(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0062914
(43) 공개일자 2010년06월10일

(51) Int. Cl.
C12N 15/11 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0110639
(22) 출원일자 2009년11월17일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020080121507 2008년12월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
이희란
경기도 성남시 분당구 정자동 상록마을라이프아파트 106동 201호
김승후
서울특별시 송파구 방이1동 코오롱아파트 103동 1312호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

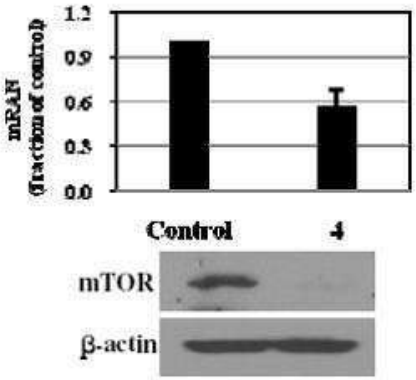
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 종간 교차활성을 지닌 mTOR을 표적으로 하는 siRNA, 이를 포함하는 재조합벡터 및 이를 함유하는 약학조성물

(57) 요 약

본 발명은 종간 교차활성을 지닌 mTOR을 표적으로 하는 siRNA, 이를 포함하는 재조합벡터 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물에 관한 것으로, 상기 mTOR 표적 siRNA는 mTOR 유전자의 일부와 상보적인 서열을 가짐으로써, mTOR 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있기 때문에 mTOR을 표적으로 하는 다양한 질환, 예를들어 암, 신경변성질환, 면역질환, 감염질환, 노화, 심장질환, 간질환 및 크론병으로 이루어진 군에서 선택된 질환, 특히 암질환을 예방하거나 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도3a



(72) 발명자

안정현

서울특별시 동대문구 답십리2동 청솔우성아파트 112동 503호

김성진

서울특별시 송파구 풍납동 388-1 울산의대 미생물학교실

이휘선

서울특별시 강남구 논현2동 77-5번지 101호

이윤선

대구광역시 동구 신서동 동화해오름타운 106동 402호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2008-0507
부처명	한국과학재단
연구사업명	기초의학연구과제
연구과제명	Autophagy 제어를 통한 줄기세포치료법 개발
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2008년 09월 01일 ~ 2009년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 4 중에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는 siRNA.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 siRNA는 mTOR과 결합하여 그 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 3

서열번호 1 내지 서열번호 4 중에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는 siRNA를 포함하는 재조합벡터.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 재조합벡터는 도 1에 도시된 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합벡터.

청구항 5

청구항 3 또는 청구항 4에 있어서, 상기 재조합벡터는 pSP72-scAAV-GFP-mTOR인 것을 특징으로 하는 재조합벡터.

청구항 6

서열번호 1 내지 서열번호 4 중에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는 siRNA를 유효성분으로 함유하는 약학조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 약학조성물은 암, 신경변성질환, 면역질환, 감염질환, 노화, 심장질환, 간질환 및 크론병으로 이루어진 군에서 선택된 질환을 예방하거나 치료하는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 8

서열번호 1 내지 서열번호 4 중에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는 siRNA를 유효성분으로 함유하는 암질환 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 암질환은 간암, 폐암, 비소세포성폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 암질환인 암질환 치료 및 예방용 약학조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 mTOR을 표적으로 하는 다양한 질환, 예를들어 암, 신경변성질환, 면역질환, 감염질환, 노화, 심장질환, 간질환 및 크론병으로 이루어진 군에서 선택된 질환, 특히 암질환을 예방하거나 치료할 수 있는, 종간 교차활성을 지닌 mTOR을 표적으로 하는 siRNA, 이를 포함하는 재조합벡터 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] mTOR(포유동물의 라파마이신 표적; mammalian Target of rapamycin)은 사이토카인-자극 세포 증식, 세포주기의 G1 위상을 조절하는 몇몇 중요 단백질을 위한 mRNA의 번역(translation), 및 인터루킨-2(IL-2) 유도 전사(transcription)를 포함하는, 다양한 신호 전환 경로에 있어서 중요한 효소이다.

[0003] mTOR의 억제는 세포주기의 G1으로부터 S까지의 진행의 억제를 야기한다. 스트렙토마이세스 히그로스코피커스(Streptomyces hygroscopicus)에 의해 제조된 항생제인 라파마이신(Sirolimus™으로서 상업적으로 이용가능함)은 중요한 mTOR 억제제로 밝혀져 있다.

[0004] mTOR 억제제는 면역억제, 항증식 및 항암 활성을 나타내므로, 이러한 질환의 치료를 위하여 mTOR이 표적으로 되고 있다(Current Opinion in Lipidology, 16: 317-323, 2005). 또, mTOR은 자가소화(autophage) 조절에 중요한 인자로서, 자가소화 경로를 조절하는 mTOR을 표적으로 하여 다양한 질환 예를들어, 암, 신경변성 질환, 심장질환, 노화, 면역질환, 감염 질환 및 크론병 등을 치료할 수 있다(Immunology, 7: 767-777; Nature 451: 1069-1075, 2008).

[0005] 한편, 리보핵산 매개 간섭현상(RNAi)은 21-25개의 뉴클레오타이드 크기의 이중나선 구조를 가진 작은 간섭 리보핵산이 상보적인 서열을 가지는 전사체(mRNA transcript)에 특이적으로 결합하여 해당 전사체를 분해하여 특정 단백질의 발현을 억제하는 현상이다. 최근 이 리보핵산 매개 간섭현상이 기존의 화학 합성 의약 개발에서 발생되는 문제의 해결책을 제시하면서 전사체 수준에서 특정 단백질의 발현을 선택적으로 억제하여 각종 질병 치료제, 특히 종양 치료제 개발에 이용하려는 연구가 진행되고 있다.

[0006] 작은 분자량의 화학 약물(small molecule chemical drugs)의 경우 특정한 단백질 표적에 최적화되기까지 오랜 동안의 개발 기간 및 개발 비용이 소요되는 반면, 리보핵산 매개 간섭현상을 이용한 siRNA 의약의 가장 큰 장점은 의약화가 불가능한 표적 물질을 포함한 모든 단백질 표적에 대하여 최적화된 리드 화합물의 개발이 신속히 진행될 수 있다는 것이다.

[0007] 단백질이나 항체 약물이 복잡한 제조공정으로 생산의 어려움을 겪는데 반해 siRNA는 합성 및 분리정제의 용이성으로 대량생산이 비교적 쉽고, 핵산 소재의 특징상 단백질 의약보다 보관상 안정성이 높은 장점이 있다. 또한 기존의 약물과는 달리 특정 분자 표적에 오직 길항작용만 할 수 있다는 점 등 여러 장점에 기반하여 새로운 의약 후보군으로서 부상하고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명자는 다양한 질환의 표적으로 알려져 있는 mTOR 유전자의 일부와 상보적인 서열을 가짐으로써, mTOR 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있는 종간 교차활성을 지닌 siRNA를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 다양한 질환의 표적으로 알려진 mTOR 유전자의 발현을 억제할 수 있는 종간 교차활성을 지닌 mTOR 표적 siRNA, 상기 siRNA를 포함하는 재조합벡터 및 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 mTOR 유전자의 발현을 억제할 수 있는 종간 교차활성을 지닌 mTOR 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 암질환 치료 및 예방용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

과제 해결수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4 중에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는 siRNA를 제공한다.

[0012] 본 발명에서 mTOR을 표적으로 하는 siRNA는 인간, 원숭이, 랫트의 mTOR 유전자의 일부와 100% 상보적인 서열을 가지고, mTOR 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있다. 상보성이 80-90%인 경우에는 mRNA의 번역을 억제할 수 있고, 100%인 경우에는 mRNA를 분해시킬 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명에 따른 mTOR을 표적으로 하는 siRNA는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 표시되는 염기서열과 80%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 100%의 상동성을 갖는 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 각각의 염기서열은 5 내지 15bp의 루프 영역에 의해 회문적으로 연결되어 헤어핀 구조를 형성할 수도 있다.

[0014] 본 발명의 siRNA는 당업계에 공지된 RNA 분자의 제조방법에 따라 제조할 수 있다. RNA 분자의 제조방법으로는 화학적 합성 방법 및 효소적 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, RNA 분자의 화학적 합성은 문헌에 개시되어 있는 방법을 사용할 수 있으며(Verma and Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 67, 99-134, 1999), RNA 분자의 효소적 합성은 T7, T3 및 SP6 RNA 폴리머라제와 같은 파아지 RNA 폴리머라제를 이용하는 방법이 문헌에 개시되어 있다(Milligan and Uhlenbeck, Methods Enzymol. 180: 51-62, 1989).

[0015] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4 중에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는 siRNA를 포함하는 재조합벡터를 제공한다.

[0016] 상기 재조합벡터는 도 1에 도시된 개열지도를 나타내며, 바람직하게는 pSP72-scAAV-GFP-mTOR이다.

[0017] 본 발명의 재조합벡터는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0018] 본 발명에서 mTOR에 대한 siRNA를 전달하기에 유용한 바이러스 또는 바이러스 벡터로는 바큘로비리디애(baculoviridiae), 파르보비리디애(parvoviridiae), 피코르노비리디애(picornoviridiae), 헤레페스비리디애(herepesviridiae), 폭스비리디애(poxviridiae), 아데노비리디애(adenoviridiae) 등이 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명에서는 아데노 부속 바이러스(Adeno Associated Virus, AAU)를 이용하는 것이 가장 바람직하다. 아데노 부속 바이러스는 면역반응과 세포독성을 거의 유발하지 않는다. 특히, 아데노 부속 바이러스 혈청형 2(serotype 2)는 CNS의 신경세포로 효율적인 유전자 전달을 할 수 있으며, 또한 신경계에서 형질전환 유전자(transgene)를 효과적으로 장기간 발현할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명에서 mTOR에 대한 siRNA를 전달하기에 유용한 비바이러스 벡터로는 전술한 바이러스 벡터를 제외한 통상적으로 유전자 요법에 사용되는 모든 벡터를 포함하며, 예를들어 진핵세포에서 발현 가능한 다양한 플라스미드 및 리포좀 등이 있다.

[0021] 한편, 본 발명에서 mTOR을 표적으로 하는 siRNA는 전달된 세포에서 적절히 전사되기 위하여 적어도 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것이 바람직하다. 상기 프로모터는 진핵세포에서 기능할 수 있는 프로모터라면 어떤 것이든지 무방하나, 사람 H1 폴리머라제-III 프로모터가 보다 바람직하다. mTOR을 표적으로 하는 siRNA의 효율적인 전사를 위하여 필요에 따라 리더 서열, 폴리아데닐화 서열, 프로모터, 인핸서, 업스트림 활성화 서열, 신호펩타이드 서열 및 전사 종결인자를 비롯한 조절서열을 추가로 포함할 수도 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4 중에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는 siRNA를 유효성분으로 함유하는 약학조성물을 제공한다.

[0023] 상기 약학조성물은 암, 신경변성질환, 면역질환, 감염질환, 노화, 심장질환, 간질환 및 크론병으로 이루어진 군에서 선택된 질환을 예방하거나 치료할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4 중에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는 siRNA를 유효성분으로 함유하는 암질환 치료 및 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0025] 상기 암질환은 간암, 폐암, 비소세포성폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 암질환을 예방하거나 치료할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 mTOR 표적 siRNA를 약학조성물로 사용할 경우에는 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤

조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.

[0028] 상기 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0029] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.

[0030] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0031] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0032] 상기 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 2.0 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0033] 또한, 이러한 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0034] 상기 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

효 과

[0035] 본 발명에 따른 mTOR을 표적으로 하는 siRNA는 다양한 종 예를들어 인간, 원숭이 및 랫트의 mTOR 유전자의 일부와 상보적인 서열을 가짐으로써, mTOR 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있기 때문에 mTOR을 표적으로 하는 다양한 질환, 예를들어 암, 신경변성질환, 면역질환, 감염질환, 노화, 심장질환, 간질환 및 크론병으로 이루어진 군에서 선택된 질환, 특히 암질환을 예방하거나 치료할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0036] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 하기에 제시한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] **<실시예 1> siRNA의 설계**

[0038] 다양한 종의 mTOR에서의 완전 보존 서열 패턴(completely conserved squence pattern)으로부터 표적 서열을 선정하였다. 이때, 사용된 종은 인간(LOCUS: NM_004958), 원숭이(XR_014791), 랫트(NM_019906) 및 마우스(NM_020009)를 포함한다.

[0039] 효과적인 siRNA의 설계를 위하여, MWG Biotech AG 소프트웨어 (www.mwgbiotech.com) 또는 CAPSID(Convenient Application Program for siRNA Design)라고 하는 교내에서 개발된 siRNA 설계 소프트웨어를 이용하였다.

[0040] siRNA의 서열을 결정한 후, 비특이적인 대조군 siRNA를 Bioneer (Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. siRNA 이중가닥 올리고뉴클레오타이드는 제조업자에 의해 지시된 바에 따라 뉴클레아제가 없는 물에 재현탁하였다. 세포로 형질감염 효율을 조사하기 위하여 Cy3-형광 염료로 표지된 비특이적인 siRNA가 대조군으로서 이용되었다. 본 실시예에서 이용된 모든 siRNA의 서열은 표 1과 같다.

표 1

[0041]

siRNA	표적서열(5'→3')	시작	siRNA-점수	서열번호
mTOR-1	GGAGUCUACUCGCUUCUAU	253	9.5	1

mTOR-2	GAAGAAGGUCACUGAGGAU	5677	9	2
mTOR-3	ACAACCUCCAGGAUACACU	5772	8.5	3
mTOR-4	GAAUGUUGACCAAUGCUAU	7221	13	4

[0042] **<실시예 2> 세포 배양 및 형질감염**

[0043] HeLa, Vero 및 H9C2 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)으로부터 구매하였다. 상기 세포는 5% CO_2 배양기에서 37℃에서 10% FBS(fetal bovine serum), 글루타맥스-1(2mM), 페니실린(100 IU/ml) 및 스트렙토마이신(50㎍/ml)으로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco BRL, Carlsbad, CA) 배지에서 배양하였다.

[0044] 일시적인 형질감염을 위하여, 무혈청 상태에서 올리고펙타민 시약(Invitrogen)을 이용하여 세포를 100nM siRNA으로 4시간 동안 배양한 후, 10% 혈청을 함유한 신선한 배지를 첨가하였다. 추가 실험을 위해 형질감염 24시간 후 세포를 수확하였다.

[0045] **<실시예 3> Real-time RT-PCR**

[0046] 총 RNA는 HeLa, Vero 및 H9C2 세포로부터 트리졸 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 추출하였다. 역전사(RT)는 올리고-dT 프라이머(Invitrogen)를 이용하여 55℃에서 슈퍼스크립트 III(Invitrogen, Carlsbad, CA)로 수행하였다. 합성된 cDNA는 iQ SYBR 그린 수퍼믹스(Bio-rad, Hercules, CA)를 이용하여 real-time RT-PCR에 의해 증폭되었다.

[0047] 상기 반응은 폴리머라아제 활성화를 위한 95℃에서 3분, 및 [95℃에서 15초(변성), 60℃에서 30초(어닐링), 72℃에서 30초(연장)]의 39회 주기로 구성되었다. β-액틴은 상대적인 유전자 발현의 정도를 평가하기 위한 정상 대조군으로 사용되었다.

[0048] 이때, 사용된 프라이머는 랫트-mTOR-센스 및 안티센스 프라이머(서열번호 5 및 6), 인간-mTOR-센스 및 안티센스 프라이머(서열번호 7 및 8), 일반 β-액틴-센스 및 안티센스 프라이머(서열번호 9 및 10)였고, 원숭이 mTOR 프라이머는 인간의 것과 동일하였다.

[0049] 상대적인 유전자 발현은 GeneXpression Macro chromo4 software(Bio-Rad)에 의해 평가되었다. 그 결과, 도 1의 상단과 같이 4종의 siRNA 모두 HeLa 세포주에서 mTOR mRNA 발현을 억제하였고, 도 3a 및 도 3b와 같이 Vero 세포주 및 H9C2 세포주에서도 역시 mTOR mRNA 발현을 억제하였다.

[0050] **<실시예 4> 웨스턴 블롯 분석**

[0051] 세포를 회수하여 100㎕의 용균 완충용액(Intron, Seoul, Korea)으로 용균하

[0052] 였다. 용균물은 5X 시료 완충용액과 함께 100℃에서 5분간 끓여주고 변성 단백질은 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분리한 후 semi-drier(Bio-Rad)를 이용하여 20V에서 30분간 PVDF 멤브레인으로 전달시켰다.

[0053] 실온에서 1시간 동안 블록 용액(0.4 % Tween 20 및 5 % dry milk in PBS)으로 처리한 후 멤브레인을 일차 항체: mTOR (1:1000, Cell signaling, Boston, MA), β-actin(1:5000, Sigma, St. Louis, MI) 및 GFP (1:1000, Santa Cruz)와 하룻밤 동안 정치하였다. PBST 또는 TBST로 세척한 후 호스 라디쉬 퍼옥시다제가 접합된 이차 항체(Jackson laboratory)는 적용되었고 블롯은 개선된 화학발광 시약(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)으로 발현시켰다.

[0054] 그 결과, 도 1의 하단과 같이 4종의 siRNA 모두 HeLa 세포주에서 mTOR 단백질 발현을 억제하였고, 도 3a 및 도 3b와 같이 Vero 세포주 및 H9C2 세포주에서도 역시 mTOR 단백질 발현을 억제하였다.

[0055] **<실시예 5> 플로우 사이토메트릭 분석**

[0056] mTOR 발현을 웨스턴 블롯 분석 이외의 다른 방법으로 분석하기 위하여, 플로우 사이토메트릭 분석을 수행하였다. 플로우 사이토메트리를 위해서는, 세포를 모으고, PBS에 용해된 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 0.05% TritonX-100로 투과한 후, 세포를 mTOR 프라머리(Cell Signaling, Boston, MA) 및 FITC-접합 2차 항체(in 1% BSA)로 배양하였다. 그후, 표식세포를 플로우사이토메트리(FACSCalibur, Becton Dickinson, San

Jose, CA)에 의해 분석하였다.

[0057] 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이 4종의 siRNA 모두 mTOR 유전자를 넉다운 시켰다.

[0058] **<실시예 6> mTOR shRNA를 발현하는 재조합 벡터의 구축**

[0059] 6-1: pSP72-pH1의 작제

[0060] shRNA 발현을 위한 프로모터로서 사람 H1 폴리머라제 -III 프로모터 (pH1)는 PCR을 기반으로 한 방법에 의해 증폭되었다. 즉, pH1의 서열은 HeLa 세포로부터 분리된 사람의 지노믹 DNA로부터 프라이머 5'-CCA TGG AAT TCG AAC GCT GA-3' (서열번호: 11) 및 5'-GGG AAA GAG TGG TCT CAT AC-3'(서열번호: 12)를 이용하여 PCR에 의해 증폭되었다. 이렇게 증폭된 PCR 산물을 주형으로 센스 프라이머 (EcoRI 링커)5'-ATC GAA TTC ATA TTT GCA TGT CGC TAT GTG-3'(서열번호: 13) 및 안티센스 프라이머(BamHI 링커)5'-ATC GGA TCC GAG TGG TCT CAT ACA GAAC-3'(서열번호: 14)를 이용하여 이차 PCR을 실시하였다. PCR 산물은 EcoRI/BamHI으로 소화시킨 후 아가로스 겔로부터 분리하였다. 그 다음 클로닝 벡터 pSP72 (Promega, Madison, WI)의 EcoRI/BamHI 위치로 클로닝하여 pSP72-pH1을 제조하였다.

[0061] 6-2: pSP72-pH1-shmTOR#1 또는 pSP72-pH1-shmTOR#4 의 작제

[0062] 서열번호 1 또는 서열번호 4의 mTOR를 표적으로 하는 siRNA 'mTOR sh #1' 또는 'mTOR sh #4'가 BamHI 및 HindIII 5'- 또는 3'- 오버행을 포함하도록 작제한 후 pSP72-pH1 벡터에 라이게이션하여 siRNA 'mTOR sh #1' 또는 'mTOR sh #4'를 제조하였다. mTOR sh #1를 위한 BamHI 링커를 갖는 센스 프라이머 서열은 5'-GATCC GGAGTCTACTCGCTTCTAT **TTCAAGAGA** ATAGAAGCGAGTAGACTCC TTTTTT GGAAA-3'(서열번호: 15)이며, HindIII 링커를 갖는 안티센스 프라이머 서열은 5'-AGCTT TTCC AAAAAA GGAGTCTACTCGCTTCTAT **TCTCTTGAA** ATAGAAGCGAGTAGACTCC G-3'(서열번호: 16)이다. 또한, mTOR sh #4 를 위한 BamHI 링커를 갖는 센스 프라이머 서열은 5'-GATCC GAATGTTGACCAATGCTAT **TTCAAGAGA** ATAGCATTGGTCAACATTC TTTTTT GGAAA-3'(서열번호: 17)이며, HindIII 링커를 갖는 안티센스 프라이머 서열은 5'-AGCTT TTCC AAAAAA GAATGTTGACCAATGCTAT **TCTCTTGAA** ATAGCATTGGTCTTCTTTC G-3'(서열번호: 18)이다. 상기 서열에 있어서 mTOR 유전자에 특이적인 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시하였고 루프 구조는 굵은체로 나타내었다.

[0063] 6-3: pSP72-XP-rAAV-MCS의 작제

[0064] 자가-상보적인 AAV의 본래 백본인 pHpa-Trs-SK는 McCarty (오하이오주립대)에 의해 제공받았다. 다중 클로닝 위치(multi-cloning site)를 갖는 새로운 벡터로 변형하였다. 먼저 pSP72-XP-rAAV 벡터를 작제하였다. 이는 pHpa-Trs-SK로부터 ITR(internal repeat), CMV 프로모터, 리포터 유전자 GFP 및 SV40 폴리 A 시그날을포함하는 AAV의 필수 영역을 XhoI 및 PvuII를 이용하여 절단한 후, pSP72 벡터로 라이게이션함으로써 작제되었다.

[0065] 다음으로는 다중 클로닝 위치를 갖는 링커를 제작하였다. 이 링커는 Kpn I 제한효소 자리를 갖는 센스 올리고뉴클레오타이드 서열인 5'- CGG GAG ATC TTC CTG CAG GAT ATC TGG ATC CAC GAA GCT TCC CAC CGG TTC TAG AGC G-3'(서열번호: 19)과, Sal I 제한효소 자리를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열인 5'-TCG ACG CTC TAG AAC CGG TGG GAA GCT TCG TGG ATC CAG ATA TCC TGC AGG AAG ATC TCC CGG TAC-3'(서열번호: 20)으로 구성하였다. 이 링커를 앞서 작제한 pSP72-XP-rAAV로부터 절단한 부분이 KpnI 및 SalI을 갖도록 작제한 후 링커를 라이게이션하여 pSP72-XP-rAAV-MCS를 제조하였다.

[0066] 6-4: rAAV-shmTOR#1 또는 rAAV-shmTOR#4의 작제

[0067] pSP72-XP-rAAV-MCS로부터 CMV 프로모터를 KpnI and XbaI 소화에 의해 제거하

[0068] 고, 이어서 DNA 폴리머라제 (New England BioLabs, Beverly, MA)로 둔단(blunt end)을 만들었다. pH1-shmTOR#1 또는 pH1-shmTOR#4 는 (pSP72-XP-rAAV-MCS에 존재하는) BGH 폴리 A 위치 다음에 인접하게 놓이도록 하였다. 그 다음 pSP72-XP-rAAV-MCS 벡터는 폴리 A 테일을 Sal I으로 절단하였다.

[0069] shmTOR#1 또는 shmTOR#4 발현을 위한 삽입물, 즉 pH1-shmTOR#1 또는 pH1-shmTOR#4 은 pSP72-pH1-shmTOR#1 또는 pSP72-pH1-shmTOR#4 벡터로부터 EcoRV 및 XhoI로 소화하여 얻었다. 이어서 상기 벡터와 삽입물은 DNA 폴리머라제 (New England BioLabs, Beverly, MA)로 둔단을 만들었다.

[0070] 이렇게 제조된 벡터와 삽입물은 둔단 라이게이션하였다. 이는 GFP는 발현하지 않으며, 단지 shmTOR#1 또는 shmTOR#4 만을 발현할 수 있도록 고안되었다. 이를 플라스미드의 경우에는 pSP72-XP-rAAV-pH1-shmTOR#1 또는 pSP72-XP-rAAV-pH1-shmTOR#4 이라고 명명하고, 바이러스의 경우에는 rAAV-shmTOR#1 또는 rAAV-shmTOR#4 라고

명명하였다.

[0071] 6-5: rAAV-GFP-shmTOR#1 또는 rAAV-GFP-shmTOR#4 의 작제

[0072] 벡터가 도입된 세포를 검출하기 위하여 최종적으로 shmTOR#1 또는 shmTOR#4의 발현을 위한 pH1과 독립적으로 GFP 발현 카세트의 발현을 위한 CMV 프로모터를 포함하는 GFP와 shmTOR#1 또는 shmTOR#4 의 이중 유전자 발현 rAAV 벡터를 작제하였다. 클로닝 전략은 다음과 같다: pSP72-XP-rAAV-MCS 벡터(또는 pSP72-XP-rAAV-GFP 벡터라고도 명명함)를 EcoRI로 절단하고 삽입물인 pH1-shmTOR#1 또는 pH1-shmTOR#4 은 pSP72-pH1-shmTOR#1 또는 pSP72-pH1-shmTOR#4 벡터로부터 EcoRV and XhoI로 소화하여 얻었다. 그 다음 벡터와 삽입물을 DNA 폴리머라제(New England BioLabs, Beverly, MA)로 둔단을 만들었다. 이 벡터는 shmTOR#1 또는 shmTOR#4 및 GFP를 발현할 수 있다.

[0073] 이 벡터는 플라스미드의 경우에 pSP72-XP-rAAV-GFP-pH1-shmTOR#1 또는 pSP72-XP-rAAV-GFP-pH1-shmTOR#4 라고 명명하고, 바이러스의 경우에 rAAV-GFP-shmTOR#1 또는 rAAV-GFP-shmTOR#4 라고 명명하였다(도 4a 및 도 4b). 또한, 상기 pSP72-XPrAAV-GFP 벡터는 바이러스의 경우에 rAAV-GFP라고 명명하였다.

[0074] **<실시예 7> real-time RT-PCR을 이용한 mTOR shRNA의 mTOR 발현 억제효과 검토**

[0075] 총 RNA는 HeLa 세포로부터 실시예 3 과 같이 트리졸 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 추출하였다. 역전사(RT)와 real-time RT-PCR 역시 실시예 3과 동일하게 진행되었다. 이때 사용된 프라이머는 인간-mTOR-센스 및 안티센스 프라이머(서열번호 7 및 8)와 일반 β-액틴-센스 및 안티센스 프라이머(서열번호 9 및 10)였다.

[0076] 상대적인 유전자 발현 역시 실시예 3과 같이 GeneXpression Macro chromo4 software(Bio-Rad)에 의해 평가되었다. 그 결과, 도 5와 같이 mTOR shRNA#1 또는 mTOR shRNA#4 는 siRNA 와 비슷하거나 더 좋은 효과로 HeLa 세포주에서 mTOR mRNA 발현을 억제하였다.

[0077] **<실시예 8> mTOR shRNA에 의한 인간 암 세포 주기의 변화 분석**

[0078] mTOR shRNA에 의한 암 세포 주기의 변화를 분석하기 위하여, 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide) 염색을 실시하여 플로우 사이토메트리를 이용하였다. 사용한 암 세포주로서는 인체 폐암 세포주인 A549, 인체 간암 세포주인 sk-hep-1을 이용하였다.

[0079] 각각의 암 세포주에 rAAV2-mTOR shRNA를 감염시키고 나흘 후에 세포를 모으고 PBS에 용해된 차가운 75% 에탄올을 한방울씩 떨어뜨려가며 고정하였다. 그 후 프로피디움 아이오다이드와 RNAse를 각각 2㎍/ml, 10㎍/ml 농도로 첨가하여 30분간 37℃ 인큐베이터에서 배양하였다. 그후, 플로우사이토메트리(FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA)에 의해 세포주기 즉 G1기, S기 및 G2기를 측정하였다.

[0080] 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 도시된 바와 같이 각각의 세포가 mTOR shRNA 에 의해 S phase가 줄어들면서 G1 arrest를 일으킴을 확인하였다.

[0081] **<실시예 9> mTOR shRNA에 의한 세포내 형태의 변화 관찰**

[0082] mTOR shRNA에 의해 mTOR를 저해함으로써 나타나는 현상 중 하나인 자기소화현상(autophagy)은 암세포의 세포 사멸에 영향을 준다고 보고되고 있다. autophagy는 세포사멸의 한 기전으로서, 세포질 내에 이중막을 가진 소포(vesicle)가 증가하는 현상을 관찰할 수 있다.

[0083] mTOR shRNA에 의해 세포질 내의 자기소화성 소포(autophagic vesicle)의 증가 등과 같은 형태학적인 변화를 관찰하기 위해 투과형 전자현미경(TEM)을 이용하였다. 이를 위하여 A549 및 sk-hep-1 세포주에 rAAV2-scramble shRNA 와 rAAV2-mTOR shRNA 를 각각 감염시킨 후 나흘에 세포를 모아 투과형 전자현미경으로 세포 내를 관찰하였다.

[0084] 그 결과, 도 7a 및 도 7b와 같이 rAAV2-mTOR shRNA를 감염시킨 세포는 rAAV2-scramble shRNA를 감염시킨 세포에 비해 세포질 내에 이중막을 가진 자기소화성 소포(autophagic vesicle)가 상당히 증가함을 볼 수 있었다. 또한, 핵의 형태 역시 비정상적으로 응집된 것을 확인하였다. 이는 mTOR shRNA에 의해 암세포의 생존이 매우 위협을 받고 있음을 증명하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 인간 세포주(HeLa)에서 mTOR 특이적 siRNA 4종에 의한 mTOR 유전자 발현 억제효과에 관한 것으로, 상단은 real-time RT-PCR을 이용하여 측정된 내인성 mTOR의 RNA 수준 및 하단은 웨스턴블롯 분석을 이용하여 측정된 내인성 mTOR의 단백질 수준을 나타낸 것이고,

[0086] 도 2는 VP1에 특이적인 플로우 사이토메트리 분석 결과를 나타낸 것이고,

[0087] 도 3a 및 도 3b는 원숭이 세포주(Vero) 및 랫트 세포주(H9C2)에서 mTOR-4 siRNA에 의한 mTOR 유전자 발현 억제효과를 나타낸 것이고,

[0088] 도 4a 및 도 4b는 본 발명에 따른 재조합벡터인 pSP72-scAAV-GFP-mTOR의 개열지도를 나타낸 것이고,

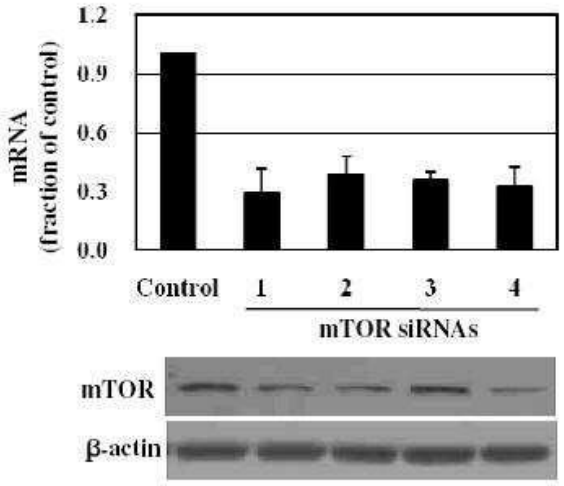
[0089] 도 5는 인간 세포주(HeLa)에서 mTOR shRNA의 mTOR 발현 억제효과를 나타낸 것이고,

[0090] 도 6a 및 도 6b는 mTOR shRNA에 의한 인간 암 세포 주기 변화를 분석한 것이고,

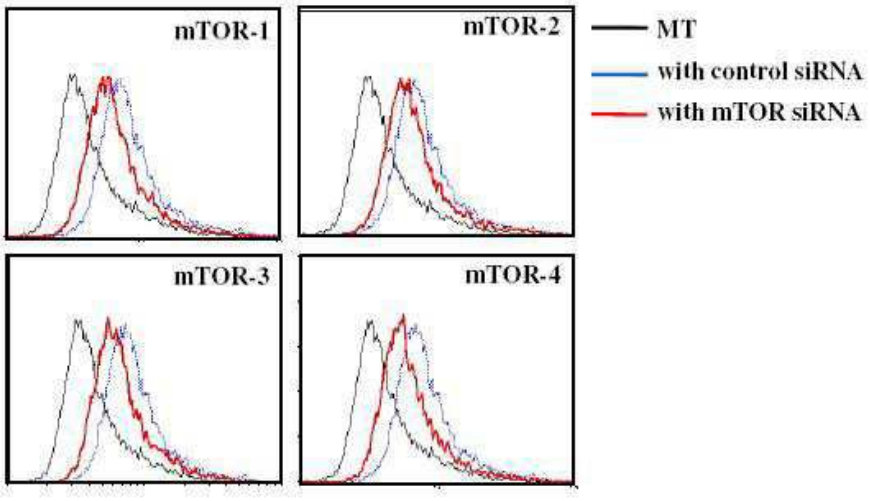
[0091] 도 7a 및 도 7b는 mTOR shRNA에 의한 인간 암 세포 내 형태 변화를 나타낸 것이다.

도면

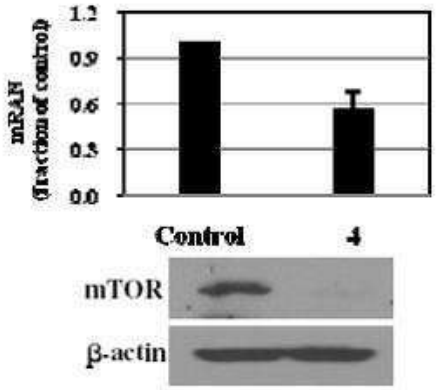
도면1



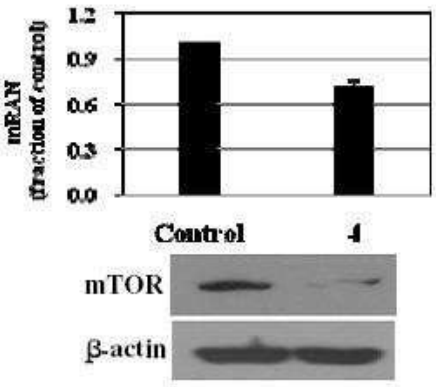
도면2



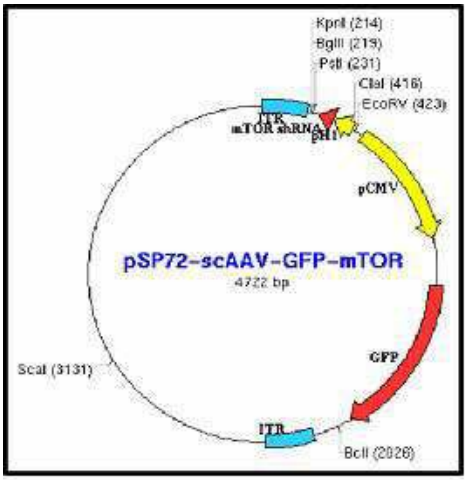
도면3a



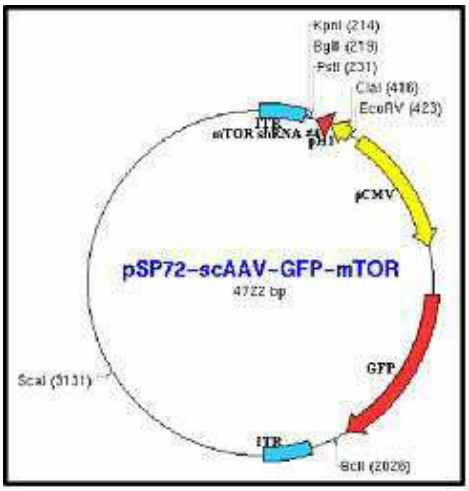
도면3b



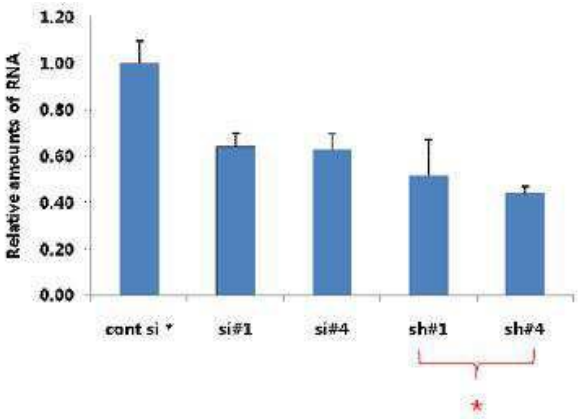
도면4a



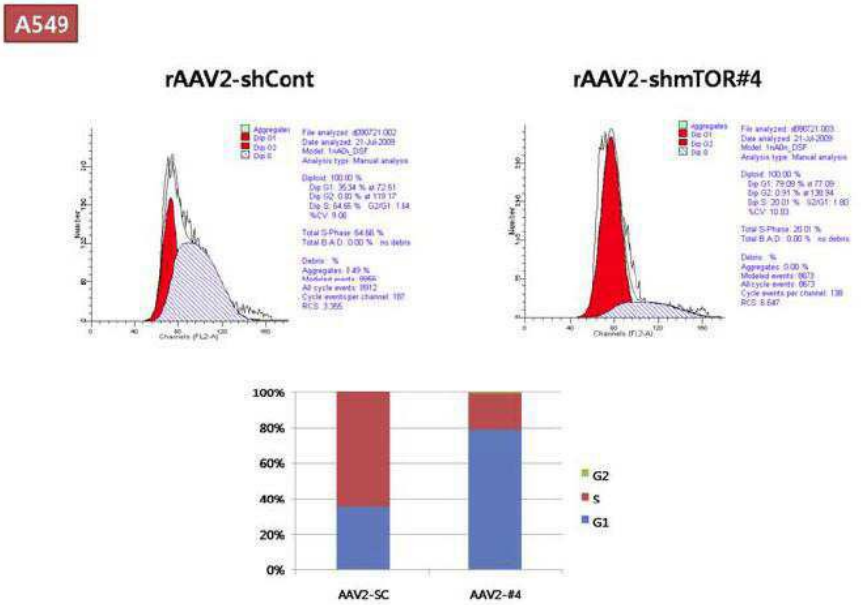
도면4b


KpnI (214)
BglII (219)
PstI (231)
ClaI (416)
EcoRV (423)
ITR
mTOR shRNA #4
H1
pCMV
pSP72-scAAV-GFP-mTOR
4722 bp
GFP
ScaI (3131)
ITR
BclI (2026)

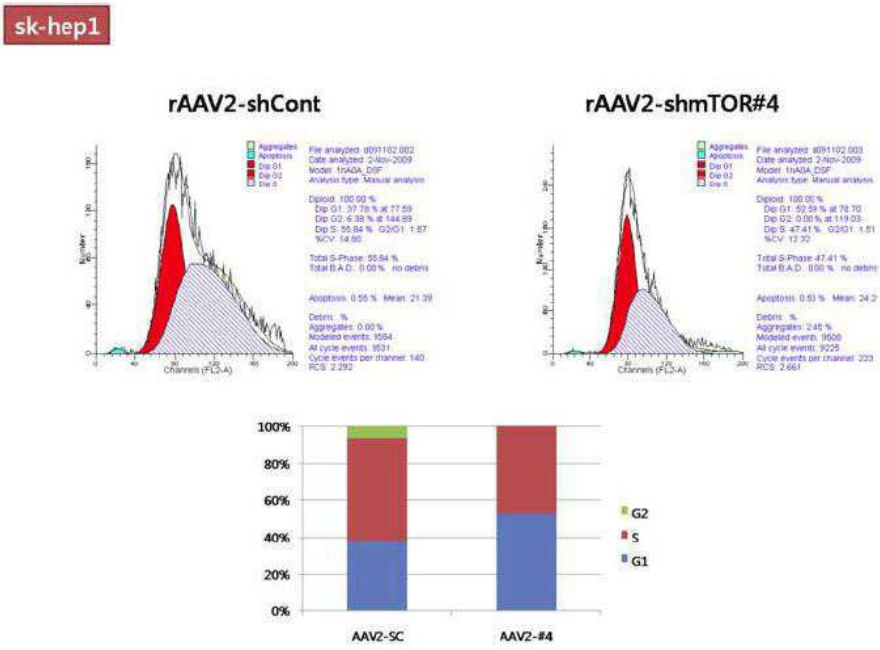
도면5


Relative amounts of RNA
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
cont si *
si#1
si#4
sh#1
sh#4
*

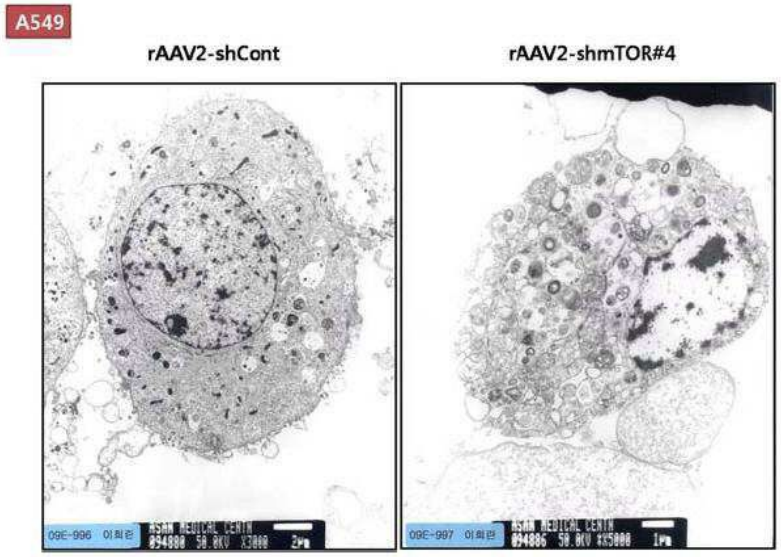
도면6a


A549
rAAV2-shCont
rAAV2-shmTOR#4
100%
80%
60%
40%
20%
0%
G2
S
G1
AAV2-SC
AAV2-#4

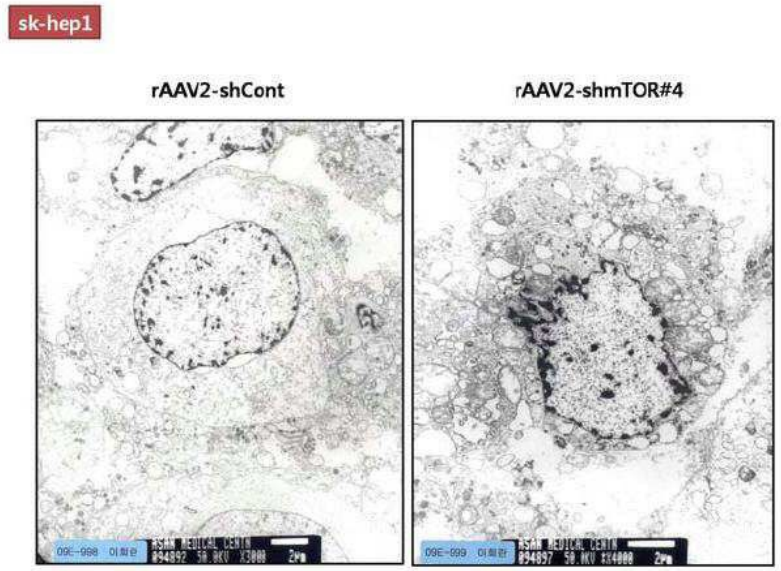
도면6b


sk-hep1
rAAV2-shCont
rAAV2-shmTOR#4
100%
80%
60%
40%
20%
0%
G2
S
G1
AAV2-SC
AAV2-#4

도면7a



도면7b



서 열 목 록

<110> UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION

<120> mTOR targeting siRNA, and expression vector and pharmaceutical composition comprising the same

<130> dp-2009-0558

<160> 20

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTOR-1

<400> 1
ggagucuacu cgcuucuau 19

<210> 2
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTOR-2

<400> 2
gaagaagguc acugaggau 19

<210> 3
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTOR-3

<400> 3
acaaccucca ggauacacu 19

<210> 4
<211> 19
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTOR-4

<400> 4
gaauguugac caaugcuau 19

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Rat-mTOR-sense primer

<400> 5
ccactgtgcc agaatccatc 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Rat-mTOR-antisense primer

<400> 6
gagaaatccc gaccagtgag 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Human-mTOR-sense primer

<400> 7

ccacagtgcc agaatctatt 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Human-mTOR-antisense primer

<400> 8
gagaagtccc gaccagtgag 20

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Universal beta-actin-sense primer

<400> 9
tgaagatcaa gatcattgct c 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Universal beta-actin-antisense primer

<400> 10
tgaagatcaa gatcattgct c 21

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pH1-sense primer

<400> 11
ccatggaatt cgaacgctga 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pH1-antisense primer

<400> 12
gggaaagagt ggtctcatac 20

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pH1-sense-EcoRI primer

<400> 13
atcgaattca tatttgcatg tcgctatgtg 30

<210> 14
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pH1-antisense-BamHI primer

<400> 14

atcggatccg agtggtctca tacagaac 28

<210> 15
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTOR sh #1-sense-BamHI primer

<400> 15
gatccggagt ctactcgctt ctatttcaag agaatagaag cgagtagact ccttttttgg 60

aaa 63

<210> 16
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTOR sh #1-antisense-HindIII primer

<400> 16
agcttttcca aaaaaggagt ctactcgctt ctattctctt gaaatagaag cgagtagact 60

cc 62

<210> 17
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTOR sh #4-sense-BamHI primer

<400> 17
gatccgaatg ttgaccaatg ctatttcaag agaatagcat tggtcaacat tctttttgg 60

aaa 63

<210> 18
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTOR sh #4-antisense-HindIII primer

<400> 18
agcttttcca aaaaagaatg ttgaccaatg ctattctctt gaaatagcat tggtcttctt 60

tcg 63

<210> 19
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AAV-sense-KpnI primer

<400> 19
cgggagatct tcctgcagga tatctggatc cacgaagctt cccaccggtt ctagagcg 58

<210> 20
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AAV-antisense-SalI primer

<400> 20
tcgacgctct agaaccggtg ggaagcttcg tggatccaga tatcctgcag gaagatctcc 60

cggtac 66