



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0041118
(43) 공개일자 2023년03월24일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12Q 1/6883</i> (2018.01) <i>A61K 31/7105</i> (2006.01)
 <i>A61P 9/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12Q 1/6883</i> (2022.01)
 <i>A61K 31/7105</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0123695
 (22) 출원일자 2021년09월16일
 심사청구일자 2021년09월16일</p> | <p>(71) 출원인
 이화여자대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)</p> <p>인하대학교 산학협력단
 인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)</p> <p>(72) 발명자
 박준범
 서울특별시 양천구 신정로 290, 303동 602호 (신정동, 신트리3단지아파트)</p> <p>박혜원
 인천광역시 중구 은하수로 412 (운남동, 영종센터 푸르지오자이)</p> <p>박혜림
 인천광역시 중구 인항로 27</p> <p>(74) 대리인
 특허법인한얼</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 10 항

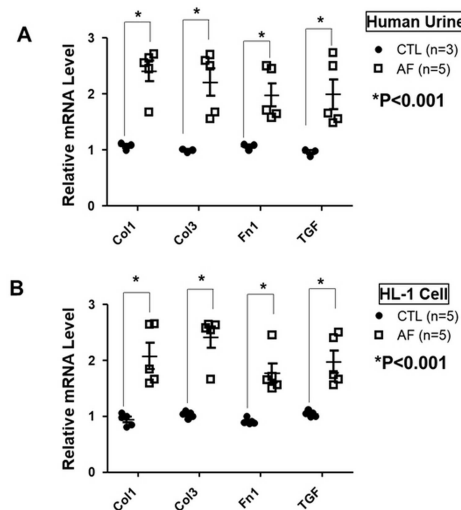
(54) 발명의 명칭 **miRNA를 이용한 심방세동의 진단 또는 치료 용도**

(57) 요약

본 발명은 miRNA(microRNA)를 이용한 심방세동(atrial fibrillation, AF)의 진단 방법 및 miRNA의 CamKII(Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase)의 발현 수준 조절 효과에 기반한 심방세동의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 miRNA는 AF 환자에서 유의하게 하향 조절되고, 칼슘 처리 단백질인 CamKII의 발현 수준 조절을 통해 심근 세포의 손상을 억제하는 바, 이를 AF의 진단 방법 및 CamKII의 발현 수준 조절 효과에 기반한 심방세동의 예방 또는 치료 용도로 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 9/00 (2018.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

miRNA-423-5p를 포함하는, 심방세동 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 miRNA-423-5p는 소변, 혈액, 혈청, 또는 타액 중 선택되는 어느 하나 이상의 생물학적 시료로부터 유래하는 것인, 조성물.

청구항 3

생물학적 시료로부터 miRNA-423-5p를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 심방세동 진단용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 소변, 혈액, 혈청, 또는 타액 중 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 키트.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 제제는 miRNA-423-5p에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 프로브 및 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 키트.

청구항 6

하기 단계를 포함하는, 심방세동 진단을 위한 정보제공방법:

- a) 개체로부터 분리된 소변, 혈액, 혈청, 또는 타액 중 선택되는 어느 하나 이상의 시료에서 miRNA-423-5p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- b) 상기 a) 단계에서 측정된 miRNA-423-5p의 발현 수준을 정상 대조군의 발현 수준과 비교하여 정상 대조군의 발현 수준보다 낮은 경우 심방세동이 진행된 것으로 판정하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 b) 단계에서 miRNA-423-5p의 발현 수준의 측정은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 및 DNA 칩으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상에 의해 수행되는 것인, 방법.

청구항 8

miRNA-423-5p를 유효성분으로 포함하는, 심방세동의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항의 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 심방세동의 치료방법.

청구항 10

하기 단계를 포함하는, 심방세동 치료제의 스크리닝 방법:

- 1) 심근 세포에 후보물질을 처리하고 miRNA-423-5p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- 2) miRNA-423-5p의 발현 수준이 증가한 경우 상기 후보물질을 심방세동 치료제로 선정하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 miRNA(microRNA)를 이용한 심방세동(atrial fibrillation, AF)의 진단 방법 및 miRNA의 CamKII(Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase)의 발현 수준 조절 효과에 기반한 심방세동의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 심방세동(atrial fibrillation, AF)은 심실상 부정맥으로 잘 알려져 있다. 동물 연구에 따르면 심방 섬유증은 심방세동의 유도 및 지속에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 심방 섬유증은 전도에서 심방간 불균일성을 유발하여 국소 재진입을 위한 기질 및 심방세동의 진행성 특성에 기여한다. 레닌-안지오텐신 시스템, 특히 안지오텐신 II(angiotensin II, Ang II)는 심방세동 동안 심장 리모델링의 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 제안되었다. 심방세동의 리모델링 과정과 관련된 주요 단백질 및 기전은 이온 채널의 발현 변화(활동 전위 지속 시간 감소 유발), Ca^{2+} 처리 단백질(세포내 Ca^{2+} 제거 및 방출 장애) 또는 코넥신(connexins, 심방 내 전도 장애)을 포함한다. 또한, 변경된 RyR2를 통한 자발적인 근형질 세망(sarcoplasmic reticulum) Ca^{2+} 방출은 AF의 트리거로 작용할 수 있으며, AF의 재진입 및 유지를 촉진하는 기질로 작용하는 섬유증을 증가시켜 AF를 유도할 수 있다.

[0004] 그러나, 심방세동 유발 심방 섬유증의 발생에 중요한 정확한 하류 분자는 아직까지 불분명하며, 아직까지 심방세동의 명확한 진단법이 없는 실정이다.

[0005] 한편, miRNA(microRNA)는 길이가 18-25 뉴클레오티드인 작은 비암호화 단일 가닥 RNA이다. 다양한 miRNA의 발현은 심부전 및 좌심실 비대를 포함한 심혈관 질환과 관련이 있다. miRNA는 많은 심혈관 병리 및 관련 대사 질환에서 잠재적인 진단 및 예후 바이오마커로서 연구되고 있다(Weber JA, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clin Chem 2010; 56: 1733-1741.). 소변은 신장에서 분비되는 단백질의 대사에 의해 생성되는 최종 산물을 포함하는 멸균 생물학적 유체이며 비침습적이고 간단한 방법으로 수집될 수 있다. 대부분의 소변 miRNA는 신장 및 요도 세포에서 유래하며 이러한 세포를 분석하면 환자의 건강 상태를 결정할 수 있다.

[0006] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 심방세동 발생 시 섬유증 및 Ca^{2+} 처리 단백질의 발현 수준을 조절하는 효과를 나타내는 miRNA를 확인하고, 소변 샘플을 통해 상기 miRNA의 변화를 검사하여 심방세동을 진단할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 miRNA-423-5p를 포함하는, 심방세동 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

- [0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 소변, 혈액 또는 혈청 중 선택되는 어느 하나 이상의 생물학적 시료로부터 miRNA-423-5p를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 심방세동 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 심방세동 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 miRNA-423-5p를 유효성분으로 포함하는, 심방세동의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 심방세동의 치료방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 심방세동 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명, 및 실시형태는 각각의 다른 설명, 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0016] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 miRNA-423-5p를 포함하는, 심방세동 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 miRNA-423-5p는 microRNA로서, 소변, 혈액 또는 혈청 중 선택되는 어느 하나 이상의 생물학적 시료로부터 유래하는 것일 수 있다. 상기 miRNA-423-5p는 miR-423, miR-423-5p 등과 혼용될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 용어, "miRNA(microRNA)"는 길이 18-25bp의 뉴클레오타이드(올리고뉴클레오타이드)인 작은 비암호화 단일 가닥 RNA를 의미한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, miRNA-423-5p는 이를 구성하는 올리고뉴클레오타이드의 작용성 등가물, 예를 들어, miRNA-423-5p 올리고뉴클레오타이드의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, miRNA-423-5p 올리고뉴클레오타이드와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants) 및 모방체(mimic)를 포함하는 개념이다.
- [0024] 본 발명의 miRNA-423-5p는 서열번호 1의 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 상기 염기와 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함될 수 있다. 또한, 본 발명에서의 miRNA-423-5p는 서열번호 1의 염기서열 앞뒤로의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드와 서로 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 본 발명의 miRNA-423-5p에 포함되는 염기서열에 해당됨은 당업자에게 자명하다. 구체적으로, 본 발명에 따른 서열번호 1의 염기서열은 이와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 폴리뉴클레오타이드에 상응하는 효능을 나타내는 염기서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0026] 본 발명에서 용어, "심방세동(atrial fibrillation, AF)"은 심방의 수축이 소실되어 불규칙하게 수축하는 상태를 의미하며, 심실상 부정맥으로도 알려져 있다. 심방세동은 대부분 승모판 질환과 같은 판막 질환, 관상동맥 질환, 고혈압성 심질환, 비후성 혹은 확장성 심근증(심부전증), 선천성 심질환 등의 기질적인 심장 질환과 동반

되는 것으로 알려져 있다.

- [0028] 본 발명에서 용어, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therapeutics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 하나의 구체예에서, 본 발명의 miRNA-423-5p는 심방세동 환자에서 유의하게 하향 조절되는 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구체예에서, 심방세동과 관련한 잠재적인 miRNA 표적을 식별하기 위해 miRNA 발현 프로파일링을 통해 발굴된 miRNA-423-5p(miR-423)는 대조군과 비교하여 AF 그룹에서 유의하게 하향 조절되었음을 확인하였으며, 특히 miR-423은 살아있는 세포에서 약 2배 하향 조절되었으며(도 2A 및 2B), Ang II 처리된 HL-1 세포에서도 유의하게 하향 조절되었음을 확인하였다(도 2C 및 2D).
- [0033] 본 발명의 다른 하나의 양태는 소변, 혈액, 혈청, 또는 타액 중 선택되는 어느 하나 이상의 생물학적 시료로부터 miRNA-423-5p를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 심방세동 진단용 키트를 제공한다.
- [0034] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 생물학적 시료는 비침습적 시료일 수 있으며, 상기 비침습적 시료는 소변, 혈액, 혈청, 또는 타액일 수 있고, 구체적으로는 소변일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 키트는 생물학적 시료로부터 miRNA-423-5p를 검출할 수 있는 제제를 포함할 수 있으며, 상기 제제란 miRNA-423-5p의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0039] 상기 miRNA-423-5p를 검출할 수 있는 제제로서 miRNA-423-5p에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 프로브, 및/또는 항체 등을 사용할 수 있으며, 상기 제제는 miRNA-423-5p를 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 유전자 발현 정도를 측정하는데 이용되는 공지된 방법, 예를 들면 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하거나, 프로브를 이용한 혼성화 반응을 통하여 실시하여 miRNA-423-5p의 발현 수준도 측정할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 상기 miRNA에 상보적으로 결합하여 발현을 억제하는 염기서열로서, 이에 제한되지는 않으나 안티센스 RNA, 길항제(antagonist) mRNA를 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 "프라이머"는 짧은 자유 수산화기를 가지는 핵산서열로서 이와 상보적인 주형과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산서열을 의미한다. 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백개의 염기로 이루어진 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 라벨링되어 있어 특정 mRNA의 존재유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA 프로브, 이중쇄 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 비오틴, FITC, 로다민, DIG 등으로 표지되거나 방사선 동위 원소 등으로 표지될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 키트에는 상기 측정 제제 이외에도 검출을 용이하게 하는 당업계에 공지된 여러 도구, 시약, 예를 들

어 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 안정화제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0049] 또한, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 예로서 RT-PCR 키트의 경우, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 심방세동 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0052] 구체적으로, 상기 방법은
- [0053] a) 개체로부터 분리된 소변, 혈액 또는 혈청 중 선택되는 어느 하나 이상의 시료에서 miRNA-423-5p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0054] b) 상기 a) 단계에서 측정된 miRNA-423-5p의 발현 수준을 정상 대조군의 발현 수준과 비교하여 정상 대조군의 발현 수준보다 낮은 경우 심방세동이 진행된 것으로 판정하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0055] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0057] 본 발명의 a) 단계는 개체로부터 분리된 소변, 혈액 또는 혈청 중 선택되는 어느 하나 이상의 시료에서 miRNA-423-5p의 발현 수준을 측정하는 것일 수 있다.
- [0058] 상기 a) 단계에서, 상기 개체는 심방세동이 의심되는 개체를 의미한다.
- [0059] 상기 a) 단계에서, 상기 miRNA-423-5p의 발현 수준의 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), 정량적 중합효소반응(quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 또는 DNA 칩 방식으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 b) 단계는 상기 a) 단계에서 측정된 miRNA-423-5p의 발현 수준을 정상 대조군의 발현 수준과 비교하여 정상 대조군의 발현 수준보다 낮은 경우 심방세동이 진행된 것으로 판정하는 것일 수 있다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 miRNA-423-5p를 유효성분으로 포함하는, 심방세동의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0064] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0066] 본 발명에서 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여에 의해 심방세동을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 심방세동에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0067] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 약학적 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.
- [0068] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 유제, 동결건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는

정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0070] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0071] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 500mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 다양한 포유동물에 다양한 경로로 투여할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한없이 포함하며, 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 구체적으로는 경구 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0072] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 인간에 적용되는 의약품뿐만 아니라, 동물 의약품의 형태로도 사용될 수 있다. 여기에서, 동물이란 가축 및 반려동물을 포함하는 개념이다.

[0073] 상기 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0074] 상기 "개체"는 심방세동이 발병하였거나 발병할 수 있는 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 약학 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다면 개체의 종류는 제한없이 포함될 수 있다.

[0076] 본 발명의 하나의 구체예에서, 본 발명의 miRNA-423-5p는 Ca^{2+} 처리 단백질인 CaMKII(Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase)의 과도한 활성을 억제시킬 수 있다.

[0077] 본 발명의 일 구현예에서, Ang II에 의해 유도된 심근 세포인 HL-1 세포에서 miR-423 투여 여부에 따라 CaMKII 활성 수준을 확인한 결과, 인산화된 CaMKII와 총 CaMKII는 모두 Ang II 유도 세포에서 유의하게 증가했지만 Ang II + miR-423 그룹에서는 정상화되어, AF 조건에서 miR-423dp 의해 CaMKII의 활성이 억제됨을 확인하였다(도 3A 및 3B).

[0078] 또한, Ang II 유도된 세포는 CaMKII 표적 PLB(phospholamban)의 인산화가 증가되었으나, miR-423 처리시 현저하게 감소되었으며(도 3A 및 3D), Ang II 유도된 세포에서 리아노딘 수용체 2 유전자(ryanodine receptor 2 gene, RyR2)의 인산화는 Ser2814와 Ser2808 모두에서 증가하여 RyR2의 Ca^{2+} 방출 특성을 나타내었으나, miR-423 처리시 크게 약화되었다(도 3A, 3E 및 3F).

- [0079] 본 발명의 다른 일 구현예에서, Ang II 처리시 CaMKII와 p-CaMKII는 모두 3.2배 증가하였으나, Ang II + miR-423 그룹은 p-CaMKII의 증가를 효과적으로 억제하였다(Ang II 그룹 대비 1.3배, $p < 0.001$). 그러나, 대조군의 CaMKII 및 p-CaMKII에서는 이러한 효과가 확인되지 않았다(도 4).
- [0081] 본 발명의 다른 하나의 구체예에서, 본 발명의 miRNA-423-5p는 Ca^{2+} 항상성을 회복시킬 수 있다.
- [0082] 본 발명의 일 구현예에서, 자발적 Ca^{2+} 과도 현상에 대한 miR-423의 효과를 확인한 결과, 도 2E와 같이 대조군, 대조군 + miR-423, 대조군 + miR-423 억제제, Ang II, Ang II + miR-423 및 Ang II + miR-423 억제제 그룹의 HL-1 세포에서 얻은 자발적 Ca^{2+} 과도 현상의 대표적인 라인 스캔 이미지를 획득하였다. Ca^{2+} 진폭 및 파동 주파수는 대조군 대비 대조군 + miR-423 억제제($P < 0.001$, 1.0 ± 0.0 F/F₀ to 2.2 ± 0.2 F/F₀), Ang II($P < 0.001$, 1.0 ± 0.0 F/F₀ to 2.1 ± 0.1 F/F₀) 및 Ang II + miR-423 억제제($P < 0.001$, 1.0 ± 0.0 F/F₀ to 1.8 ± 0.1 F/F₀) 억제제에서 증가하였다(도 2F). 대조적으로, Ca^{2+} 파동 주파수 및 진폭은 Ang II + miR-423(1.0 ± 0.0 F/F₀ to 1.1 ± 0.1 F/F₀)으로 동시에 처리된 세포에서 회복되었다.
- [0083] 상기 결과로부터 miR-423이 과도한 CaMKII 활성의 억제와 Ca^{2+} 항상성의 회복을 통해 AF에서 Ca^{2+} 처리 단백질을 감소시켜, 심근 세포를 보호할 수 있음을 알 수 있다.
- [0085] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 심방세동의 치료방법을 제공한다.
- [0087] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 심방세동 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0088] 구체적으로, 상기 방법은
- [0089] 1) 심근 세포에 후보물질을 처리하고 miRNA-423-5p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0090] 2) miRNA-423-5p의 발현 수준이 증가한 경우 상기 후보물질을 심방세동 치료제로 선정하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0091] 상기 양태에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

발명의 효과

- [0093] 본 발명에 따른 miRNA는 심방세동(atrial fibrillation, AF) 환자에서 유의하게 하향 조절되고, 칼슘 처리 단백질인 CamKII(Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase)의 발현 수준 조절을 통해 심근 세포의 손상을 억제하는 바, 이를 AF의 진단 방법 및 CamKII의 발현 수준 조절 효과에 기반한 심방세동의 예방 또는 치료 용도로 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0095] 도 1은 실시간 PCR에 의한 섬유증 마커의 발현량을 나타낸 도이다. (A 및 B) GAPDH mRNA와 비교한 콜라겐 I, 콜라겐 III, 피브로넥틴, TGF- β mRNA의 발현 수준을 보여주는 실시간 PCR. * $P < 0.001$, vs. 대조군(소변 및 세포).

도 2는 HL-1 세포에서 Ca^{2+} 과도 현상의 마이크로어레이 및 분석 결과를 나타낸 도이다. (A) SR 및 AF 환자의 소변에 대한 miRNA 마이크로어레이 분석의 히트 맵. (B) SR과 AF 환자 사이의 miRNA 화산 플롯. 파란색 점은 AF 샘플에서 하향 조절된 miRNA를 나타내고 빨간색 점은 상향 조절된 miRNA를 나타내었다. (C 및 D) 환자 및 세포

에서 7개의 miRNA의 실시간 PCR. AF 환자 및 AF 세포 모델에서 miR-423-5p의 발현은 각각 SR 및 대조군 세포보다 유의하게 낮았다. (E) 세포 내 칼슘 표시기 Fluo-4 AM으로 로드된 세포의 시간 경과 칼슘 이미징의 대표적인 라인 스캔. 그룹에 따른 자발적인 Ca^{2+} 과도 현상의 대표적인 기록. (F) Ca^{2+} 과도 진폭 및 주파수 요약. 진폭은 miR-423을 처리한 대조군과 Ang II를 처리한 그룹에서 유의하게 증가하였다. * $P < 0.001$ vs. 스튜던트 t-검정에 따른 대조군. $n=5$

도 3은 Ang II 유도 HL-1 세포에서 CaMKII, PLB 및 RyR2 활성화에 대한 miR-423의 억제 효과를 나타낸 도이다. (A) CaMKII(Thr 287, Thr 306), PBL(Thr17), SERCA2a 및 RyR2(Ser 2814, Ser 2808)의 웨스턴 블롯 분석. (B-F) Ang II 처리 HL-1 세포 및 miR-423 억제제 처리 그룹에서 p-CaMKII, p-PLB 및 p-RyR2의 유의한 증가를 나타내는 단백질 정량화. miR-423 처리군에서는 이들 단백질의 인산화가 감소하였다. 그룹당 $n=5-6$. * $P < 0.001$ vs. 대조군. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다.

도 4는 면역형광 공초점 현미경 이미지를 나타낸 도이다. (A) miR-423은 대조군 + miR-423 억제제 그룹, Ang II 그룹 및 Ang II + miR-423 억제제 그룹에서 CaMKII 인산화를 활성화하지만 Ang II + miR-423 그룹은 활성화하지 않았다. 열은 다음과 같다: 총 CaMKII(빨간색), p-CaMKII(녹색) 및 DAPI(파란색). 배율: X400. (B) p-CaMKII 강도의 정량적 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 심방세동(atrial fibrillation, AF) 및 대조군의 소변 샘플의 정량적 유전자 발현 분석

AF 환자의 소변과 HL-1 세포에서 분리한 RNA 샘플을 사용하여 섬유증 관련 유전자 발현을 분석하였다.

구체적으로, 2019년 8월부터 2020년 2월까지 이화여자대학교(서울, 한국)에서 중증 또는 진행성 심장병이 없는 8명의 환자로부터 인간 소변을 채취하였다.

다음으로, 비침습적 방법을 사용하여 발작성 심실상 빈맥(paroxysmal supraventricular tachycardia, PSVT) 및 AF로 진단된 환자로부터 소변 샘플을 수집하였다. 튜브를 환자의 요도에 삽입한 후 약 50ml의 초기 소변을 수집하고, 기존 튜브를 새 튜브로 교체하여 실험용 소변 샘플을 수집하였다. 분취된 소변 샘플은 miRNA가 분리될 때까지 -70°C 에서 보관하였다. 환자의 임상 프로파일은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Case	Sex	Age	Diagnosis
1	M	47	PSVT
2	F	46	PSVT
3	F	69	PSVT
4	M	63	PeAF
5	F	58	PeAF
6	F	63	PeAF
7	M	56	PeAF
8	M	58	PeAF

PSVT; 발작성 심실상 빈맥(Paroxysmal supraventricular tachycardia), PeAF; 지속성 심방세동(Persistent atrial fibrillation).

다음으로, 섬유증 관련 유전자인 콜라겐 I, 콜라겐 III, 피브로넥틴 및 TGF(Transforming growth factor)- β 의 발현을 AF 환자의 소변 및 안지오텐신 II(angiotensin II, Ang II) 처리된 심근 세포주인 HL-1 세포에서 분리된 RNA 샘플을 사용하여 분석하였다.

구체적으로, 소변내 세포를 제거하기 위해 $2450 \times g$ 에서 실온에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 $0.8\mu\text{m}$ 필터

를 통해 멸균 50um 튜브에 통과시켰다. 소변 검사 스트립을 사용하여 검체를 검사하고 수집 후 2시간 이내에 RNA를 분리하였다. 저속 원심분리 후 제조업체의 프로토콜에 따라 Trizol(life technologies)을 이용하여 총 RNA를 분리하였다.

[0107] HL-1 세포(ATCC)는 12.5 µg/ml 피브로넥틴 및 0.02% 젤라틴(Sigma-Aldrich; Merck KGaA)으로 코팅된 플레이트에서 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신, 100 µM 노르에피네프린(Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 및 4mM L-글루타민(Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)이 보충된 Complete Claycomb 배지(SAFC Biosciences, Lenexa, KS, USA)을 사용하여 5% CO₂와 21% O₂가 있는 가슴 인큐베이터에서 37°C 조건으로 배양하였다.

[0108] 그 결과, 소변에서 섬유증 관련 유전자인 콜라겐 I, 콜라겐 III, 피브로넥틴 및 TGF-β의 발현은 대조군보다 AF 그룹에서 더 높은 경향을 나타내었고(도 1A), Ang II (1 µM) 처리된 HL-1 세포에서 콜라겐 I, 콜라겐 III, 피브로넥틴 및 TGF-β의 발현은 대조군에 비해 Ang II 그룹에서 유의하게 증가한 것을 확인하였다(도 1B).

[0110] 실시예 2. miRNA 마이크로어레이 분석

[0111] AF 관련 잠재적인 miRNA 표적을 식별하기 위해 miRNA 발현 프로파일링을 수행하였다.

[0112] 구체적으로, Sanger miRBase 버전 20 miRNA 발현 마이크로어레이(LC Sciences, Houston, TX, USA)를 사용하여 PSVT와 AF 환자의 소변에서 추출한 RNA를 이용하여 miRNA 마이크로어레이를 수행하여 각 세포 유형의 생물학적 복제물에서 30,424개의 고유한 성숙 miRNA를 분석하였다.

[0113] 그 결과, 7개의 miRNA(miR-3613, miR-6763, miR-423, miR-3162, miR-1180, miR-6511, miR-3197)가 대조군과 비교하여 AF 그룹에서 유의하게 하향 조절되었음을 확인하였으며, 특히 miR-423은 살아있는 세포에서 약 2배 하향 조절되었다(도 2A 및 2B).

[0115] 다음으로, miRNA 마이크로어레이의 결과를 확인하기 위해 상기 7개의 miRNA(miR-3613, miR-6763, miR-423, miR-3162, miR-1180, miR-6511, miR-3197)를 이용하여 실시간 PCR 분석을 수행하였다.

[0116] 구체적으로, RNA를 Trizol® Reagent(Invitrogen)로 분리하고 500ng을 취하여 oligo d(T) 프라이머를 사용한 miRNA 특이적 stem-loop 실시간 반응에 사용하였다. cDNA는 RevertAid™ First Strand cDNA 합성 키트(Fermentas)를 사용하여 합성하였다. 실시간 PCR은 정량을 위해 SYBR® Premix Ex Taq™ II(TaKaRa)와 함께 iQ5 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 수행되었으며, 각 샘플에 대해 3회 수행되었다. 유전자 및 miRNA 발현 수준을 각각 GAPDH 및 U6 snRNA 발현 수준으로 정규화하고, 용융 곡선을 이용하여 PCR 산물의 순도를 확인하였다. 프라임어 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Target gene	Forward primer	Reverse primer
TGF-β	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA(서열번호 8)	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC(서열번호 9)
Collagen I	GAGCGGAGAGTACTGGATCG(서열번호 10)	GCTTCTTTTCTTGGGGTTC(서열번호 11)
Collagen III	TGATGGAACACAGGACCTC(서열번호 12)	CAGTCTCCCCATTCTTTCCA(서열번호 13)
Fibronectin	GATGCACCGATTGTCAACAG(서열번호 14)	TGATCAGCATGGACCACTTC(서열번호 15)
GAPDH	ACCAGGTATCTGCTGGTTG(서열번호 16)	TAACCATGATGTCAGCGTGGT(서열번호 17)
hsa-miR-3613-5p	UGUUGUACUUUUUUUUUGUUC(서열번호 2)	
hsa-miR-6763-5p	CUGGGGAGUGGUGGGGAG(서열번호 3)	
hsa-miR-423-5p	UGAGGGGAGAGAGCGAGACUUU(서열번호 1)	
hsa-miR-1180-5p	GGACCCACCCGCCGGGAUA(서열번호 5)	
hsa-miR-6511b-3p	CCUACACCCCUUCUGCCUGCA(서열번호 6)	
hsa-miR-3197	GGAGGCGCAGGCUCGAAAGGCG(서열번호 7)	
hsa-miR-3162-3p	UCCCUACCCUCCACUCCCA(서열번호 4)	
has-u6	CGCAAGGATGACACGCAATTC(서열번호 18)	
Universal reverse		GTGCAGGGTCCGAGGT(서열번호 19)

- [0119] 그 결과, 7개의 miRNA는 Ang II 처리된 HL-1 세포에서 유의하게 하향 조절되었으며, 그 중 miR-423(miR-423-5p)이 다른 miRNA보다 하향 조절되었음을 확인하였다(도 2C 및 2D).
- [0121] 다음으로, 자발적 Ca^{2+} 과도 현상에 대한 miR-423의 효과를 조사하기 위해, 음성 대조군 miRNA(cat. no. SMC-2003),
miR-423 모방체(5'-AUAAGGAAGUAGGUGAGGGGAGAGAGAGACUUUUAUUUUCCAAAAGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGUCUUGCUUCCUAACCCGCGC-3' (서열번호 20); cat. no. SMM-002) 및 miR-423 억제제(5'-UGAGGGGAGAGAGCGAGACUUU-3'(서열번호 21); cat. no. SMI-002) (Bioneer Corporation, 대전, 한국)를 준비하였다. HL-1 세포를 35mm 디쉬 내 Claycomb 배지 1ml에 시딩하고, 제조업체의 프로토콜(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)에 따라 RNAiMax Transfection Reagent를 사용하여 리포펙타민(Lipofectamine)으로 miRNA를 HL-1 세포로 형질감염시켰다. 도입된 miRNA는 37°C에서 24 시간 동안 인큐베이션하여 세포와 융합시켰다. 세포를 공초점 현미경으로 관찰하여 HL-1 세포 내에서 miRNA가 제대로 전달하고 효과가 있는지 확인하고, 형질감염 효율을 실시간 PCR로 평가하였다.
- [0123] 동적 Ca^{2+} 이미지는 공초점 현미경(LSM700; Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 취득하였다. 대조군, 대조군 + miR-423, 대조군 + miR 423 억제제, Ang II, Ang II + miR-423 및 Ang II + miR-423 억제제 그룹의 각 HL-1 세포를 이미징 용액(live cell imaging solution, 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 20 mM HEPES-Na, 5.6 mM 포도당, pH 7.4)으로 3회 세척하고 5 μM fluo-4AM를 로딩하였다. 37°C에서 20분 동안 커버 슬립을 1 ml 용량 챔버에 장착하고 488 nm 파장 아르곤 레이저 빔 또는 필터 시스템으로 여기 후 형광 측정을 위해 현미경에 배치하였다. Fluo-4는 아르곤 레이저의 488nm 라인에 의해 여기되었고 505nm 이상의 방출 신호가 수집되었다. 라인 스캔 이미지는 세포의 세로 축을 따라 수집되었다. 각 라인은 0.14 μm 간격으로 512개의 픽셀로 구성되었다. 순차적 스캔 후 512 X 10,000 라인 또는 512 X 20,000 라인의 2차원 이미지가 생성되어 오프라인 분석을 위해 저장되었다. NIH 오픈 액세스 소프트웨어 ImageJ를 사용하여 이미지 시퀀스를 분석하였으며, 세포내 Ca^{2+} 수준은 기저 형광 강도에 대한 형광 강도의 백분율로 표시하였다.
- [0124] 그 결과, 도 2E와 같이 대조군, 대조군 + miR-423, 대조군 + miR 423 억제제, Ang II, Ang II + miR-423 및 Ang II + miR-423 억제제 그룹의 HL-1 세포에서 얻은 자발적 Ca^{2+} 과도 현상의 대표적인 라인 스캔 이미지를 취득하였다. Ca^{2+} 진폭 및 파동 주파수는 대조군 대비 대조군 + miR-423 억제제($P < 0.001$, $1.0 \pm 0.0 \text{ F/F}_0$ to $2.2 \pm 0.2 \text{ F/F}_0$), Ang II($P < 0.001$, $1.0 \pm 0.0 \text{ F/F}_0$ to $2.1 \pm 0.1 \text{ F/F}_0$) 및 Ang II + miR-423 억제제($P < 0.001$, $1.0 \pm 0.0 \text{ F/F}_0$ to $1.8 \pm 0.1 \text{ F/F}_0$) 억제제에서 증가하였다(도 2F). 대조적으로, Ca^{2+} 파동 주파수 및 진폭은 Ang II + miR-423($1.0 \pm 0.0 \text{ F/F}_0$ to $1.1 \pm 0.1 \text{ F/F}_0$)으로 동시에 처리된 세포에서 회복되었다.
- [0126] **실시예 3. miR-423 투여된 Ang II 유도 세포의 하향 조절된 Ca^{2+} 처리 단백질에서 CaMKII(Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase) 활성화 분석**
- [0127] miR-423 투여 여부에 따라 CaMKII가 Ang II에 의해 유도된 HL-1 세포에서 활성화되는지 확인하기 위해 인산화된 CaMKII(T287 및 T306에서 p-CaMKII)의 단백질 수준을 웨스턴 블롯으로 분석하였다.
- [0128] 그 결과, 도 3A 및 3B와 같이, 인산화된 CaMKII와 총 CaMKII는 모두 Ang II 유도 세포에서 유의하게 증가했지만 Ang II + miR-423 그룹에서는 정상화되어, AF 조건에서 miR-423dp 의해 CaMKII의 활성이 억제됨을 확인하였다.
- [0130] 다음으로, CaMKII 표적 PLB(phospholamban)의 인산화를 웨스턴 블롯으로 분석하였다.
- [0131] 그 결과, 도 3E와 같이, Thr17에서 CaMKII에 의한 PLB의 인산화는 SERCA2(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -

ATPase 2)의 억제를 완화하고 결과적으로 SERCA2 Ca^{2+} 흡수 활성을 증가시킴을 확인하였다. 도 3A 및 3D와 같이, Ang II 유도된 세포는 인산화된 PLB(Thr17에서 p-PLB)의 증가된 단백질 수준을 나타내었으나, miR-423 처리시 현저하게 감소되었다.

[0133] 다음으로, CaMKII 발현 및 활성화 상태의 변화는 리아노딘 수용체 2 유전자(ryanodine receptor 2 gene, RyR 2)에서 CaMKII 의존적 인산화를 유도할 수 있으며, 이는 심장 근형질 세망 Ca^{2+} 방출 채널을 코딩하고 인산화된 RyR2는 개방 확률을 증가시킬 수 있으므로, RyR2의 활성화 여부를 추가로 조사하였다. RyR2는 RyR2-Ser2814(CaMKII에 의해 인산화됨) 및 RyR2-Ser2808(CaMKII 및 PKA 둘 다에 의해 인산화될 수 있음)을 비롯한 여러 인산화 부위를 포함하므로, 웨스턴 블롯에서 2개의 포스포 특이적 항체(RyR2-S2814 및 RyR2-S2808용)를 사용하여 분석하였다.

[0134] 그 결과, Ang II 유도된 세포에서 RyR2 인산화는 Ser2814와 Ser2808 모두에서 증가하여 RyR2의 Ca^{2+} 방출 특성을 나타내었으나, miR-423 처리시 크게 약화되었다(도 3A, 3E 및 3F).

[0135] 상기 실시예 2 및 실시예 3의 결과로부터 miR-423이 과도한 CaMKII(Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase) 활성의 억제와 Ca^{2+} 항상성의 회복을 통해 AF에서 Ca^{2+} 처리 단백질을 감소시킴을 알 수 있다.

[0137] 실시예 4. miR-423 투여된 Ang II 유도 세포에서 CaMKII 활성화에 대한 효과 분석

[0138] 대조군, 대조군 + miR-423, 대조군 + miR 423 억제제, Ang II, Ang II + miR-423 및 Ang II + miR-423 억제제 그룹의 각 HL-1 세포를 각각 일반 세포 배양 접시와 유연한 에너지 수확기(flexible energy harvester)에서 배양하였다. 배양된 세포를 4% 병냉 토포알데히드(pH 7.2-7.3)로 상온에서 1시간 동안 고정하고 세척한 후 0.3% Triton X-100으로 30분간 침투시켰다. 세포를 세척하고 PBS 중 5% BSA(Bovine serum albumin) 및 0.3% Triton X-100으로 30분 동안 차단하였다. 세포를 세척하고 0.3% Triton X-100 및 1% BSA를 포함하는 PBS를 사용하여 4 °C의 저온실에서 밤새 CaMKII 및 인산화된 CaMKII 1차 항체로 염색하였다. 세포를 세척하고 실온에서 3시간 동안 0.3% Triton X-100 및 1% BSA를 포함하는 PBS를 사용하여 Alexa Fluor 488 및 Alexa 555 2차 항체로 염색하였다. 이어서, 세포를 5분 동안 3회 세척하고 최종 세척 동안 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 염색하였다. 형광 이미지는 공초점 현미경을 사용하여 촬영하였다.

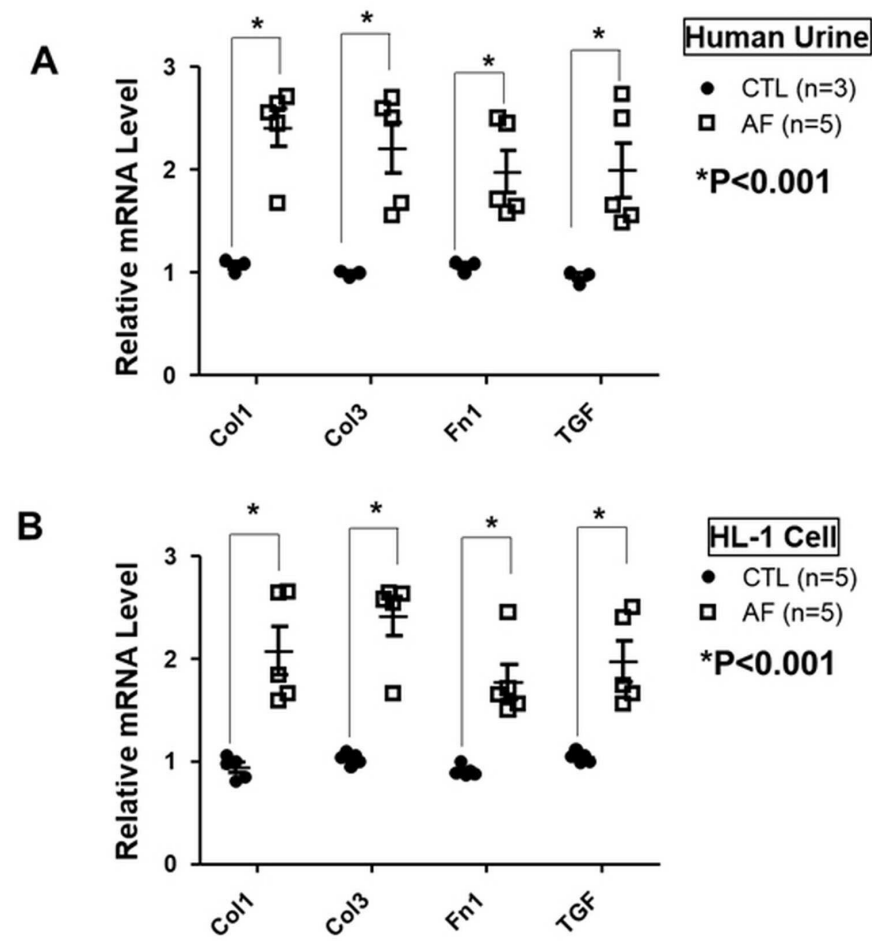
[0139] 그 결과, 도 4와 같이, Ang II 처리시 CaMKII와 p-CaMKII는 모두 3.2배 증가하였으나, Ang II + miR-423 그룹은 p-CaMKII의 증가를 효과적으로 억제하였다(Ang II 그룹 대비 1.3배, $p < 0.001$). 그러나, 대조군의 CaMKII 및 p-CaMKII에서는 이러한 효과가 확인되지 않았다.

[0141] 상기 실시예의 결과로부터, 본 발명의 miR-423은 AF 환자에서 유의하게 하향 조절되고, 칼슘 처리 단백질인 CaMKII의 발현 수준 조절을 통해 심근 세포의 손상을 억제하는 바, 이를 AF의 진단 방법 및 CaMKII의 발현 수준 조절 효과에 기반한 AF(심방세동)의 예방 또는 치료 용도로 제공할 수 있다.

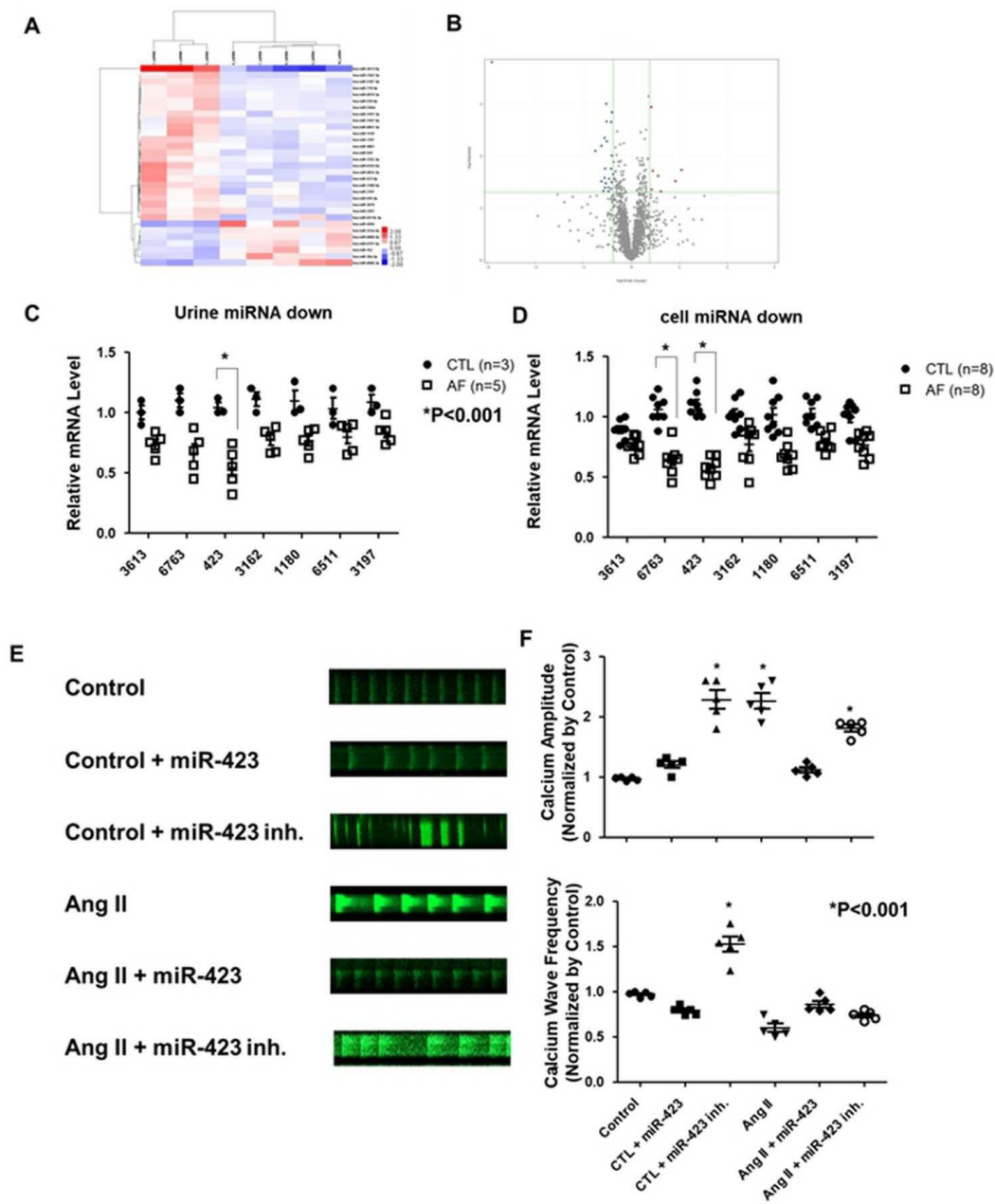
[0143] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미, 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

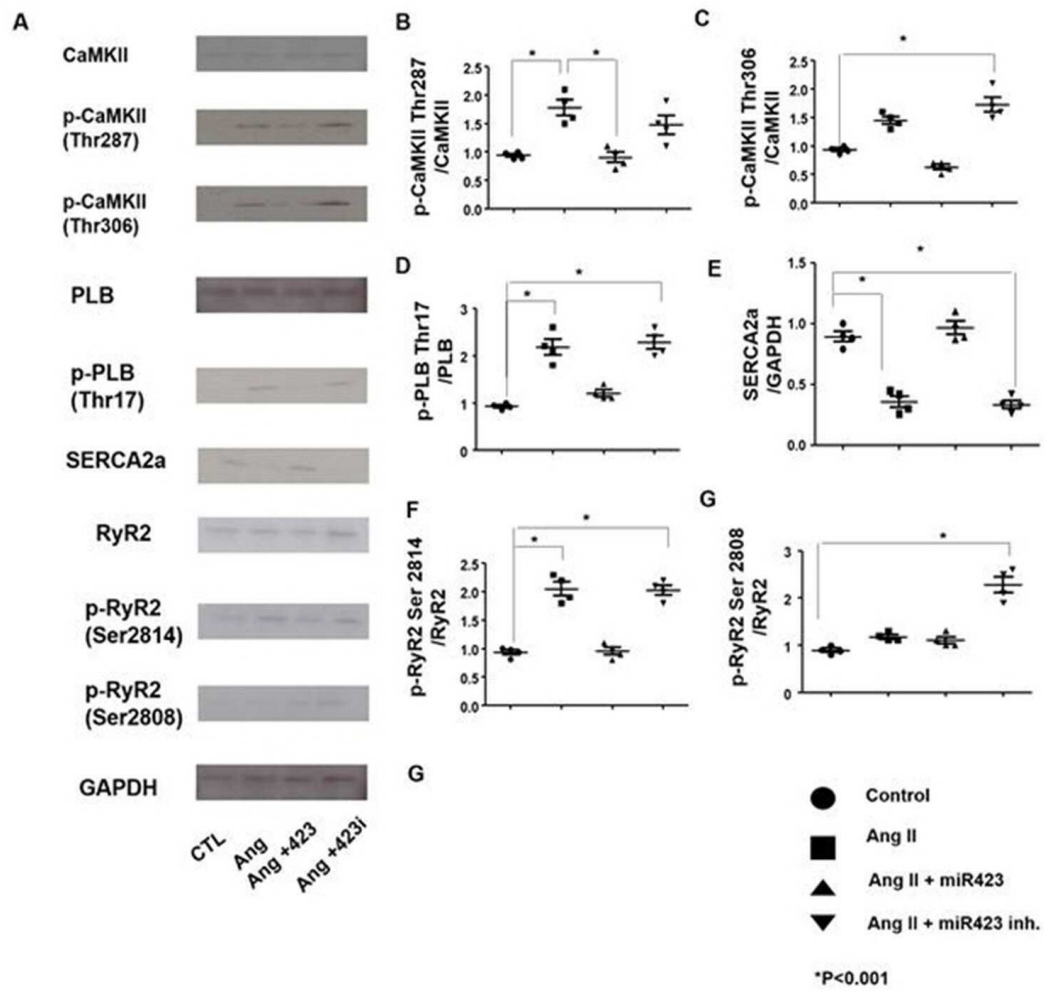
도면1



도면2

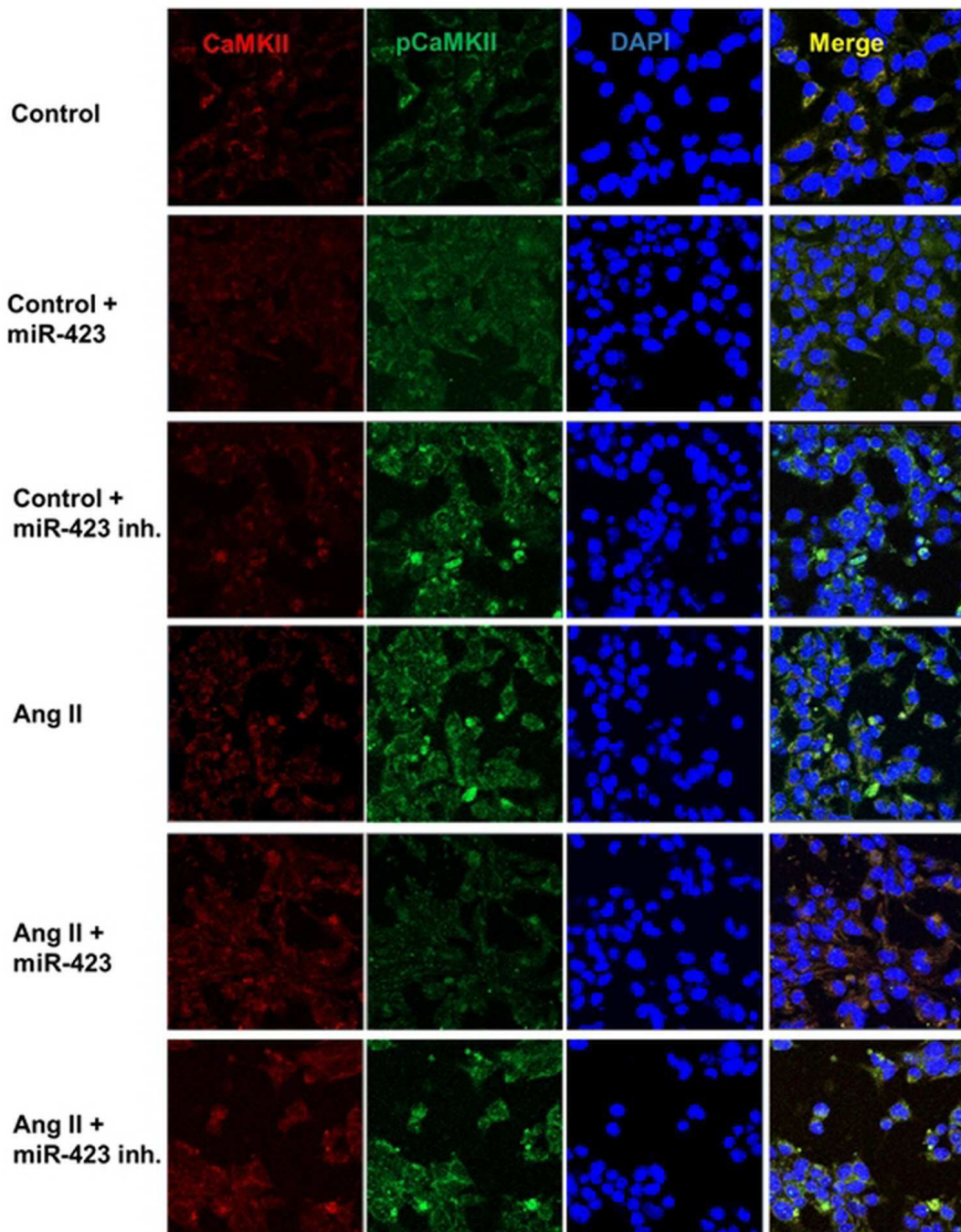


도면3

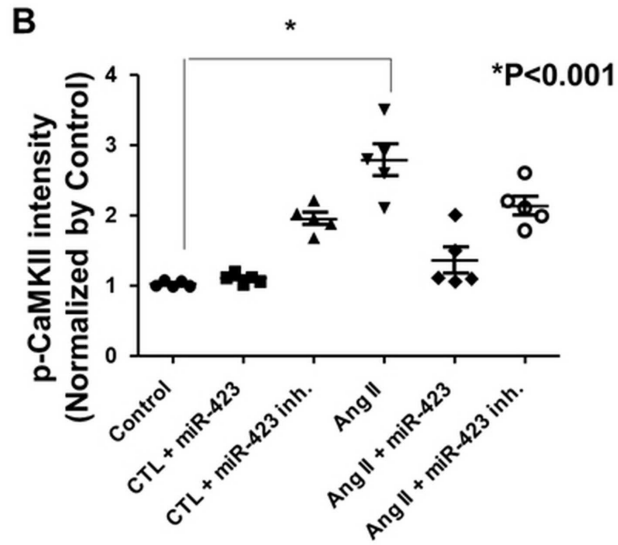


도면4a

A



도면4b



서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Diagnosis or treatment of atrial fibrillation using miRNA

<130> KPA210291-KR

<160> 21

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-423(hsa-miR-423-5p, miR-423-5p)

<400> 1

ugaggggcag agagcgagac uuu 23

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-3613(hsa-miR-3613-5p)

<400> 2

uguuguacuu uuuuuuuugu uc 22

<210> 3

<211> 19

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-6763(hsa-miR-6763-5p)	
<400>	3	
	cuggggagug gcuggggag	19
<210>	4	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-3162(hsa-miR-3162-3p)	
<400>	4	
	ucccuacccc uccacucccc a	21
<210>	5	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-1180(hsa-miR-1180-5p)	
<400>	5	
	ggaccacccc ggccgggaau a	21
<210>	6	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-6511(hsa-miR-6511b-3p)	
<400>	6	
	ccucaccacc ccuucugccu gca	23
<210>	7	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-3197(hsa-miR-3197)	
<400>	7	
	ggaggcgcag gcucggaaag gcg	23

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TGF-beta_F
 <400> 8
 ttgcttcagc tccacagaga 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TGF-beta_R
 <400> 9
 tggttgtaga gggcaaggac 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Collagen I_F
 <400> 10
 gagcggagag tactggatcg 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Collagen I_R
 <400> 11
 gcttcttttc cttggggttc 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Collagen III_F
 <400> 12

tgatggaaaa ccaggacctc	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Collagen III_R	
<400> 13	
cagtctcccc attctttcca	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Fibronectin_F	
<400> 14	
gatgcaccga ttgtcaacag	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Fibronectin_R	
<400> 15	
tgatcagcat ggaccacttc	20
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH_F	
<400> 16	
accaggtatc tgctggttg	19
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	GAPDH_R	
<400>	17	
taaccatgat gtcagcgtgg t		21
<210>	18	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	has-u6	
<400>	18	
cgcaaggatg acacgcaaat tc		22
<210>	19	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Universal reverse	
<400>	19	
gtgcagggtc cgaggt		16
<210>	20	
<211>	94	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-423 mimic	
<400>	20	
auaaaggaag uuaggcugag gggcagagag cgagacuuuu cuuuuuucca aaagcucggu		60
cugaggcccc ucagucuugc uuccuaaccc gcgc		94
<210>	21	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-423 inhibitor	
<400>	21	
ugaggggcag agagcgagac uuu		23