



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0109278
(43) 공개일자 2018년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 48/005 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0038639

(22) 출원일자 2017년03월27일

심사청구일자 2017년03월27일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(주) 씨드모젠

충북 청주시 흥덕구 직지대로 530, 508호 (송정동, 청주테크노에스타워)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

이희란

경기도 남양주시 와부읍 덕소로 180, 111동 1204호 (덕소두산위브아파트)

김지현

서울특별시 송파구 풍성로22길 21, 301호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

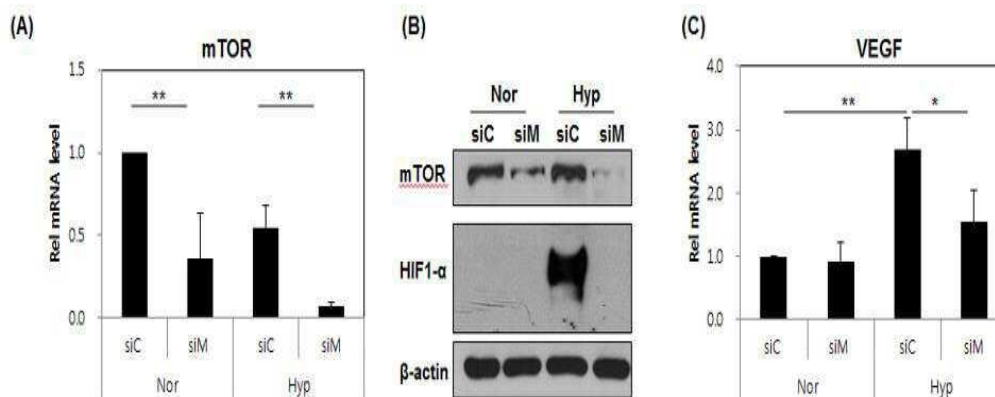
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **중간 교차활성을 지닌 mTOR를 표적으로 하는 siRNA를 함유하는 망막혈관질환 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 중간 교차활성을 지닌 mTOR를 표적으로 하는 siRNA를 함유하는 망막혈관질환 치료용 조성물에 관한 것으로, 중간 교차활성을 지닌 mTOR를 표적으로 하는 siRNA, 이를 포함하는 제조합 벡터 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 제공하며, 상기 mTOR 표적 siRNA는 mTOR 유전자의 일부와 상보적인 서열로 이루어짐으로써, mTOR 유전자의 mRNA를 분해하거나 번역을 억제할 수 있기 때문에 mTOR를 표적하는 다양한 망막혈관질환, 예를 들어, 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 망막혈관폐쇄 및 안저혈증후군으로 이루어진 군에서 선택된 질환을 예방하거나 치료할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

Y10S 514/912 (2013.01)

(72) 발명자

우하나

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 224동 302호

이주용

서울특별시 서초구 신반포로 267, 한신아파트 340동 702호

정복경

서울특별시 송파구 잠실로 62, 332동 1503호 (잠실동, 트리지움)

이영일

충청북도 청주시 흥덕구 대농로 17, 105동 2604 (북대동, 지웰시티1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016-0637

부처명 미래부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터 (ACE)육성사업 기초의약학분야 (MRC)

연구과제명 세포기능장애 연구센터(4)

기 여 율 1/2

주관기관 울산대학교산학협력단

연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016-0812

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 망막색소변성증에 대한 신개념 병합 유전자 치료기법 개발

기 여 율 1/2

주관기관 울산대학교산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어지며, mTOR와 결합하여 그 발현을 억제하는 중간 교차활성을 지닌 siRNA를 유효 성분으로 함유하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 망막혈관질환은 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 망막혈관폐쇄 및 안저 혈증후군으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 siRNA는 HIF-1 및 VEGF의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

서열번호 1의 염기서열로 이루어지며, mTOR와 결합하여 그 발현을 억제하는 중간 교차활성을 지닌 siRNA를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 2에 도시된 개열 지도를 갖는 것을 특징으로 하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 망막혈관질환은 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 망막혈관폐쇄 및 안저 혈증후군으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 4항에 있어서, 상기 siRNA는 HIF-1 및 VEGF의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 중간 교차활성을 지닌 mTOR를 표적으로 하는 siRNA를 함유하는 망막혈관질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병성 망막병증, 망막 정맥 폐쇄 및 습성 나이관련 황반변성과 같은 다양한 망막혈관질환은 심각한 시력 상실을 유발하는 일반적인 망막 병리현상이다. 이들 혈관질환의 주요 병리학적 과정은 망막 허혈(ischemia) 후 새로운 혈관 형성 및 새로운 혈관으로부터 혈관 누출을 포함한다. 이러한 병리학적 메커니즘에 기초하여, 현재 표준 치료는 무혈관 영역(avascular area)에 항-혈관 내피 성장인자(anti-vascular endothelial growth factor; anti-VEGF)의 유리체(intravitreal) 내 주사 또는 레이저 치료가 있다. 최근 임상연구 결과를 보면, 지속적인 항-혈관 내피 성장인자를 주사한 당뇨병성 망막병증 환자에서 혈관 폐쇄 감소 및 중증도 개선에 효과를 보였으나, 망막혈관질환에서 무혈관 영역 형성 예방 또는 감소를 위한 현재의 표준 치료는 없는 실정이다.

[0003] 포유류의 라파마이신 표적(mammalian target of rapamycin; mTOR)은 단백질 합성, 세포 성장, 세포 증식, 세포 운동성 및 자가소화작용(autophagy) 등을 포함하는 다양한 세포 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 세린

-트레오닌 단백질 키나아제(kinase)이다. mTOR 신호 전달 경로의 필수 구성 요소로서, mTOR는 mTOR 복합체 1(mTOR complex 1; mTORC1) 및 mTOR 복합체 2(mTORC2) 모두에 존재한다. mTOR 억제제로서, 라파마이신은 원래 항진균제로서 사용되어 왔으며, 항-종양 및 항-혈관신생 특성을 가지는 것으로 알려져 있다. 라파마이신은 mTORC1의 FK507 결합 단백질 12(FKBP12)에 특이적으로 결합하여 신호 전달 경로를 방해한다. 라파마이신에 의한 항-혈관신생 활성은 VEGF 생성의 감소와 VEGF에 의한 혈관 내피세포의 반응과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근 연구에 따르면, 라파마이신은 mTOR/저산소증 유발 인자(hypoxia-inducible factor-1; HIF-1)/VEGF 신호 전달의 표적과 관련된 메커니즘을 통하여 저산소증 유발 망막 색소 상피세포의 증식을 억제한다는 것이 보고된 바 있다. 이러한 결과에 기초하여, mTOR 신호 전달을 표적하는 것은 맥락막 신생혈관 치료에 있어서 새로운 치료법이 될 수 있다. 맥락막 혈관질환 뿐만 아니라 조기 고산소증(hyperoxia)/저산소증 모델의 망막병증에서 전신성 라파마이신의 사용은 망막 신생혈관 형성을 억제하는 것이 보고된 바 있다.

[0004] 중재자로서, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)를 이용한 RNA 간섭은 서열-특이 전사 후 유전자 침묵(post-transcriptional gene silencing; PTGS)과 관련된 진화적 메커니즘이며, 서열-특이 방식(sequence-specific manner)으로 병리학 과정의 발달과 관련된 원인 유전자를 간섭함으로써 다양한 인간 질병을 치료하기 위한 새로운 치료 방법을 제공한다. siRNA의 기본 개념을 고려하면, siRNA 기술은 다양한 유전성 선천성 질환이나 망막질환의 새로운 치료 방법으로 큰 가능성을 가지고 있다. 그러나, 인간 질병에 siRNA를 적용하기 위한 현재 주요한 한계는 siRNA가 세포막을 통과하여 표적 조직의 세포질에 도달하기 어렵다는 것이다. siRNA 전달 시스템과 관련된 이러한 한계를 극복하기 위해, 바이러스 기반 벡터(vector) 뿐만 아니라 고분자, 지질, 단백질 나노캐리어(nanocarrier) 및 덴드리머(dendrimer)와 같은 수많은 비-바이러스 캐리어(non-viral carrier)가 siRNA 전달을 위해 시도되고 있다. 이들 중 재조합 아데노 연관 바이러스(recombinant adeno-associated virus; rAAV)는 안전하고 효과적이며, 지속적인 유전자 발현 전달 도구이다.

[0005] 산소 유발 망막병증(oxygen-induced retinopathy; OIR)은 망막혈관질환의 혈관 변화를 연구하기 위한 좋은 실험 도구이다. 이전 연구에서 고산소 농도에서 망막의 혈관 성장이 억제되고, 정상 산소 농도에서 신생혈관 형성이 활성화되는 것이 보고되었다. 또한, 산소 유발 망막병증은 동물 실험(in vivo)에서 혈관신생의 재현 가능한 모델이다. 신생혈관 형성의 정도는 이상 혈관 형태, 혈관 폐쇄 및 망막 허혈 정도를 측정하여 쉽게 정량할 수 있다. 따라서, 산소 유발 망막병증은 혈관형성 질환의 분자 및 세포 메커니즘, 및 항-혈관형성 제제 검사의 유효성을 보여주는 유익한 도구이다.

[0006] 세포 실험(in vitro)은 생체의 조직 일부 혹은 세포를 분리하여 특정 물질 또는 환경에 대해 어떻게 반응하는가를 살피는 것으로 다른 여러 가지 외부 요인을 최대한 억제한 상태에서 수행되어 진다. 그러나, 세포 수준의 실험 결과가 전체 개체의 건강 상태와 어떻게 연관되는지를 파악하는 것은 매우 어려우며, 영향을 준다면 어떠한 메커니즘으로 작용하는지에 대한 해답을 얻는 것 또한 한계가 있다. 따라서, 인체에 미치는 영향을 평가하기 위해서는 세포 실험과 더불어 궁극적으로 역학 연구와 동물 실험(in vivo)의 총체적인 이해 및 일관성 있는 결과가 요구된다. 동물 실험결과를 사람과 직접 연관시킬 수 없더라도 동물과 인간의 공통적인 생체학적 반응은 매우 많으므로 짜임새 있고 재현성 있는 동물 실험 결과는 세포 수준의 실험 결과 보다 특정 물질에 대한 효능 및 부작용을 평가할 수 있으며, 역학 연구 결과들과 총체적으로 분석될 때 궁극적으로 인간에 대한 노출 영향을 평가하는데 매우 유용할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제 10-2016-0120028호(2016.10.17 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 mTOR 유전자의 일부와 상보적인 서열로 이루어짐으로써, mTOR 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있는 중간 교차활성을 지닌 siRNA 또는 상기 siRNA를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어지며, mTOR와 결합하여 그 발현을 억제하는 중간 교차활성을 지닌 siRNA 또는 상기 siRNA를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 중간 교차활성을 지닌 mTOR를 표적으로 하는 siRNA, 이를 포함하는 재조합 벡터 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 mTOR 표적 siRNA는 mTOR 유전자의 일부와 상보적인 서열로 이루어짐으로써, mTOR 유전자의 mRNA를 분해하거나 번역을 억제할 수 있기 때문에 mTOR를 표적하는 다양한 망막혈관질환, 예를 들어, 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 망막혈관폐쇄 및 안허혈증후군으로 이루어진 군에서 선택된 질환을 예방하거나 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 mTOR siRNA의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 재조합 벡터인 rAAV-GFP-simTOR의 개열 지도를 나타낸 것이다.

도 3은 ARPE19 세포 또는 HeLa 세포에서 mTOR를 타겟하는 siRNA의 유전자 침묵 효과를 확인한 것으로, mTOR의 (A) mRNA 및 (B) 단백질 발현을 실시간 증합효소 연쇄반응 및 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다.

도 4는 산소 유발 망막병증에서 망막증을 혈관조영상 및 공초점 현미경으로 분석한 결과로, (A) 혈관 영역의 경계 마스크(boundary mask), (B) 혈관 영역 안에 빈 영역 및 (C) 전체 눈 세포 영역을 나타낸 것이다.

도 5는 산소 유발 망막병증의 대표적인 망막 전체 플랫 마운트(flat mount) 이미지를 나타낸 것으로, (A) 비히클 처리 삼 군, (B) rAAV-siCon 처리 군 및 (C) rAAV-GFP-simTOR 처리 군을 나타낸 것이다. 망막 마운트는 혈관 발달 상태, 무혈관 망막 혈관 존재 여부 및 범위를 확인하기 위해 염색하였다. (노란색: 망막 내 무혈관 영역, 파란색: 망막 혈관 경계, 빨간색: 망막 맥관구조)

도 6은 산소 유발 망막증 모델에서 mTOR 신호 전달 억제에 의한 혈관 폐쇄 형성의 감소 효과를 나타낸 것이다.

도 7은 저산소 상태에서 mTOR siRNA에 의한 HIF-1 및 VEGF의 발현 억제 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 발명자들은 산소 유발 망막증 동물모델에서 mTOR siRNA를 발현하는 rAAV 벡터를 처리한 결과, 비정상적으로 증가된 HIF-1 및 VEGF의 발현을 감소함으로써 신생혈관 형성을 억제하고 혈관-폐쇄성 병리학적 증상을 개선하는 것을 확인하였으며, mTOR siRNA에 의한 mTOR 신호 전달 경로의 불활성화가 망막혈관폐쇄, 안허혈증후군, 당뇨병성 망막증을 포함하는 다양한 망막혈관질환의 치료에 있어서 새로운 치료 전략이 될 수 있음을 시사하며 본 발명을 완성하였다.

[0014] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어지며, mTOR와 결합하여 그 발현을 억제하는 중간 교차활성을 지닌 siRNA를 유효성분으로 함유하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 바람직하게는, 상기 망막혈관질환은 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 망막혈관폐쇄 및 안허혈증후군으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0016] 바람직하게는, 상기 siRNA는 HIF-1 및 VEGF의 발현을 억제할 수 있다.

[0018] 본 발명에서 mTOR와 결합하여 그 발현을 억제하는 중간 교차활성을 지닌 siRNA는 인간, 원숭이, 랫의 mTOR 유전자의 일부와 100% 상보적인 서열로 이루어지고, mTOR 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있다. 상보성이 80 내지 90%인 경우에는 mRNA의 번역을 억제할 수 있고, 100%인 경우에는 mRNA를 분해시킬 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 mTOR를 표적으로 하는 siRNA는 서열번호 1로 표시되는 염기서열과 80%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 100%의 상동성을 갖는 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 염기서열은 5 내지 15 bp의 루

프 영역에 의해 회문적으로 연결되어 헤어핀 구조를 형성할 수도 있다.

- [0020] 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 폴리머라제(polymerase)와 같은 파아지 RNA 폴리머라제를 이용하는 방법이 문헌에 개시되어 있다(Milligan and Uhlenbeck, Methods Enzymol. 180: 51-62, 1989).
- [0022] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어지며, mTOR와 결합하여 그 발현을 억제하는 중간 교차활성을 지닌 siRNA를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 망막혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0023] 바람직하게는, 상기 재조합 벡터는 도 2에 도시된 개열 지도를 가질 수 있다.
- [0024] 바람직하게는, 상기 망막혈관질환은 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 망막혈관폐쇄 및 안허혈증후군으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0025] 바람직하게는, 상기 siRNA는 HIF-1 및 VEGF의 발현을 억제할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 재조합 벡터는 당업계에 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 mTOR에 대한 siRNA를 전달하기에 유용한 바이러스 또는 바이러스 벡터로는 바쿨로비리디애(baculoviridae), 파르보비리디애(parvoviridae), 피코르노비리디애(picornoviridae), 헤레페스비리디애(herpesviridae), 포스비리디애(poxviridae), 아데노비리디애(adenoviridae) 등이 있지만, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0029] 본 발명에서는 아데노 부속 바이러스(Adeno Associated Virus, AAV)를 이용하는 것이 가장 바람직하다. 아데노 부속 바이러스는 면역반응과 세포독성을 거의 유발하지 않는 것으로 알려져 있다. 특히, 아데노 부속 바이러스 혈청형 2(serotype 2)는 중추신경계(central nervous system; CNS)의 신경세포로 효율적인 유전자 전달을 할 수 있으며, 또한 신경계에서 형질전환 유전자(transgene)를 효과적으로 장기간 발현할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명에서 mTOR에 대한 siRNA를 전달하기에 유용한 비바이러스 벡터로는 전술한 바이러스 벡터를 제외한 통상적으로 유전자 요법에 사용되는 모든 벡터를 포함하며, 예를 들어, 진핵 세포에서 발현 가능한 다양한 플라스미드(plasmid) 및 리포솜(liposome) 등이 있다.
- [0031] 한편, 본 발명에서 mTOR을 표적으로 하는 siRNA는 전달된 세포에서 적절히 전사되기 위하여 적어도 프로모터(promoter)에 작동 가능하게 연결되는 것이 바람직하다. 상기 프로모터는 진핵 세포에서 기능할 수 있는 프로모터라면 어떤 것이든지 무방하나, 사람 H1 폴리머라제-III 프로모터가 보다 바람직하다. mTOR을 표적으로 하는 siRNA의 효율적인 전사를 위하여 필요에 따라 리더(leader) 서열, 폴리아데닐화 서열, 프로모터, 인핸서(enhancer), 업스트림(upstream) 활성화 서열, 신호 펩타이드 서열 및 전사 종결인자를 비롯한 조절서열을 추가로 포함할 수도 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 mTOR과 결합하여 그 발현을 억제하는 중간 교차활성을 지닌 siRNA 또는 상기 siRNA를 포함하는 재조합 벡터를 약학 조성물로 사용할 경우, 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0035] 상기 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0036] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형

제를 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.

[0037] 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.

[0038] 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 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0039] 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.

[0040] 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.

[0041] 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, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0043] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0045] 실시예 1: mTOR siRNA의 설계 및 분석

[0046] 다양한 종의 mTOR의 완전 보존 서열 패턴(completely conserved sequence pattern)으로부터 표적 서열을 선정하였다. 이때, 사용된 종은 인간(LOCUS: NM_004958), 원숭이(XR_014791), 랫(NM_019906) 및 마우스(NM_020009)를 포함한다.

[0047] 효과적인 siRNA의 설계를 위하여, MWG Biotech AG 소프트웨어 (www.mwgbio.com) 또는 CAPSID(Convenient Application Program for siRNA Design)라고 하는 교내에서 개발된 siRNA 설계 소프트웨어를 이용하였다. mTOR siRNA의 서열(서열번호 1) 및 siRNA 점수는 하기 표 1과 같다.

표 1

이름	표적 서열 (5' → 3')	위치 (뉴클레오타이드)	타겟	siRNA 점수
mTOR siRNA	GAAUGUUGACCAUAGCUAU	7221	키나아제	13

[0051] 표 1을 참조하여 보면, CAPSID를 이용하여 mTOR siRNA의 점수를 측정한 결과, 13점으로 탁월한 점수를 가지는 것을 확인하였다. 일반적으로 siRNA 점수가 8 이상이면 우수한 편에 속한다.

[0052] 또한, 도 1을 참조하여 보면, mTOR siRNA의 2차 구조를 분석한 결과, 에너지(energy) 값이 -64.3으로 측정되었으며, 구조 상에서 볼 때 mTOR의 표적 mRNA에 대한 접근성 및 결합 가능성이 우수할 것으로 예측하였다.

[0054] 실시예 2 : 세포 배양

[0055] 인간 자궁 경부 암세포인 HeLa 세포 및 인간 망막 색소 상피세포인 ARPE19 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서 구매하였다. 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco, Middleton, WI), GlutaMAX-1(2 mM) 및 페니실린(100 IU/ml)/스트렙토마이신(50 g/ml)을 포함하는 DMEM 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0056] 저산소 처리를 위해, 배양 배지에 hypoxia-mimetic chemical Cobalt(II) chloride(Sigma, St. Louis, MO) 100 μM을 24시간 동안 처리하였다.

[0058] 실시예 3 : siRNA/rAAV 제조 및 형질감염

[0059] mTOR를 타겟하는 siRNA(5'-GAAUGUUGACCAAUGCUAU-3'; 서열번호 1)는 제놀루션(Genolution, Seoul, Korea)에서 구매하였다. 음성 대조군(negative control)으로 사용된 비특이적 scrambled control siRNA(5'-AUUCUAUCACUAGCGUGAC-3'; 서열번호 2)는 다마콘(Dharmacon Inc.)에서 제공받았다.

[0060] 일시적 형질감염(transient transfection)을 위해, 올리고펙타민 시약(oligofectamine reagent, Invitrogen)을 이용하여 세포를 100 nM의 siRNA와 무혈청 배지에서 4시간 동안 배양한 후, 10% 우태아혈청이 포함된 신선한 배지를 첨가하고 특정 시간 동안 배양하였다.

[0061] 동물 실험을 위해, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein; GFP)과 H1 프로모터(promoter)에 의해 유도된 corresponding mTOR siRNA(rAAV-simTOR) 또는 control siRNA(rAAV-siCon)를 발현하는 자가 보완적 재조합 아데노 부속 바이러스 2(recombinant adeno associated virus 2, rAAV2) 벡터는 이전에 보고된 논문(Cell Mol Life Sci 2012;69:3147-3158)을 참고하여 제조하였다. 상기 재조합 벡터인 rAAV-GFP-simTOR의 개열 지도는 도 2에 나타내었다.

[0063] 실시예 4 : 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 분석

[0064] RNA는 트리졸(trizol, Invitrogen) 시약을 이용하여 추출하였고, 추출한 RNA는 Superscript III(Invitrogen) 키트를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(real-time reverse transcription-polymerase chain reaction; real-time RT-PCR)은 SyBr Green I 및 프라이머(primer)를 이용하여 수행하였다: mTOR 프라이머, 5'-CAC AGT GCC AGA ATC TAT TC-3'(순방향; 서열번호 3) 및 5'-GAG AAG TCC CGA CCA GTG AG-3'(역방향; 서열번호 4); VEGF 프라이머, 5'-CCC ATG GCA GAA GGA GG-3'(순방향; 서열번호 5) 및 5'-GGA AGA TGT CCA CCA GG-3'(역방향; 서열번호 6); 및 β-액틴(β-actin) 프라이머, 5'-TGA AGA TCA AGA TCA TTG CTC-3'(순방향; 서열번호 7) 및 5'-TGC TTG CTG ATC CAC ATC TG-3'(역방향; 서열번호 8). 반응은 95℃에서 3분(초기 변성/중합효소 활성화) 1회 사이클(cycle) 후 95℃에서 15초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초로 39회 사이클을 반복하였다. β-액틴은 정규화(normalization)를 위해 사용되었고, 상대적인 유전자 발현은 GeneXpression Macro chromo4 소프트웨어(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 평가하였다.

[0066] 실시예 5 : 웨스턴 블랏 분석

[0067] 단백질은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 전기영동으로 분리한 단백질은 트랜스퍼 버퍼(transfer buffer; 20% 메탄올, 25 mM Tris-HCl, 192 mM 글라이신(glycine))를 이용하여 350 mA에서 120분간 플루오르화 폴리비닐리덴(polyvinylidene fluoride, PVDF) 멤브레인으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 멤브레인은 0.1% tween 20 및 5% 우태아혈청을 포함하는 TBS(Tris-buffered saline)로 블로킹(blocking)시킨 후, 일차 항체로 반응시키고 HRP가 접합된 이차 항체 Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)로 반응시켰다. 멤브레인에 ECL(enhanced chemiluminescence) 검출 kit(Advansta)의 발색시약 I 과 II를 1:1로 섞은 혼합액을 도포하고, X-선 필름(X-ray film; CP-G plus, Agfa Healthcare Ltd, New Orleans, LA, USA)에 노출하여 현상한 다음 필름 상에서 단백질의 발현 정도를 관찰하였다. 실험에 사용된 mTOR(2983S), HIF-1(610958) 및 β-액틴(A5441) 항체는 셀 시그널링(Cell signaling, Boston, MA), BD 바이오사이언스(BD Biosciences, San Jose, CA) 및 시그마(Sigma)에서 각각 구매하였다.

[0069] **실시예 6 : 산소 유발 망막증(oxygen-induced retinopathy; OIR) 모델**

[0070] 모든 실험은 ARVO(association for research in vision and ophthalmology statement for the use of animals in Ophthalmic and Vision Research)의 규정을 준수하여 수행하였으며, 동물 실험을 위해 아산생명과학연구소(Asan Life Science Institute, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea)의 기관연구 윤리심의위원회(Internal Review Board, IRB)의 승인을 받았다.

[0071] SD 랫(Sprague-Dawley rat; SD rat)은 출생 후 7일(P8)에서 P12까지 $80 \pm 5\%$ 의 산소 챔버(chamber)에서 길렀으며, 그 후 5일은 실내 공기 환경에서 길렀다. 동물은 3개의 군으로 나누었다: 1군; 비히클(vehicle) 처리 sham 군($n=5$), 2군; rAAV-GFP-siCon 처리 군($n=5$), 3군; rAAV-GFP-simTOR 처리 군($n=5$). SD 랫은 알파산(alfaxan, 20 mg/kg) 및 티레타민(tiletamine, 12.5 mg/kg)을 복강 내 주사하여 마취시켰다. Mydrin-P(트로픽아미드(tropicamide) 5 mg/mL 및 페닐에프린(phenylephrine) 5 mg/mL, Santen Pharmaceuticals, Japan)로 동공을 확장시킨 후, 수술용 현미경(Zeiss, NY) 하에서 33 게이지(gauge)의 헤밀턴 주사기(Hamilton, NE)를 이용하여 rAAV-GFP-siCon(2.5×10^8 TPs), rAAV-GFP-simTOR(2.5×10^8 TPs) 또는 비히클 5 L를 유리체 내로 주사하였다. 공막절개술(sclerotomy)은 33 게이지의 헤밀턴 주사기를 이용하여 연막(limbus; 강막과 공막 사이의 전이대)에서 약 1 mm 떨어진 후방에서 이루어졌으며, 수정체(lens)의 손상을 방지하기 위해 주의를 기울여 수행하였다.

[0073] **실시예 7 : 플루오레세인 혈관조영상(fluorescein angiogram) 분석**

[0074] 랫 망막(retina) 준비 및 혈관 염색 방법은 이전 논문을 참고(Connor et al)하였으며, 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 획득한 안구는 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde; PFA)에 담가 상온에서 1시간 동안 고정시켰다. 그 후, 공막(sclera), 포도막 조직(uveal tissue), 각막(cornea) 및 수정체를 망막에서 제거하고, 분리한 망막을 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 담가 5분 동안 흔들어주며 2회 세척하였다.

[0075] 망막 혈관을 염색하기 위해, 망막을 이소렉틴(Isolectin, B4-594, Molecular Probes, Carlsbad, CA)에 넣고 4℃에서 이틀 동안 반응시켰다. 그 후, 망막은 젤라틴을 사용하여 슬라이드에 평평하게 마운트(mount)하고 커버슬립으로 덮은 다음 메니큐어로 밀봉하였다. 녹색 형광 단백질(GFP) 발현은 플루오레세인(fluorescein) 혈관조영상 및 공초점 현미경 시스템(confocal microscope system, LSM 780, Zeiss, NY, NY)을 이용하여 분석하였다.

[0077] **실시예 8 : 산소 유발 망막병증 동물모델에서 망막증 분석**

[0078] 혈관 영역의 경계 마스크(boundary mask), 혈관 영역 안에 빈 영역(empty area) 및 전체 눈 세포 영역을 얻기 위해 다음 3단계를 수행하였다. 전처리 과정으로서 모든 이미지 파일은 RGB-색깔 채널 이미지로 분할하였다. 첫째, 빨강 채널 이미지에서 자동 임계값 방법을 적용하여 혈관 영역을 세분화하였다. 혈관 영역 마스크와 함께, 객체 크기 옵션의 제약으로 큰 객체를 검출하기 위해 수행되는 이미지J(ImageJ)의 '입자 분석(particle analysis)' 방법으로 경계 마스크를 추출하였다. 단일 객체 이상인 경우, 경계 'OR' 연산을 이용하여 단일 혈관 영역 마스크를 만들기 위해 복수 객체를 생성하였다. 둘째, 혈관 영역 안에 빈 영역을 얻기 위해, 혈관 영역 마스크를 인버트(invert) 시켰다. 그 다음 혈관 영역 안에 작은 객체를 얻기 위해 수행되는 '입자 분석' 방법으로 인버트된 혈관 마스크를 추출하였다. 첫 번째 단계와 마찬가지로, 경계 'OR' 연산을 이용하여 단일 빈 영역 마스크를 만들기 위해 복수 객체를 생성하였다. 마지막으로, 파랑 채널 이미지에서 자동 임계값 방법을 적용하여 전체 안구 영역의 바깥 경계 마스크를 세분화하였다. 바깥 경계 마스크가 닫힌 원 모양이 아닌 경우, 수동 드로잉을 수행하여 닫힌 원 모양으로 만들었다. 그 다음 '입자 분석' 방법을 이용하여 전체 눈 세포 영역으로 바깥 경계를 검출하였다. 3개의 마스크를 토대로, 각 영역은 총 픽셀 수를 기준으로 측정하였다. 전체 망막 영역에 대한 망막 혈관 영역의 총 픽셀 수의 비율을 이용하여 망막증의 중증도(severity)를 정량하였다. 자동으로 분할된 이미지를 모두 검토한 후, 확실한 오류는 전문가가 수동으로 수정하였다.

[0080] **실시예 9 : 통계 분석**

[0081] 모든 결과는 평균(mean) $\pm$ 표준 편차(SD)로 나타내었으며, $P < 0.05$ 의 값은 유의한 것으로 간주하였다. 군 간

평균 망막병증 점수의 비교는 Mann-Whitney U-test로 분석하였고, 군 간 VEGF 발현의 비교는 Kruskal-Wallis test로 분석하였다. 통계 분석은 SPSS V21(IBM SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행하였다.

[0083] 실험예 1 : mTOR 타겟 siRNA에 의한 mTOR 유전자 침묵 효과

[0084] mTOR 발현에 있어서 mTOR에 특이적인 siRNA의 효과를 확인하기 위해, ARPE19 세포에 합성된 mTOR siRNA 또는 비특이적 scrambled control siRNA를 처리하였다.

[0085] 그 결과, 도 3을 참조하여 보면, mTOR siRNA를 처리한 후 mTOR mRNA 및 단백질 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, scrambled control siRNA 처리한 후 mTOR mRNA 및 단백질 발현에서 변화가 관찰되지 않았다. 망막 색소 상피세포인 ARPE19 세포에서 mTOR siRNA에 의한 유전자 킥다운(knockdown) 정도는 자궁 경부 암세포인 HeLa 세포와 매우 유사하게 나타났다.

[0086] 또한, 리포터 단백질(reporter protein)로 GFP와 함께 corresponding mTOR siRNA(rAAV-GFP-simTOR) 또는 scrambled control siRNA(rAAV-GFP-siCon)를 발현하는 rAAV를 제조하여 분석한 결과, 바이러스 유형에 관계없이 현미경 하에서 GFP의 발현이 빠르게 관찰되었고, 반면, rAAV2-GFP-simTOR에 의해 mTOR 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 simTOR가 내인성의 감소된 mTOR mRNA 및 단백질 발현 수준을 효과적으로 하향 조절함을 의미한다.

[0088] 실험예 2 : mTOR 신호전달 억제에 의한 망막 맥관구조(vasculature)의 형성 효과

[0089] 산소 유발 망막병증 동물모델에서 망막병증이 분석을 위해, 모든 마운트 이미지(1군, 2군 및 3군)를 자동 '입자 분석' 방법으로 분석하였다.

[0090] 도 4를 참조하여 보면, 망막 혈관조영상 결과, 비히클 처리 삼 군 및 rAAV-GFP-siCon 처리 군에서 망막 주변 및 중간에 넓은 범위의 무혈관 영역이 관찰되었다. 그러나, 도 5를 참조하여 보면, rAAV-GFP-simTOR 처리 군에서 망막의 무혈관 영역이 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 6을 참조하여 보면, 전체 마운트 영역에서 혈관 영역을 측정된 결과, 각각 50.66.9% (1군), 52.05.4% (2군) 및 62.810.3% (3군)의 평균 혈관 영역이 관찰되었다.

[0091] 또한, 망막 혈관 확장 및 굴곡과 같은 망막 혈관 무력증의 다른 징후들이 모든 대상에서 관찰되었다. 무혈관 영역 근처에는 수많은 망막 혈관 다발들이 존재하나, 염색된 잔해로부터 명확한 차별이 어려웠다. 이 실험에서 망막 혈관신생 형성이 정상화되지는 않았지만, 망막 박리와 유사하게 대부분의 대상에서 망막 혈관신생 형성이 관찰되었다. 혈관신생 형성은 혈관 폐쇄 구역과 혈관화된 망막 사이에서 확인되었다. 이 병리학적 새로운 혈관은 작은 직경과 수많은 망막 혈관 다발이 있는 조직화되지 않은 형태를 보였다. 이를 종합하면, mTOR siRNA 처리가 OIR 모델에서 무혈관 영역을 유의하게 감소시키는 것을 의미한다.

[0093] 실험예 3 : 저산소 상태에서 mTOR siRNA에 의한 HIF-1 및 VEGF 억제 효과

[0094] 저산소 상태에서 mTOR 발현의 감소가 HIF-1 단백질 및 VEGF mRNA의 발현 증가에 영향을 미치는지를 확인하기 위해, ARPE19 세포에 mTOR siRNA 또는 Control siRNA를 처리하고 정상 또는 저산소 상태에서 배양하였다.

[0095] 그 결과, 도 7을 참조하여 보면, 저산소 상태에서 HIF-1 단백질 및 VEGF mRNA의 발현이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. mTOR siRNA 처리는 정상 상태 뿐만 아니라 저산소 상태에서 HIF-1 단백질 및 VEGF mRNA의 발현을 유의하게 억제시키는 것을 확인하였다. mTOR siRNA 처리는 저산소 상태에 의한 HIF-1 단백질의 안정화를 급격히 파괴하였고, VEGF mRNA 발현도 감소시켰다.

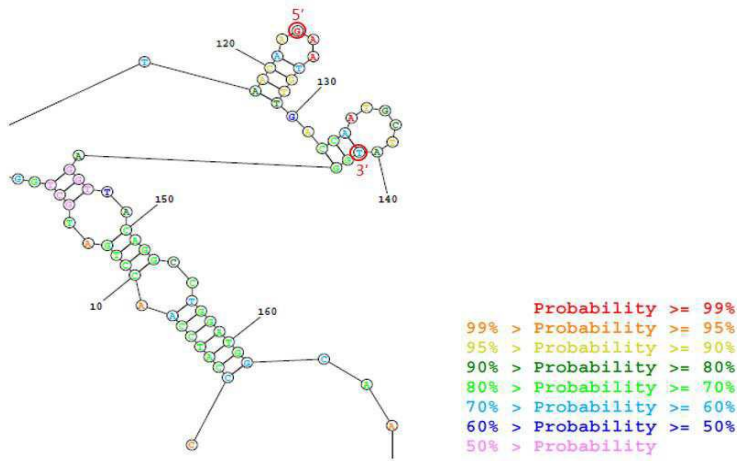
[0097] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0098] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등

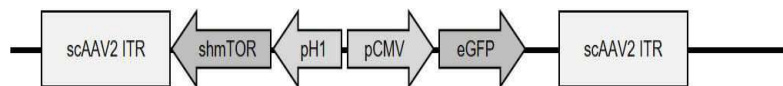
개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

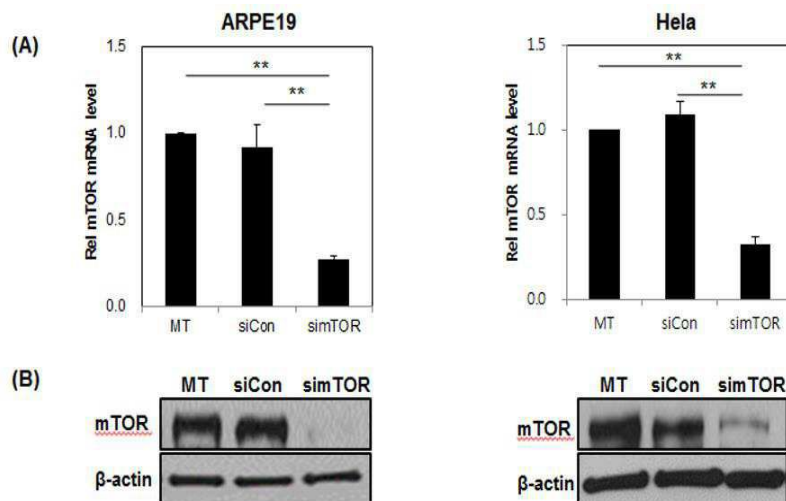
도면1



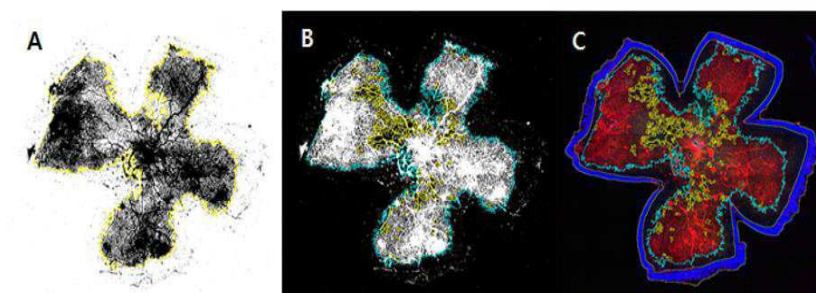
도면2



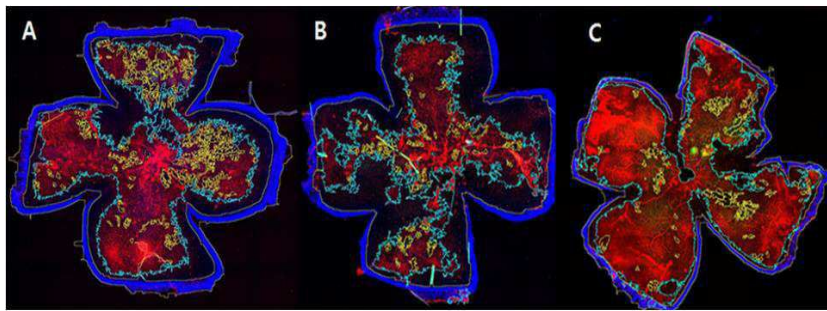
도면3



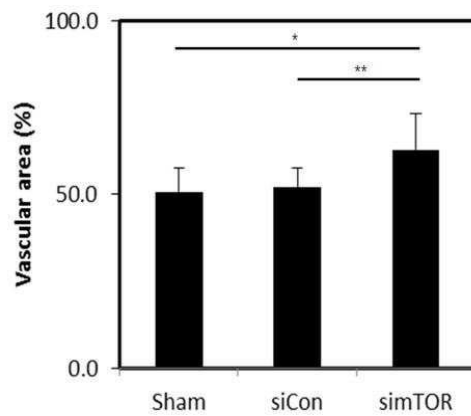
도면4



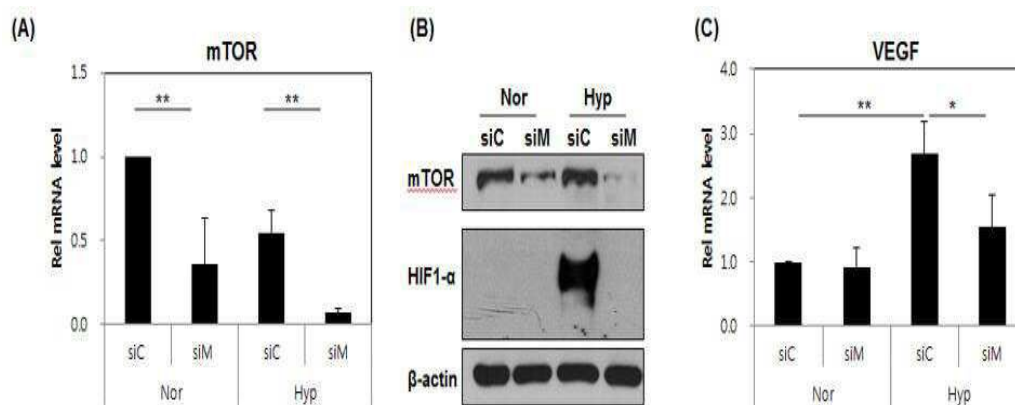
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
THE ASAN FOUNDATION
Cdmogen co., Ltd

<120> Composition for treating retinal vascular disease comprising mTOR
targeting siRNA with cross-species activity

<130> ADP-2016-0662
 <160> 8
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTOR siRNA
 <400> 1
 gaauguugac caaugcuau 19

 <210> 2
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> scrambled control siRNA
 <400> 2
 auucuaucac uagcgugac 19

 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for mTOR
 <400> 3
 cacagtgccca gaatctattc 20

 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for mTOR

 <400> 4
 gagaagtccc gaccagtgag 20

 <210> 5
 <211> 17

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer for VEGF	
<400>	5	
	cccatggcag aaggagg	17
<210>	6	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer for VEGF	
<400>	6	
	ggaagatgtc caccagg	17
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer for beta-actin	
<400>	7	
	tgaagatcaa gatcattgct c	21
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer for beta-actin	
<400>	8	
	tgcttgctga tccacatctg	20