



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년06월14일  
 (11) 등록번호 10-1629681  
 (24) 등록일자 2016년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/113</i> (2010.01) <i>A61K 48/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0072712 (22) 출원일자 2013년06월24일 심사청구일자 2013년06월24일 (65) 공개번호 10-2015-0000563 (43) 공개일자 2015년01월05일 (56) 선행기술조사문헌 KR1020100103206 A KR1020110083919 A Biomaterials, 2011, Vol. 32 (26), p.6194-6203	(73) 특허권자 <b>건국대학교 산학협력단</b> 서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동) (72) 발명자 <b>목혜정</b> 서울 광진구 아차산로 522, 802동 1504호 (광장동, 현대아파트) <b>유현동</b> 서울 은평구 서오릉로27길 26-6, 601호 (구산동, 타워아파트) <b>김승언</b> 서울 은평구 연서로22길 9-7, 403호 (대조동, 청운명가) (74) 대리인 <b>이은철</b>
---	---

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 이수철

(54) 발명의 명칭 **다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체**

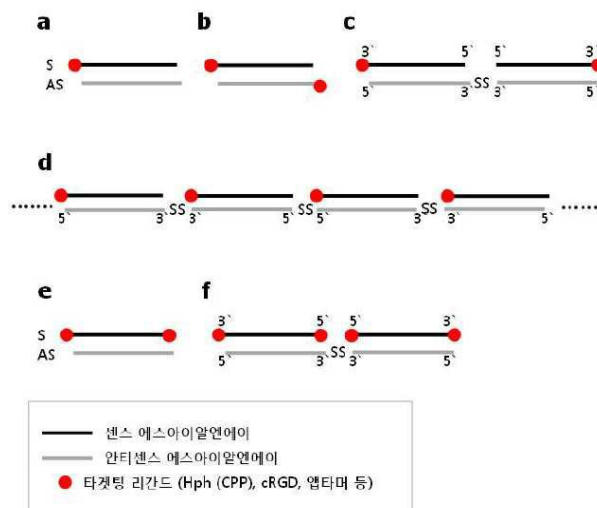
**(57) 요약**

본 발명은 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이(siRNA) 접합체에 관한 것이다.

상기와 같은 본 발명에 따르면, 에스아이알엔에이에 다중 리간드를 도입함으로써, 유전자 전달체를 사용하지 않고 에스아이알엔에이의 세포와의 부착 및 세포내로의 도입을 증가시켜 유전자 전달 효율 및 타겟 유전자 저해 효율을 향상시킬 뿐만 아니라 간단하고 높은 효율로 제조가 가능한 효과가 있다.

또한, 양이온성 전하를 띠고 있는 유전자 전달체를 사용하지 않음으로써, 비특이적 세포독성을 예방하는 효과가 있다.

**대표도** - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012A4190180  
 부처명 교육과학기술부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 기본연구지원사업  
 연구과제명 효율적 유전자 전달을 위한 siRNA 나노 구조체 제조 연구  
 기 여 율 1/2  
 주관기관 건국대학교 산학협력단  
 연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-A431-0034  
 부처명 교육과학기술부  
 연구관리전문기관 한국과학기술연구원  
 연구사업명 글로벌개방혁신연구센터시범사업  
 연구과제명 화학적기법을 이용한 다중표적 siRNA 전달체 기술개발 및 효능 평가  
 기 여 율 1/2  
 주관기관 건국대학교 산학협력단  
 연구기간 2012.12.01 ~ 2013.11.30

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

n개의 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA)의 말단이 서로 결합되어 선형의 구조를 이루고 있는 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA) 선형체;와 말단 부위에 리간드가 결합되어 있는 n개의 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA);가 상보적으로 결합하되,  
상기 n은 2 이상의 정수인 것을 특징으로 하는 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체.

**청구항 7**

제 6항에 있어서,  
상기 단일가닥 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이 선형체는 n개의 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA)의 말단이 이황화 결합(disulfide bond), 아마이드 결합(amide bond), 에스터 결합(ester bond), 언하이드라이드 결합(anhydride bond), 에테르 결합(ether bond) 또는 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)으로 결합된 것을 특징으로 하는 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체.

**청구항 8**

제 6항에 있어서,  
상기 리간드는 엽산, 콜레스테롤, 아텔로콜라겐, 펩타이드, 단백질, 항체 및 앵타머를 포함하는 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 하는 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체.

**청구항 9**

제 6항에 있어서,  
상기 리간드는 가교제를 이용하여 n개의 단일가닥 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이의 말단 부위에 결합되

는 것을 특징으로 하는 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체.

**청구항 10**

제 9항에 있어서,

상기 가교제는 DTME(Dithio-bis-maleimidoethane), BM(PEG)2(1,8-Bis-maleimidodiethyleneglycol), 말레이미드 (maleimide), 엔하이드록시석신이미드(NHS, N-hydroxysuccinimide), 엔하이드록시석신이미드 에스터 (N-hydroxysuccinimide esters), 비닐설폰(vinylsulfone), 이오도아세틸 니트로페닐아자이드(iodoacetyl, nitrophenyl azide), 아이소시아네이트(isocyanate), 피리딜다이설파이드(pyridyldisulfide), 하이드라자이드 (hydrazide), 하이드로시페닐 아자이드(hydroxyphenyl azide), 에틸다이메틸아미노프로필 카보다이아마이드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) 및 하이드록시벤조트리아졸(Hydroxybenzotriazole, HOBt)을 포함하는 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 하는 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체.

**청구항 11**

제 6항에 있어서,

상기 n은 2 내지 100인 것을 특징으로 하는 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이(siRNA) 접합체에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 별도의 운반체나 전달체 없이 에스아이알엔에이를 효율적으로 세포내에 도입시키고 세포독성이 없는 에스아이알엔에이 접합체에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 에스아이알엔에이(siRNA, small interfering RNA)는 19~22개의 핵산으로 구성된 이중 나선 구조의 짧은 RNA로서, 그의 센스가닥과 염기서열이 동일한 mRNA(messenger RNA)와 결합하게 되면 RISC(RNA induced silencing complex)가 상기 결합된 mRNA를 분해시켜 특정 단백질의 발현을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411, 494-8). 적은 양으로도 효과적이며 정확하게 서열이 동일한 mRNA의 발현을 억제하는 이러한 siRNA의 성질을 이용하여 암이나 유전적 질병 치료에 다양한 가능성이 연구되어 왔으며, siRNA를 이용한 치료약 개발 시장은 그 규모가 해마다 비약적으로 증가하고 있다.

[0003] 최근, 효과적인 치료를 위해 여러 개의 mRNA를 타겟으로 한 siRNA들을 조합하여 동시에 세포내에 전달시켜 그 효과를 확인하는 연구가 진행되고 있다. 이는 유전자 변형 빈도가 비교적 높은 바이러스를 중심으로 이루어져 왔으나 (Schuck, S. Manninen, A., Honsho, M., Frittlekrug, J., Simons, K. (2004) Generation of single and double knockdowns in polarized epithelial cells by retrovirus-mediated RNA interference. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(14), 4912-7), EGFR, CD4/8 등에도 적용되어 향상된 치료 효과를 확인하였다 (McManus, M. T., Haines, B. B., Dillon, C. P., Whitehurst, C. E., van Parijs, L., Chen, J., Sharp, P. A. (2002) Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. J Immunol. 169(10), 5754-60).

[0004] 한편, siRNA의 효소 불안정성, 열악한 세포 투과성 등은 실제 siRNA를 임상치료에 적용하는데 있어 큰 장애요인으로 작용하여 이를 해결하기 위해 다양한 전달체의 개발, siRNA 자체에 다양한 분자의 접합 등이 연구되고 있다. 효소에 직접적으로 노출되는 것을 방지하고 세포 투과성을 증가시키기 위해 음이온성의 siRNA에 양이온성의 고분자, 지질 분자, 펩타이드를 전기적 인력으로 결합시켜 전체적으로 양이온 성질을 갖는 나노 크기의 복합체를 형성하여 siRNA를 효소로부터 보호하고 동시에 음이온 성질을 가지는 세포막과의 상호작용을 향상시켜 세포

내 전달 효율을 증가시키는 연구가 대표적이라 하겠다.

[0005] 그러나, siRNA는 분자량이 ~15000 정도로 작고 RNA 특유의 뺏뺏한 구조를 가지고 있어 양이온성 고분자와 안정화된 복합체를 이루는데 어려움이 있고 기존에 개발된 다양한 유전자 전달체를 이용하는데 한계가 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 대한민국 등록특허 10-1141544호(에스아이알엔에이 다중 접합체 및 이의 제조방법)에서는 siRNA를 화학적인 방법으로 수개~수십개 자가결합시켜 분자량을 증가시켰으며, 이렇게 결합된 siRNA 다중 접합체는 저분자량의 siRNA에 비하여 linear PEI와 안정적으로 결합하여 유전자 전달 효율이 증가되었으나, 여전히 유전자 전달체를 사용하여 siRNA를 세포내에 도입해야 하는 기술적 특징을 가진다.

[0006] 또한, 도 1의 (a)에서 보는 바와 같이 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이의 한쪽 말단에 리간드를 접합시켜 세포에 처리할 경우, 세포내로의 도입 효율이 낮아 과량의 에스아이알엔에이를 처리해야 하거나, 양이온성 전달체와 함께 세포에 처리해야 하는 단점이 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명의 목적은 별도의 운반체나 전달체 없이 에스아이알엔에이(siRNA)를 효율적으로 세포내에 도입시킴으로써, 높은 유전자 전달 효율을 갖고 비특이적 세포독성이 없으며 간단하고 높은 효율로 제조가 가능한 에스아이알엔에이 접합체를 제공함에 있다.

**과제의 해결 수단**

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 4 군데의 말단 부위를 갖는 이중가닥 센스/안티센스(sense/antisense) 에스아이알엔에이(siRNA) 단량체의 2 내지 4 군데의 말단 부위에 리간드가 결합되어 있는 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체를 제공한다.

[0009] 상기 리간드는 저분자량 화합물, 펩타이드, 단백질, 항체 및 앵타머를 포함하는 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 한다.

[0010] 상기 리간드는 가교제를 이용하여 단량체의 말단 부위에 결합되는 것을 특징으로 한다.

[0011] 상기 가교제는 DTME(Dithio-bis-maleimidoethane), BM(PEG)2(1,8-Bis-maleimidodiethyleneglycol), 말레이미드(maleimide), 엔하이드록시석신이미드(NHS, N-hydroxysuccinimide), 엔하이드록시석신이미드 에스터 (N-hydroxysuccinimide esters), 비닐설폰(vinylsulfone), 이오도아세틸 니트로페닐아자이드(iodoacetyl, nitrophenyl azide), 아이소시아네이트(isocyanate), 피리디다이설파이드(pyridyldisulfide), 하이드라자이드(hydrazide), 하이드로시페닐 아자이드(hydroxyphenyl azide), 에틸다이메틸아미노프로필 카보다이아마이드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) 및 하이드록시벤조트리아졸(Hydroxybenzotriazole, HOBt)을 포함하는 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 한다.

[0012] 상기 단량체는 15 내지 200의 핵산 염기수를 갖는 것을 특징으로 한다.

[0013] 또한, 본 발명은 n개의 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA)의 말단이 서로 결합되어 선형의 구조를 이루고 있는 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA) 선형체;와 말단 부위에 리간드가 결합되어 있는 n개의 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA);가 상보적으로 결합하되, 상기 n은 2 이상의 정수인 것을 특징으로 하는 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체를 제공한다.

[0014] 상기 단일가닥 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이 선형체는 n개의 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA)의 말단이 이황화 결합(disulfide bond), 아마이드 결합(amide bond), 에스터 결합(ester bond), 언하이드라이드 결합(anhydride bond), 에테르 결합(ether bond) 또는 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)으로 결합된 것을 특징으로 한다.

[0015] 상기 리간드는 저분자량 화합물, 펩타이드, 단백질, 항체 및 앵타머를 포함하는 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 한다.

[0016] 상기 리간드는 가교제를 이용하여 n개의 단일가닥 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이의 말단 부위에 결합되는 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기 가교제는 DTME(Dithio-bis-maleimidoethane), BM(PEG)2(1,8-Bis-maleimidodiethyleneglycol), 말레이미드(maleimide), 엔하이드록시석신이미드(NHS, N-hydroxysuccinimide), 엔하이드록시석신이미드 에스터(N-hydroxysuccinimide esters), 비닐설폰(vinylsulfone), 이오도아세틸 니트로페닐아자이드(iodoacetyl, nitrophenyl azide), 아이소시아네이트(isocyanate), 피리딜다이설파이드(pyridyldisulfide), 하이드라자이드(hydrazide), 하이드로시페닐 아자이드(hydroxyphenyl azide), 에틸다이메틸아미노프로필 카보다이아마이드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) 및 하이드록시벤조트리아졸(Hydroxybenzotriazole, HOBt)을 포함하는 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 한다.

[0018] 상기 n은 2 내지 100인 것을 특징으로 한다.

**발명의 효과**

[0019] 상기와 같은 본 발명에 따르면, 에스아이알엔에이(siRNA)에 다중 리간드를 도입함으로써, 유전자 전달체를 사용하지 않고 에스아이알엔에이의 세포와의 부착 및 세포내로의 도입을 증가시켜 유전자 전달 효율 및 타겟 유전자 저해 효율을 향상시킬 뿐만 아니라 간단하고 높은 효율로 제조가 가능한 효과가 있다.

[0020] 또한, 양이온성 전하를 띠고 있는 유전자 전달체를 사용하지 않음으로써, 비특이적 세포독성을 예방하는 효과가 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0021] 도 1의 (a)는 종래 에스아이알엔에이에 리간드가 도입된 모식도, (b) 내지 (f)는 본 발명에 따른 에스아이알엔에이에 다중 리간드가 도입된 모식도.

도 2의 (a)는 센스 에스아이알엔에이와 안티센스 에스아이알엔에이를 각각 이량체와 비교한 전기영동 사진, (b)는 안티센스 에스아이알엔에이에 가교제를 사용하여 리간드를 연결시킨 것(Rxn)과 가교제 없이 혼합한 것(mixture)을 비교한 전기영동 사진, (c)는 안티센스 에스아이알엔에이의 용량별 차이와 가교제를 사용하여 안티센스 에스아이알엔에이에 각기 다른 리간드(Hph, RGD)를 결합시킨 것의 차이를 비교한 전기영동 사진, (d)는 센스/안티센스 에스아이알엔에이를 결합시킨 것에 리간드를 연결시킨 것과, 이량체 센스 에스아이알엔에이에 안티센스 에스아이알엔에이 단량체 또는 리간드를 가진 안티센스 에스아이알엔에이 단량체를 연결시킨 것을 비교한 전기영동 사진. 전기영동은 15 % 아크릴아마이드 젤을 사용함.

도 3은 앵타머가 도입된 에스아이알엔에이 접합체들의 전기영동 사진.

도 4는 앵타머가 도입된 에스아이알엔에이 접합체들의 세포내 도입 결과.

도 5는 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체들의 처리로 인한 GFP 유전자 발현 억제 결과.

도 6은 에스아이알엔에이 접합체의 세포독성 실험 결과.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은 세포 내에서 특정 메신저알엔에이(mRNA)와 결합하여 해당 유전자의 발현을 억제시키는 세포독성이 없는 에스아이알엔에이(siRNA, small interfering RNA) 접합체에 관한 것으로서, 에스아이알엔에이에 다중 리간드가 도입됨으로써 운반체나 전달체 없이 효율적으로 세포내에 도입되어 타겟으로 하는 유전자의 발현을 저해시키는 효과가 있다.

[0024] 본 발명은 4 군데의 말단 부위를 갖는 이중가닥 센스/안티센스(sense/antisense) 에스아이알엔에이(siRNA) 단량체의 2 내지 4 군데의 말단 부위에 리간드가 결합되어 있는 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체를 제공한다.

[0025] 상기 리간드는 저분자량 화합물, 펩타이드, 단백질, 항체 및 앵타머를 포함하는 군에서 선택되는 1 이상인 것이 바람직하며, 하나의 말단에 하나의 리간드가 도입되거나 다수의 리간드가 결합된 형태로 도입될 수 있다. 구체적인 종류로 저분자량 화합물은 엽산(folate), 콜레스테롤(cholesterol), 아텔로콜라겐(atelocollagen) 등, 펩타이드는 세포 투과성 펩타이드(cell penetrating peptide), 퓨소제닉 펩타이드(fusogenic peptide), 페너트라틴(penetratin), 에이치피에이치(hph), 알지디(RGD) 등, 단백질은 표피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF), 혈관 내피세포 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 등, 항체는 허셉틴(herceptin),

혈관 내피세포 성장 인자 수용체 항체(vascular endothelial growth factor receptor antibody) 등, 앵타머는 전립선 특이적 막 항원(prostate specific membrane antigen, PSMA) 앵타머 등이 있다.

- [0026] 상기 리간드는 가교제를 이용하여 단량체의 말단 부위에 결합되는 것이 바람직하다.
- [0027] 상기 가교제는 분자량이 100 내지 10000이 되는 것으로, DTME(Dithio-bis-maleimidoethane), BM(PEG)2(1,8-Bis-maleimidodiethyleneglycol), 말레이미드(maleimide), 엔하이드록시석신이미드(NHS, N-hydroxysuccinimide), 엔하이드록시석신이미드 에스터 (N-hydroxysuccinimide esters), 비닐설폰(vinylsulfone), 이오도아세틸 니트로페닐아자이드(iodoacetyl, nitrophenyl azide), 아이소시아네이트(isocyanate), 피리딜다이설파이드(pyridyldisulfide), 하이드라자이드(hydrazide), 하이드로시페닐 아자이드(hydroxyphenyl azide), 에틸다이메틸아미노프로필 카보다이아마이드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) 및 하이드록시벤조트리아졸(Hydroxybenzotriazole, HOBt)을 포함하는 군에서 선택되는 1 이상인 것이 바람직하다.
- [0028] 상기 단량체는 15 내지 200, 바람직하게는 15 내지 29의 핵산 염기수를 갖는다.
- [0029] 본 발명에 따른 에스아이알엔에이 접합체는 서로 다른 종류의 리간드를 붙일 수 있고, 4 종류의 리간드를 붙여 세포내 도입 효율을 높일 수 있다. 에스아이알엔에이 말단에 아민기, 카르복실기, 티올기, 알데하이드기, 아크릴로일기, 아지드기 등과 같은 관능기를 도입하여 3', 5' 또는 양쪽 말단에 리간드를 도입하며, 3' 또는 5' 말단에 선별적으로 관능기를 도입하고 가교제의 종류를 다르게 하여 서로 다른 종류의 리간드를 선별적으로 양쪽 말단에 접합시킬 수 있다. 또한, 상기 관능기의 종류에 따라 가교제 없이 화학적 공유 결합을 만드는 카르보디이미드 커플링 반응(carbodiimide coupling reaction), 마이클 첨가 반응(michael addition reaction), 클릭 화학(click chemistry) 등과 같은 화학 반응을 통해 리간드를 접합시킬 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 n개의 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA) 단량체들의 말단이 서로 결합되어 선형의 구조를 이루고 있는 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA) 선형체;와 말단 부위에 리간드가 결합되어 있는 n개의 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA) 단량체들;이 상보적으로 결합하되, 상기 n은 2 이상의 정수인 것을 특징으로 하는 다중 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체를 제공한다.
- [0031] 상기 단일가닥 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이 선형체는 n개의 단일가닥 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 에스아이알엔에이(siRNA)의 말단이 이황화 결합(disulfide bond), 아마이드 결합(amide bond), 에스터 결합(ester bond), 언하이드라이드 결합(anhydride bond), 에테르 결합(ether bond) 또는 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)으로 결합된 것이 바람직하다.
- [0032] 상기 리간드는 저분자량 화합물, 펩타이드, 단백질, 항체 및 앵타머를 포함하는 군에서 선택되는 1 이상인 것이 바람직하며, 하나의 말단에 하나의 리간드가 도입되거나 다수의 리간드가 결합된 형태로 도입될 수 있다. 구체적인 종류로 저분자량 화합물은 엽산(folate), 콜레스테롤(cholesterol), 아텔로콜라겐(atelocollagen) 등, 펩타이드는 세포 투과성 펩타이드(cell penetrating peptide), 퓨소제닉 펩타이드(fusogenic peptide), 페너트라틴(penetratin), 에이치피에이치(hph), 알지디(RGD) 등, 단백질은 표피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF), 혈관 내피세포 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 등, 항체는 허셉틴(herceptin), 혈관 내피세포 성장 인자 수용체 항체(vascular endothelial growth factor receptor antibody) 등, 앵타머는 전립선 특이적 막 항원(prostate specific membrane antigen, PSMA) 앵타머 등이 있다.
- [0033] 상기 리간드는 가교제를 이용하여 n개의 단일가닥 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이의 말단 부위에 결합되는 것이 바람직하다.
- [0034] 상기 가교제는 분자량이 100 내지 10000이 되는 것으로, DTME(Dithio-bis-maleimidoethane), BM(PEG)2(1,8-Bis-maleimidodiethyleneglycol), 말레이미드(maleimide), 엔하이드록시석신이미드(NHS, N-hydroxysuccinimide), 엔하이드록시석신이미드 에스터 (N-hydroxysuccinimide esters), 비닐설폰(vinylsulfone), 이오도아세틸 니트로페닐아자이드(iodoacetyl, nitrophenyl azide), 아이소시아네이트(isocyanate), 피리딜다이설파이드(pyridyldisulfide), 하이드라자이드(hydrazide), 하이드로시페닐 아자이드(hydroxyphenyl azide), 에틸다이메틸아미노프로필 카보다이아마이드(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) 및 하이드록시벤조트리아졸(Hydroxybenzotriazole, HOBt)을 포함하는 군에서 선택되는 1 이상인 것이 바람직하다.

- [0035] 상기 n은 2 내지 100, 바람직하게는 2 내지 20인 것이 최적의 효과를 나타낸다.
- [0036] 도 1의 (b) 내지 (f)에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 에스아이알엔에이 접합체는 (b) 센스와 안티센스 에스아이알엔에이 모두 리간드가 도입된 형태, (c) 이량체 에스아이알엔에이 구조를 이용하여 두 개의 리간드가 도입된 형태, (d) 다중 접합 에스아이알엔에이 구조를 이용하여 다중 리간드가 도입된 형태, (e) 단량체의 에스아이알엔에이 센스 가닥의 양쪽에 리간드가 도입된 형태, (f) 이량체의 에스아이알엔에이에서 두 개의 센스 가닥 양쪽 말단에 리간드가 도입된 형태가 있다.
- [0037] 도 1의 (a)는 센스 에스아이알엔에이의 3' 말단에 리간드를 결합시킨 뒤 상보적인 안티센스 에스아이알엔에이와 수소결합시킨 것이고, (b)는 센스/안티센스 에스아이알엔에이 3' 말단에 리간드를 공유결합시킨 것이고, (c)는 안티센스 에스아이알엔에이 3' 말단을 티올기로 치환하여 이황화결합을 통해 두 안티센스 에스아이알엔에이를 결합시킨 후 리간드가 결합된 센스 에스아이알엔에이 두 가닥을 각각 수소결합으로 연결시킨 것이고, (d)는 여러 가닥의 안티센스 에스아이알엔에이를 이황화결합으로 결합시킨 후 리간드가 결합된 센스 에스아이알엔에이를 연결시킨 것이고, (e)는 센스 에스아이알엔에이 3'과 5'말단에 리간드를 붙여 안티센스 에스아이알엔에이를 연결시킨 것이고, (f)는 3'과 5'양쪽 말단에 리간드를 붙인 센스 에스아이알엔에이를 3'을 티올기로 치환하여 이황화결합시킨 안티센스 에스아이알엔에이 이합체에 연결시킨 것이다.
- [0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0039] **실시예 1. 이량체의 센스 에스아이알엔에이 및 안티센스 에스아이알엔에이 제조**
- [0040] 3' 말단이 티올기(-SH)로 치환된 센스 에스아이알엔에이와 안티센스 에스아이알엔에이 각각 100 nmole을 DEPC(DiethylenePyrocarbonate) 처리된 증류수 260  $\mu$ l에 녹인 다음, 22  $\mu$ l의 25 X PBS를 넣고 260  $\mu$ l의 2 M DTT를 넣었다. 이후, pH를 맞추기 위해 5 N NaOH 용액을 4  $\mu$ l 넣은 후 12 시간 이상 반응시켰다. 투석과정을 통해 DTT를 제거하고, 용액을 농축시켜 농축된 각각의 에스아이알엔에이를 1 X PBS 25  $\mu$ l에 녹인 후, 가교제인 1 mg/ml의 DTME 3.9  $\mu$ l를 넣고 12 시간 이상 반응시켜 이황화결합으로 연결된 이량체의 센스 에스아이알엔에이와 안티센스 에스아이알엔에이를 제조하였다.
- [0041] 센스 에스아이알엔에이와 안티센스 에스아이알엔에이를 이량체와 비교하기 위해 15 % 아크릴아마이드 젤을 사용하여 전기영동으로 확인하였다(도 2(a)). 각 에스아이알엔에이는 1  $\mu$ g 사용하였다.
- [0042] 상기와 같이 제조된 이량체의 단일가닥 센스(S dimer, diS) 혹은 안티센스(AS dimer, diAS) 에스아이알엔에이로 이후 리간드가 도입된 상보적인 안티센스 혹은 센스 에스아이알엔에이와 수소결합을 통해 리간드가 도입된 에스아이알엔에이 접합체를 제조하였다(도 2(d), 도 3 내지 5).
- [0043] **실시예 2. 가교제를 통해 리간드가 도입된 안티센스 에스아이알엔에이의 제조**
- [0044] 안티센스 에스아이알엔에이에 가교제를 넣고 리간드를 연결시킨 Rxn2 샘플을 만들기 위해 8.3  $\mu$ l의 계면 활성제인 25 % TritonX-100과 10  $\mu$ l의 20 X PBS 용액, 1 nmol/ $\mu$ l로 희석된 안티센스 에스아이알엔에이, 10  $\mu$ g/ $\mu$ l의 리간드(Hph) 10  $\mu$ l 및 1  $\mu$ g/ $\mu$ l의 가교제(SMCC) 13.4  $\mu$ l을 순서대로 넣어준 다음, 자석교반기(stirrer)를 사용하여 24 시간 동안 반응시켰다. Rxn 샘플에서 각각의 안티센스 에스아이알엔에이, 가교제 및 리간드의 몰 비율은 1 : 2 : 3 이었다. 이때, 에스아이알엔에이, 가교제 및 리간드의 몰 비율은 1 : 1 : 1 내지 1 : 100 : 100 으로 다양하게 조절가능하다. Mixture 샘플은 동일한 조건 하에 가교제를 넣지 않고 안티센스 에스아이알엔에이와 리간드만을 넣어 반응시킨 샘플이다.
- [0045] 안티센스 에스아이알엔에이에 가교제를 사용하여 리간드를 연결시킨 것과 가교제 없이 혼합한 것을 15 % 아크릴아마이드 젤을 사용하여 전기영동으로 확인하였다(도 2(b)). Rxn1은 에스아이알엔에이, 가교제, 리간드를 포함하는 위에서 진행한 모든 조성물의 종류와 양은 같지만 다른 종류의 완충용액을 사용하여 접합체가 제조되지 않은 것을 나타낸다.
- [0046] 또한, 세포내 도입을 유도하는 대표적인 리간드인 두 종류의 펩타이드 hph와 RGD를 사용하여, 리간드와 안티센스 에스아이알엔에이 접합체를 제조한 후 제조된 접합체를 전기영동을 통해 확인하였다. 도 2(c)에서 4번, 5번 well에서 리간드가 도입된 안티센스 에스아이알엔에이 접합체들이 리간드의 도입으로 인해 분자량이 증가되어 밴드의 위치가 원래의 안티센스 에스아이알엔에이에 비해 위쪽으로 이동된 것을 알 수 있다.
- [0047] **실시예 3. 리간드가 없는 에스아이알엔에이와 리간드가 연결된 에스아이알엔에이를 결합시킨 리간드가 도입된**



**에스아이알엔에이 접합체의 제조**

- [0048] 리간드가 없는 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이와 리간드를 결합시킨 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이는 3 X PBS와 계면활성제인 3.5 % TritonX-100 조건 하에서 1 : 1로 혼합한 다음 37 °C 수조에서 1 시간 동안 반응시켜 상보적인 수소결합을 이루게 하였다. 도 2(d)에서 보는 바와 같이, 리간드가 없는 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이와 리간드를 결합시킨 센스 또는 안티센스 에스아이알엔에이가 리간드의 존재여부와 상관 없이 상보적인 수소결합을 잘 이루고 있음을 전기영동으로 확인하였다.
- [0049] **실험예 1. 앵타머가 도입된 에스아이알엔에이 접합체**
- [0050] MUC-1(Mucin-1) 앵타머(aptamer)가 5' 말단에 치환된 단일 가닥의 센스 에스아이알엔에이(Aptamer-S)에 안티센스 에스아이알엔에이(AS)와 이량체 안티센스 에스아이알엔에이(diAS) 각각을 수소결합을 통해 annealing시켰다. 15 % 아크릴아마이드 겔에서 180 V, 30 분간 전기영동하고, 에티디움브로마이드(Ethidium bromide)로 염색 20 분, 증류수로 destain 10 분 후, UV illuminator를 통해 알엔에이의 위치를 확인한 결과, 이량체의 안티센스 에스아이알엔에이에 앵타머가 도입된 센스 가닥이 상보적으로 잘 결합되었음을 알 수 있었다(도 3(a)).
- [0051] 또한, Aptamer-S에 단량체, 이량체, 다량체의 안티센스 에스아이알엔에이 (각각 AS, diAS, muAS)를 수소결합을 통해 상보적으로 결합시키고, 15 % 아크릴아마이드 겔에서 180 V, 30 분 전기영동하고, 에티디움브로마이드(Ethidium bromide)로 염색 20 분, 증류수로 destain 10 분 후 UV illuminator를 통해 확인한 결과, 상보적으로 잘 결합되었음을 알 수 있었다(도 3(b)).
- [0052] **실험예 2. 에스아이알엔에이 접합체의 세포내 도입**
- [0053] 앵타머 센스 에스아이알엔에이와 안티센스 에스아이알엔에이를 수소결합시킨 샘플과 앵타머 센스 에스아이알엔에이와 이량체 안티센스 에스아이알엔에이를 수소결합시킨 샘플을 POPO-3(invitrogen) dye를 이용하여 염색시켰다. 에탄올 침전법(Ethanol precipitation method)으로 염색된 에스아이알엔에이만을 분리하여 나노드롭(Nanodrop)으로 RNA의 농도를 측정 후, 유방암 세포주인 MCF-7 cell을  $2 \times 10^5$  cells/well로 혈청이 없는 배지 (serum-free media) 250  $\mu$ l에 위에서 준비한 알엔에이들을 2  $\mu$ g씩 넣고 4 시간 동안 유지시켰다. 4 시간 후에 media를 제거하고 1 X PBS로 2 번 씻어주고 3.7 % 포름알데히드로 셀을 고정시킨 후, 공초점 현미경(confocal microscopy)을 이용하여 세포내로 도입된 에스아이알엔에이(붉은 색)를 촬영하였다. 그 결과 리간드가 도입된 단량체에 비해 리간드가 도입된 이량체, 리간드가 도입된 다량체의 순으로 에스아이알엔에이의 세포내로의 도입이 높음을 알 수 있었다(도 4).
- [0054] **실험예 3. GFP 유전자 발현 억제**
- [0055] 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)을 발현하는 MDA-MB-435 세포를 24 well 플레이트에  $0.5 \times 10^5$  cells/well로 넣어 하루동안 배양한 뒤, GFP 유전자를 저해하는 에스아이알엔에이 단량체(S/AS), 세포도입펩타이드(PTD)가 도입된 단량체의 에스아이알엔에이(S/ASptd), 양쪽 말단에 세포도입펩타이드(PTD)가 도입된 단량체의 에스아이알엔에이(Sptd/ASptd), 세포도입펩타이드(PTD)가 도입된 안티센스 에스아이알엔에이와 이량체의 센스 에스아이알엔에이가 상보적으로 결합된 이량체 에스아이알엔에이(diS/ASptd)로 구성된 각각의 샘플을 무혈청 배지 조건에서 알엔에이 농도 0.28  $\mu$ M, 1.14  $\mu$ M로 넣어 5 시간 동안 처리 후, 새 배지로 교체한 뒤 37 °C 인큐베이터에서 48 시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후, 1 X PBS로 3 번 씻어주고 계면활성제인 1 % tritonX-100으로 셀을 터뜨려 세포 안에 있는 형광단백질의 정량을 위해 상층액을 이용하여 형광분석기(fluorescencephotometer)로 480/520 nm에서 형광을 측정하여 발현량을 알아보았다. 그 결과, Sptd/ASptd, diS/ASptd 두 가지 구조가 GFP 유전자를 저해하여 형광 발현량을 크게 감소시키는 것을 알 수 있었다(도 5).
- [0056] **실험예 4. 에스아이알엔에이 접합체의 세포독성**
- [0057] GFP 유전자를 저해하는 에스아이알엔에이 단량체(S/AS), 세포도입펩타이드(PTD)가 도입된 단량체의 에스아이알엔에이(S/ASptd), 양쪽 말단에 세포도입펩타이드(PTD)가 도입된 단량체의 에스아이알엔에이(Sptd/ASptd), 세포도입펩타이드(PTD)가 도입된 안티센스 에스아이알엔에이와 이량체의 센스 에스아이알엔에이가 상보적으로 결합된 이량체 에스아이알엔에이(diS/ASptd)로 구성된 각각의 샘플의 세포독성을 알아보기 위한 실험을 진행하였다.
- [0058] 96 well 플레이트에 GFP를 발현하는 MDA-MB-435 세포  $5 \times 10^3$  cells/well을 넣어 24 시간 동안 배양한 뒤, 각 샘플을 무혈청 배지 조건에서 0.5  $\mu$ M, 1.14  $\mu$ M로 넣어 5 시간 경과 후 원래의 배양 조건(10 % 혈청이 포함된 배지)으로 교체하였다. 그리고 37 °C 인큐베이터에서 24 시간 동안 배양하였다. 이후, 각 플레이트에 CCK

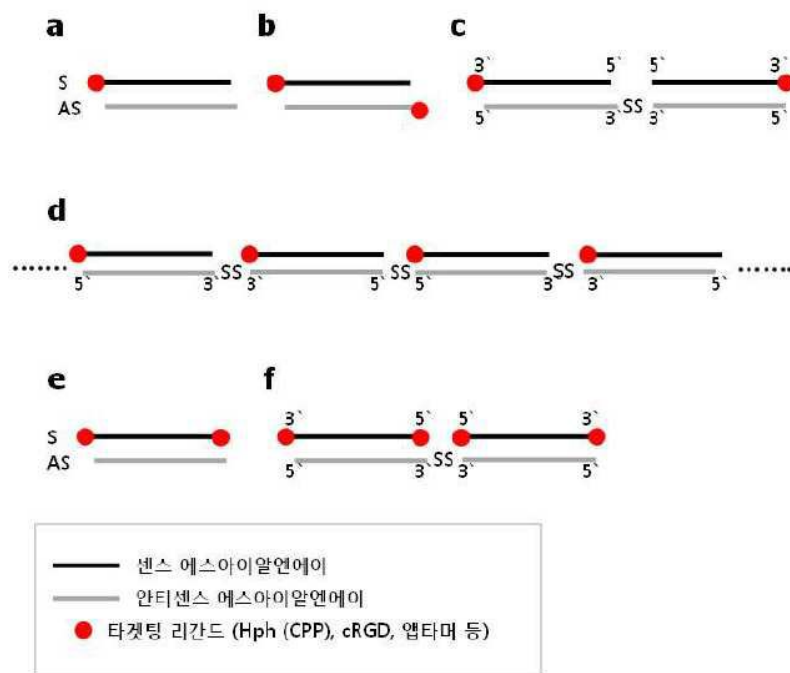
reagent(cell counting kit, dojindo) 10  $\mu$ l씩 넣어 37  $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 90 분간 인큐베이션한 후, ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포를 측정함으로써 독성이 있는지 여부를 실험하였다. 그 결과, 사용한 샘플들에서는 독성이 거의 없는 것으로 확인되었다(도 6).

[0059]

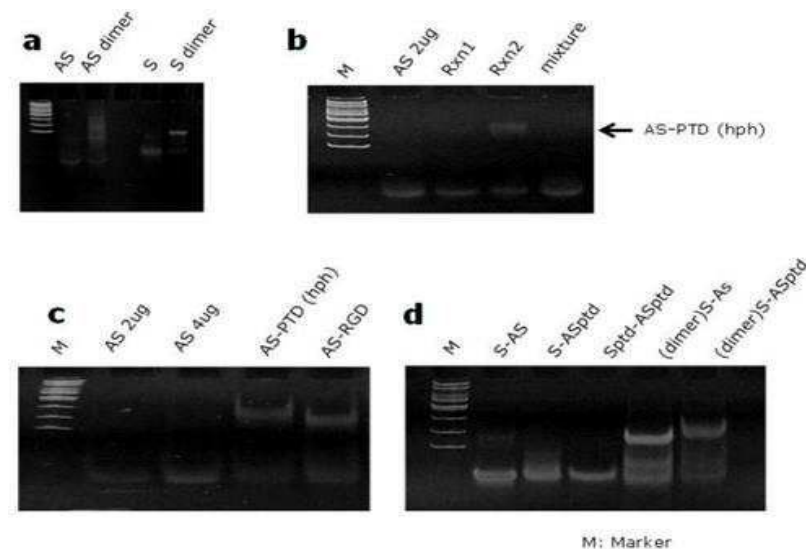
이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

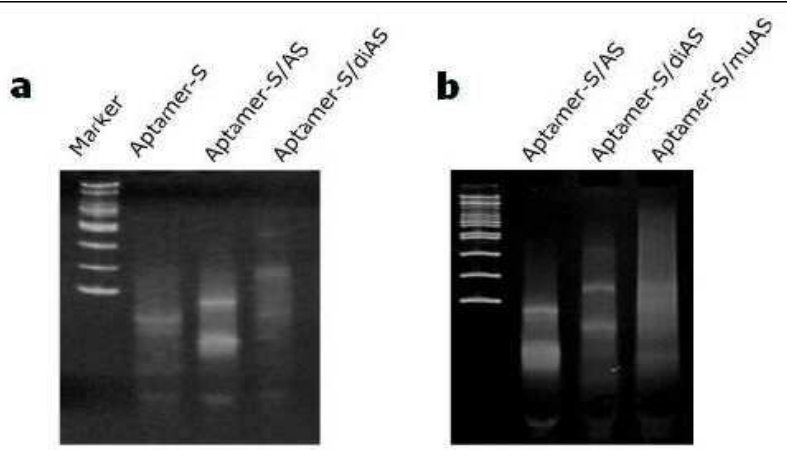
도면1



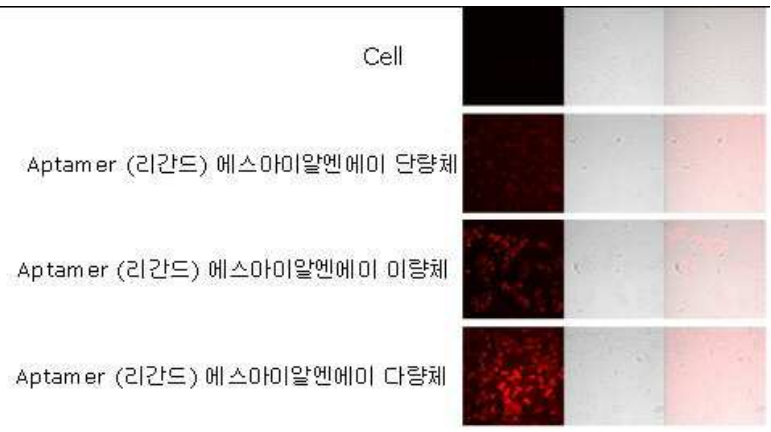
도면2



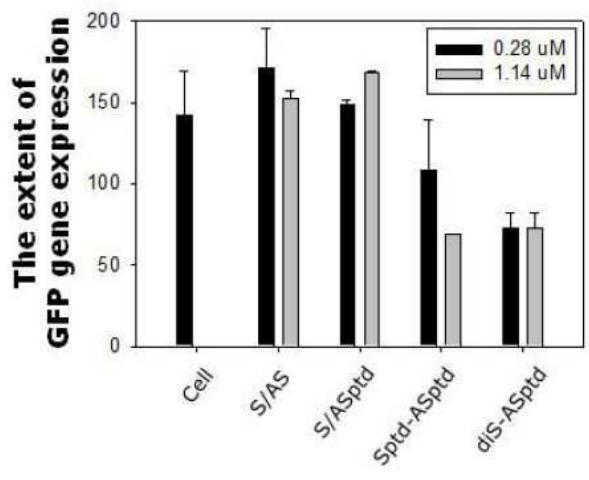
도면3



도면4



도면5



도면6

