(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0058026
(43) 공개일자 2015년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0159942
(22) 출원일자 2014년11월17일
심사청구일자 2014년11월17일
(30) 우선권주장
1020130140231 2013년11월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93
(72) 발명자
장수환
경기도 남양주시 경춘로1286번길 35, 1604동 704호(평내동, 상록데시앙)
염찬주
강원도 강릉시 토성로 170- 1(임당동)
(74) 대리인
위병갑

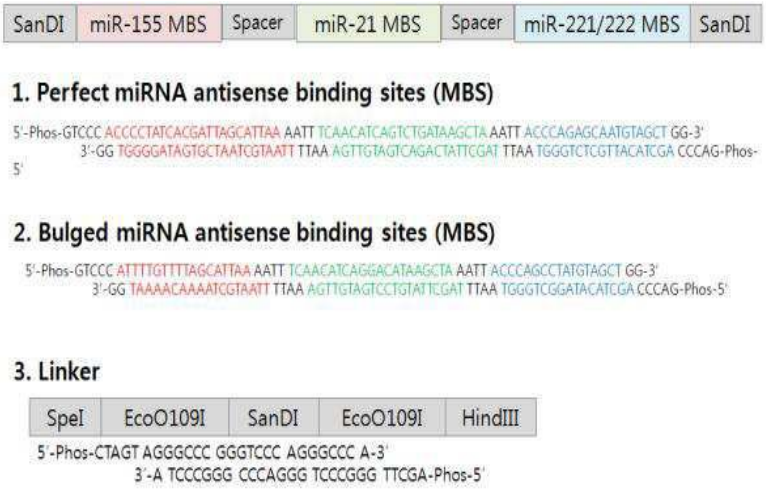
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **ｍｉＲＮＡ 스폰지 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222를 동시에 선택적으로 저해할 수 있는 마이크로 RNA 스폰지 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 miRNA 스폰지는 암, 특히 유방암 및 췌장암 발생에 관여하는 마이크로 RNA인 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222를 동시에 선택적으로 흡수하여 이들의 표적 단백질들의 발현을 증가시킴으로써 항암 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 본 발명의 miRNA 스폰지는 상기 마이크로 RNA들의 발현과 관련된 질병의 치료제로 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ009605
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대 바이오그린 21 사업
연구과제명 포괄적으로 microRNA들을 저해할 수 있는 Sponge를 이용한 동물 질병치료 모델 개발
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222에 각각 결합할 수 있는 miRNA 결합 사이트(MBS)들을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA의 활성을 동시에 저해하는 miRNA 스폰지인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 각각의 miRNA에 결합할 수 있는 miRNA 결합 사이트(MBS)들이 연속적으로 배열되어 있고, 각 MBS 사이에 스페이서 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 각각의 miRNA에 결합할 수 있는 miRNA 결합 사이트(MBS)들이 연속적으로 배열된 MBS 유닛을 두 개 이상 포함하며, 상기 MBS 유닛이 연속적으로 연결될 수 있게 하는 링커(linker) 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 링커는 SanDI 제한효소 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 프로모터 및 리포터 부위를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 miRNA 결합 사이트(MBS)는 대응되는 각각의 miRNA 염기서열 중 일부에 대해 미스매치(mismatch)되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 벡터는 유도성(inducible) 발현벡터인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 10

제9항의 재조합 벡터를 포함하는 형질전환용 키트.

청구항 11

제8항의 재조합 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 세포는 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA를 발현하는 암 세포인 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 항암용 약학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 암은 유방암 또는 췌장암인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222를 동시에 선택적으로 저해할 수 있는 마이크로 RNA 스폰지 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 마이크로 RNA(miRNA)는 약 22개 정도의 뉴클레오티드로 구성된 비번역(non-coding) RNA로, 전사(transcription) 및 전사 후 단계에서 유전자 발현을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 수천 개의 포유동물 유전자를 조절할 것으로 예측되고 있으나, 아직까지는 상대적으로 적은 수의 표적(target)들만이 실험적으로 검증되었다. 최근에는 마이크로 RNA가 암, 심혈관계질환, 자가면역질환 등 여러 질병에서 중요한 조절인자로 작용한다는 사실이 보고되고 있으며, 이에 따라 마이크로 RNA를 저해하는 질병 치료제들이 개발되고 있다. 일례로서, miR-122를 저해하는 antagomiR가 HCV의 치료제로 개발되어 현재 임상 2기 테스트 중에 있다.

[0003] 이와 관련하여 마이크로 RNA의 발현을 조절할 수 있는 여러 기술들이 개발되고 있으며, 그 중 하나가 세포 내에 존재하는 해당 miRNA를 스폰지처럼 빨아들여 그 정상적 기능을 저해하는 "마이크로 RNA 스폰지" 기술이다(Ebert M.S. et al., "MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells", Nat Methods. 2007 Sep;4(9):721-6. Epub 2007 Aug 12). 이 기술은 화학적으로 합성된 안티센스 올리고뉴클레오티드 대신 세포 내에서 발현될 수 있는, 형질전환유전자(transgene)로부터 생성되는 RNA를 마이크로 RNA의 저해제로 사용한다는 점에 기술적 특징이 있다. 이미 동물모델에서도 이러한 miRNA 스폰지를 이용한 연구가 이루어졌으며, miRNA-31에 대한 스폰지를 이용하여 제작한 형질전환 마우스가 유방암의 전이를 막는 효과를 나타낸 바 있다. 하지만 특정 질병에 관여하는 miRNA는 다수가 존재하기 때문에 위와 같은 단일 miRNA의 저해로 인한 치료효과에는 한계가 있을 수 밖에 없다. 또한, 미국 공개특허공보 US 2010/0186103 A1(2010년 7월 22일 공개)은 rAAV(recombinant Adeno-Associated Virus) 감염을 통해 동물모델에 miRNA 스폰지를 도입하는 기술을 개시하고 있는데, 이 방법의 경우 rAAV의 특성상 간 등 특정 장기에서만 miRNA 스폰지가 과량 발현될 수 있다는 단점이 있고, 바이러스 감염에 따른 돌연변이의 위험성도 존재한다.

[0004] 따라서 기존의 넉아웃(knock-out) 기술을 대체하는 miRNA 스폰지 기술을 동물모델에 적용하기 위해서는 특정 질병과 관련된 여러 마이크로 RNA들을 동시에 조절하면서도 안전성이 확보된 miRNA 스폰지를 개발할 필요가 있다. 이에 본 발명자들은 특히 유방암과 췌장암에서 발현이 증가하는 것으로 나타나는 특정 마이크로 RNA들에 대한 miRNA 스폰지를 제작하고 그 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국특허 제2013-0024831호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222에 결합하여 이들의 활성을 동시에 저해할 수 있는 miRNA 스폰지를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 miRNA 스폰지를 발현할 수 있는 재조합 벡터 및 이를 이용한 형질전환용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또다른 목적은 상기 miRNA 스폰지를 발현하는 형질전환된 세포를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또다른 목적은 상기 miRNA 스폰지를 이용한 항암용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222에 각각 결합할 수 있는 miRNA 결합 사이트(miRNA binding site, MBS)들을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA의 활성을 동시에 저해하는 miRNA 스폰지이다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222에 각각 결합할 수 있는 miRNA 결합 사이트(MBS)들이 연속적으로 배열되어 있고, 각 MBS 사이에 스페이서 부위를 포함한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 각각의 miRNA에 결합할 수 있는 miRNA 결합 사이트(MBS)들이 연속적으로 배열된 MBS 유닛을 두 개 이상 포함하며, 상기 MBS 유닛이 연속적으로 연결될 수 있게 하는 링커(linker) 부위를 포함한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 링커는 SanDI 제한효소 부위를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 프로모터 부위를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 리포터 유전자를 암호화하는 부위를 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 miRNA 결합 사이트(MBS)는 대응되는 각각의 miRNA 염기서열 중 일부에 대해 미스매치(mismatch)되는 서열을 포함(bulged match)할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 벡터는 특정 물질이나 조건 하에서 발현이 유도되는 유도성(inducible) 발현벡터일 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 포함하는 형질전환용 키트를 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 키트는 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA를 발현하는 암 세포 또는 동물을 형질전환하는데 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포는 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA를 발현하는 암 세포일 수 있다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암 세포는 유방암 또는 췌장암 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 항암용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암은 유방암 또는 췌장암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 miRNA 스폰지는 특히 유방암 및 췌장암 발생에 관여하는 마이크로 RNA인 miRNA-155, miRNA-21, miRNA-221 및 miRNA-222를 동시에 선택적으로 흡수하여 이들의 표적 단백질들의 발현을 증가시킴으로써 항암 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 본 발명의 miRNA 스폰지는 상기 마이크로 RNA들의 발현과 관련된 질병의 치료제로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명에 따른 miRNA 스폰지의 MBS(perfect match 또는 buldged match) 및 링커의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 miRNA 스폰지 카세트를 벡터에 클로닝하는 과정과 재조합 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 miRNA 스폰지 카세트의 타겟 miRNA들에 대한 특이적 결합을 바이오인포매틱스 방법으로 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 miRNA 스폰지의 MBS 유닛의 다중화(multimerization)를 나타내는 모식도이다.

도 5a 및 5b는 시퀀싱을 통해 분석한 다중결합의 수를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 miRNA 스폰지를 시험하기 위한 세포주를 결정하기 위해 실시간 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 7a는 본 발명의 miRNA가 정상적으로 작동하는지를 확인하기 위한 루시퍼라제 어세이의 원리를 나타내는 모식도이며, 도 7b는 그 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 췌장암 세포인 Panc-1과 MIA-Paca-2에서 루시퍼라제 어세이를 수행한 결과이다.

도 9는 miR-155의 발현이 낮은 MCF-7에 miR-155를 과발현시킨 상태에서 스폰지의 작용을 실험한 결과이다.

도 10은 본 발명의 miRNA 스펀지를 포함하는 유도성 발현벡터의 구조를 나타낸 그림이다.

도 11은 유도성 miRNA 스펀지를 함유한 세포주에서 독시사이클린(doxycycline)에 의해 스폰지가 발현되는 것을 확인한 결과이다. NC : Negative Control, RFP : RFP only (no sponge). PF1/2 : perfect match sponge #1/#2 (3X), Bg1/2 : Bulged match sponge #1/#2 (5X).

도 12는 유도성 miRNA 스폰지 발현벡터에 의한 타겟 miRNA들의 동시 저해 효과를 확인하기 위하여, 타겟 miRNA의 발현수준을 실시간(real-time) PCR로 확인한 결과이다.

도 13은 유도성 miRNA 스폰지 발현벡터에 의한 타겟 miRNA들의 동시 저해 효과를 확인하기 위하여, 루시퍼라제 어세이를 수행한 결과이다.

도 14는 miRNA 스폰지의 특이성을 검증하기 위하여 스폰지와의 결합력(affinity)이 높을 것으로 예상되는 4개의 miRNA들의 발현 변화를 모니터링한 결과이다.

도 15는 miRNA 스폰지의 타겟 miRNA의 타겟 단백질들의 양적 변화를 측정한 결과이다.

도 16은 본 발명의 miRNA 스폰지의 항암제 감수성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 암, 특히 유방암과 췌장암에서 특이적으로 과발현되는 것으로 알려진 miR-155, miR-21, miR-221 및 miR-222를 타겟으로 하는 miRNA 스폰지(sponge)를 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 miRNA 스폰지는 위 각각의 표적 miRNA에 결합하는 MBS (miRNA Binding Site)가 연속적으로 배열되고, 각각의 MBS 사이에 스페이서(spacer) 서열이 삽입된 MBS 유닛(unit)을 포함한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 MBS 유닛은 발현벡터에 클로닝되는 과정에서 한쪽 방향으로 다중화(multimerization)될 수 있도록 양 끝에 링커 서열이 연결될 수 있다. 상기 MBS 유닛의 다중화는 MBS의 종류, 즉 타겟 miRNA와 완전히 결합되는 perfect match MBS인지

또는 일부 서열이 미스매치되는 buldged match MBS인지에 따라 그 결합력(affinity)에 영향을 미칠 수 있다.

[0028] 본 발명의 miRNA 스폰지는 본 발명이 속하는 기술분야에서 사용되는 통상의 방법에 따라 발현벡터에 클로닝될 수 있으며, miRNA 스폰지가 발현되는 재조합 벡터는 공지된 통상의 방법에 따라 세포나 동물에 도입되어 miRNA 스폰지를 발현하는 형질전환 세포 또는 동물을 제작할 수 있다. 본 발명자들은 본 발명의 miRNA 스폰지가 클로닝된 발현벡터를 이용하여 췌장암 및 유방암 세포주를 형질전환시키고, 타겟 miRNA의 억제 효과를 분석함으로써 본 발명의 miRNA의 정상 작동을 확인하였다. 즉, 상기 형질전환된 세포주에서 리포터 단백질인 루시퍼라제의 발현을 확인한 결과 miRNA 스폰지를 발현하는 암 세포는 MBS와 타겟 miRNA의 결합으로 인해 대조군에 비해 루시퍼라제 활성이 감소하는 것을 확인하였고(도 7, 8, 9), 유도성 miRNA 스폰지 발현 벡터로 형질전환시킨 암 세포에서 타겟 miRNA의 타겟 단백질들의 양적 변화를 측정한 결과, miRNA 스폰지의 유도에 의해 그 발현양이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며(도 15), 이는 본 발명의 miRNA 스폰지가 성공적으로 miRNA들을 저해함을 보여준다. 또한, 바이오인포매틱스 분석 결과에서 결합력(affinity)이 높을 것으로 예상되는 miRNA들을 선별하여 스폰지가 발현되었을 때의 발현 변화를 모니터링한 결과, miRNA 스폰지의 발현은 위 miRNA들의 발현에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었으며(도 14), 이는 본 발명의 miRNA 스폰지가 타겟 miRNA를 특이적으로 저해함을 보여준다. 나아가, 본 발명의 miRNA 스폰지는 항암제인 사이클로포스파미드(Cyclophosphamide) 처리에 대해 감수성을 나타내었다(도 16). 따라서 본 발명의 miRNA 스폰지는 miR-155, miR-21, miR-221 및 miR-222의 과발현에 의해 발생하는 암의 치료 용도로 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 miRNA 스폰지가 포함된 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 즉 제제시에 통상적으로 이용되는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] **<실시예 1>**

[0032] **본 발명의 miRNA 스폰지(sponge)를 포함하는 재조합 벡터의 제작**

[0033] 타겟 miRNA(miR-155, miR-21, miR-221, miR-222)들에 결합할 수 있는 MBS (miRNA Binding Site)를 연속적으로 배열하고, 각각의 MBS 사이에 스페이서(spacer) 서열을 넣고, 위 MBS 유닛(unit)을 한쪽 방향으로 다중화(multimerization)하기 위하여 MBS 유닛 양쪽 끝에 SanDI 링커를 삽입하여 타겟 miRNA들을 동시에 억제할 수 있는 miRNA 스폰지를 제작하고, 이를 루시퍼라제(luciferase) 리포터 벡터에 도입하여 재조합 벡터를 완성하였다. 상기 miRNA 스폰지는 miRNA에 완벽하게 상보적인(perfect match) MBS, 또는 실제 표적에서 빈번히 관찰되는 일부 서열이 미스매치(mismatch)된 Bulged match를 모방한 MBS를 포함하는 두 종류로 제작하였으며, 상기 재조합 벡터의 염기서열을 분석한 결과, perfect match MBS 유닛은 3개까지, bulged match MBS 유닛은 5개까지 다중화(multimerization)가 일어난 것을 확인할 수 있었다. 본 발명의 miRNA 스폰지 및 재조합 벡터의 보다 상세한 제작 방법은 다음과 같다.

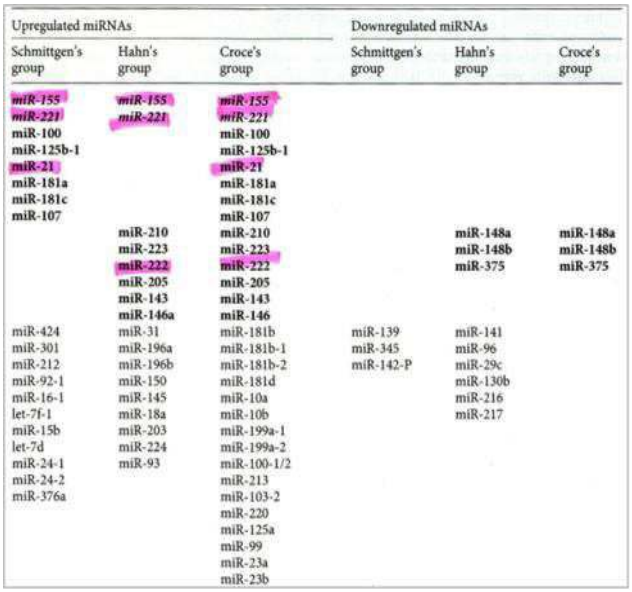
[0034] **<1-1> 타겟 miRNA의 선정**

[0035] 본 발명자들은 다수의 miRNA를 동시에 억제함으로써 우수한 항암효과를 나타낼 수 있는 miRNA 스폰지를 개발하기 위해 유방암과 췌장암에서 특이적으로 과발현되는 miRNA를 타겟으로 선정하였다. 이를 위해 기존의 보고된 자료들로부터 유방암과 췌장암에서 과발현되는 miRNA를 찾고, 다른 문헌과의 비교를 통해 췌장암과 유방암에서

공통적으로 과발현되는 4개의 마이크로 RNA(miRNA-155, 21, 221, 222)를 타겟으로 결정하였다(표 2, www.mirbase.org 참조). 상기 기존의 보고된 자료들은 하기 기술된 문헌들이다.

표 1

[0036]



Upregulated miRNAs			Downregulated miRNAs		
Schmittgen's group	Hahn's group	Croce's group	Schmittgen's group	Hahn's group	Croce's group
miR-155	**miR-155**	**miR-155**			
miR-221	**miR-221**	**miR-221**			
miR-100		**miR-100**			
miR-125b-1		**miR-125b-1**			
miR-21		**miR-21**			
miR-181a		**miR-181a**			
miR-181c		**miR-181c**			
miR-107		**miR-107**			
	miR-210	**miR-210**		**miR-148a**	**miR-148a**
	miR-223	**miR-223**		**miR-148b**	**miR-148b**
	miR-222	**miR-222**		**miR-375**	**miR-375**
	miR-205	**miR-205**			
	miR-143	**miR-143**			
	miR-146a	**miR-146**			
miR-424	miR-31	miR-181b	miR-139	miR-141	
miR-301	miR-196a	miR-181b-1	miR-345	miR-96	
miR-212	miR-196b	miR-181b-2	miR-142-P	miR-29c	
miR-92-1	miR-150	miR-181d		miR-130b	
miR-16-1	miR-145	miR-10a		miR-216	
let-7f-1	miR-18a	miR-10b		miR-217	
miR-15b	miR-203	miR-199a-1			
let-7d	miR-224	miR-199a-2			
miR-24-1	miR-93	miR-100-1/2			
miR-24-2		miR-213			
miR-376a		miR-103-2			
		miR-220			
		miR-125a			
		miR-99			
		miR-23a			
		miR-23b			

표 2

[0037]

miRNA	MirBase #	miRNA sequence(s)
miR-155	MIMAT0000646	uuaaugcuaaucgugauaggggu
miR-21	MIMAT0000076	uagcuuaucagacugauguuga
miR-221	MIMAT0000278	agcuacauugucugcuggguuuc
miR-222	MIMAT0000279	agcuacaucuggcuacugggu

[0038] 상기 기존의 보고된 자료들은 다음과 같다.

[0039] [1] Seddiki N, Brezar V, Ruffin N, Levy Y, Swaminathan S (2014). Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease *Immunology* **142**, 32-38.

[0040] [2] Vigorito E, Kohlhaas S, Lu D, Leyland R (2013). miR-155: an ancient regulator of the immune system *Immunological reviews* **253**, 146-157.

[0041] [3] Jurkovicova D, Magyerkova M, Kulcsar L, Krivjanska M, Krivjansky V, Gibadulinova A, Oveckova I, Chovanec M (2014). miR-155 as a diagnostic and prognostic marker in hematological and solid malignancies *Neoplasma* **61**, 241-251.

[0042] [4] Chang S, Sharan SK (2012). Epigenetic control of an oncogenic microRNA, miR-155, by BRCA1 *Oncotarget* **3**, 5-6.

[0043] [5] Indolfi C, Curcio A (2014). Stargazing microRNA maps a new miR-21 star for cardiac hypertrophy *The Journal of clinical investigation* **124**, 1896-1898.

[0044] [6] Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, Chun B, Zhuang J, Zhang C (2010). Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4 *Cardiovascular research* **87**, 431-439.

[0045] [7] Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C (2009). miR-21 as a key regulator of oncogenic processes

Biochemical Society transactions **37**, 918-925.

[0046] [8] Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T (2011). Regulation and function of miRNA-21 in health and disease *RNA biology* **8**, 706-713.

[0047] [9] Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafre SA, Farace MG (2007). miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1 *The Journal of biological chemistry* **282**, 23716-23724.

[0048] [10] Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G (2012). miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy *Current molecular medicine* **12**, 27-33.

[0049] **<1-2> miRNA 스폰지의 제작**

[0050] 표 2에 기재된 타겟 miRNA들에 동시에 결합할 수 있는 MBS (miRNA binding site) 유닛을 제작하기 위하여, 각각의 타겟 miRNA에 대한 상보적 결합 염기서열을 순서대로 가지고 있는 프라이머를 설계한 후 그 사이에 4개의 염기서열로 이루어진 스페이서(spacer) 서열을 삽입하고, 이를 한 개의 프라이머로 이어서 제작한 뒤 양 끝에 클로닝을 위한 SanDI 절단효소 사이트를 포함시켰다(도 1). 보다 구체적으로는 각 miRNA가 결합할 수 있게 하기 위하여 한 개의 프라미어에 세 가지 miRNA 결합서열이 들어가도록 디자인 하였고, 이렇게 완성된 sponge sequence는 단일가닥 DNA이므로 여기에 상보적인 DNA를 디자인하여 두 단일가닥 DNA를 어닐링(annealing)시켜 원하는 이중가닥 sponge DNA 유닛을 완성하였다.

[0051] 최근의 연구 결과에 따르면, 타겟 miRNA와 완전한 결합을 이루는 perfect match MBS 보다 약간의 미스매치(mismatch)가 있는 bulged match MBS가 더 효율적인 발현 저해 효과를 나타내었기 때문에, MBS 유닛은 "Perfect MBS"와 "Bulged MBS"의 두 종류로 제작하였다. 완성된 "Perfect MBS" 유닛과 "Bulged MBS" 유닛의 염기서열은 다음과 같다.

[0052] - "Perfect MBS" 유닛

[0053] Forward: 5'-Phos-GTCCC ACCCCTATCACGATTAGCATTAA AATT TCAACA

[0054] TCAGTCTGATAAGCTA AATT ACCCAGAGCAATGTAGCT GG-3'

[0055] Reverse: 3'-GG TGGGGATAGTGCTAATCGTAATT TTAA AGTTGTAGT

[0056] CAGACTATTCGAT TTAA TGGGTCTCGTTACATCGA CCCAG-Phos-5

[0057] - "Bulged MBS" 유닛

[0058] Forward: 5'-Phos-GTCCC ATTTTGTTTTAGCATTAA AATT TCAACATCAG

[0059] GACATAAGCTA AATT ACCCAGCCTATGTAGCT GG-3'

[0060] Reverse: 3'-GG TAAAACAAAATCGTAATT TTAA AGTTGTAGTCCTGTATTCGAT TTAA TGGGTCGGATACATCGA CCCAG-Phos-5'

표 3

본 발명의 miRNA 스폰지 제작에 사용된 프라이머 목록

번호	프라이머 종류	상보성	방향	링커	서열	스페이서 서열	서열	링커	방향
1	miR-155-5p		3'		UGGGGAUAGU GCUAAUCGUA AUU		UGGGGAUAGU GCUAAUCGUA AUU		5'
	miR-155-sp	S	5'	GTCCC	ACCCCTATCA CGATTAGCAT TAA	AATT	ACCCCTATCA CGATTAGCAT TAA	GG	3'
		AS	3'	GG	TGGGGATAGT GCTAATCGTA ATT	TTAA	TGGGGATAGT GCTAATCGTA ATT	CCCAG	5'
2	miR-21		3'		AGUUGUAGU C AGACUAUUCG AU		AGUUGUAGU C AGACUAUUCG AU		5'
	miR-21-sp	S	5'	GTCCC	TCAACATCAG TCTGATAAGC TA	AATT	TCAACATCAG TCTGATAAGC TA	GG	3'
		AS	3'	GG	AGTTGTAGTC AGACTATTCG AT	TTAA	AGTTGTAGTC AGACTATTCG AT	CCCAG	5'
3	miR-221		3'		CUUUGGGUC GUCUGUUACA UCGA		CUUUGGGUC GUCUGUUACA UCGA		5'
	miR-221-sp	S	5'	GTCCC	GAAACCCAGC AGACAATGTA GCT	AATT	GAAACCCAGC AGACAATGTA GCT	GG	3'
		AS	3'	GG	CTTTGGGTCGT CTGTTACATCG A	TTAA	CTTTGGGTCGT CTGTTACATCG A	CCCAG	5'
4	miR-222		3'		UGGGUCAUCG GUCUACAUCG A		UGGGUCAUCG GUCUACAUCG A		5'
	miR-222-sp	S	5'	GTCCC	ACCCAGTAGC CAGATGTAGC T	AATT	ACCCAGTAGC CAGATGTAGC T	GG	3'
		AS	3'	GG	TGGGTCATCG GTCTACATCG A	TTAA	TGGGTCATCG GTCTACATCG A	CCCAG	5'

[0061]

[0062] 상기와 같이 제작된 miRNA 스폰지 카세트가 타겟 miRNA들만을 특이적으로 저해하는지를 알아보기 위하여 바이오인포매틱스를 이용한 방법(PITA, http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html 참조)으로 예측을 수행한 결과, 목표로 하는 4개의 miRNA가 가장 높은 결합력을 보이면서 위 miRNA 스폰지에 흡수될 것이라는 예측 결과를 확인할 수 있었다(도 3).

[0063] **<1-3> 스폰지 카세트의 클로닝**

[0064] 실시예 <1-2>에서 제작한 miRNA 스폰지 카세트를 루시퍼라제(luciferase) 리포터 벡터(pMIR-REPORT miRNA Expression Reporter Vector System, Invitrogen)에 클로닝하였다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 먼저 위 벡터에 스폰지 카세트가 한 방향으로 여러 개 들어갈 수 있도록 하는 SanD1 효소 부위를 포함하는 링커(도 1 참조)를 삽입한 후, SanD1 효소를 처리하여 스폰지 카세트를 벡터에 도입하였다.

[0065] 위와 같이 SanDI 제한효소 사이트를 포함하는 링커에 의해 MBS 유닛이 한쪽 방향으로 다중화(multimerization)될 수 있으며(도 4), MBS 유닛의 수에 따라서 하나의 스폰지 벡터가 어느 정도의 miRNA를 저해할 수 있는지가 결정되게 된다. 제작된 벡터의 염기서열 분석 결과, perfect MBS의 경우는 1X부터 3X까지(도 5a), bulged MBS의 경우는 1X부터 5X까지 순차적으로 MBS 유닛이 포함된 것을 확인할 수 있었다(도 5b).

[0066] **<실시예 2>**

[0067] **miRNA 스폰지의 암 세포주 내 타겟 miRNA 저해 효과**

[0068] **<2-1> 암 세포주의 선정**

[0069] miRNA 스폰지의 타겟 miRNA 저해 효과를 실험하기 위한 세포주를 선정하기 위하여, 유방암 세포주인 MCF-7, MDA-MB-436 및 췌장암 세포주인 BxPC3, Panc-1, MIA-Paca2를 대상으로 4가지 타겟 miRNA들의 발현양을 real-time PCR을 이용하여 분석하였다. 실험은 Qiagen사의 miScript RT system을 제조사의 프로토콜에 따라 사용하여 수행하였으며, CYBR green을 이용하여 시료 내의 miRNA 양을 정량하였다.

[0070] 분석 결과, miR-21을 제외한 3가지 miRNA는 MDA-MB-436과 BxPC3에서 과발현되는 것으로 나타났으며, miR-21의 경우 그 절대적인 발현값은 상당히 높지만 (MCF-7에서도 비정상적으로 높기 때문에) 상대적인 값은 낮은 것으로 나타났다(도 6). 이러한 결과를 바탕으로 본 발명자들은 MDA-MB-436과 BxPC3를 miRNA 스폰지를 시험하기 위한 세포주로 결정하였다.

[0071] **<2-2> 루시퍼라제 어세이(luciferase assay)**

[0072] miRNA 스폰지를 위 세포주들에 도입한 후 대조군에 비하여 얼마나 타겟 miRNA들의 발현을 저해하는지 알아보기 위하여 루시퍼라제 어세이를 수행하였다(도 7a). 스폰지를 포함하는 재조합 벡터는 multiple MBS로 인하여 루시퍼라제 발현이 대조군 벡터에 비해 낮은 수준으로 나타나기 때문에 이를 측정함으로써 스폰지가 얼마나 잘 작용하는지를 알 수 있게 된다. 구체적으로 상기 세포주에 벡터를 도입하는 방법은 miRNA 스폰지를 세포주에 도입하기 위하여 리포펙타민을 이용한 형질도입방법을 사용하였는데, 이러한 방법은 스폰지 DNA를 리포좀과 혼합하여 세포막을 잘 통과할 수 있는 DNA-리포좀 복합체를 만들고 이를 세포위에 뿌려 줌으로써 sponge DNA가 세포 안으로 들어가게 되도록 한다.

[0073] 타겟 miRNA가 과발현되고 있는 상기 MDA-MB-436 세포에 본 발명의 miRNA 스폰지를 도입한 결과, 빈 벡터(empty vector)에 비하여 perfect match MBS 스폰지는 약 90%에 달하는 루시퍼라제 활성 감소효과가 나타났다(도 7b 좌측 그래프). 이러한 결과는 MBS가 한 개만 들어있는 스폰지(1X)에서도 나타났으며, 3X 까지 MBS가 증가할수록 약간의 추가적인 감소가 관찰되었다. 반면에, Bulged match MBS 스폰지의 경우, MBS가 한 개만 들어있을 때는 루시퍼라제 발현이 거의 저해되지 않았으나 MBS가 2개부터 5까지 증가함에 따라 그 발현이 비례적으로 감소하는 양상을 보였다(도 7b 우측 그래프). 따라서 스폰지의 종류에 따라 작용하는 정도에 차이가 있는 것으로 보이며, perfect match MBS 스폰지의 경우 매우 활발하게 miRNA에 결합하고 있는 것으로 판단된다. 또한, 이러한 현상은 MDA-MB-231뿐만 아니라 췌장암 세포인 Panc-1이나 MIA-Paca-2에서도 동일하게 관찰되었다(도 8 참조).

[0074] 또한, miR-155의 발현이 낮은 MCF-7에 miR-155를 과발현시킨 상태에서 스폰지의 작용을 실험해 본 결과, perfect match 스폰지와 bulged match 스폰지 두 종류 모두 그 발현이 현저히 감소하는 것으로 나타났으며(도 9), 이러한 결과들은 본 발명의 스폰지가 다양한 세포주에서 타겟 miRNA를 흡수하여 그 활성을 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 보여준다.

[0075] **<실시예 3>**

[0076] **유도성 miRNA 스폰지의 항암 효과**

[0077] **<3-1> 유도성 재조합 발현벡터의 제작**

[0078] miRNA 스폰지를 이용한 형질전환 동물을 제작하기 위해서는 이를 안정적으로 발현하는 벡터를 도입하여야 하지만, 하나의 miRNA가 여러 가지 유전자를 동시에 저해하고 있기 때문에 안정적인 miRNA의 저해가 가져올 수 있는 부작용도 고려할 필요가 있다. 이러한 부작용을 최소화하는 방법 중 하나가 원하는 때에만 스폰지를 발현시키는 유도성(inducible) 스폰지 벡터를 구축하는 것이다.

[0079] 따라서 본 발명자들은 실시예 <2-2>의 루시퍼라제 어세이를 통하여 검증된 본 발명의 miRNA 스폰지 카세트를 RFP (Red Fluoresence Protein)의 3 'UTR 부분에 삽입하고, 이를 유도성 벡터인 pcDNA™5/FRT/TO (Invitrogen, US) 벡터에 도입한 새로운 재조합 벡터를 제작하였다(도 10).

[0080] 참고로 상기 루시퍼라제 스폰지 벡터를 제작할 때 SanDI을 포함하는 링커를 먼저 삽입하였는데 이 링커에 EcoO109I사이트가 포함되어 있으며, 이 제한효소 사이트를 이용하여 루시퍼라제에 들어가 있는 스폰지를 통째로 잘라낸 뒤 pcDNA™5/FRT/TO의 EcoO109I site에 클로닝 하였고 RFP는 HindIII-XhoI site를 통하여 들어가 있는 벡터를 사용하였다.

[0081] **<3-2> 유도성 miRNA 스폰지 발현 세포주의 확립**

[0082] 실시예 <3-1>에 의해 제작된 유도성 벡터는 테트라사이클린(tetracyclin)에 의하여 발현이 유도되는 특징을 가지고 있으며, FRT 사이트를 이용하여 Flp-In™ T-REx™ 293 세포라는 세포주에 one copy만 삽입됨으로써 clonal variation이 없는 안정적인 발현이 이루어지도록 설계되어 있다. 따라서 위 벡터를 트랜스펙션한 후 선별마커인 하이그로마이신(hygromycin)을 이용하여 안정적으로 스폰지를 발현하는 세포주를 확립하였다. 이렇게 완성된 세포주에서 스폰지가 잘 발현되는지 확인하기 위하여 독시사이클린(doxycycline)을 배지에 첨가한 후 RFP의 발현을 형광 현미경으로 관찰하였다(도 11). 도 11에서 볼 수 있는 바와 같이, 독시사이클린(doxycycline)에 의해 RFP 발현이 매우 강력하게 증가하는 것을 확인할 수 있으며, perfect match 스폰지를 삽입한 경우(PF1 및 PF2)에는 RFP만 발현된 경우에 비하여 형광의 강도가 감소됨을 확인할 수 있다. 이는 상기 실시예 <2-2>의 루시퍼라제 어세이에서 관찰한 결과와 일치하며, 웨스턴 블랏팅 분석에서도 같은 결과를 확인하였다.

[0083] **<3-3> 타겟 miRNA에 대한 특이적 저해 효과**

[0084] 위 유도성 miRNA 스폰지 발현벡터에 의한 타겟 miRNA들의 동시 저해 효과를 확인하기 위하여, 타겟 miRNA의 발현수준을 직접 정량하는 real-time PCR과, miRNA의 활성을 측정하는 루시퍼라제 어세이를 수행하였다.

[0085] 그 결과, miRNA 스폰지의 발현으로 인하여 4개의 타겟 miRNA의 발현양이 60-90% 정도 감소하는 것을 확인하였으며(도 12), 루시퍼라제 어세이에서도 독시사이클린에 의한 스폰지 발현 유도로 각 miRNA의 기능적 저해가 일어나 루시퍼라제 리포터의 활성도가 2-2.5배 증가하는 것을 확인하였다(도 13).

[0086] 또한, miRNA 스폰지의 특이성을 검증하기 위하여 실시예 <1-2>에 기재된 바이오인포매틱스 분석 결과(도 3)에서 나타난 miRNA 결합 후보들 중 결합력(affinity)이 높을 것으로 예상되는 4개의 miRNA들을 선별하여 스폰지가 발현되었을 때의 발현 변화를 모니터링하였다. 그 결과, miRNA 스폰지의 발현은 위 miRNA들의 발현에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었으며(도 14), 이는 본 발명의 miRNA 스폰지가 타겟 miRNA를 특이적으로 저해함을 보여준다.

[0087] 또한, miRNA 스폰지의 기본적 성능을 최종적으로 검증하기 위하여 타겟 miRNA의 타겟 단백질들의 양적 변화를 측정하는 실험을 수행하였다. 4가지 miRNA를 동시에 저해할 수 있는 유도성 스폰지를 세포에 도입한 후 독시사이클린을 처리하여 miRNA 스폰지를 유도한 후, 4가지 miRNA 각각의 알려진 표적 단백질들을 선별하여 웨스턴 블랏팅 분석으로 그 발현양을 조사하였다.

[0088] 그 결과, miR-21의 타겟인 SRC3, ATF2 및 Bcl2의 증가가 관찰되었고, miR-155의 타겟인 Cyr61, miR-221/222의 타겟인 ER-a 및 Stat5 단백질의 양적 증가가 관찰되었다(도 15).

[0089] 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 본 발명의 miRNA 스폰지의 유도에 의하여 4가지 miRNA의 타겟들이 동시에 증가하는 것을 알 수 있으며, 이는 제작된 miRNA 스폰지가 성공적으로 miRNA들을 저해하고 있다는 것을 증명한다.

[0090] **<3-4> 항암제 감수성 증가 효과**

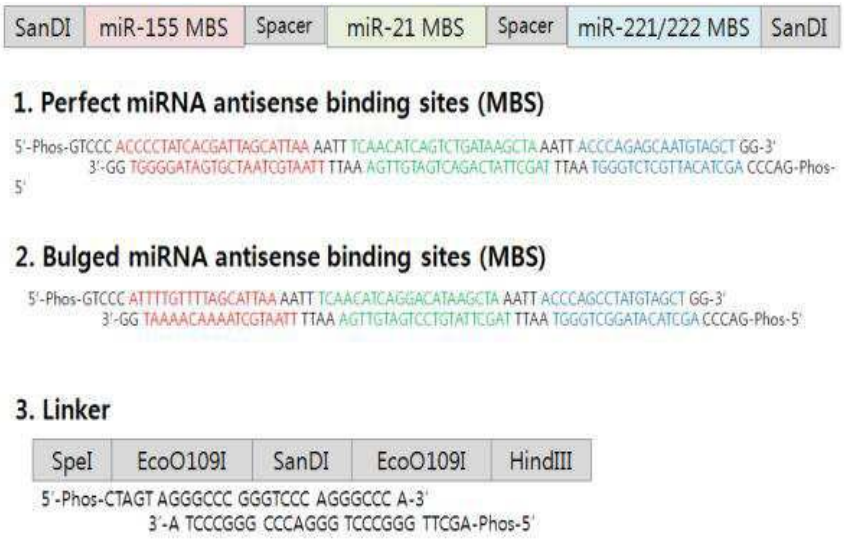
[0091] 위 실험에서 밝혀진 바와 같이 본 발명의 miRNA 스폰지는 성공적으로 발암성 miRNA를 저해하므로, 이를 통하여 암세포의 성장 억제 효과를 가져올 것으로 예측되었다. 이를 증명하기 위하여 본 발명의 miRNA 스폰지를 발현시키고 항암제인 사이클로포스파미드(Cyclophosphamide)를 암세포(HEK293;Human Embryonic Kidney

cell) 에 처리한 뒤 감수성을 측정한 결과, 대조군(RFP)에 비하여 PF 스폰지를 발현시킨 경우 항암제에 대한 세포의 반응이 유의미하게 변화하는 것을 확인할 수 있었다(도 16).

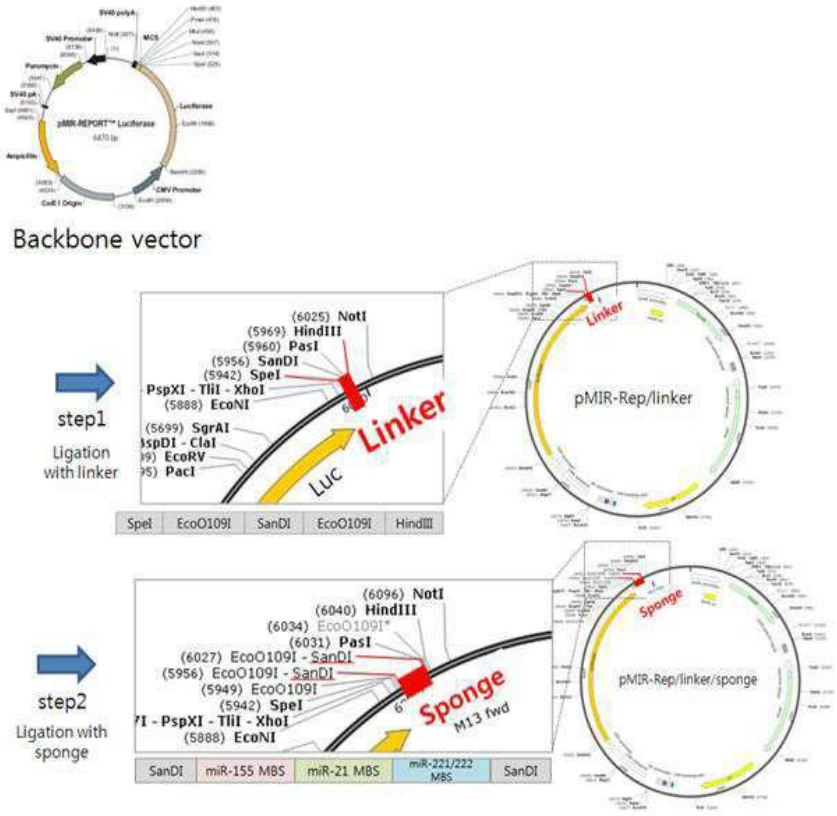
[0092] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2


Backbone vector
step1
Ligation with linker
(6025) NotI
(5969) HindIII
(5960) PasI
(5956) SanDI
(5942) SpeI
PspXI - TliI - XhoI
(5888) EcoNI
(5699) SgrAI
AspDI - ClaI
EcoRV
PacI
Linker
Luc
SpeI
EcoO109I
SanDI
EcoO109I
HindIII
pMIR-Rep/linker
step2
Ligation with sponge
(6096) NotI
(6040) HindIII
(6034) EcoO109I*
(6031) PasI
(6027) EcoO109I - SanDI
(5956) EcoO109I - SanDI
(5949) EcoO109I
(5942) SpeI
PspXI - TliI - XhoI
(5888) EcoNI
Sponge
M13 fwd
SanDI
miR-155 MBS
miR-21 MBS
miR-221/222 MBS
SanDI
pMIR-Rep/linker/sponge

도면3

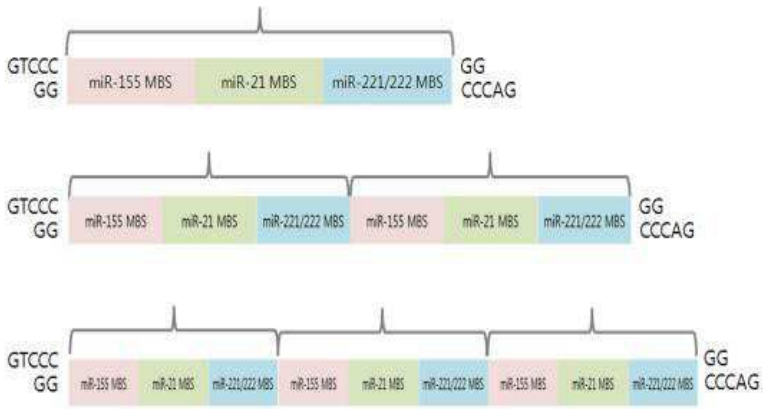
A. Perfectly matched sponge sequence

microRNA	Position	Seed	dGduplex	dGopen	ddG
hsa-miR-155	20	8:0:0	-38.5	-3.22	-35.27
hsa-miR-21	46	8:0:0	-35.5	-6.17	-29.32
hsa-miR-221	68	8:0:0	-25.6	-7.11	-18.48
hsa-miR-222	68	8:1:0	-24	-7.11	-16.88
hsa-miR-760	61	8:1:0	-20.99	-8.41	-12.57
hsa-miR-361-5p	42	8:1:0	-15.2	-3.4	-11.79
hsa-miR-103	68	8:1:1	-16.1	-7.11	-8.98
hsa-miR-107	68	8:1:1	-16.1	-7.11	-8.98
hsa-miR-1304	21	8:1:1	-11.8	-2.82	-8.97
hsa-miR-330-5p	59	8:1:0	-16.7	-8.64	-8.05
hsa-miR-612	57	8:1:1	-15.4	-7.42	-7.97
hsa-miR-1322	21	8:1:1	-10.5	-2.82	-7.67
hsa-miR-23a	67	8:1:1	-14.8	-7.16	-7.63
hsa-miR-23b	67	8:1:1	-14.8	-7.16	-7.63
hsa-miR-151-3p	39	8:0:1	-11.9	-4.36	-7.53
hsa-miR-1262	56	8:1:1	-13.7	-6.47	-7.22
hsa-miR-196b	55	8:1:1	-13.6	-6.46	-7.13
hsa-miR-1267	32	8:1:0	-10	-3.5	-6.49
hsa-miR-1290	27	8:1:1	-8.5	-3.03	-5.46

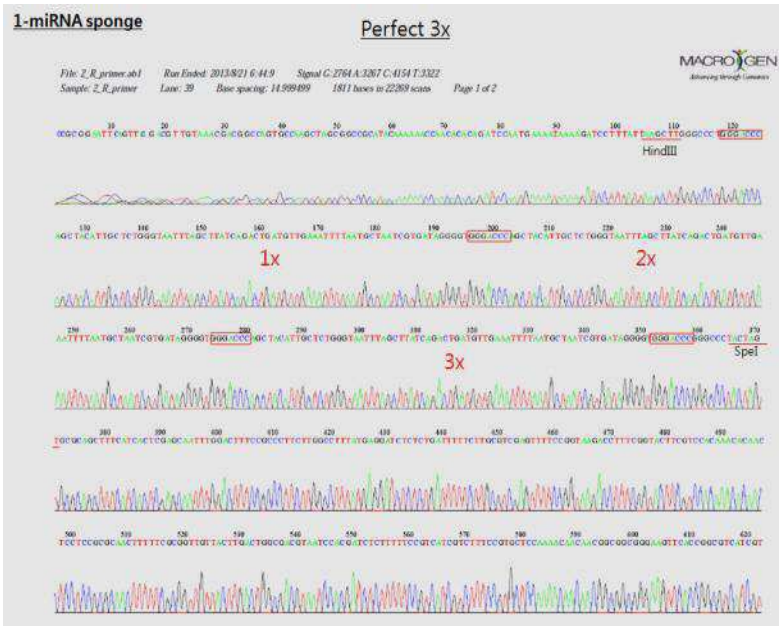
B. Bulged sponge sequence

microRNA	Position	Seed	dGduplex	dGopen	ddG
hsa-miR-21	40	8:1:0	-22	-5.02	-16.97
hsa-miR-221	61	8:1:0	-22	-8.49	-13.5
hsa-miR-222	61	8:1:0	-21	-8.49	-12.5
hsa-miR-155	15	8:0:0	-16.3	-4.07	-12.22
hsa-miR-196b	49	8:1:1	-19	-9.03	-9.96
hsa-miR-485-5p	55	8:1:0	-18.29	-9.19	-9.09
hsa-miR-1304	16	8:1:1	-12.7	-4.08	-8.61
hsa-miR-138	39	8:1:1	-13.6	-5.04	-8.55
hsa-miR-138	31	8:1:1	-13.87	-5.67	-8.19
hsa-miR-532-5p	35	8:1:1	-9.9	-1.78	-8.11
hsa-miR-612	51	8:1:1	-16.7	-9.08	-7.61
hsa-miR-874	34	8:1:1	-11.74	-4.24	-7.49
hsa-miR-758	37	8:1:1	-11.3	-4.19	-7.1
hsa-miR-645	56	8:1:0	-15.7	-9.19	-6.5
hsa-miR-448	59	8:1:1	-14.5	-8.45	-6.04
hsa-miR-567	37	8:1:1	-10	-4.19	-5.8
hsa-miR-602	58	8:1:1	-14.02	-8.32	-5.69
hsa-miR-1267	27	8:1:0	-9.2	-3.65	-5.54
hsa-miR-590-5p	40	8:1:0	-10.4	-5.02	-5.37

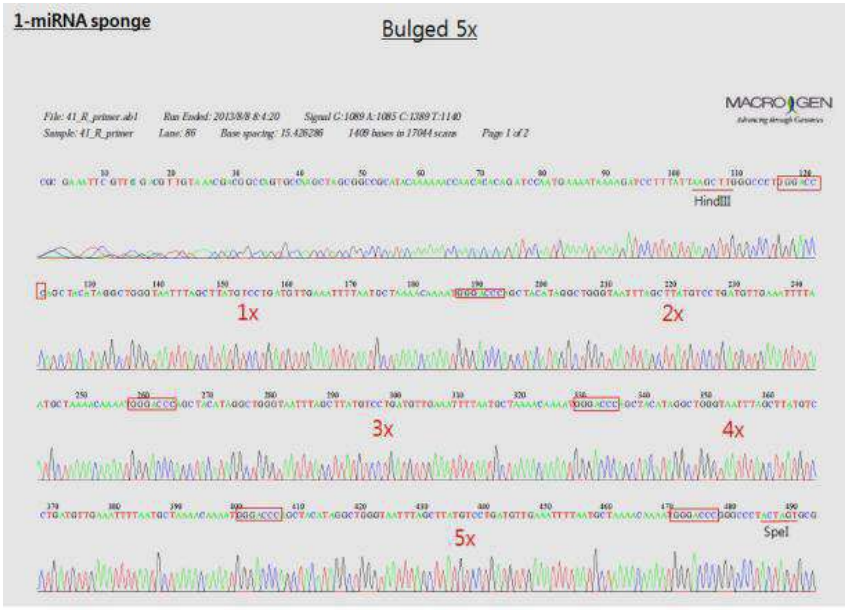
도면4



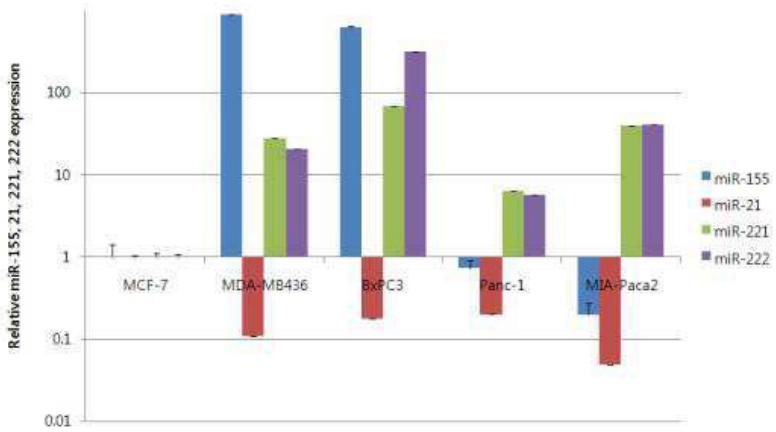
도면5a


1-miRNA sponge
Perfect 3x
MACROGEN
HindIII
1x
2x
3x
SpeI

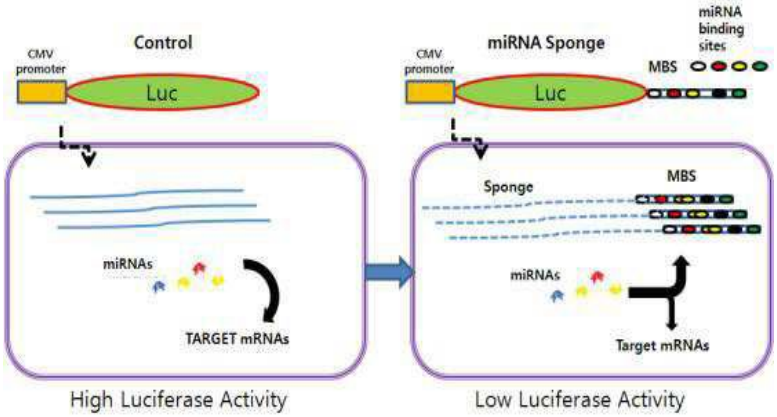
도면5b


1-miRNA sponge
Bulged 5x
MACROGEN
HindIII
1x
2x
3x
4x
5x
SpeI

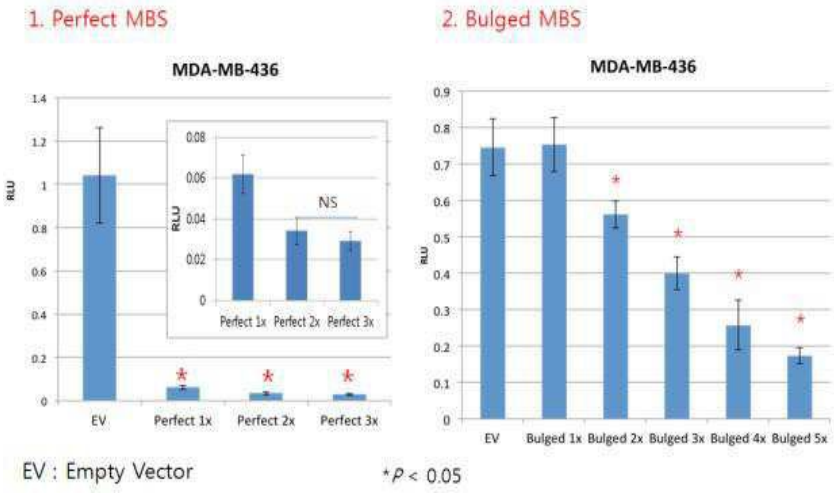
도면6



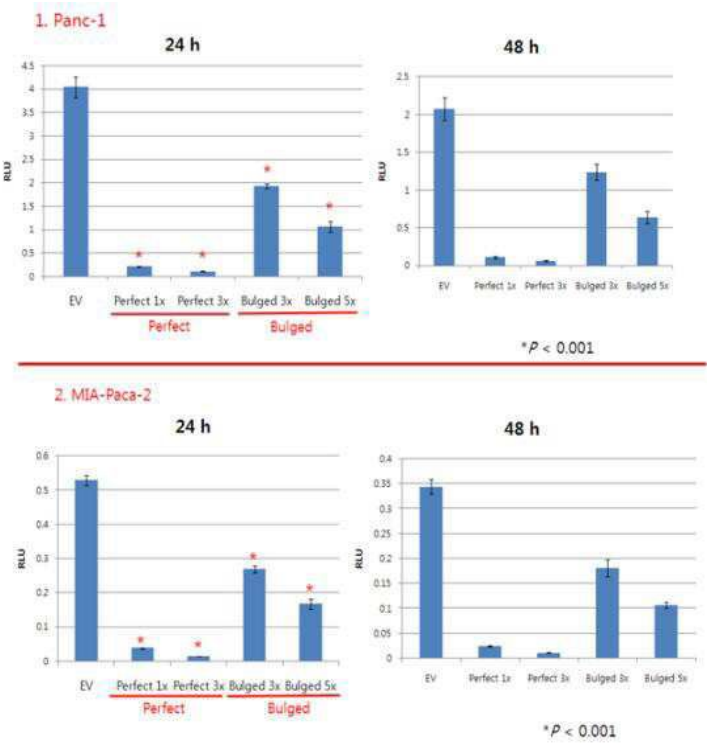
도면7a



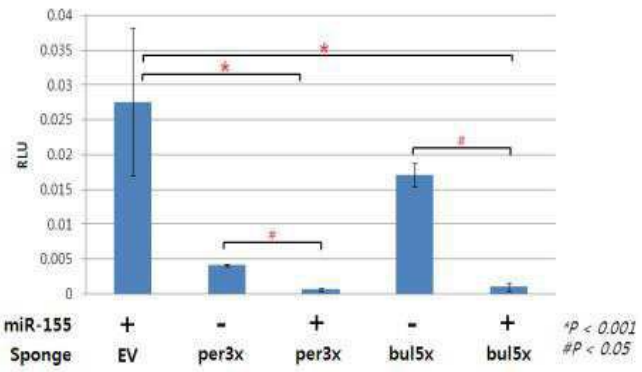
도면7b



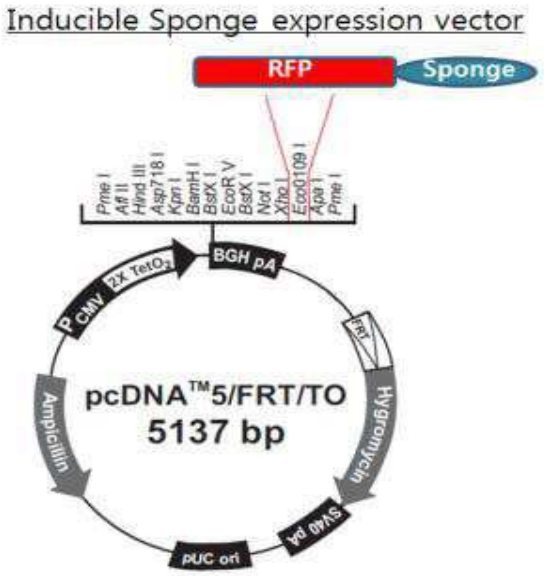
도면8


1. Panc-1
24 h
48 h
RLU
EV
Perfect 1x
Perfect 3x
Bulged 3x
Bulged 5x
Perfect
Bulged
*P < 0.001
2. MIA-Paca-2
24 h
48 h
RLU
EV
Perfect 1x
Perfect 3x
Bulged 3x
Bulged 5x
Perfect
Bulged
*P < 0.001

도면9


RLU
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
miR-155 + - + - +
Sponge EV per3x per3x bul5x bul5x
*P < 0.001
#P < 0.05

도면10


Inducible Sponge expression vector
RFP
Sponge
Pme I
Afl II
Hind III
Asp718 I
Kpn I
BamH I
BstX I
EcoR V
BstX I
Not I
Xho I
Eco0109 I
Apa I
Pme I
P CMV
2X TetO2
BGH pA
FRT
Hygromycin
SV40 pA
pUC ori
Ampicillin
pcDNA™5/FRT/TO
5137 bp