



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년12월01일
(11) 등록번호 10-1088764
(24) 등록일자 2011년11월25일

(51) Int. Cl.

A61K 38/04 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/32 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0098208

(22) 출원일자 2009년10월15일

심사청구일자 2010년06월18일

(65) 공개번호 10-2011-0041157

(43) 공개일자 2011년04월21일

(56) 선행기술조사문헌

JP2006513702 A

JP2007528202 A

논문20100325

논문2008

전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자

한양대학교 산학협력단

서울 성동구 행당동 17 한양대학교 내

(72) 발명자

채영규

서울특별시 성동구 성수2가3동 835 롯데캐슬파크 107-2202

백미나

서울특별시 금천구 시흥4동 818-21호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다울

심사관 : 이재정

(54) NK1R 단백질 억제제를 포함하는 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 NK1R 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 포함하는 알코올 의존 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 알코올 섭취와 관련이 있는 뇌의 NK1R 단백질의 발현을 RNA 간섭(RNA interference)을 이용하여 조절함으로써 알코올 의존 질환의 치료 및 예방에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정경화

경기도 안산시 상록구 사동 1561-3 301호

최인근

서울특별시 서초구 방배본동 752-36 아크로리버
101동 601호

이병철

서울특별시 강남구 자곡동 440-53

정명훈

강원도 춘천시 후평동 극동아파트 101동 1006호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A08090609020000200

부처명 보건복지가족부

연구관리전문기관

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 siRNA 기술을 이용한 알코올 의존 관련 유전자의 기능 분석

기여율

주관기관 한림대학교산학협력단

연구기간 2009.04.01~2010.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 NK1R 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 포함하는 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 NK1R 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 i) NK1R 유전자의 전사 또는 번역을 억제하는 인공 miRNA(amiRNA) 또는 ii) 상기 amiRNA를 코딩하는 유전자인, 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 NK1R 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 NK1R 특이적 siRNA, 안티센스 핵산 및 LNAs(Locked nucleic acids)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 NK1R 유전자의 전사 또는 번역을 억제하는 amiRNA는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 amiRNA 또는 서열번호 3의 염기서열을 가지는 amiRNA인, 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 4의 염기서열을 가지는 DNA 또는 서열번호 5의 염기서열을 가지는 DNA인, 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물.

청구항 6

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 NK1R 단백질의 발현 또는 작용을 억제하는, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 amiRNA.

청구항 7

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 NK1R 단백질의 발현 또는 작용을 억제하는 서열번호 3의 염기서열을 가지는 amiRNA.

청구항 8

제6항 또는 제7항의 amiRNA를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 4의 염기서열을 가지는 DNA 또는 서열번호 5의 염기서열을 가지는 DNA인, 재조합 발현벡터.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 발현백터는 렌티바이러스백터, 레트로바이러스백터, 아데노바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 재조합 발현 백터.

청구항 11

제8항의 재조합 발현백터로 형질전환된 세포.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 NK1R 단백질 억제제를 포함하는 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, RNA 간섭 기술(또는 microRNA 기술)을 이용하여 알코올 흡수와 관련이 있는 뇌의 NK1R 단백질의 발현 또는 작용을 억제함으로써, 알코올 의존을 예방 및/또는 치료하기 위한 유전자 치료제에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 알코올 의존(alcohol dependence)이란 알코올 중독과 같은 의미의 말로서, 지속적이고 반복적인 과도한 음주로 인해 신체적, 정신적, 사회적 기능이 손상되는 만성 질환을 의미한다. 일반적으로 알코올 의존은 사람의 성격 문제, 환경 문제 또는 스트레스 등에 의해 의지력이 약한 사람에게서 생기는 현상이라고 생각해 버리기 쉬우나, 알코올 의존은 명백한 뇌 질환이다.

[0003] 알코올 의존은 정신 분열증, 우울증과 더불어 병상 점유율이 높으며 치료받은 알코올 의존 환자의 30-50%가 3개월 내에 재발하는 질환이다. 특히 우리나라의 알코올 중독 평생 유병률은 21.98%로 다른 나라보다 높은 실정이다.

[0004] 알코올 의존 환자에게 투여하는 치료제가 존재하기는 하지만 그 효과는 일시적이다. 현재까지는 알코올 의존 치료를 위해 화학적 약물이 주로 사용되고 있다. 그러나 이 약물들은 부작용이 많아 모든 사람에게 사용할 수 없다는 단점이 있다. 예를 들면, 다이설피람(disulfiram)은 체내에서 알코올을 분해하는 효소 알데하이드 디하이드로제나아제(aldehyde dehydrogenase)를 억제함으로써 알코올 섭취를 줄이는 효과가 있다. 하지만 이 약물은 아세트알데하이드를 제대로 분해시키지 못하여, 이 아세트알데하이드가 체내에 축적되어 빈맥, 홍조, 오심, 구토 등의 부작용이 나타난다. 또 다른 알코올 중독 치료제인 날트렉손(Naltrexone)이나 아캄프로세이트(acamprosate)는 다이설피람에 비해 효과는 좋으나 부작용 때문에 모든 알코올 중독 환자들에게 쓰이지 못하고 있다.

[0005] 위에서 언급한 화학적 약물 치료제의 부작용을 극복하고, 보다 원천적이고 항구적인 알코올 의존 질환의 치료 방법이 개발될 필요가 있다. 구체적으로, 유전적으로 물려 받은 형질의 발현을 인위적으로 낮추어 줌으로써 알코올 치료 효과를 치료 방법 등을 예로 들 수 있다. 그런 점에서 유전적 치료 방법을 통하여 즉, 부모에게서 전달받은 고유한 유전자의 발현을 효과적으로 감소시키는 방법을 통해서 치료 효과를 극대화할 수 있을 것으로 생각된다.

[0006] 알코올 의존 또는 알코올 중독은 간 효소뿐만 아니라 신경 · 정신계와 관련이 많다. 실제로 뇌의 Mu opioid 수용체나 α4-포함 GABA 수용체 유전자의 발현을 바이러스를 이용해 억제시켰을 때, 쥐에서 알코올 섭취가 감소되었다는 보고가 있다(A. W. Lasek et al., Genes Brain Behav. 6 (2007) 728-735, M. Rewal et al., J. Neurosci. 29 (2009) 543-549).

[0007] NK1R(neurokinin 1 receptor)은 뇌 전체에서 많이 발현이 되는 단백질의 하나이다. 이 단백질은 특히 전전두 피질(prefrontal cortex), 해마(hippocampus), 꼬리-조가비핵(caudate putamen), 외측중격핵(lateral septum), 중격의지핵(nucleus accumbens), 편도체(amygdala) 등의 스트레스 반응이나 약물 중독 등과 관계가 있는 기관에서 많이 발현되는 것으로 알려져 있다.

- [0008] 설치류의 경우 유전적으로 NK1R이 제거된 쥐가 정상인 쥐에 비해 알코올 섭취가 현저하게 감소되고, 알코올에 대한 민감도가 증가하고, 그리고 알코올 섭취 욕구에 대한 진정작용이 있음이 보고되었다. 사람의 경우에도 마찬가지로 NK1R의 길항제를 처리하였을 때 알코올 섭취에 대한 욕구가 억제됨을 보였다.
- [0009] 포스트 게놈 시대에 작은 RNA(small RNAs)는, 새로운 유전자 발현 조절 인자로 각광받고 있다. 작은 RNA는 단백질을 암호화시키지 않는 쓰레기 DNA 서열로 여겨지던 부위에서 생성된다. 작은 RNA는 단백질을 생성하지 않고 그 분자 자체가 RNAi(RNA interference, RNA 간섭) 또는 microRNA 수행 조절(micro RNA-mediated regulation)로 알려진 기작에 의해 서열 특이적으로 타겟 유전자의 발현을 억제한다. 그리하여 이러한 RNA 간섭 또는 microRNA 기술은 새로운 유전자 치료법으로 관심을 받고 있는 기술 중의 하나이다.
- [0010] 대표적인 작은 RNA인 siRNA와 miRNA는 dsRNA(double strandRNA)-특이적 endonuclease인 RNase III 그룹에 속하는 다이서(Dicer) 효소가 dsRNA 전구체를 잘라내는 과정에서 생성된다.
- [0011] siRNA는 약 21개의 뉴클레오티드로 구성된 dsRNA로 19개의 염기쌍과 3'쪽에 존재하는 2개의 뉴클레오티드 돌출부위들로 구성된다. 이 3' 돌출부위는 RNAi 과정에서 중간 매개체로 기능한다. siRNA는 트랜스포존(transposon), 바이러스 또는 생체 내의 유전자로부터 길이가 긴 dsRNA가 만들어지거나 외부에서 인위적으로 dsRNA가 세포 내로 주입했을 때 생성된다.
- [0012] miRNA는 세포 내에서 자연적으로 만들어지는데, 단백질을 생성하는 유전정보를 갖지 못한 RNA이다. miRNA의 형성과정은 다음과 같다. 핵에서 유전자에 의해 일차 miRNA(primary miRNA)로 전사된 후 드로샤(drosha)에 의해 절단되어 짧은 머리핀(short hairpin) 형태의 전구체 miRNA(precursor miRNA)가 되고, 이후 핵에서 세포질로 이동한다. 세포질 내에서 리보뉴클라아제의 일종인 다이서(dicer) 효소에 의하여 전구체 miRNA의 작은 줄기 루프가 절단되면서 단일가닥의 miRNA로 성숙된다.
- [0013] siRNA는 RISC(RNA-Induced Silencing Complex)를 통해 RNA의 분해를 유도하여 유전자 기능을 억제하는 반면, miRNA는 mRNA의 번역을 방해하는 과정-표적 mRNA의 3'-UTR(untranslated region)의 염기서열에 상보적으로 결합하여 리보솜에서 mRNA가 단백질로 번역되는 과정을 억제-을 통해 유전자 기능을 억제한다.
- [0014] 초기의 RNAi관련 연구는 대부분 합성 siRNA(double stranded RNA oligonucleotide)를 이용하였는데, 합성 siRNA를 이용한 RNAi는 시험관 내에서 표적 염기서열에 대한 dsRNA를 직접 세포에 핵산전달 감염(transfection)시킴으로써 단시간 내에 특정 핵산서열에 의한 유전자 발현 억제 효과를 스크리닝할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 합성 siRNA는 반감기가 짧아 유전자 발현 억제 효과가 2~3일 정도만 유지되므로 지속적인 항바이러스 효과를 나타내기 위해서는 다량의 합성 dsRNA를 반복 주입하여야 하는 문제점이 있다.
- [0015] shRNA(short hairpin RNA)를 이용한 RNAi의 경우, 합성 dsRNA를 직접 주입하는 대신 헤어핀 구조의 단일가닥 RNA를 전사하는 플라스미드 DNA를 이용하며, 세포 안으로 주입된 DNA로부터 전사된 shRNA는 microRNA와 유사한 처리 과정을 거쳐 최종적으로 siRNA로 변환된다. 구체적으로 shRNA를 이용한 RNAi의 경우, RNA 폴리머라아제 III 프로모터로 조절되는 플라스미드가 표적세포의 핵에서 pre-miRNA와 유사한 루프를 가지는 단일 가닥 RNA로 전사된 후, Exportin-5에 의하여 세포질로 이동하여 다이서에 의한 처리 과정을 거치면서 siRNA로 변환된다.
- [0016] 앞서 언급한 바와 같이, 상기 shRNA를 세포 내에서 발현시키기 위해, 인위적으로 상기 shRNA를 발현할 수 있는 DNA를 재조합하여 세포 내에 주입한다. 이후 세포 내에 존재하는 miRNA의 발현기작에 의해 이 shRNA가 세포 내에서 발현됨으로써 타겟 유전자의 발현이 억제된다. 이러한 RNA를 "인공 microRNA(artificial microRNA, 이하 "amiRNA"라고 함)라고 부르기도 한다.
- [0017] shRNA의 경우, 세포 내에 주입된 DNA가 잔존하는 동안 계속적으로 shRNA의 전사가 일어나므로 siRNA보다 오래 RNAi가 유지된다. 그러나 네이키드 플라스미드(naked plasmid)로부터 shRNA가 전사되려면 표적 세포의 핵으로 플라스미드가 이동하여야 하므로, 활발히 분열하는 세포에서만 플라스미드의 핵 내 전달이 가능하다. 또한, 주입된 외래 DNA는 다양한 경로로 세포 내에서 비활성화되어 장기적인 발현을 기대하기 어려운 문제점이 있다.
- [0018] RNA 간섭(또는 miRNA 기술)을 바탕으로 제작된 amiRNA는 종래의 shRNA에 비해 세포 독성이 적고, 타겟 유전자 이외에 다른 유전자 발현에도 영향을 미치는 부작용(off-target effect)도 줄여준다는 장점이 있다. 따라서 이러한 amiRNA는 새로운 유전자 치료법으로 활용될 수 있다. 또한 유전자 치료에 사용되는 바이러스 벡터를 RNAi에 응용한다면, 생체 내에서 핵산 전달의 효율이 높을 것이다. 현재까지 NK1R 유전자 발현 억제에 RNAi를 이용한 기술은 보고되지 않았다.
- [0019] 본 발명자들은 상기 언급한 문제점을 해결하고 유전자 치료제를 이용하여 알코올 의존을 예방 및/또는 치료하기

위한 연구를 계속하였다. 그 결과, RNA 간섭 기술(또는 miRNA 기술)을 바탕으로 유전자 기법을 이용하여, 알코올 의존을 예방 및/또는 치료하는 기술을 개발하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0020] 본 발명은 RNA 간섭 기술을 이용하여 알코올 의존에 관련된 유전자인 NK1R 유전자의 발현 또는 작용을 억제시킴으로써, 알코올 의존을 예방 및/또는 치료하기 위한 것이다.
- [0021] 본 발명의 목적은 NK1R 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 포함하는 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [0022] 본 발명의 다른 목적은 NK1R 단백질의 발현 또는 작용을 억제하는 amiRNA, 이를 코딩하는 유전자, 이 유전자를 포함하는 발현벡터 및 상기 발현벡터로 형질전환된 세포를 제공하기 위한 것이다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 목적은 NK1R 특이적 siRNA, 안티센스 핵산 및 LNAs(Locked nucleic acids)로 이루어진 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

- [0024] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 NK1R 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 포함하는 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명에서 "단백질의 발현 또는 작용"이란, 이 기술분야에서 통상적으로 사용하는 용어이므로 구체적인 설명은 생략하기로 한다.
- [0026] 본 발명에서 "단백질 발현 또는 작용 억제제"란, 단백질의 발현을 위한 전사, 번역 등을 억제하거나 또는 단백질이 만들어지는 과정 중에 나타나는 분자생물학 수준에서의 작용들을 억제하는 조성물을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서 "알코올 의존"이란, 지속적이고 반복적인 과도한 음주로 인해 신체적, 정신적, 사회적 기능이 손상되는 만성 질환을 의미한다. 본 발명에서 "알코올 의존"이란 용어는 알코올 중독, 알코올 남용 등 알코올과 관련된 모든 질환을 포함하는 의미로 사용된 것이다.
- [0028] 본 발명에서, "인공 miRNA(amiRNA)"란, 타겟 유전자에 특이적으로 작용하도록 고안된 RNA로서, 원하는 "인공 miRNA"를 발현할 수 있는 DNA를 재조합하여 세포 내에서 주입하였을 때 miRNA의 발현/작용 기작으로 발현되는 RNA이다. 인공 miRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제시키는 역할을 한다.
- [0029] 본 발명에서, "특이적"은 세포 내에서 표적을 특이적으로 선택하거나, 표적과 특이적으로 결합 또는 반응하는 것을 의미한다. 본 발명은 NK1R 유전자 특이적 amiRNA를 제공한다. 상기 amiRNA는 NK1R의 발현과 연관된 알코올 의존 질환을 예방, 개선 및 치료하는 데 이용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 상기 NK1R 단백질의 발현 또는 작용 억제제는, i) NK1R 유전자의 전사 또는 번역을 억제하는 인공 miRNA(amiRNA) 또는 ii) 상기 amiRNA를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0031] 상기 NK1R 단백질 서열은 이미 공지되어 있고, 서열번호 1로 기재하였다. 상기 amiRNA는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 amiRNA("amiRNA3"라 명명함) 또는 서열번호 3의 염기서열을 가지는 amiRNA("amiRNA4"라 명명함)일 수 있다. 상기 유전자는 서열번호 4의 염기서열을 가지는 DNA 또는 서열번호 5의 염기서열을 가지는 DNA일 수 있다.
- [0032] 상기 amiRNA는 21 nt로 이루어져 있고, 체내에서 만들어지는 miRNA의 형태와 유사한 작은 헤어핀 구조를 가진다.
- [0033] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 염기서열을 가지는 amiRNA 및 서열번호 3의 염기서열을 가지는 amiRNA를 제공한다.
- [0034] amiRNA를 제조하는 방법은 특별히 제한되지 않으나, RNA 올리고뉴클레오타이드를 화학적으로 합성하는 방법, 인

비트로 전사를 이용한 작은 RNA의 합성 방법 등을 예시할 수 있다.

- [0035] 또한, 본 발명은 상기 amiRNA를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [0036] 상기 재조합 amiRNA의 뉴클레오티드 서열을 코딩(암호화)하는 유전자를 합성하여 발현벡터에 삽입할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 amiRNA가 세포 내에서 일시적, 또는 영구적으로 발현될 수 있도록 amiRNA 발현 벡터를 세포 내로 형질전환 또는 감염(infection)시킬 수 있다. 본 발명의 재조합 발현벡터는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 구성될 수 있다.
- [0038] 상기 발현벡터는 포유류 세포 또는 그 밖의 표적 세포 유형의 복제 및 발현에 이용되는, 당해 분야에 공지된 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택하여 사용할 수 있다. 본 발명에서는 특히 바이러스벡터들이 바람직하다. 그 이유는, 바이러스벡터들이 생체 내에서 핵산 전달의 효율이 높기 때문에 RNAi에 응용하면 그 효과가 높을 것이라고 생각되기 때문이다.
- [0039] 본 발명에서는 특히 렌티바이러스를 사용하는 것이 가장 바람직하다. 렌티바이러스는 레트로바이러스 벡터의 일종으로 분열하지 않는 세포도 형질도입(transduction)이 가능하며 주입된 유전자는 주입된 유전자는 수개월 이상 발현이 가능하므로(Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 1997;17:314-317.), RNAi를 장기간 유지시키는 데 유리한 장점을 가진다.
- [0040] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 제조된 형질전환체를 제공한다.
- [0041] 상기 amiRNA 서열을 암호화하는 유전자를 삽입한 발현벡터는 이 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 알려진 방법으로 숙주세포에 도입될 수 있다. 도입 방법으로는 일렉트로포레이션(electroporation) 및 리포펙션(lipofection) 등이 있으나 이에 한정된 것이 아니며, 당해 분야에 공지된 방법을 선택할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 사용할 수 있는 세포로는 대장균, 효모, 심장 세포, 림프구, 간 세포, 혈관내피 세포, 비장 세포, 암 세포, CHO, Cos7, NIH3T3 같은 동물 세포주, 곤충세포로 이루어진 군에서 선택할 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니며 가능한 모든 세포는 숙주 세포로 사용이 가능하다.
- [0043] 또한 본 발명은 NK1R 특이적 siRNA, 안티센스 핵산 및 LNAs(Locked nucleic acids)로 이루어진 알코올 의존 에방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0044] 앞서 설명한 바와 같이, "siRNA"는 표적 유전자의 mRNA에 특이적으로 작용하여 RNA 간섭 현상을 유도할 수 있는 이중사슬 RNA를 의미한다. siRNA는, 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 구체적으로, NK1R 유전자에 의해 코딩되는 mRNA의 일부 영역과 동일한 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 NK1R 유전자에 의해 코딩되는 mRNA의 일부 영역에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥이 이중가닥 RNA를 형성한 형태이다.
- [0045] "안티센스 핵산"이란, 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체인 핵산서열을 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA에서 단백질로의 번역을 저해하는 특징을 가진다. 안티센스 핵산의 서열과 길이는 특별히 제한되지 않는다. mRNA에 대응하지 않는 일부의 서열을 포함할 수 있다. 전체 길이는 6 내지 60 염기이고, 바람직하게는 8 내지 50 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내 40 염기이다.
- [0046] 본 발명의 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루거나, 하나 이상의 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분을 포함할 수 있다.
- [0047] 안티센스 RNA의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 것이다. 시험관에서 안티센스 RNA를 합성하는 한 예는 RNA 폴리머라제 I 을 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.
- [0048] 본 발명에서 "LNAs(Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다.

- [0049] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 기술을 이용하여 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명은 NK1R 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 처리하여 알코올 섭취를 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 알코올 의존과 관련이 있는 질병, 구체적으로 알코올 의존성 질환을 앓고 있는 개체의 치료에 이용될 수 있다. 본 발명의 조성물의 투여가 가능한 개체는 인간뿐만 아니라 새, 가금류, 가축 등의 동물도 포함한다. 본 발명에서, 치료는 알코올 의존의 발병을 예방하거나, 질환과 관련된 증상을 감소, 경감, 역전시키는 것을 포함한다.
- [0052] 본 발명의 조성물은 기존의 세포독성제, 화학요법제 등의 다양한 치료제와 병합 투여될 수 있으며, 이 경우 동시 또는 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 조성물은 표면에 전달하는 임의의 방식으로 개체에게 투여될 수 있다. 적합한 비경구 투여 경로는 혈관내 투여(예, 정맥 내 볼루스 주사, 정맥 내 주입, 동맥 내 볼루스 주사, 동맥 내 주입, 맥관 내로의 카테터 점적주입), 피하 주입을 포함하는 피하 주사 또는 침착(deposition)(예를 들면 삼투압 펌프 이용), 조직 주위 및 조직 내 투여(예: 종양주위 및 종양내 주사) 또는 침착 등을 포함한다.
- [0054] 본 발명의 약제학적 조성물의 유효량은 개체의 성별, 연령, 건강상태, 체중, 투여 방법과 횟수, 표적 조직이나 세포 등 다양한 요인을 고려하여 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정할 수 있다. 상기 유효량은 NK1R 발현을 억제시키기 위해 충분한 양 또는 NK1R 작용을 억제하기에 충분한 양이다. 각 치료에 요구되는 총 용량은 수회 용량 또는 일회량으로 투여될 수 있다.

효 과

- [0055] 알코올 섭취와 관련이 있는 뇌의 NK1R 단백질의 발현을 RNA 간섭(RNA interference)을 이용하여 조절함으로써 개체가 흡수하는 알코올의 양을 감소시킬 수 있다. 따라서 본 발명의 RNAi 유전자 치료법에 기초한 억제제를 개체에 처리함으로써 알코올 의존 질환의 효과적인 치료, 개선 및 예방이 가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0056] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 이 기술분야의 통상의 기술자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[0057] 실시예 1: amiRNAs 디자인과 렌티바이러스의 합성

[0058] 1-1: 세포배양

- [0059] 생쥐의 섬유아세포인 NIH3T3 세포주 (한국 세포주 은행, 대한민국)를 10%의 FBS, 100 IU/ml 페니실린과 10 ug/ml 스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지에서 37℃와 5% 이산화탄소 농도 조건에서 배양하였다.

[0060] 1-2: amiRNAs 디자인과 렌티바이러스의 합성

- [0061] NK1R 유전자의 발현을 억제하기 위하여 도 1 및 2와 같이 NK1R 유전자의 mRNA에 대한 다섯 부분의 스템-루프 구조 amiRNA를 고안하였다. NK1R mRNA(NCBI Reference Sequence: NM_009313.4)를 타겟으로 하는 서열은 BLOCK-iT RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>)를 이용하여 고안하였다. 고안된 서열정보는 하기 표 1에 정리하였다.

[0062] [표 1]

[0063]

명칭	개시 사이트	서열	서열번호
amiRNA 3	1356	GGUUUCACCAGUAGAAACAGU	2
amiRNA 4	1483	GUCCUGAAUGCUCUUUCGCAU	3
amiRNA 3 코딩 DNA	1356	CCAAAGTGGTCATCTTTGTCA	4
amiRNA 4 코딩 DNA	1483	CAGGACTTACGAGAAAGCGTA	5

[0064]

고안된 amiRNA서열은 BLAST를 이용해 상동성 유무를 확인을 하였고, amiRNA 서열은 스템-루프 구조를 가지게 고안하였다. NK1R mRNA를 타겟으로 하는 amiRNA 서열이 발현되게 하는 벡터를 제작하기 위하여 amiRNA 서열을 plenti6.2-GW/EmGFP-miR 벡터(Invitrogen사)에 삽입하였고, BLOCK-iTTM HiPerformTM Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System (Invitrogen사)을 이용하여 제조사의 실험지침서 방법에 따라 클로닝하였다. 클로닝된 amiRNA는 최종적으로 plenti6.4/R4R2/V5-DEST MultiSite Gateway[®] 벡터에 넣어 렌티바이러스 벡터를 만들었다 (도 3 참고). 음성 대조군 벡터는 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-neg 컨트롤 플라스미드(Invitrogen사)를 이용하여 클로닝하였다.

[0065]

이들 렌티바이러스의 제조는, 293FT 세포 및 Invitrogen사의 ViraPower packaging mix를 이용하여 제조사의 실험 지침서에 따라서 만들었다. 293FT 세포에서 렌티바이러스를 만들기 위해, amiRNA 서열을 포함하는 3 ug의 plenti6.4/EF1aMSGW/EmGFP-miR 발현 플라스미드 DNA 와 9 ug ViraPower packaging mix를 준비하였다. 준비된 DNA와 ViraPower mix를 Lipofectamine 2000과 섞고 상온에서 20분간 반응시켜 DNA-Lipofectamine 2000 complex 를 만들었다. 293FT cell(6×10^6 total cells)을 준비하고 DNA-Lipofectamine 2000 complex를 섞어 CO₂ 배양기에 서 하룻동안 배양하였다. 배양 후 세포 플레이트의 배지를 제거하고 소듐피루베이트(sodium pyruvate)가 들어간 DMEM배지를 넣어주어 CO₂ 배양기에서 48~72 시간 동안 배양하였다. 48~72 시간 후 바이러스가 포함된 배지를 거두어 원심분리 후 상층액 만을 취해 바이러스를 얻었다. 얻어진 바이러스를 NIH3T3 세포에 감염시켜 10일 정도 항생제(blasticidin S 5 ug/ml)를 이용하여 바이러스가 감염된 세포를 선택하였다. 티터(titer)가 좋은 바이러스를 선택하기 위해 크리스탈 바이올렛 염색을 하여 확인하였다.

[0066]

실시예 2: NIH3T3 세포주에 바이러스 감염

[0067]

NIH3T3 세포에 각각의 NK1R amiRNAs 서열을 가지고 있는 렌티바이러스를 감염시키고 3~4일에 한번씩 blasticidine S(5 ug/ml)가 첨가된 DMEM 배지로 갈아주었다. 30일이 지난 후 렌티바이러스가 감염된 세포만을 선택하여 NIH3T3 세포에서 안정적으로 NK1R amiRNAs 서열을 발현하는 세포주를 확립하였다.

[0068]

실시예 3: 세포 내에서의 amiRNA 효율 검증

[0069]

각각의 NK1R amiRNAs 유전자를 발현하는 세포에 Trizol(invitrogen사)을 처리하여 전체 RNA를 분리하고, 역전사 효소(Superscript III, Invitrogen사)와 oligo dT를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 실시간 RT-PCR은 Applied Biosystems사의 7500 fast real-time PCR 시스템을 사용하였다. Applied Biosystems사의 Primer Express를 이용하여 얻은 NK1R 유전자의 프라이머와 2X SYBR Green PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 2ug cDNA를 반응 버퍼와 함께 최종 용량 25 ul로 하여 실험하였다. 사용한 NK1R 프라이머 염기서열은 다음과 같다.

[0070]

서열번호 6(NK1R forward primer): 5'-CTCCACCAACACTTCTGAGTC-3'

[0071]

서열번호 7(NK1R reverse primer): 5'-TCACCACTG TATTGAATGCAGC-3'

[0072]

GAPDH 유전자를 사용하여 데이터를 표준화 하였고, 각 사이클의 생성물은 두 가닥 DNA에 결합하는 SYBR green의 증가되는 양을 이용하여 측정하였다. 모든 데이터는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용하여 유전자의 발현 증감을 분석하였다

(K. J. Livak *et al.*, *Methods*. 25 (2001) 402-408). 각각의 NK1R amiRNAs 서열을 발현하는 세포의 단백질의 발현양상을 웨스턴 블롯팅을 이용하여 확인하였다. NK1R amiRNAs 서열을 포함하는 렌티바이러스가 감염된 NIH3T3 세포를 RIPA 라이시스 버퍼(Sigma) 와 1% 프로테아제 억제제(Calbiochem사)를 섞은 반응액을 이용하여 용해시킨 후, 단백질을 분리하였고, BCA Protein Assay Reagent(Pierce)을 이용하여 정량하였다. 정량된 단백질을 20 ug을 10% SDS-PAGE를 수행한 후 PVDF 막으로 단백질을 이동시켰다. PVDF 막으로 단백질을 이동시킨 후, 5% 스킵-밀크 용액에서 2 시간 동안 블라킹(blocking)하였다. 각 단백질의 항체를 이용하여 반응시키고 난 뒤 HRP가 결합된 이차 항체(Pierce)로 반응시킨다. 1차 항체는 Santa Cruz사의 래빗 항-NK1R을 1:3000 (sc-15323)으로 희석, Sigma사의 고트 항-베타 액틴(A5316)을 1:5000으로 희석하여 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. 항체 반응 후 ECL kit(Pierce)를 이용하여 각 단백질을 확인하였다.

[0073] 실시예 4: 선별된 amiRNA의 생체 내 효능 평가

[0074] 8 주령된 C57BL/6 수컷 생쥐를 12/12 h light/dark 사이클로 온도와 습도가 조절되는 환경에서 사육하였다. 렌티바이러스의 주사는 뇌내접종법(intracerebral injection)을 이용하였다. 주사바늘(0.25 G)을 이용하여 15 ul의 바이러스 부유액을 주사하였고 알코올 섭취를 측정하기 위해 4주간 알코올 섭취량을 측정하였다. 렌티바이러스 주사 후 3일 뒤 알코올을 공급하였고, 15일 후에는 알코올 농도를 15%로 증가시켰다. 쥐의 케이지에는 물병과 알코올이 든 병을 같이 주고 일정 시간이 지나 두 병의 자리를 바꿔줌으로써 자리를 기억하여 물이나 알코올을 찾지 않도록 하였다. 또한 알코올 의존 치료제로 알려진 날트렉손(naltrexone)을 복강내 주사(intraperitoneal injection)를 이용하여 200 ul(16 mg/ml)를 4일에 한번씩 주사하였다. 렌티바이러스 및 날트렉손 주사 후 케이지에 물과 10% 알코올을 주어 4주 동안 3일에 한 번씩 몸무게와 물, 알코올 소비량을 측정하였다. 4주 후, 알코올 섭취량을 측정한 생쥐의 뇌를 적출하여 전전두 피질(prefrontal cortex), 선조체(striatum), 해마(hippocampus)와 피질(cortex)을 절개하였다. 절개한 뇌 조직에 Trizol (invitrogen사)을 처리하여 전체 RNA를 분리하고, 역전사효소(Superscript III, Invitrogen) 와 oligo dT를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 NK1R 유전자 발현을 실시간 RT-PCR방법으로 측정하였다.

[0075] 실시예 5: 면역조직화학 염색법

[0076] 생쥐를 Zoletil 50(Virbac)으로 마취시키고 4% 파라포름알데하이드를 이용하여 관류하였다(perfusion). 관류한 후에는 뇌를 적출하여 약 2주간 4% 파라포름알데하이드에 고정하였다. 고정된 뇌 조직을 파라핀에 포매한 후 포매 조직을 5 μm 두께로 박절하여 통상적인 면역조직화학 염색을 하였다. 박절한 포매 조직은 자일렌(Xylene)을 이용하여 파라핀을 제거하고 에틸알코올에 단계적으로 함수시킨 후 시트레이트 버퍼(citrate buffer)를 마이크로웨이브에서 12분간 가열하여 항원 회복을 시도하였다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 1% 과산화수소(H₂O₂) 용액을 10분간 처리 하였다. 앞의 모든 반응이 끝난 조직과 Abcam사의 NK1R 일차 항체를 4°C에서 하룻동안 반응시킨 후, HRP가 붙어있는 2차 항체와 반응시켰다. DAB(3,3-diaminobenzidine tetrachloride) 크로모젠(chromogen)을 사용하여 발색한 후 헤마톡실린(hematoxylin)으로 대조 염색을 실시하였다.

[0077] 실시예 6: NK1R amiRNA 발현 렌티바이러스를 NIH3T3 세포에 감염 후 EmGFP의 발현 관찰

[0078] 본 발명에 따른 amiRNA 서열(amiRNA 3 및 4)를 포함한 렌티바이러스 제작 후 NK1R 유전자를 발현하는 생쥐의 섬유아세포인 NIH3T3 세포에 감염시켰다. 렌티바이러스의 감염 정도를 확인하기 위하여 렌티바이러스가 감염된 NIH3T3 세포의 EmGFP 형광 발현의 양을 관찰하였다. 도 4에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 amiRNA 모두 감염률이 높음을 알 수 있다.

[0079] 실시예 7: NK1R 의 세포 내 발현 확인

[0080] NK1R의 세포 내 발현률을 확인하기 위해, NK1R 유전자를 발현하는 NIH3T3 세포에서 전체 RNA와 단백질을 분리하여 실시간 RT-PCR과 웨스턴 블롯을 통해 NK1R유전자 발현을 확인하였다. 도 5에서와 같이, 본 발명의 amiRNA 3, 4가 음성 대조군에 비해 유전자 발현이 60% 이상 현저하게 감소되었고 단백질 발현 역시 같은 결과를 나타냄을 확인하였다.

[0081] 실시예 8: 알코올 섭취량 변화 측정

[0082] NK1R 특이적 amiRNA3 포함 렌티바이러스와 음성대조군 렌티바이러스 15 μ l를 생쥐의 뇌에 접종 후 3일 뒤 알코올을 공급하였고, 15일 후에는 알코올 농도를 15%로 증가시켰다. 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 실험 초기에는 두 그룹 모두 알코올 섭취량의 큰 차이를 보이지 않았지만 15일이 지난 후 급격한 차이가 나타났다.

[0083] NK1R 특이적 aimRNA4 렌티바이러스와 음성대조군 렌티바이러스 15 μ l를 생쥐의 뇌에 접종하였고, 현재 알코올 중독 치료제로 쓰이고 있는 날트렉손(naltrexone)을 복강 내 주사(intraperitoneal injection)를 이용하여 200 μ l (16 mg/ml)를 4일에 한번씩 주사하여 알코올 섭취량을 측정하였다. 바이러스 주사 3일 후 10%를 공급하였으면 15일 후 15%의 알코올로 바꿔주었다. 도 7에 나타난 것과 같이, NK1R 특이적 aimRNA4 포함 렌티바이러스를 주사한 쥐와 날트렉손을 복강 내로 주사한 쥐는 알코올 섭취에서 음성대조군 렌티바이러스를 주사한 쥐에 비해 알코올 섭취량이 50% 이상 감소하는 양상을 보였다. 반면에 물 섭취량에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과를 통해, 본 발명에 사용한 amiRNA4가 NK1R의 발현을 감소시켜 생쥐의 알코올 섭취량을 현저하게 감소시키는 효과를 확인하였다.

[0084] 실시예 8: 렌티바이러스 감염 쥐의 뇌에서 NK1R 유전자 발현 변화 측정

[0085] NK1R 특이적 amiRNA4 포함 렌티바이러스와 음성 대조군 렌티바이러스 주사 4주 후, 쥐의 뇌 속 NK1R의 발현을 확인하기 위해 뇌를 적출하여 전전두 피질(prefrontal cortex), 해마(hippocampus), 피질(cortex) 부분을 절개하였다. RNA를 추출한 후, NK1R 유전자의 발현 변화를 실시간 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 그 결과 전전두 피질이나 피질 부분에서는 NK1R 유전자 발현 변화가 없는 반면 해마 부분에서는 음성 대조군에 비해 NK1R의 유전자 발현이 40~50% 정도 감소한 것을 확인하였다(도 8, 9 및 10).

산업이용 가능성

[0086] NK1R 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 포함하는 본 발명의 조성물은, 알코올 의존과 관련된 질환의 예방, 개선 및 치료를 위해 의학 분야에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0087] 도 1 및 2는 본 발명에 따른 amiRNA의 디자인을 나타낸 것으로, 본 발명에 대한 amiRNA는 amiRNA 3 및 4이다.

[0088] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 amiRNA를 발현할 수 있는 벡터 지도를 나타낸 것이다.

[0089] 도 4는 NK1R amiRNA 발현 렌티바이러스를 생쥐 섬유아세포 NIH3T 세포에 감염 후 EmGFP의 발현을 관찰한 것이다.

[0090] 도 5는 렌티바이러스 감염 후 한 달간의 블라스티시딘(blasticidin) 항생제 선별 과정을 거쳐 NK1R mRNA의 유전자 발현 변화를 실시간 RT-PCR와 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 데이터는 \pm SE값이다(이후 기재된 데이터도 \pm SE값임).

[0091] 도 6은 amiRNA3 포함 렌티바이러스 주사 후 알코올 섭취량의 변화 측정된 그래프이다: (a)는 렌티바이러스 주사 후 음성 대조군과 amiRNA3 주사 그룹의 물 섭취량 변화를, (b)는 알코올 섭취량의 변화를 나타낸 것임.

[0092] 도 7은 amiRNA4 포함 렌티바이러스 주사 후 알코올 섭취량의 변화 측정된 그래프이다: (a)는 렌티바이러스 주사 후 음성 대조군과 amiRNA 4 주사 그룹의 물 섭취량을, (b)는 알코올 섭취량의 변화를 나타낸 것임.

[0093] 도 8은 렌티바이러스가 감염된 쥐의 해마(hippocampus), 피질(cortex), 전전두 피질(prefrontal cortex)을 분리하여 NK1R mRNA의 유전자 발현 변화를 실시간 RT-PCR로 확인한 그래프이다.

[0094] 도9는 NK1R 단백질 발현을 보기 위해 현미경으로 관찰한 렌티바이러스가 감염된 쥐의 뇌를 나타낸 것이다.

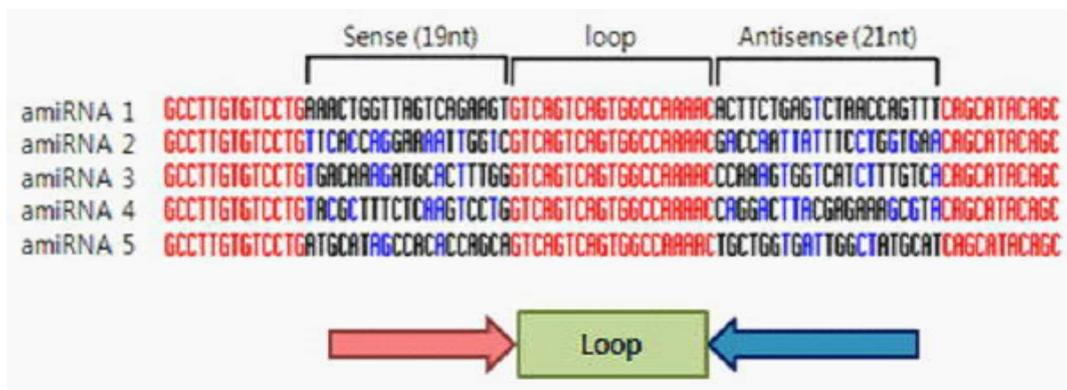
[0095] 도10은 면역조직화학염색을 통하여 렌티바이러스가 감염된 쥐 뇌의 NK1R 단백질 발현 변화를 나타낸 것이다.

도면

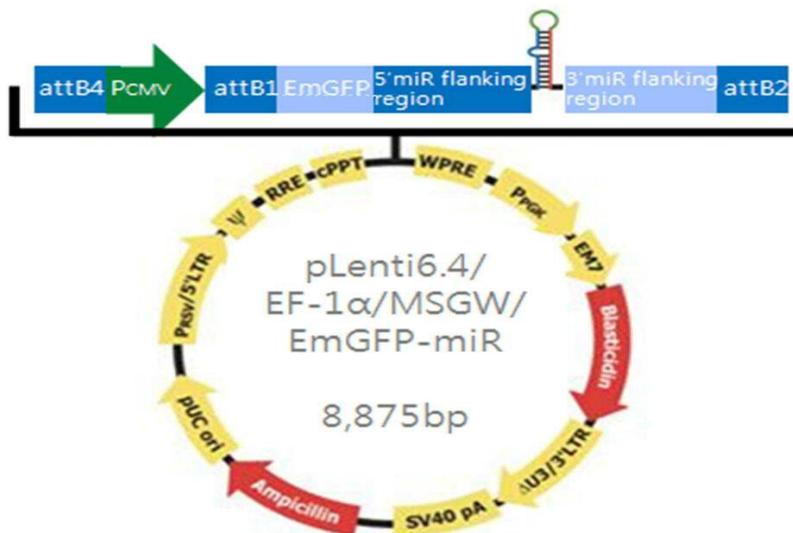
도면1



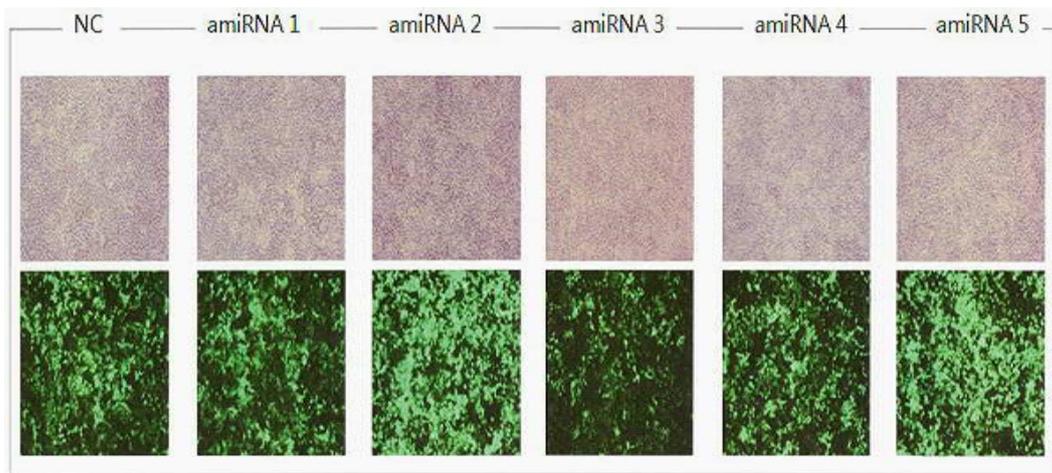
도면2



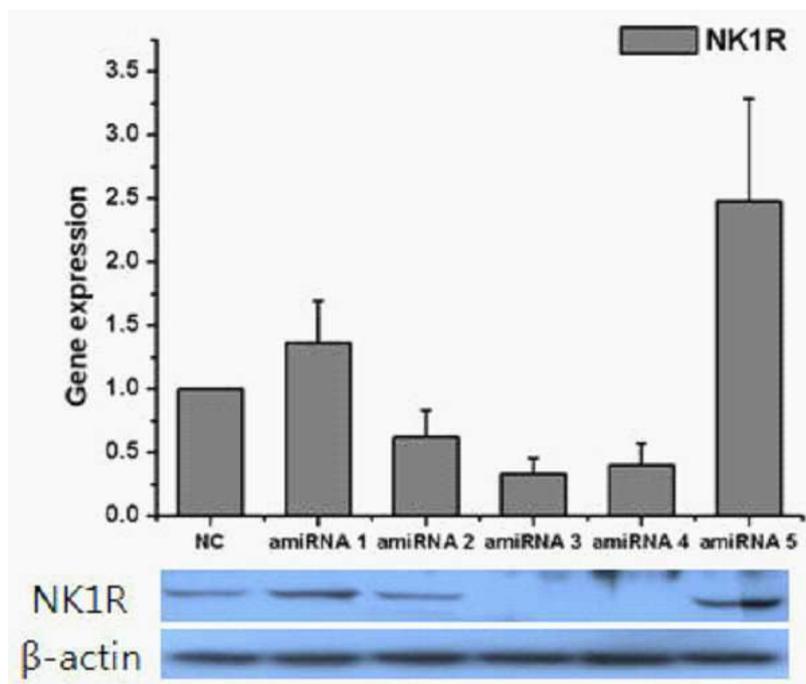
도면3



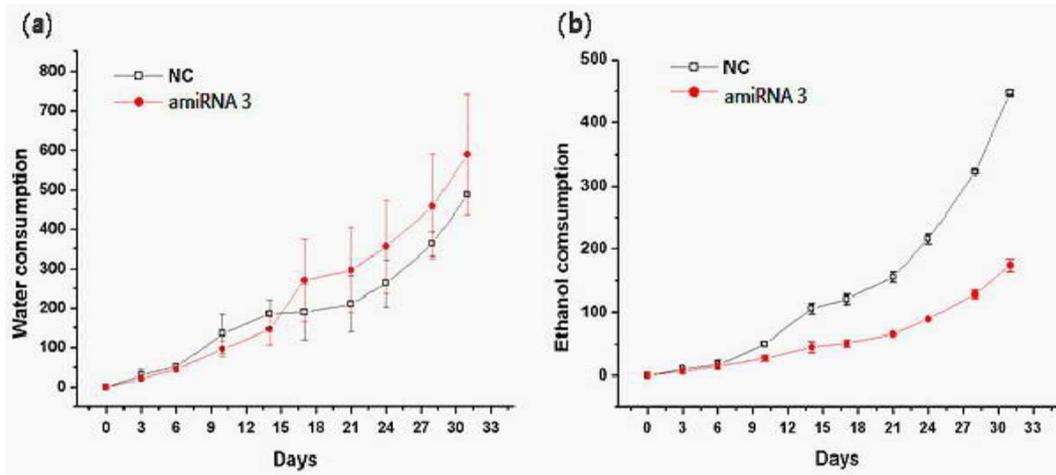
도면4



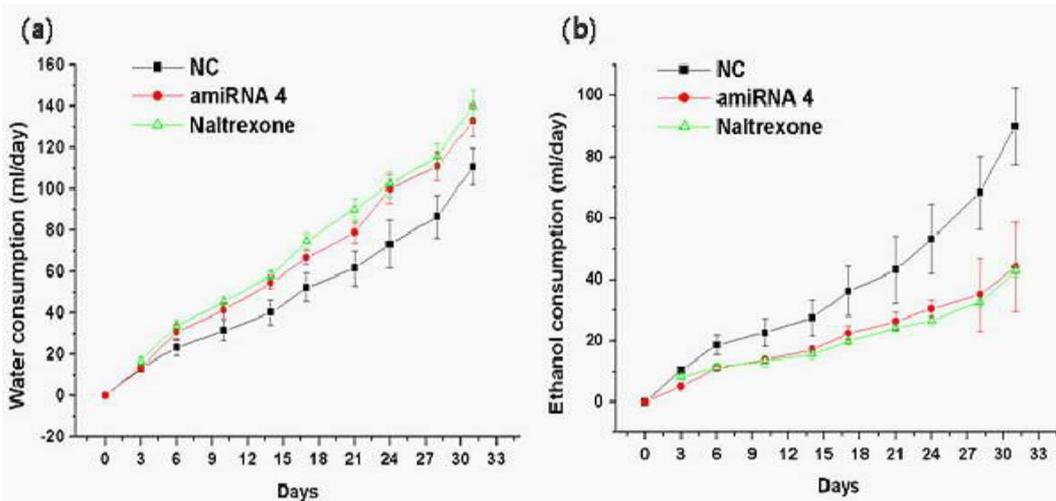
도면5



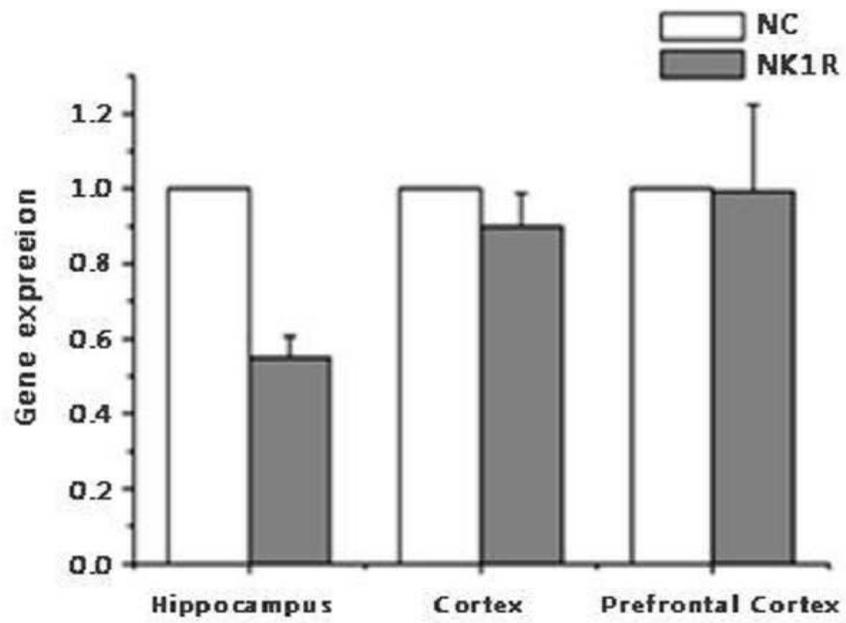
도면6



도면7



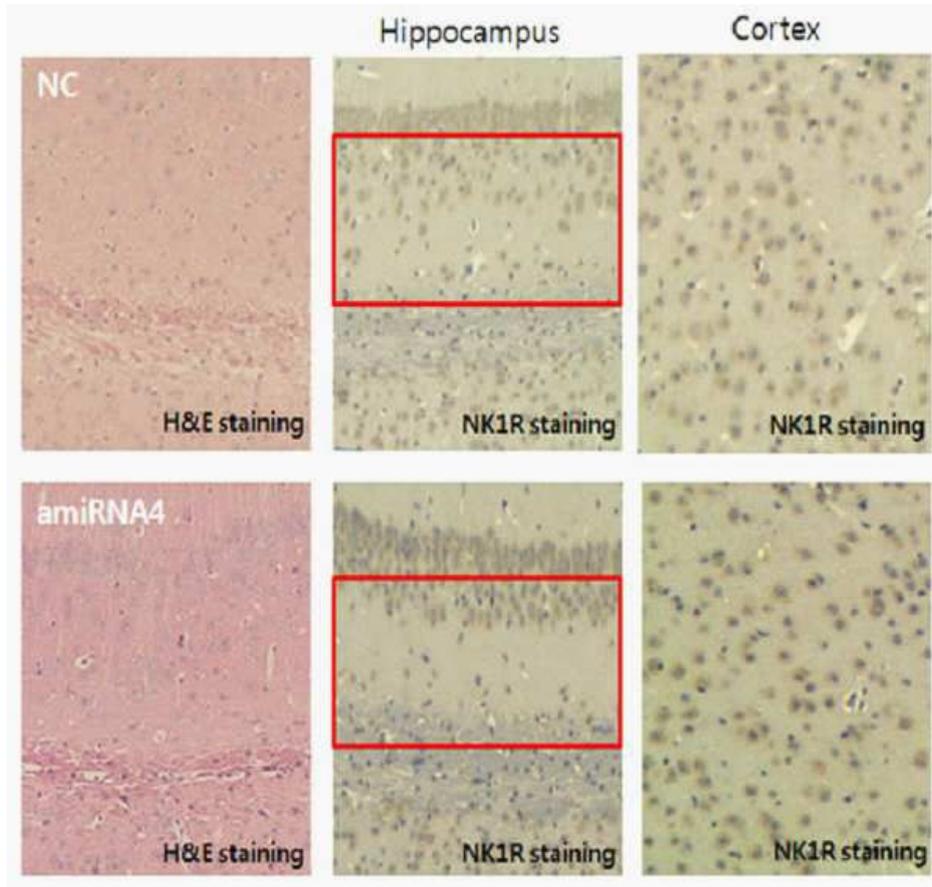
도면8



도면9



도면10



서열목록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Hanyang University
 <120> COMPOSITON FOR TREATMENT AND PREVENTION OF ALCOHOL DEPENDENCE
 INCLUDING NK1R INHIBITOR

<160> 7

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 407

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Asp Asn Val Leu Pro Val Asp Ser Asp Leu Phe Pro Asn Thr Ser
 1 5 10 15

Thr Asn Thr Ser Glu Ser Asn Gln Phe Val Gln Pro Thr Trp Gln Ile

Phe Ala Ile Cys Trp Leu Pro Phe His Ile Phe Phe Leu Leu Pro Tyr
 260 265 270

Ile Asn Pro Asp Leu Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Gln Gln Val Tyr Leu
 275 280 285

Ala Ser Met Trp Leu Ala Met Ser Ser Thr Met Tyr Asn Pro Ile Ile
 290 295 300

Tyr Cys Cys Leu Asn Asp Arg Phe Arg Leu Gly Phe Lys His Ala Phe
 305 310 315 320

Arg Cys Cys Pro Phe Ile Ser Ala Gly Asp Tyr Glu Gly Leu Glu Met
 325 330 335

Lys Ser Thr Arg Tyr Leu Gln Thr Gln Ser Ser Val Tyr Lys Val Ser
 340 345 350

Arg Leu Glu Thr Thr Ile Ser Thr Val Val Gly Ala His Glu Asp Glu
 355 360 365

Pro Glu Glu Gly Pro Lys Ala Thr Pro Ser Ser Leu Asp Leu Thr Ser
 370 375 380

Asn Gly Ser Ser Arg Ser Asn Ser Lys Thr Met Thr Glu Ser Ser Ser
 385 390 395 400

Phe Tyr Ser Asn Met Leu Ala
 405

<210> 2
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> amiRNA3 for NK1R

<400> 2
 gguuucacca guagaaacag u

21

<210> 3

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> amiRNA3 for NK1R

<400> 3
 guccugaaug cucuuucgca u 21

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA of amiRNA3

<400> 4
 ccaaagtggt catctttgtc a 21

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA of amiRNA4

<400> 5
 caggacttac gagaaagcgt a 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NK1R forward primer

<400> 6
ctccaccaac acttctgagt c 21

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NK1R reverse primer

<400> 7
tcaccactgt attgaatgca gc 22