

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0053283
(43) 공개일자 2025년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 33/243 (2019.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)

A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0136171

(22) 출원일자 2023년10월12일

심사청구일자 2023년10월12일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

충남대학교병원

대전광역시 중구 문화로 282 (대사동)

(72) 발명자

구본석

대전광역시 중구 서문로 96, 202동 1604호 (문화동, 센트럴파크2단지아파트)

정승남

대전광역시 서구 도안동로 77, 1807동 1004호 (도안동, 도안18단지리플하우스)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

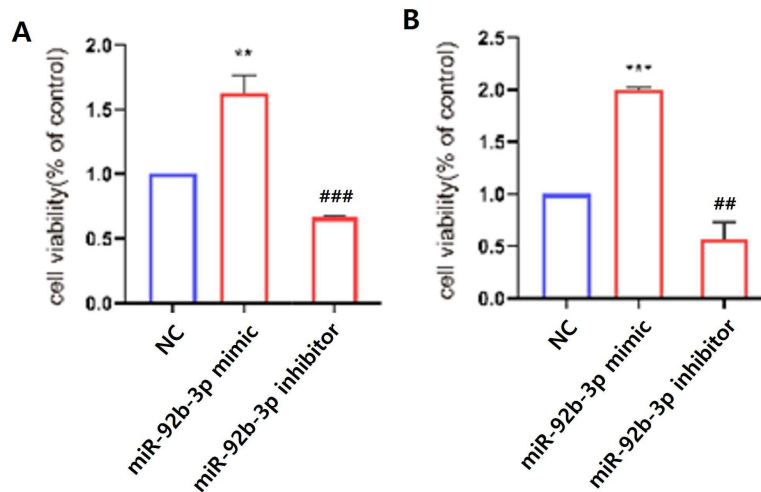
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 구강암세포에 miR-92b-3p 모방체를 처리한 군에서 세포증식, 콜로니 형성, 이동 및 침윤 정도가 증가되는 반면, 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 처리한 군에서 세포증식, 콜로니 형성, 이동 및 침윤 정도가 유의미하게 감소되었고, 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 시스플라틴과 함께 처리하였을 때, 시스플라틴을 단독 처리한 경우에 비해 세포증식 억제 및 세포사멸 효과가 증진되므로, 구강암의 예방, 개선 또는 치료용 의약품 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 33/243 (2022.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

박옥단

대전광역시 중구 문화로 266, 2동 606호 (문화동)

원호륜

서울특별시 마포구 토정로32길 11, 102동 1001호
(토정동, 한강삼성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711181927

과제번호 2019R1A2C1084125

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 두경부암 유전체 분석 기반 치료저항성 분자표지자 패널 개발 및 환자유래 오가노이

드 기반 치료반응 예측 플랫폼 확립

기 여 율 4/10

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711184133

과제번호 2022R1C1C1008265

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 두경부암의 개인별 정밀 맞춤 치료를 위한 액체 생검 기반 마이크로 RNA 표적 개발

및 유효성 검증

기 여 율 3/10

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465040029

과제번호 HR22C1734040023

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원육성

연구과제명 Centennial-care Ubiquitous Hospital (CNUH) 플랫폼

기 여 율 3/10

과제수행기관명 충남대학교병원

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 miR-92b-3p 억제제는 안타고미르(antagomir), 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide) 또는 RNA 억제 분자(inhibitory RNA molecule)인 것을 특징으로 하는 구강암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 miR-92b-3p 억제제는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 구강암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 miR-92b-3p 억제제는 구강암세포의 증식, 이동 및 침윤을 억제하는 것을 특징으로 하는 구강암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 플래티넘(platinum) 계열 항암제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 구강암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 예멸전, 시럽, 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 구강암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

청구항 8

miR-92b-3p 억제제를 인간을 제외한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 구강암의 예방 또는 치료방법.

청구항 9

miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암보조제.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항암보조제는 항암제의 구강암에 대한 항암 효과를 증진시키는 것을 특징으로 하는 항암보조제.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항암제는 플래티넘(platinum) 계열 항암제인 것을 특징으로 하는 항암보조제.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 플래티넘(platinum) 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin) 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항암보조제.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 miR-92b-3p 억제제는 항암제와 동시에, 별도로 또는 순차적으로 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 항암보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 의학의 발달로 기대수명은 늘어났지만 생활습관의 변화로 인해 암 또는 심장질환 등의 퇴행성 질환은 오히려 증가하고 있다. 특히, 우리나라 암 발생자는 지속적으로 증가하는 것으로 나타나고 있다.

[0003] 구강암은 전체 암 발생률 중에 약 2%로 매우 적은 비중을 차지하는 것으로 알려져 있으나, 구강암은 치료 후에도 저작 또는 발음 등의 구강 내 기능의 저하로 정상적인 음식물 섭취가 어렵고, 말하는 기능이 떨어지며 얼굴 외형의 변형 등 만성적인 후유증을 유발하여 환자의 삶에 치명적인 영향을 주는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 구강암의 생존율은 대략 50% 정도로 악성종양으로 알려져 있으며, 편평상피세포암이 가장 흔하게 발병하고, 이외에도 구강점막의 작은 침샘에서 발생하는 타액선암, 턱뼈나 안면부의 근육 등의 연조직에서 발생하는 육종, 구강점막의 입천장, 볼점막, 잇몸 등에서 발생하는 악성흑색종, 드물게는 림프종 등의 형태로 발병하며, 최근 들어 과거에 비해 젊은 층의 환자가 증가하는 것으로 보고되고 있는데, 이는 서구화된 식습관과 흡연 및 음주의 증가가 그 원인으로 보고되고 있다.

[0005] 종래에 암에 대한 치료방법으로는 항암요법과 함께 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 있지만 심각한 부작용과 더불어 재발의 위험도 있는 것으로 알려져 있어, 최근에는 인체에 무해하고 부작용이 나타나지 않는 항암물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0006] 구강암 관련 선행기술로는 한국등록특허 제1756809호에 '피세아타놀을 유효성분으로 포함하는 구강암 치료용 약학 조성물'이 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2011-0114131호에 '제조함 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학 조성물'이 개시되어 있다. 하지만, 본 발명의 'miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 조성물'에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고, 상세하게는 구강암세포에 miR-92b-3p 모방체를 처리한 군에서 세포증식, 콜로니 형성, 이동 및 침윤 정도가 증가되는 반면, 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 처리한 군에서 세포증식, 콜로니 형성, 이동 및 침윤 정도가 유의미하게 감소되었고, 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 시스플라틴과 함께 처리하였을 때, 시스플라틴을 단독 처리한 경우에 비해 세포증식 억제 및 세포사멸 효과가 증진되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 인간을 제외한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 구강암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암보조제를 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 구강암세포에 miR-92b-3p 모방체를 처리한 군에서 세포증식, 콜로니 형성, 이동 및 침윤 정도가 증가되는 반면, 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 처리한 군에서 세포증식, 콜로니 형성, 이동 및 침윤 정도가 유의미하게 감소되었고, 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 시스플라틴과 함께 처리하였을 때, 시스플라틴을 단독 처리한 경우에 비해 세포증식 억제 및 세포사멸 효과가 증진된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 구강암세포인 YD8(A) 및 SCC25(B)에 각각 처리하였을 때, WST-1 분석을 통해 암세포증식 억제 효과를 확인한 결과이다. NC는 아무것도 처리하지 않은 대조군이고, miR-92b-3p mimic는 miR-92b-3p 모방체를 처리한 군이며, miR-92b-3p inhibitor는 miR-92b-3p 억제제를 처리한 군이다. **, ***은 아무것도 처리하지 않은 대조군에 대비하여 miR-92b-3p 모방체 처리군의 암세포 증식능이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, **은 $p < 0.01$ 이고, ***은 $p < 0.001$ 이다. ##, ###은 miR-92b-3p 모방체 처리군에 대비하여 miR-92b-3p 억제제 처리군의 세포 증식능이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, ##은 $p < 0.01$ 이고, ###은 $p < 0.001$ 이다.

도 2는 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 구강암세포인 YD8(A) 및 SCC25(B)에 처리하였을 때, 콜로니 형성 분석(colony formation assay)을 통해 암세포증식 억제 효과를 확인한 결과이다. **은 아무것도 처리하지 않은 대조군(NC)에 대비하여 miR-92b-3p 모방체 처리군(miR-92b-3p mimic)의 콜로니 형성이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p < 0.01$ 이다. #, ##은 miR-92b-3p 모방체 처리군에 대비하여 miR-92b-3p 억제제 처리군(miR-92b-3p inhibitor)의 콜로니 형성이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, #은 $p < 0.05$ 이고, ##은 $p < 0.001$ 이다.

도 3은 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 구강암세포인 YD8(A) 및 SCC25(B)에 처리하였을 때, 암세포의 이동 정도를 확인한 결과이다. A는 광학현미경으로 촬영한 사진이고 B는 이를 정량화한 그래프이다. **, ***은 아무것도 처리하지 않은 대조군(NC)에 대비하여 miR-92b-3p 모방체 처리군(miR-92b-3p mimic)의 암세포의 이동 정도가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, **은 $p < 0.01$ 이며, ***은 $p < 0.001$ 이다. ###은 miR-92b-3p 모방체 처리군(miR-92b-3p mimic)에 대비하여 miR-92b-3p 억제제 처리군(miR-92b-3p inhibitor)의 암세포의 이동 정도가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.001$ 이다.

도 4는 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 구강암세포인 YD8(A) 및 SCC25(B)에 처리하였을 때, 암세포의 침윤 정도를 확인한 결과이다. **, ***은 아무것도 처리하지 않은 대조군(NC)에 대비하여 miR-92b-3p 모방체 처리군(miR-92b-3p mimic)의 암세포의 침윤 정도가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, **은 $p < 0.01$ 이며, ***은 $p < 0.001$ 이다. ##은 miR-92b-3p 모방체 처리군(miR-92b-3p mimic)에 대비하여 miR-92b-3p 억제제 처리군(miR-92b-3p inhibitor)의 암세포의 침윤 정도가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.01$ 이다.

도 5는 본 발명의 miR-92b-3p 억제제 및 시스플라틴을 구강암세포(SCC25)에 함께 처리하였을 때, 암세포의 증식 억제 효과를 확인한 결과이다. cisplatin은 시스플라틴 단독 처리군이고, cisplatin+anti-miR-92b-3p는 시스플라틴 및 miR-92b-3p 억제제 처리군이다.

도 6은 본 발명의 miR-92b-3p 억제제 및 시스플라틴을 구강암세포(SCC25)에 함께 처리하였을 때, 세포사멸 증가 효과를 확인한 결과이다. A는 유세포 분석 결과이고 B는 이를 통해 세포사멸 변화 비율을 나타낸 그래프이다. *은 아무것도 처리하지 않은 대조군(NC)에 대비하여 10 μ M, 20 μ M의 시스플라틴 단독 처리군; 50 μ M의 miR-92b-3p 억제제 단독 처리군; 또는 10 μ M, 20 μ M의 시스플라틴 및 miR-92b-3p 억제제 처리군;의 사멸된 암세포 비율이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p < 0.05$ 이다. #은 10 μ M, 20 μ M의 시스플라틴 단독 처리군에 대비하여 10 μ M, 20 μ M의 시스플라틴 및 50 μ M의 miR-92b-3p 억제제 처리군;의 사멸된 암세포 비율이 통계적으로 유의미하게 더 증가하였다는 것으로, $p < 0.05$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 용어, "microRNA(마이크로 RNA 또는 miRNA)"는 생물의 유전자 발현을 제어하는 역할을 하는 작은

RNA를 의미하며, 타겟 mRNA 3'UTR(untranslated region)과의 상보적인 염기쌍 배열에 의한 타겟 mRNA 번역의 억제제를 통해, 유전자 발현 과정에서 중요한 조절 역할을 할 수 있는 20~25개의 뉴클레오타이드를 포함하는 작은 RNA이다. 상기 microRNA는 증식, 분화, 세포사멸 등을 포함하는 세포 기능에 있어서 중요한 역할을 하며, 모든 동물에 존재하는 진화적으로 보존된 조절물질로서, 일부 microRNA는 그 프로모터 부위와 관련된 후성유전학적 조절 기작(히스톤 변형, DNA 메틸화 등)을 통해 유전자 발현 조절을 일으킨다고 알려져 있다.

[0016] 본 발명의 구강암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에서, 상기 miR-92b-3p 억제제는 miRNA를 억제시킬 수 있는 어떠한 억제제를 포함할 수 있고, 바람직하게는 안타고미르(antagomir), 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide) 또는 RNA 억제 분자(inhibitory RNA molecule)일 수 있으며, 더 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 상기 miR-92b-3p 억제제는 구강암세포의 증식, 이동 및 침윤을 억제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 환제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등이 해당되는데, 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, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 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, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0019] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량의 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학분야에 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 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0020] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 구강암의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 포함하는 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 포함하는 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 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, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메틸파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 miR-92b-3p 억제제를 포함하는 수의학적 조성물은 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 의한 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 좌

제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다.

[0024] 본 발명에 의한 수의학적 조성물은 동물의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있고, 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0025] 또한, 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 인간을 제외한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 구강암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 miR-92b-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암보조제를 제공한다.

[0027] 상기 항암보조제는 항암제의 구강암에 대한 항암 효과를 증진시킬 수 있다.

[0028] 상기 항암제는 플래티넘(platinum) 계열 항암제일 수 있으며, 상기 플래티넘 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin) 중에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 시스플라틴일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 상기 miR-92b-3p 억제제는 항암제와 동시에, 별도로 또는 순차적으로 병용 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 시스플라틴과 함께 처리하였을 때, 시스플라틴을 단독 처리한 경우에 비해 구강암세포의 세포사멸 효과가 증진되는 효과가 있다.

[0031] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0032] [재료 및 방법]

[0033] 1. 세포 배양

[0034] 구강암 세포주(SCC25, YD8)는 한국세포주은행으로부터 구입하였다. YD8 세포는 RPMI-1640(Welgene, 대한민국)에서 배양하였고, SCC25 세포는 DMEM/F12(Welgene)에서 배양하였다. 모든 세포주는 10% FBS(fetal bovine serum) 및 5% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco)을 첨가하였고, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0035] 2. microRNA 트랜스펙션(transfection)

[0036] 본 발명에 사용된 miR-92b-3p 모방체(mimic) 및 miR-92b-3p 억제제(inhibitor)는 한국 대전 Bioneer에서 구입하였다(표 1). SCC25 및 YD8 세포는 Lipofectamine 3000 리전트(Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)를 사용하여 miR-92b-3p 모방체(miR-92b-3p mimic, 50 μM) 또는 miR-92b-3p 억제제(miR-92b-3p inhibitor, 50 μM)와 함께 트랜스펙션하였다. 세포들은 이후 분석을 위해 24시간 또는 48시간 후에 수집하였다.

표 1

[0037] 염기서열

Inhibitor(hsa-miR-92b-3p)	GGAGGCCGGGACGAGUGCAAUA	서열번호 1
Mimic (hsa-mir-92b)	AGGGACGGGACGCGUGCAGUG(S)	서열번호 2
	UAUUGCACUCGUCCCGCCUCC(A)	서열번호 3

[0038] 3. 세포 증식 분석

[0039] 96-웰 플레이트에 웰당 6.0×10^3 CFU/ml의 트랜스펙션된 SCC25 또는 YD8 세포를 접종하고 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 이후 세포 생존율은 WST-1 분석 키트(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 측정하였다. 상기 WST-1 분석법은 살아있는 세포 내의 미토콘드리아에 존재하는 탈수소효소인 WST(Tetrazolium Salt)에서 포르마잔(formazan)이라는 발색물질을 측정하여 살아있는 세포의 수를 측정하는 것이다. 포르마잔(Formazan) 생성물은 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)을 사용하여 450nm에서 정량적으로 측정하였다.

[0040] 4. 콜로니 형성 분석

[0041] 6-웰 플레이트에 웰당 5×10^2 CFU/ml의 트랜스펙션된 SCC25 또는 YD8 세포를 접종하고, 3일마다 배지를 교체하고 14일 동안 배양하였다. 콜로니들은 4% 포르말데하이드로 고정시키고, 크리스탈 바이올렛으로 염색한 후, 해부현미경으로 이미지 촬영하고 계수하였다.

[0042] 5. 세포 이동(migration) 및 침윤(invasion) 분석

[0043] 6.5mm 직경의 폴리카보네이트 필터($8 \mu\text{m}$ 기공 크기)가 있는 트랜스웰 챔버(Corning Coster, Cambridge, MA)를 사용하여 세포의 이동 및 침윤 정도를 분석하였다. 간략하게, 침윤 분석을 위해, 트랜스웰 멤브레인을 매트리지(Matrigel, BD Biosciences)로 37°C 에서 6시간 동안 코팅하고, 이동 분석을 위해, 매트리지 없이 코팅하였다. 상부 챔버에 $100 \mu\text{l}$ 의 무혈청 배지에 들어있는 트랜스펙션된 SCC25 또는 YD8 세포(2×10^5 세포)를 첨가하였고, 하부 챔버에 10% FBS를 포함한 $700 \mu\text{l}$ 의 배지를 첨가하였다. 이후 37°C , 5% CO_2 에서 24시간(이동) 또는 48시간(침윤) 동안 배양하였다. 마지막으로, 면봉을 이용하여 이동 또는 침윤되지 않은 세포를 제거하고, 하부 챔버(이동 또는 침윤 세포)에 부착된 세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하고, 광현미경(40배 확대) 하에서 4개의 대표적인 영역에서 계수하였다.

[0044] 6. 면역조직화학(Immunohistochemistry) 분석

[0045] 조직 샘플들은 4% 포르말린 용액으로 고정시키고 파라핀에 포매하였다. 헤마토실린과 에오신(H&E) 염색의 경우, 조직 절편을 자일렌에서 탈파라핀화하고 알코올 용액에서 수화시키고 H&E로 염색하였다. 샘플들은 장착된 후 자동 디지털 슬라이드 스캐너(Pannoramic MIDI; 3DHISTECH, HU)에서 샘플을 검사하였다. 면역조직화학(immunohistochemistry)을 위해, 조직 절편은 자일렌으로 탈파라핀화시키고, 알코올 용액에 수화시키고, 항원 회수를 위해 항원 회수 시트라 용액(pH 6.0)에서 100°C 에서 15분 동안 가열하였다. 단일 면역염색의 경우, 내인성 과산화효소(peroxidase) 활성을 0.3% Triton X-100이 포함된 인산염 완충 식염수(PBS)으로 회색한 1%(v/v) 과산화수소 용액(Sig-ma-Aldrich, USA)에서 상온에서 30분 동안 차단시켰다. 절편은 표시된 항체와 함께 4°C 에서 밤새 배양한 후, HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체와 함께 배양하였다. 마지막으로, 3,3'-다이아미노벤지딘(3,3'-diaminobenzidine; DAB, USA)를 사용하여 표지된 항체들을 검출하고, 핵은 헤마톡실린으로 염색하였다. PBS로 세척한 후 시료들은 자동 디지털 슬라이드 스캐너를 사용하여 분석하였다.

[0046] 7. 세포사멸 분석

[0047] 아넥신(Annexin) V 및 PI(Propidium iodide) 염색은 아넥신 V-FITC 세포사멸 검출 키트 1(Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 배양된 세포에 트립신-EDTA(Trypsin-EDTA)를 처리하고 차가운 PBS로 2회 세척한 다음 $600 \times \text{g}$ 으로 5 분간 원심분리하였다. 세포를 5×10^5 cells/ml의 농도로 결합 완충액 $500 \mu\text{l}$ 에 재현탁시키고 5 l의 아넥신 V-FITC 및 $5 \mu\text{l}$ 의 PI를 세포 현탁액에 첨가하였다. 혼합물을 어두운 곳에서 37°C 에서 10분 동안 배양하고 BD LSRFortessa™ X-20(BD Biosciences, USA)로 분석하였다.

[0048] 8. 통계 분석

[0049] 통계 분석은 SPSS 버전 26.0(IBM Corp, Armonk, NY, USA)를 사용하여 수행하였고, 모든 시험은 3회 반복하였고, 그룹 간 비교는 Student's t-test를 이용하여 통계적 유의성을 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, $p < 0.05$ 는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다.

[0050] 실시예 1. miR-92b-3p 억제제 처리에 따른 구강암세포의 성장 억제 효과

[0051] 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 구강암세포인 YD8 및 SCC25에 처리하였을 때, WST-1 및 콜로니 형성 분석을 통해 구강암세포 증식 억제 효과를 측정하였다.

[0052] 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 대조군(NC)에 대비하여 miR-92b-3p 모방체 처리군(miR-92b-3p mimic)의 암세포 생존율이 증가된 반면, 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 처리한 군에서 암세포 생존율이 감소되었다. 또한, 콜로니 형성 분석 결과도 마찬가지로, miR-92b-3p 모방체(miR-92b-3p mimic) 처리군에 비해 본 발명의 miR-92b-3p 억제제 처리군에서 콜로니 수가 감소된 것을 알 수 있었다(도 2).

[0053] 실시예 2. miR-92b-3p 억제제 처리에 따른 구강암세포의 이동 및 침윤 억제 효과

[0054] 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 구강암세포인 YD8 및 SCC25에 처리하였을 때, 구강암세포의 이동 및 침윤 억제 효과를 측정하였다.

[0055] 그 결과, 도 3 및 도 4에 개시한 바와 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군(NC)에 대비하여 miR-92b-3p 모방체 처리군(miR-92b-3p mimic)의 암세포의 이동 및 침윤 정도가 증가된 반면, 본 발명의 miR-92b-3p 억제제 처리군에서 세포의 이동 및 침윤 정도가 현저하게 감소된 것을 확인하였다.

[0056] 실시예 3. miR-92b-3p 억제제 및 항암제 처리에 따른 구강암세포의 세포증식 억제 및 세포사멸 증가 효과

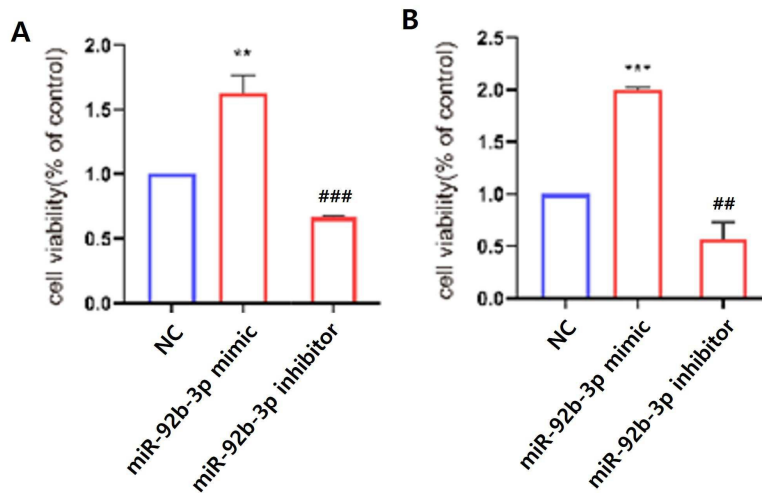
[0057] 본 발명의 miR-92b-3p 억제제 및 시스플라틴을 구강암세포(SCC25)에 함께 처리하였을 때, 구강암세포의 세포증식 억제 및 세포사멸 증가 효과를 확인하였다.

[0058] 그 결과, 도 5에 개시한 바와 같이 시스플라틴 단독 처리군(NC; IC_{50} 21.30 μ M)에 대비하여 본 발명의 miR-92b-3p 억제제 및 시스플라틴의 처리군(IC_{50} 13.22 μ M)의 세포생존율이 감소되었다.

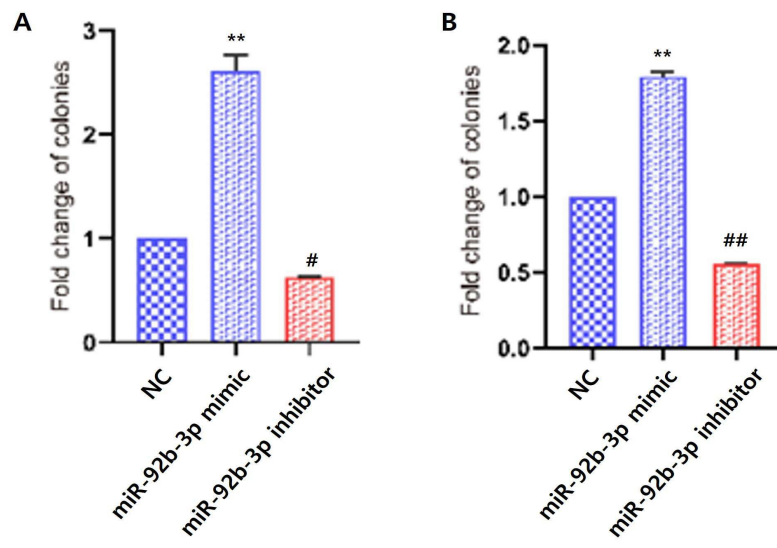
[0059] 세포사멸 측정결과도 마찬가지로, 시스플라틴을 단독 처리한 경우에 비해 본 발명의 miR-92b-3p 억제제를 시스플라틴을 함께 처리하였을 때 세포사멸 효과가 통계적으로 유의미하게 더 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

도면

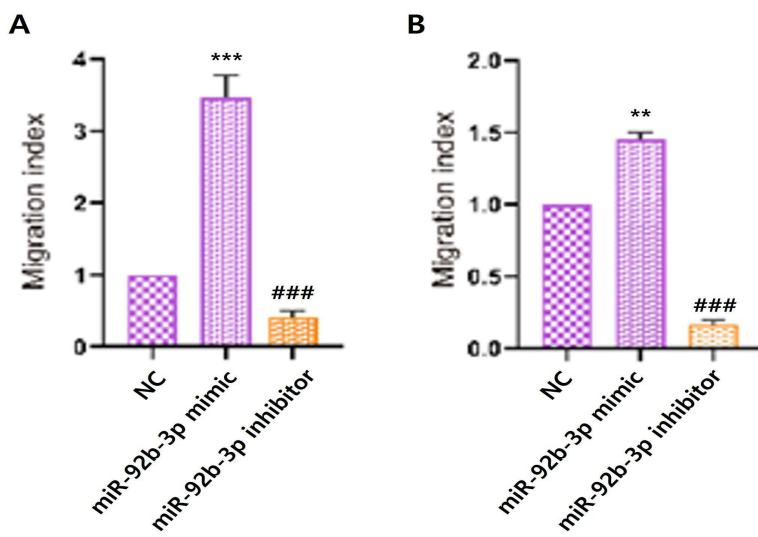
도면1



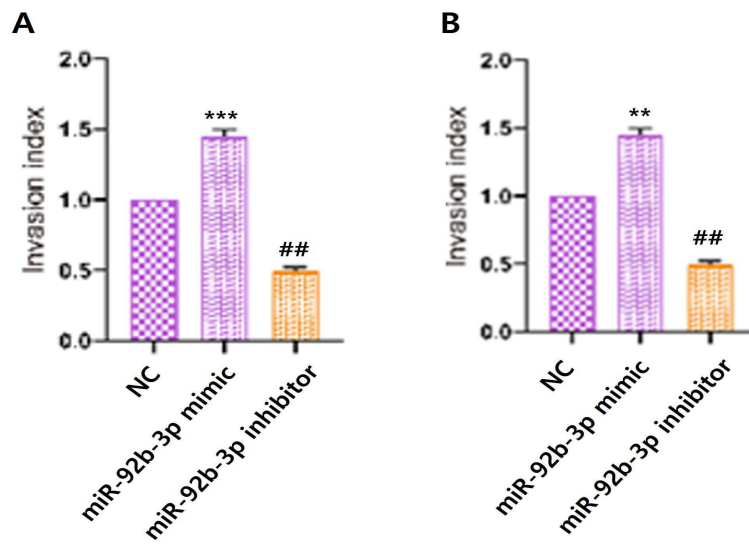
도면2



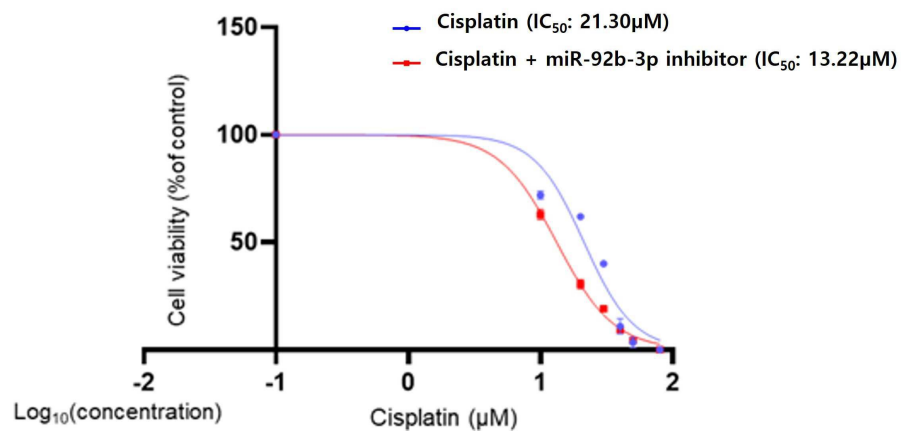
도면3



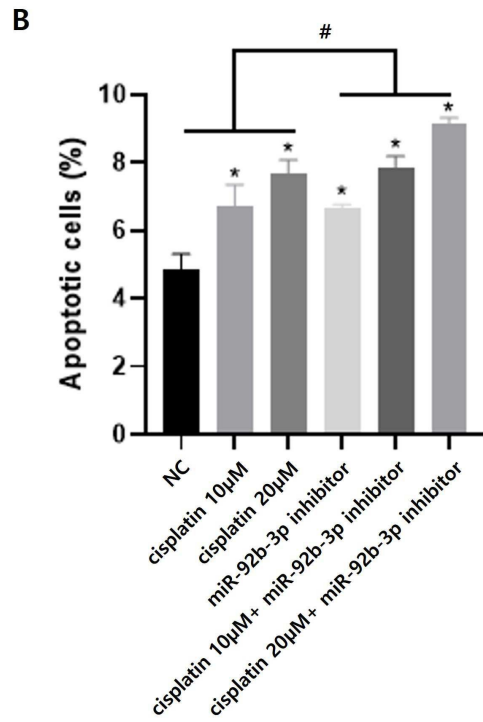
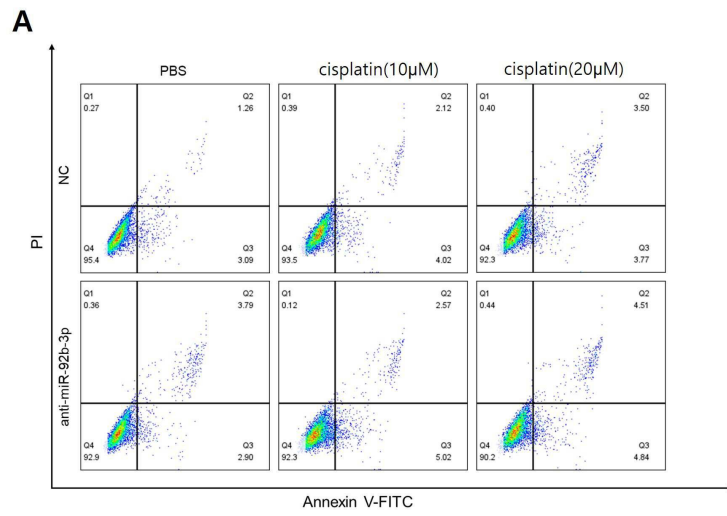
도면4



도면5



도면6



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.