



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0092345  
(43) 공개일자 2012년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 38/16* (2006.01) *C12N 15/867* (2006.01)

*C12N 15/861* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0012340

(22) 출원일자 2011년02월11일

심사청구일자 2011년02월11일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

김상훈

서울특별시 동작구 사당로23바길 9, 삼성래미안 아파트 104동 303호 (사당동)

신연남

서울특별시 동대문구 이문로35아길 23, 201호 (이문동)

이기호

서울특별시 도봉구 시루봉로 58, 한양아파트 603동 403호 (쌍문동)

(74) 대리인

이원희

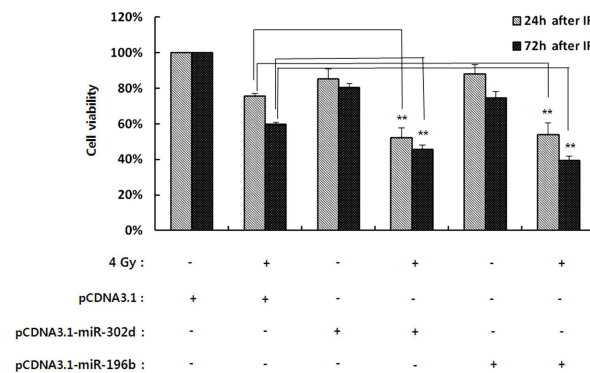
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **miRNA를 유효성분으로 함유하는 방사선 민감성 증진용 조성물**

### (57) 요약

본 발명은 microRNA를 유효성분으로 함유하는 방사선 민감성 증진용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 miR-302d 또는 miR-196b가 방사선 저항성이 강한 소화기 암세포에 방사선 민감성을 증가시킴을 확인함으로써 상기 miR-302d 또는 miR-196b를 암세포에 대해 방사선 민감성 증진제 또는 항암보조제의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있다.

**대표도** - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100017585

부처명 한국연구재단

연구사업명 원자력연구기반확충사업

연구과제명 방사선에 의한 microRNA 기능 제어를 활용한 소화기암 치료 기술 개발

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2009.04.01 ~ 2011.03.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 miRNA-302d 또는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 miRNA-196b를 유효성분으로 함유하는 암세포에 대한 방사선 증진용 약학적 조성물.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 miRNA-302d 또는 miRNA-196b는 세포내 전달을 위한 발현 벡터에 포함되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 발현 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 및 재조합 바이러스 벡터로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 재조합 바이러스는 렌티 바이러스, 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스 및 헤르페스 심플렉스로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 암세포는 소화기 암세포인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 소화기 암세포는 위암 세포 또는 대장암 세포인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 7

서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 miRNA-302d 또는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 miRNA-196b를 유효성분으로 함유하는 항암 보조제.

### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 항암 보조제는 암세포에 대한 방사선 민감성을 증진시키는 것을 특징으로 하는 항암 보조제.

### 청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 암은 소화기암인 것을 특징으로 하는 항암 보조제.

## 청구항 10

서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 miRNA-302d 또는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 miRNA-196b를 방사선에 저항성을 갖는 암세포에 처리하는 단계를 포함하는, 방사선에 저항성을 갖는 암세포의 방사선 민감성 증진 방법.

## 청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 암은 소화기암인 것을 특징으로 하는 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 방사선 민감성 증진용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 miRNA-302d 또는 miRNA-196b를 유효성 분으로 함유하는 암세포에 대한 방사선 민감성 증진용 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 암의 치료법은 수술, 방사선치료법, 항암화학요법으로 크게 나눌 수 있는데, 현재 국내에서 방사선치료를 받은 암 환자의 수는 매년 증가하고 있는 추세에 있어 암 치료에 있어 방사선 치료의 중요성 또한 증가하고 있다.

[0003] 방사선 치료는 현재 다양한 종류의 암에 필수적인 치료 방법으로 알려져 있으나, 암세포의 방사선 내성 획득, 고선량의 방사선 치료 시 정상조직의 손상 등이 방사선치료의 효율을 저하시키는 문제점으로 지적되어 왔다. 따라서, 방사선 치료의 효율을 증진시키기 위한 방사선 치료 민감제에 대한 연구가 시도되고 있으나, 현재까지 보고된 방사선 치료 민감제는 주로 항암제들로서, 예를 들어 탁솔(Taxol)과 시스플라틴(cisplatin) 등이 보고되어 있다. 또한, 항암제로서의 성질은 지니지 않고 방사선 치료에만 사용되는 방사선 치료효과 증진제로는 티라파자민(tirapazamine)이 있으나 저산소증의 종양세포에만 효과가 있으며, 저산소상태 특유의 종양 내부 압력 때문에 종양 조직 내부로의 약물전달이 미흡하여 임상적 방사선 치료에서 효과가 미약하다고 알려져 있다. 그러나 상기와 같이 방사선치료 효과를 증진시키기 위해 사용되는 항암제들을 방사선 치료와 병용할 때, 항암제의 독성이 방사선 치료시 나타나는 부작용, 즉, 방사선 치료부위의 염증, 위장장애, 오심, 구토, 설사 등과 복합적으로 나타날 수 있기 때문에 사용에 제한이 있다는 단점이 있다. 따라서, 방사선에 대해서 내재적인 방사선 저항성을 가진 암세포의 방사선 민감성을 증진시키면서 부작용은 최소화되어 방사선 요법을 최적화할 수 있는 방사선 민감성 증진제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0004] microRNA(miRNA)은 다양한 유전자 발현을 조절하는 nonprotein-coding 단일가닥 RNA이다. miRNA는 mRNA의 번역을 억제하거나, mRNA의 분해를 유도함으로써 전사 후 단계에서 유전자의 발현을 억제하고, 다양한 생리학적 및 병리학적 세포 과정에 관여한다. 또한, 몇몇 연구에서 miRNA는 세포 분화, 증식, 세포사멸, 발생, 면역, 물질대사 및 줄기세포 유지 등과 같은 많은 생물학적 과정을 통제하는 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 다양한 기능들로 인해, 몇몇 miRNA는 종양 형성 및 전이 동안 특이적으로 변하는 네트워크와 관련된 후보 종양 유전자 및 종양억제자의 역할이 밝혀졌다. 따라서 miRNA는 다양한 종양의 확인 및 분류를 위한 바이오마커로 유용하게 사용될 수 있다.

[0005] 이온화 방사선(Ionizing radiation; IR)은 악성종양을 치료하기 위해 사용되는 중요한 양식이고, 산화적 유전자독성 스트레스를 유도하는 물질의 하나의 예이다. 이온화 방사선은 직접적으로 DNA 완전성의 강력한 붕괴 및 간접적으로 세포내 자유라디칼의 형성의 결과로 인해 심각한 세포손상 및 스트레스를 유발한다. 몇몇 연구결과에서 실험관내 및 생체내 miRNA 발현 패턴에서 방사선의 효과를 나타내고 있으며, 또한 방사선 민감성은 단일

miRNA 종의 발현을 조절함으로써 변화될 수 있음을 보여주고 있다. 그러나 특이적인 miRNA 발현에서 방사선의 효과의 근본적인 메커니즘은 완전히 밝혀지지 않았다.

[0006] 이에 본 발명자들은 방사선에 대해서 내재적인 방사선 저항성을 가진 암세포의 방사선 민감성을 증진시키면서 부작용은 최소화되어 방사선 요법을 최적화할 수 있는 방사선 민감성 증진용 조성물을 개발하던 중, 마이크로레이(microarray) 및 실시간 PCR을 통하여 방사선에 의해 발현이 1.5배 이상 증가하거나 감소하는 miRNA를 발굴하고, 이중 가장 높은 방사선 민감성을 갖는 miR-302d 및 miR-196b를 선정한 후, 이들 miRNA의 방사선에 대한 암세포의 민감성 변화를 분석한 결과 방사선 저항성이 강한 위암 세포주에서 방사선 민감성을 증가시키는 것을 확인함으로써, 이들 miRNA들을 방사선 저항성을 갖는 암 세포주에 대한 방사선 민감성 증진용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 방사선 저항성이 강한 암 세포주에 대한 방사선 민감성을 증진시키는 새로운 miRNA를 발굴함으로써, 상기 miRNA를 이용한 암 세포주에 대한 방사선 민감성 증진용 조성물 또는 상기 암 세포주에 대한 방사선 치료의 항암 보조제를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 miRNA-302d, miRNA-196b 또는 이들을 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암세포에 대한 방사선 증진용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 miRNA-302d, miRNA-196b 또는 이들을 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 항암 보조제를 제공한다.

[0010] 아울러, 본 발명은 miRNA-302d, miRNA-196b 또는 이들을 포함하는 발현벡터를 방사선에 저항성을 갖는 암세포에 처리하는 단계를 포함하는, 상기 암세포에 대한 방사선 민감성을 증진시키는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0011] 본 발명의 miRNA-302d 또는 miRNA-196b은 방사선 저항성이 강한 위암 세포주에서 대한, 방사선 민감성을 증가시킴으로써, 방사선 저항성이 강한 암 세포에 대한 방사선 치료에 있어서 방사선 민감성 증진제 또는 항암 보조제의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 방사선 조사 후, 트립판블루(trypan blue) 분석을 통한 다양한 암세포주의 세포 생존도를 나타낸 도이다.

도 2는 방사선 조사 후, 콜로니 형성 분석을 통한 암세포주의 세포 생존도를 나타낸 도이다.

도 3은 SNU-638 세포에 방사선을 조사한 후, 마이크로레이(microarray) 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 방사선 특이적 miRNA에 대한 실시간 PCR을 수행한 결과, 유의적인 변화를 나타내는 miRNA를 나타낸 도이다.

도 5는 방사선 반응성 miRNA 발현 수준을 나타낸 도이다.

도 6은 SNU-638 세포에서 방사선 반응성 miRNA 과발현 테스트를 통한 상대적 발현 수준을 나타낸 도이다.

도 7은 SNU-638 세포에서 방사선 반응성 miRNA 과발현을 통한 세포 생존도 억제효과를 나타낸 도이다.

도 8은 SNU-638 세포에서 방사선 반응성 miRNA 조절을 통한 방사선 민감성을 나타낸 도이다.

도 9는 HT-29 세포에서 방사선 반응성 miRNA 과발현 테스트를 통한 상대적 발현 수준을 나타낸 도이다.

도 10은 HT-29 세포에서 방사선 반응성 miRNA 과발현을 통한 세포 생존도 억제효과를 나타낸 도이다.

도 11은 HT-29 세포에서 방사선 반응성 miRNA 조절을 통한 방사선 민감성을 나타낸 도이다.

도 12는 miRNA-302d 및 miRNA-196b의 DNA 손상기전 및 복구기전에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0014] 본 발명은 miRNA-302d 또는 miRNA-196b를 유효성분으로 함유하는 암세포에 대한 방사선 증진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 상기 miRNA-302d는 서열번호 1:(유전자 등록번호: MIMAT0000718, 서열번호: UAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGU)이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 상기 염기서열에 80% 이상 상동성을 갖는 서열도 가능하다.
- [0016] 상기 miRNA-196b는 서열번호 2:(유전자 등록번호:MIMAT0001080, 서열번호: UAGGUAGUUUCCUGUUGUGGG)이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 상기 염기서열에 80% 이상 상동성을 갖는 서열도 가능하다.
- [0017] 상기 miRNA-302d 또는 miRNA-196b는 세포내 전달을 위한 발현 벡터에 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0018] 상기 발현 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 및 재조합 바이러스 벡터로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0019] 상기 재조합 바이러스는 렌티 바이러스, 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스 및 헤르페스 심플렉스로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 상기 암세포는 소화기 암세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0021] 상기 소화기 암세포는 위암 세포 또는 대장암 세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 한가지 측면에서, 위암 세포주의 방사선 민감성을 확인하기 위하여, 방사선 조사 후, 세포 생존도를 확인한 결과 위암 세포주는 4 Gy 방사선에서 높은 세포 생존도를 나타냄으로써 방사선 저항성이 강한 것을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조).
- [0023] 본 발명의 한가지 측면에서, 위암 세포주에서 방사선 특이적 miRNA 발굴하기 위하여, 마이크로 어레이 분석을 수행한 결과, 4 Gy 방사선 조사 후, 총 372개 miRNA 발현 프로파일 확인하였고 배수 변화 분석을 통하여 22개의 miRNA를 확인하였다(도 3 및 도 4 참조).
- [0024] 본 발명의 한가지 측면에서, 방사선 특이적 miRNA 발현패턴을 검증하기 위하여, 마이크로어레이(microarray) 데이터로부터 획득한 miRNA 발현 프로파일을 qRT-PCR을 이용하여 확인한 결과, 마이크로어레이 분석과 발현패턴이 일치하고 유의성이 높은 2개의 miRNA(-302d 및 -196b)를 최종적으로 선별하였다(도 5 참조).
- [0025] 본 발명의 한가지 측면에서, miRNA 조절에 의한 소화기 암세포의 방사선 민감성을 확인하기 위하여 miR-302d 또는 miR-196b 발현 플라스미드를 제조한 후, 위암 세포 안으로 형질감염한 후 qRT-PCR을 통하여 miRNA의 발현을 확인한 다음, 세포 생존도를 통한 방사선 민감성을 확인한 결과, miR-302d 또는 miR-196b를 과발현 시킨 위암 세포주 SNU-638 세포는 정상상태의 세포에 비해 세포성장이 약 14% 억제되었고, 방사선 민감성은 약 20% 증가하는 것을 확인하였다(도 6 내지 도 8 참조).
- [0026] 본 발명의 한가지 측면에서, miRNA 조절에 의한 소화기 암세포의 방사선 민감성을 방사선 저항성이 강한 대장암 세포에서 확인한 결과, 대장암 세포에 대한 방사선 민감성을 증가시키는 것을 확인하였다(도 9 내지 도 11

참조).

- [0027] 본 발명의 한가지 측면에서, miR-302d 및 miR-196b 자체가 방사선에 의해 유도되는 DNA 손상기전과 복구기전에 영향을 미치는지 확인하기 위하여  $\gamma$ -H2AX foci 실험을 수행한 결과, miR-196b는 방사선에 의해 유도되는 DNA 복구기전을 억제하는 것으로 SNU-638 세포의 방사선 민감성을 향상시키는 반면 miR-302d는 방사선에 의해 유도되는 DNA 복구기전이 아닌 다른 기전을 통하여 SNU-638 세포의 방사선 민감성을 향상시키는 것을 확인하였다(도 12 참조).
- [0028] 따라서, miRNA-302d 및 miRNA-196b는 각각 방사선 저항성이 강한 소화기 암세포의 방사선 민감성을 증진시킴으로써 소화기암 세포의 방사선 치료시 방사선 민감성 증진제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0029] 본 발명의 miRNA-302d 또는 miRNA-196b는 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 상기 miRNA-302d 또는 miRNA-196b에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 약 0.001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.01 내지 10 mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [0033] 또한, 본 발명은 miRNA-302d 또는 miRNA-196b를 유효성분으로 함유하는 항암 보조제를 제공한다.
- [0034] 상기 miRNA-302d는 서열번호: 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 상기 염기서열에 80% 이상 상동성을 갖는 서열도 가능하다.
- [0035] 상기 miRNA-196b는 서열번호: 2로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 상기 염기서열에 80% 이상 상동성을 갖는 서열도 가능하다.
- [0036] 상기 항암 보조제는 암세포에 대한 방사선 민감성을 증진시키는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 상기 암은 소화기암인 것이 바람직하고, 상기 소화기암은 위암 또는 대장암인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0038] 따라서, miRNA-302d 및 miRNA-196b는 각각 방사선 저항성이 강한 소화기 암세포의 방사선 민감성을 증진시킴으로써 소화기암 세포에 대한 방사선 치료법의 보조제로서 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0039] 또한, miRNA-302d, miRNA-196b 또는 이들을 포함하는 조성물을 방사선에 저항성을 갖는 암세포에 처리하는 단계를 포함하는, 방사선에 저항성을 갖는 암세포의 방사선 민감성을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0040] 상기 암은 소화기암인 것이 바람직하고 상기 소화기암은 위암 또는 대장암인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [0041] 따라서, miRNA-302d 또는 miRNA-196b는 각각 방사선 저항성이 강한 소화기 암세포의 방사선 민감성을 증진시킴으로써 소화기암에 대한 방사선 치료법에 있어서 방사선 민감성을 증진시키는데 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0043] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] <실시예 1> 위암 세포주의 방사선 민감성 조사
- [0045] <1-1> 세포배양
- [0046] 사람 위암 세포주 SNU-638 및 2개의 결장암 세포주(HCT116, HT-29)를 각각 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 항온항습기(humidified chamber)에서 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(PenicillinStreptomycin)을 포함하는 RPMI-1640 또는 MEM에서 37℃로 배양하였다.
- [0047] <1-2> 방사선 조사
- [0048] 상기 실시예 <1-1>에서 배양한 세포에 이온화 방사선 조사(ionizing radiation; IR)는 Gammacell3000 Elan 방사선 조사장치(irradiator)(137Cs A-ray source; MDS Nordin, 캐나다)를 이용하여 감마 이온화방사선을 조사하였다.
- [0049] <1-3> 세포 생존도 분석
- [0050] 위암세포주의 방사선 민감성을 조사하기 위하여, 트리판블루(trypan blue assay) 분석 및 콜로니 형성 분석을 수행하였다.
- [0051] 구체적으로, 트리판블루 분석은 상기 실시예 <1-1>에서 배양한 각각의 세포를 방사선 처리 전날,  $1 \times 10^6$  세포를 100 mm 배양접시에 접종하고, 세포 성장분석을 위하여, 같은 수의 세포( $1.5 \times 10^5$ )를 6-웰 플레이트에 분주한 후, 4 Gy 방사선을 조사하였다. 그런 다음, 상기 배지를 제거하고 세포를 세척하고 수집하고, 트립신처리 후, 생존 세포(트리판블루 배출)를 시간대별로 카운트하였다.
- [0052] 또한, 콜로니 형성 분석은 상기 실시예 <1-1>에서 배양한 각각의 세포를 24시간 동안 6-웰 플레이트에서 낮은 농도로 플레이트 한 후 0, 2 또는 4 Gy 방사선을 조사한 다음, 24시간 후, 배지를 교환하고, 적어도 50개 이상의 세포를 가지는 콜로니를 형성할 때까지 배양하고 2주 후, 콜로니를 카운트하였다. 상기 콜로니는 PBS로 세척하고, 메탄올/크리스탈 바이올렛 염료로 염색하였다.
- [0053] 그 결과, 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이 SNU-638 세포주는 방사선 저항성이 강한 HCT116 세포주보다 세포 생존도가 높았으며, 또한 방사선 저항성이 강한 HT-29 세포주와 유사한 세포 생존도를 나타내는 것을 확인하였고, 콜로니 형성 분석에서도 4 Gy 방사선에서 SNU-638 세포주가 높은 생존도를 나타내는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2).
- [0054] <실시예 2> 방사선 특이적 miRNA 발굴
- [0055] 위암 세포주에 이온화 방사선을 처리한 다음, miRNA의 발현 프로파일을 확인하기 위하여, SNU-638 세포에 4 Gy 방사선을 조사 24시간 후, 1330개의 사람 miRNA 프로브(probe)가 들어있는 GenoSensor miRNA 칩을 이용하여 마이크로어레이 분석을 실시하였다.
- [0056] 구체적으로 SNU-638 세포를 배양 24시간 후, Gammacell3000 Elan 방사선 조사장치(137Cs A-ray source; MDS Nordin, 캐나다)를 이용하여 감마 IR 4Gy를 조사한 후, 24시간 동안 유지하고, 제조사의 프로토콜에 따라 TRIzolreagent(Invitrogen, 미국)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 마이크로어레이(microarray) 분석을 위

하여, ND-1000 분광 광도계(spectrophotometer)(NanoDrop Technologies, Inc., 독일)를 이용하여 전체 RNA의 순도 및 농도를 측정하고, BioAnalyzer 2100(Agilent Technology, 미국)을 이용하여 순도를 검사하였다. 마이크로어레이 분석을 위한 RNA 순도 파라미터는 1.8-2.0의 범위에서 OD 260/280 비율, 1.8 이하의 OD 260/230 비율, 1.8-2.1 범위에서 18s/28s rRNA 비율, 및 RNA integrity 수; RIN(RNA integrity number)) >8.0이 바람직하다.

[0057] 대조군 및 테스트 RNA를 위해, 표적 miRNA 프로브의 합성 및 혼성화는 GenoExplorer™ miRNA Labeling 키트(GenoSensor, 미국)를 제조사의 설명에 따라 수행하였다. 보다 상세하게는 uncapped RNA의 5'-말단에 비오틴(biotin)을 표지하기 위해, 전체 RNA의 5 ~ 10 µg을 Enzyme L로 표지한 후, 37° C로 3시간 동안 배양하였다. 상기 비오틴이 결합된 RNA는 같은 양의 Hyb 버퍼(GenoSensor, 미국)와 결합시키고, 5분 동안 가열한 후, GenoExplorer™ miRNA 바이오칩(GenoSensor, 미국)에 피펫하였다. 혼성화는 제조사의 설명에 따라 LifterSlip™(GenoSensor, 미국)를 이용하여 42° C 워터배스(waterbath)에서 16시간 동안 수행하였다. 혼성화 배양 후, 먼저 세척을 수행하고, 마이크로어레이를 원심탈수하였다. 형광염료 염색을 위하여, SA-S(streptavidin-stain)염료를 비오틴이 표지된 RNA가 혼성화된 칩에 추가한 후, 25° C의 워터배스에서 30분 동안 배양하였다. 마지막으로 비-특이적 결합을 제거하기 위하여 혼성화된 마이크로어레이를 세척 및 건조시킨 후, GenePix 4000B 스캐너(scanner)(Axon Instrument, 미국)로 스캔하였다. 혼성화된 이미지는 GenePix 소프트웨어(Axon Instrument, 미국)를 이용하여 분석하였다. 모든 데이터의 표준화 및 배수-변화된 유전자의 선별은 GeneSpringGX 7.3(Agilent Technology, 미국)을 이용하여 수행하였다. 표준화된 비율(normalized ratio)의 평균은 표준화된 신호 채널 강도의 평균을 표준화된 대조군 채널 강도의 평균으로 나누어 계산하였다.

[0058] 그 결과, 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 4Gy 방사선 조사 후, 총 372 miRNA의 발현 프로파일을 확인하였고, IR 처리한 후, 발현의 강한 변화를 나타내는 miRNA를 확인하기 위한 마이크로어레이 데이터를 통한 배수 변화 분석에서 대조군과 비교하여 1.5배 이상 유의적인 변화를 나타내는 22개의 miRNA를 확인하였다(도 3 및 도 4).

#### [0059] <실시예 3> 위암 세포주에서 방사선 특이적 miRNA 선별

[0060] 위암 세포주에서 방사선 특이적 miRNA 발현패턴을 검증하기 위하여, 마이크로어레이 데이터로부터 획득한 miRNA 발현 프로파일을 qRT-PCR을 이용하여 확인하였다. 구체적으로 GenoExplorer™ miRNA qRT-PCR 키트(GenoSensor Corporation, Tempe, 미국)를 이용하여 RT 프라이머(primer)로 역전사하여 총 RNA로부터 주형 miRNA cDNA를 제조하였다. 상기 PCR은 Line gene K Real-Time PCR machine(BIOER Technology Co., 중국)을 이용하여 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같았다; 5분 95° C; 95° C로 30, 30초 50° C, 및 30초 72° C로 45 사이클; 및 5 분 72° C. 각각의 샘플의 유전자 증폭 및 표준화(normalizing)를 확인하기 위하여 SYBR 및 U6 유전자를 이용하였다.

[0061] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 6개의 miRNA는 방사선 조사에 따라 하향 조절(down-regulation)되고, 2개는 상향 조절(up-regulation)되는 것을 확인하였으며, 마이크로어레이 분석과 발현패턴이 일치하고 유의성이 높은 2개의 miRNA(-302d, -196b)를 최종적으로 선별하였다(도 5).

#### [0062] <실시예 4> miRNA 조절에 의한 소화기 암세포의 방사선 민감성 조사

##### [0063] <4-1> 벡터의 제조

[0064] miR-302d 또는 miR-196b의 발현 플라스미드는 주형으로 사람 게놈 DNA를 이용하여 PCR 증폭으로 제작하였다. 프라이머는 다음과 같다: miR-302d, 5'-TCCATGTTTGGTGATGGTA-3'(센스)(서열번호: 3) 및 5'-CATCACCATTGCTAAAGTGC-3'(안티센스)(서열번호: 4), 및 miR-196b, 5'-TTACTGGGGCCTGTGGCTTC-3'(센스)(서열번호: 5) 및 5'-CAACCTAACCTACCTGCTG -3'(안티센스)(서열번호: 6). 상기 PCR 산물(pri-miRNA를 포함하는 300~500bp)은 pcDNA3.1-myc/His-A(-) 발현 벡터(Invitrogen)에 클로닝하였고, DNA 시퀀싱을 통해 확인하였다. 또한, ExGen500(MBI Fermentas, 미국)를 이용하여 플라스미드를 세포 안으로 형질감염함으로써 miRNA의 발현을 수행하였다. 또한 상기 제조한 벡터를 이용하여 SNU-638 세포에서 miR-302d 또는 miR-196b를 과발현시키고, 정량적인 실시간 PCR 분석을 이용하여 miRNA의 발현을 확인하였다.

[0065] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 대조군인 pcDNA3.1과 비교하여 pcDNA3.1-miRNA 그룹에서 miRNA의 발현 레벨

이 증가하는 것을 확인하였다(도 6).

[0066] <4-2> 위암 세포주에 대한 방사선 민감성 확인

[0067] 본 발명의 miRNA의 위암 세포주에 대한 방사선 민감성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 트리판블루 분석을 이용하여 miR-302d 또는 miR-196b의 과발현을 통한 SNU-638 세포의 세포 생존도의 시간에 따른 방사선 민감성을 확인하였다.

[0068] 그 결과, 도 7 및 도 8에 나타난 바와 같이 miR-302d 또는 miR-196b를 과발현시킨 SNU-638 세포는 정상상태의 세포에 비해 세포성장이 약 14% 억제되었고, 방사선 민감성은 약 20% 증가되는 것을 확인하였다(도 7 및 도 8).

[0069] <4-3> 결장암 세포주에 대한 방사선 민감성 확인

[0070] 본 발명의 miRNA의 방사선 저항성이 강한 것으로 알려진 결장암 세포주 HT-29에 대한 방사선 민감성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-2>와 동일한 실험을 수행하였다.

[0071] 그 결과, 도 9 내지 11에 나타난 바와 같이 miR-302d 및 miR-196b를 과발현은 방사선 저항성이 강한 HT-29 세포에서도 세포성장을 억제하고 방사선 민감성을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서, miR-302d 및 miR-196b는 소화기 암세포의 세포성장과 방사선 저항성을 억제할 수 있는 것을 확인하였다(도 9 내지 11).

[0072] <실시예 5> miR-302d 및 miR-196b의 DNA 손상 및 복구기전 영향 확인

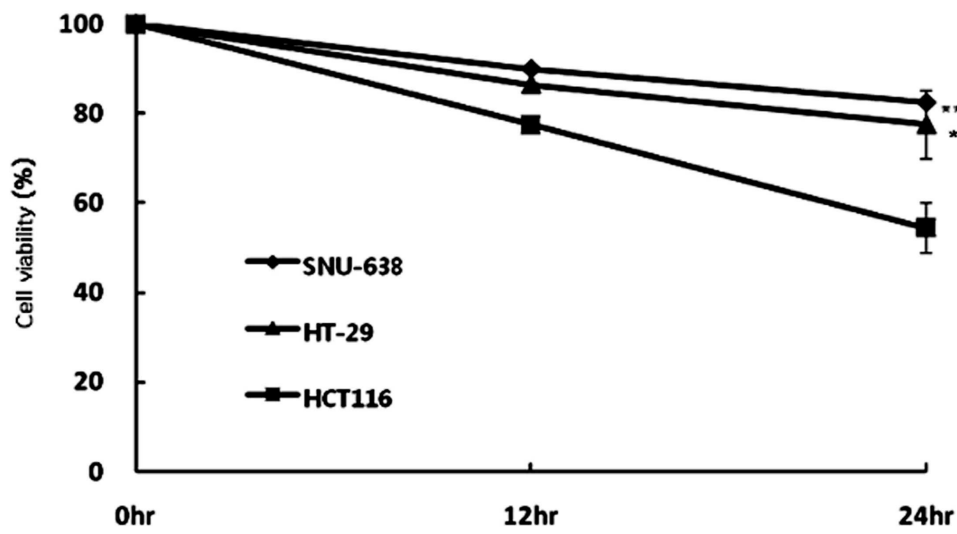
[0074] miR-302d 및 miR-196b 자체가 방사선에 의해 유도되는 DNA 손상기전과 복구기전에 영향을 미치는지 확인하기 위하여,  $\gamma$ -H2AX foci 실험을 수행하였다. 구체적으로, 감마방사선을 비롯한 여러 가지 DNA 손상물질들에 의해 세포 내에서의 DNA 단일 가닥이나 이중이 절단되면  $\gamma$ -H2AX 인산화가 일어나면서 세포핵에서 nuclear foci가 생성된다. 이를 DNA 손상 복구 능력을 평가하는 지표로 사용하여 DNA 손상 복구 능력을 평가하였다.  $\gamma$ -H2AX foci 실험은 SNU-638 세포를 35 mm 접시에 분주하고 24시간 동안 18 mm 커버 슬립으로 덮은 후, 감마선(gamma-ray)을 조사한 다음, 상기 세포를 4% 파라 포름알데히드가 포함된 PBS에 20분 동안 고정하고, 상온에서 15분 동안 0.1% NP-40이 담긴 PBS로 투과화(permeabilize)하였다. 30분 동안 블로킹 버퍼(PBS+0.1% NP-40+10% BSA)로 처리한 후, 상기 세포를 항- $\gamma$ -H2AX 항체가 희석된 블로킹 버퍼(1:500)와 상온에서 2시간 동안 배양한 다음, Alexa Flour 488 항체가 희석된 블로킹 버퍼(1:500)와 상온에서 50분 동안 배양하였다. 세포는 핵을 보기 위하여 5분 동안 DAPI(100 ng/ml)로 염색하였다. 그런 다음 시료를 마운팅(mounting)하고, LSM 510 현미경(Carl Zeiss, 독일)을 이용하여 관찰하였다. 10 이상의 foci를 보이는 세포를 양성세포로 카운트하였고, 이러한 세포를 DNA 손상 및 회복되지 않은 세포로 간주하였다.

[0075] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 SNU-68 세포를 이용하여 miR-302d 미믹(mimics)(50 nM), miR-196b 미믹(50 nM) 또는 NC 미믹(50 nM)을 48시간 처리한 결과, 각각의 miRNA가 100배 이상 과발현하는 것을 확인하였고, 또한 NC 미믹을 처리하고 24시간 후 4 Gy 방사선을 조사하게 되면 2시간 상태에서는 약 78% 정도의 세포에서  $\gamma$ -H2AX foci가 생성되었고, 24시간 상태에서는 약 15% 정도의 세포에서  $\gamma$ -H2AX foci가 생성되었으나, miR-196b 미믹을 처리하고 24시간 후에 4 Gy 방사선을 조사하게 되면 DNA 손상단계인 2시간 상태에서는 약 79% 정도의 세포에서  $\gamma$ -H2AX foci가 생성되었고, DNA 복구단계인 24시간 상태에서는 약 28% 정도의 세포에서  $\gamma$ -H2AX foci가 생성되므로 NC 미믹 그룹에 비해 상대적으로 많은 세포가 DNA 손상상태를 유지하였지만 miR-302d 미믹을 처리하고 24시간 후 4 Gy 방사선을 조사하게 되면 DNA 손상단계인 2시간 상태에서는 약 74% 정도의 세포에서  $\gamma$ -H2AX foci가 생성되었고, DNA 복구단계인 24시간 상태에서는 약 17% 정도의 세포에서  $\gamma$ -H2AX foci가 생성되므로 NC 미믹 그룹에 비해 큰 차이를 보이지 않았다.

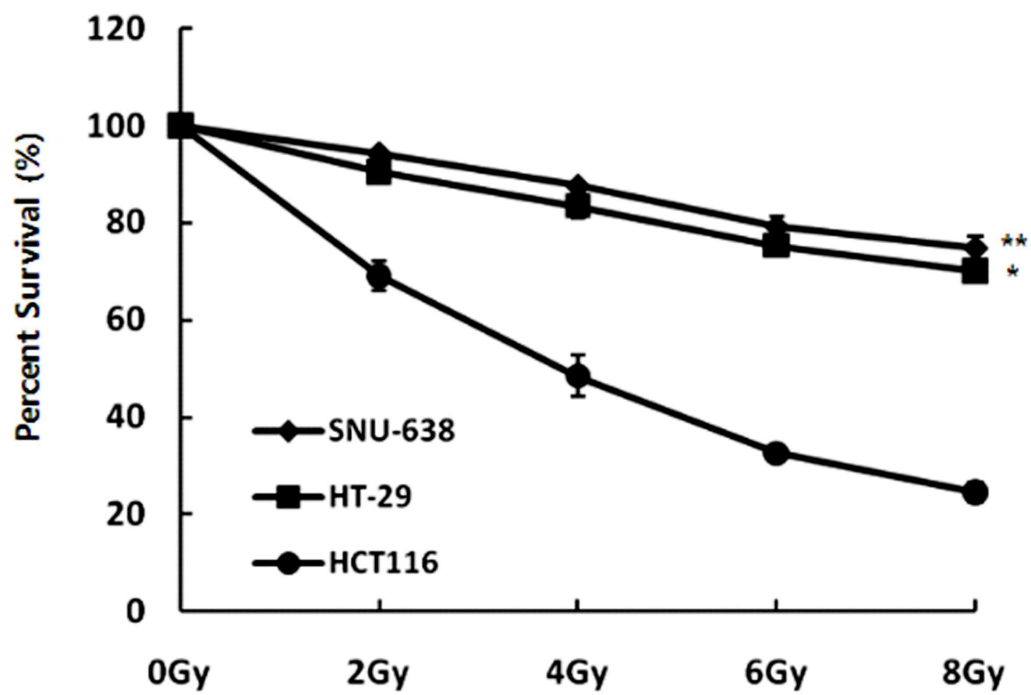
[0076] 따라서 miR-196b는 방사선에 의해 유도되는 DNA 복구기전을 억제하는 것으로 SNU-638 세포의 방사선 민감성을 향상시키는 반면 miR-302d는 방사선에 의해 유도되는 DNA 복구기전이 아닌 다른 기전을 통하여 SNU-638 세포의 방사선 민감성을 향상시키는 것을 확인하였다(도 12).

도면

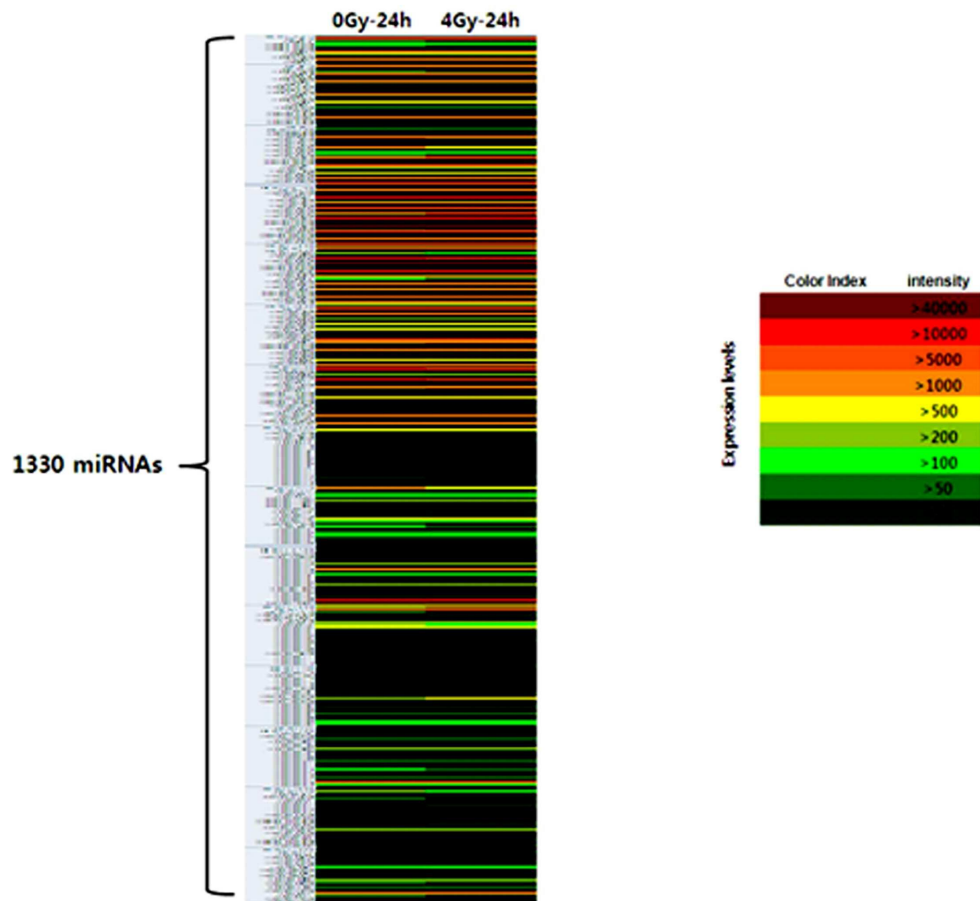
도면1



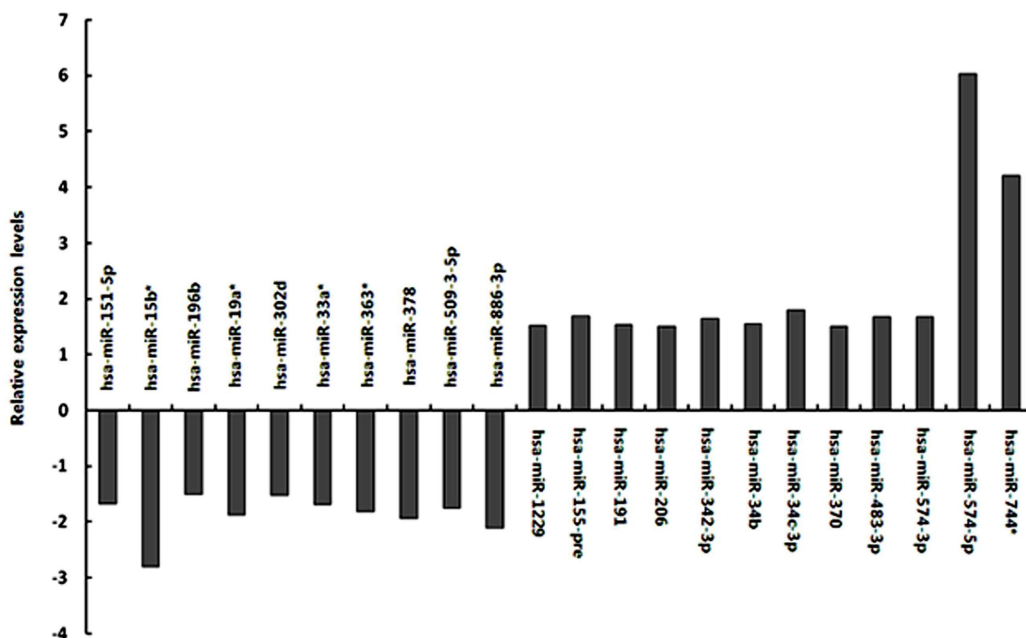
도면2



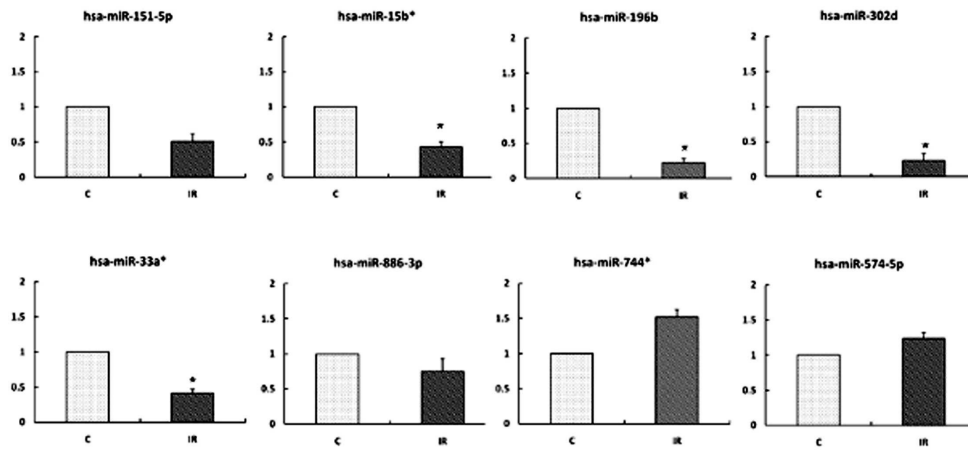
도면3



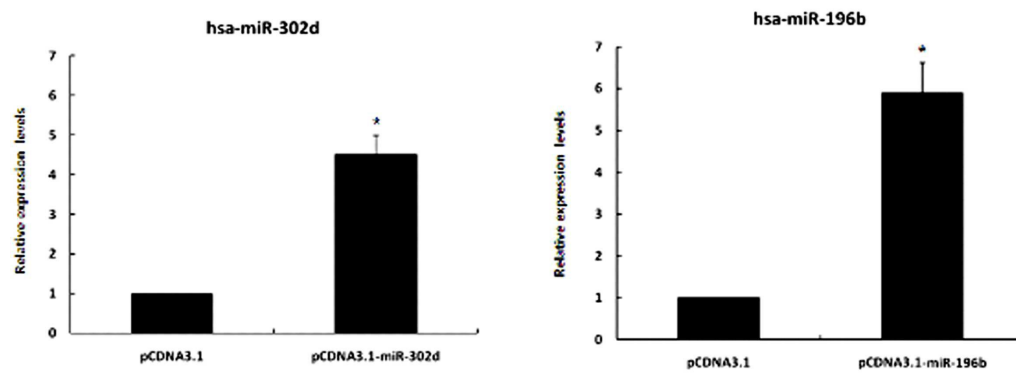
도면4



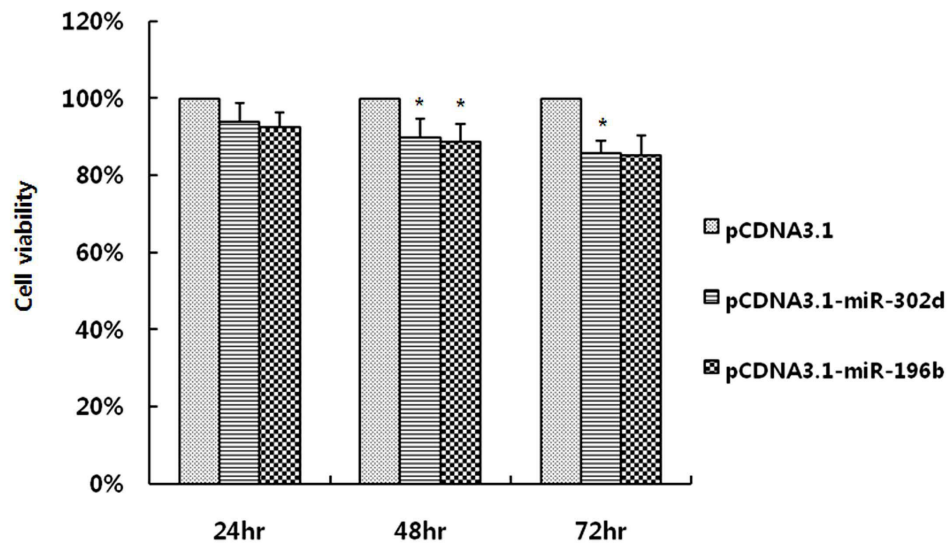
도면5



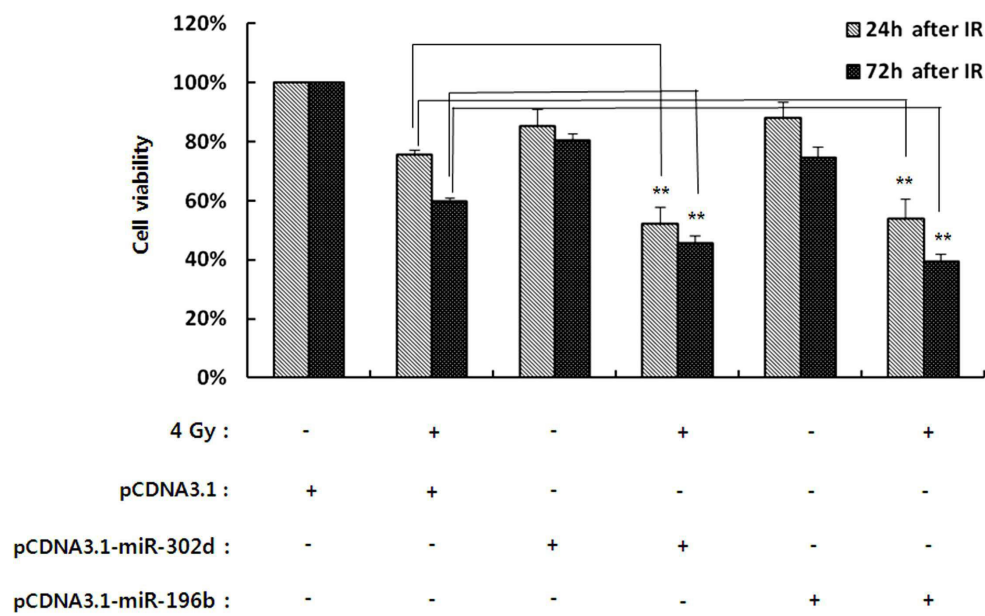
도면6



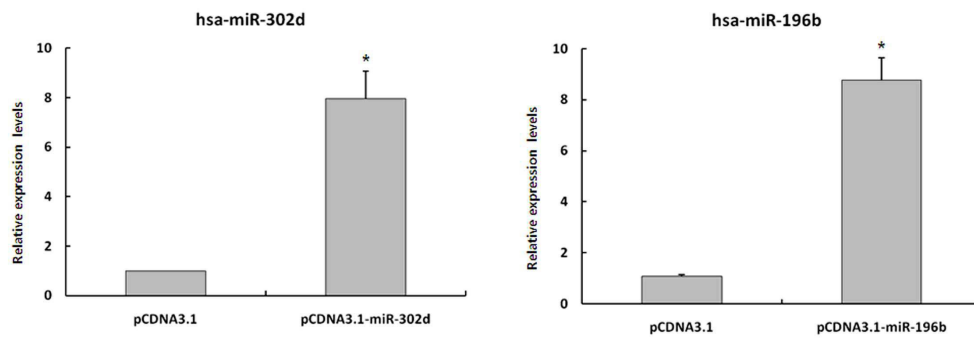
도면7



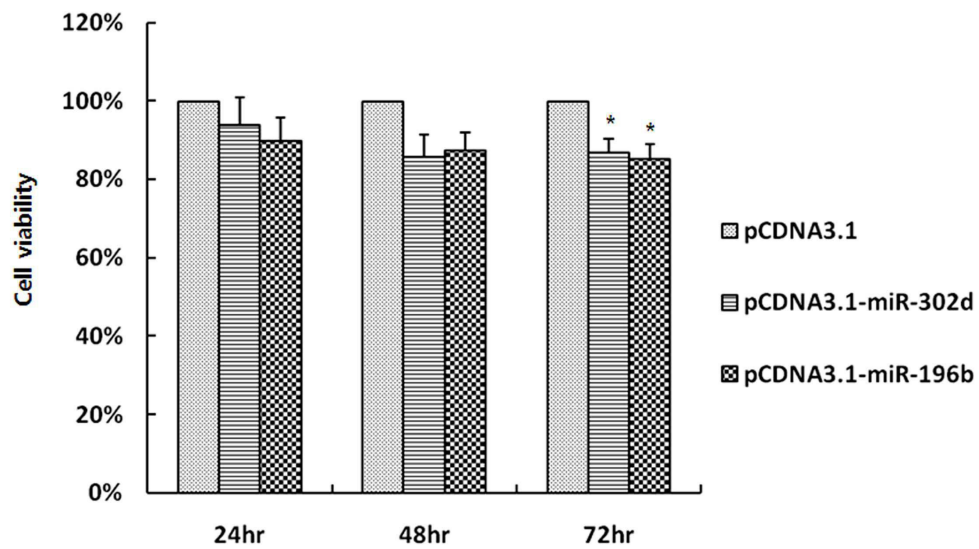
도면8



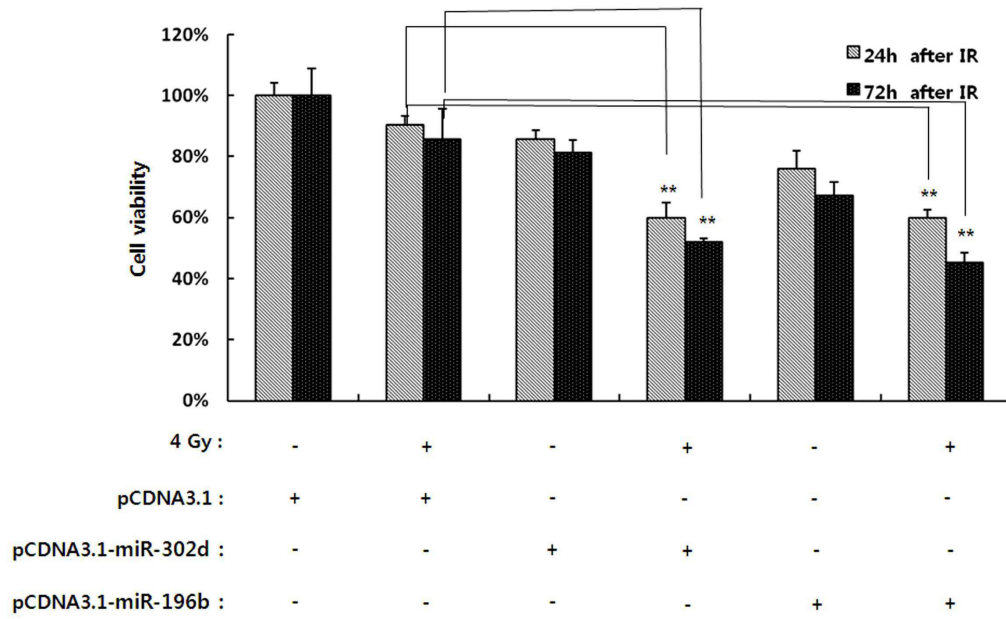
도면9



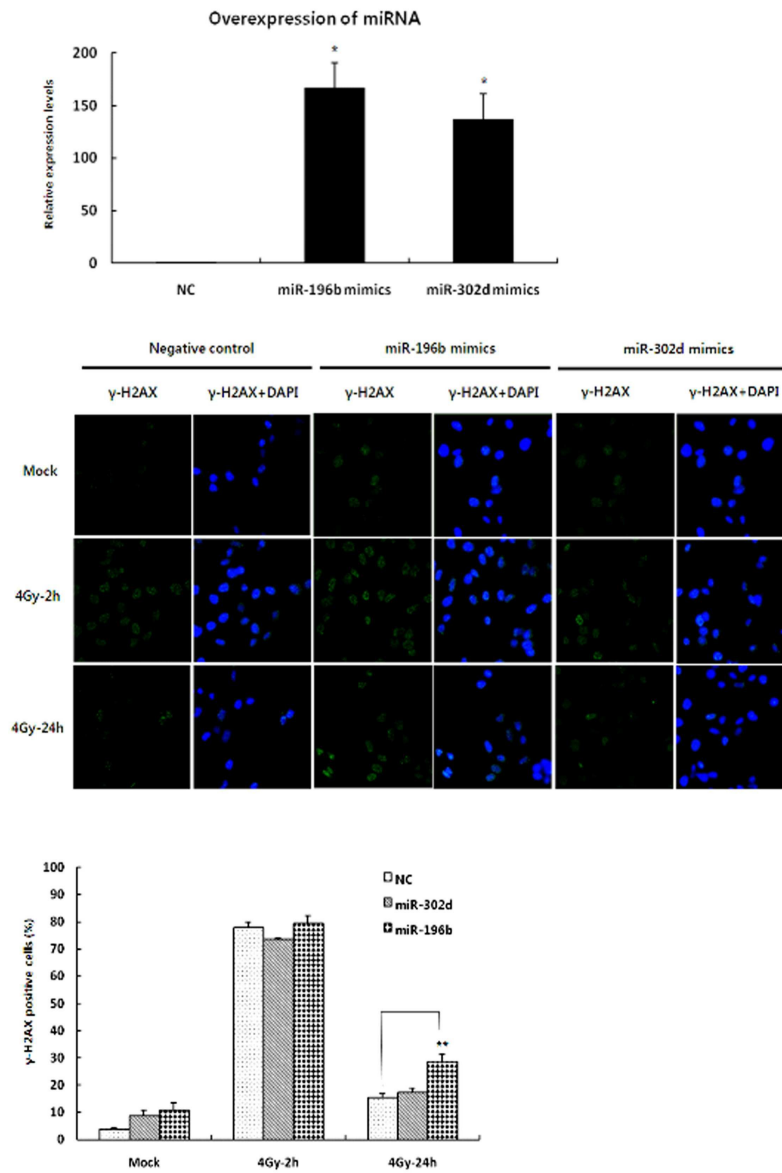
도면10



도면11



## 도면12



## 서열 목록

- <110> Kyunghee University Industry Cooperation Foundation
- <120> Composition containing microRNA for enhancing radiation sensitivity
- <130> 11p-01-09
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 23

<212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 uaagugcuuc cauguugag ugu 23  
 <210> 2  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 uagguaguuu ccuguuguug gg 22  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> sense primer for PCR amplification  
 <400> 3  
 tccatgtttt ggtgatgta 20  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> antisense primer for PCR amplification  
 <400> 4  
 catcaccatt gctaaagtgc 20  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 ><223> sense primer for PCR amplification  
 <400> 5  
 ttactggggc ctgtggcttc 20  
 <210> 6  
 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti sense primer for PCR amplification

<400> 6

caacctaacc ctacctgctg

20