



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0142774  
(43) 공개일자 2023년10월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/713 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/113 (2013.01)  
A61K 31/713 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7030334
- (22) 출원일자(국제) 2022년01월28일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년09월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2022/074635
- (87) 국제공개번호 WO 2022/166814  
국제공개일자 2022년08월11일
- (30) 우선권주장  
202110175652.9 2021년02월07일 중국(CN)  
PCT/CN2021/075958 2021년02월08일 중국(CN)

- (71) 출원인  
락티젠 세러퓨틱스  
중국 226400 장쑤 난통 뤼동 카운티 쉘강 스트리트 주강 로드 넘버 888 뤼동 가오신 디스트릭트 라이프 앤드 헬스 인더스트리 파크 빌딩 18
- (72) 발명자  
리, 룡첵  
중국 226400 지양수 난통 루동 주지양 로드 888 루동 라이프 & 헬스 인더스트리 파크 빌딩 18  
강, 무립  
중국 226400 지양수 난통 루동 주지양 로드 888 루동 라이프 & 헬스 인더스트리 파크 빌딩 18
- (74) 대리인  
양영준, 이상영

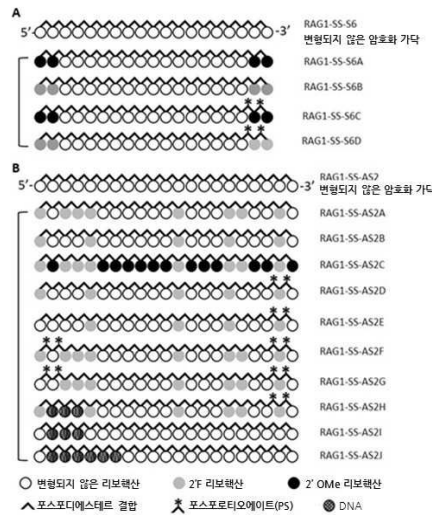
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 **화학적으로 변형된 작은 활성화 RNA**

(57) 요약

표적 유전자 발현 수준을 촉진하기 위한 작은 활성화 RNA를 제공하며, 상기 작은 활성화 RNA는 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥으로 구성되고, 상기 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로, 2'-메톡시 및 뉴클레오타이드 백본의 포스포로티오에이트에 대한 변형을 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 48/00** (2013.01)

**A61P 35/00** (2018.01)

*C12N 2310/312* (2013.01)

*C12N 2310/322* (2013.01)

*C12N 2310/3231* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

화학적으로 변형된 작은 활성화 RNA로서,

상기 작은 활성화 RNA는 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥으로 구성되고, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 표적 유전자 프로모터 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 상동성 또는 상보성을 가지며; 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단 및 3' 말단의 2개의 뉴클레오티드는 모두 화학적으로 변형된 뉴클레오티드이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 화학적으로 변형된 작은 활성화 RNA.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학적 변형은,

- a) 뉴클레오티드의 리보오스에 대한 화학적 변형;
- b) 뉴클레오티드 사이 포스포디에스테르 결합에 대한 화학적 변형;
- c) 뉴클레오티드의 염기에 대한 화학적 변형;
- d) 뉴클레오티드는 잠금 핵산; 및
- e) 5'-말단 뉴클레오티드의 비닐포스포네이트 변형 방식 중 하나 또는 하나 이상으로부터 선택되는, 작은 활성화 RNA.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 뉴클레오티드의 리보오스에 대한 화학적 변형은 뉴클레오티드 펜토오스의 히드록실(2'-OH)에 대한 변형을 포함하는, 작은 활성화 RNA.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뉴클레오티드의 리보오스에 대한 화학적 변형은 뉴클레오티드의 리보오스 2'-OH가 2'-플루오로, 2'-옥시메틸, 2'-메톡시에틸, 2,4'-디니트로페놀, 잠금 핵산, 2'-아미노 변형, 2'-H 중 하나 또는 하나 이상에 의해 치환되는 것을 포함하는, 작은 활성화 RNA.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뉴클레오티드의 염기에 대한 화학적 변형은 5'-브로모우라실 변형, 5'-요오도우라실 변형, N-메틸우라실 변형 및/또는 2,6-디아미노퓨린 변형을 포함하는, 작은 활성화 RNA.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합 중 적어도 하나가 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 화학적 변형을 갖는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합이 각각 황 및 보란으로 포스포디에스테르 결합의 비가교 산소 원자를 치환하거나; 및/또는 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합이 모두 포스포로티오에이트 변형을 수행하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 함유하고, 상기 화학적 변형은 상기 뉴클레오티드의 리보오스 2'-OH에 대한 화학적 변형, 상기 뉴클레오티드 사이 포스포디에스테르 결합에 대한 화학적 변형, 상기 뉴클레오티드의 염기에 대한 화학적 변형, 어느 하나의 상기 뉴클레오티드를 잠금 핵산(LNA)으로 치환하는 화학적 변형, 및/또는 상기 센스 올리고뉴클레오티드의 5'-말단의 뉴클레오티드에 대해 비닐포스포네이트 변형을 수행하는 화학적 변형을 포함하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합 중 적어도 하나가 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 화학적 변형을 갖는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 및/또는 5' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합이 포스포로티오에이트 변형 및/또는 보라노포스페이트 변형을 함유하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 함유하고, 상기 화학적 변형은 상기 뉴클레오티드의 리보오스 2'-OH에 대한 화학적 변형, 상기 뉴클레오티드 사이 포스포디에스테르 결합에 대한 화학적 변형, 상기 뉴클레오티드의 염기에 대한 화학적 변형, 어느 하나의 상기 뉴클레오티드를 잠금 핵산(LNA)으로 치환하는 화학적 변형, 및/또는 상기 센스 올리고뉴클레오티드의 5'-말단의 뉴클레오티드에 대해 비닐포스포네이트 변형을 수행하는 화학적 변형을 포함하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 및/또는 5' 말단의 뉴클레오티드가 리보오스 2'-OH의 화학적 변형을 갖는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥이 가장 중앙의 1 내지 5개 뉴클레오티드에서 리보오스 2'-OH의 화학적 변형을 갖는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 리보오스의 2'-OH의 화학적 변형이 2'-플루오로 변형을 포함하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및/또는 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥에 2'-플루오로 변형, 2'-메톡시 변형 및 포스포로티오에이트 변형의 3가지 변형의 조합이 채택되는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥이 리보뉴클레오티드가 데옥시리보뉴클레오티드(DNA)로 치환될 수 있는 변형을 함유하지 않는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 17**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단의 2개의 뉴클레오티드와 3' 말단의 2개의 뉴클레오티드 사이에서, 상기 화학적으로 변형된 뉴클레오티드의 비율이 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 10% 이하, 5% 이하이거나, 또는 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 전혀 함유하지 않는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합이 모두 포스포로티오에이트 변형 및/또는 보라노포스페이트 변형인, 작은 활성화 RNA.

**청구항 19**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 상에서 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100%의 뉴클레오티드는 2'-플루오로 변형 및/또는 2'-메톡시 변형을 채택해 화학적으로 변형하고, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 5개의 2'-메톡시 변형을 채택하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 지질, 지방산, 헵탄단, 리간드, 당류, 고분자 화합물, 펩티드, 항체 및 콜레스테롤의 조합 중 하나 이상의 기와 접합되는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 중 하나 또는 둘은 모두 6개, 5개, 4개, 3개, 2개, 1개 또는 0개 뉴클레오티드의 오버행을 가지며, 상기 오버행은 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단이나 3' 말단, 또는 5' 말단과 3' 말단에 위치하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 22**

제21항에 있어서,

상기 오버행은 dTdT 또는 dTdTdT, 또는 표적 유전자 상의 해당 위치의 뉴클레오티드와 동일하거나 상보적인 뉴클레오티드, 또는 표적 유전자 상의 해당 위치의 뉴클레오티드와 동일하지도 상보적이지도 않은

뉴클레오티드인, 작은 활성화 RNA.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 길이는 각각 17 내지 30개 뉴클레오티드이고, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 또는 적어도 15개 뉴클레오티드 길이의 염기 상보적 이중 가닥 영역을 형성하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 24**

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 또는 5' 영역과 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 5' 또는 3' 영역의 대응하는 뉴클레오티드는 1 내지 3개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재하거나; 또는, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 또는 5' 말단과 표적 유전자 상의 대응하는 뉴클레오티드는 1 내지 3개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재하거나; 또는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 또는 5' 말단과 표적 유전자 상의 대응하는 뉴클레오티드는 1 내지 3개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-S6A, RAG1-SS-S6B, RAG1-SS-S6C 및 RAG1-SS-S6D의 4가지 패턴으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-AS2A, RAG1-SS-AS2B, RAG1-SS-AS2C, RAG1-SS-AS2D, RAG1-SS-AS2E, RAG1-SS-AS2F, RAG1-SS-AS2G, RAG1-SS-AS2H, RAG1-SS-AS2I 및 RAG1-SS-AS2J의 10가지 패턴으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-S6A, RAG1-SS-S6B, RAG1-SS-S6C 및 RAG1-SS-S6D의 4가지 패턴으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-AS2A, RAG1-SS-AS2B, RAG1-SS-AS2C, RAG1-SS-AS2D, RAG1-SS-AS2E, RAG1-SS-AS2F, RAG1-SS-AS2G, RAG1-SS-AS2H, RAG1-SS-AS2I 및 RAG1-SS-AS2J의 10가지 패턴으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-S6D로 표시되는 패턴이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-AS2G로 표시되는 패턴인, 작은 활성화 RNA.

**청구항 29**

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표적 유전자가 인간 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 유전자(P21 유전자)를 포함하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 30**

제29항에 있어서,

상기 작은 활성화 RNA가 p21 유전자의 프로모터 영역을 특이적으로 표적화하는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 31**

제29항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 서열이 SEQ ID NO: 5, 14, 15 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 32**

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 작은 활성화 RNA의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 서열이 SEQ ID NO: 6, 8, 11, 12, 13, 18 및 19로 이루어진 군으로부터 선택되는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 33**

제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥 및 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 서열은,

- 1) SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 6;
- 2) SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 7;
- 3) SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 8;
- 4) SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 9;
- 5) SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 10;
- 6) SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 11;
- 7) SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 12;
- 8) SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 13;
- 9) SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 6;
- 10) SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 7;
- 11) SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 8;
- 12) SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 9;
- 13) SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 10;
- 14) SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 11;
- 15) SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 12;
- 16) SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 13;
- 17) SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 6;
- 18) SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 7;
- 19) SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 8;
- 20) SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 9;
- 21) SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 10;
- 22) SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 11;
- 23) SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 12;

- 24) SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 13;
- 25) SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 6;
- 26) SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 7;
- 27) SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 8;
- 28) SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 9;
- 29) SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 10;
- 30) SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 11;
- 31) SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 12;
- 32) SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 13;
- 33) SEQ ID NO: 17 및 SEQ ID NO: 18; 및
- 34) SEQ ID NO: 17 및 SEQ ID NO: 19로부터 선택되는, 작은 활성화 RNA.

**청구항 34**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 RNA를 암호화하는 단편을 포함하는 핵산 분자.

**청구항 35**

제34항에 있어서,  
상기 핵산 분자가 발현 벡터인, 핵산 분자.

**청구항 36**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 RNA 또는 제34항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자를 포함하는, 세포.

**청구항 37**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 RNA, 또는 제34항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 및 선택적으로, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

**청구항 38**

제37항에 있어서,  
상기 약학적으로 허용 가능한 담체가 지질 나노입자(lipid nanoparticle, LNP)를 포함하는, 약학 조성물.

**청구항 39**

제38항에 있어서,  
상기 지질 나노입자 성분에 DLIN-KC2-DMA 및/또는 Dlin-MC3-DMA가 포함되는, 약학 조성물.

**청구항 40**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 RNA, 및 소분자 약물을 포함하는, 복합 약학 조성물.

**청구항 41**

제40항에 있어서,  
상기 소분자 약물은 미토마이신 C(Mitomycin C) 또는 발루비신(Valuvin)으로부터 선택되는, 복합 약학 조성물.

**청구항 42**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 RNA, 또는 제34항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 또는 제36항에 따른 세포, 또는 제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물, 및/또는 제40항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 복합 약학 조성물을 포함하는, 제제.

**청구항 43**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 RNA, 또는 제34항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 또는 제36항에 따른 세포, 또는 제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물, 제40항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 복합 약학 조성물, 및/또는 제42항에 따른 제제를 포함하는, 키트.

**청구항 44**

면역자극 활성을 갖는 약물의 제조에서 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 RNA, 또는 제34항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 또는 제36항에 따른 세포, 또는 제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물, 제40항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 복합 약학 조성물, 및/또는 제42항에 따른 제제의 응용.

**청구항 45**

세포에서 p21 유전자의 발현을 활성화 또는 상향 조절하기 위한 약물 또는 제제의 제조에서 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 RNA, 또는 제34항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 또는 제36항에 따른 세포, 또는 제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물, 제40항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 복합 약학 조성물, 및/또는 제42항에 따른 제제의 용도.

**청구항 46**

제45항에 있어서,

상기 용도가 악성 종양 또는 양성 증식성 병변을 예방, 치료 또는 완화하는 약물 또는 제제를 제조하기 위한 것인, 용도.

**청구항 47**

제45항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 용도는 방광암, 전립선암, 간암, 또는 결장직장암을 예방, 치료 또는 완화하는 약물 또는 제제를 제조하기 위한 것인, 용도.

**청구항 48**

악성 종양 또는 양성 증식성 병변을 예방, 치료 또는 완화하는 방법으로서,

상기 방법은 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 RNA, 또는 제34항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 또는 제36항에 따른 세포, 또는 제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물, 제40항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 복합 약학 조성물, 및/또는 제42항에 따른 제제를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 악성 종양 또는 양성 증식성 병변을 예방, 치료 또는 완화하는 방법.

**청구항 49**

제48항에 있어서,

상기 악성 종양은 방광암, 전립선암, 간암 및 결장직장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 출원은 생물의학 분야에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학적으로 변형된 작은 활성화 RNA에 관한 것이며, 즉 유전자 프로모터 서열을 표적화하는 이중 가닥의 작은 RNA를 이용하여 유전자 발현을 상향 조절하는 것에 관한 것이다.

[0001]

**배경 기술**

[0002] 올리고뉴클레오티드는 RNAi, RNase H 활성화, miRNA 억제, RNA 활성화(RNAa)와 같은 다양한 분자 메커니즘을 통해 표적 유전자 발현을 조절할 수 있으며, 이들은 각각 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO), miRNA 모방체 또는 억제제, 작은 활성화 RNA(saRNA)로 불린다. siRNA 및 ASO와 달리, saRNA는 세포핵 중 비암호화 서열을 표적화하는 이중 가닥 RNA 올리고뉴클레오티드로, 전사 및 후생유전학적 수준에서 표적 유전자의 발현을 자극한다 (Li, Adv Exp Med Biol. 2007, 983:1-20).

[0003] 현재 올리고뉴클레오티드의 화학적 변형이 올리고뉴클레오티드의 치료제 개발에서 핵심적인 역할을 한다는 것은 이미 사람들에게 광범위하게 알려져있다(Manoharan, Curr Opin Chem Biol. 2004, 8(6): 570-579; Khvorova 및 Watts. Nat Biotechnol. 2017, 35(3): 238-248). 올리고뉴클레오티드 서열의 화학적 변형은, 예를 들어 뉴클레아제에 대한 저항성 증가, 세포 섭취 향상, 면역 자극 및 비표적 효과의 감소와 같은 다양한 방식으로 생체내 활성을 향상시킬 수 있지만, 동시에 RNAi 중 유전자 녹다운을 감소시키는 것과 같이 이러한 올리고뉴클레오티드 자체의 작용 메커니즘을 발생시켜 올리고뉴클레오티드의 활성에 영향을 미칠 수 있다(Khvorova 및 Watts. Nat Biotechnol, 2017, 35(3): 238-248). siRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO) 약물 개발 분야에서는 이미 다양한 화학적 변형이 사용되었다. 가장 일반적으로 사용되는 변형은 리보오스 당기에 대한 2'-메톡시(2'-O-메틸)와 2'-플루오로(2'F)의 변형 및 포스포디에스테르 결합을 대신하는 포스포로티오에이트(PS) 결합 변형이다 (Watts, Deleavey, 등. Drug Discov Today, 2008, 13(19-20): 842-855). 이러한 변형은 단독으로 또는 조합하여 키메라 올리고뉴클레오티드를 제조하는 데 사용될 수 있다. 그러나 안정성 증가, 면역자극 활성 억제 및 비 표적 효과를 포함하여, saRNA 올리고뉴클레오티드의 약물 특성을 어떻게 개선할지는 여전히 하나의 난제이다.

**발명의 내용**

[0004] 본 출원의 목적 중 하나는 saRNA 올리고뉴클레오티드의 약학적 특성을 개선하기 위하여, saRNA의 뉴클레오티드에 대한 화학적 변형을 제공하는 것이며, 본 발명자는 최적화된 화학적 변형을 거치면 saRNA 이중 가닥의 안정성 증가, 이의 면역자극 억제, 및/또는 비표적 효과 감소가 가능함을 발견하였다. 가장 중요한 것은, 이러한 변형이 saRNA가 RNA 활성화를 유도하는 효능을 증가시킬 수도 있다는 것이다.

[0005] 본 출원은 화학적으로 변형된 작은 활성화 RNA를 제공하며, 이는 표적 유전자를 활성화하는 데 사용될 수 있고, 상기 작은 활성화 RNA는 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥으로 구성되고, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 표적 유전자 프로모터 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 상동성 또는 상보성을 가지며; 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단 및 3' 말단의 2개의 뉴클레오티드는 모두 화학적으로 변형된 뉴클레오티드이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 화학적 변형은 (1) 뉴클레오티드의 리보오스에 대한 화학적 변형; (2) 뉴클레오티드 사이의 포스포디에스테르 결합에 대한 화학적 변형; (3) 뉴클레오티드의 염기에 대한 화학적 변형; (4) 뉴클레오티드는 잠금 핵산; 및 (5) 5'-말단 뉴클레오티드의 비닐포스포네이트 변형 방식 중 하나 또는 하나 이상으로부터 선택된다.

[0006] 본 출원의 또 다른 목적은 표적 유전자가 인간 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 유전자(P21 유전자)인 작은 활성화 RNA를 제공하는 데에 있다. p21 유전자는 Cip 계열의 구성원 중 하나이며, 이는 p53 유전자 하류에 위치한 사이클린 의존성 키나아제 억제인자이다. p21은 p53과 세포 주기 G1 체크포인트를 공동으로 구성할 수 있으며, DNA 손상 후 수복을 거치지 않으면 통과할 수 없기 때문에, 손상된 DNA의 복제 및 축적을 감소시켜, 종양 억제 작용을 나타낸다. p21은 종양 억제 작용과 밀접한 관련이 있을 뿐만 아니라, 사이클린 의존성 키나아제(cyclin-dependent kinases, CDKs) 복합체 활성을 억제함으로써, 세포 주기 및 DNA 복제와 수복 사이의 관계를 조정하여, 종양 억제 작용과 세포 주기 제어 과정을 밀접하게 연결시킨다. p21은 종양의 분화, 침윤 깊이, 증식 및 전이와 관련이 있다.

[0007] 본 출원은 상기 작은 활성화 RNA를 암호화하는 단편을 포함하는 핵산 분자를 더 제공한다. 동시에 상기 작은 활성화 RNA 또는 상기 핵산 분자를 포함하는 세포를 제공한다.

[0008] 본 출원은 약학 조성물을 제공하며, 상기 약학 조성물은 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 및 선택적으로, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 마찬가지로, 제제를 제공하며, 상기 제제는 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 또는 상기 세포, 또는 약학 조성물을 포함한다. 또한, 키트를 제공하며, 상기 키

트는 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 또는 상기 세포, 또는 약학 조성물, 또는 상기 제제를 포함한다.

[0009] 본 출원은 복합 약학 조성물을 더 제공하며, 여기에는 상기 작은 활성화 RNA, 및 소분자 약물이 포함된다. 선택적으로, 상기 소분자 약물은 미토마이신 C(Mitomycin C) 또는 발루비신(Valrubicin)으로부터 선택된다.

[0010] 본 출원은 세포에서 p21 유전자의 발현을 활성화 또는 상향 조절하기 위한 약물 또는 제제의 제조에서 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 또는 상기 세포, 또는 약학 조성물, 또는 상기 제제의 용도를 더 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 용도는 악성 종양 또는 양성 증식성 병변을 예방, 치료 또는 완화하는 약물 또는 제제를 제조하기 위한 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 악성 종양은 방광암, 전립선암, 간암 또는 결장직장암일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방광암은 비근침윤성 방광암(non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC)일 수 있다.

[0011] 본 출원은 악성 종양 또는 양성 증식성 병변을 예방, 치료 또는 완화하는 방법을 더 제공하며, 상기 방법은 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 또는 상기 세포, 또는 상기 약학 조성물, 또는 상기 제제를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 악성 종양은 방광암, 전립선암, 간암 또는 결장직장암이다. 일부 구현예에서, 상기 방광암은 비근침윤성 방광암(NMIBC)이다.

[0012] 당업자는 다음의 상세한 설명으로부터 본 출원의 다른 양상 및 장점을 용이하게 인식할 수 있다. 이하의 상세한 설명에서는 본 출원의 예시적인 구현예만을 도시하고 설명한다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 본 출원의 내용은 당업자가 본 출원에 언급된 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 개시된 구체적인 구현예를 변경할 수 있도록 한다. 이에 상응하여, 본 출원의 첨부 도면과 명세서에서의 설명은 한정적인 것이 아니라 예시적인 것일 뿐이다.

**도면의 간단한 설명**

[0013] 본 출원에 언급된 본 발명의 구체적인 특징은 첨부된 청구범위에 기재된 바와 같다. 이하의 상세한 설명에 따른 예시적인 구현예와 첨부 도면을 참조하여 본 출원에 언급된 발명의 특징 및 장점을 더욱 잘 이해할 수 있다. 첨부 도면에 대한 간략한 설명은 다음과 같다:

도 1은 화학적으로 변형된 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 구체적인 패턴이다. 도 1-a는 변형되지 않은 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및 이의 4가지 변형된 유도 서열이며, 각각의 유도 서열은 상이한 변형 패턴을 갖는다. 도 1-b는 변형되지 않은 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥(AS) 및 이의 10가지 변형된 유도 서열이며, 각각의 유도 서열은 상이한 변형 패턴을 갖는다.

도 2는 화학적으로 변형된 dsRNA 듀플렉스의 구체적인 패턴이다. 도 1-a의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 도 1-b의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥을 돌씩 조합하여, 32가지의 상이한 saRNA 듀플렉스를 획득하였다.

도 3은 화학적 변형이 RNase A에서 dsRNA 듀플렉스의 안정성에 미치는 영향을 도시한 것이다. 10 μL PBS에 희석된 dsRNA(1.5 μL, 10 μM)를 RNase A(최종 농도 0.01 μg/μL)와 37°C 조건에서 상이한 시간(레인 1: 0분; 레인 2: 5분; 레인 3: 10분, 레인 4: 15분, 레인 5: 30분, 레인 6: 1시간) 동안 배양하였다. 상기 각각의 시점에서 획득한 듀플렉스를 1 μL의 10X 로딩 버퍼에 첨가하고, 액체 질소에서 동결한다. 모든 샘플 배양을 종료한 후, 4% 아가로스 겔 전기영동으로 이중 가닥 RNA를 검출하고, Image J 소프트웨어를 이용하여 각각의 듀플렉스의 함량을 분석하였다. M은 20bp DNA 마커이다.

도 4는 화학적 변형이 RNase A에서 각각의 RNA 듀플렉스의 안정성에 미치는 영향을 도시한 것이다. RNase A(최종 농도 0.01 μg/μL)와 10 μL PBS에 희석된 이중 가닥 RNA(1.5 μL, 10 μM)를 37°C의 조건 하에서 각각 0, 24, 48 및 96시간 동안 배양하였다. 상기 각각의 시점에서 획득한 듀플렉스를 1 μL의 10X 로딩 버퍼에 첨가하고, 액체 질소에서 동결한다. 모든 샘플 배양을 종료한 후, 4% 아가로스 겔 전기영동으로 이중 가닥 RNA를 검출하고, Image J 소프트웨어를 이용하여 각각의 듀플렉스의 함량을 분석하였다. 도면 상방의 RAG1-40-XX는 샘플 명칭이며, 상방의 숫자로 XX를 바꾸면 각각의 샘플의 명칭이 된다. M은 20bp DNA 마커이다.

도 5는 화학적 변형이 인간 소변의 RNA 듀플렉스 안정성에 미치는 영향을 도시한 것이다. 17.5 μL PBS에 희석된 이중 가닥 RNA(7.5 μL, 10 μM)와 25 μL의 새로운 인간 소변을 37°C의 조건 하에서 각각 0, 1, 24 및 48시간 동안 배양하였다. 상기 각각의 시점에서 획득한 듀플렉스를 1 μL의 10X 로딩 버퍼에 첨가하고, 액체 질소에서 동결한다. 모든 샘플 배양을 종료한 후, 4% 아가로스 겔 전기영동으로 이중 가닥 RNA를 검출하고, Image J 소프트웨어를 이용하여 각각의 듀플렉스의 함량을 분석하였다. M은 20bp DNA 마커이다.

도 6은 구조적으로 최적화된 saRNA가 Ku-7-LG의 증식을 억제할 수 있음을 도시하였다. 도시된 saRNA를 이용하여 10nM로 Ku-7-LG 세포를 형질감염시켰으며, 형질감염 시간은 3일이었다. 도 6a는 단일 saRNA의 Ku-7-LG 세포에서의 p21 mRNA의 발현이고, 도 6b는 단일 saRNA의 Ku-7-LG 세포 증식 억제 수준이고, 도 6c는 단일 saRNA의 Ku-7-LG 세포에서의 루시퍼라아제의 활성이고, 루시퍼라아제의 값이 대조군에 근접할수록, saRNA의 비표적 효과의 발생 확률이 낮아짐을 의미한다. 대조군과 dsCon2는 각각 블랭크 형질감염 및 무관한 서열의 이중 가닥 RNA 형질감염이다. 세로축 값은 2회 반복 처리의 평균값±SD를 나타낸다.

도 7은 화학적으로 변형된 saRNA가 인간 방광암 세포주에서 p21 mRNA 발현을 촉진함을 도시한 것이다. 도시된 saRNA를 이용하여 10nM의 최종 농도로 Ku-7-LG 및 T24 세포를 각각 3일 동안 형질감염시켰으며, 형질감염 종료 후 Qiagen RNeasy 키트를 이용해 RNA를 추출하고, 역전사 후 ABI 7500 신속 실시간 PCR 시스템을 이용해 qPCR 증폭을 수행하였으며, 동시에 GAPDH 유전자 증폭을 내부 기준으로 사용하였다. 도 7a는 화학적으로 변형된 saRNA가 Ku-7-LG 세포에서 p21 mRNA의 발현을 촉진함을 도시한 것이고, 도 7b는 화학적으로 변형된 saRNA가 T24 세포에서 p21 mRNA의 발현을 촉진함을 도시한 것이다. 점선은 화학적으로 변형되지 않은 듀플렉스 Rag1-40에 비해, 선 이상의 값이 더 강한 활성을 나타냄을 의미한다. 대조군은 올리고뉴클레오티드가 함유되지 않은 블랭크 형질감염이다. dsCon2는 무관한 서열의 이중 가닥 RNA 형질감염이다. 세로축 값은 2회 반복 처리의 평균값±SD를 나타낸다.

도 8은 인간 암 세포주의 증식에 대한 Rag1 유도 서열의 억제 작용을 도시한 것이다. 도시된 듀플렉스를 이용하여 최종 농도 10nM로 세포를 72시간 동안 각각 형질감염시켰을 때, 형질감염 종료 후 CCK8 키트로 생존 세포의 수를 검출하였으며, 블랭크 대조 처리군의 백분율로 그래프를 도시하였다. 도 8a는 Ku-7-LG 세포에 대한 Rag1 유도 서열의 억제 작용을 도시한 것이고, 도 8b는 T24 세포에 대한 Rag1 유도 서열의 억제 작용을 도시한 것이다. 올리고뉴클레오티드가 함유되지 않은 형질감염 샘플은 블랭크 대조군으로 사용하였다. 비특이적 듀플렉스(dsCon) 형질감염 샘플은 음성 대조군으로 사용하였다. 데이터는 적어도 2회 독립 실험의 평균값±SD로 나타났다. 점선은 화학적으로 변형되지 않은 듀플렉스 Rag1-40에 비해, 선 이하의 값이 더 강한 성장 억제 활성을 나타냄을 의미한다.

도 9는 화학적 변형이 RNA 듀플렉스의 면역자극 활성을 억제할 수 있음을 도시한 것이다. 도시된 듀플렉스를 이용하여 10nM의 최종 농도로 또는 양성 대조군인 리포폴리사카라이드(LPS)로 세포를 각각 24시간 동안 처리하였다. ELISA 키트를 이용해 세포 상청액의 INF- $\alpha$  및 TNF- $\alpha$  수준을 검출하였다. 도 9a는 PBMC 세포의 INF- $\alpha$ 의 함량이고, 도 9b는 PBMC 세포의 TNF- $\alpha$  함량이다. 데이터는 2개의 독립 실험의 평균값±SD를 나타낸다. 점선은 화학적으로 변형되지 않은 듀플렉스 Rag1-40에 비해, 선 이하의 값이 억제된 활성을 나타냄을 의미한다. 강한 면역자극 활성을 갖는 것으로 알려진 RNA 듀플렉스 RAG1-IS-1을 양성 대조군으로 사용하였다(이의 서열은 표 3에 나열됨).

도 10은 비표적 효과에 대한 saRNA의 화학적 변형의 영향을 도시한 것이다. 표적 부위 Rag1-40을 포함하는 26bp 단편을 안티센스 방향으로 pmirGLO 이중 루시퍼라아제 벡터의 반딧불이 루시퍼라아제 유전자의 3' UTR 영역에 클로닝하였다. 벡터 플라스미드를 도시된 saRNA와 함께 COS-1 세포로 공동 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후에 세포를 용해시키고, 희석한 용해물의 루시퍼라아제 활성을 평가하였다. 데이터는 적어도 2회 독립 실험의 평균값±SD를 나타낸다. 점선은 블랭크 대조군(상부 점선) 및 Rag1-40(하부 점선)과의 비교를 나타낸 것이며, 상부 점선에 근접한 값은 비표적 효과를 나타내고, 하부 점선 위 및 아래의 값은 각각 화학적으로 변형되지 않은 Rag1-40와 비표적 효과의 감소 및 증가를 비교한 것이다.

도 11은 상이한 시간 동안 처리한 후 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스가 방광암 세포에서 여전히 활성화 활성을 유지함을 도시한 것이다. 도 11a는 RAG1-40-31 및 RAG1-40-53이 10nM로 Ku-7-LG 세포를 1, 2, 3, 4, 7 및 9일 처리한 후 p21 mRNA의 발현 수준이고, 도 11b는 RAG1-40-31 및 RAG1-40-53이 10nM로 T24 세포를 1, 2, 3, 4, 7 및 9일 처리한 후 p21 mRNA의 발현 수준이고, 대조군 및 dsCon2는 각각 블랭크 형질감염 및 무관한 서열의 이중 가닥 RNA 형질감염이다. 세로축 값은 2회 반복 처리의 평균값±SD를 나타낸다.

도 12는 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스가 Ku-7-LG 세포에서 세포 주기 진행을 저지함으로써 세포 증식을 억제함을 도시하였다. RAG1-40-31 및 RAG1-40-53을 최종 농도 0.1, 1, 10 및 50nM로 Ku-7-LG 세포에 형질감염시켰으며, 형질감염 시간은 48시간이었고, 각각의 처리에 2개의 복제 웰을 사용하였다. 형질감염 종료 후 유세포 분석기로 세포 주기를 분석하였으며, 수집된 데이터는 MotFit 소프트웨어로 분석하였다.

도 13은 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스가 J82 세포 및 PBMC 세포의 공동 배양에서 세포자살을 촉진함을 도시한 것이다. RAG1-40-31 및 RAG1-40-53이 0.1, 1, 10 및 25nM의 최종 농도로 J82 세포를 형질감염시켰으며,

형질감염 24시간 후 새로운 배지로 교체하고 일정 비율(J82 세포:PBMC 세포=1:4)의 PBMC 세포를 첨가하여, 48시간 동안 공동 배양하였다. 공동 배양 종료 후 세포를 수집하고 유세포 분석기를 사용하여 세포자살 상태를 검출하였다. 여기에서 도 13a 내지 13b는 화학적으로 변형된 saRNA RAG1-40-31과 미토마이신 C를 함께 처리한 후 J82 세포의 상대적 증식률이고, 도 13c는 화학적으로 변형된 RAG1-40-31과 미토마이신 C를 함께 사용한 조합 지수(CI)이다. 대조군 및 DMSO는 각각 블랭크 형질감염 대조군 및 희석된 약물의 용매 대조군이다.

도 14는 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스와 미토마이신 C가 조합되면 J82 세포의 증식이 억제될 수 있음을 도시한 것이다. RAG1-40-31을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50nM 농도로 J82 세포에 24시간 동안 형질감염시킨 후, 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 농도로 미토마이신 C를 첨가하였고, 둘씩 짝지어 조합한 농도 조합의 형태로 조합 투여하여, 처리가 종료된 후 CCK8 키트로 세포의 증식 상태를 검출하였다. 여기에서 도 14a 내지 14b는 화학적으로 변형된 saRNA RAG1-40-31과 발루비신을 함께 처리한 후 J82 세포의 상대적 증식률이고, 도 14c는 화학적으로 변형된 RAG1-40-31과 발루비신을 함께 사용한 조합 지수(CI)이다. 대조군 및 DMSO는 각각 블랭크 형질감염 대조군 및 희석된 약물의 용매 대조군이다.

도 15는 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스와 발루비신이 조합되면 J82 세포의 증식이 억제될 수 있음을 도시한 것이다. RAG1-40-31을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50nM 농도로 J82 세포에 24시간 동안 형질감염시킨 후, 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 농도로 발루비신을 첨가하였고, 둘씩 짝지어 조합한 농도 조합의 형태로 조합 투여하여, 처리가 종료된 후 CCK8 키트로 세포의 증식 상태를 검출하였다. 여기에서 도 15a 내지 15b는 화학적으로 변형된 saRNA RAG1-40-31과 미토마이신 C를 함께 처리한 후 T24 세포의 상대적 증식률이고, 도 15c는 화학적으로 변형된 RAG1-40-31과 미토마이신 C를 함께 사용한 조합 지수(CI)이다. 대조군 및 DMSO는 각각 블랭크 형질감염 대조군 및 희석된 약물의 용매 대조군이다.

도 16은 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스와 미토마이신 C가 조합되면 T24 세포의 증식이 억제될 수 있음을 도시한 것이다. RAG1-40-31을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50nM 농도로 T24 세포에 24시간 동안 형질감염시킨 후, 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 농도로 미토마이신 C를 첨가하였고, 둘씩 짝지어 조합한 농도 조합의 형태로 조합 투여하여, 처리가 종료된 후 CCK8 키트로 세포의 증식 상태를 검출하였다. 여기에서 도 16a 내지 16b는 화학적으로 변형된 saRNA RAG1-40-31과 발루비신을 함께 처리한 후 T24 세포의 상대적 증식률이고, 도 16c는 화학적으로 변형된 RAG1-40-31과 발루비신을 함께 사용한 조합 지수(CI)이다. 대조군 및 DMSO는 각각 블랭크 형질감염 대조군 및 희석된 약물의 용매 대조군이다.

도 17은 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스와 발루비신이 조합되면 T24 세포의 증식이 억제될 수 있음을 도시한 것이다. RAG1-40-31을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50nM 농도로 T24 세포에 24시간 동안 형질감염시킨 후, 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 농도로 발루비신을 첨가하였고, 둘씩 짝지어 조합한 농도 조합의 형태로 조합 투여하여, 처리가 종료된 후 CCK8 키트로 세포의 증식 상태를 검출하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0014] 이하에서는 특정한 구체적 실시예를 참조하여 본 출원 발명의 구현예를 설명하며, 당업자는 본 명세서에 개시된 내용으로부터 본 출원 발명의 다른 장점 및 효과를 용이하게 이해할 수 있을 것이다.

[0015] 본 출원은 표적 유전자 활성화용 작은 활성화 RNA를 개시하였으며, 여기에서 상기 작은 활성화 RNA는 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥으로 구성되고, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 표적 유전자 프로모터 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 상동성 또는 상보성을 가지며; 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단 및 3' 말단의 2개의 뉴클레오티드는 모두 화학적으로 변형된 뉴클레오티드이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0016] 본 출원에 따른 화학적 변형은 당업계에서 단일 뉴클레오티드 잔기, 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 단일 뉴클레오티드 사이, 및 올리고뉴클레오티드 가닥 상이한 위치의 원자/화학 기의 변화, 증가, 감소, 또는 치환, 또는 원자 간 화학 결합의 변경, 증가, 감소, 또는 치환, 또는 올리고뉴클레오티드 가닥의 임의 위치의 뉴클레오티드 상의 공유 결합기, 리간드 또는 접합체일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 화학적 변형은 하기 변형 방식 중 하나 또는 하나 이상으로부터 선택될 수 있다:

[0017] (1) 뉴클레오티드의 리보오스에 대한 화학적 변형;

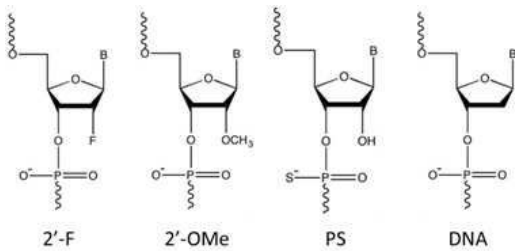
[0018] (2) 뉴클레오티드 사이 포스포디에스테르 결합에 대한 화학적 변형;

[0019] (3) 뉴클레오타이드의 염기에 대한 화학적 변형;

[0020] (4) 뉴클레오타이드는 잠금 핵산; 및

[0021] (5) 5'-말단 뉴클레오타이드의 비닐포스포네이트 변형.

[0022] 본 출원에 따른 리보오스의 화학적 변형은 당업계에서 일반적으로 사용되는 것으로, 예를 들어, 뉴클레오타이드 펜토오스의 히드록실(2'-OH)에 대한 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 펜토오스의 히드록실에 대한 변형은 2'-플루오로(2'-fluro, 2'F로 약칭), 2'-메톡시(2'-O-methyl, 2'-OMe로 약칭), 2'-메톡시에틸(2'-MOE), 2,4'-디니트로페놀 변형(2'-DNP), 잠금 핵산(LNA), 2'-아미노(2'-amino) 등 변형을 포함할 수 있다. 또는, 일부 구현예에서, 상기 화학적 변형은 뉴클레오타이드의 리보오스에 대한 2'-OH가 2'-플루오로, 2'-메톡시, 2'-메톡시에틸, 2,4'-디니트로페놀, 잠금 핵산, 2'-아미노 변형 및 2'-H 중 하나 또는 하나 이상에 의해 치환된 것일 수 있다. 여기에서, 리보오스의 2'-OH는 2'-H로 치환되어, 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 리보핵산(RNA)에서 데옥시리보핵산(DNA)으로 만들 수 있다. 일부 전형적인 뉴클레오타이드의 화학적 변형에는, 예를 들어 하기와 같은 뉴클레오타이드가 포함될 수 있다:



[0023]

[0024] 일부 구현예에서, 상기 염기 변형은 뉴클레오타이드의 염기에 대해 수행하는 화학적 변형을 의미할 수 있으며, 예를 들어, 5'-브로모우라실 변형, 5'-요오도우라실 변형, N-메틸우라실 변형 및/또는 2,6-디아미노퓨린 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 포스포디에스테르 결합에 대한 변형은 당업계에서 일반적으로 사용하는 것으로, 포스포디에스테르 결합에서 비가교 산소 원자에 대해 수행하는 변형을 포함하나 이에 한정되지 않을 수 있으며, 예를 들어 포스포로티오에이트 변형(phosphorothioate, PS) 및/또는 보라노포스페이트 변형(boranophosphate)을 포함할 수 있다.

[0025] 일부 구현예에서, 본 출원의 작은 활성화 RNA는 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥을 함유할 수 있고, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 5' 말단 및 3' 말단의 2개의 뉴클레오타이드는 모두 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 5' 말단의 2개의 뉴클레오타이드와 3' 말단의 2개의 뉴클레오타이드 사이는, 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드의 비율이 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 10% 이하, 5% 이하이거나, 또는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 전혀 함유하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 5' 말단 및/또는 3' 말단의 2개의 뉴클레오타이드는 모두 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드일 수 있다. 경우에 따라, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 다른 뉴클레오타이드는 모두 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0026] 일부 구현예에서, 본 출원의 작은 활성화 RNA의 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합 중 하나는 화학적 변형이 있을 수 있거나, 또는 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합이 모두 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 3' 말단 2개의 포스포디에스테르 결합은 각각 황과 보란으로 포스포디에스테르 결합의 비가교 산소 원자를 치환할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 모두 황으로 포스포디에스테르 결합의 비가교 산소 원자를 치환, 즉 포스포로티오에이트(PS) 변형일 수 있다.

[0027] 일부 구현예에서, 본 출원의 작은 활성화 RNA의 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 함유한다. 상기 화학적 변형은 뉴클레오타이드의 리보오스 2'-OH에 대한 화학적 변형일 수 있고, 뉴클레오타이드 사이의 포스포디에스테르 결합에 대한 화학적 변형일 수 있고, 뉴클레오타이드의 염기에 대한 화학적 변형일 수 있고, 어느 하나의 뉴클레오타이드가 잠금 핵산(LNA)으로 치환된 것일 수도 있거나, 또는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 뉴클레오타이드에 대해 비닐포스포네이트 변형을 수행할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개,

적어도 23개, 또는 더 많은 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100%의 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥을 구성하는 모든 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0028] 일부 구현예에서, 본 출원의 작은 활성화 RNA의 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단의 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합 중 하나는 화학적 변형이 있을 수 있거나, 또는 3' 말단 또는 5' 말단의 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합이 모두 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 3' 말단 및/또는 5' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 포스포로티오에이트 변형 또는 보라노포스페이트 변형 또는 이들 둘의 조합을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 모두 포스포로티오에이트 변형일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 5' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 모두 포스포로티오에이트 변형일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 5' 말단 및 3' 말단의 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 모두 포스포로티오에이트 변형일 수 있다.

[0029] 일부 구현예에서, 본 출원의 작은 활성화 RNA의 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 적어도 하나(예를 들어, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 또는 그 이상)의 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 상기 화학적 변형은 예를 들어 2'-플루오로, 2'-메톡시, 2'-메톡시에틸, 2,4'-디니트로페놀, 잠금 핵산, 2'-아미노 변형 중 하나 또는 하나 이상을 포함하는, 뉴클레오타이드의 리보오스 2'-OH에 대한 화학적 변형일 수 있고; 예를 들어 포스포로티오에이트 변형 또는 보라노포스페이트 변형을 포함하는, 뉴클레오타이드 사이 포스포디에스테르 결합에 대한 화학적 변형일 수 있고; 뉴클레오타이드의 염기에 대한 화학적 변형일 수 있고; 어느 하나의 뉴클레오타이드를 잠금 핵산(LNA)으로 치환할 수도 있고; 또는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 뉴클레오타이드에 대해 수행하는 비닐포스포네이트 변형일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 또는 더 많은 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100%의 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥을 구성하는 모든 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0030] 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 5'-말단에서의 1 내지 56개 뉴클레오타이드가 일정 비율의 리보오스 2'-OH의 화학적 변형이 있을 수 있으며, 예를 들어, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 그 이상의 2'-플루오로 변형이 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 3'-말단에서의 1 내지 6개 뉴클레오타이드가 더 높은 비율의 리보오스 2'-OH의 화학적 변형이 있을 수 있으며, 예를 들어, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개 또는 그 이상의 2'-플루오로 변형이 있을 수 있다. 본 발명자는, 상기의 이러한 위치의 2'-플루오로 변형이 안정성에 매우 중요할 수 있음을 발견하였다.

[0031] 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 가장 중앙의 1 내지 5개 뉴클레오타이드가 더 높은 비율의 리보오스 2'-OH의 화학적 변형이 있을 수 있으며, 예를 들어, 가장 중앙의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드가 리보오스 2'-OH의 화학적 변형을 가질 수 있다.

[0032] 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 2'-플루오로 변형, 2'-메톡시 변형 및 포스포로티오에이트(PS)의 3가지 변형의 조합을 채택할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 2'-플루오로 변형, 2'-메톡시 변형 및 포스포로티오에이트(PS)의 3가지 변형의 조합을 채택할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 작은 활성화 RNA의 듀플렉스는 2'-플루오로 변형, 2'-메톡시 변형 및 포스포로티오에이트(PS)의 3가지 변형의 조합을 채택할 수 있다.

[0033] 본 발명자는, 2'-플루오로 변형, 2'-메톡시 변형 및 포스포로티오에이트 변형(PS)의 3가지 변형으로 구성된 조

합(3가지 조합)이 작은 활성화 RNA 듀플렉스가 유전자 발현을 유도하는 능력을 증가시킬 수 있고; 일부 구현예에서, 상기 3가지 조합은 작은 활성화 RNA가 p21 유전자 발현을 유도하는 능력을 증가시킬 수 있고; 일부 구현예에서, 상기 3가지 조합은 작은 활성화 RNA가 암 세포 증식을 억제하는 작용을 증가시킬 수 있고; 일부 구현예에서, 상기 암 세포는 방광암 세포를 포함할 수 있음을 발견하였다.

[0034] 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 리보뉴클레오타이드가 데옥시리보뉴클레오타이드(DNA)로 치환될 수 있는 변형을 포함하지 않는다. 본 발명자는, 올리고뉴클레오타이드 가닥에서 RNA가 DNA로 전환되는 변형이 작은 활성화 RNA 듀플렉스의 세포 증식 억제 활성을 약화시킬 수 있음을 발견하였다. 경우에 따라, 올리고뉴클레오타이드 가닥에서 RNA가 DNA로 전환되는 변형을 피해야 한다.

[0035] 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 대부분(예를 들어 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%) 또는 모든 뉴클레오타이드에 대해 화학적 변형을 수행할 때(예를 들어, 2'-플루오로 변형 및/또는 2'-메톡시 변형을 사용), 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 5개 또는 그 이상의 2'-메톡시 변형을 채택할 수 있다. 본 발명자는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 대부분 또는 모든 뉴클레오타이드에 대해 화학적 변형을 수행하면 작은 활성화 RNA(예를 들어 p21 표적화 saRNA)가 세포 증식을 억제하는 활성에 악영향을 미칠 수 있음을 발견하였다. 본 발명자는, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥에 대해 수행하는 대부분의 뉴클레오타이드 또는 모든 뉴클레오타이드의 완전한 변형으로 인한 세포 증식 활성 억제의 악영향은 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 2'OMe 변형을 통해 상쇄 또는 교정할 수 있음을 발견하였다.

[0036] 본 발명자는 작은 활성화 RNA 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥 각각의 뉴클레오타이드 위치의 상이한 유형에 대한 화학적 변형의 무수한 유형의 배열 조합의 탐구를 통해, 놀랍게도, 본 출원에서 개시한 이러한 작은 활성화 RNA의 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥 및 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 화학적 변형은, 본 출원의 작은 활성화 RNA가 더욱 우수한 약학적 특성을 나타내도록 만들 수 있는데, 예를 들어 saRNA 듀플렉스의 안정성, 더 낮은 면역자극 및 더 적은 비표적 효과가 포함되며; 더욱 중요한 것은, 이러한 변형이 saRNA의 RNA 활성화 유도 효능을 향상시킬 수도 있다는 것이다. 일부 구현예에서, saRNA가 RNA 활성화 표적 유전자를 유도하는 효능은 대조군 또는 세포 중 유전자 발현 기본 수준의 적어도 1.1배, 적어도 1.2배, 적어도 1.3배, 적어도 1.5배, 적어도 1.6배, 적어도 1.8배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 8배, 적어도 10배, 적어도 12배, 적어도 15배, 또는 그 이상일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 출원에 따른 표적 유전자는 인간 또는 마우스 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 유전자(P21 유전자)일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 출원에 따른 표적 유전자는 인간 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 유전자일 수 있으며, 작은 활성화 RNA의 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥 및 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 화학적 변형을 통해, saRNA가 RNA 활성화 p21 표적 유전자를 유도하는 효능이 대조군 또는 세포 중 유전자 발현 기본 수준의 적어도 1.1배, 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 또는 그 이상이 될 수 있다.

[0037] 발명자는 놀랍게도, 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥 각각의 뉴클레오타이드 위치의 상이한 유형에 대한 화학적 변형의 무수한 유형의 배열 조합의 탐구를 통해, 일부 구현예의 작은 활성화 RNA가 면역 활성의 강화를 자극할 수 있음을 발견하였다.

[0038] 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-S6A, RAG1-SS-S6B, RAG1-SS-S6C 및 RAG1-SS-S6D의 4가지 패턴으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0039] 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-AS2A, RAG1-SS-AS2B, RAG1-SS-AS2C, RAG1-SS-AS2D, RAG1-SS-AS2E, RAG1-SS-AS2F, RAG1-SS-AS2G, RAG1-SS-AS2H, RAG1-SS-AS2I 및 RAG1-SS-AS2J의 10가지 패턴으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0040] 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-S6A, RAG1-SS-S6B, RAG1-SS-S6C 및 RAG1-SS-S6D의 4가지 패턴으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-AS2A, RAG1-SS-AS2B, RAG1-SS-AS2C, RAG1-SS-AS2D, RAG1-SS-AS2E, RAG1-SS-AS2F, RAG1-SS-AS2G, RAG1-SS-AS2H, RAG1-SS-AS2I 및 RAG1-SS-AS2J의 10가지 패턴으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0041] 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-S6D로 표시되는 패턴일 수 있고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥의 화학적 변형은 RAG1-SS-AS2G로 표시되는 패턴일 수 있다.

- [0042] 일부 구현예에서, 본 출원의 작은 활성화 RNA의 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 중 하나 또는 둘은 모두 6개, 5개, 4개, 3개, 2개, 1개 또는 0개 뉴클레오티드의 오버행을 가질 수 있으며, 상기 오버행은 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및/또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 각각의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 위치할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단은 0 내지 6개 뉴클레오티드의 오버행을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단은 2개 또는 3개 뉴클레오티드 오버행을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단과 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단은 오버행이 없거나, 또는 평행 말단일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 오버행은 dTdT 또는 dTdTdT, 또는 표적 유전자 상의 해당 위치의 뉴클레오티드와 동일하거나 상보적인 뉴클레오티드, 또는 표적 유전자 상의 해당 위치의 뉴클레오티드와 동일하지도 상보적이지도 않은 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 오버행은 표적 유전자 상의 상응하는 위치에서 뉴클레오티드에 상보적인 뉴클레오티드일 수 있다.
- [0043] 본 출원의 작은 활성화 RNA의 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 길이는 상이한 표적 유전자, 표적 유전자의 상이한 작용 위치, 또는 상이한 길이로 인한 상이한 활성화 효과에 따라 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 길이는 각각 17 내지 30개의 뉴클레오티드일 수 있으며, 예를 들어, 각각 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥이 형성하는 염기 상보적 이중 가닥 영역은 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 또는 적어도 15개의 뉴클레오티드 길이일 수 있으며, 예를 들어, 각각 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 염기 쌍의 뉴클레오티드 쌍일 수 있다.
- [0044] 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥에는 1 내지 3개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 또는 5' 영역에는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 5' 또는 3' 영역에 대응하는 뉴클레오티드에 1 내지 3개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있으며, 예를 들어, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 영역에는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 5' 영역에 대응하는 뉴클레오티드에 1, 2, 또는 3개의 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥에서 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 5' 또는 3' 말단 외의 중간 영역에 대응하는 뉴클레오티드는 1 내지 3개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있다.
- [0045] 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 또는 5' 말단에서 표적 유전자 상의 대응하는 뉴클레오티드는 1 내지 3개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 또는 5' 말단에서 표적 유전자 상의 대응하는 뉴클레오티드는 1 내지 3개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 말단에서 표적 유전자 상의 대응하는 뉴클레오티드는 1, 2, 또는 3개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있다.
- [0046] 일부 구현예에서, 본 출원의 작은 활성화 RNA의 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 지질, 지방산, 헵탄, 리간드, 당류, 고분자 화합물, 펩티드, 항체 및 콜레스테롤의 조합 중 하나 이상의 기와 접합될 수 있다. 상기 기 접합은 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단에 있을 수 있으며, 3' 말단과 5' 말단 사이에 있을 수도 있다. 일부 구현예에서, 본 출원의 작은 활성화 RNA의 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 하나의 지질 기와 접합될 수 있으며, 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단에 위치한다. 일부 구현예에서, 상기 지질 기는 지방산(fatty acyl), 양이온성 지질(cationic lipid), 음이온성 지질(anionic lipid) 및 이온화가능 지질(ionizable lipid), 사카로지질(saccharolipid), 글리세로지질(glycerolipid), 글리세로인지질(glycerophospholipid), 스테롤 지질(sterol lipid), 스프링고지질(sphingolipid), 프레놀 지질(prenol lipid), 및 폴리케티드(polyketide) 중 하나 또는 하나 이상으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 출원의 작은 활성화 RNA의 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 하나의 콜레스테롤 기와 접합될 수 있으며, 예를 들어 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단에 위치할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 출원의 작은 활성화 RNA의 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 하나의 당류 기와 접합될 수 있으며, 예를 들어 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단에 위치할 수 있다. 상기 당류 기는, 예를 들어 N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 글루코스(glucose), 만노스(mannose) 및 다른 적합한 당류 기를

포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 기 접합은 본 출원의 작은 활성화 RNA가 특정 기관, 조직 또는 세포로 더욱 잘 진입하는 전달 능력을 나타내도록 만들 수 있고, 및/또는 본 출원의 작은 활성화 RNA가 약동학(pK), 약력학(pD), 독성(toxicity), 외인성 화학물질에 대한 유기체의 흡수(absorption), 분포(distribution), 대사(metabolism) 및 배설(excretion) 과정의 특성과 같이, 원하는 약학적 특성을 갖도록 할 수 있다.

[0047] 본 출원은 작은 활성화 RNA를 개시하며, 상기 작은 활성화 RNA의 표적 유전자는 인간 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 유전자일 수 있다. 특히, 일부 구현예에서, 상기 작은 활성화 RNA는 p21 유전자의 프로모터 영역을 특이적으로 표적화할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 작은 활성화 RNA는 p21 유전자 프로모터의 전사 개시 부위(transcription start site, TSS) 상류-1000 뉴클레오티드에서 TSS까지의 영역을 특이적으로 표적화할 수 있다.

[0048] 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 길이가 17 내지 30개 뉴클레오티드일 수 있고, 및/또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 길이가 17 내지 30개 뉴클레오티드일 수 있다. 예를 들어, 상기 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 길이는 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오티드일 수 있고; 및/또는, 상기 작은 활성화 RNA의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 길이는 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오티드일 수 있고; 상기 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 길이는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 길이와 같을 수도, 다를 수도 있다.

[0049] 일부 구현예에서, 본 출원의 p21을 표적화하는 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 서열은 적어도 15개 뉴클레오티드 길이의 서열과 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥이 형성하는 염기 상보가 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥이 표적 유전자 프로모터 서열과 매칭되는 뉴클레오티드 서열 길이는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28개의 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단은 2개 뉴클레오티드의 오버행이 있을 수 있고, 상기 오버행의 2개 뉴클레오티드 중 적어도 하나는 표적 유전자 프로모터 서열과 상보적일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단은 1, 2, 또는 3개 뉴클레오티드의 오버행이 있을 수 있고, 예를 들어, 상기 오버행의 뉴클레오티드는 모두 표적 유전자 프로모터 서열과 상보적일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 영역과 표적 유전자 프로모터 서열의 암호화 가닥은 1개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 말단 뉴클레오티드와 표적 유전자 프로모터 서열의 암호화 가닥의 해당 위치에는 1개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 말단 뉴클레오티드와 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단은 1개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 5' 말단 뉴클레오티드와 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단은 1개 뉴클레오티드의 미스매치가 존재할 수 있다.

[0050] 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 서열은 SEQ ID NO: 5, 14, 15 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 서열은 SEQ ID NO: 6, 8, 11, 12, 13, 18 및 19로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 서열은 표 2에서 쌍을 이루는 서열로부터 선택될 수 있다.

[0051] 본 출원에서 제공하는 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA는 본 출원에서 상기 작은 활성화 RNA에 대해 수행하는 모든 상이한 유형의 화학적 변형을 적용하여, p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA가 더욱 우수한 약학적 특성을 나타낼 수 있도록 하는데, 여기에는, 예를 들어 saRNA 듀플렉스의 안정성, 더욱 낮은 면역 자극 및 더욱 적은 비표적 효과가 포함되며; 더욱 중요한 것은, 이러한 변형이 saRNA가 RNA 활성화를 유도하는 효능도 향상시킨다는 것이다. 일부 구현예에서, 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA의 화학적 변형은 일정한 면역자극 활성화, 예를 들어, 암 세포 증식을 억제하기 위해 충분한 면역자극 활성화, 예를 들어, 방광암 세포의 증식 억제를 유지해야 할 수 있다.

[0052] 일부 구현예에서, 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 예를 들어 2'-플루오로, 2'-메톡시, 2'-메톡시에틸, 2,4'-디니트로페놀, 잠금 핵산, 2'-아미노 변형 중 하나 또는 하나 이상을 포함하는, 뉴클레오티드의 리보오스 2'-OH에 대한 화학적 변형일 수 있고; 예를 들어 포스포로티오에이트 변형 또는 보라노포스페이트 변형을 포함하는, 뉴클레오티드 사이 포스포디에스테르 결합에 대한 화학적 변형일 수 있고; 어느 하나의 뉴클레오티드를 잠금 핵산(LNA)으로 치환할 수도 있거나; 또는 올리고뉴클레오티드의 5'-말단 뉴클레오

티드에 대해 수행하는 비닐포스포네이트 변형일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개, 또는 그 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100%의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 함유한다.

[0053] 일부 구현예에서, 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥을 구성하는 뉴클레오티드의 일부만이 화학적으로 변형된 뉴클레오티드이며, 예를 들어, 80% 이하, 75% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 또는 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 함유한다. 상기 화학적 변형은 뉴클레오티드의 리보오스 2'-OH에 대한 화학적 변형일 수 있고, 뉴클레오티드 사이의 포스포디에스테르 결합에 대한 화학적 변형일 수 있고, 뉴클레오티드의 염기에 대한 화학적 변형일 수 있고, 어느 하나의 뉴클레오티드가 잠금 핵산(LNA)으로 치환된 것일 수도 있거나, 또는 올리고뉴클레오티드의 5'-말단 뉴클레오티드에 대해 비닐포스포네이트 변형을 수행할 수 있다. 본 발명자는, 작은 활성화 RNA가 일정한 면역자극 활성을 갖도록 개선할 필요가 있을 때, 비교적 낮은 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드 비율, 예를 들어 80% 미만 또는 60% 미만을 선택하는 것이, 적합하다는 것을 발견하였다.

[0054] 일부 구현예에서, 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA를 구성하는 센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 함유한다. 상기 화학적 변형 유형은 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 동일하다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 또는 화학적으로 변형된 더 많은 뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100%의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥을 구성하는 모든 뉴클레오티드는 화학적으로 변형된 뉴클레오티드이다.

[0055] 일부 구현예에서, 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥을 구성하는 뉴클레오티드의 일부만이 화학적으로 변형된 뉴클레오티드일 수 있으며, 예를 들어, 80% 이하, 75% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 또는 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 상기 화학적 변형 유형은 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 동일하다.

[0056] 유사하게, 본 발명자는, 작은 활성화 RNA가 일정한 면역자극 활성을 갖도록 개선할 필요가 있을 때, 비교적 낮은 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드 비율, 예를 들어 80% 미만, 또는 60% 미만, 또는 40% 미만, 또는 20% 미만을 선택하는 것이, 적합할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0057] 본 발명자는, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드의 위치가 saRNA의 활성, 안정성, 면역자극성, 및/또는 비표적 효과에 영향을 미칠 수 있음을 발견하였다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 5'-말단에서의 1 내지 5개 뉴클레오티드가 일정 비율의 리보오스 2'-OH의 화학적 변형이 있을 수 있으며, 예를 들어, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 3'-말단에서의 1 내지 6개의 뉴클레오티드가 더 높은 비율의 리보오스 2'-OH의 화학적 변형이 있으며, 예를 들어, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개이다. 일부 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 가장 중앙의 1 내지 5개 뉴클레오티드가 더 높은 비율의 리보오스 2'-OH의 화학적 변형이 있을 수 있으며, 예를 들어, 가장 중앙의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 뉴클레오티드가 리보오스 2'-OH의 화학적 변형을 가질 수 있다.

[0058] 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA는 뉴클레오티드에서 리보오스의 화학적 변형, 예를 들어, 뉴클레오티드에서 리보오스 2'-OH의 화학적 변형을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 적어도 하나의 뉴클레오티드에서 리보오스 2'-OH는 2'-플루오로, 2'-메톡시, 2'-메톡시에틸, 2,4'-디니트로페놀, 잠금 핵산 및 2'-아미노 변형 중 하나 이상에 의해 치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기

p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 뉴클레오티드 사이의 적어도 하나의 포스포디에스테르 결합의 화학적 변형은 뉴클레오티드 사이의 포스포디에스테르 결합의 변형일 수 있고, 예를 들어 포스포로티오에이트 변형, 보라노포스페이트 변형, 또는 이들 둘의 조합일 수 있다.

- [0059] 일부 구현예에서, 본 출원에 따른 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합 중 하나는 화학적 변형이 있거나, 또는 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합이 모두 화학적으로 변형된 것이다. 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 포스포디에스테르 결합에 대한 변형은 당업계에서 일반적으로 사용하며, 여기에는 포스포디에스테르 결합의 비가교 산소 원자에 대해 수행하는 변형이 포함되나 이에 한정되지 않고, 예를 들어 포스포로티오에이트 변형(phosphorothioate, PS)와 보라노포스페이트 변형(boranophosphate)이 있다. 일부 구현예에서, 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 각각 황과 보란으로 포스포디에스테르 결합의 비가교 산소 원자를 치환할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 모두 황으로 포스포디에스테르 결합의 비가교 산소 원자를 치환, 즉 포스포로티오에이트(PS) 변형일 수 있다. 본 발명자는, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합이 모두 포스포로티오에이트 변형, 또는 보라노포스페이트 변형, 또는 이들 둘의 조합이고, 상기 작은 활성화 saRNA의 유전자 활성화 효능을 향상시킬 수 있음을 발견하였다. 일부 구현예에서, 상기 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 모두 포스포로티오에이트 변형, 또는 보라노포스페이트 변형, 또는 이들 둘의 조합일 수 있으며 작은 활성화 RNA 듀플렉스가 세포 증식을 억제하는 활성을 강화할 수 있고; 일부 구현예에서, 상기 작은 활성화 RNA는 p21 유전자를 표적화할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 암 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 암 세포는 방광암 세포를 포함할 수 있다.
- [0060] 일부 구현예에서, 본 출원에 따른 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합 중 하나는 화학적 변형이 있거나, 또는 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합이 모두 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 포스포로티오에이트 변형 또는 보라노포스페이트 변형 또는 이들 둘의 조합을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 모두 포스포로티오에이트 변형일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단 및 3' 말단의 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 모두 포스포로티오에이트 변형일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 가장 중앙의 1 내지 3개 뉴클레오티드가 더 높은 비율의 리보오스 2'-OH의 화학적 변형이 있으며, 예를 들어, 가장 중앙의 1개, 2개, 또는 3개 뉴클레오티드가 리보오스 2'-OH의 화학적 변형을 가질 수 있다.
- [0061] 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단 마지막 2개의 포스포디에스테르 결합은 포스포로티오에이트 결합에 의해 치환될 수 있고, 상기 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단 및 3' 말단의 2개의 뉴클레오티드는 2'-플루오로 화학적 변형일 수 있다.
- [0062] 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단의 마지막 2개 포스포디에스테르 결합 중 하나는 포스포로티오에이트 결합에 의해 치환될 수 있고, 5' 말단의 마지막 2개 포스포디에스테르 결합 중 하나는 포스포로티오에이트 결합에 의해 치환될 수 있고, 5' 말단의 5개 뉴클레오티드 중 3개는 2'-플루오로 또는 2'-메톡시 화학적 변형일 수 있고, 또한 3' 말단의 6개 뉴클레오티드 중 3개는 2'-플루오로 또는 2'-메톡시 화학적 변형일 수 있다.
- [0063] 일부 구현예에서, 상기 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단의 마지막 2개 포스포디에스테르 결합은 모두 포스포로티오에이트 결합에 의해 치환될 수 있고, 5' 말단의 마지막 2개 포스포디에스테르 결합도 모두 포스포로티오에이트 결합에 의해 치환될 수 있고, 5' 말단의 5개 뉴클레오티드 중 3개는 2'-플루오로 화학적 변형일 수 있고, 또한 3' 말단의 6개 뉴클레오티드 중 3개는 2'-플루오로 화학적 변형일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 5' 말단의 3번째, 4번째 및 5번째 뉴클레오티드는 2'-플루오로 화학적 변형이고, 또한 3' 말단의 2번째, 5번째 및 6번째 뉴클레오티드는 2'-플루오로 화학적 변형일 수 있다.
- [0064] 일부 구현예에서, 본 출원에 따른 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 화학적 변형 패턴은 도 1a로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 출원에 따른 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 화학적 변형 패턴은 도 1b로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 출원에 따른 p21을 표적화하는 작은 활성화 RNA의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 및 안티센스 올리고뉴클레

오티드 가닥의 화학적 변형 패턴은 도 2로부터 선택될 수 있다.

- [0065] 본 출원의 작은 활성화 RNA의 제조 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 제조 방법을 참조하여 개선할 수 있다. 작은 활성화 RNA를 제조하는 일부 실시예에서, 해당 제조 방법은 기본적으로, 1) 표적 유전자 프로모터 서열의 암호화 가닥을 템플릿으로 사용하고, 17 내지 28개 염기를 포함하는 서열을 표적 부위로 선택하는 단계; 2) 1) 단계에서 획득한 표적 부위 서열에 대응하는 RNA 서열을 기본 서열로 합성하여, 센스 올리고뉴클레오티드 가닥을 획득하는 단계; 3) 길이가 17 내지 30개 뉴클레오티드 길이인 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥을 합성하고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 적어도 15개 뉴클레오티드의 서열이 2) 단계에서 획득한 센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 상보적이도록 하는 단계; 및 4) 2) 단계에서 획득한 센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 3) 단계에서 획득한 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥을 동일한 몰수로 RNA 어닐링 버퍼에서 혼합, 가열한 후, 실온으로 자연 냉각하여, 이중 가닥의 작은 활성화 RNA를 획득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0066] 본 출원은 상기 작은 활성화 RNA를 암호화하는 단편을 포함하는 핵산 분자를 더 제공한다. 동시에 상기 작은 활성화 RNA 또는 상기 핵산 분자를 포함하는 세포를 제공한다.
- [0067] 선택적으로, 본 출원은 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA를 암호화하는 단편을 포함하는 핵산 분자를 더 제공한다. 동시에 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA 또는 상기 핵산 분자를 포함하는 세포를 제공한다.
- [0068] 본 출원은 약학 조성물을 더 제공하며, 상기 약학 조성물은 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 및 선택적으로, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 마찬가지로, 제제를 제공하며, 상기 제제는 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 또는 상기 세포, 또는 약학 조성물을 포함한다. 또한, 키트를 제공하며, 상기 키트는 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 또는 상기 세포, 또는 약학 조성물, 또는 상기 제제를 포함한다.
- [0069] 선택적으로, 상기 약학 조성물은 p21 유전자를 표적화하는 약학 조성물일 수 있으며, 여기에는 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA, 핵산 분자 및 선택적으로, 약학적으로 허용 가능한 담체가 포함된다. 선택적으로, 상기 제제는 p21 유전자를 표적화하는 제제일 수 있으며, 여기에는 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA, 핵산 분자, 세포, 또는 약학 조성물이 함유된다. 선택적으로, 상기 키트는 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA, 핵산 분자, 세포, 약학 조성물, 또는 제제를 함유할 수 있다.
- [0070] 본 출원에 따른 약학적으로 허용 가능한 담체는 지질 나노입자(LNP), 예를 들어 N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 글루코스(glucose), 만노스(mannose) 및 다른 적합한 당류 기를 함유하는 유기체 내 당류 수용체를 표적화하는 접합체, 상이한 지질 또는 폴리펩티드 기를 리간드로 하는 공유 접합체(covlent conjugates)와 같이 작은 핵산류 활성 분자 분야에 사용되는 지질을 기반으로 하는 포획 시스템을 포함할 수 있으며, 적합한 담체를 선택하면 작은 핵산 분자가 투여할 기관 또는 조직에 도달하는 데 도움이 될 뿐만 아니라, 작은 핵산 분자가 표적 세포, 심지어 예를 들어 이중 가닥 siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥(ASO)이 세포질로 진입하거나, saRNA 분자가 세포핵에 진입하는 것과 같이 하위 세포 구조로 진입하는 데 도움이 될 수 있고, 나아가 상응하는 작은 핵산 분자의 생물학적 조절 효과를 획득할 수 있다.
- [0071] 다양한 전달 기술에서, 지질 나노입자(LNP)는 통상적으로 이온화 가능 지질, 콜레스테롤, 인지질 및 PEG의 4가지 성분으로 구성될 수 있으며, 올리고뉴클레오티드를 효율적으로 캡슐화하고 뉴클레아제 소화로부터 이들을 보호하는 데 사용될 수 있다. 이온화 가능 지질 DLin-MC3-DMA(LNPs 제조에 가장 일반적으로 사용되는 양이온성 지질 중 하나) 또는 DLin-KC2-DMA를 사용하며, 지질 나노입자는 정맥 주사 후 올리고뉴클레오티드를 간으로 성공적으로 전달할 수 있다. 그러나, LNP 제형, 공정 및 제한된 표적 기관(간이 특이적이며, 전달 효율은 간>비장>신장 순이고, 정맥 주사 후 마우스의 십이지장, 폐, 심장 및 대뇌에서는 무시할 수 있는 정도로 누적됨)은 약학 조성물에서 LNP 기술의 응용을 제한한다.
- [0072] 본 출원에 따른 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA는 필요에 따라 지질 나노입자(LNP)와 제제, 또는 약학 조성물을 구성할 수 있다. LNP에 의해 포획되는 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA는, 간암을 치료하기 위해 간으로 전달되거나, 결장직장암, 전립선암 또는 방광암을 치료하기 위해 전신 또는 국소 투여 방식에 의해 결장직장, 전립선, 또는 방광으로 전달될 수 있다. RNA 분자 및 LNP의 조성물, 이의 제형, 및 이의 제조 방법은 예를 들어, US20190240354A1, US20190336452A1, US20160038612A1 등 당업계에서 이미 공개된 내용을 참조할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 출원은 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA와 LNP를 포함하는 제제를 제공하며, 방광을 통해 국소 투여되어 방광암을 치료할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 출원은 상기

p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA와 LNP를 포함하는 제제를 제공하며, 방광을 통해 주입되어 방광암을 치료할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 출원은 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA와 DLin-KC2-DMA 기반의 LNP를 포함하는 제제를 제공하며, 방광을 통해 주입되어 방광암을 치료할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 출원은 상기 p21 유전자를 표적화하는 작은 활성화 RNA와 DLin-KC2-DMA 기반의 LNP를 포함하는 제제를 제공하며, 방광을 통해 주입하여 비근침윤성 방광암(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)을 치료할 수 있다.

[0073] 본 출원은 복합 약학 조성물을 더 제공하며, 여기에는 상기 작은 활성화 RNA, 및 소분자 약물이 포함된다. 선택적으로, 상기 소분자 약물은 미토마이신 C(Mitomycin C) 또는 발루비신(Valrubicin)으로부터 선택된다. 일정한 약물 농도 하에서, 본 출원에 따른 작은 활성화 RNA는 미토마이신 C(Mitomycin C) 또는 발루비신(Valrubicin)과 같은 상기 소분자 약물과 상승 작용을 가질 수 있어, 방광암 세포 증식에 대한 더욱 강력한 억제 작용을 나타낸다.

[0074] 본 출원은 세포에서 p21 유전자의 발현을 활성화 또는 상향 조절하기 위한 약물 또는 제제의 제조에서 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 또는 상기 세포, 또는 약학 조성물, 또는 상기 복합 약학 조성물, 또는 상기 제제의 용도를 더 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 용도는 악성 종양 또는 양성 증식성 병변을 예방, 치료 또는 완화하는 약물 또는 제제를 제조하기 위한 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 악성 종양은 방광암, 전립선암, 간암 또는 결장직장암을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방광암은 비근침윤성 방광암을 포함할 수 있다.

[0075] 본 출원은 면역자극 활성을 갖는 약물의 제조에서 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 또는 상기 세포, 또는 약학 조성물, 또는 상기 복합 약학 조성물, 또는 상기 제제의 응용을 더 제공한다.

[0076] 본 출원은 악성 종양 또는 양성 증식성 병변을 예방, 치료 또는 완화하는 방법을 더 제공하며, 상기 방법은 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 또는 상기 세포, 또는 상기 약학 조성물, 또는 상기 복합 약학 조성물, 또는 상기 제제를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 악성 종양은 방광암, 전립선암, 간암 또는 결장직장암을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방광암은 비근침윤성 방광암(NMIBC)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 작은 활성화 RNA, 또는 상기 핵산 분자, 또는 상기 세포, 또는 약학 조성물, 또는 상기 복합 약학 조성물, 또는 상기 제제는 모두 p21 유전자를 표적화할 수 있다.

[0077] 요약하면, 화학적 변형은 saRNA 올리고뉴클레오티드의 약학적 특성을 개선할 수 있다. 최적화된 화학적 변형을 거치면 saRNA 듀플렉스의 안정성을 증가시키고, 이의 면역 자극을 억제하며, 비표적 효과를 감소시킬 수 있다. 가장 중요한 것은, 이러한 변형이 saRNA가 RNA 활성화를 유도하는 효능을 증가시킨다는 것이다. 화학적으로 변형된 작은 활성화 RNA와 다른 작은 분자 화학 요법 약물의 조합은 더 강력한 항종양 활성을 나타낸다.

[0078] 이하에서는 구체적인 설명을 통해, 본 출원을 더욱 상세하게 설명한다. 달리 정의되지 않는 한, 본 출원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 출원이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0079] 본 출원에서, 단수 형태 "하나", "해당"은 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수 대상을 포함한다.

[0080] 용어 정의

[0081] 본 출원에 사용된 용어 "상보적"은 2개의 올리고뉴클레오티드 가닥이 서로 염기 쌍을 형성하는 능력을 의미한다. 염기 쌍은 통상적으로 역평행 올리고뉴클레오티드 가닥의 뉴클레오티드 단위 사이의 수소 결합에 의해 형성된다. 상보적 폴리뉴클레오티드 가닥은 Watson-Crick 방식 염기 쌍(예를 들어, A에서 T, A에서 U, C에서 G), 또는 듀플렉스 형성을 허용하는 임의의 다른 방식(예를 들어 Hoogsteen 유형 또는 역방향 Hoogsteen 유형 염기 쌍)으로 염기 쌍을 형성할 수 있다. "100% 쌍 형성"은 100%의 상보성, 즉 2개 가닥의 뉴클레오티드 단위가 전부 서로 수소 결합됨을 의미한다.

[0082] 완전한 상보성 또는 100% 상보성은 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 분자의 이중 가닥 영역을 의미하며, 첫 번째 올리고뉴클레오티드 가닥의 각각의 뉴클레오티드 단위는 두 번째 올리고뉴클레오티드 가닥과 수소 결합을 형성할 수 있어 "미스매치"의 상황이 없다. 불완전한 상보성은 2개 가닥의 뉴클레오티드 단위가 완전히 서로 수소 결합을 형성할 수 없는 상황을 의미한다. 예를 들어, 1개 이중 가닥 영역이 20개 뉴클레오티드 길이의 올리고뉴클레오티드 가닥인 경우, 각각의 가닥 상에 2개의 염기 쌍만 서로 수소 결합할 수 있으면, 올리고뉴클레오티드 가닥은 10% 상보성을 나타낸다. 동일한 예시에서, 각각의 가닥 상의 18개 염기 쌍이 서로 수소 결합할 수 있으면, 올리고뉴클레오티드 가닥은 90% 상보성을 나타낼 수 있다. 기본적으로 상보성은 약 79%, 약 80%, 약 85%,

약 90%, 약 95% 이상의 상보성을 의미한다.

- [0083] 본 출원에 사용된 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드의 중합체를 의미하며, DNA, RNA 또는 DNA/RNA 혼성체의 단일 가닥 또는 이중 가닥 분자, 규칙적 및 불규칙적으로 교대되는 데옥시리보오스 모이어티와 리보오스 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 가닥(즉, 여기에서 대체 뉴클레오타이드 단위가 당 모이어티의 2' 위치에서 -OH, 그 다음 -H, 그 다음 -OH, 그 다음 -H 등을 가짐), 및 이러한 종류의 올리고뉴클레오타이드의 변형, 그 중 치환 또는 연결된 각종 엔티티 또는 모이어티와 임의 위치의 뉴클레오타이드 단위 및 천연적으로 존재하거나 비천연적으로 존재하는 가닥을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 출원에 따른 표적 유전자 전사 활성화를 위한 올리고뉴클레오타이드는 작은 활성화 RNA이다.
- [0084] 본 출원에 사용된 용어 "올리고뉴클레오타이드 가닥" 및 "올리고뉴클레오타이드 서열"은 호환될 수 있으며, 30개 이하 염기의 짧은 사슬 뉴클레오타이드의 총칭을 의미한다(데옥시리보핵산 DNA 또는 리보핵산 RNA 내의 뉴클레오타이드 포함). 본 출원에서, 올리고뉴클레오타이드 가닥의 길이는 17 내지 30개 뉴클레오타이드의 어느 하나의 길이일 수 있다.
- [0085] 본 출원에 사용된 용어 "유전자"는 폴리펩티드 가닥 또는 기능성 RNA를 생산하는 데 필요한 전체 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. "유전자"는 숙주 세포에 대해 내인성이거나 완전히 또는 부분적으로 재조합된 유전자일 수 있다(예를 들어, 프로모터를 암호화하는 외인성 올리고뉴클레오타이드와 암호화 서열을 도입하거나 내인성 암호화 서열에 인접한 이중 프로모터를 숙주 세포에 도입). 예를 들어, 용어 "유전자"는 엑손 및 인트론으로 구성될 수 있는 핵산 서열을 포함한다. 단백질을 암호화하는 서열은, 예를 들어, 개시 코돈과 종결 코돈 사이의 열린 해독 틀의 엑손 내에 포함된 서열이며, 본 출원에 사용된 바와 같이, "유전자"는 예를 들어 프로모터 서열, 예를 들어 프로모터, 인핸서 및 당업계에 공지된 다른 유전자의 전사, 발현 또는 활성을 제어하는 모든 기타 서열을 포함하며, 다른 유전자에 암호화 서열 또는 비암호화 서열이 포함되는지 여부는 상관없다. 이 경우, 예를 들어, "유전자"는 프로모터 또는 인핸서와 같은 조절 서열을 포함하는 기능성 핵산을 설명하는 데 사용될 수 있다. 재조합 유전자의 발현은 하나 이상의 이중 조절 서열에 의해 제어될 수 있다.
- [0086] 본 출원에 사용된 용어 "표적 유전자"는 유기체에 자연적으로 존재하는 핵산서열, 이식 유전자, 바이러스 또는 박테리아 서열, 염색체 또는 염색체 외 유전자일 수 있고/있거나 세포 및/또는 그 염색질에 일시적 또는 안정적으로 형질감염 또는 혼입될 수 있다. 표적 유전자는 단백질 암호화 유전자일 수 있으며, 비단백질 암호화 유전자(예를 들어 마이크로 RNA 유전자, 장쇄 비암호화 RNA 유전자)일 수도 있다. 표적 유전자는 통상적으로 프로모터 서열을 포함하고, 프로모터 서열과 동일성(상동성이라고도 함)을 갖는 작은 활성화 RNA를 설계하는 것은 표적 유전자에 대한 양성 조절을 구현할 수 있으며, 이는 표적 유전자 발현의 상향 조절로 나타난다. "표적 유전자 프로모터 서열"은 표적 유전자의 비암호화 서열을 의미하고, 본 출원에 언급된 "표적 유전자 프로모터 서열과 상보적"에서 표적 유전자 프로모터 서열은 서열의 해당 서열의 암호화 가닥을 의미하며, 비템플릿 가닥으로도 불리는데, 해당 유전자 암호화 서열과 동일한 서열의 핵산 서열이다.
- [0087] 본 출원에 사용된 용어 "암호화 가닥"은 전사를 수행할 수 없는 DNA 가닥을 의미하며, 해당 가닥의 뉴클레오타이드 서열은 전사에 의해 생성된 RNA의 서열과 일치하고(RNA에서 U로 DNA의 T를 치환하였음), 센스 가닥(sense strand)이라고도 한다. 본 출원에 따른 표적 유전자 프로모터 이중 가닥 DNA 서열의 암호화 가닥은 표적 유전자 DNA 암호화 가닥과 동일한 DNA 가닥 상의 프로모터 서열을 의미한다.
- [0088] 본 출원에 사용된 용어 "템플릿 가닥"은 표적 유전자의 이중 가닥 DNA에서 암호화 가닥과 상보적인 다른 가닥을 의미하며, 템플릿으로 사용하여 RNA의 해당 가닥으로 전사할 수 있고, 해당 가닥은 전사된 RNA 염기와 상보적이다(A-U, G-C). 전사 과정에서, RNA 중합효소는 템플릿 가닥과 결합하고, 템플릿 가닥의 3'→5' 방향을 따라 이동하며, 5'→3' 방향을 따라 RNA의 합성을 촉매한다. 안티센스 가닥(antisense strand), 네거티브 가닥이라고도 한다. 본 출원에 따른 표적 유전자 프로모터 이중 가닥 DNA 서열의 템플릿 가닥은 표적 유전자 DNA 템플릿 가닥과 동일한 DNA 가닥 상의 프로모터 서열을 의미한다.
- [0089] 본 출원에 사용된 용어 "동일성" 또는 "상동성"은 작은 활성화 RNA에서 그 중 하나의 올리고뉴클레오타이드 가닥(센스 가닥 또는 안티센스 가닥)이 표적 유전자의 프로모터 서열의 특정 영역의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥과 적어도 60%의 유사성을 가짐을 의미한다.
- [0090] 본 출원에 사용된 용어 "프로모터"는 단백질을 암호화하지 않는 핵산 서열을 의미하며, 단백질 암호화 또는 RNA 암호화 핵산 서열과 위치적으로 관련되어 이들의 전사에 조절 작용을 나타낸다. 통상적으로, 진핵 프로모터는 100 내지 5000개 염기 쌍을 포함하며, 그 길이 범위는 본 출원에 사용된 용어 "프로모터"를 제한하는 것을 의미

하지 않는다. 프로모터 서열은 일반적으로 단백질 암호화 또는 RNA 암호화 서열의 5' 말단에 위치하지만, 프로모터 서열은 엑손 및 인트론 서열에도 존재한다.

- [0091] 본 출원에서 사용되는 용어 "전사 개시 부위"는 유전자의 템플릿 상에 전사 개시를 표시하는 뉴클레오티드를 의미한다. 하나의 유전자는 하나보다 많은 전사 개시 부위를 가질 수 있다.
- [0092] 본 출원에 사용된 용어 "오버행", "overhang", "현수"는 호환될 수 있고, 말단(5' 또는 3') 비염기 쌍 뉴클레오티드를 지칭하며, 이는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 내로 연장되어 넘어서는 그 중 한 가닥의 다른 가닥에 의해 생성된 것일 수 있다. 듀플렉스 3' 및/또는 5' 말단을 넘어 연장되는 단일 가닥 영역은 오버행으로 칭할 수 있다.
- [0093] 본 출원에 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 활성화" 또는 "활성화 유전자"는 호환될 수 있으며, 유전자 전사 수준, mRNA 수준, 단백질 수준, 효소 활성, 메틸화 상태, 염색질 상태 또는 구성, 번역 수준, 또는 세포나 생물학적 시스템에서 이의 활성 또는 상태를 측정함으로써 특정 핵산 전사, 번역 또는 발현 또는 활성의 증가를 측정하는 것을 의미한다. 이러한 활성 또는 상태는 직접적 또는 간접적으로 측정될 수 있다. 또한, "유전자 활성화", "활성화 유전자"는 핵산 서열과 관련된 활성 증가를 의미하나, 이러한 활성이 발생하는 메커니즘이 어떠한지에 관계없이, 예를 들어 이는 조절 서열로서 조절 작용을 나타내고, RNA로 전사되며, 단백질로 번역되고 단백질의 발현을 증가시킨다.
- [0094] 본 출원에 사용된 바와 같이, 용어 "작은 활성화 RNA", "saRNA"는 호환될 수 있고, 유전자 발현을 촉진할 수 있는 리보핵산 분자를 지칭하며, 표적 유전자의 비암호화 핵산 서열(예를 들어 프로모터, 인핸서 등)과 서열 동일성을 갖는 리보핵산 분자 서열의 제1 리보핵산 가닥(안티센스 가닥, 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥으로도 칭함) 및 제1 가닥과 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 리보핵산 가닥(센스 가닥, 또한 센스 올리고뉴클레오티드 가닥으로도 칭함)으로 구성되고, 여기에서 상기 제1 가닥과 제2 가닥은 듀플렉스를 형성한다. 작은 활성화 RNA는 이중 가닥 영역 헤어핀 구조를 형성할 수 있는 단일 가닥 RNA 분자로 구성될 수도 있으며, 여기에서 제1 영역은 유전자의 프로모터 표적 서열과 서열 동일성을 갖는 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제2 영역에 포함된 리보뉴클레오티드 서열은 제1 영역과 상보적이다. 작은 활성화 RNA 분자의 듀플렉스 영역 길이는 통상적으로 약 10 내지 약 50개 염기 쌍, 약 12개 내지 약 48개 염기 쌍, 약 14개 내지 약 46개 염기 쌍, 약 16개 내지 약 44개 염기 쌍, 약 18개 내지 약 42개 염기 쌍, 약 20개 및 약 40개 염기 쌍, 약 22개 및 약 38개 염기 쌍, 약 24개 및 약 36개 염기 쌍, 약 26개 및 약 34개 염기 쌍, 약 28개 및 약 32개 염기 쌍, 통상적으로 약 10개, 약 15개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 35개, 약 40개, 약 45개, 약 50개 염기 쌍이다. 또한, 용어 "saRNA" 및 "작은 활성화 RNA"는 리보뉴클레오티드 모이어티를 제외한 핵산을 더 함유하며, 여기에는 변형된 뉴클레오티드 또는 유사체가 포함되나 이에 한정되지 않는다.
- [0095] 본 출원에 사용된 바와 같이, 용어 "센스 가닥" 및 "센스 올리고뉴클레오티드 가닥"은 호환될 수 있으며, 작은 활성화 RNA 듀플렉스에서 표적 유전자의 프로모터 서열의 암호화 가닥과 동일성을 갖는 제1 리보핵산 가닥을 지칭한다.
- [0096] 본 출원에 사용된 바와 같이, 용어 "안티센스 가닥" 및 "안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥"은 호환될 수 있으며, 작은 활성화 RNA 듀플렉스에서 센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 상보적인 제2 리보핵산 가닥을 지칭한다.
- [0097] 본 출원에 사용된 바와 같이, 용어 "기본 서열"은 작은 활성화 RNA의 제조 방법에서 표적 유전자 프로모터 이중 가닥 DNA 서열의 암호화 가닥을 템플릿으로 사용하고, 17 내지 30, 예를 들어 19개 염기를 포함하는 서열을 표적 부위로 선택하여, 획득된 표적 부위 서열에 대응하는 RNA 서열을 기본 서열로 합성하는 것을 지칭하며, 상기 기본 서열은 표적 유전자 프로모터 이중 가닥 DNA 서열의 암호화 가닥 상의 서열과 완전히 일치할 수 있고, 60% 이상의 상동성을 가질 수도 있다.
- [0098] 본 출원에 사용된 바와 같이, 용어 "합성"은 RNA의 합성 방식을 지칭하며, 화학적 합성, 생체외 전사 등과 같이 RNA를 합성할 수 있는 모든 방식을 포함한다.
- [0099] 본 출원에 사용된 바와 같이, 용어 "유도 서열"은 특정한 올리고뉴클레오티드 서열이 화학적으로 변형된 후에 획득되는 올리고뉴클레오티드 서열을 지칭한다.
- [0100] 재료 및 방법
- [0101] 이중 가닥 saRNA 및 형질감염: 이중 가닥 saRNA는 GenePharm(중국 상하이) 또는 GeneScript(중국 난징)에 의해 화학적으로 합성되었다.

[0102] 세포 배양 및 형질감염

[0103] 인간 방광암 세포 Ku-7-LG(ATCC), J82(ATCC) 및 T24(ATCC)는 모두 McCoy 배지(Gibco)에서 배양하였으며, 배지에는 10% 송아지 혈청(Sigma-Aldrich) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)이 함유되었다. 세포는 5%의 CO<sub>2</sub>, 37°C 조건 하에서 배양하였다. Ku-7-LG, J82 및 T24 세포는 12-웰 플레이트에 웰당 10 X 10<sup>4</sup>로 플레이팅하고, 제조업체의 지침에 따라, RNAiMax(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 10nM(달리 명시되지 않는 한) 농도로 작은 RNA를 형질감염시켰으며, 형질감염 시간은 3일이고, 각각의 처리에는 2개의 복제 웰을 사용하였다. 모든 saRNA 서열은 표 2에 나열하였다.

[0104] 2단계법 RT-qPCR

[0105] 형질감염 종료 후, 배지를 버리고, 웰당 세포 용해액 500 µl를 첨가하였으며, 실온에서 5분 동안 배양하였다. Qiagen RNeasy 키트로 RNA를 추출하고, 역전사 후 ABI 7500 신속 실시간(Fast Real-time) PCR 시스템(Applied Biosystems)에서 qPCR 분석을 수행하였으며, 각각의 시료는 3개의 복제 웰 증폭을 반복하였고, PCR 반응 조건은 표 5와 같다.

**표 5**

**역전사(RT) 반응 제조**

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| <b>시약(RT 반응1)</b>                | <b>부피</b> |
| 5 × gDNA Eraser 버퍼               | 2 µl      |
| gDNA Eraser                      | 1 µl      |
| 총량 RNA(1 µg)+ D.W                | 7 µl      |
| 최종 부피                            | 10 µl     |
| 42°C 2 min, 4°C에 저장              |           |
| <b>시약(RT 반응2)</b>                |           |
| 5×PrimeScript 버퍼 2               | 4 µl      |
| PrimeScript RT 효소 혼합물1           | 1 µl      |
| RT 프라이머 혼합물                      | 1 µl      |
| RNase dH <sub>2</sub> O 없음       | 4 µl      |
| RT 반응 1                          | 10 µl     |
| 최종 부피                            | 20 µl     |
| 37°C 15 min, 85°C 5 sec, 4°C에 저장 |           |

[0106]

[0107] PCR 반응 조건은 95°C에서 30초, 95°C에서 5초, 60°C에서 30초이며 40회 주기로 증폭하였다. 동시에 GAPDH 유전자를 증폭하여 내부 참조로 사용하였고, 그 중 p21은 p21 F1/R1 프라이머 쌍으로 증폭하였으며, 증폭 프라이머의 구체적인 서열은 표 1과 같다.

[0108] 대조군 처리에 대한 특정 saRNA 형질감염 시료의 p21(표적 유전자)의 발현 값(Erel)을 계산하기 위해, 공식 1을 이용해 표적 유전자 및 1개의 내부 기준 유전자의 Ct 값을 대입하였다.

[0109] 
$$E_{rel} = 2^{-(Ct_{Tm}-Ct_{Ts})} / 2^{-(Ct_{Rm}-Ct_{Rs})}$$
 (공식 1)

[0110] 여기에서, Ct<sub>Tm</sub>은 대조군 처리 시료로부터의 표적 유전자의 Ct 값이고, Ct<sub>Ts</sub>는 saRNA 처리 시료로부터의 표적 유전자의 Ct 값이고, Ct<sub>Rm</sub>은 대조군 처리 시료로부터의 내부 기준 유전자의 Ct 값이고, Ct<sub>Rs</sub>는 saRNA 처리 시료로부터의 내부 기준 유전자의 Ct 값이다.

**표 1**

qRT-PCR 분석의 프라이머 서열

| 프라이머 명칭  | 서열번호        | 서열(5'-3')             |
|----------|-------------|-----------------------|
| GAPDH F  | SEQ ID NO 1 | ATCACCATCTCCAGGAGCGA  |
| GAPDH R  | SEQ ID NO 2 | TTCTCCATGGTGGTGAAGACG |
| CDKN1A F | SEQ ID NO 3 | GGAAGACCATGTGGACCTGT  |
| CDKN1A R | SEQ ID NO 4 | GGATTAGGGCTTCCTCTTGG  |

[0111]

[0112] 세포자살 검출

[0113] RAG1-40-31은 0.1, 1, 10 및 25nM로 J82 세포를 형질감염시키고, 형질감염 24시간 후 PBMC 세포가 함유된 새로운 배지로 교체하였고, PBMC와 J82 세포를 48시간 동안 공동 배양한 후 상청액을 버리고 세포를 수집하였으며, 각각의 웰에 500 µl PBS를 첨가하여 1회 세척하고, PBS를 버렸으며, 각각의 웰에 100 µl 트립신을 첨가하고, 900 µl 배지를 첨가하여 소화를 종료하고 1.5mL 원심분리관으로 옮겨, 원심분리하여(400rcf, 5분) 모든 세포를 수집하고 계수하였다(1내지 2X10<sup>5</sup> 개 세포/100 µL 바인딩 버퍼(Binding Buffer)). 각각 100 µL의 1X 바인딩 버퍼 r(B&D Systems, 51-66121E), 5 µL FITC Annexin V(B&D Systems, 51-65874X) 및 5 µL PI(B&D Systems, 51-66211E)를 첨가하고 실온에서 차광하여 15분 동안 배양하였고, 배양 종료 후 100 µL의 1X 바인딩 버퍼를 첨가하여 균일하게 혼합하여 96-웰 플레이트로 옮겨 유세포 분석기(Beckman Coulter)로 분석하였으며, 시료는 1시간 이내에 분석을 종료하였다.

[0114] 세포주기 검출

[0115] 세포 형질감염 종료 후 상청액을 버리고 세포를 수집하였으며, 각각의 웰에 500 µl PBS를 첨가하여 1회 세척하고, PBS를 버렸으며, 각각의 웰에 100 µl 트립신을 첨가하고, 900 µl 배지를 첨가하여 소화를 종료시키고 1.5mL 원심분리관으로 옮겨, 원심분리를 수행하여(400rcf, 5분) 모든 세포를 수집하고 계수하였다(2X10<sup>5</sup> 개 세포/200 µL PBS). 차가운 70% 무수 에탄올을 첨가하고 4°C에서 밤새 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 200 µL Krishan 버퍼를 첨가하였으며, 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, 상청액을 버리고 200 µL PBS를 첨가하여 세포를 재현탁하였고, 세포를 96-웰 플레이트로 옮겨 유세포 분석기로 분석하였다. 수집된 데이터는 MotFit 소프트웨어로 분석하였다.

[0116] 세포증식 분석(CCK8)

[0117] 세포를 96-웰 플레이트에 2 내지 4X10<sup>3</sup> 개 세포/웰로 플레이팅하여, 밤새 배양하고, 올리고뉴클레오티드 듀플렉스를 형질감염시켰다. 형질감염 3일 후, CCK8(Dojindo)을 사용하여, 그 설명서에 따라 세포 증식을 검출하였다. 실험 단계를 간략하게 설명하면, 10 µL CCK8 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 배양한 후, 마이크로플레이트 리더를 사용하여 450nm 지점에서 흡광도를 측정하였다.

[0118] saRNA 안정성 분석

[0119] RNase A(Amresco, OH, USA)가 함유된 PBS에서 saRNA(1.5 µL, 10 µM)를 0.02mg/mL 최종 농도로 37°C 하에서 상이한 시간 동안 배양하였다. 배양이 종료되면, 혼합물을 액체 질소에서 급속 동결시켜 뉴클레아제 활성을 중지시켰다. 샘플을 4% 아가로스 겔 상에서 분석하고 듀플렉스의 분해 정도를 검출하였다.

- [0120] 비표적 효과 분석(플라스미드 구축 및 루시퍼라아제 활성 분석)
- [0121] Rag1-40 표적 서열을 포함하는 하나의 26bp 단편을 안티센스 방향으로 pmirGLO 이중 루시퍼라아제 벡터 (Promega, Fitchburg, WI)의 반딧불이 루시퍼라아제의 3' 비번역 영역의 다중 클로닝 부위(MCS)에 클로닝하여, pOff-표적 플라스미드를 제조하였다. 삽입물을 생성하기 위한 모든 올리고뉴클레오티드 서열을 표 4에 나열하였다. 대장균 형질전환 및 배양 배양을 거친 후, 각각의 구축물의 플라스미드를 표준 방법으로 제조하였다. Lipofectamine 3000(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 각각의 플라스미드를 COS-1 원숭이 신장 상피 세포로 형질감염시켰다. 이어서, RNAi MAX를 사용하여 saRNA를 형질감염시켰다. 24시간 배양 후, 1X 용해 버퍼로 COS-1 세포를 용해시키고, 제조업체의 설명서에 따라 이중 루시퍼라아제 리포터 유전자 측정 시스템(Promega, WI, USA)으로 루시퍼라아제 활성을 측정하였다.
- [0122] 면역자극 측정(PBMC 사이토카인 방출 측정)
- [0123] 인간 말초 혈액 단핵 세포(Allcells, Alameda, CA)를 약  $10 \times 10^4$  개 세포/웰의 밀도로 96-웰 마이크로플레이트에 접종하였다. 제조업체의 설명서에 따라 RNAiMAX(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 dsRNA의 형질감염을 수행하였다. 24시간 형질감염 후 상정액을 수집하고, ELISA 키트(R&D Systems)를 사용하여 IFN- $\alpha$  및 TNF- $\alpha$  생산을 즉시 분석하였다. 각각의 처리 성분 3개 분량을 분석하였다.
- [0124] 통계 분석
- [0125] 결과는 평균±표준 편차로 나타낸다. GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad Software)를 사용하여 일원 분산 분석을 수행한 후, Tukey's t 테스트를 수행하여 통계 분석을 실시하였다. 통계학적 유의성에 대한 기준은 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  및 \*\*\* $p < 0.001$ 로 설정하였다.
- [0126] 하기의 실시예는 어떠한 이론에 의해서도 제한되지 않으며, 이는 본 출원의 융합 단백질, 제조 방법 및 용도를 설명하기 위한 것일 뿐이므로, 본 출원 발명의 범위를 한정하지 않는다.
- [0127] 실시예
- [0128] 하기 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 실시예는 설명의 목적으로만 제공되며, 어떠한 방식으로든 본 출원의 범위나 내용을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0129] 실시예 1 saRNA의 화학적 변형
- [0130] 표 2, 도 1 및 2에 도시된 바와 같이, saRNA의 화학적 변형은 각각 2'-O-메틸(2'Me), 2'-플루오로(2'F), 포스포티오에이트를 적용한 포스포디에스테르 결합(PS) 변형, 리보뉴클레오티드의 테옥시리보핵산(DNA) 치환의 4가지 유형의 화학적 변형 또는 Rag1-40 saRNA의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥(RAG1-SS-S6) 및 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥(RAG1-SS-AS2)에 대해 수행하는 상이한 조합의 변형을 포함하며, 4가지 센스 유도 서열(RAG1-SS-S6A 내지 RAG1-SS-S6D) 및 10가지 안티센스 유도 서열(RAG1-SS-AS2A 내지 RAG1-SS-AS2J)을 생서하였다(도 1).

표 2

saRNA 의 화학적 변형

| 명칭             | 서열번호         | 서열(5'-3') a-d                              | 길이    |
|----------------|--------------|--|-------|
| Rag1-4<br>0-1  | SEQ ID NO 5  | mCmCAACUCAUUCUCCAAGmUmC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 6  | fUAFcfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGGfCA              | 21 nt |
| Rag1-4<br>0-2  | SEQ ID NO 5  | mCmCAACUCAUUCUCCAAGmUmC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 7  | fUACUfUGGAGAAfUGAGUfUGGfCA                 | 21 nt |
| Rag1-4<br>0-3  | SEQ ID NO 5  | mCmCAACUCAUUCUCCAAGmUmC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 8  | fUmAfCfUfUmGmGmAmGmAmAfUmGmAmGfUfUmGmGfCmA | 21 nt |
| Rag1-4<br>0-4  | SEQ ID NO 5  | mCmCAACUCAUUCUCCAAGmUmC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 9  | fUACUfUGGAGAAfUGAGUfUGG*fc*A               | 21 nt |
| Rag1-4<br>0-5  | SEQ ID NO 5  | mCmCAACUCAUUCUCCAAGmUmC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 10 | UACUfUGGAGAAfUGAGUfUGG*fc*A                | 21 nt |
| Rag1-4<br>0-6  | SEQ ID NO 5  | mCmCAACUCAUUCUCCAAGmUmC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 11 | fU*A*fcfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fc*A          | 21 nt |
| Rag1-4<br>0-7  | SEQ ID NO 5  | mCmCAACUCAUUCUCCAAGmUmC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 12 | U*A*fcfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fc*A           | 21 nt |
| Rag1-4<br>0-8  | SEQ ID NO 5  | mCmCAACUCAUUCUCCAAGmUmC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 13 | fUactfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fc*A              | 21 nt |
| Rag1-4<br>0-9  | SEQ ID NO 14 | fcfCAACUCAUUCUCCAAGfUfC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 6  | fUAFcfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGGfCA              | 21 nt |
| Rag1-4<br>0-10 | SEQ ID NO 14 | fcfCAACUCAUUCUCCAAGfUfC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 7  | fUACUfUGGAGAAfUGAGUfUGGfCA                 | 21 nt |
| Rag1-4<br>0-11 | SEQ ID NO 14 | fcfCAACUCAUUCUCCAAGfUfC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 8  | fUmAfCfUfUmGmGmAmGmAmAfUmGmAmGfUfUmGmGfCmA | 21 nt |

[0131]

|                |              |  |       |
|----------------|--------------|--|-------|
| Rag1-40-<br>12 | SEQ ID NO 14 | fcfCAACUCAUUCUCCAAGfUfC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 9  | fUACUfUGGAGAAfUGAGUfUGG*fc*A               | 21 nt |
| Rag1-40-<br>13 | SEQ ID NO 14 | fcfCAACUCAUUCUCCAAGfUfC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 10 | UACUfUGGAGAAfUGAGUfUGG*fc*A                | 21 nt |
| Rag1-40-<br>14 | SEQ ID NO 14 | fcfCAACUCAUUCUCCAAGfUfC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 11 | fU*A*fcfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fc*A          | 21 nt |
| Rag1-40-<br>15 | SEQ ID NO 14 | fcfCAACUCAUUCUCCAAGfUfC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 12 | U*A*fcfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fc*A           | 21 nt |
| Rag1-40-<br>16 | SEQ ID NO 14 | fcfCAACUCAUUCUCCAAGfUfC                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 13 | fUactfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fc*A              | 21 nt |
| Rag1-40-<br>17 | SEQ ID NO 15 | mCmCAACUCAUUCUCCAAG*U*C                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 6  | fUAFcfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGGfCA              | 21 nt |
| Rag1-40-<br>18 | SEQ ID NO 15 | mCmCAACUCAUUCUCCAAG*U*C                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 7  | fUACUfUGGAGAAfUGAGUfUGGfCA                 | 21 nt |
| Rag1-40-<br>19 | SEQ ID NO 15 | mCmCAACUCAUUCUCCAAG*U*C                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 8  | fUmAfCfUfUmGmGmAmGmAmAfUmGmAmGfUfUmGmGfCmA | 21 nt |
| Rag1-40-<br>20 | SEQ ID NO 15 | mCmCAACUCAUUCUCCAAG*U*C                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 9  | fUACUfUGGAGAAfUGAGUfUGG*fc*A               | 21 nt |
| Rag1-40-<br>21 | SEQ ID NO 15 | mCmCAACUCAUUCUCCAAG*U*C                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 10 | UACUfUGGAGAAfUGAGUfUGG*fc*A                | 21 nt |
| Rag1-40-<br>22 | SEQ ID NO 15 | mCmCAACUCAUUCUCCAAG*U*C                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 11 | fU*A*fcfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fc*A          | 21 nt |
| Rag1-40-<br>23 | SEQ ID NO 15 | mCmCAACUCAUUCUCCAAG*U*C                    | 19 nt |
|                | SEQ ID NO 12 | U*A*fcfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fc*A           | 21 nt |

[0132]

|            |                              |   |                |
|------------|------------------------------|---|----------------|
| Rag1-40-24 | SEQ ID NO 15<br>SEQ ID NO 13 | mCmCAACUCAUUCUCCAAG*U*C<br>fUactfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fC*A              | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-25 | SEQ ID NO 16<br>SEQ ID NO 6  | fCfCAACUCAUUCUCCAAG*U*C<br>fUAfCfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGGfCA              | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-26 | SEQ ID NO 16<br>SEQ ID NO 7  | fCfCAACUCAUUCUCCAAG*U*C<br>fUACUfUGGAGAAfUGAGfUfUGGfCA                | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-27 | SEQ ID NO 16<br>SEQ ID NO 8  | fCfCAACUCAUUCUCCAAG*U*C<br>fUmAfCfUfUmGmGmAmGmAmAfUmGmAmGfUfUmGmGfCmA | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-28 | SEQ ID NO 16<br>SEQ ID NO 9  | fCfCAACUCAUUCUCCAAG*U*C<br>fUACUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fC*A              | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-29 | SEQ ID NO 16<br>SEQ ID NO 10 | fCfCAACUCAUUCUCCAAG*U*C<br>UACUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fC*A               | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-30 | SEQ ID NO 16<br>SEQ ID NO 11 | fCfCAACUCAUUCUCCAAG*U*C<br>fU*A*fCfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fC*A          | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-31 | SEQ ID NO 16<br>SEQ ID NO 12 | fCfCAACUCAUUCUCCAAG*U*C<br>U*A*fCfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fC*A           | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-32 | SEQ ID NO 16<br>SEQ ID NO 13 | fCfCAACUCAUUCUCCAAG*U*C<br>fUactfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fC*A              | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-33 | SEQ ID NO 17<br>SEQ ID NO 18 | CCAACUCAUUCUCCAAGUC<br>UactUGGAGAAUGAGUUGGCA                          | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-34 | SEQ ID NO 17<br>SEQ ID NO 19 | CCAACUCAUUCUCCAAGUC<br>UacttgAGAAUGAGUUGGCA                           | 19 nt<br>21 nt |
| Rag1-40-53 | SEQ ID NO 24<br>SEQ ID NO 25 | mCmCAACfUCAfUfUcFUCCAAG*mU*mC<br>fUAfCfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGG*fC*fA     | 19 nt<br>21 nt |

[0133]

[0134] <sup>a</sup> 소문자 뉴클레오티드(Lower case) = DNA; <sup>b</sup> m = 2'OMe; <sup>c</sup> f = 2'F; <sup>d</sup> \* = 포스포로티오에이트(phosphothioate, PS)

[0135] 여기에서, 센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 각각 다음과 같다:

[0136] 1) RAG1-SS-S6A의 5' 및 3' 말단에 각각 2개의 2' 메톡시 변형이 있다.

[0137] 2) RAG1-SS-S6B의 5' 및 3' 말단에 각각 2개의 2'-플루오로 변형이 있다.

[0138] 3) RAG1-SS-S6C는 RAG1-SS-S6A에서 유래되며, 포스포로티오에이트 결합으로 마지막 2개의 3' 말단 포스포디에스테르 결합을 치환한다.

[0139] 4) RAG1-SS-S6D는 RAG1-SS-S6B에서 유래되며, 포스포로티오에이트 결합으로 마지막 2개의 3' 말단 포스포디에스테르 결합을 치환한다.

[0140] 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 각각 다음과 같다:

[0141] 1) RAG1-SS-AS2A는 5' 말단에서 시작해 1번째, 3번째, 4번째, 5번째, 12번째, 16번째, 17번째, 20번째 위치에 각각 2'-플루오로 변형이 있는데, 즉 총 8개의 2'-플루오로 변형을 포함한다.

[0142] 2) RAG1-SS-AS2B는 5' 말단에서 시작해 1번째, 5번째, 12번째, 16번째, 20번째 위치에 각각 2'-플루오로 변형이 있는데, 즉 총 5개의 2'-플루오로 변형을 포함한다.

[0143] 3) RAG1-SS-AS2C는 완전히 변형되며 RAG1-SS-AS2에서 유래하고, 5' 말단에서 시작해 2번째, 6번째, 7번째, 8번째, 9번째, 10번째, 11번째, 13번째, 14번째, 15번째, 18번째, 19번째, 및 20번째에서 각각 2'OMe 변형이 도입된다.

[0144] 4) RAG1-SS-AS2D는 RAG1-SS-AS2B에서 유래되며, PS로 마지막 2개의 3' 말단 포스포디에스테르 결합을 치환한다.

[0145] 5) RAG1-SS-AS2E는 RAG1-SS-AS2D에서 유래되며, 이의 5' 말단에서 시작해 1번째 뉴클레오티드에는 2'F 변형이 결합된다.

[0146] 6) RAG1-SS-AS2F는 RAG1-SS-AS2A에서 유래되며, PS로 5' 말단 1번째 및 3' 말단 마지막 2개 포스포디에스테르 결합을 치환한다.

[0147] 7) RAG1-SS-AS2G는 RAG1-SS-AS2F에서 유래되며, 이의 5' 말단에서 시작해 1번째 뉴클레오티드에는 2'F 변형이 결합된다.

- [0148] 8) RAG1-SS-AS2H는 RAG1-SS-AS2D와 유사하나, 5' 말단에서 시작해 2번째, 3번째, 4번째 위치에 있는 3개의 리보뉴클레오티드가 테옥시뉴클레오티드로 대체되고, 5' 말단에서 시작해 17번째 위치에 2'-플루오로 변형을 갖는다.
- [0149] 9) RAG1-SS-AS2I는 5' 말단에서 시작해 2번째, 3번째 및 4번째 위치에서 3개의 테옥시뉴클레오티드를 함유한다.
- [0150] 10) RAG1-SS-AS2J는 5' 말단에서 시작해 2번째, 3번째, 4번째, 5번째, 6번째 및 7번째 위치에서 6개의 테옥시뉴클레오티드를 함유한다.
- [0151] 각각의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 유도 서열은 앞 8개 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 유도 서열(RAG1-SS-AS2A-RAG1-SS-AS2H)과 어닐링하여, 총 32개의 듀플렉스를 생성하고, 각각의 듀플렉스는 고유한 변형 패턴을 갖는다(도 2). 또한, 변형되지 않은 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 RAG1-SS-S6은 RAG1-SS-AS2I 및 RAG1-SS-AS2J와 어닐링하여 2개의 추가 듀플렉스(Rag1-40-33 및 Rag1-40-34)를 생성한다(도 2).
- [0152] **실시예 2 화학적 변형은 RNase 및 소변에서 듀플렉스의 안정성을 유의하게 증가시켰음**
- [0153] 뉴클레아제의 존재 하에서 saRNA RAG1-40-38 듀플렉스의 안정성을 평가하기 위하여, 듀플렉스를 0.02 µg/µL의 RNase A 용액에서 0 내지 1시간의 상이한 시간 구간 동안 배양하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, 이중 가닥 saRNA는 5분 이내에 분해되기 시작하여 1시간 이내에 완전히 분해되었다.
- [0154] 화학적으로 변형된 모든 듀플렉스(Rag1-40-1 내지 Rag1-40-32)를 각각 0.02 µg/µL의 RNase A와 함께 상이한 시간(0 내지 96시간) 동안 배양하였다. 배양이 종료되면, 아가로스 겔 전기영동으로 듀플렉스의 크기 및 양을 검출하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 32개의 유도 서열에서, 20개의 이중 가닥 saRNA(62.5%)가 96시간에 분해의 징후를 매우 적게 또는 전혀 나타내지 않았으며, 여기에는 Rag1-40-1, Rag1-40-3, Rag1-40-6, Rag1-40-7, Rag1-40-8, Rag1-40-9, Rag1-40-11, Rag1-40-14, Rag1-40-15, Rag1-40-16, Rag1-40-17, Rag1-40-19, Rag1-40-22, Rag1-40-23, Rag1-40-24, Rag1-40-25, Rag1-40-27, Rag1-40-30, Rag1-40-31 및 Rag1-40-32가 포함되었고, 나머지 12개(37.5%) 이중 가닥 saRNA 유도 서열(Rag1-40-2, Rag1-40-4, Rag1-40-5, Rag1-40-10, Rag1-40-12, Rag1-40-13, Rag1-40-18, Rag1-40-20, Rag1-40-21, Rag1-40-26, Rag1-40-28, Rag1-40-29)은 24시간 내에 완전히 분해되었다. 이러한 데이터는, 화학적 변형을 합리적으로 사용하면 saRNA 듀플렉스의 안정성을 유의하게 연장할 수 있음을 나타낸다.
- [0155] 또한 도 4의 데이터를 추가로 분석하면, 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 RAG1-SS-AS2B, RAG1-SS-AS2D 및 RAG1-SS-AS2E(예를 들어, Rag1-40-2, Rag1-40-4, Rag1-40-5, Rag1-40-10, Rag1-40-12, Rag1-40-13, Rag1-40-18, Rag1-40-20, Rag1-40-21, Rag1-40-26, Rag1-40-28, Rag1-40-29)의 듀플렉스는 모두 24시간 이내에 분해되었으며, 나머지 듀플렉스는 96시간 이내에 안정적이었음을 알 수 있다. 이 3개의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥(RAG1-SS-AS2B, RAG1-SS-AS2D 및 RAG1-SS-AS2E)의 차이는 이들이 뉴클레오티드의 5' 말단으로부터 3번째, 4번째, 또는 17번째 위치 뉴클레오티드의 2'F 변형이 결실되었다는 것이다. 따라서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 상에서 이러한 5' 말단 근처 및 3' 말단 근처 위치의 2'F 변형은 안정성에 매우 중요하다.
- [0156] 사람의 소변에서 화학적으로 변형된 이중 가닥 saRNA의 안정성을 추가로 테스트하기 위하여, 듀플렉스를 소변에서 0 내지 48시간의 상이한 시간 구간 동안 배양하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, 화학적으로 변형되지 않은 Rag1-0과 Rag1-40은 24시간 이내에 대부분 분해되었으며 48시간 이내에 완전히 분해되었다. 또한 선택된 8가지 화학적으로 변형된 유도 서열 Rag1-40(Rag1-40-23, Rag1-40-25, Rag1-40-31, Rag1-40-17, Rag1-40-22, Rag1-40-7)은 48시간 이내에 유의한 분해 징후가 없었으나; 반면 Rag1-40-26 및 Rag1-40-29는 48시간 후 대부분 분해되었다. RNase A 안정성 분석과 일치하였으며, 해당 데이터는 화학적 변형의 합리적인 사용이 소변에서 saRNA 듀플렉스의 안정성을 향상시킬 수도 있음을 나타낸다.
- [0157] **실시예 3 구조가 최적화된 saRNA RAG1-40은 세포 증식 억제제의 작용을 강화하고 비표적 효과를 감소시킴**
- [0158] RAG1-0은 CDKN1A(p21)의 표적 서열이며, 이의 구조 최적화를 통해, 16개의 saRNA, 즉 RAG1-29, RAG1-30, RAG1-31, RAG1-32, RAG1-33, RAG1-34, RAG1-35, RAG1-36, RAG1-37, RAG1-38, RAG1-39, RAG1-40, RAG1-41, RAG1-42, RAG1-43, RAG1-44를 획득하였다.
- [0159] 도 6a는 구조가 최적화된 saRNA가 10nM로 Ku-7-LG 세포를 3일 동안 형질감염시킨 후 p21 mRNA의 발현 수준을 도시한 것이다. 대조군과 비교하여, 모든 saRNA는 더 높은 활성을 나타냈다. 표적 서열 RAG1-0과 비교하여, 모든 saRNA의 활성은 RAG1-0보다 낮았지만, 여전히 비교적 높은 활성을 유지하였다(2배 초과). 도 6b는 RAG1-40의 세포 증식률(32.4%)이 RAG1-0(48.9%)보다 낮아야 함을 보여주며, 이는 RAG1-40이 세포 증식 억제제의 작용을 강화함

을 의미한다. 도 6c는 RAG1-40의 루시퍼라아제의 활성(0.84배)이 RAG1-0(0.77배)보다 높아야 함을 보여주며, 이는 RAG1-40의 비표적 효과가 RAG1-0보다 낮아야 함을 의미한다. 상기 결과는 표적 서열 RAG1-0에 비해, 구조가 최적화된 RAG1-40이 세포 증식 억제의 작용을 강화하고 비표적 효과를 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

**[0160] 실시예 4 화학적 변형은 saRNA 듀플렉스의 RNA 활성화 활성을 유지 또는 강화시킴**

**[0161]** 유전자 조절 올리고뉴클레오티드에 화학적 변형을 도입하는 주된 목적은 생체내 안정성 강화 및 비표적 효과(예를 들어, 관련 없는 유전자의 서열 의존적 표적화 작용, 서열 의존적 또는 독립적 면역자극) 억제를 포함하여, 이들의 약물 특성을 개선하고, 동시에 이들의 유전자 조절 능력(유전자 녹다운 또는 활성화)을 유지하는 데에 있다. 화학적 변형이 p21 유전자에 대한 saRNA의 RNAa 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 10nM 비변형 (Rag1-40) 및 변형(Rag1-40-1 내지 Rag1-40-34) 듀플렉스를 각각 Ku-7-LG 및 T24 세포에 형질감염시켰다. 72시간 후, p21의 mRNA 발현 수준을 RT-qPCR로 평가하였다.

**[0162]** 모든 듀플렉스는 모든 3개 세포주에서 p21 mRNA 발현을 대조군의 적어도 2배로 유도하였다. 도 7a는 Ku-7-LG 세포에서, Rag1-40과 비교하여, Rag1-40-32, Rag1-40-33 및 Rag1-40-34를 제외한 모든 화학적으로 변형된 유도 서열이 개선되거나 유사한 RNA 활성화 활성을 나타내었다. 도 7b는 T24 세포에서, Ku-7-LG 세포와 유사하게, 화학적으로 변형된 유도 서열 중 29개(85.3%)가 Rag1-40과 비슷하거나 더 우수한 RNA 활성화 활성을 가지며; 5가지만 Rag1-40-11, Rag1-40-31, Rag1-40-32, Rag1-40-33 및 Rag1-40-34 Rag1-40보다 활성이 낮음을 보여준다.

**[0163]** 화학적으로 변형된 듀플렉스 Rag1-40-32, Rag1-40-33 및 Rag1-40-34에서, 데옥시뉴클레오티드로 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단으로부터 2 내지 4번째 위치의 뉴클레오티드 영역을 치환하였고, 모든 피험 세포주에서 약화된 활성이 나타났으며(도 7a 및 7b), 이는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 말단 근처 영역에서 리보뉴클레오티드의 DNA 치환이 RNA 활성화에 있어서 열화된 설계 전략임을 시사하였다.

**[0164]** 종합하면, 이러한 데이터에 따르면, saRNA 듀플렉스에서 2'F, 2'OMe 및 PS 변형을 합리적으로 사용하면 RNAa 활성화에 부정적인 영향을 미치지 않을 수 있고, 오히려 대부분의 조합에서 활성을 향상시킬 수 있는데, 이의 주요 원인이 화학적 변형이 뉴클레아제에 대한 saRNA 듀플렉스의 내성을 강화시킨 것에 있을 수 있고, 화학적 변형이 saRNA의 세포핵 진입을 증가시키고 Argonautes(Agos)가 가이드 가닥으로서 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥을 사용할 확률을 증가시키는 것과 관련이 있을 수 있다. 규칙을 요약하면 다음과 같다:

- [0165]** 1) 2'F, 2'OMe 및 PS 변형의 조합은 saRNA 듀플렉스가 p21 발현을 유도하는 능력을 증가시켰다.
- [0166]** 2) 듀플렉스의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 3' 말단의 2개 PS 변형이 듀플렉스의 유전자 활성화 효능을 향상시킬 수 있다. 이러한 점은 해당 변형을 포함하는 saRNA 듀플렉스(Rag1-40-17 내지 Rag1-40-32)와 해당 부위에 해당 변형을 포함하지 않는 saRNA 듀플렉스(Rag1-40-1 내지 Rag1-40-16)의 유전자 활성화 효능과 비교함으로써 얻을 수 있다.

**[0167] 실시예 5 화학적 변형은 p21 saRNA의 세포 증식 억제의 작용을 강화시켰음.**

**[0168]** saRNA에 의한 p21 유도는 p21 단백질과 같은 다양한 종양 억제 인자의 암 세포 증식에 대한 억제 작용 때문인 것으로 알려져 있다. 암 세포 기능에 대한 화학적으로 변형된 saRNA의 영향을 평가하기 위하여, 10nM 비변형 및 변형된 saRNA로 세포(Ku-7-LG 및 T24)를 72시간 동안 형질감염시키고, 세포 증식 능력을 CCK8 방법으로 측정하였다. 도 8a 및 8b에 도시된 바와 같이, Rag1-40은 2가지 세포주에서 모두 40 내지 60%의 증식 억제 작용을 나타냈고, 대부분 화학적으로 변형된 Rag1-40 유도 서열은 2가지 세포 모두에서 강한 억제 작용을 나타냈다. 또한, RNA 활성화 활성(도 7a 및 7b)과 세포 증식 활성 억제(도 8a 및 8b) 사이에는 상관관계가 있었다. 강한 p21 활성체는 통상적으로 강한 세포 증식 억제제이기도 하다. 예를 들어, Ku-7-LG 세포에서, Rag1-40-32, Rag1-40-33 및 Rag1-40-34의 약한 세포 증식 활성 억제(도 8a)는 이의 약한 RNA 활성화 활성(도 7a)과 상관관계가 있었다. 안정성 및 유전자 활성화 활성 데이터에서 볼 때, saRNA에서 선택된 화학적 변형을 합리적으로 사용하면 암 세포에 형질감염되었을 때 세포 증식을 억제하는 특성을 유의하게 강화할 수 있는 것으로 나타났으며, 이러한 강화 작용은 듀플렉스 안정성의 개선으로 인한 것이었다.

**[0169]** saRNA 듀플렉스의 세포 증식 억제 활성을 기반으로, 다음의 내용을 알 수 있다:

- [0170]** 1) saRNA 듀플렉스에서 2'F, 2'OMe 및 PS 변형을 조합 사용한 경우 saRNA 듀플렉스가 암 세포 증식을 억제하는 작용이 증가하였다.
- [0171]** 2) 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 3' 말단에 있는 2개 PS 변형의 포스포디에스테르 결합은 saRNA 듀플렉스가 증식을 억제하는 활성을 강화시켰다(PS 변형의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥(Rag1-40-17 내지 Rag1-40-32) 및

이러한 변형이 없는 센스 올리고뉴클레오티드 가닥(Rag1-40-1 내지 Rag1-40-16)의 비교를 통해).

[0172] 3) 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥에서 리보뉴클레오티드를 DNA로 치환하면 saRNA 듀플렉스의 세포 증식 억제 활성을 약화시킬 수 있다(예를 들어, Rag1-40-8, Rag1-40-16, Rag1-40-24 및 Rag1-40-32).

[0173] 4) Rag1-40-3 및 Rag1-40-19를 제외하고, 2'F 및 2'OMe의 변형 조합으로 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 모든 부위에 대해 변형을 수행하면 증식 억제 활성에 부정적인 영향을 미칠 수 있다(예를 들어, Rag1-40-11 및 Rag1-40-27). 이들 4개의 듀플렉스는 모두 동일한 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥(RAG1-SS-AS2C)을 함유하지만, Rag1-40-11 및 Rag1-40-27은 2'F 변형의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥을 함유하고, Rag1-40-3 및 Rag1-40-19는 2'OMe 변형의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥을 함유하였다. 이러한 차이는, 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥에 대한 완전한 변형에 의해 생성된 증식 억제 활성의 부정적인 영향은 센스 올리고뉴클레오티드 가닥의 2'OMe 변형에 의해 상쇄될 수 있음을 나타낸다.

[0174] **실시예 6 saRNA의 화학적 변형은 면역 자극 억제 작용을 함**

[0175] 올리고뉴클레오티드를 이용하여 유전자 발현에 간섭함으로써 질병 치료에 적용하며, 올리고뉴클레오티드의 면역 자극 효과는 경우에 따라 바람직하지 않은 부작용이다. 화학적으로 변형된 saRNA의 면역 자극 작용을 평가하기 위하여, 건강한 공여자의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 이중 가닥 saRNA와 함께 배양하고, 24시간 후 처리된 세포 상청액에서 INF- $\alpha$ 와 TNF- $\alpha$  수준을 측정하였다.

[0176] 도 9a에 도시된 바와 같이, 블랭크 대조군(~60pg/ml)과 비교하여, 양성 대조군 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 RAG1-IS-1(강한 면역 자극제로 알려져 있으며, 이의 서열은 표 3에 나열됨)로 처리된 세포는, INF- $\alpha$ 의 단백질 수준이 유의하게 증가하였다(708pg/ml). 화학적 변형을 거치지 않은 Rag1-40도 일정한 면역 자극 활성을 가지며, 이의 처리된 세포에서 INF- $\alpha$ 의 단백질 수준은 155pg/ml에 달하였다. 그러나, 화학적으로 변형된 Rag1-40 유도 서열 중 15개 유도 서열(총 수의 46.9% 차지)은 면역 자극 활성이 낮아진 것으로 나타났으며, 여기에는 Rag1-40-4, Rag1-40-5, Rag1-40-6, Rag1-40-7, Rag1-40-8, Rag1-40-9, Rag1-40-10, Rag1-40-11, Rag1-40-12, Rag1-40-13, Rag1-40-15, Rag1-40-16, Rag1-40-22, Rag1-40-27, Rag1-40-29 및 Rag1-40-32가 포함된다. 의외로, Rag1-40과 비교하여, Rag1-40-23, Rag1-40-28, Rag1-40-30 및 Rag1-40-31은 INF- $\alpha$ 에 대해 더 강한 자극 활성을 나타냈고, Rag1-40-31의 경우, 활성이 있는 것으로 알려진 양성 대조군 서열(Rag1-IS-1)보다 그 활성이 높았다. 도 9b에 도시된 바와 같이, TNF- $\alpha$  유도에 대하여, 모든 화학적으로 변형된 Rag1-40 유도 서열은 모두 억제된 면역 자극 작용을 나타냈으며, 유일한 예외는 Rag1-40-3으로, 이의 면역 자극 활성은 Rag1-40과 비교하여 변화가 없었다.

[0177] 이러한 데이터는 saRNA 듀플렉스의 화학적 변형의 다양한 조합 중 대부분이 듀플렉스의 면역 자극 효과를 억제할 수 있으나, 특정한 변형 배열 조합은 이중 가닥 RNA의 면역 자극 활성을 촉진할 수 있음을 나타낸다. 이러한 면역 강화 효과는 특정 질병의 치료에 대해 가치가 있는 것으로, 예를 들어 방광내에 주입 투여하여 비근침윤성 방광암(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)을 치료하는데, 이러한 saRNA는 표적 유전자에 직접 작용하여 기능하는 것 외에도, 면역계를 활성화하여 중앙 억제의 효과를 낼 수 있기 때문이다.

**표 3**

양성 대조군 서열

| 명칭          | 서열번호         | 서열(5'-3')               |
|-------------|--------------|-------------------------|
| RAG-IS-1 S  | SEQ ID NO 20 | GUCAUCACACUGAAUACCAAU   |
| RAG-IS-1 AS | SEQ ID NO 21 | AUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAC |

[0178]

[0179] **실시예 7 saRNA의 화학적 변형은 센스 올리고뉴클레오티드 가닥에 의해 매개되는 비표적 효과를 감소시킴**

[0180] RNA 활성화에서, 프로모터 센스 DNA 가닥 서열과 일치하는 가닥은 센스 올리고뉴클레오티드 가닥으로 불리며, 이의 표적화 활성은 억제되어 잠재적인 비표적 효과를 감소시켜야 한다. 비변형 및 변형된 saRNA의 비표적 효과를 평가하기 위하여, Rag1-40의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 상보적인 서열을 pmirGLO 이중 루시퍼라아제 벡터에서 루시퍼라아제 유전자 3'UTR 영역으로 클로닝하였다. 벡터 플라스미드를 saRNA와 함께 COS-1 세포로 공동 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후 세포를 용해시키고, 획득한 용해물의 루시퍼라아제 활성을 평가하였다.

프라이머 서열은 표 4를 참조한다.

**표 4**

루시퍼라아제 유전자 검출 프라이머

| 명칭        | 서열번호         | 서열(5'-3')                        |
|-----------|--------------|----------------------------------|
| pOFF-표적 F | SEQ ID NO 22 | CTAGCGAGTGCCAACTCATTCTCCAAGTAAAT |
| pOFF-표적 R | SEQ ID NO 23 | CTAGATTTACTTGGAGAATGAGTTGGCACTCG |

[0181]

[0182]

[0183]

[0184]

[0185]

[0186]

[0187]

[0188]

[0189]

도 10에 도시된 바와 같이, 비변형된 Rag1-40과 비교하여, Rag1-40의 화학적으로 변형된 유도 서열 대부분은 완전하게 억제, 경감 또는 유사한 비표적 효과를 나타냈다. RAG1-40의 34가지 화학적 변형 유도 서열에서, 9개 (26.5%) 유도 서열의 비표적 효과가 완전히 억제되었으며, 여기에는 Rag1-40-1, Rag1-40-3, Rag1-40-4, Rag1-40-5, Rag1-40-10, Rag1-40-11, Rag1-40-22, Rag1-40-24, Rag1-40-27가 포함되고; 22개(64.7%) 유도 서열이 경감되거나 유사한 비표적 효과(Rag1-40-2, Rag1-40-6, Rag1-40-7, Rag1-40-8, Rag1-40-9, Rag1-40-12, Rag1-40-13, Rag1-40-14, Rag1-40-15, Rag1-40-17, Rag1-40-18, Rag1-40-19, Rag1-40-20, Rag1-40-21, Rag1-40-23, Rag1-40-25, Rag1-40-28, Rag1-40-29, Rag1-40-30, Rag1-40-31, Rag1-40-33, Rag1-40-34)를 나타냈다. 3개 (8.8%)의 유도 서열이 강화된 비표적 효과를 나타냈다(Rag1-40-16, Rag1-40-26 및 Rag1-40-32).

해당 결과는, 출원인이 사용한 화학적 변형 및 그 조합이 saRNA 올리고뉴클레오타이드의 비표적 효과를 감소시킬 수 있으며, 이의 가능한 메커니즘은 Ago가 센스 가닥을 가이드 가닥으로 로딩하는 것을 방지함으로써 구현된 것임을 나타낸다. 증가된 비표적 효과를 나타낸 3가지 saRNA 듀플렉스의 경우, 그 중 2가지(Rag1-40-16 및 Rag1-40-32)는 DNA 변형을 함유한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥을 가졌고 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥에서 2'F 변형을 가졌는데, 이는 DNA가 특히 올리고뉴클레오타이드 중 2'F의 변형과 조합될 때, 올리고뉴클레오타이드 가닥 중의 DNA 변형이 피해야 하는 변형 전략임을 나타낸다.

**실시예 8 상이한 시간 동안 처리한 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스가 방광암 세포에서 여전히 활성화 활성을 유지함**

화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스를 상이한 시간 동안 처리한 후 p21 mRNA의 발현 수준을 추가로 평가하기 위하여, 상기 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스로부터 2개(RAG1-40-31 및 RAG1-40-53) saRNA를 무작위로 선택하여 검출하였다. RAG1-40-31 및 RAG1-40-53을 10nM의 최종 농도로 Ku-7-LG 및 T24 세포에 형질감염시켰으며, 형질감염 시간은 각각 1, 2, 3, 4, 7 및 9일이었고, 각각의 처리에는 2개의 복제 웰을 사용하였다. 2단계법 RT-qPCR은 상술한 범용 실험 방법과 같이 수행하였다.

도 11a는 상이한 시간 동안 처리한 후 Ku-7-LG 세포에서 RAG1-40-31 및 RAG1-40-53의 p21 mRNA의 발현 수준을 도시한 것이다. 대조군과 비교하여, RAG1-40-31의 p21 mRNA 발현 값이 1, 2, 3, 4, 7 및 9일 처리 후 각각 1.3, 11.4, 8.7, 6.1, 2.6 및 3.8배 증가하였고, RAG1-40-53 p21 mRNA의 p21 mRNA 발현 값은 1, 2, 3, 4, 7 및 9일 처리 후 각각 1.4, 13.0, 9.1, 4.5, 3.2 및 4.1배 증가하였다. 도 11b는 상이한 시간 동안 처리한 후 T24 세포에서 RAG1-40-5 및 RAG1-40-53의 p21 mRNA 발현 수준을 도시한 것이다. 대조군과 비교하여, RAG1-40-31의 p21 mRNA 발현 값이 1, 2, 3, 4, 7 및 9일 처리 후 각각 2.1, 3.7, 4.7, 3.3, 1.2 및 1.3배 증가하였고, RAG1-40-53 p21 mRNA의 p21 mRNA 발현 값은 1, 2, 3, 4, 7 및 9일 처리 후 각각 2.2, 3.5, 7.8, 4.5, 1.2 및 1.1배 증가하였다.

이는 무작위로 선택된 saRNA RAG1-40-31 및 RAG1-40-53이 처리 시간이 증가함에 따라 p21 mRNA의 발현 값이 점차 증가하고, 각각 처리 2일 및 3일 후에 정점에 도달한 후, 그 발현이 감소하기 시작하였으나 활성화 활성을 유지하였음을 나타낸다.

**실시예 9 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스가 Ku-7-LG 세포에서 세포 주기 진행을 저지함으로써 세포 증식을 억제함**

상기 실시예 5는 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스가 세포 증식을 억제할 수 있음을 보여주었으며, 세포 증식 억제의 메커니즘을 연구하기 위하여, 본 실시예에서는 유세포 분석법을 이용하여 세포 주기의 변화를 분석하였다. 무작위로 선택된 RAG1-40-31 및 RAG1-40-53을 최종 농도 0.1, 1, 10 및 50nM로 Ku-7-LG 세포에 형질감염시켰으며, 형질감염 시간은 48시간이었고, 각각의 처리에 2개의 복제 웰을 사용하였다. 세포 주기 검출 분석은 상

기 일반 실험 방법에 설명된 바와 같다.

[0190] 도 12는 상이한 농도의 RAG1-40-31과 RAG1-40-53을 Ku-7-LG 세포에 처리한 후 각 시기의 세포 백분율을 도시한 것이다. RAG1-40-31을 0.1, 1, 10 및 50nM로 처리한 경우, DNA 합성 전기(G0/G1)의 백분율은 각각 62%, 69%, 81% 및 81%였고; RAG1-40-31을 0.1, 1, 10 및 50nM로 처리한 경우, DNA 복제기(S기)의 백분율은 각각 32%, 22%, 11% 및 6%였고; RAG1-40-31을 0.1, 1, 10 및 50nM로 처리한 경우, DNA 분열 후기/분열기(G2/M)의 백분율은 각각 6%, 9%, 8% 및 13%였다. RAG1-40-33을 0.1, 1, 10 및 50nM로 처리한 경우, DNA 합성 전기(G0/G1)의 백분율은 각각 57%, 66%, 79% 및 76%였고; RAG1-40-33을 0.1, 1, 10 및 50nM로 처리한 경우, DNA 복제기(S기)의 백분율은 각각 36%, 24%, 12% 및 16%였고; RAG1-40-33을 0.1, 1, 10 및 50nM로 처리한 경우, DNA 분열 후기/분열기(G2/M)의 백분율은 각각 7%, 10%, 9% 및 8%였다.

[0191] 이는 무작위로 선택한 화학적으로 변형된 saRNA RAG1-40-31 및 RAG1-40-53이 세포 주기 중 S기의 복제를 저지함으로써 세포 증식이 억제되었음을 나타낸다.

[0192] **실시에 10 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스가 J82 세포 및 PBMC 세포 공동 배양에서 세포사멸을 촉진함**

[0193] 말초 혈액 단핵 세포(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)는 말초 혈액 중 단일 핵을 갖는 세포이며, 림프구, 단핵구 및 수지상 세포가 포함된다. PBMC 세포는 염증 인자를 분비하여 면역자극 반응을 활성화하고, 나아가 종양 세포의 성장 번식을 억제할 수 있다.

[0194] 화학적으로 변형된 RAG1-40-31이 더 강한 면역자극 활성을 나타낸 것을 감안할 때(실시에 6), 우리는 이러한 특성이 종양 세포 억제를 촉진하는 데 이용될 수 있다고 추측하였다. 해당 가설을 검증하기 위하여, 본 실시예는 RAG1-40-31 듀플렉스를 선택하여 J82 세포를 형질감염시켰으며, 형질감염 24시간 후 새로운 배지로 교체하고 일정 비율(J82 세포:PBMC 세포=1:4)의 PBMC 세포를 첨가하거나, 대조군으로 PBMC가 함유되지 않은 세포를 직접 교체하였고, 공동 배양 48시간 후 FITC Annexin V 키트를 사용하여 유세포 분석기 상에서 종양 세포의 세포사멸을 검출하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, 상이한 농도의 RAG1-40-31을 사용해 J82 세포 및 PBMC 세포 공동 배양 후 유세포 분석을 수행하였다. PBMC가 없는 세포 배양에서, RAG1-40-31을 0.1, 1, 10, 25nM로 처리한 경우, 초기 세포사멸의 비율은 각각 2.3%, 2.6%, 9.4% 및 15.5%였고, 후기 세포사멸의 비율은 각각 5.3%, 5.2%, 6.7% 및 9.1%였다. PBMC 세포와의 공동 배양에서, RAG1-40-31을 0.1, 1, 10, 25nM로 처리한 경우, 초기 세포사멸의 비율은 각각 2.0%, 4.5%, 31.5% 및 49.3%였고, 후기 세포사멸의 비율은 각각 5.6%, 7.3%, 6.3% 및 5.8%였다. 결과는 RAG1-40-31이 PBMC 세포의 존재 하에서, 특히 높은 형질감염 농도의 경우에, 종양 세포의 초기 세포사멸을 촉진하는 더 강한 활성을 가진 것으로 나타났는데, 이는 특정 화학적 변형의 조합 및 서열 상에서 이의 배치가 이중 가닥 RNA의 면역자극 활성을 향상시켜, 더욱 우수한 종양 세포 살해 효과를 구현할 수 있음을 시사한다.

[0195] **실시에 11 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스와 화학 약물 조합의 J82 세포 성장 번식에 대한 상승적 억제 작용**

[0196] 본 실시예는 화학적으로 변형된 saRNA RAG1-40-31 및 임상 화학 약물을 조합하여 사용함으로써 암 세포에 대한 조합 약물의 억제 효과를 평가하였다.

[0197] 미토마이신 C(Mitomycin C, MMC)는 임상적으로 종양을 치료하는 화학 약물의 일종으로, 주로 DNA 가교결합(암 세포에 부착하는 DNA)을 생성함으로써 DNA 합성을 억제하여, 세포가 분열할 수 없게 만들고 결국 세포사멸을 유발한다.

[0198] 발루비신(Valrubicin)은 임상적으로 방광암을 치료하는 화학요법 약물로, 주로 DNA 토포이소머라아제 II와 상호 작용하여, DNA와 효소 화합물 사이의 정상 절단에 영향을 미치고, 나아가 뉴클레오시드가 핵산에 결합되는 것을 억제하여, 염색체 손상을 유발하고, 세포 주기가 G2기로 진입되는 것을 차단한다.

[0199] 도 14a 및 14b는 화학적으로 변형된 saRNA RAG1-40-31 및 미토마이신 C 조합 처리 후 J82 세포의 상대적 증식률을 도시한 것이다. saRNA RAG1-40-31을 0.1 내지 50nM로 처리한 경우, 미토마이신 C은 100, 1000 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 35%보다 낮았다. saRNA RAG1-40-31을 5 내지 50nM로 처리한 경우, 미토마이신 C은 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 43%보다 낮았다. saRNA RAG1-40-31을 25nM 및 50nM로 처리한 경우, 미토마이신 C은 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 26%보다 낮았다. 구체적인 약물 조합 후 J82 세포의 상대적인 증식 비율에 표 6을 참조한다.

표 6

RAG1-40-31 과 미토마이신 C 조합 처리 후 J82 세포의 상대적 증식률

| 군별                  | 대조군   | MMC<br>(1 nM) | MMC<br>(10 nM) | MMC<br>(100 nM) | MMC<br>(1000 nM) | MMC<br>(10000 nM) |
|---------------------|-------|---------------|----------------|-----------------|------------------|-------------------|
| RAG1-40-31 (0 nM)   | 100.0 | 99.9          | 99.9           | 99.9            | 100.0            | 100.0             |
| RAG1-40-31 (0.1 nM) | 97.9  | 74.3          | 71.5           | 32.9            | 10.8             | 1.5               |
| RAG1-40-31 (0.5 nM) | 89.9  | 70.1          | 69.3           | 34.9            | 10.8             | 0.9               |
| RAG1-40-31 (1 nM)   | 79.8  | 55.8          | 57.2           | 30.1            | 9.3              | 1.4               |
| RAG1-40-31 (5 nM)   | 59.3  | 42.8          | 40.8           | 26.2            | 7.2              | 1.2               |
| RAG1-40-31 (10 nM)  | 48.9  | 37.0          | 37.7           | 22.2            | 6.9              | 1.0               |
| RAG1-40-31 (25 nM)  | 38.4  | 20.8          | 25.7           | 17.2            | 5.0              | 0.4               |
| RAG1-40-31 (50 nM)  | 34.8  | 25.9          | 25.8           | 13.9            | 3.4              | 0.6               |

[0200]

[0201]

도 14C는 화학적으로 변형된 RAG1-40-31과 미토마이신 C가 조합 사용된 조합 지수(combination index, CI)이다. CI 값은 0 내지 0.3 사이에서 강한 상승 작용을 나타냈고, CI 값은 0.3 내지 0.7 사이에서 상승 작용을 나타냈다. 구체적인 RAG1-40-31과 미토마이신 C의 조합 지수는 표 7을 참조한다.

표 7

J82 세포에서 RAG1-40-31 과 미토마이신 C 조합 후의 조합 지수

| 군별                  | 조합지수(CI)      |                |                 |                  |                   |
|---------------------|---------------|----------------|-----------------|------------------|-------------------|
|                     | MMC<br>(1 nM) | MMC<br>(10 nM) | MMC<br>(100 nM) | MMC<br>(1000 nM) | MMC<br>(10000 nM) |
| RAG1-40-31 (0.1 nM) | 0.08          | 0.42           | 0.47            | 0.73             | 0.50              |
| RAG1-40-31 (0.5 nM) | 0.17          | 0.47           | 0.54            | 0.75             | 0.25              |
| RAG1-40-31 (1 nM)   | 0.13          | 0.58           | 0.52            | 0.76             | 0.46              |
| RAG1-40-31 (5 nM)   | 0.29          | 0.32           | 0.40            | 0.43             | 0.41              |
| RAG1-40-31 (10 nM)  | 0.40          | 0.47           | 0.37            | 0.41             | 0.29              |
| RAG1-40-31 (25 nM)  | 0.32          | 0.50           | 0.37            | 0.28             | 0.09              |
| RAG1-40-31 (50 nM)  | 0.96          | 0.98           | 0.44            | 0.19             | 0.15              |

[0202]

[0203]

도 15a 및 15b는 화학적으로 변형된 saRNA RAG1-40-31 및 발루비신 조합 처리 후 J82 세포의 상대적 증식률을 도시한 것이다. saRNA RAG1-40-31을 0.1 내지 50nM로 처리한 경우, 발루비신은 1000nM 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 30%보다 낮았다. saRNA RAG1-40-31을 25nM 및 50nM로 처리한 경우, 발루비신은 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 30%보다 낮았다. 구체적인 약물 조합 후 J82 세포의 상대적인 증식 비율에 표 8을 참조한다.

표 8

RAG1-40-31 과 발루비신 조합 처리 후 J82 세포의 상대적 증식률

| 군별                  | J82 세포의 상대적 증식률(%) |                |                 |                  |                   |                    |
|---------------------|--------------------|----------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|
|                     | 대조군                | 발루비신<br>(1 nM) | 발루비신<br>(10 nM) | 발루비신<br>(100 nM) | 발루비신<br>(1000 nM) | 발루비신<br>(10000 nM) |
| RAG1-40-31 (0 nM)   | 100.7              | 100.0          | 100.0           | 100.0            | 100.0             | 100.0              |
| RAG1-40-31(0.1 nM)  | 85.1               | 71.0           | 58.2            | 73.2             | 26.9              | 9.9                |
| RAG1-40-31 (0.5 nM) | 77.8               | 62.4           | 54.1            | 72.8             | 24.4              | 7.7                |
| RAG1-40-31 (1 nM)   | 73.9               | 59.8           | 51.6            | 54.4             | 22.7              | 7.5                |
| RAG1-40-31 (5 nM)   | 58.4               | 37.9           | 46.6            | 50.9             | 22.6              | 5.5                |
| RAG1-40-31 (10 nM)  | 50.6               | 33.1           | 37.1            | 40.4             | 20.3              | 4.3                |
| RAG1-40-31 (25 nM)  | 45.6               | 26.1           | 23.9            | 26.3             | 13.3              | 2.7                |
| RAG1-40-31 (50 nM)  | 33.5               | 19.7           | 21.4            | 23.9             | 14.8              | 3.2                |

[0204]

[0205]

도 15c는 화학적으로 변형된 RAG1-40-31과 발루비신이 조합 사용된 조합 지수(CI)이다. CI 값은 0 내지 0.3 사이에서 강한 상승 작용을 나타냈고, CI 값은 0.3 내지 0.7 사이에서 상승 작용을 나타냈다. 구체적인 RAG1-40-31과 미토마이신 C의 조합 지수는 표 9를 참조한다.

표 9

RAG1-40-31 과 발루비신 조합 후 J82 세포에서의 발루비신

| 군별                  | 조합지수(CI)       |                 |                  |                   |                    |
|---------------------|----------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|
|                     | 발루비신<br>(1 nM) | 발루비신<br>(10 nM) | 발루비신<br>(100 nM) | 발루비신<br>(1000 nM) | 발루비신<br>(10000 nM) |
| RAG1-40-31 (0.1 nM) | 0.10           | 0.42            | 0.85             | 0.18              | 0.19               |
| RAG1-40-31 (0.5 nM) | 0.18           | 0.08            | 1.31             | 0.14              | 0.11               |
| RAG1-40-31 (1 nM)   | 0.26           | 0.12            | 0.30             | 0.12              | 0.11               |
| RAG1-40-31 (5 nM)   | 0.12           | 0.32            | 0.61             | 0.13              | 0.06               |
| RAG1-40-31 (10 nM)  | 0.14           | 0.22            | 0.37             | 0.11              | 0.04               |
| RAG1-40-31 (25 nM)  | 0.14           | 0.10            | 0.16             | 0.05              | 0.02               |
| RAG1-40-31 (50 nM)  | 0.11           | 0.14            | 0.22             | 0.09              | 0.02               |

[0206]

[0207]

상기 결과는 화학적으로 변형된 RAG1-40-31과 미토마이신 C 및 발루비신의 조합 사용은 상승 작용을 나타냈으며, 조합 사용은 더욱 우수한 J82 종양 세포 억제 효과를 구현할 수 있음을 나타냈다.

[0208]

실시예 12 화학적으로 변형된 saRNA 듀플렉스와 화학 약물 조합의 T24 세포 성장 번식에 대한 상승적 억제 작용

[0209]

화학 약물 정보는 실시예 10에 설명된 바와 같다.

[0210]

도 16a 및 16b는 화학적으로 변형된 saRNA RAG1-40-31 및 미토마이신 C 조합 처리 후 T24 세포의 상대적 증식률을 도시한 것이다. saRNA RAG1-40-31을 0.1 내지 50nM로 처리한 경우, 미토마이신 C은 1000 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 18%보다 낮았다. saRNA RAG1-40-31을 5 내지 50nM로 처리한 경우, 미토마이신 C은 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 40%보다 낮았다. saRNA RAG1-40-31을 25nM 및 50nM로 처리한 경우, 미토마이신 C은 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 21%보다 낮았다. 구체적인 약물 조합 후 T24 세포의 상대적인 증식 비율에 표 10을 참조한다.

표 10

RAG1-40-31 과 미토마이신 C 조합 처리 후 T24 세포의 상대적 증식률

| 군별                  | T24 세포의 상대적 증식률(%) |               |                |                 |                  |                   |
|---------------------|--------------------|---------------|----------------|-----------------|------------------|-------------------|
|                     | 대조군                | MMC<br>(1 nM) | MMC<br>(10 nM) | MMC<br>(100 nM) | MMC<br>(1000 nM) | MMC<br>(10000 nM) |
| RAG1-40-31 (0 nM)   | 100.0              | 100.0         | 100.0          | 100.0           | 100.0            | 100.0             |
| RAG1-40-31 (0.1 nM) | 97.9               | 93.6          | 94.5           | 63.3            | 17.6             | 5.6               |
| RAG1-40-31 (0.5 nM) | 91.7               | 90.1          | 90.0           | 59.8            | 16.8             | 5.5               |
| RAG1-40-31 (1 nM)   | 85.9               | 81.9          | 78.2           | 55.6            | 14.7             | 5.4               |
| RAG1-40-31 (5 nM)   | 42.1               | 37.4          | 36.3           | 26.0            | 7.7              | 3.1               |
| RAG1-40-31 (10 nM)  | 22.0               | 19.8          | 27.0           | 16.7            | 5.3              | 2.5               |
| RAG1-40-31 (25 nM)  | 13.6               | 15.4          | 20.9           | 12.4            | 4.1              | 1.9               |
| RAG1-40-31 (50 nM)  | 14.7               | 20.1          | 19.8           | 10.8            | 4.2              | 2.1               |

[0211]

[0212] 도 16c는 화학적으로 변형된 RAG1-40-31과 미토마이신 C이 조합 사용된 조합 지수(CI)이다. CI 값은 0 내지 0.3 사이에서 강한 상승 작용을 나타냈고, CI 값은 0.3 내지 0.7 사이에서 상승 작용을 나타냈다. 구체적인 RAG1-40-31과 미토마이신 C의 조합 지수는 표 11을 참조한다.

표 11

T24 세포에서 RAG1-40-31 과 미토마이신 C 조합 후의 조합 지수

| 군별                  | 조합지수(CI)      |                |                 |                  |                   |
|---------------------|---------------|----------------|-----------------|------------------|-------------------|
|                     | MMC<br>(1 nM) | MMC<br>(10 nM) | MMC<br>(100 nM) | MMC<br>(1000 nM) | MMC<br>(10000 nM) |
| RAG1-40-31 (0.1 nM) | 0.42          | 1.59           | 0.64            | 0.49             | 1.05              |
| RAG1-40-31 (0.5 nM) | 0.97          | 1.40           | 0.67            | 0.46             | 1.06              |
| RAG1-40-31 (1 nM)   | 0.96          | 0.88           | 0.69            | 0.41             | 0.84              |
| RAG1-40-31 (5 nM)   | 0.61          | 0.60           | 0.45            | 0.24             | 0.46              |
| RAG1-40-31 (10 nM)  | 0.52          | 0.77           | 0.47            | 0.19             | 0.30              |
| RAG1-40-31 (25 nM)  | 0.92          | 1.38           | 0.73            | 0.28             | 0.36              |
| RAG1-40-31 (50 nM)  | 2.59          | 2.60           | 1.31            | 0.50             | 0.47              |

[0213]

[0214] 도 17a 및 17b는 화학적으로 변형된 saRNA RAG1-40-31 및 발루비신 조합 처리 후 T24 세포의 상대적 증식률을 도시한 것이다. saRNA RAG1-40-31을 0.1 내지 50nM로 처리한 경우, 발루비신은 1000nM 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 60%보다 낮았다. saRNA RAG1-40-31을 5 내지 50nM로 처리한 경우, 발루비신은 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 40%보다 낮았다. saRNA RAG1-40-31을 25nM 및 50nM로 처리한 경우, 발루비신은 1, 10, 100, 1000 및 10000nM의 약물 농도 처리 후 세포의 상대적 증식률이 모두 21%보다 낮았다. 구체적인 약물 조합 후 T24 세포의 상대적인 증식 비율에 표 12를 참조한다.

표 12

RAG1-40-31 과 발루비신 조합 처리 후 T24 세포의 상대적 증식률

| 군별                  | T24 세포의 상대적 증식률(%) |                |                 |                  |                   |                    |
|---------------------|--------------------|----------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|
|                     | 대조군                | 발루비신<br>(1 nM) | 발루비신<br>(10 nM) | 발루비신<br>(100 nM) | 발루비신<br>(1000 nM) | 발루비신<br>(10000 nM) |
| RAG1-40-31 (0 nM)   | 100.0              | 100.0          | 100.0           | 100.0            | 100.0             | 100.0              |
| RAG1-40-31 (0.1 nM) | 93.5               | 96.3           | 97.8            | 93.4             | 59.6              | 18.9               |
| RAG1-40-31 (0.5 nM) | 84.8               | 91.3           | 94.3            | 91.4             | 51.8              | 19.5               |
| RAG1-40-31 (1 nM)   | 79.7               | 76.0           | 71.3            | 67.6             | 49.6              | 16.6               |
| RAG1-40-31 (5 nM)   | 38.5               | 37.2           | 33.3            | 42.1             | 25.7              | 8.0                |
| RAG1-40-31 (10 nM)  | 23.9               | 27.2           | 23.3            | 26.9             | 21.7              | 5.1                |
| RAG1-40-31 (25 nM)  | 15.1               | 16.5           | 20.4            | 19.5             | 13.2              | 3.4                |
| RAG1-40-31 (50 nM)  | 13.8               | 18.4           | 18.8            | 18.7             | 10.9              | 3.1                |

[0215]

[0216]

도 17c는 화학적으로 변형된 RAG1-40-31과 발루비신이 조합 사용된 조합 지수(CI)이다. CI 값은 0 내지 0.3 사이에서 강한 상승 작용을 나타냈고, CI 값은 0.3 내지 0.7 사이에서 상승 작용을 나타냈다. 구체적인 RAG1-40-31과 미토마이신 C의 조합 지수는 표 13을 참조한다.

표 13

RAG1-40-31 과 발루비신 조합 후 T24 세포에서의 발루비신

| 군별                  | 조합지수(CI)       |                 |                  |                   |                    |
|---------------------|----------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|
|                     | 발루비신<br>(1 nM) | 발루비신<br>(10 nM) | 발루비신<br>(100 nM) | 발루비신<br>(1000 nM) | 발루비신<br>(10000 nM) |
| RAG1-40-31 (0.1 nM) | 1.9            | 17.16           | 11.04            | 1.48              | 0.38               |
| RAG1-40-31 (0.5 nM) | 2.71           | 6.02            | 8.68             | 0.92              | 0.4                |
| RAG1-40-31 (1 nM)   | 1.23           | 0.92            | 1.02             | 0.93              | 0.33               |
| RAG1-40-31 (5 nM)   | 0.73           | 0.59            | 0.99             | 0.47              | 0.12               |
| RAG1-40-31 (10 nM)  | 0.82           | 0.62            | 0.83             | 0.63              | 0.09               |
| RAG1-40-31 (25 nM)  | 0.97           | 1.25            | 1.25             | 0.67              | 0.1                |
| RAG1-40-31 (50 nM)  | 2.12           | 2.3             | 2.3              | 1.04              | 0.19               |

[0217]

[0218]

상기 결과는 화학적으로 변형된 RAG1-40-31과 미토마이신 C 및 발루비신의 조합 사용은 상승 작용을 나타냈으며, 조합 사용은 더욱 우수한 T24 종양 세포 억제 효과를 구현할 수 있음을 나타냈다.

[0219]

참조로 인용

[0220]

본 출원에 인용된 각각 특허문헌 및 과학문헌의 전체 개시 내용은 본 출원에 참조로서 인용되었다.

[0221]

등가의 내용

[0222]

본 출원은 그 본질적인 특성을 벗어나지 않는 범위에서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다. 따라서, 전술한 실시예는 예시적인 것으로, 이는 본 출원을 제한하지 않는다. 본 출원의 범위는 전술한 명세서의 설명이 아닌 첨부된 특허청구범위에 의해 한정되며, 특허청구범위와 균등한 의미 및 범위 내에 있는 모든 변경은 본 출원의 보호범위에 속한다.

[0223]

참고문헌:

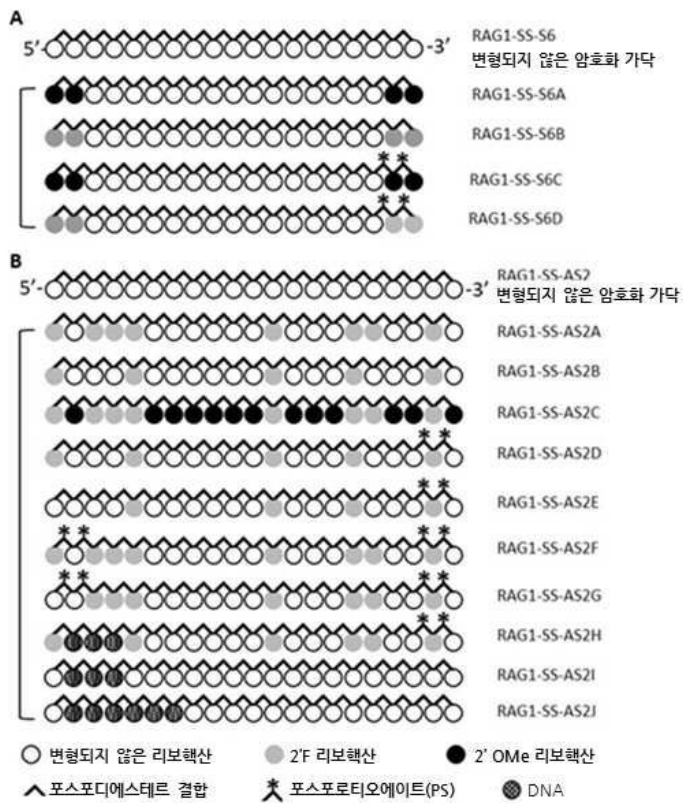
[0224]

[1] The role of helper lipids in lipid nanoparticles(LNPs) designed for oligonucleotide delivery. Cheng et.al., Volume 99, Part A, 1 April 2016, p129-137;

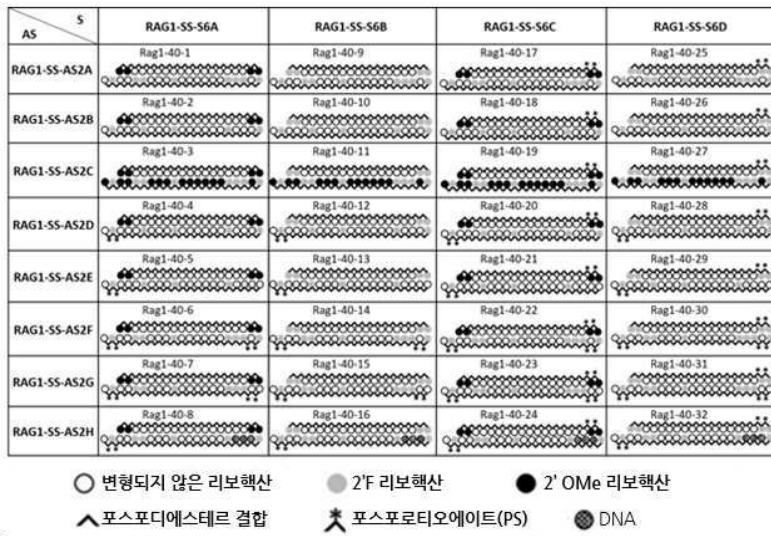
- [0225] [2] Biodistribution of Small Interfering RNA at the Organ and Cellular Levels after Lipid Nanoparticle-mediated Delivery, Shi et.al., J Histochem Cytochem. 2011 Aug; 59(8): 727-740.
- [0226] [3] W02017192679A1
- [0227] [4] US20190240354A1
- [0228] [5] US20190336452A1
- [0229] [6] US20160038612A1

도면

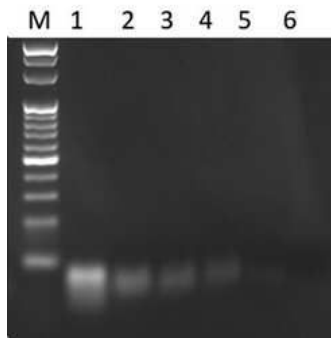
도면1



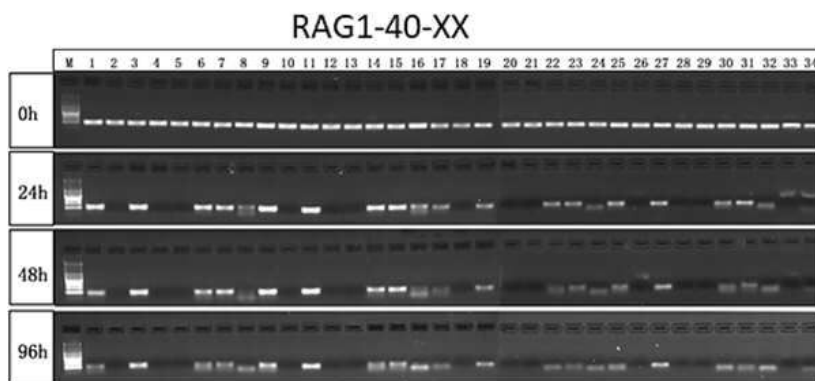
도면2



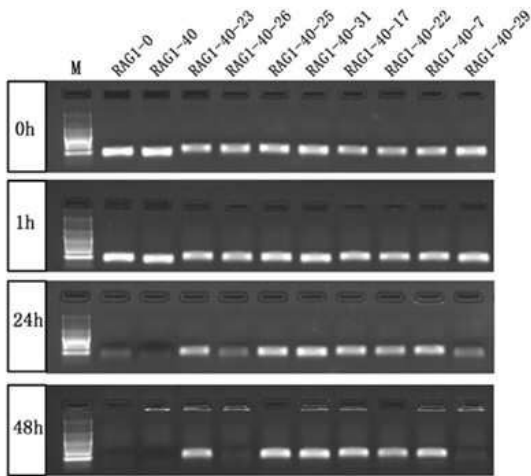
도면3



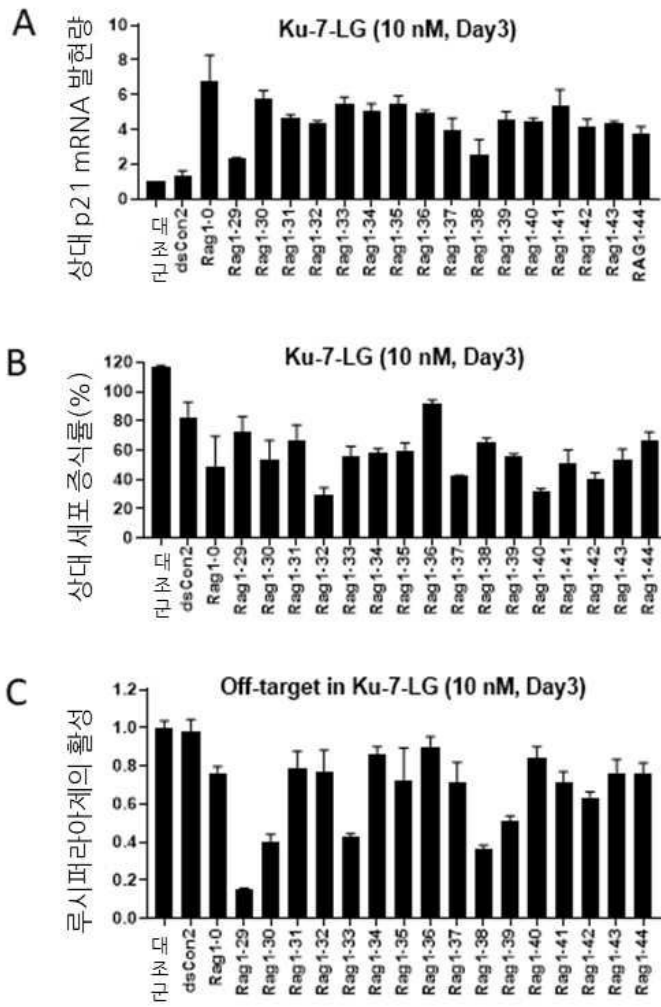
도면4



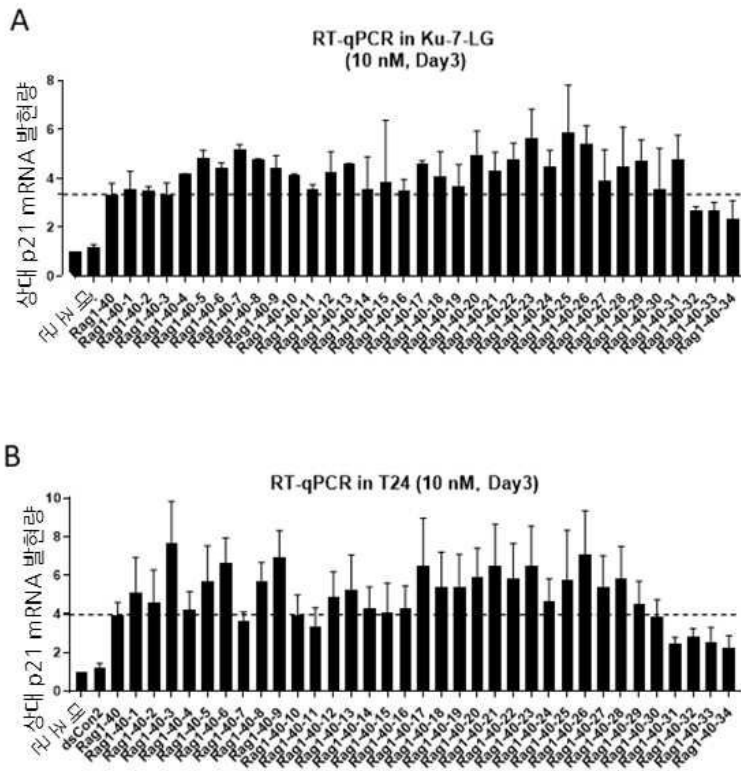
도면5



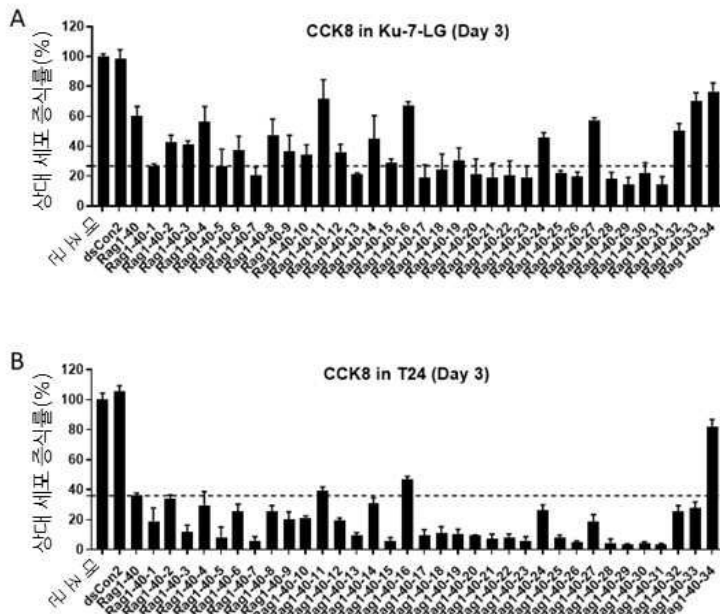
도면6



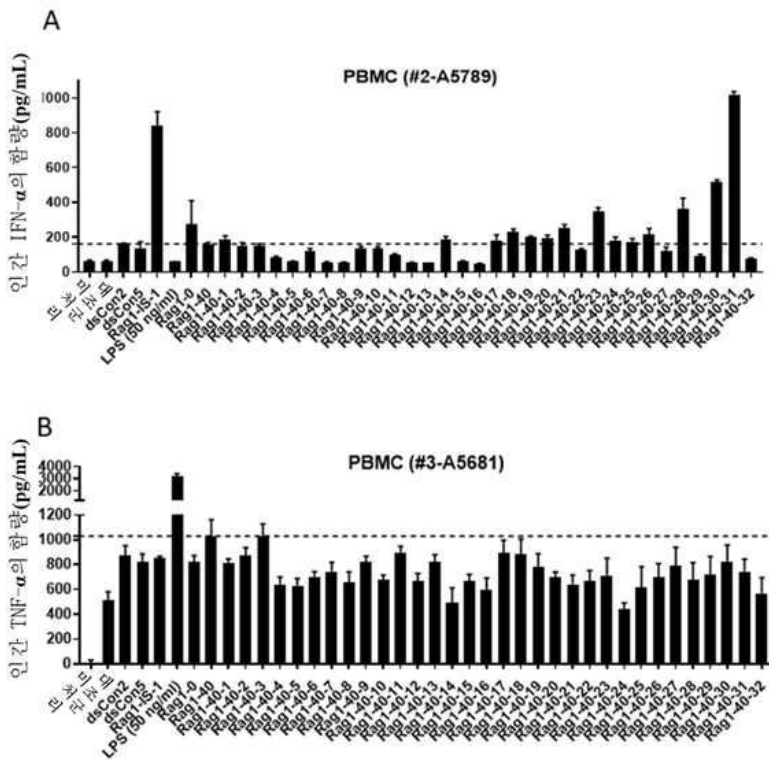
도면7



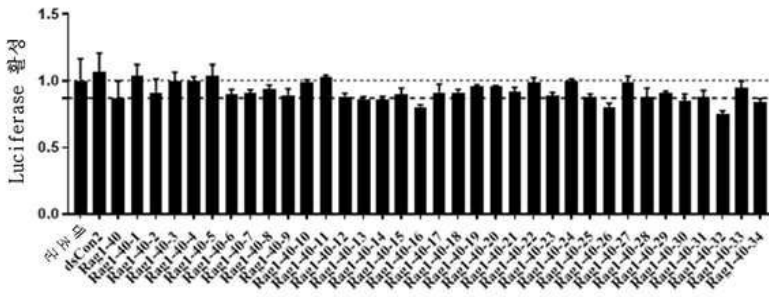
도면8



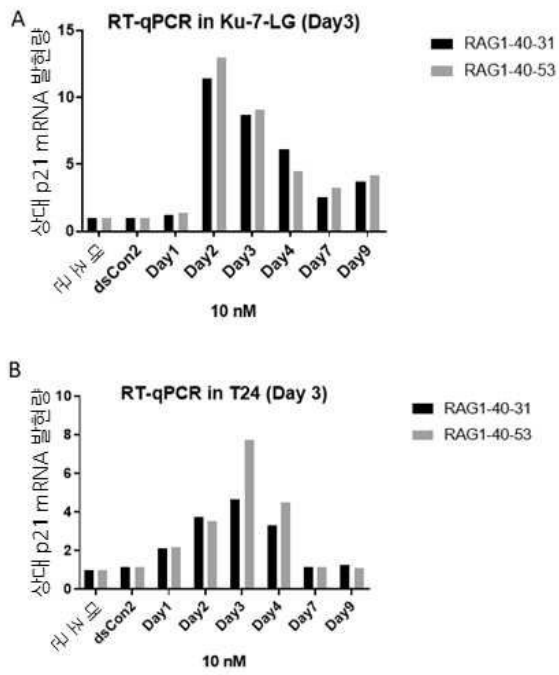
도면9



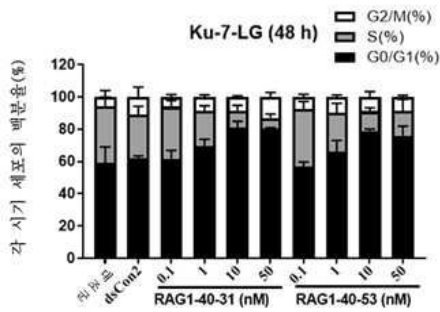
도면10



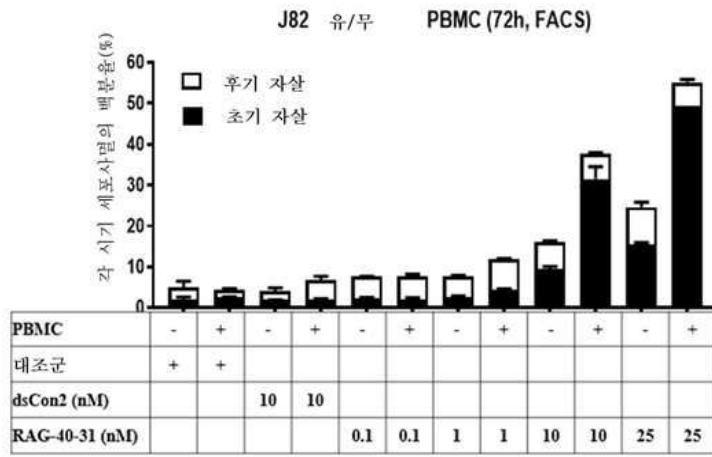
도면11



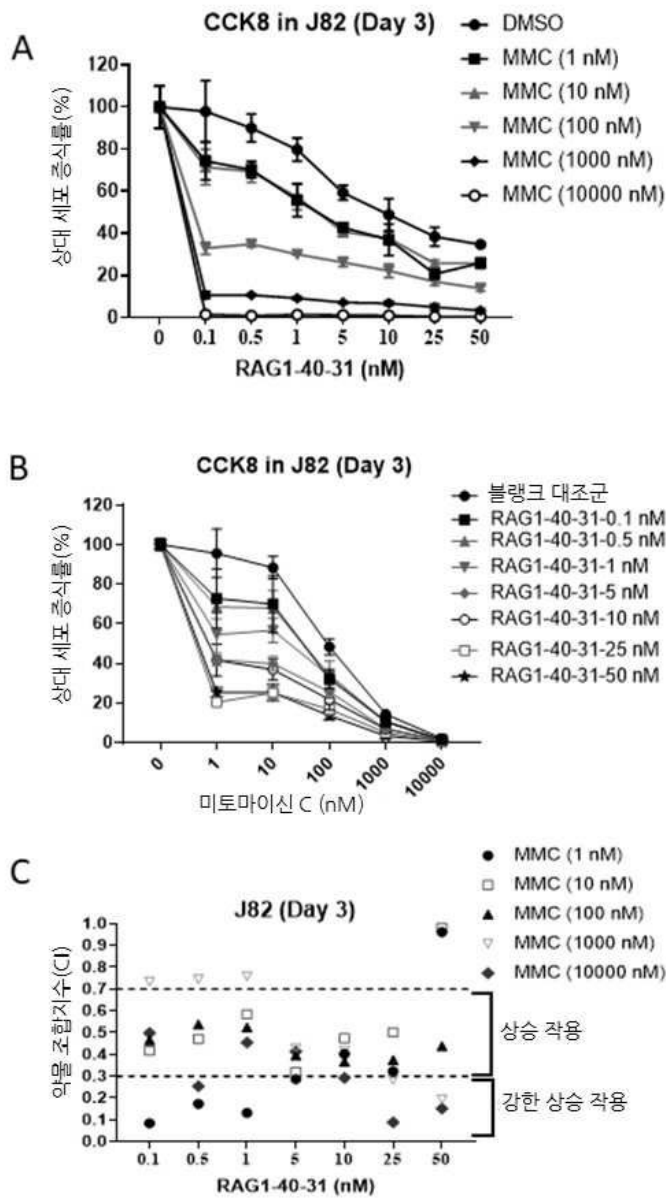
도면12



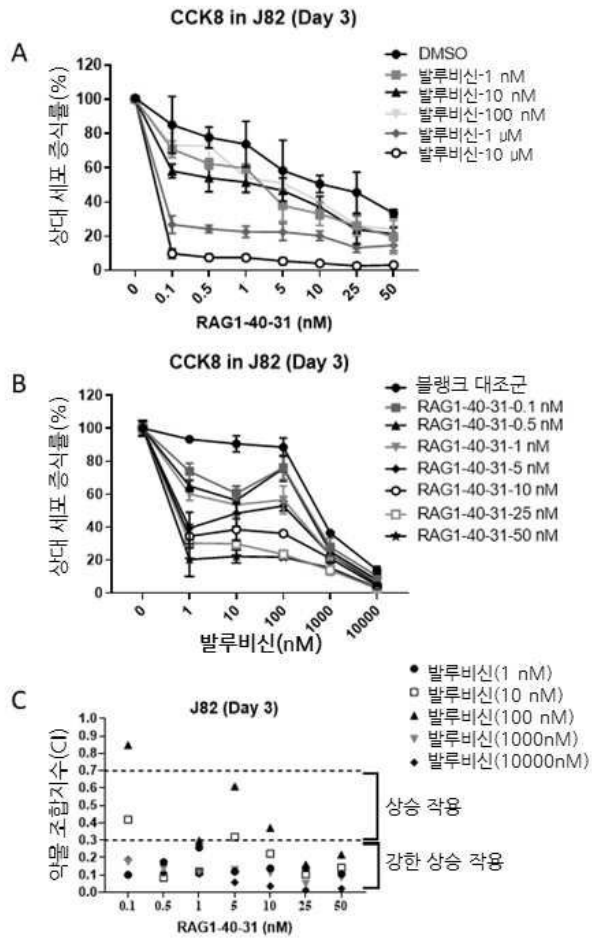
도면13



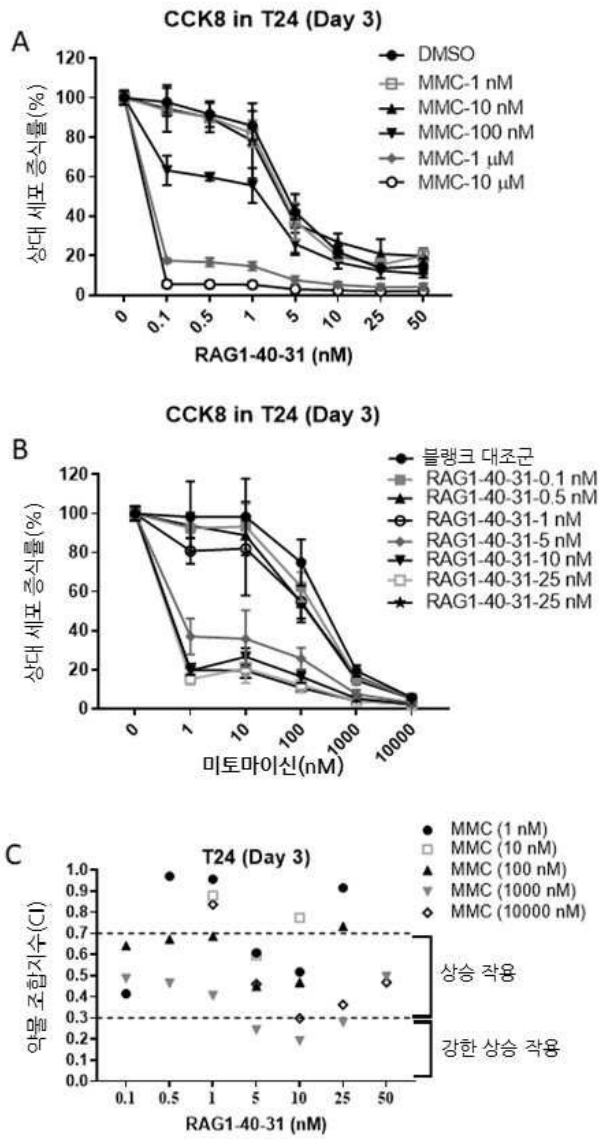
도면14



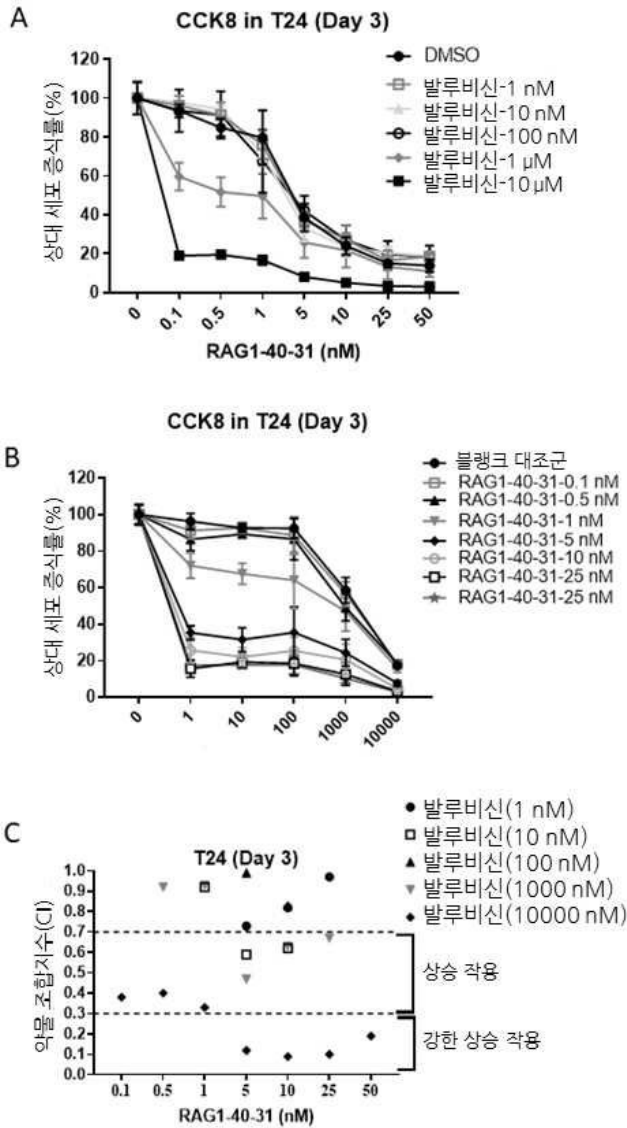
도면15



도면16



도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Ractigen Therapeutics
- <120> CHEMICALLY MODIFIED SMALL ACTIVATING RNA
- <130> 0191-PA-016
- <160> 25
- <170> SIPOSequenceListing 1.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<400> 1

atcaccatct tccaggagcg a 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

ttctccatgg tgggaagac g 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

ggaagacat gtggacctgt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ggattagggc ttctcttgg 20

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> modified\_base

<222> (1,2,18,19)

<223> 2'-O-methyl (2'-OMe) modification

<400> 5

ccaacucau cuccaaguc 19

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> modified\_base

<222> (1,3,4,5,12,16,17,20)

<223> 2'-fluoro modification  
 <400> 6  
 uacuuggaga augaguuggc a 21  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> modified\_base  
 <222>  
 (1,5,12,17,20)  
 <223> 2'-fluoro modification  
 <400> 7  
 uacuuggaga augaguuggc a 21  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1,3,4,5,12,16,17,20)  
 <223> 2'-fluoro modification  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (2,6,7,8,9,10,11,13,14,15,18,19,21)  
 <223> 2'-O-methyl (2'-OMe) modification  
 <400> 8  
 uacuuggaga augaguuggc a 21  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (19,20,21)  
 <223>  
 > phosphorothioate (PS) backbone modification  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1,5,12,17,20)

<223> 2'-fluoro modification  
 <400> 9  
 uacuuggaga augaguuggc a 21  
 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (19,20,21)  
 <223> phosphorothioate (PS) backbone modification  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (5,12,17,20)  
 <223> 2'-fluoro modification  
 <400> 10  
 uacuuggaga augaguuggc a 21  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1,2,3,19,20,21)  
 <223> phosphorothioate (PS) backbone modification  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1,3,4,5,12,16,17,20)  
 <223> 2'-fluoro modification  
 <400> 11  
 uacuuggaga augaguuggc a 21  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (2,3,19,20,21)  
 <223> phosphorothioate (PS) backbone modification

<220><221> modified\_base  
<222> (3,4,5,12,16,17,20)  
<223> 2'-fluoro modification  
<400> 12  
uacuuggaga augaguuggc a 21

<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA/RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> modified\_base  
<222> (16,17,18)  
<223> phosphorothioate (PS) backbone modification  
<220><221> modified\_base  
<222> (1,2,9,13,14,17)  
<223> 2'-fluoro modification  
<220><221> modified\_base  
<222> (2,3,4)  
<223> DNA  
<400> 13  
uactuggaga augaguuggc a 21

<210> 14  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> modified\_base  
<222> (1,2,18,19)  
<223> 2'-fluoro modification  
<400> 14  
cactcaacucauu cccaaguc 19

<210> 15  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220><221> modified\_base  
<222> (17,18,19)  
<223> phosphorothioate (PS) backbone modification  
<220><221> modified\_base  
<222> (1,2)  
<223> 2'-O-methyl (2'-OMe) modification  
<400> 15  
ccaacucauu cuccaaguc 19  
<210> 16  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> modified\_base  
<222> (17,18,19)  
<223> phosphorothioate (PS) backbone modification  
<220><221> modified\_base  
<222> (1,2)  
<223> 2'-fluoro modification  
  
<400> 16  
ccaacucauu cuccaaguc 19  
<210> 17  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 17  
ccaacucauu cuccaaguc 19  
<210> 18  
<211> 21  
<212> DNA/RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> modified\_base  
<222> (2,3,4)  
<223> DNA  
<400> 18

uactuggaga augaguuggc a 21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> modified\_base

<222> (2,3,4,5,6,7)

<223> DNA

<400> 19

uacttggaga augaguuggc a 21

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

gucaucacac ugaauaccaa u 21

<210> 21

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

auugguauuc agugugauga cac 23

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

ctagcgagtg ccaactcatt ctccaagtaa at 32

<210> 23

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

ctagatttac ttggagaatg agttggcact cg 32

<210> 24

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> modified\_base

<222> (1,2,18,19)

<223> 2'-O-methyl (2'-OMe) modification

<220><221> modified\_base

<222> (6,9,10,12)

<223> 2'-fluoro modification

<220><221> modified\_base

<222> (17,18,19)

<223> phosphorothioate (PS) backbone modification

<400> 24

ccaacucauu cuccaaguc 19

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> modified\_base

<222> (1,3,4,5,12,16,17,20,21)

<223> 2'-fluoro modification

<220><221> modified\_base

<222> (20,21)

<223> phosphorothioate (PS) backbone modification

<400> 25

uacuuggaga augaguuggc a 21