



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년03월17일
 (11) 등록번호 10-1374585
 (24) 등록일자 2014년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/63* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0046540
 (22) 출원일자 2012년05월02일
 심사청구일자 2012년05월02일
 (65) 공개번호 10-2013-0123244
 (43) 공개일자 2013년11월12일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020050050111 A
 Lung Cancer, Vol. 68(1), pp. 27-38 (2010. 4.)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)
 (72) 발명자
송재진
 서울특별시 서대문구 성산로 250 연세대 의과대학 암연구소 러들로 교수동 330
김주향
 서울 양천구 목동동로 339, C동 1207호 (목동, 목동트윈빌)
강수진
 서울시 서대문구 연세로 50 연세의료원 암센터 4층 암연구소
 (74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 조영균

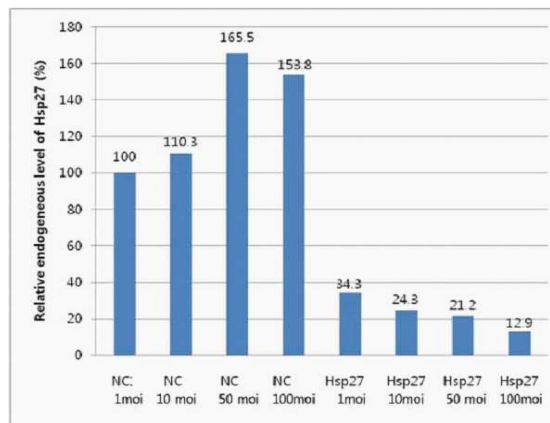
(54) 발명의 명칭 **HSP 27 발현을 억제하는 s h RNA**

(57) 요약

본 발명은 HSP27 발현을 억제하는 shRNA에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, HSP27 발현을 억제하는 shRNA를 이용한 항종양 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2011-0004516
부처명 교육과학기술부
연구사업명 일반연구자지원사업
연구과제명 siRNA 핵산소재에 의한 multi-targets gene silencing으로 TRAIL 암세포 살상효과 증진 및
획득내성 극복
기여율 1/1
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 표적서열로 하고, 서열번호 2로 표시되는 HSP27 발현을 억제하는 shRNA.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항의 shRNA를 유효성분으로 함유하는 항종양 조성물.

청구항 4

제 1 항의 shRNA 발현하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

서열번호 3으로 표시되는 탑 스트랜드(top strand)와, 서열번호 4로 표시되는 바텀 스트랜드(bottom strand)를 포함하는 DNA를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

U6 프로모터를 함유하는 벡터에 DNA를 재조합시켜 수득하는 재조합 발현벡터.

청구항 7

제 4 항에 있어서,

서열번호 7로 표시되는 pSP72 Δ E3-U6-shHSP27 인 재조합 발현벡터.

청구항 8

제 4 항의 재조합 발현벡터를 유효성분으로 하는 항종양 조성물.

청구항 9

제 4 항의 재조합 발현벡터를 도입한 아데노바이러스.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 HSP27 발현을 억제하는 shRNA 및 이를 포함하는 항종양 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] HSP27(heat shock protein 27)은 800 kD에 이를 정도로 큰 올리고머를 형성하는 인산화 단백질로 항상열 특성과 샤프론 분자(molecular chaperones) 기능을 가지며, 열 충격(heat shock)과 산화적 스트레스(oxidative stress)로부터 세포를 보호하는 small HSPs의 하나이다. Small HSPs(monomer의 크기가 15-42 kD 범위의 HSP를 지칭)는 올리고머의 크기가 클 때 샤프론 분자의 역할을 하며, 풀린 단백질들이 비가역적으로 뭉치는 것을 억제하고 HSP70과 ATP 등과 협력하여 풀린 단백질들이 다시 활성을 가지는 접힌 단백질로 되게 한다. 또한, 포유류의 sHSPs는 세포외의 다양한 스트레스에 대하여 p38의 기질인 MAPK(mitogen-activated protein kinase)-activated protein kinase 2를 통하여 매우 신속히 인산화됨. HSP27의 경우 인산화가 유도되면 올리고머의 크기가 70 kD에서 250 kD사이로 감소하며, 샤프론 기능이 감소하고 대신 산화적 스트레스에 대한 저항성이 증가한다. 저분자 열충격단백질은 약 32개의 subunit가 모여 약 800 kDa의 올리고머 단백질(oligomeric protein)을 형성하는 것으로 알려졌다. 저분자 열충격 단백질은 공통적으로 C-말단(C terminal region)에 α-크리스탈린(α-crystallin) 영역을 갖는 특징이 있음. 저분자 열충격 단백질 중 HSP27과 αBcrystallin(αBC)은 열충격 조건에서 단백질 접기(protein folding)에 관여하여 단백질의 응집(agggregation)을 막고 구조의 안정성을 유지해주는 샤프론 분자(molecular chaperone)의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 파킨슨병(Parkinson' disease), 알츠하이머병(Alzheimer' disease) 및 다발성경화증(multiple sclerosis) 등 주요 신경계 질환에서도 저분자 열충격 단백질이 밀접히 연관되어 있음이 보고되고 있다.

[0003] 또한, HSP27은 전립선암, 유방암, 위암, 난소암, 방광암 등 많은 악성 종양세포에서 과대 발현되어 있으며, 억제내성이나 세포사멸을 직접적으로 방해하는 등 기능적으로 종양 형성 및 암의 치료 내성과 연관되어 있다. HSP27은 자신을 억제하면 암세포의 생존과 저항성에 관여하는 매우 다양한 경로에 영향을 미치기 때문에 매력적인 치료 표적이 될 수 있다. 비수용체 티로신 카이네이제(non-receptor tyrosine kinase)인 Src가 활성화되면 전사인자인 STAT3를 활성화시킨다. STAT3는 세포증식, 혈관생성촉진, 세포사멸 억제, 암세포의 이동과 침윤, 전이 등에 관여할 뿐 아니라, 종양세포가 STAT3를 생성함으로써 면역세포의 면역억제에 관여하는 요소들을 생산하는 것을 촉진시킨다. 활성화된 STAT3는 HSP27의 유전자 발현을 증가시키며, 반대로 HSP27을 억제시키면 STAT3의 레벨도 감소되며 이의 downstream molecule인 c-fos 등도 감소시킨다. 따라서, HSP27을 효과적으로 억제하는 것이 종양 형성, 형성된 종양의 전이 및 면역 억제 극복에 작용할 것이라 기대하고 있다.

[0004] HSP27 관련 선행 연구로, 비특허문헌 1에는 DNA type의 OGX-427 (5'-GGGACGCGCGCTCGGCAT-3'와 siRNA 형태 (5'-GUCUCAUCGGAUUUUGCAGC-3'로 트랜스펙션 시 세포사멸이 증가되고 세포성장을 감소시키며 Paclitaxel에 대한 약제민감성을 증가시킨다고 보고된 바 있다.

[0005] 비특허문헌 2에는 HSP27 siRNA duplex의 형태(sense: 5'- UGAGAGACUGCCCAAGUAA-3'; antisense: 5'-UUACUUGCGGCAGUCUCAUU-3')로 합성되어 리포펙타민(Lipofectamine)으로 같이 트랜스펙션되었고, 두경부 편평상피암세포(head and neck squamous cancer cell)에서 전이되는 것이 감소되는 것을 확인하였으나, siRNA를 트랜스펙션하는 것은 in vitro에서는 가능하나 in vivo에서는 쉽게 분해되어 전달(delivery)면에서 문제가 있기 때문에 직접 사용하기에는 불가능하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) HSP27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells (Mol Cancer Ther 6: 299-308, 2007 by Kamada et al)

(비특허문헌 0002) Silencing heat shock protein 27 (HSP27) decreases metastatic behavior of human head and neck squamous cell cancer cells in vitro (Mol Pharm. 2010 August 2; 7(4): 1283-1290 by Zhu et al)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구 노력한 결과, HSP27의 침묵(silencing)을 효과적으로 유도하는 타겟을 선정하여 shRNA를 제작하고, 이를 아데노바이러스에 탑재시켜 기존 비바이러스성 체제에 의한 siRNA의 전달능력을 획기적으로 개선시킴으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서, 본 발명은 서열번호 1 로 표시되는 염기서열을 표적서열로 하고, HSP27 발현을 억제하는 shRNA를 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0009] 본 발명은 또한, 상기 shRNA를 유효성분으로 함유하는 항종양 조성물을 제공하는데 다른 목적이 있다.
- [0010] 본 발명은 또한, 상기 shRNA 발현하는 재조합 발현백터를 제공하는데 또 다른 목적이 있다.
- [0011] 본 발명은 또한, 상기 재조합 발현백터를 유효성분으로 하는 항종양 조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 재조합 발현백터가 도입된 아데노바이러스를 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서,
- [0014] 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열을 표적서열로 하고, HSP27 발현을 억제하는 shRNA를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서,
- [0016] 상기 shRNA를 유효성분으로 함유하는 항종양 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서,
- [0018] 상기 shRNA 발현용 재조합 발현백터를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서,
- [0020] 상기 재조합 발현백터를 유효성분으로 포함하는 항종양 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서,
- [0022] 상기 재조합 발현백터가 도입된 아데노바이러스를 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명은 HSP27 발현을 억제하는 새로운 shRNA를 제작하고, 유전자 전달체로 아데노바이러스를 사용하여 감염율을 증가시킴으로써 종래 기술에 비해 특이성, 전달능 및 발현억제능을 크게 향상시켰다.
- [0024] 본 발명에 따른 HSP27 발현을 억제하는 shRNA는 종양 생존, 전이, 면역 억제를 감소시켜 우수한 항종양 효과를 나타낸다.
- [0025] 본 발명의 shRNA를 아데노바이러스에 탑재시켜 종양에 직접 투여하여 항암 효과를 확인하였고, 아데노바이러스는 렌티바이러스와는 달리 염색체에 인테그레이션(integration)되지 않고 암 조직이 있을 때에만 효과를 발휘하므로 부작용이 없는 장점이 있다. 특히, 대부분의 암세포에서 전달효율성이 뛰어난 아데노바이러스에 표적성을

부여함으로써 모든 암에 적용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 E3 서플 벡터인 pSP72/△E3/si-negative 벡터를 나타낸 것이다.
- 도 2는 HSP27 shRNA가 서플 벡터로 서브클로닝(subcloning)된 후 아데노바이러스 백본인 d1324와 상동 재조합하는 과정의 모식도이다.
- 도 3은 도입하고자 하는 gene of interest가 포함된 서플 벡터와 백본과의 상동재조합으로 바이러스생성을 모식화한 것이다.
- 도 4는 실제로 재조합이 용이한 박테리아에서 상동 재조합된 콜로니의 선별을 위하여, 아데노바이러스의 E1, E3 부위 PCR 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 HindIII 소화 패턴(digestion pattern)으로 최종 재조합된 콜로니를 선별 확인한 것이다[C: d1324-IX, 1: 도 4의 샘플 6, 2: 도 4의 샘플 7].
- 도 6은 상동재조합된 아데노바이러스 genomic DNA의 트랜스팩션 가능 여부를 확인하는 PacI 절단 후 fragment DNA가 출현하는 결과를 나타낸 것이다[C: d1324-IX, 1: 도 4의 샘플 6, 2: 도 4의 샘플 7].
- 도 7은 원하는 HSP27의 shRNA 유전자가 정확히 들어갔는지 확인하기 위한 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명의 인간 HSP27 shRNA 발현하는 아데노바이러스에 의한 HSP27 발현 억제능을 실시간-PCR로 확인한 것이다.
- 도 9는 HSP27 shRNA를 발현하는 아데노바이러스를 감염시켜 암세포 내 HSP27 발현량을 감소시켰을 때 세포생존능의 감소 및 세포사멸 효과가 증대되는 결과를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] RNA 간섭(RNA interference, RNAi)은 표적 유전자의 발현을 선택적으로 억제하는 천연의 매커니즘이다. 서열 특이적 mRNA 분해의 매개자는 보다 긴 ds RNA로부터 리보뉴클레아제 III의 절단에 의해 생산된 19~23 뉴클레오타이드의 작은 간섭 RNA이다. 세포질의 RISC(RNA-induced silencing complex)는 siRNA에 결합하고 그 siRNA 중 한 가닥에 상보적인 서열을 포함하는 mRNA의 분해를 지시한다. 포유동물에서 RNA 간섭의 적용은 치료 유전자 침묵(silencing)의 효능을 가지고 있다. siRNA의 장점에도 불구하고 siRNA는 시험관내에서 제조되어야 하고 녹다운 유전자를 통상적으로 6 내지 10일 동안 일시적 형질감염에 의해 전달되어야 한다는 점에서 임상에 적용하는데 제한을 가지고 있다. 본 발명의 shRNA(small-hairpin RNA) 발현 시스템이 전술된 단점을 해결할 수 있다.
- [0028] shRNA는 1본쇄 RNA에서 부분적으로 회문상(回文狀)의 염기서열을 포함함으로써, 분자 내에서 2본쇄 구조를 가지고 헤어핀과 같은 구조가 되는 약 20염기 이상의 분자이다.
- [0029] 본 발명은 HSP27 발현을 억제하는 shRNA에 관한 것으로, 하기 서열을 표적서열로 하는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 인간 표적서열: 5'-GACGAGCATGGCTACATCTCCCGGT-3' [서열번호 1]
- [0031] 본 발명에서 HSP27 발현을 억제하는 shRNA는 HSP27 유전자의 일부에 상보적인 서열을 가지고, HSP27 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있다. 상보성이 80~90%인 경우에는 mRNA의 번역을 억제할 수 있고, 100%인 경우에는 mRNA를 분해시킬 수 있다.
- [0032] 따라서, 본 발명에서 HSP27 발현을 억제하는 shRNA는 인간 mRNA의 385~409 번째 뉴클레오타이드에 대한 상보적인 서열에 대하여 100% 상동성을 갖는 염기서열을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0033] 한 양태로서, 마우스 shRNA는 서열번호 3에 나타난 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지고, 인간 shRNA는 서열번호 2에 나타난 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어질 수 있다. 상기 각각의 염기서열과 그의 상보적인 염기서열은 4 내지 10 bp의 루프 영역에 의해 회문적으로(palindrome) 연결되어 헤어핀 구조를 형성하는 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 shRNA의 구체적인 예로는 하기 서열을 포함할 수 있다:

- [0035] 서열번호 1의 인간 표적서열을 위한 shRNA: 5'-gatcc gacgagcatggctacatctcccggg tctc accgggagatgtagccatgctcgtc tttttt a -3' [서열번호 2].
- [0036] RNAi에 의해 HSP27의 발현을 억제하는 물질로서는, 3'말단에 돌출부를 가지는 짧은 헤어핀 구조로 구성된 shRNA(short hairpin RNA)를 사용할 수도 있다.
- [0037] RNAi에 의해 HSP27의 발현을 억제하는 물질은, 인공적으로 화학 합성하여도 좋고, 센스가닥 및 안티센스 가닥의 DNA 서열을 역방향으로 연결한 헤어핀 구조의 DNA를 T7 RNA 폴리머라제에 의해 실험실 조건(in vitro)에서 RNA를 합성하여 제작하여도 무방하다. 실험실 조건에서 합성하는 경우, T7 RNA 폴리머라제 및 T7 프로모터를 이용하여, 주형 DNA로부터 안티센스 및 센스 RNA를 합성할 수 있다. 이들을 실험실 조건에서 어닐링한 후, 세포에 도입하면 RNAi가 유발되어, HSP27의 발현이 억제된다. 세포에의 도입은 예를 들면, 인산칼슘법, 또는 각종 트랜스펙션 시약(예를 들면, oligofectamine, lipofectamine, 및 lipofection 등)을 이용한 방법에 의해 행할 수 있다.
- [0038] RNAi에 의해 HSP27의 발현을 억제하는 물질로서는, shRNA 또는 상기 DNA을 포함하는 발현백터를 이용하여도 좋고, 상기 발현백터를 함유하는 세포를 이용하여도 좋다. 상기 발현백터나 세포의 종류는 특별히 한정되지 않으나, 이미 의약으로서 사용되고 있는 발현백터나 세포가 바람직하다.
- [0039] 본 발명에서는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 표적서열로 하는 shRNA를 이용할 수 있다.
- [0040] 따라서, 본 발명은 상기 shRNA 발현용 재조합 발현백터를 포함한다.
- [0041] 본 발명의 재조합 백터는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 구성될 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 shRNA를 전달하기에 유용한 바이러스 (또는 바이러스 백터)로는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노부속바이러스 등이 있으며, 종양에서와 같이 한시적인 발현 유도가 필요한 이유로 아데노바이러스가 바람직하다.
- [0043] 아데노바이러스에 상기 shRNA를 도입하기 위하여, shRNA 서열을 근거로 하여 하기 DNA를 제작할 수 있다.
- [0044] <인간 표적서열에 대한 DNA>
- [0045] 탑 스트랜드: 5'-gatcc gacgagcatggctacatctcccggg tctc accgggagatgtagccatgctcgtc tttttt a-3' [서열번호 3]
- [0046] 바텀 스트랜드: 5'-agctt aaaa gacgagcatggctacatctcccggg gaga accgggagatgtagccatgctcgtc g-3' [서열번호 4]
- [0047] 또한, 본 발명에서 shRNA를 전달하기에 유용한 비바이러스 백터로는 전술한 바이러스 백터를 제외한 통상적으로 유전자 요법에 사용되는 모든 백터를 의미하며, 그러한 예로는 진핵세포에서 발현 가능한 다양한 플라스미드 및 리포솜 등이 있다.
- [0048] 한편, 본 발명에서 HSP27 발현을 억제하는 shRNA는 전달된 세포에서 적절히 전사되기 위하여 적어도 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 것이 바람직하다. 상기 프로모터는 진핵세포에서 기능할 수 있는 프로모터라면 어떤 것이든 무방하나, U6 프로모터가 RNA 중합효소 III로서 small size RNA를 생성하는데 유리한 이유로 특히 바람직하다. HSP27 발현을 억제하는 shRNA의 효율적인 전사를 위하여 필요에 따라 리더 서열, 폴리아데닐화 서열, 프로모터, 인핸서(enhancer), 업스트림(upstream) 활성화 서열, 시그널 펩타이드 서열 및 전사 종결인자를 비롯한 조절서열을 추가로 포함할 수도 있다.
- [0049] 여기서, 이용된 용어 "작동 가능하게 연결된"이란 핵산 서열간의 결합이 기능적으로 연관되어 있는 것을 의미한다. 임의의 핵산서열이 작동 가능하게 연결된 경우는 임의의 핵산서열이 다른 핵산서열과 기능적으로 관련성을 가지도록 위치해 있는 경우이다. 본 발명에 있어서, 임의의 전사 조절서열이 shRNA의 전사에 영향을 미치는 경우, 상기 전사 조절서열이 상기 shRNA와 작동 가능하게 연결되어 있다고 말한다.
- [0050] 또한, 본 발명은 상기 서열번호 1의 HSP27 발현을 억제하는 shRNA, 서열번호 3로 표시되는 탑 스트랜드(top strand)와, 서열번호 4로 표시되는 바텀 스트랜드(bottom strand)를 포함하는 DNA 또는 이를 발현하는 재조합 발현백터를 유효성분으로 포함하는 항종양 조성물에 관한 것이다.

- [0051] 본 발명의 항종양 조성물의 투여경로는 특별히 한정되지 않고, 경구 투여 또는 비경구 투여(예를 들면, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 점막 투여, 직장내 투여, 질내 투여, 환자에의 국소 투여, 피부투여 등)의 어느 하나의 투여경로에 의해 투여하여도 좋다. 경구 투여에 적당한 제제형태로서는 고형 또는 액체의 형태가 가능하고, 비경구 투여의 적당한 제제 형태로서는 주사제, 점적제, 좌제, 외용제, 점안제, 점비제 등의 형태가 가능하다. 본 발명의 항종양 조성물은 그 제제형태에 의해, 필요에 따라 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 함유하여도 좋다. 약학적으로 허용 가능한 첨가제의 구체적인 예로서는, 예를 들면, 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 항산화제, 보존제, 안정화제, 등장화제, 착색제, 교미제, 희석제, 유화제, 현탁화제, 용매, 충전제, 증량제, 완충제, 송달 담체, 캐리어, 부형제 및/또는 약학적 어쥬벳트 등을 들 수 있다.
- [0052] 경구용 고형제제 형태의 본 발명의 항종양 조성물로서는, 예를 들면, 유효성분에 부형제를 가하고, 아울러, 필요에 따라서, 결합제, 붕해제, 활택제, 착색제 또는 교미제 등의 제제용 첨가물을 가한 후, 통상의 방법에 따라, 정제, 과립제, 산제, 캡슐제로서 조제할 수 있다. 경구용 액체 제제형태의 본 발명의 항종양 조성물로서는, 유효성분에, 교미제, 안정화제, 또는 보존제 등의 제제용 첨가물 1종 또는 2종 이상을 가하고, 통상의 방법에 따라, 내복액제, 시럽제, 엘릭실제 등으로서 조제할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 항종양 조성물을 액체 제제로서 처방하기 위하여 사용되는 용매로서는, 수성 또는 비수성의 어느 것도 무방하다. 액체제제는 당해 분야에 주지된 방법에 의해 조제할 수 있다. 예를 들면, 주사제는 생리식염수, PBS와 같은 완충액, 멸균수 등의 용제에 용해시킨 후, 여과지 등으로 여과멸균하고, 이어서 멸균용기(예를 들면, 앰플 등)에 충전하여 조제할 수 있다. 이 주사제에는 필요에 따라, 관용의 약학적 캐리어를 포함하여도 무방하다.
- [0054] 또한, 비침습적인 카테터를 이용하는 투여방법을 사용하여도 좋다. 본 발명에서 사용할 수 있는 캐리어로서는, 중성, 완충화 생리식염수, 또는 혈청알부민을 포함하는 생리식염수 등을 들 수 있다.
- [0055] HSP27 발현을 억제하는 shRNA 발현벡터 등 유전자 송달에 관해서는, 적용되는 세포 내에서 HSP27 발현을 억제하는 shRNA 또는 shRNA 발현벡터를 발현시키는 한, 특별히 방법은 한정되지 않으나, 예를 들면, 바이러스 벡터, 리포솜을 이용한 유전자 도입을 이용하는 것이 가능하다. 바이러스 벡터로서는, 예를 들면, 레트로바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 신린샘리키 바이러스 등의 동물바이러스를 들 수 있다.
- [0056] RNAi에 의해 HSP27 발현을 억제하는 물질은 세포에 직접 주입하여도 무방하다.
- [0057] 본 발명의 항종양 조성물의 유효성분은 치료학적 유효량으로 사용하며, 상기 조성물의 투여량은 사용 목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들면, 유효성분으로서 성인 1 kg 당 약 1×10^{10} particles 내지 1×10^{12} particles 이다. 본 발명의 항종양 조성물의 투여빈도는, 예를 들면, 1일 1회 내지 수개월에 1회이면 좋다.
- [0058] 본 발명의 shRNA는 HSP27 발현을 억제하므로, 본 발명의 약제학적 조성물은 종양과 관련된 다양한 질병 또는 질환, 예컨대 뇌암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 식도암, 췌장암, 방광암, 전립선암, 대장암, 결장암 및 자궁경부암 등의 치료에 이용될 수 있다. 본 명세서에서 용어 “치료”는 (i) 종양 세포 형성의 예방; (ii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 억제; 및 (iii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 경감을 의미한다. 따라서, 본 명세서에서 용어 “치료학적 유효량”은 상기한 약리학적 효과를 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0059] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0060] **실시예 1: shRNA 제조-HSP27의 침묵(silencing)을 효과적으로 유도하는 타겟 선정**
- [0061] 본 발명은 HSP27의 침묵(silencing)을 유도하기 위하여, 센스 25 mer/안티센스 25 mer(4 개 염기를 가지는 루프를 가운데에 포함)에 근거한 shRNA를 제작하고 아데노바이러스에서 발현시키기 위해 서플벡터에 도입하고 상동 재조합(homologous recombination) 바이러스를 제작하였다.
- [0062] shRNA HSP27의 특이성 검증을 위하여, 스크램블드(scrambled) shRNA를 가지는 서플벡터도 동시에 제작하였다. 종래 방법에 비하여 특이성과 발현억제능이 크게 향상되었다.

- [0063] 이를 위해, HSP27의 shRNA 최소 10 nM에서 인간의 HSP27 mRNA를 80% 이상 억제하는 효과가 있는 siRNA를 실시간 PCR 방법을 통해 확보하였다.
- [0064] 이를 위해 인간의 siRNA는 자궁경부암세포인 HeLa 세포주를 사용하여 shRNA를 만든 다음, 트랜스펙션시키고 24 시간이 지난 후 감소되는 정도를 조사하였다.
- [0065] 실험방법은 다음과 같다.
- [0066] 실시간 RT-PCR로 여러 가지 종류의 후보 shRNA 10nM을 30% B16F10 에 트랜스펙션하고 24시간 배양 후, 확인(validation)을 통하여 인간 HSP27에 대해 5개의 shRNA 스크리닝 결과 타겟에 해당되는 shRNA에서 82.68% 침묵(silencing) 효과를 확인하였다.
- [0067] 실시간 RT-PCR을 위하여, 정방향 프라이머로는 5'-CTACATCTCCCGGTGCTCA-3' [서열번호 5]과 역방향 프라이머로는 5'-GGATGGTATCTCGTTGGAC-3' [서열번호 6]이며, 반응조건은 다음과 같이 수행하였다.
- [0068] 1 단계: 역전사(42 °C 5 min, 95 °C 10 sec),
- [0069] 2 단계: PCR 반응 (95 °C 5 sec, 60 °C 20 sec) 50 cycles,
- [0070] 3 단계: 분리(60 °C → 95 °C)로 수행하였다.
- [0071] 확인(validation) 실험 결과, 5개의 표적서열 후보 중 표 1에 근거하여 하기 타겟을 선정하였다.
- [0072] 인간 표적서열: 5'-GACGAGCATGGCTACATCTCCCGGT-3' [서열번호 1]: 하기 표 1의 HSP27 #3

표 1

HSP27 shRNA 10nM in 20% Hela and validation in 24hr						
sh RNA	primer	ct	△ct	△△ct	2-△△ct	Reduction(%)
Dicer	actin	18.8				
	Vim	20.75	1.95			
	HSP27	18.35	-0.45			
Vim	actin	18.96				
	Vim	24.26	5.3	3.35	0.09807301	90.19269878
HSP27 #1	actin	18.27				
	HSP27	18.43	0.16	0.61	0.6551967	34.48032981
HSP27 #2	actin	18.56				
	HSP27	19.12	0.56	1.01	0.49654625	50.34537523
HSP27 #3	actin	17.74				
	HSP27	19.82	2.08	2.53	0.17313868	82.68613165
HSP27 #4	actin	17.92				
	HSP27	18.54	0.62	1.07	0.476319	52.3681001
HSP27 #5	actin	17.83				
	HSP27	18.68	0.85	1.3	0.4061262	59.38738018

- [0073]
- [0074] 주) ct: cycle threshold, saturation에 도달되는데 걸리는 cycle 수, 작을수록 원래 mRNA양이 많은 것임.
- [0075] Δct: HSP27용 ct에서 actin용 ct를 뺀 값,
- [0076] Δ Δ ct: HSP27 shRNA 처리 샘플의 Δ ct에서 대조군의 HSP27 Δ ct를 뺀 값.
- [0077] 2- Δ Δ ct: 2의 마이너스 지수 Δ Δ ct 값.

- [0078] 발현억제율은 2- $\Delta\Delta$ ct 를 백분율로 표시한 것임
- [0079] 상기 표적서열에 대하여 25/25 +4 루프를 가지는 shRNA를 합성하고 이들의 표적서열에 대한 억제 효과를 실시간 PCR로 확인하였다.
- [0080] 인간 표적서열(서열번호 1)로 하는 shRNA: 5'-gatcc gacgagcatggctacatctcccgt tctc accgggagatgtagccatgctcgtc tttttt a -3' [서열번호 2]
- [0081] 앞서 설명한 실시간 PCR 에 의해 선정된 서열번호 2의 염기서열을 아데노바이러스에서 발현시키기 위해 양 끝에 BamHI과 HindIII 염기 사이트를 삽입하고 중간에 tctc의 4개의 염기를 가지는 루프(loop)를 가지게끔 제작하였다. 즉, 인간 shRNA의 기본적인 구조는 5'-25 mer-루프(4 mer)-25mer-3'으로 구성되어 있다.
- [0082] 이에 근거하여 아데노바이러스에 도입시키기 위한 하기 2가닥의 DNA 스트랜드(strand)를 제작하여 shRNA 생성을 유도하였다.
- [0083] 탑 스트랜드: 5'-gatcc gacgagcatggctacatctcccgt tctc accgggagatgtagccatgctcgtc tttttt a-3' [서열번호 3]
- [0084] 바텀 스트랜드: 5'-agctt aaaa gacgagcatggctacatctcccgt gaga accgggagatgtagccatgctcgtc g - 3' [서열번호 4]
- [0085] **실시예 2: 타겟 서열에 대한 shRNA 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 벡터 제작**
- [0086] 실시간 RT-PCR을 통하여 확인된 가장 효과적으로 발현을 억제하는 shRNA 염기서열을 센스와 안티센스 서열 tctc 혹은 tctctc를 사이에 두고 위치하게 하고, 양 끝에 BamHI과 HindIII 제한효소 염기서열을 가진 염기로 구성된 올리고뉴클레오티드와 상보적인 올리고뉴클레오티드를 각각 합성하여 합체(annealing)시킨 뒤, E3 서플 벡터인 pSP72/ Δ E3/si-negative 벡터[도 2, pSP72 cloning 벡터(Promega)에 아데노바이러스 E3L(26591-28588)과 E3R(30504-31057)을 삽입한 플라스미드에 Ambion사의 psilencer 2.1-U6 hygro 중에서 -EcoRI-U6 promoter + -BamHI-nonsense shRNA용 염기서열인 ggatcc actaccgttg ttataggtgt tcaagagaca cctataacaacggtagtttt ttggaaaagctt-HindIII가 들어간 형태의 pSP72/ Δ E3/si negative(scrambled)]를 먼저 BamHI과 HindIII 처리 후, 상기의 합체된 BamHI과 HindIII가 양끝에 노출된 HSP27 shRNA를 삽입시켜 pSP72 Δ E3-sh-human HSP27 [서열번호 7]을 제작하였다[도 2]. 음성 대조군 아데노바이러스로는 양끝에 BamHI과 HindIII를 가지게 하고 스크램블드(scrambled) 염기서열(actaccgttgttataggtgt)과 loop(ttcaagaga) 제작하였다.
- [0087] 상동 재조합을 위하여 d1324-IX은 enzyme Spe I으로 자르고, 인간 shHSP27 (sequence : 5'-gatcc gacgagcatggctacatctcccgt tctc accgggagatgtagccatgctcgtc tttttt a-3')이 삽입되어 있는 pSP72 Δ E3-U6-sh-human Hsp27 서플 벡터는 제한효소 Xmn I으로 절단하였다. 이제 상동 재조합을 진행하기 위해 각각의 효소로 cutting되어 있는 플라스미드를 d1324-IX : pSP72 Δ E3-U6-shHsp27 = 200ng : 500ng 의 비율로 상동 재조합용 competent cell인 대장균 BJ5183에 형질전환을 진행하였다.
- [0088] (복제 가능 아데노바이러스에 shRNA를 제작하는 경우에는 shRNA에 의한 억제 효과와 세포 lysis 효과가 혼재되어 있어 억제 효과만을 명확하게 확인하기 어렵기 때문에 복제 불능 아데노바이러스를 제작하였다).
- [0089] 제대로 상동 재조합이 되었는지를 확인하는 방법은 E1, E3 부분을 PCR하여 분별하는 것이다[도 3]. shHsp27(shRNA-human Hsp27)은 E3 서플 벡터에 제작하였고, E3 부분으로 Homologous를 진행하였기 때문에 E1 부분은 d1324-IX의 band와 같아야 하고, E3 부분은 pSP72 Δ E3-U6-sh-human Hsp27의 밴드와 같아야 한다. 그렇기 때문에 도 3에서 2, 6, 7, 11번의 샘플이 되었다고 가정하고 다음 단계로 넘어갈 수 있다. 콜로니 PCR로 분별한 것을 다시 접종(inoculation)한 뒤 DNA를 추출하였다. 대장균 BJ5183에서는 DNA를 추출하여도 농도가 매우 낮기 때문에 대장균 DH5 α 로 다시 형질전환한 뒤 다시 패턴을 확인하였다.
- [0090] 접종한 뒤 DNA를 추출한 후 HindIII와 PacI의 패턴을 확인하였다. 아데노바이러스의 E1과 E3 부위 PCR로 양성 클론(#2, 6, 7, 11)만을 선별한 후[도 3], 도 3에 보듯이 HindIII 소화 패턴(digestion pattern)으로 최종 재조합체를 선별하였다.
- [0091] HindIII 상동 재조합이 되었다고 가정한 샘플(이때, 샘플 4개 모두 사용하지 않고 2개만 함. 그 이유는 BJ5183에

서 *Hind*III cutting을 하였을 때 4개 모두 positive pattern이나 #2, #11은 희미하게 패턴이 나타나 뚜렷하게 보이는 #6과 #7번만 전기 영동함. 도 5의 #1은 PCR할 때의 샘플 6, #2는 PCR할 때의 샘플 7임)을 cutting하게 되면 밴드는 대조군(control)인 d1324-IX과 달리 2개의 밴드가 더 형성되는 것을 볼 수 있다[도 5]. 또한, *Pac*I 으로 cutting을 하면 대조군인 d1324-IX과 같이 하나의 밴드가 나온다. 이는 바이러스성 유전자인 d1324-IX을 암피실린(ampicillin)이 첨가되어 있는 배지에서 박테리아 세포(bacterial cell)에 형질전환하였을 때 자랄 수 있도록 플라스미드에 바이러스성 유전자를 삽입한 것이다. 상기 플라스미드는 바이러스성 유전자와 연결되어 있는 부위가 모두 *Pac*I 부위로 되어있기 때문에 *Pac*I으로 cutting하였을 때 하나의 밴드만 나온다. 이로서 상동 재조합된 것을 확인할 수 있다.

[0092] 상기와 같이 상동 재조합된 플라스미드 DNA를 수득하여 *Hind*III 제한효소로 처리하여 DNA 패턴의 변화를 확인하고 최종적으로 서열 분석하여 상동 재조합 유무를 확인한 후, 확인된 플라스미드들을 *Pac*I으로 절단한 뒤 293 세포주에 형질 전환하여 shRNA HSP27를 발현하는 복제불능 아데노바이러스를 제작하였다. 이 아데노바이러스는 293 세포주에서 증식시켜 CsCl 변화도(gradient)로 농축하여 한계 희석배양법(limiting dilution) 또는 용균반 검사(plaque assay)로 바이러스의 역가를 결정하였다.

[0093] 최종 바이러스 역가(virus titer)는 한계 희석 적정법(limiting dilution titration)에 의해 6.32×10^9 PFU/ml 이었다.

[0094] **실시예 3: 암세포에서의 효과 확인-shRNA 발현하는 아데노바이러스에 의한 HSP27 발현 억제 확인**

[0095] 1) 실시간 RT-PCR로 확인

[0096] HSP27 발현 억제 확인은 인간 전립선암 세포인 DU-145에 1 내지 100 moi로 감염시켜 2일 후, 트리졸(Trizol)로 세포를 라이시스(lysis)시키고, 클로로포름, 이소프로판올, 에탄올 등을 연속적으로 처리하여 RNA를 수확한 후 HSP27 mRNA 발현 억제 정도를 실시간 PCR로 확인하였다

[0097] 인간 HSP27 억제를 위한 실시간 PCR용 프라이머는 정방향 프라이머: 5'-CTACATCTCCCGGTGCTTCA-3' [서열번호 8]과 역방향 프라이머: 5'-GGATGGTGATCTCGTTGGAC-3' [서열번호 9]를 사용하였으며, AB powerSYBR Green RNA-to-Ct 1step kit를 사용하여 RT enzyme mix (125X) 0.2 μ l, RT-PCR Mix(2x) 12.5 μ l, Forward Primer(100 pM) 0.5 μ l, reverse Primer(100 pM) 0.5 μ l, RNA (10ng/ μ l) 5 μ l, Nuclease-free water 6.3 μ l로 총 부피는 25 μ l 가 되게 하였고, 반응 조건은 다음 표 2와 같다.

표 2

[0098]

Step	Temp(°C)	Duration	Cycles
RT step	48	30min	Hold
Enzyme Activation	95	10min	Hold
Denature	95	15sec	40
Anneal/Extend	60	1min	

[0099] 인간 HSP27의 shRNA를 확인한 결과, 1 moi의 아데노바이러스에서 약 66%의 침묵(silencing) 효과를 보이는 등, 50 moi의 아데노바이러스에서 80% 내외의 HSP27 발현 억제를 관찰하였다[표 3, 도 8].

표 3

[0100]

구분	발현억제율(%)	
	0 moi	발현억제율(%)
NC	0 moi	0
	1 moi	0
	10 moi	0
	50 moi	0
	100 moi	0
hHSP27 shRNA	0 moi	0
	1 moi	65.7
	10 moi	75.7
	50 moi	78.8
	100 moi	87.1

[0101] 주) NC: Scrambled shRNA sequence가 삽입된 아데노바이러스

[0102] 2) HSP27 발현 억제가 세포사멸과 세포생존에 미치는 영향

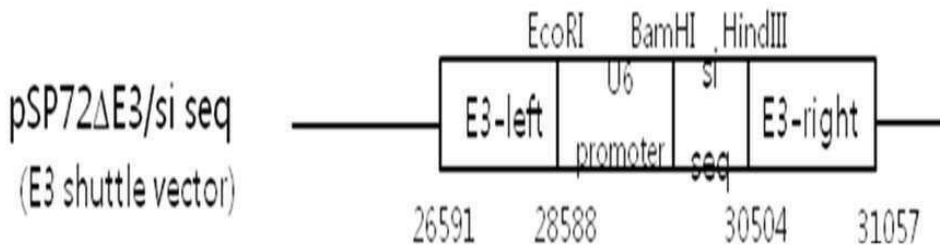
[0103] 암세포에서 HSP27의 발현 저하가 항암물질에 대한 민감도를 증가시키는지 알아보기 위하여, HSP27 shRNA를 발현하는 아데노바이러스를 감염시키고 TRAIL과 커큐민(curcumin)을 같이 복합 처리하였을 때 Akt의 인산화를 저하시키면서 PARP의 분할도 증가시켜 세포사멸을 더욱 증가시키는 것을 확인하였다[도 9].

[0104] 구체적인 실험과정은 다음과 같다. 대조군으로 nonsense shRNA를 발현하는 아데노바이러스와 shRNA HSP27을 발현하는 아데노바이러스를 암세포(DU-145 전립선암세포)에 10 moi로 감염시키고 48시간이 지난 후 암세포를 특이적으로 살상하는 사이토카인인 TRAIL과 천연 추출물 유래 화학감작제(chemosensitizer)인 커큐민 50 mM로 1시간 전처리하고 TRAIL(200 ng/ml)을 4시간 처리 후에 세포고사 마커인 PARP이나 세포생존 표지로 인산화된 Src 또는 인산화된 Akt의 수준을 웨스턴 블랏(Western blot)으로 측정하였다.

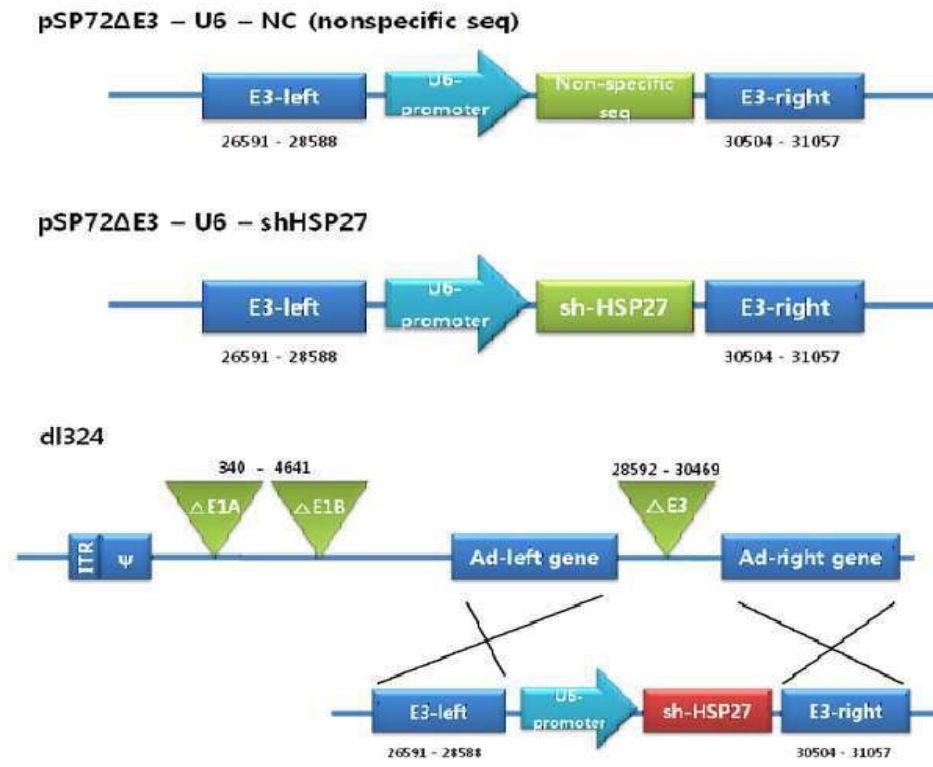
[0105] 이 실험결과는 HSP27 저하시 시간이 흐름에 따라 PARP의 잘려진 절편이 증가하고 인산화된 Src와 Akt가 감소하는 것은 세포의 사멸이 증가하고 생존능이 감소하게 됨을 의미하는 것이다.

도면

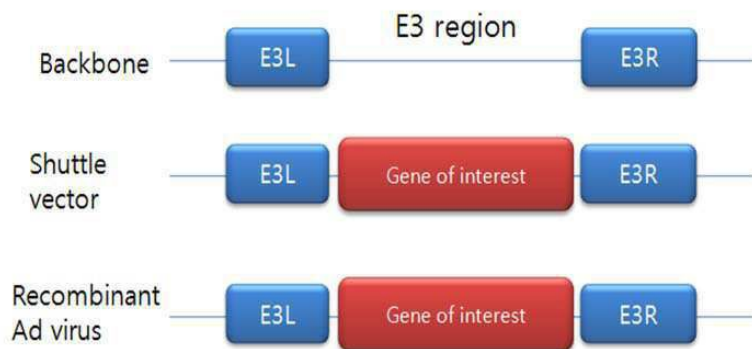
도면1



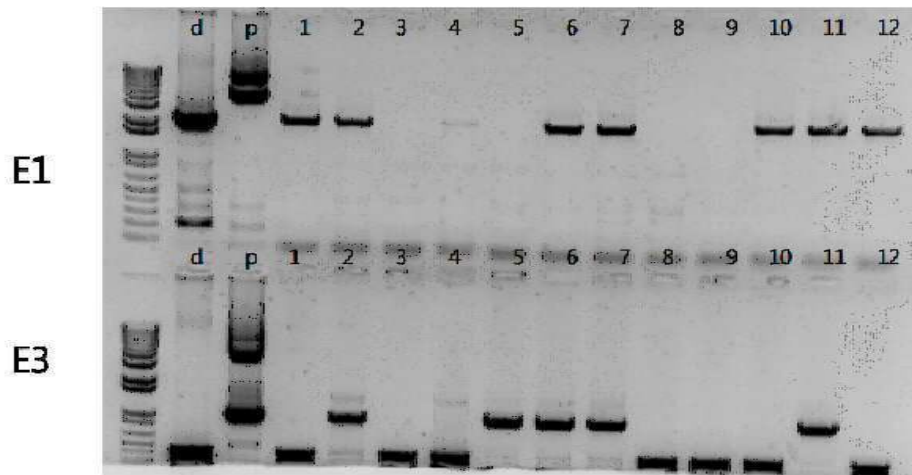
도면2



도면3

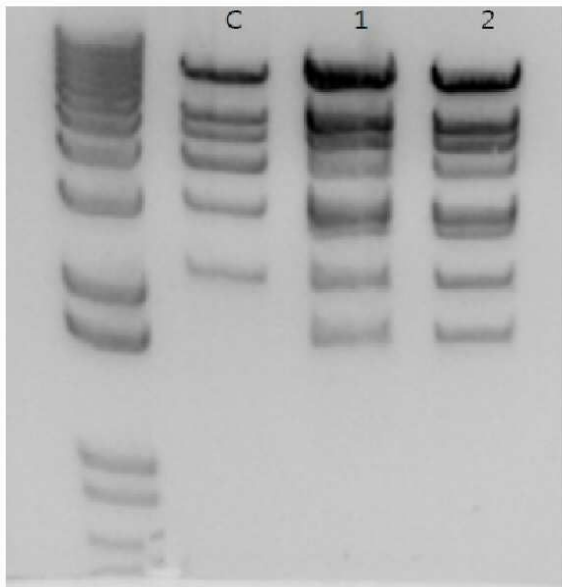


도면4

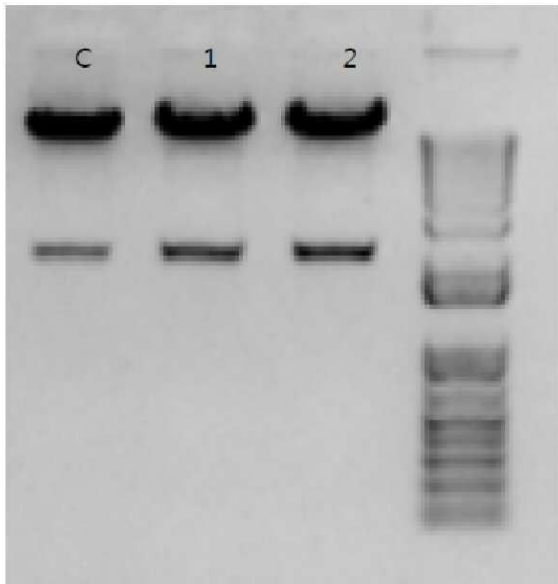


* d : d1324-IX, p : pSP72 Δ E3-U6-shHsp27, number : HR sample

도면5



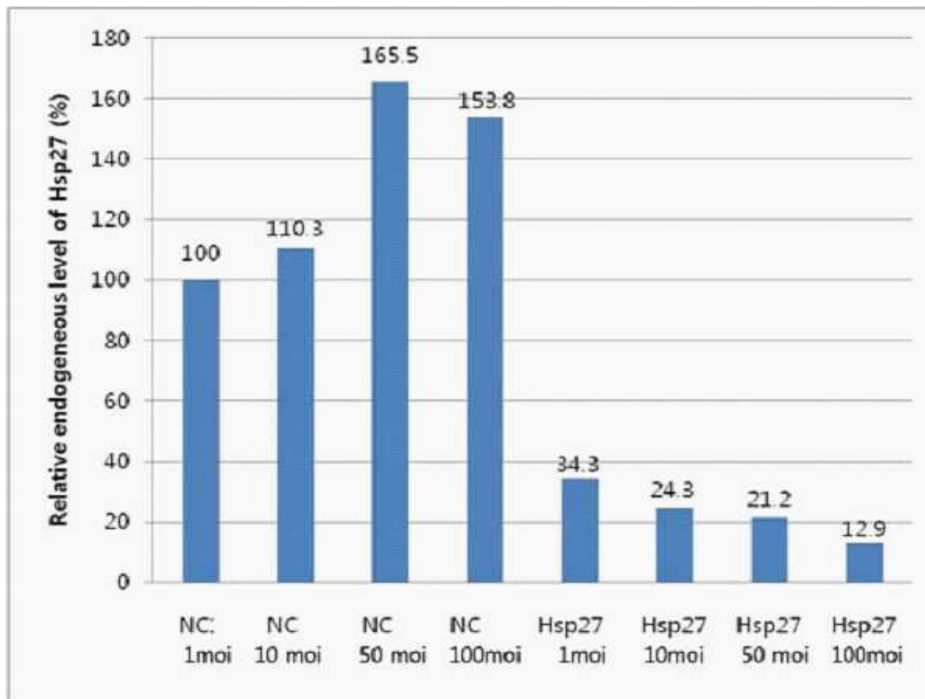
도면6



도면7

shHsp27 sequence	----- GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGATTTCCTGGGTTTATATACTTGTGGAAAGGACG
shHsp27 sequence	---GATCCGACGAGCATGGCTACATCTCCCGTTCTCACCGGGAGATGTAGCCATGCTCG CGGGATCCGACGAGCATGGCTACATCTCCCGTTCTCACCGGGAGATGTAGCCATGCTCG *****
shHsp27 sequence	TCTTTTTA----- TCTTTTTTAAAGCTTGTCCGACTTCGAGCAACTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTAC *****
shHsp27 sequence	----- AAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTTACAAAATAAAGCAITTTTTTCACTGCATTCTA

도면8



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)