



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0057022
(43) 공개일자 2010년05월28일

- (51) Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
- (21) 출원번호 10-2010-7004664
- (22) 출원일자(국제출원일자) 2008년07월31일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2010년03월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2008/071837
- (87) 국제공개번호 WO 2009/018492
국제공개일자 2009년02월05일
- (30) 우선권주장
60/952,911 2007년07월31일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
보드 오브 리전츠 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 텍사스 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트 201
- (72) 발명자
올슨 에릭
미국 텍사스 75225 텔라스 3219 사우스웨스턴
반 루이 에바
미국 텍사스 75206 텔라스 1311 8610 사우스웨스턴 블루바드
- (74) 대리인
김용인, 석혜선

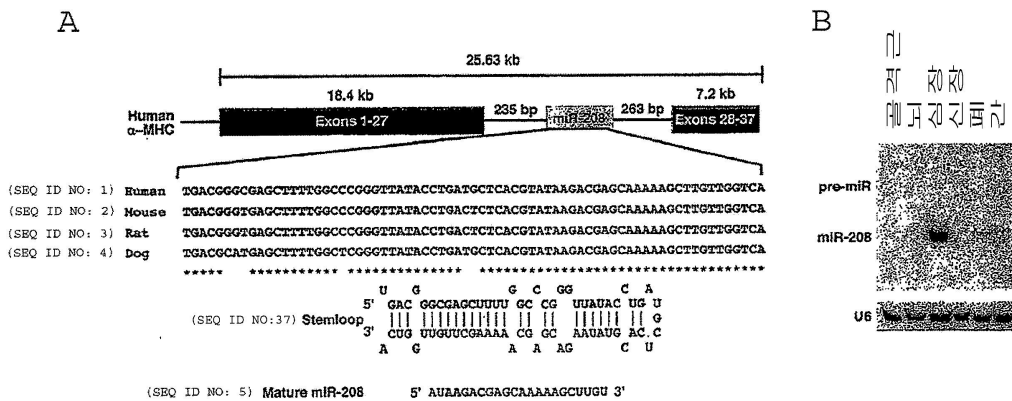
전체 청구항 수 : 총 83 항

(54) 마이오신 발현 및 근섬유 동일성을 제어하는 마이크로-RNA S

(57) 요약

본 발명은 빠른 골격근 수축성 단백질 유전자들을 억제하는 두 microRNAs, miR-499 및 miR-208b의 동정에 관한 것이다. miR-499 및/또는 miR-208b의 발현은 근골격 질환의 치료에서 빠른 섬유 유전자들을 억제하고 느린 섬유 유전자들을 활성화하는데 사용될 수 있다. miR-499 및/또는 miR-208b를 억제하는 것이 심비대, 심근 경색 및/또는 심부전의 치료로 제안된다. miR-499 및 miR-208b 기능의 길항제 및 효현제를 포함하는 약학적 조성물도 개시된다.

대표도 - 도1



(30) 우선권주장

60/980,113 2007년10월15일 미국(US)

60/980,314 2007년10월16일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 심비대, 심부전 또는 심근 경색을 가진 피험자를 확인하는 단계; 및
- (b) 상기 피험자의 심장 세포들에서 miR-499 또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함하여 필요한 피험자의 심비대, 심부전 또는 심근 경색을 치료하는 방법.

청구항 2

- 제 1 항에 있어서,
억제하는 단계는 상기 피험자에게 miR-499 또는 miR-208b의 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 3

- 제 2 항에 있어서,
miR-499 또는 miR-208b의 억제제는 안타고미르, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 억제성 RNA 분자인 방법.

청구항 4

- 제 3 항에 있어서,
안타고미르 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miR-499 또는 miR-208b 서열에 상보적인 서열을 포함하는 방법.

청구항 5

- 제 4 항에 있어서,
안타고미르 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 26 또는 SEQ ID NO: 27에 상보적인 서열을 포함하는 방법.

청구항 6

- 제 3 항에 있어서,
억제성 RNA 분자는 성숙한 miR-499 또는 miR-208b 서열과 실질적으로 동일한 서열을 포함하는 이중 가닥 부위를 포함하는 방법.

청구항 7

- 제 6 항에 있어서,
이중 가닥 부위는 SEQ ID NO: 26 또는 SEQ ID NO: 27과 실질적으로 동일한 서열을 포함하는 방법.

청구항 8

- 제 2 항에 있어서,
miR-499 또는 miR-208b의 억제제는 비경구 투여 또는 심장 조직에 직접 주사로 투여되는 방법.

청구항 9

- 제 8 항에 있어서,
비경구 투여는 정맥 또는 피하인 방법.

청구항 10

- 제 2 항에 있어서,

miR-499 또는 miR-208b의 억제제는 경구, 경피, 서방형 방출, 제어형 방출, 지연형 방출, 좌약 또는 설하 투여에 의해 투여되는 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서,
miR-499 및 miR-208b의 발현 또는 활성은 억제되는 방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서,
상기 피험자에게 보조 심비대 치료제를 투여하는 더 단계를 포함하는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,
상기 보조 치료제는 베타 차단제, 수축촉진제, 이뇨제, ACE-I, AII 길항제, BNP, Ca⁺⁺-차단제, 엔도텔린 수용체 길항제 및 HDAC 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서,
상기 보조 치료제는 miR-499 또는 miR-208b의 억제제와 동시에 투여되는 방법.

청구항 15

제 12 항에 있어서,
상기 보조 치료제는 miR-499 또는 miR-208b의 억제제 이전 또는 이후에 투여되는 방법.

청구항 16

제 1 항에 있어서,
병적 심비대, 심부전 또는 심근 경색 중 하나 이상의 증상이 miR-499 또는 miR-208b의 억제제의 투여 후 피험자에서 개선되는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서,
상기 하나 이상의 개선된 증상은 증가된 운동 능력, 증가된 심장 분출량, 감소된 좌심실 이완 말기압, 감소된 폐 모세혈관 췌기압, 증가된 심장 출력 또는 심장 지수, 낮아진 폐 동맥압, 감소된 좌심실 수축 및 이온 말기 지수, 감소된 심장 섬유증, 심장 근육에서 감소된 콜라겐 침착, 감소된 좌심실 및 우심실 벽 스트레스, 감소된 벽 장력, 증가된 삶의 질, 감소된 질환 관련 발병률 또는 사망률 또는 이의 조합인 방법.

청구항 18

제 2 항에 있어서,
miR-499 또는 miR-208b의 억제제의 투여는 피험자에서 심비대로부터 심부전으로의 전환을 지연시키는 방법.

청구항 19

- (a) 병적 심비대 또는 심부전이 발생할 위험이 있는 피험자를 확인하는 단계; 및
- (b) 상기 피험자의 심장 세포들에서 miR-499 또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함하여 필요한 환자의 병적 비대 또는 심부전을 예방하는 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

억제하는 단계는 심장 세포들에 miR-499 또는 miR-208b의 억제제를 전달하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

miR-499 또는 miR-208b의 억제제는 안타고미르, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 억제성 RNA 분자인 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

안타고미르 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miR-499 또는 miR-208b 서열에 상보적인 서열을 포함하는 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

안타고미르 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 26 또는 SEQ ID NO: 27에 상보적인 서열을 포함하는 방법.

청구항 24

제 21 항에 있어서,

억제성 RNA 분자는 성숙한 miR-499 또는 miR-208b 서열과 실질적으로 동일한 서열을 포함하는 이중 가닥 부위를 포함하는 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서,

이중 가닥 부위는 SEQ ID NO: 26 또는 SEQ ID NO: 27과 실질적으로 동일한 서열을 포함하는 방법.

청구항 26

제 19 항에 있어서,

위험에 직면한 피험자는 장기간 지속된 제어되지 않은 고혈압, 치료되지 않은 관막질환, 만성 양기나, 급성 심근경색, 심장 질환에 대한 선천적 소인 및 병적 비대로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 위험 인자를 나타내는 방법.

청구항 27

제 19 항에 있어서,

위험에 직면한 피험자는 심비대에 대한 선천적 소인을 갖는 것으로 진단되는 방법.

청구항 28

제 19 항에 있어서,

위험에 직면한 피험자는 심비대의 가족력을 갖는 방법.

청구항 29

세포들이 기능성 miR-499 또는 miR-208b를 발현하는데 실패하는 형질전환된 비-인간 포유류.

청구항 30

제 29 항에 있어서,

상기 포유류는 생쥐인 형질전환 포유류.

청구항 31

세포들이 상기 비인간 포유류의 세포들에서 활성인 이형 프로모터의 제어하에서 miR-499 또는 miR-208b 암호화 부위를 포함하는 형질전환된 비-인간 포유류.

청구항 32

제 31 항에 있어서,

상기 포유류는 생쥐인 형질전환 포유류.

청구항 33

제 31 항에 있어서,

상기 프로모터는 조직 특이적 프로모터인 형질전환 포유류.

청구항 34

제 33 항에 있어서,

조직 특이적 프로모터는 근육 특이적 프로모터인 형질전환 포유류.

청구항 35

제 33 항에 있어서,

조직 특이적 프로모터는 심근 특이적 프로모터인 형질전환 포유류.

청구항 36

하나 또는 둘 다의 고유 miR-499 대립형질유전자 및/또는 miR-29b 및/또는 하나 또는 둘 다의 고유 miR-208b의 대립형질유전자가 없는 형질전환된 비인간 포유류 세포.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

고유 miR-499 대립형질유전자 및/또는 고유 miR-208b의 대립형질유전자의 전부가 없는 세포.

청구항 38

피험자의 심장 세포들에서 miR-499 또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함하여 필요한 피험자의 심비대 및 확장성 심근병증을 예방하는 방법.

청구항 39

피험자의 심장 세포들에 miR-499 또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하여 필요한 피험자의 심비대의 진행을 억제하는 방법.

청구항 40

(a) 근골격 질환을 갖거나 위험이 있는 피험자를 확인하는 단계; 및

(b) 피험자의 골격근 세포에서 miR-499 또는 miR-208b의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하여 피험자의 근골격 질환을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

상기 근골격 질환은 불용성 위축, 항-중력에 반응하는 근 소실 및 탈신경으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 42

제 40 항에 있어서,

miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 단계는 상기 피험자에 성숙한 miR-499 및/또는 성숙한 miR-208b 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 43

제 42 항에 있어서,

폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 26 또는 SEQ ID NO: 27의 서열을 포함하는 방법.

청구항 44

제 40 항에 있어서,

miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 단계는 상기 피험자에게 miR-499 및/또는 miR-208b를 암호화하는 발현 벡터를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 45

제 44 항에 있어서,

발현 벡터는 바이러스 발현 벡터인 방법.

청구항 46

제 45 항에 있어서,

바이러스 발현 벡터는 아데노바이러스 발현 벡터인 방법.

청구항 47

제 44 항에 있어서,

발현 벡터는 비 바이러스성 발현 벡터인 방법.

청구항 48

제 47 항에 있어서,

비 바이러스성 발현 벡터는 지질 운반체 내에 포함되는 방법.

청구항 49

제 42 항에 있어서,

폴리뉴클레오티드는 지질 운반체 내에 포함되는 방법.

청구항 50

제 40 항에 있어서,

miR-499 및 miR-208b의 발현 및/또는 활성은 상기 피험자의 골격근 세포들에서 증가하는 방법.

청구항 51

제 40 항에 있어서,

상기 골격근 세포들에서 하나 이상의 빠른 골격근 유전자들의 발현은 miR-499 및 miR-208b의 발현 또는 활성이 증가한 후 감소하는 방법.

청구항 52

제 51 항에 있어서,

하나 이상의 빠른 골격근 유전자는 트로포닌 I2, 트로포닌 T3, 빠른 골격근 마이오신 경사슬 및 알파 골격 액틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 53

제 40 항에 있어서,

피험자에게 비-miR-499 또는 miR-208b 치료제를 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 54

(a) 세포와 후보 물질을 접촉시키는 단계;

(b) miR-499 및/또는 miR-208b 활성 또는 발현을 측정하는 단계; 및

(c) 단계(b)에서의 활성 또는 발현과 후보 화합물의 부존재하에서 활성 또는 발현을 비교하는 단계를 포함하며, 측정된 활성 또는 발현 사이의 차이가 후보 물질이 miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제라는 것을 나타내는 miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제를 동정하는 방법.

청구항 55

제 54 항에 있어서,

세포는 인비트로로 후보 물질과 접촉되는 방법.

청구항 56

제 54 항에 있어서,

세포는 인비보로 후보 물질과 접촉되는 방법.

청구항 57

제 54 항에 있어서,

miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제는 miR-499 및/또는 miR-208b의 효현제인 방법.

청구항 58

제 54 항에 있어서,

miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제는 miR-499 및/또는 miR-208b의 길항제인 방법.

청구항 59

제 54 항에 있어서,

상기 후보 물질은 펩타이드, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오티드, 또는 소형 분자인 방법.

청구항 60

제 54 항에 있어서,

miR-499 및/또는 miR-208b 활성 또는 발현을 측정하는 단계는 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 61

제 60 항에 있어서,

miR-499 및/또는 miR-208b의 발현을 측정하는 단계는 노던 블러팅 또는 RT-PCR를 포함하는 방법.

청구항 62

제 54 항에 있어서,

miR-499 및/또는 miR-208b 활성 또는 발현을 측정하는 단계는 miR-499 및/또는 miR-208b의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 63

제 62 항에 있어서,

miR-499 및/또는 miR-208b의 활성을 측정하는 단계는 miR-499 및/또는 miR-208b에 의해 조절된 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 64

제 63 항에 있어서,

miR-499에 의해 조절되는 유전자는 β -마이오신 중사슬 또는 빠른 골격근 단백질 유전자인 방법.

청구항 65

제 63 항에 있어서,

miR-208b에 의해 조절되는 유전자는 Sp3, 마이오스타틴, PUR베타, THRAP1 또는 빠른 골격근 단백질 유전자인 방법.

청구항 66

제 64 항 또는 제 65 항에 있어서,

빠른 골격근 단백질 유전자는 트로포닌 I2, 트로포닌 T3, 빠른 골격근 마이오신 경사슬 또는 알파 골격 액틴인 방법.

청구항 67

제 62 항에 있어서,

miR-499 및/또는 miR-208b의 활성을 측정하는 단계는 α -마이오신 중사슬 발현 수준과 β -마이오신 중사슬 발현 수준의 비를 측정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 68

miR-499 및/또는 miR-208b의 억제제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 69

제 68 항에 있어서,

상기 억제제는 안타고미르, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 억제성 RNA 분자인 약학적 조성물.

청구항 70

제 69 항에 있어서,

안타고미르 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miR-499 또는 miR-208b 서열에 상보적인 서열을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 71

제 70 항에 있어서,

안타고미르 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 26 또는 SEQ ID NO: 27에 상보적인 서열을 포함하

는 약학적 조성물.

청구항 72

제 69 항에 있어서,

억제성 RNA 분자는 성숙한 miR-499 또는 miR-208b 서열과 실질적으로 동일한 서열을 포함하는 이중 가닥 부위를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 73

제 72 항에 있어서,

이중 가닥 부위는 SEQ ID NO: 26 또는 SEQ ID NO: 27과 실질적으로 동일한 서열을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 74

제 68 항에 있어서,

상기 조성물은 miR-499의 억제제 및 miR-208b의 억제제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 75

제 68 항에 있어서,

조성물은 주사용으로 제제화되는 약학적 조성물.

청구항 76

제 68 항에 있어서,

비경구 투여를 위해 키트와 결합된 약학적 조성물.

청구항 77

제 76 항에 있어서,

비경구 투여는 정맥 또는 피하인 약학적 조성물.

청구항 78

제 68 항에 있어서,

카테테르 투여를 위해 키트와 결합된 약학적 조성물.

청구항 79

miR-499 또는 miR-208b의 성숙한 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 80

제 79 항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터 내에 포함되는 약학적 조성물.

청구항 81

제 79 항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 26 또는 SEQ ID NO: 27의 서열을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 82

제 79 항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 지질 전달 운반체에 포함되는 약학적 조성물.

청구항 83

제 79 항에 있어서,

상기 조성물은 miR-499 및 miR-208b의 성숙한 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 발달 생물학 및 분자 생물학의 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 심근세포 및 골격근 세포에서 유전자 조절 및 세포 생리학에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 구체적으로, β -마이오신 중사슬(β -MHC)의 발현을 감소시키는 MEF2-의존성 miRNA 뿐만 아니라 β -MHC와 공동 발현되는 제 2 miRNA의 억제에 관한 것이다. 이런 miRNA의 억제는 심비대와 심부전의 치료를 제공한다. 속근 대 지근 섬유 변화가 필요한 근골격계 질환을 치료하기 위해 이런 두 miRNA의 상승 조절(up-regulation)도 고려한다.

배경기술

[0002] 관상동맥질환, 심근경색, 울혈성 심부전 및 심비대를 포함하는 심장 질환 및 이의 징후는 오늘날 미국에서 주요 건강 위협을 분명히 제공한다. 이런 질환들을 앓고 있는 환자들을 진단, 치료 및 지원하기 위한 비용은 수십억 달러에 달한다. 심장 질환의 두 개의 구체적인 심각한 징후는 심근경색과 심비대이다. 심근경색의 경우, 통상적으로 급성 혈전성 관상동맥 폐색은 죽상경화증의 결과로 관상 동맥에서 발생하여 심근 세포 사망을 일으킨다. 심근세포인 심장 근육 세포는 마지막으로 분화하여 일반적으로 세포 분할할 수 없기 때문에, 이들은 급성 심근경색이 진행되는 동안 사망하는 경우 일반적으로 상처 조직으로 대체된다. 상처 조직은 수축되지 않고, 심장 기능에 영향을 주지 못하고 심장 수축 동안 팽창하거나, 예를 들어, 비대되어 심실의 크기 및 유효 반경을 증가시킴으로써 심장 기능에 해로운 역할을 주로 한다. 비록 최초 콜라겐 침착은 경색 치료하고 심장 파열을 예방하는데 필요할지라도, 섬유증에 의한 콜라겐의 연속적인 생산은 경색 경계대에서 심근 주위에 간질성 섬유증 및 경색된 심장의 원격 심근을 유도한다. 이 섬유증은 스트레스가 증가함으로써 경화, 확장기 기능이상 및 심근 비대를 유도하고 또한 부정맥을 일으킬 수 있다.

[0003] 심비대와 관련하여, 한 이론은 심비대를 비정상적 성장과 유사한 질환으로 생각하며, 심장에서 성장 신호들이 비대 질환에 영향을 줄 수 있는 지에 대한 질문을 일으킨다. 심비대는 고혈압, 기계적 부하, 심근경색, 심부정맥, 내분비 장애 및 심장 수축 단백질 유전자에서 유전자 돌연변이로부터 발생한 것들을 포함하는 거의 모든 형태의 심장 질환에 대한 심장의 적응반응이다. 비대 반응은 심장 출력을 증가하는 최초로 보상 메커니즘인 반면에, 지속성 비대는 확장성 심근병증(DCM), 심부전 및 돌연사를 유도할 수 있다. 미국에서, 대략 50만 명이 매년 심부전으로 진단되며, 사망률은 50%에 달하고 있다. 심비대의 원인 및 효과는 광범위하게 증거가 제공되었으나, 기본적인 분자 메커니즘은 설명되지 않았다. 이런 메커니즘을 이해하는 것은 심장 질환의 예방 및 치료에서 주요 관심사이고 심비대와 심부전을 특이적으로 표적화하는 새로운 약물들의 설계에서 치료 수단으로서 중요할 것이다.

[0004] 약리학적 물질들에 의한 치료는 심부전의 증후를 감소 또는 제거하기 위한 주요 메커니즘을 대표한다. 이뇨제는 경증 및 중증 심부전에 대한 치료의 첫 번째 종류를 구성한다. 만일 이뇨제가 효과 없으면, 안지오텐신 변환 효소(ACE) 억제제(예를 들어, 에날로프릴 및 리시노프릴)와 같은 혈관확장제 또는 수축촉진제 치료(즉, 심장 근육 수축의 힘을 증가시킴으로써 심장 출력을 증가시키는 약물)가 사용될 수 있다. 불행히도, 이런 표준 치료들 중 많은 것이 여러 부작용을 가지며 일부 환자들에서 사용될 수 없다. 따라서, 현재 사용되는 약리학적 물질들은 특정 환자 집단에서는 심각한 단점을 가진다. 새롭고, 안전하고 효과적인 물질들의 이용가능성은 현재 이용가능한 약리학적 수단을 이용할 수 없거나 이런 수단으로부터 적절한 완화를 얻지 못하는 환자들에게 의심할 여지 없이 유익할 것이다.

[0005] 성인 심장에서 α - 대 β -MHC 아이소폼의 비율은 심장 수축의 결정인자이다. 성인 심장에서 주요 마이오신 아이소폼인 β -MHC는 비교적 낮은 ATPase 활성을 나타내는 반면, α -MHC는 높은 ATPase 활성을 나타낸다. 심근 경색, 고혈압 및 다른 질환들과 같은 여러 병적 자극에 반응하여, β -MHC 발현이 증가하는 반면, α -MHC 발현은 근미세섬유 ATPase 활성의 결과적인 감소와 심근섬유의 감소된 수축 속도와 함께 감소하여, 언젠가 발생하는 수축이상을 일으킨다. 현저하게, 심장의 α -MHC 함량의 작은 변화는 심장 기능에 상당한 영향을 줄 수 있다.

[0006] 비정상적인 칼슘 시그널링을 포함하는 여러 시그널링 경로들은 심비대 및 병적 재형성을 일으킨다(Heineke &

Molkentin, 2006). 스트레스에 반응하는 비대 성장은 운동에 반응하여 일어나는 생리학적 비대와 다른 시그널링 경로와 유전자 발현 패턴을 포함한다. 스트레스-매개 심근 비대는 근육 세포 변형 및 사멸을 통해, 심부전에서 주로 정점에 이르는 심장이 섬유화되고, 팽창되고 대상기능장애를 일으키는 뚜렷한 분자적 및 조직학적 특징을 가진 여러 나쁜 결과와 관련이 있는 복잡한 현상이다. 이와 같이, 중요한 분자적 매커니즘을 해석하고 나쁜 심장 성장을 억제하기 위한 새로운 치료적 표적을 발견하는데 대단한 관심이 있어왔다.

[0007] 성인 골격근 섬유들은 특수화된 수축 및 신진대사 특성들을 기초로 하여 속근과 지근으로 분류될 수 있다. 이런 특성들은 마이오신 중사슬 및 경사슬, 트로포마이오신, 및 트로포닌뿐만 아니라 마이오글로빈의 빠른 및 느린 수축 단백질 동질체의 특이적 세트의 발현을 나타낸다(Naya et al., 2000). 지근들은 동작 유지 및 지속적인 운동 활동과 같은 장기간의 활동들에 주로 사용된다. 속근들은 큰 힘을 내는 활동들에 주로 사용된다. 성인 골격근 표현형은 정적이지 않고 대신 하중 지지력과 수축 용도 패턴에서의 변화에 적응하는 능력을 보유하여, 형태, 표현형, 및 수축 특성에 적응을 일으킨다. 예를 들어, 우주 비행의 무중력 환경에서 신체 하중의 제거는 현저한 정도의 근육 위축과 설치류와 인간에 대한 수축성의 느리고 빠른 변화와 신진대사 특성과 관련이 있는 변형된 단백질 표현형을 초래한다(Tsika et al, 2002; Baldwin and Haddad, 2001; Edgerton and Roy, (2000); Fitts et al, 2000).

[0008] 불용성 위축은 근육 사용의 부족에 의한 근육성 위축이다. 조직 위축은 누워만 있는 사람, 팔 다리에 깁스한 사람, 또는 다른 이유로 활동적이지 않은 사람들에게서 통상적으로 나타난다. 또한, 탈신경을 포함하는 근원섬유 전기 활동의 붕괴가 근육 위축을 일으킨다. 짧은 기간의 불사용 후, 근육 위축은 원상으로 되돌릴 수 있다. 그러나, 근육의 과도한 불사용은 골격근 섬유의 영구적인 손실과 결합 조직에 의한 골격근 섬유의 대체가 일어날 수 있다. 골격근에서 빠른 섬유 유전자를 억제하고 느린 섬유 유전자의 상호 발현을 활성화함으로써, 근육 위축의 증상들을 감소하거나 예방할 수 있다는 것이 고려된다. 또한 인슐린 저항성(2형 당뇨병을 가진 환자들에서 보이는 인슐린-자극 글루코스 흡수의 결핍)과 느린 대 빠른 경련 근섬유의 백분율의 양의 상관관계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] MicroRNAs는 다른 것들 중에서 발달 시기, 세포자멸사, 지방 신진대사 및 조혈 세포 분화의 조절을 포함하는 여러 생물학적 과정에 최근 관련이 있다. MicroRNAs(miRs)는 개별 miRNA 유전자, 단백질 암호화 유전자들의 인트론 또는 여러 밀접하게 관련된 miRNAs를 주로 암호화하는 폴리-시스트론 전사물로부터 유도된 길이가 약 18 내지 25 뉴클레오티드의 비-단백질 암호화 RNAs이다. Carrington et al. (2003)의 리뷰 참조. MiRs는 이들의 서열들이 완전히 상보적인 경우, 이들의 분해를 촉진함으로써 또는 이들의 서열들이 미스매치를 포함하는 경우, 전사를 억제함으로써 표적 mRNAs의 리프레서들(repressors)서 작용한다.

[0010] miRNAs는 RNA 폴리머라제 II(pol II) 또는 RNA 폴리머라제 III(pol III; Qi et al. (2006) Cellular & Molecular Immunology Vol.3:411-419 참조)에 의해 전사되고 개개의 miRNA 유전자, 단백질 암호화 유전자의 인트론 또는 여러 개인, 밀접하게 관련된 miRNAs를 주로 암호화하는 폴리-시스트론 전사물로부터 유도될 수 있다. RNA pol II 또는 pol III에 의한 miRNA 유전자들의 전사는 일반적으로 수천 염기 길이인 프라이머리 miRNA 전사물(pri-miRNAs)로 불리는, 최초 전사물을 생산한다. 핵에서, pri-miRNAs는 RNase, 드로샤(Drosha)에 의해 가공되어, 70- 내지 100-뉴클레오티드 헤어핀-모양 전구체(pre-miRNAs)를 생산한다. 세포질로 운반된 후, 헤어핀 pre-miRNA는 이중-가닥 miRNA를 생산하기 위해 다이스에 의해 추가로 가공된다. 성숙한 miRNA 가닥은 RNA-유도 침묵 복합체(RISC) 속에 혼합되어, 여기서 성숙한 miRNA는 염기쌍 상보성에 의해 이의 표적 mRNAs와 결합한다. miRNA 염기쌍들이 mRNA 표적과 완벽하게 일치하는 비교적 드문 경우, 이것이 mRNA 분해를 촉진한다. 더욱 일반적으로, miRNAs는 표적 mRNAs와 불완전한 이형이중가닥을 형성하여 mRNA 번역에 영향을 준다.

[0011] "씨드" 영역으로 불리는 염기 2-8에 걸쳐있는 miRNA의 5'부분은 표적 인식을 위해 특히 중요하다(Krenz and Robbins (2004) J. Am. Coll. Cardiol, Vol.44:2390-2397; Kiriiazis and Kranias (2000) Annu. Rev. Physiol, Vol. 62:321-351). 표적 서열의 계통적 보존과 함께 씨드의 서열은 많은 현재 표적 예측 모델을 위한 기초를 형성한다. 비록 miRNAs 및 이들의 표적을 예측하는 크게 정밀한 컴퓨터적 방법이 사용되고 있지만, 표적 예측은 주요 과제로 남아있고 실험적 정당성을 필요로 한다. 특이적 miRNA 표적의 조절에 대한 miRNAs의 기능을 기술하는 것은 수백의 잠재력 높고 낮은 친화성 miRNA 표적과 염기쌍을 이루는 개별 miRNAs의 능력 및 개별 miRNA에 대한 다중 miRNAs의 표적화에 의해 더 복잡해진다. miRNAs의 기능을 잘 이해하면 정상적인 발달, 분화, 세포내 및 세포간 통신, 세포 주기, 신생혈관형성, 세포자멸사 및 많은 다른 세포 과정에 영향을 주는 조절 네트워크를

틀림없이 보여줄 것이다. 최근에, 본 발명자들은 α -마이오신 중사슬(MHC) 유전자의 인트론에 의해 암호화되고, 심장 스트레스에 반응하여 β -MHC 발현의 상승 조절 및 심장에서 속 골격근 유전자들의 억제에 필요한 심장-특이적 microRNA, miR-208을 보고하였다(전문이 참조로 본 발명에 포함된 공동 출원 WO 2008/016924 참조). 본 발명은 심장뿐만 아니라 다른 조직에서 microRNAs의 관여에도 해당한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명자들은 심장의 성장, 기능 및 스트레스 반응성의 조절제로서 microRNA의 주요 역할을 발견하여, 심장 질환에 대한 밝혀지지 않은 조절 메커니즘과 잠재적 치료 표적을 밝혔다. 따라서, 본 발명은 필요한 피험자의 병적 심비대, 심부전 또는 심근 경색을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시예에서, 이 방법은 심비대, 심부전 또는 심근 경색을 가진 피험자를 확인하는 단계; 및 상기 피험자의 심장 세포들에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 이 방법은 피험자에게 보조 치료제를 투여하는 단계를 더 포함한다. 보조 치료제는 베타 차단제, 수축촉진제, 이노제, ACE-I, AII 길항제, BNP, Ca⁺⁺-차단제, 엔도텔린 수용체 길항제 및 HDAC 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0013] 본 발명의 일부 실시예들에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제하는 단계는 miR-499 및/또는 miR-208b의 안타고미르를 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시예에서, 본 발명은 miR-499 또는 miR-208b 안타고미르를 제공한다. 다른 실시예에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성은 성숙한 miR-499 및/또는 miR-208b 서열을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 투여에 의해 억제된다. 또 다른 실시예에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성은 억제성 RNA 분자를 투여함으로써 억제되고, 여기서 억제성 RNA 분자는 성숙한 miR-499 및/또는 miR-208b와 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 억제성 RNA 분자는 리보자임, siRNA 또는 shRNA 분자일 수 있다.
- [0014] 본 발명은 또한 병적 심비대 또는 심부전의 발생 위험이 있는 피험자를 확인하는 단계 및 상기 피험자의 심장 세포에서 miR-499 또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함하여 필요한 피험자의 병적 비대 또는 심부전을 예방하는 방법을 제공한다. 한 실시예에서, 억제시키는 단계는 miR-499 또는 miR-208b의 억제제를 심장 세포들에 전달하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 위험에 직면한 피험자는 장기간 지속된 제어되지 않은 고혈압, 치료되지 않은 관막질환, 만성 양기나, 급성 심근경색, 심장 질환에 대한 선천적 소인 및 병적 비대로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 위험 인자를 나타낸다.
- [0015] 안타고미르, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 억제성 RNA 분자 또는 miR-499 또는 miR-208b 발현 또는 활성의 다른 조절제는 표적 기관, 조직 또는 세포 타입에 전달하는데 적합한 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 특정 실시예들에서, miR-499 또는 miR-208b의 조절제는 정맥 주사, 관절강내 주사, 복강 주사 또는 피하 주사 또는 조직(예를 들어, 심장 조직 또는 골격근 조직) 속으로의 직접 주사와 같은 비경구 투여로 투여될 수 있다. 일부 실시예들에서, miR-499 또는 miR-208b의 조절제는 경구, 경피, 지속성 방출, 제어된 방출, 지연된 방출, 좌약 또는 설하 투여에 의해 투여될 수 있다. 다른 실시예들에서, miR-499 또는 miR-208b의 조절제는 카테테르 시스템에 의해 투여될 수 있다.
- [0016] 본 발명은 또한 필요한 환자의 근골격 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 고려한다. 한 실시예에서, 이 방법은 근골격 질환을 갖거나 위험이 있는 환자를 확인하는 단계; 및 상기 피험자의 골격근 세포들에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 단계를 포함한다. 근골격 질환은, 예를 들어, 불용성 위축, 항-중력에 반응하는 근 소실 및 탈신경을 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 단계는 상기 피험자에게 성숙한 miR-499 및/또는 성숙한 miR-208b 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 투여하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 단계는 상기 피험자에게 miR-499 및/또는 miR-208b를 암호화하는 발현 벡터를 투여하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 이 방법은 피험자에게 miR-499 또는 miR-208b 치료제를 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0017] 한 실시예에서, 본 발명은 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성의 조절제를 심장 세포 또는 골격근 세포들에 투여하는 단계를 포함하여 심장 또는 골격근 수축성을 조절하는 방법을 제공한다. 다른 실시예에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성의 조절제를 심장 세포에 투여하는 단계를 포함하여 심장 수축성 단백질 유전자 발현을 조절하는 방법이 제공된다. 다른 실시예에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성의 조절제를 골격근 세포에 투여하는 단계를 포함하여 골격근 수축성 단백질 유전자 발현을 조절하는 방법이 제공된다. 또 다른 실시예에서, 본 발명은 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성의 조절제를 골격근 세포에 투

여하는 단계를 포함하여 골격근 세포의 섬유 타입 전환을 유도하는 방법을 제공한다. 조절제는 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성의 효현제 또는 길항제일 수 있다. 일부 실시예들에서, THRAP1, PUR베타, 마이오스타틴(a.k.a. GDF8), Sox 6 및 빠른 수축성 단백질의 발현은 miR-499 억제제를 세포와 접촉시킴으로써 세포에서 증가한다. 다른 실시예들에서, THRAP1, PUR베타, 마이오스타틴(a.k.a. GDF8), Sox 6 및 빠른 수축성 단백질의 발현은 miR-499 효현제를 세포와 접촉시킴으로써 세포에서 감소한다. 다른 실시예에서, Sp3, 마이오스타틴, THRAP1 및 빠른 수축성 단백질의 발현은 miR-208b 억제제를 세포와 접촉시킴으로써 세포에서 증가한다. 또 다른 실시예에서, Sp3, 마이오스타틴, THRAP1 및 빠른 수축성 단백질의 발현은 miR-208b 효현제를 세포와 접촉시킴으로써 세포에서 감소한다. 본 발명의 방법들에 따라 증가하거나 감소하는 빠른 골격근 수축성 단백질 유전자의 예들은 트로포닌 I2; 트로포닌 T3; 마이오신 경사슬 또는 알파 골격 액틴을 포함한다.

[0018] 본 발명은 또한 형질전환된 비-인간 포유류를 포함하며, 이의 세포는 기능성 miR-499 및/또는 miR-208b를 발현 하는데 실패한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 형질전환된 비-인간 포유류를 제공하며, 이의 세포는 상기 비인간 포유류의 세포에서 활성인 이형 프로모터의 제어하에서 miR-499 및/또는 miR-208b 암호화 영역을 포함한다. 일부 실시예들에서, 형질전환 포유류는 생쥐일 수 있다.

[0019] 본 발명은 miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제를 동정하기 위한 방법을 제공한다. 한 실시예에서, 이 발명은 (a) 세포에 후보 물질을 접촉시키는 단계; (b) miR-499 및/또는 miR-208b 활성 또는 발현을 측정하는 단계; 및 (c) 단계(b)에서의 활성 또는 발현과 후보 물질의 부존재하에서의 활성 또는 발현과 비교하는 단계를 포함하고, 측정된 활성들 또는 발현 사이의 차이가 후보 물질이 miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제라는 것을 나타낸다. 세포는 인비트로 또는 인비보로 후보 화합물과 접촉된다. 후보 물질은 펩타이드, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오티드 또는 소형 분자이다. 본 발명의 다른 태양들에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제는 miR-208과 같은 miR-499 및/또는 miR-208b의 상부 조절제의 효현제 또는 길항제일 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한 miR-499 및/또는 miR-208b의 억제제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 억제제는 안타고미르, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 억제성 RNA 분자일 수 있다. 다른 실시예에서, 본 발명은 miR-499 및/또는 miR-208b의 성숙한 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 빠른 골격근 수축성 단백질 유전자들을 억제하는 두 microRNAs, miR-499 및 miR-208b의 동정에 관한 것이다. miR-499 및/또는 miR-208b의 발현은 근골격 질환의 치료에서 빠른 섬유 유전자들을 억제하고 느린 섬유 유전자들을 활성화하는데 사용될 수 있다. miR-499 및/또는 miR-208b을 억제하는 것이 심비대, 심근 경색 및/또는 심부전의 치료로 제안된다. miR-499 및 miR-208b 기능의 길항제 및 효현제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0022] 본 발명은 구체적인 실시예들의 상세한 설명과 함께 하나 이상의 도면을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1a-b. miR-208은 α-MHC 유전자에 의해 암호화되고 심장에서 특이적으로 발현된다. (도 1a) miR-208은 α-MHC 유전자의 인트론 내에서 암호화된다. 별표는 서열 보존을 나타낸다(SEQ ID NOS:1-5). (도 1b) 어른 생쥐 조직의 노던 분석에 의한 miR-208 전사물의 탐지. U6mRNA는 부하 대조군으로 작용한다.

도 2a-b. α- 및 β-MHC의 조절. (도 2a) 타이로이드 호르몬 및 TRE에 의한 클래스 스위치의 조절. (도 2b) 속근 섬유 대 지근 섬유 수축성 스위치에서 스트레스/갑상선기능저하증에 대한 모델.

도 3. 인간 심장에서 miR-208의 탐지. α-MHC 및 miR-208에 대한 전사물은 6명 정상인 및 특발성 심근병증을 가진 6명의 심장 조직의 노던 블롯에 의해 탐지되었다. 밀접한 상관관계가 α-MHC 및 pre-miR-208의 발현의 수준 사이에 존재하며, 성숙한 miR-208 발현은 pre-miR-208이 하강 조절된 후 유지된다.

도 4a-b. miR-208 돌연변이 생쥐의 발생. (도 4a) 동형 재조합에 의한 miR-208 돌연변이 생쥐를 발생시키기 위한 전략. pre-miRNA 서열(대부분의 전사물에서 생쥐 α-MHC 유전자의 인트론 29 내에 위치)은 loxP 부위가 옆에 위치한 네오마이신 저항 카세트에 대체되었다. 네오마이신 카세트는 이형접합성 생쥐를 CAG-Cre 전이유전자를 가진 형질전환 생쥐로 품종개량함으로써 생쥐 생식세포에서 제거되었다. (도 4b) 야생형 및 miR-208 돌연변이 생쥐의 심장의 노던 분석에 의한 miR-208 전사물의 탐지.

도 5. 나타난 유전자형의 신생 생쥐의 심장에서 α-MHC 및 β-MHC 단백질 수준의 웨스턴 분석. 각각의 유전자형

의 두 생쥐를 분석하였다. GAPDH는 부하 대조군으로 탐지되었다.

도 6. MiR-208^{-/-} 생쥐는 압력 과부하에 반응하여 감소된 심비대를 나타낸다. 야생형 및 마송 삼색염색법으로 염색된 miR-208^{-/-} 생쥐의 심장의 조직학적 절편. miR-208의 부존재는 21일 동안 흉부대동맥밴딩(TAB)을 받은 야생형 생쥐에서 보여진 비대와 섬유증을 감소시킨다. 스케일 바는 상부 패널에서 2mm이고 하부 패널에서 20 μ m이다.

도 7. MiR-208^{-/-} 생쥐는 칼시네우린 활성화에 반응하여 감소된 심비대를 나타낸다. 칼시네우린 전이유전자(CnA-Tg) 및 miR-208^{-/-}의 심장을 나타내는 6주 된 생쥐의 심장의 조직학적 절편; 마송 삼색염색법으로 염색한 CnA-Tg. miR-208의 부존재는 CnA-Tg 생쥐에서 보여진 비대와 섬유증을 감소시킨다. 스케일 바는 상부 패널에서 2mm이고 하부 패널에서 20 μ m이다.

도 8. MiR-208^{-/-}은 TAB 및 칼시네우린 활성화에 반응하여 β -MHC를 상승 조절하는데 실패한다.

도 9. 어린 야생형 및 miR-208 형질전환 동물에서 α 및 β -MHC 단백질의 웨스턴 분석. GAPDH는 부하 대조군으로 탐지되었다.

도 10. MiR-208^{-/-} 생쥐는 PTU 치료에 의한 갑상선기능저하증에 반응하여 β -MHC를 상승 조절하는데 실패한다.

도 11. β -MHC 발현의 대조군에서 miR-208의 역할의 개략적 다이어그램.

도 12. Thrap 1을 통한 β -MHC 및 속 골격근 유전자 발현의 조절에서 miR-208의 역할의 개략적 다이어그램.

도 13. 심비대 동안 microRNAs의 작용의 매커니즘.

도 14. 야생형, miR-208^{+/-} 및 miR-208^{-/-} 생쥐들의 심장들에서 miR-499의 발현을 나타내는 노던 블롯. 야생형 및 돌연변이 생쥐들에서 Myh7b 뿐만 아니라 miR-208 및 miR-499의 발현 사이에 직접적인 상관관계가 있다.

도 15. Myh7b 좌위 및 그 안의 영역을 암호화하는 miR-499의 위치의 구조.

도 16a-d. miR-208은 심장 myh7b 발현을 조절한다. (도 16a) miR-499와 같이 Myh7b는 심장 및 느린 골격근(넙치근)에서 특이적으로 발현된다 (도 16b) 심장 및 4개 골격근 타입(비복근/족저근(GP), 전경골근(TA), 장족지신전근(EDL) 또는 넙치근)에 대한 miR-499의 실시간 PCR 분석으로 miR-499가 심장과 넙치근에서 지배적으로 발현된다는 것을 확인한다. miR-499에 대한 단지 최소 수준이 TA와 EDL에서 탐지될 수 있다(도 16c). 원위치 잡종화는 배아형성 동안, myh7b가 심장과 체절에서 특이적으로 발현된다는 것을 나타낸다(도 16d). 야생형 및 miR-208 돌연변이 동물에 대한 노던 블롯 분석은 miR-208의 부존재하에서, miR-499의 발현은 심장에서 특이적으로 존재하지 않는 반면, 넙치근에서 여전히 발현된다는 것을 보여준다(하부 블롯).

도 17. 심장 질환을 가진 야생형 생쥐들에서 miR-499의 발현을 나타내는 노던 블롯. MI, 심근경색증, CnA Tg, 칼시네우린 형질전환 생쥐들.

도 18. 심장 근육에서 miR-208에 의한 miR-499의 조절의 개략적인 다이어그램.

도 19. 심장 및 골격 근육에서 miR-208에 의한 miR-499의 조절의 개략적인 다이어그램.

도 20. miR-499는 THRAP1, PUR베타 및 GDF8(a.k.a. 마이오스타틴)을 표적화함으로써 마이오신 스위칭 및 섬유타입 동정을 조절한다.

도 21a-c. α -MHC 발현의 억제는 miR-208의 수준의 감소를 유도한다. (도 21a-b) 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 및 21일에 α - 및 β MHC 전사물의 상대적 발현 레벨. (도 21c) PTU 치료 동안 지정한 시간에서 심장 쥐 조직에서 miR-208의 노던 블롯 분석.

도 22. miR-208 넉아웃에서 빠른 골격 유전자들의 상승조절.

도 23. miR-208 넉아웃 생쥐에서 심장 스트레스 반응 유전자들의 이상.

도 24. 심장 유전자 조절에서 miR-28의 역할에 대한 모델. α -MHC 유전자는 다른 표적들 중에서 THRAP1과 골격근 유전자들의 발현을 음성적으로 조절하는 miR-208을 암호화한다. α - 및 β -MHC 유전자들은 연결되고 miR-208은 스트레스 시그널링 및 PTU에 의한 T3 시그널링에 대한 차단에 반응하여 β -MHC의 상승 조절에 필요하다. α - 및 β -MHC는 각각 빠른 및 느린 수축성을 향상시킨다.

도 25. miR-208의 예측된 표적으로서 THRAP1. THRAP1의 3' UTR에서 추정 miR-208 결합 위치의 서열 정렬은 높은 수준의 상보성과 서열 보존을 보여준다(SEQ ID NOS:6-13).

도 26. 3' UTR THARP1 루시페라제 분석법. THARP1의 3' UTR를 함유하는 루시페라제 유전자의 발현은 miR-126(대조군)이 아닌 miR-208과 코-트랜스펙트된 세포들에서 감소한다.

도 27. miR 208 돌연변이 생쥐의 심장들에서 빠른 골격근 유전자들의 상승 조절.

도 28. Myh7 좌위(β MHC)의 구조 및 구조 내 miR-208b 암호화 영역의 위치(SEQ ID NO: 27 및 SEQ ID NOS 30-36).

도 29a-b. miR-208 및 miR-208b 마이오신 중사슬 유전자(myh6 및 myh7, 즉 α -MHC 및 β -MHC)의 게놈 복제 때문에 개발되었다. miR-208 및 miR-208b는 α -MHC 및 β -MHC(도 29a)와 함께 공동 발현되고 전체 성숙한 miRs가 서열에서 3개 염기 차이가 날 지라도 동형 씨드 영역을 공유한다(도 29b)(SEQ ID NO: 27 및 SEQ ID NO:5).

도 30a-d. myomiRs는 이들의 마이오신 숙주-유전자와 공동 발현되고 공동 조절된다(도 30a). 노던 블롯은 miR-208b는 기본 조건에서 심장에서 매우 낮은 수준으로 발현되고 비복근/족저근(GP), 전경골근(TA) 또는 장족지신전근(EDL)과 같은 빠른 골격근 섬유에서 발현되지 않는다. MiR-208b는 느린 골격근인 넙치근에서 크게 발현된다(도 30b). 나타낸 마이오신 유전자들에 대한 실시간 PCR 분석은 동물에게 PTU-함유 식사를 먹임으로써 갑상선 수용체 시그널링의 차단은 쥐들의 심장 조직에서 α -MHC를 억제하고 β -MHC 발현을 유도한다. 이 효과는 갑상선 호르몬(T3)의 뒤이은 공급에 의해 역전될 수 있다. myh7의 발현은 더 낮은 정도로 β -MHC의 발현 패턴을 반영한다. (도 30c) 출생 직후 β -MHC로부터 더 많은 α -MHC로의 이동이 있다. miR-208이 성인 심장에서 miR-499 활성화에 책임이 있는 반면, p1, p6 및 성인 야생형 및 miR-208 돌연변이 동물들의 심장 샘플들에 대한 노던 블롯 분석은 β -MHC 유전자로부터 얻은 miR-208b의 존재는 miR-208의 부존재하에서도 miR-499 발현을 일으키는데 충분할 것이라는 나타낸다. (도 30d) myomiRs에 대한 노던 블롯 분석은 miR-208b는 miR-208의 부존재하에서 스트레스 시그널링에 반응하여 β -MHC의 감소된 유도를 반영한다는 것을 나타낸다. MiR-208 너아웃 동물들은 스트레스와 갑상선기능저하증에 반응하여 β -MHC에 감소된 증가를 나타낸다. 노던 블롯이 PTU에 반응하여 야생형(WT) 동물들에서 miR-208b의 심각한 유도를 나타낸 반면, miR-208(너아웃, KO)의 부존재하에서 miR-208b의 유도는 단지 작다. 208a 또는 208b의 존재는 myh7b/miR-499를 활성화하는데 충분하다.

도 31. PTU 처리에 의한 갑상선기능저하증은 miR-208b 발현을 강하게 유도한다. 비록 β -MHC와 같은 miR-208b는 기본 조건하에서 심장에서 거의 발현되지 않으나, 이의 발현은 갑상선기능저하증에 반응하여 강하게 유도된다. 이런 유도는 갑상선 호르몬(T3)의 뒤이은 보충에 의해 역전될 수 있다.

도 32. PTU 처리에 의한 갑상선기능저하증 동안 miR-208b의 시간-의존성 유도. PTU 처리에 의한 miR-208b의 유도는 3일 후 명백하다. miR-208b의 이런 PTU-유도 발현은 PTU 처리의 지속과 함께 증가한다.

도 33a-c. miR-208은 miR-208b 및 miR-499의 발현을 조절한다. (a) miR-499 및 miR-208b의 발현은 miR-208 이 질점합체(+/-) 및 동질점합체(KO) 돌연변이 동물들에서 복용량-의존적으로 하강조절된다는 것을 보여준다. (b) MiR-208b는 β -MHC와 상관관계가 있는 miR-208 형질전환 동물들에서 상승조절된다. (c) 심근에서 miR-208에 의한 miR-499의 조절의 개략적인 다이어그램.

도 34. 심장 재형성의 miR-208 조절의 개략적 모델. miR-208은 miR-499 및 miR-208b 발현의 조절을 통해 직접 또는 간접적으로 심장 재형성을 조절한다.

도 35. miR-208b 너아웃 생쥐 모델을 설계하기 위한 표적화 전략의 개략적 모델.

도 36. miR-499 및 miR-208b의 결합 위치 영역을 과다발현하는 형질전환 생쥐의 개략적 모델. 골격 및 심근 특이적 프로모터(근육 크레아틴 키나아제(MCK))를 사용하는 miR-499 및 miR-208b에 대한 결합 위치 영역의 골격근 특이적 과다발현은 심장과 골격근에서 miR-208b와 miR-499를 제거해서, miRNAs(SEQ ID NOS: 5, 26 및 27)의 너다운을 일으켜야 한다.

도 37a-d. Myh7b/miR-499 발현은 MEF2에 의존한다. (도 37a) 겔 유동성 변화 분석법은 프로브로서 empty pcDNA-Flag 또는 Flag-MEF2C 및 방사능표지화된 MEF2 위치로 트랜스펙트된 COS-1 세포들로부터의 핵추출물을 사용하여 수행하였다. pc-DNA-Flag이 방사능표지화된 MEF2-위치(레인 1)를 결합할 수 없는 반면, MEF2C의 과다발현은 1 μ g의 다클론 Flag 항체(레인 3)로 수퍼슈프틸될 수 있는 결합을 유도한다(레인 2). 특이적 및 비특이적 경쟁자들은 50배 과량으로 사용하였다(레인 4-6)(도 37b). COS 세포들(24-웰 플레이트, 5 x 10⁴

cells/well)을 100ng의 myh7b-루시페라제 리포터(야생형 및 Mef2 돌연변이), Mef2 공동 활성제인 Mef2c, 마이오카딘 단백질을 암호화하는 50ng 발현 벡터 및 30ng의 pCMV-lacZ로 트랜스펙트되었다. Mef2c 및 마이오카딘에 의한 myh7b 리포터의 활성화는 Mef2-결합 위치를 필요로 하였다. (도 37c) MEF2 위치는 myh7b/miR-499의 심장 발현에 필수적이다. LacZ 형질전환 생쥐 배아들이 생겼고, E12.5 및 p1에서 β-갈락토시다아제의 발현을 위해 염색하였다. myh7b 유전자의 영역 0.8kb 상부는 심장 lacZ 발현을 일으키는데 충분한 반면에, MEF2 위치의 돌연변이는 심장에서 발현을 폐지했다. (도 37d). 노던 블롯 분석은 miR-499 발현은 심장 특이적 MEF2D 형질전환 동물들의 심장에서 증가한 반면, miR-499의 수준은 MEF2C 및 -D가 제거된 심장에서 감소한다는 것을 나타낸다.

도 38a-f. miR-499는 β-MHC 및 빠른 골격 유전자들의 발현을 조절한다. (도 38a) miR-499에 대한 노던 블롯 분석은 근육 특이적 프로모터를 사용하는 miR-499의 형질전환 과다발현은 모든 근육 타입에서 miR-499의 수준을 효과적으로 유도한다는 것을 나타낸다. (도 38b) 실시간 PCR 분석은 형질전환 과다발현은 기본 심장 발현 수준과 비교해서 miR-499의 효과적인 과다발현을 일으키며, 빠른 골격근 타입(GP, TA 및 EDL)에서 최고의 수준을 나타낸다. (도 38c) 야생형 또는 형질전환 동물들의 근육 조직에 대한 실시간 PCR 분석은 miR-499의 과다발현은 넙치근, TA 및 EDL에서 β-MHC 발현을 일으키는데 충분한 반면, 심장, 넙치근 및 EDL에서 빠른 골격 트로포닌 I2(TnnI2) 및 T3(TnnT3)을 억제한다는 것을 보여준다. (도 38d) 야생형 및 miR-499 형질전환 동물들의 근섬유의 스냅-프로즌(snap frozen) 조직학적 단편의 메타크로마틱 ATPase 염색은 형질전환 생쥐의 빠른 섬유들(EDL)에서 느린 근섬유의 급격한 증가를 나타낸다. (도 38e) PTU에 반응하여 β-MHC 발현에 대한 miR-208 제거의 억제 효과는 miR-499가 재도입될 때 존재하지 않는다. miR-208 돌연변이 동물들의 심장에서 miR-499를 형질전환적으로 재도입하면 β-MHC 및 이의 상응하는 miRNA인 miR-208b의 심한 도입을 일으킨다. miR-208 제거가 빠른 골격 유전자들의 부적절한 도입을 유도하는 반면, miR-499는 miR-208 돌연변이 동물들에서 형질전환적으로 발현될 때 이런 유전자들을 매우 억제할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 심장 및 골격 근육은 작업부하, 갑상선 호르몬 시그널링 및 마이오신 아이소폼의 발현 조절에 의한 손상과 같은 다양한 병리생리학적 자극에 반응하여, 수축의 효율을 조절한다. 최근에, 본 발명자들은 α-마이오신 중사슬(MHC) 유전자의 인트론에 의해 암호화되고 심장 스트레스에 반응하여 β-MHC 발현의 상승 조절 및 심장에서 속 골격근 유전자의 억제를 위해 필요한 심장-특이적 microRNA인 miR-208을 보고하였다(전문이 참조로 본 발명에 포함된 공동출원 WO2008/016924 참조).
- [0024] 본 발명에서, 본 발명자들은 초기 연구를 확장하고 miR-208은 밀접하게 관련된 microRNAs, 각각 Myh7b 유전자 및 βMHC 유전자의 인트론에 의해 암호화되는 miR-499 및 miR-208b의 심장 발현에 필요하다는 것을 보여준다. 심장뿐만 아니라 느린 골격근에서 Myh7b 및 miR-499의 발현은 가로무늬근 유전자(striated muscle gene) 발현의 시그널-의존성 조절제인 MEF2 전사 인자에 의해 제어된다.
- [0025] miR-499 또는 miR-208의 강요된 발현은 인비보에서 빠른 내지 느린 근섬유 변환을 매개하는데 충분하다. miR-208 및 miR-499는 Tharp1, 갑상선 호르몬 수용체 및 전사 인자의 PUR 집단의 구성원의 발현을 음성적으로 조절하여, 심장 및 골격 근육에서 β-MHC 발현을 음성적으로 조절한다. Sox 6는 느린 섬유 타입-특이적 유전자들의 리프레서로 작용한다. 야생형 근관에서 Sox 6 발현의 너다운은 β-MHC 발현에 현저한 증가를 일으킨다. β-MHC 프로모터의 분석은 Sox 6이 태아 골격 근육의 섬유 타입 분화 및 심장에서 β-MHC 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 나타내는 Sox 킨센서스 서열을 나타내었다. 이런 발견은 Myh 유전자들이 수축과 신호 반응성을 통제하는 조절성 microRNAs를 암호화함으로써 가로무늬근들의 유전자 발현 패턴을 조절한다는 일반적인 조절 매커니즘을 밝힌다. 가로무늬근 질환의 상황에서 miR-499 발현을 조절함으로써 골격 및 심장 근육 유전자 발현을 조작하는 전략은 이런 발견들의 관점에서 개시된다.
- [0026] 본 발명자들은 miR208의 제 2 버전, 인트론 31에 있는 β-MHC 유전자 내에 위치한 소위 miR-208b를 함유하는 게놈을 발견하였고, β-MHC와 같이, miRNA 208b는 심장 및 느린 골격근(넙치근)에서만 발현된다. 이런 microRNA의 사열은 특정 miRNA의 mRNA 표적들을 정의하는 microRNA의 영역인 소위 씨드 영역에서 100% 동일성을 가진 miR-208과 크게 겹친다. 따라서, miR-208b는 인간에서 심장 수축성에 대한 심오한 영향을 줄 수 있고 심장 수축성을 조절하는 miR-208b의 조정도 본 발명에 의해 고려된다.
- [0027] 따라서, 본 발명은 β-MHC 발현을 상승시키기 위해 내인성 miR-208b 유전자 또는 miR-208 유전자(miR-499를 상승조절)를 치료적으로 활성화하거나 외인성 miR-499 또는 miR-208을 아데노바이러스 벡터 또는 다른 것을 사용하여 도입함으로써 miR-499 및/또는 miR-208 발현 또는 활성의 아고니즘(agonism)을 포함한다. miR-208 돌연변이 생쥐들의 심장에서 여러 빠른 골격근 수축성 단백질 유전자들의 상승 조절은 miR-208 및 miR-28b이 골격 및

심장 근육에서 miR-499에 대한 유사한 역할을 암시하는, 전형적으로 빠른 골격근 유전자 프로그램을 억제한다는 것을 나타낸다. 따라서, 심장에서 이런 유전자들의 활성화는 심장 수축성을 제어하기 위한 잠재적인 방법을 나타낸다.

[0028] 또한, 본 발명자들은 골격근에서 빠른 섬유를 억제하여 느린 섬유 유전자들의 상호 발현을 활성화하기 위해 miR-499 및/또는 miR-208b의 사용을 제안한다. 느린 섬유 유전자들의 발현은 향상된 인슐린 민감성과 골격근지구력과 관련이 있다. 느린 섬유 유전자들의 억제와 빠른 섬유 유전자들의 활성화는 무용성 위축, 무중력에 반응한 근육 손실 및 탈신경을 포함하는 여러 근골격 질환과 관련이 있다.

[0029] 따라서, 본 발명자들은 miR-208와 같이, miR-499는 심장에서 β -MHC 유전자 발현의 근-특이적이고 필수적인 조절제라는 것을 발견하였다. 또한 miR-208b는 심장 섬유증을 조절하는 심장에서 마이오신 유전자 발현의 근육 특이적 및 필수적인 조절제라는 것을 발견하였다. 이런 발견은 완전히 새로운 것인데 이는 심장 수축성과 골격근 기능을 제어하기 위해 이런 microRNAs를 사용하기 때문이다.

[0030] miR-499 유전자의 게놈 위치의 분석은 α -MHC 유전자의 유사체인 Myh7b 유전자의 20th 인트론 내에 함유된다는 것을 보여주었다(도 15; SEQ ID NO:26는 성숙한 miRNA 서열을 나타내고; SEQ ID NO:25는 전구체 서열의 스템-루프 구조를 나타낸다). 생쥐, 쥐, 인간, 개, 주머니 쥐, 닭 및 엑스 트로피칼리스(*X.tropicalis*)에 대한 miR-499에 pre-miRNA 암호화 서열은 각각 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 및 SEQ ID NO:24에 제공된다(도 15). Myh7b 유전자는 척추동물에서 보존되며 심장 및 느린 골격근(예를 들어, 넙치근)에서만 발현된다.

[0031] miR-499 발현을 조절하는 것을 알려진 miR-208은 α -MHC 유전자의 인트론 내에 위치한 인트론 miRNA이다. 정확한 인트론 위치는 특정 종들 및 특이적인 전사물에 의존한다. 예를 들어, 인간에서, miR-208은 α -MHC 유전자의 28th 인트론 내에 암호화되는 반면, 생쥐에서, miR-208은 29th 인트론 내에 암호화된다. 인간, 생쥐, 쥐, 및 개에 대한 miR-28에 대한 pre-miRNA 암호화 서열은 각각 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17에 제공된다. 성숙한 miR-208 서열은 SEQ ID NO:5에 제공된다. α -MHC와 같이, miR-208은 심장에서만 발현된다(도 1).

[0032] 인간 pre-miR-208 (SEQ ID NO : 14)

[0033] acgggcgagc ttttggcccc ggttatacct gatgctcagc tataagacga gcaaaaagct tgttggtcag a

[0034] 생쥐 pre-miR-208 (SEQ ID NO: 15)

[0035] acgggtgagc ttttggcccc ggttatacct gactctcagc tataagacga gcaaaaagct tgttggtcag a

[0036] 쥐 pre-miR-208 (SEQ ID NO: 16)

[0037] acgggtgagc ttttggcccc ggttatacct gactctcagc tataagacga gcaaaaagct tgttggtcag a

[0038] 개 pre-miR-208 (SEQ ID NO: 17)

[0039] acgcatgagc ttttggctcg ggttatacct gatgctcagc tataagacga gcaaaaagct tgttggtcag a

[0040] miRNA 표적의 동정을 위해 PicTar 알고리즘을 사용하여(Krek et al, 2005), 본 발명자들은 miR-208에 대해 예측된 표적으로 갑상선 호르몬 수용체 관련 단백질 1(THRAP1)을 동정하였다. 인간, 침팬지, 생쥐, 쥐, 개, 닭, 복어 및 제브라피쉬의THRAP1 3' UTR 서열은 각각 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, 및 SEQ ID NO:13에 제공된다(도 25).

[0041] 근육 수축성의 조절에 관여할 수 있는 miRNAs에 대한 추가 연구에서, 본 발명자들은 miR-208과 밀접하게 관련된 miR-208b를 함유하는 β MHC 유전자는 인트론 31에 있다는 것을 발견하였다. miR-208b의 발현은 β MHC의 발현을 따르는데, 즉, 심장 및 느린 골격근(넙치근)에서만 발현된다. 이런 microRNA의 서열은 특정 miRNA의 mRNA 표적들을 정의하는 microRNA의 영역인 소위 씨드 영역(밑줄로 나타냄)에서 100% 동일성을 가진 miR-208과 크게 겹치며, 특정 miRNA의 mRNA 표적을 정의하는 것을 돕는 microRNA의 일부:

[0042] miR-208 AUAAGACGCAAAAAGCUUGU (SEQ ID NO:5)

[0043] miR-208b AUAAGACGAACAAAAGGUUGU (SEQ ID NO:27)

- [0044] 생쥐, 쥐, 인간, 개, 주머니 쥐, 닭 및 엑스 트로피칼리스(*X.tropicalis*)에 대한 miR-208b에 pre-miRNA 암호화 서열은 각각 SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, 및 SEQ ID NO:35에 제공된다(도 28). 도 28은 miR-208b 전구체 서열의 스템-루프 구조를 나타낸다(SEQ ID NO:36).
- [0045] **심비대, 심부전 및 심근 경색을 치료하는 방법**
- [0046] 본 발명은 필요한 피험자의 병적 심비대, 심부전 또는 심근 경색을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시예에서, 이 방법은 심비대, 심부전 또는 심근 경색을 가진 피험자를 확인하는 단계; 및 상기 피험자의 심장 세포들에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 이 방법은 병적 심비대 또는 심부전의 발생 위험이 있는 피험자를 확인하는 단계 및 상기 피험자의 심장 세포에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함한다. 병적 심비대 또는 심부전의 발생 위험이 있는 피험자는 장기간 지속된 제어되지 않은 고혈압, 치료되지 않은 관상질환, 만성 양기나, 급성 심근경색, 심장 질환에 대한 선천적 소인 및 병적 비대로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 위험 인자를 나타낸다. 특정 실시예에서, 위험에 있는 피험자는 심비대에 대한 유전적 소인을 갖는 것으로 진단될 수 있다. 본 발명의 일부 실시예들에서, 위험에 있는 피험자는 심비대의 가족력을 가질 수 있다.
- [0047] 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 피험자의 심장 세포에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함하여 필요한 피험자의 심비대 및 확장성 심근병증을 예방하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시예에서, 본 발명은 피험자의 심장 세포들에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함하여 필요한 피험자의 심비대의 진행을 억제하는 방법을 제공한다. 특정 실시예에서, 본 발명은 피험자의 심장 세포들에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함하여 심부전 또는 심비대를 가진 피험자의 운동 내성 증가, 입원 감소, 삶의 질 향상, 발병률 또는 사망률을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0048] 따라서, 본 발명은 miR-499 또는 miR-208b의 억제제를 사용하여 심비대, 심부전 또는 심근 경색을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는 miR-499 및/또는 miR-208b 억제제의 투여는 피험자의 심비대, 심부전 또는 심근 경색의 하나 이상의 증상을 개선하거나 심비대로부터 심부전으로의 전이를 지연시킨다. 하나 이상의 개선된 증상은, 예를 들어, 증가된 운동 능력, 증가된 심장 분출량, 감소된 좌심실 이완 말기압, 감소된 폐 모세혈관 폐기압, 증가된 심장 출력 또는 심장 지수, 낮아진 폐 동맥압, 감소된 좌심실 수축 및 이온 말기 치수, 감소된 심장 섬유증, 심장 근육에서 감소된 콜라겐 침착, 감소된 좌심실 및 우심실 벽 스트레스, 감소된 벽 장력, 증가된 삶의 질 및 감소된 질환 관련 발병률 및 사망률일 수 있다. 또한, miR-499 및/또는 miR-208b의 억제제의 사용은 심비대 및 이로부터 발생하는 관련 증상을 예방할 수 있다.
- [0049] miRNAs의 기능은 안타고미르의 투여에 의해 억제될 수 있다. 크루츠펠트와 동료(Kruzfeldt et al. (2005) Nature, Vol. 438:685- 689)에 의해 최초로 기술된 대로, "안타고미르"는 miRNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적인 단일 가닥이고, 화학적으로 변형된 리보뉴클레오티드이다. 안타고미르는 2'-O-메틸-과당 변형체와 같은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 안타고미르는 단지 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 안타고미르는 부분적인 또는 전체 티아인산 주쇄를 만드는 하나 이상의 티아인산 결합을 포함할 수 있다. 인비보 전달 및 안정성을 촉진하기 위해서, 안타고미르는 이의 3' 말단에 콜레스테롤 모이어티(moiety)에 연결될 수 있다. miRNAs를 억제하는데 적합한 안타고미르는 길이가 약 15 내지 약 50 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 약 18 내지 30 뉴클레오티드, 및 가장 바람직하게는 약 20 내지 약 25 뉴클레오티드일 수 있다. "부분적으로 상보적"은 표적 뉴클레오티드 서열에 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상보적인 서열을 의미한다. 안타고미르는 성숙한 miRNA 서열에 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상보적일 수 있다. 일부 실시예들에서, 안타고미르는 성숙한 miRNA 서열에 실질적으로 상보적, 즉, 표적 폴리뉴클레오티드 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상보적일 수 있다. 다른 실시예들에서, 안타고미르는 성숙한 miRNA 서열에 100% 상보적이다.
- [0050] microRNA 기능의 억제는 성숙한 miR-499, miR-208 또는 miR-28b 서열을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 투여함으로써 성취될 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 바람직하게는, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 화학적 변형을 가진다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 "잠금 핵산"으로 구성될 수 있다. "잠금 핵산"(LANs)은 리보오스 과당 모이어티의 2' 및 4' 탄소 사이에 추가 브리지를 포함하여 LANs를 포함하는 올리고뉴클레오티드에 향상된 열 안정성을 제공하는 "잠금" 형상을 만드는 변형 리보뉴클레오티드이다. 선택적으로, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 과당-인산염 주쇄보다는 펩타이드-계 주쇄를 함유하는 펩타이드 핵산(PNAs)을 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴

클레오티드를 함유할 수 있는 다른 화학적 변형은 2'-O-알킬(예를 들어, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸)과 같은 과당 변형체, T-플루오로 및 4' 티오 변형체 및 하나 이상의 티아민산, 모르폴리노 또는 카복실산포스포는 결합과 같은 주쇄 변형체를 포함한다(예를 들어, 전문이 참조로 포함된 미국특허 제 6,693,187호 및 제 7,067,641호 참조). 일부 실시예들에서, 적절한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5' 및 3' 말단 상에 2'-O-메톡시에틸-변형 리보뉴클레오티드를 포함하고 중심에 적어도 10개의 데옥시리보뉴클레오티드를 가진 2'-O-메톡시에틸 "갭머(gappers)"이다. 이런 "갭머"는 RNA 표적의 RNase H-의존성 분해 메커니즘을 일으킬 수 있다. 전문이 참조로 포함되어 있고, 미국특허 제 6,838,283호에 개시된 것과 같은 안정성을 향상시키고 효능을 개선하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 다른 변형체는 당업계에 공지되어 있고 본 발명의 방법들을 사용하는데 적합하다. miRNAs의 활성을 억제하는데 효과적인 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 길이가 약 19 내지 약 25 뉴클레오티드이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miRNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적인, 예를 들어, 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 한 실시예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miRNA 서열에 100% 상보적인 서열을 포함한다.

[0051] miR-499, miR-208 또는 miR-28b 서열의 기능을 억제하기 위한 다른 방법은 성숙한 miR-499, miR-208 또는 miR-28b 서열에 적어도 부분적 서열 동일성을 가진 억제성 RNA 분자를 투여하는 것이다. 억제성 RNA 분자는 스템-루프 구조를 포함하는 이중 가닥이고, 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA 분자(shRNA)일 수 있다. 억제성 RAN의 이중 가닥 부위는 적어도 부분적으로 동일한, 예를 들어, 성숙한 miRNA 서열에 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 억제성 RNA 분자의 이중 가닥 부위는 성숙한 miRNA 서열에 적어도 실질적으로 동일한 서열을 포함한다. "실질적으로 동일한"은 표적 폴리뉴클레오티드 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 의미한다. 다른 실시예에서, 억제성 RNA 분자의 이중 가닥 부위는 표적 miRNA 서열에 100% 동일할 수 있다.

[0052] 본 발명에 개시된 억제성 뉴클레오티드 분자들은 miR-499 (SEQ ID NO: 26), miR-208 (SEQ ID NO:5), 또는 miR-208b (SEQ ID NO: 27)의 성숙한 서열을 표적화하는 것이 바람직하다. 일부 실시예들에서, miR-499, miR-208 및 miR-28b의 억제제는 성숙한 miR-499, 성숙한 miR-208 또는 성숙한 miR-28b 서열에 완전히 상보적인 서열을 포함하는 안타고미르이다. 한 실시예에서, miR-499의 억제제는 5'-AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU-3' (SEQ ID NO: 5)에 부분적으로 또는 완전히 상보적인 서열을 가진 안타고마르이다. 다른 실시예에서, miR-208의 억제제는 5'-AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU-3' (SEQ ID NO: 5)에 부분적으로 또는 완전히 상보적인 서열을 가진 안타고마르이다. 다른 실시예에서, miR-208b의 억제제는 5'- AUAAGAC G AAC AAAAGGUUUGU (SEQ ID NO:27)에 부분적으로 또는 완전히 상보적인 서열을 가진 안타고마르이다.

[0053] 일부 실시예에서, miR-499, miR-208 또는 miR-208b의 억제제는 5'-UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU-3' (SEQ ID NO: 26)에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 화학적으로 변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 다른 실시예에서, miR-208의 억제제는 5'-AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU-3' (SEQ ID NO: 5)에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 화학적으로 변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 다른 실시예에서, miR-208b의 억제제는 5'-AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU (SEQ ID NO:27). 에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 화학적으로 변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 본 발명에서 사용된 "실질적으로 상보적"이라는 용어는 표적 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 성숙한 또는 전구체 miRNA 서열)에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상보적인 서열을 의미한다.

[0054] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 miR-499, miR-208 또는 miR-208b에 대한 전구체 miRNA 서열(pre-miRNA)에 실질적으로 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 miR-499, miR-208 또는 miR-208b 서열의 스템-루프 영역 외부에 위치한 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함한다. 한 실시예에서, miR-499 기능의 억제제는 SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 및 SEQ ID NO:24로 이루어진 그룹으로부터 선택된 pre-miR-499 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 가진 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 다른 실시예에서, miR-208 기능의 억제제는 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, 및 SEQ ID NO: 17로 이루어진 그룹으로부터 선택된 pre-miR-208 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 가진 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 또 다른 실시예에서, miR-208b 기능의 억제제는 SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, 및 SEQ ID NO: 35로 이루어진 그룹으로부터 선택된 pre-miR-208b 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 가진 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.

[0055] 본 발명의 다른 실시예들에서, miR-499, miR-208 및 miR-208b의 억제제는 리보자임, siRNAs 또는 shRNAs와 같은 억제성 RNA 분자일 수 있다. 한 실시예에서, miR-499 기능의 억제제는 이중 가닥 영역을 포함하는 억제성 RNA 분자이고, 이중 가닥 영역은 성숙한 miR-499 서열(SEQ ID NO:26)과 100% 동일성을 가진 서열을 포함한다.

다른 실시예에서, miR-208 기능의 억제제는 이중 가닥 영역을 포함하는 억제성 RNA 분자이고, 이중 가닥 영역은 성숙한 miR-208 서열(SEQ ID NO:5)과 100% 동일성을 가진 서열을 포함한다. 다른 실시예에서, miR-208b 기능의 억제제는 이중 가닥 영역을 포함하는 억제성 RNA 분자이고, 이중 가닥 영역은 성숙한 miR-208b 서열(SEQ ID NO:27)과 100% 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, miR-208, miR-208b 및 miR-499 기능의 억제제는 이중 가닥 영역을 포함하는 억제성 RNA 분자이고, 상기 이중 가닥 영역은 성숙한 miR-208, miR-208b 및 miR-499 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성의 서열을 포함한다.

[0056] 본 발명은 또한 치료 후 miR-499 및/또는 miR-208b 길항제를 청소 또는 세척하는 방법을 고려한다. 한 실시예에서, 이 방법은 심장 조직에 miR-499 및/또는 miR-208b 길항제에 대한 결합 위치들을 과다 발현하는 것을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 치료 후 miR-499 및/또는 miR-208b를 청소 또는 세척하는 방법을 고려한다. 한 실시예에서, 이 방법은 섬유아세포 특이적 프로모터(근육 크레아틴 키나아제(MCK))를 사용하여 골격근에서 miR-499 및/또는 miR-208b에 대한 결합 위치 영역의 과다발현을 포함한다. 결합 위치 영역은 miR-499 및/또는 miR-208b에 대한 씨드 영역의 서열을 함유하는 것이 바람직하다. 일부 실시예들에서, 결합 부위는 THRAP1 또는 PUR 베타와 같은 miR-499 또는 miR-208b의 하나 이상의 표적의 3'UTR로부터의 서열을 함유할 수 있다. 다른 실시예에서, miR-499 및/또는 miR-208b 길항제는 microRNA의 기능을 약화 또는 정지시키기 위해 miR-499 및/또는 miR-208b 이후 투여될 수 있다.

[0057] **병합 치료**

[0058] 다른 실시예에서, 심비대, 심부전 및 심근 경색을 치료하기 위해 다른 치료 양태와 병합해서 miR-499 또는 miR208b의 억제제를 사용하는 것이 고려된다. 심혈관 질환의 환경에서 심비대의 현재의 의료적 제어는 적어도 두 타입의 약물: 레닌-안지오텐신 시스템의 억제제 및 β -아드레날린성 차단제의 사용을 포함한다(Bristow, 1999). 심부전의 환경에서 병적 비대를 치료하는 치료제는 안지오텐신 II 변환 효소(ACE) 억제제 및 β -아드레날린성 수용체 차단제를 포함한다(Eichhorn and Bristow, 1996). 심비대의 치료에 대해 개시된 다른 약학적 물질은 안지오텐신 II 수용체 길항제(미국특허 5,604,251) 및 신경펩타이드 Y 길항제(WO 98/33791)를 포함한다.

[0059] 비-약리학적 치료는 약리학적 치료에 보조로서 주로 사용된다. 비-약리학적 치료의 한 수단은 식단에서 나트륨을 감소하는 것을 포함한다. 또한, 비-약리학적 치료는 음성 수축제(예를 들어, 특정 칼슘 채널 차단제 및 다이소피라미드와 같은 항부정맥제), 카디오독신(예를 들어, 암페타민) 및 혈장 부피 확장제(예를 들어, 비스테로이드성 항-염증제 및 글루코코르티코이드)를 포함하는 특정 침전제의 제거를 포함한다.

[0060] 따라서, 피험자에게 miR-499 및/또는 miR-208b의 억제제와 병합해서 더욱 "표준인" 약학적 심장 치료제를 제공할 수 있다. 다른 치료제의 예들은 소위 "베타 차단제", 항-고혈압제, 강심제, 항-혈전제, 혈관확장제, 호르몬 길항제, 수축촉진제, 이뇨제, 엔도텔린 수용체 길항제, 칼슘 채널 차단제, 포스포디에스테라제 억제제, ACE 억제제, 안지오텐신 2형 길항제 및 사이토키린 차단제/억제제 및 HDAC 억제제를 제한 없이 포함한다. 병합 치료는 miR-499 및 miR-208b의 발현 또는 활성을 억제하는 단계 또는 miR-208 및/또는 miR-21과 miR-195와 같은 심장 재형성에 관여하는 다른 miRNAs의 발현 또는 활성을 억제하는 단계를 포함할 수 있다. 병합 치료는 miR-29와 같은 특정 microRNAs의 과다발현을 포함할 수 있다.

[0061] 병합은 miR-499 또는 miR-208b의 억제제 및 표준 약학적 물질을 포함하는 단일 조성물 또는 약리학적 제제를 심장 세포와 접촉시키거나 동시에 2개의 구별된 조성물 또는 제제를 세포와 접촉시킴으로써 이루어질 수 있으며, 한 조성물은 miR-499 또는 miR-208b의 억제제를 포함하며 다른 것은 표준 약학적 물질을 포함한다. 선택적으로, miR-499 및/또는 miR-208b의 억제제를 사용하는 치료는 분 내지 주 범위의 간격으로 다른 물질(들)의 투여에 앞서거나 뒤에 올 수 있다. 표준 약학적 물질과 miR-499 또는 miR-208b 억제제가 세포에 개별적으로 사용되는 실시예들에서, 일반적으로 상당 기간의 시간이 각 전달의 시간 사이에 만료되지 않아서, 약학적 물질과 miR-499 또는 miR-208b 억제제는 세포에 유리하게 병합된 효과를 낼 수 있도록 해야한다. 이런 경우에, 통상적으로 서로 약 12-24시간 내, 더욱 바람직하게는, 서로 약 6-12시간 내, 가장 바람직하게는 약 12시간의 지연 시간으로 세포를 약학적 물질과 miR-499 또는 miR-208b 억제제와 접촉시키는 것이 고려된다. 일부 경우에, 치료기간을 현저하게 늘이는 것이 바람직할 수 있으나, 개별 투여 사이에 수일(2, 3, 4, 5, 6 또는 7) 내지 수주(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8)가 경과한다.

[0062] miR-499 및/또는 miR-208b 억제제 또는 다른 약학적 물질의 1회 이상의 투여가 바람직한 것으로 생각된다. 이와 관련하여, 다양한 병합이 사용될 수 있다. 예를 들어, miR-499 또는 miR-208b의 억제제가 "A"이고 다른 물질이 "B"인 경우, 3 및 4 전체 투여를 기준으로 다음 순서를 예로 들 수 있다:

- [0063] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B
- [0064] A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A
- [0065] A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

- [0066] 다른 병합도 고려된다.
- [0067] 치료 요법들은 임상적 상황에 따라 변할 것이다. 그러나, 장기간 치료는 대부분의 경우에 적절한 것으로 보인다. 또한 질환이 진행되는 동안 짧은 시간대 내에서의와 같은 miR-499 및/또는 miR-208b에 의해 비대를 단속적으로 치료하는 것도 바람직할 수 있다.
- [0068] 약리학적 치료제 및 이의 투여 방법, 복용량 등은 당업자에게 주지되어 있고(예를 들어, 관련 부분만 참조로 본 발명에 포함된, the "Physicians Desk Reference", Klaassen's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", "Remington's Pharmaceutical Sciences", and "The Merck Index, Eleventh Edition" 참조), 공개내용을 고려하여 본 발명과 병합될 수 있다. 복용량의 일부 변화는 치료될 피험자의 상태에 따라 필수적으로 일어날 것이다. 투여자는, 어떤 경우에도, 개별 피험자의 적절한 복용량을 결정할 것이고 이런 개별 결정은 당업자의 기술 내에 있다.
- [0069] 본 발명에서 사용될 수 있는 약리학적 치료제의 비-제한적인 예들은 항고지단백혈증제, 항동맥경화증제, 항혈액 응고제/섬유소용해제, 혈액 응고제, 항부정맥제, 항고혈압제, 혈관확장제, 울혈성 심부전 치료제, 항진균제, 항균제 또는 이의 조합을 포함한다.
- [0070] 또한, 다음 중 임의의 것이 심장 치료의 새로운 세트를 개발하는데 사용될 수 있고 β 차단제로서 표적 유전자들은 본 실시예(이하 참조)에서 사용되었다는 것을 알아야 한다. 이런 유전자들 중 여러 개가 결합될 수 있다고 예상되는 반면, 새로운 유전자 표적들이 개발될 수 있다.
- [0071] 특정 실시예들에서, "항고지단백혈증제"로 공지된 하나 이상의 혈액 지질 및/또는 지질단백질의 농도를 낮추는 물질의 투여는 본 발명에 따른 심혈관 치료, 특히 동맥경화 및 혈관 조직의 두꺼워짐 또는 막힘의 치료에서 병합될 수 있다. 특정 실시예들에서, 항고지단백혈증제는 아틸옥시알카노산/피브르산 유도체, 레진/담즙산 격리제, HMG CoA 환원효소 억제제, 니코틴산 유도체, 갑상선 호르몬 또는 갑상선 호르몬 유사체, 기타 물질 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.
- [0072] 아틸옥시알카노산/피브르산 유도체의 비 제한적인 예들은 베클로브레이트, 엔자피브레이트, 비니피브레이트, 시프로피브레이트, 클리노피브레이트, 클로피브레이트(아트로미트-S), 클로피브르산, 에토피브레이트, 페도피브레이트, 겐피프로질(로비드), 니코피브레이트, 피리피브레이트, 로니피브레이트, 심피브레이트 및 테오피브레이트를 포함한다.
- [0073] 레진/담즙산 격리제의 비 제한적인 예들은 콜레스티르아민(콜리바, 퀘스트란), 콜리스티폴(콜레스티드) 및 폴리텍시드를 포함한다.
- [0074] HMG CoA 환원효소 억제제의 비 제한적인 예들은 로바스타틴(메바코르), 프라바스타틴(프라보콜) 또는 심바스타틴(조코르)을 포함한다.
- [0075] 니코틴산 유도체의 비 제한적인 예들은 니코티네이트, 아세피막스, 니세리트롤, 니코클로네이트, 니코몰 및 옥시니아식산을 포함한다.
- [0076] 갑상선 호르몬 및 이의 유사체의 비 제한적인 예들은 에토록세이트, 타이로프로프산 및 타이록신을 포함한다.
- [0077] 기타 항고지단백혈증제의 비 제한적인 예들은 아시프란, 아자코스테롤, 벤플로렉스, β -벤즈알부티라미드, 카르니틴, 콘드로틴 설페이트, 클로메스트론, 텍스트란, 텍스트란 설페이트 소듐, 5, 8, 11, 14, 17-에코사펜타에노산, 에리타데닌, 푸라자볼, 메글루톨, 멜린아마이드, 미타트라이에네다이올, 오르니틴, γ -오리자놀, 팬테틴, 펜타에리트리톨 테트라아세테이트, α -페닐부티르아마이드, 파이로자딜, 프로뷰콜(로렐코), β -시토스테롤, 셀토실리산-파이피라진 염, 티아데놀, 트라이파라놀 및 젠부신을 포함한다.
- [0078] 항동맥경화증제의 비 제한적인 예들은 과아리디놀 카르바메이트를 포함한다.
- [0079] 특정 실시예들에서, 응혈의 제거 또는 예방에 도움을 주는 물질의 투여는 특히 죽상경화증 및 혈관(예를 들어,

동맥) 폐색의 치료에서 조절제의 투여와 병합될 수 있다. 항혈액응고제/섬유소용해제의 비 제한적인 예들은 항응고제, 항응고제 길항제, 항혈소판제, 혈전용해제, 혈전용해제 길항제 또는 이의 조합을 포함한다.

- [0080] 특정 실시예들에서, 예를 들어, 아스피린과 와파린(코우마딘)과 같이 경구로 투여될 수 있는 항혈액응고제가 바람직하다.
- [0081] 항응고제의 비 제한적인 예들은 아세노쿠마롤, 안크로드, 아니신디온, 브로민디온, 클로린디온, 코우메타롤, 사이클로쿠마롤, 텍스트란 설페이트 소듐, 다이쿠마롤, 다이페나디온, 에틸 비스코움아세테이트, 에틸렌 다이코우마롤, 플루인디온, 헤파린, 히루딘, 리아플레이트 소듐, 옥사지디온, 펜토산 폴리설페이트, 페닌디온, 펜프로코우몬, 포시비틴, 피코타미드, 티오클로마롤 및 와파린을 포함한다.
- [0082] 항혈소판제의 비 제한적인 예들은 아스피린, 텍스트란, 다이피리다몰(페르산틴), 헤파린, 설핌파이라논(안터레인) 및 티클로피딘(티클리드)을 포함한다.
- [0083] 혈전용해제의 비 제한적인 예들은 플라미노겐 활성화제(액티바제), 플라스민, 프로-우로키나제, 우로키나제(아보키나제), 스트렙토키나제(스트렙타제), 안티스트렙라제/APSAC(에미나제)를 포함한다.
- [0084] 피험자가 출혈이 있거나 또는 출혈 가능성이 높은 어떤 경우에, 혈액 응고를 향상시킬 수 있는 물질이 사용될 수 있다. 혈액 응고 촉진제의 비 제한적인 예들은 혈전용해제 길항제 및 항응고제 길항제를 포함한다.
- [0085] 항응고제 길항제의 비 제한적인 예들은 프로타민과 비타민 K1을 포함한다.
- [0086] 혈전용해제 길항제의 비 제한적인 예들은 아미오카프로산(아미카르) 및 트라넥사믹산(아스타트)을 포함한다. 항혈전제의 비 제한적인 예들은 아나그레리드, 아르가트로반, 실스타졸, 달트로반, 데피브로티드, 에녹사파린, 프락시파린, 인도부펜, 라모파란, 오자그렐, 피코타미드, 플라피브리드, 테텔파린, 티클로피딘 및 트라이플루살을 포함한다.
- [0087] 항부정맥제의 비 제한적인 예들은 클래스 I 항부정맥제(나트륨 채널 차단제), 클래스 II 항부정맥제(베타-아드레날린성 차단제), 클래스 III 항부정맥제(재극성화 연장제), 클래스 IV 항부정맥제(칼슘 채널 차단제) 및 기타 항부정맥제를 포함한다.
- [0088] 나트륨 채널 차단제의 비 제한적인 예들은 클래스 IA, 클래스 IB 및 클래스 IC 항부정맥제를 포함한다. 클래스 IA 항부정맥제의 비 제한적인 예들은 디소피라미드(노르페이스), 프로케인아마이드(프로네스틸) 및 퀴니딘(퀴니텍스)을 포함한다. 클래스 IB 항부정맥제의 비 제한적인 예들은 리도케인(자일로케인), 토케이니드(토코카드) 및 맥실레틴(맥시틸)을 포함한다. 클래스 IC 항부정맥제의 비 제한적인 예들은 엔케이니드(엔카이드) 및 플레케이니드(탐보코르)를 포함한다.
- [0089] 달리 β -아드레날린성 차단제, β -아드레날린성 길항제 또는 클래스 II 항부정맥제로 공지된 β -차단제의 비 제한적인 예들은 아세부톨올(섹트랄), 알프레놀올, 아모실알올, 아로티놀올, 아테놀올, 베푸놀올, 베타솔올, 베반톨올, 비소프롤올, 보핀돌올, 부쿠몰올, 부페톨올, 부프랄올, 뷰니트롤올, 부프라놀올, 뷰티드린 염산, 부토피롤올, 카라졸올, 카르테올올, 카르베딜올, 셀리프롤올, 세타몰올, 클로나놀올, 딜레발올, 에파놀올, 에스몰올(브레비블록), 인데놀올, 라베탈올, 레보부놀올, 메핀돌올, 메티프라놀올, 메토프롤올, 모프롤올, 나돌올, 나독솔올, 니페달올, 니프라딜올, 옥스프레놀올, 펜부톨올, 핀돌올, 프락톨올, 프로네달올, 프로파놀올(인데탈), 소탈올(베타파스), 설파몰올, 탈리놀올, 테르타톨올, 티몰올, 툴리프롤올 및 지비놀올을 포함한다. 특정 실시예에서, 베타 차단제는 아릴옥시프로판올아민 유도체를 포함한다. 아릴옥시프로판올아민 유도체의 비 제한적인 예들은 아세부톨올, 알프레놀올, 아로티놀올, 아테놀올, 베타솔올, 베반톨올, 비소프롤올, 보핀돌올, 부니트롤올, 부토피롤올, 카라졸올, 카르테올올, 카르베딜올, 셀리프롤올, 세타몰올, 에파놀올, 인데놀올, 메핀돌올, 메티프라놀올, 메토프롤올, 모프롤올, 나돌올, 니프라딜올, 옥스프레놀올, 펜부톨올, 핀돌올, 프로파놀올, 탈리놀올, 테르타톨올, 티몰올 및 툴리프롤올을 포함한다.
- [0090] 클래스 III 항부정맥제로 공지된 재극성화를 연장하는 물질의 비 제한적인 예들은 아미오다론(코르다론) 및 소탈올(베타페이스)을 포함한다.
- [0091] 클래스 IV 항부정맥제로 공지된 칼슘 채널 차단제의 비 제한적인 예들은 아릴알킬아민(예를 들어, 베프리딜, 딜티아젠프, 펜딜린, 갈로파밀, 프레닐아민, 테로딜린, 베라파밀), 다이하이드로피리딘 유도체(켈로디핀, 이스라디핀, 니카르디핀, 니페디핀, 니모디핀, 니솔디핀, 니트렌디핀), 파이퍼라진 유도체(예를 들어, 시나리진, 프루나리진, 일도플라진) 또는 벤사이클란, 에타페논, 마그네슘, 미베프라딜 또는 폐핵실린과 같은 기타 칼슘 채널 차단제를 포함한다. 특정 실시예에서, 칼슘 채널 차단제는 장기간 작용하는 다이하이드로피리딘(니페디핀-

로토베라트린, 라우바신, 레시메톨, 릴메니텐, 사랄라신, 소듐 나이트로루시드, 티크리나펜, 트라이메타판 캄실레이트, 타이로시나제 및 우라피딜을 포함한다.

- [0101] 특정 실시예들에서, 항고혈압제는 아릴에탄올아민 유도체, 벤조티아디아진 유도체, *N*-카복시알킬(헵타이드/락탐) 유도체, 다이하이드로피리딘 유도체, 구아디닌 유도체, 하이드라진/프탈라진, 이미다졸 유도체, 4차 암모늄 화합물, 레레르핀 유도체 또는 수플론아마이드 유도체를 포함할 수 있다.
- [0102] 아릴에탄올아민 유도체의 비 제한적인 예들은 아모설알올, 부푸랄올, 딜레발올, 라베탈올, 프로네탈올, 소탈올 및 설프말올을 포함한다.
- [0103] 벤조티아디아진 유도체의 비 제한적인 예들은 알티지드, 벤드로플루메티아지드, 벤즈티아지드, 벤질하이드로클로로티아지드, 부티아지드, 클로로티아지드, 클로르탈리돈, 사이클로펜티아지드, 사이클로티아지드, 다이아족사이드, 에피티아지드, 에티아지드, 펜퀴존, 하이드로클로로티지드, 하이드로플루메티지드, 메티클로티아지드, 메티크레인, 메톨라존, 파라플루티지드, 폴리티지드, 테트라클로메티아지드 및 트라이클로메티아지드를 포함한다.
- [0104] *N*-카복시알킬(헵타이드/락탐) 유도체의 비 제한적인 예들은 알라세프릴, 캅토프릴, 실라자프릴, 텔라프릴, 에날라프릴, 에날라필라트, 포시노프릴, 리시노프릴, 모벨티프릴, 페린도프릴, 퀴나프릴 및 라미프릴을 포함한다.
- [0105] 다이하이드로피리딘 유도체의 비 제한적인 예들은 아몰로디핀, 펠로디핀, 이사라디핀, 니카르디핀, 니페디핀, 니발디핀, 니솔디핀 및 니트렌디핀을 포함한다.
- [0106] 구아디닌 유도체의 비 제한적인 예들은 베타니딘, 데브리소퀸, 구아나벤즈, 구아나클린, 구아나드렐, 구아나조딘, 구아네티딘, 구안파신, 구아노클로르, 구아녹사벤즈 및 구아녹산을 포함한다.
- [0107] 하이드라진/프탈라진의 비 제한적인 예들은 부드랄라진, 카드랄라진, 다이하이드랄라진, 엔드랄라진, 하이드라카르바진, 하이드랄라진, 페니프랄라진, 필드랄라진 및 토트랄라진을 포함한다.
- [0108] 이미다졸 유도체의 비 제한적인 예들은 클로니딘, 로펙시딘, 펜톨아민, 티아메니딘 및 톨로니딘을 포함한다.
- [0109] 4차 암모늄 화합물의 비 제한적인 예들은 아자메토늄 브로마이드, 클로리손다민 클로라이드, 헥사메토늄, 펜타시늄 비스(메틸설페이트), 펜타메토늄 브로마이드, 펜톨리늄 타르트레이트, 페낙트로피늄 클로라이드 및 트라이메티디늄 메토설페이트를 포함한다.
- [0110] 레세르핀 유도체의 비 제한적인 예들은 비에타세르핀, 디세르피딘, 레시닌아민, 레세르핀 및 사이로신고핀을 포함한다.
- [0111] 설프아마이드 유도체의 비 제한적인 예들은 암부시드, 클로파미드, 푸로세미드, 인다파미드, 퀴네타존, 트라이파미드 및 지파미드를 포함한다.
- [0112] 혈관수축제는 일반적으로 외과 수술 동안 발생할 수 있는 쇼크 동안 혈압을 증가시키는데 사용된다. 항고혈압제로 공지된 혈관수축제의 비 제한적인 예들은 아메지늄 메틸 설페이트, 안지오텐신 아마이드, 다이페토프린, 도파민, 에티펠민, 에틸에프린, 게페프린, 메타라미놀, 미도드린, 노르에피네프린, 포레드린 및 시네프린을 포함한다.
- [0113] 울혈성 심부전의 치료를 위한 비 제한적인 물질은 안티-안지오텐신 II 물질, 부하후-부하전 감소 치료, 이뇨제 및 수축촉진제를 포함한다.
- [0114] 특정 실시예들에서, 안지오텐신 길항제를 견딜 수 없는 동물 피험자는 병합 요법으로 치료될 수 있다. 이런 치료는 하이드라라진(아프레솔린) 및 아이소소르비드 다이나이트레이트(아이소드릴, 소르비트레이트)의 투여를 병합할 수 있다.
- [0115] 이뇨제의 비 제한적인 예들은 티아지드 또는 벤조티아디아진 유도체(예를 들어, 알티아지드, 벤드로플루메티아지드, 벤즈티아지드, 벤질하이드로클로로티아지드, 부티아지드, 클로로티아지드, 클로로탈리돈, 사이클로펜티아지드, 에피티아지드, 에티아지드, 펜퀴존, 하이드로클로로티아지드, 하이드로플루메티아지드, 메티클로티아지드, 메티크레인, 메톨라존, 파라플루티지드, 폴리티지드, 테트라클로메티아지드, 트라이클로메티아지드), 오가노머큐리얼(예를 들어, 클로로메로드린, 메랄루리드, 메캄프아마이드, 머캅토메린 나트륨, 머큐말릭산, 머큐마틸린 도륨, 염화제일수은, 메르살일), 프테리딘(예를 들어, 푸르테레넨, 트라이아메텐), 퓨린스(예를 들어, 7-모르폴리노메틸테오필린, 파모브롬, 프로테오브로민, 테오브로민), 알도스테론 길항제를 포함하는 스테로이드(예를 들어, 칸레논, 올레안드린, 스피로놀락톤), 설프아마이드 유도체(예를 들어, 아세토졸아마이드,

암부시드, 아조세미드, 부메타니드, 부타졸아마이드, 클로라미노페나미드, 클로페나미드, 클로파미드, 클로렉솔론, 다이페닐메테인-4,4'-다이설폰아마이드, 다이설파미드, 에톡시졸아마이드, 푸로세미드, 인다파미드, 메프루시드, 메타졸아마이드, 파이레타니드, 퀴네타존, 토르아세미드, 트라이파미드, 지파미드), 우라실(예를 들어, 아미노메트라딘, 아미소메트라딘), 칼륨 보존성 길항제(예를 들어, 아밀로리드, 트라이암테렌) 또는 아미노진, 아르부틴, 클로라자닐, 에타크린산, 에토졸린, 하이드라카라바진, 아이소소르비드, 만니톨, 메토칼론, 무졸리민, 퍼헥실린, 티크리나펜 및 우레아와 같은 기타 이노제를 포함한다.

[0116] 강심제로 공지된 양성 수축촉진제의 비 제한적인 예들은 아세피린, 아세틸디지톡신, 2-아미노-4-피콜린, 암리논, 벤푸로딜 헤미숙시네이트, 부클라데신, 세르베로신, 캄포타미드, 콘발라톡신, 사이마린, 데노파민, 테슬라노시드, 디지탈린, 디지탈리스, 디지톡신, 디곡신, 도부타민, 도파민, 도펙사민, 에녹시몬, 에리트르플레인, 페날코민, 기탈린, 기톡신, 글리코시아민, 헵타미놀, 하이드라스티닌, 이보파민, 라나토시드, 메타미밤, 밀리논, 네리폴린, 올란드린, 오우아바인, 옥시페드린, 프레날테롤, 프로실라리딘, 레시부포게닌, 실라렌, 실라레닌, 스트립파닌, 설마졸, 테오브로민 및 잠모테롤을 포함한다.

[0117] 구체적인 실시예에서, 수축촉진제는 강심 배당체, 베타-아드레날린성 효현제 또는 포스포다이에스테라제 억제제이다. 강심 배당체의 비제한적인 예들은 디곡신(라노신) 및 디기톡신(크리스토디긴)을 포함한다. β -아드레날린성 효현제의 비제한적인 예들은 알부테롤, 밤부테롤, 바이톨테롤, 카부테롤, 클렌부테롤, 클로프레날린, 데노파민, 다이옥세테드린, 도부타민(도부트렉스), 도파민(인트로핀), 도펙사민, 에피드린, 에타페드린, 에틸노르에피네프린, 페노테롤, 포르모테롤, 헥스포레날린, 아보파민, 아이소에타린, 아이소프로테레놀, 마부테롤, 메타프로테레놀, 메톡시펜아민, 옥시페드린, 피르부테롤, 프로카테롤, 프로톡길올, 레프로테롤, 리미테롤, 리토드린, 소테레놀, 터부탈린, 트레토키놀, 툴로부테롤 및 자모테롤을 포함한다. 포스포다이에스테라제의 비제한적인 예들은 암리논(인도코어)을 포함한다.

[0118] 항협심증제는 오가노나이트레이트, 칼슘 채널 차단제, 베타 차단제 및 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0119] 나이트로혈관확장제로 알려진 오가노나이트레이트의 비 제한적인 예들은 나이트로글리세린(나이트로-비드, 나이트로스타트), 아이소소르비드 다이나이트레이트(아이소르딜, 소르비트레이트) 및 아밀 나이트레이트(아스피롤, 바포롤)를 포함한다.

[0120] 엔도텔린(ET)은 심부전의 발달에 관여하는 것으로 보이는 강력한 생리학 및 병적 효과를 가진 21-아미노산 펩타이드이다. ET의 효과들은 두 종류의 세포 표면 수용체들과의 상호작용을 통해 매개된다. 타입 A 수용체(ET-A)는 혈관수축과 세포 성장에 관여하는 반면 타입 B 수용체(ET-B)는 내피세포 매개 혈관확장 및 알도스테론과 같은 신경호르몬의 방출과 관련이 있다. ET의 생산 또는 관련 세포들을 자극하는 능력을 억제할 수 있는 약리학적 물질들이 당업계에서 공지되어 있다. ET의 생산을 억제하는 것은 전구체로부터 활성 펩타이드의 처리에 관여하는 엔도텔린-변환 효소로 불리는 효소를 차단하는 물질들의 사용을 포함한다. 세포들을 자극하는 ET의 능력을 억제하는 것은 ET와 이의 수용체의 상호작용을 차단하는 물질들의 사용을 포함한다. 엔도텔린 수용체 길항제(ERA)의 비제한적인 예들은 보센탄, 엔라센탄, 암브리센탄, 다루센탄, 테조센탄, 아트라센탄, 아보센탄, 클라조센탄, 에도넨탄, 시탁센탄, TBC 3711, BQ 123 및 BQ 788을 포함한다.

[0121] 특정 실시예에서, 보조 치료제는 일정 형태의 수술을 포함할 수 있고, 예를 들어, 예방, 진단 또는 스테이징(staging), 치료 및 완화 수술을 포함한다. 수술, 특히 치료 수술은 다른 치료들, 예를 들어, 본 발명 및 하나 이상의 다른 치료제들과 함께 사용될 수 있다.

[0122] 혈관 및 심혈관 질병 및 질환들을 위한 이런 수술 치료제들은 당업자에게 주지되어 있고, 유기체에 수술을 수행하고, 심혈관 기계적 삽입물, 혈관 형성술, 관상 동맥 재관류, 전극도자 절제술을 제공하고, 피험자에게 삽입형 체세동기를 제공하고, 기계적 순환 보조 또는 이의 조합을 제공하는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 사용될 수 있는 기계적 순환 보조의 비 제한적인 예들은 대동맥내 풍선 펌프, 좌심실 보조 장치 또는 이의 조합을 포함한다.

[0123] **근골격 질환의 치료 방법**

[0124] 본 발명은 또한 골격근 세포들에서 빠른 골격근 수축 단백질 유전자의 발현 또는 활성을 감소시키는 방법을 제공한다. 한 실시예에서, 이 방법은 miR-499 및/또는 miR-208b를 골격근 세포들에 투여하는 단계를 포함한다.

[0125] 여러 빠른 골격근 수축 단백질 유전자들의 상승 조절은 두 miR-208 대립형질유전자가 없는 생쥐의 심장에서 관찰되었다. miR-208 녹아웃 생쥐의 심장에서 빠른 골격근 수축성 단백질 유전자의 상승 조절은 miR-208은 일반적으로 빠른 골격근 유전자 프로그램을 억제하도록 기능한다는 것을 나타낸다. miR-499 발현의 동시 감소는 miR-

208 돌연변이 생쥐에서 관찰되었고, miR-499는 빠른 골격근 수축성 단백질 유전자의 발현을 음성적으로 조절할 수 있다는 것을 나타낸다. β -MHC 유전자의 인트론에 의해 암호화된 miR-208b는 단지 세 개의 염기만 miR-208과 다르고 심장과 느린 골격근에서만 발현된다. 따라서, miR-208b는 빠른 골격근 유전자 프로그램을 조절할 수 있고 섬유 동일성을 결정할 수 있다.

[0126] 골격근에서, 느린 섬유 유전자의 억제 및 빠른 섬유 유전자의 활성화는 불용성 위축, 항-중력에 반응하는 근 소실 및 탈신경을 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 골격근 질환과 관련이 있다. 따라서, 골격근 세포들에서 miR-208, miR-208b 또는 miR-499의 발현은 빠른 섬유 유전자들의 억제에 효과적이어서 느린 섬유 유전자들의 상호발현을 활성화시킨다. 따라서, 본 발명은 필요한 환자의 근골격 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 고려한다. 한 실시예에서, 이 방법은 근골격 질환을 갖거나 위험이 있는 환자를 확인하는 단계; 및 상기 피험자의 골격근 세포들에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 단계를 포함한다. 일부 실시예들에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 단계는 근골격 질환을 갖거나 발생할 위험이 있는 피험자의 골격근에 miR-499 및/또는 miR-208b의 효현제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 본 발명은 골격근에 miR-499 및/또는 miR-208b의 효현제를 투여함으로써 감소된 중력 환경에 반응하여 근 손실을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 골격근에 miR-499 및/또는 miR-208b의 효현제를 투여함으로써 근육 위축을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0127] 또한, 결과들은 miR-499 또는 miR-208b 발현을 증가시킴으로써 느린 섬유 유전자 발현을 향상시키는 전략은 인슐린 민감성을 증가시키는데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. 골격근은 인간에서 인슐린-자극 글루코스 흡수의 대부분을 차지한다. 인슐린 저항성은 2형 당뇨병을 가진 환자에서 보인 인슐린-자극 글루코스 흡수의 결핍이다. 인슐린 저항성과 느린 - 대 빠른 - 경련 근육 섬유의 백분율에 양의 상관관계가 있다. 따라서, 다른 실시예에서, 본 발명은 골격근 세포들에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하여 골격근에서 인슐린 민감성을 증가시키는 방법을 고려한다.

[0128] 본 발명의 일부 실시예에서, 세포에서 miR-499 또는 miR-208b의 발현 또는 활성을 증가시키는 miR-499 또는 miR-208b의 효현제를 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시예에서, miR-499 또는 miR-208b의 효현제는 성숙한 miR-499 또는 miR-208b 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 다른 실시예들에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 26, 또는 SEQ ID NO: 27의 서열을 포함한다. 다른 실시예에서, miR-499 또는 miR-208b의 효현제는 miR-499 또는 miR-208b에 대한 pri-miRNA 또는 pre-miRNA 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 성숙한 miR-499 또는 miR-208b 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 잠금 핵산(locked nucleic acids), 펩타이드 핵산과 같은 화학적 변이, 2'-O-알킬(예를 들어, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시 에틸), 2'-플루오로 및 4'티오 변이와 같은 과당 변이 및 하나 이상의 티오인산, 모르포놀린 또는 카복실산소스포는 결합과 같은 주쇄 변이를 포함할 수 있다. 한 실시예에서, miR-499 또는 miR-208b 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 콜레스테롤과 접합한다. 다른 실시예에서, miR-499 또는 miR-208b의 효현제는 miR-499 및/또는 miR-208b의 기능을 증가, 보충 또는 대체하는 역할을 하는 miR-499 또는 miR-208b와 구별되는 물질일 수 있다.

[0129] 다른 실시예에서, miR-499 또는 miR-208b의 효현제는 벡터로부터 인비보 발현될 수 있다. "벡터"는 세포의 내부에 관심 핵산을 전달하는데 사용될 수 있는 중요한 조성물이다. 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양쪽성 화합물들과 결합된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 따라서, "벡터"라는 용어는 자율적으로 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 바이러스성 벡터의 예들은 아데노바이러스 벡터, 아데노-결합 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 발현 구조체는 생체 세포에서 복제될 수 있거나 합성적으로 제조될 수 있다. 본 출원을 위해서, "발현 구조체", "발현 벡터" 및 "벡터"라는 용어는 일반적인 의미에서 본 발명의 출원을 설명하기 위해 상호교환해서 사용되며 본 발명을 제한하려는 것은 아니다.

[0130] 한 실시예에서, miR-499 또는 miR-208b를 발현하기 위한 발현 벡터는 miR-499 또는 miR-208b를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 "작동가능하게 연결된(operably linked)" 프로모터를 포함한다. 다른 실시예에서, 폴리뉴클레오티드는 miR-29b-2/miR-29c 클러스터를 암호화할 수 있다. 본 발명에서 사용된 "작동가능하게 연결된" 또는 "진사제어 하에서"라는 문구는 프로모터가 폴리뉴클레오티드의 RNA 폴리머라제 및 발현에 의해 전사의 개시를 제어하기 위해 폴리뉴클레오티드와 관하여 정확한 위치와 방향에 있다는 것을 의미한다. miR-499를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프라이머리-microRNA-499 서열(pri-miRNA-499), 전구체-microRNA-499 서열(pre-miR-499) 또는 성숙한 miR-499 서열을 암호화할 수 있다. miR-208b를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프라이머리-microRNA-208b 서열(pri-miRNA-208b), 전구체-microRNA-208b 서열(pre-miR-208b) 또는 성숙한 miR-208b 서열을 암호화할

수 있다. 일부 실시예에서, 발현 벡터는 프로모터에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:26 또는 SEQ ID NO:27의 서열을 포함한다. 다른 실시예에서, 발현 벡터는 프로모터에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:26 또는 SEQ ID NO:27의 서열을 포함한다. SEQ ID NO:26 또는 SEQ ID NO:27의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 길이가 약 18 내지 약 2000 뉴클레오티드, 약 70 내지 약 200 뉴클레오티드, 약 20 내지 약 50 뉴클레오티드 또는 약 18 내지 약 25 뉴클레오티드일 수 있다. 다른 실시예에서, miR-499 또는 miR-208b를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 인트론을 암호화하는 핵산에 또는 miRNA 또는 비-암호화 RNA의 번역되지 않은 영역을 암호화하는 핵산에 위치한다. 한 실시예에서, 발현 구조체는 Myh7b 유전자로부터 20th 인트론의 서열을 함유할 수 있다. 다른 실시예에서, 발현 구조체는 Myh7b(β-MHC) 유전자로부터 31th 인트론의 서열을 함유할 수 있다.

[0131] 다른 실시예에서, 발현 벡터는 세포 또는 피험자에게 miR-499 및/또는 miR-208b의 억제제를 전달하는데 사용될 수 있다. miR-499 또는 miR-208b의 억제제를 발현하기 위한 발현 벡터는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하고, 발현된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 서열은 성숙한 miR-499 또는 miR-208b 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보적이다. 또 다른 실시예에서, miR-499 또는 miR-208b의 억제제를 발현하기 위한 발현 벡터는 shRNA 또는 siRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함하고, 발현된 shRNA 또는 siRNA는 성숙한 miR-499 또는 miR-208b 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보적인 서열을 포함한다. "부분적으로 동일한"이란 표적 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 의미한다.

[0132] 본 출원 전체에서, "발현 구조체"는 서열을 암호화하는 핵산의 부분 또는 전부가 번역될 수 있는 유전자 생성물을 암호화하는 핵산을 함유하는 임의의 형태의 유전 구조체를 포함하는 것을 의미한다. 전사물은 단백질로 번역될 수 있으나, 그럴 필요는 없다. 일부 실시예들에서, 발현은 관심 유전자를 암호화하는 핵산의 전사만을 포함한다.

[0133] 일부 실시예에서, 관심 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 핵산은 프로모터의 프로모터의 전사 제어하에 있다. "프로모터"는 유전자의 특이적 전사를 개시하는데 필요한, 세포의 합성 장치 또는 소개된 합성 장치에 의해 인식된 DNA 서열을 의미한다. 프로모터라는 용어는 RNA 폴리머라제에 대한 개시 부위 주위에 명쳐진 전사 제어 모듈의 그룹을 의미하는데 사용될 것이다. 어떻게 프로모터들이 유기체로 되는 지에 대한 많은 생각은 HSV 티미딘 키나아제(tk) 및 SV40 초기 전사 단위에 대한 것들을 포함하는 여러 바이러스 프로모터의 분석으로부터 유도된다. 더욱 최근의 연구에 의해 증가된 이런 연구들은 프로모터들은 각각 대략 7-20bp의 DNA로 이루어지고 전사 활성화자 또는 리프레서 단백질에 대한 하나 이상의 인식 위치를 함유하는 구별된 기능성 모듈로 구성된다.

[0134] 각 프로모터에서 적어도 하나의 모듈은 RNA 합성에 대한 출발 위치를 지정하는 기능을 한다. 이것의 가장 잘 알려진 예는 TATA box이나, 포유류 말단 테옥시뉴클레오티딜 트랜스페라제 유전자 및 SV40 후기 유전자에 대한 프로모터와 같은 TATA box가 없는 일부 프로모터에서, 출발 위치 자체를 덮고 있는 구별된 요소(discrete element)는 개시 위치를 고정하는 것을 돕는다.

[0135] 다른 프로모터 요소들은 전사 개시의 주기를 조절한다. 통상적으로, 이들은 출발 위치의 부위 30-110bp 상부에 위치하나, 여러 프로모터는 출발 위치의 하부에 기능성 요소들을 함유하는 것으로 나타났다. 프로모터 요소들 사이의 공간은 유연하여서, 프로모터 기능은 요소들이 역전되거나 서로에 대해 이동할 때 보존된다. tk 프로모터에서, 프로모터 요소들 사이의 공간은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50bp 떨어지게 증가할 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소들은 동시에 작동하거나 독립적으로 전사를 활성화하도록 작용하는 것으로 보인다.

[0136] 다른 실시예에서, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 극초기 유전자 프로모터, SV40 초기 프로모터, Rous 육종 바이러스 긴 말단 반복체, 쥐 인슐린 프로모터, RNA pol III 프로모터, 및 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제 프로모터는 관심 폴리뉴클레오티드의 고 수준 발현을 얻기 위해 사용될 수 있다. 관심 폴리뉴클레오티드를 얻기 위해 당업계에 주지된 다른 바이러스 또는 포유류 세포 또는 박테리아 파지 프로모터의 사용은, 발현의 수준이 소정의 목적에 맞게 충분한 경우, 고려된다.

[0137] 주지된 특성을 가진 프로모터를 사용함으로써, 트랜스팩션 또는 트랜스포메이션 된 관심 폴리뉴클레오티드의 발현의 수준과 패턴은 최적화될 수 있다. 또한, 특이적 생리 신호들에 반응하여 조절되는 프로모터를 선택함으로써 유전자 생성물의 유도성 발현을 허용할 수 있다. 표 1 및 2는 본 발명의 내용에서, 관심 유전자의 발현을 조절하는데 사용될 수 있는 여러 조절성 요소를 나열한다. 이 목록은 유전자 발현의 증가에 관여하는 모든 가능한 요소들을 포괄하려는 것은 아니고 단지 이를 예시하려는 것이다.

[0138] 인핸서들은 DNA의 동일한 분자에서 떨어진 위치에 위치하는 프로모터로부터 전사를 증가시키는 유전 요소이다. 인핸서들은 프로모터들과 유사하게 유기체화된다. 즉, 인핸서들은 여러 개별 요소로 구성되고, 이의 각각은 하나 이상의 전사 단백질과 결합한다.

[0139] 인핸서들과 프로모터들 사이의 기본 차이는 사용가능성이다. 전체로서 인핸서 부위는 떨어져서 전사를 자극할 수 있어야 하고; 이것은 프로모터 부위 또는 이의 성분 요소에도 들어맞을 필요가 없다. 한편으로, 프로모터는 특정 위치에서와 특정 방향으로 RNA 합성의 개시에 영향을 주는 하나 이상의 요소를 가져야 하는 반면, 인핸서들은 이런 특이성들이 없다. 프로모터들과 인핸서들은 주로 겹쳐지고 연속되어, 종종 매우 동일한 모듈 조직을 갖는 것으로 보인다.

[0140] 바이러스 프로모터, 발현 구조체에서 관심 유전자를 암호화하는 핵산과 조합하여 사용될 수 있는 세포 프로모터/인핸서 및 유도성 프로모터/인핸서의 목록이 아래 나열된다(표 1 및 표 2). 또한, (진핵세포 프로모터 데이터 베이스 EPDB에 따라) 임의의 프로모터/인핸서 조합은 유전자의 발현을 유도하는데 사용될 수 있다. 진핵세포는 전달 작물의 일부로서 또는 추가 유전자 발현 구조체로서 적절한 박테리아 폴리머라제가 제공되는 경우, 특정 박테리아 프로모터들로부터 세포질 전사를 지원할 수 있다. 바람직한 한 실시예에서, miR-29a-c 또는 miR-29a-c 길항제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 섬유아세포 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

표 1

TABLE 1 Promoter and/or Enhancer	
Promoter/Enhancer	References
Immunoglobulin Heavy Chain	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> ; 1990
Immunoglobulin Light Chain	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T-Cell Receptor	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> ; 1990
HLA DQ a and/or DQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β-Interferon	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
Interleukin-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
Interleukin-2 Receptor	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHC Class II 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHC Class II HLA-DRa	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β-Actin	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> ; 1989
Muscle Creatine Kinase (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
Prealbumin (Transthyretin)	Costa <i>et al.</i> , 1988
Elastase I	Ornitz <i>et al.</i> , 1987
Metallothionein (MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
Collagenase	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987a
Albumin	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
α-Fetoprotein	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
t-Globin	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
β-Globin	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
Insulin	Edlund <i>et al.</i> , 1985
Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990

[0141]

TABLE 1 Promoter and/or Enhancer	
Promoter/Enhancer	References
α_1 -Antitrypsin	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B (TH2B) Histone	Hwang <i>et al.</i> , 1990
Mouse and/or Type I Collagen	Ripe <i>et al.</i> , 1989
Glucose-Regulated Proteins (GRP94 and GRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
Rat Growth Hormone	Larsen <i>et al.</i> , 1986
Human Serum Amyloid A (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
Troponin I (TN I)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
Duchenne Muscular Dystrophy	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
Polyoma	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell and/or Villarreal, 1988
Retroviruses	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Choi <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
Papilloma Virus	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987
Hepatitis B Virus	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
Human Immunodeficiency Virus	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989

[0142]

TABLE 1 Promoter and/or Enhancer	
Promoter/Enhancer	References
Cytomegalovirus (CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foeking <i>et al.</i> , 1986
Gibbon Ape Leukemia Virus	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

[0143]

표 2

TABLE 2 Inducible Elements		
Element	Inducer	References
MT II	Phorbol Ester (TFA) Heavy metals	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeall <i>et al.</i> , 1989
MMTV (mouse mammary tumor virus)	Glucocorticoids	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
β-Interferon	poly(rI)x poly(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
Adenovirus 5 E2	EIA	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
Collagenase	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
Stromelysin	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
Murine MX Gene	Interferon, Newcastle Disease Virus	Hug <i>et al.</i> , 1988
GRP78 Gene	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
α-2-Macroglobulin	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
Vimentin	Serum	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHC Class I Gene H-2kb	Interferon	Blonar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	EIA, SV40 Large T Antigen	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
Proliferin	Phorbol Ester-TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
Tumor Necrosis Factor	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
Thyroid Stimulating Hormone α Gene	Thyroid Hormone	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

[0144]

[0145]

근육 특이적 프로모터(예를 들어, 근육 크레아틴 키나아제), 더욱 구체적으로, 심장 특이적 프로모터가 특히 관심대상이다. 이들은 마이소신 경사슬-2 프로모터(Franz et al, 1994; Kelly et al, 1995), 알파 액틴 프로모터(Moss et al, 1996), 트로포닌 I 프로모터(Bhavsar et al, 1996); Na⁺/Ca²⁺ 익스체인저 프로모터(Barnes et al, 1997), 디스트로핀 프로모터(Kimura et al, 1997), 알파7 인티그린 프로모터(Ziober and Kramer, 1996), 심장나트륨이노 펩티드 프로모터(LaPointe et al, 1996) 및 알파 B-크리스탈린/소형 열 충격 단백질 프로모터(Gopal-Srivastava, 1995), 알파 마이오신 중사슬 프로모터(Yamauchi-Takihara et al, 1989) 및 ANF 프로모터(LaPointe et al, 1988)를 포함한다.

[0146]

cDNA 삽입체가 사용되는 경우, 유전자 전사물의 적절한 폴리아데닐화를 나타내기 위한 폴리아데닐화 신호를 포함하는 것을 통상적으로 원할 것이다. 폴리아데닐화 신호의 성질은 본 발명의 성공적인 실시예에 중요하지 않은 것으로 생각되며, 인간 성장 호르몬 및 SV40 폴리아데닐화 신호와 같은 임의의 이런 서열이 사용될 수 있다. 또한 발현 카세트의 요소로서 종결자가 고려된다. 이런 요소들은 메세지 수준을 향상시키고 카세트로부터 다른 서열들 속으로의 리드 스루(read through)를 최소화하는 역할을 할 수 있다.

[0147]

본 발명의 특정 실시예들에서, 본 발명의 핵산 구조체를 함유하는 세포들이 발현 구조체에서 마커를 포함함으로써 인비트로 또는 인비보에서 동정될 수 있다. 이런 마커들은 발현 구조체를 함유하는 세포들의 쉬운 동정을 허용하는 세포에 동정가능한 변화를 부여할 수 있다. 주로 약물 선택 마커의 삽입은 형질전환체의 복제 및 선택에 도움을 주며, 예를 들어, 예를 들어, 네오마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티딘올에 저항력을 부여하는 유전자들은 효과적인 선택 마커들이다. 선택적으로, 단순포진 바이러스 티미딘 키나아제(tk) 또는

클로람페니콜 아세틸트랜스페라제(CAT)와 같은 효소들이 사용될 수 있다. 면역성 마커들이 사용될 수 있다. 사용된 선택 마커는, 유전자 생성물을 암호화하는 핵산과 동시에 발현될 수 있는 한 중요하지 않은 것으로 생각된다. 선택 마커들의 다른 예들은 당업자에게 주지되어 있다.

- [0148] 발현 벡터들이 세포들 속에 주입되는 데 여러 방식이 있다. 본 발명의 특정 실시예들에서, 발현 구조체는 바이러스 게놈으로부터 유도된 바이러스 또는 가공된 구조체를 포함한다. 수용체-매개 내포 작용을 통해 세포들 속으로 들어가고, 숙주 세포 게놈 속으로 통합되고 바이러스 유전자를 안정적이고 효과적으로 발현하는 특정 바이러스의 능력은 외래 유전자들을 포유류 세포들 속으로 전달하기 위한 매력적인 후보들로 만든다(Ridgeway, 1988; Nicolas and Rubenstein, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Temin, 1986).
- [0149] 인비보 전달을 위한 바람직한 방법들 중 하나는 아데노바이러스 발현 벡터의 사용을 포함한다. "아데노바이러스 발현 벡터"는 (a) 구조체의 패키징을 돕고 (b) 그 안에서 복제된 폴리뉴클레오티드를 발현하는데 충분한 아데노바이러스 서열들을 함유하는 구조체들을 포함하는 것을 의미한다. 발현 벡터는 아데노바이러스 유전학적으로 가공된 형태를 포함한다. 아데노바이러스, 36kB, 직선, 이중 가닥 DNA 바이러스의 유전적 구조의 지식은 큰 조각의 아데노바이러스 DNA의 7kB 외래 서열들에 의한 치환을 허용한다(Grunhaus and Horwitz, 1992). 레트로바이러스와 반대로, 숙주 세포들의 아데노바이러스 감염은 아데노바이러스 DNA는 잠재적 유전 독성이 없는 에피소말 방식(episomal manner)으로 복제될 수 있기 때문에 염색체 통합을 일으키지 않는다. 또한, 아데노바이러스들은 구조적으로 안정하고 게놈 재배열이 광범위한 증폭 이후 탐지되지 않는다. 아데노바이러스는 이들의 세포 주기 상태와 상관없이 거의 모든 내피 세포들을 감염시킬 수 있다.
- [0150] 아데노바이러스는 중간 크기의 게놈, 쉬운 복제, 높은 규정농도, 넓은 표적 세포 범위 및 높은 감염성 때문에 유전자 운반 벡터로 사용하기에 특히 적합하다. 바이러스 게놈의 양 말단은 100-200 염기쌍의 역전된 반복체(ITRs)를 함유하며, 바이러스 DNA 복제 및 패키징에 필수적인 *cis* 요소들이다.
- [0151] 아데노바이러스 벡터는 복제 결함이 있거나 적어도 조건부적으로 결함이 있다는 조건 이외에, 아데노바이러스 벡터의 성질은 본 발명의 성공적 실시예에 중요한 것으로 생각되지 않는다. 아데노바이러스는 42개 다른 공지된 세로타입 또는 하부 그룹 A-F 중 임의의 것일 수 있다. 하부 그룹 C 중 아데노바이러스 타입 5는 본 발명에서 사용하기 위한 조건부 복제-결함 아데노바이러스 벡터(conditional replication-defective adenovirus vector)를 얻기 위한 바람직한 출발 물질이다. 이것은 아데노바이러스 타입 5가 상당량의 생화학적 및 유전 정보가 공지된 인간 아데노바이러스이기 때문이며, 아데노바이러스 타입 5는 벡터로서 아데노바이러스를 사용하는 대부분의 구조에 오랫동안 사용되고 있다.
- [0152] 상기한 대로, 본 발명에 따른 전형적인 벡터는 복제 결함이 있고 아데노바이러스 E1 영역을 갖지 않을 것이다. 따라서, E1-암호화 서열들이 제거된 위치에서 관심 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 주입하는 것이 가장 편리할 것이다. 그러나, 아데노바이러스 서열들 내에 구조체의 삽입 위치는 본 발명에 중요하지 않다. 관심 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 Karlsson et al. (1986)에 개시된 대로 E3 치환 벡터에서 제거된 E3 영역 또는 헬퍼 세포주 또는 헬퍼 바이러스가 E4 결함을 보완하는 E4 영역 대신에 삽입될 수 있다.
- [0153] 아데노바이러스 벡터들은 진행 유전자 발현(Levrero et al., 1991; Gomez -Foix et al., 1992) 및 백신 개발(Grunhaus and Horwitz, 1992; Graham and Prevec, 1991)에 사용되고 있다. 최근에, 동물 연구들은 재조합 아데노바이러스는 유전자 치료에 사용될 수 있다는 것을 제안하였다(Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991; Stratford- Perricaudet et al., 1990; Rich et al, 1993). 재조합 아데노바이러스를 다른 조직들에 투여하는 것에 대한 연구들은 기관내 삽입(Rosenfeld et al, 1991; Rosenfeld et al, 1992), 근육 주사(Ragot et al, 1993), 말초 정맥 주사(Herz and Gerard, 1993) 및 뇌 속으로 정위 접종(Le Gal La Salle et al, 1993)을 포함한다.
- [0154] 레트로바이러스 벡터들은 세포들에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하기 위해 적합하다. 레트로바이러스들은 역전사 과정에 의해 감염된 세포들에서 이들의 RNA를 이중 가닥 DNA로 변환하는 능력을 특징으로 하는 단일 가닥 RNA 바이러스의 그룹이다(Coffin, 1990). 그런 후에 이렇게 얻은 DNA는 프로 바이러스로서 세포 염색체 속으로 안정적으로 통합되고 바이러스 단백질의 합성을 명령한다. 통합은 수혜 세포 및 이의 후손에서 바이러스 유전자 서열의 보존을 일으킨다. 레트로바이러스 게놈은 각각 캡시드 단백질, 폴리머라제 효소 및 외피 성분을 암호화하는 3개 유전자, gag, pol 및 env를 함유한다. gag 유전자로부터 상부에 발견된 서열은 비리온들 속으로 게놈의 패키징을 위한 신호를 함유한다. 2개의 긴 말단 반복체(LTR) 서열들은 바이러스 게놈의 5' 및 3' 말단에 존재한다. 2개의 긴 말단 반복체는 강한 프로모터 및 인핸서 서열들을 함유하고 숙주 세포 게놈에서 통합을 위해 필요하다(Coffin, 1990).

- [0155] 레트로바이러스 벡터를 제조하기 위해서, 관심 유전자를 암호화하는 핵산은 복제-결합이 있는 바이러스를 생산하기 위해 특정 바이러스 서열의 위치에 있는 바이러스 게놈 속으로 삽입된다. 비리온들을 생산하기 위해서, LTR 및 패키징 성분들을 갖지 않는 gag, pol 및 env 유전자들을 함유하는 패키징 세포주가 제조된다(Mann et al, 1983). 레트로바이러스 LTR 및 패키징 서열들과 함께 cDNA를 함유하는 재조합 플라스미드가 (예를 들어, 인산칼슘 침투에 의해) 이 세포주 속으로 주입될 때, 패키징 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사물이 바이러스 입자들 속에 포장되게 하여, 배지 속으로 분비된다(Nicolas and Rubinstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al, 1983). 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지는 수집되고, 선택적으로 농축되어 유전자 전달에 사용된다. 레트로바이러스 벡터들은 매우 다양한 세포 형태를 감염시킬 수 있다. 그러나, 통합과 안정한 발현은 숙주 세포들의 분할을 필요로 한다(Paskind et al, 1975).
- [0156] 다른 바이러스 벡터들은 본 발명의 발현 구조체들에서 사용될 수 있다. 우두 바이러스(Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al, 1988) 아데노-결합 바이러스(AAV)(Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Hermonat and Muzycska, 1984) 및 헤르페스바이러스와 같은 바이러스로부터 유도된 벡터들이 사용될 수 있다. 이들은 다양한 포유류 세포들에 여러 가지 매력적인 특징을 제공한다(Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al, 1988; Horwich et al, 1990).
- [0157] 센스 또는 안티센스 유전자 구조체의 발현에 영향을 주기 위해서, 발현 구조체는 세포 속으로 전달되어야 한다. 이런 전달은 세포주들을 변형시키기 위한 실험실 절차와 같이 인비트로 또는 특정 질환 상태의 치료와 같이 인비보 또는 엑스 비보로 수행될 수 있다. 전달을 위한 한 매커니즘은 발현 구조체가 감염된 바이러스 입자에 단백질 막으로 둘러싸이는 바이러스 감염을 통해 전달된다.
- [0158] 발현 구조체를 배양된 포유류 세포 속에 전달하기 위한 여러 비-바이러스적 방법이 본 발명에서 고려된다. 이들은 인산칼슘 침투(Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al, 1990), DEAE-텍스트란(Gopal, 1985), 전기천공법(Tur-Kaspa et al, 1986; Potter et al, 1984), 직접 초미세주사법(Harland and Weintraub, 1985), DNA-로드 리포솜(Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al, 1979) 및 리포펙타민-DNA 착물들, 세포 음과과쇄(Fechheimer et al, 1987), 고속 미세추진체를 사용하는 유전자 충돌(Yang et al, 1990) 및 수송체-매개 트랜스펙션(Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988)을 포함한다. 이런 기술들의 일부는 인비보 또는 엑스 비보 사용을 위해 성공적으로 적용될 수 있다.
- [0159] 일단 발현 구조체가 세포 속으로 전달되면, 관심 유전자를 암호화하는 핵산은 다른 위치들에 위치하고 발현될 수 있다. 특정 실시예들에서, 유전자를 암호화하는 핵산은 세포의 게놈 속으로 안정적으로 통합될 수 있다. 이 통합은 동형 재조합(유전자 교환)에 의해 같은 위치 및 방향에서 일어날 수 있거나 무작위, 비-특이적 위치(유전자 증가)에서 통합될 수 있다. 또 다른 실시예들에서, 핵산은 DNA의 분리된 에피소멀 단편으로서 세포에 안정적으로 유지될 수 있다. 이런 핵산 단편 또는 "에피솜"은 숙주 세포 주기와 독립적으로 또는 동시에 유지 및 복제를 허용하기에 충분한 서열들을 암호화한다. 어떻게 발현 구조체가 세포로 전달되고 세포에서 핵산이 존재하는 곳이 어디인 지는 사용된 발현 구조체의 타입에 의존한다.
- [0160] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 발현 구조체는 단순히 네이키드 재조합 DNA 또는 플라스미드로 이루어질 수 있다. 구조체의 전달은 세포막을 물리적 또는 화학적으로 삼투할 수 있는 상기한 방법들 중 임의의 것에 의해 수행될 수 있다. 이것은 특히 인비트로 전달에 사용할 수 있으나 인비보 용도에도 사용될 수 있다. 두벤스키 등(1984)은 인산칼슘 침전물 형태의 폴리오마바이러스 DNA를 활동적인 바이러스 복제 및 급성 감염을 나타내는 어린 및 새끼 생쥐의 간 및 이자 속으로 성공적으로 주입하였다. 벤브니스티 및 네스프(1986)는 인산칼슘-침전 플라스미드의 직접 복강내 주사는 트랜스펙트된 유전자의 발현을 일으킨다는 것을 증명하였다. 관심 유전자를 암호화하는 DNA는 인비보와 유사한 방식으로 운반되고 유전자 생성물을 발현할 수 있다고 생각된다.
- [0161] 네이키드 DNA 발현 구조체를 세포 속으로 전달하기 위한 본 발명의 또 다른 실시예에서는 입자 충돌을 사용할 수 있다. 이 방법은 DNA-코팅된 미세추진체를 고속으로 가속하여 세포막을 뚫고 세포들을 죽이지 않고 세포 속으로 들어가는 능력에 달려있다(Klein et al, 1987). 작은 입자들을 가열하기 위한 여러 장치가 개발되었다. 하나의 이런 장치는 운동력을 제공하는 진류를 발생시키기 위해 높은 전압 방전에 의존한다(Yang et al, 1990). 사용된 미세추진체들은 텅스텐 또는 금속 구슬과 같은 생물학적으로 안정한 물질들로 구성되었다.
- [0162] 쥐 및 생쥐의 간, 피부 및 근육 조직을 포함하는 선택된 기관들은 인비보로 충돌되었다(Yang et al, 1990; Zelenin et al, 1991). 이것은 종과 표적 기관 사이의 임의의 삽입 조직을 제거하기 위해 조직 또는 세포의 외과적 노출, 즉 엑스 비보 처리가 필요로 할 수 있다. 또한, 특정 유전자를 암호화하는 DNA가 이 방법을 통해 전

달릴 수 있고 본 발명에 의해 포함될 수 있다.

- [0163] 본 발명의 다른 실시예에서, 발현 구조체는 리포솜에 갇힐 수 있다. 리포솜은 인지질 이중막 및 내부 수성 매질을 특징으로 하는 소포 구조이다. 다중 층상 리포솜들은 수성 매질에 의해 분리된 다중 지질 층을 가진다. 다중 층상 리포솜은 인지질이 과량의 수용액에 현탁될 때 자동적으로 형성된다. 지질 성분들은 밀폐된 구조를 형성하기 이전에 자가-재배열되고 지질 이중 층들 사이에 물과 용해된 용질을 가둔다(Ghosh and Bachhawat, 1991). 리포펙타민-DNA 착물이 고려된다.
- [0164] 리포솜-매개 핵산 전달 및 인비트로로 외래 DNA의 발현은 매우 성공적이었다. 왕 등(1980)은 리포솜-매개 전달 및 배양된 닭 태아, HeLa 및 간종양 세포에서 외래 DNA의 발현의 가능성을 증명하였다. 니콜라우 등(1987)은 정맥 주사 후 쥐들에서 성공적인 리포솜-매개 유전자 전달을 이루었다.
- [0165] 본 발명의 특정 실시예들에서, 리포솜은 적혈구용집 바이러스(HVJ)와 착물을 형성할 수 있다. 이것이 세포막과 융합을 용이하게 하고 리포솜-봉입 DNA의 세포 참가를 향상시키는 것으로 증명되었다(Kaneda et al., 1989). 다른 실시예에서, 리포솜은 핵 비-히스톤 염색체 단백질(HMG-1)과 함께 착물을 형성하거나 사용될 수 있다(Kato et al., 1991). 또 다른 실시예들에서, 리포솜은 HIV 및 HMG-1 모두와 함께 착물을 형성하거나 사용될 수 있다. 이런 발현에서 구조체들은 인비트로 및 인비보 핵산의 전달과 발현에서 성공적으로 사용되었고, 이들은 본 발명에 사용될 수 있다. 박테리아 프로모터가 DNA 구조체에 사용될 경우, 리포솜 내에 적절한 박테리아 폴리머라제를 포함하는 것이 바람직할 것이다.
- [0166] 세포들 속으로 특정 유전자를 암호화하는 핵산을 전달하는데 사용될 수 있는 다른 발현 구조체들은 수용체-매개 전달 운반체이다. 이들은 거의 모든 진핵 세포들에서 수용체-매개 내포작용에 의한 거대분자들의 선택적 흡수를 이용한다. 다양한 수용체들의 세포 타입-특이적 분배 때문에, 전달은 매우 특이적일 수 있다(Wu and Wu, 1993).
- [0167] 수용체-매개 유전자 표적화 운반체들은 일반적으로 두 개의 성분: 세포 수용체-특이적 리간드 및 DNA-결합체로 이루어진다. 여러 리간드는 수용체-매개 유전자 전달을 위해 사용되었다. 가장 광범위하게 특징적인 리간드들은 아시알루로스뮤코이드(asialoorosomuroid)(Wu and Wu, 1987) 및 트랜스페린(Wagner et al., 1990)이다. 최근에, ASOR과 동일한 수용체를 인식하는 합성 네오글리코프로틴이 유전자 전달 운반체로 사용되었고(Ferkol et al., 1993; Perales et al., 1994) 상피세포 성장인자(EGF)는 유전자들을 편평상피 암종 세포들(Myers, EPO 0273085)에 전달하는데 사용되었다.
- [0168] 다른 실시예들에서, 전달 운반체는 리간드와 리포솜을 포함할 수 있다. 예를 들어, 니콜라우 등(1987)은 리포솜에 포함된 락토실-세라미드, 갈락토스-말단 아시알간글리오시드를 사용하였고 간세포들에 의한 인슐린 유전자의 흡수의 증가를 관찰하였다. 따라서, 특정 유전자를 암호화하는 핵산은 리포솜을 갖거나 갖지 않은 임의의 수의 수용체-리간드 시스템에 의해 한 세포 타입 속으로 특이적으로 전달될 수 있는 것이 가능하다. 예를 들어, 상피세포 성장인자(EGF)는 EGF 수용체의 상승 조절을 나타내는 세포들 속으로 핵산의 매개 전달을 위한 수용체로서 사용될 수 있다. 만노스는 간 세포들에 대해 만노스 수용체를 표적화하는데 사용될 수 있다. 또한, CD5(CLL), CD22(림포마), CD25(T-세포 백혈병) 및 MAA(흑색종)에 대한 항체들은 표적 모이어티로 유사하게 사용될 수 있다.
- [0169] 한 구체적인 실시예에서, 올리고뉴클레오티드는 양이온성 지질과 함께 투여될 수 있다. 양이온성 지질의 예들은 리포펙틴, DOTMA, DOPE 및 DOTAP를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 참조로 포함된 WO/0071096의 공개공보는 DPTAP: 유전자 치료에 효과적으로 사용될 수 있는 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체 제제와 같은 다른 제제를 개시한다. 다른 문헌들도 나노입자들을 포함하는 다른 지질 또는 리포솜 제제 및 투여 방법을 논의한다; 이들은 제제 및 투여의 다른 관련 태양 및 핵산의 전달을 개시하는 정도로 참조로 본 발명에 포함된 미국특허공보 20030203865, 20020150626, 20030032615 및 20040048787을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 입자들을 형성하기 위해 사용된 방법들은 이런 태양을 위해 참조로 포함된 미국특허 5,844,107, 5,877,302, 6,008,336, 6,077,835, 5,972,901, 6,200,801 및 5,972,900에 개시된다.
- [0170] 특정 실시예들에서, 유전자 전달은 엑비보 상태하에서 더욱 쉽게 수행될 수 있다. 엑스 비보 유전자 치료는 동물로부터의 세포들을 분리, 인비트로로 세포들 속으로 핵산의 전달 및 다시 동물로 변형된 세포로의 복귀를 의미한다. 이것은 동물의 조직/기관의 외과적 제거 또는 세포들 및 조직들의 일차 배양을 포함할 수 있다.
- [0171] **피험자에게 투여하기 위한 제형 및 경로**
- [0172] 본 발명은 miR-499 및/또는 miR-208b의 억제제 또는 효현제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 치료 용도를 고려하면, 약학적 조성물들은 의도된 용도에 적합한 형태로 제조될 것이다. 일반적으로, 인간 또는 동물에 해로

을 수 있는 다른 불순물들뿐만 아니라 발열성 물질이 필수적으로 제거된 조성물들을 제조하는 것을 포함할 것이다.

[0173] 거대 분자 착물들, 나노캡슐, 미세구, 비드와 같은 콜로이드 분산 시스템, 및 오일-인-워터 에멀전, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 지질계 시스템이 miRNA 모방체 또는 miRNA 억제제를 위한 전달 수단으로 사용될 수 있다. 심장 및 골격근 조직에 본 발명의 핵산을 전달하는데 적합한 상업적으로 구입할 수 있는 지방 에멀전은 Intralipid®

, Liposyn®

II, Liposyn®

III, Nutrilipid 및 다른 유사 지질 에멀전을 포함한다. 인비보 전달 수단으로서 사용하기 위한 바람직한 콜로이드 시스템은 리포솜(즉, 인공 막 소포)이다. 이런 시스템의 제조 및 사용은 당업계에 주지되어 있다. 예시적 제제들은 전문이 참조로 본 발명에 포함된 US 5,981,505; US 6,217,900; 6,383,512; US 5,783,565; US 7,202,227; US 6,379,965; US 6,127,170; US 5,837,533; US 6,747,014; 및 W003/093449에 개시된다.

[0174] 일반적으로 운반 벡터들을 안정하게 하고 표적 세포들에 의해 흡수되도록 하기 위해 적절한 염들과 버퍼들을 사용할 것이다. 또한 버퍼들은 재조합 세포들이 환자에게 주입될 때 사용될 것이다. 본 발명의 수성 조성물들은 억제제 폴리뉴클레오티드 또는 miRNA 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 리포솜 또는 다른 착물 또는 발현 벡터) 또는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 수성 매질에 용해되거나 분산된 세포를 포함하는 유효량의 전달 운반체를 포함한다. "약학적으로 허용가능한" 또는 "약리학적으로 허용가능한"이란 용어는 동물 또는 인간에게 투여되었을 때 나쁜 반응, 알레르기 반응 또는 기타 불리한 반응을 일으키지 않는 분자 물질 및 조성물을 의미한다. 본 발명에서 사용된 대로, "약학적으로 허용가능한 담체"는 인간 투여에 적합한 약물과 같은 약물을 제제화하는데 사용하기 적합한 용매, 버퍼, 용액, 분산 매질, 코팅제, 항진균제 및 항균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적으로 활성인 물질들을 위한 이런 매질 및 물질의 사용은 당업계에 주지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 물질이 본 발명의 활성 성분들과 혼용될 수 없다는 것을 제외하고, 치료 조성물들에서 이의 용도가 고려된다. 또한 보충 활성 성분들은 조성물들의 벡터 또는 셀을 불활성화시키지 않은 경우, 조성물들에 포함될 수 있다.

[0175] 본 발명의 활성 조성물들은 전형적인 약학적 제제를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 이런 조성물들의 투여는 표적 조직이 그 경로를 통해 사용할 수 있는 한 임의의 통상적인 경로를 통할 수 있다. 선택적으로, 투여는 내피, 피하, 근육내, 복강내 또는 정맥 주사 또는 심장 조직 속으로의 직접 주사에 의해 투여될 수 있다. miRNA 길항제를 포함하는 약학적 조성물 또는 miRNA 서열을 포함하는 발현 구조체는 카테테르 시스템 또는 심장에 치료제를 전달하기 위한 관상동맥 순환을 분리하는 시스템에 의해 투여될 수 있다. 심장과 관상동맥에 치료제를 전달하기 위한 다양한 카테테르 시스템은 당업계에 공지되어 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 카테테르-기초 전달 방법 또는 관상동맥 분리 방법의 일부 비 제한적인 예들은 전문이 참조로 본 발명에 포함된 미국특허 제 6,416,510호; 미국특허 제 6,716,196호; 미국특허 제 6,953,466호, WO 2005/082440, WO 2006/089340, 미국특허공개공보 제 2007/0203445, 미국특허공개공보 제 2006/0148742호 및 미국특허공개공보 제 2007/0060907호에 개시된다. 이런 조성물들은 상기한 대로, 약학적으로 허용가능한 조성물로서 통상적으로 투여될 것이다.

[0176] 활성 화합물들은 또한 비경구 또는 복강으로 투여될 수 있다. 설명을 위해서, 자유 염기 또는 약리학적으로 허용가능한 염들로서 활성 화합물들의 용액은 하이드록시프로필셀룰로오스와 같은 계면활성제와 적절하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 또한 분산액은 글리세롤, 지질 폴리에틸렌 글리콜, 및 이의 혼합물에서 및 오일에서 제조될 수 있다. 보통의 저장 및 사용 상태하에서, 이런 제제들은 일반적으로 미생물들의 성장을 억제하기 위해 방부제를 포함한다.

[0177] 주사용으로 적절한 약학적 형태는, 예를 들어, 살균 수용액 또는 분산액 및 살균 수성 용액 또는 분산액 및 살균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 살균 분말을 포함한다. 일반적으로, 이런 제제들은 살균되며 쉽게 주사할 수 있을 정도로 유동성이 있다. 제제들은 제조 및 저장의 상태하에서 안정해야 하며 박테리아와 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 적절한 용매 또는 분산 매질은, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 지질 폴리에틸렌 글리콜 등), 이의 적절한 혼합물, 및 식물유를 포함할 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 루시틴과 같은 코팅제의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은, 파라벤, 클로로부

탄올, 페놀, 소르브산, 티머로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제에 의해 이루어질 수 있다. 많은 경우, 등장화제, 예를 들어, 설탕 또는 염화 나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물들의 지속적 흡수는 조성물에 흡수 지연제, 예를 들어, 알루미늄 모노스트레이트 및 젤라틴을 사용하여 이루어질 수 있다.

- [0178] 살균 주사 용액은 용매 속에 적절한 양으로 활성 화합물과 다른 성분들(예를 들어, 상기한 것)을 혼합시키고, 여과 살균하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 다양한 살균 활성 성분을 기본 분산액 매질과 상기한 다른 성분들을 포함하는 살균 부형제 속에 혼합시킴으로써 제조된다. 살균 주사 용액의 제조를 위한 살균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 미리 살균-여과된 용액으로부터 활성 성분(들) 및 임의의 추가의 원하는 성분들을 얻는 진공-건조 및 동결-건조 기술을 포함한다.
- [0179] 본 발명의 조성물들은 일반적으로 천연 또는 염 형태로 제제화될 수 있다. 약학적으로-허용가능한 염들은, 예를 들어, 무기산(예를 들어, 염산 또는 인산) 또는 유기산(예를 들어, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등)으로부터 유도된 산 첨가 염들(단백질의 유리 아미노기로부터 형성)을 포함한다. 단백질의 유리 카복실기로 형성된 염들은 무기 염기(예를 들어, 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 암모늄, 수산화 칼슘 또는 수산화 제이철) 또는 유기 염기(예를 들어, 아이소프로필아민, 트라이메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등)로부터 유도될 수 있다.
- [0180] 제제화 후, 용액들은 복용 제형과 혼용가능한 방식과 치료적으로 효과적인 양으로 투여되는 것이 바람직하다. 제형들은 주사 용액, 약물 방출 캡슐 등과 같은 다양한 복용 형태로 쉽게 투여될 수 있다. 수용액으로 비경구 투여를 위해, 용액은 일반적으로 적절하게 완충용액으로 처리되고 액체 희석제는 먼저 충분한 염수 또는 글루코스 등장성이 제공된다. 이런 수용액은, 예를 들어, 정맥, 근육내, 피하 및 복강 투여에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 살균 수용 매질은 당업자에게 공지된 대로, 특히 본 발명의 설명을 고려하여 사용된다. 설명을 위해서, 단일 복용은 1ml의 등장성 NaCl 용액에 용해하고 1000ml의 대량피하주사 액체에 첨가되거나 제안된 주입 위치에 주사될 수 있다(예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580 참조). 복용의 일부 변화는 치료될 피험자의 상태에 따라 반드시 일어날 것이다. 투여하는 사람은, 어떤 경우에도, 개별 피험자에 대한 적절한 복용량을 결정할 것이다. 또한, 인간 투여의 경우, 제제는 FDA의 생물학적 표준이 요구하는 살균성, 발열원성 검사, 일반적인 안전 및 순도 기준을 충족시켜야 한다.
- [0181] 개시한 조성물들 중 어떤 것도 키트에 포함될 수 있다. 비 제한적인 예에서, 개별 miRNA가 키트에 포함된다. 키트는 miRNAs의 두 가닥의 잡종화를 촉진하기 위해 물과 잡종화 버퍼를 더 포함할 수 있다. 또한 키트는 miRNA 또는 miRNA 길항제의 세포로의 전달을 촉진하기 위해 하나 이상의 트랜스펙션 물질(들)을 포함할 수 있다.
- [0182] 키트의 성분들은 수성 매질 또는 지질 형태로 포장될 수 있다. 키트의 용기 수단은 일반적으로 적어도 하나의 작은 병, 테스트 튜브, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기 수단을 포함할 것이고, 성분은 그 안에 놓이며, 바람직하게는 적절하게 배치된다. 키트에 하나 이상의 성분(레이블링 시약 및 레이블은 함께 포장될 수 있다)가 있는 경우, 키트는 일반적으로 제 2, 제 3 또는 다른 추가 용기를 포함할 것이고 이곳에 다른 성분들이 분리되어 놓일 수 있다. 그러나, 성분들의 다양한 조합이 한 병에 포함될 수 있다. 본 발명의 키트는 핵산을 수용하기 위한 수단과 상업용 판매를 위해 단단히 밀폐된 임의의 다른 시약 용기를 포함할 것이다. 이런 용기들은 주사 또는 중공성형 플라스틱 용기들을 포함할 수 있고 이 속에 원하는 병들이 유지된다.
- [0183] 키트의 성분들이 하나 및/또는 그 이상의 용액에 제공되는 경우, 용액은 수용액이고, 살균 용액이 특히 바람직하다.
- [0184] 그러나, 키트의 성분들은 건조 분말(들)로 제공될 수 있다. 시약들 및/또는 성분들이 건조 분말로 제공되는 경우, 분말은 적절한 용매의 첨가로 재구성될 수 있다. 용매는 다른 용기 수단에 제공될 수 있다고 생각된다.
- [0185] 용기 수단은 일반적으로 적어도 하나의 작은 병, 테스트 튜브, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기 수단을 포함할 것이고, 이 속에 핵산 제제가 놓이며, 바람직하게는 적절하게 배치된다. 키트는 살균된, 약학적으로 허용가능한 버퍼 및/또는 다른 희석제를 수용하기 위한 제 2 용기 수단을 포함할 수 있다.
- [0186] 본 발명의 키트는 상업용 판매를 위해 단단히 밀폐된 병을 수용하기 위한 수단을 포함할 수 있는데, 예를 들어, 주사 및/또는 중공성형 플라스틱 용기들이며 이 속에 원하는 병들이 유지된다.
- [0187] 이런 키트는 miRNA를 보존 또는 유지하거나 이의 열화를 막는 성분들을 포함할 수 있다. 이런 성분들은 RNase-제거될 수 있거나 RNases를 보호한다. 이런 키트는 일반적으로, 적절한 수단에, 각 개별 시약 또는 용액을 위한 구별된 용기들을 포함할 것이다.

- [0188] 키트는 키트에 포함되지 않은 다른 시약들의 용도뿐만 아니라 키트 성분을 사용하기 위한 지침들이 들어있다. 지침들은 수행될 수 있는 변화들이 들어있다.
- [0189] 이런 시약들은 본 발명의 키트의 실시예라고 생각된다. 그러나, 이런 키트는 상기한 특정 항목에 제한되지 않으며 miRNA의 조작 또는 묘사를 위해 사용된 임의의 시약을 포함할 수 있다.
- [0190] **조절제들을 동정하기 위한 방법**
- [0191] 본 발명은 miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제들을 동정하는 방법들을 더 포함한다. miR-499 및/또는 miR-208b의 동정된 억제제들은 심비대, 심부전 또는 심근 경색의 예방 또는 치료 또는 역전에 효과적이다. miR-499 및/또는 miR-208b의 동정된 효현제들은 근골격 질환의 치료 또는 예방에 효과적이다. miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제들은 본 발명의 방법들에 따라 심장 질환 및/또는 근골격 질환의 치료를 위한 약학적 조성물을 포함할 수 있다.
- [0192] 이런 분석법은 후보 물질들의 대형 라이브러리를 랜덤 스크리닝하는 것을 포함할 수 있고; 선택적으로, 분석법은 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 및/또는 기능을 억제하게 하는 것으로 생각되는 구조적 특성들에 대해 논의로 선택한 화합물들의 특정 집단에 집중하는데 사용될 수 있다.
- [0193] miR-499 또는 miR-208b의 조절제를 동정하기 위해서, 일반적으로 후보 화합물의 존재 및 부존재하에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 기능을 확인할 것이다. 예를 들어, 한 방법은 일반적으로:
- [0194] (a) 후보 물질을 제공하는 단계;
- [0195] (b) 상기 후보 물질과 miR-499 및/또는 miR-208b를 혼합하는 단계;
- [0196] (c) miR-499 및/또는 miR-208b 활성을 측정하는 단계; 및
- [0197] (d) 단계(c)에서의 활성과 후보 물질의 부존재하에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 활성을 비교하는 단계를 포함하며, miR-499 및/또는 miR-208b의 측정된 활성들 사이의 차이는 후보 물질이 miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제라는 것을 나타낸다.
- [0198] 또한 분석법은 분리된 세포, 기관 또는 생물에서 수행될 수 있다.
- [0199] miR-499 또는 miR-208b 활성 또는 발현을 측정하는 것은 miR-499 또는 miR-208b의 발현 수준을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 당업자는, 예를 들어, 노던 블로팅 또는 RT-PCR을 포함하는 RNA 발현 수준을 측정하기 위한 여러 방법을 잘 알 것이다. miR-499 또는 miR-208b 활성 또는 발현을 측정하는 것은 miR-499 또는 miR-208b의 활성을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, miR-499 또는 miR-208b의 활성을 측정하는 것은 miR-499 또는 miR-208b에 의해 제어되는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 것을 포함한다. miR-499에 의해 제어되는 유전자들은, 예를 들어, 트로포닌 I2, 트로포닌 T3, 마이오신 경사슬 및 α 골격 액틴과 같은 β -마이오신 중사슬과 빠른 골격근 단백질 유전자를 포함한다. miR-208b에 의해 제어되는 유전자들은, 예를 들어, Sp3, 마이오스타틴, PUR베타, THRAP1 및 빠른 골격근 유전자와 같은 β -마이오신 중사슬과 빠른 골격근 단백질 유전자를 포함한다. 본 발명의 특정 태양들에서, miR-499 또는 miR-208b의 활성을 측정하는 것은 α -마이오신 중사슬 발현 레벨 대 β -마이오신 중사슬 발현 레벨의 비율을 측정하는 것을 포함한다. 당업자는 miR-499 또는 miR-208b에 의해 제어된 유전자들의 발현 또는 활성을 측정하기 위한 여러 방법을 잘 알 것이다. 이런 방법들은, 예를 들어, 노던 블로팅, RT-PCT, ELISA 또는 웨스턴 블로팅을 포함한다.
- [0200] 물론 본 발명의 모든 스크리닝 방법은 효과적인 후보들을 발견하지 못할지라도 그 자체로 유용하다고 생각된다. 본 발명은 단지 이런 후보들을 찾기 위한 방법이 아니라 이런 후보들을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0201] 본 발명에서 사용된 용어 "후보 물질"은 miR-499 및/또는 miR-208b의 β MHC-조절 태양을 잠재적으로 조절할 수 있는 임의의 분자를 의미한다. 다양한 상업적 자료들로부터, 유용한 화합물들의 동정을 "무차별 공격" 하기 위한 노력으로 유용한 약물들에 대한 기본 기준을 충족하는 것으로 생각되는 분자 라이브러리들을 얻을 것이다. 조합해서 생성된 라이브러리(예를 들어, 안타고미르 라이브러리)를 포함하는 이런 라이브러리들의 스크리닝은 활성에 대한 여러 관련(및 미관련) 화합물을 스크리닝하는 빠르고 효과적인 방법이다. 조합 방법은 활성적이나 바람직하지 않은 화합물들에 대해 모델화한 제 2, 제 3 및 제 4 발생 화합물의 생성에 의해 잠재 약물들의 빠른 발전을 유도한다. 본 발명의 방법에 따라 스크리닝할 수 있는 후보 물질들의 비 제한적인 예들은 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 또는 소형 분자를 포함한다. miR-499 및/또는 miR-208b의 조절제는 miR-208과 같은 miR-499 및/또는 miR-208b의 상부 조절제의 효현제 또는 길항제일 수 있다.

- [0202] 실행하는데 빠르고, 저렴하고 쉬운 분석법은 인비트로 분석법이다. 이런 분석법은 일반적으로 분리된 분자들을 사용하고, 빠르고 많은 수로 실행되어, 짧은 시간에 얻을 수 있는 정보의 양을 증가시킨다. 테스트 튜브, 판, 접시 및 막대기 또는 비드와 같은 다른 표면을 포함하는 다양한 용기가 분석법을 수행하는데 사용될 수 있다.
- [0203] 화합물들의 고효율 스크리닝을 위한 기술은 WO 84/03564에 개시된다. 다수의 작은 안타고마르 화합물들은 플라스틱 핀 또는 다른 표면과 같은 고체 표면상에서 합성될 수 있다. 이런 분자들은 miR-499 또는 miR-208b로 잡종화하기 위해 이들의 능력에 대해 빠르게 스크리닝될 수 있다.
- [0204] 본 발명은 세포들에서 miR-499 또는 miR-208b 활성화와 발현을 조절하는 이들의 능력에 대한 화합물들의 스크리닝을 고려한다. 골격근 세포들로부터 유도된 것들을 포함하는 다양한 세포주들은 이런 스크리닝 분석법을 위해 사용될 수 있다. 제 1 심장 세포들은 H9C2 세포주로 사용될 수 있다.
- [0205] 인비보 분석법은 심장 질환 또는 근골격 질환의 다양한 동물 모델의 사용을 포함하는데, 다양한 동물 모델은 특정 결함을 갖도록 처리되거나 생물 내에서 다른 세포들에 도달하여 작용하는 후보 물질의 능력을 측정하기 위해 사용될 수 있는 마커들을 가질 있도록 처리된 형질전환 동물들을 포함한다. 이들의 크기, 처리의 간편함, 이들의 생물학적 및 유전 구성에 대한 정보 때문에, 생쥐가, 특히 형질전환을 위한 바람직한 대상이다. 그러나, 쥐, 토끼, 햄스터, 기니피그, 게르빌루스쥐, 우드칩, 고양이, 개, 양, 염소, 돼지, 소, 말 및 원숭이(침팬지, 긴팔 원숭이 및 비비 포함)를 포함하는 다른 동물들도 역시 적합하다. 억제제들에 대한 분석법은 이런 종들 중 임의의 것으로부터 유도된 동물 모델을 사용하여 수행할 수 있다.
- [0206] 검사 화합물들에 의한 동물들의 치료는 적절한 형태로 화합물을 동물에게 투여하는 것을 포함할 것이다. 투여는 치료 목적을 위해 사용될 수 있는 임의의 경로에 의할 수 있다. 화합물의 인비보 효과를 결정하는 것은 비대 신호 경로 및 비대의 신체 증상에 대한 변형을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 다른 기준들을 포함할 수 있다. 또한 독성과 복용량 반응을 측정하는 것은 인비트로 또는 인사이토 분석법보다 더욱 의미 있는 방식으로 동물에서 수행될 수 있다.
- [0207] 한 실시예에서, 본 발명은 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성의 조절제를 심장 세포 및/또는 골격근 세포들에 투여하는 단계를 포함하여 심장 및/또는 골격근 수축성을 조절하는 방법을 제공한다. 다른 실시예에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성의 조절제를 심장 세포에 투여하는 단계를 포함하여 심장 수축성 단백질 유전자 발현을 조절하는 방법이 제공된다. 다른 실시예에서, miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성의 조절제를 골격근 세포에 투여하는 단계를 포함하여 골격근 수축성 단백질 유전자 발현을 조절하는 방법이 제공된다. 또 다른 실시예에서, 본 발명은 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성의 조절제를 골격근 세포에 투여하는 단계를 포함하여 골격근 세포의 섬유 타입 전환을 유도하는 방법을 제공한다. 조절제는 miR-499 및/또는 miR-208b의 발현 또는 활성의 효현제 또는 길항제일 수 있다. 일부 실시예들에서, THRAP1, PUR 베타, 마이오스타틴, Sox 6의 발현은 miR-499 억제제를 세포와 접촉시킴으로써 세포에서 증가한다. 다른 실시예들에서, THRAP1, PUR 베타, 마이오스타틴, Sox 6의 발현은 miR-499 효현제를 세포와 접촉시킴으로써 세포에서 감소한다. 다른 실시예에서, Sp3, 마이오스타틴, THRAP1의 발현은 miR-208b 억제제를 세포와 접촉시킴으로써 세포에서 증가한다. 또 다른 실시예에서, Sp3, 마이오스타틴, THRAP1의 발현은 miR-208b 효현제를 세포와 접촉시킴으로써 세포에서 감소한다.
- [0208] 본 발명의 특정 실시예들에서, 심장 세포들에 miR-499 및/또는 miR-208b 발현 또는 활성의 억제제를 투여하는 단계를 포함하여 심장 세포들에서 β MHC 발현을 감소시키는 방법이 제공된다. 본 발명의 다른 실시예에서, 내인성 miR-499 및/또는 miR-208b 발현 또는 활성을 증가시키는 단계 또는 심장 세포들에 외인성 miR-499 및/또는 miR-208b를 투여하는 단계를 포함하여 심장 세포들에서 β MHC 발현을 증가시키는 방법이 제공된다. 본 발명의 한 실시예에서, 심장 세포들에 miR-499 및/또는 miR-208b 발현 또는 활성의 억제제를 투여하는 단계를 포함하여 심장 세포들에서 빠른 골격근 수축 단백질 유전자의 발현을 증가시키는 방법이 제공된다. 본 발명의 다른 실시예에서, 내인성 miR-499 및/또는 miR-208b 발현 또는 활성을 증가시키는 단계 또는 심장 세포들에 외인성 miR-499 및/또는 miR-208b를 투여하는 단계를 포함하여 심장 세포들에서 빠른 골격근 수축 단백질 유전자의 발현을 감소시키는 방법이 제공된다. 본 발명의 방법에 따라 증가하거나 감소할 수 있는 빠른 골격근 수축성 단백질 유전자의 예들은 트로포닌 I2; 트로포닌 T3; 마이오신 경사슬 또는 알파 골격 액틴을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0209] 한 실시예에서, 본 발명은 심비대, 심부전 또는 심근 경색을 가진 피험자를 확인하는 단계; 및 피험자에게 miR-499 및/또는 miR-208b 억제제를 투여하는 단계를 포함하여 필요한 피험자의 병적 심비대, 심부전 또는 심근 경색을 가진 피험자를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 특정 실시예에서, miR-499 및/또는 miR-208b 억제제

는 (a) 후보 물질을 세포와 접촉시키는 단계; (b) miR-499 및/또는 miR-208b 활성 또는 발현을 측정하는 단계; 및 (c) 단계(b)에서의 활성 또는 발현과 후보 물질의 부존재하에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 활성 또는 발현을 비교하는 단계를 포함하며, 후보 물질의 부존재하에서 세포에서 활성 또는 발현과 비교된 후보 물질과 접촉된 세포에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 활성 또는 발현의 감소는 후보 물질이 miR-499 및/또는 miR-208b의 억제제라는 것을 나타낸다.

[0210] 다른 실시예에서, 본 발명은 근골격 질환을 갖거나 위험이 있는 환자를 확인하는 단계; 및 피험자에게 miR-499 및/또는 miR-208b 효현제를 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 특정 실시예들에서, miR-499 및/또는 miR-208b 효현제는 (a) 후보 물질을 세포와 접촉시키는 단계; (b) miR-499 및/또는 miR-208b 활성 또는 발현을 측정하는 단계; 및 (c) 단계(b)에서의 활성 또는 발현과 후보 물질의 부존재하에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 활성 또는 발현을 비교하는 단계를 포함하며, 후보 물질의 부존재하에서 세포에서 활성 또는 발현과 비교된 후보 물질과 접촉된 세포에서 miR-499 및/또는 miR-208b의 활성 또는 발현의 증가는 후보 물질이 miR-499 및/또는 miR-208b의 효현제라는 것을 나타낸다.

[0211] **형질전환 동물**

[0212] 본 발명의 특정 실시예는 miR-499 및/또는 miR-208b의 하나 또는 둘 다의 기능성 대립 유전자가 없는 형질전환 동물들을 제공한다. 또한, 유도가능한, 조직 선택성 또는 구성 프로모터의 제어하에서 miR-499 및/또는 miR-208b를 발현하는 형질전환 동물들, 이런 동물들로부터 유도된 재조합 세포주들, 및 형질전환 배아들은 miR-499 및/또는 miR-208b가 심근 세포들의 발달과 분화 및 병적 심비대와 심부전의 발달에 관여하는 정확한 역할을 판단하는데 효과적일 수 있다. 또한, 이런 형질전환 동물들은 심장 발달에 통찰력을 제공할 수 있다. 유도가능하거나 제어가능한 miR-499 및/또는 miR-208b 암호화 핵산의 사용은 과다 또는 비조절 발현에 대한 모델을 제공한다. 또한, 하나 또는 두 대립유전자에서, miR-499 및/또는 miR-208b에 대해 "닉아웃"된 형질전환 동물들이 고려된다. 또한, 하나 또는 두 클러스터에 대한 하나 또는 두 대립유전자에서 miR-499 및/또는 miR-208b에 대해 "닉아웃"된 형질전환 동물들이 고려된다.

[0213] 일반적인 태양에서, 형질전환 동물은 전이유전자의 발현을 허용하는 방식으로 소정의 전이유전자를 게놈에 통합함으로써 생산된다. 형질전환 동물들을 생산하는 방법들은 일반적으로 와그너 및 호페(미국특허 4,873,191; 참조로 본 발명에 포함) 및 브린스터 등(1985; 참조로 본 발명에 포함)에 의해 개시된다.

[0214] 통상적으로, 게놈 서열들에 인접한 유전자는 수정 난자 속으로 미세 주사에 의해 운반된다. 미세 주사된 난자들은 숙주 암컷에게 이식되고 자손들은 전이유전자의 발현에 대해 스크리닝된다. 형질전환 동물들은 파충류, 양서류, 조류, 포유류 및 어류를 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 동물의 수정 난자로부터 생산될 수 있다.

[0215] 미세 주사를 위한 DNA 클론들은 당업계에서 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 미세 주사를 위한 DNA 클론들은 박테리아 플라스미드 서열들을 제거하는데 적합한 효소들로 절단될 수 있고, DNA 단편들은 표준 기술을 사용하여 TBE 버퍼 속에서 1% 아가로스겔 상에서 전기이동되었다. DNA 밴드들은 브롬 에티딴으로 염색하여 가시화되고 발현 서열들을 포함하는 밴드는 절단된다. 절단된 밴드를 0.3M 아세트산 나트륨, pH 7.0을 함유하는 투석 가방에 놓는다. DNA는 투석 가방 속으로 전기 용출되고, 1:1 페놀:클로로포름 용액으로 추출하고 2 부피의 에탄올로 침전한다. DNA를 1ml의 낮은 염 버퍼(0.2M NaCl, 20mM Tris, pH 7.4 및 1mM EDTA)에 재용해하고 Elutip-D™ 컬럼 위에서 정제하였다. 컬럼을 먼저 3ml의 고 염 버퍼(1M NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4, 및 1 mM EDTA)로 채우고 5ml의 저 염 버퍼로 세척한다. DNA 용액들을 컬럼을 3회 통과시켜 DNA를 컬럼 매트릭스에 결합시킨다. 3ml의 저 염 버퍼로 한 번 세척한 후, DNA를 0.4ml 고 염 버퍼로 용출하고 2 부피의 에탄올로 침전시켰다. DNA 농도는 UV 분광광도계에서 260nm에서 흡수하여 측정하였다. 미세 주사를 위해서, DNA 농도는 5mM Tris에서 3µg/ml, pH 7.4 및 0.1mM EDTA로 조절한다. 미세 주사를 위한 DNA의 정제를 위한 다른 방법들은 팔미터 등(1982) 및 샘브룩 등(2001)에 개시된다.

[0216] 예시적 미세 주사 방법에서, 6주 된 암컷 생쥐들에 임신한 암말 혈청 고나도트로핀(PMSG; 시그마)의 5 IU 주사(0.1 cc, ip)하고 48시간 후 인간 융모성 성선자극호르몬(hCG; 시그마)의 5 IU 주사(0.1 cc, ip)하여 과잉배란을 유도하였다. 암컷들을 hCG 주사 직후 수컷들과 놓았다. hCG 주사 21 시간 후, 짝짓기한 암컷들을 CO2 질식 또는 경추 탈골로 죽이고 배아들을 절단된 난관에서 회수하고 0.5% 소 혈청 알부민(BSA; 시그마)를 가진 들베코 인산 버퍼 함유물에 놓았다. 주위 난구세포들을 히알루론산 분해효소(1mg/ml)로 제거하였다. 그런 후에 전핵 배아들을 세척하고 37.5°C 배양기에서 0.5% BSA 함유하는 어웰스 평형염액(Earle's balance salt)에 놓고 주입 때까지 습도 분위기를 5% CO₂, 95% 공기로 하였다. 배아들은 두-세포 단계에서 이식될 수 있다.

- [0217] 무작위로 무리진 어른 암컷 생쥐를 정관절제된 수컷들과 짝을 지었다. C57BL/6 또는 스위스 생쥐 또는 다른 필적할만한 품종들이 이 목적을 위해 사용될 수 있다. 수컷 암컷들을 도너 암컷들과 동시에 짝짓기하였다. 배아 전달시에, 수컷 암컷들은 체중의 그램당 2.5% 아버틴의 0.015ml의 복강 주사로 마취시켰다. 난관들을 단일 중심 배면 절개로 노출시켰다. 그런 후에 난관 바로 위 체벽을 통해 절개하였다. 난소낭을 외과용 핀셋으로 찢었다. 운반될 배아들을 DPBS(뿔베코 인산 버퍼 함유물) 및 전달 피펫(약 10 내지 12 배아들)의 선단에 놓았다. 피펫 선단을 누두부 속에 삽입하고 배아들을 운반하였다. 운반 후에, 벤 자국은 2번 봉합으로 봉했다.
- [0218] **정의**
- [0219] 본 발명에서 사용된, "심부전"이란 용어는 심장이 혈액을 내보내는 능력을 감소시키는 어떠한 상태를 의미하는데 넓게 사용된다. 그 결과, 울혈과 부종이 조직에 생긴다. 가장 빈번하게, 심부전은 관상 동맥 혈류가 감소함으로써 심근의 수축성이 감소하기 때문에 일어난다; 그러나, 심장 관막 손상, 비타민 결핍 및원발성 심근 질환을 포함하는 많은 다른 인자들이 심부전을 일으킬 수 있다. 심부전의 정확한 생리적 메커니즘이 완전히 이해되지 않았지만, 심부전은 일반적으로, 교감신경, 부교감신경 및 압수용기 반응을 포함하는 여러 심장 자율 신경특성의 이상을 포함한다고 생각된다. "심부전의 징후"라는 문장은 숨가쁨, 함몰수종, 커진 약한 간(enlarged tender liver), 경정맥 울혈, 폐 수포음 및 심부전과 관련된 실험 발견들을 포함하는 것들과 같은 심부전과 관련된 모든 후유증을 포함하는데 넓게 사용된다.
- [0220] "치료" 또는 동의어는 심부전의 증상의 개선 및/또는 역전을 포함한다(즉, 혈액을 내보내는 심장의 능력). 심장의 "생리 기능의 개선"은 본 발명에 개시된 측정들(예를 들어, 심박출계수의, 분획단축율, 좌심실 내용적, 심장 박동 등의 측정) 중 임의의 것뿐만 아니라 동물의 생존에 대한 임의의 효과를 사용하여 평가될 수 있다. 동물 모델의 사용시에, 치료된 형질전환 동물들과 치료되지 않은 형질전환 동물들의 반응은 본 발명에서 개시한 분석법들 중 임의의 것을 사용하여 비교한다(또한, 치료된 및 치료되지 않은 비-형질전환 동물들은 대조군들로서 포함된다). 본 발명의 스크리닝 방법에서 사용된 심부전과 관련된 임의의 변수를 개선하는 화합물은 치료 화합물로 동정할 수 있다.
- [0221] "확장성 심근병증"은 약한 심장 수축 작용을 가진 대칭적으로 팽창된 좌심실의 존재를 특징으로 하는 심부전의 종류를 의미하고 자주 우심실과 관련된다.
- [0222] "화합물"이란 용어는 질환, 불쾌, 병, 신체 기능의 이상을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있는 임의의 화학물질, 약품, 약물 등을 의미한다. 화합물들은 공지된 치료 화합물들과 잠재적인 치료 화합물들 포함한다. 화합물들은 본 발명의 스크리닝 방법들을 사용하여 스크리닝함으로써 치료효과가 있는 것을 판단할 수 있다. "공지된 치료 화합물"은 (동물 실험 또는 인간에 대한 투여에 의한 이전 경험)이런 치료에 효과가 있는 것으로 증명된 치료 화합물을 의미한다. 다시 말하면, 공지된 치료 화합물은 심부전의 치료에 효과적인 화합물에 제한되지 않는다.
- [0223] 본 발명에서 사용된, "심비대"라는 용어는 성인 심근세포가 비대성 성장을 통한 압력에 반응하는 반응을 의미한다. 이런 성장은 세포 분할 없는 세포 크기 증가, 힘 발생을 최대화하기 위한 세포 내의 추가 근질들의 결합 및 태아 심장 유전자 프로그램의 활성화를 특징으로 한다. 심비대는 종종 발병과 사망의 위험 증가와 관련이 있어서 심비대의 분자 메커니즘들을 이해하기 위한 연구들은 인간 건강에 중대한 영향을 미칠 수 있다.
- [0224] 본 발명에서 사용된, "조절하다"라는 문장은 생물학적 활성의 변화 또는 변형을 의미한다. 조절은 단백질 활성의 증가 또는 감소, 키나제 활성의 변화, 결합 특성들의 변화 또는 관심 단백질 또는 다른 구조의 활성과 관련된 생물학적, 기능적, 또는 면역학적 특성들의 임의의 다른 변화일 수 있다. "조절제"라는 용어는 상기한 생물학적 활성을 변화 또는 변경할 수 있는 임의의 분자 또는 화합물을 의미한다.
- [0225] " β -아드레날린성 수용체 길항제"라는 용어는 아드레노 수용체들(즉, 카테콜아민, 특히 노르에피네프린에 반응하는 아드레날린성 시스템의 수용체)의 베타(β) 형태를 부분적으로 또는 완전히 차단할 수 있는 화합물 또는 물질을 의미한다. 일부 β -아드레날린성 수용체 길항제들은 한 수용체 아형(일반적으로 β_1)에 대한 특이도를 나타낸다; 이런 길항제들은 " β_1 -특이적 아드레날린성 수용체 길항제들" 및 " β_2 -특이적 아드레날린성 수용체 길항제들"로 불린다. " β -아드레날린성 수용체 길항제"라는 용어는 선택적 및 비선택적 길항제들인 화합물들을 의미한다. β -아드레날린성 수용체 길항제의 예들은 아세부탄올, 아테놀올, 부톡사민, 카테올올, 에스몰올, 라베톨올, 메토프롤올, 나돌올, 펜부톨올, 프로프라놀올 및 티몰올을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 공지된 β -아드레날린성 수용체 길항제들의 유도체들의 용도는 본 발명의 방법들에 포함된다. β -아드레날린성 수용체 길항제로

서 기능적으로 행동하는 임의의 화합물은 본 발명의 방법들에 포함된다.

- [0226] "안지오텐신-변환 효소 억제제" 또는 "ACE 억제제"라는 용어는 레닌-안지오텐신 시스템에서 상대적으로 불활성인 안지오텐신 I의 활성 안지오텐신 II로의 변환에 관여하는 효소들을 부분적으로 또는 완전히 억제할 수 있는 화합물 또는 물질을 의미한다. 또한, ACE 억제제들은 ACE 억제제들의 고혈압 방지 효과를 현저하게 향상시키는 브라디키닌의 열화를 동시에 억제한다. ACE 억제제의 예들은 베나제프릴, 캡토프릴, 에날로프릴, 포시노프릴, 리시노프릴, 퀴아프릴 및 라미프릴을 포함하나 이에 제한되지 않는다 공지된 ACE 억제제들의 유도체들의 용도는 본 발명의 방법들에 포함된다. ACE 억제제로서 기능적으로 행동하는 임의의 화합물은 본 발명의 방법들에 포함된다.
- [0227] 본 발명에서 사용된 "유전자형"은 유기체의 실제 유전 구성을 의미하고, "표현형"은 개체에 의해 표현된 신체적 특징을 의미한다. 또한, "표현형"은 계놈의 선택적 발현의 결과이다(즉, 이것은 세포 역사의 발현 및 세포의 환경에 대한 반응이다). 인간 계놈은 약 30,000-35,000 유전자들을 함유한다. 각 세포 타입에서, 이런 유전자들의 적은 비율(즉, 10-15%)만 발현된다.
- [0228] "한"("a" 또는 "an")이라는 단어는 청구항 및/또는 명세서에서 "포함하는" 이란 용어와 함께 사용될 때 "하나"를 의미할 수 있으나, "하나 또는 그 이상", "적어도 하나" 및 "하나 이상"의 의미와 일치한다.
- [0229] 본 발명에서 논의된 임의의 실시예는 본 발명의 임의의 방법 또는 조성물에 대해 실행될 수 있고 반대 경우도 마찬가지이다. 게다가, 본 발명의 조성물들과 키트들은 본 발명의 방법들을 성취하는데 사용될 수 있다.
- [0230] 명세서 전체에서, "약" 이란 용어는 값을 측정하는데 사용되는 장치 또는 방법에 대한 오차의 표준 편차를 포함하는 값을 나타내는데 사용된다.
- [0231] "또는" 이란 용어는 단지 대안 또는 대안이 서로 포함된 이라는 것을 명백하게 나타내지 않는 한, "및/또는"을 의미하는데 사용되며, 비록 설명이 단지 대안 및 "및/또는"을 의미하는 정의를 뒷받침하는 경우에도 그렇다.
- [0232] 명세서 및 청구항(들)에서 사용된 대로, "포함하는(comprising)"(및 "포함하다"(comprise 및 comprises)와 같은 포함하는 의 임의의 형태), "구비하는"(및 "구비하다"(have 및 has)와 같은 구비하는 의 임의의 형태), "포함하는(including)"(및 "포함하다"(includes 및 include) 또는 "함유하는"(및 "함유하다(contains 및 contain))과 같은 함유하는 의 임의의 형태)이란 단어는 포괄적이거나 개방형이고 추가의, 언급되지 않은 요소들 또는 방법 단계를 배제하지 않는다.
- [0233] 비록 단락 제목은 리뷰를 용이하게 하기 위해 본 발명에 삽입되었으나, 이런 제목은 실시예들의 일부로 해석되지 않아야 한다.
- [0234] 다음 실시예들은 본 발명의 다양한 태양들을 추가로 설명하기 위해 포함된다. 당업자는 본 발명자가 발견한 기술들 및/또는 조성물들을 나타내는 실시예들에 개시된 기술들은 본 발명을 실시하는데 잘 작용하며, 따라서 발명의 실시를 위한 바람직한 형태를 구성한다고 생각한다. 그러나, 당업자는 본 발명의 내용의 면에서, 본 발명의 취지와 범위를 벗어나지 않으며 개시된 특정 실시예들에 변화를 줄 수 있고 여전히 유사하거나 같은 결과를 얻을 수 있다는 것을 알아야 한다.
- [0235] **실시예들**
- [0236] α -MHC 유전자의 인트론 내에 암호화된 것은 miR-208이다(도 1a). α -MHC와 같이, miR-208은 폐에서 미량 발현을 가진 심장에서 특이적으로 발현된다(도 1b). miR-208은 개별 전사물로서 전사되기 보다는 α -MHC pre-mRNA로부터 가공된다. 그러나, 흥미롭게는, miR-208은 적어도 14일의 상당히 긴 반감기를 나타내고 α -MHC miRNA 발현이 하강 조절되는 경우 기능을 나타낼 수 있다. 비록 생쥐에서 miR-208의 유전자 결실이 명백한 표현형을 유도하는데 실패했을지라도, 2달 된 야생형 및 miR-208^{-/-} 동물의 심장에 대한 마이크로어레이 분석은 miR-208의 제거를 보여주었고 심장에서 정상적으로 발현되지 않는 여러 속 골격근 수축성 단백질 유전자의 명백한 발현을 일으킨다. 따라서, 이런 결과들은 정상 조건하에서 miR-208은 심장에서 골격근 유전자들의 발현을 억제함으로써 심근세포 동일성을 유지하기 위해 유일한 심장-특이적 MHC 유전자와 공동 발현된다는 것을 나타낸다.
- [0237] miR-208의 가장 현저한 기능은 심장 스트레스에 대한 miR-208 널 생쥐의 비정상적 반응에 의해 나타났다(van Rooij et al., 2007). 흉대동맥수축 또는 심장의 병적 재형성을 유도하는 칼슘/칼모둘린-의존성 포스포타제인 칼시네우린에 의한 시그널링에 의한 압력 과부하에 반응하여, miR-208-널 생쥐는 심근세포의 비대 또는 섬유증을 거의 나타내지 않았고 β -MHC 발현을 상승 조절할 수 없다(도 6-8). 반대로, ANF 및 BNP를 암호화하는 유전

자들과 같은 다른 스트레스 반응성 유전자들은 miR-208 돌연변이 동물에서 강하게 유도되었고, miR-208은 β-MHC 발현의 제어에 특이적으로 현신하는 것을 나타내며, 이는 심장 스트레스 반응의 다른 양상으로부터 분리될 수 있다.

[0238] β-MHC 발현은 갑상선 호르몬 시그널링에 의해 억제되고 갑상선 이상질환 상태에서 상승 조절된다(Leung et al, 2006). miR-208^{-/-} 동물들은 갑상선 호르몬을 유도하는 T3 억제제 프로필티오우라실(PTU)에 의한 치료 후 β-MHC 발현의 상승 조절에 저항성을 가졌다. 그러나, 흥미롭게도, 출생 전에 β-MHC의 발현은 miR-208 돌연변이 생쥐에서 정상적이었고, miR-208은 β-MHC 발현의 출생 후 조절에 특이적으로 현신한다는 것을 나타내며, β-MHC 유전자의 갑상선 호르몬 반응성의 획득과 일치한다(도 5).

[0239] miR-208의 작용의 매커니즘에 대한 단서는 miR-208^{-/-} 심장의 갑상선 이상질환 심장의 유사성으로부터 발생하며, 이 둘은 β-MHC 발현에 대한 중단, 스트레스-반응 유전자의 상승 조절 및 병적 비대와 섬유증에 대한 보호를 나타낸다(도 6-10). miR-208 심장에서 속 골격근 유전자의 상승 조절은 갑상선 이상질환 상태의 속 골격근 섬유의 유도를 모방한다(Wei et al., 2005).

[0240] 이런 발견들은 miR-208은, 적어도 부분적으로, 심장에서 스트레스-반응의 일반적인 구성요소 및 갑상선 호르몬 시그널링 경로의 발현을 억제함으로써 작용한다는 것을 나타낸다. miR-208의 가장 강한 예상 표적은 전사에 긍정적 및 부정적 효과를 나타낼 수 있는 갑상선 호르몬 수용체(TR) 보조-조절제 THARP1이다(Pantos et al, 2006; Yao and Eghbali, 1992; 도 12). TR은 어린 심장에서 β-MHC 발현을 억제하기 위해 음성 갑상선 호르몬 반응요소(TRE)를 통해 작용한다(Zhao et al, 2005). 따라서, miR-208의 부존재하에서 THARP1 발현의 증가는 β-MHC 발현에 대한 TR의 억제 활성을 향상시키는 것으로 예상되며, miR-208^{-/-} 심장에서 β-MHC 발현에 대한 차단과 일치한다. 그러나, 비록 THARP1이 miR-208에 대한 선의의 표적(*bone fide target*)으로 보일지라도(도 25 및 26), 이런 데이터는 β-MHC 발현의 조절에서 다른 표적들의 잠재적 관여를 배제하지 않는다.

[0241] β-MHC에 대한 미세한 변화도 어린 심장의 기계적 성능과 효능을 감소시키기 때문에, 심장 질환 동안 β-MHC 발현의 증가를 막기 위해 miR-208 조절을 사용하는 것은 치료적 가치가 있다. 정상적인 심장 발생이 아닌 심장 스트레스 반응에 대한 miR-208의 심장 특이성 및 현신은 miR-208(및 이의 하부 작동체) β-MHC 수준을 조작하기 위한 매력적인 치료제로 만든다(도 13).

[0242] 물질 및 방법

[0243] **노던 블롯 분석.** 심부전이 없거나 있는 것으로 진단된 익명의 사람들의 좌심실의 심장 조직 샘플들을 길리드 콜로라도(콜로라도, 웨스트미니스터)로부터 얻었다. 트리졸 시약(Gibco/BRL)을 사용하여 생쥐, 쥐 및 인간 심장 조직 샘플들로부터 전체 RNA를 분리하거나 심근세포를 분리하였다. 마이크로RNAs를 탐지하는 노던 블롯은 상기한 대로 수행하였다(I). U6 프로브는 로딩 컨트롤(U6 포워드: 5-GTGCTCGCTTCGGCAGC-3 (SEQ ID NO: 28), U6 리버스: 5-AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTGCG-3 (SEQ ID NO: 29))로 사용된다. αMHC 발현을 탐지하기 위해서, 어린 야생형 및 miR-208 돌연변이 동물의 심장 조직의 10μg의 RNA를 포함하는 노던 블롯은 5'UTR 영역과 첫 번째 엑손의 일부를 덮는 αMHC의 cDNA 단편으로 탐침하였다.

[0244] **PTU 치료.** 갑상선 호르몬 결핍은 할란 테크라드사(TD 97061)(WI, 메디슨)로부터 구입한 0.15% PTU로 보충한 아이오딘-제거 식사로 지정한 기간 동안 동물들에게 먹임으로써 유도하였다.

[0245] **마이크로어레이 및 실시간 PCR 분석.** 심장 조직의 전체 RNA는 트리졸(인비트로젠)을 사용하여 분리하였다. 마이크로어레이 분석은 쥐 게놈 430 2.0 어레이(아피메트릭)을 사용하여 수행하였다. 랜덤 헥사머 프라이머들(인비트로젠)에 의한 RT-PCR은 RNA 샘플들에 대해 수행하였고, 그 후 유전자들의 서브세트의 발현은 ABI로부터 구입한 Taqman 프로브들을 사용하여 정량적 실시간 PCR로 분석하였다.

[0246] **miR-208 돌연변이 생쥐의 생산.** miR-208 표적 벡터를 생산하기 위해서, miR-208 암호화 영역의 상부와 연장된 0.4kb 단편(5'arm)을 SacII와 NotI로 분해하고 loxP 부위 및 Frt-플랭크 네오마이신 카세트의 플라스미드 상부를 표적화하는 pGkneoF2L2dta 속에 결합하였다. 3.3kb 단편(3'arm)을 SalI 및 HindIII로 분해하고 메오마이신 저항 및 Dta 음성 선택 카세트 사이에 벡터를 결합하였다. 분열된 대립유전자를 가진 표적화된 ES-세포들은 5' 및 3' 프로브에 의해 서든 블롯 분석으로 동정하였다. 3개 miR-208 표적화된 ES 클론들을 동정하고 배반포 주입에 사용하였다. 결과로 얻은 키메릭 생쥐들은 돌연변이 대립유전자의 생식선 전달을 위해 C57BL/6로 번식시켰다.

[0247] **웨스턴 블러팅.** 마이크로신을 상기한 대로 심장 조직으로부터 추출하였다(Morkin, 2000). MHC 동질체를 SDS PAGE

로 분리하고 생쥐 단클론 αMHC(BA-G5)(ATCC, MD, 록빌)와 βMHC에 매우 특이적인 생쥐 단클론 안티마이오신(느린, 골격 M8421)(MO, 시그마)으로 웨스턴 블러팅을 수행하였다. 모든 가로무늬 마이오신(striated myosin)을 탐지하기 위해 팬 특이적 항체(생쥐 단클론 3-48; Accurate Chemical & Scientific Corporation, NY)를 사용하였다. THRAP1을 400μg의 심장 단백질을 용해물로 면역침전에 의해 탐지하였다. 샘플들을 1시간 동안 4°C에서 선-세척 후, 상청액을 1μl 토끼 다클론 항-THRAP1(a kind gift of R. Roeder, Rockefeller University)과 15μl의 단백질 A 비드들로 4°C에서 하루 동안 배양하였다. 비드들을 용해 버퍼로 3회 세척하고 SDS 샘플 버퍼에서 끓였다. 면역침전된 THRAP1 단백질을 SDS-PAGE로 분해하고 1:3000의 희석으로 토끼 다클론 항-THRAP1 및 루미놀 시약(산타 크루즈)에 의한 탐지로 1:5000의 희석에서 호오스레디쉬 퍼옥시다아제에 접합된 항-토끼 IgG를 사용하여 분석하였다.

[0248] **해부학적 분석 및 RNA 원위치 잡종화.** 해부학에 사용된 조직들을 크랩-헨셀에이트 용액에 배양하고, 4% 파라포름알데하이드에 고정하고, 절단하고, 표준기술로 헤마톡실린과 에오신(H&E) 및 마슨 트라이크롬 염색 또는 원위치 잡종화를 수행하였다(Krenz and Robbins, 2004). ³⁵S-레이블드 RNA 프로브를 맥시스크립트 키트(아머샴)를 사용하여 만들었다. 신호들을 아도브 포토샵을 사용하여 빨간색으로 가상채색하였다.

[0249] **경흉부 심초음파 검사.** 심장 기능과 심장 크기는 빙메드 시스템(노르웨이, 호르텐, GE 빙메드 울트라사운드)과 11.5-MHz 선형 배열 변환기를 사용하여 의식 있는 생쥐에서 2차원 심초음파검사로 측정하였다. M-형 조영은 말기 심이완 및 말기 심수축에서 앞면 및 뒷면 두께를 측정하는데 사용하였다. 좌심실(LV) 내부 지름(LVID)은 심이완(LVIDd) 또는 심수축(LVIDs)에서 최대 전후 직경으로 측정하였다. 데이터를 생쥐 유전자형을 모르는 한 관찰자가 분석하였다. 좌심실분획단축(FS)는 다음 식: FS (%) = [(LVIDd - LVIDs)/LVIDd] x 100에 따라 계산하였다.

[0250] **형질전환 생쥐의 생산.** 관심 miRNA에 인접한 생쥐 게놈 단편을 α-MHC 및 인간 GH 폴리(A) + 시그널을 함유하는 심장-특이적 발현 플라스미드 속에 서브클론하였다(Kiriazis and Kranias, 2000). 게놈 DNA는 생쥐 꼬리 생검으로부터 분리하였고 인간 GH 폴리(A) + 시그널에 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR로 분석하였다.

[0251] **LacZ 및 MCK 형질전환 생쥐의 생산.** myh7b/miR-499의 심장 및 골격근 발현에 책임이 있는 cis-조절성 요소들을 찾기 위해서, 생쥐 myh7b 유전자의 0.8kb 게놈 단편을 lacZ 리포터 유전자의 hsp68 기부 프로모터 상부에 융합시켰고 F0 형질전환 생쥐 배아에서 발현을 검사하였다. 형질전환 생쥐를 생산하기 위해서, 구조체는 벡터 서열들을 제거하기 위해서 SalI로 소화되었다. DNA 단편들을 B6C3F1 암컷 생쥐의 수정된 난자들 속에 주입된 QiQuick 스핀 컬럼(Qiagen, MD)을 사용하여 정제하였고 상기한 대로 가짜임신한 ICR 생쥐 속에 이식하였다(Lien et al. 1999). 배아들을 수집하고 β-갈락토시다제 활성을 위해 염색하였다. 근육 크레아틴 키나아제(MCK)로부터의 근육-특이적 인헨서의 제어하에서 miR-499의 구성적으로 활성 형태를 발현하는 형질전환 생쥐는 다른 곳에 개시된다(Naya et al. (2000) J. Biol. Chem., Vol. 275: 4545-4548). 게놈 DNA는 생쥐 꼬리 생검으로부터 분리하였고 인간 GH 폴리(A) + 시그널에 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR로 분석하였다.

[0252] **플라스미드 및 트랜스펙션 분석법.** miR-208 암호화 영역을 포함하는 305bp 게놈 단편을 PCR로 증폭하고 pCMV6 속에 결합시켰다. 전체 설치류 THRAP-1UTR을 포함하는 1kb 단편은 PCR-증폭되고 HA-태그 pCMV6 발현 구조물 및 개똥벌레 루시페라제(*luc*) 리포터 구조물(pMIR-REPORT™, Ambion) 속에 결합하였다. UCGUCUUA miR-208 씨드 결합 서열의 돌연변이는 PCR-기반 돌연변이를 통해 만들었다.

[0253] **실시예 1. miR-208은 miR-499의 발현에 필요하다**

[0254] 심장에서 miRNAs의 잠재적인 관여를 조사하기 위해서, 본 발명자들은 마이크로어레이에 의해 야생형 및 miR-208 널 생쥐의 심장에서 microRNA 발현 패턴을 정의하였다. 돌연변이 심장에서 상승 및 하강 조절된 여러 microRNA 중에서, 본 발명자들은 miR-499는 정상 심장에서 매우 풍부하다는 것을 발견하였으나, miR-208 돌연변이에서는 상기 백그라운드 레벨을 발현하지 않았다. 이런 발견은 노던 블롯에 의해 확인하였다(도 14). miR-499 유전자의 게놈 위치의 분석은 α-MHC 유전자의 유사체인 Myh7b 유전자의 20th 인트론 내에 함유된다는 것을 보여 주었다(도 15). miR-208은 myh7b에 대한 RT-PCR이 숙주 유전자의 mRNA가 miR-208의 부존재하에서 복용량 독립적으로 제거되기 때문에 Myh7b 및 전사의 수준에서 miR-499 발현을 조절한다(도 14). Myh7b 유전자는 척추동물에서 보존되고 빠른 및 느린 골격근(예를 들어, 넓적근)에서만 발현된다(도 16a). miR-499에 대한 발현 패턴은 miR-499에 대한 실시간 PCR 분석에 의해 확인하였다(도 16b). Myh7b 유전자의 3' 말단을 향한 프로브를 사용하는 원위치 잡종화에서, 이 마이오신은 E10.5 같이 일찍 심장과 체질에서 발현되었다(도 16c). miR-208의 유전자 결실은 특이적으로 miR-499의 심장 발현을 억제하는 반면 골격근 발현을 손상시키지 않는다(도 16d). 이런 데이

터는 miR-208은 관련된 miR-499를 발생시키는 추가 마이오신, Myh7b를 가동하는데 필요하다는 것을 나타낸다. 또한, miR-499는 심비대 동안 하강 조절된다(도 17).

[0255] **실시예 2. MEF2는 심장 및 골격근에서 miR-499 발현을 조절한다**

[0256] Myh7 유전자의 5' 인접 영역 내에서, 본 발명자들은 종들에 걸쳐 보존된 잠재적인 MEF2 컨센서스 서열을 동정하였다. 이 서열은 겔 유동성 이동 분석법(도 37a)에서 MEF2와 열렬하게 결합하였고 이 서열의 돌연변이는 MEF2에 의해 루시페라제 리포터의 결합(도 37a) 및 전사 활성화를 폐지하였다. Myh7 유전자의 프로모터 영역은 lacZ 리포터에 융합되었고 돌연변이가 생쥐가 생산되었다. 도 37c에 도시된 대로, 이 게놈 영역은 E12.5에서 심장에서 특이적으로 lacZ 발현을 유도하는데 충분하였다. 신생 심장에서, lacZ 염색은 심실에서만 관찰되었고, 원위치 갑종화와 일치하였다(데이터 도시되지 않음). MEF2 위치의 돌연변이는 lacZ 유전자 전이의 발현을 완전히 제거하였다(도 37c). 인비보 생쥐 모델에 대한 노던 블롯 분석은 miR-499가 MEF2에 대해 민감하다는 것을 나타냈다. MEF2D의 심장-특이적 과다 발현은 miR-499 발현에 증가를 나타낸 반면, MEF2C 및 D의 심장 결실은 miR-499 발현에 감소를 일으킨다(도 37d). Myg7b의 프로모터에 대한 MEF2의 직접 결합은 인비보에서 Myh7b 및 miR-499의 발현에 필요하다.

[0257] MEF2 위치는 MEF2에 의한 골격근 유전자 발현을 일으키는 bHLH 단백질들의 MyoD 집단의 구성원에 대한 결합 부위로 작용하는 보존된 E-박스 서열(CANNTG)에 나란히 놓인다. 또한, 편재하는 bHLH 단백질 E12와 함께 MyoD는 프로모터로부터 E-박스와 결합하였다. 이런 서열의 돌연변이는 골격근에서 lacZ 전이유전자의 발현을 예방하나 심장에서 발현에는 영향을 주지 않는다.

[0258] **실시예 3. miR-499에 대한 표적들의 동정**

[0259] miR-208 및 miR-499 사이의 서열 동일성 및 miR-208의 유전자 분열이 빠른 골격근 유전자의 강한 유도를 특이적으로 일으키고 심장에서 β-MHC의 억제를 일으킨다는 것을 고려하면, miR-499는 골격근에서 필적할만한 기능을 가지며 섬유 타입의 주요 조절자로서 작용할 수 있다. miR-499 및 이의 숙주 전사물의 발현은 근원성 전사 인자 MEF2, 느린 섬유 유전자 발현의 양성 조절자 및 근지구력에 의해 조절된다. 본 발명자들은 miR-499의 섬유 타입 조절은 섬유 타입 조절과 관련된 miR-499의 표적 유전자들에 의존할 것이라는 것을 주장한다.

[0260] MiR-208은 miR-499와 매우 일치하며 microRNAs는 Mhc 유전자들의 인트론에 의해 암호화된다는 놀라운 사실은 이들이 공통적인 조절 메커니즘을 공유한다는 것을 나타낸다. miRNAs가 서열 특이적 방식으로 유전자 발현에 악영향을 주기 때문에, 높은 등급의 상동관계가 표적 유전자들에서 겹치기 때문에 miR-208 및 miR-499가 필적할만한 기능을 나타내게 한다. 본 발명자들은 miR-499의 표적들로 작용하는 것으로 보이는 MHC 발현의 전사 조절자들을 동정하였다. 본 발명자들은 miR-499 발현은 심장에서 miR-208에 의해 제어되어, miR-208의 녹다운은 miR-499 발현을 제거한다는 것을 보여주었다.

[0261] 본 발명자들의 이전 데이터는 miR-208의 유전적 분열은 심장에서 특이적으로 빠른 골격근 유전자들의 강한 유도를 유도한다는 것을 증명하였기 때문에, miR-499는 골격근에서 필적할만한 기능을 가지며 섬유 타입의 지배적 조절제로 작용할 수 있다. 이런 가설과 일맥상통하게, 이런 전사물의 프로모터 분석은 miR-499 및 이의 숙주 전사물은 골격근 섬유 타입과 느린 섬유 유전자 발현의 중심 조절제인 근원성 전사 인자 MEF2에 의해 조절된다. 본 발명자들은 MEF2 활성이 근지구력을 향상시키고 장기간 운동 후 근육 피로를 예방한다는 것을 입증하였고 MEF2의 이런 작용들은, 적어도 부분적으로, miR-499 발현의 직접 활성화에 의존한다는 것을 입증하였다(도 18).

[0262] 이런 데이터는 Myh7b 유전자의 MEF2-조절 발현이 지근 및 심장 특이적 miRNA인 miR-499의 발현을 추가적으로 유도하며, miR-499는 빠른 골격근 유전자 프로그램의 발현을 하강조절한다. 또한, 이런 데이터는 miR-499이 골격근 섬유 타입의 중심 조절제라는 증거를 제공한다(도 19). MiRNA-499는 마이오신 발현 및 근섬유 타입의 주요 조절제로 알려지고 근섬유 동정에서 miR-499 기능성의 작동체가 될 유전자들인 THRAP1, PUR베타 및 GDF8(즉 마이오스타틴)을 표적화하는 것으로 예상된다(도 20). THRAP1은 miR-208에 의해 표적화되는 것으로 미리 확인되었고 갑상선 수용체 시그널링을 조절한다(van Rooij et al., 2007). 어른 골격근은 전사 리프로그래밍의 능력을 보유한다. 이런 특성은 베타-마이오신 중사슬(βMyHC) 유전자 발현이 감소함과 동시에 지근 대 속근 타입 전환이 일어나는 비체중부하(NWB) 넵치근에서 쉽게 관찰할 수 있다. MyHC 유전자 발현에서 NWB 조건하에서 이런 감소는 SP3, Pur α 및 Pur β 단백질 사이의 상호작용에 의해 매개된다. 이런 데이터는 Pur 단백질이 Sp3와 협동하여 근육 세포들이 이들의 표현형을 재형성하게 하는 전사 프로그램을 조절한다는 것을 증명한다(Ji et al., 2007). miR-499가 Pur β를 직접 표적화하기 때문에, 섬유 타입 조절은 Pur β의 표적화에 의해 매개될 수 있다. 근육 조절에 관여하는 다른 표적은 마이오스타틴이다. 마이오스타틴은 골격근 성장의 음성 조절제로 작용하는

변형 성장 인자-β 집단의 구성원이다. 생쥐에서, 마이오스타틴 유전자의 유전자 분열은 체중과 근중량의 현저한 증가를 유도한다. 유사하게, mdx 녹아숫 생쥐에서 인비보로 마이오스타틴과의 약리학적 간섭은 이영양성 표현형의 기능적 개선을 일으킨다(Tang et al., 2007). 결과적으로, 마이오스타틴은 근육 손실과 관련된 질환의 치료를 위한 중요한 치료 표적이다. 근 특이적 섬유 타입을 조절하는 miR-499의 기능성을 조작하는 것은 근이영양증과 같은 임상 병리학에 대한 널리 미치지 밀접한 관계가 있을 수 있다. 또한, 이런 결과들은 miR-499 발현을 증가시킴으로써 느린 섬유 유전자 발현을 강화시키는 전략들이 인슐린 민감성, 지구력 및 느린 섬유 유전자 프로그램의 다른 건강에 좋은 태양을 증가시킬 것이라는 것을 나타낸다.

[0263] **실시예 4. MiR-208은 miR-208b에 의해 상쇄된다**

[0264] β-MHC(즉, myh7) 유전자 내에 위치한 것은 이의 숙주 유전자와 공동 발현되는 miR-208b이다(도 28). 성숙한 miR-208 서열은 miR-208과 비교하여 3개 염기가 다르나 동일한 씨드 영역을 가진다. 두 miRNAs와 이들의 숙주 유전자 사이의 동일성은 α-MHC(myh6) 및 β-MHC를 발생시키는 계놈 복제의 결과일 수 있다(도 29). 노던 블롯 분석은 miR-208b의 발현 패턴을 검사하여 수행하였다. 기준선에서, miR-208b는 이의 숙주 유전자(β-MHC)와 필적할만한 유전자 패턴을 보여주는데, 즉 발현은 넓치근, 느린 골격근에서 주로 관찰되는 반면 심장과 빠른 골격근 타입에서는 적은 발현이 관찰되었다(도 30a).

[0265] 출생 후, T3 시그널링은 양성 T3 반응 요소(TRE)를 통해 α-MHC 전사를 유도하는 반면, β-MHC 유전자의 프로모터에서 음성 TRE는 전사 억제를 매개한다(Ojamaa et al, 2000 Endocrinology, Vol. 141:2139-2144). 마이오신 조절에 반응하는 miR-208, miR-28b 및 miR-499(즉, myomiRs)의 발현을 검사하기 위해서, 쥐들에게 2주 동안 PTU-함유 식사를 먹여 T3 시그널링을 차단하였고 뒤이어 PTU-치료된 쥐들에게 PTU 효과를 역전시키기 위해 T3를 공급하였다. 예상대로, PTU는 PTU에 반응하여 α-MHC에서 감소 및 β-MHC에서 증가를 유도하였고 T3에 의해 역전될 수 있다(도 30b). 비록 적은 정도이지만, myh7b의 발현은 β-MHC의 발현 패턴을 따라가며; PTU에 반응하여 발현을 유도하였고 T3와 함께 PTU와 반응하여 발현을 감소시켰다(도 30b). 노던 블롯 분석은 miR-208b 및 miR-499는 각각의 β-MHC 및 myh7b의 발현 패턴을 정확하게 따른다는 것을 나타낸다(도 31). 이 증가는 PTU에 더 오래 노출되면 시간에 따라 miR-208b 발현이 증가하기 때문에 복용량-의존성인 것으로 보였다(도 32).

[0266] α- 및 β-MHC가 심장에서 상쇄되기 때문에, miR-208/miR-208b의 발현은 일정한 수준으로 유지된다. 생쥐에서 β-MHC가 배형성과 출생 직후 동안 발현된 지배적인 MHC 유전자인 반면, α-MHC는 성인 동안 얻는다. 본 발명자들의 이전 데이터는 성인 심장에서 miR-208은 miR-499 발현에 필요하였다는 것을 나타내었고, 본 발명자들은 miR-208b가 miR-208을 대체할 수 있는지 검사하였다. p1, p6 및 성인 심장에서 myomiRs에 대한 노던 분석은 miR-208의 부존재하에서, miR-208b이 존재하는 동안 miR-499는 발현된다는 것을 나타내었다(도 30c). miR-208b가 β-MHC와 필적할만한 방식으로 마이오신 스위칭에 반응하는 지를 검사하기 위해서, 야생형 및 miR-208 돌연변이 동물들을 PTU로 치료하였다. PTU에 반응하여, α-MHC 발현은 심각하게 억제되어서 야생형 동물들에서 pre-miRNA-208(별표로 나타냄)의 손실을 일으켰다. 예상대로, miR-499는 miR-208 돌연변이 동물들에서 완전히 없었고 야생형 동물들에서 PTU에 반응하여 단지 약간만 유도되었다. 그러나, β-MHC와 같이 miR-208b는 PTU에 의해 강하게 유도된 반면, miR-208의 부존재하에서, 이 유도는 단지 최소이었다(도 30d). 이런 결과들은 마이오신 유전자들 내에 위치한 myomiRs는 마이오신 유전자들과 이들의 머무는 miRNAs의 발현 수준을 조절한다는 것을 입증한다.

[0267] 이전에 본 발명자들은 miR-208의 심장 특이적 결실이 스트레스 자극에 의해 β-MHC 발현의 유도를 억제하였다는 것을 보여주었다(도 8). 비록 β-MHC 발현이 기준선에서 매우 낮았지만, miR-208b에 대한 노던 블롯팅은 miR-208 대립 유전자들의 하나 또는 둘 다의 제거에 상응하여 miR-208b 발현에 복용량-의존성 감소를 나타내었다(도 33a). 그러나, β-MHC 발현을 유도하는 것으로 보여진 miR-208의 형질전환 과다발현은 miR-208b 발현을 유도하였다(도 33b). 이런 데이터는 비록 miR-208이 심장 β-MHC 발현에 대한 효과의 상부 조절제로 보일지라도, 병적 심장 재형성은 miR-499 및 miR-208b의 조절 때문일 것이라라는 것을 암시한다(도 33c 및 도 34).

[0268] **실시예 5. MiR-208 및 miR-499는 빠른 골격근 표현형을 억제한다**

[0269] miR-499의 느린 섬유-특이적 발현과 결합하여, miR-208 널 생쥐의 심장에서 빠른 골격근 유전자들의 상승조절은 이런 miRNAs가 빠른 골격근 유전자들의 발현을 억제하는 기능을 할 수 있다는 것을 나타내었다. 이런 조직을 처리하기 위해서, MCK 프로모터와 인헨서의 제어하에서 빠른 골격근에서 miR-499를 발현한 형질전환 생쥐를 생산하였다. 빠른 섬유에서 miR-499를 발현하는 여러 안정한 형질전환 라인들을 얻었다(도 38a). 심장 발현과 비교해서, 이런 형질전환 동물들은 넓치근과 빠른 골격근 타입에서 miR-499를 효과적으로 과다발현하였다(도 38b). 섬유 타입-특이적 유전자 발현의 분석은 빠른 섬유들이 miR-499의 강제 발현에 의해 느린 근섬유 표현형으로 변

형되었다는 것을 보여주었다. 야생형 및 miR-499 형질전환 동물에서 모든 5개 근육 타입에서 유전자 발현 분석은 miR-499가 넙치근, TA 및 EDL에서 β -MHC 발현을 일으키는데 충분한 반면, miR-499는 심장, 넙치근 및 EDL에서 빠른 골격 트로포닌 I 및 T를 억제한다는 것을 나타내었다(도 38c). 이런 형질전환 동물들의 빠른 근육 섬유들은 마이오글로빈 발현 및 혈관신생의 높은 수준을 나타내는 이들의 질은 적색에 의해 쉽게 동정될 수 있었다. 유사하게, 조직학적 단편의 메타크로메틱 ATPase 염색은 형질전환 생쥐의 빠른 섬유들(EDL)에서 느린 근섬유 유전자에 급격한 증가를 나타내었다(도 38d).

[0270] miR-208 넙치근 동물들에서 miR-499의 손실이 β -MHC 및 빠른 골격근 유전자들의 조절과 연속해서 또는 병렬되는 지를 측정하기 위해서, miR-499는 miR-208 널 백그라운드에서 형질전환적으로 과다발현되었다. β -MHC에 대한 노던 블롯 분석과 실시간 PCR은 야생형(WT) 동물들에서 β -MHC 및 miR-208b를 잠재적으로 유도하나 miR-208 돌연변이 동물들(KO)에서는 유도하지 않는다. 그러나, 형질전환 과다발현에 의한 miR-499의 재주입은 miR-208의 부존재하에서 β -MHC에 대한 이런 억제 효과를 없앤다(도 38e). 또한, miR-208의 부존재하에서 빠른 골격 트로포닌의 유도된 발현은 miR-499 전이유전자의 존재하에서 억제된다(도 38f). 이런 데이터는 miR-499가 느린 골격 섬유 표현형을 조정하는데 충분한고 miR-208 돌연변이 동물들에서 β -MHC 및 빠른 골격 유전자들에 대한 효과들의 원인이 된다는 것을 나타낸다.

[0271] miR-208b가 느린 골격근에서 발현되기 때문에, miR-208b가 miR-499의 직접 또는 조절을 통해 골격근들에서 섬유 타입 정체를 조절할 것 같다. 이전 데이터는 miR-208(miR-208b의 심장 집단 구성원)의 심장 제거는 miR-499의 심장 억제 및 빠른 골격근 유전자들의 상승조절을 일으켰다는 것을 보여주었다(도 22 및 27). 골격근으로부터 miR-208b의 제거는 miR-499 발현을 억제할 것이고 빠른 골격근 유전자들의 발현을 일으켜서, 느린것에서 빠른것으로 섬유 타입 변화를 유도한다. 더욱 상세하게는 miR-208b의 기능적 상관관계를 조사하기 위해서, 표적화 전략은 생쥐 계놈으로부터 miR-208b를 매우 정확하게 제거하도록 설계되었다(도 35). miR-499 및 miR-208b 모두를 제거하기 위한 다른 방법이 사용될 수 있다. 골격 및 심장근 특이적 프로모터(근육 크레아틴 키나아제(MCK))를 사용하는 miR-499 및 miR-208b에 대한 결합 부위 영역의 골격근 특이적 과다발현은 심장과 골격근에서 miR-208b 및 miR-499를 제거하여, miRNAs에 대한 너다운을 일으킨다(도 36).

[0272] **실시예 6. miR-208에 의한 Myh7b/miR-499의 조절**

[0273] 심장에서, miR-208은 빠른 골격근 유전자 발현을 억제함으로써 심근세포 동일성을 유지하는데 책임이 있는 시스템의 상부 조절제이고, 또한 스트레스에 반응하여 병적 재형성을 영향을 준다. miR-208은, 적어도 부분적으로, 마이오신 유전자 myh7b 내에 위치한 miR-499인 다른 miRNA의 발현을 조절함으로써 그렇게 한다. 비록 miR-208이 골격근에 없을 지라도, 밀접하게 관련된 miR인 miR-208b는 β -MHC 전사물로부터 느린 골격근에서 발현된다. miR-499의 느린 골격근 섬유로의 제한적 발현을 기초로, miR-208b는 느린 골격근에서 빠른 섬유 유전자 프로그램을 억제할 수 있다. 그러나, 우리의 데이터는 miR-499는 β -MHC 발현에 필요하여 피드 포워드 루프(feed forward loop)를 만들 수 있고, 여기서 β -MHC는, miR-2-8b와 miR-499의 활성화를 통해, 자신의 발현을 자극한다는 것을 나타낸다.

[0274] miR-208^{+/-} 생쥐의 심장에서 miR-208 발현에 50% 감소는 Myh7b/miR-499 발현에서 상응하는 감소를 일으키고 miR-208의 부존재는 Myh7b/miR-499의 발현을 완전히 제거한다는 것은 놀랍다. miR-208 발현의 수준에 대한 Myh7b/miR-499의 민감성은 miR-208의 표적(들)이 정확하게 조절되며, miRNAs는 주로 온-오프 스위치라기 보다는 유전자 발현의 정교한 조절자로 생각되기 때문에 예상밖이다.

[0275] 본 발명자들은 THRAP1, 갑상선 호르몬 수용체 보조-조절제는 miR-208의 표적일 될 것으로 이미 측정하였다. miR-208과 miR-499 사이의 씨드 서열에 현저한 겹침 때문에, 이런 miRNAs는 겹침 표적들을 가질 수 있다. 따라서, miR-499는 THRAP1을 조절할 수 있어서 β -MHC와 빠른 골격 유전자 발현을 조절할 수 있다. THRAP1 이외에, 전사 인자들의 Sox 집단의 구성원인 Sox6는 표현형에 영향을 줄 수 있다. 골격근에서 크게 발현되고 심장 및 골결근에서 β -MHC를 음성적으로 조절하는 것으로 알려진 Sox6는 이의 3'UTR에 여러개의 보존된 miR-499 결합 위치를 함유하며 근육 유전자 발현에 대한 miR-499의 효과의 매개체를 나타낸다.

[0276] **실시예 7. miR-208 및 miR-499에 의한 심장 재형성의 조절**

[0277] miR-208의 가장 현저한 기능은 심장 스트레스에 대한 miR-208 널 생쥐의 비정상적 반응에 의해 나타났다(van Rooij et al., 2007) Science, Vol.316: 575-579). 흉대동맥수축 또는 심장의 병적 재형성을 유도하는 칼시네우린에 의한 시그널링에 의해 압력 과부하에 반응하여, miR-208-널 생쥐는 심근세포의 비대 또는 섬유증을 거의 나타내지 않았고 β -MHC 발현을 상승 조절할 수 없었다. 반대로, ANF 및 BNP를 암호화하는 유전자들과 같은 다

른 스트레스 반응성 유전자들은 miR-208 돌연변이 동물에서 강하게 유도되었고, miR-208은 β -MHC 발현의 제어에 특이적으로 현신하는 것을 나타내며, 이는 심장 스트레스 반응의 다른 양상으로부터 분리될 수 있다. 본 발명자들의 데이터는 miR-499는 miR-208 돌연변이 동물에서 보인 유전자 조절 효과의 일부에 책임이 있다는 것을 나타내기 때문에, miR-499 돌연변이 동물들은 miR-208 돌연변이 동물들과 같이 심자의 병적 재형성에 저항성이 있을 것이다. miR-208 및 miR-499의 부존재는 보호 효과를 유도할 것이다.

[0278] 알파- 및 베타-MHC는 심장에서 상쇄되기 때문에, miR-208/miR-208b의 발현은 비교적 일정한 수준에서 유지될 것이다. 그러나, 알파-MHC는 생쥐에서 지배적인 MHC 아이소폼이고 베타-MHC는 인간에서 지배적인 반면, miR-208 vs miR-208b의 상대 발현은 생쥐 vs 인간에 따라 변한다. miR-208은 생쥐에서 스트레스와 감상선기능저하증에 반응하여 심장 베타-MHC 발현에 필요하기 때문에, miR-208b는 심장 질환 동안 베타-MHC를 향한 인간 이동에 중요한 역할을 할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이런 데이터는 이런 miRNAs와 마이오신 유전자들 사이에 크로스-톡(cross-talk)의 친밀한 형태가 존재해야 한다는 것을 나타낸다. 근육 특이적 섬유 타입들을 조절하는 miR-208b의 기능을 조작하면 근이영양증과 같은 임상 병리학에 대한 널리 미치는 밀접한 관계를 가질 수 있다. 또한, 이런 결과들은 miR-208b 발현을 증가시킴으로서 느린 섬유 유전자 발현을 증가시키는 전략들은 인슐린 민감성, 지구력 및 느린 섬유 유전자 프로그램의 다른 건강에 좋은 태양을 증가시킬 것이라는 것을 나타낸다.

[0279] 본 발명에서 검토하고 인용한 모든 공개공보, 특허 및 특허 출원은 전문이 참조로 본 발명에 포함된다. 본 발명에서 개시되고 청구된 모든 조성물 및 방법은 본 발명의 내용에 비추어 과도한 실험 없이 실시되고 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물들과 방법들은 바람직한 실시예들로 기술되었지만, 당업자는 본 발명의 개념, 취지 및 범위를 벗어나지 않고 본 발명의 조성물 및 방법, 및 방법들의 단계 또는 단계들의 연속에 변형을 가할 수 있다는 것을 명백히 알 것이다. 더욱 구체적으로, 화학적 및 물리적으로 관련되어 있는 특정 물질들이 동일하거나 유사한 결과들을 얻으면서 본 발명에서 개시된 물질들을 대체할 수 있다는 것은 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 모든 이런 유사한 대체와 변형은 청구항들에서 정의한 대로 본 발명의 취지, 범위 및 개념 내에 있다고 생각된다.

[0280] 참조문헌

[0281] 다음 참조문헌은 예시적 절차 또는 상기한 내용에 보충하는 다른 상세내용을 제공하는 정도로 참조를 위해 본 발명에 특별히 포함된다.

U.S. Patent 4,873,191
 U.S. Patent 5,604,251
 U.S. Patent 5,844,107
 U.S. Patent 5,877,302
 U.S. Patent 5,972,900
 U.S. Patent 5,972,901
 U.S. Patent 6,008,336
 U.S. Patent 6,077,835
 U.S. Patent 6,200,801
 U.S. Publn. 20020150626
 U.S. Publn. 20030032615
 U.S. Publn. 20030203865
 U.S. Publn. 20040048787
 Abraham *et al.*, *Mol. Med.*, 8:750-760, 2002.
 Ambros, *Cell*, 113(6):673-676, 2003.
 Angel *et al.*, *Cell*, 49:729, 1987b.
 Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987a.
 Atchison and Perry, *Cell*, 46:253, 1986.
 Atchison and Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
 Baichwal and Sugden, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), Plenum Press, NY, 117-148, 1986.
 Baldwin and Haddad, *J. Appl. Physiol.*, 90:345-357, 2001.
 Banerji *et al.*, *Cell*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
 Banerji *et al.*, *Cell*, 33(3):729-740, 1983.
 Barnes *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272(17):11510-11517, 1997.
 Bartel, *Cell*, 116:281-297, 2004.
 Benvenisty and Neshif, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(24):9551-9555, 1986.
 Berkhout *et al.*, *Cell*, 59:273-282, 1989.
 Bhavsar *et al.*, *Genomics*, 35(1):11-23, 1996.

[0282]

- Blanar *et al.*, *EMBO J.*, 8:1139, 1989.
- Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
- Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521, 1985.
- Bosze *et al.*, *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.
- Braddock *et al.*, *Cell*, 58:269, 1989.
- Brennecke *et al.*, *Cell*, 113:25-36, 2003.
- Brinster *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(13):4438-4442, 1985.
- Bristow, *Cardiology*, 92:3-6, 1999.
- Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
- Calin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:15524-15529, 2002.
- Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.
- Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.
- Campo *et al.*, *Nature*, 303:77, 1983.
- Carrington *et al.* *Science*, 301(5631):336-338, 2003.
- Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
- Celander *et al.*, *J. Virology*, 62:1314, 1988.
- Chandler *et al.*, *Cell*, 33:489, 1983.
- Chang and Karin, *Nature*, 410(6824):37-40, 2001.
- Chang *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1092(2):153-160, 1991.
- Chang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
- Chang *et al.*, *Nature*, 430(7001):785-789, 2004.
- Chatterjee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9114, 1989.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Chen *et al.*, *Science*, 303(5654):83-86, 2004.
- Choi *et al.*, *Cell*, 53:519, 1988.
- Coffin, In: *Virology*, Fields *et al.* (Eds.), Raven Press, NY, 1437-1500, 1990.
- Cohen *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
- Costa *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988.
- Couch *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.
- Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.
- Cripe *et al.*, *EMBO J.*, 6:3745, 1987.
- Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989.
- Dandolo *et al.*, *J. Virology*, 47:55-64, 1983.
- De Villiers *et al.*, *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.

[0283]

- Deschamps *et al.*, *Science*, 230:1174-1177, 1985.
- Dubensky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.
- Durand *et al.*, *Ann. Med.*, 27:311-317, 1995.
- Edbrooke *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.
- Edgerton and Roy, *J. Appl. Physiol.*, 89:1224-1231, 2000.
- Edlund *et al.*, *Science*, 230:912-916, 1985.
- Eichhorn and Bristow, *Circulation*, 94:2285-2296, 1996.
- EPO 0273085
- Fatkin *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 106:1351-1359, 2000.
- Fechheimer, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Feng and Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.
- Ferkol *et al.*, *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993.
- Firak and Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
- Fitts *et al.*, *J. Appl. Physiol.*, 89:823-839, 2000.
- Foecking and Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.
- Fraleay *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Franz *et al.*, *Cardioscience*, 5(4):235-43, 1994.
- Friedman *et al.*, *Genes Devel.*, 3:1314, 1989.
- Fujita *et al.*, *Cell*, 49:357, 1987.
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu *et al.* (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.
- Gilles *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983.
- Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.
- Godbout *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.
- Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- Goodbourn and Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.
- Goodbourn *et al.*, *Cell*, 45:601, 1986.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Gopal-Srivastava *et al.*, *J. Mol. Cell. Biol.* 15(12):7081-7090, 1995.
- Graham and Prevec, In: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, Murray (Ed.), Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graham *et al.*, *J. Gen. Virl.*, 36(1):59-74, 1977.

[0284]

- Greene *et al.*, *Immunology Today*, 10:272, 1989
- Grishok *et al.*, *Cell*, 106:23-34, 2001.
- Grosschedl and Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- Haslinger and Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.
- Hauber and Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988.
- Hen *et al.*, *Nature*, 321:249, 1986.
- Hensel *et al.*, *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Hermonat and Muzycska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hersdorffer *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990.
- Herz and Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.
- Hirochika *et al.*, *J. Virol.*, 61:2599, 1987.
- Hirsch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
- Holbrook *et al.*, *Virology*, 157:211, 1987.
- Horlick and Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Horwich *et al.* *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- Huang *et al.*, *Cell*, 27:245, 1981.
- Hug *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065, 1988.
- Hutvagner *et al.*, *PLoS Biol.*, 2(4):E98, 2004.
- Hwang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Imagawa *et al.*, *Cell*, 51:251, 1987.
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Ito and Roeder, *Trends Endocrinol. Metab.*, 12:127-134, 2001.
- Jakobovits *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988.
- Jameel and Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jaynes *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- Ji *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 27(4):1531-43, 2006.
- Johnson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989.
- Jones and Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.
- Kadesch and Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.

[0285]

- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986.
- Katinka *et al.*, *Cell*, 20:393, 1980.
- Katinka *et al.*, *Nature*, 290:720, 1981.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kawamoto *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.
- Kelly *et al.*, *J. Cell Biol.*, 129(2):383-396, 1995.
- Kiledjian *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.
- Kimura *et al.*, *Dev. Growth Differ.* 39(3):257-265, 1997.
- Kiriazis and Kranias, *Annu. Rev. Physiol.*, 62:321-351, 2000.
- Klamut *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
- Klein *et al.*, *Nature*, 327:70-73, 1987.
- Koch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Krek *et al.*, *Nature Genetics*, 37:495-500, 2005.
- Krenz and Robbins, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 44:2390-2397, 2004.
- Kriegler and Botchan, *In: Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler and Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983a.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 38:483, 1984.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 53:45, 1988.
- Kriegler *et al.*, *In: Gene Expression*, Alan Liss (Ed.), Hamer and Rosenberg, New York, 1983b.
- Krützfeldt *et al.*, *Nature*, 438:685-689, 2005.
- Kuhl *et al.*, *Cell*, 50:1057, 1987.
- Kunz *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- Lagos-Quintana *et al.*, *Science*, 294(5543):853-858, 2001.
- LaPointe *et al.*, *Hypertension* 27(3 Pt 2):715-22, 1996.
- LaPointe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263(19):9075-8, 1988.
- Larsen *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986.
- Laspia *et al.*, *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
- Lau *et al.*, *Science*, 294(5543):858-862, 2001.

[0286]

- Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
- Lee and Ambros, *Science*, 294(5543):862-864, 2001.
- Lee *et al.*, *Nature*, 294:228, 1981.
- Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
- Leung *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:18125-18130, 2006.
- Levinson *et al.*, *Nature*, 295:79, 1982.
- Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
- Lin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Lowes *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100:2315-2324, 1997.
- Luria *et al.*, *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
- Lusky and Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.
- Lusky *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Majors and Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.
- McKinsey and Olson, *J. Clin. Invest.*, 115:538-546, 2005.
- McNeall *et al.*, *Gene*, 76:81, 1989.
- Meister and Tuschl, *Nature*, 431:343-9, 2004.
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.
- Miyata *et al.*, *Circ. Res.*, 86:386-390, 2000.
- Mordacq and Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
- Morkin, *Microsc. Res. Tech.*, 50:522-531, 2000.
- Moss *et al.*, *Biol. Chem.*, 271(49):31688-31694, 1996.
- Muesing *et al.*, *Cell*, 48:691, 1987.
- Nakao *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100:2362-2370, 1997.
- Naya *et al.*, *J Biol Chem*, 275(7):4545-4548, 2000.
- Ng *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989.
- Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*,
Rodriguez and Denhardt (Eds), Stoneham: Butterworth, 494-513, 1988.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Ondek *et al.*, *EMBO J.*, 6:1017, 1987.

[0287]

- Ornitz *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987.
- Palmiter *et al.*, *Nature*, 300:611, 1982.
- Pantos *et al.*, *Horm. Metab. Res.*, 38:308-313, 2006.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Pasquinelli and Ruvkun, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 18:495-513, 2002.
- PCT Appln. WO 0071096
- PCT Appln. WO 98/33791
- Pech *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.
- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
- Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- Perez-Stable and Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.
- Physicians Desk Reference
- Picard and Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
- Pinkert *et al.*, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.
- Ponta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985.
- Porton *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.
- Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Queen and Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.
- Quinn *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
- Racher *et al.*, *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.
- Ragot *et al.*, *Nature*, 361:647-650, 1993.
- Redondo *et al.*, *Science*, 247:1225, 1990.
- Reisman and Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- Resendez Jr. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.
- Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
- Ridgeway, In: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.* (Eds.), Stoncham: Butterworth, 467-492, 1988.
- Ripe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989.
- Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rittling *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
- Rosen *et al.*, *Cell*, 41:813, 1988.

[0288]

- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.
- Rosenfeld, *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Roux *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Sakai *et al.*, *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
- Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Satake *et al.*, *J. Virology*, 62:970, 1988.
- Schaffner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.
- Searle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
- Sharp and Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- Sherman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Spalholz *et al.*, *Cell*, 42:183, 1985.
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- Stratford-Perricaudet and Perricaudet, *In: Human Gene Transfer*, Eds, Cohen-Haguenaer and Boiron, John Libbey Eurotext, France, 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.
- Stuart *et al.*, *Nature*, 317:828, 1985.
- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Takebe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tang *et al.*, *Muscle Nerve*, 36(3), 342-8, 2007.
- Tavernier *et al.*, *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
- Taylor *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- The Merck Index, Eleventh Edition
- Thiesen *et al.*, *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Top *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.
- Treisman, *Cell*, 46(4):567-174, 1986

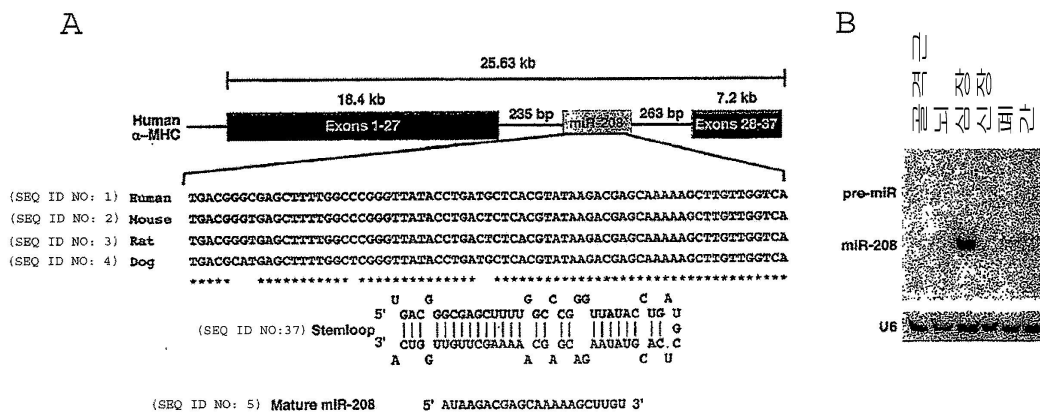
[0289]

Tronche *et al.*, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
 Tronche *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 9(11):4759-4766, 1989.
 Trudel and Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987.
 Tsika *et al.*, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 283:C1761-C1775, 2002.
 Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
 Tyndell *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
 van Rooij *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(48):18255-18260, 2006.
 van Rooij *et al. Science* 316(5824):575-9. 2007.
 Vannice and Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
 Varmus *et al.*, *Cell*, 25:23-36, 1981.
 Vasseur *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1068, 1980.
 Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9):3410-3414, 1990.
 Wang and Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
 Weber *et al.*, *Cell*, 36:983, 1984.
 Wei *et al.*, *J. Endocrinol. Invest.*, 28:8-11, 2005.
 Weinberger *et al. Mol. Cell Biol.*, 8:988, 1984.
 Winoto and Baltimore, *Cell*, 59:649, 1989.
 Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
 Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
 Wu and Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988.
 Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
 Xu *et al.*, *Curr. Biol.*, 13:790-795, 2003.
 Yamauchi-Takahara, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(10):3504-3508, 1989.
 Yang and Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.
 Yao and Eghbali, *Circ. Res.*, 71:831-839, 1992.
 Young *et al.*, In: *Handbook of Applied Therapeutics*, 7.1-7.12 and 9.1-9.10, 1989.
 Yutzey *et al. Mol. Cell Biol.*, 9:1397, 1989.
 Zelenin *et al.*, *FEBS Lett.*, 287(1-2):118-120, 1991.
 Zeng *et al.*, *Mol Cell*, 9(6):1327-33, 2002.
 Zhao *et al.*, *Nature*, 436:214-220, 2005.
 Ziober and Kramer, *J. Bio. Chem.*, 271(37):22915-22, 1996.

[0290]

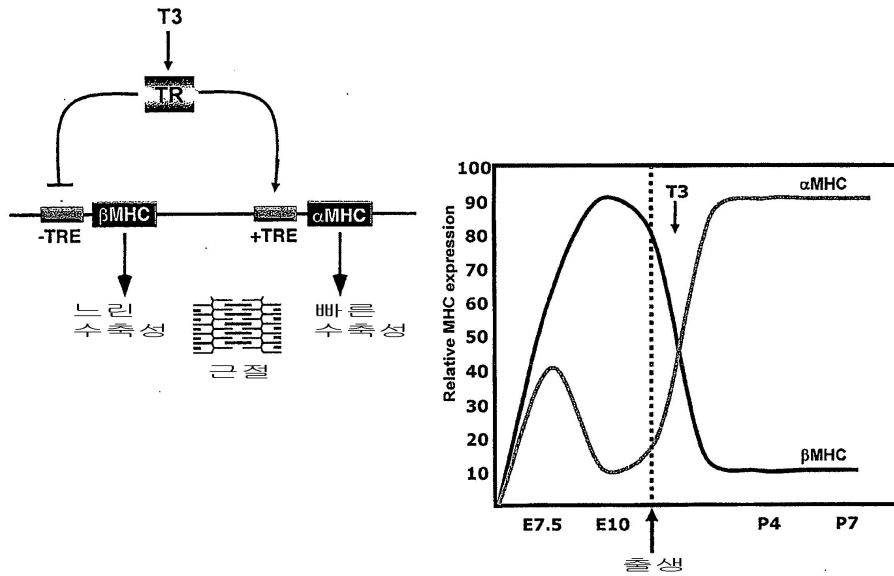
도면

도면1



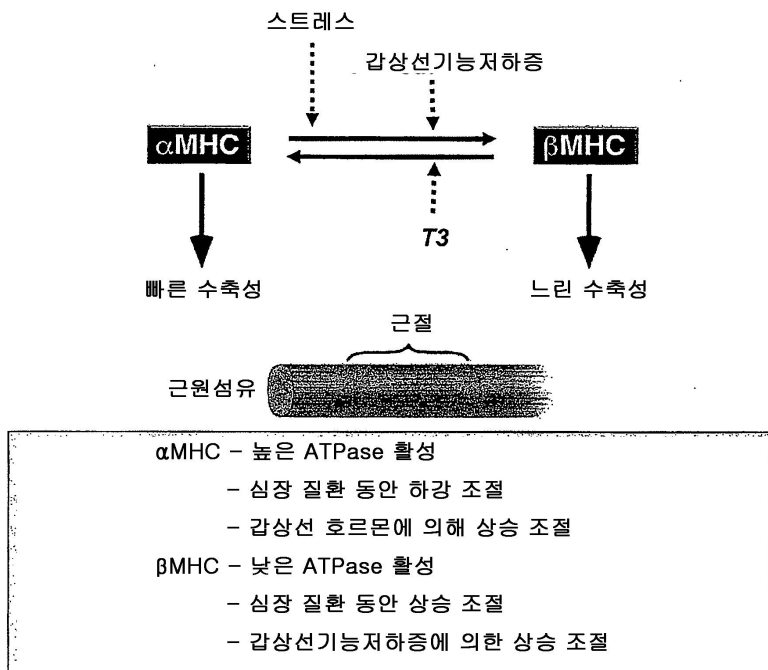
도면2a

α/β 마이오신 중사슬 스위칭



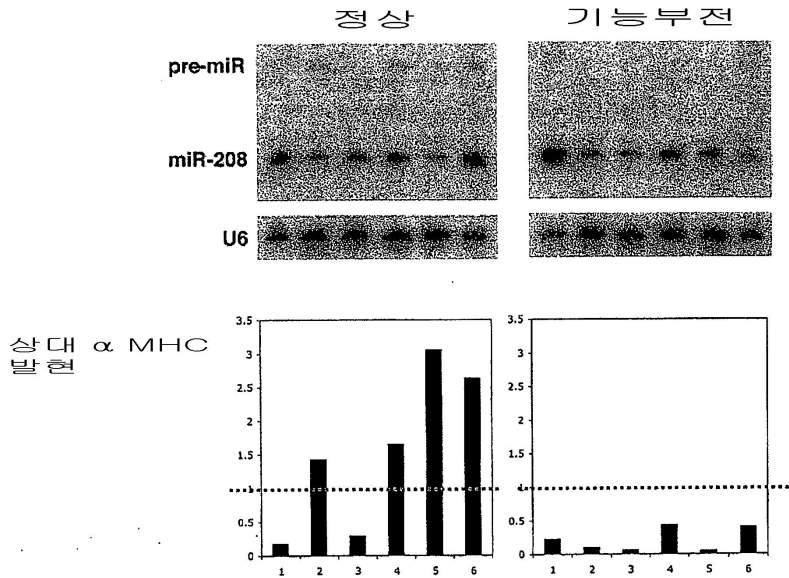
도면2b

α/β 마이오신 중사슬 스위칭



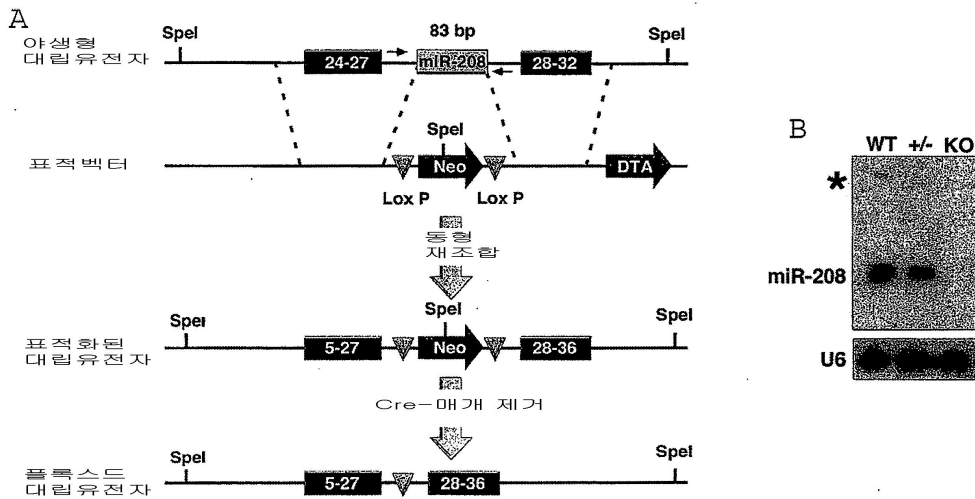
도면3

miR-208은 인간 심장에 풍부하게 존재한다



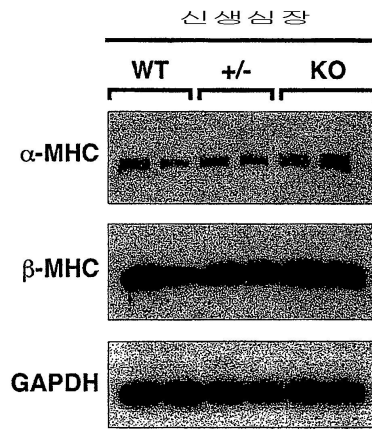
도면4

유전자 녹다운



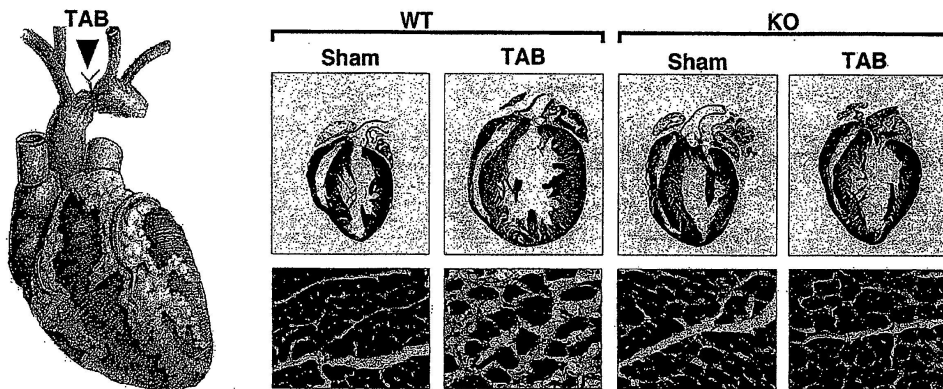
도면5

miR-208 KO는 신생심장에서 α 또는 β MHC 발현을 바꾸지 않는다



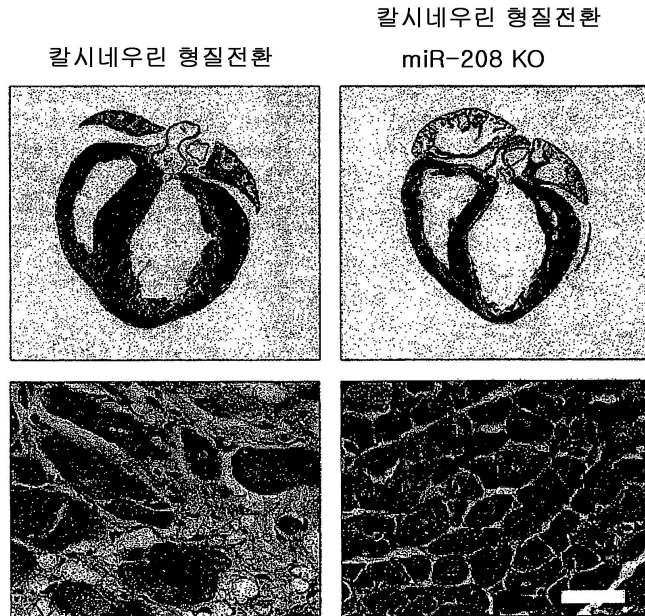
도면6

압력 과부하 후 miR-208 KO 생쥐에서
감소된 비대 및 섬유증



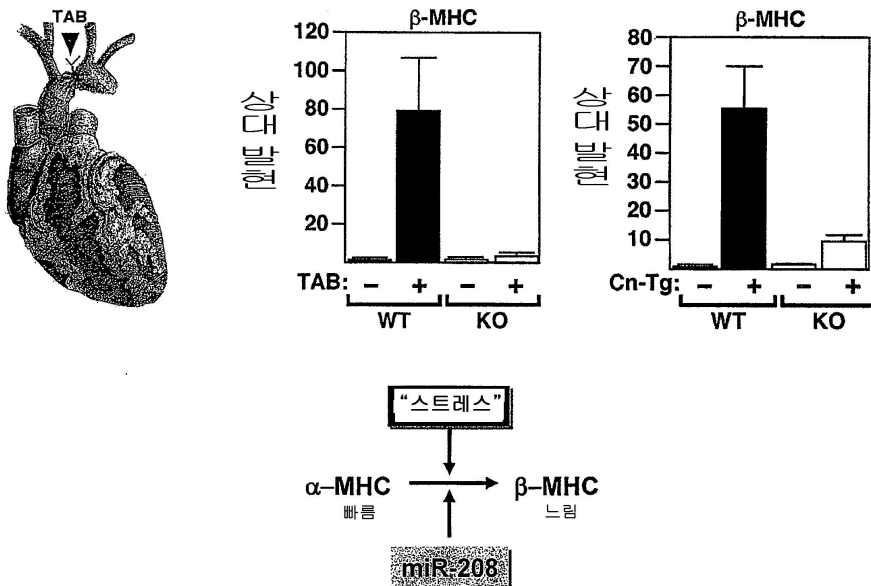
도면7

칼시네우린 시그널링에 반응하여 miR-208 KO 생쥐에서 감소된 비대 및 섬유증



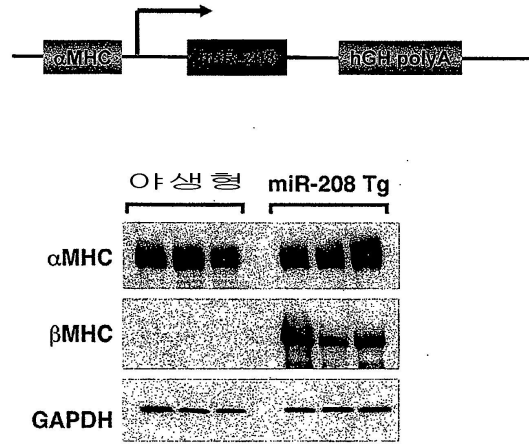
도면8

miR-208 KO 생쥐는 스트레스에 반응하여 β -MHC 상승조절에 실패한다



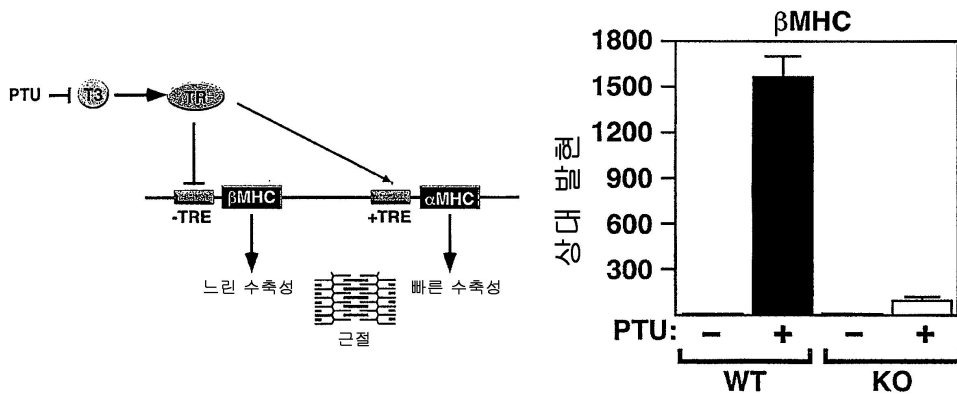
도면9

miR-208의 과다발현은 β -MHC 발현을 유도하는데 충분하다



도면10

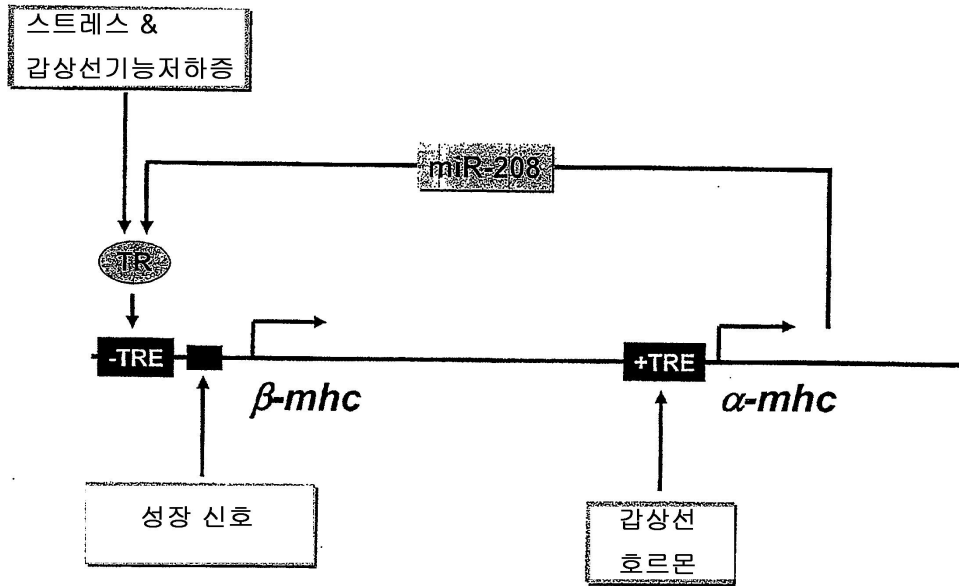
miR-208 KO 생쥐는 갑상선 기능저하에 반응하여 β -MHC 상승조절에 실패한다



PTU 베타의 발현을 허용하고 알파의 활성화를 막는다

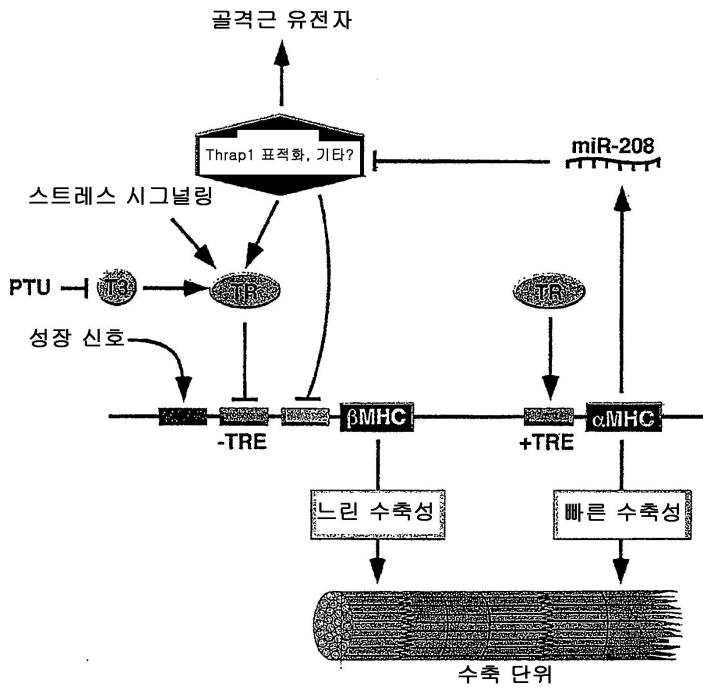
도면11

miR-208에 의한 β -MHC 발현의 제어



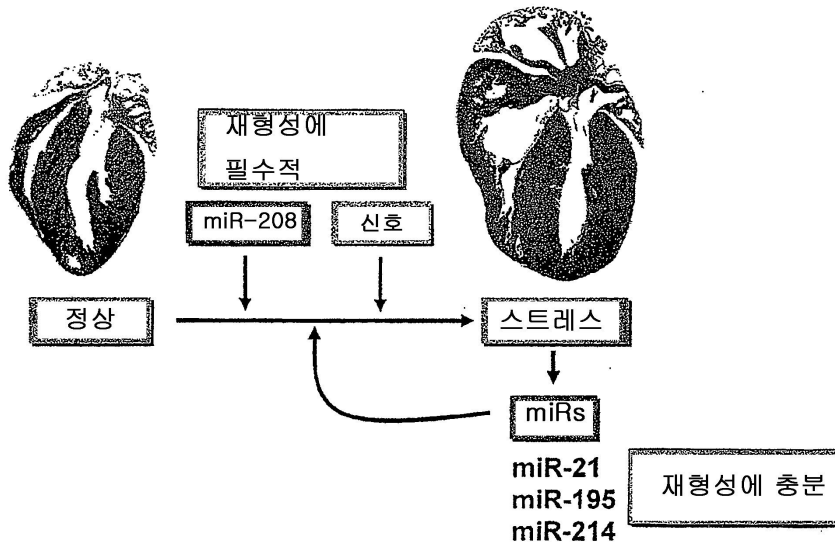
도면12

miR-208: 스트레스 반응 및 심장 수축성의 중심 조절



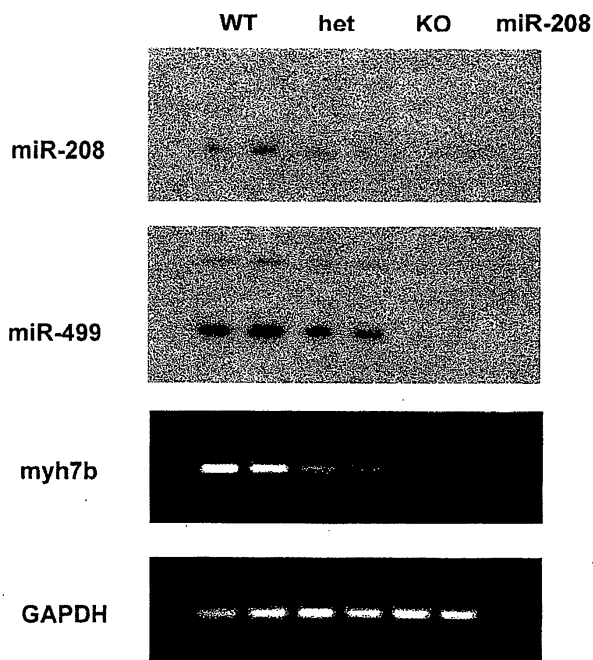
도면13

병적 심장 성장의 MicroRNA 제어



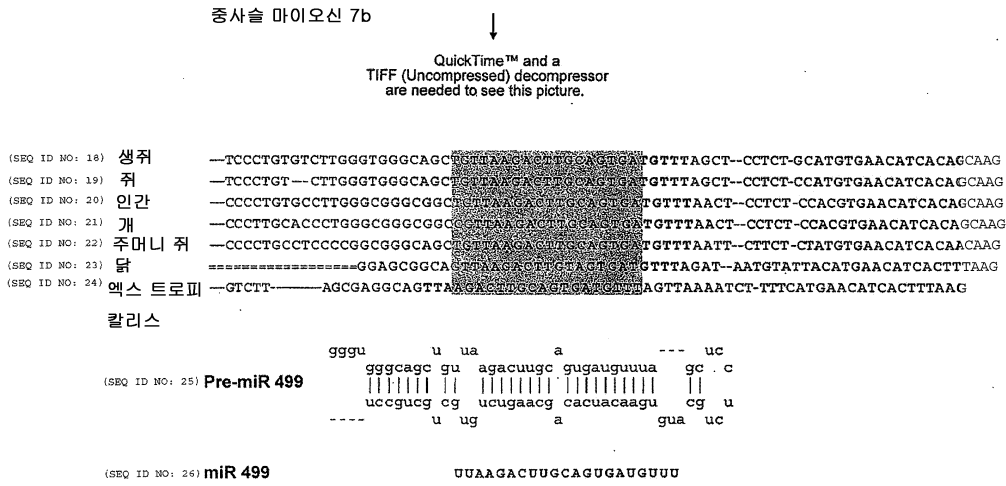
도면14

miR-499 발현은 miR-208에 의해 조절된다

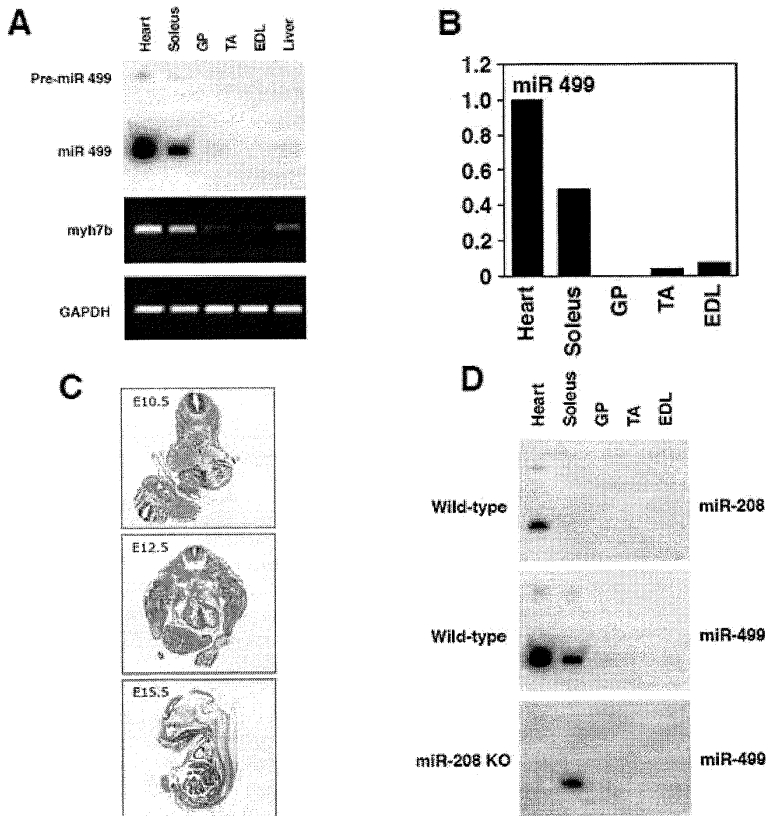


도면15

miR-499는 마이오신 중사슬 7b 내에 위치한다

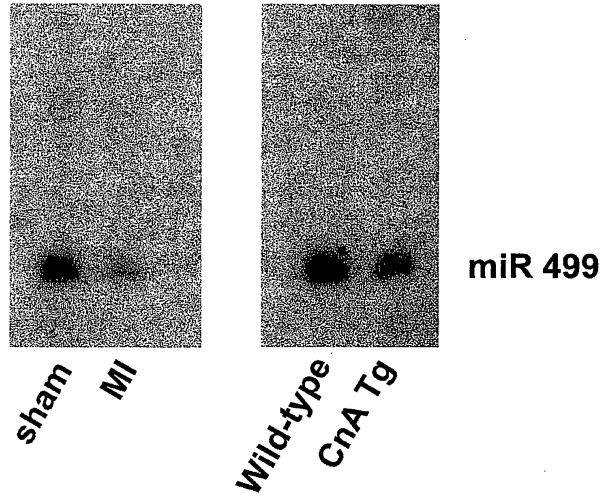


도면16



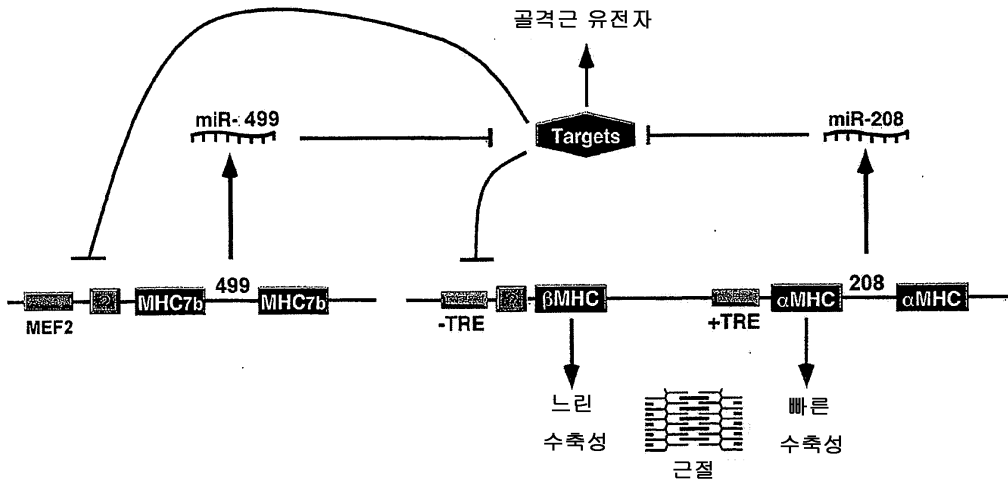
도면17

miR-499는 심장 비대 동안 하강조절된다



도면18

α MHC에서 miR-208은 β MHC에서 miR-499 발현을 조절한다



(SEQ ID NO: 38) 5' - AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGUUU

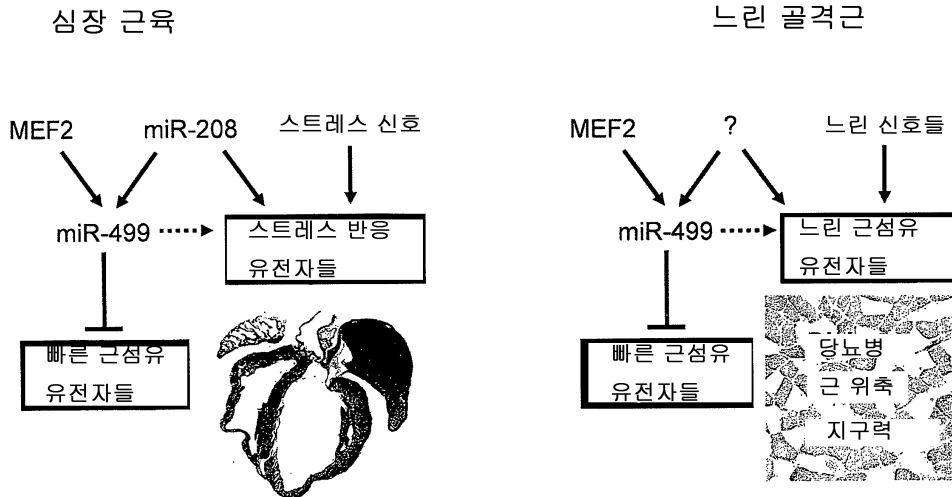
miR-208

(SEQ ID NO: 39) 5' - UUAAGACUUGCAGUGAUGUUUAA

miR-499

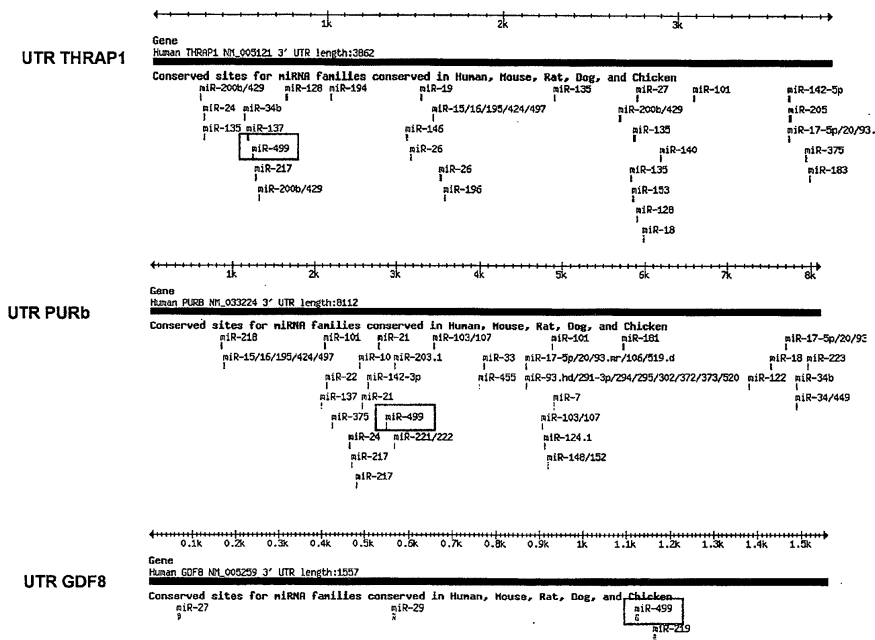
도면19

Myo-miRs에 의한 가로무늬근 유전자발현의 제어

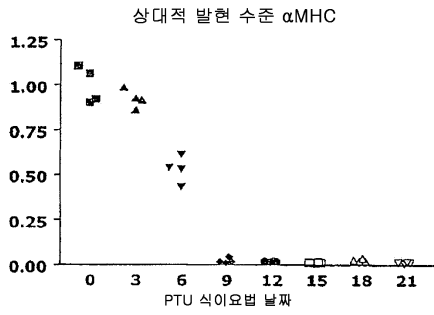


도면20

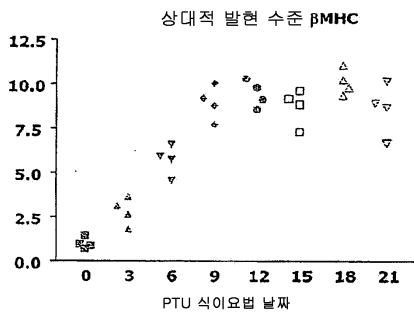
근섬유 동일성을 조절하는데 miR-499 표적 동정



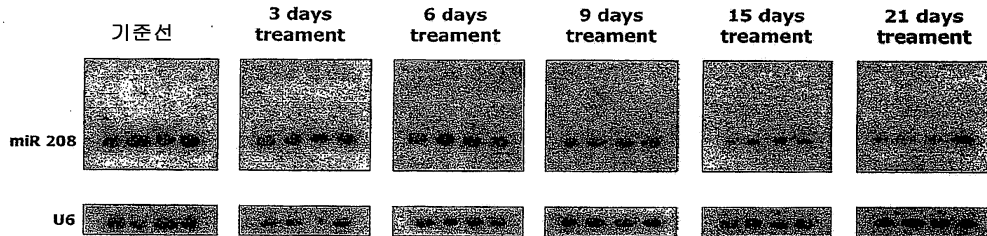
도면21a



도면21b



도면21c

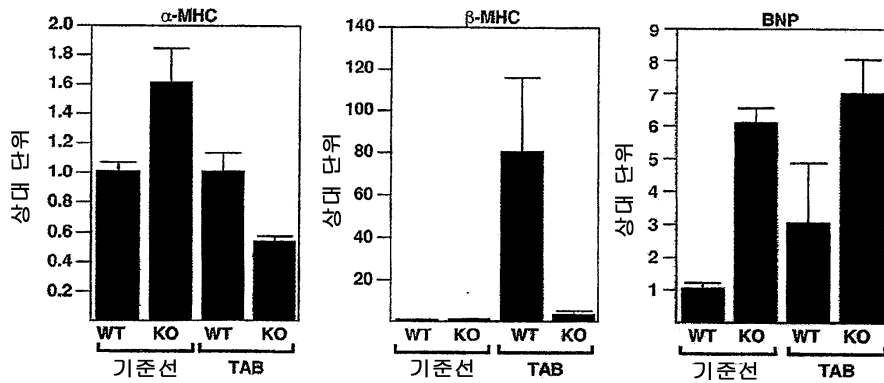


도면22

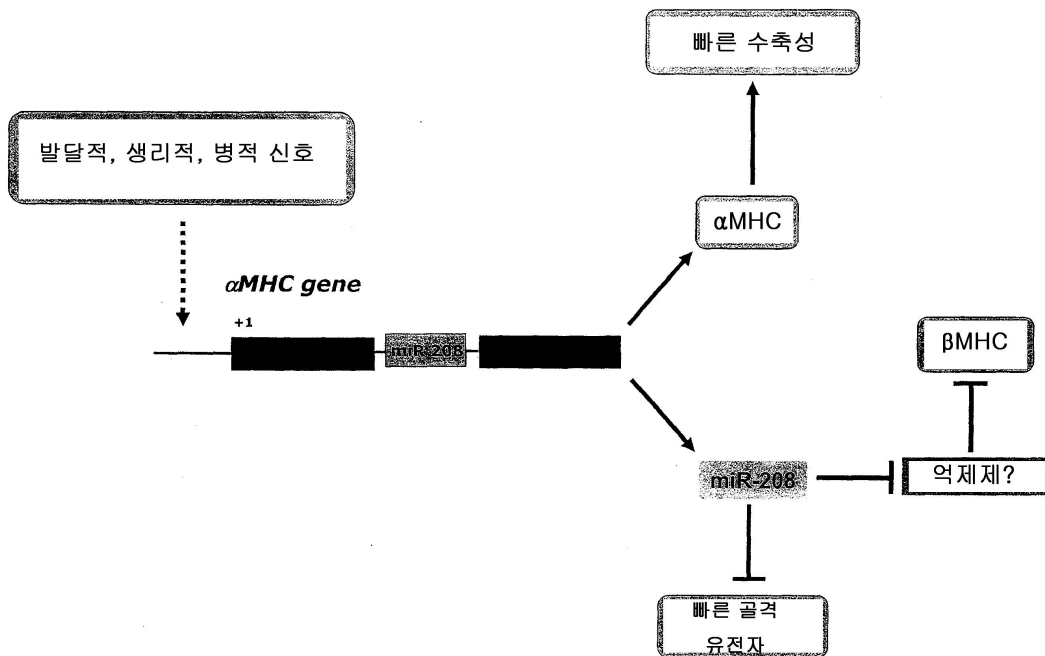
마이크로어레이 분석

심장 트로포닌 I, 빠른 골격	73.5 fold
트로포닌 T3, 빠른 골격	36.8 fold
MLC, 빠른 골격	11.3 fold
알파 골격근 액틴	1.3 fold

도면23



도면24



도면25

표적 예측:
 미란다: 15개 예측 가능 표적 (THRAP number 8)
 PicTar: 46개 예측 가능 표적 (THRAP number 1)

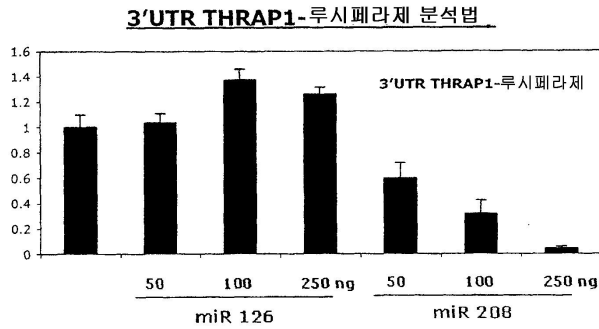
3'UTR THRAP1

3' UGUUCGAAAAACG-----AGCAGAAUA 5' miR 208 (SEQ ID NO:5)

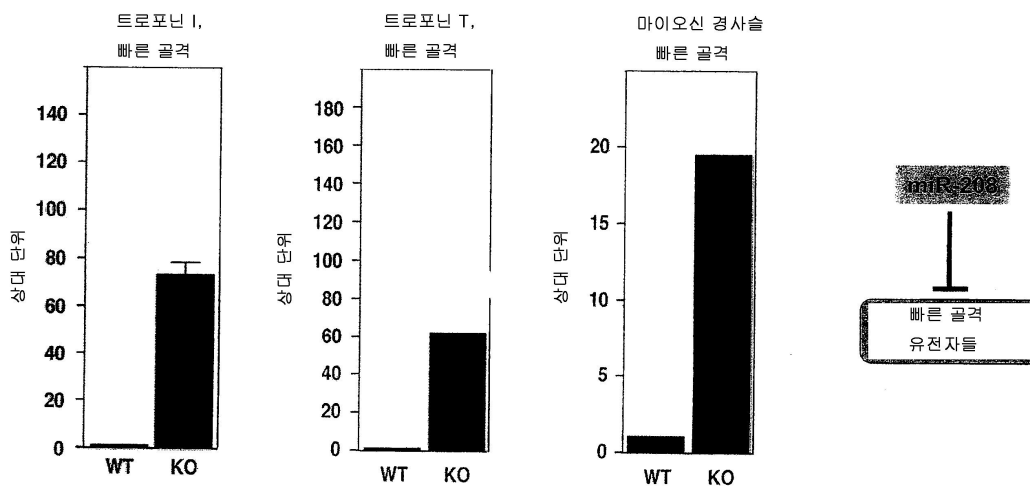
```

:[] | | | | |
인간 (SEQ ID NO:6) UUCUUGCUUUAAAAGCAAUUGGUCUAAAAUAUAUGUA---AUCGUCUUAUUAAAAAGUUGCAGUAGGGUUGC
침팬지 (SEQ ID NO:7) UUCUUGCUUUAAAAGCAAUUGGUCUAAAAUAUAUGUA---AUCGUCUUAUUAAAAACGUUGCAGUAGGGUUGC
설치류 (SEQ ID NO:8) UUCUUGCUUUAAAAGCAAUUGGUCUAAAAUAUAUGUA---AUCGUCUUAUUAAAAACGUUGCAGUAGGGUUGC
쥐 (SEQ ID NO:9) UUCUUGCUUUAAAAGCAAUUGGUCUAAAAUAUAUGUA---AUCGUCUUAUUAAAAACGUUGCAGUAGGGUUGC
개 (SEQ ID NO:10) UUCUUGCUUUAAAAGCAAUUGGUCUAAAAUAUAUGUA---AUCGUCUUAUUAAAAACGUUGCAGUAGGGUUGC
닭 (SEQ ID NO:11) UUCUUGCUUUAAAAGCAAUUGGUCUAAAAUAUAUGUA---AUCGUCUUAUUAAAAACGUUGCAGUAGGGUUGC
복어 (SEQ ID NO:12) UUCUUGCUUUAAAAGCAAUUGGUCUAAAAUAUAUGUA---AUCGUCUUAUUAAAAACGUUGCAGUAGGGUUGC
제브라피쉬 (SEQ ID NO:13) UUCUUGCUUUAAAAGCAAUUGGUCUAAAAUAUAUGUA---AUCGUCUUAUUAAAAACGUUGCAGUAGGGUUGC
    
```

도면26

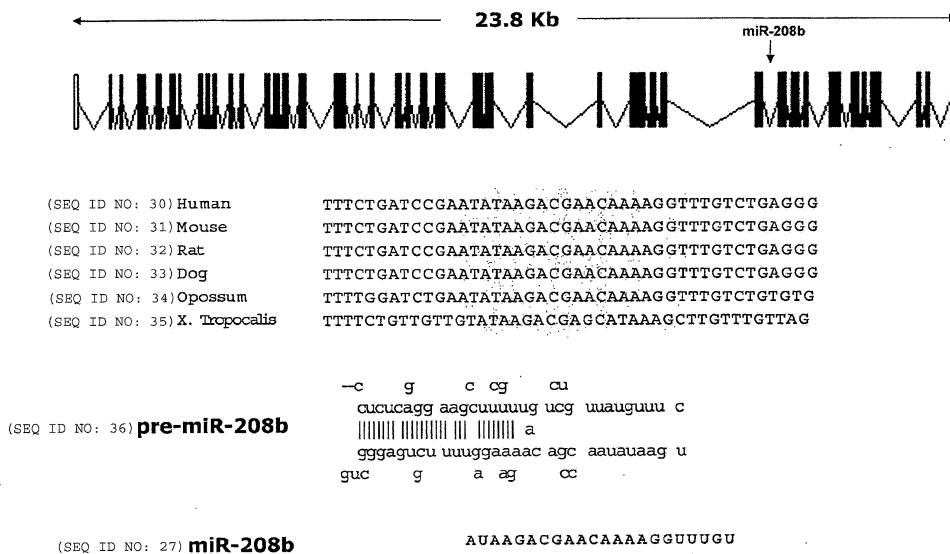


도면27

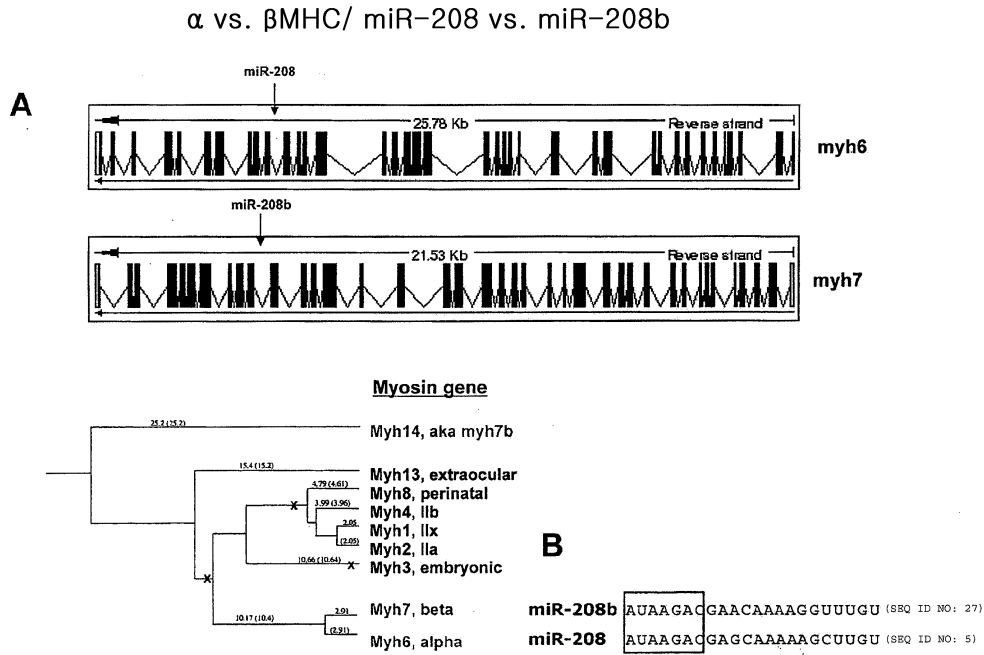


도면28

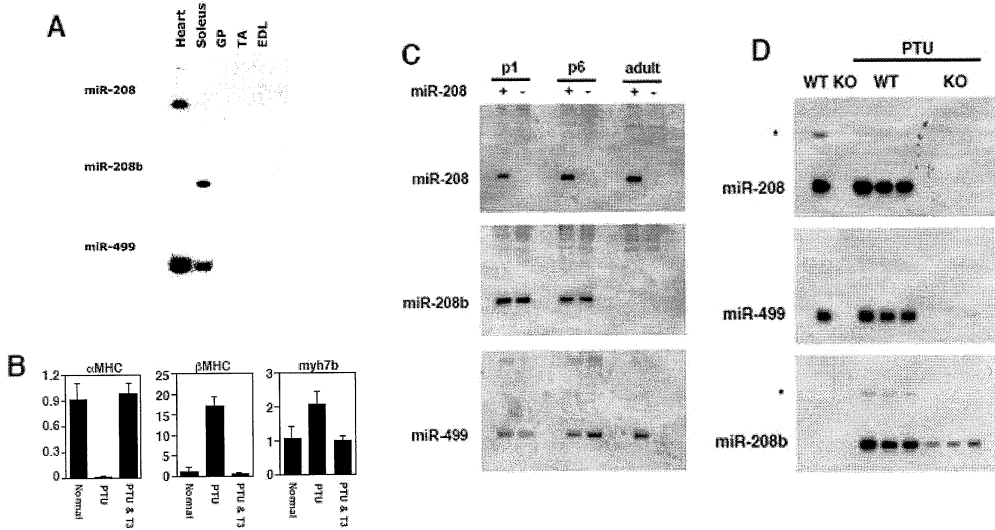
miR-208b는 β MHC의 인트론 31 내에 위치한다



도면29

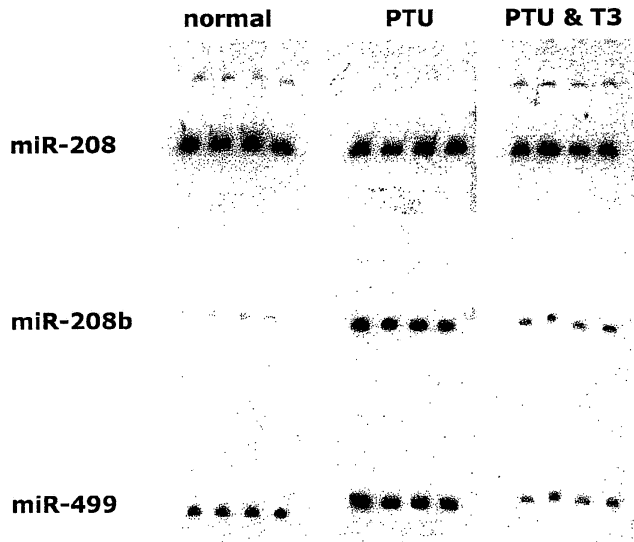


도면30



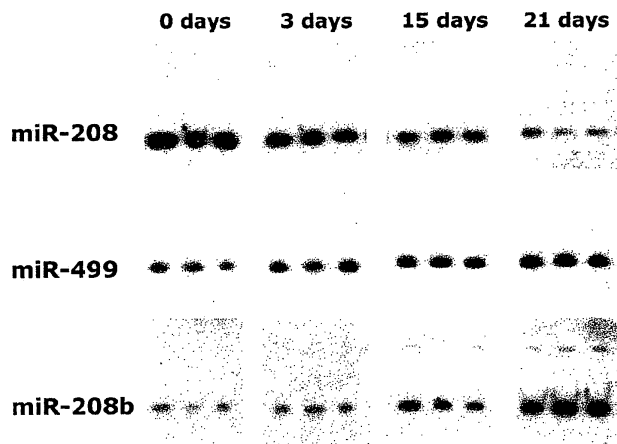
도면31

TR 시그널링에 의한 myo-miRs의 인비보 조절



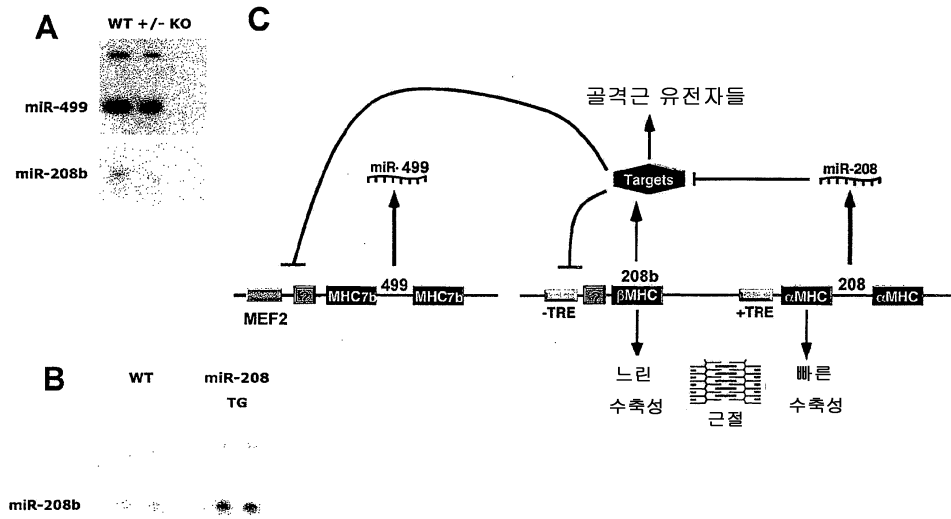
도면32

myo-miRs의 인비보 조절



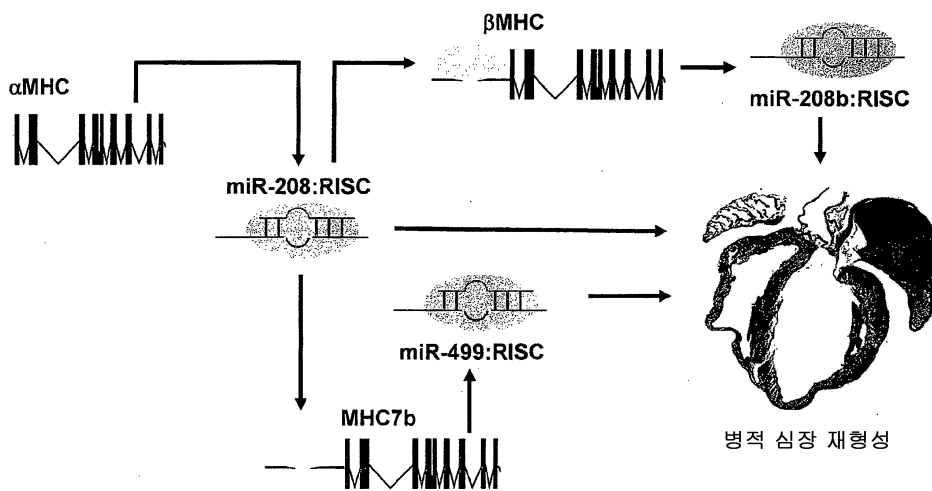
도면33

Myo-miR 네트워크에서 miR-208 매스터 조절제



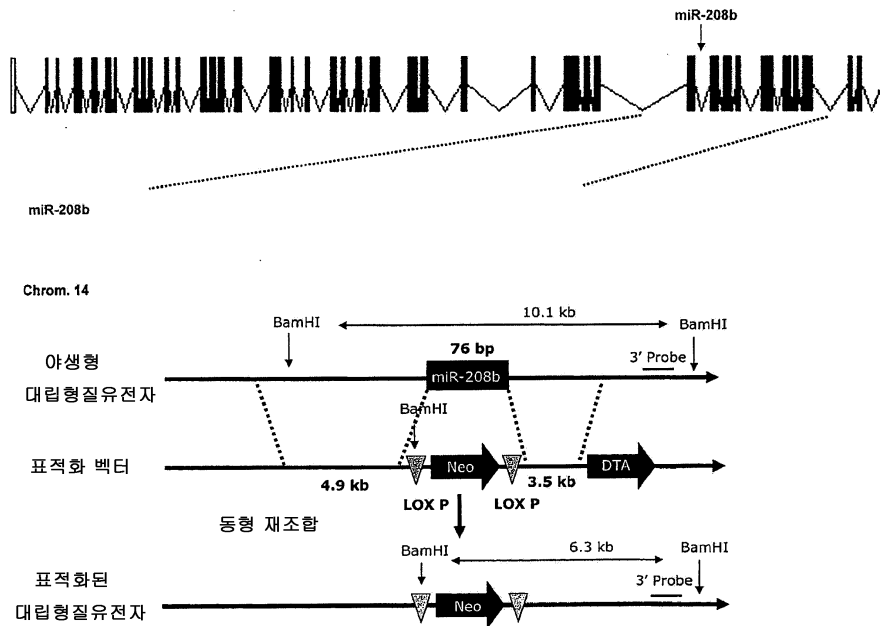
도면34

심장 질환에 대한 Myo-MiR 네트워크



도면35

miR-208b 표적화 전략



도면36

Myo-miRs를 조작하기 위한 인비보 방법

miR-208:

AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU (SEQ ID NO: 5)

miR-

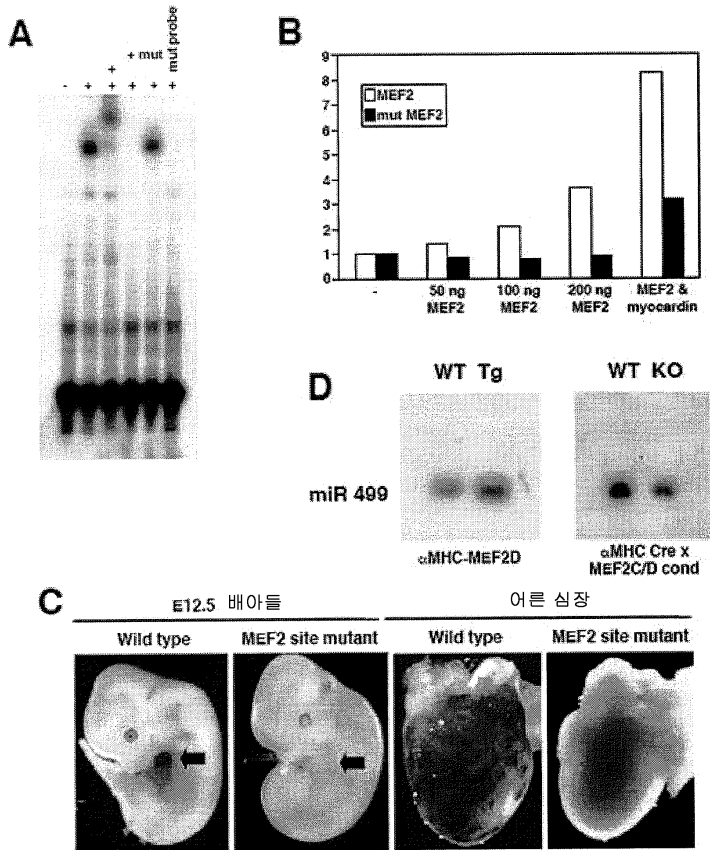
208b: AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU (SEQ ID NO: 27)

miR-499: UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU (SEQ ID NO: 26)

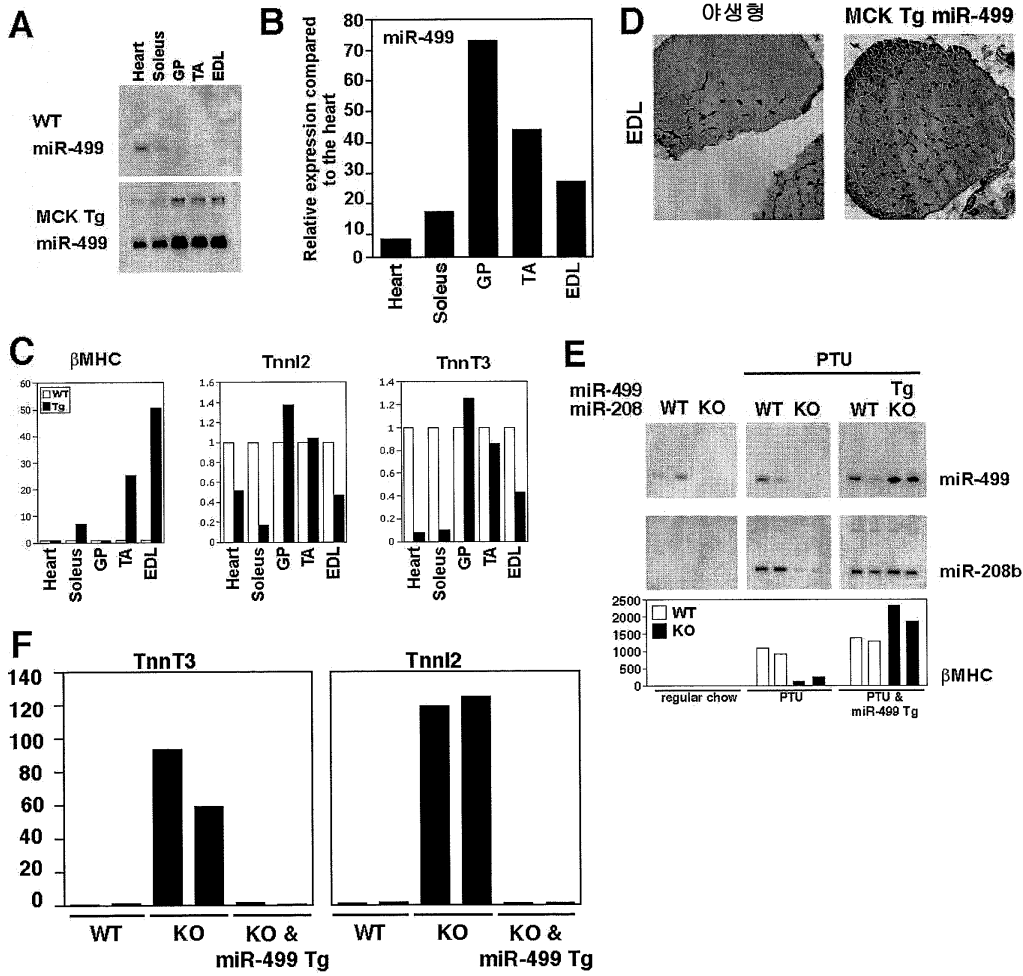
골격근 '스폰지' 방법



도면37



도면38



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Miragen Therapeutics, Inc.
- <120> MICRO-RNAS THAT CONTROL MYOSIN EXPRESSION AND MYOFIBER IDENTITY
- <130> MIRG-004/02WO
- <150> US 60/952,911
- <151> 2007-07-31
- <150> US 60/980,113
- <151> 2007-10-15
- <150> US 60/980,314
- <151> 2007-10-16
- <160> 39
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

<211> 71
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 tgacgggcga gcttttgcc cgggttatac ctgatgctca cgtataagac gagcaaaaag 60
 cttgttggtc a 71

<210> 2
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 2
 tgacgggtga gcttttgcc cgggttatac ctgactctca cgtataagac gagcaaaaag 60
 cttgttggtc a 71

<210> 3
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.
 <400> 3
 tgacgggtga gcttttgcc cgggttatac ctgactctca cgtataagac gagcaaaaag 60
 cttgttggtc a 71

<210> 4
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Canis sp.
 <400> 4
 tgacgcatga gcttttggtc cgggttatac ctgatgctca cgtataagac gagcaaaaag 60
 cttgttggtc a 71

<210> 5
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Unknown
 <220><223> Mature miR-208 sequence
 <400> 5

auaagacgag caaaaagcuu gu 22
 <210> 6
 <211> 69
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aaaguugcag 60
 uagggguugc 69
 <210> 7
 <211> 69
 <212> RNA

 <213> Pan sp.
 <400> 7
 uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aacguugcag 60
 uagggguugc 69
 <210> 8
 <211> 69
 <212> RNA
 <213> Mus sp.
 <400> 8
 uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aagcuugcag 60
 uagggguugc 69
 <210> 9
 <211> 69
 <212> RNA
 <213> Rattus sp.
 <400> 9
 uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aacguugcag 60

 uagggguugc 69
 <210> 10
 <211> 69
 <212> RNA
 <213> Canis sp.

<400> 10	
uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aacguugcag	60
uagggguugc	69
<210> 11	
<211> 69	
<212> RNA	
<213> Gallus sp.	
<400> 11	
uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aacguugcag	60
uagggguugc	69
<210> 12	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> Takifugu	
<400> 12	
uuccugcuuu aagcaauugg uugaaaauau auguauguaa uggucuuaau uaaaaaaca	60
aacuaagaca aa	72
<210> 13	
<211> 69	
<212> RNA	
<213> Danio sp.	
<400> 13	
uuccugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuucauuac aaaaacgaac	60
caucaaacg	69
<210> 14	
<211> 71	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	
acgggcgagc ttttgcccg gggtatacct gatgctcag tataagacga gcaaaaagct	60
tgttggtcag a	71
<210> 15	
<211> 71	

<212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 15
 acgggtgagc ttttggcccg gggtataacct gactctcacg tataagacga gcaaaaagct 60
 tgttggtcag a 71
 <210> 16
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.
 <400> 16
 acgggtgagc ttttggcccg gggtataacct gactctcacg tataagacga gcaaaaagct 60
 tgttggtcag a 71
 <210> 17
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Canis sp.
 <400> 17
 acgcatgagc ttttggctcg gggtataacct gatgctcacg tataagacga gcaaaaagct 60
 tgttggtcag a 71
 <210> 18
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 18
 tcctgtgtc ttgggtgggc agctgttaag acttgcatg atgtttagct cctctgcatg 60
 tgaacatcac agcaag 76
 <210> 19
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.
 <400> 19
 tcctgtctt ggggtggcag ctgttaagac ttgcagtgat gtttagctcc tctccatgtg 60
 aacatcacag caag 74

<210> 20
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 cccctgtgcc ttggcgggc ggctgttaag acttgcagtg atgtttaact cctctccacg 60
 tgaacatcac agcaag 76
 <210> 21
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Canis sp.
 <400> 21

 cccttgacc ctggcgggc ggccgttaag acttgcagtg atgtttaact cctctccacg 60
 tgaacatcac agcaag 76
 <210> 22
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Monodelphis sp.
 <400> 22
 cccctgcctc cccggcgggc agctgttaag acttgcagtg atgtttaatt ctctctatg 60
 tgaacatcac aacaag 76
 <210> 23
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Gallus sp.
 <400> 23
 ggagcggcag ttaagacttg tagt gatgtt tagataatgt attacatgga catcacttta 60

 ag 62
 <210> 24
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Xenopus tropicalis
 <400> 24

gcttagcga ggcagttaag acttgcagtg atgttagtt aaaatctttt catgaacatc 60
 actttaag 68
 <210> 25
 <211> 79
 <212> RNA
 <213> Unknown
 <220><223> Pre-miR-499 sequence
 <400> 25
 gggugggcag cuguuaagac uugcagugau guuuagcucc ucugcaugug aacaucacag 60
 caagucugug cugcugccu 79

 <210> 26
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Unknown
 <220><223> miR-499 sequence
 <400> 26
 uuaagacuug cagugauguu u 21
 <210> 27
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Unknown
 <220><223> miR-208b sequence
 <400> 27
 auaagacgaa caaaagguuu gu 22
 <210> 28
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> U6 forward primer
 <400> 28
 gtgctcgctt cggcagc 17

 <210> 29
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> U6 reverse primer
 <400> 29
 aaaatatgga acgcttcacg aatttgcg 28
 <210> 30
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 tttctgatcc gaatataaga cgaacaaaag gtttgtctga ggg 43
 <210> 31
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 31
 tttctgatcc gaatataaga cgaacaaaag gtttgtctga ggg 43
 <210> 32
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.
 <400> 32
 tttctgatcc gaatataaga cgaacaaaag gtttgtctga ggg 43
 <210> 33
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Canis sp.
 <400> 33
 tttctgatcc gaatataaga cgaacaaaag gtttgtctga ggg 43
 <210> 34
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Monodelphis sp.
 <400> 34

ttttggatct gaatataaga cgaacaaaag gtttgtctgt gtg 43
 <210> 35
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Xenopus tropicalis
 <400> 35
 ttttctgttg ttgtataaga cgagcataaa gcttgtttgt tag 43

 <210> 36
 <211> 77
 <212> RNA
 <213> Unknown
 <220><223> Pre miR-208b sequence
 <400> 36
 ccucucaggg aagcuuuuug cucgcguuau guuucucauc cgaauuaaag acgaacaaaa 60
 gguuugucug agggcug 77
 <210> 37
 <211> 71
 <212> RNA
 <213> Unknown
 <220><223> Pre miR-208 sequence
 <400> 37
 ugacgggcga gcuuuuggcc cggguuauac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaag 60
 cuuguugguc a 71
 <210>
 > 38
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Unknown
 <220><223> miR-208 sequence
 <400> 38
 auaagacgag caaaaagcuu guuu 24
 <210> 39
 <211> 23
 <212> RNA

<213> Unknown

<220><223> miR-499 sequence

<400> 39

uuaagacuug cagugauguu uaa

23