(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0013942
(43) 공개일자 2024년01월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2024.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0090440
(22) 출원일자 2022년07월21일
심사청구일자 2022년07월21일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
이재선
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 22동 106호(서초동, 삼풍아파트)
강동희
대전광역시 유성구 도안대로 560, 110동 504호(봉명동, 도안마을1단지)
백유림
인천광역시 부평구 장제로 150, A동 1208호(부평동, 유진마젤란아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

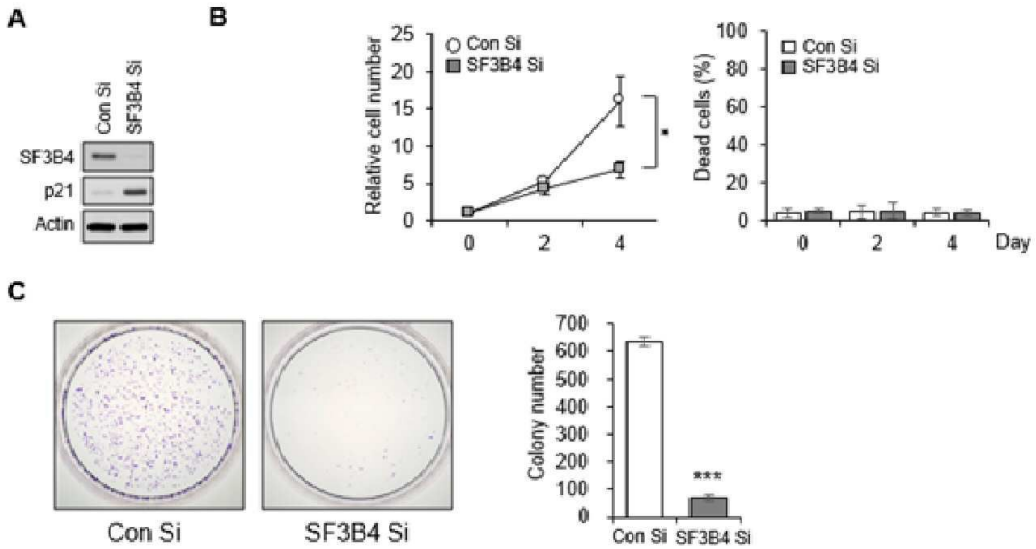
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 포함하는 세포 노화 유도용 조성물 및 이를 이용한 세포 노화 유도 방법**

(57) 요 약

본 발명은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 포함하는 세포 노화 유도용 조성물 및 이를 이용한 세포 노화 유도 방법에 대한 것으로서, SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화되는 단백질을 억제함에 따라 유방암의 세포증식이 억제되며, 세포 집락 형성 능력이 떨어지는 효과를 가질 뿐만 아니라, 유방암의 세포를 노화시키는 효과를 확인하여 세포 노화 유도용 조성물 또는 유방암 예방 또는 치료용 약학 조성물로 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711165545
과제번호 2020R1A2B5B02002375
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 세포사멸/세포증식과 차별화되는 암세포 노화에서의 p53과 AKT의 기능 연구
기 여 율 50/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711155499
과제번호 2021R1A5A2031612
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 세포교신 제어 연구센터
기 여 율 50/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 암세포 노화 유도용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 SF3B4 유전자는 서열번호 1로 표시되는 mRNA 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 SF3B4 유전자가 암호화하는 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 발현 억제제는 SF3B4 유전자 또는 이를 암호화하는 단백질에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 작은 간섭 RNA는 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 p21 단백질의 발현을 증가시키거나 암세포 증식을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 암세포는 유방암, 폐암, 췌장암, 전립선암 및 난소암으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 유방암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 유방암 개선을 위한 항암 보조제.

청구항 10

청구항 1에 따른 암세포 노화 유도용 조성물을 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포 노화 유도 방법.

청구항 11

인간으로부터 분리된 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

상기 후보물질 처리 전후의 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및

상기 후보물질 처리 전과 비교하여 처리 후 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제되는 물질을 확인하는 단계를 포함하는 암세포 노화 유도 물질 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 포함하는 세포 노화 유도용 조성물 및 이를 이용한 세포 노화 유도 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 종양세포 조기 노화는 스트레스-유도 조기 노화라고도 하며, 다양한 자극에 의해 종양세포에서 발생하는 노화를 의미한다. 종양세포는 일정한 횟수만큼만 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 되었고 이를 스트레스-유도 조기 노화(stress-induced premature senescence)라 한다. 종양세포의 노화를 유도할 수 있는 스트레스원으로는 유전적 독성 화학물질(예, 에토포시드, 시클로포스파미드), 방사선, 자외선 등이 보고되었다. 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.

[0003] 유전자의 발현을 억제하는 기술은 질병치료를 위한 치료제 개발 및 표적 검증에서 중요한 도구이다. 간섭 RNA(RNA interference, 이하 RNAi라고 한다)는 그 역할이 발견된 이후로, 다양한 종류의 포유동물세포(mammalian cell)에서 서열 특이적 mRNA에 작용한다는 사실이 밝혀졌다. RNAi는 21 내지 25개의 뉴클레오타이드 크기의 이중나선구조를 가진 작은 간섭 리보핵산 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA, 이하 siRNA라고 한다)이 상보적인 서열을 가지는 전사체(mRNA transcript)에 특이적으로 결합하여 해당 전사체를 분해함으로써 특정 단백질의 발현을 억제하는 현상이다. 세포 내에서는 RNA 이중가닥이 다이서(Dicer)라는 엔도뉴클라아제(endonuclease)에 의해 프로세싱되어 21 내지 23개의 이중가닥(base pair,bp)의 siRNA로 변환되며, siRNA 는 RISC(RNA-induced silencingcomplex)에 결합하여 가이드(안티센스) 가닥이 타겟 mRNA를 인식하여 분해하는 과정을 통해 타겟 유전자의 발현을 서열 특이적으로 저해한다. 베르트랑(Bertrand) 연구진에 따르면 동일한 타겟 유전자에 대한 siRNA가 안티센스 올리고뉴클레오티드(Antisense oligonucleotide, ASO)에 비하여 생체 내/외(invitro 및 in vivo)에서 mRNA 발현의 저해효과가 뛰어나고, 해당 효과가 오랫동안 지속되는 효과를 포함하는 것으로 밝혀졌다. siRNA를 포함하는 RNAi 기술 기반 치료제 시장은 향후 세계 시장규모가 2020년경에 총 12조원 이상을 형성하는 것으로 분석되었으며, 해당 기술을 적용할 수 있는 대상이 획기적으로 확대되어 기존의 항체, 화합물 기반 의약품으로 치료하기 어려운 질병을 치료할 수 있는 차세대 유전자 치료기술로 평가되고 있다. 또한 siRNA의 작용 기작은 타겟 mRNA와 상보적으로 결합하여 서열 특이적으로 타겟 유전자의 발현을 조절하기 때문에, 기존의 항체 기반 의약품이나 화학물질(small molecule drug)이 특정한 단백질 표적에 최적화되기까지 오랜 개발 기간 및 개발 비용이 소요되는 것에 비하여, 적용할 수 있는 대상이 획기적으로 확대될 수 있고, 개발 기간이 단축되면서, 의약화가 불가능한 표적 물질을 포함한 모든 단백질 표적에 대하여 최적화된 리드 화합물을 개발할 수 있다는 장점을 가진다. 이에, 최근 이 리보핵산 매개 간섭현상이 기존의 화학합성 의약 개발에서 발

생되는 문제의 해결책을 제시하면서 전사체 수준에서 특정 단백질의 발현을 선택적으로 억제하여 각종 질병 치료제, 특히 종양 치료제 개발에 이용하려는 연구가 진행되고 있다.

[0004] 따라서, SF3B4 유전자 또는 상기 유전자를 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 이용하여 세포 노화를 유도시켜 암세포를 노화시키는 기술이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) 1. ANTICANCER RESEARCH 40: 2033-2042

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 암세포 노화 유도용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 유방암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 유방암 개선을 위한 항암 보조제를 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 암세포 노화 유도용 조성물을 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포 노화 유도 방법을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 인간으로부터 분리된 시료에 후보물질을 처리하는 단계; 상기 후보물질 처리 전후의 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및 상기 후보물질 처리 전과 비교하여 처리 후 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제되는 물질을 확인하는 단계를 포함하는 암세포 노화 유도 물질 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 암세포 노화 유도용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 유방암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 유방암 개선을 위한 항암 보조제를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 암세포 노화 유도용 조성물을 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포 노화 유도 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 인간으로부터 분리된 시료에 후보물질을 처리하는 단계; 상기 후보물질 처리 전후의 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및 상기 후보물질 처리 전과 비교하여 처리 후 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제되는 물질을 확인하는 단계를 포함하는 암세포 노화 유도 물질 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 억제제를 포함하는 세포 노화 유도용 조성물 및 이를 이용한 세포 노화 유도 방법에 대한 것으로서, SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화되는 단백질을 억제함에 따라 유방암의 세포증식이 억제되며, 세포 집락 형성 능력이 떨어지는 효과를 가질 뿐만 아니라, 유방암의 세포를 노화시킬 수 있어서 세포 노화 유도용 조성물 또는 유방암 예방 또는 치료용 약학 조성물로 활

용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 유방암 세포주 MCF7에 SF3B4 억제제 처리 후 세포 수 측정 및 세포 집락 형성 능력을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 유방암 세포주 MCF7에 SF3B4 억제제 처리 후 세포 노화 연관 베타 갈라토시다아제 염색법을 통해 유방암 세포 노화 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 유방암 세포주 MCF7에 SF3B4 억제제와 SF3B3 억제제를 각각 처리 후 세포 노화 유도 여부 및 차이점을 비교 실험한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 암세포 노화 유도용 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 SF3B4 유전자는 서열번호 1로 표시되는 mRNA 염기서열로 이루어질 수 있다.

[0022] [서열번호 1]

[0023] AGAAGGCGGAACCGCTGCTGGGAGACGGCGGGATCTCTTTCGCCATGGCTGCCGGGCCGATCTCCGAGCGGAATCAGGATGCCACTGTGTACGTGGGGGGCC
TGGATGAGAAGGTTAGTGAACCGCTGCTGTGGGAACTGTTTCTCCAGGCTGGACCAGTAGTCAACACCCACATGCCAAAGGATAGAGTCACTGGCCAGCACC
AAGGCTATGGCTTTGTGGAATTCTTGAGTGAGGAAGATGCTGACTATGCCATTAAGATCATGAACATGATCAAACTCTATGGGAAGCCAATACGGGTGAACA
AAGCATCAGCTCACAACAAAAACCTGGATGTAGGGGCCAACATTTTCATTGGGAACCTGGACCCTGAGATTGATGAGAAGTTGCTTTATGATACTTTCAGCG
CCTTTGGGGTCATCTTACAAACCCCCAAAATTATGCGGGACCCTGACACAGGCAACTCCAAAGGTTATGCCTTTATTAATTTTGCTTCATTTGATGCTTCGG
ATGCAGCAATTGAAGCCATGAATGGGCAGTACCTCTGTAACCGTCCTATCACCGTATCTTATGCCTTCAAGAAGGACTCCAAGGGTGAGCGCCATGGCTCAG
CAGCCGAACGACTTCTGGCAGCTCAGAACCCGCTCTCCCAGGCTGATCGCCCTCATCAGCTGTTTGCAGATGCACCTCCTCCACCCTCTGCTCCCAATCCTG
TGGTATCATCATTGGGGTCTGGGCTTCCTCCACCAGGCATGCCTCCTCCTGGCTCCTTCCCACCCCCAGTGCCACCTCCTGGAGCCCTCCCACCTGGGATAC
CCCCAGCCATGCCCCCACCACCTATGCCTCCTGGGGCTGCAGGACATGGCCCCCCATCGGCAGGAACCCCAGGGGCAGGACATCCTGGTCATGGACACTCAC
ATCCTCACCCATTCCCACCGGGTGGGATGCCCCATCCAGGGATGTCTCAGATGCAGCTTGCACACCATGGCCCTCATGGCTTAGGACATCCCCACGCTGGAC
CCCCAGGCTCTGGGGGCCAGCCACCGCCCCGACCACCACCTGGAATGCCTCATCCTGGACCTCCTCCAATGGGCATGCCCCCCCGAGGGCCTCCATTCGGAT
CTCCCATGGGTCACCCAGGTCCTATGCCTCCGCATGGTATGCGTGGACCTCCTCCACTGATGCCCCCCCCATGGATACACTGGCCCTCCACGACCCCCACCCT
ATGGCTACCAGCGGGGGCCTCTCCCTCCACCCAGACCCACTCCCCGGCCACCAGTTCCCCCTCGAGGCCCACTTCGAGGCCCTCTCCCTCAGTAAATTCACA
TTTTCCTTCCTCCTGTTACATTTTCCCAATATCTTTTCTATTCCTTGGACCAATCAGAGATGCTGTAGCTCCTTGGGGCAAAGGTACTAATCCCTTTCAGCA
CCCCCACTCCATTCCCCTTTTTAATGTAACTTTTTCCACAGGAGGTATTTCTTTTTTATGTTGGTCCTGAGTATTTTGCAAATGCACAGAGAAAATAAAACT
AAACTCCTTGTTTA

[0024] 상기 SF3B4 유전자가 암호화하는 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산으로 이루어질 수 있다.

[0025] [서열번호 2]

[0026] MAAGPISERNQDATVYVGGLDEKVSEPLLWELFLQAGPVVNTHMPKDRVTGQHQGYGFVEFLSEEDADYAIKIMNMIKLYGKPIRVNKASAHNKNLDVGANI
FIGNLDPEIDEKLLYDTFSAFGVILQTPKIMRDPDTGNSKGYAFINFASFDASDAAIEAMNGQYLCNRPITVSYAFKKDSKGERHGSAAERLLAAQNPLSQA
DRPHQLFADAPPPPSAPNPVVSSLGSGLPPPGMPPPGSFPPPVPPPGALPPGIPPAMPPPPMPPGAAGHGPPSAGTPGAGHPGHGHSHPHPFPPGGMPHPGM
SQMQLAHHGPHGLGHPHAGPPGSGGQPPPRPPPGMPHPGPPPMGMPPRGPPPFGSPMGHPGPMPPHGMRGPPPLMPPHGYTGPPRPPPYGYQRGPLPPPRPTP
RPPVPPRGPLRGPLPQ

[0027] 상기 발현 억제제는 SF3B4 유전자 또는 이를 암호화하는 단백질에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 상기 작은 간섭 RNA는 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.

[0029] [서열번호 4]

[0030] 5'-GCACCAAGGCUAUGGCUUU(dTdT)-3'

[0031] 상기 조성물은 p21 단백질의 발현을 증가시키거나 암세포 증식을 감소시킬 수 있다.

[0032] 상기 암세포는 유방암, 폐암, 췌장암, 전립선암 및 난소암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 또한, 본 발명은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 유방암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01 mg/kg 내지 200 mg/kg, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0037] 또한, 본 발명은 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 유방암 개선을 위한 항암 보조제를 제공한다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 항암치료 보조제는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 인체에 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 조성물은 또한 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 상기 조성물은 항암 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있으며, 이런 담체로 생리학적 식염수를 예로 들 수 있다.

[0039] 본 발명의 항암치료용 조성물은 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "치료학적으로 유효한(therapeutically effective amount)"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량은 병용되는 항암요법의 종류, 질병의 중증도, 연령, 성별, 투여 시간, 투여경로 및 배출 비율, 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예컨대 성인기준으로 1회 1mg 내지 500mg의 본 발명의 항암치료 보조제를 투여할 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 암세포 노화 유도용 조성물을 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포 노화 유도 방법을 제공한다.

[0043] 또한, 본 발명은 인간으로부터 분리된 시료에 후보물질을 처리하는 단계; 상기 후보물질 처리 전후의 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및 상기 후보물질 처리 전과 비교하여 처리 후 SF3B4 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제되는 물질을 확인하는 단계를 포함하는 암세포 노화 유도 물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0045] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0047] **<실험 예 1> 웨스턴 블로팅(Western blotting)**

[0048] 지름이 60mm인 배양접시에서 인간 유방암 세포 MCF7에 siRNA를 형질 주입하고 2일 동안 배양하였다. 배양된 인간 유방암 세포 MCF7의 배지에 있는 세포와 배양접시에 있는 세포를 모두 회수하였다. 모은 세포는 RIPA 완충용액(5M 염화나트륨, 10% Triton X-100, 디옥시콜린산, 10% SDS, 1.5M Tris-HCl pH8.0, 0.5M EDTA, H_2O)를 넣고 세포를 깨어 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bradford 분석으로 정량한 후 SDS-PAGE 겔로 분리하였다. 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스막에 이동시키고, 각 단백질에 특이적인 1차 항체와 2차 항체를 순서대로 붙였다. TBST로 워싱 후, ECL 시약(ThermoScientific)으로 단백질 양을 확인하였다.

[0050] **<실험 예 2> 세포 수 측정(Cell counting)**

[0051] SF3B4가 세포 생장에 미치는 영향을 확인하기 위해, 세포 수 측정 실험을 수행하였다. 트리판 블루로 염색이 되지 않는 살아 있는 세포와 트리판 블루로 염색이 되는 죽은 세포는 트리판 블루 염색 가부로 구분하였다. 인간 유방암 세포 MCF7에 siRNA를 형질 주입하고 2일 또는 4일 배양하였다. 2일 또는 4일에 배지에 있는 세포를 회수하고 배양 접시에 부착된 세포는 트립신-EDTA용액을 처리하여 회수하였다. 회수한 세포는 DPBS로 재부유시킨다. 재부유된 세포 현탁액 10㎕와 트리판 블루 10 ㎕을 섞은 후 혈구계산판을 이용하여 세포 수를 측정하였다.

[0053] **<실험 예 3> 세포집락 형성 측정(Colony formation assay, CFA)**

[0054] SF3B4에 따른 세포 생장 변화를 확인하기 위해 세포집락 측정 실험을 수행하였다. 인간 유방암 세포 MCF7를 단세포 현탁액으로 만든 후, 지름이 60mm인 배양접시에 3,000개 세포를 배양하였다. 배양 세포에 siRNA를 형질 주입하고 세포집락이 확인될 때까지 6일 배양하였다. 세포집락 형성 후, 염색하여 세포 집락을 계수하였다.

[0056] **<실험 예 4> 세포 노화 연관 베타 갈락토시다아제염색법(SA-β-Gal assay)**

[0057] 인간 유방암 세포(CF7에 siRNA를 형질 주입하고 4일 동안 배양하였다. 배양 후 배양접시 내의 배지를 제거한 후 DPBS로 세척하였다. 세척된 배양접시에 농도가 3.7%인 포름알데하이드(formaldehyde) 세포고정액을 첨가하여 5분 동안 세포를 고정시켰다. DPBS로 세포고정액을 세척한 후 배양접시에 베타 갈락토시데이즈 염색용액[1mg/ml X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-Dgalactoside), 40mM 구연산/인산나트륨(pH 5.7), 5mM 페로시안화칼륨, 5mM 페리시안화칼륨, 150mM 염화나트륨, 2 mM 염화마그네슘]를 1 mL 처리하여 37℃ 세포 배양기에서 12 내지 16시간 동안 염색하였다. 대조군은 siRNA(Con Si)를 처리한 인간 유방암 세포 MCF7이다. 광학현미경을 이용하여 세포 모양과 염색 여부를 관찰하였다.

[0059] **<실험 예 5> 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR, RT-PCR)**

[0060] 지름이 60mm인 배양접시에서 인간 유방암 세포(MCF7)에 siRNA를 형질 주입하고 2일 동안 배양하였다. 배양된 인간 유방암 세포(MCF7)배지를 제거하고 DPBS로 세척하였다. 세척된 배양접시에 1 ml DPBS를 넣고 스크래퍼로 세포를 모은다. 모은 세포에 트리졸을 넣어 전체 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA와 RevertAidM-MuLVRTase을 이용하

여 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)를 합성하였다. SF3B4 mRNA에 대한 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR, RT-PCR)를 수행하였다. SF3B4 mRNA 양 변화 측정으로 SF3B4 siRNA의 SF3B3 발현 억제 효과를 확인하였다.

[0062] **<실시 예 1> SF3B4 억제제 처리 후 세포 수 측정 및 세포 집락 형성 능력 확인**

[0063] 인간 유방암 세포주 MCF7에 SF3B4 억제제 처리 후 세포 수 측정 및 세포 집락 형성 능력을 확인하기 위해, 인간 유방암 세포주 MCF7에 대조군 siRNA(Con Si; 서열정보(서열번호 3): 5'-CCUACGCCACCAAUUUCGU(dTdT)-3')와 SF3B4 siRNA(SF3B4 Si; 서열번호 4)를 형질 주입한 후, 웨스턴 블로팅을 이용하여 SF3B4 발현 억제 효과 및 세포 노화 특이적 유전자 p21의 발현을 확인하고, SF3B4 발현 억제 0, 2 및 4일 후 각각 세포의 수를 세어 유방암 세포증식 능력 변화를 확인하였다. 또한, SF3B4 발현 억제 6일 후 세포 집락 형성 측정을 통해 유방암 세포 증식 능력 변화를 확인하였다.

[0064] 세포 노화 특이적인 유전자 p21의 발현과 관련하여, 도 1A에 따르면, SF3B4 발현 억제 시 p21 단백질 양이 크게 증가하였음을 확인하였다.

[0065] 또한, 세포증식 능력과 관련하여, 도 1B에 따르면, SF3B4 발현 억제 0 및 2일 후에는 대조군 siRNA와 SF3B4 siRNA를 넣은 쪽의 차이가 크지 않았으나 4일 후에서 대조군에 비해 SF3B4 siRNA로 형질감염 시킨 세포주의 세포증식 능력이 현저히 떨어짐을 확인할 수 있었다.

[0066] 나아가, 세포 집락 형성 능력과 관련하여, 도 1C에 따르면, 대조군에 비해 SF3B4 siRNA로 형질감염 시킨 세포주의 세포 집락 형성 능력이 현저히 떨어짐을 확인할 수 있었다.

[0068] **<실시 예 2> SF3B4 억제제 처리 후 유방암 세포의 노화 여부**

[0069] 인간 유방암 세포 MCF7에 대조군 siRNA(Con Si)와 SF3B4 siRNA(SF3B4 Si)를 형질감염 한 후, 세포 노화 연관-베타-갈라토시다아제(Senescence-associated β-galactosidase, SA-β-Gal)염색법을 통해 유방암 세포의 노화 여부를 확인하였다. 이때, 독소루비신(50 ng/ml)은 암세포 노화 유도를 위한 양성 대조군으로 사용하였다.

[0070] 그 결과, 도 2에 따르면, 세포 노화 연관 베타 갈라토시다아제 염색에 의해 대조군에서 염색이 된 것에 비해 SF3B4 siRNA로 형질감염 시킨 세포주에서 염색된 부분이 더 많은 것을 확인할 수 있었다.

[0072] **<실시 예 3> SF3B4 억제제 또는 SF3B3 억제제 처리 후, 세포 노화 유도 여부 비교**

[0073] 인간 유방암 세포주 MCF7에 대조군 siRNA(Con Si), SF3B3 siRNA(SF3B3 Si; 서열정보(서열번호 5): 5'-GUUGGAGUAGAUGUCGGAUUU(dTdT)-3') 또는 SF3B4 siRNA(SF3B4 Si)를 형질감염 한 후, 세포 노화 유도 여부 비교하였다.

[0074] 세포 노화 특이적인 유전자 p21의 발현과 관련하여, 도 3A에 따르면, SF3B4 발현 억제 시 p21 단백질 양이 크게 증가하였으나, SF3B3 발현 억제시 p21 단백질 양은 상대적으로 크게 증가하지 않음을 확인하였다.

[0075] 또한, 세포증식 능력과 관련하여, SF3B3 또는 SF3B4 발현 억제 4일 후 세포 수를 측정한 결과, 도 3B에 따르면, 대조군과 비교하여 SF3B3 또는 SF3B4 발현 억제 시 세포는 증식하지 않음을 확인하였다.

[0076] 나아가, 세포 노화 여부와 관련하여, 세포 노화 연관 베타 갈라토시다아제(Senescence-associated β-galactosidase,SA-β-Gal)염색법을 통해 유방암 세포의 노화 여부를 확인하였다. 도 3C에 따르면, SF3B4 발현 억제 시 세포 노화 연관 베타 갈라토시다아제 염색을 통해 세포 노화가 유도되었음을 확인하였으나, SF3B3 발현 억제 시 대조군과 세포 노화 연관 베타 갈라토시다아제 염색의 차이를 보이지 않았음을 확인할 수 있었다.

[0077] 따라서, 노화 특이적 단백질 p21 양 변화, 세포 수 측정 및 세포 노화 특이적 염색으로 종합적으로 관찰한 결과, SF3B4 억제 시 세포 노화를 유도 하나 SF3B3 억제 시 세포 노화를 유도하지 않음을 확인할 수 있었다.

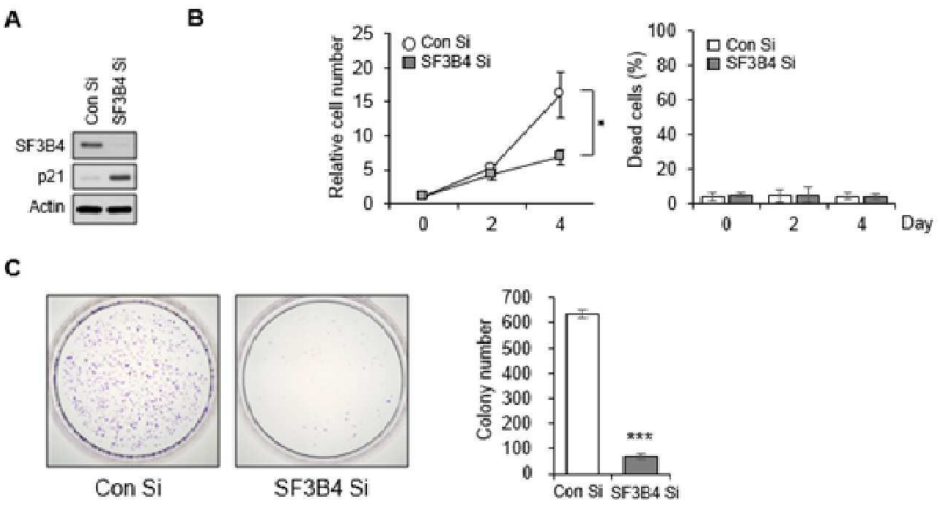
[0079] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해

할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

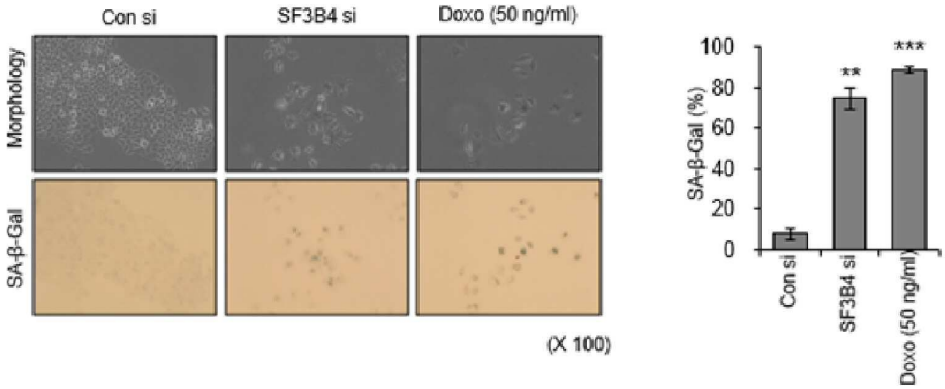
[0080] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

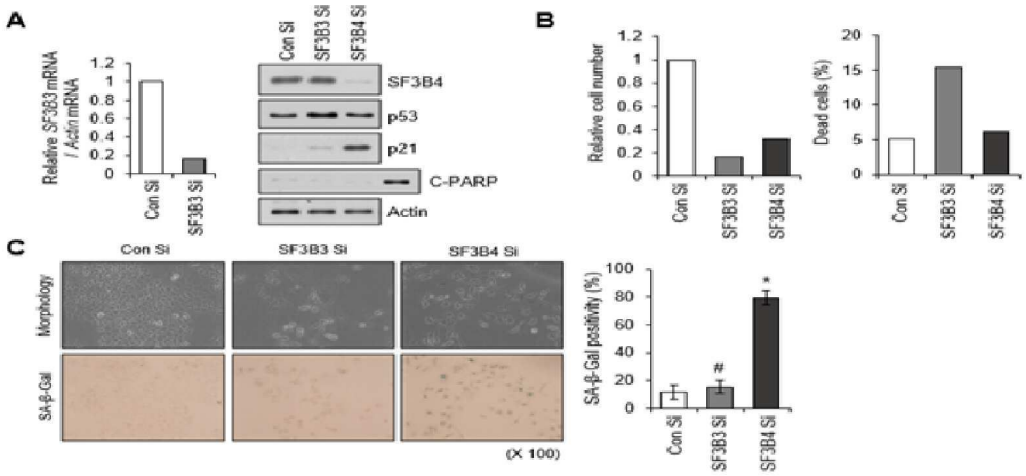
도면1



도면2



도면3


A
Relative SF3B3 mRNA / Actin mRNA
Con Si
SF3B3 Si
SF3B4 Si
SF3B4
p53
p21
C-PARP
Actin
B
Relative cell number
Dead cells (%)
C
Morphology
SA-β-Gal
(X 100)
SA-β-Gal positivity (%)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.