



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월18일
 (11) 등록번호 10-1430232
 (24) 등록일자 2014년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/08 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0087882
 (22) 출원일자 2012년08월10일
 심사청구일자 2012년08월10일
 (65) 공개번호 10-2014-0021395
 (43) 공개일자 2014년02월20일
 (56) 선행기술조사문헌
 Biotechniques. 2010 Jun,48(6):xvii-xxiii.
 Biochemistry. 2010 Aug 10,49(31):6687-95.

(73) 특허권자
 한국과학기술연구원
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
 (72) 발명자
 안형준
 서울 동대문구 회기로5길 100, 104동 802호 (청량리동, 샹그레빌아파트)
 권익찬
 서울특별시 노원구 중계동 신안아파트 101동 306호
 최귀원
 서울 동대문구 이문로1길 21, 1동 504호 (회기동, 신현대아파트)
 (74) 대리인
 유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

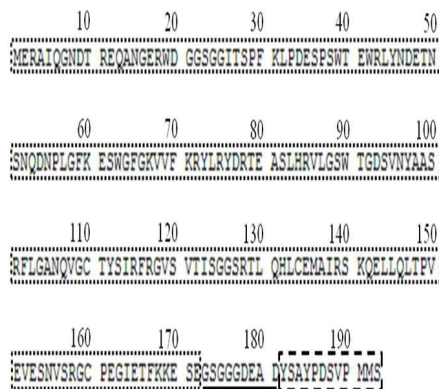
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **siRNA 전달을 위한 p19-YSA 재조합 단백질 및 이를 포함하는 조성물**

(57) 요약

본 발명은 siRNA 전달을 위한 siRNA 전달용 재조합 단백질 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 siRNA 전달용 재조합 단백질은 각종 분해효소와 같은 외부공격으로부터 siRNA의 안정성을 확보할 수 있으며, 다양한 암세포를 표적으로 하는 표적지향성 펩타이드에 의하여 암세포에 선택적 결합력을 가지면서 세포 투과 후에는 siRNA의 세포질 방출에 의하여 siRNA를 효과적으로 세포 및 생체 조직에 전달하여 타겟 유전자를 사일런싱(silencing)할 수 있는 장점이 있어, siRNA 치료제, 세포기반 약물 스크리닝 조성물 및 연구용 siRNA 전달체로 효과적으로 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011K000724

부처명 교육과학기술부

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 PET용 다기능, 다중영상용 바이오킬로소재 개발(2N34720)

기여율 1/1

주관기관 경북대학교 산학협력단

연구기간 2011.07.01~2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

siRNA 결합 단백질 및 표적지향성 펩타이드를 포함하며,

상기 siRNA 결합 단백질은 p19 RNA 결합 단백질(p19 RNA binding protein)로서,

p19 RNA 결합 단백질(p19 RNA binding protein)의 C 말단에 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 표적지향성 펩타이드가 결합된 것을 특징으로 하는,

siRNA 전달용 재조합 단백질.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 siRNA 결합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 재조합 단백질.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 p19 RNA 결합 단백질(p19 RNA binding protein)과 표적지향성 펩타이드 사이에 링커 펩타이드를 추가로 포함하는 재조합 단백질.

청구항 8

제1항에 있어서,

하기 구조를 포함하는 siRNA 전달용 재조합 단백질:

A-B-C

상기에서, A 는 p19 RNA 결합 단백질(p19 RNA binding protein)이며;

B 는 링커 펩타이드이며; 및

C 는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 표적지향성 펩타이드이다.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서,

하기 구조를 포함하는 siRNA 전달용 재조합 단백질:

A-B-C

상기에서, A 는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 p19 RNA 결합 단백질이며;

B 는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 링커 펩타이드이며; 및

C 는 서열번호 3의 아미노산을 포함하는 표적지향성 펩타이드이다.

청구항 11

제1항의 siRNA 전달용 재조합 단백질 및 siRNA를 포함하며, 상기 siRNA이 재조합 단백질 내부에 위치함을 특징으로 하는 siRNA 전달용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 siRNA 는 20 내지 30 개의 뉴클레오타이드로 이루어진 것인 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 siRNA 는 서열번호 4의 센스 서열 및 서열번호 5의 안티센스 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 siRNA 전달을 위한 siRNA 전달용 재조합 단백질 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 다양한 목적의 siRNA가 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질에 결합하여 각종 분해효소와 같은 외부 공격으로부터 안정성을 확보할 수 있으며, 다양한 암세포를 표적으로 하는 표적지향성 펩타이드에 의하여 암세포에 선택적 결합력을 가지면서 세포 투과 후에는 siRNA의 세포질 방출에 의하여 siRNA를 효과적으로 세포 및 생체 조직에 전달하여 타겟 유전자를 사일런싱(silencing)할 수 있다.

배경기술

[0002] RNA interference(RNAi)는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA와 이것과 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA로 구성되는 이중사슬 RNA(double strand RNA)을 세포 등에 도입하여 선택적으로 표적 유전자의 mRNA의 분해를 유도하거나 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 현상을 말한다. RNAi 는 처음에 선충에서 발견되었지만, 현재는 효모, 곤충, 식물, 인간 등 각종 동식물에서 매우 잘 보존이 되어 있는 생명현상으로 관찰되고 있다.

[0003] small interference RNA(siRNA)는 RNAi를 유도하는 물질로서, 약 20 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된 짧은 RNA 이중나선 가닥을 말한다. siRNA를 세포 내로 주입시켜 이 siRNA와 염기서열이 상보적인 mRNA를 표적으로 삼아 유전자 발현을 억제하게 된다. 따라서, siRNA는 질병에 대한 치료 효과를 가지며, 쉬운 제조법 및 높은 표적 선택성 등으로 인해 표적이 되는 생명 프로세스를 조절할 수 있는 효과적인 수단으로 각광을 받고 있다.

[0004] 현재 siRNA를 이용하여 치료할 수 있는 질환으로, 암, 바이러스 감염 질환, 자가면역 질환, 신경퇴행성 질환 등이 연구되고 있으며, 임상적 시도로서 노인성 황반변성 (베바시라닙; Opko Health, Inc., Miami, FL, USA; 임상 3상), 호흡기 신시치아 바이러스 감염증 (ALN-RSV01; Alnylam, Cambridge, MA, USA; 임상 2상)에 대한 치료제로서의 가능성이 보고되었다 (Melnikova I. Nat Rev Drug Discov 2007, 6, 863-864). 또한 트랜스페린을 표적으로 하는 사이클로텍스트린 기반의 나노입자 중합체 (CALAA-01; Calando Pharmaceuticals, Pasadena, CA, USA; 임상 1상)를 이용하여 인간 암 치료에서 siRNA의 전달 시스템이 가능함이 보고되었다 (Oh YK. et al., Adv

Drug Deliver Rev 2009, 61, 850-862).

[0005] 그러나, siRNA는 안정성이 낮아 생체 내에서 단시간에 분해되며, siRNA의 음이온성으로 인하여 같은 음전하를 띠는 세포막을 쉽게 투과하기 힘들어 세포 내로의 전달성이 떨어진다는 문제가 있어, 이들의 세포 내 전달을 용이하게 하는 효과적인 전달체 제조 기술이 요구되고 있다. 이와 같이 siRNA를 세포 내로 효율적으로 전달하기 위해서는, 분해효소 저항성을 가지며 장시간 생체 내에서 순환하며 임상적으로 가능한 주입경로를 통해 표적 세포에 도달할 수 있고 세포투과 후에는 효과적인 세포질 방출이 가능한 효과적인 새로운 전달 시스템이 필요하다.

[0006] 기존의 siRNA 전달체로, siRNA를 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터가 사용되거나, 리포펙틴, 리포펙타민, 셀펙틴, 양이온성 인지질 나노입자, 양이온성 고분자, 또는 리포좀에 기반한 전달체가 주로 사용되었다. 그러나, 바이러스성 전달체의 경우 전달하려는 유전자의 크기에 제한을 받게 되고 바이러스 벡터의 표면 단백질의 면역원성으로 인한 면역 부작용을 일으켜 체내 안정성이 보장되지 못하는 문제가 지적되었다. 또한, 양이온성 분자 또는 합성 고분자를 이용한 전달체의 경우 세포 내로의 수송 효율이 낮으며 세포 내로의 유전자 전달과정에서 유발될 수 있는 세포 독성에 대한 문제점이 있어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 siRNA 결합 단백질 및 표적지향성 펩타이드를 포함하는 siRNA 전달용 재조합 단백질을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질 및 siRNA를 포함하는 siRNA 전달용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질 및 siRNA를 포함하는 siRNA 관련 질환의 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 국한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 해결하기 위한 수단으로, 본 발명은 siRNA 결합 단백질 및 표적지향성 펩타이드를 포함하며, siRNA 결합 단백질 표면에 표적지향성 펩타이드가 위치함을 특징으로 하는, siRNA 전달용 재조합 단백질을 제공한다.

[0012] 상기 siRNA 결합 단백질은 이탈리아 등근무늬바이러스(Carnation Italian ringspot virus, CIRV)에 존재하는 단백질이며 20 내지 23 뉴클레오티드 길이의 이중가닥 RNA와 높은 친화력으로 결합하는 단백질일 수 있으며, 바람직하게는 p19 RNA 결합 단백질(p19 RNA binding protein, GenBank 등재번호가 CAA59481.1)일 수 있으며, 더 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 가장 바람직한 예로는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 p19 RNA 결합 단백질일 수 있으나, 이에 한정되지 않고 siRNA와 결합체를 형성할 수 있는 한, 상기 서열번호 1의 일부를 치환, 삽입 또는 결실한 변형체를 모두 포함한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 따른 p19 RNA 결합 단백질은 식물, 즉 바이러스스카네이션 이탈리아 등근무늬바이러스(Carnation Italian ringspot virus, CIRV)에 존재하는 단백질로서 20 내지 23 뉴클레오티드 길이의 이중가닥 RNA와 높은 친화력으로 결합할 수 있으나, 단일가닥 RNA, 이중가닥 DNA 및 리보솜 RNA와는 결합하지 않는 특이성을 가지므로, 본 발명의 siRNA 결합 단백질로 적합하며, p19 RNA 결합 단백질은 호모다이머(homodimer)를 형성함으로써 siRNA와 결합체를 형성하게 된다.

[0014] 본 발명에서 p19 RNA 결합 단백질은 유전자 재조합 방법을 이용하여 다양한 표적지향성 펩타이드를 도입하여 표적 세포로의 전달성을 향상시킬 수 있고, 한편으로는 p19 RNA 결합 단백질의 호모다이머(homodimer)가 형성하는 결합자리에 siRNA를 결합시킴으로써 외부 공격으로부터 siRNA를 보호하여 생체 내 안정성을 높일 수 있어, 효과적인 siRNA 전달체로 이용할 수 있다는 장점이 있다.

[0015] 본 발명의 표적지향성 펩타이드는 siRNA 전달용 재조합 단백질의 표면에 도입되어 표적 세포로의 전달을 지시하는 펩타이드를 말하며, 상기 표적지향성 펩타이드는 암세포에 특이적으로 과발현되어 있는 EphA2 막단백질에 결

합하며 HeyA8, A549, MDA-MB231, SKOV3ip1, B16F10 또는 HeLa 세포를 표적세포로 하는 펩타이드일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있으며, 더 바람직하게는 YSA 펩타이드 (Tyr-Ser-Ala-Tyr-Pro-Asp-Ser-Val-Pro-Met-Met-Ser, 서열번호 3) 일 수 있다.

- [0016] YSA 펩타이드는 siRNA 전달용 siRNA 전달용 재조합 단백질의 외부에 노출되어, 암세포에 특이적으로 과발현되어 있는 EphA2 막단백질에 결합함으로써 암세포 특이적인 세포 타겟팅을 나타낼 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예로, 상기 siRNA 결합 단백질과 표적지향성 펩타이드 사이에 링커 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 링커 펩타이드는 p19 RNA 결합 단백질과 YSA 펩타이드를 연결하는 펩타이드로서, p19 RNA 결합 단백질이 호모다이머(homodimer)를 형성하는 것을 방해하지 않으면서 결과적으로 siRNA 전달용 재조합 단백질이 siRNA 결합능력을 갖도록 하며, 또한 YSA 펩타이드가 자유로이 표면에 노출되도록 하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 상기 링커 펩타이드는 9 개의 아미노산으로 구성된 서열번호 2로 나타내는 펩타이드(GSGGGDEAD)일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예로, 하기 구조를 포함하는 siRNA 전달용 재조합 단백질일 수 있다.
- [0020] A-B-C
- [0021] 상기에서, A 는 siRNA 결합 단백질이며;
- [0022] B 는 링커 펩타이드이며; 및
- [0023] C 는 표적지향성 펩타이드이다.
- [0024] 본 발명의 다른 일 구현예로, 하기 구조를 포함하는 siRNA 전달용 재조합 단백질일 수 있다.
- [0025] A-B-C
- [0026] 상기에서, A 는 p19 RNA 결합 단백질이며;
- [0027] B 는 링커 펩타이드이며; 및
- [0028] C 는 YSA (Tyr-Ser-Ala-Tyr-Pro-Asp-Ser-Val-Pro-Met-Met-Ser) 펩타이드를 포함하는 표적지향성 펩타이드이다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 일 구현예로, 하기 구조를 포함하는 siRNA 전달용 재조합 단백질일 수 있다.
- [0030] A-B-C
- [0031] 상기에서, A 는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 p19 RNA 결합 단백질이며;
- [0032] B 는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 링커 펩타이드이며; 및
- [0033] C 는 서열번호 3의 아미노산을 포함하는 표적지향성 펩타이드이다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 구현예로, p19 RNA 결합 단백질의 173번째 아미노산 자리에 링커 펩타이드 및 YSA 펩타이드가 순차적으로 연결된 siRNA 전달용 재조합 단백질을 디자인 하였고, 또한 실제로 상기 디자인된 siRNA 전달용 재조합 단백질을 대장균 대량발현시스템을 이용하여 제조하였다(실시예 1 참조).
- [0035] 상기 제조한 siRNA 전달용 재조합 단백질의 정량분석을 통하여 두 개의 siRNA 전달용 재조합 단백질 당 한 개의 siRNA duplex를 봉입할 수 있음을 확인하였다(실시예 1 참조).
- [0036] 또한, 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질은 MTT 분석 결과 2 μ M까지 우수한 생체적합성이 있음을 확인하였으며(실시예 3 참조), 산성 조건에서 siRNA 가 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질로부터 해리되므로 엔도솜에서 세포질로의 방출 기전(endosomal escape)을 통하여 효과적으로 siRNA를 세포질로 전달할 수 있음을 확인하였다(실시예 4 참조). siRNA는 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질이 형성하는 결합자리의 내부에 결합됨으로 각종 리보뉴클레아제에 의한 외부 공격으로부터 안정성을 유지하고(실시예 5 참조), 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질 표면에 도입된 표적지향성 YSA 펩타이드에 의하여 암세포 선택적인 세포 투과성을 나타내며(실시예 6 참조), 세포질로 전달되어 표적 유전자의 사일런싱을 일으키므로(실시예 7 참조), siRNA 전달체로 유용하게 사용될 수 있다.

- [0037] 본 발명은 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질 및 siRNA를 포함하며, 상기 siRNA이 재조합 단백질 내부에 위치함을 특징으로 하는 siRNA 전달용 조성물을 제공한다. 바람직하게 siRNA 는 20 내지 30 개의 뉴클레오티드로 이루어질 수 있으며, 더 바람직하게는 서열번호 4의 센스 서열 및 서열번호 5의 안티센스 서열을 포함할 수 있으며, 가장 바람직한 예로 서열번호 4의 센스 서열 및 서열번호 5의 안티센스 서열일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 siRNA는 본 발명의 siRNA 전달용 재조합 단백질을 구성하는 siRNA 결합 단백질에 결합하므로, siRNA 전달용 재조합 단백질 내부에 보호됨을 특징으로 한다. 이와 같이 siRNA 전달용 재조합 단백질 내부에 결합된 siRNA는 외부와 물리적으로 차단되므로 뉴클레아제(nuclease)와 같은 분해효소로부터 자유로워 안정성이 우수하며, siRNA 전달용 재조합 단백질 외부에 노출된 표적지향성 펩타이드에 의해 효과적으로 표적 세포에 결합한 후 엔도시토시스(endocytosis)에 의하여 세포 내로 투과될 수 있다. 세포 내 투과 후, siRNA 결합단백질과 결합되어 있는 siRNA는 세포 내 엔도솜(endosome)의 산성 조건에서 siRNA 결합단백질과 해리되어 엔도솜으로부터 세포질로 방출(endosomal escape)됨으로써 효과적으로 mRNA의 발현을 억제할 수 있다. 따라서, 질환 유전자를 포함하는 타겟 유전자 발현을 억제하고 질병치료가 가능하게 할 수 있다.
- [0039] 본 발명은 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질 및 siRNA를 포함하며, 상기 siRNA 가 재조합 단백질의 내부에 위치함을 특징으로 하는, 암, 노인성 황반변성, 바이러스 감염 질환, 자가면역 질환 및 신경퇴행성 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 siRNA 관련 질환의 치료용 조성물을 제공한다.
- [0040] siRNA는 질환 관련 유전자의 mRNA의 발현을 억제함으로써 질환 치료 효과를 유도할 수 있는 것이라면 제한없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 20 내지 30 개의 뉴클레오티드로 이루어진 것을 포함한다.
- [0041] 상기 siRNA 관련 질환은 이에 한정되지는 않지만, siRNA로 치료할 수 있음이 알려진 질환들을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 암, 노인성 황반변성, 바이러스 감염 질환, 자가면역 질환 및 신경퇴행성 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 질환을 포함할 수 있다. 상기 암은 유방암, 폐암, 두경부암, 뇌암, 복부암, 결장암, 식도암, 위암, 위장암, 간암, 췌암, 신경아세포종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 빌립스 종양, 망막아세포종, 다발성 골수종, 피부암, 림프종 및 혈액암 등을 포함하나 특별히 이에 한정되지 않는다.
- [0042] 상기 치료용 조성물은 사람을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0043] 본 발명에 따른 상기 치료용 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0044] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명으로 표시되는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0045] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0046] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 치료용 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0048] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg당 0.1 내지 100 mg, 바람직하게는 0.5 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0049] 본 발명의 siRNA 전달용 재조합 단백질은 각종 분해효소와 같은 외부공격으로부터 siRNA의 안정성을 확보할 수 있으며, 다양한 암세포를 표적으로 하는 표적지향성 펩타이드에 의하여 암세포에 선택적 결합력을 가지면서 세포 투과 후에는 siRNA의 세포질 방출에 의하여 siRNA를 효과적으로 세포 및 생체 조직에 전달하여 타겟 유전자를 사일런싱(silencing)할 수 있는 장점이 있다.

[0050] 따라서 본 발명의 siRNA 전달용 재조합 단백질은 siRNA를 암세포 및 암조직으로 선택적으로 전달할 수 있으며 생체 내 안정성을 혁신적으로 향상시킬 수 있으므로 siRNA 치료제, 세포기반 약물 스크리닝 조성물 및 연구용 siRNA 전달체로 효과적으로 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 실시예 1에서 제조한 siRNA 전달용 재조합 단백질이 포함하는 아미노산 서열을 나타낸 것이다(p19 RNA 결합 단백질(점선 박스), p19 RNA 결합 단백질 및 YSA 펩타이드를 연결하는 링커 펩타이드(실선 밑줄), YSA 펩타이드(대시 박스)의 아미노산 서열을 나타낸다).

도 2는 본 발명의 siRNA 전달용 재조합 단백질의 3차원 분자구조를 시뮬레이션한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 siRNA 전달용 재조합 단백질을 대장균 대량발현 시스템을 이용하여 발현 유도 하였을 때의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 siRNA 전달용 재조합 단백질을 액체 크로마토그래피의 히스티딘 친화도 컬럼을 사용하여 정제 한 결과를 보여주는 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 siRNA 전달용 재조합 단백질과 siRNA의 결합비율을 확인하기 위해서 siRNA 전달용 재조합 단백질의 농도에 따라 결합하는 siRNA의 양을 정량분석한 전기영동한 결과를 나타낸 것이다(siRNA 양을 고정하면서 siRNA 전달용 재조합 단백질의 양을 변화시킬 때 결합에 참여한 siRNA는 p19-YSA/siRNA 밴드로, 결합에 참여 하지 못한 siRNA는 free siRNA 밴드로 나타난다).

도 6은 MTT 분석을 통하여 본 발명 p19-YSA/siRNA 결합체의 농도에 따른 세포 독성 및 생체적합성을 시험한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 p19-YSA/siRNA 결합체의 결합되어 있는 siRNA가 pH가 감소할수록 해리되는 것을 보여주는 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 10% FBS(fatal bovine serum) 조건 하에서 naked siRNA와 siRNA 전달용 재조합 단백질에 결합되어 있는 siRNA의 안정성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 형광체 Cy5.5와 FITC로 각각 표지된 Cy5.5-p19-YSA/FITC-siRNA 결합체가 B16F10 암세포에 세포 투과되는 것을 보여주는 형광현미경 분석결과를 나타낸 것이다(DAPI 염색은 세포 핵의 위치를 나타내며 merge 이미지는 각각의 이미지가 중첩된 결과이다).

도 10은 CPZ, Amil 및 Filip으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 저해제를 처리하였을 때의 세포 투과 감소됨을 형광현미경을 통해서 보여주는 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 100배 고농도의 YSA 펩타이드를 먼저 처리한 세포에 Cy5.5-p19-YSA/siRNA 결합체를 처리한 후의 형광현미경 및 flow cytometry를 나타낸 것이다.

도 12a 및 도 12b는 HeyA8, A549, MDA-MB231, SKOV3ip1, B16F10, HeLa, H9C2 및 HEK293 세포에 Cy5.5-p19-YSA/siRNA 결합체를 처리한 후의 flow cytometry를 나타낸 것이다.

도 13은 p19-YSA/siRNA 결합체를 형광단백질 RFP가 발현되는 암세포 (RFP/B16F10)에 처리한 후의 형광현미경 분석 결과(그림 A), 이의 정량분석 결과 (그림 B), 시간에 따른 유전자 발현 억제 효과를 보여주는 결과(그림 C)를 나타낸 것이다(Control: RFP 유전자가 발현되는 B16F10 세포, p19-YSA/siRNA: siRNA 전달용 재조합 단백질을

이용하여 siRNA를 세포에 주입한 경우, p19-YSA/sc siRNAN: RFP 유전자에 매칭하지 않는 scramble siRNA를 siRNA 전달용 재조합 단백질에 봉입하여 세포에 주입한 경우, LF/siRNA: 기존 siRNA 전달체인 리포펙타민을 사용한 경우, p19-YSA: siRNA 없이 siRNA 전달용 재조합 단백질만을 주입한 경우).

도 14는 도 13에서 RFP 유전자의 mRNA가 siRNA에 의하여 분해되었음을 RT-PCR을 통하여 확인한 전기영동 결과 및 정량분석 결과를 나타낸 것이다 (Control: RFG 유전자가 발현되는 B16F10 세포, p19-YSA/siRNA: siRNA 전달용 재조합 단백질을 이용하여 siRNA를 세포에 주입한 경우, p19-YSA/sc siRNAN: RFP 유전자에 매칭하지 않는 scramble siRNA를 siRNA 전달용 재조합 단백질에 봉입하여 세포에 주입한 경우, LF/siRNA: 기존 siRNA 전달체인 리포펙타민을 사용한 경우).

도 15은 도 13에서 RFP 유전자의 mRNA가 siRNA에 의하여 분해되어 RFP 단백질의 발현이 감소되었음을 RFP 항체를 이용하여 보여주는 western blot 결과를 나타낸 것이다 (Control: RFG 유전자가 발현되는 B16F10 세포, p19-YSA/siRNA: siRNA 전달용 재조합 단백질을 이용하여 siRNA를 세포에 주입한 경우, p19-YSA/sc siRNAN: RFP 유전자에 매칭하지 않는 scramble siRNA를 siRNA 전달용 재조합 단백질에 봉입하여 세포에 주입한 경우, LF/siRNA: 기존 siRNA 전달체인 리포펙타민을 사용한 경우).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0053] [실시예]

[0054] 실시예 1. siRNA 전달용 재조합 단백질의 제조

[0055] 1-1. siRNA 전달용 재조합 단백질의 디자인

[0056] 본 발명자들은 siRNA 전달용 재조합 단백질을 디자인하고, 3차원 구조분석 시뮬레이션을 실시하였다.

[0057] 우선, siRNA 전달용 재조합 단백질을 구성하는 도 1의 아미노산 서열을 결정하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, 이탈리아 등근무늬바이러스(Carnation Italian ringspot virus, CIRV)에서 유래한 p19 RNA 결합 단백질(서열번호 1)을 구성하는 전체 172개 아미노산의 C-말단에 링커 펩타이드로 9개 아미노산(서열번호 2: GSGGGDEAD)을 사용하여 YSA 펩타이드와 연결하도록 하였다. YSA 펩타이드는 12개 아미노산 (서열번호 3: YSAYPDSVPMMS)을 포함하도록 디자인하였다.

[0058] 이와 같이 디자인된 siRNA 전달용 재조합 단백질(서열번호 6)은 Pymol(version 1.4.1, DeLano Scientific LLC) 3차원 구조분석 프로그램을 이용한 구조생물학적 시뮬레이션을 통하여, 도 2에 나타난 바와 같은 3차원 구조를 가지게 되었으며, 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질은 2개의 단백질이 호모다이머(homodimer)를 형성하여 하나의 siRNA duplex를 결합할 수 있다.

[0059] 1-2. 대장균을 이용한 siRNA 전달용 재조합 단백질의 대량 생산 및 정제

[0060] 상기 실시예 1-1에서 디자인된 siRNA 전달용 재조합 단백질을 제조하기 위하여, 먼저 p19 RNA 결합 단백질을 코딩하는 유전자를 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 를 이용하여 PCR 증폭하였다.

[0061] 5' - CATATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACACTAGG -3' (서열번호 7)

[0062] 5' - AATATGCTCGAGTCATGACATCATTGGAAGTACGAGGTACGCCGAATAGTCAGCTTCATCACCGCTCCGGATCCCTCGCTTCTTTCTT -3' (서열번호 8)

[0063] 이 때 역방향 프라이머에는 링커 펩타이드(서열번호 2)와 YSA 펩타이드(서열번호 3)에 해당되는 유전자가 포함 되도록 디자인하여 PCR 증폭한 결과물에서 도 1에 해당되는 아미노산 서열이 가능하도록 유전자 재조합 하였다. 상기 PCR 증폭은 각각 변성 단계 95℃/30초, 어닐링 단계 60℃/30초 및 신장 단계 72℃/ 2분의 조건으로 30 사이클 실시하였고, p19 결합 단백질(서열번호 1), 링커 펩타이드(서열번호 2) 및 YSA 펩타이드(서열번호 3)의 각 유전자가 연결된 유전자 컨스트럭트를 얻을 수 있었다.

[0064] 이 때 증폭된 유전자는 NdeI, XhoI 제한 효소자리를 포함하고 있으므로 제한효소를 처리한 후 정제하였다. 마찬

가지로 pET28a 벡터(NEB Inc.)도 동일한 제한효소로 처리한 후 정제하였으며 상기 재조합 유전자를 T4 DNA ligase를 이용하여 삽입한 후 competent cell에 Hanahan method(Hanahan D et al., 1991)를 사용하여 형질전환 하고 콜로니 PCR 방법(Sheu DS et al., 2000)으로 유전자삽입을 확인한 후 최종적으로 DNA 시퀀싱을 통하여 서열을 확인하였다.

[0065] 유전자가 삽입된 발현벡터를 BL21(DE3) 숙주세포(Novagen)에 형질전환을 시킨 후, LB 배지(Sigma-Aldrich)에서 37℃에서 키운 후 OD₆₀₀ 값이 0.5에 도달하면 IPTG(Isopropyl β-D thiogalactoside) 1mM을 이용하여 발현을 유도하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0066] 도 3에 나타난 바와 같이, IPTG에 의하여 단백질 발현이 유도된 세포들은 높은 발현량을 보여주었으며 발현된 단백질 대부분이 우수한 용해도를 보여주는 것으로 확인하였다.

[0067] 이 후 37℃에서 6시간을 더 배양한 후 세포를 수거하고 용해 버퍼(50mM Tris-HCl, 8.0, 100mM NaCl, 1mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride))를 이용하여 세포를 파괴한 후 용해된 부분만을 정제에 이용하였다.

[0068] 발현 벡터의 특징상 siRNA 전달용 재조합 단백질의 N-말단에 히스티딘-태그가 위치하는 것을 이용하여 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 이용한 정제방법을 사용하였다.

[0069] 친화성 크로마토그래피는 Ni-NTA 컬럼(GE healthcare)을 사용하였으며 A 버퍼(50mM Tris-HCl, 8.0, 100mM NaCl)로 컬럼 준비와 단백질 로딩 후 수세하였다. B 버퍼(50mM Tris-HCl, 8.0, 100mM NaCl, 500mM Imidazole)로 컬럼에 붙어있는 단백질을 용출시킨 후 전기영동(Laemmli, U. K. Nature 1970, 227, 680-685.)을 하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0070] 도 4에 나타난 바와 같이, 전기영동을 통하여 분자량을 확인하였다. 정제 후 단백질의 농도는 약 1mg/mL로 농축하였으며 보관조건은 50 mM PBS(7.4)으로 하였다.

[0071]

[0072] **실시예 2. siRNA 전달용 재조합 단백질의 siRNA 결합력 조사**

[0073] 상기 실시예 1-2에서 제조한 siRNA 전달용 재조합 단백질 내부에 siRNA 를 봉입하여 siRNA 결합력을 조사하였다. 본 실험에서는 RFP(Red Fluorescent Protein) 유전자를 타겟으로 하는 siRNA를 사용하였으며, 사용한 siRNA의 염기 서열은 다음과 같다:

[0074] 센스 가닥: 5' -UGUAGAUGGACUUGAACUCdTdT-3' (서열번호 4)

[0075] 안티센스 가닥: 5' -UGAAGUUGCACUUGAAGUCdTdT-3' (서열번호 5)

[0076] 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질에 결합하는 siRNA의 몰비(mole ration) 를 결정하기 위하여, free siRNA의 농도를 고정된 상태에서 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질의 농도를 증가시키면서 siRNA 결합량을 전기영동으로 분석하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0077] 도 5에 나타난 바와 같이, 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질의 농도가 높아질수록 결합에 참여하지 못하는 siRNA의 양이 감소하면서 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질에 결합되어 gel shift를 보여주는 밴드의 두께가 증가하였으며, 정량적 분석을 통해서 두 개의 siRNA 전달용 재조합 단백질 당 결합되는 siRNA의 개수는 하나임을 확인할 수 있었다.

[0078] **실시예 3. siRNA 전달용 재조합 단백질의 세포독성 실험**

[0079] siRNA 전달용 재조합 단백질의 세포 내 생체적합성을 조사하기 MTT 분석을 수행하였다(Choi, Y. H.; Liu, F.; Kim, J. S.; Choi, Y. K.; Park, J. S.; Kim, S. W. J. Control. Rel. 1998, 54, 39-48.).

[0080] 구체적으로, 기하급수적인 증가 단계(Exponential growth phase)에 있는 HeLa 세포를 96-웰 플레이트에서 웰당 20000 세포가 되도록 키운 후, 상기 실시예 1-2에서 제조한 siRNA 전달용 재조합 단백질을 다양한 농도로 각 웰에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액(0.5mg/mL)을 웰 당 200uL씩 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후 DMSO 200uL를 넣고 10분간 반응시키고 570nm 파장에서 ELISA를 이용하여 측정하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0081] 도 6에 나타난 바와 같이, 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질은 2 μ M까지 우수한 생체적합성을 보여주었으며, 바람직하게는 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질의 농도를 1 μ M로 결정할 수 있었다.

[0082] **실시예 4. siRNA 전달용 재조합 단백질의 pH에 따른 siRNA 결합력**

[0083] siRNA 전달체는 엔도시토시스(endocytosis)에 의하여 세포 내 투과 후 세포질로의 방출을 위해서, 엔도솜(endosome)의 산성조건을 이용하여 엔도솜에서 세포질로의 방출 기전(endosomal escape)을 활용할 경우 매우 유리하다.

[0084] 이에, 상기 실시예 1-2에서 제조한 siRNA 전달용 재조합 단백질의 pH에 따른 siRNA 결합력을 측정하였다. pH 7.4 조건은 PBS 버퍼, pH 6.0 내지 5.0 조건은 50 mM 아세트산나트륨 버퍼를 사용하였고, siRNA 및 siRNA 전달용 재조합 단백질을 상온에서 10분간 각각의 해당되는 pH 조건에서 방치한 후 전기영동(200V, 100mA)을 이용하여 결합 정도를 분석하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0085] 참고적으로 상기 siRNA는 분석의 용이성을 위하여 형광체 FITC를 부착하였다.

[0086] 도 7에 나타난 바와 같이, 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질은 중성 pH에서는 siRNA 결합력이 우수하였으나 점점 pH가 감소할수록 해리가 되었다. 보다 구체적으로는 pH 약 6.0에서부터 siRNA의 해리가 확인되었으며, pH 약 5.5에서는 대부분의 siRNA가 해리되었다.

[0087] 이러한 결과로부터 siRNA 전달용 재조합 단백질이 세포 내 투과 후에 엔도솜에서의 방출 기전(endosomal escape)에 의하여 세포질로 siRNA의 전달이 가능함을 확인하였다.

[0088] **실시예 5. siRNA 전달용 재조합 단백질에 봉입된 siRNA의 생체안정성 조사**

[0089] siRNA를 분해할 수 있는 각종 리보뉴클레아제들이 혼재해 있는 10% FBS (fatal bovine serum) 조건하에서 naked siRNA와 상기 실시예 1-2에서 제조된 siRNA 전달용 재조합 단백질에 봉입된 siRNA를 각각 실온에서 시간별로 방치한 후 전기영동을 통해 분해되는 정도를 비교하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0090] 도 8에 나타난 바와 같이, naked siRNA의 경우 30분 이내에서 완전히 분해되었으나 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질에 봉입되어 보호를 받는 siRNA는 6시간까지 약 50%가 안정적이었으며 24시간까지 분해되지 않고 남아있는 siRNA를 관찰할 수 있었다.

[0091] 이러한 결과로부터 siRNA 전달용 재조합 단백질이 siRNA의 생체 안정성을 획기적으로 향상시키는 우수한 전달체임을 확인할 수 있으며, 이는 siRNA 전달용 재조합 단백질의 내부에 봉입된 siRNA는 p19 RNA 결합 단백질에 의하여 물리적으로 외부환경으로부터 보호를 받음으로써, naked siRNA에 비해 각종 리보뉴클레아제(ribonuclease)에 의한 분해 저항성이 뛰어나다는 것을 확인할 수 있었다.

[0092] **실시예 6. siRNA 전달용 재조합 단백질의 세포투과 활성**

[0093] 마우스 미엘로마 세포주인 B16F10에 대한 세포투과 실험을 수행하였다. 구체적으로 형광현미경에서의 형광관찰을 용이하게 하기 위하여, 먼저 상기 실시예 1-2에서 제조된 siRNA 전달용 재조합 단백질 표면에 위치한 라이신(Lysine) 잔기를 이용하여 Cy5.5 형광체를 결합시키고 FITC가 부착되어 있는 siRNA(Cy5.5-p19-YSA/FITC-siRNA 결합체)를 이용하였다. B16F10 세포에 상기 Cy5.5-p19-YSA/FITC-siRNA 결합체를 0.25 μ M 처리한 후 10 분 간격으로 형광현미경을 이용하여 관찰하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0094] 형광현미경으로는 Achroplan IR40 x/0.80W lens, AxioCam black and white CCD camera(Carl Zeiss)가 부착된 Axioskop2 FS plus imaging microscope (ZEISS)을 사용하였다.

[0095] 도 9에 나타난 바와 같이, 상기 Cy5.5-p19-YSA/FITC-siRNA 결합체를 처리한 후 10분 경과부터 p19-YSA와 siRNA의 세포 내 투과가 관찰되기 시작하였으며 약 30분 경과에서 최대의 세포투과성을 보여주었다. 상기 결과로부터, siRNA 전달용 재조합 단백질은 세포투과성이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

[0096] 엔도시토시스에 의한 세포 투과를 확인하기 위하여 대표적 엔도시토시스 저해제인 CPZ(Sigma, Ger), Amil(Sigma, Ger) 및 Filip(Sigma, Ger)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 저해제를 상기 siRNA 전

달용 재조합 단백질에 처리하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0097] 도 10에 나타낸 바와 같이, 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질의 세포투과력이 현저히 감소됨을 통해, siRNA 전달용 재조합 단백질이 엔도시토시스에 의하여 세포투과됨을 확인할 수 있었다.

[0098] 합성된 YSA 펩타이드(YSAYPDSVPMMS 아미노산 서열)를 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질보다 100배 고농도로 선처리한 후 Cy5.5-p19-YSA/siRNA 결합체를 처리하였고, 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0099] 도 11에 나타난 바와 같이, 세포 투과력이 현저히 감소함(70%)을 관찰하였다. p19-YSA에 존재하는 YSA 펩타이드와 세포 표면의 EphA2 사이의 상호작용에 의하여 p19-YSA가 세포안으로 들어가는 것인데, 합성된 YSA 펩타이드를 고농도로 선처리하면 EphA2 receptor가 YSA 펩타이드와 결합한 상태로 포화되기 때문에 p19-YSA가 더 이상 EphA2와 상호작용할 수 없으므로, 이 결과를 통해 siRNA 전달용 재조합 단백질 표면에 노출된 YSA 펩타이드에 의한 세포투과성을 확인하였다. 또한 flow cytometry 분석으로 YSA 펩타이드로 saturation을 시킨 후 siRNA 전달용 재조합 단백질을 처리할 경우 세포 투과력이 현저히 감소됨을 확인하였다.

[0100] 결론적으로, 이를 통해 우수한 세포투과성은 siRNA 전달용 재조합 단백질 표면에 노출되어있는 YSA 펩타이드에 의한 엔도시토시스(endocytosis)에서 기인함을 확인하였다.

[0101] 암 세포에 특이적으로 과량발현되어 있는 EphA2 막단백질을 이용하여 암세포 선택적 세포결합성을 확인하기 위하여 대표적 암세포인 HeyA8, A549, MDA-MB231, SKOV3ip1, B16F10, HeLa 세포, 또한 대표적 정상세포인 H9C2, HEK293 세포에 상기 Cy5.5-p19-YSA/siRNA 결합체를 처리한 후 flow cytometry 분석을 시행하였으며, 이를 도 12에 나타내었다.

[0102] 도 12에 나타난 바와 같이, 상기 Cy5.5-p19-YSA/siRNA 결합체는 암 세포에서 우수한 세포투과성을 확인할 수 있었으며, 이로부터 siRNA 전달용 재조합 단백질은 암세포에서 우수한 세포투과성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0103] **실시예 7. siRNA 전달용 재조합 단백질에 의한 세포 내 siRNA 전달 및 유전자 사일런싱(gene silencing) 조사**

[0104] siRNA 전달용 재조합 단백질을 전달체로 이용한 siRNA가 세포 내 유전자에 대하여 유전자 사일런싱(gene silencing)을 일으키는 효과를 기존의 siRNA 전달체인 리포펙타민(Lipofectamine, USA)과 비교하였다.

[0105] RFP 형광 단백질을 발현할 수 있는 B16F10 미엘로마 세포주에 동일한 양의 siRNA를 각각 리포펙타민과 상기 실시예 1-2에서 제조한 siRNA 전달용 재조합 단백질에 섞어 준 후 세포 처리하고 24 시간 후 형광현미경으로 관찰하였고, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0106] 도 13에 나타낸 바와 같이, siRNA를 처리하지 않은 대조군 세포는 RFP 형광단백질이 발현되어 강한 형광강도를 보였으나 상기 리포펙타민 및 siRNA 전달용 재조합 단백질로 처리한 siRNA는 세포에서 RFP 형광단백질의 발현을 억제함을 확인하였다.

[0107] 또한, RFP 단백질-코딩 유전자와 매칭(matching)되지 않는 scramble siRNA를 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질과 처리하였을 때는 유전자 사일런싱이 거의 관찰되지 않았다. 이러한 RFP 형광단백질의 유전자 사일런싱을 정량적으로 분석하였을 때 상기 리포펙타민을 처리한 siRNA는 약 70%, 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질을 처리한 siRNA는 약 70%의 유전자 발현억제를 보여줌을 확인하였다.

[0108] 또한, 본 발명자들은 RT-PCR을 이용하여 세포 내의 RFP mRNA의 양 분석을 통해 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질의 siRNA 전달 효과를 확인하였다. 보다 구체적으로 RFP mRNA에 매칭될 수 있는 프라이머 (정방향 프라이머 5' -GGCTGCTTCATCTACAAGGT-3' (서열번호 9) 및 역방향 프라이머 5' -GCGTCCACGTAGTAGGCC-3' (서열번호 10)) 및 대조군 실험을 위한 β -actin과 매칭되는 프라이머(정방향 프라이머 5' -AGAGGGAATCGTGCCTGAC-3' (서열번호 11) 및 역방향 프라이머 5' -CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3' (서열번호 12))를 이용하여 세포 내의 RFP 유전자의 mRNA의 양을 정량하기 위한 RT-PCR을 수행하였으며 (변성 단계 95°C/30초, 어닐링 단계 51°C/30초, 신장 단계 72°C/30초, 20 사이클), 전기영동 후 각각의 밴드에 대한 정량은 DNR's GelQuant (image analysis) 프로그램을 이용하였고, 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0109] 도 14에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교시, 상기 리포펙타민과 함께 처리한 siRNA는 약 70%, 상기 siRNA 전달

용 재조합 단백질과 함께 처리한 siRNA는 약 70%의 감소를 보여주었다.

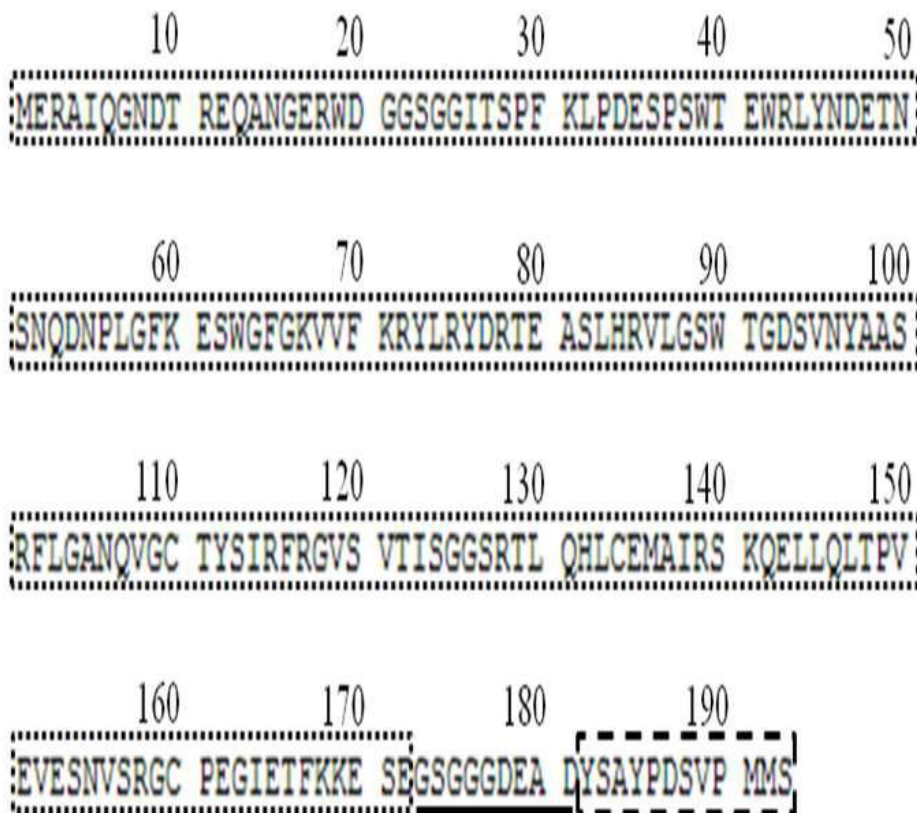
[0110] 또한, RFP 항체를 이용하여 유전자 발현 억제를 확인하였을 때 도 15에서 보여지듯이 RFP 형광단백질이 발현되는 control 세포와는 다르게 리포펙타민 또는 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질을 이용하여 siRNA를 처리한 세포에서는 RFP 단백질의 검출이 현저히 감소하였다. RFP 단백질-코딩 유전자와 매칭(matching)되지 않는 scramble siRNA를 상기 siRNA 전달용 재조합 단백질과 처리하였을 때는 유전자 사일런싱이 거의 확인되지 않았다.

[0111] 이를 통해 siRNA 전달용 재조합 단백질에 의한 세포 내로 전달된 siRNA 가 사일런싱(gene silencing)임을 일임함을 확인할 수 있었다.

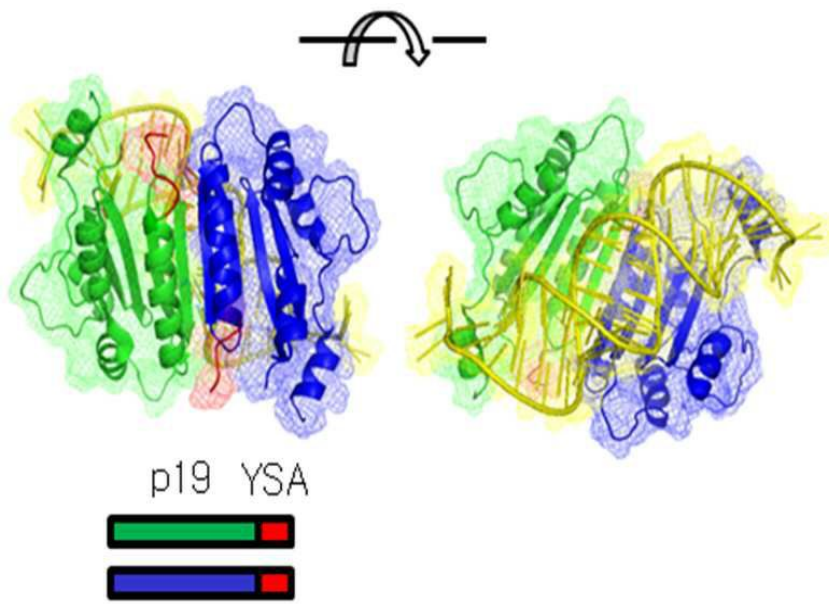
[0112] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

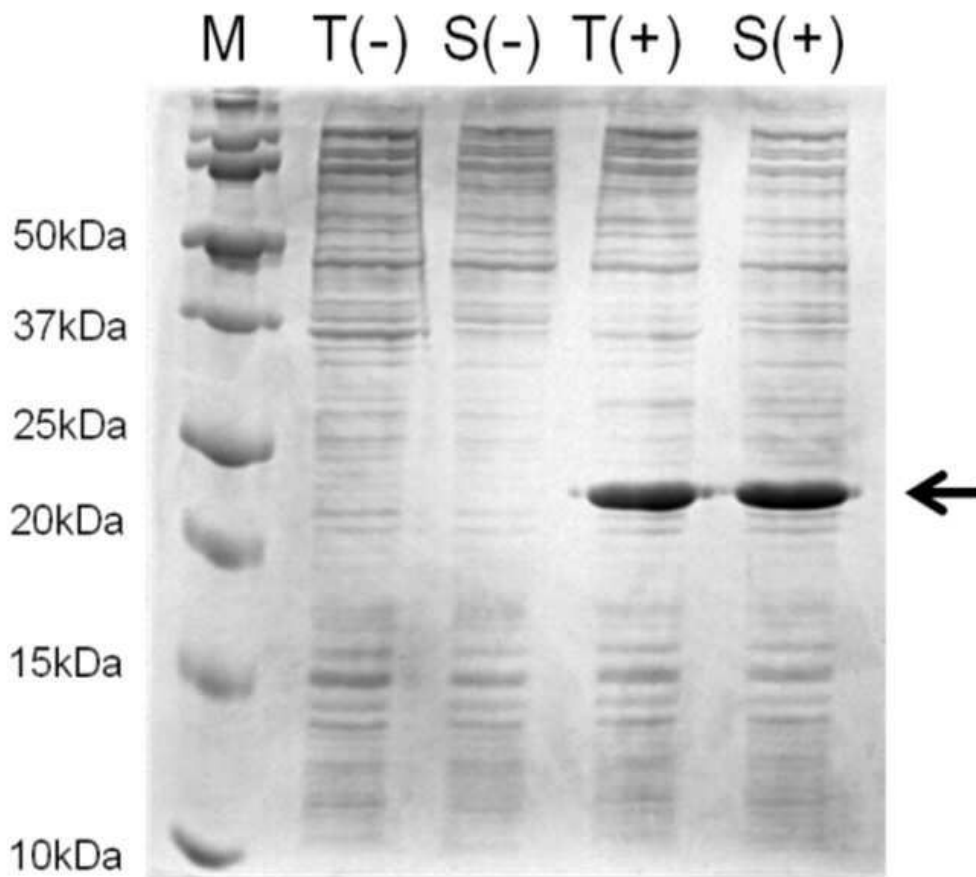
도면1



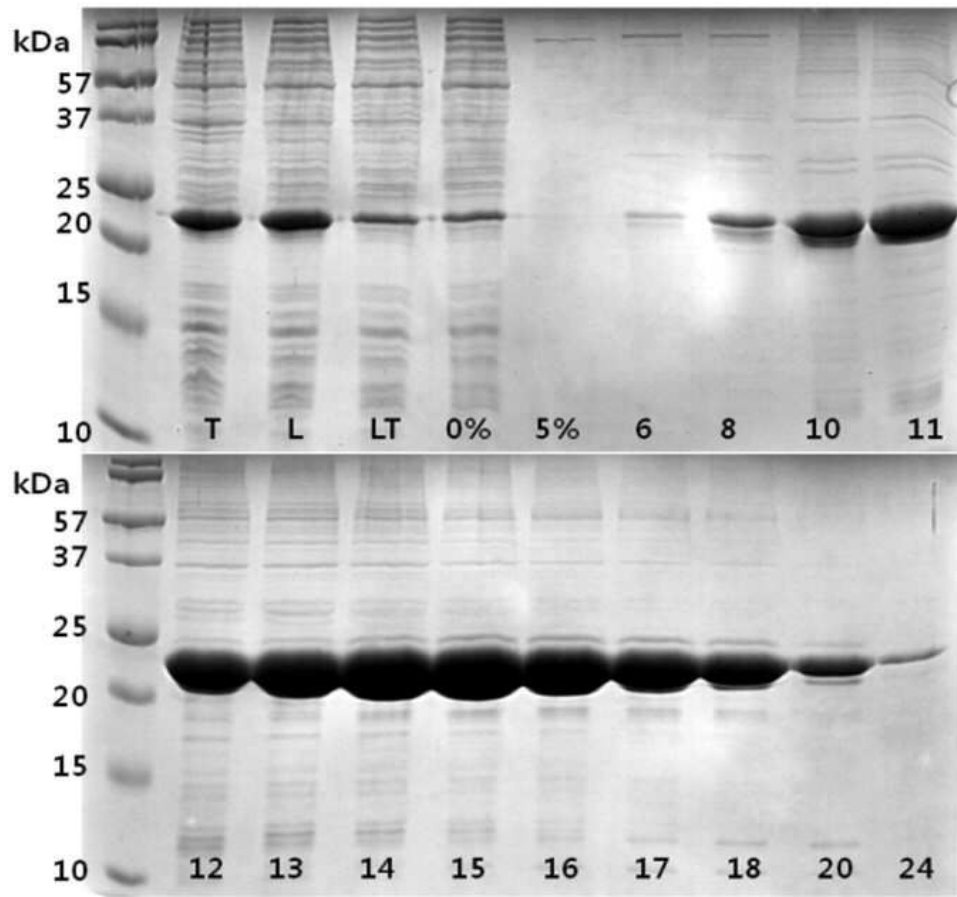
도면2



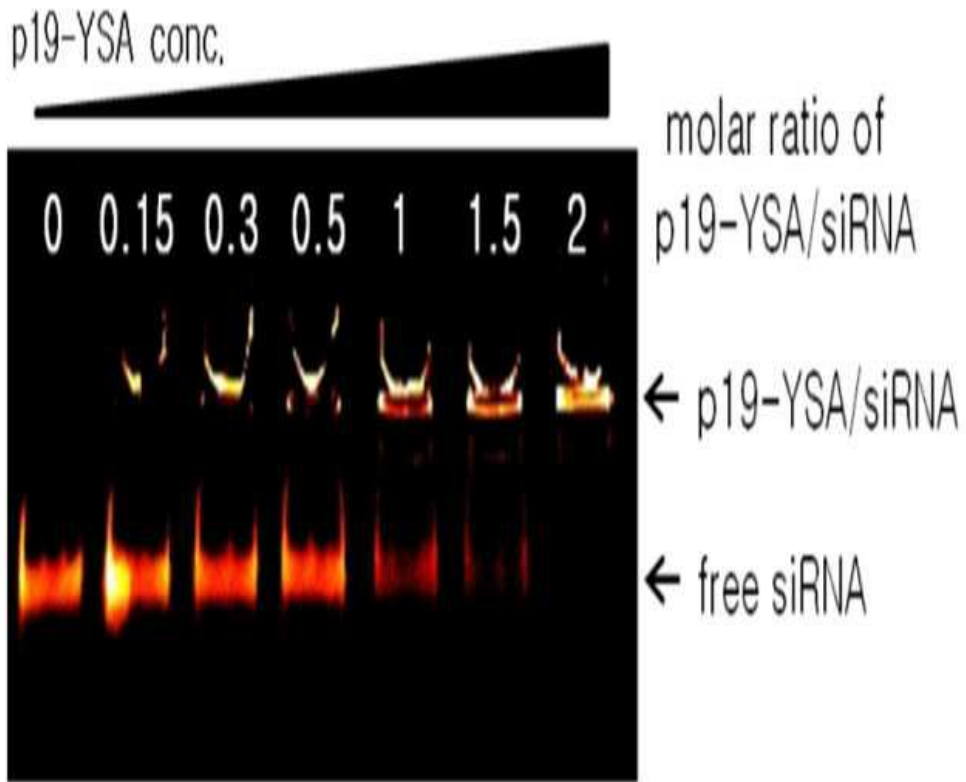
도면3



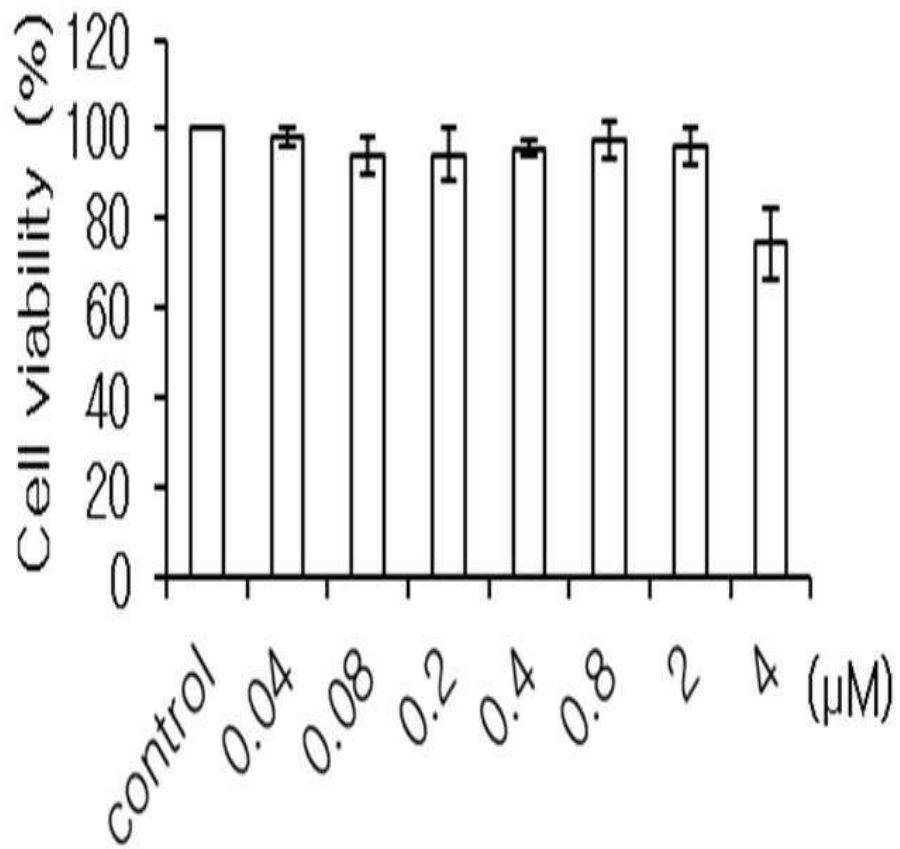
도면4



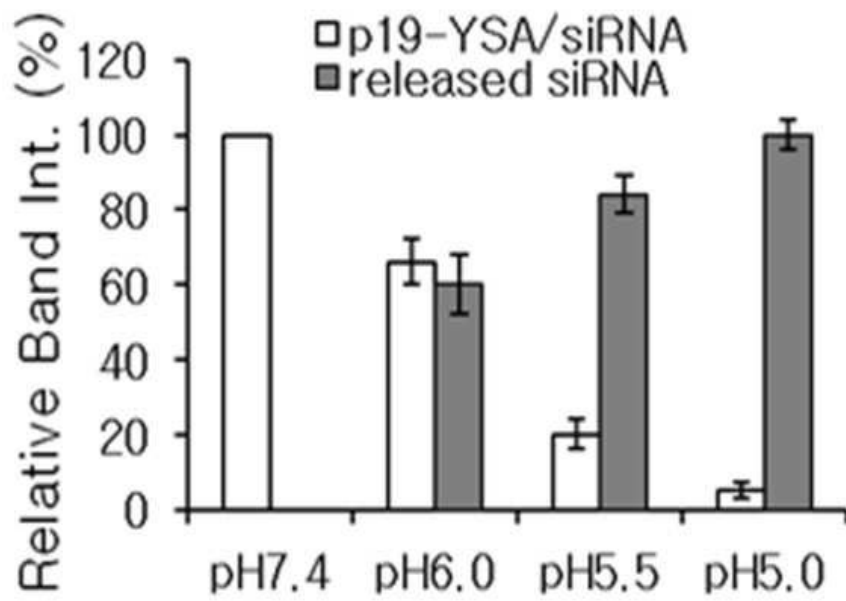
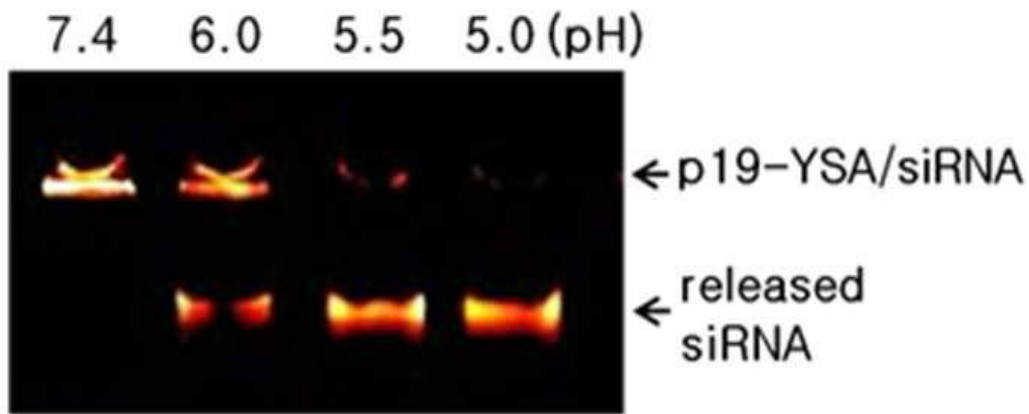
도면5



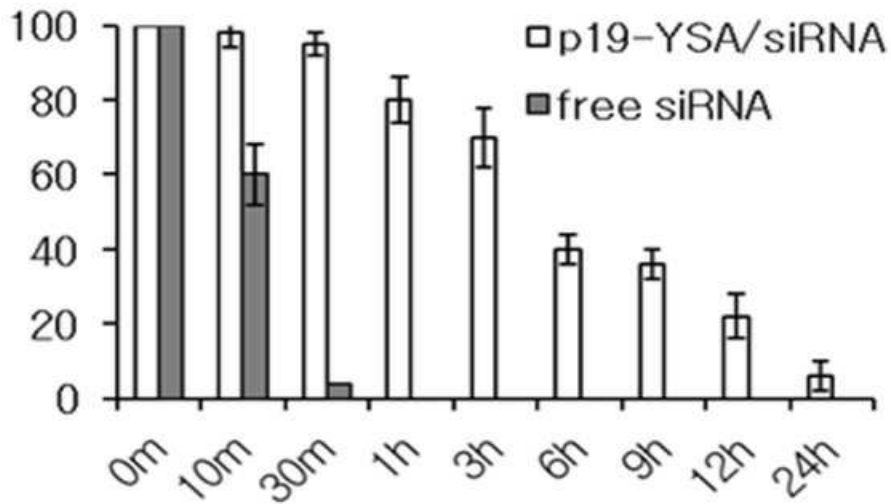
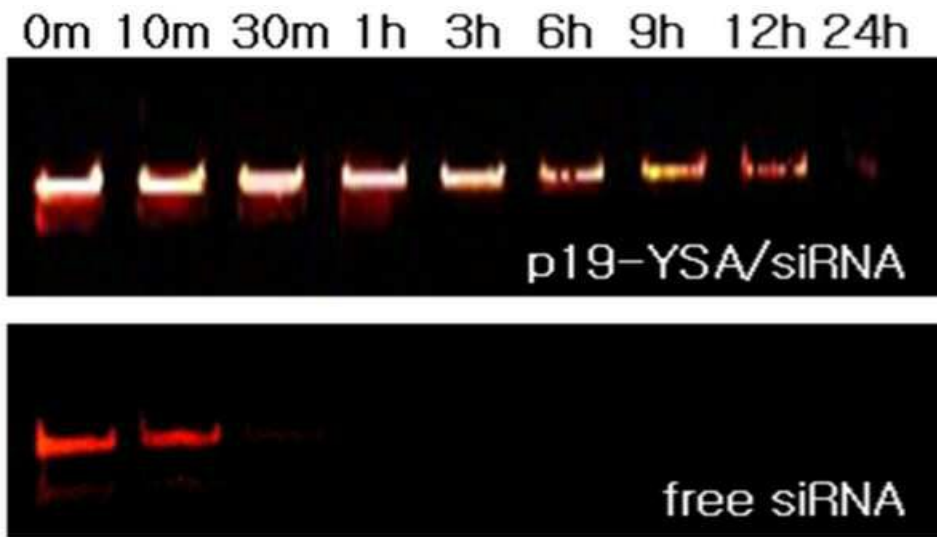
도면6



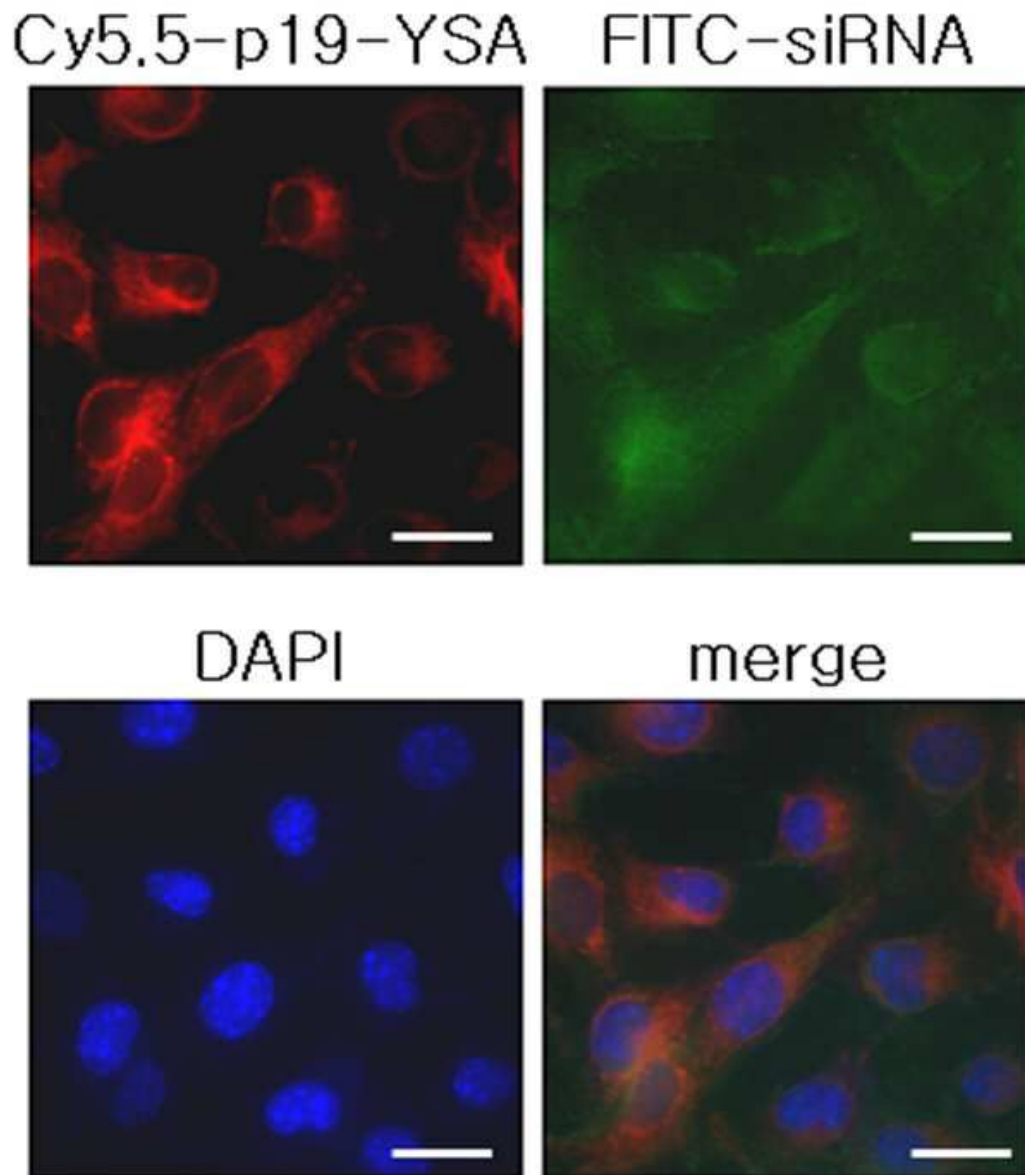
도면7



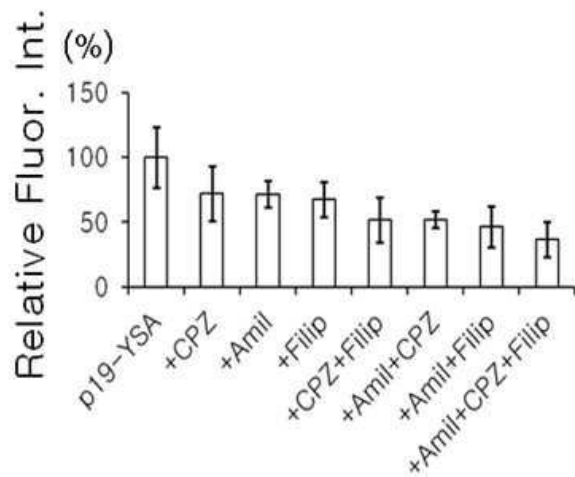
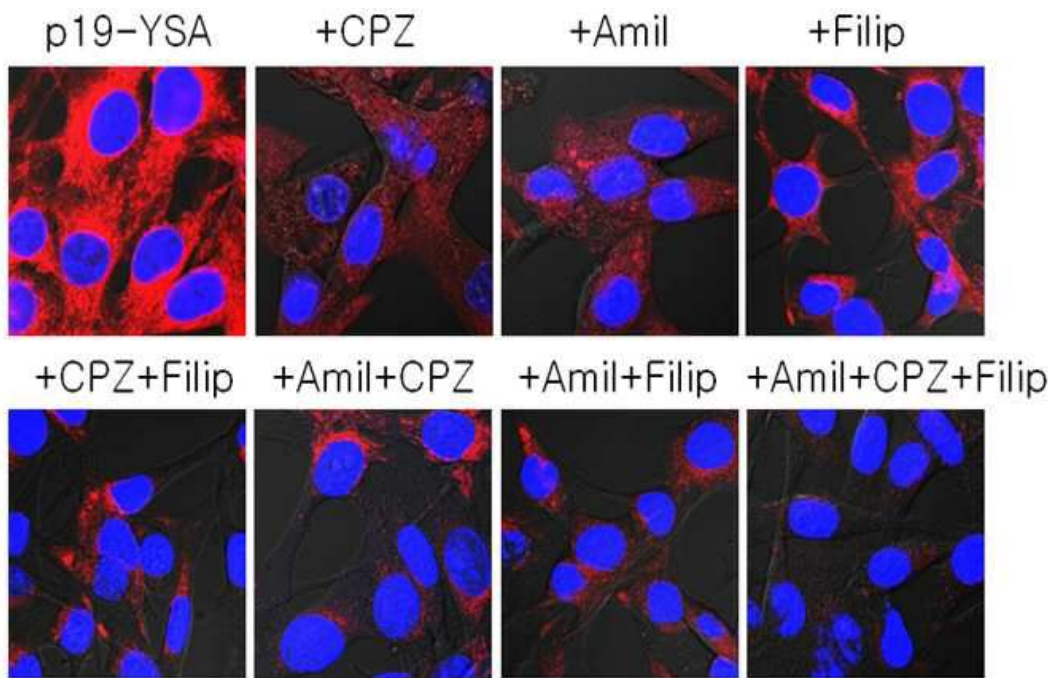
도면8



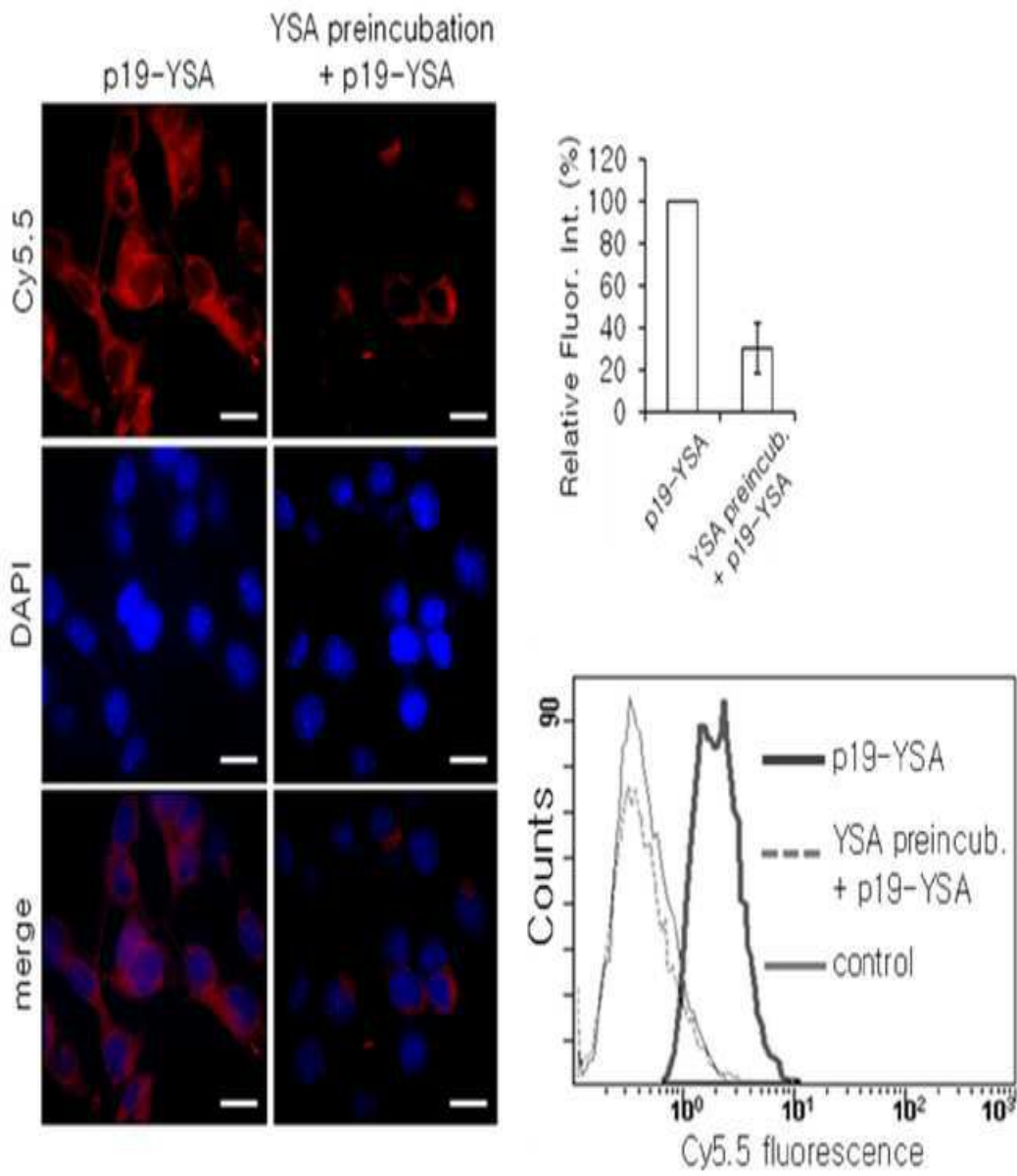
도면9



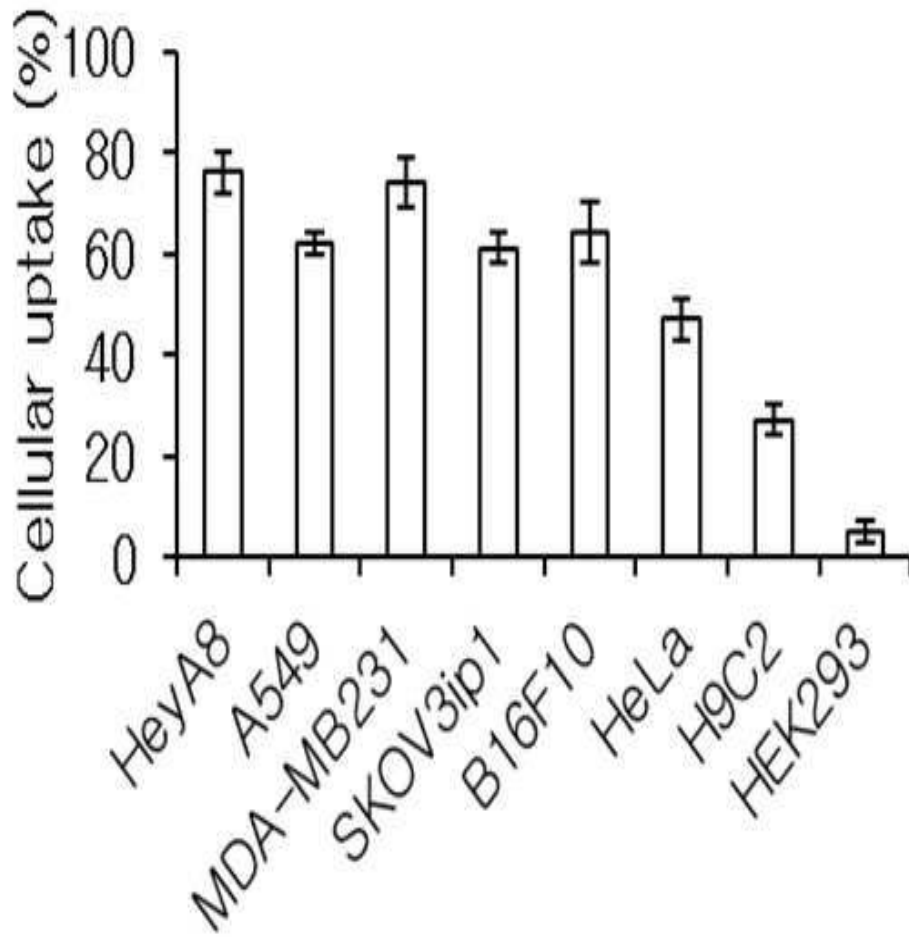
도면10



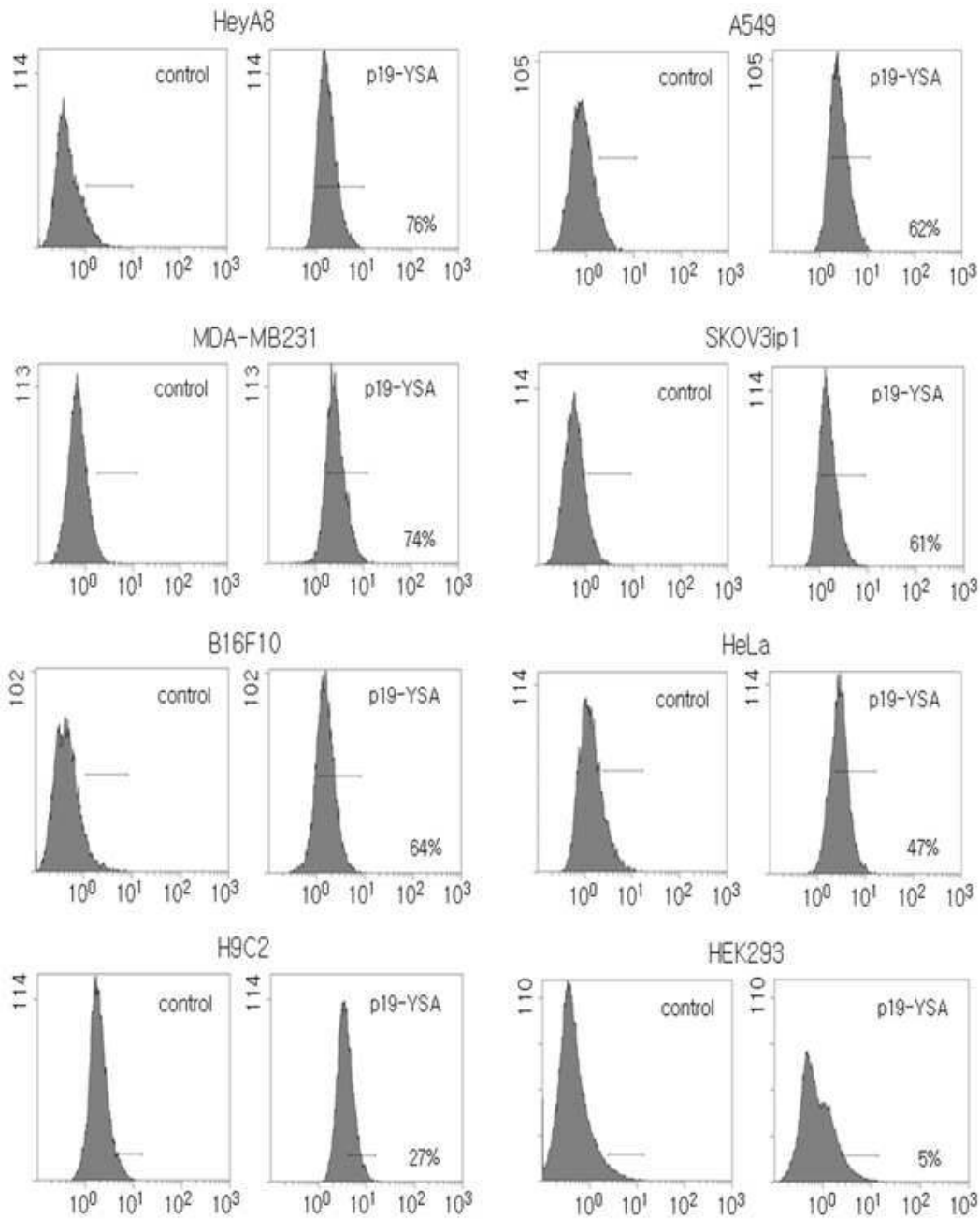
도면11



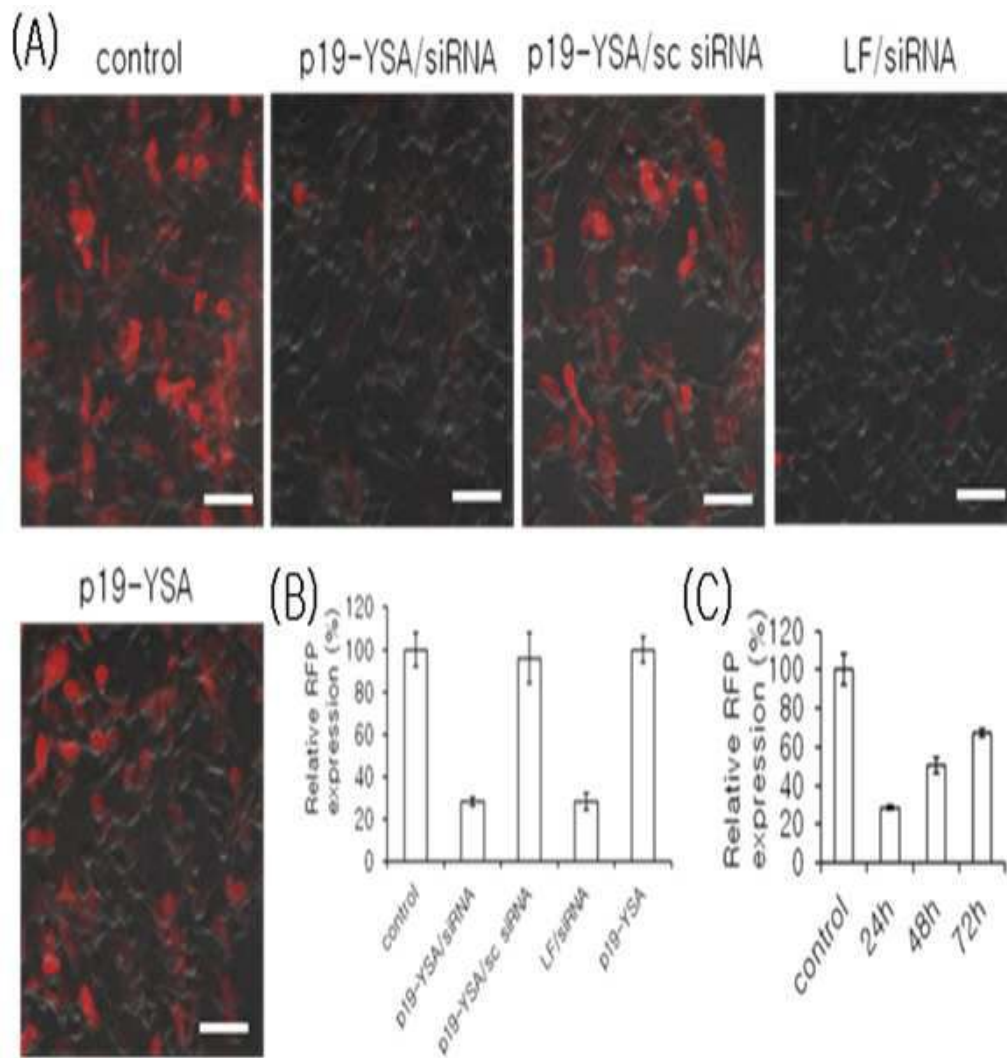
도면12a



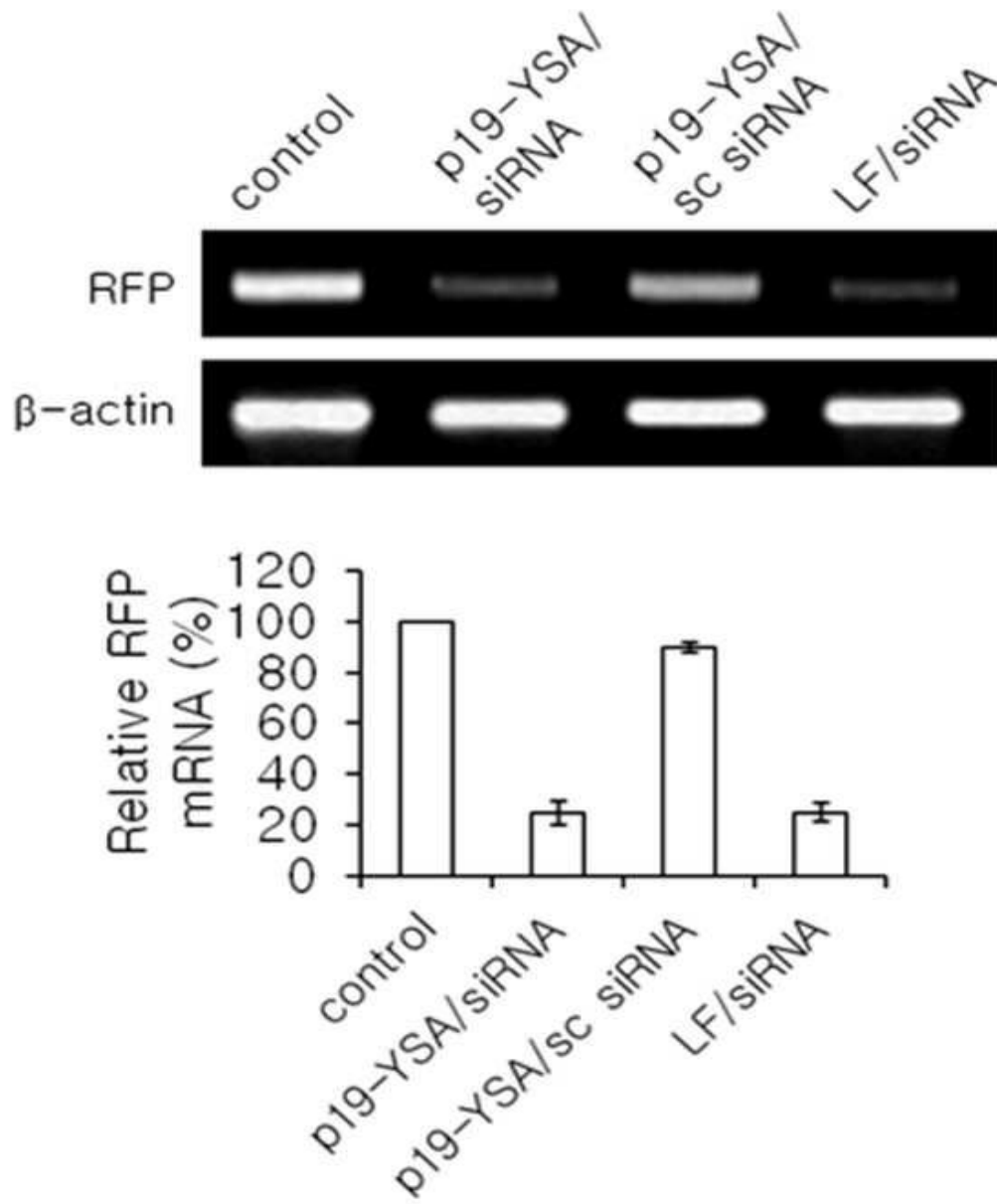
도면12b



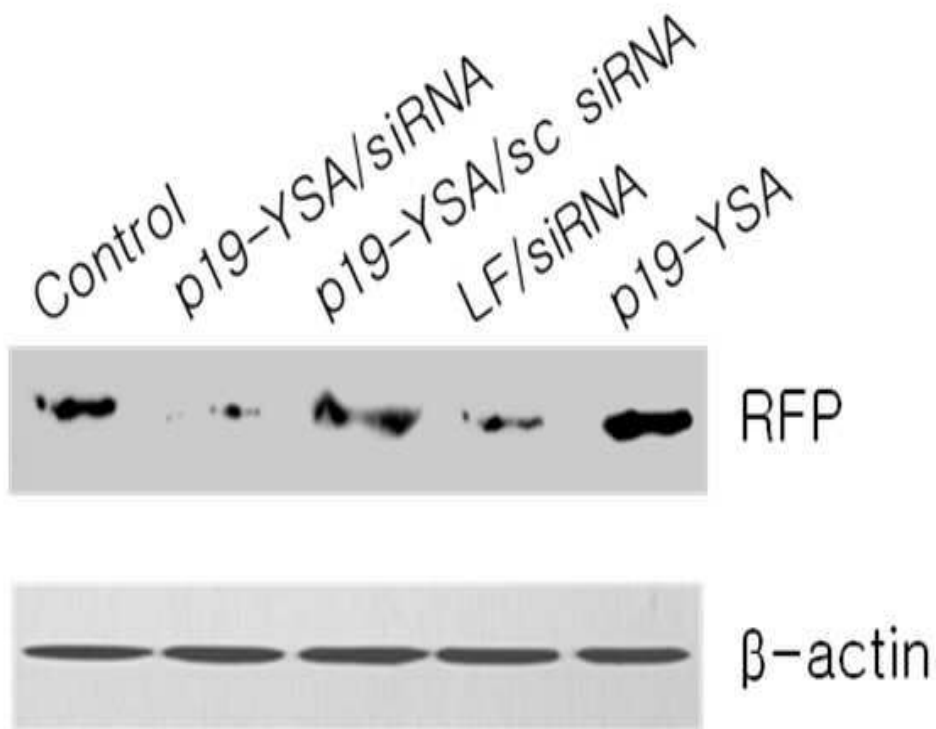
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
 - <120> Recombinant protein for siRNA delivery and composition comprising the same
 - <130> DPP20122626KR
 - <160> 12
 - <170> KopatentIn 2.0
 - <210> 1
 - <211> 172
 - <212> PRT
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> p19 protein of Carnation Italian ringspot virus (GenBank CAA59481.1)
 - <400> 1
- Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Asn Asp Thr Arg Glu Gln Ala Asn Gly
- 1 5 10 15
- Glu Arg Trp Asp Gly Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ser Pro Phe Lys Leu

Tyr Ser Ala Tyr Pro Asp Ser Val Pro Met Met Ser

1 5 10

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense strand of siRNA

<400> 4

uguagaugga cuugaacuc 19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense strand of siRNA

<400> 5

ugaaguugca cuugaaguc 19

<210> 6

<211> 579

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant protein for siRNA delivery

<400> 6

atggaacgag ctatacaagg aaacgacact agggaacaag ctaacggtga acgttgggat 60

ggaggatcag gaggtatcac ttctcccttc aaacttctg acgaaagtcc gagttggact 120

gagtggcggc tatataacga tgagacgaat tcgaatcaag ataatcccct tggtttcaag 180

gaaagctggg gtttcgggaa agttgtattt aagagatadc tcagatacga caggacggaa 240

gcttctactgc acagagtctt tggatcttgg acgggagatt cggttaacta tgcagcatct 300

cgatttctcg gtccaacca ggtcggatgt acctatagta ttcggtttcg aggagttagt 360

gtcaccattt ctggagggtc gagaactcct cagcatctct gtgagatggc aattcggctc 420

aagcaagaac tgttacagct taccaccagtc gaagtggaaa gtaatgtatc aagaggatgc 480

cctgaaggta ttgaaacctt caagaagaa agcgagggat ccggaggcgg tgatgaagct 540

gactattcgg cgtaccctga ctcagttcca atgatgtca 579

<210> 7
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for p19 protein
 <400> 7
 catatggaac gagctataca aggaaacgac actagg 36
 <210> 8
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for p19 protein
 <400> 8
 aatatgctcg agtcatgaca tcattggaac tgagtcaggg tacgccgaat agtcagcttc 60
 atcacgcct ccggatcctt cgctttcttt ctt 93
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for RFP
 <400> 9
 ggctgcttca tctacaaggt 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for RFP
 <400> 10
 gcgtccacgt agtagtagcc 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for beta-actin
<400> 11
agagggaaat cgtgcgtgac 20
<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer for beta-actin
<400> 12
caatagtgat gacctggccg t 21