



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0026106
(43) 공개일자 2020년03월10일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12N 15/113</i> (2010.01) <i>A61K 31/7088</i> (2006.01)
<i>A61K 47/64</i> (2017.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12N 15/113</i> (2013.01)
<i>A61K 31/7088</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0105623
(22) 출원일자 2019년08월28일
심사청구일자 2019년08월28일</p> <p>(30) 우선권주장
1020180102103 2018년08월29일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)</p> <p>(72) 발명자
김선화
서울특별시 성북구 화랑로14길 5
권익찬
서울특별시 성북구 화랑로14길 5
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
한윤호</p> |
|---|--|

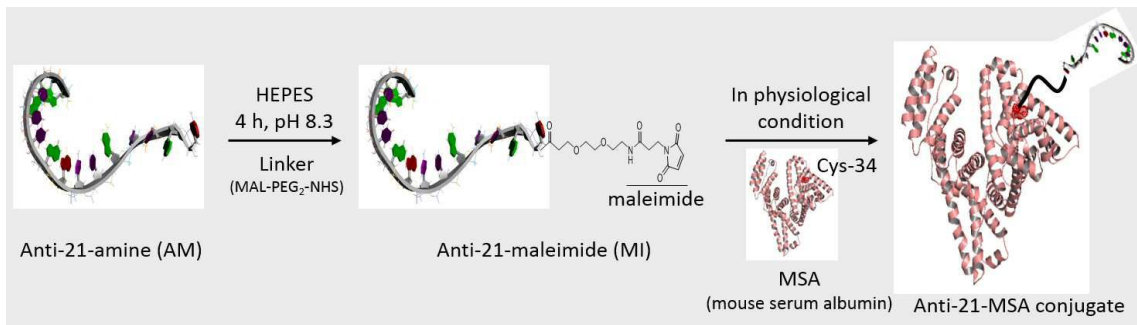
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **miRNA 억제제-알부민의 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 치료제**

(57) 요약

본 발명은 신규 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 유도체에 관한 것으로서, miRNA의 핵산서열과 상보적인 핵산서열을 갖는 항-miRNA 단일가닥 핵산분자의 일 말단에 말레이미드가 부가된 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체 및 상기 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체의 말레이미드에 혈청 알부민이 공유결합된 항-miRNA 단일가닥 핵산분자-혈청 알부민 결합체를 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 47/643 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 2310/141 (2013.01)

C12N 2310/321 (2013.01)

C12N 2310/3513 (2013.01)

(72) 발명자

김광명

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

윤홍열

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

곽기정

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

박주호

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016M3D1A1021392

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래소재디스커버리사업

연구과제명 피부재생용 펩타이드의 기능증강형 생체적합 융합소재 개발

기여율 1/1

주관기관 숙명여자대학교

연구기간 2018.02.01 ~ 2019.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

miRNA의 핵산서열과 상보적인 핵산서열을 갖는 항-miRNA 단일가닥 핵산분자의 일 말단에 말레이미드기가 추가된 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 miRNA는 miR-21, miR-17, miR-18, miR-19, miR-20, miR-21, miR-22, miR-23, miR-24, miR-25, miR-26, miR-27, miR-29, miR-30, miR-31, miR-32, miR-33, miR-34, miR-35, miR-36, miR-37, miR-38, miR-39, miR-40, miR-41, miR-42, miR-43, miR-44, miR-45, miR-46, miR-47, miR-48, miR-49, miR-50, miR-51, miR-52, miR-53, miR-54, miR-55, miR-56, miR-57, miR-58, miR-59, miR-60, miR-61, miR-62, miR-63, miR-64, miR-65, miR-66, miR-67, miR-68, miR-69, miR-70, miR-71, miR-72, miR-73, miR-74, miR-75, miR-76, miR-77, miR-78, miR-79, miR-80, miR-81, miR-82, miR-83, miR-84, miR-85, miR-86, miR-87, miR-88, miR-89, miR-90, miR-91, miR-92, miR-324a, miR-205, miR-182, miR-133b, miR-206, miR-193a-3p, miR-129-5p, miR-144-5p, miR-19a, miR-211, miR-185, miR-133b, miR-205, miR-373, miR-155, miR-31-3p, miR-194, miR-143, miR-449a, miR-224, miR-21, miR-483-3p, miR-221, miR-122, miR-612, miR-152-5p, miR-22, miR-145, miR-125a, miR-126, miR-21, miR-181d, miR-10b, miR-589-3p, miR-194-5p, miR-26a, miR-182, miR-145, miR-29b, miR-138, miR-21, miR-494, miR-1973, miR-21, miR-96, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-205, miR-212, miR-342, miR-214, miR-424, miR-503, miR-17-5p, miR-196a, miR-21, miR-1246, miR-196a, miR-196b, miR-506, miR-214, miR-383, miR-34a, miR-744-5p, miR-7, miR-21-3p, miR-199a, miR-214, miR-200c, miR-888, miR-892c, miR-890, miR-892a, miR-892b, miR-891b, miR-891a, miR-214, miR-219-5p, miR-493, miR-4286, miR-378a-3p, miR-23a, miR-146a, miR-339-3p, miR-216b, miR-186, miR-21, miR-210, miR-421, miR-373, miR-155, miR-181d, miR-15, miR-16, miR-26a, miR-196a2, Let-7a, miR-182, miR-504, miR-125b, miR-100, miR-18a, miR-101, miR-34c, miR-185, miR-125b, miR-18a, miR-192, miR-182, miR-373, miR-712, miR-205, miR-17-92, miR-1, miR-222, miR-223, miR-146a, miR-221, miR-130a, miR-155, miR-376, miR-208a, miR-15b, miR-18a, miR-19b, miR-21, miR-24, miR-30c, miR-92a, miR-106a, miR-125b-5p, miR-130a, miR-145, miR-152, miR-181a, miR-214, miR-222, miR-296-5p, miR-302a, miR-307, miR-381, miR-124, miR-132, miR-134, miR-138, miR-155, miR-23a, miR-129, miR-133a, miR-155, miR-221, miR-222, Let-7, miR-383, miR-146a, miR-146b, miR-33, miR-519d, miR-374a-5p, miR-26b, miR-27a, miR-21, miR-34a, miR-101-3p, miR-122, miR-130a, miR-137, miR-146a-5p, miR-181a, miR-373, miR-204, miR-1236, miR-143, miR-145, miR-5193, miR-93-5p 또는 miR-602인, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항-miRNA 단일가닥 핵산분자는 일부 또는 전체 골격이 개질된 핵산분자인, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 골격이 개질된 핵산분자는, PS(phosphorothioate) 개질 핵산분자, LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), PMO(phosphorodiamidate morpholino oligomer), 2'-변형 핵산인, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 2'-변형 핵산은 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형 핵산 또는 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE) 변형 핵산인, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체.

청구항 6

제4항에 있어서,

세 개의 연속된 핵산 중 하나의 비율로 골격이 개질된, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체의 말레이미드기에 혈청 알부민이 공유결합된, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자-혈청 알부민 결합체.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체를 유효성분으로 포함하는 miRNA 저해용 조성물.

청구항 9

제7항의 항-miRNA 단일가닥 핵산분자-혈청 알부민 결합체를 유효성분으로 포함하는 miRNA 저해용 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 miRNA의 과발현으로 야기되는 질환의 치료에 사용되는, 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 miRNA의 생물학적 기능을 연구하기 위한 시약용으로 사용되는, 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 miRNA의 과발현으로 야기되는 질환의 치료에 사용되는, 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 miRNA의 생물학적 기능을 연구하기 위한 시약용으로 사용되는, 조성물.

청구항 14

miR-21의 핵산서열과 상보적인 핵산서열을 갖는 항-miR-21 단일가닥 핵산분자의 일 말단에 말레이미드기가 부가된 항-miR-21 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체를 유효성분으로 포함하는, 항암 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 miRNA 억제제-알부민의 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 치료제에 관한 것으로서, 더 상세하게는 생체 내에서 반감기가 향상된 miRNA 억제제-알부민의 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 치료제에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0002] 마이크로RNA(miRNA)는 20 ~ 24개의 핵산으로 이루어진 단일 가닥의 올리고머로 핵산 순서 구조에 따라 일시적으로 특이적인 유전자 발현을 조절하여 자살, 분화, 분열, 대사 등 세포 내 신호 경로에 영향을 미침으로써 암, 감염, 면역 질환 등의 여러 질병에 깊이 관련되어 있다. 또한 miRNA에 의한 질병을 연구하고 치료하기 위하여 단일가닥의 상보적인 핵산 올리고머(single stranded antisense oligonucleotide, ASO)인 anti-miRNA(antago-miR, blockmir), miRNA sponge 등의 miRNA 억제제가 이용되고 있다. 그러나 miRNA 억제제의 생체 내 불안정성과 질병 부위 표적화 능력 감소 등의 문제점이 존재하고 있고 이를 향상시키기 위해 phosphorothioates, Neutral backbones(phosphorodiamidate morpholino oligomer, PMO), 펩티드핵산(peptide nucleic acid, PNA), 2'-modifications(2'-O-methyl(2'-O-Me)), 2'-O-methoxyethyl(2'-O-MOE)), bridged rings(locked nucleic acid(LNA)) 등의 화학적으로 개질된 핵산, 리포솜, 고분자 및 단백질 복합체 등의 전달체가 적용되고 있다. 그럼에도 불구하고, 전달체가 없는 miRNA 억제제는 생체 내에서의 빠른 배출과 낮은 질병 부위 전달능으로 약효를 위해 많은 양이 주입됨에 따라 정상 조직에서 부작용이 발생하고 전달체를 사용하더라도 전달체(carrier)의 잠재적 위험성과 복잡성으로 상업화에 어려움이 있다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제2012-0047892호는 miRNA 억제제 및 유사체를 위한 화학 변형 모티프에 대해 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 그러나 상기 선행기술의 경우, miRNA 억제제가 갖는 생체 내 불안정성 및 낮은 질병 부위 전달능으로 인한 부작용 등의 문제점을 포함하고 있다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 체내에서 활성을 가진 상태로 긴 시간 순환하며, 질병 부위에 효과적으로 전달되어 높은 생체안정성을 나타내는 miRNA 억제제-알부민의 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, miRNA의 핵산서열과 상보적인 핵산서열을 갖는 항-miRNA 단일가닥 핵산분자의 일 말단에 말레이미드기가 부가된 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체가 제공된다.

[0006] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체의 말레이미드기에 혈청 알부민이 공유결합된, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자-혈청 알부민 결합체가 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체를 유효성분으로 포함하는 miRNA 저해용 조성물이 제공된다.

[0008] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 항-miRNA 단일가닥 핵산분자-혈청 알부민 결합체를 유효성분으로 포함하는 miRNA 저해용 조성물이 제공된다.

[0009] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, miR-21의 핵산서열과 상보적인 핵산서열을 갖는 항-miR-21 단일가닥 핵산분자의 일 말단에 말레이미드기가 부가된 항-miR-21 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체를 유효성분으로 포함하는, 항암 조성물이 제공된다.

발명의 효과

[0010] 상기한 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 miRNA 억제제-알부민의 복합체를 이용하여 종래 miRNA 억제제의 문제점이었던 낮은 생체 안정성, 낮은 질병 부위 전달능 등을 개선함에 따라 우수한 암 치료효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1a는 miRNA 억제제의 합성과정 및 알부민과의 반응을 개략적으로 도시한 개요도이다.

도 1b는 알부민과 anti-21-MI의 혼합 과정에서 알부민의 비율을 높여가며 형성된 anti-21-MSA를 나타낸 SDS-page 이미지이다. 상기 이미지에서 붉은색은 Cy5.5 형광 연결을 통한 anti-21, 녹색은 쿠마시브틸리언트블루

(coomassie brilliant blue)를 이용한 단백질 염색을 의미한다.

도 1c는 본 발명의 anti-21-MI 및 마우스 혈청 알부민(MSA)을 혼합한 직후(0시간), 혼합 후 4시간 반응한 시료의 HPLC 그래프이다.

도 1d는 본 발명의 anti-21-MI 및 MSA를 다양한 시간(5분, 30분, 1시간, 4시간)동안 반응 시킨 후 생성된 anti-21-MSA를 분석한 SDS-page 이미지이다.

도 1e는 본 발명의 anti-21-MI(백본 수정) 및 쥐의 혈장을 다양한 시간(5분, 30분, 1시간, 4시간) 동안 반응 시킨 후 생성된 anti-21-MSA를 분석한 SDS-page 이미지이다.

도 2a는 본 발명의 anti-21-MI 및 anti-21-MSA를 다양한 비율(0, 0.25, 0.5, 0.75, 1)의 miRNA-21과 배양시킨 후 분석한 SDS-page 이미지이다. 상기 이미지에서 붉은색은 브롬화 에티뮴(EtBr)을 통한 핵산 염색, 녹색은 쿠마시브릴리언트블루를 통한 단백질 염색을 의미한다.

도 2b는 본 발명의 anti-21-MSA를 음성 대조군 miRNA 및 miRNA-21과 각각 배양시킨 후 분석한 SDS-page 이미지이다.

도 2c는 본 발명의 anti-21-MSA를 miRNA-21과 배양 후 RNase A로 miRNA-21을 분해시키는 과정의 반복을 통해 anti-21-MSA의 재활용 가능성을 분석한 SDS-page 이미지이다.

도 3a는 Cy5.5 형광이 연결된 anti-21와 FITC 형광이 연결된 MSA를 이용하여 세포 내 전달능을 확인한 공초점 현미경 이미지이다.

도 3b는 본 발명의 anti-21-MSA의 세포 내 전달능을 확인한 FACS 분석 그래프이다.

도 3c는 본 발명의 anti-21-MSA의 세포 내 전달능을 확인한 히스토그램 형식의 FACS 분석 그래프이다.

도 4a는 본 발명의 anti-21-MI, anti-21-MSA 및 anti-neg-MSA의 항암 효과를 확인하기 위하여 miRNA-21에 관련된 단백질 발현 변화를 분석한 겔 이미지이다.

도 4b는 본 발명의 anti-21-MI, anti-21-MSA 및 anti-neg-MSA의 항암 효과를 확인하기 위하여 U87 세포의 세포 생존율을 분석한 그래프이다.

도 4c는 본 발명의 anti-21-MI, anti-21-MSA 및 anti-neg-MSA의 항암 효과를 확인하기 위하여 스크래치 상처 회복 시험 결과를 나타내는 이미지이다.

도 4d는 본 발명의 anti-21-MI, anti-21-MSA 및 anti-neg-MSA의 항암 효과를 확인하기 위하여 스크래치 상처 회복 시험 결과를 분석한 정량 그래프이다.

도 5a는 본 발명의 anti-21-AM, anti-21-MI와 anti-21-MSA의 혈장 내 안정성을 분석한 SDS-page 이미지이다.

도 5b는 본 발명의 anti-21-AM, anti-21-MI와 anti-21-MSA의 혈장 내 안정성을 분석한 정량 그래프이다. 모든 실험은 Cy5.5 형광이 연결되고 PS와 LNA로 이루어진 anti-21(백본 수정)이 사용되었다.

도 5c는 본 발명의 anti-21-AM, anti-21-MI와 anti-21-MSA를 주입하고 수득한 혈장에서 miR-21 농도를 분석한 그래프이다.

도 5d는 본 발명의 anti-21-AM, anti-21-MI와 anti-21-MSA를 주입하고 수득한 혈장으로부터 Cy5.5 형광의 세기를 측정한 그래프이다.

도 5e는 본 발명의 anti-21-AM, anti-21-MI 및 anti-21-MSA를 주입하고 수득한 혈장의 Cy5.5 형광 이미지와 MSA 항체를 이용한 웨스턴 블랏 이미지이다.

도 6a는 본 발명의 anti-21-AM, anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 체내 분포와 질병 부위 전달능을 분석하기 위해 마우스에 주입 후 몸 전체의 형광 세기를 관찰한 이미지이다.

도 6b는 본 발명의 anti-21-AM, anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 체내 분포와 질병 부위 전달능을 분석하기 위해 마우스에 주입 후 적출된 장기의 형광 이미지이다. 왼쪽 이미지는 신장을 제거한 뒤 얻은 이미지이다.

도 7a는 본 발명의 anti-21-AM, anti-neg-MI 및 anti-21-MI의 약리 효과를 분석하기 위해 중앙 동물모델로부터 적출한 암의 중량을 분석한 그래프이다. 모든 실험은 PS와 LNA로 이루어진 anti-21(백본 수정)이 사용되었다.

도 7b는 본 발명의 anti-21-AM, anti-neg-MI 및 anti-21-MI의 약리 효과 분석을 위해 동물 실험에서 분리된 암 조직의 miRNA-21과 관련된 단백질 발현 변화를 분석한 겔 이미지이다.

도 7c는 본 발명의 anti-21-AM, anti-neg-MI 및 anti-21-MI의 약리 효과 분석을 위해 동물 실험에서 분리된 암 조직의 miRNA-21과 관련된 단백질 발현 변화를 분석한 정량 그래프이다.

도 8은 본 발명의 본 발명의 anti-21-AM, anti-neg-MI 및 anti-21-MI의 전신 독성 분석을 위해 동물실험에서 분리된 주요 장기의 haematoxylin and eosin(H&E) 염색 이미지이다.

용어의 정의:

본 문서에서 사용되는 "마이크로RNA(microRNA, miRNA)"은 생물의 유전자 발현을 제어하는 역할을 하는 작은 RNA로 보통의 mRNA가 수천개의 뉴클레오타이드 (nucleotide)로 이뤄진 데 반해 마이크로RNA는 20~25개의 뉴클레오타이드로 구성돼 있다.

본 문서에서 사용되는 "알부민(albumin)"은 생체세포나 체액 중에 넓게 분포되어 있는 단순단백질로 글로불린과 함께 세포의 기초물질을 구성하며, 동식물의 조직 속에 널리 존재한다. 동물성 알부민에는 달걀의 오브알부민, 혈청알부민, 젖의 락토탄알부민, 간 및 근육 속의 알부민(미오젠) 등이 있으며, 식물성 알부민에는 류코신(보리 씨), 레구멜린(완두콩), 리신(피마자 씨) 등이 있다.

발명의 상세한 설명:

본 발명의 일 관점에 따르면, miRNA의 핵산서열과 상보적인 핵산서열을 갖는 항-miRNA 단일가닥 핵산분자의 일 말단에 말레이미드기가 부가된 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체가 제공된다.

상기 miRNA는 miR-21, miR-17, miR-18, miR-19, miR-20, miR-21, miR-22, miR-23, miR-24, miR-25, miR-26, miR-27, miR-29, miR-30, miR-31, miR-32, miR-33, miR-34, miR-35, miR-36, miR-37, miR-38, miR-39, miR-40, miR-41, miR-42, miR-43, miR-44, miR-45, miR-46, miR-47, miR-48, miR-49, miR-50, miR-51, miR-52, miR-53, miR-54, miR-55, miR-56, miR-57, miR-58, miR-59, miR-60, miR-61, miR-62, miR-63, miR-64, miR-65, miR-66, miR-67, miR-68, miR-69, miR-70, miR-71, miR-72, miR-73, miR-74, miR-75, miR-76, miR-77, miR-78, miR-79, miR-80, miR-81, miR-82, miR-83, miR-84, miR-85, miR-86, miR-87, miR-88, miR-89, miR-90, miR-91, miR-92, miR-324a, miR-205, miR-182, miR-133b, miR-206, miR-193a-3p, miR-129-5p, miR-144-5p, miR-19a, miR-211, miR-185, miR-133b, miR-205, miR-373, miR-155, miR-31-3p, miR-194, miR-143, miR-449a, miR-224, miR-21, miR-483-3p, miR-221, miR-122, miR-612, miR-152-5p, miR-22, miR-145, miR-125a, miR-126, miR-21, miR-181d, miR-10b, miR-589-3p, miR-194-5p, miR-26a, miR-182, miR-145, miR-29b, miR-138, miR-21, miR-494, miR-1973, miR-21, miR-96, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-205, miR-212, miR-342, miR-214, miR-424, miR-503, miR-17-5p, miR-196a, miR-21, miR-1246, miR-196a, miR-196b, miR-506, miR-214, miR-383, miR-34a, miR-744-5p, miR-7, miR-21-3p, miR-199a, miR-214, miR-200c, miR-888, miR-892c, miR-890, miR-892a, miR-892b, miR-891b, miR-891a, miR-214, miR-219-5p, miR-493, miR-4286, miR-378a-3p, miR-23a, miR-146a, miR-339-3p, miR-216b, miR-186, miR-21, miR-210, miR-421, miR-373, miR-155, miR-181d, miR-15, miR-16, miR-26a, miR-196a2, Let-7a, miR-182, miR-504, miR-125b, miR-100, miR-18a, miR-101, miR-34c, miR-185, miR-125b, miR-18a, miR-192, miR-182, miR-373, miR-712, miR-205, miR-17-92, miR-1, miR-222, miR-223, miR-146a, miR-221, miR-130a, miR-155, miR-376, miR-208a, miR-15b, miR-18a, miR-19b, miR-21, miR-24, miR-30c, miR-92a miR-106a, miR-125b-5p, miR-130a, miR-145, miR-152, miR-181a, miR-214, miR-222, miR-296-5p, miR-302a, miR-307, miR-381, miR-124, miR-132, miR-134, miR-138, miR-155, miR-23a, miR-129, miR-133a, miR-155, miR-221, miR-222, Let-7, miR-383, miR-146a, miR-146b, miR-33, miR-519d, miR-374a-5p, miR-26b, miR-27a, miR-21, miR-34a, miR-101-3p, miR-122, miR-130a, miR-137, miR-146a-5p, miR-181a, miR-373, miR-204, miR-1236, miR-143, miR-145, miR-5193, miR-93-5p 또는 miR-602일 수 있다.

상기 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체에 있어서, 상기 항-miRNA 단일가닥 핵산분자는 일부 또는 전체 골격이 개질된 핵산분자일 수 있고 상기 골격이 개질된 핵산분자는, PS(phosphorothioate) 개질 핵산분자, LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), PMO(phosphorodiamidate morpholino oligomer) 또는 2'-변형 핵산일 수 있고 상기 2'-변형 핵산은 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형 핵산 또는 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE) 변형 핵산일 수 있다.

상기 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체에 있어서, 세 개의 연속된 핵산 중 하나의 비율로 골격이 개질될 수 있다.

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체의 말레이미드기에 혈청 알부민이 공유결합된, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자-혈청 알부민 결합체가 제공된다.

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 항-miRNA 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체를 유효성분으로 포함하는 miRNA 저해용 조성물이 제공된다.

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 항-miRNA 단일가닥 핵산분자-혈청 알부민 결합체를 유효성분으로 포함하는 miRNA 저해용 조성물이 제공된다.

상기 miRNA 저해용 조성물에 있어서, 상기 miRNA의 과발현으로 야기되는 질환의 치료에 사용될 수 있고 상기 miRNA의 생물학적 기능을 연구하기 위한 시약용으로 사용될 수 있으며 상기 miRNA의 과발현으로 야기되는 질환의 치료에 사용될 수 있고 상기 miRNA의 생물학적 기능을 연구하기 위한 시약용으로 사용될 수 있다.

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, miR-21의 핵산서열과 상보적인 핵산서열을 갖는 항-miR-21 단일가닥 핵산분자의 일 말단에 말레이미드기가 부가된 항-miR-21 단일가닥 핵산분자 말레이미드 유도체를 유효성분으로 포함하는, 항암 조성물이 제공된다.

본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 환부의 종류, 적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있다. 사용량은 특별히 한정되지 않지만, 0.01 µg/kg/day 내지 10 mg/kg/day 일일 수 있다. 상기 1일량은 1일에 1회, 또는 적당한 간격을 두고 하루에 2~3회에 나눠 투여해도 되고, 수일(數日) 간격으로 간헐(間歇)투여해도 된다.

본 발명의 약학적 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1-100 중량%로 함유될 수 있고 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 약학적 조성물의 제조에는 고체 또는 액체의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다. 제제용 첨가물은 유기 또는 무기 중 어느 것이어도 된다. 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분(cornstarch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 텍스트린, 카올린, 탄산칼슘 및 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트래거캔스(tragacanth), 젤라틴, 셸락(shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 텍스트린 및 펙틴(pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수 있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 모두 사용할 수 있다. 이들의 정제, 과립제에는 당의(糖衣), 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제, 항산화제 등을 첨가할 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 당 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며(예: 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 최신판; Mack Publishing Company, Easton PA), 제제의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042(Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기술되어 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여되는 것이 가능하며, 바람직하게는 비경구 투여로 정맥내 주입, 피하 주입, 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection), 뇌척수액내 주입(intracerebrospinal fluid injection), 근육내 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다.

현재 암, 감염, 면역 질환 등의 여러 질병과 깊이 관련있는 miRNA 억제제의 생체 내 불안정성과 질병 부위 표적화 능력을 향상시키기 위해 연구 개발 중인 전달체가 없는 miRNA 억제제는 생체 내에서의 빠른 배출과 낮은 질병 부위 전달능으로 약효를 위해 많은 양이 주입되어야 하고 이로 인한 정상 조직에 미치는 부작용이 우려되었다. 또한, 전달체를 사용하더라도 상기 전달체의 잠재적 위험성과 복잡성으로 상업화에 어려움이 있었다. 따라서 본 발명자들은 상술한 문제점을 극복하기 위해 체내에서 활성을 가진 상태로 긴 시간 순환하며, 질병 부위에 효과적으로 전달되고, 높은 생체안정성을 갖는 새로운 miRNA 억제제 개발을 위해 예의노력한 결과 목표하는 miRNA로 암 유발 유전자(oncogene) 중 하나인 miRNA-21을 확정하고 maleimide-PEG2-NHS ester 링커를 아민(amine) 개질된 miRNA-21 억제제(anti-21-AM)에 접합하여 maleimide 개질된 miRNA-21 억제제(anti-21-MI)를 합성하였으며 상기 합성된 anti-21-MI는 생리적인 조건에서 알부민과 반응하여 알부민 개질된 miRNA-21 억제제

(anti-21-MSA)를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

종래 miRNA 억제제에 관한 연구는 siRNA와 알부민의 결합을 통해 심장을 표적화한 것으로 siRNA의 작용 기전상 다양한 매개 단백질(RISC와 Ago)이 반드시 필요하기 때문에 siRNA-알부민 복합체의 약리 효율이 크게 저해될 수 있다. 그러나 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드 수식 항-miRNA 단일가닥 핵산분자는 생체 내로 투여시 체내 혈청 알부민과 *in situ* 공유결합을 함으로써, 항-miRNA 단일가닥 핵산분자의 단독 주사만으로 혈청 알부민과의 복합체가 형성되는 특징이 있음이 실험적으로 확인되었다. miRNA 억제제의 경우 표적 miRNA를 단순한 서열 특이적인 결합을 통해 침묵화시키는 메카니즘을 가지고 있기 때문에 siRNA와 달리 알부민 복합체를 형성하여도 약리 효과가 저해되지 않고 에너지 대사가 비이상적으로 빠르거나 혈관이 팽창하여 혈류량이 증가하는 대표적인 질병인 암과 염증반응에 대해 표적화시킬 수 있는 장점을 갖고 있다. 따라서 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드 수식 항-miRNA 단일가닥 핵산분자는 그 자체만으로도 별도의 약물전달체 없이 높은 생체내 안정성을 갖는 매우 효율적인 miRNA 표적 약물이 될 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

실시예 1: 공시 재료

본 발명에서 사용한 모든 뉴클레오시드 포스포라미티드 단량체(nucleoside phosphoramidite monomer)와 합성 과정(deblocking, coupling, oxidation, capping)에 필요한 시약인 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid), 테트라졸(tetrazole), 요오드(iodine), 아세트산 무수물(acetic anhydride) 및 N-methylimidazole은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

실시예 2: miRNA-21 억제제(anti-21-MI) 합성

본 발명자들은 종래 miRNA 억제제의 문제점을 개선하기 위하여 목표하는 miRNA로 암 유발 유전자(oncogene) 중 하나인 miRNA-21을 확정하였고 말레이미드(maleimide) 개질된 miRNA-21 억제제(anti-21-MI)를 합성하여 제조하였다. 구체적으로, miRNA-21 억제제의 합성 과정은 뉴클레오시드가 부착되어 있는 고상지지체로부터 시작하여 비블록화(deblocking), 결합(coupling), 산화(oxidation), 캡핑(capping)의 과정을 순환시키며 핵산순서에 따라 제조하였으며 합성 후에 3' 부분에 아민(amine) 작용기를 연결함으로써, mature miRNA-21의 상보적인 핵산순서로 5'-TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCT A-3'-amine(서열번호 1)와 5'-TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCT A-3'-amine(서열번호 2)의 순서를 갖는 anti-21-AM 및 anti-21-AM(백본 수정)를 합성하였고 reverse-phase HPLC와 MALDI-TOF 분석을 통해 분자량을 확인하였다.

또한 말레이미드(maleimide) 개질을 위해, 상기 anti-21-AM의 아민(amine) 작용기는 10배 많은 몰 비의 maleimide-PEG2-NHS 에스터 링커의 NHS 에스터 작용기와 pH 8.3의 0.1 M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES) 버퍼에서 4시간동안 상온에서 반응하였다. 상기 maleimide-PEG2-NHS ester 링커는 아민 개질된 miRNA-21 억제제(anti-21-AM)에 접합되어 maleimide 개질된 miRNA-21 억제제(anti-21-MI)를 합성하였다. 상기 말레이미드 개질된 miRNA-21 억제제(anti-21-MI)는 NAP-5 컬럼(GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)으로 2회 정제하였고 동결건조한 후에 Biophotometer plus(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 정량하였다. 본 발명에서 제조한 miRNA 억제제의 핵산서열 정보를 하기 표 1에 요약하였다.

【표 1】

miRNA 억제제의 핵산서열 정보

명칭	핵산서열 (5'→3')	서열번호
anti-21-AM	TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCT A	1
anti-21-AM(백본 수정)	<u>TCA</u> <u>ACA</u> TCA GTC TGA <u>TAA</u> <u>GCT</u> A	2
anti-neg-AM	GCG TAT TAT AGC CGA TTA ACG A	3
anti-neg-AM(백본 수정)	<u>GCG</u> <u>TAT</u> TAT AGC CGA <u>TTA</u> <u>ACG</u> A	4

*기울임과 밑줄로 표시된 핵산은 각각 PS(phosphorothioate nucleic acid)와 LNA(locked nucleic acid) 개질된 핵산이다.

실시예 3: MSA 개질된 miRNA-21 억제제(anti-21-MSA) 합성

본 발명자들은 MSA(mouse serum albumin) 개질된 miRNA-21 억제제를 합성하여 제조하였다. 구체적으로 MSA 개질을 위해, 다양한 몰비(1~20)를 갖는 MSA의 시스테인(cys-34)의 티올(thiol) 작용기와 pH 7.4의 PBS(phosphate buffer silane)에서 anti-21-MI의 말레이미드 작용기를 37°C 조건으로 다양한 시간(5분 ~ 4시간)동안 반응시켜 제조하였다. 알부민과 anti-21-MI의 혼합 과정에서 MSA의 비율을 높여가며 형성된 anti-21-MSA를 10% SDS-page 전기영동을 통해 수득하였다. 상기 시료는 C18 분석용 컬럼(H₂O: Acetonitrile 10 : 90에서 80 : 20, 30분, 230 nm)를 사용한 역상(reverse-phase) HPLC(Agilent Technologies 1200 series, Agilent Technologies, USA)로 분석하였다. 그 후, 상기 anti-21-MSA를 Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters(MWCO 30 kDa, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 이용하여 정제하였고 BCA protein quantification assay를 통해 정량하였다(도 1a).

그 결과, 생리적인 조건에서 알부민과 반응하여 알부민 개질된 miRNA-21 억제제(anti-21-MSA)를 제조하였고 이의 분자량은 66 kDa 정도의 알부민과 반응하여 약 74 kDa으로 나타났다(도 1b). anti-21-MI(8 kDa)의 형광이 75 kDa에서 관찰되었고 이를 통해 MSA(66 kDa)와 anti-21-MSA(74 kDa)를 형성하며 특히 5배 과량의 몰 비에서 MSA과 반응한 anti-21-MI의 양이 포화되는 것을 확인하였다. 이 후의 실험에서 MSA는 5배 과량의 몰 비로 사용되었다. 또한, HPLC 분석 결과, anti-21-MI와 MSA를 각각 분석한 데이터에서 각각의 피크(peak)를 확인하였다. 혼합한 직후(0시간)에는 각 물질의 peak 2개가 존재하였는데 4시간 반응한 이후에는 anti-21-MI의 peak가 감소하였고 기존 MSA 피크의 앞 부분에 새로운 피크가 생성되어 반응의 결과물로 anti-21-MSA가 형성된 것을 확인하였다(도 1c).

아울러, anti-21-MI와 anti-21-MI(backbone modified)를 MSA와 쥐의 혈장에서 다양한 시간(5분, 30분, 1시간, 4시간)동안 반응 시킨 결과, MSA는 물론 쥐의 혈장에서도 75 kDa에서 anti-21-MI의 형광이 관찰되었고 이를 통해 다양한 효소가 존재하는 쥐의 혈장에서도 anti-21-MI와 MSA의 반응이 일어나며 혼합 후 5분 만에 반응이 충분히 진행 되는 것을 확인하였다(도 1d). 또한, anti-21-AM은 4시간의 반응에도 75 kDa에서 형광이 관찰되지 않았고 이를 통해 anti-21-AM은 MSA와 반응하지 않는 것으로 나타났으며 이는 말레이미드 개질이 MSA와의 반응에 중요한 단계임을 시사하는 것이다(도 1e).

실시예 4: 말레이미드 개질된 음성 대조군 miRNA 억제제(anti-neg-MI) 합성

본 발명자들은 말레이미드 개질된 음성 대조군 miRNA 억제제(anti-neg-MI) 합성하여 제조하였다. 구체적으로 고상지지체를 이용한 합성 프로토콜에 따라 억제제를 합성하기 위해 상기 서열번호 1 및 서열번호 2의 억제제 대신에 서열번호 3 및 서열번호 4로 구성된 음성 대조군 miRNA 억제제 핵산순서로 합성한 것을 제외하고 상기 실시예 2와 동일한 합성과정을 수행하여 anti-neg-AM과 anti-neg-AM(backbone modified)을 제조하였다.

실험예 1: 포획 능력 분석

본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 miRNA-21 포획 능력을 분석하기 위하여, 상기 양 억제제(anti-21 300 pmole 함유)를 miRNA-21과 37°C 조건에서 다양한 비율(0, 0.25, 0.5,

0.75, 1)로 1시간 동안 배양한 후 전기영동(8% page)으로 분석하였다. 또한, 핵산순서에 의한 포획 특이성을 분석하기 위하여, anti-21-MSA(anti-21 300 pmole)를 음성 대조군 miRNA(300 pmole) 및 miRNA-21(300 pmole)과 1시간 동안 37°C에서 배양한 후 8% page를 통해 전기영동으로 분석하였다. 또한, 알부민의 생리적 특이성 재활용 가능성을 분석하기 위하여, anti-21-MSA(anti-21 300 pmole 함유)를 miRNA-21(300 pmole)과 배양하였고 RNase A(1 mg/ml)를 이용한 분해과정을 각각 3회 및 2회 반복하여 miRNA-21 포획 능력을 8% page를 통해 전기영동으로 분석하였다.

그 결과, anti-21-MI 및 anti-21-MSA 모두 공배양된 miRNA-21의 비율에 따라 anti-21-MI의 이중 가닥 핵산 위치인 22 bp와 anti-21-MSA의 MSA의 위치인 250 bp에서 형광 세기가 증가 하는 것으로 나타났고 이를 통해 miRNA-21 포획 능력이 말레이미드 개질 및 MSA 개질에 의해 제한되지 않는 것을 확인하였다(도 2a). 또한 anti-21-MSA는 miRNA-21과의 배양에서만 형광이 증가한 것을 관찰하였고 이에 따라 핵산순서 구조의 특이성을 통해 목표하는 miRNA-21만 포획하는 것을 확인하였다(도 2b). 아울러, anti-21-MSA를 miRNA-21과 배양하고 RNase A를 통해 분해시키는 과정을 각각 3회 및 2회 반복했을 때에도 miRNA-21 포획 능력이 유지되는 것을 확인하였다(도 2c).

실험예 2: 세포 내 전달 확인

본 발명자들은 본 발명의 anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 세포 내 전달능을 이미지로 확인하기 위하여, 인간 유래 뇌종양 세포인 U87 세포를 35 mm 커버-글라스 바닥 접시(cover-glass bottom dish)에 1×10^5 씩 분주하고 세포의 안착을 위해 24시간 방치하였다. 그 후 상기 세포에 무혈청 배지와 함께 각각 PBS, MSA(1.5 nmole), anti-21-MI(300 pmole), anti-21-MSA(anti-21 300 pmole 함유), anti-21-MSA(anti-21 300 pmole 함유)+M β CD를 처리하고 이산화탄소 배양기에서 37°C의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. Methyl-beta-cyclodextrin(M β CD)는 세포에서 glycoprotein60(gp60)에 의한 알부민 섭취와 재활용 특성을 억제하는 효과를 가지고 있는 엔도사이토시스(endocytosis) 억제제로 사용되었고 24시간 뒤에 세포를 고정하기 위해 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)을 처리한 뒤 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) 용액을 10분간 처리하여 핵 염색을 실시하였고 공초점 현미경(FV1000, Olympus, Japan)을 통해서 DAPI, MSA 및 anti-21의 형광을 관찰하였다. 또한, FACS 분석을 위하여, 인간 유래 뇌종양 세포인 U87 세포를 6 웰-플레이트에 웰당 1×10^5 씩 분주한 후 안착을 위해 24시간 동안 방치하였고 상기 세포를 무혈청 배지와 함께 각각 PBS, MSA(1.5 nmole), anti-21-MI(300 pmole), anti-21-MSA(anti-21 300 pmole 함유), anti-21-MSA(anti-21 300 pmole 함유)+M β CD를 처리한 후 이산화탄소 배양기에서 37°C 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후 수득한 세포는 Guava easyCyte Flow Cytometer (Billerica, MA, USA)를 이용하여 분석하였다.

그 결과, MSA는 암세포의 대사 과정에서 필요한 요소로 세포 내 전달능이 뛰어난 것을 관찰했고 anti-21-MSA의 세포 내 전달능은 MSA의 생리학적 특성을 공유하면서 anti-21-MI과 비교하여 우수한 전달능을 나타내었다. 또한, 알부민 섭취를 억제하는 M β CD를 처리한 anti-21-MSA+M β CD에서 MSA와 anti-21의 현저한 전달능 저하가 관찰되었고 이를 통해 gp60에 연관되어 있는 MSA의 전달능은 anti-21-MSA의 세포 내 전달에 중요한 영향을 미치는 것을 확인하였다(도 3a).

또한, FACS 분석 결과 PBS 실험군과 비교해서 MSA 실험군에서 98.4%의 세포에 MSA가 전달된 것을 관찰하였고 anti-21이 전달된 세포가 anti-21-MI 실험군에서 2.62%인 것과 비교하여 anti-21-MSA 실험군에서 68.1%로 증가된 것을 관찰했다. 특히, anti-21-MSA 군에서 67.1%의 세포에 MSA와 함께 anti-21이 전달된 것을 관찰했고 이를 통해 MSA의 뛰어난 전달능을 통해 anti-21의 전달능이 향상된 것을 확인하였다(도 3b). 또한, anti-21-MSA+M β CD 실험군에서 MSA가 전달된 세포는 14.18%로 감소했고 그 중 anti-21이 전달된 세포는 5.47%로 감소했다. 또한 FACS 분석을 통해 수득한 anti-21-MSA 실험군의 anti-21 Cy5.5 형광의 평균 형광강도(mean fluorescence intensity)는 3692로 PBS, MSA, anti-21-MI 및 anti-21-MSA+M β CD 실험군과 비교해서 각각 5.76, 4.56, 5.31, 4.31배 증가했다(도 3c). 상기 결과를 통해 MSA의 전달능은 anti-21-MSA의 세포 내 전달에 중요한 영향을 미치는 것을 확인하였다.

실험예 3: 항암 효과 분석

본 발명자들은 본 발명의 anti-21-MI, anti-21-MSA 및 anti-neg-MSA의 항암 효과를 확인하였다. 구체적으로 생체 외에서 miRNA-21 억제제에 의한 miRNA-21 관련 단백질의 발현 변화를 확인하기 위하여, U87 세포를 6웰-플레이트에 웰당 1×10^5 씩 분주하고 세포 안착을 위해 24시간 동안 방치하였다. 상기 안착한 세포를 무혈청 배지와 함께 각각 PBS, MSA(1.5 nmole), anti-21-MI(300 pmole), anti-neg-MSA(anti-neg 300 pmole 함유), 및

anti-21-MSA(anti-21 300 pmole 함유)를 처리하였고 이산화탄소 배양기에서 37°C 조건으로 48시간 동안 배양하였다. 그 후 상기 세포를 포유류 세포 용해 완충액(mammalian cell lysis buffer, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 세포의 용해물을 수득하였고 원심분리기를 이용해서 단백질을 정제하였다. 상기 정제된 단백질은 BCA 단백질 정량 분석(protien quantification assay)를 이용하여 정량하였고 SDS-page 전기영동을 이용하여 웨스턴 블랏 분석(western blot assay)으로 miRNA-21과 관련된 Pcd4, Timp3 및 Mmp2 단백질 발현을 비교하였으며 beta-actin 단백질의 발현으로 단백질 정량을 비교하였다.

또한 생체 외에서 miRNA-21 억제제에 의한 세포 생존율 변화를 확인하기 위하여, U87 세포를 96 웰-플레이트에 웰당 1×10^4 씩 분주하고 세포안착을 위해 24시간 방치하였고 상기 세포를 무혈청 배지와 함께 각각 PBS, MSA(1.5 nmole), anti-21-MI(300 pmole), anti-neg-MSA(anti-neg 300 pmole 함유), anti-21-MSA(anti-21 300 pmole 함유)를 처리한 후 이산화탄소 배양기에서 37°C 조건으로 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) solution을 처리해 1시간 동안 37°C에서 배양하였고 MTT solution에 의해 대사하는 세포에서 생성된 포르마잔(formazan)을 DMSO(dimethyl sulfoxide)으로 녹여 570nm의 파장에서 측정된 흡광도를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다.

아울러, 생체 외에서 miRNA-21 억제제에 의한 세포 이동능 변화를 확인하기 위하여 스크래치 상처 회복 시험을 수행하였다. 구체적으로 U87 세포를 6 웰-플레이트에 웰당 1×10^5 개씩 분주한 후 24시간 동안 방치하였고 상기 세포가 안착한 웰에 1ml 팁(tip)을 이용해 스크래치 상처를 유발 후 무혈청 배지와 함께 각각 PBS, MSA(1.5 nmole), anti-21-MI(300 pmole), anti-neg-MSA(anti-neg 300 pmole 함유) 및 anti-21-MSA(anti-21 300 pmole 함유)를 처리하고 이산화탄소 배양기에서 37°C 조건으로 48시간 동안 배양했다. 그 후 세포의 이미지는 24시간 동안 혈청이 있는 배지에서 추가 배양한 후 역상 위상차 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 통해 수득하였다.

그 결과, PBS 대조군과 비교하여 세포 내 전달능이 떨어지는 anti-21-MI 실험군 및 miRNA-21 포획능력이 없는 anti-neg-MSA 실험군에서는 miRNA-21과 관련된 단백질 발현 변화가 거의 없었지만 anti-21-MSA 군에서는 miRNA-21과 관련된 단백질 발현 변화가 나타났다. 또한 anti-21-MSA 실험군에서, miRNA-21 발현과 반비례하는 Pcd4와 금속단백분해효소(metalloproteinases) 억제 단백질인 Timp3의 발현은 증가했고 금속단백분해효소인 Mmp2의 발현은 감소했다(도 4a). 이를 통해 anti-21이 효과적으로 세포 내로 전달된 anti-21-MSA 실험군에서만 암 세포의 이동 및 암 신생 혈관 형성을 활성화하는 단백질이 감소한 것을 확인하였다.

또한, anti-21-MI 및 anti-21-MSA 실험군에서 PBS 대조군보다 유의적으로 낮은 세포 생존율을 관찰했고 이를 통해 세포 내 전달된 anti-21에 의해 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 anti-21-MSA 실험군에서 anti-21-MI 실험군보다 유의적으로 낮은 세포 생존율을 관찰했고 이에 따라 향상된 세포 전달능을 통해 anti-21의 항암 효과가 증가한 것을 확인하였다(도 4b).

또한 스크래치 상처 회복 시험 결과 anti-21-MSA가 처리된 세포는 PBS를 포함한 다른 실험군보다 유의적으로 스크래치 상처선(붉은 점선) 안으로 세포가 이동하지 못한 것을 관찰했고 이는 anti-21-MSA의 향상된 세포 전달능을 통해 anti-21의 이동 억제 효과가 증가한 것을 시사하는 것이다(도 4c 및 4d).

실험예 4: 체내 안정성 및 약물동태학 분석

본 발명자들은 본 발명의 anti-21-AM, anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 혈장 내 안정성 및 약물동태학 분석을 수행하였다. 본 발명에서의 동물실험은 한국과학기술연구원(KIST)의 지침에 따라 수행되었으며, 기관윤리회(institutional committees)로부터 승인을 받았다. 구체적으로 anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 혈장 내 안정성을 분석하기 위해, anti-21-AM(1 nmole), anti-21-MI(1 nmole) 및 anti-21-MSA(anti-21 1 nmole 함유)를 각각 혈장(50 μ l)에서 다양한 시간(5분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간) 동안 배양하였다. 상기 배양된 시료는 10% SDS-page의 전기영동을 통해 분리하였고 혈장 내 안정성은 각 시간의 형광 세기에 의해 상대적으로 정량하였다. 또한, 생체 내에서 anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 안정성 및 약물동태학적(pharmacokinetic, PK) 분석을 위해, ICR 마우스(Nara Bio tech. INC., 경기도, Republic of Korea)에 anti-21-AM(4 nmole), anti-21-MI(4 nmole) 및 anti-21-MSA(anti-21 4 nmole 함유)를 각각 꼬리 정맥을 통해 주입했다. 그 후 다양한 시간(15분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 24시간, 48시간) 조건에 따라 주입한 마우스의 꼬리 끝에서 혈액을 채취 했고 Cy5.5 형광 세기를 통해 혈액 내의 anti-21의 양을 정량하였다. 특히, 48시간 후의 혈장은 Cy5.5 형광 세기가 측정되어 정량하였고 1시간 후의 혈장은 10% SDS-page 전기영동을 통해 분리하였다.

그 결과, anti-21-MI는 혈장 내에서 MSA과 반응하여 75 kDa에서 형광이 관찰됐고 형광세기를 정량한 결과 빠르

게 분해되는 anti-21-AM과 달리 1시간부터 12시간까지 유의적으로 많은 양이 정량되는 것을 확인하였다. 특히, anti-21-MSA 실험군과 모든 시간 조건에서 유의성이 없는 것으로 나타났고 이를 통해 anti-21-MI의 혈장 내 반응 효율이 생체 외에서 반응 시킨 anti-21-MSA와 동일함을 확인하였다(도 5a). 또한, anti-21-MI의 형광 세기를 정량한 결과 빠르게 분해되고 배출되는 anti-21-AM과 달리 1시간부터 9시간까지 유의적으로 많은 양이 정량되는 것을 확인하였다. 특히, 혈장 내 반응과 유사하게, anti-21-MSA 실험군과 모든 시간 조건에서 유의성이 없는 것을 관찰했고 이를 통해 anti-21-MI의 생체 내 반응(*in situ reaction*)의 효율도 생체 외에서 반응 시킨 anti-21-MSA와 동일함을 확인하였다(도 5b). 아울러 anti-21-AM과 비교하여 48시간 후에 수득한 혈장에서 anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 형광세기가 유의적으로 높은 것으로 나타났으나 anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 형광 세기는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 상기 결과는 생체 내 반응을 통한 anti-21-MI의 약물동태학적 성질이 생체 외에서 반응 시킨 anti-21-MSA의 성질과 동일하며 48시간 후에도 유지되는 것을 확인하였다(도 5c). 또한 anti-21-MI 및 anti-21-MSA가 주입된 쥐의 혈장에서 75 kDa의 anti-21 Cy5.5 형광 밴드를 관찰하였고 이를 통해 혈장에서 정량 되는 형광 세기는 MSA와 반응하여 생리학적 특성을 공유하고 있는 anti-21의 형광 세기인 것을 확인하였고(도 5d) miRNA 억제제의 형광과 MSA 화학 형광 밴드가 복합체의 분자량 밴드에서 겹치는 것을 확인했다(도 5e).

실험예 5: 체내 분포와 질병 부위 전달능 분석

본 발명자들은 본 발명의 anti-21-AM, anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 체내 분포와 질병 부위 전달능을 분석하였다. 구체적으로 anti-21-AM, anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 체내 분포와 질병 부위 전달능 분석을 위해 면역이 고갈된 누드 마우스(Nara Bio tech. INC.)에 2×10^7 의 U87 세포를 왼쪽 허벅지에 주입(n=1)하여 종양 동물모델을 제작하였고, 3주 후 종양의 크기가 200-250 mm³ 일 때 실험을 수행하였다. anti-21-AM(4 nmole), anti-21-MI(4 nmole) 및 anti-21-MSA(anti-21 4 nmole 함유)는 각각 꼬리 정맥을 통해 주입하였고 다양한 시간조건(1시간, 3시간, 9시간, 12시간, 24시간, 36시간)에 따라 IVIS 스펙트럼 시스템(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)을 이용하여 쥐 몸 전체의 형광 이미지를 수득하였다. 또한 종양 부위의 형광세기는 Living Image[®] software(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 정량하였다. 그 후 억제제를 주사하고 36시간 뒤에 마우스의 주요 장기(간, 폐, 비장, 신장, 심장)와 암 조직을 적출하였고 IVIS 스펙트럼 시스템으로 조직 전체의 형광 이미지를 수득하였다.

그 결과, anti-21-AM의 생체 내 분포는 빠르게 분해되고 배출되는 전형적인 miRNA 억제제와 동일하였고 간과 특히 신장에 축적되어 있는 반면에, anti-21-MI 및 anti-21-MSA의 생체 내 분포는 초기 시간(1시간, 3시간, 9시간)에 신장에서 형광의 세기가 감소함을 관찰하였다. 또한, 시간이 지날수록 anti-21-AM의 생체 내 분포에서 암 부위(하얀 점선 원)에 축적되는 형광의 세기가 감소하는 반면에, anti-21-MI와 anti-21-MSA는 암 부위에 축적되는 형광의 세기가 증가하는 것을 관찰했다. 이를 통해 anti-21-MI 및 anti-21-MSA는 알부민의 생리적 특성을 공유하여 생체 내에서 긴 순환 시간과 암 질병 부위를 표적화하는 특성을 획득한 것을 확인하였다(도 6a). 또한 anti-21-AM 실험군의 암 조직과 비교하여 anti-21-MI 및 anti-21-MSA 실험군의 적출된 암 조직에 더 많은 형광이 축적된 것을 관찰했고 이를 통해 몸 전체 이미지에서 표시한 암 부위의 형광이 정확히 암 조직으로부터 수득한 형광임을 확인하였다(도 6b).

실험예 6: 약리 효과 분석

본 발명자들은 본 발명의 anti-21-AM, anti-neg-MI 및 anti-21-MI의 약리 효과를 분석하였다. 구체적으로 약리 효과 분석을 위해 면역이 고갈된 마우스 누드(Nara Bio tech. INC.)에 2×10^7 개의 U87 세포를 왼쪽 허벅지에 주입(n=5)하여 종양동물모델을 제작하였고, 2주 후 종양의 크기가 50-100 mm³ 일 때 실험을 수행하였다. anti-21-AM(2 nmole), anti-21-MI(2 nmole) 및 anti-21-MSA(anti-21 2 nmole 함유)를 각각 3일에 한번 꼬리 정맥을 통해 주입하였고 종양조직의 크기를 측정하였으며 마지막 주입하고 3일 경과 후, 주요 장기와 암 조직을 적출하였고 암 조직의 무게를 측정하였다. 또한 상기 적출된 암 조직을 통해 miRNA-21 관련된 단백질 발현을 비교하기 위해 상기 적출된 암에서 포유류 세포 용해 버퍼 및 Wisemix homogenizer(Daihan Scientific, Seoul, Republic of Korea)를 이용하여 조직의 용해물을 수득하였고 원심분리기를 이용해서 단백질을 정제하였다. 상기 수득한 단백질은 BCA 단백질 정량 분석을 이용하여 정량하였고 SDS-page 전기영동을 이용해 웨스턴 블랏 분석으로 miRNA-21과 관련된 Pcd4, Timp3 및 Mmp2 단백질 발현을 비교하였고 beta-actin 단백질을 이용하여 단백질 정량을 비교하였다.

그 결과, MSA와 반응하고 miRNA-21을 포획할 수 있는 anti-21-MI 실험군에서 PBS를 포함한 다른 실험군들과 비

교하여 암 세포를 주입 후 20일부터 실험 마지막 날인 29일까지 유의적인 항암 효과를 관찰하였다. 또한 상기 29일 췌의 암의 중량도 PBS를 포함한 다른 실험군들과 비교하여 anti-21-MI 군에서 유의적인 감소를 감소하였다. 상기 결과는 anti-21-AM 및 anti-neg-MI와 비교해서, anti-21-MI는 생체 내 반응(*in situ* reaction)으로 MSA의 생리학적 특성을 공유하며 miRNA-21에 대한 특이적인 약리 효과를 내는 것을 확인하였다(도 7a). 또한 PBS를 포함한 다른 실험군들과 비교하여 anti-21-MSA 군에서 적출된 암 조직에서 Pdcd4와 Timp3의 발현이 현저히 증가했음을 확인하여 anti-21이 효과적으로 암 조직으로 전달된 anti-21-MSA 실험군에서만 암 세포의 이동과 암 신생 혈관 형성을 활성화하는 단백질이 감소한 것을 확인하였다(도 7b 및 7c).

실험예 7: 전신 독성 분석

본 발명자들은 본 발명의 anti-21-AM, anti-neg-MI 및 anti-21-MI의 전신 독성 분석을 수행하였다. 구체적으로 상기 억제제 약리효과 분석 동물실험에서 마지막 억제제 주사 후 3일 뒤 주요장기를 적출하였고 세포 고정액으로 고정하였다. 그 후 에탄올(ethanol) 및 자일렌(xylene)을 통한 탈수과정 후 파라핀(paraffin)을 이용하여 조직 블록을 제조하였고 Leica Microtomes Biosystems RM2245(Leica Camera, Wetzlar, Germany)을 이용하여 6 μm의 두께로 절단하였고 유리 슬라이드에 올린 후 하루 동안 건조하였으며 hematoxylin and eosin(H&E)으로 염색하였다.

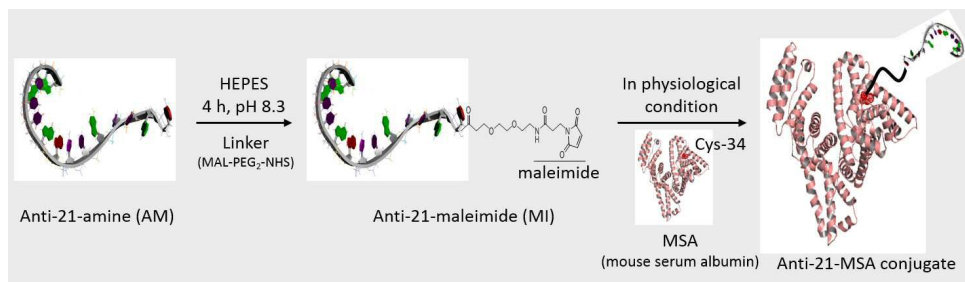
그 결과, 상기 실험예 5에서는 신장에 많은 양의 억제제가 축적되는 체내 분포를 관찰하였으나 본 실험에서는 신장을 비롯한 주요 장기인 심장, 간, 폐, 비장에서 눈에 띄는 독성은 관찰되지 않았다. 이는 MSA와의 반응을 통한 anti-21-MI의 생리적 특성 변화로 기존 miRNA 억제제 보다 적은 주사 용량에서 항암 효과는 물론 전신 독성도 줄일 수 있음을 시사한다(도 8).

결론적으로 본 발명의 miRNA 억제제-알부민의 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 치료제는 생체 내에서 알부민과 결합하여 알부민의 생리적 성질을 공유함으로써 본래 miRNA 억제제가 가지는 낮은 생체 안정성, 빠른 배출과 낮은 질병 부위 전달능으로 인한 부작용을 해결할 수 있으면서, 생체 내에서 별도의 전달체 없이도 우수한 암 발병 부위로의 축적 및 질병 치료 효과를 나타냄을 확인하여 암 치료제로 활용가능하다.

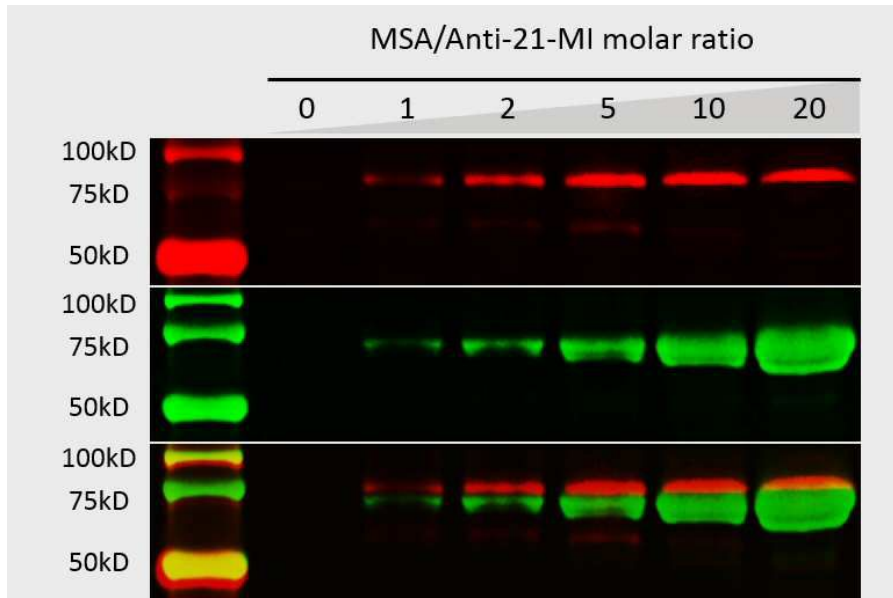
본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예 및 실험예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

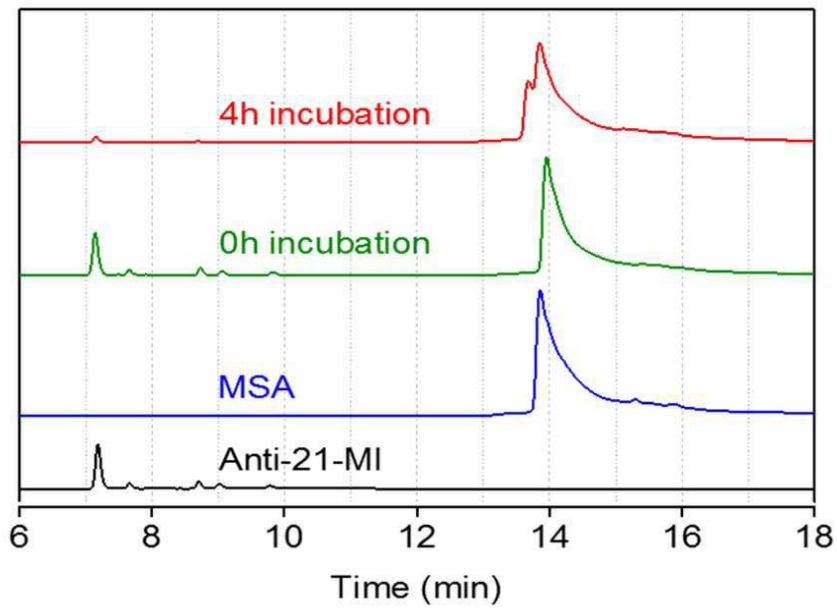
도면1a



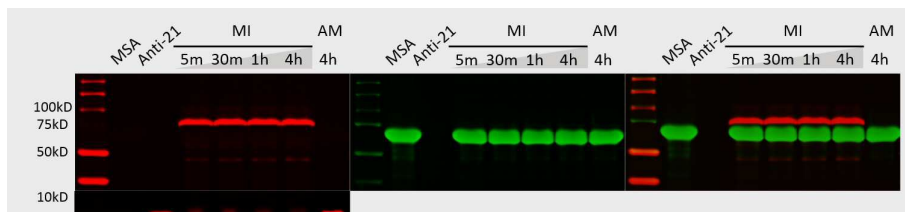
도면1b



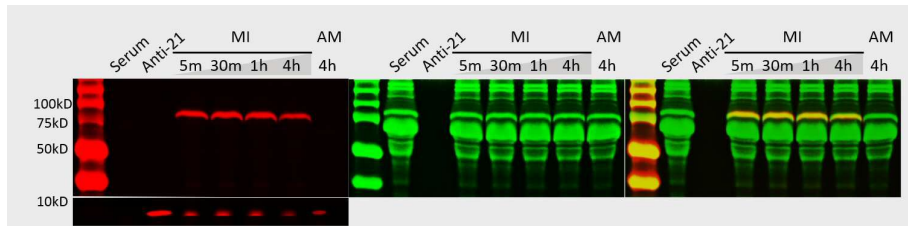
도면1c



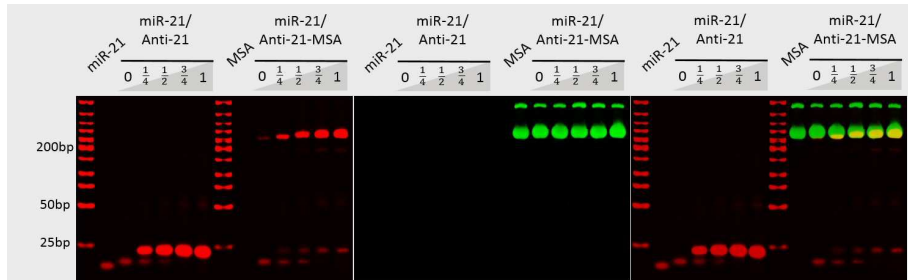
도면1d



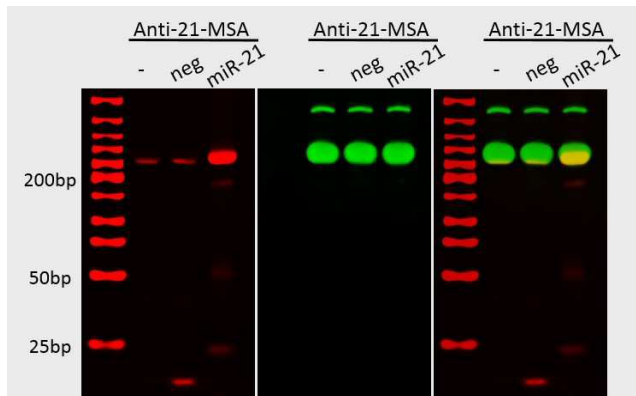
도면1e



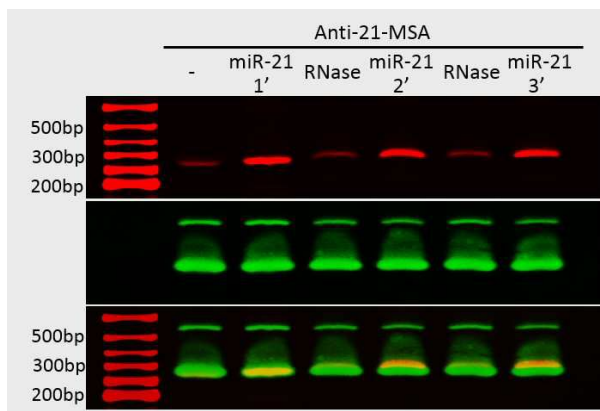
도면2a



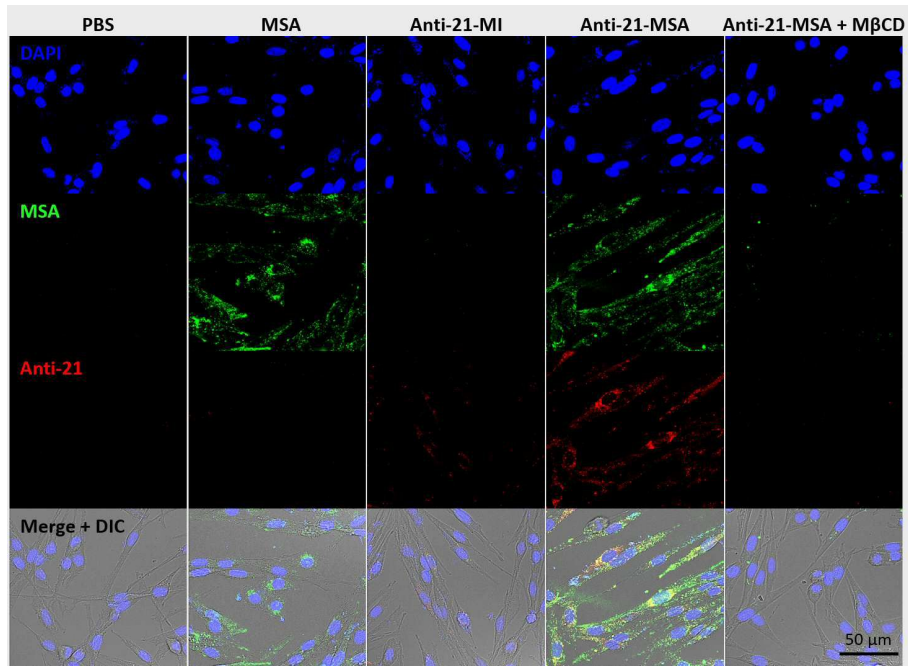
도면2b



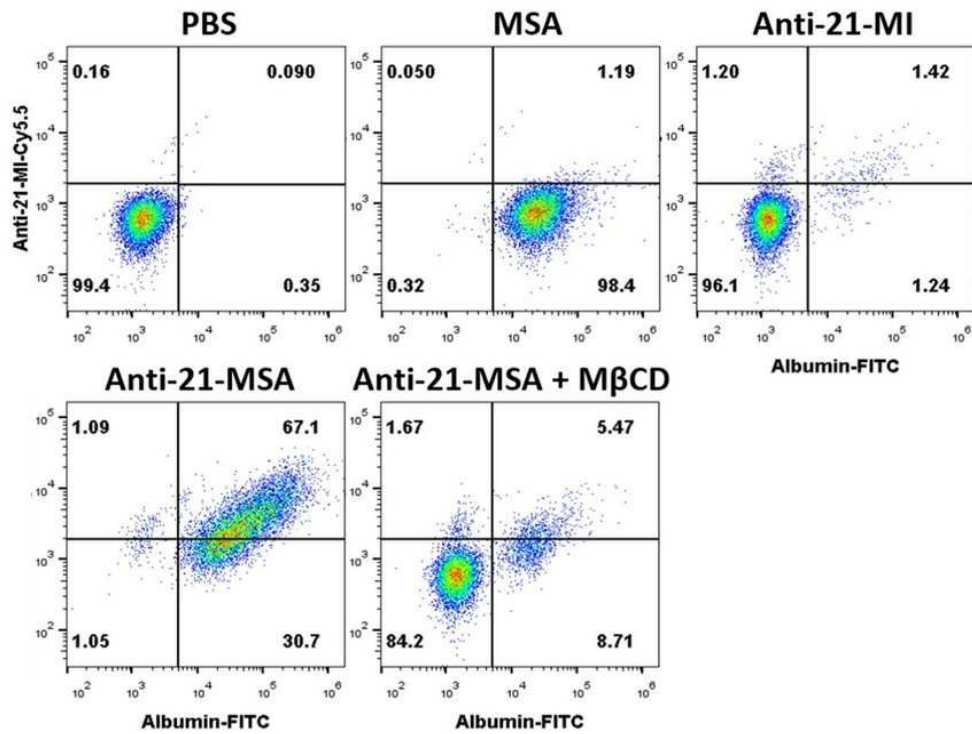
도면2c



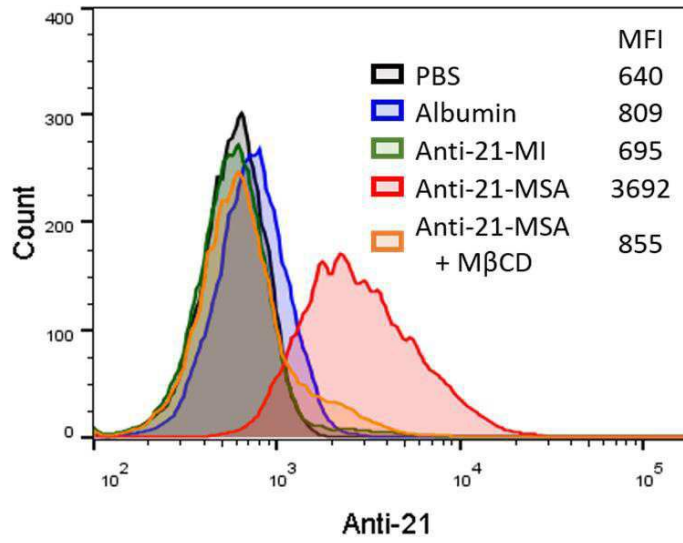
도면3a



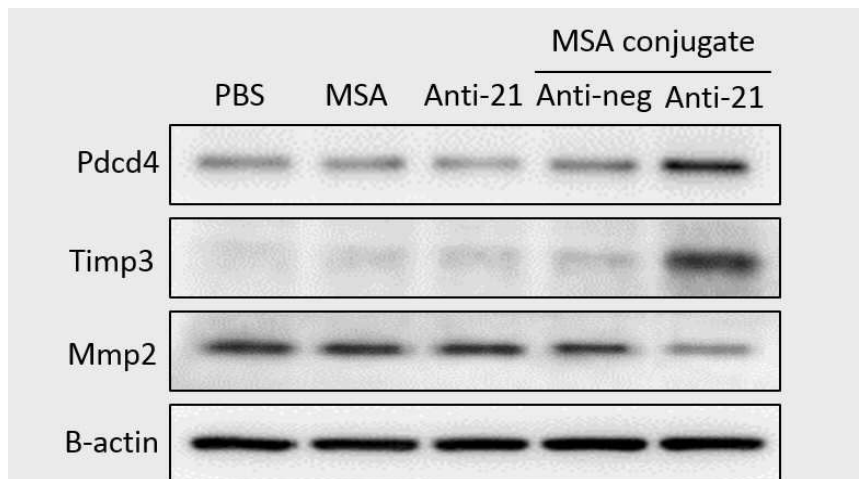
도면3b



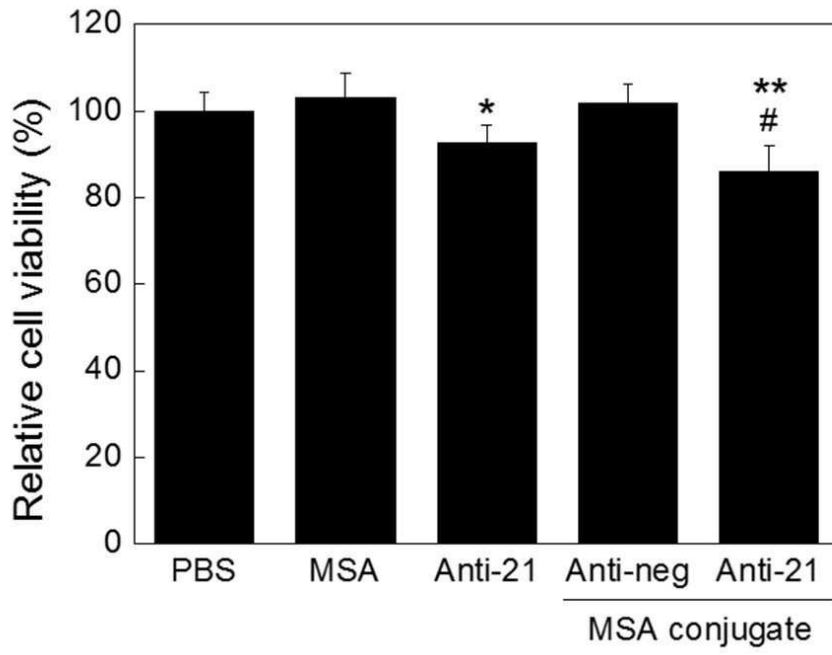
도면3c



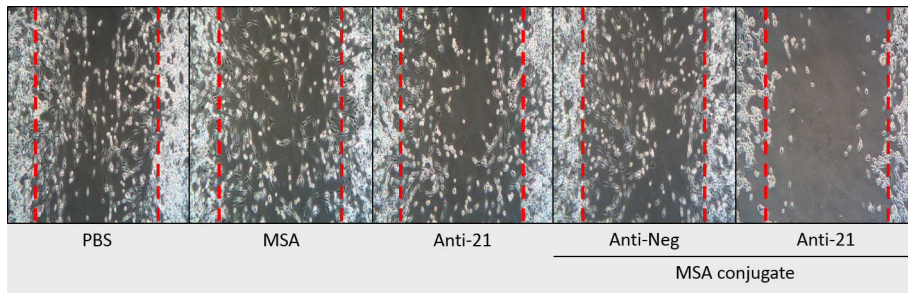
도면4a



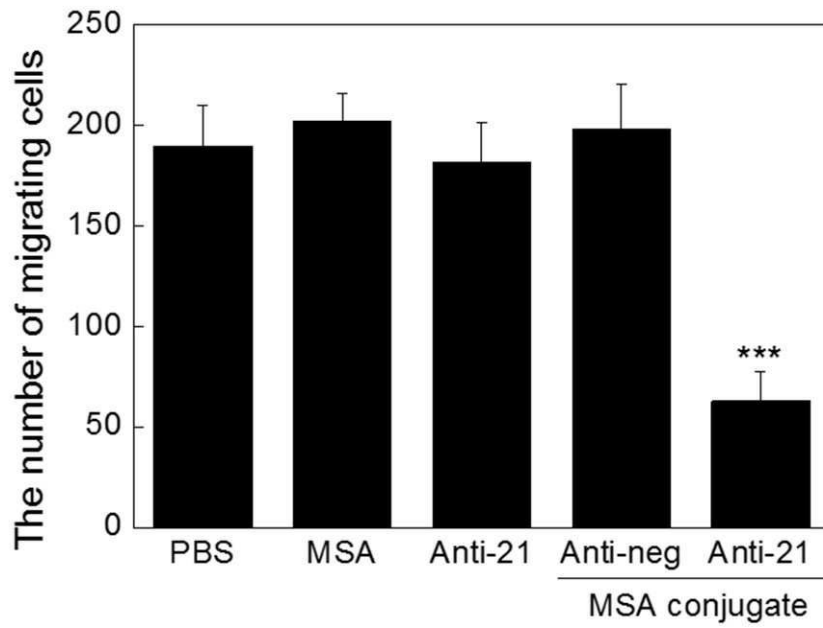
도면4b



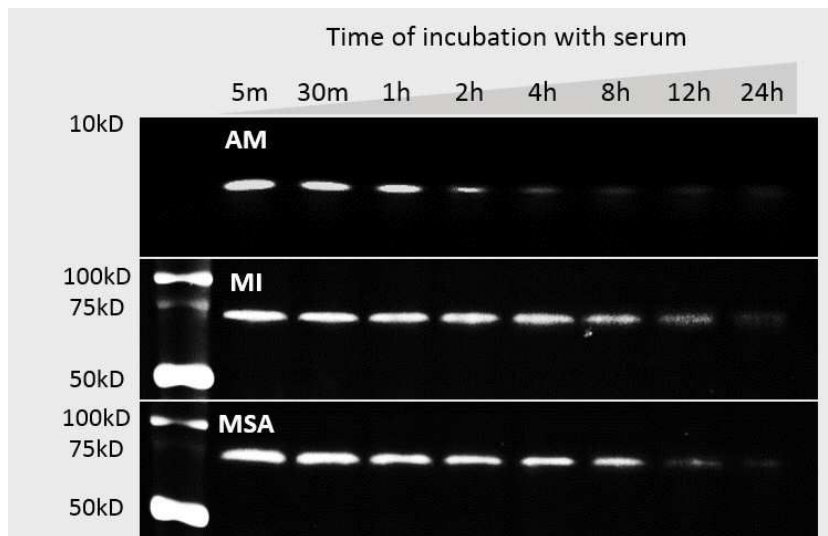
도면4c



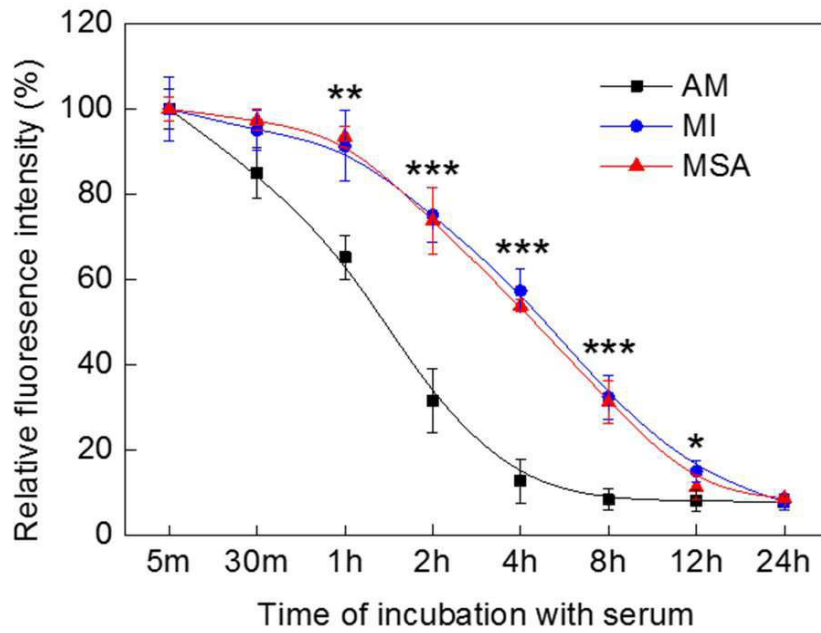
도면4d



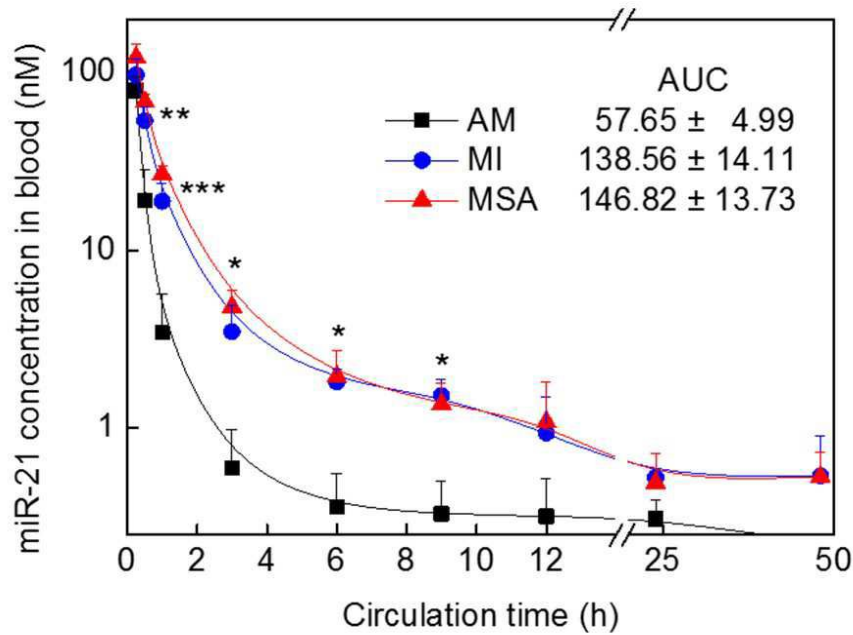
도면5a



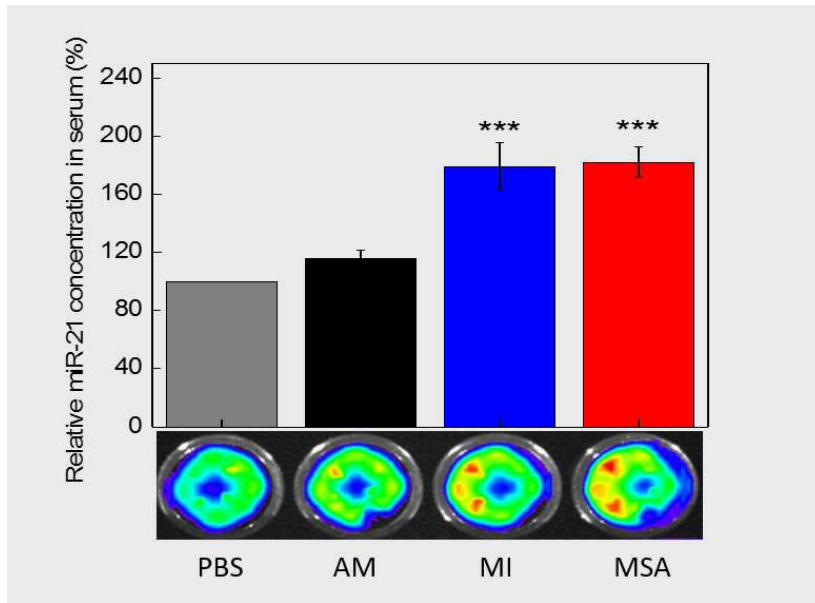
도면5b



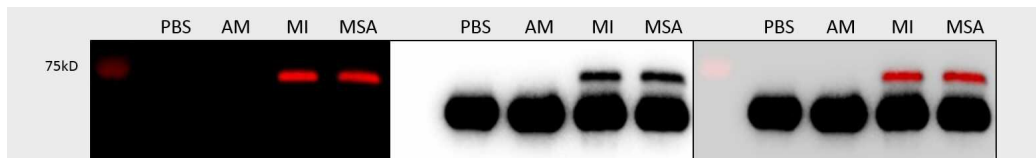
도면5c



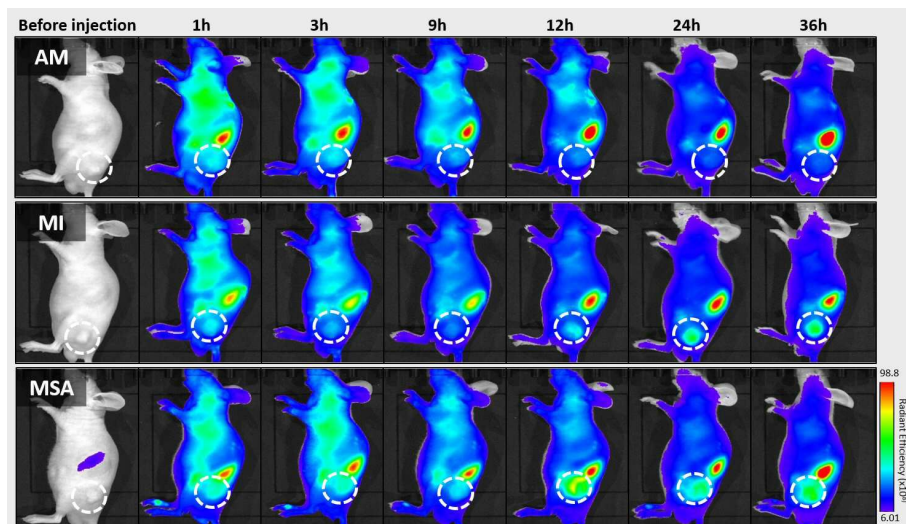
도면5d



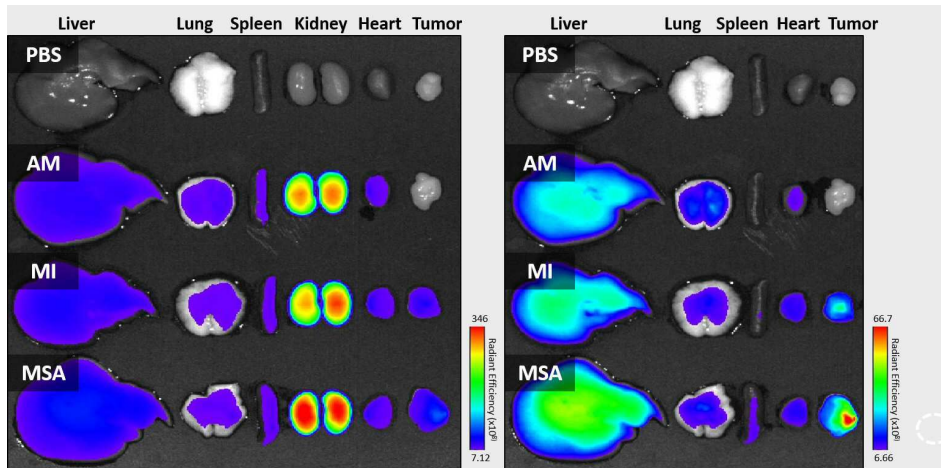
도면5e



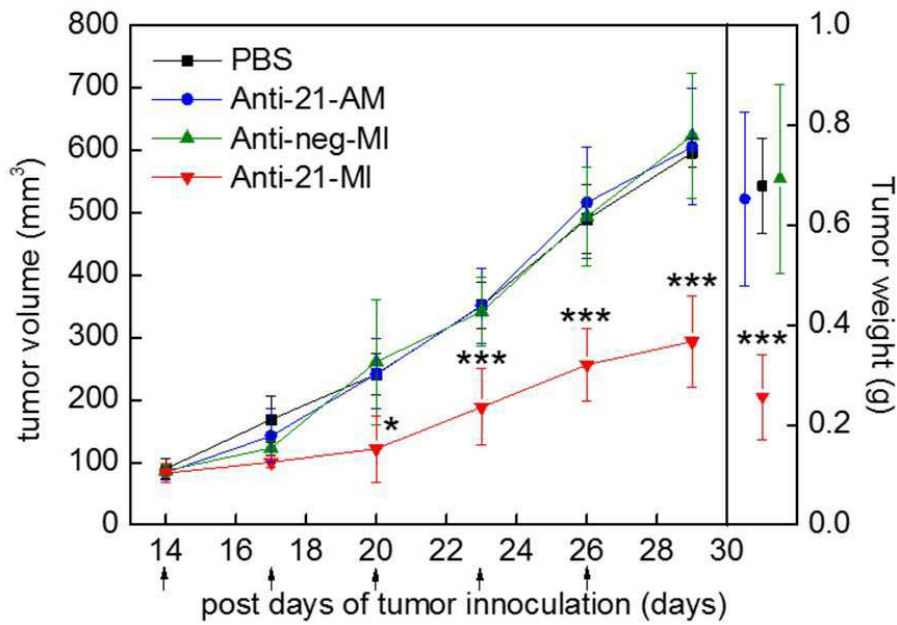
도면6a



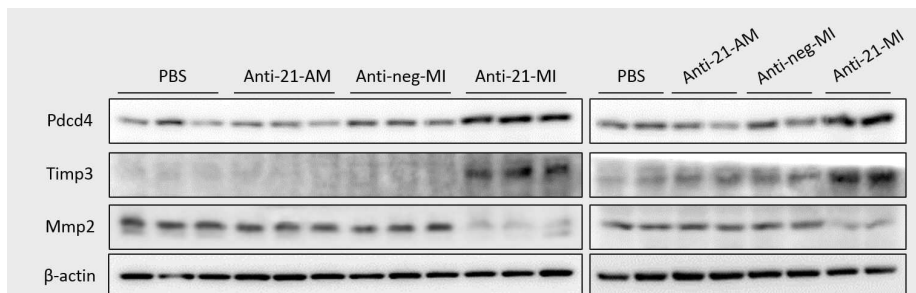
도면6b



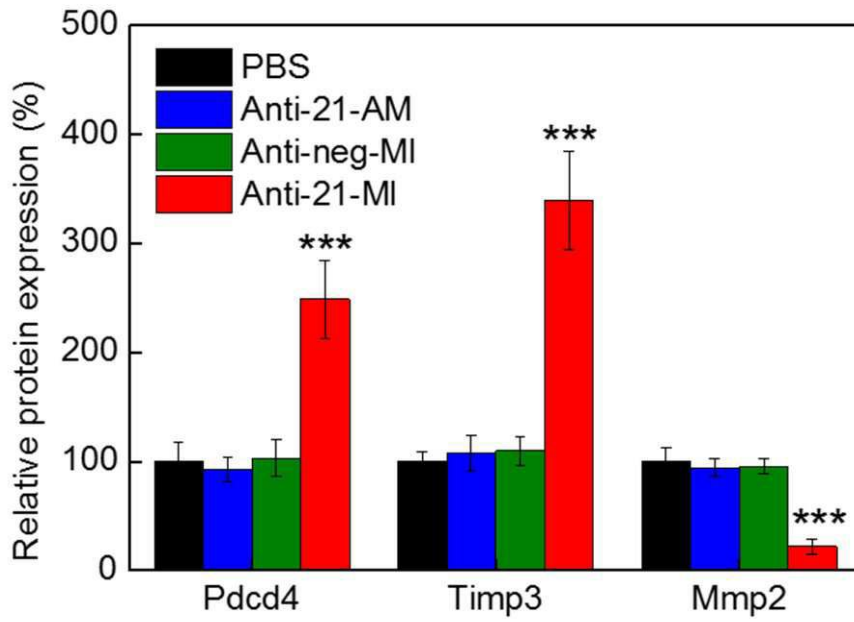
도면7a



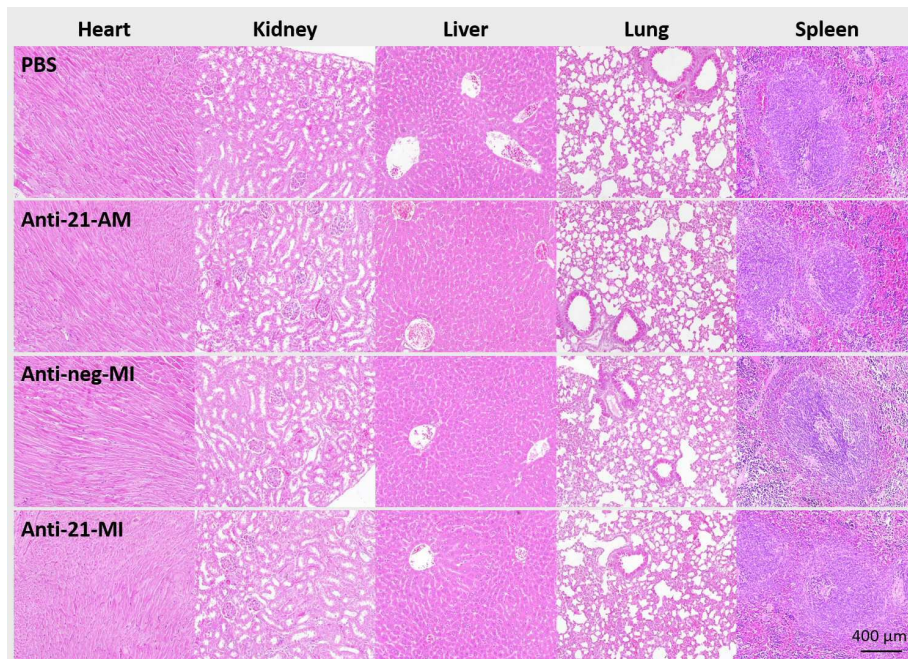
도면7b



도면7c



도면8



서열 목록

- <110> Korea Institute of Science and Technolog
- <120> Therapeutic agent for treating cancer comprising
anti-microRNA-albumin composite
- <130> PD18-5667
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> anti-21-AM

<400> 1

tcaacatcag tctgataagc ta

22

<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> anti-21-AM(backbone modified)

<220><221> variation

<222> (1)..(6)

<223> phosphorothioate nucleic acid

<220><221> variation

<222> (17)..(22)

<223> phosphorothioate nucleic acid

<220><221> variation

<222> (2)

<223> locked nucleic acid

<220><221> variation

<222> (5)

<223> locked nucleic acid

<220><221> variation

<222> (8)

<223> locked nucleic acid

<220><221> variation

<222> (11)

<223> locked nucleic acid

<220><221> variation

<222> (14)

<223> locked nucleic acid

<220><221> variation
 <222> (17)
 <223> locked nucleic acid
 <220><221> variation
 <222> (20)
 <223> locked nucleic acid
 <400> 2
 tcaacatcag tctgataagc ta 22
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-neg-AM
 <400> 3
 gcgtattata gccgattaac ga 22
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > anti-neg-AM(backbone modified)
 <220><221> variation
 <222> (1)..(6)
 <223> phosphorothioate nucleic acid
 <220><221> variation
 <222> (17)..(22)
 <223> phosphorothioate nucleic acid
 <220><221> variation
 <222> (2)
 <223> locked nucleic acid
 <220><221> variation
 <222> (5)
 <223> locked nucleic acid
 <220><221> variation
 <222> (8)

<223> locked nucleic acid

<220><221> variation

<222> (11)

<223> locked nucleic acid

<220><221>

variation

<222> (14)

<223> locked nucleic acid

<220><221> variation

<222> (17)

<223> locked nucleic acid

<220><221> variation

<222> (20)

<223> locked nucleic acid

<400> 4

gcgtattata gccgattaac ga

22