

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0166490

(43) 공개일자 2022년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)

A61P 13/08 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 31/713 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0075292

(22) 출원일자 2021년06월10일

심사청구일자 2021년06월10일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이효정

경기도 수원시 영통구 태장로71번길 19, 201동 1204호(망포동, 동수원 자이2차 아파트)

심덕용

세종특별자치시 조치원읍 충현로 159, 104동 702호(옥일아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

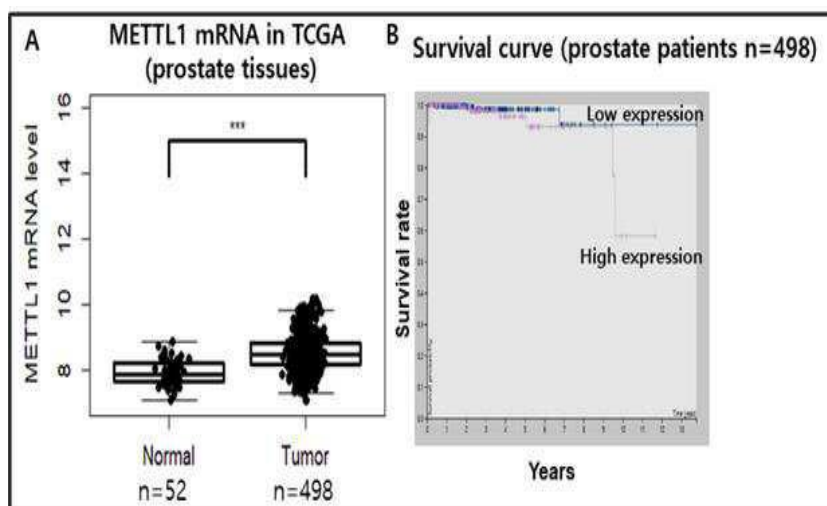
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 METTL1 억제제를 포함하는 전립선 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

METTL1 억제제를 포함하는 전립선 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, METTL1 유전자에 대한 억제제는 METTL1 유전자의 siRNA (Small Interfering RNA)를 호르몬 의존성 및 호르몬 비의존성 전립선암 세포에 도입시킨 결과, 세포증식의 감소와 AMPK의 활성화증가 및 암대사 관련 단백질(Hexokinase 2(HK2), Lactate dehydrogenase (LDH))의 발현을 억제시킴을 확인하여, 전립선암 치료제, 항암 보조제 및 전립선 치료제 스크리닝 용도 등으로 관련 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 13/08 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2500/02 (2013.01)

임은지

서울특별시 중랑구 망우로42길 13, 401호(상봉동)

(72) 발명자

김성훈

서울특별시 강남구 언주로30길 57, 이동 2405호(도곡동, 타워팰리스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113003
과제번호	2020R1A2C1004816
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업/중견연구(유형1-1)
연구과제명	암대사 관여 METTL1 유전자를 표적하는 한약소재의 기전연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

METTL1(methyltransferase like 1) 유전자 또는 단백질의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자 또는 단백질의 발현 억제제는 METTL1 유전자 또는 단백질에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 앵타머 또는 항체인 것인, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 siRNA는 상기 METTL1 유전자에 상동인 독립적인 센스 RNA 가닥 및 이에 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하거나 상기 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥이 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥인 것인, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 억제제는 AMPK의 활성을 증가시키고 및 암대사 관련 단백질 Hexokinase 2(HK2), Lactate dehydrogenase (LDH) 및 c-Myc의 발현을 억제시키는 것인, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 전립선 질환은 전립선암, 전립선 비대증, 전립선염, 전립선 농양 및 전립선석회화로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 것인, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 7

METTL1(methyltransferase like 1) 유전자 또는 단백질의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 전립선 항암 치료 보조제.

청구항 8

시험물질을 처리한 후, METTL1 유전자 또는 단백질의 발현을 분석하는 단계; 및

시험물질을 처리하지 않은 METTL1 유전자 또는 단백질의 발현을 시험물질을 처리한 경우와 비교하는 단계를 포함하는 전립선 질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 시험물질을 처리한 경우가 시험물질을 처리하지 않은 경우에 비해 METTL1 유전자 또는 단백질의 발현이 억제되면 상기 시험물질을 전립선 질환 억제제로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 전립선 질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 METTL1 유전자 또는 단백질의 발현을 분석하는 것은 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), 노던 블롯, 웨스턴 블롯, cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 인 시투 혼성화 반응, 방사능면역분석, 면역침전법, 면역염색화학법, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 및 peroxidase 활성 측정법으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행하는 것인, 전립선 질환 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 전립선질환은 전립선암, 전립선 비대증, 전립선염, 전립선 농양 및 전립선석회화로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 것인, 전립선 질환 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 METTL1 억제제를 포함하는 전립선 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전립선암(prostate cancer, PC)은 남성에게 가장 흔한 악성 종양이고, 미국과 유럽에서 암-관련 사망의 두 번째 원인이다(Gronberg H, Lancet 2003361:859-64.). 서구 스타일 식단의 보급과 노령 인구의 급증으로 인해, 전립선암(PC)의 발병률은 대부분의 선진국들에서 현저하게 증가해 왔다(Gronberg H, Lancet 2003 361:859-64. and Hsing AW et al., Epidemiol Rev 200123:3-13.). 혈청을 이용한 전립선-특이적 항원(Prostate-specific antigen, PSA)을 스크리닝하는 것은 PC의 조기 발견의 현저한 향상을 가져왔고, 수술과 방사선 치료에 의해 치유될 수 있는 국소화된 질병을 가진 환자 비율의 증가를 가져왔다(Gronberg H, Lancet 2003 361:859-64. and Hsing AW et al., Epidemiol Rev 200123:3-13.). 그러나, 이러한 PC 환자의 20-30%는 여전히 병의 재발을 겪고있다(Feldman BJ et al., Nat Rev Cancer 20011:34-45. and Han M et al., J Urol 2001166:416-9.).

[0003] 여성은 전립선을 가지고 있지 않아서 전립선암에 걸릴 수 없지만 자녀에게 유전자인자를 유전시킬 수는 있다. 미국 암 학회에 따르면 약 6명 중 1명의 남성이 자기의 일생에서 암에 걸린다. 다행히 대부분의 전립선 종양의 성장은 느리고 조기에 발견하면 치료로 종양의 크기를 줄일 수 있다. 최근까지 전립선 암의 위험인자로 잘 알려진 것은 나이, 민족성(유전), 가족력(유전)이다. 노령은 모든 유형의 암에 대한 위험성을 증가시키지만 민족성과 가족력의 관여는 유전적 요소 또한 매우 크다는 것을 시사한다.

[0004] 고형암(solid tumor)은 근치(根治) 수술이 이루어지지 않는 한 예후 불량이며, 그 주된 요인은 현재의 화학요법의 효과가 불충분하다는데 기인한다. 종래의 화학요법 약은, 핵산 합성 과정, DNA, 미소관에 작용하여, 핵산으로부터 단백질 생성 과정을 저해하는 것을 기본으로 하여, 암 세포 뿐 아니라 세포 증식이 일어나는 재생성 조직 정상세포에의 장애를 피할 수 없었다. 최근, 암 세포에 특이적으로 발현하고 있는 분자가 차례차례로 분류되고 있어, 이들을 표적으로 하는 저해약의 경우 정상세포에의 유해 반응을 최소로 할 수 있으며 그 결과, 투여량도 증대할 수 있다. 이러한 분자 표적 치료약도 개발되어 왔지만, 그 최대의 결점은, 반드시 많은 증례에 유효한 것은 아니고, 개개의 증례에 의해 효과가 달라, 그것을 투여 전에 예측하는 것이 불완전하다는 것이다. 분자 표적 치료약의 효과가 개개의 증례로 크게 다른 이유로 치료의 표적으로 여겨 온 분자가 발암 과정이나 전이에 관련되는 유전자인 것을 들 수 있다. 발암 과정은 암종에 따라서 뿐 아니라, 같은 암종 내에서도 다양하기 때문에, 표적으로 하는 분자가 암의 증식에 관여하는 정도는 개개의 증례에 따라 다르다고 생각된다. 그러므로, 암종을 넘어 보편적으로 중심적 역할을 하는 분자가 확인되면, 많은 암 증례에 보편적으로 효과를 기대할 수 있는 분자 표적 치료약의 개발이 가능해진다.

[0005] 유전자치료제(Gene therapy)는 질환을 치료하기 위해 직접적으로 기능 유전자 및 DNA 단편, RNA 간섭(RNA interfering, RNAi), 앵타머, 리보자임, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 등을 세포로 삽입하는 의약품을 지칭한다. RNA 간섭 기술 중 하나인 siRNA(small interfering RNA)는 21-25nt 크기의 작은 RNA 조각으로, 일반적인

로 세포 내에서 RISC(RNA-induced silencing complex)와 복합체를 형성하여 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 타겟 mRNA를 절단시킨 후 단백질 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다. 기존에 약이 존재하지 않았던 질병에 대해 유전자 염기 서열에 특이적인 siRNA를 제조함으로써 병인성 단백질 생성을 원천적으로 억제하여 생체 내에 존재하는 생화학적 기작을 통한 안전하고 효과적인 siRNA 신약 제조가 가능하다.

[0006] 현재 RNAi 치료제와 관련된 20개 이상의 임상시험 단계는 모두 임상 1, 2 상의 초기 단계에 있으며 전임상 중에서도 여러 가지의 siRNA 치료제가 개발 중인 실정이다. 현재 제약 산업은 특허만료와 R&D 생산성 위기라는 두 가지 과제에 직면하였는데, 특허만료는 최근 대두되고 있는 대형 제약사들의 R&D 생산성 하락 문제와 함께 제약 산업의 중장기적 성장 저해 요소이다. 미국에서 전임상을 포함한 파이프라인에서 임상이 성공할 확률이 대략 0.25%에 불과한 상황이고 임상승인 기준마저 엄격해지고 절차의 투명성, 정보공개 확대 등의 규제로 임상 성공률은 향후 더욱 낮아질 것으로 예상된다. 임상 단계별로 살펴보면 비용과 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 2상과 3상의 임상 실패율이 가장 가파르게 올라가고 있는 추세이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 METTL1 유전자가 전립선 암세포에 다량 발현되며, 이 유전자의 발현을 저해시키므로 암대사를 억제하여 암세포의 성장을 억제 시키는 작용효과가 있음을 확인하였다. 따라서, METTL1 유전자를 전립선 암의 진단 또는 치료제의 표적유전자로 활용하여, 암대사 억제를 통한 전립선암 진단, 항암제 스크리닝, 암 치료 용도로 이용 가능성을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 MMETTL1(methyltransferase like 1) 유전자 또는 단백질의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 목적은 METTL1(methyltransferase like 1) 유전자 또는 단백질의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 전립선 항암 치료 보조제를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 목적은 시험물질을 처리한 후, METTL1 유전자 또는 단백질의 발현을 분석하는 단계; 및

[0011] 시험물질을 처리하지 않은 METTL1 유전자 또는 단백질의 발현을 시험물질을 처리한 경우와 비교하는 단계를 포함하는 전립선 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 MMETTL1(methyltransferase like 1) 유전자 또는 단백질의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 METTL1(methyltransferase like 1) 유전자 또는 단백질의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 전립선 항암 치료 보조제를 제공한다.

[0014] 본 발명은 시험물질을 처리한 후, METTL1 유전자 또는 단백질의 발현을 분석하는 단계; 및

[0015] 시험물질을 처리하지 않은 METTL1 유전자 또는 단백질의 발현을 시험물질을 처리한 경우와 비교하는 단계를 포함하는 전립선 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0016] METTL1 억제제를 포함하는 전립선 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, METTL1 유전자에 대한 억제제는 METTL1 유전자의 siRNA (Small Interfering RNA)를 호르몬 의존성 및 호르몬 비의존성 전립선암 세포에 도입시킨 결과, 세포증식의 감소와 AMPK의 활성화증가 및 암대사 관련 단백질(Hexokinase 2(HK2), Lactate dehydrogenase (LDH)의 발현을 억제시킴을 확인하여, 전립선암 치료제, 항암 보조제 및 전립선 치료제 스크리닝 용도 등으로 관련 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도1은 전립선암 환자의 종양 및 정상 전립선 조직에서 TCGA RMA-Seq 데이터 베이스 분석을 한 결과 전립선암 환자의 종양 조직에서 METTL1의 발현량이 증가됨을 확인한 도이다.

도2는 siRNA METTL1이 도입된 PC-3와 LNCaP 전립선암주에서의 세포증식 억제효과를 나타낸 도이다.

도3은 siRNA METTL1이 도입된 PC-3와 LNCaP 전립선암주에서의 암대사관련 인자 발현 억제 효과를 나타낸 도이다.

도4는 siRNA METTL1이 도입된 PC-3와 LNCaP 전립선암주에서의 AMPK(Adenosine monophosphate-activated protein kinase; AMP-activated protein kinase)의 활성화 증가 효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 METTL1(methyltransferase like 1) 유전자 또는 단백질의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 METTL1(methyltransferase like 1) 유전자는 NCBI Gene ID: 4234이다.
- [0020] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 전립선 관련 질환의 발생 및 이로 인한 합병증을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 전립선 관련 질환 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0022] 상기 유전자 또는 단백질의 발현 억제제는 METTL1 유전자 또는 단백질에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 앵타머 또는 항체인 것인, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0023] 상기 siRNA는 상기 METTL1 유전자에 상동인 독립적인 센스 RNA 가닥 및 이에 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하거나 상기 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥이 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥인 것인, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 siRNA는 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명에서 용어, "siRNA"는 표적 유전자의 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNA 간섭(RNAi: RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 이중사슬 RNA를 의미하고, 표적유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법 또는 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.
- [0026] "유전자 발현 억제"는 본 발명의 siRNA의 METTL1 유전자에 대한 유전자 침묵(silencing) 능력을 지칭한다. METTL1 유전자의 발현 억제는 대조군에 기준한 시험 값이 약 90%, 바람직하게는 50%, 더욱 바람직하게는 25-0%인 경우 달성된다. 적합한 분석시험은 예를 들면, 당업자에게 공지된 기술, 예를 들면 도트 블롯, 노던 블롯, 인시튜(in situ) 하이브리드화, ELISA, 면역 침전, 효소 기능, 뿐만 아니라 당업자에게 공지된 표현형 분석시험을 사용한 단백질 또는 mRNA 수준의 조사를 포함한다.
- [0027] 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고, 스템-루프(stem-loop)의 구조를 이루는 헤어핀 구조를 가질 수 있는데, 이를 특히 shRNA(short hairpin RNA)라 지칭한다. 한편, 상기 이중사슬 또는 스템 부위는 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 별지(일방의사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수도 있다. 전체 길이는 10 내지 80 염기, 바람직하게는 15 내지 60 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 염기이다. 또한, 상기 루프 영역은 서열에 특별한 의미가 없으며, 단지 센스서열과 안티센스서열을 적당한 간격으로 연결하기 위하여 3-10 정도의 염기를 가지고 있으면 족하다. 종래에 siRNA의 루프 영역으로 많이 사용되어온 예들은 다음과 같다: AUG(Sui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(8):5515-5520, 2002), CCC, CCACC 또는 CCACACC(Paul et al., Nature Biotechnology 20:505-508, 2002), UUCG(Lee et al., Nature Biotechnology 20:500-505), CTCGAG, AAGCUU(Editors of Nature Cell Biology Whither RNAi, Nat Cell Biol. 5:489-490, 2003), UUCAAGAGA(Yu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(9):6047-6052, 2002) 및 TTGATATCCG(www.genscript.com의 default spacer). siRNA 말단 구조는 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조(protruding structure)와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조가 모두 가능하고 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 표적유전자의 발현억제 효

과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[0028] 상기 siRNA는 보통 약학적 조성물로서 투여된다. 상기 투여는 핵산이 원하는 in vitro 또는 in vivo에서 표적세포로 도입되는, 알려진 방법에 의하여 수행될 수 있다. 이때, siRNA의 세포 내로 도입은 특별히 이에 제한되지 않으나, siRNA를 직접 합성한 뒤, 숙주세포 내로 직접 함입되거나, 또는 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-기반 siRNA 발현카세트 등으로 세포를 형질전환 또는 감염(infection)시켜서 수행하는 것이 바람직하며, 발현벡터는 특별히 이에 제한되지는 않는다. siRNA를 발현하는 벡터는 본 발명의 표적 서열을 siRNA로 발현할 수 있는 종래 알려진 어떤 siRNA 발현 벡터도 사용할 수 있다. 예컨대, Promega 제품으로 GeneClip™ U1 Hairpin Cloning System(Cat.#'s C8750, C8760, C8770, C8780, C8790), siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference System(Cat.# C7800), T7 RiboMAX™ Express RNAi System(Cat.# P1700), siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning Systems(Cat.#'s C7890, C7900, C7910, C7920) 및 siLentGene™ -2 U6 등록특허 10-1087614, Hairpin Cloning Systems(Cat.#'s C7860, C8060, C8070, C8080) 등을 사용할 수 있으며, Genscript 제품으로 pRNA-U6.1(Cat.#'s SD1201, SD1202, SD1207), pRNATin-H1.2(Cat.#'s SD1223, 1224) 및 pRNA-H1.1/Adeno(Cat.#SD12009) 등을 사용할 수 있다.

[0029] 한편, 통상적으로 사용되는 표적 세포로의 유전자 도입 기법에는 칼슘 포스페이트, DEAE-덱스트란, 전기천공 및 미세주입법 및 바이러스 법이 포함된다(Graham, F.L. 및 van der Eb, A.J. (1973) Virology 52, 456; McCutchan, J.H. 및 Pagano, J.S. (1968), J. Natl. Cancer Inst. 41, 35 1; Chu, G. 등 (1987), Nucl. Acids Res. 15,1311; Fraley, R. 등 (1980), J. Biol. Chem. 255, 10431; Capecchi, M.R. (1980), Cell 22, 479). 뉴클레오타이드를 세포내로 도입하는 이러한 기법들에 최근 추가된 것은 양이온성 리포솜을 사용하는 것이다(Felgner, P.L. 등 (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413). 상업적으로 구입할 수 있는 양이온성 지질 제제는 예를 들면, Tfx 50 (Promega) 또는 Lipofectamin 2000 (Life Technologies)이 있다. Rex-1 유전자와 상호적으로 잡종 결합할 수 있는 siRNA를 직접 세포에 함입시키는 방법은 특별히 이에 제한되지는 않으나, siRNA 1 µg 당 양이온성 리포솜을 2 내지 6µg 혼합하여, 15 내지 40분간 리포펙션(lipofection)하여 수행함이 바람직하다.

[0031] 상기 억제제는 AMPK의 활성을 증가시키고 및 암대사 관련 단백질 Hexokinase 2(HK2), Lactate dehydrogenase (LDH) 및 c-Myc의 발현을 억제시키는 것인, 전립선 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0032] 상기 조성물은 상기 전립선 관련 질환은 전립선 비대증, 전립선염, 전립선암, 전립선 농양, 및 전립선석회화로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 질환인 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 전립선 암일 수도 있다.

[0033] 본 발명의 전립선 관련 질환 치료용 예방 및 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 전립선 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0035] 본 발명의 전립선 질환 치료용 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0036] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트,

탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 전립선 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 전립선 질환 예방 및 치료용 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01 ~ 5,000 μ g/ml의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 μ g/ml 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 μ g/ml를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.

[0039] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0040] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0041] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리 식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.

[0042] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명은 METTL1(methyltransferase like 1) 유전자 또는 단백질의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 전립선 항암 치료 보조제를 제공한다.

[0044] 본 발명은 시험물질을 처리한 후, METTL1 유전자 또는 단백질의 발현을 분석하는 단계; 및

[0045] 시험물질을 처리하지 않은 METTL1 유전자 또는 단백질의 발현을 시험물질을 처리한 경우와 비교하는 단계를 포함하는 전립선 질환 억제제를 스크리닝 하는 방법을 제공한다.

[0046] 상기 시험물질은 처리한 경우가 시험물질을 처리하지 않은 경우에 비해 METTL1 유전자 또는 단백질의 발현이 억제되면 상기 시험물질을 전립선 질환 억제제로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 전립선 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0047] 상기 METTL1 유전자의 발현 또는 단백질의 활성을 분석하는 것은 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), 노던 블롯, 웨스턴 블롯, cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 인 시투 혼성화 반응, 방사능면역분석, 면역침전법, 면역염색화학법, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 및 peroxidase 활성 측정법으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는 전립선 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 실시예 1. 전립선 암세포주에 siRNA METTL1의 도입에 따른 암세포주의 억제 효과 확인

[0052] **실시예 1-1. siRNA 제작**

[0053] 암세포주에서 다량 발현되는 유전자의 경우 siRNA 기법을 통해 유전자 발현을 억제하여 세포의 증식 속도에 변화가 있는지를 관찰할 수 있다. 이에 본 발명에서는 METTL1에 대한 각각의 siRNA를 바이오니아 (카타로그 번호 4234-1) 대전, 한국)에서 구입하여 전립선암 세포주 LNCaP과 PC3에 도입한 후 해당유전자 mRNA 발현 저하에 따른 암세포주의 성장 속도 및 암대사 관련 단백질 변화를 관찰하였다. 상기 LNCaP 세포주는 AR 및 PSA를 발현하지 않으며 이의 증식은 안드로겐과 무관한 안드로겐-비의존성 전립선암(Androgen-indepdent cancer)이며, PC3는 안드로겐 의존성 전립선암인 바(Prostate. 2011 Nov; 71(15): 1668-1679.), 본 발명자는 상기 두 cell line을 이용하여, 호르몬 의존성 및 비의존성 전립선암에 대한 효과를 확인하고자 하였다.

[0054] siRNA는 유전자 염기 서열을 바탕으로 19개 올리고뉴클레오타이드의 이중 리보핵산쇄에 단쇄의 2 염기가 매달린 구조로 이루어져 있다. 세포의 증식에 아무 영향을 미치지 않는 siRNA(카타로그번호 SN-1003)(바이오니아, 대전, 한국) 실험의 음성 대조군으로 사용되었다.

[0055] siRNA METTL1 올리고뉴클레오타이드

[0056] (sense: 5' -CACAAGUGGCGAAUCAUCA(dtdt)-3') 서열번호 1

[0057] (antisense: 5' -UGAUGAUUCGCCACUUCGUG(dtdt)-3') 서열번호 2.

[0059] **실시예 1-2. 단백질 측정을 위한 웨스턴 블롯(Western blot) 분석**

[0060] 수거한 세포를 PBS로 세척 한 다음 lysis용액(20mM 자당, 1mM EDTA, 20μM Tris-CL, pH7.2, 1mM DTT, 10mM KCL, 1.5mM MgCl₂, 5μg/mL 펩스타틴 A, 10μg/ml 류펩틴 및 2μg/mL 아프로티닌)를 첨가 하여 용리 시켰다. 원심 분리 후 상등액을 수집하여 단백질 농도를 측정 한 후 30μg을 함유한 분취액을 bio-rad 단백질 분석 키트를 이용하여 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리하고 지시된 1차 항체를 이용하여 포옥시다아제 공액화 2차 항체를 이용하였으며, ECL검출 시스템으로 분석하였다.

[0062] **실시예 2. 전립선암 환자의 종양 및 정상 전립선 조직에서 TCGA RNA-Seq 데이터베이스 분석을 한 결과**

[0063] 전립선암 환자의 종양 조직에서 METTL1의 발현량이 증가되어 있다. RNA-Seq 데이터베이스는 TCGA에서 얻었다. ***P < 0.001 정상 전립선 조직과 비교. TCGA 데이터베이스에 등록된 498명의 전립선암 환자에 대한 생존곡선을 나타낸 것이다. METTL1의 발현량이 높게 관찰되는 전립선암 환자의 생존 예후가 불량함을 보여준다 (도 1).

[0065] **실시예 3. siRNA METTL1이 도입된 PC-3 와 LNCaP 전립선암주에서의 세포증식 억제효과**

[0066] PC-3 세포주와 LNCaP 세포주들을 각각을 6well plate에 1X10⁵/ml로 세포로 배양후, siRNA는 40nM 농도로 INTERFERin siRNA trasfection reagent와 도입 하였다. 도입후 24시간, 48시간, 72시간후에 MTT assay를 사용하여 흡광도에서 590nm에서 측정하였다.

[0067] siRNA METTL1이 도입된 PC-3 와 LNCaP 전립선암주에서의 세포증식 억제효과를 나타냈고, siRNA METTL1 도입후 24시간, 48시간, 72시간후의 세포증식의 효과는 대조군 si control와 비교하여 시간별 세포증식억제효과를 보여 주었다(도 2).

[0068] siRNA METTL1은 암대사 효소인 HK2의 발현에 영향을 주는 암 대사 관련 전사인자 c-Myc의 발현을 저해와 많은 종류의 암에서 LDH를 활성화하여 pyruvate를 lactate로 만들어 암의 성장을 촉진하는 에너지를 생산하는데, siRNA METTL1은 LDH의 발현을 억제하는 효과를 확인하였다(도 3).

[0070] **실시예 4. siRNA METTL1이 도입된 PC-3 와 LNCaP 전립선암주에서의 AMPK의 활성화증가 효과**

[0071] PC-3 세포주와 LNCaP 세포주들을 각각을 6well plate에 1X10⁵/ml로 세포로 배양후, siRNA는 40nM 농도로 INTERFERin siRNA trasfection reagent와 도입 하였다. 도입후 48시간후에 수거하여 단백질을 추출하여

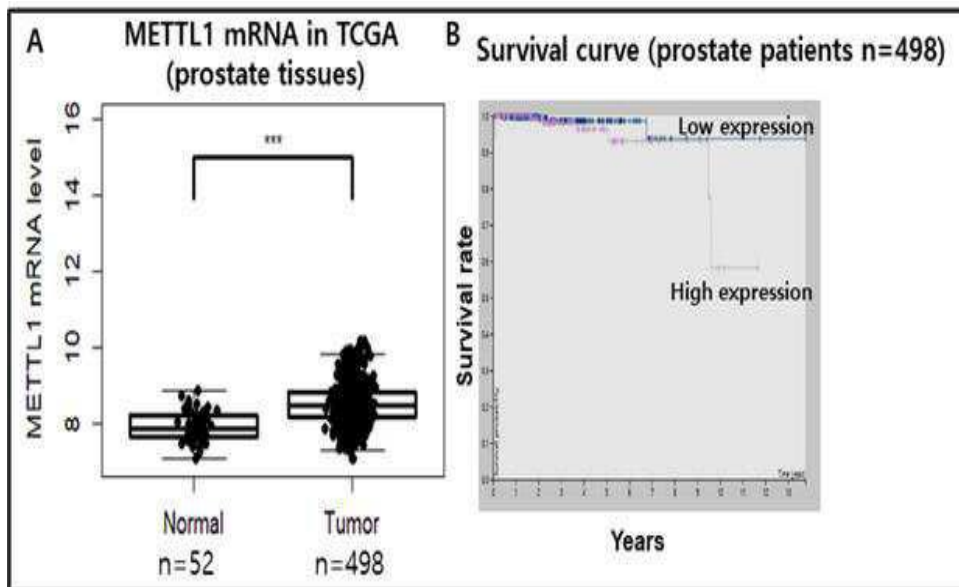
Western-blot을 사용하여 AMPK의 단백질 발현을 확인 하였다.

[0072] AMPK는 세포의 에너지 상태에 대한 중요한 센서로서 AMPK 신호계는 에너지 상태를 성장신호와 연결 시킨다. AMPK의 활성화감소는 mTOR등을 활성화 시키며, 당분해를 촉진시킨다. siRNA METTL1을 사용하여 METTL1 유전자 결핍시 AMPK가 활성화가 나타났다(도 4).

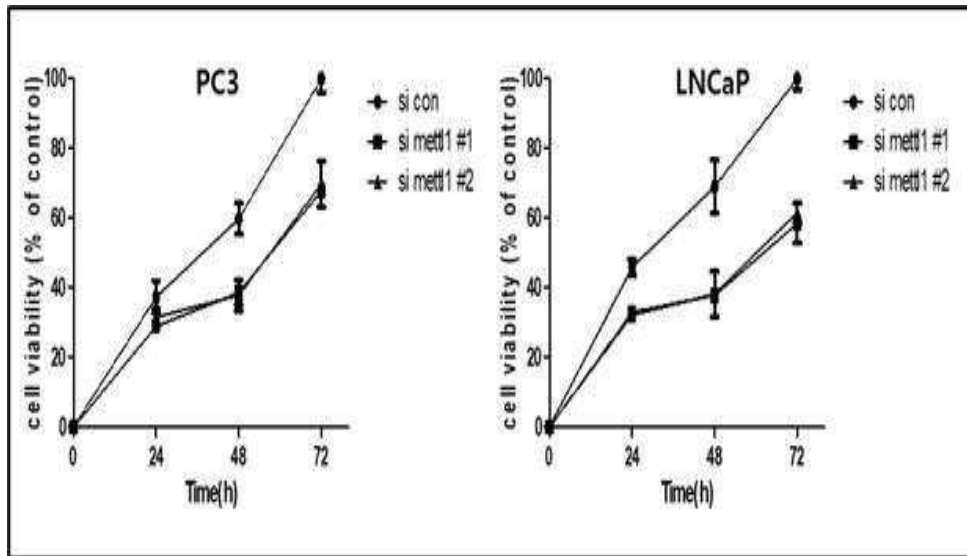
[0074] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

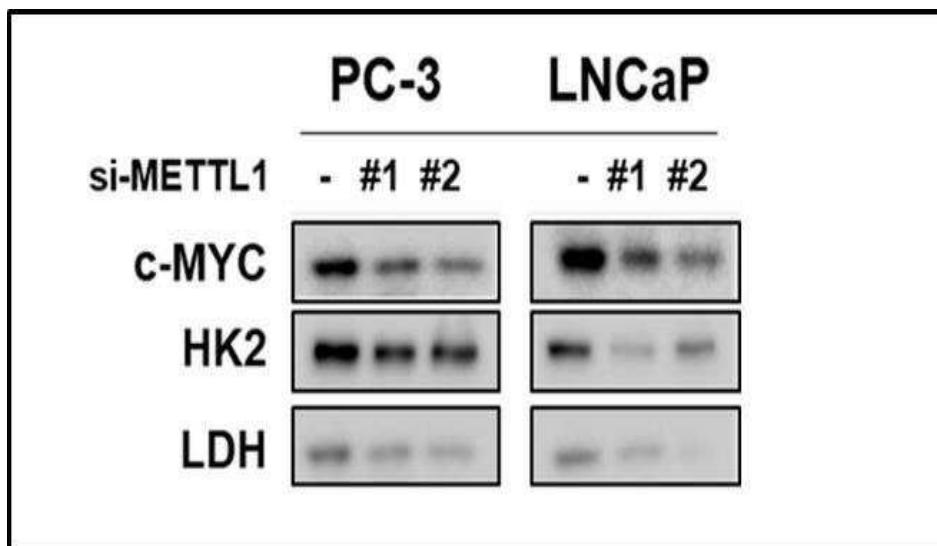
도면1



도면2



도면3



도면4

