



등록특허 10-2596986



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월02일

(11) 등록번호 10-2596986

(24) 등록일자 2023년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2022.01)

C12Q 2531/125 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0004224

(22) 출원일자 2021년01월12일

심사청구일자 2021년01월12일

(65) 공개번호 10-2021-0094466

(43) 공개일자 2021년07월29일

(30) 우선권주장

1020200007912 2020년01월21일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

이양중, "Differential expression of microRNAs in development of GH-secreting pituitary adenoma", 박사학위논문, 연세대학교 (2017)

Hormone and Metabolic Research (2018)

50:179-192

Diagnostic Pathology (2010) 5:79

Neurosurgery (2014) 75:181-189

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

구철룡

서울특별시 용산구 이촌로71길 10, 210동 2005호 (이촌동, 한가림아파트)

이은지

서울특별시 마포구 창전로 26, 서강GS Apt 103-2103

이양중

서울특별시 영등포구 당산로 214, 407동 404호(삼성래미안4차아파트)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 이재영

전체 청구항 수 : 총 8 항

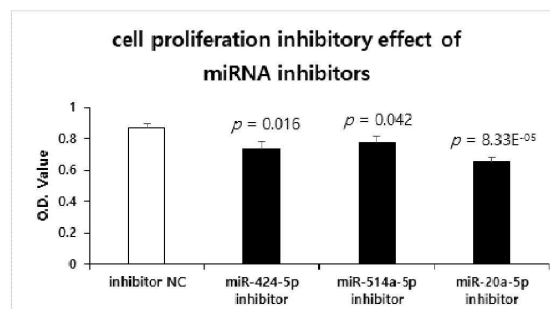
심사관 : 최수형

(54) 발명의 명칭 뇌하수체 종양의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 hsa-miR-20a-5p의 발현을 억제함으로써 뇌하수체 종양, 바람직하게는 프로락틴선종을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/106 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103510
과제번호	NRF-2017M3A9E8029720
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발사업
연구과제명	혈액내 microRNA를 이용한 고프로락틴혈증 감별진단 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

hsa-miR-20a-5p의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 프로락틴선종의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,
상기 발현 억제제는 hsa-miR-20a-5p에 특이적인 안티센스 뉴클레오티드(antisense nucleotide), 작은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA; shRNA) 및 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 발현 억제제를 더 포함하는, 약학 조성물로서,

상기 발현 억제제는 상기 hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA에 특이적인 안티센스 뉴클레오티드(antisense nucleotide), 작은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA; shRNA) 및 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

hsa-miR-20a-5p의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 뇌하수체 종양에 의한 고프로락틴혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 발현 억제제는 hsa-miR-20a-5p에 특이적인 안티센스 뉴클레오티드(antisense nucleotide), 작은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA; shRNA) 및 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 조성물은 hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 발현 억제제를 더 포함하는, 약학 조성물로서,

상기 발현 억제제는 hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA에 특이적인 안티센스 뉴클레오티드(antisense nucleotide), 작은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA; shRNA) 및 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-20a-5p의 발현 수준을 측정하는 단계;

상기 생물학적 시료에 후보 물질을 처리하는 단계; 및

상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 상기 hsa-miR-20a-5p의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 프로락틴선종(prolactinomas)의 예방제 또는 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 후보 물질의 처리 후의 발현 수준을 측정하는 단계 시, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 발현 수준을 추가로 더 측정하는, 스크리닝하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 후보 물질의 처리 후 측정된 hsa-miR-20a-5p의 발현 수준이 후보 물질의 처리 전에 비하여 감소한 경우 상기 후보 물질을 뇌하수체 종양의 예방제 또는 치료제로 결정하는, 스크리닝하는 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-20a-5p의 발현 수준을 측정하는 단계;

상기 생물학적 시료에 후보 물질을 처리하는 단계; 및

상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 상기 hsa-miR-20a-5p의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 뇌하수체 종양에 의한 고프로락틴혈증의 예방제 또는 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌하수체 종양의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌하수체 선종이란 뇌하수체에 있는 호르몬 분비세포가 비정상적으로 증식하는 종양을 말한다. 뇌하수체란 뇌의 정중앙부 하단에 위치한 부위로, 주 기능은 다양한 호르몬을 분비하는 것이다. 이 호르몬들은 직접 신체에 영향을 미치거나 타 장기에 있는 호르몬 샘의 기능을 조절을 담당하여 전체적으로 우리 몸의 호르몬의 분비를 총괄한다. 뇌하수체에서 분비되는 호르몬은 프로락틴(Prolactin), 성장 호르몬(Growth Hormone), 갑상선 자극 호르몬(Thyroid Stimulating Hormone), 부신피질 자극 호르몬(Adrenocorticotrophic Hormone), 난포 자극 호르몬(Follicle-Stimulating Hormone), 황체 형성 호르몬(Leutenizing Hormone), 항 이뇨 호르몬(Anti-diuretic Hormone) 등이 있다.

[0003] 이 중 젖분비 호르몬으로 알려진 프로락틴(prolactin)이라는 호르몬을 분비하는 종양을 프로락틴선종 또는 프로락틴 분비 뇌하수체 선종이라고 하는데, 호르몬 자체를 분비하지 않는 뇌하수체 선종의 경우에도 혈중 프로락틴의 농도는 증가될 수 있다.

[0004] 프로락틴선종의 증상은 크게 두 가지로 나누어 생각할 수 있다. 하나는 호르몬의 과다 분비에 의한 증상이며 다른 하나는 종양 자체의 종괴 효과(mass effect)에 의한 것이다. 여성의 경우 종양에 의해 프로락틴이 비정상적으로 과다 분비되어 나타나는 증상으로는 월경량의 감소, 초경의 지연, 일차성 무월경, 유즙 분비, 불임, 조기 폐경 등이 있으며 이로 인해 질병을 발견할 수도 있다. 유즙 분비는 전체 환자의 30~80%에서 나타나는 것으로 보고되고 있다. 남성의 경우에는 호르몬의 증가에 의해 성욕 저하, 발기부전 등이 발생하여 이를 통해 종양이 발견되는 경우도 있다. 또한 남녀 공통으로 호르몬의 과다 분비는 골다공증을 유발하는 것으로 보고되어 있지만 정확히는 프로락틴이 많아져서가 아니라 성호르몬의 감소에 의해 골다공증이 발생하는 것으로 이해되고 있다.

[0005] 호르몬을 비정상적으로 분비하는 분비성 뇌하수체 선종 중 가장 흔한 프로락틴선종은 전체 뇌하수체 선종의 약 30%를 차지하고 있다. 뇌하수체 선종 및 프로락틴선종의 원인은 아직 밝혀지지 않고 있다.

[0006] 이러한 프로락틴선종의 치료는 약물 치료, 수술적 제거, 방사선 치료(방사선 수술 포함) 등으로 구성된다. 프로락틴선종은 뇌하수체 종양 중 유일하게 약물 치료가 일차적인 치료인 종양이다. 도파민 작용체를 처음 시도하게 되는데 혈중 프로락틴 수치의 감소, 가임성의 회복, 종양 크기의 감소 등을 기대할 수 있어 일차적인 치료로 선호되고 있다. 대표적인 약제는 브로모크립틴(팔로텔, Bromocriptine)이다. 하지만 일부 프로락틴선종이 약물에 잘 반응하지 않는 경우도 있다. 약물 치료의 단점은 오심, 구토 등의 위장관 장애가 동반되는 경우가 빈번하다는 점과 약물 투여 중단 시 종양의 재성장 및 프로락틴 수치가 다시 증가한다는 점이다. 한편, 수술적 치료는 제한된 범위에서 시행되고 있다. 수술적 치료는 한 번의 시술로 완치를 기대할 수 있다는 장점이 있는 반면, 뇌하수체 기능 저하증(panhypopituitarism)의 위험도 및 뇌척수액 유출 등 합병증을 동반한다는 점에서 신중한 결정이 필요하다. 방사선 치료는 반복적인 수술에도 불구하고 계속 재발하거나 종양이 주변 혈관조직을 침투하여 수술적 적출 시 다량의 출혈이 우려되는 경우 등에 시행되고 있으며, 최근에는 감마나이프 등의 방사선 수술이 시도되고 있다. 그러나 종양 자체의 크기 조절은 광복합한 만한데 비해 호르몬의 정상화는 성적이 떨어지는 편이다. 이에 수술적 치료 후 완전 제거가 어려운 부위에서의 재발된 종양에 대해 주로 시행되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 목적은 뇌하수체 종양 또는 이에 의해 유발되는 고프로락틴혈증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

을 제공하는 것이다.

- [0008] 본 발명의 다른 목적은 뇌하수체 종양 또는 이에 의해 유발되는 고프로락틴혈증 유발 동물 모델을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 뇌하수체 종양 또는 이에 의해 유발되는 고프로락틴혈증의 예방제, 개선제 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 뇌하수체 종양의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명에서 상기 “hsa-miR-20a-5p”는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열(UAAAGUGCUUUAUGUCAGGUAG)로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 본 발명에서 상기 “hsa-miR-424-5p”는 서열번호 2로 표시되는 염기 서열(CAGCAGCAAUUCAUGUUUGAA)로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 본 발명에서 상기 “hsa-miR-514a-5p”는 서열번호 3으로 표시되는 염기 서열(UACUCUGGAGAGUGACAAUCAUG)로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명에서 상기 miRNA의 발현 억제제는 본 발명의 상기 miRNA와 상보적으로 결합함으로써 그 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 모든 것을 포함할 수 있고, 예를 들면, 안티센스 뉴클레오티드(antisense nucleotide), 작은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA; shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA), 앵타머(aptamer) 및 화합물로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명에서 용어, "안티센스 뉴클레오티드"는 상기 miRNA에 상보적으로 결합하여 발현을 억제하는 염기서열로서, 이에 제한되지는 않으나 antisenseRNA, antagonist mRNA를 포함한다.
- [0017] 본 발명에서 상기 "안티센스 뉴클레오티드"는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다(Rothenberg et al., J. Natl. Cancer Inst., 81:1539-1544, 1999). 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포 주입, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 "siRNA" 및 "shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀(hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이스어(dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지 여부 및 적절한 상보적인 siRNA 염기 서열은 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 PDCD5를 암호화하는 유전자에 의해 암호화되는 단백질; 또는 이의 세포 외 도메인을 암호화하는 유전자에 상보적으로 작용하여 mRNA 분자를 절단하여 RNA 간섭(RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 유전자의 발현을 억제할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 siRNA는 화학적으로 또는 효소화학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 상기 유전자 서열을 이용하여 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(In vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내 전사에 의해 합성

된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR (polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트 (cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 상기 "엡타머"란, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 올리고뉴클레오타이드 분자를 말한다. 엡타머는, 소정의 표적 분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 상기 엡타머는 RNA, DNA, 수식(modified) 올리고뉴클레오타이드 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 본 발명의 엡타머는 또한, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 본 발명의 엡타머의 길이는 특별히 한정되지 않고, 통상 15 내지 200 뉴클레오타이드일 수 있지만, 예컨대 15 ~ 100 뉴클레오타이드이고, 바람직하게는 18 ~ 80 뉴클레오타이드이며, 보다 바람직하게는 20 ~ 60 뉴클레오타이드이고, 가장 바람직하게는 22 ~ 45 뉴클레오타이드일 수 있다. 총 뉴클레오타이드 개수가 적으면 화학합성, 화학수식 및 대량 생산이 보다 용이하고, 경제적이며, 생체내 안정성은 높으면서 독성은 낮아 유리하다는 장점이 존재한다.

[0021] 본 발명에서 상기 뇌하수체 종양은 프로락틴선종(prolactinomas), 성장호르몬 분비선종(GH secreting pituitary tumor), 쿠싱씨병(ACTH secreting tumor) 및 비기능성 뇌하수체 선종(nonfunctioning pituitary adenoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에서 상기 "프로락틴선종(prolactinomas)"은 뇌하수체 세포들 중 유즙분비 호르몬을 분비하는 세포들이 종양으로 변하여 유즙분비호르몬을 과다하게 분비하는 경우로, 불규칙한 월경 또는 무월경, 유즙분비, 성욕감퇴, 불임(남성의 경우, 정자수의 감소 또는 정자의 운동성 감소로 인한 불임) 등의 증상이 동반된다.

[0023] 본 발명에서는 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 또는 hsa-miR-514a-5p의 miRNA, 바람직하게는 hsa-miR-20a-5p miRNA의 발현을 억제함으로써 뇌하수체 종양, 바람직하게는 프로락틴선종을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0024] 본 발명의 조성물은 프로락틴선종 치료제를 추가로 더 포함할 수 있다. 여기서 상기 프로락틴선종 치료제는 브로모크립틴(bromocriptine), 리서라이드(lisuride), 카베르골린(cabergoline), 페르골리드(pergolide) 및 퀴나골리드(quinagolide) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나 이상의 miRNA의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 고프로락틴혈증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0027] 본 발명에서 상기 "고프로락틴혈증(hyperprolactinemia)"은 혈액 내의 프로락틴(prolactin)의 수치가 여성의 경우 25 ng/mL 미만, 남성의 경우 15 ng/mL 미만이 정상 수치에 비하여 비정상적으로 높은 것을 의미한다. 프로락틴은 뇌하수체 전엽의 프로락틴 분비 세포에서 생성되고 프로락틴 분비 세포에 분포되어 있는 도파민 타입 2(dopamine type 2) 수용체에 의해 조절되면서 박동성에 의해 분비된다. 프로락틴의 분비를 억제하는 인자는 도파민이 대표적이며, 소마토스타틴(somatostatin), 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid) 등이 존재한다. 상기 고프로락틴혈증이 유도될 수 있는 원인들은 매우 다양하다. 생리적인 상황으로는 임신, 수유, 스트레스, 운동 그리고 수면과 같은 것들이 존재하며, 신경이완제, 항정신병약제 등과 같은 약물의 복용에 의해서도 유도될 수 있다. 일차성 갑상선기능저하증에 의해서도 중등도의 고프로락틴혈증이 유도될 수 있다. 또한, 임신과 관련되지 않는 고프로락틴혈증은 주로 프로락틴선종(prolactinoma)에 의해 유도될 수 있고, 시상하부-뇌하수체-도파민 경로를 방해하는 병적인 경우나 약물의 원인에 의해서도 유도될 수 있다. 뿐만 아니라, 비기능성 뇌하수체 종양이나 다른 터키안 주위에 발생한 종양이 뇌하수체 줄기를 압박하여 도파민 뉴런이 손상되거나 도파민 신호가 차단될 경우 프로락틴 억제가 저하되는 현상에 의해 유도될 수 있다. 하지만, 본 발명의 목적 상 상기 고프로락틴혈증은 뇌하수체 종양, 특히는 프로락틴선종에 의해 유발된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 고프로락틴혈증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에서, 상기 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p의 miRNA와 이들의 발현 억제제의 정의에 관한 내용은 앞선 뇌하수체 종양의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에서 기재된 바와 중복되어 이하 명세서의 과도한 복잡을 피하고자 그 기재를 생략한다.

[0029] 본 발명의 조성물은 프로락틴선종 치료제를 추가로 더 포함할 수 있다. 여기서 상기 프로락틴선종 치료제는 브로모크립틴(bromocriptine), 리서라이드(lisuride), 카베르골린(cabergoline), 페르골리드(pergolide) 및 퀴나골리드(quinagolide) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0031] 본 발명의 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물의 형태로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(Elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0034] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0036] 본 발명의 상기 비경구는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 유효성분 포함하는 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 상기 유효성분이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 포함하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 구체적으로, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 상기 성분은 독립적 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택될 수

있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0044] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0045] 상기 생물학적 시료에 후보 물질을 처리하는 단계; 및
- [0046] 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 상기 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 뇌하수체 종양 또는 고프로락틴혈증의 예방제, 개선제 또는 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명에서 상기 "스크리닝"이란, 여러 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적으로 하는 어떤 특정한 성질을 갖는 물질을 특정한 조작 또는 평가 방법으로 선별하는 것이다.
- [0048] 본 발명에서 상기 분리된 생물학적 시료는 뇌하수체 종양 또는 고프로락틴혈증이 유발되었거나 유발되지 않은 개체로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있다. 구체적으로, 상기 생물학적 시료는 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 세포 등일 수 있고, 바람직하게는 뇌하수체 조직 또는 뇌하수체 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서 상기 miRNA의 발현 수준을 측정하기 위해 사용되는 제제는 상기 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 또는 hsa-miR-514a-5p에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 염기서열로서, 증폭의 대상이 되는 miRNA에 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 쌍을 이루어 반응하는 과정을 통해 PCR 산물이 생성되도록 할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 상기 "프로브"는 상기 miRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백 개의 염기서열의 단편으로서, 시각화될 수 있도록 형광등이 표지되어 있기 때문에 상기 프로브를 이용하는 경우 miRNA의 존재 유무 및 시료 내 존재하는 양을 확인할 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 상기 프라이머 또는 프로브의 디자인은 상기 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p의 염기 서열을 참조하여 당업계에서 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 상기 miRNA의 발현 수준을 측정하는 방법은 상기한 miRNA를 증폭시키거나 형광 등으로 표지된 프로브와 상보적으로 결합하는 등의 통상의 방법을 통해 확인될 수 있는 것이고, 예를 들면, 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction), 회전증폭 방법, 형광상관분석법(fluorescence correlation spectroscopy), 마이크로어레이(microarray) 및 칩어세이(chip-assay)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 적어도 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명에서 상기 후보 물질은 천연 화합물, 합성 화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 상기 miRNA의 발현 수준이, 상기 후보 물질의 처리 전에 비하여 감소된 경우, 상기 후보 물질을 뇌하수체 종양 또는 고프로락틴혈증의 예방제, 개선제 또는 치료제로 결정할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 스크리닝하는 방법에서, 상기 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p의 miRNA와 이들의 발현 억제제의 정의, 뇌하수체 종양, 고프로락틴 혈증에 관한 내용은 앞선 조성물에서 기재된 바와 중복되어 이하 명세서의 과도한 복잡을 피하고자 그 기재를 생략한다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA가 과발현 되도록 형질 전환된 동물 모델에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명의 상기 "동물 모델"은 사람의 질병 등과 매우 유사한 형태를 나타낼 수 있는 동물을 의미한다. 이러한 동물 모델을 이용하는 경우에는 다양한 질병의 원인과 발병과정 등을 연구할 수 있으며, 치료제 선별, 독성 검사 등과 같은 기능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다. 본 발명의 목적 상 상기 동물 모델은 뇌하수체 종양 또는 고프로락틴혈증이 유발된 것일 수 있다.

- [0060] 본 발명의 상기 동물은 인간을 제외한 임의의 포유류 동물을 의미하며, 배아, 태아, 신생아, 성인을 포함하는 모든 연령의 동물을 포함한다. 이와 같은 동물은 토끼, 설치류(생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 또는 기니피그), 소, 양, 돼지, 염소, 말, 개, 고양이, 조류(닭, 칠면조, 오리, 거위) 및 영장류(침팬치, 원숭이, 붉은털 원숭이)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명에서 상기 "형질전환 동물"이란 외부에서 도입된 유전자가 동물의 염색체 상에 삽입됨으로써 그 형질의 일부가 변화된 동물을 의미한다.
- [0062] 본 발명에서 상기 형질 전환은 동물 개체에 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군 으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA를 포함하는 뉴클레오티드를 주입하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서, 상기 뉴클레오티드는 바람직하게는 전이 유전자(transgene), 벡터, 트랜스포손 (transposon) 등이나, 유전체(genomic DNA) 내로 삽입되어 형질 전환을 유도시킬 수 있는 종류의 뉴클레오티드 라면 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명에서 "벡터"란 상기 벡터가 도입된 세포에서 목적 유전자를 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 벡터 내에 도입된 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 말 한다. 바람직하게 본 발명은 상기한 miRNA를 포함하는 재조합 벡터를 제조할 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 상기한 뉴클레오티드는 동물 개체의 뇌하수체 세포에 형질 전환될 수 있고, 혹은 상기 동물의 수정란에 형질 전환될 수도 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 본 발명의 동물 모델에서, 상기 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p의 miRNA와 이들의 발현 억제제의 정의, 뇌하수체 종양, 고프로락틴 혈증에 관한 내용은 앞선 조성물에서 기재된 바와 중복되어 이하 명 세서의 과도한 복잡을 피하고자 그 기재를 생략한다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 동물 모델을 이용하여 뇌하수체 종양 또는 고프로 락틴혈증의 예방제, 개선제 또는 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [0068] 본 발명에서 제공하는 스크리닝하는 방법은 우선, 본 발명에서 제공하는 동물 모델에 뇌하수체 종양 또는 고프 로락틴혈증의 예방, 개선 또는 치료용 후보 물질을 처리하는 단계를 포함할 수 있다. 여기서, 상기 후보 물질은 천연 화합물, 합성 화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명에서는 상기 후보 물질을 처리한 동물 모델의 생물학적 시료로부터 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0070] 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 측정된 miRNA의 발현 수준이 후보 물질의 처리 전에 비하여 감소한 경우 상기 후보 물질을 뇌하수체 종양 또는 고프로락틴혈증의 예방제, 개선제 또는 치료제로 결정할 수 있다.
- [0071] 혹은, 본 발명에서는 상기한 후보 물질을 처리한 동물 모델을 사육하면서 예후를 확인하는 단계를 포함할 수 있 다. 즉, 상기 후보 물질에 의하여 뇌하수체 종양 또는 고프로락틴혈증이 예방, 개선 또는 치료되거나, 대조군 물질에 비하여 예후가 증진된 경우에 상기 후보 물질을 뇌하수체 종양 또는 고프로락틴혈증의 예방제, 개선제 또는 치료제로 결정할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 스크리닝하는 방법에서, 상기 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p의 miRNA와 이들 의 발현 억제제의 정의, 뇌하수체 종양, 고프로락틴 혈증, miRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 제제 및 방법에 관한 내용은 앞선 조성물 및 스크리닝하는 방법에서 기재된 바와 중복되어 이하 명세서의 과도한 복잡을 피하고 자 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0073] 본 발명에서는 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 또는 hsa-miR-514a-5p의 miRNA, 바람직하게는 hsa-miR-20a-5p miRNA의 발현을 억제함으로써 뇌하수체 종양, 바람직하게는 프로락틴선종을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있고, 더 나아가서는 상기 프로락틴선종에 의해 유발되는 고프로락틴혈증 또한 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1은 본 발명의 실시예 1에서 MMQ 세포주에 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p 억제제의 처리 후 세포 증식율의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 실시예 2에서 MMQ 세포주에 hsa-miR-20a-5p를 과발현 시킨 뒤 세포 증식율의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 실시예 3에서 MMQ 세포주에 hsa-miR-20a-5p를 과발현 시킨 뒤 프로락틴선종 치료제인 카베르골린을 농도별로 처리하며 세포 증식율의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0077] 실시예

[0079] [실시예 1] miRNA 발현 억제를 통한 프로락틴선종의 증식 억제 효과 확인

[0080] 프로락틴선종인 MMQ 세포주에 hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p 억제제로 각 miRNA의 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide)인 Invitrogen Cat#MH10057 hsa-miR-20a-5p (4464084), Cat#MH10306 hsa-miR-424-5p (4464084) 및 Cat#MH22773 hsa-miR-514a-5p (4464084)를 20 nM의 양으로 처리하고 Invitrogen Cat#11668019 Lipofectamine® 2000 시약을 처리한 뒤 96 시간 동안 형질 주입 시킨 후 Promega Cat#G3582, CellTiter 96® AQueous One Solution 세포 증식 어세이 (MTS)를 이용하여 각 처리에 따른 세포 증식율의 변화를 측정해 그 결과를 도 1에 나타내었다. 단, 대조군으로는 Cat#4464076 miRNA Inhibitor Negative Control #1을 처리하였다.

[0081] 도 1에서 보는 바와 같이, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-424-5p 및 hsa-miR-514a-5p 억제제를 처리한 경우 프로락틴선종의 세포 증식율이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었고, 그 중에서도 특히 hsa-miR-20a-5p 억제제를 처리한 경우가 프로락틴선종의 증식 억제 효과가 가장 뛰어났다.

[0083] [실시예 2] miRNA 과발현을 통한 프로락틴선종의 증식 촉진 효과 확인

[0084] 프로락틴선종인 MMQ 세포주에 hsa-miR-20a-5p 유사체인 Invitrogen Cat#MC10057 hsa-miR-20a-5p (4464066)를 20 nM의 양으로 처리하고 Invitrogen Cat#11668019 Lipofectamine® 2000 시약을 처리한 뒤 24 내지 96 시간 동안 형질 주입 시킨 후 Promega Cat#G3582, CellTiter 96® AQueous One Solution 세포 증식 어세이 (MTS)를 이용하여 각 처리에 따른 세포 증식율의 변화를 측정해 그 결과를 도 2에 나타내었다. 단, 대조군으로는 Cat#4464058 miRNA Mimic Negative Control #1를 처리하였다.

[0085] 도 2에서 보는 바와 같이, 프로락틴선종 세포주에서 hsa-miR-20a-5p를 과발현시킨 결과 세포 증식율이 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[0087] [실시예 3] miRNA 과발현 후 프로락틴선종 치료제 처리 시 반응도 비교

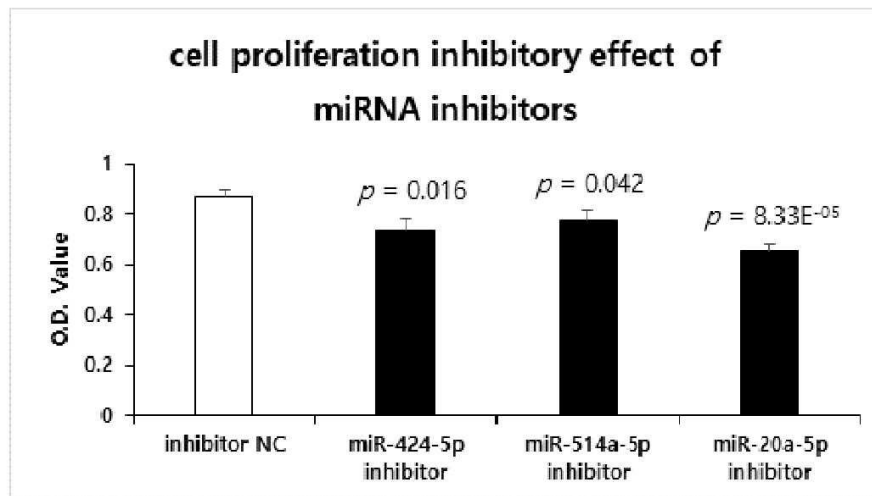
[0088] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 MMQ 세포주에 hsa-miR-20a-5p를 과발현시킨 뒤 프로락틴선종 치료제인 카베르골린(Cabergoline)을 5, 10 또는 15 μ M의 농도로 처리한 뒤 세포 증식 어세이 (MTS)를 이용하여 세포 증식율의 변화를 측정하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0089] 도 3에서 보는 바와 같이, 프로락틴선종 세포주에서 hsa-miR-20a-5p를 과발현시킨 결과 세포 증식율이 증가하였지만, 프로락틴선종 치료 약물인 카베르골린(Cabergoline)을 처리하자 세포 증식율이 감소하며 농도에 따라 처리 반응도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

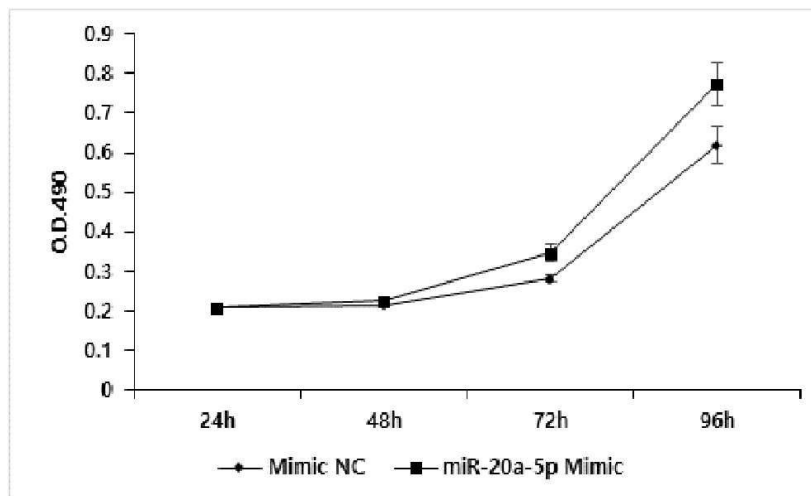
[0091] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

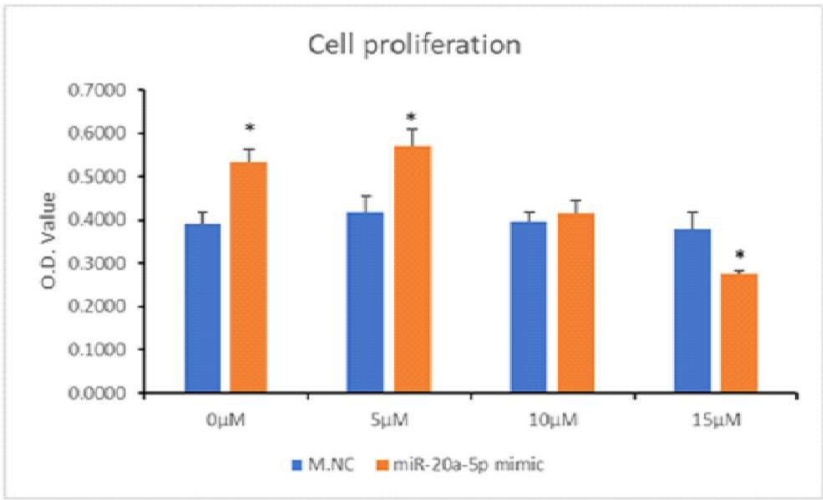
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110>	Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University	
<120>	Composition for preventing or treating pituitary tumor	
<130>	PDPB194319k01	
<150>	KR 10-2020-0007912	
<151>	2020-01-21	
<160>	3	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	1	
	uaaagugcuu auagugcagg uag	23
<210>	2	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	2	
	cagcagcaau ucauguuuug aa	22
<210>	3	
<211>	23	
<212>	RNA	

<213> Homo sapiens

<400> 3

uacucuggag agugacaauc aug

23