(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0012071
(43) 공개일자 2016년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01) *A61K 9/127* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0063151
(22) 출원일자 2015년05월06일
심사청구일자 2015년05월06일
(30) 우선권주장
1020140093256 2014년07월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박은미
서울특별시 양천구 목동동로 350, 531동 404호 (목동, 목동신시가지아파트5단지)
안정혁
서울특별시 성동구 독서당로 175, 101동 605호 (옥수동, 극동그린아파트)
성혜윤
서울특별시 성동구 독서당로 343, 104동 201호 (금호동1가, 삼성래미안아파트)
(74) 대리인
유미특허법인

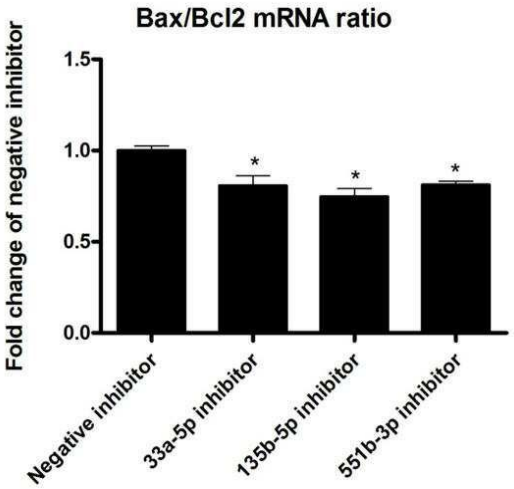
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **miR-551b-3p 를 이용한 허혈성 뇌중풍의 예방 또는 치료**

(57) 요 약

본 발명은 허혈성 전처치에 의해 조절되는 조직보호 miRNA 를 이용한 허혈성 뇌중풍의 예방 또는 치료에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 9/10 (2013.01)
A61K 9/127 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A5A2A32671867
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업-선도연구센터육성사업-기초의과학분야(MRC)
연구과제명 조직손상방어연구센터-효율적인 내인성 보호 모듈 발굴
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

miR-551b-3p 에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는,

허혈성 뇌중풍(ischemic stroke)의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 miR-551b-3p 에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드는, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 안타고미어(antagomir), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), RNA 압타머 또는 라이보자임인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 miR-551b-3p 에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드는, DNA, RNA, 2'-O-변형 올리고뉴클레오티드, 포스포로티오에이트-백본 디옥시리보뉴클레오티드, PNA(peptide nucleic acid) 또는 LNA(locked nucleic acid)인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 miR-551b-3p 에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드는, 발현 벡터에 포함되거나 세포에 도입된 형태로 제공되는 것인 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 허혈성 전처치에 의해 조절되는 조직보호 miRNA 를 이용한 허혈성 뇌중풍의 예방 또는 치료에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 허혈성 뇌중풍(ischemic stroke)은 혈전이나 색전에 의해 뇌혈관이 협착 또는 폐쇄되어 뇌혈류가 차단되는 질환으로, 빠른 시간 내에 혈류의 재공급이 이루어지지 않으면 뇌 기능에 필수적인 산소 및 포도당 등의 영양소 공급 부족으로 인해 신경세포에 영구적인 손상을 초래하게 된다.

[0003] 현재 허혈성 뇌중풍의 치료 및 예방을 위해 사용되는 약물들은 고혈압 치료제, 뇌혈류 개선제, 고지혈증 치료제 등이 있으나, 질환 발생 후에는 혈전 용해제만이 허혈에 의해서 야기되는 뇌 손상을 줄일 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나, 혈전 용해제는 출혈의 부작용으로 인하여 그 사용이 제한적이어서, 전체 환자의 10% 미만 정도만이 이러한 치료가 가능한 상황이다. 따라서, 허혈성 뇌중풍에 따른 뇌손상을 줄일 수 있는 다른 치료제의 개발이 절실하다.

[0004] 최근 연구 결과에 의하면, 짧은 기간 동안의 반복된 허혈을 전처치함으로써 역설적으로 허혈에 대한 보호 효과를 나타낼 수 있다는 것이 밝혀졌고, 이러한 내인성 보호 작용은 "허혈 내성(ischemic tolerance)", 그리고 허혈 내성을 유도하는 자극은 "허혈성 전처치(ischemic preconditioning ; IP)"라고 명명되었다. 이들 연구 결과에 따르면, 동물 모델에서 허혈성 뇌중풍을 유도하기 전에, 신경세포에 손상을 주지 않는 정도의 저강도(subthreshold) 허혈 자극에 뇌를 노출시킬 경우, 뒤이어 발생하는 심각한 허혈성 뇌중풍으로부터 뇌를 보호할 수 있다. 예를 들어, 허혈성 전처치에 의해 경색의 크기가 감소되고, 허혈 후 재관류시 재관류 손상의 특징적

소견인 세포사멸(apoptosis)이 감소되며, 재관류 후 기능의 회복을 촉진시킴과 동시에 부정맥을 예방할 수 있다(Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Trends Neurosci. 2003;26:248~254).

[0005] 이에 따라, 허혈성 전처치와 관련된 단백 및 신호 경로들에 대한 연구들이 진행되고 있으나, 허혈성 전처치가 어떻게 허혈 내성을 유도하는지에 관한 기전은 확실하지 않으며, 이 기전을 밝히는 연구는 허혈성 뇌중풍의 치료 및 예방에 필요한 약물 개발에 중요한 타겟을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서는 허혈성 전처치에 의해 조절되는 조직보호 miRNA들을 발굴하였으며, 이들을 뇌 조직의 보호 효과를 높이는 치료제로 활용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 miR-33-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 miRNA에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레티드를 포함하는, 허혈성 뇌중풍의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 하나의 목적은 miR-33-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 miRNA에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레티드의 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 허혈성 뇌중풍의 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명에서는, 허혈성 전처치를 유도한 실험 동물에 허혈성 뇌중풍에 노출시킨 후 희생시켜, 뇌의 피질(cortex)에서 miRNA를 추출한 후, 대조군으로서 허혈성 전처치를 하지 않은 대조군의 뇌 피질 miRNA와 발현 양상을 비교하였다. 그 결과, 허혈성 전처치에 의해 특이적으로 발현이 감소하는 miR-33-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 를 발굴하였다(도 1 내지 도 4).

[0010] 또한, 상기 miR-33-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 에 대한 저해 물질(inhibitor)를 N2a 세포(murine neuroblastoma cell)에 각각 도입하여 각 miRNA 의 활성을 감소시킨 경우, 대조군에 비해 Bax (pro-apoptotic Bcl2 family)와 Bcl2(anti-apoptotic Bcl2 family)의 mRNA 발현비율이 19~27%까지 감소하는 것으로 나타나 이들 miRNA의 활성이 감소할 경우 뇌신경 세포를 세포사멸(apoptosis)로부터 보호하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다(도 5).

[0011] 따라서, 허혈성 전처치에 의해 조절되는 miR-33-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 가 각각 뇌 조직보호와 관련이 있으며, 이들을 타겟으로 이용하여 뇌 조직의 보호 효과를 높이는 치료제로 활용할 수 있다.

[0012] 이에, 하나의 양태로서, 본 발명은 miR-33-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 miRNA에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레티드를 포함하는, 허혈성 뇌중풍의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0013] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 miR-33-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 miRNA에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레티드의 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 허혈성 뇌중풍의 치료 방법에 관한 것이다.

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] microRNA(또는 miRNA)는 다양한 유전자 발현을 조절하는 non-coding RNA을 말하며, mRNA의 번역을 억제하거나, mRNA의 분해를 유도함으로써 전사 후 단계에서 유전자의 발현을 억제한다. 전사 후 조절은 세포 내 신호전달과 같이 정확하고 정밀한 유전자 발현이 요구되는 과정에서 강력한 조절 방법으로 이용되고 있으며, 외부자극에 의한 유전자의 발현변화 중 절반 정도가 전사 후 단계에서 조절되므로, 전사 후 조절이 전체 유전자의 발현조절에서 매우 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다. 몇몇 연구에서는 miRNA는 세포 분화, 증식, 세포사멸, 발생, 면역, 물질대사 및 줄기세포 유지 등과 같은 많은 생물학적 과정을 통제하는 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. 또한, miRNA는 일반적으로 1개가 아닌 복수의 표적 유전자의 발현을 동시에 조절함으로 매우 높은 특이성과 효능을 가지고 있다.

[0016] 본 발명에서, miR-33-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 는 인간을 포함한 동물, 예를 들어 원숭이, 돼지, 말,

소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등으로부터 유래할 수 있으며, 인간 유래의 것이 바람직하다.

[0017] 본 발명에서, miR-33-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 을 구성하는 핵산 분자는 각각 18 내지 100 nt(nucleotide) 길이를 가질 수 있다. 바람직한 일예로, 상기 핵산 분자는 19 내지 25nt 길이, 더욱 바람직하게는 21, 22 또는 23nt 길이의 성숙 miRNA 형태일 수 있고, 바람직한 다른 일예로 50 내지 100nt, 더욱 바람직하게는 65-95nt 길이의 전구체 miRNA 형태일 수도 있다.

[0018] 상기 성숙 miRNA 또는 전구체 miRNA 형태의 miR-33-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 핵산 분자의 염기서열 정보는 미국국립보건원 유전자은행(NIH GenBank) 및 miRBASE(http://www.mirbase.org/) 등의 공지된 유전자데이터베이스에서 확인할 수 있다. 보다 상세하게, miR-33-5p 의 성숙 형태의 염기서열은 유전자 등록번호 MIMAT0000667 (서열번호 1), 전구체 형태는 MI0000707 (서열번호 2)으로 등록되어 있다. miR-135b-5p 의 성숙 형태의 염기서열은 유전자 등록번호 MIMAT0000612 (서열번호 3), 전구체 형태는 MI0000646 (서열번호 4)로 등록되어 있다. miR-551b-3p 의 성숙 형태의 염기서열은 유전자 등록번호 MIMAT0003890 (서열번호 5), 전구체 형태는 MI0004131 (서열번호 6)으로 등록되어 있다.

[0019] 또한, 본 발명에서 사용되는 miRNA 들은 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, miRNA 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실, 치환 또는 삽입에 의해 변형되더라도 상기 miRNA 핵산 분자와 기능적으로 동등한 작용을 할 수 있는 변이체를 포함하는 개념이다. 예를 들어, 본 발명의 miRNA는 각 해당 서열번호의 염기서열과 80% 이상의 상동성을 나타낼 수 있으며, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 나타내는 것을 포함할 수 있다. 이러한 상동성은 당 분야에 널리 공지된 컴퓨터 알고리즘, 예를 들어 Align 또는 BLAST 알고리즘을 이용하여 뉴클레오티드의 서열을 표적 유전자의 상응하는 부분과 비교하여 용이하게 결정할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명에서 사용되는 miRNA 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재할 수 있다. 성숙 miRNA 분자는 주로 단일 가닥으로 존재하지만, 전구체 miRNA 분자는 이중가닥을 형성할 수 있는 부분적인 자가-상보적인 구조(예를 들어 스템-루프 구조)를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 핵산 분자는 RNA, PNA(peptide nucleic acids) 또는 LNA(locked nucleic acid) 같은 형태로 구성될 수 있다.

[0021] 본 발명의 상기 핵산 분자는 표준 분자 생물학 기술, 예를 들어 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법을 이용하여 분리 또는 제조하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명에서, miR-33-5p, miR-135b-5p 및/또는 miR-551b-3p 는 허혈성 전처치에 의해 특이적으로 발현이 감소하는 특징이 있다. 따라서, miR-33-5p, miR-135b-5p 및/또는 miR-551b-3p의 발현 또는 활성을 감소시킴으로써, 허혈성 전처치에 의한 허혈 내성의 상태를 모방할 수 있다.

[0023] 상기 miR-33-5p, miR-135b-5p 및/또는 miR-551b-3p의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질의 일예는, miR-33-5p, miR-135b-5p 및/또는 miR-551b-3p에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레티드일 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 miR-33-5p, miR-135b-5p 및/또는 miR-551b-3p에 상보적으로 결합하여 이들 miRNA 의 발현을 감소시키거나 기능을 억제할 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "상보적"은, 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건, 바람직하게는 생리학적 조건 하에서 올리고뉴클레오티드가 miRNA 타겟에 선택적으로 혼성화 할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.

[0025] 본 발명에서 상기 올리고뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA 분자일 수 있고, 보다 바람직하게는 RNA 분자일 수 있다. 또한, 상기 올리고뉴클레오티드는 변형을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 2'-O-변형 올리고뉴클레오티드, 포스포로티오에이트-백본 디옥시리보뉴클레오티드, PNA(peptide nucleic acid) 또는 LNA(locked nucleic acid)일 수 있다.

[0026] 본 발명에서, 상기 miRNA에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드로는, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 안타고미어(antagomir), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), RNA 압타머 또는 라이보자임 등을 예시할 수 있다.

[0027] 일 구현예로, 안티센스 올리고뉴클레오티드는, 세포 내의 miRNA 분자의 단일 가닥 단편에 상보적으로 결합하여 miRNA 의 프로세프 효율을 감소시킴으로써, 이들의 발현 또는 활성을 억제하고, 기능을 저해시킬 수 있게 된다. 상술한 바와 같이, miRNA 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재할 수 있다. 성숙 miRNA 분자는 주로 단

일 가닥으로 존재하지만, 전구체 miRNA 분자는 주로 이중가닥 부분을 형성할 수 있는 부분적인 자가-상보적인 (예를 들어 스템- 및 루프-구조) 구조이다. 따라서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 전구체 miRNA 분자의 단일 가닥 단편에 상보적이거나, 성숙 miRNA 분자에 상보적일 수 있다.

[0028] 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는, 세포에 도입되었을 때 표적 miRNA 의 발현 또는 활성을 저해시킬 수 있으며, 내인성 뉴클레아제, 예를 들어 엑소뉴클레아제 및 엔도뉴클레아제에 내성인 것이 바람직하고, 생체 내에서 안정적인 선택적으로 변형된 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0029] 또한, 안티센스 올리고뉴클레오티드는, 타겟으로 하는 miRNA, 바람직하게는 miRNA의 종자 서열(seed sequence)에 대한 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로 miRNA의 종자 서열은 타겟 인지에 매우 중요한 서열로서, 다양한 종에 대하여 보존적(conserved)이다. 따라서, 일 구체예로, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 miR-33-5p, miR-135b-5p 및/또는 miR-551b-3p의 종자 서열에 상보적인 서열을 가질 수 있고, 이 상보적인 서열만에 의해서도 miR-33-5p, miR-135b-5p 및/또는 miR-551b-3p을 억제할 수 있다.

[0030] 다른 일 구현예로, 안타고미어는, 내성적 miRNA를 사일런싱하기 위해 디자인된 올리고뉴클레오타이드를 의미하며, 타겟 miRNA에 적어도 부분적으로 바람직하게는 완전하게 상보적인 서열을 가질 수 있고, 분해를 방지하기 위하여 변형된 형태로서 사용될 수 있다. 안타고미어는 하나 또는 그 이상의 변형 뉴클레오티드(예컨대, 2'-O-메틸-당 변형)를 포함할 수 있다. 또한, 안타고미어는 하나 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 결합을 포함할 수 있으며 이에 부분적으로 또는 완전히 포스포로티오에이트 백본을 가질 수 있다. 또한, 인 비보(in vivo) 운반 및 안정성을 개선하기 위하여, 안타고미어는 그의 3'-말단에 콜레스테롤 또는 다른 부위가 결합될 수 있다. 타겟 miRNA을 억제하기 위하여 적합한 안타고미어의 길이는 7-50 뉴클레오티드, 바람직하게는 10-40 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 15-30 뉴클레오티드, 가장 바람직하게는 20-25 뉴클레오티드일 수 있다.

[0031] 다른 일 구현예로, siRNA는, miRNA 에 특이적으로 작용하여 miRNA 분자의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 본 발명에서 siRNA는, 표적 miRNA 의 핵산 서열의 일부 또는 전부와 상동인 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되어, 세포 내에서 miRNA 에 혼성화될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 것이 바람직하다.

[0032] 다른 일 구현예로, shRNA는, siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로, RNA 중합효소 Ⅲ의 프로모터로부터 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase Ⅲ)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 miRNA의 사일런싱을 유도할 수 있다.

[0033] 다른 일 구현예로, RNA 압타머는, 특정의 3차원 입체형태를 채택하는 능력에 의해 miRNA와 결합하여 이에 대해 길항 효과를 갖는 핵산 리간드 분자를 의미한다. 전형적으로 압타머는 규정된 이차 및 삼차 구조, 예컨대 스템-루프구조로 접혀지는 15~50 염기 길이의 작은 핵산일 수 있다. 압타머는 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}, 또는 10^{-12} 보다 적은 kd로 표적 분자와 결합하는 것이 바람직하다. 압타머는 매우 고도의 특이성을 가지는 표적 분자와 결합할 수 있다. 또한, 압타머는 다수의 리보뉴클레오티드 단위, 데옥시리보뉴클레오티드 단위, 또는 두 가지 유형의 뉴클레오티드 잔기의 혼합물로 구성될 수 있다. 압타머는 하나 이상의 변형된 염기, 당 또는 포스페이트 주쇄 단위를 추가로 포함할 수 있다.

[0034] 다른 일 구현예로, 라이보자임은, 화학적 반응을 분자 내적으로나 또는 분자 사이에서 촉매할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 본 발명에서 이용할 수 있는 라이보자임으로는 천연 시스템에서 발견되는 라이보자임을 토대로 한 뉴클레아제나 핵산 중합효소 타입 반응을 촉매하는 라이보자임의 상이한 유형들 모두 가능하며, 예를 들면 햄머헤드 라이보자임, 헤어핀 라이보자임 및 테트라히메나 라이보자임이다. 또한, 천연 시스템에서는 발견되지 않지만, 생체내 특이한 반응을 촉매하기 위해 공학적으로 처리되는 라이보자임도 이용가능하다. 라이보자임은 RNA 또는 DNA 기질을 절단할 수 있으며, 바람직하게는 RNA 기질을 절단할 수 있다. 라이보자임은 전형적으로 표적 기질의 인식 및 결합과 이어지는 절단을 통하여 핵산 기질을 절단하게 되는데, 이러한 인식은 대부분 염기쌍 상호작용을 토대로 하므로, 표적 특이적 절단이 가능한 특징을 가질 수 있다.

[0035] 선택적으로, 본 발명에서 miRNA 에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드는, 이들의 표적에 대한 친화성을 증가시키고 표적 서열의 미스매치(mismatch)에 대한 내성을 제공하기 위하여, 당업계에 공지된 방법으로 변형된 올리고머 모방체, 예를 들어 펩티드 핵산(PNA) 및 고정 핵산(LNA)을 포함할 수 있다. LNA는 변형 리보뉴클레오티드로서 리보오스 당 부위의 2' 내지 4' 탄소 사이에 추가적인 브리지를 포함하여 잠금(locked) 형태를 가지게

되며 이에 LNA가 있는 올리고뉴클레오티드는 개선된 열 안정성을 가지게 된다. 또한, PNA 는 당-포스페이트 백본 대신에 펩티드-기반 백본을 포함할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는, 안정성을 증가시키고, 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 당분야에 알려진 방법에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 백본의 변형, 당 모이어티의 변형 또는 염기의 변형을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 백본 변형의 예로는, 포스포로티오에이트, 모포리노 또는 포스포노카복실레이트 결합과 같은 백본 변형을 들 수 있다. 당 변형의 예로는, 리보오스 모이어티의 2' 위치가, 1-6 포화 또는 불포화 탄소 원자를 포함하는 -O-저급 알킬기, 또는 2-6 탄소 원자를 포함하는 -O-아릴, 또는 알릴기로 2'-O-치환된 것을 포함할 수 있다. 상기 -O-알킬, 아릴 또는 알릴기는 아미노 또는 할로기(예, 할로, 하이드록시, 트리플루오로메틸 시아노, 니트로 아실 아실옥시, 알콕시, 카르복시, 카르브알콕실 또는 아미노기)로 비치환 또는 치환될 수 있다. 또한, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는, 3', 5' 또는 3' 및 5' 말단에 2'-O-알킬화된 리보뉴클레오티드를 가질 수 있으며, 적어도 4개 또는 5개의 연속 뉴클레오티드가 그렇게 변형될 수 있다. 2'-O-알킬화된 기의 예로는, 2'-O-C_{1-4} 알킬 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 2'-O-메틸, 2'-O-에틸, 2'-O-프로필 및 2'-O-부틸이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에서, miRNA 에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드는 발현 벡터에 포함되거나 세포에 도입된 형태로 제공될 수 있다.

[0038] 일 구현예로, 상기 miRNA 에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드는 세포 내 전달을 위한 발현 벡터에 포함되어 제공될 수 있다. 본 발명에서 miRNA 에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드는, 핵산 및 DEAE-덱스트란의 복합체, 핵산 및 핵 단백질의 복합체, 핵산 및 지질의 복합체 등의 다양한 형질전환 기술을 이용하여 세포 내로 도입될 수 있는데, 이를 위해 상기 세포 내로의 효율적인 도입을 가능하게 하는 전달체 내에 포함된 형태로 제공될 수 있다. 바람직하게, 상기 전달체는 벡터이며, 바이러스 벡터 및 비바이러스 벡터 모두 사용 가능하다. 바이러스 벡터(viral vector)로서 예를 들면, 렌티바이러스(lentivirus), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 허피스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipox virus) 벡터 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 상기 발현 벡터는, 형질전환된 세포의 선별을 용이하게 하기 위하여 선별마커를 추가로 포함하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들, 예를 들어 녹색 형광 단백질, 퓨로마이신, 네오마이신, 하이그로마이신, 히스티디놀 디하이드로게나제(hisD) 및 구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Gpt) 등을 예시할 수 있다.

[0040] 다른 일구현예로, 본 발명에서 miRNA 에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드는, 세포에 도입된 형태로 제공될 수 있다. 이러한 세포는 miRNA 핵산 분자 또는 miRNA 에 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드를 높은 수준으로 발현할 수 있게 되며, 이러한 세포를 뇌 조직에 이식함으로써 뇌 조직을 허혈성 뇌중풍에 의한 손상으로부터 보호할 수 있다.

[0041] 세포 내로 도입하는 방법으로는, G-fectin, Mirus TrasIT-TKO 지질친화성 시약, 리포펙틴, 리포펙타민, 셀펙틴(cellfectin), 양이온성 인지질 나노입자, 양이온성 고분자, 양이온성 미셀, 양이온성 에멀젼 또는 리포좀을 포함하는 전달시약과 함께 세포 내로 도입되거나, 폴리에틸렌글리콜과 같은 생체적합성 고분자를 접합하여 세포 내 흡수를 증가시킬 수 있다.

[0042] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체란, 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 용액 또는 현탁액(예를 들어, 마이크로입자, 리포솜, 또는 세포와 통합된) 형태로 제제화될 수 있다.

[0043] 본 발명의 약학 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조되어 투여될 수 있다. 투여는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 핵산 분자의 바이러스성 또는 비바이러스성 기술에 의한 운반 또는 핵산 분자를 발현하는 세포의 이식을 포함한다. 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 바람직하게는 뇌 조직에 국소 투여할 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물 및 치료 방법은 허혈성 뇌중풍이 발생할 수 있는 임의의 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

[0045] 본 발명 조성물의 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 및 조사되는 방사선량을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 1일 당 0.001 ㎍/kg-100 mg/kg(체중)으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 목적에 적합한 약학 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0046] 본 발명에 따라, 허혈성 전처치에 의해 조절되는 조직보호 miRNA 들을 이용하여, 뇌 조직의 보호 효과를 높이는 치료제를 개발할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 허혈성 전처치에 의해 특이적으로 1.5배 이상 발현 변화를 나타낸 5종의 miRNA의 miRNA 마이크로어레이 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 허혈성 전처치에 의한 miR-33-5p 발현 변화를 확인한 qRT-PCR 결과를 나타낸 것이다. MCAO는 중뇌동맥폐쇄(middle cerebral artery occlusion)를 의미하고, IP는 허혈성 전처치를 의미한다.

도 3은 허혈성 전처치에 의한 miR-135b-5p 발현 변화를 확인한 qRT-PCR 결과를 나타낸 것이다. MCAO는 중뇌동맥폐쇄(middle cerebral artery occlusion)를 의미하고, IP는 허혈성 전처치를 의미한다.

도 4는 허혈성 전처치에 의한 miR-551b-3p 발현 변화를 확인한 qRT-PCR 결과를 나타낸 것이다. MCAO는 중뇌동맥폐쇄(middle cerebral artery occlusion)를 의미하고, IP는 허혈성 전처치를 의미한다.

도 5는 miR-33a-5p, miR-135b-5p 및 miR-551b-3p 각각에 대한 inhibitor 를 N2a 세포주에 도입(transfection)한 후 총 RNA 를 추출하여 Bax/Bcl2 mRNA ratio의 변화를 측정한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0049] **실시예 1. 허혈성 전처치**

[0050] 10주령 수컷 마우스(C57BL6)(12마리, 오리엔트 바이오)를 isoflurane 1.2% 흡입마취 하에 오른쪽 두정부(parietal area)의 피부를 절개하고, 정수리점(bregma)에서 뒤로 2mm, 오른쪽으로 5mm 부위 두정골(parietal bone)에 컴퓨터와 연결된 레이저 도플러 뇌혈류 측정기(laser-Doppler flowmeter)의 광섬유 측정소자(fiber optic probe)를 부착시켜, 뇌혈류를 측정하였다. 마우스의 앞쪽 경부(anterior neck)의 피부를 절개 후 양쪽 총경동맥을 노출시켜 5분 간격으로 1분간 폐쇄(bilateral common carotid arteries occlusion)를 3번 시행하고, 피부를 봉합한 후, 마취에서 회복시키고 사육실로 돌려 보냈다.

[0051] **실시예 2. 허혈성 뇌중풍 유도**

[0052] 허혈성 전처치 후 24시간이 경과한 마우스(허혈성 전처치군) 및 허혈성 전처치하지 않은 마우스(대조군)를 각각 흡입마취 하에 실시예 1에서와 같은 방법으로 광섬유 측정소자를 부착시켰다. 앞쪽 경부의 피부 절개 후 오른쪽 외경동맥(external carotid artery)를 분리하여 폐쇄시키고, 오른쪽 내경동맥(internal carotid artery)에 동맥 절개(arteriotomy)한 부위에 실리콘으로 끝부분이 코팅된 6-0 나일론 봉합사를 삽입하여, 컴퓨터상 정상 뇌혈류의 85% 이상 감소되는 지점인 중뇌동맥(middle cerebral artery)의 시작 부위(origin)까지 진행시킨 후 30분간 유지하였다. 이후 나일론 봉합사를 천천히 꺼내면서 다시 재관류 시켰다. 재관류가 80% 이상임을

확인하고, 피부 봉합 후 마취에서 회복시켰다.

[0053] **실시예 3. 뇌조직에서 Total RNA 추출**

[0054] 허혈성 뇌중풍 유도 후 재관류 3시간 또는 6시간에 허혈성 전처치군과 대조군의 마우스를 안락사시킨 후 곧바로 뇌를 적출하고, 동측(오른쪽) 피질(ipsilateral cortex)을 분리하였다. 피질에서 small RNA를 포함한 total RNA는 mirVana miRNA isolation kit(Ambion)를 이용하여 추출하였다. 추출방법은 제조사의 메뉴얼을 따라 실시하였다. 추출된 total RNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였으며, RNA 상태는 1% agarose gel에서 전기영동하여 degradation 여부를 확인하였다.

[0055] **실시예 4. miRNA 마이크로어레이**

[0056] Agilent mouse 8 x 60K miRNA microarray 를 사용하여, miRNA 마이크로어레이를 수행하였다.

[0057] Scanning 후 얻어진 각 miRNA의 발현량(expression value)을 log2 transformation을 거쳐 최종적으로 통계분석에 사용하였다. 두 군에서 차별적으로 발현되는 유전자(Differentially expressed miRNA, DEmiR)를 확인하기 위하여 Bayesian t test(Limma: Linear Models for. Microarray Data. Gordon K. Smyth.) 방법을 사용하였다. 최종적으로 p value<0.05 이면서 log2(fold change)의 절대값이 0.585 보다 큰 miRNA를 DEmiR 로 선정하였다.

[0058] **실시예 5. miRNA 발현 확인을 위한 Quantitative real-time PCR(qRT-PCR)**

[0059] 각 miRNA의 발현을 확인하기 위하여 얻어진 RNA를 TaqMan MiRNA 역전사키트(Applied Biosystems)를 이용하여 상보적 DNA를 얻었다. 자세히 설명하면, 100 mM dNTPs 0.3 μl 와 전사 키트에서 제공하는 MultiScribeTM Reverse Transcription 3.0 μl, 10X RT buffer 1.5 μl, 및 RNase inhibitor 0.19 μl 을 혼합하고, 핵산가수분해효소가 없는 물을 넣어서 총 7.0 μl 가 되게 한 뒤, RNA 5.0 μl 와 RT primer pool 3.0 μl 넣고 혼합하고 16 ℃ 에서 30분, 42 ℃ 에서 30분, 85 ℃ 에서 5분 처리 후 4 ℃로 냉각시켰다.

[0060] 이후 TaqMan MiRNA Assays(Applied Biosystems)을 이용하여 20x TaqMan MiRNA Assays 0.5 μl, cDNA 0.665 μl 와 TaqMan 2X Universal PCR Master Mix 5.0 μl 혼합 후에 총 10.0 μl 을 만들어서 ABI 7500 fast sequence detection system(Applied Biosystems)에서 95 ℃ 에서 10분, 95 ℃ 에서 15초, 60 ℃ 에서 60초를 총 40회 반복하여 증폭하였다. snoRNA 202 발현을 내부 대조군(internal control)으로 사용하였으며 각각의 miRNA의 발현은 snoRNA 202의 발현 수준으로 $\Delta\Delta C_T$ 방법을 이용하여 보정하였다.

[0061] 각각의 miRNA의 발현을 조사하기 위해 사용한 TaqMan MiRNA Assays는 다음과 같다: miR-135b-5p(Part Number P/N 4427975 Assay ID TM002261, RT002261), miR-551b-3p(Part Number P/N 4427975 Assay ID TM001535, RT001535), miR-33-5p(Part Number P/N 4427975 Assay ID TM465396, RT465396) 및 snoRNA 202(Part Number P/N 4427975 Assay ID 001232).

[0062] **실시예 6. miRNA inhibitor 의 세포 도입 및 Total RNA 추출**

[0063] N2a cell(Neuro-2a, murine neuroblastoma cell)을 6 well plate에 2 x 10^5 cells로 깔고 24시간후에 항생제가 들어있지 않은 media로 바꾸어 준 뒤에 miRNA inhibitor 을 도입(transfection)하였다. miRNA inhibitor 로는 miR-33a-5p inhibitor (제조사 ambion, 제품명 mirVana®miRNA inhibitor(Part number: 4464084), 카탈로그 넘버 MH12410), miR-135b-5p inhibitor (제조사 ambion, 제품명 mirVana®miRNA inhibitor(Part number: 4464084), 카탈로그 넘버 MH13044) 및 miR-551b-3p inhibitor (제조사 ambion, 제품명 mirVana®miRNA inhibitor(Part number: 4464084), 카탈로그 넘버 MH11653)를 사용하였다. 세포에 도입할 miRNA inhibitor 는 최종 농도가 50 nM이 되도록 Opti-MEM에 섞어 주었다. Transfection reagent인 Lipofectamine 2000도 정해진 비율로 Opti-MEM에 섞어 실온에서 5분간 반응을 시켜주었다. 반응시간이 끝나면 inhibitor와 함께 섞어서 실온에서 20분동안 반응을 한 뒤 세포에 처리를 해 주었다.

[0064] Transfection을 한 후 24시간이 되었을 때 세포를 모아서 RNeasy Plus Mini kit (Qiagen)을 사용하여 total

RNA를 분리하였다. 추출방법은 제조사의 매뉴얼을 따라 실시하였다. 추출된 total RNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였으며, RNA 상태는 1% agarose gel에서 전기영동하여 degradation여부를 확인하였다.

[0065] **실시예 7. Bax와 Bcl2 발현 확인을 위한 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)**

[0066] Bax (pro-apoptotic Bcl2 family)는 세포사멸(apoptosis)를 촉진시키고 Bcl2(anti-apoptotic Bcl2 family)는 세포사멸을 억제하는 작용을 한다. Bcl-2 와 Bax 는 서로 동형중합체(homodimer) 또는 이형중합체(heterodimer)를 형성하여 세포사멸을 조절한다. 따라서, Bax/Bcl2 mRNA 발현비율을 측정함으로써 세포사멸의 억제 여부를 확인할 수 있다. 따라서, 추출한 total RNA로 cDNA를 합성하고 Bax와 Bcl2에 대한 qRT-PCR를 수행하였다.

[0067] cDNA합성을 위해 Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)을 사용하였다. 1 μg의 total RNA 와 50 ng oligo dT를 70 ℃에서 10분간 denature한 후 여기에 5X RT buffer 4 μl, 0.1 mM DTT 2 μl, 2.5 mM dNTP mixture 4 μl, Superscript II reverse transcriptase 200 units, RNase inhibitor 10 units포함한 반응액에 혼합한 20 μl 반응액을 25 ℃ 에서 10분, 42 ℃에서 50분, 95 ℃에서 5분동안 반응하여 cDNA를 합성한 후 이것을 1:4로 희석하여 이 중 2 μl를 취하여 qRT-PCR의 주형으로 사용하였다. qRT-PCR은 cDNA 2 μl, SYBR Premix EX Taq (Takara Bio) 10 μl, Rox reference dye (50×, Takara Bio) 0.4 μl, 각 유전자의 primer 200 nM를 포함한 20 μl 반응액을 ABI 7500fast sequence detection system (Applied Biosystems)을 이용하여 95 ℃에서 30초 반응한 후, 40 cycles (95 ℃ 에서 3초, 60 ℃ 에서 30초) 반복하여 증폭하였다. PCR product의 specificity는 95 ℃ 에서 15초, 60 ℃ 에서 1분, 95 ℃ 에서 15초 동안 반응하여 확인하였다. Gapdh의 발현을 internal control로 사용하였으며, Bax와 Bcl2유전자의 발현은 Gapdh 발현 수준으로 $\Delta\Delta C_T$ 방법을 이용하여 보정하였다.

[0068] 실험에 사용한 유전자의 primer는 아래와 같다:

[0069] mBax forward : 5'-TGA AGA CAG GGG CCT TTT TG-3' (서열번호 7)

[0070] mBax reverse : 5'-AAT TCG CCG GAG ACA CTC G-3' (서열번호 8)

[0071] mBcl2 forward : 5'-GTC GCT ACC GTC GTG ACT TC-3' (서열번호 9)

[0072] mBcl2 reverse : 5'-CAG ACA TGC ACC TAC CCA GC-3' (서열번호 10)

[0073] mGapdh forward : 5'-AAT GTG TCC GTC GTG GAT CT-3' (서열번호 11)

[0074] mGapdh reverse : 5'-GGT CCT CAG TGT AGC CCA AG-3' (서열번호 12)

[0075] **실시예 8. 통계처리**

[0076] 실험 결과는 평균 ± 표준편차 (n=3)로 표기하였으며, 통계처리는 GraphPad Prism5 software를 이용하였다. Bax/Bcl2 mRNA ratio의 각군의 negative inhibitor와의 비교는 one-way ANOVA를 이용하였고 p값이 0.05미만일 경우 Bonferroni's multiple comparison test로 사후 검정하였다. 각각의 통계처리 후 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하고 *로 표시하였다.

[0077] **실험결과**

[0078] **1. 허혈성 전처치에 의해 특이적으로 발현이 변화한 뇌조직 보호 관련 miRNA 선별**

[0079] 허혈성 전처치를 유도한 실험 동물에 허혈성 뇌중풍에 노출시킨 후, 뇌의 피질(cortex)에서 miRNA를 추출하여, 허혈성 전처치를 하지 않은 대조군의 뇌피질 miRNA와 발현 양상을 miRNA 마이크로어레이를 이용하여 비교하였다. 그 결과, 허혈성 전처치에 의해 특이적으로 miRNA의 발현이 1.5배 이상 감소한 3종의 뇌조직보호관련 miRNA(miR-33-5p, miR-135b-5p, miR-551b-3p)를 선별하였다(도 1).

[0080] **2. 허혈성 전처치에 의한 miRNA 의 발현조절의 확인**

[0081] 허혈성 뇌중풍에 노출시키기 전에 허혈성 전처치를 시행한 경우, 전처치를 시행하지 않은 대조군과 비교하여

miR-33-5p의 발현이 특이적으로 약 3.3배 감소하는 것을 qRT-PCR을 이용하여 확인할 수 있었다(도 2).

[0082] 또한, 허혈성 뇌중풍에 노출시키기 전에 허혈성 전처치를 시행한 경우, 전처치를 시행하지 않은 대조군과 비교하여 miR-135b-5p의 발현이 특이적으로 약 2.0배 감소하는 것을 qRT-PCR을 이용하여 확인할 수 있었다(도 3).

[0083] 또한, 허혈성 뇌중풍에 노출시키기 전에 허혈성 전처치를 시행한 경우, 전처치를 시행하지 않은 대조군과 비교하여 miR-551b-3p의 발현이 특이적으로 약 2.0배 감소하는 것을 qRT-PCR을 이용하여 확인할 수 있었다(도 4).

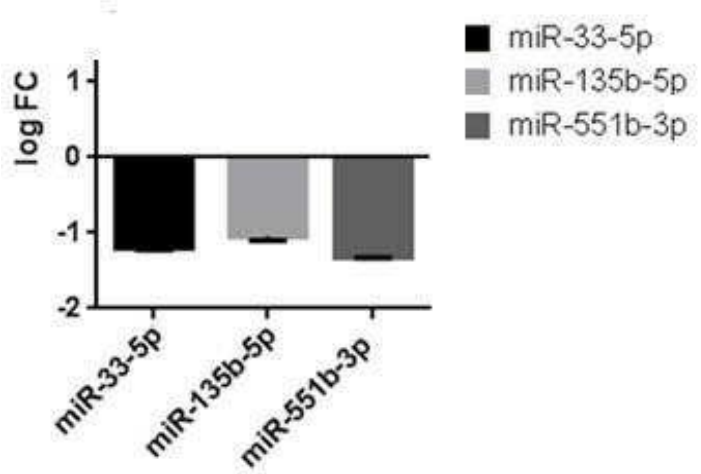
[0084] **3. 허혈성 전처치에 의해 조절되는 miRNA의 활성변화에 의한 세포보호 효과 검증**

[0085] 허혈성 전처리에 의해 특이적으로 miRNA의 발현이 감소한 miR-33a-5p, miR-135b-5p 그리고 miR-551b-3p의 세포보호 효과를 in vitro cell system을 이용하여 검증하였다. 각각의 miRNA inhibitor를 N2a 세포에 transfection하여 각 miRNA의 발현을 감소시킨 후 Bax (pro-apoptotic Bcl2 family)와 Bcl2(anti-apoptotic Bcl2 family)의 mRNA의 발현비율을 산출하였다.

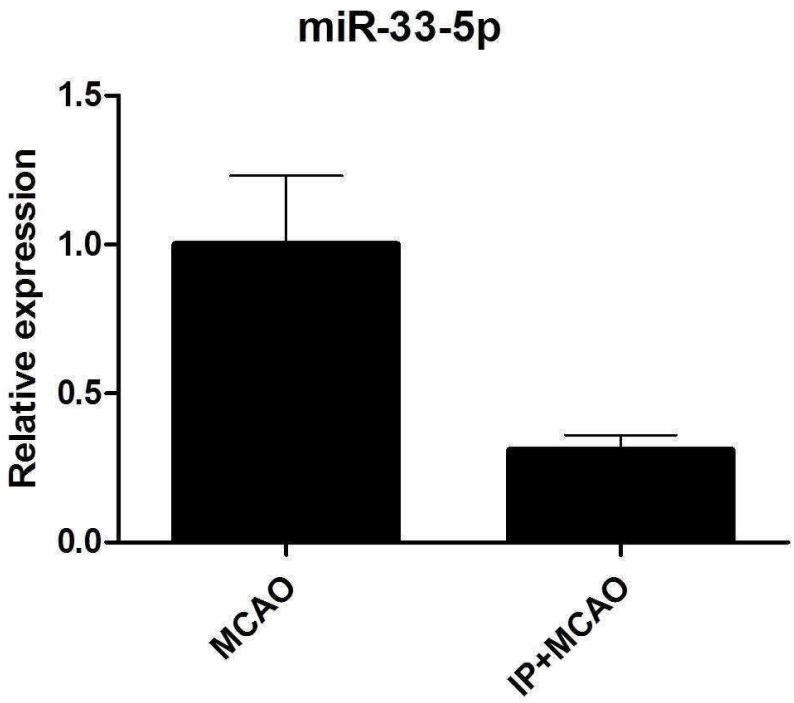
[0086] 실험결과, miR-33a-5p, miR-135b-5p 그리고 miR-551b-3p의 inhibitor를 처리하여 각 miRNA의 활성을 감소시켰을 때 대조군에 비해 Bax/Bcl2의 mRNA의 발현비율이 19~27%까지 감소하는 것으로 나타나 이들 miRNA의 활성이 감소할 경우 뇌신경 세포를 세포사멸(apoptosis)로부터 보호하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (도 5).

도면

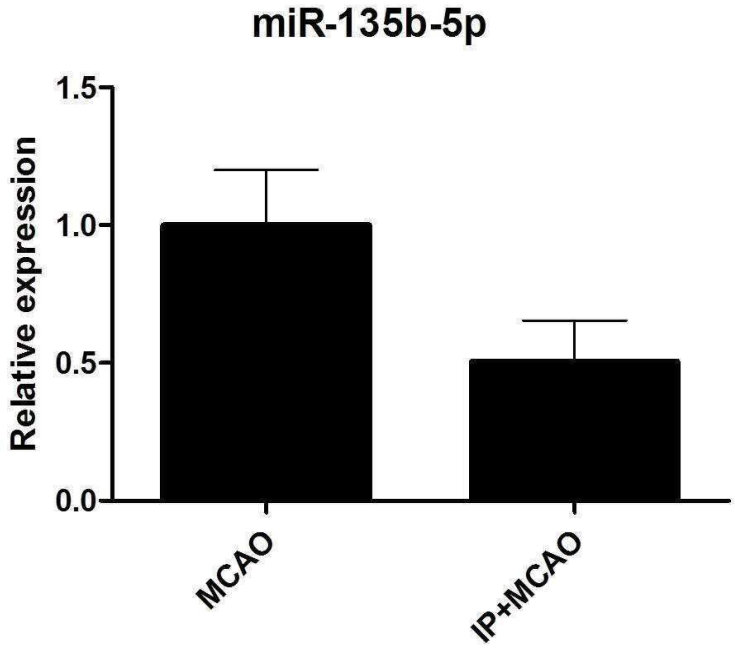
도면1



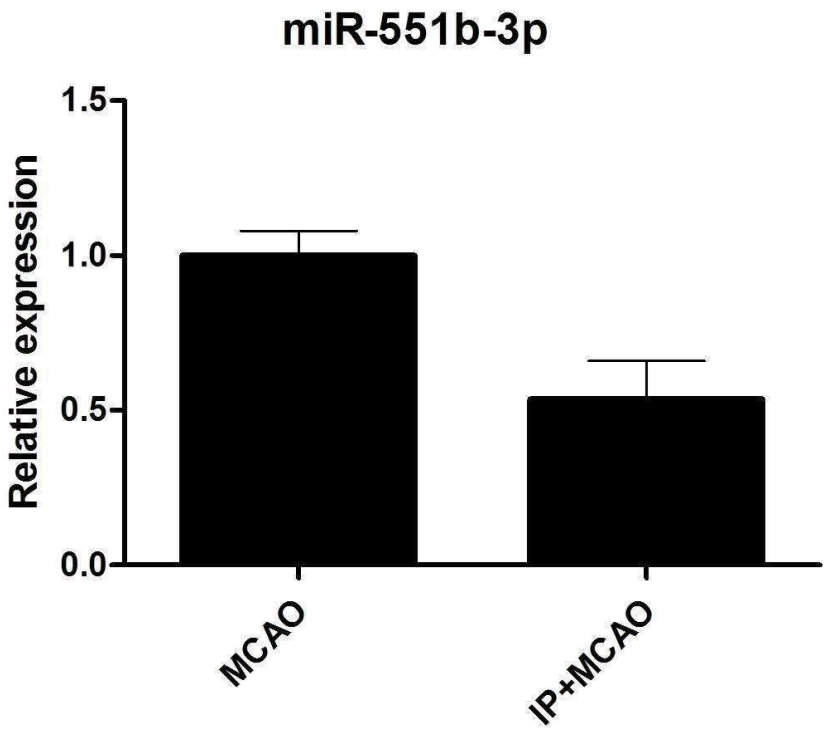
도면2


miR-33-5p
Relative expression
1.5
1.0
0.5
0.0
MCAO
IP+MCAO

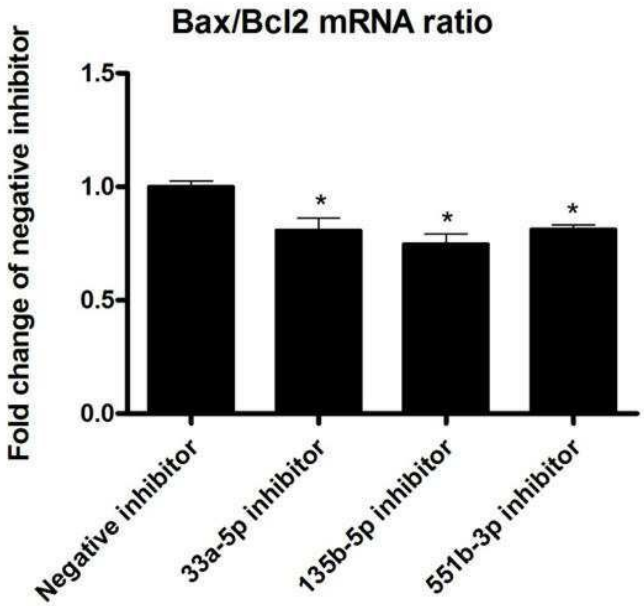
도면3


miR-135b-5p
Relative expression
1.5
1.0
0.5
0.0
MCAO
IP+MCAO

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Prevention or Treatment for ischemic stroke using miR-551b-3p

<130> DPP20151859KR

<150> KR10-2014-0093256

<151> 2014-07-23

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens, mature miR-33-5p

<400> 1

gugcauugua guugcauugc a 21

<210> 2

<211> 69

<212> RNA

<213> Homo sapiens, miR-33-5p precursor

<400> 2

cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaauac cugugcaaug uuuccacagu 60

gcaucacgg 69

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens, mature miR-135b-5p

<400> 3

uauggcuuuu cauuccuaug uga 23

<210> 4

<211> 97

<212> RNA

<213> Homo sapiens, miR-135b-5p precursor

<400> 4

cgcucugcug uggccuaugg cuuuucauuc cuaugugauu gcugcuccga acucauguag 60

ggcuaaaagc caugggcuac agugaggggc aagcucc 97

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens, mature miR-551b-3p

<400> 5

gcgacccaua cuugguuuca g 21

<210> 6

<211> 98

<212> RNA

<213> Homo sapiens, miR-551b-3p precursor

<400> 6

gugcucuugu ggcccaugaa aucaagcuug ggugagaccu ggugcagaac aggaaggcga 60

cccauacuug guuucagugg cugcaagaau gacugcau 98

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mBax forward primer

<400> 7

tgaagacagg ggccttttg 20

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mBax reverse primer

<400> 8

aattcgccgg agacactcg 19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mBcl2 forward primer

<

400> 9

gtcgctaccg tcgtgacttc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mBcl2 reverse primer

<400> 10

cagacatgca cctacccagc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mGapdh forward primer

<400> 11

aatgtgtccg tcgtggatct 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mGapdh reverse primer

<400> 12

ggtcctcagt gtagcccaag 20