



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0108776
(43) 공개일자 2007년11월13일

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0041202

(22) 출원일자 2006년05월08일

심사청구일자 2006년05월08일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

오유경

서울 도봉구 도봉동 삼환아파트 4-405

김은중

대전 서구 내동 롯데아파트 101-602

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭, 양부현, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 9 항

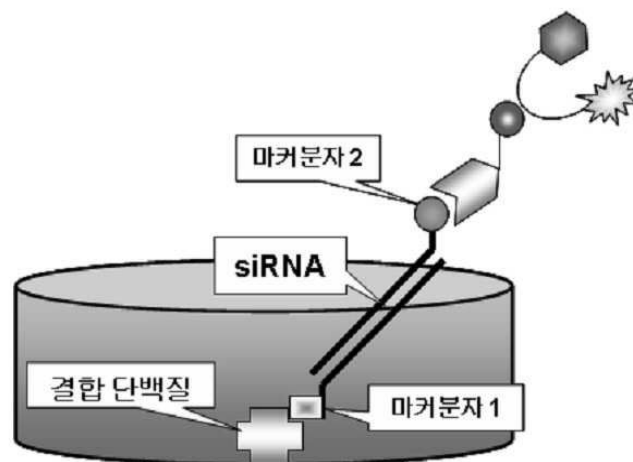
(54) 이중 마커를 이용한 siRNA의 정량용 조성물

(57) 요약

본 발명은 siRNA의 구성 염기 구조에 이중 마커(dual marker)를 도입하여 면역활성측정법을 적용하여 시료 중 존재하는 siRNA의 함량을 정량하는 조성물에 관한 것이다. 염기 구조의 이중 마커는 면역활성측정법에서 사용되는 플레이트의 결합용 마커와 항체인식용 마커로 구성되는 것을 특징으로 한다.

본 발명은 생체 시료 중 존재하는 siRNA의 양을 정량적으로 측정함으로써 향후 siRNA를 이용한 약물동력학적인 연구 등에 안전하고 정확하게 체내 분포 및 혈중 반감기 등을 측정하는 목적으로 유용하게 사용 가능할 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

허준혁

서울 서초구 양재동 204-3 다산빌라 102

이용복

광주 북구 일곡동 쌍용아파트 101-1703

특허청구의 범위

청구항 1

이중 가닥 RNA의 각 끝을 면역활성측정법을 위한 서로 다른 이중 마커 분자로 수식한 구조의 siRNA를 함유하는 것을 특징으로 하는 siRNA의 정량용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 이중 마커 분자중 하나는 면역활성측정을 위한 플레이트 결합용 마커로서 사용되고, 다른 하나는 면역활성측정을 위한 1차 항체 인식용 마커로서 사용하는 것을 특징으로 하는 siRNA의 정량용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 플레이트 결합용 마커는 글루타치온 트랜스퍼라아제 (glutathione-s-transferase), 베타-갈락토시다아제 (beta-galactosidase), 스퍼미딘 (spermidine), 도파민 (dopamine), 프로스타글란딘 (prostaglandin), 디나이트로페놀 (dinitrophenol), 슈가 또는 그 유도체 및 바이오틴 (biotin)으로 구성된 군에서 선택된 것을 사용하는 것을 특징으로 하는 siRNA의 정량용 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 1차 항체 인식용 마커는 히스티딘(histidine), 씨-믹(c-myc), 플레그(flag), 헤마글루티닌(haemagglutinin; HA), 글루타치온 트랜스퍼라아제 (glutathione-s-transferase), 베타-갈락토시다아제 (beta-galactosidase), 스퍼미딘 (spermidine), 도파민 (dopamine), 프로스타글란딘 (prostaglandin) 및 디나이트로페놀 (dinitrophenol)로 구성된 군에서 선택된 것을 사용하는 것을 특징으로 하는 siRNA의 정량용 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 siRNA의 정량용 조성물을 상기 플레이트 결합용 마커와 결합가능한 단백질로 코팅된 플레이트에 넣고 일정시간동안 반응시키는 단계, 및 상기 1차 항체 인식용 마커를 특이적으로 인식할 수 있는 1차 항체를 처리하는 단계를 포함하는 siRNA의 정량방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 플레이트 코팅 단백질로는 상기 플레이트 결합용 마커 분자에 대한 단클론 또는 다클론 항체 단백질, 말토오즈 결합 단백질 (maltose-binding protein), 렉틴 (lectin), 아비딘 (avidin) 및 스트렙타비딘(streptavidin)로 구성된 군에서 선택된 것을 사용하는 siRNA의 정량방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 효소가 결합된 2차 항체를 처리하여 효소면역활성을 측정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA의 정량방법.

청구항 8

제 5항에 있어서, 형광물질이 결합된 1차 항체나 2차 항체를 사용하여 형광면역활성을 측정하는 것을 특징으로 하는 siRNA의 정량방법.

청구항 9

제 5항에 있어서, 상기 이중마커로 수식된 siRNA를 사용하여 세포, 혈액 또는 조직 중 siRNA의 양을 측정하는 것을 특징으로 하는 siRNA의 정량방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 siRNA의 구성 염기 구조에 이중 마커(dual marker)를 도입하여 면역활성측정법을 적용하여 시료 중 존재하는 siRNA의 함량을 정량하는 조성물에 관한 것이다.
- <8> 1998년 꼬마선충(*C. elegans*)에서 이중 가닥의 RNA(dsRNA)를 세포에 주입했을 때 특정 유전자 발현이 억제되는 현상이 나타났으며, 후에 이 현상을 RNA 간섭현상(RNA interference; RNAi)이라고 칭하였다. 이후의 다양한 관련 연구를 통해 RNA 간섭현상은 인간을 비롯한 광범위한 진핵생물들에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 여러 가지 형태의 RNA중 미세크기 간섭 활성 RNA(small interfering RNA, siRNA)는 RNA 간섭 현상을 야기하는 21개 정도 핵산 서열의 이중가닥 RNA로서 siRNA가 세포 내로 도입될 경우, 본 서열과 상보적인 특정 서열의 mRNA가 세포 내에서 분해되도록 유도하는 역할을 한다.
- <9> RNAi는 현재 knock-down 동물 모델 등에 응용되어 새로운 유전자의 기능을 연구하던 초기의 사용 범위에서 최근 잠재적인 치료용 신약 후보로 진화해 가고 있다. 현재까지 약물 치료제의 대상이 되는 타겟 분자는 대략 500여 가지로 알려져 있으며, siRNA를 통한 치료제 개발은 실제로 인간이 가진 모든 유전자가 유전자 조절 기전에 의해 이루어진다고 했을 때 신약 발굴에 있어서 전례가 없는 무한한 기회를 제공할 수 있는 장점이 있다.
- <10> siRNA를 치료용 신약으로 개발하는 데 있어서 후보 타겟으로는 세포 내에서 과발현 됨으로써 암억제 유전자를 저해시키는 RNA, 돌연변이에 의해 과발현 되는 RNA, 감염질환을 유발시키는 바이러스의 RNA 등이 대상이 된다. 이러한 타겟들에 대해 siRNA를 사용한 특정 단백질의 발현 저해를 통한 연구들은 in vitro나 전임상 동물모델에서는 꽤 성공적인 효과를 보여 왔으며(Santel A. et al., *Gene Therapy*, 13: 1-11, 2006), 좀 더 복잡한 임상 분야에서도 현재 연구가 진행되는 상태이다.
- <11> siRNA를 통한 치료 목적으로 시도되었던 첫 번째 임상시험은 2004년 가을 Acuity Pharmaceuticals 사에 의해 노인황반변성증(age-related macular degeneration; AMD)을 앓는 환자들에게 이루어졌다. siRNA의 대상이 되는 유전자는 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor)로써 이 유전자의 발현이 노인황반변성증 환자의 혈관 과다 생성에 주요 요인으로 여겨져 왔으며, 이 임상 1 기 시험의 목적은 siRNA의 안전성을 확인하는 것이었다. 거의 비슷한 시기에 미국의 Sirna Therapeutics 사에서도 노인황반변성증에 대해 혈관내피성장인자 수용체를 타겟으로 하는 siRNA(Sirna-027)를 가지고 임상시험을 수행하였으며, 안전성과 그 효능을 입증받았다.
- <12> 안티센스 올리고뉴클레오타이드(anti-sense oligonucleotide)나 리보자임(ribozyme)과 같은 mRNA를 타겟으로 하는 치료전략과 마찬가지로 신약개발에 있어서 siRNA 기술의 주요 장점 중 하나는 상대적으로 다른 신약개발 전략에 비해 짧은 시간과 적은 비용으로 어떤 타겟 유전자에 대해 특이적인 siRNA를 디자인 할 수 있다는 것이다. 임상 1기에서 대상환자 표본에서 검출되는 단백질이나 mRNA의 수준을 통해 약물 투여량을 결정하는 기존 약물 임상시험의 기준에서와 같이 siRNA에서도 약물동태학(pharmacokinetics)와 약력학(pharmacodynamics)의 관계를 통해서 결정지어 질 수 있다. 이를 통해 최저 투여량으로 최대한의 치료효과를 얻는 최적화된 생물학적 투여(optimal biological dose)의 개념에 의거하여, siRNA 치료제의 개념 검증(proof of concept)을 확립할 수 있을 뿐만 아니라 인간에게 siRNA의 과다 투여로 인한 부작용을 사전에 방지하는데 도움을 줄 수 있다. 따라서 siRNA를 통한 치료제 개발에 있어서 그 투여량을 결정하는 것은 신약개발의 초기 임상시험에 있어서 주의 깊게 살펴봐야 할 문제이며, 전임상적 생체 내 활성을 갖는 siRNA의 약물동태학/약력학적 거동특징 및 그 분포에 대한 모든 것을 완전히 이해하고 연구하는 것은 이후 임상시험을 결정하고 디자인 하는데 있어서 아주 중요한 문제이다.
- <13> siRNA의 약물동태학/약력학적 거동특징을 위하여 기존 siRNA의 분포 및 정량을 확인하는 방법은 보통 siRNA에 방사성 동위원소나(Braasch D.A. et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14: 1139-1143, 2004), 형광물질을 직접 표지하거나, siRNA의 운반체에 간접적으로 표지하는 방법(Morrissey D.V. et al., *Nature Biotechnology*, 23:1002-1007, 2005)을 사용하였다. 최근에는 siRNA의 끝부분에 DNA를 연결시키고 중합연쇄반응에 의해 정량하거나(Jiang M. et al., *Nucleic Acids Research*, 33: 1-7, 2005), plasmid를 통한 siRNA를 합성시, 리포터 유전자 또한 같이 발현시켜 정량하는 방법 등이 이용되었다. 그러나, 이러한 현재의 방법들은 세포 수준에서는 용이하게 사용될 수 있으나, 실제 생체 시료 중의 정량을 위한 용도로서는 여러 가지 문제점을 내포하고 있다. 방사성 동위원소를 siRNA에 직접 표지한 경우에는 생체 내에서 siRNA가 RNA만을 분해하는 효소에 의해 깨졌을 경우에도 방사성 동위원소만은 계속 표지될 수 있고, 따라서 분해되지 않은 상태로 보존된 siRNA 자체의 정량이 가능하지 않다. 그리고 방사성 동위원소를 사용하는 경우, 전임상 단계에서는 이용이

가능하나 임상 단계에서는 항상 제기되는 안전성 문제 또한 간과할 수 없다. 위에서 언급되었던 siRNA의 끝부분에 DNA를 연결시키고 중합연쇄반응에 의해 정량하거나 수식하여 정량에 이용한 경우에도 siRNA가 이미 생체 내에서 분해되고 DNA 단편만 남았을 경우에도 siRNA의 존재유무와 상관없이 중합효소 연쇄반응을 위한 주형으로써 정량이 되기 때문에 siRNA 자체의 정량을 보장할 수 없는 문제점이 존재한다. 따라서 생체 시료중에 존재하는 siRNA를 분해되지 않은 형태를 인지하여 정량하는 새로운 정량 기술, 또한 안전성 및 편이성이 증강된 새로운 형태의 정량 기술이 당분야에서 절실히 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <14> 현재까지는 직접적으로 방사성 동위원소를 siRNA에 표지하거나, 간접적으로 특정 마커를 siRNA나 그 운반체에 표지하는 등의 방법으로 siRNA를 세포 수준에서 정량을 해왔다.
- <15> 본 발명의 목적은 직접 서로 다른 역할을 하는 특정 마커 2가지를 siRNA의 이중가닥 중 각각의 가닥에 직접 수식하고 면역활성측정법을 통해 생체 내 조건에서 수행하기 때문에 RNA 간섭 현상을 유도할 수 있는 완전한 이중가닥 형태(duplex form)가 아닐 경우, siRNA의 정량이 이루어지지 않는 매우 정확하고 효과적인 정량방법을 위한 화학적 수식된 siRNA의 정량용 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <16> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 이중 가닥 RNA의 각 끝을 면역활성측정법을 위한 서로 다른 이중 마커 분자로 수식한 구조의 siRNA를 함유하는 것을 특징으로 하는 siRNA의 정량용 조성물을 제공한다.
- <17> 본 발명의 siRNA의 정량용 조성물에 있어서, 상기 이중가닥 RNA는 발현 억제를 원하는 표적 유전자의 특정부위와 상보적인 서열을 갖는 10-30 bp의 siRNA를 의미하며, 그 서열은 원하는 표적 유전자의 서열에 따라 결정된다. 본 발명의 명세서에서, 면역활성측정법이란 항원-항체와 같은 특이적 결합에 의한 효소 또는 형광활성을 측정하는 효소면역활성측정 및 형광면역활성측정을 포함하는 개념이다.
- <18> 본 발명의 siRNA의 정량용 조성물에 있어서, 상기 이중 마커 분자중 하나는 면역활성측정을 위한 플레이트 결합용 마커로서 사용되고, 다른 하나는 면역활성측정을 위한 1차 항체 인식용 마커로서 사용하는 것을 특징으로 한다.
- <19> 본 발명의 siRNA의 정량용 조성물에 있어서, 상기 플레이트 결합용 마커는 면역활성측정법에 사용되는 플레이트의 직접 또는 간접으로 결합가능한 어떠한 마커 분자도 가능하다. 예를 들면, 글루타치온 트랜스퍼라아제 (glutathione-s-transferase), 베타-갈락토시다아제 (beta-galactosidase), 스퍼미딘 (spermidine), 도파민 (dopamine), 프로스타글란딘 (prostaglandin), 디나이트로페놀 (dinitrophenol), 갈락토스 (galactose), 글루코스(glucose), 프럭토스(fructose), 만노스 (mannose), 말토오스(maltose) 등의 슈가 또는 그 유도체, 바이오틴 (biotin) 등을 플레이트 결합용 마커로 사용할 수 있다.
- <20> 본 발명의 siRNA의 정량용 조성물에 있어서, 1차 항체 인식용 마커는 플레이트 결합용 마커와는 구별되는 것을 사용하며, 면역활성측정을 위한 1차 항체와 특이적으로 결합할 수 있는 어떤 마커 분자도 가능하다. 예를 들면, 히스티딘(histidine), 씨-믹(c-myc), 플레그(flag), 헤마글루티닌(haemagglutinin), 글루타치온 트랜스퍼라아제 (glutathione-s-transferase), 베타-갈락토시다아제 (beta-galactosidase), 스퍼미딘 (spermidine), 도파민 (dopamine), 프로스타글란딘 (prostaglandin), 디나이트로페놀 (dinitrophenol) 등 중에서 플레이트 결합용 마커와 중복되지 않은 조합으로 선택하여 사용할 수 있다. 상기 마커 분자만 결정되면 그에 특이적으로 결합할 수 있는 1차 항체는 종래 알려진 다클론성 항체 또는 단클론성 항체의 제조방법에 의해 용이하게 제조될 수 있다.
- <21> 본 발명의 다른 양태 에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 이중마커로 수식된 siRNA 조성물을 상기 플레이트 결합용 마커와 결합가능한 단백질로 코팅된 플레이트에 넣고 일정시간동안 반응시키는 단계, 및 상기 1차 항체 인식용 마커를 특이적으로 인식할 수 있는 1차 항체를 처리하는 단계를 포함하는 siRNA의 정량방법을 제공한다.
- <22> 본 발명의 siRNA의 정량방법에 있어서, 상기 플레이트 코팅 단백질로는 상기 본 발명의 플레이트 결합용 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 어떤 물질도 가능하며, 바람직하게는 상기 플레이트 결합용 마커 분자에 대한 단클론 또는 다클론 항체 단백질, 말토오스 결합 단백질 (maltose-binding protein), 렉틴 (lectin), 아비딘 (avidin), 또는 스트렙타비딘(streptavidin) 등에서 선택하여 사용할 수 있다. 여기서 말토오스 결합 단백질 (maltose-binding protein)은 말토오스와 특이적으로 결합하며, 렉틴은 갈락토스 (galactose), 글루코스, 프럭토스, 만노스, 말토오스(maltose) 등의 슈가 또는 그 유도체와 특이적으로 결합하며, 아비딘 또는 스트렙타비딘

은 바이오틴과 특이적으로 결합한다.

- <23> 본 발명의 siRNA의 정량방법에 있어서, 바람직하게는 효소가 결합된 2차 항체를 처리하여 효소면역활성을 측정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <24> 본 발명의 siRNA의 정량방법에 있어서, 상기 효소는 효소면역활성측정에 통상적으로 사용되는 어떤 효소도 사용 가능하며, 예컨대 알칼라인 포스포테이즈(alkaline phosphatase)나 홀스레디쉬 페록시다아제(horseradish peroxidase) 등을 사용할 수 있다. 이들 효소는 일반적으로 특정 파장을 나타내는 기질을 분해하는 효소로서, 상기 효소가 결합된 2차 항체를 처리하여 기질이 분해됨에 나타나는 파장의 흡수율을 측정할 수 있다.
- <25> 본 발명의 siRNA의 정량방법에 있어서, 바람직하게는 형광물질이 결합된 1차 항체나 2차 항체를 사용하여 형광면역활성을 측정하는 것을 특징으로 한다. 상기 1차 항체에 형광물질이 결합된 경우에는 2차 항체를 처리할 필요없이 바로 형광을 측정할 수 있다.
- <26> 본 발명의 siRNA의 정량방법은 어떤 시료내의 siRNA도 정량적으로 측정할 수 있으나, 바람직하게는 상기 이중마커로 수식된 siRNA를 사용하여 세포, 혈액 또는 조직 중 siRNA의 양을 측정하는 것을 특징으로 한다.
- <27> 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.
- <28> 본 발명은 특정 암유전자의 발현을 억제하는 염기서열을 가진 siRNA에 이중 마커를 도입하여 생체 내 조건에서 효소 또는 형광 면역활성측정법을 통해 분해되지 않은 상태의 siRNA만이 특이적으로 정량이 가능하도록 제작되어진 조성물로 구성된다.
- <29> siRNA의 발현 억제 대상이 될 수 있는 타겟 유전자는 기본적으로 체내에서 발현이 되는 모든 유전자가 될 수 있으나 특히 간염바이러스(hepatitis B and C virus)와 같이 체외에서 침입한 바이러스의 유전자와 그 유전자 자체가 종양유전자인 인간유두종바이러스(human papillomavirus)의 E6나 E7, 그리고 bcl-2나 survivin과 같이 과다하게 발현됨으로써 세포사멸유도(apoptosis) 유전자의 발현을 억제하는 유전자등도 발현 억제를 위한 타겟이 될 수 있다. 이러한 siRNA의 타겟 유전자를 대상으로 21개의 뉴클레오타이드로 구성된 RNA를 디자인하고, 이렇게 만들어진 siRNA 두 개 가닥의 각 서열의 5 말단 끝에 FLAG, 히스티딘, GST, streptavidin, biotin, 디나이트로페놀과 같은 서로 다른 두 개의 마커를 수식한다. 이 마커 중 한 개는 면역활성측정법용 플레이트 결합용 마커로 작용하며, 다른 하나는 항체 인지용 마커로 작용하게 된다. 본 발명에서 사용된 면역활성측정법은 위에 예시된 마커분자와 결합력이 강한 단백질이 코팅된 플레이트에 결합용 마커로 수식된 siRNA를 넣어 일정시간동안 반응시킨 후, siRNA의 또 다른 5' 끝에 결합된 또 다른 항체 인지용 마커를 특이적으로 인식할 수 있는 1차 항체를 처리하고 그 1차 항체를 인식하면서 특정 파장을 나타내는 기질을 분해하는 효소가 결합된 2차 항체를 처리하여 기질이 분해됨에 따라 나타나는 파장의 흡수율을 측정, 그에 따른 상대적인 siRNA의 양을 측정하게 되는 것이다. 경우에 따라서는 siRNA의 또 다른 5' 끝에 결합된 또 다른 항체 인지용 마커를 특이적으로 인식할 수 있는 1차 항체를 형광이 표지된 1차 항체를 이용하여 곧바로 정량에 사용할 수도 있으며, 2차 항체를 효소가 결합되지 않고 형광물질이 결합된 것을 사용하여 형광 측정을 하여 정량에 사용하는 것도 가능하다. 어떤 방법을 사용하던지 생체 내 조건에서 그 양을 측정하기 위해서는 우선적으로 기준이 되는 검량선을 그리는 것이 중요하며 그렇게 그려진 검량선을 바탕으로 생체 내에 투여된 siRNA의 양을 측정할 수 있는 것이다.
- <30> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <31> **실시예 1. siRNA의 이중 마커분자 구조**
- <32> 면역활성측정법을 통해 siRNA를 정량하기 위해 이중가닥의 5' 방향 뉴클레오타이드의 5번째 탄소에 연결된 인산화그룹에 각각 바이오틴(biotin) 과 디나이트로페놀(dinitrophenol, DNP)을 결합시켰다 (도면 1). 마커분자 1의 경우 플레이트 결합용으로서 바이오틴이 사용되었다. 마커분자 2의 경우 항체 결합용 마커로서 디나이트로페놀이 사용되었다. 이와 같은 결합 반응은 바이오틴아사(대전, 한국)에 주문제작하여 합성하였으며, 분자량이 7126.8 g/mole이며 HPLC로 정제된 이중가닥의 siRNA를 100pmol/ μ l의 농도로 -20℃에서 보관하였다.
- <33> **실시예 2. 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)에서 이중 마커수식된 siRNA의 면역활성측정법(ELISA)에 의한 검량선 제작**
- <34> 인산완충식염수, 분쇄된 동물세포, 간조직 세포, 그리고 동물 혈액에서도 면역활성측정법을 사용하는데 이중 마커 수식된 siRNA를 이용하는 경우 그 정량 원리는 도면 2에 요약한 바와 같다. 즉 면역활성측정에 사용되는 플레이트에 이중 마커로 수식된 siRNA의 결합용 마커 (마커분자 1)가 결합하게 되고 다른 5 말단의 항체 인지용

마커 (마커분자 2)에 1차 항체가 결합하게 된다. 1차 항체의 결합여부는 형광물질 또는 효소가 결합된 2차 항체를 사용하여 정량이 가능하다. 본 발명의 효과를 증명하기 위하여 1차적으로 인산완충용액에서 siRNA의 농도에 대한 검량선을 제작하였다.

<35> 시료중 siRNA의 안정성을 증강시키기 위하여 diethylpyrocarbonate (DEPC)가 처리된 인산완충식염수를 사용하였다. 본 인산완충식염수는 NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.44g, 그리고 KH₂PO₄ 0.24g을 증류수 1L에 녹인 후, HCl을 가지고 pH를 7.4로 맞춘 다음, RNA 분해효소를 불활성화 시키는 것으로 알려진 0.1% DEPC(Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 넣은 후 37℃에서 1시간 처리하고 멸균하여 제조하였다. 화학적 수식된 siRNA는 DEPC-PBS용액을 이용하여 여러농도로 희석하였다. Biotin을 플레이트 결합용 마커인 “마커분자 1”로 사용하여 이와 강한 결합력을 가지고 있는 streptavidin이 코팅된 plate에 희석된 siRNA를 100 μl씩 넣은 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. DEPC-PBST (0.1% tween-20 in DEPC-PBS)로 두 차례 수세하고 이중 마커로 수식된 siRNA의 또 다른 가닥에 존재하는 항체 인지용 마커 (“마커분자 2”)인 디나이트로페놀(dinitrophenol, DNP)을 인식할 수 있는 1차 항체(monoclonal mouse anti-DNP IgE; Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 DEPC-PBS에 5000대 1로 희석하여 100 μl 처리하고 37℃에서 1시간 방치하였다. DEPC-PBST로 세 차례 수세한 후, 2차 항체(goat anti-mouse IgE conjugate HRP; Serotec, Oxford, UK)를 1000대 1로 DEPC-PBS에 희석하여 100 μl 넣고 37℃에서 1시간 방치하였다. DEPC-PBST로 다섯 차례 수세한 다음 horseradish peroxidase 효소 기질인 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (Turbo TMBTM, Pierce, Rockford, USA)용액 100 μl를 넣고 5분 동안 발색시킨 후, 동일 양의 1N H₂SO₄ 100 μl를 넣고 반응을 중지시켰다. 반응이 중지된 플레이트는 ELISA microplate reader (BIO-RAD, PA, USA)의 450nm 파장대를 이용하여 각 well에서 반응을 일으킨 이중 마커수식된 siRNA에 의해 나타내어지는 흡광도를 읽고 그 값을 기록하였다. 이 후에 희석된 siRNA의 농도와 흡광도의 관계를 엑셀 프로그램을 이용하여 검량선을 제작하였다 (도면 3). 본 도면에서 나타나듯이 이중 마커로 수식된 siRNA를 이용할 경우, 면역활성측정법을 적용하여 siRNA의 정량이 가능함을 알 수 있다.

<36> **실시예 3. 동물세포 분쇄액 (sonicated cell lysate)에서 이중 마커 수식된 siRNA의 면역활성측정법에 의한 검량선 제작**

<37> 인유두종바이러스가 감염된 세포인 SiHa 세포를 1X10⁷ 이상 배양한 후, 수거하여 DEPC-PBS에 수차례 수세한 후, 초음파분쇄기 (Sonicator, Fisher scientific, USA)를 이용하여 세포를 분쇄하였다. 이렇게 만들어진 용액으로 이중마커 수식된 siRNA를 여러 농도로 희석한 다음, streptavidin이 코팅된 플레이트에 희석된 siRNA를 100 μl씩 넣은 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. DEPC-PBST로 수세한 다음 1차 항체(monoclonal mouse anti-DNP IgE; Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 DEPC-PBS에 5000대 1로 희석하여 100 μl 처리하고 37℃에서 1시간 방치하였다. DEPC-PBST로 세 차례 수세한 후, 2차 항체(goat anti-mouse IgE conjugate HRP; Serotec, Oxford, UK)를 1000대 1로 DEPC-PBS에 희석하여 100 μl 넣고 37℃에서 1시간 방치한 다음, DEPC-PBST로 수세하고 horseradish peroxidase 효소 기질인 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (Turbo TMBTM, Pierce, Rockford, USA)용액 100 μl를 넣고 5분 동안 발색시킨 후, 동일 양의 1N H₂SO₄ 100 μl를 넣고 반응을 중지시켰다. 동물세포 분쇄액 중에서의 이중마커 수식 siRNA의 검량선은 도면 4에 제시된 대로 siRNA의 농도가 증가함에 따라 비례적으로 450 nm에서의 흡광도가 증가되는 것이 관찰되었다.

<38> **실시예 5. 생쥐의 간조직을 분쇄하여 얻은 용액에서 이중마커 수식된 siRNA의 면역활성측정법에 의한 검량선 제작**

<39> 실험용 생쥐 (ICR mice)를 해부하고 간 조직을 얻은 다음, 조직에서 세포를 얻을 때 사용되는 키트(Cell dissociation sieve-tissue grinder kit; Sigma-aldrich, Steinheim, Germany)를 이용하여 간 조직을 분쇄하고 DEPC-PBS로 수차례 수세하여 간세포를 얻은 다음, 간세포 용액을 이용하여 화학적 수식된 siRNA를 여러 농도로 희석하고, streptavidin이 코팅된 플레이트에 희석된 siRNA를 100 μl씩 넣은 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. DEPC-PBST로 수세한 다음 1차 항체(monoclonal mouse anti-DNP IgE; Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 DEPC-PBS에 5000대 1로 희석하여 100 μl 처리하고 37℃에서 1시간 방치하였다. DEPC-PBST로 세 차례 수세한 후, 2차 항체(goat anti-mouse IgE conjugate HRP; Serotec, Oxford, UK)를 1000대 1로 DEPC-PBS에 희석하여 100 μl 넣고 37℃에서 1시간 방치한 다음, DEPC-PBST로 수세하고 horseradish peroxidase 효소 기질인 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (Turbo TMBTM, Pierce, Rockford, USA)용액 100 μl를 넣고 5분 동안 발색시킨 후, 동일 양의 1N H₂SO₄ 100 μl를 넣고 반응을 중지시켰다. 동물세포 분쇄액 중에서의 이중마커 수식 siRNA의 검량선은 도

면 5에 제시된 대로 siRNA의 농도가 증가함에 따라 비례적으로 450 nm에서의 흡광도가 증가되는 것이 관찰되었다.

<40> **실시예 6. 쥐의 혈액에서 이중마커로 수식된 siRNA의 면역활성측정법에 의한 검량선 제작**

<41> 에테르(ether)를 사용하여 쥐를 마취시킨 후, 해부하여 대동맥으로부터 헤파린이 처리된 1ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 500 rpm으로 원심분리하여 혈장만을 취하고 이 용액으로 이중마커 수식된 siRNA를 도면 6에 기재된 대로 여러 농도로 희석하고, streptavidin이 코팅된 플레이트에 희석된 siRNA를 100 µl씩 넣은 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. DEPC-PBST로 수세한 다음 1차 항체(monoclonal mouse anti-DNP IgE; Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 DEPC-PBS에 5000대 1로 희석하여 100 µl 처리하고 37℃에서 1시간 방치하였다. DEPC-PBST로 세 차례 수세한 후, 2차 항체(goat anti-mouse IgE conjugate HRP; Serotec, Oxford, UK)를 1000대 1로 DEPC-PBS에 희석하여 100 µl 넣고 37℃에서 1시간 방치한 다음, DEPC-PBST로 수세하고 horseradish peroxidase 효소 기질인 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (Turbo TMBTM, Pierce, Rockford, USA)용액 100 µl를 넣고 5분 동안 발색시킨 후, 동일 양의 1N H₂SO₄ 100 µl를 넣고 반응을 중지시켰다. 동물 혈액 시료 중에서의 이중마커 수식 siRNA의 검량선은 도면 6에 제시된 대로 siRNA의 농도가 증가함에 따라 비례적으로 450 nm에서의 흡광도가 증가되는 것이 관찰되었다.

발명의 효과

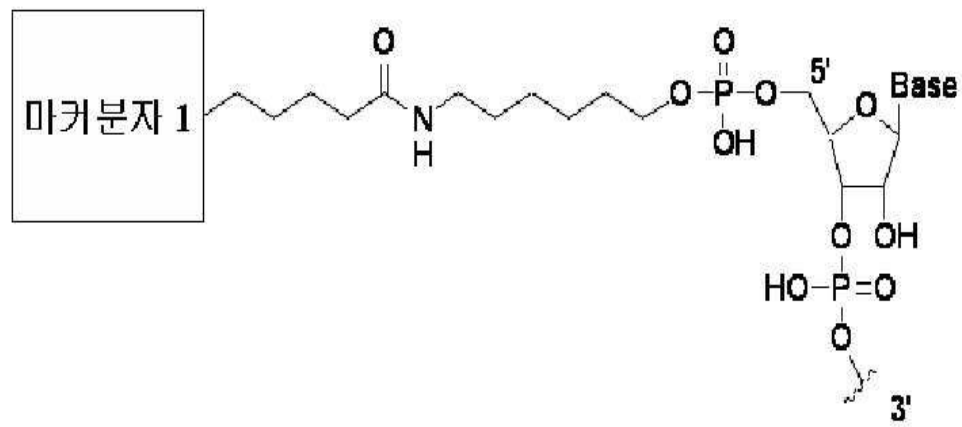
<42> 상술한 바와 같이, 본 발명은 앞으로 치료제로써 많은 잠재성을 지니고 있는 siRNA의 약물동태학적/약력학적 연구를 위해 제공되어 질 수 있는 정확하고 효과적인 정량기법을 개발한 것이다. 이 분야는 기존에 많은 연구가 이루어지지 않고, 그 기술 내용도 여러 문제를 내포한 아직 미비한 수준이다. 따라서 본 발명은 생체 내에서 확실한 기능을 할 수 있는 이중가닥의 siRNA 형태를 지닌 상태에서만 정량이 가능하게 되며, 혈액, 세포 분쇄액, 조직 분쇄액 등에서 검량선이 작성됨으로서 이 후에 치료목적의 타겟 siRNA를 생체 내에 투입하였을 경우, 분해되지 않은 상태의 siRNA의 농도를 확인하는 정량에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

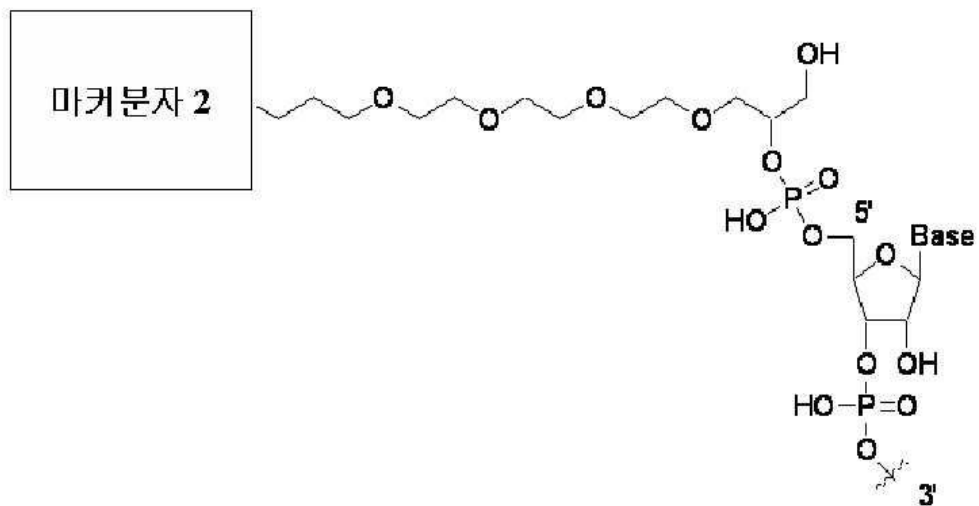
- <1> 도 1은 화학적으로 수식된 siRNA 구조이고,
- <2> 도 2는 화학적으로 수식된 siRNA를 이용한 면역활성측정법 개요도이고,
- <3> 도 3은 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)에서 화학적 변형된 siRNA의 면역활성측정법에 의해 제작된 검량선이고,
- <4> 도 4는 동물 세포 분쇄액 (sonicated cell lysate)에서 화학적 수식된 siRNA의 면역활성측정법에 의해 제작된 검량선이고,
- <5> 도 5는 쥐의 간조직을 분쇄하여 얻은 용액에서 화학적 수식된 siRNA의 면역활성측정법에 의해 제작된 검량선이고,
- <6> 도 6은 쥐의 혈액에서 화학적 수식된 siRNA의 면역활성측정법에 의해 제작된 검량선이다.

도면

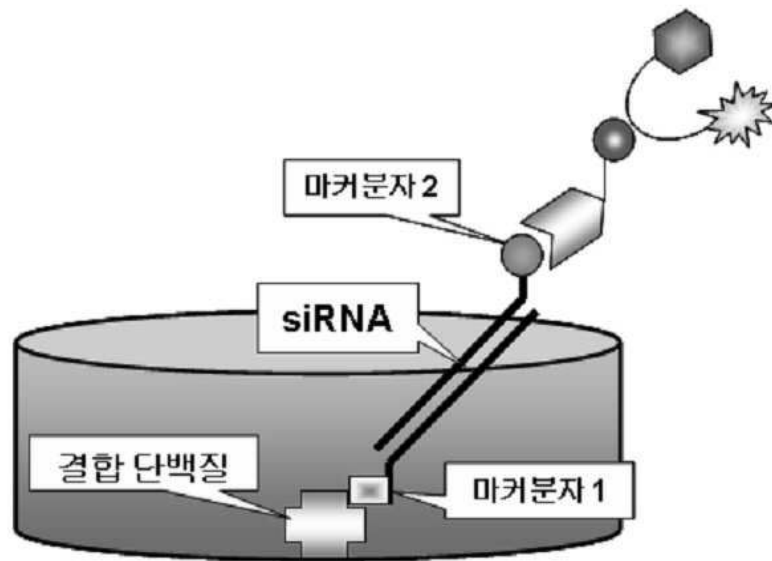
도면1a



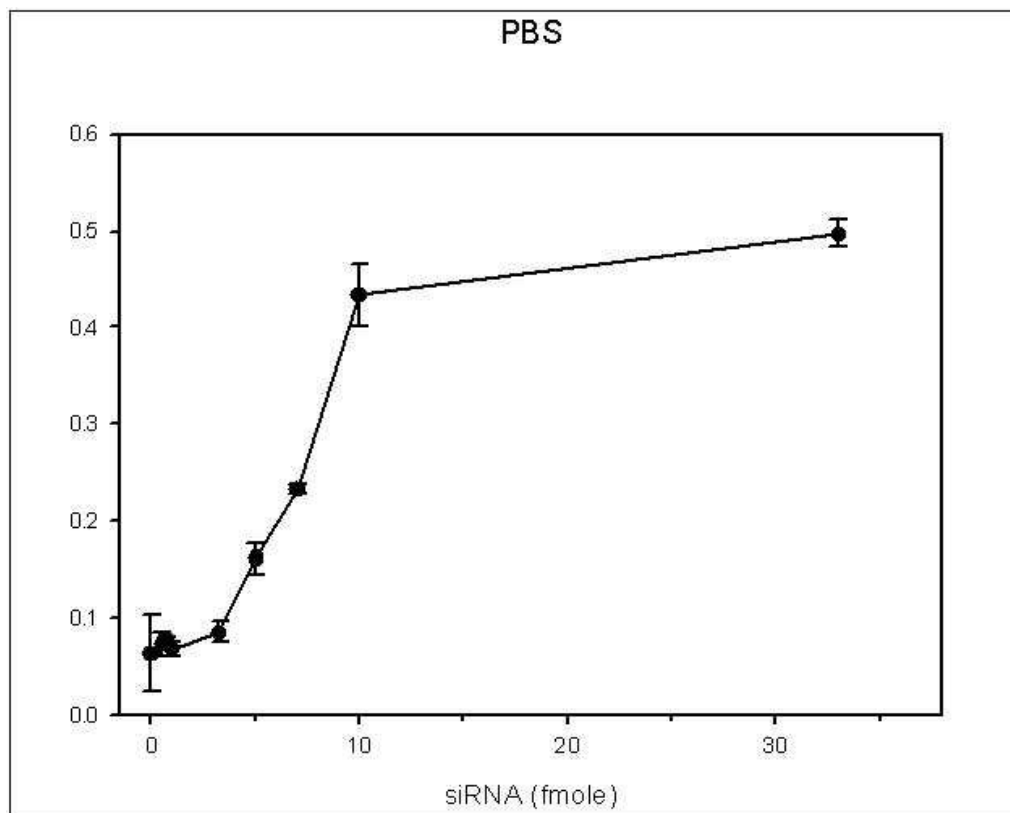
도면1b



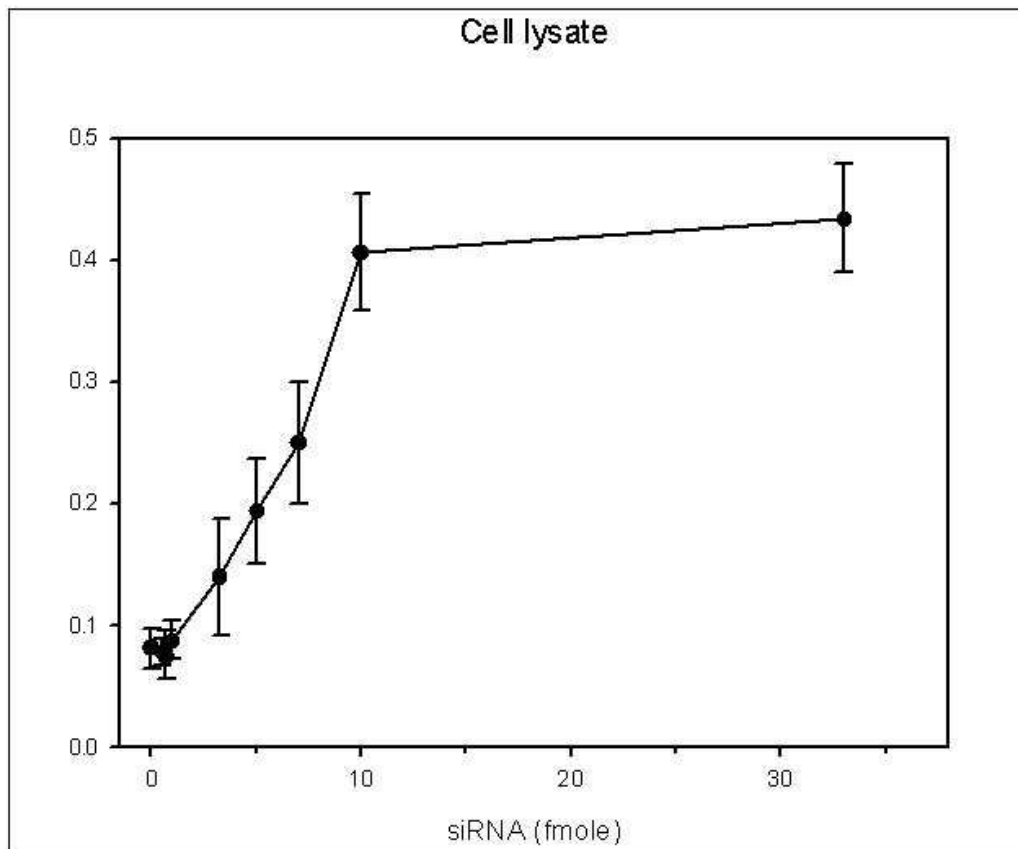
도면2



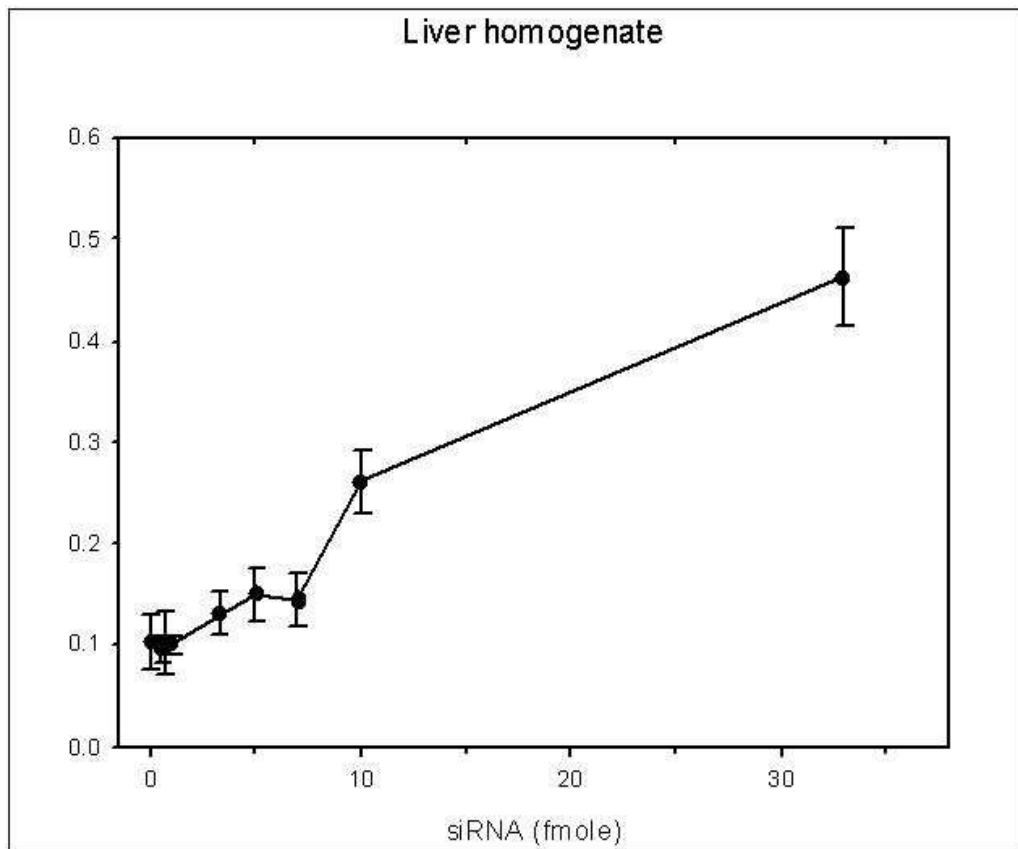
도면3



도면4



도면5



도면6

