(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0026849
(43) 공개일자 2023년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0108979
(22) 출원일자 2021년08월18일
심사청구일자 2021년08월18일

(71) 출원인
국민대학교산학협력단
서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임화선
서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 61호(여의도동, 여의도시범아파트)
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호(쌍용동, 현대아이파크홈타운)
양창원
서울특별시 성북구 한천로 713, 501동 1202호(장위동, 래미안장위퍼스트하이)
(74) 대리인
특허법인태백

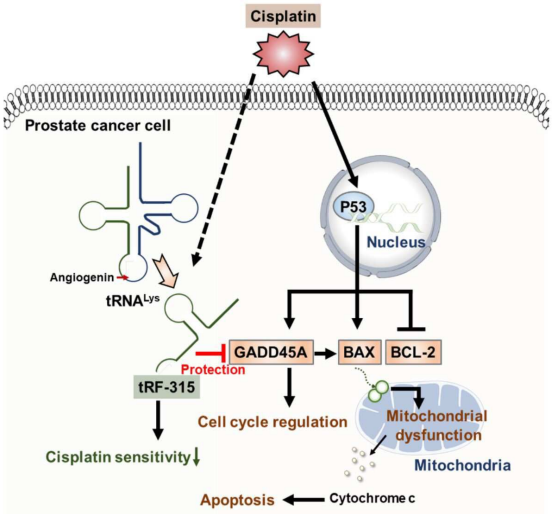
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **tRF-315 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제**

(57) 요 약

본 발명은 tRF-315 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제에 관한 것으로, $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315가 암세포에서 시스플라틴에 의한 세포자살을 예방하고, 미토콘드리아 장애를 완화시키는 것을 확인하였으며, tRF-315가 종양 억제 유전자인 GADD45A를 표적하여 시스플라틴에 의해 변경된 세포 주기를 조절하여 백금계 항암제로 유도되는 항암 활성을 회피하는 것을 확인하고, tRF-315 억제제가 암세포에서 세포자살 경로와 관련된 단백질의 발현을 증가시키는 것을 확인함으로써, tRF-315 억제제는 암의 치료를 위한 보조제 및 시스플라틴과 같은 백금계 항암제의 효과를 증진시킬 수 있는 병용 투여제로 제공된다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711129209
과제번호 2021R1C1C1009807
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 멜라토닌에 의한 엑소좀 유래 운반 RNA 소편 기반 자궁내막증 개선 메커니즘 규명
기 여 율 50/100
과제수행기관명 국민대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711133414
과제번호 2021R1A2C2005841
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 멜라토닌을 이용한 모돈-태아 간 상호작용 증진 기술 개발 및 번식능력 예측 조기 지표 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

tRF-315 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 tRF-315 억제제는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 갖는 RNA인 것을 특징으로 하는 항암보조제.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항암보조제는 백금계 항암제와 동시적 또는 순차적으로 투여할 수 있는 것을 특징으로 하는 항암보조제.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 백금계 항암제는 시스플라틴(cis-diamminedichloroplatinum [II]), 카보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 피코플라틴(picoplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 사트라플라틴(satraplatin) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 항암보조제.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항암보조제는 암세포의 세포자살(apoptosis)을 유도하는 것을 특징으로 하는 항암보조제.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항암보조제는 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직 암, 악성골암, 악성림프종, 악성중피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 윌름스암, 유방암, 삼중음성유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신융모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성 골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문근육종, 후두암, 흉막암, 혈액암 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 암을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 항암보조제.

청구항 7

tRF-315 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제 및 백금계 항암제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 병용 투여용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 tRF-315 억제제는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 갖는 RNA인 것을 특징으로 하는 병용 투여용 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 백금계 항암제는 시스플라틴(cis-diamminedichloroplatinum [II]), 카보플라틴

(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 피코플라틴(picoplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 사트라플라틴(satraplatin) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 병용 투여용 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 암은 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직 암, 악성골암, 악성림프종, 악성중피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 윌름스암, 유방암, 삼중음성유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신융모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성 골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문근육종, 후두암, 흉막암, 혈액암 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 병용 투여용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 tRF-315 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10 만 명 이상이 진단되고, 약 6 만 명 이상이 사망하고 있다. 암의 유발 인자인 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 상이하다. 최근 의학의 빠른 발전과 더불어 수술, 방사선 요법 및 화학 요법을 통해 여러 형태의 암 치료법이 다양하게 이루어지고 있음에도 불구하고, 여전히 많은 암 환자들이 암세포의 완전한 제거와 전이 방지에 대한 어려움을 겪고 있다.

[0003] 현재까지 암을 치료하는 방법으로 주로 3가지 치료법 즉, 방사선 치료, 외과적인 수술 및 화학요법을 이용하고 있으며, 이 중 한 가지 또는 이들의 조합을 통해 암을 치료하고 있다. 화학요법은 환자의 상태를 진단하여 적합한 항암제를 이용한 치료를 의미한다. 다양한 종류의 항암제 종류 중에서 특히 백금계 항암제는 백금 기반의 항암제로 두경부암, 폐암, 유방암, 방광암, 위암, 자궁경부암, 골수종 등과 같은 다양한 종류의 암을 치료하는데 매우 효과적이라고 알려져 있다.

[0004] 백금계 항암제 중에서 시스플라틴은 백금(platinum)을 함유한 중금속 화합물로서 백금 원자를 중심으로 2개의 염소 원자와 2개의 암모니아 분자가 cis-형으로 결합되어 있으며, DNA 가닥상의 인접한 2개의 구아닌(guanine)과 결합하여 인터스트랜드 크로스링크(interstrand crosslink)를 형성하여 DNA 합성을 억제한다. 즉, 암세포의 핵 내에 존재하는 DNA 이중나선 구조에 부착되어 DNA복제를 저해하여 암세포 성장 및 증식을 억제하고 암세포를 제거하여 항암효과를 나타낸다고 알려져 있다. 그러나 시스플라틴은 장기간 사용시 환자에서 내성을 유발하여 암이 재발하는 사례가 종종 보고되고 있으며, 이러한 환자를 시스플라틴 내성 환자로 분류되고 있으며, 이러한 항암제 내성 환자를 치료하기 위한 새로운 치료 방법의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2017-0139055호 (2017. 12. 18. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 백금계 항암제의 효과를 증진시키기 위해 백금계 항암제로 유도되는 항암 활성을 회피를 방지할 수 있는 항암 보조제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315의 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315의 억제제 및 백금계 항암제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 병용 투여용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315가 암세포에서 시스플라틴에 의한 세포자살을 예방하고, 미토콘드리아 장애를 완화시키는 것을 확인하였으며, tRF-315가 종양 억제 유전자인 GADD45A를 표적하여 시스플라틴에 의해 변경된 세포 주기를 조절하여 백금계 항암제로 유도되는 항암 활성을 회피하는 것을 확인하고, tRF-315 억제제가 암세포에서 세포자살 경로와 관련된 단백질의 발현을 증가시키는 것을 확인함으로써, tRF-315 억제제는 암의 치료를 위한 보조제 및 시스플라틴과 같은 백금계 항암제의 효과를 증진시킬 수 있는 병용 투여제로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 전립선 정상, 암 세포주에서 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315의 발현 수준을 평가한 결과이다.

도 2는 전립선 암 세포주에서 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315의 모방체가 세포 증식에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 3은 전립선 암 세포주에서 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315의 모방체, 억제제가 세포자살(apoptosis)에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 4는 전립선 암 세포주에서 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315의 억제제 또는 시스플라틴에 의해 유도된 세포자살에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 5는 전립선 암 세포주에서 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315의 발현이 시스플라틴에 의해 유도된 미토콘드리아 기능 장애에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 6은 전립선 암 세포주에서 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315의 발현이 시스플라틴에 의해 유도된 세포 주기 조절에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 7은 암세포에서 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315가 시스플라틴으로 유도되는 항암 활성을 억제하는 메커니즘을 나타내는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0012] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일

반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0013] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명은 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315의 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제를 제공한다.

[0016] 상기 tRF는 tRNA 유래 단편(tRNA-derived fragments)으로 tRNA 절단을 통해 생성된 작은 비코딩 RNA로, 성숙 또는 전구체 tRNA의 5’ 또는 3’ 말단에서 유래된 sncRNA이다. 최근의 시퀀싱 기술의 발전으로 전립선 암, 유방암, 결장암 등을 포함하는 다양한 암에서 tRF의 발현 프로필을 확인할 수 있으며, tRF 발현 프로파일을 통해 특정 암을 진단하거나 치료 타겟으로 사용되고 있다.

[0017] 상기 tRF-315는 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편으로 서열번호 4로 표시되는 염기서열을 갖으며, 상기 tRF-315 억제제는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 갖는 RNA이다.

[0018] 상기 항암보조제는 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315의 억제제를 유효성분으로 포함하기 때문에 암세포의 세포자살(apoptosis)을 유도한다.

[0019] 상기 항암보조제는 백금계 항암제와 동시적 또는 순차적으로 투여할 수 있으며, 상기 백금계 항암제는 시스플라틴(cis-diamminedichloroplatinum [II]), 카보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 피코플라틴(picoplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 사트라플라틴(satraplatin) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 상기 항암보조제는 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직 암, 악성골암, 악성림프종, 악성중피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 윌름스암, 유방암, 삼중음성유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신융모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성 골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문근육종, 후두암, 흉막암, 혈액암 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 암을 예방 또는 치료하기 위한 것이다.

[0021] 또한, 본 발명은 tRF-315 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제 및 백금계 항암제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 병용 투여용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0023] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0025] 상기 약학적 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 외용제 형태로 제형화될 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제 (troches), 로젠지 (lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율, 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000 mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

[0029] 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실험예 및 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실험예 및 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실험예 및 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0031] **<실험예> 실험 재료 및 방법**

[0032] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0033] 1. 세포 배양

[0034] 모든 세포주는 American Type Culture Collection에서 구입하였다. WPMY1 세포는 5% FBS(fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지(Hyclone, Carlsbad, CA, USA)에서 배양되었다. RWPE1 세포는 0.05 mg/mL 소 뇌하수체 추출물(bovine pituitary extract) 및 5 ng/mL 표피 성장인자(epidermal growth factor)를 포함하는 Keratinocyte Serum Free Medium (Gibco, Waltham, MA, USA)에서 배양되었다. PC3, DU145, 및 LNCaP 세포는 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (100 U/mL)을 포함하는 RPMI-1640 배지(Hyclone)에서 배양되었다. 시스플라틴(cis-diamminedichloroplatinum)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0035] 2. tRF 감지

[0036] Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포에서 총 RNA를 추출하였다. 전체 RNA에서 tRF를 감지하기 위해서 DIG(digoxygenin)-표지 DNA프로브, splinted ligation, EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) 가교의 사용을 포함하는 miRNA 검출 방법을 변형하여 사용하였다. DIG-표지된 프로브는 5' 말단에서 인산염(phosphate)과 접합되고, 3' 말단에서 DIG가 접합되도록 고

정된 서열이다. 브리지 올리고뉴클레오티드(bridge oligonucleotide)는 DIG-표지 프로브와 tRF 모두에 상보적인 긴 DNA 서열이다. 실험에 사용된 DIG-표지 프로브의 서열과 tRF-315 및 miR-21에 사용된 브릿지 올리고뉴클레오티드는 다음과 같다: DIG-표지 프로브, 5'-(인산염) CGC TTA TGA CAT TC (DIG)-3' (서열번호 1); tRF-315 브릿지, 5'-GAA TGT CAT AAG CGC CAT GCT CTA CCG ACT GAG CTA GCC GGG C-3' (서열번호 2); miR-21 브릿지, 5'-GAA TGT CAT AAG CGT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA-3' (서열번호 3). 모든 올리고뉴클레오티드는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 합성되었다. 동일한 농도(0.1 μM)의 브릿지 올리고뉴클레오티드 및 프로브를 총 RNA와 혼합하였다. T4 DNA 리가아제를 혼합물에 첨가하여 닉(nick)을 매꾸고, 혼합물을 30℃에서 1시간 동안 배양하였다. RNA 로딩 완충액이 보충된 결찰(ligation) 반응 혼합물을 12.5% 우레아-폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하고 200V에서 30분 동안 전기영동하였다. 이후, RNA를 나일론 막으로 옮기고 막을 1-메틸이미다졸(Sigma-Aldrich) 및 EDC(Sigma-Aldrich)를 포함하는 가교 용액과 함께 60℃에서 2 시간 동안 배양하였다. DIG Wash and Block Buffer Set (Roche, Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 DIG 신호를 감지하였다.

[0037] 3. tRF에 대한 정량적 RT-PCR

[0038] miRNA 1st-strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 폴리아데닐화(polyadenylation) 반응을 수행하고, 총 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하였다. miRNA qPCR Master Mix (Agilent Technologies)를 사용하여 tRF의 발현을 측정하였다. PCR에 사용된 프라이머의 서열은 다음과 같다: tRF-315, 5'-GCC CGG CTA GCT CAG TCG GTA GAG CAT GG-3' (서열번호 4). 표준 곡선법 및 Ct(cycle threshold) 값을 이용하여 tRF-315의 발현 정도를 결정하고, U6 sncRNA 발현을 이용하여 tRF-315의 발현을 표준화하였다. tRF-315의 상대적 정량화는 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 방법으로 분석하였다.

[0039] 4. 형질전환

[0040] tRF-315에 대한 모방체 및 억제제는 Lipofectamine 2000을 사용하여 전립선 암 세포에 형질감염되었다. 간략하게, 세포(4 X 10^5 세포)를 6-웰 플레이트에 접종하였다. 그 후, 세포를 tRF-315 및 Lipofectamine 2000에 대한 모방체 및 억제제를 함유하는 Opti-MEM(Minimum Essential Media) 감소된 혈청 배지(Gibco)에서 배양하였다. 37℃에서 6 시간 동안 배양한 후, 세포를 시스플라틴으로 처리하였다. 사용된 tRF-315 모방체 및 억제제 서열은 다음과 같다: tRF-315 mimic, 5'-GCC CGG CUA GCU CAG UCG GUA GAG CAU GG-3' (서열번호 5) 및 tRF-315 inhibitor, 5'-CCA UGC UCU ACC GAC UGA GCU AGC CGG GC-3' (서열번호 6). 대조군 올리고뉴클레오티드(siCTR), 안지오제닌(angiogenin)에 대한 siRNA(siANG), 및 GADD45A에 대한 siRNA(siGADD45A)는 Bioneer에서 구입하였다.

[0041] 5. BrdU 통합 분석(Incorporation Analysis)

[0042] 세포 증식 ELISA BrdU kit (Roche)는 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 세포를 5 X 10^3 농도로 96 웰 플레이트에 접종하였다. 세포를 6 시간 동안 tRF-315 모방체로 형질감염 시킨 후, 48 시간 동안 시스플라틴으로 처리하였다. 배양 후, 10 μM BrdU를 세포 배양물에 첨가하고, 세포를 37℃에서 추가로 2 시간 동안 배양하였다. 세포를 BrdU로 표지한 후, 고정된 세포를 항-BrdU-과산화효소(PDO) 작업 용액과 함께 90분 동안 배양하였다. 항-BrdU-POD는 새로 합성된 세포 DNA에 통합된 BrdU에 결합하고, 생성된 면역 복합체는 3,30,5,50-TMB(Tetramethylbenzidine) 기질에 대한 반응에 의해 검출되었다. 반응 생성물의 흡광도 값은 ELISA 판독기를 사용하여 370 nm 및 492 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화하였다.

[0043] 6. Annexin V 및 Propidium Iodide 염색

[0044] 세포자살(apoptosis)를 분석하기 위해, Annexin V apoptosis detection kit I (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 세포(4 X 10^5 세포)를 6-웰 플레이트에 접종하였다. 그 후 세포를 6 시간 동안 tRF-315 모방체 또는 억제제로 형질감염 시킨 후, 48 시간 동안 시스플라틴으로 처리하였다. 배양 접시에서 상층액을 제거하고 트립신-EDTA를 사용하여 부착 세포를 분리하였다. 세포를 원심분리로 수집하고, PBS로 세척한 후, 1 X 결합 완충액으로 재현탁하였다. 그 후, 100 μL의 세포 현탁액을 5 mL 배양 튜브에 옮기고, 5 μL FITC Annexin V 및 5 μL PI를 처리하고 상온, 암실에서 15분 동안 배양하였다. 그 후, 400 μL의 1 X 결합 완충액을 5 mL 배양 튜브에 첨가하였다. 형광 광도는 유세포 분석기(BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다. 그래프는 사분면의 오른쪽 상단과 왼쪽 하단의 비율로 정량화되었다.

[0045] 7. 정량적 RT-PCR

[0046] 상보적 DNA는 총 RNA(1 μg)와 AccuPower® RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 합성되었다. 유전자 발현 수준은 SYBR® Green (Sigma-Aldrich) 및 StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 측정되었다. 표준 곡선과 CT 값을 사용하여 표적 유전자의 발현 수준을 결정하였다. PCR 조건은 95℃에서 3분, 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초를 40회 반복하였다. 연속 현광 측정과 함께 용융 곡선 프로그램(10초당 0.5℃의 속도로 온도를 55℃에서 95℃로 증가)을 사용하여 PCR 조건을 유지하였다. ROX 염료(Invitrogen)는 형광 측정을 위한 음성 대조군으로 사용되었다. 용융 곡선을 생성하여 서열 특정 제품을 식별하였다. 이때, CT 값은 형광 신호가 배경보다 통계적으로 더 큰 사이클 수를 나타내고, 상대 유전자 발현을 정량화 하였다. 대부분의 실험 조건에서 안정적인 GAPDH의 발현은 표적 유전자의 발현을 정상화하는 데에 사용되었다. PCR에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다: ANG, 5'-CAG CAC TAT GAT GCC AAA CC-3' (sense)(서열번호 7), 및 5'-GAT GTC TTT GCA GGG TGA GG-3' (antisense)(서열번호 8); TP53, 5'-GTC TTT GAA CCC TTG CTT GC-3' (sense)(서열번호 9), 및 5'-CCA CAA CAA AAC ACC AGT GC-3' (antisense)(서열번호 10); BAX, 5'-TTT GCT TCA GGG TTT CAT CC-3' (sense)(서열번호 11), 및 5'-ACA CTC GCT CAG CTT CTT GG-3' (antisense)(서열번호 12); GADD45A, 5'-GAG AGC AGA AGA CCG AAA GC-3' (sense)(서열번호 13), 및 5'-GGA TGT TGA TGT CGT TCT CG-3' (antisense)(서열번호 14).

[0047] 8. 웨스턴 블롯

[0048] 세포를 6 시간 동안 tRF-315 억제제로 형질감염 시키고, BSA(bovine serum albumin)를 표준으로 하는 Bradford 단백질 분석(Bio-Rad Hercules, CA, USA)을 사용하여 전체 세포 추출물의 단백질 농도를 분석하였다. 단백질을 변성시키고, SDS-PAGE(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 사용하여 분리하고, 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 블롯은 향상된 형광발광 검출(SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 분석하고, ChemiDoc EQ 시스템과 Quantity One 소프트웨어(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 자외선하에서 정확한 크기의 밴드에서 방출되는 빛의 강도를 측정하여 정량화하였다. 면역 반응성 단백질은 1:1000 희석 및 10% SDS-PAGE 겔에서 인-단백질 및 전체-단백질에 대한 염소 항-토끼 다중 항체를 사용하여 검출하였다. 총 단백질은 웨스턴 블롯팅의 결과를 정규화하기 위한 로딩 대조군으로 사용되었다. 사용된 모든 항체의 세부 정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0049]

1차 항체	희석	공급업체	카탈로그 번호
P53	1:1000	Cell Signaling Technology	2527
BAX	1:1000	Cell Signaling Technology	2772
BCL-2	1:1000	Cell Signaling Technology	2876
Phosphor-eIF2a	1:1000	Cell Signaling Technology	3398
eIF2a	1:1000	Cell Signaling Technology	5324
Cytochrome c	1:1000	Cell Signaling Technology	11940
TUBA	1:1000	Santa Cruz	sc-5286

[0050] 9. 미토콘드리아 막 전위 분석

[0051] 미토콘드리아 염색 키트(Sigma-Aldrich)를 사용하여 전립선 암 세포에서 MMP를 측정하였다. 세포(5×10^5 세포)를 6-웰 플레이트에 접종하였다. 세포를 6 시간 동안 tRF-315 모방체 또는 억제제로 형질감염시킨 후, 48 시간 동안 시스플라틴으로 처리하였다. 배양 접시에서 상층액을 제거하고 트립신-EDTA를 사용하여 부착 세포를 분리하였다. 세포를 원심분리를 통해 수집하고, 1X 염색 완충액에 200X JC-1을 함유하는 염색 용액을 재현탁하고, CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 20분 동안 배양하였다. 염색된 세포를 원심분리를 통해 수집하고, 1X JC-1 염색 완충액으로 1회 세척하였다. 세척 후, 세포 현탁액을 한 번 더 원심분리하고, 세포를 1 mL 염색 완충액에 재현탁시켰다. FACSCalibur 기기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다. 그래프는 오른쪽 아래/오른쪽 위 비율로 정량화되었다.

[0052] 10. 세포 주기 분석

[0053] 세포 주기는 RNase A (Sigma-Aldrich) 처리 및 PI(propidium iodide) 염색 후 유세포 분석에 의해 분석되었다. 세포(5×10^5 세포)를 6-웰 플레이트에 접종하고, 70% 컨플루언시(confluency)로 배양하였다. 세포를 6 시간 동안 tRF-315 모방체 또는 억제제로 형질감염시킨 후, 48 시간 동안 시스플라틴으로 처리하였다. 세포를 subG1,

G0/G1, S, 및 G2/M 단계로 나뉘었다.

[0054] 11. 통계 분석

[0055] 모든 결과의 통계적 유의성은 SAS 프로그램을 이용한 분산 분석을 통해 검증하였다. $p < 0.05$의 확률 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 데이터는 3개의 독립적인 실험에 대한 평균 표준편차(SD)로 표시되었다.

[0056] **실시예 1. 전립선 암에서의 tRF-315의 수준**

[0057] 정상 전립선 세포주(WPMY1 및 RWPE1)에서 tRF-315 발현 수준을 전립선암 세포주(LNCaP, DU145 및 PC3)와 비교하였다. 비방사성 DIG 표지 프로브의 사용을 포함하는 작은 RNA을 검출하였다. MiR-21은 우레아-폴리아크릴아마이드(urea-polyacrylamide) 겔에 로딩했을 때, RNA의 차이를 보정하기 위해 함께 검출되었다. 블로팅 결과, tRF-315 수준이 정상 전립선 세포보다 전립선 암 세포에서 더 높게 나타났다(도 1A). 블로팅의 부정확성을 보완하고 전립선 세포주에서 tRF-315의 발현을 정확하게 정량화하기 위해, 폴리아데닐화 반응을 수행한 후 합성된 cDNA를 이용하여 정량적 PCR를 수행하였다. tRF-315의 발현은 모든 전립선 세포주 중에서 DU145 세포(WPMY1 세포 대비 202.1±21.3배 증가)에서 가장 높은 것으로 나타났다(도 1B). LNCaP 및 PC3 세포에서 tRF-315의 발현은 정상 전립선 세포보다 높은 것으로 나타났다. LNCaP 및 DU145 세포를 사용하여 시스플라틴 처리시 tRF-315의 발현 변화를 측정하였다. tRF-315 발현은 LNCaP 세포에서 시스플라틴 처리 후 상승되는 것으로 나타났다(도 1C). 또한, 시스플라틴은 DU145 세포에서 tRF-315 발현의 증가를 유도했지만, 증가는 LNCaP 세포만큼 많지는 않았다. 전립선 암 세포에서 시스플라틴 처리시 tRF-315 발현의 증가도 정량적 PCR에 의해 확인되었다(도 1D). LNCaP 세포에서 시스플라틴은 대조군에 비해 tRF-315 발현을 2816.7±1215.2배($p < 0.001$) 증가시켰다. DU145 세포에서 tRF-315의 발현은 시스플라틴에 반응하여 약 4.4±1.9배($p < 0.001$) 증가하는 것으로 나타났다. LNCaP 및 DU145 세포에 siANG을 용량 의존적으로 형질감염시킨 후 ANG의 발현을 측정하여 효능을 확인하였다. 두 세포 모두에서 20 nM 보다 큰 siANG 농도는 ANG 발현을 유의하게 억제하는 것으로 나타났다(도 1E).

[0058] 그 후, siANG (20 nM)를 LNCaP 및 DU145 세포에 형질감염시켜 안지오제닌이 tRF-315의 생산에 영향을 미치는지 여부를 결정하였다. 블로팅 결과, tRF-315의 발현은 siANG로 형질감염된 LNCaP 및 DU145 세포에서 감소한 반면, miR-21의 발현은 영향을 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(도 1F). 정량적 PCR 결과에 따르면, siANG 형질감염은 LNCaP 및 DU145 세포에서 tRF-315의 발현을 유의하게 감소시켰다(도 1G). tRF-315의 발현은 siANG-형질감염 LNCaP 및 DU145 세포에서 각각 41.0±13.2% ($p < 0.01$) 및 22.0±6.8% ($p < 0.01$) 감소하는 것으로 나타났다. 상기 결과는 tRF-315가 정상 전립선 세포보다 전립선 암 세포에서 상대적으로 풍부하게 발현되며, 시스플라틴에 의한 세포 스트레스에 의해 tRF-315의 발현이 증가될 수 있음을 입증한다.

[0059] **실시예 2. tRF-315 모방체가 전립선 암 세포의 증식 및 사멸에 미치는 영향**

[0060] tRF-315의 조절에 따라 전립선 암 세포의 특성 변화를 검증하기 위해, tRF-315 모방체를 설계하여 형질감염을 수행하였다. 블롯팅 결과는 LNCaP 및 DU145 세포에서 tRF-315 모방체가 tRF-315 프로브에 대한 DIG 신호의 강도를 증가시키는 것으로 나타났다(도 2A). 상기 결과는 정량적 PCR의 결과와 유사하게 나타났다(LNCaP 세포에서 509.1±139.0배 증가 및 DU145 세포에서 2,551,495.3±132,817.6배 증가)(도 2B). 먼저 tRF-315 모방체로 형질감염이 시스플라틴에 의해 감소된 전립선 암 세포의 증식 능력에 영향을 미치는지 여부를 검사하였다. 그 결과 tRF-315 모방체는 LNCaP 및 DU14 세포의 증식에 영향을 미치지 않았다(도 2C).

[0061] 또한, annexin V 및 PI 염색을 사용하여 tRF-315가 전립선암 세포자살에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해, 시스플라틴으로 처리된 세포에 tRF-315 모방체로 형질감염시키고, 세포자살 비율을 조사하였다. 그 결과 tRF-315 모방체가 LNCaP(9.5±0.3%, $p < 0.01$) 및 DU145(8.5±1.1%, $p < 0.01$) 세포의 세포자살을 억제하는 것으로 나타났다(도 3A). 또한, 시스플라틴-유도된 세포자살 증가는 tRF-315 모방체로 형질감염된 세포에서 완화되었다. LNCaP 세포에서 tRf-315 모방체 형질감염은 시스플라틴 단독 처리한 경우와 비교하여 세포자살로 진행된 세포의 수를 감소시켰다. DU145 세포에서 tRF-315 모방체는 시스플라틴에 의해 유도된 세포자살을 감소시켰다. 또한, tRF-315 억제제 단독 처리는 LNCaP 및 DU145 세포의 세포자살을 유도했으며, 이는 시스플라틴 처리시 추가로 증가되었다(LNCaP 세포에서 47.5±1.3% 및 DU145 세포에서 37.6±1.2%)(도 3B). 상기 결과는 tRF-315가 전립선 암 세포의 증식을 조절하는 경로와 무관하지만 시스플라틴에 의해 유도된 세포자살을 억제하는 것을 입증한다.

[0062] **실시예 3. tRF-315의 발현이 시스플라틴에 의해 유도된 세포자살 경로에 미치는 영향**

[0063] tRF-315 억제제 단독으로 전립선암 세포에서 세포자살을 유도할 수 있으므로, tRF-315의 억제가 세포자살 경로에 속하는 단백질의 발현에 영향을 미치는지 평가하였다. P53은 암세포에서 사포사멸 경로를 담당하는 중심 단

백질로 전립선 암 세포에서 시스플라틴에 의해 유도되는 것으로 보고되었다. LNCaP 세포는 야생형 P53을 발현하는 반면, DU145 세포는 돌연변이 형태의 P53을 발현하는 것으로 보고되었다. LNCaP 및 DU145 세포에서 tRF-315 억제제는 시스플라틴에 의해 유도된 P53의 mRNA 수준을 향상시키는 것으로 나타났다(대조군에 비해 LNCaP 세포에서 7.5±0.2배 증가, DU145 세포에서 40.1±7.7배 증가)(도 4A). 또한, LNCaP 및 DU145 세포에서 시스플라틴 존재 하에 tRF-315 억제제에 의해 P53의 다운 스트림 단백질이자 세포자살 촉진 단백질인 BAX의 mRNA 수준이 증가하는 것으로 나타났다(대조군과 비교하여 LNCaP 세포에서 11.2±0.3배 증가 및 DU145 세포에서 5.9±0.7배 증가)(도 4B). 웨스턴 블롯팅 분석 결과, tRF-315 억제제가 DU145(40 nM에서 5.9±0.2배, $p < 0.001$) 및 LNCaP(40 nM에서 2.0±0.1배, $p < 0.001$) 세포에서 P53의 발현을 용량 의존적으로 증가시키는 것으로 나타났다(도 4C). BAX 단백질의 발현이 증가한 반면(40 nM에서 LNCaP 세포에서 1.6±0.2배 증가 및 DU145 세포에서 3.5±0.3배 증가), 항-세포자살 단백질 BCL-2의 발현은 tRF-315 억제제에 의해 감소되었다(40 nM에서 LNCaP 세포에서 38.7±3.6% 감소 및 DU145 세포에서 45.2±4.8% 감소)(도 4D, E). eIF2α의 인산화는 P53 및 BAX 안정화 및 미토콘드리아로의 전위 억제를 통해 스트레스 유발 세포자살로부터 보호하는 것으로 보고되었다. 반면, 암세포에서 eIF2α의 과도한 활성화는 소포체(ER) 스트레스 매개 세포자살을 상징한다. LNCaP 및 DU145 세포에서 tRF-315 억제제는 eIF2α의 인산화를 유도하였다(40 nM에서 LNCaP 세포에서 1.6±0.1배 증가 및 DU145 세포에서 1.7±0.1배 증가). 이는 tRF-315 자체의 억제가 세포 스트레스를 유발하여 전립선 암 세포에서 세포자살 경로의 활성화를 유도할 수 있음을 입증한다(도 4F). 마지막으로 미토콘드리아 의존적 세포자살에 관여하는 시토크롬 C의 발현을 확인하였다. tRF-315 억제제가 LNCaP(40 nM에서 1.7±0.1배, $p < 0.001$) 및 DU145(40 nM에서 2.3±0.1배, $p < 0.01$) 세포에서 사이토크롬 C의 발현을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다(도 4G). 상기 결과는 tRF-315의 억제가 전립선 암 세포에서 P53 및 미토콘드리아 의존성 세포자살을 유도하는 것을 입증한다.

[0064] **실시예 4. 전립선 암세포에서 tRF-315가 시스플라틴에 의해 유도된 미토콘드리아 기능 장애에 미치는 영향**

[0065] tRF-315가 전립선 암 세포의 세포자살 과정에서 미토콘드리아 기능 장애에 관여하는지 여부를 평가하였다. 시스플라틴 처리는 LNCaP 및 DU145 세포에서 미토콘드리아 막 전위(MMP)를 유의하게 감소시켰다(도 5). 그러나 두 세포 모두에서 tRF-315의 형질감염시, 시스플라틴-유도 미토콘드리아 탈분극이 완화되는 것으로 나타났다. LNCaP 세포에서 tRF-315 모방체는 시스플라틴에 의해 유도된 MMP 손실을 약 32.5±4.2% ($p < 0.05$) 감소시켰다. DU145 세포에서 tRF-315 모방체는 시스플라틴으로 유도된 MMP 손실을 20.3 ± 4.6% ($p < 0.05$) 감소시켰다. 대조적으로, tRF-315 억제제는 LNCaP(대조군에 비해 2.0±0.1배, $p < 0.001$) 및 DU145(대조군에 비해 5.1±0.2배, $p < 0.001$) 세포에서 시스플라틴 처리에 의해 증가된 MMP 손실을 더 향상시키는 것으로 나타났다. 상기 결과는 tRF-315가 시스플라틴에 의해 유도된 미토콘드리아 의존성 세포자살에 대한 보호 효과를 가질 수 있음을 입증한다.

[0066] **실시예 5. 전립선 암세포에서 tRF-315가 시스플라틴에 의해 유도된 세포 주기 조절에 미치는 영향**

[0067] miRNA와 유사하게 tRF는 표적 유전자의 전사 조절에 관여한다. miRNA 데이터베이스를 기반으로 tRF-315가 표적화할 수 있는 유전자를 선택하였다. 이 중 종양 억제 유전자로 알려진 P53에 의해 자극되는 GADD45A(growth arrest and DNA damage 45 alpha) 유전자의 발현이 tRF-315에 의해 유도되는 변화를 확인하였다. 시스플라틴은 LNCaP(2.8±0.2배, $p < 0.001$) 및 DU145(1.2±0.1배, $p < 0.05$) 세포에서 GADD45A의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다(도 6A). LNCaP 및 DU145 세포에 형질감염되는 siGADD45A의 용량 의존적으로 GADD45A의 발현이 감소되는 것으로 나타났다(도 6B). GADD45A는 주로 세포 주기를 조절하여 게놈 안정성을 유지하고 세포자살 동안 BAX 발현을 유도하여 미토콘드리아 기능 장애를 유발한다. LNCaP(35.1±0.1%, $p < 0.05$) 및 DU145(54.3±2.8%, $p < 0.05$) 세포에서 BAX 발현의 시스플라틴 매개 증가는 siGADD45A에 의해 완화되는 것을 확인하였다(도 6C). 또한, 세포 주기 분석은 시스플라틴 처리 후 관찰된 subG1 단계의 세포 비율이 LNCaP에서는 siGADD45A의 형질감염 시 감소했지만, DU145 세포에서는 감소하지 않는 것으로 나타났다(도 6D). LNCaP 세포에서 subG1 단계의 세포 비율은 시스플라틴 처리시 42.25±2.4%로 증가하였으며, siGADD45A로 세포를 형질감염시키자 33.51±1.8% ($p < 0.05$) 로 감소하였다. 시스플라틴으로 처리된 DU145 세포에서 siGADD45A 형질감염은 subG1 단계의 세포 비율을 14.38±0.7%에서 12.92±0.5%로 감소시켰다. 상기 결과는 tRF-315가 시스플라틴에 의해 유도된 미토콘드리아 의존적 세포자살 동안 GADD45A의 발현을 억제시킴으로써, 전립선 암 세포를 보호한다는 것을 입증한다.

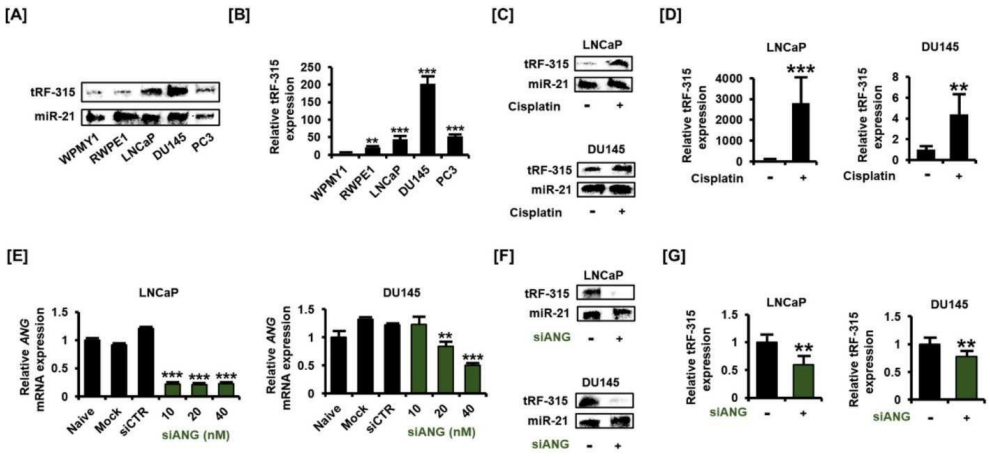
[0068] 결론적으로 상기 결과들은 도 7에 나타난 바와 같이 $tRNA^{Lys}$에서 파생된 단편인 tRF-315가 암세포에서 시스플라틴에 의한 세포자살을 예방하고, 미토콘드리아 장애를 완화시키는 것을 확인하였으며, tRF-315 억제제는 암세포에서 세포자살과 관련된 단백질의 발현을 증가시켜 암세포를 사멸시키는 것을 입증하므로, tRF-315 억제제가 암의 치료를 위한 보조제 및 시스플라틴과 같은 백금계 항암제의 효과를 증진시킬 수 있는 병용 투여제로 제공될

수 있음을 입증한다.

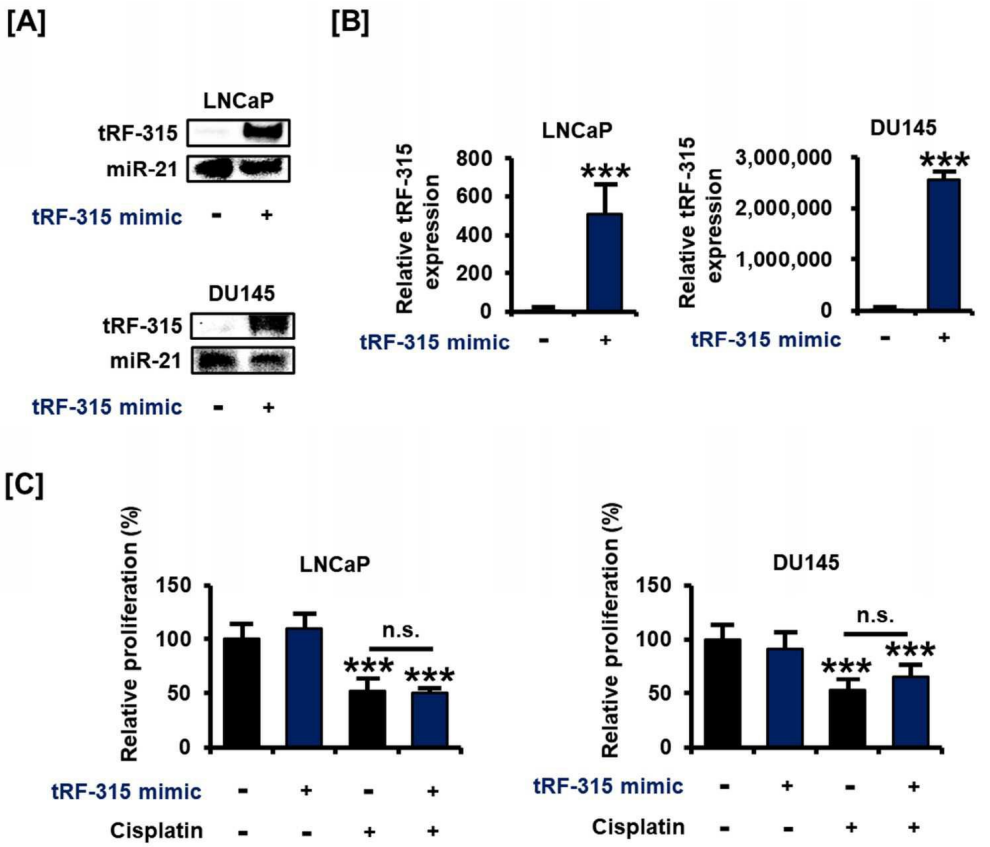
[0069] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

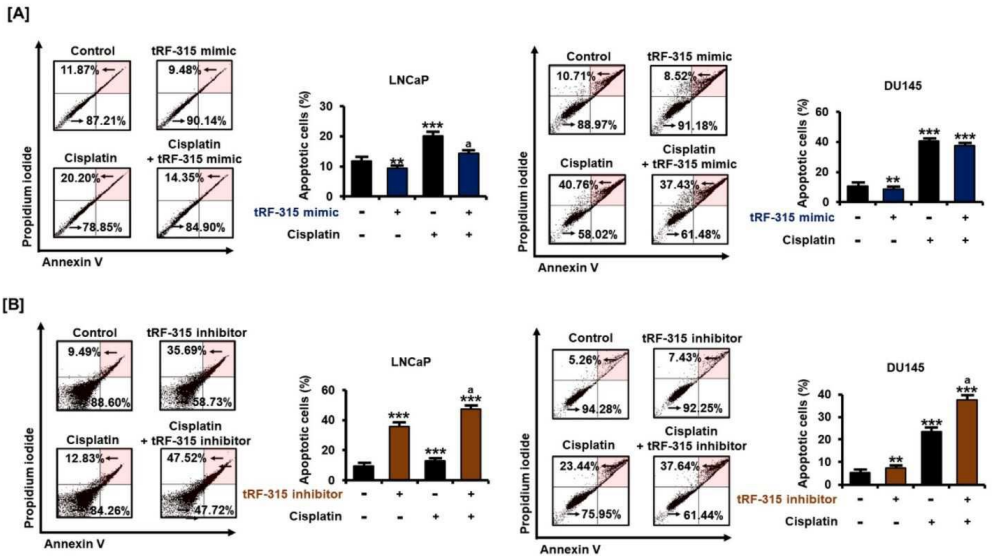
도면1



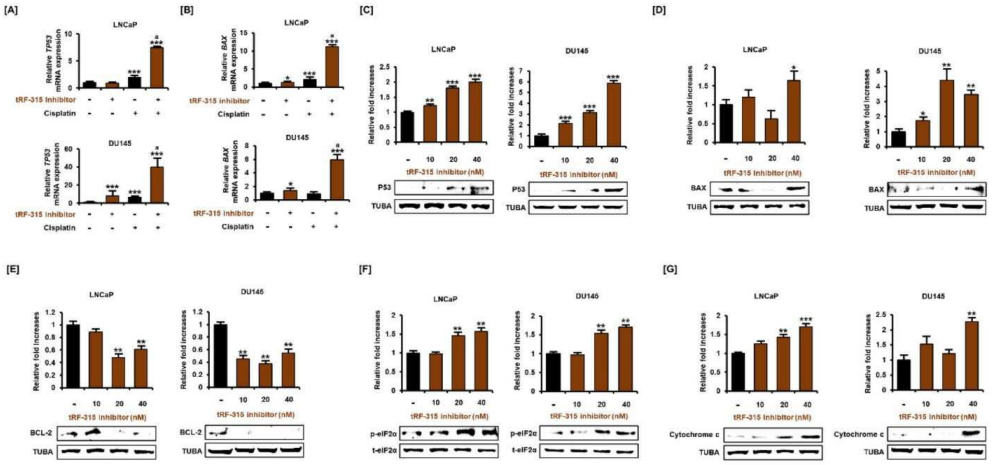
도면2



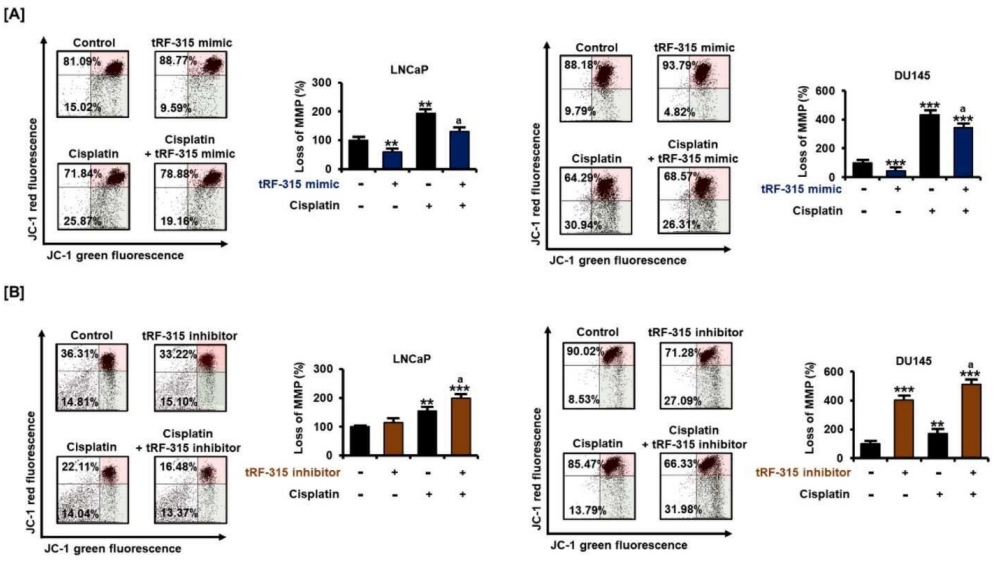
도면3


[A]
Control
tRF-315 mimic
11.87%
9.48%
87.21%
90.14%
Cisplatin
Cisplatin + tRF-315 mimic
20.20%
14.35%
78.85%
84.90%
Propidium Iodide
Annexin V
LNCaP
Apoptotic cells (%)
tRF-315 mimic
Cisplatin
DU145
10.71%
8.52%
88.97%
91.18%
40.76%
37.43%
58.02%
61.48%
[B]
tRF-315 inhibitor
9.49%
35.69%
88.60%
58.73%
12.83%
47.52%
84.26%
47.72%
5.26%
7.43%
94.28%
92.25%
23.44%
37.64%
75.95%
61.44%

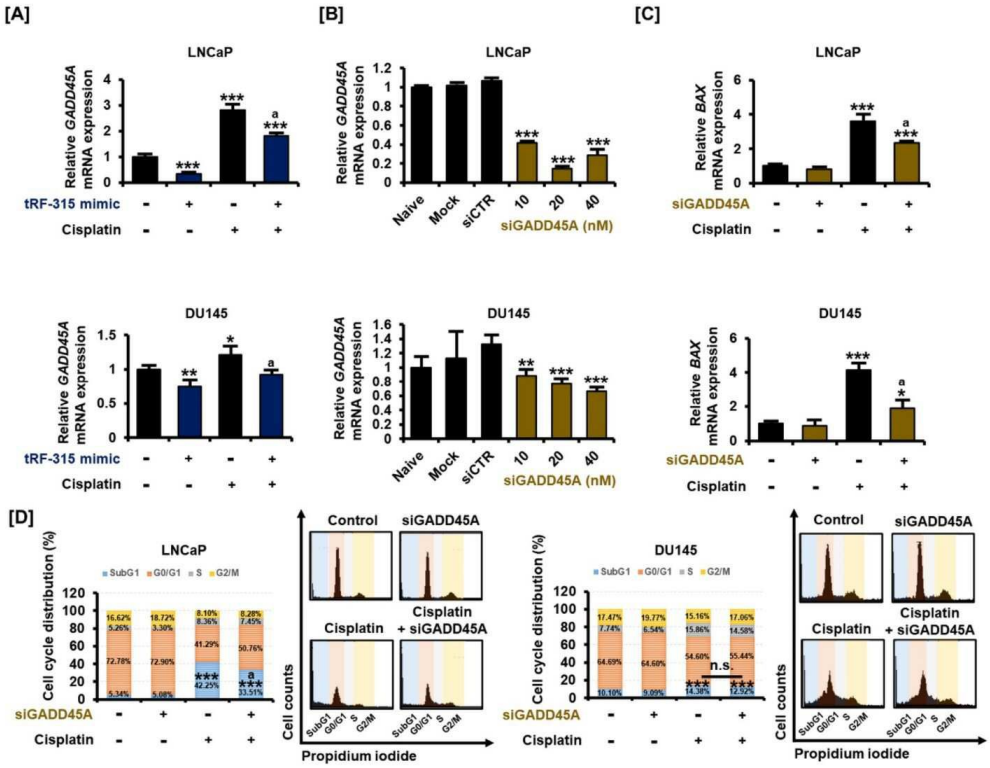
도면4


[A]
[B]
[C]
[D]
[E]
[F]
[G]
LNCaP
DU145
tRF-315 inhibitor (nM)
Cisplatin
TUBA
P53
BAX
BCL-2
p-eIF2α
t-eIF2α
Cytochrome c

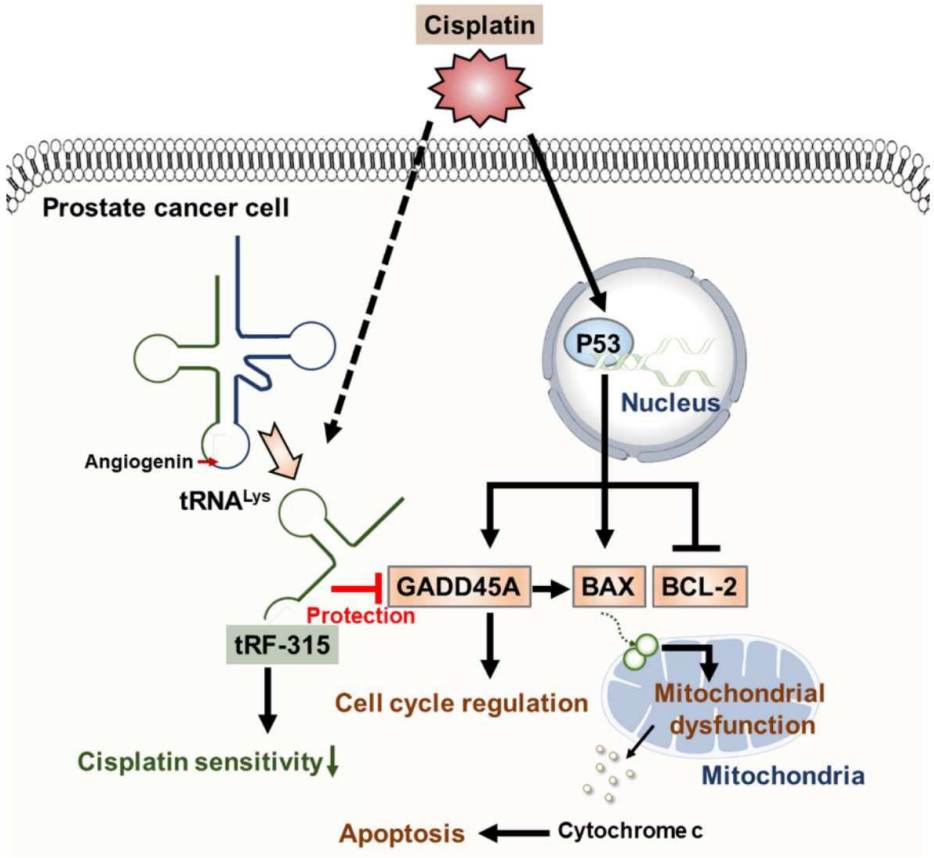
도면5


[A]
Control
tRF-315 mimic
81.09%
88.77%
15.02%
9.59%
Cisplatin
Cisplatin + tRF-315 mimic
71.84%
78.88%
25.87%
19.16%
JC-1 red fluorescence
JC-1 green fluorescence
LNCaP
Loss of MMP (%)
tRF-315 mimic
Cisplatin
DU145
88.18%
93.79%
9.79%
4.82%
64.29%
68.57%
30.94%
26.31%
[B]
tRF-315 inhibitor
36.31%
33.22%
14.81%
15.10%
22.11%
16.48%
14.04%
13.37%
90.02%
71.28%
8.53%
27.09%
85.47%
66.33%
13.79%
31.98%

도면6


[A]
[B]
[C]
LNCaP
DU145
Relative GADD45A mRNA expression
Relative BAX mRNA expression
tRF-315 mimic
Cisplatin
siGADD45A
Naive
Mock
siCTR
siGADD45A (nM)
[D]
Cell cycle distribution (%)
SubG1
G0/G1
S
G2/M
Control
siGADD45A
Cisplatin
Cisplatin + siGADD45A
Cell counts
Propidium iodide
n.s.

도면7


Cisplatin
Prostate cancer cell
P53
Nucleus
Angiogenin
tRNALys
GADD45A
BAX
BCL-2
Protection
tRF-315
Cell cycle regulation
Mitochondrial dysfunction
Mitochondria
Cisplatin sensitivity
Apoptosis
Cytochrome c

서 열 목 록

<110> Kookmin University Industry Academy Cooperation Foundation
Korea University

<120> Adjuvant for anti-cancer comprising tRF-315 inhibitor as an active ingredient

<130> ADP-2021-0364

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DIG-labeled probe

<400> 1

cgcttatgac attc 14

<210> 2

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tRF-315 bridge

<400> 2

gaatgtcata agcgccatgc tctaccgact gagctagccg ggc 43

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-21 bridge

<400> 3

gaatgtcata agcgtcaaca tcagtctgat aagcta 36

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tRF-315

<400> 4

gcccggctag ctcagtcggt agagcatgg 29

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tRF-315 mimic

<400> 5

gcccggcuag cucagucggu agagcaugg 29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tRF-315 inhibitor

<400> 6

ccaugcucua ccgacugagc uagccgggc 29

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANG-f

<400> 7

cagcactatg atgccaaacc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANG-r

<400> 8

gatgtctttg cagggtgagg 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TP53-f

<400> 9

gtctttgaac ccttgcttgc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TP53-r

<400> 10

ccacaacaaa acaccagtgc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BAX-f

<400> 11

tttgcttcag ggtttcatcc 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BAX-r

<400> 12

acactcgctc agcttcttgg 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GADD45A-f

<400> 13

gagagcagaa gaccgaaagc 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GADD45A-r

<400> 14

ggatgttgat gtcgttctcg 20