



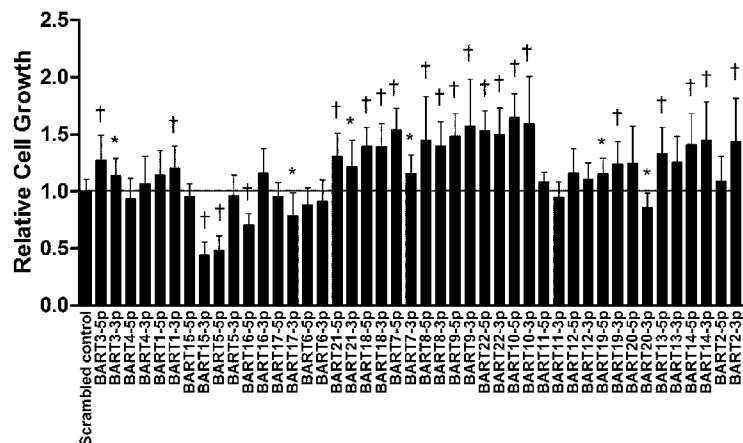
- (51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/004149
- (22) 국제출원일: 2012년 5월 24일 (24.05.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0049812 2011년 5월 25일 (25.05.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 가톨릭대학교 산학협력단 (CATHOLIC UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 서울시 서초구 반포동 505 번지 가톨릭대학교 산학협력단, 137-040 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 이숙경 (LEE, Suk Kyeong) [KR/KR]; 서울시 강남구 대치2동 대치현대아파트 102-204, 135-842 Seoul (KR). 최호윤 (CHOL, Hoyun) [KR/KR]; 인천광역시 남구 용현 5동 금호아파트 5-405, 402-761 Incheon (KR).
- (74) 대리인: 리앤목특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 서울시 서초구 서초동 1575-1, 137-875 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR PROMOTING APOPTOSIS OR INHIBITING CELL GROWTH, COMPRISING EPSTEIN-BARR VIRUS MICRORNA

(54) 발명의 명칭 : 엡스타인바 바이러스 마이크로 알엔에이를 포함하는 세포사멸 촉진 또는 세포성장억제를 위한 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to uses of miRNA of the Epstein-Barr virus (EBV) for promoting apoptosis and inhibiting cell growth, and in particular, to such uses of miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p, and mimics thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 엡스타인바바이러스 (Epstein-Barr virus : EBV) 의 miRNA, 특히 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 및 이들의 모방체(mimic)의 세포사멸(apoptosis) 촉진 및 세포성장(cell growth) 억제 용도와 관련된 것이다.



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 엡스타인바 바이러스 마이크로 알엔에이를 포함하는 세포사멸 촉진 또는 세포성장억제를 위한 조성물

기술분야

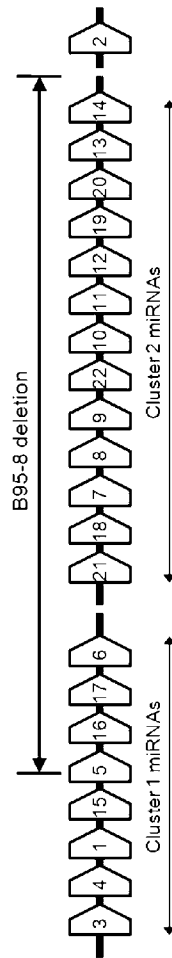
- [1] 본 발명은 엡스타인바바이러스 (Epstein-Barr virus :EBV) 의 miRNA, 특히 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 및 이들의 모방체(mimic)의 세포사멸(apoptosis) 촉진 또는 세포성장(cell growth) 억제 용도와 관련된 것이다.
- [2] 본 발명을 위한 연구는 가톨릭대학교 GRRC 사업 [과제고유번호: 가톨릭대 GRRC 2010-A01 과제명: RNA 기반 생체의약 선도분자 개발], [과제고유번호: 가톨릭대 GRRC 2011-B02 과제명: 바이러스를 이용한 생물 소재 및 항바이러스 물질 개발] 및 암정복추진연구개발사업 [과제고유번호 : 0920210 과제명: EBV 연관 종양에서 바이러스 BART microRNA의 종양원성 기전 규명] 에 의하여 지원되었다.

배경기술

- [3] 세포사멸(아포토시스 apoptosis)은 다세포 생명체의 정상적인 발달 및 기능에 중요한 과정이다. 생리학적 세포사멸은 다양한 정상적인 과정에서 중요한 역할을 수행하지만, 비정상적인 세포사멸은 다양한 질병을 일으킨다 (Science, 267, 1456-1462 (1995) ; *Biochem Biophys Res Commun.* 266(3), 699-717(1999)). 예를 들어, 세포사멸이 저해되면 암, 자가면역질환, 염증질환, 바이러스감염 등을 초래한다. 반대로, 과도한 세포사멸이 일어나면 퇴행성 신경질환이나 심장관련 질환이 발생한다. 따라서, 원하는 조직 또는 세포에서 세포사멸의 조절은 매우 가치가 있어, 세포사멸을 촉진하는 물질은 암이나 자가면역질환, 림프구증식성 질환, 염증질환, 바이러스감염과 같은 질환의 예방 및 치료에, 세포사멸을 저해하는 물질은 퇴행성 신경질환이나 심장관련 질환에 유용하다.
- [4] MicroRNAs (miRNAs)는 세포 내에서 만들어진 헤어핀 형태의 긴 전사체가 Drosha와 Dicer라는 효소에 의해 19 ~ 25 nt 길이로 잘려진 non-coding RNA들이다. MiRNA들은 타겟 유전자 mRNA의 3' untranslated region과 불완전한 염기 결합을 이루면 해독을 억제하지만, 염기 결합이 서로 완전히 상보적인 경우 mRNA의 분해를 유도한다.
- [5] 2004년, 바이러스로는 처음으로 EBV가 자체의 바이러스 miRNA를 발현한다는 것이 보고되었고 그 후 25개의 pre-miRNA가 발견되었다. 그 중 BART 전사체에서 만들어지는 22개의 pre-miRNA는 크게 Cluster 1과 Cluster 2로

나눠는데, 대다수의 EBV 연관 종양 및 세포주에서 발현된다.

[6]



[7]

EBV에 감염된 세포에서 발현되는 miR-BART5-5p는 pro-apoptotic 단백질인 PUMA의 발현을 저해하여 세포생존을 높인다고 보고되었다 (J Exp Med. 205(11), 2551-2560 (2008)). 한편, 종양원성이 있는 EBV 단백질인 LMP1은 발현이 낮을 때는 세포성장(cell growth)과 형질전환(transformation)을 유도하지만 발현이 높은 경우에는 세포생장을 억제시키는데, miR-BART1-5p, 16-5p, 17-5p가 LMP1의 발현을 저해하여 세포사멸을 감소시킨다고 보고되었다 (Proc Natl Acad Sci U S A. 104(41), 16164-16169 (2007)). miR-BART22-3p는 EBV latency 유지에 필요하다고 알려진 LMP2A의 발현을 저해하고 세포 성장과 사멸에는 영향을 주지 않으나 면역 회피에 기여할 것이라고 보고되었으며 (Neoplasia. 11(11), 1174-1184 (2009)), miR-BART2-5p는 EBV DNA polymerase인 BALF5를 타겟하여 EBV latency의 유지에 기여함과 동시에 내추럴킬러세포(natural killer cell)의 리간드인 MICB를 목표로 하여 내추럴킬러세포에 의한 면역 반응을 피한다고 알려졌다 (Nucleic Acids Res. 36(2), 666-675 (2008); Cell Host Microbe. 5(4), 376-385 (2009)). miR-BART6-5p는 miRNA biogenesis와 연관이 있는 Dicer를 타겟하며 latency 유지에 기여한다고 보고되었다(J Biol Chem. 285(43), 33358-33370 (2010)). 최근에, luciferase reporter assay를 통해 BART Cluster 1과

2에 있는 miRNA들이 pro-apoptotic 유전자인 Bim의 발현을 억제하고 세포 사멸 또한 저해하는 것을 입증하였으나, 어떤 특정 BART miRNA가 그 기능을 하는지는 찾아내지는 못하였다 (Virology. 412(2), 392-400 (2011)). 이처럼 EBV BART miRNA는 세포생장을 촉진하며 세포사멸을 저해하는 것으로 알려져 있다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명은 세포사멸을 촉진시키고 세포생장을 억제하는 물질을 찾고, 이를 이용하는 방법을 제공하는 것을 내용으로 한다.

과제 해결 수단

[10] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 EBV의 miRNA, 특히 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 또는 이들의 모방체(mimic)을 세포사멸 촉진 또는 세포생장 억제를 위하여 사용하는 용도를 제공한다.

[11] 본 발명의 발명자들은 BART miRNA들의 모방체를 double stranded RNA 형태로 합성하여 제작하고, EBV에 감염되지 않은 위암 세포주인 AGS에 형질주입(transfection)하여 그 효과를 조사한 결과, 예상치 않게 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p의 모방체들이 세포의 생장을 저해하고 세포 사멸을 촉진한다는 것을 밝혔다. 또한, 상기 BART miRNA들의 모방체의 세포 사멸 촉진효과는 항암제인 5-FU를 동시에 투여할 경우 시너지 효과를 나타내었다.

[12] 또한, 본 발명의 발명자들은 상기 세포사멸 촉진효과가 있는 BART miRNA들 및 그의 모방체들 중에서 대표적인 것인 miR-BART15-3p의 세포사멸 기전을 밝히기 위하여 그의 예상 타겟 유전자를 생물정보학적인 방법으로 선정하고 예상 타겟 유전자를 검정한 결과, miR-BART15-3p에 의하여 BIRC6의 단백질 레벨이 감소되고 TAX1BP1의 mRNA 레벨이 감소되는 것을 각각 웨스턴블롯 및 QRT-PCR로 확인함으로써 BIRC6과 TAX1BP가 타겟 유전자임을 밝혔다.

[13] 실험에 사용된 EBV BART miRNA의 모방체는 다음 표 1 및 2와 같다.

[14] 표 1

[Table 1]

miRNA name		Duplex sequence
ebv-miR-BART3-5p	sense	5'ACCUAGUGUUAGUGUUGUGCU 3'(서열번호 1)
ebv-miR-BART3-5p	antisense	5'AGCACAAACACUAAACACUAGGU 3'(서열번호 2)
ebv-miR-BART3-3p	sense	5'CGCACCACUAGUCACCAGGUGU 3'(서열번호 3)
ebv-miR-BART3-3p	antisense	5'ACACCUGGUGACUAGUGGUGCG 3'(서열번호 4)
ebv-miR-BART4-5p	sense	5'GACCUGAUGCUGCUGGUGUGCU 3'(서열번호 5)
ebv-miR-BART4-5p	antisense	5'AGCACACCAGCAGCAUCAGGUC 3'(서열번호 6)
ebv-miR-BART4-3p	sense	5'CACAUCACGUAGGCACCAGGUGU 3'(서열번호 7)
ebv-miR-BART4-3p	antisense	5'ACACCUGGUGCCUACGUGAUGUG 3'(서열번호 8)
ebv-miR-BART1-5p	sense	5'UCUUAGUGGAAGUGACGUGCUGUG 3'(서열번호 9)
ebv-miR-BART1-5p	antisense	5'CACAGCACGUCACUUCCACUAAGA 3'(서열번호 10)
ebv-miR-BART1-3p	sense	5'UAGCACCGCUAUCCACUAUGUC 3' (서열번호 11)
ebv-miR-BART1-3p	antisense	5'GACAUAGUGGAUAGCGGUGCUA 3' (서열번호 12)
ebv-miR-BART15-5p	sense	5'AGGGAAACAUGACCACCUGAAGUC 3'(서열번호 13)
ebv-miR-BART15-5p	antisense	5'GACUUCAGGUGGUCAUGUUUCCCU 3'(서열번호 14)
ebv-miR-BART15-3p	sense	5'GUCAGUGGUUUUGUUUCCCUUGA 3'(서열번호 15)
ebv-miR-BART15-3p	antisense	5'UCAAGGAAACAAAACCACUGAC 3'(서열번호 16)

ebv-miR-BART5-5p	sense	5'CAAGGUGAAUAUAGCUGCCCAUCG 3'(서열번호 17)
ebv-miR-BART5-5p	antisense	5'CGAUGGGCAGCUAUAUUCACCUUG 3'(서열번호 18)
ebv-miR-BART5-3p	sense	5'GUGGGCCGCUGUUCACCU 3' (서열번호 19)
ebv-miR-BART5-3p	antisense	5'AGGUGAACAGCGGCCAC 3' (서열번호 20)
ebv-miR-BART16-5p	sense	5'UUAGAUAGAGUGGGUGUGUCUCU 3'(서열번호 21)
ebv-miR-BART16-5p	antisense	5'AGAGCACACACCCACUCUAUCUAA 3'(서열번호 22)
ebv-miR-BART16-3p	sense	5'AUCACCACCCUCUAUCCAUAU 3' (서열번호 23)
ebv-miR-BART16-3p	antisense	5'AUAUGGAUAGAGGGUGGUGAU 3' (서열번호 24)
ebv-miR-BART17-5p	sense	5'UAAGAGGACGCAGGCAUACAAG 3'(서열번호 25)
ebv-miR-BART17-5p	antisense	5'CUUGUAUGCCUGCGUCCUCUUA 3'(서열번호 26)
ebv-miR-BART17-3p	sense	5'UGUAUGCCUGGUGUCCCCUAGU 3'(서열번호 27)
ebv-miR-BART17-3p	antisense	5'ACUAAGGGGACACCAGGCAUACA 3'(서열번호 28)
ebv-miR-BART6-5p	sense	5' UAAGGUUGGUCCAAUCCAUAAGG 3'(서열번호 29)
ebv-miR-BART6-5p	antisense	5' CCUAUGGAUUGGACCAACCUUA 3'(서열번호 30)
ebv-miR-BART6-3p	sense	5' CGGGGAUCGGACUAGCCUUAGA 3' (서열번호 31)
ebv-miR-BART6-3p	antisense	5' UCUAAGGCUAGUCCGAUCCCCG 3' (서열번호 32)

[15] <Cluster 1 BART miRNA 모방체의 센스 및 안티센스 서열>

[16] 표 2

[Table 2]

ebv-miR-BART21-5p	Sense	5'UCACUAGUGAAGGCAACUAAAC 3'(서열번호 33)
	Antisense	5'GUUAGUUGCCUUCACUAGUGA 3'(서열번호 34)
ebv-miR-BART21-3p	Sense	5'CUAGUUGUGCCCACUGGUGUUU 3'(서열번호 35)
	Antisense	5'AAACACCAGUGGGCACAACUAG 3'(서열번호 36)
ebv-miR-BART18-5p	Sense	5'UCAAGUUCGCACUUCCUAUACA 3'(서열번호 37)
	Antisense	5'UGUAUAGGAAGUGCGAACUUGA 3'(서열번호 38)
ebv-miR-BART18-3p	Sense	5'UAUCGGAAGUUUGGGCUUCGUC 3'(서열번호 39)
	Antisense	5'GACGAAGCCCAAACUUCCGAUA 3'(서열번호 40)
ebv-miR-BART7-5p	Sense	5'CCUGGACCUUGACUAUGAAACA 3'(서열번호 41)
	Antisense	5'UGUUUCAUAGUCAAGGUCCAGG 3'(서열번호 42)
ebv-miR-BART7-3p	Sense	5'CAUCAUAGUCCAGUGUCCAGGG 3'(서열번호 43)
	Antisense	5'CCCUGGACACUGGACUAUGAUG 3'(서열번호 44)
ebv-miR-BART8-5p	Sense	5'UACGGUUUCCUAGAUGUACAG 3'(서열번호 45)
	Antisense	5'CUGUACAAUCUAGGAAACCGUA 3'(서열번호 46)
ebv-miR-BART8-3p	Sense	5'GUCACAAUCUAUGGGGUCGUAGA 3'(서열번호 47)
	Antisense	5'UCUACGACCCCAUAGAUGUGAC 3'(서열번호 48)

ebv-miR-BART9-5p	Sense	5'UACUGGACCCUGAAUUGGAAAC 3'(서열번호 49)
	Antisense	5'GUUCCAAUUCAGGGUCCAGUA 3'(서열번호 50)
ebv-miR-BART9-3p	Sense	5'UACACUUCAUGGGUCCCGUAGU 3'(서열번호 51)
	Antisense	5'ACUACGGGACCCAUGAAGUGUUA 3'(서열번호 52)
ebv-miR-BART22-5p	Sense	5'UGCUAGACCCUGGAGUUGAACC 3'(서열번호 53)
	Antisense	5'GGUUCAACUCCAGGGUCUAGCA 3'(서열번호 54)
ebv-miR-BART22-3p	Sense	5'UUACAAAGUCAUGGUCUAGUAGU 3'(서열번호 55)
	Antisense	5'ACUACUAGACCAUGACUUUGUAA 3'(서열번호 56)
ebv-miR-BART10-5p	Sense	5'GCCACCUCUUUGGUUCUGUACA 3'(서열번호 57)
	Antisense	5'UGUACAGAACCAAAGAGGUGGC 3'(서열번호 58)
ebv-miR-BART10-3p	Sense	5'UACAUAACCAUGGAGUUGGCUGU 3'(서열번호 59)
	Antisense	5'ACAGCCAACUCCAUGGUUAUGUA 3'(서열번호 60)
ebv-miR-BART11-5p	Sense	5'UCAGACAGUUUGGUGCGCUAGUUG 3'(서열번호 61)
	Antisense	5'CAACUAGCGCACCAAACUGUCUGA 3'(서열번호 62)
ebv-miR-BART11-3p	Sense	5'ACGCACACCAGGCUGACUGCC 3'(서열번호 63)
	Antisense	5'GGCAGUCAGCCUGGUGUGCGU 3'(서열번호 64)

ebv-miR-BART12-5p	Sense	5'ACCCGCCCAUCACCACCGGAC 3'(서열번호 65)
	Antisense	5'GUCCGGUGGUGAUGGGCGGGU 3'(서열번호 66)
ebv-miR-BART12-3p	Sense	5'UCCUGUGGUGUUUGGUGUGGUU 3'(서열번호 67)
	Antisense	5'AACCACACCAAACACCACAGGA 3'(서열번호 68)
ebv-miR-BART19-5p	Sense	5'ACAUUCCCCGCAAACAUGACAUG 3'(서열번호 69)
	Antisense	5'CAUGUCAUGUUUGCGGGGAAUGU 3'(서열번호 70)
ebv-miR-BART19-3p	Sense	5'UUUUGUUUGCUUGGGAAUGCU 3'(서열번호 71)
	Antisense	5'AGCAUUCCCAAGCAAACAAAA 3'(서열번호 72)
ebv-miR-BART20-5p	Sense	5'UAGCAGGCAUGUCUUCAUUCC 3'(서열번호 73)
	Antisense	5'GGAAUGAAGACAUGCCUGCUA 3'(서열번호 74)
ebv-miR-BART20-3p	Sense	5'CAUGAAGGCACAGCCUGUUACC 3'(서열번호 75)
	Antisense	5'GGUAAACAGGCUGUGCCUUAUG 3'(서열번호 76)
ebv-miR-BART13-5p	Sense	5'AACCGGCUCGUGGCUCGUACAG 3'(서열번호 77)
	Antisense	5'CUGUACGAGCCACGAGCCGGUU 3'(서열번호 78)
ebv-miR-BART13-3p	Sense	5'UGUAACUUGCCAGGGACGGCUGA 3'(서열번호 79)
	Antisense	5'UCAGCCGUCCCUGGCAAGUUACA 3'(서열번호 80)

ebv-miR-BART14-5p	Sense	5'UACCCUACGCUGCCGAUUUACA 3'(서열번호 81)
	Antisense	5'UGUAAAUCGGCAGCGUAGGGUA 3'(서열번호 82)
ebv-miR-BART14-3p	Sense	5'UAAAUGCUGCAGUAGUAGGGAU 3'(서열번호 83)
	Antisense	5'AUCCCUACUACUGCAGCAUUUA 3'(서열번호 84)
ebv-miR-BART2-5p	Sense	5'UAUUUUCUGCAUUCGCCCUUGC 3'(서열번호 85)
	Antisense	5'GCAAGGGCGAAUGCAGAAAAUA 3'(서열번호 86)
ebv-miR-BART2-3p	Sense	5'AAGGAGCGAUUUGGAGAAAAUAAA 3'서열번호 87)
ebv-miR-BART2-3p	Antisense	5'UUUAUUUUCUCCAAAUCGCUCCUU 3'서열번호 88)

[17] < cluster 2 BART miRNA 모방체의 센스 및 안티센스 서열>

[18]

[19] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[20] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다.

[21]

발명의 효과

[22] 본 발명의 EBV의 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 또는 그의 모방체는 세포사멸의 촉진 및 세포생장 억제 효과가 있으므로, 세포생장을 억제하고 세포사멸을 촉진하기 위한 조성물, 세포사멸의 저해 또는 세포의 이상 증식으로 기인하는 질환의 예방 또는 치료 방법, 그를 위한 조성물 또는 키트에 사용될 수 있다.

[23]

도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 개별 EBV BART miRNA 모방체가 AGS 세포주의 세포 생장에 미치는 영향을 관찰한 결과이다. $n=9$, *은 $P < 0.05$, †은 $P < 0.01$ 을 나타낸다.
- [25] 도 2는 miR-BART5-5p와 miR-BART15-3p 모방체의 처리시간에 따른 AGS 세포주의 세포 생장에 미치는 영향을 조사한 것이다. $n=3$, †: $P < 0.01$
- [26] 도 3은 miR-BART5-5p, miR-BART15-3p 또는 miR-BART20-3p의 모방체의 처리 농도에 따른 AGS 세포주의 세포 생장에 미치는 영향을 조사한 것이다. $n=6$, †: $P < 0.01$
- [27] 도 4 및 도 5는 miR-BART5-5p와 miR-BART15-3p 모방체만을 처리한 경우와 5-FU와 병행처리한 경우, Propidium Iodide(PI) staining으로 AGS 세포주의 세포 주기에 미치는 영향을 관찰한 결과이다. $n=3$, *: $P < 0.05$, †: $P < 0.01$.
- [28] 도 6은 개별 BART miRNA 모방체와 5-FU를 병행처리하고, PI staining 으로 AGS 세포주의 세포 주기에 미치는 영향을 관찰한 결과이다. $n=6$, *: $P < 0.05$, †, $P < 0.01$.
- [29] 도 7은 Annexin V staining 으로 miR-BART5-5p와 miR-BART15-3p 모방체를 단독으로 처리한 경우와 5-FU와 병행처리한 경우의 세포 사멸 효과를 조사한 결과이다.
- [30] 도 8은 개별 BART miRNA 모방체와 5-FU를 병행처리한 경우, Annexin V staining으로 AGS 세포주의 세포 사멸에 미치는 영향을 관찰한 결과이다. $n=9$, *: $P < 0.05$, †: $P < 0.01$.
- [31] 도 9 및 도 10은 miR-BART15-3p가 타겟할 가능성이 있는 유전자의 타겟 여부를 확인한 결과이다. 상단의 그림은 miRNA 타겟 검정에 특화된 벡터인 psiCHECK의 모식도이고, 하단은 Luciferase reporter assay로 miR-BART15-3p가 타겟할 가능성이 있는 유전자를 검정한 결과이다. $n=3$, ; †, $p < 0.01$.
- [32] 도 11은 miR-BART15-3p가 BIRC6 3'UTR을 직접 타겟하는지를 확인한 결과이다. A는 psiC-BIRC6, BIRC6m1, BIRC6m2, B7IRC6m1m2에 존재하는 miR-BART15-3p의 예상 binding site를 나타낸 것이다. B는 HEK293T 세포에 각각의 벡터와 miR-BART15-3p를 함께 전달하여 luciferase reporter assay 실시한 결과이다.
- [33] 도12는 타겟으로 확인된 유전자의 mRNA 및 protein 레벨에 대한 miR-BART15-3p의 영향을 확인한 것이다. A. miR-BART15-3p가 전달된 AGS에서 BIRC6의 mRNA level을 QRT-PCR로 확인한 결과. B. miR-BART15-3p가 전달된 AGS에서 BIRC6의 protein level을 Western blot으로 확인결과. C. miR-BART15-3p 저해제가 전달된 AGS-EBV에서 BIRC6 mRNA level을 QRT-PCR로 확인한 결과. D. miR-BART15-3p 저해제가 전달된 AGS-EBV에서 BIRC6 protein level을 Western blot으로 조사한 결과. E. miR-BART15-3p가 전달된 AGS에서 TAX1BP1 mRNA level을 QRT-PCR로 조사한 결과.
- [34]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [35] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용을 한정하지 않는다.
- [36]
- [37] <실시예 1> BART miRNA 모방체의 제작
- [38] Mature 형태의 BART miRNA 모방체들의 합성은 Genolution Pharmaceuticals(Seoul, Korea)에서 의뢰하여 제작하였고 그 서열을 표 1 및 표 2에 표시하였다.
- [39]
- [40] <실시예 2> 세포 배양 및 형질전환
- [41] 위암 세포주인 AGS 세포주(한국세포주은행)는 소태아혈청(fetal bovine serum) 10%를 첨가한 RPMI1640(Gibco) 배지에서 배양하였다. Mature 형태의 합성 BART miRNA들은 G-fectin(Genolution)을 사용하여 제조사의 프로토콜을 따라서 AGS 세포주에 전달되었다.
- [42]
- [43] <실시예 3> 세포생장 시험 (CCK-8 어세이)
- [44] 개별 EBV BART miRNA가 AGS 세포주의 세포 생장에 미치는 영향을 조사하기 위해, AGS 세포주에 합성한 miRNA mimic를 transfection하고 72시간 경과 후 CCK-8 어세이로 세포 수의 변화를 측정하였다. CCK-8 어세이는 테트라졸리움염(tetrazolium salt)이 미토콘드리아의 dehydrogenase 등의 효소에 의해 쉽게 환원되어 유색의 포르마잔(formazan)으로 전환되므로 이를 측정하여 세포의 수를 측정하는 분석 방법이다.
- [45] EBV 음성 세포주인 AGS 세포주를 96 well plate에 1×10^3 cells/well 분주한 직후 합성한 miRNA(10 nM)를 G-fectin을 이용하여 형질주입(transfection)하였다. 형질주입 후, 실험 목적에 따라 37°C 세포 배양기에서 배양 후 CCK-8을 각 well당 $10 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 37°C 세포 배양기에서 2시간 반응시키고 ELISA 측정기로 흡광도를 측정하였다.
- [46] 놀랍게도 miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART16-5p, miR-BART17-3p 및 miR-BART20-3p의 모방체는 세포 성장을 억제하는 것을 관찰하였다(표 3 및 도 1).
- [47] 표 3

[Table 3]

	Relative Cell Growth	표준편차	p value
Scrambled control	1	± 0.105353	
BART3-5p	1.272325	± 0.217357	0.00544481
BART3-3p	1.134944	± 0.151438	0.04557112
BART4-5p	0.934781	± 0.177295	0.36007269
BART4-3p	1.064824	± 0.240507	0.47442005
BART1-5p	1.141337	± 0.213522	0.10024868
BART1-3p	1.201069	± 0.192482	0.01763492
BART15-5p	0.954474	± 0.112565	0.38881645
BART15-3p	0.567640	± 0.115939	1.0446E-08
BART5-5p	0.523116	± 0.125143	5.8566E-08
BART5-3p	0.958293	± 0.185292	0.56725316
BART16-5p	0.704990	± 0.097954	1.3912E-05
BART16-3p	1.158869	± 0.216577	0.07123824
BART17-5p	0.955098	± 0.121512	0.41459821
BART17-3p	0.786497	± 0.200822	0.01533499
BART6-5p	0.880951	± 0.150107	0.07181715
BART6-3p	0.910063	± 0.190801	0.23941914
BART21-5p	1.303997	± 0.204928	0.00190053
BART21-3p	1.214906	± 0.230037	0.02708391
BART18-5p	1.394629	± 0.167148	4.5047E-05
BART18-3p	1.392545	± 0.199891	0.00021762
BART7-5p	1.538728	± 0.185522	4.0421E-06
BART7-3p	1.156463	± 0.162895	0.02973117
BART8-5p	1.447761	± 0.383293	0.00813662
BART8-3p	1.395663	± 0.210488	0.00028794
BART9-5p	1.481661	± 0.197746	3.1646E-05
BART9-3p	1.569261	± 0.412069	0.00303969

BART22-5p	1.529268	± 0.173392	2.8427E-06
BART22-3p	1.495125	± 0.233896	0.000121
BART10-5p	1.646048	± 0.208024	2.5367E-06
BART10-3p	1.591101	± 0.414520	0.00097895
BART11-5p	1.079796	± 0.086483	0.09942768
BART11-3p	0.945864	± 0.134622	0.35714111
BART12-5p	1.158610	± 0.214861	0.07006222
BART12-3p	1.102165	± 0.143919	0.10628436
BART19-5p	1.151466	± 0.136228	0.01861102
BART19-3p	1.236815	± 0.195064	0.00756775
BART20-5p	1.245400	± 0.324239	0.0561646
BART20-3p	0.857667	± 0.125343	0.01903579
BART13-5p	1.325692	± 0.235629	0.0030181
BART13-3p	1.254611	± 0.227980	0.01121857
BART14-5p	1.408238	± 0.271466	0.00181178
BART14-3p	1.446585	± 0.336094	0.00346446
BART2-5p	1.084926	± 0.222797	0.3234295
BART2-3p	1.432948	± 0.382729	0.00965267

[48]

[49] <실시예 4> 처리시간에 따른 세포생장에 미치는 영향

[50] 실시예 3에 기재된 방법으로 miR-BART5-5p 모방체 또는 miR-BART15-3p 모방체 (10 nM)를 AGS 세포주에 전달하고 시간별로 세포 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 두 EBV BART miRNA 모두 세포 생장을 크게 감소시키고 특히 miR-BART15-3p 모방체의 경우 세포 생장이 거의 이루어지지 않은 것을 관찰하였다(도 2).

[51]

[52] <실시예 5> 모방체의 농도에 따른 세포생장에 미치는 영향

[53] miR-BART5-5p, miR-BART15-3p, miR-BART20-3p를 AGS 세포주 (1x10³ cells/well)에 1, 3, 10, 30 nM의 농도로 전달하고 세포 생장에 미치는 영향을 조사하였다. AGS 세포주를 96 well plate에 1x10³cells/well 분주한 직후 합성한 miRNA를 G-fectin을 이용하여 형질주입(transfection)하였다. Transfection 72 시간 뒤에 CCK-8을 각 well당 10 μ l씩 분주하고 37°C 세포 배양기에서 2시간 배양 후 ELISA 측정기로 흡광도를 측정하였다. miR-BART15-3p의 경우 3 nM에서

scrambled control에 비해 50% 감소된 세포생장을 보였고 10 nM과 30 nM에서는 세포생장이 거의 이루어지지 않았다. miR-BART5-5p는 10 nM에서부터 세포생장을 저해하는 경향이 보였다. miR-BART20-3p는 10 nM부터 세포생장이 감소하기 시작하여 30 nM에서는 거의 세포생장이 이루어지지 않았다(도 3).

[54]

[55] <실시예 6> 세포주기에 미치는 영향(**Propidium Iodide staining**)

[56] 개별 EBV BART miRNA가 AGS 세포주의 세포 주기에 미치는 영향을 관찰하였다. miR-BART5-5p 또는 miR-BART15-3p 모방체를 단독으로 혹은 5-FU 병행 처리시 AGS 세포주의 세포 주기에 미치는 영향을 관찰하였다.

[57] AGS세포를 6 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하고 합성한 miRNA(10 nM)를 전달 후 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. 형질도입 24시간 후, 항암제인 5-FU 10 uM을 처리하거나 처리하지 않고 48시간 동안 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. Trypsin-EDTA로 세포를 떼어내고 PBS로 washing을 2회 실시한 이후에 Propidium iodide staining으로 cell cycle 변화가 일어나는 비율을 FACS (Fluorescence-activated cell sorting)로 확인하였다 (도 4 및 도 5).

[58] miR-BART15-3p 모방체를 단독으로 전달받은 AGS 세포는 scrambled control을 처리한 경우보다 sub G1의 비율이 현저히 높아져 세포 사멸이 촉진되는 것을 보여주었다. 또한, miR-BART5-5p와 miR-BART15-3p 모방체 모두 5-FU 처리 후에 apoptotic cell에 해당하는 sub G1의 비율을 크게 증가시켰다.

[59]

[60] <실시예 7> 항암제와의 병행처리시의 세포주기에 미치는 영향(**Propidium Iodide staining**)[61] EBV 음성 세포주인 AGS 세포주를 6 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주한 직후 합성한 miRNA(10 nM)를 G-fectin을 이용하여 형질도입하고 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. 형질도입 24시간 후 항암제인 5-FU 10 uM을 처리하고 48시간 동안 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. Trypsin-EDTA로 세포를 떼어내고 PBS로 2회 washing한 이후에 Propidium iodide 염색으로 DNA를 염색하고 cell cycle 변화가 일어나는 비율을 FACS로 분석하여 세포주기(cell cycle) 변화를 조사하였다.

[62] FACS 측정 결과 miR-BART4-5p, 5-5p, 6-3p, 15-3p, 16-5p 17-3p, 12-5p, 12-3p, 19-5p, 19-3p, 20-5p, 20-3p, 13-5p의 모방체를 처리한 경우 sub G1의 비율이 증가하여 세포주기를 저해함을 관찰하였다 (표 4 및 도 6).

[63] 표 4

[Table 4]

	Relative Sub G1	표준편차	p value
Scrambled control	1	± 0.031059	
BART3-5p	0.822417	± 0.067281	0.049080409
BART3-3p	0.964756	± 0.047266	0.326058798
BART4-5p	1.235970	± 0.118464	0.076996648
BART4-3p	0.754954	± 0.049416	0.004307754
BART1-5p	0.802753	± 0.046515	0.006954738
BART1-3p	0.794689	± 0.070658	0.000329204
BART15-5p	0.819543	± 0.131573	0.143851905
BART15-3p	2.507941	± 0.074841	0.000890606
BART5-5p	2.111330	± 0.385397	0.037943576
BART5-3p	0.948571	± 0.075790	0.37614083
BART16-5p	1.181969	± 0.053320	0.012037789
BART16-3p	0.985176	± 0.019290	0.413525999
BART17-5p	1.098926	± 0.033329	0.01271764
BART17-3p	1.067312	± 0.086918	0.323110984
BART6-5p	1.022841	± 0.042981	0.472476656
BART6-3p	1.239752	± 0.103959	0.059670258
BART21-5p	1.086786	± 0.090225	0.067468002
BART21-3p	0.964995	± 0.143659	0.584959365
BART18-5p	0.982845	± 0.079117	0.636157842
BART18-3p	0.996285	± 0.119193	0.943515502
BART7-5p	0.991846	± 0.075438	0.813623836
BART7-3p	0.939265	± 0.094216	0.184372669
BART8-5p	1.012969	± 0.113624	0.79643115
BART8-3p	0.961632	± 0.091309	0.36746866
BART9-5p	1.005308	± 0.138199	0.92984722
BART9-3p	0.866864	± 0.113797	0.03265356
BART22-5p	0.965417	± 0.051049	0.1940472

BART22-3p	1.053684	± 0.103996	0.27121849
BART10-5p	0.833050	± 0.118185	0.01548568
BART10-3p	0.839359	± 0.092229	0.00677711
BART11-5p	1.081256	± 0.064301	0.02701403
BART11-3p	1.127625	± 0.175298	0.13865741
BART12-5p	1.134805	± 0.103104	0.02204065
BART12-3p	1.316871	± 0.233791	0.0216891
BART19-5p	1.348848	± 0.126873	0.00060989
BART19-3p	1.243943	± 0.119867	0.00292325
BART20-5p	1.378976	± 0.042194	2.6358E-08
BART20-3p	1.618129	± 0.09943	6.6505E-06
BART13-5p	1.178035	± 0.055734	0.00013301
BART13-3p	0.981342	± 0.246613	0.86134039
BART14-5p	0.907649	± 0.168803	0.24466241
BART14-3p	0.875700	± 0.061192	0.00301909
BART2-5p	1.092187	± 0.086943	0.05007166
BART2-3p	1.178367	± 0.170677	0.05327269

[64]

[65] <실시예 8> 세포사멸 측정 (Annexin V 염색)

[66] miR-BART5-5p와 miR-BART15-3p 모방체만을 사용하여 miRNA 단독으로 처리한 경우와 5-FU를 병행 처리한 경우, AGS 세포주의 세포 사멸에 미치는 영향을 관찰하였다.

[67] EBV 음성 세포주인 AGS 세포주를 6 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주한 직후 합성한 miRNA(10 nM)를 G-fectin을 이용하여 형질도입하고 37°C 세포 배양기에서 배양하였다.

[68] 형질도입 24시간 후, 항암제인 5-FU 10 uM을 처리하고 48시간 동안 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. Trypsin-EDTA로 세포를 떼어내고 PBS(인산완충용액)로 washing을 2회 실시한 이후에 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit를 처리하여 apoptosis 변화가 일어나는 비율을 FACS 로 확인하였다 (도 7).

[69] miR-BART5-5p와 miR-BART15-3p 를 단독처리하거나 5-FU와 병행처리한 경우 모두 early apoptotic cell에 해당하는 low right와 late apoptotic cell에 해당하는 upper right 비율을 증가시켰다. 5-FU와 병행 처리하면 두 miRNA 모방체 모두

시너지 효과를 보여서 세포 사멸이 일어나는 정도가 5-FU만 처리한 경우와 각 miRNA 모방체가 전달된 경우의 합보다 현저히 높았다.

[70]

[71] <실시예 9>항암제와의 병행처리의 세포사멸유도에 미치는 영향(Annexin V 염색)

[72] 개별 EBV BART miRNA가 AGS 세포주의 세포 사멸에 미치는 영향을 Annexin V 염색법으로 관찰하였다.

[73] EBV 음성 세포주인 AGS 세포주를 6 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주 뒤 바로 합성한 miRNA (10 nM) 를 G-fectin을 이용하여 형질도입(transfection)하고 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. 형질도입 24시간 후 항암제인 5-FU 10 uM을 처리하고 48시간 동안 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. Trypsin-EDTA로 세포를 떼어내고 PBS로 washing을 2회 실시한 이후에 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit로 처리하여 세포사멸이 일어난 비율을 FACS로 확인하였다.

[74] 세포사멸이 유도되는 세포의 외면을 염색할 수 있는 형광염료인 애넥신 V (annexin V)의 염색이 합성한 miR-BART4-5p, 4-3p, 1-5p, 15-3p, 5-5p, 5-3p, 16-5p, 16-3p, 17-3p, 21-3p, 18-5p, 7-5p, 9-5p, 22-5p, 20-3p, 13-5p, 13-3p, 2-3p의 모방체를 전달한 세포에서 scrambled control을 전달한 세포보다 세포 사멸이 유의성 있게 증가되는 것을 관찰하였다 (표 5 및 도 8).

[75] 표 5

[Table 5]

	Relative Apoptotic cell	표준편차	p value
Scrambled control	1	± 0.045449	
BART3-5p	1.015518	± 0.057258	0.533833207
BART3-3p	1.111229	± 0.179385	0.104858241
BART4-5p	1.203786	± 0.098988	0.0001573
BART4-3p	1.132958	± 0.112067	0.007098806
BART1-5p	1.080029	± 0.076102	0.017899831
BART1-3p	0.923128	± 0.05671	0.006299649
BART15-5p	1.022471	± 0.067605	0.42180601
BART15-3p	1.664526	± 0.262502	7.03897E-05
BART5-5p	1.325288	± 0.131761	3.70881E-05
BART5-3p	1.170317	± 0.118036	0.002362445
BART16-5p	1.311740	± 0.095923	2.57932E-06
BART16-3p	1.369744	± 0.531194	0.071050536
BART17-5p	1.003707	± 0.045914	0.865469677
BART17-3p	1.087938	± 0.038403	0.000417
BART6-5p	1.116871	± 0.553642	0.545540951
BART6-3p	1.018077	± 0.126517	0.695135495
BART21-5p	0.920701	± 0.110456	0.071812901
BART21-3p	1.155482	± 0.199968	0.048993185
BART18-5p	1.201565	± 0.139068	0.002034155
BART18-3p	0.870541	± 0.072638	0.000562715
BART7-5p	1.096568	± 0.072284	0.00480732
BART7-3p	1.106590	± 0.223946	0.195211986
BART8-5p	0.975743	± 0.05407	0.318217
BART8-3p	1.072157	± 0.238263	0.395391
BART9-5p	1.249817	± 0.252558	0.017017
BART9-3p	0.794846	± 0.11368	0.000516

BART22-5p	1.196878	± 0.120093	0.00098
BART22-3p	1.105684	± 0.247556	0.239469
BART10-5p	0.837272	± 0.066876	3.05E-05
BART10-3p	0.897144	± 0.108305	0.023527
BART11-5p	1.005647	± 0.085212	0.863686
BART11-3p	1.058308	± 0.148333	0.288678
BART12-5p	0.945826	± 0.106574	0.188281
BART12-3p	1.084376	± 0.129566	0.095047
BART19-5p	1.071132	± 0.109755	0.099917
BART19-3p	0.974170	± 0.127526	0.5797
BART20-5p	1.074948	± 0.102514	0.07019
BART20-3p	1.415718	± 0.298863	0.003319
BART13-5p	1.077471	± 0.092429	0.043486
BART13-3p	1.186893	± 0.15828	0.007815
BART14-5p	1.053543	± 0.062082	0.054294
BART14-3p	0.942639	± 0.062966	0.042576
BART2-5p	1.081581	± 0.108739	0.062056
BART2-3p	1.061974	± 0.070423	0.043585

[76]

[77] 합성한 double stranded RNA의 antisense가 대부분 분해된다고 알려져 있지만 분해되지 않고 남아 있는 miR-BART4-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART16-5p, miR-BART17-3p, miR-BART9-5p 및 miR-BART20-3p의 antisense가 siRNA로 작용할 가능성이 있기에 double stranded RNA의 off target effect를 분석해주는 siDirect 프로그램을 사용하여 off target effect 가능성을 조사하였다. 그 결과 적어도 서열 중 두 곳 이상에서 mismatch가 존재하여 siRNA로 작용할 가능성은 없다고 판단된다.

[78]

[79] <실시예 10> **miR-BART15-3p**의 예상 타겟 유전자의 선정

[80] miRNA의 예상 타겟을 찾아주는 Targetscan(<http://www.targetscan.org/>), Reptar(<http://bioinformatics.ekmd.huji.ac.il/reptar/>), DIANA-microT(<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>)와 같은 프로그램을 사용하여 miR-BART15-3p의 예상 타겟 유전자 목록을 작성하고 예상 타겟 유전자 각각의 기능을 조사하여 세포 사멸 관련 유전자들을 따로 추려내었다. 그 후 예상 타겟

유전자의 타겟 사이트와 miR-BART15-3p의 hybrid 정도를 RNA hybrid 프로그램(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)으로 조사하고 최종적으로 선정 한 유전자의 RNA hybrid 결과는 표 6과 같다.

[81] 표 6

[Table 6]

예상 타겟 유전자.	기능.	타겟 사이트와 miRNA의 hybrid 모식도..
BCL2.	anti-apoptotic 유전자.	target 5' A CU UGU CU G 3' C GGA CA GGCACUGA G CCU GU UUGGUGACU miRNA 3' A UU UU U G 5'.
BCL2L2.	BCL2와 같은 계열의 anti-apoptotic 유전자.	target 5' U U CU G C 3' GG C GA CACUGAU CC G UU GUGACUG miRNA 3' AGUU UU UU G 5'.
BIRC6.	apoptosis 진행 촉진, cell을 보호.	target 5' U UU UG U 3' UCAA G AGAACACUGAU AGUU U UUUUGGUGACUG miRNA 3' CCU UG 5'. target 5' A UC CUU A 3' AAG AGCA UCACUGA UUC UUGUU GGUACU miRNA 3' AG CU UU G 5'.
TAX1BP1.	TNF-induced apoptosis를 억제.	target 5' A G 3' AAAU AGCCACG+ UUU GUUUAACU miRNA 3' AUGUCC U G 5'.
DDX42.	TP53BP2와 interacting하여 cell survival을 높임.	target 5' U UUGGUUUU UUAU G 3' AGGAG GAAA CCACGA UCCUU UGUU GGUACU miRNA 3' AGU U G 5'.

[82] <실시예 11> miR-BART15-3p의 예상 타겟 유전자의 검정

[83] miRNA 타겟 검정을 위해 firefly와 renilla 유전자가 한 벡터에 존재하여 miRNA 타겟 검정에 특화된 luciferase 벡터(도 9)인 psiCHECK에 miR-BART15-3p가 타겟할 가능성이 있는 표 3의 5종의 유전자의 3'UTR을 각각 클로닝하여 각 유전자에 대한 타겟 검정용 벡터를 제작하였다.

[84] HEK293T을 96 well plate에 5×10^3 cells/well로 분주하고 miR-BART15-3p와 타겟 검정용 벡터를 lipofectamine2000을 이용하여 전달하였다. Transfection 48시간 뒤에 Dual luciferase reporter assay (Virology. 412(2), 392-400 (2011))를 실시하여 Firefly luciferase 유전자로 normalization하고 Renilla luciferase 유전자의 발현 변화를 관찰하였다. 실험한 5개의 후보 유전자 중 BIRC6와 TAX1BP1의 3'UTR이 들어간 psiCHECK 벡터만이 miR-BART15-3p에 의해 Renilla 값이 감소되고 miR-BART15-3p의 seed 부분을 mutation시킨 miR-BART15-3pm으로는 Renilla 값이 감소되지 않은 것을 관찰하였다. (도 10). 이는 miR-BART15-3p가 BIRC6와 TAX1BP1의 3'UTR를 타겟하여 Renilla luciferase 유전자의 발현을 감소시켰다는 것을 의미한다.

[85] BIRC6 3'UTR에 miR-BART15-3p가 결합할 가능성이 있는 타겟 사이트가 두 곳 존재하였고, 이들 사이트를 miR-BART15-3p가 직접 타겟하는지를 알기 위해 psiC-BIRC6에서 miR-BART15-3p와 seed match되는 부위를 각각 point

mutation하여 psiC-BIRC6m1 및 psiC-BIRC6m2를 제작하고, 두 곳 모두를 mutation시킨 psiC-BIRC6m1m2를 제작하였다 (도 11A).

- [86] HEK293T을 96 well plate에 5×10^3 cells/well로 분주하고 miR-BART15-3p와 타겟 검정용 벡터를 lipofectamine2000으로 전달하였다. Transfection 48시간 뒤에 Dual luciferase reporter assay를 실시하여 Firefly luciferase 유전자로 normalization하고 Renilla luciferase 유전자의 발현 변화를 관찰하였다. psiC-BIRC6m1과 psiC-BIRC6m1m2는 miR-BART15-3p에 의해 Renilla 값이 감소하지 않았으나 psiC-BIRC6m2는 psiC-BIRC6와 마찬가지로 감소하는 것을 관찰하였다. 따라서 miR-BART15-3p가 BIRC6에 있는 예상 binding 사이트 두 곳 중 psiC-BIRC6m1에 있는 mutation 사이트만을 직접 타겟한다는 것을 알 수 있다 (도 11B).

[87]

- [88] <실시예 12> miR-BART15-3p에 의한 타겟 유전자의 발현에 미치는 효과

- [89] miR-BART15-3p의 직접적인 타겟으로 생각되는 BIRC6가 miR-BART15-3p에 의해 mRNA level 및 protein level이 변화되는지 조사하였다.

- [90] AGS에 miR-BART15-3p를 lipofectamine2000을 이용하여 전달 후 48시간 뒤에 harvest하여 QRT-PCR 및 Western blot을 수행하였다 (도 12A 및 12B). miR-BART15-3p가 전달된 AGS에서 BIRC6 mRNA level 변화는 없었고 protein level은 감소된 것을 확인하였다.

- [91] AGS-EBV에 miR-BART15-3p 저해제(inhibitor)를 lipofectamine2000을 이용하여 전달 후 48시간 뒤에 harvest하여 QRT-PCR 및 Western blot을 수행하였다(도 12C 및 12D). miR-BART15-3p 저해제가 전달된 AGS-EBV에서 BIRC6 mRNA level 변화는 없었고 protein level은 증가된 것을 확인하였다.

- [92] BIRC6와는 다르게 TAX1BP1은 miR-BART15-3p가 전달된 AGS에서 mRNA level이 감소된 것을 확인하였다 (도 12E).

[93]

발명의 실시를 위한 형태

- [94] 본 발명의 일 실시형태는 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 세포사멸의 저해 또는 세포의 이상 증식과 관련된 질환의 예방 또는 치료를 위한 의약조성물이다. 본 발명의 또 다른 일 실시형태는 EBV의 miR-BART4-5p 모방체, miR-BART4-3p 모방체, miR-BART1-5p 모방체, miR-BART15-3p 모방체, miR-BART5-5p 모방체, miR-BART5-3p 모방체, miR-BART16-5p 모방체, miR-BART16-3p 모방체, miR-BART17-3p 모방체, miR-BART21-3p 모방체,

miR-BART18-5p 모방체, miR-BART7-5p 모방체, miR-BART9-5p 모방체, miR-BART22-5p 모방체, miR-BART20-3p 모방체, miR-BART13-5p 모방체, miR-BART13-3p 모방체, miR-BART2-3p 모방체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 세포사멸의 저해 또는 세포의 이상 증식과 관련된 질환의 예방 또는 치료를 위한 의약조성물이다.

- [95] 본 명세서에서 제공하는 다양한 실시형태 발명에서 사용되는 BART miRNA들이나 miR-BART들의 모방체 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단이 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 쪽이 돌출(overhang)한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조가 모두 가능하다. 돌출하는 뉴클레오타이드 수는 한정되지 않으나, 예를 들어 1 내지 8 뉴클레오타이드, 바람직하게는 1 내지 4 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [96] 본 명세서에서 제공하는 다양한 실시형태에서 사용되는 BART miRNA들이나 miR-BART들의 모방체는 생체 내 핵산 분해효소에 의한 빠른 분해를 막고 생체 내 안정성을 높이기 위해 당업계에 알려진 일반적인 방법으로 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 당(ribose ring)의 2-위치의 수산기를 H, OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br, I 등으로 수식하거나 (이 때 R은 알킬 또는 아릴, 바람직하게는 탄소수 1~6의 알킬기, R'은 알킬렌, 바람직하게는 탄소수 1~6의 알킬렌일 수 있다), 인산 백본을 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 포스포로아미 데이트, 또는 보라노포스페이트 등으로 수식할 수 있다. 또한 BART miRNA들이나 miR-BART들의 모방체는 생체 내 빠른 분해를 막고 생체 내 안정성을 높이기 위해 서열 중 1 곳 이상을 nucleic acid analog인 locked nucleic acid (LNA), peptide nucleic acid (PNA), morpholino 등으로 치환하여 사용할 수 있다.
- [97] 본 명세서에서 제공하는 다양한 실시형태에서 사용되는 BART miRNA들이나 miR-BART들의 모방체는 이의 활성을 저하시키지 않는 변화를 갖는 기능적 등가물인, 하나 이상의 치환, 삽입, 결실 및 이들의 조합을 갖는 변형체를 포함한다.
- [98] 본 명세서에서 제공하는 다양한 실시형태에서 사용되는 BART miRNA들이나 miR-BART들의 모방체는 기본적으로 두 가닥의 RNA 가 쌍을 이루어 이중가닥을 형성하는 완전한 형태, 즉 인 비트로에서 miRNA를 직접 합성한 뒤 트랜스펙션(transfection)을 통해 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 플라스미드계 pre-miRNA 벡터와 PCR-유도 miRNA 발현 카세트 등에 의한 트랜스펙션에 이용될 수 있도록 짧은 헤어핀을 갖는 구조로 변형된 형태일 수 있다.
- [99] 본 명세서에서 제공하는 다양한 실시형태에서 사용되는 BART miRNA들이나 miR-BART들의 모방체를 제조하는 방법으로, 직접 화학적으로 합성하는 방법 (Sui G et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:5515-5520, 2002), 인 비트로 전사를

이용하여 합성하는 방법 (Brummelkamp TR et al., Science 296:550-553, 2002), 인 비트로 전사에 의해 합성된 긴 이중-가닥 RNA를 RNaseIII 패밀리 효소를 이용하여 절단하는 방법 (Paul CP et al., Nature Biotechnology 20:505-508, 2002) 등 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 합성할 수 있다.

- [100] 본 명세서에서 제공하는 다양한 실시형태에서 사용되는 BART miRNA들이나 miR-BART들의 모방체는 생체 내 전달 효율을 높이기 위하여 당업계에 알려진 다양한 핵산 전달체(바이러스성 또는 비바이러스성 전달체)와 복합체 형태로 포함될 수 있다. 예컨대, BART miRNA들이나 miR-BART들의 모방체를 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터로서 포함될 수 있다. 이를 위하여 사용가능한 플라스미드로는 예를 들어, pSilencer (Ambion), pSiEx (Novagen), siXpress (Takara Bio), pBLOCK-iT™(Invitrogen), pcDNA3.1(Invitrogen), pCEP4(Invitrogen), SilenCircle™ (Allele), 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 바이러스성 전달체로 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터, EB 바이러스 벡터, 파필로마바이러스 벡터, 포오미바이러스 벡터가 사용될 수 있으며, 이로 제한되지 않는다. 또한, 비바이러스성 전달체로서, 전달 시약으로 Mirus TrasIT-TKO 지질친화성 시약, 리포펙틴, 리포펙타민, 셀펙틴(cellfectin), G-fectin, 양이온성 인지질 나노입자, 양이온성 고분자, 양이온성 미셀, 양이온성 에멀전 또는 리포솜, 리간드-DNA 복합체, 유전자총(gene gun)이 사용될 수 있으며, 이로 제한되지 않는다. 리포솜의 형태로서는 양친매성 제제(amphipathic agent), 예를 들어 마이셀, 불용성 단일층, 액정, 또는 수용액에 존재하는 라멜라층으로 존재하는 지질과 조합된다. 리포솜 제형을 위한 지질은 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 설��파타이드, 리소레스티틴, 레시틴 인지질, 사포닌, 담즙산, 리포펙틴 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

- [101] 또한 BART miRNA들이나 miR-BART들의 모방체의 체내 안정성을 높이기 위해 폴리에틸렌글리콜과 같은 생체적합성 고분자를 접합하여 세포 내 흡수를 증가시키는 등 당업계에 알려진 일반적인 리보핵산 세포 내 전달 기술을 이용하도록 제제화될 수 있다. 또한 전기천공법(electroporation)에 의해 세포를 miRNA 또는 그 모방체가 든 용액에 현탁하여 직류 고전압의 펄스를 통과시켜 세포내로 도입되게 하는 방법도 포함한다. 생체에는 miRNA 또는 모방체가 든 용액을 원하는 부위에 투여하고 전극을 통해 직류전압을 펄스로 주어 세포로 도입되게 할 수 있다.

- [102] 본 명세서에서 제공하는 다양한 실시형태에서 사용되는 상기 모방체로서 서열번호 5의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 6의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-5p, 서열번호 7의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 8의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-3p, 서열번호 9의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 10의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART1-5p, 서열번호 15의 서열을 갖는

RNA와 서열번호 16의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART15-3p, 서열번호 17의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 18의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-5p, 서열번호 19의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 20의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-3p, 서열번호 21의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 22의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-5p, 서열번호 23의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 24의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-3p, 서열번호 27의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 28의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART17-3p, 서열번호 35의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 36의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART21-3p, 서열번호 37의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 38의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART18-5p, 서열번호 41의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 42의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART7-5p, 서열번호 49의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 50의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART9-5p, 서열번호 53의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 54의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART22-5p, 서열번호 75의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 76의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART20-3p, 서열번호 77의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 78의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-5p, 서열번호 79의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 80의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-3p, 서열번호 87의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 88의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART2-3p의 모방체를 사용할 수 있다.

[103] 본 발명은 또 다른 일 실시형태로 EBV의 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용하여 세포사멸의 저해 또는 세포의 이상 증식과 관련된 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[104] 본 발명의 또 다른 일 실시형태는 EBV의 miR-BART4-5p 모방체, miR-BART4-3p 모방체, miR-BART1-5p 모방체, miR-BART15-3p 모방체, miR-BART5-5p 모방체, miR-BART5-3p 모방체, miR-BART16-5p 모방체, miR-BART16-3p 모방체, miR-BART17-3p 모방체, miR-BART21-3p 모방체, miR-BART18-5p 모방체, miR-BART7-5p 모방체, miR-BART9-5p 모방체, miR-BART22-5p 모방체, miR-BART20-3p 모방체, miR-BART13-5p 모방체, miR-BART13-3p 모방체, miR-BART2-3p 모방체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용하여 세포사멸의 저해와 관련된 질환의 예방 또는 치료방법이다. 상기 모방체로서 서열번호 5의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 6의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-5p, 서열번호 7의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 8의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-3p, 서열번호 9의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 10의 서열을 갖는 RNA로 이루어진

miR-BART1-5p, 서열번호 15의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 16의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART15-3p, 서열번호 17의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 18의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-5p, 서열번호 19의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 20의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-3p, 서열번호 21의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 22의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-5p, 서열번호 23의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 24의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-3p, 서열번호 27의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 28의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART17-3p, 서열번호 35의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 36의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART21-3p, 서열번호 37의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 38의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART18-5p, 서열번호 41의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 42의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART7-5p, 서열번호 49의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 50의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART9-5p, 서열번호 53의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 54의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART22-5p, 서열번호 75의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 76의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART20-3p, 서열번호 77의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 78의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-5p, 서열번호 79의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 80의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-3p, 서열번호 87의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 88의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART2-3p의 모방체를 사용할 수 있다.

- [105] 상기 세포사멸의 저해 또는 세포의 이상 증식과 관련된 질환은 예를 들어 종양, 자가면역질환, 림프구 증식성 질환, 염증질환, 바이러스 감염, 혈관성형술에 따른 혈관의 재협착증, 섬유모세포(fibroblast) 과다증식에 따른 섬유증(fibrosis) 등을 들 수 있으며, 이로 제한되지 않는다. 상기 종양은 위암, 방광암, 뇌종양, 유방암, 골수암, 자궁경부암, 만성 림프성 백혈병, 대장암, 식도암, 간세포암, 림프아구성 백혈병, 소포림프종, T-세포 또는 B-세포 기원의 림프양 악성 종양, 흑색종, 골수성 백혈병, 골수종, 구강암, 난소암, 비소세포 폐암, 전립선암, 비장암, 자궁경부암, 섬유육종, 근육종, 지방육종, 연골육종, 골원성육종, 척삭종, 맥관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피아세포종, 활막종, 중피종, 유잉(Ewing) 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장종양, 직장암, 췌장암, 자궁암, 머리와 목 암, 피부암, 인상세포종양, 피지선종양, 유두상종양, 유두선종, 낭포선암, 수질종양, 기관지원성종양, 신장세포종양, 간암, 담즙선종양, 융모암, 정상피종, 태아종, 빌름스(Wilm's) 종양, 고환암, 폐종양, 소세포폐종양, 비소세포폐종양, 방광종양, 상피종, 신경교종, 성상세포종, 수아세포종, 두개인두종, 뇌실상의세포종, 송과체종, 혈관아세포종, 청음신경종, 회돌기교종, 수악종, 흑색종, 신경아세포종, 망막아세포종, 백혈병, 림프종 및 카포시(Kaposi) 육종, 비인강상피암종 등을 포함하며 이로 제한되지 않는다.

- [106] 본 발명의 일 실시형태는 EBV의 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p,

miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 세포사멸(apoptosis) 촉진 또는 세포생장(cell growth) 억제를 위한 조성물이다.

[107] 본 발명의 다른 일 실시형태는 EBV의 miR-BART4-5p 모방체, miR-BART4-3p 모방체, miR-BART1-5p 모방체, miR-BART15-3p 모방체, miR-BART5-5p 모방체, miR-BART5-3p 모방체, miR-BART16-5p 모방체, miR-BART16-3p 모방체, miR-BART17-3p 모방체, miR-BART21-3p 모방체, miR-BART18-5p 모방체, miR-BART7-5p 모방체, miR-BART9-5p 모방체, miR-BART22-5p 모방체, miR-BART20-3p 모방체, miR-BART13-5p 모방체, miR-BART13-3p 모방체, miR-BART2-3p 모방체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 세포사멸(apoptosis) 촉진 또는 세포생장(cell growth) 억제 위한 조성물이다.

[108] 본 발명의 일 실시예로, 서열번호 5의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 6의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-5p, 서열번호 7의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 8의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-3p, 서열번호 9의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 10의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART1-5p, 서열번호 15의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 16의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART15-3p, 서열번호 17의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 18의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-5p, 서열번호 19의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 20의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-3p, 서열번호 21의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 22의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-5p, 서열번호 23의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 24의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-3p, 서열번호 27의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 28의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART17-3p, 서열번호 35의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 36의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART21-3p, 서열번호 37의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 38의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART18-5p, 서열번호 41의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 42의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART7-5p, 서열번호 49의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 50의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART9-5p, 서열번호 53의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 54의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART22-5p, 서열번호 75의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 76의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART20-3p, 서열번호 77의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 78의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-5p, 서열번호 79의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 80의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-3p, 서열번호 87의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 88의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART2-3p의 모방체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 세포사멸(apoptosis) 촉진

또는 세포생장(cell growth) 억제를 위한 조성물이 포함된다.

[109] 상기 본 발명의 조성물들은 생체내 또는 시험관 내에서 사용이 가능하다.

[110] 본 발명의 다른 일 실시형태는 EBV의 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용하여 세포사멸(apoptosis)을 촉진 또는 세포생장(cell growth)을 억제하는 방법이다.

[111] 본 발명의 또 다른 일 실시형태는 EBV의 miR-BART4-5p 모방체, miR-BART4-3p 모방체, miR-BART1-5p 모방체, miR-BART15-3p 모방체, miR-BART5-5p 모방체, miR-BART5-3p 모방체, miR-BART16-5p 모방체, miR-BART16-3p 모방체, miR-BART17-3p 모방체, miR-BART21-3p 모방체, miR-BART18-5p 모방체, miR-BART7-5p 모방체, miR-BART9-5p 모방체, miR-BART22-5p 모방체, miR-BART20-3p 모방체, miR-BART13-5p 모방체, miR-BART13-3p 모방체, miR-BART2-3p 모방체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용하여 세포사멸(apoptosis)을 촉진 또는 세포생장(cell growth)을 억제하는 방법이다. 상기 모방체로서 서열번호 5의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 6의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-5p, 서열번호 7의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 8의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-3p, 서열번호 9의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 10의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART1-5p, 서열번호 15의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 16의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART15-3p, 서열번호 17의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 18의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-5p, 서열번호 19의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 20의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-3p, 서열번호 21의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 22의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-5p, 서열번호 23의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 24의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-3p, 서열번호 27의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 28의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART17-3p, 서열번호 35의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 36의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART21-3p, 서열번호 37의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 38의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART18-5p, 서열번호 41의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 42의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART7-5p, 서열번호 49의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 50의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART9-5p, 서열번호 53의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 54의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART22-5p, 서열번호 75의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 76의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART20-3p, 서열번호 77의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 78의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-5p, 서열번호 79의 서열을 갖는 RNA와 서열번호

80의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-3p, 서열번호 87의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 88의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART2-3p의 모방체를 사용할 수 있다.

- [112] 본 발명의 또 다른 일 실시형태는 EBV의 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 세포사멸(apoptosis) 촉진용 또는 세포생장(cell growth) 억제용 키트이다.
- [113] 본 발명의 또 다른 일 실시형태는 EBV의 miR-BART4-5p 모방체, miR-BART4-3p 모방체, miR-BART1-5p 모방체, miR-BART15-3p 모방체, miR-BART5-5p 모방체, miR-BART5-3p 모방체, miR-BART16-5p 모방체, miR-BART16-3p 모방체, miR-BART17-3p 모방체, miR-BART21-3p 모방체, miR-BART18-5p 모방체, miR-BART7-5p 모방체, miR-BART9-5p 모방체, miR-BART22-5p 모방체, miR-BART20-3p 모방체, miR-BART13-5p 모방체, miR-BART13-3p 모방체, miR-BART2-3p 모방체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 세포사멸(apoptosis) 촉진용 또는 세포생장(cell growth) 억제용 키트이다. 상기 모방체로서 서열번호 5의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 6의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-5p, 서열번호 7의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 8의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-3p, 서열번호 9의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 10의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART1-5p, 서열번호 15의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 16의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART15-3p, 서열번호 17의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 18의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-5p, 서열번호 19의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 20의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-3p, 서열번호 21의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 22의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-5p, 서열번호 23의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 24의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-3p, 서열번호 27의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 28의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART17-3p, 서열번호 35의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 36의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART21-3p, 서열번호 37의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 38의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART18-5p, 서열번호 41의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 42의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART7-5p, 서열번호 49의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 50의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART9-5p, 서열번호 53의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 54의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART22-5p, 서열번호 75의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 76의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART20-3p, 서열번호 77의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 78의 서열을 갖는

RNA로 이루어진 miR-BART13-5p, 서열번호 79의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 80의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-3p, 서열번호 87의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 88의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART2-3p의 모방체를 사용할 수 있다.

[114] 상기 키트는 생체 내 또는 시험관 내에서 목적하는 바를 위하여 사용될 수 있다.

[115] 본 발명의 또 다른 실시 형태는, 상기 각 실시형태에서 유효성분으로서 EBV의 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상 또는 EBV의 miR-BART4-5p 모방체, miR-BART4-3p 모방체, miR-BART1-5p 모방체, miR-BART15-3p 모방체, miR-BART5-5p 모방체, miR-BART5-3p 모방체, miR-BART16-5p 모방체, miR-BART16-3p 모방체, miR-BART17-3p 모방체, miR-BART21-3p 모방체, miR-BART18-5p 모방체, miR-BART7-5p 모방체, miR-BART9-5p 모방체, miR-BART22-5p 모방체, miR-BART20-3p 모방체, miR-BART13-5p 모방체, miR-BART13-3p 모방체, miR-BART2-3p 모방체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상 이외에 하나 이상의 추가의 유효성분을 포함할 수 있다. 추가의 유효성분으로는 항암제, 화학요법제, 면역요법제, 항균제, 항바이러스제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 치료양식과 배합하여 투여하거나 방사선 치료나 광역동치료(Photodynamic therapy)와 함께 투여할 수 있다. 화학요법제는 항대사물질제, DNA 손상제, 미세소관 불안정화제, 미세소관 안정화제, 액틴 탈중합제, 성장억제제, 토포이소머라제 억제제, HMG-CoA 억제제, 퓨린억제제, 피리미딘 억제제, 메탈로프로티나제 억제제, CDK 억제제, 혈관형성 억제제, 분화증진제 및 면역요법제를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[116] 상기, 본 발명의 각 실시형태는 동물 또는 인간에 적용된다.

[117] 본 발명의 의약조성물에 포함되는 담체는 투여 경로에 따라 적절히 선택할 수 있으며, 그 외에 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제 및 당해 분야에 널리 공지된 다른 물질이 사용될 수 있다.

[118] 본 발명의 의약조성물의 투여경로는 비경구, 점막전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비강내, 에어로졸, 안구내, 혈관내, 기관내, 근육내, 복막내, 직장내, 질, 유전자총(gene gun), 피부패치, 점안약 또는 구강세척제, 주사제 형태를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[119] 본 발명의 의약 조성물 중에 포함되는 miRNA 또는 그의 모방체의 양은 치료된 질환의 특성 및 중증도, 환자에게 종래에 치료된 특징에 따라 조절될 수 있으며, 신체 또는 기관(organ)의 중량 1kg 당 약 10 마이크로그램 내지 약 20mg을 함유하도록 할 수 있다. 또한, 투여량은 발현백터, 투여대상 등에 좌우되며, 예를

들어 바이러스 벡터의 경우, 바이러스 벡터를 함유하는 재조합 바이러스의 양은 10^3 내지 10^{12} pfu/kg 범위이다.

[120]

산업상 이용가능성

[121]

본 발명의 EBV의 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 또는 그의 모방체는 세포사멸의 촉진 및 세포생장 억제 효과가 있으므로, 세포생장을 억제하고 세포사멸을 촉진하기 위한 조성물, 세포사멸의 저해 또는 세포의 이상 증식으로 기인하는 질환의 예방 또는 치료 방법, 그를 위한 조성물 또는 키트에 사용될 수 있으므로 산업상 이용가능성이 있다.

[122]

[123]

청구범위

[청구항 1]

엡스타인바바이러스(EBV)의 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 및 이들의 모방체(mimic)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 종양, 자가면역질환, 림프구 증식성 질환, 염증질환, 바이러스 감염, 혈관성형술에 따른 혈관의 재협착증 및, 섬유모세포(fibroblast) 과다증식에 따른 섬유증(fibrosis) 으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료를 위한 의약조성물.

[청구항 2]

제1항에 있어서, 상기 종양은 위암, 방광암, 뇌종양, 유방암, 골수암, 자궁경부암, 만성 림프성 백혈병, 대장암, 식도암, 간세포암, 림프아구성 백혈병, 소포림프종, T-세포 또는 B-세포 기원의 림프양 악성 종양, 흑색종, 골수성 백혈병, 골수종, 구강암, 비소세포 폐암, 전립선암 및 비장암, 자궁경부암, 섬유육종, 근육종, 지방육종, 연골육종, 골원성육종, 척삭종, 맥관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피아세포종, 활막종, 중피종, 유잉(Ewing) 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장종양, 직장암, 췌장암, 자궁암, 머리와 목 암, 피부암, 뇌암, 인상세포종양, 피지선종양, 유두상종양, 유두선종, 낭포선암, 수질종양, 기관지원성종양, 신장세포종양, 간암, 담즙선종양, 용모암, 정상피종, 태아종, 윌름스(Wilm's) 종양, 고환암, 폐종양, 소세포폐종양, 비소세포폐종양, 방광종양, 상피종, 신경교종, 성상세포종, 수아세포종, 두개인두종, 뇌실상의세포종, 송과체종, 혈관아세포종, 청음신경종, 회돌기교종, 수악종, 흑색종, 신경아세포종, 망막아세포종, 백혈병, 림프종 및 카포시(Kaposi) 육종 및, 비인강상피암종 으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 의약조성물.

[청구항 3]

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 모방체는 서열번호 5의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 6의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-5p, 서열번호 7의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 8의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-3p, 서열번호 9의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 10의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART1-5p, 서열번호 15의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 16의

서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART15-3p, 서열번호 17의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 18의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-5p, 서열번호 19의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 20의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-3p, 서열번호 21의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 22의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-5p, 서열번호 23의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 24의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-3p, 서열번호 27의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 28의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART17-3p, 서열번호 35의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 36의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART21-3p, 서열번호 37의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 38의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART18-5p, 서열번호 41의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 42의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART7-5p, 서열번호 49의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 50의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART9-5p, 서열번호 53의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 54의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART22-5p, 서열번호 75의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 76의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART20-3p, 서열번호 77의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 78의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-5p, 서열번호 79의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 80의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-3p, 서열번호 87의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 88의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART2-3p 및 이들의 모방체(mimic)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 의약조성물.

[청구항 4]

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 miRNA 또는 miRNA 모방체가 이들을 발현하는 제조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 형태로 포함되거나 비바이러스성 전달체와 함께 포함되는 것인 의약조성물.

[청구항 5]

EBV의 miR-BART4-5p, miR-BART4-3p, miR-BART1-5p, miR-BART15-3p, miR-BART5-5p, miR-BART5-3p, miR-BART16-5p, miR-BART16-3p, miR-BART17-3p, miR-BART21-3p, miR-BART18-5p, miR-BART7-5p, miR-BART9-5p, miR-BART22-5p, miR-BART20-3p, miR-BART13-5p, miR-BART13-3p, miR-BART2-3p 및 이들의 모방체(mimic)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA를 포함하는 세포사멸(apoptosis) 촉진 또는 세포생장(cell growth)의 억제를 위한 조성물.

[청구항 6]

제5항에 있어서, 상기 모방체가 서열번호 5의 서열을 갖는 RNA와

서열번호 6의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-5p, 서열번호 7의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 8의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART4-3p, 서열번호 9의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 10의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART1-5p, 서열번호 15의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 16의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART15-3p, 서열번호 17의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 18의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-5p, 서열번호 19의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 20의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART5-3p, 서열번호 21의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 22의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-5p, 서열번호 23의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 24의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART16-3p, 서열번호 27의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 28의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART17-3p, 서열번호 35의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 36의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART21-3p, 서열번호 37의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 38의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART18-5p, 서열번호 41의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 42의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART7-5p, 서열번호 49의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 50의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART9-5p, 서열번호 53의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 54의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART22-5p, 서열번호 75의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 76의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART20-3p, 서열번호 77의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 78의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-5p, 서열번호 79의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 80의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART13-3p, 서열번호 87의 서열을 갖는 RNA와 서열번호 88의 서열을 갖는 RNA로 이루어진 miR-BART2-3p 및 이들의 모방체(mimic)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA 모방체를 포함하는 세포사멸(apoptosis) 촉진 또는 세포생장(cell growth)의 억제를 위한 조성물.

[청구항 7]

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 miRNA 또는 miRNA 모방체가 이들을 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 형태로 포함되거나 비바이러스성 전달체와 함께 포함되는 것인 조성물.

[청구항 8]

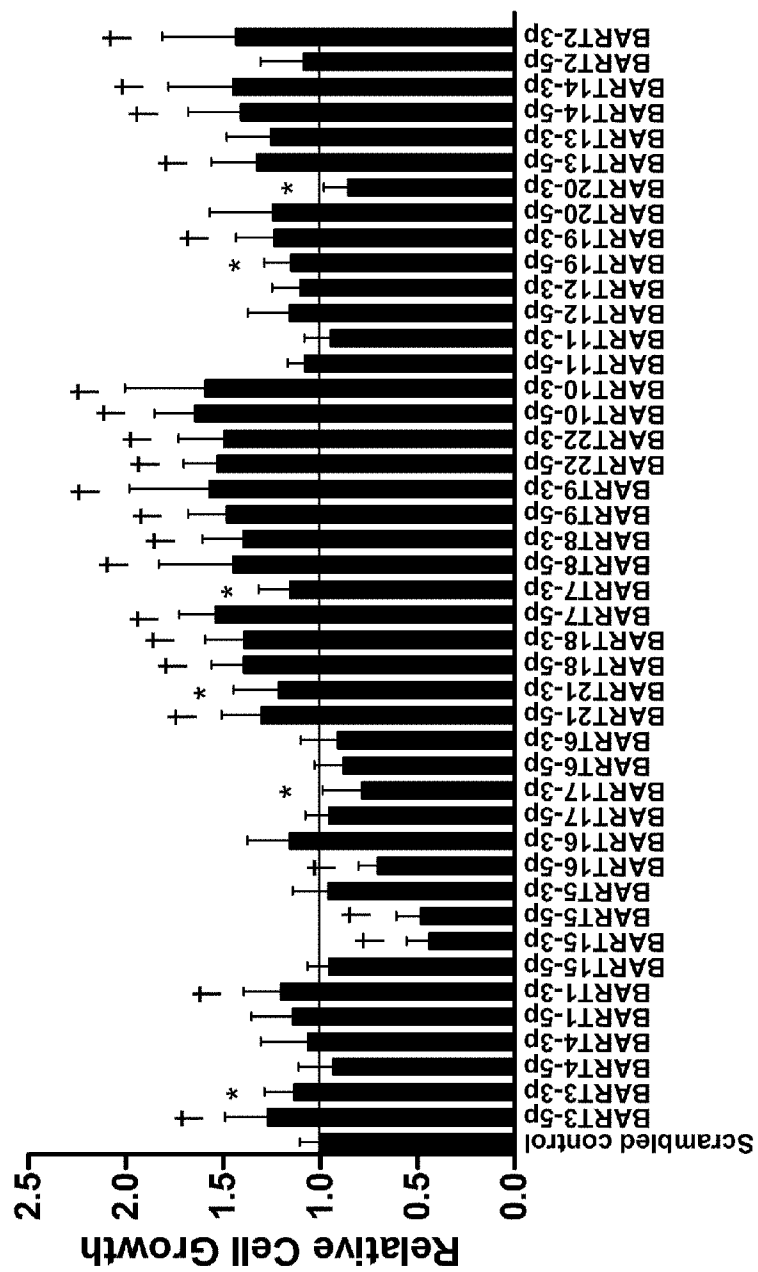
제1항, 제2항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가의 유효성분을 더 포함하는 것인 조성물.

[청구항 9]

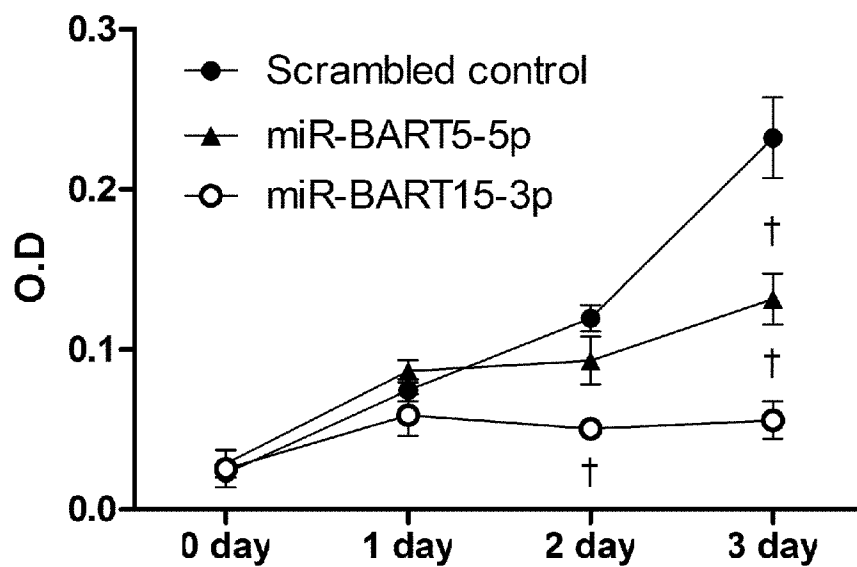
제8항에 있어서, 상기 추가의 유효성분이 항암제, 화학요법제, 면역요법제, 항균제, 방사선요법제 및 항바이러스제 및,

광역동치료법으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

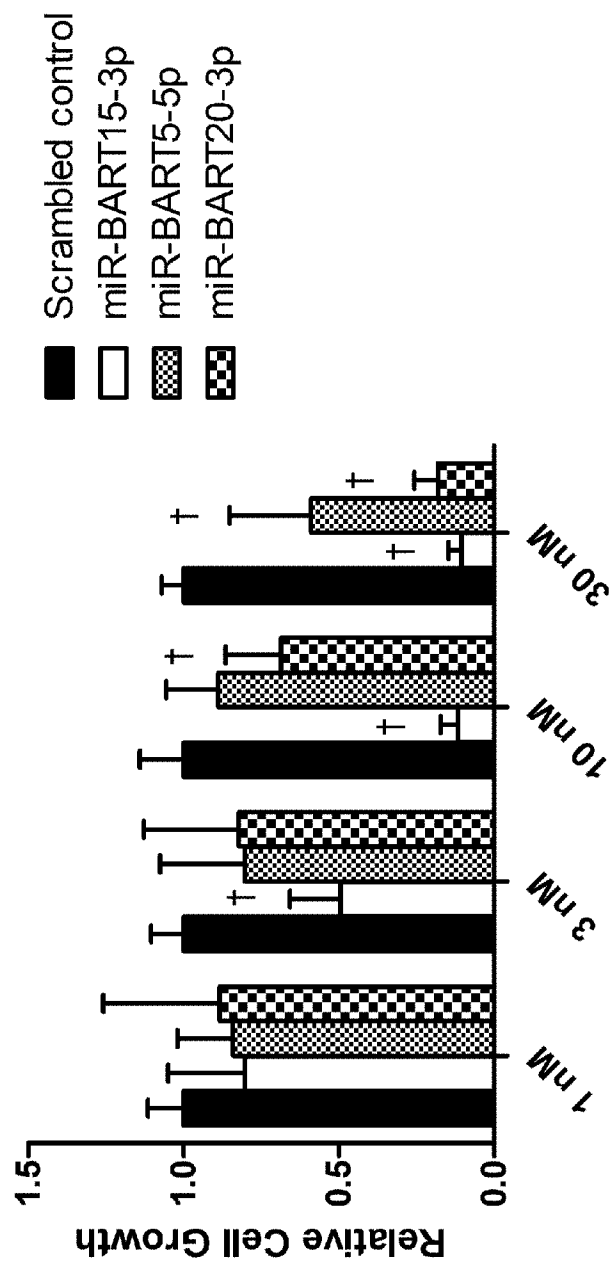
[Fig. 1]



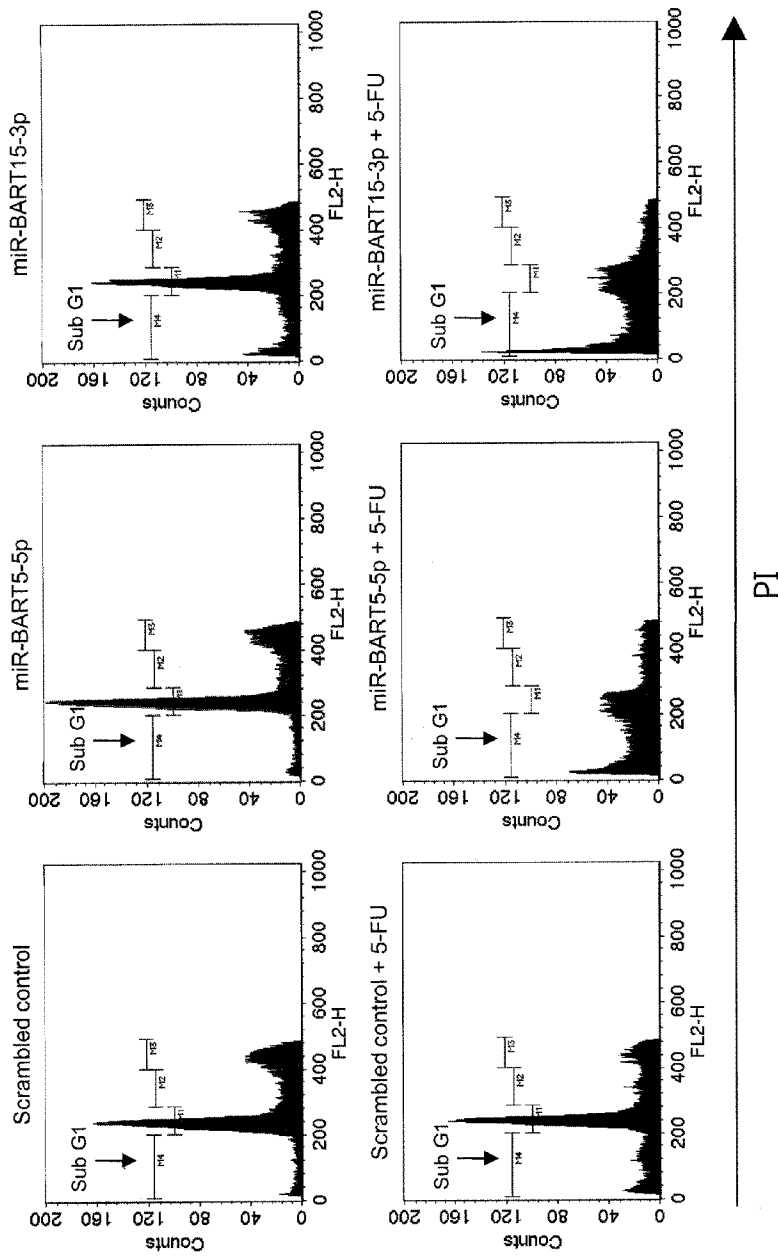
[Fig. 2]



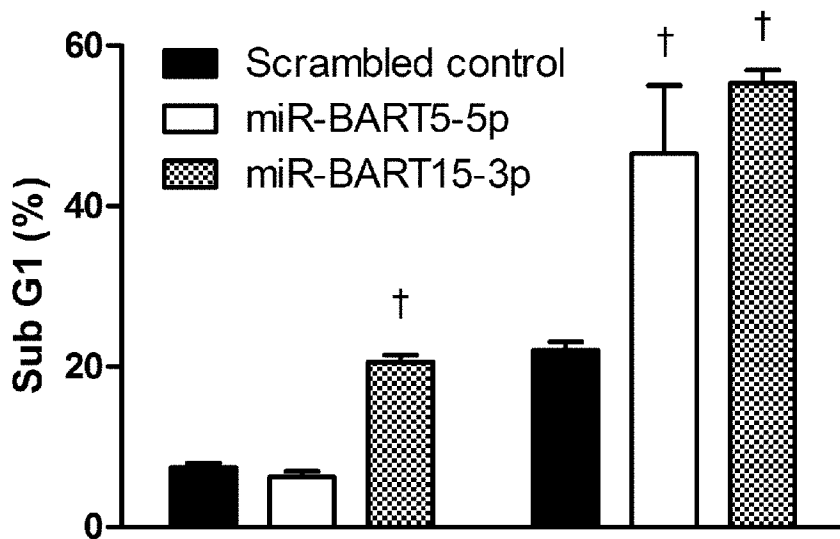
[Fig. 3]



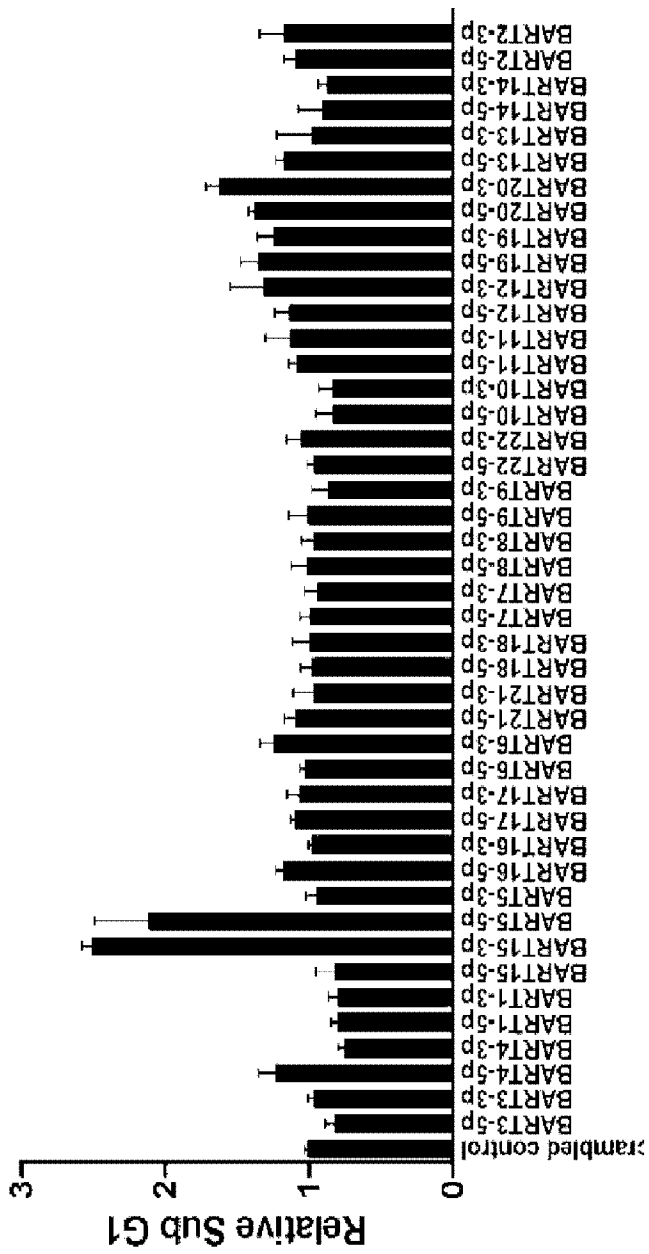
[Fig. 4]



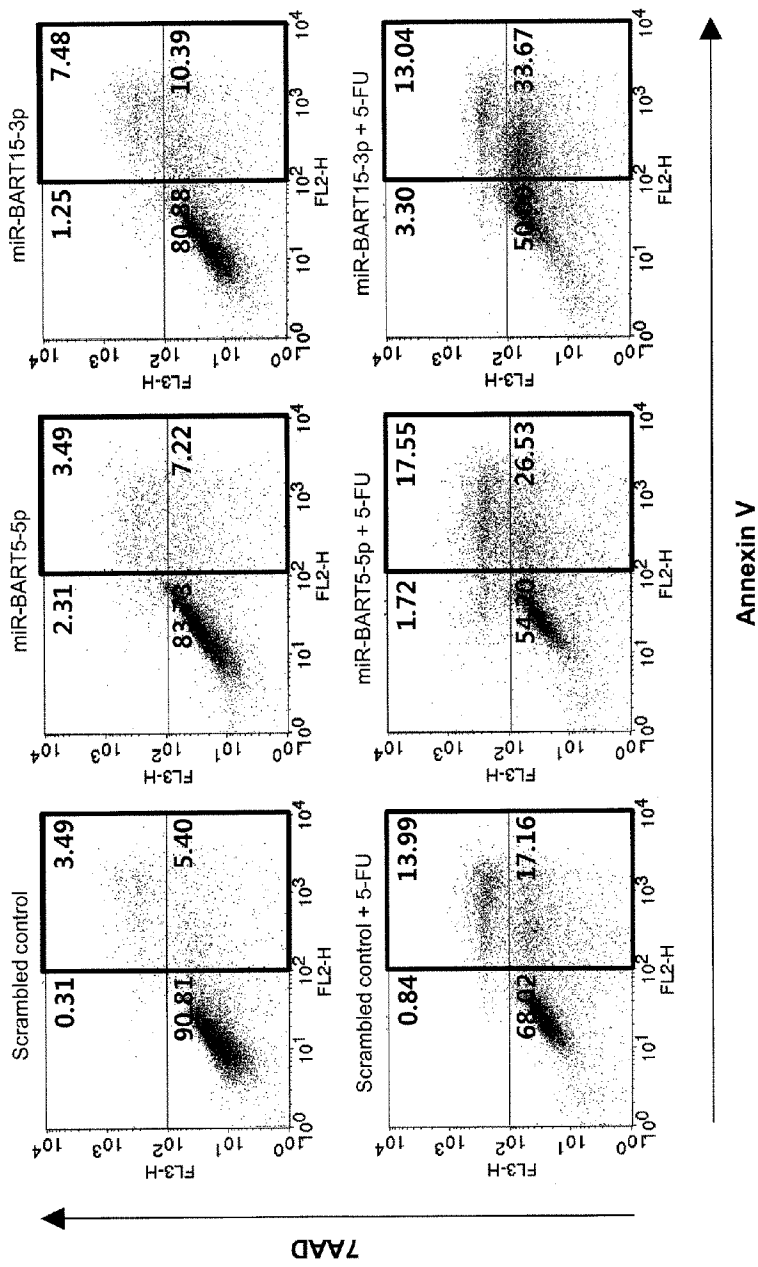
[Fig. 5]



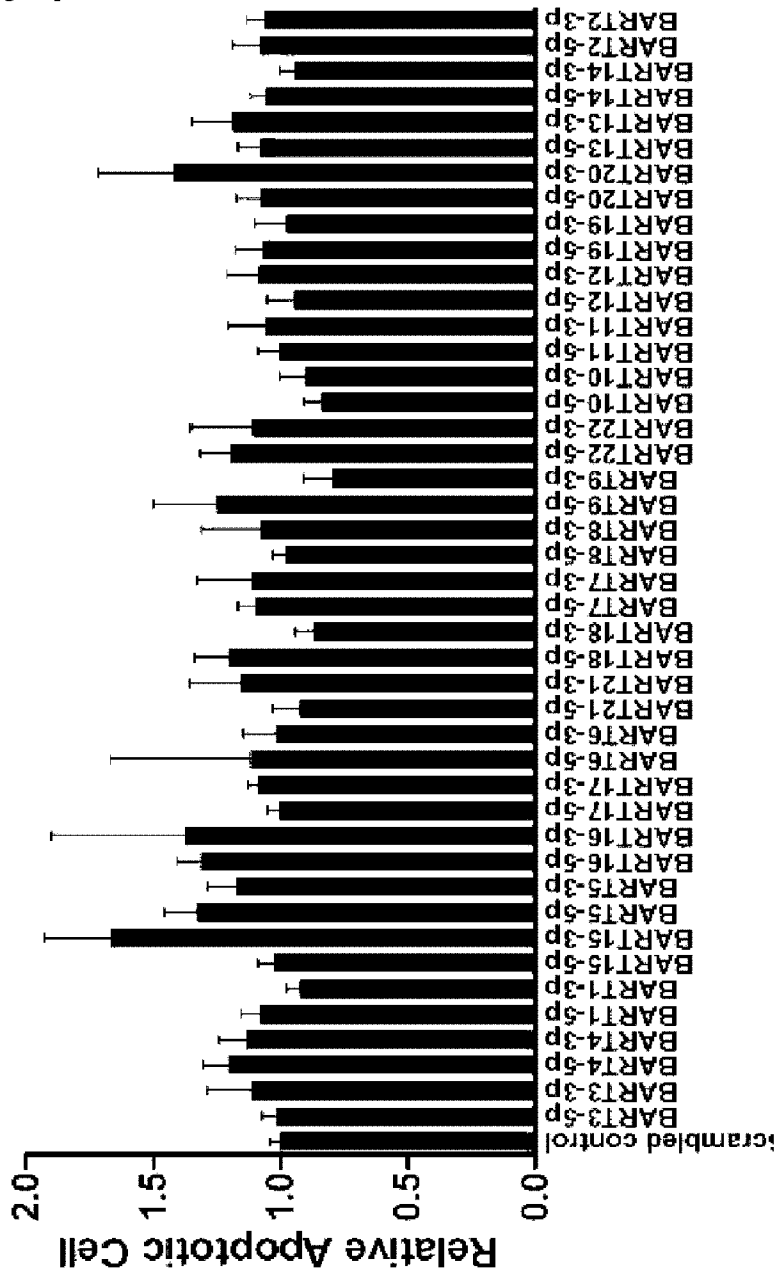
[Fig. 6]



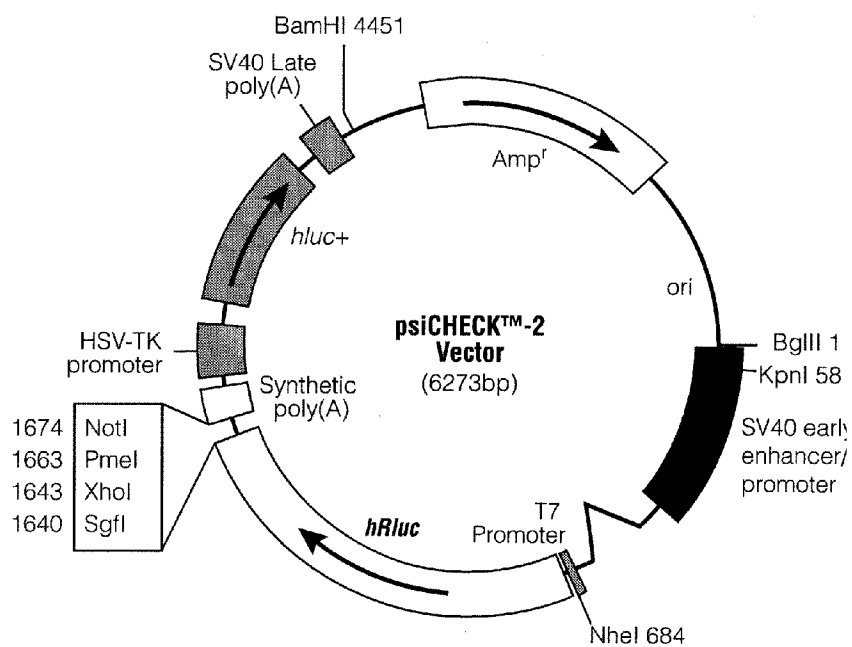
[Fig. 7]



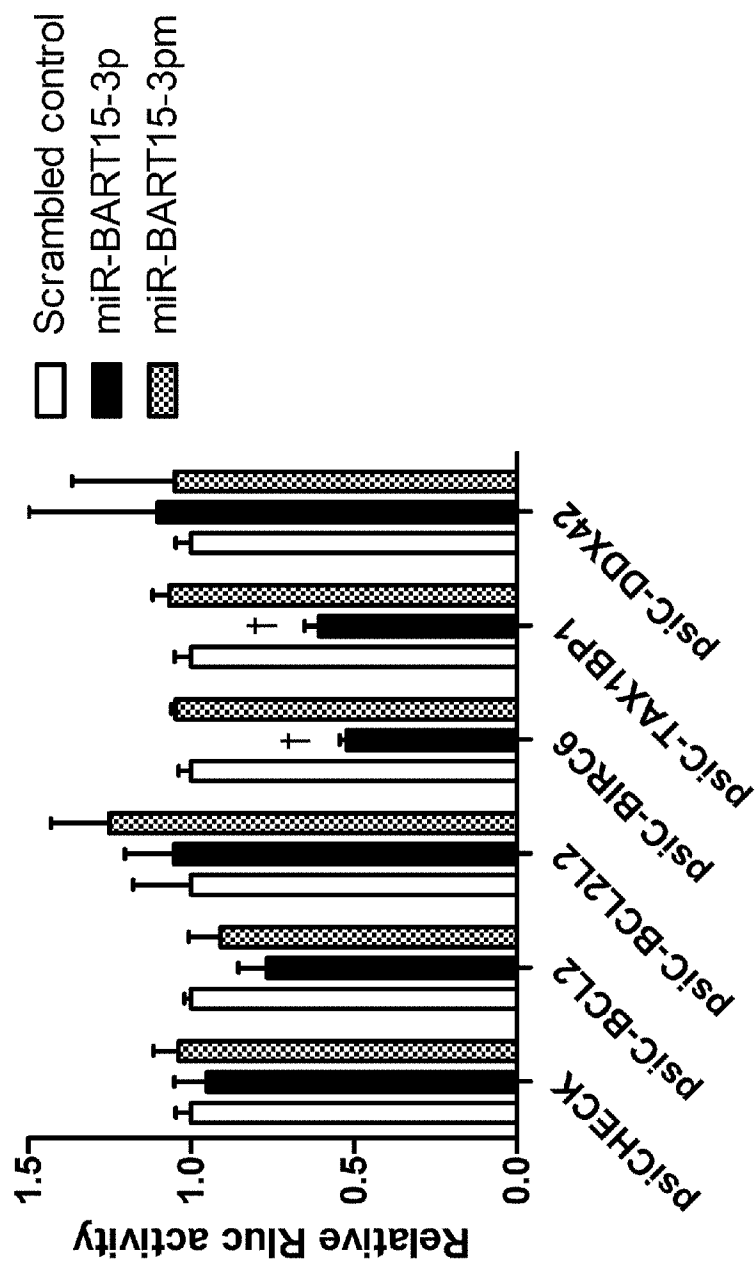
[Fig. 8]



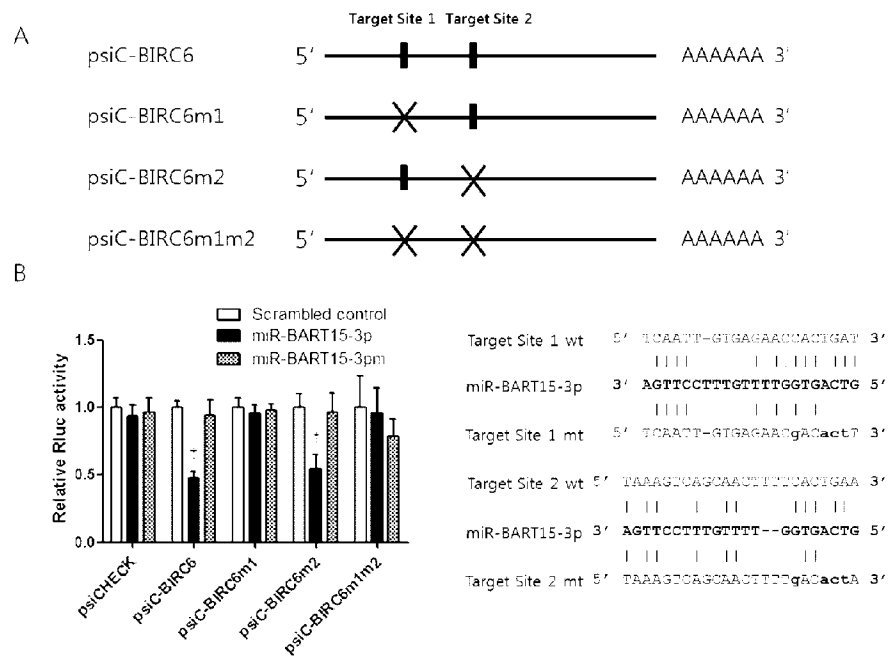
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]



[Fig. 12]

