



등록특허 10-2180550



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월18일

(11) 등록번호 10-2180550

(24) 등록일자 2020년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 31/7105 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0060595

(22) 출원일자 2020년05월20일

심사청구일자 2020년05월20일

(56) 선행기술조사문헌

Indranil B. et al. Cell. Mol. Life Sci.
(2016) 73:811-827

US20160264965 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김은희

대전광역시 유성구 엑스포로 339번길 320 싸이언
스빌 8동 201호

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 정의준

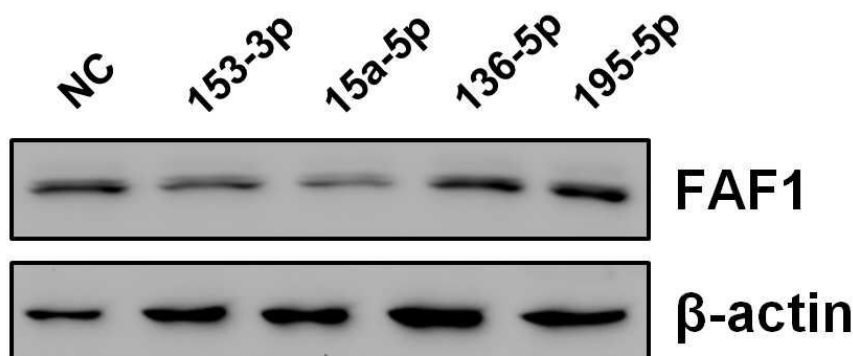
(54) 발명의 명칭 FAF1 단백질의 발현을 억제하는 miRNA를 유효성분으로 함유하는 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 FAF1 단백질의 발현을 억제하는 miRNA를 유효성분으로 함유하는 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, FAF1 단백질을 표적으로 하는 miRNA를 이용하여 FAF1 단백질의 발현을 억제하고, 엑소좀의 생성 및 분비량을 감소시켜, 엑소좀이 신경 퇴행성 질환의 병인 단백질을 인접세포로 옮기는 것을 억제함으로써, 신경 퇴행성 질환의 진행 상태를 완화시킬 수 있어, 신경 퇴행성 질환을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

Hsa-miRNA



(52) CPC특허분류

A61P 25/16 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI16C0947
과제번호	HI16C0947
부처명	보건산업진흥원
과제관리(전문)기관명	보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발사업
연구과제명	치매의 초기 진단 및 약물치료 효과 평가를 위한 신경염증 및 알파-시누클레인 표적
PET 영상기술 개발과 임상적용 연구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2016.04.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

hsa-miR-15a-5p를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병(Parkinson's disease, PD) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 파킨슨병은 흑질(substantia nigra) 및 선조체(corpus striatum)에서 도파민 신경세포(dopaminergic neuron cell)의 사멸로 인한 도파민 결핍으로 유발되는 중추신경계 퇴행성 뇌질환인 것을 특징으로 하는, 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 hsa-miR-15a-5p는 FAF1(Fas-associated factor 1) 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 FAF1 단백질은 엑소좀(exosome)의 분비량을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 엑소좀은 병인 단백질을 수송하는 것을 특징으로 하는, 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 병인 단백질은 알파-시누클레인(α -synuclein)인 것을 특징으로 하는, 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 hsa-miR-15a-5p는 알파-시누클레인의 축적 및 응집을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 FAF1 단백질의 발현을 억제하는 miRNA를 유효성분으로 함유하는 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 신경 퇴행성 질환(neurodegenerative disease)은 신경세포의 기능 감소 또는 소실에 의해 운동조절능력, 인지능력, 지각기능, 감각기능 및 자율신경의 기능 이상 등의 증상이 발생하는 질환을 뜻한다. 현재까지 알려지지 않은 원인으로 뇌와 척수의 특정 뇌세포군이 서서히 그 기능을 잃고 뇌신경계의 정보전달에 가장 중요한 뇌신경세포의 사멸, 뇌신경세포와 뇌신경세포 사이의 정보를 전달하는 시냅스의 형성이나 기능상의 문제, 뇌신경의 전기적 활동성의 이상적 증가나 감소로 인하여 야기되는 것으로 알려져 있다. 뇌와 척수의 신경세포들은 위치에 따라 매우 다양한 기능을 하고 있어 어느 부위의 신경세포들이 먼저 손상되고 기능을 잃어가는가에 따라, 또 이러한 기능장애가 어떤 형태로 진행되는가에 따라 매우 다양한 임상 양상을 보이게 된다.

[0004] 신경 퇴행성 질환은 주로 임상적 특징으로 분류되는데 주요 증상과 침범 부위를 기준으로 구분할 수 있으며, 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병(Parkinson's disease, PD), 헌팅턴병(Huntington's disease, HD), 다발성 경화증(Multiple sclerosis, MS) 및 루게릭병으로 알려진 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 등이 포함된다.

[0005] 신경 퇴행성 질환은 노화에 따른 신경퇴화, 유전적 및 환경적 요인들로 인해 단백질이 응집되어 신경세포가 사멸하여 야기되는 것으로 알려져 있으나, 아직 정확한 원인은 밝혀지지 않아 원인 규명을 위한 기초 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0007] 파킨슨병은 중뇌에 존재하는 흑질(substantia nigra) 및 선조체(corpus striatum)에서 도파민 신경세포의 사멸로 인한 도파민(dopamine) 결핍으로 유발되는 중추신경계 퇴행성 뇌질환으로, 도파민 신경 세포의 선택적인 사멸에 대한 정확한 원인이 현재까지 밝혀지지 않아, 효과적인 치료제 및 진단 시약의 개발이 미흡한 상태이다.

파킨슨병은 무표정한 얼굴, 경직(rigidity), 손떨림(tremor), 굵은 자세 또는 운동완서(bradykinesia)와 같은 운동기능과 관련된 증상을 나타낸다. 한국의 파킨슨병 환자는 2010년 기준 6만 1,565명이었으며 연평균 8.7%의 비율로 증가하여 2014년에는 8만 5,888명이었고, 2014년에는 60세 이상 환자 비율이 95.7%였다. 유병율은 환자의 나이와 상관관계를 보였으며 성비율의 경우 남성이 3만 3,831명이었고 여성은 5만 2,057명을 나타내었다.

[0009] Fas(일명, Fas receptor, CD95, Apo1 또는 TNFRSF6)는 세포사멸 수용체 중 하나로, Fas 및 Fas 리간드(FasL)는 세포 사멸에 중요한 역할을 한다. Fas 리간드 3개가 Fas 분자 3개에 결합하면 FADD(Fas-associated death domain)라 불리는 어댑터(adaptor) 단백질이 Fas의 DD(death domain)에 결합한다. 그 후, FADD의 DED(Death effector domain)에 비활성 caspase-8(일명, FLICE 또는 MACH)의 DED(Death effector domain)와 결합하면, caspase-8이 활성화되고, 결국 세포 사멸을 일으키는 이펙터(effector) caspase를 활성화시켜 세포 사멸이 유도된다(문헌 [Marsters, S. A. et al., Curr. Biol. 8:525-528, [1998] 참조).

[0010] FAF1(Fas-associated factor 1)은 Fas antigen에 결합하여 도파민 신경세포의 사멸(apoptosis)을 유도하는 기능을 하는 것으로 알려진 단백질로 파킨슨병 환자의 전두엽 피질(Frontal cortex)에서 그 발현이 유의하게 증가하는 것으로 알려져 있다. 또한, 파킨슨병 환자에서 나타나는 미토콘드리아 복합체 I 억제, 산화 스트레스 및 alpha-synuclein 발현 증가는 FAF1 발현을 특이적으로 증가시킨다고 보고되고 있다. FAF1의 발현 수준이 증가하면 세포 사멸을 유도하고 산화 스트레스, 미토콘드리아 복합체 I 억제 및 프로테아좀 억제를 포함하는 파킨슨병에 관한 스트레스 요인의 독성 효과를 강화시킨다(문헌 [Keting Chu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(25), pp.11894-11898(1995)] 참조). 이와 같이 FAF1은 파킨슨병의 발병 및 진행에 중요한 역할을 하는 단백질이다.

[0011] FAF1은 파킨슨병 환자에서 과발현되는 FAF1 단백질이 세포 내 엑소좀의 생성 및 분비량을 증가시키고, 이를 통해 병인 단백질을 인접세포로 옮겨 파킨슨병의 진행 상태를 악화시킨다.

[0013] 이에, 본 발명자들은 파킨슨병의 새로운 치료제를 찾던 중, FAF1 단백질을 표적으로 하는 miRNA를 이용하면 FAF1 단백질의 발현을 조절할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 FAF1 단백질의 발현을 억제하는 miRNA를 찾아내고 이를 이용하여 파킨슨병을 예방 또는 치료하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0018] 본 발명은 miRNA-136, miRNA-153 및 miRNA-15a로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 miRNA(microRNA)를 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 miRNA-136, miRNA-153 및 miRNA-15a로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 miRNA(microRNA)를 유효성분으로 함유하는 FAF1(Fas-associated factor 1) 단백질 발현 억제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 FAF1 단백질을 표적으로 하는 miRNA를 이용하여 FAF1 단백질의 발현을 억제하고, 엑소좀의 생성 및 분비량을 감소시켜, 엑소좀이 신경 퇴행성 질환의 병인 단백질을 인접세포로 옮기는 것을 억제함으로써, 신경 퇴행성 질환의 진행 상태를 완화시킬 수 있어, 신경 퇴행성 질환을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에서 본 발명의 miRNA가 FAF1 단백질의 발현을 억제하는지 확인하기 위해 웨스턴 블랏팅(western blotting)을 수행한 도이다.

도 2는 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에서 본 발명의 miRNA가 FAF1 단백질 발현을 억제하는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에서 본 발명의 miRNA가 세포사멸을 억제하는 정도를 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0026] 본 발명은 miRNA-136, miRNA-153 및 miRNA-15a로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 miRNA(microRNA)를 유효성분으로 함유하는, 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 miRNA는 표적 RNA의 분해(degradation)을 촉진시키거나 또는 그들의 번역을 억제시킴으로써 유전자 발현을 전사 후에 조절하는 21 내지 23개의 비코딩 RNA를 말한다. 본 발명에서 사용된 miRNA의 성숙 서열은 miRNA 데이터베이스(<http://www.mirbase.org>)에서 얻을 수 있다. 일반적으로 마이크로 RNA는 pre-miRNA라 불리는 헤어핀 구조를 갖는 약 70-80 nt(nucleotide) 길이의 전구체로 전사된 후, RNaseIII 효소인 Dicer에 의해 잘려 성숙된 형태로 생성된다. 마이크로 RNA는 miRNP라 불리는 리보뉴클레오타이드 복합체를 형성하여 표적 부위에 상보적 결합을 통해 표적 유전자를 절단하거나, 번역을 억제한다. 30% 이상의 인간 miRNA는 클러스터로 존재하며, 하나의 전구체로 전사된 후, 절단과정을 거쳐 최종 성숙 miRNA가 형성된다.
- [0028] 상기 miRNA는 FAF1 단백질의 핵산 유전자를 표적으로 하여 번역을 억제할 수 있고, 바람직하게는 상기 FAF1 단백질은 인간 FAF1 단백질일 수 있다.
- [0030] 신경 퇴행성 질환은 신경계의 한 부분 혹은 여러 부분에서 서서히 끊임없이 진행되는 신경세포(nerve cell)의 사멸로 인한 병들을 통칭하는 것으로, 광의로는 신경세포가 퇴행하는 병태 전부를 포함하며, 신경변성질환이라고도 한다.
- [0031] 본 발명의 일 측면에서, 상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병(Parkinson's disease, PD), 헌팅턴병(Huntington's disease, HD), 다발성 경화증(Multiple sclerosis, MS), 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 전두측두 치매(Frontotemporal dementia, FTD), 루이소체 치매(Dementia with Lewy bodies, DLB), 피질 기저핵 퇴행증(Corticobasal degeneration), 다계통 위축증(Multiple system atrophy, MSA), 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 원발성 측삭 경화증(Primary Lateral Sclerosis, PLS) 및 척수근육위축증(Spinal muscular atrophy, SMA)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 상기 신경 퇴행성 질환은 파킨슨병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 파킨슨병은 흑질(substantia nigra) 및 선조체(corpus striatum)에서 도파민 신경세포(dopaminergic neuron cell)의 사멸로 인한 도파민 결핍으로 유발되는 중추신경계 퇴행성 뇌질환을 의미한다.
- [0034] 본 발명의 일 측면에서, 상기 miRNA-136은 hsa-miR-136-5p일 수 있고, 상기 hsa-miR-136-5p는 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것이 바람직하다.
- [0035] 본 발명의 일 측면에서, 상기 miRNA-153은 hsa-miR-153-3p일 수 있고, 상기 hsa-miR-153-3p는 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것이 바람직하다.
- [0036] 본 발명의 일 측면에서, 상기 miRNA-15a는 hsa-miR-15a-5p일 수 있고, 상기 hsa-miR-15a-5p는 서열번호 3의 염기서열로 구성된 것이 바람직하다.
- [0038] 본 발명의 일 측면에서, 상기 miRNA는 FAF1(Fas-associated factor 1) 단백질의 발현을 억제할 수 있다.
- [0039] 상기 FAF1 단백질은 세포사멸에 관여하는 것으로 알려진 Fas의 세포질 내 도메인과 결합하는 단백질로 DD없이 Fas와 결합하는 대표적인 단백질 중 하나이다. 인간 FAF1 단백질은 Fas 결합 단백질로서 세포질에 위치하고, 핵에서의 기능은 분명히 밝혀진 바는 없지만 자체의 NLS 도메인에 의해 핵에 존재한다는 가능성이 대두되고 있으며, 단백질 키나아제 CK2에 의한 인산화, 글리코실레이션(glycosylation) 등에 의한 FAF1의 변형 가능성이 제시되고 있다. 실제로 FAF1은 유비퀴티네이션(ubiquitination) 경로의 단백질에서 보이는 도메인인 UB 도메인 2개, X 도메인 1개 및 UX 도메인 1개를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이 중 UX 도메인은 유비퀴틴과 관련된 메커니즘에 관여하는 도메인으로 알려져 있다. FAF1은 단백질 키나아제 CK2 완전효소(holoenzyme) 또는 CD2 alpha 서브유닛에 의해서 289와 291번째 아미노산이 인산화된다.
- [0041] 본 발명의 일 측면에서, 상기 FAF1 단백질은 엑소좀(exosome)의 분비량을 증가시킬 수 있다.
- [0042] 엑소좀은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭이다. 엑소좀의 직경은 대략 30-100nm인 것으

로 보고되어 있다. 엑소좀은 전자현미경을 통한 연구에서 원형질막으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하며 세포 밖으로 방출, 분비되는 것이 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 소낭들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라고 부른다.

- [0044] 본 발명의 일 측면에서, 상기 엑소좀은 신경 퇴행성 질환의 병인 단백질을 수송할 수 있다.
- [0045] 바람직하게는, 상기 병인 단백질은 알파-시누클레인(α -synuclein)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 알파-시누클레인은 파킨슨병을 포함한 다발성 경화증과 같은 신경 퇴행성 질환의 병인 단백질이며, 알파-시누클레인으로 인해 발생한 신경 퇴행성 뇌질환을 통칭하여 synucleinopathy라 한다. FAF1에 의해 알파-시누클레인의 축적을 야기할 수 있으며, 따라서, FAF1 억제제인 상기 miRNA는 알파-시누클레인의 축적 및 응집을 감소시킬 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은 FAF1 단백질의 발현을 억제하는 miRNA에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 임상 투여시에 비경구로 투여가 가능하며, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 실제 임상 투여 시에 비경구의 여러가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 충량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건고 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육 내 주사를 통할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0051] 본 발명은 miRNA-136, miRNA-153 및 miRNA-15a로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 miRNA(microRNA)를 유효성분으로 함유하는 FAF1(Fas-associated factor 1) 단백질 발현 억제용 조성물을 제공한다.
- [0052] 상기 miRNA는 FAF1 단백질의 핵산 유전자를 표적으로 하여 번역을 억제할 수 있고, 바람직하게는 상기 FAF1 단백질은 인간 FAF1 단백질일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일 측면에서, 상기 miRNA는 FAF1(Fas-associated factor 1) 단백질의 발현을 억제할 수 있다.
- [0055] 상기 FAF1 단백질은 세포사멸에 관여하는 것으로 알려진 Fas의 세포질 내 도메인과 결합하는 단백질로 DD없이 Fas와 결합하는 대표적인 단백질 중 하나이다. 인간 FAF1 단백질은 Fas 결합 단백질로서 세포질에 위치하고, 핵에서의 기능은 분명히 밝혀진 바는 없지만 자체의 NLS 도메인에 의해 핵에 존재한다는 가능성이 대두되고 있으며, 단백질 키나아제 CK2에 의한 인산화, 글리코실레이션(glycosylation) 등에 의한 FAF1의 변형 가능성이 제시되고 있다. 실제로 FAF1은 유비퀴티네이션(ubiquitination) 경로의 단백질에서 보이는 도메인인 UB 도메인 2개, X 도메인 1개 및 UX 도메인 1개를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이 중 UX 도메인은 유비퀴틴과 관련된 메커니즘에 관여하는 도메인으로 알려져 있다. FAF1은 단백질 키나아제 CK2 완전효소(holoenzyme) 또는 CD2 alpha 서브유닛에 의해서 289와 291번째 아미노산이 인산화된다.
- [0056] 본 발명의 일 실시예에서, miRNA가 FAF1 단백질의 발현을 억제하는지 확인하기 위해, 인간 신경모세포종(neuroblastoma) SH-SY5Y 세포에 FAF1 유전자를 표적으로 하는 Hsa-miRNA 4종(Hsa-miR-136-5p, 153-3p, 15a-5p 및 195-5p)을 형질도입(transfection)하여 FAF1 단백질의 발현이 저하되는지 확인하였다. 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포주는 파킨슨병 연구에서 널리 사용되는 시험관 내 모델로, SK-N-SH 세포주의 하위 계통으로 1970년에 4세 여성의 전이성 신경 모세포종 골수 생검으로 만들었고, 3차례의 클론 선택을 거쳤다. SH-SY5Y 세포주는 암 기원으로 인해 많은 유전적 이상을 보이지만 파킨슨병 발병 기전에서의 대부분 유전자와 경로는 손상되지 않았다. 따라서, SH-SY5Y 세포는 일부 파킨슨병 관련 독소의 영향에 기초한 분자 및 세포 기전을 연구하고, 가족성 파킨슨병 유전자에 대한 기능적 연구를 수행하고, 파킨슨병 치료를 위한 화합물을 시험하는데 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 일 측면에서, 상기 FAF1 단백질은 엑소좀(exosome)의 분비량을 증가시킬 수 있다.
- [0059] 엑소좀은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭이다. 엑소좀의 직경은 대략 30-100nm인 것으

로 보고되어 있다. 엑소좀은 전자현미경을 통한 연구에서 원형질막으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하며 세포 밖으로 방출, 분비되는 것이 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 소낭들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라고 부른다.

[0061] 본 발명의 일 측면에서, 상기 엑소좀은 신경 퇴행성 질환의 병인 단백질을 수송할 수 있다.

[0062] 바람직하게는, 상기 병인 단백질은 알파-시누클레인(α -synuclein)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 알파-시누클레인은 파킨슨병을 포함한 다발성 경화증과 같은 신경 퇴행성 질환의 병인 단백질이며, 알파-시누클레인으로 인해 발생한 신경 퇴행성 뇌질환을 통칭하여 synucleinopathy라 한다. FAF1에 의해 알파-시누클레인의 축적을 야기할 수 있으며, 따라서, FAF1 억제제인 상기 miRNA는 알파-시누클레인의 축적 및 응집을 감소시킬 수 있다.

[0064] 본 발명의 FAF1 단백질의 발현을 억제하는 miRNA를 유효성분으로 함유하는 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하여, FAF1 단백질의 발현을 억제시키고(도 1 및 2 참조), 엑소좀의 생성 및 분비량도 감소시키며, 그로 인해 신경 퇴행성 질환의 병인 단백질이 외부 세포로 수송되는 것을 억제하여 신경 퇴행성 질환의 병증이 진행되는 것을 억제할 수 있으므로(도 3 참조), 상기 조성물은 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

[0066] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0067] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0069] <실시예 1> FAF1을 표적으로 하는 miRNA 선별

[0070] FAF1 유전자의 3' (Untranslated region)에 특이적으로 결합하여 FAF1의 발현을 억제하는 miRNA를 선별하기 위해, [Target scan human] program을 사용하였다.

[0071] 구체적으로, [Target scan human] program을 통해 검색한 결과, FAF1의 3' 서열과 결합이 가능할 것으로 예측되는 miRNA 1768종이 검색되었고, 그 중에 종 간 보존(Conserved sites)이 온전한 30종의 miRNA를 선별하였다(표 1). 본 발명자는 췌장암(pancreatic cancer)환자에서 FAF1의 발현이 감소되어 있다는 사실을 바탕으로, 췌장암 세포주(cell lines)에서 과발현되어 있는 miRNA 중 특정 miRNA에 의해 FAF1의 발현이 감소되어 있을 것으로 예측하였고, 췌장암 세포주인 Mia-Paca-2 및 PANC-1 세포주에서 정상세포에 비해 발현이 증가되어 있는 95종의 miRNA를 조사하였다(표 2). 95종의 miRNA 중 정상 췌장세포에서 자체적으로 높았던 miRNA는 제외하고, 이를 앞서 선별한 FAF1과 결합 가능한 30종의 miRNA와 비교 분석하여, 총 13종의 miRNA(Hsa-miR-136-5p, 153-3p, 16-5p, 195-5p, 15a-5p, 15b-5p, 18a-5p, 26a-5p, 26b-5p, 181c-5p, 181d-5p, 181b-5p 및 181a-5p)를 선별하였고, 13종의 miRNA에서 발현량이 높은 최종 3종의 miRNA(Hsa-miR-136-5p, 153-3p 및 15a-5p)를 선별하였다.

표 1

[0073] FAF1과 결합 가능한 miRNA 30종

번호	miRNA	염기서열
1	hsa-miR-129-1-3p	aagcccuuacccccaaaaguau
2	hsa-miR-129-2-3p	aagcccuuacccccaaaagcau
3	hsa-miR-542-3p	ugugacagauugauaacugaaa
4	hsa-miR-338-3p	uccagcaucaguguuuuuguug
5	hsa-miR-342-3p	ucucacacagaaaucgcacccgu
6	hsa-miR-491-5p	aguggggaacccuuccaugagg
7	hsa-miR-136-5p	acuccauuuuguuuugaugaugga
8	hsa-miR-448	uugcauaguaggaugucccau
9	hsa-miR-153-3p	uugcauagucacaaaagugauc
10	hsa-miR-16-5p	uagcagcacguaaauauuggcg
11	hsa-miR-195-5p	uagcagcacagaaauauuggc
12	hsa-miR-15a-5p	uagcagcacauaaugguuuugug
13	hsa-miR-15b-5p	uagcagcacaucaugguuuaca

14	hsa-miR-6838-5p	aagcagcaguggcaagacuccu
15	hsa-miR-424-5p	cagcagcaauucauguuuugaa
16	hsa-miR-497-5p	cagcagcacacugugguuugu
17	hsa-miR-193a-3p	aacuggccuacaaagucccagu
18	hsa-miR-193b-3p	aacuggcccucaaagucccgcu
19	hsa-miR-18b-5p	uaaggugcaucuagugcaguuaag
20	hsa-miR-18a-5p	uaaggugcaucuagugcagauag
21	hsa-miR-4735-3p	aaaggugcucaaaauuagacau
22	hsa-miR-26a-5p	uucaaguaauccaggauaggcu
23	hsa-miR-26b-5p	uucaaguaauccaggauaggu
24	hsa-miR-1297	uucaaguaauccaggug
25	hsa-miR-4465	cucaaguagucugaccagggga
26	hsa-miR-181c-5p	aacauucaaccugucggugagu
27	hsa-miR-4262	gacauucagacuaccug
28	hsa-miR-181d-5p	aacauucauuguugucggugggu
29	hsa-miR-181b-5p	aacauucauugcugucggugggu
30	hsa-miR-181a-5p	aacauucaacgcugucggugagu

표 2

[0075]

Mia-Paca-2 및 PANC-1 세포주에서 과발현된 miRNA 95종

번호	miRNA	염기서열
1	let-7-family	ugagguaguagguuguauaguu ugagguaguagguuguauaguu agagguaguagguugcagu ugagguaguagguuguauaguu
2	miR-7	uggaagacuagugauuuuguug
3	miR-92	uauugcacuugucccgccug
4	miR-93	aaagugcuguucgucaggguag
5	miR-9-1	ucuuuggguuaucaugcuguaga
6	miR-101-1	uacaguacugugauaacugaag
7	miR-103	agcagcauuguacagggucauga
8	miR-106a	aaaagugcuuacagugcagguagc
9	miR-106b	uaaagugcugacagucagau
10	miR-107	agcagcauuguacagggucauca
11	miR-10b	uaccguagaaccgaauuugu
12	miR-1-1	uggaauuaaagaaguaugua
13	miR-122a	uggagugugacaaugguguuuugu
14	miR-125a	ucccugagaccuuuaaccugug
15	miR-125b	ucccugagaccuaacuuguga
16	miR-126	cauuuuuacuuuugguacgcg
17	miR-128b	ucacagugaaccggucucuuc
18	miR-132	uaacagucuacagccauggucg
19	miR-133a	uuggucccuucaaccagcugu
20	miR-134	ugugacugguugaccagagg
21	miR-135b	uauggcuuucauuccuauug
22	miR-136	acuccauuuguuuugaugaugga
23	miR-137	uauugcuuaagaauacgcguag
24	miR-140	agugguuuuaccuauugguag
25	miR-141	uaacacugucugguaaagaugg
26	miR-142-3p	uguaguguuuuccuacuuuauugga
27	miR-143	ugagaugaagcacuguagcuca
28	miR-145	guccaguuuucccaggauuccuu
29	miR-146a	ugagaacugaauuccauggguu
30	miR-149	ucuggcuccgugucuucacucc
31	miR-150	ucuccaaccuuuguaccagug

32	miR-151	acuagacugaagcuccuugagg
33	miR-153	uugcauagucacaaaaguga
34	miR-154	uagguuaucguguugccuucg
35	miR-155	uuaaugcuaaucgugauagggg
36	miR-15a	uagcagcacauaauuguuugug
37	miR-15b	uagcagcacaucaugguuuaca
38	miR-16	uagcagcacguaaauauuggcg
39	miR-17-3p	acugcagugaaggcacuugu
40	miR-17-5p	caaagugcuuacagugcagguagu
41	miR-181a	aacauucaacgcugucggugagu
42	miR-181b	aacauucauugcugucgguggg
43	miR-181c	aacauucaaccugucggugagu
44	miR-181d	aacauucauugugucggugggguu
45	miR-183	uauggcacugguagaauucacug
46	miR-185	uggagagaaaaggcaguuc
47	miR-186	caaagaauucuccuuuugggcuu
48	miR-188	caucccuugcaugguaggaggggu
49	miR-18a	uaaggugcaucuagugcagaua
50	miR-190	ugauauguuugauauuuuaggu
51	miR-191	caacggaaucacaaaagcagcu
52	miR-192	cugaccuaugaaugacagcc
53	miR-194	uguaacagcaacuccaugugga
54	miR-195	uagcagcacagaaauauuggc
55	miR-196a	uagguaguuucauguuguugg
56	miR-197	uucaccaccuuccaccaccagc
57	miR-198	gguccagaggggagauagg
58	miR-199a+b	cccaguguucagacuaccuguuc cccaguguuuagacuauccuguuc
59	miR-30b	uguaaacaucacacucagcu
60	miR-19a+b	ugugcaaaucuaugcaaaacuga ugugcaaaucacugcaaaacuga
61	miR-95	uucacacggguuuuuuugagca
62	miR-20a	uaaagugcuuauagugcagguag
63	miR-200a	uaacacugucugguuacgaugu
64	miR-200b	uaauacugccugguuauaugac
65	miR-200c	uaauacugccggguuauaugagg
66	miR-202	agagguauagggaugggaaaa
67	miR-203	gugaaauguuuaggaccacuag
68	miR-204	uucccuuugucauccuaugccu
69	miR-205	uccuucuuuccaccggagucug
70	miR-206	uggaauuaaggauguguggg
71	miR-21	uagcuuauacagacugauguuga
72	miR-210	cugugcgugugacagcggcuga
73	miR-214	acagcaggcacagacaggcag
74	miR-215	augaccuauagaauugacagac
75	miR-372	aaagugcugcgacauuugagcgu
76	miR-373	gaagugcuucgauuuuggggugu
77	miR-218	uugugcuugaucuaaccaugu
78	miR-219	ugauuguccaaacgcaauucu
79	miR-22	aagcugccaguugaagaacugu
80	miR-488	cccagauaauggcacucucuaa
81	miR-221	agcuacauugucugcggguuuc
82	miR-222	agcuacauugcucacugggucuc
83	miR-223	ugucaguuuugucaaaauacccc
84	miR-224	caagucacuagguuuccguuuu
85	miR-23a	aucacauugccagggaauucc
86	miR-24	uggcucaguucagcaggaacag
87	miR-25	cauugcacuugucucggucuga

88	miR-26a	uucaaguaauccaggauaggc
89	miR-26b	uucaaguaauccaggauagguu
90	miR-27a+b	uucacaguggcuaaguuccgc uucacaguggcuaaguucugc
91	miR-30c	uguaaacauccuacacucucagc
92	miR-29a+b+c	uagcaccaucugaaaucgguu uagcaccuuugaaaucaguguu uagcaccuuugaaaucggu
93	miR-30a-3p	cuuucagucggauuuugcagc
94	miR-30a-5p	uguaaacauccucgacuggaag
95	miR-296	agggccccccucaauccugu
96	U6 snRNA	caccacguuuauacgccggug

[0077] <실험예 1> Hsa-miRNA의 FAF1 단백질 발현 억제 효과 확인

[0078] Hsa-miRNA가 FAF1 단백질의 발현을 억제하는지 확인하기 위해, 인간 신경모세포종(neuroblastoma) SH-SY5Y 세포에 FAF1 유전자를 표적으로 하는 Hsa-miRNA 3종(Hsa-miR-136-5p, 153-3p, 15a-5p 및 195-5p)을 형질도입(transfection)하여 FAF1 단백질의 발현이 저하되는지 확인하였다. 상기 Hsa-miRNA 4종은 바이오포니아사를 통해 구입하였다.

[0079] 구체적으로, 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포 3×10^5 개를 6-well 배양 접시에 분주한 후, 항생제와 10% FBS(Fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco/s Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂의 조건으로 24시간 동안 계대 배양하였다. 배양 접시의 배지를 제거한 후, 혈청이 없는 배지 1.7ml로 교체해 주었다. 형질도입에 필요한 6μl의 Lipoplectamine RNAi MAX를 혈청이 없는 150μl DMEM 배지에 넣고 실온에서 5분 동안 반응시켰다. 세포 내에 도입할 100nM의 Hsa-miRNA 3종은 혈청이 없는 150μl DMEM 배지에 넣고 반응이 끝난 Lipoplectamine RNAi MAX 배지와 혼합하여, 상온에서 20분간 반응시켰다. 상기 혼합물을 배양된 SH-SY5Y 세포에 형질도입하고 48시간 동안 배양한 후, 배양 접시 내 세포를 모두 수거하여 Mammalian lysis buffer로 세포 내 단백질들을 추출하였다. 추출된 단백질은 웨스턴 블랏팅(Western blotting)으로 분석하였다.

[0081] 그 결과, 세포에 형질도입한 Hsa-miRNA 3종 모두 Hsa-miR-195-5a 대비 FAF1의 발현을 유의적으로 억제하였고, 그 중에서도 Hsa-miR-15a-5p가 FAF1의 발현을 가장 많이 억제하였음을 확인하였다(도 1 및 2). 이는, FAF1 단백질을 표적으로 하는 본 발명의 Hsa-miRNA가 세포 내에서 FAF1 단백질의 발현을 효과적으로 억제하여 FAF1 단백질의 양을 감소시킬 수 있음을 제시한다.

[0083] <실험예 2> Hsa-miRNA의 신경 퇴행성 질환 진행 상태 완화 효과 확인

[0084] 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에 FAF1 유전자를 타겟하는 Hsa-miRNA 3종 (Hsa-miR 153-3p, 15a-5p 및 136-5p)을 형질도입(transfection)후, H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 세포죽음을 보호하는지 확인하였다.

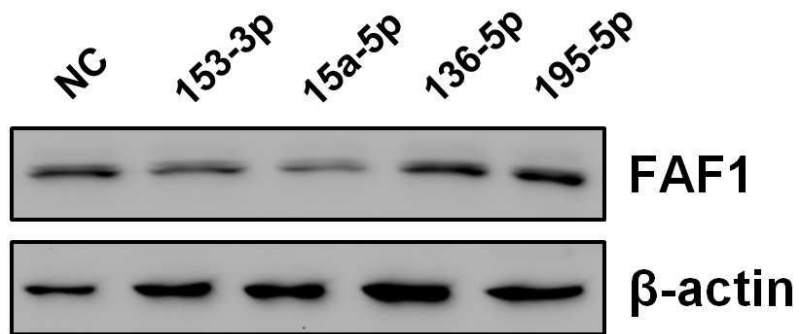
[0085] 구체적으로, 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포 3×10^5 개를 6-well 배양 접시에 분주한 후, 항생제와 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 37℃ 및 5% CO₂ 의 조건으로 24시간 동안 계대 배양 하였다. 배양 접시의 배지를 제거한 후, 혈청이 없는 배지 1.7ml로 교체해 주었다. 형질도입에 필요한 6μl의 Lipoplectamine RNAi MAX를 혈청이 없는 150μl DMEM 배지에 넣고 실온에서 5분 동안 반응시켰다. 세포 내에 도입할 100nM의 Hsa-miRNA 3종은 혈청이 없는 150μl DMEM 배지에 넣고 반응이 끝난 Lipoplectamine RNAi MAX 배지와 혼합하여, 상온에서 20분간 반응시켰다. 상기 혼합물을 배양된 SH-SY5Y 세포에 형질 도입(transfection)하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 산화적 스트레스를 통한 세포죽음을 유도하기 위해 500 μM H₂O₂를 10% 혈청이 포함된 DMEM 배지에 혼합하여 6시간 동안 형질 도입된 세포에 처리하였다.

[0087] 그 결과, 세포에 형질 도입한 Hsa-miRNA 3종 모두 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 FAF1의 발현 억제를 통해 상기 세포를 세포사멸로부터 보호하였으며, 그 가운데 Hsa-miR 15a-5p가 가장 잘 보호할 수 있음을 확인하였다(도 3). 이는, 본 발명의 miRNA가 세포사멸을 억제할 수 있고, 그로써 신경 퇴행성 질환의 진행상태를 완화시킬 수 있음을 제시한다.

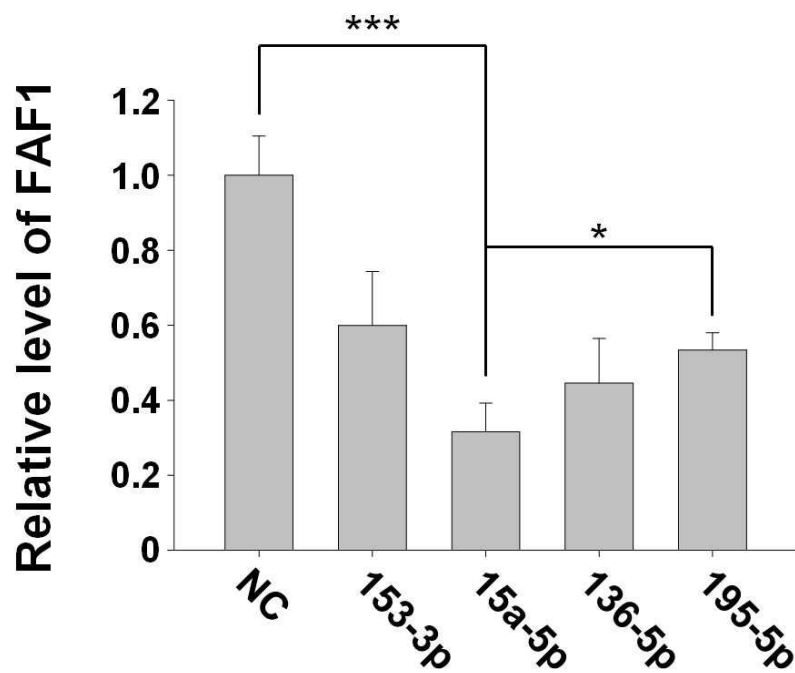
도면

도면1

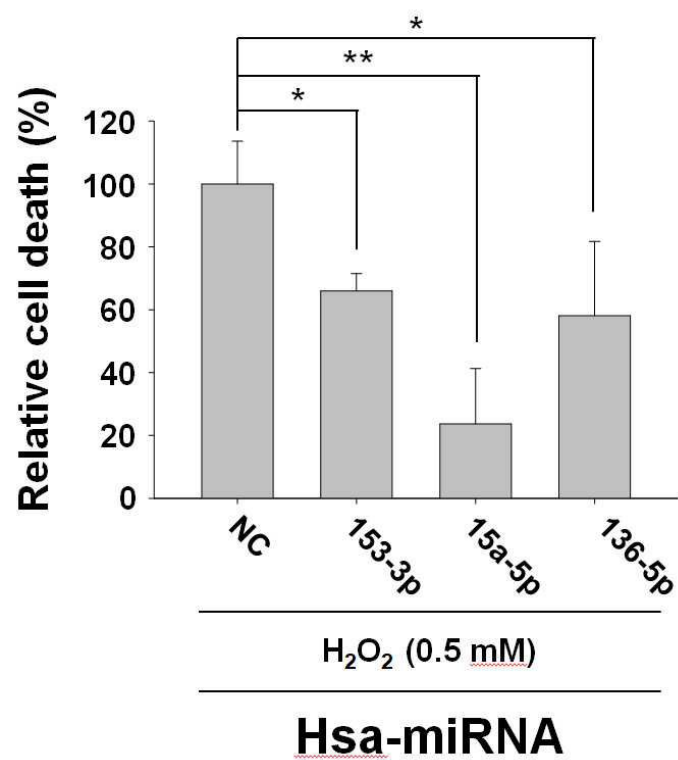
Hsa-miRNA



도면2



도면3



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
<120> Pharmaceutical composition for preventing or treating neurodegenerative disease comprising miRNA that inhibits the expression of FAF1 protein as an active ingredient
<130> 2020P-04-009
<160> 3
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> hsa-miR-136-5p
<400> 1
acuccauuug uuuuugaugau gga

<210> 2
<211> 22
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hsa-miR-153-3p

<400> 2

uugcauaguc acaaaaguga uc

22

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hsa-miR-15a-5p

<400> 3

uagcagcaca uaaugguuug ug

22