



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월26일

(11) 등록번호 10-1485071

(24) 등록일자 2015년01월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7017004

(22) 출원일자(국제) 2006년12월12일  
심사청구일자 2011년12월06일

(85) 번역문제출일자 2008년07월11일

(65) 공개번호 10-2008-0080177

(43) 공개일자 2008년09월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/047255

(87) 국제공개번호 WO 2007/070483

국제공개일자 2007년06월21일

(30) 우선권주장

60/749,544 2005년12월12일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20050059005 A1

KR1020050115231 A

US20050124566 A1

WO2004076622 A2

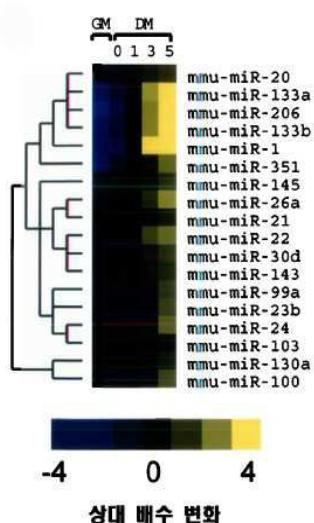
전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 마이크로 RNA를 이용한 근육 세포 증식 및 분화 조절방법과 근육 세포 치료방법 및 유전자 발현 억제방법그리고 마이크로 RNA 분자의 발현용 벡터와 이를 이용한 키트 및 미오사이트

**(57) 요 약**

본원에 개시되는 주제는 미오사이트에서의 유전자 발현을 조절하는 방법 및 조성물을 제시한다. 본원에 개시된 주제의 조성물을 포함하는 세포 역시 제시된다.

**대 표 도** - 도1a

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

피험 대상의 근육 손상을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 약제학적 조성물은 유효량의:

(a) 마이크로 RNA(miR)-133, 그리고 miR-1의 억제제; 또는

(b) miR-1, 그리고 miR-133의 억제제를 포함하고,

상기 miR-1의 억제제는 서열번호 1의 서열과 상보적인 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이고,

상기 miR-133의 억제제는 서열번호 2의 서열과 상보적인 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드인 약제학적 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

근육 손상을 기계적 근육 외상, 근육 퇴행성 질환, 심장 손상 또는 이들의 조합에서 기인하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 근육 퇴행성 질환은 근 위축증, 동작 뉴런 질병, 염증성 근병증, 신경근 접합부 질병, 내분비성 근병증 또는 대사성 근육 질병인 약제학적 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 근 위축증은 뒤센형 근위축증인 약제학적 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 피험 대상은 포유동물인 약제학적 조성물.

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 miR-133은 서열번호 2의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드인 약제학적 조성물.

### 청구항 8

삭제

### 청구항 9

삭제

### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 miR-1은 서열번호 1의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드인 약제학적 조성물.

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 2'-0-메틸 폴리뉴클레오티드인 약제학적 조성물.

**청구항 15**

제14항에 있어서,

상기 miR-1의 억제제는 2'-0-메틸-miR-1(서열번호 62)인 약제학적 조성물.

**청구항 16**

제14항에 있어서,

상기 miR-133의 억제제는 2'-0-메틸-miR-133(서열번호 63)인 약제학적 조성물.

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

제1항에 있어서,

상기 miR-133 또는 상기 miR-1은 벡터에 의해 암호화되는 약제학적 조성물.

**청구항 20**

제19항에 있어서,

상기 벡터는:

- (a) 상기 miR-133 또는 상기 miR-1을 암호화하는 핵산 분자에 작용적으로 연결된 프로모터; 및
- (b) 전사 종결 서열을 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 21**

제20항에 있어서,

상기 벡터는 바이러스 벡터인 약제학적 조성물.

**청구항 22**

제21항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터인 약제학적 조성물.

**청구항 23**

제21항에 있어서,

상기 바이러스 백터는 아데노바이러스 백터인 약제학적 조성물.

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

## 명세서

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 관한 상호 참조

[0002] 본원에 개시되는 주제는 2005년 12월 12일에 출원된 미국 특허출원 제60/749,544호의 우선권을 주장하며, 상기 출원의 개시 내용은 본원에 그 전문을 참고로 인용한다.

[0003] 인가에 관한 언급

[0004] 이 일은 국립보건원의 인가번호 R01-HL075251호에 의해 지원을 받았다. 따라서, 미국 정부는 본원에 개시되는 주제에 특정의 권리를 가진다.

[0005] 본원에 개시되는 주제는 일반적으로 미오사이트 (myocyte)에서 유전자 발현을 조절하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본원에 개시되는 주제는 미오사이트에서의 유전자의 발현 레벨을 조절하기 위해 마이크로 RNA (miRNA)를 사용하는 방법 및 miRNA를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0006] 세포 증식 및 분화를 조절하는 분자적 메카니즘에 관한 이해가 발생 생물학의 중심 주제이다. 마이크로 RNA (miRNA)는 유전자 발현을 전사후에 조절하는 22개에 이르는 뉴클레오티드로 이루어진 조절 RNA로서 최근에 발견된 종류이다<sup>1, 2</sup>. 다양한 생물학적 과정에서의 miRNA의 유력한 역할에 대해 증거들이 지적되어 왔다<sup>3-8</sup>.

[0007] 그러나, 생물학적 과정에서 miRNA의 역할(들)의 특성화에 대해서는 당해 분야에서 장기간 공감 속에 지속되어 온 필요성으로 존재하고 있다. 본원에 개시되는 주제는 이 문제와 당해 분야에서의 다른 필요에 대해 다룬다.

### 발명의 상세한 설명

[0008] **발명의 개요**

본 개요는 본원에 개시되는 주제의 몇 가지 구현예를 열거하며, 다수의 경우에는 상기 구현예의 변형예와 치환 예를 열거한다. 본 개요는 오로지 다수의 다양한 구현예를 예시하는 것에 불과하다. 제시된 구현예의 하나 이상의 대표적인 특징에 관한 언급 역시 예시일 뿐이다. 그러한 구현예는 통상 언급된 특징(들)과 함께 또는 특징 없이 존재할 수 있으며; 마찬가지로, 상기 특징들은 본 개요에 열거되었는지 여부와 상관없이 본원에 개시되는 주제의 다른 구현예에 적용될 수 있다. 과도한 반복을 피하기 위해, 본 개요는 그러한 특징들의 모든 가능한 조합을 열거하거나 시사하지는 않는다.

본원에 개시되는 주제의 일 구현예로, 피험 대상의 근육 손상을 치료하는 방법이 제시된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 피험 대상의 근육 손상 부위에 유효량의 miRNA 또는 miRNA를 암호화하는 백터 또는 miRNA의 억제제를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 miRNA는 근육 손상 부위의 미오사이트의 유전자를 표적으로 하는 것이다. 일부 구현예에서, miRNA의 억제제는 표적 miRNA에 하이브리드될 수 있고, 일부 구현예에서는, 표적 miRNA는 miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 및 miR-145로 구성되는 군에서 선택된다. 일부 특정 구현예에서, miRNA-133 및 miRNA-1의 억제제는 제1 시점에 근육 손상 부위에 맞춰 투여하며, miRNA-1 및 miRNA-133의 억제제는 제2 시점에 근육 손상 부위에 맞춰 투여하여 근육 손상을 치료한다. 일부 구현예에서, 근육 손상은 기계적 근육 외상, 근육 퇴행성 질환, 심장 손상 또는 이들의 조합에서 기인한다. 일부 구현예에서, 피험 대상은 포유동물이다.

본원에 개시되는 주제의 또 다른 구현예로, 미오사이트 분화, 증식 또는 그 둘다를 조절하는 방법이 제시된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 미오사이트를 miRNA와 또는 미오사이트 분화, 증식 또는 그 둘다를 조절할 수 있는 미오사이트내 유전자를 표적으로 하는 miRNA를 암호화하는 백터와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 조절은 억제하는 것이며, 일부 구현예에서, miRNA는 유전자의 해독을 억제한다.

본원에 개시되는 주제의 또 다른 구현예로, 미오사이트의 유전자의 발현을 조절하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 미오사이트를 miRNA와 또는 미오사이트내 유전자를 표적으로 하는 miRNA를 암호화하는 백터와 접촉시키는 단계를 포함한다.

본원에 개시되는 주제의 추가적인 구현예로, 미오사이트내 유전자의 발현을 억제하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 미오사이트를 miRNA를 암호화하는 백터를 사용하여 형질전환시키는 단계를 포함하며, 여기서, 상기 miRNA 분자는 miRNA가 유전자에서 발견될 모든 티미딘 대신에 우라실을 포함하는 것을 제외하고는 상기 유전자의 인접 17 내지 24개 뉴클레오티드 아서열과 70% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 유전자의 해독을 억제한다.

본원에 개시된 방법의 일부 구현예에서, 이용된 miRNA는 서열번호 1-11의 뉴클레오티드 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드와, 서열번호 1-11의 뉴클레오티드 서열과 70% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 및 miR-145로 구성되는 군으로부터 선택된다. 또한, 일부 구현예에서, miRNA는 유전자의 3' 비해독 영역을 표적으로 한다.

또한, 상기 방법의 일부 구현예에서, miRNA의 표적이 되는 유전자는 미오사이트 분화 유전자 (예, 히스톤 디아세틸라제 4 (HDAC4) 폴리펩티드 또는 갑상선 호르몬 수용체 단백질 240 (TRAP240)을 암호화하는 유전자), 미오사이트 증식 유전자 (예, 혈청 반응 인자 (SRF) 폴리펩티드를 암호화하는 유전자) 및 호르몬 관련 단백질 (예, 갑상선 호르몬 연관 단백질 1 (Thrap1)을 암호화하는 유전자)로 구성되는 군으로부터 선택된다.

본원에 개시되는 주제의 또 다른 구현예로, miRNA를 암호화하는 백터가 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 백터는 miRNA 분자를 암호화하는 핵산 분자에 작용적으로 연결된 프로모터; 및 전사 종결 서열을 포함한다. 또한, 일부 구현예에서, 상기 백터는 백터를 미오사이트에 도입시키기 위한 하나 이상의 시약을 추가로 포함하는 키트에 도입된다. 상기 키트는 일부 구현예에서 백터를 미오사이트에 도입시키기 위한 지시문을 추가로 포함한다.

따라서, 본원에 개시되는 주제의 목적은 miRNA-매개 방법을 사용하여 미오사이트에 유전자 발현을 조작하는 방법을 제공하는 것이다. 상기 목적은 본원에 개시되는 주제에 의해 전체적으로 또는 부분적으로 달성된다.

상기 언급한 본원에 개시되는 주제의 목적, 기타 목적 및 장점은 본원에 개시되는 주제에 관한 하기의 설명 및 비한정적인 실시예를 검토한 후의 당업자에게는 자명할 것이다.

[0019] **표에 관한 간단한 설명**

[0020] 표 1은 본원에 사용된 1-문자 뉴클레오티드 약어의 목록이다.

[0021] 표 2는 miR-1 및 miR-133이 근원성(筋原性) 증식 및 분화에 미치는 영향을 나타낸다. 성장 배지 (GM)에서 배양된 C2C12 근원세포는 miR-1, miR-133 또는 GFP에 대한 이중 가닥 miRNA 이중체 또는 2'-0-메틸 안티센스 올리고를 음성 대조군으로 사용하여 전기 천공하였다. 36 시간 후에, GM은 8, 12 및 24 시간 동안 분화 배지 (DM)로 대체하고, 세포들을 미오제닌, 포스포-히스톤 H3 및 미오신 중쇄 (MHC)에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학 분석을 위해 고정하였다. 무작위 선택된 시야로부터 5000 DAPI 염색 세포로부터 양성 세포를 계수하였다. 분석은 유사한 결과와 함께 3회 독립적으로 시행하였다.

[0022] 표 3은 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드의 명칭과 서열을 나열한 것이다.

#### 서열목록에 관한 간단한 설명

[0024] 서열 목록은 특히 다양한 miRNA들, 구체적으로 miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 및 miR-145 (각각 서열번호 1-11)의 서열뿐만 아니라 본원에 개시된 추가의 폴리뉴클레오티드 서열을 개시한다. RNA 서열이 DNA (즉, 우라실 대신에 존재하는 티미딘을 포함)의 형태로 제공되는 일부의 경우에, 상기 서열들은 상기 DNA 서열의 RNA 전사체 (각각의 T가 U로 대체된 것)에 상응한다.

#### 상세한 설명

[0026] 본원에서는 특정 miRNA가 미오사이트의 분화 및/또는 증식에 영향을 끼치는 미오사이트내 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있다는 측정 결과가 개시된다. 이 발견은 광범위한 원인, 예컨대 기계적 근육 외상, 근육 퇴행성 질환 및 심장 손상을 가진 근육 손상을 치료하는 것을 비롯하여 본원에 개시된 바와 같이 치료적 용도를 가진다. 본원에 개시된 발견의 용도로는 유전자에 대한 특이성을 가진 miRNA를 이용하여 미오사이트내 하나 이상의 특정 유전자의 발현을 조절하고, 다시 미오사이트의 기능, 예컨대 미오사이트의 분화 및/또는 증식을 조절하는 것을 추가로 포함한다. 본원에 개시되는 주제에 유용한 비한정적인 예시 miRNA로는 miRNA-1, miRNA-133, miRNA-206 및 miRNA-208이 있다.

[0027] 예컨대, 동일한 염색체 좌에 집합되어 있는 miRNA-1 (miR-1) 및 miRNA-133 (miR-133)는 발육 중에 조직 특이적인 방식으로 함께 전사된다. miR-1 및 miR-133은 각각 생체외에서 배양된 근원세포 및 생체내의 개구리 배에서의 골격근 증식 및 분화를 조절하는 데 현저한 역할을 수행한다. miR-1은 근육 유전자 발현의 전사 리프레서인 히스톤 디아세틸라제 4 (HDAC4)를 표적화함으로써 근육 발생을 촉진한다. 대조적으로, miR-133은 혈청 반응 인자 (SRF)를 억압함으로써 근원세포 증식을 증진시킨다. 그 결과는 최초로 동일한 miRNA 폴리시스템으로부터 유래하고 함께 전사되는 두 개의 성숙 miRNA가 현저한 생물학적 기능을 수행할 수 있음을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 miRNA가 근육 유전자 발현 및 배의 발육을 조절하는 전사 회로에 참여하는 분자 메커니즘을 제공한다.

[0028] 또 다른 비한정적인 예로서, Thrap 1 발현은 miR-208에 의해 조절되는 것 같다. Thrap1의 3' UTR은 두 개의 예측된 miR-208 결합 부위를 포함한다 (도 18). 두 개의 표적은 Thrap1 정지 코돈의 하류 ~80 bp에 위치하며, 불과 ~50 bp만큼만 서로 분리되어 있다. 두 표적은 miR-208의 종자 영역과 완전히 상보적이다. Thrap1 유전자는 도처에서 발현되는 TRAP (갑상선 호르몬 수용체 단백질) 복합체의 240 kd 서브유닛인 TRAP240을 암호화한다. TRAP는 핵의 수용체에 대한 공동 활성화인자인 다중 서브유닛 단백질 복합체이며, TRAP 군의 멤버들은 적절한 발육에 중요하다. 따라서, miR-208은 TRAP240의 생성을 조절하고, 호르몬 의존성 심근세포 분화를 촉진한다.

#### I. 일반적 고려 사항

[0030] 제1 miRNA가 표시하는 *lin-4* 유전자는 C. 엘레간스의 유충 발생의 시기를 조절하는 것으로서, 눈에 띄게 *lin-14* mRNA 레벨에 영향을 끼치지 않으면서 *lin-14* 단백질 발현을 억제하는 21개 뉴클레오티드 길이의 비암호성 RNA를 예기치 않게 생성시키는 것으로 확인되었다. 이러한 소형 RNA는 *lin-14*의 3' 비해독 영역 (UTR)의 상보성 부위를 표적으로 하는 것으로 확인되었다<sup>49,50</sup>. 이러한 현상은 초기에는 유전자 이상으로 취급되어 실제로 무시되었지만, 현재는 *lin-4*와 유사한 miRNA로 불리는 수백 개의 소형 RNA가 다른 종의 개놈에 존재하며 상보성 mRNA의 해독을 조절하는 것으로 이해되고 있다. 최근의 보고가 현저히 다양한 생물학적 과정에서 몇 개의 miRNA에 대한 역할을 제안하고 있지만, 다수는 주로 특성 규명되지 않은 채로 존재한다.

#### I.A. miRNA 생물 발생 및 메커니즘

[0032] miRNA 생물 발생의 일반적인 모델을 도 13에 도시한다. 성숙 miRNA는 더 긴 전사체로부터 가공되어 ~22개 뉴클레오티드 (nt)의 길이를 가진다<sup>51,52</sup>. 1차-miRNA (pri-miRNA)는 독립 전사 단위로서 RNA Pol II에 의해 전사되거

나 또는 숙주 유전자의 접속된 인트론으로부터 발생할 수 있다<sup>53</sup>. miRNA 가공 경로는 스템-루프 구조를 가지는 ~70개 nt 길이의 중간 전구체-miRNA (pre-miRNA)를 생성시키는 RNase III 엔도뉴클레아제 드로샤에 의한 pri-miRNA 핵 절단과 함께 개시될 수 있다<sup>54</sup>. 엑스포틴-5는 드로샤 절단에 의해 남겨진 엇걸린 절단을 인지하고 pre-miRNA를 세포질로 Ran-GTP 의존 방식으로 배출한다<sup>54-60</sup>. 세포질에서는 일단 pre-miRNA의 두 가닥이 스템-루프의 기저로부터 대략 나선 2회전만큼 떨어져 있는 또 다른 RNase III 효소인 다이서에 의해 절단될 수 있다<sup>61-63</sup>. 생성된 ~22량체 RNA 이중체는 다이서에 의해 해리되고, 단일의 스템-암이 RISC (RNA-유도된 사일런싱 복합체) 내로 도입될 수 있다. RISC는 miRNA 및 mRNA 표적과 함께 아르고노트 단백질 군의 멤버들과 부속 인자들을 보유하는 리보핵산 단백질 복합체이다. 스템-암 이중체의 상대적인 열 안정성은 어느 가닥이 RISC 내로 도입되는지를 측정하기 위한 것으로 생각된다: RISC로 들어가는 가닥은 종종 그 5' 말단이 덜 안정적인 것이다<sup>64,65</sup>. 해독 억제는 아직 알려지지 않은 메커니즘에 의해 표적 mRNA의 3' UTR내 표적 서열(들)에 대한 miRNA 상보성에 의해 매개된다<sup>66,67</sup>. 일반적으로, 불완전한 상보성은 해독 억제를 초래하는 반면, 완전한 또는 거의 완전한 상보성은 mRNA 절단을 초래한다<sup>68</sup>. 다양한 측면의 miRNA 생물 발생, 트래피킹, RISC 어센블리 및 RISC 기능의 메커니즘에 대해서는 규명이 되어야 하겠지만, 특정 miRNA에 대한 기능적 연구 및 유전자와 miRNA 경로의 성분들의 유전적 및 생화학적 분석은 miRNA가 다양한 생물학적 과정에서 주요함을 나타냈다.

#### I.B. 발생 중의 miRNA

[0033] I.B. 발생 중의 miRNA

[0034] 다세포 유기체의 발생은 유전자 경로의 공간적 및 일시적 제어를 필요로 한다. miRNA는 표적 유전자의 전사 후 조절에 의해 상기 복합 유전 경로를 제어 또는 미세 조정하도록 제시된다. 동물 발생에서 miRNA의 필요성을 결정하는 한 가지 방법은 miRNA를 그 성숙한 활성형으로 가공하는 데 필요한 상류 효소인 다이서에 돌연변이를 생성시키는 것이다. 척추동물은 모든 척추동물 miRNA를 완전히 가공하는 데 필요할 것 같은 다이서의 단일 사본만을 가지고 있는 것으로 생각된다<sup>62,63,69</sup>. 마우스에서 다이서 기능의 제거는 7.5일 배(E)에 의해 치사를 초래하였다<sup>69</sup>. 다이서가 없는 마우스는 원시적인 줄 마커 T (brachyury)를 발현하지 않았는데, 이는 아마도 장배 형성 중에 신체가 형성되기 전에 발육이 정지된 것을 나타낸다. 감소된 사지 크기 및 증가된 프로그래밍된 세포 사멸은 특히 마우스 사지 중배엽에서 다이서 기능의 조건부 상실로부터 초래되었다<sup>70</sup>. 모계-자이코트 다이서 돌연변이를 형성함으로써 제브라파쉬에서의 miRNA 형성을 완전히 차단한 결과, miRNA의 상실이 배에서 다수의 세포형의 축 형성 또는 패턴 형성에 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다. 그러나, 장배 형성, 뇌 형성, 체절 형성 및 심장 발생 중의 형태 발생은 모두 비정상으로 입증되고, 치사를 초래하였다<sup>71</sup>. 총괄적으로, 다이서 기능의 유전적 분석은 성숙 miRNA가 적절한 발생에 요구된다는 것을 시사한다. 모든 miRNA 기능을 제거하는 연구가 유익하지만, 그 역시 무딘 수단이고, 특정 miRNA의 정확한 기능에 대한 통찰을 제공하지는 못한다.

#### I.C. 특정 miRNA의 생물학적 역할

[0035] I.C. 특정 miRNA의 생물학적 역할

[0036] 다양한 생물학적 과정에 miRNA가 참여한다고 제안하는 증거가 증가하고 있다. 췌장 섬 세포에서, miR-375의 과발현은 글루코스-유도된 인슐린 분비를 억제한 반면, 내인성 miR-375을 억제하면 인슐린 분비가 증가하였다<sup>72</sup>. 유사한 과발현 및 억제 전략은 ERK5 단백질 발현을 조절함으로써 지방세포 (adipocyte) 분화에서 miR-143에 대한 역할을 확인하였다<sup>73</sup>. 또 다른 실시예에서, 5 miRNA를 암호화하는 폴리시스트론 miRNA 유전자는 종양 발생과 연관되어 있었다<sup>74</sup>. miRNA에 대한 다른 기능은 조혈<sup>75</sup>, 뉴런의 분화<sup>76,77</sup> 및 Hox 유전자 발현의 조절<sup>78,79</sup>에서 제안되었다.

[0037] 현재 300개가 넘는 인간 miRNA가 알려져 있지만, 어떤 할당된 생물학적 기능을 가진 것은 단지 몇 개밖에 안된다. 특정 miRNA의 연구는 발생 및 병리학에서 miRNA-매개의 조절의 유형 및 중요성을 이해하는 데 필요하다. 본원에 개시되는 주제는 근육 분화 및 증식을 조절하는 데 있어서 miRNA에 대한 역할을 최초로 제시한다.

#### I.D. 심장 발육에서의 miRNA

[0038] I.D. 심장 발육에서의 miRNA

[0039] 심장 발생은 상이한 유전 프로그램의 정확한 제어를 필요로 하며, 따라서 달리 발현되는 심장-풍부한 miRNA가 그러한 복잡한 경로를 조절할 수 있다고 추측하는 것은 흥미롭다. 그러한 조직 특이적 발현 패턴은 몇 개의 miRNA에 대해 본원에 개시된 주제에 의해 본원에 개시된다. miR-1 및 miR-133은 골격근 및 심장근 조직에서 발현되는 반면, miR-208은 심근 조직에서만 검출된다. 본 발명의 개시 이전에, 상기 근육 특이적 miRNA의 기능은

불명하였다.

#### I.E. miRNA 표적 확인

특정 miRNA의 표적을 확인하는 것은 조절 경로에서의 그들의 정확한 역할을 이해하는 것을 용이하게 한다. 대부분의 동물 miRNA는 그 표적 부위에 불완전하게 상보적인데, 이것은 동물 miRNA 표적 부위를 확인하기 위해 간단한 상동성 검색을 사용하는 것을 방해한다. 이 장애를 극복하기 위해, 새로운 동물 miRNA 표적을 예측하기 위한 기준으로서 공지의 miRNA 표적의 서열 보존 및 특성을 도입한 몇 가지 컴퓨터적인 방법이 개발되었다<sup>80-85</sup>. 예컨대, 일부 알고리즘은 다수의 miRNA가 '종자' 영역으로 불리는 유효 표적 부위 내에서 두 번째와 8번째 뉴클레오티드 사이에 높은 상보성을 나타냈음을 고려하고 있다. 기타 알고리즘은 일부 경우에 miRNA의 3' 말단에서의 상보성이 약한 5' 말단 결합을 보상할 수 있기 때문에 상기 사실을 고려하지 않는다. 상기 알고리즘은 또한 인접 영역에 대해 2개 이상의 종에 걸쳐 표적 서열 보존에 의해 예측을 평가한다. 이들 유형의 컴퓨터적 방법은 일부 포유동물의 miRNA 표적 부위를 성공적으로 예측하였다. 임의의 특정 miRNA에 대해 산출된 예측은 거의 틀림없이 허위 양성을 포함하고 있다. 그러나, 예측은 가설 생성자로서 극히 유용하다. 임의의 예측은 실험적으로 입증될 수 있고, 관련 생물학적 환경에 적용할 수 있다.

#### I.F. 중요성

miRNA-유도 억압 후의 정확한 문자 메커니즘을 이해하여 miRNA 발현을 분석하고 표적 부위를 확인하기 위한 보다 양호한 수단을 개발하고, 조절 경로 내의 특이 miRNA에 대한 생물학적으로 관련된 역할을 측정하고자 하는 mRNA 연구에서 현재 몇 가지 활발한 영역이 있다.

심장 발생 및 병리학은 복합 유전 경로의 조절과 직접적으로 연관되어 있고, 그러한 경로를 이해하기 위한 시도에 많은 노력이 확장되어 왔다. 심장 유전자 전사에 필요한 전사 인자 및 조절 인핸서 서열의 역할에 대부분의 연구가 집중되어 왔다. 심장 유전자 발현의 조절은 매우 복잡한 것으로 입증되었는데, 개개의 심장 유전자가 심장에서 매우 제한된 발현 패턴을 유도하는 다중 독립 인핸서에 의해 조절되었다. 잠재적으로, miRNA는 전사후 레벨로 조절의 또 다른 충을 첨가함으로써 훨씬 더 상기 복잡성을 극적으로 증가시켜 왔다. 본원에 개시된 주제는 부분적으로는 심근 및 골격근 유전자 발현이 어떻게 조절되는가에 대한 새로운 이해를 제공하며, 그 발견들에 대한 치료적 및 연구 응용을 개시한다. 또한, 본원에 개시된 근육 분화 및 증식의 miRNA 제어와 관련된 발견들은 다른 경로에서 miRNA의 기능을 이해하기 위한 모델로서도 작용한다.

#### II. 정의

편의상, 본 명세서, 실시예 및 첨부하는 청구의 범위에 이용된 특정 용어들을 여기에 모아 둔다. 하기 용어들은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 잘 이해될 수 있다고 생각되지만, 본원에 개시되는 주제에 관한 설명을 용이하게 하기 위해 하기의 정의를 제시하는 것이다.

달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본원에 개시되는 주제가 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 통상적으로 이해되는 것과 같은 의미를 가진다. 본원에 기재되는 것들과 유사하거나 균등한 방법, 장치 및 재료를 본원에 개시되는 주제의 실시 또는 시험에 사용할 수 있지만, 대표적인 방법, 장치 및 재료를 기재한다.

오래 지속돼 온 특허법의 관례에 따라, 용어 "부정관사(a)", "부정관사(an)" 및 "정관사(the)"는 청구의 범위를 포함하여 본원에 사용될 때 "하나 이상(one or more)"를 의미한다. 따라서, 관사 "a", "an" 및 "the"는 관사의 문법적 목적물을 하나 또는 하나 이상 (즉, 적어도 하나)을 의미하는 것으로 본원에 사용된다. 예컨대, "an element"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

본원에 사용된 "약 (about)"이란 용어는 질량, 무게, 시간, 부피, 농도 또는 비율과 관련하여 언급할 때는 지정된 양으로부터 일부 구현예에서는 ±20% 또는 ±10%, 일부 구현예에서는 ±5%, 일부 구현예에서는 ±1%, 일부 구현예에서는 ±0.5%, 일부 구현예에서는 ±0.1%의 변이를 포함하는 것을 의미하는데, 그러한 변이가 본원에 개시되는 주제를 실시하기에 적합하기 때문이다. 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서 및 청구의 범위에 사용된 성분, 반응 조건 등의 양을 표현하는 모든 수치는 "약"이란 용어에 의해 모든 예에서 변형되는 것으로 이해될 수 있다. 따라서, 반대로 언급하지 않는 한, 본 명세서 및 첨부하는 청구의 범위에 제시된 수치 매개변수는 본원에 개시되는 주제에 의해 얻어질 수 있는 바람직한 성질에 의존하여 변화될 수 있는 추정치이다.

본원에 사용된 "아미노산" 및 "아미노산 잔기"란 용어는 호환적으로 사용되며, 20개의 자연 발생적 아미노산뿐만 아니라 그 유사물, 유도체 및 동질체; 변형 축제를 가진 아미노산 유사물; 및 이들의 모든 임체 이성질체를

의미한다. 따라서, "아미노산"이란 용어는 아미노 작용성과 산 작용성을 둘다 포함하여 자연 발생적 아미노산의 중합체에 포함될 수 있는 천연 또는 합성의 모든 분자를 포함하는 것이다.

[0051] 아미노산은 웨티드 결합에서 폴리웨티드의 화학적 소화 (가수분해) 시에 형성될 수 있다. 본원에 기재된 아미노산은 일부 구현예에서 "L" 아이소형이다. 그러나, "D" 아이소형 잔기는 바람직한 작용성이 폴리웨티드에 의해 보유되는 한, "D" 아이소형은 임의의 L-아미노산 잔기 대신에 치환될 수 있다. NH<sub>2</sub>는 폴리웨티드의 아미노 말단에 존재하는 유리 아미노기를 의미한다. COOH는 폴리웨티드의 아미노 말단에 존재하는 유리 카르복시기를 의미한다. 표준 폴리웨티드 명명법을 유지하면서, 아미노산 잔기에 대한 약어는 상기 제시된 표의 형태로 제시된다.

[0052] 본원에 제시되는 모든 아미노산 잔기의 서열은 왼쪽으로부터 오른쪽으로의 방향을 가진다는 것이 주목된다. 또한, "아미노산" 및 "아미노산 잔기"라는 문구는 변형 및 이상 아미노산을 포함하도록 광범위하게 정의된다.

[0053] 또한, 아미노산 잔기 서열의 시작부 또는 말단의 대쉬는 하나 이상의 아미노산 잔기의 추가 서열에의 웨티드 결합, 또는 NH 또는 아세틸과 같은 아미노-말단기 또는 COOH와 같은 카르복시-말단기에의 공유 결합을 나타낸다는 것이 주목된다.

[0054] 본원에서 "세포"라는 용어는 그 통상의 생물학적 의미로 사용된다. 일부 구현예에서, 세포는 척추동물과 같은 유기체에 존재한다. 세포는 진핵세포 (예, 골격근 미오사이트나 심장 미오사이트와 같은 미오사이트) 또는 원핵세포 (예, 박테리아)일 수 있다. 세포는 체세포 또는 생식 계열 기원이거나, 분화 전능성 (totipotent), 분화 다능성 (pluripotent) 또는 임의의 정도로 분화되거나, 분열성 또는 비분열성일 수 있다. 세포는 또한 생식세포 (gamete) 또는 배, 줄기 세포 또는 완전 분화 세포로부터 유래하거나 이들을 포함할 수 있다.

[0055] 본원에 사용된 "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"란 용어는 호환적으로 사용되며, 본원에 개시되는 주제 (예컨대, miRNA를 암호화하는 발현 벡터)의 조성물이 도입되는 세포 (예컨대, 미오사이트)를 의미한다. 또한, 상기 용어들은 발현 구성물이 초기에 도입되는 특정 세포뿐만 아니라, 그러한 세포의 자손 또는 잠재적 자손도 의미한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후속 세대에서 특정의 변형이 일어날 수 있기 때문에, 그러한 자손은 실제로 모세포와 동일한 것이 아니라, 본원에 사용된 용어의 범위 내에 포함되는 것이다.

[0056] 본원에 사용된 "유전자"란 용어는 RNA를 암호화하는 핵산, 예컨대, 폴리웨티드를 암호화하는 구조 유전자를 포함(이에 국한되지 않음)하는 핵산 서열을 의미한다. "유전자"란 용어는 또한 생물학적 기능과 연관된 DNA의 임의의 분절까지 넓은 의미를 가진다. 그러한 의미로, "유전자"란 용어는 암호 서열; 프로모터 영역; 전사 조절 서열; 조절 단백질에 특이적인 인지 서열인 비발현된 DNA 분절; 유전자 발현에 기여하는 비발현된 DNA 분절, 예컨대, mRNA의 3' 비해독 영역 내로 전사되고, 다시 본원에 개시되는 주제의 예시 miRNA에 의해 표적화되고 결합되는 DNA 분절; 요구되는 매개변수를 가지도록 설계된 DNA 분절; 또는 이들의 조합을 포함하는 서열을 포함하나, 이들에 국한되는 것은 아니다. 유전자는 다양한 방법에 의해 얻을 수 있는데, 예컨대, 생물학적 샘플로부터 클로닝하거나, 공지 또는 예측된 서열 정보에 기초한 합성 및 하나 이상의 기준 서열로부터 재조합 유도와 같은 방법들이 있다.

[0057] 당해 분야에서 이해되듯이, 유전자는 통상 암호 가닥 및 비암호 가닥을 포함한다. 본원에 사용되는 "암호 가닥 (coding strand)" 및 "센스 가닥"이란 용어는 호환적으로 사용되며, 유전자 산물이 해독되는 mRNA와 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는 핵산 서열을 의미한다. 당해 분야에서 역시 이해되듯이, 암호 가닥 및/또는 센스 가닥을 DNA 분자를 언급하기 위해 사용할 때, 암호/센스 가닥은 상응하는 mRNA에서 발현되는 우리던 잔기 대신에 티미딘 잔기를 포함한다. 또한, DNA 분자를 언급하기 위해 사용할 때, 암호/센스 가닥은 또한 mRNA에서 발견되지 않은 추가 요소를 포함할 수 있으나, 프로모터, 인핸서 및 인트론에 국한되지 않는다. 유사하게, "주형 가닥" 및 "안티센스 가닥"이란 용어는 호환적으로 사용되며, 암호/센스 가닥에 상보적인 핵산 서열을 의미한다. 그러나, 폴리웨티드 산물을 암호화하지 않는 유전자들, 예컨대, miRNA 유전자의 경우, "암호 가닥"이란 용어는 miRNA를 포함하는 가닥을 의미하기 위해 사용한다는 것을 주의하여야 한다. 이 용례에서, miRNA를 포함하는 가닥은 miRNA 전구체와 관련하여서는 센스 가닥이나, 표적 RNA와 관련하여서는 안티센스가 될 수 있다 (즉, miRNA는 그것이 표적 RNA에 대해서는 안티센스인 서열을 포함하기 때문에 표적 RNA에 하이브리드된다).

[0058] 본원에 사용된 "상보성" 및 "상보적인"이란 용어는 전통적인 웃슨-크릭 또는 기타 비전통적 유형의 상호작용에 의해 또 다른 핵산과 하나 이상의 수소 결합을 형성할 수 있는 핵산을 의미한다. 본원에 개시되는 주제의 핵산 분자와 관련하여, 상보성 서열과 핵산 분자의 결합 자유 에너지는 핵산의 관련 기능이 일부 구현예에서는 리보뉴클레아제 활성을 진행하게 하는 데는 충분하다. 예컨대, miRNA 전구체의 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이의 상보성의 정도는 miRNA 전구체의 miRNA-포함 가닥과 표적 핵산 서열 사이의 상보성의 정도와 같거나 상이할 수

있다. 핵산 분자에 대한 결합 자유 에너지의 측정법은 당해 분야에 널리 알려져 있다. 예컨대, 문현 [ Freier *et al.*, 1986<sup>31</sup>; Turner *et al.*, 1987<sup>32</sup> ] 참조.

[0059] 본원에 사용되는 문구 "상보성 비율", "동일성 비율" 및 "동일한 비율"은 호환적으로 사용되며, 제2 핵산 서열과 수소 결합 (예컨대, 왓슨-크릭 염기쌍 결합)을 형성할 수 있는 핵산 분자에서 인접 잔기들의 비율을 의미한다 (예컨대, 10개 중에서 5, 6, 7, 8, 9, 10개는 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 및 100% 상보적임). "100% 상보적임", "전체적으로 상보적임"이란 용어는 핵산 서열의 인접 잔기 모두가 제2 핵산 서열의 동일한 개수의 인접 잔기와 수소 결합을 형성할 수 있음을 나타낸다. miRNA가 약 17 내지 24 nt이고, 5개까지의 부정합 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 부정합)은 통상 유전자 발현의 miRNA-유도 조절 중에 용인되기 때문에, miRNA와 그것을 표적으로 하는 RNA 사이에 약 70% 이상의 상보성은 표적 RNA가 유래한 유전자의 발현을 miRNA가 조절하기에 충분하다.

[0060] "유전자 발현"이란 용어는 일반적으로 생물학적 활성이 있는 폴리펩티드가 DNA 서열로부터 생성되고 세포에서 생물학적 활성을 나타내는 세포 과정을 의미한다. 그런 의미로, 유전자 발현은 전사 및 해독 과정을 포함할 뿐만 아니라, 유전자 또는 유전자 산물의 생물학적 활성에 영향을 끼칠 수 있는 전사후 및 해독후 과정을 포함한다. 상기 과정들은 RNA 합성, 가공 및 수송뿐만 아니라, 폴리펩티드 합성, 수송 및 폴리펩티드의 해독후 변형을 포함하지만, 이들에 국한되는 것은 아니다. 또한, 세포내 단백질-단백질 상호작용에 영향을 끼치는 과정들은 본원에 정의된 유전자 발현에 영향을 끼칠 수도 있다.

[0061] 그러나, 단백질 산물을 암호화하지 않는 유전자, 예컨대, miRNA 유전자의 경우에, "유전자 발현"이란 용어는 전구체 miRNA가 유전자로부터 생성되는 과정을 의미한다. 통상, 상기 과정은, 단백질 암호 유전자에 대해 RNA 폴리머라제 II에 의해 유도되는 전사와는 달리, miRNA 유전자의 전사 산물이 해독되어 단백질을 생성하지 않지만, 전사로 언급된다. 그럼에도 불구하고, miRNA 유전자로부터 성숙 miRNA의 생성은 그 용어가 본원에 사용되는 대로 "유전자 발현"이란 용어에 의해 포함된다.

[0062] 본원에 사용된 "분리된 (isolated)"이란 용어는 다른 핵산, 단백질, 지질, 탄수화물 및/또는 그것이 통상 연합되어 있는(그러한 연합은 세포 물질 또는 합성 배지에서 이루어짐) 다른 물질이 실질적으로 없는 분자를 의미한다. 따라서, "분리된 핵산 분자"라는 용어는 천연 또는 합성 기원의 리보핵산 분자 또는 데옥시리보핵산 분자 (예컨대, 게놈 DNA, cDNA, mRNA, miRNA 등) 또는 이들의 일부 조합을 의미하는데, 이들은 (1) "분리된 핵산"이 자연에서 발견되는 세포와 연합되어 있지 않거나, 또는 (2) 자연에서 연관되어 있지 않은 폴리뉴클레오티드에 작용적으로 연관되어 있다. 유사하게, "분리된 폴리펩티드"라는 용어는 일부 구현예에서는 재조합 DNA 또는 RNA로부터 제조되거나 또는 합성 기원인 폴리펩티드 또는 이들의 일부 조합을 의미하는데, 이들은 (1) 그것이 자연에서 함께 발견되는 단백질과 연합되어 있지 않거나, (2) 그것이 통상 발생하는 세포로부터 분리되거나, (3) 동일한 세포원으로부터 다른 단백질 없이 분리되거나, (4) 상이한 종으로부터 유래한 세포에 의해 발현되거나, 또는 (5) 자연에서 발생하지 않는다.

[0063] "분리된"이란 용어는 "분리된 세포"의 의미로 사용될 때는 예컨대, 기관, 조직 또는 유기체의 일부로서 그 자연환경으로부터 제거된 세포를 의미한다.

[0064] 본원에 사용된 "표지 (label)" 또는 "표지된 (labeled)"이란 용어는 분광학적, 방사선학적 또는 기타 방법에 의해 검출할 수 있는 프로브 분자에의 일 부분의 부착을 의미한다. 따라서, "표지" 또는 "표지된"이란 용어는 검출 가능한 마커를 폴리펩티드와 같은 분자에 공유적으로 또는 비공유적으로 선택적으로 혼입 또는 부착하는 것을 의미한다. 폴리펩티드를 표지하는 다양한 방법이 당해 분야에 알려져 있으며, 이들을 사용할 수 있다. 폴리펩티드용 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 표지, 중 원자, 효소 표지 또는 리포터 유전자, 화학 발광기, 비오티닐기, 2차 리포터 (예컨대, 류신 지퍼쌍 서열, 항체용 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인지되는 예정된 폴리펩티드 에피토프를 들 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 표지는 다양한 길이의 스페이서 암에 의해 부착되어 잠재적인 입체적 방해를 감소시킨다.

[0065] 본원에 사용된 "조절하다 (modulate)"라는 용어는 임의의 또는 모든 화학적 및 생물학적 활성 또는 생화학적 실체의 성질의 증가, 감소 또는 기타의 변화를 의미한다. 예컨대, "조절하다"라는 용어는 유전자의 발현 레벨 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 서브유닛을 암호화하는 RNA 분자 또는 등가의 RNA 분자의 레벨의 변화; 또는 상방 조절되거나 하방 조절되어 발현 레벨 또는 활성이 조절제의 부재시에 관찰되는 것보다 더 크거나 더 적게 만드는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 서브유닛의 활성의 변화를 의미할 수 있다. 예컨대, "조절하다"라는 용어는 "억제하다 (inhibit)" 또는 "억제하다 (suppress)"를 의미할 수 있으나, "조절하다"라는 말의 사용은 이

정의에 국한되지 않는다.

[0066] 본원에 사용되는 "조절 (modulation)"이란 용어는 반응의 상향 조절 (즉, 활성화 또는 자극) 및 하향 조절 (즉, 억제)을 의미한다. 따라서, "조절"이란 용어는 기능적 성질 또는 생물학적 활성 또는 과정 (예컨대, 효소 활성 또는 수용체 결합)과 관련하여 사용할 때 상향 조절 (예컨대, 활성화 또는 자극), 하향 조절 (예컨대, 억제) 또는 그러한 성질, 활성 또는 과정의 질을 변화시키는 능력을 의미한다. 특정 예에서, 그러한 조절은 신호 전달 경로의 활성화와 같이 특정 이벤트의 발생을 조건으로 할 수 있고/있거나 특정 세포 유형에서만 명확할 수 있다.

[0067] "조절자 (modulator)"란 용어는 폴리펩티드, 핵산, 거대 분자, 복합체, 분자, 소분자, 화합물, 종 등 (자연 발생적 또는 비자연 발생적), 또는 조절을 일으킬 수 있는 박테리아, 식물, 곤충, 또는 동물 세포 또는 조직과 같은 생물학적 물질로부터 만들어지는 추출물을 의미한다. 조절자는 분석에 포함되어 기능적 성질, 생물학적 활성 또는 과정의 억제제 또는 활성화제 (직접 또는 간접), 또는 그 조합물 (예컨대, 작동물질, 부분적 길항물질, 부분적 작동물질, 역 작동물질, 길항물질, 항-미생물제, 미생물 감염 또는 증식의 억제제 등)로서의 잠재적인 활성에 대해 평가할 수 있다. 그러한 분석에서, 다수의 조절자는 한번에 구분될 수 있다. 조절자의 활성은 공지되었거나, 미지이거나 부분적으로 공지된 것일 수 있다.

[0068] 조절자는 선택적 또는 비선택적일 수 있다. 본원에 사용된 "선택적"이란 용어는 조절자 (예컨대, 억제제)과 관련하여 사용할 때 조절자가 하나의 분자 (예컨대, 당해 표적 RNA) 대 또 다른 유사하나 동일하지 않은 분자 (예컨대, 당해 표적 RNA와 동일한 유전자군의 멤버로부터 유래된 RNA)와 상호작용하는 방식으로 측정 가능하거나 생물학적으로 관련된 차이를 의미한다.

[0069] 선택적인 조절자로 고려될 수 있는 조절자의 경우, 그것과 표적의 상호작용의 성질은 표적 (예컨대, 표적 자체 이외의 군 멤버로부터의 전사체)과 관련된 다른 분자와 그것의 상호작용을 전적으로 배제할 필요는 없다는 것이 이해되어야 한다. 다른 방식으로 언급해 보면, "선택적인 조절자"란 용어는 당해 유전자로부터 mRNA 전사체에만 결합하는 분자들 및 관련 군의 멤버의 분자들로 국한시키고자 하는 의도는 없다. 상기 용어는 또한 당해 유전자로부터 및 관련 군 멤버로부터 유래한 전사체와 상호작용할 수 있는 조절자를 포함하는 것이나, 군 멤버에 대한 표적과의 차등 상호작용이 생물학적으로 관련된 결과를 가지는 조건을 설계하는 것이 가능하다. 그러한 조건으로는 조절자와 군 멤버 사이의 서열 동일성의 정도의 차이와, 모두가 아닌 일부의 군 멤버를 발현시키는 특이 조작 또는 세포 유형에 조절자의 사용을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 후자 세트의 조건 하에, 조절자는 다른 군 멤버의 존재에 의해 조작으로부터 스며나오기 때문에 추가의 패밀리 멤버를 발현시키는 또 다른 조작에서 조절자와 표적이 상호작용하여 생물학적 효과를 일으키지는 않는다는 사실에도 불구하고, 조절자가 주어진 표적과 상호작용하여 생물학적으로 관련된 효과를 일으킨다면 조절자는 그 주어진 표적에 대해 선택적인 것으로 간주될 수 있다.

[0070] 선택적인 조절자가 확인될 때, 조절자는 그것이 또 다른 분자 (예컨대, 당해 유전자와 관련된 유전자의 mRNA 전사체)에 결합하는 방식과는 상이한 (예컨대, 더 강력한) 방식으로 하나의 분자 (예컨대, 당해 유전자의 mRNA 전사체)에 결합한다. 본원에 사용된 조절자는 그것이 결합할 수 있는 일부 다른 가능한 분자와 비교하여 그것이 더 강력하게 결합하는 분자에의 "선택적인 결합" 또는 "우선적인 결합"을 나타내는 것으로 언급된다.

[0071] 본원에 사용된 "억제하다 (inhibit)", "억제하다 (suppress)", "하향 조절하다 (down regulate)" 및 이들의 문법적 변형어들은 호환적으로 사용되며, 유전자 산물 (예컨대, 폴리펩티드), 유전자의 발현, 폴리뉴클레오티드, 예컨대, miRNA의 활성 또는 하나 이상의 유전자 산물을 암호화하는 RNA의 레벨이 본원에 개시되는 주제에 관한 연구의 실행의 부재 하에 관찰된 것 이하의 활성을 의미한다.

[0072] 일부 구현예에서, miRNA 분자를 사용한 억제는 표적 RNA의 정상 상태 발현 레벨의 감소를 초래한다. 일부 구현 예에서, miRNA 분자를 사용한 억제는 표적의 발현 레벨을 하향 조절할 수 없는 불활성 또는 약화된 분자의 존재 하에 관찰된 레벨 이하인, 표적 유전자의 발현 레벨을 초래한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시되는 주제의 miRNA 분자를 사용한 유전자 발현의 억제의 정도는 miRNA 분자의 존재시가 그 부재시보다 더 크다. 일부 구현예에서, 유전자 발현의 억제는 유전자에 의해 (예컨대, 유전자 발현의 miRNA-매개된 억제에 의해) 암호화된 mRNA의 분해의 증가된 비율과 연관이 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시되는 주제의 miRNA 분자를 사용한 억제는 miRNA의 부재시에 관찰된 레벨 이하인, 표적 유전자로부터의 유전자 산물의 발현 레벨을 초래한다.

[0073] 일부 구현예에서, 내인성 miRNA와 같은 miRNA는 miRNA 억제제에 의해 억제됨으로써, miRNA가 억제되지 않을 때 유전자 발현 (예컨대, 유전자 산물의 생성) 레벨과 비교하여, miRNA가 표적으로 하는 유전자의 발현의 증가를

초래할 수 있다. 본원에 사용된 "miRNA 억제제" 및 "miRNA의 억제제"라는 용어들은 호환적으로 사용되며, miRNA의 활성을 억제하는 분자를 의미한다.

[0074] 일부 구현예에서, miRNA 억제제는 지정된 조건 하에 특정 표적 miRNA에 하이브리드되어 표적 miRNA의 활성을 억제하는 폴리뉴클레오티드이다. miRNA 억제제가 표적 miRNA에 하이브리드될 수 있는 조건으로는 생리적 조건을 포함한다. miRNA 억제제는 표적 miRNA 폴리뉴클레오티드에 대한 miRNA 억제제 폴리뉴클레오티드 서열의 상보성에 기초하여 표적 miRNA 억제제에 큰 정도이든 적은 정도이든 하이브리드될 수 있다. 일부 구현예에서, miRNA는 표적 miRNA의 전부 또는 일부에 완전히 상보적이거나, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 일반적으로 이해되듯이, 구체적인 용도와 특이성의 필요에 따라 완전히 상보적인 것보다는 더 적은 상보성, 예컨대, 표적 miRNA에 대해 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 80% 또는 70% 상보성이 있다. miRNA 억제제는 구체적인 세트의 조건 하에 목적량의 표적 miRNA 활성을 억제할 필요가 있는 대로 단지 표적 miRNA와 상보성을 공유할 필요가 있다. 본원에 개시되는 주제와 함께 유용한 miRNA 억제제의 예로는 2'-0-메틸 폴리뉴클레오티드와 같은 변형된 폴리뉴클레오티드가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 대표적인 비한정적인 예로는 표 2 및 3에 제시되는 것으로, 2'-0-메틸-miR-1, 2'-0-메틸-miR-133 및 2'-0-메틸-miR-208이 있는데, 이들은 각각 miR-1, miR-133 또는 miR-208의 활성을 특이적으로 억제할 수 있다.

[0075] 본원에 사용된 "돌연변이"라는 용어는 그 전통적인 의미를 보유하며, 자연 발생적으로 유전되거나 핵산 또는 폴리펩티드 서열에 도입되는 변화를 의미하며, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 일반적으로 알려진 대로의 의미로 사용된다.

[0076] 본원에 사용된 "미오사이트 (myocyte)"라는 용어는 발생의 모든 단계에서 근육 세포의 모든 분류를 광범위하게 의미한다. 따라서, "미오사이트"는 근원세포와 같은 미분화된 근육 세포와 말단에서 분화된 미오튜브와 같은 분화된 근육 세포를 둘다 포함한다. "미오사이트"는 또한 다양한 조직학적 유형의 근육 세포를 포함하는데, 그 예로는 횡문근 세포 (예컨대, 골격근 세포), 평활근 세포 (예컨대, 소장 근육 세포) 및 심근 세포가 있으며, 이에 국한되는 것은 아니다. 또한, 본원에 사용된 "미오사이트"는 종 특이적인 것은 아니다.

[0077] 피험 대상에 적용되는 "자연 발생적"이란 용어는 피험 대상이 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 의미한다. 예컨대, 자연에서 임의의 출처로부터 분리될 수 있는 유기체 (박테리아 포함)에 존재하고 실험실에서 사람에 의해 의도적으로 변형된 것이 아닌 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열이 자연 발생적인 것이다. 그러나, 사람의 손에 의한 임의의 조작은 그 용어를 본원에 사용되는 대로 "자연 발생적" 피험 대상을 "분리된" 피험 대상으로 만들 수 있다.

[0078] 본원에 사용된 "핵산", "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산 분자"라는 용어들은 데옥시리보핵산 (DNA), 리보핵산 (RNA), 올리고뉴클레오티드, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 생성된 단편, 및 결찰, 절제, 엔도뉴클레아제 작용 및 엑소뉴클레아제 작용 중의 어느 하나에 의해 생성된 단편들 중의 어느 하나를 의미한다. 핵산은 자연 발생적 뉴클레오티드 (예컨대, 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드), 또는 자연 발생적 뉴클레오티드의 유사물 (자연 발생적 뉴클레오티드의  $\alpha$ -에난티오머 형태), 또는 이들의 조합인 단량체들을 포함할 수 있다. 변형된 뉴클레오티드는 당 부분 및/또는 피리미딘 또는 퓨린 염기 부분에 변형을 가질 수 있다. 당의 변형으로는 하나 이상의 히드록실기를 할로겐, 알킬기, 아민 및 아지도기로 대체하거나, 당은 에테르 또는 에스테르로서 작용될 수 있다. 더욱이, 전체 당 부분은 아자-당 및 탄소환 당 유사물과 같이 입체적으로 및 전자적으로 유사한 구조로 대체될 수 있다. 염기 부분에서의 변형의 예로는 알킬화 퓨린 및 피리미딘, 아실화 퓨린 또는 피리미딘, 또는 기타 널리 알려진 복소환 치환체가 있다. 핵산 단량체는 포스포디에스테르 결합 또는 그러한 연결체의 유사물에 의해 연결될 수 있다. 포스포디에스테르 연결체의 유사물로는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포르아닐리데이트, 포스포르아미데이트 등이 있다. "핵산"이란 용어는 또한 소위 "펩티드 핵산"을 포함하는데, 이것은 폴리아미드 주체에 부착된 자연 발생적 또는 변형된 핵산 염기를 포함한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0079] "작용적으로 연결된 (operatively linked)"이란 용어는 두 핵산 영역 사이의 관계를 설명할 때, 영역들이 그의 도된 방식으로 기능하도록 하는 관계로 위치하는 병치를 의미한다. 예컨대, 암호 서열에 "작용적으로 연결된" 제어 서열은 암호 서열의 발현이 예컨대, 적합한 분자 (예컨대, 인듀서 및 폴리머라제)가 제어 또는 조절 서열 (들)에 결합될 때와 같이 제어 서열과 양립할 수 있는 조건 하에 달성되도록 하는 방식으로 결찰될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, "작용적으로 연결된"이란 용어는 상기 암호 서열의 전사가 제어되고 그 프로모터에 의해 조절되도록 하는 방식으로 암호 서열에 연결되는 프로모터를 의미한다. 암호 서열에 프로모터를 작용적으로 연결하는 기술은 당해 분야에 알려져 있다; 당해 암호 서열에 상대적인 정확한 배향 및 위치는 특히 프로모터의

특정 성질에 의존된다.

[0080] 따라서, "작용적으로 연결된"이란 용어는 상기 뉴클레오티드 서열의 전사가 상기 프로모터 영역에 의해 제어되고 조절되는 방식으로 뉴클레오티드 서열에 연결되는 프로모터 영역을 의미한다. 유사하게, 뉴클레오티드 서열은 그것이 작용적으로 연결되는 프로모터의 "전사적 제어"하에 있는 것으로 언급된다.

[0081] "작용적으로 연결된"이란 용어는 상기 뉴클레오티드 서열의 전사의 종결이 상기 전사 종결 서열에 의해 제어되는 방식으로 뉴클레오티드 서열에 연결되는 전사 종결 서열을 의미한다. 일부 구현예에서, 전사 종결 서열은 RNA 폴리머라제 III에 의한 전사를 일으켜 종결 서열 TTTTTT에서 세 번째 또는 네 번째 T에서 종결되는 서열을 포함한다. 그러므로, 초기의 소형 전사체는 통상 3' 말단에 3 또는 4개의 U를 가진다.

[0082] 두 핵산 또는 단백질 서열과 관련하여 "동일성 비율 (percent identity)" 및 "동일한 비율 (percent identical)"이란 문구는 하기 서열 비교 알고리즘 중의 하나를 사용하거나 시각적 검사에 의해 측정되는 바와 같이, 최대 상응성에 대해 비교하고 정렬할 때, 일부 구현예에서는 60% 이상, 일부 구현예에서는 70% 이상, 일부 구현예에서는 80% 이상, 일부 구현예에서는 85% 이상, 일부 구현예에서는 90% 이상, 일부 구현예에서는 95% 이상, 일부 구현예에서는 96% 이상, 일부 구현예에서는 97% 이상, 일부 구현예에서는 98% 이상, 및 일부 구현예에서는 99% 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 동일성을 가지는 두 개 이상의 서열 또는 아서열을 의미한다. 동일성 비율은 일부 구현예에서는 약 10개 이상의 잔기 길이인 서열 영역에 걸쳐 존재하며, 일부 구현예에서는 약 20개 이상의 잔기 길이인 영역에 걸쳐 존재하며, 일부 구현예에서는 약 50개 이상의 잔기 길이인 영역에 걸쳐 존재하며, 일부 구현예에서는 약 100개 이상의 잔기 길이인 영역에 걸쳐 존재하며, 일부 구현예에서는 약 150개 이상의 잔기 길이인 영역에 걸쳐 존재한다. 일부 구현예에서는, 동일성 비율이 암호 영역 또는 전체 miRNA와 같이 주어진 영역의 전체 길이에 걸쳐 존재한다.

[0083] 서열 비교를 위해, 통상 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 참조 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 시험 및 참조 서열이 컴퓨터에 입력되고, 필요한 경우 아서열 등가물이 지정되며, 서열 알고리즘 프로그램 매개변수가 지정된다. 서열 비교 알고리즘은 지정된 프로그램 매개변수에 기초하여 참조 서열에 비교한 시험 서열(들)에 대한 서열 동일성 비율을 계산한다.

[0084] 비교를 위해 서열들의 최적 배열은 예컨대, 문헌 [Smith & Waterman, 1981]<sup>33</sup>에 기재된 국부적 상동성 알고리즘에 의해, 문헌 [Needleman & Wunsch, 1970]<sup>34</sup>에 기재된 상동성 배열 알고리즘에 의해, 문헌 [Pearson & Lipman, 1988]<sup>35</sup>에 기재된 유사성 검색 방법에 의해, 상기 알고리즘들의 컴퓨터화된 실행 (미국 캘리포니아 샌디에고 소재의 액셀리스 인코포레이티드에서 입수 가능한 GCG<sup>®</sup> 위스콘신 패키지<sup>®</sup>에서의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA)에 의해, 또는 시각적 검사에 의해 수행할 수 있다. 일반적으로 문헌 [Ausubel *et al.*, 1989]<sup>36</sup> 참조.

[0085] 서열 동일성 및 서열 유사성 비율을 측정하는 데 적합한 알고리즘의 한 가지 예가 문헌 [Altschul *et al.*, 1990]<sup>37</sup>에 기재된 BLAST 알고리즘이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 월드 와이드 웹을 통해 내셔널 센터 포 바이오테크놀로지 정보를 통해 공적으로 입수 가능하다. 이 알고리즘은 문제의 서열에서 길이  $W$ 의 짧은 단어를 확인함으로써 높은 수치로 기록되는 서열쌍 (HSP)을 먼저 확인하는 것을 포함하는데, 이것은 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어와 배열될 때 일부의 양의 값의 역치값 T와 일치하거나 T를 충족시킨다. T는 역치의 이웃말로서 언급된다<sup>37</sup>. 상기 초기의 이웃말 히트는 검색을 개시하는 종자로서 작용하여 그들을 포함하는 더 긴 HSP를 발견한다. 단어 히트는 누적 배열치가 증가될 수 있는 한 각 서열을 따라 두 방향에서 연장된다. 누적 수치는 뉴클레오티드 서열의 경우 매개변수 M (한 쌍의 정합 잔기에 대한 보상치; 항상  $>0$ ) 및 N (부정합 잔기에 대한 벌칙 수치; 항상  $<0$ )을 사용하여 계산한다. 아미노산 서열의 경우, 기록용 매트릭스를 사용하여 누적 수치를 계산한다. 각 방향으로 단어 히트의 연장은, 누적 배열 수치가 그 최대 달성치로부터 양 X만큼 하락하거나, 누적 수치가 하나 이상의 음으로 기록되는 잔기 배열의 축적으로 인해 0 이하가 되거나, 또는 두 서열의 말단에 도달될 때 중지된다. BLAST 알고리즘 매개변수  $W$ , T 및 X는 배열의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오티드 서열용)은 디폴트로서 단어 길이 ( $W$ ) 11, 기대값 (E) 10, 컷오프 100, M = 5, N = -4, 및 두 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 단어 길이 ( $W$ ) 3, 기대값 (E) 10, 및 BLOSUM62 기록용 매트릭스를 사용한다.<sup>38</sup>

[0086] 서열 동일성 비율을 계산하는 것 외에, BLAST 알고리즘은 또한 두 서열들 사이의 유사성의 통계적 분석을 수행한다. 예컨대, 문헌 [Karin & Altschul 1993]<sup>39</sup> 참조. BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성의 한 가지 척

도는 최소 확률 합계 (P(N))인데, 이것은 두 개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열들 사이의 정합이 우연히 일어날 확률의 표시를 제공한다. 예컨대, 시험 핵산 서열은 참조 핵산 서열에 대한 시험 핵산 서열의 비교에서 최소 확률 합계가 일부 구현예에서는 약 0.1 미만이고, 일부 구현예에서는 약 0.01이며, 일부 구현예에서는 약 0.001 미만이면 참조 서열과 유사한 것으로 간주된다.

[0087] 두 개의 뉴클레오티드 서열과 관련하여 "실질적으로 동일한 (substantially identical)"이란 용어는 하기 서열 비교 알고리즘 중의 하나를 사용하거나 시각적 검사에 의해 측정되는 바와 같이, 최대 상응성에 대해 비교하고 정렬할 때, 일부 구현예에서는 약 70% 이상, 일부 구현예에서는 약 75% 이상, 일부 구현예에서는 약 80% 이상, 일부 구현예에서는 약 85% 이상, 일부 구현예에서는 약 90% 이상, 일부 구현예에서는 약 95% 이상, 일부 구현예에서는 약 97% 이상, 및 일부 구현예에서는 약 99% 이상의 뉴클레오티드 동일성을 가지는 두 개 이상의 서열 또는 아서열을 의미한다. 일례로, 실질적인 동일성은 17개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 18개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 19개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 20개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 21개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 22개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 23개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 24개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 25개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 26개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 27개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 30개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 50개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 75개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 100개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 일부 구현예에서는 약 150개 잔기 이상의 뉴클레오티드 서열에서, 및 또 다른 실시예에서는 완전한 암호 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에서 존재한다. 일부 구현예에서는, 다형태성 서열이 실질적으로 동일한 서열일 수 있다. "다형태성 (polymorphic)"이란 용어는 군집내에 2개 이상의 유전적으로 결정된 또 다른 서열 또는 대립 유전자의 발생을 의미한다. 대립 유전자의 차이는 하나의 염기쌍만큼 작을 수 있다. 그럼에도 불구하고, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 다형태성 서열이 동일한 유전자에 상응한다는 것을 인지할 수 있다.

[0088] 두 개의 뉴클레오티드 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 표시는 두 개의 문자가 엄중 조건 하에 서로에게 특이적으로 또는 실질적으로 하이브리드된다는 것이다. 핵산 하이브리드화와 관련하여, 비교되는 두 개의 핵산 서열은 "프로브 서열" 및 "시험 서열로 지정될 수 있다. "프로브 서열"은 참조 핵산 문자이고, "시험 서열"은 핵산 문자의 이질적인 군집 내에서 종종 발견되는 시험 핵산 문자이다.

[0089] 하이브리드화 연구 또는 분석에 이용되는 예시적인 뉴클레오티드 서열로는 일부 구현예에서는 본원에 개시되는 주제의 핵산 문자의 약 14 내지 40개 이상의 뉴클레오티드 서열에 상보적이거나 그 서열을 모방하는 프로브 서열을 들 수 있다. 일례로, 프로브는 14 내지 20개 뉴클레오티드, 또는 필요한 경우 훨씬 더 긴 뉴클레오티드, 예컨대, 30, 40, 50, 60, 100, 200, 300 또는 500개 뉴클레오티드 또는 주어진 유전자의 전길이까지를 포함한다. 그러한 단편들은 예컨대, 화학 합성에 의해 단편을 직접 합성함으로써, 핵산 증폭 기술의 응용에 의해, 또는 재조합 생산용 재조합 백터내로 선택된 서열을 도입시킴으로써 쉽게 제조할 수 있다.

[0090] "표적으로 하는 (targeted)"이란 문구는 "...에 특이적으로 하이브리드되는"의 의미를 포함하는데, 후자의 문구는 그 서열이 복합 핵산 혼합물 (예컨대, 총 세포 DNA 또는 RNA)에 존재할 때 엄중 조건 하에 특정 뉴클레오티드 서열에만 문자를 결합, 이중체 형성 또는 하이브리드화하는 것을 의미한다.

[0091] 비한정적 실시예에 의해, 하이브리드화는 5x SSC, 4x SSC, 3x SSC, 2x SSC, 1x SSC 또는 0.2x SSC에서 약 1시간, 2시간, 5시간, 12시간 또는 24시간 이상 동안 수행할 수 있다 (SSC 완충제와 기타 하이브리드화 조건의 설명에 대해서는 문헌 [Sambrook & Russell, 2001] 참조). 하이브리드화의 온도는 반응의 엄중성을 조정하기 위해, 예컨대, 약 25°C (실온)로부터 약 45°C, 50°C, 55°C, 60°C 또는 65°C까지 증가될 수 있다. 하이브리드화 반응은 엄중성에 영향을 끼치는 또 다른 작용제를 포함할 수도 있는데; 예컨대, 50% 포름아미드의 존재 하에 수행된 하이브리드화는 정해진 온도에서 하이브리드화의 엄중성을 증가시킨다.

[0092] 하이브리드화 반응 다음에는 1회 세척 단계, 또는 동일하거나 상이한 염도 및 온도일 수 있는 2회 이상의 세척 단계가 실시될 수 있다. 예컨대, 세척의 온도는 엄중성을 조정하기 위해 약 25°C (실온)로부터 약 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 또는 그 이상까지 증가될 수 있다. 세척 단계는 세제 (예, SDS)의 존재 하에 수행할 수 있다. 예컨대, 하이브리드화 이후에는 2x SSC, 0.1% SDS에서 약 20분 동안 각각 65°C에서 2회의 세척 단계가 실시될 수 있고, 선택적으로 2회의 추가 세척 단계는 0.2x SSC, 0.1% SDS에서 약 20분 동안 각각 65°C에서 실시될

수 있다.

[0093] 다음은 본원에 개시되는 주제의 참조 뉴클레오티드 서열과 실질적으로 동일한 상동성 뉴클레오티드 서열을 클로닝하기 위해 사용할 수 있는 하이브리드화 및 세척 조건의 예이다: 프로브 뉴클레오티드 서열은 일 실시예에서 50°C에서 7% 나트륨 도데실 살레이트 (SDS), 0.5M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA) 중에서 표적 뉴클레오티드 서열에 하이브리드시킨 다음, 50°C에서 2X SSC, 0.1% SDS에 세척하거나; 일부 구현예에서는, 프로브와 시험 서열은 50°C에서 7% 나트륨 도데실 살레이트 (SDS), 0.5M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA 중에서 하이브리드시킨 다음, 50°C에서 1X SSC, 0.1% SDS에 세척하거나; 일부 구현예에서는, 프로브와 시험 서열은 50°C에서 7% 나트륨 도데실 살레이트 (SDS), 0.5M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA 중에서 하이브리드시킨 다음, 50°C에서 0.5X SSC, 0.1% SDS에 세척하거나; 일부 구현예에서는, 프로브와 시험 서열은 50°C에서 7% 나트륨 도데실 살레이트 (SDS), 0.5M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA 중에서 하이브리드시킨 다음, 50°C에서 0.1X SSC, 0.1% SDS에 세척하거나; 또 다른 실시예에서는, 프로브와 시험 서열은 50°C에서 7% 나트륨 도데실 살레이트 (SDS), 0.5M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA 중에서 하이브리드시킨 다음, 65°C에서 0.1X SSC, 0.1% SDS에 세척한다.

[0094] 추가의 예시적인 업종 하이브리드화 조건으로는 50% 포름아미드, 10x 텐하르츠 (0.2% 피콜, 0.2% 폴리비닐피롤리돈, 0.2% 소 혈청 알부민) 및 200 mg/ml의 변성된 담체 DNA, 예컨대, 전단된 연어 정자 DNA를 포함하거나 이들로 구성되는 용액에서 42°C에서 하루밤 동안 하이브리드화한 다음, 2x SSC, 0.1% SDS에 약 20분 동안 각각 65°C에서 2회 세척 단계, 및 0.2x SSC, 0.1% SDS에 약 20분 동안 각각 65°C에서 2회 세척 단계를 실시하는 것이다.

[0095] 하이브리드화는 용액 중에서 두 핵산을, 또는 용액 중의 한 핵산을 고체 지지체, 예컨대, 필터에 부착된 핵산에 하이브리드화하는 것을 포함할 수 있다. 하나의 핵산이 고체 지지체 상에 있을 경우, 하이브리드화 이전에 사전 하이브리드화 단계를 수행할 수 있다. 사전 하이브리드화는 하이브리드화와 동일한 용액 및 동일한 온도 (그러나 상보적 폴리뉴클레오티드 가닥이 없이)에서 약 1 시간, 3 시간 또는 10 시간 이상 동안 수행할 수 있다.

[0096] 따라서, 본 발명의 개시 사항의 검토 시에, 업종 조건은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 알려져 있거나, 또는 과도한 실험 없이 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 결정될 수 있다. <sup>36, 40-44</sup>

[0097] "...에 실질적으로 하이브리드되는"이란 문구는 프로브 핵산 분자와 표적 핵산 분자 사이의 상보적 하이브리드화를 의미하며, 하이브리드화 배지의 업종성을 감소시켜 목적하는 하이브리드화를 달성함으로써 수용될 수 있는 소수의 부정합을 포함한다.

[0098] "표현형"이란 용어는 예컨대, 어느 하나의 형질 또는 어느 형질군을 가진 세포 또는 유기체의 전체 물리적, 생화학적 및 생리학적 구성을 의미한다. 그런 의미로, 표현형은 세포 또는 유기체 내의 유전자의 발현으로부터 기인하며, 잠재적으로 관찰하거나 분석할 수 있는 형질에 관한 것이다.

[0099] 본원에 사용된 "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드"란 용어들은 호환적으로 사용되는 것들로서, 그 크기 또는 기능에 상관 없이 20개의 단백질 아미노산 또는 아미노산 유사물의 중합체를 의미한다. "단백질"은 종종 비교적 큰 폴리펩티드와 관련하여 사용되고, "펩티드"는 종종 작은 폴리펩티드와 관련하여 사용되지만, 당해 분야에서 상기 용어들의 용례는 중첩되고 변화된다. 본원에 사용된 "폴리펩티드"란 용어는 달리 언급하지 않는 한, 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질을 의미한다. 본원에 사용된 "단백질", "폴리펩티드" 및 "펩티드"란 용어들은 유전자 산물을 언급할 때 본원에서 호환적으로 사용된다. "폴리펩티드"란 용어는 효소를 포함하여 모든 기능의 단백질을 포함한다. 따라서, 예시적 폴리펩티드로는 유전자 산물, 자연 발생 단백질, 상동체, 오르토로그 (ortholog), 파라로그 (paralog), 단편 및 이들의 기타 동가물, 변형체 및 유사물이 있다.

[0100] 참조 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때 "폴리펩티드 단편" 또는 "단편"이란 용어는 아미노산 잔기가 참조 폴리펩티드 자체와 비교할 때 결실되나, 잔존 아미노산 서열이 통상 참조 폴리펩티드의 상응하는 위치와 동일한 폴리펩티드를 의미한다. 그러한 결실은 참조 폴리펩티드의 아미노 말단 또는 카르복시 말단, 또는 양자 모두에서 발생할 수 있다. 단편들은 통상 5, 6, 8 또는 10개 이상의 아미노산 길이, 14개 이상의 아미노산 길이, 20, 30, 40 또는 50개 이상의 아미노산 길이, 75개 이상의 아미노산 길이, 또는 100, 150, 200, 300, 500개 이상의 아미노산 길이를 가진다. 단편은 참조 폴리펩티드의 생물학적 활성을 하나 이상 보유할 수 있다. 또한, 단편들은 아단편이 그것이 유래한 영역의 기능을 보유하는 특이 영역의 아단편을 포함할 수 있다.

[0101] 본원에 사용되는 "프라이머"라는 용어는 일부 구현예에서는 2개 이상의 태옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클

레오티드, 일부 구현예에서는 3개 이상, 일부 구현예에서는 8개 이상, 및 일부 구현예에서는 엑손 또는 인트론 영역의 약 20개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 서열을 의미한다. 그러한 올리고뉴클레오티드는 일부 구현예에서는 10개 내지 30개의 염기 길이이다.

[0102] "정제된 (purified)"이란 용어는 존재하는 우세 종인 (즉, 몰 기준으로 조성물내 다른 어떤 개별종보다 더 풍부 함) 목적 종을 의미한다. "정제된 분획 (purified fraction)"은 목적 종이 존재하는 모든 종의 약 50% 이상 (몰 기준으로)을 포함하는 조성물이다. 용액 또는 분산액 중의 종들의 순도를 결정함에 있어서, 종들이 용해 또는 분산되는 용매 또는 매트릭스는 통상 그러한 결정에 포함되지 않으며; 대신에, 용해되거나 분산된 종들만이 고려된다. 일반적으로, 정제된 조성물은 조성물에 존재하는 모든 종의 약 80% 이상, 존재하는 모든 종의 85%, 90%, 95% 또는 99% 이상을 포함하는 한 가지 종을 가질 것이다. 목적 종은 조성물이 단일종으로만 구성되는 본질적인 균질성 (통상의 검출 방법으로는 오염종이 조성물에서 검출될 수 없음)을 가질 때까지 정제할 수 있다. 폴리펩티드의 순도는 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 알려진 다수의 방법, 예컨대, 아미노 말단 아미노산 서열 분석, 젤 전기영동 및 질량 분광분석법에 의해 측정할 수 있다.

[0103] "참조 서열 (reference sequence)"이란 서열 비교의 근거로서 사용되는 지정된 서열이다. 참조 서열은 예컨대, 전길이의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 분절로서 보다 큰 서열의 아세트이거나 완전 서열을 포함할 수 있다. 두 단백질은 각각 (1) 두 단백질 사이에 유사한 서열 (즉, 완전 단백질 서열의 부분)을 포함하고, (2) 두 단백질 사이에 분기하는 서열을 추가로 포함할 수 있기 때문에, 두 (또는 그 이상) 단백질 사이의 서열 비교는 통상 "비교 창" (상기 정의함)에 대해 두 단백질의 서열을 비교하여 서열 유사성의 국부 영역을 확인하고 비교함으로써 수행된다.

[0104] "조절 서열"이란 용어는 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 일반 명칭으로서, 개시 신호, 인핸서, 조절자, 프로모터 및 종결 서열과 같이 이들이 작용적으로 연결되는 암호 및 비암호 서열의 발현에 영향을 끼칠 필요가 있거나 영향을 끼치는 것이 바람직한 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 예시적 조절 서열은 문헌 [Goeddel, 1990<sup>45</sup>]에 기재되어 있으며, 그 예로는 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 초기 및 후기 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로박이러스 죽초기 프로모터, CMV 최소 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, 그 발현이 T7 RNA 폴리머라제에 의해 유도되는 T7 프로모터, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코트 단백질에 대한 제어 영역, 3-포소포글리세레이트 키나제 또는 기타 당분해 효소에 대한 프로모터, 산 포스파타제, 예컨대, Pho5의 프로모터, 효모의  $\alpha$ -교배 인자의 프로모터, 바클로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터 및 원핵 세포 또는 진핵 세포 또는 그 바이러스의 유전자의 발현을 제어하는 것으로 알려진 서열, 및 이들의 다양한 조합을 들 수 있다. 그러한 제어 서열의 성질 및 사용은 숙주 유기체에 따라 달라질 수 있다. 원핵세포에서는, 그러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함한다. "조절 서열 (regulatory sequence)"이란 용어는 최소한 그 존재가 발현에 영향을 끼칠 수 있고 그 존재가 유용한 추가 요소들, 예컨대, 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수도 있는 요소들을 포함하는 것이다.

[0105] 특정 구현예에서는, 폴리뉴클레오티드 서열의 전사는 발현을 의도하고 있는 세포 유형에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 제어하는 프로모터 서열 (또는 기타 조절 서열)의 제어 하에 이루어진다. 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 자연 발생형의 발현을 제어하는 그러한 서열과 동일하거나 또는 상이한 조절 서열의 제어 하에 존재할 수 있음도 이해될 것이다. 일부 구현예에서는, 프로모터 서열은 CMV 최소 프로모터, 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 및  $\alpha$ -미오신 중쇄 (MHC) 뼈프플로모터로 구성되는 군으로부터 선택된다. 예컨대, 골격근에서 유전자 발현을 유도하는 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터는 현재 이용 가능한 형질전환 기술을 사용하여 골격근을 비롯한 조직에서 miR-1, miR-133 또는 miR-206과 같은 miRNA를 발현시키는 데 사용할 수 있다. 임의의 프로모터 (예컨대, 본원에 열거된 프로모터)에 대해 확인된 전체 프로모터를 이용할 필요는 없으며, 그 기능적 유도체를 사용할 수 있다는 것이 이해된다. 본원에 사용된 "기능적 유도체 (functional derivative)"란 문구는 또 다른 작용적으로 연결된 핵산 분자의 전사를 유도하기에 충분한 서열을 포함하는 핵산 서열을 의미한다. 그러한 의미로서, "기능적 유도체"는 그 용어가 본원에서 정의되는 대로 최소 프로모터로서 기능할 수 있다.

[0106] 폴리뉴클레오티드 서열의 전사의 종결은 통상 작용적으로 연결된 전사 종결 서열 (예컨대, RNA 폴리머라제 III 종결 서열)에 의해 조절된다. 특정 예에서, 전사 종결인자는 또한 정확한 mRNA 폴리아데닐화를 담당한다. 3' 비 전사된 조절 DNA 서열은 일부 구현예에서는 약 50 내지 약 1,000개, 그리고 일부 구현예에서는 약 100 내지 약 1,000개 뉴클레오티드 염기쌍을 포함하며, 전사 및 해독 종결 서열을 보유한다. 일부 구현예에서는, RNA 폴리머라제 III 종결 서열이 뉴클레오티드 서열 TTTTTTT를 포함한다.

[0107] "리포터 유전자 (reporter gene)"란 용어는 그 존재 또는 활성에 의해 쉽게 검출될 수 있는 단백질을 암호화하

는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 의미하는데, 그 예로는 루시퍼라제, 형광성 단백질 (예컨대, 녹색 형광 단백질), 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제,  $\beta$ -갈اكت시다제, 분비된 태반 알칼리 포스파타제,  $\beta$ -락타마제, 인간 성장 호르몬 및 기타 분비된 효소 리포터를 들 수 있으나, 이들에 국한되는 것은 아니다. 일반적으로, 리포터 유전자는 세포(들)의 분석에 의해, 예컨대, 세포(들)의 직접 형광 분석, 방사성 동위원소 분석 또는 분광 분석에 의해 신호 분석을 위해 그리고 통상적으로 세포들을 죽일 필요 없이 검출할 수 있는, 숙주 세포에 의해 생성되지 않는 폴리펩티드를 암호화한다. 특정 예에서, 리포터 유전자는 정성적, 정량적 또는 반정량적 기능 또는 전사 활성화에 의해 검출할 수 있는, 숙주 세포의 형광분석적 성질에서의 변화를 산출하는 효소를 암호화 한다. 예시적인 효소로는 에스터라제,  $\beta$ -락타마제, 포스파타제, 퍼옥시다제, 프로테아제 (조직 플라스미노겐 활성화인자 또는 유로키나제), 및 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있거나 또는 장래에 개발되는 적합한 발색원 또는 형광원 기질에 의해 그 기능이 검출될 수 있는 기타 효소를 들 수 있다.

[0108] 본원에 사용되는 "서열 분석 (sequencing)"이란 용어는 통상의 수동 또는 자동 실험실 기술을 사용하여 DNA, RNA, 또는 단백질 표적 샘플의 핵산 또는 아미노산의 정렬된 선형 서열을 측정하는 것을 의미한다.

[0109] 본원에 사용된 "실질적으로 순수한 (substantially pure)"이란 용어는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드가 그 자연적인 상태에서 연합되어 있는 서열 및 문자들, 및 분리 과정에서 사용된 그들 문자들이 실질적으로 부재한다는 것을 의미한다. "실질적으로 부재한다 (substantially free)"라는 용어는 샘플 중에 자연계에서 연합되어 있는 재료 및 화합물이 일 구현예에서는 50% 이상, 일부 구현예에서는 70% 이상, 일부 구현예에서는 80% 이상, 및 일부 구현예에서는 90% 이상 부재한다는 것을 의미한다.

[0110] 본원에 사용된 "표적 세포 (target cell)"란 용어는 핵산 서열 또는 폴리펩티드를 삽입하거나 또는 비변형 세포에 표준인 것으로 알려진 조건으로부터 변형을 수행하고자 하는 세포를 의미한다. 표적 세포 내로 도입되는 핵산 서열은 다양한 길이를 가질 수 있다. 또한, 핵산 서열은 플라스미드 또는 기타 벡터의 요소로서 또는 네이키드 서열로서 표적 세포 속으로 들어갈 수 있다.

[0111] 본원에 사용된 "표적 유전자 (target gene)"란 용어는 본원에 개시되는 주제의 방법 및 조성물을 사용하여 조절하기 위해 표적으로 삼는 유전자를 의미한다. 그러므로, 표적 유전자는 그 발현 레벨이 mRNA 또는 폴리펩티드 레벨로 miRNA에 의해 하향 조절되는 핵산 서열을 포함한다. 유사하게, "표적 RNA" 또는 "표적 mRNA"란 용어는 miRNA가 결합하여 표적 유전자의 발현의 조절을 유도할 표적 유전자의 전사체를 의미한다. 표적 유전자는 세포로부터 유래한 유전자, 내재성 유전자, 형질전환 유전자, 또는 병원체, 예컨대, 그 감염 후의 세포에 존재하는 바이러스의 유전자와 같이 외래성 유전자일 수 있다. 표적 유전자를 포함하는 세포는 식물, 동물, 원생동물, 바이러스, 박테리아 또는 진균류와 같은 임의의 유기체로부터 유래하거나 또는 유기체에 포함될 수 있다.

[0112] 본원에 사용된 "전사 (transcription)"란 용어는 유전자의 암호 서열에 존재하는 구조 정보의 RNA로서 발현을 유도하는 유전자와 RNA 폴리머라제의 상호작용을 포함하는 세포 과정을 의미한다. 이 과정은 다음 단계를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다: (a) 전사 개시; (b) 전사체 연장; (c) 전사체 접속; (d) 전사체 캐핑; (e) 전사체 종결; (f) 전사체 폴리아데닐화; (g) 전사체의 핵 배출; (h) 전사체 편집; 및 (i) 전사체의 안정화.

[0113] 본원에 사용된 "전사 인자"라는 용어는 유전자의 발현을 조절하기 위하여 유전자에 결합하거나, 유전자의 RNA 전사체에 결합하거나, 또는 유전자 또는 RNA 전사체에 결합하는 또 다른 단백질에 결합하는 세포질 또는 핵 단백질, 또는 유전자 또는 RNA 전사체에 다시 결합하는 또 다른 단백질을 의미한다. 그러한 조절은 추가로 다른 메커니즘에 의해 달성될 수 있다; "유전자용 전사 인자"의 본질은 어떤 방식으로 유전자의 전사 레벨을 변화시키는 인자에 속한다.

[0114] "형질감염 (transfection)"이란 단어는 특정 예에서는 핵산-매개의 유전자 전이를 포함하는, 핵산, 예컨대, 발현 벡터를 수용체 세포 내로 도입시키는 것을 의미한다. "형질전환 (transformation)"이란 용어는 외래 핵산의 세포내 흡수의 결과로서 세포의 유전자형이 변화되는 과정을 의미한다. 예컨대, 형질전환된 세포는 본원에 개시되는 주제의 miRNA를 발현시킬 수 있다.

[0115] 본원에 사용된 "유의 수준 (significance)" 또는 "유의 수준의 (significant)"란 용어는 2개 이상의 실체 사이의 비무작위적 연합인 확률의 통계적 분석에 관한 것이다. 관계가 "유의 수준"인지 "유의 수준"을 가지고 있는지를 측정하기 위해 데이터의 통계적 조작을 수행하여 "p-값"으로 표현된 확률을 계산할 수 있다. 사용자 정의의 컷오프점 이하로 감소한 p-값은 유의 수준으로 간주된다. 일례로, 0.05 이하, 일부 구현예에서는 0.01 미만, 일부 구현예에서는 0.005 미만, 및 일부 구현예에서는 0.001 미만인 p-값이 유의 수준으로 간주된다.

[0116] 본원에 사용된 "표적 RNA"란 문구는 조정용 표적인 RNA 분자 (예컨대, 유전자 산물을 암호화하는 mRNA 분자)를

의미한다. 일부 구현예에서, 표적 RNA는 표적 유전자에 의해 암호화된다. 유사하게, "표적 부위 (target site)"란 문구는 표적 부위에 상보적인 안티센스 가닥내에 각종 서열들을 포함하는 miRNA 구성체에 의해 매개되는 절단을 위해 "표적화된" 표적 RNA내의 서열을 의미한다. 또한, 유사하게, "표적 세포"란 문구는 표적 RNA를 발전시키고 miRNA를 도입시키고자 하는 세포를 의미한다. 표적 세포는 일부 구현예에서는 미오사이트이다.

[0117] miRNA는 miRNA와 RNA 분자가 상호작용하기에 충분한 조건 하에 RNA 분자의 발현을 조절할 것으로 기대되는 RNA 분자에 대해 충분한 뉴클레오티드 유사성을 가진다면 RNA 분자를 "표적으로 하는" 것이다. 일부 구현예에서, 상호작용은 미오사이트 내에서 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 상호작용은 생리적 조건 하에 일어난다. 본원에 사용된 "생리적 조건"이란 문구는 미오사이트가 피험 대상의 일부 또는 피험 대상의 조직이든 또는 미오사이트가 시험관내에서 증식되든 미오사이트 내의 생체내 조건을 의미한다. 따라서, 본원에 사용된 "생리적 조건"이란 문구는 미오사이트가 피험 대상의 일부로서 또는 시험관내에서 성장될 때 노출될 수 있는 임의의 조건 하의 미오사이트내의 조건을 의미한다.

[0118] 본원에 사용된 "절단의 겸출가능한 레벨"이란 문구는 표적 RNA의 무작위적 분해에 의해 생성된 RNA의 배경 이상으로 절단 산물을 겸출하기에 충분한 표적 RNA의 절단 (및 절단된 RNA 산물의 형성)의 정도를 의미한다. 1 내지 5% 이상의 표적 RNA로부터 miRNA-매개의 절단 산물의 생성은 대부분의 겸출 방법에 대한 배경 이상으로 겸출하기에 충분하다.

[0119] "마이크로 RNA" 및 "miRNA"란 용어는 호환적으로 사용되는 것으로서, pri-miRNA, pre-miRNA, 또는 기능적 등가물로부터 생성되는 약 17 내지 24개 뉴클레오티드의 핵산 분자를 의미한다. miRNA는 외부에서 공급된 miRNA와 siRNA와 관련하여 이러한 특성은 다소 인공적일 수 있지만, 짧은 간섭 RNA (siRNA)를 사용하여 대조될 수 있다. 기억할만한 특징은 miRNA가 본원에 기재된 바와 같이 반드시 헤어핀 분자 상의 뉴클레아제 활성의 산물이고, siRNA는 완전 이중 가닥 RNA 분자 또는 헤어핀 분자로부터 생성될 수 있다는 점이다. miRNA와 관련된 추가의 정보뿐만 아니라 공지의 공개된 miRNA의 데이터베이스 및 데이터베이스에 대한 검색 수단이 본원에 참고로 인용하는 웰컴 트러스트 생거 인스티튜트 miRBase::Sequences 웹사이트에서 발견될 수 있다. 본원에 참고로 인용하는 문헌 [[The microRNA Registry](#), Griffiths-Jones S., NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111]도 참조할 것.

[0120] 본원에 사용된 "RNA"란 용어는 하나 이상의 리보뉴클레오티드 잔기를 포함하는 분자를 의미한다. "리보뉴클레오티드"란  $\beta$ -D-리보푸라노즈 부분의 2' 위치에 히드록실기를 가진 뉴클레오티드를 의미한다. 이 용어들은 이중 가닥 RNA, 단일 가닥 RNA, 이중 가닥과 단일 가닥 영역을 둘다 가진 RNA, 분리된 RNA, 예컨대, 부분적으로 정제된 RNA, 본질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA 및 재조합에 의해 생성된 RNA를 포함한다. 따라서, RNA로는 mRNA 전사체, miRNA 및 miRNA 전구체, 및 siRNA가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 본원에 사용된 "RNA"라는 용어는 또한 하나 이상의 뉴클레오티드의 첨가, 결실, 치환 및/또는 변경에 의해 자연 발생적 RNA와는 상이한 RNA인 변형된 RNA, 또는 유사 RNA를 포함한다. 그러한 변형으로는 예컨대, RNA의 말단(들)에 또는 내부적으로, 예컨대, RNA의 하나 이상의 뉴클레오티드에 비뉴클레오티드 물질의 첨가를 포함한다. 본원에 개시되는 주제의 RNA 분자 중의 뉴클레오티드는 또한 자연 발생적 뉴클레오티드 또는 화학 합성된 뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드와 같은 비표준 뉴클레오티드를 포함할 수도 있다. 이들 변형된 RNA는 자연 발생 RNA의 유사물로서 언급될 수 있다.

[0121] 본원에 사용된 "이중 가닥 RNA (double stranded RNA)"란 문구는 그 적어도 일부가 왓슨-크릭 염기쌍을 형성하는 이중체 형태인 RNA 분자를 의미한다. 그러한 의미로서, 상기 용어는 완전히 또는 부분적으로만 이중 가닥인 RNA 분자를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예시적인 이중 가닥 RNA로는 분자간 하이브리드화에 의해 부분적으로 또는 완전히 이중체 형태인 두 개 이상의 현저한 RNA 가닥을 포함하는 분자들을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 또한, 상기 용어는 분자내 하이브리드화에 의해 이중 가닥 영역 (예컨대, 헤어핀)을 형성할 수 있는 단일의 RNA를 포함하는 것이다. 따라서, 본원에 사용된 "분자간 하이브리드화" 및 "분자내 하이브리드화"란 문구는 이중체 형성에 관계된 뉴클레오티드가 상이한 분자 또는 동일한 분자에 각각 존재하는 이중 가닥 분자를 의미한다.

[0122] 본원에 사용된 "이중 가닥 영역"이란 문구는 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 이해될 수 있듯이 뉴클레오티드들 사이의 수소 결합을 통해 이중 가닥 형태로 존재하는 핵산 분자의 임의의 영역, 및 임의의 기타 핵산 이중체를 의미하는데, 상기 수소 결합으로는 시토신과 구아노신, 아데노신과 티미딘, 아데노신과 우라실 사이의 수소 결합하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 이중 가닥 영역의 길이는 약 15개의 연속 염기쌍으로부터 수천 개의 염기쌍까지 변화될 수 있다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 영역은 15개 이상의 염기쌍, 일부

구현예에서는 15개와 300개 사이의 염기쌍, 및 일부 구현예에서는, 15개와 약 60개 사이의 염기쌍일 수 있다. 상기한 바와 같이, 이중 가닥 영역의 형성은 문자간 하이브리드화 (즉, 2개 이상의 특정적인 RNA 분자를 포함)를 통해 또는 문자내 하이브리드화를 통해 상보적 RNA 가닥 (예컨대, 센스 가닥 및 안티센스 가닥)의 하이브리드화로부터 기인하는데, 상기 문자내 하이브리드화는 단일의 RNA 문자가 동일한 RNA 문자 상에서 서로에게 하이브리드될 수 있는 자체-상보적인 영역을 포함할 때 일어날 수 있다. 상기 자체-상보적 영역은 통상 문자내 하이브리드 이벤트가 당해 분야에서 "헤어핀" 또는 "스텝-루프 구조"로 언급되는 것을 형성하도록 짧은 뉴클레오티드 연장체 (예컨대, 약 5 내지 10개의 뉴클레오티드)에 의해 분리된다.

### III. 핵산

본원에 개시되는 주제에 따라 이용되는 핵산 문자는 미오사이트 유전자 산물을 암호화하는 핵산 문자뿐만 아니라, 본원에 개시되는 주제에 따라 미오사이트 유전자 (예컨대, miRNA 핵산 문자)의 발현을 조절하기 위해 사용되는 핵산 문자를 포함한다. 따라서, 본원에 개시되는 주제에 따라 이용되는 핵산 문자로는 본원에 개시된 핵산 문자를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨대, 본원에 이용되는 핵산 문자로는 miR-1 (UGGAAUGUAAGAAGUAUGUA; 서열번호 1), miR-133 (UUGGUCCCCUUCAACCAGCUGU; 서열번호 2), miR-206 (UGGAAUGUAAGGAAGGUGUGGG; 서열번호 3), miR-208 (AUAAGACGAGCAAAAGCUUGU; 서열번호 4), miR-22 (AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU; 서열번호 5), miR-26 (UUCAAGUAAUyCAGGAUAGGy(U); 서열번호 6), miR-29 (UAGCACCAUyUGAAAUCrGU(kUU); 서열번호 7), miR-30 (ykUwmAswysshhswyUvnvv(bC); 서열번호 8), miR-128 (UCACAGUGAACCGGUCUCUUUy; 서열번호 9), miR-143 (UGAGAUGAAGCACUGUAGCUA; 서열번호 10), 및 miR-145 (GUCCAGUUUUCCAGGAAUCCUU; 서열번호 11); 본원에 기재된 것들과 실질적으로 동일한 서열들 (예컨대, 일부 구현예에서는, 서열번호 1~11 중의 어느 것과 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 서열들); 및 이들의 아서열 및 연장된 서열들이 있으나, 이들에 국한되는 것은 아니다. 본원에 개시되는 주제는 또한 유전자, cDNA, 키메라 유전자, 및 개시된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함한다.

상기 및 본 명세서의 어딘가에서 사용되는 1 문자 뉴클레오티드 코드는 본원에 참고로 인용하는 문헌 [WIPO Standard ST.25 (1998), Appendix 2, Table 1, (M.P.E.P. 2422, Table 1)]에 따른 것이다. 구체적으로, 하기의 1 문자 코드는 표 1에 제시된 관련 뉴클레오티드(들)를 나타낸다. 괄호 안의 뉴클레오티드(들)은 존재하거나 부재할 수 있는 뉴클레오티드(들)을 의미하는 것이다. 또한, 도 21은 서열번호 5~11에 제시된 뉴클레오티드 순열에 근거하여 서열번호 5~11에 가능한 개개의 서열을 열거하고 있다.

### **표 1**

1 문자 뉴클레오티드 약어들

A	아데닌
G	구아닌
C	시토신
T	티민
U	우라실
k	G 또는 U/T
w	U/T 또는 A
m	C 또는 A
s	G 또는 C
h	A, C 또는 U/T
v	G, A 또는 C
b	C, G 또는 U/T
n	A, G, C 또는 U/T
y	C 또는 T/U

본원에 개시된 방법에 이용되는 예시적인 뉴클레오티드 서열은 서로 상보적인 서열로서, 상보적인 영역은 일부 구현예에서는 약 15개 내지 300 이상의 염기쌍, 및 일부 구현예에서는 약 15 내지 24개 이상의 염기쌍으로 이루어진 이중체를 형성할 수 있는 서열을 포함한다. 이중체의 한 가닥은 본원에 개시되는 주제의 핵산 문자의 핵산 서열을 가지는 15개 이상의 인접 염기로 이루어진 핵산 서열을 포함한다. 일례로, 이중체의 한 가닥은 15, 16, 17, 또는 18개 뉴클레오티드, 또는 필요에 따라 훨씬 더 긴, 예컨대, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오티드, 또는 본원에 기재되는 핵산 서열 중의 임의의 서열의 전길이까지를 포함한다.

그러한 단편들은 예컨대, 화학 합성에 의해 단편을 직접 합성함으로써, 핵산 증폭 기술을 적용함으로써, 또는 재조합 생성을 위해 선택된 서열을 재조합 벡터 내로 도입함으로써 쉽게 제조할 수 있다. "...에 특이적으로 하이브리드되는"이란 문구는 서열이 복합 핵산 혼합물 (예컨대, 총 세포 DNA 또는 RNA)에 존재할 때 염중 조건 하에 특정 뉴클레오티드 서열에만 한 문자가 결합, 이중체 형성 또는 하이브리드되는 것을 의미한다.

[0128] "아서열 (subsequences)이란 용어는 보다 긴 핵산 또는 아미노산 서열의 일부를 포함하는 핵산 문자 또는 아미노산 문자의 서열을 의미한다. 예시적인 아서열은 뉴클레아제 작용 후에 성숙 miRNA가 되는 뉴클레오티드를 포함하는 (이에 국한되는 것은 아님) pri-miRNA 또는 pre-miRNA ("miRNA 전구체")의 이중체 형성 영역 또는 miRNA 전구체 중의 단일 가닥 영역의 일부를 포함하는 서열이다.

[0129] "연장된 서열 (elongated sequence)"이란 용어는 핵산 내로 도입된 뉴클레오티드 (또는 기타 유사 문자)의 첨가를 의미한다. 예컨대, 폴리머라제 (예, DNA 폴리머라제)는 핵산 문자의 3' 말단에 서열을 추가할 수 있다. 또한, 뉴클레오티드 서열은 다른 DNA 서열들, 예컨대, 프로모터, 프로모터 영역, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 인트론 서열, 추가 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위 및 기타 암호 분절과 조합될 수 있다.

[0130] 본원에 개시되는 주제의 핵산은 클로닝, 합성, 재조합 변형, 돌연변이 유발 또는 상기 기술의 조합에 적용시킬 수 있다. 표준 재조합 DNA 및 문자 클로닝 기술을 사용하여 핵산을 분리하는 방법은 당해 분야에 알려져 있다. 예시적인 비한정적인 방법은 문헌 [Silhavy *et al.*, 1984<sup>46</sup>; Ausubel *et al.*, 1989<sup>36</sup>; Glover & Hames, 1995<sup>47</sup>; and Sambrook & Russell, 2001<sup>40</sup>]에 기재되어 있다. 부위 특이적으로 돌연변이를 유발하여 염기쌍 변화, 결실 또는 소형 삽입을 일으키는 방법 역시 공개 문헌 (Adelman *et al.*, 1983<sup>48</sup>; Sambrook & Russell, 2001<sup>40</sup>)에 예시된 대로 당해 분야에 공지되어 있다.

#### IV. miRNA-발현 벡터

[0132] 본원에 개시되는 주제의 일부 구현예에서, miRNA 문자 또는 miRNA 전구체 문자는 핵산 벡터 (일반적으로 재조합 벡터 또는 발현 벡터로 언급되기도 함) 내로 삽입된 전사 단위로부터 발현된다. 벡터를 사용하여 miRNA를 암호화하는 핵산 문자를 미오사이트 내로 전달하여 특이 유전자를 표적화할 수 있다. 재조합 벡터의 예로는 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터를 들 수 있다. 다양한 발현 벡터가 당해 분야에 공지되어 있다. 적합한 발현 벡터의 선택은 발현을 의도하는 세포 유형을 비롯하여 (이에 국한되는 것은 아님) 여러 인자에 근거하여 이루어질 수 있다.

[0133] "벡터"라는 용어는 그것이 연결되어 있는 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산을 의미한다. 벡터로는 그들이 연결되는 핵산의 자동 복제 및 발현을 할 수 있는 것들이 있다. 벡터가 작용적으로 연결되는 유전자들의 발현을 유도할 수 있는 벡터를 본원에서는 "발현 벡터"로 지칭한다. 일반적으로, 재조합 기술에 이용되는 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다. 그러나, 본원에 개시되는 주제는 동등한 기능을 수행하고 후속적으로 당해 분야에 공지되어 있는 다른 형태의 발현 벡터를 포함할 수 있다.

[0134] 본원에 사용된 "발현 벡터"라는 용어는 전사 종결 서열에 작용적으로 연결되는 당해 뉴클레오티드 서열에 작용적으로 연결된 프로모터를 포함하는, 적합한 숙주 세포에서 구체적인 뉴클레오티드 서열의 발현을 유도할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 그것은 통상 뉴클레오티드 서열의 적합한 해독에 필요한 서열을 포함하기도 한다. 당해 뉴클레오티드 서열을 포함하는 구성체는 키메라일 수 있다. 상기 구성체는 또한 자연 발생적이지만 이종 발현에 유용한 재조합 형태로 얻어지는 것일 수 있다. 뉴클레오티드 서열의 적합한 발현을 수행하도록 고안된 임의의 추가 서열을 포함하는 당해 뉴클레오티드 서열은 또한 "발현 카세트 (expression cassette)"로 지칭할 수도 있다.

[0135] 본원에 사용된 "이종 유전자 (heterologous gene)", "이종 DNA 서열", "이종 heterologous 서열", "외래 핵산 문자" 또는 "외래 DNA 분절"이란 용어들은 각각 의도된 숙주 세포에게는 외래성인 출처로부터 기원하거나, 동일한 출처로부터 유래한 것이라면 그 본래의 형태로부터 변형되는 서열을 의미한다. 따라서, 숙주 세포에서의 이종 유전자는 특정 숙주 세포에게는 내생적이나, 예컨대, 돌연변이 유발에 의해 또는 천연 전사 조절 서열로부터의 분리에 의해 변형되는 유전자를 포함한다. 상기 용어들은 또한 자연 발생적 뉴클레오티드의 비자연적으로 발생하는 다중 사본을 포함한다. 따라서, 상기 용어들은 세포에는 외래성 또는 이종성이거나, 구성 요소가 통상적으로는 발견되지 않는 숙주 세포 핵산 내의 위치에 있는 DNA 분절을 의미할 수 있다.

[0136] "프로모터" 또는 "프로모터 영역"이란 용어는 암호 서열에 대해 5'에 위치하여 암호 서열의 전사를 유도하는 기능을 하는 유전자내의 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 프로모터 영역은 전사 개시 부위를 포함하고, 추가로 하

나 이상의 전사 조절 요소를 포함할 수도 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시되는 주제의 방법은 RNA 폴리머제 III 프로모터를 이용한다.

[0137] "최소 프로모터 (minimal promoter)"는 기본 레벨의 전사가 일어날 수 있게 하는데 필요한 최소 요소를 가지는 뉴클레오티드 서열이다. 그러한 의미로서, 최소 프로모터는 완전 프로모터가 아니라, 실험 시스템에서 리포터 구성체의 전사의 기본 레벨을 유도할 수 있는 프로모터의 아서열이다. 최소 프로모터의 예로는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 최소 프로모터, 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 (HSV-tk) 최소 프로모터, 원숭이 바이러스 40 (SV40) 최소 프로모터, 인간  $\beta$ -액틴 최소 프로모터, 인간 EF2 최소 프로모터, 아데노바이러스 E1B 최소 프로모터, 및 열충격 단백질 (hsp) 70 최소 프로모터가 있으나, 이들에 국한되는 것은 아니다. 최소 프로모터는 종종 작용적으로 연결된 유전자의 전사에 영향을 끼치기 위해 하나 이상의 전사 조절 요소와 함께 증대시킨다. 예컨대, 세포 유형 특이적 또는 조직 특이적 전사 조절 요소를 최소 프로모터에 첨가하여 세포 유형 특이적 또는 조직 특이적 방식으로 작용적으로 연결된 뉴클레오티드 서열의 전사를 유도하는 재조합 프로모터를 생성시킬 수 있다. 본원에 사용된 "최소 프로모터"란 용어는 또한 RNA 폴리머라제 III 프로모터 (예컨대, H1, 7SL, 5S, 또는 U6 프로모터), 아데노바이러스 VA1 프로모터, 볼트 (Vault) 프로모터, 텔로머라제 RNA 프로모터 및 tRNA 유전자 프로모터를 포함하는 (이들에 국한되는 것은 아님) 본원에 개시되는 프로모터의 기능적 유도체도 포함한다.

[0138] 상이한 프로모터는 전사 조절 요소의 상이한 조합을 가진다. 유전자가 세포에서 발현되는지 여부는 유전자의 프로모터를 구성하는 특정 전사 조절 요소와, 세포의 핵 내에 존재하는 상이한 전사 인자의 조합에 의해 좌우된다. 그러한 의미로서, 프로모터는 종종 생체내 또는 시험관내에서의 그 기능적 활성에 따라 "구성적 (constitutive)", "조직 특이적", "세포 유형 특이적" 또는 "유도성 (inducible)" 프로모터로 분류된다. 예컨대, 구성적 프로모터는 유기체의 다양한 세포 유형에서 (일부 구현예에서는 모든 세포 유형에서) 유전자의 전사를 유도할 수 있는 프로모터이다. 예시적인 구성적 프로모터로는 특정 구성적 또는 "하우스키핑" 기능을 암호화하는 다음 유전자들: 하이포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HPRT), 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR; (Scharfmann *et al.*, 1991), 아데노신 디아미나제, 포스포글리세레이트 키나제 (PGK), 피루베이트 키나제, 포스포글리세레이트 뮤타제에 대한 프로모터들,  $\beta$ -액틴 프로모터 (Williams *et al.*, 1993 참조), 및 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 공지된 기타 구성적 프로모터를 들 수 있다. 한편, "조직 특이적" 또는 "세포 유형 특이적" 프로모터들은 유기체의 일부 조직 또는 세포 유형에서 전사를 유도하지만, 일부 또는 모든 다른 조직 또는 세포 유형에서는 불활성이다. 예시적인 조직 특이적 프로모터로는 아래에 상세히 기재되는 프로모터들뿐만 아니라, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 공지된 기타 조직 특이적 및 세포 유형 특이적 프로모터가 있다.

[0139] 프로모터와 관련하여 사용할 때, 본원에 사용된 "연결된 (linked)"란 용어는 프로모터 요소들이 함께 기능하여 작용적으로 연결된 뉴클레오티드의 전사를 유도하도록 하는 프로모터 요소의 물리적 근접성을 의미한다.

[0140] 본원에 사용된 "전사 조절 서열" 또는 "전사 조절 요소 (transcriptional regulatory element)"란 용어는 각각 조절성 전사 인자에 반응성을 가질 수 있는 프로모터 영역내의 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 반응성은 전사적 출력에서의 감소 또는 증가를 포함하고, 전사 조절 요소를 포함하는 뉴클레오티드 서열에 전사 인자를 결합시킴으로써 매개된다. 일부 구현예에서는, 전사 조절 서열이 전사 종결 신호로서 본원에서 언급되기도 하는 전사 종결 서열이다.

[0141] "전사 인자 (transcription factor)"란 용어는 일반적으로 RNA 폴리머라제, 전사 연관 인자 (TAFs), 크로마틴-리모델링 단백질, 및 유전자 전사에 영향을 끼치는 임의의 기타 관련 단백질을 포함하는 (이들에 국한되는 것은 아님), 전사 조절 요소 및 전사용 세포 성분과의 상호작용에 의해 유전자 발현을 조절하는 단백질을 의미한다.

#### V. 미오사이트에서 유전자 발현을 조절하는 방법

[0143] 본원에 개시되는 주제는 특이성을 가지고 미오사이트에서 유전자의 발현을 조절하는 방법을 제시한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 미오사이트를 miRNA 또는 미오사이트내 유전자를 표적으로 하는 miRNA를 암호화하는 벡터와 접촉시키는 단계를 포함한다. 미오사이트에서 하나 이상의 특정 유전자를 표적화함으로써 미오사이트 기능 또는 발육 (예컨대, 분화)을 고레벨의 특이성으로 조작할 수 있게 된다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 개시되는 주제는 또한 미오사이트를 미오사이트 기능 또는 발육을 조절할 수 있는 미오사이트내 유전자를 표적으로 하는 miRNA와 접촉시킴으로써 미오사이트 기능 또는 발육을 조절하는 방법을 제시한다.

[0144] 일부 구현예에서, 특정 유전자를 표적으로 하는 miRNA는 miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143, 및 miR-145 (각각 서열번호 1-11)로 구성되는 군에서 선택되는 것으로서,

예컨대, 서열번호 1-11 중의 어느 하나에 제시된 서열과 약 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 서열을 가진 miRNA들이 있다.

[0145] miRNA는 miRNA와 RNA 분자가 상호작용하기에 충분한 조건 하에 RNA 분자의 발현을 조절할 것으로 예상되도록 RNA 분자에 대해 충분한 뉴클레오티드 유사성을 가진다면 RNA 분자를 "표적으로 하는" 것이다. 일부 구현예에서는, 상호작용은 미오사이트내에서 일어난다. 일부 구현예에서, 상호작용은 생리적 조건 하에서 일어난다. 본원에 사용된 "생리적 조건"이란 문구는 미오사이트가 피험 대상 또는 피험 대상의 조직의 일부이든 미오사이트가 시험관내에서 성장하고 있든 간에 미오사이트내의 생체내 조건을 의미한다. 따라서, 본원에서 사용된 "생리적 조건"이란 문구는 미오사이트가 유기체의 일부로서 또는 시험관내에서 성장될 때 노출될 수 있는 임의의 조건 하에서의 미오사이트내 조건을 의미한다.

[0146] 일부 구현예에서, 표적화된 유전자는 미오사이트 분화 유전자 또는 미오사이트 증식 유전자이고, 발현될 때 각각 미오사이트 분화 및/또는 증식을 조절할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화된 유전자는 미오사이트 분화 및/또는 증식을 억제하는 유전자 산물을 발현시킬 수 있다. 따라서, miRNA에 의한 하나 이상의 상기 분화 및/또는 증식 표적 유전자의 발현의 표적화된 억제는 처리된 미오사이트의 분화 및/또는 증식의 증가를 초래할 수 있다. 본원에 개시되는 주제의 비한정적인 예시적 구현예에서, 미오사이트 분화 유전자는 히스톤 디아세틸라제 4 (HDAC4) 폴리펩티드 또는 갑상선 호르몬 수용체 단백질 240 (TRAP240)을 암호화할 수 있으며, 미오사이트 증식 유전자는 혈청 반응 인자 (SRF) 폴리펩티드를 암호화할 수 있다.

[0147] 하나 이상의 미오사이트 분화 또는 증식 유전자의 발현은 본원에 개시되는 miRNA 중의 하나를 이용하는 억제를 표적으로 할 수 있다. 예컨대, miRNA miR-1 및 miRNA-133은 각각 HDAC4 및 SRF의 3' 비해독 영역을 특이적으로 표적으로 하며, 이들 유전자에 의해 암호화된 유전자 산물의 발현을 억제한다. 따라서, 본원에 개시된 주제에 관한 일부 구현예에서, 미오사이트의 분화는 미오사이트를 miR-1과 접촉시킴으로써 증가시킬 수 있는데, 상기 miR-1은 HDAC4를 암호화하는 유전자를 표적으로 함으로써 HDAC4의 발현을 실질적으로 방지하고 미오사이트의 분화를 증가시킨다. 마찬가지로, 본원에 개시되는 주제의 일부 구현예에서, 미오사이트의 증식은 미오사이트를 miR-133과 접촉시킴으로써 증가시킬 수 있는데, 상기 miR-133은 SRF를 암호화하는 유전자를 표적으로 함으로써, SRF의 발현을 실질적으로 방지하고 미오사이트 분화를 증가시킨다.

## VI. 치료 방법

[0149] 본원에 개시되는 주제는 일부 구현예에서는 피험 대상의 근육 손상을 치료하는 치료 방법을 제시한다. 본원에 개시하는 대로, miRNA는 유전자의 발현을 조절하는 유전자를 표적으로 할 수 있다. 구체적으로, 미오사이트 분화 및/또는 증식을 억제하는 기능을 하는 생성물을 발현시키는 유전자는 상기 유전자의 발현을 억제함으로써 증가된 미오사이트 분화 및/또는 증식을 초래하는 miRNA의 표적이 될 수 있다. 또한, miRNA 억제제는 근육 손상의 치료에 유익한 방식으로 특정 유전자 산물의 발현에서 상대적인 증가를 용이하게 하는 내생적 miRNA를 표적으로 할 수 있다. 또한, 손상의 치료를 최적화하기 위한 연구에서는 miRNA 및/또는 miRNA 억제제의 조합물을 근육에 동시에 투여할 수 있다. 증가된 미오사이트 분화 및/또는 증식은 손상된 근육 조직의 치료에 또는 상실된 근육 조직의 재성장을 촉진하는 데 유용할 수 있다.

[0150] 따라서, 본원에 개시되는 주제의 일부 구현예에서, 피험 대상의 근육 손상을 치료하는 방법은 피험 대상의 근육에 유효량의 miRNA, miRNA를 암호화하는 벡터, miRNA의 억제제, 또는 이들의 배합물을 투여하는 것을 포함하는 데, 여기서, 상기 miRNA는 근육 손상 부위에서 미오사이트의 유전자를 표적으로 한다.

[0151] 손상 후와 같이 근육 발생 및 상응하여 근육 성장 및/또는 치료는 여러 단계들에서 발생할 수 있다. 대표적인 단계로는 미분화된 미오사이트 증식과 그에 후속적으로 미오사이트를 근육 조직의 성숙 세포로의 분화를 들 수 있다. 따라서, 근육 손상 부위에서의 근육 조직의 복구는 미분화된 미오사이트의 증식을 증가시키는 miRNA 및/또는 miRNA 억제제의 손상 부위로의 통합된 투여, 및 증식된 미오사이트의 성숙한 기능성 근육 조직으로의 분화를 증가시키는 miRNA 및/또는 miRNA 억제제의 손상 부위로의 투여에 의해 용이해질 수 있다.

[0152] 예컨대, 본원에 개시한 바와 같이, miR-1 및 miR-133은 각각 골격근 증식 및 분화를 조절하는 데 있어서 현저한 역할을 한다는 것이 측정되었다. miR-133은 SRF를 억압함으로써 미오사이트 증식을 증가시킨다. 대조적으로, miR-1은 근육 유전자 발현의 전사적 리프레서인 HDAC4를 표적으로 함으로써 미오사이트 증식을 증가시킨다. 따라서, 본원에 개시되는 주제의 비한정적인 대표 구현예에서는, miR-133 및 miR-1의 억제제 (예, 2'-0-메틸-miR-1)를 먼저 최초 시점에 근육 손상 부위로 동시에 투여하여 손상 부위에서의 미오사이트 증식을 증가시킨다. 다음, miR-1 및 miR-133의 억제제 (예, 2'-0-메틸-miR-133)을 두 번째 시점에 근육 손상 부위로 동시에 투여하여 증식된

미오사이트의 분화를 증가시킨다. 다중 miRNA 및/또는 miRNA 억제제의 일시적으로 통합된 동시 투여는 근육 손상으로부터의 회복을 추가로 개선할 수 있다.

[0153] 일부 구현예에서, 근육 손상은 기계적 근육 외상, 근육 퇴행성 질환, 심장 손상 또는 이들의 조합으로부터 기인한다. 기계적 근육 외상은 근육 조직이 잘려지거나 찢어지는 자동차 사고 또는 짤리는 상해에서 생기는 것과 같이 둔감한 힘의 외상의 결과일 수 있다. 예시적인 비한정적 근육 퇴행성 질환으로는 근위축증 (예, 뒤센형 근위축증 (Duchenne muscular dystrophy, DMD)), 동작 뉴런 질병 (예, 근위축성 측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)), 염증성 근병증 (예, 피부근염 (DM)), 신경근 접합부 질병 (예, 중증 근무력증 (myasthenia gravis, MG)), 내분비성 근병증 (예, 갑상선 기능 항진성 근병증 (HYPTM)), 및 대사성 근육 질병 (예, 포스포릴라제 결핍증 (MPD))이 있다. 예시적인 비한정적 심장 손상으로는 심근 경색 및 심근 재판류 손상이 있다.

[0154] 일부 구현예에서는, 특정 유전자를 표적으로 한 miRNA는 miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143, 및 miR-145 (각각 서열번호 1-11)로 구성되는 군으로부터 선택되는데, 그 예로는 서열번호 1-11 중의 어느 하나에 제시된 서열과 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 서열을 가진 miRNA가 있다. 일부 구현예에서는, 상기 유전자가 미오사이트 분화 유전자 (예, HDAC4 또는 TRAP240을 암호화함) 또는 미오사이트 분화 유전자 (예, SRF를 암호화함)이다.

[0155] 본원에 개시되는 주제의 치료 방법과 관련하여, 바람직한 피험 대상은 척추동물이다. 바람직한 척추동물은 온혈동물이며; 바람직한 온혈동물은 포유동물이다. 바람직한 포유동물은 가장 바람직하게는 인간이다. 본원에 사용된 "피험 대상 (subject)"이란 용어는 인간과 동물 피험 대상을 모두 포함한다. 따라서, 수의학적 치료 용도가 본원에 개시되는 주제에 따라 제시된다.

[0156] 그런 의미로서, 본원에 개시되는 주제는 인간과 같은 포유동물뿐만 아니라 시베리아 호랑이와 같이 위험으로 인해 중요한 포유동물; 인간에 의한 소비용으로 농장에서 길러지는 동물과 같이 경제적인 중요성을 갖는 동물; 및/또는 애완동물이나 동물원에서 보존되는 동물과 같이 인간에게 사회적인 중요성을 갖는 동물의 치료 방법을 제시한다.

[0157] 상기 동물들의 예로는 개와 고양이 같은 육식동물; 어린 돼지 (pig), 성장한 돼지 (hog) 및 수퇘지 (wild boar)를 포함하는 돼지 (swine); 소 (cattle), 황소 (oxen), 양, 기린, 사슴, 염소, 들소 (bison) 및 낙타와 같은 반추동물 및/또는 유제류; 및 말을 들 수 있으나, 이들에 국한되는 것은 아니다. 위험해지고/또는 동물원에서 보호되는 종류의 새들뿐만 아니라 가금류, 및 더 구체적으로는 길들여진 가금류, 즉 칠면조, 닭, 오리, 거위, 기니 가금 등과 같은 가금류의 치료를 포함하여 새의 치료 방법도 제시되는데, 이들 역시 인간에 경제적인 중요성을 갖기 때문이다. 따라서, 길들여진 돼지, 반추동물, 유제류, 말 (경주용 말을 포함), 가금류 등을 포함하여 (이들에 국한되는 것은 아님) 가축의 치료 방법도 제시된다.

[0158] miRNA 또는 miRNA를 암호화하는 벡터를 피험 대상에게 투여하는 적합한 방법으로는 전신 투여, 비경구 투여 (정맥내, 근육내, 동맥내 투여를 포함), 경구적 전달, 구강 전달, 피하 투여, 흡입, 기관내 삽입, 외과적 이식, 경피적 전달, 국부 주사, 및 고속 주사/충격이 있으나, 이들에 국한되는 것은 아니다. 적용 가능한 경우, 연속 주입이 표적 부위에서 약물 축적도를 증가시킬 수 있다.

[0159] 본 발명의 주제에 따라 사용된 구체적인 투여 방식은 다양한 인자, 예컨대, miRNA 및/또는 이용되는 벡터 담체, 치료하고자 하는 상태의 심각도, 및 투여 이후에 활성화합물(들)의 대사 또는 제거 메커니즘이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0160] "유효량"이란 용어는 측정 가능한 생물학적 반응 (예컨대, 미오사이트 분화 및/또는 증식의 증가)을 산출하기에 충분한 양의 치료용 조성물 (예컨대, miRNA 또는 miRNA를 암호화하는 벡터를 포함하는 조성물)을 의미한다. 본원에 개시되는 주제의 치료용 조성물에서 활성화합물의 실제 투여 레벨은 특정 피험 대상 및/또는 용도에 대한 목적하는 치료 반응을 얻는 데 효과적인 활성화합물(들)의 양을 투여하기 위해 변화될 수 있다. 선택되는 투여 레벨은 치료용 조성물의 활성, 제형, 투여 경로, 다른 약 또는 치료와의 조합, 치료되는 상태의 심각도 및 치료되는 대상의 물리적 상태 및 이전 의료 이력을 포함하는 다양한 인자에 의존된다. 최소 투여량을 투여하는 것이 바람직하며, 투여량은 용량 한정적 독성이 부재시에 최소 유효량까지 상승시킨다. 유효 용량의 결정 및 조정뿐만 아니라, 그러한 조정을 만드는 시기와 방법에 관한 평가는 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 인지 범위 내에 존재한다.

## 실시 예

[0222] 하기 실시예들은 본원에 개시되는 주제의 양태를 예시하기 위한 것이다. 본원의 개시 내용 및 당해 분야의 일반적인 기술 수준에 비추어, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 하기 실시예들이 단지 예시용일 뿐이며, 다수의 변화, 개조 및 변형예를 본원에 개시되는 주제의 범위로부터 이탈하지 않으면서 이용할 수 있음을 이해할 것이다.

### 실시예 1

[0224] 골격근 증식 분화에 있어 마이크로 RNA (miRNA)의 잠재적 관련성을 이해하기 위해, 본원 발명자들은 확립된 마이크로어레이 분석을 사용하여 골격근 분화 중에 miRNA의 발현을 분석하였다<sup>9</sup>. 본 발명자들은 C2C12 근원세포를 선택하였는데, 혈청이 배양 배지로부터 제거될 때 근원세포가 말단에서 분화된 미오튜브가 되도록 유도할 수 있음에 따라 이 세포주들이 시험관내에서 골격근 분화를 충실히 모방하기 때문이다<sup>10-12</sup>. 본 발명자들은 검사된 miRNA의 분획의 발현이 분화된 C2C12 근원세포/미오튜브에서 상향 조절되었음을 확인하였다 (도 1a 및 도 6). 분화된 근원세포에서 miR-1 및 miR-133의 발현의 증가는 노던 블롯 분석에 의해 확인하였다 (도 1b 및 도 7).

### 실시예 2

[0225] miR-1 및 miR-133은 성체 심근 및 골격근 조직에서 특이적으로 발현되나, 시험된 기타 조직에서는 발현되지 않았다 (도 1c, 도 8). 그러나, 포유동물 발생 중에 특이 miRNA의 일시 공간 분포에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 그러므로, 본 발명자들은 마우스 배와 신생물에서 miR-1 및 miR-133의 발현을 검사하였다. miR-1 및 miR-133은 E13.5 및 E16.5 배의 발육 중인 심장 및 골격근에서 매우 낮은 레벨로 발현되었다 (도 1d 및 도 8). miR-1 및 miR-133 발현의 증가하는 레벨은 신생물 심장 및 골격근에서 확인되었는데, 그것은 여전히 성체의 그것보다 상당히 더 낮았다 (도 1e 및 도 8). 상기 데이터는 대부분의 miRNA가 배 발생 중에 상대적으로 후기에 발현되는 제브라피쉬로부터의 발견과 일치하였다<sup>16</sup>.

### 실시예 3

[0226] miR-1 및 miR-133은 마우스 염색체 2 (9.3 kb에 의해 분리됨) 및 18 (2.5 kb에 의해 분리됨) 상에서 함께 집합되어 있다 (도 9 및 참조문헌 14). 본 발명자들은 miR-1 또는 miR-133 서열을 포함하는 ~300 bp 게놈 프로브를 사용하여 노던 블롯 분석을 수행하였다 (도 9a-9e). 염색체 18로부터의 miR-1 및 miR-133 프로브는 심장 및 골격근으로부터 분리된 총 RNA로부터 ~ 6 kb의 단일의 1차 전사체를 검출하였는데 (도 9b 및 9c), 이것은 miR-1 및 miR-133이 실제로 함께 전사된다는 것을 나타내는 것이다. 염색체 2로부터의 두 miR-1 및 miR-133 프로브는 심장 및 골격근으로부터 ~ 10 kb의 전사체를 검출하고, miR-133 프로브는 또한 ~ 4.5 kb 및 ~ 2.2 kb의 두 개의 추가 전사체에 하이브리되는 반면, miR-1 프로브는 또한 ~ 6 kb의 주요 전사체를 검출하였는데 (도 9d 및 9e), 이것은 전사후 가공의 잠재적 관련을 나타내는 것이다. 더불어, 본 발명자들의 데이터는 miR-1 및 miR-133의 심근 및 골격근 특이적 발현이 1차 전사 단계에서 지시되어 있음을 나타낸다.

### 실시예 4

[0227] 본 발명자들은 염색체 2 및 18의 miR-1 및 miR-133 집합체의 전사를 제어하는 조절 요소들이 보존되어 있을 가능성을 추론하였다. 그러므로, 본 발명자들은 서열 분석을 수행하여 고도로 보존된 영역 (~ 2 kb)을 확인하였는데, 이 영역은 두 염색체 2 및 18 상의 miR-1/133 집합체의 약 50kb 상류에 존재한다 (도 10). 염색체 2로부터의 상기 게놈 단편을 사용하여 형질전환 개구리의 dsRed 리포터 유전자의 발현 및 형질전환 유전자의 골격근 특이적 발현을 유발하였다 (도 10).

### 실시예 5

[0228] 골격근에서 miR-1 및 miR-133의 기능을 평가하기 위해, 본 발명자들은 먼저 포유동물에서 miR-1 및 miR-133을 과발현시키는 시도를 하였다. 본 발명자들은 노던 블롯 분석뿐만 아니라 miR-1 및 miR-133 "센서"<sup>17</sup>를 사용하여 두 miRNA의 발현 및 활성을 시험하고 입증하였는데, 이 때 miR-1 또는 miR-133에 대한 상보적 서열은 dsRed 암호 서열의 하류에 클로닝되었다 (도 11 및 데이터는 제시하지 않음). 본 발명자들은 miR-1 또는 miR-133로 C2C12 근원세포를 형질감염시킨 다음, 성장 배지 (GM)에서 세포를 배양하거나 또는 분화 배지 (DM)로 이동시켜 배양하였다. miR-1은 각각 초기 및 후기 근원성 마커인 미오제닌 및 미오신 중쇄 (MHC)뿐만 아니라 기타 근원성 마커, 예컨대, MyoD, Mef2, 및 골격근  $\alpha$ -액틴의 증가된 발현에 의해 나타나는 바와 같이 근육 발생을 강력하게

증가시켰다 (도 2a-2e, 2i, 2j 및 표 2). miR-1은 로그-단계 성장 조건 (도 2c) 및 분화 조건 (도 2, 2d, 2e)에서 배양되는 세포들에서 균원성 마커 유전자 발현을 유도하였다. miR-1에 의해 유도된 촉진된 균원성 분화는 또한 포스포-히스톤 H3의 발현에서의 상당한 감소에 의해 표시되는 바와 같이 세포 증식의 감소를 수반한다 (도 2, 2c, 2e 및 표 2). 특히 주의할 것으로는, GFP 대조군 또는 골격 미오사이트에서 내생적으로 발현되지 않는 miR-208의 과발현은 효과를 나타내지 않았기 때문에 miR-1 유도 근육 발생은 특이적이라는 것이다 (도 2a-2e). 또한, miR-1 "종자" 서열내로 도입된 돌연변이는 균원성 유전자 발현을 활성화하는 그 능력을 제거하였다 (도 2d-2e). 대조적으로, miR-133의 과발현은 미오계嫩 및 MHC의 발현을 억압하였고 (도 2, 2e 및 표 2), 균원세포 증식을 촉진하였다 (도 2c-2e 및 표 2). 또한, 대조군은 효과를 나타내지 않았기 때문에, 균원세포 증식에 miR-133가 미치는 영향은 특이적이며, 도입된 돌연변이는 miR-133의 기능을 제거하였다 (도 2a-2e, 2j).

표 2

치료	DM (8 hr)			DM (12 hr)			DM (24 hr)					
	미오계嫩 양성 세포	대조군 대비	미오계嫩 양성 세포	대조군 대비	포스포 H-3 양성 세포	대조군 대비	미오계嫩 양성 세포	대조군 대비	포스포 H-3 양성 세포	대조군 대비	MHC 양성 세포	대조군 대비
GFP	172	100%	93	100%	135	100%	118	100%	137	100%	22	100%
miR-1	206	121%	230	247.3%	93	68.9%	251	212.7%	76	55.5%	56	254.5%
miR-133	89	51.7%	68	73.1%	168	124.4%	93	78.8%	201	146.7%	12	54.5%
2'-O- 메틸 - GFP	146	100%	145	100%	172	100%	348	100%	207	100%	22	100%
2'-O- 메틸 - miR-1	120	82.2%	98	67.6%	214	124.4%	299	85.9%	283	136.7%	18	81.8%
2'-O- 메틸 - miR-133	205	140.4%	211	145.5%	107	62.2%	498	143.1%	191	92.3%	44	200%

[0233]

(miR-1 및 miR-133의 과발현 및 감소가 균원성 증식 및 분화에 미치는 영향)

[0234]

본 발명자들은 miRNA의 기능을 억제하는 것으로 나타난 miR-1 또는 miR-133 2'-O-메틸 안티센스 억제 올리고 (또는 대조군 GFP 및 miR-208)로 C2C12 균원세포를 형질감염시키는 상반 실험을 수행하였다<sup>18,19</sup>. miR-1 억제제로 형질감염시킨 세포들은 균원성 마커의 감소 및 포스포-히스톤 H3의 감소에 의해 나타나는 바와 같이 근육 발생의 억제 및 균원세포 증식의 촉진을 나타낸다 (도 2f-2i 및 표 2). 균원세포 증식의 촉진 및 분화의 억압에서의 miR-133의 역할과 일치되게, miR-133의 억제는 근육 발생은 증가되고 세포 증식은 억압되는 반대의 효과를 야기 했다 (도 2f-2j 및 표 2). 대조적으로, 대조군 2'-O-메틸 억제제는 아무런 효과를 나타내지 않았다 (도 2f-2j). 본 발명자들은 miR-1 및 miR-133이 골격근 증식 및 분화에 현저한 역할을 하며, miR-1은 균원세포 분화를 촉진하는 반면, miR-133은 균원세포 증식을 자극한다는 것으로 결론지었다.

[0235]

## 실시예 6

miR-1 및 miR-133은 둘다 초파리로부터 인간까지 대부분의 동물종에서 발견되었는데, 이것은 이들은 진화의 관점에서 보존된 것임을 시사한다. miR-1 및 miR-133이 생체내에서 골격근과 심장 발생에 미치는 영향을 시험하기 위해, 본 발명자들은 개구리에서의 miR-1 및 miR-133의 사본들을 확인하고, 오발현을 통해 그 기능을 시험하였다. 하나의 세포 단계에서 miR-1을 도입하면, 비주사된 또는 miGFP 주사된 대조군과 비교하여 등-배 축을 따라 정면 구조의 감소와 몸의 크기의 증가를 수반하면서 급격하게 단축된 축이 초래된다 (n > 45, 두 개의 독립 실험) (도 3). miR-1 손상된 배에서 체절이 형성되지만 (도 3), 전체 착상 항체 염색 및 연속 단면화는 조직이 고도로 파괴되어 있고 분절된 구조로 발생되지 않음을 나타낸다 (도 3e, 3f, 3j). 심장 조직은 조직학, 트로모파이신 염색 (도 3f, 3j) 및 심장 액틴 염색으로 판단할 때 완전히 부재하였다. 상기 결함 외에도, 미오사이트 증식 및 분화를 조절함에 있어 miR-1의 필수적인 역할과 일치되게, 포스포-히스톤 H3 염색에서는 극적인 감소가 있었다 (도 3i-3k). miR-1과 대조적으로, miR-133의 오발현 역시 체절 발생에서 정면 구조 및 결합의 감소를 초래하지만, 전후 길이에는 약간의 감소만이 있고, 체세포의 결합은 체절이 형성되지 못하는 배의 더 많은 전방 또는 후방 모양에서 가장 심각하였다 (도 3g, 3h). 또한, 심장 조직은 고도로 파괴되어 심장 루프 형성 또는 심실 형성을 수행하지 못하지만, miR-133 배에서 자주 형성된다 (도 3g, 3h, 3k). 총괄하면, 상기 데이터는 miR-1 및 miR-133 둘다의 정확한 시기 및 레벨이 적합한 골격근 및 심장 발생에 필요하다는 것을 시사한다.

[0236]

## 실시예 7

HDAC4는 그 3' UTR에서 두 개의 자연 발생적 추정 miR-1 부위를 포함하는데, 이들은 척추동물종 사이에 진화적 관점에서 보존되어 있다 (도 12). 유사하게, 두 개의 보존된 miR-133 결합 부위가 포유동물 SRF 유전자의 3' UTR에서 발견되는데 (도 12), 이것은 시험관내 및 생체내에서 근육 증식 및 분화에 중요한 역할을 하하는 것으로 나타났다<sup>11, 24, 25</sup>.

본 발명자들은 마우스 SRF 및 HDAC4의 3' UTR을 루시퍼라제 리포터 유전자에 융합시키고 이를 구성체를 형질감염 대조군과 함께 포유동물 세포내로 형질감염시켰다. miR-1의 이소성 과발현은 HDAC4 3' UTR 루시퍼라제 리포터 유전자를 강하게 억압한 반면에, miR-133은 SRF 3' UTR 루시퍼라제 리포터 유전자의 발현을 억제하였다 (도 4a). 이와 대조적으로, miR-1 또는 miR-133 "종자" 서열내로 도입된 돌연변이는 그러한 억압을 제거하였는데, 이것은 작용의 특이성을 나타내는 것이다 (도 4a).

상기 리포터들을 C2C12 근원세포내로 형질감염시키고 세포 분화 전후에 루시퍼라제 활성을 측정하였을 때, 본 발명자들은 리포터 활성이 분화된 세포에 급격하게 억압되었는데 (도 4b), 이것은 증가된 레벨의 내재성 miR-1 및 miR-133이 리포터 유전자를 억제하였음을 나타낸다. 내재성 miR-1 및 miR-133의 효과 및 특이성은 miRNA "센서"에 의해 모니터하였다 (도 11). 이와 대조적으로, 근육 분화의 지시물인 MCK-luc 리포터의 루시퍼라제 활성을 분화된 미오사이트에서 증가되었다 (도 4b). 또한, miR-1의 과발현은 성장 조건 (도 4c) 및 분화 조건 (도 4e)에서 C2C12 세포에서의 내재성 HDAC4 단백질의 하향 조절을 초래한 반면에, miR-133은 내재성 SRF 단백질의 발현을 억압하였다 (도 4c, 4e). 이와 대조적으로, SRF 및 HDAC4의 mRNA 레벨은 상기 miRNA들에 의해 변화되지 않았는데 (도 4d), 이것은 miRNA가 주로 해독을 억제함으로써 그 표적 유전자의 기능을 억압한다는 개념을 지지하는 것이다. miR-1 또는 miR-133에 대한 2'-O-메틸-안티센스 올리고를 적용할 때, 이들은 각각 HDAC4 또는 SRF의 단백질 레벨에 작용하는 억압을 구제하였으며 (도 4g), 그 mRNA 레벨에는 영향이 없었다 (도 4f).

HDAC4 및 SRF가 골격근 유전자 발현의 조절에 있어서 miR-1 또는 miR-133에 대한 동족의 표적임을 추가로 입증하기 위해, 본 발명자들은 SRF 또는 HDAC4에 대한 발현 플라스미드를 동시 형질감염시키면 miRNA-매개의 근육 발생을 "억압"할 수 있는지 여부를 시험하였다. 실제로, 도 4h에 도시된 바와 같이, SRF의 과발현은 miR-133에 의해 유도된 근원성 유전자 억압을 부분적으로 역전시켰다. 이와 대조적으로, HDAC4는 miR이 골격근 유전자 발현에 미치는 영향을 상쇄하였다 (도 4h).

miR-1 및 miR-133-의존성 골격근 증식 및 분화에 있어서의 HDAC4 및 SRF의 잠재적인 관련성과 일관되게, 내재성 HDAC4 및 SRF 단백질 레벨은 분화된 C2C12 세포에서 하향 조절되었는데, 이에 부수하여 근원성 분화 마커의 발현의 증가 및 유사분열 지수 마커 포스포-히스톤 H3의 발현의 감소가 발생하였다 (도 4i 및 도 7d). SRF 및 HDAC4 단백질의 감소된 발현은 miR-1 및 miR-133의 발현의 증가를 수반하였다 (도 4i와 도 1b 비교). 더불어, 이들 데이터는 miR-1 및 miR-133이 각각 HDAC4 및 SRF 단백질 레벨을 특이적으로 억압하고, 그 결과 다시 상기 miRNA가 근원세포 증식 및 분화에 조절적인 영향을 끼친다 (적어도 부분적으로).

본 발명자들은 심근 및 골격근 특이적인 miR-1 및 miR-133을 특성 분석하였고, 골격근 증식 및 분화를 제어함에 있어서의 그들의 기능을 나타냈다. 중요하게는, 본 발명자들은 동일한 염색체좌에 집합되어 단일의 전사체로서 함께 전사되는 miR-1 및 miR-133이 상이한 표적 유전자를 억제함으로써 달성되는 현저한 생물학적 기능을 가진 두 개의 독립된 성숙 miRNA로 되었음을 확인하였다. 이것은 복잡한 분자 메커니즘에 miRNA가 관련되어 있음을 의미한다. 흥미롭게도, miR-1 및 miR-133의 조직 특이적 발현은 myoD 및 SRF<sup>8</sup>에 의해 제어되는 반면에, SRF 발현은 miR-133에 의해 억압된다. 그러므로, 상기의 발견은 miRNA가 조절 경로에 참가하여 세포 증식 및 분화를 제어하는데 참가한다는 것을 나타낸다(도 5).

### 실시예 1-7에 대한 재료 및 방법

## 마이크로어레이에 의한 마이크로 RNA 발현 분석

전체 RNA는 10% 소 태내 혈청 (FBS) (시그마) 및 1% 페니실린/스트렙토マイ신 (미국 캘리포니아 칼스배드에 소재하는 인비트로젠)과 함께 둘베코의 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) (미국 미주리 세인트루이스에 소재하는 시그마 케미컬 컴퍼니)로 구성되는 성장 배지 (GM)에서, 또는 상이한 시점에 (DM으로 이동시킨 첫째 날을 0일로 계산하여, 0, 1, 3, 및 5일에) 2% 말 혈청 (시그마)과 함께 DMEM (시그마)으로 구성되는 분화 배지에서 배양한 C2C12 세포로부터 분리하였다. 마이크로어레이 (microarray) 하이브리드화를 수행하고 데이터를 분석하고 기재하였다<sup>9</sup>. 간략히 언급하면, 2.5  $\mu$ g의 분리된 RNA는 RNA 리가제를 사용하여 5'-포스페이트-시티딜-우리딜-Cy3-3' (미국 콜로라도 라파예트에 소재하는 다마론)으로 표지하고, 알렉사 647<sup>®</sup> (Cy5) (미

국 오레곤 유진에 소재하는 몰레큘라 프로브스)로 표지된 124 miRNA에 대해 올리고뉴클레오티드 프로브의 0.5 mM 혼합물과 함께 1회용 챔버 (미국 네바다 레노에 소재하는 MJ 리서치; 파트 번호 SLF-0601)에서 하이브리드시켰다. 정규화 로그 (밀이 2임) 데이터는 유전자에 의해 계층적으로 집합되어 열지도로 작성된다. 신호의 범위는 -4배로부터 +4배까지였다. 황색은 평균에 비해 고발현을 나타내고, 청색은 저발현을 나타낸다.

[0248]

### 노던 블롯 분석

[0249]

전체 RNA는 트리졸<sup>®</sup> 시약 (인비트로젠)을 사용하여 C2C12 세포, 마우스 배 또는 성체 조직으로부터 추출하였다. miRNA의 노던 블롯 분석을 위해, PEG를 적용하여 큰 크기의 RNA를 제거하였다. 간략히 언급하면, 30 µg의 각각의 전체 RNA 샘플을 5X PEG 용액과 1:1로 혼합하고 얼음에 10분 동안 배치하였다. 4°C에서 최대 속도로 10분 원심분리한 후, 상청액을 새로운 퓨브로 옮겼다. 그 후, 2.5 부피의 100% EtOH를 첨가하여 RNA를 침전시키고, 최대 속도로 30분 동안 원심분리하였다. miRNA에 대한 노던 블롯 분석을 문현에 기재된 대로 수행하였다<sup>13</sup>. 프로브로 사용된 miR-1 및 miR-133 올리고뉴클레오티드 서열을 표 3에 열거한다. 노던 블롯 분석을 사용하여 miRNA의 1차 전사체를 검출하고, 각 샘플로부터 20 µg의 전체 RNA를 사용하여 문현에 기재된 대로 수행하였다<sup>26</sup>. miR-1 및 miR-133에 대한 계놈 단편은 PCR-클로닝되어 프로브로서 작용하였다.

### 표 3

명칭	서열
miR-1 프로브	TACATACTTCTTACATTCCA
miR-133 프로브	ACAGCTGGTTGAAGGGGACCAA
miR-133a-1- 위	CATGTGACCCCTCACACACA
miR-133a-1- 아래	ACAAGGGGAGCCTGGATCCC
miR-133a-2- 위	GGACATATGCCTAAACACGTGA
miR-133a-2- 아래	GAAACATCTTATCCAGTTT
miR-1-2- 위	AGACTGAGACACAGGGCACACC
miR-1-2- 아래	TGCCGGTCCATCGGTCCATTGC
miR-1-1- 위	CACTGGATCCATTACTCTTC
miR-1-1- 아래	TTGGAATGGGGCTGTAGTA
miR-1mut- 위	TGAACATTCTAGTGTATAAAGAAGTATGTATTTGGTAGGTA
miR-1mut- 아래	TACCTACCCAAAATACATACTTCTTTATAGCACTGAATGTTCA
miR-133mut- 위	AATCGCCCTTCATGGATTGTCACACAGCTGTAGCTATGATTGAT
miR-133mut- 아래	ATCAATGCATAGCTACAGCTGGTGTGACAATCCATTGAGAGGGCATT
miR-1 이중체	UGGAUAUGUAAGAAGUAUUGUA
miR-1-mut 이중체	CAUACUUCUUUACAUUCCAU
miR-133 이중체	UUAACCAUAAGAAGUAUUGUA
miR-133-mut 이중체	CAUACUUCUUUAGGUUAUUA
miR-133-mut 이중체	UUGGUCCCCUUAACACAGCUGU
miR-133-mut 이중체	AGCUGGUUGAAGGUUACUUGUAU
miR-208 이중체	AUAAGACGAGCAAAAGCUUJGU
GFP 이중체	AAGCUUUUUGCUCGUCUUUAAC
2'-O- 메틸 -miR-1	AACUUCAGGGUCAGCUUUGCUU
2'-O- 메틸 -miR-133	GGCAAGCUGACCCUUGAAGUUG
2'-O- 메틸 -miR-208	AAUACAUACUUUUCAUUCCAUAGC
2'-O- 메틸 -GFP	AGCUACAGCUGGUUGAAGGGGACCAAUCCA
HDAC4-UTR- 위	CAGCACTGGTGTAGACTTGG
HDAC4-UTR- 아래	CTTAAGATAAAGTTCAATAAGAC
SRF-UTR- 위	AGATATGGGGCTTGTGCCC
SRF-UTR- 아래	CTGGGAGAAAAGGGGTAGAC
미오케닌 F	TGGAGCTGTATGAGACATCCC
미오케닌 R	TGGACATGCTCAGGGTCCC
MyoD F	GCAGGCTCTGCTGCGCGACC
MyoD R	TGCACTGATCTCTCAAAGCAC
골격 $\alpha$ - 엑틴 F	CAGAGCAAGCGAGGTATCC
골격 $\alpha$ - 엑틴 R	GTCCTTCAAGAACACCC
MEF2D F	CAAGCTTCCAGTATGCCAG
MEF2D R	AAGGGATGATGTCACCAAGGG
HDAC4 F	GAGAGAATTCTGCTAGCAATGAGCTCCAA

[0250]

(본원에 개시된 올리고뉴클레오티드의 서열)

[0251]

### miR 및 miR-133의 클로닝 및 발현

[0252]

마우스 염색체 2 및 18 (ch 2 및 ch 18)로부터 유래한 miR-1 및 miR-133 전구체에 대한 계놈 단편을 주형으로서 마우스 계놈 DNA를 사용하여 PCR 증폭시켰다 (PCR 프라이머에 대해서는 상기 표 3 참조). PCR 생성물을 pcDNA<sup>TM</sup>(+).3.1 벡터 (인비트로젠) 내로 클로닝하고, miRNA의 발현은 포유동물 세포 (COS7, 10T1/2 또는 C2C12) 내로 발현 벡터를 형질감염시켜 측정하고, 노던 블롯 분석에 의해 검출하였다.

[0254] 세포 배양, 시험관내 근육 발생 분화 및 루시퍼라제 리포터 분석

C2C12 근원 세포를 배양하고, 문헌에 기재된 대로 근육 발생을 유도하였다<sup>12</sup>. 일시적인 형질감염 루시퍼라제 리포터 분석을 문헌에 기재된 대로 수행하였다<sup>12,26</sup>. miRNA 이중체 및 miR-1, miR-133, miR-208 및 GFP에 대한 2'-O-메틸 안티센스 올리고뉴클레오티드를 다마콘으로부터 구입하였다 (서열에 대해서는 표 3 참조). 이들을 리포펙타민™(인비트로겐) 형질감염 (200 nM)을 사용하여 포유동물 세포 내로 도입하거나, 아막사 바이오시스템스 (미국 매릴랜드 게티스버그 소재)의 뉴클레오펙터® 시스템 (5  $\mu$ g)을 사용하여 전기 천공하였다.

[0255] 3' UTR-루시퍼라제 리포터 구성의 경우, pGL3-콘트롤 벡터 (미국 위스콘신 매디슨에 소재하는 프로메가)를 제거하고, 루시퍼라제 유전자의 하류에 배치하였다. 마우스 *HDAC4* 및 *SRF*에 대한 3' UTR을 PCR 증폭시키고, 변형된 pGL3-콘트롤 벡터 내로 클로닝하여 SRF-3'UTR 및 HDAC4-3'UTR 구성체를 생성시켰다 (PCR 프라이머 서열에 대해서는 표 3 참조). 루시퍼라제 리포터 분석을 문헌에 기재된 대로 수행하였다<sup>26</sup>.

[0257] 웨스턴 블로트 및 면역 염색

[0258] 웨스턴 블로트는 전술한 바와 같이 수행하였다<sup>27</sup>. 다음 항체들을 사용하였다: 항-미오계닌; SRF; MEF2; HDAC4; 및  $\beta$ -튜불린 (미국 캘리포니아 산타 크루즈에 소재하는 산타 크루즈 바이오테크놀로지); 및 포스포-히스톤 H3 (미국 뉴욕 레이크 플래시드에 소재하는 업스테이트 바이오테크놀로지). 횡문근 특이적 MHC를 인지하는 MF20 항체를 DSHB (미국 아이오와 아이오와 씨티에 소재하는 유니버시티 오브 아이오와).

[0259] 면역 염색의 경우, 12-웰 평판 중의 처리된 C2C12 세포를 37°C에서 5분 동안 4% 포름알데히드로 고정시키고, 실온에서 15분 동안 0.1% NP40/PBS 용액으로 변경하였다. 1차 항체를 0.1% NP40-PBS에서 다음의 농도로 2 시간 동안 3% BSA와 함께 항온 배양하였다: 항-미오계닌 (1: 20 희석), 항-포스포-히스톤 H3 (1:100 희석), MF20 (1:10 희석). 2차 항체인 플루오레세인 항-마우스/토끼 (1:100 희석; 미국 캘리포니아 벌링검에 소재하는 벡터 래보리토리즈)를 37°C에서 0.1% NP40-PBS에 3% BSA와 함께 1 시간 동안 첨가하였다. DAPI를 실온에서 5분 동안 첨가하였다. PBS로 수차례 세척한 후, 세포들을 형광 현미경으로 관찰하였다. 전체 웰을 커버하는 10개시야를 선택하고, DAPI 염색으로 녹색의 형광 양성 세포 및 총 세포를 각 웰에 대해 계수하였다.

[0260] RT-PCR 분석

[0261] RT-PCR을 문헌에 기재된 바와 본질적으로 동일하게 수행하였다<sup>27</sup>. 전체 RNA를 트리졸® 시약 (인비트로겐)을 사용하여 C2C12 세포로부터 추출하고, 2.0  $\mu$ g 분획을 무작위 6량체 및 MMLV 역전사 효소 (인비트로겐)를 사용하여 cDNA에 역전사시켰다. 각각의 경우, 2.5% cDNA 풀을 증폭에 사용하고, PCR을 24 내지 28 주기 동안 수행하였다. PCR 프라이머에 대한 서열들은 표 3에서 확인할 수 있다.

[0262] 개구리 배 주사 및 형질전환 유전자 발생

[0263] 제노푸스 라비스 배를 얻고 배양하는 데는 표준 방법을 이용하였다. DNA 구성물을 *Kpn* I을 사용하여 선형화하고, 형질전환 배는 문헌 Kroll & Amaya의 문헌에 기재된 방법에 따라 생성시켰다<sup>28</sup>. 형질전환 유전자의 발현은 레이카 MZFLIII 현미경 하에서 분석하였다. miRNA를 사용한 제노푸스의 제조 및 주사는 전술한 바와 본질적으로 동일하게 수행하였다<sup>29</sup>. 그러나, RNA는 주사 전에 캐핑하지 않았다. 전체 착상 면역 조직학 분석을 문헌에 기재된 대로 수행하였다<sup>30</sup>.

[0264] 실시예 8

[0265] miR-208은 인간, 마우스 및 래트 사이에 보존된 심장 특이적 miRNA이다 (도 14). 노던 블롯 분석은 miR-208 발현이 발생학적으로 조절된다는 것을 나타냈다 (도 15). 노던 블로트는 단계화된 마우스 조직으로부터 제조되고 miR-208에 상보적인 방사성 표지된 프로브로 처리하였다. miR-208 레벨은 E13.5, E16.5에 비해 성체 마우스 심장, 및 신생물 단계의 심장에서 극적으로 더 높았다. miR-208은 심근 *a*-미오신 중쇄 (*a*-MHC) 유전자의 인트론에 의해 주도된다 (도 14). 두 심근 미오신 중쇄 아이소형 중의 하나인 *a*-MHC는 마우스 발생 중에 약하게 발현되나, 나중에 성체 마우스 심장에서 우세한 아이소형이 된다. miR-208 및 *a*-MHC는 둘다 심장 특이적이고, 반대 가닥으로부터 전사되는데, 이것은 miR-208이 *a*-MHC 인트론으로부터 가공되어 *a*-MHC 전사에 병행하여 발현된다는 것을 시사한다.

[0266] **실시예 9**

[0267] 심근세포에서 miR-208의 시험관내 기능을 조사하기 위해, 본 발명자들은 심장 세포의 형태학적, 생화학적 및 전기 생리학적 특성의 연구를 위해 잘 특성 규명된 시험관내 모델이란 이유로 신생물 래트의 심근세포를 사용하기 위해 선택하였다. 신생물 심근세포는 출생 후에 그 복제 능력을 상실하지 않으며; 큰 분획이 심장 유전자 발현 역시 활성화되는 시험관내 및 생체내에서 유사 분열을 진행하고 증식한다. 심장에서의 miR-208 기능을 측정하기 위해, 상기 모델 시스템을 사용하여 심장 발생 프로그램에 미치는 miR-208 발현 및 억제의 영향을 연구하였다.

[0268] 시험관내 모델 시스템

[0269] 배양된 심근세포는 심장 연구에서 가장 널리 사용되는 실험 모델 중의 하나이다. 작은 포유동물로부터 유래한 심근세포의 준비는 전체 동물 연구에 비해 경제적이고, 신뢰할만하며, 광범위한 실험을 가능하게 한다. 경제적 및 기술적 이유로, 심근세포는 신생물 래트로부터 가장 흔히 분리된다. 본 발명자들은 약간의 변형과 함께 전술한 바와 본질적으로 동일하게 래트를 분리하였다.<sup>86</sup>

[0270] miRNA 전구체 서열과 ~150개의 인접 뉴클레오티의 전사를 유도하기 위한 RNA Pol II 프로모터 서열을 사용하여 기능적 성숙 miRNA를 이소성으로 발현시킬 수 있다. 생성되는 RNA 전사체는 miRNA 가공 기구에 의해 인지되고, 해독 억압을 유도할 수 있는 완전히 기능적인 miRNA로 된다. 본 발명자들은 마우스 게놈 DNA로부터 miR-208 전구체 서열 및 인접 영역을 PCR 증폭시키고, 이 단편을 아데노바이러스 벡터 내로 삽입하여 miR-208 (Ad-208)을 발현시키는 재조합 아데노바이러스를 생성시켰다. 노던 블롯 분석은 증가하는 농도의 Ad-208로 감염시킨 분리된 심근세포에서 miR-208 발현의 용량 의존적 증가를 나타낸다 (도 16). 이 수단을 이용하여 miR-208 과발현이 시험관내에서 심근세포의 표현형에 미치는 효과를 연구할 수 있다.

[0271] 이소성 miR-208 발현의 분석

[0272] 세포 계수 분석법을 사용하여 miR-208 발현에서의 변화가 증식에 영향을 끼치는지를 측정한다. 아데노바이러스는 심근세포 연구에서 크게 성공하면서 광범위하게 사용되고 있지만, Ad-GFP를 가진 세포는 Ad-208과 동일한 감염 다중도 (MOI)로 감염되어 아데노바이러스 감염에 의해 야기된 간접 효과를 제어할 수 있다. 두 바이러스는 녹색의 형광 단백질 (GFP)을 발현시키기 때문에, 감염 효율은 또한 동시 형광 현미경에 의해 제어할 수도 있다.

[0273] 감염전 및 감염 24, 48, 72, 및 96 시간 후에 광시야 조명 하에 세포들을 계수한다. 각 시점에서의 두 조건에 대해 10개 시야에서의 세포들을 계수한다. 세포 계수 데이터에 통계 분석을 적용한다. 짹없는 학생 t-시험 (unpaired Student t-test)을 사용하여 시야당 계수된 세포의 평균 갯수가 각각의 특정 시점에서 Ad-208과 Ad-GFP 감염 사이에 유의 수준으로 상이할 확률을 측정할 수 있는 반면에; 짹을 이룬 학생 t-시험은 각각의 감염에 대해 계수된 세포의 평균 갯수가 시점들 사이에서 유의 수준으로 상이할 확률을 측정할 수 있다. 임의의 두 평균이 유의 수준으로 상이할 확률이 95% 이상이면, 그러한 차이는 유의 수준으로 간주된다.

[0274] 포스포-히스톤 H3 항체를 사용하여 유사분열 지수를 측정하고 BrdU 도입에 의한 DNA 합성을 진행하는 세포 비율을 측정하기 위한 연구로 세포 계수 분석을 보충하였다. miR-208 과발현이 세포 사멸을 일으킬 확률을 배제하기 위해 고정된 세포를 튜넬 염색하였다. 심근세포 증식시 Ad-208 감염의 잠재적 결과는 감소하거나, 증가하거나, 또는 세포수에 변화는 없었다. 이론으로 구속하고자 할 의도 없이 miR-208은 분화된 성체 심근세포에서 통상 고도로 발현되기 때문에 miR-208 발현은 대조군에 비해 심근세포 증식을 지연시킬 것 같다.

[0275] Nkx2.5, MEF2C, GATA4, 미오카딘 및 TBX5를 포함하는 심장 전사 인자 세트는 초기 분화성 심근세포에서 발현됨으로써 심근세포를 심장 분화의 초기 유전자 마커로 만드는 것으로 나타났다.  $\alpha$ -MHC,  $\beta$ -MHC,  $\alpha$ -CA, 및 MLV2V 와 같이 심근 특이적 수축성 단백질은 심근세포의 말단 분화 마커이다. 상기 심장 유전자의 일부는 발생 중에 차별적으로 조절된다. 예컨대,  $\beta$ -MHC는 배(embryonic) 심장에서 고도로 발현되나, 신생물 발생 후에 하향 조절되는 반면에,  $\alpha$ -MHC는 반대의 발현 패턴을 가진다. miR-208이 심장근 유전자 발현의 조절에서 어떤 역할을 하는지를 측정하기 위해, 신생물 래트의 심근세포에서 심장 마커 유전자 발현에 이소성 miR-208 발현이 미치는 영향을 검사하였다. 이론으로 구속하고자 하는 의도는 없이, miR-208 발현은 태내 유전자 발현을 감소시키고/또는 성체 심장 유전자의 발현을 촉진할 것이다.

[0276] 반-정량적 역전사 효소-PCR (RT-PCR) 방법을 사용하여, Ad-208 대 Ad-GFP 감염된 신생물 래트의 심근세포에서 다양한 심장 마커 유전자의 상대 mRNA 전사 레벨을 분석하였다. cDNA 라이브러리는 통상의 기술에 의해 감염된 심근세포로부터 분리한 RNA로부터 만들어진다. 거의 모든 조직에서 고도로 발현되는 GAPDH를 증폭시켜 cDNA 레벨을 정규화하는 데 사용한다. DNA 오염이 존재하는 경우 더 큰 PCR 증폭 산물을 생성시킬 하나 이상의 인트론

을 연결하는 생성물을 증폭시키도록 모든 PCR 프라이머 세트를 고안한다. 또한, 시판되는 항체를 사용하여 웨스턴 블로트 분석에 의해 다양한 심장 마커의 단백질 발현 레벨을 검사하며 단백질 발현에서 검출되는 임의의 변화가 mRNA 전사 레벨과 일치하는지를 측정한다.

[0277] miR-208이 심장 유전자 발현에 미치는 영향을 연구하는 것 외에도, 전사 인자 및 구조 요소를 포함하여 다양한 심장 단백질의 국부화에 어떤 영향을 끼치는지를 측정한다. Ad-208 감염된 심근세포의 관찰은 상기 세포들이 Ad-GFP 감염된 심근세포에 대한 상이한 형태를 나타낸다는 것을 시시한다 (도 16b). Ad-208 감염된 심근세포는 그들의 Ad-GFP 감염된 상대에 비해 "둥근" 것으로 나타났다.

[0278] Ad-208 및 Ad-GFP 감염된 심근세포를 유리 커버 슬립 상에 고정하고, 적합한 1차 및 2차 항체로 프로브 처리하고, 핵 염색하며 현미경에 의한 분석용 슬라이드에 착상시켰다.

#### miR-208의 불활성화

[0280] miR-208 과발현 연구와 병행하여, miR-208에 대해 2'-0-메틸올리고뉴클레오티드 안티센스를 사용하는 miR-208 억제의 영향을 연구하였다. 2'-0-메틸올리고뉴클레오티드는 화학량론적 방식으로 miRNA 기능의 서열 특이적 및 비가역적 억제제로서 작용한다. 이 miRNA 억제 시스템은 심근세포에 적용된다. 안티센스 miR-208 2'-0-메틸올리고뉴클레오티드 또는 대조군에서는 무작위 2'-0-메틸올리고뉴클레오티드를 양이온성 지질 시약에 의해 또는 전기 천공에 의해 심근세포로 형질감염시켰다. 루시퍼라제 유전자에 직접 3'에서 부착된 (luc-miR-208-센서) 안티센스 miR-208 서열을 가진 리포터 구성체를 대조군으로 사용하고, 시스템이 miR-208 기능을 차단하는 효과를 시험하였다. mRNA 및 단백질 레벨뿐만 아니라, 단백질 국부화를 miR-208 과발현에 대해 기재된 대로 연구한다.

#### 실시예 10

[0282] miR-208은 배의 심장에서 약하게 발현되며, 그 발현은 성체 심장에서 극적으로 증가한다. 본 실시예는 miR-208 기능이 발생 중의 심장 또는 성체 심장에서 유전자 조절에 더 중요하다는 것을 분석하였다. 발생 중에, miR-208은 배에서 약하게 발현되기 때문에 중요하지 않을 것 같다는 것을 주장할 수 있다. 그러한 주장에 대해, 적합한 miR-208 투여는 발생 중에 특정 유전자 경로를 조절하는데 중요할 수 있다. 또한, miR-208의 발현이 그들 동물에서 영향을 받은지 여부는 알려져 있지 않지만, 성체 단계에 비해 발생 중에 약하게 발현되는 그 숙주 유전자  $\alpha$ -MHC의 낙아웃 (knockout) 마우스는 배의 치사성을 겪었다<sup>87</sup>. 성체 심장에서 검출된 miR-208의 고발현은 그것의 가장 중요한 기능이 발생 후기에 존재한다는 것을 나타낼 수 있다. 상기 유형의 이슈를 자세히 살펴보기 위해, 두 개의 마우스 모델을 창조하여 miR-208 기능을 연구하였다: 조건에 따라 miR-208을 과발현시키는 miR-208 낙아웃 마우스 및 형질전환 마우스.

#### miR-208 낙아웃 마우스 디자인

[0284] 숙주 유전자  $\alpha$ -MHC의 발현에 영향을 끼치지 않고 miR-208에 대해 기능적으로 무의미한 마우스를 디자인하고 생성시켰다. miR-208 낙아웃 마우스로부터 유래한 배-스템 세포의 생성은 3 단계 과정이다: 표적 벡터의 생성; 상동 재조합에 의해 배의 줄기 세포내로 DNA 서열의 도입; 및 배의 줄기 세포로부터 유래한 유전자 변형된 마우스의 생성. 관련 miRNA는 그 종자 영역 내의 서열 상동성에 근거하여 패밀리로 분류하였다. 상기 패밀리는 잠재적으로 생체내에서 그들의 기능의 유전자 분석을 복잡하게 하면서 동일 유전자의 발현을 중복되게 조절할 수 있다. miR-208의 종자 영역은 계통수에서 기타 공지의 miRNA와 집합체를 이루지 않아 miR-208을 적합한 miRNA 낙아웃 후보로 만든다.

[0285] miR-208 표적화 구성체는 선형 DNA 단편과 원형 플라스미드 사이의 상동 재조합을 사용하는 재조합 공학이라 불리는 전략을 사용하여 제조한다<sup>88,89</sup>. 원형 플라스미드는 miR-208이 중앙에 존재하는  $\alpha$ -MHC 유전자의 6~7 kb의 단편을 포함할 수 있다. 선형 DNA 단편은 22개 nt의 miR-208 서열을 플록세드 선별 카세트 (floxid selection cassette)로 대체하도록 고안된 두 개의 상동성 암을 포함한다. 원형 플라스미드로 형질전환시킨 박테리아를 선형 DNA 단편으로 전기 천공하고, 이어서 재조합 콜로니에 대한 선형 단편 선별체에 의해 내성이 암호화된다. 생성되는 구성체를 사용하여 상동 재조합에 의해 ES 세포를 표적으로 한다. PCR에 기초한 스크리닝을 사용하거나 서던 블로트에 의해 이형접합성 ES 세포를 일단 확인하면, 배반포 (blastocyst) 주사에 의해 키메라를 생성시키는데 사용한다. 본원에 개시되는 낙아웃 디자인은  $\alpha$ -MHC의 인트론내에 외래성 DNA의 소형 족문만을 남기고,  $\alpha$ -MHC의 전사 또는  $\alpha$ -MHC mRNA의 접속 패턴은 영향을 받지 않은 채로 유지된다는 것을 보장한다.

#### 조건적 형질전환 마우스 디자인

[0287]

조건적인 형질전환 전략이 도 17에 다이아그램으로 제시되어 있다. 조건적인 형질전환 방법은 두 개의 형질전환 유전자로 구성되는 2원 시스템이다. 하나의 형질전환 유전자는 miR-208 (*tet208*)을 암호화하는 반면에, 다른 형질전환 유전자는 조절 서열을 그 프로모터 내에 결합시킴으로써 miR-208 형질전환 유전자를 활성화시키는 트랜스액티베이터 (*tTA*)를 암호화한다. 독시사이클린 (DOX)이 존재할 때마다 *tTA*의 결합이 억제됨으로써 DOX 처리에 의해 miR-208 형질전환 유전자의 일시적 조절을 가능하게 한다.

[0288]

miR-208 형질전환 유전자에 상동 결합성인 마우스 콜로니가 확립되었다. *tet208* 마우스는 *tTA* 형질전환 유전자를 보유하여 연구용 이중 형질전환체를 생성시키기 위해 교배된 것이다. 멘델 유전학을 추정하면, 4개 자손 중 하나가 이중 형질전환체이고 *tTA*가 발현되는 miR-208을 발현시킨다.  $\alpha$ -MHC 프로모터를 이용하여 *tTA* 발현을 유도한다.  $\alpha$ -MHC 프로모터는 잘 특성 규명되어 있고, 발생 초기에 조직 특이적 발현을 적절히 유도하기에 충분하다<sup>90</sup>. 내재성 miR-208은 통상  $\alpha$ -MHC 유전자내의 인트론으로부터 기원하기 때문에  $\alpha$ -MHC 프로모터를 사용하여 *tTA*를 발현시키면 이중 형질전환 동물에서 내재성 miR-208과 동일한 조직에서 miR-208 투여량을 증가시킬 것이다. 마우스  $\alpha$ -MHC 프로모터를 사용하여 *tTA* 발현을 유도하는 형질전환 마우스 라인이 존재하고, 성공적으로 사용되어 왔다<sup>91,92</sup>. *tet208* 형질전환 마우스 라인은 우리가 발생하는 배 또는 성체 마우스 심장에서 독립적으로 miR-208 발현의 투여 효과를 연구할 수 있게 한다. 통상, 조절 형질전환 창설자의 초기 배의 치사성은 표현형 분석을 연구하고 지연시키는 데 이용하는 발생학적으로 정지된 배들의 수를 심각하게 제한하였다. 조건적인 전략으로, 본 발명자들은 이중 형질전환 마우스가 초기의 miR-208 과발현이 치명적인 것으로 입증되었기 때문에 miR-208 형질전환 발현을 지연시킬 수 있다.

[0289]

### 분석

[0290]

표현형이 어떻게 규명되는가에 따라 특이적 분석을 수행하였다. 일반적으로, 발생하는 배 및/또는 성체에서 잠재적인 표현형을 특성 분석하기 위해 조직학적 및 생화학적 연구를 사용하는 것이 허용 가능하다. 심장을 전체 이상에 대해 검사하고 조직학적 분석을 위해 절단하여 잠재적으로 더 민감한 발생학적 결함을 확인한다. 결함 가능성성이 무수하며, 결함성 격막 형성으로부터 두꺼워진 아트리아까지 어떤 것을 포함할 수 있다. 표현형은 전기 생리학적 연구에 의해 특성 분석될 수 있는 수축성 결함일 수 있다는 것이 동일하게 가능하다.

[0291]

### 실시예 11

[0292]

miR-208의 직접적인 분자 표적의 확인은 그 생물학적 기능을 강조하는 메커니즘에 관한 이해를 용이하게 한다. 표적 예측법을 이용하여 시험판내 및 생체내 마우스 모델에서 miR-208 기능의 연구와 관련된 관찰을 보충한다.

[0293]

이론으로 구속할 의도 없이, Thrap1 발현은 miR-208에 의해 조절되는 것으로 가정된다. Thrap1의 3' UTR은 두 개의 예측 miR-208 결합 부위를 포함한다 (도 18). 두 개의 표적은 Thrap1 정지 코돈의 ~80 bp 하류에 배치하고, ~50 bp만큼만 서로 이격시킨다. 두 표적은 miR-208의 종자 영역과 완전히 상보적이다. Thrap1 유전자는 도처에서 발현되는 TRAP (갑상선 호르몬 수용체 단백질)의 240 kd 서브유닛을 암호화한다<sup>93</sup>. TRAP는 초기에는 갑상선 호르몬 핵 수용체에 대해 특성 분석되었다<sup>94</sup>. Thrap1은 특성 규명되지 않았으나, 다른 TRAP 서브유닛의 결합이 핵의 수용체 신호작용에 영향을 끼치는 것으로 나타났다. 마우스에서 TRAP220의 유전자 절제는 심장 및 신경계 발생을 손상시킨 반면에, TRAP230 및 TRAP240의 초파리 상동체가 적합한 눈-안테나 디스크 발생에 필요하다<sup>95,96</sup>. Thrap2로 명명된 Thrap1과 고도로 유사한 유전자의 돌연변이가 선천적인 심장 결함인 대동맥의 병치 환자에서 발견되었다<sup>97</sup>. 따라서, TRAP 패밀리 멤버들은 적합한 발생에 중요하다. 특히 관심을 끄는 것은 miR-208의 표적으로서 Thrap1인데, 갑상선 호르몬은 심장 수축성에 깊은 영향을 끼치는 것으로 알려져 있기 때문이다.

[0294]

갑상선 호르몬은 심장 미오신 아이소형 전환에 연결되어 있다. 심근세포에서, 갑상선 호르몬은  $\alpha$ -MHC mRNA의 신속한 축적을 야기함과 동시에  $\beta$ -MHC 발현을 억제한다<sup>98,99</sup>. 몇 개의 양성 작용 갑상선 반응 요소 (TRE)는  $\alpha$ -MHC 프로모터내에 배치되고,  $\beta$ -MHC 프로모터내의 음성 작용 반-TRE를 확인하였다<sup>100,101</sup>.  $\alpha$ -MHC 및  $\beta$ -MHC 유전자는 염색체 14상에 병렬로 배열되고, 이들은 상이한 속도로 ATP를 기계적인 일로 전환시키고, 그 단백질 발현 비가 심장 사크로메아의 수축성에 영향을 끼치는, 두 개의 심장 미오신 중체 아이소형을 암호화하며;  $\alpha$ -MHC는 "신속한" 반면에,  $\beta$ -MHC는 "느리다". 그들의 발현은 발생학적으로 조절된다. 마우스 및 래트에서,  $\beta$ -MHC는 후기 태내 삶에서 우세하나, 출생 직후  $\alpha$ -MHC는 우세한 성체 심장 아이소형으로 된다. 전이는 출생 직후에 발생하는 순환성 갑상선 호르몬의 상승에 의해 야기되는 것 같다<sup>98</sup>. 토끼와 인간과 같이 보다 큰 포유동물에서는,  $\beta$

$\alpha$ -MHC가 우세한 성체 심장 아이소형이다. 그러나,  $\alpha$ -MHC 및  $\beta$ -MHC 유전자의 프로모터들은 마우스와 인간 사이에서 고도로 보존되어 있는데, 이것은 이들이 유사하게 조절된다는 것을 의미한다.  $\alpha$ -MHC 인트론으로부터 miR-208의 기원이 주어지고 이론으로 구속받고자 하는 의도가 없이, miR-208은 TRAP 복합체의 요소를 표적화함으로써 심장 미오신 중체 아이소형의 비를 조절하기 위해 음성 피드백 루프에서 갑상선 호르몬 신호 작용의 조직 특이적 억제제로서 작용한다 (도 19).

[0295] 초기의 스크리닝 전략은 miR-208의 과발현이 3' UTR에서 추정 표적 부위를 보유하는 리포터 유전자의 발현을 하향 조절하는지를 질문한다. 본 발명자들은 구성적으로 발현되는 루시퍼라제 리포터 유전자의 암호 서열 바로 뒤에 Thrap1 3' UTR을 삽입하였다. 결과는 miR-208이 Thrap1 UTR을 표적으로 한다는 것을 시사한다 (도 18). 상기 관찰을 확인하기 위해, 본 발명자들은 Thrap1 UTR내의 두 개의 추정 표적 부위의 종자 영역을 별개로 및 조합하여 돌연변이시켰다. 돌연변이된 폴리뉴클레오티드를 시험하여 이들이 miR-208 매개의 억압을 경감시킬 수 있는지를 측정할 수 있다.

[0296] 종전의 연구는 심근세포에서 갑상선 호르몬이  $\alpha$ -MHC 쇄 발현을 전사적으로 활성화하며,  $\beta$ -MHC 발현을 억제한다는 것을 제시하고 있다<sup>98,99,102</sup>. 심근세포는 Ad-208로 감염시켜 miR-208 발현이  $\alpha$ -MHC 및  $\beta$ -MHC의 전사 및 단백질 레벨을 모니터함으로써 갑상선 호르몬 신호작용을 억제하는지를 측정한다. miR-208에 의한  $\alpha$ -MHC 발현의 억제는 miR-208이 갑상선 호르몬 신호작용 경로의 요소를 표적으로 한다는 우리의 가설을 간접적으로 지지하는 것이다.

[0297] 예측된 표적을 추가로 입증하기 위해, miR-208 발현이 miR-208 낙아웃 및 miR-208 형질전환 마우스 모델로부터 심장에서의 mRNA 또는 단백질 레벨을 감소시키는지를 측정할 수 있다. 표적화된 단백질에 대한 특이 항체를 이용한다. 인간의 Thrap1이 시판된다. 마우스 연구에서 효과적이지 않으면, 마우스 Thrap1-특이 항체가 개발된다.

#### miR-208에 대한 추가의 후보 표적

[0299] Thrap1 외에도, 본 발명자들은 리포터 연구를 위해 4개의 다른 흥미로운 miR-208 예측된 표적의 3' UTR을 루시퍼라제 유전자에 직접 클로닝하였다. 3' UTR은 SP3 (Spe 트란스 작용성 전사 인자 3), EYA4 (눈에 부재하는 상동체 4), CSNK2A2 (카제인 키나제 2, 알파 프라임 폴리펩티드 및 TTN (티린)으로부터 유래한다.

[0300] SP3 단백질 발현은 miR-208 발현과는 반대된다; SP3은 GC-박스르르 포함하는 다양한 프로모터와 상호작용하는 전사 인자이다<sup>103,104,105</sup>. SP3 단백질은 태내 마우스 심장에서 쉽게 발견되나, 성체 심장에서는 드물게 검출될 수 있다. SP3 및 miR-208의 반대되는 발현 패턴은 miR-208이 SP3 해독을 형식적으로 조절할 수 있게 한다.

[0301] EYA4는 인간의 심장에서 병리학에 대한 그 확립된 연관이 주어지면 miR-208의 흥미로운 잠재적인 표적이다. 돌연변이는 확장된 심근병증 및 관련 심부전을 야기하는 인간 EYA4에서 확인되었다<sup>106,107</sup>. EYA4는 사인-오쿨리스 패밀리 (*Six1-Six6*)의 멤버 및 유전자 활성화를 초래하는 다쉬 (Dach) 전사 인자와 상호작용하는 전사 공활성화 인자이다<sup>108,109</sup>. 약화된 EYA4 레벨은 심부전의 형태학적 및 혈역학적 특성을 생성시키기 때문에 인간의 돌연변이의 특성 분석은 제브라피쉬에 관한 연구에 의해 지지되었다<sup>106</sup>. 현재, EYA4의 잠재적인 하류 심장 유전자가 확인된 것은 없다.

[0302] CSNK2A2는 DNA 복제, 기초 및 유도성 전사의 조절, 해독 및 대사 제어에 관여하는 광범위하게 발현되는 단백질 세린/트레오닌 키나제이다<sup>110,111</sup>. 본 발명자들은 다양한 유전적 경로를 조절함에 있어서 그 잠재력에 대해 CSNK2A2에 관심이 있다.

[0303] EYA4와 유사하게, TTN 역시 심장 혈관 기능 및 병리학과 그 확립된 관련성이 주어진 흥미로운 miR-208 표적 후보이다. TTN은 심근 및 골격근 조직에서 발현되는 거대 사크로메어 단백질이며, 사크로메어 조립 및 힘 전달에 중요하다<sup>112</sup>. TTN에서의 돌연변이는 비대성 및 확장된 심근병증과 연관되었다. 심근 및 골격근 기능에 TTN의 필요성이 주어지면, 본 발명자들은 miR-208이 TTN을 강력하게 조절하는지를 의심하나, 하나의 사크로메어 유전자 (즉,  $\alpha$ -MHC)가 또 다른 유전자 (즉, TTN)의 발현을 미세 조정하여 심근세포의 수축성을 조정하였다.

[0304] 예측된 표적 유전자의 3' UTR은 리포터 분석에 의해 시험되어 그것이 miR-208 매개의 억제를 제공하는지를 측정한다. 후보 유전자들은 예측된 표적 부위를 돌연변이시키고, miR-208 억제가 감소되는지를 시험함으로써 추가로 특성 분석된다. 후보 표적의 초기 리포터 스크리닝 후에, 심근세포를 사용하는 miR-208의 시험관내 과발현이 전사 및 단백질 레벨의 후보 유전자 발현에 미치는 영향을 분석한다. 우리의 miR-208 낙아웃 및 유도성 형질

전환 마우스 모델을 사용하여 입증된 표적의 생물학적 관련성을 생체내에서 연구한다. 잠재적인 miR-208의 시험 관내 및 생체내 표적의 분석은 표적 예측을 입증하고, 심장에서 miR-208에 의해 조절되는 유전적 경로를 이해하기 위해 그 생물학적 관련성을 확인할 수 있다.

[0305] **실시예 12**

골격근은 삶의 전체에 걸쳐 손상받고 반복적으로 복구되곤 한다. 근육 재생은 노화 중의 운동 기능을 유지하고, 신경 근육 질병, 예컨대, 뒤센형 근위축증에서 임상적 징후의 발현을 지연시킨다. 조직 복구에 관한 이 능력은 바닥판과 성숙 근섬유의 횡문근형질막 사이에 배치된 위성 세포로 불리는 줄기세포 유사 세포의 서브세트에 의해 부여된다. 손상이 있을 때, 위성 세포는 세포 사이클로 재진입하고, 증식한 다음, 세포 사이클을 떠나 잠복 위성 세포 풀을 간신하거나 성숙 근섬유로 분화시킨다. 세포 증식 및 분화 프로그램이 근육 발생에 필수적이다.

[0307] 본원에 개시되는 주제는 miRNA가 근육 세포의 증식 및 분화에 반응성이 있다는 것을 입증하는 데이터를 제시한다.

[0308] **방법:**

[0309] 카디오톡신을 Yan 등의 문헌에 따라 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스의 전경골근 (*tibialis anterior*, TA)내로 주사하였다<sup>114</sup>. 주사 3일 후에 근육을 수집하였다. 비주사된 TA 근육을 대조군으로서 사용하였다. TA 근육으로부터 전체 RNA를 추출하고, 마이크로 RNA의 마일크로어레이 분석에 5  $\mu$ g을 사용하였다.

[0310] **결과:**

[0311] 도 20a 및 20b는 카디오톡신 주사된 (손상된) 또는 비주사된 (대조군) 전경골근 (TA)으로부터 miRNA 어레이를 발현 데이터를 도시한 것이다. 정규화 로그 (밑이 2임) 데이터는 유전자에 의해 계층적으로 집합되어 열지도로 작성된다. 신호의 범위는 -4배로부터 +4배까지였다. 밝은 음영은 평균에 상대적으로 고발현을 나타내고, 어두운 음영은 저발현을 나타낸다. 도 20a는 손상된 근육에서 하향 조절되는 miRNA를 나타내며, 도 20b는 손상된 근육에서 상향 조절되는 miRNA를 나타낸다.

[0312] **실시예 13**

[0313] 골격근의 위성 세포는 성숙한 다향 근섬유의 혈장막과 주위 바닥판 사이에 배치된 소형 단핵 세포군이다. 위성 세포는 성체 골격근의 전구 세포로서 오래 동안 간주되어 왔다. 최근의 증거는 위성 세포가 이질적이고 줄기세포 유사 잠재력을 가진다는 개념을 지지한다. 이들 세포는 잠복 상태로 유지되나, 일단 활성화되면 광범위하게 증식하여 근육 조직을 분화 및 재생 또는 복구시키는 근원세포의 풀을 형성한다.

[0314] 위성 세포를 정상 조건 하에 그 불활성 잠복 상태로 유지하는 유전적 경로 및 분자적 메커니즘뿐만 아니라, 이들 세포가 근육 손상에 반응하여 활성화되어 근육 재생을 용이하게 하는 방법이 밝혀내야 할 출발점이다. 짹을 이룬 박스/호모도메인 전사 인자 패밀리의 멤버인 Pax3 및 Pax7은 위성세포-관련 골격근 재생 과정에서 중요하고 현저한 역할을 하는 것으로 입증되었다. 그러나, Pax 단백질의 발현이 위성 세포 유지 및 활성화의 과정 중에 어떻게 조절되는지는 명확하지 않다. 모호하게도, Pax3 및 Pax7의 발현은 분화성 근원세포에서 하향 조절된다. 더 중요한 것은, C2C12 근원세포에서 Pax3 또는 Pax7의 이소성 과발현은 그 분화를 차단한다는 것이다. 그러한 관찰은 위성 세포의 잠복 및 자가 간신뿐만 아니라 근원세포 증식 및 분화의 상태가 긴밀한 전사 및 전사 후 조절 하에 있다는 것을 시사한다.

[0315] 또한, 뇌에서 유래한 신경성장인자 (BDNF)는 골격근 위성 세포에서 발현되고, 근원성 분화를 억제한다. Pax7 및 BDNF가 miR-1/206에 대한 추정의 조절 표적임이 발견되어 본원에 개시되는데, 이것은 miR-1/206이 골격근 위성 세포 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

[0316] **위성 세포에서 miRNA 과발현 및 검출 시스템의 확립**

[0317] miRNA를 위성 세포 내로 이소성으로 효율적으로 상시 발현시키기 위해, 레트로바이러스에 기초한 과발현 시스템을 적용하였다. The genomic sequences miR-1 및 miR-206에 인접한 (300-400 bp 부근) 계놈 서열은 녹색 형광 단백질 (GFP) 암호 서열이 miRNA-SDSA 서열의 하류에 배치되는 쥐의 줄기 세포 바이러스 (MSCV)-유래의 레트로바이러스 백터내에 접속 공여자 (SD) 및 접속 수용자 (SA)가 인접되어 있다. 이러한 방식으로, miR-1/206 및 GFP는 동시에 발현되고, GFP의 발현은 miR-1/206 발현의 우수한 표시로서 작용할 것이다 (도 23).

[0318] 위성 세포에서 miRNA의 발현 및 억제 효과를 모니터하기 위해, 본 발명자들은 dsRed 유전자의 발현이 구성적으로 활성이 있는 CMV 프로모터의 전사 제어 하에 있는 "miRNA 센서"를 생성시켰다. miR-1/206의 상보적 서열은

dsRed 리포터 유전자의 3'에 연결하고, 기능적 miRNA가 dsRed 단백질의 해독을 억압하도록 MSCV-유래의 레트로바이러스 벡터내로 삽입하였다 (도 22). 이 시스템을 사용하여, 본 발명자들은 위성 세포에서 miRNA의 발현 및 억제 효과를 정확히 검출할 수 있는데, 이것은 골격근에서 miRNA의 기능을 추가로 연구하기 위한 강력한 수단을 제공한다.

[0319] Pax7 및 BDNF는 위성 세포에서 miR-1/206의 조절 표적이다

본 발명자들은 Pax7 및 BDNF 유전자가 그 3' UTR에서 고도로 보존된 miR-1/206 표적 부위를 포함한다는 것을 발견하였다 (도 24, 25, 26). 본 발명자들은 상기 3' UTR 서열을 루시퍼라제 리포터내로 클로닝하고, 이들이 miRNA에 의해 억압될 수 있는지에 대해 시험하였다. 도 24에 도시한 바와 같이, miR-1 및 miR-206은 둘다 상기 리포터를 강력하게 억압한다. miRNA-매개의 억압은 보존된 miRNA 결합 서열이 돌연변이될 때 제거되는데, 이것은 억압의 특이성을 나타내는 것이다. 이러한 데이터는 miR-1/206이 중요한 표적 유전자를 억압함으로써 근육세포 및/또는 그들의 전구체의 증식 및 분화를 제어할 수 있음을 시사한다.

[0321] 단일 골격근 근섬유로부터 위성 세포의 분리

위성 세포는 출생 후의 성장 및 재생에 반응하는 성체 골격근 원조 세포이다. 이론으로 구속할 의도 없이, 본 발명자들은 miRNA가 위성 세포의 조절자라고 가정한다. 이 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 신생물 또는 성체 마우스의 뒷다리 또는 횡경막으로부터 위성 세포를 분리하기 시작했다. 본 발명자들은 단일의 근섬유로부터 위성 세포를 분리할 수 있는데, 이것은 가장 순수한 위성 세포 군집을 생성시키고 재현성 있는 결과를 제공한다. 이러한 위성 세포는 bFGF가 배양 배지에 포함될 때 미분화된 상태로 유지될 수 있는데, 상기 배지에서 Pax7 및 기타 위성 세포 마커의 발현이 검출될 수 있다. 그러나, 상기 위성 세포들은 성장인자 bFGF 제거 시에 근원세포 및 미오튜브로 분화될 수 있는데, 이것은 골격근 분화 과정을 시험관내에서 충실히 모방하는 것이다 (도 28).

[0323] miR-1/206은 위성 세포의 증식을 억제한다

골격근 원조 세포에서 miR-1/206의 기능을 규명하기 위해, 성체 마우스의 단일 근섬유로부터 분리된 위성 세포를 24 웨 조직 배양 평판 상에 도말하고, SDSA 벡터에 기초한 레트로바이러스를 사용하여 miR-1/206을 세포내로 도입하였다. 이소성으로 발현되는 miRNA의 발현 및 활성을 여러 방식으로 모니터하였다: miR-1의 발현을 검출하고 정량적으로 측정하기 위해 노던 블롯 분석을 적용하였다. miR-1/206의 활성 역시 "센서" 리포터를 사용하여 모니터하였는데, 상기 리포터에는 miR-1/206에 대한 상보적 서열이 dsRed 리포터 유전자를 향해 3'에 클로닝된다.

[0325] 증식 분석을 위해, 위성 세포 배양물을 수집 전에 BrdU로 1 시간 동안 표지하였다. 그 후, 세포들을 고정하고 증식 세포는 BrdU 양성 염색 세포를 계수하여 측정하였다. 도 27에 도시한 바와 같이, 위성 세포에서 miR-1/206의 과발현은 그들의 증식을 억제한다.

[0326] miR-1/206은 위성 세포의 분화를 증가시킨다

분화 역학 분석을 위해, 단일 근섬유로부터 얻은 위성 세포를 DMEM + 20% FBS 및 10 ng/ml의 bFGF 중의 콜라겐 코팅된 24개 웨 평판 상에 도말하였다. 세포들을 약  $5 \times 10^3$  세포/cm<sup>2</sup>의 밀도로 도말하고, miR-1/206 레트로바이러스 또는 대조군 레트로바이러스로 감염시켰다. 일단 bFGF가 배양 배지로부터 제거되면, 위성 세포는 자발적으로 세포 사이클을 떠나서 분화한다. 도 28 및 29에 도시한 바와 같이, miR-1/206의 과발현은 위성 세포의 분화를 증가시키고, 그 분화 역학을 촉진한다.

[0328] 요약하면, 본 실시예에 제시된 데이터는 miR-1 및 miR-206이 골격근 위성 세포 증식 및 분화 과정을 조절하는데 중요한 역할을 함을 입증하는 것이다. 골격근 재생 및 복구 과정에서 위성 세포의 중요한 기능이 주어지면, 이론으로 구속하고자 하는 의도 없이, miR-1, miR-206 및 miR-133은 골격근 재생에 중요하다는 것이 시사되고 있다 (도 30).

[0329] 참고 문헌

[0330] 아래에 열거되는 참고 문헌뿐만 아니라, 본 명세서 중에 인용된 모든 참고 문헌은 이들이 본원에 이용되는 방법론, 기술 및/또는 조성물에 대해 보충하거나, 설명하거나, 배경을 제시하거나 또는 교시하는 정도로 본원에 참고로 인용한다.

1. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-97 (2004).
2. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350-5 (2004).
3. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-54 (1993).
4. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855-62 (1993).
5. Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. & Bartel, D.P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**, 83-6 (2004).
6. He, L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828-33 (2005).
7. Giraldez, A.J. et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* **308**, 833-8 (2005).
8. Zhao, Y., Samal, E. & Srivastava, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **436**, 214-20 (2005).
9. Thomson, J.M., Parker, J., Perou, C.M. & Hammond, S.M. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods* **1**, 47-53 (2004).
10. Blau, H.M. et al. Plasticity of the differentiated state. *Science* **230**, 758-66 (1985).
11. Soulez, M. et al. Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Mol Cell Biol* **16**, 6065-74 (1996).

12. Lu, J., McKinsey, T.A., Zhang, C.L. & Olson, E.N. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell* **6**, 233-44 (2000).
- 5 13. Lee, R.C. & Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862-4 (2001).
14. Lagos-Quintana, M. et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**, 735-9 (2002).
- 10 15. Sempere, L.F. et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* **5**, R13 (2004).
16. Wienholds, E. et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* **309**, 310-1 (2005).
- 15 17. Mansfield, J.H. et al. MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* **36**, 1079-83 (2004).
18. Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C. & Zamore, P.D. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* **2**, E98 (2004).
19. Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y. & Tuschl, T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *Rna* **10**, 544-50 (2004).
- 20 20. Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. & Burge, C.B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787-98 (2003).
- 25 21. Kiriakidou, M. et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* **18**, 1165-78 (2004).
22. Krek, A. et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* **37**, 495-500 (2005).
- 30 23. McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Lu, J. & Olson, E.N. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* **408**, 106-11 (2000).

24. Wang, D. et al. Regulation of cardiac growth and development by SRF and its cofactors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **67**, 97-105 (2002).
- 5 25. Li, S. et al. Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1082-7 (2005).
26. Wang, D. et al. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* **105**, 851-62 (2001).
- 10 27. Cao, D. et al. Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin. *Mol Cell Biol* **25**, 364-76 (2005).
28. Kroll, K.L. & Amaya, E. Transgenic Xenopus embryos from sperm nuclear transplants reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* **122**, 3173-83 (1996).
- 15 29. Conlon, F.L., Sedgwick, S.G., Weston, K.M. & Smith, J.C. Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of Xbra in dorsal mesoderm. *Development* **122**, 2427-35 (1996).
- 20 30. Brown, D.D. et al. Tbx5 and Tbx20 act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. *Development* **132**, 553-63 (2005).
31. Freier et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:9373-9377.
32. Turner et al. (1987) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **LII**:123-133.
33. Smith & Waterman (1981) *Adv Appl Math* **2**:482-489.
- 25 34. Needleman & Wunsch (1970) *J Mol Biol* **48**:443-453.
35. Pearson & Lipman (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:2444-2448.
36. Ausubel et al., eds (1989) Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, New York, New York, United States of America.
37. Altschul et al. (1990) *J Mol Biol* **215**:403-410.
- 30 38. Henikoff & Henikoff (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10915-10919.
39. Karlin & Altschul (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:5873-5877.

40. Sambrook & Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 5 41. Agrawal S (ed.) Methods in Molecular Biology, volume 20, Humana Press, Totowa, New Jersey, United States of America.
42. Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes. Elsevier, New York, United States of America.
- 10 43. Tibanyenda et al. (1984) *Eur J Biochem* 139:19-27.
44. Ebel et al. (1992) *Biochem* 31:12083-12086.
45. Goeddel (1990) Gene Expression Technology. Methods in Enzymology, Volume 185, Academic Press, San Diego, California, United States of America.
- 15 46. Silhavy (1984) Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, United States of America.
47. Glover & Hames (1995) DNA Cloning: A Practical Approach, 2nd ed. IRL Press at Oxford University Press, Oxford ; New York.
48. Adelman et al. (1983) *DNA* 2:183-193.
- 20 49. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
50. Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
- 25 51. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051-4060.
52. Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P., and Pasquinelli, A. E. (2004). Trans-splicing and polyadenylation of *let-7* microRNA primary transcripts. *Rna* 10, 1586-1594.
- 30 53. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 1902-1910.

54. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419.
- 5 55. Basuyk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R., and Bertrand, E. (2003). Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* **31**, 6593-6597.
56. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-98.
- 10 57. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**, 3011-3016.
58. Yi, R., Doeble, B. P., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2005). Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *Rna* **11**, 220-226.
- 15 59. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* **10**, 185-191.
60. Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A. M., Evers, S., Macara, I. G., and Dargemont, C. (2004). Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. *J Biol Chem* **279**, 884-891.
- 20 61. Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**, 23-34.
62. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschi, T., and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834-838.
- 25 63. Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., and Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in

- synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654-2659.
- 5           64. Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- 10          65. Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
- 15          66. Pillai, R. S., Artus, C. G., and Filipowicz, W. (2004). Tethering of human go proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna* 10, 1518-1525.
- 20          67. Doench, J. G., and Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18, 504-511.
- 25          68. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- 30          69. Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., and Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35, 215-217.
70. Harfe, B. D., McManus, M. T., Mansfield, J. H., Hornstein, E., and Tabin, C. J. (2005). The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
71. Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., Hammond, S. M., Bartel, D. P., and Schier, A. F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833-838.
72. Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschi, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., and Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226-230.
73. Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R. J., Jain, R., et al.

- (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **279**, 52361-52365.
74. He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., and Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828-833.
- 5 75. Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**, 83-86.
76. Johnston, R. J., and Hobert, O. (2003). A microRNA controlling 10 left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **426**, 845-849.
- 15 77. Chang, S., Johnston, R. J., Jr., Frokjaer-Jensen, C., Lockery, S., and Hobert, O. (2004). MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature* **430**, 785-789.
78. Yekta, S., Shih, I. H., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**, 594-596.
79. Mansfield, J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenauer, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G., et al. (2004). MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes 20 uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* **36**, 1079-1083.
80. Zhao, Y., Samal, E., and Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **436**, 214-220.
- 25 81. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787-798.
82. John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D. S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* **2**, e363.
- 30 83. Kiriakidou, M., Nelson, P. T., Kouranov, A., Fitziev, P., Bouyioukos, C., Mourelatos, Z., and Hatzigeorgiou, A. (2004). A combined

- computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 18, 1165-1178.
- 5 84. Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., and Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500.
- 10 85. Rajewsky, N., and Socci, N. D. (2004). Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol* 267, 529-535.
86. Nicol, R. L., Frey, N., Pearson, G., Cobb, M., Richardson, J., and Olson, E. N. (2001). Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *Embo J* 20, 2757-2767.
- 15 87. Jones, W. K., Grupp, I. L., Doetschman, T., Grupp, G., Osinska, H., Hewett, T. E., Boivin, G., Gulick, J., Ng, W. A., and Robbins, J. (1996). Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart. *J Clin Invest* 98, 1906-1917.
88. Liu, P., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 13, 476-484.
- 20 89. Cotta-de-Almeida, V., Schonhoff, S., Shibata, T., Leiter, A., and Snapper, S. B. (2003). A new method for rapidly generating gene-targeting vectors by engineering BACs through homologous recombination in bacteria. *Genome Res* 13, 2190-2194.
- 25 90. Subramaniam, A., Jones, W. K., Gulick, J., Wert, S., Neumann, J., and Robbins, J. (1991). Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266, 24613-24620.
91. Sanbe, A., Gulick, J., Hanks, M. C., Liang, Q., Osinska, H., and Robbins, J. (2003). Reengineering inducible cardiac-specific transgenesis with an attenuated myosin heavy chain promoter. *Circ Res* 92, 609-616.

92. Czubryt, M. P., McAnally, J., Fishman, G. I., and Olson, E. N. (2003). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1711-1716.
- 5 93. Ito, M., Yuan, C. X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J. D., Yamamoto, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J., and Roeder, R. G. (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell* **3**, 361-370.
- 10 94. Fondell, J. D., Ge, H., and Roeder, R. G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8329-8333.
- 15 95. Treisman, J. (2001). Drosophila homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development* **128**, 603-615.
96. Ito, M., Yuan, C. X., Okano, H. J., Darnell, R. B., and Roeder, R. G. (2000). Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell* **5**, 683-693.
- 20 97. Muncke, N., Jung, C., Rudiger, H., Ulmer, H., Roeth, R., Hubert, A., Goldmuntz, E., Driscoll, D., Goodship, J., Schon, K., and Rappold, G. (2003). Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries). *Circulation* **108**, 2843-2850.
- 25 98. Lompre, A. M., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1984). Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem* **259**, 6437-6446.
- 30 99. Everett, A. W., Sinha, A. M., Umeda, P. K., Jakovcic, S., Rabinowitz, M., and Zak, R. (1984). Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in the alpha- and beta-myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart. *Biochemistry* **23**, 1596-1599.

100. Darling, D. S., Carter, R. L., Yen, P. M., Welborn, J. M., Chin, W. W., and Umeda, P. K. (1993). Different dimerization activities of alpha and beta thyroid hormone receptor isoforms. *J Biol Chem* 268, 10221-10227.
- 5 101. Subramaniam, A., Gulick, J., Neumann, J., Knotts, S., and Robbins, J. (1993). Transgenic analysis of the thyroid-responsive elements in the alpha-cardiac myosin heavy chain gene promoter. *J Biol Chem* 268, 4331-4336.
- 10 102. Gustafson, T. A., Markham, B. E., Bahl, J. J., and Morkin, E. (1987). Thyroid hormone regulates expression of a transfected alpha-myosin heavy-chain fusion gene in fetal heart cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3122-3126.
- 15 103. Santalucia, T., Boheler, K. R., Brand, N. J., Sahye, U., Fandos, C., Vinals, F., Ferre, J., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (1999). Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle. *J Biol Chem* 274, 17626-17634.
- 20 104. Hagen, G., Muller, S., Beato, M., and Suske, G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* 13, 3843-3851.
- 20 105. Hagen, G., Muller, S., Beato, M., and Suske, G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* 20, 5519-5525.
- 25 106. Schonberger, J., Wang, L., Shin, J. T., Kim, S. D., Depreux, F. F., Zhu, H., Zon, L., Pizard, A., Kim, J. B., Macrae, C. A., *et al.* (2005). Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 37, 418-422.
- 30 107. Wayne, S., Robertson, N. G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., Tranebjarg, L., Morton, C. C., Ryan, A. F., Van Camp, G., and Smith, R. J. (2001). Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 10, 195-200.

108. Borsani, G., DeGrandi, A., Ballabio, A., Bulfone, A., Bernard, L., Banfi, S., Gattuso, C., Mariani, M., Dixon, M., Donnai, D., *et al.* (1999). EYA4, a novel vertebrate gene related to *Drosophila eyes absent*. *Hum Mol Genet* 8, 11-23.
- 5 109. Bonini, N. M., Leiserson, W. M., and Benzer, S. (1993). The *eyes absent* gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 72, 379-395.
- 10 110. Heanue, T. A., Reshef, R., Davis, R. J., Mardon, G., Oliver, G., Tomarev, S., Lassar, A. B., and Tabin, C. J. (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by *Dach2*, *Eya2*, and *Six1*, homologs of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev* 13, 3231-3243.
- 15 111. Xu, X., Rich, E. S., Jr., and Seldin, D. C. (1998). Murine protein kinase CK2 alpha: cDNA and genomic cloning and chromosomal mapping. *Genomics* 48, 79-86.
112. Pinna, L. A., and Meggio, F. (1997). Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res* 3, 77-97.
- 20 113. Granzier, H. L., and Labeit, S. (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* 94, 284-295.
114. Yan et al (2003). *J. Biol. Chem.* 278(10), 8826-8836.

[0336]

### 도면의 간단한 설명

[0161]

도 1a-1e는 발육 중의 심근 및 골격근에서의 miR-1 및 miR-133의 발현 데이터를 도시한 것이다.

[0162]

도 1a는 성장 배지 (GM) 또는 분화 배지 (DM)에서 배양된 C2C12 근원세포로부터 각각 0, 1, 3 및 5일 동안 얻은 miRNA 배열 발현 데이터를 나타낸다. 정규화 로그 (밑이 2임) 데이터는 유전자에 의해 계층적으로 집합되어 열지도로 작성된다. 신호의 범위는 -4배로부터 +4배까지였다. 황색은 평균에 상대적으로 고발현을 나타내고, 청색은 저발현을 나타내며, 분화 배지에서 상향 조절되는 miRNA만이 나타나 있다.

[0163]

도 1b는 GM 또는 분화 배지 DM에서 배양된 C2C12 근원세포로부터 각각 0, 1, 3 및 5일 동안 분리된 전체 RNA를 사용한 miR-1 및 miR-133의 발현에 관한 노던 블롯 분석을 도시한 것이다. tRNA를 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0164]

도 1c는 마우스 성체 조직에서 miR-1 및 miR-133의 발현에 관한 노던 블롯 분석을 도시한 것이다.

[0165]

도 1d는 13.5일째의 배 (E13.5) 및 16.5일째의 배 (E16.5)의 마우스 조직에서 miR-1 및 miR-133의 발현에 관한 노던 블롯을 도시한 것이다.

[0166]

도 1e는 신생물 마우스 조직에서 miR-1 및 miR-133의 발현에 관한 노던 블롯 분석을 도시한 것이다. 성체의 심장 및 골격근에서 얻은 동일량의 전체 RNA를 블롯내로 로딩하여 배와 신생물 RNA에 대한 비교용으로 사용하였다 (도 1d 및 1e).

[0167]

도 2a-2j는 miR-1 및 miR-133에 의한 근원세포 증식 및 분화의 조절을 나타내는 데이터를 도시한 것이다. 성장 배지 (GM)에서 배양된 C2C12 근원세포를 miR-1, miR-133 및 대조군으로서 GFP에 대한 이중 가닥 miRNA 이중체와 함께 전기 천공하였다.

[0168]

도 2a-2e는 세포들을 형질감염후 24 시간 동안 GM에서 연속 배양한 다음, 미오게닌 (도 2a)에 대한 면역 염색 전에 12 시간 동안 또는 MHC (도 2b)에 대한 면역 염색 전에 36 시간 동안 분화 배지 (DM)로 이동시켜 배양한 실험의 결과를 나타낸다. GM에서 배양된 C2C12 근원세포를 miR-1, miR-133 (또는 나타낸 바와 같이 그 돌연변이체) 또는 miR-208 및 대조군으로서 GFP에 대해 이중 가닥 miRNA 이중체와 함께 전기 천공하고 지시된 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅하기 전에 24 시간 동안 배양하거나 (도 2c); 세포들을 24 시간 동안 DM으로 이동시키고, 지시된 유전자에 대해 RT-PCR을 수행하거나 (도 2d); 또는 세포들을 24 시간 동안 DM으로 이동시키고, 지시된

항체를 사용하여 웨스턴 블로팅을 수행하였다 (도 2e).

[0169] 도 2f-2h는 GM에서 배양된 C2C12 근원세포를 miR-1, miR-133 또는 miR-208 및 대조군으로서 GFP에 대해 2'-0-메틸 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제와 함께 전기 천공하는 실험의 결과를 나타낸다. 세포들을 형질감염후 GM에서 24 시간 동안 배양한 다음, 포스포-히스톤 H3에 대한 면역 염색 전에 12 시간 동안 (도 2f); 지시된 유전자에 대한 RT-PCR을 수행하기 전에 24 시간 동안 (도 2g); 또는 지시된 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅하기 전에 24 시간 동안 (도 2h) DM에 이동시켜 배양하였다.

[0170] 도 2i 및 2j는 GM에서 배양된 C2C12 근원세포를 miRNA 이중체 또는 지시된 대로 2'-0-메틸 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제와 함께 전기 천공하는 실험의 결과를 나타낸다. 세포들을 형질감염후 24 시간 동안 GM에서 배양한 다음, 미오케닌 (도 2i) 또는 포스포-히스톤 H3 (도 2j)에 대한 면역 염색 전에 12 시간 동안 DM에 이동시켜 배양하였다. 양성 염색 세포를 계수하고, GFP 대조군 (100%)에 대한 발현 레벨로서 데이터를 제시하였다.

[0171] 도 3a-3k는 생체내에서 miR-1 및 miR-133에 의한 심근 및 골격근 발생의 제어를 나타내는 데이터를 도시한 것이다.

[0172] 도 3a-3h는 개구리 배 실험에서 얻은 데이터를 나타낸다. 무주사된 (도 3a 및 3b), GFP RNA 대조군-주사된 (도 3c 및 3d), miR-1-주사된 (도 3e 및 3f) 또는 miR-133-주사된 (도 3g 및 3h) 배들로부터 유래된 개구리 배는 항-트로포마이신으로 염색하여 명시야 (도 3a, 3c, 3e 및 3g) 또는 형광 (도 3b, 3d, 3f 및 3h) 하에 단계 32에서 나타냈다. 심장 조직에 대한 염색의 부재 (도 3b 및 3d, H 화살표) 및 분절된 체절의 파괴 (도 3f 및 3h, S 화살표)를 주목할 것.

[0173] 도 3i-3k는 개구리 배의 횡단면으로부터 얻은 데이터를 나타낸다. 무주사된 (도 3i), miR-1 주사된 (도 3j) 또는 miR-133 주사된 (도 3k) 배들로부터 얻은 단계 32의 심장의 위치에 상응하는 개구리 배의 횡단면을 항-트로포마이신으로 염색하여 체절 (S 화살표)과 심장 조직 (H 화살표)을 가시화하고, 항-포스포-히스톤 H3 (적색)으로 염색하여 S 단계의 세포들을 가시화하였다. 각각의 주사 세트는 2회 이상 독립적으로 수행하고, 전체 착상 면역염색에 의해 평가되는 50개 배중 최소 90% 이상에서 표현형을 관찰하였다.

[0174] 도 4a-4i는 골격근에서의 miR-1 및 miR-133 표적 유전자의 동정을 나타내는 데이터를 도시한 것이다.

[0175] 도 4a는 miR-133 및 miR-1에 의한 SRF 및 HDAC4 3'UTR의 억압을 나타내는 데이터를 도시한 것이다. 마우스 SRF 3' UTR (SRF-3'-UTR)로부터 miR-133 상보성 부위, 마우스 HDAC4 3' UTR (HDAC4-3'-UTR)로부터 miR-1 상보성 부위 또는 miR-133 (miR-133-1uc) 또는 miR-1 (miR-1-1uc)의 완전 안티센스 서열을 보유하는 루시퍼라제 리포터를 지시된 miRNA 발현 벡터 또는 그 돌연변이체로 동시 형질감염시켰다. 루시퍼라제 활성을 형질감염 48 시간 후에 측정하였다. 데이터는 3종의 독립적 실험을 두번씩 실시하여 얻은 평균 ± 표준편차를 나타낸다 (\* P < 0.05).

[0176] 도 4b는 C2C12 근원섬유 내로 형질감염된 SRF-3'-UTR, HDAC4-3'-UTR 및 MCK-luc 루시퍼라제 리포터의 결과를 나타내는 데이터를 도시한 것이다. 세포들을 루시퍼라제 활성을 측정하기 전에 GM에서 24 시간 동안 (GM) 유지하거나 1일 동안 (DM1) 또는 3일 동안 (DM3) DM으로 이동시켜 배양하였다.

[0177] 도 4c-4e는 GM에서 배양되고, 지시된 이중 가닥 miRNA 이중체 (또는 그 돌연변이체) 또는 miR-208 및 대조군으로서 GFP와 함께 전기 천공하였다. 항-SRF 및 항-HDAC4 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅하기 전에 형질감염후 24 시간 동안 GM에서 세포들을 배양하고 (도 4c); 세포들을 DM으로 이동시켜 24 시간 동안 배양하고 지시된 유전자에 대해 RT-PCR을 수행하고 (도 4d); 세포들을 DM으로 이동시켜 24 시간 동안 배양하고 지시된 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅을 실시하였다. GM에서 배양된 C2C12 근원섬유는 지시된 2'-0-메틸 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제와 함께 전기 천공하였다 (도 4e).

[0178] 도 4f 및 4g는 형질감염후 GM에서 24 시간 동안 배양한 다음, 지시된 유전자에 대한 RT-PCR (도 4f) 및 지시된 항체를 사용하는 웨스턴 블로팅 (도 4g)을 수행하기 전에 DM으로 이동시켜 24 시간 동안 배양한 세포들의 결과를 나타내는 데이터를 도시한 것이다.

[0179] 도 4h는 GM에서 배양하고, SRF 또는 HDAC4에 대한 지시된 이중가닥 miRNA 이중체 또는/및 발현 플라스미드와 함께 전기 천공한 C2C12 근원섬유의 결과를 나타내는 데이터를 도시한 것이다. 세포들을 형질감염후 GM에서 24 시간 동안 배양하였다. 지시된 항체를 사용하여 DM으로 이동시킨 지 24 시간 후에 웨스턴 블로팅을 수행하였다.

[0180] 도 4i는 GM 또는 DM에서 0, 1, 3 또는 5일 동안 배양한 C2C12 근원섬유의 결과를 나타내는 데이터를 도시한 것

이다.

[0181] 도 5는 골격근 증식 및 분화의 miR-1 및 miR-133-매개된 조절에 대한 모델을 나타낸다.

[0182] 도 6은 성장 배지 (GM) 또는 분화 배지 (DM)에서 각각 0, 1, 3 및 5일 동안 배양한 C2C12 근원세포로부터 miRNA 배열 발현 데이터에서 얻은 분석 데이터를 나타낸다. 정규화 로그 (밀이 2임) 데이터는 유전자에 의해 계층적으로 집합되어 열지도로 작성된다. 신호의 범위는 -4배로부터 +4배까지였다. 밝은 음영은 평균에 상대적으로 고발현을 나타내고, 어두운 음영은 저발현을 나타낸다.

[0183] 도 7a-7d는 C2C12 세포에서 miR-1, miR-133 및 골격근 분화 마커 유전자의 발현의 데이터를 나타낸다.

[0184] 도 7a 및 7b는 GM 또는 분화 배지 (DM)에서 각각 0, 1, 3 및 5일 동안 배양된 C2C12 근원세포로부터 얻은 전체 RNA를 사용한 miR-1 (도 7a) 및 miR-133 (도 7b)의 발현에 관한 노던 블롯 분석을 도시한 것이다. 두 성숙 miRNA 및 그 전구체 (Pre)가 표시되어 있다. tRNA를 로딩 대조군으로서 사용하였다.

[0185] 도 7c는 골격근 분화 마커 유전자의 반-정량적 RT-PCR 분석을 나타낸다. GAPDH를 균등 로딩용 대조군으로서 사용하였다.

[0186] 도 7d는 골격근 분화 마커의 발현을 나타낸다. C2C12 근원세포를 성장 배지 (GM) 또는 분화 배지 (DM)에서 0, 1, 3 및 5일 동안 배양하고, 지시된 항체를 사용하여 세포 추출물과 함께 웨스턴 블롯을 수행하였다.  $\beta$ -튜불린이 로딩 대조군으로 작용하였다.

[0187] 도 8a-8f는 성체 마우스 및 전체 발생 단계에서 심근 및 골격근내 miR-1 및 miR-133의 발현 데이터를 도시한 것이다. 노던 블롯 분석은 성체 마우스 조직에서 miR-1 (도 8a) 및 miR-133 (도 8d)의 발현에 대해 나타난다. 노던 블롯 분석은 13.5일째 배 (E13.5) 및 16.5일째 배 (E16.5)의 마우스 조직에서 miR-1 (도 8b) 및 miR-133 (도 8e)의 발현에 대해 나타난다. 성체 심근 및 골격근에서 얻은 전체 RNA의 동일량도 역시 블롯에서 비교용으로 로딩하였다. 노던 블롯 분석은 신생물 마우스 조직에서 miR-1 (도 8c) 및 miR-133 (도 8f)의 발현에 대해 나타난다. 성체 심근 및 골격근에서 얻은 전체 RNA의 동일량도 역시 블롯에서 비교용으로 로딩하였다. 두 성숙 miRNAs 및 그 전구체 (Pre)가 표시되어 있다. tRNA를 로딩 대조군으로서 사용하였다.

[0188] 도 9a-9e는 심근 및 골격근에서 miR-1 및 miR-133 1차 전사체의 발현에 관한 데이터를 도시한 것이다.

[0189] 도 9a는 마우스 염색체 2 및 18 상에 집합된 miR-1 및 miR-133 유전자를 나타내는 다이아그램이다. 도 9b-9e에는 노던 블롯에 사용된 프로브가 표시되어 있다.

[0190] 도 9b-9e 염색체 2 (도 9d 및 9e) 및 염색체 18 (도 9b 및 9c)로부터 miR-1 (도 9c 및 9e) 및 miR-133 (도 9b 및 9d)에 대한 1차 전사체의 발현에 관한 노던 블롯 분석의 데이터를 도시한 것이다. 지시된 성체 마우스 조직으로부터 얻은 20  $\mu$ g의 전체 RNA를 사용하였다.

[0191] 도 10a-10g는 miR-1 및 miR-133 인핸서가 심근 및 골격근에서 리포터 유전자 발현을 유도할 수 있다는 것을 나타내는 데이터를 도시한 것이다.

[0192] 도 10a는 단계 28에서 체절 (S, 화살표) 발현을 예시하는 dsRed에 연결된 마우스 miR-1 및 miR-133 게놈 서열에 대한 제노푸스 라비스 형질전환체의 데이터를 도시한 것이다.

[0193] 도 10b는 광시야 하에 단계 46에서 miR-1 및 miR-133이 포함하는 형질전환 유전자를 보유하는 형질전환 (Tg) 제노푸스 라비스 (아래쪽 배) 및 음성 대조군 (비형질전환체, Ct, 위쪽 배)를 도시한 것이다.

[0194] 도 10c는 형광 하에 도 10b에 도시된 것과 동일한 배에 관한 사진이다.

[0195] 도 10d는 심장 (H, 화살표) 및 아가미궁 (BA, 화살표)에서 형질전환 유전자의 발현을 나타내는 광시야 하에 도 10b에서의 형질전환 배의 고배율 광학현미경 사진이다.

[0196] 도 10e는 심장 (H, 화살표) 및 아가미궁 (BA, 화살표)에서 형질전환 유전자의 발현을 나타내는 형광 하에 도 10b에서의 형질전환 배의 고배율 광학현미경 사진이다.

[0197] 도 10f는 체절 (S, 화살표)에서 형질전환 유전자의 발현을 나타내는 단계 46의 형질전환 배의 고배율 광학현미경 사진이다.

[0198] 도 10g는 마우스 염색체 2로부터 miR-1/133 인핸서의 게놈 DNA 서열 (서열번호 82)을 도시한 것이다. 추정 MEF2 부위 및 CArG 박스가 표시되어 있고, 이를 부위 내로 도입된 돌연변이가 표시되어 있다.

[0199]

도 11a-11h는 C2C12 세포에서 miR-133에 의한 miR-133 센서의 억압을 입증하는 데이터를 도시한 것이다. miR-133 센서를 안정하게 발현하는 C2C12 세포를 GFP (대조군), 야생형 miR-133 (miR-133), "종자" 서열이 돌연변이되어 있는 돌연변이 miR-133 (miR-133mut)에 대한 발현 벡터, 또는 miR-133 발현 벡터와 2'-0-메틸 안티센스 올리고의 조합 (miR-133 + 2'-0-메틸)으로 형질감염시켰다. 세포들을 분화 배지로 이동시켜 12 시간 동안 배양하고, dsRed 리포터 유전자 (도 11e-11h)의 발현을 나타내기 위해 상대조 (P/C) (도 11a-11d) 또는 형광을 사용하여 이미지를 얻었다. 각 조건으로부터의 세포들을 모으고, dsRed 리포터 유전자의 발현을 FACS 분석 (아래 패널)을 사용하여 정량 분석하였다. 라인 아래의 열린 영역은 세포의 자동 형광을 나타내며, 라인 아래의 줄무늬 영역은 ds-Red 발현을 나타낸다.

[0200]

도 12는 *HDAC4* 및 *SRF* 유전자의 3' UTR에서 miR-1 및 miR-133 표적 부위의 서열을 도시한 것이다. 위쪽 패널: 보존된 척추동물종인 인간 (서열번호 24), 침팬지 (서열번호 25), 마우스 (서열번호 26), 래트 (서열번호 27), 개 (서열번호 28) 및 닭 (서열번호 29)으로부터 얻은 *HDAC4* 3' UTR 서열, 및 이들과 miR-1 (서열번호 1) 및 miR-206 (서열번호 3)과의 정렬. 아래 패널: 인간 (서열번호 30 및 31) 및 래트 (서열번호 32 및 33)으로부터 *SRF* 3' UTR 서열, 및 이들과 miR-133의 정렬. 보존된 뉴클레오티드 서열이 대문자로 나열되어 있다.

[0201]

도 13은 miRNA 생물 발생의 모델을 도시한 것이다. (A) pri-miRNA는 RNA 폴리머라제 II에 의해 핵에서 전사되고, (B) 드로샤에 의해 스템-루프를 포함하는 pre-miRNA로 가공된다. (C) 엑스포틴-5는 드로샤에 의해 남겨진 3' 돌출부를 인지하고 pre-miRNA를 세포질내로 배출하며, (D) 여기서, 다이서는 스템-루프 아래의 pre-miRNA를 절단하여 ~22개의 뉴클레오티드 이중체를 생성한다. (E) 단일 가닥이 RISC에 도입되며, (F) 이것은 mRNA의 3' 비해독 영역 내의 상보성 서열을 인지하고 해독에 의한 억제 또는 mRNA 절단에 의한 유전자 발현을 조절한다.

[0202]

도 14a-14c는 miR-208 계놈학을 도시한 것이다. 도 14a는 마우스 전구체 miR-208 서열 (서열번호 34)은 mFold 를 사용하여 풀딩하여 오른쪽 성숙 miR-208 (서열번호 4)이 되는 것을 도시한다. 도 14b는 마우스 (서열번호 35), 래트 (서열번호 36) 및 인간 (서열번호 37) 전구체 miR-208 서열의 배열을 도시한다. 성숙 miR-208 서열은 도 14A의 위쪽 우측에 도시되어 있다. 별표는 완전한 서열 보존을 나타낸다. 도 14c는 miR-208이 알파-MHC 인트론으로부터 기원함을 나타낸다. 마우스 miR-208은  $\alpha$ -MHC의 인트론 29 내에 배치된다. 유사하게, 인간의 miR-208은  $\alpha$ -MHC의 인트론 28 내에 배치된다.

[0203]

도 15a-15c는 miR-208이 발육 단계적으로 조절된다는 것을 입증하는 데이터를 도시한 것이다. 상이한 마우스 조직에서 얻은 전체 RNA를 블로팅하고, miR-208에 상보적인 5'-방사성 표지된 올리고데옥시뉴클레오티드로 프로브 처리하였다. 젤 상에 전체 RNA의 균등한 로딩은 이동 전에 에티듐 브로마이드 염색에 의해 입증되었다.

[0204]

도 15a는 miR-208이 심장 특이적임을 입증하는 데이터를 도시한 것이다. 위쪽 신호는 pre-miR-208 전사체인 반면, 아래쪽 신호는 성숙한 22 nt 형태이다.

[0205]

도 15b는 성체 심근 및 골격근에 상대적인 신생물 마우스로부터 얻은 조직에서의 miR-208 발현의 데이터를 도시한 것이다.

[0206]

도 15c는 성체 심근 및 골격근에 상대적인 E13.5 및 E16.5로부터 얻은 다양한 조직에서의 miR-208 발현의 데이터를 도시한 것이다.

[0207]

도 16a 및 16b는 심근세포에서의 이소성 miR-208 발현의 데이터를 도시한 것이다. 도 16a는 방사성 표지된 miR-208 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하여 프로브 처리된 Ad-GFP 또는 Ad-208로 감염된 심근세포로부터 준비되는 노던 블롯을 도시한 것이다. 도 16b는 MOI 1 및 10에서 감염된 심근세포의 형광현미경 사진을 도시한 것이다.

[0208]

도 17은 본원에 개시된 조건부 형질전화 시스템의 다이아그램을 도시한 것이다. 마우스의 형질전환 라인의 두 독립 라인을 이용하였다:  $\alpha$ -MHC 프로모터의 제어 하에 tTA-VP16 융합 단백질을 발현하는 라인과, CMV 최소 프로모터의 제어 하에 miR-208 형질전환 유전자를 포함하는 두 번째 라인. CMV 최소 프로모터는 바로 상류에 위치한 테트라사이클린 오페론 (tetO)의 몇 개의 반복 서열을 가진다. 두 라인은 함께 교배되어 이중 형질전환체인 4 마리 마우스 중의 한 마리로서 멘델의 유전 패턴을 산출한다. 독시사이클린 (DOX)을 이중 형질전환 마우스에 투여하면, tTA-VP16 단백질이 DOX에 의해 결합되고 miR-208의 전사가 억제된다. DOX가 부재하면, tTA 단백질이 tetO 콘카테머에 결합하는데, 이 콘카테머는 VP16 도메인이 CMV 최소 프로모터로부터 miR-208 전사를 유도하게 한다. 심장 특이적 표적 유전자 발현은 DOX의 첨가 또는 제거에 의해 개시 또는 중단될 수 있다. 본원에 참고로 인용한 James 등의 문헌 [Am J Physiol 273: H2105-H211] 참조.

[0209]

도 18a-18c는 miR-208 표적 Thrap1을 입증하는 데이터를 나타내는 그래프 및 서열 배열이다. 안티센스 miR-208 서열을 가진 루시퍼라제 리포터 (mir-208 센서), 또는 헤모글로빈- $\beta$ (Hbb)의 3' UTR 및 갑상선 호르몬 연합 단백질 1 (Thrap1) (도 18a) 또는 Thrap1 3' UTR (도 18b)로부터 유래한 추정 miR-208 결합 부위의 4개의 사본을 루시퍼라제 유전자의 하류에 직접 부착시키고, 293T 세포에서 증가하는 양의 pCDNA3.1 miR-208로 동시 형질감염시켰다. miR-208 센서, Thrap1 및 4x Thrap1 르리포터는 모두 용량 의존적 방식으로 억압되는 반면에, 음성 대조군 CSNK는 유의 수준으로 변화되지는 않았다. 도 18c는 인간 (서열번호 38) 및 마우스 (서열번호 39) Thrap1 유전자의 3' UTR 내의 예측된 miR-208 표적 부위에 결합된 성숙 miR-208 서열 (서열번호 4)을 나타낸다. 두 예측된 표적 (miR-208의 5' 말단에서 두 번째에서부터 8번째까지의 뉴클레오티드) 내에 완전히 보존된 표적 종자 영역을 주목할 것.

[0210]

도 19는 심장 미오신 중쇄 아이소형 전환의 miR-208 조절 모델을 도시한 것이다. 갑상선 호르몬 핵 수용체 (TR)는  $\alpha$ -MHC 및  $\beta$ -MHC 유전자의 프로모터 내의 갑상선 수용체 요소 (TRE)에 결합한다.  $\alpha$ -MHC 프로모터는 두 개의 TR에 의해 결합된 전체-TRE를 포함하는 반면에,  $\beta$ -MHC는 반-TRE에서 하나의 TR에 의해 결합된다. TR 단량체 및 이량체는 둘다 TR 공인자인 TRAP 복합체와 이종 이량체를 형성할 수 있다. 갑상선 호르몬 ( $T_3$ )은 TR에 결합하고,  $\alpha$ -MHC의 발현을 유도하면서  $\beta$ -MHC의 전사를 억제한다. miR-208은  $\alpha$ -MHC 단백질과 함께 동시에 발현되며, TRAP 복합체의 최대 서브유닛인 Thrap1의 해독을 조절하는 것으로 예측된다. miR-208이  $T_3$  신호 작용을 억제함으로써 심장 미오신 중쇄 아이소형 발현을 조절하는 음성 피드백 루프의 성분인 것으로 믿어지고 있다.

[0211]

도 20a 및 20b는 손상된/재생된 골격근의 miRNA 배열 분석으로부터 얻은 데이터를 도시한 것이다. 도 20a는 손상된 근육에서 하방 조절되는 miRNA로부터 얻은 데이터를 도시한 것이다. 도 20b는 손상된 근육에서 상방 조절되는 miRNA로부터 얻은 데이터를 도시한 것이다.

[0212]

도 21은 서열번호 6-9에 대한 예시적 서열을 나열한 것이다.

[0213]

도 22는 miRNA 센서를 사용하여 골격근 위성 세포를 분화시키는 데 있어서 miR-1의 발현을 입증하는 데이터를 도시한 것이다. miR-1 센서 (dsRed::miR-1) 또는 돌연변이 센서 (dsRed::miR-1-Mut)를 안정하게 발현시키는 위성 세포는 분화 배지로 이동시켜서 분화되도록 유도하는데, 분화 배지에서 bFGF가 제거되고, dsRed 리포터 유전자 (dsRed::miR-1) 또는 근육 분화 마커 유전자 미오신 중쇄 (MF20)의 발현을 나타내기 위해 형광을 사용하여 이미지를 얻었다. 센서 발현된 분화 세포에서 dsRed의 저발현은 이들 세포에서 miR-1의 발현을 나타낸다. DAPI은 세포핵을 염색한다.

[0214]

도 23a 및 23b는 miR-1/206 발현 시스템 (도 23a) 및 miR-1/206 센서 (도 23b)의 확립을 입증하는 데이터를 도시한 것이다. 도 23a는 miR-1/206 및 GFP 단백질 (도 23a, 왼쪽 패널)의 발현용 발현 구성체의 다이아그램을 도시한 것이다. 노던 블롯 분석은 miR-1 (도 23a, 오른쪽 패널)의 발현을 나타낸다. 도 23b는 293 세포에서 miR-1에 의해 miR-1/206 센서의 억압을 입증한다. miR-1/206 센서를 안정하게 발현시키는 293 세포를 miR-1/206 (SDSA::miR-1)용 발현 벡터로 형질감염시키고, dsRed 리포터 유전자 (dsRed::miR-1) 또는 miRNA::GFP (SDSA::miR-1) 또는 둘다의 오버레이 (Overlay)의 발현을 나타내기 위해 상대조 (293 세포) 또는 형광을 사용하여 이미지를 얻었다. dsRed 센서 및 miR-1의 발현이 예외적임을 주목하여야 하는데, 이것은 miR-1이 센서 리포터의 발현을 특이적으로 억압한다는 것을 나타낸다.

[0215]

도 24a 및 24b는 miR-1/206에 의한 Pax7 및 BDNF 3' UTR의 억압을 나타내는 데이터를 도시한 것이다. 도 24a는 MiR-1 (서열번호 1) 및 miR-206 (서열번호 3)과 함께 마우스 Pax7 UTR (서열번호 40-41)의 서열 배열이다. 마우스 Pax7 3' UTR (Luc-Pax7::UTR), 또는 그 돌연변이 (Luc-Pax7::UTR-M) 또는 BDNF 3' UTR (Luc-BDNF::UTR) 또는 그 돌연변이 (Luc-BDNF::UTR-M)를 포함하는 루시퍼라제 리포터를 지시된 miRNA 발현 벡터와 함께 동시 형질감염시켰다. 루시퍼라제 활성은 형질감염 48 시간 후에 측정하였다. 데이터는 3종 이상의 독립 실험을 중복으로 실시하여 얻은 평균  $\pm$  표준편차를 의미한다. miR-1/206은 Pax7 및 BDNF 3' UTR 리포터의 발현을 강하게 억압한다는 것을 주목할 것.

[0216]

도 25a-25c는 miR-1/206이 위성 세포에서 Pax3이 아닌 Pax7의 발현을 억제하는 것을 나타낸다. 도 25a는 Pax7 발현의 노던 블롯 분석인데, 이것은 Pax7 mRNA의 전사 레벨이 3' UTR에 의해 억제되지 않는다는 것을 입증하는 것이다. 도 25a는 Pax3이 아닌 Pax7 단백질 레벨이 miR-1/206 과발현된 위성 세포에서 더 낮음을 입증하는 웨스턴 블롯 분석이다. 도 25c는 골격근 위성 세포에서 Pax7 또는 Pax3 단백질 (Pax7 및 Pax3 패널) 또는 miRNA::GFP (SDSA::miR-1/206 패널) 또는 오버레이 (오버레이 패널)의 발현을 나타내기 위해 상대조 (상/대조 패널) 또는 형광을 사용하여 얻은 이미지를 나타낸다. Pax3이 아닌 Pax7의 발현이 miR-1/206에 의해 억제된다는

것을 주목할 것.

[0217] 도 26은 miR-1/206이 위성 세포에서 GDNF가 아닌 BDNF의 발현을 억제한다는 것을 나타낸다. 골격근 위성 세포에서 BDNF 또는 GDNF 단백질 (BDNF 및 GDNF 패널) 또는 miRNA::GFP (SDSA::miR-1/206 패널) 또는 오버레이 (오버레이 패널)의 발현을 나타내기 위해 상대조 (상/대조 패널) 또는 형광을 사용하여 이미지를 얻었다. GDNF가 아닌 BDNF의 발현이 miR-1/206에 의해 억제된다는 것을 주목할 것.

[0218] 도 27a 및 27b는 miR-1/206이 위성 세포 증식을 억제한다는 것을 나타낸다. 도 27a는 BrdU (BrdU 패널) 또는 miRNA::GFP (SDSA::miR-1+206 패널)에 의해 표시된 대로 세포 증식 지수를 나타내기 위해 상대조 또는 형광을 사용하여 얻은 위성 세포 이미지를 나타낸다. 더 적은 수의 BrdU 양성 세포들이 miR-1/206 과발현된 위성 세포에서 관찰되었다. 도 27b는 BrdU 양성 염색된 세포를 대조군과 miR-1/206 과발현된 세포에서 계수하고, 데이터를 BrdU 양성 세포 대 총 세포의 비로서 제시되는 실험들의 결과를 나타내는 그래프이다.

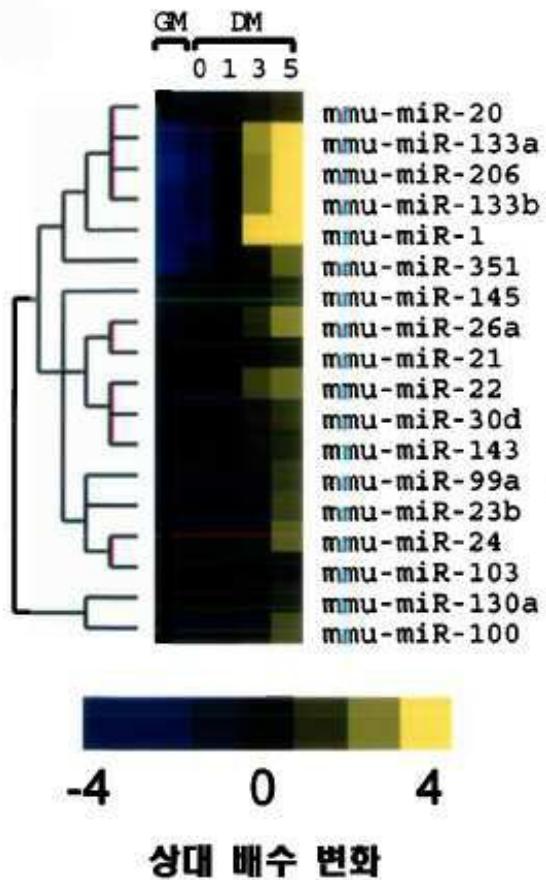
[0219] 도 28a 및 28b는 miR-1/206이 위성 세포 분화를 증가시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 28a 및 28b는 위성 세포들이 miR-1/206 (SDSA-miR-1+206) 또는 GFP (대조군)를 안정하게 과발현한 다음, 미오신 중쇄 (MyHC)에 대한 면역 염색 전에, GF가 제거되는 분화 배지로 이동시켜 24 시간 동안 (도 28a) 또는 48 시간 동안 (도 28b) 배양하는 실험들의 결과를 도시한 것이다. miR-1/206 과발현된 세포에서 MyHC 염색이 증가된 것을 주목할 것. DAPI는 세포핵을 표시한다.

[0220] 도 29는 miR-1/206의 과발현이 위성 세포 분화 역학을 증가시키는 실험들의 결과를 나타내는 그래프이다. miR-1/206 (■) 또는 GFP (대조군; ◆)를 과발현하는 위성 세포를 성장 배지에서 배양하거나, bFGF가 제거되는 분화 배지로 상이한 시점 (0, 12, 24, 36 및 48 시간)에 이동시켜 배양하고, 미오신 중쇄 (MyHC) 양성 세포를 기록하였다. 결과는 MyHC 양성 세포 대 총 세포의 비로서 제시하였다.

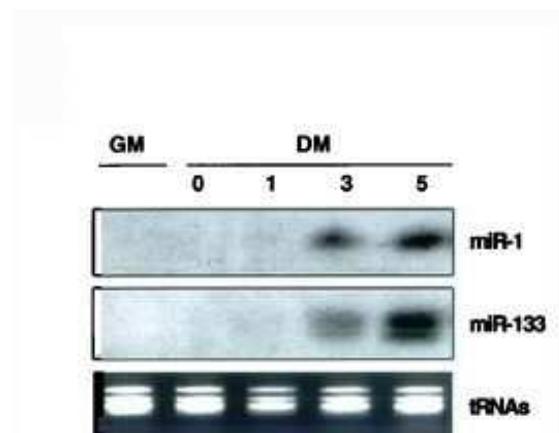
[0221] 도 30은 골격근 위성 세포 증식 및 분화의 조절에서 miR-1/206에 대한 모델을 도시한 것이다.

도면

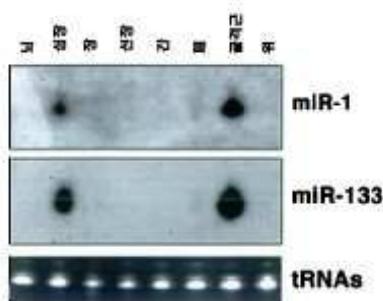
도면 1a



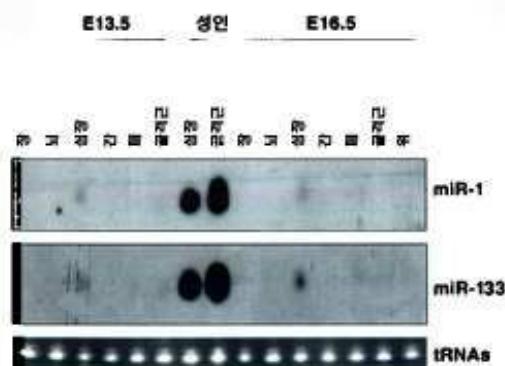
도면 1b



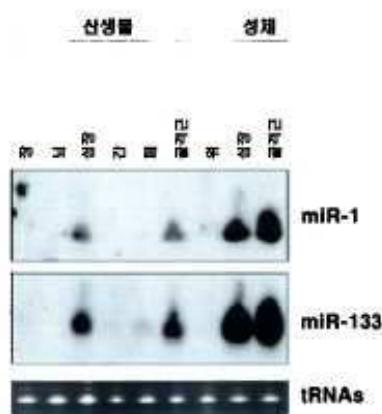
도면1c



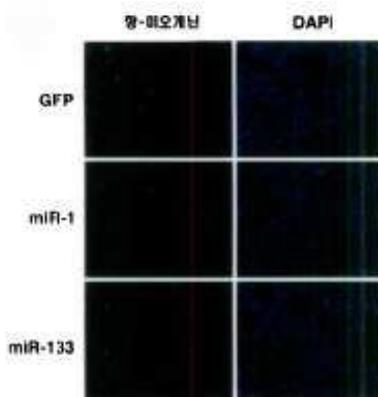
도면1d



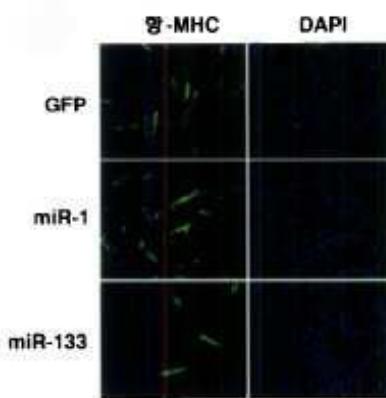
도면1e



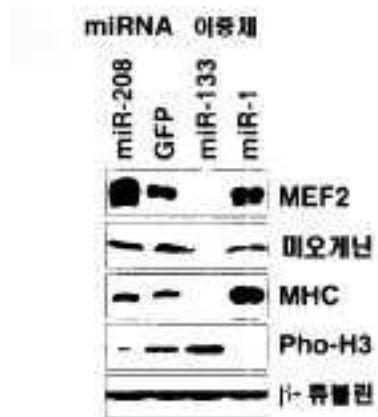
도면2a



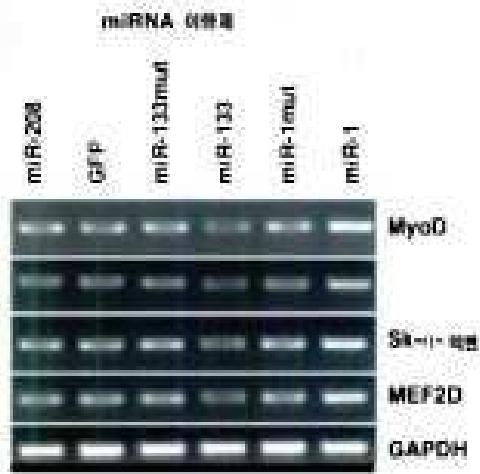
도면2b



도면2c



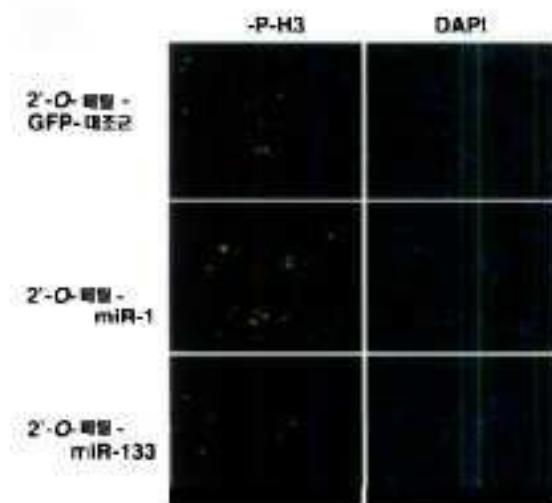
도면2d



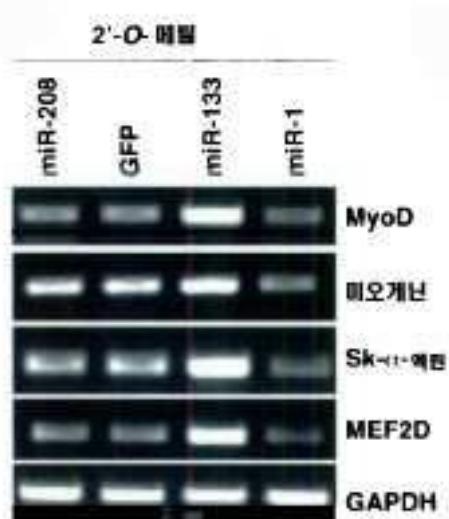
도면2e



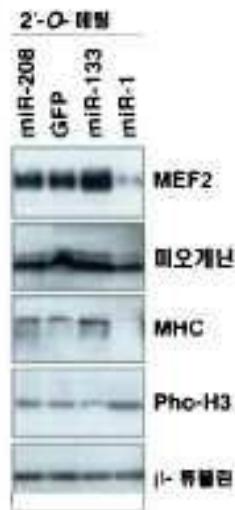
도면2f



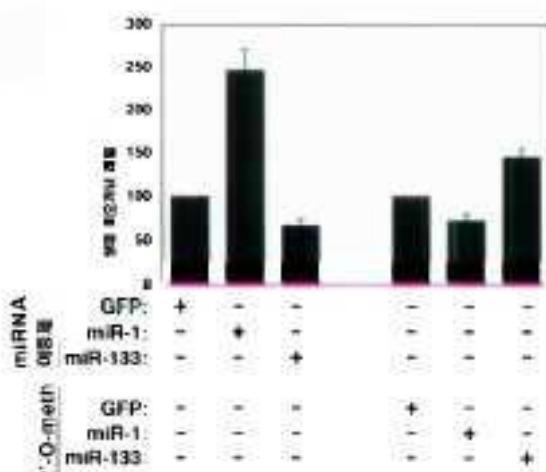
도면2g



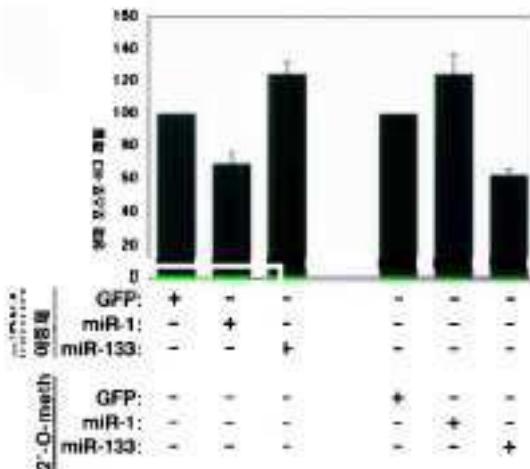
도면2h



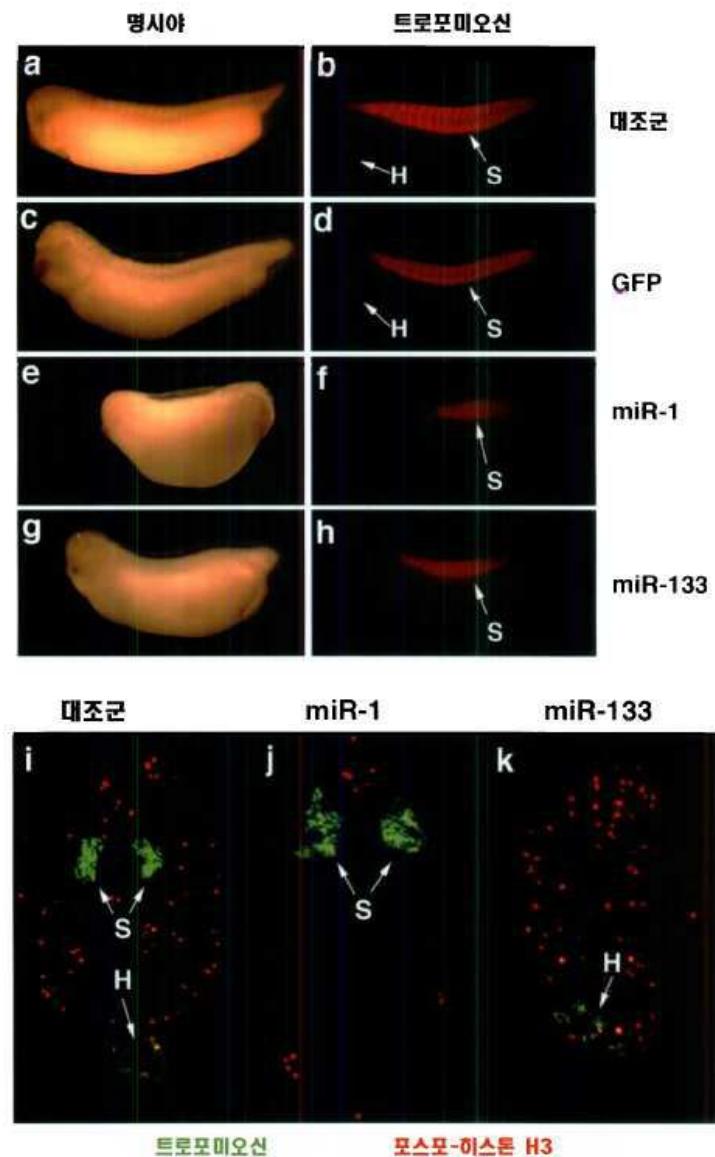
도면2i



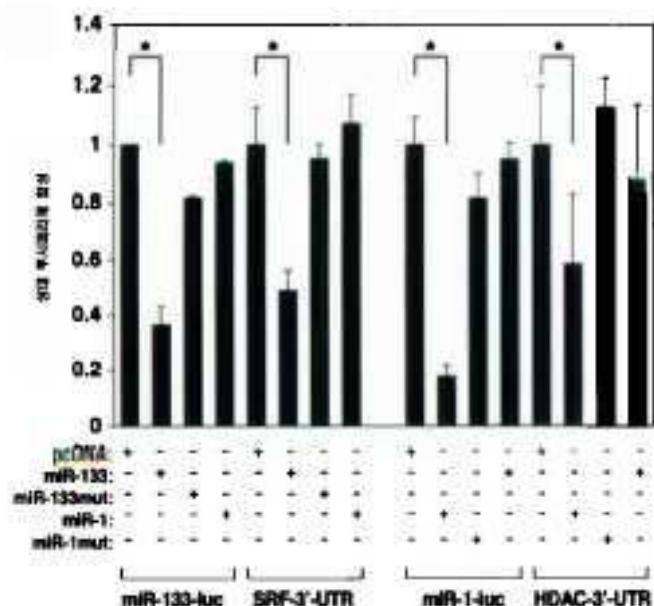
## 도면2j



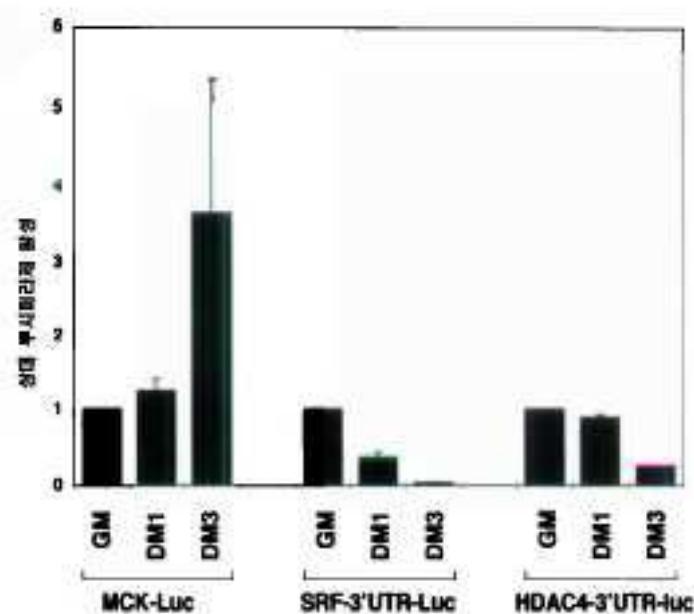
도면3



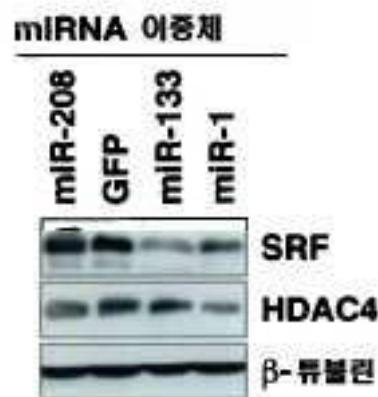
도면4a



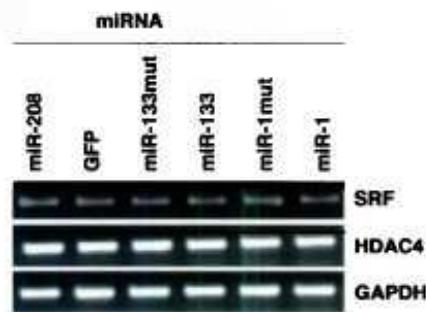
도면4b



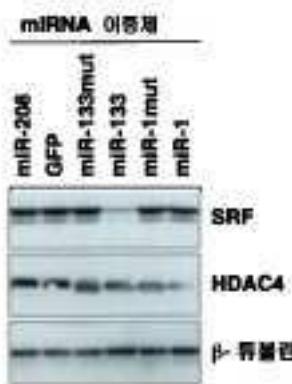
도면4c



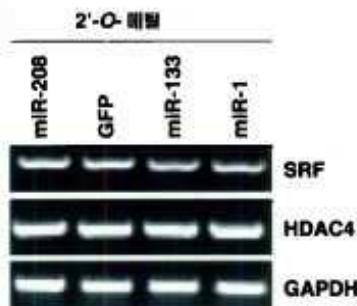
도면4d



도면4e



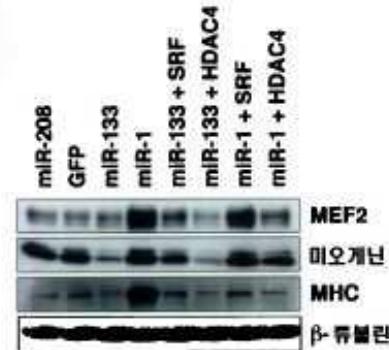
도면4f



도면4g



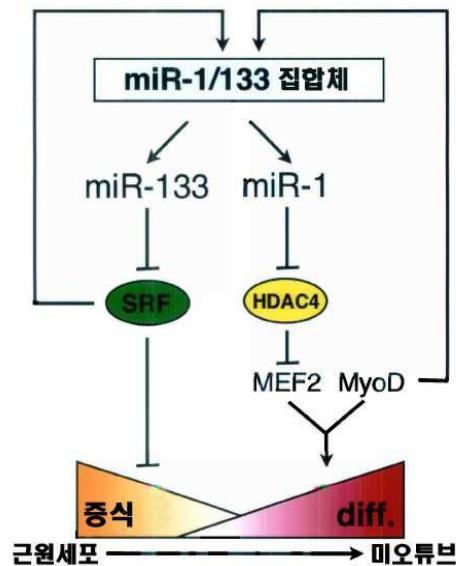
도면4h



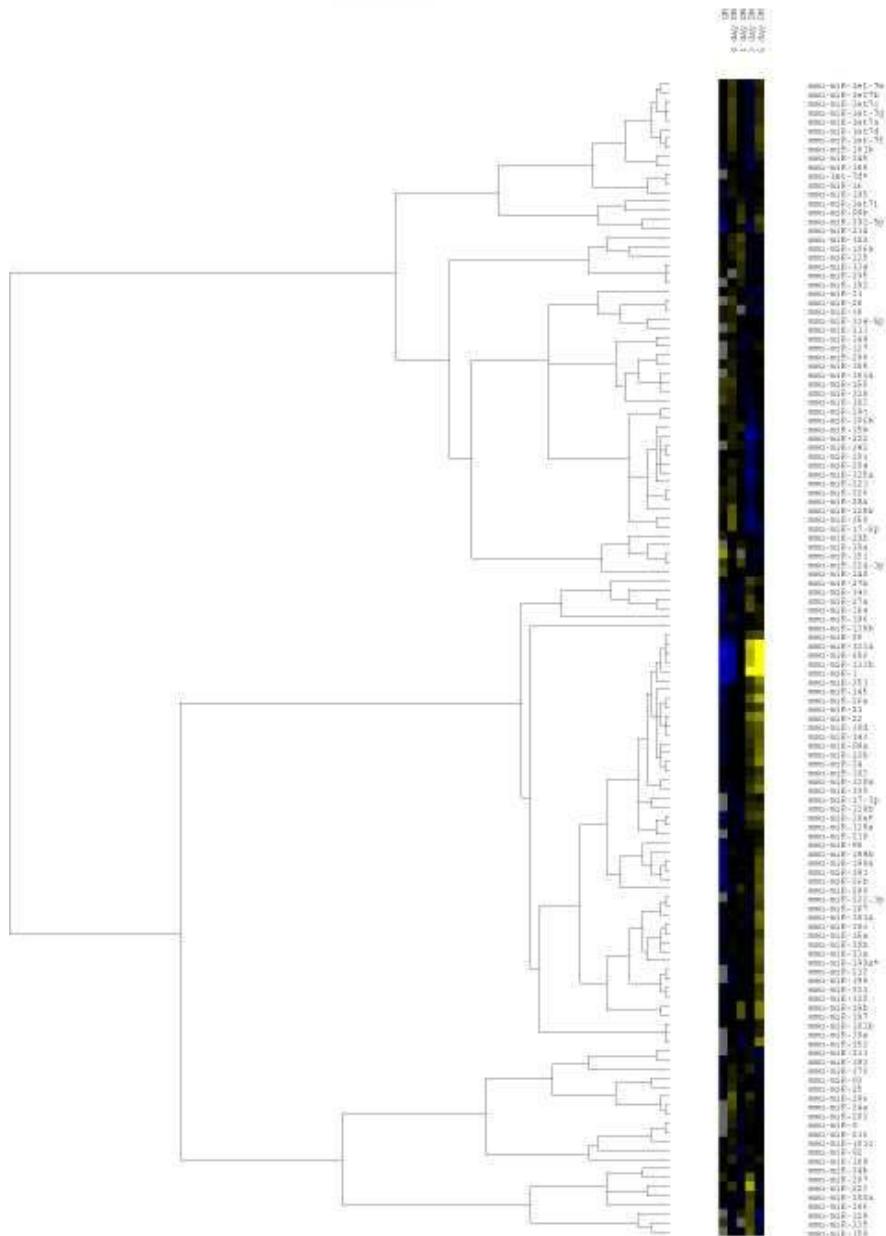
도면4*i*



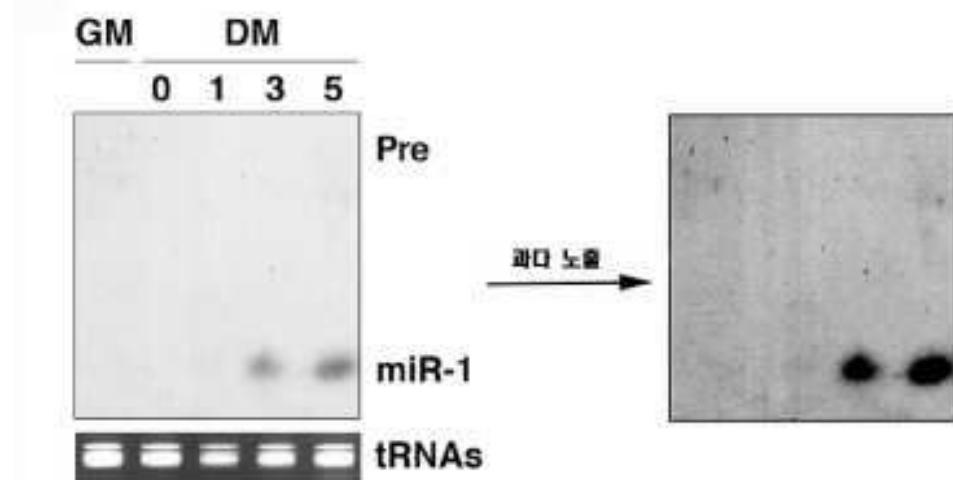
도면5



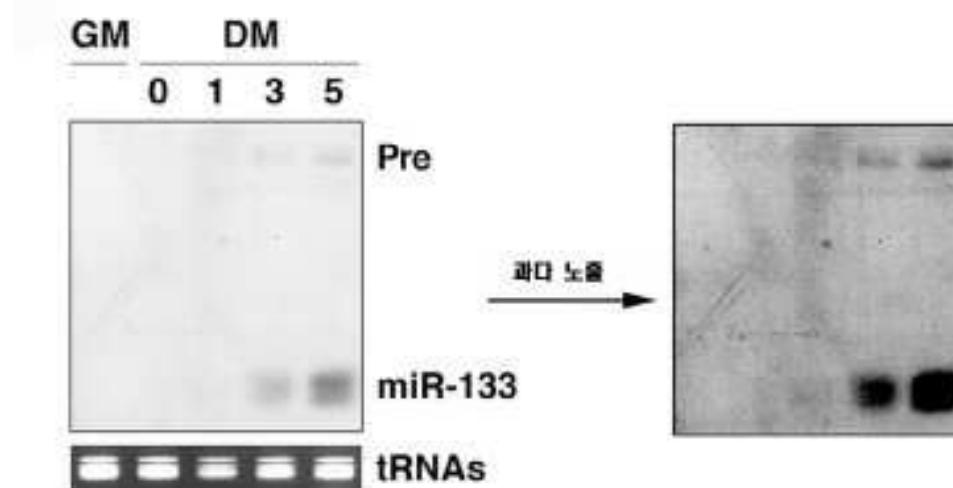
## 도면6



도면7a



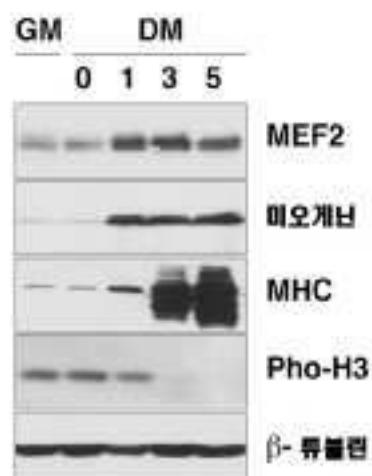
도면7b



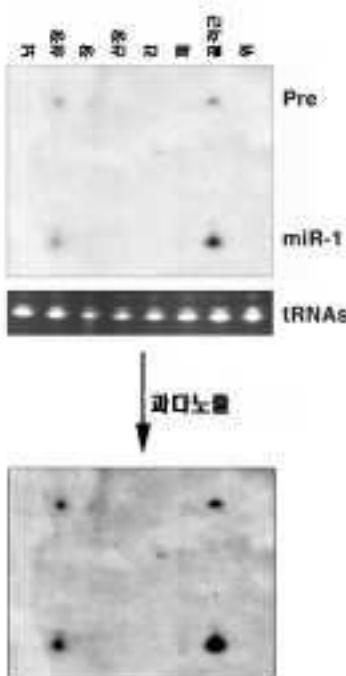
도면7c



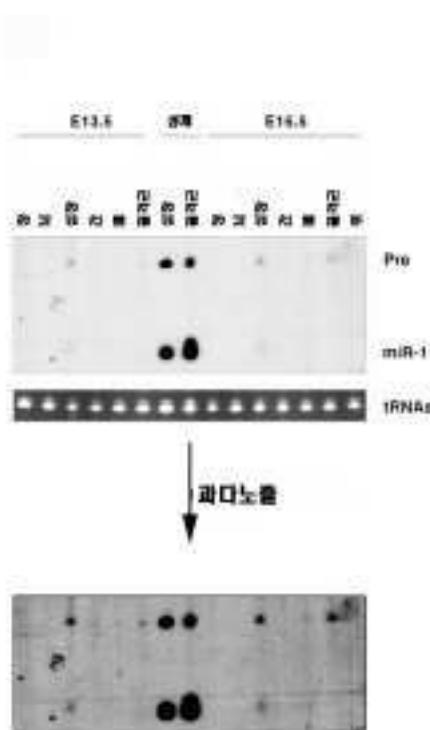
도면7d



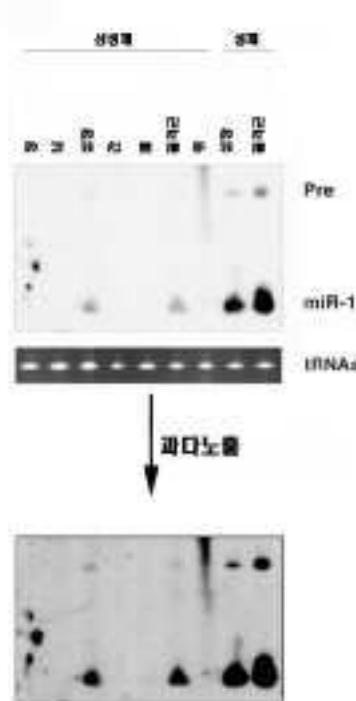
도면8a



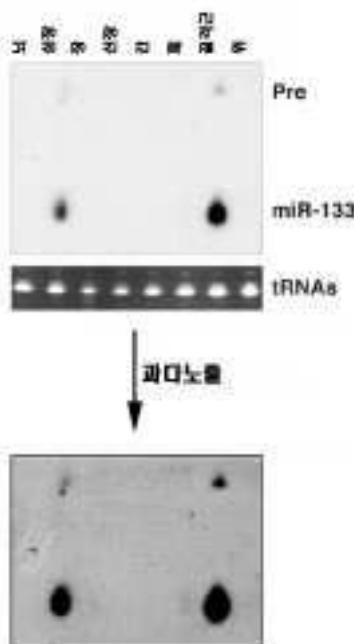
도면8b



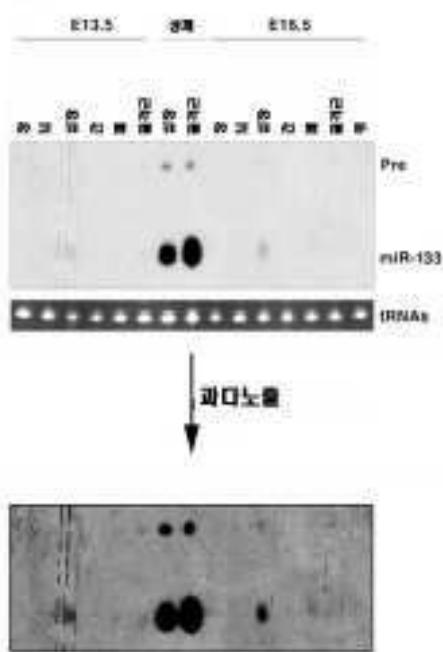
도면8c



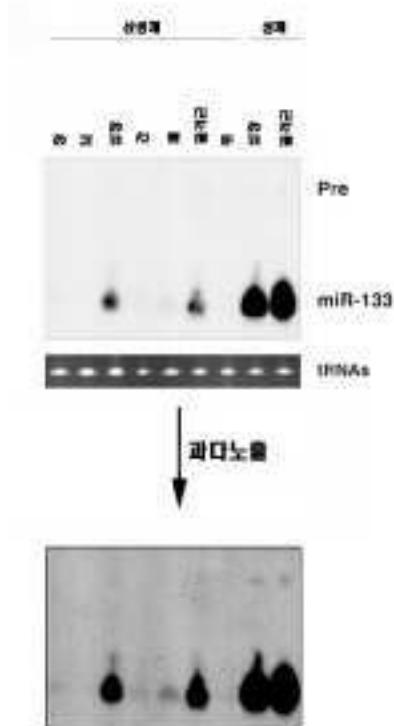
도면8d



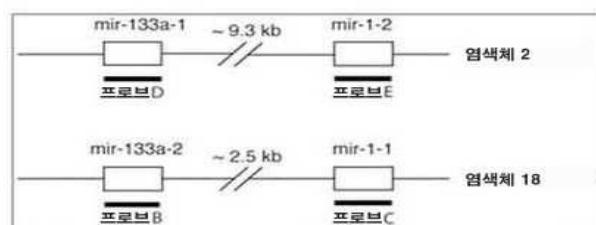
도면8e



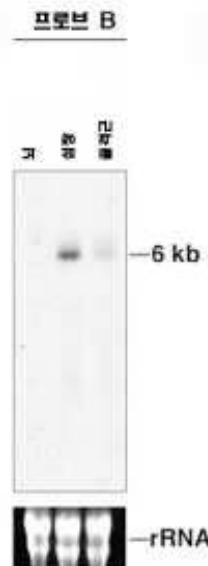
도면8f



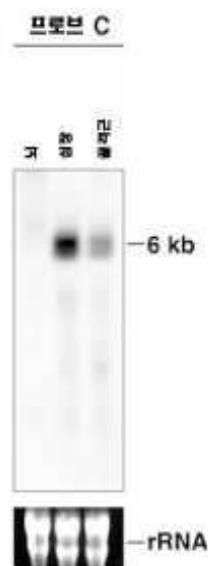
도면9a



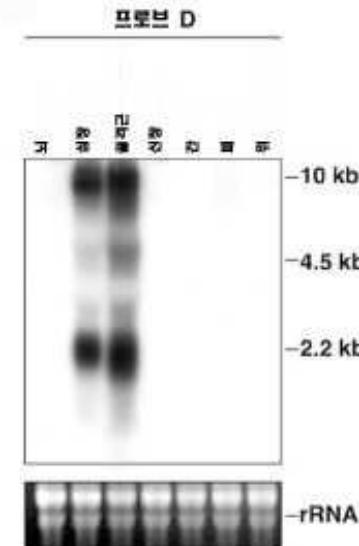
도면9b



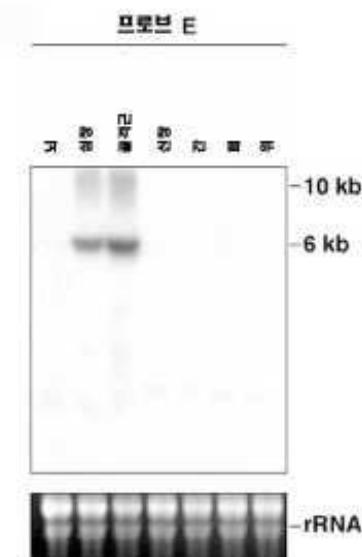
도면9c



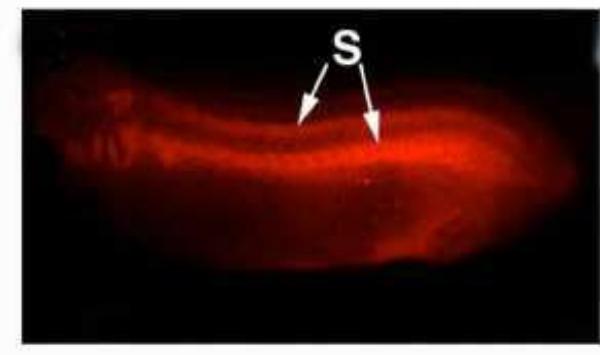
도면9d



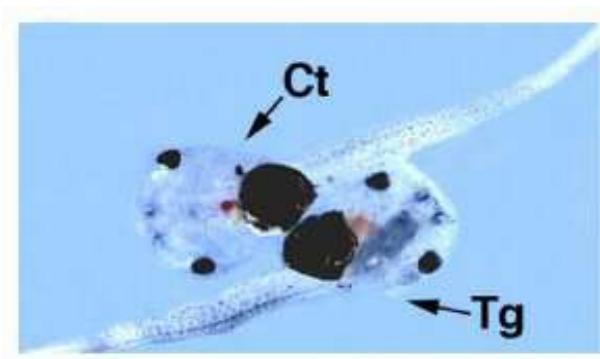
도면9e



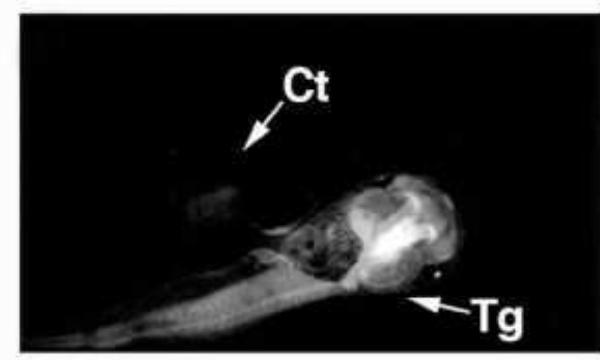
도면10a



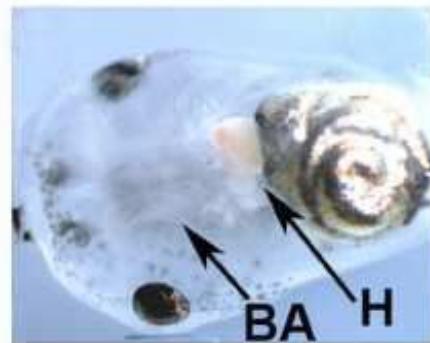
도면10b



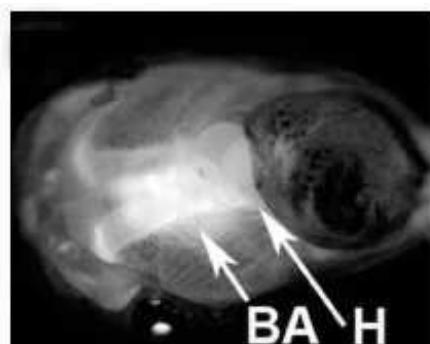
도면10c



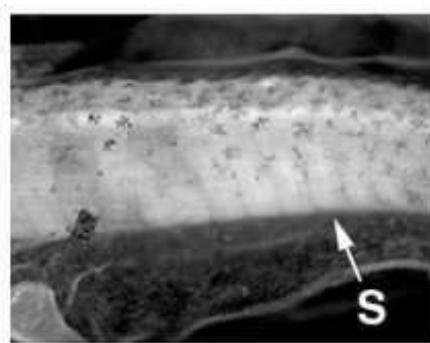
도면10d



도면10e



도면10f

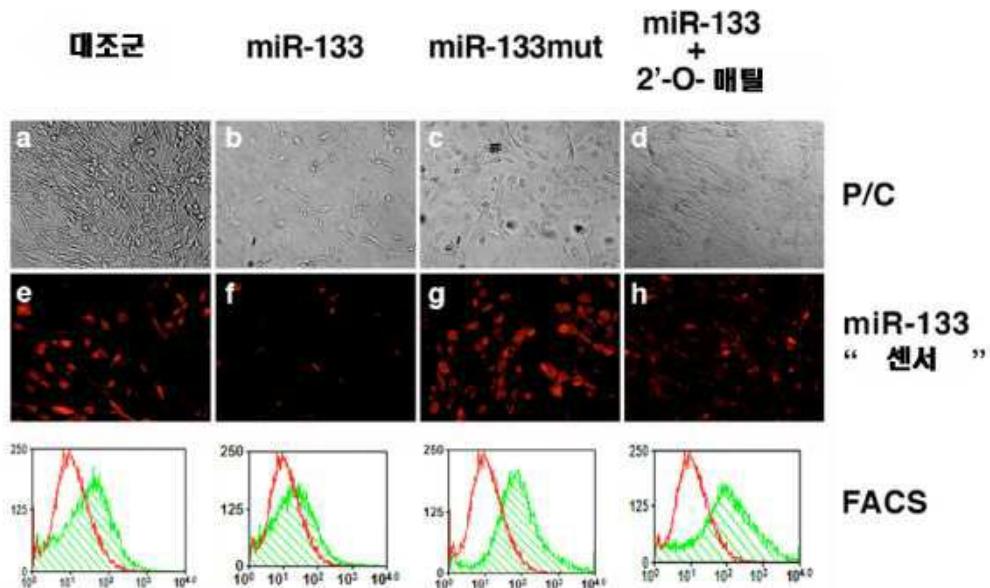


도면10g

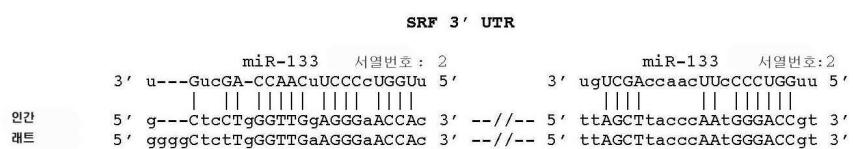
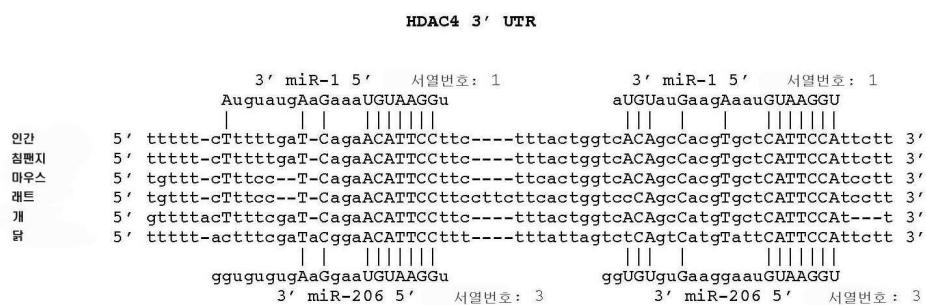
## 염색체 2 miR-1/133 집합체 인해서 서열

1 GAGCAAGTTC CACTAGGGCC ACACAGTATC ATTGAGCACT GAGCGTGGAA GGAGACAGAT  
 51 GGGCCAGGT TCTCTCCCT CTETCTAGCC TTCTTCTCC CTCCCTTTTC TTATACATTA  
 121 TATCTGGCG GCAGTTTCC CTCCTCCAC TTCTCCAGT TCCCTCCCCA CTTCCTTCT  
 181 CCCCCAGATC CATTCTCTT ATGCCCTCCCC CCCCAAGAG CAGGCCTTCC ATGAATACCC  
 241 ACCAAACATG GCATACAAAG TTACRATAAG ATCAAGAACAA ACCCTCTATA TCAAGGCTGG  
 301 ATGAGGCRAC CCAACAGGGAG GAARAGGGCC CCAAGAGCRG GCAAAARACT CCCACTGTTG  
 361 TGTCTCTGAG TAGAACACAA AGTAAATGTA TATGCAGAGG ACCCAGCTCA  
 421 GTCTCATCTAG GGTCTGGTT TGTTCTACA TTCTATGTA ACCTCTGTTG CCTCTCTTA  
 481 GTGGGTTCTG TGGGGTGTG TCCTGTGGCA TCTCAACTC CTCTGGCTCC TACAATCTT  
 541 CCTGGCTGAGT TCTTGGAGT TCCCTGGCC ATGGCTGTG TGTTGGTGGC TGGCTGTG  
 601 GGGCCCTGTC ATTTCTCC GTCACTGCT GGAAGACATC CCTCTGTGTA CAGTTGGTCC  
 661 ATGCACTGAT CTATGAGGAT AGCAGAGTAT CACTAGGAAAT TACCTTATG TCTTTTTC  
 721 CAGTCGTTT TGGTCTCTC CCGAGCTCTG GGCGTGTGCA GTCTCTGGTT CCTGGCTTC  
 781 CAGACACTGT CAGTGTGGGG TTCCCTTGG TGGTGTGGC CTCAACTTGG CCAGTCATG  
 841 GTTGGCCAT CCCACAAAGTT CTACACCACC ATTACCTAG CAAGTCTGG AGGCAGGACA  
 901 GATTCAGTACGG GGAAGGATTT ATGCGTGGGT EAAGTCTCAG TCCAGGGCT GAAAGCTTCG  
 961 CCTGGGTTAA GAAGACAGCT ATGCTCTGACT CAGTATTCCC TGTTACTAGC AGAATTCACT  
 1021 AGGATTACCC TCACTCTCAG GGCATTTCCA CAGCACTAGG GTCTCTGATC GCCTCTCCAA  
 1081 TACCCCTCTC AATTCAGCTC GCCTTCCCA GAACCTCTCTT CCCCCCAGCTT GATCCCTTAAT  
 1141 GTTCCACCC CCACTCCACCC CCACTCCACC TACAAAGCTC TTCTCCCTTC CCAAGBAGAT  
 1201 CCATGAGTTT CTCTGTGCT GTGGATGTGGA GTATGATCTG TGGATTITAGC AGCTATGTT  
 1261 CACTGAGTGG AGAGTACACA CGGTGGCTTG TTGGGTGTTG GGTACCTCA CTCAGGGTGG  
 1321 ATTTGGGTTT TTTCCTTGG AGTGCCTATCC ATTTGTCCTG AAATGTCATG ATGTCATT  
 1381 TTTAAACAGC TGAGGAATTC TCTCAGAAC ACCATTCTT TATCCATTAT TCAGATTGGT  
 MEF2 site  
 1441 CCCAGTTCTT GGCTATTATA AGGCTGCTAT GAACATGGTT GAACAAAGTGT CCTTGTGGTA  
 tcggTACA ca  
 (MEF mutation)  
 1501 GGATGTGGCA TCCCTGGGT ATATGCCCTAG GAGTGGGTATC GATGGGTCTC GAGGTAGATC  
 1561 ATTCCTCGAT TTTCCTGAGAA ACTGCCATAT CTGTTCCCA AGTGGCTGTG TAAAGTTGCG  
 1621 CCCCCACAG CAACCGAGGA GTGTCTCCCT TACTCTCCCA ACATTTATCAA CAGTGTGAGC  
 1681 TGTCACTGTT TTTCCTGATC TTAGCTTTC TGGAGGGTGT AGATGGAAAT CCTAAACTAG  
 1741 CTTTGATTC CATTTCCCTG CTGGCTAAGG ATGTTGAACA TTCTTIAAG TGGTTCTAG  
 1801 CCATTGAGA TTATCCATT GAGAAITCIG TTAGATCTG AACCTCCACCI TCTAATTGGA  
 1861 TTTTTGGTT TTAAATATCC CCACTTCTC GAGTCTTAA TGGGTTTGG ATATTAGCCC  
 1921 TCTGTCAAT GTGGAGTGG TGAGATCTT TTCCCATCTG GTAGGTITG ICCTAITGAC  
 CAIG Box  
 1981 AGTGTCTTT GCTCACAGA AGCTTTCTAG TTTCATGAGG TCCCATTAT TGATTGTTGA  
 atctTGGT ct  
 (CAIG Box mutation)  
 2041 TCTTAGTGCC TGTGCTATTG ATGCTCTATC AGGAAGTGTG CTCTCTGTCCTC ATGCGTTCA  
 2101 AGGCTTATTC CCACTCTCTC TTCTATTAGG TTCACTGAT CTCAATTTCAT GTGAGGCTCT  
 2161 TGGATCCACT TGGAGCTGGAG TTGTGGAG AGTGGATAGAT ATGGATCTTA TGGCATTCCT  
 2221 CTACATGCGAG ATATCCAGTA AGACCCAGCAT CATTCTATGCA GGATGCTTTC TAAATTTCCT  
 2281 CGCTTGTCGA TTTCCTGCTT CTTATATAAA ATCAGGTGTT CACTGATTC ATGATCAGC  
 2341 CRATGCTTCT CTGGCGATAC CAGTGGTTT TATGCTATA GCTCTGAGGT ACAGCTTGAG  
 2401 TCAGGGATGT GATGCCCTG GACGCCCTT TATTGTACAG GAGTATCTA GGTTCACCA  
 2461 TCCTTAGGTTT TTGTTTTC CACATGGAGT TAACTATGTT CCTTCTCAGG TCTATAGAGA  
 2521 ATGCAATTGG GATTTGGTG GAGATGGTAT TGGATTGTA GATTTGGTAG GGTGGCCATT  
 2581 TTATCTATGG TAACTCTACC

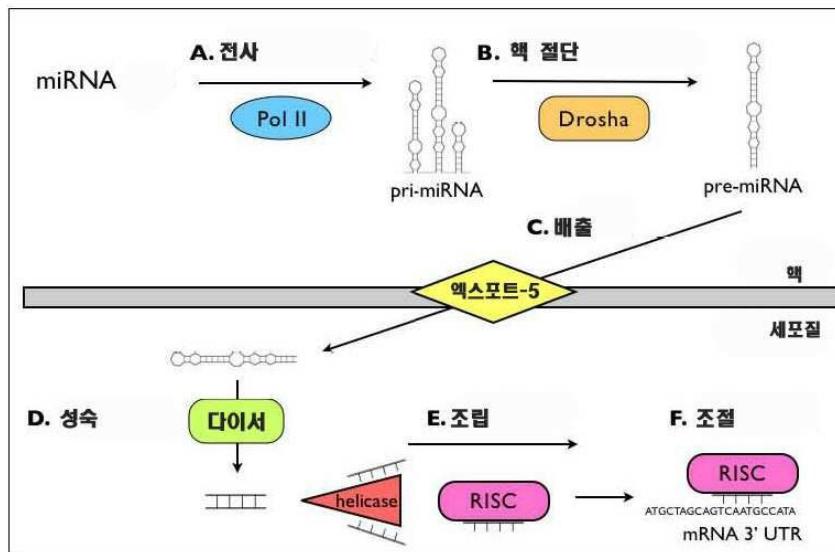
## 도면11



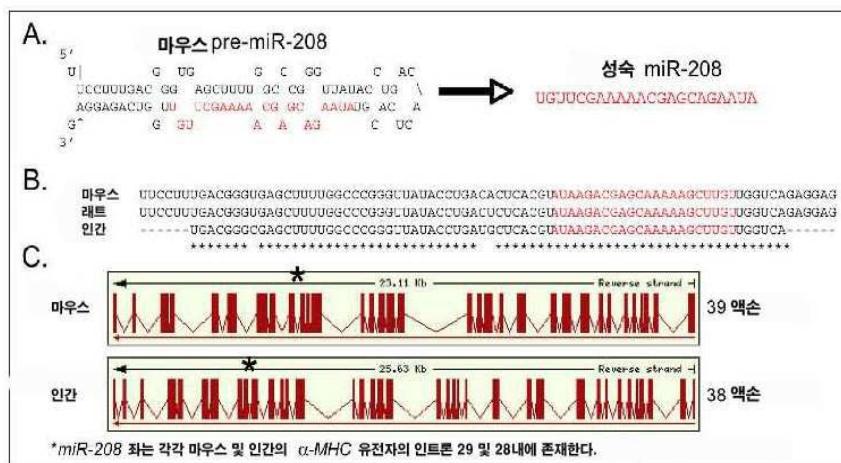
## 도면12



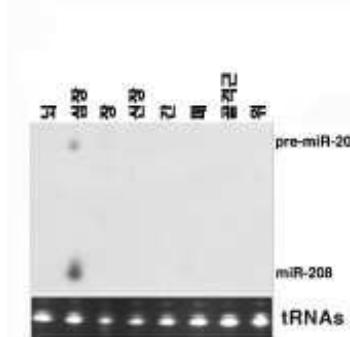
도면13



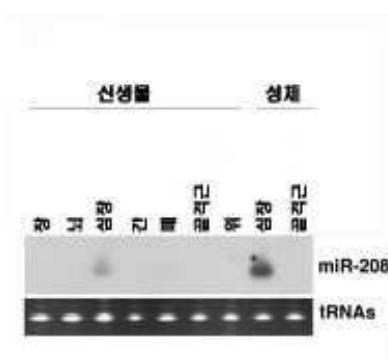
도면14



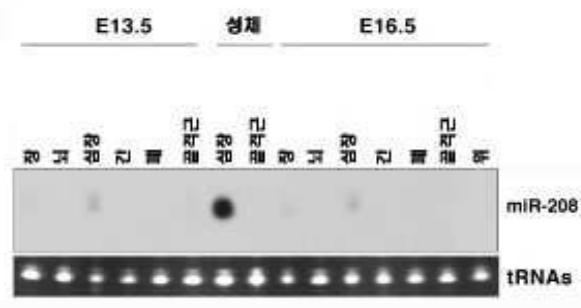
### 도면15a



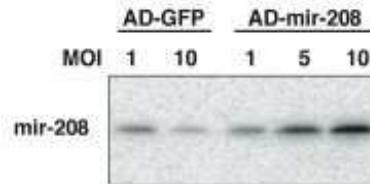
### 도면15b



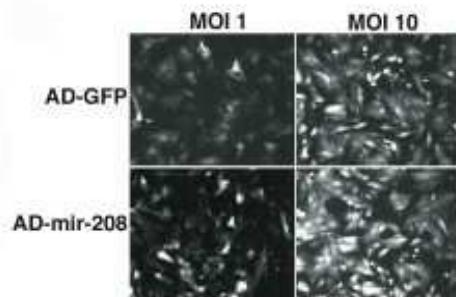
### 도면15c



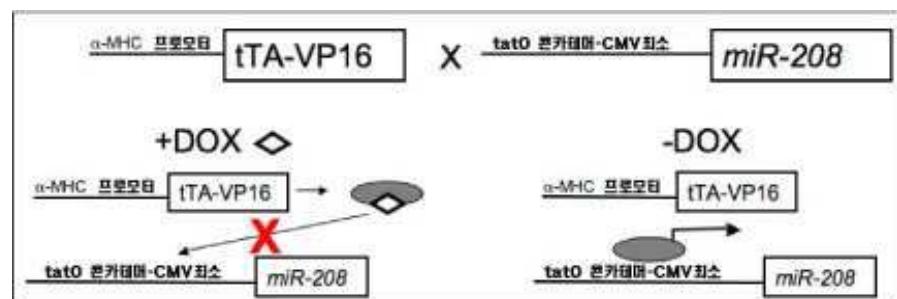
도면16a



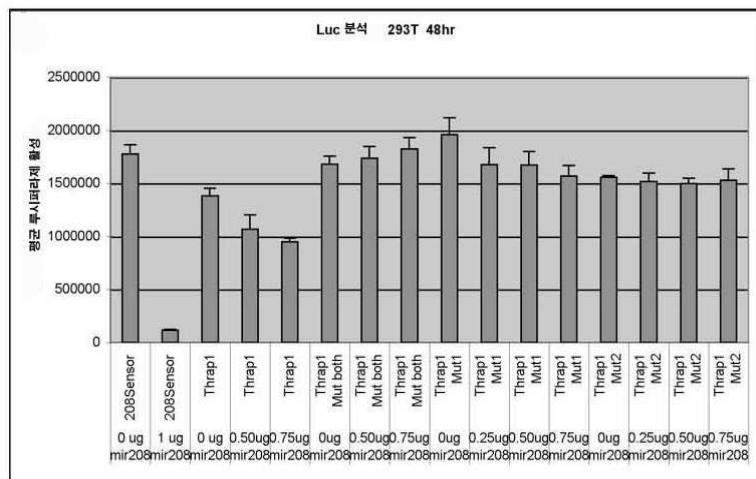
도면16b



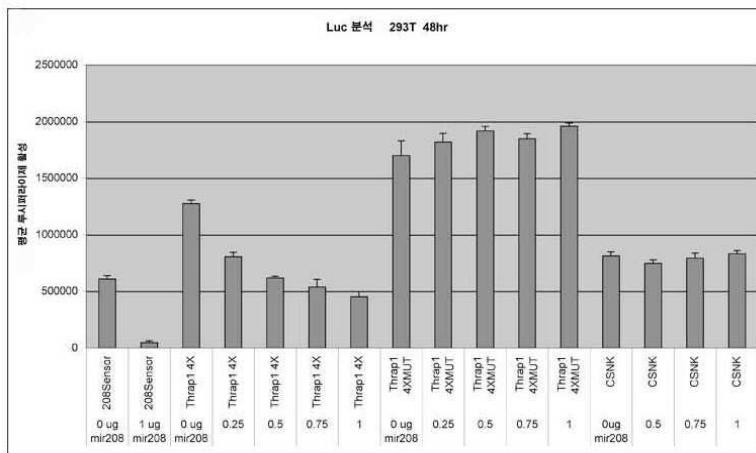
도면17



도면18a



도면18b

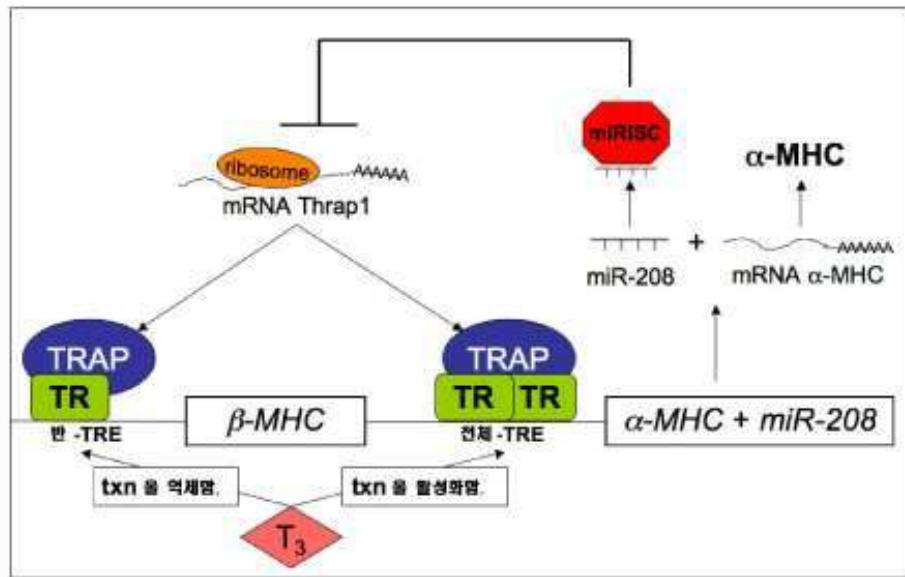


도면18c

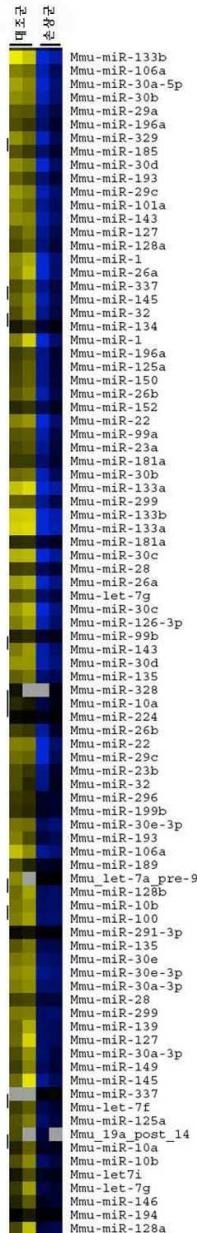
3' UGUUCGAAAAACG--AGCAGAAUA 5'  
 549:5' CUAAAAAUUAUGUAUUCGUCUUAA 3'  
 532:5' CUAAAAAUUAUGUAUUCGUCUUAA 3'  
 3' UGUUCGAAAAACG--AGCAGAAUA 5'

인간 miRNA: [hsa-miR-208 \(UCSC\) \(Rfam\)](#)  
 수치: 144, 에너지: -10.9 kCal/mol  
 인간 전사체: [ENST000000262436](#)  
 보존율: 100.0%  
 마우스 전사체: [ENSMUSG00000034297](#)  
 수치: 144, 에너지: -10.9 kCal/mol  
 마우스 miRNA: [mmu-miR-208 \(Rfam\)](#)

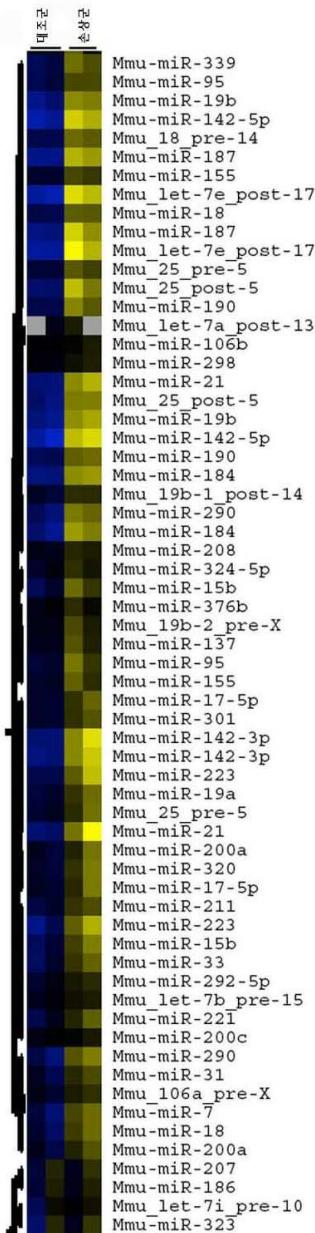
## 도면19



## 도면20a



## 도면20b



도면21

miR-26 ( 서열번호: 6 )  
mmu-miR-26a MIMAT0000533  
UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC ( 서열번호: 12 )

mmu-miR-26b MIMAT0000534  
UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU ( 서열번호: 13 )

miR-29 ( 서열번호: 7 )  
mmu-miR-29a MIMAT0000535  
UAGCACCAUCUGAAAUCGGUU ( 서열번호: 14 )

mmu-miR-29b MIMAT0000127  
UAGCACCAUUUGAAAUCAGGUU ( 서열번호: 15 )

mmu-miR-29c MIMAT0000536  
UAGCACCAUUUGAAAUCGGGU ( 서열번호: 16 )

miR-30 ( 서열번호: 8 )  
mmu-miR-30a-3p MIMAT0000129  
CUUUCAGUCGGGAUQUUUGCAGC ( 서열번호: 17 )

mmu-miR-30b MIMAT0000130  
UGUAAAACAUCCUACACUCAGCU ( 서열번호: 18 )

mmu-miR-30c MIMAT0000514  
UGUAAAACAUCCUACACUCAGC ( 서열번호: 19 )

mmu-miR-30d MIMAT0000515  
UGUAAAACAUCCCCGACUGGAAG ( 서열번호: 20 )

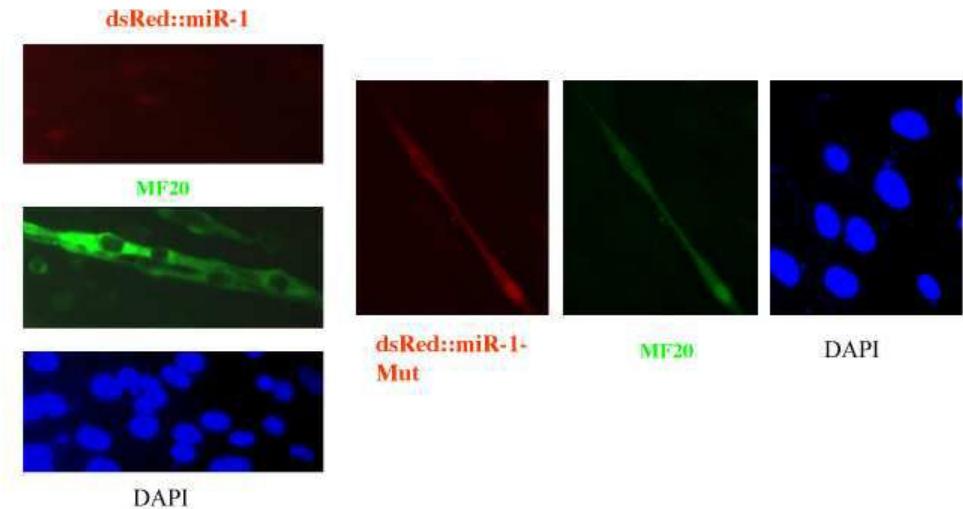
mmu-miR-30e\* MIMAT0000249  
CUUUCAGUCGGGAUGUUUACAG ( 서열번호: 21 )

miR-128 ( 서열번호: 8 )  
mmu-miR-128a MIMAT0000140  
UCACAGUGAACCGGUCUCUUU ( 서열번호: 22 )

mmu-miR-128b MIMAT0000675  
UCACAGUGAACCGGUCUCUUUC ( 서열번호: 23 )

도면22

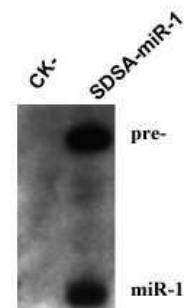
골격근 위성 세포 분화 중에 miR-1이 점진적으로 발현된다.



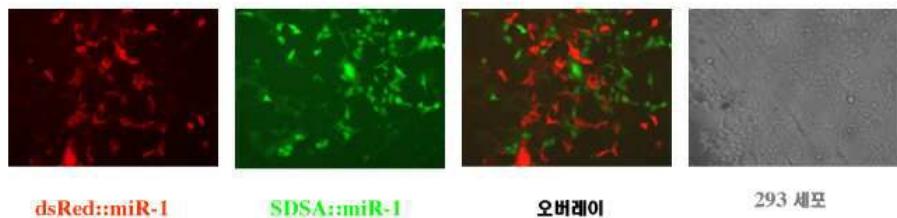
도면23a

miR-1/206 발현 시스템

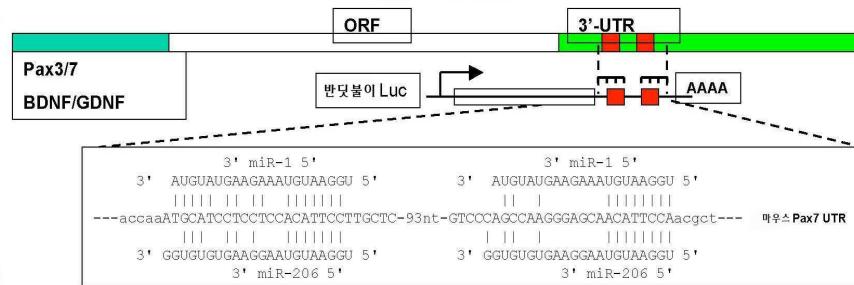
SDSA-miR-1/206 발현 구성체



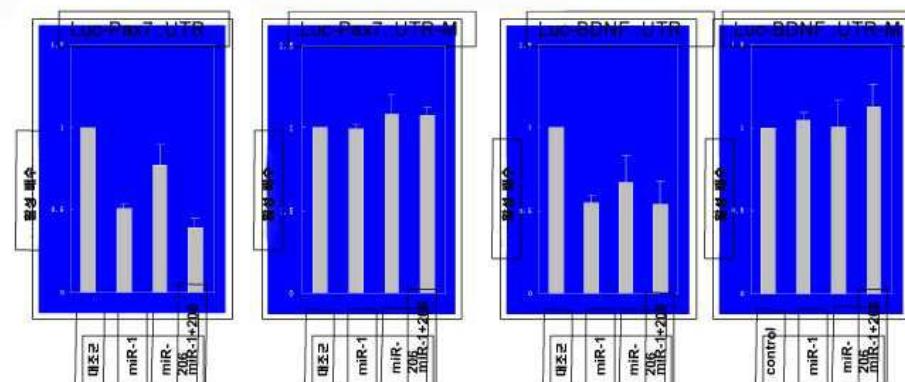
도면23b



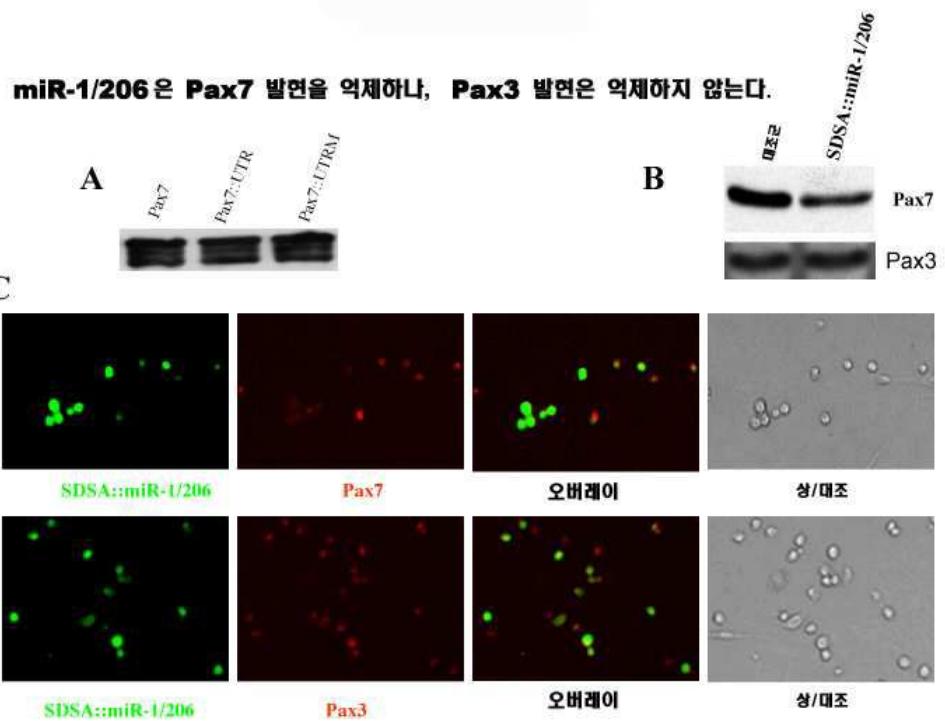
## 도면24a



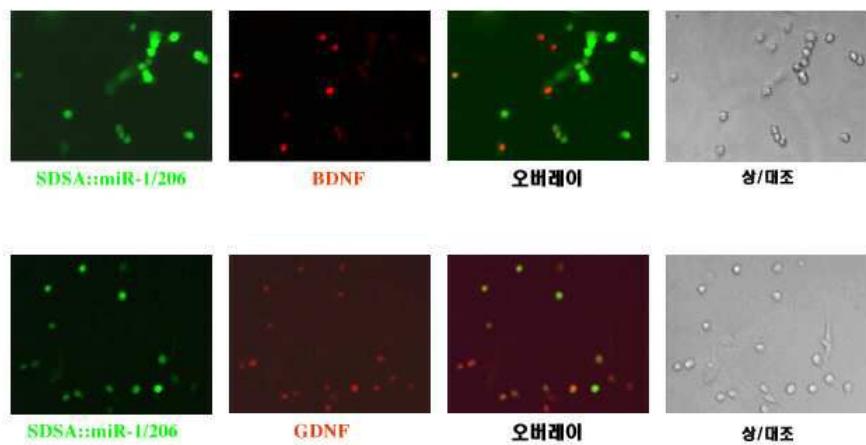
## 도면24b



도면25

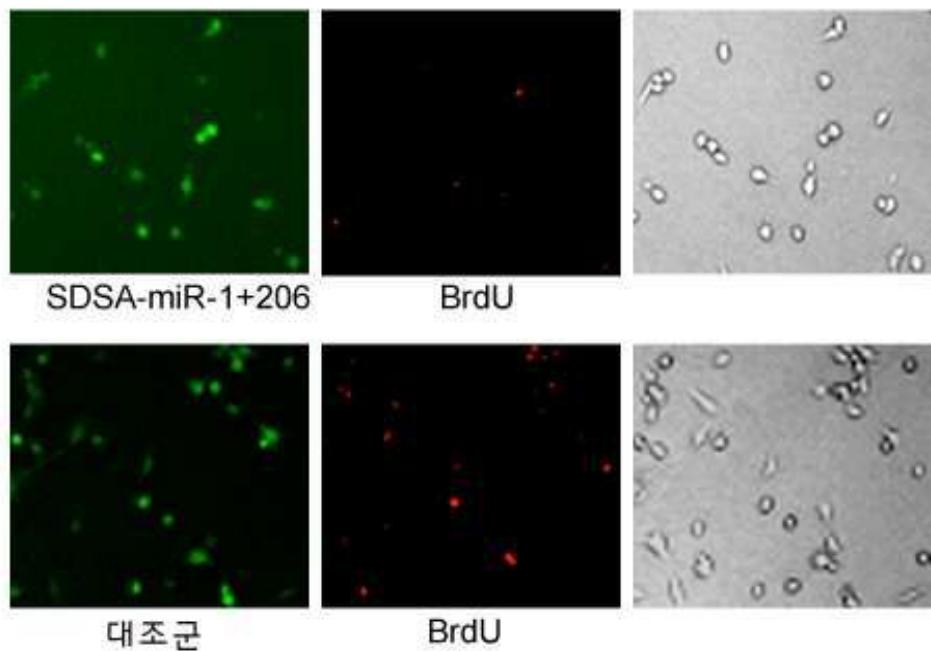


도면26

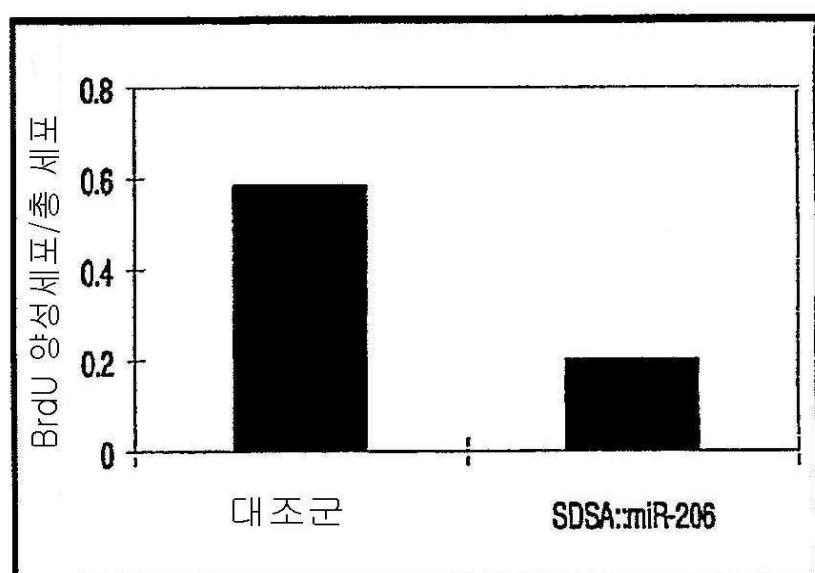
**MiR-1/206은 BDNF 발현을 억제하나, GDNF 발현은 억제하지 않는다.**

도면27a

**miR-1/206은 위성 세포 증식을 억제한다.**

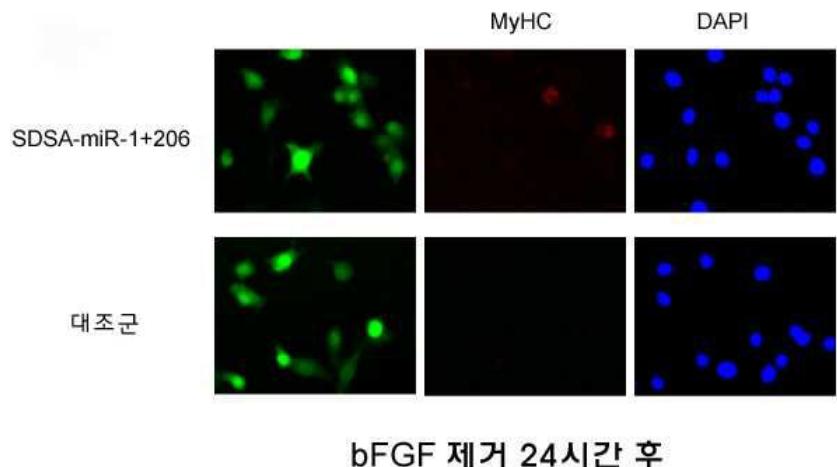


도면27b



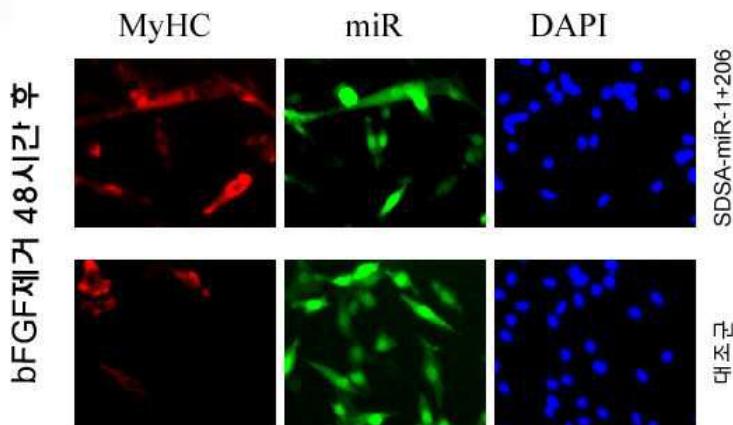
도면28a

**miR-1/206은 위성 세포 분화를 증가 시킨다.**



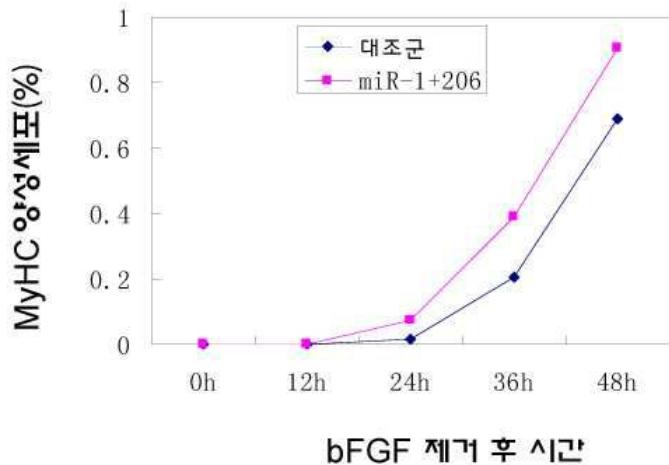
도면28b

**miR-1/206은 위성 세포 분화를 증가 시킨다.**

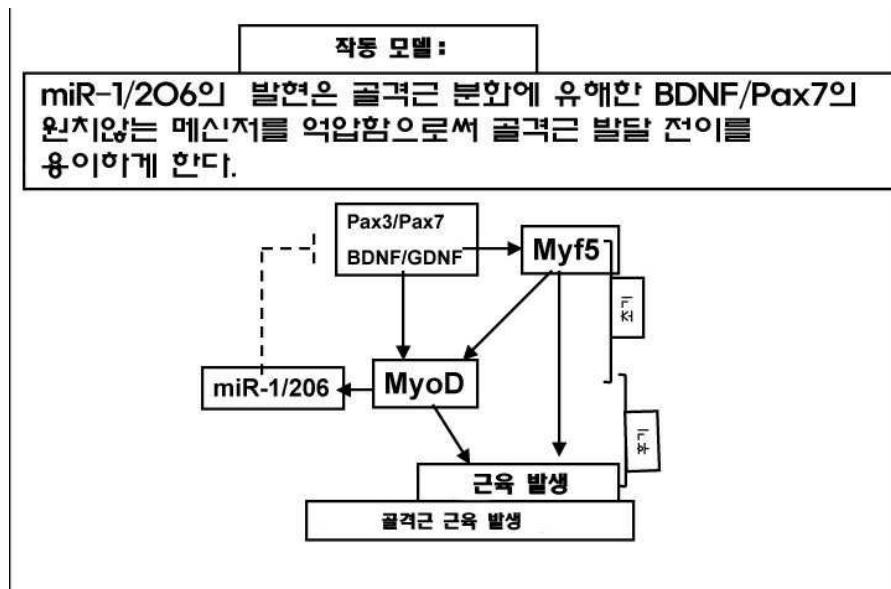


## 도면29

miR-1/206의 과발현은 위성 세포 분화 억제를 증가시킨다.



## 도면30



## 서 롤 목 록

&lt;110&gt; University of North Carolina at Chapel Hill

Wang, Da-Zhi

Chen, Jianfu

&lt;120&gt; MICRORNAs THAT REGULATE MUSCLE CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION

<130> 421/166 PCT/KR

<150> 60/749,544  
<151> 2005-12-12

<150> PCT/US2006/047255  
<151> 2006-12-12

<160> 82

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 1  
uggaauguaa agaaguaugu a 21

<210> 2  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 2  
uugguccccu ucaaccagcu gu 22

<210> 3  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 3  
uggaauguaa ggaagugugu gg 22

<210> 4  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 4  
auaagacgag caaaaagcuu gu 22

<210> 5  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 5  
aagcugccag uugaagaacu gu 22

<210> 6  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(11)  
<223> y can be C or U

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (21)..(21)  
<223> y can be C or U

<400> 6  
uucaaguaauu ycaggauagg yu 22

<210> 7  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (10)..(10)  
<223> y can be C or U

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (18)..(18)  
<223> r can be G or A

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (21)..(21)  
<223> k can be G or U

<400> 7  
uagcaccauuy ugaaaucrgu kuu 23

<210> 8  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(22)  
<223> y can be C or U; k can be G or U; w can be U or A; m can be C or A; s can be G or C; h can be A, C, or U; v can be G, A, or C;

n can be A, G, C, or U; b can be C, G, or U

<400> 8  
ykuwmaswys shhswyuvnv vbc 23

<210> 9  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> y can be C or U

<400> 9  
ucacagugaa ccggucucuu uy 22

<210> 10  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 10  
ugagaugaag cacuguagcu ca 22

<210> 11  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 11

guccaguuuu cccaggaauccuu

24

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized miRNA

<400> 12  
 uucaaguauu ccaggauagg c 21

<210> 13  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized miRNA

<400> 13  
 uucaaguauu ucaggauagg uu 22

<210> 14  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized miRNA

<400> 14  
 uagcaccauc ugaaaucggu u 21

<210> 15  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 15

uagcaccaau ugaauaucagu guu

23

<210> 16

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 16

uagcaccaau ugaauaucggu

20

<210> 17

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 17

cuuucagucg gauguuugca gc

22

<210> 18

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 18

uguaaacau cuacacucag cu

22

<210> 19

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 19

uguaaacauc cuacacucuc agc

23

<210> 20

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 20

uguaaacauc cccgacugga ag

22

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 21

cuuucagucg gauguuuuaca g

21

<210> 22

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miRNA

<400> 22

ucacagugaa ccggucucuu uu

22

<210> 23  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized miRNA

<400> 23  
 ucacagugaa ccggucucuu uc 22

<210> 24  
 <211> 63  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 tttttcttt tgatcagaac attccttct tactggtcac agccacgtgc tcattccatt 60

ctt 63

<210> 25  
 <211> 63  
 <212> DNA  
 <213> Pan troglodytes

<400> 25  
 tttttcttt tgatcagaac attccttct tactggtcac agccacgtgc tcattccatt 60

ctt 63

<210> 26  
 <211> 61  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 26  
 tgtttctttc ctcagaacat tccttctca ctggcacag ccacgtgctc attccatct 60

t 61

<210> 27  
 <211> 65  
 <212> DNA  
 <213> Rattus rattus

<400> 27  
 tgtttcttcc tcagaacat tccttccttc ttcaactggtc ccagccacgt gctcattcca 60

tcctt 65

<210> 28  
 <211> 61  
 <212> DNA  
 <213> Canis familiaris

<400> 28  
 gttttacttt tcgatcagaa catttccttc ttactggtca cagccatgtc ctcattccat 60

t 61

<210> 29  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> Gallus gallus

<400> 29  
 tttttacttt cgatacggaa catttccttt ttatttagtct cagtcatgtc ttcatccat 60

tctt 64

<210> 30  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 30  
 gtcctgggt tggagggAAC cac 23

<210> 31  
 <211> 22  
 <212> DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 31	
ttagcttacc caatgggacc gt	22

<210> 32	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Rattus rattus	

<400> 32	
gggctttg gtttgaaggg aaccac	26

<210> 33	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Rattus rattus	

<400> 33	
ttagcttacc caatgggacc gt	22

<210> 34	
<211> 83	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	

<400> 34	
uuccuuugac gggugagc uuggccggg uuauaccuga cacucacgu aagacgagc	60

aaaaagcuug uuggucagag gag	83
---------------------------	----

<210> 35	
<211> 83	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	

<400> 35	
uuccuuugac gggugagc uuggccggg uuauaccuga cacucacgu aagacgagc	60

aaaaagcuug uuggucagag gag	83
---------------------------	----

<210> 36  
 <211> 83  
 <212> RNA  
 <213> Rattus rattus

<400> 36  
 uuccuuugac gggugagccuu uuggccggg uuauaccuga cucucacgua uaagacgagc 60

aaaaagcuug uuggucagag gag 83

<210> 37  
 <211> 71  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 37  
 ugacgggcga gcuuuuggcc cggguuauac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaag 60

cuuguugguc a 71

<210> 38  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 38  
 cuaaaaauua uguaaucguc uuaa 24

<210> 39  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> Mus musculus

<400> 39  
 cuaaaaauua uguaaucguc uuaa 24

<210> 40  
 <211> 32  
 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 40  
accaaatgca tcctcctcca cattccttgc tc

32

<210> 41  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 41  
gtcccagcca agggagcaac attccaacgc t

31

<210> 42  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miR-1 probe

<400> 42  
tacatacttc tttacattcc a

21

<210> 43  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miR-133 probe

<400> 43  
acagctgggtt gaaggggacc aa

22

<210> 44  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miR-133a-1-up regulation probe

<400> 44

catgtgaccc ctcacacaca

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificially synthesized miR-133a-1-down regulation probe

<400> 45

acaaggggag cctggatccc

20

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miR-133a-2-up probe

<400> 46

ggacatatgc ctaaacacgt ga

22

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miR-133a-2-down probe

<400> 47

gaaacatctt tatccagttt

20

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miR-1-2-up probe

<400> 48

agactgagac acaggcgaca cc

22

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miR-1-2-down probe

<400> 49

tgcgggtcca tcgggtccatt gc

22

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miR-1-1-up probe

<400> 50

cactggatcc attactttc

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miR-1-1-down probe

<400> 51

ttgaaatggg gctgttagta

20

<210> 52  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized miR-1mut-up probe

<400> 52  
 tgaacattca gtgctataaa gaagtatgtat tttggtag gta 43

<210> 53  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized miR-1mut-down probe

<400> 53  
 tacctaccca aaatacatac ttctttatag cactgaatgt tca 43

<210> 54  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized miR-133mut-up probe

<400> 54  
 aatcgccctct tcaatggatt tgtcaaccag ctgttagtgcattgat 48

<210> 55  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized miR-133mut-down probe

<400> 55

atcaatgcat agctacagct gggtgacaaa tccatgaaag aggcgatt 48

<210> 56  
<211> 42  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miR-1 duplex

<400> 56  
uggaauguaa agaaguaugu acauacuucu uuacauucca ua 42

<210> 57  
<211> 42  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miR-1-mut duplex

<400> 57  
uuaaccuaaa agaaguaugu acauacuucu uuaugguuua ua 42

<210> 58  
<211> 44  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized miR-133 duplex

<400> 58  
uugguccccu ucaaccagcu guagcugguu gaaggggacc aaau 44

<210> 59  
<211> 44  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miR-133-mut duplex

<400> 59

ucaaguaacu ucaaccagcu guagcugguu gaaguuacuu gaau 44

<210> 60

<211> 44

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized miR-208 duplex

<400> 60

auaagacgag caaaaagcuu guaagcuuuu ugcucgucuu auac 44

<210> 61

<211> 44

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized GFP duplex

<400> 61

aacuucaggg ucagcuugcc uuggcaagcu gaccuugaag uugg 44

<210> 62

<211> 28

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized 2'-0-methyl-miR-1

<400> 62

aaauacauac uucuuuacau uccauagc 28

<210> 63

<211> 31

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized 2'-0-methyl-miR-133

<400> 63

agcuacagcu gguugaaggg gaccaaaucc a

31

<210> 64

<211> 32

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized 2'-0-methyl-miR-208

<400> 64

gaccaacaag cuuuuugcuc gucuaauacg ug

32

<210> 65

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized 2'-0-methyl-GFP

<400> 65

aaggcaagcu gacccugaag uu

22

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized HDAC4-UTR-up

<400> 66

cagcactgggt gatagacttg g

21

<210> 67  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized HDAC4-UTR-down

<400> 67  
 cttaagaata agttcaataa gac 23

<210> 68  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized SRF-UTR-up

<400> 68  
 agatatgggg gcttgtgcc 20

<210> 69  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized SRF-UTR-down

<400> 69  
 ctgggagaaa gggggtagac 20

<210> 70  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Artificially synthesized Myogenin F PCR primer

<400> 70

tggagctgta tgagacatcc c 21

<210> 71  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized Myogenin R PCR primer

<400> 71  
tggacaatgc tcaggggtcc c 21

<210> 72  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized MyoD F PCR primer

<400> 72  
gcaggctctg ctgcgcgacc 20

<210> 73  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificially synthesized MyoD R PCR primer

<400> 73  
tgcagtcgat ctctcaaagc acc 23

<210> 74  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized Skeletal -actin F PCR primer

<400> 74

cagagcaagc gaggtatcc

19

<210> 75

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized Skeletal -actin R PCR primer

<400> 75

gtccccagaa tccaaacacg

19

<210> 76

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized MEF2D F PCR primer

<400> 76

caagctgttc cagtatgccg

21

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized MEF2D R PCR primer

<400> 77

aaggatgat gtcaccaggg

20

<210> 78

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized HDAC4 F PCR primer

<400> 78

gagagaattc tgcttagcaat gagctcccaa

30

<210> 79

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized HDAC4 R PCR primer

<400> 79

gagactcgag ctatgcaggt tccaaggca gtga

34

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized SRF F PCR primer

<400> 80

gtcccatgc agtgatgtat g

21

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificially synthesized SRF R PCR primer

<400> 81

gtagctcggt gaggttgctg

20

<210> 82  
 <211> 2620  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 82  
 gagcaagttt cactaggccc acacagtatc attgagcact gagcgtggaa ggagacagat 60  
 gggccacgtt ttcctccct ctttctagcc ttccctctcc ctccctttc ttatacatta 120  
 tatcctggcg gcagtttcc ctccctccac tcctccagt tcctcccca ctccattct 180  
 cccccagatc cattctt atgcccccc ccccaagag caggttcc atgaatacc 240  
 accaaacatg gcataacaag ttacaataag atcaggaaca aaccctata tcaaggctgg 300  
 ataggcaac ccaacaggag gaaaaggccc ccaagagcag gcaaaaaact cccactgtt 360  
 tgtcttctgc tagaacacaa agctacacaa ctataatgtt tatgcagagg acccagctca 420  
 gtctcatcag ggtccgtt tttgtaca gtttctgtga acctctgtgg gctctgctta 480  
 gttggttctg tgggttgtgt tcttggca tcctcaactc ctctggctcc tacaatctt 540  
 cctcccatct tcttggagt tccctggcc atgcctgatg tttgggttgc ttggctgtgt 600  
 gggcctctgc atttatttcc gtcagttgtt ggaaagcatc cctctgttga cagttggcc 660  
 atgcactgtt ctatgaggat agcagatgtt cactaggaat tactttatttgc 720  
 cagtcgtttt tgggtcttc ccgagttctt gggctgtcca gtctctgggtt cctggcttc 780  
 cagacactgtt cagttgtggg ttcccttttgg tgggttgc ctcaacttgg ccagtcattt 840  
 gttggccattt cccacaagttt ctacaccacc attacccttagt catgtctcgc aggcaggaca 900  
 gattgtacgc ggaaggattt atggctgggt tatgtctcgtt tccctggctt ggaaggctt 960  
 cctggtaaa gaagacagctt agttctgactt cagtttccctt tgggttgc agaatttactt 1020

aggatttaccc tcacccttag ggcatttcca cagcactagg gtttgcatt gccttccaa 1080  
 tacccctcc aattccagtc gccttccca gaactctct ccccccagct gatccctatt 1140  
 gttccccacc ccatccaccc ccagtcacc tacaaagctc tttcccttc ccaagaagat 1200  
 ccatgagttt ctctgtgtct gtggatggaa gtatgatctg tggatggc agctaattgtt 1260  
 cacttaccag ttagtacaca cggtttgtct tttgggtctg ggtaacctca ctcagggtgg 1320  
 attttggatt ttttttttg agtgctatcc atttgtctgc aaatgtcatg atgtcatttt 1380  
 ttttaacagc tggatggaaatc ttcagaacc acatttctt tttccattat tcagatttt 1440  
 cccagtttct ggctattata aggctgctat gaacatgggtt gaacaagtgt ctttggta 1500  
 tcggtagacaca ggttggca tccttgggt atatgcctag gagttgtatc gatgggtctc 1560  
 gaggttagatc aattcccgat ttctgagaa actgccatat ctgttccaa agtggctgt 1620  
 taagtttgcg ctcccaccag caacggagga gtgttctct tactcctccc acattatcaa 1680  
 cagtgtgagc tgtcacttgt gttttgtatc ttagccttc tgacagggtt aagatggaaat 1740  
 ctcaaaatgtt ctttgatttgc cattttccctg ctggctaaagg atgttgcaca ttttttaag 1800  
 tttttcttag ccatttgaga ttatccatt gagaattctg tttagatctg aactccacct 1860  
 tctaatttggaa ttatgggtt tttaaaatccacttctc gagttctaa tgggtttgg 1920  
 atattagccc tctgtcaat gtggagttgg tgaagatctt ttcccatcg gtaggttttg 1980  
 tcctatttgc acgtgtcctt gttcacaga agcttttagt tttcatgagg tcccatat 2040  
 tgattgttgc acgtgttgc tcttagtgc tttgttgcatttgc atgttgcatttgc aggaagggtt 2100  
 ctctgttgc acgtgttgc tcttagtgc tttgttgcatttgc ttcagggtat 2160  
 ctcattttat gttgggtct ttgttgcact tagagttgg ttttgcag agtgcataat 2220

atggatctat ttgcatttt ctacatgcag atatccagta agaccagcat catttattgc 2280

ggatgcttt taaattttt cgcttggtta tttctggctt ctttataaaa atcaggtgtt 2340

cactgattt attgatcagc caatgcctt ctggcgatac catgtggttt tattgctata 2400

gctctgaggt acagcttgag tcagggatgt gatgcccctg gacgtccctt tattgtacag 2460

gagtatccctt gggttagcta tcctaggttt tttgggtttc cacatggagt taagtattgt 2520

ccttcaagg tctatagaga attgcattgg gatttggtg gagattgtat tgcattgtt 2580

gatttggtag ggtggccatt tttactatgg taatcctacc 2620