



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월08일
(11) 등록번호 10-2224580
(24) 등록일자 2021년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 5/0784 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/11 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0122794

(22) 출원일자 2019년10월04일

심사청구일자 2019년10월04일

(56) 선행기술조사문헌

W02017039313 A1*

KR1020150080232 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

이규리

서울특별시 동대문구 한천로58길 107, 101동 250 4호(이문동, 현대아파트)

이혁진

서울특별시 서초구 방배로37길 26-9, 102동 207 호(방배동, 쌍용예가클래식)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 19 항

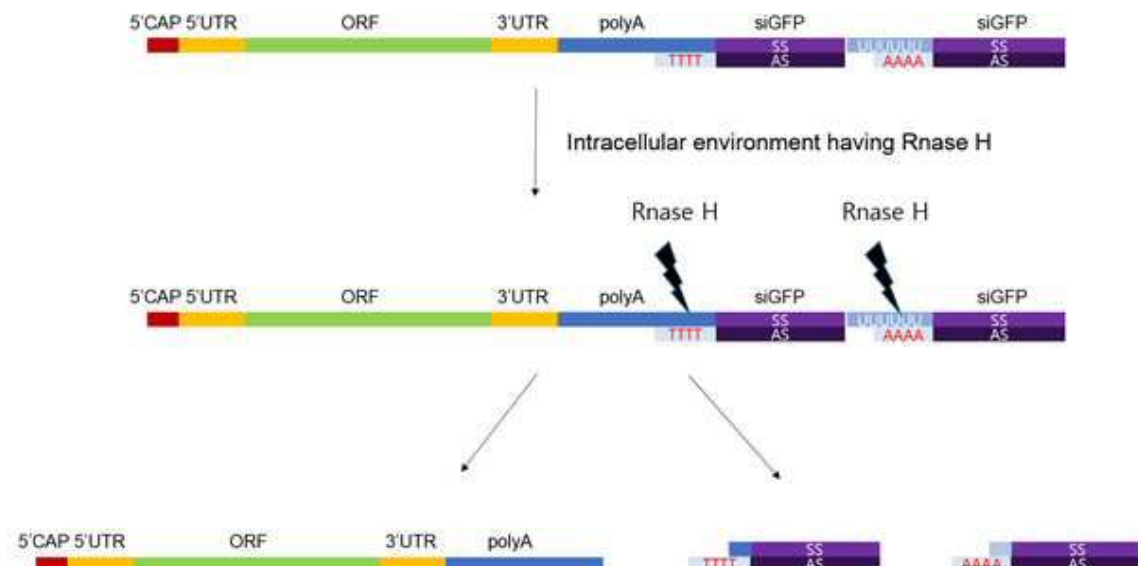
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 유전자 발현 및 억제가 동시에 가능한 핵산 구조체

(57) 요약

본 발명은 유전자 발현 및 억제가 동시에 가능한 핵산 구조체에 관한 것이다. 본 발명에 따른 유전자 발현 및 억제가 동시에 가능한 핵산 구조체는 단일 구조체 내에 mRNA와 siRNA를 모두 포함함에 따라 동일한 세포에 mRNA 및 siRNA를 동시에 도입시키고, 이를 통해 발현하고자 하는 단백질을 정상적으로 발현시키면서도, 특정 유전자의 발현은 특이적으로 억제할 수 있다. 상기 mRNA-siRNA 핵산 구조체는 항원 제시 세포에 타겟 단백질을 발현시켜 면역체계를 활성화시키고 동시에 면역관문 단백질의 활성화를 차단하여 면역회피 방해를 극복할 수 있어, 면역치료 분야, 특히 항암면역치료 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)
A61K 9/51 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 5/0639 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/585 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/3519 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345294153
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	치료용 유전자 백신 개발을 위한 최적화된 mRNA 염기 서열 디자인과 mRNA용 유전자 전달 시스템의 개발
기 여 율	8/10
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711093243
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	섬유화질환 제어 연구센터
기 여 율	1/10
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711081990
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	CRISPR/Cas9 기반 다중 유전체편집을 통한 난치성 만성 B형간염 치료 기술 개발
기 여 율	1/10
과제수행기관명	한동대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

mRNA 및 siRNA를 포함하는 핵산 구조체로,

(i) 3' 말단에 5' 방향에서 3' 방향으로 순차적으로 위치하는 폴리(A) 테일(poly(A) tail); 및 제1 siRNA 센스 또는 안티센스 서열을 포함하는 mRNA; 및

(ii) 상기 제1 siRNA 서열에 상보적으로 결합하는 혼성화 서열을 포함하는 핵산 구조체로서,

상기 혼성화 서열은 3' 말단에 상기 mRNA의 폴리(A) 테일과 상보적으로 결합하는 폴리(T) 테일(poly(T) tail)을 더 포함하는 것인, 핵산 구조체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 혼성화 서열은 제1 siRNA 서열에 상보적으로 결합하는 제2 siRNA 안티센스 또는 센스 서열; 또는 제1 siRNA 서열에 상보적으로 결합하는 DNA 안티센스 또는 센스 서열인 것을 특징으로 하는, 핵산 구조체.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리(T) 테일은 2 내지 6 nt 길이인 것을 특징으로 하는, 핵산 구조체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 mRNA가 코딩하는 타겟 단백질의 발현 및 표적 유전자의 발현 억제를 동시에 유발하는 것을 특징으로 하는, 핵산 구조체.

청구항 6

제1항에 있어서, 제1 siRNA 센스 또는 안티센스 서열의 3' 말단에 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열을 위한 제1 링커 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 핵산 구조체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제1 링커 서열은 폴리(U) 테일(poly(U) tail)인 것을 특징으로 하는, 핵산 구조체.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 제1 링커 서열의 3' 말단에 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 핵산 구조체.

청구항 9

제8항에 있어서, 혼성화 서열; 및 제2 링커 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체로서,
상기 혼성화 서열은 상기 제1 링커 서열; 및 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열에 상보적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 핵산 구조체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 혼성화 서열은 추가의 siRNA 서열에 상보적으로 결합하는 제2 siRNA 안티센스 또는 센스 서열; 또는 추가의 siRNA 서열에 상보적으로 결합하는 DNA 안티센스 또는 센스 서열인 것을 특징으로 하는, 핵산 구조체.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 제2 링커 서열은 제1 링커 서열과 상보적으로 결합하는 폴리(A) 테일(poly(A) tail)인 것을 특징으로 하는, 핵산 구조체.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 제1 siRNA 센스 또는 안티센스 서열의 3' 말단에 다음 (a) 및 (b)를 포함하는 반복단위를 복수 개 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 핵산 구조체:

- (a) 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열을 위한 제1 링커 서열; 및 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열; 및
- (b) 혼성화 서열; 및 제2 링커 서열로서, 상기 혼성화 서열은 상기 제1 링커 서열; 및 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열에 상보적으로 결합하는 것임.

청구항 13

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제12항 중 어느 한 항의 핵산 구조체 및 핵산 전달체를 포함하는 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 핵산 전달체는 나노입자인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 15

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제12항 중 어느 한 항의 핵산 구조체를 포함하는 면역치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 면역치료는 암 면역치료인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 췌

지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 18

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제12항 중 어느 한 항의 핵산 구조체를 포함하는 암 백신.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 암 백신은 수지상세포를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 암 백신.

청구항 20

- 1) 3' 말단에 5' 방향으로 순차적으로 위치하는 폴리(T) 테일(poly(T) tail) 및 siRNA 안티센스 또는 센스 서열이 도입된 DNA 주형을 제조하는 단계;
- 2) DNA 주형에 RNA 중합효소를 포함하는 반응용액을 처리하여 3' 말단에 siRNA 서열을 포함하는 mRNA를 얻는 단계; 및
- 3) 3' 말단에 Oligo(dT)가 연결된 siRNA를 상기 mRNA 산물에 어닐링하는 단계; 를 포함하는 mRNA 및 siRNA를 포함하는 핵산 구조체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전자 발현 및 억제가 동시에 가능한 핵산 구조체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서 세포가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐 무제한적이고, 비 조절적인 방식으로 증식 및 불사화되어 발생하는 질병이다. 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되어 그에 따른 치료제가 개발되어 오고 있으나, 아직까지 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있다. 이러한 암치료의 새로운 패러다임으로 자리매김하고 있는 것이 바로 면역항암요법(암면역치료, cancer immunotherapy)이다.

[0004] 상기 면역항암요법은 수동면역치료와 능동면역치료로 구분할 수 있다. 수동면역치료에는 면역관문 억제제(immune checkpoint inhibitor), 면역세포치료제(immune cell therapy), 치료용 항체(therapeutic antibody) 등이 사용되며, 이 중 면역관문억제제는 T세포 억제에 관여하는 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)의 활성화를 차단하여 T세포를 활성화시켜 암세포를 공격하는 치료제로서 CTLA-4, PD-1, PD-L1 억제제 등이 있다.

[0005] 능동면역치료에는 암치료 백신, 면역조절제 등이 사용되며, 구체적으로 체내 면역세포를 수집하여 강화시키거나 유전공학적으로 변형시켜 다시 넣어주는 세포치료 방식으로 종양침윤림프구(tumor infiltrating lymphocytes, TIL), T세포 수용체(T cell receptor, TCR), 키메라항원수용체(chimeric antigen receptor, CAR) 세포치료제 등이 있고, 암세포가 갖고 있는 종양특이적 항원(tumor-specific antigen)을 암환자에게 투여하여 면역체계를 활성화시킴으로써 체내 면역기능을 활발하게 만들어 암세포를 공격하도록 하는 암백신 등이 있다.

[0006] 그 중에서도 수지상세포(dendritic cell, DC)는 면역계의 가장 핵심적인 항원제시세포로서 수지상세포 암백신은 암 항원을 제시하여 항암 면역 반응 활성화를 통해 종양을 효과적으로 제거할 수 있는 이상적인 치료제로 여겨지고 있다. 그러나, 종양 및 종양미세환경(tumor microenvironment, TME)은 직접적으로 수지상세포의 기능장해를 유도하거나 종양 항원을 감추고 면역억제 사이토카인을 다량 분비하여 항암 면역 활성을 억제한다. 특히, 암

세포와 이를 공격하려는 면역세포의 힘의 균형이 무너지게 되면 암세포가 본격적인 증식을 개시하며 체내 면역 시스템을 교란하는데, 이 때 일부 암세포는 면역세포의 면역관문을 활용하여 면역을 회피하게 된다.

[0007] 따라서, 면역체계를 활성화시켜 능동적으로 암세포에 대한 면역반응을 증가시키면서도, 수동적으로 면역관문 단백질의 활성화를 차단하여 면역회피 방해를 받지 않도록 하는 새로운 면역항암제에 대한 필요성이 대두된다.

[0008] 또한, 유전체 시스템의 복잡한 환경, 특히 암 환경에서 특정 유전자들의 상향 또는 하향 조절이 원활하게 이루어질 필요가 있는데, 하나의 물질의 처리로써 이러한 유전자 조절을 이루는 것이 매우 어렵다. 즉, 단일의 분자를 이용하여 생체 내에서 유전자들의 정확하고 빠른 조절을 목적하는 많은 연구들이 있었으나, 충분한 결과를 확보하고 있지 못한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 mRNA 및 siRNA를 포함하는 핵산 구조체를 제조하고, 상기 구조체가 특정 유전자들을 mRNA 또는 siRNA 각각을 통해 동시에 발현 또는 억제함을 확인하였다. 특히, 항원 mRNA를 발현시켜 면역체계를 활성화시킴과 동시에 면역관문 단백질의 활성화를 억제하여 면역관문 단백질에 의한 면역 회피 기전을 극복할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 유전자 발현 및 억제가 동시에 가능한 mRNA 및 siRNA를 포함하는 핵산 구조체를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 mRNA 및 siRNA를 포함하는 핵산 구조체를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 핵산 구조체 및 핵산 전달체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 핵산 구조체를 포함하는 면역치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 핵산 구조체를 포함하는 암 백신을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 핵산 구조체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 유전자 발현 및 억제가 동시에 가능한 핵산 구조체는 단일 구조체 내에 mRNA와 siRNA를 모두 포함함에 따라 동일한 세포에 mRNA 및 siRNA를 동시에 도입시키고, 이를 통해 발현하고자 하는 단백질을 정상적으로 발현시키면서도, 특정 유전자의 발현은 특이적으로 억제할 수 있다. 상기 mRNA-siRNA 핵산 구조체는 항원 제시 세포에 타겟 단백질을 발현시켜 면역체계를 활성화시킴과 동시에 면역관문 단백질의 활성화를 차단하여 면역 회피 방해를 극복할 수 있어, 면역치료 분야, 특히 항암면역치료 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명에 따른 mRNA-siRNA 핵산 구조체의 제조방법을 순서대로 도식화한 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 mRNA-siRNA 핵산 구조체의 제조방법을 순서대로 도식화한 것이다. DNA 주형, 상기 주형 DNA를 사용하여 시험관 내 전사된 mRNA(“mRNA-siRNA(SS or AS)”) 및 상기 mRNA에 siRNA를 어닐링(annealing)시켜 제조된 mRNA-siRNA 핵산 구조체를 siRNA의 센스(SS) 또는 안티센스 서열(AS) 표시와 함께 도식화하였다.

도 3은 본 발명에 따른 mRNA-siRNA 핵산 구조체가 세포 내 환경에서 RNase H에 의해 mRNA 및 siRNA로 분리되는 과정을 도식화한 것이다(붉은색 글씨는 DNA 서열에 해당).

도 4는 siRNA의 센스 또는 안티센스 서열, 길이를 달리하는 Oligo(dT)를 다양한 구성으로 조합한 siRNA-Oligo(dT)를 mRNA에 어닐링(annealing)시켜 제조한 mRNA-siRNA 실시예들을 도식화한 것이다(붉은색 글씨는 DNA 서열에 해당).

도 5는 DNA 주형(a) 및 시험관 내 전사 산물(b)에 대하여 전기영동한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 mRNA-siRNA에 대하여 전기영동한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 서로 다른 mRNA-siRNA 실시예들의 단백질(빨간 형광 단백질, GFP) 발현 능력을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 형질주입 24시간 후, 서로 다른 mRNA-siRNA 실시예들의 단백질(파란 형광 단백질, BFP) 발현 능력 및 유전자(녹색 형광 단백질, GFP) 발현 억제 능력을 평가한 결과를 나타낸 도이다. (a) mBFP 단백질 발현 효율, (b) GFP 단백질 발현 효율.

도 9는 형질주입 48시간 후, 서로 다른 mRNA-siRNA 실시예들의 단백질(파란 형광 단백질, BFP) 발현 능력 및 유전자(녹색 형광 단백질, GFP) 발현 억제 능력을 평가한 결과를 나타낸 도이다. (a) mBFP 단백질 발현 효율, (b) GFP 단백질 발현 효율.

도 10은 본 발명에 따른 핵산 구조체에 오브알부민(Ovalbumin, OVA)을 발현하는 mRNA 및 STAT3 유전자의 발현을 억제하는 siRNA를 도입하고, 상기 mOVA-siSTAT3의 STAT3 단백질 발현 억제 능력을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 mOVA-siSTAT3의 수지상세포 성숙 촉진 효과를 CD40, CD80 발현량을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0023] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0025] 본 발명에서 용어, “백터”는 적절한 숙주 세포에서 목적하는 단백질을 발현할 수 있도록 하는 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 핵산 제작물을 의미한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 백터는 본 발명에 따른 핵산 구조체를 생산하는데 적합한 것이면 제한 없이 사용될 수 있으며, 프로모터 등 전사를 위해 필요한 요소를 포함한다. 상기 백터는 RNA 백터 또는 DNA 백터일 수 있으며, 바람직하게는 DNA 백터일 수 있다. 상기 백터는 바이러스 백터 또는 플라스미드 백터와 같이 통상의 기술자에게 알려진 백터이면 제한 없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 DNA 플라스미드 백터를 사용할 수 있다. 또한, 상기 백터는 원형 분자인 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 백터, 바람직하게 원형 백터는, 예를 들어 제한 효소에 의해 선형화(linearization)될 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 용어, “프로모터”는 전사조절인자들이 결합하는 DNA 염기서열 부위를 의미하며, 본 발명의 목적상 유전자 발현율을 높이기 위하여 강력하고 안정적인 유전자 발현을 유도할 수 있는 프로모터를 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 프로모터는 바람직하게는 RNA 중합효소 프로모터일 수 있고, 보다 바람직하게는 T7 프로모터 또는 SP6 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에서 용어, “UTR(untranslation region, 비해독 부분)”은 mRNA의 비해독 부분을 이르는 단어로 일반적으로 코딩 영역의 양 말단을 의미한다. 특히, 5' 말단 부분을 5' UTR로 3' 말단 부분을 3' UTR로 지칭한다.
- [0029] 본 발명에서 용어, “폴리(A) 테일(poly(A) tail)”은 폴리아데닐산 또는 폴리아데닐산 절편으로도 불리며, 진핵 생물의 mRNA 3' 말단에 보편적으로 존재하는 아데닐산의 연속한 배열을 의미한다. 그 길이는 10 내지 200 뉴클레오티드(nt) 정도이며, 발현백터 백본(backbone)의 허용 크기에 따라 다양하게 조절될 수 있다. 폴리(A)는 mRNA의 안정화, 해독, 핵에서 세포질로의 수송 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [0030] 본 발명에서 용어, “siRNA(small interfering RNA)”는 이중가닥 RNA가 다이서(Dicer) 효소에 의해 절단되어 생성되는 18~23 뉴클레오티드(nt) 크기의 작은 RNA 조각으로, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 타겟 단백질을, mRNA의 발현을 억제하는 데 사용할 수 있다. 상기 siRNA는 센스 RNA와 안티센스 RNA가 이중가닥 RNA 분자를 형성하고, 이때 센스 RNA가 mRNA 중 일부의 연속 뉴클레오티드의 표적 서열과 동일한 핵산 서열을 포함하는 siRNA 분자인 것이 바람직하다. 상기 안티센스 서열은 센스 서열과 상보적인 서열을 가지는 것이 가장 바람직하다.
- [0031] 본 발명에서, 용어 “상보적인 서열”은 서로 상보적 결합을 이루는 특징을 유지할 수 있다면 100% 상보적 서열 외에 60 내지 100%의 상보적 서열, 바람직하게는 80% 내지 100% 상보적 서열, 더욱 바람직하게는 90 내지 100%

상보적 서열, 더더욱 바람직하게는 95% 내지 100%의 상보적 서열로 이루어지는 것을 포함할 수 있다.

- [0032] 본 발명에서 용어, "표적 유전자"란 상기 siRNA에 의해 발현이 선택적으로 억제되거나 불활성화되는 유전자이다. 이러한 불활성화는, siRNA가 표적 유전자의 mRNA를 절단함에 의해 달성된다.
- [0033] 본 발명에서 용어, "리보뉴클레아제(ribonuclease, RNase)"는 리보핵산을 분해하여 올리고뉴클레오타이드 혹은 단일 핵산으로 만드는 반응을 촉매하는 효소로, 바람직하게는 엔도 리보핵산 분해효소(endo ribonuclease)이며, 상기 엔도 리보핵산 분해효소는 RNase A, RNase H, RNase I, RNase III, RNase L, RNase P, RNase PhyM, RNase T1, RNase T2, RNase U2, RNase V1 및 RNase V를 포함한다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 리보핵산은 전령 리보핵산(messenger RNA)일 수 있으며, 상기 리보뉴클레아제로는 바람직하게는 RNase H를 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, RNase H를 사용하여 본 발명에 따른 핵산 구조체인 mRNA-siRNA의 폴리(A)-폴리(T) 혼성화 부분의 인산다이에스터 결합(phosphodiester bond)을 가수분해시켜 mRNA에 따른 유전자 발현 및 siRNA에 따른 단백질 발현 억제를 동시에 달성할 수 있음을 확인하고 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어, "mRNA-siRNA(SS or AS)"는 3' 말단에 siRNA의 센스 또는 안티센스 서열을 포함하는 mRNA를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서는, 폴리(A) 서열 및/또는 siRNA(센스/안티센스) 서열을 포함하는 역방향 프라이머(Reverse Primer, RP)를 사용하여 3' UTR 바로 옆 3'에 폴리(T) 테일(poly(T) tail) 및 siRNA(안티센스/센스) 서열이 도입된 DNA 주형을 제조하고, 제조한 DNA 주형을 이용하여 시험관 내(in vitro) 전사(in vitro transcription, IVT)를 통해 3' 말단에 siRNA 센스 또는 안티센스 서열을 포함하는 mRNA("mRNA-siRNA(SS or AS)")를 제조하였다.
- [0036] 본 발명에서 용어, "mRNA-siRNA"는 상기 제조한 mRNA-siRNA(SS or AS)의 3' 말단에 도입된 siRNA의 센스 또는 안티센스 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 "혼성화 서열"을 어닐링한 결과, mRNA-siRNA 3' 말단의 폴리(A) 테일 및 siRNA 서열(센스/안티센스)이 각각 이와 상보적인 혼성화 서열(안티센스/센스) 및 oligo(dT)와 결합하여 이중가닥을 형성하는 핵산 구조체를 의미한다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 "혼성화 서열"은 siRNA 또는 DNA일 수 있으며, 따라서 "mRNA-siRNA"은 본 명세서 내에서 "mRNA-siRNA/siRNA" 또는 "mRNA-siRNA/DNA"로도 표기된다.
- [0039] 본 발명은 유전자 발현 및 억제가 동시에 가능한 핵산 구조체를 제공한다.
- [0040] 보다 구체적으로, 본 발명은 mRNA 및 siRNA를 포함하는 핵산 구조체로, (i) 3' 말단에 5' 방향에서 3' 방향으로 순차적으로 위치하는 폴리(A) 테일(poly(A) tail); 및 제1 siRNA 센스 또는 안티센스 서열을 포함하는 mRNA; 및 (ii) 상기 제1 siRNA 서열에 상보적으로 결합하는 혼성화 서열을 포함하는 핵산 구조체를 제공한다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 혼성화 서열은 제1 siRNA 서열에 상보적으로 결합하는 제2 siRNA 안티센스 또는 센스 서열; 또는 제1 siRNA 서열에 상보적으로 결합하는 DNA 안티센스 또는 센스 서열인 것을 특징으로 한다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 혼성화 서열은 3' 말단에 상기 mRNA의 폴리(A) 테일과 상보적으로 결합하는 폴리(T) 테일(poly(T) tail)을 더 포함할 수 있다. 상기 폴리(T) 테일은 2 내지 6 nt 길이일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 구조체는 제1 siRNA 센스 또는 안티센스 서열의 3' 말단에 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열을 위한 제1 링커 서열을 더 포함할 수 있고, 상기 제1 링커 서열은 링커 서열의 3' 말단에 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열을 더 포함할 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 링커 서열; 및 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열에 상보적으로 결합하는 혼성화 서열; 및 제2 링커 서열을 더 포함할 수 있다. 상기 혼성화 서열은 상기 제1 링커 서열; 및 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열에 상보적으로 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 링커(linker) 또는 어댑터(adaptor) 서열은 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 서열을 제한 없이 사용할 수 있고, 바람직하게는 상기 제1 링커 서열은 폴리(U) 테일일 수 있고, 상기 제2 링커 서열은 제1 링커 서열과 상보적으로 결합하는 폴리(A) 테일일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 링커 또는 어댑터 서열은 DNA와 혼성화되지 않는 부위를 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 구조체는 하기 그림에서 붉은 점선으로 표시한 반복단위를 복수 개 더 포함할 수 있으며, 바람직하게는 1개 내지 5개 더 포함할 수 있다. 추가되는 반복단위의 개수는 당업자가 목적에 따라 적

절히 조절할 수 있다.



[0049]

[0051]

구체적으로, 상기 핵산 구조체는 제1 siRNA 센스 또는 안티센스 서열의 3' 말단에 (a) 및 (b)를 포함하는 반복 단위를 복수 개 더 포함할 수 있고, 상기 (a) 및 (b)는, (a) 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열을 위한 제1 링커 서열; 및 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열; 및 (b) 혼성화 서열; 및 제2 링커 서열인 것을 특징으로 하며, 이 때 상기 혼성화 서열은 상기 제1 링커 서열; 및 추가의 siRNA 센스 또는 안티센스 서열에 상보적으로 결합하는 것을 특징으로 한다.

[0052]

반복단위의 일부로 추가되는 siRNA는 타겟으로 하는 유전자가 서로 같거나 다를 수 있으며, 상기 핵산 구조체는 세포 내로 주입되면 RNase H에 의해 mRNA-siRNA의 혼성화 부위가 절단되어 독립된 이중가닥 siRNA로 분리되어 효과적으로 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 서로 상이한 2종 이상의 siRNA를 포함하는 경우, 2 이상의 타겟 유전자를 동시에 발현 억제할 수 있다.

[0054]

또한, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 구조체 및 핵산 전달체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0055]

본 발명에서, 용어 “핵산 전달체(nucleic acid delivery system)”는 본 발명에 따른 핵산 구조체의 체내로의 전달효율을 높이기 위한 것으로, 체내에서의 안정성이 우수할 뿐 아니라 약물로서의 제조 공정이 간단하다는 장점이 있다.

[0056]

상기 핵산 전달체는, 이에 제한되는 것은 아니나, 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터, 리포솜, 양이온성 고분자, 미셀(micelle), 에멀전 및 나노입자(nanoparticles)를 포함할 수 있고, 바람직하게는 나노입자일 수 있다. 상기 양이온성 고분자에는 키토산, 아텔로콜라겐(atelocollagen), 양이온성 폴리펩타이드(cationic polypeptide) 등과 같은 천연고분자와 poly(L-lysine), 선형 또는 분지형 PEI(polyethylene imine), 사이클로덱스트린계열 다가양이온(cyclodextrin-based polycation), 덴드리머(dendrimer) 등과 같은 합성고분자를 포함한다.

[0057]

본 발명에 있어서, 상기 나노입자는 이에 제한되는 것은 아니나, 자성입자(magnetic bead), 금(Au) 나노입자, 은(Ag) 나노입자, 백금(Pt) 나노입자, 양자점(Quantum dot), 상방전환 나노입자(upconversion nanoparticle, UCNP), 그래핀(graphene)-나노입자 복합체, 색 염색 나노입자(color dyed particles) 및 라텍스(latex) 나노입자, 실리카 나노입자(silica nanoparticle), 탄소유도체 나노입자(carbon derivative nanopartilces; 예컨대, 탄소나노튜브(carbon nanotube) 및 고형리피드 나노입자(solid lipid nanoparticles)로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0058]

본 발명에 따른 핵산 구조체는 상기와 같은 나노입자에 도입되는 경우 상기 핵산 구조체의 타겟 세포로의 전달이 촉진되어, 비교적 낮은 농도의 투여량으로도 타겟 세포로 전달되어 높은 타겟 단백질 발현 유도 및 표적 유전자 발현 억제 기능을 나타낼 수 있다. 또한, 타겟 이외의 타 장기 및 세포로의 비 특이적인 mRNA-siRNA의 전달을 방지할 수 있다.

[0060]

또한, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 구조체를 포함하는 면역치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 면역 반응을 증가시키거나, 특정 질병, 감염 또는 질환의 치료 또는 예방에 바람직한 면역 반응의 일부를 선택적으로 상승시킬 수 있다.

[0061]

본 발명에 있어서, 상기 면역치료는 바람직하게는 암 면역치료일 수 있다.

[0062]

본 발명에 있어서, 상기 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 췌장교종, 두개내인종, 상피세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063]

본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 본 발명에 따른 핵산 구조체를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 제공될 수 있다.

- [0064] 상기 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 의미하며, 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 세프 테졸에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calciumcarbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0066] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0067] 상기 약학적 조성물은 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 예를 들어 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 복강, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0068] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 구조체를 포함하는 암 백신을 제공한다. 본 발명에 따른 핵산 구조체는 항원제시세포에 항원을 표지하여 면역반응을 유도시킬 수 있으며, 동시에 면역 관문 단백질의 발현을 억제할 수 있다. 상기 핵산 구조체는 나노입자와 결합한 상태로 암 백신에 포함될 수 있다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 상기 암 백신은 수지상세포를 더 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 암 백신은 생체 외(ex vivo)에서 본 발명에 따른 핵산 구조체를 수지상세포에 전달한 다음, 형질감염된 수지상세포를 전달하는 형태로 제공될 수 있다. 상기 수지상세포는 대상체의 면역원성을 증가시킬 수 있어, 대상체 내 종양의 증식 및/또는 전이를 효과적으로 예방 또는 억제할 수 있다.
- [0070] 본 명세서에서 용어, "수지상세포"는 항원을 세포 내부로 흡수하고, 이를 처리하여 항원 또는 항원으로부터 유래된 펩타이드를 MHC 클래스 I 복합체 또는 MHC 클래스 복합체와 함께 제시하는 항원제시세포(antigen presenting cell)를 의미한다. 수지상세포는 성숙도에 따라 미성숙 수지상세포와 성숙 수지상세포로 분류한다.
- [0071] 상기 "미성숙 수지상세포"는 성숙 초기 단계에서 발견되는 것으로서, 성숙 수지상세포와 마찬가지로 CD14와 같은 세포 표면 마커를 발현하지 않으며, HLA-DR, CD86, CD80, CD83 또는 CD40을 낮은 수준으로 발현하고, CD1a 및 CCR1, CCR2, CCR5 및 CXCR1을 통상적 수준으로 발현하는 수지상세포를 말한다.
- [0072] 상기 "성숙 수지상세포"는 미성숙 수지상세포가 성숙화되어 형성된 세포를 의미하며, B 세포 및 T 세포 활성화에 관여하는 세포 표면 마커, 예를 들어 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 (HLA-DR), 세포 부착인자(CD54, CD18, CD11), 공동 자극 인자(예를 들어, CD86, CD80, CD83 또는 CD40)이 미성숙 수지상세포에 비하여 높은 수준 또는 상대적으로 증가된 수준으로 발현하는 세포를 의미한다.
- [0073] 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 핵산 구조체에 오브알부민(Ovalbumin, OVA)을 발현하는 mRNA 및 STAT3 유전자의 발현을 억제하는 siRNA를 도입한 mRNA-siSTAT3을 형질주입한 결과, CD40 및 CD80 마커의 발현량이 현저히 증가하여 분리된 mRNA 및 siRNA를 혼합하여 투여하는 것보다 수지상세포 성숙 촉진 효과가 훨씬 우수함을 확인하였다.
- [0075] 또한, 본 발명은
- [0076] 1) 3' 말단에 5' 방향에서 3' 방향으로 순차적으로 위치하는 폴리(T) 테일(poly(T) tail) 및 siRNA 안티센스

또는 센스 서열이 도입된 DNA 주형을 제조하는 단계;

[0077] 2) DNA 주형에 RNA 중합효소를 포함하는 반응용액을 처리하여 3' 말단에 siRNA 서열을 포함하는 mRNA를 얻는 단계; 및

[0078] 3) 3' 말단에 Oligo(dT)가 연결된 siRNA를 상기 mRNA 산물에 어닐링하는 단계; 를 포함하는 mRNA 및 siRNA를 포함하는 핵산 구조체의 제조방법을 제공한다.

[0079] 상기 1) 단계에 있어서, DNA 주형은 mRNA 합성을 위한 전사주형으로서, T7 프로모터(promoter), 5' UTR, 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF) 및 3' UTR을 포함하는 DNA 벡터(pUCIDT-Amp vector)를 제조하였고, 상기 DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 벡터를 선형화한 후 증폭시킨 것일 수 있다.

[0080] PCR은 DNA 벡터를 1차 주형으로 하여 PCR 반응 혼합액, 정방향 프라이머(forward primer)로서 5' - TTGGACCTCGTACAGAAGCTAATACG-3' (서열번호 4)으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드, 역방향 프라이머(reverse primer)로서 "5' - siRNA 서열 - 폴리(A) - DNA 벡터와 특이적으로 결합하는 프라이머 서열 - 3' (역방향 프라이머)" 구성에 기반한 것을 사용하여 수행하였다. 구체적으로, 상기 역방향 프라이머는 폴리(A) 서열 및/또는 siRNA(센스/안티센스) 서열을 포함하여, 제조된 DNA 주형의 3' UTR 바로 옆 3' 에 폴리(T) 테일(poly(T) tail) 및 siRNA(안티센스/센스) 서열을 도입시켰다. 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 PCR 반응 혼합액은 2X TOPsimple™ DryMIX-HOT(enzymomics, 한국)을 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0081] DNA 주형을 제조하기 위한 PCR의 조건은 PCR 수행을 위한 3단계, 즉 변성(Denaturation) 단계, 혼성(Annealing) 단계, 연장(Elongation) 단계를 수행하기 위한 온도 및 시간을 각각 유지할 수 있고, 상기 변성 단계를 수행하기 위한 조건은 85℃ 내지 105℃ 5분 내지 15분, 바람직하게는 95℃ 10분, 상기 혼성 단계를 수행하기 위한 조건은 40℃ 내지 65℃ 20초 내지 40초, 바람직하게는 59℃ 30초, 상기 연장 단계를 수행하기 위한 조건은 50℃ 내지 80℃ 30초 내지 2분, 바람직하게는 72℃ 1분일 수 있다. 상기 PCR 수행을 위한 특정된 온도 및 시간 범위는 PCR을 수행함에 있어서 실현 가능한 범위 내에서 조절 가능하다.

[0082] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 DNA 주형을 제조하기 위한 PCR의 조건은 초기변성(Initial denaturation) 95℃ 10분 후, 변성 95℃ 3초, 혼성 59℃ 30초, 연장 72℃ 1분을 1회전으로 총 30회전을 진행하고, 추가 연장(Final elongation) 72℃ 5분을 진행하였다. 또한, 증폭된 PCR 반응산물은 AccuPrep®PCR Purification Kit(Bioneer, South Korea)를 사용하여 정제하였다.

[0083] 상기 2) 단계는 시험관 내 전사(*in vitro* transcription, IVT) 단계로, 1) 단계에서 제조한 DNA 주형에 RNA 중합효소를 포함하는 반응용액을 처리하여 3' 말단에 siRNA 서열을 포함하는 mRNA("mRNA-siRNA")를 제조하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 시험관 내 전사는 제조한 DNA 주형에 반응용액을 처리하여 37℃에서 16시간 동안 배양한 뒤, Turbo DNase I를 1μl 추가하여 37℃에서 15분간 반응시켜 수행하였다. 다만, 상기 시험관 내 전사를 위한 구체적인 반응조건은 실현 가능한 범위 내에서 조절 가능하다.

[0084] 상기 3) 단계에 있어서, 어닐링(annealing)을 위한 조건은 서열-의존적이며 환경적 변수에 따라 다양하나, 40 내지 80℃ 5분 내지 15분, 바람직하게는 75℃ 10분일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 어닐링은 75℃ 10분 수행 후 4℃까지 패스트 쿨링(급냉)하여 수행하였다.

[0086] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구 범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

[0088] 실시예. 본 발명에 따른 핵산 구조체의 제조

[0089] DNA 주형 제조

[0090] 유전자 발현 및 억제가 동시에 가능한 핵산 구조체를 제조하기 위해, 다음과 같이 실험을 수행하였다. 먼저, mRNA 합성을 위한 전사주형으로서 T7 프로모터(promoter), 5' UTR, 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF) 및 3' UTR을 포함하는 DNA 벡터(pUCIDT-Amp vector)를 제조하였다. 상기 DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 벡터를 선형화하고 T7 프로모터부터 3' UTR까지 증폭시켰다. PCR은 TOPsimple™ DryMIX-HOT(enzymomics, 한국)을 사용하여 수행하였고, 구체적인 PCR 조건은 하기 표 1과 같다. 증폭된 PCR 반응산물은 AccuPrep® PCR Purification Kit(Bioneer, South Korea)를 사용하여 정제하였다.

[0091] [표 1]

Standard reaction conditions			
- PCR mixture			
2X TOPsimple™ DryMIX-HOT			1 tube
Template DNA (3-5 ng/μl)			1 μl
Forward Primer (10 pmole/μl)			1 μl
Reverse Primer (10 pmole/μl)			1 μl
DEPC water			up to 20 μl
- PCR cycles			
Step	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation ^a	95℃	10 min	1
Denaturation	95℃	30 sec	30
Annealing ^b	59℃	30 sec	
Elongation	72℃	1 min/kb	
Final elongation	72℃	5 min	1

[0092]

[0094] 이 때, 폴리(A) 서열 및/또는 siRNA(센스/안티센스) 서열을 포함하는 역방향 프라이머(Reverse Primer, RP)를 사용하여 3' UTR 바로 옆 3' 에 폴리(T) 테일(poly(T) tail) 및 siRNA(안티센스/센스) 서열이 도입된 DNA 주형을 제조하였다(도 1의 a). 즉, 상기 역방향 프라이머는 다음 구성에 기반한 것을 사용하였다.

[0096] 5' - siRNA 서열 - 폴리(A) - DNA 벡터와 특이적으로 결합하는 프라이머 서열 - 3' (역방향 프라이머)

[0098] 본 실시예에 있어서, 본 발명자들은 상기 역방향 프라이머로 120 nt 폴리(A) 서열만으로 이루어진 프라이머, 120 nt 폴리(A) 서열과 siRNA(센스/안티센스) 서열을 포함하는 프라이머, 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP) mRNA를 표적하는 siRNA(이하, siGFP), 빨간 형광 단백질(Red fluorescent Protein, RFP) 및 파랑 형광 단백질(Blue fluorescent Protein, BFP)을 코딩하는 mRNA를 사용하였다.

[0099] mRNA-siRNA 합성

[0100] 상기 실시예에서 제조한 DNA 주형을 사용하여 시험관 내(*in vitro*) 전사(*in vitro* transcription, IVT)를 수행하여 말단에 siRNA 서열을 포함하는 mRNA(이하, "mRNA-siRNA(SS or AS)" 라 한다)를 합성하였다. T7 RNA 중합효소, rATP, rCTP, rGTP, rUTP 및 캡 유사체(cap analogue)를 포함하는 반응 용액(MEGAscript™T7 Transcription Kit (Ambion, USA)을 사용하여 시험관 내 전사를 수행하고, DNA 분해효소(DNase) 처리로 주형 DNA를 제거하고 mRNA만을 회수하였다.

[0101] 구체적으로, 반응용액을 튜브에 넣고 37℃에서 16시간 동안 배양한 뒤, Turbo DNase I를 1μl 추가하여 37℃에서 15분간 반응시키고, 반응산물을 MEGAclean™ Kit(Ambion, USA)를 사용하여 정제하였다. 반응용액을 구성하는 모든 성분 및 이의 용량, 농도는 하기 표 2와 같다. 이를 통해 합성된 mRNA는 캡 유사체를 전사 반응에 첨가함으로써 생산된 5'-캡(5'-cap)을 5' 말단에 포함하였다(도 1의 b).

[0102] [표 2]

Amount	Component	Concentration
to 20 μ l	DEPC water	
5 μ l	3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog (NEB, USA)	10mM
2 μ l	ATP solution	75mM
1.5 μ l	mCTP solution (Trilink, USA)	100mM
0.5 μ l	GTP solution	75mM
1.5 μ l	Pseudo UTP solution (Trilink, USA)	100mM
1ug	PCR amplified DNA template	
2 μ l	Enzyme mix	10X
2 μ l	10x reaction buffer	10X

[0103]

[0105] 본 발명에 따른 핵산 구조체 제조

[0106] 다음으로, dTdTdTdTdTdT와 연결시킨 siRNA(siRNA-Oligo(dT))를 포함하는 역방향 프라이머를 상기 실시예에서 제조한 mRNA-siRNA(SS or AS)에 어닐링(annealing)하여, mRNA-siRNA(SS or AS)의 일부가 혼성화 서열과 상보적으로 결합하여 이중가닥을 형성하는, 본 발명에 따른 핵산 구조체(“mRNA-siRNA”를 제조하였다. 이 때, 상기 혼성화 서열은 폴리(T)를 포함하는 siRNA 서열 또는 폴리(T)를 포함하는 DNA 서열에 해당한다.

[0107] 구체적으로, 어닐링은 mRNA-siRNA(SS or AS)와 siRNA-Oligo(dT)를 동일한 튜브에 넣어 혼합하고, 75℃에서 10분간 반응시킨 뒤, 4℃까지 패스트 쿨링(급냉)하였다. 이 때, dTdTdTdTdTdT 부위는 mRNA-siRNA(SS or AS)의 폴리(A) 테일(poly(A) tail)에 어닐링되고, siRNA 서열(안티센스/센스)은 mRNA-siRNA(SS or AS)의 3' 말단에 도입된 siRNA에 상보적으로 어닐링되었고(도 1의 c), 그 결과 mRNA-siRNA(SS or AS) 3' 말단의 폴리(A) 테일 및 siRNA 서열(센스/안티센스)이 각각 이와 상보적인 siRNA(안티센스/센스) 및 oligo(dT)와 결합하여 이중가닥을 형성하는 본 발명에 따른 핵산 구조체가 형성되었다(이하, “(또는 mRNA-siRNA/siRNA 또는 mRNA-siRNA/DNA)”라 한다). 상기 mRNA-siRNA의 제조과정을 도식화하여 도 2에 나타내었다.

[0108] 본 실시예 및 실험예에서 사용한 DNA 벡터, 모든 프라이머 서열, 모든 siRNA 서열을 하기 표 3에 나타내었다. 모든 서열은 IDT(유전자 합성서비스)로부터 제공받아 사용하였다.

표 3

[0109]

유전자 이름	서열 정보	서열번호
pUCIDT-AMP_mTagB FP2	TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCT TGCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTG TCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCAGAGTGCACCAATGCGGTGTG AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTTCGCCATTCAGGCTGCGC AACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCATCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATG TGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAAGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAAACGACGG CCAGTGCAACGCGATGACGATGGATAGCGATTTCATCGATGAGCTGACCCGATCGCCGCCCGCGGA GGGTTGCGTTTGAGACGGGCGACAGATGAGGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACG CCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGG ATCGAACCTTTTGGACCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAATAAGAGAGAAA AGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGCTGATTAAGGAGAA CATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCCTGGACAACCATCACTTCAAGTGCACATCCGAGG GCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGGTCGAGGGCGGCCCTCTC CCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACTAGCTTCTCTACGGCAGCAAGACCTTCATCAACCACAC CCAGGGCATCCCCGACTTCTTCAAGCAGTCTTCCCTGAGGGCTTCACATGGGAGAGAGTCAACCA CATACGAAGACGGGGCGTGTGACCGCTACCCAGGACACAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATC TACAACGTCAGATCAGAGGGGTGAACCTTACATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACT CGGCTGGGAGGGCTTACCGAGACGCTGTACCCGCTGACGGCGGCCCTGGAAGGCAGAAACGACA TGGCCCTGAAGCTCGTGGGCGGGAGCCATCTGATCGCAACGCCAAGACCACATATAGATCCAAG AAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAAGAATCAA GGAGGCCAACACGAGACCTACGTCGAGCAGCAGGAGTGGCAGTGGCCAGATACTGCGACCTCC CTAGGCAACTGGGGCACAAGCTTAATGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTCTGCGCCATGACCTC TTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTGAAGGTCTAG AACTAGTGTGACGCAAAATCAGTTCTGGACCAGCGAGCTGTGCTGCGACTCGTGGCGTAATCATG GTCTAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATGTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGA GCATAAAGTGTAAGACCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCA CTGCCCCGTTTTCCAGTCGGGAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG GAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTG TTCGAGTTCGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAGATCAGG GATAACGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGC GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTC AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTG CGCTCTCCTGTTCCGACCTGTGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT GGCGTTTTCTATAGCTACAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTCCGCTCAAGCTGG GCTGTGTGACGAACCCCGGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG TCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGC GAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAA CAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTCTTGA TCCGGCAAAACAAACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAG AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGGAACGAAA ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAAT TAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG CTTAATCAGTGAAGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCC CCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCG CGAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGAAGGGCCGAGCG CAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAG TAAGTAGTTCGCGAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGTACAGGCATCGTGGTGTCA CGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATC CCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGG CCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCTATGCCATCCGTA AGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACC GAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTAAAAAGTGC TCATCATTTGGAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGT TCGATGTAACCCACTCGTGCACCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGG GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAA TACTCATACTCTACCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGA TACATATTGAATGTATTAGAAAAATAAACAATAAGGGTTCCGCGCACATTTCCCGCAAAAGT GCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGA GGCCCTTTCGTC	1

pUCIDT-AMP_DsRed Express2 RFP	TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCT TGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTG TCGGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGACCAAAATGCCGTGTG AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTTCGCCATTCAGGCTGCGC AACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCATCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATG TGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGG CCAGTGCAACGCGATGACGATGGATAGCGATTTCATCGATGAGCTGACCCGATCGCCCGCCGCGGA GGGTTGCGTTTGAGACGGGCGACAGATGAGGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACG CCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGG ATCGAACCCTTTTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTACTATAGGGAATAAGAGAGAAA AGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCAT GCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCG AGGGCAAGCTACGAGGGCACCCAGACGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCTCGCC TTCCGCTGGGACATCCTGTGCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAGGTGTACGTGAAGCAGCCCGC CGACATCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAAC TCGAGGACGGCGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTAC CACGTGAAGTTCATCGGCGTGAACCTCCCTCCGACGGCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGG CTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCTGTACCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGG CGCTGAAGCTGAAGGGCGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAG CCCGTGAAGCTGCCCGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCAACGAGGA CTACACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGCCGCCACCACTGTTCCAGTAGGGTGCCT TCTGCGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTT GAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTGAGGGTCTAGAACTAGTGTGACGCAAAATCAGTCTGGACCAG CGAGCTGTGCTGCGACTCGTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCTGTGTGAAATTGTTATCC GCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCATATGAG TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGC CAGCTGCATTAAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGC TTCTCGCTCACTGACTCGCTCGGTCGGTTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA AGGCGGTAAACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGC CAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC TGACGAGCATCAGAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATAAAGAT ACCAGGCGTTTTCCCTTGAAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCTGTGCTTACCGGA TACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCT CAGTTCCGTGTAGGTGCTTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGTTACGCGGACC GCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG GCAGCAGCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA GTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAG TTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGT TTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAT CAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAGTGTAAATCAATCTAAAGTATA TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACTATCTCAGCGATCTG TCTATTTCTGTTATCCATAGTTGCTGACTCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCT TACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGGAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCA GCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTCCAT CCAGTCTATTAATTGTTGCGGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCGAGTTAATAGTTTGCACAACG TTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCC GGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTT CGTCCCTCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCAC TGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACC AAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAA TACCGCGCCACATAGCAGAAGTTTAAAGTGCTCATCATTTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAAAC TCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCT TCAGCATCTTTACTTTACACAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAAAGGCAAGGCAAAATGCCGAAA AAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTACCTTTTCAATATTATTGAA GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAA ATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATTATCAT GACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATACGAGGCCCTTTCGTC	2
----------------------------------	--	---

pOVA	gatttataagggattttgccgatttcggcctatttggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatt taacgcgaattaatctgtggaatgtgtcagttagggtgtggaaagtcaccaggctccccagc aggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagttagcaaccagggtgtggaaagtcaccaggct ccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagttagcaaccatagtcgccccctta actccgcccatccgcccttaactccgccagttccgcccatctccgcccatggctgactaat tttttttatttatgtagggcaggccgctctgctctgagctattccagaagtagtgaggag gctttttggaggcctaggcttttgcaaaaagctccgggagcttgatataccatttcggatct gatcaagagacaggataggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcagggttctcc ggccgcttgggtggagaggctattcggtatgactgggcacacagacaatcggtgctctgatg ccgcgctgttcggctgtcagcgcaggggcgcccggttcttttgtcaagaccgacctgtccggt gcccgaatgaactgcaggacaggcagcgcggtatcgtggtggccacgacggcggttcttctg cgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaaggagctggctgctattgggcgaagtgccgg ggcaggatctctgtcatctcaccttgtctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatg cggcggctgcatacgcttgatccgctacctgccattcgaccaccaagcgaacatcgcatcga gcgagcacgtactcggatggaagccggttctgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcagg ggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatgccgacggcgaggatctcgtc gtgacccatggcgatgcctgcttgcgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcat	3
	cgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctaccgctgatattg ctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgctttacgggtatcgccgctcccga tcgcagcgcacgccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggttcgaa atgaccgaccaagcgacgcccacactgccatcacgagatttcgattccaccgccgcttctatga aagggttgggttcggaatcgttttcgggacgcccggctggatgatcctccagcgggggactctca tgctggagttcttcgccaccccaacttgtttattgcagctataatgggtacaaataaagcaat agcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcatctagtgtgtggttgtccaaact catcaatgtatcttatcatgtctgtataccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggt catagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatcagagccggaagc ataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagttagctaacacattaatgctgtgcgctcact gcccgctttccagtgcggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcgggga gaggcgggttgcgtattggcgctcttcgcttctcgtcactgactcgtgcgctcggtcgtt cggtcgcggcgagcggatcagctcactcaaggcggtaatacgggttatccacagaatcagggga taacgcaggaaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaacctaaaaaggccgct tgctggcgtttttccataggctcgcgcccttgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagttag aggtggcgaaaccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcg ctctcctgttcgacctgcccgttaccggataacctgtccgctttctcccttcgggaagcgtgg	
	cgtttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggc tgtgtgcacgaaccccccttcagcccgaccgctgcgcttaccggttaactatcgtcttgagtc caaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggttaacaggattagcagagcga ggtatgtaggcgggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaaca gtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatc cggcaaaacaccaccgctggtagcgggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaa aaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaac tcacgttaagggtatttggtcatgagattataaaaaaggatcttcacctagatccttttaattta aaaatgaagtttttaatacaatctaaagtataatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgct taatcagtgaggcacctatctcagcgtatctgtctatttcgttcacatcatagttgcctgactccc gtcgtgtagataaactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcg agaccacgctcacggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgca gaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagttctattaatgttgccgggaagctagagta agtagttcgccagttaatagtttgccgaacgttgttgccattgctacaggcatcgtgggtgtcacg ctcgtcgtttgggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccc ccatgttgtgcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagtggcc gcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaag	

	atgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccga gttgcctcttgcggcgctcaatacgggataataaccgcccacatagcagaactttaaaagtgtc atcatttgaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttc gatgtaaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttaccagcggtttctgggt gagcaaaaacaggaaggcaaaaatgccgcaaaaagggaataaggggcgacacggaatgttgaata ctcatactcttcttttcaatattatgaagcatttatcagggttatgtctcatgagcggata catatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggggttccgcgcacatttcccgaaggc cacctgacgtcgacggatcgggagatctccgatccctatgggtgactctcagtacaatctgct ctgatgccgatagttaagccagtatctgctccctgcttgtgtgttgagggtcgctgagtgtgc gcgagcaaaaatttaagctacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttag ggttaggcggttttgcgctgcttcgcatgtacgggacagatatacgcgttgacattgattatga ctagtattatagtagtaataacacggggtcatagttcatagcccatataggagtcccgctt acataacttacggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaat aatgacgtatgttcccagatagtaacgcaaatagggaacttccatgacgtcaatgggtggagtatt tacggtaaaactgccacttggcagtagatcaagtgatcatatgccaagtacgccccctattgac gtcaatgacggtaaatggcccgctggcatatgcccagtagacacattatgggactttcctac ttggcagtagacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatgcgggttttggcagtagacatca atggcgctggatagcggtttgactcacggggatttccaagctccacccccattgacgtcaatggg agtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgaataactccgccccattgac gcaaatggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaaactagag aacccactgcttactggcttatcgaaattaatcagactcactataggagagaccaagcttggtag cgagctcggtccactagttaacggcgccagtgctggaattcctcgaaagacaactcagagtt caccatgggctccatcggtgcagcaagcatggaattttgttttgatgtattcaaggagctcaaag tccaccatgccaatgagaacatcttctactgccccattgccatcatgtcagctctagccatggtat tacctgggtgcaaaagacagcaccaggacacaaaataaagggttgttcgctttgataaacttcc aggattcgagacagtagtaagactcagtggtgacacatctgtaaacgttcaactcttcaacttagag acatcctcaaccaaatcaccacacaaaatgatgtttattcgttcagccttgccagtagactttat gctgaagagagataccaatcctgccagaatacttgagtggtgaaggaaactgtatagaggagg cttggaaacctatcaactttcaaacagctgcagatcaagccagagagctcatcaattcctgggtag aaagtgcagacaaatggaattatcagaaatgtccttcagccaagctccgtggattctcaactgca atggttctgggttaatgccattgtcttcaaaggactgtgggagaaagcatttaaggatgaagacac acaagcaatgcctttcagagtgactgagcaagaaagcaaacctgtgcagatgatgtaccagattg gtttatttagagtggtcaatggcttctgagaaaatgaagatcctggagcttccatttgccagt gggacaatgagcatgttggtgctgttcctgatgaagctcagggcttgagcagcttgagagtagt aatcaactttgaaaaactgactgaatggaccagttctaatgttatggaagagaggaaagatcaaag tgtacttacctcgcatgaagatggaggaataaacaacctcacatctgtcttaaggctatgggc attactgacgtgtttagctcttcagccaatctgtctggcatctcctcagcagagagcctgaagat atctcaagctgtccatgcagcacatgcagaaatcaatgaagcaggcagagaggtggtagggtcag cagaggctggagtggatgctgcaagcgtctctgaagaatttagggctgaccatccattcctctt tgtatcaagcacatcgcaaccaacgccttctcttcttggcagatgtgttccctttaaaga agaaagctgaaaaactctgtcccttccaacaagaccagagcactgtagtatcagggttaaatg aaaagtatgttatctgctgcacagacttcataaaagctggagcttaacttagagggccctatt ctatagtgctcacctaaatgctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagtggcagcc atctgttgtttgccccccccctgcttcccttgacctggaagggtgccactccactgtccttt cctaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcatctattctggggggtggg gtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggtatgcggtggg ctctatggctctgaggcggaagaacagctggggctctagggggtatccccacgcgcctgta gcggcgcattaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacatttgccagcgcc ctagcgcccgctcctttcgcttcttcccttcccttctcgccacgttcgcccggcttccccgtca agctcctaaatcgggggctcctttagggttcgatttagtgctttacggcaccctcgaccccaaaa aacttgattagggtgatggttcacgtagtgggcatcgccctgatagacggtttttcgccctttg acgttggagtccagctctttaaagtggactctgttccaaactggaacaacactcaaccctat ctcggtctattctttt	
Forward primer- pUC1DT-AMP_mTagB FP2	5'-TTGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG-3'	4
Reverse primer- pUC1DT-AMP_mTagB FP2-siGFP (AS)	5'-AAG CAA GCT GAC CCT GAA GTT TTT CTT CCT ACT CAG GCT TTA TTC AAA GAC CA-3' (<i>Italic: sequence for antisense strand of siGFP</i>)	5
SS siGFP	5' -GCA AGC UGA CCC UGA AGU U (dT) _{2 or 6} -3'	6, 7
Reverse primer- pUC1DT-AMP_mTagB FP2-siGFP (SS)	5'-AAA ACT TCA GGG TCA GCT TGC TTT CTT CCT ACT CAG GCT TTA TTC AAA GAC CA-3' (<i>Italic: sequence for sense strand of siGFP</i>)	8
AS siGFP	5' -AAC UUC AGG GUC AGC UUG C (dT) _{2 or 6} -3'	9, 10

[illegible]

[0111] 본 발명에 따른 mRNA-siRNA는 세포 내 환경에서 Rnase H에 의해 mRNA의 폴리(A)와 siRNA의 폴리(T) 간에 형성된 이중가닥 혼성체가 절단되어, 타겟 단백질을 발현시킬 수 있는 mRNA와 특정 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 siRNA로 분리되고, 이를 통해 대상체에서 단백질의 발현과 억제를 동시에 가능하게 한다(도 3).

[0112] 한편, 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 mRNA-siRNA는 mRNA의 3' 말단에 siRNA가 하나 이상 연결될 수 있는 것을 특징으로 한다. 이 때, 첫번째 siRNA의 도입 이후 두번째 siRNA부터는 상기 어닐링과 동일한 조건으로 실험을 수행하되, 역방향 프라이머에 siRNA 서열을 추가하여 진행한다. 추가되는 siRNA의 경우, 역방향 프라이머에 대하여 도입하고자 하는 개수만큼 siRNA를 도입하여 추가할 수 있음을 특징으로 한다. 예를 들어, 두번째 siRNA를 도입하기 위해 사용한 모든 프라이머를 하기 표 4에 나타내었다.

丑 4

[0113]

유전자 이름	서열 정보	서열번호
Forward primer- pUCIDT-AMP_mTagBFP2	TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG	4
Reverse primer- pUCIDT-AMP_mTagBFP2-s iGFP (2개) (AS)	AAG CAA GCT GAC CCT GAA GTT AAAA AAG CAA GCT GAC CCT GAA GTT TTT CTT CCT ACT CAG GCT TTA TTC AAA GAC CA(<i>Italic: sequence for antisense strand of siGFP 2개</i>)	18
Reverse primer- pUCIDT-AMP_mTagBFP2-s iGFP (2개) (SS)	AAA ACT TCA GGG TCA GCT TGC AAAA AAA ACT TCA GGG TCA GCT TGC TTT CTT CCT ACT CAG GCT TTA TTC AAA GAC CA(<i>Italic: sequence for sense strand of siGFP 2개</i>)	19
AS siGFP	5' -AAC UUC AGG GUC AGC UUG C (dT) _{2 or 6} -3'	9, 10
SS siGFP	5' -GCA AGC UGA CCC UGA AGU U (dT) _{2 or 6} -3'	6, 7

- [0115] 본 실시예에 있어서, 본 발명자들은 하기와 같이 siRNA의 센스 또는 안티센스 서열, 길이를 달리하는 Oligo(dT)를 다양한 구성으로 조합한 siRNA-Oligo(dT)를 사용하여 mRNA의 단백질 발현 효율 및 siRNA의 유전자 발현 억제능을 평가하고, 유전자 발현 및 억제 효과가 우수한 핵산 구조체의 최적 구조를 도출하고자 하였다(도 4).
- [0117] 5' - siGFP와 상보적으로 결합하는 siRNA 서열(안티센스/센스) - dTdT - 3' (T2)
- [0118] 5' - siGFP와 상보적으로 결합하는 siRNA 서열(안티센스/센스) - dTdTdTdTdTdT - 3' (T6)
- [0119] 5' - siGFP와 상보적으로 결합하는 DNA 서열(안티센스/센스) - dTdTdTdT - 3' (DNA)
- [0121] **실험예 1. 각 반응산물의 확인**
- [0122] 상기 실시예의 각 반응이 끝난 후, 반응 산물을 1% 아가로스 겔에 100V 전압으로 30분간 전기영동하여 PCR 반응 산물, 시험관 내 전사 산물을 확인한 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0123] 도 5의 a에 나타난 바와 같이, 역방향 프라이머를 사용하여 증폭된 DNA 단편의 크기는 각각 971 bp(poly(A)120, 라인 4) 및 992 bp(poly(A)120-AS siGFP, 라인 5)임을 확인하였다. 상기 결과를 통해, PCR을 수행함에 따라 3' UTR 바로 옆 3' 에 폴리(T) tail 및 siRNA 서열이 도입되도록 디자인된 역방향 프라이머를 통해 DNA 주형이 효과적으로 증폭되었음을 확인하였다.
- [0124] 또한, 도 5의 b에 나타난 바와 같이, 상기 DNA 주형을 사용하여 시험관 내 전사를 수행한 결과, 각각 3' 말단에 poly(A)120 서열이 도입된 mRFP(라인 2) 및 3' 말단에 poly(A)120-AS siGFP 서열이 도입된 mRFP(라인 3)가 합성되었음을 확인하였다.
- [0126] 마찬가지로, 상기 실시예에 기재한 방법으로 제조한 mRNA-siRNA 핵산 구조체를 확인한 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0127] 도 6의 a에 나타난 바와 같이, mRNA의 3' 말단에 poly(A)120 서열만 도입된 것과 poly(A)120과 안티센스 siGFP 서열이 함께 도입된 형태의 mRFP를 센스 siGFP 가닥과 패스트 쿨링을 시킨 결과, poly(A)120과 안티센스 siGFP 서열이 함께 도입된 형태의 mRFP에 주입한 센스 siGFP의 밴드가 열어지는 것을 확인함으로써 센스 siGFP가 성공적으로 poly(A)120과 안티센스 siGFP 서열이 도입된 mRFP에 어닐링되었음을 확인하였다.
- [0128] 또한, 도 6의 b에 나타난 바와 같이, FITC 표지된 센스 siGFP(FITC-SS siGFP, 라인 1)보다, 3' 말단에 안티센스 siGFP가 도입된 mRFP(mRFP-AS siGFP)에 대하여 FITC 표지된 센스 siGFP가 어닐링된 경우(mRFP-AS siGFP + FITC-SS siGFP, 라인 2) 밴드가 더 위쪽에서 나타남을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 3' 말단에 siRNA 서열을 포함하는 mRNA와 상기 siRNA 서열에 상보적으로 결합하는 siRNA를 어닐링시키면, 상호 간에 부분적으로 혼성화된 mRNA-siRNA 핵산 구조체가 형성됨을 확인하였다.
- [0130] **실험예 2. 각 구조체의 단백질 발현 능력 평가**
- [0131] 상기 실시예에서 제조한 서로 다른 mRNA-siRNA 핵산 구조체의 단백질 발현 효과를 확인하였다. 구체적으로, 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 1×10^4 개로 시딩하고, 형질주입 시약을 사용하여 세포를 10 pg mRNA/cell의 용량의 각 구조체로 형질주입(transfection)시켰다. 형질주입 24시간 후, 유세포 분석기 FACS Calibur(BD Biosciences, CA)를 사용하여 각 실시예에서 발현되는 빨간 형광 단백질의 형광 강도를 측정하여 각 구조체의 번역 효율(translation efficiency)을 확인하고 그 결과를 도 7에 나타내었다. 실험에 사용한 모든 실시예를 하기 표 5에 나타내었다. 하기 표 5에 있어서, mRNA-SS/SS 또는 mRNA-SS/AS는 siGFP-T2 서열과 어닐링 된 것을 의미하며, mRNA-AS/SS(DNA) 또는 mRNA-AS/AS(DNA)는 siGFP 서열을 가지고 있는 DNA에 추가적으로 dT 서열이 4 개 도입된 서열과 어닐링 된 것을 의미한다.

표 5

[0132] 본 발명의 실시예

mRNA-siRNA(SS or AS) (5'-3')		siRNA 및/또는 DNA (5'-3')		실시예
mRNA	siRNA	siRNA	Oligo(dT)	
-	-	-	-	Blank

mRFP	-	-	-	mRNA
	siGFP(SS)	-	-	mRNA-SS
		siGFP(SS)	TT(T2)	mRNA-SS/SS
		siGFP(AS)	TT(T2)	mRNA-SS/AS
		siGFP(SS) (DNA)	TTTT(DNA)	mRNA-SS/SS(DNA)
		siGFP(AS) (DNA)	TTTT(DNA)	mRNA-SS/AS(DNA)
	siGFP(AS)	-	-	mRNA-AS
		siGFP(SS)	TT(T2)	mRNA-AS/SS
		siGFP(AS)	TT(T2)	mRNA-AS/AS
		siGFP(SS) (DNA)	TTTT(DNA)	mRNA-AS/SS(DNA)
		siGFP(AS) (DNA)	TTTT(DNA)	mRNA-AS/AS(DNA)

[0134] 도 7에 나타난 바와 같이, 3' 말단에 siRNA 서열을 포함하는 mRNA를 형질주입한 실시예에서 공통적으로 번역 효율이 낮아진 것을 확인하였다. 반면, mRNA(SS)에 siGFP(AS)-TTTT(DNA)를 어닐링시킨 실시예와 mRNA(AS)에 siGFP(SS)-TTTT(DNA)를 어닐링시킨 실시예의 경우 감소된 번역 효율이 현저히 증가하며, mRFP을 형질주입한 경우보다도 형광 강도가 강하여 mRNA의 단백질 발현 능력이 완전히 회복되었음을 확인하였다.

[0135] 상기 결과를 통해, 3' 말단에 siRNA(센스/안티센스) 서열을 포함하는 mRNA와, 상기 siRNA에 상보적으로 결합하는 siRNA(안티센스/센스) 서열 및 mRNA에 상보적으로 결합하는 Oligo(dT)를 포함하는 siRNA를 혼성화시키면, siRNA 서열의 결합에 의해 저해된 mRNA의 번역 효율이, mRNA-siRNA(SS or AS)의 siRNA 서열에 어닐링(annealing)된 DNA 서열에 의해 회복될 수 있음을 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 mRNA-siRNA/DNA 하이브리드 구조체가 세포 내 RNase H에 의해 잘려나가는 기전에 의한 것으로 보인다. 또한, mRNA-siRNA(SS or AS)에 어닐링시킨 siRNA-dTdT(T2)의 경우 단백질 번역 효율이 저해되는 것을 확인함으로써 mRNA-siRNA(SS or AS)와 어닐링된 DNA의 시퀀스의 길이가 적어도 2개 이상은 되어야 세포 내 RNase H에 의해 추가적으로 도입된 siRNA 시퀀스가 잘려나가 mRNA 단백질 번역 효율이 회복될 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, 이후 실험에서는 mRNA-siRNA(SS or AS)에 siRNA-dTdTTdTdTdT(T6)를 어닐링시켜 세포 내 도입 시 RNase H에 의해 mRNA와 siRNA로 분리되어 mRNA의 단백질 번역 효율 및 siRNA의 단백질 억제 효율이 유지될 수 있도록 디자인하였다.

[0137] 실험예 3. 각 구조체의 단백질 발현 능력 및 유전자 발현 억제 능력 평가

[0138] 상기 실시예에서 제조한 서로 다른 mRNA-siRNA 구조체의 단백질 발현 능력 및 유전자 발현 억제 효과를 확인하였다. 구체적으로, 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 1×10^4 개로 시딩하고, 형질주입 시약을 사용하여 세포를 10 pg mRNA/cell의 용량의 각 구조체로 형질주입(transfection)시켰다. 형질주입 24, 48시간 후, 유세포 분석기 FACS Calibur(BD Biosciences, CA)를 사용하여 각 실시예에서 발현되는 과란 형광 단백질 및 녹색 형광 단백질의 형광 강도를 측정하여 각 구조체의 단백질 발현 효율을 확인하고 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다. 실험에 사용한 모든 실시예를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

mRNA-siRNA(SS or AS) (5'-3')		siRNA 및/또는 DNA (5'-3')		실시예
mRNA	siRNA	siRNA	Oligo(dT)	
-	-	-	-	Blank
mBFP	-	-	-	mBFP
-	-	siGFP	TT(T2)	siGFP-T2
-	-	siGFP	TTTTTT(T6)	siGFP-T6
mBFP	siGFP(SS)	-	-	mBFP-SS
		siGFP(AS)	TT(T2)	mBFP-SS/AS-T2
		siGFP(AS)	TTTTTT(T6)	mBFP-SS/AS-T6
		siGFP(AS)	TTTT(DNA)	mBFP-SS/AS(DNA)
	siGFP(AS)	-	-	mBFP-AS
		siGFP(SS)	TT(T2)	mBFP-AS/SS-T2
		siGFP(SS)	TTTTTT(T6)	mBFP-AS/SS-T6
		siGFP(SS)	TTTT(DNA)	mBFP-AS/SS(DNA)

- [0141] 도 8의 a에 나타난 바와 같이, 3' 말단에 siRNA 서열을 포함하는 mRNA를 형질주입한 실시예에서 과란 형광 강도가 감소했으며, 이를 통해 siRNA 서열을 연결함에 따라 단백질 발현 효율이 낮아진 것을 확인하였다. 반면, mBFP(SS)에 siGFP(AS)-TTTTT(T6), siGFP(AS)-TTTT(DNA)를 어닐링시킨 실시예와 mBFP(AS)에 siGFP(SS)-TTTTT(T6), siGFP(SS)-TTTT(DNA)를 어닐링시킨 실시예의 경우 감소된 번역 효율이 현저히 증가하며, mBFP을 형질주입한 경우보다도 형광 강도가 강하여 mRNA의 단백질 발현 능력이 완전히 회복되었음을 확인하였다.
- [0142] 상기 결과를 통해, 3' 말단에 siRNA(센스/안티센스) 서열을 포함하는 mRNA와, 상기 siRNA에 상보적으로 결합하는 siRNA(안티센스/센스) 서열을 포함하는 siRNA를 혼성화시키는 경우(mRNA-siRNA), mRNA에 siRNA 서열을 연결 시킴에 따른 번역 효율의 감소를 극복할 수 있음을 확인하였다. 나아가, 감소된 번역 효율은 어닐링되는 siRNA의 3' 말단에 위치하는 Oligo(dT)가 T2인 경우보다는 T6이, T6인 경우보다는 T4일 때 현저히 증가함을 확인하였다.
- [0144] 한편, 도 8의 b에 나타난 바와 같이, mBFP(SS)에 siGFP(AS)-TTTTT(T6)을 어닐링시킨 실시예와 mBFP(AS)에 siGFP(SS)-TTTTT(T6)을 어닐링시킨 실시예에서 녹색 형광 강도가 감소했으며, 특히 측정된 형광 강도가 정상 siRNA를 형질주입한 경우와 유사함을 확인하였다.
- [0145] 상기 결과를 통해, mRNA의 단백질 발현과는 독립적으로, 3' 말단에 siRNA(센스/안티센스) 서열을 포함하는 mRNA와, 상기 siRNA에 상보적으로 결합하는 siRNA(안티센스/센스) 서열을 포함하는 siRNA를 혼성화시키는 경우(mRNA-siRNA), 상기 siRNA가 표적하는 유전자의 발현이 현저히 억제됨을 확인하였다. 특히, 단백질 발현 억제 효율은 어닐링되는 siRNA의 3' 말단에 위치하는 Oligo(dT)가 T6인 경우 가장 높음을 확인하였다.
- [0146] 이와 같은 결과는 형질주입 48시간 후에도 유사하게 나타남을 확인하였다. 다만, 도 9의 a에 나타난 바와 같이, mRNA에 siRNA 서열을 연결시킴에 따른 감소된 번역 효율은 어닐링되는 siRNA의 3' 말단에 위치하는 Oligo(dT)가 T2 또는 T4일 때 가장 크게 증가하였다. 또한, 도 9의 b에 나타난 바와 같이, 유전자 발현 억제 효율은 mBFP(AS)에 siGFP(SS)-TTTTT(T6)을 어닐링시킨 실시예에서 가장 높았다.
- [0148] 상술한 분석 결과, 본 발명에 따른 mRNA-siRNA 핵산 구조체는 고효율로 세포에 동시에 도입되고, 도입된 후 세포 내 RNase에 의해 mRNA와 siRNA간에 형성된 이중가닥 혼성체가 절단되어 타겟 단백질을 발현시킬 수 있는 mRNA와 특정 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 siRNA로 분리됨을 확인하였다. 나아가, 이와 같은 특이적 구조를 가짐으로써, 본 발명에 따른 mRNA-siRNA 핵산 구조체는 하나의 세포에서 mRNA에 의한 타겟 단백질의 발현 및 siRNA에 의한 특정 유전자의 발현 억제를 동시에 성공적으로 달성할 수 있음을 확인하였다.
- [0150] **실험예 4. 본 발명에 따른 핵산 구조체의 면역원성 향상 능력 평가**
- [0151] mRNA는 톨-유사 수용체(toll-like receptor, TLR)를 자극하여 면역반응을 유도하는 효과가 있다고 알려져 있다. 즉, mRNA는 자체적으로 면역반응 유도 효과가 있는 동시에 항원(단백질) 발현이 가능하여 별도의 어쥬번트(adjuvant) 없이도 백신으로 활용 가능하다. 한편, 이와 같은 mRNA 기반 백신은 수지상세포나 T 세포에 특정 항원을 발현시키는데, 이 때 STAT3 단백질은 면역반응 활성화를 억제하여 수지상세포의 성숙(maturation)을 억제한다.
- [0152] 이에, 본 발명자들은 본 발명에 따른 핵산 구조체를 활용하여, 항원을 발현하도록 설계된 mRNA 구조체에 STAT3의 발현을 억제하는 siRNA 서열을 도입하면 면역회피 방해를 받지 않으면서 동시에 수지상세포의 성숙을 효과적으로 촉진할 수 있을 것으로 판단하고 다음과 같이 실험을 수행하였다. 먼저, 상기 실시예에 기재한 것과 동일한 방법으로, 본 발명에 따른 핵산 구조체에 오브알부민(Ovalbumin, OVA)을 발현하는 mRNA 및 STAT3 유전자의 발현을 억제하는 siRNA를 도입하였다. 비교실험군으로는 STAT3을 표적하는 siRNA(siSTAT3), 오브알부민을 발현하는 mRNA와 siSTAT3의 단순 혼합물(mOVA + siSTAT3)을 사용하였다. 실험에 사용한 모든 mRNA와 siRNA 서열은 상기 실시예 내 표 3에 기재하였다.
- [0154] **4-1. STAT3 단백질 발현 억제 효과**
- [0155] 골수-유래 수지상세포(bone marrow-derived dendritic cell, BMDC)에 상기 제조한 siSTAT3, mOVA 및 siSTAT3의 단순 혼합물(mOVA 및 siSTAT3의 단순 혼합물) 및 mOVA-siSTAT3/siSTAT3 구조체를 각각 처리하였다. 구체적으로, BMDC(1×10^6 cells/웰)를 10% FBS와 항생제(100 unit/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신)를 함유한 X-vivo 15 media으로 37°C에서 24시간 동안 24-웰 플레이트에서 배양하였다. 배양한 BMDC를 대상으로 siSTAT3, mOVA + siSTAT3 및 mOVA-siSTAT3/siSTAT3을 각각 형질주입하였다. 각 BMDC에서 STAT3 유전자의 발현 정도를 qRT-PCR 방법을 사용하여 분석하고, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0156] 도 10에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 핵산 구조체에 mOVA 및 siSTAT3을 도입한 mOVA-siSTAT3/siSTAT3 처리 시, mOVA 및 siSTAT3을 단순 혼합한 mOVA + siSTAT3에 비해 STAT3 발현이 현저히 억제됨을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 분리된 mRNA 및 siRNA를 혼합하여 투여하는 것보다 단백질 발현을 목적으로 하는 mRNA와 siRNA가 결합된 형태의 mRNA-siRNA 핵산 구조체를 투여하는 경우에 면역원성 향상 효과가 훨씬 우수함을 확인하였다.

[0158] 4-2. 수지상세포 성숙 촉진 효과

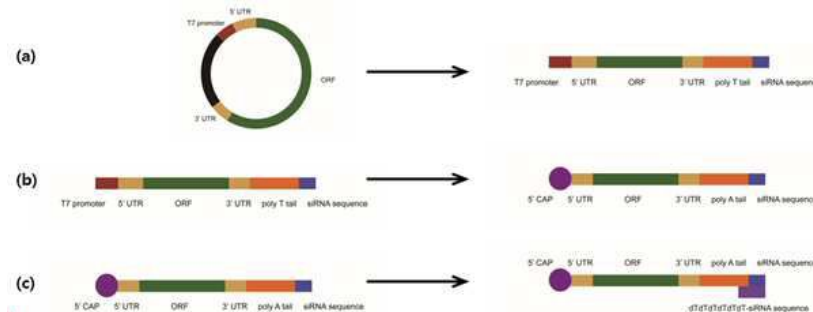
[0159] 상기 실험예 4-1에 기재한 것과 동일한 방법으로 골수-유래 수지상세포(bone marrow-derived dendritic cell, BMDC)에 상기 제조한 siSTAT3, mOVA + siSTAT3 및 mOVA-siSTAT3/siSTAT3 구조체를 각각 처리하여 12시간 내지 48시간 동안 배양하였다. 일부 세포를 취하여 세포 표면에서 발현하는 CD40 및 CD80 마커의 발현량을 유세포분석(Flow cytometry, FACS)을 통하여 분석하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0160] 도 11에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 핵산 구조체에 mOVA 및 siSTAT3을 도입한 mOVA-siSTAT3/siSTAT3 처리 시, mOVA 및 siSTAT3을 단순 혼합한 mOVA + siSTAT3에 비해 성숙한 수지상세포의 표현형인 CD40 및 CD80의 발현이 모두 현저하게 증가함을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 분리된 mRNA 및 siRNA를 혼합하여 투여하는 것보다 단백질 발현을 목적으로 하는 mRNA와 siRNA가 결합된 형태의 mRNA-siRNA 핵산 구조체를 투여하는 경우에 수지상세포 성숙 촉진 효과가 훨씬 우수함을 확인하였다.

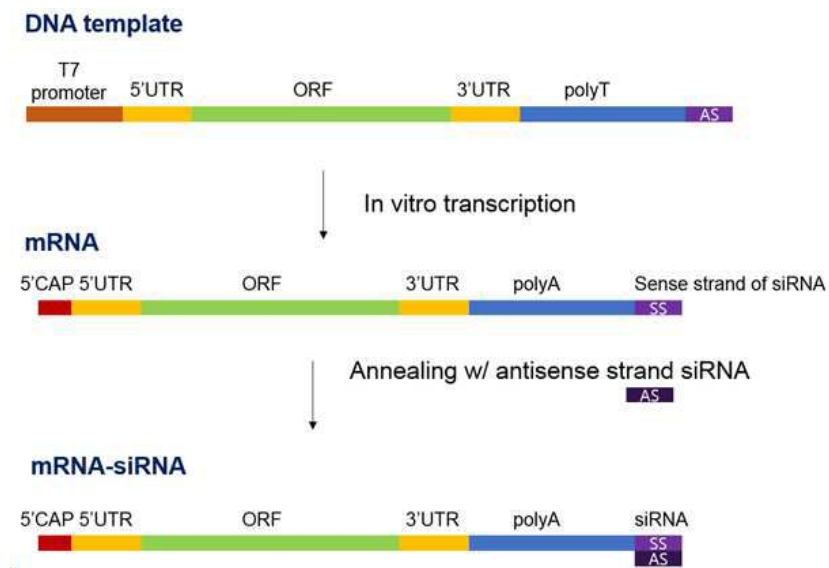
[0162] 상기와 같은 실험들을 통해, 본 발명에 따른 mRNA-siRNA 핵산 구조체는 mRNA와 siRNA가 동시에 세포에 도입되어, mRNA는 발현하고자 하는 단백질을 정상적으로 발현하고, siRNA는 특정 유전자의 발현을 특이적으로 억제할 수 있음을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 핵산 구조체는 항원 제시 세포에 타겟 단백질을 발현시켜 면역체계를 활성화시키고 동시에, 면역관문 단백질의 활성화를 차단하여 면역회피 방해를 극복할 수 있어, 면역치료 분야, 특히 항암면역치료 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

도면

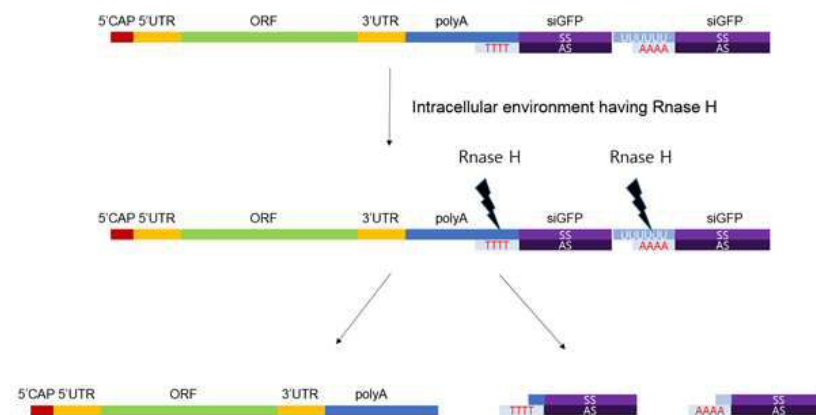
도면1



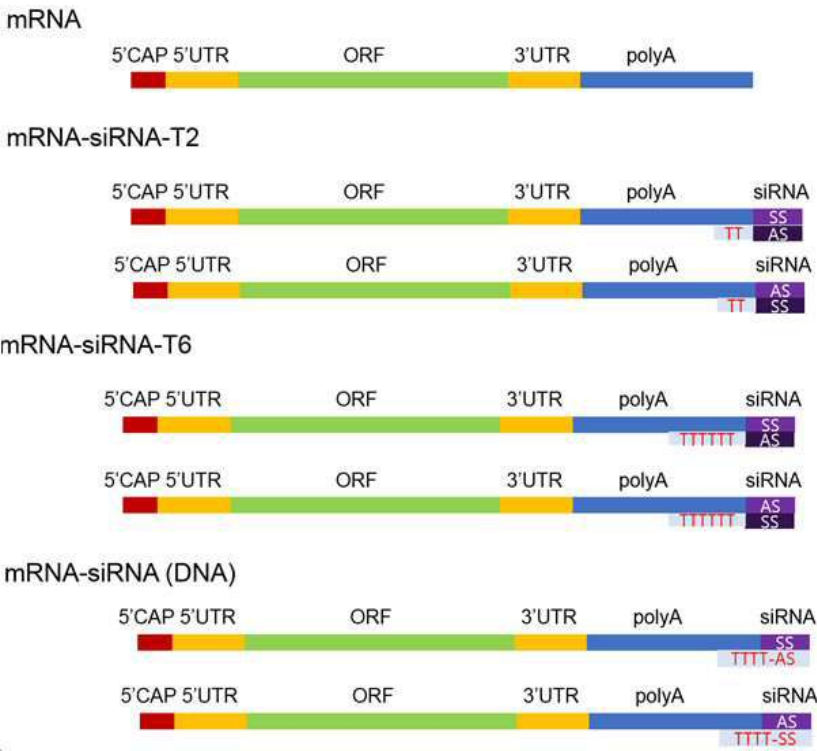
도면2



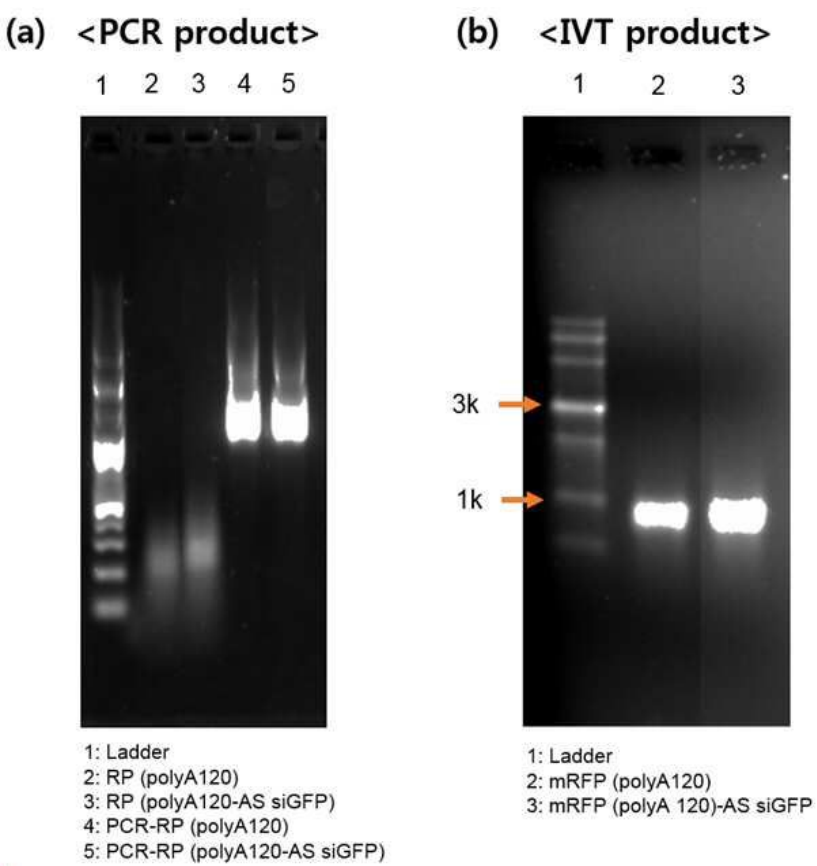
도면3



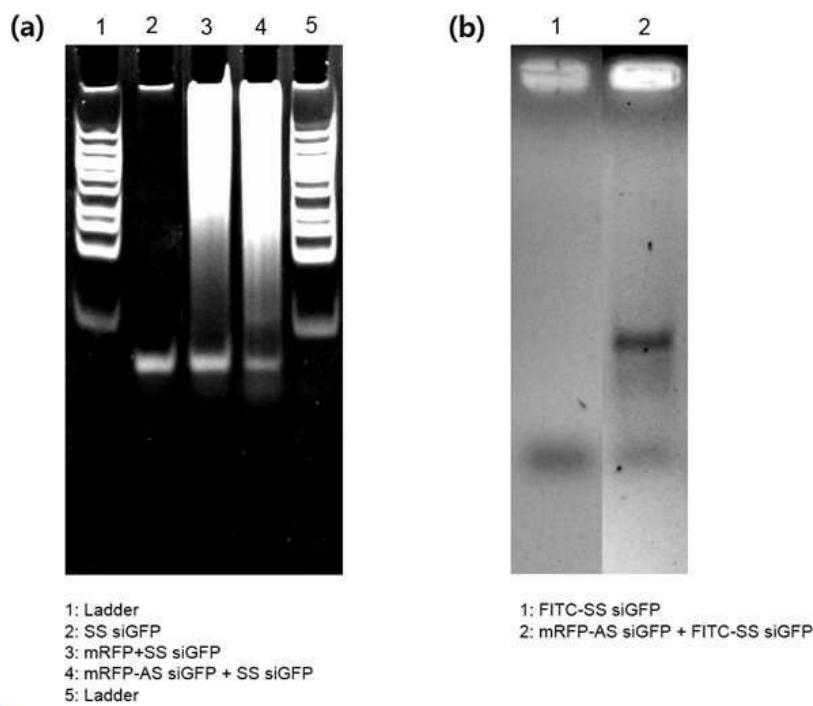
도면4



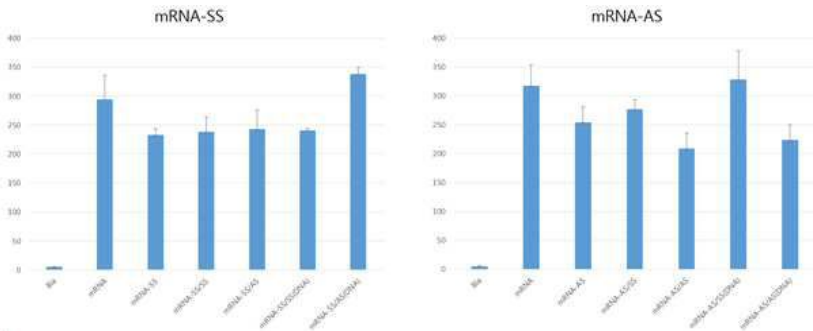
도면5



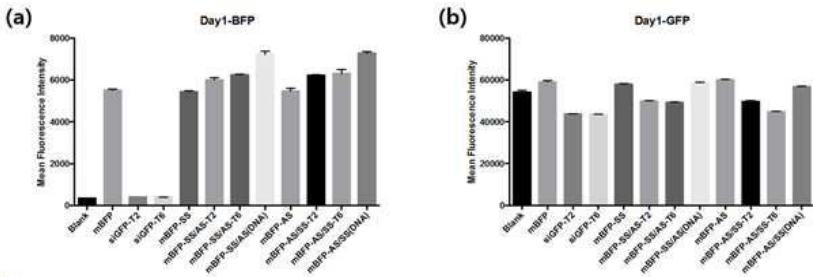
도면6



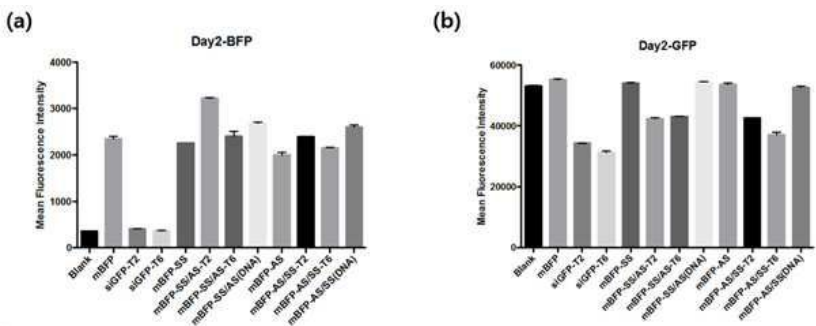
도면7



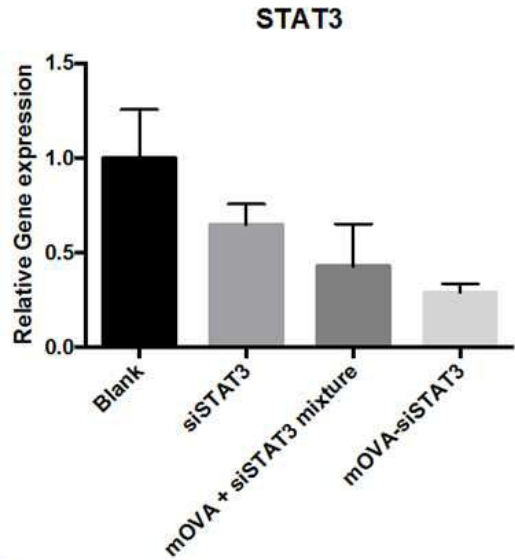
도면8



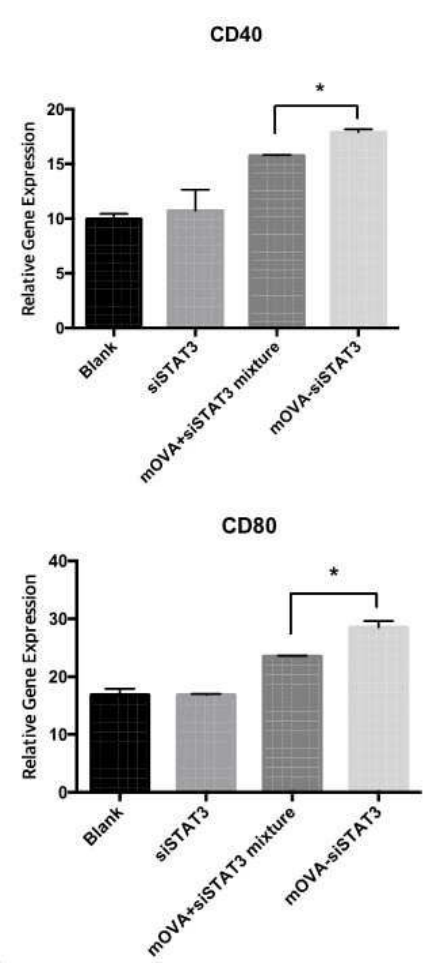
도면9



도면10



도면11



서열 목록

<110>	Ewha University - Industry Collaboration Foundation	
<120>	Nucleic acid construct for simultaneous gene expression and suppression	
<130>	EWHA1-60P	
<160>	19	
<170>	KoPatent In 3.0	
<210>	1	
<211>	3782	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pUCIDT-AMP_mTagBFP2	
<400>	1	
	t c g c g c g t t t c g g t g a t g a c g g t g a a a a c c t c t g a c a c a t g c a g c t c c c g g a g a c g g t c a	60
	c a g c t t g t c t g t a a g c g g a t g c c g g g g a g c a g a c a a g c c c g t c a g g g c g c g t c a g c g g g t g	120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accaaatacg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcatcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagtgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgcac gcgatgacga tggatagcga	420
ttcatcgatg agctgacccg atcgccgccg ccggagggtt gcgtttgaga cgggcgacag	480
atgaggtctg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc	540
tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccggactct agaggatcga acccttttgg	600
accctcgta agaaagtaac acgactcact atagggaat aagagagaaa agaagagtaa	660
gaagaaatat aagagccacc atggtgtcta agggcgaaga gctgattaag gagaacatgc	720
acatgaagct gtacatggag ggcacgtgg acaacatca cttcaagtgc acatccgagg	780
gcgaaggcaa gccctacgag ggcaccaga ccatgagaat caaggtggtc gagggcggcc	840
ctctccctt cgccttcgac atectggcta ctacttct ctacggcagc aagaccttca	900
tcaaccacac ccagggcac cccgacttct tcaagcagtc cttccctgag ggcttcacat	960
gggagagagt caccacatag gaagacgggg gcgtgctgac cgctaccag gacaccagcc	1020
tccaggacgg ctgcctcatc tacaacgtca agatcagagg ggtgaacttc acatccaacg	1080
gccctgtgat gcagaagaaa acactcggct gggaggcctt caccgagacg ctgtaccccg	1140
ctgacggcgg cctggaaggc agaaacgaca tggccctgaa gctcgtgggc gggagccatc	1200
tgatcgcaaa cgccaagacc acatatagat ccaagaaacc cgctaagaac ctcaagatgc	1260
ctggcgtcta ctatgtggc tacagactgg aaagaatcaa ggaggccaac aacgagacct	1320
acgtcgagca gcacgaggtg gcagtggcca gatactcgca cctccctagc aaactggggc	1380
acaagcttaa tgctgccttc tgcggggctt gccttctggc catgcccttc ttctctccct	1440
tgcacctgta cctcttggtc tttgaataaa gcctgagtag gaagtgaggg tctagaacta	1500
gtgtcgacgc aaatcagttc tggaccagcg agctgtgctg cgactcgtgg cgtaatcatg	1560
gtcatagctg tttctgtgt gaaattgtta tccgtcaca attccacaca acatacgagc	1620
cggaaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc	1680
gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat	1740
cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt cctcgctcac	1800
tgactcgctg cgctcggtcg ttccgctgcg gcgagcggtc tcagctcact caaaggcgg	1860
aatacggtta tccacagaat caggggataa gcgaggaaag aacatgtgag caaaaggcca	1920

gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc	1980
ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact	2040
ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacct	2100
gtcgcttacc ggatacctgt ccgcctttct ccttcggga agcgtggcg tttctcatag	2160
ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca	2220
cgaaccccc gttcagcccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa	2280
cccgtaaga cagacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc	2340
gaggtatgta ggcggtgcta cagagtctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag	2400
aagaacagta ttigtatct gcgctctgct gaagccagtt accctcgaa aaagagtgg	2460
tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggttttttg ttgcaagca	2520
gcagattacg cgagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatcttt ctacggggtc	2580
tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcagttagat tatcaaaaag	2640
gatcttcacc tagatcctt taaattaaaa atgaagttt aaatcaatct aaagtatata	2700
tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgt	2760
ctgtctatct cgttcaccca tagttgccctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg	2820
ggagggtta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gtcaccggc	2880
tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggtcctgc	2940
aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc	3000
gccagttaat agtttgcga acgttgttc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc	3060
gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc	3120
ccccatgttg tgcaaaaaa cggttagctc cttcggctct ccatcgttg tcagaagtaa	3180
gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat	3240
gccatccgta agatgcttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata	3300
gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca	3360
tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag	3420
gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc	3480
agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc	3540
aaaaaaggga ataaggcgca cacggaatg ttgaatactc atactctacc tttttcaata	3600
ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta	3660
gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta	3720
agaaaccatt attatcatga cattaacctt taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg	3780

tc 3782

<210> 2

<211> 3749

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pUCIDT-AMP_DsRed Express2 RFP

<400> 2

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accaaatacg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggcc tcatcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagtgggta acgccagggt 360

tttccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaac gcgatgacga tggatagcga 420

ttcatgatg agctgacccg atcgccgcgg ccggagggtt gcgtttgaga cgggcgacag 480

atgaggtcgc tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc 540

tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccggactct agaggatcga acccttttgg 600

accctcgtac agaagctaata acgactcact atagggaaat aagagagaaa agaagagtaa 660

gaagaaatat aagagccacc atggatagca ctgagaacgt catcaagccc ttcattcgct 720

tcaaggtgca catggagggc tccgtgaacg gccacgagtt cgagatcgag ggcgaggcg 780

agggcaagcc ctacgagggc acccagaccg ccaagctgca ggtgaccaag ggcggccccc 840

tgcccttcgc ctgggacatc ctgtccccc agttccagta cggtccaag gtgtacgtga 900

agcaccgcgc cgacatcccc gactacaaga agctgtcctt ccccgagggc ttcaagtggg 960

agcgcgtgat gaacttcgag gacggcggcg tggtagaccgt gaccaggac tctcctctgc 1020

aggacggcac ctcatctac cagtgaaat tcatcggcgt gaacttccc tccgacggcc 1080

ccgtaatgca gaagaagact ctgggctggg agccctccac cgagcgctg taccgccgcg 1140

acggcgtgct gaagggcgag atccacaagg cgctgaagct gaagggcggc ggccactacc 1200

tggtaggtt caagtcaatc tacatggcca agaagcccg gaagctgccc ggctactact 1260

acgtggactc caagctggac atcacctccc acaacagga ctacaccgtg gtggagcagt 1320

acgagcgcg cgagggcgcc caccacctgt tccagtaggc tgcttctgc ggggcttgcc 1380

ttctggccat gcccttcttc tctccttgc acctgtacct cttggtcttt gaataaagcc 1440

tgagtaggaa gtgagggtct agaactagtg tcgacgcaaa tcagttctgg accagcgagc	1500
tgtgtcgcga ctctgtggct aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc	1560
gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta	1620
atgagtgagc taactacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa	1680
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat	1740
tgggcgtctt tccgcttctt cgctcactga ctctgtgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg	1800
agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc	1860
aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt	1920
gctggcggtt ttccataggc tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag	1980
tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc	2040
cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgtc gcttacggga tacctgtccg cttttctccc	2100
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt	2160
cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt	2220
atccgtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc	2280
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa	2340
gtggtggcct aactacggct acactagaag aacagtatct ggtatctgcg ctctgtgaa	2400
gccagttacc ttcggaaaaa gaggttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgtgg	2460
tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga	2520
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg	2580
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg	2640
aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt	2700
aatcagttag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact	2760
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat	2820
gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg	2880
aagggccgag cgcagaagtg gtcttgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg	2940
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat	3000
tgctacaggc atcgtgggtg cacgctcgtc gtttgggatg gcttcattca gctccggttc	3060
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt	3120
cggctcctcg atcgttgta gaagtaagt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc	3180
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga	3240
glactcaacc aagtcattct gagaatagt tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc	3300

gtcaatacgg gataataaccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa 3360

acgtttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 3420

accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 3480

agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg 3540

aatactcata ctctaccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 3600

gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca atagggttc cgcgcacatt 3660

tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 3720

aaataggcgt atcacaggc cctttcgtc 3749

<210> 3

<211> 6711

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pOVA

<400> 3

gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa 60

aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtcgccag 120

gtccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattcaa ttagtcagca accaggtgtg 180

gaaagtcccc aggtcctcca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag 240

caaccatagt cccgcccta actccgcca tccgccct aactccgcc agttccgcc 300

atttccgcc ccatggctga ctaattttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg 360

cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg aggcctagc ttttgcaaaa 420

agctccggg agcttgtata tccattttcg gatctgatca agagacagga tgaggatcgt 480

ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc 540

tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatccgcc gtgttccggc 600

tgtcagcgca gggcgcccc gttctttttg tcaagaccga cctgtccgt gccctgaatg 660

aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ctttgcgag 720

ctgtgtcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccg 780

ggcaggatct ccgtcatct cacctgtct ctgccagaa agtatccatc atggctgatg 840

caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaac 900

atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccgtct tgtcgatcag gatgatctgg 960

acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc 1020

ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg	1080
aaaatggccg cttttctgga ttcactgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc	1140
aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc	1200
gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc	1260
ttcttgacga gttctttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc	1320
caacctgcc aacagagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg	1380
aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt	1440
cttcgccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaa gcaatagcat	1500
cacaaatttc acaataaag ctttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact	1560
catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc	1620
atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg	1680
agccggaagc ataaagtga aagcctgggg tgccaatga gtgagctaac tcacattaat	1740
tgcgttgcgc tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg	1800
aatcggccaa cgcgcgggga gagcggttt gcgtattggg cgctcttcgc cttcctcgt	1860
cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaagcg	1920
ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg	1980
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggtccg	2040
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg	2100
actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac	2160
cctgcgcgtt accggatacc tgtcgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca	2220
tagctcacgc ttaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt	2280
gcacgaacct ccggttcagc ccgaccgtg cgctttatcc ggtaactatc gtcttgagtc	2340
caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag	2400
agcgaggatg gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac	2460
tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt	2520
tggtagctct tgatccggca aacaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa	2580
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct ttctacggg	2640
gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggtt ttggtcatga gattatcaaa	2700
aaggatcttc acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	2760
atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaac agtgaggcac ctatctcagc	2820

gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat	2880
acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc	2940
ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggtec	3000
tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag	3060
ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg	3120
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcctca cgatcaaggc gagttacatg	3180
atcccccag ttgtgcaaaa aagcggtag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag	3240
taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt	3300
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtagt tcaaccaagt cattctgaga	3360
atagtgtatg cggcgaccga gttgtcttgc cccggcgta atacgggata ataccgcgcc	3420
acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc	3480
aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgac	3540
ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc	3600
cgcaaaaaag ggaataaggc gcacacggaa atgttgaata ctcatactct tctttttca	3660
atattattga agcatttacc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat	3720
ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt	3780
cgacggatcg ggagatctcc cgatccctta tggtagcact tcagtaaat ctgctctgat	3840
gccgcatagt taagccagta tctgtctcct gcttgtgtgt tggaggtcgc tgagtagtgc	3900
gcgagcaaaa tttaaagtac aacaaggcaa ggcttgaccg acaattgcat gaagaatctg	3960
cttagggtta ggctttttgc gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat	4020
tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggc cattagttca tagcccatat	4080
atggagtacc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggtgacc gcccaacgac	4140
ccccgccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacccaat agggactttc	4200
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt	4260
tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat	4320
tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc	4380
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt	4440
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac	4500
caaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc	4560

ggtaggcgtg tacgggtgga ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc	4620
actgcttact ggcttatcga aattaatacg actcactata gggagaccca agcttggtac	4680
cgagctcgga tccactagta acggccgcca gtgtgctgga attcctcgaa agacaactca	4740
gagttcacca tgggctccat cggtgcagca agcatggaat tttgttttga tgtattcaag	4800
gagctcaaag tccacatgc caatgagaac atcttctact gccccattgc catcatgtca	4860
gctctagcca tggatatact gggtgcaaaa gacagcacca ggacacaaat aaataaggtt	4920
gttcgctttg ataaacttcc aggattcgga gacagtattg aagctcagtg tggcacatct	4980
gtaaacgttc actcttctact tagagacatc ctcaacaaaa tcaccaaacc aaatgatgtt	5040
tattcggttca gccttgccag tagactttat gctgaagaga gatacccaat cctgccagaa	5100
tacttgacgt gtgtgaagga actgtataga ggaggcttgg aacctatcaa ctttcaaca	5160
gctgcagatc aagccagaga gctcatcaat tcctgggtag aaagtacagac aaatggaatt	5220
atcagaaatg tccttcagcc aagctccgtg gattctcaaa ctgcaatggt tctggttaat	5280
gccattgtct tcaaaggact gtgggagaaa gcatttaagg atgaagacac acaagcaatg	5340
cctttcagag tgactgagca agaaagcaaa cctgtgcaga tgatgtacca gattggttta	5400
tttagagtgg catcaatggc ttctgagaaa atgaagatcc tggagcttcc atttgccagt	5460
gggacaatga gcatgttggg gctgttgccg gatgaagtct caggccttga gcagcttgag	5520
agtataatca actttgaaaa actgactgaa tggaccagtt ctaatgttat ggaagagagg	5580
aagatcaaag tgiacttacc tcgcatgaag atggaggaaa aatacaacct cacatctgtc	5640
ttaatggcta tgggcattac tgacgtgttt agctcttcag ccaatctgtc tggcatctcc	5700
tcagcagaga gcctgaagat atctcaagct gtccatgcag cacatgcaga aatcaatgaa	5760
gcaggcagag aggtggtagg gtcagcagag gctggagtgg atgctgcaag cgtctctgaa	5820
gaatttaggg ctgaccatcc attctcttc tgtatcaagc acatcgcaac caacgccgtt	5880
ctcttctttg gcagatgtgt ttccccttaa aaagaagaaa gctgaaaaac tctgtccctt	5940
ccaacaagac ccagagcact gtagtatcag gggtaaaatg aaaagtatgt tatctgctgc	6000
atccagactt cataaaagct ggagcttaat ctagagggcc ctattctata gtgtcaccta	6060
aatgctagag ctgctgac agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt	6120
tgccctccc ccgtgccttc cttgacctg gaaggtgcca ctccactgt cctttcctaa	6180
taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg	6240
gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg	6300
gtgggctcta tggcttctga ggcggaaaga accagctggg gctctagggg gtatccccac	6360
gcgcctgta gcggcgcat aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgt	6420

acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt tctcgccacg 6480

ttcgccggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggtt ccgatttagt 6540

gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggtg atggttcacg tagtggggcca 6600

tcgccctgat agacgggttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt taatagtgga 6660

ctcttggttc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt t 6711

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer- pUCIDT-AMP_mTagBFP2

<400> 4

ttggaccctc gtacagaagc taatacg 27

<210> 5

<211> 170

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer- pUCIDT-AMP_mTagBFP2-siGFP (AS)

<400> 5

aagcaagctg accctgaagt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 120

tttttttttt tttttttttt tcttctact caggctttat tcaaagacca 170

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS siGFP

<400> 6

gcaagcugac ccugaaguut t 21

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS siGFP

<400>	7	
gcaagcugac ccugaaguut ttttt		25
<210>	8	
<211>	170	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer- pUCIDT-AMP_mTagBFP2-siGFP (SS)	
<400>	8	
aaaacttcag ggtcagcttg cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt		60
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt		120
tttttttttt tttttttttt ttttctact cagcttttat tcaaagacca		170
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS siGFP	
<400>	9	
aacuucaggg ucagcuugct t		21
<210>	10	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AS siGFP	
<400>	10	
aacuucaggg ucagcuugct ttttt		25
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer- pOVA	
<400>	11	
gagaaccac tgcttactgg		20
<210>	12	

<211> 163
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer- pOVA-siSTAT3 (AS)

<400> 12
 aaagtaggtg caggaactgt gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 120
 tttttttttt tttttttttt ttcagcgagc tctagcattt agg 163

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SS siSTAT3

<400> 13
 aguaggugca ggaacugugt t 21

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SS siSTAT3

<400> 14
 aguaggugca ggaacugugt ttttt 25

<210> 15
 <211> 163
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer- pOVA-siSTAT3 (SS)

<400> 15
 aacacagttc ctgcacctac tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 120
 tttttttttt tttttttttt ttcagcgagc tctagcattt agg 163

<210> 16
 <211>

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AS siSTAT3

<400> 16

cacaguuccu gcaccuacut t 21

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AS siSTAT3

<400> 17

cacaguuccu gcaccuacut ttttt 25

<210> 18

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer- pUCIDT-AMP_mTagBFP2-siGFP (2)(AS)

<400>

> 18

aagcaagctg accctgaagt taaaaaagca agctgaccct gaagtttttt tttttttttt 60

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 120

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttttcttc ctactcaggc 180

tttattcaaa gacca 195

<210> 19

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer- pUCIDT-AMP_mTagBFP2-siGFP (2) (SS)

<400> 19

aaaacttcag ggtcagcttg caaaaaaac ttcagggtca gcttgctttt tttttttttt 60

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 120

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttttcttc ctactcaggc 180

tttattcaaa gacca 195