

Validation of Stem-loop RT-qPCR Method on the Pharmacokinetic Analysis of siRNA Therapeutics

Hye Jeong Kim^{1,2}, Taek Min Kim³, Hong Joong Kim², Hun Soon Jung^{2*} and Seung Ho Lee^{3*}

¹Division of Forest Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²EnhancedBio Inc. R&D center, 9th Fl, HanWha Biz Metro Bldg, 242 Digital-ro, Guro-gu, Seoul 08394, Korea

³Department of Nano-Bioengineering, Incheon National University, 119 Academy-ro, Yeonsu-gu, Incheon 22012, Korea

received May 7, 2019 / Revised May 28, 2019 / Accepted May 28, 2019

The first small interfering RNA (siRNA) therapeutics have recently been approved by the Food and Drug Administration in the U.S., and the demand for a new RNA therapeutics bioanalysis method – which is essential for pharmacokinetics, including the absorption, distribution, metabolism, and excretion of siRNA therapeutics – is rapidly increasing. The stem-loop real-time qPCR (RT-qPCR) assay is a useful molecular technique for the identification and quantification of small RNA (e.g., micro RNA and siRNA) and can be applied for the bioanalysis of siRNA therapeutics. When the anti-HPV E6/E7 siRNA therapeutic was used in preclinical trials, the established stem-loop RT-qPCR assay was validated. The limit of detection was sensitive up to 10 fM and the lower limit of quantification up to 100 fM. In fact, the reliability of the established test method was further validated in three intra assays. Here, the correlation coefficient of $R^2 > 0.99$, the slope of -3.10 ~ -3.40, and the recovery rate within $\pm 20\%$ of the siRNA standard curve confirm its excellent robustness. Finally, the circulation profiles of siRNAs were demonstrated in rat serum, and the pharmacokinetic properties of the anti-HPV E6/E7 siRNA therapeutic were characterized using a stem-loop RT-qPCR assay. Therefore, the stem-loop RT-qPCR assay enables accurate, precise, and sensitive siRNA duplex quantification and is suitable for the quantification of small RNA therapeutics using small volumes of biological samples.

Key words : Bioanalysis, pharmacokinetics, siRNA therapeutics, stem-loop RT-qPCR, validation

서 론

RNA 간섭(RNA interference, RNAi)의 개념을 이용한 질병 치료방법은 특정 유전자 발현을 제어하여 다양한 세포의 기능, 분화, 증식 및 사멸에 관여한다[6, 7]. 초기 연구에는 유전자 전달을 위해 바이러스를 이용한 전달시스템을 이용하고자 하였으나, 안전성과 관련된 여러 문제점들로 인해 리포솜, 고분자 접합체 등을 이용한 비바이러스성 전달체에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[15, 19].

siRNA (small interfering RNA)는 특정 유전자의 발현을 제어하는 역할을 하는 small RNA의 한 종류로, 19~21 mer 길이의 dsRNA 형태로 양 말단의 2~3 nucleotides가 돌출(overhang)되어 있는 구조를 갖고 있다[2]. 자연적으로는 RNA

바이러스 또는 전이인자 유래의 duplex RNA가 Dicer에 의해 절단되어 생성되고, RISCs (RNA-induced silencing complex)의 구성요소인 Ago 단백질이 결합하여 타겟 mRNA에 대해 완벽한 상보적 가닥으로 이루어져 타겟 mRNA를 cleavage하여 유전자 침묵(gene silencing)을 유도한다[11].

siRNA를 이용한 치료제의 경우, 기존의 약물치료가 어려웠던 난치질환에 새로운 해결책으로 부상하고 있으며 다양한 질병에 대한 적용 가능성이 확인되고 있다[1]. 또한 기존의 약물치료가 어려웠던 질병에 대해 제약없이 모든 생물의 유전자 특이적인 적용이 가능한 치료제로 사용이 가능하다는 장점을 가지고 있다[9].

2004년 처음으로 임상시험을 시작한 이후로, 현재 50건 이상의 siRNA 치료제 관련 임상시험이 보고되었다[1]. 글로벌 임상 시험이 진행되고 있는 siRNA 치료제를 가운데 국소적 효과를 확인하거나 일부의 임상연구에서는 off-target 효과로 인해 중단되기도 하였으나, 최근 미국 바이오기업 앨라일람 파마슈티컬스는 희소 신경 손상 질환인 ‘유전성 트랜스티레틴(hATTR) 아밀로이드증’을 치료하는 약물로 미국 식품의약국(FDA)으로부터 세계 첫 RNAi 치료제 판매허가를 받았다[14]. 현재 전 세계적으로 siRNA를 이용한 임상연구가 계속해서 진행중에 있으며, 이에 따라 약물의 효능 검증 및 핵심 약물의 동태분석에 대하여 보다 다양한 방법들이 요구되고 있는 실정

*Corresponding authors

Tel : +82-2-2039-5750, Fax : +82-2-2039-5760 (Hun Soon Jung)

E-mail : hunsoonjung@enhancedbio.com

Tel : +82-32-835-8260, Fax : +82-32-835-0798 (Seung Ho Lee)

E-mail : seungho@inu.ac.kr, lsh1602@gmail.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*These corresponding authors contributed equally to this work.

이다[3].

혈액내 핵산 약물체의 특성을 확인하는 방법으로는 방사성 동위 원소 또는 형광 표지 siRNA, 또는 RNA 수준을 측정하는 생물학적 분석법(Northern blotting, ELISA)등이 있으며 핵산 약물의 정량분석법으로는 qPCR, hybridization assay, HPLC 및 LC-MS법 등이 있으나[8, 13, 16, 18], 분석에 이용하기 위해서는 500 µl 이상의 많은 혈액을 필요로 하므로 마우스와 같은 작은 동물의 경우 분석에 어려움이 있다[5]. 이러한 생체시료에서 siRNA 검출의 어려움을 극복하기 위한 방법으로써 stem-loop reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)법은 소량의 시료에서 가장 높은 민감도로 정량이 가능한 장점이 있다. 이는 짧은 siRNA에 hairpin structure를 갖는 긴 염기서열을 붙여 역전사 시킨 후에 합성된 cDNA로부터 real-time PCR법을 가능하게 하는 검출법이다[4, 12, 17].

본 연구에서는 치료제로 개발 중인 Anti-HPV E6/E7 siRNA를 활용하여 stem-loop primer를 이용한 RT-qPCR법을 확립하고 혈액내에서 siRNA의 확인 가능성과 검출한계, 재현성, 민감성, 특이성 등 반복 실험을 통한 분석법 검증에 하였다. 최종적으로 동물모델에서 siRNA를 검출하여 생체시료분석(Bioanalysis)을 성공적으로 수행함으로 개발 중인 siRNA치료제의 약동학적 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

siRNA, Stem-loop RT-primer, PCR primer 및 probe 제작

본 연구에서는 현재 치료제로 개발 중인 Anti-HPV E6/E7 siRNA를 사용하였다[10]. 이는 Human Papillomavirus의 E6/E7 mRNA를 타겟으로 바이러스의 발암유전자 침묵을 통해 치료 효능을 나타내는 약물이다. Anti-HPV E6/E7 siRNA를 정량하기 위해 필요한 각 primer들은 바이오니아(Bioneer, Korea)사에서 합성하였고, probe는 TaqMan™ MGB Probe (Applied Biosystems™, USA)을 이용하였다(Table 1).

siRNA Specific Stem-loop RT-qPCR assay

Anti-HPV E6/E7 siRNA 표준시료를 주형으로 stem-loop RT-primer를 이용한 역전사반응을 통해 cDNA를 합성하였고 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Switzerland)를 사용하였다. siRNA 정량은 TaqMan™ MGB Probe (Thermofisher, USA)를 이용하여 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real-time PCR)을 진행하였고, 반응에 사용된 장비는 Light Cycler 480II (Roche, Switzerland)를 이용하였다(Fig. 1).

Stem-loop RT-qPCR assay의 표준곡선 작성

비임상 시험을 위해 준비한 표준시료인 Anti-HPV E6/E7

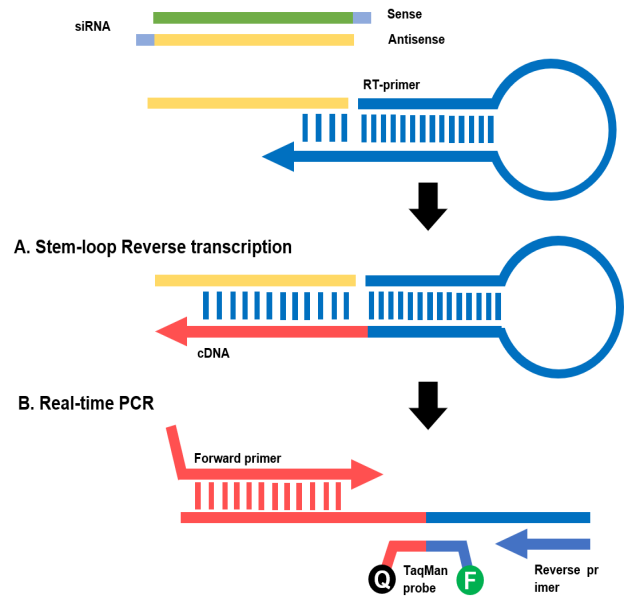


Fig. 1. Schematic description of stem-loop RT-qPCR. (A) Reverse transcription of siRNA primed by specific stem-loop RT primer. (B) First-strand cDNAs are amplified in real-time PCR using specific forward primer, reverse primer complementary to stem-loop RT primer and specific TaqMan probe.

siRNA에 대한 보관과 냉, 해동의 따른 오차를 줄이기 위하여 5 µl씩 분주하여 -20℃에 보관하였다가 real-time PCR진행시 표준곡선을 위한 주형으로 사용하였다. siRNA 표준시료를 10 nM부터 10배로 순차적으로 희석한 후, 3회의 real-time PCR을 진행하였고, 희석된 siRNA 표준시료들의 Cp 값으로부터 얻어진 결과를 이용하여 siRNA 농도의 log 값(x축)에 대한 Cp 값(y축)을 표시하여 그려지게 되고, 이때 기울기(slope)와 결정계수(R²) 값을 이용하여 real-time PCR의 효율(eficiency)을 결정하였다.

Stem-loop RT-qPCR assay 수행 및 신뢰성 검증

혈액내에 siRNA를 정량하기 위한 stem-loop qRT-PCR 반응액 20 µl는 10 pmole primer mixture 1 µl, 10 pmole probe 1 µl, 2x LightCycler® 480 Probes Master (Roche, Switzerland) 10 µl과 LightCycler® 480II (Roche, Switzerland)를 이용하여 real-time PCR을 진행하였다.

확립된 stem-loop RT-qPCR 검출시험법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 의약품등 시험방법 벨리데이션 가이드 라인을 참고하여 확립된 실험법의 검출한계(Limit of Detection, LOD), 최저정량한계(Lower Limit of Quantification, LLOQ), 정밀성, 정확성, 완건성(Robustness)을 검증하였다. 모든 stem-loop RT-qPCR 반응에는 고, 중, 저농도의 표준물질 siRNA를 quality control (QC) sample로 이용하였고, 이는 순차적으로 희석한 표준물질과는 별도로 제작하여 positive con-

rol로서 사용하였다. Template를 넣지 않은 well과 stem-loop RT primer만 넣은 well을 negative control하여 real-time PCR 반응 결과의 정확성을 확인하였다.

검출한계(LOD) 값 검증을 위해 Anti-HPV E6/E7 siRNA 표준시료를 1 nM부터 1 fM까지 10배씩 순차적으로 희석하여, 3회의 real-time PCR을 실시하였다. 최저정량한계(LLOQ) 값 검증을 위해 Anti-HPV E6/E7 siRNA 표준시료를 1 nM부터 10 fM까지 10배씩 순차적으로 희석하여, 3회의 real-time PCR을 실시한 후 표준곡선을 작성하고 siRNA 표준시료 농도(log)에 대한 Cp 값(y)간의 표준 회귀식과 결정계수(R²)를 구하였다. 결정계수(R²)값이 0.95 이상인 경우에 직선성이 있다고 판단하였다.

Stem-loop RT-qPCR 방법의 정확성, 정밀성, 안전성을 검증하기 위해 Anti-HPV E6/E7 siRNA 표준시료를 1 nM 부터 100 fM까지 10배씩 순차적으로 희석하고, 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Cp 값을 비교함으로써 실험법 반복의 재현성을 살펴보고, 실험자를 달리하여 3회의 real-time PCR을 실시한 후 표준곡선으로부터 결정된 siRNA 표준시료 측정값의 환산율(recovery, %)을 비교하였다.

동물실험을 통한 약물 동태학(Pharmacokinetics) 분석

Stem-loop RT-qPCR법을 siRNA를 주입한 동물의 혈액에서 활용가능성을 검증하기 위해 Anti-HPV E6/E7 siRNA 약물을 랫트의 대퇴정맥에 주사후 분리된 혈액샘플을 이용하여 stem-loop RT-qPCR법을 검증하였다. 이를 위해 수컷 Sprague-Dawley 랫트(7~8 주령, n=4)(중앙실험동물)를 이용하였으며, 동물 실험은 서울대학교 동물실험윤리위원회의 승인(SNU-180207-1)을 받은 후 시행되었다. 전 실험 과정 동안 모든 동물은 실험동물관리원칙(National Institutes of Health

publication No. 85-32, revised 1985)에 의거 수행되었다.

Anti-HPV E6/E7 siRNA 약물을 랫트의 대퇴정맥에 주사(femoral vein, 1 mg/kg)한 후, 0.5분~24시간까지의 혈액을 채취하고 즉시 13,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리를 한 후, plasma를 확보하여 -70°C deep freezer에 보관하였다. 확립된 stem-loop RT-qPCR 검출법을 사용하여 생체시료분석을 수행하였고, WinNonlin 프로그램을 이용하여 약물 동태 파라미터를 분석하였다.

결과 및 고찰

Stem-loop RT-qPCR assay 최적화 및 표준곡선(Standard Curve)

LightCycler® 480 probe Master (Roche)를 사용하여 real-time PCR의 조건을 확립하였다. 최적의 stem-loop primer 선별을 위하여 길이를 다르게 한 4개의 stem-loop primer와 2개의 probe를 이용하여 real-time PCR 진행하였다. Stem-loop primer의 길이에 따라 형광증폭곡선의 안정화가 각기 다르게 확인되었다. Probe 2를 이용하였을 때 반응이 시작되는 baseline이 직선형으로 안정적으로 확인되었고, plateau에서 증폭된 형광값이 더 높게 확인되며, 음성대조군에서의 Cp 값을 고려하여 stem-loop RT-primer 2과 probe 2를 stem-loop RT-qPCR에 사용하였다. 다음으로 확인된 stem-loop RT primer와 probe를 이용하여 forward primer를 확인하였다. 200 nM Anti-HPV E6/E7 siRNA를 이용하여 real-time PCR을 진행하였을 때, 형광그래프의 안정된 baseline과 상대적으로 높은 형광값이 확인된 forward primer 3을 최종적으로 stem-loop RT-qPCR에 사용하였다(Fig. 2A, Table 1).

선별된 stem-loop primer와 probe를 이용하여 Anti-HPV

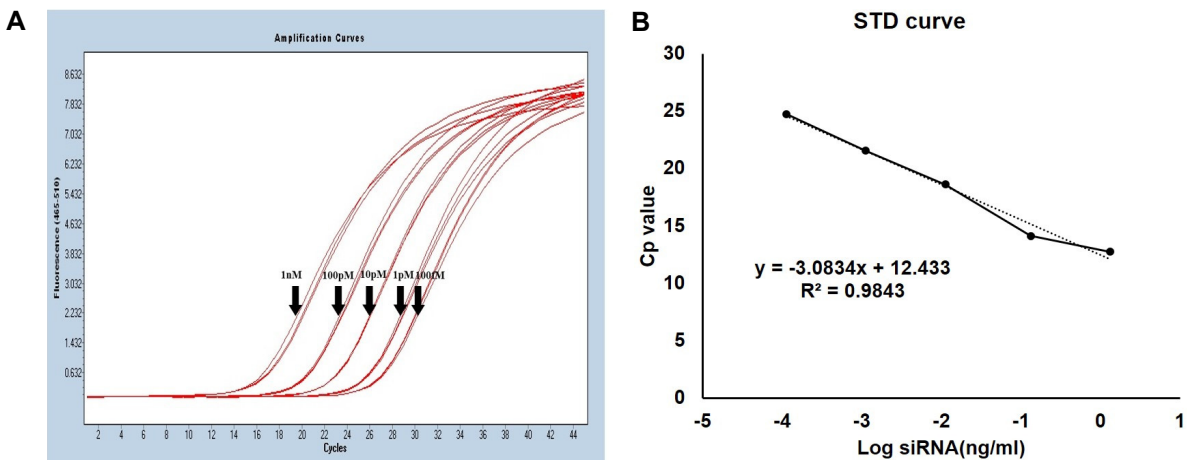


Fig. 2. Specific amplification of Anti-HPV E6/E7 siRNA using stem loop RT-qPCR assay. (A) Linearity of the standard curve in optimized assay conditions. The optimal condition of the siRNA amplification is established using the stem-loop RT-primer2, probe2 and forward primer3. (B) Amplification plots for 10-fold serial dilutions of the Anti-HPV E6/E7 siRNA standards ranging from 1 nM to 100 fM.

Table 1. Sequences of siRNA, stem-loop primer and RT-qPCR primers used in the study

siRNA	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')	Selected Primer
Anti-HPV E6/E7 siRNA	GCAAAGACAUCUGGACAAAAdTdT	UUUGUCCAGAUGUCUUUGCdTdT	
Primer/Probe	Sequence (5' → 3')		
Stem loop RT-primer 1	GTCTGTCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAGGCTACAGGCACGCCACTGGATACGACAAGCAAAA		
Stem loop RT-primer 2	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAGGCTACAGGCACGCCACTGGATACGACAAGCAAAAG		*
Stem loop RT-primer 3	GTCTGTCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAGGCTACAGGCACGCCACTGGATACGACAAGCAAAAGA		
Stem loop RT-primer 4	GTCTGTCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAGGCTACAGGCACGCCACTGGATACGACAAGCAAAAGAC		
Forward 1	GGCGAGGTATTGTCCAGAT		
Forward 2	GCCAGATCCCCTTTGTCCA		
Forward 3	CGAGGTATTGTCCAGATGT		*
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT		*
Probe 1	FAM-TGCTTGTCTGTATCCAGTG-MGB		
Probe 2	FAM-TTTGCTTGTCTGTATCCAG-MGB		*
Probe 3	FAM-GCTTGTCTGTATCCAGTGC-MGB		

Table 2. Stem-loop RT-qPCR results with serial diluted standard siRNA. Comparison of mean Cp value (three replicates) obtained with stem-loop RT-qPCR

Concentration	Set 1 (Cp value)			Set 2 (Cp value)			Final					
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3	AVE	SD	CV	AVE	SD	CV
1 pM	22.59	22.69	22.70	22.83	22.84	22.83	22.83	0.01	0.03	22.75	0.10	0.45
100 fM	25.90	25.93	25.95	26.20	26.14	26.16	26.17	0.03	0.12	26.05	0.13	0.51
10 fM	28.04	28.10	28.08	29.58	29.60	29.58	29.59	0.01	0.04	28.83	0.83	2.88
1 fM	28.76	28.68	28.72	29.23	29.20	29.24	29.22	0.02	0.07	28.97	0.28	0.96
*NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A						

*NTC: No template control.

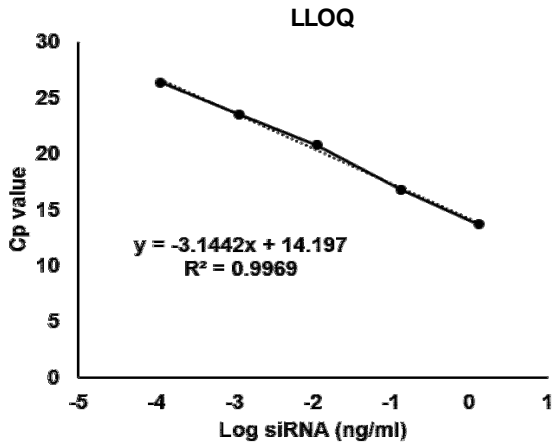


Fig. 3. Determination of low limit of quantification (LLOQ) concentration. The real-time fluorescence units are plotted against concentration of initial Anti-HPV E6/E7 siRNA ranging from 1 nM using LightCycler® 480II (Roche). All standard curve generated using known concentration of Anti-HPV E6/E7 siRNA of 10-fold serially diluted 5-times and the threshold cycle (Cp) value. All the experimental points were obtained in triplicates. R2 values were always ≥ 0.99 .

E6/E7 siRNA 표준시료를 1 nM에서 100 fM까지 10배씩 순차적으로 희석하여 real-time PCR을 수행하였다. siRNA 표준시료에 대한 Cp 값(y)간의 선형분석결과 기울기는 -3.0834, 결정계수(R²)는 0.9843로 확인되어 siRNA 표준시료와 Cp 값 간의 회귀성이 높아 정량 분석이 가능한 시험법임을 확인하였다 (Fig. 2A, Fig. 2B).

Anti-HPV E6/E7 siRNA 표준시료를 통한 검출한계 (LOD) 및 최소정량한계(LLOQ) 확인

검출한계 검증을 위해 1 nM Anti-HPV E6/E7 siRNA 표준시료를 10배씩 순차적으로 1 fM까지 희석한 시료를 독립적으로 준비하여 각 희석배수당 3회 반복적으로 수행하였다. 검출한계(LOD) 값은 100 fM ~ 1 nM 농도범위의 Cp 값 간격이

3 ~ 3.5을 일정하게 유지하며 나타남으로써 PCR 효율이 약 100%임을 확인하였지만, 10 fM 농도 이하의 Cp 값에서는 변화량이 3 이하로 변하는 것으로 확인되어 검출한계를 10 fM 농도로 결정하였고(Table 2), 10 nM siRNA 표준시료를 10배씩 순차적으로 희석했을 때 100 fM siRNA 표준시료 농도까지 확인된 표준곡선의 slope의 값이 -3.1442, 결정계수(R²) 값이 0.99 이상으로 확인되어 100 fM siRNA 표준시료의 농도를 정량표준곡선의 최소값(LLOQ)으로 결정하였다(Fig. 3).

Stem-loop RT-qPCR 검출법의 신뢰성 검증

완건성(robustness)은 시험방법 중 일부 조건이 의도적으로 변경되었을 때 측정값이 얼마나 영향을 받는지에 대한 척도를 나타내는 것으로 통상적으로 검사법의 신뢰도에 대한 지표이다.

생체시료에서 Anti-HPV E6/E7 siRNA 검출이 가능한지 확인하기 위해 확립된 stem-loop RT-qPCR 시험법의 재현을 통하여 정확성 및 완건성 검증을 실시하였다. 실험자를 다르게 하여 동일한 siRNA 표준시료를 이용하여 3명의 stem-loop RT-qPCR을 진행하여 재현성을 확인하였다(Table 3). 3명의 실험자들로부터 확인된 siRNA 표준시료에 대한 Cp 값(y) 간의 표준곡선의 slope는 -3.10~ -3.40으로 확인되었고, 결정계수 R²는 모두 0.99 이상으로 확인되었다. 확립된 시험법의 조건에서 각 농도별 표준시료의 Cp 값의 변화가 거의 없고 CV (%)가 0.04~0.34%로 모두 3% 이하로 나타났다. 각 시험결과로부터 확인된 표준곡선에 Cp 값을 적용하여 환산된 siRNA 표준시료의 회수율(%)을 분석한 결과 80.14~118.54%로 확인되어 실험자간 반복의 시험결과에 대한 완건성이 있음을 확인하였다.

3일간 동일한 Anti-HPV E6/E7 siRNA 표준시료를 이용하여 stem-loop RT-qPCR을 수행한 후 Cp값을 비교하여 정밀성을 확인하였다(Fig. 4, Table 4). siRNA 표준시료에 대한 Cp 값(y) 간의 표준곡선은 첫째 날의 경우 $y = -3.0491x + 17.194$ (결정계수(R²) = 0.9971), 둘째 날의 경우 $y = -3.331x + 16.631$ (결정계수(R²) = 0.9910), 셋째 날의 경우 $y = -3.130x + 16.755$ (결정계수(R²) = 0.9910)로 표준곡선의 결정계수(R²)는 모두 0.99

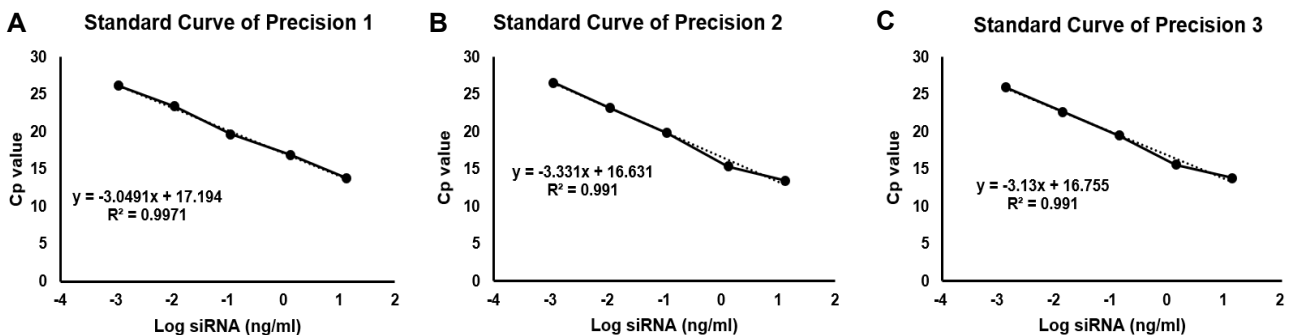


Fig. 4. Reproducibility and linearity of stem-loop RT-qPCR assay for quantitative detection of siRNA (A-C). Standard curve generated using known concentration of 10-fold serially diluted Anti-HPV E6/E7 siRNA and the threshold cycle (Cp) value. Every siRNA concentration was measured 3-times.

Table 4. Precision of stem-loop RT-qPCR from independent experiments

	Concentration	Cp value			Final analysis		
		Test 1	Test 2	Test 3	AVE	SD	CV
1 day	1 nM	13.79	13.80	13.83	13.81	0.02	0.15
	100 pM	16.92	16.96	16.95	16.94	0.02	0.12
	10 pM	19.65	19.66	19.67	19.66	0.01	0.05
	1 pM	23.39	23.46	23.41	23.42	0.04	0.15
	100 fM	26.09	26.17	26.17	26.14	0.05	0.18
	NTC	N/A	N/A	N/A			
2 day	1 nM	13.46	13.47	13.49	13.47	0.02	0.11
	100 pM	15.40	15.39	15.39	15.39	0.01	0.04
	10 pM	19.83	19.84	19.83	19.83	0.01	0.03
	1 pM	23.20	23.14	23.16	23.17	0.03	0.13
	100 fM	26.58	26.60	26.58	26.59	0.01	0.04
	NTC	N/A	N/A	N/A			
3 day	1 nM	13.77	13.82	13.79	13.79	0.03	0.18
	100 pM	15.49	15.68	15.71	15.63	0.12	0.76
	10 pM	19.40	19.52	19.52	19.48	0.07	0.36
	1 pM	22.59	22.69	22.70	22.66	0.06	0.27
	100 fM	25.90	25.93	25.95	25.93	0.03	0.10
	NTC*	N/A	N/A	N/A			

* NTC: No template control.

이상으로 나타나 재현성뿐만 아니라 회귀성이 매우 높음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과에서 stem-loop RT-qPCR assay를 이용하여 siRNA 정량검출법의 활용이 가능함을 확인할 수 있었다.

또한 동일한 Anti-HPV E6/E7 siRNA 표준시료를 이용한 다른 정량분석법인 hybridization assay를 이용하여 두 assay 간의 검출한계 및 민감도를 비교하였을 경우 hybridization assay의 경우 10 pM의 검출한계와, 20 pM의 최소정량한계값을 보이는 반면에 본 연구에서 확립한 stem-loop RT-qPCR법의 경우 10 fM의 검출한계와 100 fM의 최소정량한계값을 갖는 것으로 확인되어(data not shown) hybridization assay에 비해 경우 약 1,000배 정도의 높은 민감도를 보이는 것으로 나타나 소량의 생체시료 분석 및 저농도의 siRNA 검출에 더 적합한 방법임을 알 수 있었다.

랫 모델에서 stem-loop RT-qPCR 분석법에 의한 siRNA 약물 동태학 분석

약효를 기대하는 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설에 대한 체내 동태를 분석하기 위한 방법으로서 시험동물을 이용하여 확립된 stem-loop RT-qPCR 분석법의 활용을 확인하였다. Anti-HPV E6/E7 siRNA를 랫트의 대퇴정맥에 주입 후, 0.5분~24시간까지의 혈액을 채취하였다. 채취된 랫트 혈액으로부터 plasma를 분리하여 stem-loop RT-qPCR을 사용하여 siRNA를 정량하였다. 표준곡선의 경우, siRNA 표준시료를 이용하여 진행하였을 때 stem-loop RT-qPCR의 slope 값은 -3.1443, 결정계수 $R^2 > 0.99$ 으로 확인되었다(Fig. 5A). 결정된 표준곡선의 회귀식을 이용하여 시간별 랫트의 혈액에 존재하는 siRNA의 양을 분석하였을 때 naked siRNA는 혈중최고농도(Cmax)인 13.9 µg/ml에서 30분만에 0.011 µg/ml로 급격히 감소함을 확인하

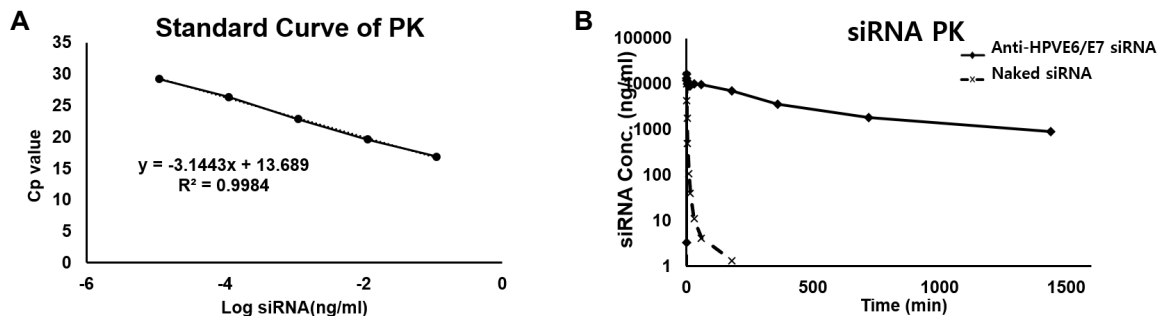


Fig. 5. Quantitative detection of Anti-HPV E6/E7 siRNA in rat serum. (A) Standard curves in rat serum using stem-loop RT-qPCR. (B) Circulation profile of Anti-HPV E6/E7 siRNA in rat.

Table 5. Pharmacokinetic parameter analysis of Anti-HPV E6/E7 siRNA in rat serum

Parameter	1 mg/kg	
	Naked siRNA	Anti-HPV E6/E7 siRNA
AUC _t (min*µg/ml)	29.14	6580.64
C _{max} (µg/ml)	13.9	22.7
CL (ml/min/kg)	38.0	0.15
T _{1/2} (min)	5.0	364.3

였다(Fig. 5B). 이는 제형화가 되지 않은 siRNA는 혈액과 serum 상에서 nuclease에 의해 분해되며 매우 불안정하다는 것을 보여준다. 약물 동태학적 분석을 통해 혈장농도-시간곡선 하 면적(AUC)은 29.14 min*µg/ml, 반감기(T_{1/2})는 5 min으로 계산되었다(Table 5).

Anti-HPV E6/E7 siRNA 치료제의 경우, 24시간까지 혈중에서 약물의 안정성이 지속되는 것을 확인하였으며(Fig. 5B) 혈중최고농도(C_{max})는 22.7 µg/ml이며 24시간에도 0.9 µg/ml로 계산되었다. 혈장농도-시간곡선 하 면적(AUC)은 6580.64 min*µg/ml, 반감기(T_{1/2})는 약 6시간으로 계산되었다(Table 5).

본 연구를 통해 siRNA기반 약물의 생체내 검증을 할 수 있는 민감도가 높은 stem-loop RT-qPCR assay를 확립하였고, 최종적으로 동물실험에 사용된 현재 개발중인 Anti-HPV E6/E7 siRNA 치료제의 약물 동태학적 특성을 파악하는데 사용이 가능한 것으로 확인하였다. 따라서 본 연구에서 사용된 stem-loop RT-qPCR assay 법은 혈액내의 약물 분석뿐만 아니라 siRNA 치료제의 약물 동태학적 ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) 분석과 조직 및 세포내의 전달효율 분석 등 소량의 약물 분석에도 적극 활용이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 중소기업청의 맞춤형 기술파트너사업 (No. 201802580001)의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

- Burnett, J. C., Rossi, J. J. and Tiemann, K. 2011. Current progress of siRNA/ shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol. J.* **6**, 1130-1146.
- Cejka, D., Losert, D. and Wacheck, V. 2006. Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clin. Sci.* **110**, 47-58.
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., Doss, C. G. P. and Lee, S. S. 2017. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from bench to clinic as next generation medicine. *Mol. Ther.* **8**, 132-143.
- Chen, C. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **33**, 79-79.
- Fan, A. C., Goldrick, M. M., Ho, J., Liang, Y., Bachireddy, P. and Felsner, D. W. 2008. A quantitative PCR method to detect blood microRNAs associated with tumorigenesis in transgenic mice. *Mol. Cancer* **7**, 74.
- Haasnoot, J., Westerhout, E. M. and Berkhout, B. 2007. RNA interference against viruses: Strike and counterstrike. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1435-1443.
- Hannon, G. J. 2002. RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- Hunt, E. A., Broyles, D., Head, T. and Deo, S. K. 2015. MicroRNA detection: Current technology and research strategies. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **8**, 217-237.
- Jesse, S., Megan, B., Amanda, H., Annaleen, V., Melissa, L. K. and Anja, B. 2017. A new method for generating arrayed RNAi screening tools for any organism. GDI conference. September. London, England.
- Jung, H., Rajasekaran, N., Song, S., Kim, Y., Hong, S., Choi, H. and Shin, Y. 2015. Human papillomavirus E6/ E7-specific siRNA potentiates the effect of radiotherapy for cervical cancer *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 12243-12260.
- Lam, J. K., Chow, M. Y. T., Zhang, Y. and Leung, S. W. 2015. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **4**, e252.
- Liu, W., Stevenson, M., Seymour, L. W. and Fisher, K. D. 2008. Quantification of siRNA using competitive qPCR. *Nucleic Acids Res.* **37**, e4.
- Luo, G. 2002. CYP3A4 induction by drugs: Correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP 3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 795-804.
- Rizk, M. and Tuzmen, S. 2017. Update on the clinical utility of an RNA interference-based treatment: focus on Patisiran. *Pharmacogenomics Pers. Med.* **10**, 267-278.
- Thakur, A., Fitzpatrick, S., Zaman, A., Kugathasan, K., Muirhead, B., Hortelano, G. and Sheardown, H. 2012. Strategies for ocular siRNA delivery: Potential and limitations of non-viral nanocarriers. *J. Biol. Eng.* **6**, 7.
- Tremblay, G. A. and Oldfield, P. R. 2009. Bioanalysis of siRNA and oligonucleotide therapeutics in biological fluids and tissues. *Bioanalysis* **1**, 595-609.
- Varkonyi-Gasic, E. and Hellens, R. P. 2011. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods Mol. Biol.* **744**, 145-157.
- Wang, S. J., Wu, S. T., Gokemeijer, J., Fura, A., Krishna, M., Morin, P. and Jemal, M. 2011. Attribution of the discrepancy between ELISA and LC-MS/MS assay results of a PEGylated scaffold protein in post-dose monkey plasma samples due to the presence of anti-drug antibodies. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 1229-1239.
- Zhang, J., Li, X. and Huang, L. 2014. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer. *J. Control. Release* **190**, 440-450.

초록 : Stem-loop RT-qPCR 분석법을 이용한 siRNA 치료제의 생체시료 분석법 검증 및 약물 동태학적 분석

김혜정¹ · 김택민² · 김홍중¹ · 정현순^{1*} · 이승호^{2*}

(¹인헨스드바이오, ²인천대학교 생명공학부 나노바이오전공)

본 연구는 siRNA 기반 치료제등의 핵산치료제 개발에 있어서 필수적인 약물의 생체내 흡수, 분포, 대사, 배설에 대한 동태의 확인을 위해 stem-loop RT-qPCR 법을 이용하여 보다 더 정확한 시험법을 확립하고자 하였다. siRNA에 특이적인 primer와 probe를 선별하여 siRNA 정량검출 시험법을 최적화하였다. siRNA 표준시료를 이용하여 최적화된 시험법을 적용하였을 때 siRNA 표준시료에 대한 Cp 값(y)간의 선형분석 결과, 기울기 평균 -3.3, 결정계수 $R^2 > 0.99$ 으로 확인되어 siRNA 표준시료와 Cp 값 간의 회귀성이 매우 높아 정량 분석이 가능한 시험법임을 확인하였고, 같은 표준시료를 이용한 stem-loop RT-qPCR의 검출한계(LOD)는 10 fM, 최소정량한계(LLOQ)는 100 fM이었다. 확립된 시험법의 신뢰성을 확인하기 위해 시험자를 다르게 하고, 시험법을 3회 반복하여 각각 진행한 결과, siRNA 표준시료에 대한 Cp 값(y)간의 선형분석 결과 기울기와 결정계수 R^2 의 재현성(slope \pm -3.2, 결정계수 $R^2 > 0.99$)을 확인하였고, 표준 곡선으로부터 환산된 siRNA 표준시료의 회수율(recovery \pm 20%)과 완전성이 우수함을 확인하였다. 확립된 stem-loop RT-qPCR을 생체내 존재하는 약물 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 시험동물에 siRNA를 주입 후 시간별 혈액을 채취하여 확립된 시험법으로 시험을 진행하였고 약물 동태학적 분석을 통해 siRNA치료제의 혈액내의 안정성을 확인하였다. 따라서 본연구에서 개발된 stem-loop RT-qPCR 분석법은 정확성, 정밀성 및 민감도가 높은 분석법으로 핵산치료제 개발 연구의 다양한 생체시료 분석 연구에 적용할 수 있을 것으로 기대한다.