



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월28일
 (11) 등록번호 10-1465319
 (24) 등록일자 2014년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/113</i> (2010.01) <i>C12N 15/63</i> (2006.01) <i>A61K 31/713</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0024815 (22) 출원일자 2013년03월08일 심사청구일자 2013년03월08일 (65) 공개번호 10-2014-0110465 (43) 공개일자 2014년09월17일 (56) 선행기술조사문헌 KR1020070115321 A KR1020100100774 A US20090209621 A1 전체 청구항 수 : 총 14 항	(73) 특허권자 서울대학교산학협력단 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동) (72) 발명자 안광석 서울 서초구 신반포로33길 64, 1동 407호 (잠원동, 한신로얄아파트) 이상현 경기 안양시 동안구 흥안대로414번길 20, 101동 1008호 (평촌동, 영풍아파트) (74) 대리인 박원미
---	--

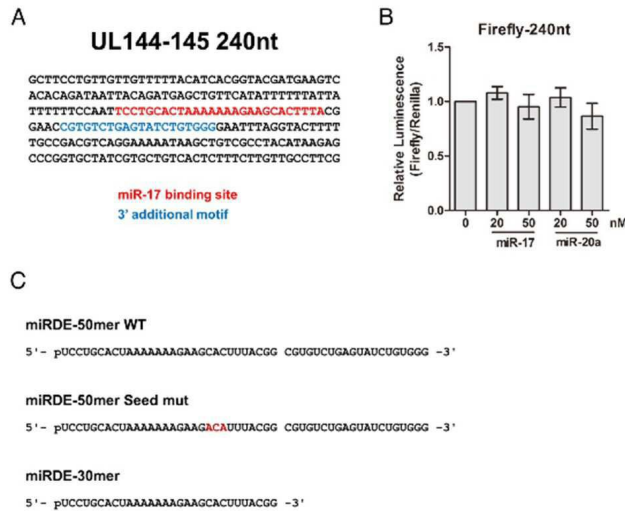
심사관 : 조현경

(54) 발명의 명칭 **마이크로 RNA 분해 엘리먼트 및 그 용도**

(57) 요약

본원에 따른 miRNA 조절용 폴리뉴클레오타이드는 특정 마이크로 RNA와 결합할 수 있는 다양한 서열을 갖도록 디자인할 수 있어, 다양한 서열 응용을 통해 여러 종류의 miRNA에 표적하는 것이 가능하여 분자·세포생물학적 연구 도구로써 뿐만 아니라, miRNA와 관련된 임상적인 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2006-0050689
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업
연구과제명 창의적연구진흥사업
기 여 율 1/1
주관기관 서울대학교
연구기간 2012.03.01 ~ 2015.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드로

상기 마이크로 RNA는 miR-17-92 마이크로 RNA 클러스터에 속하는 miR-17, miR-18, miR-19, 또는 miR-92의 패밀리
의 마이크로 RNA이고,

상기 폴리뉴클레오타이드는 RNA로 5'-X₁-Y-X₂-CGUGUCUGAWUAUCUGUGGG-3'의 서열을 포함하며,

상기 서열에서 W는 G 또는 A이고, X₂는 8 내지 10 nt 길이의 상기 마이크로 RNA의 시드서열에 상보적인 서열이
고, Y는 7 내지 8 nt 길이의 내부 2차 구조를 형성하지 않는 상기 마이크로 RNA에 비상보적 서열이고, X₁은 상
기 마이크로 RNA의 시드서열부터 3'방향으로 3 내지 4 nt 떨어진 위치한 연속적인 7 내지 9 nt 서열에 상보
적인 서열인, 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 X₂는 상기 각 패밀리의 시드서열에 상보적인, GCACUUU, GCACCUU, UUUGCAC 또는
GUGCAAU의 서열을 포함하는 것인, 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드는 miR-17-92 마이크로 RNA 클러스터에 속하는
miR-17, miR-18, miR-19, 또는 miR-92의 패밀리의 마이크로 RNA를 조절하며, 상기 miR-17 조절용은 5'-
UCCUGCACUAAAAAAGAAGCACUUUACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3' 또는 5'-
UCCUGCACUAAAAAAGAAGACAUUUACGGCGUGUCUGAWUAUCUGUGGG-3'; miR_18 조절용은 5'-
UUCUGCACUAAAAAAGAUGCACCUUACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3'; miR_19 조절용은 5'-
UGUUUUGCAAAAAAAGGAUUUGCACACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3'; 및 miR_92 조절용은 5'-
UAGGCCGGGAAAAAAGAAGUGCAAUACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3'의 서열을 포함하는 것인, 마이크로 RNA 조절용 폴리
뉴클레오타이드.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 조절은 상기 폴리뉴클레오타이드와 상기 마이크로 RNA간의 결합에 의해 상기 각 마이크
로 RNA가 분해되는 것인, 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

제 1 항에 따른 폴리뉴클레오타이드에 대응하는 DNA를 포함하는 벡터.

청구항 6

제 5 항에 따른 벡터를 포함하는 세포.

청구항 7

제 1 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 암 치료용 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 암은 림프성백혈병, 미분화갑상선암, 또는 악성폐암인, 암 치료용 조성물.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 암은 miR-17-92 마이크로 RNA 클러스터와 관련된 암인, 암 치료용 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 miR-17-92 마이크로 RNA 클러스터와 관련된 암은 림프종, 림프세망종양, 림프아구성백혈병, 또는 백혈병인, 암 치료용 조성물.

청구항 12

HCMV 증식 억제제 스크리닝 방법으로,

miR-17, miR-18, miR-19, 및 miR-92 패밀리를 포함하는 miR-17-92 클러스터의 마이크로 RNA 중 하나 이상을 제공하는 단계;

상기 각 패밀리의 마이크로 RNA에 결합하는 GCACUUU, GCACCUU, UUUGCAC 또는 GUGCAAU을 포함하는 상기 각 패밀리의 시드서열에 결합하는 서열 및 상기 서열의 3 '방향에 CGUGUCUGAWUAUCUGUGGG-3' 부가모티브를 포함하는 서열을 갖는 HCMV 유래의 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;

상기 마이크로 RNA와 상기 폴리뉴클레오타이드의 상호작용을 억제할 것으로 기대되는 시험물질을 처리하는 단계; 및

시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 상호작용을 억제하는 시험물질을 후보화합물로 선정하는 단계를 포함하는, HCMV 바이러스 증식 억제제 스크리닝 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제 12 항에 있어서, 상기 마이크로 RNA는 이를 포함하는 세포의 형태로 제공되는 것인, HCMV 바이러스 증식 억제제 스크리닝 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 세포는 HEK293T, HFF, HUVEC, THP-1, 또는 U373MG 인, HCMV 바이러스 증식 억제제 스크리닝 방법.

청구항 16

제 1 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 마이크로 RNA와 접촉하는 단계를 포함하는, 세포 또는 인비트로에서 마이크로 RNA 조절방법.

명세서

기술분야

[0001] 본원은 마이크로 RNA 조절과 관련된 것이다.

배경기술

[0002] 마이크로 RNA [MicroRNA (miRNA)]는 표적 mRNA와의 상보적 결합을 통해 전사후 단계에서 mRNA 조절에 관여하는 짧은 길이의 내인성 RNA이다. miRNA는 헤어핀 구조의 긴 전구체로부터 RNase III 리보뉴클레이즈인 Drosha (Lee et al. 2003. Nature 425: 415-419) 및 Dicer (Hutvagner et al. 2001. Science 293: 834-838; Ketting et al. 2001, Genes Dev 15: 2654-2659)에 의해 잘려 성숙된 형태가 된다. 2012년 8월 현재 miRNA 데이터베이스 (19판, miRBase)에 의하면 193개 종에서 유래한 25,141 개의 성숙 miRNA가 등록되어 있다.

[0003] 대부분의 miRNA는 표적 유전자의 3' -UTR에 결합하여 이의 번역을 억제하며, 세포내 다양한 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 miRNA는 세포 성장 및 세포사멸 (Brennecke, J. et al. 2003. Cell 113: 25-36), 조혈세포 분화 (Chen, C. Z., et al. 2004. Science 303: 83-86), 수명조절 (Boehm, M., Slack, F. 2005. Science. 310:1954-7)와 같은 세포내 기능은 물론, 바이러스 감염은 물론 암을 포함하는 각종 질환과도 연관되어 있는 것으로 나타났다. 특히 암과 관련하여 50% 이상의 miRNA 유전자가 암과 연관된 유전체 영역에 위치하고 있는 것으로 나타났다 (Calin, G. A. et al. 2004. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 2999-3004). miRNA의 조절이상은 유방암(Iorio, M. V. et al. 2005. Cancer Res. 65: 7065-70.), 폐암 (Johnson, S. M. et al. 2005. Cell 120: 635-647) 및 대장암 (Michael, M. Z. et al. 2003. Mol. Cancer Res. 1: 882-891)과 연관이 되어 있으며, 예를 들면 miR-17-92 클러스터는 인간 B-세포 림프종에서 증폭되어 있으며, 버킷 림포마에서 상향 발현된다 (He, L. et al. 2005. Nature 435: 828-833).

[0004] 따라서 인간 miRNA의 조절이 치료제 개발을 위한 새로운 표적으로 떠오르고 있으나, miRNA의 생성과정과는 달리, 이의 조절 특히 분해와 관련된 연구는 초기상태이다.

[0005] 후자의 한 예로 miRNA에 결합하여 이의 번역 억제 또는 절단을 유도하여 조절하는 폴리뉴클레오타이드 조절제를 들 수 있으며, 미국 특허 제7365058호는 마이크로 RNA 및 이의 억제 방법에 관한 것으로, 췌장소도의 miRNA에 결합하는 항 miRNA를 개시한다. 또한 미국 공개 특허 공보 제 2012-0238618호는 항-miRNA 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 약학 조성물에 관한 것으로 LNA를 포함하는 8-26 nt 길이의 다양한 miRNA에 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 개시한다.

[0006] 하지만 여전히, 세포내 다양한 기능 및 질환의 발생에 관여하는 다양한 miRNA를 조절할 수 있는 조절제의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본원은 다양한 질환의 발생과 관련된 miRNA 조절제를 개발하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 한 양태에서 본원은 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드는 RNA로 5'-X₁-Y-X₂-CGUGUCUGAWUAUCUGUGGG-3' 의 서열을 포함하며, 상기 서열에서 W는 G 또는 A이고, X₂는 약 8

내지 약 10 nt 길이의 상기 마이크로 RNA의 시드서열에 상보적인 서열이고, Y는 약 7 내지 약 8 nt 길이의 내부 2차 구조를 형성하지 않는 상기 마이크로 RNA에 비상보적 서열이고, 벌지 (bulge)라고도 하며, 상기 조건을 만족하는 한 다양한 서열이 사용될 수 있다. 한 구현예에서는 예를 들면 AAAAAAAG가 사용되나, 이로 제한하는 것은 아니다. 상기 X₁은 상기 마이크로 RNA의 시드서열부터 3 ‘방향으로 약 3 내지 약 4 nt 떨어진 위치한 연속적인 약 7 내지 약 9 nt 서열에 상보적인 서열을 가진다. 본원에 따른 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드는 마이크로 RNA간의 결합에 의해 상기 각 마이크로 RNA를 분해하며, 예시적 작용방식은 도 8에 기재되어 있다.

[0009] 본원에 따른 일 구현예에서, 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드가 결합하는 마이크로 RNA는 miR-17-92 마이크로 RNA 클러스터에 속하는 miR-17, miR-18, miR-19, 또는 miR-92의 패밀리의 마이크로 RNA이고, 상기 X₂는 상기 각 패밀리의 시드서열에 상보적인, GCACUUU, GCACCUU, UUUGCAC 또는 GUGCAAU의 서열을 포함한다.

[0010] 본원에 따른 다른 구현예에서, 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드가 결합하는 마이크로 RNA는 miR-17-92 마이크로 RNA 클러스터에 속하는 miR-17, miR-18, miR-19, 또는 miR-92의 패밀리의 마이크로 RNA이고, 상기 각 본원에 따른 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드는 miR-17 조절용은 5'-UCCUGCACUAAAAAAGAAGCACUUUACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3' (야생형) 또는 5'-UCCUGCACUAAAAAAGAAGACAUUUACGGCGUGUCUGAWUAUCUGUGGG-3' ; miR-18 조절용은 5'-UUCUGCACUAAAAAAGAUGCACCUUACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3' ; miR-19 조절용은 5'-UGUUUUGCAAAAAAAGGAUUUGCACACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3' ; 및 miR-92 조절용은 5'-UAGGCCGGGAAAAAAGAAGUGCAAUACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3' 의 서열을 포함한다.

[0011] 다른 양태에서 본원은 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드에 대응하는 DNA를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0012] 또 다른 양태에서 본원은 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 마이크로 RNA 관련 질환 치료용 조성물을 제공한다. 본원에 따른 조성물은 림프성백혈병, 미분화갑상선암, 또는 악성폐암 등을 포함하는 암관련 질환의 치료에 사용될 수 있다. 특히 miR-17-92 마이크로 RNA 클러스터 관련질환 예를 들면 림프종, 림프세망종양, 림프아구성백혈병, 또는 백혈병을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0013] 다른 양태에서 본원은 또한HCMV 증식 억제제 스크리닝 방법을 제공하며, 상기 방법은 일 구현예에서, miR-17, miR-18, miR-19, 및 miR-92 패밀리를 포함하는 miR-17-92 클러스터의 마이크로 RNA 중 하나 이상을 제공하는 단계; 상기 각 패밀리의 마이크로 RNA에 결합하는 HCMV 유래의 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계; 상기 마이크로 RNA와 상기 폴리뉴클레오타이드의 상호작용을 억제할 것으로 기대되는 시험물질을 처리하는 단계; 및 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 상호작용을 억제하는 시험물질을 후보화합물로 선정하는 단계를 포함한다. 본원에 따른 방법에서 miR-17, miR-18, miR-19, 및 miR-92 의 각 패밀리에 결합하는 HCMV 유래의 폴리뉴클레오타이드는 각각 GCACUUU, GCACCUU, UUUGCAC 및 GUGCAAU을 포함하는 상기 각 패밀리의 시드서열에 결합하는 서열 및 상기 서열의 3 ‘방향에 CGUGUCUGAWUAUCUGUGGG-3’ 부가모티브를 포함하는 서열을 포함한다. 본원에 따른 일 구현예에서, 마이크로 RNA는 HEK293T, HFF, HUVEC, THP-1, 또는 U373MG를 포함하는 세포의 형태로 제공될 수 있다.

[0014] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드를 마이크로 RNA와 접촉하는 단계를 포함하는, 세포 또는 인비트로에서 마이크로 RNA 조절방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본원에 따른 miRNA 조절용 폴리뉴클레오타이드는 특정 마이크로 RNA와 결합할 수 있는 다양한 서열을 갖도록 디자인할 수 있어, 다양한 서열 응용을 통해 여러 종류의 miRNA에 표적하는 것이 가능하여 분자·세포생물학적 연구 도구으로써 뿐만 아니라, miRNA와 관련된 임상적인 치료제로서도 사용 가치가 높다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 임상에서 분리된 HCMV 유래의 miR-17-92 클러스터의 차별적 발현 조절을 나타내는 것으로,

도 1a는 HCMV 감염으로 인한 miRNA 발현 변화를 나타내는 마이크로어레이 결과이고,

도 1b는 miR-17 (miR-17 및 miR-20a), miR-18 (miR-18a), miR-19 (miR-19a, b), 및 miR-92 (miR-92a) 4종류의 패밀리로 구성되는 miR-17-92 클러스터의 구조를 나타내는 모식도로 적색은 시드 서열이고,

도 1c는 HCMV Toledo 감염으로 인한 miR-17-92 클러스터에서의 성숙한 miRNA 농도 변화를 나타내는 노던블랏 결과이고,

도 1d는 HCMV Toledo 감염으로 인한 miR-17-92 클러스터에서의 성숙한 miRNA 농도 변화를 나타내는 정량 역전사 PCR 결과이고,

도 1e는 Toledo-WT 또는 Toledo Δ 15kb (5 MOI)로 감염된 HFF에서 miR-17, miR-20a, and miR-19a의 노던블랏 결과로, NI는 비감염 대조군이고, 에러바는 ± 1 SD이다.

도 2는 HCMV 감염으로 인한 miR-17-92 발현 조절 (temporal regulation)을 나타내는 결과로,

도 2a 및 도 2b는 Toledo-WT 또는 Toledo Δ 15kb (5 MOI)로 감염된 HFF에서의 프라이머리 miR-17-92에 대한 정량 역전사 PCR 결과이고,

도 2c는 HCMV IE1 및 IE2를 발현하는 HFF에서의 pri-miRNA에 대한 정량 역전사 PCR 결과이고,

도 2d는 IE1 또는 IE2 특이적 siRNA로 전달이입된 HFF 세포에서의 IE1 또는 IE2의 miR-17-92 유도기능의 상실을 나타내는 pri-miRNA에 대한 정량 역전사 PCR (왼편) 결과이고, IE1 및 IE2의 결손을 나타내는 면역블랏 결과 (오른편)이고,

도 2e는 Toledo 감염 동안 성숙한 miR-20a (위패널) 및 miR-17 (아래패널)의 발현을 나타내는 노던블랏 결과이고, 장기 노출을 통해 pre-miR-20a를 검출한 결과 (오른쪽 위 패널)이고, 에티디움 브로마이드로 염색된 rRNA 밴드를 로딩 컨트롤로 사용하였으며, NI는 비감염 대조군이고, 에러바는 ± 1 SD을 나타낸다.

도 3은 UL144-145 RNA의 유전자사이에 위치한 비코딩 영역이 서열특이적 상호작용을 통해 성숙된 miR-17 및 miR-20a를 하향조절하는 것을 나타내는 결과로,

도 3a는 12 hpi Toledo-WT (5 MOI)에서 대조군으로서 DMSO, 악티노마이신 D (Act D) 또는 사이클로헥사마이드 (CHX)로 처리한 뒤 36시간 후에 HFF에 추출한 총 RNA에 대한 정량 분석결과이고,

도 3b는 (B) 회복 실험에 사용된 15-kb 영역의 일부 유전체를 도식적으로 나타낸 것이고,

도 3c는 Toledo Δ 17Seed (5 MOI)로 감염된 HFF를 프로모터가 없는 벡터(pBlueScript)에 도 3b의 15-kb 영역의 일부 유전체를 포함하는 벡터로 전달이입한 후 성숙한 miR-17 and pri-miR-17-92 전사체 농도를 정량 역전사 PCR로 분석한 결과이고,

도 3d는 도 3b의 클론 3의 UL144-145 RNA 좌위를 도식적으로 나타낸 것으로, miR-17 결합 부위를 UL144 및 UL145 사이의 비유전자(intergenic) 영역에 위치하며,

도 3e는 Mfold 소프트웨어를 이용하여 UL144-145 RNA를 2차원적으로 나타낸 것으로, miR-17 (적색) 및 miR-17 결합 부위 (청색)의 중앙돌출부에 대한 5' 및 3' 상보적 서열을 표시하였으며,

도 3f는 UL144-145 RNA를 포함하는 pcDNA3.1 벡터로 농도를 달리하여 전달이입된 HEK293T 유래의 성숙된 miRNA 전사체를 정량 역전사 PCR로 검출한 결과이고,

도 3g는 miR-17 시드-결합 부위에 돌연변이를 갖는 UL144-145 RNA(UL144-145 seed mut)가 도입된 HEK293T 세포의 miRNA 전사체 농도를 정량 역전사 PCR로 검출한 결과이고,

도 3h는 UL144-145 RNA의 miR-17 결합 부위가 miR-18a-결합부위 (UL144-145 17 \rightarrow 18a)로 변이가 유발된 UL144-145가 도입된 HEK293T 세포의 miRNA 전사체 농도를 정량 역전사 PCR로 검출한 결과이고,

도 3i는 UL144-145에 해당하는 240nt의 유전자간 부위를 Rosetta 프로그램을 이용하여 분석한 3차 구조로, miR-17 은 적색으로, 중간 돌출부위는 청색, 3' 부가 부위는 오렌지색으로 나타낸 것이고(A), B는 miR-17 결합 부위를 miR-92a 결합부위 (17 \rightarrow 92a)로 치환한 후 HEK 293T 세포에 전달이입 한 후, 성숙된 miRNA를 정량 역전사 PCR로 분석하였다.

여기에서 **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$ (Student' s t-test); NS: nonspecific을 나타내고, 에러바는 ± 1 SD를

나타낸다.

도 4는 miR-17 분해에 요구되는 최소 서열을 규명한 결과로,

도 4a는 유전자간 영역을 포함하는 firefly-736nt, UL145 ORF, 및 3' UTR; 유전자간 영역만을 포함하는 firefly-240nt; 및 miR-17 결합 부위만을 포함하는 firefly-30nt의 루시페라제 리포터 시스템 구축물 모식도이고,

도 4b는 HEK293T에서 상기 리포터 시스템을 과발현한 결과, pri-miR-17-92는 아닌, miR-17 및 miR-20a 만이 농도에 변화가 있음을 나타내는, qRT-PCR로 검출한 결과이고,

도 4c는 HEK293T에서 상기 리포터 시스템을 과발현한 결과, firefly-30nt가 miR-17 분해에 미치는 영향을 나타내는 qRT-PCR 결과이고,

도 4d는 추가의 모티브 규명을 위한 UL144-145 유전자간 영역에 대한 일련의 결실부위를 도식적으로 나타낸 것이고,

도 4e는 40-nt 길이의 결실부위를 이용한 일차 스크리닝 결과로, HEK293T로 전달이입 후 qRT-PCR 결과이고,

도 4f는 $\Delta 3$ 영역에서 4-nt 길이의 결실부위를 이용한 이차 스크리닝 결과로, HEK293T로 전달이입 후 qRT-PCR 결과이고,

도 4g는 최소화된 바이러스 유전자간 RNA의 합성 RNA 올리고머를 이용한 결과로, 50nt의 miR-17-결합 부위 및 miRDE 3' 부가 모티브 (miRDE-50-mer_WT)를 포함하는 50nt RNA 올리고머를 HEK293T로 전달이입 후 성숙된 miRNA에 대한 qRT-PCR 결과이고,

도 4h는 최소화된 바이러스 유전자간 RNA의 합성 RNA 올리고머를 이용한 결과로, miRDE wild-type 올리고머 (miRDE-50-mer_WT) 또는 miR-17 시드 결합부위 돌연변이 올리고머 (miRDE-50-mer_seed mut)를 포함하는 50nt RNA 올리고머를 HEK293T로 전달이입 후 성숙된 miRNA에 대한 qRT-PCR 결과이고,

도 4i는 최소화된 바이러스 유전자간 RNA의 합성 RNA 올리고머를 이용한 결과로, miRDE (miRDE-30-mer)의 miR-17 결합부위만을 포함하는 30nt RNA 올리고머를 HEK293T로 전달이입 후 성숙된 miRNA에 대한 qRT-PCR 결과이고, 에러바는 ± 1 SD를 나타낸다.

도 5는 miR-17 결합 부위에 3중으로 염기가 치환된 돌연변이 바이러스가 성숙된 miR-17의 표적화된 분해를 유도할 수 없음을 나타내는 결과로,

도 5a는 miR-17-결합 부위가 치환된 (CAC→ACA, red) 돌연변이 바이러스(Toledo Δ 17Seed)의 miR-17-결합 부위를 도식적으로 나타낸 것이고,

도 5b는 HFF를 Toledo-WT, Toledo Δ 17Seed, 또는 Toledo-Rev (2 MOI)로 감염한 후, 총 RNA의 pre-miR-17 (top panel), 성숙 miR-17 (second panel), pre-miR-20a (third panel), 및 성숙 miR-20a (fourth panel)의 노던블랏 결과이고,

도 5c는 Pri-miR-17-92 농도에 대한 qRT-PCR 분석 결과이고,

도 5d는 UL144-145 농도에 대한 qRT-PCR 분석 결과이고,

도 5e는 HCMV 감염 중 성숙 miRNA의 안정도에 대한 펄스-체이스 분석 결과로, 0.2 nM의 miR-17/miR-17* 듀플렉스로 전달이입 한 후 miR-17 전사체의 양을 표시된 시간에 qRT-PCR로 분석한 결과이다. 에러바는 ± 1 SD를 나타낸다.

도 6은 miRDE에 의한 miR-17의 분해가 용균감염 동안 신속한 바이러스 생산에 중요함을 나타내는 결과로,

도 6a는 2 MOI의 Toledo-WT and Toledo Δ 17Seed로 감염된 HFF에서의 바이러스 생성 그래프로 바이러스 타이터는 감염된 배지의 상층액을 제한 희석법으로 분석하였으며,

도 6b는 2 MOI의 Toledo-WT and Toledo Δ 17Seed로 감염된 HFF에서의 바이러스 유전체 DNA의 농도를 정량 PCR로 분석한 결과로, 에러바는 ± 1 SD를 나타내고,

도 6c는 HCMV immediate early proteins (IE1 and IE2) 및 late (gB)에 대한 면역블랏 결과이고,

도 6d는 입상에서 분리된 HCMV UL144-145 유전자간 영역의 miRDE에 대한 서열비교 결과로, GenBank 정보는 다음

과 같다: Toledo (GU937742.1), VR1814 (GU179289.1), Merlin (AY446894.2), JHC (HQ380895.1), TB40/E (AY446866.1), AF1 (GU179291.1), 3301 (GQ466044.1), HAN38 (GQ396662.1), JP (GQ221975.1), U11 (GU179290.1), U8 (GU179288.1), HAN20 (GQ396663.1), 3157 (GQ221974.1), 및 HAN13 (GQ221973.1). 보존 (적색) 및 비보존 (청색) 서열을 표시하였다. miRNA decay element (miRDE) 서열은 박스안에 표시되어 있으며, miR-17 결합부위 서열 및 3' 부가 모티프가 표시되어있다.

도 7은 UL144-145 유전자간 영역의 서열을 나타내는 것으로, A는 GenBank 번호 GU937742.1의 서열로, miR-17 결합 부위는 적색으로 3' 부가 모티프는 청색으로 표시되어 있으며, B는 레닐라 루시페라제, firefly-240nt 벡터 및 miR-17 또는 miR-20로 공전달이입된 HEK293T세포에서 전달이입 24시간 후에 측정된 루시페라제 활성 측정 결과를 나타내고, 상대적 루시페라제 활성은 레닐라 루시페라제 활성에 대한 비로 나타냈으며, C는 miR-17 결합 부위 (30 mer) 및 3' 부가 모티프 (20 mer)를 포함하는 UL144-145 RNA 올리고머를 나타내며, 돌연변이 올리고머는 적색으로 표시된 miR-17 시드 결합부위에 치환을 포함하고 있으며, 모든 올리고머는 5' 모노포스페이트 변형을 포함하고 있다.

도 8은 본원에 따른 miRDE의 작용방식을 도식적으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본원은 HCMV (Human Cytomegalo virus) 유래의 서열이 인간 마이크로 RNA에 결합하여 이의 조절을 통해 용균주기에서 증식을 촉진한다는 발견에 근거한 것이다.
- [0018] 한 양태에서 본원은 miR-17-92 마이크로 RNA 클러스터에 속하는 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드에 관한 것으로, 폴리뉴클레오타이드는 RNA로 5'-X₁-Y-X₂-CGUGUCUGAWUAUCUGUGGG-3' 의 서열을 포함하며, 상기 서열에서 W는 G 또는 A이고, X₂는 8 내지 10 nt 길이의 상기 마이크로 RNA의 시드서열에 상보적인 서열이고, Y는 7 내지 8 nt 길이의 내부 2차 구조를 형성하지 않는 상기 마이크로 RNA에 비상보적 서열이고, 상기 X₁은 상기 마이크로 RNA의 시드서열부터 3' 방향으로 약 3 내지 4 nt 떨어진 위치한 연속적인 약 7 내지 9 nt 서열에 상보적인 서열을 포함한다.
- [0019] 도 1b를 참조하면, 본원의 miR-17-92 클러스터는 miR-17 (miR-17 및 miR-20a), miR-18 (miR-18a), miR-19 (miR-19a, b), 및 miR-92 (miR-92a) 4 종류의 패밀리로 구성 (괄호안은 각 패밀리에 속하는 멤버임)되며, 시드 서열은 적색으로 표시하였다. 시드 서열은 miRNA의 5' 부분의 약 2~8 nt 핵산 서열을 지칭하는 것으로, 본원의 폴리뉴클레오타이드와 상보적 결합에 참여한다. 상기 각 패밀리에 속하는 miRNA는 각각 GCACUUU, GCACUUU, UUGCAC 또는 GUGCAAU의 시드서열을 포함하고, 본원의 폴리뉴클레오타이드는 상기 시드서열에 상보적인 서열 및 부가 모티프(5'CGUGUCUGAWUAUCUGUGGG')를 포함한다.
- [0020] 일 구현예에서 본원에 따른 마이크로RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드는 miR-17-92 마이크로 RNA 클러스터에 속하는 miR-17, miR-18, miR-19, 또는 miR-92의 패밀리의 마이크로 RNA를 조절하며, 상기 각 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드는 miR-17 조절용은 5'-UCCUGCACUAAAAAAGAAGCACUUACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3' 또는 5'-UCCUGCACUAAAAAAGAAGACAUUACGGCGUGUCUGAWUAUCUGUGGG-3'; miR_18 조절용은 5'-UUCUGCACUAAAAAAGAUGCACUUACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3'; miR_19 조절용은 5'-UGUUUGCAA AAAAAGGAUUGCACACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3'; 및 miR_92 조절용은 5'-UAGGCCGGGAAAAAAGAAGUGCAAUACGGCGUGUCUGAGUAUCUGUGGG-3'의 서열을 포함한다.
- [0021] 마이크로 RNA (miRNA)는 유전자 발현 조절에 중요한 기능을 하는, 단백질을 코딩하지 않는 RNA를 일컫는 것이다. 일반적으로 마이크로 RNA는 pre-miRNA라 불리는 헤어핀 구조를 갖는 약 70-80 nt (nucleotide) 길이의 전구체로 전사된 후, RNase III 효소인 Dicer에 의해 잘려 성숙된 형태로 생성된다. 마이크로 RNA는 miRNP라 불리는 리보뉴클레오택합체를 형성하여 표적 부위에 상보적 결합을 통해 표적 유전자를 절단하거나, 번역을 억제한다.
- [0022] 본원의 용어 "miRNA" 또는 "마이크로 RNA" 는 약 18 내지 25 nt 길이의 RNA 올리고뉴클레오타이드로, 세포내 다양한 조절기능을 갖는 내인성 RNA 분자이다.
- [0023] 본원의 용어 "표적 miRNA" 는 질환과 관련 있는 miRNA로, 상향 또는 하향 조절이 질환과 관련된 것으로, 예를 들면 암유발성(oncogenic) miRNA, 또는 암억제 miRNA를 들 수 있으며, 질환 치료제 개발의 표적으로 작용할 수 있다.

- [0024] 30% 이상의 인간 miRNA는 클러스터로 존재하며, 하나의 전구체로 전사된 후, 절단과정을 거쳐 최종 성숙 miRNA가 형성된다. 대부분의 miRNA는 표적 유전자의 3' -UTR에 결합하여 이의 번역을 억제하며, 세포내 다양한 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 miRNA는 세포 성장 및 세포사멸 (Brennecke et al. 2003), 조혈세포 분화 (Chen et al. 2004), 수명조절 (Boehm and Slack 2005)와 같은 세포내 기능은 물론, 바이러스 감염은 물론 암을 포함하는 각종 질환과도 연관되어 있는 것으로 나타났다.
- [0025] 특히 암과 관련하여 50% 이상의 miRNA 유전자가 암과 연관된 유전체 영역에 위치하고 있는 것으로 나타났다 (Calin et al. 2004). miRNA의 조절이상은 유방암(Iorio et al. 2005), 폐암 (Johnson et al. 2005) 및 대장암 (Michael et al. 2004)과 연관이 되어 있으며, 특히 miR-17-92 클러스터는 인간 B-세포 림프종에서 증폭되어 있으며, 버킷 림프종에서 상향 발현된다 (He et al. 2005).
- [0026] 한 구현예에서 표적 miRNA는 miR-17-92 클러스터에 존재한다. miR-17-92 클러스터는 암유발유전자로 기능하는 6개의 miRNA 즉 miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, 및 miR-92a-1로 구성되어 있다 (He et al., 2005). miR-17-92와 암과의 관련성은 Olive V. et al. Int J Biochem Cell Biol. 2010 Aug;42(8):1348-54에 기재되어 있다. miR-19은 세포사멸 유전자인 Pten 및 Bim을 표적으로 하여, 림프종을 유발하는 것으로 알려져 있으며 (Mavrakis, K.J. et al. 2010. Nat Cell Biol 12: 372-379; Mu, P. et al. 2009. Genes Dev 23: 2806-2811; Olive, V et al. 2009. Genes Dev 23: 2839-2849), miR-17은 세포부착, 이동 및 증식과 관련된 것으로 알려져 있다 (Shan, S.W. et al. 2009. Nat Cell Biol 11: 1031-1038).
- [0027] 따라서 miRNA는 질환 치료의 중요한 표적으로 작용할 수 있으며, miR-17-92의 miRNA를 조절하는 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드는 이와 관련된 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0028] 본원에서 용어 “핵산”은 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, DNA, RNA, 및 그 유사체를 포함하는 것으로 예를 들면 펩타이드 핵산 (PNA) 또는 그 혼합물을 포함한다. 또한 핵산은 단일 또는 이중가닥일 수 있으며, 폴리펩타이드, mRNA, microRNA 또는 siRNA 등을 포함하는 분자를 코딩할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드와 상호 교환적으로 사용되며, DNA 또는 RNA를 포함한다.
- [0029] 본원의 한 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 RNA로 miRNA 결합부위 및 그 3'에 부가 모티브를 포함하는 약 50 내지 240nt이다. 본원의 폴리뉴클레오타이드는 각 miRNA에 결합하는, 즉 miR-17 (miR-17 및 miR-20a), miR-18 (miR-18a), miR-19 (miR-19a, b), 및 miR-92 (miR-92a) 4 종류의 각 패밀리에 결합하는 GCACUUU, GCACUUU, UUUGCAC 및 GUGCAAU의 코어(시드)서열 및 상기 코어서열의 3' 방향에 CGTGTCTGAGTATCTGTGGG 부가모티브를 포함한다. 부가 모티브는 miRNA 서열과의 상보적이지 않으며, 본원의 폴리뉴클레오타이드 즉, miRDE가 miRNA와 결합할 수 있게 구조적으로 도움을 주는 것으로 이해될 수 있으나, 본 이론으로 한정하는 것은 아니다.
- [0030] 본원에서 폴리뉴클레오타이드는 단일가닥으로, 상보적인 서열의 존재 시에는 이에 결합하여 이중가닥을 형성할 수 있으며, 또한 내부의 상보적 서열로 인해 분자 내 부분적 이중가닥이 형성되는 것을 배제하는 것은 아니다.
- [0031] 본원의 폴리뉴클레오타이드는 표적 miRNA에 결합하여, 이의 분해를 촉진하는 것으로, 예시적 작용방식은 도 8에 기재되어 있다. 결합을 위해 본원의 폴리뉴클레오타이드와 표적 miRNA간에는 서열 상보성이 있어야 하며, 분해를 촉진하는 한, 100%의 상보성만이 필요한 것은 아니며, 상보성의 정도는 다양할 수 있다. 구체적으로, miRNA 5' 시드서열을 포함하는 약 9-nt와 하기 설명하는 상보적 결합에 참여하지 않는 부분인 약 8nt의 벌지 그리고 3' 부분의 약 8nt 서열이 miRDE와 상보적 결합을 형성한다.
- [0032] 다른 양태에서 또한 본원의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드는 세포내에서의 발현 또는 생산을 위해 이의 전사를 유도할 수 있는 프로모터를 포함하는 적절한 원핵 또는 진핵세포에서 작동할 수 있는 벡터에 포함되어 사용될 수 있다. 당업계에 공지된 다양한 벡터가 사용될 수 있으며, 예를 들면 pcDNA3, pCK를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다. 본원은 또한 상기 벡터를 포함하는 세포를 포함한다. 이러한 세포는 원핵 또는 진핵세포 일 수 있으며, 공지된 다양한 세포가 사용될 수 있으며, 예를 들면 HFF, HEK293, HeLa, THP-1, 및 U937를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0033] 본원의 폴리뉴클레오타이드는 miR-17-92 클러스터내의 miRNA에 특이적으로 결합하여 이의 분해를 유도하는 것으로 따라서 miR-17-92와 관련된 질환의 치료에 사용될 수 있다.
- [0034] 따라서 한 양태에서 본원은 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 miR-17-92와 관련된 질환의 치료, 개선 완화 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

- [0035] 본원의 용어 "치료", "완화" 또는 "개선" 이란 본 조성물의 투여로 관련 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0036] 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본원의 조성물은 초기 증상, 또는 나타나기 전에 투여할 경우 관련 질환을 예방할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.
- [0037] 본원 조성물은 본원의 폴리뉴클레오타이드 이외에 질환의 치료와 관련하여 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 또는 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다. 또한 선택적으로, 화학치료제, 항염증제, 항바이러스제 및/또는 면역조절제 등을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면 중앙 조직으로의 전달을 향상시키기 위하여, 담체 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니다 양이온성 리포좀, 시클로덱스트린, 포르피린 유도체, 분지쇄덴드리머, 폴리에틸렌이민 폴리머, 나노 입자 및 미세구와 같은 것이 사용될 수 있다. 또한 본원의 조성물은 관련 질환의 치료 또는 예방을 위하여 단독으로, 또는 수술, 약물 치료 및 생물학적반응조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0038] 본원 조성물은 상기 언급한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 담체 및/또는 아주번트를 1종 이상 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포좀 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제형화할 수 있다. 예를 들면 용액, 에멀전 및 리포좀 제형 등과 같은 다양한 제형 및 투약형태로 제조될 수 있다. 예를 들면 활성성분을 약제학적으로 허용가능한 액체 및/또는 미세분말의 고형 담체 또는 부형제와 혼합하여, 정제, 캡슐, 젤, 시럽 또는 좌제로 제조될 수 있다. 또한 본원에 따른 조성물은 수성, 비수성 또는 혼합 매질을 이용한 현탁액으로 제조될 수 있다. 수성 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 소르비톨 및/또는 텍스트라관과 같은 현탁액의 점도를 높이는 물질을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 따른 조성물에 포함되는 폴리뉴클레오타이드는 기타 질환 치료에 효과가 있는 다른 약물과 키투게이션 될 수 있다.
- [0039] 본원의 치료제의 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니며, 공지된 억제제의 투여방법을 적용할 수 있으며, 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 신속한 치료효과를 얻기 위해서는 정맥내 주사에 의한 투여가 바람직하다.
- [0040] 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양하며, 적절한 투여량은 예를 들면 환자의 체내에 축적된 약물의 양 및/또는 사용되는 폴리뉴클레오타이드의 구체적 효능정도에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로 인비보 동물모델 및 인비트로에서 효과적인 것으로 측정된 EC₅₀을 기초로 계산될 수 있으며, 예를 들면 체중 1kg당 0.01 µg 내지 1 g 일 수 있으며, 일별, 주별, 월별 또는 연별의 단위 기간으로, 단위 기간 당 일회 내지 수회 나누어 투여될 수 있으며, 또는 인퓨전 펌프를 이용하여 장기간 연속적으로 투여될 수 있다. 반복투여 횟수는 약물이 체내 머무는 시간, 체내 약물 농도 등을 고려하여 결정된다. 질환 치료 경과에 따라 치료가 된 후라도, 재발을 위해 조성물이 투여될 수 있다.
- [0041] 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드는 그 자체로 또는 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 조성물에 사용될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염이란, 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드의 생물학적 활성은 유지하면서, 바람직하지 않는 독성은 최소화된 것이다. 이러한 염은 예를 들면 아연, 칼슘, 비스부스, 바륨, 마그네슘, 알루미늄, 코퍼, 코발트, 니켈, 카드뮴, 소듐, 포타슘 등과 같은 금속 양이온과 형성된 염기 부가염 및 유기 아마노산과 형성된 염, 또는 암모니아, N,N-디벤질에틸렌디아민 (dibenzylethylene-diamine), D-글루코사민 (glucosamine), 테트라에틸암모늄(tetraethylammonium), 또는 에틸렌디아민(ethylenediamine) 유래의 양이온과 형성된 염을 포함 할 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.

- [0042] 본원에 따른 일 구현예에서, 본원의 폴리뉴클레오타이드는 전구약물 (prodrug)의 형태일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 이를 이루는 뉴클레오타이드의 특성상 음으로 하전되어 있다. 세포막은 친지질성 성질로 인해, 폴리뉴클레오타이드의 세포막으로의 흡수가 감소될 수 있다. 이러한 극성으로 인한 흡수 방해는 하기에 기재된 전구약물 접근방식을 통해 해결될 수 있다 (Crooke, R. M. (1998) in Crooke, S. T. Antisense research and Application. Springer-Verlag, Berlin, Germany, vol. 131, pp. 103-140).
- [0043] 본원의 조성물에 포함되는 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 miRNA를 표적으로 할 수 있으며, 하나의 폴리뉴클레오타이드가 하나 이상의 miRNA를 표적으로 할 수 있거나, 또는, 각 miRNA를 표적으로 하는 다수의 폴리뉴클레오타이드의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [0044] 본원에 따른 조성물은 상술한 바와 같이 miR-17-92 클러스터와 관련된 질환의 치료에 사용될 수 있으며, 따라서, 다른 양태에서 본원은 miR-17-92 클러스터와 관련된 질환의 치료방법에 관한 것이다.
- [0045] 본원의 방법은 치료적으로 유효한 양의 본원의 폴리뉴클레오타이드 또는 그 컨주게이트, 또는 이를 포함하는 조성물을 질환의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 방법에서 폴리뉴클레오타이드 이외에 화학/방사선 치료제가, 개별적으로, 함께 또는 연속적으로 사용될 수 있다.
- [0046] 본원의 조성물은 암의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서, 마이크로 RNA와 관련된 질환은 miR-17-92와 관련된 것으로, miR-17-92에 속하는 하나 이상의 miRNA의 조절이상, 특히 과발현으로 인한 질환, 특히 암으로, 예를 들면 림프종, 림프세막종양, 림프아구성백혈병 (He et al., 2005. Nature 435: 828-833), 미분화갑상선암 (Takakura et al., 2008. Cancer Sci:1147-1154), 악성폐암 (Hayashita et al., 2005. Cancer Res 65: 9628-32; Lu et al., 2005. Nature 435: 834-838)을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0047] 본원에 따른 폴리뉴클레오타이드는 HCMV (Human cytomegalovirus) 유래의, 인간 마이크로 RNA를 분해하는 마이크로 RNA 분해 요소 (miRNA Decay Elements, miRDE)로, 특히 miR-17-92 클러스터에 속하는 miRNA에 서열특이적으로 결합하여 이의 분해를 유도한다. 그 결과 HCMV는 바이러스의 생성을 통해 용균주기 효율이 감소한다. 따라서 HCMV의 miRDE와 마이크로 RNA의 상호작용을 억제하는 물질은 HCMV 증식 억제제로 사용될 수 있다.
- [0048] 따라서 한 양태에서 본원은 HCMV 증식 억제제 스크리닝 방법을 제공한다. 한 구현예에서 상기 방법은 miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, 및 miR-92a-1를 포함하는 miR-17-92 클러스터의 마이크로 RNA 중 하나 이상을 제공하는 단계; 상기 각 마이크로 RNA에 결합하는 HCMV 유래의 마이크로 RNA 조절용 폴리뉴클레오타이드 즉 miRDE를 제공하는 단계; 상기 마이크로 RNA와 상기 폴리뉴클레오타이드의 상호작용을 억제할 것으로 기대되는 시험물질을 처리하는 단계; 및 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 상호작용을 억제하는 시험물질을 후보화합물로 선정하는 단계를 포함한다.
- [0049] 본원에 사용되는 miRDE는 당업계에 공지된 RNA 제조 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면 miRDE는 pET28b(Novagen)과 같은 벡터에 해당 유전자를 클로닝하여 인비트로 전사 키트를 사용하여, 인비트로에서 발현하여 사용하거나 세포주에 전달이입한 후, 정제하여 사용할 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0050] 마이크로 RNA 및 miRDE는 시험관내에서 이들을 직접 사용하여 시험물질의 부재 또는 존재하에서 활성 여부를 확인할 수 있다. 시험물질을 첨가한 후, 일정 시간 후에 시험물질의 활성 여부를 공지의 방법으로 확인할 수 있다. 이러한 방법은 예를 들면, 노던블랏 또는 정량 역전사 PCR등의 방법으로 확인할 수 있다.
- [0051] 한 구현예에서, 마이크로 RNA는 이를 발현하는 세포의 형태로 제공될 수 있으며, 여기에 miRDE를 공지의 방법에 따라 전달이입하여 사용할 수 있다. 사용가능한 세포주로는 [Human embryonic kidney 293T (HEK293T)], 또는 인간 음경꺼플 섬유세포 [(Human foreskin fibroblasts (HFF)], HUVEC, THP-1, 또는 U373MG 를 포함할 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니며, 본원 목적을 달성할 수 있는 다양한 세포가 사용될 수 있다. 세포에 시험물질을 첨가한 후, 일정 시간 후에 세포로부터, 총 RNA를 추출하여, 시험물질의 활성 여부를 공지의 방법, 예를 들면, 노던블랏 또는 정량 역전사 PCR등의 방법으로 확인할 수 있다.
- [0052] 본 방법에서 사용되는 마이크로 RNA 및 miRDE 양, 세포의 종류 및 시험물질의 양 및 종류 등은 사용하는 구체적인 실험방법 및 시험물질의 종류에 따라 달라지며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있을 것이다. 실험결과 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재하에서 miRDE의 마이크로 RNA 분해 활성을 억제하는 물질을 후보물질로 선별한다. 대조군과 비교 약 99% 이하 감소, 약 95% 이하 감소, 약 90% 감소, 약 85% 감소, 약 80% 감소, 약 75% 감소, 약 70% 감소, 약 65% 이하 감소, 약 60% 이하 감소, 약 55% 감소, 약 50% 이하 감소, 약 45% 이하 감소, 약 40% 이하 감소, 약 30% 이하 감소, 약 20% 이하 감소를 의미하나, 이를 벗어나는

범위를 제외하는 것은 아니다.

- [0053] 본원의 "시험물질"은 마이크로 RNA 및 miRDE의 상호작용(결합)을 억제할 것으로 기대되는 물질을 의미하여, 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 또는 바이오의약품(예컨대, 단백질, 항체, 펩타이드, DNA, RNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi, 앵타머, RNAzyme 및 DNAzyme), 또는 당 및 지질 등을 포함하나 이로 한정하는 것은 아니다.
- [0054] 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있으며 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 구입 가능하다. 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 페러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.
- [0055] 약물의 스크리닝 목적을 위해서는 화합물은 저분자량의 치료효과를 갖는 것이 사용될 수 있다. 예를 들면 중량이 400 Da, 600 Da 또는 800 Da과 같은 약 1000 Da 내외의 화합물이 사용될 수 있다. 목적에 따라 이러한 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 숫자도 수십개부터 수백만개까지 다양하다. 이러한 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보사이클 및 폴리사이클 화합물 (예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클 (예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함하는 것일 수 있으나, 이는 단지 예시적인 것으로 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0056] 또한 예를 들면 바이올로지스가 스크리닝에 사용될 수 있다. 바이올로지스는 세포 또는 바이오분자를 일컫는 것으로, 바이오분자란, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 생체내 및 생체외에서 세포 시스템 등을 이용하여 생산된 물질을 일컫는 것이다. 바이오분자를 단독으로 또는 다른 바이오분자 또는 세포와 조합으로 제공될 수 있다. 바이오분자는 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 항체, 또는 기타 혈장에서 발견되는 단백질 또는 생물학적 유기물질을 포함하는 것이다.
- [0057] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] **실시예**
- [0059] **실험방법**
- [0060] 본 실시예에 사용된 실험방법은 하기와 같다.
- [0061] **사용된 세포 및 바이러스**
- [0062] 인간 배아성 신장 세포주 [Human embryonic kidney 293T (HEK293T) (CRL-11268)]는 2 mM L-글루타민, 50 U/mL 페니실린, 50 µg/mL 스트렙토마이신, 7.5% 소태아혈청을 포함하는 DMEM 배지 (Hyclone)에서 배양하였다. 인간 음경꺼플 섬유세포 (Human foreskin fibroblasts (HFF) (SCRC-1041), passages 10-15)는 10% 소태아혈청을 포함하는 DMEM 배지 (Hyclone)에서 배양하였다.
- [0063] 전달이입은 Lipofectamine (Invitrogen)을 제조자의 방법에 따라 사용하였다.
- [0064] 박테리아 인공 염색체 [Bacterial artificial chromosomes (BAC)]인 Toledo, ToledoΔ15kb, 및 AD169는 HFF 세포에 전기천공법 (Gene-Pulser II, Bio-Rad)으로 도입되었다. 2주 후, 배양액을 모아 면역형광 분석을 통해

IE1-양성 세포를 측정된 후 감염성 유니트로서 타이터를 측정하였다. 면역블랏에는 항-IE1 항체 (MAB810R, Millipore) 및 항-gB 항체(1-M-12, Santacruz)가 사용되었다.

[0065] **miRNA 마이크로어레이**

[0066] HCMV 감염동안 세포내 miRNA의 발현 양상을 조사하기 위하여 마이크로어레이 분석을 수행하였다. 비감염 대조군, Toledo-WT, 및 Toledo Δ 15kb 로 감염된 HFF에서 총 RNA를 Trizol reagent (Invitrogen) 이용하여 추출한 후 분석하였다. 각 시료는 Agilent miRNA Microarray System (Agilent Human miRNA array v14.0) 프로토콜에 따라 준비하였다.

[0067] **바이러스 돌연변이 유발**

[0068] 부위 특이적 돌연변이 바이러스인 Toledo Δ 17Seed를 구축하기 위하여, Toledo-BAC의 UL144-145 유전체 영역을 rpsL-neo 카세트로 치환하였다. 요약하면, rpsL-neo 카세트는 표적 유전자의 50 nt 상방 및 하방 서열로 구성되는 상동성 암을 포함하는 프라이머를 사용하여 증폭하였으며 (반응 조건: 98 $^{\circ}$ C 10초, 56 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분의 사이클을 25회 반복), 상기 증폭 산물을 야생형 Toledo-BAC을 포함하는 *Escherichia coli* DH10b 세포에 Gene Pulser II를 이용한 전기천공으로 도입하였다. rpsL-neo 카세트를 포함하는 중간체 Toledo-BAC 구축물에 대하여 카나마이신 및 스트렙토마이신을 포함하는 배지에서 카운터선별을 수행하였다. 카세트는 돌연변이 바이러스 유전체로 치환되어, UL144-145에 세 개의 염기 치환을 포함한다. Toledo-Revertant BAC도 상기와 동일한 방법으로 수행되었다.

[0069] 프라이머는 하기 표 1-1 내지 표 1-4에 있다.

[0070]

[표 1-1]

Purpose	Name	Direction	Sequence
15-kb Clone recovery	Clone 1	Forward	AAG GAA AAA AGC GGC CGC CCG AGT CGA TGC AGA TGA CCT G
		Reverse	CGG AAT TCG TTT CAC TCG CCG ATG CGG CG
15-kb Clone recovery	Clone 2	Forward	AAG GAA AAA AGC GGC CGC CAG TTC ACC ACC GTA GCC ATG G
		Reverse	CGG AAT TCC ACC CAT TCA ATC CGC ATA TTT T
15-kb Clone recovery	Clone 3	Forward	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ACG CCG GGA AGG GGA CGA CG
		Reverse	CGG AAT TCC AAT AAT TAC CCA ATA TAA TTT TAT T
15-kb Clone recovery	Clone 4	Forward	AAG GAA AAA AGC GGC CGC CCA ACT AGC GAC CCC AAA GGA G
		Reverse	CGG AAT TCT CCC AGT AAT GCG GTA CTC GGT
15-kb Clone recovery	Clone 5	Forward	GCT CTA GAG AAC AGC ACC AGC TGG CAG ATT
		Reverse	CGG GAT CCA GTA CCA AGC GAC GAT ACT GAC
15-kb Clone recovery	Clone 6	Forward	AAG GAA AAA AGC GGC CGC CCT GAA ACC CAC GTT AAC CGA C
		Reverse	CGG AAT TCG GGG GCG GCG GGG ACT CCA C
Overexpression	UL144-145	Forward	CT GTG AAG ATG GCT GAC TAT CC
		Reverse	ATT AGG TTT CAA AAT CGA TAC TGT

[0071]

[0072]

[표 1-2]

Reporter system	Firefly-736nt	Forward	GAGCGAATTCGCTTCCTGTGTTGTTTTTA C
		Reverse	CGAACC GCGGAATTAGGTTTCAAAATCGA TAC
Reporter system	Firefly-240nt	Forward	GAGCGAATTCGCTTCCTGTGTTGTTTTTA C
		Reverse	CGAACC GCGGCGAAGGCAACAAGAAAGA GTG
Deletion screening	Firefly-240nt Δ1	Forward	GAATTCGCTC TAGAATTACA CG
		Reverse	GATAATTACA GATGAGCTGT TC
Deletion screening	Firefly-240nt Δ2	Forward	TGTGTGACTT CATCGTACCG TG
		Reverse	ATTCTGCACTAAAAAAGAAG
Deletion screening	Firefly-240nt Δ3	Forward	CGTAAAGTGC TTCTTTTTTAG
		Reverse	TGCCGACGTCAGGAAAAATAAG
Deletion screening	Firefly-240nt Δ4	Forward	AAAAGTACCTAAATTCCTCA CA
		Reverse	CCCGGTGCTA TCGTGCTGTCAC
Deletion screening	Firefly-240nt Δ5	Forward	CTCTTATGTAGGCGACAGCT TA
		Reverse	CCGCGGATATCCTGCAGGC TA
Deletion screening	Firefly-240nt Δ3-1	Forward	CGTAAAGTGC TTCTTTTTTAG
		Reverse	CGTG TCTGAGTATCTG TGGG
Deletion screening	Firefly-240nt Δ3-2	Forward	GTTCCGTAAAGTGCTTCTTTTT
		Reverse	TCTGAGTATCTGTGGGGAAT
Deletion screening	Firefly-240nt Δ3-3	Forward	CACGGTCCGTAAAGTGCTTCT
		Reverse	AGTATCTGTGGGGAATTTAG
Deletion screening	Firefly-240nt Δ3-4	Forward	CAGACACGGTCCGTAAAGTGC
		Reverse	TCTGTGGGGAAT TTAGGTAC

[0073]

[0074]

[표 1-3]

Deletion screening	Firefly-240nt Δ3-5	Forward	TACTCAGACACGGTCCGTAAA
		Reverse	TGGG GAAT TTAG GTAC TTTT
Deletion screening	Firefly-240nt Δ3-6	Forward	CAGATACTCAGACACGGTCCG
		Reverse	GAAT TTAG GTAC TTTT TGCC
Deletion screening	Firefly-240nt Δ3-7	Forward	CCCACAGATACTCAGACACGGT
		Reverse	TTAG GTAC TTTT TGCC GACG
Deletion screening	Firefly-240nt Δ3-8	Forward	ATTCCCCACAGATACTCAGACA
		Reverse	GTAC TTTT TGCC GACG TCAG
Deletion screening	Firefly-240nt Δ3-9	Forward	CTAAATTCCCCACAGATACTCA
		Reverse	TTTT TGCC GACG TCAG GAAA
Deletion screening	Firefly-240nt Δ3-10	Forward	GTACCTAAATTCCCCACAGATA
		Reverse	TGCCGACGTC AGGAAAAATA AG
Mutagenesis	UL144-145 Seed mut	Forward	CCTGCACTAAAAAAGAAGACATTTACGG AACCGTGTCTG
		Reverse	CAGACACGGTCCGTAAATGTCTTCTTTT TTAGTGCAGG
BAC mutagenesis	rpsL- UL144-145	right arm	GCTTCTGTGTGTTGTTTTACATCACGGTA CGATGAAGTCACACAGATAAGGCTGGTG ATGATGGCGGGATCG
		left arm	CGAAGGCAACAAGAAAGAGTGACAGCAC GATAGCACCGGCTCTTATGTATCAGAAG AACTCGTCAAGAAGGCG
BAC mutagenesis	UL144-145 amplification	Forward	GCTTCTGTGTGTTGTTTTACATC
		Reverse	CGAAGGCAAC AAGAAAGAGT GAC
HCMV genome	HCMV genome (UL150)	Forward	CCGGAATTCCGGATGCTCACACTCTATCTC TTC
		Reverse	CGCGGATCCCTACAGCTCCAAGCGCCG

[0075]

[0076] [표 1-4]

	region)		
qRT-PCR	UL144-145	Forward	GCTTCCTGTTGTTGTTTTTAC
		Reverse	CGAAGGCAACAAGAAAGAGTG
qRT-PCR	GAPDH	Forward	ATCATCCCTGCCTCTACTGG
		Reverse	GTCAGGTCCACCACTGACAC
qRT-PCR	Pri-miR-17-92	Forward	CAGTAAAGGTAAGGAGAGCTCAATCTG
		Reverse	CATACAACCACTAAGCTAAAGAATAATCTGA
qRT-PCR	Pri-miR-125b-1	Forward	CCATACCACCTGTTTGTTCATCT
		Reverse	CTGAGAGGAGCGCAACAATGT
qRT-PCR	Pri-miR-29a	Forward	CCAACCCTCAGCCTTCTG
		Reverse	TCCTCTCAGCAGTCAGCATCA
qRT-PCR	Pri-miR-199a-1	Forward	GGTTCTGCAGGATGGATAGC
		Reverse	GGGTGGTGAAAATGACACT

[0077]

[0078] **파이어플라이 리포터 구축물 및 이중 루시퍼라제 분석**

[0079] 대조군으로 *Renilla* 루시퍼라제 벡터 pRL-TK (Promega) 및 CMV 프로모터를 포함하는 파이어플라이 루시퍼라제 벡터인 pGL3-CMV (Promega)를 사용하여, UL144-145 RNA의 기능을 규명하였다. 사용된 프라이머는 표 1에 기재되어 있다. 파이어플라이 루시퍼라제 활성은 레닐라 루시퍼라제 활성으로 적정화되었으며, 각 활성은 루미노미터 (Berthold Technologies)를 사용하여 제조사 (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega)의 방법대로 수행되었다.

[0080] **정량 역전사 PCR (qRT-PCR) 및 노던블랏**

[0081] 본원 실험에 사용된 miRNA 서열은 *miRBase* (Sanger Institute)로부터 입수하였다. 이를 기초로 miRNA 블랏에 사용된 프로브를 디자인하였다. HFF 및 HEK293T 세포의 총 RNA는 Trizol reagent (Invitrogen) 시약을 제조사의 사용법에 따라 분리하였다. 분리된 총 RNA는 15% 아크릴아마이드 및 8M 우레아를 포함하는 젤에 전기영동으로 분리한 후 나일론막 (Zeta-probe GT, Bio-Rad)으로 전이하였고, EDC로 1시간 동안 가교되었다 (Pall and Hamilton, 2008). 이어 교잡반응은 교잡 용액 (Clontech)을 이용하여 37°C에서 3시간 동안 수행된 후, FUJIBAS 필름에 하루 동안 노출되었다.

[0082] 정량 역전사 PCR의 경우, oligo-dT를 사용하여 M-MLV 역전사효소(Invitrogen)로 총 RNA를 37°C에서 3시간 동안 역전사 한 후, iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)를 사용하여 PCR 증폭하였다(반응 조건: 95°C 10초, 60°C 40초의 사이클을 40회 반복). pri-mRNA 및 표적 mRNA의 발현 정도는 GAPDH mRNA에 대하여 적정화하였다. miRNA는 miRNA assay kit (Taqman, Applied Biosystems)를 사용하여 역전사 정량 PCR로 정량하였다. 성숙한 miRNA는 U6 snRNA에 대하여 적정화되었고, 실험절차는 제조사의 방법에 따라 수행되었다.

[0083] **작은 RNA 및 플라스미드 DNA 전달이입**

[0084] 작은 RNA, RNA 올리고머 및 siRNA는 Dharmafect 1 시약 (Dharmacon)을 이용하여 전달이입되었다. 전달이입 24 시간 전에, HFF 및 HEK293T 세포를 항생제를 포함하지 않는 상술한 배지를 포함하는 12-웰의 배양접시에 시딩하였다. RNA 및 Dharmafect 혼합물을 상기 배지에 50 nM 농도로 첨가하였다. 6시간 후에 전달이입 배지를 교환한 후, 48시간 후에 분석에 사용하였다. 사용된 siRNA는 다음과 같다: IE1, GCGGGAGAUGUGGAGGCudTdT; 및 IE2, AAACGCAUCUCGAGUUGGACdTdT. 부가하여, 하기의 합성 miR-17 듀플렉스를 사용하였다: miR-17, pCAAAGUGCUUACAGUCAGGUAG; 및 miR-17*, pACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG. miRDE 시리즈 서열은 도 7에 기재되어 있다. 합성 siRNA는 IDT에서 구입하였다. 플라스미드 전달이입은 인산칼슘법을 사용하였다. HFF는 미리 적정화된 조건에서 Neon (Invitrogen)을 사용하여 전기천공되었다.

[0085] **실시예 1 임상 분리주 HCMV에 의한 miR-17-92 클러스터에 대한 차별적 발현조절**

[0086] 실험방법에 기재된 바와 같이 miRNA 마이크로어레이 분석을 이용하여 임상 분리주인 HCMV 감염으로 인한 숙주 miRNA 발현 프로파일을 분석하였다. HFF 세포를 임상에서 분리된 HCMV 주인 Toledo로 감염하였으며, 약독화된 바이러스 주로는 ToledoΔ15kb를 사용하였으며, 이는 UL/b'의 15-kb의 유전체 영역이 결실되어 있다 (Wang et al., 2005. J Virol 79: 2115-2123).

[0087] 결과는 도 1a에 기재되어 있다. HCMV 감염으로 인해 수개의 숙주 miRNA가 조절되는 양상을 나타내었다. 구체적으로 miR-100, miR-199a-3p, miR-199a-5p, 및 miR-199b-5p는 Toledo-야생형 (WT) 및 ToledoΔ15kb 감염으로 하향조절되었다. 특히 miR-29a/b/c, miR-125b, miR-199a-3p, 및 miR-199a-5p는 일차 miRNA 수준에서 하향 조절되었다. 특히, Toledo-WT에 의해 miR-17-92 cluster 내의 성숙 miRNA의 농도가 차별적으로 조절되었다. miR-17-92 클러스터는 다음 6개의 miRNA를 포함한다: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, 및 miR-92a. 이들은 시드 서열에 따라 다음 4개의 패밀리로 분류된다: miR-17 (miR-17 and miR-20a), miR-18 (miR-18a), miR-19 (miR-19a and miR-19b), 및 miR-92 (miR-92a) (도 1b).

[0088] 노던블랏 및 qRT-PCR 분석 결과 Toledo-WT 2 개의 상동성 성숙 miRNA, miR-17 및 miR-20a를 하향 조절하였으나, miR-18a, miR-19a, miR-19b, 및 miR-92a는 상향조절하였다 (도 1c 및 1d). 이러한 차별적 조절은 Toledo-WT에서만 관찰되었으며, ToledoΔ15kb-감염 세포에서는 나타나지 않았다. ToledoΔ15kb 감염은 miR-17 및 miR-20a 발현을 증가시켰다 (도 1e). 약독화된 HCMV 주 AD169 ToledoΔ15kb 와 유사한 결과를 나타냈다.

[0089] 이러한 결과는 Toledo가 전사 후 단계에서 15-kb 영역을 통해 miR-17-92 클러스터 내의 miRNA 발현을 차별적으로 조절하는 것을 나타내는 것이다.

[0090] **실시예 2 HCMV 감염으로 인한 miR-17-92 클러스터의 일차 전사 유도 및 miR-17 및 miR-20a 하향조절**

[0091] 동일한 miRNA 클러스터 내에 개별적 miRNA의 차별적 발현은 예측되지 못한 것으로, 추가 규명을 위해 Toledo 감염이 miR-17-92 (pri-miR-17-92) 일차 전사에 미치는 영향을 조사하였다. Toledo 또는 ToledoΔ15kb 감염으로 인해 pri-miR-17-92 농도는 감염 후 72시간(hpi)까지 점차적으로 증가하였다 (도 2a 및 도 2b). miR-17-92 클러스터의 전사는 E2F 패밀리에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있는데 (Sylvestre et al., 2007. J Biol Chem 282: 2135-2143), HCMV Immediate early protein 1 (IE1)은 E2F1와 감염 중에 상호작용을 하며 (Margolis et al., 1995. J Virol 69: 7759-7767), HCMV Immediate early protein 2 (IE2)는 E2F-response genes의 발현을 증가시킨다 (Hagemeier et al., 1994. EMBO J 13: 2897-2903; Song and Stinski, 2002. Proc Natl Acad Sci USA 99: 2836-2841). 따라서 본원에서는 HCMV IE1 및 IE2이 Toledo 감염으로 인한 pri-miR-17-92 상향 발현에 관여할 것으로 추측되었으며, IE1 or IE2의 발현을 유도한 결과 pri-miR-17-92 발현이 증가하였으며, 이 두 종류 분자의 공동발현으로 pri-miR-17-92 발현이 상당히 증가하였다 (도 2c). 실제 감염과정에서 IE1 및 IE2가 pri-miR-17-92 발현을 증가시키는 지 여부를 관찰하기 위하여, IE1 and IE2에 특이적인 siRNA를 제조하여 IE1 and/or IE2를 낮추는 결과, pri-miR-17-92 상향발현이 억제되었다 (도 2d). 이는 HCMV IE1 및 IE2가 일차 miR-17-92 전사 유도에 있어서의 역할을 나타내는 것이다.

[0092] 이어 Toledo에 의한 성숙 miR-17 및 miR-20a 농도의 하향 조절기전을 파악하기 위하여, 노던블랏을 수행한 결과, miR-20a의 약 60-nt 전구체 miRNA (pre-miRNA)의 농도가 감염 동안 점차적으로 증가하였다(도 2e, 장기 노출). 이와 대조적으로, 약 23-nt 성숙 miR-20a 농도는 감염 중에 현저히 감소하였다 (도 2e 단기 노출). 성숙 miR-17 농도 또한 유사한 양상으로 감소하였다 (도 2e 하측 패널). 이러한 결과는 Toledo는 초기에는 pri-miR-

17-92의 전사를 유도한 후, miR-17-92 클러스터의 miR-17 패밀리의 성숙 miRNA인 miR-17 및 miR-20a를 선별적으로 하향조절하는 것을 나타낸다.

[0093] 실시예 3 서열특이적 RNA-miRNA 상호작용을 통한 임상 분리주 HCMV 특이적인 RNA에 의한 miR-17 and miR-20a 분해

[0094] miR-17 패밀리에 속하는 miRNA의 선별적 분해에 관여하는 바이러스 인자를 규명하기 위하여, 세포를 전사 억제제인 actinomycin D (ActD) 또는 번역 억제제인 cycloheximide (CHX)로 처리하였다. ActD 및 CHX 처리로 인해, Toledo에 의한 miR-19a 상향발현이 억제되었다 (도 3a, 왼쪽). 이는 Toledo 매개된 miR-19a의 상향발현은 RNA 및 단백질 합성을 필요로 한다는 것을 나타낸다. 특히 Toledo로 야기된 miR-17 발현 감소는 CHX가 아닌 ActD에 의해 차단되었는데, 이는 바이러스 RNA가 miR-17의 하향조절에 관여하는 것을 나타낸다 (도 3a, 오른쪽). 15kb-UL/b' 영역의 조절서열의 위치를 규명하기 위하여, 15-kb 영역의 일부를 포함하는 클론을 이용하여 어느 것이 miR-17의 하향조절을 유도하는지 조사하였다(도 3b). 그 결과 클론 3 ToledoΔ15kb 으로 감염된 HFF 세포에 전달이입시 성숙 miR-17의 하향조절을 유도하였다 (도 3c, 좌측). 이 경우 pri-miR-17-92 농도에는 영향을 미치지 않았다 (도 3c, 우측). 클론 3의 3kb 영역내에, 대략 1.6kb의 주 폴리시스트론 전사체가 위치하고 있다 (He et al., 2011; Stern-Ginossar et al., 2012). 이 전사체 (이하 UL144-145 RNA)는 5' UTR, UL144 ORF, 유전자간 영역 (intergenic region), UL145 ORF, 및 3' UTR 서열을 포함한다 (도 3d). 바이러스 RNA 엘리먼트 및 miRNA 분해간의 관련성을 조사하기 위해 (도 3a), UL144-145 RNA 엘리먼트 단독으로 miRNA 분해를 매개할 수 있는지 여부를 바이오인포매틱스 알고리즘인 *NA Hybrid*를 사용하여 조사하였다. 그 결과 UL144-145 RNA의 유전자간 부위에 miRNA 결합부위가 위치하고 있음을 발견하였다 (도 3d). UL144-145 RNA 유전자간 영역의 이차구조에 대한 종전 분석결과(Zuker, 2003. *Nucleic Acids Res* 31: 3406-3415)에 의하면 miR-17 결합부위는 miR-17에 상보적인, 6개 염기쌍으로 분리된, 두 부분의 돌출된 염기쌍을 이루지 않은 뉴클레오타이드 서열로 이루어져 있는 것으로 나타났다 (도 3e). Rosetta program (Das and Baker, 2007. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 937-945)을 이용한 3차원 구조 분석에 의하면, 6개 염기쌍 듀플렉스는 내측으로 굽어져 있으며, 이로 인해 결합부위가 모이게 되어, miR-17 결합에 유리한 구조가 형성되는 것으로 나타났다 (도 3i의 A 참조).

[0095] HEK293T 세포에서 UL144-145 RNA의 과발현은 양에 의존적인 방식으로 miR-17 및 miR-20a에 특이적인 하향발현을 유도하였으며, miR-19a 농도는 변함이 없었다 (도 3f). 이러한 결과는 UL144-145 RNA가 miR-17 및 miR-20a의 분해를 책임지고 있으며, miR-17에 대한 시드 결합 부위에 3 중 치환 돌연변이를 포함하는 경우, 이러한 효과는 사라졌다 (도 3g). 이러한 결과는 UL144-145 RNA가 miRNA가 서열특이적인 상호작용을 한다는 것을 나타낸다. UL144-145 RNA 매개된 miRNA의 분해에 있어, 이들 간의 서열특이적 상호작용의 중요성을 규명하기 위해 UL144-145 RNA를 다른 miRNA 패밀리로 표적화할 수 있는지 여부를 조사하였다.

[0096] UL144-145 RNA의 miR-17 결합부위를 miR-18a 결합부위로 치환한 결과, miR-18a의 분해가 초래되었으며, 반면 miR-17 및 miR-20a는 분해되지 않았다 (도 3h). 또한 miR-92a의 시드 서열에 상보적인 점 돌연변이를 UL144-145 RNA에 생성한 결과, miR-92a 특이적인 분해가 유도되었다 (도 3i). 이러한 결과는 UL144-145 RNA 매개된 miRNA의 분해가 서열특이적인 방식으로 일어나는 것임을 나타낸다.

[0097] 실시예 4 miRNA의 분해를 유도하는 바이러스의 비코딩 RNA 엘리먼트 규명

[0098] miR-17 패밀리의 멤버의 분해에 관여하는 코어 서열을 규명하고, 표적과의 상호작용의 특성을 규명하기 위하여, miR-17 결합부위를 포함하는 240 nt의 유전자간 영역을 기초로 하는 일련의 파이어플라이 루시퍼라제 리포터 벡터를 구축하였다 (도 4a). Firefly-736nt 및 firefly-240nt 벡터는 miR-17 및 miR-20a의 하향 발현을 조절하였다 (도 4b). 이는 UL144-145 RNA의 240nt 부위 (도 7)가 miR-17 패밀리의 하향조절에 충분한 서열임을 나타내는 것이다. miR-17 또는 miR-20a를 과발현하는 세포의 firefly-240nt의 루시퍼라제 활성을 근거로, firefly-240nt RNA를 표적으로 하는 miR-17 or miR-20a는 없는 것으로 나타났다. 통상의 miRNA-mRNA 상호작용에 관찰되는 현상이 나타나지 않는 것은 miRNA 또는 mRNA의 분해를 제시하는 것이다. Firefly-30nt는 miR-17 전사체 농도를 하향조절하지 않았으며, 이는 단순히 miR-17 결합부위만으로는 miR-17의 분해가 충분하지 않음을 나타내는 것이다 (도 4c). miR-17 분해에 필요한 최소 서열을 규명하기 위하여 일련의 결손 변이체를 구축하였다. 그 결과 30-nt miR-17 결합부위에 인접한 20-nt ($\Delta 3-2-\Delta 3-6$ region) 서열이 필요한 것을 발견하였다 (도 4d 내지 도 4f).

[0099] 따라서 이러한 ~50-nt의 바이러스 유전자간 비코딩 영역의 서열이 마이크로 RNA 분해 엘리먼트 (miRNA decay element, miRDE, 서열은 도 7 참조)로 작용한다는 것을 나타낸다. 이어 상기 miRDE에 상응하는 50mer의 RNA (miRDE-50-mer_WT) 올리고를 제작하여 세포에 전달이입한 결과, miR-17 수준이 농도의존적으로 감소한 것으로 나타났다 (도 4g). 반면 miR-17 결합부위에 돌연변이가 일어난 miRDE seed mut (miRDE-50-mer_seed mut) 올리고로 전달이입된 경우에는 이러한 현상은 관찰되지 않았다 (도 4h). miR-17 결합부위만을 포함하는 30-mer RNA oligo (miRDE-30-mer)의 경우에도 하향조절 효율이 감소되었다 (도 4i). 이러한 결과는 50-mer의 바이러스 유전자간 비코딩 영역의 RNA 서열이 miR-17 패밀리 마이크로 RNA 조절에 중요하며, mRNA context에 상관없이 작용함을 나타내는 것이다.

[0100] **실시예 5 miR-17 결합부위 돌연변이를 포함하는 HCMV의 miR-17-92 클러스터에 대한 차별적 조절 기능 상실**

[0101] 상술한 바와 같이 발현벡터 및 RNA 올리고머를 이용한 miR-17 및 miR-20a 조절 시험에 이어, 바이러스 감염에 의한 miRDE-매개된 miRNA 조절여부를 시험하였다. 이를 위해 miR-17에 대한 miRDE 시드 결합 부위에 3개의 염기 서열이 치환된 돌연변이를 포함하는 Toledo 돌연변이 바이러스 (ToledoΔ17Seed) 및 그 복귀(revertant) 바이러스 (Toledo-Rev)를 생성하였다 (도 5a). Toledo-WT 및 Toledo-Rev으로 감염된 세포에서 성숙된 miR-17 및 miR-20a의 농도는 감소한 반면, ToledoΔ17Seed로 감염된 세포에서 이들의 농도는 현저히 증가하였다 (도 5b). miR-17 전사체 전구체 농도는 3 종류의 모든 바이러스 감염에서 증가하였고 (도 5b), pri-miR-17-92 및 UL144-145 전사체의 농도도 유사한 것으로 나타났다 (도 5c 및 도 5d).

[0102] 이어, 합성된 miR-17 듀플렉스를 이용한 펄스 체이스 실험을 통해, miRDE가 성숙 miR-17을 분해하는지 여부를 조사하였다. 외인성 miR-17/miR-17* 듀플렉스의 양은 내인성 miR-17의 타이터에 맞추어 조절하였다. HFF를 Toledo-WT 또는 ToledoΔ17Seed로 감염한 후 miR-17/miR-17* 듀플렉스로 전달이입하였다. 이어 시간에 따른 잔존하는 miR-17의 농도를 측정하였다. 그 결과 Toledo-WT으로 감염된 세포의 경우, ToledoΔ17Seed와 비교하여, 외인성 miR-17의 분해 속도가 높은 것으로 나타났다 (도 5e). 이러한 결과는 miRDE가 바이러스 감염상황에서도 성숙한 miR-17의 분해를 촉진한다는 것을 나타낸다.

[0103] **실시예 6 miRDE-매개된 miR-17 패밀리 조절로 인한 바이러스 생성 촉진**

[0104] HFF 세포를 2 MOI의 Toledo-WT or ToledoΔ17Seed로 감염하여 용균상태에서 miRDE 매개된 miR-17 조절에 미치는 영향을 시험하여 실제 생리적 상태에서의 효과를 시험하였다. 감염 후 2-4일째 (dpi), ToledoΔ17Seed 감염된 HFF는 Toledo-WT로 감염된 HFF와 비교하여 바이러스 생산이 적었다. Toledo-WT 및 ToledoΔ17Seed에서 바이러스 생산은 5 dpi에서 정점에 달하였으며, 이는 제한된 환경 조건이 원인인 것으로 추정된다 (도 6a). ToledoΔ17Seed로 감염된 세포에서 바이러스 유전체의 합성은 지연되고 감소되었고(도 6b), 또한 2 dpi에서 바이러스 유전자의 발현이 부분적으로 감소되었으나, 3-4 dpi에서는 Toledo-WT 감염 세포와 유사한 발현을 나타냈다 (도 6c). 특히, ToledoΔ15kb는 모 바이러스와 비교하여 성장속도가 느리고 하루 늦게 감염성 바이러스를 생산한다는 종전 보고에 비추어 보면, ToledoΔ15kb의 성장 지연은 miR-17 조절이상으로 인한 것으로 판단된다. 종합하면, 이러한 결과는 miR-17의 분해로 인해 용균 감염동안 바이러스의 성장이 촉진되고, miR-17의 분해가 효과적인 바이러스 유전체의 합성을 위해 필요한 과정임을 나타내는 것이다. miRDE 매개된 miR-17-92 클러스터의 miR-17 패밀리의 조절의 기능적 중요성은 모든 임상 분리된 HCMV 주의 miRDE 서열이 보존되어 있다는 사실로부터 또한 입증될 수 있다 (도 6d). 14 개의 HCMV 임상 분리 주 유래의 UL142에서 UL147를 코딩하는 4.2-kb 유전체 영역의 서열을 비교한 결과, miRDE를 포함하는 유전자간 영역에서 서열이 상당히 높게 보존된 것으로 나타났다. 특히 miR-17 결합 부위는 모든 HCMV 임상 분리 주에서 거의 완벽하게 보존되어 있었으며, 이는 진화과정에서 바이러스가 세포내 miRNA에 의한 조절에 대응하기 위해 적응하였음을 나타내는 것이다.

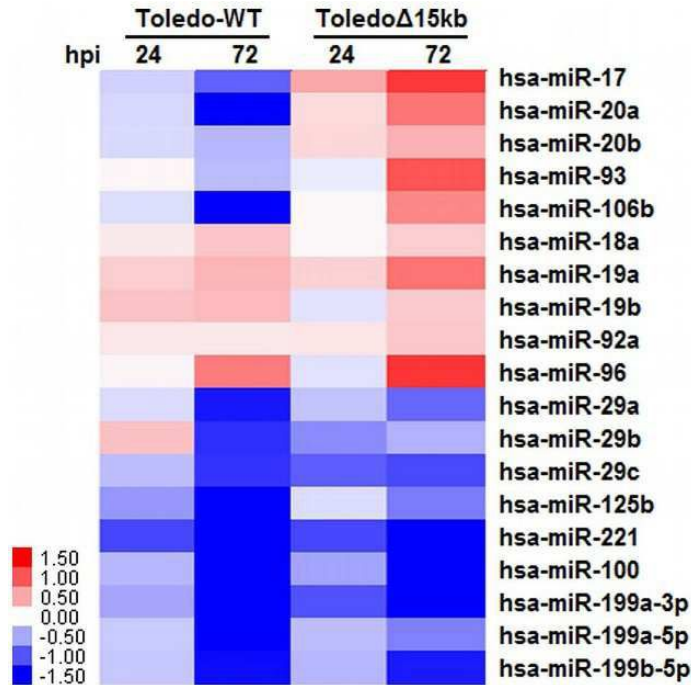
[0105] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

[0106] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은

본 발명에 도입된다.

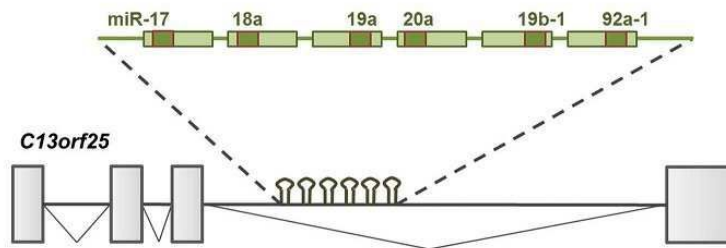
도면

도면1a



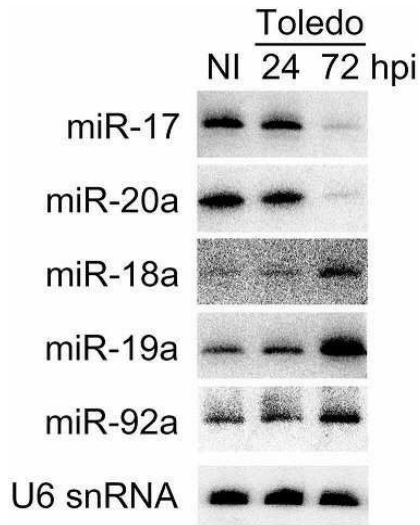
도면1b

miR-17-92 cluster

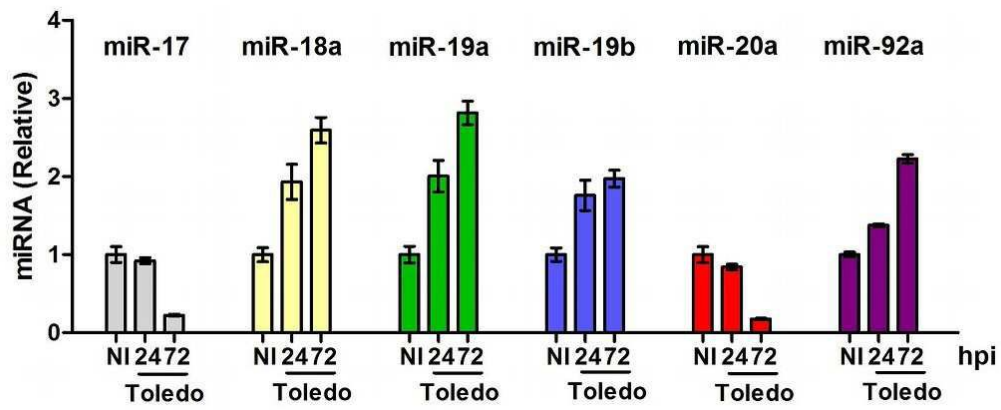


miR-17	CAAAGUGC	UUACAGUGCAGGUAG
miR-20a	UAAAGUGC	UUAUAGUGCAGGUAG
miR-18a	UAAGGUGC	AUCUAGUGCAGAUAG
miR-19a	UGUGCAAA	UCUAUGCAAAACUGA
miR-19b	UGUGCAAA	UCCAUGCAAAACUGA
miR-92a	UAUUGCAC	UUGUCCCGCCUGU

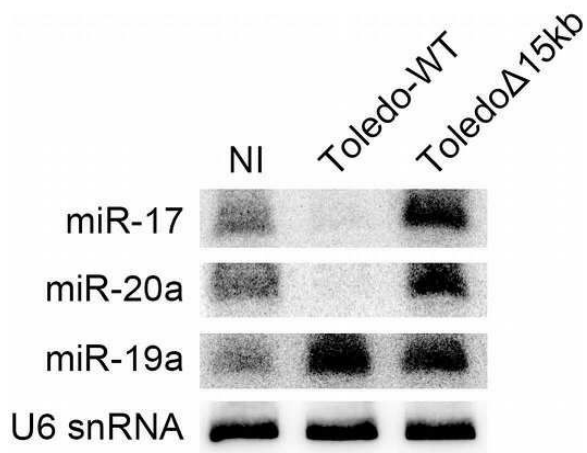
도면1c



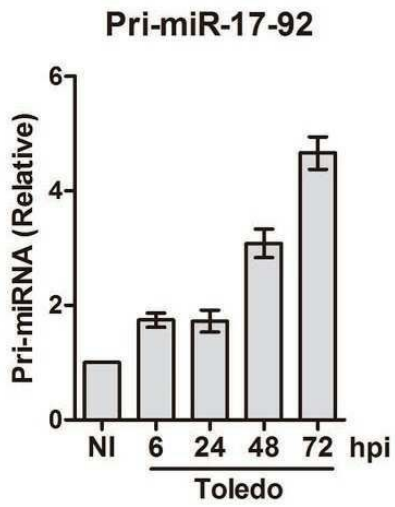
도면1d



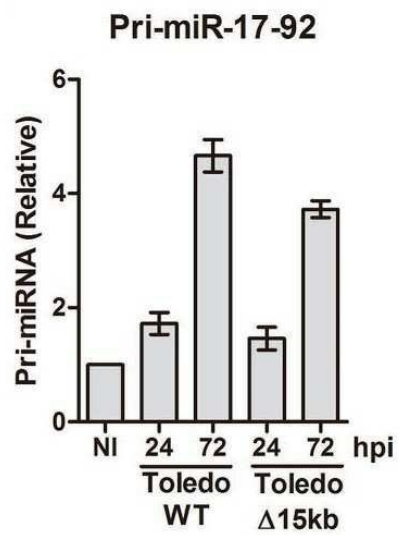
도면1e



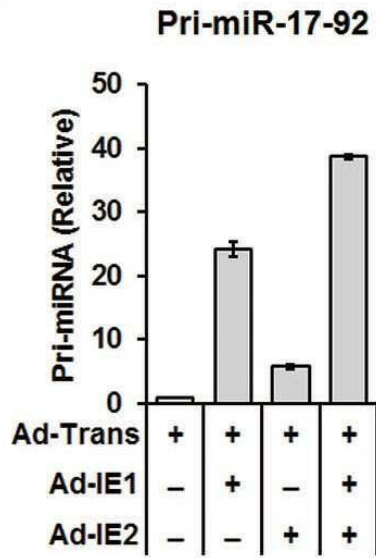
도면2a



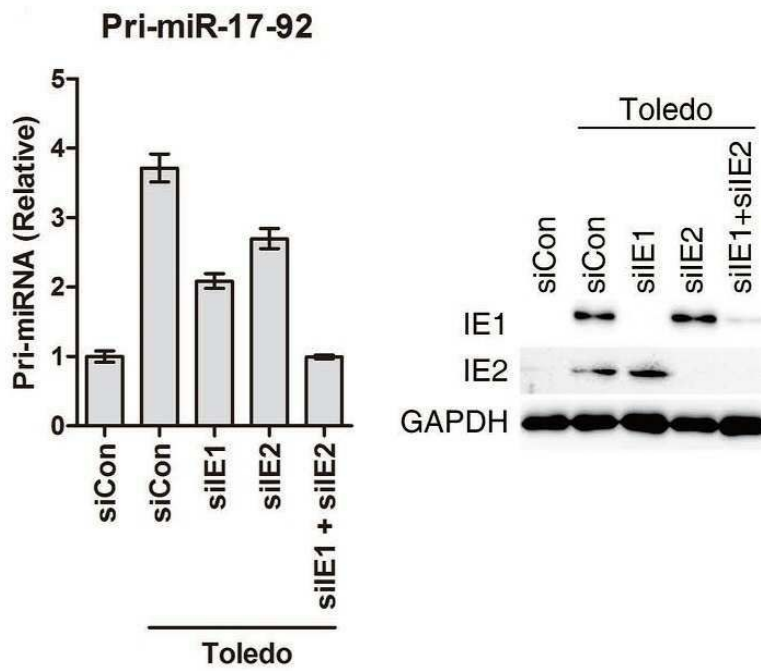
도면2b



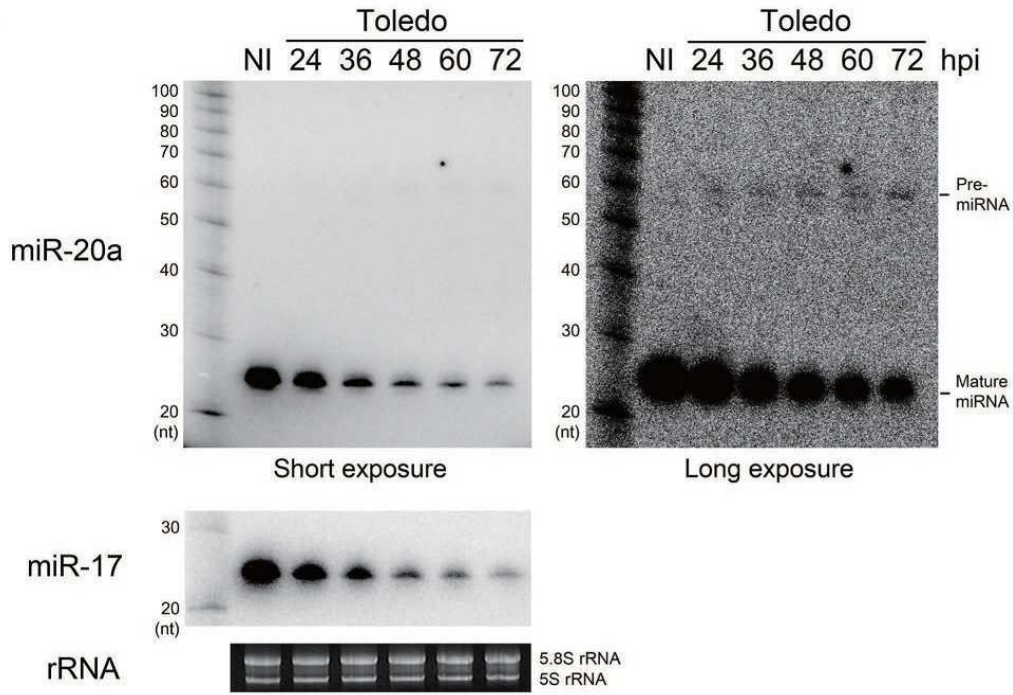
도면2c



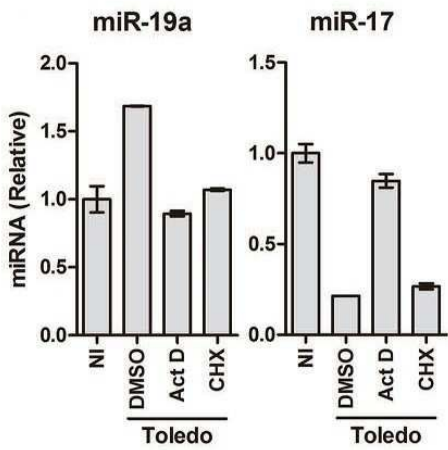
도면2d



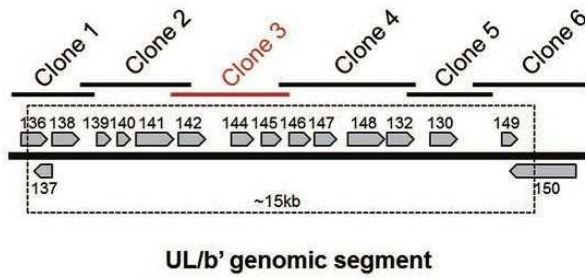
도면2e



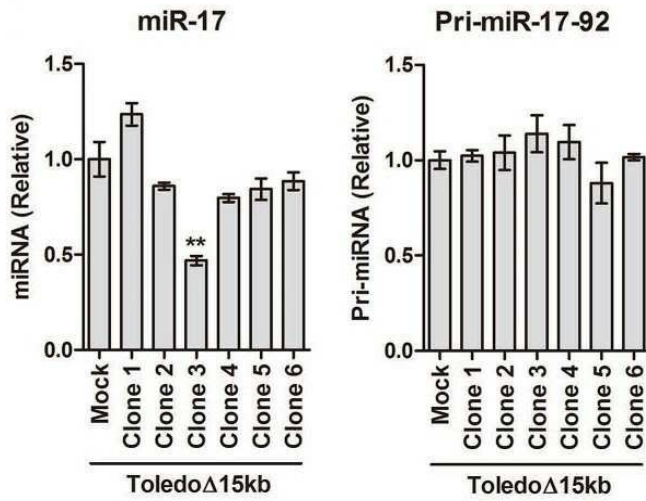
도면3a



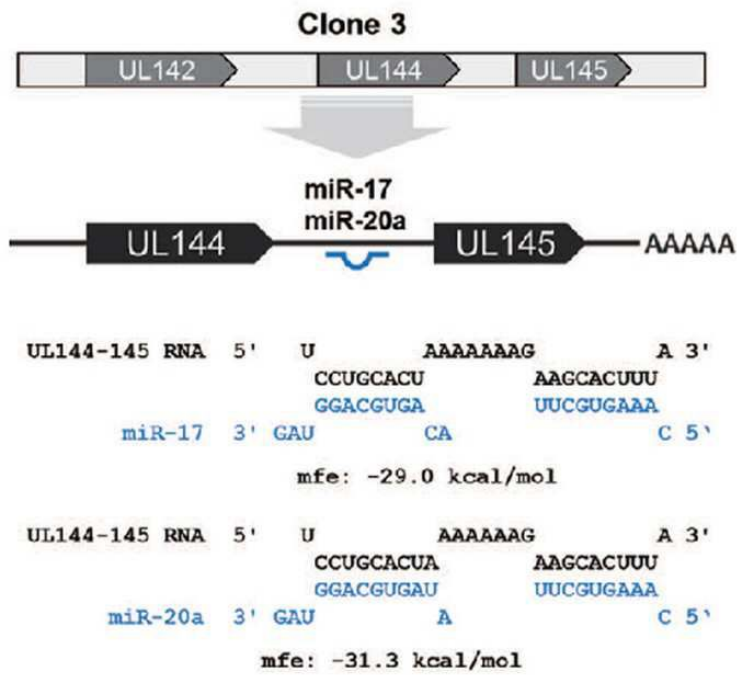
도면3b



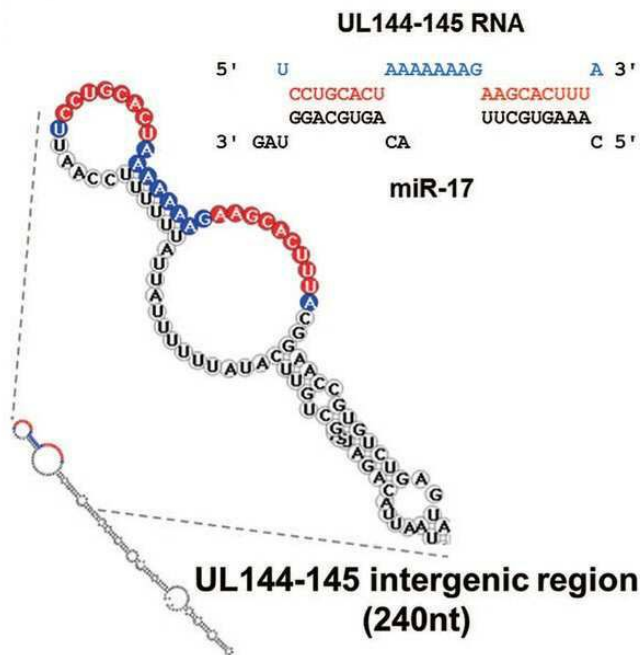
도면3c



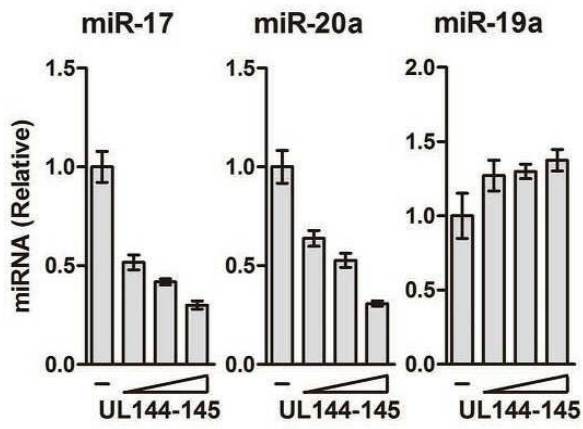
도면3d



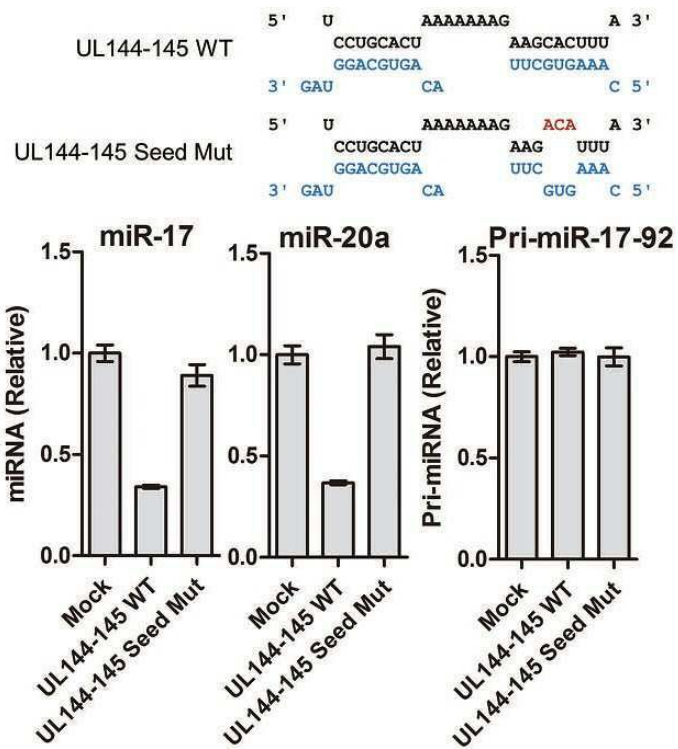
도면3e



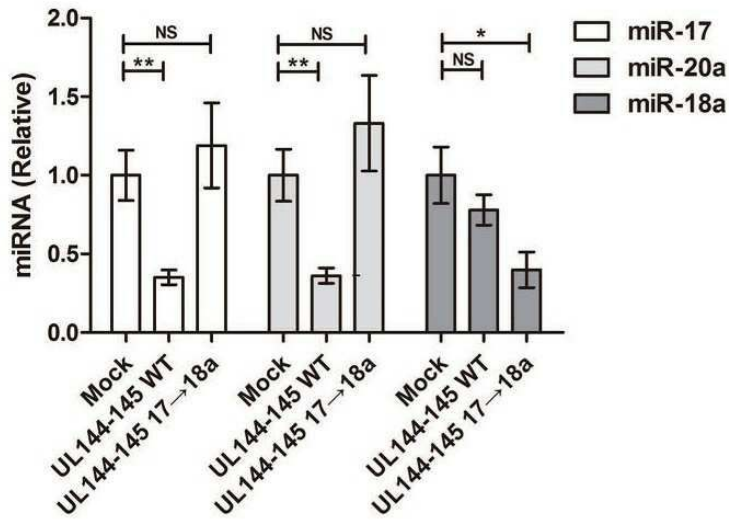
도면3f



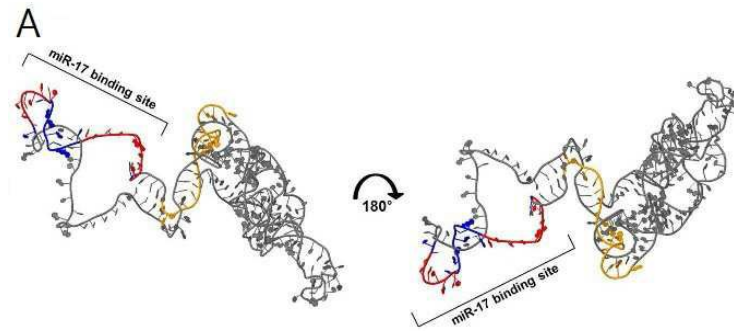
도면3g



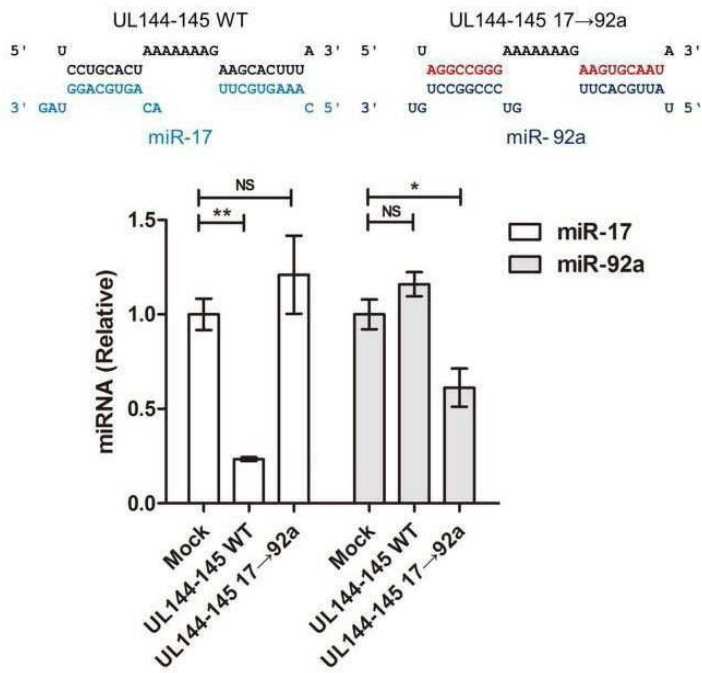
도면3h



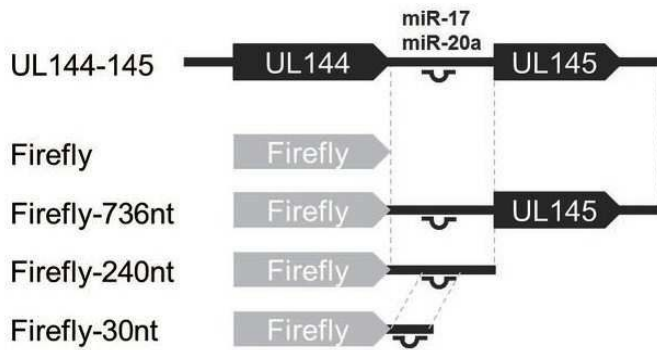
도면3i



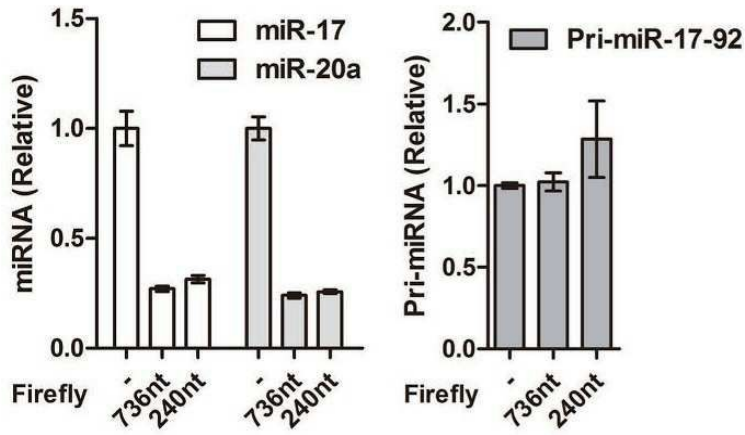
B



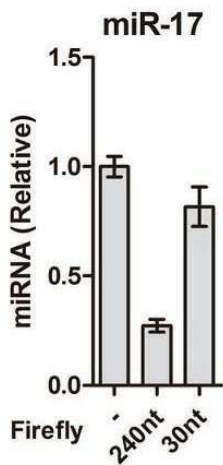
도면4a



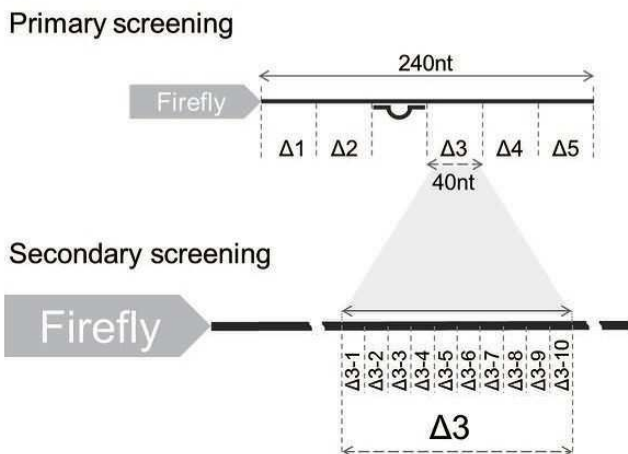
도면4b



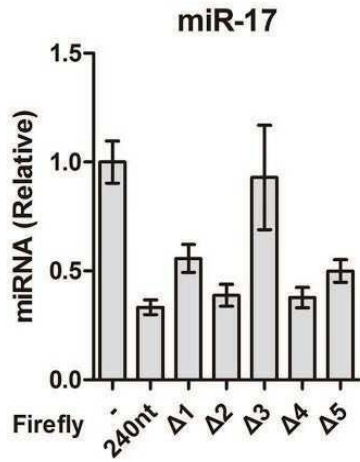
도면4c



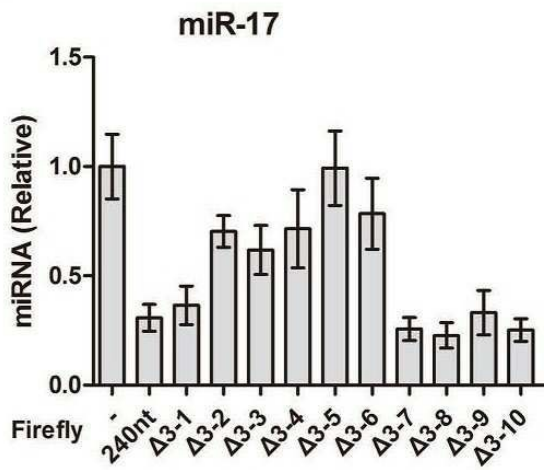
도면4d



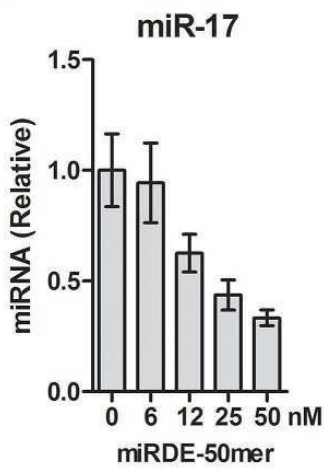
도면4e



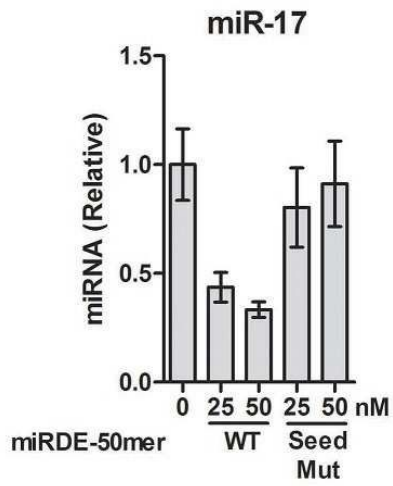
도면4f



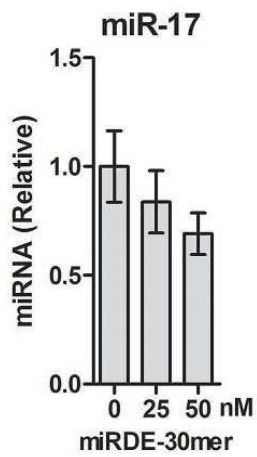
도면4g



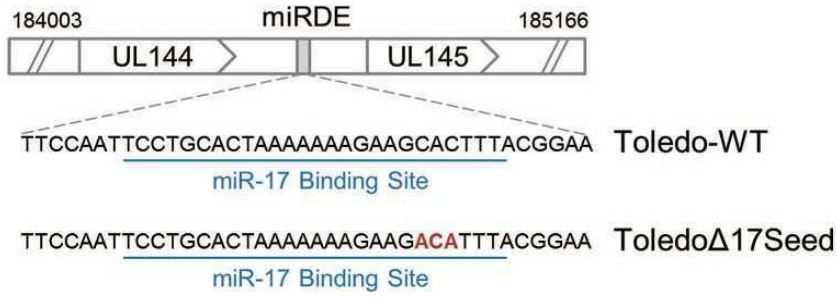
도면4h



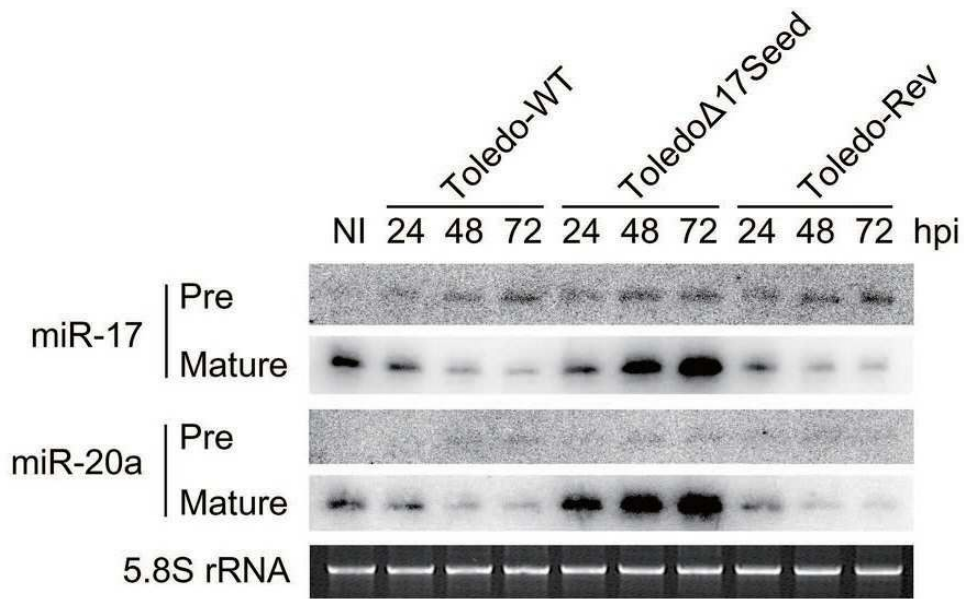
도면4i



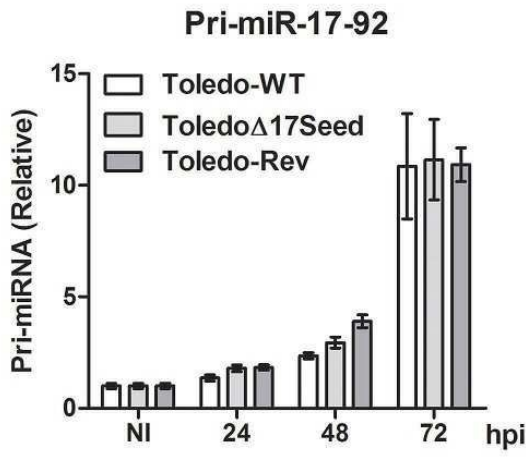
도면5a



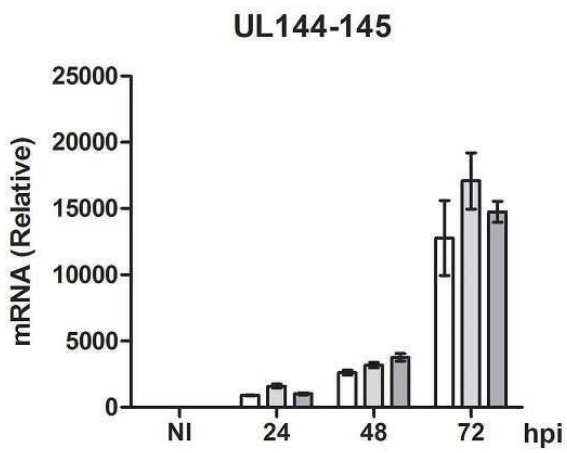
도면5b



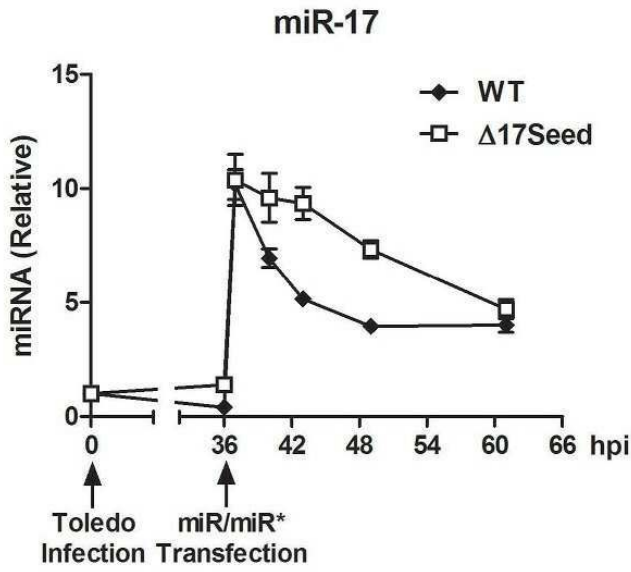
도면5c



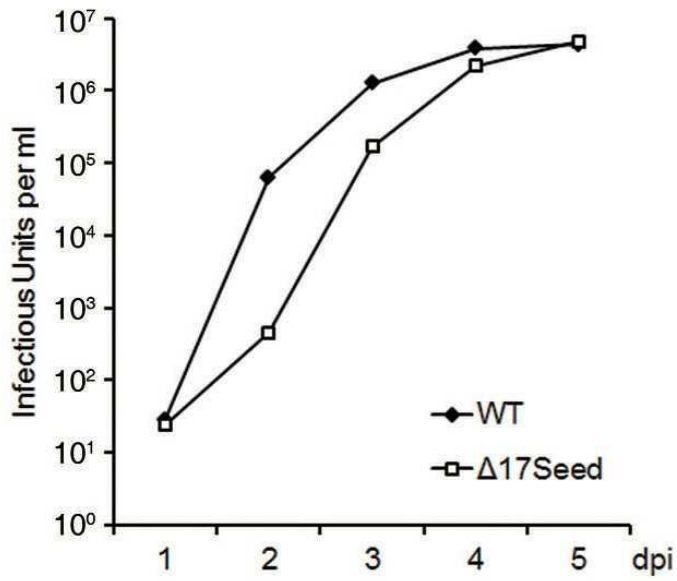
도면5d



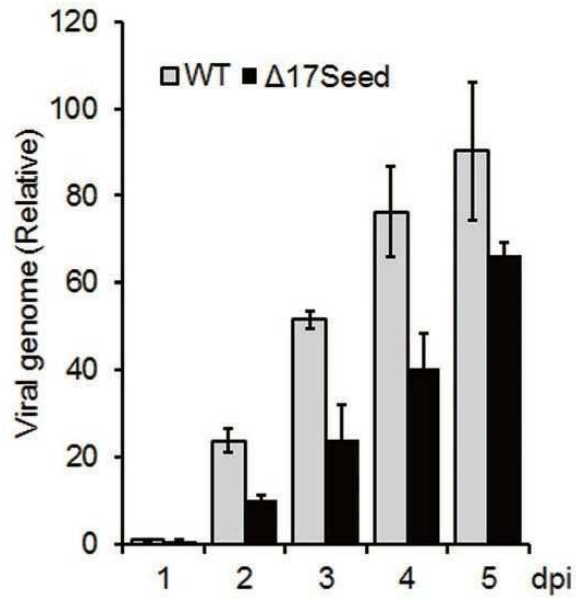
도면5e



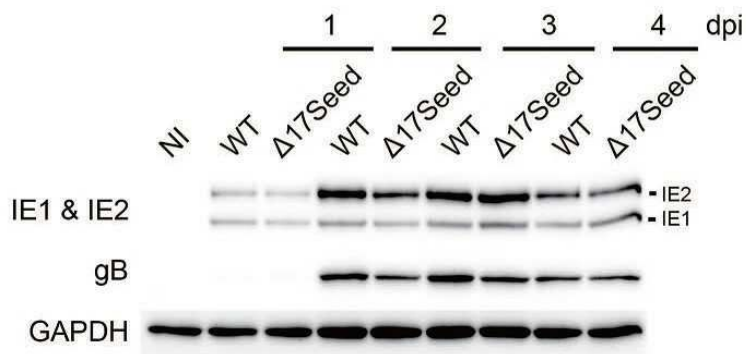
도면6a



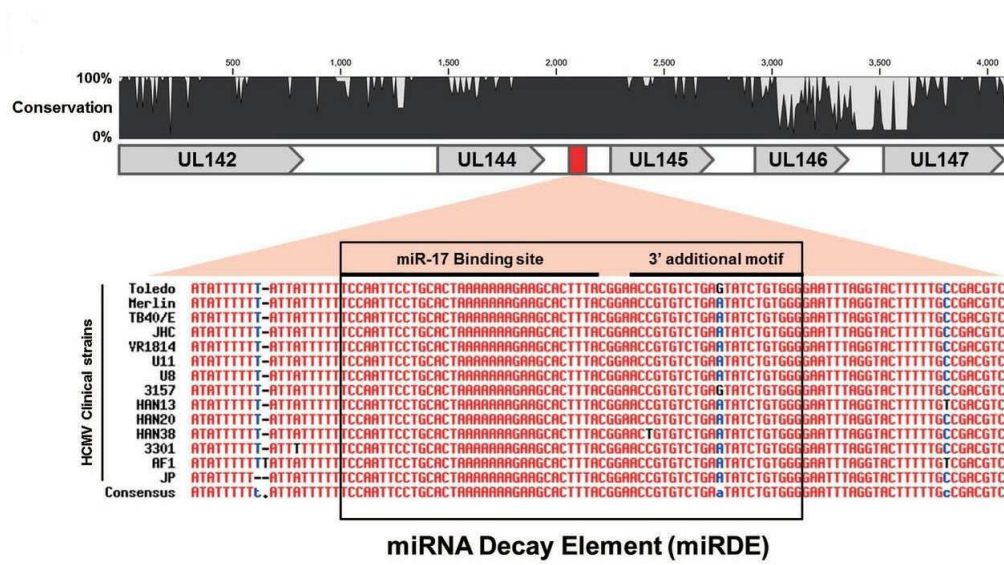
도면6b



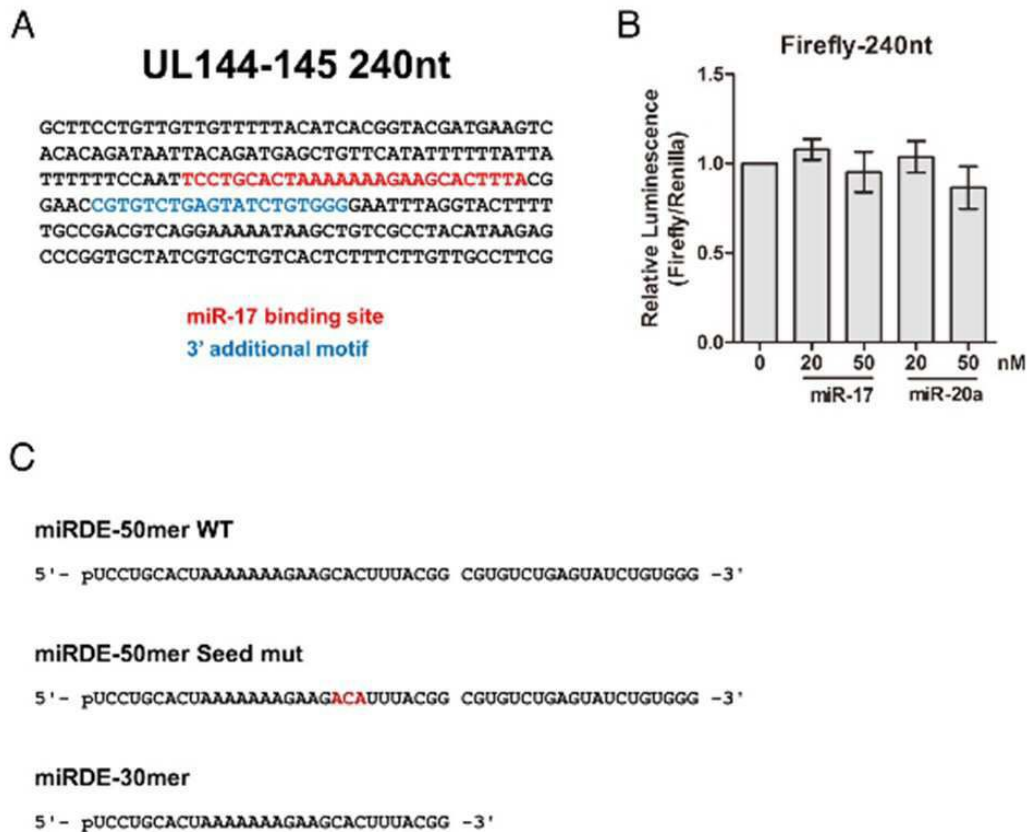
도면6c



도면6d



도면7



도면8

