

## 폐쇄형 *c-myb* Antisense Oligonucleotides 개발과 암세포의 성장억제 연구

계명대학교 동산의료원 의과학연구소

문 의 재 · 박 종 구

### Development of Covalently Closed *c-myb* Antisense Oligonucleotides for Growth Inhibition of Leukemic Cells

Ik Jae Moon, Ph.D. and Jong Gu Park, Ph.D.

Institute for Medical Science, Dongsan Medical Center,  
Keimyung University, Taegu, Korea

**Purpose:** Aberrant expression of the *c-myb* gene is often detected in transformed leukemic cells. Inhibition of *c-myb* expression by antisense oligos could be an effective way to abort rapid growth of leukemic cells. Developing stable antisense oligos combined with enhanced delivery into cells would be of great use in developing an effective anti-cancer molecular agent.

**Materials and Methods:** Selection of target sites was carried out by employing computer simulation of mRNA secondary structures. Multiple antisense oligo sequences were adjoined and AS-oligos were then covalently closed to evade exonuclease activities. *C-myb* antisense oligos with a novel structure were complexed with cationic liposomes and used to treat HL-60 leukemic cells.

**Results:** We developed covalently closed antisense oligos which harbor four adjoined antisense sequences. The *c-myb* antisense oligos were found to be exceptionally stable and effective in specifically ablating *c-myb* mRNA. The antisense oligos were able to inhibit growth of leukemic cell line (HL-60) by about 80%. Antisense effect was more pronounced when the cells were treated twice with the antisense oligos at lower concentrations.

**Conclusions:** The novel covalently closed antisense oligo (CMAS-oligos) was found to be effective and exceptionally stable. Growth of HL-60 was significantly inhibited, showing a rational way to develop an effective molecular anti-cancer agent.

---

**Key Words:** Leukemic cells, Antisense oligos, *c-myb*.

---

책임저자 : 박종구, 대구광역시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 동산의료원 의과학연구소, 700-310  
Tel: 053-250-7854, E-mail: jonggu@dsmc.or.kr

본 연구는 1996년도 과학기술부 특정연구 개발사업 간판연구(star project) 연구비 지원으로 이루어진 것임.  
접수일 : 1998년 10월 22일, 게재승인일 : 1999년 3월 8일

## 서 론

Antisense oligodeoxynucleotides (AS-oligos)를 이용한 유전자의 염기배열 특이적인 발현 억제는 유전자 기능 연구에 유용한 도구로 사용되어 왔으며(1,2), 암과 같은 질병의 분자 치료제 개발 연구에도 이용되어 왔다. Antisense 연구에 사용되는 짧은 길이의 합성 oligos는 Watson-Crick base pairing으로 목적 mRNA에 결합되도록 디자인된 것이다. AS-oligos는 특이적으로 유전자의 발현을 억제할 수 있고 목표 설계와 제작이 용이한 장점이 있다. 이러한 장점을 이용하여 발암 유전자의 표현 억제와 더불어 암세포 성장 억제에 관한 여러 연구가 시도되어 왔다(3,4). AS-oligos에 의한 유전자 발현의 저해는 상보적인 mRNA 염기 배열에 결합하여 RNase H 활성을 유도함으로써 mRNA를 제거하거나 혹은 단백질 번역을 위한 ribosomal complex의 형성 및 진행을 방해함으로써 이루어진다(5). 또한 genomic DNA를 목표로 한 AS-oligos는 triple-helix 구조를 형성하여 유전자의 전사를 억제한다(6).

AS-oligos를 활용하기 위해서는 몇 가지 개선되어야 할 문제점이 있는데 이는 nucleases에 대한 안정성 향상, 목적 염기 배열에 특이적인 결합 및 목표 조직과 세포내의 효율적 전달 등이다(5,6). Phosphodiester (PO)-oligo는 nucleases에 매우 불안정하기 때문에 phosphorothioate (PS)-oligo, methylphosphonate (MP)-oligo, C-5 propyne pyrimidine oligo 그리고 N3'→P5' phosphoramidates 등 다수의 변형된 oligo 유사체들이 연구되어 왔다(7~9). 그러나 이들은 경우에 따라 목적 핵산 염기 배열에 대한 특이성 및 RNase H 활성에서 문제점을 나타내고 있다(5,7). AS-oligos의 세포 내 효율적 전달을 위해서는 liposomes (10,11), folic acid-polylysine carrier (12), electroporation (13) 등 여러 가지 방법이 사용되었다. 근년에는 cationic liposomes을 이용한 전달 방법이 사용상의 간편함과 상대적으로 높은 세포 내 전달 효율성으로 빈번히 사용되고 있다.

Cationic liposomes의 사용으로 nucleases에 대한 AS-oligo의 안정성 및 세포 내 전달은 상당히 개선되었지만, cationic liposomes은 자체의 독성에 따른 사용량의 한계가 있으며, 전달 효율면에서 아직도 많은 개선을 필요로 한다(10).

Proto-oncogene *c-myc*은 조혈 세포(hematopoietic cell)에서 세포 증식과 분화 과정을 조절하는 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 보고되었다. 정상적인 조혈 세포에서 *c-myc* 단백질은 분화 단계에 따라서 양적인 변화가 있으며 최종 분화 상태의 조혈 세포에서는 매우 적은 양의 *c-myc* 단백질이 발현된다(3). 그러나 혈액암 세포에서는 빈번히 *c-myc*이 비정상 또는 과발현(overexpression)되고 있다. HL-60 (promyelocytic cancer cell line)와 K562 (CML, chronic myelogenous leukemia) 암 세포주를 대상으로 *c-myc* mRNA를 감소시켰을 때 세포의 증식이 저해되거나 apoptosis로 진행되고 보고되고 있다(3). 그러나 현재까지 사용된 AS-oligos는 antisense 효과가 항암제로 개발되기에는 충분치 못한 점이 있었다.

mRNA의 2차 및 3차 구조가 AS-oligos의 접근성에 중요한 영향을 미쳐서 2차 구조가 적은 부분이 많은 부분보다 AS-oligos의 목표로서 훨씬 유리함이 보고되었다. 따라서 mRNA에서 2차 구조가 적은 영역을 AS-oligos의 목표 지점으로 선정하기 위해 본 연구팀이 기존에 개발한 바 있는 체계적인 mRNA 2차 구조 분석 방법을 사용하였다(14). 사용한 선상 AS-oligos중 mRNA 제거 효과가 상대적으로 우수한 것으로 판단된 4개의 antisense 염기 배열을 선택한 후 nucleases에 매우 저항성이 높은 새로운 구조의 폐쇄형(covalently-closed) 분자로 제작하였다. 폐쇄형 구조의 AS-oligos 제작은 생체내의 nuclease 활성이 대부분 exonuclease에 기인한(15) 것을 이용하고자 했다. 본 연구에서는 cationic liposomes을 운반체로 하여, *c-myc* mRNA에 대해 새로운 구조의 폐쇄형 AS-oligos를 사용 혈액암 세포에서 암세포 성장 억제 효과를 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 1) Cell line과 세포 배양

혈액암 세포 주인 HL-60는 KTCT(대전, KIST 생명공학연구소)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. RPMI 1640 (Gibco BRL, USA) 배양액에 10% heat-inactivated FBS (Gibco BRL, USA)와 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 배양하였다. 실험에 사용된 모든 세포는 배양 과정에서 적절한 세포 농도를 유지하도록 하여 단위 배양액에서 지나친 성장이 되지 않도록 유의하였다. Transfection 등의 실험에 사용된 세포는 실험 전날(16시간 전) 신선한 배양액으로 교체한 후, 0.4% trypan blue로 viability를 확인한 다음 실험에 사용하였다.

### 2) 폐쇄형 Antisense oligos 제작

Oligos의 제작은 Gibco BRL (USA) 혹은 Bioneer (주)(충북 청원)에 주문하여 사용하였다. C-myc의 cDNA (16)를 DNAsis program (Ver. 2.1, Hitach software, Japan)을 사용하여 2차 구조 분석을 시행하였다. 선정된 antisense 염기 배열 중 antisense 효과가 있는 것으로 판명된 몇 개의 AS-oligos를 대상으로 자체적 2차 구조 형성이 적은 조합 형태의 폐쇄형 AS-oligos가 제작되었다. DNAsis program을 이용하여 4개의 antisense 염기 배열(Table 1)을 연속 배열하여 2차 구조가 적은 형태로 조합하였다(Fig. 1A). 합성된 60 mer의 5 prime 선단에 인산화된 oligo (5' prime end-TCAGTTTTTCA

TCCTGCTTTGCGATTTCTGTGATCTTCTTTTGG ACCGTATTTAATTTTC-3' prime end)를 T<sub>4</sub> DNA ligase (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 양쪽 끝을 공유결합으로 연결시켰다. Ligation을 위해서 5' prime과 3' prime 말단에 반쪽씩 상보적인 14 mer primer (5' prime end-AACTGAGA-AATTA-3' prime end)를 이용하여 분자내(intramolecular) ligation을 하였다(Fig. 1A~D). Ligation은 AS-oligos와 이에 상보적인 primer를 85°C에서 2분간 열 처리한 뒤 상온에서 서서히 냉각시켜 결합시킨 후, T<sub>4</sub> DNA ligase를 1 U/μg oligo로 처리한 뒤 16°C에서 16시간 반응시켰다. Ligation된 폐쇄형 oligo는 5% Metaphor agarose (FMC, USA) 또는 15% 변성(denaturing) acrylamide gel에서 이동이 지연된 띠(band)의 유무로 확인하였다. 폐쇄형 AS-oligos에 결합된 14 mer primer는 exonuclease 처리에 의해 제거되었다.

### 3) Antisense oligos의 nuclease에 대한 안정성 시험

선상 및 폐쇄형 AS-oligos의 nucleases에 대한 안정성을 알아보기 위해 열처리되지 않은(non-heat inactivated) FBS와 exonuclease III (Dakara, Japan)를 처리하여 분해 정도를 조사하였다. FBS 20%를 처리한 AS-oligos는 37°C에서 4시간과 16시간 동안 각각 반응시킨 후 phenol과 chloroform 추출을 거쳐 15%의 변성 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)로 분석하였다. Exonuclease III (160 U/1 μg oligo)를 처리한 AS-oligos는 37°C에서 2시간 반응시킨 후 상기와 같은 방법으로 추출 및 분

Table 1. C-myc antisense oligos used for construction of a covalently-closed antisense molecule

Name	Complimentary site	Type	Size (mer)	Sequence
MIJ-1	253 - 267	antisense	15	TCAGTTTTTCATCCT
MIJ-2	401 - 415	antisense	15	TGATCTTCTTCTTTG
MIJ-3	613 - 627	antisense	15	GCTTTGCGATTTCTG
MIJ-4	1545 - 1559	antisense	15	ACCGTATTTAATTTTC

Nuclotide numbering is in accordance with the published numbering of Majello, B. et al. (1986).

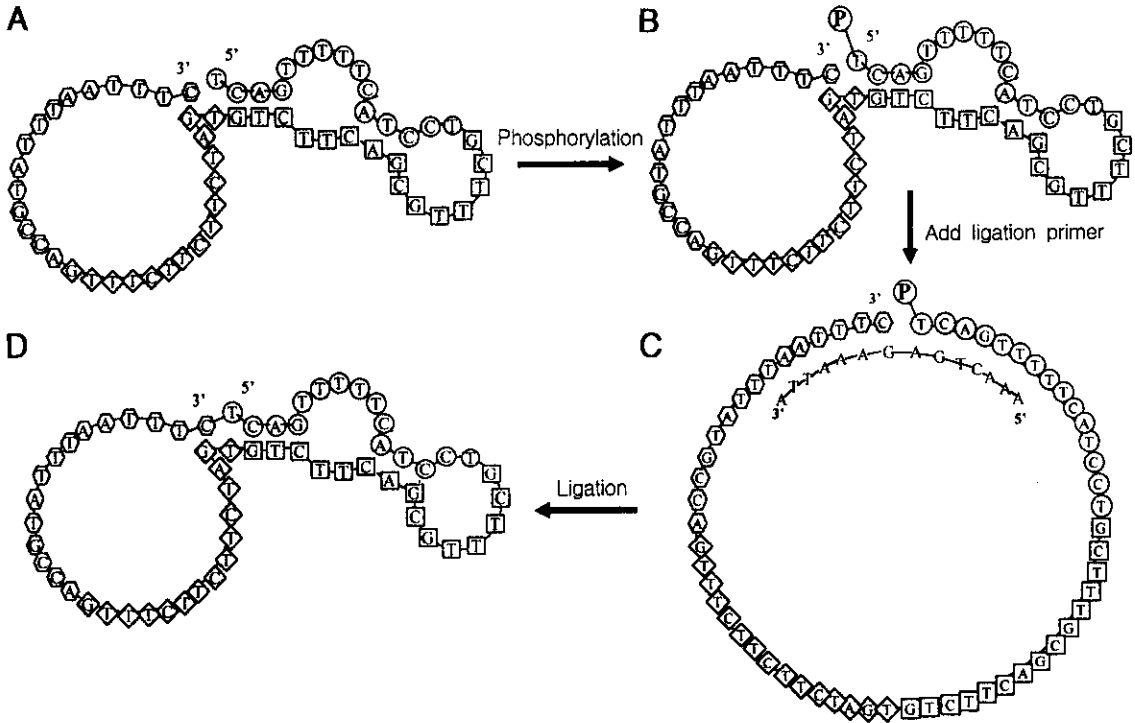


Fig. 1. Schematic flow-diagram for the construction of a *c-myc* CMAS-oligo. A) 60-mer linear molecule consists of 4 distinct antisense oligos. Antisense sequences are denoted by distinct shapes, circles, squares, diamonds and hexagons. Minor secondary structures shown in the figures will be unstable at 37°C. B) 5 prime end phosphorylation of the 60 mer linear antisense molecule. C) binding of a ligation primer (14-mer) shown inside the 60 mer AS-oligo molecule. The 60 mer AS-oligo harbors complementary sequence to the ligation primer at both 5 prime and 3 prime ends. D) an oligo molecule of closed multiple antisense sequence (CMAS) with 4 antisense sequences.

석하였다.

#### 4) Antisense oligo-Cationic liposome 복합체의 transfection

Lipofectin™ (Gibco BRL, USA)의 cationic liposomes과 oligos의 복합체는 serum과 항생제를 첨가하지 않은 OPTI-MEM (Gibco BRL, USA)으로 희석, 배양세포에 처리하였다. Oligos와 cationic liposomes은 각각 20  $\mu$ l OPTI-MEM에 희석하고 혼합한 다음, 상온에서 40분간 반응시킨 뒤 oligo-cationic liposomes 복합체를 준비하였다. 실험 전날 신선한 RPMI-1640 배양액으로 교환해 준 혈액암 세포는 OPTI-MEM으로 두 번 세척하여  $5 \times 10^5$  cells/ml로 세포 농도를 조정 한 후 48-well plate에

100  $\mu$ l씩 분주하였다. Oligo-liposomes 복합체는 2 일(day 0, day 1)동안 2회 처리하였다. 각 well에 oligo-liposomes 복합체를 40  $\mu$ l씩 처리하고 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>로 6시간 배양한 다음, 10% FBS (Gibco BRL, USA)가 포함된 OPTI-MEM을 100  $\mu$ l 가 하여 16시간 배양하였다. 16시간 뒤 각 well로부터 100  $\mu$ l씩 상층액을 조심스럽게 제거한 후 상기와 같은 방법으로 각각의 well에 oligo-liposomes 복합체를 재처리하였다. 6시간 뒤 serum과 penicillin/streptomycin이 포함된 OPTI-MEM을 100  $\mu$ l 가 하고 24시간 배양한 후 antisense 효과를 분석하였다.

#### 5) RNA 분리과 RT-PCR

RNA분리는 Tripure™ Isolation Reagent (Boehringer

ger Mannheim, Germany)를 사용하였으며 제조 회사에서 권장하는 방법으로 하였다. 각각의 well에서 수집한 세포에 0.4 ml Tripure Reagent와 80  $\mu$ l chloroform을 가하여 total RNA를 분리하고, 분리된 RNA는 RT-PCR에 사용하였다. RT-PCR은 Access<sup>TM</sup> RT-PCR kit (Promega, USA)을 사용하여 회사가 추천한 방법을 이용, 다음과 같이 수행하였다. 0.5 ml PCR 튜브에 총 반응량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 튜브에 RNA와 primer를 넣고, AMV reverse transcriptase (5 U/ $\mu$ l), Tfl DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l), dNTP (10 mM, 1  $\mu$ l)와 MgSO<sub>4</sub> (25 mM, 2.5  $\mu$ l)를 넣은 후, DNA thermal cycler (Perkin Elmer, USA)로 reverse transcription과 polymerase chain reaction을 순차적으로 수행하였다. First strand cDNA 합성은 48°C에서 45분 동안 실시하였으며, second strand cDNA 합성과 PCR 증폭은 94°C에서 30초, 56°C에서 1분, 68°C에서 2분으로 25 cycles 동안 수행하였다. PCR 생성물은 1% agarose gel에서 확인하였으며, gel documentation program (Gel Doc. 1000, Bio-Rad, USA)을 이용하여 증폭된 cDNA를 정량적으로 비교, 분석하였다.

## 6) Southern blotting

Southern hybridization은 ELC 3 prime end oligo-labelling and detection system (Amersham Life Science, England)을 회사에서 권장하는 방법으로 다음과 같이 하였다. RT-PCR 생성물은 1% agarose gel로 전기영동시킨 후 0.4 M NaOH 용액상에서 nitrocellulose membrane에 이전시켰다. Oligonucleotide probe labelling은 30 mer의 oligonucleotide (5'-TGTAACGCTACAGGGTATGGAACATGACTG-3') 100 pmol에 fluorescein-11-dUTP, cacodylate buffer, terminal transferase를 잘 섞은 후 37°C에서 70분간 반응시켜 labelled probe를 제조하였다. Hybridization은 nitrocellulose membrane에 hybridization 완충액 (5X SSC, 0.02% SDS, liquid block) 6 ml로 60°C에서 40분간 처리한 다음 oligonucleotide probe를 6.25 ng/ml 넣고 62°C로 1시간 반응시켰다. Membrane의 세척은 0.1% SDS가 포함된 5X SSC로 두

번, 1X SSC (0.1% SDS)로 58°C에서 15분간 두 번 실행하였다. Membrane blocking과정을 거친 후 HRP anti-fluorescein conjugated 항체를 30분간 반응시킨 다음 ECL 시약을 처리한 후, x-ray 필름에 노출시키고 현상하였다.

## 7) 세포 증식 저해 시험(Inhibition test of cell growth)

세포 증식 저해 정도의 측정은 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma, USA) 시약을 사용하여 다음과 같이 실행하였다. HL-60는 serum이 없는 OPTI-MEM으로 두 번 세척한 후 96-well plate에  $6 \times 10^4$  cells/ml로 세포 농도를 조정하여 50  $\mu$ l씩 분주하였고, Lipofectin은 0.2  $\mu$ g/15  $\mu$ l로 조제하여 40분간 상온에서 반응시켰다. Oligos는 1  $\mu$ g/30  $\mu$ l로 농도를 조정하여서 15  $\mu$ l OPTI-MEM에 2배수로 희석하였으며, 미리 조제된 Lipofectin 용액을 동량 (15  $\mu$ l) 혼합하고 15분간 더 반응시켜 2회에 걸쳐 처리하였다. 1차 처리 5시간 후 2차 처리하고, 2시간 뒤 10% FBS (HyClone, USA)와 항생제가 포함된 OPTI-MEM을 가하고 37°C로 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 5일간 배양하였다.

MTT 시약은 PBS 완충액으로 5 mg/ml로 조제하였으며, 배양액 100  $\mu$ l/well 당 100  $\mu$ g의 MTT 시약을 처리하고 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 37°C로 4시간 배양하였다. 그 후 isopropanol (0.1 N HCl)을 배양액과 동량으로 처리하여 한시간 동안 상온에서 반응시키고 잘 섞어 준 다음 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

### 1) 효율적 target sequence의 설정과 폐쇄형 antisense oligos 제작

혈액암 세포에서 과발현되는 *c-myc* mRNA를 효율적으로 감소시키기 위해서는 AS-oligos의 작용부위 선택이 매우 중요하다. 세포 내에서 mRNA는 상당한 2차 혹은 3차 구조를 형성하여 자체적

인 안정성을 높이는 것으로 알려져 있다. mRNA의 복합적 구조는 자체적 염기 결합과 RNA 결합성 단백질에 의해 이루어진다. AS-oligos의 작용 부위는 이러한 사실을 감안하여 2차 구조가 최소화된 부위를 선택할 때 antisense효과가 개선된다는 것이 보고된 바 있다(14). 선상 phosphodiester (PO) oligos는 nucleases에 대한 저항성이 낮으나 PS capped oligos (oligo의 양쪽 말단이 phosphorothioate로 수정된 것)는 부분적인 안정성의 개선을 보인다. 본 연구팀에서는 새로운 stem-loop 구조를 이용 AS-oligos의 안정성의 개선을 보고한 바 있으나 AS-oligos의 안정성은 추가적인 개선이 필요한 실정이다. 세포 내에서는 exonucleases가 대부분의 nucleases activities를 나타낸다(15). 이러한 사실에 착안하여 기존의 AS-oligos보다 nucleases에 안정성이 높고, 한 분자의 AS-oligos가 4개의 상이한 작용 부위에 결합할 수 있도록 "closed multiple antisense sequences"-oligos (CMAS-oligo)

를 고안, 제작하였다. CMAS-oligo의 제작은 다음과 같이 이루어졌다. 선상 AS-oligos중 4개의 AS-oligos를 연속적으로 다양한 조합으로 선상 배열을 한 후 2차 구조를 분석하였다. 자체적 2차 구조형성이 최소화된 것 즉, MIJ-1, 3, 2, 4 조합을 선택하였다. 조합된 60 mer의 선상 AS-oligo는 5' prime 말단을 인산화 하였다. 인산화된 oligo는 양쪽 말단에 상보적인 14 mer primer를 결합시킨 후 covalent ligation을 통하여 CMAS-oligo를 제작하였다(Fig. 1). 60 mer CMAS-oligo는 15% 변성 PAGE 상에서 선상 AS-oligo와 비교시 전기영동 지연 현상으로 폐쇄성을 확인하였다(Fig. 2A). CMAS-oligo의 폐쇄성은 exonucleases에 대한 안정성으로 재확인되었다. Exonuclease III를 처리하였을 때 전기영동 상에서 지연된 oligos 떠는 분해를 보이지 않았다(Fig. 2B). 반면 선상 oligo는 2시간만에 Exonuclease III에 의해 완전히 분해되었다. Exonuclease III에 안정한 CMAS-oligo 분자는 mono-

**Fig. 2.** Electrophoretic mobility patterns of CMAS-oligo. A) Oligos were analyzed by 5% Metaphor agarose gel, lane 1; size marker, lane 2; 14 mer primer that was the ligation primer, lane 3; linear 60 mer oligo and lane 4; CMAS-oligo. 60 mer CMAS-oligo was shown to be retarded when comparing to the linear 60 mer oligo. B) Stability of linear and covalently closed oligos on treatment with exonuclease III. AS-oligos are shown on 15% denaturing polyacrylamide gel. Both linear and CMAS-oligos were treated with exonuclease III (160 U/ $\mu$ g oligo) at 37°C for 2 hrs. Lane 1 and 3; samples were not treated with exonuclease III, lane 2 and 4; samples were treated with exonuclease III.

mer (60 mer), dimer (120 mer) 그리고 trimer (180 mer)로 acrylamide 겔상에 나타났다.

## 2) Antisense oligos의 serum nuclease에 대한 안정성 개선

AS-oligos는 목적 염기배열에 대한 특이적 결합과 더불어 nuclease에 대한 높은 안정성이 antisense 효과에 중요한 요소이다. CMAS-oligo의 nucleases 분해에 대한 안정성을 조사하기 위해 세포 배양에 사용되는 소 혈청인 FBS를 사용하였다. 혈청은 nucleases 활성을 유지하도록 하기 위해 가열처리 (heat-inactivation)를 하지 않았다. AS-oligos와 20%의 혈청을 혼합하여 반응 후 분해 정도를 조사하였다. 선상 oligo는 FBS로 4시간 처리하였을 때 70% 이상의 분해를 보였고 16시간 후에는 대부분이 분해를 나타냈다(Fig. 3A). 반면 CMAS-oligo는 FBS에 대해 4시간과 16시간 동안 처리했을 때에 분해 정도가 경미했다(Fig. 3B). 이러한 결과에서 CMAS-oligo는 nucleases에 대한 안정성이 선상 oligo보다 월등히 우수하다는 것을 알 수 있다.

## 3) CMAS-oligos에 의한 *c-myb* mRNA의 특이적 감소

CMAS-oligo의 nucleases에 대한 안정성이 대단히 우수했으므로, 본 연구팀에서는 CMAS-oligo가 염기배열 특이적인 antisense 효과도 우수한지를 조사하였다. CMAS-oligo의 세포내 전달은 cationic liposomes을 사용하여 이루어졌다. 시도된 수종의 cationic liposomes에서 lipofectin이 자체적 세포독성이 적고 또 지속적으로 신뢰할 수 있는 결과를 나타내었다(비교 연구결과 생략). CMAS-oligos인 MIJ-5 0.3  $\mu$ g을 lipofectin 1  $\mu$ g과 함께 HL-60 세포에 transfection시켰을 때 scrambled oligo (SC-oligo)와 비교하여 *c-myb* mRNA 발현이 95% 이상 감소했다. 선상 AS-oligo인 MIJ-5A 1  $\mu$ g을 liposomes과 사용했을 때는 Sc-oligo와 비교해서 65% 발현 감소가 있었다(Fig. 4A). 이러한 결과는 60 mer 선상 AS-oligos보다 CMAS-oligos가 적은 양으로도 우수한 antisense 효과를 나타내는 것을 보여주고 있다.

AS-oligos를 통한 *c-myb* mRNA 감소의 진위를 분석하기 위해, RT-PCR후 생성된 agarose gel상의 특정 DNA 띠를 southern hybridization으로 확인하였다. CMAS-oligos와 선상 AS-oligos를 HL-60 세

Fig. 3. Degradation patterns of linear and CMAS-oligos in the presense of serum.

A) stability test of linear AS-oligos; lane 1, oligos were not treated with serum (negative control); lane 2 and 3, treated with 20% FBS for 4 hrs and 16 hrs respectively. B) stability test of CMAS-oligos; lane 1, oligos were not treated with serum (negative control); lane 2 and 3, treated with 20% FBS for 4 hrs and 16 hrs respectively.

**Fig. 4.** Effect of *c-myb* CMAS-oligos on *c-myb* mRNA expression in HL-60. A) RT-PCR was performed with total RNA and two *c-myb* primers (described in Material and Methods). Cells were treated with 60 mer CMAS-oligo (0.3  $\mu$ g) + Lipofectin (1  $\mu$ g) (lane 1), 60 mer linear-oligos (1  $\mu$ g) + Lipofectin (1  $\mu$ g) (lane 2) and scrambled AS-oligo (1  $\mu$ g) + Lipofectin (1  $\mu$ g) (lane 3). B) RT-PCR was performed with total RNA and two *c-myb* primers (described in Material and Methods). PCR products were analyzed by Southern hybridization, and hybridized bands were visualized with anti-fluorescein detection system. Upper panel shows the hybridized RT-PCR bands of *c-myb* mRNA and lower panel the hybridized RT-PCR bands of  $\beta$ -actin mRNA.

AS-oligos보다 CMAS-oligos가 적은 양으로도 우수한 antisense 효과를 나타내는 것을 보여주고 있다.

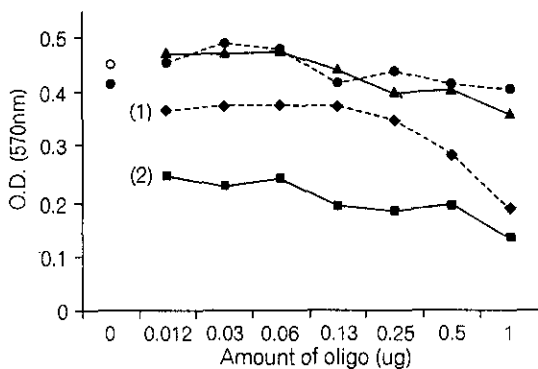
AS-oligos를 통한 *c-myb* mRNA 감소의 진위를 분석하기 위해, RT-PCR 후 생성된 agarose gel상의 특정 DNA 띠를 southern hybridization으로 확인하였다. CMAS-oligos와 선상 AS-oligos를 HL-60 세포에 상기한 것과 같은 방법으로 transfection하였다. RT-PCR 후 증폭된 특성의 띠에서 관찰한 것처럼 CMAS-oligo를 처리했을 때는 선상 AS-oligos를 사용했을 때와 비교해서 *c-myb* mRNA 감소가 더욱 현저하여 70%이상 mRNA 표현 감소를 나타냈다(Fig. 4B).

#### 4) CMAS-oligos의 효과적 암 세포 성장 억제

*C-myb* 유전자의 발현이 세포 성장에 관여하므로 *c-myb*에 대한 AS-oligos를 HL-60 세포에 처리한 뒤 세포 성장 억제를 조사하였다. 세포 성장 억제를 조사하기 위해 MTT를 이용한 발색 시약

의 O.D. 측정으로 세포 수의 증감을 측정하였다. CMAS-oligos를 포함한 각종 oligos를 0.03  $\mu$ g~1  $\mu$ g 농도로 HL-60 세포에 transfection한 후, 5일째에 MTT시약을 가하고 O.D.를 측정하였다. MIJ-5 CMAS-oligos를 HL-60에 1번 또는 2번 처리했을 때 농도의 증가에 따라 점진적으로 세포수의 감소가 나타났으며, 2번 처리했을 때 1번 처리한 것보다 세포 성장이 2배 정도 감소되었다. 2회 처리 시에는 MIJ-5 CMAS-oligos가 매우 낮은 농도(0.13  $\mu$ g)에서도 80% 이상의 강력한 antisense 효과를 나타냈다(Fig. 5). 반면 선상 60 mer인 MIJ-5A AS-oligos와 선상 sense-oligos는 Lipofectin 또는 아무것도 처리되지 않은 대조군과 비교했을 때 변화가 거의 없었다. 이러한 결과는 CMAS-oligos가 암 세포 성장을 효과적으로 그리고 농도 의존적으로 억제하는 것을 나타낸다.





**Fig. 5.** Effect of 60 mer CMAS or linear AS-oligos on proliferation of HL-60. HL-60 cells were treated with complexes containing 0.2  $\mu$ g of Lipofectin and oligos with 2-fold serial dilutions. Dose-response curves are shown for growth inhibition of HL-60 cells treated with 60 mer CMAS or linear AS-oligos. Concentrations of AS-oligos are between 0.015  $\mu$ g and 1  $\mu$ g. Linear sense (S), Lipofectin alone or untreated controls were assayed in the same fashion. Cells were then assayed with a MTT reagent. Experiments were repeated in four times and similar results were obtained. Symbols in the figure are follows. —○—; CMAS-oligos (1)\*, —●—; CMAS-oligos (2)\*, ---○---; MIJ-5A AS-oligos, —▲—; Sense-oligo (2)\*, ●; Lipofectin alone (2)\*, ○; Untreated control. \*(1) or (2); times of treatment with oligos.

## 고 찰

*c-myc* 유전자에 의해 표현되는 발암 단백질 Myb은 몇가지 뚜렷한 기능 부위(functional regions)를 갖는다(17). Amino 말단 부위에 인산화 의존성(phosphorylation dependent) DNA 결합 부위를 가지며, 중간 부위에는 transcriptional activator, 그리고 carboxyl 말단 부위에는 기능 조절 부위가 있는데 *v-myc* oncogene에서는 이 부분이 결손되어 있다. Myb 단백질은 주로 핵 내에 존재하며 DNA에 결합하여 활성화되면 cell cycle에서 G<sub>1</sub>/S phase를 통과하는 조절자로 작용한다(18). 또한 *c-myc* 유전자는 조혈 세포의 발생을 조절하는 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려졌다(19). 세포의 분화와 증식에 직, 간접적으로 관여하는 *c-myc*

은 혈액암 세포에서 빈번히 이상 과발현된다. 이러한 과발현을 AS-oligos로 감소시키거나 제거하여 혈액암 세포의 성장을 부분적으로 억제시킬 수 있음이 보고되었다. 그러나 좀더 antisense 효과가 개선된 AS-oligos의 개발은 *c-myc*의 기능 연구에도 도움을 줄 수 있고 나아가 특이적인 분자적 항암제 개발에도 이용될 수 있다. 본 연구에서는 *c-myc* mRNA에 대해 2차 구조가 적은 형태의 폐쇄형 다중 AS-oligos (CMAS-oligos)를 제작하였다. CMAS-oligos는 하나의 분자가 다수의 목표에 작용할 수 있도록 4개의 antisense 염기 배열로 구성되어 있으며, nucleases에 대해 대단히 안정되고 antisense 효과가 우수하다는 것이 본 실험에서 입증되었다.

목적 염기 배열의 설정은 antisense 효과를 극대화시키는데 중요한 요소가 된다. mRNA는 세포 내에서 막대와 같은 선상 형태로 존재하지 않고 2차 또는 3차 구조를 취하기 때문에 AS-oligos가 작용할 부위 선택을 신중히 고려해야 한다. 안정된 hairpin loop를 취하는 *Ha-ras* 유전자의 mRNA를 이용하여 10 mer의 AS-oligos와 상보적 결합성(hybridization)을 측정 한 결과 loop 양쪽의 5 prime 또는 3 prime 주변 염기(flanking sequences) 보다는 단일 가닥의 loop 영역이 10<sup>6</sup>배 더 높게 나타난다고 보고되었다(20). 따라서 *c-myc* mRNA에 작용하게 될 antisense 염기 배열 설정은 2차 구조 분석에 따라 loop 영역을 선택하였다. 본 연구팀에서는 2차 구조분석 프로그램을 이용하여 세포 내에서 *c-myc* mRNA가 취할 수 있는 2차 구조를 예측하고자 했다. 100 nucleotides를 하나의 분석 frame으로 정하고 30 nucleotides씩 frame을 3 prime 방향으로 이동시키며 분석하였다. 특정 부위를 각각 다른 frames으로 2차 구조를 3번에 걸쳐 중복하여 조사함으로써 실제 세포 내에서 형성되는 2차 구조가 부재 영역의 발견 가능성을 높이고자 했다. 조사된 antisense 염기 배열 중 2차 구조가 적은 부위(주로 loop 형성 부위)와 G+C 함량이 30%이상 되는 것을 AS-oligos의 목표 염기 배열로 선택하였다. 이러한 체계적인 접근 방법을 사용해서

본 연구팀은 세포 내 면역 신호 전달계에 중요한 역할을 하는 protein tyrosine kinase인 Syk를 성공적으로 제거한 사실을 발표하였다(14).

AS-oligos를 이용한 다수의 연구에서 AS-oligos의 작용 영역이 빈번히 단백질 번역 개시 codon을 중심으로 이용되어 왔다(1). 그러나 인간 *c-myc*의 경우 단백질 번역 개시 codon을 중심으로 downstream쪽에 G-4 배열이 존재하는데 이 G-4 배열은 비특이적인 antisense 효과를 나타낸다고 논란이 되고 있으며(21), 따라서 G-4 배열을 피하기 위해서 단백질 번역 개시 codon영역을 제외시켰다. 현재까지 *c-myc*에 대한 antisense 연구는 주로 PO-, PS-oligos를 이용하여 이루어지거나 혹은 expressed antisense vector (22) 등의 방법으로 연구가 이루어져 왔다. 본 실험에서는 *c-myc* 유전자 표현의 특이적 억제에 따른 암세포 성장 억제를 본 연구팀이 개발한 새로운 AS-oligos의 antisense 효과의 표지로 삼고자 했다. 본 실험에서 사용된 CMAS-oligos는 기존의 PS-oligos보다 nucleases에 월등히 안정하였다. 더불어 한 분자의 AS-oligos가 4개의 상이한 부위에 결합할 수 있는 폐쇄형 분자로 제작되었다. 폐쇄형 AS-oligos는 몇가지 장점을 생각해 볼 수 있는데 첫째, *c-myc* mRNA에 상보적인 염기 배열을 갖는 4 영역과의 결합 기회를 높여주고 둘째, 한 분자의 AS-oligos가 다중 목적 부위에 작용할 수 있으며 셋째, exonuclease의 작용 부위가 없어 안정성이 개선되므로 소량의 oligos 사용으로 부작용의 감소가 가능할 것으로 사료된다.

PO-oligos는 인간 혈청내에서 30분 안에 완전히 분해되며, 10% fetal calf serum이 포함된 특정 배양액 내에선 PO-oligos는 빠르게 분해되고 PS-oligos는 1시간 안에 분해 산물이 나타나기 시작하며, MP-oligos 역시 PS-oligos처럼 nucleases에 대한 부분적인 안정성의 증가를 보고했다(23). 그러나 MP-oligos는 용해도 및 염기 배열 특이성이 다소 떨어지며, RNase H의 활성을 저해한다(24). 한편 PS-oligos를 대상으로 동물 실험에서 정맥으로 주입된 oligos의 반감기가 18~51시간 동안 지속

된다고 보고되고 있다(25). 폐쇄형 PO-oligos는 용해도 및 목적 sequence의 특이성과 RNase H 활성 문제에 있어서 아무런 문제점도 없을 것이며, nucleases에 저항성 시험에서 FBS (20%)로 oligos를 처리했을 때 선상 oligos는 거의 분해되었으나 폐쇄형 oligos는 16시간까지 뛰어난 안정성을 보였다. 폐쇄형 oligos를 exonuclease III로 2시간 처리했을 때 거의 분해되지 않았으며, 이에 반해 선상 oligos는 완전히 분해되었다. 이러한 실험 결과로 볼 때 폐쇄형 oligos의 nucleases에 대한 안정성이 매우 우수하다는 것이 입증되었으며, 생체 내에서의 주된 nucleases 활성인 exonuclease에 높은 저항성을 가진다는 사실에 비추어 볼 때 폐쇄형 oligos가 in vivo에서 유효할 것으로 판단된다. 더불어 CMAS-oligos는 분해된 후에도 변형된 nucleosides를 생성하지 않음으로 세포에 의한 재 사용시 돌연변이 도입에 대한 우려를 할 필요가 없다.

폐쇄형 AS-oligos의 antisense효과는 *c-myc* mRNA 표현량의 감소, 세포 성장 저해 실험으로 측정하였다. 폐쇄형 AS-oligos를 0.3  $\mu$ g과 1  $\mu$ g의 소량으로 HL-60에 처리했을 때 scrambled 대조군과 비교해서 *c-myc* mRNA 발현이 90%이상 감소되었다. 이러한 결과는 다수의 논문(1,2,7,26)에서 20  $\mu$ g~200  $\mu$ g 이상의 많은 oligos양으로 antisense 효과를 측정한 것과 비교가 된다. 실험에 사용된 세포에 따라 다소의 차이는 있지만 20배 이상의 적은 양으로 *c-myc* mRNA의 표현 억제가 90%이상 되었다는 것은 선상의 PS-oligos보다 CMAS-oligos가 antisense효과에 탁월한 것을 나타낸다.

AS-oligos의 처리 횟수 및 양에 따른 melanoma 세포 성장 억제 실험에서 20  $\mu$ g/ml을 매일 5일간, 50  $\mu$ g/ml을 2일간 그리고 100  $\mu$ g/ml을 1일 동안 처리했을 때 후자의 경우 50% 성장 저해를 보였으며, 양에 따라 성장 저해 효과가 높게 나타났다고 보고하였다(26). 그러나 본 연구에서 CMAS-oligos (1  $\mu$ g)를 한번과 두 번으로 나누어 처리했을 때, 후자의 경우가 세포 성장 저해 효과가 높게 나타났다. 이러한 상이한 결과는 처리된 AS-oligos의 양적 차이가 현저하고, 실험 대상 세포와 실험 조

건이 다르기 때문으로 여겨진다.

결론적으로 본 연구에서 개발된 CMAS-oligos는 좀더 효율적인 세포 전달과 품질이 좋은 AS-oligos의 양적 확보가 이루어진다면, nucleases에 매우 안정하고 소량의 oligos로도 antisense 효과가 탁월한 새로운 분자 약제로서 개발 가능성이 높은 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구팀에서는 4개의 antisense 염기 배열이 내재되어 있는 폐쇄형 AS-oligos (CMAS-oligos)를 개발하였다. 인간 *c-myc* 발암 유전자에 대해서 제작된 새로운 구조의 CMAS-oligos는 nucleases에 대단히 안정되고 antisense 효과도 있는 것으로 나타났다. Liposomes과 결합한 *c-myc* CMAS-oligos를 사용했을 때 암 세포의 성장을 80% 이상 억제했다. 암 세포 성장 억제 효과는 AS-oligos를 두 번 처리했을 때 보다 효과적이었다.

## 참 고 문 헌

- Melani C, Rivoltini L, Parmiani G, Calabretta B, Colombo MP. Inhibition of proliferation by *c-myc* antisense oligodeoxynucleotides in colon adenocarcinoma cell lines that express *c-myc*. *Cancer Res* 1991; 51: 2897-2901.
- Anfossi G, Gewirtz AM, Calabretta B. An oligomer complementary to *c-myc* encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3379-3383.
- Kamano H, Ohnishi H, Tanaka T, Ikeda K, Okabe A, Irino S. Effects of the antisense *v-myc* expression on K562 human leukemia cell proliferation and differentiation. *Leukemia Res* 1990; 14: 831-839.
- Thaler DS, Liu S, Tomblin G. Extending the chemistry that supports genetic information transfer in vivo; phosphorothioate DNA, phosphorothioate RNA, 2'-O-methyl RNA, and methylphosphonate DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1352-1356.
- Wagner RW. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 1994; 372: 333-335.
- Young SL, Krawczyk SH, Matteucci MD, Toole JJ. Triple helix formation inhibits transcription elongation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10023-10026.
- Akhtar S, Kole R, Juliano L. Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera. *Life Sci* 1991; 49: 1793-1801.
- Wagner RW, Matteucci MD, Lewis JG, Gutierrez AJ, Moulds C, Froehler BC. Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines. *Science* 1993; 260: 1510-1513.
- Gryaznov S, Skorski T, Cucco D, Nieborowska-Skorska M, Chiu CY, Lloyd D, Chen JK, Koziolkiewicz M, Calabretta B. Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as antisense agents. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1508-1514.
- Capaccioli S, Pasquale GD, Mini E, Mazzei T, Quattrone A. Cationic liposomes improve antisense oligonucleotide uptake and prevent degradation in cultured cells and in human serum. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 197: 818-825.
- Yoon SJ, Kim WS, Seol JG, Lee SG, Lee KH, Heo DS, Kim NK. Preclinical study of HLA-B7 DNA/Liposome complex for gene therapy. *J Korean Cancer Assoc* 1996; 28: 358-367.
- Ginobbi P, Geiser TA, Ombres D, Citro G. Folic acid-polylysine carrier improves efficacy of *c-myc* antisense oligodeoxynucleotide on human melanoma (M14) cells. *Anticancer Res* 1997; 17: 29-36.
- Bergan R, Connell Y, Fahmy B, Neckers L. Electroporation enhances *c-myc* antisense oligodeoxynucleotide efficacy. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3567-3573.
- Matsuda M, Park JG, Wang D, Hunter S, Chien P, Schreiber AD. Abrogation of the Fcγ receptor II-mediated phagocytic signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 1095-1106.
- Eder PS, DeVine RJ, Dagle JM, Walder JA. Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma. *Antisense Res Dev* 1991; 1: 141-151.
- Majello B, Kenyon LC, Dalla-Favera R. Human *c-myc* protooncogene: nucleotide sequence of cDNA and organization of the genomic locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9636-9640.
- Luscher B, Christenson E, Litchfield DW, Krebs EG, Eisenman RN. Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature* 1990; 344: 517-525.
- Gewirtz AM, Anfossi G, Venturelli D, Valpreda S,

- Sims R, Calabretta B. G1/S transition in normal human T-lymphocytes requires the nuclear protein encoded by *c-myb*. *Science* 1989; 245: 180-182.
19. Duprey SP, Boettinger D. Developmental regulation of *c-myb* in normal myeloid progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6937-6942.
20. Lima WF, Monia BP, Ecker DJ. Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics. *Biochem* 1992; 31: 12055-12061.
21. Burgess TL, Fisher EF, Ross SL, Bready JV. The antiproliferative activity of *c-myb* and *c-myc* antisense oligonucleotides in smooth muscle cells is caused by a nonantisense mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4051-4055.
22. Kamano H, Ohnishi H, Tanaka T, Ikeda K, Okabe A, Irino S. Effects of the antisense *v-myb* expression on K562 human leukemia cell proliferation and differentiation. *Leukemia Res* 1990; 14: 831-839.
23. Akhtar S, Kole R, Juliano L. Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera. *Life Sciences* 1991; 49: 1793-1801.
24. Furdon PJ, Dominski Z, Kole R. RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 9193-9204.
25. Cossum PA, Sasmor H, Dellinger D. Disposition of the <sup>14</sup>C-labeled phosphorothioate oligonucleotide ISIS 2105 after intravenous administration to rats. *J Pharm Exp Ther* 1993; 267: 1181-1190.
26. Gewirtz AM. Potential therapeutic applications of antisense oligodeoxynucleotides in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymph* 1993; 11: 131-137.