

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0085690

(43) 공개일자 2021년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2018.05)*C12Q 2600/158* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0179019

(22) 출원일자 2019년12월31일

심사청구일자 2019년12월31일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

권호정

서울특별시 서초구 나루터로4길 28, 309동 404호 (잠원동, 신반포8차아파트)

홍지원

서울특별시 서대문구 증가로 15-1, 604호(연희동, 정연지오빌)

김정민

서울특별시 은평구 갈현로 170-2, 502호(구산동, 구궁빌라)

(74) 대리인

특허법인충현

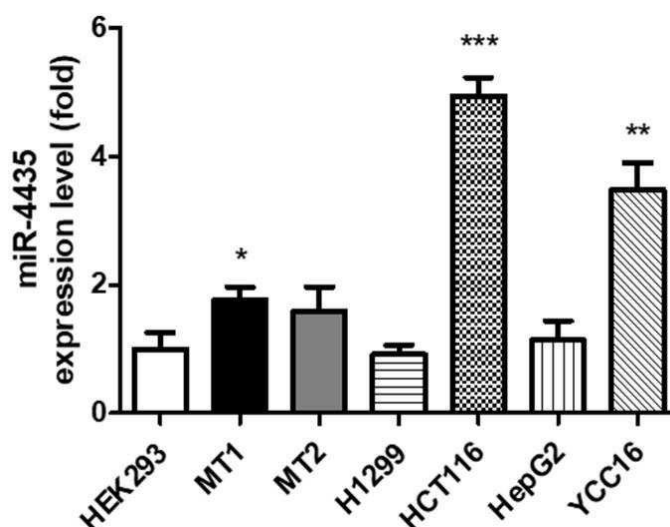
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 신규한 UQCRB-관련 순환 miRNA 바이오 마커 및 이를 이용한 대장암의 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 위장관암의 진단용 조성물, 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 발굴된 MiR-4435는 위장관암, 구체적으로는 *UQCRB* 유전자 돌연변이 관련 대장암의 발병 여부 및 진행 단계에 대한 정확한 정보를 체액 분석만으로 간단하게 수집할 수 있는 우수한 순환 바이오 마커로 유용하게 이용될 수 있다. 또한 본 발명의 MiR-4435 억제제는 종양억제 유전자인 *TIMP3*를 활성화시킴으로써 효율적인 항암 조성물로 적용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012-11-1954
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발사업
연구과제명	질환 유전자 모델 세포를 이용한 질환 관련 microRNAs 대량 발굴 및 검증
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2012.11.30 ~ 2013.11.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019-11-0314
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	글로벌연구실
연구과제명	비수식 화합물의 표적 결정시스템과 이미징 질량분석기술을 활용한 한의약 유래 화합물의 혈관신생 저해 효능 및 기전 규명
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

miR-4435, miR-21-3p 및 miR-1226-3p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 위장관암의 진단용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 miRNA는 miR-4435인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 위장관암은 위암 또는 대장암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 위장관암은 *UQCRB* 유전자의 돌연변이를 가지는 대장암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 위장관암은 3기 또는 4기 대장암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 miRNA의 발현량을 측정하는 제제는 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 핵산 분자인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 체액 진단용 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 체액은 혈액인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

miR-4435의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 위장관암은 위암 또는 대장암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 위장관암은 *UQCRB* 유전자의 돌연변이를 가지는 대장암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 miR-4435의 발현 억제제는 miR-4435과 특이적으로 결합하는 핵산분자인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 9 항에 있어서, 상기 조성물은 TIMP3(tissue inhibitor of metalloproteinases 3)의 발현 또는 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

다음의 단계를 포함하는 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법:

(a) miR-4435를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 시료 내 miR-4435의 발현량을 측정하는 단계,

상기 miR-4435의 발현량이 감소한 경우, 상기 시험물질은 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 위장관암은 위암 또는 대장암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

miR-4435, miR-21-3p 및 miR-1226-3p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 UQCRB 관련 질환의 진단용 조성물.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 miRNA는 miR-4435인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 UQCRB-관련 순환 바이오 마커인 miR-4435가 대장암에서 고발현되며 이의 억제를 통해 대장암의 형성 및 진행이 억제된다는 새로운 발견에 기반하여, miR-4435의 발현량 측정 및 이의 발현 억제를 통해 각각 대장암을 진단 및 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0003] 미토콘드리아는 에너지를 전환하여 ATP를 생성하는데 중요한 기능을 담당하고 다양한 생합성 과정에 기여한다. 미토콘드리아의 전자 전달 복합체(ETC)는 전기화학적 양성자 구배를 발생시켜 ATP 합성에 의한 에너지를 생산한다¹. 미토콘드리아 기능 이상은 많은 미토콘드리아 관련 질환을 유발하고 대사질환이나 암과 같은 다양한 질환과 연관되어 있다¹⁻⁵.
- [0004] 유비퀴놀-시토크롬 c 환원효소 결합 단백질(UQCRB)은 미토콘드리아 복합체 III에 위치하여 전자수송 및 복합체 III 유지에 중요한 역할을 한다⁶. 뿐만 아니라, UQCRB는 미토콘드리아 활성 산소종(mROS)의 생성 및 저산소-유도인자(HIF)-매개 혈관신생에 관여하며, 혈관내피세포 성장인자 수용체 2(VEGFR2)의 신호로 유도된 혈관신생을 조절한다⁷⁻⁸. UQCRB는 또한 항-혈관신생 천연 화합물인 테르페스타신(terpestacin)의 타겟 단백질로도 알려져 있고, 특히 테르페스타신이 UQCRB에 결합하며 항-혈관신생 활성을 가지는 것으로 보고되었다⁹. 나아가, 몇몇 연구에서는 간세포 암종¹⁰, 난소암¹¹, 췌장선암¹² 및 대장암(CRC)¹³에서의 UQCRB의 유전적 변화를 동정함으로써 UQCRB가 암의 발병에 역할을 한다는 것을 밝혔다.
- [0005] UQCRB에서의 돌연변이는 미토콘드리아 결함 및 관련 질환으로 이어질 수 있다. 예를 들어, *UQCRB* 유전자 내에 삭제(deletion)가 발생한 여성은 유아기의 대사위기(metabolic crisis) 동안 저혈당증 및 젖산증을 보인다¹⁴. 이에 근거하여, 본 발명자들은 두 개의 돌연변이 UQCRB-발현 세포주인 MT1 및 MT2를 제작한 바 있다. MT1은 MT2보다 높은 UQCRB 돌연변이 발현을 보인다. 본 발명자들은 안정적인 이들 세포주를 사용하여 혈관 신생에서의 UQCRB의 생물학적 기능을 조사하였다. 돌연변이 UQCRB-발현 세포주는 크게 증가된 세포 성장 및 혈관신생 활성을 보였다. 또한, 돌연변이 UQCRB-발현 세포주의 미토콘드리아는 비정상적인 형태를 띄고 UQCRB 억제제에 대해 보다 민감하였다¹⁵.
- [0006] 마이크로RNA(miRNA)는 21-23 뉴클레오타이드 길이를 가지는 작은 비-코딩 RNA 분자이다. 성숙한 miRNA는 타겟 mRNA의 3' UTR(untranslated region)의 상보적인 부위에 결합하여 mRNA 사일런싱을 유발한다. miRNA의 전사 조절이 보고되었으며¹⁶⁻¹⁷, miRNA는 종양 억제제으로도, 종양 유전자로도 작용할 수 있다¹⁸. 이에, miRNA는 수많은 생리학적, 병리학적 과정의 조절에 매우 중요하다¹⁹⁻²⁰. 본 발명자들은 최근 hsa-miR-10a-5p가 UQCRB와 관련되어 있음을 보고한 바 있다. 돌연변이 UQCRB-발현 세포에서의 miR-10a-5p의 감소는 콜레스테롤-합성 효소를 타겟팅함으로써 콜레스테롤 경로를 활성화시키는데, 이는 UQCRB와 관련된 miRNA가 암세포 증식에 일정한 역할을 할 가능성을 시사한다²¹. 또한, 이러한 miRNA는 혈청 및 혈장에서 안정적이며 이들의 발현 수준은 암과 같은 질환의 상태에 따라 다양하다²². 최근 많은 연구에서 miRNA 발현 프로파일의 다양한 질환의 바이오마커로서의 사용 가능성이 제시되고 있으며, 최근 혈청 miR-155가 CRC 환자에서 정상인에 비해 고발현됨이 보고됨으로써 miR-155가 CRC 바이오마커로 사용될 수 있음을 제안되었다²³. 또한, Lv, Z. C. 등은 4개의 miRNA가 비소세포성 폐암(NSCLC)의 전체 생존기간과 관련되어 있음을 보고하였다²⁴. 그러나, 질환에서 이들 miRNA를 조절하는 기작은 여전히 불명확하다.
- [0007] CRC는 전 세계적으로 3번째로 흔한 암이며 사망의 주요 원인을 차지한다. 최근까지 암의 초기단계에서는 외과적 절제술이 주로 시행되었으나, 질환이 상당부분 진행되거나 심지어 원격 전이가 일어나기까지 진단되지 못하는 경우가 종종 있다²⁵. 최근 UQCRB와 CRC 간의 관계가 연구되어 왔는데, UQCRB 유전자 및 단백질이 대장암 환자에서 인접한 비종양 조직에 비해 현저하게 고발현되어 있음이 발견되었다²⁶. 이는 UQCRB가 CRC에서 종양 형성에 관여하고 진단을 위한 바이오마커로도 사용될 수 있는 가능성을 시사한다. 본 발명자들은 돌연변이 UQCRB-발현 세포주에서의 miRNA 발현을 조사하여 새로운 CRC 관련 바이오마커를 동정하고자 하였다. 또한, UQCRB의 임상적 중요도를 조사하기 위해 인간 CRC 환자 혈청시료에서 miRNA 분석을 수행한 결과, CRC에서의 UQCRB-관련 암에 대한 순환 miRNA 바이오마커로서 miR-4435를 동정하였다.
- [0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. JE Kim et al., Hsa-miR-10a-5p downregulation in mutant UQCRB-expressing cells promotes the cholesterol biosynthesis pathway Scientific Reports (8): 12407 (2018)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명자들은 위장관암, 구체적으로는 위암 또는 대장암의 진단을 위한 종합적이고 신뢰도 높은 정보를 제공하면서도 조직 시료 없이 체액 검사만으로 간단하게 측정할 수 있는 순환(circulating) 바이오 마커를 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 3개의 miRNA가 위장관암에서 특이적으로 발현될 뿐 아니라 암이 후기로 진행될수록 고발현되어 암의 발병 여부 및 진행 단계에 대한 정확한 정보를 제공하고, 엑소좀을 경유하여 분비됨으로써 혈청시료의 간단한 분석만으로 진단이 가능함을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 따라서 본 발명의 목적은 위장관암의 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 miR-4435, miR-21-3p 및 miR-1226-3p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 위장관암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명자들은 위장관암, 구체적으로는 위암 또는 대장암의 진단을 위한 종합적이고 신뢰도 높은 정보를 제공하면서도 조직 시료 없이 체액 검사만으로 간단하게 측정할 수 있는 순환(circulating) 바이오 마커를 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, miR-4435(서열목록 제1서열), miR-21-3p(서열목록 제2서열) 및 miR-1226-3p(서열목록 제3서열)의 3개의 miRNA가 위장관암에서 특이적으로 발현될 뿐 아니라 암이 후기로 진행될수록 고발현되어 암의 발병 여부 및 진행 단계에 대한 정확한 정보를 제공하고, 엑소좀을 경유하여 분비됨으로써 혈청시료의 간단한 분석만으로 진단이 가능한 우수한 바이오마커로 기능할 수 있음을 발견하였다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는 지 여부의 판정, 및 특정 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다. 본 발명의 miRNA의 발현량은 현재 발병 여부 뿐 아니라 발병 위험성에 대한 유전적 표지자가 되므로, 이를 측정함으로써 위장관암이 현재 개체에서 발생되었는지 여부의 판정 및 현재 개체가 위장관암에 걸리지는 않았으나 향후 발병할 가능성과 관련된 예후(prognosis)의 판정을 위한 정보를 제공한다. 따라서, 용어 “위장관암의 진단”은 “위장관암의 발병 위험성의 예측”으로 표현될 수도 있다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 “위장관암의 진단용 조성물”은 대상체의 위장관암 발병 여부를 판단하기 위해 위해 miR-4435 등의 발현량 측정수단을 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 “위장관암의 진단용 키트”로 표현될 수도 있다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 miRNA는 miR-4435이다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 진단되는 위장관암은 위암 또는 대장암이며, 보다 구체적으로는, UQCRB 유전자의 돌연변이를 가지는 대장암이다.

- [0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 진단되는 대장암은 3기 또는 4기 대장암이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 순환 바이오 마커인 miR-4435는 대장암에서 특이적으로 고발현됨은 물론, CRC 1기 내지 4기의 다양한 연령의 환자의 혈청 시료 분석 결과 CRC 단계가 후기로 진행될수록, 특히 3기 및 4시 환자에서 그 발현이 더욱 증가함을 확인하였다(표 1 및 도 2e 참조). 따라서, 본 발명의 miR-4435는 대장암의 발병 여부 뿐 아니라 대장암의 진행 정도에 대한 정보 또한 제공할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 miRNA의 발현량을 측정하는 제제는 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 핵산 분자이다.
- [0027] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)). “miRNA에 특이적으로 결합하는 핵산 분자”는 본 발명의 miRNA와 실질적으로 상보적인 염기서열을 가져 이에 특이적으로 혼성화될 수 있는 핵산 분자를 의미하며, 예를 들어 프라이머 및 프로브를 포함한다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “프라이머”는 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [0030] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산, 예를 들어 miR-4435의 특정 염기서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우를 모두 포괄하는 의미이며, 구체적으로는 완전히 상보적인 경우를 의미한다. 본 명세서에서 용어 “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [0031] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, pH 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 이러한 프라이머의 설계는 타겟 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 더욱 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 miR-4435의 특정 염기서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 타겟 서열의 3' -말단 또는 5' -말단에 상보적인 프로브를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0033] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 진단용 조성물은 체액 진단용 조성물이다. 상기 체액(body fluid)은 소변, 타액, 정액, 눈물, 양수(Amniotic Fluid), 뇌척수액(Cerebrospinal Fluid), 활막액(Synovial

Fluid), 심막액(pericardial fluid), 복수(Peritoneal Fluid), 혈액, 혈장 및 혈청으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 체액이다. 가장 구체적으로는, 상기 체액은 혈액, 혈장 또는 혈청이다.

- [0035] 본 발명에 따르면, 본 발명의 miR-4435는 암세포에서 분비되는 엑소좀을 경유하여 혈액을 순환함으로써, 혈액 내의 농도 측정을 통해 암의 진단이 가능하다. 이를 통해 본 발명은 조직검사 없이도 신뢰도 높은 임상 정보를 제공함으로써 환자의 편의성 및 절차의 간편성과 경제성을 모두 달성한다.
- [0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 miR-4435의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명에서 진단 또는 치료 등의 대상이 되는 위장관암에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0040] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발현의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물이 대상체에 투여되면 miR-4435의 발현 억제를 통해 종양 억제 유전자인 *TIMP3*가 활성화되면서 종양의 형성 및 진행을 차단하여 종양에 따른 증상의 발현을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 위장관암의 치료 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0041] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0042] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분(즉, miR-4435의 발현 억제제)이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.
- [0043] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0045] 본 명세서에서 용어 “발현 억제제”는 타겟 유전자의 활성 또는 발현의 저하를 야기시키는 물질을 의미하며, 이에 의해 타겟 유전자의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, 타겟 유전자의 생물학적 기능이 유의하게 저하될 수 있을 정도로 활성 또는 발현을 저하시키는 물질을 의미한다. 상기 발현 억제제는 핵산분자, 화합물, 펩타이드 및 천연물을 포함한다.
- [0046] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 miR-4435의 발현 억제제는 miR-4435과 특이적으로 결합하는 핵산분자이다. 타겟 유전자의 발현 억제를 위해 타겟 유전자와 특이적으로 결합하는 핵산 분자는 예를 들어 당업계에 이미 그 서열이 공지된 상기 miR-4435의 발현을 억제하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miR-4435를 인식하는 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR 시스템을 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 모든 유전자의 억제수단이 사용될 수 있다.
- [0047] 본 명세서에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA)”는 인 비보 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열을 의미한다. 통상적으로 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성하며, 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 타겟 유전자의 발현억제가 유전되도록 한다.
- [0048] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내

지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이고, 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.

[0049] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 유전자의 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA 분자를 의미한다.

[0050] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 mRNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.

[0051] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지면서 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성되며, 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization)를 통해 이중가닥을 형성하여 타겟 유전자의 발현을 조절한다.

[0052] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로서 타겟 mRNA 내의 상보적 서열에 결합하여 이의 단백질로의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당솔포네이 등으로 변형될 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 용어 “발현시키다”는 대상체가 외래(exogenous) 유전자를 발현하게 하거나 또는 내인성(endogenous) 유전자의 자연적 발현량을 증가시키기 위해 유전자 전달체를 이용하여 인위적으로 이를 도입함으로써 유전자가 대상체 세포 내에서 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 따라서, 용어 “발현”은 “형질전환(transformation)”, “형질감염(transfection)” 또는 “형질도입(transduction)”과 동일한 의미이다.

[0054] 본 명세서에서, 용어 “유전자 전달체(gene carrier)”는 유전자를 세포 내로 운반하는 모든 수단을 의미하며, 유전자 전달은 유전자의 세포내 침투(transduction)와 동일한 의미를 가진다. 조직 수준에서, 상기 용어 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 유전자 침투 시스템 및 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.

[0055] 본 발명의 유전자 전달체는 도입하고자 하는 유전자를 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 구조체인 발현카세트의 형태로 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 유전자에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터, 전사종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다.

[0056] 본 발명에서 이용되는 유전자 전달체는 통상적인 유전자 삽입에 이용되는 모든 유전자 전달 시스템이 적용될 수 있으며, 예를 들어 플라스미드, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 배시니아 바이러스, 리포솜 및 니오솜을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명의 유전자 전달체를 대상체의 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 예를 들어 미세 주입법(Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.* 101:1094-1099 (1985)), 칼슘포스페이트 침전법(Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.* 7:2745-2752 (1987)), 전기천공법(Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718(1986)), 리포솜-매개 형질감염법(Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990))가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물은 TIMP3(tissue inhibitor of metalloproteinases 3)의 발현 또는 활성을 증가시킨다. 상술한 바와 같이 본 발명의 조성물이 대상체에 투여되면 miR-4435의 발현 억제를 통해 종양 억제 유전자인 *TIMP3*가 활성화되면서 종양의 형성 및 진

행을 효율적으로 억제한다.

- [0060] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0061] (a) miR-4435를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0062] (b) 상기 시료 내 miR-4435의 발현량을 측정하는 단계,
- [0063] 상기 miR-4435의 발현량이 감소한 경우, 상기 시험물질은 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.
- [0064] 본 발명에서 예방 또는 치료하고자 하는 위장관암에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [0065] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, miR-4435를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로는, 상기 miR-4435를 발현하는 세포는 암세포이며, 가장 구체적으로는 대장암 세포이다.
- [0066] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 miR-4435를 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 miR-4435의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 miR-4435의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다. 측정 결과, miR-4435의 발현량 또는 활성이 감소한 경우 상기 시험물질은 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물로 판정될 수 있다.
- [0067] 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 감소”는 miR-4435에 의해 종양 억제 유전자 *TIMP3*가 저해되는 정도가 유의하게 감소되어 *TIMP3*의 고유의 종양 억제 작용이 측정 가능한 수준으로 회복될 정도로 miR-4435의 발현량 또는 생체 내 고유한 기능이 감소하는 것을 의미한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 miR-4435, miR-21-3p 및 miR-1226-3p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 UQCRB 관련 질환의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0070] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 miRNA는 miR-4435이다.
- [0071] 본 명세서에서 용어 “UQCRB 관련 질환”은 UQCRB 내의 기능이상 돌연변이 또는 이의 과발현으로 인해 미토콘드리아의 기능에 결함이 유발되는 모든 질환을 의미한다. UQCRB 관련 질환은 주로 전자 전달을 촉매하는 효소 결핍으로 인한 복합체 III 결핍(complex III deficiency)과 관련되어 있으며, 예를 들어 콜레스테롤 생합성 이상(cholesterol biosynthesis disease), 저혈당(hypoglycemia), 젖산산증(lactic acidosis), 대사산증(metabolic acidosis), 심근병증(Cardiomypathy), 미오글로빈뇨(myoglobinuria), 망막색소병증(retinitis pigmentosa), 미토콘드리아성 근병증(mitochondrial myopathy), 간세포 암, 난소암, 췌장선암을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0073] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0074] (a) 본 발명은 위장관암의 진단용 조성물, 위장관암의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0075] (b) 본 발명의 MiR-4435는 위장관암, 구체적으로는 *UQCRB* 유전자 돌연변이 관련 대장암의 발병 여부 및 진행 단계에 대한 정확한 정보를 체액 분석만으로 간단하게 수집할 수 있는 우수한 순환 바이오 마커로 유용하게 이용될 수 있다.

[0076]

(c) 본 발명은 또한 MiR-4435 억제제를 통해 종양억제 유전자인 *TIMP3*를 활성화시킴으로써 효율적인 항암 조성물로 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0078]

도 1은 본 발명에 선정된 miRNA들이 돌연변이 UQCRB-발현 세포 및 대장암 세포에서 고발현됨을 보여주는 그림이다. 도 1a는 돌연변이 UQCRB-발현 세포 및 대장암과 관련된 miRNA 선정 과정을 보여주는 모식도이다. FC는 대조군과 MT 세포 간 상이한 발현을 나타낸다. CPM은 각 miRNA의 정규화된 발현을 나타낸다. 도 1b는 qRT-PCR를 이용하여 돌연변이 UQCRB-발현 세포주에서 선정된 miRNA를 확인한 결과를 보여주는 그림이다. 도 1c는 qRT-PCR를 이용하여 돌연변이 대장암 세포에서 선정된 miRNA를 확인한 결과를 보여주는 그림이다. 모든 정량 데이터는 대조군에 대한 평균 \pm 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$).

도 2는 MiR-4435가 엑소솜에 의해 분비됨을 보여주는 그림이다. 도 2a는 돌연변이 UQCRB-발현 세포주에서 분비된 엑소솜에서의 miR-4435 발현 수준을 qRT-PCR로 분석한 결과를 나타낸다. 도 2b는 돌연변이 UQCRB-발현 세포 배양 배지 내에서의 엑소솜 마커 *racnf* 결과를 보여준다. CD63이 엑소솜의 양성 마커로, 칼넥신(Calnexin)이 음성 마커로 각각 사용되었다. 도 2c는 대장암 세포에서 분비된 엑소솜에서의 miR-4435(좌측) 및 miR-21(우측)의 발현 수준을 qRT-PCR로 분석한 결과를 보여주는 그림이다. 도 2d는 대장암 세포 배양 배지에서의 엑소솜 마커 검출 결과를 보여주는 그림이다. 도 2e는 qRT-PCR을 이용하여 대장암 환자 혈청 내의 miR-4435를 측정하는 결과로서, 각 환자의 miR-4435 발현수준(좌측)과 각 단계에서의 miR-4435의 평균 발현수준(우측)을 각각 보여준다. 모든 정량 데이터는 대조군에 대한 평균 \pm 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$). 모든 이미지는 3번의 독립적인 반복 실험에 대한 대표 이미지들이다.

도 3은 종양 억제 유전자인 *TIMP3*가 MiR-4435의 유력한 타겟임을 보여주는 그림이다. 도 3a는 miRmap 데이터베이스를 이용하여 동정된 miR-4435 및 *TIMP3* 씨드(seed) 서열을 나타낸다. 도 3b 및 3c는 돌연변이 UQCRB-발현 세포주 및 대장암 세포에서의 단백질 발현 수준을 보여주는 그림이다. β -액틴이 내부 대조군으로 사용되었다. 도 3d 및 3e는 돌연변이 UQCRB-발현 세포주 및 대장암 세포에 miR-4435 억제제를 형질주입시킨 뒤의 miR-4435의 발현 수준을 나타낸 그림이다. 도 3f 및 3g는 돌연변이 UQCRB-발현 세포주 및 대장암 세포에 miR-4435 억제제를 형질주입시킨 뒤의 *TIMP3*의 발현 수준을 보여주는 그림이다. β -액틴이 내부 대조군으로 사용되었다. 모든 정량 데이터는 대조군에 대한 평균 \pm 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$). 모든 이미지는 3번의 독립적인 반복 실험에 대한 대표 이미지들이다.

도 4는 MiR-4435가 UQCRB 억제제인 A1938에 의해 조절됨을 보여주는 그림이다. 도 4a 및 4b는 돌연변이 UQCRB-발현 세포주 및 대장암 세포에서 A1938가 miR-4435 발현 수준에 미치는 영향을 보여주는 그림이다. 도 4c 및 4d는 돌연변이 UQCRB-발현 세포주 및 대장암 세포에서 A1938가 *TIMP3* 발현 수준에 미치는 영향을 보여주는 그림이다. β -액틴이 내부 대조군으로 사용되었다. 도 4e 및 4f는 miR-4435 억제제 형질주입 후의 세포증식을 보여주는 그림이다. 도 4g 및 4h는 A1938가 세포 증식에 미치는 영향을 보여주는 그림이다. 세포에 A1938(30 μ M)를 36시간 동안 처리하였다. 모든 정량 데이터는 대조군에 대한 평균 \pm 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$). 모든 이미지는 3번의 독립적인 반복 실험에 대한 대표 이미지들이다.

도 5는 대장암 세포주에서 miR-4435가 고발현됨을 보여주는 그림이다. 다양한 암세포주에서 선정된 miRNA의 유효성을 평가하기 위해, qRT-PCR을 이용하여 위암(YCC16), 간암(HepG2), 폐암(H1299) 및 대장암 세포(HCT116)에서의 miR-4435 발현을 측정하였다. 모든 정량 데이터는 대조군에 대한 평균 \pm 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$).

도 6은 qRT-PCR를 이용하여 대장암 환자 혈청에서의 miR-21 발현수준을 조사한 결과를 보여주는 그림이다. 각 환자의 miR-21 발현수준(좌측) 및 각 단계에서의 miR-21 평균 발현수준(우측)을 각각 나타내었다. 모든 정량 데이터는 대조군에 대한 평균 \pm 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079]

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

[0081] 실시예

[0082] 실험방법

[0083] 세포 배양

[0084] 대조군(HEK293, 인간 정상 신장세포) 및 HEK293 세포 중 돌연변이 UQCRB-발현 세포주인 MT1 및 MT2를 10% 우태아혈청(FBS; Invitrogen) 및 1% 항생제(Invitrogen)가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen, Grand Island, NY)에서 배양하였다. HCT116(인간 대장암 세포)를 동일한 조건 하에 RPMI1640(Invitrogen)에서 배양하였다. 인간 정상 대장세포인 CCD18Co를 20% 우태아혈청(Gibco BRL) 및 1× 비-필수 아미노산(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)이 보충된 DMEM에서 배양하였다. 모든 세포를 pH 7.4 배지의 가습 인큐베이터에서 37℃, 5% CO₂하에서 배양하였다. 안정적인 돌연변이 세포주 유지를 위하여, 1mg/mL G418를 DMEM 배지에 적용하였다.

[0086] RNA 분리

[0087] 세포를 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 수집하고 총 RNA를 PureLink™ RNA 분리 키트(Ambion)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 추출하였다. 엑소좀으로부터 RNA의 분리는 SeraMir™(System Biosciences)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다.

[0089] miRNA 시퀀싱 및 miRNA 발현

[0090] 분리된 총 RNA를 miRNA-시퀀싱(Illumina HiSeq 2000)에 적용하고, MacroGen(Seoul, South Korea)으로부터 미가공 데이터 세트를 획득하였다. 요약하면, miRNA-사일런싱을 위해 Illumina 프로토콜에 따라 소량의 RNA 시료를 제작하였다. 5' 및 3' 아답터를 5-10 µg의 총 RNA로부터 정제된 18-30 염기의 소형 RNA에 연속적으로 결합시켰다. 아답터-결합 소형 RNA에서 아답터를 잘라내고 역전사 후 증폭시켜 제거하고 HiSeq 2000 (Illumina)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 시퀀싱하였다. 다음으로, 아답터를 제거하고 Bowtie 툴을 이용하여 기준 유전자에 대해 맵핑하였다²⁷. edgeR을 이용하여 사분위수 방법으로 데이터를 표준화하였다. 마지막으로, 리드(read) 값을 CPM(counts per million)으로 표준화하고 배수 변화(fold change, FC)를 계산하였다. Benjamini-Hochberg 알고리즘을 이용하여 *p*-값을 조정함으로써 오발견율(false discovery rate, FDR)을 조절하여 후보 miRNA를 동정하였다. 돌연변이 UQCRB-발현 세포의 전사체 분석 데이터는 국가생명연구자원정보센터(KOBIC)에서 이용 가능하다(KBRS20171018-0000001 ~ KBRS20171018-0000336)

[0092] mRNA 시퀀싱

[0093] 본 발명자들은 총 RNA에 대한 mRNA-시퀀싱(Illumina HiSeq 2000)을 수행하였으며 MacroGen(Seoul, South Korea)으로부터 미가공 데이터 세트를 획득하였다. 요약하면, 1 µg의 총 RNA를 이용하여 TruSeq RNA 라이브러리 키트로 cDNA 라이브러리를 구축하였다. 프로토콜은 poly A-선택 RNA 추출, RNA 절편화, 무작위 욱량체 프라이밍 역전사 및 Illumina HiSeq 2000를 이용한 100 nt 페어드-엔드 시퀀싱으로 구성된다. qRT-PCR를 이용하여 qRT-PCR 정량화 프로토콜 가이드에 따라 라이브러리를 정량화하고 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer를 이용하여 정량하였다. 다음으로, 이들 mRNA 리드(read)의 아답터를 제거하고 TopHat2를 이용하여 맵핑하였다. 기준 지놈서열(hg19, Genome Reference Consortium GPCh37) 및 이의 주석에 관한 데이터는 UCSC 웹사이트(<http://genome.ucsc.edu>)에서 다운로드하였다.

[0095] 정량적 RT-PCR (qRT-PCR)

[0096] TaqMan miRNA 역전사 키트(Applied Biosystems, Waltham, MA)과 Taqman 프라이머(Applied Biosystems)를 이용하여 분리된 RNA를 역전사하였다. TaqMan 프라이머(Applied Biosystems)를 가지고 Taqman Fast Universal PCR master mix Applied Biosystems)를 이용하여 HT Fast Real Time PCR 시스템(Applied Biosystems) 상에서, 또는

FastStart Essential DNA Probes Master(Roche)를 이용하여 LightCycler 96 시스템(Roche) 상에서 실시간 PCR을 제조사의 지시에 따라 수행하였다. $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용하여 데이터를 계산하고 내부 대조군 소형 RNA인 *RNU48*에 대해 표준화하였다.

[0098] 웨스턴 블롯 분석

[0099] 세포 용해물을 12.5% SDS-PAGE로 분석하고 이플루오로화 폴리비닐리덴 막(Millipore, Billerica, MA)으로 옮겼다. 블롯을 항-UQCRB(1:500) (A78559, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), 항-TIMP3(1:3000)(ab39184, Abcam, Cambridge, MA)의 1차 항체 및 β -액틴(1:3000)(ab6276, Abcam, Cambridge, MA)과 함께 4°C에서 밤새 배양하였다. Clarity Western ECL 기질(Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 면역 표지(Immunolabeling)를 수행하였다. LabTM 소프트웨어(Bio-Rad)를 이용하여 영상을 정량화하였다.

[0101] 엑소좀 분리

[0102] ExoQuick-TC™를 이용하여 엑소좀을 세포 배양배지(CCM)로부터 추출하였다. 세포(3×10^5)를 72시간 동안 100 mm 세포배양 플레이트에 씨딩하고 37°C, 5% CO₂, pH7.4의 가습 인큐베이터에서 배양하였다. 72시간 뒤, ExoQuick™ 키트를 이용하여 제조사의 지시에 따라 대장암 환자 시료로부터 엑소좀을 분리하였다. CRC 환자의 혈청 시료는 세브란스 병원 유전자 은행(IRB 승인번호: 7001988-201803-BR-141-01E)에서 공여받았다.

[0104] miRNA 억제제 형질주입

[0105] 돌연변이 UQCRB-발현 세포 및 대장암 세포에 Bioneer Co.(Daejeon, Korea)로부터 구입한 miR-4435 억제제를 형질주입시켰다. 형질주입 48시간 전에 세포(1.5×10^5)를 6-웰 플레이트에 씨딩하였다. 형질주입은 리포펙타민 RNAiMAX(Invitrogen) 시약을 이용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다.

[0107] 세포증식 어세이

[0108] 세포(3×10^3)를 96-웰 플레이트에 24 - 72시간 동안 씨딩하고 MTT (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨브로마이드, Sigma Aldrich, SaintLouis, MO) 분석을 통해 세포증식을 측정하였다. 세포에 UQCRB 억제제(A1938)를 처리하고 miR-4435 억제제를 형질주입하였다.

[0110] 통계적 분석

[0111] 결과 값은 평균 \pm 표준오차(S.E.M.)로 나타내고 모든 통계적 분석은GraphPad Prism(ver. 5.00, GraphPad Software, San Diego, CA, www.graphpad.com)를 이용하여 계산하였다. 스튜던트 *t*-검정을 이용하여 대조군과 시험군 간의 통계적 유의성을 결정하였다. *p*-값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다(**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

[0113] 실험결과

[0114] 선정된 miRNA는 돌연변이 UQCRB-발현 세포주 및 CRC 세포에서 발현이 증가되었다

[0115] 본 발명자들은 앞서 돌연변이 세포에서 대조군 세포(HEK293)에 비해 상이하게 발현되는 miRNA를 분석하고자 HEK293 및 돌연변이 UQCRB-발현 HEK293 세포주(MT1 및 MT2)에서 miRNA-시퀀싱을 수행한 바 있다²¹. 우선, 대조군에 비해 상이하게 발현되는 1,338개 및 1,195개의 miRNA를 MT1 및 MT2 세포주에서 각각 동정하였다. 이 중 6개의 miRNA(hsa-miR-4485, -4745-5p, -1908-3p, -1226-3p, -4435, -21-3p)가 다음의 세 가지 기준에 따라 주요 후보로서 선정되었다: 대조군 대비 $|\log_2FC| > 1$, $|\log_2CPM| > 2$, FDR<0.05. miRNA 후보 선정과정의 모식도는 도

1a에 나타내었다. 먼저, 상기 6개 후보 중 CRC에서 증가하는 것으로 확인된 3개의 후보(miR-21-3p, miR-1226-3p, miR-4435)를 1차 선정하고, 이들 3개 중 CRC 세포에서 엑소솜을 경유하여 분비되는 것으로 확인된 miR-4435를 최종 후보로 선정하였다. 다음으로, 정량적 RT-PCR을 이용하여 대조군 세포주(HEK293)에 비해 돌연변이 UQCRB-발현 세포주에서 miR-4435 수준이 증가하는지를 확인한 결과, miR-4435 수준은 대조군 세포주(HEK293)에 비해 돌연변이 UQCRB-발현 세포주에서 증가되어 있었다(도 1b). CRC 바이오마커인 miR-21 역시 CRC에서 증가되어 있었으며, 이를 양성 대조군으로 사용하였다. miR-21 및 miR-4435의 발현수준 모두 CRC 세포주인 HCT116에서 정상 대장 세포주 대비 2배 증가되어 있었다(도 1c). 또한, 본 발명자들은 높은 유병률의 암으로 알려진 위암(YCC16), 간암(HepG2), 폐암(H1299) 및 대장암(HCT116)에서 miR-4435 발현 수준을 조사하였으며, 그 결과 miR-4435가 대장암에서만 특이적으로 발현이 증가되어 있음을 발견하였다. 다음으로 높은 발현을 보이는 곳은 위암이었는데, 이는 위장관의 영향인 것으로 보인다(도 5). 이러한 결과를 종합하면, miR-4435가 돌연변이 UQCRB-발현 세포주 및 대장암 세포에서 발현이 증가함을 알 수 있다.

[0117] 선정된 miRNA는 엑소솜에서 증가한다

[0118] 돌연변이 UQCRB-발현 및 CRC 세포에서 선정된 miRNA인 miR-4435의 발현이 증가함이 관찰되었고, miR-4435가 엑소솜을 통해 분비되는지를 조사하였다. 돌연변이 UQCRB-발현 세포 및 CRC 세포를 72시간 동안 배양하고 세포 배양배지(CCM)로부터 엑소솜을 분리한 뒤 엑소솜 내의 후보 miRNA의 발현 수준을 측정하였다. 분리된 엑소솜에서의 miR-4435 발현수준은 대조군(HEK293)에서보다 돌연변이 UQCRB-발현 세포주 유래 엑소솜 내에서 더 높았다(도 2a). 추가적인 확인을 위해 엑소솜을 분리하여 엑소솜-특이적 마커(CD63 및 칼넥신)에 대한 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, 엑소솜이 CCM으로부터 성공적으로 분리되었으며(도 2b), 정상 세포에 비해 CRC 세포에서 엑소솜을 통해 분비되는 양은 miR-4435가 miR-21 보다 높은 수준이었다(도 2c). 이 역시 엑소솜-특이적 마커에 대한 웨스턴 블롯팅 결과를 통하여 엑소솜이 잘 분리되었음을 확인할 수 있었다(도 2d). 종합하면, 돌연변이 UQCRB-발현 세포주 및 CRC 세포에서 miR-4435가 고발현될 뿐 아니라 이들 세포에서 분비되는 엑소솜에도 높은 수준의 miR-4435가 존재하였다.

[0119] 다음으로, 본 발명자들은 CRC 환자의 혈청에서 miR-4435의 발현을 조사하였다. CRC 환자의 혈청 시료로부터 엑소솜을 분리하고 qRT-PCR로 엑소솜 내의 miR-4435 발현 수준을 측정하였다. CRC 1기 내지 4기의 다양한 연령의 환자의 혈청 시료를 분석한 결과(표 1), miR-4435 발현은 CRC 단계가 후기로 진행될수록 증가하였다(도 2e). 한편, 환자 혈청시료의 miR-21 발현 수준은 CRC 단계의 진행과 연관성을 보이지 않았다(도 6). 이들 결과는 miR-4435가 특정 단계의 CRC에 대한 순환 miRNA 바이오마커로 기능할 수 있음을 보여준다. 특히, miR-4435는 CRC의 진행 정도와 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다.

[0121] UQCRB-관련 핵심 miRNA는 종양 억제 유전자인 TIMP3를 타겟팅한다

[0122] miR-4435가 어떠한 유전자를 타겟팅하는지를 조사하기 위하여, 돌연변이 UQCRB-발현 세포주(MT1 및 MT2)와 대조군의 mRNA-시퀀싱 결과를 비교하였다. 이들 중 대조군 대비 $|FC| > 2$ 인 133개 mRNA가 유의하게 감소하는 후보군으로 선정되었다. 이후 타겟 예측 프로그램인 miRDB를 이용하여 miR-4435의 타겟 mRNA를 동정한 결과 총 474개의 타겟 유전자가 예측되었다. 돌연변이 UQCRB-발현 세포주에서의 mRNA-시퀀싱 결과와 miRDB 결과를 비교하여 공통 유전자를 가려내고, 이들 중 가장 높은 점수(53)를 받은 TIMP3가 타겟 유전자 후보로 최종 선정되었다. miR-4435 및 TIMP3의 씨드(seed) 서열은 도 3a에 나타내었다. TIMP3는 CRC에서 낮게 발현되며, 종양 억제 유전자로 알려져 있다²⁸. 이에, 단백질 발현 수준을 조사한 결과 TIMP3 단백질은 HEK293에서보다 돌연변이 UQCRB-발현 세포주에서 낮게 발현됨을 발견하였다(도 3b). 나아가, 내재적인 UQCRB 수준은 CRC 세포에서 정상 대조군 세포보다 높은 반면, miR-4435의 타겟으로 예측되는 TIMP3의 단백질 수준은 대조군보다 낮았다(도 3c). TIMP3가 miR-4435의 타겟인지를 추가적으로 확인하기 위하여, 돌연변이 UQCRB-발현 세포주 및 대장암 세포에 miR-4435 억제제를 형질주입하였다. 50nM의 miR-4435 억제제를 형질주입한 돌연변이 UQCRB-발현 세포주에서 qRT-PCR를 이용하여 miR-4435 발현수준을 측정한 결과, 발현이 약 50% 감소하였음을 확인하였다(도 3d). CRC 세포에서, miR-4435 발현은 miR-4435 억제제 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다(도 3e). 다음으로, miR-4435의 억제 후 TIMP3의 단백질 수준을 조사하였다. 그 결과, miR-4435 억제제를 형질주입한 돌연변이 UQCRB-발현 세포에서 TIMP3 단백질 수준이 증가하였으며(도 3f), 대장암 세포에서도 역시 miR-4435 억제제의 처리에 의해 TIMP3의 단백질 수준이 비처리군에 비해 증가하였다(도 3g). 이러한 결과는 miR-4435가 TIMP3를 타겟팅하고

UQCRB 및 *TIMP3*간의 관계를 조절함으로써, 궁극적으로 CRC 종양 형성에 부분적으로 기여함을 보여준다.

[0124] **MiR-4435는 UQCRB 억제제인 A1938에 의해 조절된다**

[0125] 다음으로, UQCRB-관련 miRNA가 알려진 UQCRB 억제제인 A1938²⁹에 의해 조절될 수 있는지를 조사한 결과, 돌연변이 UQCRB-발현 세포주에 A1938를 처리한 후 miR-4435 수준이 감소함을 확인하였다(도 4a). 특히, miR-4435 수준은 A1938 처리 CRC 세포에서 농도 의존적으로 감소하였다(도 4b). A1938가 miR-4435 발현 수준을 조절하였으므로, 본 발명자들은 A1938가 miR-4435의 타겟인 *TIMP3*에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, *TIMP3*의 단백질 수준은 A1938 처리에 의해 돌연변이 UQCRB-발현 세포주(도 4c) 및 CRC 세포(도 4d)에서 증가하였다. 이를 통해 A1938를 처리하여 UQCRB를 억제할 경우 miR-4435 및 *TIMP3*의 일련의 발현이 조절됨을 알 수 있다.

[0126] 또한, 본 발명자들은 miR-4435 억제제 및 A1938 처리를 통해 *TIMP3*의 발현 회복 후 세포증식이 어떻게 영향을 받는지를 조사하였다. 먼저, 돌연변이 UQCRB-발현 세포 및 CRC 세포에 miR-4435 억제제 및 A1938를 처리하였다. 20 nM 및 50 nM의 MiR-4435 억제제 처리는 돌연변이 UQCRB-발현 세포의 증식을 억제하였으며(도 4e), 대장암 세포 증식 또한 miR-4435 억제제 처리에 의해 억제되었다(도 4f). UQCRB 억제제인 A1938를 세포에 처리한 경우에도 돌연변이 UQCRB-발현 세포(도 4g) 및 대장암 세포(도 4h)의 증식이 용량 의존적으로 억제되었다. 이들 결과를 통해 A1938 및 miR-4435 억제제 처리에 의한 *TIMP3* 발현 수준의 회복이 세포증식에 영향을 준다는 사실을 알 수 있다.

[0128] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

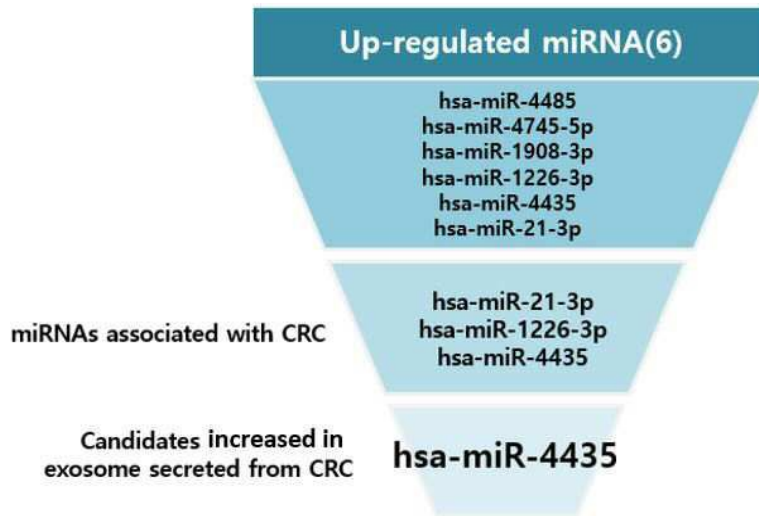
[0130] **참고문헌**

- [0131] 1. Nunnari, J. & Suomalainen, A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. **148**, 1145-1159 (2012).
- [0132] 2. Wallace, D. C. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. **12**, 685-698 (2012).
- [0133] 3. Dromparis, P. & Michelakis, E. D. Mitochondria in vascular health and disease. *Annu Rev Physiol*. **75**, 95-126 (2013).
- [0134] 4. Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R. & Shulman, G. I. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. **350**, 664-671 (2004).
- [0135] 5. Friedman, J. R. & Nunnari, J. Mitochondrial form and function. *Nature*. **505**, 335-343 (2014).
- [0136] 6. Suzuki, H., Hosokawa, Y., Toda, H., Nishikimi, M. & Ozawa, T. Cloning and sequencing of a cDNA for human mitochondrial ubiquinone-binding protein of complex III. *Biochem Biophys Res Commun*. **156**, 987-994 (1988).
- [0137] 7. Jung, H. J. & Kwon, H. J. Exploring the role of mitochondrial UQCRB in angiogenesis using small molecules. *Mol Biosyst*. **9**, 930-939 (2013).
- [0138] 8. Jung, H.J. et al. Mitochondrial UQCRB regulates VEGFR2 signaling in endothelial cells. *J Mol Med (Berl)*. **91**, 1117-1128 (2013).
- [0139] 9. Jung, H.J. et al. Terpestacin inhibits tumor angiogenesis by targeting UQCRB of mitochondrial complex III and suppressing hypoxia-induced reactive oxygen species production and cellular oxygen sensing. *J Biol Chem*. **285**, 11584-11595 (2010).
- [0140] 10. Jia, H.L. et al. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. **13**, 1133-1139 (2007).

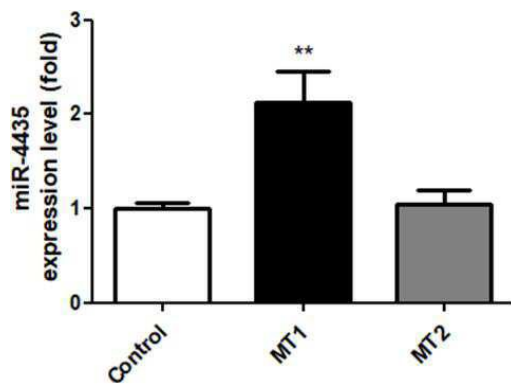
- [0141] 11. Wrzeszczynski, K.O. *et al.* Identification of tumor suppressors and oncogenes from genomic and epigenetic features in ovarian cancer. *PLoS One*. **6**, e28503 (2011).
- [0142] 12. Harada, T., Chelala, C., Crnogorac-Jurcevic, T. & Lemoine, N.R. Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based techniques. *Pancreatology*. **9**, 13-24 (2009).
- [0143] 13. Lascorz, J. *et al.* Polymorphisms in the mitochondrial oxidative phosphorylation chain genes as prognostic markers for colorectal cancer. *BMC Med Genet*. **13**, 31 (2012).
- [0144] 14. Haut, S. *et al.* A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycemia and lactic acidosis. *Hum Genet*. **113**, 118-122 (2003).
- [0145] 15. Chang, J. *et al.* A mutation in the mitochondrial protein UQCRB promotes angiogenesis through the generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. **455**, 290-297 (2014).
- [0146] 16. Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136:215-33.
- [0147] 17. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. **6**, 259-269 (2006).
- [0148] 18. Kent, O.A. & Mendell, J.T. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. **25**, 6188-6196 (2006).
- [0149] 19. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. **431**, 350-355 (2004).
- [0150] 20. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. **116**, 281-297 (2004).
- [0151] 21. Kim, J.E. *et al.* Hsa-miR-10a-5p downregulation in mutant UQCRB-expressing cells promotes the cholesterol biosynthesis pathway. *Sci Rep*. **1**, doi:10.1038/s41598-018-30530-6 (2018).
- [0152] 22. Chim, S.S. *et al.* Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. **54**, 482-490 (2008).
- [0153] 23. Hu, Z. *et al.* Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. **28**, 1721-1726 (2010).
- [0154] 24. Lv, Z. C., Fan, Y. S., Chen, H. B. & Zhao, D. W. Investigation of microRNA-155 as a serum diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. **36**, 1619-1625 (2015).
- [0155] 25. DeRosa, M. *et al.* Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer. *Oncol Rep*. **3**, 1087-1096 (2015).
- [0156] 26. Kim, H.C. *et al.* Mitochondrial UQCRB as a new molecular prognostic biomarker of human colorectal cancer. *Exp Mol Med*. **11**, e391 (2017).
- [0157] 27. Langmead, B. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter11, Unit1117*, doi:10.1002/0471250953.bi1107s32 (2010).
- [0158] 28. Lin, H. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 transfer suppresses malignant behaviors of colorectal cancer cells. *Cancer Gene Ther*. **19**, 845-51 (2012).
- [0159] 29. Jung, H. J., Cho, M., Kim, Y., Han, G., Kwon, H. J. Development of a novel class of mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein (UQCRB) modulators as promising antiangiogenic leads. *J Med Chem*. **57**, 7990-98 (2014).

도면

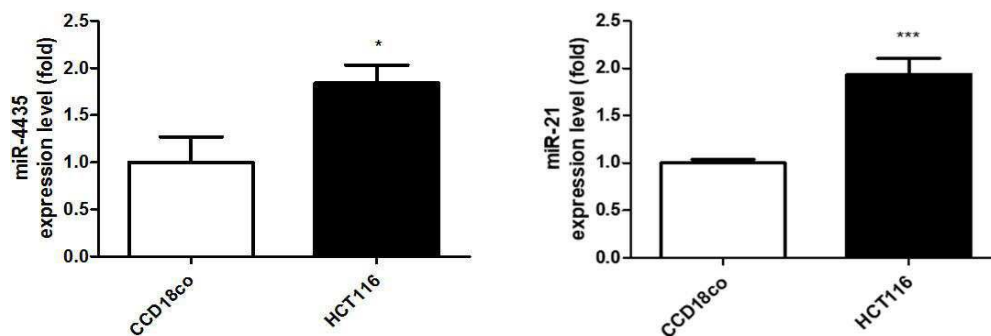
도면1a



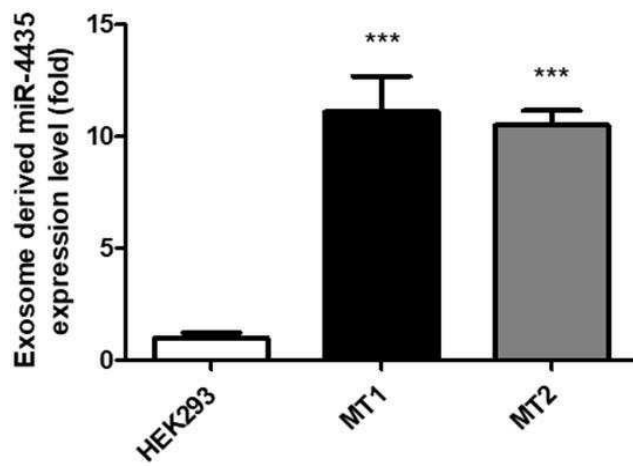
도면1b



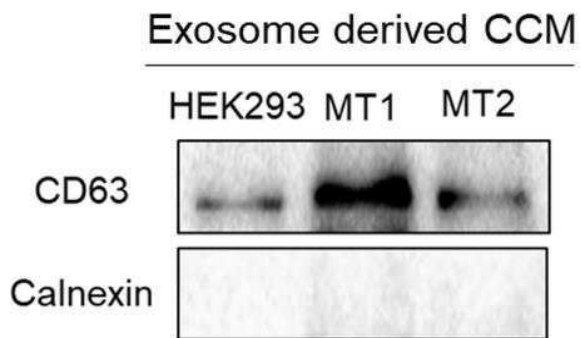
도면1c



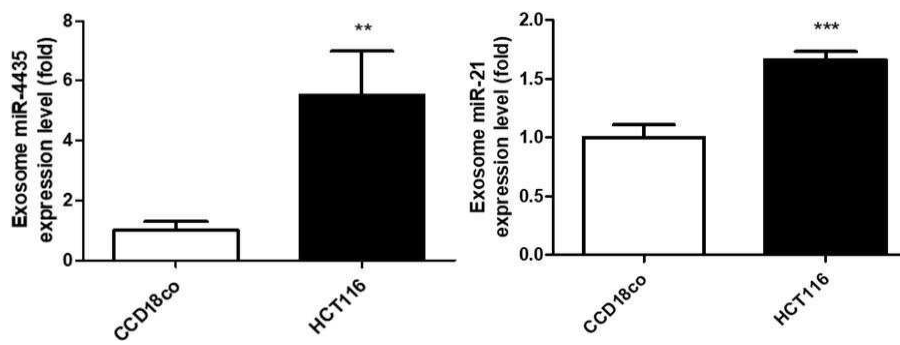
도면2a



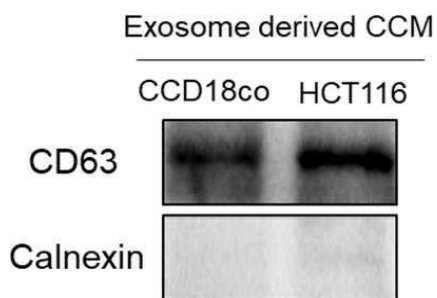
도면2b



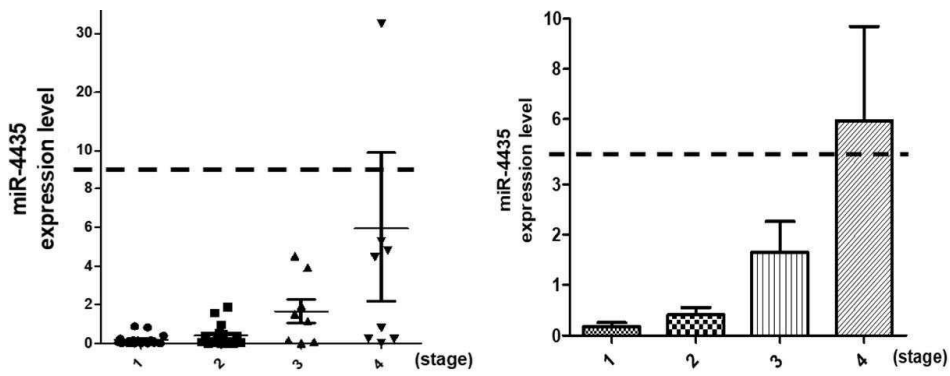
도면2c



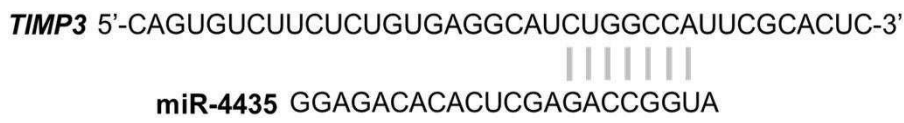
도면2d



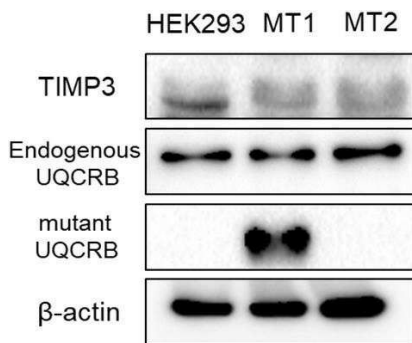
도면2e



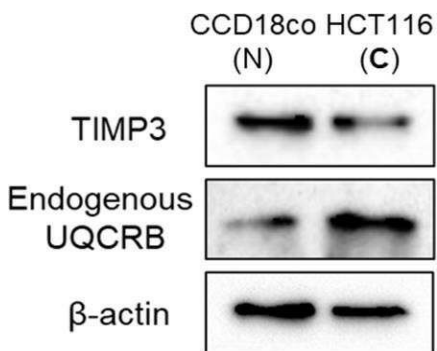
도면3a



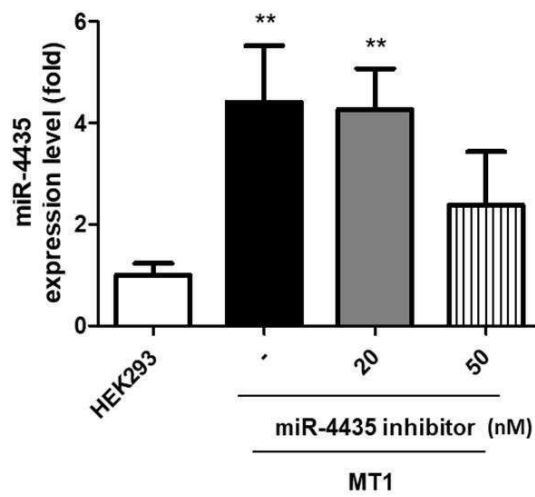
도면3b



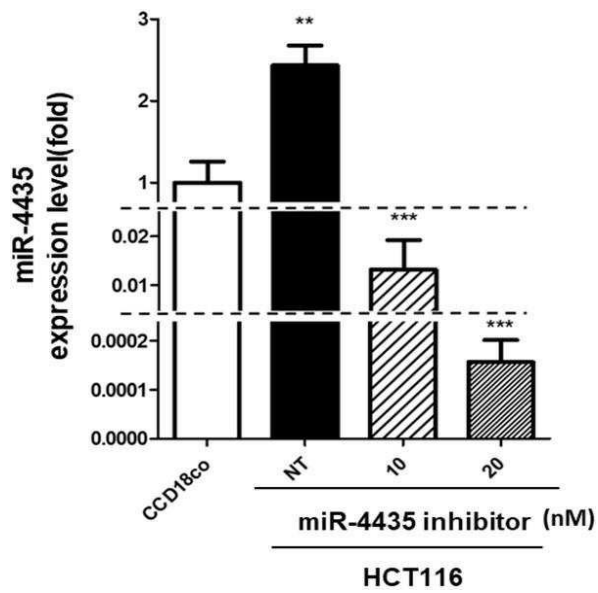
도면3c



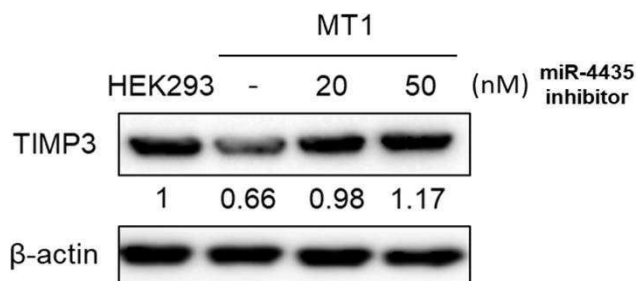
도면3d



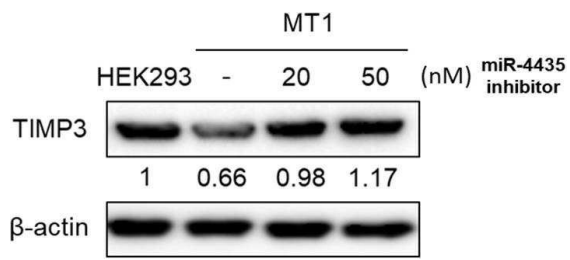
도면3e



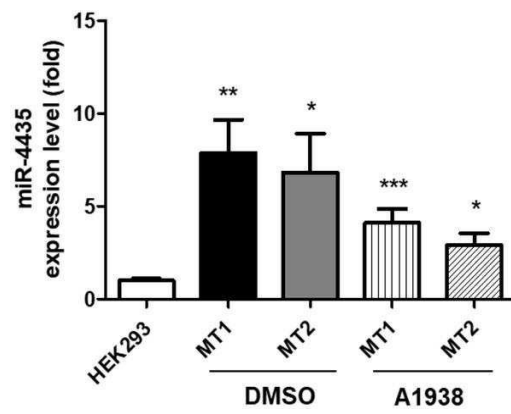
도면3f



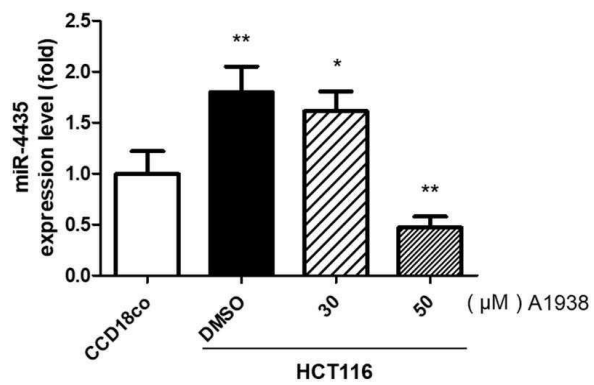
도면3g



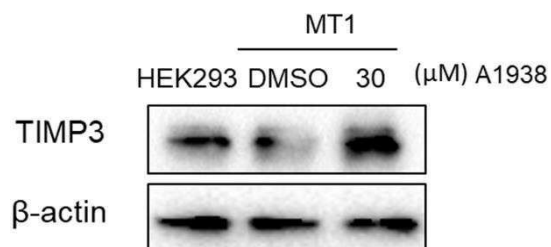
도면4a



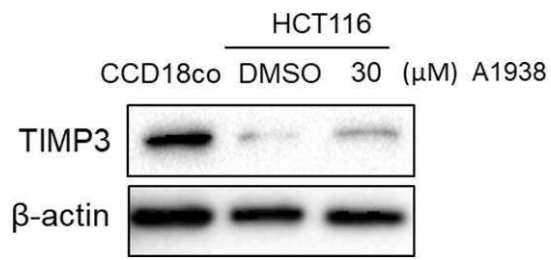
도면4b



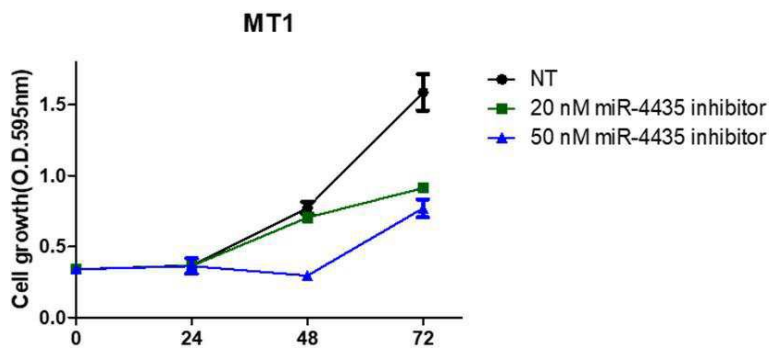
도면4c



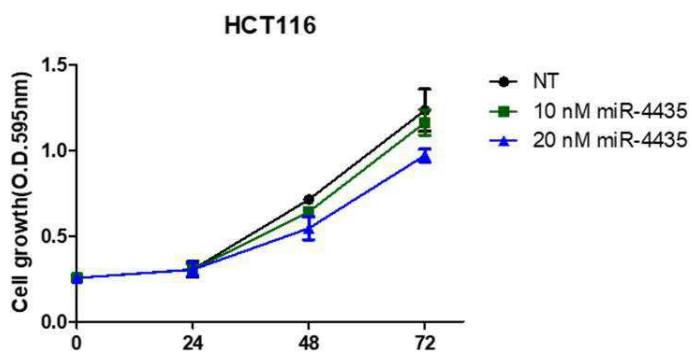
도면4d



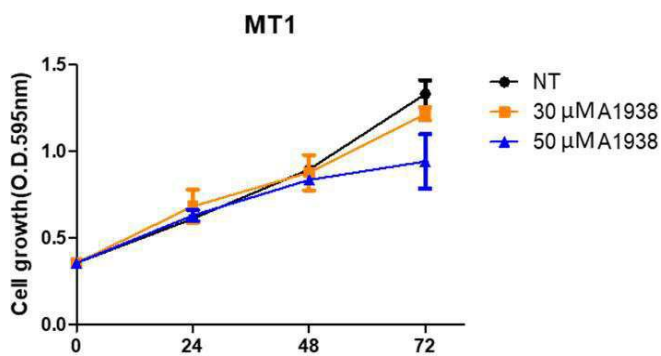
도면4e



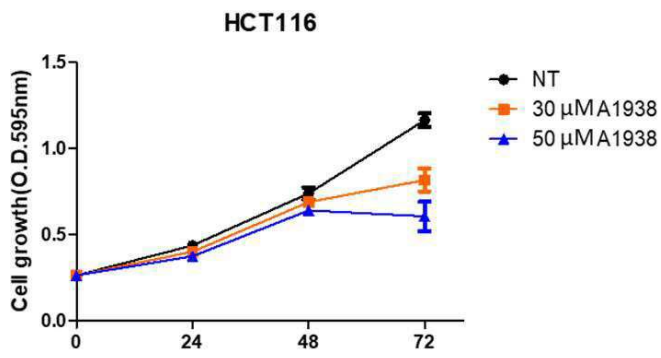
도면4f



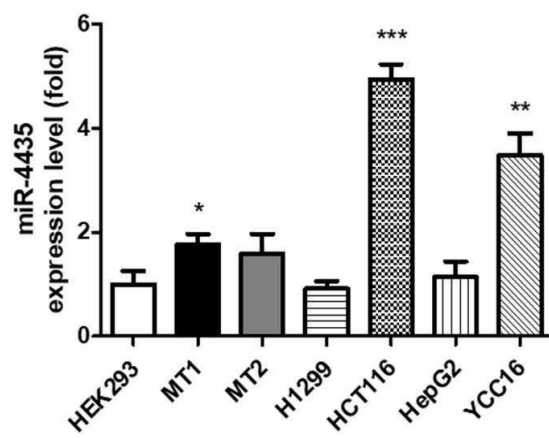
도면4g



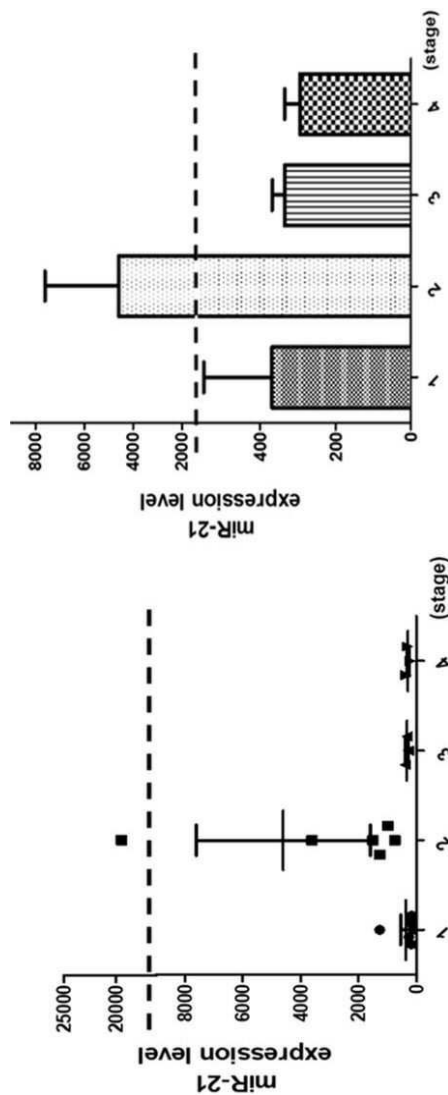
도면4h



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Yonsei Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> A Novel UQCRB-related Circulating miRNA Biomarker and a Method for Diagnosing Colorectal Cancer Using the Same
- <130> HPC-9139
- <160> 3
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> RNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

auggccagag cucacacaga gg

<210> 2
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 caacaccagu cgaugggcug u 21

<210> 3
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 ucaccagccc uguguuccu ag 22