



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0081506
(43) 공개일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 25/04 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)
A23L 33/13 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0154268

(22) 출원일자 2022년11월17일

심사청구일자 2022년11월17일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

김지현

서울특별시 송파구 위례송파로 89, 1502동 802호
(거여동, 위례 포레샤인 15단지)

우하나

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 224동 302호(신
천동, 파크리오)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

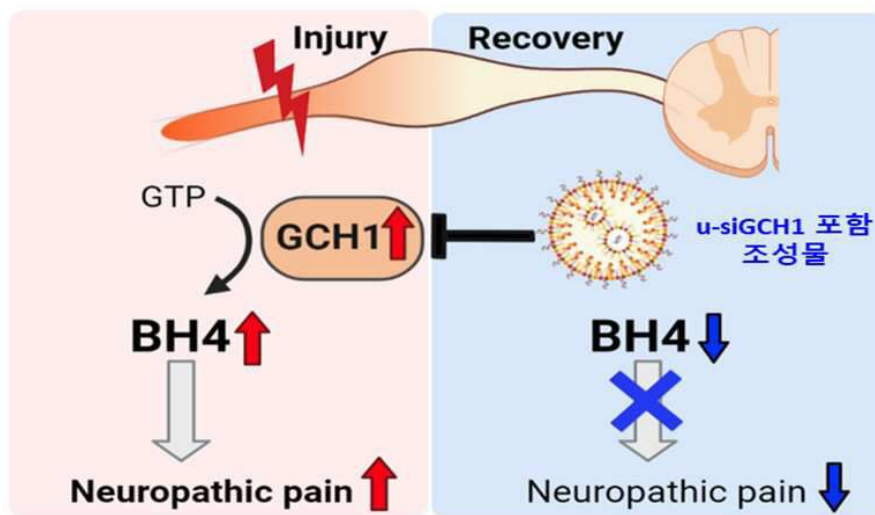
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 GCH1 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 GCH1 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명자들은 다양한 종의 GCH1에서의 보존 서열 패턴(conserved sequence pattern)으로부터 표적 서열을 선정하여, 확인한 보존 서열 패턴 내에서 10종의 siRNA를 설계하였으며, 상기 설계한 10종의 siRNA 중에서 효능이 좋은 siRNA 후보군 3종을 선별하였다. 본 발명에 따른 GCH1 표적 siRNA는 GCH1의 mRNA 및 단백질 발현을 억제함으로써, GCH1에 의해 생성되는 신경전달물질인 BH4의 농도까지 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. 이에 본 발명에 따른 GCH1 표적 siRNA는 신경병증성 통증 환자에서 과발현하는 GCH1을 억제하여 통증 조절 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61P 25/04 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/322 (2013.01)

(72) 발명자

이경진

서울특별시 마포구 모래내로3길 4, 101동 1504호(성산동, 성산동성아파트)

이희란

경기도 남양주시 와부읍 덕소로 180, 119동 1105호(덕소두산위브아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465036681

과제번호 HN22C0307000022

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 국가신약개발사업

연구과제명 GCH1 발현 역전을 통한 신경병증성 통증용 바이오의약품 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2022.03.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 siRNA는 GCH1을 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 siRNA는 인간 GCH1(NCBI accession no. NM_000161.3), 랫트 GCH1(NCBI accession no. NM_024356.1) 및 원숭이 GCH1(NCBI accession no. XM_003930511.3)를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 siRNA는 GCH1을 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 siRNA는 인간 GCH1(NCBI accession no. NM_000161.3), 랫트 GCH1(NCBI accession no. NM_024356.1) 및 원숭이 GCH1(NCBI accession no. XM_003930511.3)를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GCH1 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경병증성 통증(Neuropathic pain)은 말초 신경계(peripheral nervous system, PNS) 또는 중추 신경계(central nervous system, CNS)의 질환에 의해 일어나며, 특히 뇌 손상에 의해 유발된다. 특히 말초 신경병증성 통증은 말초 구심의 비정상적인 활성화에 의해 기인된 통증으로 정의된다. PNS에서의 비정상은 말초와 CNS 모두에 다양한 변화를 유도하고 통증을 유발한다. 이는 척추 신경의 활성화와 흥분성에서의 변화로 이어지는 증폭된 감각 전달(중추 민감화)을 일으킨다. 신경병증성 통증은 다양한 신경-생리학적 과정에 의해 유발된다. 이 통증은 피부, 뼈, 연결 조직 및 근육에 존재하는 A-델타 및 C-신경섬유상 수용체에 의해 매개된다. 이 수용체는 유해 화합물, 열 및 기계적 자극과 같은 상이한 정보를 감지하고 그 다음 뇌로 전달한다. 이러한 감지에 의한 연장되고 일관된 고통은 심각한 어려움이 될 수 있다. 이러한 비정상적인 감각은 일반적으로 이질통(allodynia) 및 통각 과민(hyperalgesia)에 의해 나타난다. 이질통은 일반적으로 통증을 일으키지 않는 자극 (예, 가벼운 접촉)에 대하여 통증 반응을 보인다. 통각과민은 보통의 통증을 일으키는 자극에 대하여 민감성이 증가된다.

[0003] 현재 신경병증성 통증의 약물 요법은 크게 두 가지 유형의 약물에 기초한다. 비스테로이드 염증제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 및 아편양제제(opioid)이다. 이 약물들은 오랫동안 확립되

어 왔음에도 불구하고 종종 부분적이고 일시적인 고통 경감 효과를 보인다는 결함이 있다. 또한, 상기 약물의 반복적인 이용은 우울증과 조직 독성과 같은 부작용을 유발할 수 있다. 따라서 통증 경감을 위한 다른 전략이 요구된다. 만성적 통증의 경감을 위한 또 다른 전략으로서, 유전자 기반 치료는 단일 치료만으로도 효과적이고 덜 침습성이라는 점 등에서 다양한 이점을 가지고 있다. 또한, 효과는 장기간 지속되고 상대적으로 부작용이 적다. 이를 위해서는 적절한 치료 유전자를 선택하고 유전자 전달 비히클을 포함하여 더욱 효과적인 유전자 발현 시스템을 개발할 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1292924호 (2013.07.29 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 GCH1 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 GCH1 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명자들은 다양한 종의 GCH1에서의 보존 서열 패턴(conserved sequence pattern)으로부터 표적 서열을 선정하여, 확인한 보존 서열 패턴 내에서 10종의 siRNA를 설계하였으며, 상기 설계한 10종의 siRNA 중에서 효능이 좋은 siRNA 후보군 3종을 선별하였다. 본 발명에 따른 GCH1 표적 siRNA는 GCH1의 mRNA 및 단백질 발현을 억제함으로써, GCH1에 의해 생성되는 신경전달물질인 BH4의 농도까지 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. 이에 본 발명에 따른 GCH1 표적 siRNA는 신경병증성 통증 환자에서 과발현하는 GCH1을 억제하여 통증 조절 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 인간(a), 랫트(b), 원숭이(c) 세포주에서 siRNA 3종과 기존 특허 siRNA에 따른 GCH1 mRNA 감소 효능 비교 결과이다.

도 2는 인간 세포주(293T)에서 siRNA 3종과 기존 특허 siRNA에 따른 GCH1 단백질 감소 효능 비교 결과이다.

도 3은 인간 세포주(293T)에서 u-siGCH1 #8에 따른 BH4 농도 감소 효능 비교 결과이다.

도 4는 본 발명의 모식도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0011] 바람직하게는, 상기 siRNA는 GCH1을 표적으로 하고, 보다 바람직하게는, 상기 siRNA는 인간 GCH1(NCBI accession no. NM_000161.3), 랫트 GCH1(NCBI accession no. NM_024356.1) 및 원숭이 GCH1(NCBI accession no. XM_003930511.3)를 표적으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0012] 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 약학조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 약학조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명은 서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효 성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 siRNA는 GCH1을 표적으로 하고, 보다 바람직하게는, 상기 siRNA는 인간 GCH1(NCBI accession no. NM_000161.3), 랫트 GCH1(NCBI accession no. NM_024356.1) 및 원숭이 GCH1(NCBI accession no. XM_003930511.3)를 표적으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0018] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생용 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0019] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0020] 본 발명의 GCH1(GTP cyclohydrolase I)은 신경병증성 통증과 관련된 인자 중 하나이다. GCH1은 28kDa의 동중 서브유닛 집합체로서, GTP의 디히드로네오프테린 트리포스페이트(dihydroneopterin triphosphate 또는 neopterin)로의 전환을 촉매한다. GCH1은 BH4 생합성에서 초기 속도 제한 효소로서 알려져 있다. BH4는 티로신 합성에 관여하는 페닐알라닌 하이드록실라제, 카테콜아민 생합성에 관여하는 티로신 하이드록실라제, 세로토닌 합성에 관여하는 트립토판 하이드록실라제 및 질산 합성에서 질산 합성효소의 필수적인 보조인자이다. 신경병증성 통증 동물 모델을 이용한 연구를 통하여 BH4 합성 효소가 손상된 감각 신경에서 활성화됨이 규명되었다. BH4 또는 이와 유사한 분자의 직접 주입은 통증을 유발하는 자극에 대한 동물의 반응을 증가시킬 수 있다. 따라서, 신경병증성 통증을 완화하기 위해서는 BH4의 생합성을 효과적으로 억제하여야 한다.
- [0021] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.
- [0022]

<실시예>

1. siRNA의 설계

다양한 종의 GCH1에서의 보존 서열 패턴(conserved sequence pattern)으로부터 표적 서열을 선정하였다. 이때, 사용된 종은 인간(NM_000161.3), 랫트(NM_024356.1)를 포함하며, 보존 서열 패턴 확인에 필요한 각종의 GCH1 서열 정렬에는 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)를 사용했다.

확인한 보존 서열 패턴 내에서 10종의 siRNA를 설계했으며, 각 siRNA의 특성은 표 1에 나타났다.

표 1

siRNA 10종 후보군의 서열정보 및 특성

서열 번호	Target Sequence (5' →3')	Start (Codon#)	Multi-species compatibility (Yes or No)	siRNA score	GC (%)	Tm (℃)
1	GCAGTTCTTCACCAAGGGCTA	306	No	11.5	52.4	62.1
2	CAGTTCTTCACCAAGGGCTAC	307	No	8.5	52.4	60.7
3	GGCTACCAGGAGACCATCTCA	322	No	12	57.1	64.4
4	TTGAAGCAACACACATGTGTA	617	No	10	38.1	55.7
5	AAGCAACACACATGTGTATGG	620	No	9.5	42.9	56.7
6	CAGTTCTTCACCAAGGGCTAC	307	No	8.5	52.4	60.7
7	CCATATGTTTATCTTCCTAA	456	Yes	14.5	33.33	50.5
8	GGTTATCTTCCTAACAAAGCAA	463	Yes	15	38.1	54
9	CTTCCTAACAAAGCAAGTCCTT	469	Yes	13.5	42.86	56.7
10	GAAGCAACACACATGTGTATG	619	No	13.5	42.86	55.2
진하게 표시한 서열은 중간 미스매치되는 뉴클레오티드이다.						

* multi-species compatibility: 설계한 siRNA 서열과 원숭이(XM_003930511.3)의 GCH1 서열을 비교했을 때 100% 일치하는지 여부를 나타낸다.

* siRNA score: siRNA의 기능 발현에 중요한 역할을 하는 서열상 특징을 항목화 하여 각 항목에 따라 점수를 부여한다. 점수가 높을수록 siRNA로서의 효능이 우수할 확률이 높다.

* GC contents(%): siRNA 전체 서열 내 Guanine(G)와 Cytosine(C)의 백분율.

* Tm(℃): 이중가닥 RNA의 녹는점(melting temperature)으로 RNA의 folding 안정성을 예측할 수 있는 척도.

2. 효과적인 siRNA 후보군 3종 선별

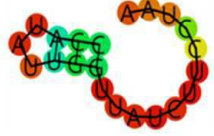
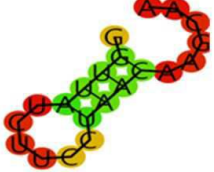
설계한 10종의 siRNA 중에서 효능이 좋은 siRNA 후보군 3종(#7, #8, #9)을 선별했고, 뉴클레오타이드 서열에 따른 2차 구조를 예측할 수 있는 시뮬레이션 예측 RNAfold webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)를 이용하여 후보군 3종의 2차 구조를 예측했다.

siRNA의 서열을 결정한 후, 비특이적인 대조군 siRNA를 Bioneer (Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. siRNA 이중가닥 올리고뉴클레오타이드는 제조업자에 의해 지시된 바에 따라 뉴클레아제가 없는 물에 재현탁하였다. 본 발명에서 이용된 siRNA 후보군 3종의 서열은 표 2와 같다.

표 2

[0037]

선별된 siRNA 3종의 서열 및 2차 구조 예측 결과

이름	서열 번호	서열	*Probability(%)	2차 구조
u-siGCH1 #7	7	CCATATTGGTTATCTTCCTAA	24.09	
u-siGCH1 #8	8	GGTTATCTTCCTAACAAGCAA	52.23	
u-siGCH1 #9	9	CTTCCTAACAAGCAAGTCCTT	54.76	
* Probability: 2차 구조의 빈도				

[0038]

3. 세포 배양 및 형질감염

[0039]

HeLa, Vero 및 C6 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)으로부터 구매했다. 상기 세포는 5% CO₂ 배양기에서 37℃에서 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 글루타맥스-1(2mM), 페니실린(100IU/ml) 및 스트렙토마이신(50 µg/ml)으로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco BRL) 배지에서 배양했다.

[0040]

1) Real-time RT-PCR 샘플 준비: 일시적인 형질감염을 위하여, 무혈청 상태에서 올리고펙타민 시약(Invitrogen)을 이용하여 세포를 100nM siRNA으로 6시간 동안 배양한 후, 10% FBS를 함유한 신선한 배지를 첨가했다. 1차 형질감염 24시간 후, 동일한 방법으로 2차 형질감염을 시행하고 24시간 뒤에 추가 실험을 위해 세포를 수확했다.

[0041]

2) Western Blot 및 BH4 ELISA 샘플 준비: 일시적인 형질감염을 위하여, 무혈청 상태에서 올리고펙타민 시약(Invitrogen)을 이용하여 세포를 100nM siRNA으로 6시간 동안 배양한 후, 10% FBS를 함유한 신선한 배지를 첨가했다. 1차 형질감염 24시간 후, 무혈청 상태에서 리포펙타민 시약(Invitrogen)을 이용하여 100nM siRNA와 human GCH1 plasmid 400ng을 처리하고 6시간 배양한 후, 10% FBS를 함유한 신선한 배지를 첨가했다. 2차 형질감염을 시행하고 24시간 뒤에 추가 실험을 위해 세포를 수확했다.

[0042]

4. Real-time RT-PCR

[0043]

총 RNA는 HeLa, Vero 및 C6 세포로부터 트리졸 시약(Invitrogen)을 이용하여 추출했다. 역전사(RT)는 올리고-dT 프라이머(Invitrogen)를 이용하여 55℃에서 슈퍼스크립트 III (Invitrogen)로 수행했다. 합성된 cDNA는 iQ SYBR 그린 슈퍼믹스(Bio-rad)를 이용하여 real-time RT-PCR에 의해 증폭되었다.

[0044]

상기 반응은 폴리머라아제 활성화를 위한 95℃에서 3분, 및 [95℃에서 15초(변성), 60℃에서 30초(어닐링), 72℃에서 30초(연장)]의 39회 주기로 구성되었다. β-액틴은 상대적인 유전자 발현의 정도를 평가하기 위한 정상 대조군으로 사용되었다.

[0045]

이때, 사용된 프라이머는 인간, 원숭이, 랫트 3가지 종간 교차 사용이 가능한 GCH1 센스 및 안티센스 프라이머와 일반 β-액틴-센스 및 안티센스 프라이머였다(표 3).

표 3

[0046]

Real-time RT-PCR에 사용된 프라이머 목록

타겟 단백질	센스/안티센스	서열(5' →3')	합성서열 크기(bp)	Tm(℃)	서열번호
GCH1	센스	GAGATGGTGATTGTGAAGGAC	110	HeLa:79.0 Vero:79.0	11
	안티센스	CCAAGGACTTGCTTGTTAGG		C6:80.5	12
β-액틴	센스	TGAAGATCAAGATCATTGCTC	80	HeLa:82.5 Vero:85.0	13
	안티센스	TGCTTGCTGATCCACATCTG		C6:84.0	14

[0047]

상대적인 유전자 발현은 GeneXpression Macro chromo4 software(Bio-Rad)에 의해 평가되었다. 그 결과, 도 1a와 같이 3종의 siRNA 모두 HeLa 세포주에서 GCH1 mRNA 발현을 억제했고, 이는 기존 특허 siRNA 보다 더 억제 효과가 컸다. 다른 세포주에서도 도 1b 및 도 1c와 같이 3종의 siRNA 모두 GCH1 mRNA 발현을 억제했다.

[0048]

5. 웨스턴 블롯 분석

[0049]

세포를 회수하여 100μl의 용균 완충용액(Thermofisher, Seoul, Korea)으로 용균했다. 용균물은 5× 시료 완충용액과 함께 100℃에서 5분간 끓여주고 변성 단백질은 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분리한 후 semi-drier(Bio-Rad)를 이용하여 20V에서 30분간 PVDF 멤브레인으로 전달시켰다.

[0050]

실온에서 1시간 동안 블록 용액(0.4 % Tween 20 및 5 % BSA in TBS)으로 처리한 후 멤브레인을 일차 항체: GCH1 (1:1000, Abnova), β-actin(1:5000, Sigma)과 하룻밤 동안 정치하였다. TBST로 세척한 후 호스 라디쉬 퍼옥시다제가 접합된 이차 항체(Jackson laboratory)는 적용되었고 블롯은 개선된 화학발광 시약(Pierce Biotechnology)으로 발현시켰다.

[0051]

그 결과, 도 2a와 같이 3종의 siRNA와 기존 특허 siRNA 모두 HeLa 세포주에서 GCH1 단백질 발현을 억제하였는데, 선별된 3종의 siRNA가 기존 특허 siRNA보다 GCH1 단백질 억제 효과가 탁월했다. 도 2b 및 도 2c와 같이 웨스턴 블롯 상의 밴드를 정량화 하여 통계 분석을 실시한 결과, 선별된 3종의 siRNA 처리군에서 유의미한 GCH1 단백질 감소효과를 확인했다.

[0052]

6. Tetrahydrobiopterin(BH4) ELISA 분석

[0053]

세포를 회수하여 400μl의 PBS와 함께 Freezing and thawing 과정을 3회 반복함으로써 용균했다. 용균물은 BH4 ELISA kit(Tetrahydrobiopterin ELISA Kit, Novus)에 시료로 사용했다. ELISA 과정을 간략히 서술하면, 용균물과 BH4 일차 항체 각 50μl씩을 ELISA plate에 넣고 45분간 37℃에서 반응시켰다. 그 후, washing 용액으로 3회 세척을 실시했고, 호스 라디쉬 퍼옥시다제가 접합된 이차 항체를 100μl 처리 후 30분간 37℃에서 반응시켰다. 이후, washing 용액으로 5회 세척을 실시했고, 화학적 발색 기질(substrate, TMB)을 100μl 처리 후 15분간 빛을 차단한 상태로 37℃에서 반응시킨 뒤에 stop 용액 90μl 처리 후 450nm의 발색 값을 측정했다.

[0054]

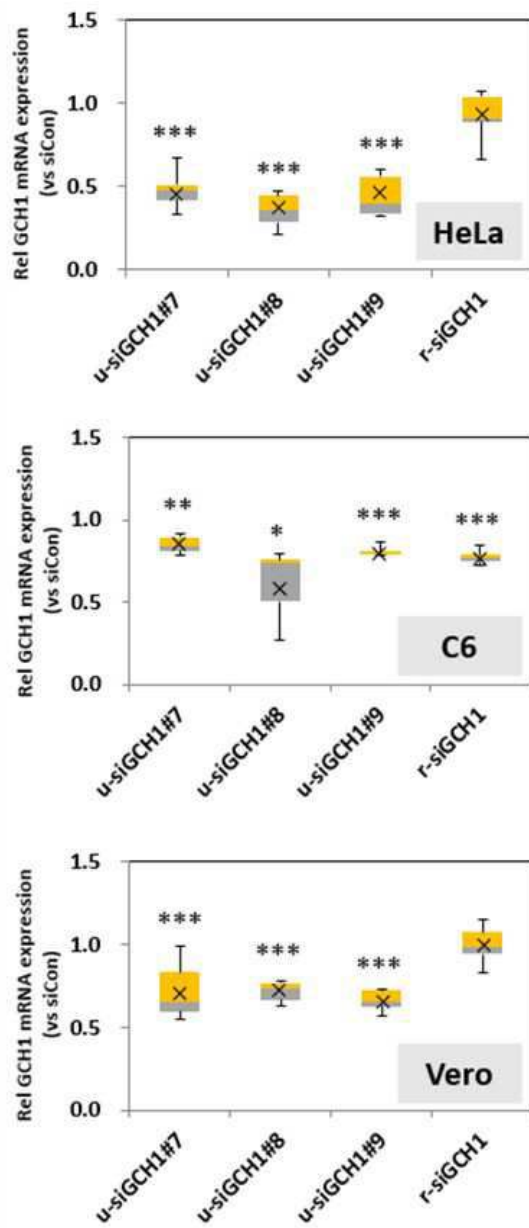
도 3a와 같이 siCon에 비해 u-siGCH1 #8 처리군에서 BH4 농도가 유의미하게 감소된 것을 확인했다. 이는 도 3b에서 통계 분석 후 도출된 결과이다. 이를 통해 u-siGCH1 #8은 GCH1의 mRNA, 단백질 발현을 감소함으로써 GCH1에 의해 생성되는 신경전달물질인 BH4의 농도까지 감소시키는 효과가 있음을 입증했다.

[0055]

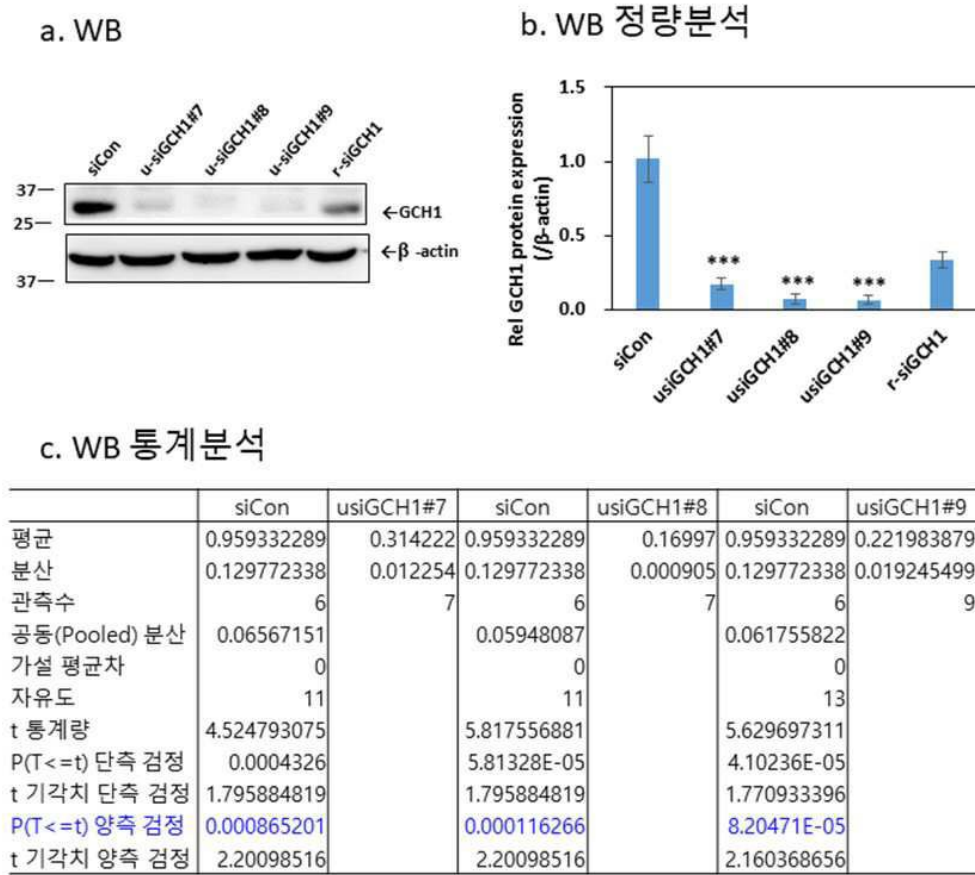
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

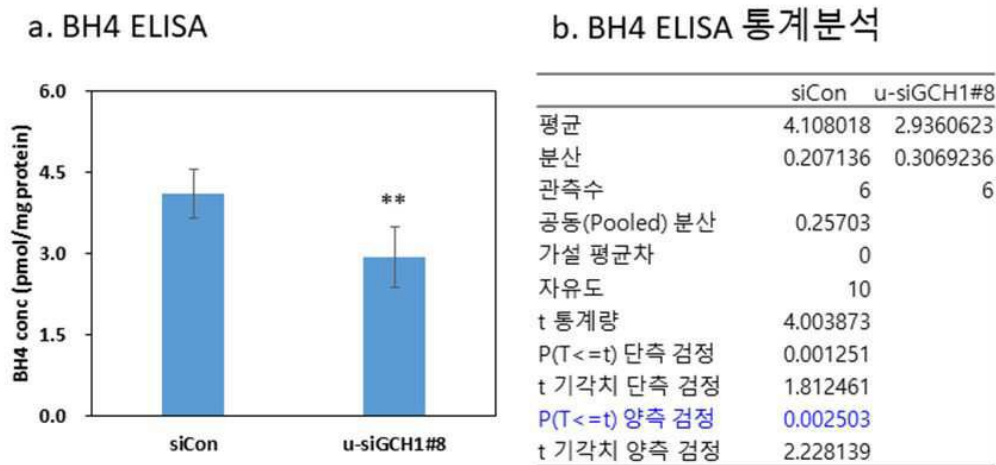
도면1



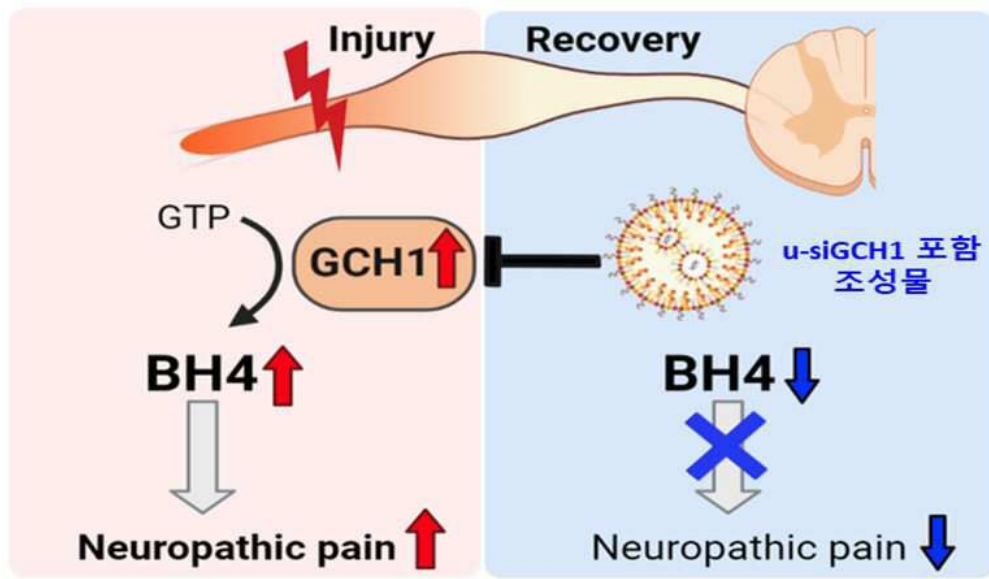
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.