(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0056055
(43) 공개일자 2011년05월26일

(51) Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 35/74* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0112734
(22) 출원일자 2009년11월20일
심사청구일자 2009년11월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
박용근
서울특별시 도봉구 도봉동 30-1 한신공영@ 122-1304
윤원석
서울특별시 용산구 문배동 3-3 이안프리미어 608호
이승석
서울특별시 강남구 대치동 601-1 미도맨션 3차 101호
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 6 항

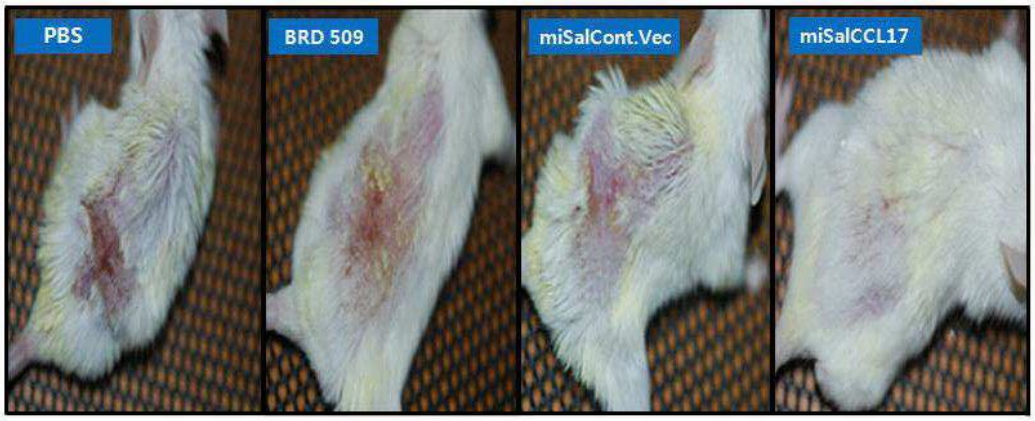
(54) 아토피성 피부염에 치료효과를 갖는 작은 간섭 RNA

(57) 요 약

본 발명은 아토피성 피부염에 치료효과를 갖는 작은 간섭 RNA에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 CCL17 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 박테리아 세포를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 치료제에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 CCL17 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 박테리아 세포를 제조할 수 있으며, 상기 박테리아 세포를 이용하여 아토피성 피부염의 유발을 억제시킬 수 있다. 따라서, 아토피성 피부염에 치료효과를 갖는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 이용한 치료제는 난치성 질환으로 적절한 치료제가 부재한 아토피성 피부질환의 치료 및 예방제로서 의약산업에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

CCL17 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 전사하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 박테리아 세포를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 치료제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 박테리아 세포는 살모넬라 티피머리움(salmonella typhimurium)인 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 치료제.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 siRNA인 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 치료제.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 1에 도시된 pcDNA-CCL17miRNA의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 치료제.

청구항 5

서열번호 2의 염기서열을 갖는 siRNA인 것을 특징으로 하는 CCL17 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA).

청구항 6

제 5항의 siRNA를 전사하는 유전자를 포함하는 재조합벡터로 형질전환된 박테리아 세포.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아토피성 피부염에 치료효과를 갖는 작은 간섭 RNA에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 CCL17 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 박테리아 세포를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 치료제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아토피성 피부염은 현대인에게 빈번하게 발생되고 있는 의학적으로 원인이 불분명한 만성적 피부질환이다. 아토피성 피부염은 일반적으로 인간 면역체계의 불균형에 의해 초래된 질환으로 알려져 있다. 우리 몸의 면역은 B 림프구가 주관하는 체액성 면역과 T 림프구가 주관하는 세포성 면역으로 이루어져 있다. 세포성 면역을 주관하

는 T 세포에는 Tc-세포와 Th-세포가 있으며, Th-세포는 Th-1과 Th-2로 구분된다. 상기 Th-1과 Th-2의 균형이 깨져 Th-2의 양이 갑자기 늘어나고 Th-1의 양이 줄어들면 알레르기 질환, 즉 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 알레르기성 천식 등의 질환이 발생하며, 반대로 Th-1의 양이 많이 늘어나게 되면 자가 면역 질환이 초래된다. 따라서 Th-2 면역반응의 과민은 아토피성 피부질환의 핵심요소이다. Th-2 면역반응은 즉시형 과민반응으로 IL-4, IL-5, IL-13 사이토카인의 분비를 매개로 이루어지며, IL-4와 IL-13은 B 세포의 isotype을 자극하고 Ig-E의 생성을 조절한다.

[0003] 최근들어 국내외적으로 아토피성 피부염 발병이 소아에서 성인에 이르기까지 광범위하게 발생하고 있어 치료제의 개발이 시급하다. 현재 스테로이드 계열의 아토피성 피부염 억제제가 치료제로 사용되고 있으나 아토피성 피부염의 원천적인 해결방법이 아닌 일시적인 경감효과를 보여주며 동시에 내성이 생기는 부작용이 알려진바 적절하고 광범위한 치료제 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 한편, CCL17은 T 세포에서 Th-2 phenotype의 CD+ T 세포들을 선택적으로 발현하는 CCR4의 리간드로써, 정상 환자군에 비해 아토피성 피부염 환자군에서 CCL17의 혈중 농도가 급격히 증가되어 있다. 그러나 아직까지 CCL17을 타겟으로 하는 아토피 피부염 치료제가 개발되지는 않았다. 또한, 살모넬라 균주를 피하주사시 피부염 억제가 유도된다는 특허(대한민국 등록특허: 10-0650451)가 있으나, 살모넬라의 경우 본 특허내용과 같이 경구투여시 아무런 효과가 없다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 21 ~ 25개 정도의 뉴클레오티드로 구성된 단일 염기가닥인 siRNA의 RNAi(RNA interference)를 살모넬라를 캐리어로 이용하여 아토피성 피부염이 유발된 실험군에 경구투여하는 경우, Th-2 면역반응의 지표인 IL-4의 발현을 감소시키고, Th-1 면역반응의 지표인 IFN-γ의 발현을 증가시키며, 또한 아토피 질환의 지표인 Ig-E의 면역반응을 급격히 감소시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 CCL17 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 박테리아 세포를 이용한 아토피성 피부염 치료제를 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 CCL17 유전자의 발현을 억제시킴으로써 IL-4와 Ig-E의 발현을 감소시키고, IFN-γ의 발현을 증가시켜 아토피성 피부염에 치료효과를 갖는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 CCL17 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 전사하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 박테리아 세포를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 치료제를 제공한다.

[0009] 본 발명의 아토피성 피부염 치료제에 있어서, 상기 박테리아 세포는 살모넬라 티피머리움(salmonella typhimurium)인 것을 특징으로 한다. 살모넬라 균주는 장티푸스를 유발하는 group D Salmonella에 속하는 병원균으로서, 본 발명에서는 상기 살모넬라 균주의 병원성을 없애기 위해 약독화된(attenuated) 살모넬라 균주를 사용하였다. 상기 약독화된 살모넬라 균주는 장티프스 예방용 약독화 백신인 것을 특징으로 한다. 상기 "약독화(attenuation)"란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 만든 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고, 면역 체계만을 자극하여 면역성을 유도하는 것을 의미한다.

[0010] 본 발명의 구체적인 실시예에 사용된 살모넬라 균주는 살모넬라 티피머리움(salmonella typhimurium) BRD509 균주로, 병원성이 없는 약독화된 균주이다.

[0011] 본 발명의 상기 siRNA는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 siRNA인 것을 특징으로 한다. 상기 siRNA는 21 ~ 25 뉴클레오티드의 CCL17 유전자의 mRNA와 상보적인 염기서열로써, 바람직하게는 상기 서열번호 2의 염기서열과 이와 상보적인 서열을 포함하는 이중가닥(double-strand) siRNA일 수 있다. 본 발명에서는 서열번호 1과 서열번호 2의 이중가닥 올리고(top 및 bottom strand)를 합성하여 사용하였다. 상기 siRNA는 CCL17 유전자의 mRNA에 상보

적으로 결합하여 번역을 방해하는 과정을 통해 유전자 기능을 억제한다. 다음 표 1은 siRNA에 쓰이는 CCL17 유전자의 target sequence와 siRNA의 서열을 나타낸 것이다.

[0012] [표 1. 염기서열]

이름	염기서열 (5' → 3')	서열번호
CCL17 target sequence	sense : 5′ - TGC TGA TCC CTG GAA CAC TCC ACT GAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TCA GTG GAG TTC CAG GGA T - 3′	1
	anti-sense(siRNA) : 5′ - CCU GAU CCC UGG AAC UCC ACU GAG UCA GUC AGU GGC CAA AAC UCA GUG GAG UGU UCC AGG GAU C - 3′	2

[0013]

[0014] 본 발명에 따른 siRNA 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현벡터 내에 포함될 수 있다. 상기 “작동 가능하게 연결(operably linked)” 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. 상기 “발현 조절 서열(expression control sequence)”이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0015] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 CCL17 유전자를 억제시키는 siRNA를 발현하는 재조합 벡터를 약독화된 살모넬라 균주에 형질도입 함으로써 본 발명의 살모넬라를 제작하고, 아토피와 유사한 피부병을 유발시킨 마우스 모델에 상기 형질도입된 살모넬라를 투여함으로써 그에 의한 아토피성 피부질환의 예방 및 치료효과를 형질도입 시키지 않은 대조군 살모넬라자체에 의한 효과와 비교분석하여 확인하였다. 분석 결과, 도 1 내지 4에 나타낸 것과 같이, 형질도입 시키지 않은 살모넬라만을 경구투여시 아토피피부염을 오히려 증가시켰으나, siRNA를 발현하는 재조합 벡터를 형질도입시킨 살모넬라를 경구투여한 경우 아토피피부염을 치료하는 효과가 나타남을 확인하였다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 벡터는 상기 siRNA를 발현시킬 수 있는 프로모터와 클로닝을 위한 멀티클로닝사이트를 가지고 있는 어떠한 발현벡터도 사용할 수 있으나, 바람직하게는 도 1에 도시된 pcDNA-CCL17miRNA의 개열지도인 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명에서 아토피성 피부염 치료 효과를 유도하는 siRNA를 발현하는 살모넬라 균주는 당업계에서 통상 사용되는 형질도입방법에 의해 제조 가능하며, 제조된 살모넬라를 체내에 도입시킬 때, 상기 siRNA가 과발현 될 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 염기서열을 갖는 siRNA인 것을 특징으로 하는 CCL17 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 제공한다.

[0019] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 상기 siRNA를 전사하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 박테리아 세포를 제공한다. 본 발명의 상기 박테리아 세포는 살모넬라 티피머리움(salmonella typhimurium)인 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 아토피성 피부염 치료제는 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들들은 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여될 수 있다.

[0021] 본 발명의 치료제는 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 “치료학적으로 유효한 양(therapeutically

effective amount)" 은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적적히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0023] **실시예 1. CCL17 유전자에 특이적인 miRNA 구축**

[0024] CCL17 유전자 염기서열에서 miRNA에 상보적인 타겟(target) 염기서열을 결정하기 위해, miRNA 활성 효율에 영향을 주는 이차 구조(secondary structure), GC contents, cis-acting sequences 등을 고려하여 functional miRNA를 설계할 수 있는 알고리즘 프로그램에 CCL17 유전자 염기서열을 넣어 miRNA 타겟 염기서열을 검색하여 21-뉴클레오티드의 miRNA 올리고뉴클레오티드를 합성하였다. 각각의 단일 가닥 올리고(single strand oligo)는 miRNA 염기서열을 바탕으로 플라스미드 벡터와 연결할 수 있는 링커(linker) 염기서열(TGCT, CCTG)과 센스 가닥(sense strand)과 안티-센스 가닥(anti-sense strand)을 연결하는 루프(loop) 염기서열(TTGGCCACTGACT)을 삽입하여 설계한 각 64-뉴클레오티드의 top 및 bottom strand를 이중 가닥 올리고(double strand oligo)로 합성한 후, T4 DNA ligase를 통해 pcDNA6.2-GW/±EmGFP-miR vector(INVITROGEN, USA)의 5′ 및 3′ miR flanking region 사이에 삽입하여 재조합 벡터 pcDNA-CCL17miRNA(도 1)를 제조하였다. 상기 합성된 top 및 bottom strand 염기서열은 하기에 나타내었다.

[0025] Top strand : 5′ - TGC TGA TCC CTG GAA CAC TCC ACT GAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TCA GTG GAG TTC CAG GGA T - 3′

[0026] Bottom strand : 5′ - CCT GAT CCC TGG AAC TCC ACT GAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TCA GTG GAG TGT TCC AGG GAT C - 3′

[0027] **실시예 2. 구축된 CCL17 유전자 특이적 miRNA 벡터(vector)의 형질전환**

[0028] 상기 실시예 1에서와 같이 구축된 CCL17 유전자에 특이적인 miRNA 벡터(pcDNA-CCL17miRNA)를 약독화된 살모넬라 균주인 BRD509(Salmonella typhimurium BRD509) competent cell에 electrophoration shock을 통해 형질도입 시켰다. 본 발명의 구체적인 실시예는 하기에 나타내었다.

[0029] 먼저, 약독화된 살로넬라 균주 BRD509(Salmonella typhimurium BRD509)를 37 ℃에서 루리아 벌테니(Luria Bertani) 배지에 배양하였다. 배양된 상기 살모넬라 균주에 마우스의 pcDNA-CCL17miRNA 벡터를 형질도입하기 위해, 상기 살모넬라 균주를 다시 100 ml의 양으로 24 시간 동안 배양한 후, 600 nm에서 광학흡광도(O.D.600)를 측정하였다. 이후, 0.7을 나타내는 배양농도에서 세균을 5500 rpm의 속도로 원심분리하였다. 원심분리 후, 바닥에 가라앉은 세균만을 수집하여 배양부피와 동일한 부피의 차가운 증류수로 희석하였다. 상기 희석된 세균을 다시 상기와 동일한 방법으로 원심분리하여 2 ml의 차가운 20% 글리세롤 증류수에 희석시킨 후, 또 다시 원심분리의 과정을 수행하였다. 이후, 수득한 세균을 100 μl의 20% 글리세롤에 희석하였다. 상기 과정에 의해 얻어진 혼합액의 30 μl(2 μg)를 미니원심분리용기에 넣은 후, 상기 용기에 pcDNA-CCL17miRNA 벡터를 3 μl(2 μg)를 가한 후, 275-325V의 전기로 형질도입을 유도하였다.

[0030] **실시예 3. 생체내(in vivo) 실험을 위한 아토피성 피부염 모델 제조 및 아토피성 피부염 지표 측정**

[0031] 5주령된 ICR mouse를 5 마리씩 대조군과 실험군의 두 그룹으로 나눈 후, 각각의 쥐에 피부병 유발 물질인 DNCB를 1%의 농도로 1주일간 100 μl씩 도포하여 아토피와 유사한 피부병을 유발시켰다. 이후, 실험군 쥐에 CCL17 유전자에 특이적인 miRNA 벡터가 형질도입된 살모넬라 BRD509 균주를 1.6×10^{8}의 농도로 경구투여 하였다. 투여한지 일주일이 되는 시점에 안와채취법을 이용하여 각각의 쥐의 혈청을 뽑아 아토피성 피부염의 지표인 IL-4, IFN-γ, Ig-E의 혈청내 적정농도를 구하기 위해 ELISA 실험을 수행하였다. 상기 IL-4는 아토피를 유도하는 사이

토카인이며, IFN-γ는 아토피를 억제시키는 사이토카인이며, Ig-E는 아토피 피부염을 유발하는 항체이다.

[0032] 실험 결과, 도 2에 나타낸 것과 같이 CCL17 유전자에 특이적인 miRNA를 발현하는 재조합 벡터로 형질도입된 살모넬라 BRD509 균주를 피부염이 유발된 쥐에 투여한 경우, Th-2 면역반응의 지표인 IL-4의 발현이 감소하였으며, 도 3에 나타낸 것과 같이 Th-1 면역반응의 지표인 IFN-γ의 발현이 증가함을 관찰하였다. 또한, 도 4에 나타낸 것과 같이 아토피 질환의 지표인 Ig-E 면역반응이 급격히 감소하였다.

[0033] 또한 도 5에 나타낸 것과 같이 대조군인 PBS와 BRD509 균주, miSalCont.Vec(CCL17 유전자에 특이적인 miRNA가 삽입되지 않은 벡터를 형질도입 시킨 살모넬라 균주)를 각각 처리한 군에 비해 miSalCCL17(CCL17 유전자에 특이적인 miRNA를 발현하는 재조합 벡터로 형질도입된 균주)을 투여한 실험군의 경우 가려움증 및 피부염의 증상완화가 눈에 띄게 감소함을 볼 수 있었다.

산업이용 가능성

[0034] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 CCL17 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 박테리아 세포를 제조할 수 있으며, 상기 박테리아 세포를 이용하여 아토피성 피부염의 유발을 억제시킬 수 있다.

[0035] 상기 실시예를 살펴본 바와 같이, CCL17 유전자에 특이적인 siRNA(small interfering RNA)를 발현하는 재조합 벡터로 형질도입된 살모넬라 BRD509 균주를 피부염이 유발된 쥐에 투여한 경우, 아토피 피부염의 활성인자 중 하나인 IL-4의 발현을 억제시키고, 억제인자인 IFN-γ의 발현을 증가시켰으며 동시에 아토피 질환의 지표인 Ig-E의 면역반응을 억제시키는 효과를 확인할 수 있었다. 또한 상기 면역반응의 결과로 아토피성 피부염의 증상인 가려움증 및 피부염의 증상완화 효과가 나타남을 확인하였다. 따라서, 아토피성 피부염에 치료효과를 갖는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 이용한 치료제는 난치성 질환으로 적절한 치료제가 부제한 아토피성 피부질환의 치료 및 예방제로서 의약산업에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 siRNA를 전사하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pcDNA-CCL17miRNA의 개열지도이다.

[0037] 도 2는 아토피 피부염의 활성인자인 IL-4 사이토카인의 억제효과를 나타낸 도면이다.

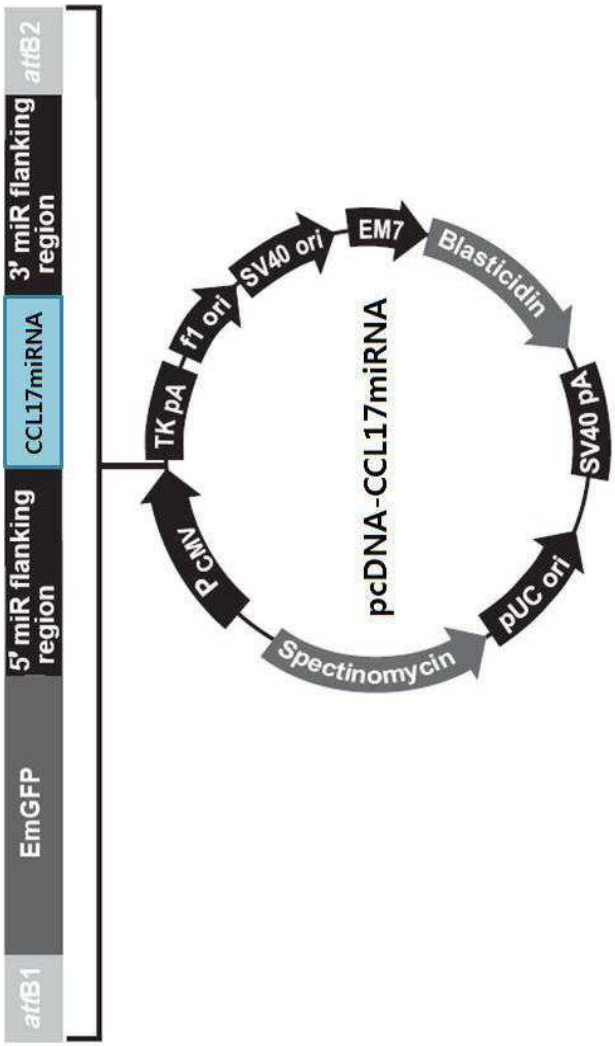
[0038] 도 3은 아토피 피부염의 억제인자인 INF-γ 사이토카인의 발현결과를 나타낸 도면이다.

[0039] 도 4는 아토피 피부염의 유발 항체인 Ig-E의 발현결과를 나타낸 도면이다.

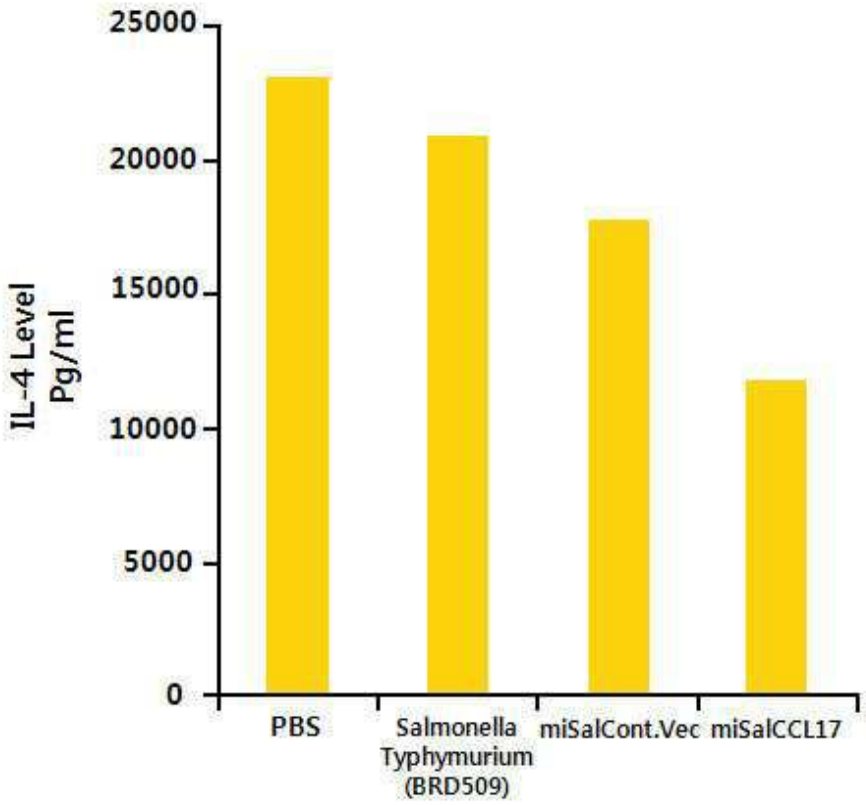
[0040] 도 5는 아토피성 피부염을 유도시킨 마우스에서 피부의 염증 완화를 보여주는 도면이다.

도면

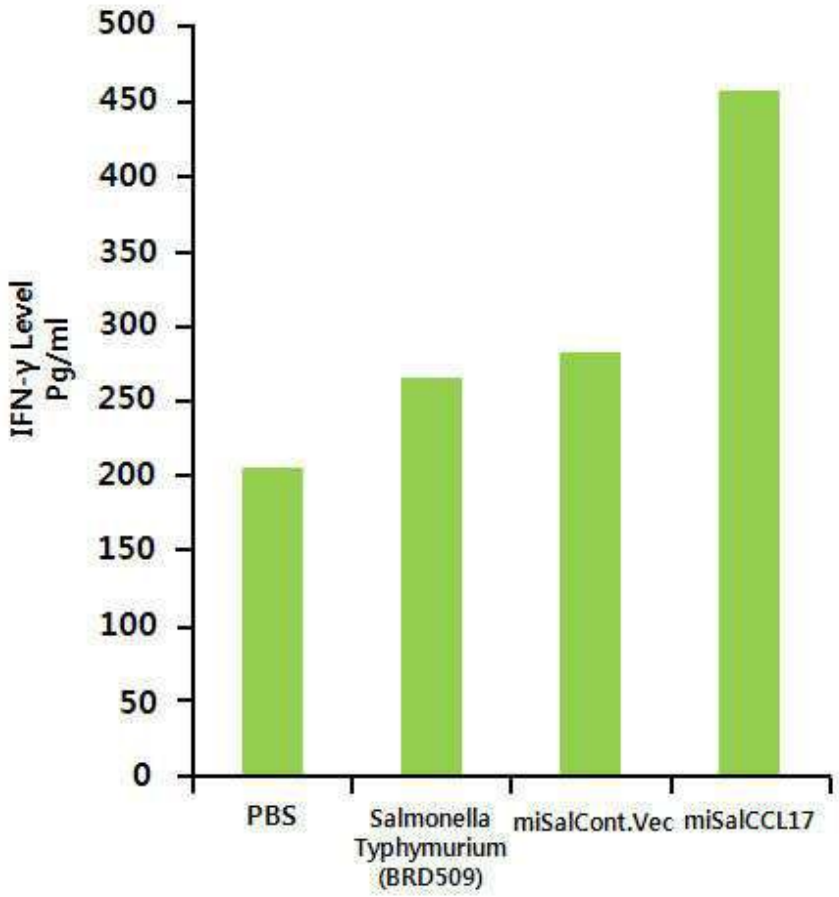
도면1


attB2
3' miR flanking region
CCL17miRNA
5' miR flanking region
EmGFP
attB1
pcDNA-CCL17miRNA
TK pA
f1 ori
SV40 ori
EM7
Blasticidin
SV40 pA
pUC ori
Spectinomycin
P CMV

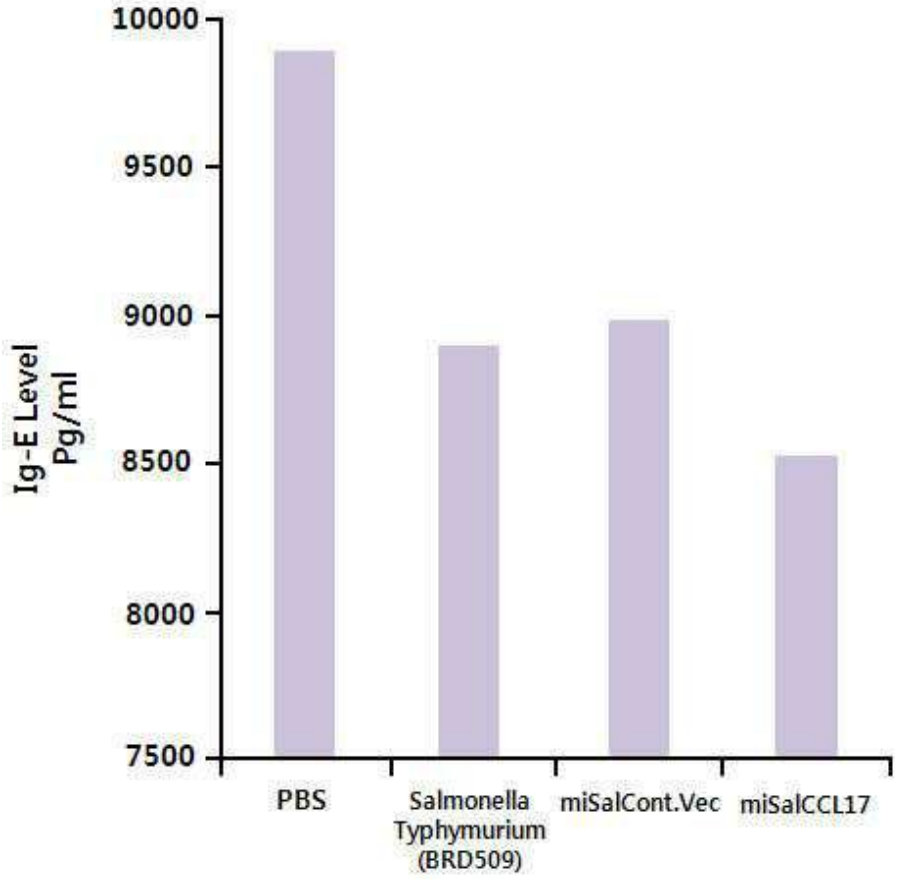
도면2


25000
20000
15000
10000
5000
0
IL-4 Level
Pg/ml
PBS
Salmonella
Typhymurium
(BRD509)
miSalCont.Vec
miSalCCL17

도면3


IFN-γ Level
Pg/ml
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
PBS
Salmonella Typhymurium (BRD509)
miSalCont.Vec
miSalCCL17

도면4


10000
9500
9000
8500
8000
7500
Ig-E Level Pg/ml
PBS
Salmonella Typhymurium (BRD509)
miSalCont.Vec
miSalCCL17

도면5



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
<120> Small interfering RNA having therapeutic effects on atopic dermatitis

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense of CCL17 target sequence

<400> 1
tgctgatccc tggaacactc cactgagttt tggccactga ctgactcagt ggagttccag 60

ggat 64

<210> 2
<211> 64
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> anti-sense of CCL17 target sequence

<400> 2
ccugaucccu ggaacuccac ugagucaguc aguggccaaa acucagugga guguuccagg 60

gauc 64