



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월03일

(11) 등록번호 10-1336552

(24) 등록일자 2013년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/40 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0085443

(22) 출원일자 2011년08월26일

심사청구일자 2011년08월26일

(65) 공개번호 10-2013-0022671

(43) 공개일자 2013년03월07일

(56) 선행기술조사문헌

Advanced Functional Materials, 18(7),
2008.03.27., pp.993-1001*

Cancer Research, 67, 2007, pp.10958-10965*

Clinical Cancer Research, 11, 2005,
pp.139-146*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

포항공과대학교 산학협력단

경상북도 포항시 남구 효자동 산31 포항공과대학
교내

(72) 발명자

김원종

경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 4동 403호 (지
곡동, 교수숙소)

남궁란

경기도 용인시 수지구 푸른솔로 76, 보성아이월드
아파트 402동 1001호 (죽전동)

(74) 대리인

특허법인이룸

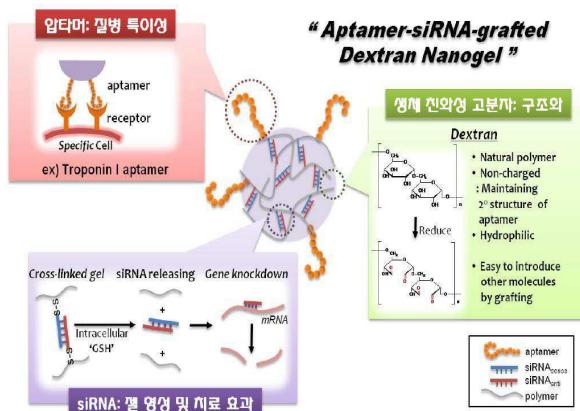
전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 전립선암 특이적 siRNA 전달체

(57) 요약

본 발명은 고분자 텍스트란을 기반으로 한 전립선암세포 특이적 siRNA 전달체에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 전립선 암세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드(DUP-1)와 siRNA를 고분자 텍스트란에 가교 결합시켜 전립선 암세포에 선택적으로 siRNA를 전달할 수 있는 siRNA 전달체에 관한 것이다. 본 발명에 따른 siRNA 전달체는, 특정한 구성 성분의 조합 및 결합 방법으로 인해 세포 독성을 감소시키며, 세포 특이적으로 siRNA를 전달하는 향상된 정확성 등을 가진다.

대 표 도 - 도1

이) 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0019459
부처명 교육과학기술부
연구사업명 바이오·의료기술개발사업
연구과제명 심근경색 치료를 위한 차세대 표적지향 압타머 전달체의 개발
기여율 1/1
주관기관 경희대학교산학협력단
연구기간 2011.06.30 ~ 2012.06.29

특허청구의 범위

청구항 1

비전하 엑스트란에 siRNA와 DUP-1을 화학적으로 결합시킨 siRNA 전달체를 포함하되,

상기 DUP-1은 페닐알라닌(Phe)-아르기닌(Arg)-프롤린(Pro)-아스파라긴(Asn)-아르기닌(Arg)-알라닌(Ala)-글루타민(Gln)-아스파르트산(Asp)-티로신(Tyr)-아스파라긴(Asn)-트레오닌(Thr)-아스파라긴(Asn)의 아미노산 서열을 갖는, 전립선암 진단 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 siRNA 전달체는 전립선암 세포에 선택적으로 상기 siRNA를 전달하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 siRNA 전달체는 siRNA 사이의 상보적인 수소결합을 매개로 자발적으로 형성되는 나노겔 형태를 가지는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 siRNA 전달체는 입자의 크기가 10 내지 500nm인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 siRNA는 15 내지 30 개의 뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 siRNA는 전립선암의 진단 또는 치료를 목적으로 하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 비전하 텍스트란과 siRNA의 화학적 결합은 이황화 결합에 의하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 비전하 텍스트란은 세포 특이적 펩타이드와 이황화결합, pH 반응 결합, 또는 광반응 결합에 의하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 siRNA는 환원성 조건에서 나노겔로부터 방출되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 고분자 텍스트란을 기반으로 한 전립선암 특이적 siRNA 전달체에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 siRNA로 가교 결합된 고분자 텍스트란 나노 구조체에 전립선 암세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드(DUP-1)를 도입하여 전립선암에 선택적으로 siRNA를 전달할 수 있는 siRNA 전달체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

siRNA는 19-25개의 뉴클레오티드로 이루어진 이중 가닥의 RNA로서 상보 서열의 mRNA를 특이적으로 인지하고 잘라, 그 mRNA에 암호화된 단백질의 발현을 억제하는 기작을 갖는 올리고뉴클레오티드이다. 이러한 기작으로 인해, siRNA는 다양한 질병의 원인이 되는 유전자 변형에 의한 질병을 치료할 수 있는 획기적인 약물로서 주목을 받고 있다. 하지만 수년에 걸친 연구에도 불구하고 아직 실제로 siRNA를 치료제로 이용한 보고는 이루어지지 않고 있는데, 이는 siRNA를 세포 내로 유입시킬 수 있는 효과적인 전달체(gene delivery system)가 개발되지 않았기 때문이다.

[0003]

기존에 알려진 siRNA 전달체 시스템들은 대부분 양이온성 고분자를 기반으로 하여 siRNA와 정전기적 인력에 의해 복합체를 형성하고 여분의 양이온성 전하를 이용하여 세포막과의 상호작용을 촉진하여 세포내 유입을 유도한 방법들이다. 하지만 이러한 양이온성 고분자는 적은 수의 염기로 이루어진 낮은 전하 밀도와 단단한(rigid) 구조를 갖는 독특한 특성의 siRNA와 안정한 복합체를 형성하기 어렵다. 뿐만 아니라 이러한 불안정한 양이온성 고분자/siRNA 복합체는 세포에 유입시 세포막 외부에 존재하는 프로테오글리칸(proteoglycan)과 같은 강한 음전하를 갖는 물질들에 의해 붕괴되어 siRNA를 복합체로부터 해리시키므로 siRNA의 세포 내 전달에 한계점이 있다고 지적되어 왔다.

[0004] 따라서 siRNA의 효과적인 세포내 전달을 위해서는 siRNA에 특성화된 전달 시스템을 개발해야 한다는 흐름이 형성되어 오고 있으며, 다양한 연구들이 진행되고 있다. 이러한 연구의 흐름으로써 최근 짧은 길이의 siRNA를 긴 사슬 형태로 연결하여 전하 밀도와 유연성을 높인 고분자화된 siRNA를 제조하는 연구들이 이루어지고 있고, 세포 유입이 용이하다고 알려진 유-무기 나노 입자 표면에 화학적으로 siRNA를 접합한 시스템에 대한 연구들도 활발하게 진행되고 있다. 하지만 이러한 siRNA 전달 시스템들은 여전히 세포 독성, 낮은 전달 효율성 등의 문제점을 가지고 있다.

[0005] 한편, 현재 유전자 전달 시스템에서 가장 중요하게 생각되고 있는 부분은 표적 특이적 전달성(target specific delivery)에 관한 것이다. siRNA를 생체 내에 직접 투여하게 되면, 생체 내 모든 장기 및 세포들이 동일하게 siRNA에 노출이 되기 때문에 siRNA와 mRNA의 비특이적 결합으로 인하여 정상 유전자의 발현이 억제되는 부작용이 일어나게 된다.

[0006] 이와 같이 siRNA를 효과적인 유전자 치료제로 이용하기 위해서는, 약물의 생체 내 안정성을 향상시키고, 특정 세포로의 표적 지향적인 전달을 위한 siRNA 전달체의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, siRNA의 특정 세포내 전달 효율성 및 안정성을 향상시키기 위하여, 생체적합성 고분자인 텍스트란에 siRNA와 세포 특이적 웨타이드를 결합시킨 siRNA 전달체를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 텍스트란에 siRNA와 세포 선택적 웨타이드를 화학적으로 결합시킨 siRNA 전달체를 제공한다.

[0010] 본 발명의 일구현예로, 상기 siRNA 전달체는 특정 세포에 선택적으로 상기 siRNA를 전달하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 siRNA 전달체는 siRNA의 수소결합을 매개로 한 나노셀 형태를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 siRNA 전달체는 입자의 크기가 10 내지 500nm인 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 siRNA 전달체는 15 내지 30 개의 뉴클레오티드로 구성된 siRNA를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 siRNA 전달체는 전립선암의 진단 또는 치료를 목적으로 하는 siRNA를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 siRNA 전달체는 전립선 암세포에 선택적으로 결합하는 웨타이드를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 siRNA 전달체는 전립선 암세포에 선택적으로 결합하는 웨타이드인 DUP-1을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 siRNA 전달체는 텍스트란과 siRNA가 이황화 결합에 의하여 결합되는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 siRNA 전달체는 텍스트란과 세포 특이적 웨타이드가 이황화 결합, pH 반응 결합, 또는 광반응 결합에 의하여 결합되는 것을 특징으로 한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 siRNA 전달체는 환원성 조건에서 siRNA를 방출하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 또한 본 발명은 텍스트란, siRNA, 및 DUP-1을 함유하는 siRNA 전달체를 약제학적 유효량 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

- [0021] 본 발명의 일구현예로, 상기 약학적 조성물은 전립선암의 진단용으로 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 전립선암의 치료용으로 사용되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따른 siRNA 전달체는 siRNA와 텍스트란의 이황화 결합으로 인하여, 세포 내로 siRNA를 효율적으로 전달 가능하며, 또한 전립선 암세포 특이적 웨타이드인 DUP-1의 사용으로 전립선암에 선택적으로 siRNA를 전달할 수 있기 때문에, siRNA의 효율을 증가시키며 부작용을 감소시켜 전립선암의 진단 및 치료에 적용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 다양한 질병 치료에 적합한 siRNA와 표적 지향성 물질인 웨타이드, 암타미, 단분자 등을 자유자재로 siRNA 전달체에 도입하여 유전자 치료에 응용할 수 있는 원천기술로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 siRNA 전달체의 개념을 간략히 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 siRNA 전달체의 제조과정을 간략히 나타낸 모식도이다.
- 도 3은 (A) DTT 유무에 따른 Dex-ss-siLUC, Dex-ss-DUP-1 및 Dex-ss-siLUC/DUP-1 컨쥬케이트, (B) Dex-CHO와 siLUC-SH 컨쥬케이트, 및 (C) DTT 유무에 따른 Dex-ss-siLUC와 Dex-xs-siLUC 컨쥬케이트를 보여주는 PAGE 사진이다.
- 도 4는 DTT 유무에 따른 siRNA 전달체를 보여주는 PAGE 사진이다.
- 도 5는 (A) 이중 가닥의 siLUC, (B) Dex-ss-siLUC 컨쥬케이트, (C) siRNA 전달체, 및 (D) DTT를 처리한 siRNA 전달체를 보여주는 형광 현미경 사진이다.
- 도 6은 (A) siRNA 전달체, 및 (B) DTT를 처리한 siRNA 전달체를 보여주는 투과전자현미경(TEM) 사진과 (C) siRNA 전달체, 및 (D) DTT를 처리한 siRNA 전달체를 보여주는 주사투과형전자현미경(STEM) 사진과 (E) siRNA 전달체, 및 (F) DTT를 처리한 siRNA 전달체를 보여주는 주사전자현미경(SEM) 사진이다.
- 도 7은 (A) siRNA 전달체, (B) 단일 가닥의 siLUC를 첨가한 siRNA 전달체, 및 (C) 단일 가닥의 siVEGF를 첨가한 siRNA 전달체의 크기를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 (A) siRNA 전달체, 및 (B) 대조군으로 환원성 조건에서 siRNA가 방출되지 않는 siRNA 전달체의 DTT에 의한 수화 크기의 변화를 나타내는 그래프이다.
- 도 9는 (A) DTT를 처리하지 않은 siRNA 전달체, 및 (B) DTT를 처리한 siRNA 전달체의 환원 조건에 따른 siRNA 방출 정도를 보여주는 PAGE 사진이다.
- 도 10은 Dex-ss-siLUC 전달체, Dex-ss-siLUC/DUP-1 전달체, Dex-xs-siLUC 전달체, 및 Dex-xs-siLUC/DUP-1 전달체의 세포 독성을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 11은 Dex-ss-siLUC 전달체, Dex-ss-siLUC/DUP-1 전달체, Dex-xs-siLUC 전달체, 및 Dex-xs-siLUC/DUP-1 전달체가 전립선 암세포인 PC-3 세포의 유전자 발현을 억제하는 정도를 나타내는 그래프이다.
- 도 12는 Dex-ss-siLUC 전달체, Dex-ss-siLUC/DUP-1 전달체, Dex-xs-siLUC 전달체, 및 Dex-xs-siLUC/DUP-1 전달체가 DUP-1 웨타이드와 경쟁적으로 전립선 암세포인 PC-3 세포의 유전자 발현을 억제하는 정도를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명자들은 세포에 독성을 유발하지 않으며, 세포 선택적인 특성을 가지는 siRNA 전달체에 대하여 연구한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0026] 본 발명은 텍스트란에 siRNA와 세포 선택적 웨타이드를 화학적으로 결합시킨 siRNA 전달체를 제공한다.
- [0027] 본 발명자들은 세포에 독성을 유발하지 않는 siRNA 전달체를 개발하고자, 생체 적합성 고분자인 텍스트란을 이용하였다. 텍스트란은 6- α -D-glucopyranosidic 결합을 갖는 선형의 천연 고분자로서 물에 대한 용해도가 좋고 독성이 낮기 때문에 널리 이용되고 있다. 또한 전하를 갖고 있지 않기 때문에 전하를 가지고 있는 물질을 도입하기에 유리하며, 이웃자리 다이올(vicinal diol)을 가지고 있어 특정 산화제로 쉽게 산화되어 반응성이 좋은

알데하이드기를 가지게 된다. 본 발명에서는 이 특성을 이용하여 siRNA를 텍스트란에 결합시켰다.

[0028] 이종가닥의 siRNA는 sense 서열과 antisense 서열의 자체적인 염기 간의 수소 결합에 의하여 형성된다. 본 발명에서는 이 특성을 이용하여 한 그룹의 텍스트란에는 sense 서열의 단일 가닥 siRNA를 결합시키고, 다른 한 그룹의 텍스트란에는 antisense 서열의 단일 가닥 siRNA를 결합시킨 후, 이 두 그룹을 섞어 siRNA의 상보적인 수소 결합에 의하여 텍스트란 분자들을 가교결합 시켰다. 이때 텍스트란 한 분자당 5개의 siRNA가 도입되어 있으므로 텍스트란 고분자들은 서로 가교결합을 통하여 네트워크 구조를 형성하게 된다. 가교결합된 복합체는 친수성이 높은 물질들로 구성되어 있기 때문에, 수분을 함유하게 되면 팽창이 가능한 젤의 형태를 이루게 되며 siRNA를 외부의 물질로부터 안전하게 보호하는 역할을 하게 된다.

[0029] 세포 내부는 외부에 비하여 글루타티온(glutathione, GSH)이라는 물질을 수 배 이상 높은 농도로 함유하고 있기 때문에, 상대적으로 환원성 조건을 형성하게 된다. 본 발명에서는 세포 내/외부의 환원도의 차이를 이용하여 siRNA를 세포 내에서 방출될 수 있도록, 텍스트란과 siRNA를 이황화 결합에 의하여 결합시켰다. 이 결합으로 인하여 siRNA 전달체는 세포 내부로 유입된 후, 환원성 조건에 의하여 siRNA를 분해하여 방출하는 특징을 가지게 된다. 텍스트란에 연결될 수 있는 siRNA의 종류에는 제한이 없다.

[0030] 본 발명에서는 siRNA 전달체가 전립선 암세포에 선택적으로 전달되게 하기 위하여 DUP-1 웨타이드를 사용하였다. DUP-1 웨타이드는 전립선 암세포 중에서 전립선 특이적 막항원(prostate-specific membrane antigen, PSMA)이 없는 세포에 특이적으로 결합하는 것으로 알려져 있다. 상기에서 언급했듯이 텍스트란은 한 분자의 사슬에 다수의 알데하이드기를 도입할 수 있기 때문에, 하나의 고분자 사슬에 다양한 물질을 결합시킬 수 있다. 따라서 본 발명에서는 텍스트란에 siRNA와 DUP-1 웨타이드를 함께 결합시킨 siRNA 전달체를 제조하였다. 텍스트란에 연결될 수 있는 웨타이드의 종류에는 제한이 없다. 또한 텍스트란과 웨타이드의 결합 방법에는 제한이 없다. 예를 들어, 이황화 결합, 또는 에스테르(ester), 아세탈(acetal), 하이드라존(hydrazone) 결합 등과 같은 pH 반응 결합, 또는 아조벤젠(azobenzene), o-나트로벤질에스테르(o-nitrobenzylester) 등과 같은 광 반응 결합에 의해 결합될 수 있다.

[0031] 본 발명의 일실시예에서는 siRNA 전달체가 환원성 조건에서 siRNA를 방출함을 확인하였으며(실시예 2 및 3 참조), 다른 실시예에서는 siRNA 전달체가 세포에 독성을 나타내지 않고 세포 내로 안정적으로 유입되어 모델 단백질의 발현을 억제하는 것을 확인하였다(실시예 3 내지 5 참조).

[0032] 상기 결과로부터, 본 발명의 siRNA 전달체는 전립선 암세포 특이적이며, 따라서 전립선암의 진단 및 치료에 적용될 수 있을 것으로 기대된다. 이에 본 발명은 텍스트란, siRNA 및 DUP-1을 함유하는 siRNA 전달체를 유효량 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 생리식염수, 폴리에틸렌글리콜, 에탄올, 식물성 오일, 및 이소프로필미리스테이트 등을 포함할 수 있으며, 이에 한정되지는 않는다.

[0034] 본 발명의 다른 측면은 siRNA 전달체를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 약제학적 유효량을 개체에 투여하여 전립선암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 개체란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간, 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다. 또한, 본 발명에서 약제학적 유효량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하게 조절될 수 있음을 당업자에게 명백하다.

[0035] 본 발명의 siRNA 전달체의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로, 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직하게는, 1일 0.001 내지 100mg/체중kg으로, 보다 바람직하게는 0.01 내지 30mg/체중kg으로 투여한다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 여러번 나누어 투여할 수도 있다. 본 발명의 siRNA 전달체는 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%의 양으로 존재할 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여방법에는 제한이 없으며, 예를 들면, 경구, 직장, 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막, 또는 뇌혈관(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0037] 이하, 본 발명의 이해를 돋기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0038] [실시예]

[0039] 실시예 1. siRNA 전달체 제조방법

알데하이드기로 기능화된 산화 텍스트란을 제조하기 위하여, 분자량 40kDa의 텍스트란(200mg, 1.23mmol)을 1당량의 과요오드산 나트륨(263mg, 1.23mmol)으로 4°C의 수용액상에서 12시간 동안 산화시켰다. 이후 분자량 1,000 이상의 물질을 투석 방법을 통해 정제한 후, 동결건조하여 텍스트란 알데하이드(Dex-CHO)의 백색 고체(177mg)를 얻었다(수율 88.5%). 텍스트란에 도입된 알데하이드기의 양을 히드록실아민(hydroxylamine)을 이용하여 정량한 결과, 약 62%의 글루코오스화이 산화되어 한 분자의 텍스트란 당 약 300개의 알데하이드기가 도입되었음을 확인하였다. 또한 겔 투과성 크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC)를 통해 분자량 감소가 있음을 관찰하였다.

하이드라자이드기로 기능화된 siRNA를 제조하기 위하여, 모델 단백질인 luciferasse의 발현을 억제하는 siRNA인 siLUC(sense 서열: 5' -CUUACGCGAGUACUUCGAdTdT-3' , 및 antisense 서열: 5' -UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3')를 사용하였다. 하이드라자이드기로 기능화하기 위하여, siLUC의 5' 말단에는 FITC가 달려있고, 3' 말단에는 헥실티올기(hexylthiol group)가 달려있는 siLUC-thiol을 사용하였다. 기능화된 siLUC-thiol의 제작은 Pioneer(한국)에 의뢰하였다. siLUC-thiol(10nmol, 1당량)과 PDPH(3-[2-pyridyldithiol]propionic hydrazide, 100nmol, 10당량)를 PBS 버퍼(pH8.0)에서 12시간 동안 반응시켰다. 이후 PD-10 컬럼을 이용하여 반응하지 않은 여분의 PDPH와 부산물을 제거하여 이황화 결합을 가지며 말단에 하이드라자이드기를 가진 siLUC-ss-hydrazide를 분리 후 동결건조시켰다.

환원 가능한 siRNA 전달체에 대한 대조군으로 환원 가능하지 않은 siRNA 전달체를 합성하기 위하여, PDPH 대신 BMPH(N-[b-maleimidopropionic acid]hydrazide)를 사용하였다. BMPH는 말레이미드기(maleimide group)와 함께 하이드라자이드기를 갖고 있으므로, 텍스트란의 알데하이드기와는 반응하지만, 환원성 조건에서 siRNA의 방출은 일어나지 않는다. DMSO에 녹인 BMPH(100nmol, 10당량)와 PBS 버퍼(pH7.2)에 녹인 siLUC-thiol(10nmol, 1당량)을 혼합한 후 12시간 동안 반응시켰다. 이후 PD-10 컬럼을 이용하여 반응하지 않은 여분의 BMPH와 부산물을 제거하여 siLUC-xs-hydrazide를 분리 후 동결건조시켰다.

하이드라자이드기로 기능화된 DUP-1을 제조하기 위하여, N-말단에 시스테인(cysteine)이 도입되어 있는 DUP-1-SH를 사용하였다. 기능화된 DUP-1-SH의 제작은 Anygen(한국)에 의뢰하였다. DUP-1-SH(3mg, 1당량)와 PDPH(3.3mg, 10당량)를 PBS 버퍼(pH8.0)에서 12시간 동안 반응 시킨 후, 분자량 500 이상의 물질을 투석 방법을 통해 정제하였다. 이후 동결건조하여 (DUP-1)-ss-hydrazide의 노란색 고체(0.124mg)를 얻었다.

텍스트란, siRNA 및 DUP-1의 컨쥬게이트를 제조하기 위하여, Dex-CHO(1.5nmol, 1당량), siLUC-ss-hydrazide(7.5nmol, 5당량), 및 (DUP-1)-ss-hydrazide(7.5nmol, 5당량)를 PBS 버퍼(pH7.4)에서 24시간 동안 반응시켰다. 이후 분자량 10,000 이상의 컨쥬게이트를 초원심분리기 필터를 이용하여 정제한 후 동결건조하여 Dex-ss-siLUC/DUP-1을 얻었다. 대조군인 환원가능하지 않은 Dex-xs-siLUC/DUP-1은 siLUC-xs-hydrazide를 사용하여 상기의 방법과 동일하게 합성하였다. 또 다른 대조군으로 DUP-1이 도입되지 않은 Dex-ss-siLUC와 Dex-xs-siLUC는 상기에 기재한 방법에서 DUP-1만 첨가하지 않고 동일한 방법으로 수행하여 합성하였다.

상기에서 제조된 Dex-ss-siLUC/DUP-1 또는 Dex-ss-siLUC 컨쥬게이트를 이용하여, 나노겔 형태의 siRNA 전달체를 제조하기 위하여, sense 서열의 siLUC가 도입된 컨쥬게이트와 antisense 서열의 siLUC가 도입된 컨쥬게이트를 각각 20 μ M이 되도록 annealing 버퍼에 녹인 후, 50 μ L씩 섞어 12시간 동안 실온에서 반응시켜 siRNA 상보적 서열의 수소결합에 의한, siRNA 전달체를 형성하였다.

상기 실험에 대한 개략적인 모식도를 도 2에 나타내었다.

[0047] 실시예 2. Dex-ss-siLUC/DUP-1 컨쥬게이트의 특성 분석

효과적으로 컨쥬게이트가 제조되었는지 확인하기 위하여 폴리아크릴아마이드젤 전기영동법(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)을 이용하여 분석하였다. 환원성 조건에서 siRNA가 정상적으로 방출되는지 확인하기 위하여 siRNA 전달체를 1,4-dithiothreitol(DTT) 용액(100mM)과 3시간 반응 후 PAGE를 이용하여 분석하였다.

PAGE는 13% 폴리아크릴아마이드겔을 이용하여 TBE 버퍼에서 2시간 동안 100V의 전압을 걸어서 수행하였고, SYBR green으로 염색하여 siRNA의 위치를 확인하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0049] 도 3A에 나타난 바와 같이, Dex-ss-siLUC/DUP-1의 경우에는 큰 분자량의 텍스트란에 siRNA가 결합되어, 젤 상에서의 움직임이 느려져 siRNA 단독 시료에 비하여 지연된 움직임이 관찰되었다. 여기에 환원제인 DTT를 처리한 경우에는 이황화 결합이 끊어져 텍스트란과 siRNA가 분리되어서 siRNA 단독 시료와 같은 위치에서 밴드가 관찰되었다. 이러한 결과를 통해서 텍스트란에 siRNA가 결합되어 분자량이 큰 복합체를 형성하였음을 확인할 수 있었을 뿐만 아니라, siRNA가 텍스트란에 이황화 결합으로 연결되어 있음을 확인할 수 있었다. siRNA 대신 웨타이드를 텍스트란에 결합시킨 경우에도 젤에서는 이동이 지연되고, DTT를 처리한 경우 단일 웨타이드의 밴드가 회복되는 것을 통해 웨타이드도 텍스트란에 이황화 결합을 매개로 하여 결합되어 있음을 확인하였다. 또한 siRNA 와 웨타이드를 텍스트란과 동시에 반응시킨 경우에도 상기의 두 가지 현상이 동일하게 나타나는 것을 확인하였다. 따라서 텍스트란에 siRNA 및 웨타이드가 모두 효과적으로 이황화 결합을 매개로 하여 결합되었음을 확인하였다.

[0050] 복합체의 움직임이 젤 상에서 지연되는 이유가 화학적인 결합의 형성에 의한 것인지 확인하기 위하여, 대조실험으로 siLUC-SH를 Dex-CHO와 반응시킨 후 이를 동일한 조건에서 PAGE하였다. 결과는 도 3B에 나타난 바와 같이, siRNA 단일 밴드와 siLUC-ss-siLUC 밴드가 독립적으로 관찰되었다. 이 결과를 통하여 Dex-ss-siLUC에서 siLUC는 hydrazone 결합을 통해 텍스트란과 결합되어 있음을 확인하였다.

[0051] 또한 비환원성 Dex-xs-siLUC의 합성 여부도 상기와 동일한 방법으로 확인하여, 도 3C에 나타내었다. 비환원성의 Dex-xs-siLUC의 경우에는 DTT 처리 유무에 관계없이 siRNA가 분리되어 단독 밴드를 형성하지 않았다. 이 결과를 통해 siRNA가 텍스트란에 이황화 결합에 의해 결합되어 있지 않은 것을 확인하였다.

[0052] 실시예 3. siRNA 전달체의 특성 분석

[0053] 3-1. PAGE를 이용한 siRNA 전달체의 확인

[0054] siRNA 전달체가 수소결합에 의해 결합되었는지 확인하기 위하여, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 PAGE를 수행하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다. siRNA 전달체에 DTT를 처리한 결과, 이중가닥의 siRNA가 관찰되었다. 이를 통해 siRNA 전달체가 siRNA의 상보서열을 매개로 하여 결합되어 있는 것을 확인하였다.

[0055] 3-2. 현미경을 이용한 siRNA 전달체의 확인

[0056] 효과적으로 siRNA 전달체가 제조되었는지 확인하기 위하여, 다양한 현미경을 이용하여 관찰하였다. 형광 현미경 관찰 시에는 annealing buffer에 분산된 상태에서 관찰하였고, TEM, STEM, 및 SEM 관찰 시에는 siRNA 전달체 용액을 탄소가 코팅된 격자판 위에 올리고, 거름종이로 여분의 물기를 제거한 후, 진공 오븐에서 12시간 건조시킨 후 관찰하였다.

[0057] 형광 현미경으로 관찰한 결과는 도 5에 나타내었다. siLUC 용액에서는 녹색 형광이 퍼져 있는 것이 관찰되었고 (도 5A), Dex-ss-siLUC 컨쥬게이트는 수십 μm 정도 크기의 희미한 녹색 형광을 통하여 확인하였다(도 5B). siRNA 전달체의 경우에는 강한 형광을 보여주는 나노 크기의 입자들이 확인되었으나(도 5C), DTT를 처리한 경우에는 형광이 다시 줄어드는 것을 확인하였다(도 5D). 이 결과를 통해, siRNA가 나노젤 안에 국소적으로 매우 높은 농도로 존재하기 때문에, 강한 형광을 나타내는 것을 확인하였고, 또한 환원 조건에 따라 전달체가 붕괴되는 것을 확인하였다.

[0058] 투과전자현미경(TEM), 주사투과형전자현미경(STEM), 및 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과는 도 6에 나타내었다. TEM 관찰 결과, siRNA 전달체는 직경 200nm 내지 300nm를 갖는 구형 입자임을 확인하였다(도 6A). STEM 결과는 siRNA 전달체 내부에 구멍들이 존재함을 보여주었다(도 6C). SEM 관찰 결과도 siRNA 전달체가 직경 200 내지 300nm를 갖고 있는 구형의 입자임을 보여주었고, 또한 더 작은 나노 크기의 입자들이 모여 구성된 복합체인 것을 확인할 수 있었다(도 6E). DTT를 처리한 후에는 TEM에서는 크기의 변화를 관찰할 수 없었지만, STEM과 SEM에서는 100nm 이하의 구형입자들이 관찰되었다(도 6B, D, 및 F). 이는 siRNA 전달체가 DTT에 의해서 siRNA가 방출되어 구조가 붕괴된 것을 의미한다.

3-3. 동적 빛 산란법(dynamic light scattering, DLS)을 이용한 siRNA 전달체의 확인

[0059] siRNA 전달체의 정확한 크기와 siRNA를 매개로 하여 결합되었음을 확인하기 위하여 DLS를 이용하여 관찰하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0060] siRNA 전달체의 크기는 평균 직경 350nm임을 보여주었다(도 7A). 이 siRNA 전달체에 단일 가닥의 siRNA(1당량)를 첨가한 후 한 시간 동안 반응시켜 관찰하였다. 그 결과는 도 7B에 나타내었다. siRNA 전달체의 크기가 평균 직경 103nm로 줄어든 것을 확인하였다. 이는 단일 가닥의 siRNA가 siRNA 전달체 내의 siRNA와 결합하여, siRNA 전달체가 붕괴된 것을 의미한다. 이에 대한 대조군으로 siRNA 전달체 내부의 RNA와 상보적이지 않은 siRNA(siVEGF)를 첨가하였다. 이때는 siRNA 전달체의 크기가 평균 직경 506nm로 증가된 것을 확인하였다. 이는 siRNA 전달체가 붕괴되지 않고 시간에 따라 팽창되었음을 의미한다. 이 결과를 통해 siRNA 전달체가 siRNA의 상보적 서열의 결합에 의해 형성되었음을 확인하였다.

3-4. DLS를 이용한 환원성의 조건 하에서의 siRNA의 방출 확인

[0061] 환원성의 조건에서 siRNA가 siRNA 전달체로부터 방출되는지 확인하기 위하여, DLS를 이용하여 관찰하였다. siRNA 전달체와 대조군을 DPBS 버퍼에 분산시킨 후, 상기와 동일한 방법으로 DTT를 처리한 후, 처리하지 않은 시료와 처리한 시료를 관찰하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0062] siRNA 전달체에 DTT를 처리한 시료의 경우, 10분 이내에 크기가 150nm로 감소되었고, DTT를 처리하지 않은 시료의 경우에는 크기가 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 8A). 환원성 조건에서 siRNA가 방출이 되지 않는 대조군의 경우에는 크기가 줄어들지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 8B). 이 결과는 환원성의 조건에서 siRNA 전달체로부터 siRNA가 방출되며, siRNA 전달체는 팽창이 가능한 수화젤의 특징을 가진다는 것을 의미한다.

3-5. PAGE를 이용한 시간에 따른 siRNA의 방출 확인

[0063] siRNA 전달체 내부의 siRNA가 시간에 따라 방출이 이루어지는지 확인하기 위하여, DTT를 처리한 시료와 처리하지 않은 시료를 시간에 따라 상기 실시예 2에 기재한 방법과 동일하게 PAGE를 수행하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0064] DTT를 처리하지 않은 경우에는 24시간까지 siRNA의 방출이 일어나지 않았지만, DTT를 처리한 경우에는 30분 이내에 siRNA의 방출이 시작되어, 지속적으로 방출이 이루어지는 것을 확인하였다.

3-6. siRNA 전달체의 표면 전하 및 크기의 측정

[0065] siRNA 전달체가 세포 내로 유입되기 위해서는, 그 크기와 표면전하가 매우 중요하기 때문에 제조된 siRNA 전달체의 표면 전하 및 크기를 측정하였다. siRNA 전달체(100pmol)를 400 μ L의 DPBS 버퍼에 분산시킨 후, 1mL의 큐벳에 넣고, 표면 전하 측정기기(Zetasizer Nano Z)와 크기 측정기기(Zetasizer Nano S)에 각각 넣어 표면 전하 및 그 크기를 측정하였다. 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[0066] DUP-1 웨타이드가 결합되지 않은 siRNA 전달체의 경우 평균 361nm의 크기를 가지고 있고, DUP-1 웨타이드가 결합된 siRNA 전달체의 경우에는 30nm 정도 증가된 크기였다. 환원성 조건에서 siRNA를 방출시키지 않는 대조군의 경우에는 DUP-1 웨타이드의 여부에 따라 각각 평균 404nm와 425nm의 크기를 보여주었다. 표면 전하는 네 개의 시료 모두 -14 내지 -15mV로 유사한 결과를 보여주었다.

[0071]

표 1. siRNA 전달체의 표면 전하 및 크기

| Nanogels | size (nm) | zeta potential (mV) |
|--------------------|-------------------|---------------------|
| Dex-ss-siRNA | 361.7 ± 150.2 | -15.9 ± 0.9 |
| Dex-ss-siRNA/DUP-1 | 391.3 ± 62.8 | -15.8 ± 0.8 |
| Dex-xs-siRNA | 404.1 ± 24.8 | -14.3 ± 0.6 |
| Dex-xs-siRNA/DUP-1 | 425.0 ± 35.7 | -14.5 ± 0.3 |

[0072]

실시예 4. 세포 독성 실험

[0074]

siRNA 전달체의 세포 독성을 확인하기 위하여 MTT 분석법을 이용하여 세포 독성 조사를 수행하였다. 전립선 암 세포 PC-3 세포주(한국 세포주 은행)를 96-well plate에 각 well 당 5×10^3 세포를 넣은 후, 24시간 배양하였다. 이 후 luciferase를 암호화하고 있는 플라스미드 pCMV-LUC(0.1 μ g/well)를 양이온성 고분자 BPEI와 N/P=10 비율로 섞은 후 30분 동안 처리하여 복합체를 형성하였다. 형성된 복합체를 상기의 세포에 처리 후 1.5시간 배양하였다. 이후 배양액을 제거하고 DPBS 버퍼로 세척한 후, siRNA 전달체가 포함된 새 배양액으로 교체하여 4.5 시간 배양하였다. 이후에 10% 혈청이 포함되어 있는 새 배지로 교체하여 24시간 동안 추가적으로 세포를 배양한 후, MTT 용액(20 μ L, 5mg/mL)을 처리하고 세포를 4시간 동안 배양하였다. 이후 PBS 버퍼로 세척하고, DMSO(150 μ L)를 처리하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 생존률은 시료를 처리하지 않은 세포에 대한 활성을 100%로 하여 상대적으로 산출하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[0075]

40pmol 이하의 siRNA 전달체는 세포의 생존률에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 이 안정성은 이를간 유지됨을 확인하였다. 이 결과는 siRNA 전달체를 안정적으로 전달 및/또는 치료에 적용할 수 있음을 의미한다.

[0076]

실시예 5. siRNA의 전달 효율 확인 실험

[0077]

세포 내에서 siRNA 전달체로부터 siRNA의 방출이 일어나, 유전자의 발현이 억제되는지 확인하기 위하여, siRNA 전달체를 세포에 처리 후 luciferase의 발현량을 측정하였다. 발현량 측정은 상기의 실시예 4와 동일한 방법으로 수행한 후, luciferase의 발현량을 측정하여 확인하였다. 발현 억제율은 시료를 처리하지 않은 세포에 대한 활성을 100%로 하여 상대적으로 산출하였다. 그 결과는 도 11에 나타내었다.

[0078]

DUP-1이 결합된 siRNA 전달체의 경우 유전자 발현이 55% 억제된 것을 확인할 수 있었다. DUP-1이 결합되지 않은 siRNA 전달체에 비하여 억제율이 12% 증가된 것으로 보아, 전립선 암세포 특이적 웹타이드로 인해 siRNA 전달체가 세포 내로의 유입이 촉진된 것을 확인할 수 있었다. 이에 대한 대조군으로써 비환원성의 siRNA 전달체를 이용한 경우에는 DUP-1이 결합되지 않은 경우 유전자의 발현에 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었던 반면, DUP-1이 결합된 경우에는 환원성 siRNA 전달체와 유사한 억제율을 보여주었다. 이 결과는 환원 가능성 여부에 관계없이 DUP-1으로 인해 세포 내로의 siRNA 전달 효율이 높아졌음을 의미한다.

[0079]

실시예 6. 경쟁 반응을 통한 siRNA 전달체의 세포특이성 분석

[0080]

상기의 실시예 5에서 관찰된 바와 같이, DUP-1이 결합된 siRNA 전달체가 DUP-1이 결합되지 않은 siRNA 전달체에 비해 높은 유전자 발현 억제율을 보이는 이유가 DUP-1에 의한 세포 내 유입 촉진에 의한 것인지 확인하기 위하여 경쟁 반응을 통한 siRNA 전달체의 세포특이성을 분석하였다. 세포특이성 분석을 위하여, 상기의 실시예 4와 동일한 방법으로 수행하되, siRNA 전달체 처리 전에 DUP-1(0, 1, 5, 및 10당량)을 1시간 동안 선처리한 후, siRNA 전달체를 처리하였다. 이 후 luciferase의 발현량을 측정하여 확인하였다. 발현 억제율은 시료를 처리하지 않은 세포에 대한 활성을 100%로 하여 상대적으로 산출하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.

[0081]

환원성 및 비환원성 siRNA 전달체 모두 DUP-1이 결합되지 않은 siRNA 전달체의 경우에는, DUP-1을 추가적으로

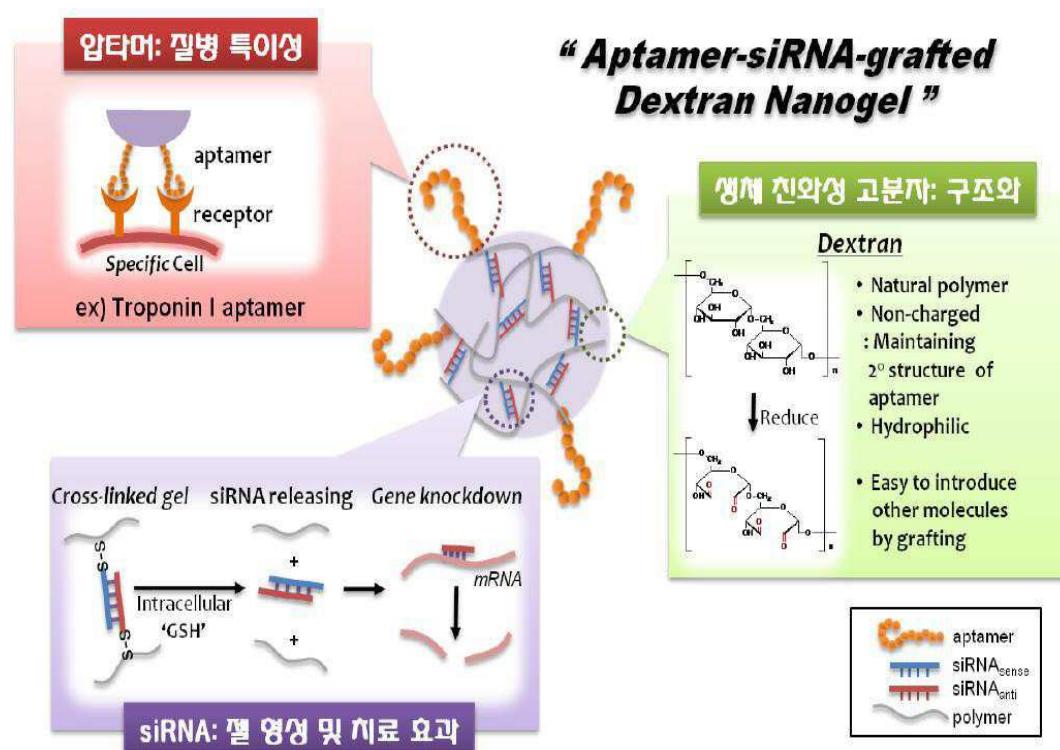
첨가한 경우에 유전자 발현 억제율에 영향을 미치지 않는데 반하여, DUP-1이 결합된 siRNA 전달체의 경우에는 DUP-1을 추가적으로 첨가한 경우에 유전자 발현 억제 효율이 감소되는 것을 확인하였다. 이 결과는 DUP-1이 결합된 siRNA 전달체의 경우, 전립선 암세포에 DUP-1을 매개로 하여 세포 내로 유입되는 것을 의미한다.

[0082]

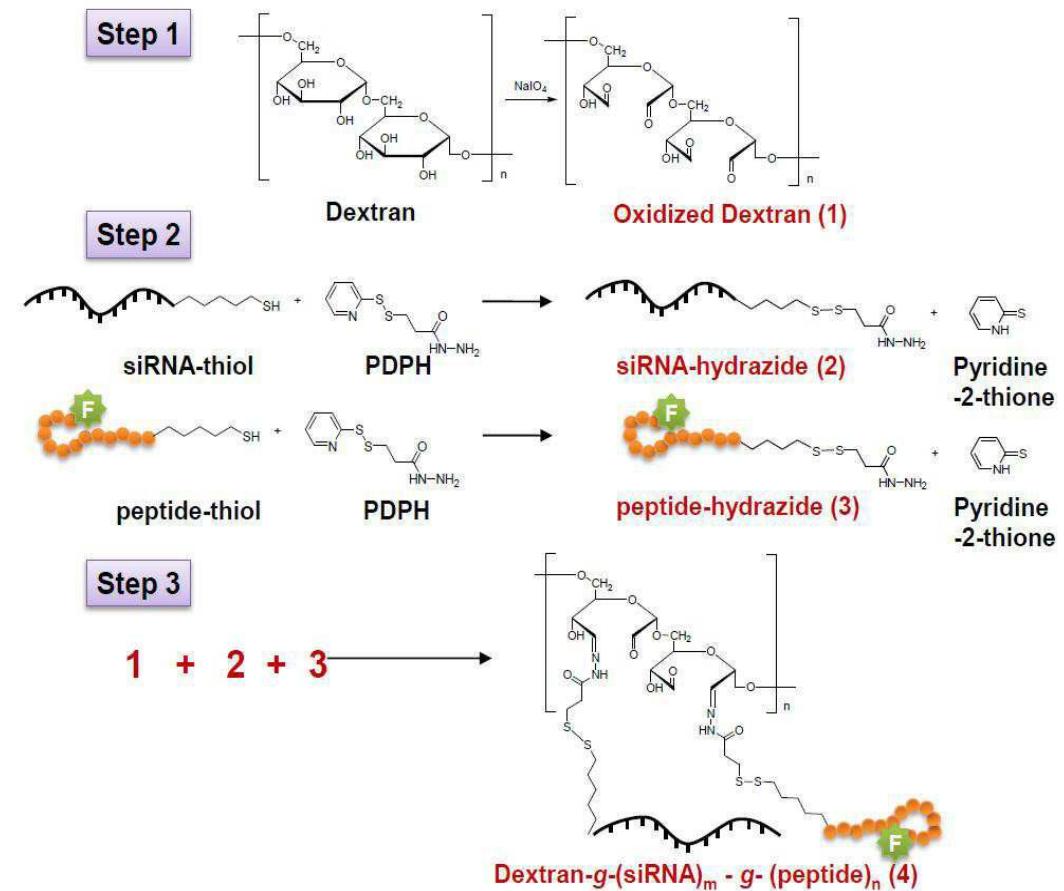
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

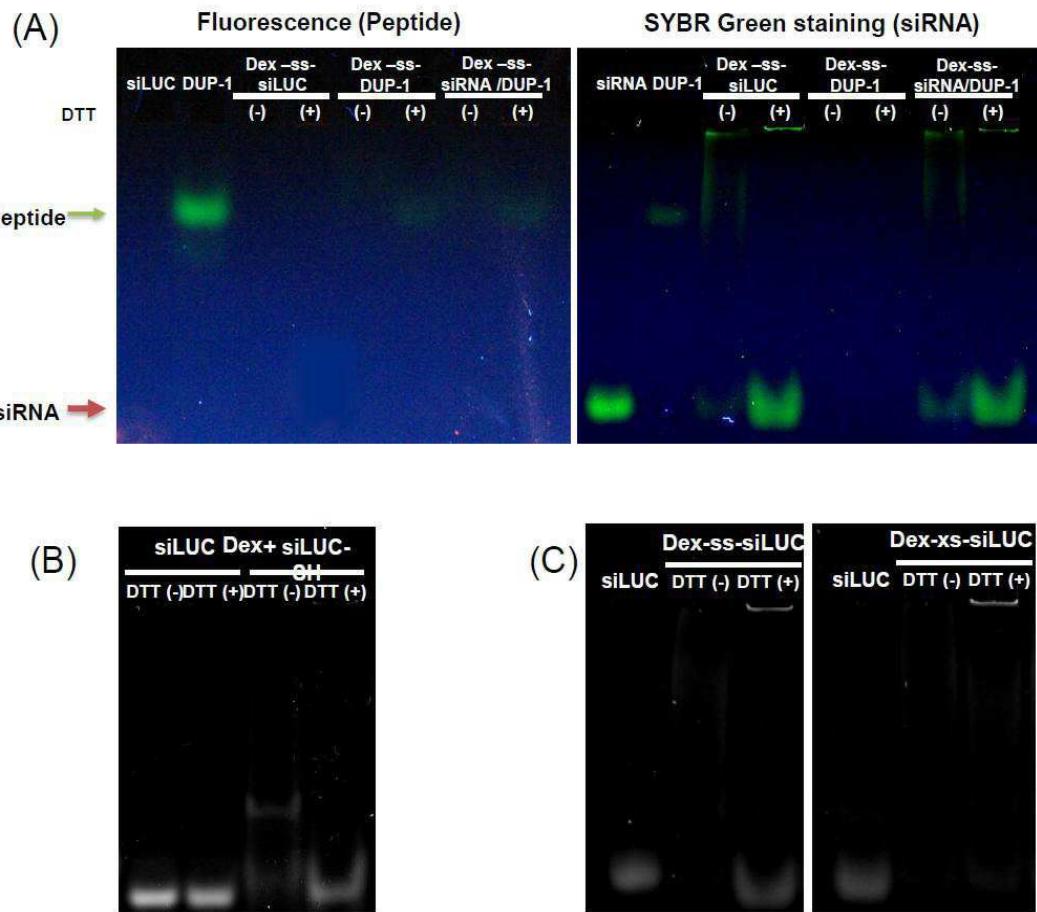
도면1



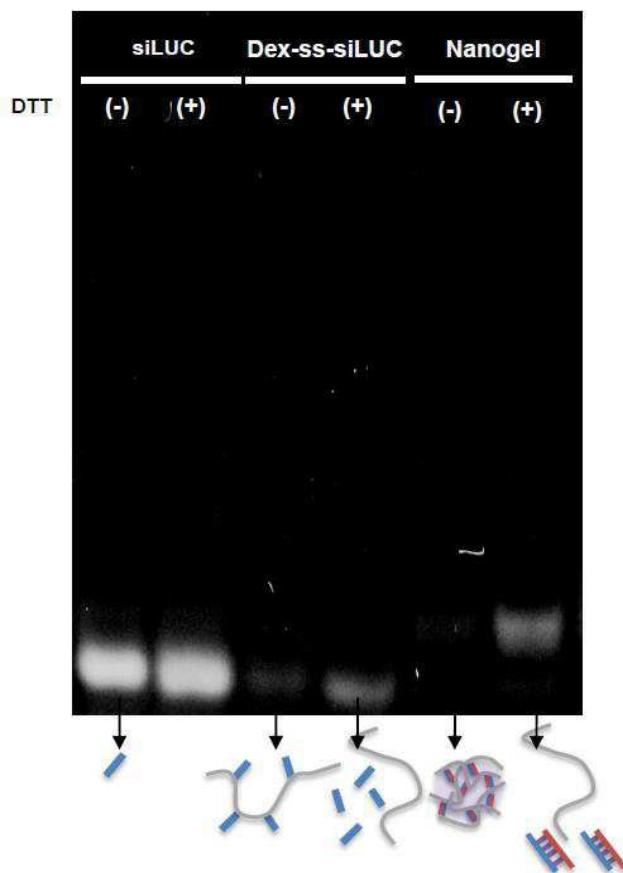
도면2



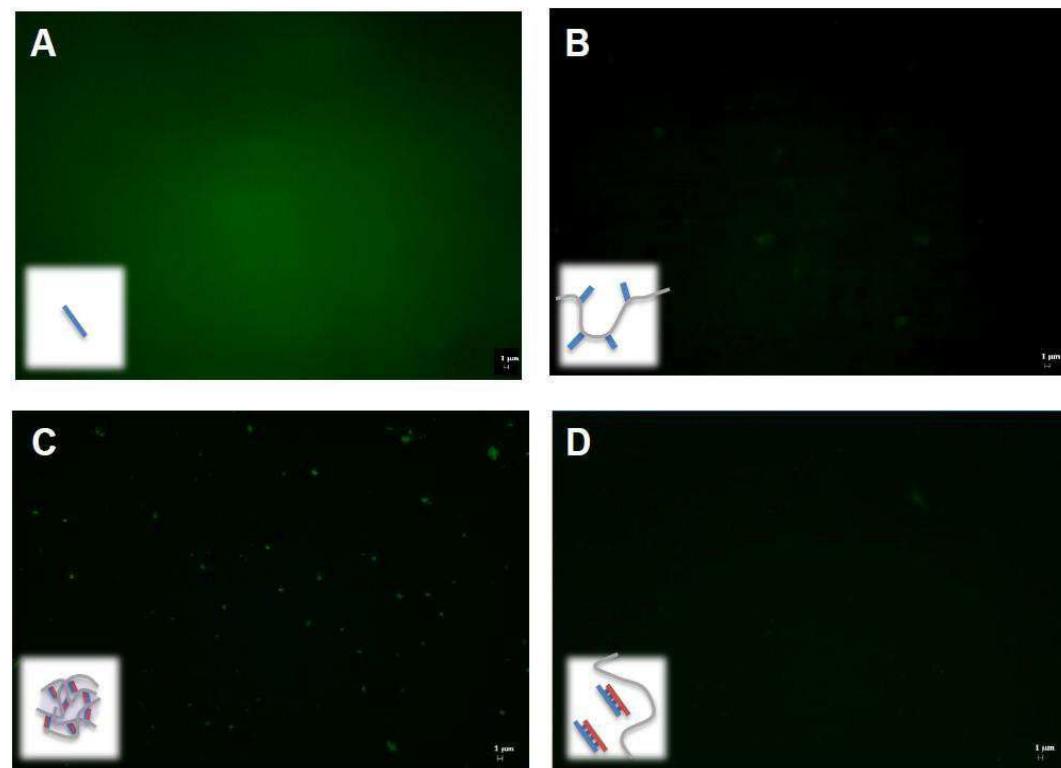
도면3



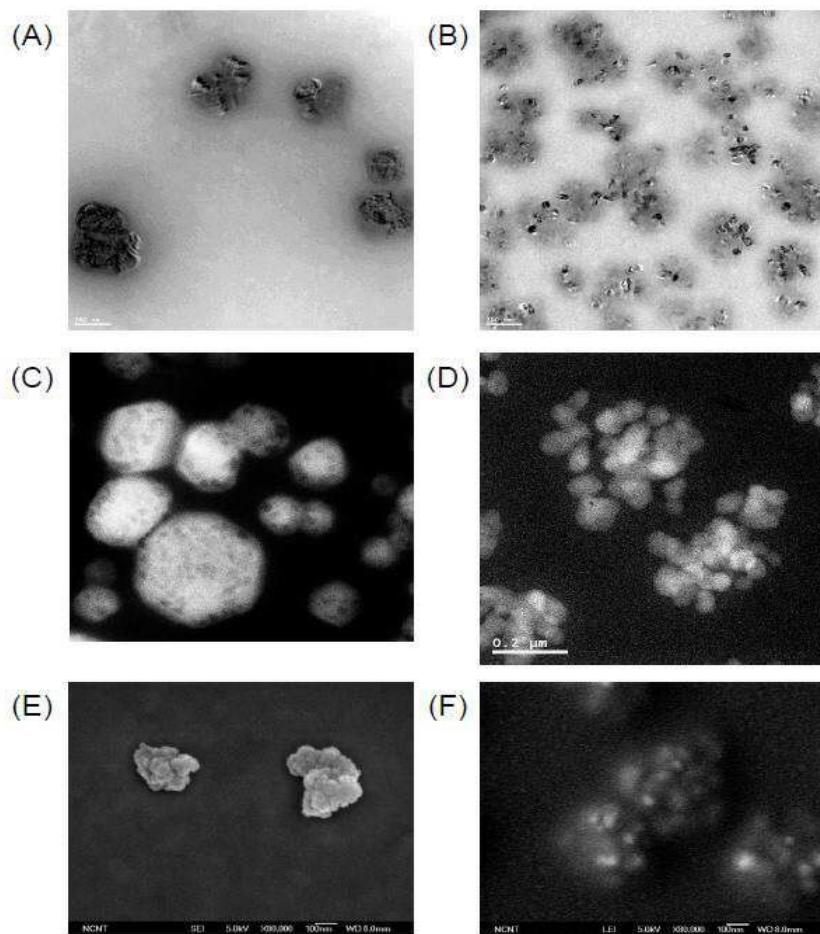
도면4



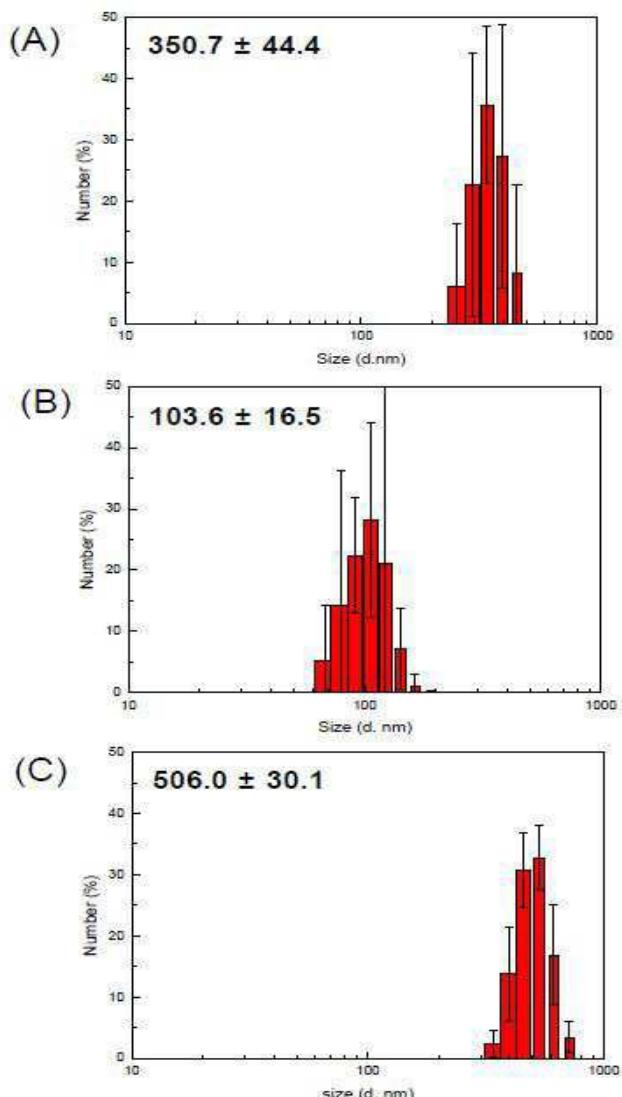
도면5



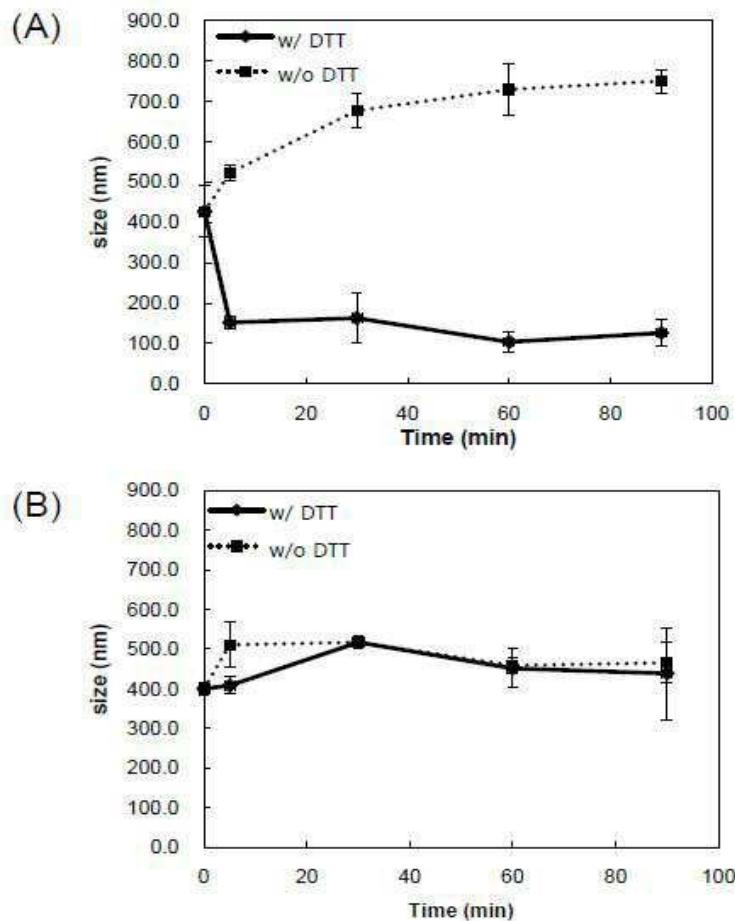
도면6



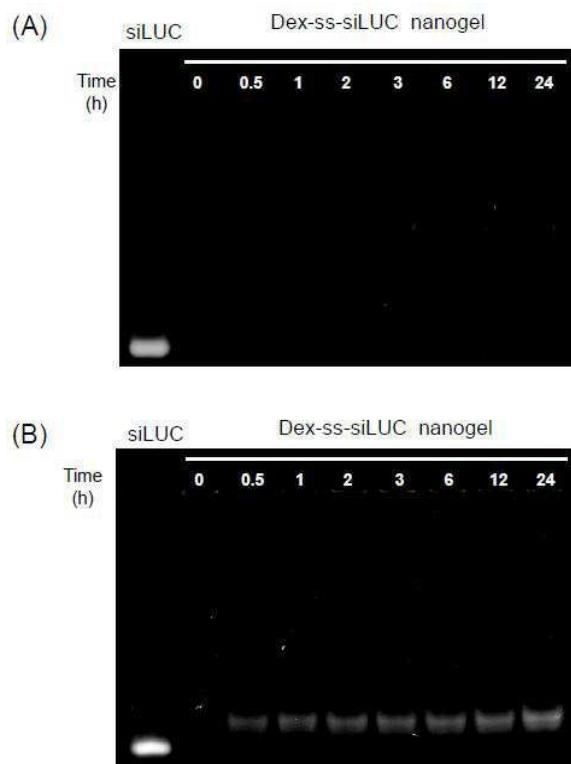
도면7



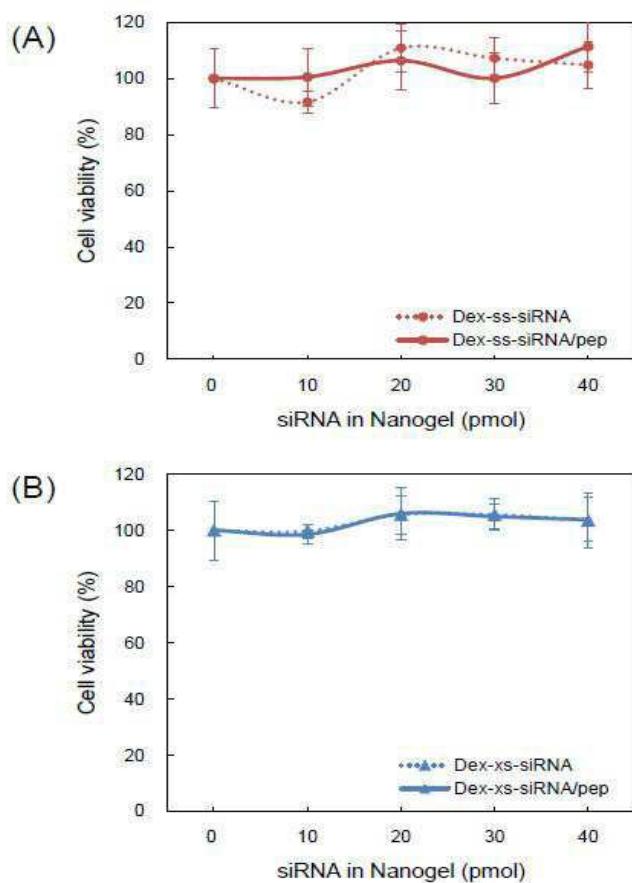
도면8



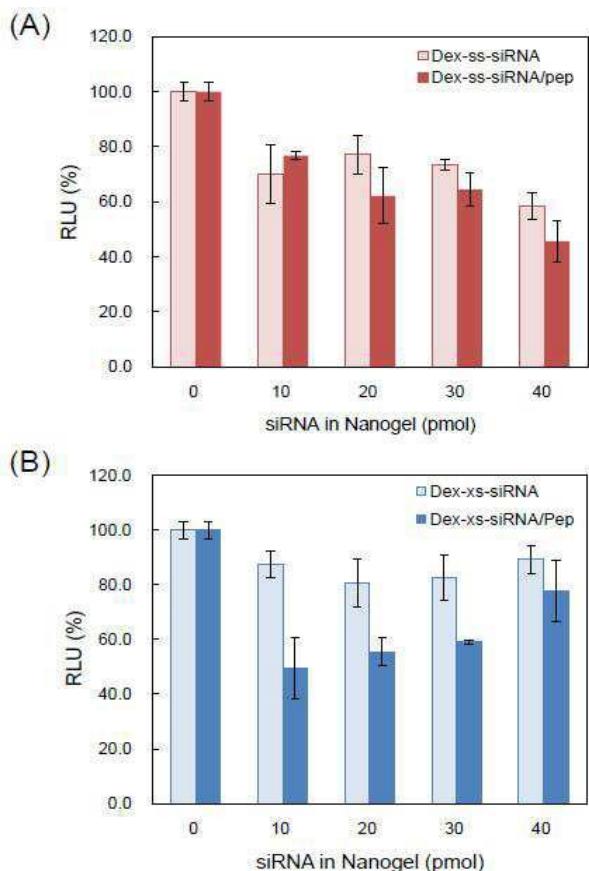
도면9



도면10



도면11



도면12

