Kurreck J, et al., *Eur. J. Biochem.* 270(8), 1628-1644, 2003).

<8> siRNA만의 혈관주입 이나 비강내 투입이 시도된 적도 있고 배양세포의 경우도 막 수용체 비의존적으로 들어 간다고 알려진 바 있지만 실제로는 매우 낮은 효율성으로 성공적이지 못했다. 이런 고로 siRNA의 적합한 전달매체를 개발하는데 많은 노력들이 있어 왔고 배양세포를 기준으로 개발이 되었다. 지금까지 개발된 siRNA의 효율적인 전달매체는 아데노 혹은 레트로 바이러스 벡터를 이용하는 방법이 주를 이루며, 비-바이러스 벡터로서 양이온성 지질이나 리포좀을 사용하는 방법, 펩타이드와 같은 양이온성 폴리머를 사용하는 방법 등이 있다 (Akhtar S, et al., *J. Clin. Invest.* 117(12), 3623-3632, 2007). 그러나 스텐트를 통한 죽상동맥경화 병변으로의 in vivo에서 siRNA를 전달하고자 한 시도는 없었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<9> 본 발명의 목적은 혈관 재협착방지 스텐트 코팅용 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

<10> 본 발명의 다른 목적은 혈관 재협착방지 스텐트 코팅용 조성물이 코팅된 혈관 재협착 방지용 스텐트를 제공하고자 하는 것이다.

<11> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재협착방지 스텐트 코팅용 조성물이 코팅된 혈관 재협착 방지용 스텐트의 제조방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제 해결수단

<12> 본 발명은 혈관재협착을 유발하는 유전자에 대한 siRNA 및 형질전환제를 함유하는 혈관 재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물을 제공한다.

<13> 본 발명의 조성물에 함유되는 siRNA는 혈관재협착과 관련된 혈소판 유래 성장 인자 수용체 (Platelet Derived Growth Factor Receptor, PDGFR) 유전자에 대한 siRNA, 내막두께 수용체 (Intimal thickness receptor, ITR) 유전자에 대한 siRNA, 인터루킨-1 수용체 (IL-1R) 유전자에 대한 siRNA, α(v)β(3)-인테그린 수용체 (Integrin receptor) 유전자에 대한 siRNA, 저밀도 지단백 수용체 (Low density lipoprotein receptor, LDLR) 유전자에 대한 siRNA, 안지오텐신 II형 I 수용체 (angiotensin II type I receptor) 유전자에 대한 siRNA, 리보뉴클레오타이드 환원효소 (ribonucleotide reductase) 유전자에 대한 siRNA, 싸이클로옥시제네이즈-2 (cyclooxygenase-2) 유전자에 대한 siRNA, 혈소판 당단백 IIb/IIIa 수용체 (platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor) 유전자에 대한 siRNA, 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 siRNA일 수 있다(Ferns GA, et al., *Science,* 253(5024), 1129-1132, 1991; Tsukada S, et al., *Circulation,* 107, 313-319, 2003; Binder CJ, *Nature Medicine* 8, 1218 -1226, 2002; Bishop GG, *Circulation.* 103, 1906-1911, 2001; Chen Z, et al., *Circulation* 106(1), 21-23, 2002; Kang PM, et al., *Am Heart J.* 127(5), 1388-1401, 1994; Radke PW, et al., *Am Heart J.* 152(4), 761.e1-6, 2006; Brune W, et al., *Science* 291(5502), 303-305, 2001; Linton MF, et al., Curr Opin Lipidol. 13(5), 497-504, 2002; Yang HM, et al., *Circulation,* 110(3), 301-308, 2001; Lincoff AM, et al., *N Engl J Med.* 341(5), 319-327, 1999).

<14> 본 발명의 조성물에 함유되는 바람직한 siRNA는 PDGFR에 대해 특이적인 1종 이상의 siRNA 혼합물이며, 보다 바람직한 siRNA는 서열번호:1로 표시되는 서열, 서열번호:3로 표시되는 서열, 서열번호:5로 표시되는 서열, 서열번호:7로 표시되는 서열, 및 이들의 안티센스 서열로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 siRNA 혼합물이다.

<15> 본 발명의 조성물에 함유되는 siRNA는 시판품을 사용할 수도 있고, 혈관 재협착을 유발하는 표적 유전자를 주형으로 하고 그의 mRNA와 결합하여 분해할 수 있는 염기서열을 siRNA 제작 프로그램에 따라 디자인 하여 실험실 내에서 제작하여 사용할 수도 있다.

<16> 본 발명에서, 용어 'siRNA'는 생체내 핵산 분해효소에 의한 빠른 분해를 막기 위해 화학적으로 변형된 siRNA를 포함한다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다. (Henschel A, et al., a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. Nucleic Acids Research 32(Web Server Issue), W113-W120, (2004) DEQOR).

<17> 본 발명의 조성물에 함유되는 siRNA는 이중나선 구조를 가지므로, 단일나선 구조의 리보핵산이나 안티센스 올리고핵산(antisense oligonucleotide)보다는 상대적으로 안정한 구조이지만 생체내 핵산 분해효소에 의해 빠르게 분해되기 때문에 화학적 변형을 통해 분해 속도를 감소시킬 수 있다. siRNA가 쉽게 분해되지 않도록 안정하고 저항적이도록 하기 위한 당업계에서 잘 알려진 여러 화학적 변형 방법이 사용될 수 있다.

<18> 본 발명의 조성물에 함유되는 siRNA는 스텐트에 코팅되어 국소적으로 혈관내피에 적용된 후 세포 안으로 도입되어 mRNA를 분해시킴으로써 효과적으로 표적유전자의 발현을 막는다.

<19> 또한 본 발명의 조성물에 함유되는 siRNA는 표적유전자의 mRNA를 분해시키는 siRNA의 작용이 염기서열 특이적이기 때문에 원하는 유전자만 선택적으로 억제한다.

<20> 본 발명의 조성물에 함유되는 형질전환제 (transfection reagent)는 siRNA를 포유동물 세포 내로 효율적으로 도입하는 것으로, 폴리아민 함유 제제 (polyamine), 리피드 제제 (lipoplex), 양이온성 리포좀 (cationic liposome), 또는 양이온성 폴리머 (cationic polymer) 등이 바람직하며, 폴리아민 함유제제 또는 양이온성 리포좀 제제가 보다 바람직하다. 보다 구체적으로 현재 시판되고 있는 Lipofectamine 2000 (#11668, Invitrogen, USA), Lipofectamine RNAiMAX (#13778, Invitrogen, USA), Oligofectamine 형질전환제 (#12252, Invitrogen, USA); HiPerFect 형질전환제(#301704, QIAGEN, Netherlands); Dharma*FECT* 1, 2, 3 or 4 siRNA 형질전환제 (T 2001,2002,2003,2004, DHARMACON, USA), DharmaFECT Duo lipid reagent (T-2010, DHARMACON, USA); DOTAP Liposomal 형질전환제(11811177001, Roche, Germany), DOSPER Liposomal 형질전환제(11781995001, Roche, Germany), Fugene6 (11988387001, Roche, Germany), X-tremeGENE siRNA 형질전환제 (04476093001, Roche, Germany); siPORT Lipid 형질전환제 (AM4504, Ambion, USA), siPORT *Amine* Polyamine-Based 형질전환제 (AM4502, Ambion, USA), siPORT NeoFX 형질전환제 (AM4510, Ambion, USA); TransFast 형질전환제 (E2431,

Promega, USA), Tfx Reagents for the Transfection of Eukaryotic Cells (E1811, Promega, USA), CodeBreaker siRNA 형질전환제 (E5052, Promega, USA); GeneJuice 형질전환제 (#70967, Novagen, USA); TransIT-TKO siRNA 형질전환제 (# MIR 2154, Mirus, USA) 또는 TransIT-siQUEST siRNA 형질전환제(# MIR 2114, Mirus, USA); In vivo JetPEI transfection reagent (Polyplus-transfection, #201-10) 등을 사용할 수 있다.

<21> 본 발명은 또한 혈관재협착을 유발하는 유전자에 대한 siRNA 및 형질전환제를 함유하는 혈관 재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물을 포함하는 제1코팅액으로 코팅된 스텐트를 제공한다.

<22> 본 발명의 조성물이 코팅되는 스텐트는 금속 또는 플라스틱 그 자체 (bare stent), 또는 헤파린 (heparin) 이나 포스포콜린 (phosphocholine, PC) 등으로 코팅된 금속 또는 플라스틱일 수 있다. 바람직하게는 금속 스텐트 (bear metal stent), 포스포콜린이 코팅된 금속 스텐트(PC-금속 스텐트) 등을 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 포스포콜린이 코팅된 금속 스텐트를 사용할 수 있다. 상기 스텐트는 제조하여 사용할 수도 있으며, 시판되는 포스포콜린 (PC)-코팅된 금속 스텐트 (ARTHOSpico,, Biocompatibles Ltd, England), 금속 스텐트(ARTHOSpico, AMG International GmbH, Germany), 헤파린 코팅된 금속 스텐트 (Carmeda AB, Stockholm, Sweden) 등을 구입하여 사용할 수도 있다. 형질전환제로서 리피드 제제를 사용하는 경우 PC-금속스텐트가, 형질전환제로서 양이온성 리포좀을 사용하는 경우 PC-금속 스텐트가, 형질전환제로서 폴리아민을 사용하는 경우 금속 스텐트 또는 PC-금속 스텐트가 바람직하다.

<23> 본 발명은 또한 뛰어난 siRNA 전달 효과를 나타내는 다양한 형질전환제를 코팅한 다양한 종류의 스텐트를 제공한다. 본 발명은 나아가 형질전환제는 리피드 제제이고, 사용된 스텐트는 PC-금속 스텐트인 혈관 재협착 방지용 스텐트를 제공한다. 본 발명은 또한 형질전환제가 폴리아민인 혈관 재협착 방지용 스텐트를 제공하는데, 사용된 스텐트는 바람직하게는 금속 스텐트 또는 PC-금속 스텐트이며, 보다 바람직하게는 PC-금속 스텐트이다. 본 발명의 조성물이 코팅되었을 때, 코팅된 스텐트는 매우 우수한 siRNA 전달효과를 나타내며, 형질전환제로서 폴리아민 함유 제제를 사용하는 경우에는 스텐트의 종류에 무관하게 특히 뛰어난 siRNA 전달효과를 나타내며 PC-금속 스텐트의 경우 더욱 뛰어나다.

<24> 본 발명은 또한 상기 제1코팅액이 코팅된 스텐트 위에 생분해성 고분자 또는 비생분해성 고분자를 포함하는 제2코팅액이 추가로 코팅된 혈관 재협착 방지용 스텐트를 제공한다.

<25> 상기 제2코팅액에 포함되는 생분해성 고분자 또는 비생분해성 고분자는 젤라틴(gelatin), 폴리글리콜산/폴리락트산 (polyglycolic acid/polylactic acid, PGLA), 폴리카프로락톤 (polycaprolactone, PCL), 폴리히드록시부티레이트발레레이트 (polyhydroxybutyrate valerate, PHBV), 폴리오르쏘에스테르 (polyorthoester, POE), 및 폴리에틸렌옥사이드/폴리부틸렌테레프탈레이트 (polyethyleneoxide/ polybutylene terephthalate, PEO/PBTP) 등의 생분해성 고분자; 및 폴리우레탄 (polyurethane, PUR), 실리콘 (silicone, SIL), 및 폴리에틸렌테레프탈레이트 (polyethylene terephthalate, PETP)등의 비생분해성 고분자로 구성된 군으로부터 선택되는 것이다.

<26> 본 발명의 상기 제2코팅액은 상기 생분해성 고분자 또는 비생분해성 고분자의 0.1~5%, 바람직하게는 0.1 ~ 2% (w/v%) 용액이며, 용매로는 바람직하게는 물 또는 에탄올 등을 사용할 수 있다.

<27> 본 발명의 조성물로 코팅된 스텐트는, siRNA가 혈류에 주입되었을 경우 종래와 같은 안정성의 문제없이 효율적으로 치료효과를 나타낼 수 있다.

<28> 본 발명의 조성물로 코팅된 스텐트는, 혈관재협착을 유발하는 유전자에 대한 siRNA를 성공적으로 혈관벽에 전달하여 혈관재협착과 관련된 세포를 형질전환시킨다. 상기 혈관재협착에 관련이 있는 수용체 또는 효소들에 대한 siRNA, 특히 PDGFRβ에 대한 siRNA를 함유하는 조성물로 코팅된 스텐트는 혈관재협착 억제에 있어 매우 뛰어난 효과를 보인다.

<29> 본 발명은 a) 혈관재협착을 유발하는 유전자에 대한 siRNA 및 형질전환제를 함유하는 혈관 재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물을 제조하는 단계; b) 상기 조성물을 포함하는 제1코팅액으로 스텐트를 코팅하는 단계; c) 건조하는 단계를 포함하는 혈관 재협착 방지용 스텐트의 제조방법을 제공한다.

<30> 나아가, 본 발명은 추가적으로 d) 건조된 코팅층에 제2코팅액으로 추가 코팅하는 단계; 및 e) 건조하는 단계를 포함하는 혈관 재협착 방지용 스텐트 제조방법을 제공한다.

<31> 본 발명은 또한 혈관재협착을 유발하는 유전자에 대한 siRNA 및 형질전환제를 함유하는 혈관 재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물로 코팅된 스텐트를 혈관내막에 적용시키는 것을 포함하는 혈관 재협착 방지 방법을 제공한다.

효 과

<32> 본 발명에 의한 조성물로 코팅된 스텐트를 이식함으로써 안정하고 효과적으로 혈관 재협착을 방지할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<33> 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

<34> 본 발명의 실시예들에서 사용한 시약은 다음과 같다. Synthetic selected siRNA SMART pools (Dharmacon RNA Technologies, USA), siCONTROL nontargeting siRNA pool(Dharmacon RNA Technologies, USA), 형광 표지된 siGLO-red siRNA(Dharmacon RNA Technologies, USA); SiPORTTM NeoFXTM reagent (Ambion, USA), 포스포콜린(PC)-코팅된 금속 스텐트 (ARTHOSpico,, Biocompatibles Ltd, England), 금속 스텐트(ARTHOSpico, AMG International GmbH, Germany).

<35> **실시예 1 : 혈관재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물의 제조**

<36> PDGFR 유전자 (Genebank NM_031525)의 발현을 저해시키는 4가지 다른 siRNA 혼합물 (Dharmacon Co.; Rat PDGFRB (#L-091874-01-0010)과, siPORT™ NeoFX™ reagent (Ambion, USA)를 이용해 제조자 설명서 기재에 따라 다음과 같이 혈관 재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물을 제조하였다.

<37> [표1]

		Sequence
서열번호: 1	sense	5'-GUAGAAAUCCUUGGGUAUAUU-3'
서열번호: 2	antisense	5'-PUAUACCCAAGGAUUUCUACUU-3'
서열번호: 3	sense	5'-GAGAAAGCCAUCAACGUUAUU-3'
서열번호: 4	antisense	5'-PUAACGUUGAUGGCUUUCUCUU-3'
서열번호: 5	sense	5'-ACAUCAAAUACGCGGACAUUU-3'
서열번호: 6	antisense	5'-PAUGUCCGCGUAUUUGAUGUUU-3'
서열번호: 7	sense	5'-CAGAUUACCUCUUCGGAGUUU-3'
서열번호: 8	antisense	5'-PACUCCGAAGAGGUAAUCUGUU-3'

<38>

<39> 5ml siPORT NeoFX™ 제제를 먼저 100ml Opti-MEM I 배지(Invitrogen, USA)에 희석하고 상온에서 10분 방치했다. 또한 20mM siRNA을 1ml씩 100ml Opti-MEM I 배지에 희석하여 최종 siRNA의 농도를 200nM로 하였다. 양쪽 희석된 혼합용액을 조금씩 잘 섞어 최종 혼합액을 준비하고, 이를 상온에서 다시 10분간 방치하여 siRNA 및 형질전환제를 함유하는 형질전환 혼합액을 제조하였다. siRNA의 전달을 확인하는 실험들에서는 siGLO (DY-547 붉은 형광체가 부착된 대조군 siRNA (#D-001630-02-05, Dharmacon)가 최종농도 20 ~ 200 nM로 사용되었다.

<40> **실시예 2 : 본 발명의 스텐트 코팅용 조성물을 코팅한 스텐트의 제조**

<41> 실시예 1에서 제조한 siRNA, 및 형질전환제를 함유하는 형질전환 혼합액을 준비하였다. 이 혼합액에 금속 스텐트 또는 PC-금속 스텐트를 5분간 담근 후 공기 중에 5분간 건조시키고, siRNA로 코팅되어진 스텐트를 다시 1% 젤라틴(gelatin) 수용액으로 추가적으로 5분간 코팅하고 다시 5분간 공기 중에 조심스럽게 건조시켰다.

<42> 이렇게 코팅된 siGLO의 안정성을 확인하기 위하여 코팅된 스텐트를 인산완충액 (phosphate-buffered saline, PBS)이 들어 있는 비이커에 담근 후 1시간 동안 자석혼합기 (magnetic stirrer)로 저어주면서 방치하였다. 지시된 시간대별로 꺼내어 다시 건조한 후 형광 형상화기(Typoon™)로 스텐트에 남아 있는 붉은색 파장대의 형광(Cy3 filter)을 측정하여 용출된 정도를 확인하였다.

<43> **실시예 3: 본 발명의 스텐트의 혈관 내 이식**

<44> **(1) 경동맥 풍선 손상 (Balloon-injury) 쥐 모델의 제조**

<45> 공지의 수술 방식대로 infiltrated 2F Fogarty 풍선 카테터 (Edwards Lifesciences, USA)로 정상 수컷 쥐 (Rattus rattus, n = 2~4)의 왼쪽 경동맥에 풍선 손상 일으켰다(Usui M, et al., *FASEB J.* 2002;16: 1838-

1840). 10주된 수컷 쥐를 마비시킨 후, 쥐의 왼쪽 외경동맥을 노출시켰으며 경동맥의 경계선을 전기압축시켰다. 외경동맥의 횡동맥절개(transverse arteriotomy)를 통해 카테터를 1cm 정도 밀어 넣은 후 경동맥을 3 ~ 5회 왕복 통과함으로써 풍선과 접촉된 내피세포를 손상시켰다. 손상시킨 후 혈관은 다시 봉합하고 혈액흐름을 회복시켰다. 쥐는 7일 이나 10일 동안 회복실에서 생활한 뒤 이화여대 동물실의 동물관리규정에 따라 희생되었다. 마취된 쥐로부터 손상되었던 경동맥을 절단하고 3.7% 포름알데히드를 함유한 헤파린 처리 생리식염수로 고정한 뒤 파라핀에 고정시켰다. 파라핀 고정된 경동맥은 마이크로톰을 이용하여 절편을 얻었다. 다섯 개의 연속적인 조직절편 (직경 100㎛, 두께 3㎛)을 각 경동맥의 중간부분에서 얻었다. 각각의 슬라이드는 헤마톡실린 및 에오신(Haematoxylin & Eosin, H&E)으로 염색하였다.

<46> H&E 염색된 부분의 4개의 서로 다른 부분(lumen, intima, media, total vascular area)의 면적이 분석 소프트웨어로 측정되었다 (NIH Image 1.62; http://rsb.info.nih.gov/nihimage/download.html). 간단히 혈관강(lumen) 공간, 내탄력층 (internal elastic lamina, IEL), 및 외탄력층(external elastic lamina, EEL)으로 둘러싸인 영역들이 측정되었다. 내막 (intima) 영역은 IEL 영역에서 혈관강(lumen) 영역을 제외시킴으로써 측정되었고, 중막(media) 영역은 EEL영역에서 IEL영역을 제외시킴으로써 측정 되었다. 결과분석은 각 마리 당 5장의 슬라이드의 영역 값의 평균을 사용하였고 중막에 대한 내막의 비율 (intima/media ratio)로 표시하였다.

<47> **(2) 스텐트 코팅용 조성물을 코팅한 스텐트의 쥐의 대동맥으로 이식**

<48> 쥐를 먼저 호흡 마취시키고 오른쪽 다리 고관절 부위를 절개하였다. 대퇴동맥 아래 부분을 노출한 다음 천자(puncture)할 부분의 아래를 동맥/정맥을 함께 봉합사(4/0 black silk)로 결찰하였다. 이어 동맥은 바늘 카테터(needle catheter)로 구멍을 뚫었다. 바늘은 제거되고 가이딩 카테터(guiding catheter)를 사용하여 가이드 와이어를 복부동맥(abdominal aorta)에 위치시켰다. 카테터를 빼낸 후 introducer를 넣어 장착하였다. 이어 가이드 와이어를 제거 하고 최종적으로 introducer를 통해 본 발명의 스텐트 코팅용 조성물을 코팅한 스텐트를 복부동맥에 위치시킨 후 혈관을 봉합하고 이식을 완료하였다. siGLO의 전달을 확인하기 위하여, 스텐트 시술된 동맥(stented artery)은 plastic-embedded (Technovoit 9100, Wehrheim, Germany) (PNAS 2006;10(1): 159-164 Heart 2002;88:401-405)되고 절편으로 만들어 졌다. siGLO의 형광과 금속 스텐트는 공초점 레이저 주사현미경(confocal laser-scanning microscope, LSM510, Carl-Zeiss)을 사용하여 관찰되었다.

<49> **실험예 1: siRNA의 혈관 내로의 전달 여부 확인**

<50> siGLO라고 불리는 red fluorescent DY547-labeled control siRNA (# D-001630-02-05, Dharmacon, USA)를 이용하여 표적 siRNA의 전달 여부를 확인하였다. siGLO 및 그와 동일한 비-형광 대조군 siRNA (siCONT)를 형질전환제(siPORT™ NeoFXTM, Ambion, USA)와 최종농도 20 ~ 200 nM 되도록 혼합한 용액을 사용하였다. 형질전환제와 섞지 않은 비-형광 대조군 siRNA 또는 siGLO 역시 최종농도가 20 ~ 200 nM이 되도록 인산완충액(PBS)과 혼합한 용액을 대조군으로 사용하였다. 쥐의 오른쪽 경동맥은 앞서 상술한 바와 같이 노출시켰고, 이를 두 그룹으로 나누어 한 그룹은 풍선 카테터 손상을 받게 했고, 다른 한 그룹은 손상시키지 않았다. 비-형광 대조군 siRNA나 siGLO를 포함하는 형질전환제제 혼합용액 200 ㎕를 손상된 혈관내에 주입하고 15분 동안 incubation하였다. 혈관성형술 후 1주일 경과시, 오른쪽 경동맥을 잘라서 냉동상태에서 절편을 준비하였다. 준비된 절편들은 먼저 형광현미경으로 DY547-표지된 siGLO의 분포를 관찰하고 이어 비후된 혈관내막의 두께를 관찰하기 위해 H&E 염색을 하였다. 풍선 카테터 손상의 경우는 손상 받지 않은 경우에 비하여 내막이 현저하게 두터워짐(내막/중막 비율이 60%이상 증가)을 H&E 염색에서 재현성 있게 확인할 수 있었다(도 1).

<51> 비-형광 대조군 siRNA나 siGLO로 처리된 혈관벽 모두에서 혈관벽 자체의 자가형광인 몇 겹의 형광선이 관찰될 뿐이었다(도 1(A)). 한편, 풍선으로 손상되고 siGLO 혼합액으로 처리된 혈관에서는 두터워진 내막 부분에서 빨강색의 형광이 선명하게 관찰되었다 (도 1(B), 화살표 머리). 반면, 혈관은 손상되었지만 형질전환제를 혼합하지 않고 siRNA와 식염수를 혼합한 용액을 처리한 혈관에서는 두터워진 내막 부분에서 빨강색 형광을 전혀 관찰할 수 없었다(도 1(C)). 이를 통해 siRNA 자체로는 손상되지 않은 혈관내피층은 물론 심지어 손상된 혈관세포로도 형질전환제의 도움 없이는 통과할 수 없음을 확인하였다.

<52> **실험예 2 : PDGFR beta 발현 억제에 의한 내막 두께의 감소 실험**

<53> 주입된 siRNA가 기능 하는지 알아보기 위해 평활근에 잘 발현되어 있고, 그 성장을 조절하는 것으로 알려진 PDGFR을 타겟으로 삼았다. 또한 손상된 부위로 모이는 혈소판들에 의해 생성되는 것으로 알려진 PDGF-BB (Genebank XM_343293)를 대조군으로 선택하였다. 해당 단백질인 PDGFR와 PDGF-BB의 발현을 저해시키는 siRNA는 각각의 처리도 가능하나, 특이성을 향상시키기 위해 PDGFR의 경우는 표 1기재의, PDGF의 경우에는 표2 기재의,

4가지 다른 siRNA 혼합물 (Dharmacon Co.; Rat PDGFB (#L-081176-01-0010))을 이용하였다.

<54> [표2]

	Sequence	
서열번호: 9	sense	5'-GGUGAGAAAGAUCGAAAUUUU-3'
서열번호: 10	antisense	5'-PAAUUUCGAUCUUUCUCACCUU-3'
서열번호: 11	sense	5'-ACACUAAGAGCGUGCGUCAUU-3'
서열번호: 12	antisense	5'-PUGACGCACGCUCUUAGUGUUU-3'
서열번호: 13	sense	5'-GUGGCAAAGCUGACGUCUUUU-3'
서열번호: 14	antisense	5'-PAAGACGUCAGCUUUGCCACUU-3'
서열번호: 15	sense	5'-CCAAAGGGAAGCACCGAAAUU-3'
서열번호: 16	antisense	5'-PUUUCGGUGCUUCCCUUUGGUU-3'

<55>

<56> 대조군 siRNA, PDGF-BB에 대한 siRNA 또는 PDGFRβ에 대한 siRNA를 형질전환제와 혼합한 용액을 실험예 1에서처럼 노출되고 손상된 쥐의 오른쪽 경동맥에 200 μl 씩을 각각 주입하고 15분 동안 incubation하였다. 혈관성형술 후 1주일 경과시, 오른쪽 경동맥을 잘라서 냉동상태에서 절편을 준비하였다. 준비된 절편들은 비후된 혈관내막의 두께를 관찰하기 위해 H&E 염색을 하였다. 도 2A의 화살표로 강조된 부분에서 보는 바와 같이 경동맥의 풍선 손상은 내막영역에서의 평활근 세포의 증식과 이동을 크게 증가시켰다. PDGF-BB의 발현 저해는 내막 두께 감소에 미미한 효과를 일으켰으나, PDGFRβ 의 발현 저해는 현저한 내막 두께 감소 효과를 나타냄을 확인하였다 (도 2). 이러한 결과는 또한 주입된 siRNA가 성공적으로 기능을 하고 있다는 것을 보여준다.

<57> **실험예 3: 스텐트에 코팅된 siRNA의 용출 확인**

<58> 실시예1에 의해 제조된 siGLO를 포함하는 형질전환 혼합용액(혈관 재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물)을 두 개의 서로 다른 스텐트, 즉 아무것도 코팅하지 않은 금속 스텐트(bear metal stent)와 포스포콜린(phosphocholine, PC) 코팅된 금속 스텐트(PC-금속 스텐트)에 실시예 2의 방법으로 코팅하고, 각각을 다시 두 군으로 나누어 한 군에는 1% 젤라틴 수용액을 제2코팅액으로 하여 추가적인 코팅을 시행하였고, 다른 한 군은 추가적인 코팅을 하지 않았다. 5분 동안 상온에서 공기 건조한 후, siGLO가 용출되도록 인산완충액(phosphate-buffered saline)에 담궈 자석혼합기에서 서서히 저어 주면서 도 3에서 표시된 시간대 별로 꺼내어 남아 있는 형광의 양을 실시예 2에서 서술한 바와 같이 측정하였다.

<59> 놀랍게도, 금속 스텐트와 비교하여 PC-금속 스텐트에 코팅되는 siGLO의 양이 2배 가량 많았다. 금속 스텐트와 PC-금속 스텐트 모두에서 초기 30분내에 30%정도의 코팅 siRNA의 용출이 일어나고 이후에는 안정화되어 더 이상의 용출은 일어나지 않았다(도 3). 한편 젤라틴의 제2코팅액으로 추가적인 코팅을 한 군은 추가적인 코팅을 하지 않은 군에 비해 siGLO의 용출이 현저히 지연되어 90% 이상의 siGLO가 스텐트 종류에 무관하게 남아 있음을 확인하였다. 결국, 스텐트 이식 후 안정하게 잔존하고 있는 siRNA의 양이 본 발명의 효과에 가장 큰 영향을 미침을 고려할 때, PC-금속 스텐트에 젤라틴 제2코팅액으로 추가적으로 코팅한 스텐트가 단순한 금속 스텐트보다 2배 가까운 양의 siRNA를 안정하게 유지하여 매우 바람직한 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 나아가, 젤라틴을 포함한 다양한 생분해성 (bio-degradable) 또는 비-생분해성 고분자를 포함하는 제2코팅액의 사용은 siRNA의 안정한 전달에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

<60> **실험예 4: 스텐트의 동맥 내 이식 및 혈관벽으로의 전달 확인**

<61> 실시예 1에서 제조된 siGLO 형질전환 혼합액(혈관 재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물)으로 코팅하고 1% 젤라틴 수용액을 포함하는 제2코팅액으로 추가적으로 코팅된 금속 스텐트들을 쥐의 동맥에 이식하여 2주간 유지하였다. 그리고 분석을 위해 동맥 혈관을 잘라내어 고정시키고, 조직절편을 만들어 확인한 결과 금속 스텐트는 혈관 벽에 잘 이식되는 것으로 나타났다 (도 4, 화살표).

<62> 스텐트 및 형질전환제의 조합에 따른, siRNA의 이식된 스텐트로부터 혈관벽으로의 전달 효율성을 조사하였다. 실험예3에서 기재된 바와 같이 siGLO를 siPORT NeoFX, Polyamine, 및 Lipofectamine에서 선택된 어느 하나의 형질전환제와 혼합하여 각각의 형질전환 혼합액(혈관 재협착 방지 스텐트 코팅용 조성물)을 제조하였다. 제조된 형질전환 혼합액으로 금속 또는 PC-금속 스텐트를 코팅하였다. 상기 코팅된 스텐트를 1% 젤라틴 수용액을 포함하는 제2코팅액으로 추가 코팅하고 각각 쥐의 동맥에 이식하고 2주간 유지하였다.

<63> 도 4에 나타난 형광 이미지는 siGLO가 혈관 벽으로 확산되어 안정적으로 남아있다는 것을 보여준다. 이로써, siRNA가 혈관 벽 내에 안정적으로 확산 분포하고 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 조성물이 코팅된

스텐트를 통한 siRNA의 운반법은 실제 생체에서 안정적으로 안전하게 적용가능하며, siRNA를 혈관재협착을 치료하는 새로운 방법으로 적용가능함을 확인하였다.

<64> 전달된 형광 siRNA의 양을 정량적으로 분석한 결과(도 5), siPORT NeoFX 또는 lipofectamine의 경우는 PC 코팅 스텐트에 코팅되었을 때 가장 잘 전달되는 반면, polyamine은 스텐트의 종류에 상관없이 잘 전달됨을 확인하였다. 조사된 조합 중 polyamine과 혼합된 siRNA가 금속 스텐트에 코팅되었을 때 이식동안 제거되지 않고 동맥 혈관 벽으로 가장 잘 전달되었다.

도면의 간단한 설명

<65> 도 1은 siRNA가 혈관벽으로 통과하는 지 여부를 확인한 도이다. si-CONT은 비-형광 대조군 siRNA를 의미하며, Cy3은 DY-547 형광체를 측정하기 위한 빨강색 형광 필터를 이용함을 의미한다. H&E 염색은 풍선손상 (balloon injury)의 경우 내막이 현저히 두터워 졌음을 보여준다.

<66> 도 2A는 대조군 siRNA와 비교하여 도입된 PDGF-BB 혹은 PDGFRβ에 대한 siRNA의 기능을 내막 두께 (화살표시된 부분)의 감소로 확인한 도이다. 도 2B 는 내막두께를 정량하여 나타낸 그래프이다.

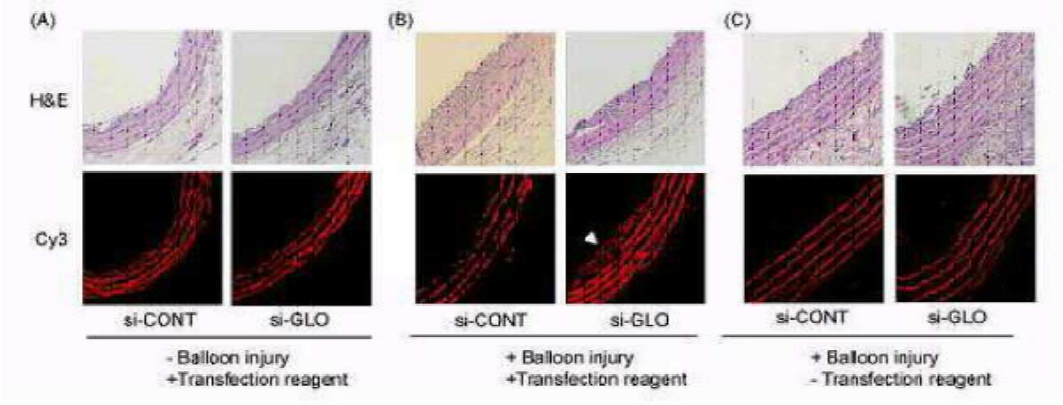
<67> 도 3은 금속스텐트에 이루어진 코팅 및 코팅된 siRNA의 용출을 확인한 도이다.

<68> 도 4는 이식된 스텐트로부터 siRNA가 혈관벽으로 전달되는지 여부를 확인한 도이다.

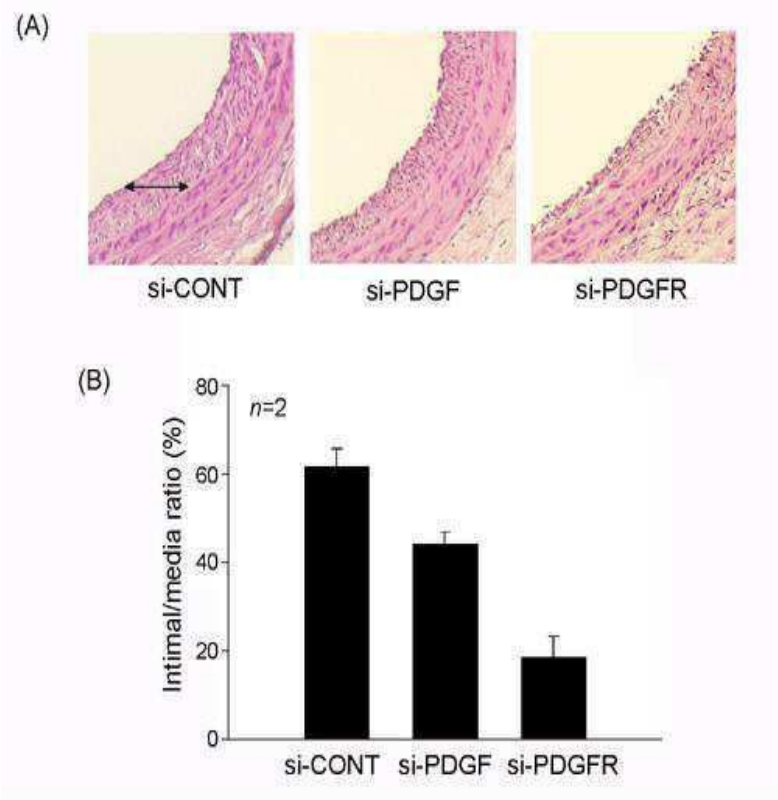
<69> 도 5는 혈관벽에 전달된 형광의 양을 정량 분석하여 표시한 그래프이다.

도면

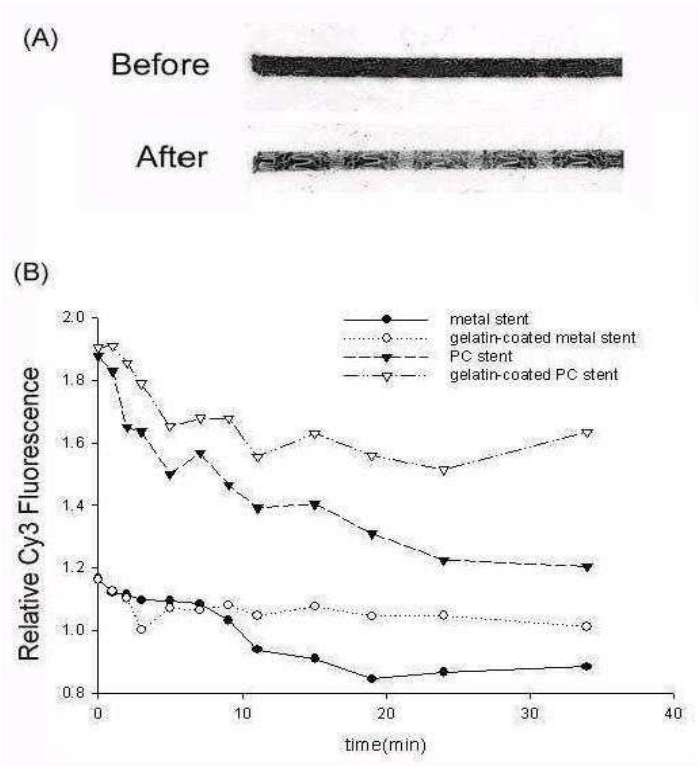
도면1



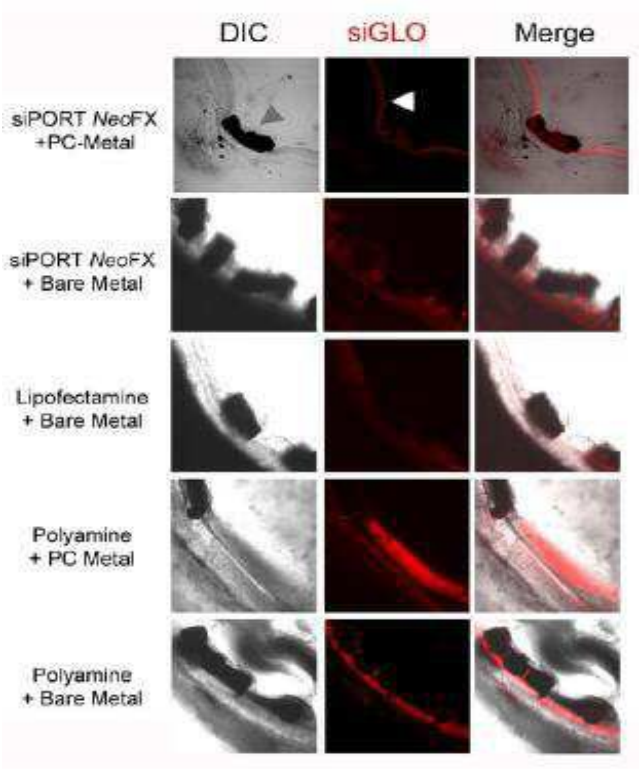
도면2


(A)
si-CONT
si-PDGF
si-PDGFR
(B)
n=2
Intimal/media ratio (%)
80
60
40
20
0
si-CONT
si-PDGF
si-PDGFR

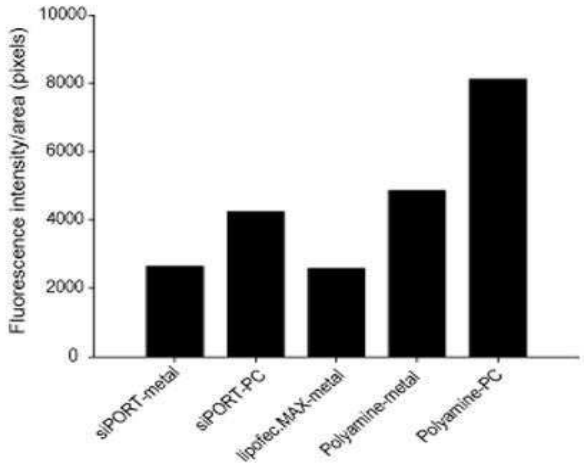
도면3


(A)
Before
After
(B)
metal stent
gelatin-coated metal stent
PC stent
gelatin-coated PC stent
Relative Cy3 Fluorescence
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0
10
20
30
40
time(min)

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> A Composition for the coating of a stent for the prevention of a restenosis and the prevention method of restenosis using thereof

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Seq 1, Sense Sequence

<400> 1
guagaaaucc uuggguauau u 21

<210> 2
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Seq 1, Antisense Sequence

<400> 2
uauacccaag gauuucuacu u 21

<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Seq 2, Sense Sequence

<400> 3
gagaaagcca ucaacguuau u 21

<210> 4
<211> 21
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Seq 2, Antisense Sequence

<400> 4
uaacguugau ggcuuucucu u 21

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Seq 3, Sense Sequence

<400> 5
acaucaaaua cgcggacauu u 21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Seq 3, Antisense Sequence

<400> 6
auguccgcgu auuugauguu u 21

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Seq 4, Sense Sequence

<400> 7

cagauuaccu cuucggaguu u 21

<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Seq 4, Antisense Sequence

<400> 8
acuccgaaga gguaaucugu u 21