



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0002482
 (43) 공개일자 2012년01월05일

(51) Int. Cl.
A61K 38/16 (2006.01) **A61K 31/7105** (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0064247
 (22) 출원일자 2011년06월30일
 심사청구일자 2011년06월30일
 (30) 우선권주장 1020100062674 2010년06월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
(주)아모레퍼시픽
 서울특별시 용산구 한강대로 106 (한강로2가, 태평양빌딩)
 (72) 발명자
김규한
 서울특별시 광진구 구의로6길 11-1, 우신빌리지 402호 (구의동)
심중현
 경기도 용인시 기흥구 고매로43번길 32-2, 104동 1401호 (공세동, 불곡마을벽산블루밍)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김 순 영, 임희택, 김영철

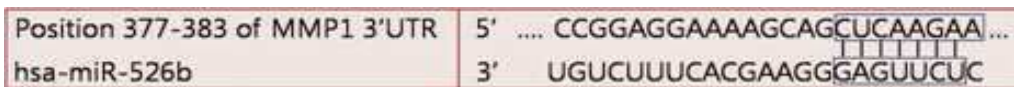
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 콜라겐 조절용 조성물

(57) 요약

본 발명은 miRNA-526b 기능의 저해제(inhibitor)로 작용하는 올리고뉴클레오티드 또는 모방체(mimic)로 작용하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 콜라겐 조절용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 콜라겐 분해효소(collagenase) 중의 하나인 MMP1(matrix metalloproteinase 1)의 발현을 조절하여 진피층을 채우는 콜라겐 생성을 조절하므로 노화 개선, 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

신동욱

서울특별시 서대문구 독립문로 10, 102동 508호 (영천동, 독립문삼호아파트)

최현

경기도 용인시 수지구 용구대로 2722, 203동 1802호 (죽전동, 현암마을동성2차아파트)

노민수

서울특별시 서초구 신반포로23길 41, 110동 606호 (잠원동, 신반포아파트)

이태룡

경기도 용인시 기흥구 동백평촌로 39, 1201동 1602호 (동백동, 호수마을동보노빌리티)

특허청구의 범위

청구항 1

올리고뉴클레오티드를 포함하는 체내 콜라겐 양을 조절하기 위한 조성물로서,

상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1의 서열에서 선택되는 15~23개의 연속적인 뉴클레오티드로 구성된 올리고뉴클레오티드 중에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 콜라겐 조절은 콜라겐 분해효소인 매트릭스 메탈로프로테이나제 1(matrix metalloproteinase 1: 이하 MMP1)의 발현을 조절하여 체내 콜라겐의 양을 조절하는 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 MMP1 mRNA와 혼성화하여 MMP1의 발현을 감소 또는 억제시키는 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 MMP1 mRNA의 3'-UTR의 377 ~ 383 번째 핵산 서열과 혼성화하는 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 서열 내에 서열번호 9의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물.

청구항 6

올리고뉴클레오티드를 포함하는 체내 콜라겐 양을 조절하기 위한 조성물로서,

상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 2의 서열에서 선택되는 15~23개의 연속적인 뉴클레오티드로 구성된 올리고뉴클레오티드 중에서 선택된 어느 하나 이상인 것이고,

서열번호 1의 서열 또는 그의 일부와 상보적인 올리고뉴클레오티드로서 서열번호 1의 서열과 혼성화될 수 있는 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 콜라겐 조절은 콜라겐 분해효소인 매트릭스 메탈로프로테이나제 1(matrix metalloproteinase 1: 이하 MMP1)의 발현을 조절하여 체내 콜라겐의 양을 조절하는 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1의 서열과 혼성화하여 MMP1의 발현을 증가 또는 활성화시키는 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 노화 개선 또는 방지용 조성물인 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 조성물은 피부 노화 개선 또는 방지용 조성물인 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 마이크로 RNA(microRNA: 이하 miRNA)인 miR-526b의 동정하여 miRNA-526b 기능의 저해제(inhibitor) 올리고뉴클레오티드 또는 모방체(mimic) 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] miRNA는 세포 내에 존재하는 20-25 뉴클레오티드(nucleotide) 길이의 작은 RNA(endogenous small RNA)의 일종으로 단백질을 합성하지 않는 DNA에서 유래되어 헤어핀-구조 전사체(hairpin-shaped transcript)로부터 생성이 된다. miRNA는 표적 mRNA의 3'-UTR의 상보적 시퀀스에 결합하여 그 mRNA의 번역 억제 또는 불안정화를 유도하여, 궁극적으로 그 표적 mRNA의 단백질 합성을 억제하는 리프레서(repressor) 역할을 하게 된다. 하나의 miRNA는 여러 개의 mRNA를 타겟팅하며, mRNA 역시 여러 개의 miRNA에 의해 조절될 수 있다고 알려져 있다.

[0003] 현재 miRNA는 발달 시기, 세포 사멸사, 지방 신진대사 및 조혈 세포 분화의 조절을 포함하는 여러 생물학적 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려짐에 따라 생명과학분야에서 매우 큰 관심을 받고 있다. 하지만 암 등의 질병이나 발생 과정에서의 miRNA의 기능연구는 상당히 진행된 것에 비해 상대적으로 피부과학에서의 miRNA 역할에 대한 연구는 비교적 적은 상태이다. 최근 miR-203이 각질형성세포(keratinocyte)에서 p63 mRNA를 타겟팅함으로써 분화능력을 억제한다는 보고는 있지만, 그 외의 피부관련 특이적 miRNA와 기능에 대해선 거의 알려져 있지 않다. 하지만 miR-203 외에도 여러 특정 miRNA가 피부에서도 생물학적으로 중요한 역할을 담당할 것으로 충분히 예측이 된다. 또한 miRNA는 생물학적 마커 및 소재 등 다양한 분야에서 응용이 가능하기 때문에 피부에서 miRNA의 연구는 화장품 및 의약산업 등에 다양한 적용이 가능할 것으로 판단된다.

[0004] 피부는 크게 표피층(epidermis)과 진피층(dermis)으로 나뉘는데, 진피층은 섬유아세포(fibroblast)에서 만들어지는 콜라겐(collagen)으로 채워져 있다. 이 콜라겐은 피부가 노화됨에 따라 분해(degradation) 되거나 변형된다고 알려져 있다. 이때 콜라겐 분해효소(collagenase)의 하나인 MMP1(matrix metalloproteinase 1)의 발현과 활성이 증가되어 콜라겐을 분해하여 진피층을 약화시켜 피부의 탄력을 저하시켜 주름 및 피부 처짐 등의 증상을 일으키기 때문에 MMP1는 피부탄력의 생물학적 지표로 이용되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 피부의 섬유아세포에서 콜라겐의 분해를 유도하는 MMP1을 직접 타겟팅하여 그 발현을 억제함으로써 피부 섬유아세포에서 콜라겐 합성을 조절하는 miRNA를 찾기 위한 연구를 하였고, 그 결과 miR-526b가 MMP1을 타겟팅함을 밝혔다. 그래서, 본 발명은 miRNA-526b 기능의 저해제(inhibitor)로 작용하는 올리고뉴클레오티드 또는 모방체(mimic)로 작용하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 콜라겐 조절용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 체내 콜라겐 양을 조절하기 위한 조성물로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1의 서열에서 선택되는 15-23개의 연속적인 뉴클레오티드로 구성된 올리고뉴클레오티드 중에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물

을 제공한다.

- [0007] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 상기 콜라겐 조절은 콜라겐 분해효소인 매트릭스 메탈로프로테이나제 1(matrix metalloproteinase 1: 이하 MMP1)의 발현을 조절하여 체내 콜라겐의 양을 조절하는 것일 수 있다.
- [0008] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 상기 올리고뉴클레오티드는 MMP1 mRNA와 혼성화하여 MMP1의 발현을 감소 또는 억제시킬 수 있다.
- [0009] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 상기 올리고뉴클레오티드는 MMP1 mRNA의 3'-UTR의 377 ~ 383 번째 핵산 서열과 혼성화하는 것일 수 있다.
- [0010] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 내에 서열번호 9의 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0011] 또한, 본 발명의 일 실시예는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 체내 콜라겐 양을 조절하기 위한 조성물로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 2의 서열에서 선택되는 15~23개의 연속적인 뉴클레오티드로 구성된 올리고뉴클레오티드 중에서 선택된 어느 하나 이상인 것이고, 서열번호 1의 서열 또는 그의 일부와 상보적인 올리고뉴클레오티드로서 서열번호 1의 서열과 혼성화될 수 있는 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 상기 콜라겐 조절은 콜라겐 분해효소인 매트릭스 메탈로프로테이나제 1(matrix metalloproteinase 1: 이하 MMP1)의 발현을 조절하여 체내 콜라겐의 양을 조절하는 것일 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 상기 올리고뉴클레오티드는 MMP1 mRNA와 혼성화하여 MMP1의 발현을 증가 또는 활성화시키는 것일 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명의 일 실시예는 상기 조성물은 노화 개선 또는 방지용 조성물일 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 노화 개선 또는 방지용 약학 조성물일 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 노화 개선 또는 방지용 화장품 조성물인 것일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명의 일 실시예는 상기 조성물은 피부 노화 개선 또는 방지용 조성물일 수 있다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 및 그 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 콜라겐 분해효소(collagenase) 중의 하나인 MMP1(matrix metalloproteinase 1)의 발현을 조절하여 진피층을 채우는 콜라겐 생성을 조절하므로 피부 노화 개선, 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 MiRANDA(www.microRNA.org) 와 targetScan(www.targetscan.org) 사이트를 이용하여 miR-526b가 MMP1에 결합 가능성을 확인하고 miR-526b가 MMP1 mRNA 3'-UTR에 결합할 수 있는 부위를 박스로 표시하였다.
- 도 2는 miR-526b의 상보적인 시퀀스를 갖는 올리고핵산(oligonucleotide)을 세포 내에 존재하는 miR-526b에 결합시켜 그 기능을 억제하고 나서 real-time PCR 을 수행하여 MMP1 mRNA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 miR-526b와 동일한 시퀀스를 갖는 올리고핵산(oligonucleotide)으로 세포 내로 주입하여 miR-526b의 과발현 현상(overexpression)을 유도하고 나서 real-time PCR을 수행하여 MMP1 mRNA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 miR-526b와 동일한 시퀀스를 갖는 올리고핵산(oligonucleotide)으로 세포 내로 주입하여 miR-526b의 과발현 현상(overexpression)을 유도하고 나서 real-time PCR을 수행하여 콜라겐 타입 1(collagen type 1) mRNA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 miR-526b의 MMP1에 대한 직접적인 결합에 의한 타겟팅의 여부를 알아보기 위해 도 1에서 예측된 miR-526b의 MMP1 타겟팅 사이트를 포함한 MMP1의 3'UTR을 CMV 프로모터에 의해 발현되는 루시페라제(luciferase)의 3' 부위에 클로닝하여 야생형(wild type) 컨스트럭트를 제작하여 올리고뉴클레오티드를 세포 내로 트랜스펙션하여 루시페라제의 활성을 측정하고, 베타갈락토시다제(beta-galactosidase)의 활성으로 루시페라제의 활성을 정규화하여 결과값을 나타낸 것이다.
- 도 6은 miR-526b의 MMP1에 대한 직접적인 결합에 의한 타겟팅의 여부를 알아보기 위해 도 1에서 예측된 miR-

526b의 MMP1 타겟팅 사이트를 변형된 MMP1의 3'UTR을 CMV 프로모터에 의해 발현되는 루시페라제(luciferase)의 3' 부위에 클로닝하여 제작한 돌연변이형(mutant type) 컨스트럭트를 제작하여 올리고뉴클레오티드를 세포 내로 트랜스펙션하여 루시페라제의 활성을 측정하고, 베타갈락토시다제(beta-galactosidase)의 활성으로 루시페라제의 활성을 정규화하여 결과값을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0021] 용어 "뉴클레오티드"는 일반적으로 당에 부착된 인-함유 기를 포함하는 뉴클레오시드를 칭한다.
- [0022] 용어 "뉴클레오시드"는 일반적으로 당, 대개 리보즈 또는 데옥시리보즈, 및 푸린 또는 피리미딘 염기로 이루어진 화합물을 칭한다.
- [0023] 용어 "핵산"은 게놈 영역 또는 이로부터 전사된 RNA 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산은 mRNA이다.
- [0024] 용어 "올리고뉴클레오티드"(또는 간단히 "올리고")라는 용어는 본 발명에서 "올리고머"라는 용어와 호환적으로 사용되며, 2개 이상의 뉴클레오티드의 공유 결합에 의해 형성되는 분자를 지칭하는 것이다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드(단일 가닥의 올리고뉴클레오티드라고도 칭함)라는 용어의 의미상, "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 한 가지 실시 상태에서, 수개 내지 수십개의 뉴클레오티드를 갖는 것이다. 또한, 용어 "올리고뉴클레오티드"는 복수의 결합된 뉴클레오시드 단위로부터 형성된 폴리뉴클레오시드를 칭한다. 뉴클레오시드 단위는 바이러스, 박테리아, 세포 잔해 또는 올리고뉴클레오티드-기반 조성물(예를 들어, microRNA)의 일부일 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 또한 게놈 또는 cDNA를 포함하는 존재하는 핵산 공급원으로부터 획득될 수 있지만, 바람직하게 합성 방법에 의해 생산된다. 특정 구체예에서, 각 뉴클레오시드 단위는 헤테로사이클 염기 및 펜토푸라노실, 트레할로즈, 아라비노즈, 2'-데옥시-2'-치환된 뉴클레오시드, 2'- 데옥시-2'-치환된 아라비노즈, 2'-O-치환된 아라비노즈 또는 핵소즈 당기를 포함한다. 뉴클레오시드 잔기는 임의의 여러 공지된 뉴클레오시드간 결합에 의해 서로 커플링될 수 있다. 이러한 뉴클레오시드간 결합은 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 알킬포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포라미데이트, 실록산, 카보네이트, 카보알콕시, 아세트아미데이트, 카바메이트, 모르폴리노, 보라노, 티오에테르, 브릿징된 포스포라미데이트, 브릿징된 메틸렌 포스포네이트, 브릿징된 포스포로티오에이트, 및 설폰 뉴클레오시드간 결합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명에서 "혼성화"이라는 용어는 수소 결합을 의미하며, 이는 다시 상보적인 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 염기들 사이의 왓슨-크릭(Watson-Crick) 결합, 혹스틴(Hoogsteen) 결합, 역 혹스틴 수소결합 등일 수 있다. DNA에서 흔히 발견되는 네 가지 뉴클레오염기는 G, A, T 및 C로서 G는 C와, A는 T와 쌍을 이룬다. RNA에서 T는 우라실(U)로 대체되는데, 이것은 A와 쌍을 이룬다. 표준적인 이중가닥 형성에 참여하는 뉴클레오염기에 있어서 이들 화학 기들은 왓슨-크릭 페이스(Watson-Crick face)를 구성한다. 몇 년 후에 혹스틴은 그들의 왓슨-크릭 페이스에 더해서 퓨린 뉴클레오염기가 이중가닥의 외부로부터 인식될 수 있음으로 해서 수소 결합을 통해 피리미딘 올리고뉴클레오티드에 결합하는데 이용되어, 삼중 나선 구조를 형성할 수 있음을 입증한 바 있다.
- [0026] 본 발명의 내용상 "상보적(complementary)"이라는 용어는 두 개의 뉴클레오티드 서열이 서로 정확한 쌍을 이룰 수 있는 능력을 가리킨다. 예컨대, 올리고뉴클레오티드의 어떤 특정 위치에서 하나의 뉴클레오티드가 DNA 또는 RNA 분자의 대응하는 위치에 있는 뉴클레오티드와 수소 결합을 할 수 있다면, 상기 올리고뉴클레오티드와 상기 DNA 또는 RNA는 그 위치에서 서로 상보적인 것으로 간주된다. DNA 또는 RNA 가닥은, 올리고뉴클레오티드 중의 충분한 수의 뉴클레오티드들이 표적 DNA 또는 RNA 중의 대응하는 뉴클레오티드와 수소 결합을 형성하여 안정한 복합체를 형성하는 경우, 서로 상보적인 것으로 간주된다. 시험관내 또는 생체내에서 안정하기 위해서 올리고뉴클레오티드 서열이 그의 표적 마이크로RNA와 100% 상보적인 필요는 없다. "상보적" 및 "혼성화 할 수 있는"이라는 표현은 따라서, 비표적 RNA의 기능에는 하등 영향을 미침이 없이, 표적 RNA의 정상적인 기능만을 원하는 대로 간섭하도록, 그 올리고뉴클레오티드가 표적 분자와 충분히 강하고 특이적인 결합을 형성하는 것을 의미한다. 그러나, 한 가지 바람직한 실시 상태에서, 상보적이라는 용어는 100% 상보적 또는 전적으로 상보적임을 의미하는 것이다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 체내 콜라겐 양을 조절하기 위한 조성물로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1의 서열에서 선택되는 15~23개의 연속적인 뉴클레오티드로 구성된 올리고뉴클레오티드 중에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물을 제공한다.

- [0028] 5'- CUCUUGAGGGAAGCACUUUCUGU -3'(서열번호 1)
- [0029] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 내에 5'-UCUUGAG-3'(서열번호 9) 를 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 상기 올리고뉴클레오티드는 miR-526b의 모방체(mimic)로서 제작할 수 있다. 상기 miR-526b의 모방체(mimic)는 상기 miR-526b 염기서열과 유사한 서열로서, MMP1의 발현을 조절하는 기능을 수행하는 것들을 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 체내 콜라겐 양을 조절하기 위한 조성물로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 2의 서열에서 선택되는 15~23개의 연속적인 뉴클레오티드로 구성된 올리고뉴클레오티드 중에서 선택된 어느 하나 이상인 것이고, 서열번호 1의 서열 또는 그의 일부와 상보적인 올리고뉴클레오티드로서 서열번호 1의 서열과 혼성화될 수 있는 것을 특징으로 하는 콜라겐 조절용 조성물을 제공한다.
- [0032] 3'- GAGAAGCTCCCTTCGTGAAAGACA -5'(서열번호 2)
- [0033] 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드는 miRNA의 저해제(inhibitor)로서 상기 miRNA에 혼성화될 수 있는 것이다. 또한, miR-526b 또는 그의 모방체의 저해제로 상기 서열번호 2의 염기서열, 그와 유사한 서열 또는 그들의 일부 서열로서, 상기 서열번호 1의 서열에 혼성화될 수 있는 것들을 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 상기 올리고뉴클레오티드는, 변형된 뉴클레오티드 분자로 이루어질 수도 있다. 예컨대, 2'-O-알킬(예: 메틸, 에틸), 2'-O-알릴, 2'-O-알릴과 같은 2'-치환된 라이보스를 포함하는 뉴클레오티드 분자를 부분적으로 또는 전체적으로 포함할 수 있다. 또한, 치환된 염기를 갖는 뉴클레오티드 분자를 부분적으로 또는 전체적으로 포함할 수도 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예는 상기 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 노화 개선 또는 방지용 조성물, 구체적으로는 피부 노화 개선 또는 방지용 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 노화 개선 또는 방지용 약학 조성물, 구체적으로는 피부 노화 개선 또는 방지용 약학 조성물일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 노화 개선 또는 방지용 화장품 조성물, 구체적으로는 피부 노화 개선 또는 방지용 화장품 조성물일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에서 약학 조성물은 치료학적, 약제학적 또는 예방학적 유효량의, MMP1의 발현을 억제하는데 효과적인 올리고뉴클레오티드가 세포에 투여된다. 이러한 세포는 포유동물, 예를 들어 인간 또는 다른 포유동물의 일부 또는 전신일 수 있다.
- [0039] 용어 "치료"는 일반적으로 증상의 완화, 또는 질환 진행의 지연 또는 개선을 포함할 수 있는, 유익하거나 요망되는 결과를 얻기 위해 의도된 방법을 칭한다.
- [0040] 용어 "치료학적 유효량" 또는 "약제학적 유효량"은 일반적으로 질환 또는 질병의 징후 또는 증상의 예방, 감소, 완화 또는 제거를 포함하지만 이에 제한되지 않는 유익한 결과와 같은 요망되는 생물학적 효과에 영향을 미치는 데 충분한 양을 칭한다. 이에 따라, 약제학적 조성물 또는 방법의 각 활성 성분의 전체 양은 의미있는 환자의 유익, 예를 들어 면역 자극에 의해 특징되는 만성 질환의 치료(그러나, 이에 제한되지 않음)를 나타내는데 충분하다. 이에 따라, "약제학적 유효량"은 투여되는 환경에 의존적일 것이다. 약제학적 유효량은 하나 이상의 예방적 또는 치료적 투여로 투여될 수 있다. 단독으로 투여된 개개의 활성 성분에 적용되는 경우에, 이러한 용어는 그러한 성분 단독의 양을 칭한다. 조합으로 적용되는 경우에, 이러한 용어는 조합으로, 연속적으로 또는 동시에 투여되든지 간에 치료 효과를 나타내는 활성 성분들의 조합된 양을 칭한다.
- [0041] 용어 "예방학적 유효량"은 일반적으로 요망되지 않는 생물학적 효과를 억제하거나 이의 발전을 감소시키는데 충분한 양을 칭한다.
- [0042] 투여는 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비강내, 에어로졸, 안구내, 기관내, 직장내, 유전자 총에 의한, 피부패치 또는 점안약 투여 형태를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 적합한 경로에 의한 것일 수 있다.
- [0043] 상기 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 하고 상용되는 무기 또는 유기 담체, 부형제 및 희석제를 가하여 고체, 반고체 또는 액상의 형태로 경구 또는 비경구 투여제로 제제화 할 수 있다.
- [0044] 치료학적 유효량의 본 발명의 합성 올리고뉴클레오티드가 경구적으로 투여될 때, 올리고뉴클레오티드는 정제,

캡슐, 분말, 용액 또는 엘릭서(elixir)의 형태로 존재할 것이다. 정제 형태로 투여될 때, 본 발명의 약학 조성물은 젤라틴 또는 에주번트와 같은 고체 담체를 추가적으로 함유할 수 있다. 정제, 캡슐, 및 분말은 약 5내지 95% 올리고뉴클레오티드, 바람직하게 약 25 내지 90% 올리고뉴클레오티드를 함유한다. 액체 형태로 투여될 때, 물, 원유, 땅콩 오일, 미네랄 오일, 대두유, 참깨 오일과 같은 동물 또는 식물 기원의 오일, 또는 합성 오일과 같은 액체 담체가 첨가될 수 있다. 액체 형태의 약학 조성물은 생리학적 염수 용액, 텍스트로즈 또는 다른 사카라이드 용액 또는 글리콜, 예를 들어 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜을 추가로 함유할 수 있다. 액체 형태로 투여될 때, 약학 조성물은 약 0.5 내지 90 중량%의 올리고뉴클레오티드, 구체적으로 1 내지 50 중량%의 올리고뉴클레오티드를 함유한다.

[0045] 치료학적 유효량의 본 발명의 올리고뉴클레오티드가 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비강내, 에어로졸, 안구내, 기관내, 직장내, 유전자 총에 의한, 피부 패치 또는 점안약 형태에 의해 투여될 때, 올리고뉴클레오티드는 발열원 부재의 비경구적으로 허용가능한 수용액의 형태일 것이다. pH, 등장성, 안정성 등을 고려한, 이러한 비경구적으로 허용가능한 용액의 제조가 당해 분야 내에서 이루어진다. 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비강내, 에어로졸, 안구내, 기관내, 직장내, 유전자 총에 의한, 피부 패치 또는 점안약 또는 구강세척제 형태를 위한 약학 조성물은 올리고뉴클레오티드 이외에, 등장성 비히클(isotonic vehicle), 예를 들어 소듐 클로라이드 주사액, 링거 주사액, 텍스트로즈 주사액, 텍스트로즈 및 소듐 클로라이드 주사액, 락테이트화된 링거 주사액(Lactated Ringer Injection) 또는 당해 분야에 공지된 다른 비히클을 함유할 것이다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 안정화제, 보존제, 완충제, 항산화제, 또는 당업자에게 공지된 다른 첨가제를 함유할 수 있다.

[0046] 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비강내, 에어로졸, 안구내, 기관내, 직장내, 유전자 총에 의한, 피부 패치 또는 점안약 형태로 투여될 때, 0.01% 내지 10%(중량/부피)의 범위가 사용될 수 있다. 액체 형태로 투여될 때, 물, 원유, 땅콩 오일, 미네랄 오일, 대두유, 참깨 오일과 같은 동물 또는 식물 기원의 오일, 또는 합성 오일과 같은 액체 담체가 첨가될 수 있다. 국소 투여는 리포솜 또는 경피 시간-방출 패치(time-release patch)에 의해 이루어질 수 있다.

[0047] 상기 비경구 투여를 위한 제재로는 점적제, 연고, 로션, 젤, 크림, 패취, 스프레이, 현탁제 및 유제로 이루어진 군에서 선택되는 경피 투여형 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0049] 각 제형에 의한 피부 외용제 조성물에 있어서, 상기한 본 발명의 조성물 이외의 다른 성분들을 기타 피부 외용제의 제형 또는 사용 목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 이 경우 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승효과가 일어날 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명에 의한 조성물이 약학 조성물로 사용될 경우에, 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진 물질, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제 등의 약학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다.

[0051] 유효성분의 실제 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 주사제를 제외한 제재에 대해서는 노화가 발생하는 부위에 외용 도포하는 식으로 당업자의 수준에서 적용할 수 있고, 주사제의 경우에는 노화가 진행된 피부에 국소적으로 주사할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물을 이용한 정맥 내 치료의 지속시간은 노화 정도의 중증도, 및 각 개별적인 환자의 상태 및 가능한 특이 반응(idiosyncratic response)에 따라 변경될 것이다.

[0052] 본 발명의 방법을 실행하기 위해 사용되는 약학 조성물은 신체 또는 기관(organ) 중량 1 kg 당 10 μ g ~ 20 mg의 올리고뉴클레오티드를 함유할 것으로 고려된다.

[0053] 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드의 전신 투여가 바람직할 수 있다. 투여 횟수는 연속 주입 내지 한달에 한번, 한달에 여러 차례일 수 있거나 보다 적은 횟수가 노화 과정 및 올리고뉴클레오티드의 생물학적 반감기를 기초로 하여 결정될 것이다.

- [0054] 약학 조성물은 투여 설명서와 함께 용기, 팩 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.
- [0055] 화장료 조성물로는 그 제형은 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0056] 예를 들면, 상기 화장료 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연화장수, 영양화장수, 로션, 바디로션, 영양 크림, 마사지 크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 젤, 패치, 수중유(O/W)형, 유중수(O/W)형 등의 기초 화장료, 립스틱, 메이크업베이스 또는 파운데이션 등의 색조 화장료로 제형화 될 수 있다.
- [0057] 상기 화장료 조성물은 화장품학적으로 허용가능한 매질 또는 기제를 함유한다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜) 및/또는 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0059] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 화장료 조성물에 추가적으로 점증제를 함유할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 점증제는 메틸 셀룰로스, 카르복시 메틸 셀룰로스, 카르복시 메틸 하이드록시 구아닌, 하이드록시 메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 카르복시 비닐 폴리머, 폴리쿼터늄, 세테아릴 알콜, 스테아릭산, 카라기난 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 카르복시 메틸 셀룰로스, 카르복시 비닐 폴리머, 폴리쿼터늄 중에서 1종 이상을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 카르복시 비닐 폴리머가 될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일 실시태양에서 상기 화장료 조성물은 필요에 따라 적절한 각종의 기제와 첨가제를 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 발명자에 의해 용이하게 선정될 수 있다. 필요에 따라 허용 가능한 첨가제를 함유할 수 있으며, 예를 들면, 당업계에 통상적인 방부제, 색소, 첨가제 등의 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0065] 방부제는 구체적으로 페녹시에탄올(Phenoxyethanol) 또는 1,2-헥산디올(1,2-Hexanediol) 등이 될 수 있고, 향료는 인공향료 등이 될 수 있다.
- [0066] 그리고, 본 발명의 일 실시태양에서 화장료 조성물은 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 조성물을 포함할 수 있다. 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진 물질, 냉감제, 제한

(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.

- [0067] 또한, 이외에 첨가해도 되는 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니며, 또, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하다.
- [0068] 이하, 본 발명의 실시예를 참조하여 본 발명을 상세히 설명한다. 이들은 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위해 예시적으로 제시한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에 통상의 지식을 가지는 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0069] [실시예 1] miR-526b에 의한 MMP1 타겟팅 바이오인포매틱 분석.
- [0070] MMP1 mRNA의 3'-UTR에 상보적으로 결합하는 miRNA를 선택하기 위해 바이오인포매틱 툴을 이용하였다. MiRANDA(www.microRNA.org) 와 targetScan(www.targetscan.org) 에서 MMP1에 결합할 것으로 예측한 후보들 중에서 그 두 개에 중복적으로 포함되어 있는 miR-526b를 예측하였다. miR-526b는 성숙한 형태(mature form)의 5' 으로부터 2번째에서 8번째까지 시퀀스가 MMP1 mRNA 3'-UTR 와 정확히 일치하는 '8-mer'의 결합 형태를 가지는 것으로 추측하였다(도 1).
- [0071]
- [0072] [실시예 2] miR-526b의 저해제(inhibitor) 에 의한 MMP1 mRNA 발현양 증가
- [0073] 본 발명자들은 miR-526b의 억제 기능적 연구(loss-of-functional study)를 위하여 miR-526b의 저해제를 이용하였는데, miR-526b의 저해제는 miR-526b의 상보적인 뉴클레오티드를 갖는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)으로 세포 내에 존재하는 miR-526b에 결합하여 그 기능을 억제할 수 있다.
- [0074] 먼저, 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast) 에 miR-526b 저해제를 농도가 75uM가 되도록 리포솜(liposome)을 이용하여 트랜스펙션(transfection)하여 세포 안으로 이동시켰다. 대조군은 지금까지 알려진 miRNA와는 전혀 겹쳐지지 않는 올리고뉴클레오티드를 트랜스펙션시킨 샘플과 어떤 올리고뉴클레오티드도 넣지 않은 샘플을 이용하였다. 트랜스펙션 후 약 60 시간 후 트리졸(Trizol) 시약을 이용하여 RNA를 분리한 뒤, 올리고디티(oligo dT) 및 역전사 효소(reverse transcriptase) 를 이용하여 cDNA를 만들고 MMP1 mRNA 에 특이적인 프라이머를 이용하여 MMP1 mRNA 발현량을 관찰할 수 있는 real-time PCR 실험을 수행하였다. MMP1 mRNA 발현양은 하우스킵핑(house keeping) 유전자인 GAPDH의 mRNA 발현량으로 정규화(normalization) 하였다(도 2).
- [0075] [실시예 3] miR-526b의 모방체(mimic) 에 의한 MMP1 mRNA 발현양 감소
- [0076] 본 발명자들은 miR-526b의 획득기능적 연구(gain-of-functional study)를 위하여 miR-526b의 모방체를 이용하였는데, miR-526b의 모방체는 miR-526b와 동일한 시퀀스를 갖는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)로 세포 내로 주입하여 miR-526b의 과발현 현상(overexpression)을 유도할 수 있다.
- [0077] 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast) 에 miR-526b 모방체를 농도가 10uM가 되도록 리포솜(liposome)을 이용하여 트랜스펙션(transfection)하여 세포 안으로 이동시켰다. 대조군은 지금까지 알려진 miRNA와는 전혀 겹쳐지지 않는 올리고뉴클레오티드를 트랜스펙션시킨 샘플과 어떤 올리고뉴클레오티드도 넣지 않은 샘플을 이용하였다. 트랜스펙션 후 약 60 시간 후 트리졸(Trizol) 시약을 이용하여 RNA를 분리한 뒤, 올리고 디티(oligo dT) 및 역전사 효소(reverse transcriptase) 를 이용하여 cDNA를 만들고 MMP1 mRNA 에 특이적인 프라이머를 이용하여MMP1 mRNA 발현양을 관찰할 수 있는 real-time PCR 실험을 수행하였다. MMP1 mRNA 발현양은 하우스킵핑(house keeping) 유전자인 GAPDH의 mRNA 발현 양으로 정규화(normalization) 하였다(도3).
- [0078] [실시예 4] miR-526b의 모방체에 의한 콜라겐 타입 1(collagen type I) mRNA 발현양 증가
- [0079] 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast) 에 miR-526b 모방체를 농도가 10uM가 되도록 리포솜(liposome)을 이용하여 트랜스펙션(transfection)하여 세포 안으로 이동시켰다. 대조군은 지금까지 알려진 microRNA와는 전혀 겹쳐지지 않는 올리고뉴클레오티드를 트랜스펙션시킨 샘플과 어떤 올리고뉴클레오티드도 넣지 않은 샘플을 이용하였다. 트랜스펙션 후 약 60 시간 후 트리졸(Trizol) 시약을 이용하여 RNA를 분리한 뒤, 올리고 디티(oligo dT) 및 역전사 효소(reverse transcriptase) 를 이용하여 cDNA를 만들고 콜라겐 타입

1(collagen type I) mRNA 에 특이적인 primer를 이용하여 콜라겐 타입 1(collagen type I) mRNA 발현량을 관찰할 수 있는 real-time PCR 실험을 수행하였다. MMP1 mRNA 발현량은 하우스키핑(house keeping) 유전자인 GAPDH 의 mRNA 발현량으로 정규화(normalization) 하였다(도 4).

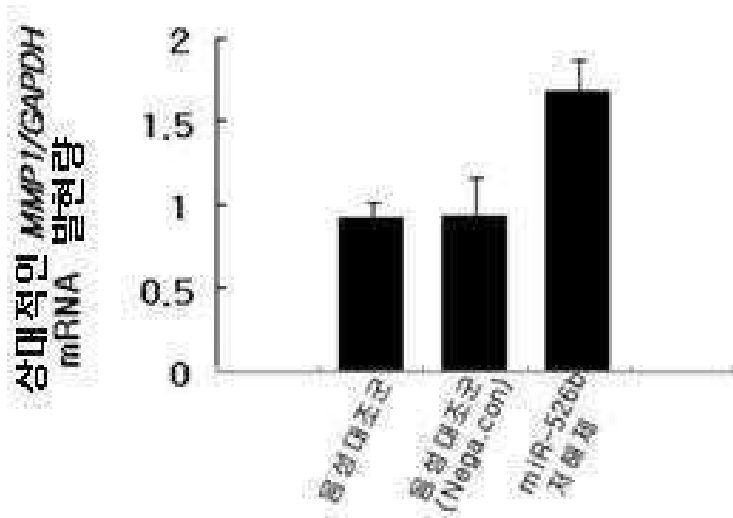
- [0080] [실시에 5] mir-526b에 의한 MMP1 타겟팅 사이트 발굴
- [0081] 실시예 1에서 예상된 MMP1 mRNA 3'UTR의 miR-526b 의 결합부위가 실제로 miR-526b에 의해 타겟팅되는지 실험으로 확인하였다.
- [0082] 먼저 MMP1 3'UTR 부위를 miRNA의 타겟팅 실험에 쓰이고 있는 pMIR-REPORT vector(applied biosystems, part number AM5795)에 클로닝한 야생형(wild-type) 컨스트럭트를 제작하였다. MMP1 3'UTR 부위의 11번에서 482번 부위를 5'-TTTGAATGGAAAACACATGGTG-3'(서열번호 3) 및 5'-AAACAAGGTTGACTTTATTCCAAA-3'(서열번호 4)를 가지는 올리고뉴클레오티드를 이용하여 PCR기법으로 인서트(insert)를 얻은 뒤, pMIR-REPORT vector의 SpeI 및 Hind3 제한효소 부위에 라이게이션(ligation) 하였다.
- [0083] 또한 MMP1 3'UTR 부위에서 miR-526b가 결합할 것으로 예상되는 377-383부위의 5'-CTCAAGAA-3'(서열번호 5) 올리고뉴클레오티드를 5'-CTCCCTCA-3'(서열번호 6) 변경한 돌연변이형(mutant type) 컨스트럭트를 제작하였다. 5'-TTTGAATGGAAAACACATGGTG-3'(서열번호 3)와 5'-CCAGTGACTGCACATGTG TGAGGGAG CTGCTTTTCTCCGGCAA-3'(서열번호 7)를 가지는 올리고뉴클레오티드를 이용하여 PCR기법으로 첫 번째 주형을 얻고 5'-TTGCCGAGGAAAAGCAGCTCCCTCA CACATGTGCAGTCACTGG-3'(서열번호 8)와 5'-AAACAAGGTTGACTTTATTCCAAA-3'(서열번호 4)를 가지는 올리고뉴클레오티드를 이용하여 PCR기법으로 두 번째 주형을 얻은 뒤, 첫 번째 주형과 두 번째 주형에서 5'-TTTGAATGGAAAACACATGGTG-3'(서열번호 3) 올리고뉴클레오티드 및 5'-AAACAAGGTTGACTTTATTCCAAA-3'(서열번호 4)를 가지는 올리고뉴클레오티드를 이용하여 PCR기법으로 miR-526b의 결합부위가 변경된 인서트(insert)를 얻은 뒤, pMIR-REPORT vector의 SpeI 및 Hind3 제한효소 부위에 라이게이션(ligation) 하였다.
- [0084] Hela 세포주에 12well에 약 70% confluency 상태에서 pMIR-REPORT에 MMP1 3'UTR을 클로닝한 야생형(wild-type) 컨스트럭트와 돌연변이형(mutant type) 컨스트럭트를 각각 0.2g 정도와 베타-갈라토시다제(beta-galactosidase)(applied biosystem사의 pMIR-REPORT system에 포함됨)의 발현백터를 0.1g씩, 그리고 miR-526b의 유도체의 농도가 20uM이 되도록 리포솜(liposome, Invitrogen사의 lipofectamine 2000)을 이용하여 트랜스펙션(transfection)하여 세포 안으로 이동시킨다. 대조군은 지금까지 알려진 microRNA와는 전혀 겹쳐지지 않는 올리고뉴클레오티드를 트랜스펙션시킨 샘플과 어떤 올리고뉴클레오티드도 넣지 않은 샘플을 이용하였다. 트랜스펙션 후 약 60 시간 후 베타-갈라토시다제(beta-galactosidase) 활성과 루시페라제 활성을 측정하였다. Reporter lysis buffer(Promega, beta-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter lysis buffer, Cat. E2000) 약 200ul를 이용하여 세포를 깨뜨린 뒤, 약 13000rpm에서 3분 정도 원심분리하여 그 상등액을 얻는다. 상등액의 약 5ul를 취하여 루시페라제 에세이 서브스트레이트(substrate) 용액(Promega, Luciferase assay system, Cat. E1500) 약 20ul와 반응한 뒤, 루미노미터(luminometer)로 측정하여 루시페라제의 활성값을 얻는다. 그리고 상등액의 약 50ul를 취하여 2X 베타-갈라토시다제(beta-galactosidase) 버퍼와 반응하여 37℃에서 1 시간 정도 반응하여 그 색이 노란색으로 변할 때 405nm에서 O.D.값을 측정한 뒤, 앞에서 측정한 루시페라제 활성 값에서 나뉘서 정규화 과정을 하였다(도 5 및 도 6).
- [0085] 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.

도면

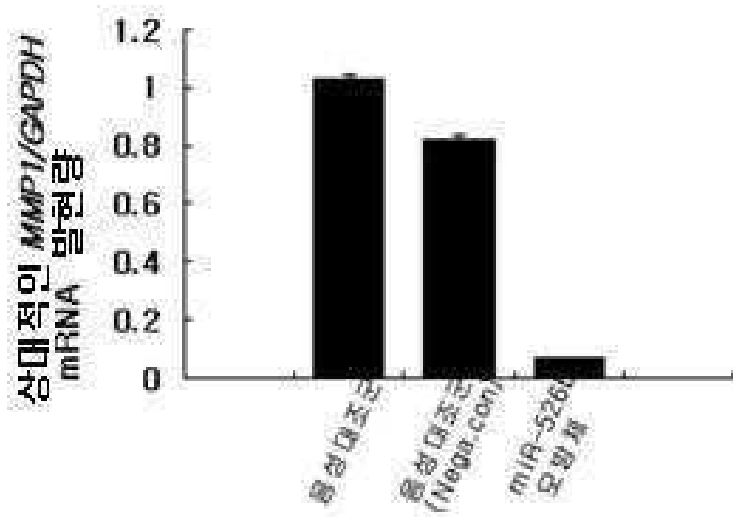
도면1

Position 377-383 of MMP1 3'UTR	5' CCGGAGGAAAAGCAGCUC <u>CAAGAA</u> ...
hsa-miR-526b	3' UGUCUUUCACGAAGGGAGUUCUC

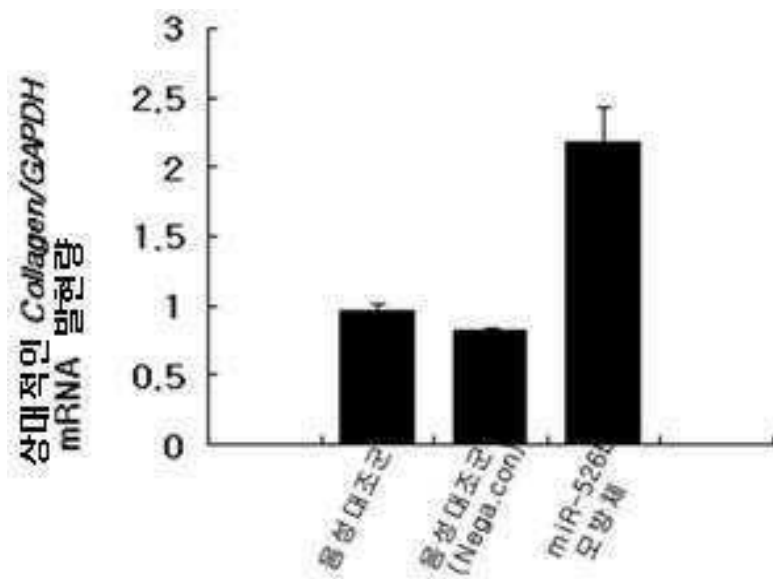
도면2



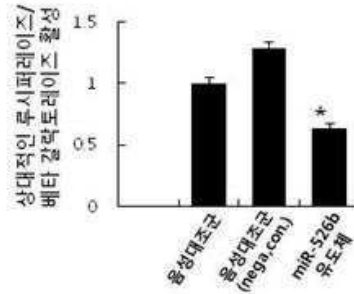
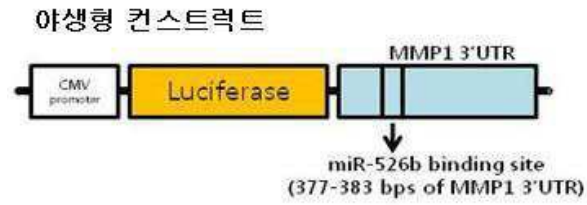
도면3



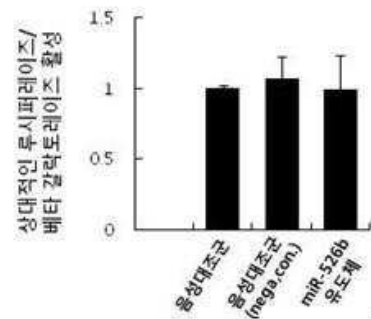
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> AMOREPACIFIC CORPORATION
- <120> COMPOSITION FOR REGULATING COLLAGEN
- <130> 11p239ind
- <150> KR 10-2010-0062674
- <151> 2010-06-30
- <160> 10
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 23
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> miRNA
- <400> 1
- cucuugaggg aagcacuuuc ugu
- <210> 2
- <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense miR-526b
 <400> 2
 acagaaagtg cttccctcaa gag 23

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 3
 tttgaatgga aaacacatgg tg 22

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 4
 aaacaagggtt gactttattc caaa 24

<210> 5
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 5
 ctcaagaa 8

<210> 6
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 6
 ctcctca 8

<210> 7
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 7
 ccagtgactg cacatgtgtg agggagctgc tttcctccg gcaa 44
 <210> 8
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 8
 ttgccggagg aaaagcagct ccctcacaca tgtgcagtca ctgg 44

 <210> 9
 <211> 7
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 9
 ucuugag 7
 <210> 10
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Position 377-383 of MMP1 3'UTR
 <400> 10
 ccggaggaaa agcagcucaa gaa 23