



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0067181
(43) 공개일자 2018년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2018.05)

C12Q 2600/118 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0168647

(22) 출원일자 2016년12월12일

심사청구일자 2016년12월12일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

최혜선

울산광역시 남구 북부순환도로 35, 108동 1005호
(무거동, 무거위브자이)

설옥주

울산광역시 울주군 범서읍 천상6길 6, 101동 120
4호 (천상그린코아아파트1단지)

(74) 대리인

특허법인태백

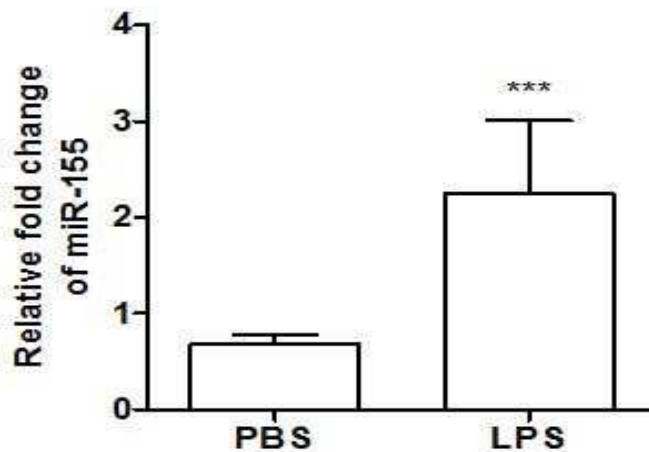
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 miRNA-155를 유효성분으로 함유하는 염증성 골소실 진단용 또는 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 마이크로RNA-155(microRNA-155; miRNA-155)를 유효성분으로 포함하는 염증성 골소실 진단용 바이오마커 조성물 또는 염증성 골소실 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 특히 상기 miRNA-155는 염증으로 인한 골소실이 발생할 경우 그 발현량이 매우 증가하는 사실을 확인하여 신규한 염증성 골소실의 표적으로서 miRNA-155의 가능성을 입증하였다. 따라서 miRNA-155의 발현 수준을 이용해 용이하게 염증성 골소실을 진단 또는 이의 치료 예후를 예측할 수 있고, miRNA-155의 발현 내지는 활성 억제제를 염증성 골소실 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A2A01002417

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단(NRF)

연구사업명 핵심개인연구

연구과제명 염증성 골소실에서 TNFRSF14에 의한 autophagy 조절

기 여 율 1/2

주관기관 울산대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A6A1030318

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단(NRF)

연구사업명 중점연구소지원사업

연구과제명 고령질환 제어 메타염증 연구

기 여 율 1/2

주관기관 울산대학교

연구기간 2014.09.01 ~ 2023.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

마이크로RNA-155(microRNA-155; miRNA-155)를 유효성분으로 포함하는 염증성 골소실 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

miRNA-155를 유효성분으로 포함하는 염증성 골소실 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 3

miRNA-155의 발현량을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 염증성 골소실 진단용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 miRNA-155의 발현량을 측정할 수 있는 제제는 상기 miRNA-155에 특이적으로 결합하는 프라이머인 것을 특징으로 하는 염증성 골소실 진단용 조성물.

청구항 5

제 3 항 또는 제 4 항의 조성물을 포함하는 염증성 골소실 진단용 키트.

청구항 6

miRNA-155의 발현량을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 염증성 골소실 치료 예후 예측용 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 miRNA-155의 발현량을 측정할 수 있는 제제는 상기 miRNA-155에 특이적으로 결합하는 프라이머인 것을 특징으로 하는 염증성 골소실 치료 예후 예측용 조성물.

청구항 8

제 6 항 또는 제 7 항의 조성물을 포함하는 염증성 골소실 치료 예후 예측용 키트.

청구항 9

(a) 환자에서 분리된 시료로부터 miRNA-155의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 miRNA-155 발현 수준을 정상 대조군 시료의 miRNA-155 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 miRNA-155 발현 수준이 정상 대조군 시료의 miRNA-155 발현 수준보다 높을 경우 염증성 골소실이라고 판단하는 단계;를 포함하는 염증성 골소실 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

(a) 치료받기 전의 환자에서 분리된 시료로부터 miRNA-155의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 miRNA-155 발현 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 miRNA-155 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 miRNA-155 발현 수준이 치료를 시행하기 전의 환자에서 분리된 시료의 miRNA-155 발현 수준보다 낮아졌을 경우 염증성 골소실의 치료 효과가 있다고 판단하는 단계;를 포함하는 염증성 골소실 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

miRNA-155 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 염증성 골소실 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

miRNA-155 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 염증성 골소실 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 13

(a) miRNA-155의 발현이 증가된 동물의 miRNA-155의 발현량을 측정하는 단계; (b) 상기 동물에 시험물질을 처리하는 단계; (c) 상기 시험물질을 처리한 동물의 대퇴부나 경골에서 miRNA-155 발현량을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (a)에서 측정한 miRNA-155 발현량과 비교하여, 상기 단계 (c)에서 측정한 miRNA-155 발현량이 감소된 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 골소실 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 염증성 골소실은 류마티스 관절염, 염증성 장염, 폐 염증 질환 및 신장 염증 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환에서 나타나는 것을 특징으로 하는 염증성 골소실 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 염증성 골소실 진단용 또는 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물, 염증성 골소실 치료제 및 이의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리 몸의 골격계를 유지하는 가장 단단한 조직인 뼈는 중요 장기를 보호하며, 조혈모세포를 저장하여 혈액세포들을 공급하는 신체 내 면역체계의 중요한 조직이다. 뼈는 신체 내에서 계속해서 리모델링이 이루어지는 매우 동적인 상태를 유지하고 있고, 이는 뼈를 만드는 조골세포(osteoblast)와 뼈를 흡수하는 파골세포(osteoclast)의 균형 속에서 이루어진다. 특히, 파골세포가 활성화되면 자가소화작용(autophagy)을 하게 되는데, 이 과정이 과다해져 조골세포와 파골세포 기능의 균형이 깨지면 골다공증, 뼈의 파궤병, 류마티스 관절염 등의 골 질환이 발생하게 된다.

[0003] 한편, 마이크로 RNA(MicroRNA, miRNA)는 염기서열이 20~25개인 암호화되지 않은(non-coding) 단일가닥 RNA 분자로서, 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 조절물질이다. 이러한 miRNA는 두 단계의 프로세싱으로 생성되는데, 최초의 miRNA 전사체(primary miRNA)가 핵 안에서 Drosha라는 RNase III type 효소에 의해 70-90 염기서열 정도의 스템-고리(stem-loop)구조, 즉, pre-miRNA로 만들어지고, 이후 세포질로 이동하여 Dicer라는 효소에 의해 절단되어 21-25 염기서열의 성숙 miRNA로 만들어진다. 이렇게 생성된 miRNA는 표적 mRNA에 상보적으로 결합하여 번역 억제와 mRNA 불안정화를 유도하여, 주로 세포 분화나 증식과 관련 있는 유전자 발현을 조절한다. 이렇듯 miRNA는 특정 mRNA를 억제하는 기능으로 생체 내 다양한 유전자들의 발현을 조절하여 매우 중요한 역할을 하고 있지만, 거꾸로 miRNA의 발현을 조절하는 정확한 메커니즘은 아직 밝혀지지 않고 있다.

[0004] 그럼에도 불구하고 현재까지 진행된 연구에 의하면, 몇몇의 miRNA를 타겟으로 하여 다양한 질환의 치료제를 모색하는 방안이 제시되었다. 특히 자가소화작용과 관련하여, miRNA-20a 및 miRNA-106b(Wu H, 2012 Cell Signaling)이 ULK1이라는 유전자를 억제하거나, miRNA-30a가 Beclin-1(Zou Z, 2012 JBC)이라는 유전자를 억제하여 자가소화작용을 억제할 수 있다는 결과가 보고된 바 있고, PI3K/mTOR 경로를 표적으로 하여 자가소화작용을 유도하는 miRNA-7의 존재도 밝혀졌다. 그러나 상기 문헌들도 miRNA들과 골소실과의 분명한 연관성을 개시하지는 못했다.

[0005] 이에, 본 발명의 발명자들은 상기 miRNA들의 작용 외에 새로운 miRNA 및 이의 효과, 특히 염증성 골소실에 miRNA가 미치는 영향을 규명하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 제10-1625755호(2016.05.24 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 염증성 골소실이 나타날 때 증가하는 마이크로RNA의 양을 측정함으로써 염증성 골소실을 진단 또는 이의 치료 예후를 예측할 수 있는 바이오마커 조성물, 염증성 골소실 진단용 또는 치료 예후 예측용 조성물, 이를 포함하는 염증성 골소실 진단용 또는 치료 예후 예측용 키트 및 이를 이용한 염증성 골소실 진단 방법 및 치료 예후 예측방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 염증성 골소실이 나타날 때 증가하는 마이크로RNA의 억제제를 포함하는 염증성 골소실 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 염증성 골소실이 나타날 때 증가하는 마이크로RNA의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 염증성 골소실 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 따라서 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 마이크로RNA-155(microRNA-155; miRNA-155)를 유효성분으로 포함하는 염증성 골소실 진단용 바이오마커 조성물 또는 염증성 골소실 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 miRNA-155의 발현량을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 염증성 골소실 진단용 조성물 또는 이를 포함하는 염증성 골소실 진단용 키트, 또는 miRNA-155의 발현량을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 염증성 골소실 치료 예후 예측용 조성물 또는 이를 포함하는 염증성 골소실 치료 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (a) 환자에서 분리된 시료로부터 miRNA-155의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 miRNA-155 발현 수준을 정상 대조군 시료의 miRNA-155 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 miRNA-155 발현 수준이 정상 대조군 시료의 miRNA-155 발현 수준보다 높을 경우 염증성 골소실이라고 판단하는 단계;를 포함하는 염증성 골소실 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 (a) 치료받기 전의 환자에서 분리된 시료로부터 miRNA-155의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 miRNA-155 발현 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 miRNA-155 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 miRNA-155 발현 수준이 치료를 시행하기 전의 환자에서 분리된 시료의 miRNA-155 발현 수준보다 낮아졌을 경우 염증성 골소실의 치료 효과가 있다고 판단하는 단계;를 포함하는 염증성 골소실 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0014] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, miRNA-155 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 염증성 골소실 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, (a) miRNA-155의 발현이 증가된 동물의 miRNA-155의 발현량을 측정하는 단계; (b) 상기 동물에 시험물질을 처리하는 단계; (c) 상기 시험물질을 처리한 동물의 대퇴부나 경골에서 miRNA-155 발현량을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (a)에서 측정한 miRNA-155 발현량과 비교하여, 상기 단계 (c)에서 측정한 miRNA-155 발현량이 감소된 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 염증성 골소실 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따르면, 염증성 골소실을 나타내는 환자에서 마이크로RNA-155의 양이 증가하여 파골세포의 자가소화 작용을 활성화시키는 것을 확인함에 따라, 마이크로RNA-155를 바이오마커 조성물로 사용하여 염증성 골소실의 진단 또는 치료 예후 예측용 조성물로 활용할 수 있고, 이를 표적으로 하여 마이크로RNA-155의 활성을 감소시키는 물질을 선별하는 스크리닝 방법에도 활용할 수 있어, 염증성 골소실을 효과적으로 치료할 수 있는 치료제를 선별해낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명에 따른 하나의 실시예에서 LPS를 처리한 골수 유래 대식세포에서의 miRNA-155의 발현량을 확인한 결과이다.

도 2는 도 1에 따른 하나의 실시예에서 RANKL이 전처리된 전구세포에 LPS를 처리한 후의 miRNA-155의 발현량을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 더 상세하게 설명하도록 한다.

[0019] 본 발명은 마이크로RNA-155(microRNA-155; miRNA-155)를 유효성분으로 포함하는 염증성 골소실 진단용 바이오마커 조성물 또는 염증성 골소실 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0020] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.

[0021] 본 명세서에서 용어 "예후(prognosis)"는 질병을 진단하여 판단된 장래의 증세 또는 경과에 대한 전망을 말한다. 염증성 골소실을 나타내는 환자에 있어서 치료 예후는 통상적으로 miRNA-155의 발현 감소량을 뜻한다. 예후의 예측은 향후 염증성 골소실 치료의 방향에 대한 단서를 제시하므로 매우 중요한 임상적 과제이다.

[0022] 또한, 본 발명은 miRNA-155의 발현량을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 염증성 골소실 진단용 조성물 또는 염증성 골소실 치료 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0023] 이때, 상기 miRNA-155의 발현량을 측정할 수 있는 제제는 상기 miRNA-155에 특이적으로 결합하는 프라이머일 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3'-hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template), 즉 miRNA-155와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 염증성 골소실 진단용 키트 또는 치료 예후 예측용 키트를 제공하는 바, 본 발명의 키트는 바이오마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지 용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0026] 더욱이, 본 발명은 (a) 환자에서 분리된 시료로부터 miRNA-155의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 miRNA-155 발현 수준을 정상 대조군 시료의 miRNA-155 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 miRNA-155 발현 수준이 정상 대조군 시료의 miRNA-155 발현 수준보다 높을 경우 염증성 골소실이라고 판단하는 단계;를 포함하는 염증성 골소실 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 (a) 치료받기 전의 환자에서 분리된 시료로부터 miRNA-155의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 miRNA-155 발현 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 miRNA-155 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 miRNA-155 발현 수준이 치료를 시행하기 전의 환자에서 분리된 시료의 miRNA-155 발현 수준보다 낮아졌을 경우 염증성 골소실의 치료 효과가 있다고 판단하는 단계;를 포함하는 염증성 골소실 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0028] 구체적으로, 상기 microRNA 발현 수준을 측정하는 방법으로는 일반적으로 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR)을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 명세서에서 용어 "환자에서 분리된 시료"는 바이오마커인 상기 miRNA-155의 발현 수준에 있어서 대조군과 차이가 나는 조직, 세포, 골수, 전혈, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 더불어, 본 발명은 miRNA-155 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 염증성 골소실 예방 또는 치료용

약학 조성물을 제공한다.

- [0031] 이때, 상기 miRNA-155 발현 또는 활성 억제제는 전체 조성물 100 중량부에 대하여 0.1 내지 50 중량부로 포함될 수 있는 바, 상기 범위보다 적게 포함되는 경우에는 억제제의 miRNA-155 발현 또는 활성 억제 효과가 제대로 나타나지 않고, 너무 많이 포함되는 경우에는 함량 증가량 대비 miRNA-155 발현 또는 활성 억제 효과의 증가량이 저하되므로 바람직하지 않다.
- [0032] 본 발명의 약학 조성물은 화합물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고 뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 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 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있으며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명은 miRNA-155 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 염증성 골소실 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0037] 이때, 상기 miRNA-155 발현 또는 활성 억제제는 전체 조성물 100 중량부에 대하여 0.1 내지 90 중량부로 포함될 수 있는 바, 상기 범위에서 촉진제의 miRNA-155 발현 또는 활성 억제 효과가 가장 뛰어나므로 바람직하다.
- [0038] 상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 건강기능식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0040] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.
- [0041] 더불어, 본 발명은 (a) miRNA-155의 발현이 증가된 동물의 miRNA-155의 발현량을 측정하는 단계; (b) 상기 동물에 시험물질을 처리하는 단계; (c) 상기 시험물질을 처리한 동물의 대퇴부나 경골에서 miRNA-155 발현량을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (a)에서 측정된 miRNA-155 발현량과 비교하여, 상기 단계 (c)에서 측정된 miRNA-155 발현량이 감소된 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 골소실 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0042] 이때, 상기 염증성 골소실은 류마티스 관절염, 염증성 장염, 폐 염증 질환 및 신장 염증 질환으로 이루어진 군에서 하나 이상의 질환에서 나타날 수 있고, 보다 바람직하게는 류마티스 관절염에서 나타날 수 있으나 이에 제

한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명에 따른 상기 치료제는 miRNA-155의 발현 또는 활성을 억제함으로써 파골세포의 자가소화 작용을 억제하는 바, 조골세포와 파골세포의 작용 균형이 깨져 골소실, 보다 구체적으로 염증성 골소실을 나타내는 환자에서 보다 효과적으로 치료 작용을 나타낼 수 있다.

[0044] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 당업계에 있어 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이며, 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐이므로 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] <준비에 1> 동물 및 세포 준비

[0046] 앞으로 수행할 실험을 위해 10주령된 암컷 C57BL/6J 마우스를 하나상사(부산)에서 분양받아 울산대의 면역제어 연구센터(Immunomodulation Research Center, IRC)의 무특이 병원체 시설에서 사육하였다. 이후, 상기 마우스들을 6마리씩 2개의 그룹, 즉, 비이클(vehicle) 처리 대조군 그룹 및 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS) 처리 그룹으로 나누고, 각각을 1주일에 한 번 5 mg/kg씩, 총 3주간 처리하였다. 이후 CO₂ 마취 상태에서 마우스들을 희생하였다. 본 실험에서 모든 마우스들은 IRC의 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)에서 제시한 기준에 맞추어 사육되었다. 또한, 모든 과정은 IACUC에 의해 승인되었다.

[0047] 골수세포는 4-5주 된 C57BL/6J 마우스에서 분리하였다. 구체적으로, 대퇴골 및 경골을 수거하여 붙어있는 근육 조직 등으로부터 분리하였다. 이후 뼈의 끝을 자르고, 골수강을 그 끝에서부터 다른 한쪽까지 살균한 21-게이지 바늘을 이용해 α-MEM을 흘려보내고, 파스퇴르 피펫을 이용해 혼합하여 단일 세포 현탁액을 만들었다. 그렇게 얻어진 골수 현탁액을 두 번 세척하고, M-CSF(20 ng/ml)에 덧붙여 16시간 동안 플레이트에 배양하였다.

[0048] 이후, 세포를 획득하고, 피콜 하이파크 비중(Ficoll-hypaque gradient)을 이용해 세포를 모으기 위해 세포들을 층층이 쌓았다. 접착성 단핵구/대식세포-유사 세포들의 개체수가 배양 플레이트의 바닥에 형성될 때까지 2일간 배양하였다. 적은 수의 비접착성 세포들은 인산완충버퍼(phosphate-buffered saline, PBS)로 디시를 세척하여 제거하였고, 남은 접착성 세포들(골수 유래 대식세포, bone marrow-derived macrophages; BMM)을 획득하여 플레이트에 균주하였다. 상기 접착성 세포들은 FACS Calibur flow cytometer(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 분석하였고, CD3 및 CD45R에 음성, CD11b엔 양성인 것을 확인하였다. 오염된 기질 세포가 없다는 것은 M-CSF의 첨가 없이는 성장하지 않는 것으로 확인하였다.

[0049] 또한, 상기 세포들을 M-CSF 및 RANKL을 처리한 후 40시간 동안 배양하여 전구세포(pre-osteoclast)를 얻었다.

[0050] 모든 실험값들은 평균값±SEM으로 표현되었고, 두 가지 그룹이 비교되는 경우에는 스튜던트의 t-test을 수행하거나 여러 그룹이 동시에 비교될 때는 일원분산분석과 본페로니 사후검사로 통계학적 분석을 수행하였다. P 값이 0.05보다 적으면 통계학적으로 유의미한 것으로 간주되었다.

[0051] <실시에 1> miRNA-155 측정

[0052] 상기 준비예 1에서 준비 및 배양된 골수 유래 대식세포의 miR-155 발현량을 마이크로RNA 정량적 증합효소연쇄반응(miRNA quantitative PCR, miR qPCR)을 수행하여 측정하였다. 구체적으로, Trizol 용액(GIBCO, Life Technol.)을 이용하여 상기 세포에서 총 RNA를 추출하고 1 μg의 총 RNA를 miScript RT kit(Qiagen)를 이용하여 역전사하였다. 이렇게 얻어진 cDNA로 miRNA qPCR을 진행하였는데, 이때 miScript SYBR Green PCR kit(Qiagen) 및 miR-155에 특이적인 프라이머를 이용하였다. 상기 miR-155에 특이적인 프라이머는 하기 <표 1>에 개시된 바와 같았다.

표 1

종류	서열	서열번호
miRNA 특이적 프라이머	5' -uuuauugcuauugugauaggggu-3'	1

[0054] 총 20 μl의 PCR 반응용액은 2 μl의 역전사 생성물(상기에서 얻은 cDNA), 10 μl의 2X QuantiTect SYBR Green PCR master mix, 2 μl의 10X miScript universal primer, 2 μl의 10X miScript primer assay, 그리고 4 μl의 가압멸균처리 된(autoclaved) 증류수를 혼합하여 제조하였다. 이후, 상기 PCR 반응 용액을 95℃에서 15분, 94℃에서 15초, 60℃에서 60초간 반응시키는 한 사이클을 총 44번 반복하여 miR-155를 증폭하였다. PBS를 처리한 대조군 및 LPS 처리군에 대해 각각 3개의 시료를 준비하여 3번 실험을 수행하였고, RNU6B 프라이머를 내부적 기준

점(endogenous standard)으로 사용하였다. 상기의 모든 과정이 StepOnePlus™ Real Time System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 수행되었다.

[0055] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, LPS를 처리한 마우스의 정강이뼈에서 얻은 세포의 miR-155는 PBS를 처리한 대조군 마우스에서보다 대략 2배 이상 높게 발현되었다.

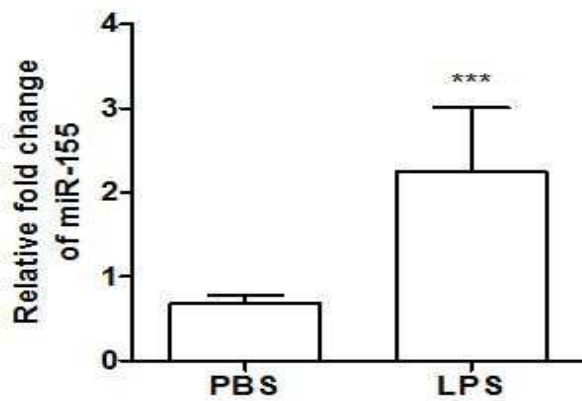
[0056] 또한, 마우스 뼈 조직에서의 miR-155 발현수준을 측정하기 위하여, 상기 준비예 1에서 RANKL 처리로 얻은 전구 세포에서의 miR-155 발현량을 상기과 동일한 방법으로 측정하였다. 즉, 상기 RANKL 처리 전구세포에 LPS를 100 ng/ml를, 대조군에는 LPS 대신 동일한 양의 PBS를 처리하고 실험을 시작한 시점, 약물(LPS 및 PBS) 처리 후 24 시간 및 48시간이 될 때 각각 발현량을 확인하였다.

[0057] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, PBS를 처리한 RANKL 처리 전구세포에서의 miR-155의 발현량은 처음(M0), 24 시간(M24) 및 48시간(M48) 후에도 모두 낮았지만, LPS를 처리한 경우에는 24시간 후(M+LPS24) 약 140배까지 증가했고, 이 증가된 miR-155의 양이 48시간이 될 때까지(M+LPS48) 계속해서 유지되었다.

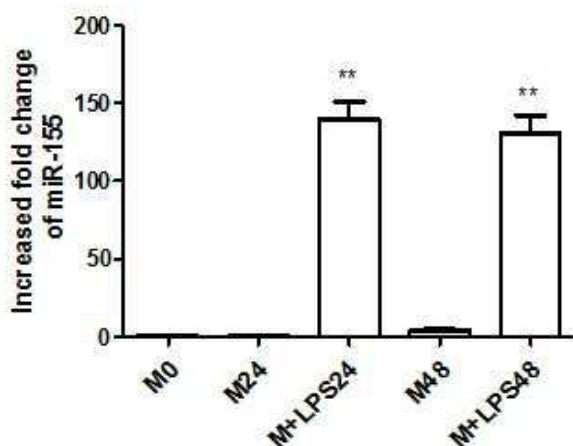
[0058] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아님은 명백할 것이다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Biomarker Composition for Diagnosing Inflammatory Bone Loss or
Prognosing Treatment of Inflammatory Bone Loss Comprising
miRNA-155

<130> ADP-2016-0435

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

uuaaugcuua uugugauagg ggu

23