



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월23일
(11) 등록번호 10-2182081
(24) 등록일자 2020년11월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0004562
- (22) 출원일자 2018년01월12일
심사청구일자 2019년01월04일
- (65) 공개번호 10-2019-0086252
- (43) 공개일자 2019년07월22일
- (56) 선행기술조사문헌
Nasu K, et al. Cancer Sci. 2017 Mar;
Vol.108(3): pp.435-443 (2017.03.31)
Leppilampi M, et al. Clin Cancer Res. 2002
Jul; Vol.8(7): pp.2240-5. (2002.07.31)
Demir C, et al. Asian Pac J Cancer Prev.
2010; Vol.11(1): pp.247-50. (2010.12.31)

- (73) 특허권자
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)
- (72) 발명자
정희용
경기도 성남시 분당구 예원로6번길 61, 나동 107호(분당동, 가람빌라)
장수화
서울특별시 송파구 마천로57길 16, 203호(마천동, 마천금호아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 정의준

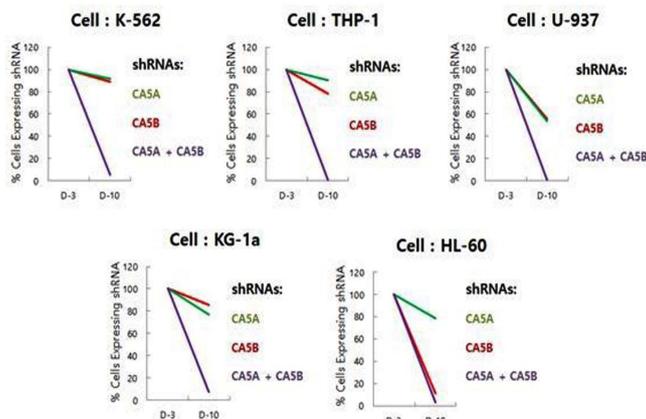
(54) 발명의 명칭 CA5A 및 CA5B의 발현 억제제를 포함하는, 백혈병 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 CA5A(carbonic anhydrase 5A)의 발현 억제제 및 CA5B(carbonic anhydrase 5B)의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 백혈병 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CA5A 및 CA5B의 발현 억제제는 다양한 백혈병 세포에 대하여 매우 우수한 세포사멸 유도 효과를 나타내며, 암세포의 분열 기작을 표적으로 하는 종래 항암제들과 달리 미토콘드리아의 대사 과정을 표적함으로써 기존 항암제들과 병용치료 시 높은 상승작용을 보임과 동시에 약제 내성 극복에도 매우 유리함을 알 수 있는바, 효과적이고 안전한 백혈병 치료제로 개발되어 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도6

Effect of CA5A and CA5B shRNA Expression on Human Leukemia Cell Survival *in vitro*



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61P 35/02 (2018.01)

(72) 발명자

박준순

서울특별시 마포구 월드컵로31길 77, 101동 410호
(망원동, 우림아파트)

이수재

서울특별시 중로구 경희궁길 57, 106동 206호(사직
동, 광화문풍림스페이스본)

명세서

청구범위

청구항 1

CA5A(carbonic anhydrase 5A)의 발현 억제제 및 CA5B(carbonic anhydrase 5B)의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 백혈병(leukemia) 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 발현 억제제는 각각 CA5A shRNA(short hairpin RNA) 및 CA5B shRNA(short hairpin RNA)인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CA5A shRNA는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CA5B shRNA는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 백혈병 세포의 사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 약리학적으로 허용 가능한 담체(carrier) 또는 보조제(additive)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 CA5A(carbonic anhydrase 5A)의 발현 억제제 및 CA5B(carbonic anhydrase 5B)의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 백혈병 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 백혈병(Leukemia)이란 혈액 세포 중 백혈구에 발생하는 암으로서, 비정상적인 백혈구(백혈병 세포)가 과도하게 증식하여 정상적인 백혈구와 적혈구, 혈소판의 생성이 억제되는 혈액암의 일종이다. 정상적인 백혈구 수가 감소하면 면역 저하를 일으켜 세균 감염에 의한 패혈증을 일으킬 수 있고, 적혈구가 감소되면 빈혈 증상이 유발되며

혈소판 감소는 출혈을 일으킨다. 또한, 과다 증식된 백혈병 세포 자체로 인해 고열, 피로감, 뼈의 통증, 설사, 의식저하, 호흡곤란, 및 출혈도 일으킬 수 있다. 백혈병은 세포의 분화 정도, 즉 악화 속도에 따라 급성과 만성으로 분류되고 세포의 기원에 따라 골수성과 림프구성으로 나뉘어진다. 2015년 백혈병 환자는 230만명으로 이중 353,500명의 환자가 사망한 것으로 집계되었으며, 아이들에게서 가장 흔하게 나타나는 암종으로 아이들에서는 급성 림프구성 백혈병이 3/4 이상을 차지한다고 보고된 바 있다. 그러나 백혈병 환자의 90%는 성인이며 주로 급성 골수성 백혈병(Acute myelogenous leukemia; AML) 및 만성 림프구성 백혈병(Chronic lymphocytic leukemia; CLL)이 발병하는 것으로 보고되어 있다.

[0003] 한편, 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)는 동식물, 일부 종의 세균, 효모 등에 널리 존재하며 이산화탄소와 물을 탄산수소 이온과 수소 이온으로 바꾸는 것을 촉매하는 효소로, 효소의 활성부위에 아연 이온을 가지고 있어 금속 효소(metalloenzyme)로 분류된다. 상기 효소는 동물의 적혈구에서는 CO₂ 수송에 작용하고 위산 분비에도 관여하며, 식물에서는 광합성에 관여한다고 알려져 있다. 포유동물에서 상기 효소는 최소 14가지의 아형이 존재한다고 보고되어 있다.

[0004] Carbonic anhydrase는 대사질환에 대한 치료제의 표적으로 알려져 있는데, 예컨대 녹내장 치료 및 이뇨제로 사용되고 있는 아세타졸아마이드(acetazolamide)가 알려져 있다(Expert Opin Ther Pat. 2013; 23(6):705-16. Epub 2013 Apr 30). 또한, 상기 효소의 아형 중 미토콘드리아 막에 존재하는 CA9에 대한 억제제를 항암제로 사용하기 위한 연구가 수행된 바 있으나, 그 효과가 미미한 것으로 보고된 바 있다.

[0005] 이에, 아직까지 Carbonic anhydrase 또는 이의 아형을 표적으로 한 효과적인 항암제 개발에 대한 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 Ras와 Hox 유전자의 백혈병 유발에서의 상호협력 기작을 연구하던 중, Hox 전사인자가 Carbonic Anhydrase 4 유전자의 발현을 매우 강력하게 활성화시킴을 발견하였으며, 이에 기반하여 Carbonic Anhydrase의 다양한 아형 유전자들의 발현이 백혈병 세포에 어떤 영향을 미치는지 분석한 결과 CA5A의 발현이 억제되면 백혈병 세포의 증식 억제가 유도되며, CA5A 및 CA5B의 발현이 동시에 억제되는 경우 백혈병 세포의 완벽한 사멸이 유도되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 이에, 본 발명은 CA5A(carbonic anhydrase 5A)의 발현 억제제 및 CA5B(carbonic anhydrase 5B)의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 백혈병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CA5A(carbonic anhydrase 5A)의 발현 억제제 및 CA5B(carbonic anhydrase 5B)의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 백혈병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일구현예로, 상기 발현 억제제는 CA5A 또는 CA5B 유전자 각각에 대한 안티센스 뉴클레오티드, shRNA(short hairpin RNA), siRNA(small interfering RNA), miRNA(micro RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 CA5A shRNA는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 CA5B shRNA는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 백혈병 세포의 사멸을 유도할 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 약리학적으로 허용 가능한 담체(carrier) 또는 보조제(additive)를 더 포함할 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 백혈병 예방 또는 치료방법을 제공한

다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의, 백혈병 예방 또는 치료용도를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명자들은 shRNA 기술을 이용해 백혈병 세포 내 CA5A 및 CA5B 유전자의 발현을 특이적으로 저해한 결과 백혈병 세포가 완벽히 사멸함을 실험적으로 확인하였다. 이에, 본 발명에 따른 CA5A 및 CA5B의 발현 억제제는 다양한 백혈병 세포에 대하여 매우 우수한 세포사멸 유도 효과를 나타내며, 암세포의 분열 기작을 표적으로 하는 종래 항암제들과 달리 미토콘드리아의 대사 과정을 표적함으로써 기존 항암제들과 병용치료 시 높은 상승작용을 보임과 동시에 약제 내성 극복에도 매우 유리함을 알 수 있는바, 효과적이고 안전한 백혈병 치료제로 개발되어 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명에 따른 shRNA 발현용 렌티바이러스 플라스미드(lentivirus plasmid) 구조를 도시한 것이다.
 도 2는 2 종류의 마우스 백혈병 세포주 각각에서 Car5a 특이적 shRNA의 세포 내 도입에 의한 세포 증식 억제 효과를 보여주는 결과이다.
 도 3은 본 발명의 Car5a shRNA에 의한 백혈병 세포의 증식 억제효과가 shRNA의 서열 특이적인 Car5a의 발현 억제에 의한 것임을 확인한 결과로서, 도 3a는 Car5a cDNA의 shRNA 인식서열(WT sequence) 및 상기 서열부위에 잠재성 돌연변이를 유발시킨 cDNA 서열(Silent mutation in cDNA)을 보여주는 것이고, 도 3b는 293T 세포에 정상적인 Car5a WT cDNA 또는 돌연변이를 유발시킨 Car5a MT cDNA를 발현시키고 각기 다른 4 종류의 Car5a 특이적 shRNA(6-1 내지 6-4)를 처리한 경우 Car5a 단백질의 발현수준 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.
 도 4는 상기 정상적인 cDNA(WT Car5a cDNA) 또는 돌연변이가 유도된 cDNA(MT Car5a cDNA(silent mutation))가 발현된 마우스 백혈병 세포주인 P815에서 Car5a shRNA 처리에 따른 세포 증식 억제효과를 비교한 결과이다.
 도 5는 서로 다른 5종의 인간 백혈병 세포주에서 CA5A shRNA 또는 CA5B shRNA를 각각 또는 동시에 발현시킨 후 FACS 분석을 통해 상기 shRNA가 동시에 발현되는 군에서 효과적인 세포사멸을 확인한 결과이다.
 도 6은 도 5의 CA5A shRNA 및 CA5B shRNA의 동시 발현에 따른 세포 사멸 결과를 그래프로 변환하여 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명자들은 Carbonic Anhydrase의 다양한 아형 유전자들의 발현이 백혈병 세포에 어떤 영향을 미치는지 분석한 결과 CA5A의 발현이 억제되면 백혈병 세포의 증식 억제가 유도되며, CA5A 및 CA5B의 발현이 동시에 억제되는 경우 백혈병 세포의 완벽한 사멸이 유도되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
 [0021] 이에, 본 발명은 CA5A(carbonic anhydrase 5A)의 발현 억제제 및 CA5B(carbonic anhydrase 5B)의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 백혈병(leukemia) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
 [0022] 본 발명에서 예방 또는 치료 대상으로 하는 질환인 “백혈병(leukemia)”은 혈액세포 중 백혈구에 발생하는 암으로서, 비정상적인 백혈구(백혈병 세포)가 과도하게 증식하여 정상적인 백혈구와 적혈구, 혈소판의 생성이 억제되는 혈액암의 일종이다. 백혈병은 세포의 분화 정도 및 진행 속도에 따라 흔히 급성 골수성 백혈병(Acute myeloid leukemia), 급성 림프구성 백혈병(Acute lymphoblastic leukemia), 만성 골수성 백혈병(Chronic myeloid leukemia), 만성 림프구성 백혈병(Chronic lymphocytic leukemia)의 4가지 형태로 분류되며, 본 발명에 있어서 백혈병은 상기 4가지 형태에 속하는 백혈병을 모두 포함한다.
 [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 “발현 억제”란 표적 유전자의 기능 저하를 야기하는 것을 의미하며, 바람직하게는 이에 의해 표적 유전자 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을 의미한다.
 [0024] 본 발명에 있어서, 상기 발현 억제제는 CA5A 또는 CA5B 유전자 각각에 대한 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA(short hairpin RNA), siRNA(small interfering RNA), miRNA(micro RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있고, 보다 바람직하게는 shRNA 또는 siRNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
 [0025] 본 발명에서 사용되는 용어 “shRNA(short hairpin RNA)”란 단일가닥의 50-60개로 구성된 뉴클레오타이드를 의

미하며, *in vivo*상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 즉, shRNA는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열이다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 15-30개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다. shRNA는 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 유전자 발현억제가 유전되도록 한다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 내 기작에 의하여 절단되어 siRNA가 된 후 RISC(RNA-induced silencing complex)에 결합한다. 이들 RISC는 mRNA에 결합하여 이를 절단한다. shRNA는 RNA 중합효소(polymerase)에 의해 전사된다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어, “siRNA(small interfering RNA)”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knock-down) 방법으로서 또는 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 shRNA는 CA5A의 mRNA에 상보적으로 결합하여 이의 단백질로의 발현을 특이적으로 저해하는 CA5A 특이적 shRNA 및 CA5B의 mRNA에 상보적으로 결합하여 이의 단백질로의 발현을 저해하는 CA5B 특이적 shRNA를 의미하는 것이다.

[0028] 상기 CA5A 특이적 shRNA 및 CA5B 특이적 shRNA는 각각 CA5A 또는 CA5B의 mRNA에 상보적으로 결합하여 이를 절단함으로써 발현 저해 효과를 나타낼 수 있다면 CA5A 또는 CA5B 상의 결합부위는 특별히 제한되지 않는다. 그러나 본 발명에 있어서 바람직하게는 CA5A 특이적 shRNA는 CA5A 암호화 서열(coding sequence)의 187~205번 위치에 상보적으로 결합하며, CA5B 특이적 shRNA는 CA5B 암호화 서열(coding sequence)의 891~911번 위치에 상보적으로 결합할 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서 상기 CA5A 특이적 shRNA는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있고, CA5B 특이적 shRNA는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 구현예에 따르면 본 발명에 따른 CA5A shRNA 및 CA5B shRNA는 유전자 캐리어(carrier)에 삽입되어 있다. 바람직하게는 상기 유전자 캐리어는 플라스미드, 재조합 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV), 레트로바이러스(retrovirus), 렌티바이러스(lentivirus), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus), 배시니아 바이러스(Vaccinia virus), 리포솜 또는 니오솜이며, 가장 바람직하게는 재조합 렌티바이러스이다.

[0031] 본 발명의 실시예에서는 상기 shRNA를 세포 내에 발현시키기 위해 렌티바이러스 플라스미드인 psi-LVRU6GP 및 psi-LVRU6MP 각각에 CA5A 및 CA5B에 대한 shRNA를 암호화하는 각각의 올리고뉴클레오타이드 서열을 삽입한 후 상기 플라스미드를 리포솜을 이용해 293T 세포에 형질감염시키고, 동시에 pLP1, pLP2, pVSVG의 3가지 렌티바이러스 패키징 플라스미드도 함께 형질감염시켜 재조합 렌티바이러스가 생산되도록 하였다. 상기 생산된 렌티바이러스를 백혈병 세포주에 감염시키기 위해 상기 293T 세포의 배양액에 폴리브렌(polybrene)을 첨가하고 백혈병 세포주와 동시에 배양하는 방법을 이용하였다. 또한 상기 렌티바이러스 플라스미드는 삽입된 shRNA가 발현됨과 동시에 각각 GFP 또는 mCherry 형광 단백질도 발현되므로 CA5A 특이적 shRNA가 발현되는 세포는 녹색형광(GFP)을, CA5B 특이적 shRNA가 발현되는 세포는 적색형광(mCherry)을 나타내게 되어 각 shRNA의 발현여부를 쉽게 확인할 수 있도록 제작하였다(실시예 1-2 참조).

[0032] 본 발명의 다른 실시예에서는, 마우스 백혈병 세포주에서 Car5a 특이적 shRNA를 발현시켜 Car5a의 발현을 저해시킨 경우 세포에 미치는 영향을 관찰한 결과 세포의 증식이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(실시예 2 참조). 또한, 이러한 결과가 shRNA의 특이적인 Car5a의 발현 저해에 의한 것인지를 검증하기 위해 shRNA insensitive cDNA expression assay를 실시하여 오프-타겟 효과에 의한 것이 아닌 Car5a 특이적 shRNA의 작용에 의해 Car5a의 발현이 저해되어 도출된 결과임을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0033] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 다양한 인간 백혈병 세포주에 인간 CA5A 특이적 shRNA와 CA5B 특이적 shRNA를 각각 또는 동시에 발현시킨 다음 FACS 분석을 통해 상기 세포들을 관찰한 결과, CA5A 특이적 shRNA와 CA5B 특이적 shRNA를 동시에 발현하는 세포들은 shRNA의 도입 10일째에 거의 완전히 사라지는 것을 관찰하였으며, 이는 CA5A 특이적 shRNA 또는 CA5B 특이적 shRNA를 각각 발현시킨 경우와 달리 매우 우수한 효과임을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0034] 상기 실시예 결과들을 통해 인간 백혈병 세포에서 CA5A와 CA5B의 동시적인 발현 저해가 상기 세포의 사멸을 완

벽히 유도함으로써 매우 유망한 치료 표적임을 알 수 있었다.

- [0035] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 CA5A의 발현 억제제 및 CA5B의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레퍼팅의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으나, 바람직하게는 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0038] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 백혈병 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물의, 백혈병 예방 또는 치료용도를 제공한다.
- [0043] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0045] [실시예]
- [0046] **실시예 1. 실험준비 및 실험방법**
- [0047] **1-1. 세포배양**
- [0048] 본 발명의 실시예에서 사용한 마우스유래 백혈병 세포는 비만세포종(mastocytoma) 세포주인 P815로, 10% 소태아 혈청(FBS)이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다. 또한, 다양한 종류의 인간유래 백혈병 세포주 및 이의 배양액은 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

표 1

Human 세포주	특성	배양액
HL60	급성 전골수성 백혈병(acute promyelocytic leukemia) 세포주	IMDM + 20% FBS
THP-1	급성 단구성 백혈병(acute monocytic leukemia) 세포주	RPMI + 10% FBS

K562	만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia) 세포주	IMDM + 20% FBS
KG-1a	급성 골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia) 세포주	IMDM + 20% FBS
U-937	조직구성백혈병(histiocytic leukemia) 세포주	RPMI + 20% FBS

[0051] **1-2. shRNA 발현용 렌티바이러스 생산 및 바이러스의 세포주 도입**

[0052] 본 발명의 shRNA를 세포 내에 발현시키기 위해 렌티바이러스 플라스미드(lentivirus plasmid) 벡터를 이용하였으며, 그 구조를 도 1에 도시하였다. 상기 구조의 psi-LVRU6GP 및 psi-LVRU6MP 플라스미드에 BamH1/EcoR1 제한 효소를 이용하여 하기에 나타난 CA5A 및 CA5B에 대한 shRNA를 암호화하는 각각의 올리고뉴클레오티드 서열을 삽입하였다.

[0053] 5' -cggcagtctctattaaca- 3' (CA5A 특이적 shRNA, 서열번호 1)

[0054] 5' -gcatgattatgtgctgaatgt- 3' (CA5B 특이적 shRNA, 서열번호 2)

[0055] 이후 합성된 렌티바이러스 플라스미드를 lipofectamine 3000(Life-Science/Gibco-BRL) 또는 CaPO₄법을 이용하여 293T 세포에 형질감염(Transfection)시켰다. 이때, pLP1, pLP2, pVSVG의 3가지 렌티바이러스 패키징 플라스미드(lentivirus packaging plasmid)도 동시에 상기 세포에 형질감염시켰다. 다음으로 플라스미드가 도입된 293T 세포의 배양 상등액(culture supernatant)에 폴리브렌(polybrene)을 첨가하고 상기 실시예 1-1에 기재한 다양한 백혈병 세포주 각각과 동시에 배양하여 생산된 바이러스가 백혈병 세포주 내로 도입되도록 하였다. 세포로 도입된 바이러스는 세포의 염색체에 DNA 형태로 영구 삽입되어 shRNA를 생산하며, CA5A 특이적 shRNA를 발현하는 세포는 GFP 형광단백질을 동시에 발현하고, CA5B 특이적 shRNA를 발현하는 세포는 mCherry 형광단백질을 동시에 발현하게 되며, 상기 형광단백질은 각각 녹색(green) 및 적색(red) 형광을 띠게 된다.

[0057] **1-3. 세포증식 억제 분석**

[0058] 세포에서 shRNA가 발현되면 상기 shRNA가 표적하는 유전자의 발현이 특이적으로 억제되며, 이러한 방법을 통해 특정 유전자의 발현 억제가 암세포의 증식에 미치는 영향을 분석할 수 있고, 이는 shRNA를 발현하는 세포가 전체 암세포 집단에서 차지하는 빈도(percentage, 혹은 frequency)가 배양과정에서 어떠한 kinetics로 변화하는지를 측정함으로써 확인할 수 있다. 즉, 암세포의 증식 및 생존에 필수적인 유전자의 발현 억제는 이에 특이적인 shRNA를 발현하는 세포의 감소를 초래한다.

[0059] 따라서 본 실시예에서는 CA5A 또는 CA5B 특이적 shRNA를 발현하는 세포의 빈도를 shRNA를 발현하지 않는 세포와 혼합된 상태에서 10일 이상 추적하는 방식으로 백혈병에서 CA5A 및 CA5B 유전자의 중요성을 검증하였다. 또한, 두 가지 유전자를 표적하는 각각의 shRNA를 동시에 발현하는 세포, 즉, GFP/mCherry Double-Positive 세포의 증식 정도를 동시에 측정하여 결과를 도출하였다.

[0061] **실시예 2. 마우스 Car5a 유전자의 발현 저해에 의한 백혈병 세포의 증식 억제 검증**

[0062] 본 발명자들은 마우스의 미토콘드리아에 존재하는 Carbonic Anhydrase의 아형인 Car5a 또는 Car5b가 백혈병 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

[0063] 이를 위해, 먼저 마우스 백혈병 세포주인 P815 및 Ras-HoxA1 모델 백혈병 세포에서 상기 실시예 1-2의 방법으로 Car5a 특이적 shRNA를 발현시킨 다음 shRNA 발현세포를 형광으로 추적하여 전체 세포에서 상기 형광을 발현하는 세포의 백분율을 측정하였다.

[0064] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 Car5a shRNA를 발현하는 상기 두 가지 세포 모두 일주일 안에 전체 세포 중에서 빠른 속도로 감소하여 거의 사라지는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 Car5a 유전자가 마우스 백혈병 세포의 증식 및 생존에 필수적인 역할을 수행함을 보여주는 것이다.

[0066] **실시예 3. Car5a shRNA에 의한 Car5a의 특이적 발현 저해 검증**

[0067] shRNA는 기본적으로 뉴클레오티드 서열의 상보적 결합 정도에 따라 작동하기 때문에 오프-타겟 효과(off-target effect) 즉, 서열의 완벽한 상보적 결합이 아닌 기타 80~90%의 상보적 결합을 통한 표적분자의 발현 억제 효과가 실험결과에 미치는 영향을 배제하는 것이 중요하다.

[0068] 이에 본 발명자들은 Car5a를 표적하는 shRNA의 특이성을 검증하고자 하였다. 이를 위해, shRNA insensitive

cDNA expression assay를 실시하였는데, 구체적으로 Car5a 특이적 shRNA의 표적 서열(target sequence)에 잠재성 돌연변이(silent mutation)를 인위적으로 유도하여 shRNA와의 결합을 줄이면서 표적 유전자의 단백질 발현은 유지하는 방법으로 shRNA의 특이성을 검증하는 실험을 실시하였다. 이는 cDNA에서 shRNA가 인식하는 부분의 유전암호(genetic code)를 변환시키고, 변환된 cDNA를 세포에 발현시켜 shRNA에 의해 유발된 세포의 형질이 원래 상태로 복원되는 가를 확인하는 원리이다.

[0069] 이에 도 3a에 나타낸 바와 같이 정상적인 Car5a cDNA와 shRNA의 표적 서열 부분에 잠재성 돌연변이를 유발시킨 cDNA(Silent Mutation in cDNA)를 준비하고, 상기 표적서열에 상보적으로 결합하는 4종류의 shRNA(6-1 내지 6-4) 및 상기 표적서열에 상보적으로 결합하지 않는 대조군 shRNA(C-1 shRNA)를 제작하였다. 이후 293T 세포에 상기 각 Car5a cDNA를 발현시킨 다음 각 shRNA의 도입에 의한 Car5a 단백질의 발현수준을 비교하였다.

[0070] 그 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이 정상적인 Car5a cDNA(Car5a WT)를 발현시킨 경우 4 종류의 Car5a 특이적 shRNA를 처리한 각 군 모두에서 Car5a 단백질의 발현수준이 현저히 감소한 것을 확인하였다. 이에 반해 상기 cDNA에 잠재성 돌연변이를 유발시킨 경우(Car5a MT) shRNA에 의한 단백질 발현의 감소가 나타나지 않는 것을 확인하였다.

[0071] 나아가 상기와 같은 결과를 바탕으로, 정상적인 Car5a cDNA(WT Car5a cDNA) 또는 돌연변이를 유발시킨 cDNA(MT Car5a cDNA)를 P815 마우스 백혈병 세포주에 발현시킨 다음, Car5a 특이적 shRNA가 세포의 증식에 미치는 영향을 측정하였다.

[0072] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 MT Car5a cDNA를 발현시킨 경우 Car5a 특이적 shRNA에 의한 백혈병 세포의 증식 억제효과가 나타나지 않는 것을 관찰하였다. 이에 반해 WT Car5a cDNA를 발현시킨 경우에는 shRNA에 의해 상기 백혈병 세포의 증식이 현저히 억제되는 것을 확인하였다.

[0073] 상기 결과들은 본 발명에 따른 백혈병 세포의 증식 억제효과가 shRNA에 의한 Car5a mRNA의 특이적인 발현 저해에 의한 것임을 입증하는 것이다.

[0074]

[0075] **실시예 4. 인간 CA5A 및 CA5B 유전자의 발현 저해에 의한 백혈병 세포의 증식 억제 검증**

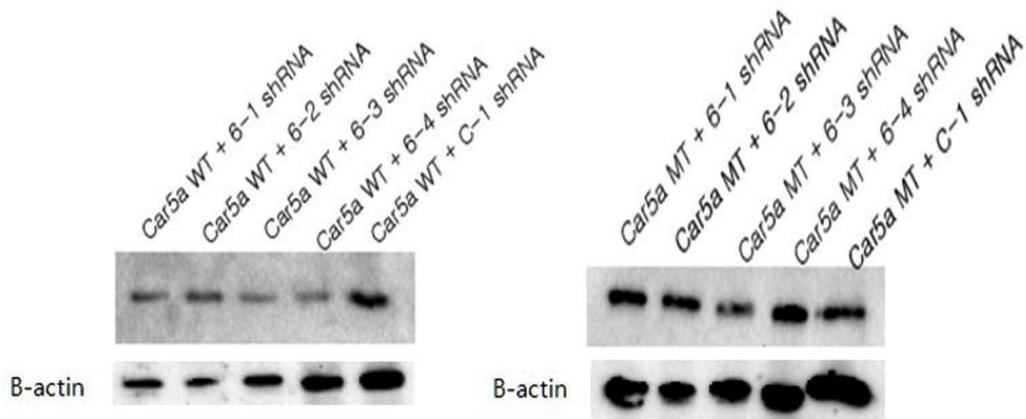
[0076] 상기 실시예 2 및 3에서 마우스 Car5a 유전자를 이에 특이적인 shRNA로 발현을 저해시킨 경우 백혈병 세포의 증식이 현저히 감소하는 것을 확인하였는바, 이의 상동 유전자인 인간의 CA5A 및 CA5B의 발현을 저해시켰을 때 동일한 결과가 나타나는지 검증하고자 하였다.

[0077] 이를 위해, 상기 실시예 1-1에 기재한 각기 다른 인간 골수성 백혈병 세포주 5중에 CA5A 및 CA5B에 특이적인 각각의 shRNA를 발현시켜 상기 유전자들의 발현을 동시에 저해한 다음 FACS 분석을 통해 상기 세포들의 증식 및 생존능을 관찰하였다. 이때, CA5A shRNA를 발현하는 세포는 GFP 형광단백질이 동시에 발현되고, CA5B shRNA를 발현하는 세포는 m-Cherry 형광단백질이 동시에 발현되도록 하여 각각의 shRNA를 단독 혹은 동시에 발현하는 세포를 FACS로 분석 가능하도록 조작하였다.

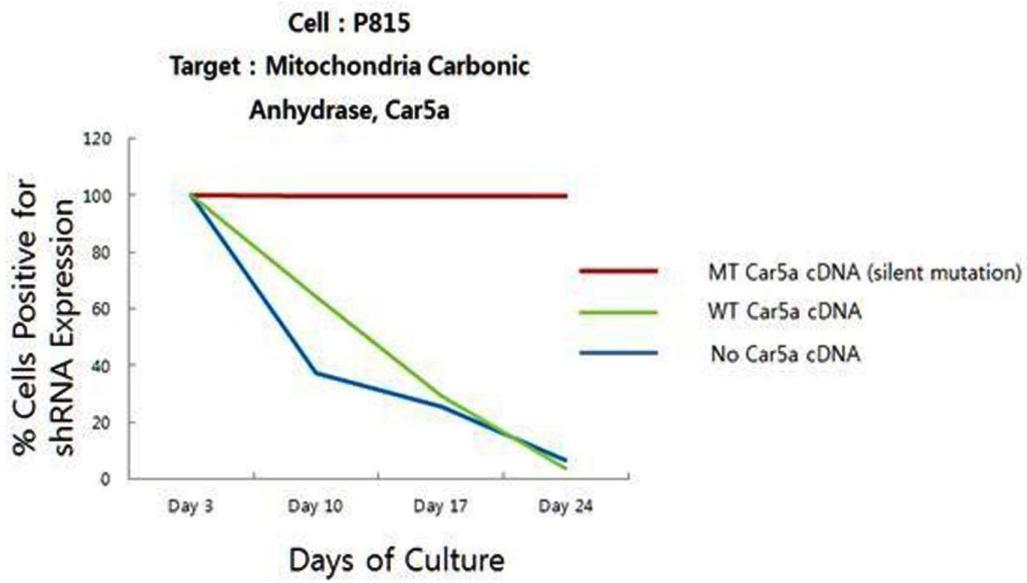
[0078] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 5종의 백혈병 세포주 모두에서 CA5A(가로축)와 CA5B(세로축) shRNA가 동시에 세포 내로 도입된 Quadrant 2(Q2) 영역의 세포는 도입 후 10일째(D-10)에 거의 사라지는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 미토콘드리아 기질에서 Carbonic Anhydrase 의 두 가지 아형인 CA5A와 CA5B의 발현이 모두 저해되면 백혈병 세포의 생존이 불가능함을 의미하는 것이다. 또한, 상기 도 5의 결과를 그래프로 표현한 도 6의 결과를 통해 CA5A 또는 CA5B의 발현을 각각 저해한 경우와 비교하여 상기 두 가지 유전자의 발현을 동시에 저해(CA5A + CA5B)할 때 백혈병 세포의 증식이 현저히 감소하는 것을 통해 그 효과가 매우 우수함을 알 수 있었다.

[0080] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

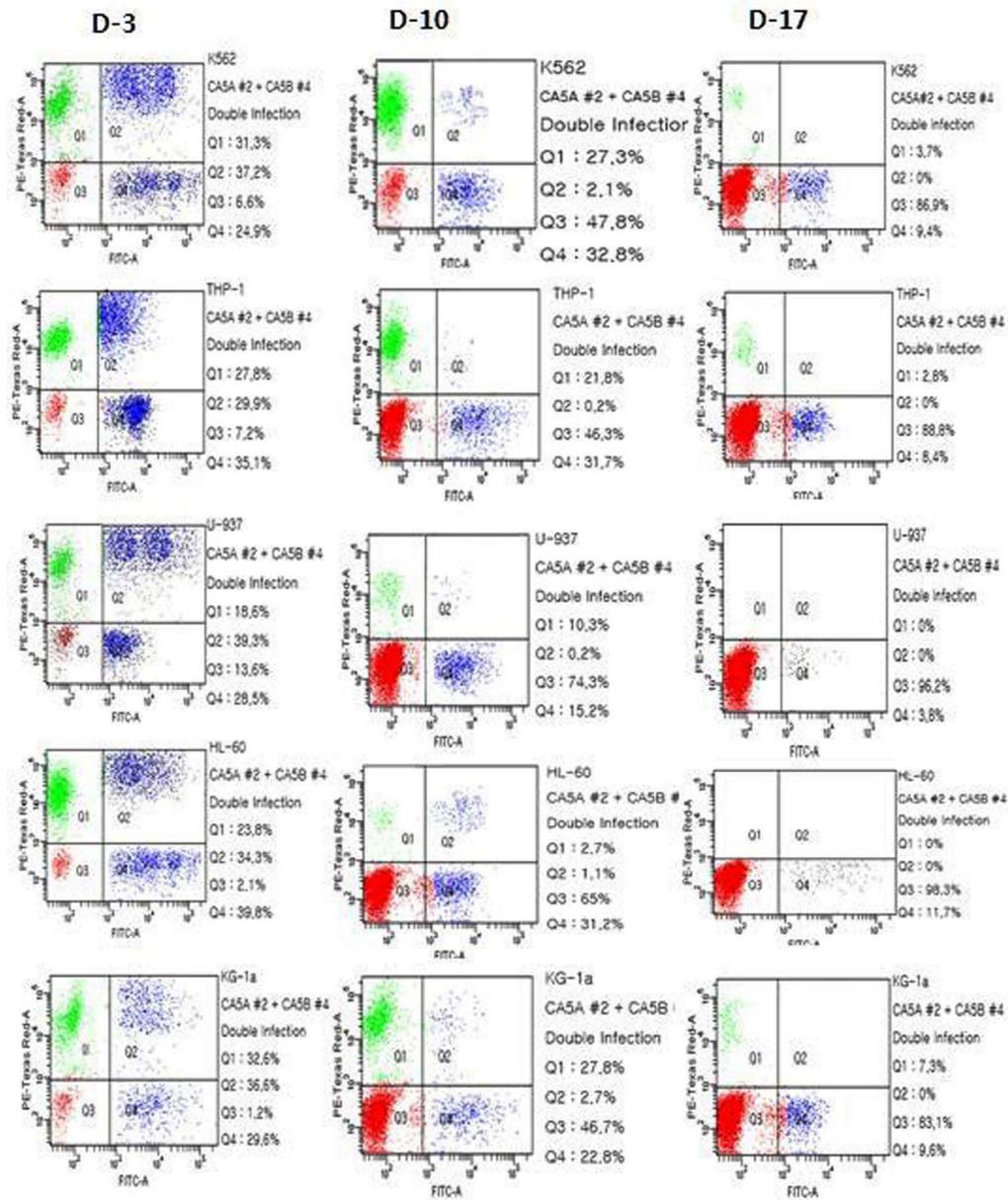
도면3b



도면4



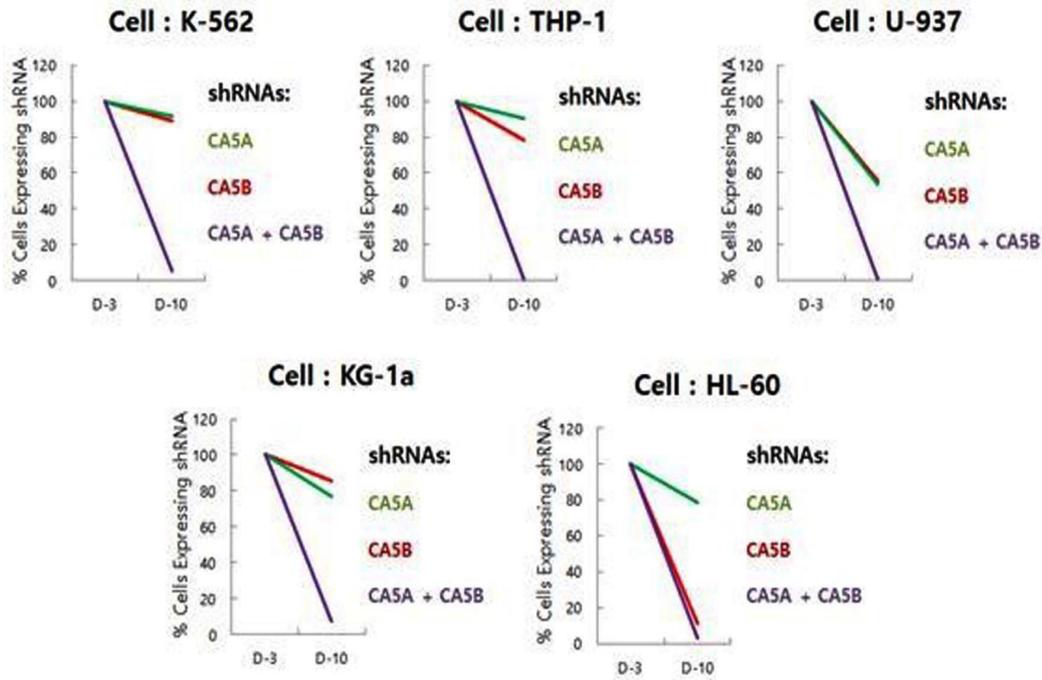
도면5



PE-Texas Rea-A : CA5B #4 shRNA Expressing Cells,
FITC-A : CA5A #2 shRNA Expressing Cells

도면6

Effect of CA5A and CA5B shRNA Expression on Human Leukemia Cell Survival *in vitro*



서열 목록

- <110> IUCF-HYU (Industry-University Cooperation Foundation Hanyang University)
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating leukemia containing expression inhibitor of CA5A and CA5B
- <130> PD17-166
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> CA5A shRNA
- <400> 1
- cggcagtctc ctattaaca
- <210> 2
- <211> 21

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> CA5B shRNA

<400> 2

gcatgattat gtgctgaatg t

21