

삼차원 핵산자기조립 나노입자를 이용한 siRNA 전달에 관한 연구

Self-assembled 3-D Nucleic Acid Nanoparticles for the Efficient Delivery of Therapeutic RNAs

홍철암 · 정은혜 · 이혁진 | Cheol Am Hong · Eun Hye Jeong · Hyukjin Lee

College of Pharmacy, Ewha Womans University, 52, Ewhayeodae-gil, Seodaemun-gu, Seoul 120-750, Korea
E-mail: hyukjin@ewha.ac.kr

1. 서론

21세기 초, 인간 유전체의 염기서열이 완전히 규명됨으로서 유전자 치료제의 가능성이 대두되었다. 이러한 가능성을 기반으로 유전자 검색을 통해 유전병을 예측하고 질병을 치료할 수 있는 예측의약과 개개인의 유전자 차이를 이용한 개인 맞춤형의약 시대가 열리고 있다.^{1,2} 최근 RNA 간섭(RNA interference, RNAi)이 규명됨으로서 난치성 질병과 유전 질환을 치료하는 데 새로운 유전자 치료법으로 큰 관심을 받고 있다.³ RNA 간섭은 이중 가닥 siRNA(small interfering RNA)와 상보적인 염기서열을 갖는 mRNA를 선택적으로 분해하여 해당 유전자의 발현을 억제하는 생물학적 현상이다.⁴ 기존 약물인 단백질, 항체, 소분자들은 질병의 결과인 증상을 완화 및 억제하는 치료임에 반해 siRNA는 질병의 원인이 되는 유전자를 근본적으로 치료한다. 성공적인 siRNA 치료법은 외부의 siRNA를 세포 내로 안정적으로 전달하는 것이 필수적이다. 외부의 siRNA를 세포내도입 방식은 바이러스를 이용한 바이러스성 전달과 양이온 고분자, 지질, 금속물질을 이용한 비바이러스성 전달체가 있다.^{5,6} 바이러스성 전달체는 바이러스의 유전물질을 숙주 세포 내로 감염시키는 고유특성을 이용하여 높은 siRNA 전달효율성을 보이지만, 전달체 자체가 야기하는 면역반응으로 반복적 사용이 어렵고 병원성 감염의 잠재적 위험성이 있다. 반면 독성이 낮고 제조가 용이한 비바이러스성 전달체의 경우 안정성에 대한 장점을 갖는것이 일반적이다. 이러한 비바이러스성 전달체의 경우 세포내도입이 용이한 나노입자(30 ~ 200 nm)를 주로 형성한다. 그러나, 비바이러스성 전달체는 나노입자의 크기, 모양, 리간드 위치와 양을 규명하기 어렵고 낮은 유전자 전달효율성을 갖는다. 따라서, siRNA 치료법은 siRNA를 안정적이고 효율적으로 세포 내로 전달할 수 있는 전달체의 개발이 절실히 요구되고 있다.

DNA는 대부분 생명체의 유전물질로 유전정보를 담고 있다. 최근, DNA의 상보적인 염기서열간의 선택적

Author



홍철암

2009 충남대학교 생화학 (학사)
2013 한국과학기술원 (KAIST) 생명과학 (박사)
2013-현재 이화여자대학교 약학대학 (박사후연구원)



정은혜

2013 대전대학교 생명과학 (학사)
2013-현재 이화여자대학교 약학대학 (석박사통합과정)



이혁진

2002 Johns Hopkins University, Biomedical Engineering (학사)
2004 Columbia University, Biomedical Engineering (석사)
2009 한국과학기술원 (KAIST) 생명과학 (박사)
2009-2010 한국과학기술원 (KAIST) 화학과 (박사후연구원)
2010-2012 MIT (박사후연구원)
2012-현재 이화여자대학교 약학대학 조교수

결합을 이용하여 복잡한 나노크기의 구조를 용이하게 제조할 수 있는 재료로 사용되고 있다.⁷ 특히, DNA는 생체재료 물질로 생체적합성이 매우 우수하여 약물전달학, 조직공학, 의공학 분야에서 활발한 연구가 진행되고 있다.⁸⁻¹⁰

본 연구는 생체재료인 DNA의 자기조립을 이용하여 치료용 siRNA를 세포내로 효과적으로 전달할 수 있는 전달체로 삼차원의 DNA 나노입자를 개발하였다.¹¹ 제조된 DNA 나노입자는 siRNA의 혈류 내 체류시간을 증가시켜 siRNA 반감기를 향상시켰으며, 세포독성과 면역반응의 위험성이 없었다. 더욱이, DNA 나노입자 표면에 암세포와 특이적 결합하는 표적리간드의 공간적 배열과 밀도를 정확하게 조절하여 세포내 선택적 전달효율성을 비약적으로 증가시켜 표적세포 내의 타겟유전자의 mRNA와 단백질 발현을 억제하였다.

2. 본론

2.1 삼차원 핵산자기조립 나노입자 제조 및 생물리학적 특징

6개의 DNA 단일가닥들이 왓슨-크릭 염기쌍 결합으로 총 186개의 염기쌍으로 구성된 나노크기의 핵산 나노입자를 제조하였다. 그들의 각 변 중심에는 20개 염기로 이루어진 단일가닥 sticky overhang을 갖는다. 이는 상보적인 염기서열을 갖는 overhang 구조가 도입된 siRNA를 효과적으로 나노입자에 접목하였다. 따라서, 제조된 DNA 나노입자 한 분자에는 최대 6개의 siRNA를 접목시킬 수 있다. 계획된 나노입자는 한 변이 30개 염기쌍으로 높이가 대략 8 nm의 정사면체 구조이다.

폴리아크릴아미드 젤 전기영동을 통해 나노입자의 순차적 합성과정과 합성 수득율을 분석하였다. 나노입자를 구성하는 DNA 가닥들이 순차적으로 증가함에 따라 점점 높은 분자량을 갖는 입자가 형성되는 것을 확인하였으며, 6개의 DNA 가닥이 모두 구성된 나노입자는 95% 이상의 높은 수득율을 보였다. 제조된 나노입자와 siRNA를 1:6 몰비율로

접목시킨 경우에 뚜렷한 밴드 이동이 확인되었으며, 수득율은 ~98%이다(그림 1(a)). 이와 같이 제조된 핵산 나노입자는 안정적이고 효과적으로 siRNA를 접목하여 약물형 유전자 전달체로 사용될 수 있다. 더욱이, DNA 나노입자에 접목된 siRNA의 혈류 내 반감기는 24분으로 기존의 siRNA 반감기(6분)보다 높았다. 이는 혈류내 안정성이 매우 낮아 쉽게 분해되어 표적세포 내의 siRNA 전달의 어려움을 크게 향상시킬 수 있다.

수용액상에서 제조된 나노입자의 크기와 구조를 AFM(atomic force microscopy) 분석하였다. 그림 1(b)에서 보는 바와 같이 매우 균일하고 견고한 나노크기의 입자를 확인하였으며, 측정된 나노입자의 높이는 대략 7.8 nm이다. 이는 이론적으로 계산된 나노입자 크기(8 nm)와 매우 비슷하였다. 특히, 확대한 그림에서 세 면이 한 지점에 만나는 꼭짓점은 매우 뾰족한 각을 보였다. 입자크기를 측정하는 DLS(dynamic light scattering) 분석 결과 DNA 나노입자는 대략 28.6 nm으로 매우 좁은 입자크기 분포도 가졌다. 이와 같이 핵산자기조립 기술을 이용한 구조체 형성은 매우 균일하고 견고한 나노입자를 용이하게 제조할 수 있다.

기존의 양이온성 전달체는 약물형 유전자와 정전기적 결합으로 안정한 나노입자를 형성되지만, 그들의 입자크기는 불균등하고 나노입자 안에 포집된 약물의 양을 정확히 알 수 없다.¹² 그러나, 핵산 자기조립기술로 제조된 나노입자는 매우 균등한 크기를 갖는다. 또한, 여러 종류의 치료용 siRNA를 동시에 DNA 나노입자에 접목시킬 수 있으며 특히 공간적 배열과 약물의 포집량을 정확히 조절할 수 있다.

2.2 표적세포 지향성 핵산자기조립 나노입자 및 *in vivo* 유전자 저해효과

DNA 자기조립으로 만들어진 삼차원 나노입자의 표면은 강한 음전하와 친수성을 띄기 때문에 음전하와 소수성 지질 이중막으로 된 세포벽을 통과하여 내부로의 전달이 매우 어

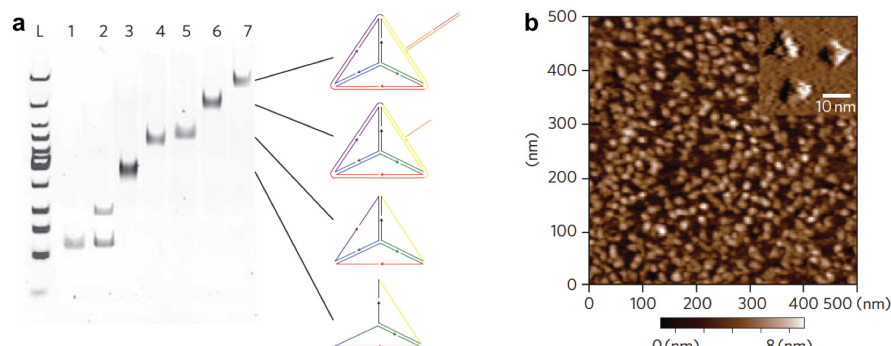


그림 1. DNA 자기조립기술로 제조된 나노입자 : (a) DNA 가닥들의 순차적 증가에 따른 DNA 구조체 형성과정을 폴리아크릴아미드 젤 전기영동으로 분석함. (1. 가닥 1, 2. 가닥 1과 2 결합, 3. 가닥 1-3 결합, 4. 가닥 1-4 결합, 5. 가닥 1-5 결합, 6. 가닥 1-6 결합, 7. 가닥 1-6과 siRNA 결합), (b) DNA 나노입자의 AFM 그림.

렵다. 이를 극복하기 위해 종양세포 표면과 결합 특이성을 갖는 다양한 리간드를 DNA 나노입자에 도입하여 세포 내 전달 효율성을 확인하였다(그림 2(a)). siRNA 말단에 리간드를 화학적 결합으로 DNA 나노입자에 접목하였다. 그 중에서 folate 리간드가 도입된 DNA 나노입자가 가장 효과적으로 세포 내 타겟유전자를 저해하였다. 일부 양이온성 리간드(HpH1, Penetratin)가 도입된 경우에 타겟유전자 저해효과를 보였으나, 그들의 양전하 표면은 음전하의 DNA 나노입자와 정전기적 결합으로 나노입자의 구조적 안정성을 저해하였다.

DNA 나노입자의 6개 sticky overhang 구조는 정확하게 원하는 위치에 리간드를 접목시킬 수 있다. 최적의 세포내 전달 효율성을 보인 folate 리간드를 선택하여 DNA 나노입자에 선택적으로 접목시켜 리간드간의 밀도와 공간적 배열에 따른 세포내 도입과 타겟유전자 저해효율성을 분석하였다(그림 2(b)-(e)). DNA 나노입자의 세포내 타겟유전자 저해를 위해서는 최소 3개 이상의 folate 리간드 도입이 요구되었다. 그러나, 도입된 3개의 리간드를 공간적으로 가장 멀리 배열한 경우 잠재적인 유전자 저해효과를 확인할 수 없었다. 따라서, 삼차원 DNA 나노입자의 리간드 밀도와 공간적인 배열은 세포 내 도입과 유전자 저해에 중요한 요인이라는 것을 본 연구에서 처음으로 규명하였다.

2.3 DNA 나노입자의 *in vivo* siRNA 전달 및 유전자 저해효과

본 연구에서 개발된 DNA 나노입자의 *in vivo* siRNA 전달 효과를 확인하기 위해 실험용 동물주를 대상으로 약물동력학(pharmacokinetics, PK)과 생체내 분포(biodistribution, BD)에 관한 연구를 진행하였다. 형광물질인 Cy5가 결합된 DNA

나노입자를 동물쥐 꼬리정맥에 주입하여 FMT-CT(fluorescence molecular tomography-computed tomography) 장비를 이용하여 분석하였다. 그림 3(a)에서 보는 바와 같이 DNA 나노입자는 표적 종양세포 주변으로 빠르게 도달(~ 15분)하였다. 이는 나노구조체의 siRNA 혈류내 반감기(24분)보다 빨라 siRNA를 종양세포에 안전하게 전달할 수 있다. 주요 장기내의 DNA 나노입자의 분포와 축적을 *ex vivo* 실험을 통해 확인하였다. DNA 나노입자 대부분은 종양세포와 신장에 축적되었으며 간, 신장, 이자, 폐에서는 전혀 발견되지 않았다. 따라서, 생체 내에서 DNA 나노입자는 종양세포에 선택적, 안정적으로 치료유전자인 siRNA를 전달 할 수 있다. DNA 나노입자의 siRNA 전달을 위한 잠재적 전달체로서의 가능성을 *in vivo* 유전자 저해효과를 통해 확인하였다.

DNA 나노입자를 종양세포를 갖는 실험용 동물쥐에 국소부위 주사(intratumour injection)와 전신부위 주사(tail-vein injection)를 한 결과 모두 효과적으로 표적유전자의 발현을 저해하였다(그림 3(c)-(d)). 더욱이, 외부물질 도입에 따른 면역반응으로 IFN- α (interferon- α)의 방출을 측정해본 결과 나노입자가 주입된 동물쥐 혈액에서 방출되는 양은 대조군(나노입자가 주입되지 않은 동물쥐)과 비교하여 큰 변화가 없었다. 따라서, 본 연구에서 제조된 DNA 나노입자는 면역반응없이 특이적으로 종양세포에 전달하여 세포내 타겟유전자를 효과적으로 저해하였다.

3. 결론

본 연구는 치료용 유전자인 siRNA를 효과적, 안정적, 특이적으로 종양세포에 전달할 수 있는 삼차원 DNA 나노입자

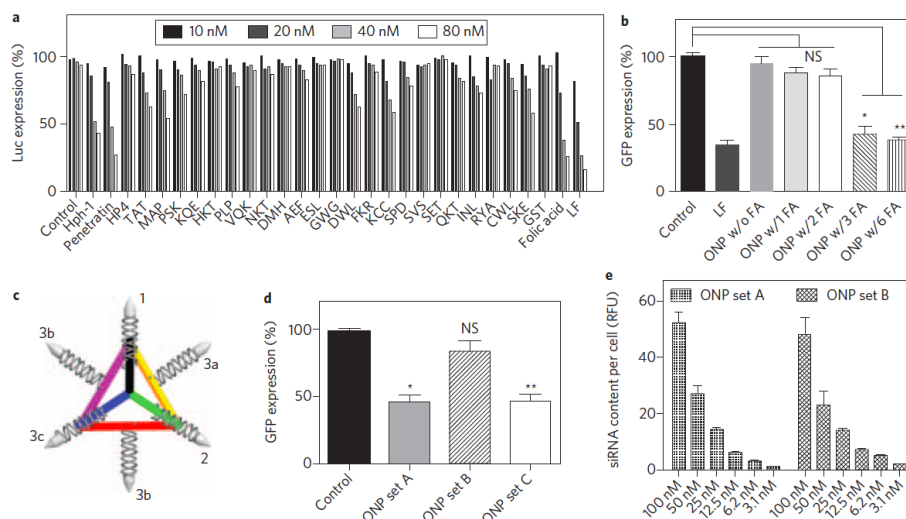


그림 2. DNA 나노입자의 *in vitro* 유전자 저해효과 : (a) 다양한 리간드 접목에 따른 DNA 나노입자의 유전자 저해효과 분석, (b) DNA 나노입자에 접목된 folate 밀도에 따른 유전자 저해효과, (c), (d) DNA 나노입자의 구조 및 나노입자에 접목된 리간드의 공간적 배열에 따른 유전자 저해효과, (Set A, 1, 2, 3a 위치에 접목된 리간드, Set B, 1, 2, 3b 위치에 접목된 리간드, Set C, 1, 2, 3c 위치에 접목된 리간드), (e) 다양한 siRNA 농도에 따른 두종류의 DNA 나노입자의 유전자 저해효과.

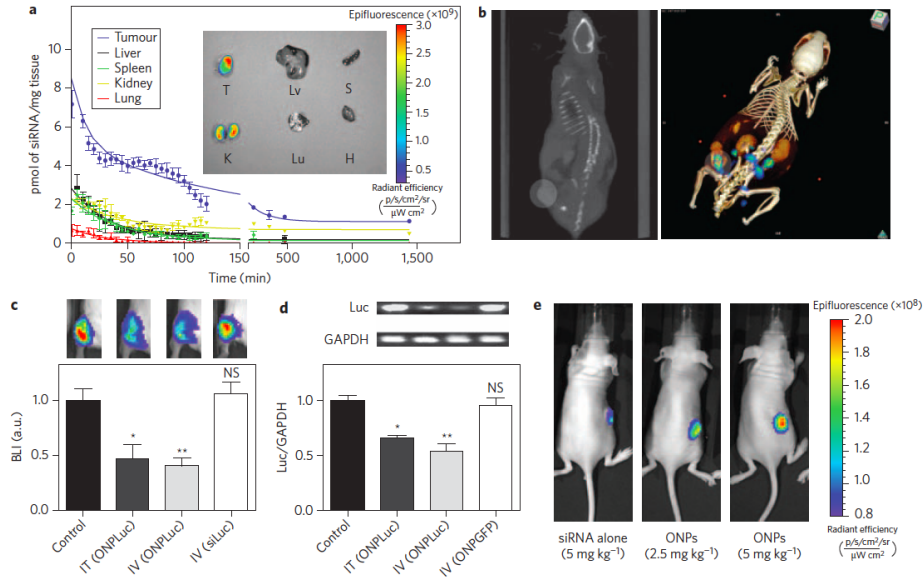


그림 3. DNA 나노입자의 *in vivo* 유전자 저해효과 : (a) 주요 장기들에서 DNA 나노입자의 약물동력학 분석 및 *ex vivo* 형광 그림(T, 종양, Lv, 간, S, 이자, K, 신장, Lu, 폐, H, 심장). (b) 형광물질 Cy5 결합된 DNA 나노입자의 생체내 분포를 CT (좌)와 FMT-CT 분석함 (우), (c), (d) *in vivo* 유전자 저해효과와 타겟 mRNA의 양적 분석(IT, 국소부위 주사, IV, 전신부위 주사, ONPLuc, DNA 나노입자에 접목된 Luc siRNA와 folate 리간드), (e) DNA 나노입자 농도에 따른 종양세포의 *in vivo* 형광 그림.

를 개발하였다. DNA 자기조립기술을 응용한 siRNA 전달을 위한 나노입자 제조의 가장 큰 장점은 1) 균등한 나노크기의 입자 형성 2) 구조체 내의 정확한 약물양 도입 3) 약물 및 표적리간드의 공간적 배열 조절 4) 낮은 세포독성 및 면역반응이다. 따라서, siRNA 전달을 위한 DNA 자기조립기술로 제조된 나노입자는 유전질환과 난치성 질병 치료 및 유도줄기세포 분화에 응용될 것으로 기대되고 있다.

참고문헌

1. International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature*,

431, 931 (2004).

2. M. Miyagishi and K. Tair, *Oligonucleotides*, **13**, 325 (2003).
3. A. Aigner, *J. Biomed. Biotechnol.*, **4**, 71659 (2006).
4. S. M. Elbashir *et al.*, *Nature*, **411**, 494 (2001).
5. Y. K. Oh and T. G. Park, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **61**, 850 (2009).
6. Y. Wang, Z. Li, Y. Han, L. H. Liang, and A. Ji., *Curr. Drug Metab.*, **11**, 182 (2010).
7. N. C. Seeman, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **8**, 573 (1990).
8. D. Bhatia. *et al.*, *Nature Commun.*, **2**, 339 (2011).
9. A. S. Walsh. *et al.*, *ACS Nano.*, **5**, 5427 (2011).
10. J. W. Keum. *et al.*, *Small.*, **7**, 3529 (2011).
11. H. Lee *et al.*, *Nature Nanotechnol.*, **7**, 389 (2012).
12. Y. Patil and J. Panyam, *Int. J. Pharm.*, **367**, 195 (2009).