



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0108167
(43) 공개일자 2019년09월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7115* (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01) *A61K 31/713* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7115 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7025890
- (22) 출원일자(국제) 2018년02월12일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년09월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2018/000330
- (87) 국제공개번호 WO 2018/146557
국제공개일자 2018년08월16일
- (30) 우선권주장
62/457,282 2017년02월10일 미국(US)

- (71) 출원인
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균
관대학교내)
- (72) 벌명자
이동기
대한민국 서울특별시 서초구 서초4동 서초 래미안
아파트 105-2202
- (74) 대리인
특허법인 광장리앤고

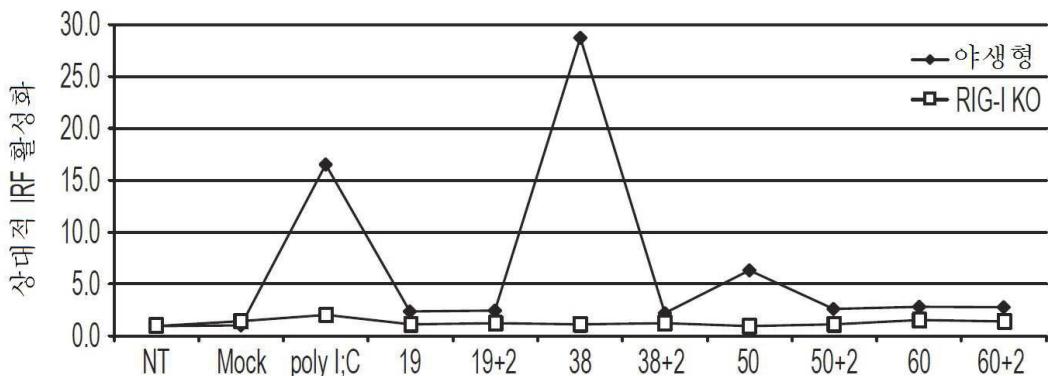
전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 RNA 간섭을 위한 긴 이중가닥 RNA

(57) 요 약

본 기술은 부분적으로 유전자 발현을 억제하는 긴 이중가닥 RNA(dsRNA)(예컨대, 30개 이상의 염기쌍)에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1c



(52) CPC특허분류

A61K 31/7125 (2013.01)

A61K 31/713 (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/335 (2013.01)

C12N 2310/3515 (2013.01)

명세서**청구범위****청구항 1**

40개 이상의 염기쌍의 듀플렉스(duplex) 길이를 갖는 2개의 실질적으로 상보적인 RNA 가닥 및 하나 이상의 가이드 서열을 포함하는, RNA 간섭(RNAi) 메커니즘을 통해 유전자 침묵을 유발할 수 있는 긴 이중가닥 RNA(1dRNA).

청구항 2

제1항에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 1dRNA.

청구항 3

제2항에 있어서, 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결된 뉴클레오티드를 포함하는, 1dRNA.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 톨-유사 수용체(toll-like receptor)에 의한 RNA 인식을 억제하는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 1dRNA.

청구항 5

제4항에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 슈도우리딘을 포함하는, 1dRNA.

청구항 6

제4항에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 5-메틸시티딘을 포함하는, 1dRNA.

청구항 7

제5항에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 N1-메틸슈도우리딘을 포함하는, 1dRNA.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 친유성 컨쥬게이트(conjugate)를 추가로 포함하는, 1dRNA.

청구항 9

제8항에 있어서, 친유성 컨쥬게이트가 콜레스테롤, 콜레스텐, 콜레스탄, 콜레스타디엔, 담즙산, 콜산, 데옥시콜산 또는 데하이드로콜산으로부터 선택되는, 1dRNA.

청구항 10

제8항에 있어서, 친유성 잔기가 콜레스테롤인, 1dRNA.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 친유성 컨쥬게이트가 폴리리보 뉴클레오티드의 3'말단에 컨쥬게이트된, 1dRNA.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 1dRNA의 한쪽 또는 양쪽 말단이 평활(blunt)인, 1dRNA.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 듀플렉스 길이가 45bp 이상인, 1dRNA.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 듀플렉스 길이가 50bp 이상인, 1dRNA.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 듀플렉스 길이가 60bp 이상인, 1dRNA.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상대적 IRF 활성화가 10 이하인, 1dRNA.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상대적 IRF 활성화가 5 이하인, 1dRNA.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 mRNA에 상보적인 8bp 이상의 하나 이상의 서열을 포함하는, 1dRNA.

청구항 19

제18항에 있어서, 동일한 mRNA에 상보적인 8bp 이상의 2개 이상의 서열을 포함하는, 1dRNA.

청구항 20

제18항에 있어서, 2개 이상의 상이한 mRNA에 상보적인 8bp 이상의 2개 이상의 서열을 포함하는 1dRNA.

청구항 21

제18항에 있어서, 3개 이상의 상이한 mRNA에 상보적인 8bp 이상의 3개 이상의 서열을 포함하는, 1dRNA.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 1dRNA의 말단이 mRNA에 상보적인 안티센스 서열의 5'말단을 포함하는, 1dRNA.

청구항 23

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 1dRNA의 양쪽 말단이 mRNA에 상보적인 안티센스 서열의 5'말단을 포함하는, 1dRNA.

청구항 24

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA에 상보적인 서열이 8 내지 50개의 뉴클레오티드 길이의 서열로부터 독립적으로 선택되는, 1dRNA.

청구항 25

제24항에 있어서, mRNA에 상보적인 서열이 15 내지 50개 뉴클레오티드 범위 길이의 서열로부터 독립적으로 선택되는, 1dRNA.

청구항 26

제18항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 바이러스 mRNA인, 1dRNA.

청구항 27

제18항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 암 세포 성장 및 생존에 중요한 다중 경로에 관여된, 1dRNA.

청구항 28

제18항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 동일한 신호 전달 경로에서 기능하는, 1dRNA.

청구항 29

제9항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 공통 신호로부터 나오는 2개 이상의 신호 전달 경로에서 기능하는, 1dRNA.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 1dRNA 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 폴리뉴클레오티드의 세포 내로의 수송을 촉진시키는 비히클을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 비히클이 칼슘 포스페이트, 양이온성 지질, 양이온성 중합체, 폴리에틸렌이민 또는 단백질계 형질주입(transfection) 시약인, 조성물.

청구항 33

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 1dRNA, 또는 제30항 내지 제32항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 포유 동물 세포, 조직 또는 동물에 투여하는 것을 포함하는, 하나 이상의 mRNA의 수준을 감소시키는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 세포가 siRNA 처리에 대해 면역 민감성인, 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 하나 이상의 mRNA가 효소를 코딩하는, 방법.

청구항 36

제33항에 있어서, 하나 이상의 mRNA가 전사 인자를 코딩하는, 방법.

청구항 37

제33항에 있어서, 하나 이상의 mRNA가 분비 시그널링(signaling) 단백질을 코딩하는, 방법.

청구항 38

제33항에 있어서, 하나 이상의 mRNA가 신호 전달 단백질을 코딩하는, 방법.

청구항 39

제33항에 있어서, 하나 이상의 mRNA가 키나아제 또는 포스파타아제를 코딩하는, 방법.

청구항 40

제33항에 있어서, 하나 이상의 mRNA가 세포 수용체 또는 이온 채널을 코딩하는, 방법.

청구항 41

제33항에 있어서, 하나 이상의 mRNA가 분비 단백질을 코딩하는, 방법.

청구항 42

제33항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 1dRNA 조성물이 국소적으로 투여되는, 방법.

청구항 43

제33항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1dRNA 조성물이 비경구 투여에 의해 투여되는, 방법.

청구항 44

제33항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 1dRNA 조성물이 흡입에 의해 투여되는, 방법.

청구항 45

제33항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 1dRNA 조성물이 정맥 내로 투여되는, 방법.

청구항 46

제33항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 병태가 피부에 영향을 미치는, 방법.

청구항 47

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항의 1dRNA 조성물을 대상체에 투여함을 포함하는, 대상체의 세포에서 하나 이상의 mRNA의 발현을 감소시키는 방법.

발명의 설명**기술 분야****[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조**

본 출원은 2017년 2월 10일에 출원된 미국 특허 출원 제62/457,282호의 이점 및 우선권을 주장하며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 원용된다.

[0003] 분야

본 기술은 부분적으로 유전자 발현을 억제하는데 유용한 긴 이중가닥 RNA에 관한 것이다.

[0005] 서열목록

본 출원은 EFS-Web을 통해 ASCII 형식으로 제출되었고 그 전체가 본원에 참고로 원용되는 서열목록을 포함한다. 2018년 2월 12일에 작성된 상기 ASCII 사본은 OLX-003PC_Sequence Listing_ST25.txt로 명명되며 8,192 바이트 크기이다.

배경 기술

[0007] RNA 간섭(RNAi)은 상보적 뉴클레오티드 서열을 갖는 표적화된 전령 RNA(mRNA)를 중화시킴으로써 이중-가닥 RNA(dsRNA)가 유전자 발현을 억제하는 진화 적으로 보존된 생물학적 과정이다(Hannon et al., Nature, 418:244-251, 2002). RNAi 경로는 다이서(dicer) 엔도뉴클레아제에 의해 개시되는데, 이는 긴 dsRNA를 19개의 상보적 염기쌍 뉴클레오티드 및 각각의 말단에 2개의 뉴클레오티드의 3' 돌출부(overhang)를 갖는 짧은 간섭 RNA(siRNA) 단편으로 절단한다. siRNA는 2개의 단일-가닥 RNA인 패신저(passenger) 가닥 및 가이드(guide) 가닥으로 풀린다. 가이드 가닥은 RNA-유도 침묵 복합체(RISC)에 도입된다. 가이드 가닥의 안티센스 서열이 mRNA의 상보적 서열과 쌍을 이루어 RISC 복합체의 촉매 성분인 Argonaute 2(Ago2)에 의한 절단을 유도할 때, 전사-후 유전자 침묵이 발생한다.

[0008] RNAi는 선충류 및 절지동물에서 처음 발견되었다(Fire et al., Nature, 391:806-811, 1998). 이들 문(phyla)에서, RNAi는 0.3 내지 1kb의 dsRNA로 유도될 수 있다. 이 RNAi 절차는 면역 반응의 활성화로 인해 포유동물 세포에서는 실패하였다(Stark et al., Annu. Rev. Biochem., 67:227-264, 1998). 인터페론 발현의 유도에 의해 나타나는 이러한 형태의 선천 면역은 바이러스 감염과 전형적으로 연관된 RNA 형태에 결합하는 패턴 인식 수용체에 의해 매개된다. 항바이러스 반응의 활성화를 피하기 위해, 포유동물 세포에서의 RNAi는 종종 다이서의 소화 생성물을 모방하는 합성 21-mer siRNA를 사용하여 유도된다(Elbashir et al., Nature, 411:494-498, 2001).

[0009] 25 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 RNA 듀플렉스(duplex)는 상응하는 통상적인 21-mer siRNA보다 최대 100배 더 강력할 수 있다. 이러한 25 내지 30bp 듀플렉스의 향상된 효능은, 이들이 siRNA의 생산과 직접적으로 연결되어

RISC 복합체 내로 도입되는 다이서 기질이라는 사실에 기인한다(Kim et al., Nat. Biotechnol. 23:222-6, 2005). 보다 더 긴 dsRNA 듀플렉스는 2개의 상이한 표적 mRNA 서열의 발현을 억제할 수 있다. 단일 dsRNA 구조체를 이용한 2개의 mRNA의 동시 하향 조절(downregulation)은 안티센스 서열의 5' 말단이 dsRNA의 어느 한쪽 말단에 위치하는 경우에 가장 효율적이었다(Chang et al., Mol. Cells 27, 689-695, 2009).

[0010] 평활-말단 dsRNA의 길이를 27bp까지 증가시키면 면역-민감성 T98G 세포주에서 인터페론 발현을 유도하였다 (Marques et al., Nat. Biotechnol. 24:559-65, 2006). 이와 같은 관찰은 더 긴 간섭 RNA의 개발을 권장하지 않았다.

[0011] 하나 초과의 mRNA 또는 하나 초과의 mRNA 영역을 선택적으로 표적화할 수 있는 구조체를 포함하는, 선천 면역 반응의 최소 활성화를 갖는 효율적인 유전자 침묵 구조체가 요구된다. 본 발명은 이러한 목적 및 다른 목적을 충족시킨다.

발명의 내용

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1a는 길이가 상이한, 두 가닥의 다양한 평활-말단 dsRNA의 상보적 뉴클레오티드 서열들이다(즉, 19bp의 길이를 갖는 평활-말단 dsRNA(상단 가닥은 서열번호 1이고; 하단 가닥은 서열번호 2이다), 38bp의 길이를 갖는 평활-말단 dsRNA(상단 가닥은 서열번호 3이고; 하단 가닥은 서열번호 4이다), 50bp의 길이를 갖는 평활-말단 dsRNA(상단 가닥은 서열번호 5이고; 하단 가닥은 서열번호 6이다), 및 60bp의 길이를 갖는 평활-말단 dsRNA(상단 가닥은 서열번호 7이고; 하단 가닥은 서열번호 8이다)).

도 1b는 길이가 상이한, 2bp의 3' 돌출부를 갖는 두 가닥의 다양한 dsRNA의 상보적 뉴클레오티드 서열들이다(즉, 19+2의 길이를 갖는 dsRNA(상단 가닥은 서열번호 9이고; 하단 가닥은 서열번호 10이다), 38+2의 길이를 갖는 dsRNA(상단 가닥은 서열번호 11이고; 하단 가닥은 서열번호 12이다), 50+2의 길이를 갖는 dsRNA(상단 가닥은 서열번호 13이고; 하단 가닥은 서열번호 14이다), 및 60+2의 길이를 갖는 dsRNA(상단 가닥은 서열번호 15이고; 하단 가닥은 서열번호 16이다)).

도 1c는 야생형 RAW 264.7 세포 및 RAW 264.7 RIG-I 녹아웃 세포에서 표시된 dsRNA에 의해 활성화된 항바이러스 반응을 나타내는 그래프이다.

도 2는 야생형 RAW 264.7 세포, RAW 264.7 RIG-I 녹아웃 세포 및 RAW 264.7 MDA5 녹아웃 세포에서, 30, 40, 50 및 60개의 염기쌍 길이를 갖는 서바이빈(survivin) 유전자를 표적화하는 평활(blunt)-말단 dsRNA에 의한 상대적 ISG 발현, 및 2개의 뉴클레오티드의 3' 돌출부를 갖는, 서바이빈 유전자를 표적화하는 dsRNA의 상대적 ISG 발현을 보여주는 그래프이다.

도 3은 40bp 및 60bp의 길이를 갖는 서바이빈 유전자를 표적화하는 평활-말단 dsRNA로 형질주입된 세포에서 IFN- β 및 IFIT1(ISG56)의 유전자 발현을 보여주는 그래프이다.

도 4는 서바이빈에 대한 종래의 siRNA와 비교하여 30bp, 30+2, 40bp, 40+2, 50bp, 50+2 및 60bp를 갖는, 서바이빈 표적화 dsRNA(survivin targeting dsRNA)가 표적 서바이빈 mRNA를 녹-다운(knock-down)시키는 것을 보여주는 그래프이다.

도 5a는 40+2, 50+2 및 60+2의 서바이빈 표적화 dsRNA에 대한 뉴클레오티드 서열을 보여주는 표이다.

도 5b는 30bp, 30+2, 40bp, 40+2, 50bp, 50+2 및 60bp의 서바이빈 표적화 dsRNA에 대한 겔(gel) 벤드를 보여주는 이미지이다.

도 6a는 실시예 1의 루시퍼라야제-GFP 표적화 dsRNA에 대한 뉴클레오티드 서열을 보여주는 표이다.

도 6b는 실시예 2의 서바이빈 표적화 dsRNA에 대한 뉴클레오티드 서열(즉, 30bp, 30+2, 40bp, 40+2, 50bp, 50+2, 60bp, 및 60+2)을 보여주는 표이다. 도 6b는 또한 종래의 서바이빈 siRNA(si-서바이빈; si-sur 19+2)에 대한 뉴클레오티드 서열을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 유의하게 항바이러스 반응을 유도하지 않으면서 포유동물 세포에서 유전자 발현을 억제할 수 있는 긴 이중가닥 RNA(lndRNA), 및 이를 이용한 유전자 침묵 방법을 제공한다. 놀랍게도, 평활(blunt)성 38-mer dsRNA는

인터페론 발현을 강하게 유도하는 것으로 밝혀진 반면, 평활성 dsRNA의 길이가 증가되어, 50 또는 60개의 염기쌍 및 임의로 하나 이상의 3' 디뉴클레오티드 돌출부를 갖는 구조체를 포함하는 경우, 이러한 세포 반응이 관찰되지 않았다. 이러한 더 긴 구조체는 효율적인 유전자 침묵자(silencer)일 수 있고, 복수의 mRNA 또는 mRNA 영역을 침묵시키는 능력을 제공할 수 있다.

[0014] 실시양태에 따르면, 1dRNA의 각각의 말단은 평활일 수 있거나, 3' 돌출부를 가질 수 있다. 일부 1dRNA는 양쪽 말단이 평활이다. 따라서 절단 사건(event)의 siRNA 생성물은 양쪽 말단에 2개의 뉴클레오티드의 3' 돌출부를 갖는다. 이들 3' 돌출부는 RNA 헬리카아제 활성을 갖는 패턴 인식 수용체인 인식 RIG-I을 억제한다(Marques et al., Nat. Biotechnol. 24:559-65, 2006). 대조적으로, 일부 바이러스는 평활 말단을 갖는 dsRNA를 생성한다. 이들 외래 dsRNA는 선천 면역의 특징적인 인터페론 및 다른 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 그러나, 본 발명의 실시양태에 따른 다양한 1dRNA는 항바이러스 반응의 활성화를 거의 또는 전혀 유발하지 않는다.

[0015] 본 발명의 다양한 1dRNA는 40bp 이상, 또는 45bp 이상, 또는 50bp 이상, 또는 60bp 이상, 또는 80bp 이상, 또는 100bp 이상의 길이인 듀플렉스를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 1dRNA는 200bp 이하, 또는 150bp 이하, 또는 100bp 이하의 길이인 듀플렉스를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 실시양태에 따른 다양한 1dRNA는 40 내지 200bp의 길이, 또는 40 내지 150bp의 길이, 또는 40 내지 100bp 길이; 또는 50 내지 200bp의 길이, 또는 50 내지 150bp의 길이, 또는 50 내지 100bp의 길이인 듀플렉스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1dRNA는 40 내지 80bp의 길이, 45 내지 80bp의 길이, 50 내지 80bp의 길이, 40 내지 60bp의 길이, 45 내지 60bp의 길이, 또는 50 내지 60bp의 길이인 듀플렉스를 포함한다.

[0016] 다양한 실시양태에서, 듀플렉스는 실질적으로 상보적인 2개의 RNA 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스는 완전한 상보성을 갖는 표준 염기쌍만을 함유한다. 일부 실시양태에서, RNA는 최대 10개 또는 최대 5개(예컨대, 1, 2 또는 3개)의 불일치(mismatch) 염기 또는 비표준 염기쌍(예컨대, G:U 염기쌍)을 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 1dRNA의 양쪽 말단은 평활성이다. 일부 실시양태에서, 한쪽 또는 양쪽 말단은 3' 말단에 돌출부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌출부은 디뉴클레오티드 돌출부(예컨대, dTdT)이다.

[0018] 항바이러스(선천 면역) 반응의 유도는 상대적 인터페론 활성화를 측정함으로써 확인된다. 본 발명의 다양한 1dRNA는 인터페론 또는 IRF 발현을, 비-제한적으로 야생형 RAW 264.7 세포, RAW 264.7 RIG-I 녹아웃 세포 및 RAW 264.7 MDA5 녹아웃 세포를 포함하는 세포주에서 mock의 형질주입에 의해 유도된 발현 수준의 15배 이하, 10배 이하 또는 5배 이하로 유도한다.

[0019] 본 발명의 다양한 1dRNA는 RNAi 경로를 통하여 표적 유전자의 발현을 감소시킬 수 있다. 이들 1dRNA는 표적 mRNA에 상보적인 8bp 이상의 가이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1dRNA는 단일 mRNA 내의 상이한 세그먼트에 상보적인 2, 3, 4개 이상의 가이드 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 1dRNA는 2, 3, 4개 이상의 상이한 표적 mRNA에 상보적인 가이드 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, mRNA에 상보적인 서열은 8 내지 50개의 뉴클레오티드 범위, 또는 8 내지 40개의 뉴클레오티드 범위, 또는 8 내지 30개의 뉴클레오티드 범위 또는 8 내지 20개 뉴클레오티드의 범위인 서열들로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시양태에서, mRNA에 상보적인 서열은 15 내지 50개의 뉴클레오티드 범위, 또는 15 내지 40개의 뉴클레오티드 범위, 또는 15 내지 30개의 뉴클레오티드 범위 또는 15 내지 20개 뉴클레오티드 범위인 서열들로부터 독립적으로 선택된다. 예를 들어, 상보적인 서열은 약 15nt, 약 16nt, 약 17nt, 약 18nt, 약 19nt 또는 약 20nt일 수 있다.

[0020] 1dRNA의 가이드 서열은 안티센스 서열이다. 이들은 5' 비번역 영역, 개시 부위, 코딩 서열, 종결 부위 또는 3' 비번역 영역의 mRNA에 결합할 수 있다. 우선적으로, 이들은 표적화된 mRNA 내의 접근 가능한 세그먼트에 결합한다.

[0021] 1dRNA는, 두 가닥이 서로 상보적이고 반대 방향으로 배향된 dsRNA이다. 따라서, 하나의 RNA 가닥의 5' 말단과 다른 RNA 가닥의 3' 말단은 1dRNA의 동일한 말단에 위치한다. 일부 1dRNA는 가이드 서열을 포함하는데, 가이드 서열의 5' 말단이 1dRNA의 하나의 RNA 가닥의 5' 말단에 위치한다. 다른 1dRNA는 2개의 가이드 서열을 포함하는데, 2개의 가이드 서열의 5' 말단은 2개의 RNA 가닥의 5' 말단에 위치하여, 1dRNA의 반대쪽 말단에 스스로 위치하게 된다.

[0022] 1dRNA의 RNAi 활성은 통상적인 방법, 예컨대, 노던 블롯팅, 정량적 rtPCR 및 당업계에 널리 공지된 다른 기술을 사용하여 표적 mRNA의 수준을 측정함으로써 결정될 수 있다. 1dRNA가 RNAi 활성을 갖는 경우 표적 mRNA 수준은 감소될 것이다. 1dRNA의 RNAi 활성이 표적화된 mRNA에 특이적인 경우, 비-표적화된 mRNA의 수준은 감소되지 않을 것이다. 대안적으로, RNAi 활성은 표적화된 mRNA에 의해 코딩된 단백질의 발현 또는 활성을 정량함으로써 간

접적으로 측정될 수 있다. 단백질 발현 및 활성은 당업계에 공지된 통상적인 방법, 예컨대 효소결합 면역흡착검사(enzyme linked immunosorbant assay(ELISA)) 및 효소 검정법에 의해 확인된다.

[0023] 1dRNA의 RNA 가닥은 변형된 주쇄(backbone), 변형된 뉴클레오티드 및/또는 다른 화학적 변형을 가질 수 있다.

[0024] 1dRNA에서 하나 또는 둘 다의 RNA 가닥의 포스페이트 주쇄는 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결기로 치환될 수 있다. 자연에서 발견되는 표준 RNA 주쇄는 뉴클레오티드 사이에 포스포디에스테르 연결기를 포함한다. 포스포로티오에이트 결합 변형은 비-가교 산소 중 하나를 황 원자로 대체함으로써 포스페이트 연결기를 변경시킨다. 이러한 변경은 폴리뉴클레오티드의 전반적인 화학적 특성을 변화시킨다. 특히, 포스포로티오에이트 결합의 첨가는 뉴클레아제 분해(degradation)에 대한 폴리뉴클레오티드 주쇄를 안정화시켜, 세포 환경에서 이의 반감기를 효과적으로 증가시킬 수 있다. 포스포로티오에이트 연결기는 1dRNA의 하나 또는 둘 다의 가닥에 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1dRNA의 뉴클레오티드의 약 1%, 2%, 4%, 8%, 16%, 32% 또는 약 50% 이상이 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결된다.

[0025] 1dRNA는 비-표준 뉴클레오티드, 예컨대, 비제한적으로 슈도우리딘, N1-메틸슈도우리딘 및/또는 5-메틸시티딘으로부터 합성될 수 있다. 이러한 뉴클레오티드는 톨-유사 수용체(toll-like receptor)를 통한 선천 면역의 활성화를 감소시킬 수 있다.

[0026] 1dRNA는 거의 모든 임의의 mRNA를 표적화하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 다양한 1dRNA는 효소, 전사 인자, 시그널링(signaling) 단백질, 키나아제, 포스파타아제, 이온 채널, 세포질 단백질, 막 단백질 및 분비 단백질을 코딩하는 mRNA의 수준을 감소시킨다.

[0027] 1dRNA는 바이러스 mRNA를 표적화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1dRNA의 다수의 가이드 서열은 단일 표적 바이러스 mRNA의 상이한 세그먼트에 상보적이다. 다른 실시양태에서, 단일 1dRNA 내의 가이드 서열은 2개 이상의 바이러스 mRNA 표적의 서열에 상보적이다.

[0028] 다양한 1dRNA는 암 세포 성장 및/또는 생존에 중요한 경로와 관련된 단백질을 코딩하는 mRNA를 표적화한다. 이러한 단백질 발현의 감소는 종양 세포의 성장 또는 생존을 감소시킨다. 다양한 실시양태에서, 본 발명의 1dRNA는 암 세포 성장 및/또는 생존에 중요한 경로와 관련된 단백질에 대한 2개 이상의 가이드 서열을 포함한다. 본 발명은 또한 암에 관련된 mRNA의 수준을 낮추는 1dRNA로 암 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

[0029] 다양한 1dRNA는 신호 전달 단백질을 코딩하는 mRNA를 표적화한다. 1dRNA는 신호 전달 단백질을 코딩하는 mRNA의 2개 이상의 상이한 세그먼트를 표적화할 수 있다. 대안적으로, 단일 다기능성 1dRNA 내의 가이드 서열은 관련된 신호 전달 단백질을 코딩하는 2개 이상의 mRNA를 표적화할 수 있다. 관련된 신호 전달 단백질은 동일한 신호 전달 경로, 병렬 신호 전달 경로 또는 공통 기원으로부터 분기되는 신호 전달 경로에서 기능할 수 있다. 다기능성 1dRNA는 또한 독립적인 신호 전달 경로에서 작용하는 단백질을 코딩하는 mRNA를 표적화할 수 있다.

[0030] 본 발명은 본 발명의 1dRNA를 세포, 조직 또는 동물에 투여함으로써 표적 유전자의 발현을 감소시키는 방법을 포함한다. 대상체는 질환 또는 병태에 대한 치료가 필요하거나 질환 또는 병태의 위험이 있는 인간 또는 동물 대상체 또는 환자일 수 있다. 조성물은 엑스 비보(ex vivo) 또는 인 비보(in vivo) 세포에 투여될 수 있다.

[0031] 임의의 포유 동물 세포는 dsDNA에 의한 선천 면역의 유도에 민감성이거나 비민감성인지에 관계없이 1dRNA 치료에 적합하다. 예를 들어, 1dRNA는 면역-민감성 T98G 교모세포종 세포 및 면역-비민감성 HeLa 암종 세포에 투여될 수 있다. 표적 유전자의 발현은 두 세포 유형 모두에서 억제될 수 있고, 인터페론 발현은 평활-말단의 38bp dsRNA의 투여 후보다 1dRNA 투여 후에 더 낮을 것이다. 1dRNA와의 접촉에 의해 단백질을 발현하도록 유도될 수 있는 세포 유형의 비-제한적인 예로는 각질형성세포, 멜라닌세포, 대식세포, 간세포, 허파꽈리세포, 섬유아세포, 평활근 세포 및 림프구(예컨대, B세포 또는 T세포 또는 이들의 전구 세포)를 포함한다. 또한, 1dRNA는 과형성 세포, 악성 세포 및 줄기 세포에 의한 단백질 발현을 유도할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 표적 세포는 항원-체시 세포, 수지상 세포, 대식세포, 신경 세포, 비장 세포, 림프계 세포, 폐세포(예컨대, 폐포세포), 피부 세포(예컨대, 각질형성세포 또는 섬유아세포), 내피세포, 성상세포, 미세아교세포, 간엽 세포, 상피 세포 또는 조혈 세포로부터 선택될 수 있다.

[0032] 1dRNA는 피부, 망막, 폐, 간, 심장 등을 포함한 다양한 조직에 투여될 수 있다. 또한, 1dRNA는 모든 동물에 전신적으로 투여될 수 있다. 전신 투여는 면역-민감성 및 면역 저항성 세포 둘 다에 의한 흡수로 유도될 것으로 예상된다. 1dRNA는 다른 dsRNA보다 면역원성이 적기 때문에 면역-민감성 세포를 포함한 세포의 혼합 집단에 안전하게 투여될 수 있다.

- [0033] 다양한 실시양태에서, 본 발명의 1dRNA는 약학 제형에 도입될 수 있다. 약학 제형의 비-제한적 예로는 국소 크림 또는 연고 또는 안정화제를 임의로 포함하는 수성 또는 완충 용액을 포함한다. 약학 제형은 세포 및 조직에 의한 세포 흡수를 용이하게 하기 위해 비히클을 추가로 포함할 수 있다.
- [0034] 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제는 당업자에게 널리 공지되어 있다. 담체 또는 희석제는, 다양한 실시양태에서, 고체 제형을 위한 고체 담체 또는 희석제, 액체 제형을 위한 액체 담체 또는 희석제, 또는 이의 혼합물일 수 있다.
- [0035] 다른 실시양태에서, 고체 담체/희석제는 검(gum), 전분(예컨대, 옥수수 전분, 전호화 전분(pregeletanized starch)), 당(예컨대, 락토오스, 만니톨, 수크로스, 텍스트로스), 셀룰로오스성 물질(예컨대, 미세결정성 셀룰로오스), 아크릴레이트(예컨대, 폴리메틸아크릴레이트), 칼슘 카보네이트, 마그네슘 옥사이드, 활석, 또는 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 방출 조절형 조성물, 즉, 1dRNA가 투여 후에 일정 기간에 걸쳐 방출되는 조성물이다. 방출 조절형 또는 서방형 조성물은 친유성 데포(depot)(예컨대, 지방산, 왁스, 오일) 내의 제형을 포함한다. 다른 실시양태에서, 조성물은 속방성 조성물(immediate-release composition), 즉, 화합물 전부가 투여 후에 즉시 방출되는 조성물이다.
- [0037] 다른 실시양태에서, 1dRNA는 중화된 약학적으로 허용가능한 염 형태로서 조성물로 제형화된다.
- [0038] 당업자는 1dRNA를 대상체에 투여하는 방식이 표적화된 mRNA, 표적 세포, 치료될 질환 또는 병태, 및 약학 제형의 형태에 의존할 것이라는 것을 이해할 것이다.
- [0039] 1dRNA는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 1dRNA는 흡입, 정맥 주사 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1dRNA는 유효량으로, 예를 들어, 피하 주사, 피내 주사, 근육내 주사, 안내 주사 또는 종양내 주사, 또는 비경구 투여의 다른 형태에 의해 환자에 투여된다.
- [0040] 일부 실시양태에서, 1dRNA는 경구 투여되므로, 경구 투여에 적합한 형태, 즉 고체 또는 액체 제제로 제형화된다. 적합한 고체 경구 제형은 정제, 캡슐, 환제, 과립제, 펠렛 등을 포함한다. 적합한 액체 경구 제형은 용액, 혼탁액, 분산액, 유화액, 오일 등을 포함한다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 1dRNA는 캡슐 내에 제형화된다. 이 실시양태에 따르면, 본 발명의 조성물은 활성 화합물 및 불활성 담체 또는 희석제 이외에 경질 젤라틴 캡슐을 포함한다.
- [0041] 다른 실시양태에서, 1dRNA는 신체 표면에 국소적으로 투여되므로, 국소 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 적합한 국소 제형은 젤, 연고, 크림, 로션, 점액 등을 포함한다. 국소 투여를 위해, 조성물 또는 이들의 생리적으로 용인되는 유도체는 약학 담체의 존재 또는 부재하에 생리적으로 허용가능한 희석제 중의 용액, 혼탁액 또는 유화액으로서 제조되고 도포된다.
- [0042] 다른 실시양태에서, 1dRNA는 좌약, 예를 들어 직장 좌약 또는 요도 좌약으로서 투여된다. 다른 실시양태에서, 약학 조성물은 펠렛의 피하 이식에 의해 투여된다. 다른 실시양태에서, 펠렛은 일정 기간에 걸쳐 약제의 조절된 방출을 제공한다.
- [0043] 다양한 실시양태에서, 투여량은 일일 용량, 주간 용량, 월간 용량 또는 연간 용량이다. 일부 실시양태에서, 용량은 1회 용량이거나, 조성물은 10회 이상 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 몇 년동안 1년 마다 6회 이상 또는 12회 이상 투여된다.
- [0044] 본 발명은 1dRNA를 투여함으로써 다양한 질환 또는 병태의 치료 방법을 제공한다. 1dRNA는 하나 이상의 유해한 표적 유전자의 발현을 감소시켜, 질환 또는 병태를 치료할 것이다. 예를 들어, 피부에 영향을 미치는 질환 또는 병태는 1dRNA로 치료될 수 있다. 1dRNA로 치료하기에 적합한 피부 질환 또는 병태는 피부 미백, 다크닝(darkening), 또는 반흔, 아토피성 피부염, 건선, 경피증, 탈모 또는 주름진 피부를 포함한다. 1dRNA는 또한 섬유증에 의해 나타나는 질환 또는 병태의 치료를 위해 투여될 수 있다. 1dRNA로 치료될 수 있는 섬유성 질환 또는 병태는 간 섬유증, 망막 섬유증 및 폐 섬유증(예컨대, 특발성 폐 섬유증)이다. 1dRNA로 치료될 수 있는 안구 병태는 황반 변성(습식 또는 건식 AMD)을 포함한다. 1dRNA로 치료될 수 있는 염증성 병태는 류마티스 관절염 및 크론병(Crohn's disease)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병태는 신경성 통증이다. 일부 실시양태에서, 병태는 고콜레스테롤혈증, 죽상동맥경화증 또는 심장 질환이다.
- [0045] 일부 실시양태에서, 1dRNA는 복수의 mRNA를 표적화한다. 예시적인 표적에는 CTGF-코딩 mRNA 및 MYD88 코딩 mRNA

를 포함한다.

[0046] 1dRNA는 음으로 하전된 핵산 중합체이다. 세포 흡수를 용이하게 하기 위해, 1dRNA는 핵산을 세포 내로 수송하는 비히클과 함께 제형화될 수 있다. 적합한 비히클에는 칼슘 포스페이트, 양이온성 지질, 양이온성 중합체, 폴리에틸렌이민 및 단백질계 형질주입 시약을 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, 형질주입 시약은 리포좀을 형성한다. 리포좀은 세포 내 안정성을 증가시키고, 흡수 효율을 증가시키고, 생물학적 활성을 개선시킬 수 있다. 리포좀은 세포막을 구성하는 지질과 유사한 방식으로 배열된 지질로 이루어진 중공(hollow) 구형 비히클이다. 이들은 수용성 화합물을 포획하기 위한 내부 수성 공간을 가질 수 있고 0.2 미크론 내지 수 미크론의 크기의 직경을 가질 수 있다. 문헌[Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327)] 참조.

[0048] 친유성 잔기는 1dRNA에서 하나 이상의 뉴클레오티드에 컨쥬케이트될 수 있다. 우선적으로, 친유성 잔기는 1dRNA의 RNA 가닥 중 하나의 5' 말단에 컨쥬케이트된다. 친유성 잔기의 비-제한적인 예로는 콜레스테롤, 토코페롤, 및 10개 이상의 탄소 원자를 갖는 장쇄 지방산, 예컨대, 스테아르산 또는 팔미트산을 포함한다. 공유 결합된 친유성 잔기는 1dRNA의 세포 내로의 진입을 용이하게 할 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어, PCT/KR2013/004463 및 US 2015/0111948에 공지 및 기술되어 있으며, 이는 이들 전체가 본원에 참고로 원용된다.

[0049] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본원에 사용된 명명법은 당업계에 널리 공지되어 있고 통상적으로 사용된다.

실시예

실시예 1: 다양한 dsRNA에 대한 면역 반응

[0052] 면역 반응을 측정하기 위해, RAW 264.7 세포를 10% 소태아 혈청, 100 μg/ml 노르모신(인비보젠(InvivoGen)) 및 200 μg/ml 제오신(인비보젠)이 보충된 둘베코 수정 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Media(Gibco))에 증식시켰다. 세포를, 96-웰 플레이트에 1.0×10^4 세포/cm²의 밀도로 씨딩(seeding)하고 항생제 없이 24시간 동안 배양하였다. 세포를, RNAiMAX 형질주입제(써모 피셔 사이언틱(Thermo Fisher Scientific))를 사용하여 10nM dsRNA로 형질주입시켰다. 형질주입 24시간 및 48시간 후, 상청액의 10 μl 분취량을 96-웰 화이트 플레이트에 샘플링하였다. Quant i-Luc 루시퍼라제 기질(인비보젠) 50 μl를 각각의 웰에 첨가하였고, 플레이트는, 마이크로플레이트 리더(퍼킨엘머(PerkinElmer))를 사용하여 루시퍼라제 활성에 대해 즉시 판독되었다.

[0053] 평활-말단 dsRNA는 19, 38, 50 및 60개의 염기쌍 길이로 합성되었다(도 1a 및 도6a). 이를 dsRNA에 대한 항바이러스 반응은 상대적 IRF 활성화를 측정함으로써 확인되었다(도 1c). 예상한 바와 같이, 38bp dsRNA는 강한 항바이러스 반응을 유도하였고, 짧은 19bp ds RNA는 그렇지 않았다. 놀랍게도, 50bp dsRNA에 대한 항바이러스 반응은 38-mer에 대한 반응에 비해 >80% 감소되었으며, 60-mer의 경우에는 보다 더 낮은 반응이 관찰되었다. 이러한 항바이러스 반응은 RIG-I 녹아웃 세포에서 실질적으로 없어졌는데, RIG-I이 평활성 dsRNA를 인식하는 dsRNA 센서임을 확인하였다. 추가 시험은, 양성 대조군 polyIC에 대해서는 항바이러스 반응을 보여주고 mock 처리된 세포에서는 어떠한 반응도 보여주지 않았다. 또한, dsRNA로의 2개 뉴클레오티드의 3' 돌출부의 첨가(도 1b 및 도 6a)는 항바이러스 반응을 또한 없앴으며, 이는 RIG-1이 3' 돌출부를 갖는 dsRNA에 의해 활성화되지 않음을 보여주는 이전 연구와 일치한다(Marques et al., Nat. Biotechnol. 24:559-65, 2006).

실시예 2: 긴 dsRNA의 면역 반응 및 녹다운 효능

[0055] 서바이빈 유전자를 표적화하는 평활-말단 dsRNA는 30, 40, 50 및 60개의 염기쌍 길이로 합성되었다(도 6b 참조). 2개의 뉴클레오티드 3' 돌출부 dsRNA(즉, 30+2; 40+2; 50+2; 및 60+2)도 합성되었다. 도 5a 및 도 6b 참조. 상기 개시된 서바이빈 표적화 dsRNA의 확인이 도 5b에 도시되어 있다. 이를 dsRNA에 대한 항바이러스 반응은 상대적 ISG 발현을 측정함으로써 확인되었다(도 2). dsRNA를 야생형(WT), RIG-I 음성(RIG-I(-/-)) 또는 MDA5 음성(MDA5(-/-))인 RAW 264.7 세포에서 시험하였다.

[0056] 결과는, (상대적 ISG 발현에 의해 측정된) 일부 면역 자극이 40bp 및 50bp dsRNA에서 발생했음을 보여준다. 도 2. 그러나, 종래의 개념에 대조적으로, 40bp 및 50bp dsRNA는 60bp dsRNA에 의해 생성된 상대적 ISG와 비해 보다 많은 상대적 ISG를 발현하였다. 도 2.

- [0057] 40+2, 50+2, 및 60bp 1dRNA는 ISG 발현이 거의 없음을 나타냈다. 도 2. 데이터는 3' 말단의 2개의 뉴클레오티드 RNA 돌출부(예컨대, 40+2 및 50+2)가 효율적으로 선천 면역 시스템을 피하는 것을 보여준다. 도 2.
- [0058] 결과는 또한 RIG-I 결핍 세포(RIG-I(-/-))가 ISG 단백질의 발현을 유도하지 않았음을 나타내며, 이는 RIG-I이 화학적으로 합성된 긴 dsRNA를 인식하는 패턴 인식 수용체(PRR)임을 보여준다. 도 2.
- [0059] 도 3은 IFN- β 및 IFIT1(ISG56) 유전자 발현이 60bp dsRNA에 의한 형질주입에 의해 상향 조절되지 않음을 보여 준다. 이 결과는 ISG54가 60bp dsRNA에 의해 상향 조절되지 않는 이유가, PKR에 의한 번역 억제 때문이 아니라 60bp dsRNA가 선천 면역 시스템을 활성화시키지 않기 때문임을 나타낸다.
- [0060] 도 4는 상기 개시된 30bp, 30+2, 40bp, 40+2, 50bp, 50+2, 및 60bp의 서바이빈 표적화 dsRNA가 서바이빈에 대한 종래의 siRNA(si-sur 19+2)와 동일한 효능으로 서바이빈 유전자 발현을 침묵시킬 수 있음을 보여준다.
- [0061] 등가물
- [0062] 본 발명은 이의 특정 실시양태와 관련되어 기술되었지만, 이는 추가의 변형이 가능하고, 본 출원이, 일반적으로 본 발명의 원리를 따르고; 본 발명이 속하는 분야에서 공지되거나 통상적인 관례 내에 있으며, 전술한 필수적인 특징들에 적용될 수 있고, 다음의 첨부된 청구범위의 범주와 같은 본 발명의 이러한 개시를 포함하는; 본 발명의 임의의 변형, 용도 또는 개조를 포함하는 것으로 의도된 것임이 이해될 것이다.
- [0063] 당업자는 일상적인 실험만을 사용하여 본원에 구체적으로 기술된 특정 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 다음의 청구범위의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

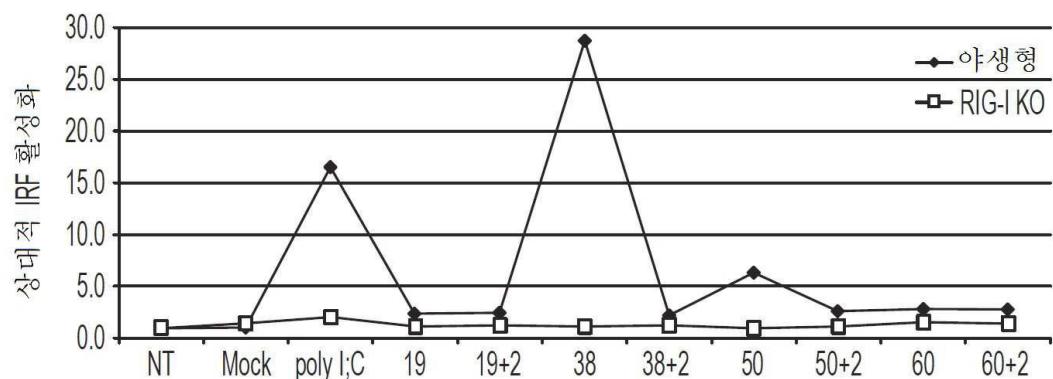
도면1a

19 5'-UUCACCUUGAUGC CAUUCU-3'
 3'-AAGUGGAACUACGGUAAGA-5'
 38 5'-UUCACCUUGAUGC CAUUCUCCAAUCAUCCAAAAAUUA-3'
 3'-AAGUGGAACUACGGUAAGAGGUUAGUAGGUUUUUUAU-5'
 50 5'-UUCACCUUGAUGC CAUUCUUGGCCUAGCUCCCA AUCAUCCAAAAAUUA-3'
 3'-AAGUGGAACUACGGUAAGAACCGGAUUCGAGGGUUAGUAGGUUUUUUAU-5'
 60 5'-UUCACCUUGAUGC CAUUCUUGGCCUUGUCGAAAAAAGCUCCCA AUCAUCCAAAAAUUA-3'
 3'-AAGUGGAACUACGGUAAGAACCGGAACAGCUUUUUUCGAGGGUUAGUAGGUUUUUUAU-5'

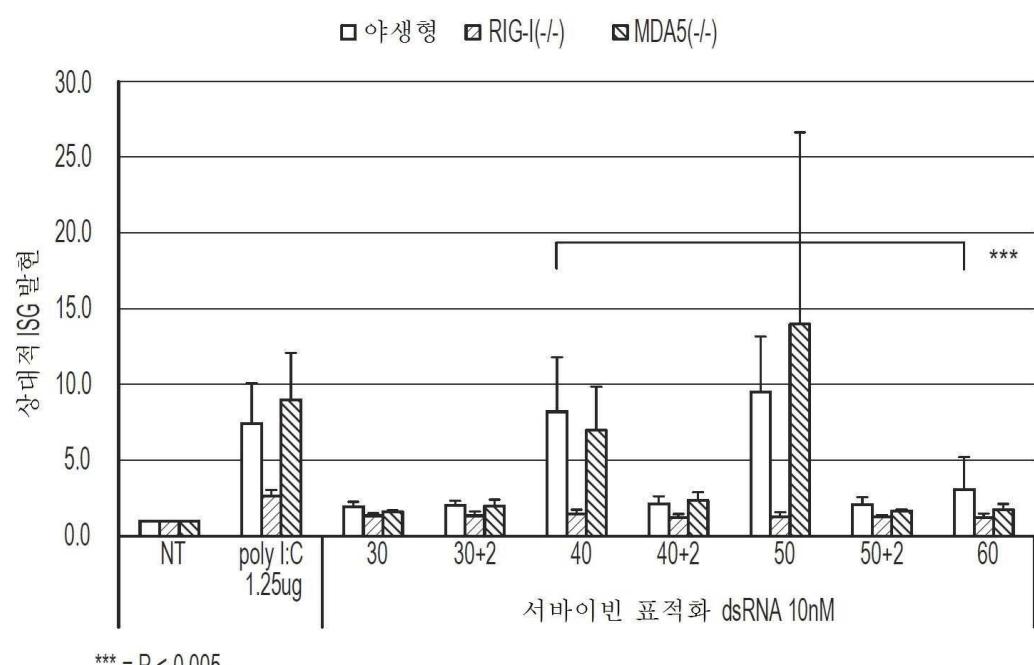
도면1b

19+2 5'-UUCACCUUGAUGC CAUUCUTT-3'
 3'-TTAAGUGGAACUACGGUAAGA-5'
 5'-UUCACCUUGAUGC CAUUCUCCAAUCAUCCAAAAAUATT-3'
 38+2 3'-TTAAGUGGAACUACGGUAAGAGGUUAGUAGGUUUUUUAU-5'
 5'-UUCACCUUGAUGC CAUUCUUGGCCUAGCUCCCA AUCAUCCAAAAAUATT-3'
 50+2 3'-TTAAGUGGAACUACGGUAAGAACCGGAUUCGAGGGUUAGUAGGUUUUUUAU-5'
 5'-UUCACCUUGAUGC CAUUCUUGGCCUUGUCGAAAAAAGCUCCCA AUCAUCCAAAAAUATT-3'
 60+2 3'-TTAAGUGGAACUACGGUAAGAACCGGAACAGCUUUUUUCGAGGGUUAGUAGGUUUUUUAU-5'

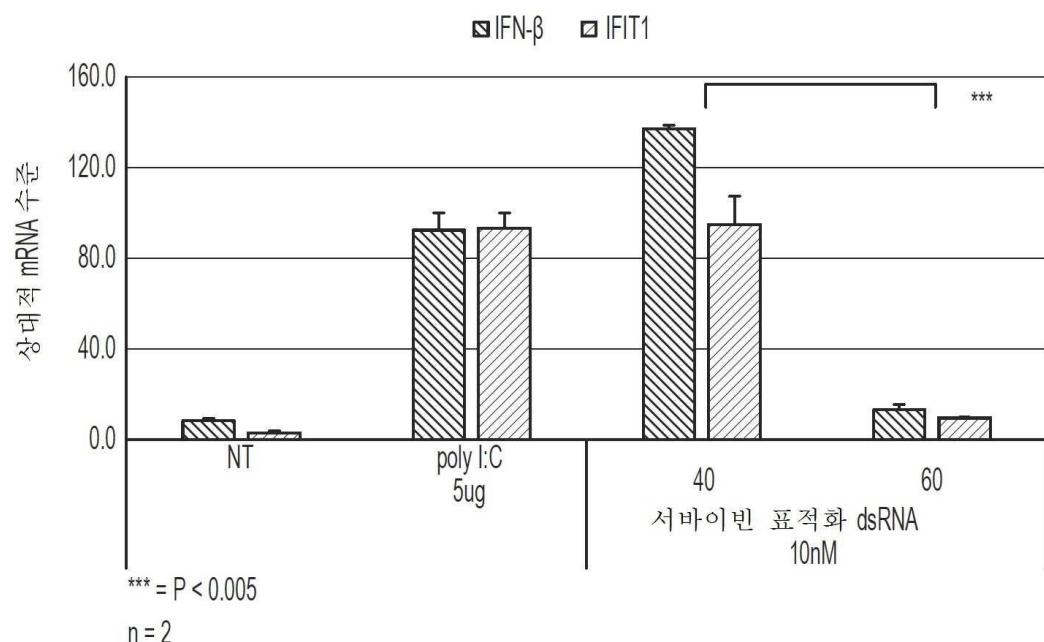
도면1c



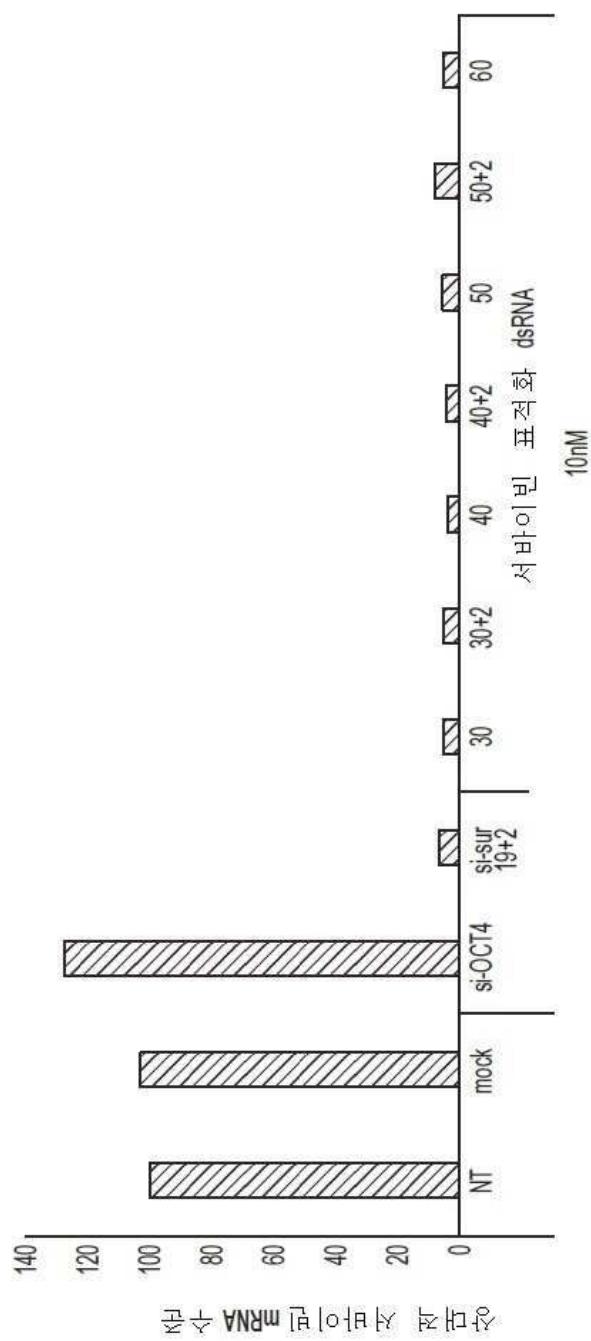
도면2



도면3



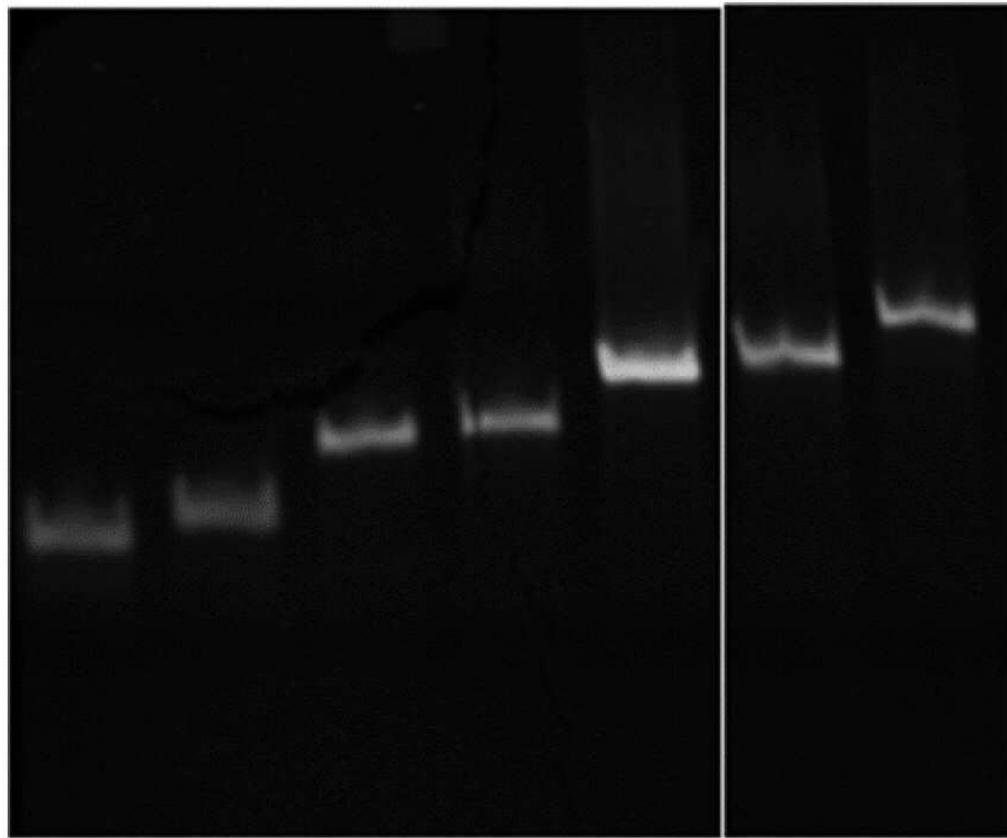
도면4



도면5a

	길이	서열	서열번호
서부이익 표적화 dsRNA	40(+2) 5' 3'	UG <u>A</u> AAA UGU UCU CCA AGA CAU UGC UAA GGG G (CC) (AA)ACU UUU ACA ACU AGA GGA AAG GAU UCU GUA AGG AUU CCC C	서열번호 27 서열번호 28
	50(+2) 5' 3'	UG <u>G</u> AAA UGU UGA UGU CCU UUC CUA AGA CAU UGC UAA GGG GCG CAC AGG AA (GG) (AA) ACU UUU ACA ACU AGA GGA AAG GAU UCU GUA AGG AUU CCC CGG GUG UCC UU	서열번호 29 서열번호 30
	60(+2) 5' 3'	UG <u>A</u> AAA UGU UGA UGU CCU UUC CUA AGA CAU UGC UAA GGG GCG CAC AGG AA GCU GGU GGC (AC) (AA) ACU UUU ACA ACU AGA GGA AAG GAU UCU GUA AGG AUU CCC CGG GUG UCC UTC CCA CCG	서열번호 31 서열번호 32

도면5b



서바이빈 표적화 dsRNA

30	30+2	40	40+2	50	50+2	60
----	------	----	------	----	------	----

도면6a

	명칭	서열
	38안티센스	5' UUCACTTUGAUGCACAUUCUCAAUAUAAU
	38센스	3' AAGGGAACAUACGGGAGGUAGAGGUUUUAAU
	50안티센스	5' UUCACTTUGAUGCACAUUCUCCCACUCCAUUACUCAAUAUAA
	50센스	3' AAGGGAACAUACGGGAGAAACGGGUAGAGGUUUUAAU
루시퍼라제-GFP 표적화 표적화 dsRNA	60안티센스	5' UUCACTTUGAUGCACAUUCUCCCACUCCAUUACUCAAUAUAA
	60센스	3' AAGGGAACAUACGGGAGAAACGGGUAGAGGUUUUAAU
	38+2인티센스	5' UUCACTTUGAUGCACAUUCUCAAUAUCCAAAUAU <u>dtct</u>
	38+2센스	3' <u>dtcta</u> UGGAAACAUACGGGUAGAGGUUUUAAU
	50+2안티센스	5' UUCACTTUGAUGCACAUUCUCCCACUCCAUUACUCAAUAU <u>dtct</u>
	50+2센스	3' <u>dtcta</u> UGGAAACAUACGGGUAGAGGUUUUAAU
	60+2안티센스	5' UUCACTTUGAUGCACAUUCUCCCACUCCAUUACUCAAUAU <u>dtct</u>
	60+2센스	3' <u>dtcta</u> UGGAAACAUACGGGUAGAGGUUUUAAU

도면6b

	명칭	서열
30	30 인터센스	5' UGAAAAGUGUAGCUCCUUCCUAAGACAU 서열번호 17
30	엔스	3' ACUUUACAAUCAAGGAAGAACUUCGUA 서열번호 18
40	안티센스	5' UGAAAAGUGUAGCUCCUUCCUAAGACAUUCAGGGG 서열번호 19
40	엔스	3' ACUUUACAAUCAAGGAAGAACUUCGUAAGAUCCCC 서열번호 20
50	안티센스	5' UGAAAAGUGUAGCUCCUUCCUAAGACAUUCGUAAGGGGCCACAGGAA 서열번호 21
50	엔스	3' ACUUUACAAUCAAGGAAGAACUUCGUAAGAUCCCCGUCCU 서열번호 22
60	안티센스	5' UGAAAAGUGUAGCUCCUUCCUAAGACAUUCGUAAGGGGCCACAGGAGGGGGGC 서열번호 23
60	엔스	3' ACUUUACAAUCAAGGAAGAACUUCGUAAGAUCCCCGGGUCCUUCGACACC 서열번호 24
서부이 표적화 dsRNA	30+2 인터센스	5' UGAAAAGUGUAGCUCCUUCCUAAGACAUUCGUAAGGGGG 서열번호 25
	30+2 엔스	3' AACUUUACAAUCAUGAGGAGAGAUUCGUA 서열번호 26
40+2	안티센스	5' UGAAAAGUGUAGCUCCUUCCUAAGACAUUCGUAAGGGGCC 서열번호 27
40+2	엔스	3' AAAUUUUACAAUCAUGAGGAGAGAUUCGUAACGUUCCC 서열번호 28
50+2	안티센스	5' UGAAAAGUGUAGCUCCUUCCUAAGACAUUCGUAAGGGGCCACAGGAG 서열번호 29
50+2	엔스	3' AAAUUUUAACAUCAUGAGGAAAGGAUUCGUAACGUUCCC 서열번호 30
60+2	안티센스	5' UGAAAAGUGUAGCUCCUUCCUAAGACAUUCGUAAGGGGCCACAGGAGGGGG 서열번호 31
60+2	엔스	3' AAAUUUUAACAUCAUGAGGAAAGGAUUCGUAACGUUCCC 서열번호 32
si-서부이 빈 안티센스		5' UCAACACACAGCUAUGCAGU <u>dtat</u> 서열번호 33
si-서부이 빈 엔스		3' dtatGUGUZGUUCAUAGCUA 서열번호 34

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> LEE, Dong Ki

<120> LONG DOUBLE-STRANDED RNA FOR RNA INTERFERENCE

<130> OLX-003PC

<150> US62457282

<151> 2017-02-10

<160> 34

<170> Patent In version 3.5

<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide
<400> 1
uucaccuuga ugccaauucu 19
<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide
<400> 2
aaguggaaacu acgguaaga 19
<210> 3
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide
<400> 3
uucaccuuga ugccaauucuc caaucaucca aaaaauua 38
<210> 4
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide
<400> 4
aaguggaaacu acgguaagag guuaguaggu uuuuuuau 38
<210> 5
<211> 50
<212> DNA
<213>
Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 5

uucaccuuga ugccaucuu ggccuaagcu cccaaucauc caaaaaauua 50

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 6

aaguggaacu acgguaagaa ccggauucga ggguuaguag guuuuuuaau 50

<210> 7

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 7

uucaccuuga ugccaucuu ggccuugucg aaaaaaagcu cccaaucauc caaaaaauua 60

<210> 8

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 8

aaguggaacu acgguaagaa ccggAACAGC uuuuuuuucga ggguuaguag guuuuuuaau 60

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 9

uucaccuuga ugccaucut t 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 10

ttaaguggaa cuacgguaag a

21

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 11

uucaccuuga ugccaauucuc caaucaucca aaaaauuatt

40

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 12

ttaaguggaa cuacgguaag agguuaguag guuuuuuau

40

<210> 13

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 13

uucaccuuga ugccaauucuu ggccuaagcu cccaaucauc caaaaaauua tt

52

<210> 14

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 14

ttaaguggaa cuacgguaag aaccggauuc gaggguuagu aguuuuuuua au

52

<210> 15

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> n is a, c, g, t or u

<400> 15

uucaccuuga ugccaauucuu ggccuugucg anaaaaagcu cccaaucauc caaaaaauua	60
tt	62

<210> 16

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 16

uucaccuuga ugccaauucuu ggccuugucg aaaaaaagcu cccaaucauc caaaaaauua	60
tt	62

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 17

ugaaaaauguu gaucuccuuu ccuaagacau	30
-----------------------------------	----

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 18

acuuuuacaa cuagaggaaa ggauucugua	30
----------------------------------	----

<210> 19

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 19

ugaaaaauguu gaucuccuuu ccuaagacau ugcuaagggg 40

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 20

acuuuuuacaa cuagaggaaa ggauucugua acgauucccc 40

<210> 21

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 21

ugaaaaauguu gaucuccuuu ccuaagacau ugcuaagggg cccacagggaa 50

<210> 22

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 22

acuuuuuacaa cuagaggaaa ggauucugua acgauucccc ggguguccuu 50

<210> 23

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 23

ugaaaaauguu gaucuccuuu ccuaagacau ugcuaagggg cccacagggaa ggcugguggc 60

<210>	24	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Polynucleotide	
<400>	24	
acuuuuacaa cuagaggaaa ggauucugua acgauucccc ggguguccuu ccgaccacccg		60
<210>	25	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Polynucleotide	
<400>	25	
ugaaaaauguu gaucuccuuu ccuaagacau ug		32
<210>	26	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Polynucleotide	
<400>	26	
aaacuuuuac aacuagagga aaggauucug ua		32
<210>	27	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Polynucleotide	
<400>	27	
ugaaaaauguu gaucuccuuu ccuaagacau ugcuaaggcc		42
<210>	28	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Polynucleotide	
<400>	28	

aaacuuuuac aacuagagga aaggauucug uaacgauucc cc	42
<210> 29	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 29	
ugaaaaauguu gaucuccuuu ccuaagacau ugcuaagggg cccacagggaa gg	52
<210> 30	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 30	
aaacuuuuac aacuagagga aaggauucug uaacgauucc ccgggugucc uu	52
<210> 31	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 31	
ugaaaaauguu gaucuccuuu ccuaagacau ugcuaagggg cccacagggaa ggcugguggc	60
ac	62
<210> 32	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 32	
aaacuuuuac aacuagagga aaggauucug uaacgauucc ccgggugucc uuccgaccac	60
cg	62
<210> 33	
<211> 23	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 33

ucacacacaa gucaugcaut t

21

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 34

ttagugugug uucaguacgu a

21