(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0105063
(43) 공개일자 2011년09월26일

(51) Int. Cl.
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0024096
(22) 출원일자 2010년03월18일
심사청구일자 2010년03월18일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
윤세나
경기도 용인시 수지구 풍덕천2동 신정마을 주공9단지아파트 901-601
최영철
대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 411-301
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이한영

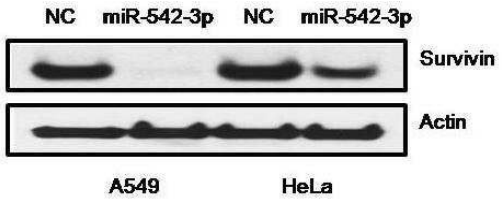
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 이중가닥 마이크로 ＲＮＡ를 유효성분으로 포함하는 항암제

(57) 요 약

본 발명은 서바이빈(survivin)과 사이클로옥시게나제-2(COX-2) 유전자로부터 전사된 mRNA와 결합하여, 이들 유전자의 발현을 억제하고 암세포의 성장을 저해할 수 있는 이중가닥 마이크로 RNA(miRNA) 및 상기 이중가닥 마이크로 RNA(miRNA)를 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제에 관한 것이다. 본 발명의 항암제는 miR-542-3p(서열번호 1)를 단일가닥으로 포함하는 이중가닥 miRNA를 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 항암제는 서바이빈 및 사이클로옥시게나제-2를 암호화하는 유전자의 발현을 동시에 억제하는 miR-542-3p를 유효성분으로 포함하여, 암세포의 성장을 저해하므로, 종래의 miRNA를 유효성분으로 하는 항암제에 비하여 개선된 항암효과를 나타내는 바, 항암치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도3a



(72) 발명자

윤재승

경기도 용인시 수지구 죽전동 1112번지 대지마을 중앙하이츠빌 101-1505

백광희

서울특별시 동대문구 청량리2동 234-2 현대아파트 3-307

특허청구의 범위

청구항 1

miR-542-3p(서열번호 1)와 이에 상보적인 서열번호 2의 염기서열을 가지는 RNA가 결합된 이중가닥 miRNA.

청구항 2

제 1항에 개시된 miR-542-3p(서열번호 1)를 단일가닥으로 포함하는 이중가닥 miRNA를 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제.

청구항 3

제 2항에 있어서,

캅셀제, 액제, 정제, 과립제, 주사제, 겔제 및 경피흡수용 점착제로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1종의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는

항암제

청구항 4

miR-542-3p(서열번호 1)와 이에 상보적인 서열번호 2의 염기서열을 가지는 RNA가 결합된 이중가닥 miRNA를 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이중가닥 마이크로 RNA를 유효성분으로 포함하는 항암제에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 서바이빈(survivin) 및 사이클로옥시게나제-2(COX-2) 유전자로부터 전사된 mRNA와 결합하여, 이들 유전자의 발현을 억제함으로써 암세포의 성장을 저해할 수 있는 이중가닥 마이크로 RNA(miRNA) 및 상기 이중가닥 마이크로 RNA(miRNA)를 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 특정 유전자의 발현을 억제하는 기술은 질병치료를 위한 치료제의 개발과 표적 검증을 위한 중요한 도구가 된다. 종래에는 특정 유전자를 억제하기 위하여 특정 유전자에 대한 전이유전자(transgene)를 도입하는 기술을 사용하였으며, 이 기술은 프로모터를 기준으로 역방향(antisense)으로 전이유전자를 도입하는 방법(참조: Sheehy, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:8805-8808, 1988; Smith, et al., Nature, 334:724-726, 1988)과 프로모터를 기준으로 정방향(sense)으로 전이유전자를 도입하는 방법을 응용함으로써, 그의 적용범위를 확장시키고 있는 실정이다(참조: Napoli, et al., Plant Cell, 2:279-289, 1990; van der Krol, et al., Plant Cell, 2:291-299, 1990; 미국특허 제 5,034,323호; 미국특허 제 5,231,020호; 및, 미국특허 제 5,283,184호).

[0003] 한편, 마이크로 RNA(microRNA, miRNA)는 길이가 19 내지 25개의 뉴클레오티드를 가지는 짧은 단일가닥 리보핵산(RNA)으로, 세포내에서 발현되어 많은 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다(참조: Bartel D.P., Cell, 116(2):281-97, 2004; He L. and Hannon G.J., Nat. Rev. Genet., 5(7):522-31, 2004). 현재까지는 인간에서 약 700여종이 발견되었는데, 하나의 miRNA가 여러 종류의 mRNA를 조절하는 것이 가능하기 때문에, 인간 유전자

중의 약 30%가 miRNA에 의해 조절될 것이라고 예측되고 있다(참조: Bentwich, et al., Nat. Rev. Genet., 37(7):766-70, 2005; Berezikov, et al., Cell, 120(1):21-4, 2005; Lewis, et al., Cell, 120(1):15-20, 2005; Krek, et al., Nat. Genet., 37:495-500, 2005; Friedman, et al., Genome Res., 19:92-105, 2009).

[0004] miRNA는 세포내에서 자연적으로 만들어지며, 대부분 RNA 폴리머라제 II(RNA polymerase II) 에 의해 일차 miRNA(primary miRNA)로 전사된 후, 핵 내에서 RNase III 효소인 드로샤(drosha)와 파샤(pasha, DGCR8) 등에 의해 전구체 miRNA(precursor miRNA)로 절단된다. 이후, 전구체 miRNA는 엑스포틴-5(Exportin 5)에 의해 핵에서 세포질로 이동하고, 세포질내에서 RNase III 효소인 다이서(dicer)에 의하여 짧고 불완전한 이중가닥의 miRNA로 제조된다. 상기 제조된 miRNA는 리스크(RISC, RNA-induced silencing complex) 단백질 복합체와 결합하여 단일가닥으로 분리되며, 분리된 단일가닥의 miRNA는 표적 mRNA의 3'-UTR(untranslated region)의 염기서열에 상보적으로 결합하여 리보솜(ribosome)에 의해 mRNA가 단백질로 번역되는 과정을 억제하거나 또는 표적 mRNA가 분해되도록 하여 유전자의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다(참조: Lee, et al., Nature, 425(6956):415-9, 2003; Gregory, et al., Nature, 432(7014):235-40, 2004; Yi, et al., Genes & Dev., 17:30113016, 2003; Bohnsack, et al., RNA, 10:185191, 2004; Hutvagner, et al., Science, 293:834838, 2001; Ketting, et al., Genes & Dev., 15:26542659, 2001; Pillai et al., Trends Cell Biol., 17:118-126, 2007).

[0005] 최근에는, 많은 종류의 암에서 특정 miRNA 발현이 증가 또는 감소되어 있어, miRNA가 암 발병 기작과 강한 연관성이 있을 것으로 기대되고 있으며, 지속적인 연구에 의하여, 여러 종류의 miRNA가 암 억제인자(tumor suppressor) 또는 발암인자(oncogene)로 작용하고 있음이 보고되었다(참조: Iorio, et al., Cancer Res., 65(16):7065-70, 2005; Yu, et al., DNA Cell Biol., 26(5):283-92, 2007; Soifer, et al., Mol. Ther., 15(12):2070-2079, 2007). 예를 들어, 암 억제인자로서 작용하는 miRNA로는 miR-15, miR-16, let-7 miRNA, miR-34 family 등이 알려져 있는데, 이 중 miR-15 및 miR-16은 Bcl2 발암 유전자의 발현을 조절하고, 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)에서는 그 발현이 감소되고(참조: Cimmino, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 102(39):13944-9, 2005), let-7 miRNA는 발암 유전자인 RAS, HGMA2, myc, CDK6, CDC25 등의 활성을 억제하며(참조: Johnson, et al., Cell, 120(5):635-47, 2005; Lee Y.S., Dutta A., Genes Dev., 21:1025-1030, 2007; Sampson et al., Cancer Res., 67:9762-9770, 2007; Johnson et al., 67:7713-7722, 2007), miR-34 family(miR-34a, miR-34b, miR-34c)는 p53에 의해 발현이 조절되어, E2F3, CDK4, CDK6, CCNE2, BIR3, DCR3, BCL2등의 표적 mRNA의 발현을 조절함으로써, 암 억제인자로서의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(참조: Tarasov et al., Cell Cycle, 6:1586-1593, 2007; He et al., Nature, 447:1130-1134, 2007; Corney et al., Cancer Res., 67:8433-8438, 2007; Chang et al., Mol. Cell, 26:745-752, 2007).

[0006] 이에 반하여, 발암인자로서 작용하는 miRNA로는 miRNA-17-92-1 클러스터(cluster), miR-372와 miR-373, miR-21, miR-155 등이 보고되었다(참조: He et al., Nature, 435:828-833, 2005; O'Donnell et al., Nature, 435:839-843, 2005; Voorhoeve, et al., Cell, 124:1169-1181, 2006; Si et al., Oncogene, 26:2799-2803, 2007; Meng et al., Gastroenterology, 133:647-658, 2007; Costinean et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:7024-7029, 2006).

[0007] 이와 같이 암 질환과 특정 miRNA가 서로 연관되어, 여러 종류의 miRNA가 암 억제인자(tumor suppressor) 또는 발암인자(oncogene)로 작용한다는 것이 밝혀짐에 따라, 이들 miRNA를 이용하여 항암치료를 수행하려는 연구가 활발히 진행된 결과, miRNA를 이용하여 목적 유전자의 발현을 억제할 수 있음이 보고되었다(참조: Cimmino, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 102(39):13944-9, 2005; Takamizawa, et al., Cancer Res., 64(11):3753-6, 2004; Akao, et al., Biol. Pharm. Bull., 29(5):903-6, 2006; Scott, et al., J. Biol. Chem., 282(2):1479-86, 2007; Chan, et al., Cancer Res., 65(14):6029-33, 2005; Si, et al., Oncogene, 26(19):2799-803, 2007; Krutzfeldt, et al., Nature, 438(7068):685-9, 2005; Esquela-Kerscher, et al., Cell Cycle, 7:759-764, 2008; Kumar, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 105:3903-3908, 2008; Elmen, et al., Nature, 452:896-899, 2008). 상술한 항암치료방법으로는, 암 억제인자로 작용하는 miRNA를 miRNA 모방체(mimetic) 또는 miRNA 발현벡터를 암세포에 도입하여 해당 miRNA의 발현을 증가시키거나 또는 발암인자로 작용하는 miRNA의 경우는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide)를 암세포에 도입하여 해당 miRNA 발현을 감소시킴으로써, 암세포의 증식을 직접적으로 억제하는 방법이 알려져 있다.

[0008] 예를 들어, 미국특허공개 제 2006/0189557호에는 let-7 miRNA를 암세포에 도입하여 RAS 발암 유전자의 활성을 억제함으로써 암세포를 치료하는 방법이 개시되어 있고, 국제특허공개공보 WO 06133022호에는 miRNA-17-92-1 cluster의 miRNA들을 억제하여 암세포를 치료하는 방법이 개시되어 있으며, 특허공개 제 2009-0081125호에는 메트(Met) 유전자로부터 전사된 mRNA와 결합하여, 메트 유전자의 발현을 억제하고 암세포 성장을 저해할 수 있는 이중가닥 miRNA 및 그를 유효성분으로 포함하는 항암제가 개시되어 있다.

[0009] 암은 하나 이상의 여러 세포 신호경로에서 이상을 나타내는 매우 이질적인(heterogeneous) 성격을 나타내므로, 상술한 바와 같이 하나의 표적 또는 하나의 경로에만 작용하는 치료제는 항암치료의 효과가 매우 낮기 때문에, 이러한 단점을 극복하기 위하여 각각 다른 표적에 작용하는 여러 억제제를 같이 또는 연속적으로 투여하는 복합치료(combination therapy)가 요구되고 있으나, 상기 복합치료는 환자의 암세포 뿐만 아니라 정상세포까지도 사멸시키거나 또는 손상시키는 부작용이 있어, 유효성분으로서 하나의 표적 또는 하나의 경로에만 작용하는 miRNA를 단독으로 또는 복합적으로 포함하는 치료제는 그의 항암치료 효과를 크게 기대할 수 없는 실정이다. 그러나, miRNA는 세포내에서 자연적으로 존재하기 때문에, 화학적으로 합성된 치료제에 비하여, 부작용이 상대적으로 낮을 것으로 예상되므로, miRNA를 유효성분으로 포함하면서도 복합치료 효과를 가지는 항암제를 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에, 본 발명자들은 miRNA를 유효성분으로 포함하면서도 복합치료 효과를 가지는 항암제를 개발하고자 예의 연구노력한 결과, miRNA의 일종인 miR-542-3p가 항암치료의 표적유전자로 알려진 서바이빈 및 사이클로옥시게나제-2를 암호화하는 유전자를 동시에 조절하여 복합치료 효과를 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 결국, 본 발명의 주된 목적은 miR-542-3p에 이에 상보적인 염기서열을 갖는 RNA가 결합되어, 세포내에서 서바이빈 및 사이클로옥시게나제-2를 암호화하는 각 유전자로부터 전사된 mRNA와 결합하여, 상기 각 mRNA의 해독을 저해하는 활성을 나타내는 이중가닥 miRNA를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 이중가닥 miRNA를 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 이중가닥 miRNA는 miR-542-3p(서열번호 1)와 서열번호 2의 서열을 갖는 RNA가 상보적으로 결합되도록 구성된다.

[0014] 본 발명의 항암제는 상기 miR-542-3p(서열번호 1)를 단일가닥으로 포함하는 이중가닥 miRNA를 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 이때, 상기 이중가닥 miRNA는 특별히 이에 제한되지 않으나, miR-542-3p(서열번호 1)와 서열번호 2의 서열을 갖는 RNA가 상보적으로 결합된 것을 사용함이 바람직하다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 항암제는 서바이빈 및 사이클로옥시게나제-2를 암호화하는 유전자의 발현을 동시에 억제하는 miR-542-3p를 유효성분으로 포함하여, 암세포의 성장을 저해하므로, 종래의 miRNA를 유효성분으로 하는 항암제에 비하여 개선된 항암효과를 나타내는 바, 항암치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1a는 본 발명의 이중가닥 miRNA로 형질전환시킨 인간 폐암세포 A549, 자궁암세포 HeLa 및 유방암세포 MCF7의 세포수의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 1b는 miR-542-3p 모방체 및 NC 모방체를 각각 처리한 폐암세포주의 콜로니수를 나타내는 그래프이다

도 1c는 miR-542-3p 모방체 및 NC 모방체를 각각 처리한 폐암세포주의 콜로니들을 나타내는 사진이다.

도 2a는 miR-542-3p 모방체 및 NC 모방체를 각각 처리한 폐암세포주의 핵의 개수를 유세포분석기로 측정한 결과를 나타낸다.

도 2b는 miR-542-3p 모방체 및 NC 모방체를 처리하고, 이어 노코다졸(nocodazole)로 처리한 폐암세포주의 핵의 개수를 유세포분석기로 측정한 결과를 나타낸다.

도 3a는 본 발명의 이중가닥 miRNA로 형질전환된 세포에서 발현된 서바이빈(survivin)의 단백질 수준을 나타내는 웨스턴블롯 사진이다.

도 3b는 본 발명의 이중가닥 miRNA로 형질전환된 세포에서 발현된 사이클로옥시게나제-2(COX-2)의 단백질 수준을 나타내는 웨스턴블롯 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명자들은 miRNA를 유효성분으로 포함하면서도 복합치료 효과를 가지는 항암제를 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 서바이빈(survivin)을 암호화하는 유전자와 사이클로옥시게나제-2(COX-2)를 암호화하는 유전자에 주목하게 되었다. 상기 서바이빈은 세포성장을 촉진하거나 또는 세포자멸을 억제하는 활성을 갖는 단백질이고, COX-2는 암 발생의 원인이 된다고 알려진 프로스타글란딘(prostagladin)을 생성하는 효소활성을 나타내는 단백질로서, 양자 단백질은 모두 항암치료의 주요 표적으로 알려져 있다.

[0018] 본 발명자들은 서바이빈 및 COX-2 유전자의 발현을 동시에 억제할 수 있는 miRNA를 개발하기 위하여, 다각적으로 연구를 수행한 결과, 하기의 서열번호 1의 염기서열을 갖는 miR-542-3p가 서바이빈 및 COX-2 유전자의 발현을 동시에 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

[0019] miR-542-3p

[0020] 5'-UGUGACAGAUUGAUAACUGAAA-3'(MIMAT0003389, 서열번호 1)

[0021] 상기 miR-542-3p는 단일가닥이지만, 세포내에서는 이중가닥 RNA 형태로 RISC와 결합한 후 단일가닥으로 변환되므로, 실제 도입되는 것은 miRNA의 염기서열(sense) 및 상보적인 안티센스(antisense) 염기서열을 가지는 이중가닥 RNA 구조를 가진다. 또한, 상기 이중가닥 miRNA에는 어느 하나 또는 양쪽 가닥에 3' 오버행(overhang)을 포함할 수 있으며, 이는 이중가닥 miRNA의 3' 끝에 최소 하나, 일반적으로 두 개의 비결합(unpaired) 뉴클레오티드를 갖는 구조를 의미한다.

[0022] miR-542-3p(서열번호 1)에 대응하는 안티센스(antisense) RNA :

[0023] 5'-UCAGUUAUCAAUCUGUCACAUU-3'(서열번호 2)

[0024] 상기 miR-542-3p(서열번호 1)가 서열번호 2의 안티센스 RNA와 결합된 이중가닥 miRNA(miR-542-3p 모방체)를 종양세포에 도입시킬 경우, 세포내에서 서바이빈 및 COX-2의 단백질 양이 저하될 뿐만 아니라, 종양세포의 증식이 억제됨을 확인할 수 있었다. 아울러, 종양세포를 이식한 실험동물에 이중가닥 miRNA들을 피하주사하여 도입시킬 경우, 실험동물의 종양증식이 억제되고, 유발된 종양이 사멸함을 확인하였으므로, 본 발명의 이중가닥 miRNA를 항암제로서 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0025] 한편, 본 발명의 항암제의 유효성분으로 함유되는 상기 miR-542-3p는 약학적으로 허용가능한 결합제(예, 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필셀룰로오스), 붕해제(예, 카복시메틸셀룰로오스칼슘, 전분글리콜나트륨), 희석제(예, 옥수수전분, 유당, 콩기름, 결정셀룰로오스, 만니톨), 활택제(예, 스테아린산 마그네슘, 탈크), 감미제(예, 백당, 과당, 솔비톨, 아스파탐), 안정제(카복시메틸셀룰로오스나트륨, 알파 또는 베타 싸이클로덱스트린, 비타민 C, 구연산, 백납), 보존료(예, 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 안식향산나트륨) 및 향료(예, 에틸바닐린, 마스킹후레바, 멘톨후라보노, 허브향)와 혼합하여 정제, 캅셀제, 연질캅셀제, 액제, 연고제 또는 주사제와 같은 약학적 제제로 제조될 수 있다.

[0026] 바람직하게는, 본 발명의 항암제는 주사용 조성물의 형태로 제조되어 종양이 발생한 부위에 주사하거나, 또는 겔 조성물 또는 경피흡수용 점착 조성물의 형태로 제조되어 종양이 발생한 부위에 직접 바르거나 붙여서 투여할 수 있도록 구현할 수 있다. 이때, 상기 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액의 형태로 조제되어 보조제(예를 들면, 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염, 완충제 및/또는 리포좀 제제)를 함유할 수 있고, 상기 겔 조성물은 카르복시메틸 셀룰로오즈, 메틸 셀룰로오즈, 아크릴산 중합체, 카르보폴(carbopol) 등의 겔 제제와 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 리포좀 제제를 함유할 수 있으며, 상기 경피흡수용 점착제제는 유효성분층이 점착제층, 피지흡수를 위한 흡착층 및 치료약물층을 포함하고, 치료약물층은 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 리포좀 제제를 함유한다.

[0027] 급성독성실험

[0028] 6 내지 7주령 된 비설치류 비글견을 대상으로 본 발명의 miRNA를 주사하여 24시간내의 개체사망율을 조사하였으며, 이때 암컷은 6 내지 8㎏인 개체를, 수컷은 7 내지 9㎏인 개체를 각각 8마리 사용하였다. 그 결과, 0.1g/kg까지 죽은 개체가 발생하지 않아, 본 발명의 miRNA는 kg당 0.1g까지도 급성독성을 관찰할 수 없을만큼 안전하므로, 항암제로서 생체내에 안전하게 투여할 수 있다.

[0029] 유효량

[0030] 본 발명의 항암제의 유효성분인 miRNA의 투여량은 환자의 연령, 성별, 증상, 투여방법 또는 예방목적에 따라, 체중 kg당 각각 1일 1 내지 5mg 을 투여함이 바람직하고, 특이 증상을 나타내는 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 당업자가 투여량을 변화시킬 수도 있다.

[0031] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0032] 실시예 1: 표적 염기서열의 설계 및 이중가닥 RNA의 제조

[0033] 맨체스터 대학(University of Manchester)에서 구축하고 있는 miRNA 서열 데이터베이스인 miRBase(http://www.mirbase.org)에 등록되어 있는 miRNA 서열인 has-miR-542-3p(MIMAT0003389) miRNA 서열로부터 miRNA 염기서열이 세포내에서 생성되도록 이중가닥 RNA를 제조하였다.

[0034] 즉, β-시아노에틸 포스포라미다이트(β-cyanoethyl phosphoramidite)를 이용하여 DNA 구조의 골격을 이루는 포스포디에스터 결합을 연결하는 방법으로, 표적 염기서열과 결합할 수 있도록 설계된 이중가닥 RNA를 합성하였다(참조: Sinha, et al., Nucleic Acids Research, 12:4539-4557, 1984). RNA 합성기(Perseptive Biosystems 8909, PE Biosystems, USA)를 사용하여, 뉴클레오티드가 부착된 고형지지체 상에서, 차단제거(deblocking), 결합(coupling), 산화(oxidation) 및 캡핑(capping)으로 이루어지는 일련의 과정을 반복하여 원하는 길이의 RNA를

포함하는 반응물을 수득하였다. 상기 반응물을 Daisogel C18(Daiso, Japan)을 사용하는 HPLC LC918(Japan Analytical Industry, Japan)로 RNA를 분리하고, MALDI-TOF 질량 흡광분석기(Shimadzu, Japan)로 분리된 RNA가 합성하고자 하는 염기서열과 일치하는지의 여부를 확인하였다. 이어, 센스와 안티센스 RNA가닥을 결합시켜, 목적하는 이중가닥 miRNA(miR-542-3p 모방체; 서열번호 1 및 2)를 제조하였다.

[0035] 실시예 2: 종양세포 배양 및 miR-542-3p 모방체를 이용한 형질전환

[0036] 미합중국 종균협회(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 입수한 인간 폐암세포(A549), 자궁암 세포(HeLa), 및 유방암 세포(MCF7)를 10%(v/v) 우태아 혈청, 100units/ml 페니실린 및 100㎍/ml 스트렙토마이신을 포함하는 RPMI 배양배지(GIBCO/Invitrogen, USA)에서 6-웰 플레이트의 각 웰당 1.5 X 10^5개의 세포를 분주하여, 37℃, 5%(v/v) CO_2의 조건하에서 24시간 동안 배양하고, Opti-MEM 배지(GIBCO/Invitrogen, USA) 2ml로 한 번 세척한 후, 웰 당 Opti-MEM 배지 500㎕씩 분주하였다.

[0037] 상기 세포주를 형질전환시키기 위한 형질전환용 용액은, 실시예 1에서 제조한 이중가닥 miRNA를 최종농도 20nM(20 pmol/ml)이 되도록 250㎕ Opti-MEM 배지와 혼합하고, 3.5㎕ lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen, USA)와 250㎕ Opti-MEM 배지를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 용액을 가한 후, 실온에서 20분간 반응시켜 제조하였다. 이어, 배양된 종양세포주에 형질전환용 용액을 각각 500㎕씩 분주하여 5시간 동안 배양한 다음, 형질전환용 용액이 포함된 배지를 제거하였다. 이후, 각 종양세포주에 RPMI 배양배지 2.0㎖을 각 웰에 분주한 다음, 48시간 내지 72시간 동안 37℃, 5%(v/v) CO_2의 조건하에 배양하여 형질전환 세포를 수득하였다. 크기가 다른 웰의 플레이트를 사용할 경우, 웰의 면적에 비례하여 세포수 및 용액의 양을 조절하여 형질전환을 수행하였다.

[0038] 실시예 3: miR-542-3p 모방체에 의한 세포증식 억제효과

[0039] 암세포주들에서 miR-542-3p 모방체에 의한 세포증식 억제효과를 검증하기 위하여, 실시예 2의 방법으로 형질전환된 폐암세포 A549, 자궁암세포 HeLa, 유방암세포 MCF7를 3일동안 배양 후 CCK-8(Dojindo Laboratories, Japan) 시약을 배지의 1/10 넣어 주고 37℃ 배양기에서 1시간동안 반응시켰다. 그런 다음, 450nm에서 흡광도를 측정하여, 각 암세포주 세포수의 변화를 비교하였다(참조: 도 1a). 이때, 대조군으로는 NC 모방체(negative control 모방체)로 형질전환된 암세포를 사용하였다.

[0040] NC 모방체:

[0041] 센스 RNA 가닥 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'(서열번호 3),

[0042] 안티센스 RNA 가닥 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'(서열번호 4)

[0043] 도 1a는 본 발명의 이중가닥 miRNA로 형질전환시킨 인간 폐암세포 A549, 자궁암세포 HeLa 및 유방암세포 MCF7의 세포수의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 1a에서 보듯이, miR-542-3p 모방체(서열번호 1 및 2)를 처리한 실험군의 경우(흰막대), NC 모방체(대조군)를 처리한 세포(검은막대)에 비하여 세포수가 현저히 적어 여러 종류의 암세포 증식이 miR-542-3p 모방체 처리에 의해 효과적으로 억제됨을 알 수 있었다.

[0044] 실시예 4: miR-542-3p 모방체에 의한 콜로니 형성능 억제효과

[0045] miR-542-3p 모방체에 의한 콜로니(colony) 형성능 억제효과를 검증하기 위하여, 실시예 2의 방법으로 형질전환된 폐암세포 A549를 24시간동안 배양 후 200개의 세포를 6-웰 플레이트에 분주하여, 37℃, 5%(v/v) CO_2의 조건

하에서 10일 동안 배양하고, 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색한 후 콜로니들의 수를 계수하고, 이를 서로 비교하였다(참조: 도 1b 및 도 1c). 이때, 대조군으로는 NC 모방체(negative control 모방체)로 형질전환된 암세포를 사용하였다. 도 1b는 miR-542-3p 모방체 및 NC 모방체를 각각 처리한 폐암세포주의 콜로니수를 나타내는 그래프이고, 도 1c는 miR-542-3p 모방체 및 NC 모방체를 각각 처리한 폐암세포주의 콜로니들을 나타내는 사진이다. 도 1b 및 1c에서 보듯이, miR-542-3p 모방체(서열번호 1 및 2)를 처리한 실험군의 경우, 대조군(NC 모방체)을 처리한 세포에 비하여 콜로니수가 현저히 적어 폐암세포의 콜로니 형성능력이 miR-542-3p 모방체 처리에 의해 효과적으로 억제됨을 알 수 있었다.

[0046] 상기 실시예 3과 4의 결과를 종합하면, 본 발명의 이중가닥 miRNA는 여러 종류의 암, 특히 폐암세포를 사멸시키거나 또는 폐암세포의 증식을 억제하는 효과를 나타내므로, 항암제로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0047] 실시예 5: miR-542-3p 모방체에 의한 세포주기 억제효과 분석

[0048] 실시예 2의 방법으로 형질전환된 A549 세포를 대상으로 하여, 세포주기에 대한 miR-542-3p 모방체의 효과를 유세포 분석기(FACS Vantage SE, Becton Dickinson)로 분석하였다. 형질전환시키고 72시간이 경과하면, 세포를 트립신 처리하여 단세포로 분리해 낸 후, PBS로 2회 세척하고, 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide)로 염색하여 유세포 분석기로 분석하였다(참조: 도 2a 및 도 2b). 이때, 세포주기의 각 단계에 대한 백분율은 세포주기 분석 소프트웨어(Cell Quest, Becton Dickinson)를 사용하여 측정하였다. 유세포 분석기를 사용하여 세포내의 핵에 염색된 형광을 측정하여 핵의 개수를 산출하였는데, 핵의 개수가 2N이면 G0/G1 단계, 4N이면 G2/M 단계 및 2N과 4N 사이는 S단계로 분류하였다.

[0049] 도 2a는 miR-542-3p 모방체 및 NC 모방체를 각각 처리한 폐암세포주의 핵의 개수를 유세포분석기로 측정한 결과를 나타내고, 도 2b는 miR-542-3p 모방체 및 NC 모방체를 처리하고, 이어 노코다졸(nocodazole)로 처리한 폐암세포주의 핵의 개수를 유세포분석기로 측정한 결과를 나타낸다.

[0050] 도 2a에서 보듯이, miR-542-3p 모방체를 처리할 경우에 S단계는 감소하는 반면, G2/M단계는 증가함을 알 수 있었고, 상기 결과로부터 miR-542-3p 모방체에 의해 많은 수의 세포가 세포주기 진행과정에서 G2/M단계에서 정지되고 이로 인해 세포성장이 억제됨을 확인할 수 있었다. 또한, miR-542-3p 모방체가 G1단계에서도 억제될 가능성을 조사하기 위하여, 마이크로튜뷸 비안정제(microtubule destabilizer)인 노코다졸을 처리한 결과, 많은 수의 세포들이 G2/M단계에서 정지하였다. 도 2b에서 보듯이, NC를 처리하면 많은 수의 세포들이 G2/M단계에서 정지되었으나, miR-542-3p 모방체를 처리할 경우, 많은 수의 세포들이 G1단계에서 정지됨을 확인할 수 있었다.

[0051] 따라서, 도 2a와 2b의 결과로부터, miR-542-3p 모방체를 처리하면 G1과 G2/M단계, 즉 두 단계에서 세포성장을 정지시켜 더 효율적으로 세포증식을 억제함을 알 수 있었다.

[0052] 실시예 6: 서바이빈(survivin) 및 사이클로옥시게나제-2(COX-2) 단백질에 대한 웨스턴 블럿(Western blot) 분석

[0053] 실시예 2의 방법으로 형질전환된 A549 세포를 대상으로 하여, 서바이빈 및 사이클로옥시게나제-2 단백질에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블럿을 수행하였다. 구체적으로, 형질전시킨 후 48시간이 경과한 A549 세포로부터 단백질 추출키트(PRO-PREP protein extraction reagent, Intron Biotechnology, Korea)를 이용하여, 전체 세포내 단백질을 추출하였다. SDS 샘플 완충용액(Komabiotech, Korea)을 추출된 전체 단백질 30㎍에 넣고 95℃에서 5분간 처리한 후, 4 내지 20% SDS 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(SDS-PAGE)에 적용하였다. 이어, 분리된 단백질들을 전기영동으로 니트로셀룰로오스 막으로 옮긴 다음, 5% 탈지유(skim milk)가 함유된 트리스 완충용액(Tris buffered saline + 0.05% Tween 20)에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 항-서바이빈과 항-사이클로옥시게나제-2 단일클론 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)를 1차 항체로 하고, 호스래디시페록시다제(horseradish peroxidase)가 결합된 항-래빗 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)를 2차 항체로 사용하여 순차적으로 결합시킨 후, ECL 검출키트(Amersham Biosciences, UK)로 발광반응을 유도하여 웨스턴

블롯을 수행하였다(참조: 도 3a 및 도 3b).

[0054] 도 3a는 본 발명의 이중가닥 miRNA로 형질전환된 세포에서 발현된 서바이빈의 단백질 수준을 나타내는 웨스턴블롯 사진이고, 도 3b는 본 발명의 이중가닥 miRNA로 형질전환된 세포에서 발현된 사이클로옥시게나제-2(COX-2)의 단백질 수준을 나타내는 웨스턴블롯 사진이다. 도 3a와 3b의 결과로 부터, miR-542-3p 모방체(서열번호 1 및 2)를 처리한 경우, 서바이빈 및 사이클로옥시게나제-2 단백질의 발현량이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0055] 상기 실시예 5와 6의 결과를 종합하면, 본 발명의 이중가닥 miRNA는 세포증식을 억제할 뿐만 아니라, 항암치료의 주요 표적으로 알려진 서바이빈 및 사이클로옥시게나제-2 단백질의 발현을 감소시킬 수 있으므로, 항암제의 유효성분으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0056] 실시예 7: 항암제의 제제화

[0057] 본 발명의 이중가닥 miRNA를 통상의 부형제, 결합제, 윤활제, 붕해제, 희석제 등과 같은 보조제와 혼합하여 다음과 같은 약학적 제제로 제조하였다.

[0058] 실시예 7-1: 정제의 제조

[0059] 이중가닥 miRNA 10mg, 유당 20mg, 전분 20mg 및 스테아린산 마그네슘 적당량을 통상의 정제 제조방법에 따라서 50mg의 정제로 타정하여, 정제형의 항암제를 제조하였다.

[0060] 실시예 7-2: 캅셀제의 제조

[0061] 이중가닥 miRNA 10mg, 유당 20mg, 전분 19mg, 탈크 1mg 및 스테아린산 마그네슘 적당량을 통상 캅셀제의 제조방법에 따라서 50mg 용량의 캅셀에 충진하여, 캅셀제형의 항암제를 제조하였다.

[0062] 실시예 7-3: 액제의 제조

[0063] 이중가닥 miRNA 100mg, 이성화당 10g, 벌꿀 500mg, 니코틴산아마이드(약전) 20mg, 무수카페인(약전) 30mg 및 안식향산나트륨 70mg을 통상의 액제 제조방법에 따라서 제조하고, 100ml 용량의 갈색병에 충진한 다음, 밀전하여 저온 살균처리함으로써, 액제형의 항암제를 제조하였다.

[0064] 실시예 7-4: 과립제의 제조

[0065] 이중가닥 miRNA 10mg 및 유당25mg을 통상의 압출조립기로 압출시켜서, 과립제형의 항암제를 제조하였다.

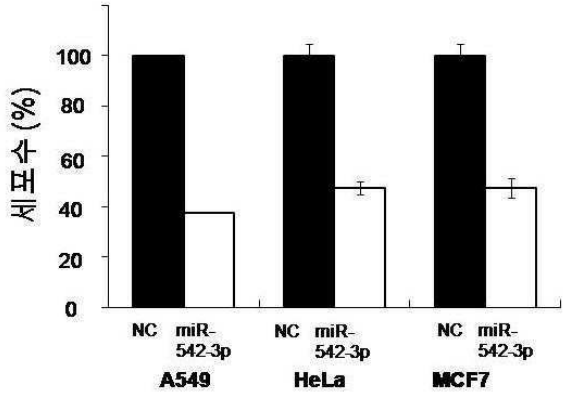
[0066] 실시예 7-5: 주사제의 제조

[0067] 이중가닥 miRNA 6mg 및 멸균정제수 적당량을 통상의 주사제 제조방법에 따라서 제조하고, 2ml의 앰플에 충진시

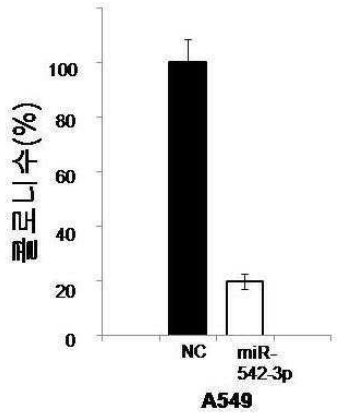
킨 다음, 밀봉 및 멸균하여, 주사제형의 항암제를 제조하였다.

도면

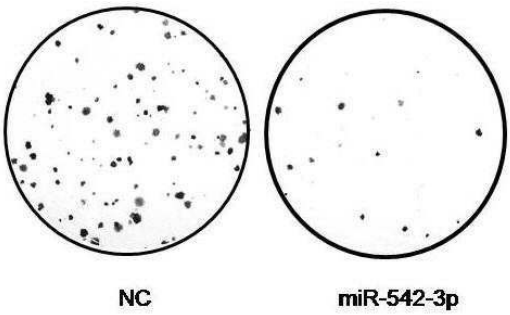
도면1a



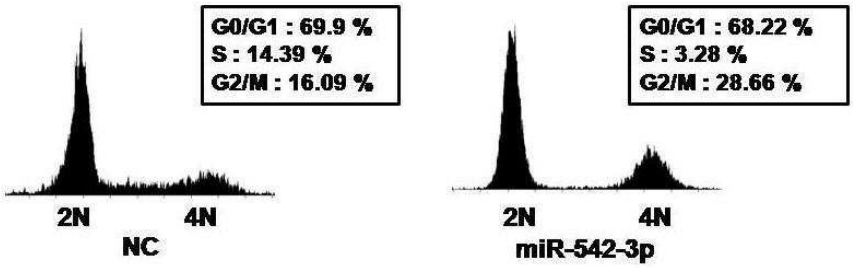
도면1b



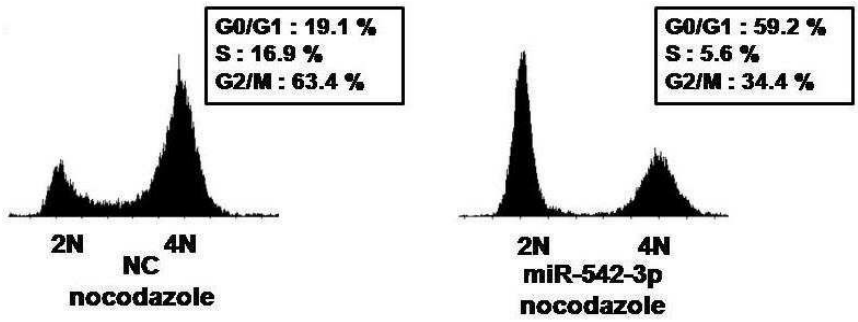
도면1c



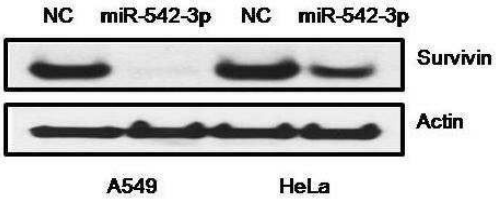
도면2a



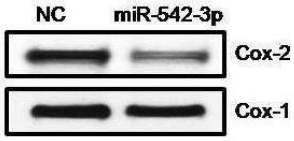
도면2b



도면3a



도면3b



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Pharmaceutical Composition for Treating Cancer Comprising miRNAs for Inhibiting tumour cell proliferation as Active Ingredien

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miRNA

<400> 1

ugugacagau ugauaacuga aa 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miRNA

<400> 2

ucaguuauca aucugucaca uu 22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NC mimetics

<220><223> NC mimetics

<400> 3

uucuccgaac gugucacgut t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NC mimetics

<220><223> NC mimetics

<400> 4

acgugacacg uucggagaat t 21