



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월23일  
(11) 등록번호 10-1308924  
(24) 등록일자 2013년09월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/85 (2006.01)  
A61K 31/7105 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-0017615  
(22) 출원일자 2012년02월21일  
심사청구일자 2012년02월21일  
(65) 공개번호 10-2013-0096347  
(43) 공개일자 2013년08월30일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020110020953 A  
JP2005192484 A  
KR1020110043859 A

(73) 특허권자  
차의과학대학교 산학협력단  
경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)  
(72) 발명자  
김진경  
경기도 성남시 분당구 정자동 한솔마을 청구아파트 107동 1803호  
정형민  
서울특별시 강남구 논현동 275 동부센트레빌 103동 1701호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인다울

전체 청구항 수 : 총 14 항

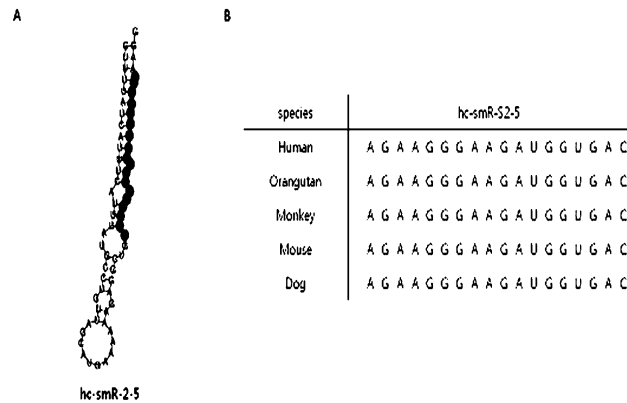
심사관 : 조영균

(54) 발명의 명칭 신규한 miRNA hc-smR-S2-5 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 miRNA hc-smR-S2-5 및 상기 miRNA를 함유하는 폐암 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 폐암 세포로부터 유래된 신규한 인간 암-작은 RNA(human cancer-small RNA, hc-smR)-S2-5는 머리핀(stem-loop) 구조를 형성하고 포유류에서 그들의 서열을 보존하며, 폐암 세포에서 저발현하고, 인간 중간엽-상피 전이 인자(mesenchymal-epithelial transition factor, c-Met)를 mRNA 및 단백질 수준에서 직접적으로 억제하며, 폐암 세포에서 hc-smR-S2-5의 과발현은 c-Met을 통해 세포의 증식 및 이동을 감소시키고 세포주기 관련 단백질을 감소시키는 것을 확인함으로써, hc-smR-S2-5를 폐암 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**유중기**

경기도 양주시 덕정동 청담마을 412동 1404호

**이지민**

서울특별시 송파구 잠실2동 엘스 아파트 108동  
2403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10033642  
부처명 지식경제부  
연구사업명 바이오의료기기산업원천기술개발사업  
연구과제명 인간배아줄기세포를 이용한 심혈관계 세포치료제 개발  
주관기관 (주)차바이오앤디오스텍  
연구기간 2009.06.01 ~ 2013.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2006-2004127  
부처명 교육부  
연구사업명 원천기술개발사업/바이오·의료기술개발사업/줄기세포연구사업  
연구과제명 특이유전자와 miRNA를 이용한 전분화능 정원줄기세포의 기능조절  
주관기관 차의과학대학교  
연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 구성된 hc-smR(human cancer-small RNA)-S2-5 miRNA.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, miRNA는 인간 폐 또는 폐암 세포로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 hc-smR-S2-5 miRNA.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, miRNA는 중간엽-상피 이행 인자(mesenchymal-epithelial transition factor, c-Met)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 hc-smR-S2-5 miRNA.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, miRNA는 인간 폐 또는 폐암 세포의 증식 및 이동을 억제하는 것을 특징으로 하는 hc-smR-S2-5 miRNA.

### 청구항 5

제 1항의 hc-smR-S2-5 miRNA를 포함하는 발현벡터.

### 청구항 6

제 5항에 있어서, 발현벡터는 비바이러스성 벡터 또는 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

### 청구항 7

제 5항의 발현벡터를 숙주세포에 형질전환시킨 형질전환체.

### 청구항 8

제 7항에 있어서, 숙주세포는 인간 폐 또는 폐암 세포인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

### 청구항 9

제 1항의 hc-smR-S2-5 miRNA 또는 제 5항의 발현벡터를 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 10

제 1항의 hc-smR-S2-5 miRNA의 검출을 위한 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함하는 폐암 진단용 키트.

**청구항 11**

- 1) 피검체에서 분리된 시료에서 제 1항의 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- 2) 대조군에 비하여 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준이 감소되면 폐암에 걸릴 위험이 있는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 유전자 검출 방법.

**청구항 12**

제 11항에 있어서, hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준은 실시간 RT-PCR에 의한 것을 특징으로 하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 유전자 검출 방법.

**청구항 13**

- 1) 피검 조성물 또는 화합물을 제 1항의 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 세포에 처리하는 단계; 및
- 2) 대조군에 비하여 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준을 증가시키는 피검 조성물 또는 화합물을 선별하는 단계를 포함하는, 폐암 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법.

**청구항 14**

제 13항에 있어서, hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준은 실시간 RT-PCR에 의한 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 신규한 miRNA 및 이를 함유하는 폐암 치료제에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 첫번째 마이크로RNA(miRNA)는 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에서 발견되었고(비특허문헌 1, 2) 현재는 miRBase(<http://microrna.sanger.ac.uk/index.shtml>)에서 1,400개 이상의 인간 miRNA들이 있다(비특허문헌 3). miRNA는 18-25개의 뉴클레오티드(nt) 길이이고 60-80 nt 전구체 miRNA(pre-miRNA)로부터 유래되는 내생의 비암호화 RNA이다(비특허문헌 4, 5). miRNA의 단계별 공정은 이중 가닥 특이적 리보뉴클레아제(double-strand-specific ribonuclease, Drosha), RNase III 효소 다이서(RNase III enzyme Dicer) 및 RNA 유도 침묵 복합체(RNA-induced silencing complex, RISC)를 요구한다(비특허문헌 6). 상기 공정은 우선 핵에서 일어난 다음 세포질에서 일어난다(비특허문헌 7). 첫째로, 60-80 nt의 pre-miRNA는 핵에서 Drosha에 의해 최초의 miRNA(primary miRNA, pri-miRNA)로부터 절단된다(비특허문헌 8). 그런 다음, pre-miRNA는 세포질로 이동된 후, 성숙한 miRNA를 생성하기 위해 Dicer에 의해 절단된다(비특허문헌 9). 그런 후, 성숙한 miRNA는 RISC로 불리는 단백질-RNA 복합체로 통합된다(비특허문헌 10). 결과로서, 성숙한 miRNA는 RISC에서 ORF 또는 3' 비번역 부위(untranslated region, UTR)에서 그의 종자 서열(seed sequence)에 의해 상기 miRNA에 결합하는 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있으며, 이는 mRNA 번역의 억제를 야기한다(비특허문헌 11).

[0003] 암에서 miRNA의 증폭은 세포 사멸, 생존 및 분화에 영향을 줄 수 있다. miRNA는 세포 특이적 방법에서 발현되고, 세포 동정 및 발달 시기를 포함하는 진행 생물에서 많은 생물학적 대사 공정에서 중요한 기능을 한다(비특허문헌 12). 최근에, 암 치료에 대한 치료학적 표적으로 잠재적 역할을 가진 다양한 암 관련 miRNA들이 보고된 바 있다(비특허문헌 13). 암의 한 부분집합은 전세계적으로 암 관련 인간 죽음의 주요한 원인으로 남아있다.

폐암 환자 중에서 대략 80%의 환자는 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC)이다(비특허문헌 14, 15). 임상적 치료 전략의 개선에도 불구하고, NSCLC는 높은 사망률을 갖는 공격성 악성 종양으로 남아있다(비특허문헌 16). 따라서, 폐암에 관한 연구는 폐암 환자의 치료를 위한 신규한 약제를 발굴하기 위해 매우 중요하다.

[0004] 최근 연구는 miRNA에 의한 3' UTR 표적 유전자 인식이 상기 miRNA 종자에서 (뉴클레오티드 2-8) 뉴클레오티드에 대해 쌍을 이루어 달성되는 것을 보여주었다(비특허문헌 17). 또한 최근에는 miRNA가 상기 종자 부위의 5' UTR에 결합하여 표적 mRNA에서 다중 부위의 인식이 가능하게 할 수 있음이 발견되었다(비특허문헌 18). miRNA는 표적 유전자의 침묵에서 중요한 역할을 하는 것이 규명되었다(비특허문헌 19). 일부 보고는 암 세포주에서 세포사멸, 분화, 염증, 전이 및 이동에서 중요한 역할을 하는 것이 보고된 바 있다(비특허문헌 20). miR-212는 항-세포사멸 단백질을 표적화함으로써 NSCLC에서 세포사멸을 증가시킨다(비특허문헌 21). 인간 중간엽-상피 이행 인자(mesenchymal-epithelial transition factor, c-Met)를 조절하는 miRNA는 흑색종 유래 최초 세포의 이동을 유도한다(비특허문헌 22). miR-203은 전이성 전립선암의 억제에 대한 매력적인 표적을 조절한다(비특허문헌 23). 암과 관련된 miRNA에 관한 연구가 수행되고 있음에도 불구하고, 이런 주제에 대한 더 많은 연구가 요구된다.

[0005] 최근에, 일부 연구에서 miRNA가 암 세포 및 조직에서 발현이 감소된다는 보고가 있다. miR-1은 정상 세포에 비해 폐암 세포에서 유의적으로 발현이 감소한 다(비특허문헌 28). miR-15a 및 miR-16는 NSCLC 세포에서 특이적으로 발현이 감소하고, miR-15a/miR-16는 사이클린 D1, D2, 및 E1의 발현 감소를 통해 G<sub>1</sub> 차단을 유도한다(비특허문헌 29). 게다가, 종양 시료에서 miR-16의 발현은 NSCLC에서 예후 마커가 될 수 있다(비특허문헌 30). miR-145는 폐암에서 발현이 감소하고 진행되는 NSCLC에 대한 마커가 될 수 있다(비특허문헌 31). 이런 miRNA들은 그 기능이 알려져 있지 않더라도, miRNA들은 다양한 생물학적 과정에서 표적 유전자를 조절한다(비특허문헌 33, 34).

[0006] 한편, 인간 중간엽-상피 전이 인자(mesenchymal-epithelial transition factor, c-Met)은 간세포 성장인자 수용체(hepatocyte growth factor receptor, HGFR)로서, 종양 성장 및 종양 세포의 전이를 조절한다고 알려져 있다(비특허문헌 26). c-Met으로부터 유래된 다운스트림 신호의 억제는 NSCLC의 치료에 효과적일 수 있다(비특허문헌 39). miR-34a는 c-Met의 발현 감소를 통해 세포 증식 및 이동을 조절한다. 따라서, c-Met의 발현 감소는 암 세포의 증식 및 이동을 억제하고 세포사멸을 증가시킨다(비특허문헌 40).

[0007] 이에, 본 발명자들은 폐암 세포로부터 신규한 miRNA를 동정 및 특정하기 위해, 폐암 조직에서 신규한 miRNA의 발현 패턴을 분석하고 표적 유전자를 조사한 결과, hc-smR-S2-5가 인간 폐암에서 중요한 역할을 할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Long JE, Chen HX. (2009) Identification and characteristics of cattle microRNAs by homology searching and small RNA cloning. *Biochem Genet.* 47, 329-343.

(비특허문헌 0002) Zheng J, Xue H, Wang T, Jiang Y, Liu B, Li J, Liu Y, Wang W, Zhang B, Sun M. (2011) miR-21 downregulates the tumor suppressor P12 CDK2AP1 and stimulates cell proliferation and invasion. *J Cell Biochem.* 112, 872-80.

(비특허문헌 0003) Liu D, Fan J, Mei M, Inqvarsson S, Chen H. (2009) Identification of miRNAs in a liver of a human fetus by a modified method. *PLoS One.* 4, e7594.

- (비특허문헌 0004) Bartel, DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116, 281-297.
- (비특허문헌 0005) Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos MA. (2010) MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One*. 5, e11780.
- (비특허문헌 0006) Xie SS, Huang TH, Shen Y, Li XY, Zhang XX, Zhu MJ, Qin HY, Zhao SH. (2010) Identification and characterization of microRNAs from porcine skeletal muscle. *Anim Genet*. 41, 179-190.
- (비특허문헌 0007) Kim VN. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6, 376-385.
- (비특허문헌 0008) Hossain MM, Ghanem N, Hoelker M, Rings F, Phatsara C, Tholen E, Schellander K, Tesfaye D. (2009) Identification and characterization of miRNAs expressed in the bovine ovary. *BMC Genomics*. 10, 443.
- (비특허문헌 0009) Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425, 415-419.
- (비특허문헌 0010) Nelson KM, Weiss GJ. (2008) MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future. *Mol Cancer Ther*. 7, 3655-3660.
- (비특허문헌 0011) Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. (2009) MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer*. 8, 102.
- (비특허문헌 0012) Huang J, Hao P, Chen H, Hu W, Yan Q, Liu F, Han ZG. (2009) Genome-wide identification of *Schistosoma japonicum* microRNAs using a deep-sequencing approach. *PLoS One*. 4, e8206.
- (비특허문헌 0013) Yao Q, Xu H, Zhang QQ, Zhou H, Qu LH. (2009) MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 388, 539-542.
- (비특허문헌 0014) Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 18, 997-1006.
- (비특허문헌 0015) Donnem T, Lonvik K, Eklo K, Berg T, Sorbye SW, Al-Shibli K, Al-Saad S, Andersen S, Stenvold H, Bremnes RM, Busund LT. (2011) Independent and tissue-specific prognostic impact of miR-126 in non-small cell lung cancer: Coexpression with vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival. *Cancer*. 117, 3193-3200.
- (비특허문헌 0016) Wang CL, Sun BS, Tang Y, Zhuang HQ, Cao WZ. (2008) CCR1 knockdown suppresses human non-small cell lung cancer cell invasion. *J Cancer Res Clin Oncol*. 135, 695-701.
- (비특허문헌 0017) Liang H, Landweber LF. (2007) Hypothesis: RNA editing of microRNA target sites in humans? *RNA*. 13, 463-467.
- (비특허문헌 0018) Li T, Morgan MJ, Choksi S, Zhang Y, Kim YS, Liu ZG. (2010) MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF- $\kappa$ B pathway by regulating expression of the kinase IKK $\alpha$  during macrophage differentiation. *Nat Immunol*. 11, 799-805.
- (비특허문헌 0019) Sdassi N, Silveri L, Laubier J, Tilly G, Costa J, Layani S, Vilotte JL, Le Provost F. (2009) Identification and characterization of new miRNAs cloned from normal mouse mammary gland. *BMC Genomics*. 10, 149.
- (비특허문헌 0020) Mead EA, Tu Z. (2008) Cloning, characterization, and expression of microRNAs from the Asian malaria mosquito, *Anopheles stephensi*. *BMC Genomics*. 9, 244.

- (비특허문헌 0021) Incoronato M, Garofalo M, Urso L, Romano G, Quintavalle C, Zanca C, Iaboni M, Nuovo G, Croce CM, Condorelli G. (2010) miR-212 increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in non-small cell lung cancer by targeting the antiapoptotic protein PED. *Cancer Res.* 70, 3638-3646.
- (비특허문헌 0022) Migliore C, Petrelli A, Ghiso E, Corso S, Capparuccia L, Eramo A, Comoglio PM, Giordano S. (2008) MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth. *Cancer Res.* 68, 10128-10136.
- (비특허문헌 0023) Saini S, Majid S, Yamamura S, Tabatabai ZL, Suh SO, Shahryari V, Chen Y, Deng G, Tanaka Y, Dahiya R. (2011) Regulatory role of miR-203 in prostate cancer progression and metastasis. *Clin Cancer Res.* 17, 5287-5298.
- (비특허문헌 0024) Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33, e179.
- (비특허문헌 0025) Peltier HJ, Latham GJ. (2008) Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA.* 14, 844-852.
- (비특허문헌 0026) Tan S, Li R, Ding K, Lobie PE and Zhu T. (2011) miR-198 inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting the HGF/c-MET pathway. *FEBS Lett.* 585, 2229-2234.
- (비특허문헌 0027) Ro S, Park C, Jin J, Sanders KM, Yan W. (2006) A PCR-based method for detection and quantification of small RNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 351, 756-763.
- (비특허문헌 0028) Nasser MW, Datta J, Nuovo G, Kutay H, Motiwala T, Majumder S, Wang B, Suster S, Jacob ST, Ghoshal K. (2008) Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem.* 283, 33394-33405.
- (비특허문헌 0029) Bandi N, Zbinden S, Gugger M, Arnold M, Kocher V, Hasan L, Kappeler A, Brunner T, Vassella E. (2009) miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 69, 5553-5559.
- (비특허문헌 0030) Navarro A, Diaz T, Gallardo E, Vinolas N, Marrades RM, Gel B, Campayo M, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M. (2011) Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer. *J Surg Oncol.* 103, 411-415.
- (비특허문헌 0031) Chen Z, Zeng H, Guo Y, Liu P, Pan H, Deng A, Hu J. (2010) miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc. *J Exp Clin Cancer Res.* 29, 151.
- (비특허문헌 0032) Ro S, Song R, Park C, Zheng H, Sanders KM, Yan W. (2007) cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary. *RNA.* 13, 2366-2380.
- (비특허문헌 0033) Sachdeva M, Mo YY. (2010) MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res.* 70, 378-387.
- (비특허문헌 0034) Xu F, Zhang X, Lei Y, Liu Z, Tong T, Wang W. (2010) Loss of repression of HuR translation by miR-16 may be responsible for the elevation of HuR in human breast carcinoma. *J Cell Biochem.* 111, 727-734.
- (비특허문헌 0035) Wang G, Mao W, Zheng S. (2008) MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells. *FEBS Lett.* 582, 3663-3668.
- (비특허문헌 0036) Bentwich I. (2005) Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett.* 579, 5904-5910.
- (비특허문헌 0037) Luo H, Zou J, Dong Z, Zeng Q, Wu D, Liu L. (2011) Up-regulated miR-17 promotes cell

proliferation, tumor growth and cell cycle progression by targeting RND3 tumor suppressor gene in colorectal carcinoma. Biochem J.[Epub ahead of print].

(비특허문헌 0038) Rajewsky N. (2006) microRNA target predictions in animals. Nat Genet. S8-13.

(비특허문헌 0039) Li N, Fu H, Tie Y, Hu Z, Kong W, Wu Y, Zheng X. (2009) miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer lett. 275, 44-53.

(비특허문헌 0040) Kim S, Lee UJ, Kim MN, Lee EJ, Kim JY, Choung S, Kim YJ, Choi YC. (2008) MicroRNA miR-199a\* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). J Biol Chem. 283, 18158-18166.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 신규한 hc-smR-S2-5 miRNA, 이를 포함하는 발현벡터, 및 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입한 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 신규한 hc-smR-S2-5 miRNA를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또다른 목적은 본 발명에 따른 신규한 hc-smR-S2-5 miRNA를 이용하여 폐암을 진단하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또다른 목적은 본 발명에 따른 신규한 hc-smR-S2-5 miRNA를 이용하여 폐암 치료제의 후보물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 구성된 hc-smR-S2-5 miRNA를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA를 포함하는 발현벡터를 숙주세포에 형질전환시킨 형질전환체를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA 또는 이를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA의 검출을 위한 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함하는 폐암 진단용 키트를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은
- [0019] 1) 피검체에서 분리된 시료에서 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0020] 2) 대조군에 비하여 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준이 감소되면 폐암에 걸릴 위험이 있는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 폐암 진단 방법을 제공한다.
- [0021] 아울러, 본 발명은
- [0022] 1) 피검 조성물 또는 화합물을 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 세포에 처리하는 단계; 및
- [0023] 2) 대조군에 비하여 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준을 증가시키는 피검 조성물 또는 화합물을 선별하는 단계를 포함하는, 폐암 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.



**발명의 효과**

[0024] 본 발명에서는 폐암 세포로부터 신규한 hc-smR-S2-5 miRNA를 분리하였고, 구조 및 서열 분석을 통해 상기 miRNA가 머리핀(stem-loop) 구조를 형성하고 포유류에서 그들의 서열을 보존하는 것을 확인하였고, 폐암 세포에서 저발현하고, 인간 c-Met를 mRNA 및 단백질 수준에서 직접적으로 억제하며, 폐암 세포에서 hc-smR-S2-5의 과발현은 c-Met을 통해 세포의 증식 및 이동을 감소시키고 세포주기 관련 단백질을 감소시키는 것을 확인함으로써, hc-smR-S2-5를 폐암 진단의 바이오마커로 사용할 수 있고, 폐암 예방 및 치료의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0025] 도 1은 hc-smR-S2-5의 구조 및 서열을 나타내는 그림이다.

도 1의 A는 hc-smR-S2-5 pre-miRNA의 2차 구조를 나타내는 그림이다. hc-smR-S2-5의 인간 게놈 서열 업스트림과 다운스트림은 컴퓨터 프로그램 RNAfold로 접혀져 있다. hc-smR-S2-5의 성숙한 miRNA 서열은 노란색으로 표시되어 있다.

도 1의 B는 다양한 포유류에서 hc-smR-S2-5의 서열을 나타내는 그림이다. 포유류는 hc-smR-S2-5의 서열이 보존되어 있다. 포유류 보전은 NCBI 블라스팅(blasting)에 의해 확인되었다.

도 2는 다양한 세포들에서 hc-smR-S2-5의 발현을 나타내는 그림이다. 다양한 세포들에서 hc-smR-S2-5의 발현은 폴리-A-테일(Poly-A-tailed) RT-PCR에 의해 측정된 결과를 나타내는 그림이다.

도 3은 폐암 세포 및 조직에서 hc-smR-S2-5의 발현을 나타내는 그래프이다.

도 3의 A는 폐암 세포에서 hc-smR-S2-5의 발현을 나타내는 그래프이다. 다양한 폐 유래 세포에서 hc-smR-S2-5의 수준은 TaqMan miRNA 분석에 의해 결정되었다.

도 3의 B는 폐암 조직에서 hc-smR-S2-5의 발현을 나타내는 그래프이다. hc-smR-S2-5의 발현은 폐암 및 정상 조직 사이 비교되었다.

도 4는 c-Met이 hc-smR-S2-5의 잠재적인 표적임을 나타내는 그림이다.

도 4의 A는 예측되는 hc-smR-S2-5의 표적 유전자와 3'-UTR에서 결합 부위를 나타내는 그림이다. pGL3-예측되는 표적 유전자와 miRNA 미믹(mimic)(완충용액, NC 또는 hc-smR-S2-5)으로 공동-형질전환된 세포에서 루시페라아제 활성을 측정하였다. hc-smR-S2-5 미믹의 서열을 나타내었다.

도 4의 B는 c-Met 결합 부위에서 돌연변이가 종자 부위(seed region) 아래에 나타나는 것을 나타내는 그림이다. 상기 데이터는 파이어플라이(firefly) 및 레닐라(renilla) 루시페라아제 활성의 비율에 의해 정상화되었다. 이런 결과는 적어도 세 번의 실험으로부터 획득되었다.

도 5는 hc-smR-S2-5가 c-Met의 전사 및 번역을 유의적으로 억제시키는 것을 나타내는 그래프이다.

도 5의 A는 hc-smR-S2-5 또는 대조군으로 형질전환된 A549의 발현을 TaqMan miRNA 분석에 의해 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5의 B는 미믹으로 형질전환된 A549에서 c-Met의 mRNA 수준을 정량적 RT-PCR 분석에 의해 측정된 결과를 나타내는 그래프이다. 유전자 전사의 상대적인 양은 GAPDH로 정상화되었다.

도 5의 C는 미믹으로 형질전환된 A549에서 c-Met의 단백질 수준을 웨스턴 블랏팅(Western blotting) 분석에 의해 측정된 결과를 나타내는 그림이다. RNA 미믹은 24시간 동안 100 nmol의 농도로 형질전환되었다.

도 6은 hc-smR-S2-5가 세포 성장 및 이동을 통한 c-Met 네트워크를 조절하는 것을 나타내는 그림이다.

도 6의 A는 hc-smR-S2-5 또는 대조군으로 형질전환된 A549에서 세포 증식을 XTT 분석에 의해 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6의 B는 hc-smR-S2-5 또는 대조군으로 형질전환된 A549의 세포 수를 트리판 블루 염색(trypsin blue staining) 분석에 의해 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6의 C는 hc-smR-S2-5 또는 대조군 미믹으로 형질전환된 A549의 세포 운동성을 조직손상 회복(wound healing) 분석에 의해 측정된 결과를 나타내는 그림이다.

도 6의 D는 세포 이동을 트랜스웰(transwell) 분석에 의해 측정된 결과를 나타내는 그림이다. 왼쪽의 현미경 사진은 형질전환 후 48시간에 획득되었다(확대, X 100). 실험은 세 번의 반복되었다.

도 7은 hc-smR-S2-5에 의한 c-Met 억제가 c-Met 다운스트림 및 세포주기 관련 단백질을 조절하는 것을 나타내는 그림이다.

도 7의 A는 hc-smR-S2-5로 형질전환된 세포에서 다운스트림 표적 유전자, p-Akt, p-ERK의 단백질 수준을 웨스턴 블랏팅 분석에 의해 측정된 결과를 나타내는 그림이다.

도 7의 B는 hc-smR-S2-5로 형질전환된 세포에서 세포주기 관련 단백질 수준을 NC와 비교하여 입증한 결과를 나타내는 그림이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명은 신규한 hc-smR(human cancer-small RNA)-S2-5 miRNA를 제공한다.
- [0028] 상기 hc-smR-S2-5 miRNA는 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 상기 서열번호 1의 염기서열에서 1개 또는 2개의 염기가 치환, 결실 또는 삽입되는 변이도 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 hc-smR-S2-5 miRNA는 인간 폐 또는 폐암 세포에서 유래된 것이 바람직함, 이에 한정되지 않으며, 인간, 오랑우탄, 원숭이, 쥐 및 개와 같은 다양한 포유류 세포에서 유래될 수 있다.
- [0030] 상기 hc-smR-S2-5 miRNA는 중간엽-상피 이행 인자(mesenchymal-epithelial transition factor, c-Met)를 mRNA 및 단백질 수준에서 직접적으로 억제할 수 있다.
- [0031] 상기 hc-smR-S2-5 miRNA는 폐암 세포에서 저발현하고, 폐암 세포에서 hc-smR-S2-5의 과발현은 c-Met을 통해 세포의 증식 및 이동을 감소시키고 세포주기 관련 단백질을 감소시킬 수 있다.
- [0032] 본 발명자들은 인간 폐암 세포에서 신규한 miRNA인 hc-smR-S2-5를 분리 및 동정한 후 그 기능을 분석한 결과, 대략 70 nt 서열의 hc-smR-S2-5 건구체는 2차 폴딩 구조(secondary folding structure)를 형성하고(도 1의 A), hc-smR-S2-5는 염색체 2에 위치하며, 유전자 사이 부위(intergenic region)로부터 전사되고, 성숙한 hc-smR-S2-5의 서열은 오랑우탄, 원숭이, 쥐 및 개와 같은 다양한 포유류에서 100% 보존되어 있음을 확인하였다(도 1의 B). 또한, hc-smR-S2-5의 발현 프로파일을 분석한 결과, 폐 유래 세포를 포함한 거의 모든 세포에서 발현되는 것을 확인하였다(도 2). 이런 데이터는 hc-smR-S2-5가 모든 다양한 세포에서 검출되는 것을 제시하며, 그러므로 hc-smR-S2-5는 세포에서 알려지지 않은 miRNA로 존재하는 것이 확인되었다(비특허문헌 32).
- [0033] 본 발명자들은 hc-smR-S2-5의 폐암에서 발현 수준을 분석한 결과, hc-smR-S2-5가 폐암 조직에서 저발현하는 것을 확인하였다(도 3의 B). 또한, hc-smR-S2-5의 표적 유전자를 알아보기 위해, 예측되는 표적 유전자(IGF1R, BAD, c-Met 및 VCAM1)를 선별한 후 이들 유전자를 발현하도록 형질전환된 폐암 세포를 제조한 다음, 루시퍼라아제 리포터 분석을 이용하여 분석한 결과, hc-smR-S2-5는 c-Met를 직접적으로 조절하고(도 4의 A), hc-smR-S2-5의 표적 부위는 c-Met 3'UTR의 504-512 nt 부위인 것을 확인하였다. 또한, hc-smR-S2-5의 c-Met에 대한 효과를 알아보기 위해, hc-smR-S2-5로 형질전환된 폐암 세포에서 c-Met의 전사 및 번역을 정량적 RT-PCR 분석 및 웨스턴블랏팅 분석을 이용하여 분석한 결과, hc-smR-S2-5는 c-Met의 전사 및 번역을 감소시키는 것을 확인하였다(도 5).
- [0034] 본 발명자들은 c-Met가 세포 증식 및 이동을 조절하기 때문에, hc-smR-S2-5가 c-Met를 표적화하여 세포 증식 및 이동을 억제하는지 알아보기 위해, hc-smR-S2-5로 형질전환된 폐암 세포에서 세포 증식 및 이동을 각각 XTT 분석, 트리판 블루 염색 분석, 조직손상 회복 분석 및 트랜스웰 분석을 이용하여 분석한 결과, hc-smR-S2-5는 c-Met의 발현 감소를 통해 폐암 세포의 증식 및 이동을 억제하는 것을 확인하였다(도 6).
- [0035] 본 발명자들은 hc-smR-S2-5에 의한 c-Met의 발현 감소 후 다운 스트림 신호 경로의 발현을 분석한 결과, hc-

smR-S2-5는 c-Met을 통해 인산화된 Akt 및 인산화된 ERK1/2을 감소시켰고, 인산화된 Rb, CDK2 및 사이클린 E와 같은 세포주기 관련 단백질의 발현을 감소시켰다(도 7). 그러나, hc-smR-S2-5는 이들 분자의 3' UTR에 직접적으로 종자 매치되지 않았다. 즉, hc-smR-S2-5는 c-Met를 직접적으로 억제시켰고, c-Met의 다운스트림 인자들은 간접적으로 유사하게 억제시켰다.

[0036] 결론적으로, 본 발명의 hc-smR-S2-5는 폐암 세포에서 분리되었고, 폐암 조직에서 저발현하며, 직접적으로 c-Met 발현을 감소시키고, c-Met 다운스트림의 신호 및 세포주기 관련 단백질들의 발현을 감소시키며, c-Met의 발현 감소를 통해 세포 증식 및 이동을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, hc-smR-S2-5는 폐암 진단의 바이오마커가 될 수 있고, 폐암 치료제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA를 포함하는 발현백터를 제공한다.

[0038] 상기 발현백터는 비바이러스성 백터 또는 바이러스성 백터인 것이 바람직하고, 비바이러스성 백터로는 플라스미드 DNA인 것이 바람직하며, 바이러스성 백터로는 레트로바이러스 백터, 아테노바이러스 백터 또는 아테노부석바이러스 백터인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0039] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA를 포함하는 발현백터를 숙주세포에 형질전환시킨 형질전환체를 제공한다.

[0040] 상기 숙주세포는 인간을 포함한 포유류의 체세포인 것이 바람직하고, 인간의 폐 또는 폐암 세포인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0041] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA, 이를 포함하는 발현백터, 또는 상기 발현백터로 형질전환된 형질전환체를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0042] 본 발명의 hc-smR-S2-5 miRNA는 폐암 세포에서 저발현하고, c-Met를 mRNA 및 단백질 수준에서 직접적으로 억제하며, 폐암 세포에서 hc-smR-S2-5의 과발현은 세포의 증식 및 이동을 감소시키고 세포주기 관련 단백질을 감소시키는 것을 확인함으로써, hc-smR-S2-5를 폐암 예방 및 치료제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 조성물은 hc-smR-S2-5에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다.

[0044] 상기 조성물은 임상 투여 시에 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0045] 상기 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0046] 상기 조성물의 일일 투여량은 약 0.0001 내지 1000 mg/kg이고, 구체적으로 0.001 내지 100 mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으나 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0047] 본 발명의 hc-smR-S2-5를 포함하는 백터의 경우 구체적으로 0.01 내지 500 mg을 함유하고, 보다 구체적으로 0.1 내지 300 mg을 함유하며, hc-smR-S2-5를 포함하는 재조합 바이러스의 경우, 구체적으로  $10^3 \sim 10^{12}$  IU(10 내지  $10^{10}$  PFU)를 함유하고, 보다 구체적으로  $10^5$  내지  $10^{10}$  IU를 함유하나, 이에 한정되지 않는다.

[0048] 또한, 본 발명의 hc-smR-S2-5를 포함하는 세포의 경우, 구체적으로  $10^3$  내지  $10^8$  개를 함유하고, 보다 구체적으로  $10^4$  내지  $10^7$  개를 함유하나, 이에 한정되지 않는다.

[0049] 또한, 본 발명의 hc-smR-S2-5를 포함하는 백터 또는 세포를 유효성분으로 함유하는 조성물의 유효 용량은 체중

1 kg당 백터의 경우에는 0.05 내지 12.5 mg/kg, 재조합 바이러스의 경우에는  $10^7$  내지  $10^{11}$  바이러스 입자( $10^5$  내지  $10^9$  IU)/kg, 세포의 경우에는  $10^3$  내지  $10^6$  세포/kg이고, 구체적으로 백터의 경우에는 0.1 내지 10 mg/kg, 재조합 바이러스의 경우에는  $10^8$  내지  $10^{10}$  입자( $10^6$  내지  $10^8$  IU)/kg, 세포의 경우에는  $10^2$  내지  $10^5$  세포/kg이며, 하루 2 내지 3회 투여될 수 있다. 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 발병 정도에 따라 변할 수 있다.

[0050] 상기 조성물은 실제 임상 투여 시에 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA의 검출인자를 포함하는 폐암 진단용 키트를 제공한다.

[0052] 상기 miRNA의 검출인자로는 프라이머, 프로브 또는 항체인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0053] 또한, 본 발명은

[0054] 1) 피검체에서 분리된 시료에서 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0055] 2) 대조군에 비하여 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준이 감소되면 폐암에 걸릴 위험이 있는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 폐암 진단 방법을 제공한다.

[0056] 상기 방법에 있어서, 상기 피검체는 인간을 포함한 포유류인 것이 바람직하고 인간인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0057] 상기 방법에 있어서, 상기 시료는 체세포인 것이 바람직하고, 폐 또는 폐암 세포 또는 조직인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0058] 상기 방법에 있어서, 상기 hc-smR-S2-5의 발현 수준의 측정은 실시간 RT-PCR으로 수행되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0059] 아울러, 본 발명은

[0060] 1) 피검 조성물 또는 화합물을 본 발명에 따른 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 세포에 처리하는 단계; 및

[0061] 2) 대조군에 비하여 hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 수준을 증가시키는 피검 조성물 또는 화합물을 선별하는 단계를 포함하는, 폐암 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0062] 상기 방법에 있어서, hc-smR-S2-5 miRNA의 발현 세포는 hc-smR-S2-5 miRNA를 포함하는 발현백터를 폐암 세포에 형질전환시켜 제조된 hc-smR-S2-5 miRNA 과발현 세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0063] 상기 방법에 있어서, 상기 hc-smR-S2-5의 발현 수준의 측정은 실시간 RT-PCR으로 수행되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0064] 이하 실시예를 통해 본 발명의 내용을 보다 상세히 설명한다.

[0065] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## 실시예 1

[0066] **인간 세포의 배양**

[0067] 인간 세포주는 미국 균주 은행(American Type Culture Collection, ATCC) 및 한국 세포주 은행(Korean cell line bank, KCLB)에서 획득하였다. 인간 이배체 폐 정상 섬유아세포 WI-38 세포(ATCC, CCL-75)는 이글스 최소 필수 배지(Eagle's minimal essential medium, EMEM)(Lonza)에서 배양시켰다. SV-40 형질전환 인간 폐 상피 WI-38 VA-13 세포(KCLB, 10075.1), 인간 폐 선편평암 상피 NCI-H596 세포(KCLB, 90596), 인간 폐암 상피 A549 세포(ATCC, CCL-185), 및 인간 폐 편평세포암 상피 HCC-1588 세포(KCLB, 71588)는 RPMI(Welgene)에서 배양시켰다. 모든 세포주는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)(Hyclone, Lonza), 100 U/ml 페니실린, 및 100 ug/ml 스트렙토마이신으로 보충하였으며, 대기 중 5% CO<sub>2</sub>를 포함하는 습한 대기의 인큐베이터에서 37°C로 배양하였다.

**실시예 2**

[0068] **폐암 세포로부터 hc-smR-S2-5의 클로닝 및 동정**

[0069] **<2-1> 폐암 세포로부터 RNA의 분리**

[0070] 제조사의 프로토콜에 따라 트리졸(TRIZOL) 시약(Molecular Research Center Inc.)으로 총 RNA를 추출하였다. 그런 다음, 추출된 RNA를 80% 에탄올로 세척한 후, 0.1% DEPC로 처리된 물(Sigma)로 재현탁한 다음, -80°C에서 저장하였다.

[0071] **<2-2> 작은 RNA의 클로닝 및 시퀀싱**

[0072] mirVana RNA 분리 키트(Ambion)를 이용하여 폐암 세포로부터 200 nt 보다 더 작은 RNA를 추출하였다. 상기 추출된 작은 RNA를 DynaExpressmiRNA 클로닝 키트(BioDynamics Laboratory Inc.)를 이용하여 벡터 내로 클로닝하였다. RNA 침전에 의해 작은 RNA를 분리한 후, 15% 변성 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)에서 정제하였다. 알칼린포스파타아제(alkaline phosphatase)에 의해 18-30 nt RNA를 탈인산화시켰다. 그런 다음, 작은 RNA를 3'-링커에 연결시켰다. 3'-링커가 연결된 산물은 5'-링커에서 환상화 되는 것을 막기 위해 3'-말단을 차단시켰다. 3'-말단이 차단된 산물을 15% 변성 PAGE를 이용하여 정제한 후, 36-46 nt의 산물을 절단한 다음 정제하였다. 두 개의 링커의 연결은 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동한 후 염색함에 의해 수행되었다. 50-60 nt miRNA는 겔을 절단하여 만들어졌다. 결과 산물을 cDNA를 만들기 위해 역전사시켰다. PCR 산물을 TA 클로닝 키트(Promega)를 이용하여 T 벡터 내로 직접 연결시키고, 클로닝하고, 서열화(Macrogen)하였다.

[0073] **<2-3> 바이오인포매틱스 분석**

[0074] 작은 RNA 서열은 웹 기초 프로그램을 이용하여 miRNA의 특성을 평가하였다. 작은 RNA의 서열은 NCBI 블라스팅을 이용하여 인간 게놈에서 서열을 확인하였다. 머리핀(stem loop)을 형성하는 작은 RNA는 RNAfold 웹서버를 이용하여 분석하였다.

[0075] 그 결과, 작은 RNA 중에서 hc-smR-S2-5를 동정하였고 RNAfold 프로그램에 의해 2차 구조를 확인하였다(도 1의 A). 또한, hc-smR-S2-5의 성숙한 miRNA 서열은 다음과 같이 나타났다: 5'-AGAAGGGAAGAUGGUGAC-3'(서열번호: 1). 또한, hc-smR-S2-5의 염색체는 염색체 2p25.2: 6790550-6790567에 위치하였다. hc-smR-S2-5는 유전자 사이 부위로부터 전사하는 것을 확인하였다. 또한, hc-smR-S2-5의 서열은 오랑우탄, 원숭이, 쥐 및 개와 같은 다양한 포유류에서 100% 보존되어 있음을 확인하였다(도 1의 B).

**실시예 3**

[0076] **다양한 세포 및 폐 조직에서 hc-smR-S2-5의 발현**

[0077] 인간 폐 및 폐암 세포에서 hc-smR-S2-5의 발현을 폴리-A-테일(Poly-A-tailed) RT-PCR 및 TaqMan miRNA 분석을 이용하여 확인하였다.

[0078] **<3-1> 폴리-A-테일(Poly-A-tailed) RT-PCR 분석**



- [0079] 폴리-A-테일(Poly-A-tailed) RT-PCR(비특허문헌 27)을 수행하여 다양한 인간 세포주에서 hc-smR-S2-5의 발현을 분석하였다.
- [0080] 그 결과, hc-smR-S2-5는 다양한 인간 폐 세포 및 폐암 세포에서 발현되는 것을 확인하였다(도 2).
- [0081] <3-2> 폐암 환자의 조직 준비
- [0082] 폐암 환자의 조직 시료는 과학기술부 내 한국과학재단(Korea Science & Engineering Foundation)에 의해 승인 및 지지를 받는 한국 폐 조직 은행(Korea Lung Tissue Bank)으로부터 획득하였다.
- [0083] <3-3> TaqMan miRNA 분석
- [0084] TaqMan miRNA 분석(Applied Biosystems, Foster City, CA)(비특허문헌 24 및 25)을 이용하여 실시간 PCR에 의해 인간 폐 세포 및 폐암 조직에서 miRNA의 발현을 정량하였다. TaqMan miRNA 분석을 위해, miRNA-특이적 프라이머를 사용하였다. miRNA 발현 분석을 위해, 10 ng 총 RNA를 TaqMan miRNA 분석으로 공급된 miRNA-특이적 프라이머와 함께 사용하였다. 주문 제작된 RT-프라이머를 성숙한 miRNA의 상보적인 서열에 합성시킨 후 Custom TaqMan miRNA 분석에 공급하였다. 상보적인 DNA 주형은 RNU48로 표준화한 후 제조사의 지시에 따라 40 주기(cycle)를 갖는 PCR 분석에 적용시켰다. CFX Manager™ 소프트웨어(Biorad)를 이용하여 데이터를 생성시켰다.  $2^{-ddCT}$  방법을 통해 상대적인 유전자 발현을 산출하였다.
- [0085] 그 결과, hc-smR-S2-5의 발현은 WI-38 VA-13, HCC1588, A549 및 NCI-H596 세포에서 WI-38 세포에 비해 대략 두 배 정도 낮게 발현되었다(도 3의 A). 또한, 10개의 인간 폐암 조직에서 hs-smR-S2-5의 발현 수준을 10개의 폐 정상 조직에서 발현과 비교한 결과, hc-smR-S2-5의 발현은 폐암 조직에서 폐 정상 조직에 비해 대략 두 배로 낮게 발현되었다(도 3의 B).

#### 실시예 4

- [0086] hc-smR-S2-5에 의한 c-Met의 조절 확인
- [0087] hc-smR-S2-5의 기능을 알아보기 위해, 폐암에서 발현이 증가되는 후보 표적 유전자를 확인하였다(<http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiment/E-MTAB-37>). 이들 중, hc-smR-S2-5 후보 표적 유전자는 hc-smR-S2-5 종자 부위(seed region)와 서열 상동성을 가지는 것으로 선택하였다. 구체적으로, 폐암에서 과발현하고 세포 증식 및 이동과 관련된(비특허문헌 35), hc-smR-S2-5의 표적 유전자를 확인하기 위해, EMBL 데이터베이스를 이용하여 폐암 증식 및 이동과 관련된 유전자를 확인하였고, TargetScan 및 PicTar 프로그램을 이용하여 표적 유전자를 조사하였으며(비특허문헌 36), 유전자의 3' UTR 내에서 hc-smR-S2-5의 5' 말단의 7 nt에 걸쳐서 염기쌍을 이루는(비특허문헌 37 및 38) 표적 유전자를 선별하였다. 잠재적인 hc-smR-S2-5 표적인 4개의 후보 표적 유전자(IGF1R, BAD, c-Met 및 VCAM1)를 이중 루시페라아제 리포터 분석을 이용하여 선별하였다.
- [0088] <4-1> miRNA 미믹(mimic)의 형질전환
- [0089] 형질전환은 제조사의 프로토콜에 따라 리포펙타민 2000 사약을 이용하여 수행하였다. miRNA 미믹[음성 대조군(Negative control, NC), hc-smR-S2-5, si-c-Met 및 Anti-S2-5]을 제놀루션 제약회사(Genolution Pharmaceuticals, Inc)에서 구입하였다. NC는 보편적인 대조군으로 측정하였다. anti-S2-5 및 si-c-Met는 각각 hc-smR-S2-5 억제제 및 c-Met를 표적화하는 siRNA로 화학적으로 합성시켰다.
- [0090] <4-2> 이중 루시페라아제 리포터 분석
- [0091] pGL3 벡터 내로 예측되는 표적 유전자 3'-UTR 부위의 삽입을 통해 pGL3-리포터 플라스미드를 제작하였다. c-Met-3'UTR-돌연변이 컨스트럭트를 제작하기 위해, 종자 부위를 뮤타-직접 부위-직접 돌연변이 생성 키트(mutadirect site-directed mutagenesis kit)(iNTRON)를 이용하여 돌연변이시켰다. A549 세포( $5 \times 10^4$ )를 24-웰 플레이트에 플레이트시킨 후, 24시간 동안 100 nmol hc-smR-S2-5 또는 NC(예측되는 표적 유전자에 대한 pGL3-리포터 및 pRL-TK 벡터)로 공동-형질전환시켰다. pRL-TK 레닐라 루시페라아제 대조군 벡터는 내부 대조군으로서 공동-형질전환시켰다. 파이어플라이(firefly) 및 레닐라(renilla) 루시페라아제 활성은 이중 루시페라아제 리포터 분석 시스템 키트(Dual-Luciferase Reporter Assay System kit)(Promega)로 연속적으로 측정 후, 발광은 분석기 VICTOR(FerkinElmer)로 측정하였다.

[0092] 그 결과, miRNA 미믹들 중에서 c-Met 3' UTR의 루시퍼라아제 활성은 hc-smR-S2-5에 의해 감소한 반면, 다른 유전자들에 의해 유의적인 변화가 나타나지 않았다(도 4의 A). 또한, hc-smR-S2-5 및 pGL3-c-Met 벡터로 형질전환된 A549 세포의 루시퍼라아제 활성은 NC 세포에 비해 50% 보다 더 낮게 나타났다.

[0093] 한편, c-Met 3'UTR에 예측되는 결합 부위(위치 503-511 nt)를 다음과 같이 돌연변이 시켰다: c-Met-3'UTRs-mut, 결합 부위 GGGCCUUUU(서열번호 2)의 결핍(도 4의 B). 그 결과, c-Met 3'UTR-결합 부위의 돌연변이는 루시퍼라아제 활성을 조절하는 hc-smR-S2-5의 활성을 완전히 제거되었다. 따라서, c-Met가 hc-smR-S2-5의 표적임을 알 수 있었다.

**실시예 5**

[0094] **hc-smR-S2-5에 의한 c-Met의 발현 감소 확인**

[0095] hc-smR-S2-5의 역할을 알아보기 위해, A549 세포를 NC 또는 hc-smR-S2-5로 형질전환시킨 후, 정량적 RT-PCR 및 웨스턴 블랏팅 분석을 이용하여 분석하였다. 또한, c-Met에 대한 hc-smR-S2-5의 효과를 알아보기 위해, A549 세포를 NC, hc-smR-S2-5, Anti-S2-5 또는 si-c-Met로 각각 형질전환시킨 후, 정량적 RT-PCR 및 웨스턴 블랏팅 분석을 이용하여 c-Met를 분석하였다. c-Met을 표적화하는 특이적인 siRNA를 대조군으로 포함시켰다.

[0096] **<5-1> 정량적 RT-PCR 분석**

[0097] 실시간 PCR은 실시간 PCR 검출 시스템(Bio-Rad)에서 QuantiTect SYBR green PCR 키트(QIAGEN)를 이용하여 수행하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다:

[0098] GAPDH: 5'-tgcaccaccaactgcttagc-3' 및 5'-ggcatggactgtggcatg ag-3';

[0099] c-Met 5'-gtttgtccacagagacttggetg-3' 및 5'-atccacttcactggcagctttg-3'(비특허문헌 26).

[0100] **<5-2> 웨스턴 블랏팅 분석**

[0101] 세포로부터 추출된 단백질은 제조사의 프로토콜에 따라 항체로 면역블랏시켰다. 세포로부터 추출된 단백질은 프로-프렙(pro-prep) 용해 완충용액(iNtRON)에 의해 용해시켰다. 단백질은 도데실황산 나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS)-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis)에서 분리한 다음 폴리비닐리덴 불화물(polyvinylidene fluoride, PVDF) 막에 이동시켰다. 분리된 단백질은 c-Met, ERK1/2, 인산화된-ERK1/2, Akt, 인산화된-Akt, Rb, 인산화된-Rb, 사이클린(cyclin) E, CDK2(Santa Cruz), GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase) 1차 항체(AB Frontier) 및 적절한 2차 항체(Santa Cruz)를 이용하여 면역블랏 분석에 적용시켰다. GAPDH는 내부 대조군으로 사용하였다.

[0102] 그 결과, hc-smR-S2-5의 발현은 hc-smR-S2-5로 형질전환된 세포가 NC 세포에 비해 대략 3000배 증가하였다(도 5의 A). 한편, c-Met의 전사 및 번역은 hc-smR-S2-5로 형질전환된 세포에서 NC 세포에 비해 감소하였다. 반대로, anti-S2-5는 hc-smR-S2-5 억제제를 통해 c-Met 수준을 유의적으로 증가시켰다(도 5의 B 및 C). 따라서, hc-smR-S2-5가 A549 세포에서 c-Met를 직접 조절하는 것을 알 수 있었다.

**실시예 6**

[0103] **hc-smR-S2-5의 과발현에 의한 세포 증식의 억제 효과 확인**

[0104] hc-smR-S2-5가 A549 세포의 세포 성장 및 운동성에 영향을 미치는지 알아보기 위해, NC, hc-smR-S2-5, Anti-S2-5 또는 si-c-Met로 각각 형질전환된 A549 세포에 대해 XTT 증식 분석, 트리판 블루 염색 분석, 조직손상 회복 분석 및 트랜스웰 이동 분석을 각각 수행하였다.

[0105] **<6-1> XTT 증식 분석**

[0106] 세포 증식은 상업적으로 이용가능한 증식 키트(XTT, Roche)를 이용하여 조사하였다. 구체적으로, A549 세포를 웰 당  $1 \times 10^4$  세포의 밀도로 96-웰 배양 플레이트 내로 계대배양하였다. hc-smR-S2-5의 형질전환은 리포펙타민 2000 시약(Invitrogen)을 이용하여 수행하였다. 인큐베이션의 말에, 배지를 버린 후 세포를 인산완충용액(PBS)으로 세척하였다. XTT 테스트 용액[50 ul, 3V-(1-(페닐-아미노카르보닐)-3,4-테트라졸륨)-비스(4-메톡시-

6-니트로) 벤젠설폰산 나트륨 수화물(sodium 3V-(1-(phenyl-aminocarbonyl)-3,4-tetrazolium)-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate)과 N-메틸 다이벤조피라진 메틸 황산(N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate)이 50 : 1의 비율로 혼합된]은 5 ml의 XTT-표지된 시약과 100 ml의 전자 커플링 시약을 혼합하여 제조하였다. 이런 혼합물은 제조사의 프로토콜에 지시에 따라 각 웰에 첨가하였다. 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 4시간 배양한 후, ELISA 리더에서 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0107] 그 결과, hc-smR-S2-5의 과발현은 A549 세포의 증식을 억제시켰다(도 6의 A). 상기 결과는 hc-smR-S2-5이 시간 의존적으로 증식을 억제하였고, NC 또는 anti-hc-smR-S2-5 보다 60% 더 낮은 증식을 보였음을 확인하였다.

[0108] <6-2> 트리판 블루 염색(Trypan Blue stain) 분석

[0109] 형질전환된 A549 세포를 트리판 블루(Lonza) 배타 방법을 이용하여 세포 생존도를 확인하였다. 세포를 0.4% 트리판 블루 용액으로 염색한 후, 생존 세포를 헤마사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 계수하였다. 그런 다음, 세포를 현미경으로 계수하였다.

[0110] 그 결과, hc-smR-S2-5의 과발현은 A549 세포수를 감소시켰다(도 6의 B).

[0111] <6-3> 조직손상 회복(Wound healing) 분석

[0112] 형질전환된 A549 세포를 웰 당 3 x 10<sup>5</sup> 세포의 밀도로 6-웰 플레이트로 계대배양하였다. 세포층(Cell layer)을 플라스틱 팁으로 긁은 후 배양하였다. 그런 다음, 세포를 현미경으로 분석하였다.

[0113] 그 결과, hc-smR-S2-5 또는 si-c-Met는 세포 운동성 및 이동을 억제시켰다(도 6의 C).

[0114] <6-4> 트랜스웰 이동 분석

[0115] 세포 이동을 코닝 트랜스웰 시스템을 이용하여 수행하였다. 형질전환 24시간 후, 2 x 10<sup>4</sup> A549 세포를 0.2 ml 무혈청 배지에서 배양한 후 0.1% 젤라틴으로 코팅된 막(24-웰; 구멍 크기, 8 mm; 코닝)으로 상위 챔버에 플레이트하였다. 그런 다음 0.5 ml 10% 혈청 배지를 더 낮은 챔버에 첨가하였다. 세포를 48시간 동안 배양한 다음, 막을 95% 에탄올에서 고정시킨 후 37°C에서 30분 동안 0.2% 크리스탈 바이올렛(Sigma)으로 염색한 다음 PBS로 세척하였다. 세포 이동에 대한 수치는 3번의 실험 동안 한 필터당 세 개의 부위에 걸쳐서 현미경적 부위당 세포의 평균 수로 나타내었다. 실험은 적어도 세 번 반복하였다.

[0116] 그 결과, hc-smR-S2-5 또는 si-c-Met는 세포 운동성 및 이동을 억제시켰다(도 6의 D).

[0117] 따라서, hc-smR-S2-5가 A549 세포의 운동성 및 이동을 음성적으로 조절하는 것을 알 수 있었다. 이는 적어도 부분적으로 hc-smR-S2-5가 c-Met을 표적화하여 그 효과를 나타내는 것임을 알 수 있다.

**실시예 7**

[0118] hc-smR-S2-5에 의한 c-Met 다운 스트림 및 세포주기 관련 단백질의 발현 감소 확인

[0119] hc-smR-S2-5에 의한 c-Met의 발현 감소 후 다운 스트림 신호 경로의 발현을 조사하였다.

[0120] 그 결과, hc-smR-S2-5에 의한 c-Met의 발현 감소는 A549 세포에서 인산화된 Akt 및 인산화된 ERK1/2를 감소시켰다. 총 Akt 및 ERK1/2의 번역은 NC와 비교할 때 hc-smR-S2-5에 영향을 받지 않았다(도 7의 A). 또한, hc-smR-S2-5는 인산화된 Rb, CDK2 및 사이클린 E와 같은 세포주기 관련 단백질의 발현을 감소시켰다. 그러나 Rb는 hc-smR-S2-5에 영향을 받지 않았다(도 7의 B).

[0121] 따라서, hc-smR-S2-5는 c-Met를 표적화하여 A549 세포에서 세포주기를 막는 것을 알 수 있었다.

**산업상 이용가능성**

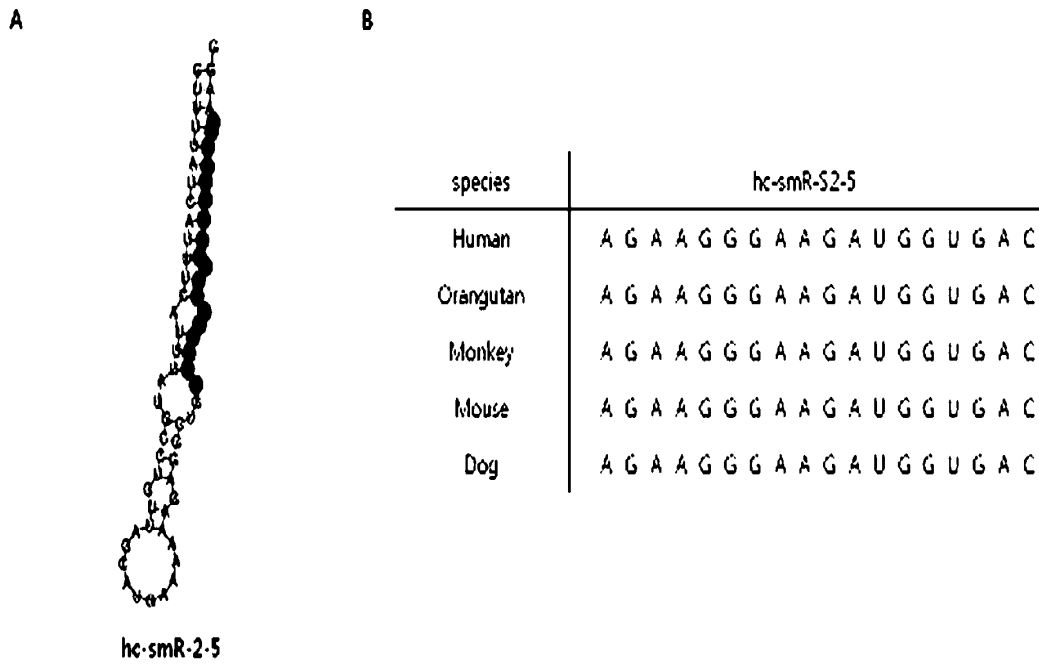
[0122] 상기에서 보는 바와 같이, 본 발명은 폐암의 예방 또는 치료를 위한 약제의 개발과 이를 이용한 예방 또는 치료 방법 개발, 즉, 단백질 치료제, 발현 및 활성 조절물질, 유전자 치료제 또는 세포 치료제 개발 등에 유용하게



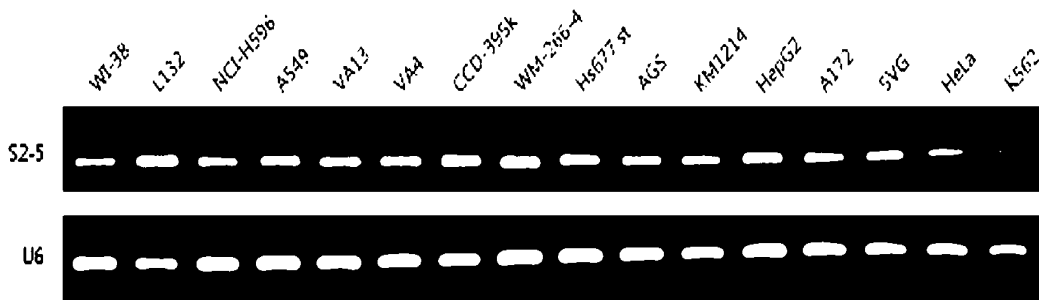
사용될 수 있다.

도면

도면1

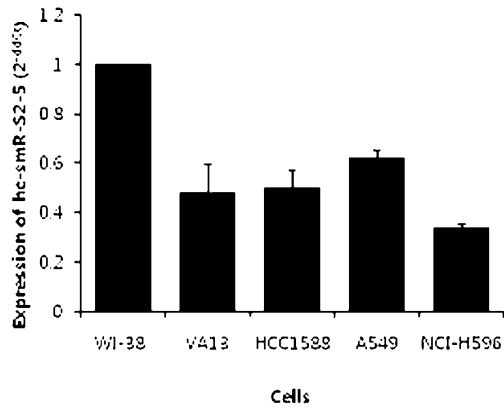


도면2

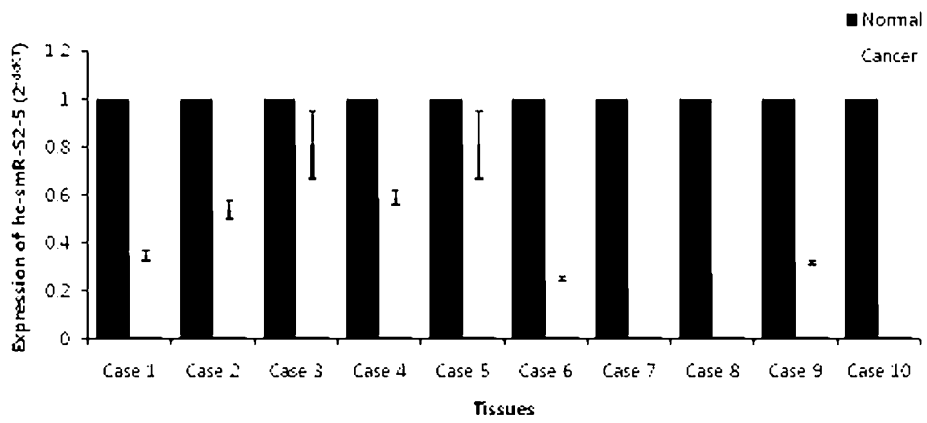


도면3

A



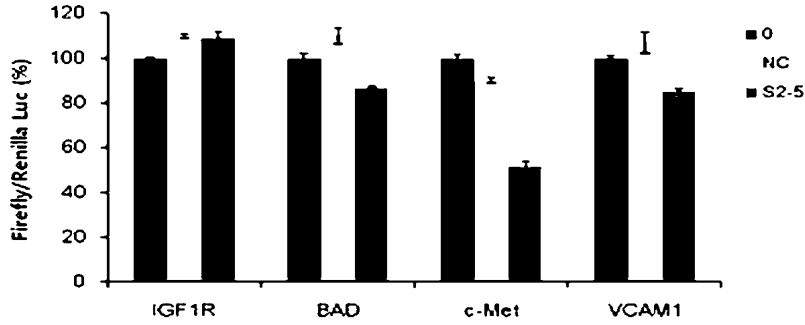
B



도면4

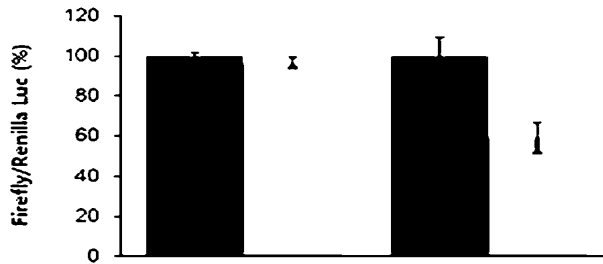
A

hc-smR-S2-5 (18nt) 3'-C A G U G G U A G A A G G G A A G A -5'  
 IGF1R-3'UTR-wt (2030nt) 378-5'-U G U U G G C C A C U C C C U U C U -3'-395  
 BAD-3'UTR-wt (397nt) 66-5'-C G G A A G U A C U U C C C U C A G -3'-83  
 BAD-3'UTR-wt (397nt) 130-5'-T G A C C C A G A U U C C C U U C C -3'-147  
 c-Met-3'UTR-wt (2281nt) 494-5'-A G G U A A A C A U U C C C U U U U -3'-511  
 VCAM1-3'UTR-wt (799nt) 90-5'-A G A G G C A G A C U U C C C U G A -3'-107



B

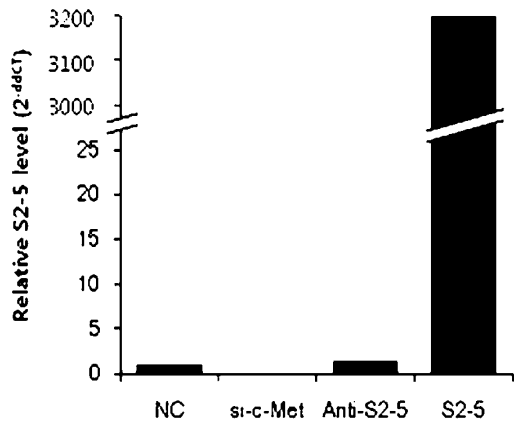
c-Met-3'UTR-wt (2281nt) 494-5'-A G G U A A A C A U U C C C U U U U -3'-511  
 hc-smR-S2-5 (18nt) 3'-C A G U G G U A G A A G G G A A G A -5'  
 c-Met-3'UTR-mut (2281nt) 494-5'-A G G U A A A C A G G G G G G U U -3'-511



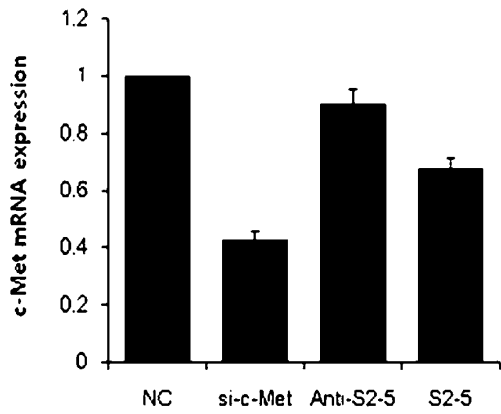
c-Met-3'UTRs-wt	-	-	+	-
c-Met-3'UTRs-mut	+	-	-	-
Negative control	+	-	+	-
hc-smR-S2-5	-	-	-	-

도면5

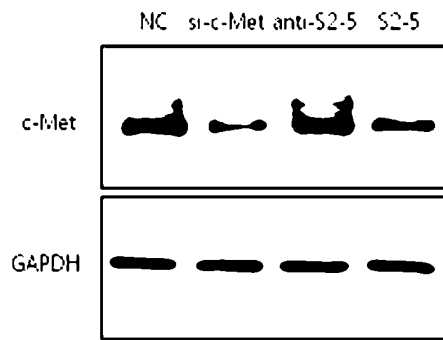
A



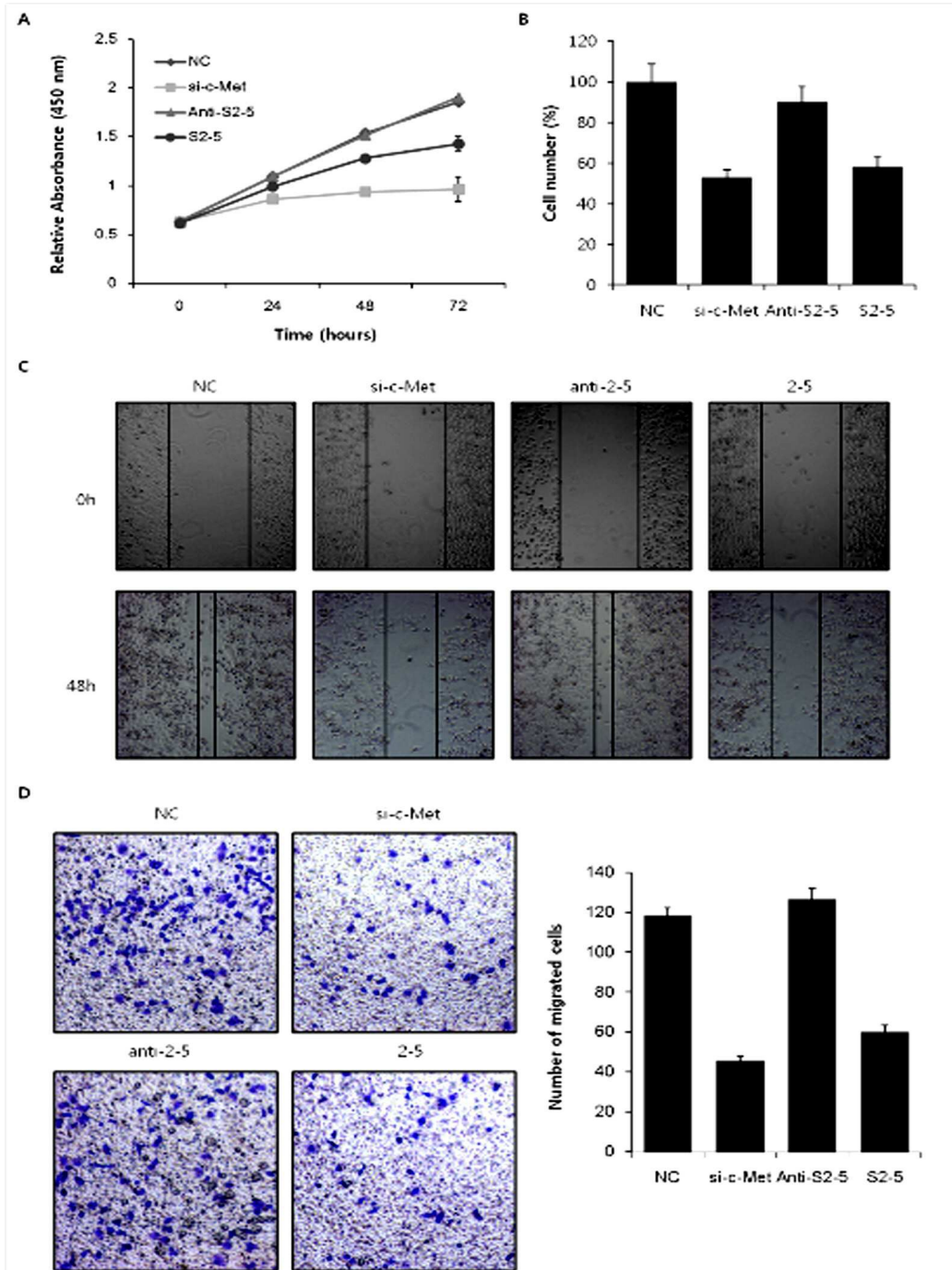
B



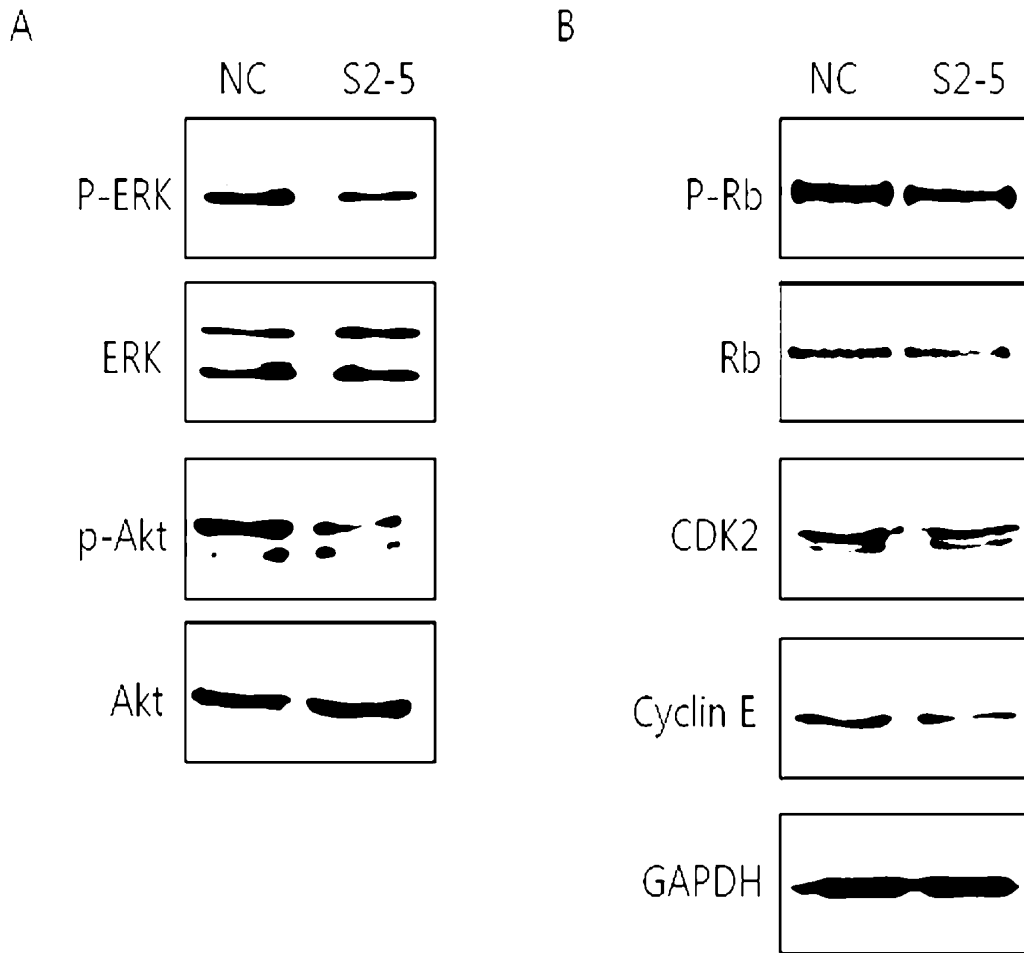
C



도면6



도면7



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)