(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월17일
(11) 등록번호 10-2215987
(24) 등록일자 2021년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0067731
(22) 출원일자 2019년06월10일
심사청구일자 2019년06월10일
(65) 공개번호 10-2019-0139790
(43) 공개일자 2019년12월18일
(30) 우선권주장
1020180066197 2018년06월08일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130129704 A*
KR1020140092430 A*
KR1020160048232 A*
논문1:Chem. Commun., 2014
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)
(72) 발명자
박노경
경기도 용인시 기흥구 보정로 87, 215동 16층 1601호(보정동, 죽현마을 아이파크)
이민혁
경기도 용인시 수지구 상현로 144, 1004동 101호 (상현동)
(74) 대리인
특허법인다나

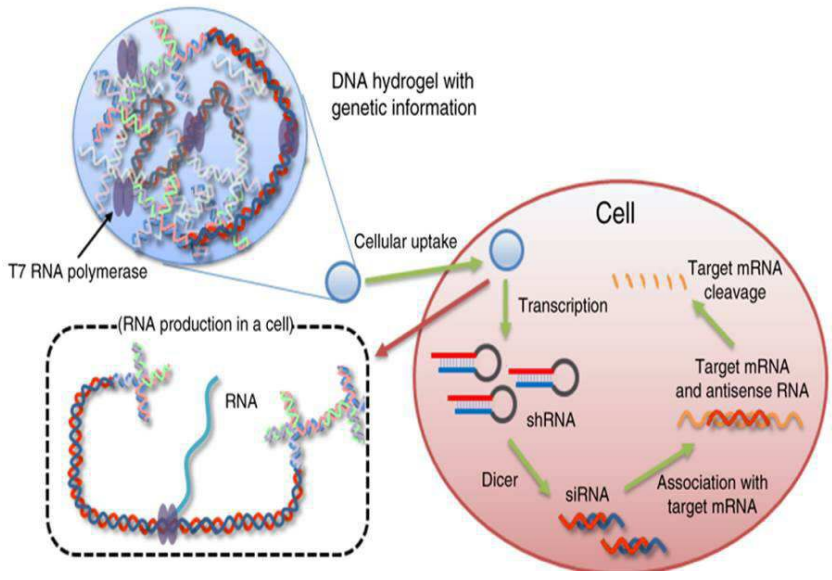
전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **신규한 RNA 간섭 시스템 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 RNA 간섭을 위한 새로운 RNAi 시스템 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 RNAi 시스템은 DNA 하이드로겔과 RNAi 물질을 생산할 수 있는 플라스미드를 포함함으로써, 종래의 RNAi 물질 전달 방법과 비교해서 세포 내 흡수 효율이 높고, 전달된 개체 내 안정성이 높아 RNAi 효과를 갖는 물질의 생산 및 이의 표적 유전 발현 저해 효과가 우수하며, 생체 물질만을 이용하므로, 세포 내 독성 문제를 일으키기 않아, 유전자 치료를 위한 임상에 효과적으로 적용될 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 48/0008 (2013.01)
A61P 43/00 (2018.01)
C12N 2310/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2015R1A2A2A04005445
부처명	선도연구지원팀
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업_핵심연구(융합)
연구과제명	[3-3차년도]DNA 수화젤 기반의 인공핵 및 다기능성 나노복합체 개발연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	명지대학교 산학협력단
연구기간	2017.05.01 ~ 2018.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

DNA 하이드로겔; 및 표적 유전자에 대한 RNA 간섭(RNAi)을 나타내는 올리고뉴클레오티드를 생산할 수 있는 선형의 플라스미드를 포함하는 RNA 간섭(RNAi) 시스템으로,

상기 DNA 하이드로겔은 3개의 점착성 말단을 갖는 X-DNA를 단량체로 포함하며, 상기 X-DNA 단량체가 가교 결합된 것이고,

상기 플라스미드는 양 말단에 상기 DNA 하이드로겔의 점착성 말단과 상보적인 서열을 가지며, X-DNA의 3개의 점착성 말단 중 일 말단과 결합되어 DNA 하이드로겔 내부에 존재하고,

상기 RNAi 시스템을 위한 DNA 하이드로겔은 평균직경 50nm 내지 150nm의 나노입자 인, RNA 간섭(RNAi) 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 플라스미드는 X-DNA의 3개의 점착성 말단 중 일 말단과 공유결합된 것인, RNAi 시스템.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 플라스미드는 RNA 간섭효과(RNAi)를 나타내는 올리고뉴클레오티드를 전사하는 발현부위(expression site); 및 X-DNA 분자와 결합하는 절단부위(cleavage site)를 포함하고 상기 발현부위와 절단부위 사이에 프로모터를 포함하는 것인, RNAi 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 DNA 하이드로겔은 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 X-DNA를 포함하는 것인, RNAi 시스템.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 X-DNA는 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 서열의 일 말단에 서열번호 5의 핵산서열을 더 포함하는 것인, RNAi 시스템.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 shRNA 및 siRNA 및 안티센스 RNA로 이루어진 군에서 선택된 것인, RNAi 시스템.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 RNAi 시스템은 X-DNA와 플라스미드를 1,000 초과 내지 2,000 미만 : 1의 몰비로 포함하는 것인, RNAi 시스템.

청구항 9

DNA 하이드로겔; 및 표적 유전자에 대한 RNA 간섭(RNAi)을 나타내는 올리고뉴클레오티드를 생산할 수 있는 선형의 플라스미드를 포함하고,

상기 DNA 하이드로겔은 3개의 점착성 말단을 갖는 X-DNA를 단량체로 포함하며, 상기 X-DNA 단량체가 가교 결합된 것이고,

상기 플라스미드는 일 말단에 상기 DNA 하이드로겔의 점착성 말단과 상보적인 서열을 가지며, X-DNA의 3개의 점착성 말단 중 일 말단과 결합되어 DNA 하이드로겔 내부에 존재하고,

상기 RNAi 시스템을 위한 DNA 하이드로겔은 평균직경 50nm 내지 150nm의 나노입자 인, RNA 간섭(RNAi)용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 플라스미드는 X-DNA의 일 말단과 공유결합된 것인, RNA 간섭(RNAi)용 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 shRNA 및 siRNA 및 안티센스 RNA로 이루어진 군에서 선택된 것인, RNA 간섭(RNAi)용 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 RNAi 시스템은 X-DNA와 플라스미드를 1,000 초과 내지 2,000 미만 : 1의 몰비로 포함하는 것인, RNA 간섭(RNAi)용 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제2항 및 제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 RNA 간섭(RNAi) 시스템을 포함하는 유전자 치료용 조성물.

청구항 15

3개의 점착성 말단을 갖는 X-DNA를 준비하는 것;

표적 유전자에 대한 RNA 간섭(RNAi)을 나타내는 올리고뉴클레오티드를 생산할 수 있고, 일 말단에 상기 DNA 하이드로겔의 점착성 말단과 상보적인 서열을 갖는 선형 플라스미드를 준비하는 것; 및

X-DNA, 선형 플라스미드 및 리가아제(ligase)를 혼합하여 가교 결합을 통해 플라스미드를 포함하는 DNA 하이드로겔을 형성하는 것을 포함하고, 상기 DNA 하이드로겔은 평균직경 50nm 내지 150nm의 나노입자이고, 내부에 X-DNA의 일 말단과 결합된 플라스미드를 포함하는 것인, RNA 간섭(RNAi) 시스템 제조 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 플라스미드는 DNA 하이드로겔 내부에서 X-DNA의 일 말단과 공유 결합된 것인, RNA 간섭(RNAi) 시스템 제조 방법.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 shRNA 및 siRNA 및 안티센스 RNA로 이루어진 군에서 선택된 것인, RNAi 시스템 제조방법.

청구항 18

제15항에 있어서,

상기 X-DNA와 플라스미드를 1,000 초과 내지 2,000 미만 : 1의 몰비로 혼합하는 것인, RNAi 시스템 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 DNA 하이드로겔을 포함하는 RNAi 시스템 관한 것으로, 구체적으로 RNA 간섭을 위한 새로운 플랫폼으로서 RNA 간섭 시스템 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] DNA는 주로 생물학적 시스템에서 유전물질로 간주되어 왔지만, 최근에는 나노기술 분야에서 블록을 쌓는 것, 약물 전달체 및 고효율 단백질 생산과 같은 다양한 용도에 핵산을 이용하려는 노력이 시도되고 있다[1,2,3,4,5]. 이러한 노력은 대부분 DNA 분자의 매력적인 화학적 및 물리적 특성에 기반한다. 예를 들어, DNA는 설계된 서열로 합성될 수 있으며, 나노 규모의 정확도로 매우 정교한 구조로 접히거나 조립될 수 있다. 이러한 정교한 구조 재현성을 이용하여 또한, 이러한 DNA 나노구조체(예: 나노 로봇[6])는 DNA 이중 나선 구조를 이루게 하는 원동력인 수소 결합의 열역학적 거동에 의해 자체 구조적 기능을 나타내며 무기화합물 소재의 정확한 조립을 위한 주형으로 사용되었다[7]. 구조적 이점 외에도 DNA 분자 및 그 조립 구조의 우수한 생체 적합성에 더하여 독특한 분자 인식 능력은 다양한 생물학적 용도로 DNA 물질의 사용을 가능하게 한다[31].

[0003] DNA 나노 구조 빌딩 블록을 조립하여 제조된 물질 중에서 DNA 하이드로겔(D 겔)은 진단[8,9], 플라즈몬[10], 약물전달 및 방출시스템[11,12]과 같이 여러 분야에 다양하게 활용되고 있으며 이러한 광범위한 응용성으로 인해 주목을 받고 있다. 또한, D 겔은 효율적인 단백질 생산 시스템에 사용될 수 있음을 보여주는 연구가 보고되었다[13].

[0004] RNA 간섭(RNAi)은 짧은 RNA 단편을 사용하여 유전자 발현을 억제하는 것으로, 유전자 치료 분야 등에서 널리 연구되고 있다[14,15,16]. 짧은 RNA 단편(siRNA라고도 함)은 생체 내에서 알고너트(Argonaute)를 비롯한 여러 단백질들과 RICS(RNA-induced silencing complex) 복합체를 형성함으로써 상보적 mRNA의 서열 특이적 분해 및 그 후의 번역 저해를 유도함으로써 유전자 발현을 저해하고 감소시킨다. 그러나 많은 RNA 단편이 개발되었지만, 주로 네이키드 상태의 짧은 RNA 단편은 RNA 라는 특성상 생물학적으로 불안정하여 생리적 조건에서 빠르게 분해되고, 이런 불안정함과 더불어 RNA는 골격에 많은 인산기를 갖고 있어 생리적 조건에서 음전하를 갖기 때문에 세포로 흡수 및 세포질로의 전이가 효과적이지 못하다. 따라서, 치료 목적으로 이들을 임상에 적용하는데 여전히 어려움이 있다[17]. 이러한 네이키드 짧은 RNA 단편을 이용한 RNAi의 약점을 극복하고, 이의 임상적 사용을 실현하기 위해, 짧은 RNA 단편이 효소 등에 의해 분해되는 것을 막아 생체 내 잔존 시간을 늘리고, 활성 형태의 짧은 RNA 단편을 효과적으로 표적 부위에 전달할 수 있는 전달 시스템의 개발이 중요하다[18,19].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 상기한 문제를 해결하기 위해서, 본 발명의 발명자는 RNAi를 이용한 표적 유전자 억제 효율을 개선하기 위한 연구를 지속하여, DNA 하이드로겔을 이용하는 경우 체내에서도 지속적이고 안정적으로 RNA를 생산할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 따라서, 상기한 종래 RNAi의 문제점들에 대한 해결 수단의 일 양태로서, 본 발명은 짧은 RNA 단편을 이용한 표적 유전자 억제를 위한 새로운 형태의 RNA 간섭(RNAi) 시스템을 제공한다.

[0007] 본 발명의 RNA 간섭(RNAi) 시스템은 DNA 하이드로겔; 및 표적 유전자에 대한 RNA 간섭(RNAi)을 나타내는 올리고뉴클레오티드를 생산할 수 있는 선형의 플라스미드를 포함하며, 여기서 상기 DNA 하이드로겔은 3개의 점착성 말단을 갖는 X-DNA를 단량체로 포함하며, 상기 X-DNA 단량체가 가교 결합된 것이고, 상기 플라스미드는 양 말단에 상기 DNA 하이드로겔을 이루고 있는 X-DNA 단량체의 점착성 말단과 상보적인 서열을 갖는 것이다.

[0008] 상기 플라스미드는 X-DNA의 3개의 점착성 말단 중 일 말단과 공유결합되어, DNA 하이드로겔 내부에 존재하는 것일 수 있다.

[0009] 상기 RNAi 시스템을 위한 DNA 하이드로겔은 평균직경 50nm 내지 150nm의 나노입자일 수 있다.

[0010] 상기 플라스미드는 RNA 간섭효과(RNAi)를 나타내는 올리고뉴클레오티드를 전사하는 발현부위(expression site); 및 X-DNA 분자와 결합하는 절단부위(cleavage site)를 포함하고 상기 발현부위와 절단부위 사이에 프로모터를 포함하는 것일 수 있다.

[0011] 상기 DNA 하이드로겔은 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 X-DNA를 포함하는 것일 수 있다.

[0012] 상기 X-DNA는 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 서열의 일 말단에 서열번호 5의 핵산서열을 더 포함할 수 있다.

[0013] 상기 올리고뉴클레오티드는 shRNA 및 siRNA 및 안티센스 RNA로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0014] 상기 RNAi 시스템은 X-DNA와 플라스미드를 1,000 초과 내지 2,000 미만 : 1의 몰비로 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 다른 양태로서, 본 발명은 DNA 하이드로겔; 및 표적 유전자에 대한 RNA 간섭(RNAi)을 나타내는 올리고뉴클레오티드를 생산할 수 있는 선형의 플라스미드를 포함하는 RNA 간섭(RNAi)용 조성물로, 상기 DNA 하이드로겔은 3개의 점착성 말단을 갖는 X-DNA를 단량체로 포함하며, 상기 X-DNA 단량체가 가교 결합된 것이고, 상기 플라스미드는 양 말단에 상기 DNA 하이드로겔의 점착성 말단과 상보적인 서열을 가지는 것인, RNA 간섭(RNAi)용 조성물을 제공한다.

[0016] 또 다른 양태로서, 본 발명은 RNA 간섭(RNAi) 시스템을 포함하는 유전자 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 3개의 점착성 말단을 갖는 X-DNA를 준비하는 것; 표적 유전자에 대한 RNA 간섭(RNAi)을 나타내는 올리고뉴클레오티드를 생산할 수 있고, 양 말단에 상기 DNA 하이드로겔의 점착성 말단과 상보적인 서열을 갖는 선형 플라스미드를 준비하는 것; 및 X-DNA, 선형 플라스미드 및 리가아제(ligase)를 혼합하여 가교 결합을 통해 플라스미드를 포함하는 DNA 하이드로겔을 형성하는 것을 포함하는 RNA 간섭(RNAi) 시스템 제조 방법을 제공한다.

[0018] 상기 DNA 하이드로겔은 평균직경 50nm 내지 150nm의 나노입자이고, 내부에 X-DNA의 일 말단과 공유 결합된 플라스미드를 포함할 수 있다.

[0019] 상기 올리고뉴클레오티드는 shRNA 및 siRNA 및 안티센스 RNA로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0020] 상기 X-DNA와 플라스미드를 1,000 초과 내지 2,000 미만 : 1의 몰비로 혼합하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 DNA 하이드로겔을 이용한 RNAi 시스템 및 이를 포함하는 조성물은 종래의 RNAi 물질 전달 방법과 비교해서 세포 내 흡수 효율이 높고, 전달된 개체 내 안정성이 높아 RNAi 효과를 갖는 물질의 생산 및 이의 표적 유전 발현 저해 효과가 우수하며, 생체 물질 만을 이용하므로, 세포 내 독성 문제를 일으키지 않아, 유전자 치료를 위한 임상에 효과적으로 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a 및 1b는 I-gel의 RNAi 메커니즘의 그림이다: 도 1a는 살아있는 세포에서 I-gel 메카니즘을 설명하는 개략도이고, 도 1b는 세포 용해물 분석에서 I-gel 메커니즘을 설명하는 개략도이다.

도 2는 I-gel의 최적화 및 특성을 확인한 것으로, 도 2a, 2b 및 2d에서의 모든 실험에서 57ng의 I-plasmid가 사

용되었고, 이 데이터는 HeLa 세포 용해 시스템으로 *in vitro* 전사/번역에 의해 얻어졌으며, 오류 막대는 세 번의 실험의 표준 편차를 나타낸다:

도2a는 각 조건(DNA 없음, GFP 발현 단독, 스크램블 shRNA 1eq, 스크램블 shRNA 100eq, 스크램블 플라스미드 혼합물, 스크램블 플라스미드 겔, I-plasmid 및 I-gel)에서의 GFP의 발현을 확인한 결과이고, 도 2b는 2a 각 그래프의 피크점에서의 형광 강도 및 각 실험군의 형광 이미지이다.

도 2c는 I-plasmid 및 I-gel의 첨가량이 증가하는 경우 단백질 발현 억제 효과를 보여주는 그래프이다(*$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.005$ 및 $^{***}P<0.001$, t test에 의해 분석된 상대 FL 강도. 별표는 I-gel과 I-plasmid 사이에 통계적으로 유의한 차이를 나타냄).

도 2d는 I-gel에서 X-DNA분자와 I-plasmid의 함량비에 따른 단백질 발현 억제효과를 확인한 결과이다.

도 2e는 본 발명의 일 실시예에 따라 I-plasmid 양의 증가에 따른 GFP 발현 억제 효과를 확인한 정규화된 FL 스펙트럼이다.

도 2f는 본 발명의 일 실시예에 따라 I-plasmid 양 (0, 150, 300, 500, 1000, 및 2000 ng)의 증가에 따른 GFP 발현 억제효과를 확인한 결과이다.

도 2g는 본 발명의 일 실시예에 따라 다양한 조건에서 I-gel의 전기영동 사진이다: DNA는 1x 겔-레드 염료로 염색된 2% 아가로스 겔에서 분리되었다. 겔상의 시료는 레인 M: DNA 마커(25 ~ 2,000 bps); 레인 1: 36 염기 단일 가닥 DNA (X-DNA를 구성하는 하나의 요소); 레인 2: 3개의 점착성 말단 X-DNA; 레인 3~9: 1,000, 1,500, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000 나노 스케일 I-gel의 I-plasmid 대비 X-DNA 비율; 레인 10: I-plasmid.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 다양한 조건에서 RNA 발현을 비교한 것으로, 오차 막대는 3회 반복 값의 표준 편차를 나타낸다:

도 3a 및 3d는 세포 용해물에서 추출한 RNA 시료에서 shRNA(3a) 및 GFP mRNA(3d) 검출을 위한 아가로스겔 전기영동에 따른 RT-PCR 산물을 보여준다:

도 3a: 레인 M: 분자량 표준 마커; 레인 1: 표준 shRNA, 레인 2: I-plasmid로부터 발현된 shRNA, 레인 3: I-gel로부터 발현된 shRNA.

도 3d: 각 시료가 존재하는 경우 세포 용해물에서 전사/번역되어 생성된 GFP mRNA로부터 각각 역전사된 cDNA, 각 시료는 레인 1: GFP 플라스미드 단독; 레인 2: GFP 플라스미드+스크램블 shRNA; 레인 3: GFP 플라스미드+스크램블 플라스미드 혼합물; 레인 4: GFP 플라스미드+스크램블 플라스미드 겔; 레인 5: GFP 플라스미드+I-plasmid; 및 레인 6: GFP 플라스미드+I-gel.

도 3b 및 도 3e는 각 조건에서 주형 플라스미드로부터 발현된 RNA 카피 수를 확인 한 것이다(†I-gel의 주형으로부터 RNA 전사율을 고려해서 스크램블 shRNA의 농도를 I-plasmid 대비 102배(fold) 증가시킴)

도 3b는 주형 플라스미드 당 shRNA의 수를 보여주는 그래프($^{***}P<0.001$, t test에 의해 분석됨, 별표는 I-gel과 I-plasmid 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있음을 의미함).

도 3e는 주형 플라스미드 당 GFP mRNA의 발현 수를 보여주는 그래프($^{***}P<0.001$, t test에 의해 분석됨, 별표는 I-gel과 선으로 표시된 각 조건들 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있음을 의미함).

도 3c 및 3f는 I-plasmid 양에 따른(5.7ng, 57ng 또는 114ng) 상대적인 shRNA 발현값(3c) 또는 상대적인 GFP mRNA 발현값(3f)을 보여주는 그래프이다. 점선은 상자의 확대된 이미지를 나타낸다($^{***}P<0.001$, t test에 의해 분석됨, 별표는 I-gel과 I-plasmid 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있음을 의미함)

도 4a는 본 발명의 일 실시예의 플라스미드의 형태에 따른 세포 내 유입(uptake) 정도를 확인한 결과로, 왼쪽에서 두 번째는 Cy5로 표지된 I-plasmid; 세 번째는 리포펙타민과 복합체를 이룬 Cy5로 표지 된 I-plasmid; 네 번째는 Cy5로 표지 된 shRNA; 다섯 번째는 리포펙타민과 복합체를 이룬 Cy5로 표지된 shRNA; 그리고 마지막은 Cy5로 표지된 I-gel을 나타내며, 스케일 바는 20㎛이다.

도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 각 실험군들의 비-처리된 MDCK-GFP 세포(세포 단독군)에 대한 Cy5의 상대적인 픽셀 강도를 확인한 그래프이다. 각 실험군은 I-plasmid, 리포펙타민-I-plasmid 복합체(Lipo.+I-plasmid)

또는 I-gel로 처리된 세포를 의미하며, 오차 막대는 3회 반복 값의 표준 편차를 나타낸다.

도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른 각 실험군들의 비-처리된 MDCK-GFP 세포(세포 단독군)에 대한 GFP 형광 현미경 이미지의 상대적인 픽셀 강도를 확인한 그래프이다. 각 실험군은 I-plasmid, 리포펙타민-I-plasmid 복합체(Lipo.+I-plasmid) 또는 I-gel로 처리된 세포를 의미하며, 오차 막대는 3회 반복 값의 표준 편차를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 수준에서 I-gel의 유전자 침묵 효과를 보여준다:

도 5a는 I-plasmid, I-plasmid-리포펙타민 복합체 및 I-gel과 공동-인큐베이션된 MDCK-GFP-발현(MDCK-GFP) 세포의 형광 현미경 이미지로, 스케일 바는 20㎛이다.

도 5b는 RNA 간섭 효과의 양성 대조군으로서 shRNA 단독 실험군 및 리포펙타민-shRNA 복합체 실험군에서 형광 현미경 이미지로, 스케일 바는 50㎛이다.

도 5c는 RNA 간섭 효과의 음성 대조군으로서 스크램블 shRNA 단독 실험군, 스크램블 플라스미드 혼합물 단독 실험군, 리포펙타민-스크램블 플라스미드 복합체 실험군 및 스크램블 플라스미드 겔 실험군의 형광 현미경 이미지로, 스케일 바는 50㎛이다.

도 5d는 무-혈청 배지에서 시료/중합효소 복합체의 처리 후 GFP-발현 세포주(MDCK-GFP 세포)의 형광-활성 세포 분류기 분석 결과를 보여준다. 숫자는 막대로 표시된 것처럼 앞에 나오는 게이트 영역 내에서 정렬된 GFP-과발현 세포의 비율을 의미한다.

도 5e 및 도 5f는 다양한 조건에서 인큐베이션된 GFP-발현 MDCK 세포의 GFP mRNA의 상대량(5e) 및 shRNA의 상대량(5f)을 의미한다(?농도는 I-gel의 주형에서 RNA 전사율을 고려하여 I-plasmid 대비 102 배 높은 농도를 표시)(5e: $^{*}P<0.05$, one-away ANOVA, 다음에 Holm-Bonferroni multiple comparison after post-test로 분석됨, 별표는 각 조건 실험군과 세포 단독군 사이에 통계적으로 유의미한 차이가 있음을 의미) (5f: $^{*}P<0.05$ 및 $^{**}P<0.005$, t test로 분석. 별표는 각 조건과 I-gel 간의 통계적으로 유의 한 차이를 나타냄을 의미). 여기서 오차 막대는 세 번(5f는 6번)의 반복에서 표준 편차를 나타낸다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 GFP mRNA의 상대적인 양의 분산형 도표이다 (shRNA 조건은 I-gel의 주형에서 RNA로의 전사율을 고려하여 농도 조건이 I-plasmid 대비 102배(fold) 향상됨, $^{*}P<0.05$, 통계 분석은 one-away ANOVA 를 통해 분석한 뒤에 Holm-Bonferroni multiple comparison after post-test로 분석됨, 별표는 각 조건 실험군과 세포 단독군 사이에 통계적으로 유의미한 차이가 있음을 의미).

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 shRNA 발현 플라스미드(I-plasmid) 지도 및 예상되는 shRNA 전사물을 보여준다: 설계된 서열은 BbsI와 BamHI 사이에 삽입된다. 상기 플라스미드는 증폭을 위해 최대-프렙(maxi-prepped)되고, BamHI 제한 효소에 의해 선형화된다. 상기 제한효소 자리는 각각의 X-DNA 및 플라스미드 자체와 상보적이며, 앞뒤역순상동 의(palindromic) 서열이다. X-DNA와 선형화된 플라스미드는 점착성 말단(sticky-end)에 의해 연결될 수 있고, I-gel은 리가아제(ligase) 효소 반응을 통한 점착성 말단의 공유 결합으로 합성될 수 있다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 RT-PCR 산물의 용융점을 측정한 결과를 나타내는 것으로, 표준 shRNA(standard shRNA, 파란색), 자유 I-plasmid(I-plasmid, 노란색), 및 I-gel(빨강)을 나타낸다. 여기서 오차 막대는 세 번의 반복에서 표준 편차를 나타낸다.

도 9a, 9b, 9c 및 9d는 본 발명의 일 실시예에 따른 각 시료의 CT 및 표준곡선을 나타내는 그래프이다. GFP mRNA(9a) 및 shRNA(9c)의 qPCR 곡선 및 추출된 CT 값. GFP mRNA(9b) 및 shRNA(9d)에 대한 표준 곡선. 여기서 오차 막대는 세 번의 반복에서 표준 편차를 나타낸다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 I-gel과 이의 구성의 아가로스 겔 전기영동 사진으로, DNA는 1x 겔-레드 염료로 염색된 2% 아가로스 겔에 의해 분리되었다: 레인 M: DNA 마커(25~2,000 bps); 레인 1: 36염기 단일 가닥 DNA(X-DNA를 이루는 하나의 구성 가닥); 레인 2: 3개의 점착성-말단을 갖는 X-DNA; 레인 3: I-gel; 레인 4: 블랭크-겔(Blank-gel, I-plasmid 없이 X-DNA끼리 가교결합된 구조체); 레인 5: shRNA를 발현하는 플라스미드(I-plasmid).

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 무-세포 시스템의 DNA 단편을 보여주는 아가로스 겔 전기영동 사진이다: DNA는 1x 겔-레드 염료로 염색된 0.7% 아가로스 겔에서 분리되었다, 레인 M: DNA 마커 (0.5 ~ 10.2kbp DNA);

레인 1: 36염기 단일 가닥 DNA(X-DNA를 이루는 하나의 구성 가닥); 레인 2: 3개의 점착성 말단(sticky end)을 갖는 X-DNA; 레인 3: I-gel(X-DNA 와 I-plasmid가 가교결합으로 연결된 구조체); 레인 4: 블랭크-겔(blank-gel)); 레인 5: pcDNA3.1(+) IRES GFP 플라스미드(GFP 발현 플라스미드)(원형, 6,777bp); 레인 6: I-plasmid(선형).

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 I-gel의 SEM 사진으로, X-DNA와 플라스미드의 몰비가 1,500:1일 때 (a, b) 벌크 스케일의 I-gel의 SEM 사진 및 (c, d) 나노 스케일의 I-gel의 SEM 사진. 스케일 바: a) 20 μm, b) 10 μm, c) 100nm 및 d) 10nm.

도 13a, 13b 및 도 13c는 I-plasmid 및 I-gel의 안정성(Stability)을 확인한 전기영동 결과이다. I-gel(13a) 및 I-plasmid(13b)에는 37℃에서 DNase I가 처리되었고 각 레인은 처리시간을 나타낸다: 레인 1: 0시간, 레인 2: 1시간, 레인 3: 4시간, 레인 4: 12시간 및 레인 5: 24시간. 13c는 시간에 따른 I-gel 및 자유 I-plasmid로부터 전사된 shRNA의 양의 변화를 측정한 결과이다. 여기서 오차 막대는 세 번의 반복에서 표준 편차를 나타낸다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따라, I-gel과 블랭크-겔(Blank-gel)의 유체 역학적인 크기 분포를 확인한 결과로, 동적 광 산란법(DLS)에 의하여 결정된 I-gel 및 블랭크-겔의 평균 유체 역학 직경을 나타내며, 각 값은 3번의 독립적인 실험을 대표하는 평균±표준편차를 나타낸다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라, I-gel과 I-plasmid의 전사 효율을 비교한 그래프로, 시간에 따라 shRNA 생산을 모니터링한 결과이다. 여기서 오차 막대는 세 번의 반복에서 표준 편차를 나타낸다.

도 16a 및 16b는 본 발명의 일 실시예에 따른 1, 2, 4, 및 6시간의 반응 시간의 I-plasmid 및 I-gel의 FL 강도비(ratio)를 보여준다. 16a는 GFP 플라스미드 단독 처리군, I-plasmid 실험군 또는 I-gel 실험군의 각 처리 시간에서 정규화된 FL 강도를 나타내며, 16b는 각 시점에서의 I-plasmid와 I-gel의 FL 강도비를 나타낸다. 여기서 오차 막대는 세 번의 반복에서 표준 편차를 나타낸다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 각 반응 시간 조건에서 발현된 GFP의 상대적인 FL 스펙트럼 및 정규화된 강도 값을 확인한 결과이다. 상기 GFP의 FL 강도 변화는 I-plasmid 또는 I-gel을 첨가한 후 1, 2, 4, 및 6시간 동안 반응시킨 후 측정되었다. 여기서 오차 막대는 세 번의 반복에서 표준 편차를 나타낸다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 각 시료에서 GFP 플라스미드(플라스미드 단독 처리군)에 대한 I-plasmid, X-DNA와 I-plasmid 혼합물, 블랭크-겔과 I-plasmid 혼합물, I-gel의 상대적인 GFP FL 강도 값을 나타내며, 여기서 오차 막대는 세 번의 반복에서 표준 편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 하기 실시예 및 도면을 참고하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0025] 본 발명의 일 양태는 DNA 하이드로겔; 및 표적 유전자에 대한 RNA 간섭(RNAi)을 나타내는 올리고뉴클레오티드를 생산할 수 있는 선형의 플라스미드를 포함하는 RNA 간섭(RNAi) 시스템에 관한 것이다.

[0026] 본 발명에서 RNA 간섭(RNAi) 시스템은 숙주 세포 내에서 표적 유전자의 전사 또는 발현을 억제할 수 있는 RNAi 물질(예: shRNA, siRNA 등)을 발현하는 시스템을 의미하는 것으로, RNA 간섭(RNAi) 발현 시스템 또는 RNA 간섭(RNAi) 물질 발현 시스템으로도 지칭할 수 있다.

[0027] 일반적으로 표적 유전자의 전사 또는 발현을 억제하기 위한 RNAi 물질들은 네이키드(naked) 상태로 투여되거나, 전달체(vector)와 함께 전달되는데, 이 경우 숙주 세포 내로 전달되는 효율이 낮고, 체내 안정성이 낮아 RNA 간섭 효율이 떨어지는 문제가 있으나, 본 발명의 RNA 간섭 시스템은 DNA 하이드로겔과 RNAi 물질을 생산하는 플라스미드를 함께 포함하여 종래의 RNA 간섭 시스템보다 전달 및 유전자 억제효율이 우수한 RNA 간섭 효과를 제공할 수 있다.

[0028] 본 발명의 "DNA 하이드로겔"은 DNA 분자가 결합되어 3차원 구조의 겔 형태를 이루고 있는 것을 의미하는 것으로, DNA 분자를 단량체로 리가아제(ligase)에 의해서 각 말단을 가교결합 형성할 수 있다. 본 발명의 DNA 하이드로겔은 생체 적합성이 매우 뛰어날 뿐 아니라, 세포독성을 나타내지 않으므로, 임상적 사용에 매우 유리하다.

[0029] 특히, 본 발명의 DNA 하이드로겔은 3개의 점착성 말단을 갖는 X 분지형의 DNA(X-DNA)를 단량체로 포함하며, 상기 X-DNA 단량체가 가교 결합된 것이다. 본 발명의 X-DNA를 단량체로 이용하는 경우, 다른 형태의 분지형 DNA

분자(T-DNA 또는 Y-DNA)보다 안정성이 우수한 하이드로겔을 형성할 수 있어, RNAi 시스템의 효율을 향상시킬 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어 "점착성 말단" 핵산 분자의 말단 서열과 다른 말단 서열이 서로 상보적이면서 회문(palindrome) 구조를 띄는 서열을 의미한다. 이는 정방향으로 상보적이면서, 역방향에서도 상보적인 서열을 의미하는 것으로, 본 발명의 기술분야에서 사용되는 회문성 서열을 인식하는 제한효소에 의한 인식 서열 또는 인위적으로 설계된 서열을 모두 포함할 수 있다. 일 예로 GGATCC, AGATCT, GAATT 또는 GACGTC 서열이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 RNAi 시스템에서 X형의 분지 DNA이 점착성 말단을 포함하고, 플라스미드의 양 말단이 이와 상보적인 서열을 포함함으로써, DNA 나노겔을 형성하면서 내부에 플라스미드를 내포할 수 있다.

[0031] 본 발명의 DNA 하이드로겔은 X형의 분지형 DNA 분자의 가교결합에 의하여 구성되며, 수십 내지 수백 나노미터일 수 있다. 따라서, 본 발명의 DNA 하이드로겔은 나노 사이즈의 겔을 형성하므로 나노겔 또는 나노입자로도 지칭될 수 있다. 생체를 이루는 분자로만 구성되므로, 생체 적합성이 매우 우수하고, 독성을 나타내지 않아 의료용 치료제 등으로 활용하는데 유리하다.

[0032] 본 발명의 DNA 하이드로겔은 플라스미드를 포함하는 상태에서 평균직경 200nm 미만인 것 일 수 있다. 이 경우, 세포의 내부로 유입(uptake)되는 효율이 우수하여, RNA 간섭 시스템의 체내 유입 효율을 높일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에서는 50nm 내지 150nm의 DNA 하이드로겔이 세포 내로 잘 전달될 수 있음을 확인하였다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에서는 나노 크기의 RNAi 시스템(본 발명의 일 실시예에서는 X-DNA와 가교결합된 플라스미드를 포함하는 DNA 하이드로겔을 "I-gel"로 지칭함)을 제조하기 위해, X-DNA 및 X-DNA의 점착성 말단에 상보적인 말단 서열을 함유하는 플라스미드("I-plasmid"로 지칭함)의 혼합물을 T4 리가아제를 이용해서 가교 결합시켰다. 제조된 I-gel과 I-gel 형성에 필요한 성분은 아가로스 겔 전기 영동 분석(도 10)을 통해 확인하였고, I-gel의 크기는 동적 광산란 측정을 사용하여 평가하였다 (도 14). 또한, I-gel의 RNAi 효율은 녹색 형광 단백질(GFP) 발현 분석 및 RNA 생산 정량화를 통해 확인하였을 때, 네이키드 상태의 플라스미드(일 실시예에서는 "자유 I-plasmid"로도 지칭함)와 비교해서 8배 더 높은 전사효율을 갖는 것을 확인하였다.

[0035] 본 발명의 DNA 하이드로겔은 3개의 점착성 말단을 갖는 X-DNA와 함께, 점착성 말단을 갖지 않는 X-DNA를 더 포함할 수 있다. 일 예로, 3개의 점착성 말단을 갖는 X-DNA 3종 및 점착성 말단을 갖지 않는 X-DNA 1종을 포함하는 DNA 하이드로겔 일 수 있다.

[0036] 본 발명의 DNA 하이드로겔의 크기 및 다공성은 단량체로 포함되는 X-DNA 빌딩 블록의 초기 농도, 플라스미드와 X-DNA 단량체의 비율 등을 통해서 조절될 수 있다. 본 발명의 DNA 하이드로겔은 다공성 구조를 가지며, X-DNA 분자 골격의 인산기에 의해 음전하를 가질 수 있다.

[0037] 상기 본 발명의 X-DNA는 4개의 말단 중 3개의 말단에 점착성 말단서열을 포함할 수 있다. 상기 점착성 말단 서열은 X-DNA 단량체들이 결합되어 3차원의 하이드로겔을 형성할 수 있게 해주며, 플라스미드의 일 말단과 각각 연결되어 플라스미드가 DNA 하이드로겔 내부에 혼입된 형태로 존재하면서 효율적으로 RNAi 물질을 생산할 수 있도록 해준다. 또한, 상기 X-DNA는 앞뒤역순상동서열(palindromic), 즉 회문 서열을 가질 수 있다.

[0038] 본 발명의 RNA 간섭 시스템에서 X-DNA와 결합된 플라스미드가 DNA 하이드로겔 내부에 흡입된 형태 존재함으로써, 플라스미드의 국지적 농도를 높여 RNA 중합효소가 하나의 플라스미드에서 다른 플라스미드로 옮겨가는 이동을 용이하게 하고, 중합 환경을 더욱 효과적으로 형성하여 RNAi 물질의 생산률을 현저하게 높일 수 있다.

[0039] 본 발명의 X-DNA 분자는 본 발명이 속하는 기술분야에서 공지된 방법에 따라 골격 서열을 합성하여 상용할 수 있고, 상업적으로 판매되는 것을 이용할 수 있다. 이는 DNA 하이드로겔을 형성하는 단량체로 본 발명에 포함되는 것으로, 하이드로겔의 안정성 등의 측면에서 X형태의 분지를 갖는 DNA 분자를 이용하는 것에 특징이 있을 뿐, 특정 서열에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에서는 RNAi 시스템을 위해 서열번호 1 내지 4의 X-DNA 분자를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 기술적 특징은 X-DNA 분자의 3개의 말단에 점착성 서열을 위치시켜 가교결합을 통해서 DNA 하이드로겔을 형성하는데 있을 뿐, 상기 점착성 말단 서열에 의하여 발명의 효과가 상이해지는 것은 아니다. 따라서, 본 발명의 기술 분야에서 공지된 서열을 이용할 수 있고, 일 예로 서열번호 5의 염기서열 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, X-DNA 분자 및 원형 플라스미드를 선형으로 절단할 때 사용하는 공지된 제한효소의 자리(절

단위치)의 서열을 고려해서 본 발명에 적용될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 "RNA 간섭효과(RNAi)를 나타내는 올리고뉴클레오티드" 또는 "RNAi 물질"은 표적 유전자의 전사 또는 발현을 저해할 수 있는 물질을 의미하는 것으로, shRNA 및 siRNA 및 안티센스 RNA로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0043] 본 발명에서 "siRNA(small interfering RNA)"란, RNA 간섭 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 약 20 뉴클레오티드 크기의 작은 핵산 분자를 의미하며, shRNA가 세포 내에 도입되면, 다이서(dicer) 단백질에 의해 인지되어 상기 바이오마커 유전자를 분해하여, siRNA로 변환시키며 이것이 결국 유전자의 발현을 저해하게 된다.

[0044] 본 발명의 용어 "shRNA(short hairpin RNA)"란, siRNA 타겟 서열의 센스 및 안티센스 서열이 5-9개의 염기로 구성된 루프(loop)를 사이에 두고 위치한 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA)를 의미한다. 상기 shRNA는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 RNA 중합효소 Ⅲ의 프로모터로부터 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase Ⅲ)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도하는데 사용될 수 있다. 그러나 바이러스성 벡터는 숙주의 체내에서 면역성 반응을 일으킬 수 있고, 체내 안정성이 낮아 표적 유전자를 저해할 수 있을 정도로 충분한 양의 shRNA의 합성에 어려움이 있었다.

[0045] 본 발명의 DNA 하이드로겔의 내부에 결합된 형태의 RNAi 시스템은 이러한 벡터 시스템의 독성 및 부작용을 해결할 수 있고, 플라스미드의 RNAi 물질 생산 효율을 높여 RNA 간섭 효율을 현저하게 높일 수 있다는 점에서 기술적 특징을 갖는다. 따라서, 상기 올리고뉴클레오티드는 shRNA 일 수 있다.

[0046] 본 발명의 플라스미드는 RNAi 물질을 코딩하는 것으로, RNA 간섭효과(RNAi)를 나타내는 올리고뉴클레오티드를 전사하는 발현부위(expression site); 및 X-DNA 분자와 결합하는 절단부위(cleavage site)를 포함한다. 또한, 본 발명의 플라스미드는 하나 이상의 프로모터 서열을 더 포함할 수 있으며, 상기 프로모터 서열을 절단부위 가까이에 위치시켜 중합효소의 접근을 용이하게 하여 RNAi 물질 생산효율을 높일 수 있다.

[0047] 본 발명의 플라스미드는 상업적으로 판매되는 것을 이용할 수 있고, 본 발명 기술분야의 공지된 방법에 따라서 제조하여 사용할 수 있다. 상기 발현부위는 표적 유전자의 발현을 억제하기 위해 설계되어 플라스미드 구조체에 삽입될 수 있고, 이는 타겟 유전자에 따라 달리 설계될 수 있어 특정 서열에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 일 실시예인 도 7에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 설계 시, 겔 네트워크를 형성하기 위해 X-DNA에 가교결합되는 절단 부위(cleavage site) 가까이에 프로모터를 위치시켰다. 이중 가닥 DNA(dsDNA)의 지속 기간을 고려하면, 프로모터 영역은 신장될 수 있고, RNA 중합효소에 쉽게 노출될 수 있어, 중합효소의 접근을 용이하게 해 전사가 빨리 될 수 있도록 한다.

[0049] 상기 플라스미드는 선형이며, 일 말단 또는 양 말단에 상기 DNA 하이드로겔의 단량체인 X-DNA의 점착성 말단과 상보적인 서열을 갖는다. 상기 점착성 말단과 상보적인 서열을 갖는 부위는 제한효소에 의한 절단부위에 포함될 수 있다. 이를 통해서, 리가아제에 의해 X-DNA의 일 말단과 혼성화에 의한 가교결합을 형성한다. 상기 플라미드는 DNA 하이드로겔의 내부에 포함된 형태로 하이드로겔을 구성하며, DNA 하이드로겔이 효소 등으로부터 플라스미드를 보호함으로써 RNAi 물질을 장시간 동안 효과적으로 생산할 수 있다. 상기 점착성 말단과 상보적인 서열은 점착성 말단의 가교결합을 통해 X-DNA 단량체와 가교결합 되기 위한 것이므로, X-DNA 단량체의 각 점착성 서열에 따라 다르게 설계될 수 있으므로, 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 5의 서열에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 또한, 국소부위에서 플라스미드가 더 높은 농도로 존재하게 함으로써 RNAi 효율을 개선시킬 수 있다. I-gel에 함유된 플라스미드의 농도는 세포 용해물 또는 세포질에 확산된 자유 I-plasmid의 동일한 양과 비교해서 10배(fold) 더 치밀하다. 높은 플라스미드 농도는 하나의 플라스미드에서 다른 플라스미드로 RNA 중합효소가 이동하는 것을 더 쉽게 해주어 더 전사 효율을 더 높일 수 있다. 이러한 국소적으로 높은 플라스미드의 농도에 의한 효과는 주변부(periphery)에 점착성 말단을 갖는 DNA 하이드로겔(Dgel)과 상기 Dgel의 점착성 말단에 상보적인 말단 서열을 함유한 선형 플라스미드의 혼합물을 이용한 대조군 발현 실험을 통해서 확인되었다. 이 경우, 겔과 플라스미드 사이에 공유 가교-결합은 없으나 혼성화 유도된 플라스미드가 겔의 주변부로 모이게되어 높은 국소적 농도와 이에 따른 높은 RNAi 효율을 갖게 된다(도 18).

[0051] 본 발명의 RNAi 시스템은 X-DNA와 플라스미드를 100 내지 10,000 : 1; 또는 500 내지 8,000 : 1의 몰비로 포함

할 수 있다. 상기 비율보다 X-DNA의 비율이 낮아지면 DNA 하이드로겔 형성에 어려움이 있고, X-DNA의 비율이 너무 높아지면 RNAi 물질 생성률이 낮아질 수 있다. 바람직한 예로, X-DNA와 플라스미드를 1,000 초과 내지 2,000 미만 : 1의 몰비로 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명의 일 실시예에서, 플라스미드의 농도 17.5 nM을 1로 하여 X-DNA 및 플라스미드를 이용한 실험을 수행하였고, 모든 조건에서도 동일하게 적용하여 실험을 수행하였다.

[0053] 본 발명의 일 실시예에서 RNA 간섭 시스템은 X-DNA와 플라스미드를 1,500 : 1의 몰비로 포함하는 경우, 다른 경우보다 현저히 우수한 GFP 발현 억제효과를 얻을 수 있음을 확인하였다 (도 2f)

[0055] 상기한 바와 같이, 현저하게 증가된 RNAi 효율은 RNA 간섭 시스템의 겔 네트워크에서의 플라스미드 안정성, 겔 상의 플라스미드의 높은 전사 효율, 신장된 프로모터 영역, 겔 크기 및 플라스미드의 보다 높은 국소적 농도에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따라 DNA 하이드로겔의 네트워크에서의 플라스미드 안정성은 DNase-함유 용액에서 자유 I-plasmid와 I-gel의 변성 저항성을 비교하고 분해반응 후 I-gel 및 자유 I-plasmid의 전사 효율 측정에 의해 확인되었다. 도 13a 내지 도 13c 및 표 2에 나타낸 바와 같이, 자유 I-plasmid의 경우, 24시간 동안 현저히 많은 수가 변성되었고, 전사 효율이 63%나 감소하였다. 대조적으로, I-gel의 경우, DNase와 24시간 이큐베이션 한 후에도 ~95% 정도가 분해처리되지 않은 I-gel과 비슷한 전사 효율을 유지하였다 (ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석). I-gel의 안정성 이외에도, I-gel에 포함된 플라스미드의 전사효율은 자유 I-plasmid 보다 높았다(도 15). 시간에 따른 자유 I-plasmid와 I-gel의 전사 효율을 비교해보면, I-gel에서는 120분 까지 shRNA 생산이 증가하였으나, 자유 I-plasmid는 반응 초기부터 시간이 흐를수록 shRNA의 생산량이 계속 감소함을 실험적으로 확인하였다.

[0056] 자유 I-plasmid 및 I-gel의 이러한 전사 프로파일은 플라스미드의 안정성과 상관 관계가 있다. 전사 및 간섭 효율 사이의 상관 관계는 자유 I-plasmid 및 I-gel(57ng의 I-plasmid 포함)의 고정된 농도에서 시간에 따른 용해물 용액 중의 GFP 발현량을 통해서 확인하였다. I-gel과 I-plasmid 사이의 GFP 발현의 간섭 효율비는 세포 용해물에서 반응 2시간 만에 최대값에 도달하였고, 시간이 지남에 따라 따라 감소하였다. 이러한 결과는 I-gel에 의한 전사가 매우 빨라서 반응이 2시간 이내에 완료되었고, 자유 I-plasmid의 경우 6시간 후에도 계속 전사가 이루어지고 있음을 의미한다(도 16a, 16b 및 도 17). 세포 수준의 실험에서도 I-gel의 안정성은 간섭 효과를 향상시키는데 중요한 요소이다. 기 보고된 바와 같이, DNA 하이드로겔(Dgel)의 네트워크 구조는 핵산 분해 효소에 대해 훨씬 향상된 안정성을 보였고 더 긴 시간 동안 겔 내의 플라스미드가 손상되지 않도록 유지시켜 세포에서 더 많은 shRNA를 전사할 수 있게 해준다. 또한, 플라스미드와 혼성되지 않는 X-DNA의 존재 하에서 I-plasmid의 간섭 효과를 모니터한 결과, 용해물 용액에 X-DNA를 간단하게 첨가하더라도 간섭 효과가 현저하게 향상되었다 (자유 I-plasmid 만 첨가한 경우와 비교해서, 형광강도 33.6배(fold) 감소, 도 18). 이러한 결과는 X-DNA가 핵산분해효소[28]로부터 플라스미드를 보호하는 것을 의미한다. 또한, 본 발명의 RNA 간섭 시스템은 플랫폼인 I-gel의 경우 플라스미드 주형 하나 당 131카피의 shRNA를 생산하였음을 실험적으로 확인하였는바, 이는 전-합성된 shRNA의 직접적인 전달과 비교해서 shRNA 양의 증폭효과를 갖는다고 할 수 있다.

[0057] 이러한 이점에 따라, 본 발명의 RNA 간섭 시스템은 RNAi를 이용한 표적 유전자 저해 및 침묵을 위한 RNAi 플랫폼으로 제공될 수 있다.

[0058] 또한, 상기 RNA 간섭 시스템은 RNAi를 위한 조성물로서 이용될 수 있어, 이러한 측면에서 본 발명은 본 발명은 DNA 하이드로겔; 및 표적 유전자에 대한 RNA 간섭(RNAi)을 나타내는 올리고뉴클레오티드를 생산할 수 있는 선형의 플라스미드를 포함하고, 상기 DNA 하이드로겔은 3개의 점착성 말단을 갖는 X-DNA를 단량체로 포함하며, 상기 X-DNA 단량체가 가교 결합된 것이고, 상기 플라스미드는 일 말단에 상기 DNA 하이드로겔의 점착성 말단과 상보적인 서열을 가지는 것인, RNA 간섭(RNAi)용 조성물을 제공한다.

[0059] RNA 간섭(RNAi)용 조성물은 그 구성 및 효과를 상기한 RNA 간섭 시스템과 같이하는바, 반복된 기재를 피하기 위해 상기 RNA 간섭 시스템에 대한 기재를 본 발명에 준용한다.

[0060] 본 발명의 RNA 간섭 시스템은 RNAi를 이용한 유전자 발현 저해 또는 이에 따른 유전자 치료 등에서 효과적으로 사용될 수 있다. 이러한 측면에서 본 발명은 또 다른 양태로서 RNA 간섭(RNAi) 시스템을 포함하는 유전자 치료용 조성물; 또는 RNA 간섭(RNAi) 시스템을 포함하는 유전자 발현 저해용 조성물에 관한 것이다.

[0061] 본 발명의 조성물은 유전자 치료 또는 발현 저해를 위해 본 발명의 RNA 간섭 시스템을 체내에 투여하는데 필요한 약제학적으로 허용된 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0062] 본 명세서에서 용어 "치료"는 대상이 되는 질병 또는 질환의 억제; 및 경감을 의미한다. 따라서, 본 명세서에서 용어 "치료학적 유효량"은 상기 약리학적 효과를 달성하는 데 충분한 양을 의미한다. 본 발명에서는 RNA 간섭 시스템에 포함된 플라스미드에서 생산되는 올리고뉴클레오티드(RNAi 물질)가 표적 유전자의 발현 억제 및 침묵을 통해서 질병을 치료할 수 있는 것이므로, 개체의 체 내에서 치료학적 유효량 수준의 올리고뉴크레오티드를 생산할 수 있는 정도의 RNA 간섭 시스템을 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제화에서 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여될 수 있고, 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다. 상기 투여방법은 제제의 형태, 유효성분의 양, 대상질병의 종류 등에 따라서 다르게 적용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0066] 본 발명의 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명의 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 화학 요법 또는 방사 요법과 함께 병용 투여되어 이용될 수도 있다.

[0069] 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 3개의 점착성 말단을 갖는 X-DNA를 준비하는 것; 표적 유전자에 대한 RNA 간섭(RNAi)을 나타내는 올리고뉴클레오티드를 생산할 수 있고, 일 말단에 상기 DNA 하이드로겔의 점착성 말단과 상보적인 서열을 갖는 선형 플라스미드를 준비하는 것; 및 X-DNA, 선형 플라스미드 및 리가아제(ligase)를 혼합하여 가교 결합을 통해 플라스미드를 포함하는 DNA 하이드로겔을 형성하는 것을 포함하는 RNA 간섭(RNAi) 시스템 제조 방법을 제공한다.

[0070] RNA 간섭(RNAi)용 조성물은 그 구성 및 효과를 상기한 RNA 간섭 시스템과 같이하는바, 반복된 기재를 피하기 위해 상기 RNA 간섭 시스템에 대한 기재를 본 발명에 준용한다.

[0071] 본 발명에서는 분지형 DNA 분자(X-DNA)를 이용해서 간단히 가교 결합시켜 플라스미드-겔 복합체를 형성시킴으로서 RNAi 효율을 유의적으로 향상시킬 수 있음을 확인하였다. 본 발명의 복합체는 종래의 RNAi 전달을 위한 DNA 운반체와 비교해서, 전사 과정을 증폭 단계로 활용함으로써 독특한 이점을 갖는다.

[0073] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 통상의 기술자에 있어 자명할 것이다.

[0074] **[실시예]**

[0075] **[실험방법]**

[0076] **1. I-gel의 합성 및 특성 확인**

[0077] X-DNA를 이루는 4개 올리고뉴클레오타이드 (XO1-XO4 DNA 가닥)는 Integrated DNA Technologies(Skokie, IL, USA)에서 상업적으로 합성되었다. X-DNA를 이루는 각 구성 가닥의 서열은 표 1에 나타낸 바와 같이 설계, 제조 및 특성화하여 사용하였다[10, 13].

표 1

[0078]

X-DNA		
	Sticky-end	Main body sequence
X01		5'- CGA CCG ATG AAT AGC GGT CAG ATC CGT ACC TAC TCG-3'
X02	5'-p-GATC	CGA GTA GGT ACG GAT CTG CGT ATT GCG AAC GAC TCG-3'
X03	5'-p-GATC	CGA GTC GTT CGC AAT ACG GCT GTA CGT ATG GTC TCG-3'
X04	5'-p-GATC	CGA GAC CAT ACG TAC AGC ACC GCT ATT CAT CGG TCG-3'

I-plasmid (siRNA expression plasmid) (inserted sequence)		
Spacer	Expression sequence	Spacer and Restriction site (hybridization site with X-DNA)
5'- GTG TCT TC	CG CAA GCT GAC CCT GAA GTT CAT TCA AGA GAT GAA CTT CAG GGT CAG CTT GCT TTT TT	C TCG AGG GTA CCG GAT CC-3'

Scrambled I-plasmid (negative control RNA expression plasmid) (inserted sequence)		
Spacer	Expression sequence	Spacer and Restriction site (hybridization site with X-DNA)
5'- GTG TCT TC	N_{52} (random base 52mer)	C TCG AGG GTA CCG GAT CC-3'

Primer (for RT-PCR or qPCR)		
	Forward	Reverse
shRNA	5'- CTT CAG GGT CAG CTT GCT TT-3'	5'- GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA C-3'
GFP mRNA	5'- GTC TTT CCC CTC TCG CCA AA-3'	5'- TTC TGC TTG TCG GCC ATG AT-3'
RT-primer	5'-GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG$(T)_{12}$VN-3' (where V is A, C and G, and N is A, C, G and T)	

[0079] 1μmol의 동결건조된 DNA 가닥을 실온에서 14,000g에서 15초 동안 원심분리하여 수집하였다. 각 DNA 가닥을 1x TE 완충액(pH 8.0)에 1.0mM 농도로 재현탁시켰다. 동결건조된 올리고뉴클레오타이드를 완전히 용해시키기 위해서, MULTI-THERM™(Benchmark Scientific, NJ, USA)을 사용하여 1,500 rpm에서 ~3시간 동안 각 튜브를 진탕 및 혼합하였다. 각 DNA 가닥 0.05μmol(50㎕)을 1.5㎖ 튜브에 혼합시키고, 핵산분해효소가 없는(nuclease-free) 물을 올리고뉴클레오타이드 혼합물에 첨가하여 최종 부피를 500㎕가 되게하였다. 500㎕의 올리고뉴클레오타이드 혼합물을 0.5ml 튜브 5개에 각각 100㎕씩 분배시켰다. 어닐링 과정을 진행하기 위해 튜브를 thermocycler(Bio-Rad, CA, USA)에 넣었다. 4종류의 올리고뉴클레오타이드(X01 내지 X04)를 다음 조건으로 어닐링하였다: 95℃에서 10 분간의 초기 변성; 65℃에서 2분, 60℃에서 5.5분, 1℃에서 1분간 저온 유지, 20℃에서 30초, 그리고 X-DNA의 안정화 및 보관을 위해 4℃로 감소. 그 다음 완충액 교환을 위해, 미세 원심분리를 위한 필터 유닛(3-kDa Mw cutoff)에 어닐링된 X-DNA 용액(500㎕)을 넣고 15,000g, 4℃에서 정제수(DI water) 400㎕를 첨가해가며 2시간씩 3번 원심분리하여 용매 부피를 낮췄다. 상기 필터 유닛을 새로운 원심 분리 튜브로 옮겼다. 전체 중, 약 4℃의 핵산분해효소가 없는 물 100㎕를 상기 필터 유닛에 첨가하였다. 필터 유닛을 15,000g, 4℃에서 정제수(DI water) 400㎕를 첨가해가며 2시간씩 2번 원심 분리하여 X-DNA의 잔류 염을 헹구었다. 절단 필터 모듈을 튜브에 거꾸로 놓고 4℃에서 3분간 2000g에서 원심 분리하였다. 동일한 원심 분리 튜브를 사용하여 핵산분해효소가 없는 물을 첨가하고 원심분리를 2번 더 수행하여 X-DNA의 잔류 염을 완전히 제거했다. X-DNA 용액의 최종 부피는 ~ 300㎕ 일 것이다.

[0081] shRNA를 발현하는 플라스미드(I-plasmid)를 구입하였고, Cosmo Genetech (Seoul, Korea)에 의해 최대로 제조되었다. I-gel을 제조하기 위해, I-plasmid를 제한 효소 BamHI를 사용하여 선형화하였다. shRNA 유전자의 크기는 스페이서를 포함해서 66bp(서열번호 8) 또는 T7 프로모터를 포함해서 498bp 였다(도 7의 I-plasmid 지도).

[0082] 시료의 DNA 양은 BioSpectrometer(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 UV/Vis 흡수값으로부터 결정되었

다. X-DNA 및 선형 플라스미드를 우선 T4 DNA 리가 제(Promega, Madison, WI, USA)의 존재 하에 소정의 몰비로 혼합되어 D겔(Dgel)을 합성하였다. X-DNA : I-plasmid 몰비가 1500 : 1 인 경우, 30㎕ 반응 부피에서 75μM의 X-DNA 10.5㎕와 100nM 플라스미드 5.25㎕를 사용했다. 블랭크-겔(Blank-gel)의 경우, 상기 I-gel과 동일한 양의 X-DNA 물질이 T4 DNA 리가아제에 의하여 연결되었다. 각 시료 10㎕를 2㎕의 겔 충전 완충액과 혼합하고 0.7 또는 2% 아가로스겔 상에서 100V로 60분간 전기영동했다. 모든 DNA(X-DNA, I-plasmid, 블랭크-겔 및 I-gel)는 아가로스겔 전기영동에 의해 확인되었다(도 2g, 도 10 및 도 11). 합성 된 D겔은 Amicon 3-kDa Mw 컷오프 미세 소관 원심 분리 필터를 사용하여 두 번 탈염과정을 거쳤다. 스캐닝 전자 현미경(SEM) 이미징을 위해, 시료는 모든 물이 제거될 때까지 FreeZone 동결 건조기(Labconco, Kansas City, MO, USA)에서 동결 건조시켰다. 건조 된 시료는 새로운(fresh) 표면이 드러나도록 균열되었다. 2 내지 3 nm Pt 레이어로 100초 동안 스퍼터 코팅된 후, 이러한 하이드로겔의 표면의 형태성(morphology)을 S-3500N(Hitachi, Tokyo, Japan) 스캐닝 전자 현미경을 사용하여 가속 전압 15kV에서 ~50,000 배율(magnification)로 관찰하여, 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0084] **2. I-gel 안정성 확인**

[0085] 자유 I-plasmid 및 I-gel 각각에 대해 7개의 시료를 제조하였다. 각 시료에서 2㎕의 자유 I-plasmid(57ng) 또는 I-gel(57ng의 I-plasmid를 함유하는 1:1500 겔)을 12㎕의 증류수에 희석한 다음, 4㎕의 Transcription Optimized 5X Buffer를 첨가하였고, 3.33 X 10^{-5} 유닛의 DNase I(No. M6101; Promega)를 최종 부피 20㎕까지 처리 한 후, 37℃에서 각각 0, 1, 4, 12, 24 및 48시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 이후, 하나는 전기영동을 위해, 다른 하나는 다음의 전사를 위해 20㎕의 시료를 2개의 10㎕ 표본(aliquot)으로 분취하였다. 각각의 표본에서, DNase I에 의한 분해반응은 1㎕의 RQ1 DNase 정지 용액을 첨가하고 65℃에서 10분 동안 인큐베이션하여 종결되었다. 그 후 각 시료 10㎕를 2㎕의 겔 충전 완충액과 혼합하고, 2% 아가로스 겔에서 100V로 60분간 전기영동하였다(도 13a 내지 13c). 또 다른 각 시료의 표본은 분해(digestion) 반응 후 I-gel의 전사 효율을 입증하기 위해 전사 반응에 사용되었다.

[0086] shRNA는 전사 키트(Riboprobe; Promega)를 사용하여 제작자의 지시에 따라 I-gel 또는 자유 I-plasmid 주형(0, 24, 48 시간)으로부터 전사되었다.

[0087] 얻어진 shRNA는 총 RNA 제조 및 역전사 및 실시간 PCR 및 데이터 분석에서 언급하는 바와 같이 RT-qPCR에 의해 정량화되었고, 그 결과를 표 2에 나타내었다. 하기 표 2의 데이터는 3번의 독립적인 실험값의 평균±표준편차를 나타낸다. 플라스미드 주형 당 shRNA의 수는 shRNA 농도의 교정곡선(calibration curve)에 의해서 결정되었다.

표 2

[0088]

DNase I treatment time	Sample	Conc. of shRNA (nM)	The number of shRNA per one plasmid template
0 h	I-plasmid	13.09 ± 0.29	18.71 ± 0.42
	I-gel	61.54 ± 3.15	87.91 ± 4.50
24 h	I-plasmid	4.82 ± 0.18	6.89 ± 0.25
	I-gel	65.39 ± 3.37	93.41 ± 4.81
48 h	I-plasmid	3.06 ± 0.05	4.37 ± 0.08
	I-gel	40.99 ± 3.38	58.55 ± 4.82

[0090] **3. 단백질 발현 및 저해 분석**

[0091] Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 커플링된 전사 및 번역 키트 (1-Step Human Coupled IVT Kit-DNA, 카탈로그 번호: 88882)를 구입하여 제조사의 지침에 따라 반응을 수행하였다. 보다 구체적으로, HeLa 세포 용해물, 액세서리 단백질, 반응 믹스 및 pcDNA3.1(+) IRES GFP 플라스미드(0.5μg/㎕; No. 51406; Addgene, Cambridge, MA, USA)를 12.5 : 2.5 : 5 : 2 (v/v) 비율로 혼합하고, 30℃에서 1, 2, 4 및 6시간 동안 인큐베이션하였다. 표시된 반응 시간 후, 시료 용액을 4℃에서 24시간 동안 인큐베이션하여 반응을 중지시키고, 충분한 단백질 접힘 시간을 확보했다. 간섭 효율을 평가하기 위해, 1000ng의 GFP 플라스미드의 존재 하에 자유 I-plasmid(free I-plasmid) 또는 I-gel을 세포 용해물에 첨가하였다. I-gel 조건 최적화를 위한 대조 실험군으로 57ng의 I-plasmid(17.5nmol); 스크램블 shRNA(17.5nmol 및 1.75μmol; I-plasmid의 양에 대한 각각 1eq 및 100eq) (SN-1003; Bioneer, Seoul, Korea); 스크램블 플라스미드 혼합물(17.5 nmol; 스크램블 shRNA 발현 플라

스미드 혼합물; Cosmo Genetech); 스크램블 플라스미드 겔(X-DNA와 효소 적으로 가교-결합된 스크램블 플라스미드 혼합물); I-gel 성분(X-DNA 단독, I-plasmid 단독 또는 효소적 가교-결합 없는 이들의 혼합물; 즉, 겔형성 없음); 또는 블랭크-겔(효소 가교 결합된 X-DNA 단독)이 GFP 발현 반응 용액에 직접 첨가되었다.

[0092] 모든 반응은 적어도 3 회 수행되었다. 달리 명시하지 않는 한, 반응 부피는 25㎕로 유지되었다. 형광 스펙트럼은 형광분광광도계(FluorMate FS-2, SCINCO Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 세포 용해물에서 GFP 발현 수준을 측정하여 분석되었다.

[0094] **4. 전체 RNA 준비 및 역전사**

[0095] RNA 추출 전에 사전 발현된(preexpressed) 세포 용해물(20㎕) 모두에 3㎕의 cel-miR-39(33 fmol/㎕; No. 59000; Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Canada; 스파이크-인(spike-in) 컨트롤)를 첨가하였다. 그 다음, 총 RNA는 TRIzol Reagent(Ambion, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 23㎕의 용해물로부터 추출하였다. 추출된 총 RNA를 DEPC-처리된 물(Ambion, Thermo Fisher Scientific) 10㎕에 용해시켰다. 그 다음, 20㎕ 반응 혼합물 중에서, 총 RNA 2㎕를 대장균 poly(A)polymerase(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 5U가 함유된 1 x poly(A) polymerase 완충액에서 37℃조건에서 20분 동안 1mM ATP로 폴리아데닐화(polyadenylated)하였다. 역전사를 위해, 폴리아데닐화 된 RNA 4㎕는 1pmol의 RT 프라이머 및 0.5mM dNTP 믹스와 혼합되었다. 그 다음 DEPC-처리된 물을 첨가하여 13㎕의 부피로 만들었다. 혼합물을 65℃에서 5분 동안 가열한 다음 얼음 위에서 빠르게 냉각시켰다. 그런 다음, 5mM 디티오트레이톨(dithiothreitol), 1X first-strand buffer, 40U RNase 억제제 및 200U SuperScript III 역전사 효소(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 최종 부피 20㎕로 맞추고, 50℃에서 1시간 동안 인큐베이션 한 후, 70 ℃에서 15분 동안 효소를 비활성화시켰다.

[0096] RT 프라이머 서열은 RNA 서열로부터 cDNA를 합성하기 위해 고안되었고, 표 1에 나타낸 바와 같다. 사용된 프라이머는 FirstChoice RLM-RACE 키트(Ambion, Thermo Fisher Scientific)에서 제공되는 3'RACE 어댑터였다. cel-miR-39 정방향 프라이머(Norgen Biotek Corp.)를 제외하고, 모든 프라이머는 Cosmo Genetech에서 합성되었다. 각 용해액에서 RNA 회수율은 얻어진 스파이크-인 컨트롤의 CT값과 참조 cel-miR-39(추출 공정을 진행하지 않음)의 CT값 사이의 차이로부터 추정하였다.

[0098] **5. 실시간 PCR(Real-time PCR 및 qPCR 데이터 분석**

[0099] shRNA 및 GFP mRNA의 양은 StepOne Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 qPCR로 정량화되었다. 각 시료의 qPCR은 2㎕의 cDNA, 10㎕의 2 x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific) 및 각각의 프라이머 10 pmol을 포함하여 총 부피 20㎕에서 수행되었다. PCR 과정은 다음 조건으로 수행 하였다: 95℃에서 10 분간의 초기 변성; 95℃에서 15초 동안, 60℃에서 30초 동안, 및 72℃에서 30초 동안 처리의 30사이클. qPCR은 cel-miR-39를 표준 RNA로 사용하여 각 시료에서 전체 RNA의 회수율을 얻었다. qPCR 프로토콜은 10 pmol의 공통 리버스 프라이머(shRNA 리버스 프라이머와 동일) 및 cel-miR-39 포워드 프라이머를 사용한 것을 제외하고, 본 실험에서 상기 기재된 바와 동일하게 수행되었다. 각각의 증폭 된 DNA 산물의 용융 곡선(melting curve)은 qPCR 완료 후 + 0.3℃/s의 속도로 60 ℃에서 95 ℃까지 온도를 증가시키면서 시료당 6회 SYBR Green 염료의 형광 강도 변화를 측정하여 얻었다. qPCR을 위한 특정 프라이머는 Primer3 프로그램(http://primer3.ut.ee/)을 사용하여 디자인하였고, 구체적인 서열은 표 1에 나타낸 바와 같다.

[0100] 표적의 상대적인 발현은 비교 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 방법을 사용하여 결정하였다. GFP mRNA의 상대적 양은 2% 아가로스 겔 상에서의 밴드 강도 측정을 통해 확인되었다.

[0101] cDNA의 증폭은 PCR 사이클 횟수(GFP mRNA의 경우 20번)를 제외하고는 상기 기재된 qPCR에 사용된 것과 동일한 PCR 조건 및 프로그램으로 수행하였다.

[0103] **6. RNA 양의 교정(calibration) 및 절대 정량(absolute quantification)**

[0104] 각 RNA 표준 물질을 사용하여 RNA 농도와 CT 값에 대한 표준 곡선을 얻었다. shRNA의 경우, Integrated DNA Technologies에서 구입한 합성 shRNA를 사용하여 표준 곡선을 얻었다. GFP mRNA의 경우, 제조사의 지시에 따라 전사 키트(Riboprobe; Promega)에서 추출한 GFP mRNA를 사용하여 상기 곡선을 얻었다. 표준 shRNA의 RNA 양은 Integrated DNA Technologies의 정보를 이용하였고, 추출된 표준 GFP mRNA의 RNA 양은 BioSpectrometer를 사용하여 UV/Vis 흡수 값으로부터 결정하였다. 상기 "총 RNA 준비 및 역전사"에서 설명한대로 획득한 표준 RNA를 역

전사에 의해 cDNA로 전환시켰다. 그 후, cDNA를 10, 100, 1000, 10,000배 희석한 후, qPCR을 3회 반복하고, 얻어진 CT 값을 표준 곡선을 얻는데 사용하였다.

[0105] RT-qPCR에서 얻은 CT 값은 교정(calibration) 과정을 통해 세포 용해물의 초기 RNA 농도로 변환되었다(도 9a 내지 도 9d). RNA의 최종 절대량(absolute amount)은 각 RNA 회수율(%)과 교정곡선의 RNA 양의 값을 곱하여 결정하였다(표 3 및 표 4).

[0107] **7. Cy5-I-gel(Cy5-표지된 I-gel)을 이용한 세포 표지.**

[0108] MDCK(Madison-Darby Canine Kidney) 세포는 한국 세포주 은행(Korea Cell Line Bank)로부터 얻었고, 이후 보습 및 CO_2(5%)-유지되는 인큐베이터에서 10% 태아소혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 DMEM에 보관되었다. 리포펙타민 시약(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 pEGFP-N1 벡터를 세포에 형질감염시켜 GFP 발현하는 MDCK(MDCK-GFP) 세포를 제조하였다. 그 후, FACSCanto II 시스템(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)을 사용하여 GFP 방출 세포를 분류하였다. 모든 실험에서, 세포는 마이코플라스마 오염에 대해 음성으로 확인되었다.

[0109] 24-well plate에서 커버슬립을 이용해 배양된 MDCK-GFP 세포(각 well 당 50,000 세포)는 Cy5-컨쥬게이트된 X01 DNA 서열 가닥(2.625 μM X-DNA에 해당; Integrated DNA Technologies)을 포함하는 Cy5-I-gel(Cy5-컨쥬게이트된 I-젤)과 함께 혈청없는 배지에서 4시간 동안 공동 인큐베이션되었다. Cy5-I-plasmid를 제조하기 위해, 먼저 Cy5-컨쥬게이트된 X01(부가적인 5'-p-GATC 접착성 말단을 갖는)와 그의 상보적인 카운터-가닥(5'- CGA GTA GGT ACG GAT CTG ACC GCT ATG CAT CGG TCG-3')을 어닐링하여 Cy5-dsDNA(Cy5-표지된 dsDNA)를 제조하였다. 이어서, Cy5-dsDNA와 I-plasmid를 5000 : 1의 몰비로 혼합하고 결찰시켰다. 과량의 결합되지 않은 Cy5-dsDNA를 Amicon 미세관형 원심분리 필터(50kDa Mw 컷오프)를 이용해 4-5회 원심분리(12,400g, 4℃, 60분)하여 제거하였다. Cy5-shRNA(Cy5-컨쥬게이트된 shRNA)는 상업적으로 합성되었다(Integrated DNA Technologies). Cy5-I-plasmid 및 Cy5-shRNA의 경우, 세포는 무-혈청 배지에서 2.625nM의 각 시료와 4시간 동안 공동 인큐베이팅되었다. 리포펙타민-Cy5-I-plasmid 및 리포펙타민-Cy5-shRNA 세트의 경우, 리포펙타민 및 Cy5-컨쥬세이트된 시료를 1:1의 몰비로 함께 혼합하여 최종 용액의 농도가 리포펙타민 2.625μM 및 기질 2.625μM이 되도록 하였다. 이어서 세포를 2.625μM 리포펙타민-Cy5-I-plasmid; 또는 리포펙타민-Cy5-shRNA와 무-혈청 배지에서 4시간 동안 각각 공동 인큐베이션하였다. 세포 단독 대조군의 경우, 세포를 1%(v/v) 페니실린(HyClone)을 포함한 무-혈청 DMEM과 공동 인큐베이션하였다. 4시간의 공동 인큐베이션이후, 모든 시료를 인산완충식염수(PBS) 완충액(0.1M, pH 7.4)으로 2회 세척하고, 세포를 10%(v/v) 소태아혈청 및 1% 페니실린을 함유하는 성장 배지에서 6시간 동안 추가로 인큐베이션하여 충분한 세포 재생 및 흡수(uptake) 시간을 갖도록 하였다.

[0110] 배양된 세포를 실온에서 10분 동안 4% 포름알데히드로 고정시키고 PBS 완충액(0.1 M, pH 7.4)으로 3 회 더 세척하였다. 현미경 사진의 경우, 세포가 부착된 커버슬립을 페이딩 방지 제제(antifading agent)와 수성 마운팅 배지를 이용해서 유리 슬라이드에 장착하였되었다. Zeiss Axioplan 2 현미경을 사용하여 형광 이미지를 기록하고 Zeiss Axiocam HR 카메라를 사용하여 사진을 촬영했다.

[0112] **8. I-gel을 이용한 GFP 유전자-침묵(gene-silencing) 시험**

[0113] 먼저, 262.5μM의 X-DNA 및 175nM의 I-plasmid를 함유하는 I-gel을 300U의 T7 RNA 중합효소(Thermo Fisher Scientific)와 함께 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, I-gel 시료를 1% 페니실린을 함유하는 무-혈청 DMEM으로 100배 희석하였다. 그런 다음, MDCK-GFP 세포(well 당 20,000세포)로 24시간 동안 전 처리한 커버슬립을 갖는 24-well plate의 각 well에 1/6 부피의 I-gel/중합효소 복합체를 첨가하였다.

[0114] I-plasmid, 스크램블 플라스미드 혼합물 및 스크램블 플라스미드 겔 실험군의 경우, I-gel의 경우와 동일한 몰량의 각 플라스미드 및 T7 RNA 중합효소와 MDCK-GFP 세포를 함께 배양하였다. 네이키드 shRNA 및 리포펙타민-shRNA의 RNAi 효과를 측정하기 위해, 세포 용해물 실험으로부터 계산된 I-gel의 shRNA 발현율을 고려하여 I-plasmid 주형의 수에 대해 100배 이상의 각 RNA 시료를 사용하였다. 네이키드 shRNA 및 스크램블 shRNA 실험군의 경우, MDCK-GFP 세포를 175nM의 RNA 시료와 공동 인큐베이션하였다. 리포펙타민-복합 시료는 제조자의 지시에 따라 제조하였다. 리포펙타민-I-plasmid 및 리포펙타민-스크램블 플라스미드 혼합물 실험군의 경우, 리포펙타민과 각 플라스미드 시료를 5:1의 몰 비로 혼합하여 정전지적으로 복합체를 형성하게하여 8.75nM의 리포펙타민 및 1.75nM의 플라스미드 기질 농도의 최종 용액을 얻었다.

[0115] 리포펙타민-shRNA 세트의 경우 리포펙타민과 자유 shRNA를 5:1의 몰비로 혼합하여 정전기적으로 복합체를 형성하게하여 875nM 리포펙타민 및 175nM shRNA 농도의 최종 용액을 얻었다. MDCK-GFP 세포를 혈청이 없는 배지에서

준비된 리포펙타민-복합체 시료와 4시간 공동-인큐베이션하였다. 세포 단독 실험군의 경우, 시료없이 MDCK-GFP 세포 만을 무-혈청 배지에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 4시간 동안 인큐베이션 한 후, 모든 실험군의 시료를 세척하고, 세포는 성장배지(10%(v/s) FBS 및 1% 페니실린을 함유하는 DMEM)에서 48시간 동안 추가로 인큐베이션하고, 37℃ 및 5% CO_2 하에서 RNA-침묵(silencing)효과를 평가하였다. 그 다음 세포는 4% 포름알데하이드를 이용해서 실온에서 10분 동안 고정하고, PBS 완충액으로 세척하였다.

[0116] 현미경 사진을 위해서, 커버슬립-부착된 세포를 페이딩 방지제(antifading agent)를 함유한 수용성 마운팅 배지를 사용해서 유리 슬라드이드 상에 올렸다.

[0118] **9. 살아있는 세포에서 정량적 PCR을 이용한 유전자 발현 분석**

[0119] 모든 시료는 앞서 기재된 "I-gel을 사용한 GFP 유전자-침묵 실험"에서 사용된 것과 동일한 양 및 동일한 조건으로 모든 시료에 처리되고, 각 세포 배지에서 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 상기 MDCK-GFP 세포를 PBS 완충액으로 1회 세척하고, 플레이트의 각 well에서 세포를 분리시키기 위해 트립신 처리하였다. 분리된 세포를 PBS 완충액으로 희석하여 트립신을 비활성화시킨 후, 1.5mL 마이크로 튜브에 수집하고 원심분리(180g, 5분)하여 펠렛화하였다. 상등액을 제거하고 세포를 20㎕의 PBS 완충액으로 희석시켰다. 세포 현탁액(20㎕)을 1mL의 TRIzol 시약, 3㎕의 cel-miR-39(33 fmol/㎕) 및 200㎕의 클로로포름 용액으로 처리하였다. 일련의 RNA 추출은 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 세포 수준에서 GFP mRNA와 shRNA의 상대적인 양을 정량화하기 위해, 모든 qPCRs 시료의 준비는 "총 RNA 준비 및 역전사" 그리고 "실시간 PCR 및 데이터 분석" 섹션에 개시된 바와 동일한 방법으로 수행되었다.

[0121] **10. 픽셀 강도 정량화(pixel intensity quantification)를 위한 세포 이미징 분석**

[0122] MATLAB(The MatWorks, Inc., Beltsville, MD, USA) 프로그램을 사용하여 세포 이미지 처리를 수행하였다. 원본 형광 이미지를 MATLAB로 가져 와서 이미지의 각 픽셀을 매트릭스의 각 구성 요소로 변환했다. 각 성분의 형광 강도의 분포를 히스토그램 그래픽으로 나타내었다. 전체 데이터 세트는 256개의 인터벌(interval)로 분류되었다.

[0124] **11. 형광-활성 세포(Fluorescence-activated cell) 분류 분석**

[0125] 세포를 1mL의 PBS로 1회 세척 한 후, 세포 배양 플레이트에서 성장배지를 흡입하였다. 그 후, 트립신 처리하여 세포를 플레이트로부터 분리하였다. 분리된 세포를 15mL 튜브에 수집하고 원심분리하여 펠렛(180g, 3분)을 얻었다. 상청 트립신 용액을 제거하고 세포 펠렛을 2mL의 PBS를 사용하여 2회 세척하였다. 세포를 50,000 세포/mL의 농도로 PBS에 재현탁하였. 그 다음, 실온에서 10분 동안 1% 포름 알데히드 용액으로 세포를 고정시켜 시료를 제조하였다. FACSCanto II 시스템(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)을 사용하여 각 시료를 GFP 형광 강도에 대해 분석하였다.

[0127] **12. 암(dark) 조건에서의 상대 생존율**

[0128] MDCK-GFP 세포 현탁액(well 당 5,000세포)을 96-well plate(Corning Inc., Corning, NY, USA)에 분배하고 5% CO_2, 37℃에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 세포가 플레이트에 부착되면, 성장배지(10%(v/v) FBS 및 1% 페니실린을 함유하는 DMEM)에서 상이한 농도의 I-gel(X-DNA 농도에 상응)과 함께 암 조건에서 공동 인큐베이션하였다. I-gel은 X-DNA:I-plasmid 1500:1의 몰비로 구성되었다. 이 시료를 37℃, 5% CO_2 하에서 6, 24 및 48 시간 동안 인큐베이션 하였다. 각 인큐베이션 시간의 끝에서, Cell Counting Kit-8 용액(Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)을 제조자의 지시에 따라 시료에 첨가하였다. 1시간 동안 추가 인큐베이션 한 후, 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이 측정의 결과는 시료의 흡광도와 시료없이 인큐베이션된 음성 대조군 세포의 흡광도 사이의 비율로 나타내었다.

[0130] **13. 통계 분석**

[0131] 통계 분석은 Student's t test, Bonferroni multiple comparison post test를 이용한 일원 분산 분석 (one-way ANOVA)에는 Prism 7.05 소프트웨어(GraphPad Software)을 사용하였다. Holm-Bonferroni multiple comparison post test는 Prism 7.05 소프트웨어(GraphPad Software)[30]의 Bonferroni 다중 비교 사후 테스트(multiple comparison post test) 결과를 사용하여 수행되었다. 정규화(normality) 테스트는 Shapiro-Wilk 테스트에 의해 계산되었다. Shapiro-Wilk 테스트의 결과에서, 데이터는 대략적인 정규 분포를 보였다. 통계적 유의성은

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001로 표시하였다.

[0133] **[시험 결과]**

[0134] **1. RNAi-발현 겔(I-gel) 개발**

[0135] 본 발명의 새로운 RNAi 방법에서, 자유(free) 형태 또는 폴리머 복합체 형태의 합성된 RNA 단편을 세포에 직접 전달하는 종래의 방법 대신, 나노크기의 D겔을 세포로 전달하여 mRNA 전사를 방해하여 단백질 발현을 억제 할 수 있는 RNA를 생산하도록 하였다(Fig. 1a). siRNA 주입(transfection)을 대체 할 수 있는 D겔을 제공함으로써, 일반적인 siRNA 또는 shRNA와 비교해서 세포 내 생산성이 더 높아짐에 전달 캐리어의 개선된 안정성과 더 높은 간섭 효율이 기대된다.

[0136] 본 발명의 RNAi 시스템의 효과를 검증하기 위해 녹색형광단백질(GFP)-간섭 D겔(I-gel로 표시)을 설계하고 세포 용해물을 사용하여 겔 형성 및 구성을 최적화하였다. 또한, 포유동물 세포주에서 I-gel과 GFP 발현을 방해하는 작은 RNA 단편을 생산하기 위해 전사될 수 있는 유전자 단편을 포함하는 자유 형태의 플라스미드 DNA(이하, 'I-plasmid'로 표시)[20] 및 상업적으로 가장 많이 사용되는 siRNA 전달 시약인 리포펙타민과 I-plasmid 복합체를 비교하여 I-gel의 간섭 효율을 평가 하였다. 또한, 네이키드 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)와 리포펙타민-shRNA 복합체를 세포 실험을 위한 대조군으로 사용했다. I-gel은 선형화된 플라스미드 DNA와 X형 DNA(X-DNA)를 가교 결합하여 합성되었다(도 1b). 리포터 단백질인 GFP를 표적으로 선택하였고, 활성 단백질의 발현 수준은 형광 강도의 측정을 통해 정량화 되었다[21]. 제한효소에 의해 선형화되고 I-gel 네트워크에 공유결합 된 I-plasmid는 shRNA-생산 유전자 모이어티를 포함하였다.

[0138] **2. I-gel의 평가(Evaluation) 및 최적화**

[0139] I-gel 평가 및 최적화를 위해, 세포 모방 환경(cell-mimic environment)을 제공하는 연결된 전사 및 번역 시스템(상용된 세포 용해물 시스템을 통해)을 사용하여 GFP 발현의 전사 및 후속 억제을 확인하는 실험을 수행하였다. 진핵 세포주(HeLa)로 제조된 상기 상업적으로 이용 가능한 무-세포 발현 시스템(cell-free expression system)은 플라스미드로부터 단백질을 생산할 수 있으므로 플라스미드의 단백질 생산능 또는 siRNA의 억제 효율을 보여줄 수 있다.

[0140] 여기에서, I-gel의 간섭 효율(interference efficiency)을 평가하기 위해, 상이한 플라스미드를 보유하는 8개의 세포 용해물 실험군을 다음과 같이 제조 하였다: DNA 첨가 없음(블랭크 대조군); GFP 플라스미드 단독(양성 대조군); GFP 플라스미드 및 스크램블 shRNA, 1eq(첨가된 shRNA의 카피 수는 I-plasmid의 카피 수와 동일 함을 의미); GFP 플라스미드 및 스크램블 shRNA, 100eq(첨가된 shRNA의 카피 수는 I-plasmid의 카피 수의 100 배임을 의미); GFP 플라스미드 및 스크램블 shRNA를 생산할 수 있는 자유 스크램블 플라스미드; GFP 플라스미드 와 X-DNA로 구성된 D-겔 및 스크램블 shRNA-생산 가능한 플라스미드 혼합물, GFP 플라스미드 및 I-plasmid 혼합물(자유 플라스미드의 RNA 간섭능력을 측정하기 위해서); 그리고 GFP 플라스미드 및 I-gel 혼합물(본 발명의 겔의 RNA 간섭능을 평가하기 위해서). 또한, GFP 발현에 대하여 X-DNA 및 블랭크 겔에 의한 간섭 효과가 없음을 확인했다(도 S1). 각각의 발현 산물의 형광 강도를 측정하고 용액에서 활성 GFP의 양을 계산하여, 각 실험군의 플라스미드로부터의 GFP 발현 및 RNAi 효율을 분석하였다.

[0141] 도 2a에 나타낸 바와 같이, 블랭크 대조군은 거의 0의 형광 강도를 나타내 었으며, 용해물에 GFP 발현의 원천이 없음을 확인하였다. 또한, 스크램블 shRNA 및 스크램블 shRNA를 발현하는 플라스미드 혼합물을 사용한 대조군의 결과는 자유(free) 또는 겔-상(phased) I-plasmid로부터 전사된 완전히 일치하는 shRNA를 제외하고, GFP 발현 간섭에 대한 불일치한 RNA의 오프-표적 효과가 없음을 입증하였다(도 2a 및 도 2b). GFP 플라스미드 만을 첨가한 HeLa 세포 용해물 실험군의 경우, 상당량의 형광 강도가 관찰되었으며, 이는 플라스미드가 활성 단백질을 적절한 방식으로 생성했음을 의미한다. GFP 플라스미드와 I-plasmid(57 ng)의 혼합물로 트랜스펙션된 세포의 경우, 양성 대조군(GFP 플라스미드 단독)과 비교하여 유의적인 형광 강도의 변화가 관찰되지 않았다. 이 결과는 I-plasmid로부터 생성된 siRNA가 양 또는 활성 측면에서 GFP 발현을 간섭하기에 충분하지 않다는 것을 의미한다.

[0142] 그러나, I-gel(I-plasmid 57ng 포함) 및 GFP 플라스미드의 혼합물 처리군의 경우, 형광 강도의 현저한 감소가 관찰되었는데, GFP 플라스미드 단독 처리군 및 GFP 플라스미드와 I-plasmid의 혼합물 처리군과 비교해서 25% 미만 수준이었고, 이러한 결과는 I-gel에 의하여 GFP 단백질의 발현이 효과적으로 저해되었다는 것을 의미한다. 도 2b에 나타낸 바와 같이, 디지털 카메라로 촬영한 이미지에서도 4배의 형광 강도의 차이를 명확하게 확인할

수 있다.

[0143] 자유 I-plasmid의 첨가량을 증가시켰을 때, 형광 강도의 유의적인 저하가 관찰되었는데, 구체적으로 2000ng의 I-plasmid를 첨가하였을 때, 57ng의 I-plasmid를 함유하는 I-gel과 유사한 간섭 효과를 나타내는 것으로 나타났다(도 2e 및 도 2f). 따라서, 이러한 결과로부터 GFP 발현 간섭에 I-gel이 더욱 효과적임이 확인되었다.

[0145] I-gel의 RNAi 효율을 극대화하기 위해, 다양한 실험 조건에서 I-gel의 다양한 성분의 존재 하에서 GFP 발현 분석을 수행하여 겔 제조 공정을 최적화하였다. 모든 실험군에서, GFP 플라스미드-단독 발현을 세포 용해물 변이로 인한 오차를 최소화하기 위한 양성 대조군으로 사용하였고, 간섭 효과를 정확하게 비교하기 위해서, 각 반응에 대해 동일한 양의 GFP 플라스미드(1000 ng)를 첨가하였다. 우선, 각각의 반응에 사용된 I-gel의 양은 총 25.0㎕ 반응(1000ng의 GFP 플라스미드를 포함)에 대해 0.1 내지 2.0㎕로 다양화하였다. 여기서, 각각의 겔의 부피(volume)에서 상응하는 I-plasmid의 양은 각각 5.7ng, 11.4ng, 28.5ng, 57.0ng 및 114.0ng 이었다. 대조군으로서, 세포 용해물 용액에서 동일한 양의 I-plasmid 및 GFP 플라스미드를 사용하여 일련의 반응을 수행하였다. 도 2c에 나타낸 바와 같이, 모든 처리구에서 I-plasmid보다 높은 RNAi 효율을 나타냈다.

[0146]

[0147] I-gel 시스템을 더욱 최적화하기 위해 플라스미드 양을 일정하게 유지하면서 각 겔의 X-DNA 농도를 변경하여, X-DNA와 I-plasmid 몰비를 1000 : 1에서 6000 : 1로 달리하여 GFP 발현 저해 효율을 확인하였다(도 2g).

[0148] 도 2d에 나타낸 바와 같이, 모든 비율에서 GFP 발현 저해 효과를 가짐을 확인할 수 있었고, 특히, X-DNA: I-plasmid의 몰비가 1,500 : 1인 경우가 GFP 발현이 가장 효과적으로 저해되었음을 알 수 있다. 구체적으로, X-DNA : I-plasmid 비율이 1500 : 1 인 1.0㎕의 I-gel(~ 57ng의 선형화된 I-plasmid 포함)이 첨가되었을 때, GFP 생산량은 자유 I-plasmid를 첨가한 경우와 비교해서 약 20%이었다. 결과적으로, 겔의 측정된 RNAi 효율은 이러한 조건 하에서 자유 I-plasmid 보다 더 높았다 (도 2c 및 2d).

[0150] **3. siRNA 전사 효율의 정량화 및 비교**

[0151] I-gel의 RNAi 효율이 높은 이유를 확인하기 위해서, 발현 반응 후 각각의 용해물에서 siRNA 양을 정량화하였고, 자유 I-plasmid와 I-gel이 각각 존재할 때 전사된 GFP 플라스미드의 mRNA 수준을 더 조사하였다[22]. 각 세포 용해액(lysate solution)에서의 RNA 전사량의 비교는 RT-qPCR(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction)을 사용하여 수행되었다. 여기서, 각 RNA는 역전사 효소 반응에 의해 cDNA(complementary DNA)로 역전사되고, DNA의 상대적인 양은 PCR 과정에서 증폭된 DNA로부터의 형광 강도의 실시간 모니터링에 의해 측정되었다. 세포 용해액에서 추출된 RNA의 역전사 후, 상기 결과 cDNA는 다음 분석 과정에 충분한 양을 생산하기 위해 증폭되었다. 증폭된 cDNA가 역전사 RNA의 올바른 증폭 산물인지 확인하기 위해 아가로스 겔 전기영동을 수행하였다(도 3a). 도 3a에 나타낸 바와 같이, 각 반응에서 하나의 유전자 산물 만이 증폭되었고, 이는 RT-PCR에서 의도된 cDNA 만이 생성되었다는 것을 증명하는 결과이다. I-plasmid 및 I-gel로부터의 shRNA의 상이한 이동성(mobility)은 정지 서열상의 T7 RNA 중합효소(polymerase)의 낮은 인식정도에 기인한다. shRNA-전사 위치(transcribing region) 말미에 종결 서열을 삽입 했음에도 불구하고(도 7), T7 RNA 중합효소는 서열 상에서 정확하게 전사를 멈추지 않는 것처럼 보였다. 역전사 DNA의 아가로스 겔 전기영동 사진 및 용융 온도 측정 결과에 따르면, 자유 I-plasmid와 I-gel로부터 전사된 shRNA의 길이는 각각 71 및 111 염기(base) 였다(도 3a 및 도 8). 두 경우 모두 원래 설계된 표준 shRNA(56 염기)보다 길었다. 완료된 PCR은 유전자 증폭 과정에 필요한 물질들이 제한되어 있으므로 일반적으로 비슷한 양의 DNA양에서 멈추기 때문에, 자유 I-plasmid 및 I-gel에 의해 생성된 shRNA로부터 역전사되고 증폭된 DNA를 나타내는 2개의 레인 각각에서 유사한 밴드 강도를 나타내고, I-plasmid 및 I-gel로부터의 siRNA의 상대량은 적절하게 설계된 프라이머를 이용해서 실시간 PCR(qPCR)에 의해 정확하게 측정되었다. 예상대로, 각 시료는 지수적, 선형 및 고조기의 증폭을 보였다(도 9a 내지 도 9d). 도 9a 내지 9d에 삽입된 표에서는 증폭 시작 전 시료의 cDNA 초기 양에 대한 정보를 제공하는 시료의 평균 임계값 사이클(average threshold cycle, CT) 값을 비교하여 나타낸다. 여기서 높은 CT 값은 초기 cDNA의 양이 더 적음을 의미하며 그 반대도 마찬가지 이다[23].

[0152] 정량화에서, 표준 시료를 사용해서 RNA 양을 보정했다(도 9a 내지 9d). shRNA 표준 시료는 상업적으로 합성된 시료를 이용하였고, mRNA 표준은 전사된 용액에서 추출되었다. 보다 정확한 정량화를 위해 모든 RNA RT-qPCR에 스파이크-인 컨트롤 RNA(spike-in control RNA; cel-miR-39)를 사용했다. 추출 전에 발현 용해물(expression lysate)에 스파이크-인 컨트롤을 추가하여, 용해물(lysate)로부터 RNA를 추출할 때의 시료 추출률을 계산하였다(표 3 및 표 4). 표 3 및 표 4에 나타낸 값은 3번의 독립적인 실험의 평균값±표준편차를 나타내고, 표 3에서

EGFP mRNA의 양은 각 RNA 회수율(%)과 도 9의 보정곡선으로부터의 RNA 양의 값을 곱하여 결정되었다. 또한, 표 4에서 shRNA의 양은 각 RNA 회수율(%)과 도 9의 보정곡선으로부터의 RNA 양의 값을 곱하여 결정되었다.

표 3

[0153]

Sample	CT value (spike-in control)	Recovery Rate(%)	Conc. of GFP mRNA (nM)
ref cel-miR-39	19.37 ± 0.27	100	NA
Only GFP plasmid	19.58 ± 0.05	86.75 ± 2.56	622.0 ± 25.8
GFP plasmid + Scrambled shRNA	19.87 ± 0.04	71.73 ± 1.94	647.5 ± 43.0
GFP plasmid + Scrambled plasmid mix	19.57 ± 0.06	87.32 ± 3.50	593.6 ± 61.6
GFP plasmid + Scrambled I-gel	19.85 ± 0.05	72.99 ± 2.21	625.9 ± 25.0
GFP plasmid + I-plasmid	19.54 ± 0.06	89.25 ± 3.39	588.7 ± 47.6
GFP plasmid + I-gel	20.17 ± 0.04	59.04 ± 1.69	73.4 ± 5.2

표 4

[0154]

Sample	CT value (spike-in control)	Recovery Rate(%)	Conc. of shRNA (nM)
ref cel-miR-39	19.37 ± 0.27	100	NA
I-plasmid	20.92 ± 0.08	36.18 ± 1.97	12.7 ± 1.8
I-gel	21.09 ± 0.02	32.22 ± 0.47	91.9 ± 6.5

[0155] 도 3b에 나타낸 바와 같이, 57 ng의 I-plasmid가 사용된 경우, 각각 18±3 및 131±9 카피의 shRNA가 자유 I-plasmid(I-plasmid) 및 I-gel-결합된 I-plasmid(I-gel)의 각각의 단일 주형으로부터 생산되었다. 또한, I-gel 및 자유 I-plasmid의 존재 하에 GFP 플라스미드로부터 전사된 mRNA 양을 평가하여 감소된 GFP 형광 강도가 주로 간섭된 mRNA 수준 때문이라는 것을 확인하였다. GFP mRNA의 상대량은 shRNA와 동일한 과정을 사용하여 측정되었다. 도 3d의 아가로스 겔 전기 영동 분석에서 볼 수 있듯이, 하나의 유전자 산물 만이 증폭됨을 확인하였다. I-gel 존재 하에서 GFP-발현 용해물로부터 전환된 GFP mRNA의 cDNA의 양은 자유 I-plasmid의 유무에 관계없이 GFP-발현 용해물로부터의 것보다 훨씬 적었다.

[0156] 동일한 양의 GFP 플라스미드(1,000ng) 조건에서, 57ng의 자유 I-plasmid 및 57ng의 I-plasmid를 포함하는 I-gel 각각과 공동발현된 단일 주형 GFP 플라스미드로부터 생산된 GFP mRNA는 63±5 카피 및 8±1 카피였다(도 3e). 이러한 데이터는 I-gel의 전사 효율이 자유 I-plasmid의 7.3 배이며, 이러한 최적화된 조건에서 I-gel의 간섭 효과가 자유 I-plasmid의 간섭 효과보다 약 7.9배 높음을 의미한다. 세포 용해물에서 자유 I-plasmid와 I-gel의 양을 달리하는 추가 실험 결과에 따르면, shRNA와 mRNA의 전사량(형광 강도 측면에서 GFP 생산을 의미)은 반 대의 상관관계와 일관되게 일치하였다(도 2c, 도 3c 및 도 3f).

[0157] 형광 강도의 측면에서 생산된 GFP 양의 측정에 따르면, 57ng의 I-plasmid를 포함하는 실험군에서는, I-gel이 강도의 70% 감소를 보인데 반해, 자유 I-plasmid는 형광의 감소를 거의 나타내지 않았기 때문에, 자유 I-plasmid 및 I-gel의 shRNA 생산 효율을 직접적으로 간섭 효율(interference efficiency)로 해석하는 것은 쉽지 않았다. 그러나, 114ng의 I-plasmid를 사용 하였을 때, 자유 I-plasmid에 의한 형광 강도 감소(간섭 효과)는 22.5%로 I-gel(70.1%)보다 약 3배 낮았다(도 2c). 자유 I-plasmid의 간섭효율이 3배 낮은 것은, I-gel의 shRNA 전사율에 비해 4.5배 정도 전사율이 낮기 때문이다(도 3c). shRNA 생산 및 간섭 효과의 배수(fold)가 완전하게 일치하지는 않으나, 증가된 shRNA 생산률과 더 높은 간섭효과의 경향은 일관되게 나타남을 알 수 있다.

[0158] 종합하면, shRNA와 GFP mRNA의 양을 정량적으로 분석한 결과로부터, GFP 발현에 대한 유의적인 간섭효과는 I-

gel의 높은 전사 효율에 의한 것이라는 결론을 내릴 수 있다[24,25].

[0160] **4. 세포 수준에서 I-gel에 의한 유전자 침묵 효과 확인**

[0161] 살아있는 세포에서의 I-gel의 RNAi 효과를 조사하였다. I-gel의 사용은 효소 분해에 대한 높은 안정성, 우수한 RNA 발현 및 나노사이즈에 따른 높은 세포 흡수 및 축적 효율과 같은 Dgel의 장점을 활용할 것으로 예상된다. GFP를 발현하는 MDCK-GFP(Madin-Darby canine kidney) 세포와 같은 대부분의 포유동물 세포는 나노 구조체를 내부화하는 것으로 알려져 있으며, 비특이적 결합 시 수용체-매개 엔도시토시스 또는 막 파괴를 통해 이들을 내부화 할 수 있다. MDCK-GFP 세포를 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, Hyclone, Logan, UT, USA)에서 염료(Cy5)-표지된 I-gel과 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션한 후의 사진인 도 4에 나타낸 바와 같이, 세포 내부에 I-gel의 높은 축적이 관찰되었음을 알 수 있다. 또한, 다른 대조군의 세포 흡수 효율과 비교하여, 자유 I-plasmid(Cy5-conjugated I-plasmid)는 세포 내로 거의 흡수되지 않았고, 리포펙타민과 복합체를 이루는 I-plasmid((Lipo.)Cy5-conjugated I-plasmid)는 I-gel과 유사한 세포 흡수 효율을 보였다. shRNA의 경우, 네이키드 shRNA(Cy5-conjugated shRNA) 및 리포펙타민과 복합체를 이루는 shRNA((Lipo.)Cy5-conjugated shRNA)의 세포 흡수의 경향은 I-plasmid와 일치하였다(도 4b). 이러한 결과는 I-gel이 잘 알려진 상용 형질 전환 시약인 리포펙타민과 복합체를 이룬 형태만큼 효율적으로 세포 내로 운반되고 축적 될 수 있음을 의미한다.

[0163] I-gel이 세포막을 통과하여 세포 내에 축적될 수 있다는 것을 확인한 후, RNA 중합효소가 shRNA를 효율적으로 발현하고 살아있는 세포에서 RNAi 효과를 유도 할 수 있는지 더 연구하였다.

[0164] I-gel의 RNAi 효율을 보다 정확하게 평가하기 위해, 리포펙타민과 자유 I-plasmid 복합체(I-plasmid complexed with Lipofectamine)와 자유 I-plasmid, 그리고 블랭크 대조군을 사용하였다. 또한, 세포에 다음의 대조군들을 추가로 처리하고, 세포의 GFP 형광강도를 측정하였다: 네이키드 shRNA; 리포펙타민-shRNA 복합체; 스크램블 shRNA; 스크램블 플라스미드 혼합물; 리포펙타민-스크램블 플라스미드 혼합물 복합체; 및 리포펙타민-스크램블 플라스미드 겔 복합체.

[0165] I-gel, 자유 I-plasmid 및 리포펙타민-I-plasmid 복합체를 포함한 모든 실험군은 T7 프로모터에 중합효소를 결합시켜놓기 위해 T7 RNA 중합효소와 함께 미리 인큐베이션 되었고, 37℃ 및 5% 농도 CO_2의 DMEM에서 MDCK-GFP 세포에 처리되었다. 대조군의 경우, 플라스미드가 첨가되지 않은 블랭크 대조군을 제외하고, 각 간섭 실험에 서는 I-gel에서와 동일한 양의 I-plasmid(자유 및 리포펙타민-복합체 모두)를 사용하였다. shRNA 대조군의 경우, I-gel에서 플라스미드의 전사 효율을 고려하여, I-plasmid 주형의 수의 100 배(fold)를 세포에 첨가하였다. 각 시료를 세포와 48 시간 동안 인큐베이션한 후 관찰하였고, 상대적인 GFP 발현 수준과 연관성 있는 RNAi 효과는 형광 영상 및 형광-활성 세포 분류(FACS) 분석으로 정량화되었다.

[0166] 도 5a, 5b 및 5c에 나타낸 바와 같이, I-gel과 다른 대조군 사이에 형광 강도의 현저한 차이가 관찰되었다. 상당한 형광 강도를 나타내는 대조군들(블랭크 대조군, 자유 I-plasmid, 네이키드 shRNA 및 모든 스크램블 플라스미드 또는 shRNA를 포함)와는 대조적으로, I-gel에서는 형광이 거의 관찰되지 않았다. 리포펙타민-I-plasmid 복합체와 리포펙타민-shRNA 복합체 실험군 만이 리포펙타민의 도움에 의한 높은 세포 흡수율 덕분에, 형광 강도의 감소가 나타난 것을 확인하였다. 도 5g에 나타낸 바와 같이, I-gel에서는 세포 독성이 관찰되지 않았으므로, 감소된 형광은 전사된 shRNA의 간섭에 의한 것으로 여겨진다.

[0167] 형광 이미지를 평균 픽셀 강도 값에 기초하여 추가로 정량화하여, I-gel의 GFP 발현 간섭 효과가 자유 I-plasmid 및 리포펙타민-I-plasmid 복합체 보다 각각 9.4배 및 2.8배 높음을 확인하였다(도 4c).

[0168] 또한, 도 5d에 나타낸 바와 같이, FACS를 사용하여 세포의 형광 강도를 추가로 분석하여, 블랭크 대조군과 비교한 결과, MDCK-GFP 세포에서 형광 강도 분포가 59.6% 이나, I-gel 처리된 세포에서는 10.2%로 상당한 분포 이동(shift)이 확인되었다. 이와 대조적으로, 자유 I-plasmid 또는 리포펙타민-I-plasmid 복합체로 처리된 세포는 각각 50.3% 및 34.1%로 상대적으로 미미한 분포 이동을 보였다.

[0169] GFP 발현에 대한 I-gel의 간섭 효과를 보다 정확하고 정량적으로 비교하기 위해, RT-qPCR을 사용하여 세포 내 GFP mRNA와 shRNA를 정량화했다. 용해물 실험에서 수행된 것처럼, 모든 RNA RT-qPCR에 스파이크-인 컨트롤 RNA(cel-miR-39)를 사용하였다.

[0170] 도 5e 및 5f에 나타낸 바와 같이, I-gel은 세포에서 GFP mRNA의 전사를 가장 효과적으로 방해했다(비-처리 세포의 GFP mRNA 양과 비교하면 측정된 값이 1/4 수준). 리포펙타민-shRNA 복합체군 만이 I-gel과 비슷한 정도의 간섭 효과를 나타냈다. 세포 내에 존재하는 shRNA의 경우, I-gel로부터 전사된 shRNA의 양은 리포펙타민-I-

plasmid 복합체로부터 생성된 양보다 9배 많았고, 리포펙타민-shRNA 복합체 형태로 최초에 한번 첨가된 실험군의 잔존 shRNA 보다 2.5배 많았다,

[0171] 대조군과 I-gel 사이의 GFP mRNA 저해 효율 차이의 유의성을 확인하기 위해 여러 실험군들 중에서 일원 분산 분석(one-way ANOVA)과 Holm-Bonferroni 사후 검사(Holm-Bonferroni post test)를 수행하여, 표 5에 일원 분산 분석 결과를, 표 6 에는 Holm Bonferroni의 다중 비교 테스트 결과(세포 단독 실험군 대비)를, 그리고 표 7에는 Holm Bonferroni의 다중 비교 테스트 결과(I-gel 실험군 대비)를 나타내었다. 하기 표 5 내지 표 7에서 별표는 각 군과 I-gel 실험군 간의 통계적으로 유의미한 차이를 나타내며, t는 Bonferroni T-statistic를 의미한다.

표 5

[0172]

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	3.1064	9	0.3452	F (9, 20) = 5.5477	P=0.0007
Residual (within columns)	1.2443	20	0.0622		
Total	4.3507	29			

[0173] * SS: Sum of Squares, DF: Degree of Freedom, MS: Mean Square

표 6

[0174]

Holm Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	t	Holm P Value	Summary
Cell only vs. Scrambled shRNA	-0.1995	0.9797	>0.9999	ns
Cell only vs. Scrambled plasmid mixture	-0.1354	0.6647	>0.9999	ns
Cell only vs. Scrambled plasmid gel	0.0674	0.3308	>0.9999	ns
Cell only vs. Lipo+Scrambled plasmid mixture	0.1038	0.5096	>0.9999	ns
Cell only vs. I-plasmid	0.2085	1.024	>0.9999	ns
Cell only vs. Lipo+I-plasmid	0.3446	1.692	0.6368	ns
Cell only vs. shRNA	0.4663	2.290	0.2313	ns
Cell only vs. Lipo+shRNA	0.7582	3.723	0.0121	*
Cell only vs. I-gel	0.7537	3.701	0.0113	*

표 7

[0175]

Holm Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	t	Holm P Value	Summary
I-gel vs. Cell only	-0.7537	3.701	0.0099	*
I-gel vs. Scrambled shRNA	-0.9532	4.681	0.0013	**
I-gel vs. Scrambled plasmid mixture	-0.8891	4.365	0.0024	**
I-gel vs. Scrambled plasmid gel	-0.6863	3.370	0.0183	*
I-gel vs. Lipo+Scrambled plasmid mixture	-0.6499	3.191	0.0229	*
I-gel vs. I-plasmid	-0.5452	2.677	0.0580	ns
I-gel vs. Lipo+I-plasmid	-0.4091	2.009	0.1748	ns
I-gel vs. shRNA	-0.2874	1.411	0.3472	ns
I-gel vs. Lipo+shRNA	0.0045	0.0219	0.9828	ns

[0176] Holm-Bonferroni 사후 테스트를 이용해서 다른 군들과 세포 단독 군을 비교했을 때, Lipo+shRNA(P=0.012)와 I-gel(P=0.011) 군만이 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 또한 I-gel을 다른 군들과 비교했을 때 Lipo+shRNA만이 유사한 mRNA 간섭 효과를 나타냄을 알 수 있다. 이러한 결과는 살아있는 세포나 세포 용해액(lysate solution) 모두에서 I-gel의 간섭 효과가 자유(free) 및 복합체 형태의 I-plasmid 보다 훨씬 우수하다는 것을 의미한다. 또한, 데이터의 분포가 정규 분포를 따르는 지 확인하기 위해, Shapiro-Wilk 검정을 수행하였다(도 6).

[0178] [REFERENCE]

[0179] 1. Peng, S., Derrien, T. L., Cui, J., Xu, C. & Luo, D. From cells to DNA materials. Mater. Today 15, 190-194 (2012).

[0180] 2. Xiong, X. et al. Responsive DNA-based hydrogels and their applications. Macromol. Rapid Commun. 34, 1271-1283 (2013).

[0181] 3. Yang, D. et al. DNA materials: bridging nanotechnology and biotechnology. Acc. Chem. Res. 47, 1902-1911 (2014).

[0182] 4. Li, J. et al. Functional nucleic acid-based hydrogels for bioanalytical and biomedical applications. Chem. Soc. Rev. 45, 1410-1431 (2016).

[0183] 5. Seeman, N. C. & Sleiman, H. F. DNA nanotechnology. Nat. Rev. Mater. 3, 17068 (2017).

[0184] 6. Douglas, S. M., Bachelet, I. & Church, G. M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. Science 335, 831-834 (2012).

[0185] 7. Numata, M., Sugiyasu, K., Hasegawa, T. & Shinkai, S. Sol-gel reaction using DNA as a template: an attempt toward transcription of DNA into inorganic materials. Angew. Chem. Int. Ed. 43, 3279-3283 (2004).

[0186] 8. Song, P. et al. DNA hydrogel with aptamer-toehold based recognition, cloaking and decloaking of circulating tumor cells for live cell analysis. Nano. Lett. 17, 5193-5198 (2017).

[0187] 9. Mao, X. et al. Surface-immobilized and self-shaped DNA hydrogels and their application in biosensing. Chem. Sci. 9, 811-818 (2018).

[0188] 10. Song, J. et al. Light-responsible DNA hydrogel-gold nanoparticle assembly for synergistic cancer therapy. J. Mater. Chem. B 3, 1537-1543 (2015).

[0189] 11. Um, S. H. et al. Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel. Nat. Mater. 5, 797-801 (2006).

[0190] 12. Nishikawa, M. et al. Biodegradable CpG DNA hydrogels for sustained delivery of doxorubicin and immunostimulatory signals in tumor-bearing mice. Biomaterials 32, 488-494 (2011).

[0191] 13. Park, N., Um, S. H., Funabashi, H., Xu, J. & Luo, D. A cell-free protein-producing gel. Nat. Mater. 8, 432-437 (2009).

[0192] 14. Gaynor, J. W., Campbell, B. J. & Cosstick, R. RNA interference: a chemist's perspective. Chem. Soc. Rev. 39, 4169-4184 (2010).

[0193] 15. Agrawal, N. et al. RNA interference: biology, mechanism, and applications. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 657-685 (2003).

[0194] 16. Mello, C. C. & Conte, D. Jr Revealing the world of RNA interference. Nature 431, 338 (2004).

[0195] 17. Yoo, J.-W., Irvine, D. J., Discher, D. E. & Mitragotri, S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. Nat. Rev. Drug. Discov. 10, 521-535 (2011).

[0196] 18. Burnett, J. C. & Rossi, J. J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. Chem. Biol. 19, 60-71 (2012).

[0197] 19. Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C. & Langer, R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. Nano. Lett. 10, 3223-3230 (2010).

[0198] 20. Tiscornia, G., Singer, O., Ikawa, M. & Verma, I. M. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 1844-1848 (2003).

[0199] 21. Soboleski, M. R., Oaks, J. & Halford, W. P. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. FASEB J. 19, 440-442 (2005).

[0200] 22. Freeman, W. M., Walker, S. J. & Vrana, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques 26, 112-125 (1999).

[0201] 23. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle CT}$ method. Methods 25, 402-408 (2001).

[0202] 24. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. & Johne, R. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. J. Appl. Microbiol. 113, 1014-1026 (2012).

[0203] 25. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409, 363-366 (2001).

[0204] 26. Gao, X. & Huang, L. Cytoplasmic expression of a reporter gene by co-delivery of T7 RNA polymerase and T7 promoter sequence with cationic liposomes. Nucleic Acids Res. 21, 2867-2872 (1993).

[0205] 27. Siolas, D. et al. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. Nat. Biotechnol. 23, 227-231 (2005).

[0206] 28. Yang, D. et al. Enhanced transcription and translation in clay hydrogel and implications for early life evolution. Sci. Rep. 3, 3165 (2013).

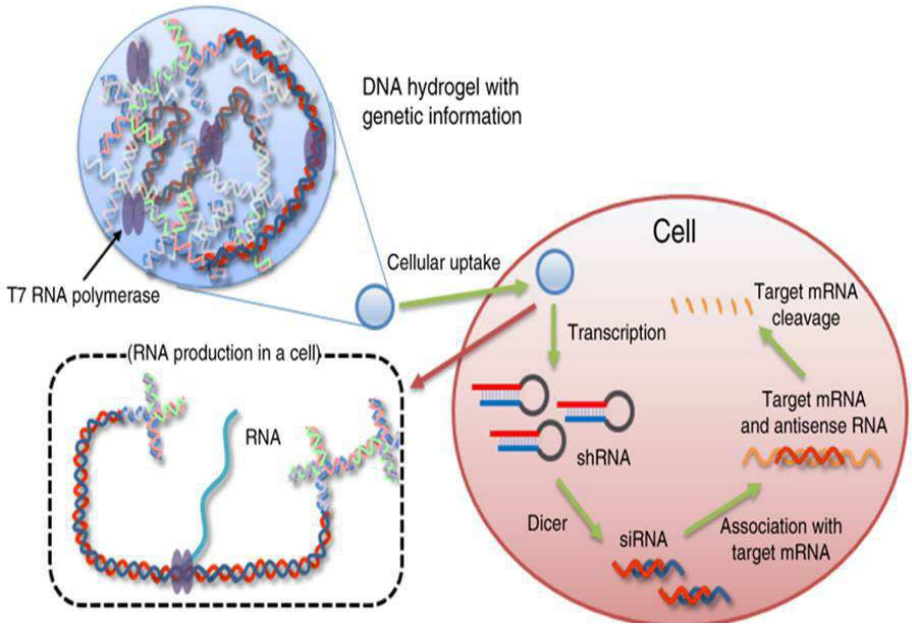
[0207] 29. Ren, K. et al. A DNA dual lock-and-key strategy for cell-subtype-specific siRNA delivery. Nat. Commun. 7, 13580 (2016).

[0208] 30. Holm, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Stat. 6, 65-70 (1979).

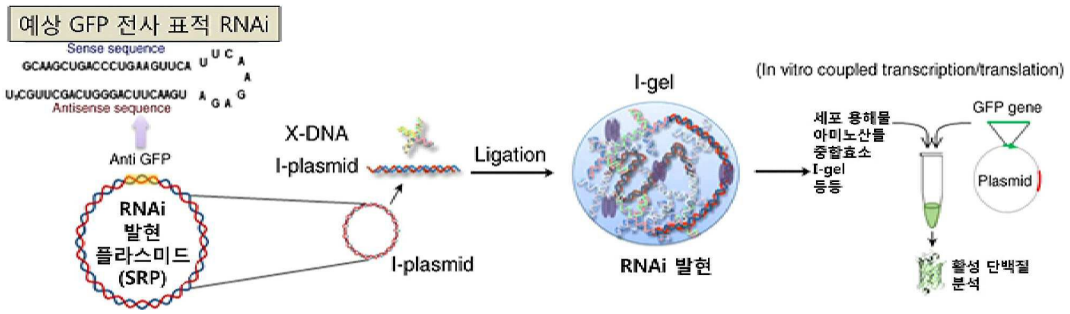
[0209] 31. Tan W, Donovan MJ, Jiang J. Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications. Chem. Rev. 113, 2842-62 (2013).

도면

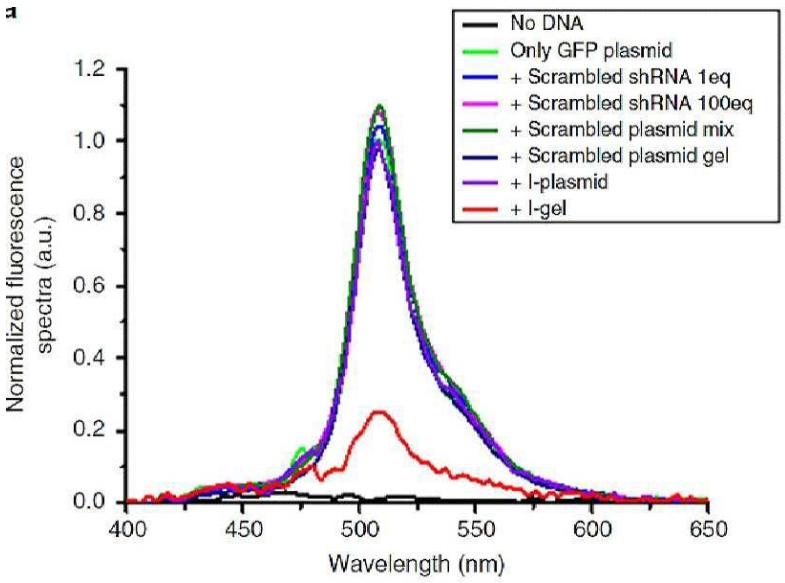
도면1a



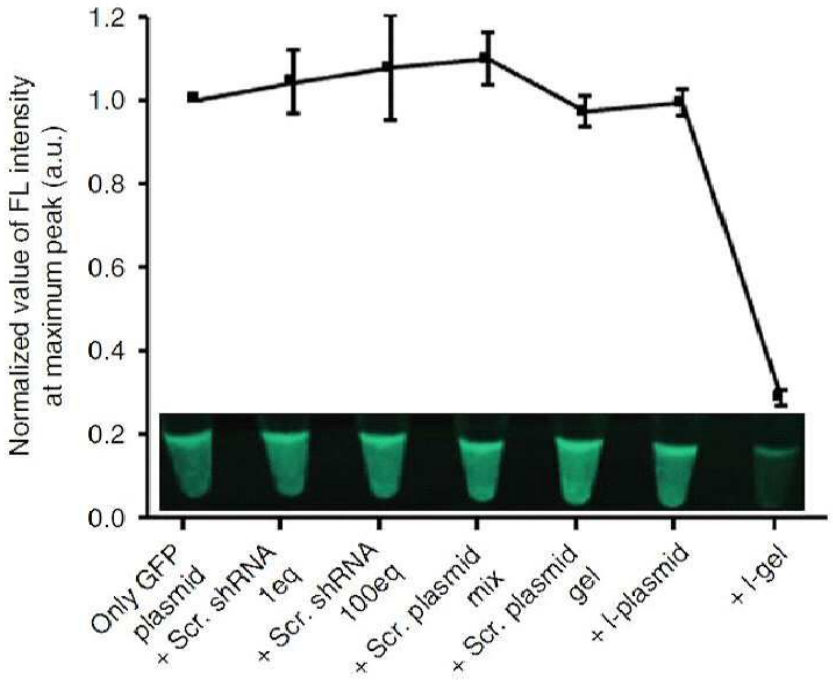
도면1b



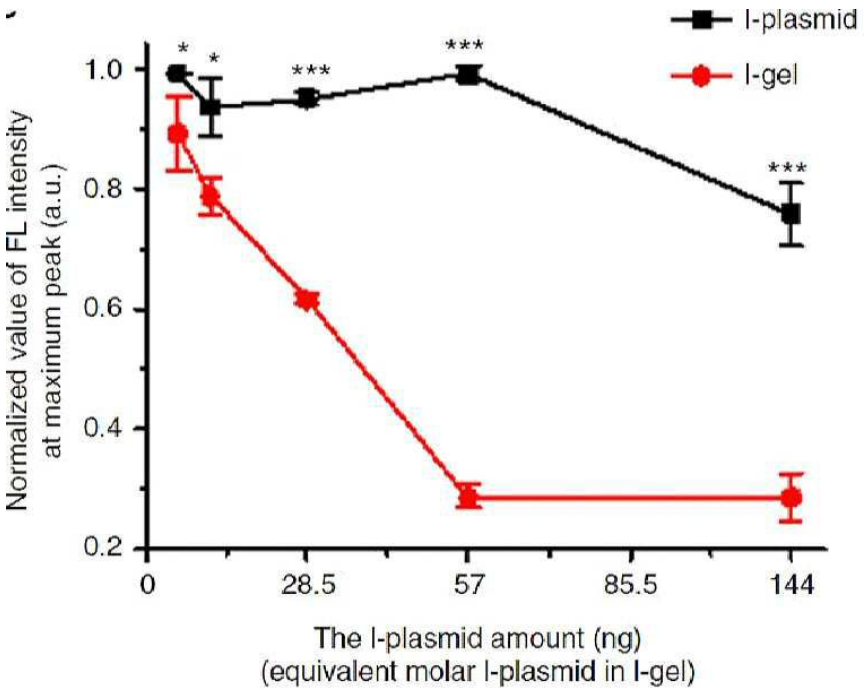
도면2a



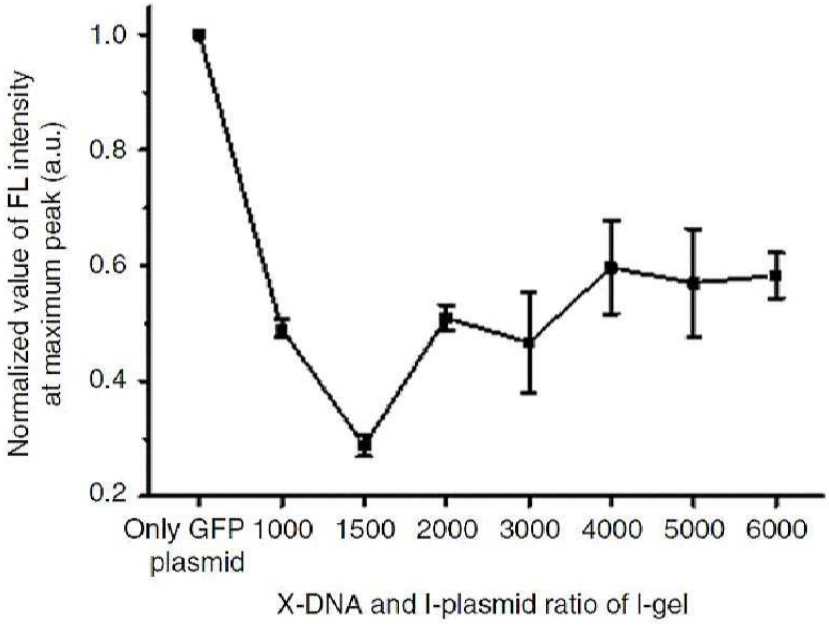
도면2b



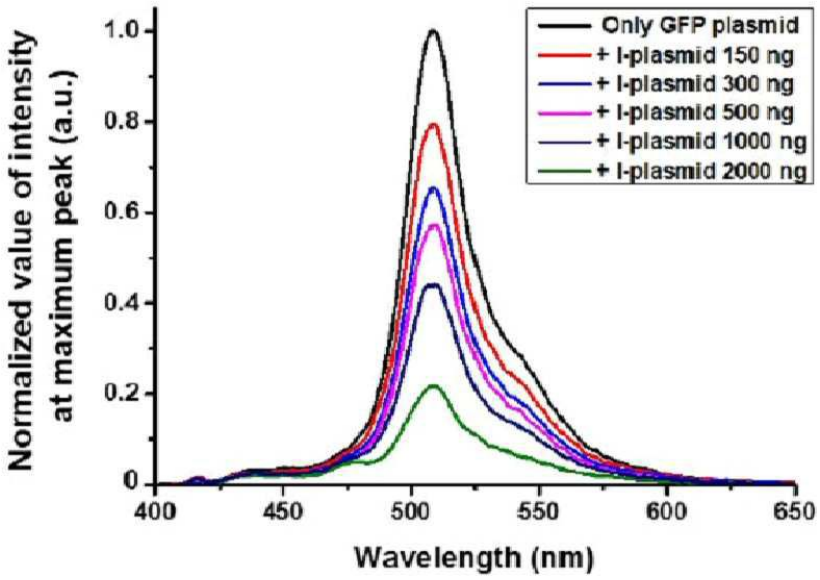
도면2c


I-plasmid
I-gel
Normalized value of FL intensity at maximum peak (a.u.)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
28.5
57
85.5
144
*
*
***
***
***
The I-plasmid amount (ng)
(equivalent molar I-plasmid in I-gel)

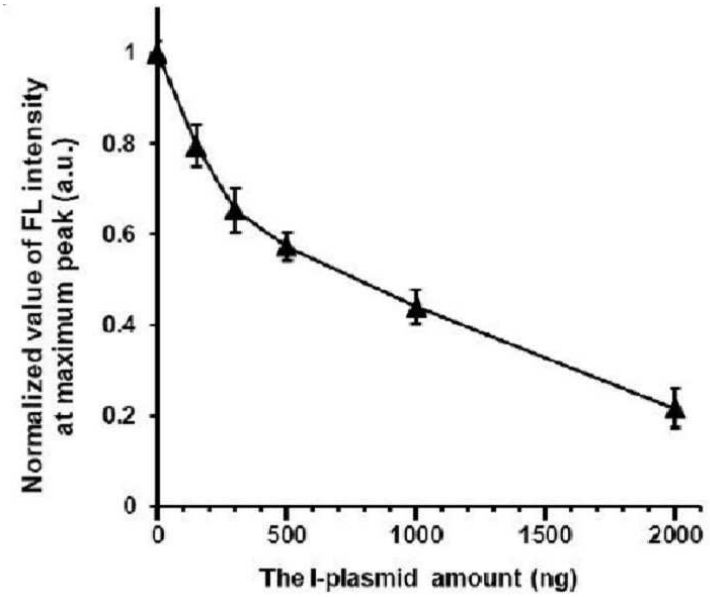
도면2d


Normalized value of FL intensity at maximum peak (a.u.)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
Only GFP plasmid
1000
1500
2000
3000
4000
5000
6000
X-DNA and I-plasmid ratio of I-gel

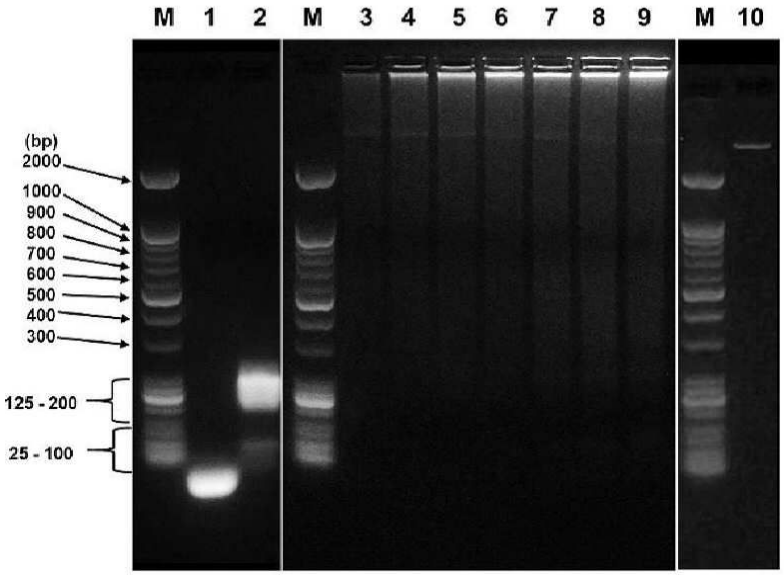
도면2e


Only GFP plasmid
+ I-plasmid 150 ng
+ I-plasmid 300 ng
+ I-plasmid 500 ng
+ I-plasmid 1000 ng
+ I-plasmid 2000 ng
Normalized value of intensity at maximum peak (a.u.)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
400
450
500
550
600
650
Wavelength (nm)

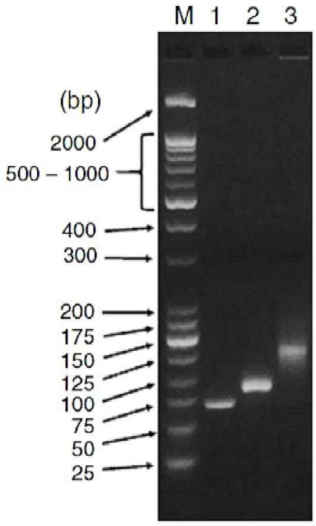
도면2f


Normalized value of FL intensity at maximum peak (a.u.)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
500
1000
1500
2000
The I-plasmid amount (ng)

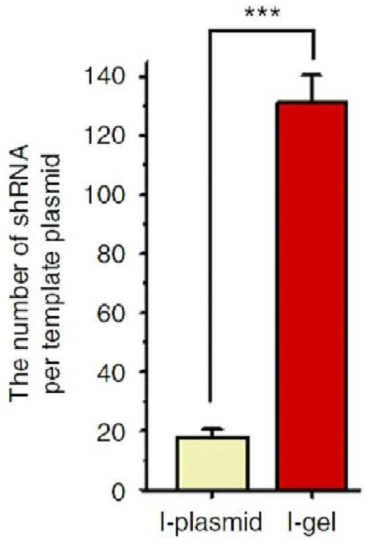
도면2g


M 1 2 M 3 4 5 6 7 8 9 M 10
(bp)
2000
1000
900
800
700
600
500
400
300
125 - 200
25 - 100

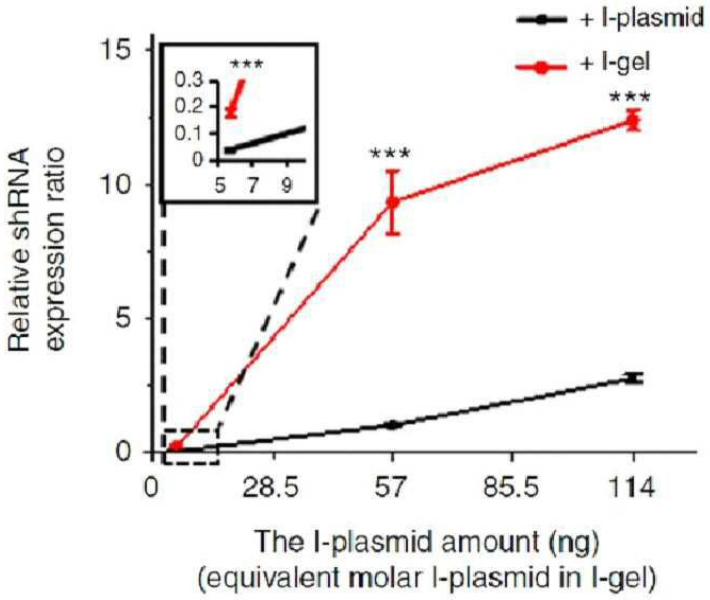
도면3a


M 1 2 3
(bp)
2000
500 – 1000
400
300
200
175
150
125
100
75
50
25

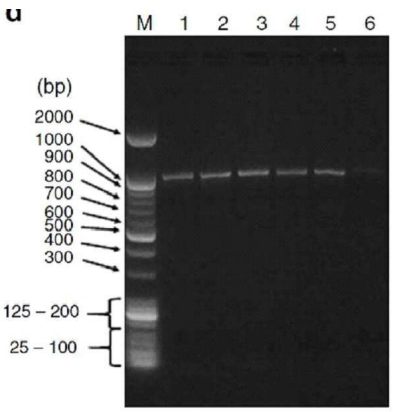
도면3b



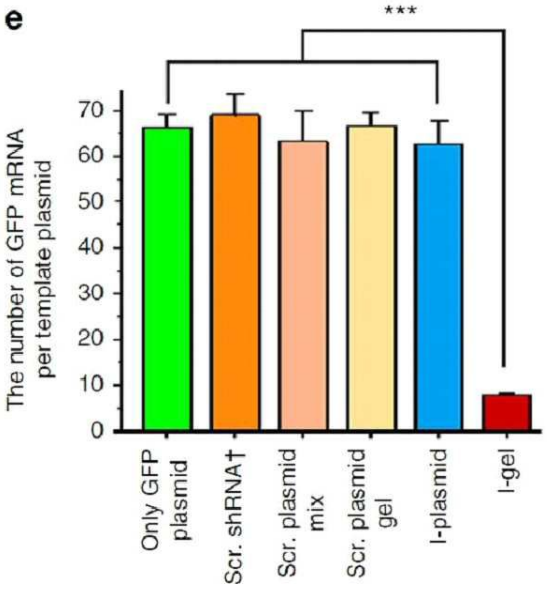
도면3c



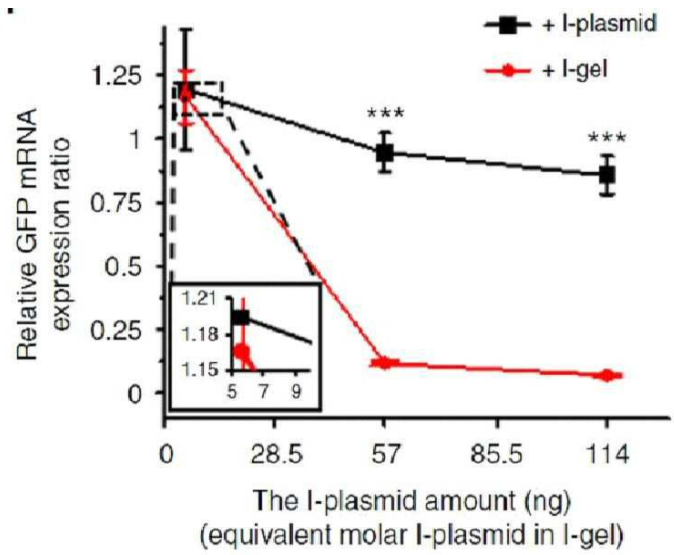
도면3d



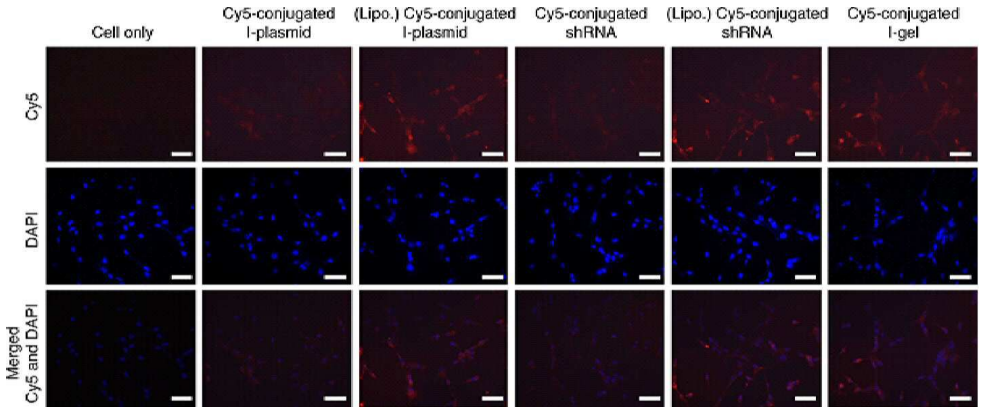
도면3e



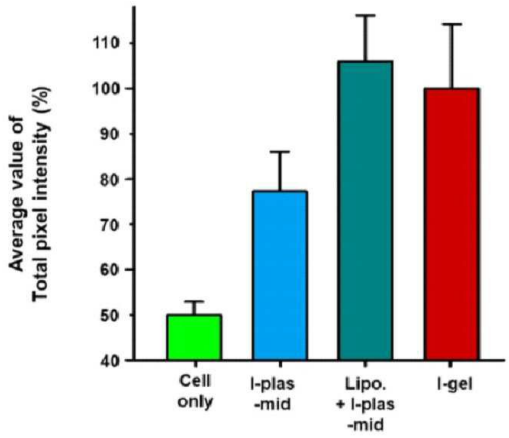
도면3f



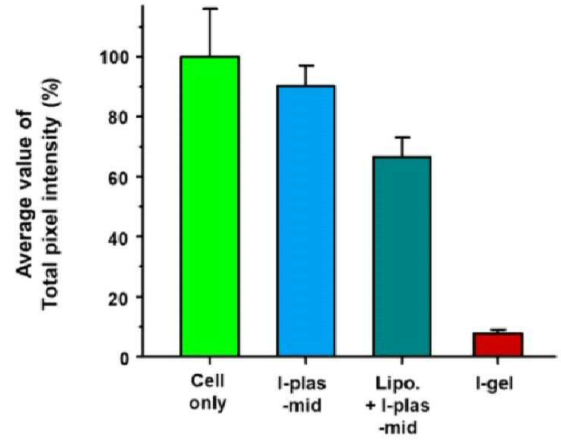
도면4a



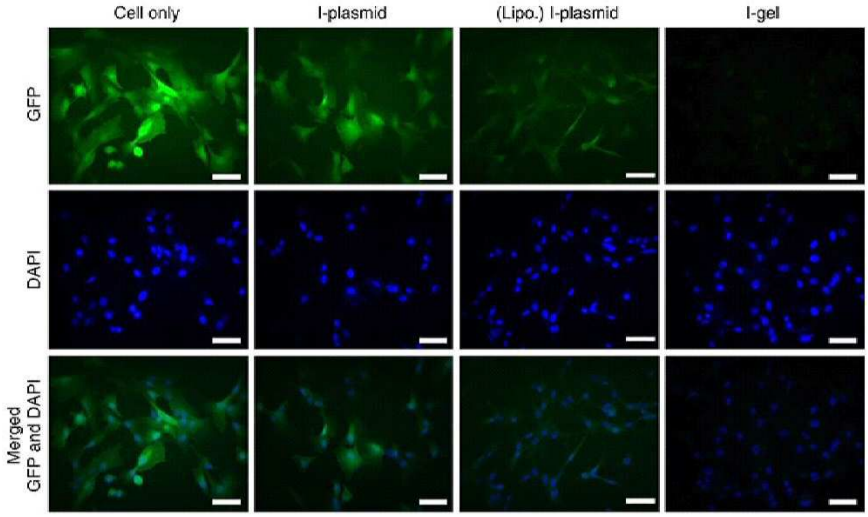
도면4b



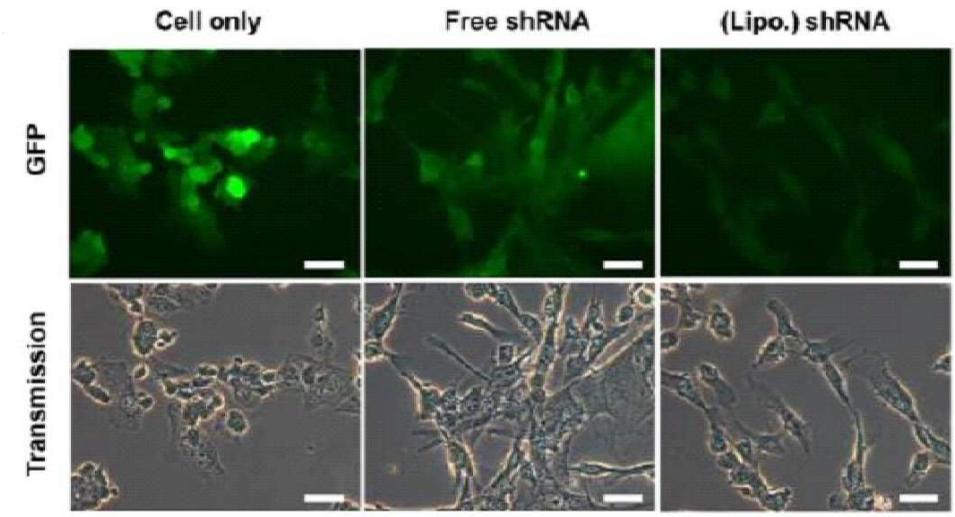
도면4c



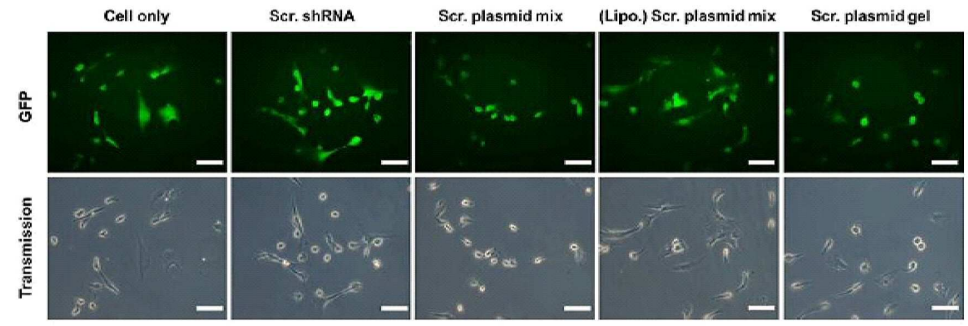
도면5a



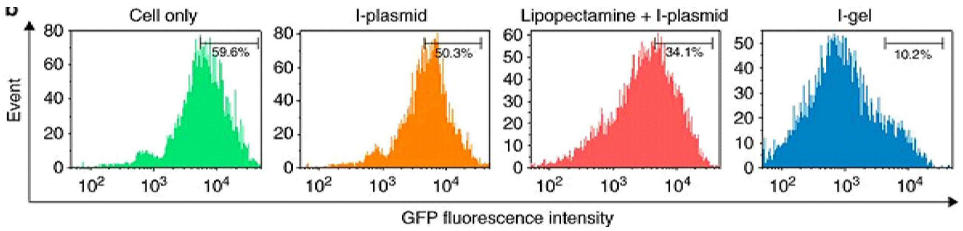
도면5b



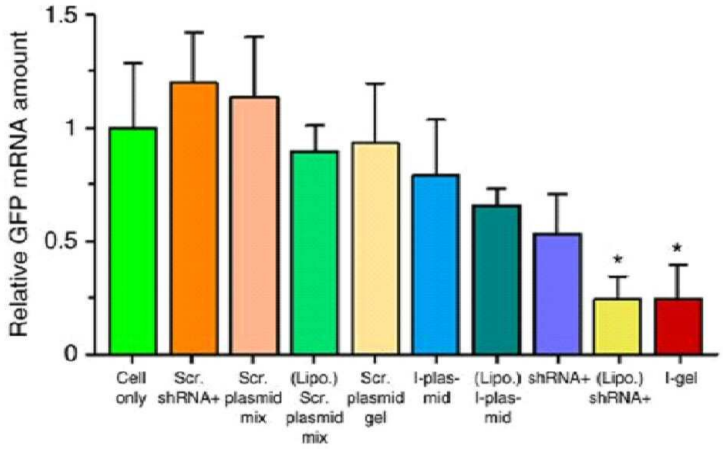
도면5c



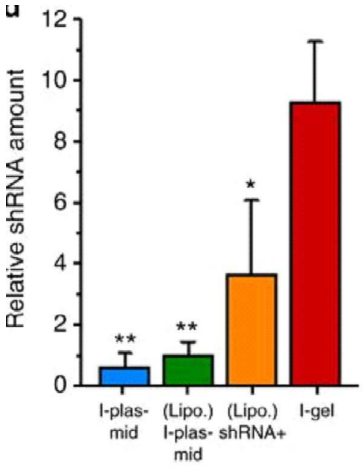
도면5d



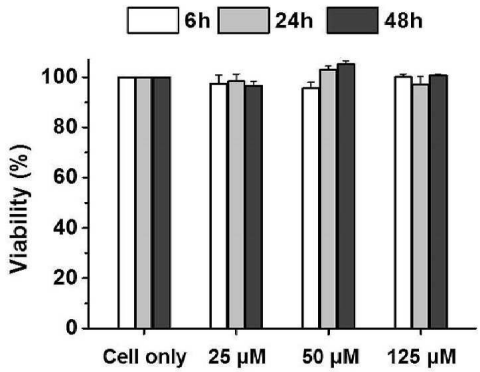
도면5e



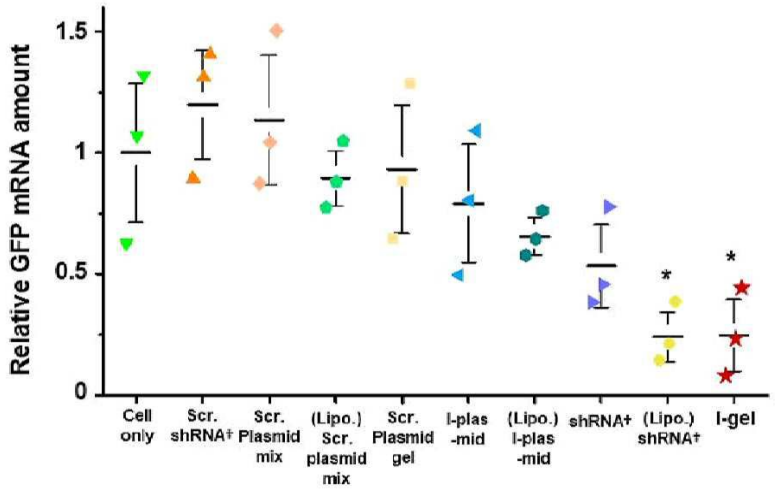
도면5f



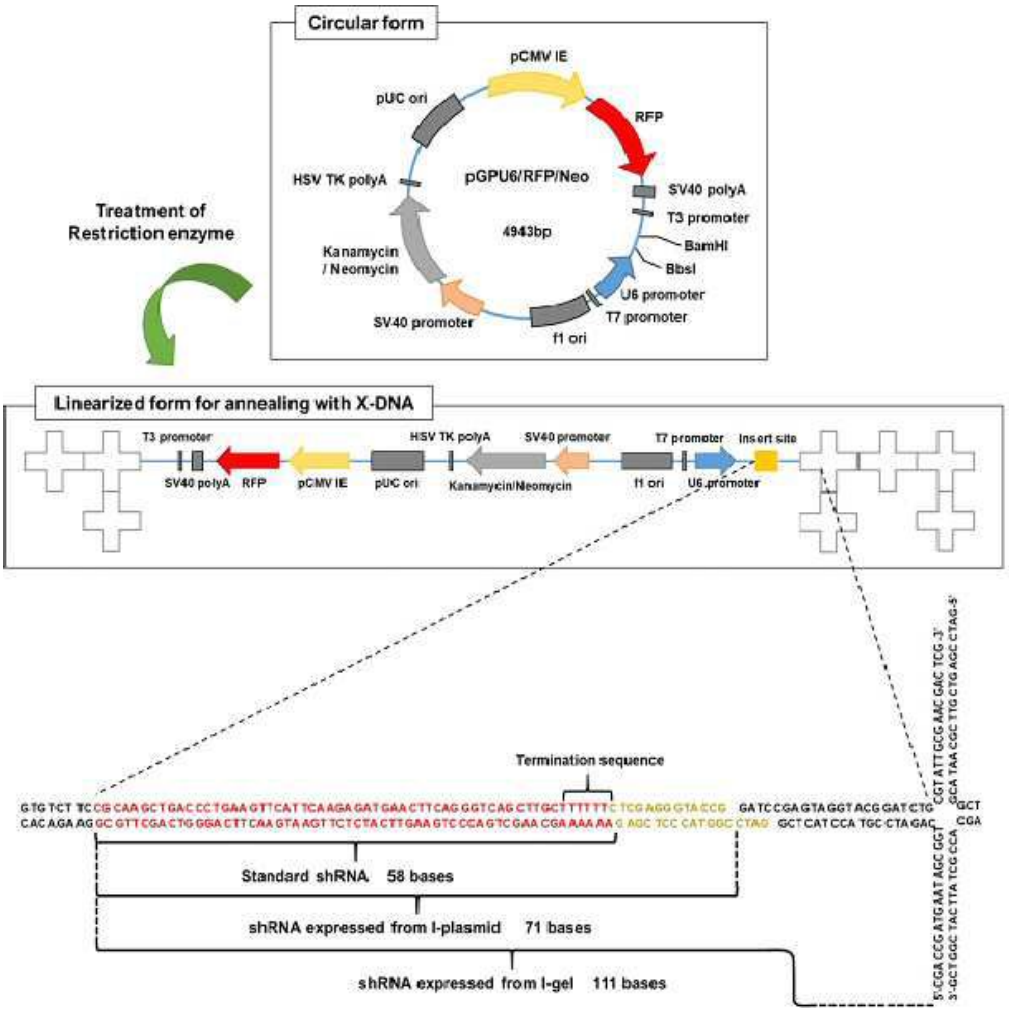
도면5g



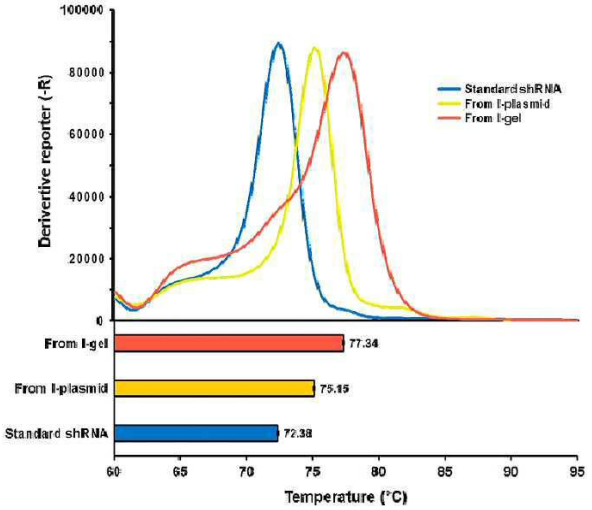
도면6


Relative GFP mRNA amount
1.5
1
0.5
0
Cell only
Scr. shRNA†
Scr. Plasmid mix
(Lipo.) Scr. plasmid mix
Scr. Plasmid gel
l-plas -mid
(Lipo.) l-plas -mid
shRNA†
(Lipo.) shRNA†
l-gel
*
*

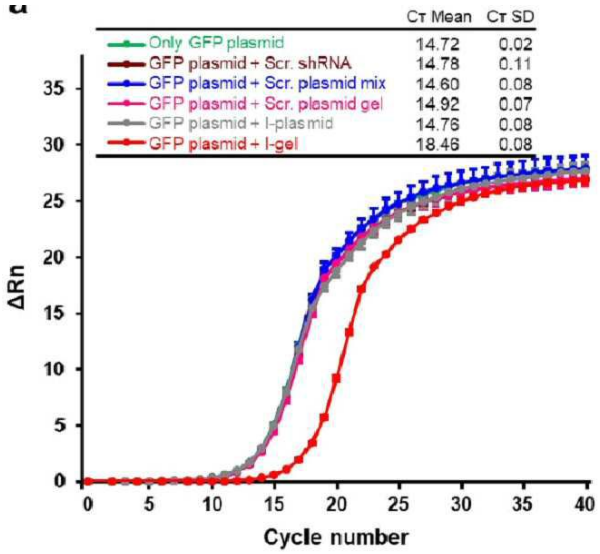
도면7


Circular form
pCMV IE
pUC ori
RFP
HSV TK polyA
pGPU6/RFP/Neo
SV40 polyA
T3 promoter
4943bp
BamHI
BbsI
Kanamycin / Neomycin
U6 promoter
SV40 promoter
T7 promoter
f1 ori
Treatment of Restriction enzyme
Linearized form for annealing with X-DNA
T3 promoter
HSV TK polyA
SV40 promoter
T7 promoter
Insert site
SV40 polyA
RFP
pCMV IE
pUC ori
Kanamycin/Neomycin
f1 ori
U6 promoter
Termination sequence
Standard shRNA 58 bases
shRNA expressed from l-plasmid 71 bases
shRNA expressed from l-gel 111 bases

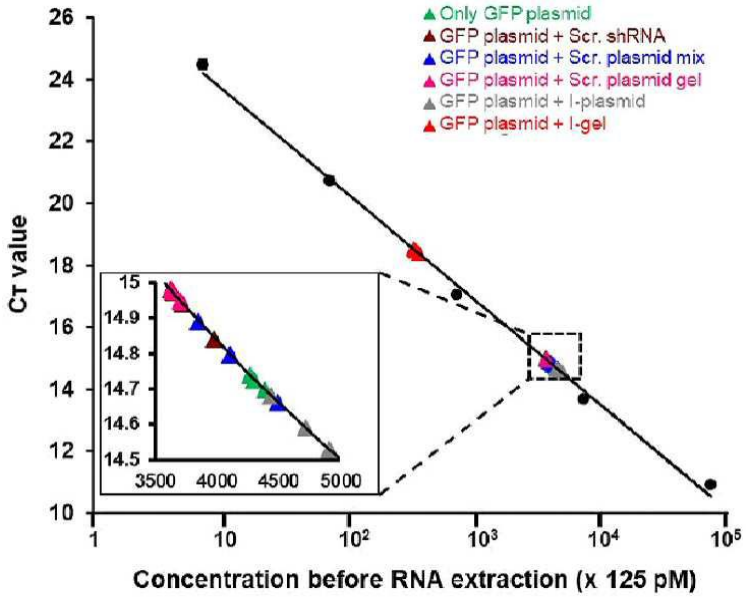
도면8


Derivertive reporter (-R)
100000
80000
60000
40000
20000
0
Standard shRNA
From I-plasmid
From I-gel
From I-gel
77.34
From I-plasmid
75.15
Standard shRNA
72.38
60
65
70
75
80
85
90
95
Temperature (°C)

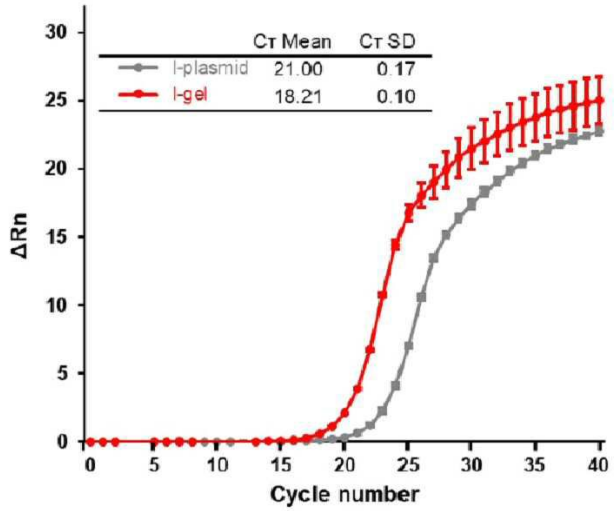
도면9a


a
Ct Mean
Ct SD
Only GFP plasmid
14.72
0.02
GFP plasmid + Scr. shRNA
14.78
0.11
GFP plasmid + Scr. plasmid mix
14.60
0.08
GFP plasmid + Scr. plasmid gel
14.92
0.07
GFP plasmid + I-plasmid
14.76
0.08
GFP plasmid + I-gel
18.46
0.08
ΔRn
35
30
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Cycle number

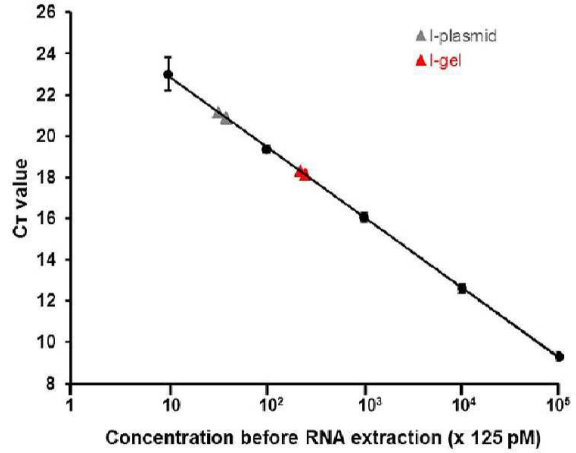
도면9b



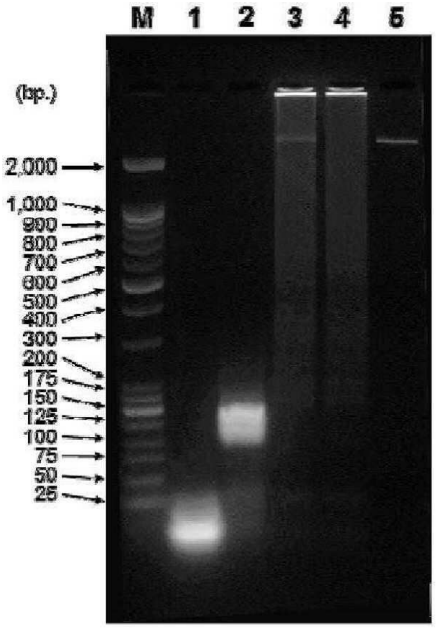
도면9c



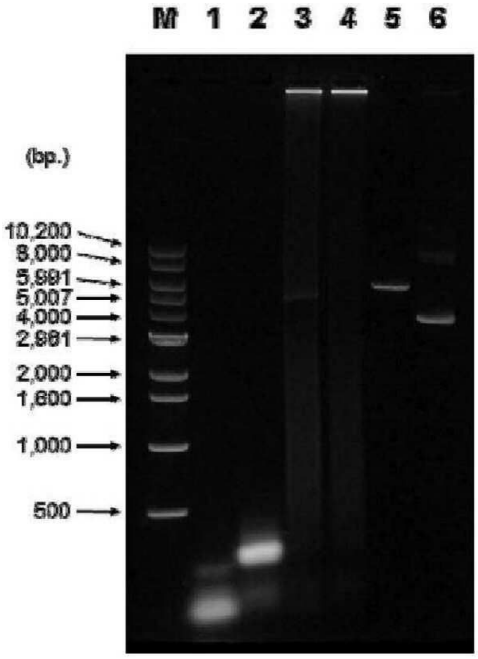
도면9d



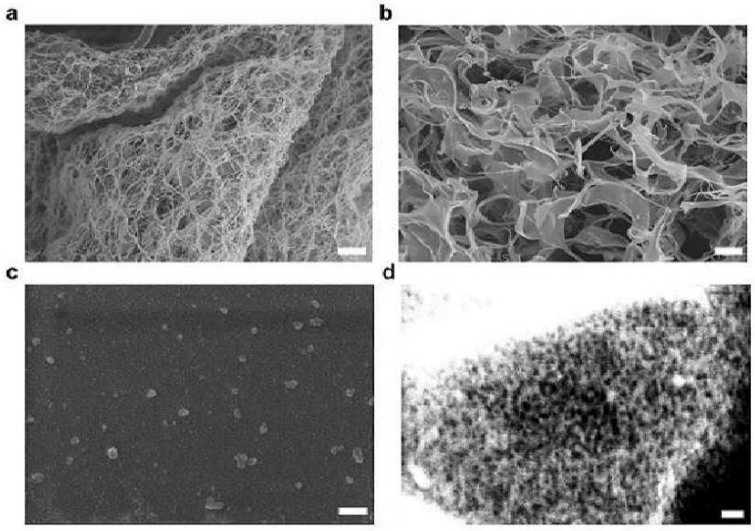
도면10


M 1 2 3 4 5
(bp.)
2,000
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
175
150
125
100
75
50
25

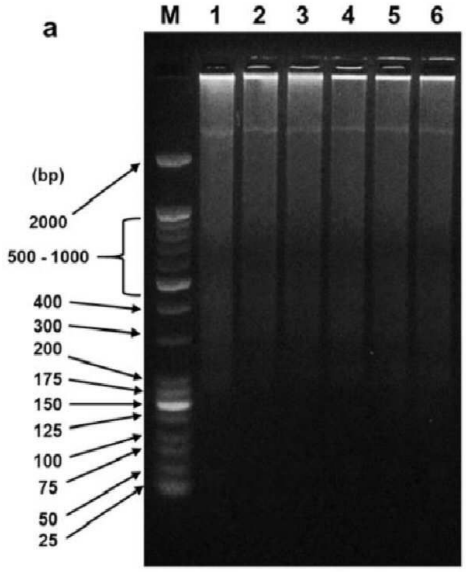
도면11


M 1 2 3 4 5 6
(bp.)
10,200
8,000
5,991
5,007
4,000
2,991
2,000
1,600
1,000
500

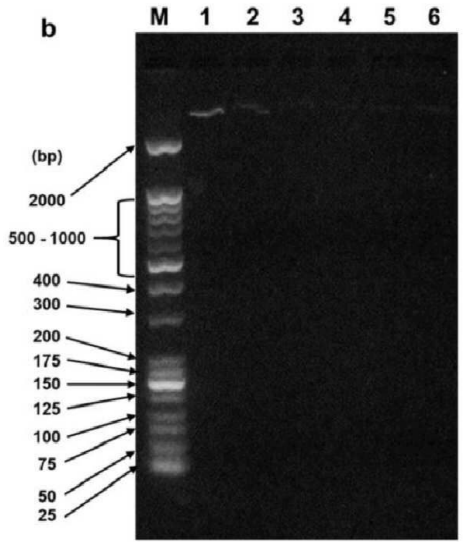
도면12


a
b
c
d

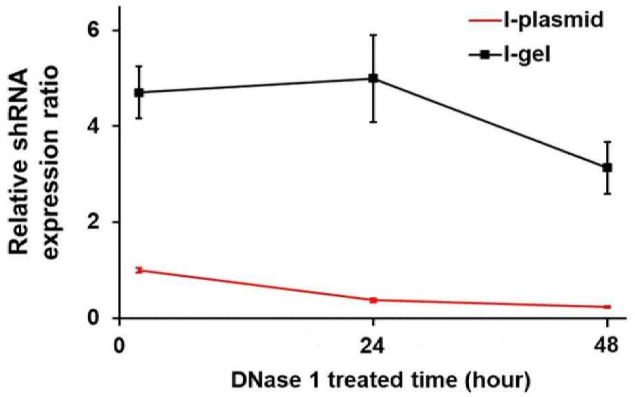
도면13a


a
M 1 2 3 4 5 6
(bp)
2000
500 - 1000
400
300
200
175
150
125
100
75
50
25

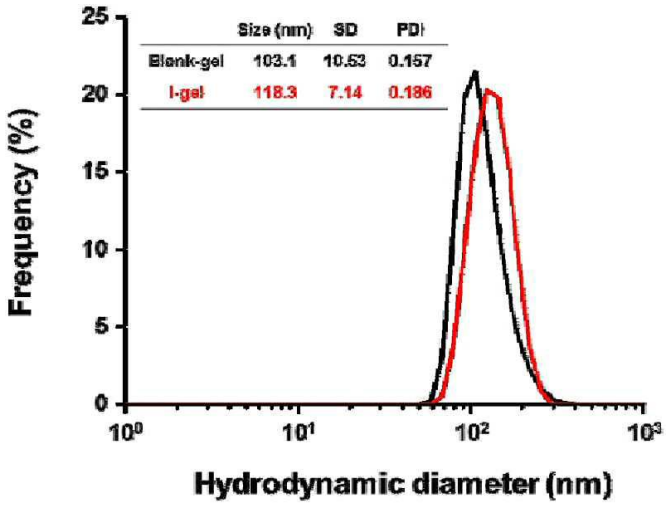
도면13b



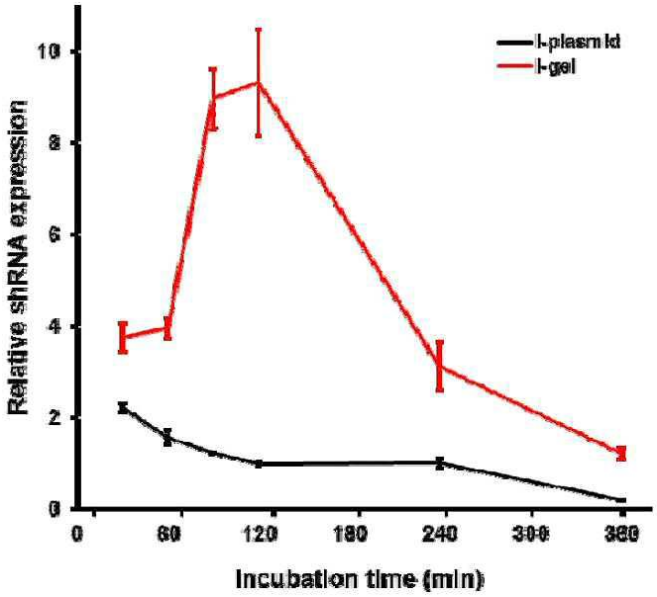
도면13c



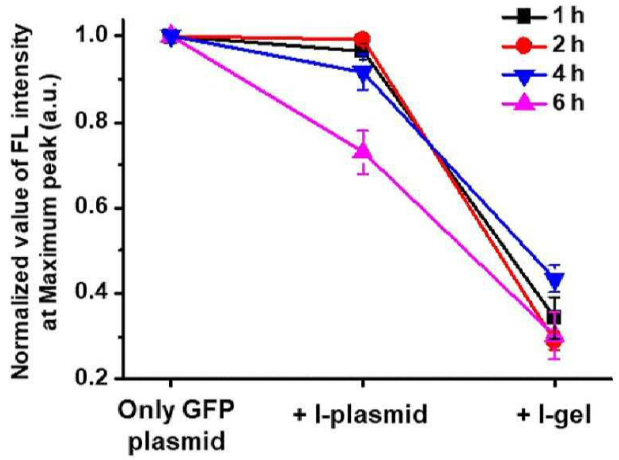
도면14



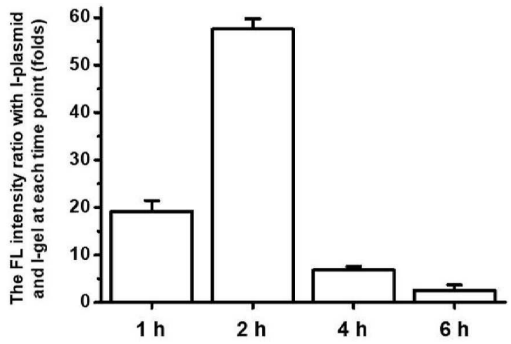
도면15



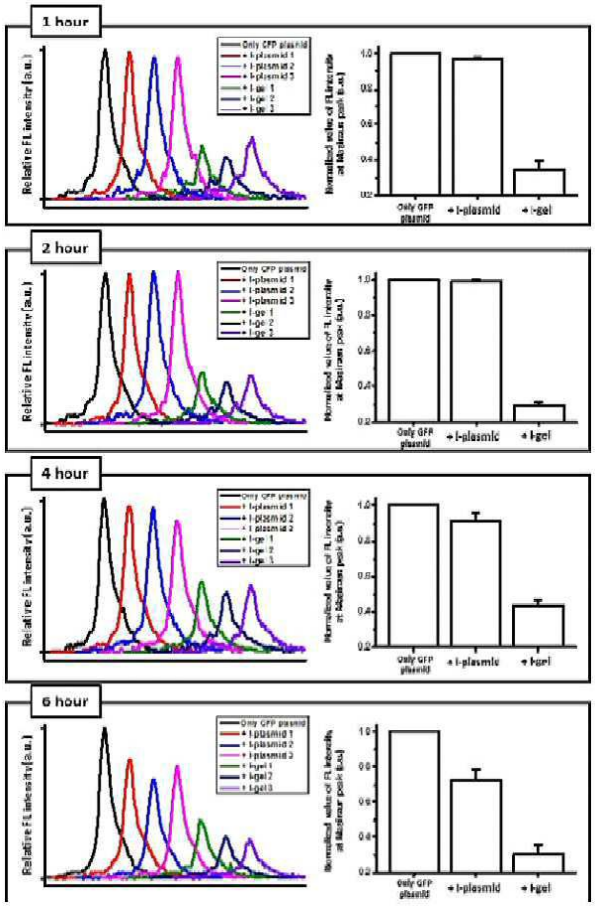
도면16a



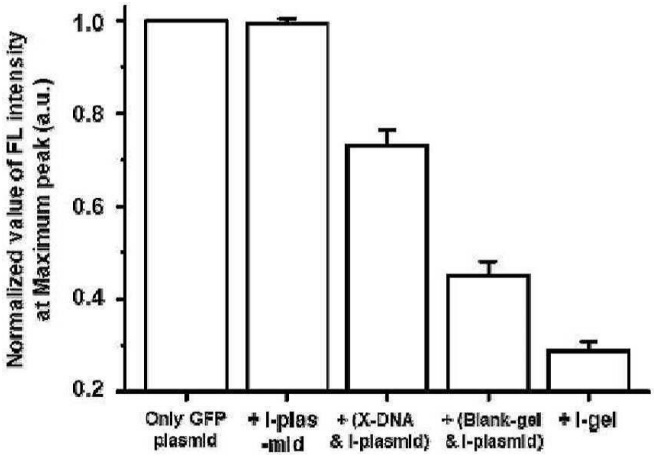
도면16b



도면17



도면18



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Myongji University Industry and Academia Cooperation Foundation

<120> A NOVEL RNA INTERFERENCE SYSTEM AND AN USE THEREOF

<130> P18U10C0772

<160> 13

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> X-DNA for DNA hydrogel

<400> 1

cgaccgatga atagcggtca gatccgtacc tactcg 36

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> X-DNA for DNA hydrogel

<400> 2

cgagtaggta cggatctgcg tattgcgaac gactcg 36

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> X-DNA for DNA hydrogel

<400> 3

cgagtcgttc gcaatacggc tgtacgtatg gtctcg 36

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> X-DNA for DNA hydrogel

<400> 4

cgagaccata cgtacagcac cgctattcat cggtcg 36

<210> 5

<211> 4

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> sticky end of DNA

<400> 5

gatc 4

<210> 6

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> spacer sequence for plasmid

<400> 6

gtgtcttc 8

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Spacer and Restriction sequence for plasmid

<400> 7

ctcgagggta ccggatcc 18

<210> 8

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> inserted sequence in siRNA expression plasmid

<400> 8

gtgtcttccg caagctgacc ctgaagttca ttcaagagat gaacttcagg gtcagcttgc 60

tttttt 66

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer for shRNA

<400> 9

cttcagggtc agcttgcttt 20

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer for shRNA

<400> 10

gcgagcacag aattaatacg ac 22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Forward primer for GFP mRNA

<400> 11

gtctttcccc tctcgccaaa 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Reverse primer for GFP mRNA

<400> 12

ttctgcttgt cggccatgat 20

<210> 13

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> RT-primer

<220><221> misc_feature

<223> V is A, C and G

<220><221

> misc_feature

<223> V is A, C and G

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 13

gcgagcacag aattaatacg actcactata ggttttttt ttttvn 46