



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0128838  
(43) 공개일자 2011년11월30일

(51) Int. Cl.  
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)  
C12N 15/113 (2010.01) C12Q 1/68 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-7020396  
(22) 출원일자(국제출원일자) 2010년02월04일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2011년09월01일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/023234  
(87) 국제공개번호 WO 2010/091204  
국제공개일자 2010년08월12일  
(30) 우선권주장  
61/149,915 2009년02월04일 미국(US)

(71) 출원인  
보드 오브 리전츠 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템  
미국 텍사스 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트 201  
(72) 발명자  
울슨 에릭  
미국 텍사스 75225 텔라스 사우스웨스턴 블러바드 3219  
루이 에바 반  
미국 텍사스 78701 오스틴 웨스트 7 스트리트 201  
보드 오브 리전츠 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템 내  
(74) 대리인  
석혜선, 김용인

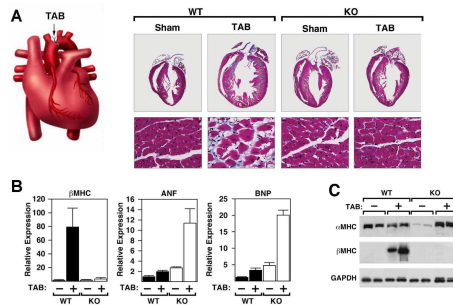
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 심장 질환 치료에서 MIR-208 및 MIR-499의 이중 표적화

(57) 요약

본 발명은 대상의 심장 세포에서 miR-499 및 miR-208 모두의 발현 또는 기능을 억제함으로써, 심장 질환(cardiac disorders)의 치료를 필요로 하는 대상에서 심장 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 특히, 효과적이며 장기 억제가 가능한 두 miRNA 억제제 투여를 위한 구체적인 프로토콜이 개시되어 있다. 또한, 본 발명은 대상의 골격근 세포에서 miR-208 및 miR-499 모두의 발현 또는 활성을 증가시킴으로써, 근골격계 질환(musculoskeletal disorders)의 치료를 필요로 하는 대상에서 근골격계 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

병적 심장 비대(pathologic cardiac hypertrophy), 심근경색증(myocardial infarction), 또는 심부전(heart failure)의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법으로, miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제를 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 투여 이후 대상의 심장 세포에서 miR-208a 또는 miR-208b 및 miR-499의 발현 또는 활성이 감소하는 것인 방법.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotides)인 방법.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 공동 투여(co-administered)되는 것인 방법.

### 청구항 4

제 3 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 발현벡터(expression vector)에 의해 인코딩되는 것인 방법.

### 청구항 5

제 4 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 동일한 발현벡터에 의해서 인코딩되는 것인 방법.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 순차적(sequentially)으로 투여되는 것인 방법.

### 청구항 7

제 6 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 억제제는 miR-499의 억제제 보다 먼저 투여되는 것인 방법.

### 청구항 8

제 6 항에 있어서, miR-499의 억제제는 miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 보다 먼저 투여되는 것인 방법.

### 청구항 9

제 6 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 적어도 24 시간 간격을 두고 투여되는 것인 방법.

### 청구항 10

제 1 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 약 1 mg/kg 내지 약 200 mg/kg의 용량으로 투여되는 것인 방법.

### 청구항 11

제 1 항에 있어서, 억제제의 투여 이후 대상의 심장 세포에서 miR-208a 또는 miR-208b 및 miR-499의 발현 또는 활성이 60 퍼센트를 초과하여 감소하는 것인 방법.

### 청구항 12

제 1 항에 있어서, 대상의 심장 스트레스 반응(cardiac stress response)은 억제제의 투여 이후 감소되는 것인 방법.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서, 심장 스트레스 반응은 상기 대상의 심장 세포에서  $\alpha$ -MHC의 감소된 발현 및/또는  $\beta$ -MHC의 증가된 발현을 포함하는 것인 방법.

**청구항 14**

제 12 항에 있어서, 심장 스트레스 반응의 감소는 억제제의 투여 후 8 주 이내에 일어나는 것인 방법.

**청구항 15**

제 12 항에 있어서, 심장 스트레스 반응의 감소는 억제제의 투여 후 4 주 이내에 일어나는 것인 방법.

**청구항 16**

제 12 항에 있어서, 심장 스트레스 반응의 감소는 억제제의 투여 후 1 주 이내에 일어나는 것인 방법.

**청구항 17**

근골격계 질환(musculoskeletal disorder)의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료 또는 예방하는 방법으로, miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질(agonist) 및 miR-499의 작용물질을 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 투여 이후 대상의 골격근 세포에서 miR-208a 또는 miR-208b 및 miR-499의 발현 또는 활성이 증가하는 것인 방법.

**청구항 18**

제 17 항에 있어서, 상기 miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질 및 miR-499의 작용물질은 성숙한(mature) miR-208a 또는 miR-208b 및/또는 miR-499 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(polynucleotides)인 방법.

**청구항 19**

제 18 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질 및 miR-499의 작용물질은 발현벡터(expression vector) 상에 인코딩되는 것인 방법.

**청구항 20**

제 17 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질 및 miR-499의 작용물질은 공동 투여(co-administered)되는 것인 방법.

**청구항 21**

제 17 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질 및 miR-499의 작용물질은 순차적(sequentially)으로 투여되는 것인 방법.

**청구항 22**

제 21 항에 있어서, miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질은 miR-499의 작용물질 보다 먼저 투여되는 것인 방법.

**청구항 23**

제 21 항에 있어서, miR-499의 작용물질은 miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질 보다 먼저 투여되는 것인 방법.

**청구항 24**

제 17 항에 있어서, miR-499 및 miR-208 작용물질들의 투여 이후 상기 골격근 세포에서 하나 또는 그 이상의 속 골격근 유전자(fast skeletal muscle genes)의 발현이 감소하는 것인 방법.

**청구항 25**

제 24 항에 있어서, 하나 또는 그 이상의 속 골격근 유전자는 트로포닌 I2(troponin I2), 트로포닌 T3(troponin

T3), 속 골격 미오신 경쇄(fast skeletal myosin light chain), 및 알파 골격 액틴(alpha skeletal actin)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 마이크로RNA(microRNAs; miRNAs)의 활성 또는 발현을 조절하는 약품 투여에 의한 심장 및 근골격계 질환의 치료에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인간을 포함한 대상의 심장 세포에서 miR-208a/miR-208b 및 miR-499 모두의 발현 또는 활성 억제에 의한 심장 질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 대상의 골격근 세포에서 miR-208b 및 miR-499 모두의 발현 또는 활성 증가에 의한 근골격계 질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

**배경기술**

[0002] 관상동맥질환(coronary artery disease), 심근경색증(myocardial infarction), 울혈성 심부전(congestive heart failure) 및 심장 비대(cardiac hypertrophy)를 포함하는 심장 질환 및 이의 징후는 현재 미국에서의 주요 건강상의 위협을 명확하게 나타낸다. 이러한 병들로부터 고통 받는 환자를 진단, 치료 및 지원하기 위한 비용은 수십억 달러에 이른다. 심장 질환의 특히 심각한 두 가지 징후는 심근경색증과 심장 비대이다.

[0003] 흔히 심장마비로 알려진 심근경색증(myocardial infarction)은 일반적으로 관상동맥의 좁아짐 또는 폐색에 의한 결과로서, 심장 조직에 공급되는 혈류량의 갑작스러우면서도 지속적인 부족에 의해 야기된다. 적절한 혈액의 공급이 없는 경우, 조직은 허혈성이 되고, 심근세포(cardiomyocyte)(예를 들면, 심장근육세포) 및 혈관 구조(vascular structure)의 죽음을 야기한다. 심근세포의 죽음에 의해 발생하는 괴사성 조직은 일반적으로 반흔 조직(scar tissue)에 의해 교체되며, 상기 반흔 조직은 수축성이 없고, 심장 기능에 기여하지 못하며, 종종 심장 수축 동안 확장하거나 또는 심실(ventricle)의 크기 및 유효 반경을 증가시킴으로써, 예를 들어, 비대성(hypertrophic)이 됨으로써 심장 기능에 유해한 역할을 한다.

[0004] 심장 비대(cardiac hypertrophy)는 고혈압(hypertension), 기계적 부하(mechanical load), 심근경색증(myocardial infarction), 심장부정맥(cardiac arrhythmias), 내분비계 질환(endocrine disorders), 및 심장 수축성 단백질 유전자(cardiac contractile protein genes)의 유전자 변형(genetic mutations)으로 인해 일어나는 것들을 포함한 사실상 모든 종류의 심장 질환에 대한 심장의 적응 반응이다. 비대 반응은 심박출량을 늘리는 초기의 보상적인 메커니즘이기는 하지만, 지속되는 비대는 확장성 심근병증(dilated cardiomyopathy; DCM), 심부전(heart failure), 및 돌연사(sudden death)를 이끌 수 있다. 미국에서는, 매년 약 50 만명이 사망률 50%에 달하는 심부전 진단을 받고 있다.

[0005] 많은 신호 전달체계(signaling pathways), 특히 이상(aberrant) 칼슘 신호와 연관된 전달체계의 경우, 심장 비대 및 병리학적 리모델링을 유도한다(Heineke & Molkentin, 2006). 스트레스에 의한 비대적 발육(Hypertrophic growth)은 운동에 의해 일어나는 생리학적인 비대와는 다른 신호 전달체계 및 유전자 발현 패턴을 수반한다. 스트레스-매개된 심장 비대는 심근세포의 퇴화 및 소멸을 통해 심장에 섬유증(fibrose)을 일으키고, 팽창(dilated)시키고, 보상 작용을 상실시켜(decompensate) 주로 심부전을 일으키는 독특한 분자적 특징 및 조직학적 특징을 가진 많은 불리한 결과들과 관련된 복잡한 현상이다. 이러한 근거를 토대로, 근원적인 분자학적 메커니즘의 관독 및 불리한 심장 성장 및 최종적인 부전을 억제하기 위한 새로운 치료적 목표물을 발견하고자 하는 지대한 관심이 있었다. 이러한 메커니즘의 이해는 심장 비대 및 심부전을 치료하기 위한 새로운 치료법 디자인에 필수적이다.

[0006] 마이크로RNA는 최근 발달 타이밍(developmental timing)의 조절, 세포자살(apoptosis), 지방 대사(fat metabolism), 및 특히, 조혈모세포의 분화(hematopoietic cell differentiation)를 포함하는 여러 생물학적 과정들과 연관되었다. 마이크로RNA(miRNAs)는 비-단백질(non-protein)을 코딩하는 약 18 내지 25 뉴클레오티드 길이의 작은 RNA이며, 상기 마이크로RNA는 개개의 miRNA 유전자 단백질 코딩 유전자의 인트론 또는 다수의 밀접하게 연관된 miRNA들을 주로 인코딩하는 폴리시스트론성 전사물(poly-cistronic transcripts)로부터 유래한다. Carrington 외.의 리뷰 참조(*Science*, Vol. 301(5631):336-338, 2003). MiRNA는 표적 mRNA의 서열(sequence)과 완벽하게 상보적(complementary)인 경우 표적 mRNA의 분해를 촉진함으로써, 또는 표적 mRNA의 서열과 미스매치(mismatch)인 서열을 포함하고 있는 경우 번역(translation)을 방해함으로써, 표적 mRNA의 억제자(repressor) 역할을 한다.

[0007] MiRNA는 RNA 중합효소II(RNA polymerase II; pol II) 또는 RNA 중합효소III(pol III; Qi 외. (2006) Cellular & Molecular Immunology, Vol. 3:411-419 참조)에 의해 전사되고, 일반적으로 수천개의 염기서열을 가지는, 제 1 차 miRNA 전사물(pri-miRNAs)이라 불리는 최초의 전사물로부터 나타난다. Pri-miRNA는 핵 안에서 RNase 드로샤(Drosha)에 의해 약 70- 내지 100-뉴클레오티드의 헤어핀 구조를 가지는 전구체(pre-miRNAs)로 가공된다. 세포질로 이동된 후, 헤어핀 pre-miRNA는 이중가닥(double-stranded)의 miRNA를 생성하기 위해 다이서(Dicer)에 의해 추가적으로 가공된다. 성숙한(mature) miRNA 가닥은 이후 염기쌍 상보성에 의해 그의 표적 mRNA와 결합하는 RISC(RNA-induced silencing complex)에 합쳐진다. 상대적으로 매우 드문 경우로, miRNA 염기쌍은 mRNA 표적과 완벽히 일치하여, mRNA의 분해를 증진시킨다. 보다 일반적으로, miRNA는 표적 mRNA와 불완전한 이형2중가닥(heteroduplex)을 형성하여, mRNA의 안정성 또는 mRNA 번역 억제에 영향을 미친다.

[0008] 최근 발명자들은  $\alpha$ -미오신 중쇄( $\alpha$ -myosin heavy chain; MHC) 유전자의 인트론에 의해 인코딩되며, 또한 심장 스트레스에 대응한  $\beta$ -MHC 발현의 상향-조절(up-regulation)을 위해 필요하며, 심장에서 속 골격근 유전자의 억제를 위해 필요한 심장-특이 마이크로RNA인 miR-208a를 보고하였다(van Rooij 외., (2007) Science, Vol. 316: 575-579). 본 발명은 이러한 발견을 확장시키며, 심장 및 골격근 질환의 치료에 있어 신규한 치료적 접근을 제공한다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 부분적으로 본 발명은 심장 세포에서 miR-208a 및 miR-499 모두의 시스템적인 하향 조절(down-regulation)이 스트레스에 의한 심장 비대, 진전, 강화된 수축성, 및 병적 심장 리모델링에 있어서, 시너지적 효과를 제공한다는 것을 발견한 것에 기초한다. 놀랍게도 본 발명자들은  $\beta$ -MHC와 같은 스트레스-관련 유전자의 발현을 조절하기 위한 시간이 miR-208a 및 miR-499 억제제들의 동시 또는 순차적 투여를 통해 miR-208a 및 miR-499 모두를 하향 조절함으로써 현저하게 감소한다는 것을 발견하였다. 이러한 이중 표적화(dual targeting)는 miR-208a를 단독으로 하향 조절하여 유사한 효과를 관찰하기 위해 몇 달이 지연되는 것과 비교할 때, 스트레스-관련 유전자 발현에 직접적인 효과를 제공한다. 따라서, 본 발명은 병적 심장 비대, 심부전, 및 심근경색증 치료에 있어서, 인간을 포함한 이를 필요로 하는 대상에게 신규한 치료적 접근을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

[0010] 일 실시태양에서, 상기 방법은 miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제를 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 투여 이후 대상의 심장 세포에서 miR-208a 또는 miR-208b 및 miR-499의 발현 또는 활성이 감소된다. 일부 실시태양들에서, 억제제의 투여 이후 대상의 심장 세포에서 miR-208a 또는 miR-208b 및 miR-499의 상기 발현 또는 활성이 60 퍼센트를 초과하여 감소한다. miR-208 및 miR-499 억제제는 안타고미어(antagomirs) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotides)를 포함한다. 일 실시태양에서, miRNA 억제제들은 발현벡터(expression vector) 상에 인코딩된다.

[0011] 다른 실시태양에서, 대상에서 심장 스트레스 반응(cardiac stress response)은 miR-208a 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제 투여 이후 감소된다. 상기 심장 스트레스 반응은 상기 대상의 심장 세포에서 심근세포(cardiomyocytes)의 비대, 심장의 섬유증,  $\alpha$ -MHC의 감소된 발현, 및/또는  $\beta$ -MHC의 증가된 발현을 포함한다. 특정 실시태양들에서, 상기 심장 스트레스 반응의 감소는 miR-208a/miR-208b 및 miR-499 억제제들의 투여 후 두 달 이내에 일어난다. 바람직한 실시태양에서, 상기 심장 스트레스 반응의 감소는 억제제들의 투여 후 1 주 이내에 일어난다.

[0012] 일부 실시태양들에서, miR-208a/miR-208b 억제제 및 miR-499 억제제가 순차적으로 투여된다. 두 억제제들의 투여는 대략 수분(minutes)에서 수주(weeks)일 수 있는 간격으로 나누어질 수 있다. 일 실시태양에서, miR-208a/miR-208b 억제제 및 miR-499 억제제는 적어도 24 시간 간격을 두고 투여되었다. 다른 실시태양에서, miR-208a/miR-208b 억제제 및 miR-499 억제제는 공동 투여(co-administered)되었다. 상기 두 억제제들은 각각 약 1 mg/kg 내지 약 200 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다.

[0013] 본 발명은 또한 근골격계 질환(musculoskeletal disorder)의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료 또는 예방하는 방법으로, miR-208의 작용물질(agonist) 및 miR-499의 작용물질을 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 투여 이후 대상의 골격근 세포에서 miR-208 및 miR-499의 발현 또는 활성이 증가하는 것인 방법을 제공한다. 일 실시태양에서, 상기 방법은 miR-208b의 작용물질 및 miR-499의 작용물질을 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 상기

miRNA 작용물질들은 성숙한(mature) miR-208a, miR-208b, 또는 miR-499 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(polynucleotides)일 수 있다. 일부 실시태양에서, 이와 같은 폴리뉴클레오티드들은 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결(operably linked)되고, 발현벡터(expression vector) 내에서 대상의 세포로 제공된다.

[0014] 상기 miRNA 작용물질들은 공동 투여되거나 또는 특정 시간 간격으로 나뉘어 순차적으로 투여될 수 있다. 일부 실시태양에서, miR-499 및 miR-208a 또는 miR-208b 작용물질들을 대상에게 투여한 이후 대상의 골격근 세포에서 하나 또는 그 이상의 속 골격근 유전자(fast skeletal muscle genes)의 발현이 감소되었다. 하나 또는 그 이상의 속 골격근 유전자는 트로포닌 I2(troponin I2), 트로포닌 T3(troponin T3), 속 골격 미오신 경쇄(fast skeletal myosin light chain), 및 알파 골격 액틴(alpha skeletal actin)을 포함할 수 있다.

**발명의 효과**

[0015] 본 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0016] 도 1. MiR-208 녹아웃(knockout) 동물들은 흉대동맥결찰(thoracic aortic banding)에 대하여 보다 적은 심장 비대(cardiac hypertrophy) 및 섬유증(fibrosis)을 나타낸다. A. 흉대동맥결찰(TAB) 절차(procedure)를 개략적으로 나타냄(왼쪽). TAB 절차(TAB Procedure) 또는 삼 절차(sham procedure) 이후 메손트리크롬(Masson trichrome)으로 염색된 야생형(wild-type) 및 miR-208<sup>-/-</sup> 마우스의 심장의 조직학적 단면도(오른쪽). miR-208의 부재는 TAB을 21일 동안 받은 야생형 마우스에서 보이는 비대증 및 섬유증을 감소시킨다. B. 삼 또는 TAB 절차 이후 야생형(wild-type) 및 miR-208<sup>-/-</sup> 동물의 심장에서 베타-미오신 중쇄(beta-myosin heavy chain;  $\beta$ -MHC), 심방나트륨이뇨성인자(atrial natriuretic factor; ANF), 및 뇌성나트륨이뇨펩티드(brain natriuretic peptide; BNP)의 상대적인 발현 수준. C. 삼 또는 TAB 절차 이후 야생형(wild-type) 및 miR-208<sup>-/-</sup> 동물의 심장에서  $\alpha$ -MHC 및  $\beta$ -MHC 단백질 수준의 웨스턴 분석(Western analysis). GAPDH가 로딩 컨트롤(loading control)로써 탐지되었다.

도 2. miR-208의 장기 낙다운(longterm knockdown)은 miR-208 녹아웃 동물들에서의 스트레스 반응 억제 표현형을 모사(phenocopies)한다. A. 성숙한 miR-208 서열을 표적으로 하는 합성 올리고뉴클레오티드의 서열(서열번호: 16). 미스매치 컨트롤 서열(mismatch control sequence)은 안티 miR-208 서열(서열번호: 17)과 비교하여 4개의 염기 미스매치를 포함한다. B. 실시간 PCR 분석(Realtime PCR analysis)은 안티-miR-208 올리고뉴클레오티드로 처리된 동물의 심장에서 miR-208의 효율적인 낙다운을 보여준다. C. 삼 또는 흉대동맥결찰(TAB) 절차 이후 안티-miR-208 올리고뉴클레오티드(안티 208) 또는 미스매치된 컨트롤(mm)을 받은 동물의 심장에서 베타-미오신 중쇄( $\beta$ -MHC), 심방나트륨이뇨성인자(ANF), 및 뇌성나트륨이뇨펩티드(BNP)의 상대적인 발현 수준. TAB에 대한 반응으로 스트레스 마커들인 ANF 및 BNP가 유도되는 한편, 안티-miR-208을 받은 동물들은  $\beta$ MHC 발현의 감소된 유도를 나타내었다.

도 3. Myh7b 및 miR-499는 miR-208에 의해 조절된다. 노던 블롯(Northern blot)은 야생형(+/+), miR-208 이형 접합체(+/-) 및 miR-208 녹아웃(-/-) 마우스의 심장에서 miR-499의 발현을 보여준다. 야생형 및 돌연변이 마우스에서 miR-208의 발현은 Myh7b 뿐만 아니라 miR-499와도 직접적인 상관이 있다. GAPDH의 발현이 컨트롤로서 측정되었다.

도 4. Myh7b 및 miR-499는 심장 및 느린 골격근(slow skeletal muscle)에서 발현된다. A. 노던 분석(northern analysis)은 miR-499가 심장 및 느린 골격근(예를 들어, 가자미근(soleus))에서 발현된다는 것을 알려준다. Myh7b의 RT-PCR은 miR-499가 miR-499의 호스트유전자(hostgene)와 공동-발현(co-expressed)된다는 것을 보여준다. B. 심장 및 4개의 골격근 타입[비복근(gastrocnemius)/족척근(plantaris)(GP), 전경골근(tibialis anterior)(TA), 장지신근(extensor digitorum longus)(EDL), 및 가자미근(soleus)]에 대한 miR-499의 실시간 PCR 분석은 miR-499가 심장 및 가자미근(soleus)에서 현저하게 발현된다는 것을 입증한다. 단지 낮은 수준의 miR-499 발현이 TA 및 EDL에서 탐지될 수 있다. C. *In situ* 혼성화(hybridization)는 배발생(embryogenesis) 동안 Myh7b가 특히 심장 및 가자미근에서 발현된다는 것을 알려준다.

도 5. MiR-499는 미오신 발현에 영향을 미치지 않는다. A. Myh7b의 RT-PCR 분석은 miR-499의 유전자 결실(genetic deletion)이 miR-499의 호스트유전자(hostgene), Myh7b, GP-비복근/족척근; TA-전경골근; EDL-장지신근의 발현에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. GAPDH의 발현은 컨트롤로서 측정되었다. B.  $\alpha$ - 및  $\beta$ -MHC 두 가지 모두를 위한 야생형(WT), 이형접합체(+/-), 및 miR-499 녹아웃(KO) 동물들로부터 분리된 심장의 웨스턴

블롯 분석(Western blot analysis)은 miR-499의 결실이 단백질 수준의 어떠한 유전자의 발현에도 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. C. 갑상선 호르몬 생체 내 합성을 막아주며,  $\beta$ -MHC의 강력한 유도 물질(inducer)인 프로필티오우라실(Propylthiouracil; PTU)은 야생형(WT) 및 miR-499 녹아웃(KO) 동물들 모두에서  $\alpha$ -MHC의 감소 및  $\beta$ -MHC의 증가를 나타낸다.

도 6. miR-208의 *in vivo* 낙다운에 의한 miR-499의 조절. A. 지시된 양의 안티-miR-208 올리고뉴클레오티드 또는 염분(sal)의 꼬리 정맥 주사 3일 후 miR-208 및 miR-499 발현의 노던 분석. B. 단일의 80 mg/kg 용량의 안티-miR-208, 연속적인 이틀 동안의 2 x 80 mg/kg 용량의 안티-miR-208, 또는 미스매치 컨트롤 올리고뉴클레오티드(mm) 중 어느 하나가 주사된 동물의 치료 두 달 이후 심장 조직의 miR-208 및 miR-499 발현의 노던 분석. C. 단일 용량의 안티-miR-208, 연속적인 이틀 동안 2회 용량의 안티-miR-208, 또는 연속적인 이틀 동안 2회 용량의 미스매치 올리고뉴클레오티드로 치료한지 두 달 이후 심장 조직에서 miR-208, miR-499, miR-208b,  $\alpha$ -MHC, Myh7b, 및  $\beta$ -MHC 발현의 실시간 PCR 분석. D. 안티-miR-208(단일 80 mg/kg 용량 또는 두 번 연속적인 80 mg/kg 용량) 또는 미스매치(mm) 컨트롤 치료 두 달 이후 심장 조직에서  $\beta$ -MHC 발현의 웨스턴 블롯 분석.

도 7. miR-208 및 miR-499의 이중 표적화. A. 야생형 및 miR-499 녹아웃 동물들의 심장 조직에서 miR-208, miR-208b 및 miR-499의 노던 분석은 PTU에 의한 miR-208b의 강한 유도를 보여준다. miR-208b는  $\beta$ -MHC와 공동-발현되며, 그것의 발현의 표시이다. miR-499 녹아웃 동물들에서, miR-208b의 유도는 야생형에 필적한다. 하지만, miR-499 녹아웃 동물들에서 miR-208의 낙다운은 PTU에 의한 miR-208b 발현의 유도를 억제한다. B. 야생형 동물들, miR-208 녹아웃 동물들, miR-499 녹아웃 동물들, 및 PTU의 존재 및 부존재 하에서 안티-miR-208로 처리된 miR-499 녹아웃 동물들의 심장 조직에서 miR-208,  $\alpha$ -MHC, 및  $\beta$ -MHC의 실시간 PCR 분석.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0017] 심장 및 골격근은 수축의 효율을 조절하는 미오신의 이소폼(isoforms) 발현을 조절함으로써, 작업부하(workload), 갑상선 호르몬 신호전달(thyroid hormone signaling) 및 상해(injury)와 같은 다양한 병리생리학적(pathophysiological) 자극에 반응한다.
- [0018] 성인 심장에서  $\alpha$ - 대  $\beta$ -MHC 이소폼의 비율은 심장 수축성의 주요한 결정 요소이다. 성인 심장에서 주요한 미오신 이소폼인  $\beta$ -MHC은 상대적으로 낮은 ATPase 활성을 나타내는 반면,  $\alpha$ -MHC는 높은 ATPase 활성을 가진다. 심근경색증, 고혈압, 및 다른 질환들과 같은 다양한 병적 자극에 반응하여,  $\beta$ -MHC 발현은 증가하는 반면, 근원섬유(myofibrillar) ATPase 활성의 감소 및 심장 근섬유(cardiac myofibers)의 감소된 단축 속도(shortening velocity)의 결과로  $\alpha$ -MHC 발현은 감소하게 되고, 최후에는 수축성 기능장애(contractile dysfunction)에 이르게 된다. 놀랍게도, 심장에서  $\alpha$ -MHC 양의 작은 변화는 심장 기능에 충분한 영향을 끼칠 수 있다.
- [0019] 최근, 발명자들은  $\alpha$ -미오신 중쇄 유전자의 인트론에 의해 인코딩되며, 심장 스트레스에 대응한  $\beta$ -MHC 발현의 상향-조절 및 심장에서 속 골격근 유전자 억제에 필요한 심장-특이적 miRNA인 miR-208a를 보고하였다(그 전체가 본 명세서에 참고로 포함되는 함께-계류중인 출원 WO 2008/016924 참조).
- [0020] 발명자들은 또한 최근에 Myh7b 유전자의 인트론에 의해 인코딩되는 밀접하게 연관된 miRNA인 miR-499의 심장 발현을 위해 miR-208a가 또한 필요하다는 것을 발견하였다(그 전체가 본 명세서에 참고로 포함되는 함께-계류중인 출원 PCT/US08/71837 참조). 느린 골격근과 마찬가지로 심장에서도 Myh7b 및 miR-499의 발현은 가로무늬근(striated muscle) 유전자 발현의 신호-의존적인 조절제인 MEF2 전사 인자(transcription factor)에 의해 조절된다. miR-499 또는 miR-208의 강제적인 발현은 속(fast)에서 느린(slow) 근육섬유(myofiber)로의 *in vivo* 전환을 매개하기에 충분하다. miR-208 및 miR-499는 갑상선 호르몬 리셉터 공동-조절제(thyroid hormone receptor coregulator)인 Thrap1, 및 차례로 심장과 골격근에서  $\beta$ -MHC 발현을 음성적으로(negatively) 조절하는 전사 인자의 PUR 패밀리를 구성요소의 발현을 음성적으로 조절할 수 있다. Sox6은 느린 섬유 타입-특이 유전자(slow fiber type-specific genes)의 억제제로 기능한다. 야생형 근관세포(myotube)에서 Sox6 발현의 낙다운은  $\beta$ -MHC 발현에 의미 있는 증가를 가져온다.  $\beta$ -MHC 프로모터의 분석은 태아의 골격근의 섬유 타입(fiber type) 분화 및 심장에서의  $\beta$ -MHC 조절에 Sox6이 결정적인 역할을 한다는 것을 제안하는 Sox 공통 서열(consensus sequence)을 밝혔다. 이러한 발견들은 Myh 유전자들이 수축성 및 신호 민감성을 결정하는 규제력을 지닌(regulatory) miRNA들을 인코딩함으로써 가로무늬근(striated muscle)의 유전자 발현 패턴을 조절하는 공통적 조절 메커니즘의 비밀을 밝혔다(van Rooij 외, (2009) Developmental Cell, Vol. 17: 662-673).
- [0021] 부분적으로 본 발명은 심장 세포에서 miR-208 및 miR-499 모두의 하향 조절(downregulation)이 심장 스트레스 반응을 억제하는데 있어서, 시너지적 효과를 제공한다는 것을 발견한 것에 기초한다. 심장 세포에서 miR-208a

발현의 억제제는 스트레스에 의해 유발된  $\beta$ -MHC 발현의 감소를 초래한다. 하지만, 이러한 효과는 miR-208 억제제의 투여 이후 두 달까지는 관찰되지 않는다. 놀랍게도 본 발명자들은 miR-208a 및 miR-499 모두의 억제가 스트레스에 의해 유발된  $\beta$ -MHC 발현의 억제를 투여 이후 거의 즉시 초래하며, 따라서 심장 스트레스 반응에 대한 효과를 가속시키는 것을 발견하였다. 따라서, 심장 질병의 치료 및 예방을 위해, 동시에 또는 순차적으로, miR-208 및 miR-499의 발현을 조절함으로써 골격 및 심장근 유전자 발현을 조작하는 전략이 이러한 발견들의 관점에서 서술되어 있다.

[0022] MiR-208a는  $\alpha$ -MHC 유전자 인트론 안에 위치하고 있다. 정확한 인트론의 위치는 개개의 종(species) 및 구체적인 전사물(transcript)에 의존한다. 예를 들어, 인간에서 miR-208a는  $\alpha$ -MHC 유전자의 28번째 인트론 안에서 인코딩되는 반면, 마우스의 경우, 29번째 인트론 안에서 인코딩된다. 인간(human), 마우스(mouse), 랫(rat), 및 개(canine)를 위한 miR-208a의 pre-miRNA 인코딩 서열은 아래에서 각각 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 및 서열번호: 4로 나타나있다. 성숙한 miR-208a 서열은 서열번호: 5에 나타나있다.  $\alpha$ -MHC와 같이, miR-208a는 심장에서 단독으로 발현된다.

[0023] 인간(Human) pre-miR-208a (서열번호: 1)

[0024] ACGGGCGAGC TTTTGGCCCG GGTATACCT GATGCTCAG TATAAGACGA

[0025] GCAAAAAGCT TGTTGGTCAG A

[0026] 마우스(Mouse) pre-miR-208a (서열번호: 2)

[0027] ACGGGTGAGC TTTTGGCCCG GGTATACCT GACTCTCAG TATAAGACGA

[0028] GCAAAAAGCT TGTTGGTCAG A

[0029] 랫(Rat) pre-miR-208a (서열번호: 3)

[0030] ACGGGTGAGC TTTTGGCCCG GGTATACCT GACTCTCAG TATAAGACGA

[0031] GCAAAAAGCT TGTTGGTCAG A

[0032] 개(Canine) pre-miR-208a (서열번호: 4)

[0033] ACGCATGAGC TTTTGGCTCG GGTATACCT GATGCTCAG TATAAGACGA

[0034] GCAAAAAGCT TGTTGGTCAG A

[0035] 성숙한(Mature) miR-208a (서열번호: 5)

[0036] AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU

[0037] miR-499 유전자의 게놈 위치 분석은 상기 유전자가  $\alpha$ -MHC 유전자의 상동 기관(homolog)인 Myh7b 유전자의 20번째 인트론 안에 포함되어 있다는 것을 보여준다. 마우스(mouse), 랫(rat), 인간(human), 개(canine), 주머니쥐(opossum), 닭(chicken) 및 서양밭뜯개구리(*X. tropicalis*)를 위한 miR-499의 pre-miRNA 인코딩 서열은 아래에서 각각 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11 및 서열번호: 12로 나타나있다. 서열번호: 13은 마우스 전구체 서열(precursor sequence)의 머리핀 구조(stem-loop structure)이며, 서열번호: 14는 성숙한 miR-499 서열이다. Myh7b 유전자는 척추동물(vertebrate)에 보존되고, 심장 및 느린 골격근(예를 들면, 가자미근)에서 단독으로 발현된다.

- [0038]     마우스(Mouse) pre-miR-499 (서열번호: 6)
- [0039]     TCCCTGTGTC TTGGGTGGGC AGCTGTTAAG ACTTGCAGTG ATGTTTAGCT
- [0040]     CCTCTGCATG TGAACATCAC AGCAAG
- [0041]     랫(Rat) pre-miR-499 (서열번호: 7)
- [0042]     TCCCTGTCTT GGGTGGGCAG CTGTTAAGAC TTGCAGTGAT GTTTAGCTCC
- [0043]     TCTCCATGTG AACATCACAG CAAG
- [0044]     인간(Human) pre-miR-499 (서열번호: 8)
- [0045]     CCCCTGTGCC TTGGGCGGGC GGCTGTTAAG ACTTGCAGTG ATGTTTAACT
- [0046]     CCTCTCCACG TGAACATCAC AGCAAG
- [0047]     개(Canine) pre-miR-499 (서열번호: 9)
- [0048]     CCCTTGACCC CTGGGCGGGC GGCCGTTAAG ACTTGCAGTG ATGTTTAACT
- [0049]     CCTCTCCACG TGAACATCAC AGCAAG
- [0050]     주머니쥐(oposum) pre-miR-499 (서열번호: 10)
- [0051]     CCCCTGCCTC CCCGCGGGC AGCTGTTAAG ACTTGCAGTG ATGTTTAACT
- [0052]     CTTCTCTATG TGAACATCAC AACAAG
- [0053]     닭(Chicken) pre-miR-499 (서열번호: 11)
- [0054]     GGAGCGGCAG TTAAGACTTG TAGTGATGTT TAGATAATGT ATTACATGGA
- [0055]     CATCACTTTA AG
- [0056]     서양밭뜯개구리(*X. tropicalis*) pre-miR-499 (서열번호: 12)
- [0057]     GTCTTAGCGA GGCAGTTAAG ACTTGCAGTG ATGTTTAGTT AAAATCTTTT
- [0058]     CATGAACATC ACTTTAAG
- [0059]     pre-miR-499 서열의 마우스(Mouse) 헤어핀 구조(stem-loop) (서열번호: 13)
- [0060]     GGGUGGGCAG CUGUUAAGAC UUGCAGUGAU GUUUAGCUCC UCUGCAUGUG
- [0061]     AACAUACAG CAAGUCUGUG CUGCUGCCU
- [0062]     성숙한(Mature) miR-499 (서열번호: 14)
- [0063]     UUAAGACUUG CAGUGAUGUU U
- [0064]     본 발명자들은 miR-208b라 불리는,  $\beta$ -MHC 유전자 내의 인트론 31에 위치하며,  $\beta$ -MHC와 유사하게 심장 및 느린

골격근(slow skeletal muscle)(예를 들어, 가자미근)에서 단독으로 발견되는, miR208a의 두 번째 이형(second version)을 포함하는 게놈을 또한 발견하였다. miR-208b에 의해 조절되는 유전자들은 예를 들어, Sp3, 미오스타틴(Myostatin), PUR베타, THRAP1, 및 속 골격근 단백질 유전자들(fast skeletal muscle protein genes)을 포함한다. 이 miRNA의 서열은 대부분 miR-208a와 일정한 miRNA의 mRNA 표적을 정의하는 “시드 영역(seed region)”에서 100% 상동성(homology)을 가지고 중복된다. 따라서, miR-208b는 인간에서 심장 및 골격근 수축성에 대해 충분한 영향을 가질 수 있다. pre-miR-208b 서열은 여러 포유동물 종 전역에서 보존된다(예를 들어, 인간, 마우스, 랫, 및 개). 성숙한 miR-208b 서열 뿐만 아니라 pre-miR-208b 서열 역시 아래에 나타나있다:

[0065] pre-miR-208b (서열번호: 18)

[0066] TTTCTGATCC GAATATAAGA CGAACAAAAG GTTTGTCTGA GGG

[0067] 성숙한(Mature) miR-208b (서열번호: 19)

[0068] AUAAGACGAA CAAAAGGUUU GU

[0069] 여기에 개시된 RNA 서열들이 디옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotides)가 필요한 실시태양에서 사용되었을 때, 티미딘 잔기(thymidine residue)가 우리딘 잔기(uridine residue)를 대체하는 것으로 이해된다. 유사하게, 리보뉴클레오티드(ribonucleotides)가 필요한 실시태양에서, 여기에서 개시된 DNA 서열들에서 우리딘 잔기가 티미딘 잔기를 대체한다.

[0070] 일 실시태양에서, 본 발명은 인간을 포함한, 대상의 심장 세포에서 miR-208(예를 들어, miR-208a 및/또는 miR-208b, 또는 다른 말로, miR208a/miR208b) 및 miR-499 둘 중 하나 또는 모두의 발현 및/또는 활성을 표적화함으로써, 병적 심장 비대(pathologic cardiac hypertrophy), 심근경색증(myocardial infarction), 또는 심부전(heart failure)의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, miR-208a/miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 대상의 심장 세포에서 miR-208a/miR-208b 및 miR-499의 발현 또는 활성을 감소시키기 위해 대상에게 투여된다.

[0071] 다른 실시태양에서, 상기 이를 필요로 하는 대상은 병적 심장 비대(pathologic cardiac hypertrophy), 심부전(heart failure), 또는 심근경색증(myocardial infarction)이 발생하는 위험한 상태일 수 있다. 그러한 대상은 오래된 조절되지 않는 고혈압(long standing uncontrolled hypertension), 고쳐지지 않는 심장판막증(uncorrected valvular disease), 만성 협심증(chronic angina), 새로운 심근경색증(recent myocardial infarction), 심장 질병에 대한 선천적인 소인(congenital predisposition to heart disease) 또는 병적 비대증(pathological hypertrophy)을 포함하지만 여기에 한정되지 않는 하나 또는 그 이상의 위험 요인을 나타낼 수 있다. 위험한 상태의 대상은 심장 비대증에 대한 유전적 소인을 가지는 것으로 또는 심장 비대증의 가족력(familial history)을 가지는 것으로 진단될 수 있다.

[0072] 바람직하게는, 대상에게 miR-208a/miR-208b 억제제 및 miR-499 억제제 두 가지 모두를 투여하는 것이 대상에서 심장 비대, 심부전, 또는 심근경색증의 하나 또는 그 이상의 증상을 개선시키거나, 또는 심장 비대로부터 심부전까지의 이행을 지연시키는 결과를 초래한다. 하나 또는 그 이상의 개선된 증상은 예를 들어, 증진된 운동 능력(increased exercise capacity), 증진된 심장 박출 용량(increased cardiac ejection volume), 감소된 좌심실이완기말압(decreased left ventricular end diastolic pressure), 감소된 폐동맥혈압(decreased pulmonary capillary wedge pressure), 증진된 심박출량(increased cardiac output), 증진된 심계수(increased cardiac index), 낮아진 폐동맥압력(lowered pulmonary artery pressures), 감소된 좌심실수축기말압 및 이완기 면적(decreased left ventricular end systolic and diastolic dimensions), 감소된 심장 섬유증(decreased cardiac fibrosis), 심장근의 감소된 콜라겐 침착(decreased collagen deposition in cardiac muscle), 감소된 좌우 심실벽 스트레스(decreased left and right ventricular wall stress), 감소된 벽 긴장(decreased wall tension), 증진된 삶의 질(increased quality of life), 및 줄어든 질병 관련 이환율 또는 사망률(decreased disease related morbidity or mortality)일 수 있다.

[0073] 본 발명의 일 실시태양에서, 심장 스트레스 반응은 miR-208(예를 들어, miR-208a 및/또는 miR-208b) 및 miR-499 억제제 투여 이후 대상에서 줄어든다. 상기 심장 스트레스 반응은, 그 중에서도, 심근세포 비대증

(cardiomyocyte hypertrophy), 심장의 섬유증(fibrosis of the heart), 심장 세포에서  $\alpha$ -MHC의 감소된 발현, 및/또는 심장 세포에서  $\beta$ -MHC의 증진된 발현을 포함한다. 대상에게 miR-208a/miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제 두 가지 모두를 투여한 것은 어느 한 쪽의 억제제를 단독으로 투여한 것과 비교하여 심장 스트레스 반응에 보다 빠른 효과를 나타내는 결과를 초래한다. 예를 들어, 심장 스트레스 반응의 감소는 억제제의 투여 이후 8주 이내, 6주 이내, 4주 이내, 3주 이내, 2주 이내, 1주 이내, 5일 이내, 3일 이내, 또는 1일 이내에 일어난다. 다른 실시예에서, 심장 스트레스 반응의 감소는 억제제 투여 이후 12시간 이내에 일어난다.

[0074] 일부 실시태양에서, miR-208(예를 들어, miR-208a 및/또는 miR-208b) 및 miR-499 억제제들은 성숙한 miR-499 및/또는 miR-208a 또는 miR-208b 서열을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드들(antisense oligonucleotides)일 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 리보뉴클레오티드 또는 디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 바람직하게는, 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 적어도 하나의 화학적 변형(chemical modification)을 가진다. 예를 들어, 적합한 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 하나 또는 그 이상의 “형태적으로 속박된(conformationally constrained)” 또는 바이사이클릭 당 뉴클레오시드 변형(bicyclic sugar nucleoside modifications), 예를 들어, “잠금 핵산(locked nucleic acids)” 이 포함될 수 있다. “잠금 핵산(locked nucleic acids)” (LNA)은 리보스 당 부분(ribose sugar moiety)의 2' 및 4' 탄소 사이에 추가적인 다리(bridge)를 포함하여, LNA를 포함하는 올리고뉴클레오티드에 향상된 열적 안정성을 부여하는 “잠긴(locked)” 형태를 나타내는 변형된 리보뉴클레오티드이다. miR-208a/miR-208b 및 miR-499를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 LNA들 또는 다른 변형된 뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드 또는 디옥시리보뉴클레오티드들의 조합을 포함할 수 있다. 선택적으로, 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 당-인산 골격(sugar-phosphate backbone) 대신 펩티드-기본 골격(peptide-based backbone)을 포함하는 펩티드 핵산(peptide nucleic acids; PNAs)을 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드들의 다른 화학적 변형은 2'-O-알킬(예를 들어, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸), 2'-플루오로, 및 4' 티오 변형과 같은 당 변형(sugar modification), 및 하나 또는 그 이상의 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 모르폴리노(morpholino), 또는 포스포노카복실레이트 결합(phosphonocarboxylate linkages)과 같은 골격 변형(backbone modifications)(예를 들어, 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함되는 미국특허 No. 6,693,187 및 7,067,641 참조)을 포함할 수 있지만 여기에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드들, 특히 짧은 길이의 것들은(예를 들어, 15 뉴클레오티드 미만) 하나 또는 그 이상의 LNA, 바이사이클릭 뉴클레오시드(bicyclic nucleoside), 포스포노포르메이트(phosphonoformates), 2' O 알킬 및 기타 같은 종류의 것과 같은, 하지만 여기에 한정되지 않는, 친화도 증가 변형(affinity enhancing modifications)을 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 적합한 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 5' 및 3' 말단 양쪽 모두에 2'-O-메톡시에틸-변형된 리보뉴클레오티드를 포함하며, 적어도 10개의 디옥시리보뉴클레오티드를 중심에 가지는 2'-O-메톡시에틸 “갭머(gapmers)”이다. 이러한 “갭머”는 RNA 표적의 RNase H-의존적인 분해 메커니즘을 유발할 수 있다. 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함되는 미국특허 No. 6,838,283 기술된 것과 같은 안정성을 증가시키고 효력을 향상시키기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드들의 다른 변형들은 당업계에 알려져 있으며, 본 발명의 방법에서 사용하기에 적합하다. miRNA들의 활성을 억제하기에 유용한 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 약 5 내지 약 50 뉴클레오티드 길이, 약 10 내지 약 30 뉴클레오티드 길이, 또는 약 20 내지 약 25 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시태양에서, miR-208a/miR-208b 및 miR-499를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 약 8 내지 약 18 뉴클레오티드 길이이고, 다른 실시태양에서는 약 12 내지 16 뉴클레오티드 길이이다. 특히, miR208a 또는 miR208b에 상보적인 어떠한 8-머(8-mer) 또는 이보다 긴 것도 사용될 수 있으며, 즉, miR의 5' 말단에서 시작하여 성숙한 서열의 3' 말단에 이르는 miR208a 또는 miR208b의 어떠한 연속적인 서열에 상보적인 어떠한 안티미어(antimir) 서열도 사용될 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 몇몇 경우에 성숙한 miRNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적인, 예를 들어, 성숙한 miRNA 서열에 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miRNA 서열에 실질적으로 상보적일 수 있으며, 즉, 표적 폴리뉴클레오티드 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상보적이다. 일 실시태양에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 성숙한 miRNA 서열에 100% 상보적인 서열을 포함한다.

[0075] 다른 실시태양에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 안타고미어(antagomirs)이다. “안타고미어”는 miRNA 서열에 적어도 부분적으로 상보적인 단일-가닥의, 화학적으로-변형된 리보뉴클레오티드들이다. 안타고미어는 2'-O-메틸-당 변형들(2'-O-methyl-sugar modifications)과 같은 하나 또는 그 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 안타고미어는 오직 변형된 뉴클레오티드들만 포함한다. 안타고미어는 부분 또는 전체 포스포로티오에이트 골격을 초래하는 하나 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 연결(phosphorothioate linkage)을 포함할 수 있다. *in vivo* 전달(delivery) 및 안정(stability)을 용이하게 하기 위하여, 안타고미어

는 자신의 3' 말단에서 콜레스테롤, 지방산, 비타민, 탄수화물, 펩타이드 또는 다른 작은 분자 리간드(small molecule ligand)와 같은 스테로이드와 연결될 수 있다. miRNA 억제에 적합한 안타고미어는 약 15 내지 약 50 뉴클레오티드 길이, 보다 바람직하게는 약 18 내지 약 30 뉴클레오티드 길이, 및 가장 바람직하게는 약 20 내지 약 25 뉴클레오티드 길이일 수 있다. “부분적으로 상보적인(partially complementary)” 은 표적 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상보적인 서열을 나타낸다. 안타고미어는 성숙한 miRNA 서열과 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상보적일 수 있다. 일부 실시태양에서, 안타고미어는 성숙한 miRNA 서열과 실질적으로 상보적일 수 있으며, 즉, 표적 폴리뉴클레오티드 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상보적이다. 다른 실시태양에서, 안타고미어는 성숙한 miRNA 서열에 100% 상보적이다.

[0076] 일부 실시태양에서, miR-499 및 miR-208a/miR-208b의 억제제들은 성숙한 miR-499 및 성숙한 miR-208a 또는 miR-208b 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 포함하는 안타고미어들이다. 일 실시태양에서, miR-499의 억제제는 5'-UUAAGACUUGC AGUGAUGUUU-3'(서열번호: 14)에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 서열을 가지는 안타고미어이다. 다른 실시태양에서, miR-208a의 억제제는 5'-AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU-3'(서열번호: 5)에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 서열을 가지는 안타고미어이다. 다른 실시태양에서, miR-208a의 억제제는 5'-ACAAGCUUUUGCUCGUCUUU-3'(서열번호: 15)의 서열을 가지는 안타고미어이다. 또 다른 실시태양에서, miR-208a의 억제제는 서열번호: 16의 서열을 가지는 안타고미어이다. 다른 실시태양에서, miR-208b의 억제제는 5'-AUAAGACGAACAAAAGGUUGU-3'(서열번호: 19)에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 서열을 가지는 안타고미어이다.

[0077] 일부 실시태양에서, miR-499 및 miR-208a 또는 miR-208b의 억제제들은 화학적으로-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드들이다. 일 실시태양에서, miR-499의 억제제는 5'-UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU-3'(서열번호: 14)에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 화학적으로-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 다른 실시태양에서, miR-208a의 억제제는 5'-AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU-3'(서열번호: 5)에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 화학적으로-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 또 다른 실시태양에서, miR-208b의 억제제는 5'-AUAAGACGAACAAAAGGUUGU-3'(서열번호: 19)에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 화학적으로-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 여기에서 사용된 “실질적으로 상보적인” 은 표적 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 성숙한 또는 전구체 miRNA 서열)에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상보적인 서열을 나타낸다.

[0078] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 miR-499 또는 miR-208a/miR-208b를 위한 전구체 miRNA 서열(pre-miRNA)에 실질적으로 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 pre-miR-499 또는 pre-miR-208a/miR-208b 서열의 헤어핀 구조 영역(stem-loop region) 외부에 위치한 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함한다. 일 실시태양에서, miR-499 기능의 억제제는 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11 및 서열번호: 12로 구성된 그룹으로부터 선택되는 pre-miR-499 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 가지는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 다른 실시태양에서, miR-208a 기능의 억제제는 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 및 서열번호: 4로 구성된 그룹으로부터 선택되는 pre-miR-208a 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 가지는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 또 다른 실시태양에서, miR-208b 기능의 억제제는 pre-miR-208b 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 가지는 서열번호: 18의 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.

[0079] 본 발명의 다른 실시태양에서, 단일 핵산 분자가 miR-208 및 miR-499 두 가지 모두를 동시에 억제하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 단일 핵산은 성숙한 miR-208a 서열(예를 들어, 서열번호: 5)에 적어도 부분적으로 상보적인 서열 및 성숙한 miR-499 서열(예를 들어, 서열번호: 14)에 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시태양에서, 단일 핵산은 성숙한 miR-208b 서열(예를 들어, 서열번호: 19)에 적어도 부분적으로 상보적인 서열 및 성숙한 miR-499 서열(예를 들어, 서열번호: 14)에 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 단일 핵산 분자는 pre-miR-208a 서열(예를 들어, 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 및 서열번호: 4)에 적어도 부분적으로 상보적인 서열 및 pre-miR-499 서열(예를 들어, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11 및 서열번호: 12)에 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시태양에서, 단일 핵산 분자는 pre-miR-208b 서열(예를 들어, 서열번호: 18)에 적어도 부분적으로 상보적인 서열 및 pre-miR-499 서열(예를 들어, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11 및 서열번호: 12)에 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 단일 핵산 분자는 하나 또는 그 이상의 스페이서 뉴클레오티드들(spacer nucleotides)을 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-08b) 및 miR-499 표적 서열들(targeting sequences) 사이에 더 포함할

수 있다. 예를 들어, 단일 핵산 분자는 약 1 내지 약 200의 스페이스 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 약 5 내지 약 100의 스페이스 뉴클레오티드, 가장 바람직하게는 약 10 내지 약 50의 스페이스 뉴클레오티드를 miR-208a/miR-208b 및 miR-499 표적 서열들 사이에 포함할 수 있다.

[0080] 여기에서 설명된 어떠한 miR-208a/miR-208b 및 miR-499의 억제제들도 miR-208a/miR-208b 및 miR-499 억제제들을 인코딩하는 발현벡터를 세포에 전달함으로써 표적 세포(예를 들어, 심장 세포, 골격근 세포)에 전달될 수 있다. miR-208a/miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 동일한 발현벡터에 의해 인코딩될 수 있다. 선택적으로, miR-208의 억제제(예를 들어, miR-208a/miR-208b) 및 miR-499의 억제제는 따로따로 분리된 발현벡터 상에 인코딩된다. “벡터”는 관심 핵산을 세포의 내부로 전달하기 위해 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 친양쪽성 화합물과 연관된 폴리뉴클레오티드, 플라즈미드, 및 바이러스를 포함하는, 하지만 여기에 한정되지 않는, 수많은 벡터들이 당업계에 알려져 있다. 따라서, 용어 “벡터”는 자율적으로 복제하는 플라즈미드 또는 바이러스를 포함한다. 바이러스성 벡터는 예를 들어, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 및 기타 같은 종류의 것을 포함하나 여기에 한정되는 것은 아니다. 발현 컨스트럭트(expression construct)는 살아있는 세포(living cell)에서 복제되거나, 또는 합성적으로 만들어질 수 있다. 이러한 응용 목적을 위해서, 용어 “발현 컨스트럭트(expression construct)”, “발현벡터(expression vector)”, 및 “벡터”는 발명의 응용을 전반적, 해설의 의미, 및 발명을 한정하지 않으려는 의도로 설명하기 위해 서로 번갈아가며 사용된다.

[0081] 일 실시태양에서, miR-208a/miR-208b 및/또는 miR-499의 억제제를 발현하기 위한 발현벡터는 발현된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 서열이 부분적으로 또는 완벽하게 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b) 및/또는 miR-499의 성숙한 서열에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 프로모터(promoter)를 포함한다. 여기에서 사용된 “작동 가능하게 연결된(operably linked)” 또는 “전사 조절 하에서(under transcriptional control)”는 RNA 중합효소 및 폴리뉴클레오티드의 발현에 의해 전사(transcription)의 시작을 조절하는 폴리뉴클레오티드와의 관계에서 프로모터가 정확한 위치 및 방향에 있다는 것을 의미한다. 다른 실시태양에서, 발현벡터는 여기에서 서술된 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b) 및 miR-499 두 가지 모두를 표적으로 하는 단일 핵산을 인코딩할 수 있으며, 상기 단일 핵산은 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있다. 다른 실시태양에서, 단일 발현벡터는 miR-208a/miR-208b 억제제 및 miR-499 억제제를 인코딩할 수 있으며, 상기 miR-208a/miR-208b 억제제는 miR-499 억제제와는 다른 프로모터에 의해 가동(drive n)된다.

[0082] 여기에서 사용된 것과 같이, “프로모터”는 세포의 합성 기관(synthetic machinery) 또는 유전자의 특정 전사를 시작하기에 필요한 유도된 합성 기관(induced synthetic machinery)에 의해 인식된 DNA 서열을 나타낸다. 적합한 프로모터는 RNA 중합효소I(polI), RNA 중합효소II(polII), RNA 중합효소III(polIII), 및 바이러스성 프로모터(viral promoter)[예를 들어, 인간 세포거대바이러스 즉각 초기 유전자 프로모터(human cytomegalovirus (CMV) immediate early gene promoter), SV40 초기 프로모터(SV40 early promoter), 및 라우스육종바이러스 긴 말단반복(the Rous sarcoma virus long terminal repeat)]를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 일 실시태양에서, 프로모터는 조직 특이적 프로모터이다. 특별히 관심있는 것은 근육 특이적 프로모터들이며, 보다 특별하게는 심장 특이적 프로모터들이다. 이들은 미오신 경쇄-2 프로모터(the myosin light chain-2 promoter)(Franz 외. (1994) *Cardioscience*, Vol. 5(4):235-43; Kelly 외 (1995) *J. Cell Biol*, Vol. 129(2):383-396), 알파 액틴 프로모터(the alpha actin promoter)(Moss 외 (1996) *Biol. Chem.*, Vol. 271(49):31688-31694), 트로포닌 1 프로모터(the troponin 1 promoter)(Bhavsar 외. (1996) *Genomics*, Vol. 35(1): 11-23); Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 교환기 프로모터(the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger promoter)(Barnes 외 (1997) *J. Biol. Chem.*, Vol. 272(17):11510-11517), 디스트로핀 프로모터(the dystrophin promoter)(Kimura 외. (1997) *Dev. Growth Differ.*, Vol. 39(3):257-265), 알파7 인테그린 프로모터(the alpha7 integrin promoter)(Ziober and Kramer (1996) *J. Bio. Chem.*, Vol. 271(37):22915-22), 뇌성나트륨이뇨펩타이드 프로모터(the brain natriuretic peptide promoter)(LaPointe 외 (1996) *Hypertension*, Vol. 27(3 Pt 2):715-22) 및 알파 B-크리스탈린/작은열충격단백질 프로모터(the alpha B-crystallin/small heat shock protein promoter)(Gopal-Srivastava (1995) *J. Mol. Cell. Biol*, Vol. 15(12):7081-7090), 알파 미오신 중쇄 프로모터(alpha myosin heavy chain promoter)(Yamauchi-Takahara 외 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, Vol. 86(10):3504-3508) 및 ANF 프로모터(ANF promoter)(LaPointe 외. (1988) *J. Biol. Chem.*, Vol. 263(19):9075-9078)를 포함한다.

[0083] 특정 실시태양에서, miR-499 및/또는 miR-208a/miR-208b 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 프로모터는 유도성 프로모터(inducible promoter)일 수 있다. 테트라사이클린 프로모터(tetracycline

promoter), 메탈로티오네인 IIA 프로모터(metallothionein IIA promoter), 열충격 프로모터(heat shock promoter), 스테로이드/갑상선호르몬/레티노산 반응 요소(steroid/thyroid hormone/retinoic acid response elements), 아데노바이러스 후기 프로모터(the adenovirus late promoter), 및 유도성 생쥐 유방 종양 바이러스 LTR(the inducible mouse mammary tumor virus LTR)을 포함하는, 하지만 여기에 한정되지 않는, 유도성 프로모터들이 당업계에 알려져 있다. 발현백터는 여기에서 서술된 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b) 및 miR-499 두 가지 모두를 표적으로 하는 단일 핵산을 인코딩할 수 있으며, 상기 단일 핵산은 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있다. 선택적으로, 단일 발현백터는 miR-208a/miR-208b 억제제 및 miR-499 억제제를 인코딩할 수 있으며, 상기 miR-208a/miR-208b 억제제는 제 1 유도성 프로모터에 의해 가동되고, miR-499 억제제는 제 2 유도성 프로모터에 의해 가동된다. 다른 실시태양에서, 제 1 발현백터는 miR-208a/miR-208b 억제제를 인코딩할 수 있으며, 상기 miR-208a/miR-208b 억제제는 제 1 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있고, 제 2 발현백터는 miR-499 억제제를 인코딩할 수 있으며, 상기 miR-499 억제제는 제 2 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있다. miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b) 및 miR-499 억제제들의 발현을 조절하기 위한 유도성(inducible) 및 구성적(constitutive) 프로모터들의 다른 조합들 또한 고려된다. 예를 들어, miR-208a/miR-208b 억제제는 구성적(constitutive) 프로모터를 사용하여 벡터로부터 발현될 수 있는 반면, miR-499 억제제는 유도성(inducible) 프로모터를 사용하여 벡터로부터 발현될 수 있다.

[0084] 본 발명은 또한 치료 이후 miR-499 및 miR-208a/miR-208b 억제제들을 제거 또는 청소하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 심장 조직에서 miR-499 및 miR-208a/miR-208b 억제제들의 과발현 결합부위(overexpressing binding site)를 포함한다. 다른 실시태양에서, 본 발명은 치료 이후 miR-499 및 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b)를 제거 또는 청소하는 방법을 제공한다. 일 실시태양에서, 상기 방법은 골격근에서 골격 및 심장근 특이적 프로모터(근크레아틴키나아제)(muscle creatine kinase (MCK))를 이용한 miR-499 및 miR-208a/miR-208b의 결합부위 영역(binding site region)의 과발현을 포함한다. 결합부위 영역은 바람직하게는 miR-499 및 miR-208a 또는 miR-208b를 위한 시드 영역(seed region)의 서열을 포함한다. 시드 영역은 표적 인식에 중요한 2-8 염기에 걸친 miRNA의 5' 부분이다. 일부 실시태양에서, 결합부위는 THRAP1 또는 PUR베타와 같은 miR-499 또는 miR-208의 하나 또는 그 이상 표적의 3'UTR로부터 나온 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시태양에서, miR-499 및 miR-208 억제제는 miRNA의 기능을 감소시키거나 정지시키기 위해 miR-499 및 miR-208 이후 투여될 수 있다.

[0085] 발명의 다른 실시태양에서, miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b)의 억제제 및 miR-499의 억제제는 공동 투여(co-administered)된다. miR-208 억제제 및 miR-499는 단일 제형(single formulation)으로 투여될 수 있다. 예를 들어, miR-208 억제제 및 miR-499 억제제를 포함하는 약학적 조성물은 두 억제제들을 공동 투여하기 위해 사용될 수 있다. 선택적으로, miR-208 및 miR-499 억제제들은 여기에서 서술된 발현백터와 같은 단일 핵산에 의해 인코딩될 수 있다. 두 억제제들 다수의 공동-투여는 지속된 기간 동안, 예를 들어, 1주, 2주, 3주, 1달, 2달, 3달, 4달, 5달, 6달, 9달, 1년, 2년, 3년, 4년, 또는 5년간 주어질 수 있다.

[0086] 일부 실시태양에서, miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b)의 억제제 및 miR-499의 억제제는 순차적으로 투여될 수 있다. 일 실시태양에서, miR-208의 억제제는 miR-499의 억제제보다 먼저 투여된다. 다른 실시태양에서, miR-499의 억제제는 miR-208의 억제제보다 먼저 투여된다. miR-208 및 miR-499 억제제들의 투여를 분리하는 간격은 수분에서 수일의 범위일 수 있다. 예를 들어, 간격은 약 1시간에서 약 72시간, 6시간에서 약 48시간, 또는 약 12시간에서 약 24시간일 수 있다. 바람직한 실시태양에서, miR-208 억제제 및 miR-499 억제제 투여 사이의 간격은 적어도 24시간이다. 발명자들은 miR-208 억제제를 투여하기 적어도 약 24시간 전에 miR-499 억제제를 투여하는 경우 스트레스에 의해 유발된(stress-induced) β-MHC 발현이 적어도 약 50% 감소한다는 것을 miR-208 억제제의 투여 약 3일 후에 관찰하였다. miR-499 억제제가 없는 경우, 스트레스에 의해 유발된 β-MHC 발현에 있어 비교되는 효과는 miR-208 억제제 투여 이후 적어도 약 2달 이후 전까지 관찰되지 않았다.

[0087] 발명의 다른 실시태양에서, miR-208 및 miR-499 억제제들의 하나 이상의 연속적인 투여는 지속된 효과를 제공하기 위해 쓰일 수 있다. 이러한 관점에서, 다양한 조합들이 사용될 수 있다. 실례로서, miR-499의 억제제는 "A"이고, miR-208의 억제제(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b)는 "B"이며, 총 3 및 4 투여들에 기초한 이하의 순열들은 전형적인 예이다:

[0088] 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

[0089] 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

[0090] 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

- [0091] 다른 조합들도 마찬가지로 예측된다.
- [0092] 바람직하게는, 대상에게 miR-208 억제제 및 miR-499 억제제를 투여한 이후 대상의 심장 세포에서 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b) 및 miR-499의 발현 또는 활성은 감소된다. 특정 실시태양에서, miR-208 및 miR-499 억제제의 투여 이후 miR-208a/miR-208b 및/또는 miR-499의 발현 또는 활성은 50%를 초과하여, 60%를 초과하여, 70%를 초과하여, 75%를 초과하여, 80%를 초과하여, 85%를 초과하여, 90%를 초과하여, 또는 95%를 초과하여 감소된다. 일 실시태양에서, 억제제들의 투여 이후 대상의 심장 세포에서 miR-208a/miR-208b 및 miR-499의 발현 또는 활성은 60%를 초과하여 감소된다. 다른 실시태양에서, 억제제들의 투여 이후 대상의 심장 세포에서 miR-208a/miR-208b 및 miR-499의 발현 또는 활성은 80%를 초과하여 감소된다. 또 다른 실시태양에서, 억제제들의 투여 이후 대상의 심장 세포에서 miR-208a/miR-208b 및 miR-499의 발현 또는 활성은 90%를 초과하여 감소된다.
- [0093] 본 발명은 또한 심장 및/또한 골격근 수축성을 조절하는 방법을 포함한다. 성인 골격근 섬유는 전문화된 수축성 및 신진대사 특성에 기초한 속(fast) 및 느린(slow) 트위치 서브타입(twitch subtype)으로 분류될 수 있다. 특성들은 미오글로빈 뿐만 아니라, 미오신 중쇄 및 경쇄, 트로포미오신, 및 트로포닌의 속(fast) 및 느린(slow) 수축성 단백질 이소폼들의 특정한 세트들의 발현을 반영한다(Naya 외. (2000) *J Biol Chem*, Vol. 275(7):4545-4548). 느린-트위치(slow-twitch) 근육들은 주로 자세 유지, 지속된 운동활성과 같은 장기간(chronic) 활동에 사용된다. 속-트위치(fast-twitch) 섬유들은 주로 높은 힘이 폭발하는 활동(high-force burst activities)에 사용된다. 성인 골격근 표현형은 정적이지 않으며, 대신에 하중지지의 변화 및 수축성 사용 패턴에 순응하기 위한 능력을 보유하며, 모폴로지, 표현형, 및 수축 특성에 있어 적응을 초래한다.
- [0094] 여러 속 골격근 수축성 단백질 유전자의 상향-조절(up-regulation)은 miR-208a의 대립유전자(alleles)가 둘 다 모두 부족한 마우스의 심장에서 관찰되었다. miR-208a 낙아웃 마우스의 심장에서 이러한 속 골격근 수축성 단백질 유전자(fast skeletal muscle contractile protein genes)의 상향-조절은 miR-208이 일반적으로 속 골격근 유전자 프로그램을 억제하는 기능을 한다는 것을 알려준다. miR-499 발현의 동반 감소가 miR-208a 돌연변이 마우스에서(실시예 3 참조) 관찰되었으며, miR-499 또한 속 골격근 수축성 단백질 유전자의 발현을 음성적으로 조절할 것이라는 것을 암시한다. 위에서 언급된 바와 같이, miR-208b는 또한 느린 골격근(예를 들어, 가자미근)에서 우세하게 발현된다. 따라서, miR-208b는 인간의 심장 및 골격근 수축성에 대한 충분한 효과를 가지고 있으며, 또한 속 골격근 유전자 프로그램을 조절할 수 있으며, 섬유 정체(fiber identity)를 결정한다. 발명자들은 최근 miR-208b 및 miR-499가 느린 근섬유 유전자 프로그램을 활성화시키고, 속 근섬유 유전자 프로그램(fast myofiber gene programs)을 억제함으로써 근섬유 정체(muscle fiber identity)의 명확화에서 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었다. 이러한 miRNA의 활동은 Sox6, PUR $\beta$ , Sp3 및 HP1 $\beta$ 와 같은 느린 근섬유 유전자의 전사 억제자 집단(collection)에 의해 부분적으로 매개된다. 또한 근섬유 특이적 MCK-프로모터를 이용하면 miR-499 형질전환 동물들(transgenic animals)은 더 느린 근섬유 타입으로의 전환을 나타내었다. 보다 더 주목할만하게는, 마우스가 쳇바퀴(treadmill) 달리기를 하도록 지배받았을 때, miR-499 형질전환 동물들은 야생형의 한배새끼(littermate) 보다 50%를 초과하여 길게 달렸으며, 이는 속 근섬유를 더 느린 섬유 타입으로 재프로그래밍한 결과에 따른 향상된 지구력의 표시이다(van Rooij 외. (2009) *Developmental Cell*, Vol. 17:662-673 참조).
- [0095] 일 실시태양에서, 심장 및/또는 골격근 수축성을 조절하는 방법은 miR-499 및 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b) 발현 또는 활성의 조절인자(modulator)를 심장 및/또는 골격근 세포에 투여함을 포함한다. 다른 실시태양에서, 방법은 miR-499 및 miR-208b의 조절인자를 투여함을 포함한다. 다른 실시태양에서, miR-499 및 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b) 발현 또는 활성의 조절인자를 심장 세포에 투여함을 포함하는 심장 수축성 단백질 유전자 발현을 조절하는 방법이 제공된다. 다른 실시태양에서, miR-499 및 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b) 발현 또는 활성의 조절인자를 골격근 세포에 투여함을 포함하는 골격근 수축성 단백질 유전자 발현을 조절하는 방법이 제공된다. 다른 실시태양에서, miR-499 및 miR-208b 발현 또는 활성의 조절인자를 골격근 세포에 투여함을 포함하는 골격근 세포에서 섬유 타입 변경을 유발하는 방법을 제공한다. 다른 실시태양에서, 골격근 세포에서 섬유 타입 변경을 유발하는 방법은, miR-499 및 miR-208b 발현 또는 활성의 조절인자를 골격근 세포에 투여함을 포함한다. 조절인자는 miR-499, miR-208, 및/또는 miR-208b 발현 또는 활성의 작용물질(agonist) 또는 억제제일 수 있다. 일부 실시태양에서, 세포를 miR-499 및 miR-208a(또는 miR-208b)의 억제제와 접촉시킴으로써 THRAP1, PUR베타, 미오스타틴, Sp3, HP1 $\beta$ , 및 Sox6의 발현이 세포에서 증가한다. 다른 실시

태양에서, 세포를 miR-499 및 miR-208a(또는 miR-208b)의 작용물질(agonist)과 접촉시킴으로써 THRAP1, PUR베타, 미오스타틴, Sp3, HP1 $\beta$ , 및 Sox6의 발현이 세포에서 감소한다.

[0096] 발명의 특정 실시태양에서, 심장 세포에 miR-499 및 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b) 발현 또는 활성의 억제제를 투여함을 포함하는 심장 세포에서  $\beta$ -MHC 발현을 감소시키는 방법이 제공된다. 일 실시태양에서, 골격근 세포에 miR-499 및 miR-208b 발현 또는 활성의 억제제를 투여함을 포함하는 골격근 세포에서  $\beta$ -MHC 발현을 감소시키는 방법이 제공된다. 발명의 다른 실시태양에서, 내인성(endogenous) miR-499 및 miR-208a(또는 miR-208b) 발현 또는 활성을 증가시키거나 또는 외인성(exogenous) miR-499 및 miR-208a(또는 miR-208b)를 심장 세포 및/또는 골격근 세포에 투여함을 포함하는 심장 세포 및/또는 골격근 세포에서  $\beta$ -MHC 발현을 향상시키는 방법이 제공된다.

[0097] 발명의 일 실시태양에서, miR-499 및 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b) 발현 또는 활성의 억제제를 심장 세포에 투여함을 포함하는 심장 세포에서 속 골격근 수축성 단백질 유전자 발현을 증가시키는 방법이 제공된다. 다른 실시태양에서, miR-499 및 miR-208b 발현 또는 활성의 억제제를 골격근 세포에 투여함을 포함하는 골격근 세포에서 속 골격근 수축성 단백질 유전자 발현을 증가시키는 방법이 제공된다. 발명의 다른 실시태양에서, 내인성(endogenous) miR-499 및 miR-208a(또는 miR-208b) 발현 또는 활성을 증가시키거나 또는 외인성(exogenous) miR-499 및 miR-208a(또는 miR-208b)를 심장 세포 및/또는 골격근 세포에 투여함을 포함하는 심장 세포 및/또는 골격근 세포에서 속 골격근 수축성 단백질 유전자 발현을 감소시키는 방법이 제공된다. 본 발명의 방법에 따라 증가되거나 감소될 수 있는 속 골격근 수축성 단백질 유전자의 예는 트로포닌 I2(troponin I2); 트로포닌 T3(troponin T3), 속 골격 미오신 경쇄(fast skeletal myosin light chain), 또는 알파 골격 액틴(alpha skeletal actin)을 포함하나 여기에 한정되지는 않는다.

[0098] 골격근에서, 느린 섬유 유전자의 억제 및 속 섬유 유전자의 활성화는 불활동성 위축(disuse atrophy), 반중력에 대응한 근육소모(muscle wasting in response to anti-gravity), 및 신경제거(denervation)를 포함하나 여기에 한정되지 않는 수많은 근골격계질환(musculoskeletal disorders)과 연관되어 있다. 따라서, 골격근 세포에서 miR-208a 또는 miR-208b와 결합한 miR-499의 발현은 속 섬유 유전자들의 억제에 유용할 수 있으며, 그것에 의해서 느린 섬유 유전자들의 상호(reciprocal) 발현을 활성화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 이를 필요로 하는 대상에서 근골격계질환을 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다. 일 실시태양에서, 방법은 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b)의 작용물질 및 miR-499의 작용물질을 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 투여 이후 대상의 골격근 세포에서 miR-208a/miR-208b 및 miR-499의 발현 또는 활성이 증가한다. 다른 실시태양에서, 방법은 miR-208b의 작용물질 및 miR-499의 작용물질을 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 투여 이후 대상의 골격근 세포에서 miR-208b 및 miR-499의 발현 또는 활성이 증가한다. 바람직하게는, 대상의 골격근 세포에서 하나 또는 그 이상의 속 골격근 유전자의 발현은 miR-499 및 miR-208a(또는 miR-208b) 작용물질들의 투여 이후 감소된다. 하나 또는 그 이상의 속 골격근 유전자는 트로포닌 I2(troponin I2), 트로포닌 T3(troponin T3), 속 골격 미오신 경쇄(fast skeletal myosin light chain), 및 알파 골격 액틴(alpha skeletal actin)을 포함할 수 있으나, 여기에 한정되지는 않는다.

[0099] 다른 실시태양에서, 본 발명은 골격근에 miR-499 및 miR-208(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b)의 작용물질 투여함으로써 감소된 중력 환경에 대응한 근육소모(muscle wasting)를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 다른 실시태양에서, 감소된 중력 환경에 대응한 근육소모(muscle wasting)를 치료 또는 예방하는 방법은 골격근에 miR-499 및 miR-208b의 작용물질을 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 골격근에 miR-499의 작용물질 및 miR-208(예를 들어, miR-208a 및/또는 miR-208b)의 작용물질 투여함으로써 근육 위축(muscle atrophy)을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 다른 실시태양에서, 근육 위축(muscle atrophy)을 치료 또는 예방하는 방법은 골격근에 miR-499의 작용물질 및 miR-208b의 작용물질 투여하는 것을 포함한다.

[0100] 일부 실시태양에서, miR-208(miR-208a 또는 miR-208b)의 작용물질 및 miR-499의 작용물질은 성숙한 miR-208(miR-208a 또는 miR-208b) 및/또는 miR-499서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 일 실시태양에서, 폴리뉴클레오티드는 성숙한 miR-208a 서열(서열번호: 5) 및 성숙한 miR-499 서열(서열번호: 14)을 포함한다. 다른 실시태양에서, 폴리뉴클레오티드는 성숙한 miR-208b 서열(서열번호: 19) 및 성숙한 miR-499 서열(서열번호: 14)을 포함한다. 다른 실시태양에서, miR-499의 작용물질 및 miR-208(miR-208a 또는 miR-208b)의 작용물질은 miR-499 및 miR-208(miR208a 또는 miR-208b)를 위한 pri-miRNA 또는 pre-miRNA 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 선택적으로, miR-208(miR208a 또는 miR-208b)의 작용물질 및 miR-499의 작용물질은 각각 miRNA의 성숙한 서열 또는 pre-miRNA 서열을 포함하는 별개의 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 성숙한 miR-499 및/또는 miR-208(miR208a 또는 miR208b) 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있다.

폴리뉴클레오티드는 잠금 핵산(locked nucleic acids), 펩티드 핵산(peptide nucleic acids), 2'-O-알킬(예를 들어, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸), 2'-플루오로, 및 4' 티오 변형과 같은 당 변형(sugar modification), 및 하나 또는 그 이상의 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 모르폴리노(morpholino), 또는 포스포노카복실레이트 결합(phosphonocarboxylate linkages)과 같은 골격 변형(backbone modifications)과 같은 하나 또는 그 이상의 화학적 변형을 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, miR-499, miR-208, 및/또는 miR-208b 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 콜레스테롤과 결합되어 있다.

[0101] 다른 실시태양에서, miR-499 및 miR-208(miR208a 또는 miR-208b)의 작용물질은 발현벡터 상에 인코딩될 수 있다. miR-499 및 miR-208(miR208a 또는 miR-208b)의 발현을 위한 발현벡터는 miR-499 및/또는 miR-208(miR208a 또는 miR-208b)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터를 포함한다. miR-499를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 primary-miRNA-499 서열(pri-miR-499), 전구체-miRNA-499 서열(pre-miR-499) 또는 성숙한 miR-499 서열을 인코딩할 수 있다. miR-208a/miR-208b를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 primary-miRNA-208a/208b 서열(pri-miR-208/pri-miR-208b), 전구체-miRNA-208/208b 서열(pre-miR-208a/pre-miR-208b) 또는 성숙한 miR-208a/208b 서열을 인코딩할 수 있다. 일부 실시태양에서, 발현벡터는 작동 가능하게 프로모터에 연결된 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 5 및 서열번호: 14의 서열을 포함한다. 다른 실시태양에서, 발현벡터는 작동 가능하게 프로모터에 연결된 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 19 및 서열번호: 14의 서열을 포함한다. 이와 같은 폴리뉴클레오티드들은 약 18 내지 약 200 뉴클레오티드 길이, 약 70 내지 약 200 뉴클레오티드 길이, 약 20 내지 약 50 뉴클레오티드 길이, 또는 약 18 내지 약 25 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 다른 실시태양에서, 발현벡터는 다른 프로모터들로부터 miR-499 작용물질(예를 들어, miR-499 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드) 및 miR-208 작용물질(예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드)을 발현할 수 있다. miR-499, miR-208a, 및/또는 miR-208b를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 인트론을 인코딩하는 핵산 내 또는 mRNA의 비해석부위(untranslated region)를 인코딩하는 핵산 내 또는 비-코딩 RNA(non-coding RNA) 내에 위치할 수 있다. 일 실시태양에서, 발현벡터는 Myh7b 유전자의 20번째 인트론부터의 서열 또는 Myh7( $\beta$ -MHC) 유전자의 31번째 인트론부터의 서열을 포함할 수 있다.

[0102] miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질은 miR-499의 작용물질과 함께 대상에 공동-투여될 수 있다. 상기 두 작용물질들은 단일 제형, 예를 들어, miR-208a 또는 miR-208b 작용물질 및 miR-499 작용물질을 포함하는 약학적 조성물로서 투여될 수 있다. 선택적으로, 두 작용물질들(예를 들어, miR-208a 및 miR-499 또는 miR-208b 및 miR-499)은 두 miRNA의 성숙한 또는 pre-miRNA 서열을 인코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 두 작용물질들의 다수 공동-투여는 지속된 기간 동안, 예를 들어, 1주, 2주, 3주, 1달, 2달, 3달, 4달, 5달, 6달, 9달, 1년, 2년, 3년, 4년, 또는 5년간 주어질 수 있다.

[0103] 특정 실시태양에서, miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질 및 miR-499의 작용물질은 순차적으로 투여된다. 일 실시태양에서, miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질은 miR-499의 작용물질보다 먼저 투여된다. 다른 실시태양에서, miR-499의 작용물질은 miR-208a 또는 miR-208b의 작용물질보다 먼저 투여된다. 작용물질들의 투여를 분리하는 간격은 수분에서 수주의 범위일 수 있으며, 예를 들어, 약 1시간에서 약 72시간, 6시간에서 약 48시간, 또는 약 12시간에서 약 24시간일 수 있다. 바람직한 실시태양에서, miR-208a 또는 miR-208b 작용물질 및 miR-499 작용물질 투여 사이의 간격은 적어도 24시간이다.

[0104] 본 발명은 또한 miR-499, miR-208a, 및/또는 miR-208b의 억제제 또는 작용물질을 포함하는 약학적 조성물을 포함한다. 임상 적용(clinical application)이 고려되는 경우, 약학적 조성물은 의도된 적용에 적절한 형태로 조제될 수 있다. 일반적으로, 이는 본질적으로 인간 또는 동물에게 해로울 수 있는 다른 불순물 뿐만 아니라 발열원(pyrogen)이 없는 조성물의 조제를 수반할 것이다.

[0105] 일 실시태양에서, 약학적 조성물은 miR-499 억제제의 유효량 및/또는 miR-208a 또는 miR-208b 억제제의 유효량을 포함한다. 다른 실시태양에서, 약학적 조성물은 miR-499 작용물질의 유효량 및/또는 miR-208a 또는 miR-208b 작용물질의 유효량을 포함한다. "유효량"은 유의한 또는 요구되는 의학적 결과를 가져오기에 충분한 양이다. 발명의 miRNA 억제제 또는 miRNA 작용물질의 유효량은 약 1 mg/kg에서 약 200 mg/kg, 약 20 mg/kg에서 약 160 mg/kg, 또는 약 40 mg/kg에서 약 100 mg/kg일 수 있다. 일 실시태양에서, miR-208 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 각각 약 20 mg/kg 내지 약 200 mg/kg의 양으로 투여된다. 다른 실시태양에서, miR-208 또는 miR-208b의 억제제 및 miR-499의 억제제는 각각 약 80 mg/kg의 양으로 투여된다. 다른 실시태양에서, miR-208 또는 miR-208b의 작용물질 및 miR-499의 작용물질은 각각 약 20 mg/kg 내지 약 200 mg/kg의 양으로 투여된다. 또 다른 실시태양에서, miR-208 또는 miR-208b의 작용물질 및 miR-499의 작용물질은 각각 약 80 mg/kg의

양으로 투여된다. 유효량으로 여겨지는 양에 대한 정확한 결정은 크기, 나이, 질병의 종류(예를 들어, 심근경색증, 심부전, 심장 비대, 또는 근골격계), 및 억제제 또는 작용물질의 성질(예를 들어, 안타고미어, 발현 컨스트럭트, 안티센스 올리고뉴클레오티드 등)을 포함하는 각 환자 개인의 요인들에 기초를 둘 수 있다. 그러므로, 상기 양은 당업계의 통상적인 기술을 가진자가 본 명세서 및 당업계의 지식을 통해 쉽게 알아낼 수 있다.

[0106] 거대분자 복합체(macromolecule complexes), 나노캡슐(nanocapsules), 마이크로스피어(microspheres), 비드(beads), 및 오일이 물에 분산된 에멀전을 포함하는 지질 기반 시스템(lipid-based systems including oil-in-water emulsions), 마이셀(micelles), 혼합된 마이셀(mixed micelles), 및 리포솜(liposomes)과 같은 콜로이드 분산 시스템(Colloidal dispersion systems)은 miRNA 기능의 올리고뉴클레오티드 억제제, miRNA 작용물질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 특정 miRNA 억제제 또는 작용물질을 발현하는 컨스트럭트를 위한 전달 부형체(delivery vehicles)로 사용될 수 있다. 본 발명의 핵산을 심장 및 골격근 조직으로 전달하기에 적합한 상업적으로 사용 가능한 지방 에멀전(fat emulsions)은 인트라리피드®(Intralipid), 리포신®(Liposyn), 리포신® II(LiposynII), 리포신® III(LiposynIII), 뉴트리리피드(Nutrilipid), 및 다른 유사한 지질 에멀전을 포함한다. *in vivo*에서 전달 부형체로 사용하기 위한 바람직한 콜로이드 시스템은 리포솜이다(이는 인공적인 막소포이다(artificial membrane vesicle)). 이러한 시스템의 준비 및 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 전형적인 제형이 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함되는 US 5,981,505; US 6,217,900; US 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 또한 개시되어 있다.

[0107] 누군가는 일반적으로 전달 부형체를 안정하고, 표적 세포에 의해 흡수되도록 만들기 위하여 적절한 염 및 버퍼를 사용하고자 할 것이다. 본 발명의 수용성 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체(carrier) 또는 수성 매질(aqueous medium)에 용해 또는 분산된 억제제 폴리뉴클레오티드들 또는 miRNA 폴리뉴클레오티드 서열들(예를 들어, 리포솜 또는 다른 복합체 또는 발현벡터)을 포함하는 유효한 양의 전달 부형체를 포함한다. “약학적으로 허용가능한” 또는 “약리학적으로 허용가능한”은 동물 또는 사람에게 투여되었을 때, 해로운, 알레르기의, 또는 다른 뜻밖의(untoward) 반응들을 만들지 않는 분자 독립체들(molecular entities) 및 조성물을 나타낸다. 여기에서 사용된 “약학적으로 허용가능한 담체”는 용매, 버퍼, 용액, 분산매, 코팅, 향균 및 항진균 약품(antibacterial and antifungal agents), 등장성 및 흡수 지연 약품(isotonic and absorption delaying agents) 및 인간에 투여하기 적합한 약과 같은 약의 제제화에 사용이 허용되는 기타 같은 종류의 것을 포함한다. 약학적 활성 물질들을 위한 이와 같은 매질(media) 및 약품(agent)의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 본 발명의 활성 성분과 맞지 않는 어떠한 전통적인 매질 또는 약품을 제외하는 한에 있어서, 치료학적 조성물에 있어서의 이의 용도는 고려된다. 보충적인 활성 성분들 또한 만약 조성물의 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 불활성화 시키지 않는다면 조성물에 혼합될 수 있다.

[0108] 본 발명의 활성 조성물은 전통적인 약학적 제형을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 이러한 조성물의 투여는 표적 조직이 그 경로를 통해 이용 가능한 한 어떠한 일반적인 경로라도 통할 수 있다. 이는 경구(oral), 비강(nasal), 또는 구강(buccal)을 포함한다. 선택적으로, 투여는 내피(intradermal), 피하(subcutaneous), 근육내(intramuscular), 복막내(intraperitoneal) 또는 정맥내(intravenous) 주사, 또는 심장 조직으로의 직접 주사(by direct injection into cardiac tissue)에 의할 수 있다. miRNA 억제제들, miRNA 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 miRNA 서열을 포함하는 발현 컨스트럭트를 포함하는 약학적 조성물은 또한 카테터 시스템(catheter systems) 또는 치료 약품을 심장에 전달하기 위해 관상동맥 순환을 분리하는 시스템에 의해 투여될 수 있다. 치료 약품을 심장 및 관상동맥 맥관구조(coronary vasculature)에 전달하기 위한 다양한 카테터 시스템은 당업계에 알려져 있다. 본 발명의 사용에 적합한 카테터-기반 전달 방법 또는 관상동맥 분리 방법의 일부 비-제한적인 예는 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함되는 미국특허 No. 6,416,510; 미국특허 No. 6,716,196; 미국특허 No. 6,953,466, WO 2005/082440, WO 2006/089340, 미국공개특허 No. 2007/0203445, 미국공개특허 No. 2006/0148742, 및 미국공개특허 No. 2007/0060907에 개시되어 있다. 이와 같은 조성물은 일반적으로 여기에서 설명한 바와 같이, 약학적으로 허용가능한 조성물로서 투여될 수 있다.

[0109] 활성 화합물은 또한 비경구적으로(parenterally) 또는 복강내로(intraperitoneally) 투여될 수 있다. 실례로써, 유리 염기(free base) 또는 약리학적으로 허용가능한 염으로써의 활성 화합물의 용액은 하이드록시프로필셀룰로스(hydroxypropylcellulose)와 같은 계면활성제(surfactant)와 적절하게 혼합되어 물에서 조제될 수 있다. 분산액(dispersions)은 또한 글리세롤, 액상 폴리에틸렌글라이콜, 및 이들의 혼합물 내에서, 및 오일 내에서 조제될 수 있다. 저장 및 사용의 일반적인 조건 하에서, 이러한 제형은 미생물의 성장을 막기 위한 방부제를 일반

적으로 포함한다.

- [0110] 주사 가능한 용도 또는 카테터 전달에 적합한 약학적인 형태는 예를 들어, 살균된 수용액 또는 분산액(sterile aqueous solutions or dispersions) 및 살균된 주사 용액 또는 분산액의 즉석 조제를 위한 살균된 파우더(sterile powders)를 포함한다. 일반적으로, 이러한 제형들은 무균이며, 쉬운 주사성이 존재하는 정도로 유동적이다. 제형은 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야 하며, 박테리아 및 균류와 같은 미생물의 오염 활동에 대비하여 보존되어야 한다. 적절한 용매 또는 분산매는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 및 액상 폴리에틸렌글리콜, 및 기타 같은 종류의 것), 이들의 적절한 혼합물, 및 식물성 기름을 포함할 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산의 경우 필요로 하는 입자 사이즈의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 활동의 방지는 대체로 다양한 항균 및 항진균 약품(antibacterial and antifungal agents), 예를 들어, 파라벤(parabens), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀(phenol), 소르빈산(sorbic acid), 티메로살(thimerosal), 및 기타 같은 종류의 것들에 의해 이루어질 수 있다. 많은 경우에, 등장성 약품(isotonic agents), 예를 들어, 당(sugar) 또는 소듐클로라이드(sodium chloride)를 포함하는 것이 선호된다. 주사 가능한 조성물의 장기 흡수(prolonged absorption)는 대체로 흡수 지연 약품, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트(aluminum monostearate) 및 젤라틴(gelatin)을 조성물에 사용함으로써 일어난다.
- [0111] 살균된 주사 가능한 용액은 적절한 양의 활성 화합물을 요구되는 다른 성분들(예를 들어, 상기에서 열거한 바와 같은)과 함께 용매에 혼합함으로써 조제될 수 있으며, 여과된 살균(filtered sterilization)이 뒤따른다. 일반적으로, 분산액은 다양한 살균된 활성 성분들을 기본적인 분산매 및 요구되는 다른 성분들, 예를 들어, 상기에서 열거한 것과 같은 것을 포함하는 살균된 부형제에 혼합함으로써 조제된다. 살균된 용액의 제조를 위한 살균된 파우더의 경우, 바람직한 제조방법은 상기 살균-여과된 용액(sterile-filtered solution)으로부터 어떠한 추가적으로 요구되는 성분들을 더한 활성 성분(들)의 파우더를 생산하는 진공-건조(vacuum-drying) 및 동결-건조(freeze-drying) 기술을 포함한다.
- [0112] 본 발명의 조성물은 일반적으로 중성 또는 염 형태(neutral or salt form)로 제형화될 수 있다. 약학적으로-허용가능한 염은 예를 들어, 무기산(예를 들어, 하이드로클로릭 또는 포스포릭 산) 또는 유기산(예를 들어, 아세트, 옥살릭, 타르타릭, 만델릭, 및 기타 같은 종류의 것)으로부터 유래한 산부가염(acid addition salts)(단백질의 자유 아미노 그룹들로 형성된다)을 포함한다. 단백질의 자유 카복실 그룹으로 형성된 염들은 무기 염기(예를 들어, 소듐, 포타슘, 암모늄, 칼슘, 또는 철의 수산화물)로부터 또는 유기 염기(예를 들어, 이소프로필아민(isopropylamine), 트리메틸아민(trimethylamine), 히스티딘(histidine), 프로카인(procaine) 및 기타 같은 종류의 것)로부터 유래될 수 있다.
- [0113] 제형(formulation)에서, 용액들은 되도록 투약 제형(dosage formulation)에 적합한 방식 및 치료에 효과적인 양으로 투여된다. 제형은 주사 가능한 용액, 약물 방출 캡슐 및 기타 같은 종류의 것과 같은 다양한 투약 형태로 쉽게 투여될 수 있다. 수용액에서 비경구적 투여를 위해서, 예를 들어, 용액은 일반적으로 적절하게 완충되고(buffered), 액상 희석액은 먼저 예를 들어 충분한 염 또는 글루코스로 등장성을 만든다. 이와 같은 수용액은 예를 들어, 정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular), 피하(subcutaneous) 및 복막내(intraperitoneal) 투여에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 특히 본 발명의 관점에서, 당업계의 통상적인 기술을 가진자에게 이미 알려진 바대로 살균된 수용 매질이 사용된다. 실례로서, 단일 용량은 1ml의 등장성 NaCl 용액에 용해되고, 1000ml의 피하주액 유체(hypodermoclysis fluid)에 첨가되거나 또는 예정된 주입 부위에 주사될 수 있다(예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, 페이지 1035-1038 및 1570-1580 참조). 치료받는 대상의 상태에 따라 용량의 일부 변화는 필연적으로 생기게 된다. 투여에 대해 책임을 지는 사람은 대상 각각에게 적절한 용량을 결정할 것이다. 또한, 인간에게 투여함에 있어서, 제형들은 FDA 생물학 기준에 의해 요구되는 무균성(sterility), 발열원성(pyrogenicity), 일반적인 안전(general safety) 및 순도 기준(purity standards)을 만족해야만 한다. 여기에서 설명된 조성물 중 어떤 것도 키트(kit) 안에 포함될 수 있다. 일 실시태양에서, 키트는 miR-208a 또는 miR-208b 억제제를 포함하는 제 1 약학적 조성물 및 miR-499 억제제를 포함하는 제 2 약학적 조성물을 포함한다. 다른 실시태양에서, 키트는 miR-208a 또는 miR-208b 억제제 및 miR-499 억제제를 포함하는 단일 약학적 조성물을 포함한다. 다른 실시태양에서, 키트는 miR-208a 또는 miR-208b 작용물질을 포함하는 제 1 약학적 조성물 및 miR-499 작용물질을 포함하는 제 2 약학적 조성물을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 키트는 miR-208a 또는 miR-208b 작용물질 및 miR-499 작용물질을 포함하는 단일 약학적 조성물을 포함한다. 일부 실시태양에서, 키트는 또한 miRNA 작용물질 또는 억제제의 세포로의 전달을 용이하게 하기 위해 하나 또는 그 이상의 형질주입 시약(transfection reagent)을 포함할 수 있다.

- [0114] 키트의 구성요소들은 수성 매질에 또는 동결건조 형태(lyophilized form)로 패키지화(packaged)될 수 있다. 키트의 컨테이너 수단은 적어도 하나의 바이알(vial), 테스트 튜브(test tube), 플라스크(flask), 병(bottle), 시린지(syringe) 또는 구성요소가 위치할 수 있는, 바람직하게는 적절하게 등분된(aliquoted) 다른 컨테이너 수단을 일반적으로 포함할 것이다. 키트에 하나 이상의 구성요소가 위치하는 경우, 키트는 또한 일반적으로 제 2, 제 3 또는 추가적인 구성요소가 분리되어 위치할 수 있는(예를 들어, 살균한, 약학적으로 허용가능한 버퍼 및/또는 다른 희석액) 다른 추가적인 컨테이너를 포함한다. 하지만 구성요소의 다양한 조합은 바이알(vial)에 포함될 수 있다. 본 발명의 키트들은 또한 전형적으로 상업적인 판매를 위해 단단히 밀폐된 핵산을 포함하기 위한 수단 및 어떤 다른 시약 컨테이너를 포함할 것이다. 이와 같은 컨테이너들은 주사 또는 원하는 바이알을 보유하고 있는 중공 성형 플라스틱 컨테이너(blow molded plastic containers)를 포함할 수 있다.
- [0115] 키트의 구성요소들이 하나 및/또는 그 이상의 액상 용액에 제공되었을 때, 상기 액상 용액은 수용액, 특히 살균된 수용액이 바람직하다.
- [0116] 하지만, 키트의 구성요소들은 건조된 파우더(들)로 제공될 수 있다. 시약 및/또는 구성요소들이 건조된 파우더로 제공되었을 때, 파우더는 적절한 용매의 추가에 의해 재구성될 수 있다. 용매는 다른 컨테이너 수단에 의해 제공되는 것을 생각할 수 있다.
- [0117] 이와 같은 키트는 또한 miRNA 작용물질 또는 miRNA 억제제를 보존 또는 유지하는 또는 그들의 분해를 막는 구성요소를 포함할 수 있다. 이와 같은 구성요소들은 DNase-프리(DNase-free), RNase-프리(RNase-free) 또는 뉴클레아제를 막는(예를 들어, RNase들 및 DNase들) 것일 수 있다. 이와 같은 키트는 일반적으로 각각의 개별 시약 또는 용액을 위한 구별되는 컨테이너를 적절한 수단으로써 포함할 것이다.
- [0118] 키트는 또한 키트 구성요소를 사용하기 위한 것 뿐만 아니라 키트에 포함되지 않은 어떤 다른 시약의 용도를 위한 설명서를 포함할 것이다. 설명서는 구현될 수 있는 변형을 포함할 수 있다. 키트는 또한 비경구 또는 카테터 투여와 같은 다양한 투여 루트를 통해 miRNA 작용물질 또는 억제제를 투여하기 위한 기구 또는 장치를 포함할 수 있다.
- [0119] 이와 같은 시약들은 본 발명 키트의 실시태양으로 고려된다. 하지만, 이와 같은 키트는 상에서 정의된 특정 품목 제한되지 않으며, miRNA의 조작 또는 특성 해석에 사용되는 어떠한 시약이라도 포함할 수 있다.
- [0120] 다음 실시예들은 단지 본 발명의 다양한 양면을 설명하기 위해 포함된다. 실시예 및 도에서의 miR208에 대한 참조는 마우스의 miR208a를 나타낸다. 하지만, 본 발명의 관점에서, 당업자는 본 발명을 어떠한 인간 또는 다른 동물에게 동일하게 적용 가능할 것으로 이해할 것이며, miR208a 및/또는 miR208b 둘 중 하나를 조절하는 것을 포함할 것이다.
- [0121] 실시예
- [0122] 실시예 1. 과도한 압박(pressure overload)에 대해 MiR-208 낙아웃 마우스는 감소된 심장 비대 및 섬유증을 나타낸다
- [0123]  $\alpha$ -MHC 유전자의 인트론 내에 인코딩된 것이 miR-208이다.  $\alpha$ -MHC와 같이, miR-208은 특별히 심장에서 발현되며, 폐에서 흔적 발현(trace expression)된다. miR-208은 독립된 전사물로 전사되기보다는  $\alpha$ -MHC pre-mRNA 외부에서 과정을 거친다. 하지만, 흥미롭게도, miR-208은 최소 14일의 현저하게 긴 반감기를 보이며, 따라서  $\alpha$ -MHC mRNA 발현이 하향-조절된 경우에도 기능을 발휘할 수 있다.
- [0124] MiR-208 낙아웃 마우스는 SacII 및 NotI을 가지는 miR-208 코딩 영역의 업스트림으로 연장된 0.4 kb 단편(5'팔(arm))을 절단하고, 단편을 loxP 위치 및 Frt-측면에 접한 네오마이신 카세트(Frt-flanked neomycin cassette)의 pGKneoF2L2dta 표적화 플라스미드 업스트림에 결찰(ligating)시킴으로써, miR-208 표적화 벡터를 형성시킴으로써 만들어졌다. 3.3 kb 단편(3'팔(arm))이 SalI 및 HindIII에 의해 절단되고, 네오마이신 저항(neomycin resistance) 및 Dta 네거티브 선택 카세트(Dta negative selection cassettes) 사이의 벡터에 결찰되었다. 분열된 대립유전자(disrupted allele)를 운반하는 표적화된 ES-세포들이 5' 및 3' 프로브를 사용하여 써던 블롯 분석에 의해 확인되었다. 세 개의 miR-208 표적화된 ES 클론들이 확인되었으며, 배반포 주입(blastocyst injection)을 위해 사용되었다. 결과의 키메라 마우스는 돌연변이 대립유전자의 생식세포 전달(germline transmission)을 획득하기 위해 C57BL/6로 길러졌다.
- [0125] 비록 마우스에서 miR-208의 유전적 결실이 명백한 표현형을 유도하는데 실패했다 하더라도, 2개월된 야생형 및

miR-208-/- 동물로부터 얻은 심장에 대한 마이크로어레이 분석(microarray analysis)을 통해, miR-208의 제거는 일반적으로 심장에서 발현되지 않는 다수의 속 골격근 수축성 단백질 유전자의 뚜렷한 발현을 초래한다는 것을 밝혀내었다. 따라서, 이러한 결과들은 일반적인 상태 하에서, miR-208은 심장에서 골격근 유전자의 발현을 억제함으로써 심근세포 정체(cardiomyocyte identity)를 유지하기 위해 유일한(sole) 심장-특이적 MHC 유전자와 공동-발현된다는 것을 제안한다.

[0126] miR-208의 가장 주목할 만한 기능이 miR-208 무효 마우스(miR-208 null mice)의 심장 스트레스에 대한 이상 반응에 의해 밝혀졌다(van Rooij 외, (2007) Science, Vol. 316: 575-579). 심장의 병적 리모델링을 유발하는 흉대동맥결찰(TAB)에 따른 과도한 압박에 대한 응답으로, miR-208 녹아웃 마우스로부터 나온 심장의 조직학적 단면은 야생형 마우스(도 1A)의 단면과 비교했을 때 심근세포의 비대 또는 섬유증을 사실상 보이지 않았다. 게다가, miR-208 녹아웃 동물들은 과도한 압박에 응하여  $\beta$ -MHC 발현을 상향-조절할 수 없었다(도 1B 및 C). 대조적으로, ANF 및 BNP를 인코딩하는 것들과 같은 다른 스트레스 반응 유전자들은 miR-208 돌연변이 동물에서 강하게 유도되었으며(도 1B), miR-208이 심장 스트레스 반응의 다른 측면으로 분리될 수 있는  $\beta$ -MHC 발현 조절에 특별히 역할한다는 것을 증명한다.

[0127] 실시예 2. 스트레스에 대해 miR-208의 낙다운은 miR-208 녹아웃 동물들의 표현형을 모사한다

[0128] 심장 스트레스 반응에 대해 miR-208 없는 경우 효과의 특이성을 조사하기 위하여, 동물들에게 매일 성숙한 miR-208 서열에 상보적인 서열을 가지는 안타고미어(안티 208; 서열번호: 16) 또는 미스매치 서열(mm;서열번호: 17)이 정맥 내로 주사되었다. 모든 뉴클레오타이드들은 2'-OMe 변형되었으며, 5' 말단(terminal)의 두 개의 베이스 및 3' 말단의 네 개의 베이스는 포스포로티오에이트를 뉴클레오타이드들 사이에 포함한다. 콜레스테롤은 하이드록시프롤리놀 링커(도 2A)을 통해 여객 가닥(passenger strand)의 3' 말단(end)에 부착된다. miR-208 안타고미어가 주사된 동물 심장의 치료 두 달 이후 실시간 PCR 분석은 miR-208의 효과적인 낙다운을 보여준다(도 2B).

[0129] 심장 스트레스 반응에 대한 miR-208 *in vivo* 하향조절의 효과를 테스트하기 위해, 안티-miR-208 안타고미어 또는 미스매치 컨트롤을 받은 동물들에게 과도한 압박을 유도하기 위해 삼 과정(sham procedure) 또는 흉대동맥결찰 과정을 받게 하였다. 미스매치 컨트롤로 처리된 동물들은 다른 스트레스 유전자들(ANF 및 BNP) 뿐만 아니라  $\beta$ -MHC의 상향조절과 같은 전형적인 스트레스 반응을 나타내었다. 대조적으로, 안티-miR-208 안타고미어로 처리된 동물들은 스트레스 자극에 대해  $\beta$ -MHC의 상향조절을 보이는데 실패하였다. 하지만, 다른 스트레스 유전자(ANF 및 BNP) 발현의 증가는 관찰되었다(도 2C). 안티-miR-208 안타고미어로 처리된 동물들의 스트레스 반응은 miR-208이 스트레스에 의한  $\beta$ -MHC 발현 조절에 핵심적인 역할을 한다고 제안하는 miR-208 녹아웃 동물들의 결과와 놀랍게도 유사하였다.

[0130] 실시예 3. MiR-208은 miR-499의 발현에 필요하다

[0131] 심장에서의 miR-208 활동 메커니즘을 더 조사하기 위하여, 발명자들은 마이크로어레이 분석을 통해 야생형 및 miR-208 녹아웃 마우스로부터 얻은 심장에서 miRNA 발현 패턴을 정의하였다. miR-208 녹아웃 심장에서 상향-조절 및 하향-조절되는 여러 miRNA 중에서, 본 발명자들은 miR-499가 일반적인 심장에서 매우 풍부하지만, miR-208 녹아웃 동물들에서 백그라운드 수준(background level) 이상으로 발현되지 않는다는 것을 발견하였다. 이러한 발견들은 노던 블롯에 의해 확인되었다(도 3). miR-499 유전자의 게놈 위치의 분석은 상기 유전자가  $\alpha$ -MHC 유전자의 상동 기관인 Myh7b 유전자의 20번째 인트론 안에 포함되어 있음을 보여주었다. MiR-208은 Myh7b 및 이에 의해 전사 수준의 miR-499 발현을 조절하는 것으로 보이며, 이는 miR-208이 없을 때 호스트 유전자의 mRNA는 용량-의존적(dose-dependently)으로 파괴된다는 것을 Myh7b의 RT-PCR이 보여주기 때문이다(도 3).

[0132] Myh7b 유전자는 척추동물(vertebrate)에 보존되고, 심장 및 느린 골격근(예를 들면, 가자미근)에서 단독으로 발현된다(도 4A). 유사하게, 실시간 PCR 분석을 통해 확인된 바와 같이 miR-499는 miR-499의 호스트 유전자와 같은 발현 패턴을 가지고 있다(도 4A 및 B). Myh7b 유전자의 3' 말단에 대해 유도된 탐침을 사용한 *In situ* 혼성화는 미오신(및 miR-499)이 E10.5처럼 빨리 심장에서 발현된다는 것을 알려준다(도 4C). 후기 배발생(embryogenesis) 동안, Myh7b/miR-499는 또한 체절(somite)에서 발현된다. 이러한 자료들은 miR-499와 관련된 것을 생기게 하는 추가적인 미오신인 Myh7b를 유도하는데 miR-208이 필요하다는 것을 알려준다. 또한, miR-499는 심장 비대 동안 하향-조절된다.

[0133] 병적 심장 비대 및 근육 수축성의 조절에 있어, miR-499의 역할을 더 조사하기 위해, miR-499 녹아웃 동물들이

만들어졌다. miR-499의 유전적 결손은 miR-499의 호스트 유전자인 Myh7b의 발현에 효과를 나타내지 못하였다(도 5A).  $\alpha$ - 및  $\beta$ -MHC 모두를 위한 miR-499 돌연변이 및 야생형 동물들로부터 얻은 심장의 웨스턴 블롯 분석은 miR-499의 결손은 단백질 수준에서 어느 쪽의 유전자의 발현에도 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다(도 5B). miR-499가  $\beta$ -MHC 조절에 있어 영향을 가지는지 조사하기 위해, 야생형 및 miR-499 낙아웃 동물들이, 갑상선 기능 저하증(hypothyroidism)을 유도하고,  $\beta$ -MHC를 상향조절하는 프로필티오우라실(PTU)을 받았다. 야생형 및 miR-499 낙아웃 동물들은 둘 다 PTU에 의한  $\alpha$ -MHC의 감소 및  $\beta$ -MHC의 증가를 나타내었다(도 5C). 놀랍게도, miR-208과는 달리, miR-499는  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -MHC 둘 중 하나의 발현 조절에 필요하지 않았다.

[0134] 실시예 4. miR-208 및 miR-499의 이중 표적화

[0135] miR-208 이형접합체 및 miR-208 낙아웃 동물들에서 miR-499 발현의 용량-의존적인 감소에서 나타난 바와 같이 miR-208은 miR-499의 발현을 조절한다(도 3 및 실시예 3). miR-208 및 miR-499 사이의 상호관계를 보다 명료하게 하기 위해, 야생형 동물들에게 염분(saline) 또는 성숙한 miR-208 서열(안티-miR-208;서열번호: 16)에 상보적인 서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 안타고미어) 4개의 용량(20 mg/kg, 40 mg/kg, 80 mg/kg, 및 160 mg/kg) 중 하나가 정맥 내로 주사되었다. 꼬리 정맥 주사 3일 후 심장 조직의 노던 분석은 성숙한 miR-208의 발현의 경우 용량-의존적으로 감소하는 반면 pre-miR-208의 발현은 그대로인 것을 밝혀내었다(도 6A). 하지만, 유전적 결손 모델과는 달리, miR-499의 발현은 변화 없이 유지되었다. 게다가, 안티-miR-208 안타고미어 주사 3일 이후  $\beta$ -MHC의 발현 수준 또한 영향을 받지 않았다(데이터는 도시되지 않음).

[0136] 두 번째 종류의 실험들에서, 야생형 동물들에게 단일 용량의 안티-miR-208(80 mg/kg), 연속적인 이틀 동안 2회 순차적인 용량(80 mg/kg)의 안티-miR-208, 또는 연속적인 이틀 동안 2회 순차적인 용량(80 mg/kg)의 미스매치 컨트롤 올리고뉴클레오티드(서열번호: 17)가 정맥 내로 주사되었다. 치료 두달 이후 심장 조직의 노던 분석은 안티-miR-208로 처리된 동물에서 miR-208 및 miR-499 두 경우 모두의 발현이 감소되었음을 보여준다(도 6B). 실시간 PCR 분석은 이러한 결과를 확인하였다(도 6C). 게다가,  $\beta$ -MHC의 인트론 내에서 인코딩되며  $\beta$ -MHC와 공동-발현되는 miR-208b의 발현 감소 또한 관찰되었다. 대응하는 호스트 미오신 유전자를 위한 실시간 PCR 분석은 miR-208의 낙다운은  $\alpha$ -MHC의 발현에 영향을 미치지 않지만  $\beta$ -MHC 및 Myh7b 발현의 감소를 유도한다는 것을 밝혀냈다(도 6C).  $\beta$ -MHC 단백질의 감소 또한 안티-miR-208 치료 두 달 이후 관찰되었다(도 6D). 이러한 결과들은 miR-499 및  $\beta$ -MHC 발현의 miR-208 조절은 지연 이후 일어나며, 이는 miR-208이 miR-499의 업스트림이며, 차례대로 miR-499는  $\beta$ -MHC의 업스트림이라는 것을 나타낸다. 따라서,  $\beta$ -MHC 발현의 촉진된 감소를 얻기 위해서는 miR-208 및 miR-499 모두 하향조절될 필요가 있다. miR-208 단독의 하향조절은 miR-499의 결과적인 감소로 나타나고, 이는 차례대로  $\beta$ -MHC 발현의 감소를 유도한다.  $\beta$ -MHC 발현에 보다 즉각적인 효과를 얻기 위해서, miR-499 및 miR-208 모두가 하향조절을 위한 표적이 될 수 있다.

[0137] miR-208 및 miR-499 모두를 하향조절하는 경우의 조합된 효과를 조사하기 위하여,  $\beta$ -MHC 발현의 유도체인 프로필티오우라실(PTU)을 받기 전에 miR-499 낙아웃 동물들에게 안티-miR-208 올리고뉴클레오티드들이 투여되었다. 이전 결과와 유사하게, 안티-miR-208 올리고뉴클레오티드로 처리하지 않은 상태에서 야생형 및 miR-499 낙아웃 동물들 모두에서 PTU는  $\alpha$ -MHC 발현의 감소 및  $\beta$ -MHC/miR-208b 발현(miR-208b는  $\beta$ -MHC와 공동-발현되었다)의 증가를 유도하였다(도 7A, B). 이와 같은 효과들은 심장 스트레스 반응의 특징이다. 대조적으로, 치료 2주 후 안티-miR-208 올리고뉴클레오티드로 처리된 miR-499 낙아웃 동물들로부터 얻은 심장 조직의 노던 및 실시간 PCR 분석은 PTU에 의한  $\beta$ -MHC/miR-208b 발현의 증가는 관찰되지 않는 것을 보여준다(도 7A, B). 안티-miR-208로 처리된 miR-499 낙아웃 동물들의 반응은 miR-208 낙아웃 동물들의 반응과 유사하다(도 7B). 이러한 결과들은 효과적이며 빠른  $\beta$ -MHC의 하향 조절은 miR-208 및 miR-499 두 가지 모두를 표적화함으로써 달성될 수 있다는 것을 제안한다. 동물에게 투여된 안티-miR-208 올리고뉴클레오티드의 투약은 miR-208 발현의 60% 감소를 나타내었다. miR-499가 없는 경우 이러한 퍼센트 감소는 PTU에 의한  $\beta$ -MHC의 유도를 억제하기에 충분하였다(도 7B). 이러한 발견들은 miR-499 및 miR-208 모두의 감소는 병적 심장 비대 및 심부전과 같은 심장 질환에 대한 효과적인 치료 전략이라는 것을 알려준다.

[0138] 실시예 5. miR-208 및 miR-499의 낙다운은 심장 스트레스 반응을 억제한다

[0139] 심장 질환 치료를 위한 miR-208 및 miR-499 표적화의 치료적 가치를 더 평가하기 위해, 성숙한 miR-208a 서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 올리고뉴클레오티드(안티-208), 성숙한 miR-499 서열에 상보적인 서열을 가지는

는 안티센스 올리고뉴클레오티드(안티-499), 또는 안티-208 및 안티-499 올리고뉴클레오티드 서열 두 가지 모두가 마우스의 정맥 내로 주입되었다. 안티-208 및 안티-499 둘 다 포스포로티오에이트 인터뉴클레오시드 결합(phosphorothioate internucleoside linkages)에 의해 연결된 잠금 핵산(LNA) 및 디옥시리보핵산(DNA)의 조합을 포함하고 있다. miR-208 및 miR-499의 낙다운을 평가하기 위해, 치료 이후 안티센스 올리고뉴클레오티드로 3주에서 2달까지 주사된 동물 심장의 실시간 PCR 분석이 사용되었다.

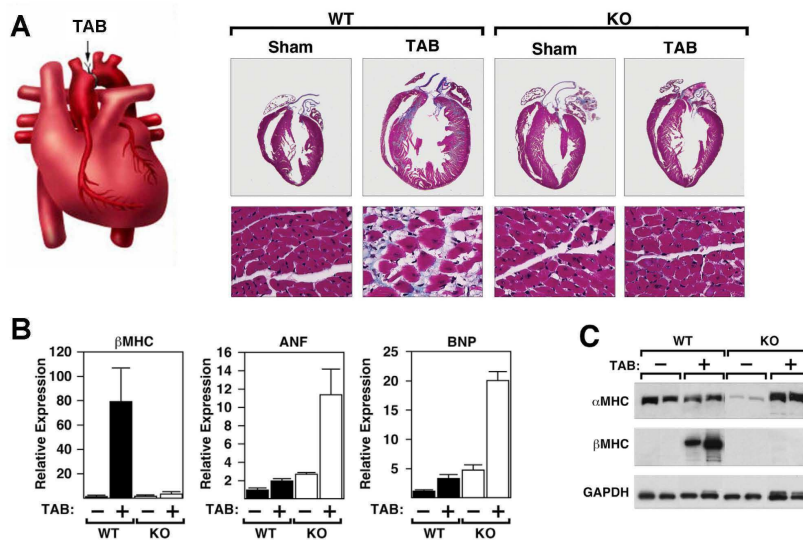
[0140] 심장 스트레스 반응에 대해 miR-208 및 miR-499 하향조절의 *in vivo* 효과를 테스트하기 위해, 안티-208, 안티-499, 또는 안티-208 및 안티-499 올리고뉴클레오티드를 모두 받은 동물들에게 과도한 압박을 유도하기 위해 삼과정 또는 흉대동맥결찰 과정을 수행하였다. 처리되지 않은 동물들은 다른 스트레스 유전자들(ANF 및 BNP) 뿐만 아니라  $\beta$ -MHC의 상향조절과 같은 전형적인 스트레스 반응을 나타내는 것이 기대되어졌다. 대조적으로, 안티-208 및 안티-499 모두로 처리된 동물들은 안티센스 올리고뉴클레오티드 중 하나만 단독으로 받은 동물들보다 더 뚜렷한 스트레스 자극에 의한  $\beta$ -MHC의 감소된 상향조절 나타내는 것이 기대되어졌다.

[0141] 여기에서 토론되고 인용된 모든 간행물, 특히 및 특허공개공보들은 모두가 그 전체로서 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 발명에 개시된 특별한 방법론, 프로토콜 및 물질은 변할 수 있기 때문에 기재된 것에 한정되지 않는 것으로 이해된다. 또한 여기에서 사용된 용어는 단지 특정한 실시태양을 설명하기 위한 목적으로 이해되며, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니며, 상기 발명의 범위는 오직 첨부되는 청구항에 의해서만 제한될 것이다.

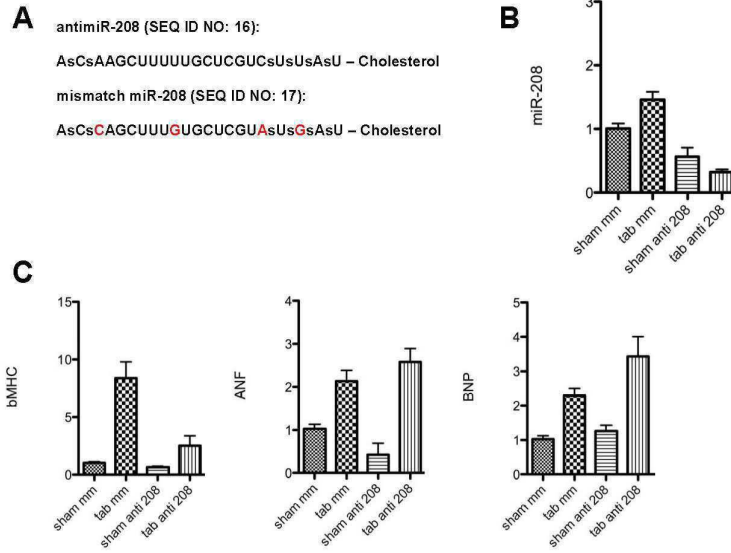
[0142] 당업자는 여기에서 기술된 통상적인 실험, 본 발명의 특정 실시태양에 대한 여러 등가물을 사용하여 인식 또는 확인할 수 있을 것이다. 이와 같은 등가물들은 다음 청구항들에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

도면

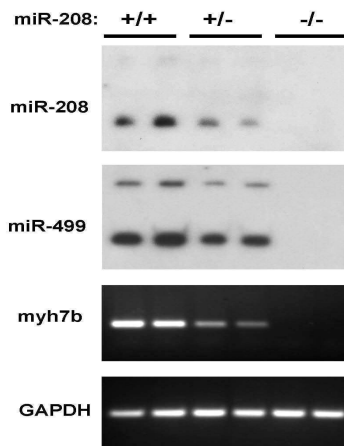
도면1



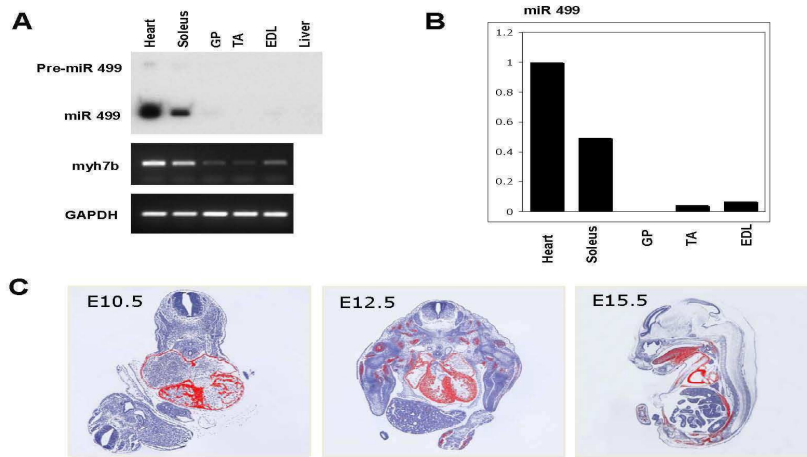
도면2



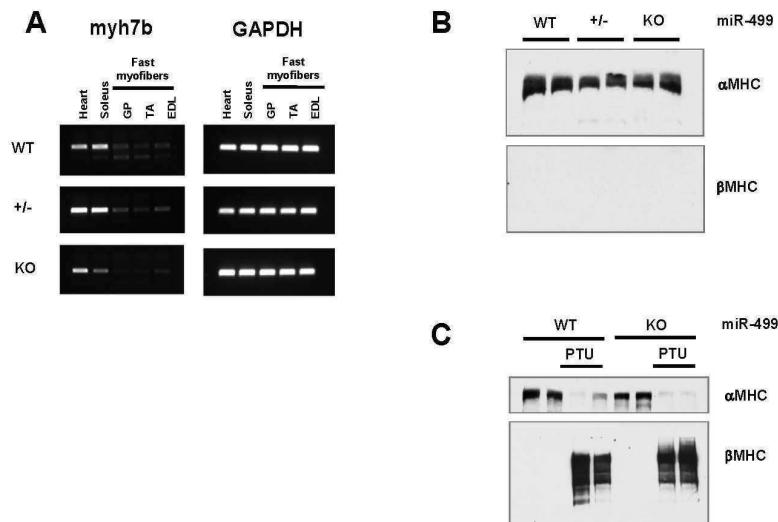
도면3



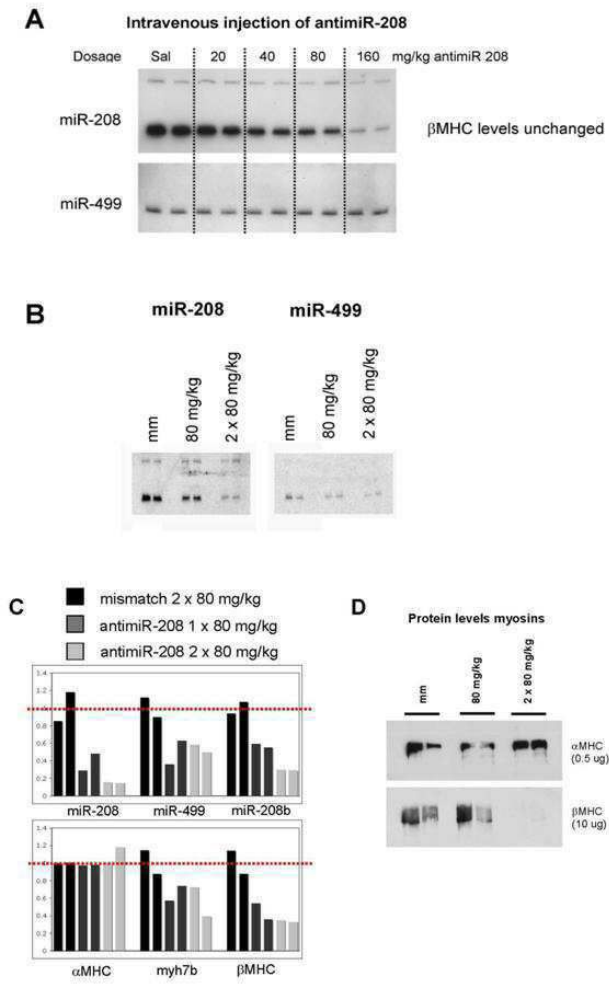
도면4



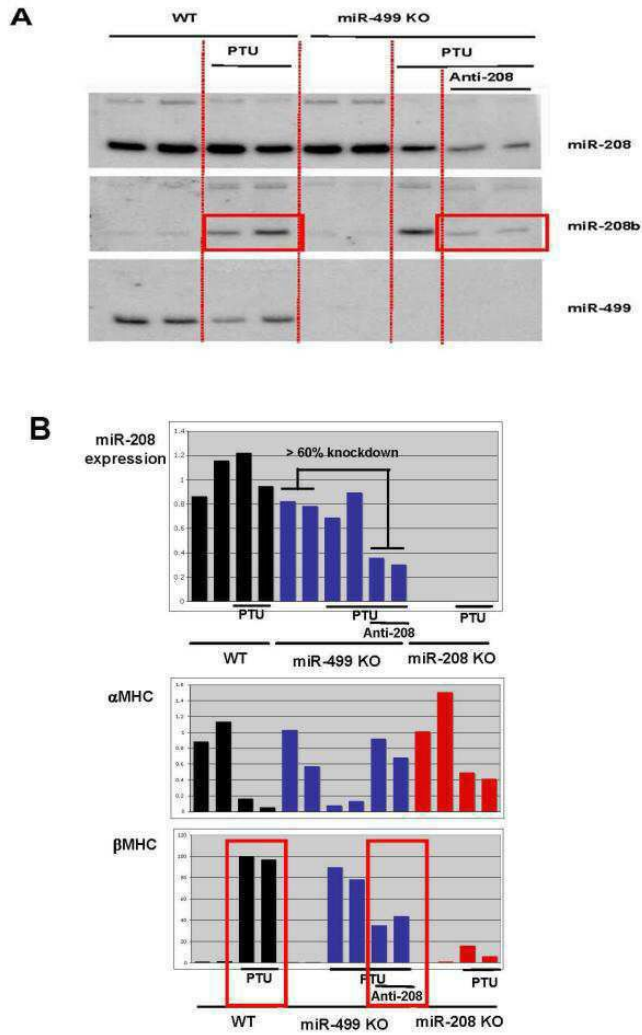
도면5



도면6



도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Board of Regents, The University of Texas System

Olson, Eric

Von Rooij, Eva

<120> DUAL TARGETING OF MIR-208 AND MIR-499 IN THE TREATMENT OF CARDIAC DISORDERS

<130> MIRG-013/01WO

<150> US 61/149,915

<151> 2009-02-04

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 71  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 acgggcgagc ttttgcccg ggttatacct gatgctcacg tataagacga gcaaaaagct 60  
 tgttggtcag a 71  
  
 <210> 2  
 <211> 71  
 <212> DNA  
 <213> Mus sp.  
 <400> 2  
 acgggtgagc ttttgcccg ggttatacct gactctcacg tataagacga gcaaaaagct 60  
 tgttggtcag a 71  
  
 <210> 3  
 <211> 71  
 <212> DNA  
 <213> Rattus sp.  
 <400> 3  
 acgggtgagc ttttgcccg ggttatacct gactctcacg tataagacga gcaaaaagct 60  
 tgttggtcag a 71  
  
 <210> 4  
 <211> 71  
 <212> DNA  
 <213> Canis sp.  
 <400> 4  
 acgcatgagc ttttgctcg ggttatacct gatgctcacg tataagacga gcaaaaagct 60  
  
 tgttggtcag a 71  
  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Unknown  
 <220><223> mature miR-208  
 <400> 5

auaagacgag caaaaagcuu gu 22  
 <210> 6  
 <211> 76  
 <212> DNA  
 <213> Mus sp.  
 <400> 6  
 tcctgtgtc ttgggtgggc agctgttaag acttgcagtg atgttagct cctctgcatg 60  
 tgaacatcac agcaag 76  
 <210> 7  
 <211> 74  
 <212> DNA  
 <213> Rattus sp.  
 <400> 7  
 tcctgtctt ggggtggcag ctgttaagac ttgcagtgat gtttagctcc tctccatgtg 60  
 aacatcacag caag 74  
 <210> 8  
 <211> 76  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 ccctgtgcc ttggcgggc ggctgttaag acttgcagtg atgttact cctctccacg 60  
 tgaacatcac agcaag 76  
 <210> 9  
 <211> 76  
 <212> DNA  
 <213> Canis sp.  
 <400> 9  
 cccttgacc ctggcgggc ggccgttaag acttgcagtg atgttact cctctccacg 60  
 tgaacatcac agcaag 76  
 <210> 10  
 <211> 76  
 <212> DNA  
 <213> Didelphis sp.

<400> 10  
cccctgcctc cccggcgggc agctgttaag acttgcaagt atgtttaatt cttctctatg 60  
tgaacatcac aacaag 76

<210> 11  
<211> 62  
<212> DNA  
<213> Gallus sp.

<400> 11  
ggagcggcag ttaagacttg tagtgatgt tagataatgt attacatgga catcacttta 60  
ag 62

<210> 12  
<211> 68  
<212> DNA  
<213> Xenopus tropicalis

<400> 12  
gtcttagcga ggcagttaag acttgcaagt atgtttagtt aaaatctttt catgaacatc 60  
actttaag 68

<210> 13  
<211> 79  
<212> RNA  
<213> Mus sp.

<400> 13  
gggugggcag cuguuaagac uugcagugau guuuagcucc ucugcaugug aacaucacag 60  
caagucugug cugcugccu 79

<210> 14  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Unknown

<220><223  
> mature miR-499

<400> 14  
uuuagacuug cagugauguu u 21

<210> 15  
<211> 22

<212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miR-208 antagomir  
 <400> 15  
 acaagcuuuu ugcucgucuu au 22  
 <210> 16  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> antimiR-208 oligonucleotide  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (1)..(22)  
 <223> May be 2'-OMe modified oligonucleosides  
 <220><221> misc\_feature  
  
 <222> (1)..(2)  
 <223> May contain phosphorothioate internucleoside linkages  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (19)..(22)  
 <223> May contain phosphorothioate internucleoside linkages  
 <400> 16  
 acaagcuuuu ugcucgucuu au 22  
 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> mismatch miR-208 oligonucleotide  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (1)..(22)  
 <223> May be 2'-OMe modified oligonucleosides  
 <220><221> misc\_feature  
  
 <222> (1)..(2)  
 <223> May contain phosphorothioate internucleoside linkages  
 <220><221> misc\_feature

<222> (19)..(22)

<223> May contain phosphorothioate internucleoside linkages

<400> 17

accagcuuug ugcucguaug au 22

<210> 18

<211> 43

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> pre-miR-208b

<400> 18

tttctgatcc gaatataaga cgaacaaaag gtttgtctga ggg 43

<210> 19

<211> 22

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223>

> mature miR-208b

<400> 19

auaagacgaa caaaagguu gu 22