

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0034228

(43) 공개일자 2025년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)

A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0116096

(22) 출원일자 2023년09월01일

심사청구일자 2023년09월01일

(71) 출원인

한양대학교 산학협력단

서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

남진우

서울특별시 강남구 압구정로 401, 53동 507호 (압구정동, 한양아파트)

박석주

서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대 FTC 1123
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

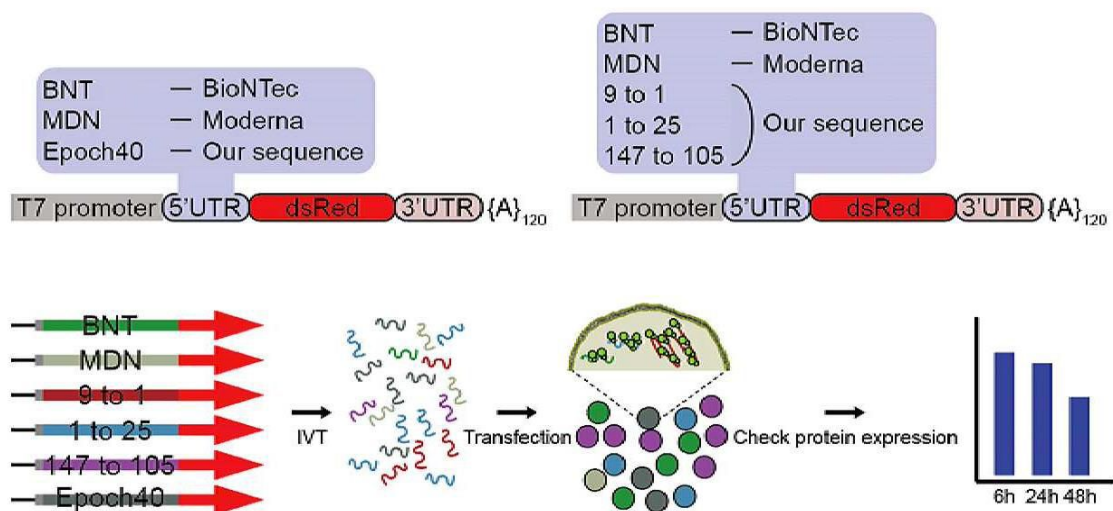
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 증강된 유전자 발현을 위한 5' 비번역 영역을 포함하는 뉴클레오타이드를 포함하는 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 증강된 유전자 발현을 위한 5' 비번역 영역을 포함하는 뉴클레오타이드를 포함하는 조성물 및 방법에 관한 것으로, 높은 번역 효율을 나타내는 5' 비번역 영역을 이용하여 각종 감염병을 예방하기 위한 mRNA 백신 및 각종 질병 치료를 위한 mRNA 치료제의 설계에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/00 (2025.01)
A61K 48/00 (2024.01)
A61P 31/00 (2018.01)
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)

박민사

경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 109동 504호
 (가좌동, 센트럴웰가)

(72) 발명자

김솔빈

서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대 FTC 1123

이규리

경상남도 진주시 사들로 13, 904동 405호 (충무공
 동, 혁신도시엘에이치아파트9단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711160178
과제번호	2022M3E5F101850212
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	감염병차세대백신기초원천핵심기술개발사업
연구과제명	인공지능기반 증강(Augmented) mRNA 백신 플랫폼 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한양대학교
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 12로 표시되는 염기서열 (ATAGTTTATAGATAATTTTTATTATTCTTTAGAGGAGTATGGTAATA)로 이루어진 5' 비번역 영역 (5' UTR)을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

청구항 1의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 재조합 벡터.

청구항 3

타겟 유전자의 5' 비번역 영역에 청구항 1의 폴리뉴클레오타이드를 결합시키는 단계;를 포함하는, 타겟 유전자의 번역 효율이 증진된 RNA 제조 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 RNA는 시험관 내 전사(in vitro transcription)를 통하여 제조되는 것인, 타겟 유전자의 번역 효율이 증진된 RNA 제조 방법.

청구항 5

타겟 유전자의 mRNA 발현을 위한 코딩 영역 (coding region);

상기 코딩 영역의 상류 (upstream)에 위치하는 5' 비번역 영역 (UTR); 및

상기 코딩 영역의 하류 (downstream)에 위치하는 3' 비번역 영역 (UTR)을 포함하는 유전자 구조체로,

상기 5' 비번역 영역 (5' UTR)은 서열번호 12로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 유전자 구조체.

청구항 6

청구항 5의 유전자 구조체를 포함하는, 억제학적 조성물.

청구항 7

청구항 6의 억제학적 조성물은 감염병 예방 또는 치료용인, 조성물.

청구항 8

청구항 5의 유전자 구조체를 포함하는, 백신 조성물.

청구항 9

청구항 8의 백신 조성물은 감염병 예방용인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 증강된 유전자 발현을 위한 5' 비번역 영역을 포함하는 뉴클레오타이드를 포함하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] mRNA 백신의 효능과 안전성은 코로나19 팬데믹 상황에서 널리 사용되면서 검증되었으며, 감염병 예방 백신 및 암 치료제 등 다양한 분야에서 연구개발이 이루어지고 있다. mRNA 백신의 구조는 지질나노입자(Lipid nanoparticle, LNP) 운반체로 둘러싸인 mRNA로 이루어지며, mRNA에는 목표 항원에 대한 서열이 담겨있다. 백신의 mRNA는 우리 몸에 주사된 이후 LNP를 통해 세포 내부로 들어와 번역되어 항원을 만들어낸다. 이 항원에 의한 면역 반응 유도를 활용하여 감염병을 예방하고 치료한다.

[0003] mRNA 백신이 잘 기능하려면 충분한 양의 항원이 생성되어야 한다. 따라서 mRNA가 높은 번역효율을 갖도록 설계할 필요성이 있다. mRNA의 구조는 서열의 앞에서부터 CAP, 5' UTR, CDS, Stop codon, 3' UTR, poly-A tail로 이루어진다. 5' UTR 부위는 CAP에서부터 번역이 시작되는 개시코돈 이전까지의 영역으로 다양한 번역 조절 기작이 존재하기 때문에 높은 번역효율을 갖는 5' UTR 서열을 생성하고자 하는 연구가 이루어지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 인공지능 모델을 이용하여 최적 번역효율을 갖는 인공 5' UTR 서열을 발견하였으며, 특정 5' UTR 서열이 높은 번역효율을 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0005] 이에, 본 발명은 서열번호 12로 표시되는 염기서열 (ATAGTTTATAGATAATTTTTATTCTTTTAGAGGAGTATGGTAATA)로 이루어진 5' 비번역 영역 (5' UTR)을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0006] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 제조용 벡터를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 타겟 유전자의 5' 비번역 영역에 청구항 1의 폴리뉴클레오타이드를 결합시키는 단계;를 포함하는, 타겟 유전자의 번역 효율이 증진된 RNA 제조 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 타겟 유전자의 mRNA 발현을 위한 코딩 영역 (coding region);

[0009] 상기 코딩 영역의 상류 (upstream)에 위치하는 5' 비번역 영역 (UTR); 및

[0010] 상기 코딩 영역의 하류 (downstream)에 위치하는 3' 비번역 영역 (UTR)을 포함하는 유전자 구조체로,

[0011] 상기 5' 비번역 영역 (5' UTR)은 서열번호 12로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 유전자 구조체를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 유전자 구조체를 포함하는, 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 유전자 구조체를 포함하는, 백신 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명은 서열번호 12로 표시되는 염기서열 (ATAGTTTATAGATAATTTTTATTCTTTTAGAGGAGTATGGTAATA)로 이루어진 5' 비번역 영역 (5' UTR)을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0017] 본 명세서에서 5' 비번역 영역 (5' UTR)은 오픈 리딩 프레임 (open reading frame, ORF)의 5'에 위치한다. 5'UTR은 전사 시작 부위에서 시작하고 오픈 리딩 프레임의 시작 코돈 전 뉴클레오타이드에서 종결된다. 5'UTR은 예를 들어 리보솜 결합 부위와 같은 유전자 발현을 조절하는 요소를 포함할 수 있다. 5'UTR은 예를 들어 5'-캡

의 추가에 의해 전사후 변형될 수 있다. 5'UTR은 5'캡 및 시작 코돈 사이에 위치한 성숙 mRNA의 서열에 상응한다.

[0018] 본 명세서에서 "폴리뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드 단위체 (monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오타이드의 중합체 (polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 가닥을 의미한다.

[0019] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 12로 표시되는 염기서열로 이루어진 5' 비번역 영역 (5' UTR)을 포함할 수 있으며, 이때, 상기 서열번호 12로 표시되는 염기서열과 70 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상, 가장 바람직하게는 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 또는 99 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열도 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드가 서열번호 12로 표시되는 염기서열로 이루어진 5' 비번역 영역을 포함하는 경우에 상기 비번역 영역을 포함하지 않는 대조군에 비해 높은 번역 효율을 나타낼 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 청구항 1의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 제조용 벡터를 제공한다.

[0023] 본 명세서에서 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있다.

[0024] 제조용 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 사용되는 벡터면 제한 없이 사용될 수 있다. 구체적으로, 벡터는 pCES208, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pH79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등의 플라스미드, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δz1 및 M13 등의 파지 또는 SV40 등의 바이러스 벡터를 이용하여 제작될 수 있고, 예를 들어, pCES208GFP 벡터를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 또한, 본 발명은 타겟 유전자의 5' 비번역 영역에 청구항 1의 폴리뉴클레오타이드를 결합시키는 단계;를 포함하는, 타겟 유전자의 번역 효율이 증진된 RNA 제조 방법을 제공한다.

[0029] 본 명세서에서 상기 "결합시키는 단계"는 각각의 mRNA 단편을 물리적으로 결합시키는 것 만을 의미하는 것이 아니고, DNA 분자로부터 전사(transcription)를 통해 5' 말단 및 3' 말단에 각각 특정 서열의 5' UTR 및 특정 서열의 3' UTR 또는 이의 단편이 결합된 RNA 서열을 생산하는 공정을 포함한다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 5' 비번역 영역은 서열번호 12로 표시되는 염기서열 (ATAGTTTATAGATAATTTTTTTTATTCTTTAGAGGAGTATGGTAATA)로 이루어진 것일 수 있다.

[0031] 본 명세서에서 "시험관 내 전사(in vitro transcription)"란 세포외, 시험관 내에서의 DNA 의존적 RNA 합성을 의미하는 것이다. 주형 DNA는 시험관 내 전사 전에 적당한 제한 효소로 선형화될 수 있다. RNA 시험관 내 전사에 이용되는 시약은, 전형적으로, 박테리오파지-인코딩된 RNA 폴리머레이스(bacteriophage- encoded RNA polymerases)(T7, T3, SP6 또는 Syn5)와 같은 폴리머레이스; 4개의 염기(base)(아데닌, 시토신, 구아닌 및 우라실)에 대한 NTP(ribonucleotide triphosphate)이며, 이외에 선택적으로 캡 아날로그; 변형된 뉴클레오타이드; RNase 억제제 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명자들은 본 발명의 5' 비번역 영역 또는 이의 단편을 포함하는 RNA가 DNA 플라스미드를 통해 세포 내에서 합성되는 경우 뿐만 아니라, 시험관 내 전사(in vitro transcription)를 통해 합성된 상기 RNA를 사용하는 경우에도, 타겟 유전자 번역 효율 또는 타겟 단백질 발현 효율이 증진되고, 이에 따라 세포내 발현 양상이 조절될 수 있음을 확인하였다.

[0034] 또한, 본 발명은 타겟 유전자의 mRNA 발현을 위한 코딩 영역 (coding region);

[0035] 상기 코딩 영역의 상류 (upstream)에 위치하는 5' 비번역 영역 (UTR); 및

- [0036] 상기 코딩 영역의 하류(downstream)에 위치하는 3' 비번역 영역(UTR)을 포함하는 유전자 구조체로,
- [0037] 상기 5' 비번역 영역(5' UTR)은 서열번호 12로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 유전자 구조체를 제공한다.
- [0038] 본 명세서에서 3'UTR은 전형적으로 mRNA의 단백질 코딩 영역(즉, 오픈 리딩 프레임, ORF) 및 폴리(A) 서열 사이에 위치한 mRNA의 일부이다. mRNA의 3'UTR은 아미노산 서열로 번역되지 않는다. 3'UTR 서열은 보통 유전자 발현 과정 중에 각각 mRNA로 전사되는 유전자에 의해 코딩된다. 유전체 서열은 선택적 인트론을 포함하는 mRNA로 우선 전사된다. mRNA는 이후 5'캡핑, 스플라이싱 및 3'-말단의 폴리아데닐화와 같은 3'-말단의 변형 및 선택적 엔도- 또는 엑소뉴클레아제 분해 등의 단계를 포함한다. 3'UTR은 단백질 코딩 영역의 정지 코돈 3' 바로 옆에 위치하고 폴리(A) 서열 5' 바로 옆의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0039] 전형적으로 펩타이드 또는 단백질로 번역될 수 있는 몇몇 뉴클레오타이드 트리플렛(triplets)의 서열일 수 있다. 오픈 리딩 프레임(ORF)은 바람직하게는 시작 코돈, 즉 이의 5'-말단에 아미노산 메티오닌(ATG 또는 AUG)을 일반적으로 코딩하는 세개의 후속 뉴클레오타이드의 조합 및 보통 3 뉴클레오타이드의 배수인 길이를 보이는 후속 영역을 포함한다. 오픈 리딩 프레임(ORF)은 바람직하게는 정지 코돈(예를 들어 TAA, TAG, TGA)에 의해 종결된다. 이는 오픈 리딩 프레임(ORF)의 유일한 정지 코돈이다. 따라서 본 발명의 맥락에서 오픈 리딩 프레임(ORF)은 바람직하게는 시작 코돈(예를 들어 ATG 또는 AUG)로 시작하고 바람직하게는 정지 코돈(예를 들어 TAA, TGA, 또는 TAG 또는 UAA, UAG, UGA, 각각)으로 종결되는, 세개로 나뉠 수 있는 뉴클레오타이드의 수로 이루어진 뉴클레오타이드 서열이다. 오픈 리딩 프레임(ORF)은 분리 또는 보다 긴 핵산 서열, 예를 들어 벡터 또는 mRNA에 병합될 수 있다. 오픈 리딩 프레임(ORF)은 또한 '폴리펩티드 또는 단백질 코딩 영역'으로 불릴 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따르면, 프로모터 및/또는 폴리(A) 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 프로모터는 5' 비번역 영역(UTR)의 상류에 위치할 수 있다. 상기 프로모터는 예를 들어 RNA 중합효소 프로모터와 같은, 전사를 위해 필요한 요소를 포함할 수 있다. SP6 또는 T7과 같은 과지 RNA 중합효소 프로모터, 바람직하게는 mRNA 서열을 코딩하는 T7 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 폴리(A) 서열의 길이는 다양할 수 있다. 예를 들어, 폴리(A) 서열은 약 20 아데닌 뉴클레오타이드 내지 약 300 아데닌 뉴클레오타이드, 바람직하게는 약 40 내지 약 200 아데닌 뉴클레오타이드, 약 60, 70, 80, 90 또는 100 아데닌 뉴클레오타이드와 같이 더욱 바람직하게는 약 50 내지 약 100 아데닌 뉴클레오타이드와 같이, 약 20 아데닌 뉴클레오타이드 내지 약 400 아데닌 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다.
- [0043] 폴리(A) 서열은 3' 비번역 영역(UTR)의 하류에 위치할 수 있다. 예를 들어, 폴리(A) 서열은 직접 또는 링커를 통해, 예를 들어 1-50, 바람직하게는 1-20 뉴클레오타이드의 링커를 통해, 또는 2, 4, 6, 8, 10, 20 등 뉴클레오타이드와 같은, 뉴클레오타이드의 스트레치를 통해 연결될 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명은 상기 유전자 구조체를 포함하는, 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 실시예에서 상기 약제학적 조성물은 감염병 예방 또는 치료용일 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 상기 유전자 구조체를 포함하는, 백신 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 실시예에서 상기 백신 조성물은 감염병 예방용일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 유전자 구조체는 본 발명의 5' 비번역 영역을 포함함으로써, 코딩 영역의 타겟 유전자의 발현이 증가함으로써, 감염병의 우수한 예방 및 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0048] 본 명세서에서 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 감염병을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0049] 본 명세서에서 "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 감염병에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물에서 발현된 타겟 유전자(mRNA 등)를 전달하기 위한 전달 수단을 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 실시예에서, 발현된 mRNA는 나노입자를 통해 전달될 수 있다. 예를 들어, 금 나노입자, DNA 나노구조체, 엑소솜 또는 리포솜 등을 통해 전달될 수 있다.

- [0052] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 mRNA 전달에 펩타이드가 사용될 수 있다. 펩타이드는 핵산의 음이온성 인산기와 정전기적 상호작용하기 양이온을 가져야 하고, 인산기와 정전기 상호 작용하기 위해 양으로 하전된 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분 등의 함량 및 투여방법은 통상의 환자의 증후와 질병의 심각도에 기초하여 본 기술분야의 통상의 전문가가 결정할 수 있다. 또한 산제, 정제, 캡슐제, 액제, 주사제, 연고제, 시럽제 등의 다양한 형태로 제제화 할 수 있으며 단위-투여량 또는 다-투여량 용기, 예를 들면 밀봉된 앰플 및 병 등으로 제공될 수도 있다.
- [0054] 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 기관지, 구강, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 장관, 설하 또는 국소 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 방법, 배설율 또는 질병의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 본 기술분야의 통상의 전문가가 용이하게 결정할 수 있다. 또한, 임상 투여를 위해 공지 기술을 이용하여 본 발명의 조성물을 적합한 제형으로 제제화할 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명은 서열번호 12로 표시되는 염기서열로 이루어진 5' 비번역 영역 (5' UTR)을 포함하는 유전자 구조체를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 감염병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0058] 또한, 본 발명은 서열번호 12로 표시되는 염기서열로 이루어진 5' 비번역 영역 (5' UTR)을 포함하는 유전자 구조체를 유효성분으로 포함하는 조성물의 감염병의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0060] 본 명세서에서 "핵산"은 바람직하게 DNA 또는 RNA를 의미한다. 상기 핵산과 관련하여, "폴리뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드 서열", 및 "올리고뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용된다. 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 폴리머 형태, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 또는 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있으며, 공지된 또는 비공지된 임의의 기능을 수행할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리머의 어셈블리 전 또는 후에 가능할 수 있다.
- [0061] 바람직하게 핵산은 당/인산 백본의 포스포디에스터 결합에 의해 서로 공유결합된 뉴클레오타이드 모노머를 포함 또는 이로 이루어진 폴리머이다. "핵산"은 염기 변형된, 당 변형된 또는 백본 변형된 DNA 또는 RNA 분자와 같은, 변형된 핵산을 포함한다.
- [0062] 상기 DNA는 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid)에 대한 약어이다. 이는 핵산 분자, 즉 뉴클레오타이드로 이루어진 폴리머이다. 이들 뉴클레오타이드는 보통 디옥시-아데노신-모노포스페이트, 디옥시-티미딘-모노포스페이트, 디옥시-구아노신-모노포스페이트 및 디옥시-시티딘-모노포스페이트 모노머이며, 당 (디옥시리보스), 염기 및 포스페이트로 이루어지고, 특유의 백본(backbone) 구조에 의해 중합된다. 백본 구조는 전형적으로 첫째 뉴클레오타이드의 당 일부, 즉 디옥시리보스 및 둘째 포스페이트 일부, 인접한 모노머 사이의 포스포디에스터 결합에 의해 형성된다. 모노머의 특정한 순서, 즉 당/포스페이트 백본에 연결된 염기들의 순서는 DNA 서열로 불린다. DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥 형태에서 첫번째 가닥의 뉴클레오타이드는 전형적으로 두번째 가닥의 뉴클레오타이드와 혼성화하며, 예를 들어 A/T 염기쌍 및 G/C 염기쌍에 의한다.
- [0063] 상기 RNA는 예를 들어 mRNA를 포함한다. RNA는 보통 리보핵산의 약어이다. 이는 핵산 분자, 즉 뉴클레오타이드로 이루어진 폴리머이다. 뉴클레오타이드는 보통 소위 백본을 통해 서로 연결된 아데노신-모노포스페이트, 우리딘-모노포스페이트, 구아노신-모노포스페이트 및 시티딘-모노포스페이트 모노머이다. 백본은 첫째로 당, 예를 들어 리보스 및 두번째로 인접 모노머, 포스페이트 일부 사이의 포스포디에스터 결합에 의해 형성된다. 모노머들의 특이적인 연속은 RNA 서열로 불린다. 보통 RNA는 DNA 서열의 전사에 의해, 예를 들어 세포 내에서 얻어질 수 있다. 진핵 세포에서, 전사는 전형적으로 핵 또는 미토콘드리아 내에서 수행된다. 체내에서, DNA의 전사는

보통 mRNA, 메신저 RNA로 가공될 수 있다. 예를 들어 진핵세포 내에서 RNA의 가공은 스플라이싱, 5'-캐핑, 폴리 아데닐화, 핵 또는 미토콘드리아 및 그와 유사한 것으로부터 배출과 같은 다른 다양한 전사후 변형을 포함한다. 메신저 RNA는 보통 특정한 펩타이드 또는 단백질의 아미노산 서열로 번역될 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 제공한다. 전형적으로, mRNA는 5'-캡, 5'UTR, 오픈 리딩 프레임 (ORF), 3'UTR 및 폴리(A) 서열을 포함한다. 메신저 RNA를 제외하고, 전사 및/또는 번역의 조절에 포함될 수 있는 RNA의 몇몇 비코딩 형태가 존재한다.

발명의 효과

[0064] 본 발명의 5' UTR 서열은 높은 번역효율을 나타내는 바, 각종 감염병을 예방하기 위한 mRNA 백신 및 각종 질병 치료를 위한 mRNA 치료제의 설계에 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 후보 서열의 확인을 위한 방법을 나타낸 개요도이다.

도 2는 서로 다른 5' -UTR 서열을 갖는 IVT mRNA의 단백질 발현 능력을 6시간에서 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 서로 다른 5' -UTR 서열을 갖는 IVT mRNA의 단백질 발현 능력을 24시간에서 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 서로 다른 5' -UTR 서열을 갖는 IVT mRNA의 단백질 발현 능력을 48시간에서 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 서로 다른 5' -UTR 서열을 갖는 IVT mRNA의 단백질 발현 능력에 대해 6시간 및 24시간에서 P 값을 확인한 도이다. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실험예 및 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0068] 실험예 및 실시예

[0069] 실시예 1. pDNA를 주형으로 IVT를 위한 DNA 주형 제조

[0070] 모델 단백질 (Red fluorescent protein; dsRed)을 코딩하는 오픈 리딩 프레임 (open reading frame, ORF) 및 서로 다른 5'-UTR 서열을 포함하는 DNA 벡터를 주형으로 PCR을 수행하여 시험관 내 전사(in vitro transcription, IVT)를 위한 DNA 주형을 합성하였다. 정방향 프라이머(forward Primer, FP)는 T7 프로모터의 upstream에 부착하며, 역방향 프라이머(Reverse Primer, RP)는 3'-UTR 끝에 부착하며 poly(A) 꼬리 도입을 위한 120-nt의 T를 포함한다.

[0071] 본 실시예 및 실험예에서 사용된 프라이머 및 PCR 생산물(IVT를 위한 DNA 주형)의 서열을 하기 표 1에 나타냈다. 또한, 5'-UTR 서열은 하기 표 2에 나타냈다.

표 1

[0072]

이름	서열 정보	서열번호
BNT	TTGGACCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCC CACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGC TTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGG CAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCG CCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGAC ATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCTCGA GGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCACG TGAAGTTTCATCGGCGTGAACCTTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGG GAGCCCTCCACCGAGCGCTGTACCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCT GAAGCTGAAGGGCGGCGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCG TGAAGCTGCCCCGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTAC ACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCGAGGCCGCCACCCTGTTCAGTAGGCTGCTTCTTG CGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAAT AAAGCCTGAGTAGGAAGAAA AAA AAAAAA	1
Mdn	TTGGACCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAG AAGAAATATAAGACCCCGCGCGCCACCATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATG CGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGA GGGAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCT TCGCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCC GACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCT CGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACC ACGTGAAGTTTCATCGGCGTGAACCTTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGC TGGGAGCCCTCCACCGAGCGCTGTACCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGC GCTGAAGCTGAAGGGCGGCGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGC CCGTGAAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCACAACGAGGAC TACACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCGAGGCCGCCACCCTGTTCAGTAGGCTGCTT CTGCGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTG AATAAAGCCTGAGTAGGAAGAA AAA AAAAAA	2
9 to 1	TTGGACCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGAGTCCCTACGGCGCATAAGAGTTCCA CATCTGACGAAGAACCACCATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGG TGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCC TACGAGGGCACCCAGACGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCTGGGA CATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCGACATCCCCG ACTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCTCGAGGACGGC GGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCAGTGAAGTT CATCGGCGTGAACCTTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCT CCACCGAGCGCTGTACCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGAAGCTG AAGGGCGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAAGCT GCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACACCGTGG TGGAGCAGTACGAGCGCGCGAGGCCGCCACCCTGTTCAGTAGGCTGCTTCTGCGGGGCT TGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCT GAGTAGGAAGAAA AAA	3
1 to 25	TTGGACCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGGCATCACTTAAACAATATAACCATT GACGGACAACGGTACCACCATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGG TGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCC TACGAGGGCACCCAGACGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCTGGGA CATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCGACATCCCCG ACTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCTCGAGGACGGC GGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCAGTGAAGTT CATCGGCGTGAACCTTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCT CCACCGAGCGCTGTACCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGAAGCTG AAGGGCGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAAGCT GCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACACCGTGG TGGAGCAGTACGAGCGCGCGAGGCCGCCACCCTGTTCAGTAGGCTGCTTCTGCGGGGCT TGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCT GAGTAGGAAGAAA AAA	4

147 to 105	TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGCTCTTATATTTCTTCTTACTCTTCTT TTCTCTCTTATTTCCACCATTGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGG TGCACATGGAGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCC TACGAGGGCACCAGACCGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCTGGGA CATCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCGCGGACATCCCCG ACTACAAGAAGCTGTCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCTCGAGGACGGC GGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCACGTGAAGTT CATCGCGTGAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCT CCACCGAGCGCTGTACCCCGCGACGGCGTGTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGAAGCTG AAGGGCGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAAGCT GCCCCGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCGTGG TGGAGCAGTACGAGCGCGCGAGGGCCGCCACACCTGTTCCAGTAGGCTGCCTTCTGCGGGGCT TGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCT GAGTAGGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA AAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA AAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA	5
Epoc40	TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGATAGTTTATAGATAATTTTTTATTTA TTCTTTTAGAGGAGTATGGTAATAATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTT CAAGGTGCACATGGAGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCA AGCCCTACGAGGGCACCAGACCGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCC TGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCGCGGACAT CCCCGACTACAAGAAGCTGTCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCTCGAGG ACGCGGGCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCACGTG AAGTTCATCGGCGTGAACCTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGGGA GCCCTCCACCGAGCGCTGTACCCCGCGACGGCGTGTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGA AGCTGAAGGGCGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTG AAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACAC CGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCGAGGGCCGCCACACCTGTTCCAGTAGGCTGCCTTCTGCG GGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAA AGCCTGAGTAGGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA AAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA AAAAA	6
RFP-FP	TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG	7
RFP-RP	TTT TTTCTTCTACTC AGGCTTTATTCAAAGACCA	8

표 2

이름	서열	서열번호
9 to 1	AGTCCCTACGGCGCATAAGAGTTCCACATCTGACGAAGAACCACC	9
1 to 25	GGCATCACTTAAACAATATAACCATTGACGGACAACGGTACCACC	10
147 to 105	CTCTTATATTTCTTCTTACTCTTCTTTTCTCTTATTTCCACC	11
Epoc40	ATAGTTTATAGATAATTTTTTATTTATTTCTTTTAGAGGAGTATGGTAATA	12
BNT	GAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC	13
Mdn	GAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGCGCGGCCACC	14

[0073] PCR은 TOPsimple PCR DryMIX-Forte(enzymomics, 한국)를 사용하여 수행하였고, 구체적인 PCR 조건은 하기 표 3 및 표 4와 같다. 증폭된 PCR 반응산물은 AccuPrep® PCR Purification Kit(Bioneer, 한국)를 사용하여 정제하였다.

표 3

PCR mixture	
PCR mixture (FORTE)	1 tube
DW	17μl
pLuc (3~5ng/μl)	1μl
FP (10pmole/μl)	1μl
RP (10pmole/μl)	1μl
total 20μl	

[0075]

표 4

PCR cycles			
Step	Temp.	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	5 min	1
Denaturation	95°C	30 sec	30
Annealing	59°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Final elongation	72°C	5 min	1

[0076]

[0078] **실시예 2. DNA를 주형으로 IVT mRNA 제조**

[0079] 상기 실시예에서 제조한 DNA 주형을 사용해 시험관 내 전사(in vitro transcription, IVT)를 수행하여 IVT mRNA를 합성하였다. 구체적으로, DNA 주형을 T7 RNA 중합효소, rATP, rCTP, rGTP, rUTP 및 캡 유사체(cap analogue)와 혼합하고 37°C에서 2시간 동안 배양해 시험관 내 전사를 수행하였다. 반응이 끝나면 Turbo DNase I를 1μl 추가하여 37°C에서 15분간 반응시켜 주형 DNA를 제거하고 합성된 mRNA만을 RNeasy Mini Kit(Qiagen, USA)을 사용하여 정제하였다. 반응용액을 구성하는 모든 성분 및 용량, 농도는 하기 표 5와 같다. 이를 통해 합성된 mRNA는 캡 유사체를 전사 반응에 첨가함으로써 생산된 5'-캡(5'-cap)을 5' 말단에 포함한다.

표 5

3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog(NEB, USA)	50mM	1.6μl
rATP	100mM	1.0μl
rCTP	100mM	1.0μl
Pseudouridine-5'-Triphosphate(Trilink,USA)	100mM	1.0μl
rGTP	100mM	0.2μl
10X reaction buffer		2μl
DNA template(Enzyme cut)	1μg	Xμl
DEPC		Up to 20μl
10X T7 polymerase		2μl
total		20μl

[0080]

[0082]

실험예 1. IVT mRNA의 단백질 발현 능력 평가

[0083]

(1) 6시간 및 24시간

[0084]

상기 실시예에서 제조한 서로 다른 5' -UTR 서열을 갖는 IVT mRNA의 단백질 발현 능력을 6시간 및 24시간에서 확인하였다. 구체적으로, HEK 293T 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 2.0×10^4 개로 시딩하고, 형질주입 시약 (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen, USA)을 사용하여 세포를 100 ng mRNA/well 용량의 IVT mRNA로 형질주입 (transfection)시켰다. 형질주입 후 시간별 세포 내 RFP 발현 효율을 microplate reader를 사용하여 측정하였다.

[0085]

그 결과, Epoch 40 모델의 생성기로부터 생성된 5' UTR 서열이 Mdn와 BNT사의 서열보다 높은 발현효율을 보여주었다. 구체적으로, Epoch 40과 비교하였을 때 P value 값은 6 시간(h)에서 BNT 0.0317, Mdn 0.0187, 24 시간에서 BNT 0.0037, Mdn 0.0053으로 나타났다 (도 2 및 3 참조).

[0086]

(2) 48시간

[0087]

상기 실시예에서 제조한 서로 다른 5' -UTR 서열을 갖는 IVT mRNA의 단백질 발현 능력을 48시간에서 확인하였다. 구체적으로, HEK 293T 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 1.0×10^4 개로 시딩하고, 형질주입 시약 (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen, USA)을 사용하여 세포를 100 ng mRNA/well 용량의 IVT mRNA로 형질주입 (transfection)시켰다. 이때, aspiration 후 wash 하지 않고, lysis buffer 100ul를 이용하였다. 형질주입 후 시간별 세포 내 RFP 발현 효율을 microplate reader를 사용하여 측정하였다.

[0088]

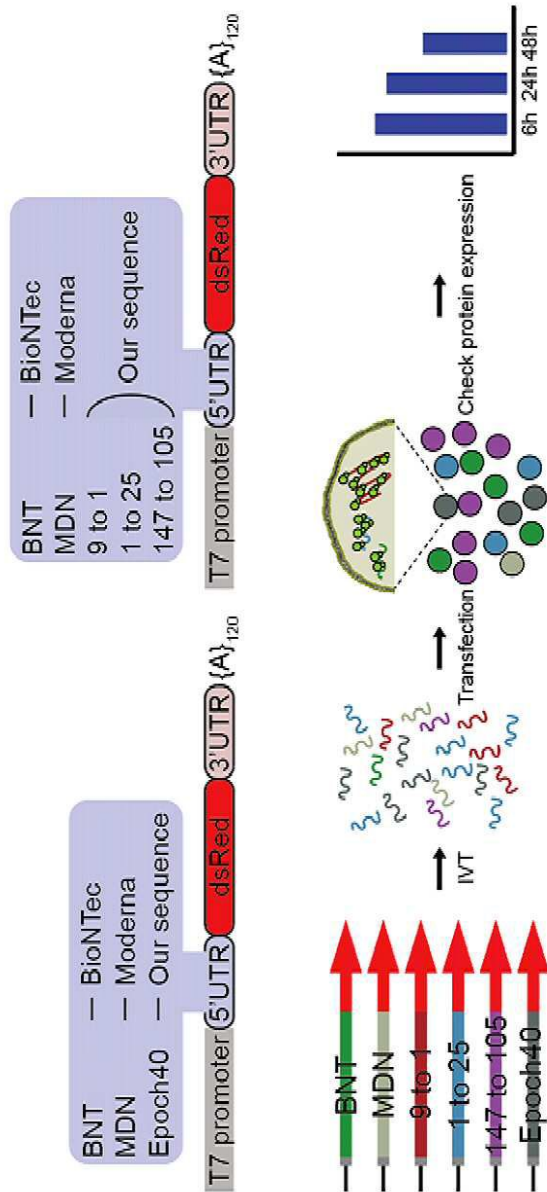
그 결과, Epoch 40 모델의 생성기로부터 생성된 5' UTR 서열이 Mdn와 BNT사의 서열과 유사한 정도의 발현을 보여주었다. 이는 Epoch 40 모델의 생성기로부터 생성된 5' UTR 서열이 BNT 및 Mdn만큼 단백질 발현을 유지할 수 있음을 의미한다.

[0090]

상기의 결과로부터 6시간, 24시간 및 48시간에서의 단백질 발현양을 종합적으로 고려하면, 본 발명의 Epoch 40 모델의 생성기로부터 생성된 5' UTR 서열을 포함하는 경우, 단백질 발현양이 높은 것을 확인할 수 있다. 이를 이용하여 각종 감염병 및 암 예방 백신과 치료제 설계에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면

도면1



도면2

96well
HEK293T 2.0×10^4 cells/well
100ng mRNA : RFP-RP1(3'UTR-pUC), ARCA, mΨ
Lipo2000 0.3ul/well

6h post-transfection

Blank	190936	195394	177892
lipo	189010	181368	169674
GGG-N40-RP1	532873	540342	468490
5'BNT-RP1	1735603	1195540	1103235
5'Mdn-RP1	1478082	1580136	1102263
9 to 1-RP1	1440484	918629	1244710
1 to 25-RP1	1087572	1634087	1382109
147 to 105-RP1	1871520	1367556	1423641
Epoc20-RP1	1077997	1336672	916488
Epoc30-RP1	1228750	1031858	834090
Epoc40-RP1	2138389	2182625	1863027

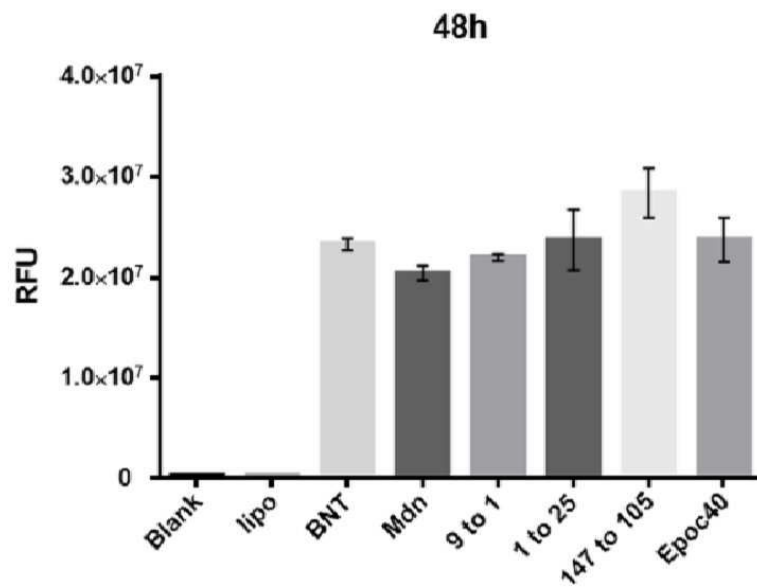
도면3

HEK293T 2.0×10^4 cells/well
100ng mRNA : RFP-RP1(3'UTR-pUC), ARCA, mΨ
Lipo2000 0.3ul/well

24h post-transfection

Blank	210977	225604	209611
lipo	228002	233544	200517
GGG-N40-RP1	8078764	7407484	7012896
5'BNT-RP1	20866162	20039564	16258354
5'Mdn-RP1	22146084	20663694	16619503
9 to 1-RP1	20680571	19773791	17399645
1 to 25-RP1	24203299	22076886	18872732
147 to 105-RP1	32343034	27852484	20587200
Epoc20-RP1	17853496	17885429	13533778
Epoc30-RP1	15697905	11534812	9904991
Epoc40-RP1	35685760	38028418	30707463

도면4a



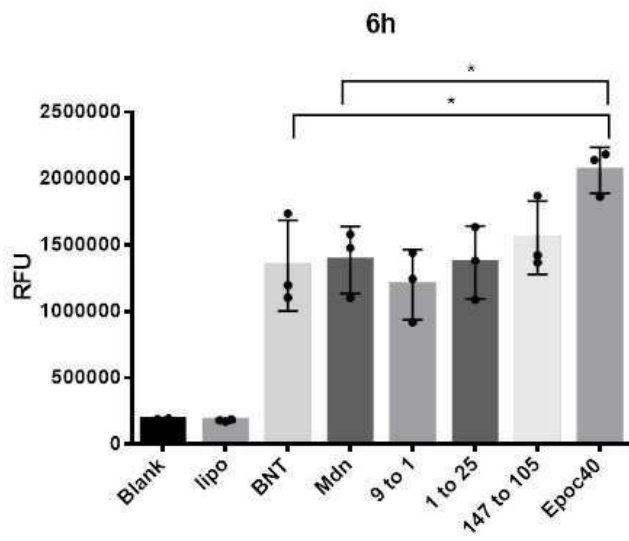
도면4b

HEK293T 1.0x10⁴ cells/well
 100ng mRNA : RFP-RP1(3'UTR-pUC), ARCA, mΨ
 Lipo2000 0.3ul/well

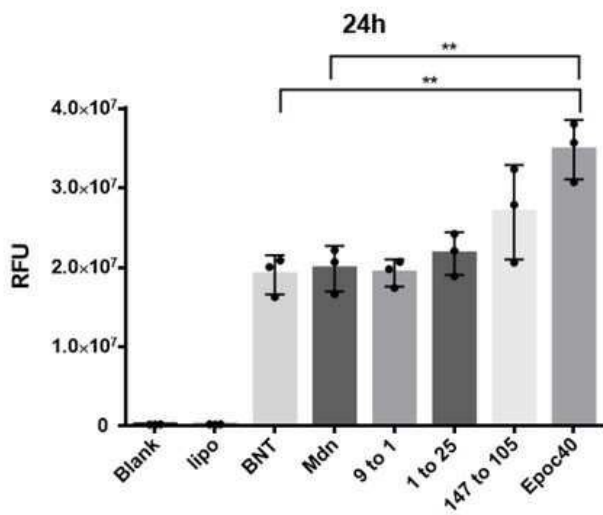
48h post-transfection

Blank	256143	265894	275619
lipo	267118	255470	263419
GGG-N40-RP1	8016896	8005425	7542987
5'BNT-RP1	23452747	23729922	22629826
5'Mdn-RP1	21203813	20247574	19744648
9 to 1-RP1	21895328	22331666	21646083
1 to 25-RP1	26304929	24396000	20390168
147 to 105-RP1	30595183	28683852	25782363
Epoc20-RP1	19292454	16898320	16081115
Epoc30-RP1	14378353	13872121	11965778
Epoc40-RP1	24553992	25375120	21246065

도면5a



도면5b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.