



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0015211
(43) 공개일자 2011년02월15일

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0072816

(22) 출원일자 2009년08월07일

심사청구일자 2009년08월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김태우

대구광역시 달서구 성당1동 58-19

김진희

경기도 안산시 단원구 고잔동 대우마이빌 327호

(74) 대리인

안소영

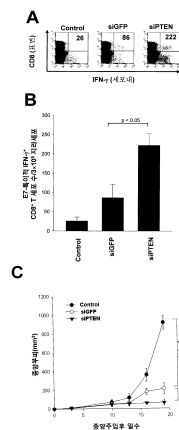
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) PTEN 단백질 특이적인 siRNA

(57) 요약

본 발명은 PTEN (phosphatase and tensin homolog) 유전자 특이적 siRNA, 상기 siRNA가 형질 주입된 세포, 및 이를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 암과 같은 만성면역질환의 예방, 치료 및/또는 보조치료에 우수한 작용효과를 나타낸다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A062260B8150508A31N010A

부처명 한국보건산업진흥원

연구관리전문기관

연구사업명 보건의료기술개발사업

연구과제명 (2차년도)중양 유래 면역억제 인자들의 무력화를 통한 수지상세포 매개성 항종양 면역치
료 효증 증가

기여율

주관기관 서울대학교

연구기간 2008년 12월 01일 ~ 2009년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 센스서열 및 서열번호 2의 안티센스 서열; 서열번호 3의 센스서열 및 서열번호 4의 안티센스 서열; 서열번호 5의 센스서열 및 서열번호 6의 안티센스 서열; 서열번호 7의 센스서열 및 서열번호 8의 안티센스 서열; 서열번호 9의 센스서열 및 서열번호 10의 안티센스 서열; 서열번호 11의 센스서열 및 서열번호 12의 안티센스 서열; 서열번호 13의 센스서열 및 서열번호 14의 안티센스 서열; 서열번호 15의 센스서열 및 서열번호 16의 안티센스 서열; 서열번호 17의 센스서열 및 서열번호 18의 안티센스 서열; 및 서열번호 19의 센스서열 및 서열번호 20의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1쌍 이상의 PTEN (phosphatase and tensin homolog) 단백질 특이적 siRNA.

청구항 2

제1항의 siRNA를 포함하는, 면역세포의 세포자멸 억제제.

청구항 3

제2항에 있어서, 면역세포는 수지상세포(dendritic cell), T세포, B 세포, 및 NK(natural killer) 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 세포자멸 억제제.

청구항 4

제1항의 siRNA를 포함하는, 면역세포의 면역 활성화 보조제.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 면역세포는 수지상세포(dendritic cell), T세포, B 세포, 및 NK(natural killer) 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 면역 활성화 보조제.

청구항 6

제1항의 siRNA를 포함하는 면역반응 증강용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가적으로 포함하는 면역반응 증강용 조성물.

청구항 8

제1항의 siRNA를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 보조치료용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가적으로 포함하는 조성물.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 암은 인유두종바이러스(human papilloma virus)유래의 비뇨생식기암, 두경부암, 피부암, 호흡기암, 및 소화기암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 11

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 암은 자궁경부암, 편평세포암, 구강암, 및 비세포소암 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 12

제1항의 siRNA를 포함하는 DNA 백신.

청구항 13

제1항의 siRNA가 형질주입된 세포.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 세포는 수지상세포(dendritic cell), T세포, B 세포, 및 NK(natural killer) 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 세포.

청구항 15

제13항 또는 제14항의 세포를 포함하는 면역반응 증강용 조성물.

청구항 16

제13항 또는 제14항의 세포를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 보조치료용 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서 상기 암은 인유두종바이러스(human papilloma virus)유래의 비뇨생식기암, 두경부암, 피부암, 호흡기암, 및 소화기암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서 상기 암은 자궁경부암, 편평세포암, 구강암, 및 비세포소암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 19

제1항의 siRNA를 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법.

청구항 20

제6항 또는 제7항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법.

청구항 21

제15항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법.

청구항 22

제1항의 PTEN 특이적 siRNA를 포함하는 siRNA 콕테일(cocktail)을 포함하는 암의 예방, 치료 또는 보조치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PTEN (phosphatase and tensin homolog) 단백질의 발현을 특이적으로 저해하는 siRNA, 상기 siRNA가 형질주입된 세포, 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 증식력이 강하며 전이성이 높아 생명을 위협하는 악성종양을 지칭한다. 우리 몸을 구성하는 60조의 세포 중 약 백여 개에서 천 개의 세포는 유전적 이상을 가지고 있을 것으로 추정되며, 이들 이상 세포들은 면역감시 체계에 의해 계속적으로 제거됨으로서 우리 몸의 항상성이 유지된다. 그러나 많은 유전적 이상이 중첩될 경우에 세포는 항상성을 상실하고 비정상적으로 증식하여 암으로 발전된다. 이와 같이, 암은 유전적 변이 세포를 사멸시켜 제거하는 면역 기능의 이상에 의하여 발생하는 면역학적 질환으로 볼 수 있다.

[0003] 현재 암의 치료는 수술, 방사선, 항암제 요법 등을 통해 주로 행해지고 있으나, 이들 치료법의 단점과 심각한 부작용들이 보고되고 있을 뿐 아니라, 환자의 고통을 수반하기 때문에 환자의 삶의 질에 있어서 많은 문제점을

갖고 있다. 이에 보다 획기적이고 새로운 암 치료법의 개발이 절실히 요구되어 왔다.

- [0004] 이러한 배경 하, 대안적 암치료법으로 부작용이 거의 없는 면역요법이 주목을 받고 있다. 특히 최근 분자생물학의 발전으로 면역학에서 많은 연구 성과가 얻어지면서 새로운 항암 면역치료(cancer immunotherapy)가 시도되고 있다. 이러한 시도는 암 역시 면역질환의 하나라는 전제 하에 매우 합리적인 항암요법이 될 것으로 기대되고 있다.
- [0005] 항암면역치료는 암 특이 항원(tumor specific antigen) 또는 암 관련 항원(tumor associated antigen)에 대한 면역반응을 유도하여 암 특이성 독성 면역세포(killer T cell)에 의해 암세포를 제거하는 것을 말한다.
- [0006] 항암면역을 유도하는 면역제제들을 유형별로 구분하면, 종양세포, 정제된 종양항원, 싸이토카인과 보조자극 강화제, 바이러스성 벡터, DNA백신, 수지상세포에 기반한 세포치료제 등이 있으며, 이 중 DNA백신과 수지상세포를 기반으로 한 면역제제들이 많은 주목을 받고 있다.
- [0007] 많은 임상적 보고들에 따르면 수지상세포 면역제제는 임상시험에서 어떠한 심각한 부작용도 유발하지 않는 매우 안전한 항암제인 것으로 보고되고 있다 (Mayordomo JI et al., Nat Med 1995; 1: 1297-1302, Nestle FO et al, Nat Med 1998;4:328-332). 그러나 치료 효능은 아직 다소 기대에 미치지 못하여 추가적인 개선이 요구되고 있다.
- [0008] 현재까지, 항암면역세포 백신들은 다음과 같은 원인 때문에 효능의 한계를 나타내었다.
- [0009] (1) 면역세포를 생체 내로 주입시, 주입된 면역세포들은 자가 활성화 및 주변의 종양 세포들에 의해 세포자멸 자극을 받아 제 기능을 다 하지 못하고 세포자멸된다. 예를 들어, 수지상세포 백신의 경우 수지상세포에 의해 활성화된 세포 독성 T세포들에 의해 수지상세포 자신이 공격 받아 그 기능을 다 하지 못하고 세포자멸 되며, T세포 백신의 경우 활성화된 T세포들이 세포 표면에 Fas와 FasL을 동시에 발현하여 FasL의 신호를 받아 세포자멸에 이른다. (2) 암세포들이 항암면역에 대해 면역 회피 기전을 가짐으로써 항암면역 자체를 무력화하기도 한다. 수지상세포를 포함한 많은 면역 세포들이 항상성을 유지하기 위하여 과도한 활성화를 방지하는 음성적 조절 기전을 가지기 때문에 항암면역세포 치료시 항암면역세포가 활성화됨과 동시에 면역 억제 인자들의 발현이 증가되기도 한다. 본 발명자들은 수지상세포의 활성화를 증강시킴과 동시에 면역세포를 세포자멸 공격으로부터 보호함으로써 면역세포 백신의 효능을 개선할 수 있음을 확인하였다.
- [0010] 수지상세포의 성숙(maturation)을 유도하는 LPS (Lipopolysaccharide)나 CD40 signal에 의해 AKT가 안정화된다. AKT가 안정화되면 수지상세포의 활성이 증가될 뿐만 아니라 BCL-2 등의 항세포 자멸인자 의존적으로 수지상세포의 수명이 증가된다. 따라서, AKT가 수지상세포의 수명 및 활성화를 결정하는 조절자 역할을 하는 것으로 예상된다.(Nat. Biotechnol. 2006 Dec;24(12):1581-90.)
- [0011] AKT 경로의 음성조절자 (negative regulator)인 PTEN은 일반적으로 PIP₃를 PIP₂로 탈인산화함으로써 AKT의 활성화를 억제한다. PTEN (phosphatase and tensin homolog)은 PIP₃ (phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate)를 PIP₂ (phosphatidyl inositol(4,5)-bisphosphate)로 변환시키고, 이러한 탈인산화 과정은 AKT의 활성화를 유도하는 PI3K (phosphoinositide 3-kinase)의 활성화를 억제하여, 결과적으로 AKT의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다.
- [0012] 이에, 본 발명자들은 세포독성 T 세포 (Cytotoxic T Lymphocyte; 이하, 'CTL'이라 함) 매개성 세포자멸 및 면역 활성화에 있어 중추적인 역할을 하는 PI3K/AKT의 활성을 조절하는 음성조절자인 PTEN의 발현을 small interfering RNA(siRNA)를 통해 억제함으로써, 수지상세포를 포함한 면역세포들의 활성화 및/또는 성숙화를 촉진하고, CTL 매개성 세포자멸을 억제하여, 그 결과 암에 대한 항암면역효과를 증강시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 면역세포들의 세포자멸을 효율적으로 억제하고, 이들 면역세포를 활성화시킴으로써 면역유도능 및 항암 면역효과를 증가시키는, PTEN (phosphatase and tensin homolog) 단백질을 표적화한 siRNA를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 siRNA를 형질 주입한 면역세포 및 이를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0015] 본 발명은 면역세포의 세포자멸억제 및 활성화 유도를 위한, PTEN 단백질에 특이적인 siRNA를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 면역세포의 세포자멸억제 및 활성화 유도를 위한, 상기 siRNA를 포함하는 면역세포의 세포자멸 억제제를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 면역세포의 세포자멸억제 및 활성화 유도를 위한, 상기 siRNA 를 포함하는 면역 활성화 보조제를 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한 면역세포의 세포자멸억제 및 활성화 유도를 위한, 상기 siRNA 를 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한 면역세포의 세포자멸을 억제하고, 이의 활성화를 유도함으로써 암을 예방, 치료 또는 보조치료 하는데 사용하기 위한, 상기 siRNA 를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 보조치료용 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한 면역세포의 세포자멸억제 및 활성화 유도를 위한, 상기 siRNA가 형질 주입된 세포, 보다 바람직 하게는 면역세포를 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한 면역세포의 세포자멸억제 및 활성화 유도를 위한, 상기 세포를 포함하는 면역세포의 세포자멸 억제제, 상기 세포를 포함하는 면역 활성화 보조제, 상기 세포를 포함하는 면역 증강용 조성물, 및 암의 예방, 치 료 또는 보조치료용 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 세포자멸 억제 및 AKT 활성화가 필요한 대상 면역세포 내 PTEN 단백질의 발현을 억제하여 세포 자멸을 억제함과 동시에 활성화를 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0023] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0024] 본 발명에서는 PTEN 단백질의 발현을 억제하는 물질로 PTEN 단백질에 특이적인 17~23 염기쌍으로 구성된 siRNA 를 제공하며, 바람직하게는 후술하는 바와 같은 PTEN 특이적인 siRNA를 제공한다.
- [0025] 'siRNA'는 이중가닥 RNA가 다이스(Dicer) 효소에 의해 절단되어 생성되는 약 17 내지 23 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로, siRNA는 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 당해 단백질의 발현을 억제하 는 데 사용된다.
- [0026] 본 발명의 siRNA는 당업자가 당해 기술 분야에서 공지된 방법을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법(Sui G et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:5515-5520, 2002), 시험관 내(in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법(Brummelkamp TR et al., Science 296:550-553, 2002), 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중-가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법(Paul CP et al., Nature Biotechnology 20:505-508, 2002), siRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포내 전달을 통한 발 현법 (Lee NS et al., Nature Biotechnology 20:500-505, 2002) 및 PCR(polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트(cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법(Castanotto D et al., RNA 8:1454-1460, 2002) 등 이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 siRNA는 생체 내 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.
- [0028] 본 발명의 PTEN 특이적인 siRNA는 서열번호 1의 센스서열 및 그의 안티센스 서열(서열번호 2), 서열번호 3의 센스서열 및 그의 안티센스 서열(서열번호 4), 서열번호 5의 센스서열 및 그의 안티센스 서열(서열번호 6), 서열 번호 7의 센스서열 및 그의 안티센스 서열(서열번호 8), 및 서열번호 9의 센스서열 및 그의 안티센스 서열(서열 번호 10)로 이루어진 군으로부터 선택된 1쌍 이상의 siRNA이다. 상기 서열번호 1 내지 10의 센스서열 및 안티센 스 서열은 마우스 PTEN 특이적인 siRNA 서열로서, 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

[0029] [표 1] 마우스 PTEN 특이적인 siRNA 서열

표적부위	siRNA 서열		서열번호
3478-3496	센스	5'-CAGUAGAAAUUGUCCUACAUU	1
	안티센스	3'-GUCAUCUUUAAACAGGAUGUAA	2
128-150	센스	5'-GGCGUAUACAGGAACAAUAAU	3
	안티센스	3'-CCGCAUUAUGUCCUUGUUUAA	4
937-959	센스	5'-GGAAUAUCUAGUACUUACUAA	5
	안티센스	3'-CCUUUAUAGAUCAUGAAUGAUU	6
989-1011	센스	5'-GACAAAGCCAACCGAUACUUU	7
	안티센스	3'-CUGUUUCGGUUGGCUAUGAAA	8
988-1010	센스	5'-AGACAAAGCCAACCGAUACUU	9
	안티센스	3'-UCUGUUUCGGUUGGCUAUGAA	10

[0030]

[0031] 또한, 본 발명의 PTEN 특이적인 siRNA는 서열번호 11의 센스서열 및 그의 안티센스 서열(서열번호 12), 서열번호 13의 센스서열 및 그의 안티센스 서열(서열번호 14), 서열번호 15의 센스서열 및 그의 안티센스 서열(서열번호 16), 서열번호 17의 센스서열 및 그의 안티센스 서열(서열번호 18), 및 서열번호 19의 센스서열 및 그의 안티센스 서열(서열번호 20)로 이루어진 군으로부터 선택된 1쌍 이상의 siRNA이다. 상기 서열번호 11 내지 20의 센스서열 및 안티센스 서열은 사람 PTEN 특이적인 siRNA 서열로서, 하기 표 2에 나타난 바와 같다.

[0032] [표 2] 사람 PTEN 특이적인 siRNA 서열

표적부위	siRNA 서열		서열번호
128-150	센스	5'-GGUGUAUACAGGAACAAUA	11
	안티센스	3'-CCACAUUAUGCCUUGUUUAU	12
1000-1022	센스	5'-CCGAUACUUCUCUCCAAAU	13
	안티센스	3'-GGCUAUGAAGAGAGGUUUA	14
145-167	센스	5'-UAUUGAUGAUGUAGUAAAGG	15
	안티센스	3'-AUAACUACUACAUCAUUC	16
513-535	센스	5'-GGCGCUAUGUAUUAUUA	17
	안티센스	3'-CCGCGAUACAUAUAAUAAU	18
511-533	센스	5'-GAGGCGCUAUGUAUUAUUAU	19
	안티센스	3'-CUCCGCGAUACAUAUAAUA	20

[0033]

[0034] 또한, 본 발명의 PTEN 특이적 siRNA는 이의 활성을 저하시키지 않는 변형을 갖는, 즉, 하나 이상의 치환, 삽입, 결실 및 이들의 조합을 갖는 변이체를 포함한다. 이러한 변이체는 상기 서열번호의 siRNA와 70% 이상의 상동성을 나타낼 수 있으며, 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 나타낸다. 이러한 상동성은 당 분야에 널리 공지된 컴퓨터 알고리즘, 예를 들어 Align 또는 BLAST 알고리즘(Altschul, S. F. J. Mol. Biol. 219, 555-565, 1991; Henikoff, S. and Henikoff, J. G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919, 1992)을 이용하여 폴리뉴클레오타이드의 서열을 표적 폴리뉴클레오타이드의 상응하는 부분과 비교하여 결정할 수 있다.

[0035] 본 발명은 상기 PTEN 특이적 siRNA 중 1쌍 이상의 siRNA를 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법을 제공한다.

[0036] 본 발명의 상기 PTEN 특이적 siRNA가 유전자요법을 위하여 사용되는 경우, 본 발명의 siRNA는 주사제로 직접 투여될 수 있으며, 또한, 이를 포함한 벡터의 형태로 투여될 수 있다. 상기 벡터로는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 허피스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터 또는 리트로바이러스 벡터 등 당업계에 통상적으로 사용되는 것을 사용할 수 있다. 이러한 바이러스 벡터를 사용하여, 본 발명의 siRNA를 효율적으로 투여할 수 있다. 또한, 본 발명의 siRNA는 리포솜과 같은 인지질 소포에 둘러싸여서 환자에 투여될 수 있다.

[0037] 본 발명은 상기 PTEN 특이적 siRNA 중 1쌍 이상의 siRNA를 포함하는 면역세포의 세포자멸 억제제 및 면역 활성화 보조제를 제공한다. 본 발명에 의한 면역세포의 세포자멸 억제 및 면역 활성화 보조제는 수지상세포(dendritic cell), T세포, B 세포, 및 NK(natural killer) 세포 등의 세포자멸을 억제하고 면역 활성을 증강시킨다.

[0038] 본 발명은 상기 세포자멸 억제제 및/또는 면역 활성화 보조제를 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법을

제공한다.

- [0039] 본 발명은 상기 PTEN 특이적 siRNA 중 1쌍 이상의 siRNA를 포함하는 면역반응 증강용 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명은 상기 PTEN 특이적 siRNA 중 1쌍 이상의 siRNA를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 보조치료용 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 사용되는 '약제학적으로 허용되는 부형제'에는 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0042] 본 발명은 또한 PTEN 특이적 siRNA를 포함하는 siRNA 칵테일(cocktail)을 포함하는 암의 예방, 치료 또는 보조 치료용 조성물을 제공한다. 여기서 siRNA 칵테일은 본 발명의 PTEN 유전자와는 기전이 다른 유전자에 대한 siRNA의 혼합물로서, 본 발명의 PTEN 특이적 siRNA와 함께 사용시 향상된 면역 증강 효과를 나타낼 수 있는 siRNA의 혼합물을 말하며, 예를 들면 인터루킨(interleukin; IL)-2, 종양괴사인자(tumor necrosis factor; TNF) 등과 같은 면역억제 사이토카인의 발현을 억제하는 siRNA의 혼합물 등이 있다.
- [0043] 본 발명의 면역반응 증강용 조성물 및 암의 예방, 치료 또는 보조치료용 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 당업계에 공지된 방법에 의하여 추가로 제제화될 수 있다.
- [0044] 본 발명은 또한 상기 암의 예방, 치료 또는 보조치료용 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 보조치료 방법을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 조성물의 투여방법으로서, 정맥내, 동맥내 투여와 같은 통상적인 전신투여 이외에, 중추신경계(뇌, 척수), 혈관계(동맥, 정맥, 심장), 호흡계(기관지, 폐), 소화계(침샘, 위, 소장, 간, 이자), 림프계(림프절, 비장, 흉선), 비뇨계(신장) 또는 생식계(정소, 난소, 자궁)로의 국소적 투여가 행해질 수 있다. 또한, 카테터(catheter) 기술 및 외과적 수술과 조합된 투여 방법이 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명은 또한 상기 PTEN 특이적 siRNA 중 1쌍 이상을 포함하는 DNA 백신을 제공한다. 본 발명의 DNA 백신은 상기 siRNA 중 1종 이상을 포함함으로써, PTEN 발현을 저하하고 AKT의 활성화함으로써 면역 반응을 증강시켜, 증가된 DNA 백신으로서의 효능을 가진다.
- [0047] 본 발명은 상기 DNA 백신을 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명은 또한 상기 PTEN 특이적 siRNA 중 1쌍 이상의 siRNA가 형질주입(transfection)된 세포를 제공한다. 본 발명의 형질전환된 세포에는 수지상세포(dendritic cell), T세포, B 세포, 및 NK(natural killer) 세포를 들 수 있다.
- [0049] 본 발명의 siRNA가 형질 주입된 세포는 당업계에 공지된 방법, 예컨대, 칼슘 인산염 형질주입법(calcium phosphate transfection), 리포펙션법(lipofection), 전기천공(electroporation), 미량주사법(microinjection), 마이크로프로젝틸법(microprojectile) 등에 의해 제조될 수 있다.
- [0050] 본 발명은 또한 상기 세포를 포함하는 면역반응 증강용 조성물, 및 암의 예방, 치료 또는 보조치료용 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명은 또한 상기 형질전환된 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법, 및 암의 예방, 치료 또는 보조치료 방법을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 PTEN 특이적 siRNA와 관련하여 언급되는 암은 인유두종바이러스(human papilloma virus)유래의 비뇨 생식기암, 두경부암, 피부암, 호흡기암, 소화기암 등을 들 수 있다. 보다 바람직하게는, 상기 암은 자궁경부암, 편평세포암, 구강암, 비세포소암 등을 들 수 있다.
- [0053] 본 발명의 조성물은 종래 공지의 항암 화학요법제를 추가적으로 포함함으로써 병용 효과를 기대할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 조성물은 세포 내로의 도입효율을 증강시키기 위해 공지의 핵산 전달체와 함께 세포내로 도입될 수 있다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 세포자멸 억제제, 면역 활성 보조제, 면역증강용 조성물, 및 암의 예방, 치료 또는 보조치료용 조성물 내 siRNA는 치료상 유효량으로 포함된다. 상기 siRNA의 치료상 유효량은 암 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 투여되는 핵산의 종류, 제형, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별, 식이, 투여시간, 투여경로 및 치료기간, 동시에 사용되는 화학

항암제 등의 약물을 포함하는 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인에게 상기 암 치료용 조성물은 예컨대 1일 1회 투여시 0.05 내지 4 mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0056] 본 발명의 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 이를 위하여 본 발명에 의한 siRNA에 추가적으로 다른 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 의한 조성물의 제형은 정제, 환제, 산제, 새세이, 엘릭서제, 현탁제, 유제, 액제, 시럽제, 에어로졸, 캡셀제, 멸균주사제, 멸균 산제 등의 형태일 수 있으며, 바람직하게는 정맥주사, 피하주사, 내피주사, 근육주사 등의 주사제로 제제화된다.

효 과

[0057] 본 발명에 따른 siRNA, 상기 siRNA가 형질주입된 세포 및 이를 포함하는 조성물은 PTEN의 발현을 선택적으로 억제함으로써, 면역세포의 수명과 면역세포의 활성화를 증가시켜 면역반응을 증강시키고, 암의 예방, 치료, 및/또는 보조치료 효과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0059] 실시예 1- PTEN 특이적 siRNA의 제조

[0060] 하기 표 3 및 표 4에 기재된 siRNA를 (주)바이오니아(<http://www.bioneer.co.kr/>)에 의뢰하여 제조하였다. 상기 siRNA는 β-시아노에틸 포스포라미디트를 이용하여 RNA구조의 골격의 포스포디에스테르 결합을 연결해가는 '포스포트 트리에스테르' 방법(Nucl. Acids Res. 1984, 12, 4539 ; Tetrahedron Lett. 1983, 24,5843)을 이용하여 siRNA합성기 내에서 합성되었다.

[0061] 구체적으로는, 뉴클레오시드가 부착된 고�형지체(CPG) 상에서 탈블록킹, 커플링, 캡핑, 산화로 이루어진 주기를 반복하여 원하는 길이의 siRNA를 합성하였다.

[0062] 합성 완료 후, 암모니아를 처리하여 합성된 siRNA를 고�형지체로부터 분리하고, 이어서 탈보호 및 TBDMS 처리를 한 후 정제하였다. 합성된 각각의 단일가닥 RNA (센스서열 및 안티센스 서열)를 어닐링하여 최종 이중가닥 형태의 siRNA를 제조하였다.

[0063] [표 3] 마우스 수지상세포 형질 주입에 사용된 PTEN 특이적 siRNA

표적부위	siRNA 서열		서열번호
3478-3496	센스	5'-CAGUAGAAAUGUCCUACAUAU	1
	안티센스	3'-GUCAUCUUUAAACAGGAUGUAA	2

[0065] [표 4] 사람 수지상세포 형질 주입에 사용된 PTEN 특이적 siRNA

표적부위	siRNA 서열		서열번호
128-150	센스	5'-GGUGUAUACAGGAACAAUA	11
	안티센스	3'-CCACAU AUGUCCUUGUUAU	12
1000-1022	센스	5'-CCGAUACUUCUCUCCAAAU	13
	안티센스	3'-GGCUAUGAAGAGAGGUUUA	14
145-167	센스	5'-UAUUGAUGAUGUAAGG	15
	안티센스	3'-AUAACUACAUCAUCC	16
513-535	센스	5'-GGCGUAUGUAUUAUUA	17
	안티센스	3'-CCGCAUACAUAAUAAU	18
511-533	센스	5'-GAGGCGUAUGUAUUAU	19
	안티센스	3'-CUCCGCAUACAUAAUA	20

[0067] 실시예 2- 마우스 PTEN 특이적 siRNA의 형질주입 및 AKT 단백질의 활성 증가 효과 확인

[0068] PTEN 특이적 siRNA로 형질 전환된 수지상세포에서 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯을 통해 siRNA전달 효율과 siRNA전달에 따른 AKT의 활성화를 확인하였다. 구체적으로는, 상기 표 3의 siRNA(Bioneer, Daejeon, Korea)를 수지상세포에 5×10^5 세포당 3ug으로 리포펙타민 2000 (Invitrogen, MD, USA)을 이용하여 형질 주입하여 형질전환된 수지상세포를 제조하였다. 대조군으로 GFP siRNA가 처리된 수지상세포, 및 PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포에 AKT 억제제인 API2 (Sigma)를 추가로 처리한 수지상 세포를 제조하였다. 상기 형질 전환된 수지상세포를 세포용해 버퍼(lysis buffer) (50 mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 650 mM NaCl, 5% Triton X-100, 200 mM phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, 0.02 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM benzamidin)에 넣은 후 균질화시키고 13,000 xg에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 총 단백질 50 ug을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하여 분리한 후 멤브레인으로 트랜스퍼시켰다. 1차 항체로 래빗(rabbit) PTEN, AKT 및 p-AKT 폴리클로날 항체 (세포 신호), 2차 항체로 항-래빗 면역글로불린 양고추냉이 과산화효소-연결 전 항체 (anti-rabbit Ig horseradish peroxidase-linked whole antibody) (Amersham Biosciences, UK)를 반응시킨 후 ECL 웨스턴 블롯 감지 시약(Amersham Biosciences, UK)을 반응시켜 영상을 얻었으며 내부 대조군으로 β -액틴을 이용하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 PTEN 특이적 siRNA는 PTEN의 발현을 효과적으로 억제하였으며 (도 1A), AKT의 활성을 유의적 수준으로 증가시켰다 (도 1B).

[0069] 실시예 3- PTEN 특이적 siRNA의 수지상세포 표면인자 발현 증가 효과 확인

[0070] 상기 표 3의 PTEN 특이적 siRNA(Bioneer, Daejeon, Korea)를 수지상세포에 5×10^5 세포당 3ug으로 리포펙타민 2000 (Invitrogen, MD, USA)을 이용하여 형질 주입하여 형질전환된 수지상세포를 제조하였다. 대조군으로 GFP siRNA가 처리된 수지상세포를 제조하고, PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포에 AKT 억제제인 API2 (Sigma)를 추가로 처리한 수지상세포를 제조하였다. 형질 전환된 수지상세포에서 수지상세포 표면에 발현되고 있는 표면인자 CD40, CD80, CD86 그리고 CCR7의 발현을 특이적인 항체 (Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 이용하여 FACS 분석을 통해 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 보는 바와 같이, PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포(siPTEN)에서 수지상세포 표면인자 CD40, CD80, CD86 그리고 CCR7의 발현이 대조군인 GFP siRNA가 처리된 수지상세포(siGFP)와 PTEN 특이적 siRNA처리 후 API2가 처리된 수지상세포(siPTEN+API2)에 비하여 증가되어 있음을 확인하였다.

[0071] 실시예 4- PTEN 특이적 siRNA 형질 주입에 따른 수지상세포내 세포자멸억제인자 (Bcl-2, Bcl-xL)의 발현 변화 및 세포자멸 억제효과 확인

[0072] 상기 표 3의 PTEN 특이적 siRNA(Bioneer, Daejeon, Korea)를 수지상세포에 5×10^5 세포당 3ug으로 리포펙타민 2000 (Invitrogen, MD, USA)을 이용하여 형질 주입하여 형질전환된 수지상세포를 제조하였다. 대조군으로 GFP siRNA가 처리된 수지상세포를 제조하고, PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포에 AKT 억제제인 API2 (Sigma)를 추가로 처리한 수지상세포를 제조하였다. 수지상세포의 수명 조절에 있어 결정적인 역할을 하는 Bcl-2와 Bcl-xL단백질 발현을 Bcl-2와 Bcl-xL 특이적인 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 그 결과 PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포는 GFP siRNA가 처리된 그룹에 비해 Bcl-2의 발현이 1.9배, Bcl-xL의 발현이 1.5배 증가한 것을 확인하였다 (도3A). GM-CSF가 결핍된 배양액에서 5일 동안 수지상세포들을 배양하며 PI 염색 후 유세포 분석기를 통해 수지상세포의 세포자멸을 확인하였다. 그 결과 PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포의 경우 세포자멸이 유의성 있게 감소하였음을 확인하였다 (도3B).

[0073] 한편, 상기 제조된 형질전환된 수지상세포주의 세포독성 림프구 공격에 대한 내성을 확인하기 위해 세포자멸 비율을 다음과 같은 방법으로 확인하였다.

[0074] GFP siRNA가 형질주입된 수지상세포의 제1 그룹(siGFP; 대조군), E7 특이 CD8 T 세포를 이펙터(effector)로 사용하여 PTEN 특이적 siRNA가 형질 주입된 수지상세포에 API2를 처리한 수지상세포의 제2 그룹(siPTEN+API2; 대조군), API2를 처리하지 않은 제3 그룹(siPTEN; 본 발명), 이러한 세 그룹의 수지상세포를 1ug/ml 농도의 펄타이드로 펄싱(pulsing)하여 각기 다른 E:T 비율 (T 세포: DC 비율=12.5:1, 2.5:1, 0.5:1 or 0.1: 1)로 포함하는 배지에서 4시간과 16시간 배양 후 세포자멸세포를 검출하여 세포자멸비율(백분율)을 산출하였다. 세포자멸세포

의 검출은 T 세포와 수지상세포(DC)의 반응 후 PE-콘주게이션 래빗 항-활성 캐스파제-3 항체 키트 (PE-conjugated Rabbit Anti-Active Caspase-3 Antibody Kit; Becton Dickinson, Mountain View, CA)을 이용하여 유세포분석기 (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA) 분석을 통해 백분율을 결정하였다 (도3C). 시험된 전체 비율에서 GFP siRNA가 처리된 수지상 세포주나 PTEN 특이적 siRNA 처리 후 API2가 처리된 수지상세포 보다 PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상 세포주에서 높은 세포자멸 저항성을 획득한 것을 확인하였으며, 16시간 반응 후 본 발명의 제3 그룹의 수지상 세포주(siPTEN)가 대조군인 제1 그룹의 수지상세포 (siGFP), 제2 그룹의 수지상 세포(siPTEN+API2)에 비하여 각각의 비율에서 10% 이상 높은 세포자멸 저항성을 획득한 것을 확인할 수 있었다. 따라서, PTEN을 표적화함으로써 T 세포의 공격으로부터 보다 강력한 세포자멸 내성을 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0075] **실시예 5 - PTEN 특이적 siRNA의 시험관내 면역반응 증가 효과 확인**

[0076] PTEN 특이적 siRNA의 형질주입에 의한 수지상세포의 면역반응 증강효과를 확인하기 위해, GFP siRNA를 형질주입한 수지상 세포주 및 PTEN 특이적 siRNA의 형질주입에 의한 수지상세포에 추가로 API2를 처리한 수지상세포를 대조군으로 하여, E7 특이 CD8 T 세포주를 0, 0.01, 0.1, 1 ug/ml의 E7 펩티드 (RAHYNIVTF, Anygen, Korea)를 처리한 수지상세포들과 12.5:1의 이펙터 : 타겟 비율로 섞어 16시간 배양 한 후 활성화된 CD8+ T 세포주의 백분율을 구하였다. 이때, T cell line의 활성화는 유세포분석기 (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA)를 사용하여 PE-콘주게이션 래빗 항-INF-감마 항체 키트 (PE-conjugated Rabbit Anti-INF-gamma Antibody Kit; Becton Dickinson, Mountain View, CA)을 이용하여 세포내 INF-감마의 발현을 확인하여 백분율로 나타내었다(도4). 도 4에서 보는 바와 같이 PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포 군이 GFP siRNA가 처리된 수지상세포나 PTEN siRNA처리 후 API2를 처리한 수지상세포에 비해 2배 이상으로 T세포들을 활성화 시키는 것을 확인하였다. 이를 통해, PTEN을 표적화 함으로써 면역반응 유도능이 증강된 수지상세포를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

[0077] **실시예 6- PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포의 생체내 이동능 (migration) 증가 효과 확인**

[0078] 생체내 이동능 확인을 위하여, PTEN 특이적 siRNA 처리된 수지상 세포(siPTEN), 여기에 API2를 추가로 처리한 수지상 세포(siPTEN+API2), 및 GFP siRNA 처리된 수지상 세포(siGFP)를 형광물질인 CFSE로 표지 후 1×10^6 개씩 50ul OPTI-MEM배지(Invitrogen, MD, USA)에 현탁하여 C57BL/6 생쥐의 발바닥에 주사하였다. 수지상세포 주사 48시간 후 정강이 림프절을 적출하여 FACS (Becton Dickinson Immunocytometry systems, Mountain view, CA) 분석을 통해 CFSE 와 수지상세포 표지 인자인 CD11c를 발현하는 수지상세포의 수를 계수함으로써 림프절로 이동한 수지상세포의 생체내 이동능을 확인하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 대조군(control)은 수지상세포를 주사하지 않은 생쥐의 림프절 PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포를 주입한 생쥐 그룹에서 GFP siRNA가 처리된 수지상세포나 PTEN 특이적 siRNA처리 후 API2 처리된 수지상세포에 비해 5배 이상 많은 수의 주입된 수지상세포가 림프절에 존재하는 것을 확인하였다. 이로써 PTEN 특이적 siRNA를 처리한 수지상세포의 생체내 이동능이 증가하는 것을 확인하였다 (도5).

[0079] **실시예 7- PTEN 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포의 항암 면역능과 항암 치료능 증가 효과 확인 (생쥐)**

[0080] C57BL/6 생쥐군(암컷, 5주령, n=5)에 상기 실시예 2에서 얻은 수지상세포 2×10^5 개를 50ul OPTI-MEM배지 (Invitrogen, MD, USA)에 현탁하여 발바닥에 주사하였다. 상기 면역은 1주일 간격으로 2차례 진행하고 마지막 면역 7일 후, 비장세포를 적출하여 1ug/ml 농도의 E749-57 펩타이드 자극 후 CD8+, IFN- γ E7 특이 CD8 T 세포 반응을 FACS (Becton Dickinson Immunocytometry systems, Mountain view, CA) 분석을 통해 확인하였다 (도 6A 및 6B). 도 6에서 보는 바와 같이, PTEN 분자를 표적화한 siRNA 투여 군에서 현저하게 높은 항원 특이적인 면역 반응 (대조군과 대비 3배 이상)이 관찰되었다.

[0081] 항암 치료능 확인을 위해 1×10^5 개의 TC-1 종양세포(Olson et al., 2003; Jeong et al., 1997)를 C57BL/6생쥐 (암컷, 5주령, n=5)복부 표피에 각각 주입하고, 주입 3일 및 10일 후에 두 차례 실시예 4에서와 동일한 방법으로 얻은 PTEN 특이적 siRNA로 각각 형질 주입된 수지상세포를 한 마리당 2×10^5 개씩 50ul OPTI-MEM 배지에 혼탁

하여 발바닥에 주사하여 면역 후, 종양 체적을 종양세포 주입 3일, 10일, 13일, 16일 및 19일째에 caliber(*Mitutoyo, Japan*)로 각각 측정하였다 (도 6C 참조). 도 6C에서와 같이, 대조군 siRNA를 형질주입한 수지상 세포로 면역한 군에 비해 PTEN 특이적 siRNA로 형질 주입한 수지상 세포로 면역한 군에서의 종양 체적이 유의적으로 작음($P<0.05$)을 확인할 수 있었다.

[0082] 실시예 8- 사람 PTEN 특이적 siRNA의 PTEN 유전자 발현 저해 효과 확인

[0083] 사람의 말초 혈액에서 얻은 CD14⁺ 단핵구들을 GM-CSF와 IL-4가 첨가된 배양액에서 6일간 배양하여 CD14⁺ 단핵구 유래의 수지상세포들로 분화시킨 후, 상기 표4에 기재된 PTEN 에 특이적인 siRNA(Bioneer) 및 대조군으로 GFP siRNA를 각각 수지상세포에 5×10^5 세포당 3 μ g으로 리포펙타민 2000 (Invitrogen)을 이용하여 형질 주입하여 형질 전환된 수지상세포를 제조하였다. 형질 전환된 수지상세포들에서 TRIzol 시약(Invitrogen)를 이용하여 RNA를 추출하였다. Superscript[®] III RT (Invitrogen)로 역전사 반응을 수행하였다. PCR 프라이머로 PTEN (센스 서열: 5'-ACCGCCAAATTTAATTGCAG-3', 안티센스서열: 5'-TTCGTCCCTTTCAGCTTTA-3'), GAPDH (센스서열:5'-CCACC CATGGCAAATTCATGGCA-3', 안티센스:5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGC CAT-3') 실시간 PCR(Lightcycler 1.5, Roche, switzerland)을 수행하였다.

[0084] 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에서는 대조군의 mRNA 발현양을 100으로 하여 그에 대한 상대적 PTEN mRNA 발현양을 나타내었으며, mRNA 발현양은 목적 유전자의 정량결과를 GAPDH(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 발현양으로 나누어 보정한 값을 사용하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, 하기 표4의 PTEN 특이적 siRNA에 의해 PTEN의 mRNA 발현이 저하됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 siRNA에 의해 PTEN 억제효과를 확인할 수 있으며, PTEN의 발현이 억제된 인간 수지상세포를 제조할 수 있음을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 siRNA를 수지상세포주에 형질주입한 후 siRNA의 전달 및 PTEN 발현 저하에 따른 AKT의 활성화를 확인한 결과이다.

[0086] 도 2는 PTEN 발현 저하에 따른 수지상세포 표현형에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

[0087] 도 3은 PTEN 발현 저하에 따른 수지상세포 사멸 관련 유전자 발현의 변화 및 시험관 내에서 세포 자멸의 감소를 확인한 결과이다.

[0088] 도 4는 PTEN 발현 저하에 따른 수지상세포의 시험관 내에서 항원특이적인 T세포의 활성 유도능을 확인한 결과이다.

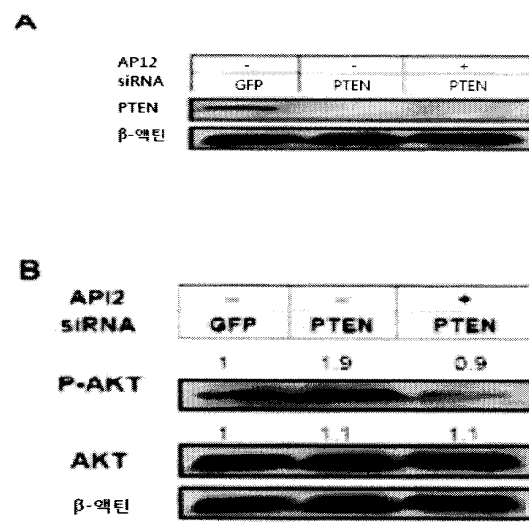
[0089] 도 5는 PTEN 발현 저하에 따른 수지상세포의 생체내 이동능의 변화를 확인한 결과이다.

[0090] 도 6은 PTEN발현 저하된 수지상세포 면역 후 항원특이적인 면역 반응의 유도능과 종양 체적의 감소를 확인한 결과이다.

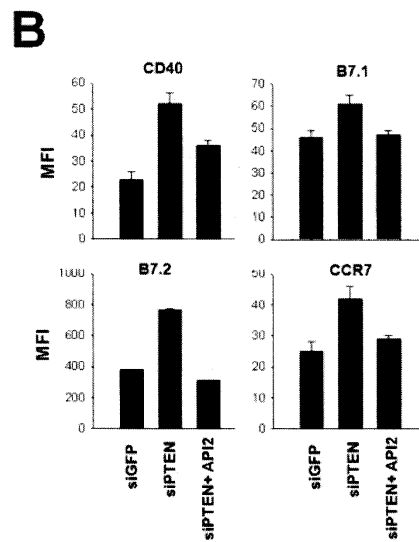
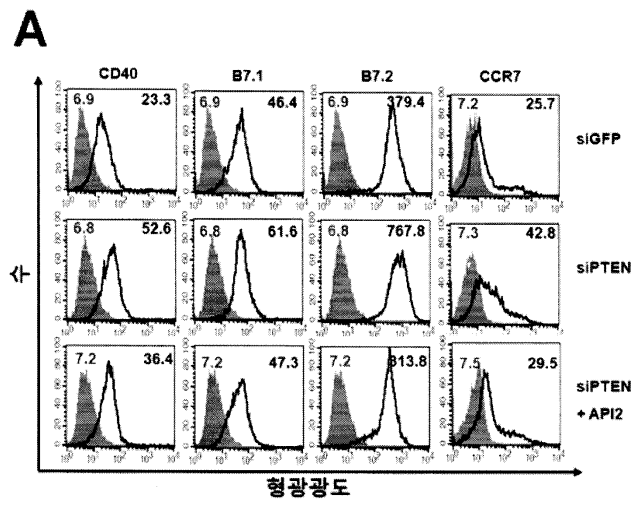
[0091] 도 7은 서열번호 11의 서열 및 이의 안티센스 서열, 서열번호 13의 서열 및 이의 안티센스 서열, 서열번호 15의 서열 및 이의 안티센스 서열, 서열번호 17의 서열 및 이의 안티센스 서열, 및 서열번호 19의 서열 및 이의 안티센스 서열에 해당하는 siRNA의 PTEN mRNA 발현 저해율을 보여주는 결과이다.

도면

도면1

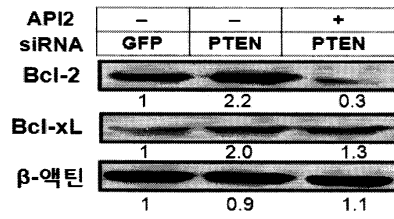


도면2

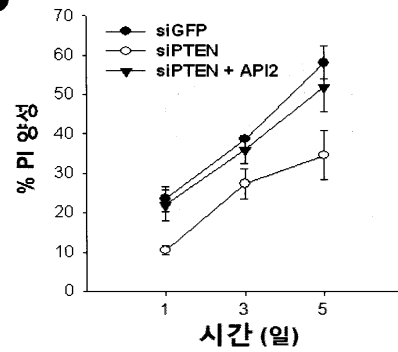


도면3

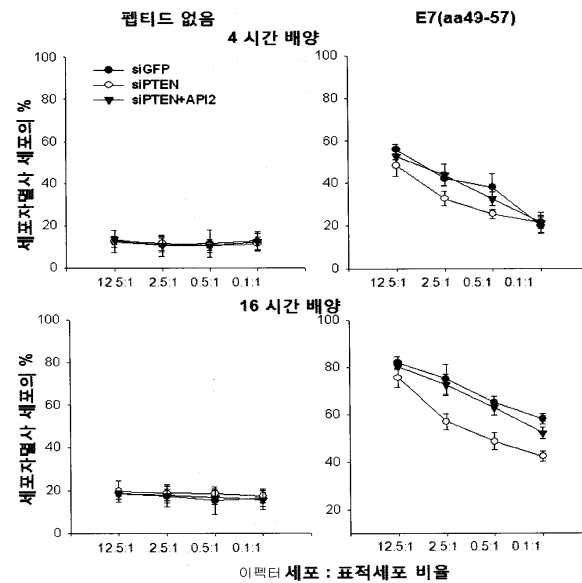
A



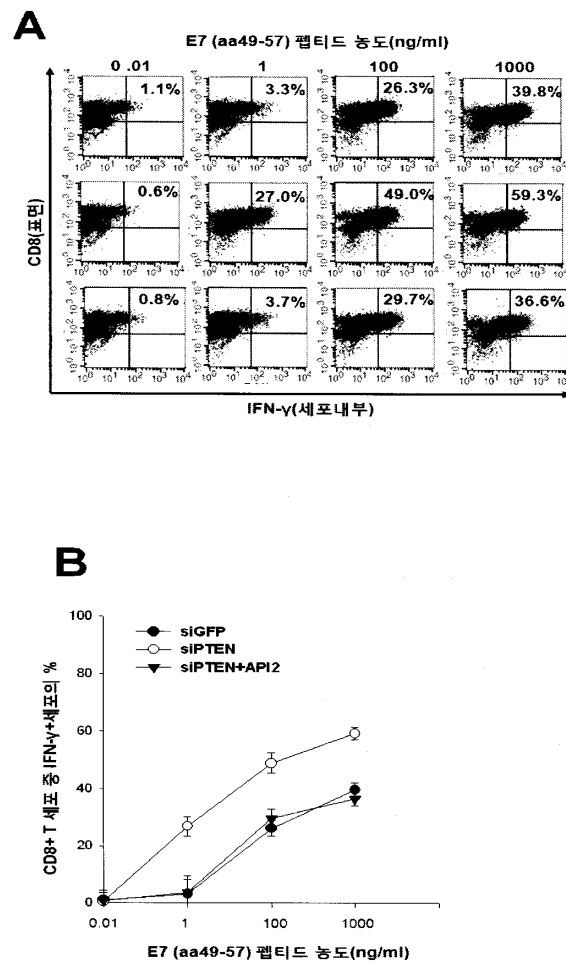
B



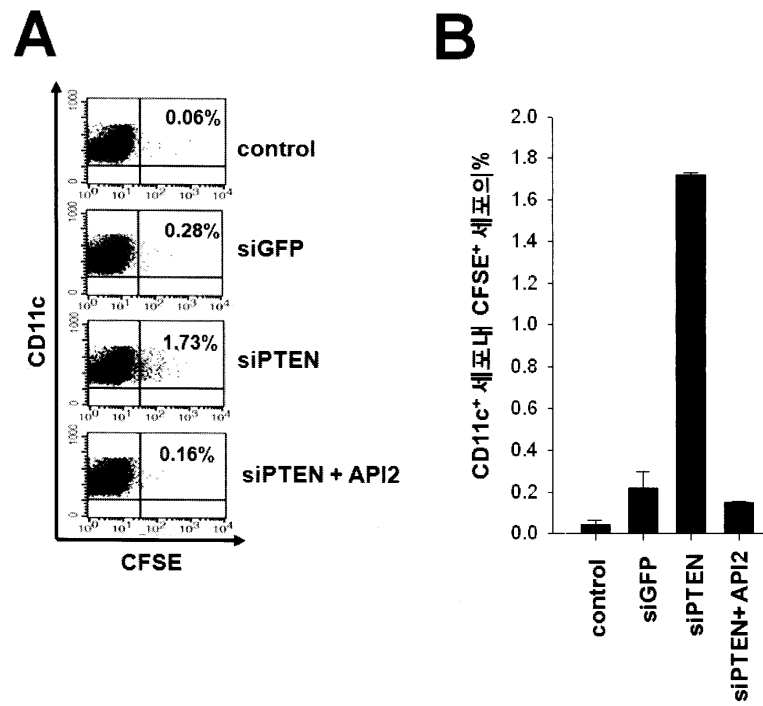
C



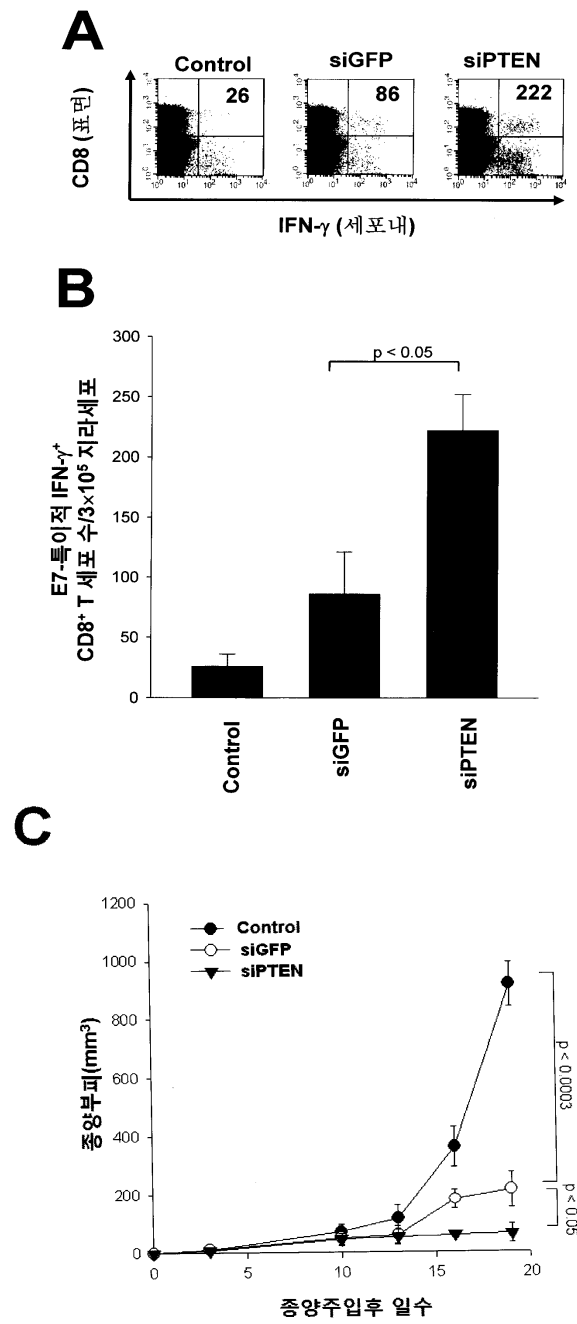
도면4



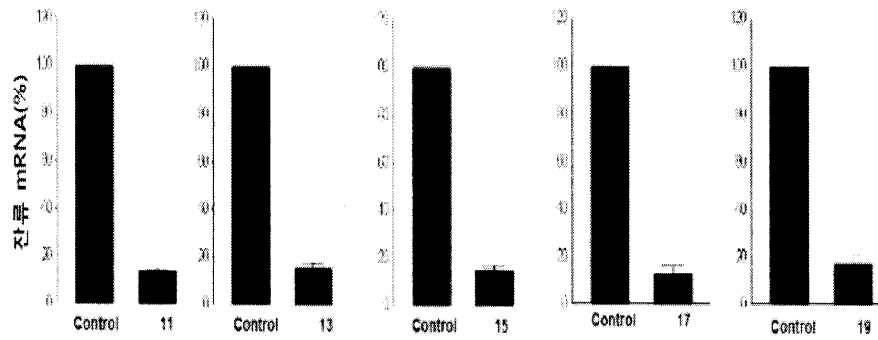
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation
 <120> PTEN PROTEIN SPECIFIC SIRNA

<130> P09-050-KRU

<160> 20

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense siRNA speicific to mouse PTEN

<400> 1

caguagaaau uguccuacau u

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense siRNA speicific to mouse PTEN

<400> 2
aauguaggac aauuucuacu g 21

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

<220>
<223> sense siRNA specific to mouse PTEN

<400> 3
ggcguauaca ggaacaauau u 21

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense siRNA speicific to mouse PTEN

<400> 4
aauauuguuc cuguauacgc c 21

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

<220>
<223> sense siRNA specific to mouse PTEN

<400> 5
ggaauaucua guacuuacua a 21

<210> 6

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

<220>
 <223> antisense siRNA specific to mouse PTEN

<400> 6
 uuaguaagua cuagauauuc c 21

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

<220>
 <223> sense siRNA specific to mouse PTEN

<400> 7
 gacaaagcca accgauacuu u 21

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

<220>
 <223> antisense siRNA specific to mouse PTEN

<400> 8
 aaaguaucgg uggcuuugu c 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> sense siRNA specific to mouse PTEN

<400> 9
agacaaagcc aaccgauacu u 21

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense siRNA specific to mouse PTEN

<400> 10
aaguaucggg uggcuuuguc u 21

<210> 11
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense siRNA specific to human PTEN

<400> 11
gguguauaca ggaacaaua 19

<210> 12
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense siRNA specific to human PTEN

<400> 12
uauuguuccu guauacacc 19

<210> 13
<211> 19

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense siRNA specific to human PTEN

<400> 13
ccgauacuuc ucuccaaau 19

<210> 14
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense siRNA specific to human PTEN

<400> 14
auuuggagag aaguaucgg 19

<210> 15
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense siRNA specific to human PTEN

<400> 15
uauugaugau guaguaagg 19

<210> 16
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisens siRNA specific to human PTEN

<400> 16
ccuuacuaca ucaucaaua 19

<210> 17
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense siRNA specific to human PTEN

<400> 17
ggcgcuaugu auauuuua 19

<210> 18
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense siRNA specific to human PTEN

<400> 18
uaauaauua cauagcgcc 19

<210> 19
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense siRNA specific to human PTEN

<400> 19
gaggcgcuau guauuuuau 19

<210> 20
<211> 19
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense siRNA specific to human PTEN

<400> 20

auaaauauaca uagcgccuc

19