



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0028690
(43) 공개일자 2018년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0116317
(22) 출원일자 2016년09월09일
심사청구일자 2016년09월09일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
이재선
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 22동 106호(서초동, 삼풍아파트)
강동희
대전광역시 유성구 도안대로 560, 110동 504호(봉명동, 도안마을1단지)
(74) 대리인
김순웅

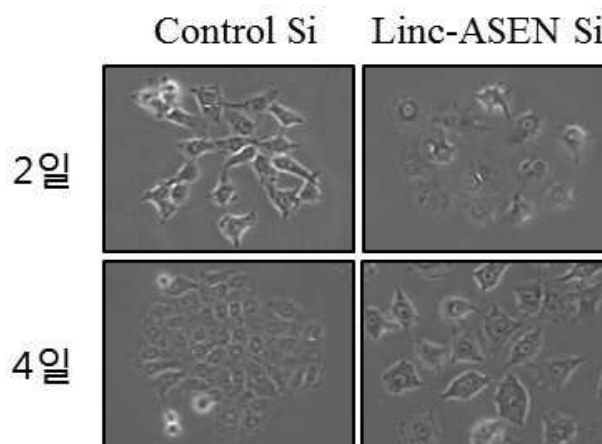
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 Linc-ASEN 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 세포 노화 유도용 조성물

(57) 요약

본 발명은 Linc-ASEN 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 세포 노화 유도용 조성물, 암 예방 또는 치료용 조성물 및 항암보조제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 세포에서 Linc-ASEN(Long intergenic noncoding RNA-Associated with Senescence) 유전자의 발현을 억제하여 세포의 노화, 특히 암세포에서 노화를 유도할 수 있으며, 이를 통하여 암세포의 증식을 억제할 수 있는바, 항암제 및 항암보조제 등으로 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 9/08 (2013.01)

A61K 9/10 (2013.01)

A61K 9/20 (2013.01)

(72) 발명자

이형철

인천광역시 서구 봉오대로318번길 23, 201동 806호(가정동, 하나아파트)

정승희

서울특별시 마포구 독막로20나길 21, 204동 304호(상수동, 래미안 밤섬리베뉴Ⅱ)

박헌주

서울특별시 서초구 서초대로74길 30, 502동 902호(서초동, 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 52647-1

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업 (중견연구자지원사업-핵심연구)

연구과제명 암노화 제어를 위한 noncoding RNAs 발굴 및 작용 기전 연구

기 여 율 50/100

주관기관 인하대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 53233-1

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업 (선도연구센터지원사업)

연구과제명 저산소 표적 질환 연구센터

기 여 율 50/100

주관기관 인하대학교

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

Linc-ASEN(Long intergenic noncoding RNA-Associated with Senescence) 발현 억제제를 포함하는 세포 노화 유도용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Linc-ASEN은 서열번호 1로 표시되는 DNA로부터 전사된 RNA인, 세포 노화 유도용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 발현 억제제는 Linc-ASEN에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 세포 노화 유도용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 작은 간섭 RNA는 서열번호 2 내지 5로 표시되는 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 세포 노화 유도용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 암세포인, 세포 노화 유도용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 암세포는 간암세포, 위암세포, 폐암세포, 혈액암세포, 유방암세포, 피부암세포, 자궁경부암세포, 뇌종양세포, 자궁내막암세포, 갑상선암세포, 대장암세포, 방광암세포, 난소암세포, 전립선암세포, 췌장암세포 및 직장암세포로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 세포 노화 유도용 조성물.

청구항 7

Linc-ASEN 발현 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 암은 간암, 위암, 폐암, 혈액암, 유방암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 갑상선암, 대장암, 방광암, 난소암, 전립선암, 췌장암 및 직장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 암 예방

또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

Linc-ASEN 발현 억제제를 포함하는 항암보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Linc-ASEN 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 세포 노화 유도용 조성물, 암 예방 또는 치료용 조성물 및 항암보조제에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 인간 유전체(genome)는 30억개의 염기서열로 구성되어 있으며 단 2 %정도의 유전체만 단백질을 생성한다. 종래 연구자들은 단백질을 생성하는 유전자에 집중하였다. 이 후 ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) 프로젝트를 통하여 단백질을 생성하지 않는 RNA(비암호화 RNA) 또한 생물학적 중요한 기능을 한다는 것이 밝혀졌고, 비암호화 RNA는 크기에 따라 200 nucleotides를 기준으로 길이가 짧은 비암호화 RNA(small non-coding RNA) 및 길이가 긴 비암호화 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)로 분류된다.

[0004] 길이가 짧은 비암호화 RNA(small non-coding RNA)들은 생물종 간에 염기서열의 보존성이 높은 것으로 알려져 있으며, 짧은 비암호화 RNA(small non-coding RNA)들은 마이크로 RNA(microRNA), 짧은 간섭 RNAs(siRNA), 피위-간섭 RNA(Piwi-interfering RNA, piRNAs) 등이 있으며 그 중 가장 잘 알려진 마이크로 RNA는 타겟 메신저 RNA의 3 말단 꼬리 지역(3' untranslated region, 3'UTR)에 결합하여 번역을 억제한다.

[0005] 길이가 긴 비암호화 RNA(long intergenic RNA; lncRNA)는 길이가 짧은 비암호화 RNA(small non-coding RNAs)와 달리 상대적으로 종들 간에 염기서열 보존성이 낮은 것으로 알려져 있으나, 종양 억제 및 세포 성장 정지와 같은 생물학적 기전, 발달학적 기전 및 병리학적 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 MEG3 lncRNA는 종양 억제 단백질인 p53과 결합하며, 이러한 결합을 통해 p53에 의해 조절되는 유전자들을 활성화시킴으로써 종양을 억제한다. HOTAIR lncRNA는 히스톤 변형 복합체 PRC2(Polycomb-repressive complex 2)와 결합하여 암 발생 억제 유전자들의 발현량을 감소시키고, 과발현된 HOTAIR lncRNA는 유방암과 간암의 전이를 촉진시킨다.

[0006] 한편, 종양세포 조기 노화는 스트레스-유도 조기 노화라고도 하며, 다양한 자극에 의해 종양세포에서 발생하는 노화를 의미한다. 종양세포는, 일정한 횡수만큼만 분열하고 노화되는 정상세포와 달리, 암화 과정에서 복제성 노화의 특성이 변화되어 무한정 분열하는 세포들이므로, 종양세포는 세포 노화과정이 진행되지 않을 것이라는 개념이 일반적이었다. 그러나, 최근 종양세포도 다양한 자극에 의해 세포 노화가 급격히 유도됨이 알려지게 되었다. 종양세포의 노화를 유도할 수 있는 스트레스원으로는 유전적 독성 화학물질, 방사선, 자외선 등이 보고되고 있다.

[0007] 최근 스트레스 유도 조기노화를 이용한 종양세포의 노화를 통한 종양세포 증식 억제가 암 환자 치료를 위한 효율적인 기전으로 제시되었으며, 세포 노화 유도 기전 연구를 통한 암 치료의 효율성 증대가 필수적임이 제안되었다. 또한, 종양의 악성화가 저지된 암 환자의 조직 분석 결과, 종양세포 노화가 효율적으로 유도되었음이 보고되었고, 종양 억제 단백질 p53이 작용해 세포 노화를 통해 종양조직이 효율적으로 제거됨이 종양모델 동물 실험에서 입증되었다. 이는 종양 치료에 세포 노화가 유용하게 활용될 수 있음을 제시하는 것이다. 실질적으로 종양세포의 노화기전 활성화는 세포사멸 기전 활성화보다 낮은 용량의 항암제나 방사선 투여를 가능하게 함으로서 암치료 부작용을 개선할 수 있고, 세포사멸에 대한 저항성을 획득한 종양세포의 암 치료 저항성 극복에 이용될 수 있다.

[0008] 본 발명자들은 lncRNA를 이용하여 세포 노화에 대해 연구하던 중 신규 lncRNA인 Linc-ASEN을 동정하고, Linc-ASEN과 세포 노화 사이에 상관관계를 분석한 후, 이를 억제하여 암세포 노화를 유도할 수 있음을 확인하였으며, 이러한 특성을 통하여 궁극적으로는 Linc-ASEN 발현억제제를 암 치료제 및 항암보조제로 사용할 수 있음을 확인

하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) KR 특허 등록 번호 제10-1466372호
(특허문헌 0002) KR 특허 등록 번호 제10-1497930호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 Linc-ASEN(Long intergenic noncoding RNA-Associated with Senescence) 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 세포 노화 유도용 조성물, 암 예방 또는 치료용 조성물 및 항암 보조제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Linc-ASEN 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 세포 노화 유도용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 Linc-ASEN 발현 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 Linc-ASEN 발현 억제제를 포함하는 항암보조제를 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 조성물은 세포에서 Linc-ASEN(Long intergenic noncoding RNA-Associated with Senescence) 유전자의 발현을 억제하여 세포의 노화, 특히 암세포에서 노화를 유도할 수 있으며, 이를 통하여 암세포의 증식을 억제할 수 있는바, 항암제 및 항암보조제 등으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 작은 간섭 RNA에 의한 Linc-ASEN RNA 억제에 따른 세포 노화 유도 효과를 확인하기 위하여 트립판 블루 염색법으로 분석한 배양세포 증식률을 그래프로 나타낸 도이다.
- 도 2는 작은 간섭 RNA에 의한 Linc-ASEN RNA 억제에 따른 세포 노화 유도 효과를 확인하기 위하여 광학현미경 사진을 나타낸 도이다.
- 도 3은 작은 간섭 RNA에 의한 Linc-ASEN RNA 억제에 따른 세포 노화 유도 효과를 확인하기 위하여 노화관련 베타-갈락토시다아제 염색법으로 세포를 염색한 후, 베타-갈락토시다아제 양성세포 비율을 그래프로 나타낸 도이다.
- 도 4는 작은 간섭 RNA에 의한 Linc-ASEN RNA 억제에 따른 세포 노화 유도 효과를 확인하기 위하여 노화 특이적 발현 단백질인 (Phospho)-pRb, p53, p21의 발현량을 웨스턴 블롯팅으로 분석한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 Linc-ASEN(Long intergenic noncoding RNA-Associated with Senescence) 발현 억제제를 포함하는 세포 노화 유도용 조성물을 제공한다.
- [0021] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

- [0022] 본 발명에서 Linc-ASEN은 LncRNA(long intergenic RNA)의 일종으로, 인간 염색체 17번의 59491502 내지 59492295에 위치하는 총 794 염기쌍의 크기이다.
- [0023] 본 발명에서 Linc-ASEN은 서열번호 1로 표시되는 DNA 서열로부터 전사되는 것을 특징으로 한다. 상기 서열번호 1은 예시일 뿐 이에 한정되는 것은 아님은 당업자에게 자명하다. 상기 서열들에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 여기서 사용된 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 또 다른 서열과의 실질적인 구조적 또는 기능적 동일성을 나타냄을 표현하기 위해 사용된다. 이러한 차이는 예를 들어 다른 종 간의 코돈 용법의 고유의 변이에 기인한다. 2 이상의 다른 서열 사이의 유의적인 양의 서열 중복 또는 유사성이 있는 경우 이들 서열의 길이 또는 구조가 다르더라도 유사한 물리적 특성을 지니는 경우 구조적 차이는 무시할만한 정도가 된다. 본 발명은 상기한 Linc-ASEN의 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 "발현 억제제"란 목적 유전자인 RNA의 발현 수준이 제거 또는 감소된 것을 의미하고, 바람직하게는 RNA의 절단(cleavage)을 통해 일어나는 RNA 간섭(RNAinterference) 현상에 의한 것을 말하며, 이제 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명에 따른 Linc-ASEN 발현 억제제는 Linc-ASEN RNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상 일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 작은 간섭 RNA는 Linc-ASEN RNA의 염기서열 내에서 선택되는 15 내지 30머(mer)의 센스서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되며, 이때, 상기 센스 서열의 구성은 특별히 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명에 따른 작은 간섭 RNA는 예를 들어, 서열번호 2로 표시되는 센스 RNA 및 서열번호 3으로 표시되는 안티센스 RNA, 또는 서열번호 4로 표시되는 센스 RNA 및 서열번호 5로 표시되는 안티센스 RNA일 수 있으나, Linc-ASEN RNA의 염기서열을 바탕으로 선택될 수 있는 것으로 상기 RNA로 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 서열번호 2 내지 5로 표시되는 작은 간섭 RNA는 그 활성을 저하시키지 않는 하나 이상의 치환, 삽입, 결실 및 그 조합을 갖는 변형체를 포함한다. 이러한 변형체는 상기한 siRNA의 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으며, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는다.
- [0029] 상기 작은 간섭 RNA의 제조방법은 특별히 한정되지 않는다. 상기 작은 간섭 RNA는 직접 화학적으로 합성하거나(Sui G 등, (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5515-5520), 인비트로 전사를 이용하여 합성하는 방법(Brummelkamp TR 등, (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian celss, Science 296: 550-553) 등 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 합성할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 상기 Linc-ASEN 발현 억제제와 함께 Linc-ASEN 발현 억제 효과를 갖는 공지의 유효성분 또는 세포 노화 유도 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 바람직하게는 암세포일 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 암세포는 간암세포, 위암세포, 폐암세포, 혈액암, 유방암세포, 피부암세포, 자궁경부암세포, 뇌종양세포, 자궁내막암세포, 갑상선암세포, 대장암세포, 방광암세포, 난소암세포, 전립선암세포, 췌장암세포 또는 직장암세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 세포 노화 유도용 조성물은 약학적 조성물일 수 있으며, 상기 노화된 세포는 세포의 크기가 커지고 평평해지며, 특정 pH에서 베타-갈락토시다아제 활성을 나타낸다는 일반적인 특징이 있다.
- [0034] 상기 노화 유도는 조직의 재생 및 신생 등에 치명적이기 때문에 생명체에 해로운 효과(예를 들어, 조직 노화(tissue aging))를 유발할 수도 있지만 세포분열이 왕성한 종양세포에서는 영구적인 세포 성장 억제(tumor suppressor)를 유발하기 때문에 항암 또는 항암보조제로서 이로온 효과를 낼 수 있다.
- [0035] 본 발명의 세포 노화 유도용 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린

용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 공지된 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [0036] 상기 Linc-ASEN 발현 억제제는 p21을 증가시키는 효과를 가진다.
- [0037] 또한, 본 발명은 Linc-ASEN(Long intergenic noncoding RNA-Associated with Senescence) 발현 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 암을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0039] 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 암에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0040] 본 발명에 있어서 상기 암은 간암, 위암, 폐암, 혈액암, 유방암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 갑상선암, 대장암, 방광암, 난소암, 전립선암, 췌장암 또는 직장암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 조성물은 Linc-ASEN 발현 억제제와 함께 암에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다.
- [0044] 상기 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 또한, 상기 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0045] 상기 비경구투여를 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 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 상기 비경구투여는 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 사용하여 이루어질 수 있다.
- [0046] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0047] 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될

수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0048] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학적 조성물은 암의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명은 Linc-ASEN(Long intergenic noncoding RNA-Associated with Senescence) 발현 억제제를 포함하는 항암보조제를 제공한다.

[0051] 본 발명에 따른 항암 보조제는 약학적 조성물 또는 식품 조성물의 형태일 수 있으며, 보다 구체적으로는 항암 약학적 보조제 또는 항암 식품보조제일 수 있다.

[0052] 항암보조제란 당업계에서 일반적으로 사용되는 암치료제의 효과를 증진시키기 위하여 보조적으로 사용될 수 있는 제제를 말하며, 본 발명에 의한 보조제를 사용함으로써 암치료제의 효과를 증진시킬 수 있다.

[0053] 상기 용어 "식품"은 사람이 일상적으로 섭취하는 음식을 통틀어 이르는 말로, 건강기능식품을 포함하는 개념이다.

[0054] 본 발명의 Linc-ASEN 발현 억제제는 항암보조제로 식품 조성물에 첨가될 수 있으며, 본 발명의 Linc-ASEN 발현 억제제를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0055] 본 발명의 항암보조제와 함께 사용될 수 있는 항암제의 종류는 특별히 한정되지 않는다. 항암제는 암세포의 종류, 항암제의 흡수 속도(치료기간과 항암제 투여 경로), 종양의 위치, 종양의 크기 등의 항암제 선택 시 고려하는 일반적인 원칙하에 선택될 수 있다.

[0056] 본 발명의 일 실시예에 따르면, Linc-ASEN 발현 억제제는 암세포의 노화를 유도함으로써, 우수한 암 예방 또는 치료 효과를 가지고 있다. 따라서 본 발명의 Linc-ASEN 발현 억제제는 암치료제의 항암 효과의 효율을 높이기 위한 항암 보조용 의약품 또는 건강기능식품에 유용하게 이용될 수 있다.

[0057] 상술한 본 발명의 조성물에 대한 설명은 중복된 내용의 기재에 의한 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0059] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0061] **실시예 1. 신규 Lnc RNA(long intergenic RNA) 동정 및 이에 대한 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA)의 제조**

[0063] 1-1. 신규 Lnc RNA 동정

[0064] 인간 유방암 세포는 10% 소태아혈청(FBS, TBC)과 1% 페니실린 스트렙토마이신(WeIGENE)이 포함된 DMEM(WeIGENE)에서 유지하였으며, 37℃ 및 5% CO₂ 공기가 유지되는 인큐베이터에서 2일 간격으로 계대배양하였다. 상기 인간 유방암 세포를 50ng/ml 독소루비신(Doxorubicin) 처리 또는 6Gy 방사선(Irradiation)을 조사하여 노화를 유도시켰다. 이 후 전체 RNA를 추출하였고, RNA sequencing 결과를 바탕으로 노화된 인간 유방암 세포에서 특정 유전자(이하 "Linc-ASEN"이라 지칭함)의 발현이 변화하는 것을 확인하였다. UCSC 게놈 브라우저를 이용하여 상기 노화된 암세포에서 발현이 변화하는 Linc-ASEN이 지금까지 알려지지 않은 새로운 Lnc RNA인 것을 확인하였다.

[0065] 해당 유전자의 전체 염기서열을 확인 및 결정하기 위하여, RACE법(Rapid Amplification of CDNA Ends)을 이용

하였다. RACE는 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends kits(Invitrogen, Carlsbad, CA)와 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends kit(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 수행하였다. 그 결과 Linc-ASEN의 염기서열은 서열번호 1로 표시되는 DNA로부터 전사되는 염기서열로 이루어져 있으며, 인간 염색체 17번의 59491502 내지 59492295 (총 794 염기쌍)에 위치하는 유전자임을 확인하였다.

[0067] 1-2. Linc-ASEN 작은 간섭 RNA 제조

[0068] 실시예 1-1에서 동정한 Linc-ASEN의 발현을 억제하는 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA를 제조하기 위하여, BLOCK-iTTM RNAi Designer (Invitrogen, <https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>)을 이용하였다. 대조군으로 사용한 대조군 작은 간섭 RNA는 기존에 이 기술 분야에서 사용되던 작은 간섭 RNA를 사용하였다(Kim et al. 2012).

표 1

[0069] 대조군 작은 간섭 RNA 및 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA의 염기서열

대상	서열번호	염기서열
대조군 작은 간섭 RNA	-	5'-CCUACGCCACCAAUUCGU(dTdT)-3'
Linc-ASEN 작은 간섭 RNA 1(센스)	2	5'-GCUCAUGUUGCUCUCAAU(dTdT)-3'
Linc-ASEN 작은 간섭 RNA 1(안티 센스)	3	5'-AUUGAGAGCAAACAUGAGC(dTdT)-3'
Linc-ASEN 작은 간섭 RNA 2(센스)	4	5'-GGAAACUUCGCUGAUGAA(dTdT)-3'
Linc-ASEN 작은 간섭 RNA 2(안티 센스)	5	5'-UUCAUCAGCGAAAGUUCC(dTdT)-3'

[0071] 실시예 2. 트립판 블루 염색법을 통한 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA의 암세포 증식률 감소 효과 확인

[0072] Linc-ASEN 작은 간섭 RNA의 암세포 노화 유도 효과를 확인하기 위하여 배양 세포 증식률 변화를 관찰하였으며, 이를 위해 트립판 블루 염색법을 실시하였다. 먼저, 인간 유방암 세포(MCF7)에 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA(서열번호 2 및 3)를 Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen Corp.)를 이용하여 처리하였다. 이 후 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA를 처리한 당일(0일)부터 1, 2, 3, 4일 각각 살아 있는 인간 유방암 세포(MCF7)의 수를 이 기술분야에 공지된 트립판 블루 염색법을 이용하여 확인하였다. 각 날짜별 세포 수를 확인 한 후, 0일을 1로 기준으로 하여 상대적인 세포 증식률을 나타내었으며, 대조군 작은 간섭 RNA를 동시에 처리하여 비교하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0073] 도 1에 나타난 바와 같이, 대조군 작은 간섭 RNA를 처리한 세포는 정상적으로 세포가 증식하는 것을 확인하였고, 반면 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA를 처리한 세포에서는 세포증식율이 현저히 감소됨을 확인하였다. 이는 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA가 Linc-ASEN의 발현 억제를 통하여 암세포의 증식을 억제, 즉 노화 유도 효과를 가짐을 시사한다.

[0075] 실시예 3. 세포 외관 관찰을 통한 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA의 암세포의 노화 유도 효과 확인

[0076] Linc-ASEN 작은 간섭 RNA의 암세포 노화 유도 효과를 확인하기 위하여 광학현미경을 이용하여 세포 외관 관찰을 실시하였다. 먼저, 상기 실시예 2와 같은 방법으로 인간 유방암 세포 (MCF7)에 대조군 작은 간섭 RNA 및 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA(서열번호 2 및 3)를 처리하였다. 각각의 세포를 37℃ 및 5% CO₂ 공기가 유지되는 인큐베이터에서 2일간격으로 계대배양하였다. 2일 및 4일이 경과 하였을 때 광학현미경을 이용하여 세포 외관 관찰을 실시하였고, 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0077] 도 2에 나타난 바와 같이, 대조군 작은 간섭 RNA를 처리한 세포와 달리 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA를 처리한 세포에서는 넓고 평평한 형태인 노화세포 특이적인 형태가 나타남을 확인하였다. 이는 Linc-ASEN 억제제인 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA가 암세포에서 노화를 유도하는 효과를 가짐을 시사한다.

[0079] 실시예 4. 베타-갈락토시다제(β -galactosidase) 염색법을 통한 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA의 인간 유방암 세포 노화 유도 효과 확인

[0080] 노화된 세포에서 베타-갈락토시다제 발현의 변형된 패턴이 나타남을 바탕으로 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA의 노화 유도 효과를 확인하기 위하여 베타-갈락토시다제 염색법을 실시하였다. 먼저, 60mm 배양 접시에 상기 실시예 2와 같은 방법으로 인간 유방암 세포주 MCF7를 배양하고, 상기 세포에 작은 간섭 RNA 처리군인 대조군과 LincASEN 작은 간섭 RNA(서열번호 2 및 3)를 처리한 실험군을 준비하였다.

[0081] PBS(인산완충식염수)로 상기 세포의 배지를 세척한 후에 3.7% 포름알데하이드로 5분 동안 세포를 고정하였다. 이 후 베타-갈락토시다제 활성 염색 용액인 1mg/ml X-Gal(5-브로모-4-클로로-3-인돌 β -D-갈락토시드), 40mM 시트르산/인산나트륨(pH 5.7), 5mM 페로시아니화칼륨(potassium ferrocyanide), 150mM 염화나트륨 및 2mM 염화마그네슘이 포함된 용액으로 세포를 염색하였다. 염색은 37℃ 항온 배양기에서 12 내지 16시간동안 진행하였다. 베타-갈락토시다아제 활성 정도인 양성세포의 비율은 광학현미경을 사용하여 관찰하였으며, 이를 그래프로 나타낸 결과는 도 3에 나타내었다.

[0082] 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA를 처리한 실험군에서 노화 관련 베타-갈락토시다아제 양성을 보이는 세포의 비율이 증가함을 확인하였다. 이는 Linc-ASEN 억제제인 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA가 인간 유방암 세포에서 노화를 유도하는 효과를 가짐을 나타낸다.

[0084] 실시예 5. 웨스턴 블롯팅을 통한 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA의 인간 유방암 세포 노화 유도 효과 확인

[0085] Linc-ASEN 작은 간섭 RNA의 노화 유도 효과가 단백질 수준의 발현 변화에 의한 것인지 확인하기 위하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 먼저, 실시예 2와 같은 방법으로 배양된 인간 유방암 세포주 MCF7에 작은 간섭 RNA 처리군인 대조군과 LincASEN 작은 간섭 RNA(서열번호 2 및 3) 처리군인 실험군을 준비하였다.

[0086] PBS(인산완충식염, phosphate buffered saline)로 상기 세포의 배지를 세척한 후에 스크래퍼로 세포를 모았다. 모은 세포에 RIPA 버퍼(5M 염화나트륨, 10% 트리톤 X-100, 디옥시콜산(Deoxycholic Acid), 10% SDS, 1.5M 트리스-염화수소(Tris-HCl) pH8.0, 0.5M EDTA, 증류수)를 처리하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 BCA 단백질 분석 키트(Thermo Scientific Pierce)를 이용하여 정량하고, 이를 SDS-PAGE 겔로 분리하였다.

[0087] 분리한 단백질을 니트로셀룰로소막에 이동시키고, 하기 [표2] 및 [표3]에 나타낸 바와 같이 각 단백질에 특이적인 1차 항체와 2차 항체를 순서대로 처리하였다. 상기 니트로셀룰로소막을 PBST(phosphate buffered saline with tween 20)로 세척한 후, ECL 시약(Thermo Scientific)을 처리하여 단백질의 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다. 액틴(actin)은 대조군으로 사용되었다.

표 2

[0088] 단백질에 특이적인 1차 항체

항체	숙주	제조사
Ser807/811에서 항-인-pRb	Rb	Cell signaling Inc. (Danvers, MA)
항-p53	Mo	Novocastra Inc. (Newcastle, UK)
항-p21	Rb	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
항-베타 액틴	Mo	Applied Biological material Inc. (Richmond BC, Canada)

표 3

[0089] 단백질에 특이적인 2차 항체

항체	숙주	제조사
HRP-conjugated anti-mouse	Mo	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
HRP-conjugated anti-rabbit	Rb	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

[0091] 도 4에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA를 처리한 실험군에서 세포 노화의 지표

가 되는 p21의 발현이 특이적으로 증가하고 Rb의 인산화가 감소됨을 확인하였다. 이는 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA 가 단백질 수준으로 발현을 조절하여 암세포 노화를 유도하는 효과를 가짐을 나타낸다.

[0093] 상기 실험으로부터 Linc-ASEN 발현억제제인 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA에 의한 암 증식률 감소 및 암세포 노화유도 효과를 확인하였다. 따라서, 본 발명의 Linc-ASEN 작은 간섭 RNA는 암세포 노화유도를 통한 암세포 증식 억제에 효과적이므로 세포 노화 유도용 조성물, 항암제 및 항암 보조제 등 다양한 분야에서 사용될 수 있다.

[0095] 이하 본 발명의 Linc-ASEN 발현억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아니고 단지 이를 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0097] **제제예 1. 약학적 제제의 제조**

[0098] 1. 산제의 제조

[0099]	Linc-ASEN 발현억제제	20 mg
[0100]	유당	100 mg
[0101]	탈크	10 mg

[0102] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조할 수 있다.

[0104] 2. 정제의 제조

[0105]	Linc-ASEN 발현억제제	10 mg
[0106]	옥수수전분	100 mg
[0107]	유당	100 mg
[0108]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0109] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조할 수 있다.

[0111] 3. 캡슐제의 제조

[0112]	Linc-ASEN 발현억제제	10 mg
[0113]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0114]	락토오스	14.8 mg
[0115]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

[0116] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조할 수 있다.

[0118] 4. 주사제의 제조

[0119]	Linc-ASEN 발현억제제	10 mg
[0120]	만니톨	180 mg
[0121]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0122]	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	26 mg

[0123] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조할 수 있다.

[0125] 5. 액제의 제조

[0126] Linc-ASEN 발현억제제 20 mg

[0127] 이성화당 10 g

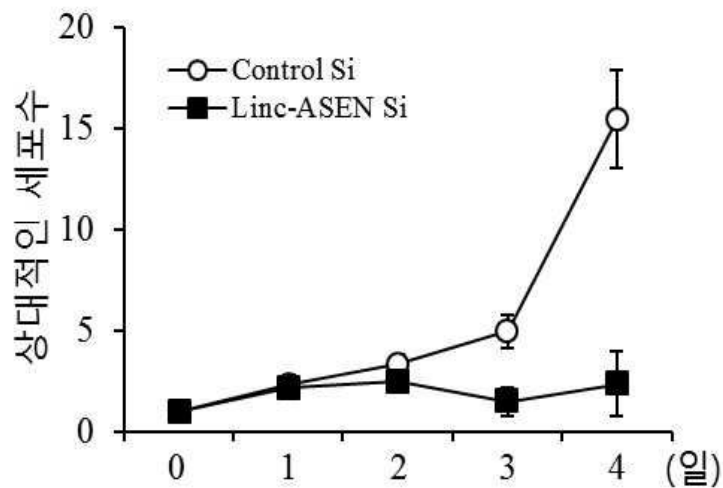
[0128] 만니톨 5 g

[0129] 정제수 적량

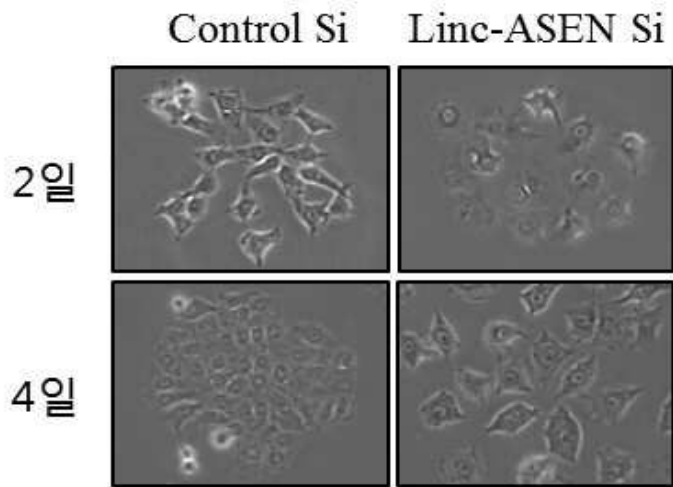
[0130] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고, 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 다시 정제수를 가한다. 전체를 정제수로 가한 액제의 약을 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 최종적으로 액제를 제조할 수 있다.

도면

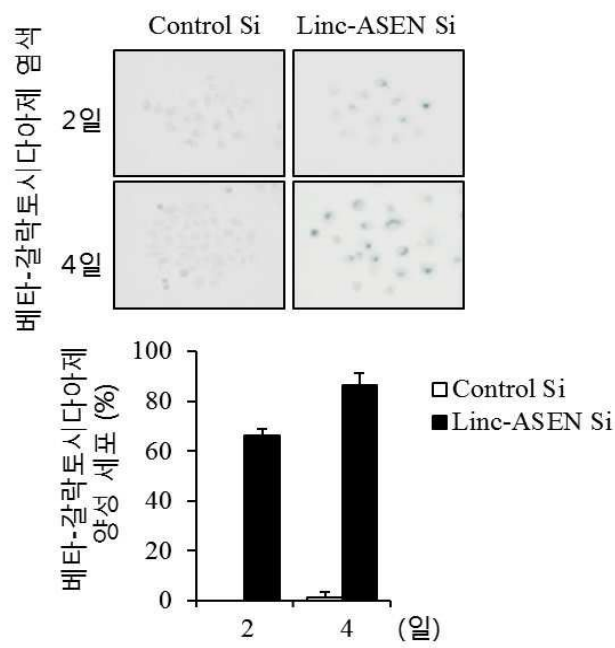
도면1



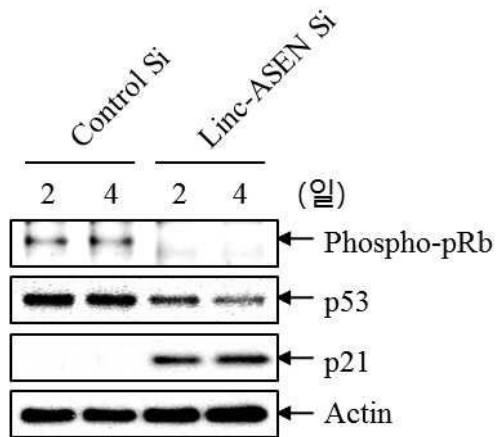
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Inha University Research and Business Foundation
- <120> Composition for inducing cell senescence comprising Linc-ASEN gene expression inhibitor
- <130> 1-203P
- <160> 5
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 794
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

gttgactttg gtgccagca ctacaattg ttgactgtgt gtgacttctc tccaaagaga      60
gaccccaaag agagaaagcg ataccaatga aggccattca ggcacccatg ttaaggggg      120
tccccaggc taatttctta cttgcgagga agccttcattg gcagtcaatg cgctttcaca      180

tgtggcctct ccccgaccct cactggccgg gtggagacta tgagtcctcg ttacacagac      240
atgacattgg ggttcagaga aatgaagtga ggtgcccaag gccatccagt aaataaagga      300
cggagctctt tcacaatccc ttgggcctgg cccttggaag ctttcgctga tgaagtgatg      360
atgggtgaga gtcaggcttg cagcaggaaa agggcaaacg gggcagggga gggagtgcgc      420
ggatgtcctg gccaggaggt gtgtccgtgg gagaagcagc ctggctcaga gccaagtec      480
agcaggcccc ggggagggtg gcctcatggc tccagtcagc ccagctgggc ctgcaaggac      540
ccctgtgcgg gcaggggctt ctcagtgtaa aaccttaaca ggggcgttga gaggattacc      600
    
```

cgagaggggg ctgcatcctg tgcttagctc agggcatggc tcatgtttgc tctcaatatt 660
 atttatttct ctcccaaaga gaacaagcag gatgtcctct ggctccatgg tgctgctcc 720
 tcagcccgac aggagcagct gtggaacagc cactgtgtgc ttaataaaca tgcagacatt 780
 tgattgaatt ctca 794

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linc-ASEN siRNA 1-SENSE

<400> 2

gcucauguuu gcucucaau 19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linc-ASEN siRNA 1-ANTISENSE

<400> 3

auugagagca aacaugagc 19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linc-ASEN siRNA 2-SENSE

<400> 4

ggaaacuuuc gcugaugaa 19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linc-ASEN siRNA 2-ANTISENSE

<400> 5

uucaucagcg aaaguuucc 19