



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0096462
(43) 공개일자 2021년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 9/14 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0009956

(22) 출원일자 2020년01월28일

심사청구일자 2020년01월28일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

서울시립대학교 산학협력단

서울특별시 동대문구 서울시립대로 163 (전농동, 서울시립대학교내)

(72) 발명자

이창환

서울특별시 서초구 서초대로64길 83, 101동 702호

이중범

서울특별시 서초구 신반포로 270, 127동 2002호 (반포동, 반포자이아파트)

김혜진

서울특별시 동대문구 망우로18마길 4-3, 105호

(74) 대리인

특허법인태백

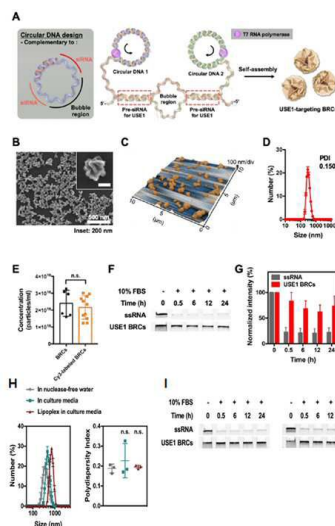
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 USE1 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 USE1 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 RNA 입자는 효율적인 siRNA 방출을 위해 특정 다이스 절단 부위로 구성된 버블링된 RNA-기반 화물(bubbled RNA-based cargoes, BRCs)로서, 이는 USE1을 표적으로 하는 RNAi로 구성되어 종양 성장 억제 효과 있어 암 치료에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)
A61K 9/14 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 15/111 (2013.01)
C12N 15/1137 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2320/32 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2019R1A2C2084181
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	유비퀴틴 결합효소 TRIM28 작용기작 규명을 통한 난치성 폐암 제어 기술 연구
기 여 율	50/100
과제수행기관명	울산대학교 산학협력단
연구기간	2019.09.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2016M3A9C6917402
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	서울시립대학교 산학협력단
연구사업명	바이오의료기술개발사업 (세포재생기술개발사업)
연구과제명	RNA 나노구조체 전달을 통한 신개념 염색체 비삽입형 세포 전환 기술 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	서울시립대학교
연구기간	2016.07.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 RNA 입자는 평균 입경이 100 내지 400 nm인 나노입자인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 RNA 입자는 평균 입경이 150 내지 250 nm인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 RNA 입자는 다이서 효소에 의해 잘려 siRNA를 방출하여 USE1 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 RNA 입자는 다공성의 구의 형태를 가지는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 RNA 입자는 복수 개의 RNA 가닥이 부분적으로 상보적인 염기서열에 의해 서로 결합하고 엉키면서 자가조립(self-assembly)을 통해 형성되는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 암은 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 결장암, 방광암, 혈액암 및 체장암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 암은 자궁경부암 또는 폐암인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 10

제 1 항 내지 제 8 항 중에서 선택된 어느 한 항의 암 예방 또는 치료용 조성물을 포함하는 용액을 세포에 처리하는 단계를 포함하는 종양세포의 억제방법.

청구항 11

2개 이상의 환형의 DNA와 RNA 중합효소가 상보적 롤링 서클 전사(complementary rolling circle transcription, cRCT)를 통해 서열목록 3 또는 서열목록 4의 DNA 염기서열에 대해 상보적인 염기서열의 RNA를 포함하는 RNA 입자를 생성하는 단계를 포함하되,

상기 RNA 중합효소와 환형의 DNA는 마이크로리터 당 80 Unit : 0.5 pmole의 농도 비율로 사용하고, 반응물인 리보뉴클레오티드삼인산(ribonucleotide triphosphate, rNTP)의 농도를 1 mM 내지 2 mM로 조절하여 RNA 나노입자를 제조하는 것을 특징으로 하는, USE1 발현을 억제하는 RNA 입자의 제조방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 RNA 입자는 평균 입경이 100 내지 400 nm인 나노입자인 것을 특징으로 하는, USE1 발현을 억제하는 RNA 입자의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 USE1 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 RNA 입자는 효율적인 siRNA 방출을 위해 특정 다이서 절단 부위로 구성된 버블링된 RNA-기반 화물(bubbled RNA-based cargoes, BRCs)로서, 이는 USE1을 표적으로 하는 RNAi로 구성되어 종양 성장 억제 효과 있어 암 치료에 이용될 수 있다.

배경 기술

[0003] 암(cancer)은 매년 전 세계적으로 1,000만 명의 새로운 환자가 발생하고 있는 주요 질병 중에 하나로, 우리나라의 경우 암으로 인한 사망률은 1위로 전체 사망자의 약 25.5 %를 차지하고 있다. 이러한 경향성은 계속 지속될 것으로 전망되고 있다. 특히, 폐암은 가장 흔한 악성 종양 중 하나이며 전 세계 암 사망률에서 중요한 역할을 한다.

[0004] 암의 치료는 1960년대 수술에 의한 치료를 시작으로 1970년대 방사선 치료 기술을 거쳐 1980년대부터 화학치

료 요법이 중요한 치료법으로 사용되고 있다. 그러나 이러한 치료법들은 현재의 생존율과 삶의 질은 이러한 폐암 질환이 있는 환자에게는 여전히 불충분하다. 따라서, 신규한 치료 표적의 확인은 이들 중앙 치료에 매우 필수적이다.

- [0005] 유비퀴틴-접합 효소 E2Z(ubiquitin-conjugating enzyme, UBE2Z)로도 알려진 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1)은 E2 효소 패밀리의 일구성이다. USE1은 유비퀴틴과 티오에스테르 결합의 형성에 필요한 활성 부위 시스테인 잔기(active site cysteine residue)를 함유하는 E2 촉매 코어 도메인(E2 catalytic core domain)을 포함한다. 흥미롭게도 유비퀴틴 결합을 위해, USE1은 기존의 UBE1 E1 효소보다 UBA6 유비퀴틴 활성화(E1) 효소와 특이적으로 반응한다. 최근 연구에서 폐암 환자의 단백질 수준을 분석한 결과, USE1이 상승한 것으로 나타났다(JNCI-Journal of the National Cancer Institute 109(3)(2017)).
- [0006] USE1 과발현(overexpression)이 세포와 동물 모두에서 증식, 이동 및 침윤을 유의하게 증가시켰으며, 폐암 세포에 USE1 수준의 감소는 이러한 영향을 역전시켰는바, 이는 USE1이 암 치료를 위한 새로운 타겟임을 시사한다.
- [0007] USE1의 치료 효능은 폐암-특이적 화합물 또는 유전자 요법으로 확인되지 않았다. 본 발명자들은 폐암에 대한 특정 유전자 치료에 있어서 RNA 입자가 USE1의 잠재적인 가치를 확인할 수 있는 방법이라고 가정하였다.
- [0008] 한편 RNAi 치료법(RNAi therapy)의 주요 이점은 특이성, 효능 및 다양성에 있다.
- [0009] 구체적으로, RNAi(RNA interference)는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA와 이것과 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA로 구성되는 이중사슬 RNA(dsRNA)를 세포 등에 도입하여 선택적으로 표적유전자의 mRNA의 분해를 유도하고 표적유전자의 발현을 억제할 수 있는 현상이다. 이와 같이 RNAi는 선택적으로 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 종래의 비효율적인 상동 재조합에 의한 유전자 파괴방법을 대신하는 간단한 유전자 녹다운(knock-down) 방법으로서 또는 유전자치료의 방법으로서 상당한 관심을 모으고 있다. 상기 RNAi는 처음에 선충에서 발견되었지만(Nature 391, 806-811, 1998), 현재는 식물, 선행동물, 초파리 및 원생동물 등의 각종 동물에서도 관찰되고 있다(Genes Dev. 15, 485-490 2001). 한편, 포유동물 세포에서는 다른 생물에서 사용되는 긴 이중사슬 RNA 대신 단일사슬의 2 혹은 3 뉴클레오티드를 가지는 3' 돌출(overhang)말단을 갖는 전장 21 혹은 22 뉴클레오티드의 짧은 dsRNA를 포유동물 세포에 도입함으로써 포유동물 세포에서도 RNAi를 유도할 수 있음이 보고되었다(Nature 411, 494-498, 2001).
- [0010] RNAi 기술(RNAi technology)은 유전자 질환, 전염병 및 암 치료에 새로운 치료법으로 적용될 수 있다. RNA 기반 구조의 합성에서 가장 유망한 최근 발전 중 하나는 RCT(rolling circle transcription) 매개 효소 자기 조립(RCT-mediated enzymatic self-assembly)이다. RCT 기반 효소 자기 조립은 RNAi 마이크로 스펀지, siRNA 나노 시트 및 종양-표적화 RNA 나노 벡터와 같은 RNAi 기반 치료를 위한 다양한 RNA 구조에 적용되어 왔다. RNAi는 재료 설계 및 제작 기준에 따라 다이서(Dicer) 절단 효율에 영향을 받는다(Nat Mater 11(4) (2012) 316-22). RNAi 마이크로 스펀지의 다이서 절단 효율은 약 21 %인 것으로 밝혀졌지만 최근에 개발된 siRNA 나노 시트 구조는 다이서-매개 기능성 siRNA 방출을 80 % 이상으로 개선하였다고 보고된 바 있다(Adv Sci (Weinh) 4(8) (2017) 1600523, Nat Mater 11(4) (2012) 316-22, Sci Rep 6(2016) 25146).
- [0011] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 USE1를 표적으로 하는 RNA 간섭을 높이기 위한 버블링된 RNA 기반 화물(bubbled RNA-based cargoes, BRCs)을 제조하고, 이를 항암 효과를 극대화할 수 있는 사이즈로 최적화한 후 이의 항암 효과를 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) (0001) 한국 등록특허 제10-1660017호(2016.09.20. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는데 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 암 예방 또는 치료용 조성물을 포함하는 용액을 세포에 처리하는 단계를 포함하는 종양세포의 억제방법을 제공하는데 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 USE1 발현을 억제하는 RNA 입자의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 암 예방 또는 치료용 조성물을 포함하는 용액을 세포에 처리하는 단계를 포함하는 종양세포의 억제방법을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 2개 이상의 환형의 DNA와 RNA 중합효소가 상보적 롤링 서클 전사(complementary rolling circle transcription, cRCT)를 통해 서열목록 3 또는 서열목록 4의 DNA 염기서열에 대해 상보적인 염기서열의 RNA를 포함하는 RNA 입자를 생성하는 단계를 포함하되, 상기 RNA 중합효소와 환형의 DNA는 마이크로리터 당 80 Unit:0.5 pmole의 농도 비율로 사용하고, 반응물인 리보뉴클레오티드삼인산(ribonucleotide triphosphate, rNTP)의 농도를 1 mM 내지 2 mM로 조절하여 RNA 나노입자를 제조하는 것을 특징으로 하는, USE1 발현을 억제하는 RNA 입자의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따르면, USE1 발현을 억제하는 RNA 입자는 종양 부위 침윤에 유리한 입자 크기를 갖으며, 다이서(Dicer) 효소에 의해 USE1 발현을 억제하는 siRNA로 다량 분리되어 적은 양으로 뛰어난 USE1 유전자 발현 억제 효과를 얻을 수 있는 바, 종양 억제 효과가 우수하여 암 치료제로서 활용할 수 있다. 또한 세포 독성이 적어 향상된 안전성을 제공할 수 있다.

[0022] 본 발명에 따른 RNA 입자(USE1 BRCs)를 이용한 질병 치료법은 적은 양으로 뛰어난 유전자 발현 억제 효과를 얻을 수 있고, 세포 독성이 적어 향상된 안전성을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1 (A) USE1 표적 BRCs(이하, USE1 BRC) 합성 개략도이다. (B) BRCs의 저배율 및 고배율(삽입) SEM 이미지로써 구형 및 다공성 표면을 나타낸다. (C) BRCs의 3D 재구성된 AFM 이미지는 전체 z 차원 크기(z-dimensional sizes)가 200 nm 이하임을 의미한다. (D) 동적 광산란(DLS)을 통해 분석한 결과로서, BRCs의 크기 분포(Size distribution) 및 다분산 지수(polydispersity index)는 단분산성(monodispersity)을 나타낸다. (E) 565 nm 필터의 유무와 상관없이 NTA에 의해 측정된 cy3-표지된 BRCs의 농도를 나타낸 그래프이다(student's t-test; n.s., 유의적이지 않음). (F) 비변성(non-denaturing) PAGE에 의해 분석된 결과로서, 10% FBS 존재 하에 ssRNA 및 BRCs의 안정성을 분석한 결과이다. (G) (F) 결과에 대한 밴드 강도 분석(Band intensity analysis) 결과이다. (H) 뉴클레아제가 없는(nuclease-free) 물 또는 배양 배지에서 BRCs와 배양 배지에서 리포플렉스(lipoplex)에 대한 크기 분포 및 다분산 지수(PDI) 분석 결과이다. (I) 비변성 PAGE에 의해 분석된 10 % FBS의 존재 하에 ssRNA 및 BRCs의 안정성을 반복적으로 확인한 결과이다.

도 2는 USE1 녹다운이 HeLa 세포 및 A549 세포의 증식 및 콜로니 형성 능력을 감소시킴을 확인한 결과이다. (A) 48 시간 동안 2 μ g USE1 BRC로 형질감염시킨 HeLa 세포 및 A549 세포에서의 USE1 단백질 수준을 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과이다. BRCs로 형질 감염시킨 암 세포(2 μ g)와 블랭크 세포를 대조군으로 사용하였다. (B) HeLa 세포 및 A549 세포 증식에 있어서 USE1 침묵 효과를 CCK-8 분석(CCK-8 assay)한 결과이다. 결과는 mean $\pm$ SE (n = 4)이다; *** P < 0.001. (C) HeLa 세포 및 A549 세포의 콜로니 형성 능력에 대한 USE1 침묵 효과를 플레이트 콜로니 분석(plate colony assay)한 결과이다. 블랭크 세포의 상대적 콜로니 형성 효율은 1로 설정하였다. 각 그룹에서 컬럼은 3 중 실험으로부터의 평균값으로 나타냈다. 데이터는 mean $\pm$ SE (n = 4) 이다; * P < 0.001. (D) TC1 세포 및 SKOV3 세포에서 USE 1의 녹다운에 따른 세포 생존력을 확인한 결과로서 USE 1의 녹다운

운에 따른 세포 생존력과 관련이 있음을 확인한 결과이다.

도 3은 여러 세포주에서 USE1 BRC의 효과를 확인한 결과이다.

도 4는 USE1가 HeLa 세포 및 A549 세포의 이동(migration) 및 침습(invasion)을 조절함을 확인한 결과이다. (A, B) 시험관 내(in vitro) 스크래치 상처 치유 분석(in vitro scratch wound healing assay)을 수행하여 HeLa 세포 및 A549 세포의 이동 능력을 평가한 결과이다. 세포 단층(monolayer)에 상처(wounding)낸 후, 0, 24 및 48 시간에 찍은 사진이다. (C, D) HeLa 세포 및 A549 세포의 침습성을 트랜스웰 분석법(Transwell assay)을 수행하여 평가하고, 매트릭셀 코팅된 트랜스웰 챔버(matrigel-precoated Transwell chamber)에서 세포를 배양한 후 48 시간에 후에 이미지를 촬영한 결과이다(original magnification, $\times 200$); *** $P < 0.001$ 은 SC BRC 처리된 암 세포와 비교한 것이다.

도 5는 HeLa 세포 및 A549 세포에서 USE1 억제가 세포사멸사(apoptosis) 및 S 주기의 세포 정지를 유도한다는 것을 확인한 결과이다. (A) 아넥신 V 및 PI 이중 염색을 이용하여 세포사멸사 세포를 확인하였다. 총 2 μg 의 PBS(control), SC BRC, USE1 BRC 각각을 48 시간 동안 세포에 형질감염시켰다. (B) PBS(control), SC BRC, USE1 BRC 각각을 처리하고 48 시간 후에 유세포분석(flow cytometry)으로 세포주기 분포를 확인하였다. (C) 사이클린 D1, 사이클린 E, Bax, cleaved cas-3에 대한 USE1 침묵의 효과를 확인한 것이다. 내부 로딩 대조군으로 β -액틴을 사용하였다.

도 6은 A549 이종 이식편 모델에서 USE1 BRC의 항종양 효능(Antitumor efficacy)을 확인한 결과이다. (A) 마우스 A549 이종 이식편에 PBS, SC BRC, USE1 BRC 각각을 3 주 동안 주당 3 회 정맥 주사하고, 주사 후 17 일에 각 처리군에서의 절단한 종양의 모습을 확인한 결과이다. (B) $L(w)^2 \times 0.5$ 공식을 사용하여 종양 부피를 평가하여 주사 후 17 일에 걸쳐 종양 성장을 측정하였다. 여기서 L은 가장 큰 직경(길이)이고, w는 가장 작은 직경(폭)이다. 데이터는 평균 $\pm$ SE를 나타냈고($n = 5$); ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 은 대조군(control) 및 SC BRC 처리군과 비교한 것이다. (C) 주사 후 마우스 체중의 변화를 확인한 것이다. (D) USE1 침묵은 A549 이종 이식편 종양에서 p53, Bax 및 caspase-3의 활성화와 관련이 있음을 확인한 것이다. (E) PBS, SC BRC 또는 USE1 BRC로 처리된 이종 이식 종양 조직의 조직학적 분석 결과이다. H&E, USE1-특이적 항체(USE1-specific antibody) 및 TUNEL로 염색된 종양 조직을 광학 현미경으로 관찰한 결과이다. 모두 원래 배율이고($\times 100$), Scale bar는 10 μm 이다.

도 7은 마우스에서 USE1 BRC의 생체 외(Ex vivo) 광학 이미지 및 생화학적 독성을 확인한 결과이다. (A) 마우스에서 USE1 BRC 입자의 생체 분포(Biodistribution)를 나타낸 것이다. 이때 마우스에 PBS, SC BRC-Cy3 또는 USE1 BRC-Cy3을 정맥 주사하였다. 주사 30 분 후에, 간, 폐, 심장, 비장 및 신장에서는 IVIS 시스템을 사용하여 BRC의 생체 분포를 확인하였다($n = 3$). (B) USE1 BRC 입자 주입 효과를 확인한 결과이다. H&E 염색, 전체혈구계산(CBC) 및 다양한 생화학적 파라미터를 평가하였고, 데이터는 mean $\pm$ SE ($n = 5$)이다. WBC($10^3/\mu\text{L}$), RBC($10^6/\mu\text{L}$), HGB(g/dL), PLT($10^3/\mu\text{L}$), AST(U/L), ALT(U/L), BUN(mg/dL), TP(g/dL), TBIL(mg/dL) 및 CREA(mg/dL) 단위이다. 모두 원래 배율이고($\times 100$), Scale bar는 10 μm 이다.

도 8은 USE1 BRC 사이즈에 따른 종양 세포 내 섭취 효과를 나타낸 결과이다. (A) A549 폐암 세포 내 섭취에 사용한 USE1 BRC 크기 분포를 동적 광산란(dynamic light scattering)을 이용하여 측정한 결과이다. (B) A549 폐암 세포에 8 시간 동안 평균 입경이 200 nm인 USE1 BRC-cy5(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 350 nm인 USE1 BRC-cy5(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 각각 처리하고 공초점 현미경(Confocal microscopy)으로 측정된 사진이다. (C) A549 폐암 세포에 8 시간 동안 평균 입경이 200 nm인 USE1 BRC-cy5(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 350 nm인 USE1 BRC-cy5(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 후 이미지 세포 분석(Image cytometry analysis)한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

이하에서는 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0025]

본 발명자들은 USE1의 과발현(overexpression)이 세포 증식, 이동 및 침윤을 유의하게 증가시키고 폐암 세포의 USE1 발현 억제제가 폐암 세포의 감소에 영향을 준다는 사실을 바탕으로 USE1을 타겟으로 하는 항암제를 연구하던 중, USE1 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 제조하게 되었고, 이는 다이스 효소에 의해 USE1 발현을 억제하는 siRNA를 다량 분리되어 적은 양으로 뛰어난 USE1 유전자 발현 억제 효과를 얻을 수 있다는 것을 알게 되어 본 발명을 완성하게 되었다. 또한 USE1 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자는 종양 부위 침습

(침윤)에 유리한 입자 크기를 갖고 있어 종양 억제에 더욱 효과적이다.

- [0026] 본 발명에서 ‘RNA 입자’는 특정 분자를 표적으로 하는 RNA 간섭을 높이기 위한 버블링된 RNA 기반 화물(bubbled RNA-based cargoes, BRCs)로서, ‘BRC’ 또는 ‘BRCs’로 표시될 수 있다. 본 발명에서는 USE1을 표적으로 하는 버블링된 RNA 기반 화물을, ‘USE1 BRC’로 표시하였다.
- [0027] 또한, 상기 ‘RNA 입자’는 효율적인 siRNA 방출을 위해 특정 다이서 절단 부위를 포함하는 버블링된 RNA 기반 화물로서(도 1A), 상보적 롤링 서클 전사(complementary rolling circle transcription, cRCT)를 통해 제조된 입자를 의미한다(Adv Sci (Weinh) 4(8) (2017) 1600523). 이는 RNA 간섭 효율 높이기 위한 버블링된 RNA 기반 화물이다.
- [0028] 본 발명은 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효 성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0029] 상기 RNA 입자는 평균 입경이 100 내지 400 nm인 나노입자일 수 있다. 바람직하게는 상기 RNA 나노입자는 평균 입경이 150 내지 250 nm인 것이 종양 부위 침윤에 유리한 입자 크기를 갖고 있어 종양 억제에 더욱 효과적이다(도 8).
- [0030] 상기 RNA 입자는 다이서 효소에 의해 잘려 siRNA를 방출하여 USE1 발현을 억제할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 RNA 입자는 다공성의 구의 형태를 가진다.
- [0032] 또한, 상기 RNA 입자는 복수 개의 RNA 가닥이 부분적으로 상보적인 염기서열에 의해 서로 결합하고 엉키면서 자가조립(self-assembly)을 통해 형성된다.
- [0033] 상기 암은 고형암을 모두 포함될 수 있으나, 바람직하게는 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 결장암, 방광암, 혈액암 및 체장암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나일 수 있고, 더욱 바람직하게는 자궁경부암 또는 폐암일 수 있다.
- [0034] 상기 RNA 입자는 사이클린 D 또는 사이클린 E의 발현을 억제시키고, Bax 및 cleaved Cas-3 발현은 향상시킬 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0038] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.
- [0039] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 1일 1회 내지 수회 투여 시, 0.01 ng/kg ~ 10 g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.
- [0041] 또한, 이러한 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을

및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

- [0043] 또한, 본 발명은 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 발현을 억제하는 siRNA를 포함하는 RNA 입자를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 건강식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적절하게 결정될 수 있다.
- [0045] 상기 건강식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0046] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명은 상기 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 포함하는 용액을 세포에 처리하는 단계를 포함하는 종양세포의 억제방법을 제공한다.
- [0048] 또한, 본 발명은 2개 이상의 환형의 DNA와 RNA 중합효소가 상보적 롤링 서클 전사(complementary rolling circle transcription, cRCT)를 통해 서열목록 3 또는 서열목록 4의 DNA 염기서열에 대해 상보적인 염기서열의 RNA를 포함하는 RNA 입자를 생성하는 단계를 포함하되, 상기 RNA 중합효소와 환형의 DNA는 마이크로리터 당 80 Unit:0.5 pmole의 농도 비율로 사용하고, 반응물인 리보뉴클레오티드삼인산(ribonucleotide triphosphate, rNTP)의 농도를 1 mM 내지 2 mM로 조절하여 RNA 나노입자를 제조하는 것을 특징으로 하는, USE1 발현을 억제하는 RNA 입자의 제조방법을 제공한다.
- [0049] 본 발명은 RNA 중합효소의 농도(양)에 따라 RNA 입자 크기가 나노미터 수준으로 조절될 수 있으며, 본 발명에서는 RNA 나노입자의 평균 입경을 100 내지 400 nm로 조절하여 제조할 수 있다.
- [0050] 도 1에 도시된 바와 같이 환형의 제1의 DNA(Circular DNA 1) 및 환형의 제2의 DNA(Circular DNA 2)를 RNA중합효소(RNA polymerase)를 사용하여 상보적 롤링 서클 전사(Complementary rolling circle transcription, cRCT)시킴으로써, 제2의 RNA와 부분적으로 상보적인 결합이 가능하도록 하는 제2의 RNA결합 위한 염기서열을 포함하는 제1의 RNA와, 상기 제1의 RNA와 부분적으로 상보적인 결합이 가능하도록 하는 제1의 RNA결합 위한 염기서열을 포함하는 제2의 RNA를 생성하며, 상기 제1의 RNA결합 위한 염기서열과 제2의 RNA결합 위한 염기서열이 상보적으로 결합하여 엮기면서 자가조립을 통해 RNA 입자를 형성한다.
- [0051] 구체적으로, 상기 상보적 롤링 서클 전사(Complementary rolling circle transcription, cRCT)라 함은 도 1에 도시된 바와 같이, RNA 중합효소가 2개 이상의 환형의 DNA에서 RNA를 반복적으로 뽑아내며 서로 상보적인 부분이 결합하여 siRNA 구조를 이루는 과정을 의미한다. 상보적 롤링 서클 전사 과정에서는 상대적으로 많은 양의 dsRNA(Double stranded RNA)가 생성되며 상기 dsRNA는 상기 RNA 입자에 포함되게 되어 상기 RNA 입자는 상대적으로 많은 양의 siRNA 전구체를 포함하고, 상기 RNA 입자는 다이스 효소에 의해 절단되어 siRNA가 방출되도록 설계되며, RNA 중합효소의 농도(양)에 따라 RNA입자 크기가 나노미터 수준으로 조절되므로, siRNA의 발생과 세포 내의 침투 효율을 높여 RNA 간섭현상(RNA interference)의 효율을 높일 수 있다.
- [0052] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명은 하나의 환형 DNA를 전사시켜 생성된 하나의 RNA 가닥이 결합하여 siRNA 염기서열을 포함하는 RNA 입자를 형성하는 것에 비하여, RNA 중합효소가 2개 이상의 환형의 DNA에서 RNA를 반복적으로 뽑아내며 서로 상보적인 부분이 결합하여 siRNA 구조를 이루도록 하여 RNA 입자를 생성하므로, 상기 RNA 입자가 상대적으로 많은 양의 siRNA 전구체를 가지는 효과가 있다. 또한, 본 발명은 질병을 일으키는 특정 단백질의 발현을 억제함으로써, 다양한 질병을 치료할 수 있는 효과가 있다. 또한, 생체물질인 RNA로만 이루어져 인체에 대한 안전성을 담보할 수 있는 효과가 있다.
- [0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업

계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

본 발명에서 ‘RNA 입자’는 특정 분자를 표적으로 하는 RNA 간섭을 높이기 위한 버블링된 RNA 기반 화물(bubbled RNA-based cargoes, BRCs)로서, ‘BRC’ 또는 ‘BRCs’로 표시될 수 있다. 본 발명에서는 USE1을 표적으로 하는 버블링된 RNA 기반 화물을 ‘USE1 BRC’로 표시하였고, 표적대상이 없는 비표적 스크램블링된 RNA 기반 화물을 ‘SC BRC’로 표시하였다.

<실험예>

하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

1. BRCs 입자의 제조 및 형질감염

본 연구에서는 USE1을 침묵시키는 BRCs 입자(GenBank accession no. NM_153451, 이하 ‘USE1 BRC’)와 비표적화 BRCs 입자(scrambled BRC, 이하 ‘SC BRC’)를 음성 대조군으로 사용하였다(표 1).

BRC 입자의 제조를 위해 선형 및 프라이머 DNA(Integrated DNA Technologies)를 종래에 보고된 Nature 447(7148)(2007) 1135-8에 개시된 프로토콜에 따라 하이브리드화 하고 원형화하였다.

0.5 μ M의 센스 환형 DNA(sense-circular DNA) 및 안티센스 환형 DNA(antisense-circular DNA)에 1 mM 또는 2 mM 각각의 rNTP(New England BioLabs) 및 T7 RNA polymerase(80 U μ l⁻¹; AM2085; Invitrogen)를 폴리머라제 반응 완충액(40 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM 스퍼미딘(pH 7.9 @ 25°C; M0251S, New England BioLabs)에 혼합하여 섞은 후, 37°C에서 20 시간 동안 RCT 반응을 수행하였다. cy3-표지된 BRC(cy3-labeled BRC)를 합성하기 위해, 50 μ M의 cy3-UTP(ENZ-42506; Enzo Life Sciences)를 반응에 첨가하였다. SYBR Green II-표지된 BRC(SYBR Green II-labeled BRC)를 합성을 위해, SYBR Green II 10,000 X(Invitrogen)를 최종 농도 10X 에서 BRC를 혼합하고 실온에서 10 분 동안 배양하였다.

과량의 미반응 단량체 또는 염료 분자를 제거하기 위해, 최종 반응 용액을 간단히 초음파 처리하고, 추가 분석 전에 BRC 입자를 뉴클레아제-프리 워터로 3회 세척하였다. BRC 형질 감염의 경우, 제조사의 프로토콜에 따라 RNAimax(Invitrogen)를 사용하였다.

표 1

구분	서열(5' → 3')	서열번호
USE1 siRNA targeting region in the mRNA	GGG AAA GUC UGC UUG AGU A	1
Primer for the T7 promoter region	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA T	2
USE1 pre-siRNA sense strand	/5Phos/ ATA GTG AGT CGT ATT AAA GGG AAA GTC TGC TTG AGT ATT GCT GGA TGA AGG ACG GTC GAA CGC AAG GGA AAG TCT GCT TGA GTA TTA TCC CT	3
USE1 pre-siRNA antisense strand	/5Phos/ ATA GTG AGT CGT ATT AAA TAC TCA AGC AGA CTT TCC CTT CTT AGG CTG GAC AAC AAC CAT CTA AAT ACT CAA GCA GAC TTT CCC TTA TCC CT	4
Non-targeting presiRNA sense strand	/5Phos/ ATA GTG AGT CGT ATT AAA GTA TCT CTT CAT AGC CTT ATT GTA TCT CTT CAT AGC CTT AAA GTA TCT CTT CAT AGC CTT ATT ATC CCT	5
Non-targeting presiRNA antisense strand	/5Phos/ ATA GTG AGT CGT ATT AAA TAA GGC TAT GAA GAG ATA CTT GTA TCT CTT CAT AGC CTT AAA TAA GGC TAT GAA GAG ATA CTT ATC CCT	6

2. BRCs 입자의 특징(Characterization)

[0069] FE-SEM(Hitachi)을 사용하여 합성된 BRC 분자의 표면 형태를 관찰하였다. SEM 사진을 측정하기 위해, BRC 입자를 실리콘 웨이퍼에 증착시킨 다음 공기 중에 건조시키고, 백금(Pt)으로 코팅하였다. AFM(Park Systems)을 사용하여 BRC 입자의 고해상도 z-이미지를 얻었다. AFM 이미지에 사용된 BRC 입자를 절단된 운모(mica)에 침착시키고 공기 중에서 건조시켰다. 그런 다음 BRC 샘플을 PPP-NCHR 팁(Park Systems)을 이용하여 비접촉 모드로 스캔하고 AFM 이미지를 XEI 소프트웨어(Park Systems)로 분석하였다. RNAimax 시약과의 착화(complexation) 전후의 BRCs에 대한 크기 분포(size distribution) 및 다분산지수(polydispersity index)를 분석하기 위해, ZetaSizer ZS90(Malvern Panalytical)을 사용하여 동적광산란(Dynamic Light Scattering)을 측정하였다. 565 nm 필터를 갖는 NanoSight NS300(Malvern Panalytical) 기기를 이용하여 나노입자추적분석(Nanoparticle tracking analysis, NTA)을 수행하고, NanoSight software로 데이터를 분석하였다.

[0071] 3. BRCs 입자의 안정성(Stability)

[0072] BRCs 입자의 안정성을 평가하기 위해, 나노입자 및 ssRNA 혼합물을 10 % 소태아 혈청-함유 배지(FBS; Gibco)와 함께 37℃에서 30 분, 6 시간, 12 시간 및 24 시간 동안 배양하였다. 아무것도 처리하지 않은 비처리군 BRC를 포함하는 1X TBE 완충제(Bio-Rad)에 85 V에서 70 분 동안 10 % 비변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 수행하였다. 이어서 겔을 1X TBE에서 1X GelRed (41003, Koma Biotech)로 염색하고 GelDoc EZ Imager(Bio-Rad)로 UV 하에서 분석하였다. 이 실험을 3 회 반복 수행하고, 겔 사진을 도 1F에 나타냈다. GelDoc software를 사용하여 밴드 강도를 분석하였고, 도 1G에 나타낸 바와 같이 플롯팅 하였다.

[0074] 4. 세포주(Cell lines) 및 세포 배양(cell culture)

[0075] 모든 세포를 ATCC로부터 획득하고 10% FBS가 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 성장시키고 37℃에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 유지시켰다.

[0077] 5. 웨스턴 블로팅(Western blotting)

[0078] 웨스턴 블롯 분석을 위해, 프로테아제 억제제(Roche)가 보충된 용해 완충액 (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 % Triton X-100, 1 mM EDTA)을 이용하여 조직 및 세포를 균질화 시켰다. 이어서 용해물을 13,500 g에서 30 분 동안 원심분리하고 상층액을 회수하였다.

[0079] 약 30 µg의 단백질 추출물을 SDS-PAGE로 분석하고 UBA6(Mol Cell 43(3) (2011) 392-405), USE1(Jnci-Journal of the National Cancer Institute 109(3) (2017)), Cyclin D(2978, Cell Signaling Technology), Cyclin E(4129, Cell Signaling Technology), Caspase-3(9662, Cell Signaling Technology), p53(sc-126, Santa Cruz Biotechnology), Bax(sc-7480, Santa Cruz Biotechnology), α-β-actin(sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) 및 α-tubulin(ab7291, Abcam)에 대한 1차 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이어서, 이에 상응하는 IgG horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody(ThermoFisher Scientific)를 처리하고, 증대된 화학 발광(enhanced chemiluminescence, Bio-Rad)을 이용하여 검출하였다.

[0081] 6. 세포사멸사(Apoptosis) 및 세포주기 분석

[0082] Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(Invitrogen)를 사용하여 세포사멸사 분석(Apoptosis assay)을 수행하였다. 간략하게, 4×10^5 세포를 2 µg의 대조군인 SC BRC와 실험군인 USE1 BRC에 각각 48 시간 동안 노출시켰다. 이어서, 세포를 원심분리하여 수집하고 500 µl의 1x 바인딩 버퍼(binding buffer)에 재현탁시킨 후, 아넥신 V-FITC(5 µl) 및 PI(5 µl)를 첨가하였다.

[0083] 암실 속에서 5 분 동안 실온 조건에서 짧게 배양한 후, 유세포분석기(FACSCalibur)를 사용하여 세포를 분석하였다.

[0084] 초기 세포사멸사(annexin V-FITC 염색만) 및 후기 세포사멸사(annexin V-FITC 및 PI 염색)에 대해 양성으로 염색된 세포를 분석을 위해 조합하였다. 프로피듐 요오다이드(PI) 염색하여 DNA 함량 및 세포주기 분포를 분석하였다. 24 시간 동안 상이한 농도의 마그놀롤(magnolol) 용액에 노출시킨 후, 세포를 수거하여 70% 에탄올에 고

정시키고, 원심분리(1500 rpm, 5 분)하고, 37°C에서 30 분 동안 RNase(100 mg/mL)와 함께 배양하고, PI(PBS 중 50 mg/mL)로 염색시켰다. 이어서 세포 DNA 함량 및 세포주기 분포를 유세포분석기(FACSCalibur)를 사용하여 세포를 분석하였다.

7. 세포 증식 분석(Cell proliferation assay)

siRNA 일시적 형질 감염 분석(siRNA transient transfection assays)을 위해, 세포를 5×10^6 cells/dish 밀도로 10 cm 접시에 접종하고 20 nM siCDH17 또는 스크램블링된 siRNA로 형질 감염시켰다. 48 시간 배양한 후, 세포를 분리하고 3000 cells/well 밀도로 96-웰 플레이트로 옮긴 후, 추가로 72 시간 동안 배양하였다. Cell Counting Kit (CCK)-8(Donjindo)을 사용하여 세포 생존력(Cell viability)을 분석하였다.

BRCs 형질 감염을 분석하기 위해, 세포를 4×10^5 cells/dish의 밀도로 6 웰 플레이트에 접종하고 2 μ g의 USE1 BRC 또는 SC BRC로 형질감염시켰다. 배양 48 시간 후, 세포를 분리하고 1000 cells/well의 밀도로 96-웰 플레이트로 옮긴 다음, 다시 0, 24 또는 48 시간 동안 배양하였다. CCK-8 키트를 사용하여 세포 생존력을 다시 분석하였다. 생성된 용액의 흡광도(λ , 450 nm)를 분광광도계로 측정하였다.

8. 스크래치 상처 치유 분석(Scratch wound-healing assay)

스크래치 상처 치유 분석을 위해, 세포를 먼저 6-웰 플레이트에 웰당 5×10^5 로 세포를 접종하고 배양하였다. 이어서, 세포 단층을 멸균 200 μ l 피펫 팁으로 긁어내고 분리된 세포를 제거하기 위해 배지로 세척하였다. 단층 상의 상처 부위의 차이를 측정함으로써 세포 이동을 평가하였다.

9. 침습성 분석(Invasion assay)

침습성 분석을 위해, 24-웰 플레이트에 배치된 1 내지 2 mg의 매트릭젤(BD Biosciences)로 코팅된 트랜스웰 삽입물(transwell insert)의 상부 챔버에서 세포를 웰당 1×10^5 세포를 접종하였다. 이어서 하부 챔버에 10% 소 태아 혈청이 보충된 800 μ l DMEM을 채우고, 36 시간 동안 배양하였다.

10. 콜로니 형성 분석(Colony formation assay)

콜로니 형성을 평가하기 위해, 6-웰 디쉬에서 웰당 1 내지 10^3 개 세포를 접종하고 2 주 동안 FBS가 보충된 DMEM에서 배양하였다. 이어서, 세포를 4 % 파라포름알데히드로 고정시키고 30 분 동안 0.5 % 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다.

11. 동물과 종양 모델

암컷 BALB/c 누드 마우스(5 주령)는 Orient Bio Inc에서 구입하였다. 모든 동물 연구는 울산대학교 의과대학의 윤리위원회와 동물관리위원회(2017-12-281) 지침에 따라 수행되었다. A549 세포(1×10^7)를 마우스의 왼쪽 옆구리에 피하 주사 하였다. 이어서, 종양 부피(V)를 $V = L(w)^2 \times 0.5$ 로 측정하였다. 여기서 L(length)은 종양에서 가장 큰 직경(길이)이고 w(width)는 종양에서 가장 작은 직경(폭)이다.

12. 생체 내 치료 효능(In vivo therapeutic efficacy)

USE1 BRC 입자의 항종양 효과는 A549 세포를 포함하는 폐암 이종 이식편에서 조사되었다. 종양 부피가 약 100 mm³의 크기에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 3 개의 그룹으로 나누었다(그룹당 n = 5).

이어서, 동물을 마취시키고 PBS, SC BRC, USE1 BRC을 각각 정맥 내 투여하였다. 0.1 mL PBS 용액에서 5 μ g로

SC BRC 및 USE1 BRC의 농도를 표준화시켰다. 3 주 동안 일주일에 3 번 BRC를 정맥 주사 놓았다.

[0105] 17 일 동안 종양 성장이 기록되었다. 임의의 항종양 효과를 추가로 분석하기 위해, 종양을 치료 후 17 일에 절제하고 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. 종양 조직에서 USE1 발현을 시각화하기 위해, USE1 특이적 항체를 사용한 면역조직화학(immunohistochemistry)을 수행하였다(최종 희석 1 : 200).

[0106] 슬라이드를 4°C에서 밤새 배양하고, 시판 키트(Vectastain Universal Quick Kits and DAB, vector lab)를 사용하여 면역 염색을 수행하였다. TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 분석은 세포사멸사 세포 사멸 영역(apoptotic cell death areas)을 검출하기 위해 제조사의 지침(Merck)에 따라 TdT-FragEL DNA 단편화 검출 키트를 사용하였다.

[0108] 13. 생물 분포(Biodistribution)

[0109] 마우스를 꼬리 정맥을 통해 15 μ g SC BRC-Cy3, USE1 BRC-Cy3, PBS 100 μ l를 주사하였다. 주사 후 30 분 또는 18 시간 후에(n = 3), 동물을 안락사 시키고 심장, 간, 폐, 신장 및 비장을 포함한 조직을 수확하였다. 각 기관은 IVIS 시스템(Perkin-Elmer)을 사용하여 이미지화 하였다. 대조군 장기(organs)로 정규화(normalization)한 후 동일한 임계값이 설정된 각 조직 유형에 대해 평균 형광 강도(average fluorescence intensity)를 측정하였다.

[0111] 14. BRCs의 독성 측정(Toxicity of the BRCs)

[0112] 생체 내에서 BRC의 독성을 평가하기 위해, 마우스에 꼬리 정맥을 통해 25 μ g SC BRC, USE1 BRC, PBS를 주사하였다. 주사 후 24 시간에(n = 5), 이들 동물을 안락사 시키고 폐, 간, 비장 및 신장을 수확하여 10% 포르말린으로 고정시켰다. 이어서 조직을 파라핀에 내장(embed)하고 표준 프로토콜에 따라 H&E 염색하였다. 각 조직은 수의과의 병리학자에 의해 분석되었다.

[0114] 15. 생화학 분석(Biochemical assays)

[0115] 꼬리 정맥 주사 24 시간 후 마우스 혈액 샘플을 수집한 다음 원심분리 하였다. 얻어진 혈청을 분석할 때까지 -20°C에서 보관하였다. 아스파탐산아미노트랜스페라제(AST), 알라닌아미노트랜스페라제(ALT), 크레아닌(CREA), 혈액유레아질소(BUN), 총 단백질(TP), 총 빌리루빈(TBIL)의 혈청 수준을 Hitachi clinical analyzer 7180(Hitachi)을 사용하여 평가하였다. Advia 2120i automated analyzer(Siemens)를 사용하여 전체혈구수(CBC) 검사하였다.

[0117] <실시예 1> USE1 발현을 억제하는 RNAi의 효율적 방출이 가능한 BRCs의 제조

[0118] RNA 나노 기술의 최근 진보를 이용하여, 본 발명자들은 USE1 발현의 효율적인 다운 레귤레이션을 가능하게하기 위해 상보적인 롤링 서클 전사(cRCT) 반응을 사용하여 BRCs를 제작하였다.

[0119] 종래에 밝혀진 연구에 기초하여, BRCs는 기포 영역에 의해 규칙적으로 이격된 이중 가닥 영역을 가지며, 이는 다이스 효소에 의한 절단을 통해 siRNA의 효율적인 방출을 가능하게 한다(도 1A). 이전의 연구에서 효소 대 주형 DNA 비율을 조작하여 평균 입자 크기를 350 nm 까지 성공적으로 설계했지만(Adv Sci (Weinh) 4(8) (2017) 1600523, Nat Commun 5 (2014) 4367), 본 연구에서는 350 nm 이하로 크기를 더욱 감소시킬 수 있었다. 구체적으로, RNA 중합효소 대 주형 DNA(template DNA)의 농도 비율을 유지하되 반응물인 리보뉴클레오타이드삼인산(ribonucleotide triphosphate, rNTP)의 반응 내 농도를 조절하여 자가조립된 BRCs 입자를 제조하였다.

[0120] 본 발명에서는 RNA 중합효소 대 주형 DNA(template DNA)를 160 : 1 (마이크로리터당 80 Unit:0.5 pmole)의 농도 비율로 사용하고 rNTP의 농도를 1 mM로 하여 평균 입경이 200 nm인 자가조립된 BRCs 입자를 제조할 수 있었다(도 1C).

[0122] <실시예 2> BRCs의 높은 다공성과 최적화된 크기 확인

- [0123] 주사전자현미경(SEM)을 통해 자가조립된 BRCs 구조의 다공성 표면을 확인하였다(도 1B). 다공성 표면은 높은 표면적으로 인해, 표적세포 내로 내재화(internalization)시 siRNA를 보다 효율적으로 방출할 수 있도록 기여한다. 원자 현미경(AFM)을 통해 추가로 200 nm BRCs 입자를 확인하였고(도 1C), 동적광산란(DLS)에 의해 측정된 이들 입자의 다분산지수(PDI; 0.150)는 단분산성(monodispersity)을 나타냈다(도 1D).
- [0124] 본 발명자들은 이들 BRCs 입자 크기가 종양 부위 침윤(infiltration)에 유리한 범위 내에 있음을 주목하였다. 유체 역학적 크기의 증가는 형질감염 시약 도입 시 성공적인 리포플렉스 형성을 하였고, PDI가 0.2로서, BRCs가 균일한 복합체로서 응집없이 안정적으로 존재함을 확인할 수 있었다(도 1H).
- [0125] cRCT에 의해 유도된 나노구조(cRCT-induced nanostructure)가 RNA 가닥으로부터 생성되었음을 확인하기 위해, 형광표지된 뉴클레오티드 트리포스페이트(cyanine 3-labeled UTP; cy3-UTP)를 cRCT 반응에 사용하였다.
- [0126] 이어서, 복제된 RNA 가닥(replicated RNA strands)은 cRCT 반응 동안 T7 RNA 폴리머라제 활성화에 의해 cy3-UTP 뉴클레오티드의 혼입에 의해 cy3로 표지되었다. 이러한 형광 표지로 태그된 나노입자의 나노입자 크기 분포 및 농도를 확인하기 위해 나노입자 추적 분석(nanoparticle tracking analysis, NTA)을 통해 측정하였다.
- [0127] 측정 결과, NTA의 형광 및 비형광 모드로 측정된 cy3 표지된 BRCs(cy3-labeled BRCs)의 농도에서 유의한 차이가 발견되지 않았는 바, 이는 이들 입자가 cRCT 반응 전사체로부터 생성되었음을 의미한다(도 1E).
- [0128] BRCs의 작은 크기와 다공성 구조는 암 세포로의 내재화(internalization)를 더욱 촉진시키고, siRNA를 방출하기 위해 다이스 효소의 접근을 용이하게 하고, 압축적인 구조는 높은 생리학적 안정성을 제공한다. 이러한 안정성은 30 분 내지 24 시간 동안 10 % 소 태아 혈청의 존재 하에서 평가하였다(도 1F 및 도 1I).
- [0129] 이러한 결과는 혈청의 존재 하에 30 분 이내에 분해된 대부분의 ssRNA 혼합물과 달리, BRCs의 50 % 이상이 혈청 처리 24 시간 후에도 이들의 분자량이 유지되었음을 의미한다(도 1G).
- [0131] **<실시에 3> USE1 녹다운에 대한 세포 증식 및 콜로니 형성 감소 확인**
- [0132] 비조절된 세포 증식 및 강화된 콜로니 형성은 암에 있어서 중요한 특징이기 때문에, CCK-8 분석을 통해 A549 세포 및 HeLa 세포 성장에 대한 USE1 침묵이 미치는 영향을 확인하였다.
- [0133] 분석 결과, USE1 BRC가 단백질 수준에서 암 세포주의 성장을 억제하는데 효과적임을 확인할 수 있었다(도 2A 및 도 3). 또한, A549 세포 및 HeLa 세포의 증식 활성은 대조군인 PBS 처리군 및 SC BRC 처리군과 비교하여 USE1 BRC 처리군에서 점진적으로 감소함을 확인할 수 있었다(도 2B 및 도 2D).
- [0134] 다음으로 동일한 처리 조건에서 이들 세포의 콜로니 형성 능력을 평가했을 때, A549 세포 및 HeLa 세포 모두에서, USE1 BRC 처리군이 가장 낮은 콜로니 형성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다(도 2C).
- [0136] **<실시에 4> USE1의 세포 이동 및 침습 조절 확인**
- [0137] 종래의 연구에 따르면 USE1은 폐암의 이동 및 침습성에 유의한 관련성이 있음이 보고된바 있다(JNCI-Journal of the National Cancer Institute 109(3)(2017)).
- [0138] 스크래치 상처 치유 분석(scratch wound healing assay)을 수행하여 A549 세포 및 HeLa 세포에서 USE1의 이동 촉진 능력(migration-promoting ability)을 평가하고, 다시 BRCs 입자를 사용하여 유전자를 침묵시켰다(도 4A 및 도 4B). USE1 BRC 입자로 형질감염시킨 두 세포주 모두에서 시간 의존적으로 현저하게 감소된 세포 이동을 보인 반면, 대조군인 SC BRC 처리군에서는 감소가 보이지 않았다.
- [0139] 마트리젤 침습 분석(matrigel invasion assay) 수행 결과, A549 세포 및 HeLa 세포에서 USE1 BRC 처리군 세포는 대조군과 비교하여 침습성이 손상되었음을 확인할 수 있었다(도 4C).
- [0140] 상기 결과를 종합하면, USE1의 억제가 암 세포의 이동 및 침습성을 방해한다는 것을 알 수 있다.
- [0142] **<실시에 5> USE1 침묵에 의한 세포사멸사 및 S 주기 정지 유도 확인**
- [0143] USE1의 RNAi 침묵에 의해 야기된 HeLa 세포 및 A549 세포의 증식 억제가 세포사멸사(apoptosis) 반응에 의한 것

인지 여부를 확인하기 위해, 본 발명자들은 아넥신 V 및 PI 염색을 사용한 유세포분석법에 의해 이들 세포를 분석하였다. 형질감염 후 48 시간 후에 USE1 BRC 처리군의 세포주에서 세포사멸사 속도(apoptosis rate)(아넥신-V+/PI- 및 아넥신-V+/PI+)는 대조군에 비해 상승한 것으로 확인되었다.

[0144] HeLa 세포 및 A549 세포에 있어서 세포사멸사 백분율은 대조군인 블랭크(blank) 및 SC BRC 처리군 세포와 비교하여 각각 48.8 % 및 37 %로 증가하였음을 확인할 수 있었다(도 5A).

[0145] 아울러, 암 세포 성장을 제어할 수 있는 USE1 침묵의 잠재적인 메커니즘을 조사하기 위해, 본 발명자들은 USE1 BRC 입자로 형질감염 시킨 후 유세포분석을 통해 HeLa 세포 및 A549 세포의 세포주기를 모두 확인하였다.

[0146] 형질감염 48 시간 후, G1 주기 및 S 주기에서 USE1 BRC 처리한 HeLa 세포의 비율은 블랭크(blank) 및 SC BRC 처리한 HeLa 세포와 비교하여 감소하였음을 확인할 수 있었다. sub G1 주기에서 대조군, SC BRC 처리한 HeLa 세포, 및 USE1 BRC 처리한 HeLa 세포의 세포 백분율은 각각 0.3 %, 2.8 % 및 17.3 %이었다(도 4B). S 주기에서 SC BRC로 형질감염된 A549 세포의 백분율은 약 15 내지 29%인 반면, USE1 BRC로 형질감염된 A549 세포는 약 40 %였다. 동시에, sub G1 주기에서 USE1 BRC 처리한 A549 세포수는 두 개의 대조군보다 높았다(도 5B).

[0147] 또한, USE1 억제 시 사이클린 D 및 사이클린 E는 둘 다 하향 조절된 것으로 확인되었고(도 5C), Bax 및 cleaved cas-3의 단백질 수준은 활성화 하는 것을 확인하였다.

[0148] 상기 결과를 종합하면, 이들 결과는 USE1 침묵이 세포주기 정지 및 세포사멸사 유도를 통해 시험관내 암 세포의 증식을 억제함을 시사한다.

[0150] <실시예 6> 종양 이종이식 모델에서의 USE1-BRCs 입자의 항종양 효능 확인

[0151] USE1 BRC 입자의 암 치료 효과를 확인하기 위해, A549 폐 종양 이종 이식편(A549 lung tumor xenografts)을 보유하는 마우스를 사용하여 생체 내(in vivo)에서 추가로 조사하였다. 종양의 부피가 대략 100 mm³에 도달했을 때 PBS 또는 SC BRC, USE1 BRC를 종양에 정맥 내 주사하였다. 총 양 0.025 mg/kg인 BRCs를 동물에 3 주 동안 일주일에 3 회 투여하였다. 투여 후 17 일 동안 종양 성장을 확인하였고, USE1 BRC 처리군은 대조군과 비교하여 종양 크기가 더 작음을 확인할 수 있었다(도 6A). 한편, SC BRC 처리군의 마우스 종양 부피는 PBS 대조군과 유사하였다(도 6B).

[0152] 투여 10 일 후, USE1 BRC 처리군은 2 개의 대조군과 대비하여 약 70 %의 종양 성장 억제 효과를 나타냈다(P < 0.05).

[0153] 이들 실험에서 종양 성장 억제 가능한 메커니즘을 조사하기 위해, 웨스턴 블롯을 통해, 폐 종양에서 USE1, p53, Bax 및 cleaved cas-3의 단백질 발현을 평가하였다(도 6D). 동일한 종양 조직에서 USE1 단백질 농도는 USE1 BRC의 투여에 의해 효과적으로 감소됨을 확인할 수 있었다. 그러나 세포사멸사 세포 사멸(apoptotic cell death)을 위한 신호 전달 단백질로 알려진 p53, Bax 및 cleaved cas-3의 발현 은 현저하게 증가하였음을 확인할 수 있었다. 반면, 비표적화 SC BRC는 동일한 형질감염 조건 하에서 이러한 효과를 나타내지 않았다.

[0154] 아울러, 각 치료의 항종양 활성을 평가하기 위해, 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 및 TUNEL 분석을 사용하여 종양 조직 섹션의 조직학적 검사를 수행하였다(도 6E). 그 결과는 세포 사멸 병변(cell death lesions) 및 세포 사멸성 종양 세포(apoptotic tumor cells)가 USE1 BRC 또는 SC-BRC로 처리된 종양에 국한된 것으로 밝혀졌다. 그러나 USE1 BRC로 처리된 마우스에서의 종양은 대조군인 SC-BRC 처리한 마우스와 비교하여 증가된 세포사멸 및 더 넓은 세포사멸사 영역(apoptotic areas)을 나타냈다. 또한 USE1 BRC 처리군에서 USE1 영역의 감소된 수가 확인되었다(도 6E).

[0156] <실시예 7> USE1-BRCs 입자의 생체 분포 및 독성 확인

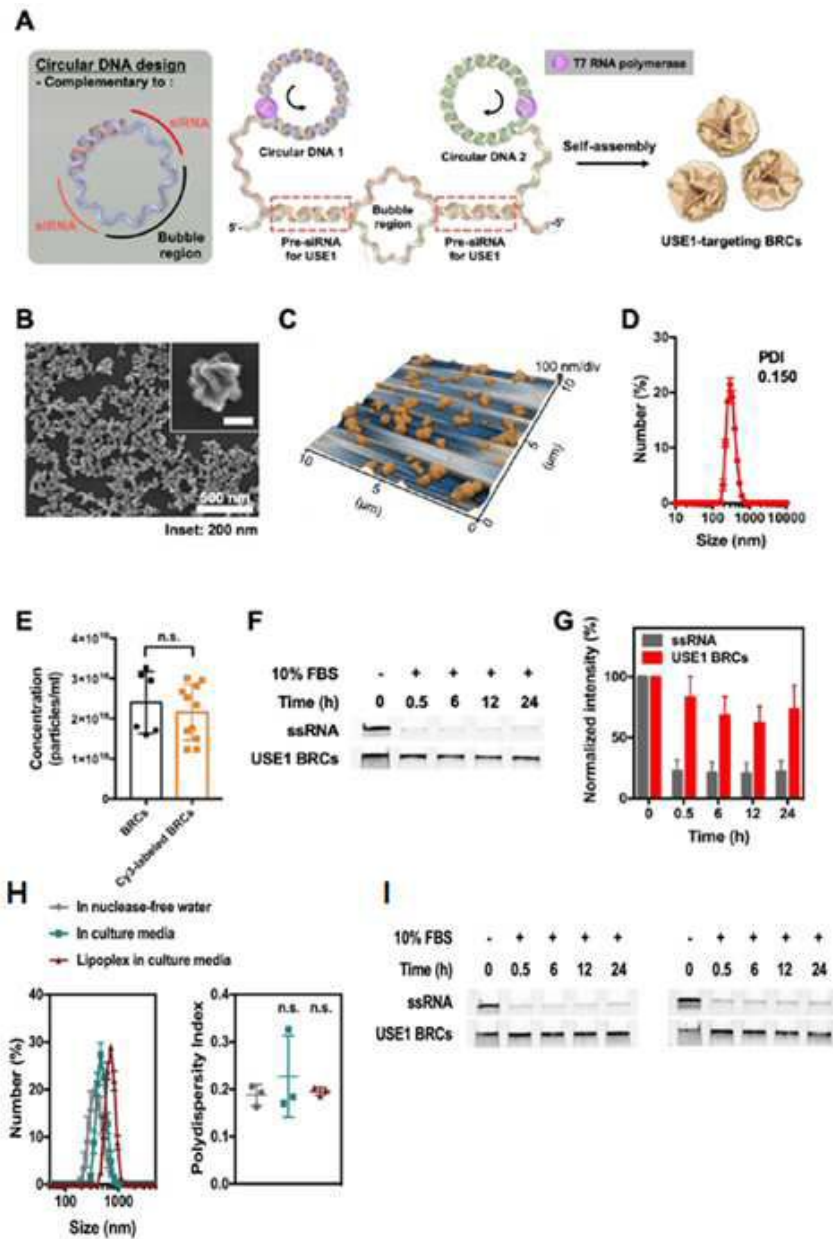
[0157] 마우스에서 USE1 BRC 입자의 생체 분포 및 독성을 조사하기 위해, 마우스의 꼬리 정맥을 통해 USE1 BRC-Cy3, PBS 또는 SC BRC-Cy3을 주사하였다. 투여한 후, 마우스 생체 기관에서의 BRC 입자 축적은 IVIS 시스템을 사용하여 검출하였다.

[0158] 주사 후 30 분에 USE1 BRC 및 SC BRC가 주입된 마우스의 신장에서 BRC 입자가 상당히 축적되었음을 확인할 수 있었다(도 7A). 흥미롭게도 주사 후 18 시간까지 신장에서 USE1 BRC-Cy3 나노입자만이 관찰되었다.

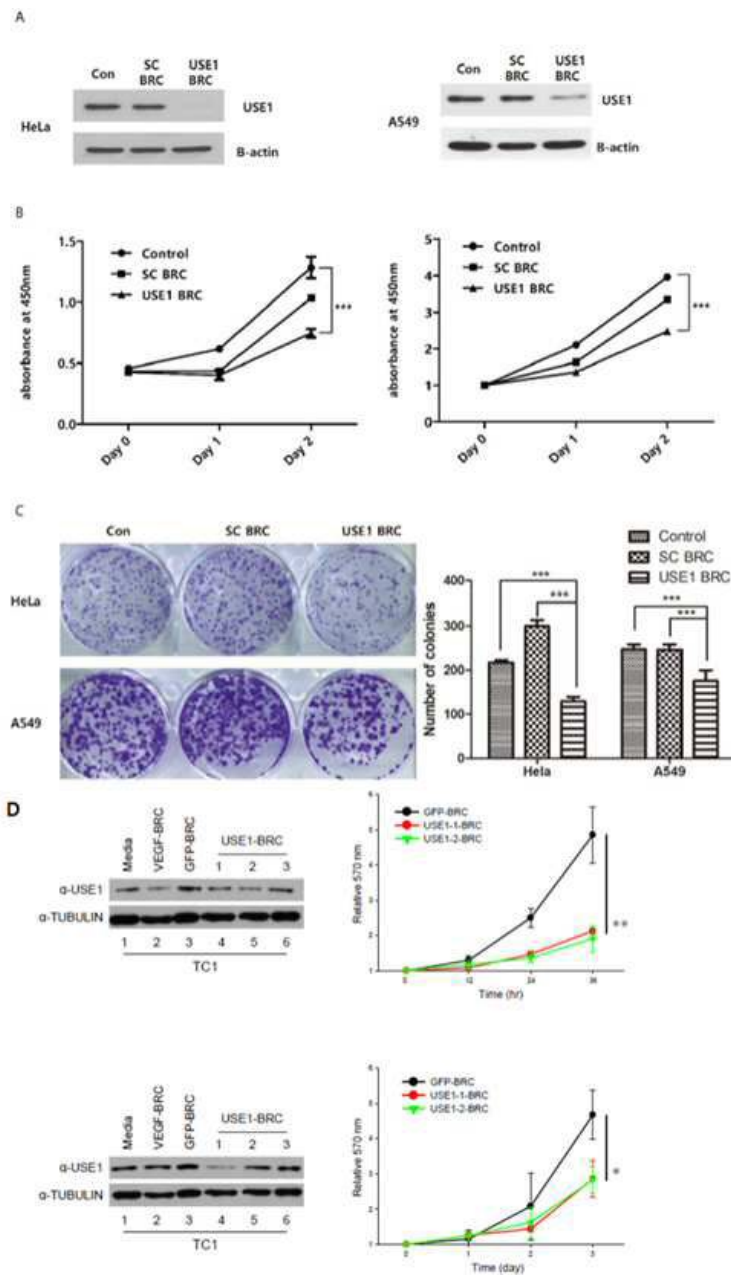
- [0159] 마우스에서 USE1 BRC 입자의 잠재적 독성 영향을 평가하기 위해 혈액 생화학 검사를 수행했지만 그룹 간에 유의한 차이가 없음을 확인할 수 있었다(도 7B). 아울러, 조직학적 분석 결과, USE BRC 입자는 간, 신장, 비장 또는 폐 조직에 심각한 손상을 유발하지 않는 것으로 나타났다(도 7B). 이러한 결과는 생체 내 USE1 BRC에 의한 독성 유도가 없음을 의미한다.
- [0161] <실시예 8> USE1-BRCs 입자 크기에 따른 종양 억제 효과 확인
- [0162] BRC 합성 반응의 반응물인 리보뉴클레오타이드삼인산(rNTP)의 농도를 기존 2 mM에서 1 mM로 조절하여 반응물의 제한적 공급을 통해 BRC의 평균 입경을 기존 350 nm에서 최종 200 nm 로 효과적으로 조절한 결과를 동적광산란(DLS)을 통해 확인하였다(도 8A).
- [0163] USE1-BRCs 입자 크기에 따른 종양 억제 효과 확인하기 위해, A549 세포에 8 시간 동안 평균 입경이 200 nm인 USE1 BRC-cy5 ($2\mu\text{g/ml}$)와 평균 입경이 350 nm인 USE1 BRC-cy5($2\mu\text{g/ml}$)를 처리하여 공초점 현미경(Confocal microscopy)으로 찍은 사진으로, 세포를 영상화하기 전에 Hoechst33342(청색; 핵) 및 Alexa 488-phalloidin(녹색; F-액틴)으로 고정하고 염색하였다. 확인 결과, cy5 (홍색) 표지된 BRC가 평균 입경이 200 nm 인 경우에서 350 nm 인 경우에 대비하여 다량 검출된 결과를 확인할 수 있었다(도 8B).
- [0164] 또한, A549 세포에 8 시간 동안 USE1 BRC-cy5($2\mu\text{g/ml}$)로 처리한 후 이미지 세포 분석(Image cytometry analysis)하였으며, 평균 입경이 200 nm 인 BRC의 경우 2회 측정 평균 20.85 % 의 세포가 cy5 양성이며 평균 입경이 350 nm 인 BRC의 경우 그 값이 12.65 % 로 평균 입경의 조절로 표적 세포 내 섭취 효율을 높인 결과를 확인할 수 있었다(도 8C).
- [0166] 본 연구에서는 RNAi를 통해 USE1을 침묵에서의 BRCs 입자의 효능을 제시하고 HeLa 자궁경부암 세포주 및 A549 폐암 세포주에서 항종양 효과를 평가하였다. 실험 결과, USE1 BRC의 사용은 USE1를 녹다운시켜 생체 내(in vivo) 및 실험관 내(in vitro)에서 종양 세포 성장을 억제함을 확인할 수 있었다. 또한, USE1 BRC 형질감염 세포에서 p53 신호 통로 통해 S 주기 정지 및 세포사멸사 반응을 확인하였으며, USE1 BRC는 세포 독성에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 아울러, A549 폐암 이종이식 모델에서, USE1 BRC 처리 마우스와 SC BRC 또는 PBS 처리 마우스(대조군)의 종양 크기를 비교한 결과, USE1 BRC 처리 마우스에서 항종양 효과를 확인할 수 있었다.
- [0167] 이러한 결과를 통해, USE1 녹다운이 S 주기의 정지 및 향상된 세포사멸사 반응에 의해 암세포 증식을 억제시킴을 확인할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 USE1 BRC 입자는 새로운 형태의 고형암 치료법으로서 응용될 수 있다.
- [0169] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

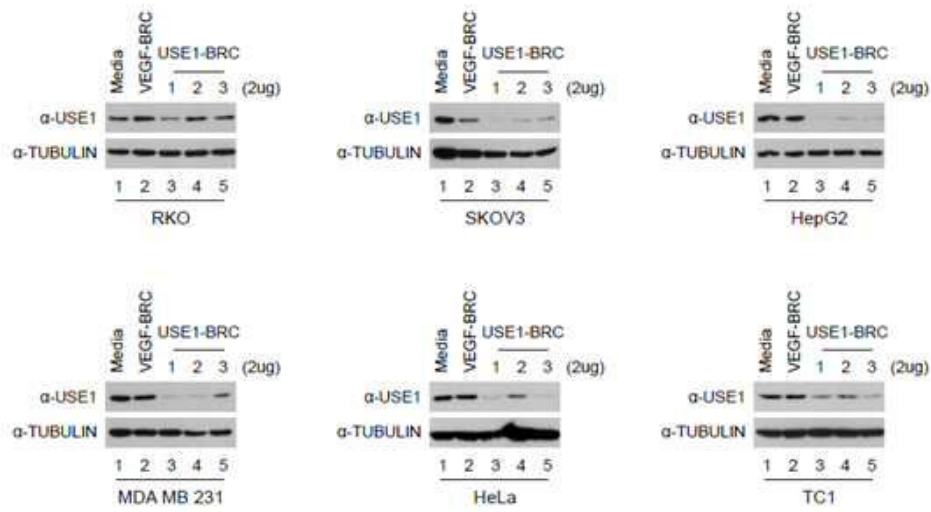
도면1



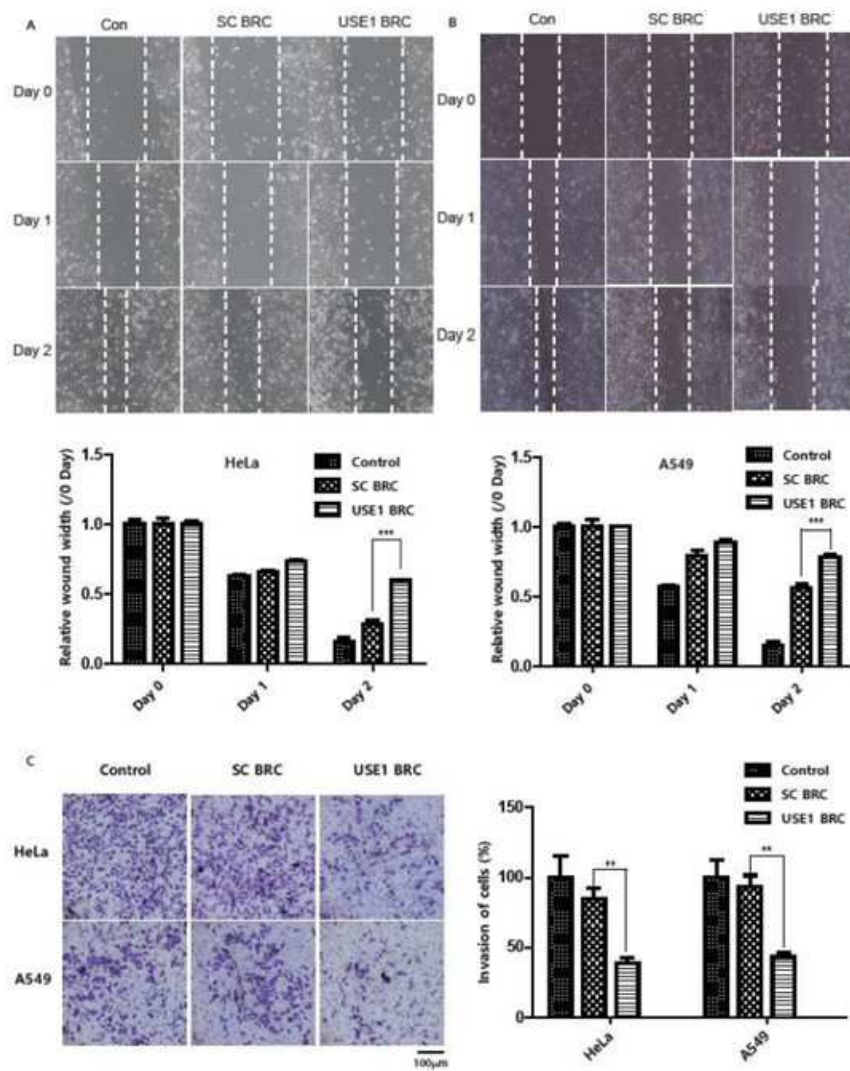
도면2



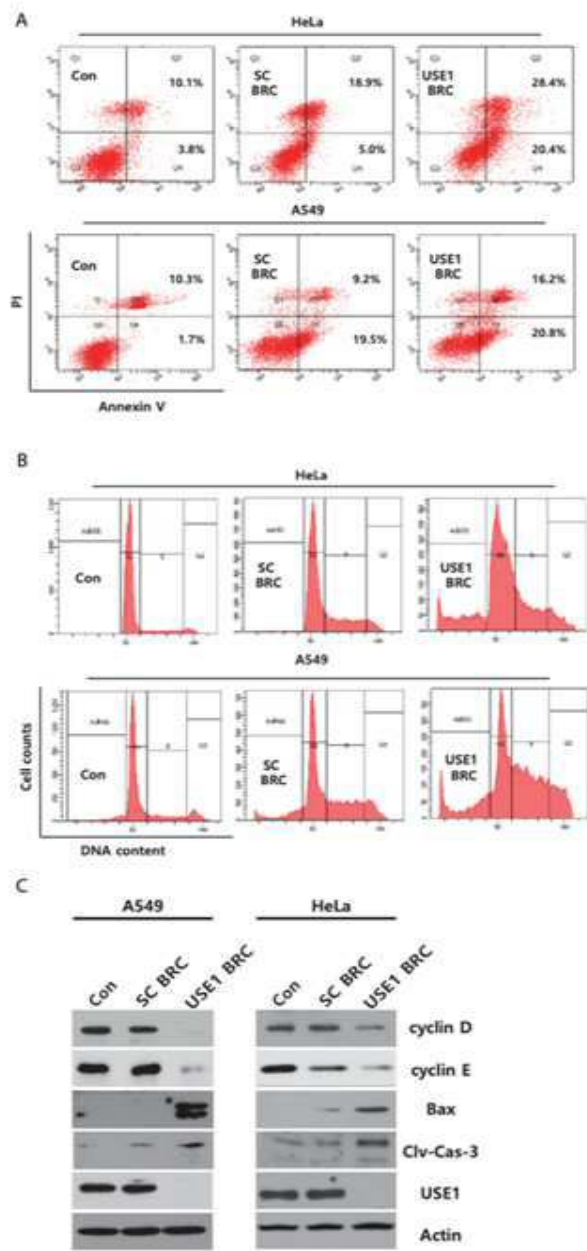
도면3



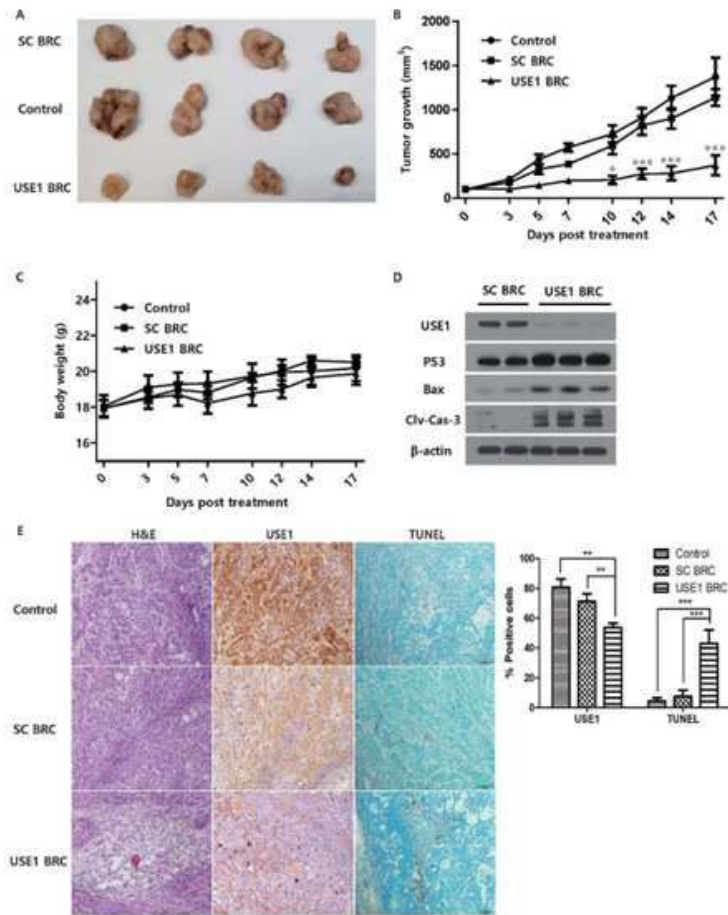
도면4



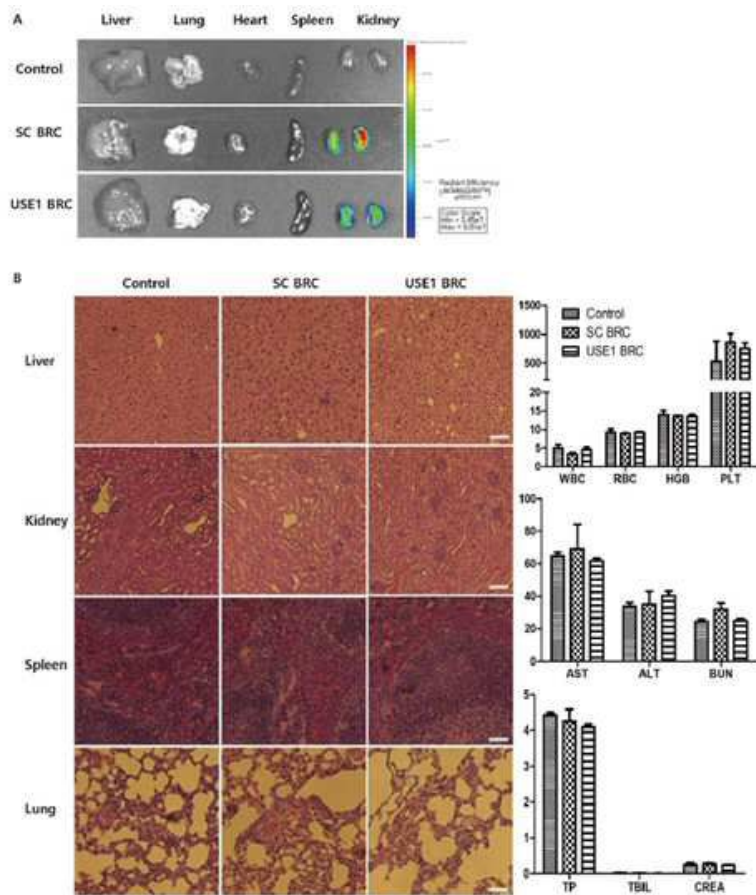
도면5



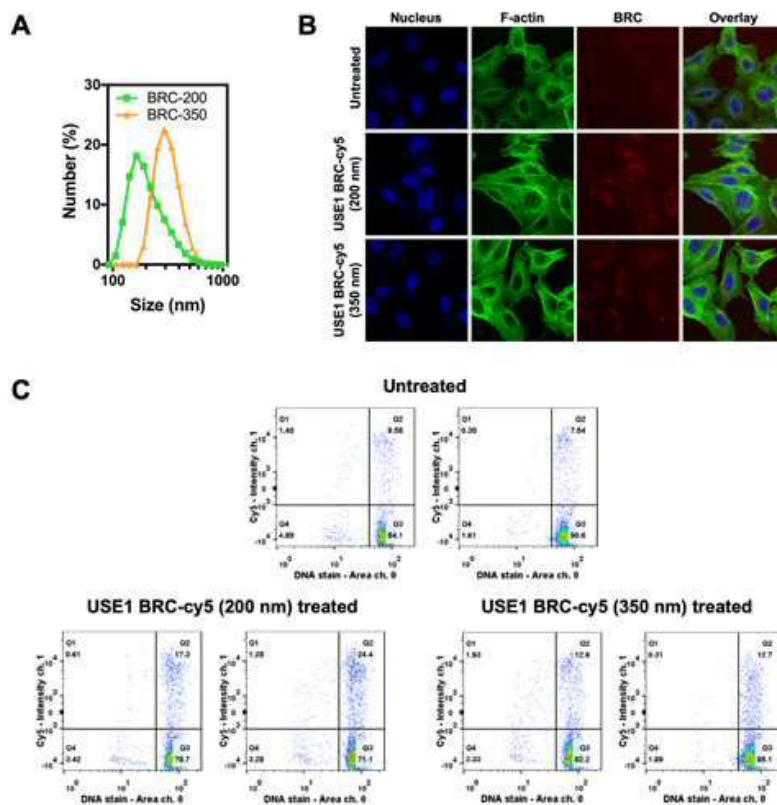
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110>	THE ASAN FOUNDATION University of seoul Industry Cooperation Foundation. University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation	
<120>	Composition for preventing or treating cancer comprising RNA particles containing siRNA for inhibiting USE1 and manufacturing method thereof	
<130>	ADP-2019-0555	
<160>	6	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	USE1 siRNA targeting region in the mRNA	
<400>	1	
	gggaaagucu gcuugagua	19
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for the T7 promoter region	
<400>	2	
	taatacgact cactataggg at	22
<210>	3	
<211>	92	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	USE1 pre-siRNA sense strand	
<400>	3	
	atagtgagtc gtattaaagg gaaagtctgc ttgagtattg ctggatgaag gacggtcgaa	60
	cgcaagggaag agtctgcttg agtattatcc ct	92
<210>	4	

<211> 92
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> USE1 pre-siRNA antisense strand
 <400> 4
 atagtgagtc gtattaaata ctcaagcaga ctttcccttc ttaggctgga caacaaccat 60
 ctaaatactc aagcagactt tcccttatcc ct 92
 <210> 5
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Non-targeting presirRNA sense strand
 <400> 5
 atagtgagtc gtattaaagt atctcttcat agccttattg tatctcttca tagccttaaa 60
 gtatctcttc atagccttat taccct 87
 <210> 6
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Non-targeting presirRNA antisense strand
 <400> 6
 atagtgagtc gtattaaata aggctatgaa gagatacttg tatctcttca tagccttaaa 60
 taaggctatg aagagatact taccct 87