(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0012528
(43) 공개일자 2015년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0088133
(22) 출원일자 2013년07월25일
심사청구일자 2013년07월25일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
오범석
서울 서초구 반포대로 275, 113동 902호 (반포동, 래미안퍼스티지)
이현주
경기 용인시 기흥구 연원로42번길 2, 116동 501호 (마북동, 연원마을벽산아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

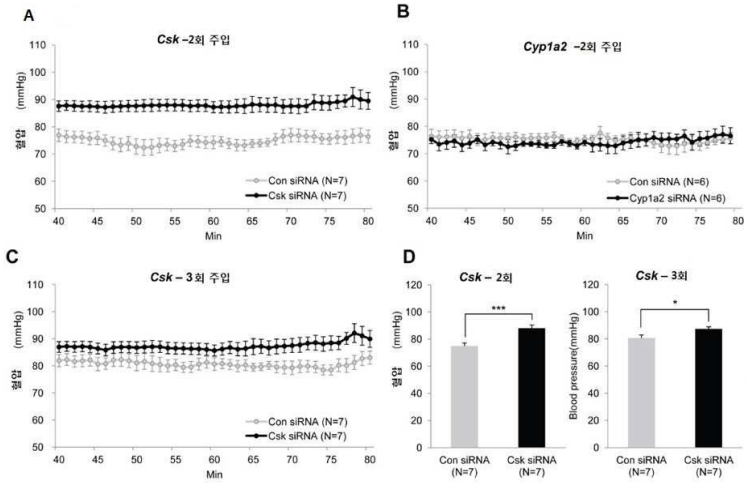
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **ＣＳＫ 유전자 조절제를 포함하는 혈압 조절용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 CSK 유전자 조절제를 포함하는 혈압 조절용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 CSK 유전자 조절제는 CSK 유전자의 발현을 억제하거나 증가시킴으로서 저혈압 또는 고혈압 상태의 혈압을 정상 혈압으로 조절하는 효과가 우수하므로, 혈압과 관련된 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

지수민

서울 강남구 도곡로 404, 102동 1002호 (대치동, 롯데캐슬리베아파트)

박소연

경기 수원시 영통구 산남로4번길 25-9, (매탄동)

임지은

서울특별시 종로구 평창동 446-1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100012080
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 혈압조절 유전인자 발굴 및 조절기전 규명
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교
연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20120009384
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 산화스트레스에 의한 혈관손상 기전의 유전체 연구
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교
연구기간 2011.09.07 ~ 2015.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

CSK(C-terminal Src kinase) 유전자 조절제를 유효성분으로 포함하는 혈압 조절용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CSK 유전자 조절제는 CSK 유전자 억제제인, 혈압 조절용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 CSK 유전자 억제제는 CSK 단백질을 코딩하는 유전자의 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(small interfering RNA) 또는 shRNA(small hairpin RNA)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상인, 혈압 조절용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 이루어진 군에서 1종 이상 선택된 것인, 혈압 조절용 약학적 조성물.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CSK 유전자 억제제는 혈압을 증가시키는 것인, 혈압 조절용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 CSK 유전자 조절제는 CSK 유전자 활성화제인, 혈압 조절용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 CSK 유전자 활성화제는 CSK 유전자의 발현을 증가시키는 전사인자인, 혈압 조절용 약학적 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 CSK 유전자 활성화제는 혈압을 감소시키는 것인, 혈압 조절용 약학적 조성물.

청구항 9

CSK 유전자 억제제를 유효성분으로 포함하는 저혈압 치료제.

청구항 10

CSK 유전자 활성화제를 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CSK 유전자 조절제를 포함하는 혈압 조절용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 1993년에 공표된 미국 합동 위원회의 보고에 따르면, 수축기 혈압의 최적 범위는 120 ㎜Hg 이하이고, 수축기 혈압이 120 내지 139 ㎜Hg이면 정상 혈압, 140 ㎜Hg 이상을 고혈압으로 분류하고 있다. 최근에는 신체의 혈압 조절 이상과 대사 증후군(metabolic syndromes)이 연관된 것으로 알려지면서 혈압 조절 이상이 건강에 미치는 유해성이 더욱 명백해지고 있다.

[0003] 한편, 저혈압은 기립시의 현기증이나 몽롱한 증상 등의 여러 가지 증상의 원인으로 알려져 있지만, 임상적으로 문제시되는 것이 없어 명확한 분류는 되어 있지 않다. 일반적으로는 수축기 혈압이 110 mmHg 이하인 상태를 저혈압이라고 정의한다. 최근 생활 습관의 변화나 다이어트 등에 의한 신체 스트레스 등으로부터 젊은 여성을 중심으로 저혈압에 기인하는 여러 가지 증상, 이른바 부정형 신체 증후군이 심각한 문제가 되고 있다.

[0004] 저혈압에 의해서 나타나는 여러 가지 증상은 일상 생활상의 문제가 되기 때문에, 삶의 질의 저하를 가져오고 생활의 부담을 높이게 된다. 또한, 고혈압은 질환으로서 인정된 바와 같이 생명 그 자체에 영향을 미치는 것이다. 따라서 혈압을 정상적으로 유지함으로써 다양한 연관 질환 위험성을 제거할 뿐만 아니라 삶의 질을 개선하기 위한 연구가 다양하게 진행되고 있다.

[0005] 저혈압 개선의 대책으로는, 교감 신경 작동약을 이용한 약물 요법에 의한 혈압 상승 작용이 주류를 이루고 있지만, 의약품이기 때문에 한정적인 이용에 머무르고 있어, 본질적인 문제 해결에는 이르고 있지 않다.

[0006] 이러한 상황으로부터, 일상적으로 섭취가 용이한 보충제 등의 식품에 의해 이들 증상을 개선하는 제안이 이루어지고 있다. 예를 들면, 파초과 (Musaceae) 식물의 과실 추출물에 혈압 상승 효과가 있다는 보고가 있다. 그러나 혈압이 정상 영역 이상인 경우의 영향이 불명확하고 일반 식품으로서 섭취하기에는 안전성의 증명이 불충분한 한계가 있다.

[0007] 또한, 페룰린산(ferulic acid)류로 이루어지는 저혈압 예방·치료제에 대한 보고가 있다. 이것에 의하면, 출혈(hemorrhage) 래트에 대한 혈압 저하 억제 작용, 자연 발증 고혈압 래트에 대한 혈압 상승 억제작용, 및 정상 혈압 래트에 대한 무 작용이 기재되어 있다. 그러나 저혈압을 상승시키는 작용에 대해서는 명확한 기재가 없어 추가 연구가 필요한 한계가 있다.

[0008] 또한 최근 고혈압과 같은 성인병 환자가 급격히 증가하고 있으며, 특히 이러한 고혈압으로 인한 손상이 급성 심장병 또는 심금 경색 등을 초래할 수 있으므로, 보다 효과적인 고혈압 치료제의 개발이 역시 계속적으로 요구되고 있다.

[0009] 한편, 이제까지 개발된 고혈압 치료제는 그 작용 기전에 따라, 안지오텐신 II 수용체 차단제(Angiotensin II Receptor Blocker; ARB), 안지오텐신 전환 효소 억제제(Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor; ACEI) 또는 칼슘 채널 차단제(Calcium Chanel Blocker; CCB) 등의 약물로 구분될 수 있다. 이 중에서도, ARB 또는 CCB 등에 속하는 약물들이 보다 우수한 혈압 강하 효과를 나타냄에 따라, 최근 들어 보다 높은 빈도로 사용되고 있다.

[0010] 그러나, 이들 약물 역시 그 혈압 강하 효과에 한계가 있고 각 약물을 일정 함량 이상으로 투여할 경우 여러 부작용이 나타낼 수 있다. 따라서 최근에는 2종 이상의 약물을 조합 또는 배합한 복합제 또는 병용 치료 방법 등을 사용하여 보다 우수한 혈압 강하 효과를 얻고자 하는 시도가 다양하게 이루어지고 있다. 각 약물에 따른 부작용은 각각의 단일 약물의 함량 또는 투여량에 직접적으로 관련되기 때문에, 2종 이상의 약물을 조합 또는 배합하여 각각의 단일 약물의 함량 또는 투여량을 줄이면서도, 이들 2종 이상의 약물의 상승 작용에 의해 보다 더욱 우수한 혈압 강하 효과를 얻고자 하는 시도가 매우 활발하게 이루어지고 있는 것이다.

[0011] 이상과 같이 혈압이 정상 영역보다 높거나 낮게 벗어 나는 경우 신체에 이상을 초래할 수 있기 때문에 혈압을 정상적인 영역 이내로 유지하는 것은 매우 중요하다. 이러한 필요성에 의하여 고혈압 및 저혈압을 효과적으로 치료할 수 있는 방법에 대하여 다양한 연구가 이루어지고 있으나 아직까지 특정 유전자의 발현을 조절함으로서 혈압을 적절하게 높이거나 낮출 수 있는 유전자 치료제에 대해서는 연구가 많이 이루어지지 않았다.

[0012] 이에 본 발명자들은 혈압을 조절할 수 있는 타깃 유전자에 관하여 연구하던 중, CSK 유전자가 혈압 조절의 타깃 유전자가 될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 CSK 유전자 조절제를 유효성분으로 포함하는 혈압 조절용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 또한 본 발명의 목적은 CSK 유전자 억제제를 유효성분으로 포함하는 저혈압 치료제를 제공하는 것이다.

[0015] 또한 본 발명의 목적은 CSK 유전자 활성화제를 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 CSK 유전자 조절제를 유효성분으로 포함하는 혈압 조절용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 상기 CSK 유전자 조절제가 CSK 유전자 억제제인, 혈압 조절용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은, 상기 CSK 유전자 억제제가 CSK 단백질을 코딩하는 유전자의 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(small interfering RNA) 또는 shRNA(small hairpin RNA)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상인, 혈압 조절용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은, 상기 siRNA가 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 이루어진 군에서 1종 이상 선택된 것인, 혈압 조절용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 또한 본 발명은 상기 CSK 유전자를 억제제가 혈압을 증가시키는 것인 혈압 조절용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 또한 본 발명은 상기 CSK 유전자 조절제가 CSK 유전자 활성화제인, 혈압 조절용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 또한 본 발명은 상기 CSK 유전자 활성화제가 CSK 유전자의 발현을 증가시키는 전사인자인, 혈압 조절용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 또한 본 발명은 상기 CSK 유전자 활성화제가 혈압을 감소시키는 것인, 혈압 조절용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 또한 본 발명은 CSK 유전자 억제제를 유효성분으로 포함하는 저혈압 치료제를 제공한다.

[0025] 또한 본 발명은 CSK 유전자 활성화제를 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료제를 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 CSK 유전자 조절제는 CSK 유전자의 발현을 억제하거나 증가시킴으로서 저혈압 또는 고혈압 상태의 혈압을 정상 혈압으로 조절하는 효과가 우수하므로, 혈압과 관련된 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 혈압 조절 유전자 후보가 위치한 15q24 좌위를 인간 및 마우스의 상동 염색체 상에서 나타낸 도이다.

도 2는 혈압 조절 유전자 후보인 Cyp1a1, Cyp1a2, Csk, 및 Ulk3의 siRNA을 마우스에 처리한 후, mRNA 발현의 변화를 실시간 PCR을 통해 확인한 결과를 siRNA 처리군 vs. 대조군으로 나타낸 도이다($p<0.05$).

도 3은 Csk 또는 Cyp1a2 특이적인 siRNA를 2회 및 3회 주입한 후 측정한 경동맥 내 혈압의 변화를 나타낸 도이다(*$p<0.05$, ***$p<0.001$).

도 4는 Csk+/- 이형 마우스와 야생형 Csk+/+ 마우스의 혈압을 비교한 결과(A) 및 mRNA의 상대적 발현 차이를 각 기관에서 확인한 결과를 나타낸 도이다(*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 CSK(C-terminal Src kinase) 유전자 조절제를 유효성분으로 포함하는 혈압 조절용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명의 CSK 유전자 조절제는 CSK 유전자의 발현을 억제하거나 증가시킴으로서 저혈압 또는 고혈압 상태의 혈압을 정상 혈압으로 조절하는 효과가 우수하므로, 혈압과 관련된 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

[0030] 상기 CSK 유전자는 인간(NCBI Gene ID 1445), 마우스(NCBI Gene ID 12988), 갈색쥐(Rattus norvegicus)(NCBI Gene ID 315707), 노랑초파리(Drosophila melanogaste)(NCBI Gene ID: 41398), 제브라피쉬(Danio rerio)(NCBI Gene ID: 556454)등 다양한 종에 존재하는 유전자이다.

[0031] 상기 Csk는 도1에서 나타내는 바와 같이 Ulk3(unc-51-like kinase3), Cyp1A1(cytochrome P450 1A1), Cyp1A2(cytochrome P450 1A2)와 함께 15q24 좌위에 위치하는 유전자이며 혈압 조절의 타깃이 되는 유전자이다. 15q24p 좌위는 아시아 인종 및 유럽 인종에서 혈압에 영향을 미치는 것으로 동정된 33개의 유전적 좌위 중 하나이다. 15q24 좌위에는 1Mb 범위 내에 21개의 유전자가 위치하고 있으나 아직까지 혈압에 영향을 주는 특정 유전자가 동정되지는 않았다.

[0032] 본 발명은 CSK 유전자가 혈압을 조절할 수 있는 타깃 유전자임을 밝히고 있으며, 이를 기초로 하여 CSK 유전자

의 발현을 증가시키거나 억제시킴으로서 혈압을 효과적으로 조절할 수 있다는 사실을 확인하고 CSK 유전자 조절제를 유효성분으로 하는 혈압 조절용 약학적 조성물 및 혈압 치료제를 제공한다.

[0033] 본 발명의 CSK 유전자 조절제는 CSK 유전자 억제제일 수 있다. CSK 유전자 억제제는 CSK mRNA의 발현을 억제할 수 있으며, CSK 단백질의 발현을 억제하여 결과적으로 혈압을 조절할 수 있다.

[0034] 본 발명은 CSK 유전자의 발현 억제뿐만 아니라 CSK 유전자가 넉아웃된 경우에도 혈압이 변화되는 것을 확인하였으므로, 상기 CSK 유전자 억제제는 CSK 단백질을 코딩하는 유전자의 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(small interfering RNA) 또는 shRNA(small hairpin RNA)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 CSK 유전자의 발현을 조절할 수 있는 물질을 제한없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 siRNA, 더욱 바람직하게는 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 이루어진 군에서 1종 이상 선택된 것일 수 있고, 서열번호 10의 siRNA인 것이 더욱 바람직하다.

[0035] 본 발명에 따른 CSK 유전자 억제제를 투여하면 혈압이 상승될 수 있으며 이를 통해 저혈압을 치료할 수 있다.

[0036] 또한 본 발명의 CSK 유전자 조절제는 CSK 유전자 활성화제일 수 있다.

[0037] 상기 CSK 유전자 활성화제는 CSK의 생물학적 활성을 개선, 유도, 자극, 증가시키는 물질을 말한다. 이런 물질은 유기 또는 무기 화합물과 같은 단일 화합물 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물 및 복수 화합물의 복합체 등을 포함할 수 있다.

[0038] 또한 상기 CSK 유전자 활성화제는 CSK 유전자의 발현을 증가시키는 전사인자 일 수 있으며, 예를 들어 PKA(protein kinase A)일 수 있다.

[0039] CSK 유전자 활성화제의 기작은 특별히 제한되지 않으나 예를 들어, 전사, 번역 등을 통해 유전자 발현을 증가시키거나 비활성형을 활성형으로 전환시키는 기작을 이용하여 혈압을 감소시킬 수 있다.

[0040] 본 발명의 CSK 유전자 활성화제는 높은 혈압이 유지되는 개체에 투여되는 경우, 혈압을 감소시킬 수 있으며 이를 통해 고혈압을 치료할 수 있다.

[0041] 상기와 같이 본 발명에 따른 CSK 유전자 조절제는 CSK 유전자를 억제하거나 발현을 증가시킴으로서 혈압을 효과적으로 조절할 수 있으므로, CSK 유전자 조절제를 유효성분으로 포함하는 혈압치료제를 제공할 수 있다.

[0042] 따라서 본 발명은 CSK 유전자 억제제를 유효성분으로 포함하는 저혈압 치료제 및 CSK 유전자 활성화제를 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료제를 제공한다. 상기 치료제는 바람직하게는 CSK 유전자 억제제를 유효성분으로 포함하는 저혈압 치료제이다.

[0043] 본 발명의 약학적 조성물 및 혈압 치료제는 혈압 조절이 필요한 환자에 처방될 수 있으며 바람직하게는 아시아인종 또는 유럽 인종인 혈압 환자에 처방될 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 본 발명의 유전자 치료제를 포함하는 약학적 조성물의 제형은 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약앰플 또는 다중 투약형태로 제조할 수 있다. 기타 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[0045] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토오즈, 덱스트로오즈, 수크로오즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오즈, 메틸 셀룰로오즈, 미정질 셀룰로오즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록 시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명의 조성물은 의약으로서, 혈압 조절제로서 사용할 수 있고, 경구 또는 비경구 투여가 가능하며 특히 경구 의약품 또는 주사 형태로 할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 구강, 비강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 장관, 설하, 흡입 또는 국소 투여가 가능하다. 이와 같은 임상 투여를 위해 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 기술을 이용하여 적합한 제형으로 제제화할 수 있다.

[0047] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본

발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이드, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다.

[0048] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0049] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필레글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여 시 피하주사, 정맥주사를 통하여 투여될 수 있다.

[0051] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 CSK 유전자 조절제는 1일 0.1 내지 100mg/kg으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 1일 0.1 내지 10mg/kg 투여, 더욱 바람직하게는 1일 0.1 내지 5.0mg/kg 투여할 수 있다. 본 발명의 CSK 유전자 조절제는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량의 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0052] 본 발명의 조성물은 혈압 조절을 위하여 단독으로, 또는 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있으며 의약품 외에도 보충제, 의약 부외품 등으로도 사용할 수 있다.

[0053] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 또는 제제예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1. 혈압조절 유전자 선별 및 유전자 억제에 의한 혈압 변화 확인**

[0055] 1.1 실험 동물의 준비

[0056] 7주 내지 9주령의 BALB/c 마우스(일본 SLC, Inc., 신주쿠, 일본)를 siRNA 주입을 위하여 무균상태에서 사육하였다.

[0057] 1.2 후보 유전자에 대한 siRNA 선별

[0058] siRNA를 in vivo로 주입하기 전, 정상 마우스 조직에서 후보 유전자의 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. Csk 및 Ulk3은 대부분의 조직에서 발현되었고, Cyp1a1 은 대부분의 조직에서 낮게 발현되었으며, Cyp1a2 은 간에서 매우 높게 발현되었다.

[0059] 각 유전자 당 3개의 siRNA를 합성하고 NIH3T3 및 B16F10 세포에서 그들의 침묵 효율의 확인을 통해 가장 효율적인 siRNA를 선택하여 이후의 siRNA 주입 실험에 사용하였다. 사용한 타깃 siRNA 및 스크램블 대조군 siRNA의 서열정보를 표 1에 나타내었다.

[0060] [표 1]

서열번호	siRNA 명칭	타깃서열 (5'-3')	침묵효율 (%)	세포주
1	스크램블 대조군 siRNA	ACGUGACACGUUCGGAGAAUU		
2	*Cypla1* #1	GCGUGAAAUGGAAGAGAAC	29.8	
3	*Cypla1* #2	CAGGUUAUCAACGAAACUU	26.3	NIH3T3
4	*Cypla1* #3	GUCUGAAUGGCUUCUAUAU	**36.3**	
5	*Cypla2* #1	CUGAACAUCGUGAAUAACA	22.1	
6	*Cypla2* #2	GAUUGUCAACAUUGUCAAU	44.9	NIH3T3
7	*Cypla2* #3	GGUUUAAGACCUUCAAUGA	**44.9**	
8	*Csk* #1	GAATGTATTGCCAAGTACA	11.7	
9	*Csk* #2	ACAAGAAGTACGAATCTTA	29.3	B16F10
10	*Csk* #3	CTGGCCATCCGGTACAGAA	**40.1**	
11	*Ulk3* #1	CGTACGCCACGGTGTACAA	8.0	
12	*Ulk3* #2	GGACAATGACAATATCTAC	17.1	B16F10
13	*Ulk3* #3	GAATGTGACCTTGTCATTA	**28.3**	

[0061]

[0062] 구체적으로 유전자 당 3개의 siRNA를 Genolution (서울, 한국)에서 합성하여 사용하였으며, in vivo 주입을 위하여 3개 중에 1개의 siRNA를 선택하였다. siRNA의 침묵 효율을 확인하기 위하여, 제조사의 방법에 따라 NIH3T3 세포 내에서 siRNA 20nM을 G-Fectin(Genolution, 서울, 한국) 및 리포펙타민 2000(Invitrogen, Carlsbad, 캐나다)을 이용하여 B16F10 세포로 형질감염시켰다. TRP53 siRNA를 모든 in vitro 형질감염의 양성 대조군으로 사용하였다. 상기와 같은 실험을 수행하여, 합성된 siRNA 중 Cyp1a1, Cyp1a2, Csk, 및 Ulk3을 각각 36.3%, 44.9%, 40.1%, 및 28.3%까지 감소시키는 서열번호 4, 7, 10, 13 siRNA를 선택하고 이후 혈압 조절 실험에 사용하였다.

[0063] 1.3 siRNA 주입에 따른 유전자 발현 변화 분석 및 후보 유전자 선별

[0064] 상기 실시예 1.2에서 선택된 siRNA들을 마우스로 주입하면 mRNA 및 단백질 발현을 변화시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 siRNA와 폴리에틸렌아민을 혼합하여 마우스의 꼬리 정맥으로 주사하였고, 실시간 PCR을 통해 mRNA 발현을 측정하였다. 제조사의 지시에 따라, 50㎍ siRNA와 6.5㎕의 in vivo-jetPEI(N/Pcharge ratio of 6)을 50㎕ 10% 글루코오스 용액 및 50㎕ 멸균 H_2O를 이용하여 희석시켰다. 희석된 용액을 부드럽게 교반시킨 후 실온에서 15분 동안 방치하여 혼합물을 제조하였다. 제조된 혼합물을 7주령의 마우스의 꼬리 정맥을 통해 주입하고, 처리된 마우스의 혈압을 측정하고 mRNA 측정을 위하여 희생시켰다.

[0065] 실시간 PCR을 위하여 siRNA 최종 주입 24시간 후, siRNA 주입된 마우스의 조직으로부터 총 RNA를 TRIzol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 PrimeScript™RT 키트(TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 500ng의 총 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 정량적 실시간 PCR 분석을 SYBR 그린 I(TaKaRa, Shiga, Japan)을 이용하여 ABI Step One Real-Time PCR 시스템(Applied Biosystems, Foster, CA)상에서 수행하였다. PCR 반응은 95℃에서 10초, 60℃에서 15초 및 72℃에서 20초로 45 사이클로 수행하였다. 각각의 반응에서의 샘플 cDNA양을 표준화하기 위하여, Gapdh의 Ct 값을 ΔCt를 얻기위한 각각 타깃 유전자로부터 감산하였고 유전자 발현의 변화를 계산하기 위하여 대조군 샘플의 ΔCt값을 ΔΔCt를 얻기위한 케이스 샘플에서 감산하였다(ΔΔCt =ΔCt 케이스 - ΔCt 대조군)(Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. Methods. 2001;25:402-408). 발현의 상대적인 수준을 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 계산하였다.

[0066] 실시간 PCR을 통해 확인된 4가지 후보 유전자의 mRNA 발현의 변화를 도 2에 나타내었다.

[0067] 도 2에 나타낸 바와 같이 Csk mRNA 수준은 심장과 콩팥에서 각각 40%(P=0.038) 및 22%(P=0.038)까지 뚜렷하게 감소하였고, Cyp1a2 은 간에서 54%(P=0.032)까지 감소되었다. 그러나 Cyp1a1 및 Ulk3 mRNA 수준은 siRNA 주입된 마우스에서 유의하게 변화되지 않았고, Ulk3 siRNA 주입은 심장에서 오히려 mRNA가 뚜렷하게 증가되도록 하였다. 이를 통해 후보 유전자 4개 가운데 siRNA 주입을 통해 실제로 조직에서 발현을 조절할 수 있는 유전자인 Cyp1a2 및 Csk를 추가 실험 대상 유전자로 선정하였다.

[0068] 1.4 대상 유전자 억제에 의한 혈압 조절 효과 확인

[0069] siRNA 주입 24 시간 후 경동맥 내 혈압을 혈압 센서와 연결된 동맥주사 카테터를 사용하여 측정하여 siRNA에 따른 대상 유전자 억제가 혈압을 조절할 수 있는지 여부를 확인하였다. 마우스를 마취시킨 후, 2시간 마다 연속적

으로 혈압을 기록하였다. 혈압은 컴퓨터화된 데이터 수집 시스템(AD Instruments, Bella Vista, Australia)을 이용하여 기록하였다. 폴리에틸렌 튜브 동맥주사 카테터(0.2mm I.d., 0.5mm O.D.)를 위치시키기 위하여 마우스를 g 체중 당 0.018ml 트리브로모에탄올로 용액으로 마취시켰다. 카테터를 100U/ml 헤파린을 포함하는 0.9% NaCl로 채우고 우 경동맥으로 삽입하고 고정시켰다. 혈관 내 혈압이 카테터를 따라 변환기의 diaphragm(MLT0699 Disposable BP Transducer, AD Instruments, Bella Vista, Australia)으로 전달되었다. diaphragm 신호는 분기 증폭기(bridge amplifier)로 증폭되었고 파워랩시스템(Lab Chart 7.2, AD Instruments, Bella Vista, Australia)에 기록되었다. 혈압은 2시간 동안 관찰되었고, 마취제 주입(1분당 1포인트) 후 40 내지 80분 후 사이에서 40분 동안의 평균으로 표현하였다.

[0070] 결과를 도 3에 나타내었다.

[0071] 도 3에 나타낸 바와 같이 Csk siRNA 주입군의 혈압은 2회 주입(2일 동안, 1회/1일) 후에 대조군의 혈압인 75mmHg(N=7)와 비교하여 88mmHg(N=7)로 나타나 혈압이 뚜렷하게 변화되었다(P<0.001)(A). 3회(3일) 주입에서도 Csk siRNA 주입군의 혈압은 대조군의 혈압과 뚜렷한 차이를 보였다(C 및 D). 그러나 Cyp1a2 siRNA가 주입된 마우스는 2회 주입 후에도 대조군과 구별되는 뚜렷한 혈압 차이를 보이지 않았다(P=1.000)(B). 이러한 결과에 따라 최종적으로 Csk 유전자가 혈압 조절의 타깃이 될 수 있으며 Csk 유전자를 조절하는 경우 혈압을 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0072] **실시예 2. Csk-이형 결핍(haploinsufficent) 마우스에서의 혈압 증가**

[0073] Csk 유전자 조절에 의한 혈압 변화를 재확인하기 위하여, Csk 넉아웃 마우스에서 혈압 변화를 확인하였다. Csk 넉아웃 마우스(knockout mice, B6.129-Csk$^{-/-tm1Tara}$)는 The Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)로부터 구입하여 사용하였다. 이형접합체 및 정상 동형접합체쌍을 교배하고, PCR을 이용하여 교배로 태어난 자손들의 유전자형을 분석하였다. 사용한 PCR 프라이머 쌍의 서열을 하기 표2에 나타내었다.

[0074] [표 2]

[0075]

	서열
정방향	5''-CCTTCTATCGCCTTCTTGACG-3''
역방향	5''-GGGCTCAGTTCAAGTTCAGG-3'

[0076] 7주 내지 9주령의 넉아웃 마우스에서 혈압을 실시예 1.4에 기재된 방법과 동일한 방법을 이용하여 측정하였으며, 마우스들을 식이 제한이 없는 항온 환경으로 12시간 명/암 주기에서 유지시켰다. Csk-/- 동형은 배아-치사(embryonic-lethal)이기 때문에, Csk+/- 이형 마우스와 야생형 Csk+/+ 마우스의 혈압을 비교하였다.

[0077] 결과를 도 4에 나타내었다.

[0078] 도 4에 나타낸 바와 같이, 40분 내지 80분 동안 경동맥에서의 혈압을 측정한 결과 Csk+/- 이형 마우스의 혈압은 Csk+/+ 마우스의 혈압보다 높게 나타났으며 이러한 혈압의 차이는 유의적인 차이임을 확인하였다(A)(이형접합 N=15, 야생형 N=12; P=0.021). 심장, 간, 폐 등 다양한 조직에서 CsK mRNA 수준을 측정한 결과에서도 이형접합인 Csk+/- 에서 Csk mRNA가 동형접합과 비교하여 상대적으로 발현이 절반 수준으로 감소되어 있음을 확인하였다(B). 이러한 결과를 통해 Csk 유전자는 혈압을 조절할 수 있는 타깃 유전자임을 재확인하였다.

[0079] **제제예 1. 의약품의 제조**

[0080] 1.1 산제의 제조

[0081] CSK 조절제 100mg

[0082] 유당 100mg

[0083] 탈 10mg

[0084] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0085] 1.2 정제의 제조

[0086] CSK 조절제 100mg

[0087] 옥수수전분 100mg

[0088] 유당 100mg

[0089] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0090] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0091] 1.3 캡슐제의 제조

[0092] CSK 조절제 100mg

[0093] 옥수수전분 100mg

[0094] 유당 100mg

[0095] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0096] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 정제를 제조한다.

[0097] 1.4 주사제의 제조

[0098] CSK 조절제 100mg

[0099] 주사용 멸균 증류수 적량

[0100] pH 조절제 적량

[0101] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0102] 1.5 액제의 제조

[0103] CSK 조절제 100mg

[0104] 설탕 20g

[0105] 이성화당 20g

[0106] 레몬향 적량

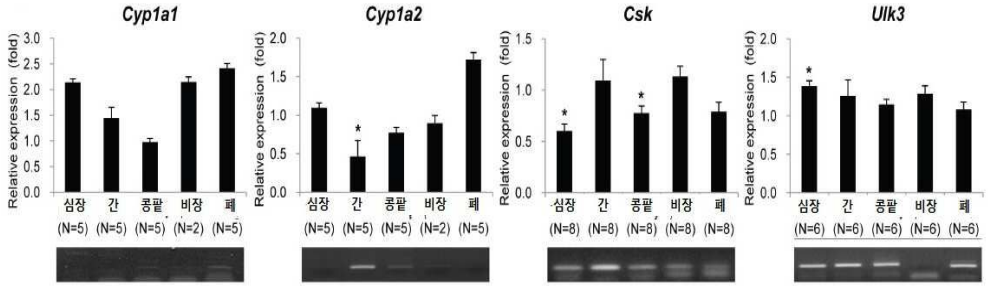
[0107] 정제수를 가하여 전체 1,00ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

도면

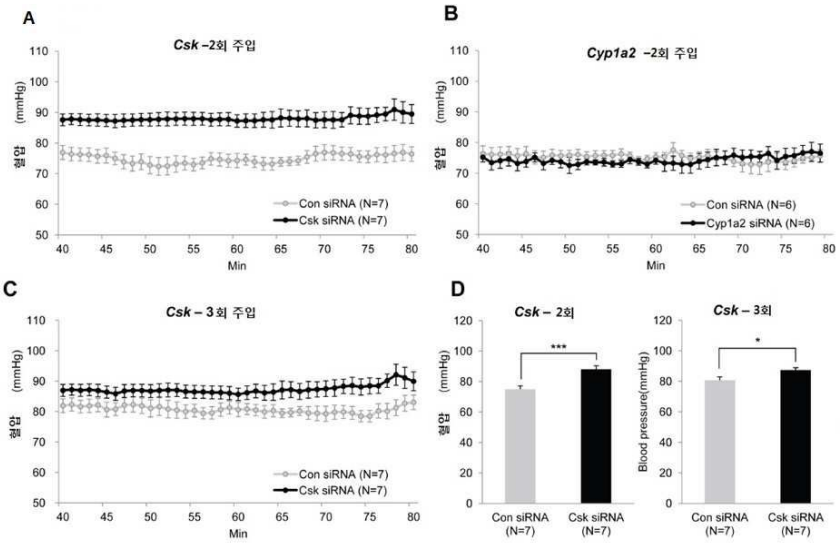
도면1



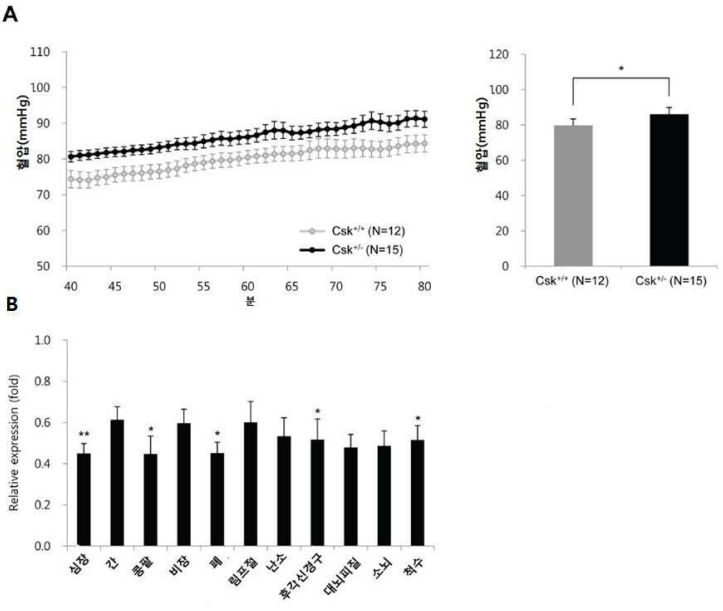
도면2


Cyp1a1
Cyp1a2
Csk
Ulk3
Relative expression (fold)
심장 간 콩팥 비장 폐
(N=5) (N=5) (N=5) (N=2) (N=5)
(N=8) (N=8) (N=8) (N=8) (N=8)
(N=6) (N=6) (N=6) (N=6) (N=6)

도면3


A
Csk –2회 주입
B
Cyp1a2 –2회 주입
C
Csk – 3회 주입
D
Csk – 2회
Csk – 3회
혈압 (mmHg)
Blood pressure(mmHg)
Min
Con siRNA (N=7)
Csk siRNA (N=7)
Con siRNA (N=6)
Cyp1a2 siRNA (N=6)
***
*

도면4



서 열 목 록

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

<120> Pharmaceutical composition for controlling blood pressure comprising CSK gene regulator

<130> P13-043-KHU

<160> 13

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> scramble control siRNA

<400> 1

acgugacacg uucggagaau u 21

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cypla1 #1

<400> 2

gcgugaaaug gaagagaac 19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cypla1 #2

<400> 3

cagguuauca acgaaacuu 19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cypla1 #3

<400> 4

gucugaaugg cuucuauau 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cypla2 #1

<400> 5

cugaacaucg ugaauaaca 19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cypla2 #2

<400> 6

gauugucaac auugucaau 19

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cypla2 #3

<400> 7

gguuuaagac cuucaauga 19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Csk #1

<400> 8

gaatgtattg ccaagtaca 19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Csk #2

<400> 9

acaagaagta cgaatctta 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Csk #3

<400> 10

ctggccatcc ggtacagaa 19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ulk3 #1

<400> 11

cgtacgccac ggtgtacaa 19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ulk3 #2

<400> 12

ggacaatgac aatatctac 19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ulk3 #3

<400> 13

gaatgtgacc ttgtcatta 19