



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월05일

(11) 등록번호 10-2174854

(24) 등록일자 2020년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) *A23L 33/13* (2016.01)*A61P 35/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)*A23L 33/13* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0028913

(22) 출원일자 2019년03월13일

심사청구일자 2019년03월13일

(65) 공개번호 10-2020-0109623

(43) 공개일자 2020년09월23일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170018412 A*

Journal of Cancer. 2018. Vol.9, pp.450-459.*

Oncology Letters. 2018. Vol.16,
pp.5131-5139.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

이혜영

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미
래관 205호

김정호

서울특별시 서대문구 연희로16길 20 썬빌 303호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인키

전체 청구항 수 : 총 1 항

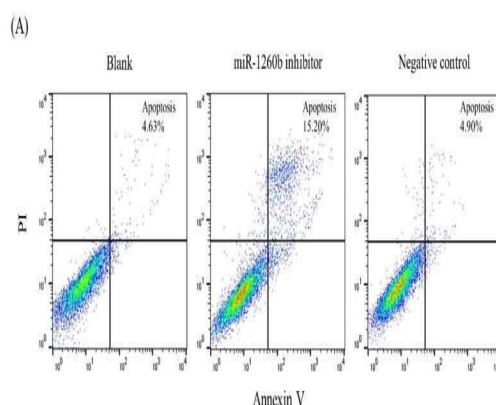
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 miR-1260b 억제제를 포함하는 유방암 세포 증식, 이동 또는 침윤 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 microRNA-1260b 억제제를 포함하는 유방암세포 증식, 이동, 또는 침윤 억제용 약학적 조성물에 관한 것으로, microRNA-1260b는 세포사멸의 *CASP8*의 발현을 억제하여 유방암 세포의 증식, 이동 및 침윤을 억제하고 유방암 세포의 이상 증식, 이동 또는 침윤을 예방, 치료 또는 예후를 예측하는데 사용할 수 있다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자

안성우

강원도 원주시 배율로 24 중흥 프로라디움아파트
208동 1305호

박선영

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미래
관 216호

김지혁

대구광역시 달성군 다사읍 죽곡1길 42, 103동 160
1호

김승일

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 러들러교수동
208호

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

인 비트로에서 유방암 세포에 후보 물질을 처리한 후 상기 유방암 세포에서 카스파제(caspase)-8 발현을 측정하여 카스파제(caspase)-8 발현이 증가되는 경우에 상기 후보물질은 miR-1260b를 억제하는 것으로 판단하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 caspase-8의 발현을 조절하여 유방암세포의 증식, 이동 또는 침윤을 억제하는 microRNA-1260b의 약제학적 등의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 유방암은 전 세계적으로 매년 약 522,000명이 사망하는 질환으로 전체 여성 암 중 폐암 다음으로 2번째로 사망률이 높은 암이다. 유방암의 효과적인 관리는 질병의 조기진단과 호르몬 수용체 및 전이 인자와 같은 예후 인자들의 적절한 모니터링 및 적절한 치료에 달려있다. 이러한 이유로, 유방암의 조기진단, 예후 예측 및 치료 타겟에 도움을 주는 새로운 바이오 마커 개발이 필요하다.

[0004] microRNA (miRNA 또는 miR)는 18-25 nucleotide의 단일 가닥 RNA 분자로서 mRNA 3'UTR에 결합하여 진핵생물의 유전자 발현을 억제하는 물질이다. microRNA의 생성은 Drosha (RNase III)에 의해 스템-루프 구조의 전구체 microRNA로 만들어지고, 세포질로 이동하여 Dicer에 의해 절단되어 성숙한 microRNA로 만들어진다. 최근에 유전자 발현을 조절하고 전이와 침윤 등으로 종양을 형성하도록 세포기전을 조절하는 잠재적 바이오 마커로써 microRNA가 연구되고 있다.

[0005] TNF 계열의 핵심 리간드인 TNF 관련 세포 사멸 유발 리간드 (TRAIL)는 정상 세포를 손상시키지 않으면서 선택적으로 암세포의 세포 사멸을 유도한다. 유방암을 비롯한 여러 암세포는 종종 caspase-3, caspase-8, caspase-10 발현의 결여 및 이들 caspase를 표적으로 하는 microRNA의 조절에 의해 부분적으로 TRAIL에 내성을 갖는다.

[0006] [선행 특허 문헌]

[0007] 대한민국 특허공개번호 제10-2014-0079255호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 유방암세포의 증식, 이동, 및 침윤을 억제하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 유방암세포 이상 증식, 이동, 침윤에 의한 전이를 예방, 예후 또는 치료하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 유방암세포 이상 증식, 이동 및 침윤 질환의 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 microRNA-1260b 억제제를 유효성분으로 포함하는 유방암의 증식 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 microRNA-1260b 억제제는 화합물, 또는 올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하고, 상기 microRNA-1260b 억제제는 서열번호 1에 기재된 올리고뉴클레오타이드인 것이 더욱 바람직하나 이

에 한정되지 아니한다.

- [0014] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 microRNA-1260b 억제제는 이를 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 형태로 포함되거나 비바이러스성 전달체와 함께 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, microRNA-1260b 억제제는 microRNA-1260b에 의한 카스파제(caspase)-8 발현 억제를 억제하여 유방암세포의 세포사멸을 유도하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 또 본 발명은 microRNA-1260b 억제제를 유효성분으로 포함하는 유방암의 이동 및 침윤 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 microRNA-1260b 억제제는 화합물, 또는 올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하고, 상기 microRNA-1260b 억제제는 서열번호 1에 기재된 올리고뉴클레오타이드인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0018] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 microRNA-1260b 억제제는 이를 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 형태로 포함되거나 비바이러스성 전달체와 함께 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, microRNA-1260b 억제제는 microRNA-1260b에 의한 카스파제(caspase)-8 발현 억제를 억제하여 유방암세포의 세포사멸을 유도하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 또한 본 발명은 microRNA-1260b 억제제를 유효성분으로 포함하는 유방암 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 microRNA-1260b 억제제는 화합물, 또는 올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하고, 상기 microRNA-1260b 억제제는 서열번호 1에 기재된 올리고뉴클레오타이드인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0022] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 microRNA-1260b 억제제는 이를 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 형태로 포함되거나 비바이러스성 전달체와 함께 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0023] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, microRNA-1260b 억제제는 microRNA-1260b에 의한 카스파제(caspase)-8 발현 억제를 억제하여 유방암세포의 세포사멸을 유도하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0024] 또한 본 발명은 microRNA-1260b 억제제를 유효성분으로 포함하는 카스파제(caspase)-8 발현 억제용 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 microRNA-1260b 억제제는 서열번호 1에 기재된 올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0026] 또한 본 발명은 인 비트로에서 세포에 microRNA-1260b 억제제를 처리하여 상기 세포에서 카스파제(caspase)-8 발현을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 microRNA-1260b 억제제는 서열번호 1에 기재된 올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0028] 또한 본 발명은 인 비트로에서 유방암 세포에 후보 물질을 처리한 후 상기 유방암 세포에서 카스파제(caspase)-8 발현을 측정하여 카스파제(caspase)-8 발현이 증가되는 경우에 상기 후보물질은 miR-1260b를 억제하는 것으로 판단하는 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명에서 상기 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여(근육내, 피하, 정맥내, 좌약 등)에 의해 투여될 수 있다. 적당한 투여량은 환자의 상태, 예를 들어, 연령 및 증상의 정도 등에 따라 적절히 조절할 수 있지만, 통상 성인의 경우 0.001~500mg/kg체중의 용량 범위에서 일반적으로 일회 또는 수 회로 나누어 1일당 0.1~1,000mg의 양으로, 바람직하게는 1일 3~1,000mg의 양으로 투여되는 것이다.
- [0030] 본 발명의 조성물을 경구용 제제로서 조제하는 경우에는 부형제, 또한 필요에 따라서 결합제, 붕괴제, 활택제, 착색제, 교미교취제 등을 가한 후, 통상적인 방법에 의해 정제, 피복 정제, 과립제, 캡슐제 등으로 한다.
- [0031] 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 젓당, 옥수수 전분, 백당, 포도당, 솔비트, 결정 셀룰로스, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이, 결합제로는 폴리비닐알콜, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 아라비

아 고무, 트라가칸트, 젤라틴, 셀락, 하이드록시프로필셀룰로스, 하이드록시프로필스타치, 폴리비닐피리돈 등이 사용된다.

- [0032] 그리고, 붕괴제로는 전분, 한천, 젤라틴 분말, 결정 셀룰로스, 탄산칼슘, 탄산수소나트륨, 구연산칼슘, 텍스트란, 펙틴 등이, 활택제로는 스테아린산 마그네슘, 활석, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화 식물유 등이 사용된다.
- [0033] 또한, 착색제로서는 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이, 교미교취제로서는 예를 들면 코코아 분말, 박하, 방향산, 박하유, 용뇌, 계피 분말 등이 사용된다. 이들의 정제에는 과립제의 경우 당, 젤라틴, 기타 필요에 따라 적절하게 코팅하는 것을 배제하는 것은 아니다.
- [0034] 또한 본 발명의 조성물을 주사제로 조제하는 경우에는 필요에 따라, pH 조정제, 완충제, 안정화제, 보존제 등을 첨가하고, 통상적인 방법에 의해 피하, 근육내, 정맥 주사제로 한다.
- [0035] 본 발명의 억제제는 필요에 따라, 염산, 황산, 인산 등의 무기염, 및 수산, 푸마르산, 말레인산, 능금산, 구연산, 주석산, 글루탐산 등의 유기염 등, 약학적으로 허용할 수 있는 산부가염으로서도 약효를 충분히 발휘시킬 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 억제제를 포함하는 조성물은 다양한 기능성 식품 및 건강보조 식품의 제조시 식품의 주성분 또는 첨가제 및 보조제로 사용될 수 있다.
- [0038] 본 명세서에서 '기능성 식품'이란, 일반 식품에 본 발명의 억제제를 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다. 기능성에는 물성 및 생리기능성으로 대별될 수 있는데, 본 발명의 억제제를 일반식품에 첨가할 경우, 일반 식품의 물성 및 생리기능성이 향상될 것이고, 본 발명은 이러한 향상된 기능의 식품을 포괄적으로 '기능성 식품'이라 정의한다.
- [0039] 예를 들어, 본 발명의 억제제의 암세포 성장 억제효과를 이용하여 항암 기능성식품을 제조할 수 있다. 또한 암세포 성장 억제효과를 이용한 기능성 강화식품, 암 예방 음료 등을 제조할 수 있을 것이다.
- [0040] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0041] 그밖에 본 발명의 억제제는 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100중량부 당 0.01~20중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0042] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0043] 본 발명자들은 새로운 분자표적치료 방법으로 miR-1260b의 발현 억제를 통한 유방암 세포의 증식, 이동 및 침윤의 영향을 확인하였으며, 유방암 환자 조직 102개 분석을 통해 miR-1260b의 발현 결과는 환자의 생존에 영향을 준다는 결과를 도출하였다.
- [0044] 본 발명은 miR-1260b를 억제하여 유방암세포의 증식, 이동 및 침윤을 억제할 수 있으며, 바이오마커로서 miR-1260b의 발현 변화를 측정하여 유방암 환자의 예후를 예측 할 수 있을 뿐만 아니라, 유방암 치료 및 예방을 위한 새로운 치료제로써 miR-1260b를 조절하는 신약개발에 적용이 가능하다는 것을 확인하였다.
- [0045] 단일 가닥 분자인 miR-1260b의 성숙한 형태로써, 이중 가닥 부분을 형성할 수 있는 스템-루프 구조일 수도 있다.
- [0046] 본 발명의 miR-1260b는 기본적으로 두가닥의 RNA가 쌍을 이루어 이중가닥을 형성하는 완전한 형태, 즉 인 비트로 (in vitro)에서 miR-1260b를 직접 합성한 뒤 형질 주입을 통해 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 플라스미드계 pre-microRNA 벡터와 PCR-유도 miRNA 발현 카세트 등에 의한 형질주입에 이용될 수 있도록 짧은 헤어핀을 갖는 구조로 변형된 형태일 수 있다.
- [0047] 본 명세서에서 제공하는 다양한 실시형태에서 사용되는 발명 miR-1260b는 생체 내 전달 효율을 높이기 위하여

당업계에 알려진 다양한 핵산 전달체(바이러스성 또는 비바이러스성 전달체)와 복합체 형태로 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0049] 본 발명은 microRNA-1260b를 억제하여 유방암세포의 증식, 이동, 및 침윤을 억제함으로써 전이를 막을 수 있고, 예후 바이오 마커로서 microRNA-1260b의 발현 변화를 측정하여 유방암 환자의 예후정보를 제공할 수 있을 뿐만 아니라 새로운 치료제 개발에 적용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 유방 정상세포 대비 유방암세포에서의 miR-1260b 발현양상 분석결과와 실시 예, 도 2는 유방암 세포(MDA MB-231) 증식에 대한 miR-1260b의 효과를 나타낸 것으로 (A)는 miR-1260b inhibitor(80 nM)를 형질 주입(transfection)된 MDA MB-231에서 miR-1260b의 발현을 실시간 PCR과 전기영동으로 측정을 통해 형질주입 효율을 나타낸 것이며 (B)는 miR-1260b 발현 억제에 따른 MDA MB-231 viable cell 수를 현미경 상에서 확인한 결과이며 (C)는 WST 분석으로 miR-1260b 발현 억제에 따른 MDA MB-231의 증식 변화를 나타낸 것이고, 도 3은 flow cytometry(PI와 Annexin V) 분석(A)을 통해 miR-1260b 발현 억제 따른 유방암 세포(MDA MB-231)의 세포 자멸 변화 비율(B)을 나타낸 것이고, 도 4는 유방암 세포(MDA MB-231) 이동에 대한 miR-1260b의 효과를 나타낸 것으로, (A)는 현미경을 이용하여 손상-치유(wound healing) 분석으로 0시간째부터 24시간째까지 관찰된 세포 이동 결과의 대표 이미지이며 (B)는 24시간째 대표 필드에서 분석한 MDA MB-231의 이동능을 나타낸 것이고, 도 5는 유방암 세포(MDA MB-231) 침윤에 대한 miR-1260b의 효과를 나타낸 것으로, (A)는 챔버를 침윤하여 밀바닥에서 보이는 MDA MB-231의 그림과 (B) 현미경을 이용하여 대표 필드에서 카운팅한 MDA MB-231의 이동 세포 수를 나타낸 것이고, 도 6은 유방암세포(MDA MB-231)에서 miR-1260b의 직접 표적으로서 CASP8의 동정 결과를 나타낸 것으로, (A)는 targetScan 온라인 분석 프로그램을 통해 확인한 CASP8의 miR-1260b 결합 부위를 나타낸 도식도이며 (B)는 음성 대조군(negative control), miR-1260b 억제제(80 nM)가 형질주입된 MDA MB-231에서 CASP8 유전자 발현을 실시간 PCR로 측정한 결과를 나타낸 것이고, (C)는 음성 대조군 또는 miR-1260b 모방체가 형질주입된 MDA MB-231에서 웨스턴 브랏을 이용하여 caspase-8과 cleaved caspase-8 단백질 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이고(β -actin을 대조군으로 사용) (D)는 유방암 환자 조직 샘플에서 miR-1260b 발현과 CASP8 유전자 발현의 상관관계를 분석한 결과이며, (E)는 miR-1260b 결합 서열을 포함하는 CASP8 3'UTR을 루시페라아제 리포터 유전자에 클로닝하고, (F) 듀얼 루시페라아제 분석으로 루시페라아제 활성을 평가한 결과를 나타낸 것이고, 도 7은 유방암 환자의 조직을 이용하여 miR-1260b의 발현에 따른 예후를 분석한 것으로, (A)는 유방암 환자 총 102명에 대한 miR-1260b 발현에 따른 생존율, (B)는 병기 I-II에서의 miR-1260b 발현에 따른 생존율, (C)는 병기 III에서의 miR-1260b 발현에 따른 생존율을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 비한정적인 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시 예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시 예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0054] 실시예 1. 유방암세포에서 miR-1260b의 억제학적 용도

[0055] 1) 유방암세포의 배양

[0056] 유방 정상 세포(MCF-10A)는 MEGM Single Quots 그리고 cholea toxin(Lonza, Basel, Switzerland)가 첨가된 MEBM 배지에 37 ° C에서 배양하였다. 유방암 세포들 중 MDA MB-231, SKBR-3는 100 U/mL의 페니실린과 100 μ L의 스트렙토마이신 용액이 첨가되고 10% 소 태아 혈청(FBS)가 함유된 Roswell Park Memorial Institute media(RPMI; Gibco, Carlsbad, USA)에 37 ° C에서 배양하였다.

[0057] 나머지 유방암 세포들 MCF-7 그리고 BT-474는 100 U/mL의 페니실린과 100 μ L의 스트렙토마이신 용액이 첨가되고 10% 소 태아 혈청(FBS)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM; Gibco, Carlsbad, USA)에 37 ° C에서 배양하였다.

[0058] 2) microRNA 형질주입

[0059] miR-1260b 억제제, miR-1260b 모방체와 음성 대조군의 RNA 올리고머 (negative control) (Ambion, USA)를 80 nM의 최종 농도로 사용하였다. miR-1260b의 염기서열은 5'-AUCCACCACUGCCACCAU-3'이다. FBS를 포함하지 않은 RPMI에서 유방암세포 (MDA MB-231)에 0,0'-dimyristyl-N-lysyl glutamate (DMKE)를 사용하여 miR-1260b 억제제, miR-1260b 모방체 또는 음성 대조군을 형질주입한 후, CO2 배양기에서 37 ° C에 4시간 동안 배양한 후, 10% FBS를 포함한 배지를 바꿔준 후 24시간 배양 후 추후 분석을 진행하였다.

[0060] miR-1260b 억제제의 서열은 표1에 기재하였다.

표 1

유전자	서열번호	염기서열(5' →3')*
miR-1260b 억제제	서열번호 1	AUGGUGGCAGUGGUGGGAU

[0063] 표 1은 miR-1260b 억제제의 서열

[0065] 3) 세포 증식 분석

[0066] MDA MB-231을 96 well 플레이트에 2×10^4 cells/well으로 세 칸씩 반복하여 배양하였다. miR-1260b 억제제 혹은 음성대조군을 형질주입한 세포는 10% FBS RPMI으로 24시간 동안 배양 후, WST 분석 키트 EZ-Cytox (DaeilLab, Seoul, Republic of Korea)을 사용하여 측정하였다.

[0067] 각 well에 10 μ L의 WST 용액을 첨가 한 후 2시간동안 37 ° C에서 배양하였다. 샘플의 흡광도는 분광계(Tecan, Salzburg, Austria)를 사용하여 450 nm 파장으로 측정하였다.

[0069] 3) 세포 자멸 분석

[0070] Annexin V 및 propidium iodide (PI) 염색은 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 1(BD Biosciences, Sparks, MD, USA)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 배양 된 세포에 트립신-이디티에이(Trypsin-EDTA)를 처리하고 차가운 PBS로 2회 세척 한 다음 600 x g으로 5 분간 원심 분리하였다.

[0071] 세포를 5×10^5 cells/mL의 농도로 결합 완충액 500 μ L에 재현탁시키고 5 μ L의 Annexin V-FITC 및 5 μ L의 PI 를 세포 현탁액에 첨가하였다. 혼합물을 어두운 곳에서 37 ° C에서 10분 동안 배양하고 BD FACSCalibur (BD Biosciences, Sparks, MD, USA)로 분석 하였다.

[0073] 4) 실시간-PCR

[0074] 4-1) 조직검체로부터 total RNA 분리

[0075] FFPE 조직 3-4개의 절편을 Scroll된 상태로 취하여, Deparaffinization solution (Qiagen, Hilden, Germany)을 넣어 탈파라핀 후, Qiagen RNeasy FFPE kits (Qiagen, Hilden, Germany)의 프로토콜을 이용하여 total RNA를 추출하였다.

[0077] 4-2) miR-1260b 유전자 증폭을 위한 cDNA 합성

[0078] 추출된 RNA 5 μ L와 TaqMan microRNA reverse transcription 시약(Applied Biosystem, USA) (100mM dNTPs(0.15 μ L), Reverse transcriptase(50 U/ μ L)(1 μ L), 10x reverse transcription buffer (1.5 μ L), RNase inhibitor(20 U/ μ L)(0.19 μ L), nuclease free water (4.16 μ L) 그리고 miR-1260b specific RT primer (3 μ L))을 16 ° C에서 30 분간, 42 ° C에서 30 분간, 85 ° C에서 5 분간 반응하여 합성하였다.

[0080] 4-3) miR-1260b 유전자 증폭 및 발현양 확인

[0081] 실험과정의 조성은 10 μ L 2x Tunderbird 프로브 qPCR (Toyobo, Osaka, Japan), 1 μ L 20 x miR-1260b specific primer, 7.6 μ L nuclease-free water 그리고 1.4 μ L 주형 cDNA, 최종 용량 20 μ L 로 수행한다. PCR 반응은 95 ° C에서 10 분간, 95 ° C에서 15 초간, 60 ° C에서 1 분으로 40 사이클을 수행하여 실시간으로 발현 양을 확인할 수 있다.

[0082] miR-1260b의 발현은 형광이 배경 형광보다 훨씬 높은 값을 초과하는데 필요한 PCR 사이클의 수로 정의되는 C_T를

측정하여 정량화하였다. miR-1260b의 양은 CFX Manager Software v1.6 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 참조 유전자에 상대적인 microRNA를 측정하는 비교 C_T 방법 ($\Delta \Delta C_T$ 방법)을 사용하여 결정하였다 (Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8).

본 발명에서 $\Delta \Delta C_T$ 는

$\Delta \Delta C_T = 2^{-[\text{환자군}(\text{miR-1260b} - \text{reference})C_T - \text{정상군}(\text{miR-1260b} - \text{reference})C_T]}$ 으로 계산하였다.

여기에서 C_T 값이란 PCR 과정 중 증폭이 뚜렷하게 증가되기 시작하는 사이클의 수치를 의미한다.

표 2

miRNA ID	Primer/probe		Sequence
miR-1260b	RT primer	서열 번호 2	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGGATACGACATGGTG
	Forward primer	서열 번호 3	CAGATCCCACCACTGC
	Reverse primer	서열 번호 4	GTGCAGGGTCCGAGGT
	Probe	서열 번호 5	(6-FAM) GGATACGACATGGTGG (MGB)

표 2는 본 발명에서 사용한 miR-1260b 프라이머와 프로브 정보

4-4) CASP8 유전자를 위한 cDNA 합성

추출된 RNA와 cDNA 합성 시약 (0.25 μ g의 random hexamer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), dNTP Mixture (각 2.5mM), DEPC 처리 된 물, 5 * 버퍼 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 0.1M DTT (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 및 200 U 역전사 효소 (MMLV-RT, Invitrogen, Carlsbad, California, USA)를 25 °C에서 10 분간, 37 °C에서 50 분간, 70 °C에서 15 분간 반응하여 합성하였다.

4-5) CASP8 유전자 증폭 및 발현양 확인

상기 실시예 4-1)과 실시예 4-4)를 통해 준비한 환자의 cDNA로부터 유방암환자의 CASP8 유전자를 검출하기 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.

실험과정의 조성은 10 μ L 2 x Tunderbird 프로브 qPCR 믹스 (Toyobo, Osaka, Japan), 3 μ L 프라이머 및 TaqMan 프로브 혼합물, 2 μ L 주형 cDNA 및 증류수 (DW)를 샘플 당 최종 용량 20 μ L로 수행한다.

PCR 반응은 Pre-denaturation 과정으로 94 °C에서 3분, denaturation 과정으로 94 °C 3초와 annealing과 elongation과정으로 55 °C에서 30초로 40사이클을 수행하여 실시간으로 발현양을 확인할 수 있으며 만들어지는 산물은 96-126bp이다.

본 발명에서 사용된 CASP8 프라이머 및 프로브(한국 바이오니아에 의뢰하여 합성) 서열은 표 3에 기재하였다.

표 3

유전자	Oligomer	서열번호	염기서열(5' ->3')*	비고
CASP8	CASP8-F	서열번호 6	GCTAAATTCACACTACC	casp8 증폭
	CASP8-R	서열번호 7	CTTGGGTCAAGCAATC	

5) 세포 이동 분석

세포 이동 분석은 제조사의 지시에 따라 SPLScar TM (SPL, Pocheon, Republic of Korea)을 이용하여 수행 하였다. miR-1260b 억제제, 음성 대조군 또는 blank가 형질주입된 세포 5 * 10⁵를 6 웰 플레이트에서 37 °C에서 24 시간 동안 배양 하였다. 그런 다음, 합류 단층 세포를 500 μ m SPLScarTM에 의해 직선으로 긁어 내고, 세포를 상 처가 폐쇄하도록 하였다.

- [0102] 상처 치유 이미지를 0, 12, 및 24시간까지 현미경을 이용하여 포착하였다. 초기 상처부위와 비교하여 이동된 세포를 갖는 면적의 백분율을 상처 봉합으로 정의 하였다.
- [0104] 6) 세포 침윤 분석
- [0105] 세포 침윤 분석은 SPLInsert™ Hanging (SPL, Pocheon, Republic of Korea)을 이용하여 제조사의 시에 따라 수행하였다. 챔버를 24 웰 플레이트에 삽입하고 miR-1260b 억제제 또는 음성 대조군이 형질 주입된 세포, 5×10^4 를 상부 챔버에 배양 하였다. 0.1% FBS를 함유하는 배지를 상부 챔버에 삽입하고 20% FBS를 함유하는 배지를 하부 웰에 첨부하였다. 세포를 37 °C, 5% CO₂에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 챔버의 멤브레인을 트리밍하고 0.1% 크리스탈 바이올렛으로 염색하고 광학 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰 하였다. 각각의 막으로부터 3 건의 무작위로 선발하고, 침입 된 세포의 수를 세었다.
- [0107] 7) 루시퍼라아제 분석
- [0108] 한국 바이오니아 의뢰를 통해 TargetScan 7.2 정보에 기초한 잠재적 표적 유전자(CASP8)로부터 3'UTR에서의 결합 부위에 대한 pmirGLO 이중 루시퍼라제 miRNA 표적 발현 벡터(Promega, San Luis Obsipo, CA)를 사용하여 플라스미드를 제작하였다. CASP8 야생형 (WT): 5'-GTTTAAACATAATCCCAGCACTTTGGGAGGTTGAGGTGGGAGGATTGCTGAACCCAAGAGGTCTAGA-3' ,
- [0109] CASP8 돌연변이 타입 (MT): 5' -GTTTAAACATAATCCCAGCACTTTGGGAGGTTGATTTT TTTTGGATTGCTGAACCCAAGAGGTCTAGA-3' .
- [0110] 보고된 유전자 분석을 위해 MDA MB-231을 리포터 벡터 (CASP8 WT 또는 CASP8 MT)를 miR-1260b 모방체 및 음성 대조군과 함께 형질주입시켰다. 루시퍼라아제와 Rneilla 신호는 듀얼 루시퍼라아제 시스템 (Promega)을 사용하여 형질 주입 24시간 후에 측정 하였다.
- [0112] 8) 조직학적 분석
- [0113] 8-1) 유방암 환자 조직 샘플
- [0114] 8-2) 면역조직화학염색법 (Immunohistochemistry; IHC)
- [0115] 파라핀 블록을 4 μm 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시키고 충분히 건조시킨 후 BenchMark ST (Ventana medical system, USA) 자동면역염색기기를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 슬라이드 염색한 후 암세포의 세포막에 ER, 그리고 PR 단백질이 염색되는 정도가 10% 이상일 때 ER 그리고 PR 양성으로 진단하였다. HER2 단백질의 경우 염색되는 정도에 따라 4가지 등급, 즉 0, 1+, 2+, 3+으로 나누어 판정한다. 그 중에서 0, 1+ 일 경우 HER2 음성으로 진단하고, 3+일 경우 양성으로 진단하였으며, 2+일 경우 환자의 임상정보에 따라 양성 혹은 FISH를 수행하여 진단하였다.
- [0117] 8-3) 형광동소포합법 (Fluorescence in situ Hybridization; FISH)
- [0118] HER2 IHC법에서 2+가 나온 환자를 대상으로 하여, 파라핀으로 고정되어 있는 조직 블록을 microtome을 이용하여 4 μm 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 후, 탈파라핀화 및 함수 과정을 거쳐 상용화된 HER2 DNA probe kit (Vysis Inc, Downers Grove, IL, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 실험을 진행하였다. HER2 발현 여부는 유전자 발현 정도에 따라서 Amplification Index가 2.2이상일 경우 양성으로 판독하였다.
- [0120] 9) 통계학적 분석
- [0121] GraphPad Prism 소프트웨어 버전 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) 및 SPSS Statistics 소프트웨어 버전 21.0 (IBM, Armonk, YN, USA)을 사용하여 통계 분석을 수행 하였다. Mann-Whitney test와 Kruskal-Wallis test를 사용하여 통계적 유의성을 각각 non-parametric 통계치로 결정하였다.
- [0122] 사례는 중앙값 miR-1260b 발현 수준에 의해 두 그룹으로 나누었다. miR-1260b의 발현과 다양한 임상 병리학 적 매개 변수간의 연관성을 Fisher's exact test로 분석하였다. 생존은 Kaplan-Meier 방법으로 추정하고 log-rank test로 평가 하였다. 예후 가치에 대한 다변량 분석은 Cox 비례 위험 모델을 사용하여 평가하였다. 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.
- [0124] 상기의 실시예의 결과를 하기에 서술한다.

- [0125] 유방암 세포주에서 miR-1260b의 발현 양상을 RT-qPCR로 측정하여 유방암에서 miR-1260b의 발현 변화를 확인하였다. 유전자 발현을 측정하기 위해 RNU6B로 표준화 된 표적 델타 C_T (ΔC_T)를 이용하여 microRNA 유전자 발현을 계산하였다.
- [0126] 그 결과 유방암 세포주 (MDA MB-231, SKBR-3, BT-474 및 MCF-7)에서의 miR-1260b의 발현 수준은 유방 정상 세포주 (MCF-10A)에 비해 통계학적으로 높음을 확인하였다 ($P < 0.01$)[도 1].
- [0127] 유방암 세포의 세포 증식 능력에 대한 miR-1260의 영향을 조사하기 위해, MDA MB-231 세포를 24시간 동안 음성 대조군, blank 또는 miR-1260b 억제제를 형질 주입시켰다. 이어서, miR-1260b의 발현 수준을 RT-qPCR에 의해 조사하였다.
- [0128] miR-1260b 억제제로 형질 주입된 세포에서 miR-1260b의 발현은 음성 대조군 및 blank로 형질 주입된 세포에 비해 감소 됨을 확인하였다 ($p < 0.01$)[도 2A].
- [0129] 또한 miR-1260b 발현 억제한 군에서 viable 세포의 감소를 현미경 상에서 확인하였다[도 2B].
- [0130] 다음으로, 세포 증식을 WST 분석에 의해 측정하였다. MDA MB-231 세포의 증식 능력은 음성 대조군 및 blank와 비교하여 miR-1260b 발현 억제군에서 감소하였다 ($p < 0.0001$)[도 2C].
- [0131] miR-1260b 억제제로 형질 주입한 MDA MB-231의 세포 생존율은 음성 대조군 (100%) 또는 Blank(100%)와 비교하여 71%로 감소했다.
- [0132] miR-1260의 발현이 억제되었을 때 세포 증식이 감소하는 이유를 확인하기 위해 세포의 사멸사를 측정하였다. 세포 사멸을 조사하기 위해, 세포 1×10^5 를 Annexin V-FITC 및 PI로 염색하고 분석하였다.
- [0133] 그 결과, miR-1260b 발현의 억제가 MDA MB-231에서 세포 사멸이 유도함을 확인하였다[도 3 A].
- [0134] 세포의 사멸의 비율이 음성 대조군 및 blank 대비 miR-1260b 발현 억제 군에서 약 10% 증가하였다[도 3 B].
- [0135] miR-1260b 발현의 감소가 세포 이동 능력에 영향을 주는지 조사하기 위해 창상 치유 분석을 수행하였다. MDA MB-231은 miR-1260b 억제제, 음성 대조군 및 blank로 형질 주입하였다. 형질 주입 후 (24시간), 세포를 500 μ m 폭으로 끊었다.
- [0136] 상처 치유 분석은 miR-1260b 억제제로 형질 주입된 MDA MB-231이 음성 대조군 또는 blank로 형질 주입된 MDA MB-231보다 낮은 이동성을 나타내었다[도 4 A].
- [0137] miR-1260b 억제제로 형질 주입한 MDA MB-231의 스크래치 면적은 52.1%로 채워졌고, 음성 대조군 및 blank로 형질 주입한 MDA MB-231의 스크래치 면적은 24시간에서 완전히 채워졌다 ($p < 0.0001$)[도 4 B].
- [0138] miR-1260b의 발현 감소가 세포 침윤능력에 영향을 미치는지 알아보기 위해 트랜스 웰 침윤 분석을 수행하였다. MDA MB-231은 miR-1260b 억제제, 음성 대조군 및 blank로 형질 주입하였다.
- [0139] 형질 주입한 세포를 0.1% FBS가 함유 된 배양 배지로 재현탁 하고 트랜스 웰의 상부 챔버에 배양하였다. 하부 챔버는 20% FBS를 함유하는 배양 배지로 채우고 추가로 48시간 동안 배양하였다. 챔버 멤브레인에 침윤한 세포를 고정시키고 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. miR-1260b 억제제로 형질 주입한 세포의 침윤 능력은 음성 대조군 및 blank로 처리한 세포의 침윤 능력보다 훨씬 더 감소하였다[도 5 A, 및 B].
- [0140] MDA MB-231에서 miR-1260b의 직접 표적으로서 *CASP8*의 동정을 확인하기 위해서, 도 6A는 targetScan7.2 온라인 분석 프로그램을 통해 확인한 *CASP8*의 miR-1260b 결합 부위를 나타낸 도식도이다.
- [0141] 음성 대조군 (negative control) 및 miR-1260b 억제제(80 nM)이 형질주입된 MDA MB-231에서 *CASP 8* 유전자 발현을 실시간 PCR로 측정한 결과, miR-1260b의 발현 억제군에서 음성 대조군 대비 통계학적으로 유의하게 *CASP8* 유전자가 증가 되었음을 확인하였다[도6 B].
- [0142] 유방암 환자 조직 샘플에서 miR-1260b 발현과 *CASP8* 유전자 발현의 상관관계를 분석한 결과, 역 상관관계를 확인하였다($r = -0.6137$, $p < 0.0001$). 도6 D는 miR-1260b 결합 서열을 포함하는 *CASP8* 3'UTR을 루시퍼라아제 리포터 유전자에 클로닝하여 완성한 구조물을 나타낸 도식도이며, MDA MB-231을 리포터 벡터 (*CASP8* WT 또는 *CASP8* MT)를 miR-1260b 모방체 및 음성 대조군과 함께 형질주입시켰다. 루시퍼라아제와 Rneilla 신호는 듀얼 루시퍼라아제 시스템 (Promega)을 사용하여 형질 주입 24시간 후에 측정하였다. 그 결과, *CASP8* WT에서 음성 대조군 대비 miR-1260b 모방체에서 루시퍼라아제 활성이 통계학적으로 유의하게 감소함을 확인 하였다 ($p < 0.01$)

[도6 E].

[0143] 유방암 조직에서의 miR-1260b의 발현 수준과 임상 병리학 적 특성의 관계를 알아 보기 위해 miR-1260b 발현을 RT-qPCR로 102개의 유방암 조직을 이용하여 측정 하였다. 신촌 세브란스 병원으로부터 모집된 환자의 특징은 표 4에 요약되어 있다.

[0144] 유방암 환자 102명의 연령은 30-84세 (평균 \pm SD, 49.5 ± 11.3 세, 95% CI, 47.3-51.8)였다. 102명의 유방암 환자 중 I-II 병기는 70명 (63.6%), III-IV 병기는 31명 (30.4%), 알려지지 않은 병기 1명 (1.0%) 이었다. 조직학적 등급은 I-III 등급이 65명 (63.7%), III 등급이 35명 (34.3%) 그리고 알려지지 않은 등급이 2명 (2.0%)이었다. HER2 양성율, ER 양성율, PR양성율은 각각 28.4%, 69.9%, 및 41.1%였다 (표 4).

표 4

[0146]

Characteristics	Breast cancer patients	
	n = 102	%
Age (years)		
< 50	54	52.9
\geq 50	48	47.1
TNM 단계		
I - II	70	68.6
III-IV	31	30.4
Unknown	1	1.0
조직학적 등급		
I - II	65	63.7
III	35	34.3
Unknown	2	2.0
종양 크기(cm)		
< 2	56	54.9
\geq 2	46	45.1
Unknown	0	0.0
림프 노드 침윤		
No	55	53.9
Yes	42	44.1
Unknown	2	2.0
HER2 ^a		
Negative	73	71.6
Positive	29	28.4
Unknown	0	0.0
ER ^b		
Negative	31	30.4
Positive	71	69.9
Unknown	0	0.0
PR ^c		
Negative	60	58.8
Positive	42	41.2
Unknown	0	0.0
miR-1260b 발현		
Low	50	49.0
High	52	51.0
Unknown	0	0.0

[0147] 표 4는 102명 유방암 환자 조직의 임상정보 결과

[0149] 유방암 조직에서 miR-1260b 및 환자의 임상정보 (나이, TNM 병기, 조직학적 등급, 종양의 크기, 림프절 침윤, HER2, ER, 및 PR)의 연관성을 알아보기 위해 miR-1260b 발현을 중앙값에 따라 저 발현 군과 과 발현 군으로 나눈 후, 임상적 연관성을 분석하였다. miR-1260b의 발현에서 TNM 병기, 림프절 침윤, 종양의 크기, HER2, 및 PR

과 통계적으로 유의한 상관관계를 확인하였다(표 5).

표 5

변수	n	miR-1260b 발현		p value
		Low, n (%)	High, n (%)	
Age (years)				0.172
< 50	54	30 (55.6)	24 (44.4)	
≥ 50	48	20 (41.7)	28 (58.3)	
TNM 단계				< 0.001
I / II	70	45 (64.3)	25 (35.7)	
III/IV	31	5 (16.1)	26 (83.9)	
조직학적 등급				0.092
Well/moderate	65	37 (56.9)	28 (43.1)	
poor	35	13 (37.1)	22 (62.9)	
종양 크기				< 0.001
< 2 cm	56	37 (66.1)	19 (39.9)	
≥ 2 cm	46	13 (28.3)	33 (71.7)	
림프 노드 침윤				< 0.05
No	55	35 (63.6)	20 (36.4)	
Yes	45	15 (33.3)	30 (66.7)	
HER2				< 0.01
Negative	73	42 (57.5)	31 (42.5)	
Positive	29	8 (27.6)	21 (72.4)	
ER				0.086
Negative	31	11 (35.5)	20 (64.5)	
Positive	71	39 (54.9)	32 (45.1)	
PR				< 0.05
Negative	60	24 (40.0)	36 (60.0)	
Positive	42	26 (61.9)	16 (38.1)	

표 5는 miR-1260b 발현과 환자의 임상정보와의 상관성 분석

생존 분석을 통한 예후를 분석하였다. miR-1260b의 발현과 전체 생존율 사이의 연관성을 Kaplan-Meier 분석 및 log-rank으로 조사하였다. 결과는 miR-1260b의 높은 발현이 전체 생존율 저하와 유의한 상관 관계가 있음을 보여주었다 ($p < 0.0001$)[도 7].

miR-1260b 발현의 다변량 Cox 비례 위험 모델 분석은 miR-1260b의 높은 발현이 전체 생존율에 대해 독립적인 예후 인자임을 보여준다.(Hazard ratio = 5.112, $p < 0.05$)(표 6)

표 6

특성	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value
연령 (years)						
< 50 vs ≥ 50	0.804	0.279-2.318	0.687			
TNM 단계						
I II vs IIIIV	9.020	3.009-27.039	< 0.001	6.053	1.935-18.932	< 0.01
조직학적 등급						
Well/ moderate vs Poor	0.848	0.891-2.893	0.848			
종양 크기(cm)						
< 2 vs ≥ 2	5.622	1.567-20.169	< 0.01	5.723	1.593-20.557	< 0.01
림프노드 침윤						
No vs Yes	4.281	1.342-13.658	< 0.05	3.599	1.067-12.134	< 0.05
HER2						
Negative vs Positive	4.714	1.635-13.598	< 0.05	3.766	1.230-11.528	< 0.01
ER						
Negative vs Positive	0.350	0.123-0.998	< 0.05	0.315	0.104-0.955	< 0.05
PR						

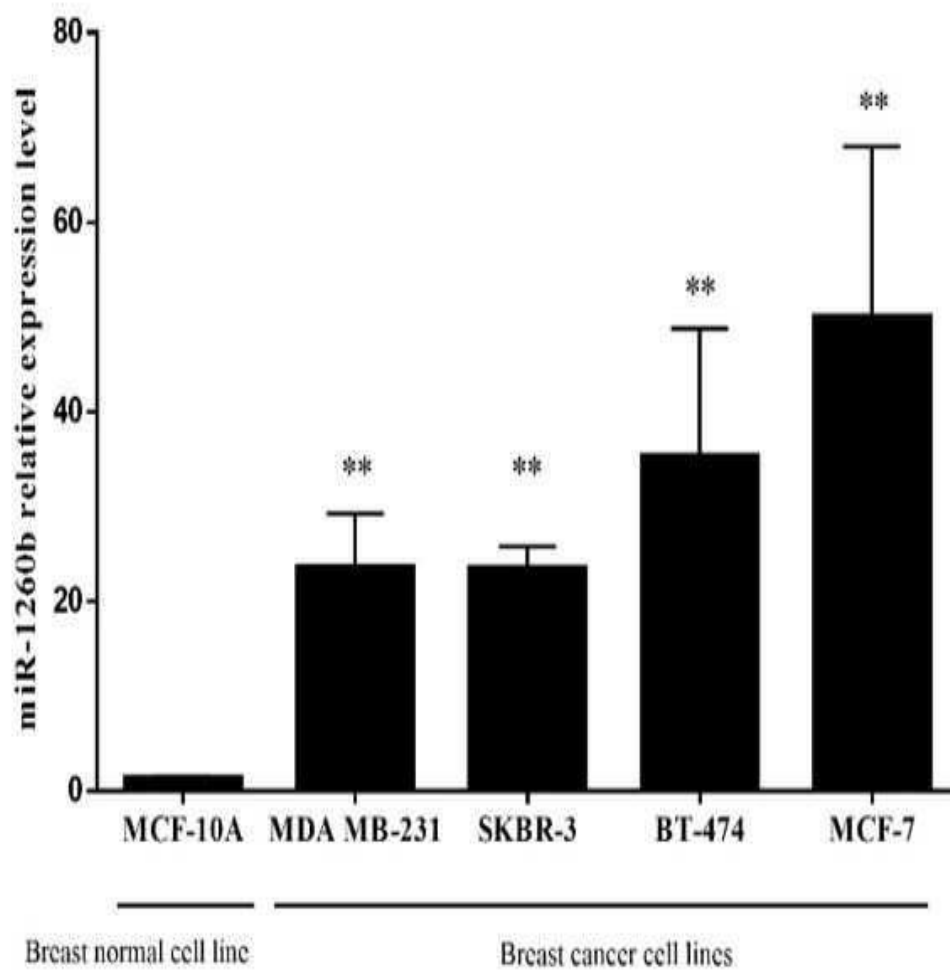
Negative vs Positive	0.449	0.141-1.431	0.176			
miR-1260b 발현						
Low vs High	8.523	1.906-38.109	< 0.01	5.112	1.080-24.197	< 0.05

[0157] 표 6은 miR-1260b 발현 및 환자의 임상 인자들의 위험도 분석

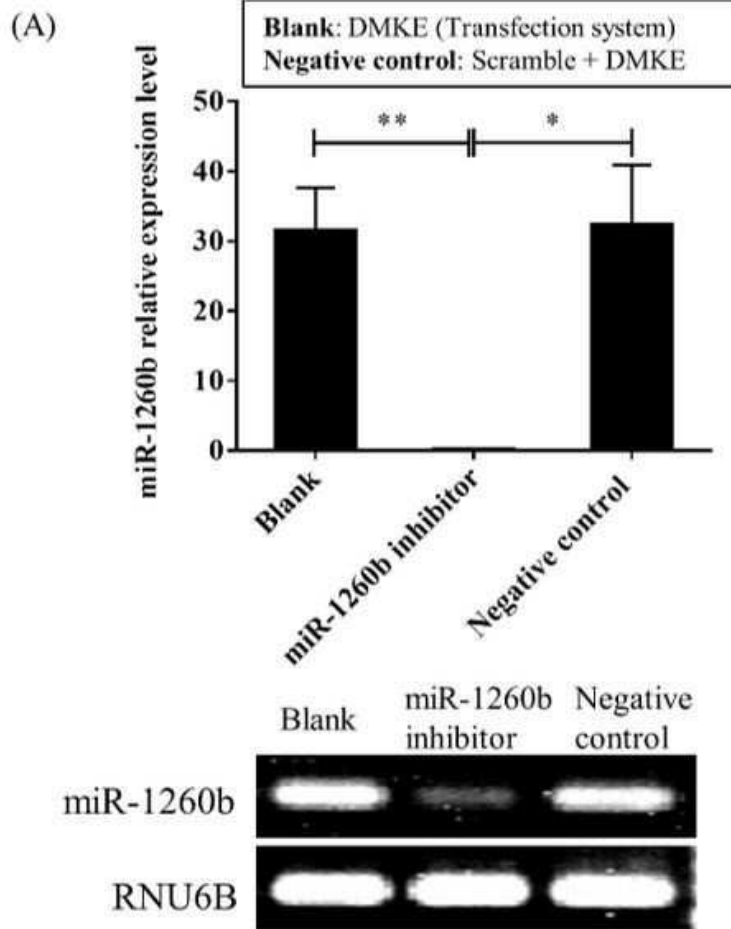
[0160] 표 6은 miR-1260b 발현 및 환자의 임상인자들의 위험도 분석

도면

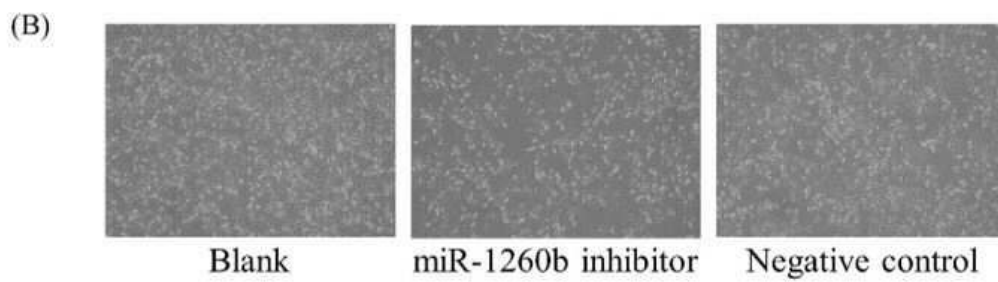
도면1



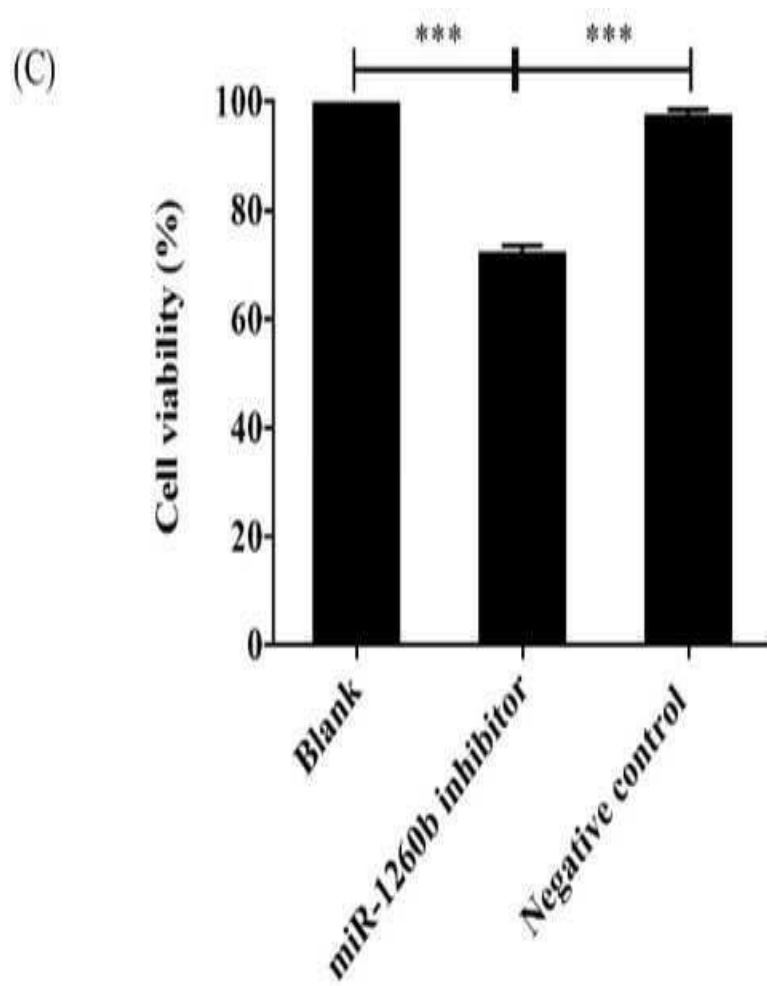
도면2a



도면2b

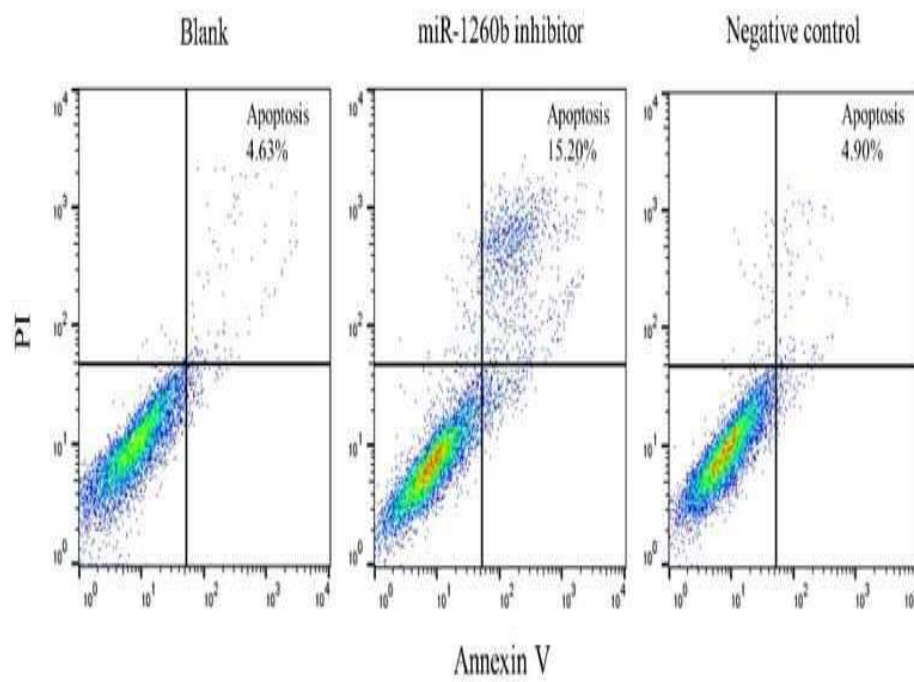


도면2c



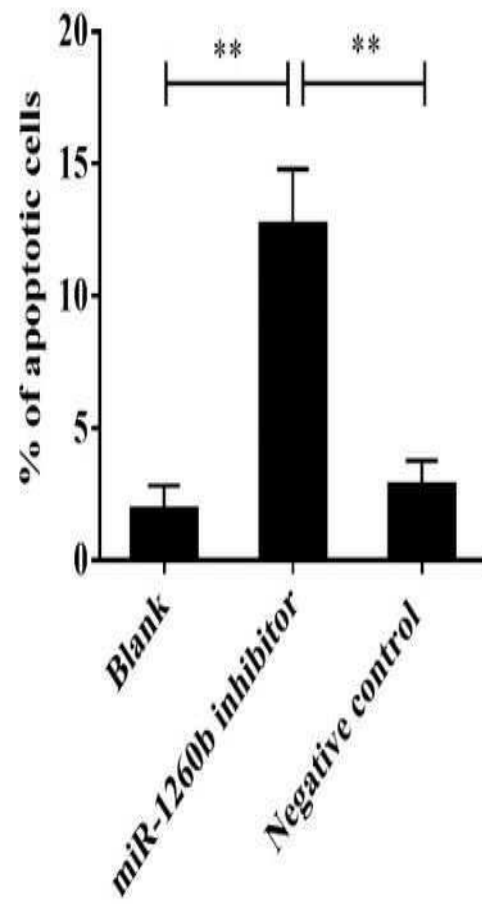
도면3a

(A)



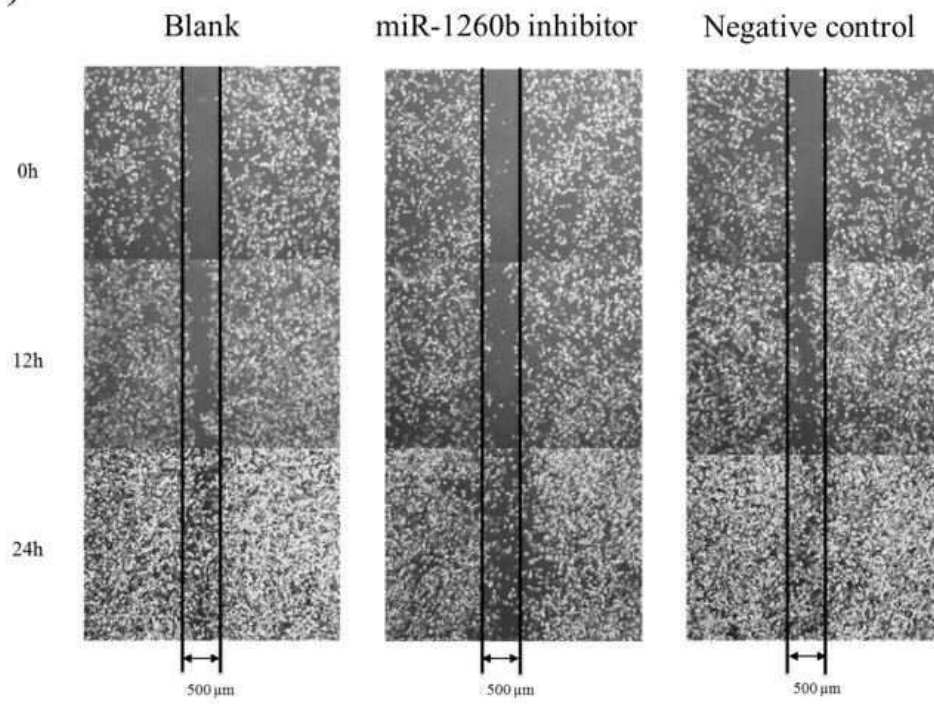
도면3b

(B)



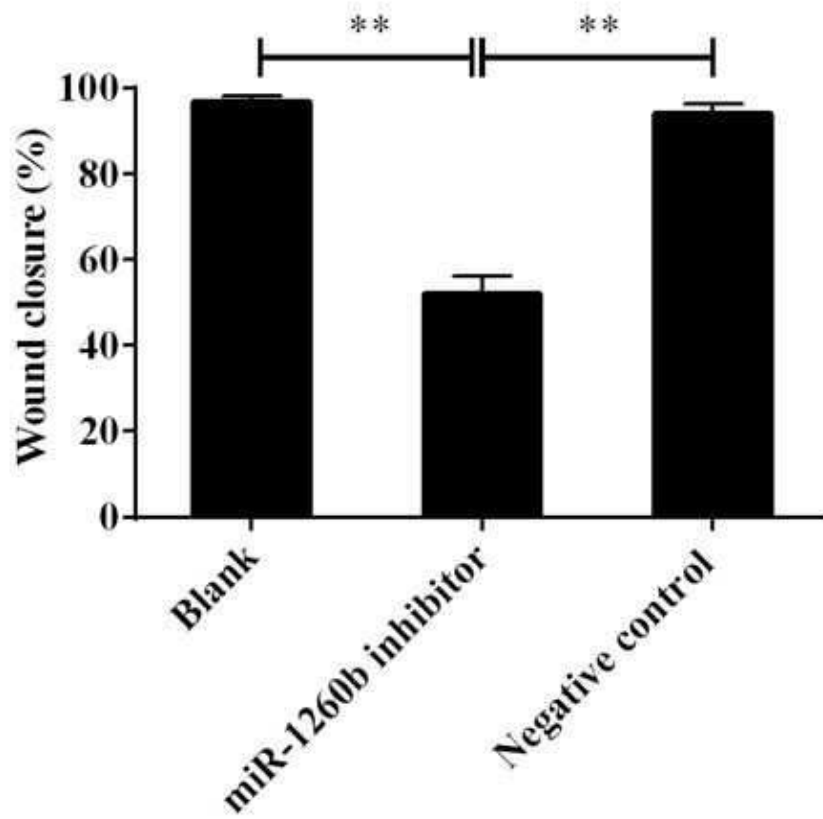
도면4a

(A)



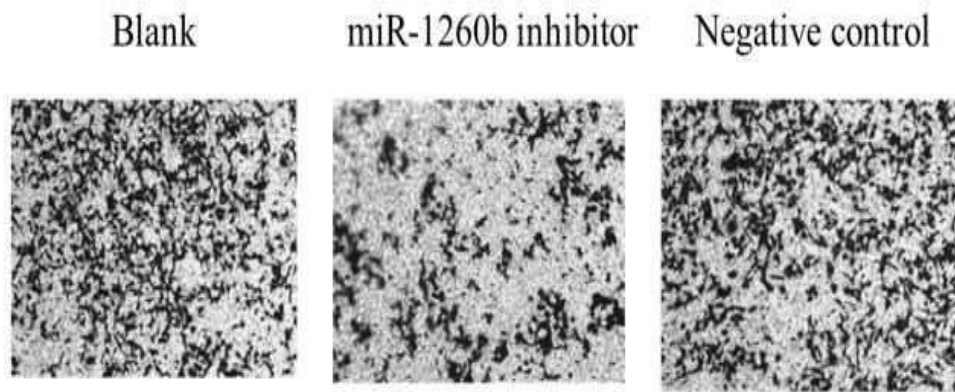
도면4b

(B)

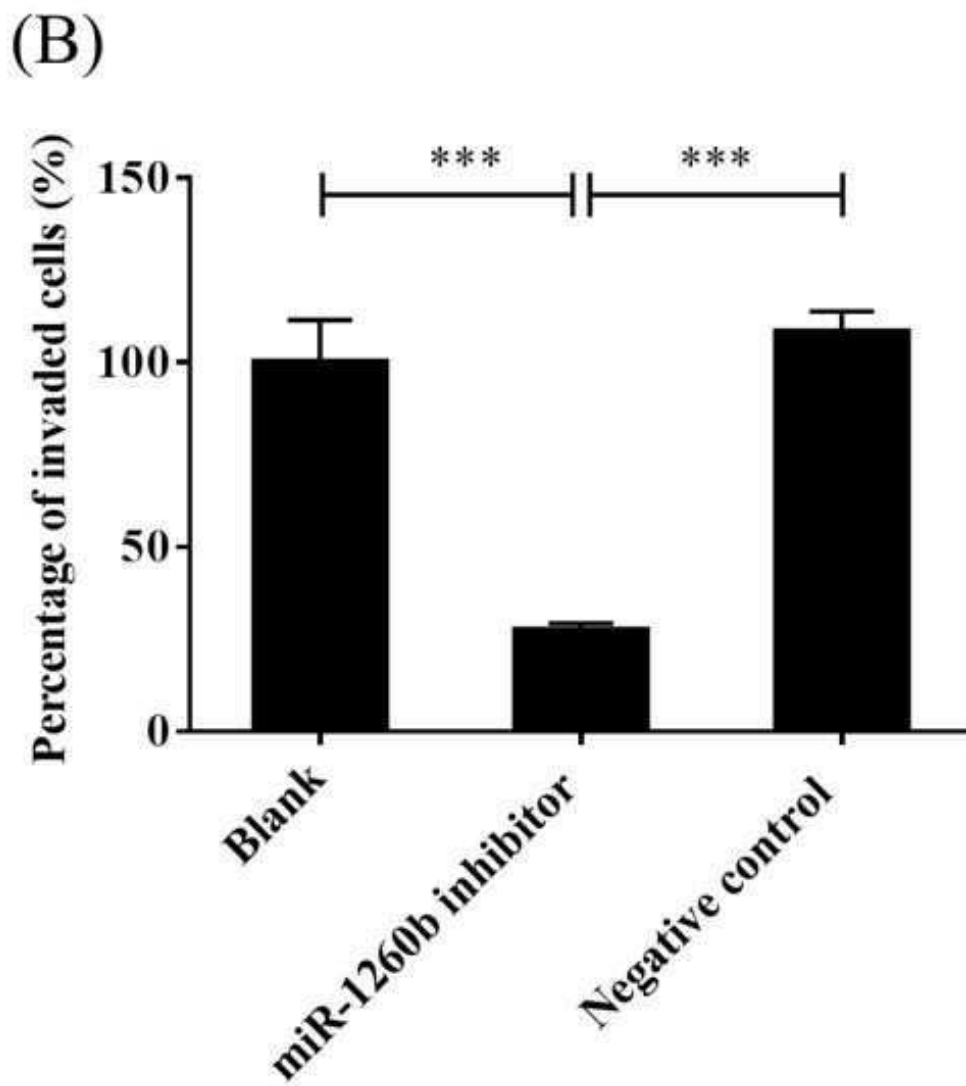


도면5a

(A)

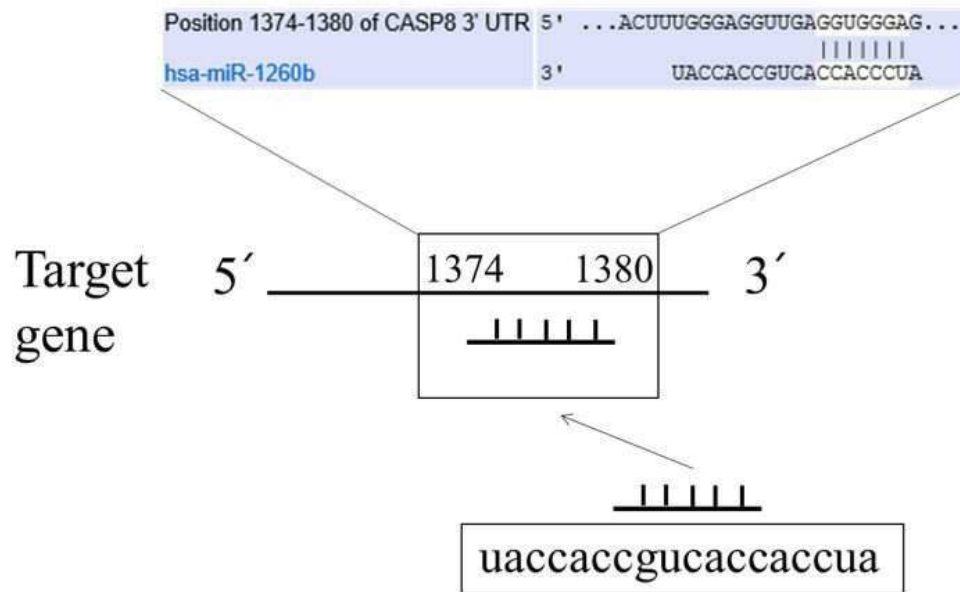


도면5b

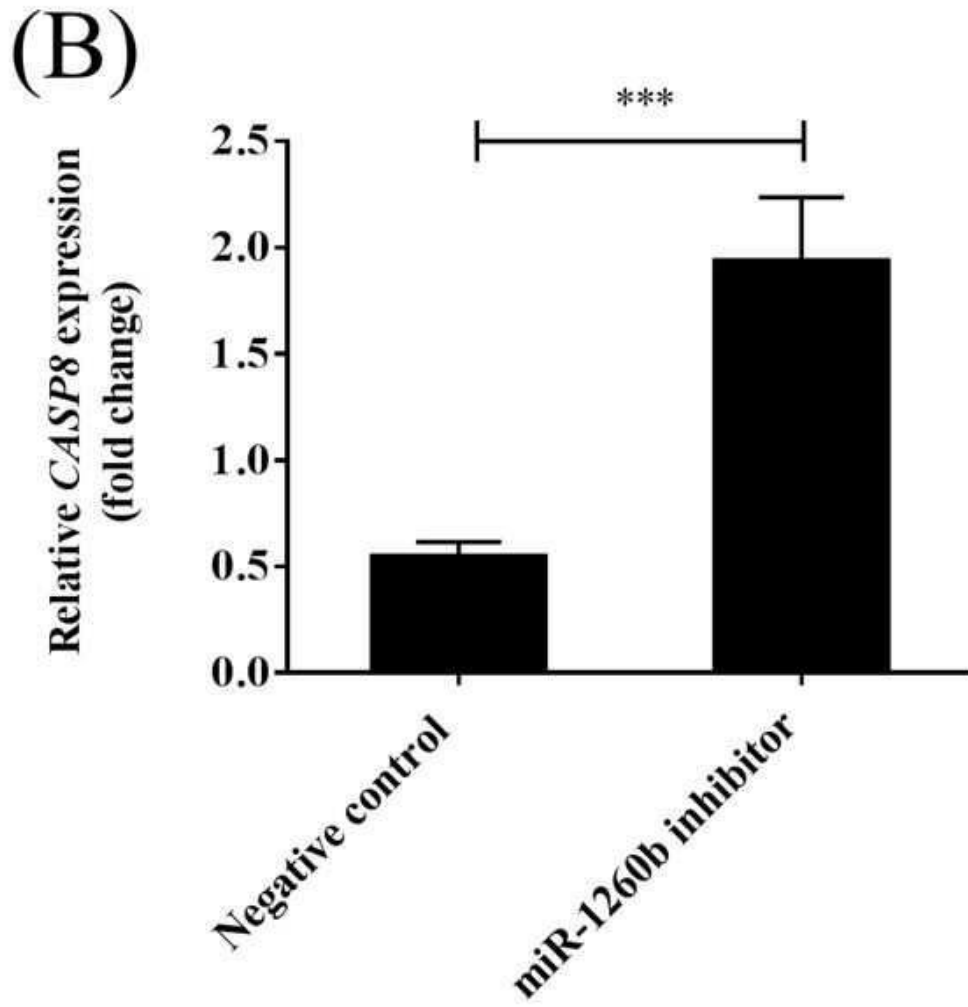


도면6a

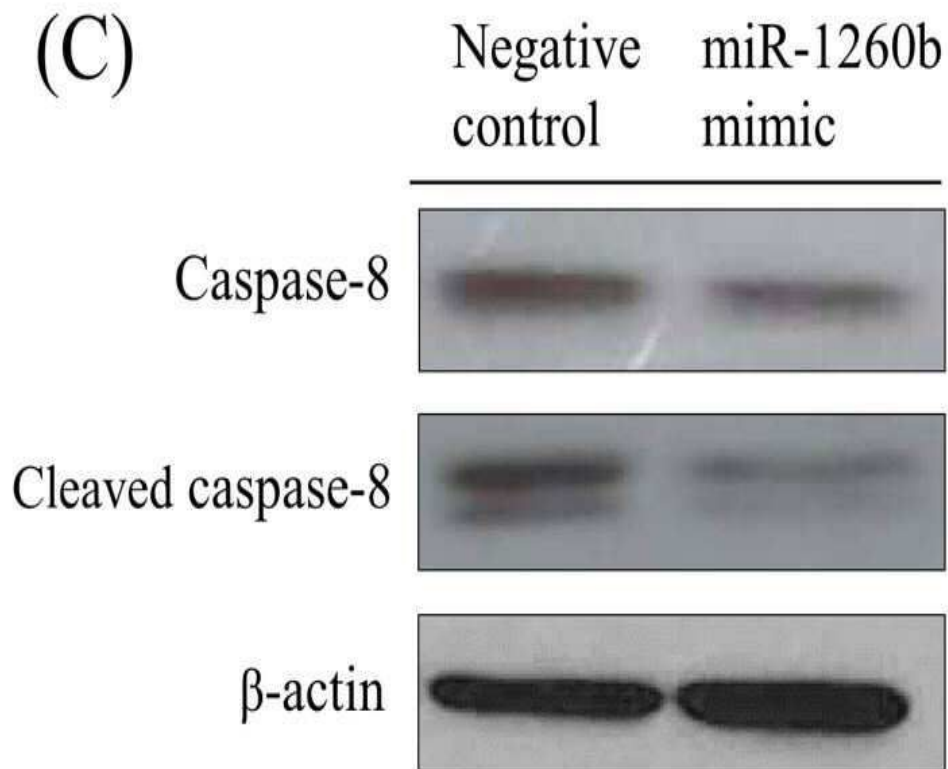
(A)



도면6b

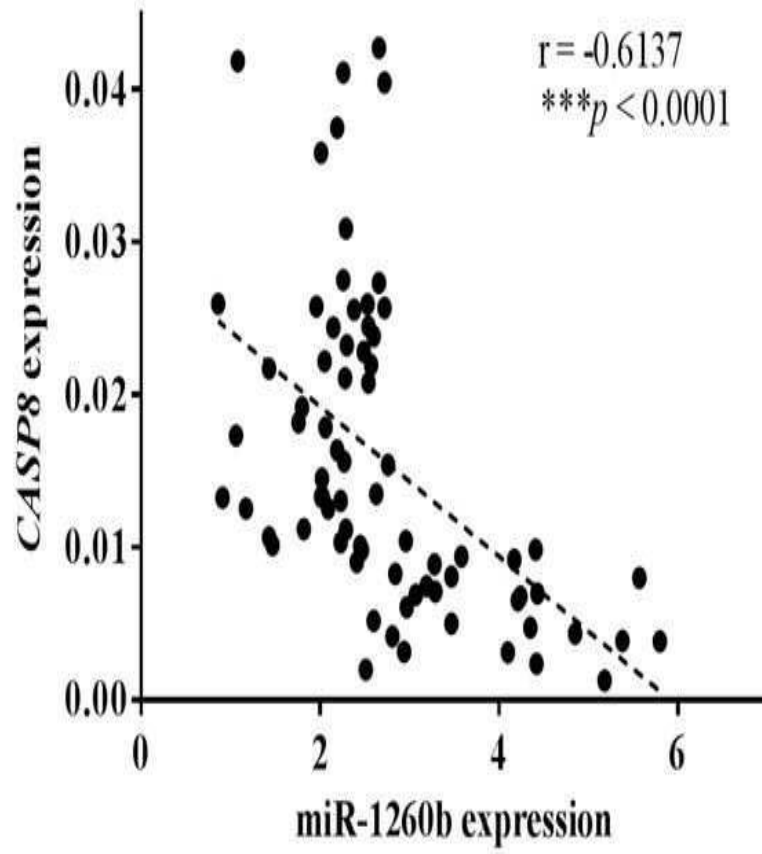


도면6c

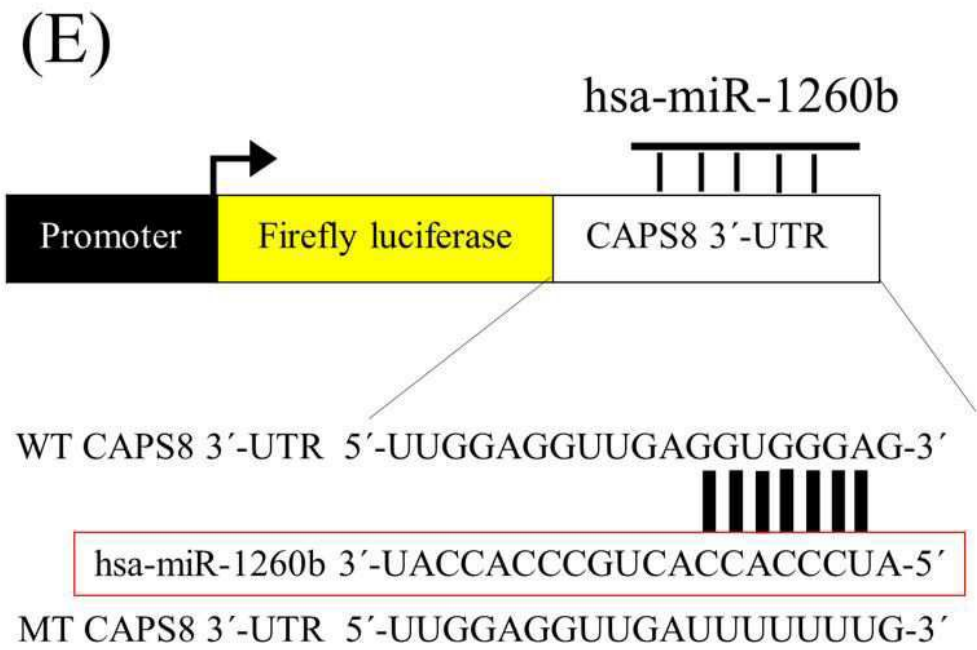


도면6d

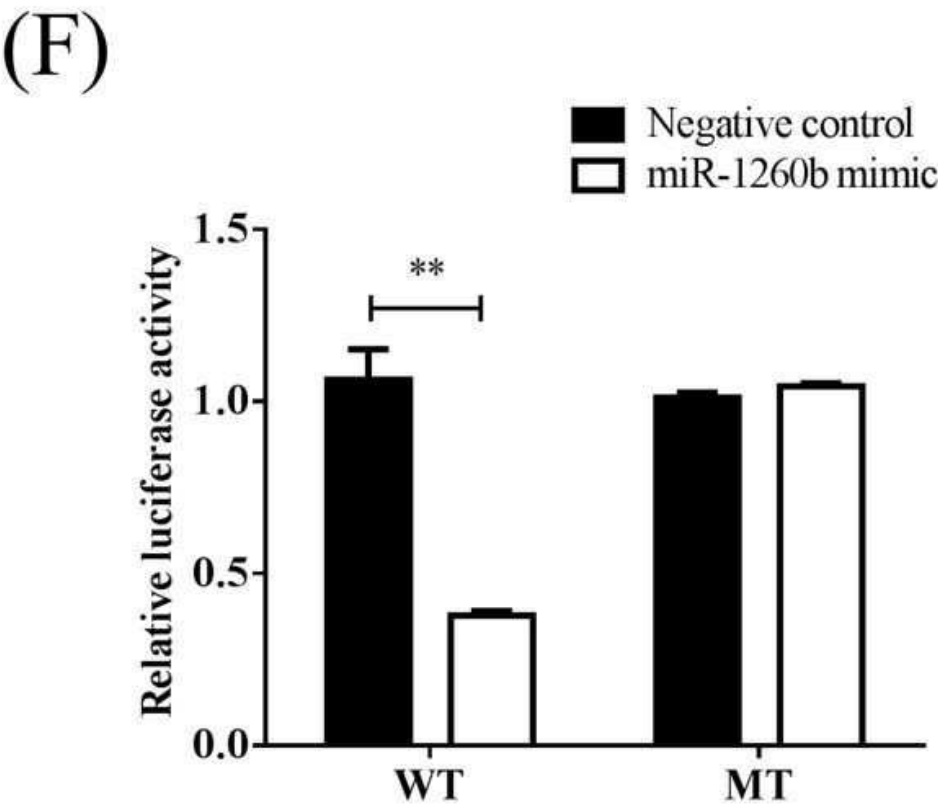
(D)



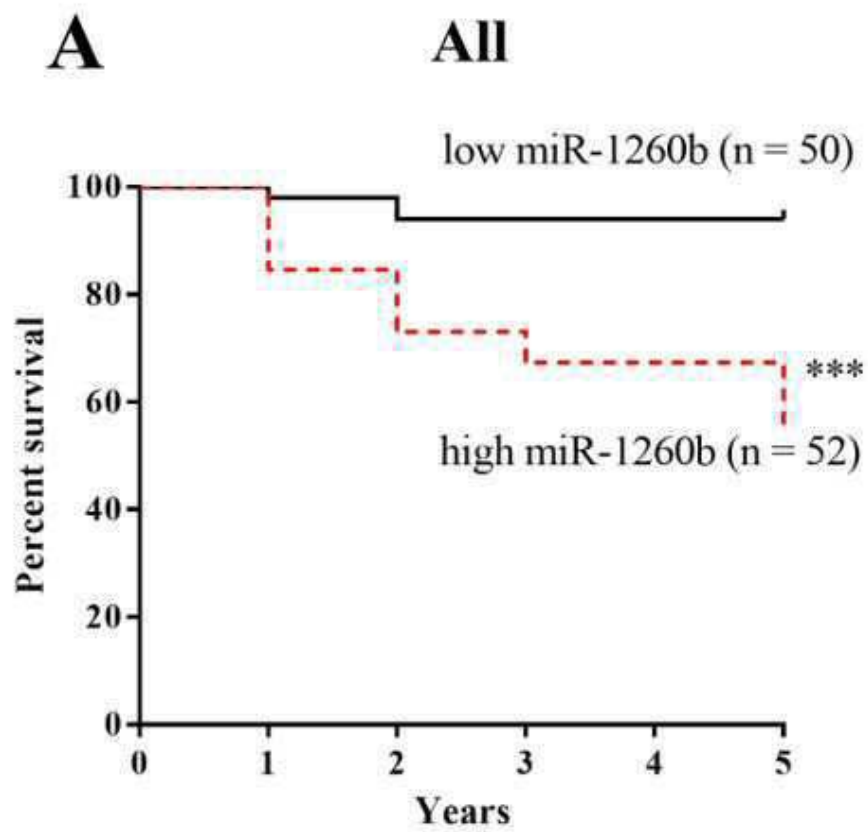
도면6e



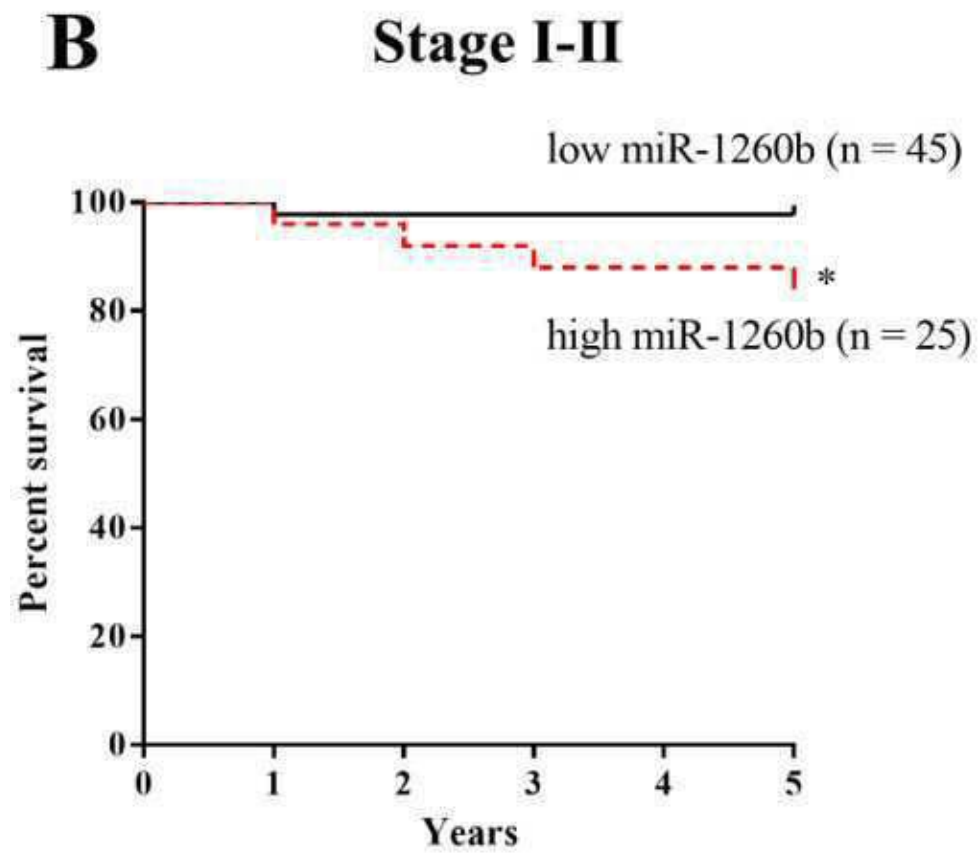
도면6f



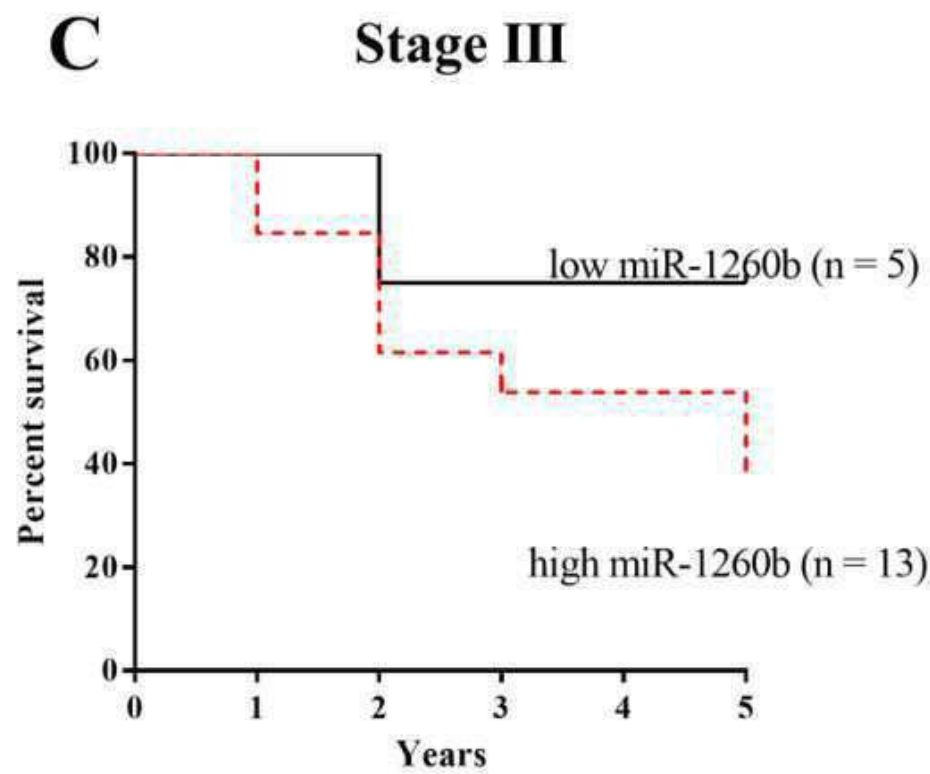
도면7a



도면7b



도면7c



서 열 목 록

- <110> YONSEI UNIVERSITY WONJU INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> A composition comprising microRNA-1260b inhibitors for inhibiting the proliferation, migration or invasion of breast cancer cell
- <130> P19-0019HS
- <160> 7
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> mIR-1260b inhibitor
- <400> 1
- augguggcag uggugggau
- <210> 2
- <211> 50

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 gtcgtatcca gtgcagggtc cgaggtattc gcactggata cgacatgggtg 50
 <210> 3
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 cagatccac cactgc 16
 <210> 4
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 gtgcagggtc cgaggt 16
 <210> 5
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 5
 ggatacgaca tgggtg 16
 <210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 gctaaattcc acactacc 18
 <210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

cttgggttca agcaatc

17