



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0003502
(43) 공개일자 2021년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A23L 33/13* (2016.01)
A61K 8/60 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *A61Q 90/00* (2009.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)
 (21) 출원번호 10-2019-0079353
 (22) 출원일자 2019년07월02일
 심사청구일자 2019년07월02일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
 (72) 발명자
김백길
 서울특별시 용산구 효창원로104나길 16
김지은
 서울특별시 관악구 남부순환로216길 8 예림오피스텔 507호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
이재영

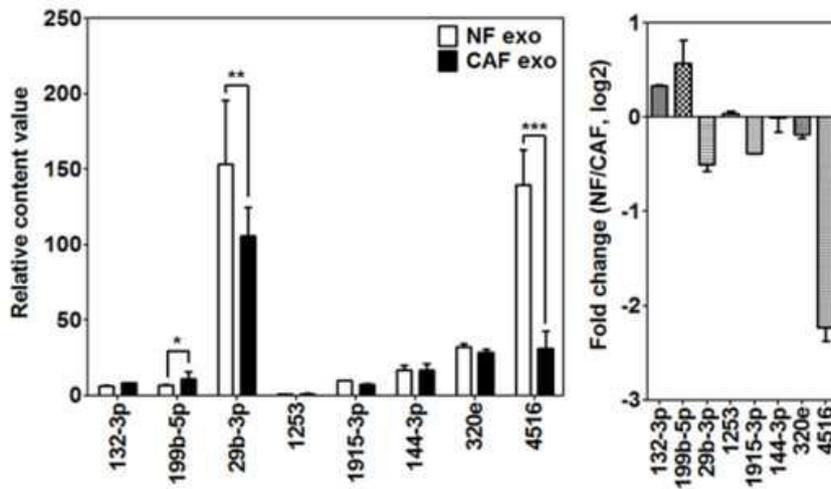
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 miR-4516 또는 이의 모방체(mimic)는 FOSL1(FOS-like antigen 1) 유전자로부터 전사된 mRNA의 3'UTR에 특이적으로 결합하여, 상기 mRNA의 번역을 저해함으로써 암 세포의 성장을 효과적으로 저해할 수 있어, 암의 예방, 개선 또는 치료 용도로 사용될 수 있다. 나아가, 후보물질에 의하여 miR-4516의 발현 수준의 변화를 확인함으로써 암의 치료제를 효과적으로 선별해낼 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/606 (2013.01)
 A61P 35/00 (2018.01)
 A61Q 19/00 (2013.01)
 A61Q 90/00 (2013.01)
 A23V 2002/00 (2013.01)
 A23V 2200/308 (2013.01)

강숙희

경기도 파주시 쇠재로 30(금촌동)

(72) 발명자

조남훈

서울특별시 강남구 언주로130길 30, 103-301(논현동, 동양파라곤)

장연수

서울특별시 용산구 효창원로104나길 16

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019R1A2B5B01069934
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견후속연구
연구과제명	통합형 경화성 종양미세환경 제어기술을 이용한 암진행 억제
기여율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.06.01 ~ 2022.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019R1I1A1A01060549
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	학문균형발전지원사업
연구과제명	고형암 진행 상의 CEACAM 과발현 활성화 섬유아세포의 역할 규명
기여율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.06.01 ~ 2022.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1C1B6003964
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구
연구과제명	유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포를 이용한 대퇴골두 무혈성 괴사질환의 발병기전 규명
기여율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

miR-4516 또는 이의 모방체(mimic)를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 miR-4516 또는 이의 모방체는 FOSL1(FOS-like antigen 1) 유전자로부터 전사된 mRNA의 3'-UTR을 표적으로 하는 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 miR-4516 또는 이의 모방체는 발현 벡터에 포함되거나, 세포에 도입된 형태인 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 세포는 섬유아세포인 것인, 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 암은 유방암, 방광암, 자궁경부암, 대장암, 폐암, 췌장암, 위암, 난소암, 혈액암, 간암, 전립선암 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 약학 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 유방암은 삼중음성유방암(Triple-negative breast cancer; TNBC)인 것인, 약학 조성물.

청구항 7

miR-4516 또는 이의 모방체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

miR-4516 또는 이의 모방체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 9

암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및

상기 생물학적 시료에서 miR-4516이 존재하는 수준을 확인하는 단계;를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 생물학적 시료에서 miR-4516이 존재하는 수준이 후보물질을 처리하기 이전에 비하여 증가된 경우, 상기 후보물질을 암 치료제로 선별하는 단계를 더 포함하는, 암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 암은 유방암, 방광암, 자궁경부암, 대장암, 폐암, 췌장암, 위암, 난소암, 혈액암, 간암, 전립선암 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 유방암은 삼중음성유방암(Triple-negative breast cancer; TNBC)인 것인, 암 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 현재 전세계적으로 가장 많은 사망자를 내는 질병 중 하나로서, 평균 수명의 연장과 암 발생 연령이 낮아짐에 의해 암 발생률은 계속적으로 증가되고 있는 추세이다. 한국의 국립 암센터(National Cancer Center)에서 제공하는 2013년 통계 자료에 따르면, 2010년 암 등록 통계과에 등록된 우리나라 암 발생 환자는 모두 202,053명이며 계속적으로 증가되는 추세이다.

[0003] 상기 암이 고형 장기에 발생된 경우에는 전통적으로 외과적 절제술에 의해 치료하였다. 그러나, 환부가 너무 크거나, 고형 장기가 아닌 절제술이 불가능한 부분에 암이 발생된 경우 등에는 외과적 절제술이 불가능하여 경구 또는 주사제 등을 이용한 항암 화학요법(Chemotherapy)이 사용되었다. 상기 항암 화학요법에 사용되는 항암제는 주로 단분자 물질을 유기적 또는 무기적 방법을 이용하여 합성하여 사용하였다. 암이 주로 세포신호 전달체계에 포함된 인산 활성화 인자 단백질의 과발현 등에 의해 세포신호 전달체계를 교란시키는 단백질에 효과적으로 결합하여, 단백질의 활성을 억제하는 용도로 개발되어 사용되었다. 그러나, 이러한 방식의 항암 화학요법은 머리카락과 같은 세포주기가 빠른 정상 세포의 성장을 저해하거나, 구강 건조, 구내염, 오심, 구토, 설사, 호중구 감소증 등과 같은 다양한 부작용을 야기할 수 있다는 문제점이 존재한다.

[0004] 이와 같은 항암 화학요법의 문제점에 따라 다양한 방면으로 항암 화학요법에 사용되는 물질의 연구가 진행되고 있다. 일 예시로, siRNA(small interfering RNA)가 존재한다. 상기 siRNA는 리보핵산단백질과 RISC(RNA induced silencing complex)를 이뤄 siRNA에 상보적인 서열을 갖는 mRNA(messenger RNA)를 절단하도록 함으로써, mRNA로부터 단백질이 생성되는 것을 억제한다. 상기 siRNA 기반의 항암제는 단백질 생성 단계 이전의 mRNA를 차단한다는 점, 그리고 RNA와 세포 내재적인 RISC 시스템을 활용한다는 점에 있어서 상기 단분자 물질의 항암제보다 진보한 기술로 평가되고 있다. 그러나, siRNA 기반의 항암제는 비 표적 효과(off-target effect)와 같은 현상에 의해 나타나는 부작용이 존재한다는 기술적 한계점이 존재한다.

[0005] 한편, 이와 같은 현상의 대안으로 세포 분화, 증식, 세포사멸, 발생, 면역, 물질대사 및 줄기세포 유지 등과 같은 많은 생물학적 과정을 통제하는 miRNA에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 특히 miRNA는 펩타이드나 항체 치료제와 달리 개발 기간이 짧고, 확실한 질환 표적 유전자만 밝혀진다면 이론적으로 모두 치료제를 개발할 수 있다는 장점이 있다. 또한, miRNA는 일반적으로 1개가 아닌 복수의 표적 유전자의 발현을 동시에 조절함으로써 매우 높은 특이성과 효능을 가지고 있다. 따라서 항암 화학요법에 사용되는 항암제가 갖는 상기 언급된 부작용들을 극복하기 위한 신규한 miRNA로 이루어진 항암제에 대한 연구가 절실히 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 암 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 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

- [0009] 본 발명의 일 구현 예에서는 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 상기 조성물은 약학 조성물, 식품 조성물 및 화장품 조성물로 제공될 수 있다.
- [0011] 본 발명의 상기 조성물은 miR-4516 또는 이의 모방체(mimic)를 유효성분으로 포함한다.
- [0012] 본 발명의 상기 miR-4516은 miRNA로서, 인간을 포함하는 동물, 예를 들면 원숭이, 침팬지, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등으로부터 유래된 것일 수 있고, 바람직하게는 인간으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 상기 miR-4516은 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재할 수 있다. 성숙 miRNA 분자는 주로 단일 가닥으로 존재하지만, 전구체 miRNA 분자는 이중 가닥을 형성할 수 있는 부분적인 자가-상보적인 구조(예를 들어 스템-루프 구조)를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 miRNA는 RNA, PNA(peptide nucleic acids) 또는 LNA(locked nucleic acid) 같은 형태로 구성될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 상기 miR-4516의 모방체는 전구체 miRNA로서, 이중 가닥으로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명의 상기 miR-4516이 단일 가닥인 경우에는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 miR-4516이 이중 가닥인 경우에는 서열번호 1과, 상기 서열번호 1과 상보적인 염기 서열인 서열번호 2가 상보적으로 결합되어 있는 형태로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명의 상기 "miRNA"는 다양한 유전자 발현을 조절하며 단백질을 암호화하지 않는 RNA 서열을 의미하며, mRNA가 단백질로 번역되는 단계를 억제하거나 mRNA 자체의 분해를 유도하여 전사 후 유전자 발현 수준을 조절한다.
- [0017] 본 발명의 상기 암은 유방암, 방광암, 자궁경부암, 대장암, 폐암, 췌장암, 위암, 난소암, 혈액암, 간암, 전립선암 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있고, 바람직하게는 유방암일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 삼중음성유방암(Triple-negative breast cancer; TNBC)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 상기 "삼중음성유방암"은 치료 표적 유전자에 해당하는 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 및 HER2의 발현이 모두 음성을 나타내는 유방암의 종류로서, 삼중음성유방암은 비삼중음성유방암 환자와 비교하여 조직학적 분화도의 3등급 비율이 높고, 재발 시기가 빠르며, 예후가 매우 나쁘다. 특히, 상기 삼중음성유방암은 기존에 유방암 치료제로 사용되는 HER2 표적 항체 약물인 허셉틴과 같은 약물을 사용할 수 없다는 한계점이 존재한다. 따라서, 본 발명의 상기 miR-4516을 이용하는 경우에는 기존의 유방암 치료제로 치료가 어려운 삼중음성유방암을 매우 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다는 장점이 존재한다.
- [0019] 본 발명의 상기 miR-4516은 FOSL1(FOS-like antigen 1) 유전자로부터 전사된 mRNA의 3'-UTR을 표적으로 하는 것일 수 있다. 본 발명의 상기 miR-4516은 FOSL1 유전자로부터 전사된 mRNA의 3'-UTR에 결합하여 FOSL1의 mRNA를 분해하거나 번역이 억제되도록 할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 상기 "FOSL1 유전자"는 유방암, 특히 비 TNBC에 비하여 TNBC에서 특이적으로 그 유전자 및 그에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준이 증가되어 있는 것으로서, 본 발명의 상기 miR-4516은 FOSL1의 mRNA의 3'-UTR을 표적하여 FOSL1의 mRNA 및 단백질의 발현을 매우 효과적으로 억제하여 암의 예방 또는 치료 효과가 발휘되도록 할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 상기 "miRNA"는 상기 miR-4516과 기능적으로 동등한 작용을 할 수 있다면 miRNA를 구성하는 일부 염기서열이 결실, 치환 또는 삽입에 의해 변형되더라도 모두 포함될 수 있다. 예를 들면, 상기 miR-4516을 구성하는 염기 서열과 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 상동성을 갖는 것을 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 상기 "상동성"은 야생형(wild type) 유전자의 염기 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 염기 서열과 상기와 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 염기 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시될 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package(Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈

에서 이용 가능하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화될 수 있다.

- [0023] 본 발명의 상기 miR-4516은 세포 내 전달을 위하여, 발현 벡터에 포함되어 제공될 수 있다. 본 발명에서 miRNA 핵산 분자는, 핵산 및 DEAE-텍스트란의 복합체, 핵산 및 핵 단백질의 복합체, 핵산 및 지질의 복합체 등의 다양한 형질전환 기술을 이용하여 세포 내로 도입될 수 있는데, 이를 위해 상기 세포 내로의 효율적인 도입을 가능하게 하는 전달체 내에 포함된 형태로 제공될 수 있다. 바람직하게, 상기 전달체는 벡터이며, 바이러스 벡터 및 비바이러스 벡터 모두 사용 가능하다. 바이러스 벡터(viral vector)로서 예를 들면, 렌티바이러스(lentivirus), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 헤르페스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipox virus) 벡터 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 상기 발현 벡터는, 형질전환된 세포의 선별을 용이하게 하기 위하여 선별 마커를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같이 선택 가능한 표현형이 나타날 수 있는 마커, 즉 녹색 형광 단백질, 퓨로마이신, 네오마이신, 하이그로마이신, 히스티딘올 디하이드로게나제(hisD) 및 구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Gpt) 등을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 상기 miR-4516은 세포에 도입된 형태로 제공될 수 있다. 상기 miR-4516을 세포 내로 도입하는 방법은 통상의 방법, 예를 들면 G-fectin, Mirus TrasIT-TKO 지질친화성 시약, 리포펙틴, 리포펙타민, 셀펙틴(cellfectin), 양이온성 인지질 나노입자, 양이온성 고분자, 양이온성 미셀, 양이온성 에멀전 또는 리포솜을 포함하는 전달 시약과 함께 세포 내로 도입되는 방법 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 상기 "세포"는 암 세포의 주위의 종양미세환경을 구성하는 세포라면 모두 포함될 수 있고, 예를 들면 섬유아세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 상기 "예방"은 본 발명의 조성물을 이용하여 암으로 인해 발생한 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 "개선" 또는 "치료"는 본 발명의 조성물을 이용하여 암으로 인해 발생한 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0030] 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.
- [0031] 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 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 상기 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필 하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 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.

- [0034] 본 발명의 상기 "비경구"란, 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.
- [0035] 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 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/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.
- [0036] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0037] 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.
- [0038] 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 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 동일 수 있다.
- [0039] 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.
- [0040] 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.
- [0041] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 화장수, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용목욕물첨가제, 바디로션, 바디밀크, 베스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샤워겔, 샤워크림, 선스크린로션, 선스크린크림, 선텐크림, 스킨로션, 스킨크림, 자외선차단용 화장품, 클렌징밀크, 탈모제화장용, 페이스 및 바디로션, 페이스 및 바디크림, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용 크림, 자스민오일, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제(핸드클리너), 약용비누비의료용, 크림비누, 페이스 워시, 전신 세정제, 두피 세정제, 헤어린스, 화장비누, 치아미백용 겔, 치약 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 조성물은 화장료 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 용매나, 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 상기 화장료 조성물 내에 더 추가될 수 있는 용매의 종류는 특별히 한정하지 않으나, 예를 들어, 물, 식염수, DMSO 또는 이들의 조합을 사용할 수 있다. 또한, 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제, 항산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 향진균제를 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 상기 오일로서는 수소화 식물성유, 피마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있으며, 왁스로는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸델라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 상기 지방산으로는 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알콜로는 세틸 알콜, 옥틸 도데칸올, 올레일 알콜, 판텐올, 라놀린 알콜, 스테아릴 알콜, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며 지방산 에스테르로는 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트가 이용될 수 있다. 계면 활성제로는 당업계에 알려진 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제 및 비 이온성 계면활성제가 사용가능하며 가능한 한 천연물 유래의 계면활성제가 바람직하다. 그 외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점

제, 항산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.

- [0046] 본 발명의 다른 구현 예에서는 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 생물학적 시료에서 miR-4516이 존재하는 수준을 확인하는 단계;를 포함한다.
- [0048] 본 발명의 상기 생물학적 시료에서 miR-4516이 존재하는 수준이 후보물질을 처리하기 이전에 비하여 증가된 경우, 상기 후보물질을 암 치료제로 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 상기 스크리닝 방법에서 암, 삼중음성유방암 및 miR-4516에 대한 내용은 상기 조성물에 기재된 바와 동일하여 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0050] 본 발명의 상기 생물학적 시료는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는 혈액, 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명의 상기 후보물질은 암의 증상을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 활성, 즉 miR-4516의 발현 수준을 증대시킬 수 있는 활성이 존재하는지 여부에 대해 테스트하기 위한 약제를 의미하며, 단백질, 올리고 펩타이드, 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오티드 및 광범위한 화합물 등의 임의의 분자를 포함한다. 이러한 후보물질은 천연 물질뿐만 아니라, 합성 물질도 모두 포함하는 것일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 상기 miR-4516이 존재하는 수준의 측정은 상기 miR-4516 존재하는 수준을 측정할 수 있는 체제를 이용하여, RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯 분석(Northern blot assay), DNA 칩 분석법 등의 방법을 통해 진단하는 데에 사용되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명의 상기 miR-4516이 존재하는 수준을 측정할 수 있는 체제는 상기 miR-4516에 특이적인 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 상기 “프라이머”는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 주형 가닥(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 기능을 하는 짧은 염기 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충 용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 상기 “프로브”는 상기 유전자와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하고, 이와 같은 프로브는 특정 유전자와 그로부터 전사되는 mRNA의 존재 유무, 유전자로부터 전사되는 mRNA의 발현 수준(발현량)을 확인할 수 있도록 라벨링되어 있을 수 있다. 상기 프로브는 올리고뉴클레오티드(Oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(Single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(Double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 상기 프라이머 또는 프로브는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열을 기반으로 하여 통상의 방법을 참조해 당업자에 의해 쉽게 제조될 수 있다.
- [0058] [서열목록]

- [0059] 서열번호 1: miR-4516
- [0060] GGGAGAAGGGUCGGGGC
- [0061] 서열번호 2: miR-4516
- [0062] 3'- CCCGACCCUUCUCCUU-5'
- [0063] 서열번호 3: miR-132-3p forward primer
- [0064] TAACAGTCTACAGCCATGGT
- [0065] 서열번호 4: miR-132-3p reverse primer
- [0066] AACGAGACGACGACAGACTTT
- [0067] 서열번호 5: miR-199b-5p forward primer
- [0068] CCCAGTGTTTAGACTATCTG
- [0069] 서열번호 6: miR-199b-5p reverse primer
- [0070] AACGAGACGACGACAGACTTT
- [0071] 서열번호 7: miR-29b-3p forward primer
- [0072] TAGCACCATTTGAAATCAGT
- [0073] 서열번호 8: miR-29b-3p reverse primer
- [0074] AACGAGACGACGACAGACTTT
- [0075] 서열번호 9: miR-1253 forward primer
- [0076] AGAGAAGAAGATCAGCCTGC
- [0077] 서열번호 10: miR-1253 reverse primer
- [0078] AACGAGACGACGACAGACTTT
- [0079] 서열번호 11: miR-1915 forward primer
- [0080] CCCAGGGCGACGCGGCGGG
- [0081] 서열번호 12: miR-1915 reverse primer
- [0082] AACGAGACGACGACAGACTTT
- [0083] 서열번호 13: miR-144-3p forward primer
- [0084] TACAGTATAGATGATGTACT
- [0085] 서열번호 14: miR-144-3p reverse primer
- [0086] AACGAGACGACGACAGACTTT
- [0087] 서열번호 15: miR-320e forward primer
- [0088] AAAGCTGGGTGAGAAGG
- [0089] 서열번호 16: miR-320e reverse primer
- [0090] AACGAGACGACGACAGACTTT
- [0091] 서열번호 17: miR-4516 forward primer
- [0092] GGGAGAAGGGTCGGGGC
- [0093] 서열번호 18: miR-4516 reverse primer
- [0094] AACGAGACGACGACAGACTTT

- [0095] 서열번호 19: FOSL1 forward primer
- [0096] AGCTGCAGAAGCAGAAGGAG
- [0097] 서열번호 20: FOSL1 reverse primer
- [0098] GGAGTTAGGGAGGGTGTGGT
- [0099] 서열번호 21: PAX5 forward primer
- [0100] GGAGGAGTGAATCAGCTTGG
- [0101] 서열번호 22: PAX5 reverse primer
- [0102] GGCTTGATGCTTCCTGTCTC
- [0103] 서열번호 23: TCL1A forward primer
- [0104] GCCTGGGAGAAGTTCGTGTA
- [0105] 서열번호 24: TCL1A reverse primer
- [0106] ACTAAGCGCCAGAACTGGA

발명의 효과

- [0107] 본 발명에 따른 miR-4516 또는 이의 모방체(mimic)를 유효성분으로 포함하는 조성물은 FOSL1(FOS-like antigen 1) 유전자로부터 전사된 mRNA의 3'UTR에 특이적으로 결합하여, 상기 FOSL1의 mRNA의 번역을 억제함으로써 암 세포의 성장을 효과적으로 저해할 수 있어, 암의 예방, 개선 또는 치료 용도로 사용될 수 있다. 나아가, 후보물질에 의하여 miR-4516의 발현 수준의 변화를 확인함으로써 암의 치료제를 효과적으로 선별해낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0108] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 NF(normal fibroblast) 세포주 또는 CAF(cancer-associated fibroblast) 세포주의 엑소솜에서 miRNA 발현 수준 변화를 실시간 중합효소 연쇄반응을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 miR-4516의 과발현에 의한 유방암 세포주의 증식 감소 효과를 CCK-8을 이용한 세포 성장을 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 miR-4516이 과발현되도록 형질전환된 NF 세포주 또는 CAF 세포주와 유방암 세포주(MCF7 또는 MDA-MB-231)의 공배양에 따른 세포 증식 억제 효과를 형광염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 miR-4516과 결합 활성이 있는 표적 유전자를 확인하기 위해 루시퍼라제 활성을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 miR-4516이 과발현된 유방암 세포주에서 FOSL1, PAX5 또는 TCL1A의 mRNA 발현 수준 변화를 실시간 중합효소 연쇄반응을 통해 확인하고(A), 단백질의 발현 수준 변화를 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인한 결과(B)를 나타낸 것이다.
- 도 6의 A 내지 C는 본 발명의 일 실시예에 따른 miR-4516의 과발현에 의해 억제된 FOSL1의 번역 억제에 의해 삼중음성유방암(TNBC) 세포주에서, 실시간 중합효소 연쇄반응을 통해 유전자의 발현 수준(A), 웨스턴 블롯 분석을 통해 단백질의 발현 수준(B) 및 CCK-8을 이용한 분석을 통해 증식 억제 효과(C)를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 miR-4516 모방체(mimic)의 처리에 의한 TNBC 세포주의 증식 억제 효과를 CCK-8을 이용한 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 CAF 세포주와 유방암 세포주의 공배양 시에도 miR-4516 모방체의 처리에 의해 TNBC 세포주의 증식 억제 효과를 CCK-8을 이용한 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 miR-4516의 과발현된 CAF 세포주와 유방암 세포주의 공배양에 따라 유방암 세포주의 증식 감소 효과가 GW4869의 처리에 억제되는 것을 CCK-8을 이용한 세포 성장을 분석을 통해 확인한 결

과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 miR-4516 모방체의 처리에 의해 비 TNBC 세포주와 TNBC 세포주에서의 증식 억제 효과를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 유방암 환자의 조직에서 miR-4516의 mRNA 발현 수준과(A), FOSL1의 단백질의 발현 수준을 조직면역염색을 통해 확인한 결과(B)를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0109] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0111] **실시예**

[0113] **[준비예 1] 활성화된 섬유아세포 유래 엑소좀 분리**

[0114] NF(normal fibroblast) 세포 및 CAF(cancer-associated fibroblast) 세포를 혈청이 포함되지 않은 배지에서 2 일 동안 배양한 뒤 상등액을 수집하였다. 그런 다음, 상기 상등액을 3,000 g에서 20분간 원심분리하고, 0.22 μm 필터(Nalgene제, 와트만)를 이용하여 상기 원심분리가 완료된 상등액을 여과하였다. 이후, 9 kD 분자량 컷오프 농축기(9 kD molecular weight cutoff concentrators; Pierce, 락포드)를 이용하여 상기 여과액을 10 ml로 농축하였다.

[0115] 상기 농축액에 ExoQuick-TC 제 (System Bioscience, 마운틴 뷰)를 첨가하고 4 °C에서 하룻밤 동안 배양한 뒤에 3,500 g에서 30분간 원심분리하여 펠렛을 수득하였다. 상기 펠렛을 인산 완충 식염수(Phosphate buffered saline; PBS)를 이용하여 세척하고, 1 % 페니실린/스트렙토 마이신이 포함된 DMEM/F12 배지에 희석하였다.

[0117] **[준비예 2] 세포주의 배양 방법**

[0118] 10 % 우태아 혈청(Fetal bovine serum; FBS)와 항생제(100 U/ml의 페니실린 및 10mg/ml의 스트렙토마이신)가 포함된 RPMI 배양 배지를 이용하여 37 °C, 5 % CO₂의 조건에서 삼중음성유방암(Triple-negative breast cancer; TNBC) 세포주 및 비 TNBC 세포주를 배양하였다.

[0120] **[실시예 1] 엑소좀에서 miRNA 발현 수준 변화 확인**

[0121] 트리졸을 이용하여 상기 준비예 1의 엑소좀(NF 세포주 또는 CAF 세포주)에서 전체 RNA를 추출하고, TOPscript™ cDNA 합성 키트(엔지노믹스)를 이용하여 전체 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 이때, miRNA를 증폭하기 위해, cDNA 합성 이전에 대장균 폴리(A) 중합효소 I을 이용하여 전체 RNA를 폴리아데닐화 하였다. 그런 다음, 하기 표 1에 기재된 유전자에 따른 프라이머, 25 ng의 cDNA, 파워 SYBR® 녹색 PCR 마스터 믹스(Power SYBR® Green PCR Master Mix)를 전체 볼륨이 25 μl가 되도록 혼합한 뒤, 베르티 써모사이클러(Veriti Thermocycler; Applied Biosystems®)를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하고, 델타-델타 Ct 방법을 통해 miRNA의 상대적인 발현 수준을 확인하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

표 1

[0123]

이름	서열번호	염기 서열
miR-132-3p	서열번호 3	TAACAGTCTACAGCCATGGT
	서열번호 4	AACGAGACGACGACAGACTTT
miR-199b-5p	서열번호 5	CCCAGTGTTTAGACTATCTG
	서열번호 6	AACGAGACGACGACAGACTTT

miR-29b-3p	서열번호 7	TAGCACCATTTGAAATCAGT
	서열번호 8	AACGAGACGACGACAGACTTT
miR-1253	서열번호 9	AGAGAAGAAGATCAGCCTGC
	서열번호 10	AACGAGACGACGACAGACTTT
miR-1915	서열번호 11	CCCCAGGGCGACGCGGGCGGG
	서열번호 12	AACGAGACGACGACAGACTTT
miR-144-3p	서열번호 13	TACAGTATAGATGATGTACT
	서열번호 14	AACGAGACGACGACAGACTTT
miR-320e	서열번호 15	AAAGCTGGGTTGAGAAGG
	서열번호 16	AACGAGACGACGACAGACTTT
miR-4516	서열번호 17	GGGAGAAGGGTCGGGGC
	서열번호 18	AACGAGACGACGACAGACTTT

[0125] 도 1에서 보는 바와 같이, NF 세포로부터 분리된 엑소솜에 비하여, CAF 세포로부터 분리된 엑소솜에서 miR-199b-5p, miR-29b-3p 및 miR-4516이 통계적으로 유의하게 발현 수준이 감소되었고, 특히 miR-4516의 경우에는 2배 이상 발현 수준이 감소된 것을 확인하였다.

[0126] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 miR-4516은 암의 진행을 억제할 수 있는 정상 섬유아세포에 비하여, 암 진행에 기여할 수 있는 종양미세환경 세포인 CAF 세포에서 특이적으로 그 발현 수준이 감소되어 있는 것을 알 수 있다.

[0128] **[실시예 2] miR-4516의 과발현에 의한 유방암 세포주의 증식 감소 효과 확인(1)**

[0129] 리포펙타민[®](라이프 테크놀로지)을 사용하여 제조사에서 제공하는 프로토콜에 따라, 상기 준비예 2에 기재되어 있는 MCF7 또는 MDA-MB-231 세포주에 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 miR-4516이 삽입된 pENTR[™]/H1/TO 벡터(인비트로젠)를 형질전환 하였다. 이때, 대조군으로 상기 세포주 각각에 상기 miR-4516이 삽입되어 있지 않은 pENTR[™]/H1/TO 벡터만을 형질전환 하였다.

[0130] 상기 형질전환이 완료된 세포주들을 각각 상기 준비예 2의 배양 배지에 희석한 뒤, 100 μ l의 상기 세포 희석액을 96웰 플레이트에 분주하였다. 그런 다음, 상기 플레이트의 각 웰에 10 μ l의 CCK-8(도진도 분자 테크놀로지)를 추가로 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂의 조건에서 한시간 동안 배양한 뒤, 450 nm에서 흡광도를 측정하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0131] 도 2에서 보는 바와 같이, 대조군 벡터가 형질전환된 경우(Control)와 비교하여, MCF7 세포주 및 MDA-MB-231 세포주 모두에서 miR-4516이 과발현되도록 형질전환 되었을 때(miR-4516) 세포주의 성장이 현저하게 감소되었다. 나아가, miR-4516이 과발현되도록 형질전환한지 3일째에, MCF7 세포주의 상대적 성장율이 2에 해당하는 반면, MDA-MB-231 세포주(MDA)의 상대적 성장율은 1.5임을 확인하였다.

[0132] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 miR-4516의 과발현은 암의 증식을 억제할 수 있고, 특히 저침윤성 세포주와 비교하여 고침윤성 TNBC 세포주에서 더욱 효과적으로 암의 증식을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0134] **[실시예 3] miR-4516의 과발현에 의한 암 세포주의 증식 감소 효과 확인(2)**

[0135] 상기 실시예 2에 기재되어 있는 형질전환 방식과 동일한 방법으로 CAF 세포주에서 miR-4516의 과발현을 유도하였다. 그런 다음, miR-4516이 과발현되도록 형질전환된 NF 세포주 또는 CAF 세포주를 6웰 플레이트에 분주하고, CellTracker 녹색 CMFDA 염료(인비트로젠)가 포함된 무 혈청 DMEM/F12 배지를 첨가하여 상기 세포주를 염색하였다. 상기 염색된 세포주가 포함되어 있는 플레이트에 붉은색 염료로 염색된 MCF7 세포주 또는 MDA-MB-231 세포주를 추가로 분주한 뒤, 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂의 조건에서 3일 동안 배양하고, 형광현미경을 통해 세포주를 확인하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0136] 도 3에서 보는 바와 같이, 대조군 벡터가 형질전환된 CAF 세포주와 공배양된 MCF7 및 MDA-MB-231 세포주와 비교

하여, miR-4516이 포함된 벡터가 형질전환된 CAF 세포주와 공배양된 MCF7 및 MDA-MB-231 세포주의 증식이 현저하게 억제되었다. 또한, miR-4516이 포함된 벡터가 형질전환된 CAF 세포주에 의한 증식 억제는 MCF7(MCF7/CAF)에 비하여 MDA-MB-231 세포주(MDA/CAF)에서 더욱 높은 수준으로 나타나는 것을 확인하였다.

[0137] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 miR-4516은 CAF 세포주에서 과발현됨으로써 암의 증식을 억제할 수 있고, 특히 저침윤성 세포주에 비하여 고침윤성 TNBC 세포주에서 더욱 효과적으로 암의 증식을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0139] **[실시예 4] miR-4516의 표적 mRNA와의 결합 확인**

[0140] miR-4516가 표적할 것으로 예상되는 FOSL1(FOS-like antigen 1), PAX5(paired box 5) 또는 TCL1A(T Cell Leukemia/Lymphoma 1A) 유전자로부터 전사된 mRNA의 3'UTR과의 결합 활성을 확인하였다.

[0141] 구체적으로, 상기 FOSL1, PAX5 또는 TCL1A의 mRNA의 3'UTR(비 번역 영역)의 염기 서열을 pGL3 컨트롤 벡터에 삽입하였다. 그런 다음, 상기 벡터에 삽입되어 있는 miR-4516이 결합할 것으로 예상되는 3'UTR의 염기 서열에 돌연변이를 유도하기 위해 중첩 확장 중합효소연쇄반응(overlap extension PCR)을 수행하였다. 이후, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 HEK293T 세포주에 pGL3 컨트롤 벡터(정상 3'UTR 또는 돌연변이가 유도된 3'UTR)과 miR-4516이 삽입된 벡터 또는 pRL-TK 벡터를 공동 형질전환하고 2일 동안 배양하였다. 상기 공동 형질전환된 세포로부터 수득된 세포 용해물을 이용하여 통상의 방법에 따라 루시페라제 활성을 측정하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0142] 도 4에서 보는 바와 같이, 정상 3'UTR을 갖는 FOSL1, PAX5 및 TCL1A의 mRNA의 경우 miR-4516이 과발현되었을 때 루시페라제의 활성이 현저하게 억제되었다. 반면, 돌연변이가 3'UTR을 갖는 FOSL1, PAX5 및 TCL1A mRNA의 경우에는 miR-4516이 과발현되어도 루시페라제 활성의 변화가 없는 것을 확인하였다.

[0143] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 miR-4516은 FOSL1, PAX5 및 TCL1A mRNA의 3'UTR 부위에 특이적으로 결합함으로써 상기 mRNA가 분해되도록 유도할 수 있고, 나아가 암이 진행되는 데 관여하는 FOSL1과 같은 유전자로부터 전사된 mRNA를 분해함으로써 암의 진행을 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0145] **[실시예 5] miR-4516에 의한 FOSL1 유전자의 번역 억제 효과 확인**

[0146] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 MCF7 세포주 또는 MDA-MB-231 세포주에 miR-4516의 과발현을 유도하기 위해 miR-4516이 삽입된 pENTRTM/H1/TO 벡터를 형질전환 하였다. 이때, 대조군으로는 pENTRTM/H1/TO 벡터만을 형질전환 하였다.

[0147] 상기 형질전환이 완료된 MCF7 세포주 및 MDA-MB-231 세포주로부터 전체 RNA를 분리한 뒤, 하기 표 2에 기재되어 있는 FOSL1, PAX5 또는 TCL1A에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여, 그 결과를 도 5의 A에 나타내었다.

표 2

[0149]

이름	서열번호	염기 서열
FOSL1	서열번호 19	AGCTGCAGAAGCAGAAGGAG
	서열번호 20	GGAGTTAGGGAGGGTGTGGT
PAX5	서열번호 21	GGAGGAGTGAATCAGCTTGG
	서열번호 22	GGCTTGATGCTTCCTGTCTC
TCL1A	서열번호 23	GCCTGGGAGAAGTTCGTGTA
	서열번호 24	ACTAAGCGCCAGAACTGGA

[0151] 또한, 상기 형질전환이 완료된 MCF7 세포주 및 MDA-MB-231 세포주를 50 μl의 PRO-PREP 단백질 추출 용액(iNTRON 바이오테크놀로지)에 녹이고 30 케이지 바늘로 충분히 균질화 한 뒤, 4 °C에서 30분 동안 배양하였다.

그런 다음, 15,000 g에서 원심분리하여 단백질 추출물을 수득하였다. 브래드포드(Bradford) 방법을 통해 정량화된 상기 단백질 추출물을 20 µg만큼 10% 폴리 아크릴 아미드 겔에 전기영동하고, PVDF 막(Millipore)에 옮긴 뒤에 FOSL1(Abcam), PAX5(Abcam), TCL1A(Abcam) 및 GAPDH (SantaCruz)에 특이적인 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 그 결과를 도 5의 B에 나타내었다.

[0152] 도 5의 A 및 B에서 보는 바와 같이, MCF7 세포주 및 MDA-MB-231 세포주 모두에서 miR-4516이 과발현 되었을 때, FOSL1, PAX5 및 TCL1A의 mRNA 및 단백질이 존재하는 수준이 감소되었다. 특히, FOSL1의 mRNA 및 단백질의 경우에는 MCF7 세포주에 비하여 MDA-MB-231 세포주에서 특히 높은 수준으로 존재하였으나, miR-4516의 과발현에 의하여 그 mRNA 및 단백질이 존재하는 수준이 현저하게 감소되었다.

[0153] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 miR-4516은 비 TNBC인 MCF 세포주에 비하여, TNBC인 MDA-MB-231 세포주에 높은 수준으로 존재하는 FOSL1의 번역을 현저하게 억제함으로써 TNBC 세포주의 성장을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0155] **[실시예 6] miR-4516에 의한 FOSL1 유전자의 번역 억제에 따른 TNBC 세포주의 증식 억제 효과 확인**

[0156] BT-20 세포주 또는 Hs578T 세포주에 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 miR-4516이 삽입된 pENTR™/H1/TO 벡터를 형질전환 하였다. 이때, 대조군으로는 pENTR™/H1/TO 벡터만을 형질전환 하였다. 그런 다음, 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 상기 세포주들에서 FOSL1의 단백질 및 mRNA의 발현 수준을 확인하여 그 결과를 도 6의 A 및 B에 나타내었다. 또한, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 CCK-8을 이용하여 상기 세포주들의 성장율을 측정하여, 그 결과를 도 6의 C에 나타내었다.

[0157] 도 6의 A 및 B에서 보는 바와 같이, TNBC 세포주인 BT-20 세포주 및 Hs578T 세포주에서 FOSL1의 단백질이 높은 수준으로 나타났으며, miR-4516이 과발현되었을 때, 그 FOSL1의 단백질 및 mRNA가 존재하는 수준이 현저하게 감소되었다.

[0158] 도 6의 C에서 보는 바와 같이, BT-20 세포주 또는 Hs578T 세포주에 miR-4516이 과발현된 경우, miR-4516이 과발현되지 않은 경우와 비교하여 0.2 정도 감소된 것을 확인하였다.

[0159] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 miR-4516은 비 TNBC 세포주와 비교하여, TNBC 세포주에서 특이적으로 발현이 증가되어 있는 FOSL1의 mRNA 분해를 유도함으로써 TNBC 세포주의 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0161] **[실시예 7] miR-4516 모방체(mimic)에 의한 TNBC 세포주의 증식 억제 효과 확인(1)**

[0162] TNBC 세포주(TNBC)인 MDA-MB-231 세포주, BT-20 세포주 또는 Hs578T 세포주를 6웰 플레이트에 분주하였다. 상기 각각의 세포주에 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 염기 서열이 이중 가닥으로 구성되어 있는 miR-4516 모방체를 10 nM의 농도로 처리하고, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 CCK-8을 이용하여 상기 세포주들의 성장율을 측정하여, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 여기서, 대조군으로는 miR-4516 모방체를 대신하여 10 nM 농도의 대조군 miRNA를 처리하였다.

[0164] 센스: 3'- GGGAGAAGGGUCGGGC-5'(서열번호 1)

[0165] 안티센스: 3'- CCCGACCCUUCUCCUU-5'(서열번호 2)

[0167] 도 7에서 보는 바와 같이, 대조군 miRNA를 처리한 경우와 비교하여 TNBC 세포주들에 miR-4516 모방체를 처리하였을 때, MDA-MB-231 세포주의 경우 12.1, BT-20 세포주의 경우 9.8 및 Hs578T 세포주의 경우 8.5 성장율이 감소하였다.

[0168] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 miR-4516 모방체는 TNBC 세포주에서 miR-4516과 동일하게 세포주의 성장을 저해하는 효과를 발휘하는 것을 알 수 있다.

[0170] **[실시예 8] miR-4516 모방체에 의한 TNBC 세포주의 증식 억제 효과 확인(2)**

[0171] 실제 환자의 종양미세환경에서도 miR-4516 모방체에 의한 TNBC 세포주의 증식 억제 효과가 유도되는지 여부를 확인하기 위해, 상기 실시예 7과 동일한 조건으로 MDA-MB-231 세포주, BT-20 세포주 또는 Hs578T 세포주에 miR-4516 모방체를 처리하고, 상기 각각의 세포주들의 웰에 CAF 세포주가 분주되어 있는 트랜스웰 인서트(Transwell insert)를 삽입하였다. 그런 다음, 1 % 페니실린/스트렙토 마이신 및 10 % FBS가 포함된 DMEM 또는 DMEM/F12 배지에서 1 일 동안 배양하고, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 CCK-8을 이용하여 상기 세포주들의 성장율을 측정하여, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0172] 도 8에서 보는 바와 같이, CAF 세포주와 공배양된 경우에도 miR-4516 모방체가 처리되었을 때, 대조군 miRNA를 처리한 경우와 비교하여 TNBC 세포주의 성장율이 감소되는 것을 확인하였다.

[0173] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 miR-4516 모방체는 종양미세환경과 유사한 CAF 세포주와 공배양된 TNBC 세포주에서도 매우 효과적으로 세포 성장을 저해할 수 있음을 알 수 있다.

[0175] **[실시예 9] miR-4516 모방체에 의한 TNBC 세포주의 증식 억제 효과 확인(3)**

[0176] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 miR-4516이 삽입된 pENTR™/H1/TO 벡터가 형질전환된 CAF 세포주를 트랜스웰 인서트(Transwell insert)에 GW4869(Cas no. 6823-69-4)를 처리하고 24시간 뒤에, MDA-MB-231 세포주, BT-20 세포주 또는 Hs578T 세포주가 분주된 6웰 플레이트 위에 삽입하여 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 공배양 하였다. 그런 다음, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 CCK-8을 이용하여 상기 세포주들의 성장율을 측정하여, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0177] 도 9에서 보는 바와 같이, miR-4516이 과발현된 CAF 세포주에 엑소솜 억제제인 GW4869가 처리되었을 때에는 TNBC 세포주들의 성장율이 각각 10.3(MDA-MB-231 세포주), 7.8(BT-20 세포주) 및 9.1(Hs578T 세포주) 만큼 GW4869를 처리하지 않은 경우에 비하여 증가되었다.

[0178] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 miR-4516은 CAF 세포주의 엑소솜을 통해 방출되어 TNBC 세포주의 성장을 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0180] **[실시예 10] miR-4516 모방체에 의한 TNBC 세포주의 증식 억제 효과 확인(4)**

[0181] 비 TNBC 세포주인 BT-474 세포주, MCF 7 세포주 및 SK-BR-3 세포주와, TNBC 세포주인 MDA-MB-231 세포주, BT-20 세포주 및 Hs578T 세포주에서 상기 실시예 7과 동일한 방법으로 miR-4516 모방체를 0 nM, 4 nM, 10 nM, 50 nM 또는 100 nM을 처리한 뒤, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 CCK-8을 이용하여 상기 세포주들의 성장율을 측정하여, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0182] 도 10에서 보는 바와 같이, 비 TNBC 세포주들에서는 암 세포주의 성장 억제 효과가 거의 나타나지 않았으며, MCF7 세포주의 경우에는 100 nM을 처리하였을 때 오히려 성장이 증가되었다. 그러나, TNBC 세포주들에서는 농도에 의존적으로 암 세포주의 성장이 매우 효과적으로 억제되었다.

[0183] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 miR-4516은 비 TNBC 세포주가 아닌, TNBC 세포주의 증식을 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0185] **[실시예 11] miR-4516 및 FOSL1의 mRNA와 환자 생존율과의 상관 관계 분석 결과**

[0186] miR-4516 및 FOSL1의 mRNA 발현 수준과 환자의 생존율을 분석하기 위해, 비 TNBC 또는 TNBC 환자 조직으로부터 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 전체 RNA를 추출한 뒤, miR-4516 및 FOSL1에 특이적인 프라이머를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 그런 다음, miR-4516 및 FOSL1의 mRNA 발현 수준의 상관관계에 대해 Windows 용 Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 통해 분석하였다. 또한, 4 μm로 절편화된 상기 환자의 조직을 실란이 코팅된 슬라이드에 올려놓고, 탈 파라핀화 한 뒤에 0.3 % (v/v) 과산화수소가 포함된 인산완충식염수 및 pH 6.5, 10 mM 소듐 시트레이트 완충액을 넣은 뒤 700 W 전자레인지에서 15분 동안 반

응시했다. 이후, 상기 슬라이드에 1 % (w/v)의 소 혈청 알부민이 포함되어 있는 완충액을 이용하여 30분 동안 블로킹 하고, FOSL1에 특이적인 항체와 반응시킨 뒤에 시각화 하여, 그 결과를 도 11의 A 및 B에 나타내었다.

[0187] 도 11의 A에서 보는 바와 같이, 유방암 환자의 조직에서 miR-4516의 발현 수준이 증가될수록 FOSL1의 mRNA 발현 수준은 감소되는, 즉 음의 상관관계인 것을 확인하였다.

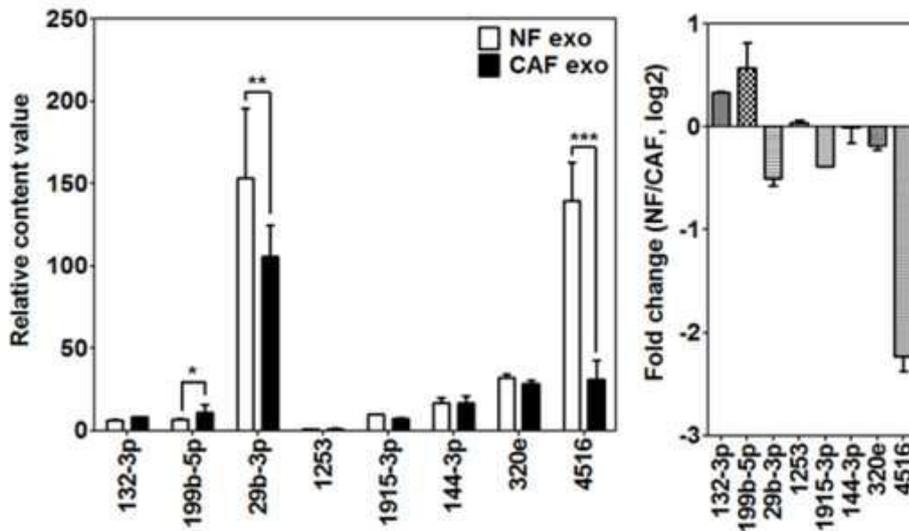
[0188] 또한, 도 11의 B에서 보는 바와 같이, 비 TNBC 환자에 비하여, TNBC 환자의 조직에서는 miR-4516의 발현 수준이 감소되어 있었으며, FOSL1의 단백질의 발현 수준이 증가되어 있는 것을 확인하였다.

[0189] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 miR-4516이 표적하는 FOSL1의 mRNA 발현 수준은 TNBC에서 특이적으로 증가되어 있으며, 이와 같은 현상은 miR-4516이 감소되어 있어 나타나는 것임을 알 수 있다.

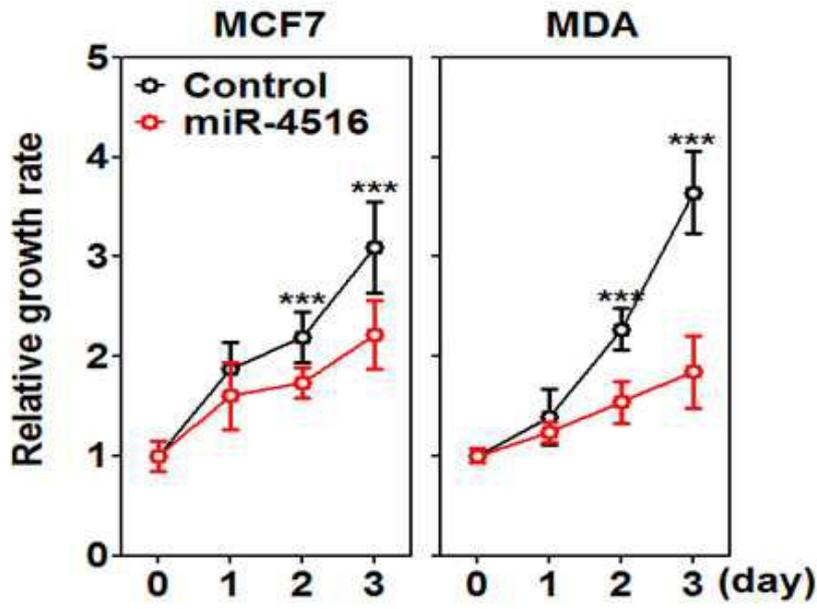
[0191] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

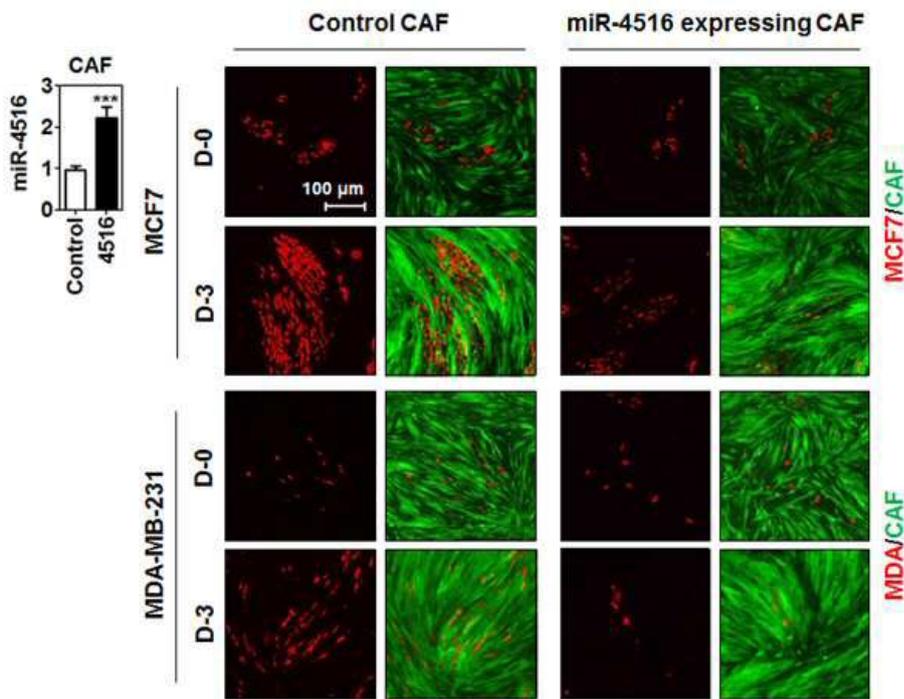
도면1



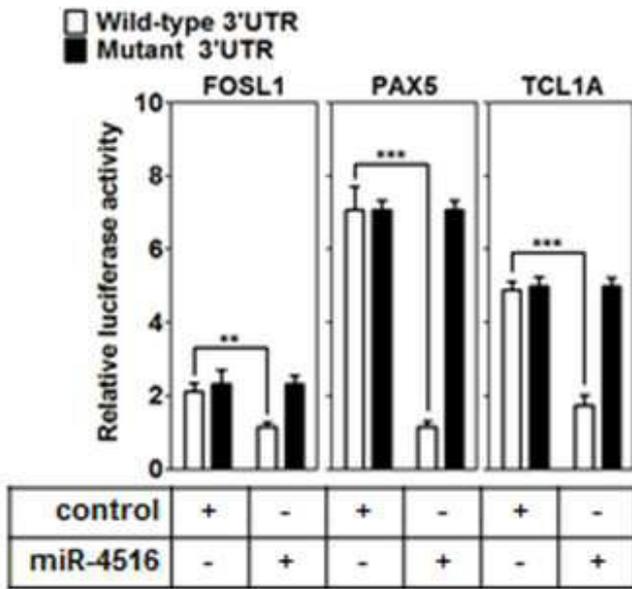
도면2



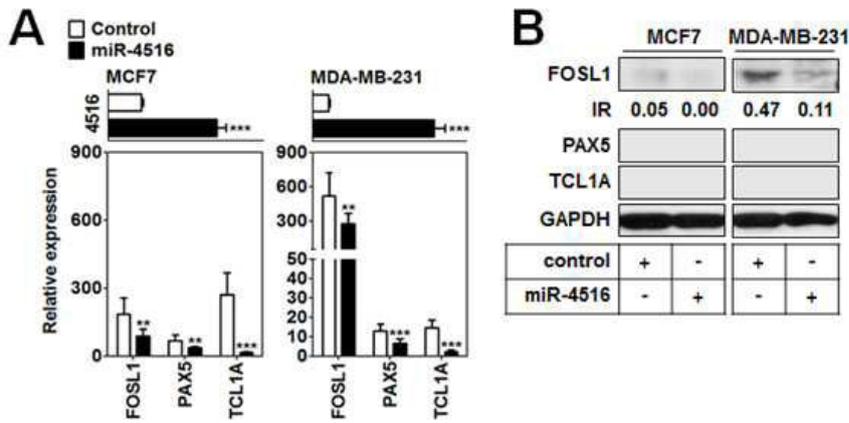
도면3



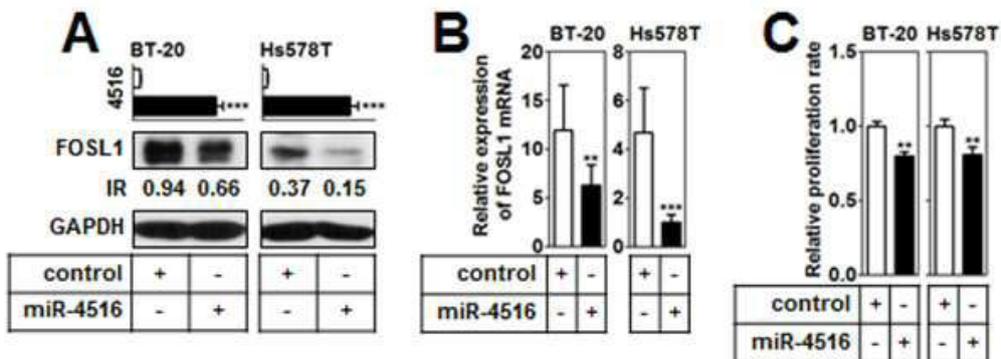
도면4



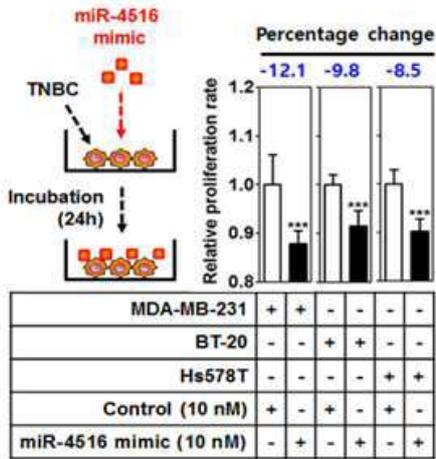
도면5



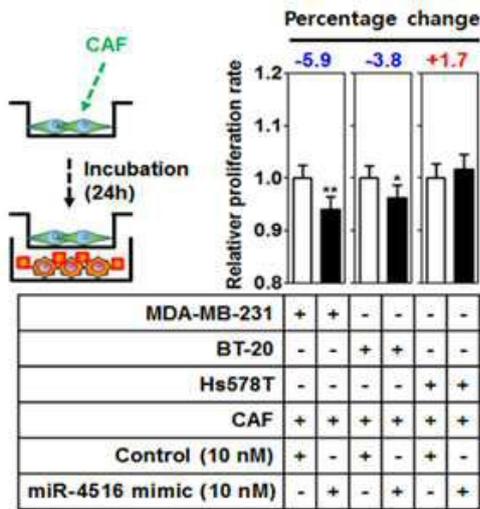
도면6



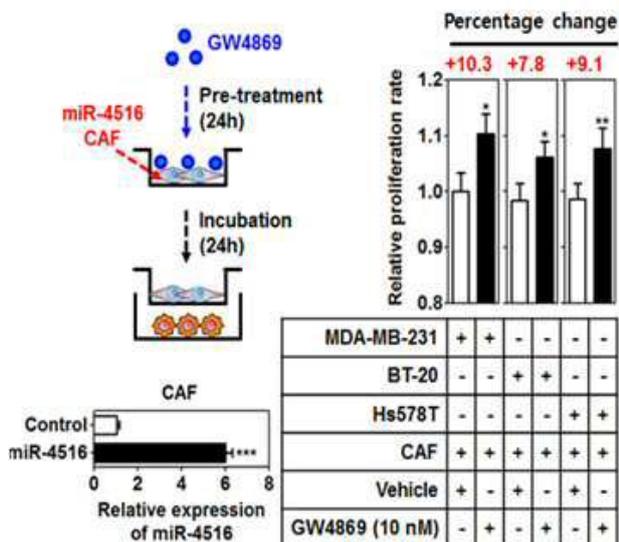
도면7



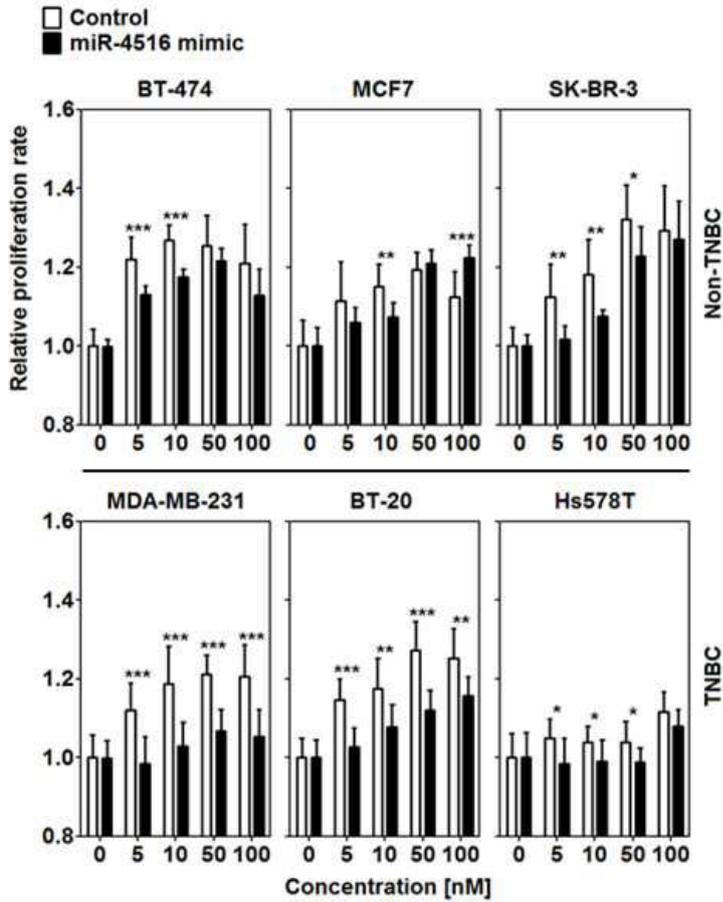
도면8



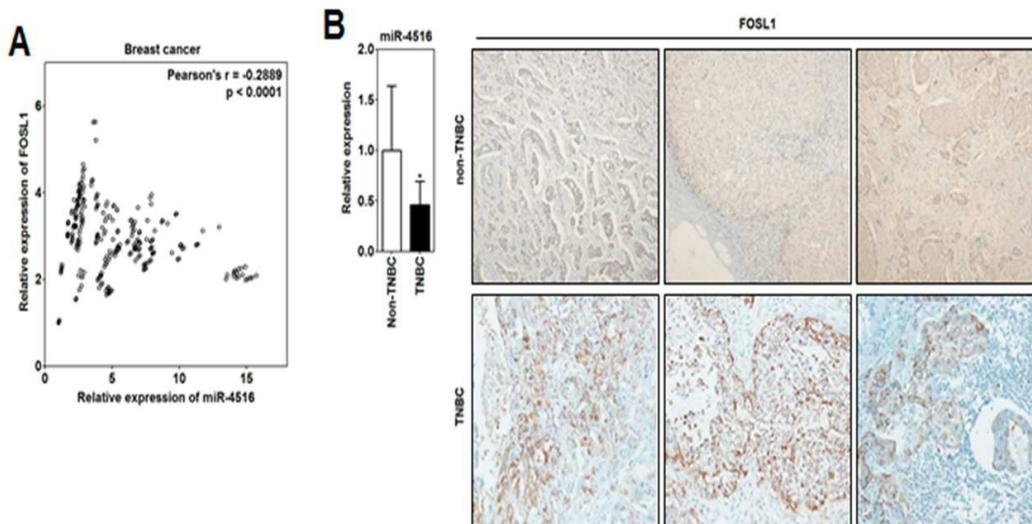
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A composition for preventing, improving or treating for cancer
- <130> PDPB194090

<160> 24
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 17
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-4516
 <400> 1
 gggagaaggg ucggggc 17
 <210> 2
 <211> 17
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-4516
 <400> 2
 cccgaccuu cucccuu 17

 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-132-3p forward primer
 <400> 3
 taacagtcta cagccatggt 20
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-132-3p reverse primer
 <400> 4
 aacgagacga cgacagactt t 21
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> miR-199b-5p forward primer

<400> 5

cccagtgttt agactatctg 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-199b-5p reverse primer

<400> 6

aacgagacga cgacagactt t 21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-29b-3p forward primer

<400> 7

tagcaccatt tgaatcagt 20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-29b-3p reverse primer

<400> 8

aacgagacga cgacagactt t 21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-1253 forward primer

<400> 9

agagaagaag atcagcctgc 20

<210> 10

<211> 21

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-1253 reverse primer	
<400>	10	
	aacgagacga cgacagactt t	21
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-1915 forward primer	
<400>	11	
	ccccagggcg acgcgcgggg	20
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-1915 reverse primer	
<400>	12	
	aacgagacga cgacagactt t	21
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-144-3p forward primer	
<400>	13	
	tacagtatag atgatgtact	20
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-144-3p reverse primer	
<400>	14	
	aacgagacga cgacagactt t	21

<210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-320e forward primer

 <400> 15
 aaagctgggt tgagaagg 18
 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-320e reverse primer
 <400> 16
 aacgagacga cgacagactt t 21
 <210> 17
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-4516 forward primer
 <400> 17
 gggagaaggg tcggggc 17
 <210> 18

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-4516 reverse primer
 <400> 18
 aacgagacga cgacagactt t 21
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FOSL1 forward primer

<400> 19
agctgcagaa gcagaaggag 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FOSL1 reverse primer

<400>
20
ggagttaggg aggtgtggt 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PAX5 forward primer

<400> 21
ggaggagtga atcagcttgg 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PAX5 reverse primer

<400> 22
ggcttgatgc ttctgtctc 20

<210> 23
<211>
20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> TCL1A forward primer

<400> 23
gcctgggaga agttcgtgta 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCL1A reverse primer

<400> 24

actaagcgcc agaaactgga

20