



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월25일
(11) 등록번호 10-0807069
(24) 등록일자 2008년02월18일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0096396

(22) 출원일자 2007년09월21일

심사청구일자 2007년09월21일

(56) 선행기술조사문헌

US 2004/0247593

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

오유경

서울 도봉구 창4동 동아청솔아파트 110동 1002호

심가용

경기 용인시 수지구 죽전1동 96 GS 자이아파트

103-102

김상희

경남 양산시 북정동 세롬성원 네오파트 106-403

(74) 대리인

김기정, 안소영

전체 청구항 수 : 총 14 항

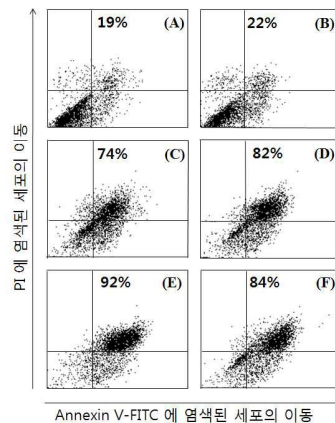
심사관 : 김윤경

(54) 암 치료용 의약 조성물

(57) 요약

본 발명은 Wnt1 전사체(mRNA transcript) 염기서열에 상보적으로 결합하여 세포 내에서 Wnt1의 발현을 억제하는 작은 간섭 리보핵산(small interfering RNA, siRNA) 및 이를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 Wnt1 전사체의 염기서열에 상보적인 siRNA는 리보핵산 매개 간섭현상(RNA-mediated interference, RNAi)에 의해 암세포에 공통적으로 발현되는 Wnt1의 발현을 억제하여 암세포를 사멸시키므로 본 발명의 조성물은 우수한 항암제로 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2, 서열번호 7 또는 서열번호 14의 Wnt1 전사체(mRNA transcript) 염기서열에 상보적으로 결합하여 세포 내에서 Wnt1의 발현을 억제하는 하나 이상의 siRNA를 포함하는 암 치료용 의약 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 siRNA를 핵산 전달체와의 복합체 형태로 포함하는 암 치료용 의약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 핵산 전달체는 양이온성 리포좀인 암 치료용 의약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 양이온성 리포좀은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EPOPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDMPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, SPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDPPC), 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP), N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTMA) 및 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 (3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol, DC-Cholesterol)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 양이온성 지질을 포함하는 것인 암 치료용 의약 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 양이온성 리포좀은 1,2-디아실-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE), 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPhPE), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린] (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DOPS), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, DO-Ethyl-PC) 및 콜레스테롤로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 보조 지질을 추가로 포함하는 것인 암 치료용 의약 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 핵산 전달체는 양이온성 고분자인 암 치료용 의약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 양이온성 고분자는 폴리-L-라이신 (poly-L-lysine), 폴리-L-오르니틴(poly-L-ornithine), 폴리-L-히스티딘(poly-L-histidine), 폴리-L-아르기닌 (poly-L-arginine), 비스(3-아미노프로필) 터미네이티드 폴리테트라하이드로퓨란 (bis(3-aminopropyl)terminated polytetrahydrofuran), 폴리아크릴아마이드 (polyacrylamide, PA), 폴리(α-[4-아미노부틸]-L-글리콜산 (poly(α-[4-aminobutyl]-L-glycolic acid, PAGA), 폴리(2-아미노에틸 프로필렌 포스페이트) (poly(2-aminoethyl propylene phosphate), PPE-EA), 사이클로덱스트린의 양이온성 유도체 (cationic derivatives of cyclodextrin), 폴리(2-(디메틸아미노)에틸 메타아크릴레이트) (poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate), pDMAEMA), 폴리(4-비닐피리딘) (poly(4-vinylpyridine), P4VP), 0,0'-비스(2-아미노프로필) 폴리프로필렌 글리콜-블록-폴리에틸렌 글리콜-블록-폴리프

로필렌 글리콜 (0,0'-bis(2-aminopropyl) polypropylene glycol-block-polyethylene glycol-block-polypropylene glycol), 키토산, 키토산 유도체, 폴리에틸렌이민 (polyethylenimine, PEI), 폴리에틸렌이민 유도체, 폴리아미도아민(polyamidoamine, PAMAM), 파쇄형(fractured) PAMAM 및 폴리-N-에틸-4-비닐피리디늄 트리브로마이드 (poly-N-ethyl-4-vinylpyridinium tribromide)로 구성되는 군으로부터 선택되는 암 치료용 의약 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 항암 화학요법제를 추가적으로 포함하는 암 치료용 의약 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 siRNA가 서열번호 18의 센스 서열 및 서열번호 19의 안티센스 서열을 갖는 것인 암 치료용 의약 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 siRNA가 서열번호 28의 센스 서열 및 서열번호 29의 안티센스 서열을 갖는 것인 암 치료용 의약 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 siRNA가 서열번호 42의 센스 서열 및 서열번호 43의 안티센스 서열을 갖는 것인 암 치료용 의약 조성물.

청구항 13

Wnt1의 발현을 억제하고 서열번호 18의 센스 서열 및 서열번호 19의 안티센스 서열을 갖는 siRNA.

청구항 14

Wnt1의 발현을 억제하고 서열번호 28의 센스 서열 및 서열번호 29의 안티센스 서열을 갖는 siRNA.

청구항 15

Wnt1의 발현을 억제하고 서열번호 42의 센스 서열 및 서열번호 43의 안티센스 서열을 갖는 siRNA.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 Wnt1 전사체(mRNA transcript) 염기서열에 상보적으로 결합하여 세포 내에서 Wnt1의 발현을 억제하는 작은 간섭 리보핵산(small interfering RNA, siRNA) 및 이를 포함하는 암 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

<2> Wnt는 주변 세포의 수용체에 결합하여 다양한 유전자의 발현을 조절하는 분비 단백질로 Wnt 단백질에 대한 유전자는 많은 종류의 종양에서 공통적으로 발견되어 최초의 세포성 암유전자 int라고 명명되었다. 이후, 초파리의 형태 발생 과정에 참여하는 wingless 유전자가 int-1의 homolog라는 사실이 밝혀져 int가 발생과정에서도 중요한 역할을 한다고 제안되어 wingless의 w와 int를 합쳐서 Wnt라고 부르게 되었다.

<3> Wnt 신호전달경로는 종양 발생에서 주요한 경로로 인식되어 왔다. 베타-카테닌(β -catenin)과 결합하여 불활성화 복합체를 형성하는 adenomatous polyposis coli (APC), Axin, Axin2, β TrCP(E3 ligase)등은 베타-카테닌을 분해할 수 없는 형태로 돌연변이가 일어나고, 베타-카테닌 또한 분해가 잘 되지 않는 형태로 돌연변이가 일어나므로써 결론적으로 베타-카테닌이 핵 내에 많이 존재하게 되어 Wnt/베타-카테닌 경로가 활성화된 상태가 된다. 베타-카테닌이 핵 내에 많이 존재하게 되면, TCF/LEF(T-cell factor/Lymphoid enhancing factor)와 복합체를 형성하여 대상 유전자들의 전사(transcription)를 유도하게 된다.

- <4> Wnt/베타-카테닌 경로가 활성화되면 암 생성과 관련된 여러 가지 유전자의 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다. Wnt/베타-카테닌 경로는 c-myc 과 cyclin D1의 발현을 유도하여 세포분열을 활성화 시키고, 더불어 성장인자 수용체인 c-met과 성장인자(growth factor)인 FGF 18(fibroblast growth factor 18) 등의 발현을 유도함으로써 세포증식을 증가시킨다. 세포 증식에 필요한 단백질 이외에도 서바이빈(survivin) 단백질과 같은 세포사멸 억제 기능을 보유하는 유전자의 발현을 증가시키며 VEGF(vascular endothelial growth factor) 유전자의 발현을 유도하여 종양에서의 혈관생성을 자극하고 종양의 성장과 전이를 위한 기반을 마련해준다. 그 밖에도 암 세포의 이동과 전이를 위해 세포부착과 세포외부의 매트릭스(extracellular matrix)와 관련된 ASEF(APC stimulated exchange factor), MMP(matrix metalloproteinase) 패밀리를, CD44 등이 Wnt/베타-카테닌 경로의 대상 단백질로서 작용한다. 이렇게 암 발생에 관련된 많은 단백질의 조절에 관여하는 Wnt/ β -카테닌 경로를 대상으로 하는 종양 치료제 개발 분야의 연구는 활발히 진행되고 있으나, 현재까지의 연구는 Wnt/베타-카테닌 경로에 관여하는 단백질을 각각의 3차 구조를 기반으로 하여 설계되는 화학적인 합성 의약을 이용한 경로 억제제가 대부분이다 (Nick et al., Nature Reviews Drug Discovery, 5:997-1014, 2006).
- <5> 리보핵산 매개 간섭현상(RNAi)은 21-25개의 뉴클레오타이드 크기의 이중나선 구조를 가진 작은 간섭 리보핵산이 상보적인 서열을 가지는 전사체(mRNA transcript)에 특이적으로 결합하여 해당 전사체를 분해하여 특정 단백질의 발현을 억제하는 현상이다. 최근 이 리보핵산 매개 간섭현상이 기존의 화학 합성 의약 개발에서 발생하는 문제의 해결책을 제시하면서 전사체 수준에서 특정 단백질의 발현을 선택적으로 억제하여 각종 질병 치료제, 특히 종양 치료제 개발에 이용하려는 연구가 진행되고 있다. 작은 분자량의 화학 약물(small molecule chemical drugs)의 경우 특정한 단백질 표적에 최적화되기까지 오랜 동안의 개발 기간 및 개발 비용이 소요되는 반면, 리보핵산 매개 간섭현상을 이용한 siRNA 의약의 가장 큰 장점은 의약화가 불가능(non-druggable)한 표적 물질을 포함한 모든 단백질 표적에 대하여 최적화된 주도 물질(lead compound)의 개발이 신속히 진행될 수 있다는 것이다. 단백질이나 항체 약물이 복잡한 제조공정으로 생산의 어려움을 겪는데 반해 siRNA는 합성 및 분리정제의 용이성으로 대량생산이 비교적 쉽고, 핵산 소재의 특징상 단백질 의약보다 보관상 안정성(stability)이 높은 장점이 있다. 또한 기존의 약물과는 달리 특정 분자 표적에 오직 길항작용만 할 수 있다는 점 등 여러 장점에 기반하여 새로운 의약 후보군으로서 부상하고 있다 (David et al., Nature Chemical Biology, 2:711-719, 2006).
- <6> siRNA를 이용한 치료에서 가장 먼저 고려되어야 할 점은 목표로 하는 염기서열에서 siRNA가 가장 큰 활성을 가지는 최적의 서열을 선정하는 것이다. 리보핵산 매개 간섭현상의 효율은 표적이 되는 전사체에의 특정 결합부위가 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 지난 수 년 간의 데이터베이스를 바탕으로 단지 전사체에 결합만 하는 것이 아니라 실제로 표적 리보핵산의 발현을 억제하는 siRNA의 서열위치를 디자인할 수 있는 알고리즘이 개발되어 이용자들에게 제공되고 있다. 그러나 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 in silico 방법으로 결정된 모든 siRNA가 실제 세포 및 생체중에서 표적 리보핵산을 효과적으로 억제할 수 있다고는 말할 수 없다. siRNA가 표적 전사체와 상보적으로 결합할 수 있는 요구 사항이 충족된다 하더라도 리보핵산과 단백질의 안정성 및 세포내 위치, 리보핵산 매개 간섭현상에 관여하는 단백질들의 상태 등 이 밖에도 아직 규명되지 않은 여러 요소들이 리보핵산 매개 간섭현상의 효율을 결정하는데 관여한다는 것이 알려져 있다. 따라서 한 유전자의 전사체당 여러 개의 표적 서열위치를 선정하여 siRNA를 제조하고 이들 후보군중 발현 억제 효능이 우수한 최적위치의 서열을 발굴하는 기술이 표적 단백질에 대해 수행되는 것이 필요하다 (Derek et al., Annual Review of Biomedical Engineering, 8:377-402, 2006).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명의 목적은 Wnt1 전사체 염기서열에 상보적으로 결합하여 세포 내에서 Wnt1의 발현을 억제하는 하나 이상의 siRNA 및 이를 포함하는 암 치료용 의약 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <8> 본 발명은 서열번호 2 (5'-CCTGCTTACAGACTCCAAG-3'), 서열번호 7 (5'-CGGCGTTTATCTTCGCTAT-3') 또는 서열번호 14(5'-ATCGCCCAACTTCTGCACG-3')의 Wnt1 전사체(mRNA transcript) 염기서열에 상보적으로 결합하여 세포 내에서 Wnt1의 발현을 억제하는 하나 이상의 siRNA를 포함하는 암 치료용 의약 조성물을 제공한다.
- <9> 본 발명의 Wnt1의 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 암 치료용 의약 조성물은 Wnt의 전사체(mRNA)의 하나의 서열위치에만 선택적으로 결합이 가능하도록 siRNA 한가지만 포함할 수도 있으며 한군데 이상의 서열위치에 표적

이 가능하도록 2종 이상의 siRNA를 포함할 수도 있다.

- <10> 본 발명에 있어서, 용어 "siRNA"는 생체내 핵산 분해효소에 의한 빠른 분해를 막기 위해 화학적 변형된 siRNA를 포함하는 것으로 해석된다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다 (Andreas Henschel, Frank Buchholz1 and Bianca Habermann (2004) DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. Nucleic Acids Research 32(Web Server Issue):W113-W120). 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 저항적 이도록 하기 위한 siRNA의 화학적 변형 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. siRNA의 화학적 변형에 가장 많이 사용되는 방식은 보라노포스페이트(boranophosphate) 또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 수식 방법(modification)이다. 이들 물질은 siRNA의 뉴클레오사이드(nucleoside) 간의 연결을 안정하게 형성하여, 결과적으로 핵산 분해에 대한 저항성을 부여한다. 보라노포스페이트로 수식된 리보핵산은 핵산 분해가 잘 되지 않는 특징이 있지만, 화학 반응에 의하여 만들어 지지 않고 in vitro 전사 반응에 의해 보라노포스페이트가 리보핵산에 들어가는 방식으로만 합성이 된다. 보라노포스페이트 수식방법은 비교적 손쉬운 방법에 속하지만, 특정 위치에 수식하기 어려운 단점이 있다. 반면 포스포로티오에이트 수식 방법은 원하는 부분에 황(sulfur) 원소를 도입할 수 있는 장점이 있으나, 정도가 심한 포스포로티오에이션(phosphothioation)은 효능 감소, 독성, 비특이적 RISC(RNA-induced silencing complex) 형성 등의 문제가 나타날 수 있다. 따라서 최근에는 위의 두 가지 방법 외에 리보핵산의 종결 위치(3'말단 초과부위)에만 화학적 변형을 하여 핵산 분해효소에 저항성을 부여하는 방법이 보다 선호되고 있다. 또한 리보스 환(ribose ring)을 화학적으로 수식하여도 핵산 분해효소에 대한 저항성이 강해지는 것으로 알려져 있는데 특히 본래 세포내 존재하는 리보오스 2'-위치의 변이는 siRNA를 안정화 시킨다. 그러나 이 위치에 정확히 메틸기가 들어가야 안정성이 증가되며 너무 많은 메틸기는 반대로 리보핵산 매개 간섭 현상이 상실되는 등의 문제도 있다. 이러한 화학적 변형의 이유는 생체 내에서의 약물동력학적(pharmacokinetic)인 체류시간의 증대 및 유효성을 높이기 위한 목적도 있다 (Mark et. al., Molecular Therapy, 13:644-670, 2006).
- <11> 화학적 수식방법 외에, siRNA의 세포 내 전달 효율을 높이기 위해서는 안전하고 효율적인 전달 시스템이 요구되어진다. 이를 위해, 본 발명의 siRNA는 핵산 전달체(nucleic acid delivery system)와의 복합체 형태로 암 치료용 의약 조성물 내에 포함될 수 있다.
- <12> 세포 내로 핵산 물질을 전달하기 위한 핵산 전달체는 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 구분할 수 있다. 가장 널리 이용되는 것은 바이러스 벡터 (viral vector)로 전달 효율이 높고 지속 시간이 길기 때문이다. 여러 가지의 바이러스벡터 중 레트로바이러스 벡터(retroviral vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral vector), 아데노 부속 바이러스 벡터(adeno-associated viral vector) 등이 주요하게 사용되고 있다. 이러한 바이러스 벡터는 리보핵산의 세포내 전달 면에서는 효율적이지만, 생체 내에서의 활성을 가진 바이러스로의 재조합, 면역 반응 유발, 숙주 염색체로의 무작위 삽입 등 안전성(safety) 측면에서 여러 문제점을 가지고 있다. 이에 비해 비바이러스 벡터(nonviral vector)는 바이러스 벡터에 비해 장점을 가지고 있는데, 독성과 면역 반응이 작고, 반복적으로 투여가 가능하며, 리보핵산과의 복합체 형성이 간편하고, 대량 생산이 용이하다. 또한, 질 환 세포나 조직부위에 특이적 리간드를 비바이러스성 벡터에 접합하여, 장기○세포 선택적 핵산 전달을 가능하게 한다. 비바이러스성 벡터로서는 리포솜, 양이온성 고분자를 비롯하여, 미셀, 에멀전, 나노입자 등의 다양한 제형이 사용될 수 있다. 핵산 전달체는 동물 세포 내에 목적하는 핵산의 수송 효율을 현저히 증강시킬 수 있으며 전달하고자 하는 핵산의 사용 목적에 따라 어떤 동물 세포로도 핵산 전달이 가능하다.
- <13> 본 발명의 한 구체예에서, 상기 핵산 전달체는 양이온성 리포솜일 수 있다.
- <14> 상기 양이온성 리포솜은, 이에 제한되는 것은 아니나, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EPOPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDMPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, SPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDPPC), 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP), N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTMA) 및 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol,

DC-Cholesterol)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 양이온성 지질을 포함할 수 있다.

- <15> 또한 상기 양이온성 리포솜은, 이에 제한되는 것은 아니나, 1,2-디아실-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE), 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPhPE), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린] (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DOPS), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, DO-Ethyl-PC), 콜레스테롤 등으로부터 선택되는 하나 이상의 보조 지질을 추가로 포함할 수 있다.
- <16> 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 핵산 전달체는 양이온성 고분자일 수 있다.
- <17> 상기 양이온성 고분자는, 이에 제한되는 것은 아니나, 폴리-L-라이신 (poly-L-lysine), 폴리-L-오르니틴 (poly-L-ornithine), 폴리-L-히스티딘 (poly-L-histidine), 폴리-L-아르기닌 (poly-L-arginine), 비스(3-아미노프로필)터미네이티드 폴리테트라하이드로퓨란 (bis(3-aminopropyl)terminated polytetrahydrofuran), 폴리아크릴아미드 (polyacrylamide, PA), 폴리(α -[4-아미노부틸]-L-글리콜산 (poly(α -[4-aminobutyl]-L-glycolic acid, PAGA), 폴리(2-아미노에틸 프로필렌 포스페이트) (poly(2-aminoethyl propylene phosphate), PPE-EA), 사이클로덱스트린의 양이온성 유도체 (cationic derivatives of cyclodextrin), 폴리(2-(디메틸아미노)에틸 메타아크릴레이트) (poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate), pDMAEMA), 폴리(4-비닐피리딘) (poly(4-vinylpyridine), P4VP), 0,0'-비스(2-아미노프로필) 폴리프로필렌 글리콜-블록-폴리에틸렌 글리콜-블록-폴리프로필렌 글리콜 (0,0'-bis(2-aminopropyl) polypropylene glycol-block-polyethylene glycol-block-polypropylene glycol), 키토산, 키토산 유도체, 폴리에틸렌이민 (polyethylenimine, PEI), 폴리에틸렌이민 유도체, 폴리아미도아민 (polyamidoamine, PAMAM), 파쇄형 (fractured) PAMAM 및 폴리-N-에틸-4-비닐피리디늄 트리브로마이드 (poly-N-ethyl-4-vinylpyridinium tribromide)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 고분자일 수 있다.
- <18> 양이온성 리포솜, 양이온성 고분자 등의 제형을 갖는 본 발명의 핵산 전달체는 양하전을 띠므로, 핵산 전달체의 양하전과 핵산의 음이온성 하전에 의해 단순한 혼합(mix)에 의해 정전기 결합을 함으로써 핵산 전달체와 핵산 간의 복합체를 형성할 수 있다.
- <19> 또한, 본 발명의 암 치료용 의약 조성물은 Wnt 1의 발현을 억제하는 siRNA 외에 종래에 공지된 항암 화학요법제를 추가적으로 포함함으로써, 병용 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 Wnt1의 발현을 억제하는 siRNA와 병용투여가 가능한 항암 화학요법제는 예를 들어, 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 독소루비신 (doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토산트론(mitoxantrone), 발루비신(valubicin), 커큐민(curcumin), 제피티닙(gefitinib), 에를로티닙(erlotinib), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 도세탁셀(docetaxel), 또는 파클리탁셀(paclitaxel) 등을 사용할 수 있다.
- <20> 본 발명은 siRNA 또는 siRNA와 핵산 전달체와의 복합체 외에 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 적당한 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 이러한 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 제제화 될 수 있다.
- <21> 본 발명의 siRNA 또는 siRNA와 핵산 전달체와의 복합체는 암의 치료를 위해 세포 내로 도입될 수 있다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 siRNA 또는 siRNA와 핵산 전달체와의 복합체를 세포 내에 도입하게 되면 암의 생성에 관여하는 Wnt1의 발현이 억제되어 암세포가 사멸하게 된다.
- <22> 따라서 본 발명은 항암제의 제조를 위한 서열번호 2, 서열번호 7 또는 서열번호 14의 Wnt1 전사체(mRNA transcript) 염기서열에 상보적으로 결합하여 세포 내에서 Wnt1의 발현을 억제하는 siRNA의 용도 및 유효량의 서열번호 2, 서열번호 7 또는 서열번호 14의 Wnt1 전사체(mRNA transcript) 염기서열에 상보적으로 결합하여 세포 내에서 Wnt1의 발현을 억제하는 siRNA를 대상체의 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 암 치료방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 암 치료는 암의 예방 및 억제를 포함한다.
- <23> 본 발명의 암 치료용 의약 조성물을 통해 in vivo 또는 ex vivo 상에서 세포 내부로 목적하는 핵산을 도입하게 되면 표적 단백질인 Wnt1의 발현을 선택적으로 감소시키거나 표적 유전자에 생긴 변이를 수정하는 역할을 하여 Wnt1의 과다 발현으로 발생하는 암을 치료할 수 있게 된다.

<24> 본 발명에 있어서, 상기 siRNA 또는 siRNA와 핵산 전달체의 복합체의 치료상 유효량은 암 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 투여되는 핵산의 종류, 제형의 종류, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 치료 기간, 동시 사용되는 화학 항암제 등의 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인에게 상기 암 치료용 조성물을 예컨대 1일 1회 투여시 0.001 mg/kg ~ 100 mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

<25> 하기 실시예에서는 Wnt1의 전사체 전체 서열에서 발현 억제에 효과적인 siRNA 구성에 적합한 후보 서열군을 선택하여 siRNA들을 합성한 후, 리포좀, 양이온성 고분자 등의 전달체를 이용하여 종양 세포주에 처리하여 리보핵산 매개에 의한 발현 간섭현상을 전사체 단계에서 역전사효소반응으로 확인하였다. 또한 Wnt 1 발현 억제가 종양 세포의 생장에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Wnt1에 대한 siRNA 처리군들을 대상으로 MTT(tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 이용한 염색 방법, 젖산 탈수소효소(LDH) 측정 실험, Annexin V-FITC(fluorescein isothiocyanate)/PI(propidium iodide) 염색법 및 세포염색법을 사용하였다.

<26> 하기 실시예를 통해 밝혀진 바에 따르면, 서열번호 2, 서열번호 7 또는 서열번호 14의 Wnt1 전사체(mRNA transcript) 염기서열에 상보적으로 결합하여 세포 내에서 Wnt1의 발현을 억제하는 본 발명의 siRNA 중에서도 서열번호 18의 센스 서열 및 서열번호 19의 안티센스 서열을 갖는 siRNA, 서열번호 28의 센스 서열 및 서열번호 29의 안티센스 서열을 갖는 siRNA, 서열번호 42의 센스 서열 및 서열번호 43의 안티센스 서열을 갖는 siRNA가 특히 Wnt1의 발현을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. 따라서 본 발명은 서열번호 18의 센스 서열 및 서열번호 19의 안티센스 서열을 갖는 siRNA, 서열번호 28의 센스 서열 및 서열번호 29의 안티센스 서열을 갖는 siRNA, 서열번호 42의 센스 서열 및 서열번호 43의 안티센스 서열을 갖는 siRNA 및 이들을 포함하는 암 치료용 의약 조성물을 제공한다.

효 과

<27> 본 발명의 Wnt1 전사체(mRNA)의 염기서열에 상보적인 siRNA는 리보핵산 매개 간섭현상(RNA-mediated interference, RNAi)에 의해 암세포에 공통적으로 발현되는 Wnt1의 발현을 억제하여 암세포를 사멸시키므로 본 발명의 조성물은 우수한 항암제로 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<28> 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.

<29> [실시예]

<30> 실시예 1. Wnt1 발현 억제용 siRNA가 결합할 수 있는 타겟 염기서열 후보군의 디자인

<31> Wnt1의 전사체에서 siRNA가 결합할 수 있는 타겟 염기서열 후보군을 디자인하였다.

<32> 먼저 원하는 염기서열에 대한 siRNA 디자인 프로그램을 사용하여, Wnt1 mRNA서열(NM_005430)에서 siRNA가 결합할 수 있는 타겟 염기서열을 디자인하였다.

<33> 표 1은 인터넷 상에서 제공되는 siRNA 디자인 프로그램 및 URL을 표기한 것이고, 표 2는 표 1의 프로그램들을 사용하여 본 발명에서 최종적으로 선택한 in silico method에 의한 siRNA의 타겟 염기서열의 후보군이다.

<34> 표 1. siRNA 디자인 프로그램

디자인 프로그램 명칭	URL
siRNA Sequence Designer (Clontech)	http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesign.do
GenScript siRNA Target Finder	http://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai
siRNA Design Tool (Qiagen)	http://www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner.aspx

Find siRNA sequences (Invivogen)	http://www.sirnazizard.com/design.php
siRNA Selection Program (WI)	http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/
siRNA Target Finder (Ambion)	http://ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html

표 2. Wnt1 mRNA (NM_005430)에서 siRNA가 결합할 수 있는 목표 염기서열 후보군

서열번호	염기시작번호	염기서열
1	326	CCACGAACCUGCUUACAGA
2	333	CCUGCUUACAGACUCCAAG
3	396	CAAACAGCGGCGUCUGAUA
4	550	AACCGAGGCGUCGAGAAA
5	559	UGUCGAGAAACGGCGUUUA
6	561	UCGAGAAACGGCGUUUAUC
7	567	CGGCGUUUAUCUUCGCUAU
8	627	UCAGAAGGUUCCAUCGAAU
9	653	CGUGUGACUACCGGCGGCG
10	707	CAGCGACAACAUUGACUUC
11	785	UCCUCAUGAACCUUCACAA
12	817	GUACGACCGUAUUCUCCAA
13	1075	GAGAAUCCGCGAACUUCU
14	1079	AUCGCGAACUUCUGCACG
15	1273	AACUGCACGACGCGCGUA

실시예 2. Wnt1 발현 억제용 siRNA 후보군의 제조

실시예 1에서 디자인한 타겟 염기서열에 결합할 수 있는 siRNA 15종을 Ambion사(Ambion Inc., Texas, USA)의 *Silencer*[®] siRNA Construction kit를 구입하여 설명서에 기재된 방법대로 합성 제조하였다. 15종의 siRNA 후보군의 서열은 표3에 나타내었다.

표 3. Wnt1 발현 억제용 siRNA의 염기서열 후보군

실시예	서열번호	센스 염기서열(5'-3')	염기시작번호
		안티센스 염기서열 (5'-3')	
2-1	16	CCACGAACCUGCUUACAGATT	326
	17	UCUGUAAGCAGGUUCGUGGTT	
2-2	18	CCUGCUUACAGACUCCAAGTT	333
	19	CUUGGAGUCUGUAAGCAGGTT	
2-3	20	CAAACAGCGGCGUCUGAUATT	396
	21	UAUCAGACGCCGUGUUUGTT	
2-4	22	AACCGAGGCGUCGAGAAATT	550
	23	UUUCUCGACAGCCUCGGUUTT	
2-5	24	UGUCGAGAAACGGCGUUUATT	559
	25	UAAACGCCGUUUCUGACATT	
2-6	26	UCGAGAAACGGCGUUUAUUCTT	561
	27	GAUAAACGCCGUUUCUGATT	
2-7	28	CGGCGUUUAUCUUCGCUAUTT	567
	29	AUAGCGAAGAUAAACGCCGTT	
2-8	30	UCAGAAGGUUCCAUCGAAUUTT	627
	31	AUUCGAUGGAACCUUCUGATT	

2-9	32	CGUGUGACUACCGGCGGCGTT	653
	33	CGCCGCCGGUAGUCACACGTT	
2-10	34	CAGCGACAACAUGACUUCTT	707
	35	GAAGUCAAGUUGUCGUGTT	
2-11	36	UCCUCAUGAACCUACAATT	785
	37	UUGUGAAGGUCAUGAGGATT	
2-12	38	GUACGACCGUAUUCUCCAATT	817
	39	UUGGAGAAUACGGUCGUAGTT	
2-13	40	GAGAAAUCGCCCAACUUCUTT	1075
	41	AGAAGUUGGGCGAUUUCUCTT	
2-14	42	AUCGCCCAACUUCUGCACGTT	1079
	43	CGUGCAGAAGUUGGGCGAUTT	
2-15	44	AACUGCACGCACGCGGUATT	1273
	45	UACGCGCGUGCGUGCAUUTT	

<43> 실시예 3. Wnt1 발현 억제용 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체의 제조

<44> 실시예 2에서 합성 제조한 15종의 Wnt 발현 억제용 siRNA와 이를 전달해 주는 양이온성 리포솜과의 복합체를 제조하였다.

<45> 먼저, 세포 융합성 인지질인 1,2-디아실-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE)과 콜레스테롤, 양이온성 인지질인 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC) (Avanti Polar Lipid Inc., USA)을 몰비 1:1:1로 취해 유리 바이알에 넣어 혼합한 후 질소 환경에서 모든 클로로포름이 증발될 때까지 낮은 속도로 회전 증발시켜 지질 박막 필름으로 제조하였다. 지질 다층형 소구체 (multilamella vesicle)를 제조하기 위하여 이 박막필름에 인산완충용액 1ml를 첨가하고 바이알을 37℃로 하여 밀봉 후 3분간 교반(vortexing)하였다. 균일한 크기를 만들기 위해 이를 입자 균질화 제조기 (extruder, Northern Lipid Inc., Canada)를 사용하여 0.2 μ m 폴리카보네이트 막을 3번 통과시켜 양이온성 리포솜을 제조하였다. 얻어진 양이온성 리포솜을 실시예 2의 15종의 Wnt 발현 억제용 작은 간접 리보핵산과 각각 혼합하여 상온에서 20분간 유지시켜 siRNA 및 양이온성 리포솜과의 복합체를 제조하였다. 실시예 3을 통해 제조된 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체의 구성을 정리하면 표 4와 같다.

<46> 표 4. 실시예 3을 통해 제조된 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체의 구성

실시예	Wnt1 siRNA	양이온성 리포솜
3-1	실시예 2-1	DOPE + 콜레스테롤 + EDOPC
3-2	실시예 2-2	
3-3	실시예 2-3	
3-4	실시예 2-4	
3-5	실시예 2-5	
3-6	실시예 2-6	
3-7	실시예 2-7	
3-8	실시예 2-8	
3-9	실시예 2-9	
3-10	실시예 2-10	
3-11	실시예 2-11	
3-12	실시예 2-12	
3-13	실시예 2-13	
3-14	실시예 2-14	
3-15	실시예 2-15	

<48> 실시예 4. Wnt1 발현 억제용 siRNA와 양이온성 고분자와의 복합체의 제조

<49> 실시예 2에서 합성 제조한 Wnt1 발현 억제용 siRNA를 2종씩 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)과 혼합하여 3가지의 복합체를 제조하였다. 분자량 25kD 폴리에틸렌이민(PEI) (Sigma-

Aldrich, USA)을 물에 녹인 후 물농도 1 mM의 비율로 조정하고 취해 파이렉스 100ml 유리 등근바닥 플라스크에 넣어 녹인 후 1N 염산으로 pH 5가 될 때까지 조정하였다. 불순물을 제거하기 위하여 syringe filter 0.2 μ m 막을 통과시켜 양이온성 고분자를 제조하였다. 실시예 2에서 합성 제조한 Wnt1 발현 억제용 siRNA 중 2종을 표 4와 같이 선택하여, 상기 제조한 양이온성 고분자와 혼합하고 20분간 실온에 방치하여 복합체를 제조하였다.

표 5. 실시예 4를 통해 제조된 siRNA와 양이온성 고분자와의 복합체의 구성

실시예	Wnt1 siRNA	양이온성 고분자
4-1	실시예 2-2 + 실시예 2-7	폴리에틸렌이민
4-2	실시예 2-2 + 실시예 2-14	
4-3	실시예 2-7 + 실시예 2-14	

비교예 1. 루시퍼라제 GL2(luciferase GL2) 발현 억제용 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체의 제조

siRNA 자체의 세포독성을 비교하기 위한 음성대조군으로써 기존 시판품인 루시퍼라제 GL2의 발현을 억제하는 siRNA를 삼천리제약(Samchully Pharmaceuticals, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 루시퍼라제 GL2 발현 억제용 siRNA의 염기서열은 정방향인 5'-CGUACGCGAAUACUUCGATT-3' 이고 역방향인 5'-UCGAAGUAUCCGCGUACGTT-3' 이다. 루시퍼라제 GL2 발현 억제용 siRNA를 실시예 3에서 제조한 양이온성 리포솜과 혼합하여 상온에서 20분간 유지시켜 siRNA 및 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물을 제조하였다.

<간암세포주 Hep3B의 배양>

간암세포인 Hep3B 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Hep3B 세포주는 10% 우태아 혈청 w/v (HyClone laboratories Inc, USA)과 100 unit/ml 페니실린 또는 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM (Dulbecco's modified eagles medium, Gibco, USA)에 배양하였다.

실시예 5. 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 Wnt1 발현 억제 siRNA의 Wnt1 전사체 발현 억제 효능평가

Wnt1에 대한 siRNA 함유 조성물이 암세포사멸에 미치는 효과에 대해 평가하기 위하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다.

Hep3B 세포주를 실험 전날 24-웰 플레이트에 웰 당 세포를 8 $\times$ 10⁴ 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 50-70%정도 균일하게 성장했을 때 배지를 제거하고 새 배지를 웰(well) 당 250 μ l씩 첨가하였다.

에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 50 μ l씩을 넣고 비교예 1의 루시퍼라제 GL2 발현 억제 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물, 실시예 3-1 내지 3-15까지의 15종의 Wnt1 발현억제용 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물을 각각 첨가하였다. 배양배지에 포함된 siRNA의 최종 농도는 50nM이 되게 조절하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고 이렇게 제조된 조성물을 웰 플레이트에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C의 CO₂ 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

24시간 후 Trizol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포내에 존재하는 전체 리보핵산(RNA)을 분리하고 이 리보핵산은 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 상보성 디옥시리보핵산(cDNA)으로 역전사 하였다. 중합효소연쇄반응을 위해 사용한 Wnt1에 특이적인 프라이머의 서열은 5'-CGGCGTTTATCTTCGCTATC-3' (왼쪽), 5'-GCCTCGTTGTGTGAAGGTT-3' (오른쪽)이며, 중합효소연쇄반응 생성물의 크기는 244염기쌍이었다. Wnt1 전사체 (mRNA transcript)의 발현 정도는 Wnt1 특이적인 연쇄반응 생성물의 밴드 밀도를 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 전사체를 증폭하여 나타나는 밴드 밀도로 보정하여 정량적으로 측정하였다.

도 1은 Wnt1 발현 억제 siRNA에 의해 매개된 Wnt1 전사체 발현 억제 효능을 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 사람의 간암 세포주인 Hep3B에서 확인한 결과를 보여준다. 도 1A는 Wnt1의 전사체의 상대적인 발현량을 수치화 한 것이고, 도면 1B는 Wnt1의 전사체의 발현 정도를 보여주는 대표적인 전기영동 사진이다. 도 1에서, "C"는 대조군, "NC"는 비교예 1 처리군, 3-1내지 3-15는 실시예 3-1부터 3-15까지의 복합체 조성물 처리군을 나타낸다. 대조군(C)은 미처리군으로 Wnt1 전사체의 발현이 관찰되었고, 비교예 1 처리군(NC)은 루시퍼라제 GL2 리보핵산 처리군으로서 Wnt1 전사체의 발현에 대조군에 비하여 변화가 없었고, 실시예 3-1내지 3-15의 복합체 처리군은 대조군과 비교했을 때 다양한 발현 억제 효능을 나타내었다. 이중 실시예 3-2, 3-7, 3-14의 복합체 처

리군에서 Wnt1 전사체의 발현이 유의성 있게 감소하였다. 따라서 도 1로부터 실시예 2-2, 2-7, 2-14에서 제조된 siRNA가 Hep3B 세포 내로 전달되어 Wnt1의 발현을 선택적으로 억제시키는 것을 알 수 있다.

<63> **실시예 6. MTT 방법을 이용한 Wnt1 발현 억제 siRNA의 항종양 효능 평가**

<64> Wnt1에 대한 siRNA 함유 조성물이 암세포 사멸에 미치는 효과에 대해 평가하기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-di-phenyl tetrazolium bromide) 방법을 이용하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다.

<65> Hep3B 세포주를 실험 전날 24-웰 플레이트에 웰 당 세포를 8×10^4 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 50-70%정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 혈청이 포함되지 않은 새 배지를 웰(well) 당 $250\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다.

<66> 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 $50\mu\text{l}$ 씩을 넣고 비교예 1의 루시퍼라제 GL2 발현억제 siRNA와 양이온성 리포솜의 복합체 조성물, 실시예 3-1 내지 3-15의 15종의 Wnt1 발현억제용 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물을 각각 첨가하였다. 배양배지에 포함된 siRNA의 최종 농도는 50nM이었다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고 이렇게 제조된 복합체 조성물을 웰 플레이트에 첨가하여 37°C의 CO₂ 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

<67> 조성물을 처리하고 48시간 경과 후 각각 MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-di-phenyl tetrazolium bromide) 용액을 배지의 10 %가 되도록 가하고, 4시간 더 배양 한 다음 상층액을 제거하고 0.06 N 염산 이소프로판올 용액을 첨가한 후에 엘라이저 리더 (ELISA reader)를 이용하여 570 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 아무 처리도 하지 않은 세포가 사용되었다.

<68> 도 2는 Wnt1 발현 억제 siRNA에 의해 매개된 종양 세포사멸효과를 MTT (tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium bromide) 염색법을 사용하여 사람의 간암 세포주인 Hep3B에서 확인한 결과를 보여준다. 도 2에서, "C"는 대조군, "NC1"은 핵산 전달체인 양이온성 리포솜 단독처리군, "NC2"는 비교예 1 처리군, 3-1내지 3-15는 실시예 3-1부터 3-15까지의 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물 처리군을 나타낸다. 대조군 "C"는 미처리군으로 종양세포 생존율을 100%로 산정하였으며, 전달체 리포솜 단독처리군인 "NC1"은 siRNA를 함유하지 않아 대조군에 비하여 세포 생존율에 큰 변화가 없었고, 비교예 1 처리군인 "NC2"는 루시퍼라제 GL2 억제 siRNA로서 종양세포 생존율에 아무 영향을 주지 않았고, 실시예 3-1 내지 3-15의 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물 처리군은 대조군과 비교했을 때, 실시예 3-2, 3-7, 3-14의 복합체 조성물 처리군에서 종양세포 생존율이 감소하였다. 따라서 도 2로부터 실시예 2-2, 2-7, 2-14에서 제조된 작은 간섭리보핵산이 Hep3B 세포 내로 전달되어 Wnt1의 발현을 선택적으로 억제시키고 그 결과로 항종양 효능을 나타내는 것을 알 수 있다.

<69> **실시예 7. 젖산탈수소효소 (LDH) 방법을 이용한 Wnt1 발현 억제 siRNA의 항종양 효능 평가**

<70> Wnt1의 발현을 억제하는 siRNA 함유 조성물이 종양세포를 손상시키는 정도를 평가하기 위하여 종양세포의 손상으로 인하여 세포 외부로 배출된 젖산 탈수소효소(LDH)를 고감도로 측정하는 LDH Cytotoxicity Detection kit(TAKARA Bio Inc., Otsu Shiga, Japan)를 이용하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다.

<71> Hep3B 세포주를 실험 전날 24-웰 플레이트에 웰 당 세포를 8×10^4 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 50-70%정도 균일하게 성장했을 때 배지를 제거하고 혈청이 포함되지 않은 새 배지를 웰(well) 당 $250\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다.

<72> 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 $50\mu\text{l}$ 씩을 넣고 비교예 1의 루시퍼라제 GL2 발현 억제 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물, 실시예 3-1 내지 3-15의 Wnt1 발현억제용 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물을 각각 첨가하였다. 미디어에 포함된 siRNA의 최종 농도는 50nM이 되게 맞추었다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37°C의 CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 이 때 Triton X-100을 3%가 되도록 처리하여 최대 LDH 활성을 측정할 수 있도록 준비하여 역시 37°C의 CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 복합체를 처리하고 48시간 경과 후, 조직배양 플레이트를 $250 \times g$ 에서 10분간 원심분리 후 상층액을 웰당 $100\mu\text{l}$ 씩 취하여 별도의 투명한 96-웰 플레이트에 옮기고 제조사의 프로토콜 대로 반응혼합액을 조제하여 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 플레이트를 차광하여 실온에서 30분간 정치한 후 엘라이저 리더 (ELISA reader)를 이용하여 492 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로는 아무 것도 포함되어 있지 않은 배양배지가 사용되었고 양성대조군으로는 Triton X-100을 3%가 되도록 처리한 세포가 사용되었다. 종양세포 손상율은 [(실험군의 흡광도-음성대조군의 흡광도)/(양성대조군의 흡광도-음성대조군

의 흡광도)×100]의 식을 사용하여 계산하였다.

<73> 도 3은 Wnt1 발현 억제 siRNA의 세포사멸효과를 젓산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 측정법을 사용하여 사람의 간암 세포주인 Hep3B에서 확인한 결과를 보여준다. 도 3에서, "C"는 대조군, "NC1"은 핵산 전달체인 양이온성 리포솜 단독처리군, "NC2"는 비교예 1 처리군, 3-1내지 3-15는 실시예 3-1 내지 3-15의 복합체 조성물 처리군을 나타낸다. 대조군 "C"는 미처리군으로 종양세포 손상율에 변화가 없었고, 양이온성 리포솜 단독처리군인 "NC1"은 작은 간접 리보핵산을 함유하지 않아 대조군에 비하여 종양세포 손상율에 큰 변화가 없었으며, 비교예 1 처리군인 "NC2"는 루시퍼라제 GL2 억제 siRNA가 리보핵산매개간섭을 일으키지 않아 종양세포 손상율에 큰 변화가 없었고, 실시예 3-1내지 3-15의 처리군은 대조군과 비교했을 때, 실시예 3-2, 3-7, 3-14의 siRNA와 양이온성 리포솜의 복합체 조성물 처리군에서 종양세포 손상율이 증가하였다. 따라서 도 3으로부터 실시예 2-2, 2-7, 2-14에서 제조된 siRNA가 Hep3B 세포 내로 전달되어 Wnt1의 발현을 선택적으로 억제시키고 그 결과로 항종양 효능을 가지는 것을 알 수 있다.

<74> 실시예 8. 형광 유세포 분석을 통한 Wnt1 발현 억제 siRNA의 암세포 사멸 효과 확인

<75> Wnt1의 발현을 억제하는 siRNA 함유 조성물이 암세포 사멸에 미치는 효과를 평가하기 위하여, 형광 유세포 분석법을 이용하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다.

<76> 간암 세포주(Hep3B)에 비교예 1의 루시퍼라제 GL2 발현 억제 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물, 실시예 3-7, 3-11, 3-14의 Wnt1 발현억제용 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물, 실시예 4-1, 4-3의 Wnt1 발현억제용 siRNA 2종과 폴리에틸렌이민 양이온성 고분자와의 복합체 조성물을 각각 처리하고 세포사멸을 평가하였다. 평가 방법으로는 BD사(BD Biosciences, USA)에서 구입한 Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit을 사용하였다.

<77> Hep3B 세포주를 실험 전날 6-웰 플레이트에 웰 당 세포를 2×10^5 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 40-50%정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 혈청이 포함되지 않은 새 배지를 웰(well) 당 $1400\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다.

<78> 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 $50\mu\text{l}$ 씩을 넣고 비교예 1의 루시퍼라제 GL2 발현억제 siRNA와 리포솜과의 복합체 조성물, 실시예 3-7, 3-11, 3-14의 Wnt1 발현억제용 siRNA와 리포솜의 복합체 조성물, 실시예 4-1, 4-3의 Wnt1 발현억제용 siRNA 2종과 폴리에틸렌이민 양이온성 고분자와의 복합체 조성물을 각각 첨가하였다. 배양배지에 포함된 siRNA의 최종 농도는 50nM이 되게 맞추었다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고 이렇게 제조된 복합체조성물을 웰 플레이트에 첨가하여 37℃의 CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 복합체를 처리하고 92시간 경과 후, 배양된 세포를 수집한 후 인산완충용액으로 2번 세척하고 키트에서 제공하는 annexin V-FITC와 propidium iodide (PI)를 사용하여 빛을 차광한 채 30분 염색하였다. 그 후 형광 유세포 분석기인 BD FACS CALIBUR(BD Bioscience, USA)를 사용하여 형광 강도 피크의 이동에 의한 세포사멸 효능을 분석하였다. 리보핵산 미처리 세포군, annexin V-FITC와 PI를 단독처리하여 염색한 세포군들을 각각 사용하여 형광 강도 피크의 이동을 보정하였다.

<79> 도 4는 Wnt1 발현 억제 siRNA의 세포사멸효과를 annexin V-FITC/PI 염색법을 사용하여 사람의 간암세포주인 Hep3B에서 확인한 결과를 보여준다. 도 4에서, (A)는 비교예 1의 복합체, (B)는 Wnt1 전사체 억제효능이 없었던 실시예 3-11의 복합체 조성물, (C)는 실시예 3-7의 복합체 조성물, (D)는 실시예 3-14의 복합체 조성물, (E)는 실시예 4-1의 복합체 조성물, (F)는 실시예 4-3의 복합체 조성물 처리군을 나타낸다. 비교예 1의 복합체 조성물 처리군에서는 아넥신(annexin V) 양성 세포, 즉 세포사멸이 일어난 세포의 비율이 19% 였으며(도면 4A 참고), 실시예 5에서 Wnt1 전사체 억제효능이 없었으며 실시예 6과 7에서도 항종양 효능이 없는 것으로 나타났던 실시예 3-11의 복합체 조성물을 처리한 군에서는 아넥신 양성 세포가 22%로 비교예 1 처리군과 유사한 수준이었다(도 4B). 반면 실시예 3-7, 3-14의 siRNA 조성물은 아넥신 양성세포의 비율이 각각 74%, 82%로 세포사멸(apoptosis)이 진행된 세포들이 현저히 증가하였음을 알 수 있다(도 4C, 4D). 2종의 Wnt1 발현 억제 siRNA를 포함하고 있는 실시예 4-1의 복합체 조성물(실시예 2-2의 siRNA + 실시예 2-7의 siRNA) 및 실시예 4-3의 복합체(실시예 2-7의 siRNA + 실시예 2-14의 siRNA)를 처리한 군에서는 세포사멸이 진행된 아넥신 양성세포의 비율이 각각 92% 및 84%로 증가되었다(도 4E, 4F). 따라서 도 4로부터 실시예 3-7, 3-14에서 제조된 siRNA 조성물이 Wnt1의 발현을 선택적으로 억제시키고 그 결과로 항종양 효능을 가지는 것을 알 수 있고 또한 실시예 4-1 및 실시예 4-3의 복합체 처리군에서 관찰되는 것과 같이 효과적인 siRNA 2종을 함께 사용하는 것 또한 항종양 효능을 가짐을 알 수 있다.

<80> 실시예 9. 간존 세포염색 방법을 통한 Wnt1 siRNA의 암세포 사멸 효과 확인

<81> Wnt1 siRNA 함유 조성물이 암세포사멸에 미치는 효과를 평가하기 위하여, 간존 세포염색 방법을 이용하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다.

<82> 간암 세포주(Hep3B)에 비교예 1의 루시퍼라제 GL2 발현 억제 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물, 실시예 3-2, 3-5, 3-7의 Wnt1 발현억제용 siRNA와 양이온성 리포솜과의 복합체 조성물, 실시예 4-2의 Wnt1 발현억제용 siRNA 2종과 폴리에틸렌이민 양이온성 고분자와의 복합체 조성물을 각각 처리하고 세포사멸을 평가하였다. 평가 방법으로는 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 염료(dye)를 이용한 세포 염색법을 사용하였다.

<83> Hep3B 세포주를 실험 전날 6-웰 플레이트에 웰 당 세포를 2×10^5 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 40-50%정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 혈청이 포함되지 않은 새 배지를 웰(well) 당 $1400\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다.

<84> 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 $50\mu\text{l}$ 씩을 넣고 비교예 1의 루시퍼라제 GL2 발현억제 siRNA와 리포솜과의 복합체 조성물, 실시예 3-1, 3-5, 3-7의 Wnt1 발현억제용 siRNA와 리포솜의 복합체 조성물, 실시예 4-2의 Wnt1 발현억제용 siRNA 2종과 폴리에틸렌이민 양이온성 고분자와의 복합체 조성물을 각각 첨가하였다. 배양배지에 포함된 siRNA의 최종 농도는 50nM 이 되게 맞추었다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37°C 의 CO_2 세포배양기에서 배양하였다. 복합체를 처리하고 92시간 경과 후, 인산완충용액으로 세척하고 0.5% 크리스탈 바이올렛, 20% 메탄올이 포함된 용액을 $500\mu\text{l}$ 처리하여 1분간 염색한 후 용액을 제거하여 플레이트에 남아있는 간존세포의 정도를 관찰하였다. 대조군으로는 siRNA 미처리 세포를 사용하였다.

<85> 도 5는 Wnt1 발현 억제 siRNA의 세포사멸효과를 크리스탈 바이올렛 (crystal violet) 염료를 이용한 세포 염색법을 사용하여 사람의 간암세포주인 Hep3B에서 확인한 결과를 보여준다. 도 5에서, (A)는 대조군, (B)는 비교예 1의 복합체, (C)는 실시예 3-2의 복합체, (D)는 Wnt1 발현 억제능이 없는 실시예 3-5의 복합체, (E)는 실시예 3-7의 복합체, (F)는 실시예 4-2의 복합체 처리군을 나타낸다. 리보핵산 미처리 세포군인 대조군 (도 5A) 및 비교예 1의 복합체 처리군(도 5B참고)에 비교할 때 Wnt1 발현 억제능이 없는 실시예 3-5의 리보핵산과 리포솜 조성물 처리군 (도 5D)은 웰플레이트에 부착된 간존 세포들이 다량 염색되어 세포사멸에 있어 큰 차이를 보이지 않았고, 반면 실시예 5에서 Wnt1 발현이 억제되었던 실시예 3-2의 조성물, 실시예 3-7의 조성물, 그리고 실시예 4-2의 조성물 처리군(도 5C, 5E, 5F)은 손상된 종양세포들이 웰플레이트에서 떨어져 나가서 염색된 간존세포의 비율이 감소된 것이 관찰되었다. 따라서 도 5로부터 실시예 3-2, 3-7에서 제조된 siRNA와 리포솜 조성물이 Wnt1의 발현을 선택적으로 억제시키고 그 결과로 항종양 효능을 가지는 것을 알 수 있고 또한 실시예 4-2의 조성물 처리군에서 관찰되는 것과 같이 효과적인 siRNA 2종을 함께 사용하는 것 또한 유의성 있는 항종양 효능을 가짐을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

<86> 도 1은 Wnt1 발현 억제 siRNA에 의해 매개된 Wnt1 전사체 발현 억제 효능을 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 사람의 간암 세포주인 Hep3B에서 확인한 결과를 보여준다.

<87> 도 2는 Wnt1 발현 억제 siRNA에 의해 매개된 종양 세포사멸효과를 MTT (tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 염색법을 사용하여 사람의 간암 세포주인 Hep3B에서 확인한 결과를 보여준다.

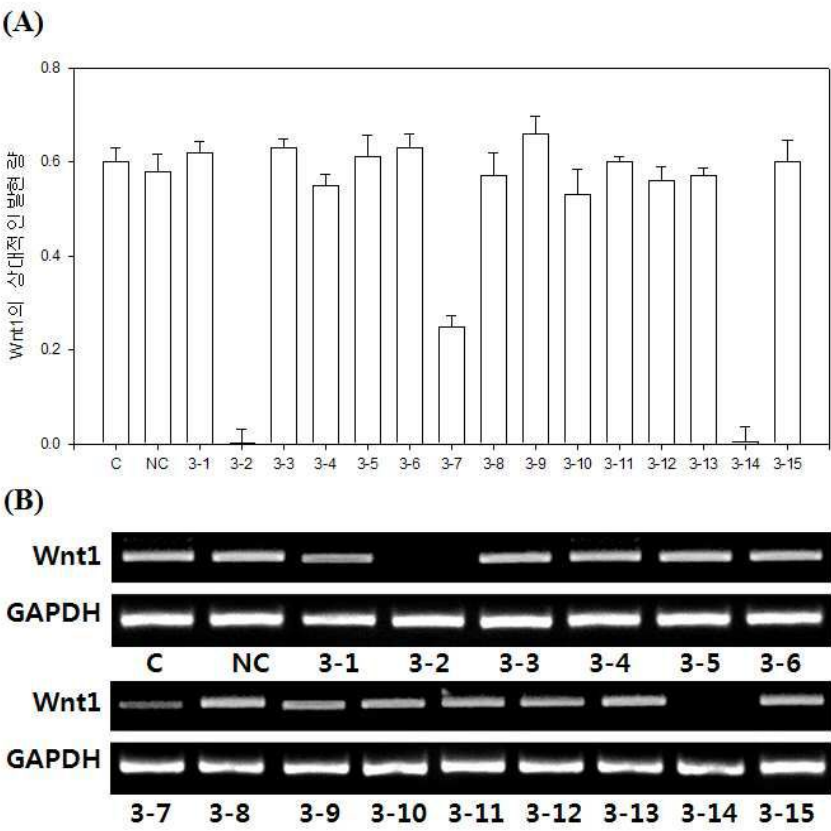
<88> 도 3은 Wnt1 발현 억제 siRNA의 세포사멸효과를 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 측정법을 사용하여 사람의 간암 세포주인 Hep3B에서 확인한 결과를 보여준다.

<89> 도 4는 Wnt1 발현 억제 siRNA의 세포사멸효과를 annexin V-FITC/PI 염색법을 사용하여 사람의 간암세포주인 Hep3B에서 확인한 결과를 보여준다.

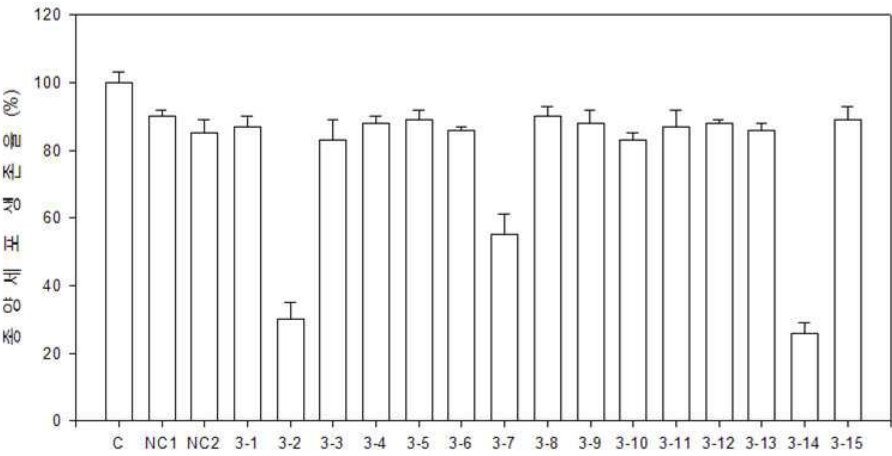
<90> 도 5는 Wnt1 발현 억제 siRNA의 세포사멸효과를 크리스탈 바이올렛 (crystal violet) 염료를 이용한 세포 염색법을 사용하여 사람의 간암세포주인 Hep3B에서 확인한 결과를 보여준다.

도면

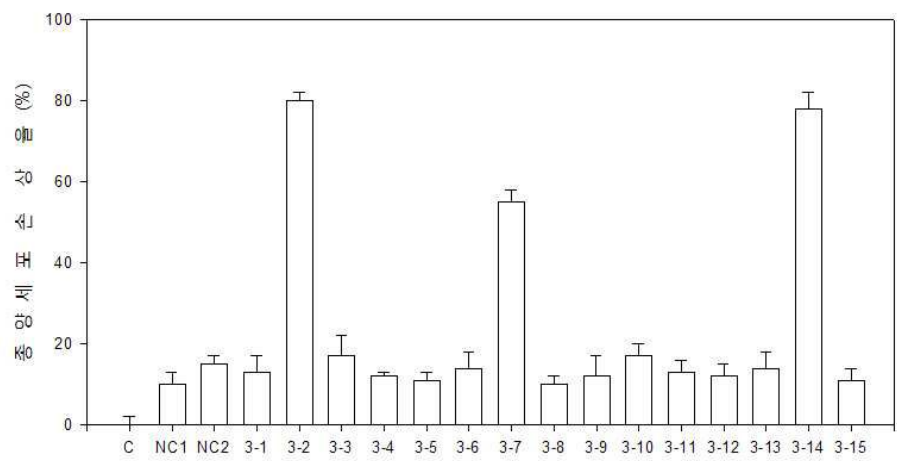
도면1



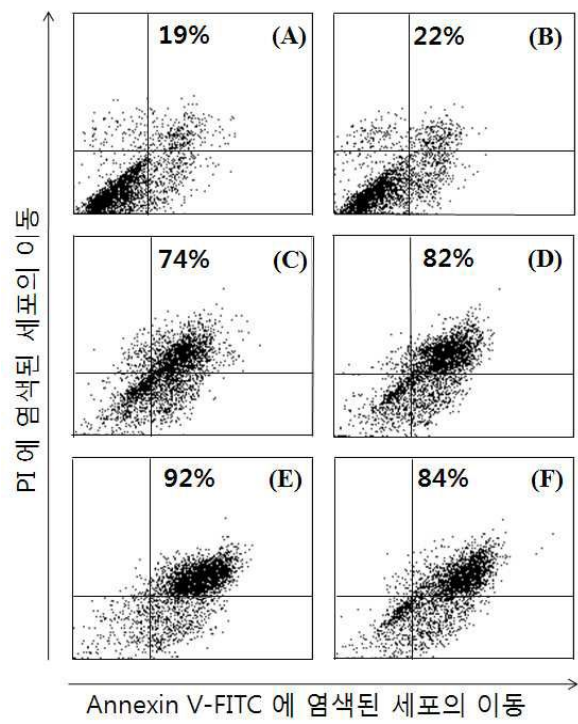
도면2



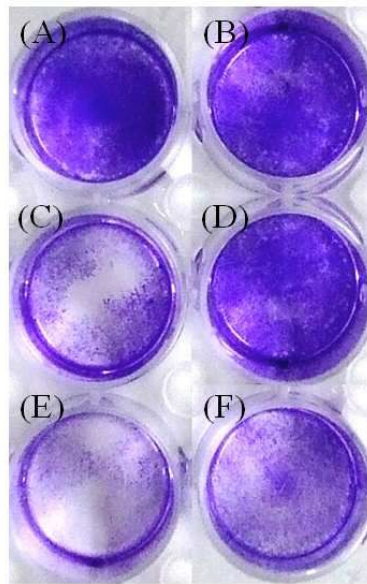
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부