

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2019-0137015
(43) 공개일자 2019년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) C12Q 1/6876 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12Q 1/6876 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0064386
(22) 출원일자 2019년05월31일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020180063055 2018년05월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
지성욱
서울특별시 강남구 광평로34길 35, 202-403 (수서동, 강남더샵포레스트아파트)
장은숙
서울특별시 강남구 광평로34길 35, 202-403 (수서동, 강남더샵포레스트아파트)
석희영
서울특별시 강남구 개포로110길 15, 112동 401호 (일원동, 우성7차아파트)
(74) 대리인
이명진

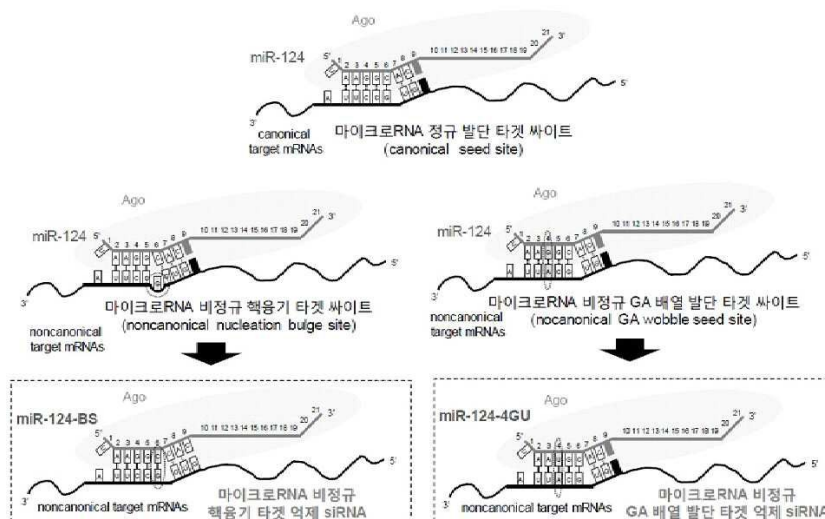
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 마이크로RNA의 비정규 표적을 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 특정 마이크로RNA의 일부 서열이 변형되어 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자(noncanonical target gene)를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산에 관한 것으로, 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산을 이용하면, 마이크로RNA가 비정규 표적 유전자를 억제함으로써 나타내는 생물학적인 기능을 효율적으로 증대하거나, 기존의 마이크로RNA가 나타내는 기능 중 일부, 즉 비정규 표적 유전자를 억제함으로써 나타내는 생물학적 기능만 선택적으로 나타내는 효과를 가지며, 본 발명의 간섭 유도 핵산을 통해 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식 또는 사멸 조절이 가능한바, 약물, 화장품 등 다양한 분야에서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/33 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711024887
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구자지원
연구과제명 마이크로RNA 표적 인식 시스템 이해를 통한 신개념 종양억제 기술 연구
기 여 율 35/100
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465021805
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 마이크로RNA 표적인식 모드에 기반한 단계별 심혈관질환 치료제 연구
기 여 율 35/100
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345269233
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 신경줄기세포 분화시 마이크로RNA의 비정규 표적인식 기능 연구
기 여 율 30/100
주관기관 고려대학교
연구기간 2017.11.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

RNA 간섭(RNA interference)을 유도하는 핵산의 이중가닥 중 하나 이상의 단일가닥에 있어서, 특정 마이크로RNA의 일부 서열이 변형되어 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자(noncanonical target gene)를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서,

상기 RNA 간섭 유도 핵산은 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일하며 6번째와 7번째 염기는 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 위블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되는 것을 특징으로 하고, 또는

상기 RNA 간섭 유도 핵산은 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(Guanine) 염기가 유라실(Uracil) 또는 아데닌(Adenine)으로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 것을 특징으로 하는,

RNA 간섭 유도 핵산.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자를 선택적으로 억제하고 마이크로RNA의 정규 표적 유전자는 억제하지 않는 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 특정 마이크로RNA는 miR-124, miR-155, miR-122, miR-1, let-7, miR-133, miR-302a 및 miR-372로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단 2번째에서 7번째 염기 서열이 다음 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산:

miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-AA GGC C-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-124-BS);

miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로 5'-GG AGU U-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-122-BS);

miR-155의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UA AUG G-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-155-BS); 또는

miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-GG AAU U-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-1-BS).

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 RNA 간섭 유도 핵산의 염기 서열이 다음 중 어느 하나 이상으로 나타내는 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산:

miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UAA GGC CAC GCG GUG AAU GCC-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-124-BS);

miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로 5'-UGG AGU UGU GAC AAU GGU GUU-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-122-BS);

miR-155의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UUA AUG GGC UAA U CGU GAU AGG-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-155-BS);

miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UGG AAU UGU AAA GAA GUA UGU-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-1-BS).

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열이 다음 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산:

miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서

5'-UAA UGC ACG-3' (miR-124-G4U), 5'-UAA GUC ACG-3' (miR-124-G5U) 또는 5'-UAA UUC ACG-3' (miR-124-G4,5U)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;

miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서

5'-UUG AAU GUA-3' (miR-1-G2U), 5'-UGU AAU GUA-3' (miR-1-G3U), 5'-UGG AAU UUA-3' (miR-1-G7U), 5'-UUU AAU GUA-3' (miR-1-G2,3U), 5'-UGU AAU UUA-3' (miR-1-G3,7U), 5'-UUG AAU UUA-3' (miR-1-G2,7U) 또는 5'-UUU AAU UUA-3' (miR-1-G2,3,7U)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;

miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서

5'-UUG AGU GUG-3' (miR-122-G2U), 5'-UGU AGU GUG-3' (miR-122-G3U), 5'-UGG AUU GUG-3' (miR-122-G5U), 5'-UGG AGU UUG-3' (miR-122-G7U), 5'-UGG AGU GUU-3' (miR-122-G9U), 5'-UUU AGU GUG-3' (miR-122-G2,3U), 5'-UUG AUU GUG-3' (miR-122-G2,5U), 5'-UUG AGU UUG-3' (miR-122-G2,7U), 5'-UUG AGU GUU-3' (miR-122-G2,9U), 5'-UGU AUU GUG (miR-122-G3,5U), 5'-UGU AGU UUG-3' (miR-122-G3,7U), 5'-UGU AGU GUU-3' (miR-122-G3,9U), 5'-UGG AUU UUG-3' (miR-122-G5,7U), 5'-UGG AUU GUU-3' (miR-122-G5,9U), 또는 5'-UGG AGU UUU-3' (miR-122-G7,9U)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;

miR-133의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서

5'-UUU UGU CCC-3' (miR-133-G4U), 5'-UUU GUU CCC-3' (miR-133-G5U) 또는 5'-UUU UUU CCC-3' (miR-133-G4,5U)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;

let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서

5'-UUA GGU AGU-3' (let-7-G2U), 5'-UGA UGU AGU-3' (let-7-G4U), 5'-UGA GUU AGU-3' (let-7-G5U), 5'-UGA GGU AUU-3' (let-7-G8U), 5'-UUA UGU AGU-3' (let-7-G2,4U), 5'-UUA GUU AGU-3' (let-7-G2,5U), 5'-UUA GGU AUU-3' (let-7-G2,8U), 5'-UGA UUU AGU-3' (let-7-G4,5U), 5'-UGA UGU AUU-3' (let-7-G4,8U), 또는 5'-UGA GUU AUU-3' (let-7-G5,8U)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;

miR-302a의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서

5'-UAA UUG CUU-3' (miR-302a-G4U), 5'-UAA GUU CUU-3' (miR-302a-G6U), 또는 5'-UAA UUU CUU-3' (miR-302a-G4,6U)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산; 또는

miR-372의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서

5'-AAA UUG CUG-3' (miR-372-G4U), 5'-AAA GUU CUG-3' (miR-372-G6U), 5'-AAA GUG CUU-3' (miR-372-G9U), 5'-AAA UUU CUG-3' (miR-372-G4,6U), 5'-AAA UUG CUU-3' (miR-372-G4,9U), 또는 5'-AAA GUU CUU-3' (miR-372-G6,9U)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 RNA 간섭 유도 핵산의 염기 서열이 다음 중 어느 하나 이상으로 나타내는 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산:

miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서

5'-UAA UGC ACG CGG UGA AUG CCA A-3' (miR-124-G4U), 5'-UAA GUC ACG CGG UGA AUG CCA A-3' (miR-124-G5U) 또는 5'-UAA UUC ACG CGG UGA AUG CCA A-3' (miR-124-G4,5U) 의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산;

miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서

5'-UUG AAU GUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2U), 5'-UGU AAU GUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G3U), 5'-UGG AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G7U), 5'-UUU AAU GUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2,3U), 5'-UGU AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G3,7U), 5'-UUG AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2,7U) 또는 5'-UUU AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2,3,7U) 의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산;

miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UUG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2U), 5'-UGU AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3U), 5'-UGG AUU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G5U), 5'-UGG AGU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G7U), 5'-UGG AGU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G9U), 5'-UUU AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,3U), 5'-UUG AUU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,5U), 5'-UUG AGU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,7U), 5'-UUG AGU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,9U), 5'-UGU AUU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3,5U), 5'-UGU AGU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3,7U), 5'-UGU AGU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3,9U), 5'-UGG AUU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G5,7U), 5'-UGG AUU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G5,9U) 또는 5'-UGG AGU UUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G7,9U) 의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산;

miR-133의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UUU UGU CCC CUU CAA CCA GCU G -3' (miR-133-G4U), 5'-UUU GUU CCC CUU CAA CCA GCU G-3' (miR-133-G5U) 또는 5'-UUU UUU CCC CUU CAA CCA GCU G-3' (miR-133-G4,5U) 의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산; let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UUA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2U), 5'-UGA UGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G4U), 5'-UGA GUU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G5U), 5'-UGA GGU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G8U), 5'-UUA UGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2,4U), 5'-UUA GUU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2,5U), 5'-UUA GGU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2,8U), 5'-UGA UUU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G4,5U), 5'-UGA UGU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G4,8U) 또는 5'-UGA GUU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G5,8U)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산;

miR-302a의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UAA UUG CUU CCA UGU UUU GGU GA-3' (miR-302a-G4U), 5'-UAA GUU CUU CCA UGU UUU GGU GA-3' (miR-302a-G6U), 또는 5'-UAA UUU CUU CCA UGU UUU GGU GA-3' (miR-302a-G4,6U)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산; 또는

miR-372의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-AAA UUG CUG CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G4U), 5'-AAA GUU CUG CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G6U), 5'-AAA GUG CUU CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G9U), 5'-AAA UUU CUG CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G4,6U), 5'-AAA UUG CUU CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G4,9U), 또는 5'-AAA GUU CUU CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G6,9U)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자 발현 억제용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식 또는 사멸 조절용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 조성물은 다음 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물:

miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물;

miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 신경 돌기 가지 분화 유도용 조성물;

miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 간암 세포의 세포 주기 정지 유도용 조성물;

miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 근세포 분화 촉진 또는 근섬유화 촉진용 조성물;

miR-155의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 근세포 사멸 유도용 조성물;

miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 신경 모세포종의 세포 사멸 촉진용 조성물;

miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 신경 모세포종의 세포 분열 증식 촉진용 조성물;

miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 심근 비대 유도용 조성물;

miR-133의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 심근 비대 유도용 조성물;

let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 암 세포의 세포 주기 정지 유도용 조성물;

let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 간세포의 세포 주기 진행 활성 유도용 조성물;

miR-302a의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 역분화 촉진용 조성물;

miR-372의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 역분화 촉진용 조성물; 또는

miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 간암 세포의 세포 이동 저해용 조성물.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는, RNA 간섭(RNA interference)을 유도하는 핵산의 이중가닥 중 하나 이상의 단일가닥에 있어서, 특정 마이크로RNA의 일부 서열이 변형되어 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자(noncanonical target gene)의 발현을 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산의 제조방법:

특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일하며 6번째와 7번째 염기는 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 위블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되도록 RNA 간섭 유도 핵산을 작제하는 단계, 또는

특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(Guanine) 염기가 유라실(Uracil) 또는 아데닌(Adenine)으로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지도록 RNA 간섭 유도 핵산을 작제하는 단계.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 RNA 간섭 유도 핵산을 대상 세포에 트랜스펙션하는 단계;

대상 세포에 시험 물질을 처리하는 단계; 및

대상 세포에서 RNA 간섭 유도 핵산이 억제하는 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자의 발현양 내지 발현 여부를 확인하는 단계를 포함하는,

세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식 또는 사멸 조절용 시험 물질을 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전자 발현을 저해하는 RNA 간섭 유도 핵산 및 그 용도에 관한 것으로, 마이크로RNA의 비정규 표적을 선택적으로 억제함으로써 발휘되는 유용한 효과를 갖는 간섭 유도 핵산 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] RNA 간섭(RNA interference)은 전사후 단계에서 유전자의 발현을 억제하는 현상을 말한다. 자연적으로 존재하는 RNA 간섭 현상은 마이크로RNA(micro RNA, miRNA)에 의해서 일어난다. 마이크로RNA는 약 21개의 염기로 구성된 작은 RNA로서, 아고너트(Argonaute) 단백질을 통해 표적이 되는 유전자의 전령RNA (mRNAs)와 상보적 염기 배열을 한다. 동물 마이크로RNA의 경우, 아고너트 단백질과 결합해 표적이 되는 전령RNA와 부분적인 염기배열을 하게 되는데, 이때 마이크로RNA의 5' 말단 기준 1번째부터 8번째까지의 핵산으로 정의되는 발단 지역(seed region)에서 최소한 6개 이상의 연속적인 염기 배열을 할 경우 표적으로 인식하고, 해당 mRNA를 분해하거나 번역(translation)이 되는 것을 억제하여 그 발현을 저해한다 (Lewis BP, et.al, 2003, Cell, 115 (7), 787-98). 이렇게 마이크로RNA가 부분적인 염기 배열을 통해 표적 유전자의 전령RNA를 인식하기 때문에, 한개의 마이크로RNA는 보통 수 백개에서 수 천개의 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있다.

[0004] 마이크로RNA의 표적 유전자 발현 저해 작용은 유전자 발현의 중요한 기전의 하나로서 정상상황에서는 세포의 분화와 성장에 관여하고, 기능에 이상이 있을 때는 암 및 퇴행성 질환, 당뇨병 등을 유발하게 되어 생명 현상의 열쇠로 주목받고 있다. 따라서, 마이크로RNA의 유전자 발현 저해 작용을 인위적으로 유도하기 위해, 마이크로RNA의 발단 지역을 포함하는 RNA 간섭 소재(siRNA 또는 shRNA)를 디자인하여 세포 안으로 도입함으로써 인위적으로 세포를 분화시키거나 기능을 바꾸고, 경우에 따라 질병 치료제로 사용하기도 한다. 그러므로, 아고너트로 매개되어 표적 전령RNA를 인식하게 되는 마이크로RNA 발단 지역에서의 상보적 염기 배열은 마이크로RNA를 포함하는 RNA 간섭 소재가 기능을 발휘함에 있어 중요하다. 특히, 이러한 RNA 간섭 소재를 활용하기 위해서는, 각각의 마이크로RNA의 기능을 파악하는 것이 요구되며, 이 때 마이크로RNA의 기능은 어떠한 표적 유전자를 억제하는 지에 따라 결정되므로, 마이크로RNA의 전체 표적 유전자(표적체)에 대한 분석이 필요하게 되었다.

[0005] 전사체적 수준에서, 마이크로RNA 표적체에 대한 연구는 본 발명자에 의해 Ago HITS CLIP 실험을 통해 처음으로 수행되었다. Ago HITS CLIP 실험 방법은 세포나 조직 샘플에 UV를 조사하여 세포 내에서 RNA와 아고너트 단백질 사이에 공유결합을 통한 복합체를 형성하게 하고, 이러한 RNA-아고너트 복합체를 아고너트 특이적 인식 항체를 이용하여 면역침강법으로 분리한 다음, 분리된 RNA를 차세대염기서열 (Next-generation sequencing)로 분석하는 방법이다. 이를 통해서 아고너트에 결합한 마이크로RNA와, 상보적 염기 배열하는 표적 전령RNA군을 정확하게 분석할 수 있다 (Chi S et al, Nature, 2009, 460 (7254): 479-86).

[0006] 그 결과, 본 발명자들은 마이크로RNA가 표적 전령RNA와 결합할 때 마이크로RNA 발단 지역(seed region)과 정확히 상보관계가 아니더라도 결합하는 경우가 있음을 것을 밝혀냈다. 보다 구체적으로, 마이크로RNA의 5' 말단 기준 1번째부터 8번째 염기 서열로 정의되는 마이크로RNA 발단 지역(seed region)이 최소한 6개 이상의 연속적이고 완벽한 염기 서열의 배열로 전령RNA와 결합하는 것을 정규 표적 인식(canonical target recognition)이라고 하고, 상술한 규칙에서 벗어나, 마이크로RNA 발단 지역(seed region)과 연속적이고 정확한 상보서열 관계가 아

니더라도 마이크로RNA의 표적으로 인식하고 결합하는 것을 비정규 표적 인식(non-canonical target recognition)이라 한다. Ago HITS-CLIP 분석 결과에 따르면 마이크로RNA가 발단 지역을 통해 비정규적으로 표적을 인식하는 빈도는 정규적으로 인식하는 빈도의 약 50%에 이를 정도로 빈번히 나타남을 알 수 있다.

[0007] 따라서, 기존의 마이크로RNA의 발단 지역의 서열을 포함하도록 디자인된 RNA 간섭 소재(예컨대, siRNA 또는 shRNA)는 정규 표적 유전자뿐만 아니라 여러 비정규 표적 유전자를 억제함으로써 생물학적 기능이 나타나는 것일 수도 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 기존의 마이크로RNA의 발단 지역의 서열을 그대로 포함하여 디자인된 RNA 간섭 소재가 가지는 한계를 해결하고 효율을 증대하기 위한 것이다.

[0010] 보다 구체적으로, 기존의 마이크로RNA의 발단 지역의 서열을 그대로 포함하여 디자인된 RNA 간섭 소재는 정규 표적 유전자와 비정규 표적 유전자 모두를 억제하되, 정규 표적 유전자는 강하게 억제하지만 그에 비해 비정규 표적 유전자는 매우 약하게 억제한다. 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 기존의 마이크로RNA가 비정규 표적 유전자를 억제함으로써 나타내는 생물학적인 기능을 효율적으로 증대하거나, 기존의 마이크로RNA가 나타내는 기능 중 일부, 즉 비정규 표적 유전자를 억제함으로써 나타내는 생물학적 기능만 선택적으로 나타내는 효과를 갖는, RNA 간섭 유도 핵산을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 특정 마이크로RNA의 일부 서열이 변형되어 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자(noncanonical target gene)를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 제공한다.

[0014] 보다 구체적으로,

[0015] 본 발명은 RNA 간섭(RNA interference)을 유도하는 핵산의 이중가닥 중 하나 이상의 단일가닥에 있어서, 특정 마이크로RNA의 일부 서열이 변형되어 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자(noncanonical target gene)를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서,

[0016] 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일하며 6번째와 7번째 염기는 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 위블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되는 것을 특징으로 하고, 또는

[0017] 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(Guanine) 염기가 유라실(Uracil) 또는 아데닌(Adenine)으로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 것을 특징으로 하는,

[0018] RNA 간섭 유도 핵산을 제공한다.

[0020] 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자를 선택적으로 억제하고 마이크로RNA의 정규 표적 유전자는 억제하지 않는 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산을 제공한다.

[0022] 바람직하게, 상기 특정 마이크로RNA는 miR-124, miR-155, miR-122, miR-1, let-7, miR-133, miR-302a 및 miR-372로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산을 제공한다.

- [0024] 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단 2번째에서 7번째 염기 서열이 다음 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산을 제공한다:
- [0025] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-AA GGC C-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-124-BS) (서열번호 1);
- [0026] miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로 5'-GG AGU U-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-122-BS) (서열번호 2);
- [0027] miR-155의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UA AUG G-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-155-BS) (서열번호 3); 또는
- [0028] miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-GG AAU U-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-1-BS) (서열번호 4).
- [0030] 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산의 염기 서열이 다음 중 어느 하나 이상으로 나타내는 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산:
- [0031] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UAA GGC CAC GCG GUG AAU GCC-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-124-BS) (서열번호 5);
- [0032] miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로 5'-UGG AGU UGU GAC AAU GGU GUU-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-122-BS) (서열번호 6);
- [0033] miR-155의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UUA AUG GGC UAA U CGU GAU AGG-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-155-BS) (서열번호 7); 또는
- [0034] miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UGG AAU UGU AAA GAA GUA UGU-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-1-BS) (서열번호 8).
- [0036] 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열이 다음 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산을 제공한다:
- [0037] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서
- [0038] 5'-UAA UGC ACG-3' (miR-124-G4U) (서열번호 9), 5'-UAA GUC ACG-3' (miR-124-G5U) (서열번호 10) 또는 5'-UAA UUC ACG-3' (miR-124-G4,5U) (서열번호 11)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;
- [0039] miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서
- [0040] 5'-UUG AAU GUA-3' (miR-1-G2U) (서열번호 12), 5'-UGU AAU GUA-3' (miR-1-G3U) (서열번호 13), 5'-UGG AAU UUA-3' (miR-1-G7U) (서열번호 14), 5'-UUU AAU GUA-3' (miR-1-G2,3U) (서열번호 15), 5'-UGU AAU UUA-3' (miR-1-G3,7U) (서열번호 16), 5'-UUG AAU UUA-3' (miR-1-G2,7U) (서열번호 17) 또는 5'-UUU AAU UUA-3' (miR-1-G2,3,7U) (서열번호 18)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;
- [0041] miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서
- [0042] 5'-UUG AGU GUG-3' (miR-122-G2U) (서열번호 19), 5'-UGU AGU GUG-3' (miR-122-G3U) (서열번호 20), 5'-UGG AUU GUG-3' (miR-122-G5U) (서열번호 21), 5'-UGG AGU UUG-3' (miR-122-G7U) (서열번호 22), 5'-UGG AGU GUU-3' (miR-122-G9U) (서열번호 23), 5'-UUU AGU GUG-3' (miR-122-G2,3U) (서열번호 24), 5'-UUG AUU GUG-3' (miR-122-G2,5U) (서열번호 25), 5'-UUG AGU UUG-3' (miR-122-G2,7U) (서열번호 26), 5'-UUG AGU GUU-3' (miR-122-G2,9U) (서열번호 27), 5'-UGU AUU GUG-3' (miR-122-G3,5U) (서열번호 28), 5'-UGU AGU UUG-3' (miR-122-G3,7U) (서열번호 29), 5'-UGU AGU GUU-3' (miR-122-G3,9U) (서열번호 30), 5'-UGG AUU UUG-3' (miR-122-G5,7U) (서열번호 31), 5'-UGG AUU GUU-3' (miR-122-G5,9U) (서열번호 32), 또는 5'-UGG AGU UUU-3' (miR-122-G7,9U) (서열번호 33)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;
- [0043] miR-133의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UUU UGU CCC-3' (miR-133-G4U) (서열번호 34), 5'-UUU GUU CCC-3' (miR-133-G5U) (서열번호 35) 또는 5'-UUU UUU CCC-3' (miR-133-G4,5U) (서열번호

36)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;

- [0044] let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서
- [0045] 5'-UUA GGU AGU-3' (let-7-G2U) (서열번호 37), 5'-UGA UGU AGU-3' (let-7-G4U) (서열번호 38), 5'-UGA GUU AGU-3' (let-7-G5U) (서열번호 39), 5'-UGA GGU AUU-3' (let-7-G8U) (서열번호 40), 5'-UUA UGU AGU-3' (let-7-G2,4U) (서열번호 41), 5'-UUA GUU AGU-3' (let-7-G2,5U) (서열번호 42), 5'-UUA GGU AUU-3' (let-7-G2,8U) (서열번호 43), 5'-UGA UUU AGU-3' (let-7-G4,5U) (서열번호 44), 5'-UGA UGU AUU-3' (let-7-G4,8U) (서열번호 45), 또는 5'-UGA GUU AUU-3' (let-7-G5,8U) (서열번호 46)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;
- [0046] miR-302a의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UAA UUG CUU-3' (miR-302a-G4U) (서열번호 47), 5'-UAA GUU CUU-3' (miR-302a-G6U) (서열번호 48), 또는 5'-UAA UUU CUU-3' (miR-302a-G4,6U) (서열번호 49)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산; 또는
- [0047] miR-372의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-AAA UUG CUG-3' (miR-372-G4U) (서열번호 50), 5'-AAA GUU CUG-3' (miR-372-G6U) (서열번호 51), 5'-AAA GUG CUU-3' (miR-372-G9U) (서열번호 52), 5'-AAA UUU CUG-3' (miR-372-G4,6U) (서열번호 53), 5'-AAA UUG CUU-3' (miR-372-G4,9U) (서열번호 54), 또는 5'-AAA GUU CUU-3' (miR-372-G6,9U) (서열번호 55)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산.
- [0049] 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산의 염기 서열이 다음 중 어느 하나 이상으로 나타내는 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산을 제공한다:
- [0050] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서
- [0051] 5'-UAA UGC ACG CGG UGA AUG CCA A-3' (miR-124-G4U) (서열번호 56), 5'-UAA GUC ACG CGG UGA AUG CCA A-3' (miR-124-G5U) (서열번호 57) 또는 5'-UAA UUC ACG CGG UGA AUG CCA A-3' (miR-124-G4,5U) (서열번호 58)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산;
- [0052] miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서
- [0053] 5'-UUG AAU GUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2U) (서열번호 59), 5'-UGU AAU GUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G3U) (서열번호 60), 5'-UGG AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G7U) (서열번호 61), 5'-UUU AAU GUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2,3U) (서열번호 62), 5'-UGU AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G3,7U) (서열번호 63), 5'-UUG AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2,7U) (서열번호 64) 또는 5'-UUU AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2,3,7U) (서열번호 65)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산;
- [0054] miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UUG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2U) (서열번호 66), 5'-UGU AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3U) (서열번호 67), 5'-UGG AUU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G5U) (서열번호 68), 5'-UGG AGU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G7U) (서열번호 69), 5'-UGG AGU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G9U) (서열번호 70), 5'-UUU AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,3U) (서열번호 71), 5'-UUG AUU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,5U) (서열번호 72), 5'-UUG AGU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,7U) (서열번호 73), 5'-UUG AGU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,9U) (서열번호 74), 5'-UGU AUU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3,5U) (서열번호 75), 5'-UGU AGU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3,7U) (서열번호 76), 5'-UGU AGU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3,9U) (서열번호 77), 5'-UGG AUU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G5,7U) (서열번호 78), 5'-UGG AUU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G5,9U) (서열번호 79) 또는 5'-UGG AGU UUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G7,9U) (서열번호 80)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산;
- [0055] miR-133의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UUU UGU CCC CUU CAA CCA GCU G -3' (miR-133-G4U) (서열번호 81), 5'-UUU GUU CCC CUU CAA CCA GCU G-3' (miR-133-G5U) (서열번호 82) 또는 5'-UUU UUU CCC CUU CAA CCA GCU G-3' (miR-133-G4,5U) (서열번호 83)의 염기 서열을 포함하는 RNA 간섭 유도 핵산;
- [0056] let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UUA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2U) (서열번호 84), 5'-UGA UGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G4U) (서열번호 85), 5'-UGA GUU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G5U) (서열번호 86), 5'-UGA GGU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G8U)

(서열번호 87), 5'-UUA UGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2,4U) (서열번호 88), 5'-UUA GUU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2,5U) (서열번호 89), 5'-UUA GGU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2,8U) (서열번호 90), 5'-UGA UUU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G4,5U) (서열번호 91), 5'-UGA UGU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G4,8U) (서열번호 92) 또는 5'-UGA GUU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G5,8U) (서열번호 93)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산;

[0057] miR-302a의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-UAA UUG CUU CCA UGU UUU GGU GA-3' (miR-302a-G4U) (서열번호 94), 5'-UAA GUU CUU CCA UGU UUU GGU GA-3' (miR-302a-G6U) (서열번호 95), 또는 5'-UAA UUU CUU CCA UGU UUU GGU GA-3' (miR-302a-G4,6U) (서열번호 96)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산; 또는

[0058] miR-372의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-AAA UUG CUG CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G4U) (서열번호 97), 5'-AAA GUU CUG CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G6U) (서열번호 98), 5'-AAA GUG CUU CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G9U) (서열번호 99), 5'-AAA UUU CUG CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G4,6U) (서열번호 100), 5'-AAA UUG CUU CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G4,9U) (서열번호 101), 또는 5'-AAA GUU CUU CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G6,9U) (서열번호 102)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산.

[0060] 본 발명의 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자 발현 억제용 조성물을 제공한다.

[0062] 본 발명의 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 역분화, 분열, 증식 또는 사멸 조절용 조성물을 제공한다.

[0064] 바람직하게, 상기 조성물은 다음 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물을 제공한다:

[0065] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물;

[0066] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 신경 돌기 가지 분화 유도용 조성물;

[0067] miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 간암 세포의 세포 주기 정지 유도용 조성물;

[0068] miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 근세포 분화 촉진 또는 근섬유화 촉진용 조성물;

[0069] miR-155의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 근세포 사멸 유도용 조성물;

[0070] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 신경 모세포종의 세포 사멸 촉진용 조성물;

[0071] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 신경 모세포종의 세포 분열 증식 촉진용 조성물;

[0072] miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 심근 비대 유도용 조성물;

[0073] miR-133의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 심근 비대 유도용 조성물;

[0074] let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 암 세포의 세포 주기 정지 유도용 조성물;

[0075] let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 간세포의 세포 주기 진행 활성 유도용 조성물;

[0076] miR-302a의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 역분화 촉진용 조성물;

[0077] miR-372의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 역분화 촉진용 조성물; 또는

- [0078] miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 간섭 세포의 세포 이동 저해용 조성물.
- [0080] 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, RNA 간섭(RNA interference)을 유도하는 핵산의 이중가닥 중 하나 이상의 단일가닥에 있어서, 특정 마이크로RNA의 일부 서열이 변형되어 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자(noncanonical target gene)의 발현을 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산의 제조방법을 제공한다:
- [0081] 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일하며 6번째와 7번째 염기는 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 위블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되도록 RNA 간섭 유도 핵산을 작제하는 단계, 또는
- [0082] 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌 염기가 유라실 또는 아데닌으로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지도록 RNA 간섭 유도 핵산을 작제하는 단계.
- [0084] 또한, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식, 역분화 또는 사멸 조절용 시험 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다:
- [0085] RNA 간섭 유도 핵산을 대상 세포에 트랜스펙션하는 단계;
- [0086] 대상 세포에 시험 물질을 처리하는 단계; 및
- [0087] 대상 세포에서 RNA 간섭 유도 핵산이 억제하는 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자의 발현양 내지 발현 여부를 확인하는 단계.
- [0089] 이하, 본 발명을 설명한다.
- [0091] 마이크로RNA가 표적 전령RNA와 결합할 때 마이크로RNA 발단 지역(seed region)과 정확히 상보관계가 아니더라도 마이크로RNA의 표적으로 인식하고 전령RNA에 결합하는 경우가 있는바, 이를 비정규 표적 인식(non-canonical target recognition)이라고 한다. 본 발명자들은 이러한 마이크로RNA의 비정규 표적 인식에 착안하여, 마이크로RNA의 일부 서열을 변형시켜 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자를 선택적으로 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산을 개발하고 이의 효능을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0093] 본 발명은 RNA 간섭(RNA interference)을 유도하는 핵산의 이중가닥 중 하나 이상의 단일가닥에 있어서, 특정 마이크로RNA의 일부 서열이 변형되어 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자(noncanonical target gene)의 발현만을 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서,
- [0094] 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일하며 6번째와 7번째 염기는 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 위블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되는 것을 특징으로 하고, 또는
- [0095] 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌 염기가 유라실 또는 아데닌으로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 것을 특징으로 하는, RNA 간섭 유도 핵산을 제공한다.
- [0097] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은 RNA 간섭(RNA interference)을 유도하는 핵산의 이중가닥 중 하나 이상의 단일가닥으로서, 바람직하게 마이크로RNA, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA) 및 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA), DsiRNA, lsiRNA, ss-siRNA, asiRNA, piRNA, 또는 endo-siRNA 등이 포함

된다.

- [0099] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은 마이크로RNA의 2가지 비정규 표적 인식(non-canonical target recognition)을 토대로 한다.
- [0100] 보다 구체적으로, 마이크로RNA는 정규 표적 유전자 뿐만 아니라 비정규 표적 유전자도 인식한다. 마이크로RNA가 인식하는 비정규 표적 유전자는 마이크로RNA와 정확하게 일치하는 상보 관계를 가지지 않는다.
- [0102] 마이크로RNA가 인식하는 비정규 표적 유전자 및 상기 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산의 일 양태는 다음과 같다.
- [0103] 마이크로RNA가 결합하는 비정규 표적 유전자중 하나의 인식 종류는 마이크로RNA의 5' 말단에서 5번째까지의 염기와 모두 연속적으로 상보 관계를 가진다. 그러나 마이크로RNA의 5' 말단에서 6번째의 염기가 인식하는 (마이크로RNA의 5' 말단에서 6번째의 염기와 배열되는) 유전자는 상기 마이크로RNA의 5' 말단에서 5번째 염기와 상보 관계를 갖는 염기와 바로 연속되는 염기가 아니라, 바로 연속되는 염기는 용기 모양으로 밀어내고, 그 다음에 마이크로RNA와 상보 관계를 갖는 염기가 마이크로RNA의 5' 말단에서 6번째의 염기가 인식하는 염기가 된다.
- [0104] 상기 일 양태의 마이크로RNA가 인식하는 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째까지의 4개의 염기 서열을 포함한다. 또한, 상기 4개의 염기 서열에 연속하는 2개의 염기는 서로 동일하며, 상기 2개의 염기 서열은 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 워블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함된다.
- [0105] 이러한 특정 마이크로RNA가 인식하는 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산은 상기 마이크로RNA의 염기 서열과 비교하건대, 적어도 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째까지의 4개의 염기 서열을 공통으로 포함한다.
- [0106] 또한, RNA 간섭 유도 핵산의 5' 말단으로부터 6번째 염기 서열과 7번째 염기 서열은 동일할 수 있으며, 이들 2개의 염기 서열은 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 워블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함된다. 예컨대, 특정 마이크로RNA의 6번째 염기: 상기 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기: 상기 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기는 (A: U, G: A, C), (G: A, U, C: U, A, G), (U: G, A: C, U) 또는 (C: G: C)일 수 있다. 예컨대, 특정 마이크로RNA의 6번째 염기가 A일때, RNA 간섭 유도 핵산의 5' 말단으로부터 6번째 염기 서열과 7번째 염기 서열은 AA, CA일 수 있고; 특정 마이크로RNA의 6번째 염기가 G일때, RNA 간섭 유도 핵산의 5' 말단으로부터 6번째 염기 서열과 7번째 염기 서열은 UG, AG 또는 GG 일 수 있고; 특정 마이크로RNA의 6번째 염기가 U일때, RNA 간섭 유도 핵산의 5' 말단으로부터 6번째 염기 서열과 7번째 염기 서열은 CU, UU 일 수 있으며; 또는 특정 마이크로RNA의 6번째 염기가 C일때, RNA 간섭 유도 핵산의 5' 말단으로부터 6번째 염기 서열과 7번째 염기 서열은 CC 일 수 있다.
- [0107] 바람직하게 RNA 간섭 유도 핵산의 5' 말단으로부터 6번째 염기 서열과 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 6번째 염기 서열은 동일할 수 있고, 바람직하게 RNA 간섭 유도 핵산의 5' 말단으로부터 7번째 염기 서열과 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 6번째 염기 서열은 동일할 수 있다.
- [0108] 또한, 바람직하게 RNA 간섭 유도 핵산은 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 7번째 염기 서열을 5' 말단으로부터 8번째 염기 서열로 포함할 수 있다.
- [0110] 또 다른 양태로, 마이크로RNA가 인식하는 비정규 표적 유전자 및 상기 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산의 일 양태는 다음과 같다.
- [0111] 마이크로RNA가 인식하는 비정규 표적 유전자는 마이크로RNA와 마이크로RNA가 인식하는 표적 유전자의 염기가 A:U, G:C, C:G, U:A 의 상보 관계의 배열과 함께 G:A 의 워블 관계의 배열 또는 G:U 의 워블 관계의 배열을 포함한다.

- [0112] 마이크로RNA와 마이크로RNA가 인식하는 표적 유전자가 G:A 의 위블 관계에 있을 때, 특정 마이크로RNA의 염기: 상기 특정 마이크로RNA가 인식하는 표적 유전자의 염기: 상기 특정 마이크로RNA가 인식하는 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산의 염기의 배열은 G:A:U 이다. 또한, 마이크로RNA와 마이크로RNA가 인식하는 표적 유전자가 G:U 의 위블 관계에 있을 때, 특정 마이크로RNA의 염기: 상기 특정 마이크로RNA가 인식하는 표적 유전자의 염기: 상기 특정 마이크로RNA가 인식하는 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산의 염기의 배열은 G:U:A 이다.
- [0113] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 하나 이상의 구아닌(G) 염기가 유라실(U)로 치환된 변형 염기 서열을 가진다. 또는 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 하나 이상의 구아닌(G) 염기가 아데닌(A)로 치환된 변형 염기 서열을 가진다. 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(G) 염기가 하나 이상 포함된 경우, 포함된 구아닌 염기가 모두 유라실(U) 또는 아데닌(A)로 치환될 수도 있고, 적어도 하나 이상의 구아닌 염기가 유라실(U) 또는 아데닌(A)로 치환된다. 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(G) 염기가 하나 이상 포함된 경우, 유라실 또는 아데닌 염기로 치환되는 염기 외에 나머지 염기는 특정 마이크로RNA의 염기와 동일하다.
- [0115] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자를 선택적으로 억제하고 마이크로RNA의 정규 표적 유전자는 억제하지 않는다.
- [0116] 본 발명의 구체적 실시예 2 (도 2 참고)에 따르면, 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산의 표적 유전자에 대한 전령RNA의 발현 조절 기능은 비정규 표적 유전자에 대해 특이적이며, 정규 표적 유전자에 대해서는 억제 효과를 나타내지 않았다.
- [0117] 따라서, 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산을 이용하면, 비정규 표적 유전자 발현만을 선택적으로 억제할 수 있고, 그러므로 RNA 간섭 유도 핵산 발현 억제를 통해 기대되는 효과만을 선택적으로 유도할 수 있다.
- [0119] 본 발명에 있어서, 특정 마이크로RNA가 miR-124, miR-155, miR-122, miR-1, miR-133, let-7, miR-302a, miR-372로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0120] 본 발명에 있어서, 각각 인간의 miR-124, miR-155, miR-122, miR-1, miR-133, let-7, miR-302a 및 miR-372의 염기 서열은 마이크로RNA의 서열 데이터베이스인 miRBase (<http://www.mirbase.org/>)에서 MIMAT0000422, MIMAT0000646, MIMAT0000421, MIMAT0000416, MIMAT0000427, MIMAT0000062, MIMAT0000684, 및 MIMAT0000724에 기재된 바와 같다.
- [0121] 다만, 본 발명에 따른 특정 마이크로RNA는 인간의 마이크로RNA로 한정되지 않고, 포유동물을 포함하는 동물의 마이크로RNA를 포함한다.
- [0123] 본 발명에 따른 특정 마이크로RNA가 인식하는 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일할 수 있으며 6번째와 7번째 염기는 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 위블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되는 것을 특징으로 하는 RNA 간섭 유도 핵산의 길이는 6개 이상의 염기 서열을 포함하며, 이에 제한되지 않지만, 보통 21개 정도로 24개 이하의 염기 서열을 가질 수 있다.
- [0125] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 miR-124일 때, miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, miR-124의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일할 수 있으며 6번째와 7번째 염기는 miR-124의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 miR-124의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 위블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되는 RNA 간섭 유도 핵산이다.
- [0126] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단 2번째에서 7번째 염기 서열이 5'-AA GGC C-3'의 염기 서열을 나타

내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-124BS)일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5'-UAA GGC CAC GCG GUG AAU GCC-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-124BS)일 수 있다.

[0127] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 miR-122일 때, miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, miR-122의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일하며 6번째와 7번째 염기는 miR-122의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 miR-122의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 워블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되는 RNA 간섭 유도 핵산이다.

[0128] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단 2번째에서 7번째 염기 서열이 5'-GG AGU U-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-122BS)일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5'-UGG AGU UGU GAC AAU GGU GUU-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-122BS)일 수 있다.

[0129] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 miR-155일 때, miR-155의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, miR-155의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일하며 6번째와 7번째 염기는 miR-155의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 miR-155의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 워블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되는 RNA 간섭 유도 핵산이다.

[0130] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단 2번째에서 7번째 염기 서열이 5'-UA AUG G-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-155BS)일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5'-UUA AUG GGC UAA U CGU GAU AGG-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-155BS)일 수 있다.

[0132] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 miR-1일 때, miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, miR-1의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일하며 6번째와 7번째 염기는 miR-1의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 miR-1의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 워블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되는 RNA 간섭 유도 핵산이다.

[0133] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단 2번째에서 7번째 염기 서열이 5'-GG AAU U-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-1BS)일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5'-UGG AAU UGU AAA GAA GUA UGU-3'의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산 (miR-1BS)일 수 있다.

[0135] 본 발명에 따른 특정 마이크로RNA가 인식하는 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(G) 염기가 유라실(U) 또는 아데닌(A)으로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 RNA 간섭 유도 핵산의 길이는 9개 이상의 염기 서열을 가지며, 이에 제한되지 않지만, 보통 21개 정도로 24개 이하의 염기 서열을 가질 수 있다.

[0137] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 miR-124일 때, miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, miR-124의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(G) 염기가 유라실(U) 또는 아데닌(A) 염기로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 RNA 간섭 유도 핵산이다.

[0138] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열이 5'-UAA UGC AC-3' (miR-124-G4U), 5'-UAA GUC AC-3' (miR-124-G5U) 또는 5'-UAA UUC AC-3' (miR-124-G4,5U)을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5'-UAA UGC ACG CGG UGA AUG CCA A-3' (miR-124-G4U), 5'-UAA GUC ACG CGG UGA AUG CCA A-3' (miR-124-G5U) 또는 5'-UAA UUC ACG CGG UGA AUG CCA A-3' (miR-124-G4,5U)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다.

[0139] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 miR-1일 때, miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, miR-1의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(G) 염기가 유라실(U) 또는 아데닌(A) 염기로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 RNA 간섭 유도 핵산이다.

- [0140] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열이 5'-UUG AAU GUA-3' (miR-1-G2U), 5'-UGU AAU GUA-3' (miR-1-G3U), 5'-UGG AAU UUA-3' (miR-1-G7U), 5'-UUU AAU GUA-3' (miR-1-G2,3U), 5'-UGU AAU UUA-3' (miR-1-G3,7U), 5'-UUG AAU UUA-3' (miR-1-G2,7U) 또는 5'-UUU AAU UUA-3' (miR-1-G2,3,7U)을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5'-UUG AAU GUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2U), 5'-UGU AAU GUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G3U), 5'-UGG AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G7U), 5'-UUU AAU GUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2,3U), 5'-UGU AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G3,7U), 5'-UUG AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2,7U) 또는 5'-UUU AAU UUA AAG AAG UAU GUA U-3' (miR-1-G2,3,7U)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다.
- [0141] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 miR-122일 때, miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, miR-122의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(G) 염기가 유라실(U) 또는 아데닌(A) 염기로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 RNA 간섭 유도 핵산이다.
- [0142] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열이 5'-UUG AGU GUG-3' (miR-122-G2U), 5'-UGU AGU GUG-3' (miR-122-G3U), 5'-UGG AUU GUG-3' (miR-122-G5U), 5'-UGG AGU UUG-3' (miR-122-G7U), 5'-UGG AGU GUU-3' (miR-122-G9U), 5'-UUU AGU GUG-3' (miR-122-G2,3U), 5'-UUG AUU GUG-3' (miR-122-G2,5U), 5'-UUG AGU UUG-3' (miR-122-G2,7U), 5'-UUG AGU GUU-3' (miR-122-G2,9U), 5'-UGU AUU GUG (miR-122-G3,5U), 5'-UGU AGU UUG-3' (miR-122-G3,7U), 5'-UGU AGU GUU-3' (miR-122-G3,9U), 5'-UGG AUU UUG-3' (miR-122-G5,7U), 5'-UGG AUU GUU-3' (miR-122-G5,9U), 또는 5'-UGG AGU UUU-3' (miR-122-G7,9U)을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5'-UUG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2U), 5'-UGU AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3U), 5'-UGG AUU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G5U), 5'-UGG AGU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G7U), 5'-UGG AGU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G9U), 5'-UUU AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,3U), 5'-UUG AUU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,5U), 5'-UUG AGU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,7U), 5'-UUG AGU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G2,9U), 5'-UGU AUU GUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3,5U), 5'-UGU AGU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3,7U), 5'-UGU AGU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G3,9U), 5'-UGG AUU UUG ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G5,7U), 5'-UGG AUU GUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G5,9U) 또는 5'-UGG AGU UUU ACA AUG GUG UUU G-3' (miR-122-G7,9U)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다.
- [0143] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 miR-133일 때, miR-133의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, miR-133의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(G) 염기가 유라실(U) 또는 아데닌(A) 염기로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 RNA 간섭 유도 핵산이다.
- [0144] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열이 5'-UUU UGU CCC-3' (miR-133-G4U), 5'-UUU GUU CCC-3' (miR-133-G5U) 또는 5'-UUU UUU CCC-3' (miR-133-G4,5U)을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5'-UUU UGU CCC CUU CAA CCA GCU G-3' (miR-133-G4U), 5'-UUU GUU CCC CUU CAA CCA GCU G-3' (miR-133-G5U) 또는 5'-UUU UUU CCC CUU CAA CCA GCU G-3' (miR-133-G4,5U)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다.
- [0145] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 let-7 일 때, let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, let-7의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(G) 염기가 유라실(U) 또는 아데닌(A) 염기로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 RNA 간섭 유도 핵산이다.
- [0146] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열이 5'-UUA GGU AGU-3' (let-7-G2U), 5'-UGA UGU AGU-3' (let-7-G4U), 5'-UGA GUU AGU-3' (let-7-G5U), 5'-UGA GGU AUU-3' (let-7-G8U), 5'-UUA UGU AGU-3' (let-7-G2,4U), 5'-UUA GUU AGU-3' (let-7-G2,5U), 5'-UUA GGU AUU-3' (let-7-G2,8U), 5'-UGA UUU AGU-3' (let-7-G4,5U), 5'-UGA UGU AUU-3' (let-7-G4,8U), 또는 5'-UGA GUU AUU-3' (let-7-G5,8U)을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5'-UUA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2U), 5'-UGA UGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G4U), 5'-UGA GUU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G5U), 5'-UGA GGU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G8U), 5'-UUA UGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2,4U), 5'-UUA GUU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2,5U), 5'-UUA GGU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G2,8U), 5'-UGA UUU AGU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G4,5U), 5'-UGA UGU AUU AGG

UUG UAU AGU U-3' (let-7-G4,8U) 또는 5'-UGA GUU AUU AGG UUG UAU AGU U-3' (let-7-G5,8U)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다.

[0147] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 miR-302a일 때, miR-302a의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, miR-302a의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(G) 염기가 유라실(U) 또는 아데닌(A) 염기로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 RNA 간섭 유도 핵산이다.

[0148] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열이 5'-UAA UUG CUU-3' (miR-302a-G4U), 5'-UAA GUU CUU-3' (miR-302a-G6U), 또는 5'-UAA UUU CUU-3' (miR-302a-G4,6U)을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5'-UAA UUG CUU CCA UGU UUU GGU GA-3' (miR-302a-G4U), 5'-UAA GUU CUU CCA UGU UUU GGU GA-3' (miR-302a-G6U), 또는 5'-UAA UUU CUU CCA UGU UUU GGU GA-3' (miR-302a-G4,6U)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다.

[0149] 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은, 특정 마이크로RNA가 miR-372일 때, miR-372의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서, miR-372의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(G) 염기가 유라실(U) 또는 아데닌(A) 염기로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지는 RNA 간섭 유도 핵산이다.

[0150] 예컨대, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열이 5'-AAA UUG CUG-3' (miR-372-G4U), 5'-AAA GUU CUG-3' (miR-372-G6U), 5'-AAA GUG CUU-3' (miR-372-G9U), 5'-AAA UUU CUG-3' (miR-372-G4,6U), 5'-AAA UUG CUU-3' (miR-372-G4,9U), 또는 5'-AAA GUU CUU-3' (miR-372-G6,9U)을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 RNA 간섭 유도 핵산은 miR-372의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산으로서 5'-AAA UUG CUG CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G4U), 5'-AAA GUU CUG CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G6U), 5'-AAA GUG CUU CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G9U), 5'-AAA UUU CUG CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G4,6U), 5'-AAA UUG CUU CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G4,9U), 또는 5'-AAA GUU CUU CGA CAU UUG AGC GU -3' (miR-372-G6,9U)의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산의 염기 서열을 나타내는 RNA 간섭 유도 핵산일 수 있다.

[0152] 본 발명에 따른 상술한 RNA 간섭 유도 핵산을 이용하면, 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자를 특이적으로 억제할 수 있다.

[0153] 이에, 본 발명은 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자 발현 억제용 조성물 또는 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자 발현 억제용 키트를 제공한다.

[0155] 또한, 본 발명에 따른 상술한 RNA 간섭 유도 핵산을 이용하면, 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자를 특이적으로 억제함으로써, 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자의 발현 억제로 인해서 일어나는 작용을 선택적으로 조절할 수 있다.

[0156] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산을 이용하면, 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자를 특이적으로 억제하므로, 본 발명에 따른 상술한 RNA 간섭 유도 핵산을 이용하면, 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자 발현에 따른 작용(예컨대, 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식, 또는 사멸)을 특이적으로 조절할 수 있다.

[0157] 이에, 본 발명은 RNA 간섭 유도 핵산을 포함하는 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식, 또는 사멸 조절용 조성물 또는 키트를 제공한다.

[0158] 본 발명에 있어서, 상기 '세포 주기'는 세포가 성장하여 분열하고 다시 성장하는 연속적인 과정으로, 세포가 M기(세포분열기), G1기(제1분열준비기), S기(DNA 합성기), G2기(제2분열준비기)의 4기(phase)를 반복하는 것을 의미한다. G1기는 세포분열 직후에서 DNA 합성 개시까지의 DNA 합성준비기이고 G2기는 DNA 합성의 종료에서 세포분열 개시까지의 세포분열 준비기이다.

[0159] 본 발명에 있어서, 상기 '세포 주기 조절'은 세포가 상기 4기(phase) 간에 변동하도록 유도하거나, 상기 변동을 촉진 또는 정지(arrest)시키는 것을 포함하며, 예컨대, G2/M기의 세포를 G1/G2기로 변동하도록 유도하는 것이

세포 주기 조절의 예로 포함될 수 있다.

- [0160] 본 발명에 있어서, 상기 '세포 분화(differentiation)'는 세포가 형태적, 기능적으로 특수성을 획득하는 과정으로, 세포는 분화를 통해서 크기나 모양, 막전위, 대사 활성, 그리고 신호에 대한 반응이 변화한다.
- [0161] 본 발명에 있어서, 상기 '세포 분화 조절'은 세포가 분화하는 속도를 촉진 또는 지연시키거나, 분화가 시작되도록 유도하거나, 분화가 시작되지 않도록 억제하는 것을 포함하며, 예컨대 신경세포가 분화되도록 유도하여 형태적 특수성(예. 신경돌기분화)을 획득하도록 유도하는 것이 세포 분화 조절의 예로 포함될 수 있다. 또는 예컨대, 근세포가 분화되도록 유도하여 형태적 특수성(예. 근세포의 근섬유화)을 갖도록 유도하는 것이 세포 분화 조절의 예로 포함될 수 있다.
- [0162] 본 발명에 있어서, 상기 '역분화'란 분화 진행을 되돌리는 것 내지 분화가 다 된 세포를 분화가 되기 전의 미분화 시기의 전분화능을 획득하여 나아가 중기세포와 같이 변하는 현상을 말한다.
- [0163] 본 발명에 있어서, 상기 '역분화 조절'은 세포가 역분화 되도록 유도, 촉진하거나, 역분화 진행을 억제, 지연하는 것을 포함하며, 역분화 조절 결과는 예컨대 세포 성장 형태(예. 군집 형성 등), 역분화 인자(Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4)의 활성 등을 확인함으로써 판단할 수 있다.
- [0164] 본 발명에 있어서, 상기 '세포 형태'는 세포의 모양, 구조, 크기 등을 포함하는 표현형 상의 특징을 의미하며, 세포 형태는 생물의 종류에 따라, 또 같은 생물이라도 조직이나 기관의 종류에 따라 다종다양하다.
- [0165] 본 발명에 있어서, 상기 '세포 형태 조절'은 세포의 모양, 구조, 크기 등을 포함하는 표현형 상의 특징의 변화를 유도하는 것으로, 세포의 자연적 형태 변화를 촉진, 지연, 유도 또는 억제하는 것과 세포의 형태를 비-자연적으로 변화시키는 것을 촉진 내지 유도하는 것을 포함한다. 예컨대, 심근 세포의 심근 비대 현상을 유도하는 것이 예로 포함될 수 있다.
- [0166] 본 발명에 있어서, 상기 '세포 이동'은 세포의 움직임을 의미하며, 동물의 성장 및 생리 활동을 위해 중요한 과정으로, 세포들은 주로 주어진 자극에 빠른 반응을 보이며 보통 비집단적인 형상으로 이동하는데 반해, 다른 세포 유형들은 특정한 성장 기간이나 특수한 상황에서만 이동할 수 있다. 세포 이동은 신경관과 맥관의 발달이나 상피 조직의 상처 치유 과정에서 주로 일어나며, 세포 집단 이동은 다종의 종양 전이에 기여한다.
- [0167] 본 발명에 있어서, 상기 '세포 이동 조절'은 세포의 이동을 지연, 촉진, 유도 또는 억제(저해)하는 것을 의미한다.
- [0168] 본 발명에 있어서, '세포 분열, 증식'은 모 세포가 두 개의 딸 세포로 나뉘는 과정으로, 세포 수를 늘리는 과정을 의미한다.
- [0169] 본 발명에 있어서, '세포 분열, 증식 조절'은 세포 분열, 증식을 지연, 촉진, 억제 내지 유도하는 것을 포함한다. 세포 주기 중 M기(세포분열기)로 세포의 기(phase)를 유도하는 경우 세포 분열, 증식을 유도하게 될 수 있다. 예컨대, G0/G1 기에 분포하는 세포의 수를 감소시키고 G2/M 기에 분포하는 세포의 수를 증가시키면, 세포 분열, 증식 조절의 예로 포함될 수 있다.
- [0170] 본 발명에 있어서, '세포 사멸(Apoptosis)'은 세포가 기능적인 역할은 유지하면서 유전적 성질에 의해 죽음으로 이르는 단계를 의미하며, 이른 세포 사멸과 늦은 세포 사멸이 모두 포함된다. 세포 사멸에 의하면 세포 전체가 위축되면서 새로운 단백질이 합성되고 세포의 자살 유전자에 의해 죽음으로 유도된다.
- [0171] 본 발명에 있어서, '세포 사멸 조절'은 세포 사멸을 유도, 지연, 촉진 또는 억제하는 것을 포함한다.
- [0172] 보다 구체적으로, 본 발명은 miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-124BS)을 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물;
- [0173] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-124BS)을 포함하는 신경 돌기 가지 분화 유도용 조성물;
- [0174] miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-122BS)을 포함하는 간암 세포의 세포 주기 정지 유도용 조성물;
- [0175] miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-1BS)을 포함하는 근세포 분화 촉진 또는 근섬유화 촉진용 조성물;
- [0176] miR-155의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-155BS)을 포함하는 근세포 사멸

유도용 조성물;

- [0177] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-124-G5U)을 포함하는 신경 모세 포종의 세포 사멸 촉진용 조성물;
- [0178] miR-124의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-124-G4U)을 포함 하는 신경 모 세포종의 세포 분열 증식 촉진용 조성물;
- [0179] miR-1의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-1-G2U, miR-1-G3U, miR-1-G7U)을 포함하는 심근 비대 유도용 조성물;
- [0180] miR-133의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-133-G4U)을 포함하는 심근 비대 유도용 조성물;
- [0181] let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, let-7-G2U, let-7-G2,4U)을 포함하는 암 세포의 세포 주기 정지 유도용 조성물;
- [0182] let-7의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, let-7-G4U)을 포함하는 간세포의 세포 주기 진행 활성 유도용 조성물;
- [0183] miR-302a의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-302a-G4U)을 포함하는 역분화 촉진용 조성물;
- [0184] miR-372의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-372-G4U)을 포함하는 역분화 촉진용 조성물; 또는
- [0185] miR-122의 비정규 표적 유전자를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산(바람직하게, miR-122-G2U, 또는 miR-122-G2,3U)을 포함하는 간암 세포의 세포 이동 저해용 조성물.
- [0187] 또한, 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산을 이용하면, 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자를 특이적으로 억제함으로써, 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자의 작용을 선택적으로 조절할 수 있는바, 다양한 분야(예컨대, 약학, 화장품학, 세포학 등)에서 활용될 수 있다.
- [0189] 또한, 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산은 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식 또는 사멸 조절용 시험 물질을 스크리닝하는 방법에 활용될 수 있다.
- [0190] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 RNA 간섭 유도 핵산을 대상 세포에 도입하는 단계;
- [0191] 대상 세포에 시험 물질을 처리하는 단계; 및
- [0192] 대상 세포에서 RNA 간섭 유도 핵산이 억제하는 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자의 발현양 내지 발현 여부를 확인하는 단계를 포함하는,
- [0193] 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식 또는 사멸 조절용 시험 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0194] 본 발명에 있어서, 상기 대상 세포는 인간을 포함한 포유 동물에서 유래된 것이면 제한되지 않고 포함되며, 대상 세포를 추출하는 조직 내지 종류 등은 제한되지 않으며 예컨대 신경세포, 심근세포, 암세포, 근세포 등이 포함될 수 있다.
- [0195] 본 발명에 있어서, 상기 RNA 간섭 유도 핵산의 대상 세포에의 도입은 당업계 공지된 다양한 방법에 따라 적절히 수행될 수 있으며, 예컨대 도입은 인산칼슘을 이용한 형질감염(Graham, FL 등, Virology, 52:456(1973)), DEAE 텍스트란에 의한 형질감염, 미세주사에 의한 형질감염(Capecchi, MR, Cell, 22:479(1980)), 양이온성 지질에 의한 형질감염(Wong, TK 등, Gene, 10:87(1980)), 전기천공법(Neumann E등, EMBO J, 1:841(1982)), 형질도입 또는 트랜스펙션과 같이 문헌(Basic methods in molecular biology, Davis 등, 1986 및 Molecular cloning: A laboratory manual, Davis 등, 1986)에 기재된 바와 같이 본 발명이 속한 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 익히 공지되어 있는 방법들에 따라 이뤄질 수 있다. 바람직하게, 트랜스펙션에 의할 수 있다. 트랜스펙션 효율은 세포의 종류 뿐만 아니라 세포 배양조건, 트랜스펙션 시약 등에 따라 많은 차이가 날 수 있다

- [0196] 본 발명에 있어서, 시험 물질은 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자의 발현을 조절하여 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식 또는 사멸에 영향을 미치는지 검사하기 위해 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미하며, 화합물, 추출물, 단백질 또는 핵산 등이 포함되고, 이에 제한되지 않는다.
- [0197] 본 발명에 있어서, 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자의 발현양 내지 발현 여부는 당업계 공지된 다양한 발현 분석 방법에 의해 확인할 수 있으며, 예컨대 RT-PCR, ELISA(참조: Sambrook, J et al, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd ed Cold Spring Harbor Press(2001)), western blot, FACS analysis 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0198] 본 발명에 있어서, 상기 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자의 발현양 내지 발현 여부를 확인하고, 그 결과 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자의 발현양 내지 발현에 있어 시험물질 없이 RNA 간섭 유도 핵산만을 처리한 경우와 비교해 차이가 있다면, 시험물질은 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자의 발현에 영향을 미치는 것으로 판단할 수 있다. 나아가, 상기 시험물질은 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식 또는 사멸 조절 기능을 가지는 것으로 판단할 수 있다.
- [0200] 또한, 본 발명은 상술한 RNA 간섭 유도 핵산의 제조방법을 제공한다.
- [0201] 보다 구체적으로, 다음의 단계를 포함하는, RNA 간섭(RNA interference)을 유도하는 핵산의 이중가닥 중 하나 이상의 단일가닥에 있어서, 특정 마이크로RNA의 일부 서열이 변형되어 마이크로RNA의 비정규 표적 유전자(noncanonical target gene)를 억제하는 RNA 간섭 유도 핵산의 제조방법을 제공한다:
- [0202] 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 2번째에서 5번째의 4개의 염기 서열을 포함하고, 6번째와 7번째 염기는 동일하며 6번째와 7번째 염기는 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기와 상보적인 염기 서열을 가지며, 상기 특정 마이크로RNA의 6번째 염기와 배열할 수 있는 염기에는 G:A, G:U 위블(wobble) 배열을 포함한 모든 상보적 염기가 포함되도록 RNA 간섭 유도 핵산을 작제하는 단계, 또는
- [0203] 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 9번째 염기 사이의 염기 서열 중 구아닌(Guanine) 염기가 유라실 또는 아데닌으로 적어도 하나 이상 치환된 변형 염기 서열을 가지도록 RNA 간섭 유도 핵산을 작제하는 단계.
- [0204] RNA 간섭 유도 핵산에 관해서는 이미 기재하였으므로, 중복 기재를 피하기 위해, 설명을 생략한다.
- [0205] RNA 간섭 유도 핵산 작제는 당업계 공지된 다양한 방법에 따르며, 특정 방법으로 제한되지 않는다.
- [0207] 또한, 본 발명은 특정 마이크로RNA의 5' 말단으로부터 6번째 뉴클레오타이드의 리보실 링의 2' 위치에 메틸기(2'OME)를 넣어 변형한 간섭 유도 핵산을 제공한다.
- [0208] 상기 변형된 간섭 유도 핵산은 해당 miRNA의 비정규 핵융기 사이트만을 특이적으로 억제하려는 본 발명의 목적은 유지하면서, 새롭게 나타날 수 있는 비정규 핵융기 결합은 완전히 제거하는 효과가 있다.

발명의 효과

- [0210] 본 발명에 따른 간섭 유도 핵산을 이용하면 기존의 마이크로RNA가 비정규 표적 유전자를 억제함으로써 나타내는 생물학적인 기능을 효율적으로 증대하거나, 기존의 마이크로RNA가 나타내는 기능 중 일부, 즉 비정규 표적 유전자를 억제함으로써 나타내는 생물학적 기능만 선택적으로 나타내는 효과를 가질 수 있다. 또한, 이러한 간섭 유도 핵산을 통해 세포 주기, 분화, 역분화, 형태, 이동, 분열, 증식 또는 사멸 조절이 가능한바, 약물, 화장품 등 다양한 분야에서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0212] 도 1은 마이크로RNA의 비정규 표적을 억제하는 간섭 유도 핵산의 작용 기작을 도식화해서 나타낸 것이다.
- 도 2는 miR-124의 정규 타겟 (발단:Seed) 과 비정규 핵융기 타겟 (핵융기: nucleation bulge) 의 표적 유전자 억제를 루시퍼라제 리포터의 효소로 측정하여 miR-124-BS의 비정규 표적 특이적 발현 억제 효과에 대해서 확인

한 것이다.

도 3은 자궁경부암세포 (HeLa)에서 miR-124의 정규 타겟 (발단:Seed) 과 비정규 핵융기 타겟 (핵융기: nucleation bulge) 이 유도하는 세포사멸을 miR-124-BS에서 유세포 (Fluorescence-activated cell sorting: FACS) 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 miR-124의 비정규 핵융기 타겟 (핵융기: nucleation bulge)이 유도하는 신경돌기 분화를 miR-124-BS의 인간 신경 종양 모세포종(Sh-Sy-5y)에서의 발현을 통해 세포형태 및 마커의 발현 양상으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 miR-124의 핵융기 타겟 (핵융기: nucleation bulge) 을 정규 타겟 (발단:Seed)으로 조절하는 miR-124-BS의 자연적인 형태인 miR-124-BS(4753)와 miR-124와 동일한 발단 서열을 가지는 miR-124(3714)이 유도하는 신경 돌기 가지 분화를 세포형태상, 분자생물학적 특징으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 마우스 신경모세포종 (N2a)에서 miR-124의 비정규 핵융기 타겟 (핵융기: nucleation bulge)이 유도하는 신경 돌기 가지 분화가 MAPRE1 유전자의 발현 조절을 통한 기작임을 세포형태상, 분자생물학적 특징으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 마우스 신경 모세포종 (N2a) 세포에서 miR-124-BS가 유도하는 비정규 핵융기 타겟 (핵융기: nucleation bulge) 유전자의 발현 억제를 전사체 수준에서 RNA-Seq 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 인간 간암세포주 (HepG2)에서 miR-122의 비정규 핵융기 타겟 (핵융기: nucleation bulge) 이 유도하는 cell cycle arrest 를 miR-122-BS와 유세포 분석을 통해 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 근세포주에서 miR-1의 비정규 핵융기 타겟 (핵융기: nucleation bulge)이 유도하는 근육세포의 두꺼워지는 효과와 miR-155 비정규 핵융기 타겟(핵융기: nucleation bulge)이 유도하는 근세포 분화 저해 및 세포사멸 유도를 각각 miR-1-BS, miR-155-BS를 통해 세포 형태상, 분자 생물학적 특징과 유세포 분석으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 사람의 뇌조직에서 아고너트 단백질과 결합하는 마이크로RNA와 표적체 RNA 데이터인 Ago HITS-CLIP 결과를 생물정보학적으로 분석한 결과로, 정규 발단 타겟 (발단: seed) 뿐 아니라, 비정규 GA 배열 발단 (G:A wobble) 타겟이 자연적으로 존재하는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 마우스 신경 모세포종 (N2a) 세포에서 miR-124의 4번 비정규 GA 배열 발단 타겟, 5번 비정규 GA 배열 발단 타겟이 뇌세포 분화에 있어 miR-124와 전혀 다른 기능을 보이는 것을 miR-124-G4U, miR-124-G5U를 통해 세포 형태상의 관찰과, 세포 사멸을 유세포 분석으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 인간 신경 모세포종 (SH-sy-5y) 세포에서 miR-124의 4번 비정규 GA 배열 발단 타겟, 5번 비정규 GA 배열 발단 타겟의 억제의 생물학적 기능을 miR-124-G4U, miR-124-G5U를 통해 세포 분열(proliferation)과 세포주기 분석에 대한 유세포 분석 (Fluorescence-activated cell sorting: FACS)으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 miR-1의 7번 비정규 GA 배열 발단 타겟이 유전자 억제 기능을 한다는 점을 형광 단백질 리포터에서 유세포 분석 (Fluorescence-activated cell sorting: FACS)을 통해 심근세포주(h9c2)에서 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 miR-1의 2번, 3번, 7번 비정규 GA 배열 발단 타겟의 기능을 랫트(rat)의 신생백서 심근세포 (neonatal cardiomyocyte)에서 miR-1-G2U, miR-1-G3U, miR-1-G7U를 발현시킨 후 심근비대 유도 효과에 대한 세포형태상과 분자생물학적 특징에 대한 관찰을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 miR-133의 4번 비정규 GA 배열 발단 타겟의 기능을 심근세포 (h9c2)에서 miR-133-G4U를 발현시킨 후 심근비대 유도 효과에 대한 세포형태상 특징을 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 16는 miR-122의 2번, 3번 비정규 GA 배열 발단 타겟을 통해 유전자의 발현을 억제한다는 사실을 인간 간암세포주 (HepG2) 에서 루시퍼라제 리포터의 효소 활성 측정을 통해 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 miR-122에 의한 2번 비정규 GA 배열 발단 타겟, 2,3번 비정규 GA 배열 발단 타겟 발현의 저해가 인간 간암 세포주 (HepG2)의 이동을 저해하는 기능을 miR-122-G2U, miR-122-G2,3,U의 발현을 통해 세포형태상의 관찰로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 miR-122에 의한 2,3번 비정규 GA 배열 발단 타겟 발현의 억제가 인간 간암 세포주 (HepG2)의 세포 주기 정지 (cell cycle arrest) 를 유도한다는 것을 miR-122-G2,3U의 발현을 통해 유세포 분석으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 19는 miR-122에 의한 2,3번 비정규 GA 배열 발단 타겟, 2,7번 비정규 GA 배열 발단 타겟의 발현 저해가 인간 간암 세포주 (HepG2)의 세포 주기 정지 (cell cycle arrest) 를 유도한다는 것을 miR-122-G2,3U, miR-122-G2,7U의 발현을 통해 유세포 분석으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 let-7에 의한 2번 또는 2,4번 비정규 GA 배열 발단 타겟 발현의 저해가 인간 간암 세포주 (HepG2)의 세포 주기 정지 (cell cycle arrest) 를 유도한다는 것과 4번의 비정규 GA 배열 발단 타겟 발현의 저해가 세포 주기를 촉진한다는 것을 let-7a-G2U, let-7a-G2,4U, let-7-G4U의 발현을 통해 유세포 분석으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 21은 miR-372 또는 miR-302a에 의한 4번 비정규 GA 배열 발단 타겟 발현의 저해를 유도하는 miR-372-G4U 또는 miR-302a-G4U가 miR-372 또는 miR-302a와 함께 역분화를 촉진시킨다는 것을 Oct4 유전자 발현 리포터로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 22는 5 '말단 기준 6번째에 2 'OMe 변형이 해당 RNA 간섭 유도체의 비정규 핵융기 표적을 억제하지 못하는 현상을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0213] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 일례일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 한정된 것은 아니다.

[실시예 1] 마이크로RNA의 비정규 표적을 억제하는 간섭 유도 핵산의 작용 기작

[0216] 본 발명자들은 Ago HITS CLIP 실험을 통해, 아고너트 단백질에서 마이크로RNA가 표적체와 염기배열을 할 때, 마이크로RNA 발단과 완전 상보적 배열을 하는 정규 발단 타겟 외에도, 마이크로RNA 발단과 완전 상보적 배열을 하지 않고 표적 전령RNA와 결합한다는 사실을 아고너트 단백질에 결합한 RNA 복합체 서열 결과 (Ago HITS-CLIP)의 분석을 통해 확인하였다. 아울러, 이런 특징을 지닌 RNA의 염기 서열을 분석해 본 결과, 마이크로RNA의 6번 염기가 표적체에 핵융기 (nucleation bulge) 를 유도하여 염기 배열하는 표적체 (마이크로RNA 비정규 핵융기 타겟 사이트)와, 마이크로RNA 발단 지역에서 GA 배열 (wobble)을 허용하는 표적체 (마이크로RNA 비정규 GA배열 발단 타겟 사이트)가 자연적으로 존재한다는 것을 확인하였다 (도 1).

[0217] 도 1에 나타낸 도식화된 예로 보면, miR-124 는 아고너트 단백질을 매개로 발단염기서열 (5 '-UAAGGCAC-3')을 통해 표적체의 염기 서열 5'- GUGCCUUA-3'에 대하여 최소 6개의 연속된 상보적 염기배열을 하게 되며, 이러한 염기 배열을 가지는 표적체는 마이크로RNA 의 정규 발단 타겟 사이트 (canonical seed site)로 보고된 바 있다 (Nature, 2009, 460 (7254): 479-86).

[0218] 또한 아고너트와 결합한 RNA 복합체 중, miR-124 발단염기서열 (5'-UAAGGCAC-3')과 마이크로RNA 비정규 핵융기 타겟 사이트 (5'- GUGCCUUA-3')로 miR-124의 5 '말단 기준 5번째와 6번째에 사이에 표적 전령RNA의 G가 벌지 (bulge)로 배열되도록 상보적 염기 배열을 한 표적을 확인하였고, 이를 바탕으로 마이크로RNA 비정규 핵융기 타겟 사이트와 상보적으로 염기배열이 가능한 miR-124의 발단 염기 서열은 miR-124 발단의 6번-7번째 사이에 6번 염기가 한번 더 반복되는 염기서열 (5-UAAGGCCA-3)을 가지며, 이에 대하여 연속적이고 완벽한 상보 서열은 miR-124의 비정규 핵융기 타겟을 억제하는 miR-124BS (BS: Bulge site) siRNA 로 사용하였다.

[0219] 아고너트와 결합한 RNA 복합체에서 마이크로RNA와 결합한 표적 전령RNA의 서열을 분석하였을 때, 기존의 상보적인 염기배열 이외에 G:A 위블(wobble) 염기 배열이 마이크로RNA의 발단서열과 표적 전령RNA의 결합에서 일어난다는 것을 확인하였다. 따라서 miR-124의 경우 발단염기서열 (5'-UAAGGCAC-3')에서 5'말단 기준 4번째의 G염기가 G:A 위블 배열을 하여 마이크로RNA 비정규 GA배열 발단 타겟 사이트(5'- UGGCAUU -3')를 인식하고, 이를 바탕으로 miR-124의 비정규 GA배열 발단 타겟 사이트와 연속적이고 완벽하게 상보적인 서열로 siRNA를 디자인 하여 miR-124-GU를 발명하였으며, 이 siRNA는 miR-124의 비정규 GA배열 발단 타겟의 발현을 저해하는 siRNA로 사용하였다.

- [0221] [실시예 2] 비정규 핵융기 타겟 싸이트와 연속적이고 완벽하게 상보적인 염기 서열을 발단지역에 포함하는 마이크로RNA-BS의 억제능 확인
- [0222] 자연적으로 존재하는 miR-124의 정규적인 발단 타겟 싸이트 (seed target site) 중 miR-124의 5'말단 기준 2번째부터 7번째까지의 염기와 상보적인 것은 5'- GUGCCUU-3' 염기 서열로 이러한 정규적인 발단 타겟 싸이트는 miR-124의 발단 (5'-UAAGGCAC-3') 과 최소 6개의 연속된 염기로 완전 상보적 염기배열을 하게 된다 (도 2a).
- [0223] Ago HITS CLIP 실험을 통해 발견한 miR-124의 비정규 핵융기 타겟 싸이트 (Nuc site; nucleation bulge site) 는 5'- GUGCCUU -3'로 miR-124의 6번 C 염기가 타겟과 핵융기를 형성하여 염기 배열하게 되고, 이에 따라 miR-124의 5 '말단 기준 5번째와 6번째 사이에 배열되는 표적 RNA의 G가 벌지(bulge)로 형성된다. 이를 바탕으로 비정규 핵융기 타겟 싸이트 (nucleation bulge site)와 연속적이고 완전하게 상보 결합하는 염기 서열 (5'-UAAGGCCA-3') 을 마이크로RNA 발단으로 하는 siRNA를 디자인하여 miR-124-BS siRNA로 명명하였다 (도 2a). miR-124-BS는 miR-124의 비정규 표적인 핵융기 타겟 싸이트 (Nuc site)를 정규적인 발단 타겟으로 인식하여 이를 가지고 있는 비정규적 표적의 유전자 발현을 특이적이고 보다 강력하게 저해할 것으로 생각하고, 이러한 사실을 루시퍼라제 리포터 실험을 통해 확인하였다 (도 2b-c).
- [0224] 우선은 miR-124가 기존의 정규적인 표적인 발단 싸이트(seed site)에 비하여 얼마나 비정규적인 표적인 핵융기 타겟 싸이트를 억제할 수 있는지를 확인하기 위해서 루시퍼라제 리포터에 miR-124에 대한 해당 싸이트를 삽입하였고, 이와 함께 여러 농도 (0, 0.01, 0.1, 0.5, 2.5, 15nM)의 miR-124를 세포에 도입 시킨 후 루시퍼라제의 활성으로 IC50 (inhibitory concentration 50)를 측정해 본 결과, 정규 발단 싸이트는 약 0.5nM, 비정규 핵융기 싸이트는 약 0.2nM로 유사한 것으로 확인할 수 있었다 (도 2b). 하지만 최고로 억제되는 비율을 보면 정규 발단 싸이트는 약 50%, 비정규 핵융기 싸이트는 약 80%로 비정규 핵융기 싸이트를 통한 저해가 다소 약함을 알 수 있었다. 특히 유전자 발현 저해가 시작되는 점을 살펴 보았을 때, 정규 발단 타겟은 약 0.01nM 이상에서, 비정규 핵융기 타겟은 0.1nM 이상의 농도 조건에서 유전자 억제가 시작되는 점을 루시퍼라제 활성 측정을 통해 확인하였다 (도 2b). 따라서 miR-124는 정규 타겟과 비정규 핵융기 타겟의 발현을 조절하며, 정규 타겟 발현 조절 효율이 높다는 점을 알 수 있었다.
- [0225] 이때 실시한 루시퍼라제 리포터 실험은 해당하는 miR-124 타겟 싸이트 서열을 psi-check2 벡터 (Promega 사)의 레닐라 루시퍼라제 유전자 3'UTR (3'untranslated region) 부분에 2번 연속 배열로 클로닝 하여 실시하였다. 비정규 염기싸이트 서열은 MINK1의 3'UTR 부분에 자연적으로 존재하는 비정규 핵융기 타겟 싸이트 를 사용하였다. miR-124는 인간 유래의 서열로 miRBase 데이터베이스에 따라, 해당되는 가이드 가닥 (guide strand), 운반 가닥 (passenger strand) 을 각각 Bioneer사에서 화학적으로 합성 제작 후, HPLC로 분리, 상기 회사에서 제공한 방법에 따라 가이드 가닥과 운반 가닥의 이중체 (duplex)로 제조하였다. miR-124와 루시퍼라제 리포터 벡터는 Lipofectamine 2000 시약 (Invitrogen)을 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 대략 10,000개의 자궁경부암 세포 (HeLa: ATCC CCL-2) 에 전달(co-transfection)시켰다. HeLa 세포는 10% FBS (fetal bovine serum), 100 U/ml 페니실린, 및 100 μ g/ml 스탬토마이신을 보충한 Dulbecco's 개질 Eagle's 배지 (Invitrogen)에서 배양하였으며, 트랜스펙션 수행시는 항생제 없는 완전배지에서 세포를 배양하였다. 트랜스펙션을 수행한 24시간 후, Promega사의 Dual-luciferase reporter assay system을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 루시퍼라제의 활성을 측정하였으며, 레닐라 루시퍼라제 활성계측은 promega사의 Glomax Luminometer를 이용하여 최소 3번 이상의 반복 실험하였고, 반딧불(firefly) 루시퍼라제의 활성에 의해 표준화되어 계산하였다.
- [0226] miR-124의 비정규 핵융기 타겟만을 특이적으로 억제하기 위해 발명한 miR-124-BS의 기능을 확인하기 위하여, 동일하게 루시퍼라제 리포터를 사용하여 실험하였다. 그 결과 miR-124-BS는 miR-124 정규 발단 타겟에 대하여 어떤 농도 (0~ 10 nM) 에서도 루시퍼라제 리포터 효소 활성을 저해시키지 못하였으나, miR-124 비정규 핵융기 타겟 리포터에 대해서는 0.1nM 이상의 농도에서 루시퍼라제 리포터 효소 활성을 저해시키는 효과를 확인할 수 있었다 (도 2c). 이때의 유전자 억제 효율을 IC50으로 측정해보았을 때 비정규 핵융기 타겟에 대한 억제가 약 0.5nM로 나타났다. 이러한 점으로 보아, miR-124-BS의 miR-124 비정규 핵융기 타겟 발현 조절 기능은 비정규 핵융기 타겟 싸이트 특이적이라고 해석할 수 있다 (도 2c). 이때의 루시퍼라제 리포터 실험은 miR-124-BS를 이전과 동일하게 바이오니아사에서 합성하여 제작하고, 해당 루시퍼라제 리포터 벡터와 함께 자궁경부암 세포 (HeLa: ATCC CCL-2)에 트랜스펙션(co-transfection)한 후 24시간 후에 루시퍼라제 효소 활성을 측정하여 수행하였다.
- [0227] 상기의 실시예에서 발명자는 마이크로RNA의 비정규 유기 표적만을 억제할 수 있도록 하는 목적으로 해당 싸이트 서열에 대해서 연속적이고 완벽하게 상보적인 발단 지역 서열을 포함하는 miRNA-BS를 발명하였으며, 그 효과를

검증하기 위해서 miR-124에 적용해서 루시퍼라제 리포터 실험을 통해 확인해보았을 때, miR-124-BS가 정규 발단 표적의 발현은 억제하지 못하고, 비정규 용기 표적의 발현은 효과적으로 억제할 수 있다는 특징을 검증할 수 있었다.

[0229] [실시예 3] miR-124의 비정규 핵융기 타겟 발현 저해를 통해 유도되는 자궁경부암 세포의 세포 사멸현상 관찰

[0230] miR-124-BS가 miR-124가 억제하는 여러 표적 중 비정규 용기 표적만을 억제한다는 사실을 이전 실시예에서 확인한 후, 이를 통해 miR-124의 특정 기능만을 나타낼 수 있는지를 확인하고자 하였다. miR-124의 경우 일반적으로 신경세포에만 특이적으로 발현되므로 주로 신경세포에 관련된 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 하지만 종양으로 발생된 야교종에서는 miR-124의 발현이 떨어져 있으며, 이와 상반되어 miR-124의 발현을 인위적으로 종양세포에 유도할 경우 종양 세포의 사멸을 일으킬 수 있다는 사실이 관찰되었다. 따라서 이러한 miR-124의 다양하고 다른 기능이 그 표적을 인식하는 종류에 따라 다른지를 확인하고자, miR-124-BS를 자궁경부암 세포(HeLa)에 도입하고 세포의 사멸을 유세포 분석으로 관찰하였다 (도 3a).

[0231] 본 실험은 75nM의 miR-124 또는 miR-124-BS 이중체를 자궁경부암 세포 (HeLa: ATCC CCL-2)에 RNAiMAX 시약 (Invitrogen 사)을 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 트랜스펙션(transfection)한 후, 72시간 후에 트립신을 처리하여 세포를 배양 접시로부터 떼어내고, BD Pharmingen 社 의 Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit II 를 제조사가 제공한 방법에 따라 세포를 처리하여 BD Aria I (BD Biosciences)으로 Annexin V로는 apoptosis를 PI(Propidium Iodide)로는 necrosis를 측정하여 수행하였다. 이때 대조군으로는 예쁜 꼬마선충 (C.elegans)의 마이크로RNA인 cel-67의 서열과 동일하게 합성하여 사용하였다

[0232] 이러한 실험을 각각 대조군, miR-124 발현, miR-124-BS 발현으로 나누어서 비교해본 결과, miR-124가 발현 되었을 경우 자궁경부암 세포(HeLa)에서 대조군에 비해 apoptosis (Annexin V 로 염색 된 세포의 수)에 의해서 사멸이 진행되는 비율이 약 30%에서 약 78%로 증가하는 것을 관찰하였으며, 동일하게 miR-124-BS도 약 73%로 2배이상 증가하는 것을 확인하였다 (도 3a). miR-124-BS가 miR-124의 정규 발단 사이트는 억제하지 못하고 비정규 용기 사이트만을 억제했던 이전 실시예 2의 결과로 비추어 볼 때, 자궁경부암의 세포 사멸은 비정규 핵융기 타겟의 발현 억제로 일어남을 알 수 있다.

[0233] miR-124 는 뇌조직 특이적 마이크로RNA로, 조직세포 특이적 전사체 발현이 없는 전혀 다른 세포에서는 뇌조직 특이적 기능을 하지 않는다고 보고된 바 있다 (Farh K et al, 2005, Science, 310 (5755) 1817-21). 따라서, miR-124가 비정규 용기 표적을 억제함으로 일으키는 기능을 신경 세포에서 관찰하기 위해서, miR-124-BS를 소뇌 신경줄기세포주인 C17.2에 도입한 후, 세포분화를 세포 형태학적으로 관찰하였다 (도 3b, 위의 도면). 그 결과 miR-124를 도입한 경우에는 C17.2 세포의 신경 돌기 가지 분화가 길게 만들어 지면서 촉진되었으나, miR-124-BS의 경우에는 분화는 관찰되었으나 가지가 짧은 형태로 다르게 관찰되었다. 따라서 miR-124에 의해서 일어나는 일반적인 신경 돌기 가지 분화는 정기적인 발단 사이트 표적을 억제함으로 일어나는 것을 알 수 있다. 이때, miRNA의 도입은 이전 실시예 2와 동일한 방법으로 50nM의 miRNA를 합성하여 RNAiMax 시약으로 실행하였다.

[0234] 또한, 이전 HeLa 세포에서 miR-124-BS가 세포 사멸을 유도하였으므로, 신경세포에서도 이러한 기능이 나타나는지를 실시예 2에서 수행한 방법과 동일하게 C17.2 세포에서 유세포 분석으로 관찰하였다. 그 결과 miR-124 발현의 경우에는 세포사멸이 일어나는 비율이 대조군의 21%에 비해서 거의 비슷한 정도인 22.4% 인데 비해, miR-124-BS는 33.4%로 다소 증가하는 것으로 나타났다 (도 3b, 중간 도면). 이는 자궁경부암 세포에서 동일하게 세포 사멸이 miR-124의 비정규 용기 표적 억제를 통해 일어난다는 점에서 동일한 경향성을 보이나, 그 증가율은 약 2배로 나타나는 자궁경부암보다는 매우 작은 것을 알 수 있었다. miR-124는 신경줄기세포에서 분화에 관련된 역할을 주로 하는데, 이때 세포주기의 조절은 중요한 역할을 할 수 있다. 따라서 miR-124와 miR-124-BS를 C17.4 세포에 도입한 후 세포주기를 PI(Propidium Iodide) 염색을 통해 유세포 분석을 적용하여 관찰하였다 (도 3b, 밑의 도면). 이때 miR-124는 G0/G1에서의 세포주기 정지 상태(cell cycle arrest)를 대조군인 69%에 비해 다소 증가시킨 83%로 유도시키는 것으로 나타났다. 이에 비하여 miR-124-BS의 발현은 세포주기 정지가 현저하게 일어나지 않음을 관찰할 수 있었다. 이때의 실험은 이전 실시예와 동일하게 해당 마이크로RNA를 트랜스펙션하고 48 시간동안 배양 후, 세포를 떼어 에탄올로 고정 (fix) 하고 1mg/ml 의 propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich)를 0.2 mg/ml의 RnaseA 와 함께 37℃에서 30분간 반응시킨 다음 BD FACSCalibur (BD Biosciences) 로 유세포 분석을 수행하였다.

[0235] 상기의 실시예에서의 결과를 정리하면, miR-124-BS에 의해 miR-124 비정규 핵융기 타겟 발현을 저해하는 경우만

으로도, miR-124와 동일하게 자궁경부암 세포 (Hela) 의 사멸을 유도하며, 이를 통해 miR-124의 비정규 용기 표적의 저해 기능은 암세포의 사멸임을 알 수 있다. 또한 신경줄기세포의 경우 miR-124의 발현에 의해서 신경 돌기 가지 분화가 일어나면서, 약간의 세포사멸과 세포 주기 정지가 일어나는 데, miR-124의 비정규 용기 표적만을 저해하는 miR-124-BS에서는 이러한 기능 다소 다른 형태로 나타난다. 따라서 miR-124의 신경세포 분화 기능은 기존의 알려진 정규적인 발단 표적 유전자의 억제에 의해서 주로 일어남을 알 수 있으며, 다른 형태로는 비정규 용기 타겟을 통해 일어날 수 있음을 생각할 수 있었다.

[0237] **[실시예 4] miR-124-BS가 miR-124 비정규 핵용기 타겟 발현을 저해함으로써 가지가 많고 돌기가 짧은 다른 형태의 신경분화(branched neurite outgrowth) 유도 기능 확인**

[0238] miR-124-BS가 miR-124와는 다른 형태의 신경 가지 돌기 분화를 일으키는 것을 이전 실시예에서 확인한 후, 이를 보다 자세히 살펴보기 위해서 인간 신경 모세포종(neuroblastoma)인 sh-sy-5y 세포주(CRL-2266)를 사용하여 실험을 하였다. 이때 추가적으로 miR-124-BS 이외에 miR-124의 비정규 핵용기 싸이트를 인식하고 억제할 수 있는 발단 서열을 동일하게 가지지만, 이외의 서열은 다른 서열을 가지고 있는 마이크로RNA 서열을 miR-124와 동일하게 한 miR-124-BS를 이전 실시예에서 기술한 방법으로 합성하여 실험을 진행하였다. 이때 사용한 miR-124-BS(4753)의 서열은 5 ‘-CAAGGCCAAAGGAAGAGAACAG-3’ 이며, 대조군(control)으로써는 예쁜 꼬마선충(C.elegans)의 마이크로RNA인 cel-67(NT; non-targeting)의 서열과 동일하게 합성하여 사용하였다. 해당되는 miRNA를 이전 실시예에서 기술한 동일한 방법으로 트랜스펙션하고 60시간 동안 세포를 배양한 후, 세포 형태학적 변화를 광학현미경으로 관찰하였다 (도 4a).

[0239] 그 결과, miR-124의 발현은 인간 신경 모세포종 (Sh-sy-5y)의 신경돌기를 길게 분화시키는 형태상 변화를 관찰할 수 있었으며, 반면에 miR-124의 비정규 용기 표적만을 억제할 수 있는 발단 서열을 miR-124-BS와 동일하게 지니고 있는 miR-124-BS(4753)의 경우에는, 짧지만 한 세포에서 많은 수의 신경 돌기 가지가 생기는 세포 형태 (branched neurite outgrowth) 가 관찰되었다 (도 4a). 이를 바탕으로 추가로 카테콜아민계 신경세포 (CAD, CRL-11179)에서도 동일한 실험을 진행해 보았다. 이때는 해당 마이크로RNA를 트랜스펙션 시키고, 52시간 동안 세포를 배양한 후 관찰하였다 (도 4b). 그 결과 인간 신경 모세포종 (Sh-sy-5y, CRL-2266) 세포에서 보인 결과와 동일하게 miR-124는 숫자가 적지만 긴 돌기를 형성하고, miR-124-BS(4753)은 짧지만 많은 신경돌기 가지가 뻗어 나오는 분화 현상을 관찰할 수 있었다. (도 4b). 추가적으로, miR-124와 miR-124-BS(4753)을 함께 동일 비율로 세포내에 전달할 경우, 긴 신경 돌기를 가진 세포와 많은 신경돌기 가지를 친 세포가 동시에 관찰되었다. 이는 발명한 miR-124-BS와 기존의 miR-124와 함께 발현했을 경우, 인위적으로 좀 더 복잡한 신경 네트워크에서 보이는 뇌세포와 유사하게 다양한 형태의 신경 분화를 촉진시킬 수 있는 가능성을 보여준다.

[0240] 추가적으로 이러한 마이크로RNA에 의해서 촉진되는 CAD 세포주의 신경분화는 신경세포 특이적인 마커인 Tuj1에 대한 면역 염색을 통해서 확인하였다 (도 4b, 아래 도면). 이때의 실험은 해당 마이크로RNA를 트랜스펙션 한 후 52시간 후에, CAD 세포를 4% 파라포름 알데하이드로 고정 (fixation) 후, 1차 항체인 Tuj1 (MRB-435P, Covance Antibody Products 社) 을 1:1000 의 비율로, Alexa 594 형광물질이 결합된 2차 항체 (Abcam: ab150076)는 1:1000 의 비율로 항체 염색 (immune-staining) 한 후, DAPI로 핵을 염색하여 수행하였다.

[0241] 상기의 실시예의 결과로 미루어, miR-124는 비정규 핵용기 표적만을 억제하므로써 기존의 miR-124의 기능과는 다른 형태인 짧지만 많은 신경돌기 가지를 형성시키는 기능을 가지고 있음을 알 수 있다. 특히 miR-124-BS와는 서열이 다르나 동일하게 발단지역의 서열을 가지고 있어서 비정규 핵용기 표적만을 억제할 수 있는 miR-124-BS(4753)을 사용하여 이러한 사실을 관찰하였으며, 이는 비정규 핵용기 표적을 인식할 수 있는 발단 서열을 포함하고 있는 RNA간섭 유도체는 miR-124-BS와 동일한 효과를 나타낸다는 사실을 밝혀준다. 또한 miR-124-BS에 의해서 생성되는 복잡한 신경돌기 가지는 복잡한 신경 네트워크를 보이는 인간 뇌세포와 유사하게 다양한 형태의 신경 분화를 촉진시킬 수 있는 방법으로 활용될 수 있음을 나타낸다.

[0243] **[실시예 5] miR-124-BS를 siRNA와 shRNA 벡터로 발현시킨 후, 이로 인하여 유도되는 신경 돌기 분화(branched neurite outgrowth) 의 형태 및 분자생물학적 특징 확인.**

[0244] miR-124-BS의 발현으로 유도되는 특이적인 신경 돌기 분화 현상을 생쥐 신경 모세포종인 N2a (CCL-131)에서 추가적으로 확인하고자, 실시예 4와 동일하게 miR-124, miR-124-BS(4753)을 세포에 도입한 후 72시간동안 배양하면서 세포의 형태 변화를 관찰하였다 (도 5a). 또한 동시에 miR-124의 발단 서열을 동일하게 가지고 있지만 그

의외의 부분은 다른 서열을 지닌 miR-124(3714)도 5'-GAAGGCAGCAGUGCUCCCUGU-3' 서열로 합성하여 siRNA 형태로 이중체를 형성시킨 후 세포에 도입하여 실험하였다. 이때 대조군으로써는 예쁜 꼬마선충(*C.elegans*)의 마이크로RNA인 cel-67(NT; non-targeting)의 서열과 동일하게 합성하여 사용하였다.

[0245] 그 결과, miR-124가 전달된 실험군에서는 카테콜아민계 신경세포인 CAD에서 보인 것과 유사한 긴 신경돌기를 가지는 신경세포를 관찰할 수 있었고, miR-124(4753)을 트랜스펙션한 세포에서는 다양한 방향으로 가지를 뻗은 짧은 신경돌기를 가진 세포 형태상의 특징을 확인할 수 있었다(도 5a, 위). 또한 miR-124(3714)를 트랜스펙션한 실험군에서는 miR-124와 동일하게 비교적 긴 세포 돌기를 보이는 세포를 많이 관찰할 수 있었다(도 5a, 위). 이와 같은 세포 형태상의 변화는 분화된 신경세포에서 발현되는 해당 단백질에 대한 항체, Tuj1 (Covance Antibody Products, MRB-435P), vGLUT1(synaptic systes 사, 135-303), MAP2 (millipore 사, MAB3418)을 사용하여 그 발현 양이 증가한 것을 면역 블롯 실험(immuno blotting)을 통해 4가지 대조군 단백질(ACT-B, TUB-A, GAPDH, H3B)의 발현에 대비하여 확인할 수 있었다(도 5a, 아래). 이를 통해 miR-124와 유사하지만 다른 형태를 보이는 miR-124-BS(4753)에 의한 신경분화는 형태학적으로는 다소 다르나, 유전자 발현 마커상 동일하게 분화를 유도한 것을 확인할 수 있었으며, miR-124와 동일한 발단 서열을 지니고 있어서 동일하게 주로 정규적 발단 표적을 억제할 것으로 보이는 miR-124(3714)는 예상대로 miR-124처럼 신경세포의 가지가 길게 분화하는 특징을 보인다는 점을 알 수 있었다. 또한 miR-124-BS(4753), miR-124(3714)가 발현된 경우 모두다 분화된 신경세포에서 보이는 단백질 발현양이 증가되었는바, 이들은 모두 분화된 형태의 신경세포의 분자적 특징을 지니고 있음을 확인할 수 있었다.

[0246] 지금까지의 실시예에서의 마이크로RNA의 발현은 합성된 이중체를 세포에 도입하여 실시하였으나, 마이크로RNA의 발현은 이를 생성시킬 수 있는 헤어핀 형태의 RNA인 shRNA 형태를 발현 시키는 벡터를 도입하여서도 가능하다. 따라서 pre-miRNA로 발현시키는 벡터인 pCAG-miR30 플라스미드 (addgene #14758)를 사용하여 miR-124, miR-124-BS(4753), miR-124(3714)를 shRNA 형태로 발현시키는 벡터를 제작하였다. 이때 사용한 pCAG-miR30 벡터는 마이크로RNA를 강하게 발현시키기 위해 CAG 프로모터를 사용하였고, 마이크로RNA-30의 원형체 (backbone)를 발현시키도록 디자인 되어서, 마이크로 RNA 발현을 극대화 시키는 장점을 지니고 있다 (Paddison P et al, Nature methods, 2004, 1(2): 163-7).

[0247] 각각 miR-124, miR-124-BS(4753), miR-124(3714)를 발현시키도록 만들어진 pCAG 벡터는 아무것도 발현되는 않는 pCAG 벡터를 대조군으로 사용하여, N2a 세포에 도입되었고, 그 이후 세포 형태를 관찰하였다(도 5b). 신경모 세포종인 N2a에 도입된 헤어핀구조의 실험군은, miR-124, miR-124-BS(4753), miR-124(3714) 이중체가 보이는 세포 형태상의 변화와 유사한 변화를 보였다. 트랜스펙션 후 72시간 배양시, miR-124와 miR-124(3714)가 발현된 실험군에서는 긴 신경돌기를 지닌 신경모 세포종을 관찰할 수 있었다. 이에 반하여, miR-124-BS(4753)가 발현된 실험군에서는 짧고 다양한 방향으로 뻗은 신경돌기를 지닌 신경 세포종을 관찰할 수 있었다(도 5b, 위). 이러한 세포 형태의 변화는 분화된 신경세포에서 발현되는 단백질인 Tuj1 (O. von Bohlen et al. 2007 Cell and Tissue Research, 329, 3, 409-20)의 발현이나, Synaptophysin (SYP)의 발현이 증가한 것으로 확인되었으며(도 5b, 아래), 따라서 miR-124, miR-124-BS(4753), miR-124(3714) 헤어핀 벡터가 도입된 세포가 대조군에 비해 분화된 형태의 신경세포의 특징을 지님을 확인할 수 있었다. Tuj1의 증가는 이전 실시예와 동일한 방법으로 면역 블롯 실험으로 관찰하였으며, Synaptophysin은 qPCR(Quantitative Polymerase Chain Reaction) 실험을 통해 이전 논문 (S.E.Kwon et al. 2011 Neuron 70, 847-54)에서 기술된 primer 서열을 사용하여 진행하였다. 이때의 실험은 해당 벡터를 N2a 세포에 Lipofectamine 3000 시약 (Invitrogen 사)을 해당 회사의 프로토콜에 따라 사용하여 수행하여 트랜스펙션 한 후, 24시간 후에 총 RNA를 RNeasy 키트(Qiagen)로 추출하고, 해당 프로토콜에 따라 Superscript III RT(Invitrogen)로 역전사하고, SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)로 qPCR을 수행하여 해당 프라이머로 SYP의 전령RNA의 양을 측정하고 GAPDH 전령RNA 값으로 표준화하였다.

[0248] 상기의 실시예의 결과로 미루어 볼 때, 마이크로RNA의 도입을 shRNA 형태로 발현하게 하는 벡터를 사용하더라도, miR-124의 발단 부분만의 서열만 동일하게 가진다면(miR-124(3714)), miR-124와 동일하게 정규적인 표적 유전자의 발현 억제를 통해 일반적으로 긴 신경 돌기 분화를 일으킨다는 것을 알 수 있다. 또한 miR-124의 비정규 용기 표적도 shRNA형태로 발단 부분만 miR-124-BS와 동일하게 발현(miR-124-BS(4753))된다면 가지가 더 많은 신경 돌기 분화를 일으킬 수 있다. 이렇게 miR-124에 의한 정규 표적 억제와 비정규 용기 표적 억제 둘다 신경세포의 신경돌기분화형태의 분자적인 유전자 마커 발현을 보이며, 이를 통해 모두 신경세포로 분화했음을 확인할 수 있었다.

- [0250] [실시예 6] miR-124-BS가 MAPRE1 의 발현 조절을 통해 마우스 신경모세포종 (N2a)의 신경돌기분화 유도 확인
- [0251] 추가적으로 miR-124, miR-124-BS(4753), miR-124(3714) 의 신경모세포종(N2a)에서 신경돌기분화 유도를 세포 형태학상으로 관찰하고, 이를 정량적으로 분석하여 보았다 (도 6a). 정량 분석 시, 각각의 신경세포에서 유래한 신경 가지를 구분하기 위해서 녹색형광단백질 (GFP: Green fluorescent protein) 을 발현시키는 pUltra (addgene #24129) 플라스미드와 해당 마이크로RNA 발현 벡터를 이전 실시예에서의 방법과 동일하게 트랜스펙션 (co-transfection)시키고, 72시간동안 세포배양을 진행하면서, 신경돌기를 형광현미경 (Leica)으로 관찰하면서 신경돌기 가지의 수를 측정하고, 세포당 생성된 신경돌기의 길이를 이미지J 프로그램을 통해 분석하였다.
- [0252] 그 결과, 100개의 세포에 대해, 세포당 발현된 신경돌기 가지의 수 (neurite branch) 가 대조군에 비해 miR-124, miR-124-BS(4753), miR-124(3714) 에서는 약 3~5배 증가한 것을 확인하였다 (도 6a, 아래 왼쪽). 하지만 miR-124-BS(4753)가 발현된 경우에는 miR-124나 miR-124(3714)가 발현된 경우에 비해 유의하게 더 많은 가지가 만들어 집이 관찰되었다. 또한 세포당 생성된 신경돌기의 길이도 대조군에 비해 miR-124-BS(4753), miR-124(3714) 실험군에서 4~6배로 증가한 것을 확인할 수 있었으면, 보다 자세하게는 miR-124 또는 miR-124(3714)가 발현되었을 경우에는 miR-124-BS(4753)이 발현되었을 때보다 더 긴 신경 돌기 가지가 만들어 진다는 것을 관찰할 수 있었다 (도 6a, 아래 오른쪽). 이는 이전 실시예 (도 4, 도 5, 도 6)에서 세포 형태학적으로 관찰한 것과 동일한 결과이다.
- [0253] miR-124-BS의 의해서 일어나는 특이적인 신경분화 현상이 어떠한 유전자의 비정규 용기 싸이트에 의해서 일어나는지 알아보기 위해서, 신경분화에 관련된 유전자의 3 'UTR 부분에 서열에서 miR-124의 비정규 용기 표적 서열을 찾아보았다. 그 결과 신경세포의 분화를 조절한다고 보고된 MAPRE1(Microtubule-associated protein RP/EB family member 1: Elena Tortosa et al. 2013 EMBO 32, 1293-1306) 유전자를 찾게 되었다. MAPRE1은 신경 돌기를 생성시킬 때 이를 구성하는 마이크로튜블(microtubule)의 끝에 붙는 단백질로 해당 마이크로튜블의 형성 조절을 통해 신경 돌기의 형태를 결정할 수 있다. 따라서 이 MAPRE1 유전자가 miR-124의 비정규 용기 표적으로 인식되어 그 발현이 저해되는 지를 확인하고자, N2a 세포에 miR-124-BS를 도입한 후 MAPRE1의 전령RNA의 양을 실시예 5b에서 수행한 방법에 따라 qPCR 실험을 실시하여 측정해보았다 (도 6b). 2가지 다른 프라이머를 가지고 qPCR을 시행해 보았을 때 두 결과 모두 대조군에 비교하여 miR-124-BS 도입된 실험군에서는 70~40 % 수준으로 MAPRE1 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 MAPRE1이 miR-124의 비정규 용기 싸이트로 그 발현이 억제된다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0254] MAPRE1이 miR-124의 비정규 용기 표적이고, 매우 중요한 타겟이라면, miR-124-BS의 비정규 용기 표적 억제로 인하여 나타나는 신경분화 형태가 MAPRE1의 발현 감소로 인해서 더 촉진이 되어야 한다. 따라서 이러한 점을 확인하기 위해서 MAPRE1을 저해할 수 있는 siRNA를 2가지 제작하고 이와 함께 miR-124를 함께 N2a 세포에 트랜스펙션하고 세포형태학상 변화를 보이는 지 확인하는 실험을 수행하였다 (도 6c). 그 결과, miR-124만 발현시킨 대조군에 비해서, miR-124와 MAPRE1에 대한 siRNA를 함께 발현시킨 실험군에서 신경돌기 가지가 많이 증가한 것을 관찰할 수 있었고, 이는 두 종류의 다른 서열의 MAPRE1 siRNA를 사용한 실험에서도 동일하게 관찰하였다 (도 6c). 이때의 실험은 이전 실시예에서 사용한 방법과 동일하게 RNA를 세포에 도입했으면, 이 후 48시간동안 세포 배양하면서 형태를 관찰하였다.
- [0255] 이를 통해 miR-124-BS 가 유도하는 짧고 가지가 많은 신경 돌기 분화는 적어도 부분적으로는 MAPRE1 유전자의 발현을 miR-124의 비정규 용기 표적 싸이트를 통해서 억제하여 나타날 수 있는 생물학적 기능임을 확인하였다.
- [0257] [실시예 7] 전사체 수준에서 miR-124-BS의 세포 도입시 miR-124의 비정규 용기 표적 유전자의 저해 경향성 분석
- [0258] 마우스 신경모세포종(N2a)에서 miR-124-BS를 통해 억제된 유전자는 궁극적으로 신경모세포종의 신경돌기가지가 많이 생성시키는 신경세포 분화를 유도한다는 것을 확인하였다 (도 5). 이러한 현상은, miR-124-BS의 발단서열이 miR-124의 비정규 용기 표적을 인식하고 억제하는 기작에 의해서 나타날 것으로 생각되며, 그러한 가능성을 표적 유전자로 찾아낸 MAPRE1으로 확인하였다 (도 6). 하지만 실제로는 수백개의 miR-124 비정규 용기 표적 유전자들이 억제되어 일어나는 현상 일 것이다.
- [0259] 본 발명자들이 발명한 miR-124-BS가 실제로 모든 유전자가 발현되어 있는 전사체 수준에서 miR-124의 비정규 용기 표적 유전자만을 확인하기 위하여, miR-124와 miR-124-BS를 N2a 세포에 도입한 후에 RNA-Seq 분석을 시행하

였다. 이때의 대조군으로는 miR-124와 동일한 염기서열이나 5' 말단 기준 6번이 비염기 (pi)인 이중체 (miR-124-6pi)를 사용하였으면, 이러한 변형은 miRNA의 5 '말단 기준 6번째에 염기가 없기에 표적 전령RNA와 전혀 배열하지 못한다고 보고되었다 ((Lee HS et. Al. 2015, Nat Commun. 6:10154).

[0260] RNA-Seq 실험은 실험 대조군으로 예쁜 꼬마선충(C.elegans)의 마이크로RNA인 cel-67의 서열에서 5' 말단 기준 6번을 비염기로 변환한 것 (NT-6pi)를 사용하여 N2a세포에 miR-124, miR-124-BS, miR-124-6pi 이중체를 75nM 농도로 각각 전달시키고, 24시간 배양 후, 전체 RNA를 RNAeasy (Qiagen) 키트로 추출한 후, Otogenetics에서 라이브러리를 제작하고 차세대서열분석(Next-generation sequencing)을 수행하였다. 이 후, 상기 실험으로 얻어진 서열 데이터인 FASTAQ 파일을 TopHat2 프로그램으로 마우스 유전체 서열 (mm9)에 맵핑하고, Cufflink, Cuffdiff 프로그램으로 발현값 (FPKM)을 구하여, 대조군 NT-6pi를 도입한 마우스 신경 모세포종 (N2a) 세포에서의 결과로 표준화하여 로그비 (Fold change, log2 ratio)로 나타내어 분석을 실시하였다.

[0261] 마이크로RNA의 표적 사이트를 가지고 있는 유전자의 전령RNA의 양이 해당 마이크로RNA의 발현으로 저해되는 지를 RNA-Seq 결과에서 분석하기 위해서 miR-124의 정규 발단 사이트 (5'말단 기준 2번째에서부터 8번째까지와 염기 배열하는 7mer)를 3'UTR에 가지고 있으면서, 해당 사이트의 서열이 여러 중에서 보존된 것을 선택하고자 phastCons 점수가 0.9 이상인 유전자를 선별하였고, 이러한 프로파일 결과를 해당 마이크로RNA의 발현에 의존적으로 저해되는 순서대로 누적비율 (cumulative fraction)로 비교 분석하였다. 또한 동일한 방법으로 miR-124의 비정규 용기 사이트(nuc, 7mer)도 동정하여 해당 유전자의 억제 비율을 동일하게 누적비율로 분석하였다. 이때 miR-124의 비정규 용기 사이트를 가지고 있는 유전자가 동시에 정규 발단 사이트를 가지고 있어서, 그 억제 효과에 대한 판단이 어려울 수 있으므로 전체 전령RNA에 miR-124의 정규 발단 서열이 없는 경우 (nuc only)와 반대로 정규 발단 사이트만 있고 비정규 용기 사이트는 없는 경우(seed only)도 분석하였다.

[0262] miR-124 발현된 실험군의 RNA-Seq 서열분석에서 miR-124 발현에 따른 비율 변화(fold change)를 누적비율 (cumulative fraction)에 따라 분석하였을 때, miR-124의 보존된 정규 발단 사이트를 3 'UTR에 가지고 있는 유전자(miR-124 seed)나 해당 사이트 만을 가지고 있는 유전자 (miR-124 seed only)는 전체 유전자(Total mRNA)에 분포에 비해 매우 많이 억제되는 현상을 확인하였으며 (도 7a, 위), 이에 비하여 miR-124의 비정규 용기 사이트를 가지고 있는 유전자는 유의하게 억제되다 매우 약한게 저해되는 것으로 관찰할 수 있었다 (도 7a, 아래). 하지만, 이러한 억제 현상은 대조군인 miR-124-6pi를 도입한 세포에서는 관찰되지 않았다 (도 7b).

[0263] 본 발명자가 개발한 miR-124-BS를 발현시킨 경우에는 RNA-Seq 서열분석에서 miR-124-BS 발현에 따른 비율 변화(fold change)를 누적비율 (cumulative fraction)에 따라 분석하였을 때, miR-124의 보존된 정규 발단 사이트를 3 'UTR에 가지고 있는 유전자(miR-124 seed)에서는 약간의 저해 효과를 보였지만, miR-124의 비정규 용기 사이트는 없고 해당 정규 발단 사이트 만을 가지고 있는 유전자 (miR-124 seed only)에서는 전혀 변화가 없음을 확인하였다 (도 7c, 위). 하지만, miR-124의 비정규 용기 표적을 가지고 있는 유전자의 경우 (miR-124 nuc)나 해당 표적만을 가지고 있는 유전자의 경우 (miR-124 nuc only) 둘 다 강하고 유효하게 유전자 억제 현상이 일어남을 알 수 있었다 (도 7c, 아래). 도 7c에서 miR-124-BS가 발현 되었을 경우, miR-124의 정규 발단 사이트 만을(miR-124 seed only) 가지고 있는 유전자는 저해가 일어나지 않는 것으로 보아 miR-124의 정규 발단 사이트를 전혀 억제하지 못하는 것으로 결론을 내릴 수 있지만, miR-124-BS가 다소 miR-124의 발단 사이트 표적을 저해한 것은, 아마도 하지만 miR-124의 정규 사이트가 있는 경우에는 아마도 miR-124의 비정규 용기 사이트가 함께 존재하여 억제 효과를 조금이라도 나타내는 것으로 추측된다.

[0264] 상기의 실시예의 결과로 미루어 볼 때, 전사체 수준에서 miRNA는 기존의 정규 발단 표적 유전자의 억제를 매우 강하고 효율적으로 억제하지만, 비정규 용기 표적은 매우 약하게 저해함을 알 수 있었으며, miRNA-BS는 전사체 수준에서 miRNA의 비정규 용기 표적의 발현을 억제하지만, 기존의 정규 발단 서열은 억제하지 못한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0266] **[실시예 8] miR-122-BS가 인간 간암세포주 (HepG2) 에서 유도하는 세포 주기 정지 상태 (cell cycle arrest)의 유세포 분석을 통한 확인**

[0267] miR-124의 비정규 핵용기 표적에 의한 miR-124의 신경세포 분화유도를 관찰한 결과를 바탕으로 다른 마이크로 RNA의 비정규 핵용기 표적의 생물학적 기능에 대한 실험을 수행하였다. miR-122 는 발단 염기 서열로 5'-UGG AGU GU-3'를 가지며, 이의 비정규 핵용기 타겟 사이트와 염기 배열하는 siRNA의 염기 서열인 miR-122-BS는 6번 U가 한번 더 반복되는 형태 일 수 있으며, 이 경우에는 5'-UGG AGU U GUG ACA AUG GUG -3' 서열을 5 ' 말단

에 가지면서 19개의 염기로 구성되며, 20번째와 21번째 염기로는 dt (Deoxy Thymine Nucleotide)로 이루어진다. 특히 이중체 구조에서는 해당 dt 부분이 3'말단에 2개의 뉴클레오티드 돌출부(overhang)를 구성할 수 있도록 가이드와 운반자 가닥의 이중체로 구성하였다. 이때, 운반자 가닥은 가이드 가닥과 완전 상보 염기 결합을 하며, 5'말단 기준 1번째와 2번째 모두를 2'OMe로 변형하고, 염기 서열 끝에 dt 를 2개 포함하게 구성하였다 (도 8a). miR-122-BS의 가이드 가닥과 운반자 가닥은 바이오니아사에서 화학적으로 합성하고 HPLC로 분리하였으며, 상기 회사에서 제공한 방법에 따라 가이드 가닥과 운반 가닥의 이중체(duplex)로 제조하였다.

[0268] 이렇게 제조한 miR-122-BS (도 8a)를 인간 간암세포주 (HepG2)에 도입하고 이후 세포 주기의 변화를 유세포 분석을 통해 관찰하였다. 이때의 실험은 대조군인 NT-6pi, miR-122, miR-122-BS의 이중체를 50nM 농도로 HepG2에 RNAiMAX (Invitrogen) 시약을 이용하여, 세포에 전달 (transfection) 하고, 24 시간 배양 후, 노코다졸 (nocodazole) 을 100ng/ml 로 16시간 동안 처리하여 G2/M (분열준비기/분열기)에 세포를 동기화 (synchronization)한 다음, MuseTM Cell Cycle Kit (Catalog No. MCH100106, Milipore)을 이용하여, 회사가 제공하는 실험 방법에 따라 Muse Cell Analyzer (Milipore) 로 세포 주기를 분석하였다.

[0269] 그 결과, NT-6pi 가 전달된 대조군의 세포주기 분석과 비교하여, miR-122-BS 실험군은 G0/G1기의 세포가 10. 7%에서 24.3% 로 약 2배 정도 증가하는 것으로 간암 세포인 HepG2의 세포 주기 정지가 증가됨을 확인할 수 있었다 (도 8b-c). 이러한 G0/G1기의 세포 증가는 miR-122가 전달된 세포에서는 관찰되지 않았다. 이어, miR-122-BS 가 전달된 인간 간암세포주 (HepG2)의 G2/M 기 세포분포는 대조군과 비교시 83. 4% 에서 67.3% 로 감소하였으며, 이러한 결과는 miR-122가 전달된 세포에서는 관찰되지 않았다 (도 8b,c).

[0270] 이를 통해 miR-122-BS 는 miR-122 의 비정규 핵유기 표적 발현의 조절을 통해, 인간 간암 세포주에서 세포주기 정지를 유도하는 생물학적 기능을 보이며, 이는 miR-122 가 작용하는 생물학적 기능과는 전혀 다른 기능임을 관찰할 수 있었다.

[0271]

[0272] **[실시예 9] miR-1-BS가 골격 근육세포 (C2C12) 에서 유도하는 근육섬유화 기능 및, miR-155-BS가 세포 사멸 기능 확인**

[0273] miRNA-BS가 miRNA의 정규 발단 표적의 발현을 억제해서 나타나는 기능과는 다른 새로운 생물학적 기능을 관찰하였기에, 이러한 기능이 근육세포에서 어떻게 나타나는 지를 관찰하기 위해서 근육세포에서 발현하면서 중요한 기능을 하는 miR-1, miR-155에 miRNA-BS를 적용해보았다.

[0274] 우선, miR-1은 근조직 특이적 마이크로RNA로, 근세포 분화 (differentiation) 에 기능한다고 보고되어 있으므로 (Chen J et.al, Nature genetics, 2006, 38(2): 228-233), miR-1-BS를 골격 근육세포주인 C2C12에 발현시킨 후 세포 형태학적 변화(도 9a)와 분화시에 발현되는 유전자 마커의 발현 유무(도 9b)를 조사하였다. 이 때 miR-1-BS를 이전 실시예에서 사용한 동일한 방법으로 합성하고 세포에 트랜스펙션 해주었으며, 48시간 동안 세포 배양 시 10% FBS (fetal bovine serum), 100 U/ml 페니실린, 및 100 µg/ml 스타프토마이신을 보충한 Dulbecco's 개질 Eagle's 배지 (Invitrogen)를 사용하여 이는 증식 배양 조건 (growth condition; GM) 상태 (도 9a, 위)와 이렇게 키운 후 FBS를 제거한 결핍 배양 조건 (deprivation media condition; DM) 으로 48시간 더 배양한 상태(도 9a, 아래)로 나누어서 관찰하였다. 이후 세포는 4% 파라포름 알데히드 (para-form aldehyde: PFA)를 처리하여 세포를 고정하고 분화된 근육세포에 발현하는 myosin 2 heavy chain 단백질을 1차 항체 (MF20 : Developmental studies hybridoma bank) 로 반응 시킨 후 , Alexa 488 형광물질이 붙은 마우스 2차 항체 (ab150105) 로 염색하여 세포 형태 및 분화를 관찰하였다 (도 9a).

[0275] 그 결과 생쥐 골격 근육세포(C2C12)는 증식 배양 조건(GM)에서는 miR-1-BS가 발현되었을 때, 대조군인 NT나 miR-1 이중체가 전달된 세포에 비해서 더 많은 수의 분화된 근세포를 MF20 염색 결과로 확인 할 수 있었다. 배양시 혈청을 감소시키는 결핍 배양 조건 (deprivation media condition; DM)에서는 근섬유 (muscle fiber) 로의 분화가 진행되는 것을 모두 관찰 하였으나, miR-1-BS가 대조군인 NT를 발현시킨 골격 근육세포에서 보다 더 굵은 형태를 관찰 할 수 있었다 (도 9a). 이는 miR-1-BS가 증식 배양 조건에서 보다 빨리 근세포 분화를 유도하여 생긴 결과 일 수 있다. 이러한 근육 세포의 분화는 분화시에 발현이 증가하는 유전자의 발현 양을 마커로 분자적으로 확인할 수 있는데, 이에 따라 sk-actin과 Myogenin 발현 양을 해당 전령RNA에 특이적인 프라이머로 RT(Reverse transcription)-PCR을 수행해서 분화시에도 발현량에 차이가 없는 b-actin의 전령RNA의 양과 비교하여 검출해 보았다 (도 9b). 그 결과 miR-1(1)과 miR-1-BS(1BS) 모두 발현시에 sk-actin과 Myogenin의 전사량이 증가함을 확인 할 수 있었으며, Myogenin의 경우 그 양이 miR-1-BS에 의해 miR-1보다 더 많이 증가함을 관찰

할 수 있었다

[0276] miR-155는 근세포 분화를 억제하는 마이크로RNA (Seok H et. Al, JBC, 286(41):35339-46 2011)로, 위에서 miR-1에 대해서 실시한 동일한 방법으로 miR-155-BS의 효과를 골격 근육세포(C2C12)의 분화를 통해 관찰하였다 (도 9c). 그 결과, 대조군인 NT, miR-155, miR-155-BS를 발현시킨 후 증식 배양 조건(GM)에서는 세포의 별다른 형태학적 차이를 관찰하지 못하였으나, 근 세포의 분화를 유도하는 결핍 배양 조건(DM)에서는 대조군은 분화되고, miR-155이 발현되는 경우에는 억제되지만, miR-155-BS를 도입한 경우에는 분화가 도리어 없어지는 것을 myosin 2 heavy chain 단백질을 통한 면역염색(immune-staining) 실험을 통해 확인하였다 (도 9c). 특히, miR-155-BS를 발현한 C2C12 세포를 자세히 살펴보았을 때, miR-155-BS 가 세포의 사멸을 유도한 것이 관찰되었다. 이에 반해, miR-155가 전달된 근세포에서는 세포 사멸은 전혀 관찰되지 않았다 (도 9c, 아래). 이를 보다 자세히 조사해보기 위해서 해당 마이크로RNA가 발현된 C2C12 세포를 48시간동안 증식 배양 조건에서 키운 후에, 실시예 3에서의 방법과 동일한 유세포 분석을 적용하여 세포 사멸을 살펴보았다 (도 9d). 그 결과, miR-155-BS 가 전달된 실험군은 대조군에 비해 약 1.5~2.5배 이상 세포사멸이 증가한 것으로 확인되었다 (도 9d, e).

[0277] 상기의 실시예를 통해, miR-1-BS는 골격 근육 세포의 분화를 촉진하여 굵은 근 섬유 분화를 유도하며, miR-155-BS는 골격 근육 세포의 사멸을 유도하며, 이러한 기능은 기존의 근육 세포를 수축시키는 miR-1의 기능과 근육 세포 분화를 억제하는 miR-155의 기능과는 다른 것을 확인할 수 있었다.

[0278]

[실시예 10] Ago HITS CLIP 분석에서 워블(wobble) 염기 배열을 마이크로RNA의 발단위치에서 허용하는 비정규 표적 사이트의 발견

[0280] 마이크로RNA의 표적을 전사체 수준에서 분석할 수 있는 방법으로는 Ago HITS CLIP이라는 실험 방법이 개발되어 널리 사용되고 있다 (Nature, 2009, 460 (7254): 479-86). Ago HITS CLIP 실험은 세포나 조직 샘플에 UV를 조사하여 세포내에서 RNA와 아고너트 단백질 사이에 공유결합을 유도하고, 이렇게 생성된 RNA-아고너트 복합체를 아고너트를 특이적으로 인식하는 항체를 이용하여 면역침강법으로 분리한 다음, 분리된 RNA를 차세대염기서열 (Next-generation sequencing)로 분석하는 방법이다. 이렇게 얻어진 염기서열 데이터는 생물정보학적 분석을 통해서 마이크로RNA의 표적mRNA를 동정할 수 있을 뿐만 아니라, 그 결합 위치와 서열도 정확하게 분석할 수 있다 (Nature, 2009, 460 (7254): 479-86). Ago HITS-CLIP은 최초로 생쥐의 대뇌피질 조직에 적용되어 뇌 조직에서의 마이크로RNA의 표적에 대한 지도를 작성하였고, 그 이후 지금까지 여러 조직에 해당 방법이 적용되었다. 이러한 여러 Ago HITS-CLIP 분석을 통해 여러조직에서의 마이크로RNA 결합 위치가 밝혀지게 되었고, 특히 이러한 표적 서열에서 마이크로RNA의 발단 결합과는 유사하지만, 표적 mRNA의 서열에서 다른 형태의 비정규적 결합 표적이 많이 존재한다는 것을 알게 되었다 (Nat Struct Mol Biol. 2012 Feb 12;19(3):321-7).

[0281] 밝혀진 비정규적 결합 법칙 중 일부는 기존의 알려진 염기배열 이외에 G:U 염기배열을 통한 워블(wobble)로 존재한다는 것이 관찰되었다. 워블 염기배열은 기존의 염기배열과는 다르게 특정 RNA에서 발견되며, 잘 알려진 G:U 워블은 마이크로RNA의 비정규 표적에서도 배열할 수 있음이 제시되었다. 하지만 이에 비해 그 결합이 약하고 자주 관찰 되지 않았고, 특히 G:A 워블의 경우는 특정 RNA에서 염기배열을 형성할 수 있지만 그 외에는 전혀 조사가 되지 않았다. 하지만 마이크로RNA의 발단 서열 같은 경우에는 염기배열의 자유에너지(free energy)가 구조적으로 아고너트 단백질에 의해 안정화되기 때문에 일반적으로 약한 G:A 염기배열이 상대적으로 중요할 수 있으며, 본 발명자들은 이러한 사실에 주목하여 다음과 같은 분석을 진행하였다.

[0282] 우선은 G:A를 포함한 워블 염기배열이 사람의 뇌 조직에서의 마이크로RNA 표적에 존재하는지를 확인하기 위해서 사후 뇌 조직의 회백질 (gray matter)에 Ago HITS-CLIP을 수행한 데이터(Boudreau RL et al, Neuron, Vol.81 (2), 2014, 294-305)를 분석하였다 (도 10a). 이때의 분석은 Ago HITS-CLIP을 개발(Nature, 2009, 460 (7254): 479-86)했을 때의 방법에 따라 아고너트-마이크로RNA와 함께 결합했던 RNA 서열을 시퀀싱된 FASTQ 파일에서 Bowtie2 프로그램으로 인간 유전체 서열에 배열하여 수행하였다. 또한 동시에 해당 시퀀싱 결과를 인간 마이크로RNA서열에 배열하여, 해당 뇌 조직에서 아고너트 단백질 자주 결합하고 있는 20 종류의 마이크로RNA (top20 miRNA: 도 10b) 도 분석하였다. 최종적으로는 이렇게 파악한 top20 miRNA에 대하여 해당 발단 (seed) 서열인 5' 말단으로부터 2번째부터 8번째까지에 대하여 상보적인 서열을 가지는 정규 표적(canonical target) 사이트를 살펴보았다 (도 10b). 이때 마이크로RNA 결합위치에, 상당히 많은 수의 정규 발단 표적 사이트가 발견됨을 관찰하였다 (도 3b, 미디안 값 1292.5사이트, 오차범위+/- 706.62). 이 후, 이러한 마이크로RNA의 발단 염기 서열에서 G:U 또는 G:A 워블 염기배열로 결합할 수 있는 비정규적 표적 사이트가 존재하는 지를 Ago HITS-CLIP 데이터에서 살펴보았다. 이 때 분석에 대한 대조군(Control)으로 마이크로RNA 발단 (seed) 염기 서열과 동일한 염기

서열로 인해 염기의 상보적 배열이 불가능한 표적 서열을 사용하여 분석하였다.

[0283] 분석 결과, G:A 위블이 허용된 표적 (중앙값 1119.5 사이트, 오차범위+/- 526.48) 과 G:U 위블이 허용된 표적 (중앙값 995사이트, 오차범위+/- 523.22) 사이트 모두 대조군 (중앙값 891사이트, 오차범위+/- 410.71) 에 비해 높은 분포를 보였으며, 특히 G:A 위블이 존재하는 마이크로RNA 표적 사이트는 G:U 위블보다 약 1.1배 더 많이 존재함을 나타내었다 (도 10b). 뇌조직에서 특이적으로 발현되는 miR-124는 발단 부분에 2개의 G를 5' 말단으로부터 4번째와 5번째에 가지고 있어서, 이를 통한 G:U, G:A 위블 염기배열을 할 수 있다 (도 10c). 따라서 이러한 특정 위치의G에 의한 G:A, G:U 위블 염기배열을 구별하여 분석해본 결과 (도 10d), miR-124의 정규 발단 표적 사이트(seed)가 가장 많이 발견되었다 (1,992개). 하지만, 이와 견줄 수 있을 정도로 4번째가 G:U 위블 (1,542개)을 이루는 것을 발견하였으며, 그 다음으로는 G:A 위블(1,542개)을 이루는 것을 관찰하였다. 또한 5번째의 G도 G:U 위블(1,800개)과 G:A 위블(1,198개)을 이루는 표적 사이트가 많이 보였으며, 이렇게 조사한 모든 사이트는 대조군의 개수(647개) 보다 모두 많이 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (도 10d). 따라서, 마이크로RNA는 발단부분의 염기서열을 통한 표적 mRNA를 인식할 때, 발단 부분을 통한 정규적인 염기배열 뿐만 아니라 비정규적으로 G:U 또는 G:A 위블 염기배열을 허용하며, 이러한 결합을 통해서 표적 mRNA와 결합할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이러한 G:A 위블 염기를 통한 마이크로RNA의 표적 인식은 보고 된 바가 없는 새로운 결과이며, 따라서 상기 실시예에서 관찰한 바와 같이 여러 마이크로RNA에서 비정규적인 표적으로 인식된다는 것을 확인할 수 있었다,

[0284] 상기의 실시예를 통해, 마이크로RNA의 비정규 표적 인식에는 발단 서열에 G:A 위블 배열을 허용하는 경우가 존재하고, 이를 통해 많은 마이크로RNA가 표적 유전자의 전령RNA에 결합하여 그 유전자의 발현을 억제할 것으로 여겨진다.

[실시예 11] 마이크로RNA의 비정규 표적인 G:A 발단 배열 사이트를 인식하는 miRNA-GU의 개발 및 miR-124 적용 시 miR-124-G5U의 신경세포 사멸 증대 효과 확인

[0287] 실시예 10에서 마이크로RNA의 비정규 표적 인식에는 발단 서열에 G:A 위블 배열을 허용하는 경우가 있다는 것을 발견하였고, 이를 비정규 G:A 발단 배열 사이트로 명칭하고, 이에 대하여 상보적으로 배열할 수 있는 새로운 RNA 간섭 유도 물질의 서열인 miRNA-GU를 다음과 같이 발명하였다. 이러한 서열 결정 기술을 miR-124를 대상으로 적용해 보면, miR-124는 발단서열이 5'-AAGGCAC-3'으로 비정규 GA 배열 발단 표적은 4번 G 염기, 5번 G염기가 각각 G:A 위블 염기 배열이 가능한 염기 서열이며, 따라서 이러한 G:A 위블 배열을 기존의 상보적인 염기 배열로 바꾸는 형식인 miRNA-GU의 서열로 바꾸면, miR-124-G4U (5'-AAUGCAC-3'), miR-124-G5U (5'-AAGUCAC-3')로 변경할 수 있다. 이렇게 변경된 miR-124-G4U와 miR-124-G5U는 기존의 miR-124가 G:A 위블 배열 형태로 약하게 결합하고 인식했던 비정규 표적 사이트를 상보적인 배열로 결합할 수 있기에, miR-124에서의 비정규 G:A 발단 배열 표적의 기능을 나타낼 수 있다.

[0288] 따라서, miRNA 비정규 GA 배열 발단 타겟을 매개로 하는 생물학적 기능을 알아보기 위하여, 비정규 GA 배열 발단 타겟을 miR-124에 적용하여 실험을 수행하였다. 이를 위해서 이전에 실시예에서의 동일한 방법에 따라 대조군으로 NT (도 11b에 N2a로 기술), miR-124, miR-124-G4U, miR-124-G5U를 신경 모세포종인 N2a에 도입하고 세포의 형태를 72시간동안 배양하면서 관찰해보았다 (도 11b). 그 결과, miR-124를 발현 시켰을 경우 긴 신경 가지 돌기가 형성되는 분화 현상이 일어나지만, miR-124-G4U, miR-124-G5U가 전달된 실험군의 경우 분화가 일어나지 않는 현상을 관찰하다 (도 11b). 이렇게 기존의 miR-124의 기능인 신경분화능이 miRNA-GU로 변경하였을 때 관찰되지 않았기에, 세포 사멸 정도에서의 변화를 인간○ 신경 모세포종인 Sh-sy-5y 세포주에서 관찰하였다. 이때의 유세포 분석은 실시예 9에서 사용한 방법과 유사하게, Muse Annexin V and Dead Cell Assay Kit(millipore 社)을 이용하였으며, Muse Cell Analyzer (Milipore)을 통해 수행하였다. 그 결과 miR-124-G-5U의 발현은 세포 사멸을 대조군에 비해 2배이상 증가시킨 것을 확인하였고 (도 11c), 이를 이른 세포사멸 (early apoptosis) 이나 늦은 세포사멸 (late apoptosis) 로 세분화해서 분석한 경우, miR-124가 전달된 실험군에 비해, miR-124-G-5U가 전달된 실험군은 이른 세포사멸 (early apoptosis) 과 늦은 세포사멸 (late apoptosis) 두가지 경우 모두 유의적으로 증가한 것으로 분석되었다 (도 11d). miR-124-G-4U 가 전달된 실험군의 경우 miR-124가 전달된 실험군에 비해 늦은 세포사멸 (late apoptosis)이 유의적으로 억제되었으며 (도 11 c,d) 살아있는 세포의 수도 많음을 관찰할 수 있었다 (도 11 b).

[0289] 이를 바탕으로, miR-124-GU에 의한 miR-124 비정규 GA 배열 발단 타겟 억제는 miR-124에 의해서 유도되는 신경 분화의 능력은 사라지고, 대신에 다른 생물학적 기능인 세포 사멸 조절 기능을 나타내는 것으로 확인할 수 있었

다.

[실시예 12] miR-124-G4U 가 유도하는 신경 모세포의 세포 분열 촉진

이전 실시예에서 miR-124-G4U의 경우에는 신경 세포 분화능을 상실하고, 세포 사멸에서도 별다른 기능이 나타나지 않아, 세포 분열에 대해서 살펴보았다. 즉, 대조군 NT, miR-124, miR-124-G4U, miR-124-G5U를 각각 신경 모세포종 세포인 N2a에 이전 실시예에서 수행한 방법과 동일한 방법으로 도입 시킨 후 세포 분열 증식 현상에 대해서 유세포 분석을 실시하였다 (도 12a). 이 때의 실험은 Muse Ki67 Proliferation Kit(millipore 社)을 이용하여 제조사가 제공한 실험 방법에 따라세포를 처리한 후, Muse Cell Analyzer (Milipore) 로 세포 분열을 분석하여 진행하였다. 이 방법은 Ki67이 염색된 세포의 수를 측정함으로써 세포 분열 증식이 증가된 세포의 수를 정량적으로 분석하는 방법이다. N2a 세포에서 miR-124를 발현시키면 대조군인 NT에 비해서 세포가 분화함으로 Ki67의 염색의 세기가 줄어든 세포가 늘어난다. 하지만 miR-124-G4U 전달된 실험군은 대조군(NT)에 비교하여 세포 분열이 증식된 세포인 Ki67 염색 세포가 61%에서 65%로 다소 늘어났다. 이에 비해 miR-14-G5U는 대조군과 비교하여 차이가 없음을 관찰 할 수 있었다.

추가적으로 miR-124-G4U가 세포주기에 주는 영향을 조사하기 위해서, 인간 신경 모세포종인 sh-sy-5y 세포주를 이용하여 유세포 분석을 실시하였다 (도 12b). 이때의 분석은 miR-124-G4U와 miR-124-G5U의 기능을 세포 주기별로 알아보기 위하여 MuseTM Cell Cycle Kit (Catalog No. MCH100106, Milipore)을 이용하여, Muse Cell Analyzer (Milipore) 로 분석하였다. 그 결과, miR-124의 경우 세포의 주기가 G0/G1에 있는 수가 증가하는 세포 분열 정지(cell cycle arrest)가 관찰되었으나, miR-124-G4U, miR-124-G5U는 miR-124에 의한 세포 분열 정지 현상은 사라지고 대조군과 동일하게 세포 주기가 돌아가는 것을 관찰하였다.

상기의 실시예를 통해 miR-124 비정규 GA 배열 발단 타겟 억제하는 RNA 간섭 유도 변형 서열 중 miR-124-G4U는 신경 모세포의 세포 분열 증식을 증가 시키는 기능을 가지는 것을 알 수 있었다.

[실시예 13] 심근세포주 에서 miR-1이 비정규 GA 배열 발단 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있다는 것을 형광 단백질 리포터를 이용하여 확인

위의 실시예에서 마이크로RNA가 비정규적으로 발단 서열에서 G:A 위블 배열을 허용하여 표적 mRNA와 결합할 수 있으며, 이것이 새로운 기능을 가질 수 있다는 사실을 발견한 후, 이러한 결합이 실제로 표적 유전자의 억제를 일으킬 수 있는지를 세포수준에서 확인하는 리포터 실험을 진행하였다. 이때 확인 실험은 심근세포인 h9c2와 같이 근육계 세포에서 많이 발현되는 것으로 알려진 miR-1을 대상으로 진행하였으며, 특히 miR-1의 5' 말단으로부터 7번째에 존재하는 G에 주목하여, 이를 통한 G:A 위블 염기배열을 대상으로 수행하였다 (도 13). 마이크로RNA에 의한 유전자 억제는 보다 정밀하게 개별 세포 수준에서 측정하기 위해서 형광 단백질 발현 리포터 시스템을 구축하여 사용하였다 (도 13). 형광 단백질 발현 리포터 시스템은 두가지 색의 형광단백질이 하나의 벡터에 발현되게 구성되었으며, 이때 SV40 프로모터에는 녹색 형광 단백질 (green fluorescent protein: GFP)이 발현되게 하고, 그 3'UTR (3'untranslated region) 부분에 마이크로 RNA의 표적 사이트를 여러 개 연속적으로 배열하여, 녹색 형광 단백질의 세기를 통해 마이크로RNA에 의한 유전자 억제 효과를 측정할 수 있도록 하였으며, 동시에 적색 형광 단백질 (red fluorescent protein: RFP)은 TK 프로모터에 의해 발현되도록 하여 그 세기 정도로 녹색 형광 신호를 표준화하여 사용하였다 (도 13a, 위).

이렇게 구축된 형광 단백질 발현 리포터 벡터에 miR-1의 5' 말단으로부터 2번째부터 8번째까지 염기에 대해서 상보적이면서, 7번째 염기에 G에 대해서는 G:A 위블로 염기배열하는 비정규 표적 사이트(7G:A-site)를 삽입하여 리포터를 제작한 후 (GFP-7G:A site), 이것이 miR-1에 의해서 억제되는지를 실험을 통해 확인하였다. 이때 실험은, 500ng GFP-7G:A site 리포터 벡터와 25μM의 miR-1을lipofectamine 2000 (Invitrogen 사) 시약을 이용하여 회사에서 제공하는 프로토콜에 따라 심근세포주인 H9c2에 동시에 도입(co-transfection)하였고, 24시간 후 Life Technologi사의 Attune NxT를 통해 각각의 형광 신호를 유세포 분석으로 측정하였다. 그 결과 miR-1의 발현에 의해서 miR-1의 7G:A 사이트가 매우 효율적으로 억제(도 13a, 가운데)되는 것을 대조군 핵산(cont; NT)을 도입한 세포(도 13a, 왼쪽)와 비교하여 확인하였다. 즉, 심근세포주인 h9c2 에서 두가지 형광 단백질의 발현 정도에 따라 네부분 (Q5-1, Q5-2, Q5-3, Q5-4)으로 분석한 결과 miR-1이 도입된 세포의 경우, 대조군 핵산이 도입된 경우보다 10³ 세기의 적색 형광 단백질과 10³ 세기의 녹색 형광 단백질을 보이는 세포의 분포가 59.51% (control:

Q5-3)에서 41.80 % (miR-1: Q5-3)로 감소된 것을 관찰하였다.

[0299] GFP-7G:A site 리포터 벡터는 miR-1의 도입 없이도 h9c2 세포에서 어느정도 억제되고 있는 것이 대조군에서 관찰되었다. 이것은 h9c2세포내에서 이미 발현되고 있는 miR-1에 의해서 리포터 표적 mRNA와의 G:A 위블 염기배열을 통해 억제하는 것으로 예상할 수 있다. 이러한 점을 확인하기 위해서 h9c2 세포 내의 miR-1의 발현을 억제할 수 있는 miRIDIAN microRNA Hairpin inhibitor (miR-1 inhibitor, 도 13a, 오른쪽)를 Dharmacon사로부터 구입하여 50uM 농도로 세포에 트랜스펙션시켜 사용하였다. 이러한 결과, 대조군에서 비해 (도 13a, 왼쪽 도면) miR-1 inhibitor를 도입한 경우 (도 13a, 오른쪽 도면), 10^3 세기의 적색 형광 단백질과 10^3 세기의 녹색 형광 단백질을 보이는 세포의 분포가 81.56% (miR-1 inhibitor: Q5-3)로 증가하는 것으로 보아, 세포내에 존재하는 miR-1이 miR-1의 7G:A 사이트를 통해 유전자 발현을 억제할 수 있음을 확인하였다 (도 13a).

[0300] 이는 추가적으로 형광 단백질 발현 리포터에 마이크로RNA 표적 사이트를 넣지 않은 대조군 (GFP-no site)과 miR-1의 7G:A 사이트 들어간 리포터인 GFP-7G:A site를 H9c2 세포에 도입하여 그 활성을 비교하여 확인하였으며, 양성 대조군으로는 miR-1을 함께 도입한 경우와 정량적으로 비교하여 확인하였다 (도 13b). 이때의 분석은 유세포 분석기에서 측정한 적색 형광 단백질(RFP) 값을 구간별로 나누고, 이때의 녹색 형광 단백질(GFP) 값을 평균을 내어 로그 비율로 변환하였으며, 이때 대조군인 GFP-no site의 녹색 형광 단백질 수치를 1로 두고 (relative log GFP) 상대적으로 계산하였다. 이때, miR-1 과 7번 G 염기에 대해, G:A 위블 (wobble)을 통해 상보적으로 염기 배열되는 사이트가 있는 경우 (GFP-7G:A site), 특히 1.5 - 3값의 적색 형광 단백질의 발현 (log RFP) 이 보이는 구간에서, G:A 위블 (wobble)을 통한 녹색 형광 단백질의 발현 (relative log GFP)이 1보다 10% 정도 낮아지는 것을 확인하였다. 이러한 억제는 양성 대조군에서는 특히 1.5 - 4 구간의 적색 형광 단백질의 발현 (log RFP)에서 40%-10% 정도 녹색 형광 단백질의 발현 (relative log GFP)이 억제되는 패턴과 동일하게 나타나는 점을 관찰하였다.

[0301] 위의 실시예에서 관찰한 결과가 해당 형광 단백질 리포터에서 사용한 서로 다른 프로모터의 세기와 두가지 다른 형광단백질이 가지는 형광 활성도의 차이에 의해서 영향을 받지 않음을 확인하기 위해서, 두개의 형광 단백질을 서로 바뀌어 있는 형광 단백질 리포터인 p.UTA.3.0 (Lemus-Diaz N et al, Scientific Reports,(7), 2017)을 Addgene(plasmid # 82447)으로부터 구입하여 사용하였다. 이때 리포터 실험은 p.UTA.3.0 벡터에서 SV40 프로모터에 의해 조절되는 적색 형광 단백질 (red fluorescent protein: RFP)의 3' UTR 부분에 miR-1-7G:A 서열을 5번 반복하여 삽입한 후 리포터 벡터(RFP-7G:A site)를 제작하여 진행하였으며, 이때 적색 형광 단백질 발현 수치는 Tk 프로모터로 발현되는 녹색 형광 단백질 (green fluorescent protein: GFP) 값을 세포내에 도입된 정도를 반영한 표준화로 사용하여 변형하여 사용하였다 (도 13c, 위). 그 결과 이전 실시예와 동일하게 miR-1의 7G:A 사이트가 h9c2에서 발현되는 miR-1에 의해서 억제되는 것을 miRNA 표적 위치가 없는 리포터 (RFP-no site)의 대조군과 miR-1의 7G:A site가 들어간 리포터(RFP-7G:A site)의 결과를 비교하여 확인하였으며, 동시에 양성 대조군이 miR-1과의 co-transfection 에서도 이전 실시예와 같은 현상을 관찰하였다 (도 4c-d).

[0302] 상기로부터, Ago HITS-CLIP 분석을 통해 발견한 마이크로RNA의 비정규 표적이 실제로 마이크로RNA의 발단 서열에서 G:A 위블 배열을 통해 결합할 수 있을 뿐 아니라, 해당 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있음을 확인하였다. 따라서 이러한 점으로 미루어 볼 때, G:A 위블 배열을 통한 표적 사이트를 이용하여 마이크로RNA와 충분히 결합 할 수 있으며, 이러한 점을 miRNA-GU를 통해 유서하게 유도할 수 있다면, 비정규적 표적 억제에 의한 마이크로RNA의 생물학적 기능만을 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

[0304] **[실시예 14] miR-1 의 2, 3, 7 번 G 염기에 대한 비정규 GA 배열 발단 타겟 유전자 조절을 통한 심근세포의 비대화 유도 기능 확인**

[0305] 이러한 비정규적인 유전자 억제 현상은 G:A 위블 염기 배열이 마이크로RNA의 비전형 타겟으로 작용하여, 생물학적 기능을 조절할 수도 있다는 가능성을 miRNA-GU를 통해 확인하고자, 이전 실시예에서 살펴본 심근세포의 miR-1을 중심으로 실험을 진행하였다.

[0306] 비정규적인 G:A 위블 표적이 특정한 생물학적 기능을 가지고 있는지를 조사하기 위해서는, miR-1이 정규적인 표적은 인식하지 않고, 비정규적인G:A 위블 배열 표적 사이트만을 인식하게 하여야 하므로, miR-1의 발단 지역에 있는 G가 C가 아닌 A와 염기 배열하도록 해당 G를 U로 치환하여 제작한 miRNA-GU를 실험에 사용하였다. 본 실험에서는 보다 생리학적으로 심장과 유사한 조건으로 수행하기 위해서 랫트(rat)의 심장 조직으로부터 1차 심근세포 (primary rat neonatal cardiomyocyte culture)를 배양하여 수행하였다. 이때, 심근세포의 배양은 생후

1일차 랫트 (rat neonate) 의 심장조직에서 효소 반응을 통해 심근 세포를 분리하고 (Cellutron 사의 neomyt kit), 심근세포는 10% FBS (fetal bovine serum), 5% HS (horse serum), 100 U/ml 페니실린, 및 100 μ g/ml 스테ptomycin을 보충한 Dulbecco's 개질 Eagle's 배지 (Invitrogen)와 M199 (WellGene) 배지를 4:1 로 섞어 준비한 배지에 brdU를 첨가하여, 심장 조직에 존재하는 세포주기를 갖는 다른 세포들과 구별하여 배양하였다.

[0307] 이렇게 얻어진 1차배양 심근세포에서 심근비대현상이 유도되는 지를 우선적으로 확인하였다 (도 14a). 심근세포는 세포주기를 멈추고, 심근 세포의 크기를 증가시킬 수 있는 특징을 가지고 있는데, 이를 심근 비대 현상이라고 한다. 심근 비대 현상은 심근 세포의 기능 저하를 보완하는 역할을 해왔으며, 심장질환의 병리 중간 단계로도 알려져 있으며, 세포 형태학적 관찰 및 유전자 발현 프로파일 변화가 잘 알려진 심장 질병 모델 시스템이다. 심근 비대증의 세포 모델에서는 페닐에프린 (PE) 과 같은 아드레날릭 리셉터 작용제 (agonist) 를 심근 세포에 처리해주면 심근 비대증을 유도할 수 있다 (Molkentin, JD et al, 1998, Cell 93(2), 215-228). 따라서, 배양한 심근 세포에 100uM의 페닐에프린을 처리하여 심근 비대를 유도 하였고, 이에 따라 아무것도 처리하지 않은 대조군(도 6a, rCMC)과 비교하여 심근 세포의 크기가 증가하는 것을 형태학적으로 확인하였다 (도 14a, +PE). 또한 1차 심근세포에 miR-1을 도입하였을 때 심근 세포의 크기가 감소하는 것을 관찰하였다 (도 14a, 위줄 오른쪽). 이는 잘 알려진 심근 비대현상과 miR-1 의 심근세포에서의 기능과 일치한다 (Molkentin, JD et al, 1998, Cell 93(2), 215-228, Ikeda S et al, Mol cell boil, 2009, vol29, 2193-2204).

[0308] miR-1은 발단지역에 3개의 G를 포함하고 있으며, 이에 따라 정규적인 표적은 인식하지 않고, 비정규적인G:A 위블 배열 표적 사이트만을 인식하게 하기 위해서, 이러한 G를 U로 치환한 miR-1을 디자인 하였으며, 이를 G가 있는 위치에 따라 5' 말단 기준 2번째 위치(miR-1-G2U), 3번째 위치(miR-1-G3U), 7번째 위치(miR-1-G7U)에 적용하여 합성하였다. 이때, 도 14에 사용한 miR-1의 치환 염기 서열은 다음과 같으며 (miR-1-G2U: 5' p-UUGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU-3' ; miR-1-G3U: 5' p-UGUAAUGUAAAGAAGUAUGUAU-3' ; miR-1-G7U: 5' p-UGGAAUUUAAAGAAGUAUGUAU-3') 이는 가이드 가닥으로 합성되었고, 운반자 가닥은 기존의 miR-1의 것을 디자인하여 Bioneer사에서 화학적으로 합성 제작 후, HPLC로 분리, 상기 회사에서 제공한 방법에 따라 가이드 가닥과 운반 가닥의 이중체 (duplex)로 제조하여 사용하였다. 해당 마이크로RNA의 1차 심근세포주로의 도입 (transfection)은 RNaimax (Invitrogen 사) 시약을 이용하여 50uM 농도로 수행 하였다

[0309] 그 결과 miR-1-G2U 또는 miR-1-G3U 또는 miR-1-G7U 를 1차 심근세포배양에 도입하였을 때 심근 세포의 형태가 심근 비대를 유도한 세포 (도 14a, +PE)와 유사한 수준으로 커진 것을 관찰 할 수 있었다 (도 14a). 이때 각각의 세포 크기를 정량적으로 분석하기 위해서, 100개 이상의 세포가 이미지J 프로그램 (NIH)을 통해 정량화 되었으며, 이에 따라 miR-1의 G:A 위블 배열 사이트만을 인식하게 합성한 miR-1 치환체(miR-1-G2U, miR-1-G3U, miR-1-G7U) 모두 대조군(NT) 핵산을 도입했을 때와 비교해서 약 1.5~1.8 배 정도 그 크기가 커진것으로 분석되었다. 이는 페닐에프린(PE) 약물이 유도하는 심근세포비대증 모델의 심근 세포 크기와 비슷한 수준이며, miR-1 자체는 심근세포 형태상으로는 세포 크기를 감소시키는 효과를 보임으로써, 그 정규적인 표적 억제효과가 G:A 위블을 통한 표적 억제와는 세포 형태학상 다른 기능을 나타내는 것을 관찰하였다 (도 14b). 또한, 추가적으로 본 실시예에서 관찰한 심근비대 현상을 분자적 수준에서 확인하기 위해서 마커로 그 발현이 증가하는 것으로 알려진 ANP (atrial natriuretic peptide) 유전자의 발현을 qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) 실험을 통해 GAPDH와 비교하여 상대적인 값으로 측정해 보았다 (도 14c). 그 결과, miR-1의 G:A 위블 배열 사이트만을 인식하게 합성한 miR-1 치환 체 (miR-1-G2U, miR-1-G3U, miR-1-G7U)를 심근세포에 도입했을 경우에는 모두ANP 발현양을 대조군(NT)에 비해 1.2~1.5 배 정도 유의하게 증가시킨 것을 4번의 반복 실험을 통해 확인할 수 있었다. 이러한 ANP 발현 증가는 페닐에프린(PE) 약물을 처리한 심근 세포 실험군이 대조군에 비해 크기가 약 2배 정도 증가한 것 보다는 적지만, 원래의 miR-1이 도입 되었을 때 도리어 ANP 발현이 유의하게 감소하는 현상과는 반대되는 것으로, 이를 통해 miR-1은 G:A 위블 배열 사이트를 통해 완전히 다른 생물학적 기능을 나타낸다고 볼 수 있다.

[0310] 상기로부터 마이크로RNA 발단 지역에서 G:A 위블 배열을 통해 억제하는 비정규 표적은 기존의 정규적인 표적 인식과는 생물학적으로 다른 기능을 나타낼 수 있다는 점을 최종적으로 알 수 있었다. 이러한 발견은 마이크로RNA의 정규적인 표적을 통한 기능과 비정규적 표적을 통한 기능이 서로 다르다는 것을 나타내며, 이러한 점으로 미루어 볼 때 마이크로RNA의 G:A 위블 표적만을 억제할 수 있다면 G:A 위블 표적에 의해서 일어나는 생물학적 기능만을 선택적으로 제어할 수 있을 것이다.

[0312] [실시예 15] 심근 세포주 (H9c2)에서 miR-133-G4U 발현을 통한 심비대증의 유도 관찰

- [0313] G:A 위블 염기 배열이 마이크로RNA의 발단부분에 작용하여 인식하는 비정규적 표적 현상에 대해서, 추가적으로 그 생물학적 기능을 심근세포에서 확인하고자, 이전 실시예에서 살펴본 miR-1 이외에 심근 세포에서 기능을 하는 것으로 알려진 miR-133에 대해 miRNA-GU를 적용해 보았다. miR-133은 근세포 발달 및 질병 병리를 조절하며, 심근 비대현상의 억제기능을 지닌다고 알려졌다 (Nat Med. 2007, 13(5): 613-618; Ikeda S et al, Mol cell boil, 2009, vol29, 2193-2204). 따라서 본 발명진은 miR-133의 비정규 GA 배열 타겟 사이트 중 5 ‘말단 기준 4번째 G를 통해서 이루어지는 표적 인식을 특이적으로 억제하는 간섭유도 핵산인 miR-133-G4U (5’ - UUUUGUCCCCUUAACACGUG-3’)를 위의 실시예에서와 같이 바이오폴리머에서 합성 제작하여, 50 nM 농도의 이중체로 RNAiMAX 시약 (Invitrogen 사) 을 이용하여 심근세포주 h9c2 에 전달시켜 그 세포 형태상의 변화를 관찰하였다 (도 15a). 그 결과, miR-133-G4U의 발현이 H9c2 세포의 크기를 대조군 (NT) 에 비해 증대시켰으며 (도 15a), 100개 이상의 세포의 크기를 이미지J (NIH) 프로그램을 통해 정량적으로 분석한 결과, 약 2배정도 유의하게 증가 시킴을 확인할 수 있었다 (도 15b).
- [0314] 따라서, miR-133-G4U에 의해서 일어나는 miR-133의 비정규 GA 배열 발단 타겟 발현 저하는 심비대증을 유도하며, 이는 심비대증을 억제하는 miR-133 의 정규 발단 표적 저해 기능과는 다른 새로운 기능임을 유추할 수 있다.
- [0316] **[실시예 16] 간암 세포내의 miR-122 에 의한 비정규 GA 배열 발단 사이트 유전자의 발현 저해 효과를 루시페라제 리포터를 통해 확인**
- [0317] 이전 실시예 10에서 miRNA가 비정규적으로 G:A 위블 배열 발단 사이트와 결합한다는 발견에서, 이러한 비정규적 표적 결합만을 특이적으로 인식하게 하는 miRNA-GU를 발명하게 되었고, 이를 miR-124, miR-1, miR-133에 적용하였을 때, 기존의 기능과는 다른 효과가 나타남을 실시예 11, 12, 14, 14에서 관찰하였다. 그리고 또한 실제로 마이크로RNA에 비정규적 G:A 위블 배열 발단 사이트를 가지고 있는 표적 유전자의 발현을 저해 할 수 있는지를 확인하기 위해, 실시예 13에서 miR-1을 대상으로 심근 조직 세포주에서 그 기능을 확인하였다. 추가적으로 간 조직과 간암 세포에 특이적으로 발현하는 miR-122을 대상으로 비정규 G:A 위블 배열 발단 표적 유전자의 발현을 저해할 수 있는 지를 루시페라제 리포터 시스템을 사용하여 확인하고자 하였다 (도 16).
- [0318] 간암 또는 간 조직에 특이적으로 발현하여 기능하는 miR-122는, 그 발단 서열 (5'발단 기준 1-8번 염기: 5' - UGG AGU GU-3')에 5 ‘말단 기준 2번째, 3번째, 5번째, 7번째에 G:A 위블 배열을 할 수 있는 G를 가지고 있다. 따라서 우선적으로는 이중 2번째 G가 비정규적으로 G:A 위블 배열을 통해 인식할 수 있는 해당 표적 사이트를 대상으로 그 억제 효율을 측정하기 위해서, 실시예 2에서 진행한 동일한 방법으로 IC50 (Inhibitory concentration 50)을 측정하여 정규적 발단 사이트와 비교하며 살펴 보았다 (도면 16a).
- [0319] 실험을 진행하기 위한 루시페라제 리포터 벡터는 miR-122 의 2번 G 염기에 대해 GA염기 배열이 가능한 비정규 GA배열 발단 타겟의 발현 억제를 감지하기 위해서, miRNA-122의 2번 G 염기에 대한 비정규 GA배열 발단 사이트 (2G:A) 서열 (5'발단 기준 1-9번 염기: 5' -CAC ACU CAA-3')을 psi-check2 (Promega사) 벡터 안에 있는 레닐라 루시페라제 유전자의 3'UTR (3'untranslated region) 부분에 5번 연속적으로 배열되게 하게 도입하여 제작하였다. 또한 동시에 정규 발단 사이트 (5'발단 기준 1-9번 염기: 5' -CAC ACU CCA-3')에 대한 루시페라제 리포터 벡터도 동일하게 제작하였다.
- [0320] 이렇게 제작된 루시페라제 리포터 벡터를 가지고, miR-122의 여러 농도에서 정규 발단 사이트 (seed site)와 5 ‘말단 기준 2번째 G를 통한 비정규 GA배열 발단 사이트 (2G:A site)를 가지는 표적 유전자의 발현 저해 효과를 해당 루시페라제 리포터의 활성의 변화로 측정하고, IC50 (inhibitory concentration 50) 값을 살펴본 결과, miR-122는 정규 발단 표적 사이트에 대해서는 약 0.5 nM, 비정규 GA배열 발단 사이트 (2G:A site)에 대해서는 약 7nM 로 측정되어, miR-122가 비정규 GA배열 발단 사이트 (2G:A site)를 가지는 유전자의 발현을 억제하는 것을 확인하였으며, 그 효율은 정규 발단 사이트에 비해서 낮음을 알 수 있다 (도 16a). 또한 유전자 발현 억제 시작되는 농도를 비정규 GA배열 발단 타겟에서 루시페라제 리포터로 살펴보았을 때, 1.5 nM 이상의 농도 조건에서 루시페라제 효소 활성이 저해되는 것을 확인하였다 (도 16a). 이는 miR-122가 정규 발단 타겟 사이트 발현을 억제하는 것과 약 2배 정도 억제 효율의 차이를 보였다.
- [0321] 본 실험은 상기 실시예에서 사용했던 동일한 방법으로 miR-122의 이중체를 합성하고, 이를 여러 농도 (0, 1, 5, 10, 25nM)에서 해당 psi-check2 벡터(50ng)와 함께 Lipofectamine 2000 시약 (Invitrogen)을 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 대략 10,000개의 간암세포주 (Huh7, KCLB: 60104) 에 전달(co-transfection)시켜서 96

well에서 배양하며 진행하였으며, 실시예 2에서 수행한 방법과 동일하게 루시퍼라제 활성을 측정하여 실행하였다.

[0322] miR-122가 비정규 GA배열 발단 사이트 유전자의 발현을 억제한다는 사실을 확인한 후, 이것이 세포안에 존재하는 miR-122에 의해서 동일하게 조절되는 지를 확인하기 위해서, miR-122가 존재하는 간암세포인 Huh7 세포주를 사용하여, 5' 말단 기준 2번째 G 및 3번째 G에 의해서 일어나는 비정규 GA배열 발단 사이트 (2G:A)에 대한 루시퍼라제 리포터 실험을 수행하였다 (도 16b). 이러한 실험을 진행하기 위해서 추가적으로 5' 말단 기준 3번째 G에 의해서 일어나는 비정규 GA배열 발단 사이트 (3G:A)에 대한 루시퍼라제 리포터 벡터 (luc-3G:A site), 5' 말단 기준 2번째와 3번째 G에 의해서 함께 일어나는 비정규 GA배열 발단 사이트 (luc-2G:A, 3G:A site)에 대한 루시퍼라제 리포터 벡터, 전체 miR-122의 서열에 완전 상보적인 서열을 측정하는 루시퍼라제 리포터 벡터 (luc-PM site) 를 상기에 기술된 동일한 방법으로 제작하였고, 5' 말단 기준 2번째 G에 의해서 일어나는 비정규 GA배열 발단 사이트(2G:A)에 대한 루시퍼라제 리포터 벡터 (luc-2G:A site) 와 함께 간암세포주에 도입 후 루시퍼라제의 활성을 측정하여 실험하였다 (도 16b).

[0323] 그 결과, miR-122 존재하는 것으로 알려진 Huh7에 세포에 luc-PM site 벡터를 도입하였을 때 그 활성이 루시퍼라제 벡터 자체만 도입된 대조군에 비해 약 50% 정도 줄어드는 것을 관찰하여, Huh7 세포에 miR-122가 존재함을 확인하였으며, 동시에 miR-122는 3번 비정규 GA배열 발단 타겟 리포터 (Luc-3G:A), 2,3번 비정규 GA배열 발단 타겟 리포터 (Luc-2G:A, 3G:A)의 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 억제 효과가 miR-122에 의해 유도된 것인지 알기 위하여, miR-122의 발현 저해제 (hsa-miR-122-5p inhibitor, IH-300591-06-0010)를 다마콘사에서 구매하여 50nM로 처리하였고, 이 때 이런 모든 억제 현상이 사라지는 것으로 확인하였다.

[0324] 상기의 실시예를 통해, miR-122는 비록 정규적 발단 사이트보다는 약하지만, 5' 말단 기준 2번 비정규 GA 배열 발단 타겟의 발현을 억제할 수 있다는 사실을 확인하였으며, 또한 간암세포인 Huh7에 자연적으로 존재하는 miR-122는 5' 말단 기준 3번 비정규 GA배열 발단 타겟 유전자와, 2,3번 비정규 GA배열 발단 타겟 유전자의 발현을 억제한다는 사실을 알 수 있었다. 특히 간암세포인 Huh7에서 이루어지는 억제 효과는 miR-122의 발현 저해제 처리에 의해 사라지는 것으로 miR-122에 의한 조절임을 확인하였다(도 16b). 따라서, miR-122는 비정규 GA배열 발단 타겟 유전자의 발현을 억제하는 조절 기능이 있음을 알 수 있다.

[0326] **[실시예 17] miR-122의 특정 비정규 GA배열 발단 표적 유전자의 발현 억제를 통한 간암세포주의 세포 이동 저해 현상 확인**

[0327] miR-122 의 비정규 GA 배열 발단 표적의 간암 세포내 기능을 알아보기 위해서, 해당 비정규 GA 배열 발단 표적 사이트를 상보적으로 인식하여 저해하는 miRNA-GU를 적용하여 이를 간암세포인 hepG2에 도입한 후에, 간암 세포의 성질 중 암전이에 중요한 세포 이동 능력이 어떻게 달라지는 지를 상처 치유 분석(wound healing assay)을 수행하여 살펴보았다.

[0328] 간암세포주인 hepG2에서의 상처 치유 분석은 우선은 miR-122의 5' 말단 기준 2번 비정규 GA배열 발단 타겟, 3번 비정규 GA배열 발단 타겟, 2,3번 비정규 GA배열 발단 타겟에 상보적으로 인식하는 miRNA-GU를 해당 서열로 합성한 후 이를 상기 실시예에서 실행한 동일한 방법으로 hepG2 세포안에 도입 하고, 24시간 배양 후, 1000ul 팁을 이용하여 세포배양층 (cell layer) 에 흠 (scratch) 을 만들고, 세포를 48시간까지 배양하며 각 실험군의 세포가 이동하는 것을 대조군인 NT-6pi를 도입한 것과 비교 관찰하며 진행하였다. 이때 실험에 사용된 간접 유도 핵산의 서열은 다음과 같다 (miR-122: 5' - UG GAG UGU GAC AAU GGU GUU UG - 3' ; miR-122-G2U: 5' - UU GAG UGU GAC AAU GGU GUU UG - 3' ; miR-122-G3U: 5' - UG UAG UGU GAC AAU GGU GUU UG - 3' ; miR-122-G2,3U: 5' - UU UAG UGU GAC AAU GGU GUU UG - 3').

[0329] 그 결과, 대조군인 NT-6pi 의 경우와 동일하게 miR-122를 도입한 경우에는, 48 시간 세포 배양 시, 만들어진 흠이 거의 채워지는 세포 이동을 관찰할 수 있었다. 하지만 miR-122-G2U, miR-122-G2,3U siRNA 가 전달된 실험군에서는 이러한 세포 이동이 저해되는 것을 보였으며, 이런 저해 현상은 miR-122-G2,3U siRNA 가 전달된 실험군에서 가장 강하게 나타났다 (도 17a). 이를 정량적으로 측정해본 결과, miR-122-G2U, miR-122-G2,3U siRNA의 경우 대조군에 비해 2~3배 세포 이동이 저해되었음을 확인하였다 (도 17 b). 해당, 정량 분석은 miR-122의 세포 이동을 세포 형태상으로 관찰한 다음, 이 관찰 결과를 이미지J 프로그램 (NIH) 을 이용하여 분석하여 측정하였다. 추가적으로, miR-122-G3U siRNA 가 유도하는 세포 이동을 실험을 진행한 결과, miR-122-G3U에 의해서는 세포 이동 저해 기능을 관찰할 수 없었다 (도 17c-d).

- [0330] 이를 바탕으로 miR-122 의 비정규 GA배열 발단 표적 억제제는 간암 세포의 이동을 저해하며, 이는 2번 염기의 GA배열이 우선적으로 작용하며, 이어 첨가적으로 3번 염기의 GA배열이 더해질 경우, 세포 이동 저해 기능의 강화가 유도된다는 점을 알 수 있다.
- [0332] [실시예 18] miR-122-G2,3U에 의한 비정규 GA배열 발단 표적 조절로 인한 세포 주기 정지(cell cycle arrest)의 증가 확인
- [0333] 세포의 이동은 세포 분열과 밀접하게 연관되어 있으며, 특히 암세포에서 많이 관찰되고 있다 (Cancer research, 2004, 64(22):8420-8427). 따라서 miR-122-G2,3U가 유도하는 간암 세포 이동의 저해가 세포 주기 조절과 관계가 있는지 확인하기 위해 실시예 12에서의 동일한 방법으로 유세포 분석 실험을 진행하였다. 이때 NT-6pi, miR-122, miR-122-G2, miR-122-3U, miR-122-G2,3U를 간암세포주인 HepG2에 전달한 후 각 세포의 세포주기를 측정 한 결과, miR-122-G2,3U 전달된 실험군에서, G0/G1 분포를 보인 세포의 비율이 대조군(NP-6pi)의 평균 52%에서 68%로 증가한 것을 확인했으며, G2/M 기의 세포 분포가 현저히 낮은 것을 확인하였다 (도 18). 하지만, miR-122, miR-122-G2U, miR-122-G3U는 대조군에 비해 유의한 차이점을 관찰하지 못하였다. 이 때 세포 주기 분석 실험은, 합성된 해당 siRNA 이중체를 50nM 농도로 HepG 에 전달해, 24시간 배양하고 Muse Cell Cycle Kit (Catalog No. MCH100106, Milipore)을 이용하여, 해당 회사가 제공하는 프로토콜에 따라 실험을 수행하고, Muse Cell Analyzer (Milipore) 로 측정하였다.
- [0334] 따라서 miR-122-G2,3U 가 조절하는 암세포 기능은 세포 분열 (G2/M) 을 낮추고, 세포주기 정지상태 (cell cycle arrest: (G0/G1)) 를 유도한다는 것을 확인하였으며, 이에 본 실시예의 결과는 miR-122가 비정규 GA 배열 발단 사이트를 5 ‘말단 기준 2번째 G 와 3번째 G 모두를 동시에 G:A 위블 배열하여 인식하여, 간암 세포 주기의 진행을 막는 기능을 나타낸다고 해석할 수 있다.
- [0336] [실시예 19] miR-122-G2,3U, miR-122-G2,7U에 의한 비정규 GA배열 발단 표적 조절로 인한 세포주기 정지상태 유도 관찰
- [0337] miR-122의 비정규 GA 배열 발단 표적에 기능은 이전 실시예 17에서miR-122-G2,3U가 간세포의 이동을 저해하는 기능이 있다는 점을 파악했으며, 이때 특히 miR-122-G2,3U의 발현에 의해서 유도되는 세포 이동의 저해는, 2번 G 염기의 비정규 GA배열 발단 표적 조절의 생물학적 기능에 3번 G 염기의 조절 효과가 첨가될 경우, 그 기능이 극대화 되는 것을 관찰하였다 (도 17). 따라서 miR-122의 2, 3, 7번 G 염기가 추가적인 조합으로 비정규 GA배열 발단 표적 저해의 생물학적 기능이 변화하는지 알아보기 위해, miR-122-G7U, miR-122-G3,7U, miR-122-G2,7U siRNA의 세포 주기 조절 기능을 추가적으로 확인하는 실험을 수행하였다.
- [0338] 이 때의 실험은 동일하게 간암세포주인 HepG2를 사용하였으며, 이전 실시예 18에서의 방법과 동일하게 해당 miRNA-GU 이중체로 제조하여 50 nM 농도로 세포에 트랜스펙션 하였다. 하지만 이번 세포주기 관찰에서는 24시간 배양 후 노코다졸 (nocodazole) 을 100ng/ml 로 16시간 동안 처리하여 G2/M (분열준비기/분열기)에 HepG2 세포를 동기화(synchronization)한 다음, 얼마나 많은 수의 세포가 G2/M에서 멈춰있는지로 G0/G1에서의 세포주기 정지 상태의 세포의 양을 Muse Cell Analyzer (Milipore) 유세포 분석기로 측정하였다(도 19).
- [0339] 그 결과, miR-122-G2U는 대조군인 NT-6pi에 비하여 세포주기 정지상태인 G0/G1에 있는 세포 수가 차이가 없었지만, miR-122-G2,3U siRNA, miR-122-G2,7U와 같이 2번째 G에 첨부적으로 비정규 GA배열 발단 타겟 사이트를 조절하는 경우, 세포주기 정지상태 (G0/G1) 의 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 19a). 하지만 miR-122-G3, 7U 는 별다른 증가를 보이지 않았다 (도 19a). 이를 정량적으로 분석해 보면, miR-122-G2,3U siRNA이 전달된 실험군의 경우, 대조군에 비해 약 2배 이상 세포주기 정지상태 (G0/G1) 의 비율이 증가했으며, 이어 miR-122-G2,7U 실험군에서는 약 1.5 배로 세포주기 정지상태 (G0/G1)의 비율이 증가함을 관찰했다 (도 19b).
- [0340] 이를 바탕으로, miR-122-G2,3U siRNA, miR-122-G2,7U siRNA에 의한 비정규 GA배열 발단 표적의 조절을 통해 세포 주기 증지 상태를 증대시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0342] [실시예 20] let-7a-G2U, let-7a-G2,4U에 의한 비정규 GA배열 발단 표적 조절이 유도하는 세포주기 정지 상태 유도 관찰

- [0343] 항암 조절 (Tumor suppressor) 기능을 하는 대표적인 마이크로RNA로는 let-7 family 가 있다. 이는 예쁜 꼬마 선충의 발달 과정을 조절하는 기능이 보고 (Nature, 2000, 403(6772): 901-906)된 이후, 다양한 암세포에서 억제된 발현 (Cancer Res., 2004, 64(11): 3753-3756) 및 종양 형성 과정 (Tumorigenesis) 조절을 통한 항암 기능 (Cell, 2005, 120(5): 635-647 ;Genes Dev. 2007, 21(9):1025-1030) 이 보고되어 왔으며, 이를 바탕으로 암 진단 및 항암제 개발의 가능성을 지닌 중요한 유전자로 연구되어왔다. 이에 본 발명자들은 let-7 의 비정규 GA 배열 발단 표적의 저해가 유도하는 생물학적 기능을 알아보는 실험을 진행하였다.
- [0344] let-7a의 5'말단 1번째에서부터 9번째까지의 발단 서열은 5'-UGA GGU AGU-3'로써 G:A 위블 염기 배열을 할 수 있는 G는 2번째, 4번째, 5번째, 8번째에 존재한다. 본 발명자는 이 중에 2번째와 4번째 G에 주목을 하고 이를 miRNA-GU로 변형하여 합성하고, 이를 간암 세포주인 HepG2 세포에 도입한 후 세포 주기에서 어떠한 영향을 미치는지를 이전 실시예 19에서 실시한 방법과 동일하게 실험을 수행하였다. 이때 합성하여 사용한 let-7에 대한 염기서열은 다음과 같다 (let-7a: 5' - U GAG GUA GUA GGU UGU AUA G UU - 3' ;let-7a-G2U: 5' - U UAG GUA GUA GGU UGU AUA G UU - 3' ; let-7a-G4U: 5' - U GAU GUA GUA GGU UGU AUA G UU - 3' ; let-7a-G2,4U: 5' - U UAU GUA GUA GGU UGU AUA G UU - 3').
- [0345] 그 결과, let-7a의 경우는 대조군인 NT-6pi에 비해서 별다른 차이를 나타내지 못하였지만, let-7a-G2U와 let-7a-G2,4U는 G0/G1에서의 세포 주기 정지 상태를 증가시키고, let-7-G4U는 도리어 G2/M에 있는 세포의 양을 증가시켜 세포 주기를 빠르게 돌아가게 한다는 것을 관찰할 수 있었다 (도 20a). 이를 4번의 반복 실험으로 정량화해보면, let-7a-G2U 실험군의 경우, G1/G0세포의 분포가 대조군 (Nt-6pi) 과 비교시, 약 1.5 배 정도 증가하였으며, G2/M 세포의 분포가 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다 (도 20b). 이를 통해 let-7a의 2번 비정규 GA배열 발단 타겟의 발현 억제는 HepG2 세포의 세포 주기 정지상태를 유도함을 확인할 수 있었다. 이어 let-7a 의 발단에 존재하는 4번 G염기의 경우, 단독 GA 배열 (let-7a-G4U)로는 HepG2 의 세포 주기 정지 상태를 유도를 감소시키면서, 도리어 G2/M 상태로 빠르게 진행되어 노코다줄 약물 처리로 많은 세포 수가 머무르는 결과를 보였다. 또한 2번과 4번이 동시에 GA 배열 할 경우 (let-7a-G2,4U), HepG2 의 세포 주기 정지 상태 유도를 관찰할 수 있었다. 이러한 세포 주기 정지 상태는 let-7a 가 전달된 HepG2 세포에서 관찰되지 않았다 (도 20 b). 따라서, let-7a의 2번과 2,4번 비정규 GA배열 발단 타겟의 발현 억제는 HepG2 세포의 세포 주기 정지 상태를 유도하며, 이는 let-7a 이 본 발명자들이 수행한 HepG2 세포 조절에서 보이는 기능과는 전혀 다른 기능임을 확인하였다.
- [0346] 상기의 실시예를 통해, let-7은 5 '말단 기준 2번 G를 통한 비정규 GA 발단 배열 사이트의 유전자를 억제함으로써 암세포 주기 정지를 촉진 시키는 역할을 하며, 더 바람직하게는 5' 말단 기준 2번 G와 4번 G가 함께 G:A 위블 배열로 작용할 때 그 효과가 가장 크다는 것을 알 수 있다. 또한 let-7의 5 '말단 기준 4번 G를 통한 비정규 GA 발단 배열 사이트는 도리어 암세포의 세포 주기 진행을 촉진 시켜, 암세포의 증식을 유도할 것으로 여겨진다.
- [0348] [실시예 21] miR-302a-4GU, miR-372-4GU에 의한 비정규 GA배열 발단 표적 저해가 유도하는 역분화 촉진을 OCT4 프로모터 리포터로 관찰
- [0349] 분화된 세포는 몇가지 전사인자의 인위적인 발현으로 분화능을 다시 획득할 수 있으며, 최종적으로 다시 배아세포와 같은 전능 분화능을 획득한 세포를 역분화 세포 (induced pluripotent stem cell) 라고 한다. 이러한 기술은 쥐의 배성섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast: MEM)에 4개의 인자 (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4)를 도입하여, 줄기세포와 같이 분화 다양성을 가진 유도 만능 줄기세포 (iPS cell: inducible pluripotent stem cell)를 만들 수 있음이 보고되었다 (Cell, 2006,126 (4): 663-676). 유사하게 인간의 체세포에 4개의 인자 (OCT4, SOX2, NANOG, 및 LIN28) 전달을 통해 유도 만능 줄기세포를 만들 수 있음이 보고된 바 있다 (Science,2007, 318(5858): 1917-1920). 이는 역분화 (dedifferentiation)과정을 거쳐 만능으로 분화될 수 있는 재생 가능성을 인간 세포를 포함한 어떤 세포를 통해서도 만들어 낼 수 있다는 점에서 그 응용 가능성이 매우 높은 분야이며, 최초 발견 후, 유도 만능 줄기세포 생성 효율성을 높이기 위한 노력이 지속되어왔다. 그 일환으로 보고된 마이크로RNA 유도 만능줄기세포 (mirPS) 역시 효율적으로 만능성 (pluripotency)을 유도 하는 방법의 하나로써, miR-302a와 miR-372 같은 마이크로RNA가 단독으로 또는 4개의 인자 (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) 와 함께 세포를 역분화시키는 기능이 보고되었다 (RNA, 2008 14(10): 2115-2124; Nat Biotechnol. 2011, 29 (5): 443-448). 따라서, 본 발명자들은 miR-302a와 miR-372의 비정규 GA배열 발단 표적 발현의 저해가 세포를 역분화 시키는 과정을 촉진 할 수 있는지를 알아보는 실험을 진행하였다.

- [0350] 우선 만능성 (pluripotency) 유도를 모니터 하기 위해, 줄기세포에서 활성화된다고 보고된 Oct4 프로모터와 이에 의존하여 발현되는 녹색 형광 단백질이 포함된 플라스미드를 구입하였다 (Addgene #21319) (도 21 a). 이러한 Oct4 발현 리포터 벡터 (pOct4:GFP) 를 분화가 된 자궁경부암 세포 HeLa에 도입하였을 때는, 녹색 형광 단백질이 발현되지 않으나 해당 세포가 역분화되어 분화능을 획득하였을 때는 Oct4 발현 리포터에서 녹색 형광 단백질이 발현되게 된다. 이러한 Oct4 발현 리포터 벡터와 함께 역분화를 일으키는 것으로 알려진 마이크로RNA인 miR-302a, miR-372를 대상으로 실험을 수행하였다. miR-302a와 miR-372의 발단 서열중 5 ‘말단 기준 2번째에서 8번째의 서열은 "AA GUG CU" 이며 따라서 비정규 GA배열 발단 배열은 5’ 말단 기준 4번째 G와 6번째 G를 통해서 가능하다. 하지만 본 발명자들은 4번째의 G에 주목하여 miR-302a-G4U, miR-372-G4U를 합성하여 실험을 수행하였다.
- [0351] 우선적으로 실험은, HeLa 세포에 Oct4 발현 리포터 벡터 (pOct4:GFP)를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 사) 시약을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 전달한 다음, 인간 miR-302a와 miR-372 서열대로 가이드 가닥과, 운반자 가닥을 상기 실시예와 같이 바이오키나아에서 합성 제작하여, 이중체로 제조하고 RNAimax (Invitrogen 사) 시약을 이용하여 50nM 농도로 순차적 전달을 하였다. 또한, miR-302a와 miR-372의 비정규 GA배열 발단 표적 특이적 siRNA의 제작은 발단내 G 염기를 U로 치환하여 상기예와 동일하게 준비하여, 50nM 농도로 세포에 전달하였다. 이에 사용된 핵산의 염기 서열은 다음과 같다 (miR-302a: 5’ - UAAGUGCUCCAUGUUUUGGUGA-3’ ; miR-302a-G4U: 5’ - UAAUUGCUU CCAUGUUUUGGUGA-3’ ; miR-302a 운반가닥: 5’ - ACUUAACGUGGAUGUACUUGCU-3’ ; miR-372: 5’ - AAAGUGCUGCG ACAUUUGAGCGU-3’ ; miR-372-G4U: 5’ - AAAUUGC UGCGACA UUUGAGCGU-3’ , miR-372 운반가닥: 5’ -CCUCAAUGUGGAGCACUAUUCU-3’). 이렇게 리포터 벡터와 RNA를 도입한 HeLa 세포는 14일동안 10% FBS (fetal bovine serum), 100 U/ml 페니실린, 및 100 µg/ml 스테ptomycin을 보충한 Dulbecco's 개질 Eagle's 배지 (Invitrogen)에서 배양하였으며, 트랜스펙션 수행시는 항생제 없는 완전배지에서 세포를 배양하였다.
- [0352] 그 결과, miR-302a나 miR-372 가 단독으로 전달된 실험군에서는 대조군에 비해 군집형태 (colony) 의 세포 성장을 보였으나, Oct4 프로모터의 활성을 나타내는 녹색 형광 단백질 발현이 14일 배양 시기까지는 관찰되지는 않았다. 하지만, miR-302a와 miR-372 비정규 GA배열 발단 표적 억제 siRNA가 도입된 실험군에서는 군집 형태의 세포 성장 뿐 아니라, Oct4 프로모터의 활성을 나타내는 녹색 형광 단백질 발현이 관찰되었으며 (도 21 b-c, 적색 화살표), 이는 miR-302a와 miR-372 과 각각의 비정규 GA배열 발단 표적 억제 siRNA 가 동시에 세포로 전달되었을 때 좀 더 강하고 큰 녹색 형광 단백질 발현 세포 군집을 관찰할 수 있었다 (도 21 b-c). 이를 바탕으로 miR-302a와 miR-372 비정규 GA배열 발단 표적의 저해는 세포를 역분화시키고 Oct4 발현을 통해 분화능을 획득하는 것을 촉진 할 수 있다는 점을 알 수 있다.
- [0353] 상기의 실시예를 통해, miR-372-G4U와 miR-302a-G4U는 기존의 miR-372, miR-302a 만을 단독으로 발현 시켜 세포의 역분화를 일으키는 것 보다 효율적으로 세포의 역분화를 촉진 시킬 수 있다는 점을 관찰 할 수 있으며, 이에 따라 miR-372-G4U와 miR-302a-G4U는 세포의 역분화를 촉진 시키는 소재로 사용될 수 있다는 점을 알 수 있다.
- [0355] [실시예 22] 5 ‘말단 기준 6번째에 2 ‘OMe 변형이 해당 RNA 간섭 유도체의 비정규 핵염기 표적을 억제하지 못하는 현상을 확인
- [0356] 상기 실시예에서, 비정규 핵염기 타겟이 정규 발단 타겟과는 전혀 다른 생물학적 기능을 보이며, 따라서 비정규 핵염기 타겟의 발현 저해만 조절하는 RNA 간섭 유도 핵산인 miRNA-BS를 발명하고, 이의 기능을 확인하였다. 하지만 miRNA-BS의 경우에도 기존의 miRNA의 비정규 핵염기 사이트를 상보적으로 배열하도록 그 발단 서열이 바뀌었지만, 바뀐 발단 서열을 통해서 또다시 새로운 핵염기 사이트가 생겨남을 확인할 수 있었다. 따라서 miRNA-BS와 같은 RNA 간섭 유도 핵산이 정규 발단 서열만 인식하고, 비정규 핵염기 사이트는 인식하지 못하는 기술이 필요함을 알게 되었다. 이에, 본 발명자들은 비정규 핵염기 결합을 하기 위해서는 발단 서열에 있어서 5 ‘말단 기준 6번 위치의 염기가 중요하며, 이 6번 위치에 염기 배열의 배열 세기에 따라 비정규 핵염기 결합이 일어나는 정도가 달라질 수 있음에 주목하여, 6번 위치의 염기 배열 세기를 줄일 목적으로, 다음과 같은 실험을 진행하였다. 즉, miR-124의 6번 뉴클레오타이드의 리보실 링의 2’ 위치에 메틸기 (2’ OMe) 를 넣어 변형하고, 변형된 간섭 유도 핵산 (miR-124-6me)이 miR-124의 비정규 핵염기 타겟 저해 기능이 있는지를 루시퍼라제 리포터 실험으로 관찰하였다. 2’OMe 변형된 miR-124는 합성(바이오키나아 사)을 통해 제조하였고, 이전 실시예 2에서 수행한 방법과 동일한 방법으로 루시퍼라제 리포터 실험을 진행하고 유전자 억제 효율을 IC50로 측정하였다 (도 22). 이 때 사용한 루시퍼라제 리포터 벡터는 miR-124의 정규 발단 사이트 (Luc-seed)와 비정규 핵염기 사이트

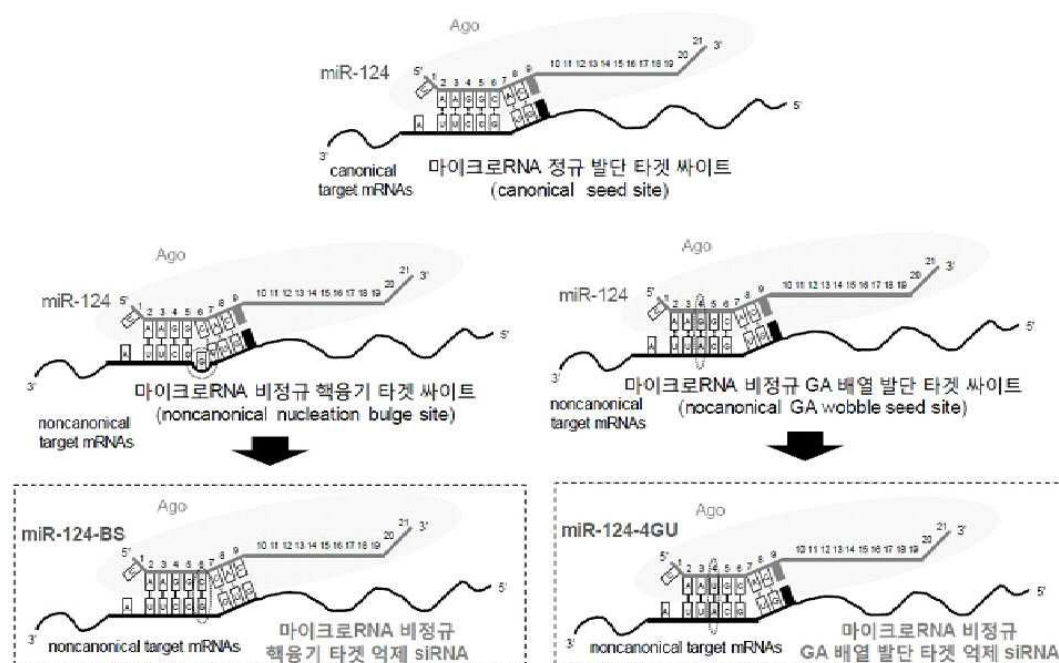
(Luc-nucleation bulge)에 대한 것을 사용하였다.

[0357] 그 결과, 실시예 2에서 보였던 miR-124에 의한 비정규 용기 표적 유전자 저해 효과가 완전히 사라졌으며, 반면에 정규 발단 사이트를 통한 유전자 발현 억제는 IC50 값이 0.3 nM로 2' OMe를 6번째 뉴클레오타드에 가하더라도 여전히 우수한 억제 효과를 보이는 것으로 관찰되었다 (도 22).

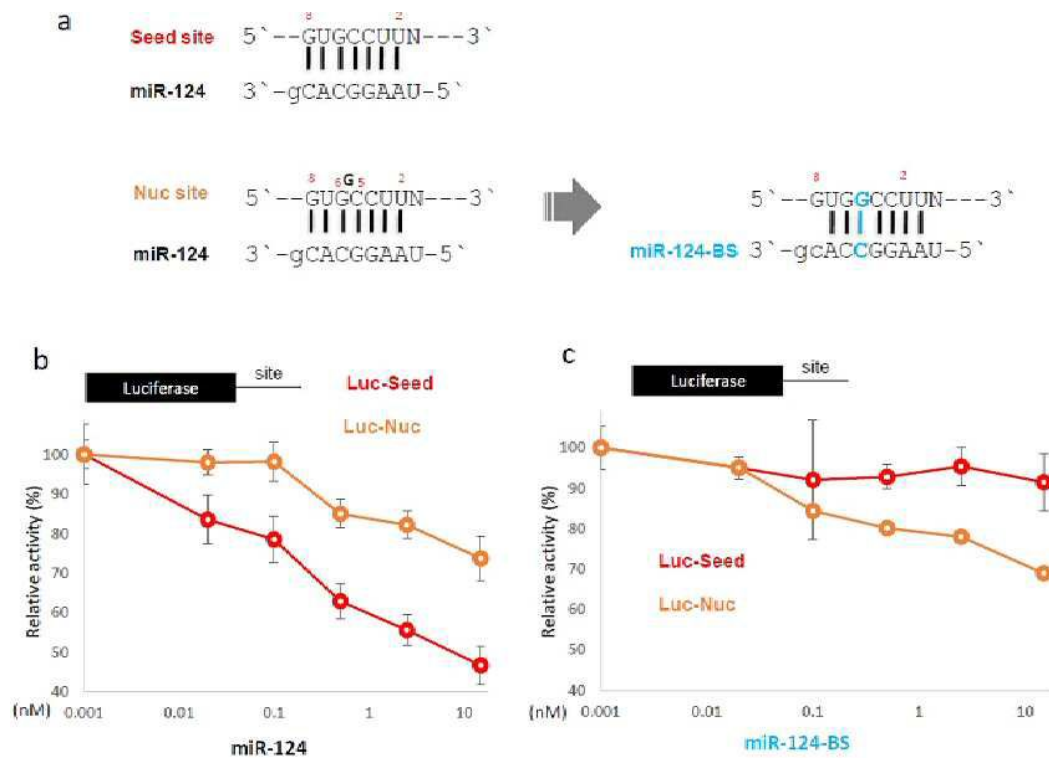
[0358] 상기의 실시예를 통해, RNA 간섭을 유도하는 핵산의 5' 말단 기준 6번째에 2' OMe 변형을 가하게 되면, 해당 RNA 간섭 유도 핵산에 의해서 유도되는 정규 발단 표적 유전자의 발현 억제 효과는 유지되면서, 비정규 핵용기 표적 유전자의 발현 억제는 사라지는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서, 5' 말단 기준 6번째에 가하는 2' OMe 변형은 miRNA-BS에 적용하여 해당 miRNA의 비정규 핵용기 사이트를 특이적으로 억제하려는 본래의 의도는 유지하면서, 새롭게 나타날 수 있는 비정규 핵용기 결합은 완전히 제거함으로써 그 부작용을 최소화 할 수 있다.

도면

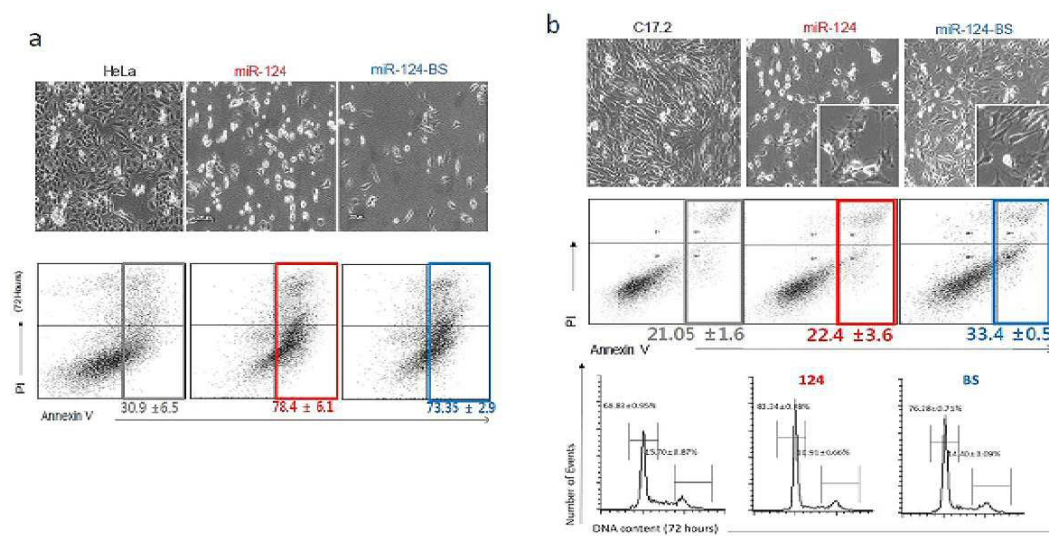
도면1



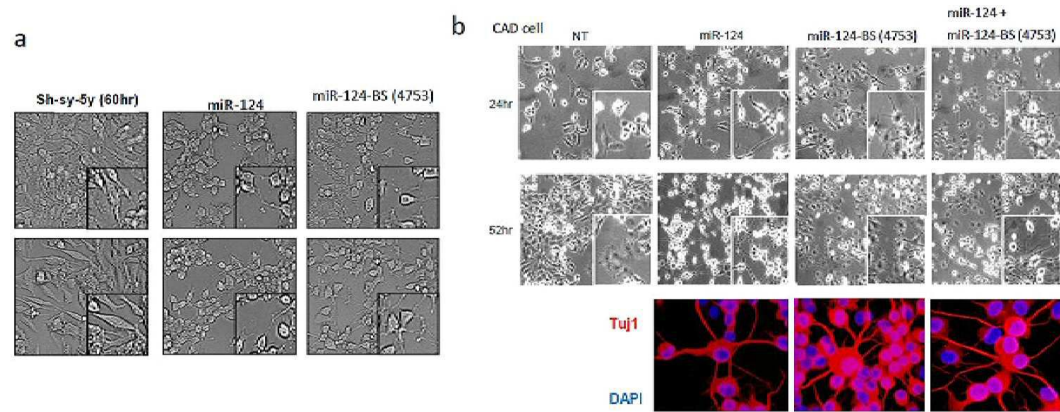
도면2



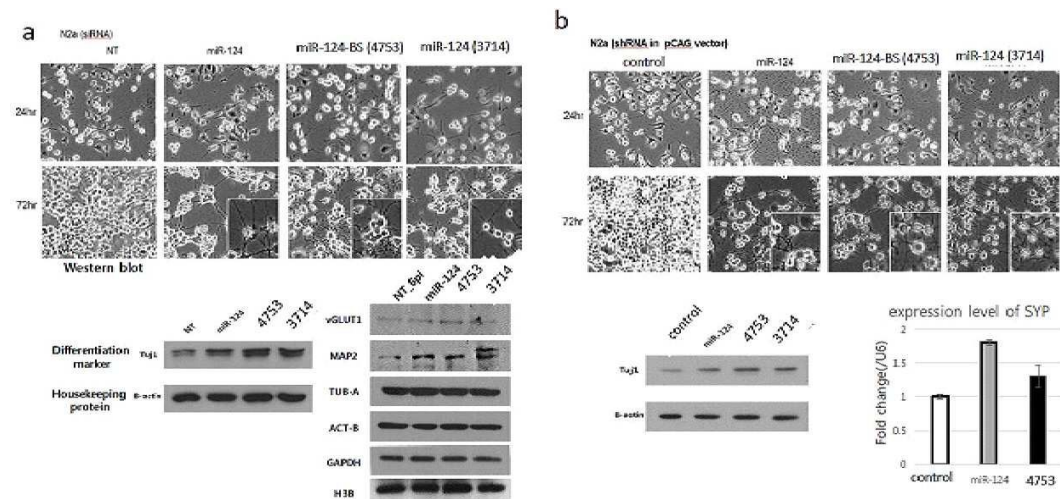
도면3



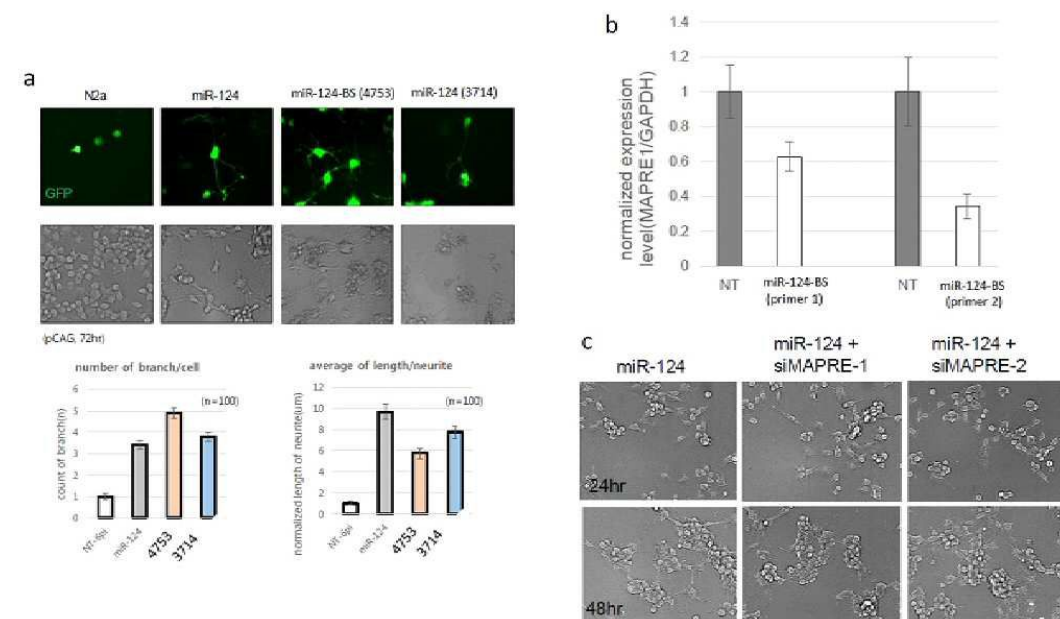
도면4



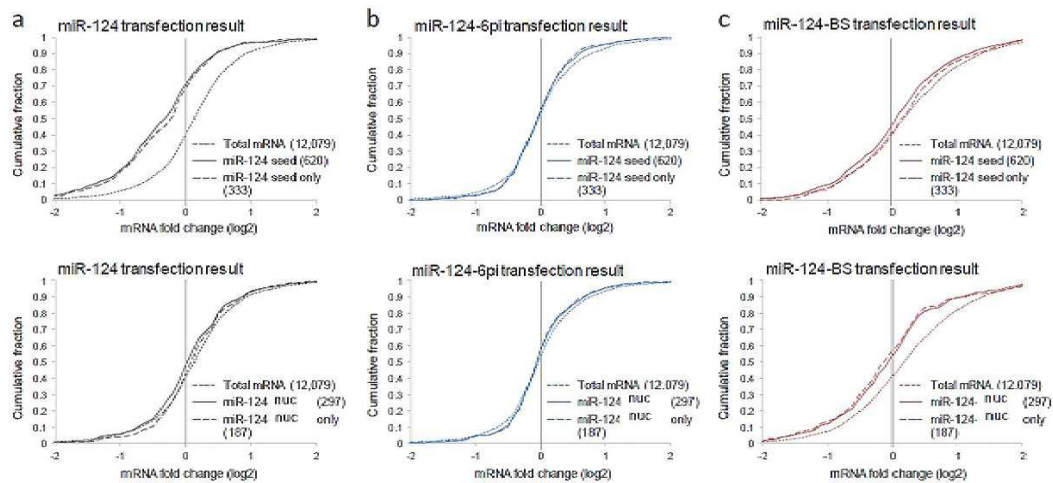
도면5



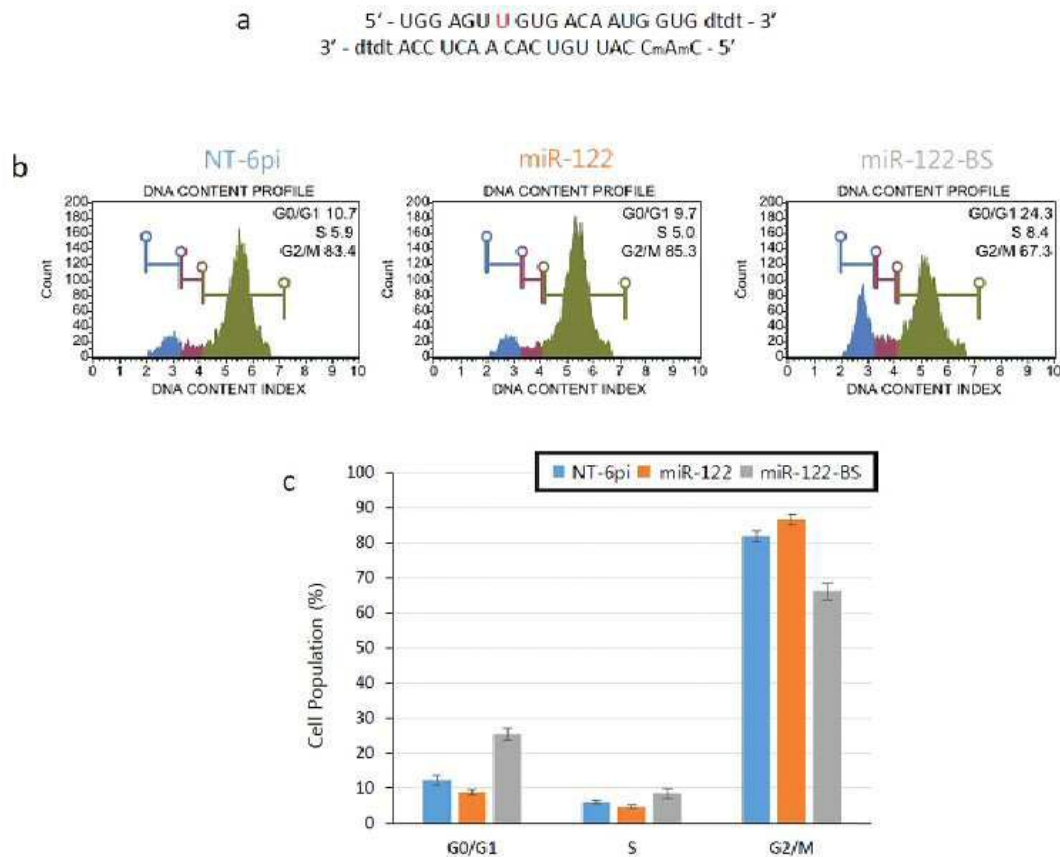
도면6



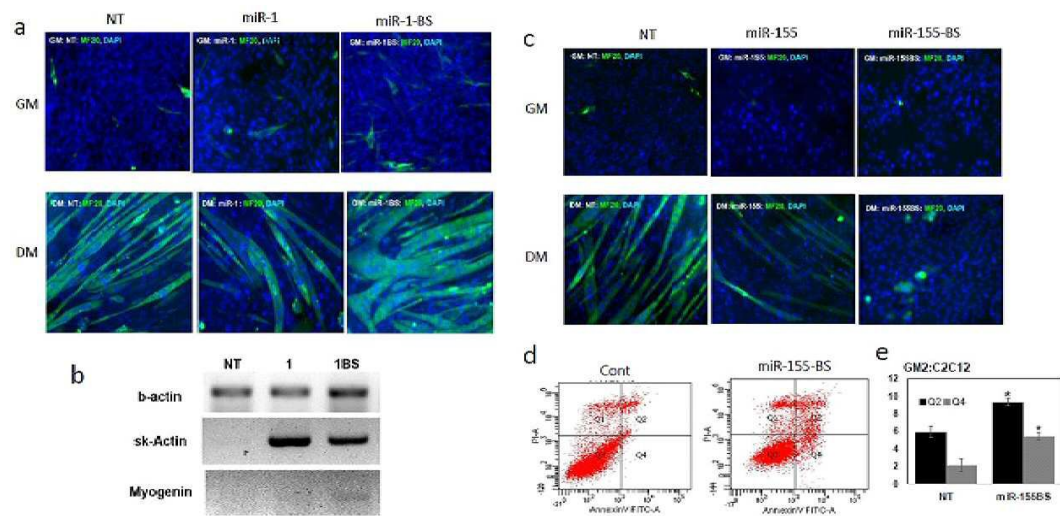
도면7



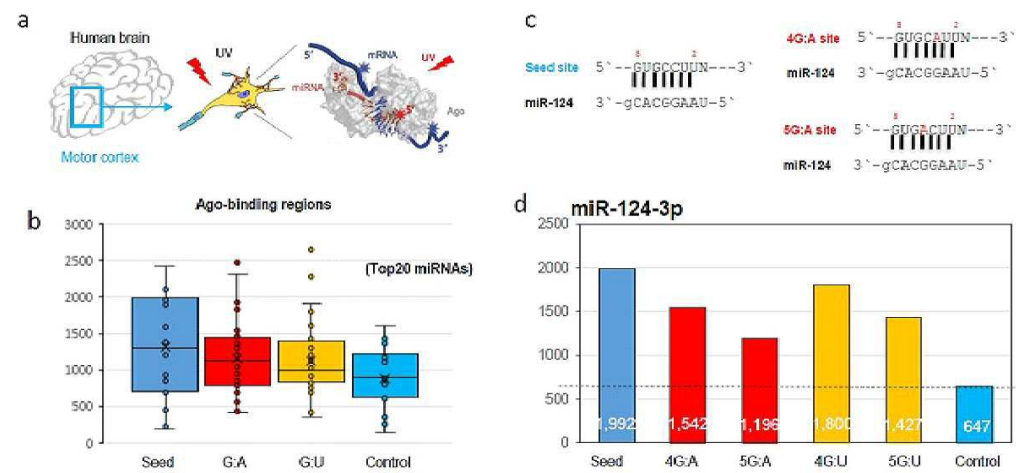
도면8



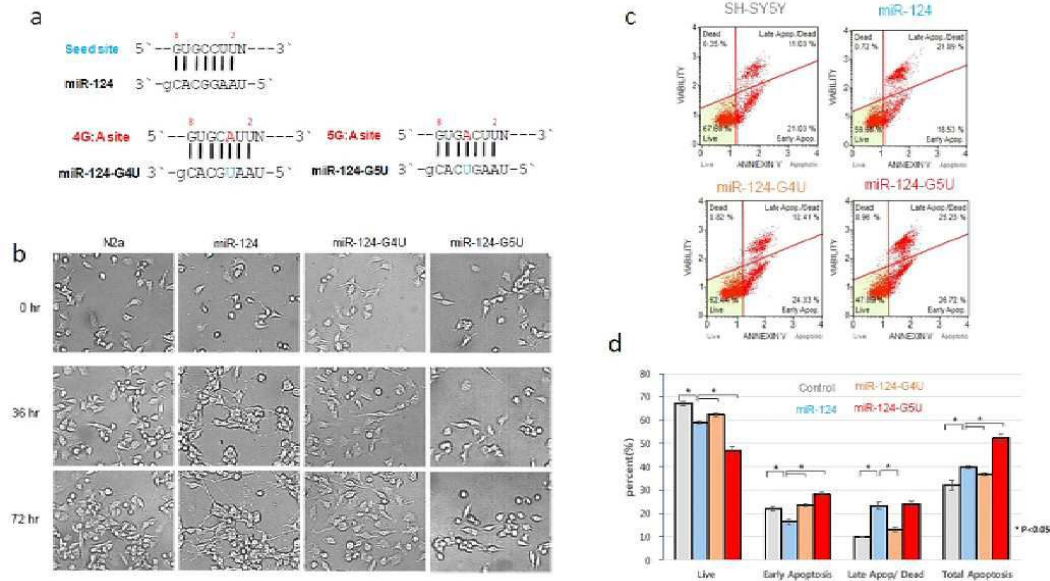
도면9



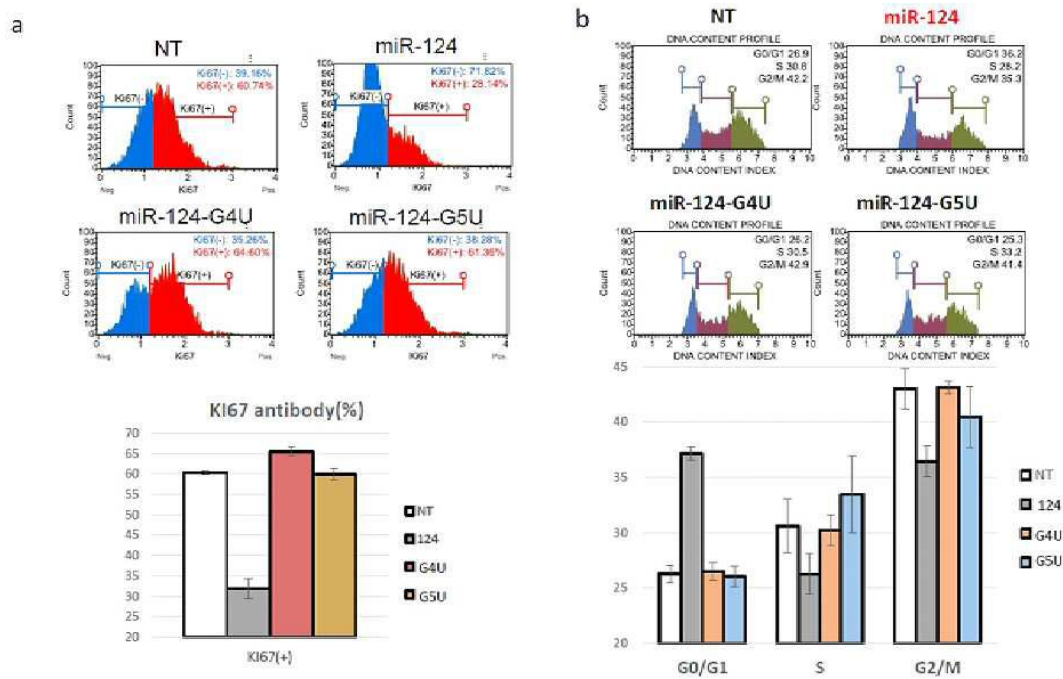
도면10



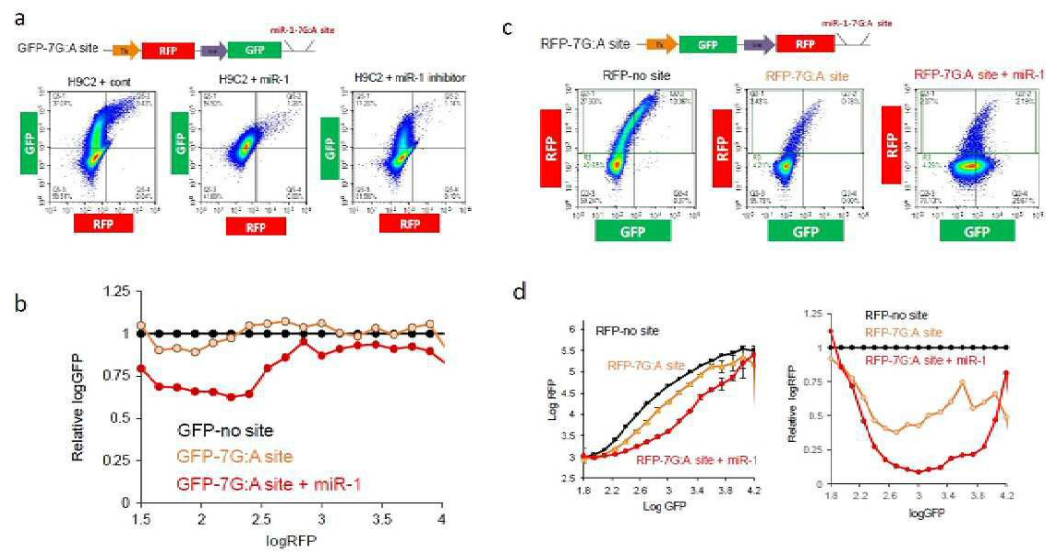
도면11



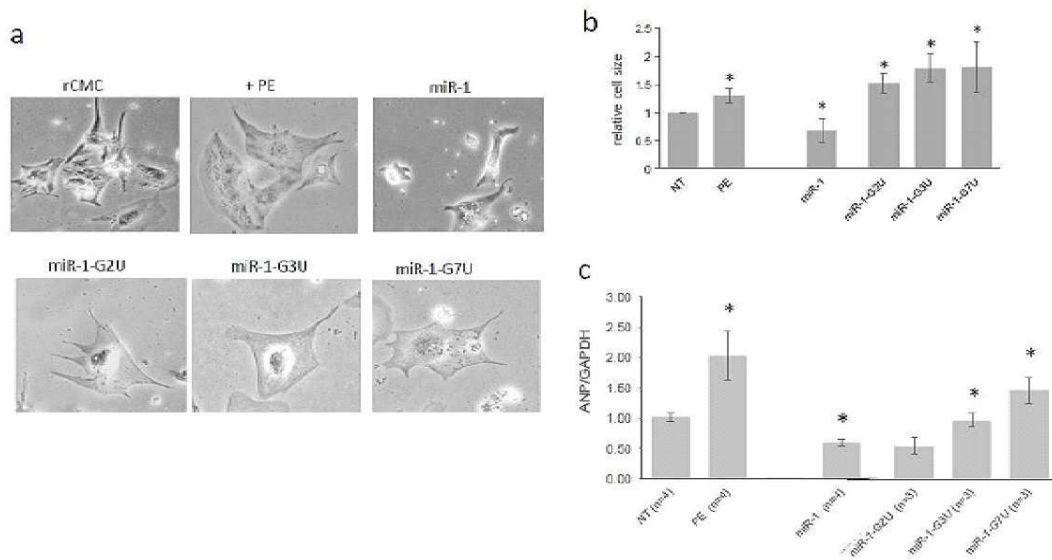
도면12



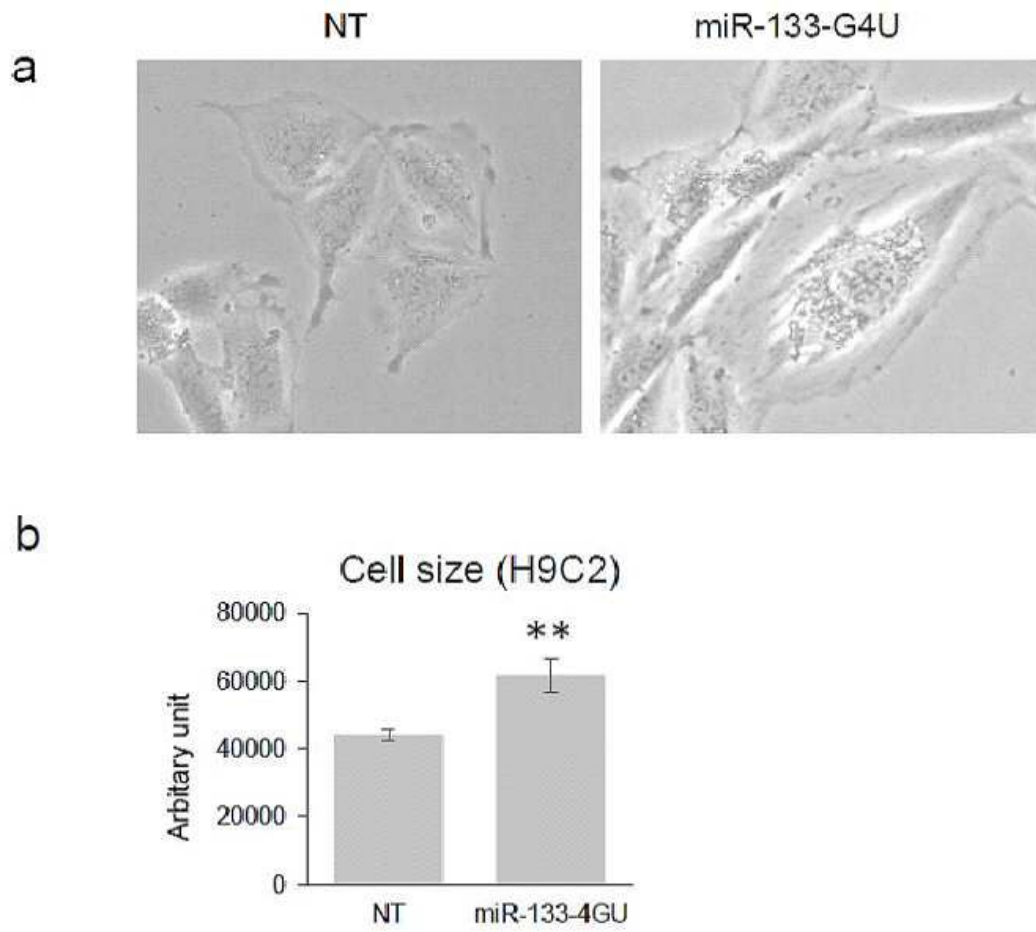
도면13



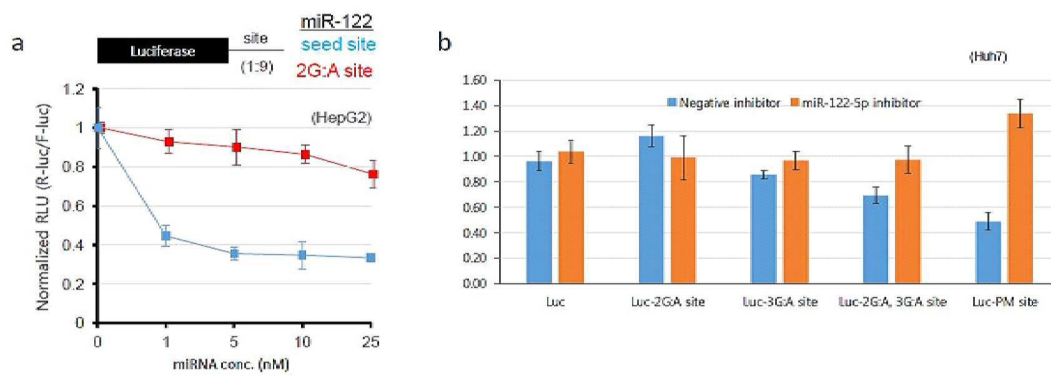
도면14



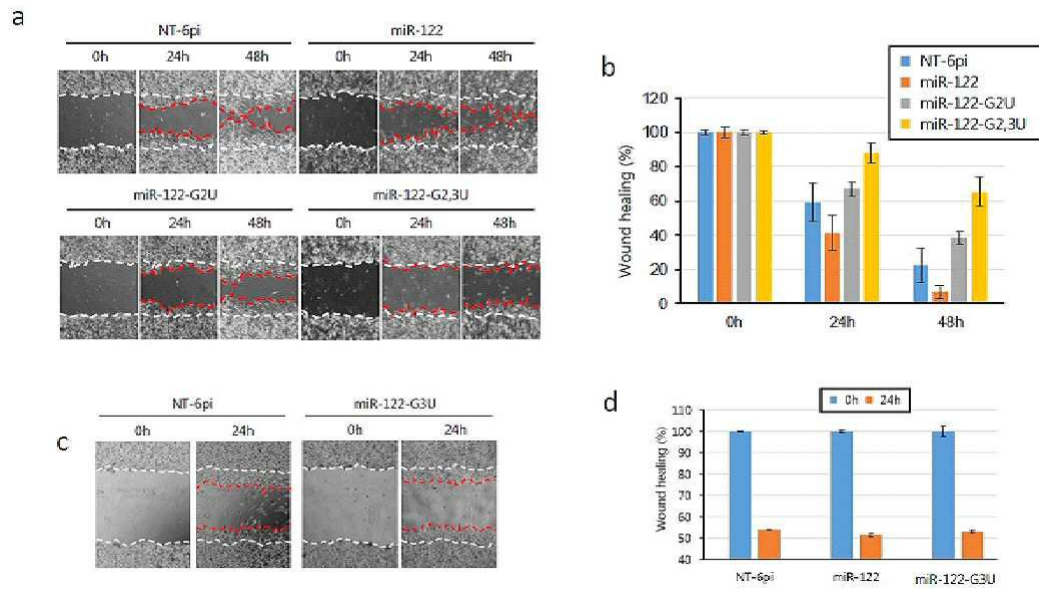
도면15



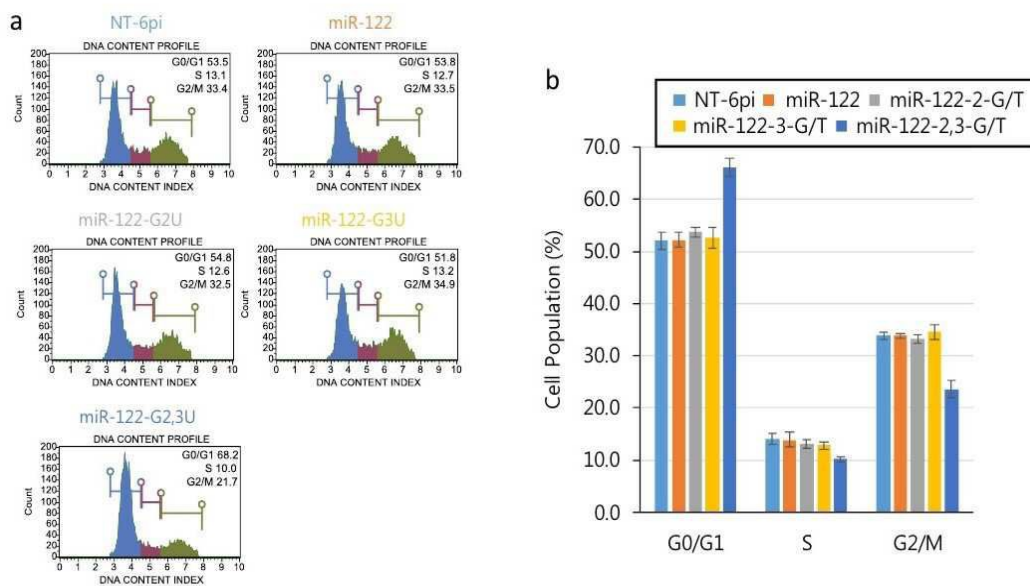
도면16



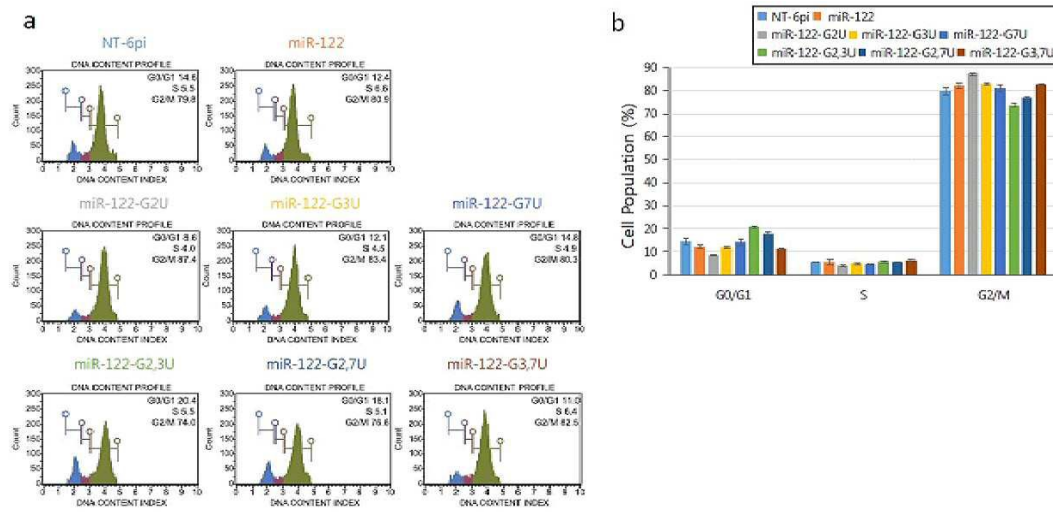
도면17



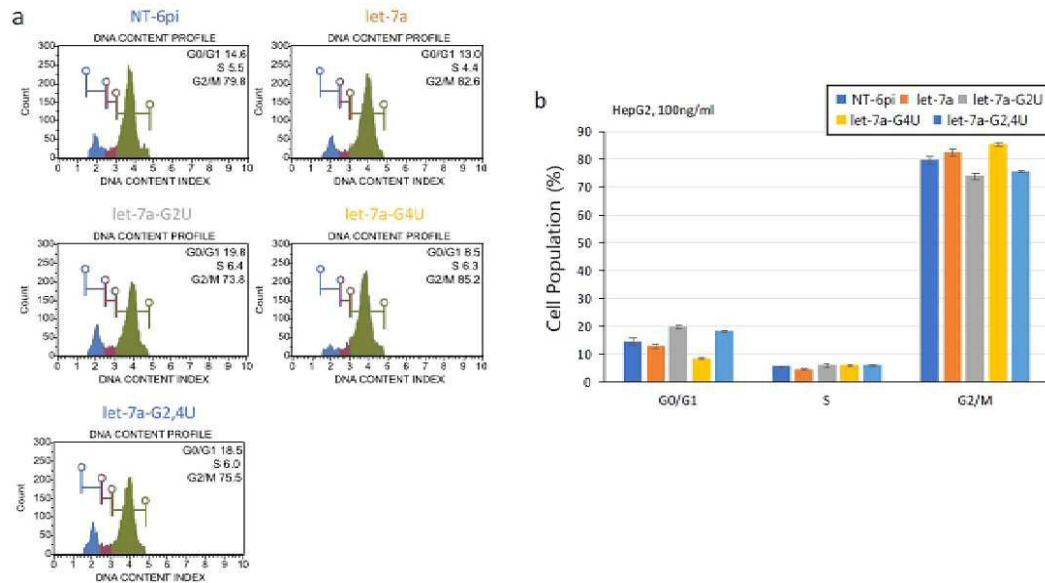
도면18



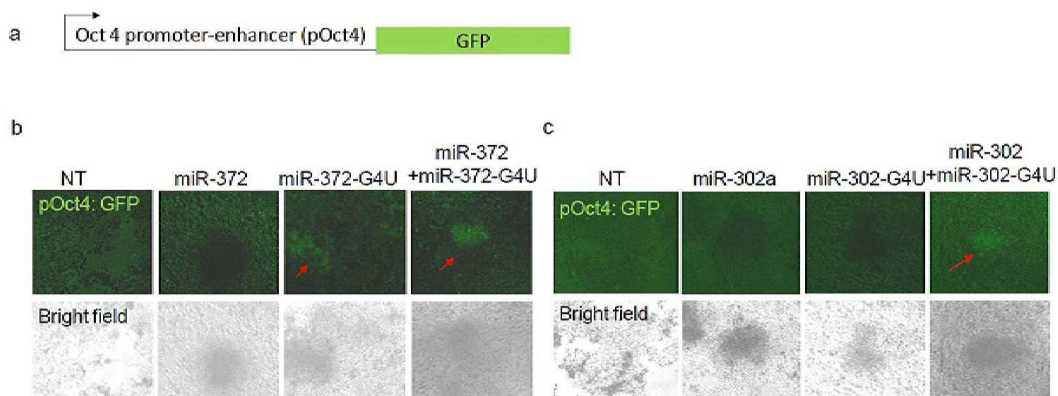
도면19



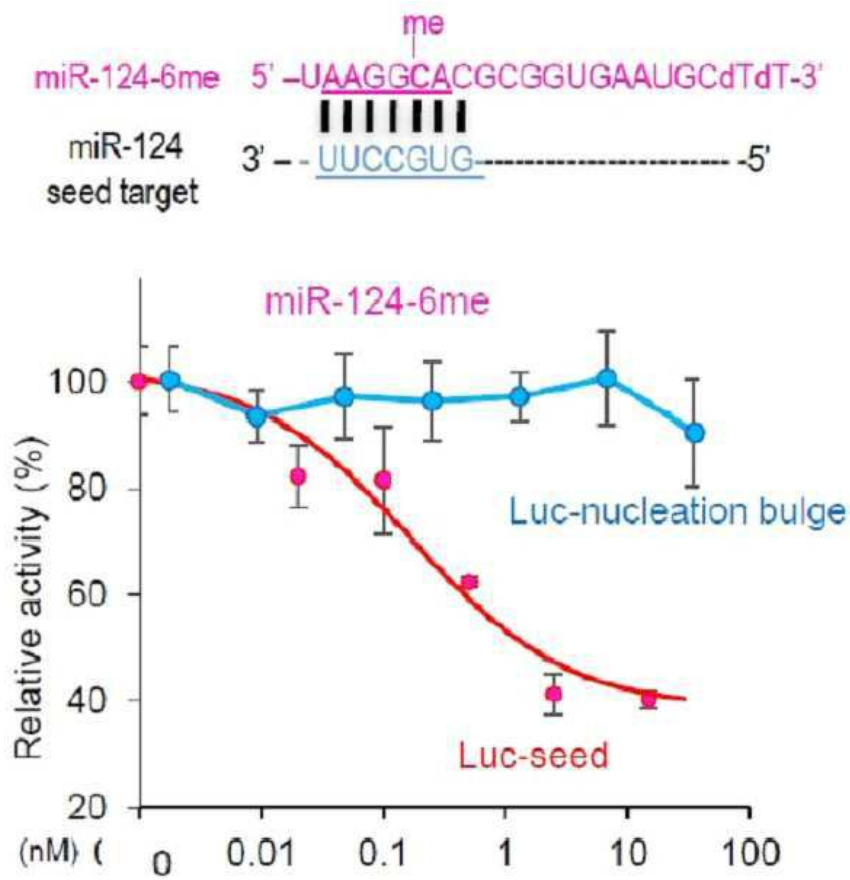
도면20



도면21



도면22



서열 목록

- <110> Korea University
- <120> RNA interference inducing nucleic acids suppressing noncanonical targets of microRNA and use thereof
- <130> MP19-161
- <150> KR 10-2018-0063055
- <151> 2018-05-31
- <160> 102
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 6
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 5' 2~7 of miR-124-BS
- <400> 1
- aaggcc
- <210> 2

<211> 6
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 2~7 of miR-122-BS

<400> 2

aaggcc

6

<210> 3

<211> 6

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 2~7 of miR-155-BS

<400> 3

uaaugg

6

<210> 4

<211> 6

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 2~7 of miR-1-BS

<400> 4

ggaaau

6

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-124-BS

<400> 5

uaaggccacg cggugaaugc c

21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-122-BS

<400> 6

uggaguugug acaauggugu u	21
<210> 7	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-155-BS	
<400> 7	
uuaaugggcu aaucgugaua gg	22
<210> 8	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-1-BS	
<400> 8	
uggaauugua aagaaguaug u	21
<210> 9	
<211> 9	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5' 1~9 of miR-124-G4U	
<400> 9	
uaaugcacg	9
<210> 10	
<211> 9	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5' 1~9 of miR-124-G5U	
<400> 10	
uaagucacg	9
<210> 11	
<211> 9	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> 5' 1~9 of miR-124-G4,5U

<400> 11

uaauucacg

9

<210> 12

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-1-G2U

<400> 12

uugaaugua

9

<210> 13

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-1-G3U

<400> 13

uguaaugua

9

<210> 14

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-1-G7U

<400> 14

uggaauuua

9

<210> 15

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-1-G2,3U

<400> 15

uuuaaugua

9

<210> 16

<211> 9

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5' 1~9 of miR-1-G3,7U	
<400>	16	
uguaauuuu		9
<210>	17	
<211>	9	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5' 1~9 of miR-1-G2,7U	
<400>	17	
uugaauuuu		9
<210>	18	
<211>	9	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5' 1~9 of miR-1-G2,3,7U	
<400>	18	
uuuaauuuu		9
<210>	19	
<211>	9	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5' 1~9 of miR-122-G2U	
<400>	19	
uugagugug		9
<210>	20	
<211>	9	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5' 1~9 of miR-122-G3U	
<400>	20	
uguagugug		9

<210> 21

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-122-G5U

<400> 21

uggauugug 9

<210> 22

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-122-G7U

<400> 22

uggaguuug 9

<210> 23

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-122-G9U

<400> 23

uggaguguu 9

<210> 24

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-122-G2,3U

<400> 24

uuuagugug 9

<210> 25

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-122-G2,5U

<400>	25	
uugauugug		9
<210>	26	
<211>	9	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5' 1~9 of miR-122-G2,7U	
<400>	26	
uugaguuug		9
<210>	27	
<211>	9	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5' 1~9 of miR-122-G2,9U	
<400>	27	
uugaguguu		9
<210>	28	
<211>	9	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5' 1~9 of miR-122-G3,5U	
<400>	28	
uguauugug		9
<210>	29	
<211>	9	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5' 1~9 of miR-122-G3,7U	
<400>	29	
uguaguuug		9
<210>	30	
<211>	9	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-122-G3,9U

<400> 30

uguaguguu

9

<210> 31

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-122-G5,7U

<400> 31

uggauuuug

9

<210> 32

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-122-G5,9U

<400> 32

uggauuguu

9

<210> 33

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-122-G7,9U

<400> 33

uggaguuuu

9

<210> 34

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-133-G4U

<400> 34

uuuuguccc

9

<210> 35

<211> 9
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' 1~9 of miR-133-G5U
 <400> 35
 uuuguuccc 9
 <210> 36
 <211> 9
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' 1~9 of miR-124-G4,5U
 <400> 36

 uuuuuuccc 9
 <210> 37
 <211> 9
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' 1~9 of let-7-G2U
 <400> 37
 uuagguagu 9
 <210> 38
 <211> 9
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' 1~9 of let-7-G4U
 <400> 38
 ugauguagu 9
 <210> 39
 <211> 9
 <212>
 > RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' 1~9 of let-7-G5U
 <400> 39

ugaguuagu	9
<210> 40	
<211> 9	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5' 1~9 of let-7-G8U	
<400> 40	
ugagguauu	9
<210> 41	
<211> 9	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5' 1~9 of let-7-G2,4U	
<400> 41	
uuauuguagu	9
<210> 42	
<211> 9	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5' 1~9 of let-7-G2,5U	
<400> 42	
uuaguuagu	9
<210> 43	
<211> 9	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5' 1~9 of let-7-G2,8U	
<400> 43	
uuagguauu	9
<210> 44	
<211> 9	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> 5' 1~9 of let-7-G4,5U

<400> 44

ugauuuagu

9

<210> 45

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of let-7-G4,8U

<400> 45

ugauguauu

9

<210> 46

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of let-7-G5,8U

<400> 46

ugaguauuu

9

<210> 47

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-302a-G4U

<400> 47

uaauugcuu

9

<210> 48

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-302a-G6U

<400> 48

uaaguucuu

9

<210> 49

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-302a-G4,6U

<400>

> 49

uaauuucuu 9

<210> 50

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-372-G4U

<400> 50

aaauugcug 9

<210> 51

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-372-G6U

<400> 51

aaaguucug 9

<210> 52

<211>

> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-372-G9U

<400> 52

aaagugcuu 9

<210> 53

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' 1~9 of miR-372-G4,6U

<400> 53

aaauuucug 9

<210> 54
 <211> 9
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' 1~9 of miR-372-G4,9U
 <400> 54

aaaauugcuu 9

<210> 55
 <211> 9
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5' 1~9 of miR-372-G6,9U
 <400> 55

aaaguucuu 9

<210> 56
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-124-G4U
 <400> 56

uaaugcacgc ggugaaugcc aa 22

<210> 57
 <211> 21
 <212>

RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-124-G5U
 <400> 57

uaagucacgc ggugaaugcc a 21

<210> 58
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-124-G4,5U

<400> 58
 uaaauucacgc ggugaaugcc aa 22

<210> 59
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-1-G2U
 <400> 59
 uugaauguaa agaaguaugu au 22

<210> 60
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-1-G3U
 <400> 60
 uguaauguaa agaaguaugu au 22

<210> 61
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-1-G7U
 <400> 61
 uggaauuuuaa agaaguaugu au 22

<210> 62
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-1-G2,3U
 <400> 62
 uuuaauguaa agaaguaugu au 22

<210> 63
 <211> 22
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-1-G3,7U
 <400> 63
 uguaauuuuaa agaaguaugu au 22
 <210> 64
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-1-G2,7U
 <400> 64
 uugaauuuuaa agaaguaugu au 22
 <210> 65
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-1-G2,3,7U
 <400> 65
 uuuaauuuuaa agaaguaugu au 22

 <210> 66
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G2U
 <400> 66
 uugaguguga caaugguguu ug 22
 <210> 67
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G3U
 <400> 67
 uguaguguga caaugguguu ug 22
 <210> 68
 <211> 22

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G5U
 <400> 68
 uggauuguga caaugguguu ug 22

<210> 69
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G7U
 <400> 69
 uggaguuuga caaugguguu ug 22

<210> 70
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G9U
 <400> 70
 uggaguguua caaugguguu ug 22

<210> 71
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G2,3U
 <400> 71
 uuuaguguga caaugguguu ug 22

<210> 72
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G2,5U
 <400> 72
 uugauuguga caaugguguu ug 22

<210> 73
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G2,7U
 <400> 73
 uugaguuuga caaugguguu ug 22
 <210> 74
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G2,9U
 <400> 74
 uugaguguua caaugguguu ug 22
 <210> 75
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G3,5U
 <400> 75
 uguauuguga caaugguguu ug 22
 <210> 76
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G3,7U
 <400> 76
 uguaguuuga caaugguguu ug 22
 <210> 77
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-122-G3,9U
 <400> 77

uguaguguua caaugguguu ug	22
<210> 78	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-122-G5,7U	
<400> 78	
uggauuuuga caaugguguu ug	22
<210> 79	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-122-G5,9U	
<400> 79	
uggauuguua caaugguguu ug	22
<210> 80	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-122-G7,9U	
<400> 80	
uggaguuuuu caaugguguu ug	22
<210> 81	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-133-G4U	
<400> 81	
uuuugucccc uucaaccagc ug	22
<210> 82	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> miR-133-G5U

<400> 82

uuuguuuccc uucaaccagc ug 22

<210> 83

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-124-G4,5U

<400> 83

uuuuuuuccc uucaaccagc ug 22

<210> 84

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> let-7-G2U

<400> 84

uuagguagua gguuguauag uu 22

<210> 85

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> let-7-G4U

<400> 85

ugauguagua gguuguauag uu 22

<210> 86

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> let-7-G5U

<400> 86

ugaguuagua gguuguauag uu 22

<210> 87

<211> 22

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	let-7-G8U	
<400>	87	
	ugagguauua gguuguauag uu	22
<210>	88	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	let-7-G2,4U	
<400>	88	
	uuauuguagua gguuguauag uu	22
<210>	89	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	let-7-G2,5U	
<400>	89	
	uuaguuuagua gguuguauag uu	22
<210>	90	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	let-7-G2,8U	
<400>	90	
	uuagguauua gguuguauag uu	22
<210>	91	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	let-7-G4,5U	
<400>	91	
	ugauuuuagua gguuguauag uu	22
<210>	92	

<211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> let-7-G4,8U
 <400> 92
 ugauguauua gguuguauag uu 22

<210> 93
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> let-7-G5,8U
 <400> 93
 ugaguauua gguuguauag uu 22

<210> 94
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-302a-G4U
 <400> 94
 uaaauugcuuc cauguuuugg uga 23

<210> 95
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-302a-G6U
 <400> 95
 uaaguucuuc cauguuuugg uga 23

<210> 96
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-302a-G4,6U
 <400> 96

uaauuucuuc cauguuugg uga	23
<210> 97	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-372-G4U	
<400> 97	
aaauugcugc gacauuugag cgu	23
<210> 98	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-372-G6U	
<400> 98	
aaaguucugc gacauuugag cgu	23
<210> 99	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-372-G9U	
<400> 99	
aaagugcuuc gacauuugag cgu	23
<210> 100	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-372-G4,6U	
<400> 100	
aaauuucugc gacauuugag cgu	23
<210> 101	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-372-G4,9U	

<400> 101

aaaauugcuuc gacauuugag cgu

23

<210> 102

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-372-G6,9U

<400> 102

aaaguucuuc gacauuugag cgu

23