

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 12월 5일 (05.12.2024) WIPO | PCT



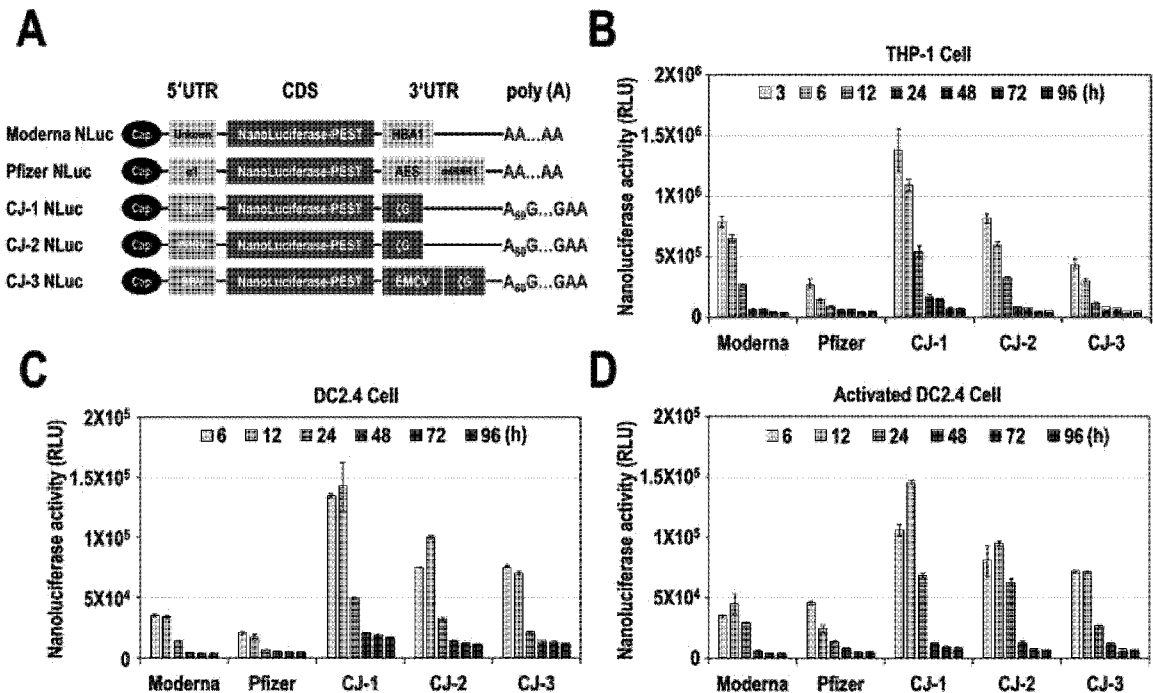
(10) 국제공개번호
WO 2024/248367 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/006580
- (22) 국제출원일: 2024년 5월 14일 (14.05.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2023-0068278 2023년 5월 26일 (26.05.2023) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 조성찬 (CHO, Sungchan); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 조민주 (JO, Min Ju); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김세영 (KIM, Seyoung); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 정민선 (JEONG, Min Sun); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 함영욱 (HAM, Youngwook); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

- (74) 대리인: 특허법인 태평양 (BAE, KIM & LEE IP); 04521 서울특별시 중구 청계천로 30, 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: MRNA STRUCTURE PLATFORM FOR PROTEIN EXPRESSION WITH HIGH EFFICIENCY

(54) 발명의 명칭: 단백질 고효율 발현용 mRNA 구조체 플랫폼



(57) Abstract: The present invention relates to an mRNA structure platform capable of expressing a protein with high efficiency.

(57) 요약서: 본 발명은 단백질을 고효율로 발현시킬 수 있는 mRNA 구조체 플랫폼에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]



공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 단백질 고효율 발현용 mRNA 구조체 플랫폼

기술분야

- [1] 관련 출원과의 상호 인용
- [2] 본 출원은 2023년 05월 26일자 한국 특허출원 제2023-0068278호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 상기 한국 특허출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [3] 기술분야
- [4] 본 발명은 단백질을 고효율로 발현시킬 수 있는 mRNA 구조체 플랫폼에 관한 것이다.

배경기술

- [5] 2019년 창궐한 신종 코로나바이러스인 SARS-CoV-2의 감염증인 COVID-19가 전 세계적으로 빠르게 확산됨에 따라, 추가적인 확산 예방과 사망 피해 감소를 위해 국가적인 차원에서 백신 개발이 경쟁적으로 이루어졌다. 다양한 백신 개발 전략 중 비교적 새로운 전략으로 분류되는 mRNA 백신이 가장 단기간에 사용승인되어 현재까지 투여되고 있다. 상기 mRNA 백신은 인공적으로 합성한 mRNA(messenger RNA, 항원 단백질 정보를 포함한 설계도)를 이용하여 후천면역을 강화하는 핵산-기반 백신으로, 바이러스 항원 유전자를 포함하는 mRNA를 생체 외에서 합성하고 고순도로 정제하여 LNP(lipid nanoparticle)에 감싼 형태로 인체에 투여되는데, 면역세포에 의해서 발현된 항원은 세포밖으로 제시되어 다양한 항원 특이적 후천면역을 유도하게 된다.
- [6] 2020년 12월 모더나社(mRNA-1273)와 화이자-바이오엔텍社(BNT162b2)의 mRNA 백신이 미국을 비롯한 주요국에서 긴급사용 승인을 받았고, 30,000명 이상의 대규모 임상에서 95% 이상의 놀라운 효능이 확인되었는데, 이는 전통적인 백신들이 50-70% 수준에 머무는 것과 매우 대조적이다. 이렇듯 mRNA 백신의 전례없는 성공에도 불구하고, 백신의 효력이 오래 지속되지 않아 추가접종이 필수적인 현실이다. 또한, 백신접종 이후 시간이 지남에 따라 중화항체가 및 백신 효력이 감소하게 되는데, 모더나社와 화이자-바이오엔텍社의 mRNA 백신 모두 2차 접종 6~8개월 이후 중화항체가 6배 이상 감소하는 것으로 보고되었다.
- [7] 더불어, 코로나 팬데믹의 장기화로 인한 지속적인 변이 바이러스의 출현이 mRNA 백신의 효력을 저하시키는 또 다른 원인이 되고 있다. SARS-CoV-2는 RNA 바이러스이어서 복제 과정에서 자연적으로 다수의 변이가 발생하게 되는데 이들 중 중화항체가 작용하는 부위에 변이가 생기게 되면 중화항체가 작용하지 못하게 되어 백신 효력이 저하 또는 상실하게 되는 문제가 있다.
- [8] 이에, mRNA 백신의 효력 지속성을 높이기 위해서는 항원제시 면역세포에서 항원 발현을 1세대 mRNA 백신 보다 더 높이고 오랫동안 지속될 수 있도록 고도

화된 mRNA 구조체 개발이 필요하다. 특히 비활성 항원제시 면역세포 뿐 아니라 활성화된 항원제시 면역세포가 림프절로 이동한 이후에도 지속적 고발현을 하는 것이 후천 면역의 활성화에 중요할 것으로 사료된다.

- [9] 한편, 상기 mRNA는 현재 감염병의 백신뿐 아니라 암 백신 개발을 위해서도 활발하게 적용연구가 이루어지고 있고, 향후에는 더 나아가 다양한 희귀 유전질환 및 난치질환의 치료제 개발을 위해서도 활용범위가 넓을 것으로 예상된다.
- [10] 질병 원인 유전자를 mRNA 형태로 세포 및 생체에 전달해서 단백질의 양이나 활성을 보충함으로써 치료적 효과를 내는 방식으로, 질병과의 상관성이 명확하게 검증된 유전자의 양이나 활성의 감소에 의해서 발병하는 유전질환 그 중에서도 단일 유전자의 결함이 원인인 단일 유전자 질환(monogenic disease)에 가장 적합한 방식이다.
- [11] 상기와 같은 mRNA를 수단으로 하는 백신이나 치료제 개발은 질병의 원인 유전자를 직접적으로 공급하는 방식이기 때문에 표적 특이성이 높은 방식이고, RNA를 활용하기 때문에 유전체에 삽입되지 않고 일시적인 발현을 하는 방식이어서 안전성이 높으며, mRNA 구조체 및 전달체 모듈이 확립되면 다양한 질병 유전자를 쉽게 적용할 수 있다. 더불어 생산 및 공정이 효율적이고 전체 개발기간이 짧아 전반적으로 경제적인 의약개발이 가능하고 저가 약물 개발에 유리하며, 향후 환자 맞춤형 치료제 개발에 매우 적합한 방식일 수 있는 장점이 있다.
- [12] 최근 AAV(adeno-associated virus)를 이용한 생체 전달방식의 유전자 치료제가 다수 신약 승인된 바 있다. 척수성 근위축증 치료제인 졸겐스마(zolgensma), 빈혈치료제 진테글로(zynteglo), 혈우병 치료제인 헴제닉스(hemgenix) 등이 대표적인 예로, 약가가 25-45억/1회로 천문학적인 수준이다. 1회 투여로 다년간의 치료 효과를 낸다는 장점에도 불구하고, AAV 벡터의 패키징 수용능력의 한계로 유전자의 크기에 제약이 있고, 여전히 비현실적으로 높은 약가, 작지 않은 면역반응, AAV 바이러스에 노출된 환자의 경우 중화항체가 형성되어 약효를 내지 못하는 점 등이 한계점으로 인식되고 있다.
- [13] 이에 반해, mRNA 기반 치료제는 적용 유전자의 크기에 이론적으로 제약이 없고, 안전성이 높고, 경제적 의약생산으로 비교적 낮은 약가가 가능하고, 환자군에 제약이 없어 AAV 기반의 치료제의 약점을 보완할 수 있는 강점을 가지고 있다. 이러한 mRNA 기반 치료제의 장점에도 불구하고, mRNA가 치료제로서 성공적이기 위해서는 질병 유전자를 고발현으로 장기간 지속적으로 발현하는 것이 필수적인데, 이는 백신이 1회 투여로도 충분한 항원을 발현하여 생체내 면역작용에 의해서 면역기억을 형성하는 것과는 달리 치료제의 경우 질병 단백질을 지속적으로 높게 발현하는 것이 치료적 효과를 내는데 중요하기 때문이다.
- [14] 따라서 단백질을 높은 효율로 발현시킬 수 있는 mRNA 구조체 플랫폼의 개발은 SARS-CoV-2를 비롯해 다양한 고위험 바이러스들(Zika, influenza, SFTS, Dengue 등) 및 향후 출현할 신변종 바이러스 전염병을 극복할 수 있는 mRNA 백신

신의 효과적이고 신속한 개발에 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 나아가 mRNA 기반의 유전자 치료제 개발을 가능하게 하는 필수적인 과정이라 하지 않을 수 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [15] 본 발명의 일 목적은 목적 단백질을 고효율로 발현할 수 있는 플랫폼으로 적용될 수 있는 신규 mRNA 구조체를 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규 mRNA 구조체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [17] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 목적 단백질을 암호화하는 염기서열; 상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 하류에 배치되는 ξ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열; 및 상기 ξ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열의 하류에 배치되는 $(A_{60}G)_n$ 의 반복단위를 포함하는 염기서열(여기서, n 은 1 내지 3의 정수); 을 포함하는 mRNA 구조체를 제공한다.
- [18] 상기 mRNA 구조체는 상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 상류에 배치되는 BBV(black beetle virus) 또는 PPRV(peste des petits ruminants virus) 유래 염기서열을 더 포함할 수 있다.
- [19] 상기 mRNA 구조체는 상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 하류와 상기 ξ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열의 상류의 사이에, EMCV(encephalomyocarditis virus)의 IRES(internal ribosome entry site)의 염기서열을 더 포함할 수 있다.
- [20] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 측면은 상기 mRNA 구조체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [21] 상기 약학적 조성물은 백신 또는 유전자 치료제일 수 있다.

발명의 효과

- [22] 본 발명에서 새롭게 고안 및 도출된 mRNA 구조체는 종래 상용화된 모더나社나 화이자-바이오엔텍社의 mRNA 구조체에 비해, 그 세포 내에서의 발현 효율이 훨씬 우수하므로, mRNA 기반의 백신이나 치료제의 개발에 폭넓게 활용될 수 있는 플랫폼 기술로서 유용하게 적용될 수 있는 장점이 있다.
- [23] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 최적의 3'-UTR을 도출하기 위하여, 3'-UTR에 다양한 세포 유전자의 염기서열을 적용하여 mRNA 구조체들을 설계하고(A), 이들 mRNA 구조체들을 293T 세포에 형질주입한 후 시간별로 나노루시퍼라아제의 활성을 측정한 결과(B)와 상기 나노루시퍼라아제의 활성을 12시간 결과로 보정하여 상대적인 활성의 변화를 분석한 결과(C)를 나타낸 것이다.

- [25] 도 2는 역시 최적의 3'-UTR을 도출하기 위하여, 3'-UTR에 다양한 바이러스 유래의 염기서열을 적용하여 mRNA 구조체들을 설계하고(A), 이들 mRNA 구조체들을 293T 세포에 형질주입한 후 시간별로 나노루시퍼라아제의 활성을 측정한 결과(B)와 상기 나노루시퍼라아제의 활성을 12시간 결과로 보정하여 상대적인 활성의 변화를 분석한 결과(C)를 나타낸 것이다.
- [26] 도 3은 역시 최적의 폴리(A)테일을 도출하기 위하여, 폴리(A)테일에 구아닌을 다양한 숫자와 간격으로 삽입한 염기서열을 적용하여 mRNA 구조체들을 설계하고(A), 이들 mRNA 구조체들을 293T 세포에 형질주입한 후 시간별로 나노루시퍼라아제의 활성을 측정한 결과(B)와 상기 나노루시퍼라아제의 활성을 12시간 결과로 보정하여 상대적인 활성의 변화를 분석한 결과(C)를 나타낸 것이다.
- [27] 도 4는 3'-UTR에 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열 또는 EMCV의 IRES의 염기서열을 단독 또는 조합하여 적용하고, 폴리(A)테일로 A₆₀G₂를 적용하여 mRNA 구조체들을 설계하고(A), 이들 mRNA 구조체들을 293T 세포에 형질주입한 후 시간별로 나노루시퍼라아제의 활성을 측정한 결과(B)와 상기 나노루시퍼라아제의 활성을 12시간 결과로 보정하여 상대적인 활성의 변화를 분석한 결과(C)를 나타낸 것이다.
- [28] 도 5는 최적의 5'-UTR을 도출하기 위하여, 3'-UTR에 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열 또는 EMCV의 IRES의 염기서열과 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열의 조합을 적용하고, 폴리(A)테일로 A₆₀G₂를 적용하는 한편, 5'-UTR에 다양한 염기서열을 적용하여 mRNA 구조체들을 설계하고(A), 이들 mRNA 구조체들을 293T 세포에 형질주입한 후 시간별로 나노루시퍼라아제의 활성을 측정한 결과(B)와 상기 나노루시퍼라아제의 활성을 12시간 결과로 보정하여 상대적인 활성의 변화를 분석한 결과(C)를 나타낸 것이다.
- [29] 도 6은 도 5에서 최고의 발현효율을 나타내는 3종의 mRNA 구조체(CJ-1, BBV+ ζ G+A₆₀G₂, CJ-2, PPRV+ ζ G+A₆₀G₂, CJ-3, BBV+EMCV+ ζ G+A₆₀G₂)를 선별하고, 모더나社 및 화이자-바이오엔텍社에서 코로나 mRNA 백신 개발에 사용한 mRNA 구조체를 추가적으로 제작하여(A), 이들 mRNA 구조체들을 단핵구 계열 면역세포인 THP-1 세포(B), 덴드리틱 세포 계열인 마우스 DC2.4 세포(C), 그리고 상기 DC2.4 세포를 LPS로 활성화시킨 세포(Activated DC2.4 Cell)(D)에 형질주입한 후 시간별로 나노루시퍼라아제의 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 7은 3종의 mRNA 구조체(CJ-1, CJ-2, CJ-3)를 대표적인 마우스 근육세포인 C2C12 세포(A), 대표적인 간세포인 Huh-7 세포(B), 대표적인 폐세포인 A549(C) 및 대표적인 망막세포인 AREP-19(D), 대표적인 신경세포인 SH-SY5Y 세포(ATCC) 및 Neuro-2a 세포(ATCC), 및 293T 세포에 형질주입한 후 시간별로 나노루시퍼라아제의 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [31] 도 8은 3종의 mRNA 구조체(CJ-1, CJ-2, CJ-3)를 293T 세포(A), 또 다른 대표적인 간세포인 HepG2 세포(B), 대표적인 신경세포인 SH-SY5Y 세포(C) 및 Neuro-2a 세

포(D)에 형질주입한 후 시간별로 나노루시퍼라아제의 활성을 측정한 결과(C)를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [32] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [33] **1. 신규 mRNA 구조체**
- [34] 본 발명의 일 측면은 신규 mRNA 구조체를 제공한다.
- [35] 상기 본 발명의 mRNA 구조체는 목적 단백질을 암호화하는 염기서열; ζ -글로빈의 3'-UTR(3'-untranslated region)의 염기서열; 및 $(A_{60}G)_n$ 의 반복단위를 포함하는 염기서열;을 포함한다.
- [36] 상기 목적 단백질은 본 발명의 mRNA 구조체를 통해 발현시키고자 하는 목적이 되는 단백질을 의미한다. 구체적으로, 상기 목적 단백질은 본 발명의 mRNA 구조체가 세포에 도입된 후에 상기 세포의 자체 번역(translation) 체계에 의해 상기 mRNA 구조체로부터 직접 번역되어 발현되는 단백질을 의미할 수 있다. 따라서 상기 본 발명의 mRNA 구조체에 포함되는 '목적 단백질을 암호화하는 염기서열'은 인트론이 제거되고 엑손만으로 구성되어 곧바로 번역되어 목적 단백질로 생성될 수 있는 CDS(coding sequence)를 의미하는 것일 수 있다.
- [37] 상기 ζ -글로빈은 인간 *HBZ* 유전자로, 인간 α -글로빈 유전자 클러스터에 속하는 5종의 유전자들 중 하나이다. 상기 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열은 상기 인간 *HBZ* 유전자가 발현되는 과정에서 생성되는 mRNA에 포함된 3'-UTR의 염기서열을 의미한다. 특히, 상기 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열은 서열번호 6의 염기서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고, 구체적으로 상기 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열은 서열번호 6의 염기서열 또는 이의 변이체로 구성되는 것일 수 있다. 상기 서열번호 6의 염기서열의 변이체는 서열번호 6의 염기서열과 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 것들을 의미하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 서열번호 6의 염기서열과 같이 mRNA의 안정성과 발현 효율을 향상시킬 수 있는 기능을 하는 염기서열을 모두 의미한다.
- [38] 상기 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열은 상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 하류(downstream)에 배치될 수 있고, 특히 상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열과 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [39] 상기 $(A_{60}G)_n$ 의 반복단위를 포함하는 염기서열은 폴리(A)테일의 변이체로서, 상기 $(A_{60}G)_n$ 의 반복단위를 포함하는 염기서열은 115nt 내지 125nt의 길이를 가질 수 있고, 예컨대 117nt 내지 123nt의 길이를 가질 수 있고, 특히 상기 $(A_{60}G)_n$ 의 반복단위를 포함하는 염기서열은 121nt의 길이를 가질 수 있다. 이에, 상기 n은 1 내지 3의 정수일 수 있고, 예컨대 1 내지 2의 정수일 수 있고, 특히 상기 n은 1일 수 있다. 구체적으로, 상기 $(A_{60}G)_n$ 의 반복단위를 포함하는 염기서열은 서열번호 21의 염기서열($A_{57}GA_{60}GAA$)일 수 있다.

- [40] 상기 $(A_{60}G)_n$ 의 반복단위를 포함하는 염기서열은 상기 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열의 하류에 배치될 수 있고, 특히 상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열 및 상기 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열과 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [41] 한편, 상기 본 발명의 mRNA 구조체는 BBV(black beetle virus)의 5'-UTR의 염기서열 또는 PPRV(pestes des petits ruminants virus)의 5'-UTR의 염기서열을 더 포함할 수 있다. 상기 BBV의 5'-UTR의 염기서열은 검은딱정벌레에 감염되는 바이러스에서 유래한 서열로 암호화 서열(coding sequence)의 상류에 존재함으로써 단백질의 번역 효율을 향상시킨다. 특히, 상기 BBV의 5'-UTR의 염기서열은 Cap-독립적 번역(Cap-independent translation) 기전으로 알려져 있는 IRES 염기서열에 비해 훨씬 짧으면서도 높은 단백질 번역 효율을 나타낸다. 또한, 상기 PPRV는 파라믹소바이러스과(*Paramyxoviridae*) 하위 모르빌리바이러스(*Morbillivirus*) 속에 속하고, 주로 염소와 양에 감염하는 가성우역바이러스이다. 상기 PPRV의 5'-UTR의 염기서열은 PPRV의 F 유전자의 상류에 존재하면서 18S rRNA와 상보적으로 결합함으로써 단백질 번역 효율을 향상시킬 것으로 추정된다.
- [42] 상기 BBV(black beetle virus)의 5'-UTR의 염기서열은 서열번호 24의 염기서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고, 구체적으로 상기 BBV의 5'-UTR의 염기서열은 서열번호 24의 염기서열 또는 이의 변이체로 구성되는 것일 수 있다. 또한, 상기 PPRV의 5'-UTR의 염기서열은 서열번호 25의 염기서열이나 서열번호 26의 염기서열 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있고, 구체적으로 상기 PPRV의 5'-UTR의 염기서열은 서열번호 25의 염기서열이나 서열번호 26의 염기서열 또는 이들의 변이체로 구성되는 것일 수 있다. 상기 서열번호 24, 25 또는 26의 염기서열의 변이체는 상기 서열번호 24, 25 또는 26의 염기서열과 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 것들을 의미하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 서열번호 24, 25 또는 26의 염기서열과 같이 mRNA의 안정성과 발현 효율을 향상시킬 수 있는 기능을 하는 염기서열을 모두 의미한다.
- [43] 상기 BBV의 5'-UTR의 염기서열 또는 PPRV의 5'-UTR의 염기서열은 상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 상류(upstream)에 배치될 수 있고, 특히 상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열과 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [44] 또한, 상기 본 발명의 mRNA 구조체는 EMCV(encephalomyocarditis virus)의 IRES(internal ribosome entry site)의 염기서열을 더 포함할 수 있다. 상기 EMCV의 IRES의 염기서열은 서열번호 13의 염기서열 또는 이의 변이체로 구성되는 것일 수 있다. 상기 서열번호 13의 염기서열의 변이체는 서열번호 13의 염기서열과 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 것들을 의미하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 서열번호 13의 염기서열과 같이 mRNA의 안정성과 발현 효율을 향상시킬 수 있는 기능을 하는 염기서열을 모두 의미한다.

- [45] 상기 EMCV의 IRES의 염기서열은 상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 하류와 상기 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열의 상류의 사이에 배치될 수 있고, 특히 상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열 및 상기 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열과 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [46] 상기와 같이 구성되는 본 발명의 mRNA 구조체는 세포 내에서의 안정성이나 발현 효율이 매우 우수하여, 형질주입된 후에도 세포 내에서 높은 발현 상태를 장시간 동안 유지할 수 있는 효과가 있다. 특히, 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 기존의 모더나社나 화이자-바이오엔텍社의 mRNA 구조체에 비하여 더욱 높은 발현 효율을 나타내는 것으로 확인되었을 뿐만 아니라, 근육세포, 간세포, 폐세포, 안세포, 신경세포 등 다양한 세포의 종류에 상관없이 일관성 있게 높은 발현 효율을 나타내는 것으로 확인되었다(도 6 내지 8 참고).
- [47] **2. 신규 mRNA 구조체의 활용**
- [48] 상술한 바와 같이, 상기 본 발명의 신규 mRNA 구조체는 세포 내에서 높은 발현 효율을 나타내므로 목적 단백질의 발현을 위해 세포에 형질주입되기 위한 것일 수 있다.
- [49] 또한, 상기와 같이 세포에 형질주입될 수 있는 본 발명의 신규 mRNA 구조체는 목적 단백질에 따라 약학적 조성물의 유효성분으로 이용될 수 있다.
- [50] 예컨대, 상기 목적 단백질이 바이러스나 세균에서 유래한 단백질인 경우 상기 본 발명의 mRNA 구조체를 포함하는 약학적 조성물은 백신일 수 있다. 이러한 경우, 본 발명의 약학적 조성물이 주입된 개체 내에서 상기 신규 mRNA 구조체에 의해 목적 단백질인 바이러스나 세균 유래의 단백질이 높은 효율로 발현되게 되고, 이렇게 발현된 바이러스나 세균 유래의 단백질은 개체 내에서 항원으로 인식되어 면역 반응을 유발함으로써 백신으로 작용할 수 있다.
- [51] 또한, 상기 목적 단백질이 암이나 유전질환 등과 같은 특정 질환에서 결핍된 원인 단백질인 경우 상기 본 발명의 mRNA 구조체를 포함하는 약학적 조성물은 유전자 치료제일 수 있다. 이러한 경우, 본 발명의 약학적 조성물이 주입된 개체 내에서 상기 신규 mRNA 구조체에 의해 목적 단백질인 상기 특정 질환에서 결핍된 원인 단백질이 높은 효율로 발현되게 되고, 상기 원인 단백질의 고효율 발현에 의해 상기 원인 단백질의 결핍이 보완됨으로써 상기 특정 질환이 치료될 수 있다. 따라서 결핍된 유전자의 보완에 의해 치료될 수 있는 질환이라면 특별한 제한없이, 본 발명의 약학적 조성물에 의해 치료될 수 있다.
- [52] 특히, 상기와 같은 유전자 치료제로 적용하기에 가장 적합한 질환으로는 단일 유전자 결함으로 발병하는 단일 유전 질환(monogenic genetic diseases)이 있는데, 예컨대 희귀 신경근육질환인 척수성 근위축증(Spinal muscular atrophy, SMA)이 대표적이고, 그 외에도 낭포성 섬유증(Cystic Fibrosis, CF), 듀켄씨 근이영양증(Duchenne Muscular Dystrophy, DMD), 프리드리히 실조(Friedreich's Ataxia, FA), 혈우병(hemophilia), 레트 증후군(Rett Syndrome), 파브리병(Fabry Disease), 겸상적혈구병(Sickle Cell Disease) 등에도 적용해 볼 수 있다.

- [53] 더욱이, 본 발명의 mRNA 구조체는 근육세포, 간세포, 폐세포, 안세포, 신경세포 등 다양한 세포의 종류에 상관없이 일관성 있게 높은 발현 효율을 나타내므로 각종 질환이 유발될 수 있는 다양한 세포에 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 mRNA 구조체는 상기와 같은 유전자 치료제의 유효성분으로 이용될 때, 기존의 모더나社나 화이자-바이오엔텍社의 mRNA 구조체를 이용하는 경우에 비해, 훨씬 우수한 치료 효과를 담보할 수 있는 장점이 있다.
- [54] 한편, 상기와 같이 본 발명의 mRNA 구조체가 약학적 조성물의 유효성분으로 이용되는 경우, 상기 약학적 조성물은 본 발명의 mRNA 구조체를 전달하기 위한 전달 수단을 더 포함할 수 있다.
- [55] 상기 전달 수단의 대표적인 예로 리포솜이나 LNP(lipid nanoparticle) 등과 같은 나노입자를 들 수 있고, 상기 리포솜 또는 LNP는 양이온성 지질, 비양이온성 지질 또는 중성 지질 등을 포함하며, 추가적으로 PEG(polyethylene glycol) 또는 콜레스테롤 등의 다른 지질을 포함할 수 있다. 또한, 상기와 같은 전달 수단으로서의 역할을 하는 나노입자로는 엑소솜도 이용될 수 있고, 또 다른 전달 수단으로 본 발명의 mRNA 구조체와 정전기적으로 상호작용하여 향상된 안정성을 제공할 수 있는 양이온성 생체적합성 폴리머나 양이온성 펩티드(예, 프로타민, 세포 투과성 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP) 등이 이용될 수도 있으나, 이에 한정되지 않고 본 발명이 속하는 기술분야에서 mRNA 구조체를 전달할 수 있는 것으로 알려진 임의의 모든 수단이 이용될 수 있다.
- [56] 또한, 상기 약학적 조성물은 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 본 발명의 유효성분과 양립 가능하여야 하며, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 한 성분 또는 둘 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있고, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형으로 제제화 할 수 있다. 특히, 동결건조(lyophilized)된 형태의 제형으로 제제화하여 제공하는 것이 바람직하다. 동결건조 제형 제조를 위해서 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 알려져 있는 방법이 사용될 수 있으며, 동결건조를 위한 안정화제가 추가될 수도 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 레밍톤 약학 과학(Remington's pharmaceutical Science, Mack Publishing company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질병에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [57] 상기 약학적 조성물에 포함되는 유효성분 등의 함량 및 투여방법은 통상의 환자의 증후와 질병의 심각도에 기초하여 본 기술분야의 통상의 전문가가 결정할 수 있다. 또한 산제, 정제, 캡슐제, 액제, 주사제, 연고제, 시럽제 등의 다양한 형태로 제제화 할 수 있으며 단위-투여량 또는 다-투여량 용기, 예를 들면 밀봉된 앰플 및 병 등으로 제공될 수도 있다.

[58] 또한 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 기관지, 구강, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 장관, 설하 또는 국소 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 방법, 배설을 또는 질병의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 본 기술분야의 통상의 전문가가 용이하게 결정할 수 있다. 또한, 임상 투여를 위해 공지 기술을 이용하여 상기 약학적 조성물을 적합한 제형으로 제제화할 수 있다.

[59] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[60] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[61] **[실시예 1]**

[62] **신규 mRNA 구조체의 구조**

[63] 선형의 형태로 세포 내에서 높은 안정성 및 번역 효율을 갖는 신규의 mRNA 구조체를 도출하기 위하여, 먼저 리포터 단백질들 중 가장 발광도가 높고 단백질의 크기가 작은 나노루시퍼라아제와 상기 나노루시퍼라아제의 C-말단에 PEST 아미노산이 융합된 나노루시퍼라아제-PEST 융합 단백질을 발현 대상의 목적 단백질로 정하였다. 그리고, 상기 나노루시퍼라아제-PEST 융합 단백질을 암호화하는 서열번호 1의 염기서열을 기준으로, 그 상류에 5'-UTR의 염기서열이 배치되고 상기 5'-UTR의 염기서열의 5'-말단에 Cap1의 형태를 지닌 CleanCap(TriLink社)이 배치되는 한편, 그 하류에 3'-UTR의 염기서열과 폴리(A)테일의 염기서열을 순차적으로 배치되는 형태로 신규 mRNA 구조체의 구조를 특정하였다.

[64] **[실시예 2]**

[65] **신규 mRNA 구조체의 최적의 구성요소들의 선별**

[66] **[2-1] 최적의 3'-UTR의 선정**

[67] 먼저, 최적의 3'-UTR을 도출하기 위하여, 상기 실시예 1에서 특정한 mRNA 구조체에서, 5'-UTR의 염기서열을 인간 α -글로빈(α -globin)의 5'-UTR의 염기서열(서열번호 2의 염기서열)로, 폴리(A)테일의 염기서열을 117nt의 폴리(A) 서열로 각각 고정하는 한편, 3'-UTR의 염기서열로 아래 표 1에 개시된 여러 종류의 3'-UTR의 염기서열들을 적용하여, 도 1의 A에 도시된 바와 같은 제조예 1-1 내지 제조예 1-6의 mRNA 구조체 6종을 설계하였다.

[68] **[표1]**

적용 제조예 #	명칭	염기서열(5'→3')	서열번호
1-1	α -globin	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCT TCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCA GCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACC	3

		CGTACCCCCGTGGTCTTTGAATA AAGTCTGAGTGGGCGGCA (111bp)	
1-2	β -globin	GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTT CTATTAAAGGTTCTTTGTTCCC TAAGTCCAACACTAACTGGGG GATATTATGAAGGGCCTTGAGCA TCTGGATTCTGCCTAATAAAAAA CATTTATTTTCATTGCAA (134bp)	4
1-3	γ 1-globin	GCTCACTGCCCATGATTCAGAGCT TTCAAGGATAGGCTTTATTCTGCA AGCAATACAAATAATAAATCTAT TCTGCTGAGAGATCACACA (90bp)	5
1-4	ζ -globin	GCGCCGCTCCGGGACCCCCA GGACAGGCTGCGGCCCTCCCC CGTCCTGGAGGTTCCCCAGCCC CACTTACGCGTAATGCGCCAA TAAACCAATGAACGAA (103bp)	6
1-5	Tyrosine h ydroxylase	GTGCACGGCGTCCCTGAGGGCCCTTC CCAACCTCCCCTGGTCCTGCACTGTC CCGGAGCTCAGGCCCTGGTGAGGGG CTGGGTCCCGGGTGCCCCCATGCCC TCCCTGCTGCCAGGCTCCCACTGCCC CTGCACCTGCTTCTCAGCGCAACAGC TGTGTGTGCCCCGTGGTGAGGTTGTGC TGCCTGTGGTGAGGTCCTGTCCTGGC TCCCAGGGTCCTGGGGGCTGCTGCA CTGCCCTCCGCCCTTCCCTGACACTG TCTGCTGCCCCAATCACCGTCACAAT AAAAGAACTGTGGTCTCTA (304bp)	7
1-6	Insulin	ACGCAGCCCCGCAGGCAGCCCCACACC CGCCGCCTCCTGCACCGAGAGAGATG GAATAAAGCCCTTGAACCAGC (73bp)	8

[69] 상기와 같이 설계된 제조예 1-1 내지 제조예 1-6의 mRNA 구조체를, DNA 벡터 (pcDNA3.1 hygro Vector)의 T7 프로모터 하류에 연결하는 한편, 상기 mRNA 구조체의 폴리(A)테일 바로 뒤에 타입 II 제한효소 인식 서열이 배치되도록 삽입하였다. 따라서 상기와 같은 DNA 벡터로부터 발현되는 mRNA 구조체는 5'-말

단이 CleanCap으로 캡핑되어 있고, 3'-말단은 순수하게 117nt 길이의 아테닌 서열이 된다.상기와 같이 제조된 DNA 벡터 5ug에 타입 IIS 제한효소 BspQI(NEB사)를 처리하고 밤새 반응시킴으로써 DNA 벡터를 선형화하였고, 아가로오스 젤을 이용한 전기영동을 통해 DNA 벡터의 절단이 완벽하게 이루어졌는지 여부를 확인한 다음, 상기 선형화 과정에서 이용된 효소와 완충용액들을 glassfiber membrane(ExpinTMCleanUP SV, GeneAll사)을 이용하여 제거하고 선형화된 DNA 만을 분리 및 정제하였다. 상기와 같이 분리 및 정제된 선형 DNA 500ng을 이용하여 섭씨 37도에서 4시간 동안 인 비트로 전사(*in vitro* transcription)을 진행한 다음, DNase를 처리하고 섭씨 37도에서 30분 동안 반응시켜 반응에 사용된 DNA를 제거하였다. 그리고 실리카 컬럼(HiYield RNA UltraPurification Kit, RealBiotechCorporation(RBC)사)을 이용하여 인 비트로 전사 결과 생성된 mRNA 만을 분리 및 정제하였다. 상기와 같이 분리 및 정제된 mRNA를 섭씨 70도에서 10분간 변성(denaturation)한 다음 아가로오스 젤을 이용한 전기영동을 수행하여 해당 mRNA 들이 예상되는 크기로 균일하게 생성된 것을 확인하였고, 추가적으로 nanodrop 장비(spectrophotometer, ND-2000, ThermoScientific사)를 이용하여 생성된 mRNA의 순도와 농도를 측정하였다.그런 다음, 리포펙타민 2000(Lipofectamine2000TM Transfection Reagent, ThermoFisher)을 이용하여 역-트랜스펙션(reverse-transfection)법으로, 96웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰의 농도로 분주되어 있는 293T 세포(ATCC)에, 상기와 같이 분리 및 정제된 mRNA를 형질주입하였고, Nano-Glo 시약(Nano-Glo^(R) Luciferase Assay System, Promega사)을 이용하여 형질주입 후 6, 12, 24, 48, 72, 96 시간 경과 후의 나노루시페라아제 활성을 측정하였다.

[70] 그 결과, 도 1의 B, C에 도시된 바와 같이, 인간 ζ -글로빈의 3'-UTR을 적용한 제조예 1-4의 mRNA 구조체에서 나노루시페라아제의 발현이 가장 높고 가장 오랫동안 지속된 것으로 확인되었다.

[71] 한편, 상기 실시예 1에서 특정한 mRNA 구조체에서, 3'-UTR의 염기서열로 아래 표 2에 개시된 카포시싸코마 허피스바이러스 (KSHV)의 RNA 안정화 서열인 ENE 및 여러 RNA 바이러스의 IRES(internal ribosome entry site)의 염기서열들을 적용하여, 도 2의 A에 도시된 바와 같은 제조예 1-7 내지 제조예 1-13의 mRNA 구조체 7종을 설계하였다.

[72] [표2]

적용 제조예 #	명칭	염기서열(5'→3')	서열 번호
1-7	1X ENE	TGTTTTGGCTGGGTTCTTCCTTGTT CGCACCGGACACCTCCAGTGACCA GACGGCAAGGTTCTTATCCCAGTG TATATTGGAAAAACATGTTATACTT	9

		TTGACAATTTAACGTGCCTAGAGC TCAAATTAATACTAATAACCATAACG TAATGCAACTTACAACATAAAATAA AGGTCAATGTTTAATCCATA (190bp)	
1-8	2X ENE	TGTTTTGGCTGGGTTCTTCCTTGTTTC GCACCGGACACCTCCAGTGACCAG ACGGCAAGGTTCTTATCCCAGTGTA TATTTGTTTTGGCTGGGTTCTTCCTT GTTTCGCACCGGACACCTCCAGTGAC CAGACGGCAAGGTTCTTATCCCAGT GTATATTGGAAAAACATGTTATACT TTTGACAATTTAACGTGCCTAGAGC TCAAATTAATACTAATAACCATAACG TAATGCAACTTACAACATAAAATAA AGGTCAATGTTTAATCCATA (269bp)	10
1-9	3X ENE	TGTTTTGGCTGGGTTCTTCCTTGTTTCGC ACCGGACACCTCCAGTGACCAGACGG CAAGGTTCTTATCCCAGTGATATTTGT TTTGGCTGGGTTCTTCCTTGTTTCGCACC GGACACCTCCAGTGACCAGACGGCAA GGTTCTTATCCCAGTGATATTTGTTTT GGCTGGGTTCTTCCTTGTTTCGCACCGG ACACCTCCAGTGACCAGACGGCAAGG TTCTTATCCCAGTGATATTGGAAAAA CATGTTATACTTTTGACAATTTAACGTG CCTAGAGCTCAAATTAATACTAATACCA TAACGTAATGCAACTTACAACATAAAT AAAGGTCAATGTTTAATCCATA (348bp)	11
1-10	CVB3	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCAC CCACAGGGCCCATTTGGGCGCTAGCAC TCTGGTATCACGGTACCTTTGTGCGCC TGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTA ACTTAGAAGTAACACACACCGATCAA CAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGT TTTGATCAAGCACTTCTGTTACCCCGG ACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCG GTTGAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCG	12

		GCCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAA CACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTCGC TCAGCACTACCCAGTG TAGATCAGGT CGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGG CGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCG GCCTGCCCATGGGGAAACCCATGGGA CGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAG AGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTC CGGCCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAAC TGC GGAGCACACACCCTCAAGCCAGA GGGCAGTGTGTCGTAACGGGGCAACTC TGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGT CCGTGTTTCATTTTATTCCTATACTGGC TGCTTATGGTGACAATTGAGAGATTGT TACCATATAGCTATTGGATTGGCCATC CGGTGACTAATAGAGCTATTATATATC CCTTTGTTGGGTTTATAACCACTTAGCTT GAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCA TTGTTAAGTTGAATACAGCAAA (742bp)	
1-11	EMCV	CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTT ACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGG CCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTT TCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAAT GTGAGGGCCCCGGAAACCTGGCCCTGTC TTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTT TCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGT CTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTT CCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACA ACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAG CGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTG CCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATA AGATACACCTGCAAAGGCGGCACAAC CCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAG TTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCT CAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAG GATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATG GGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACA	13

		TGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTAA AAAAACGTCTAGGCCCCCGAACAC GGGGACGTGGTTTTTCCTTTGAAAAACA CGATGATAATATGGCCACAACC (586bp)	
1-12	HCV	GGCGACACTCCACCATAGATCACTCC CCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGC AGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGT ATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGACC CCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGT CTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGA ATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCT TGGATTAACCCGCTCAATGCCTGGAG ATTTGGGCGTGCCCCCGCGAGACTGC TAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAA GGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGT GCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCG TAGACCGTGCATCATGAGCACAAATC CTAAACCTCAAAGAAAAACC (357bp)	14
1-13	CrPV	AAAGCAAAAATGTGATCTTGCTTG TAAATACAATTTTGAGAGGTTAAT AAATTACAAGTAGTGCTATTTTTG TATTAGGTTAGCTATTTAGCTTTA CGTTCCAGGATGCCTAGTGGCAGC CCCACAATATCCAGGAAGCCCTCT CTGCGGTTTTTCAGATTAGGTAGTC GAAAAACCTAAGAAATTTA (189bp)	15

[73] 상기와 같이 설계된 제조예 1-7 내지 제조예 1-13의 mRNA 구조체를, 상기 제조예 1-1 내지 제조예 1-6의 mRNA 구조체와 동일한 방식으로 DNA 벡터에 삽입한 다음, 인 비트로 전사시키고 생성된 mRNA를 293T 세포에 형질주입하여 나노루시퍼라아제 활성을 측정하였다. 그 결과, 도 2의 B, C에 도시된 바와 같이, EMCV의 IRES를 적용한 제조예 1-11의 mRNA 구조체에서 나노루시퍼라아제의 발현이 가장 높고 가장 오랫동안 지속된 것으로 확인되었다. [2-2] 최적의 폴리(A)테일의 선정

[74] 폴리(A)테일이 아데노신(A)만으로 구성된 경우에 비해 구아노신(G)이 혼합된 형태의 경우에 mRNA 안정성이 더욱 향상될 수 있다는 최근 보고에 따라, 상기 실시예 1에서 특정한 mRNA 구조체에서, 3'-UTR의 염기서열은 제외하고, 폴리(A)테일의 염기서열로 아래 표 3에 개시된 여러 종류의 염기서열들을 적용하여,

도 3의 A에 도시된 바와 같은 제조예 2-1 내지 제조예 2-6의 mRNA 구조체 6종을 설계하였다.

[75] [표3]

적용 제조예 #	명칭	염기서열(5'→3')	서열번호
2-1	A10-G11	A ₉ GA ₁₀ GA ₁₀ GA ₁₀ GA ₁₀ GA ₁₀ G A ₁₀ GA ₁₀ GA ₁₀ GA ₁₀ GA ₁₀ GAA	16
2-2	A20-G6	A ₁₃ GA ₂₀ GA ₂₀ GA ₂₀ GA ₂₀ GA ₂₀ GAA	17
2-3	A30-G4	A ₂₅ GA ₃₀ GA ₃₀ GA ₃₀ GAA	18
2-4	A40-G3	A ₃₆ GA ₄₀ GA ₄₀ GAA	19
2-5	A50-G3	A ₁₆ GA ₅₀ GA ₅₀ GAA	20
2-6	A60-G2	A ₅₇ GA ₆₀ GAA	21

[76] 상기와 같이 설계된 제조예 2-1 내지 제조예 2-6의 mRNA 구조체를, 상기 실시예 [2-1]에서와 동일한 방식으로 DNA 벡터에 삽입한 다음, 인 비트로 전사시키고 생성된 mRNA를 293T 세포에 형질주입하여 나노루시퍼라아제 활성을 측정하였다. 그 결과, 도 3의 B, C에 도시된 바와 같이, 다양한 서열들 중에서, 60nt의 간격으로 2개의 구아노신(G)이 삽입된 형태의 변형 폴리(A)테일(A60-G2)을 적용한 제조예 2-6의 mRNA 구조체에서 나노루시퍼라아제의 발현이 가장 높고 가장 오랫동안 지속된 것으로 확인되었다.

[77] [2-3] 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 하류의 최적 조합 선정

[78] 또한, 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 하류의 최적 조합을 선정하기 위하여, 상기 실시예 1에서 특정한 mRNA 구조체에서, 폴리(A)테일의 염기서열로 상기 실시예 2-2에서 선정된 변형 폴리(A)테일(A60-G2)을 적용하는 한편, 3'-UTR의 염기서열로 상기 실시예 2-1에서 선정된 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열(서열번호 6의 염기서열)과 EMCV의 IRES의 염기서열(서열번호 13의 염기서열)을 도 4의 A에서와 같이 조합하여 적용하여, 도 4의 A에 도시된 바와 같은 제조예 3-1 내지 제조예 3-6의 mRNA 구조체 6종을 설계하였다.

[79] 상기와 같이 설계된 제조예 3-1 내지 제조예 3-6의 mRNA 구조체를, 상기 실시예 [2-1]에서와 동일한 방식으로 DNA 벡터에 삽입한 다음, 인 비트로 전사시키고 생성된 mRNA를 293T 세포에 형질주입하여 나노루시퍼라아제 활성을 측정하였다.

[80] 그 결과, 도 4의 B, C에 도시된 바와 같이, ζ -글로빈의 3'-UTR이 단독으로 적용된 제조예 3-4의 mRNA 구조체에서 나노루시퍼라아제의 발현이 가장 높고 가장 오랫동안 지속된 것으로 확인되었다. 그리고, EMCV의 IRES와 조합된 경우에는, EMCV의 IRES가 ζ -글로빈의 3'-UTR의 상류에 배치된 제조예 3-5의 mRNA 구조

체에서 우수한 나노루시퍼라아제의 지속 발현을 달성할 수 있는 것으로 확인되었다.

[81] [2-4] 최적의 5'-UTR의 선정

[82] 한편, 최적의 5'-UTR을 도출하기 위하여, 상기 실시예 1에서 특정한 mRNA 구조체에서, 3'-UTR을 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열(제조예 4-1 내지 제조예 4-5의 mRNA 구조체)이나 EMCV의 IRES의 염기서열과 ζ -글로빈의 3'-UTR의 조합(제조예 4-6 내지 제조예 4-10의 mRNA 구조체)으로, 그리고 폴리(A)테일을 A60-G2의 변형 폴리(A)테일로 각각 고정하는 한편, 5'-UTR의 염기서열로 아래 표 4에 개시된 여러 종류의 5'-UTR의 염기서열들을 적용하여, 도 5의 A에 도시된 바와 같은 제조예 4-1 내지 제조예 4-10의 mRNA 구조체 10종을 설계하였다.

[83] [표4]

적용 제 조 예 #	명 칭	염기서열(5'→3')	서열 번호
4-1, 4-6	1-23b	CAGCGGAAACGAGCGAAAAAA AACAGCGGAAACGAGCGAAAA AAAACAGCGGAAACGAGCGAAAA AAAAACAGCGGAAACGAGCGAAA AAAAAACAGCGGAAACGAGCGAG AGAGAACCCCTTAAGACC (131bp)	22
4-2, 4-7	17.2	TCCGGTCGTAAAAAAAATCCGGTCGT AAAAAAAATCCGGTCGTAAAAAAA ATCCGGTCGTAAAAAAAATCCGGTCG TAGAGAGAACCCCTTAAGACC (101bp)	23
4-3, 4-8	BBV	GTTTTCGAAACAAATAAAACAG AAAAGCGAACCTAAACA (39bp)	24
4-4, 4-9	PPRV	AGGGGCCAAGTCCATACGACAGG CCCCAGCCCGCCAGACGGAGGG CCGCAGAAAGGAAGGAGACACG ACCGCCCCAGAAGGAGGA (85bp)	25
4-5, 4-10	Δ PPRV	GCCCGCCAGACGGAGGGCCGC AGAAAGGAAGGAGACACGAC CGCCCCAGAAGGAGGA (57bp)	26

[84] 상기와 같이 설계된 제조예 4-1 내지 제조예 4-10의 mRNA 구조체를, 상기 실시예 [2-1]에서와 동일한 방식으로 DNA 벡터에 삽입한 다음, 인 비트로 전사시키고 생성된 mRNA를 293T 세포에 형질주입하여 나노루시퍼라아제 활성을 측정하였다. 그 결과, 도 5의 B, C에 도시된 바와 같이, 3'-UTR로 ζ -글로빈의 3'-UTR의

염기서열을 이용한 경우나, 3'-UTR로 EMCV의 IRES의 염기서열과 ζ -글로빈의 3'-UTR의 조합을 이용한 경우 모두, BBV의 5'-UTR의 염기서열을 적용한 제조예 4-3, 4-8의 mRNA 구조체와 PPRV의 5'-UTR의 염기서열을 적용한 제조예 4-4, 4-5, 4-9 및 4-10의 mRNA 구조체에서 나노루시퍼라아제의 발현이 가장 높고 가장 오랫동안 지속된 것으로 확인되었다.

[85] **[실시예 3]**

[86] **최적의 mRNA 구조체의 도출 및 평가**

[87] 상기 [실시예 2]에서 선별된 최적의 요소들을 조합하여, 상기 실시예 1에서 특정한 mRNA 구조체에서, i) 5'-UTR로 BBV의 5'-UTR의 염기서열(서열번호 24)이나 PPRV의 5'-UTR의 염기서열(서열번호 25)을, ii) 3'-UTR로 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열(서열번호 6)이나 EMCV의 IRES의 염기서열과 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열의 조합(서열번호 13+서열번호 6)을, 그리고 iii) 폴리(A)테일로 A60-G2의 변형 폴리(A)테일(서열번호 21)을 적용하여, 도 6의 A에 도시된 바와 같은 3종의 mRNA 구조체(BBV+ ζ G+A₆₀G₂; CJ-1, PPRV+ ζ G+A₆₀G₂; CJ-2, BBV+EMCV+ ζ G+A₆₀G₂; CJ-3)를 제작하였다. 그리고, 상기와 같은 3종의 mRNA 구조체를, 기존에 상용화된 모더나社 및 화이자-바이오엔텍社의 mRNA 구조체와 비교하여 평가하였다.

[88] 먼저, mRNA 구조체가 백신 개발에 적용되는 경우를 고려하여, 상기 실시예 [2-1]에서와 동일한 방식으로 생성한 3종의 mRNA, 그리고 실시예 [2-1]과 유사하지만 타입 IIS 제한효소로 BsmBI(NEB社)를 사용하여 DNA를 선형화한 후 인 비트로 전사를 통해 생성된 모더나社 및 화이자-바이오엔텍社의 mRNA를, 대표적인 항원제시 세포이면서 단핵구 유래 세포인 THP-1 세포(ATCC) 또는 항원제시 면역세포이면서 근육조직에서 중요하게 작용하는 덴드리틱(dendritic) 세포 계열인 마우스 DC2.4 세포(Merck), 또는 상기 DC2.4 세포에 LPS를 처리하여 활성화시킨 세포(Activated DC2.4 Cell)에 형질주입하여 시간별로 나노루시퍼라아제의 활성을 비교하였다. 그 결과, 도 6의 B, C, D에 도시된 바와 같이, 본 발명의 3종의 mRNA 구조체가 전반적으로 모더나社 및 화이자-바이오엔텍社의 mRNA 구조체와 유사하거나 더 우수한 발현 효율을 나타내는 것으로 확인되었고, DC2.4 세포에서 본 발명의 mRNA 구조체의 높은 효율이 한층 더 두드러지게 나타나는 것으로 확인되었으며, 특히 CJ-1의 mRNA 구조체가 가장 높은 효율을 나타내는 것으로 확인되었다.

[89] 나아가, 향후 mRNA 구조체가 근육질환, 간질환, 폐질환, 안질환, 신경질환 등의 유전자 치료에 적용되는 경우를 고려하여, 상기 실시예 [2-1]에서와 동일한 방식으로 생성한 mRNA를 대표적인 근육세포인 C2C12 세포(ATCC), 대표적인 간세포인 Huh-7 세포(ATCC) 및 HepG2 세포(ATCC), 대표적인 폐세포인 A549(ATCC), 대표적인 망막세포인 AREP-19(ATCC), 대표적인 신경세포인 SH-SY5Y 세포(ATCC) 및 Neuro-2a 세포(ATCC), 및 293T 세포에 형질주입하여 시간별로 나노루시퍼라아제의 활성을 비교하였다. 그 결과, 도 7 및 도 8에 도시된

바와 같이, 모든 세포에서 본 발명의 mRNA 구조체가 높은 발현 효율을 나타내는 것으로 확인되었다. 특히, 모더나社 및 화이자-바이오엔텍社의 mRNA 구조체는 사용하는 세포에 따라 그 발현 양상이 다르게 나타났으나 본 발명의 3종의 mRNA 구조체는 세포의 종류에 상관없이 일관되게 높은 발현 효율을 나타내는 것으로 확인되었다.

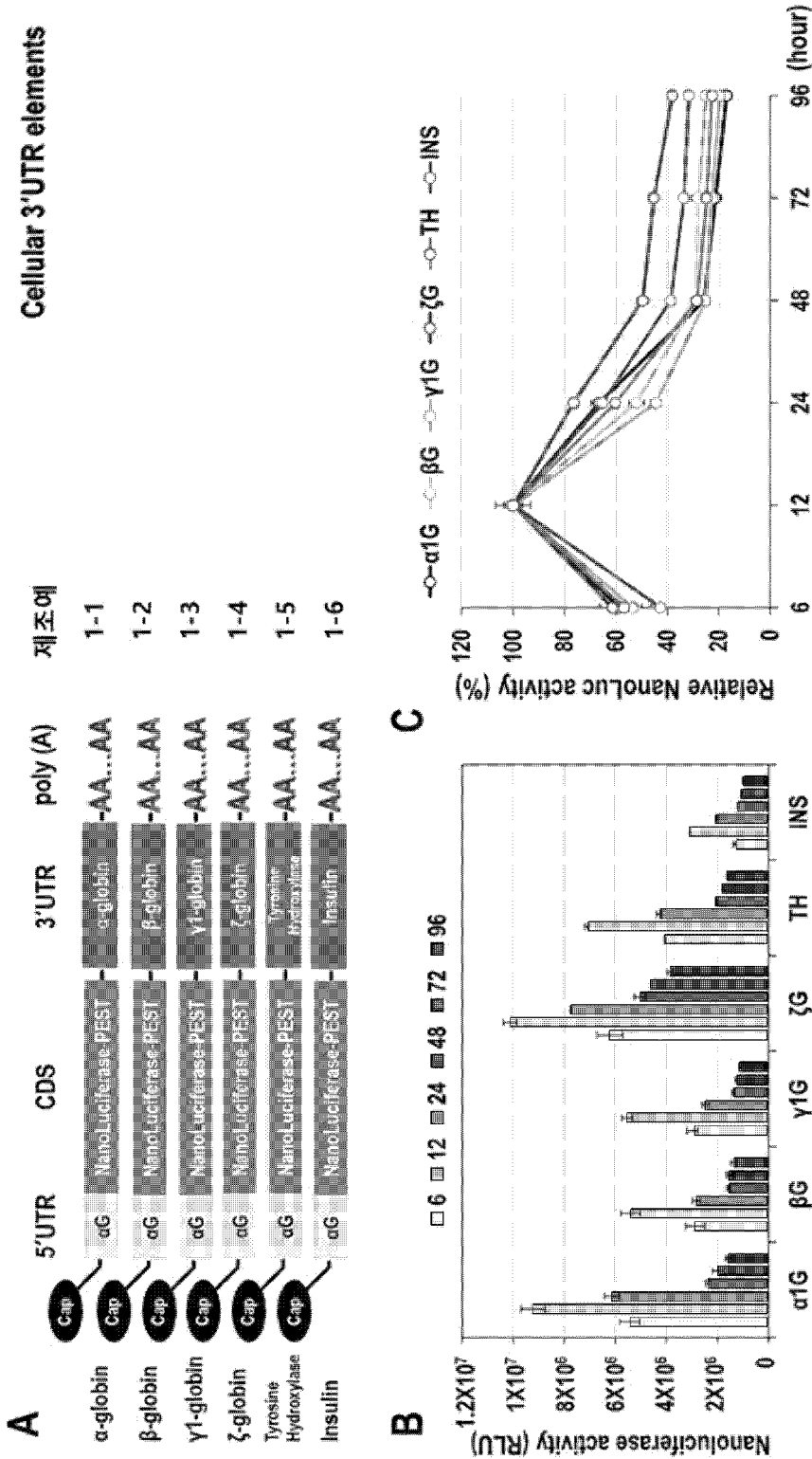
- [90] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

청구범위

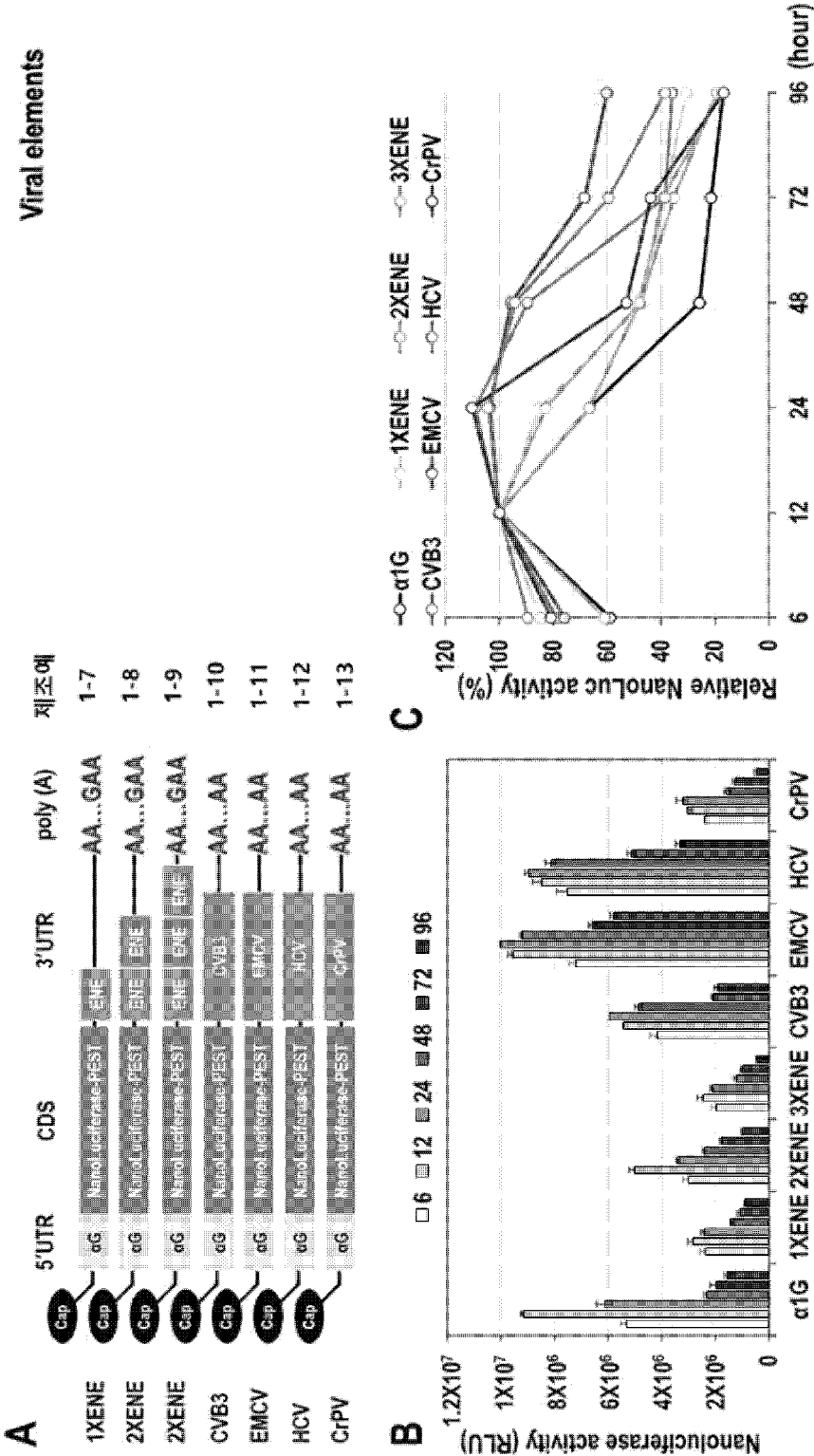
- [청구항 1] 목적 단백질을 암호화하는 염기서열;
상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 하류에 배치되는 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열; 및
상기 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열의 하류에 배치되는 $(A_{60}G)_n$ 의 반복 단위를 포함하는 염기서열(여기서, n 은 1 내지 3의 정수);
을 포함하는 mRNA 구조체.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 ζ -글로빈 3'-UTR의 염기서열은 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 것인, mRNA 구조체.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 $(A_{60}G)_n$ 의 반복단위를 포함하는 염기서열은 서열번호 21의 염기서열을 포함하는 것인, mRNA 구조체.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 하류와 상기 ζ -글로빈의 3'-UTR의 염기서열의 상류의 사이에, EMCV(encephalomyocarditis virus)의 IRES(internal ribosome entry site)의 염기서열을 더 포함하는 것인, mRNA 구조체.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서,
상기 EMCV의 IRES의 염기서열은 서열번호 13의 염기서열을 더 포함하는 것인, mRNA 구조체.
- [청구항 6] 청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,
상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 상류에, BBV(black beetle virus)의 5'-UTR의 염기서열 또는 PPRV(peste des petits ruminants virus)의 5'-UTR의 염기서열을 더 포함하는 것인, mRNA 구조체.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서,
상기 BBV의 5'-UTR의 염기서열은 서열번호 24의 염기서열을 포함하는 것이고,
상기 PPRV의 5'-UTR의 염기서열은 서열번호 25의 염기서열 또는 서열번호 26의 염기서열을 포함하는 것인, mRNA 구조체.
- [청구항 8] 청구항 6에 있어서,
상기 목적 단백질을 암호화하는 염기서열의 상류에, BBV의 5'-UTR의 염기서열을 포함하는 것인, mRNA 구조체.
- [청구항 9] 청구항 6에 있어서,
상기 mRNA 구조체는 세포에 형질주입되기 위한 것인, mRNA 구조체.
- [청구항 10] 청구항 1의 mRNA 구조체를 포함하는 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 11] 청구항 10에 있어서,
상기 약학적 조성물은 백신인 것인 약학적 조성물.
- [청구항 12] 청구항 1의 mRNA 구조체를 포함하는 암 또는 유전질환의 예방 또는 치료
용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 청구항 12에 있어서,
상기 약학적 조성물은 유전자 치료제인 것인 약학적 조성물.

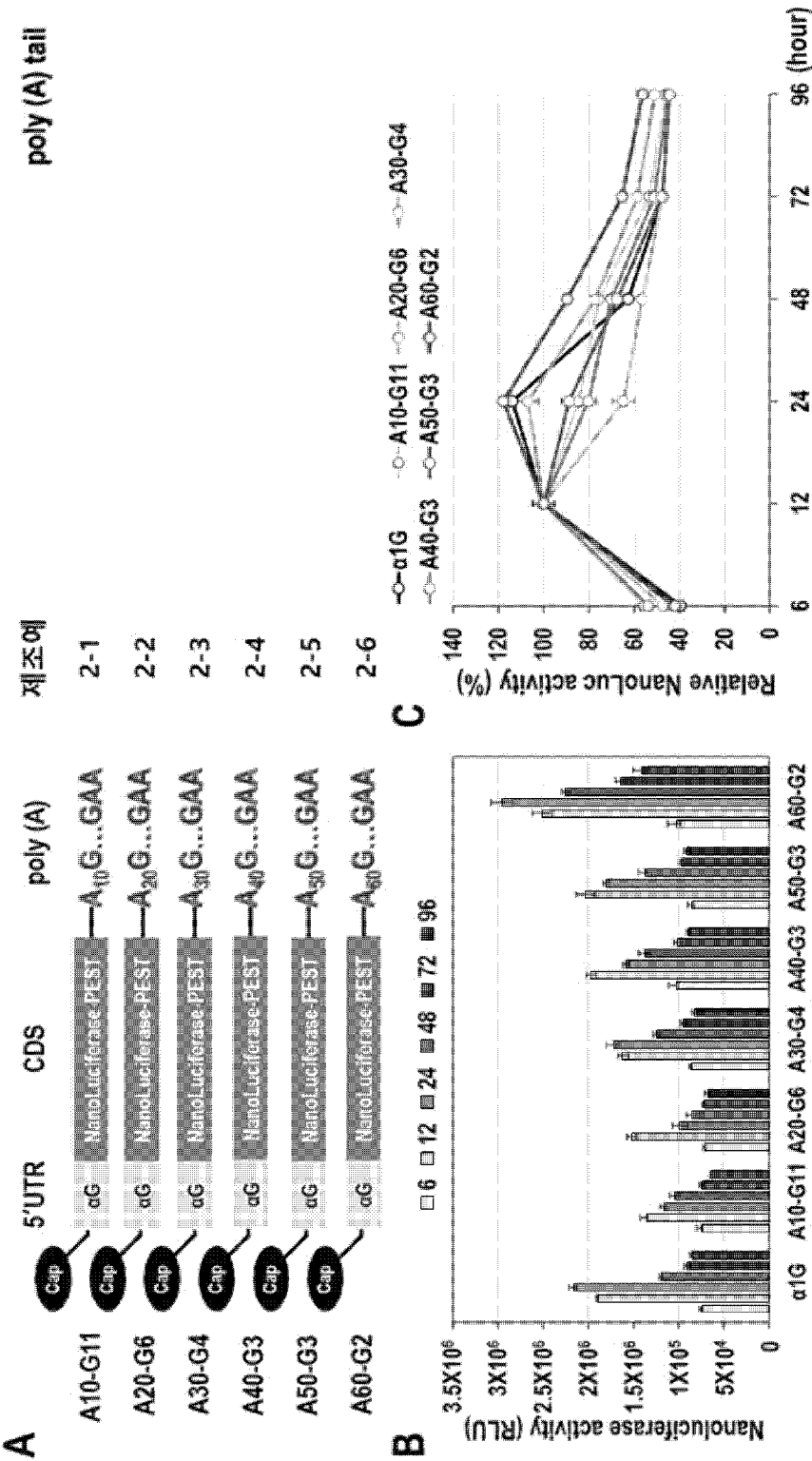
[도1]



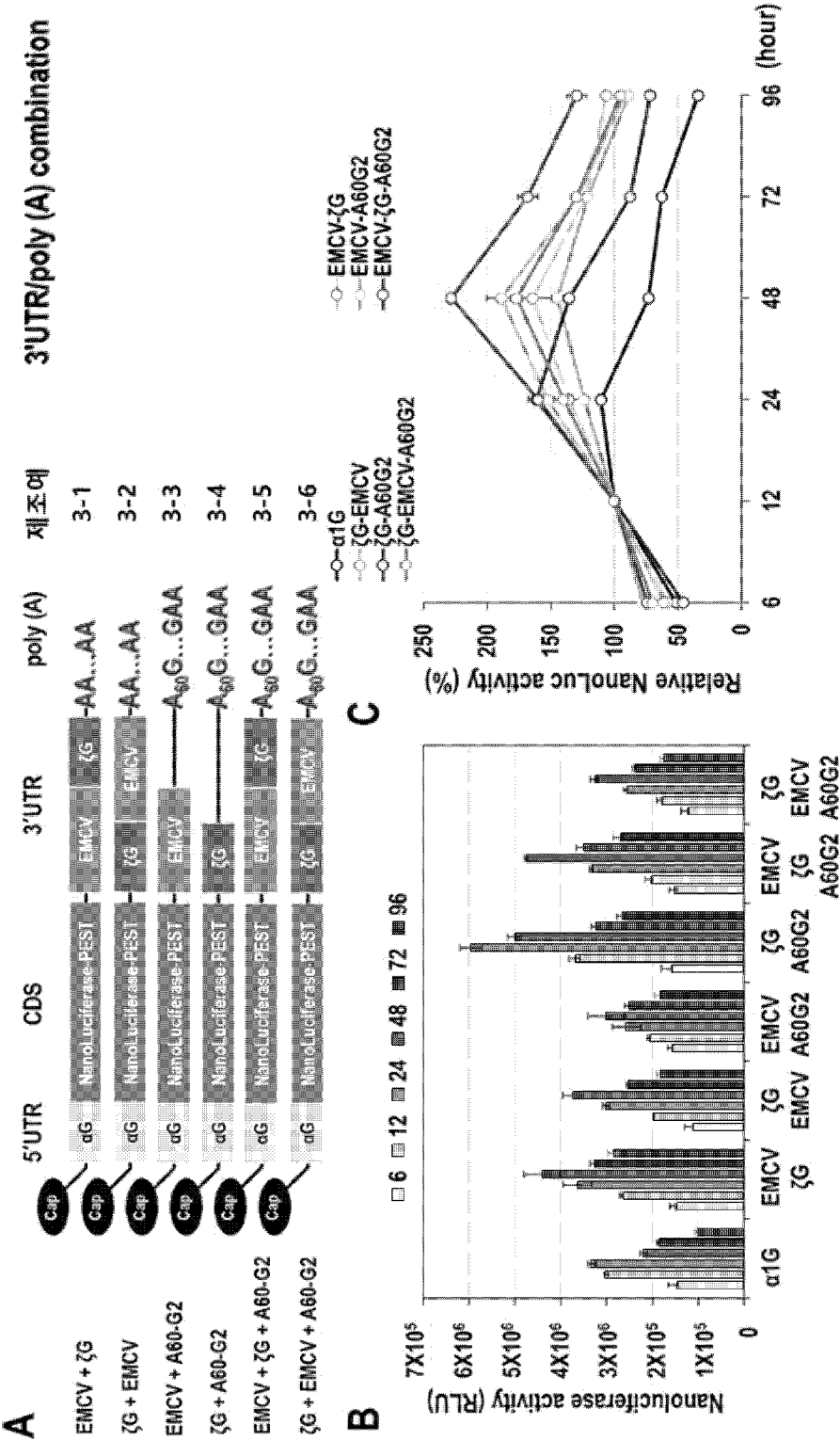
[도2]



[도3]



[도4]



A

5'UTR CDS 3'UTR poly(A)

4-1 4-2 4-3 4-4 4-5 4-6 4-7 4-8 4-9 4-10 4-11

1-23b + ζG + A60-G2
17.2 + ζG + A60-G2
BBV + ζG + A60-G2
PPRV + ζG + A60-G2
ΔPPRV + ζG + A60-G2
1-23b + EMCV + ζG + A60-G2
17.2 + EMCV + ζG + A60-G2
BBV + EMCV + ζG + A60-G2
PPRV + EMCV + ζG + A60-G2
ΔPPRV + EMCV + ζG + A60-G2

B

NanoLuciferase activity (RLU)

4.5X10⁶
4X10⁶
3.5X10⁶
3X10⁶
2.5X10⁶
2X10⁶
1.5X10⁶
1X10⁶
5X10⁵
0

ICS-23b ICS2-17.2 BBV PPRV(1-85) PPRV(28-85) ICS-23b ICS2-17.2 BBV PPRV(1-85) PPRV(28-85)

6 12 24 48 72 96

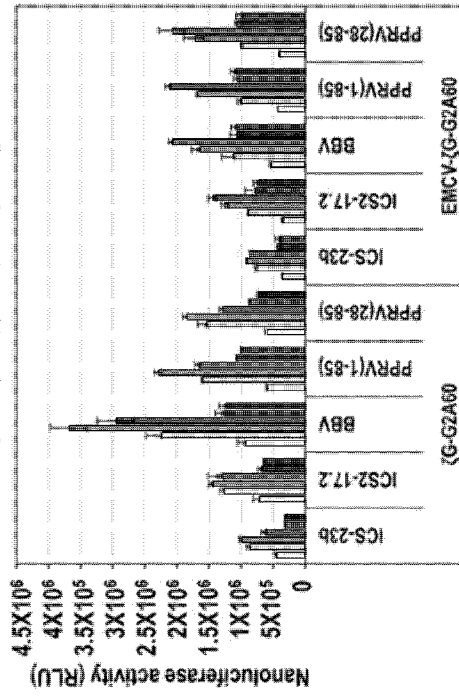
C

Relative NanoLuc activity (%)

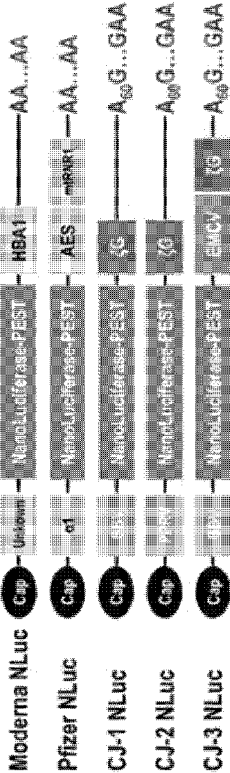
250
200
150
100
50
0

ICS-23b ICS2-17.2 BBV PPRV(1-85) PPRV(28-85)

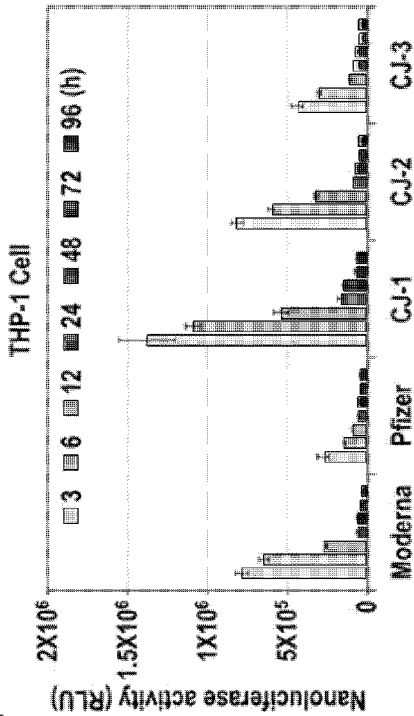
6 12 24 48 72 96 (hour)



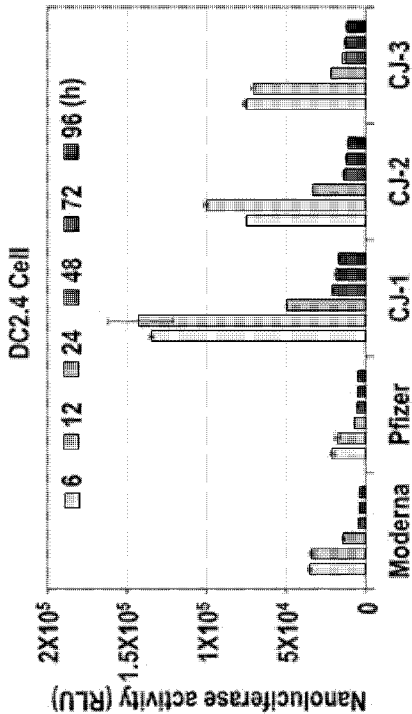
A



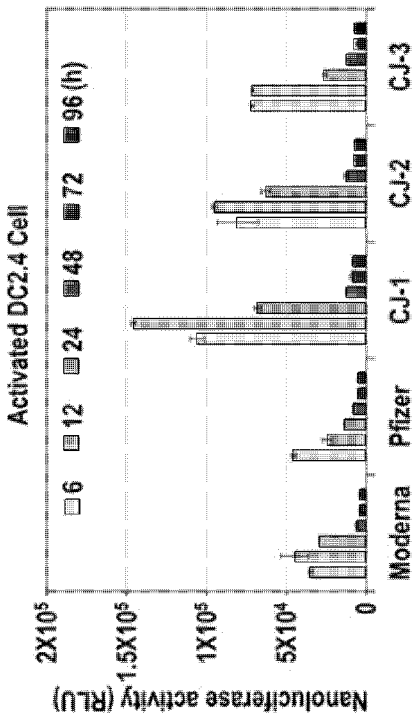
B



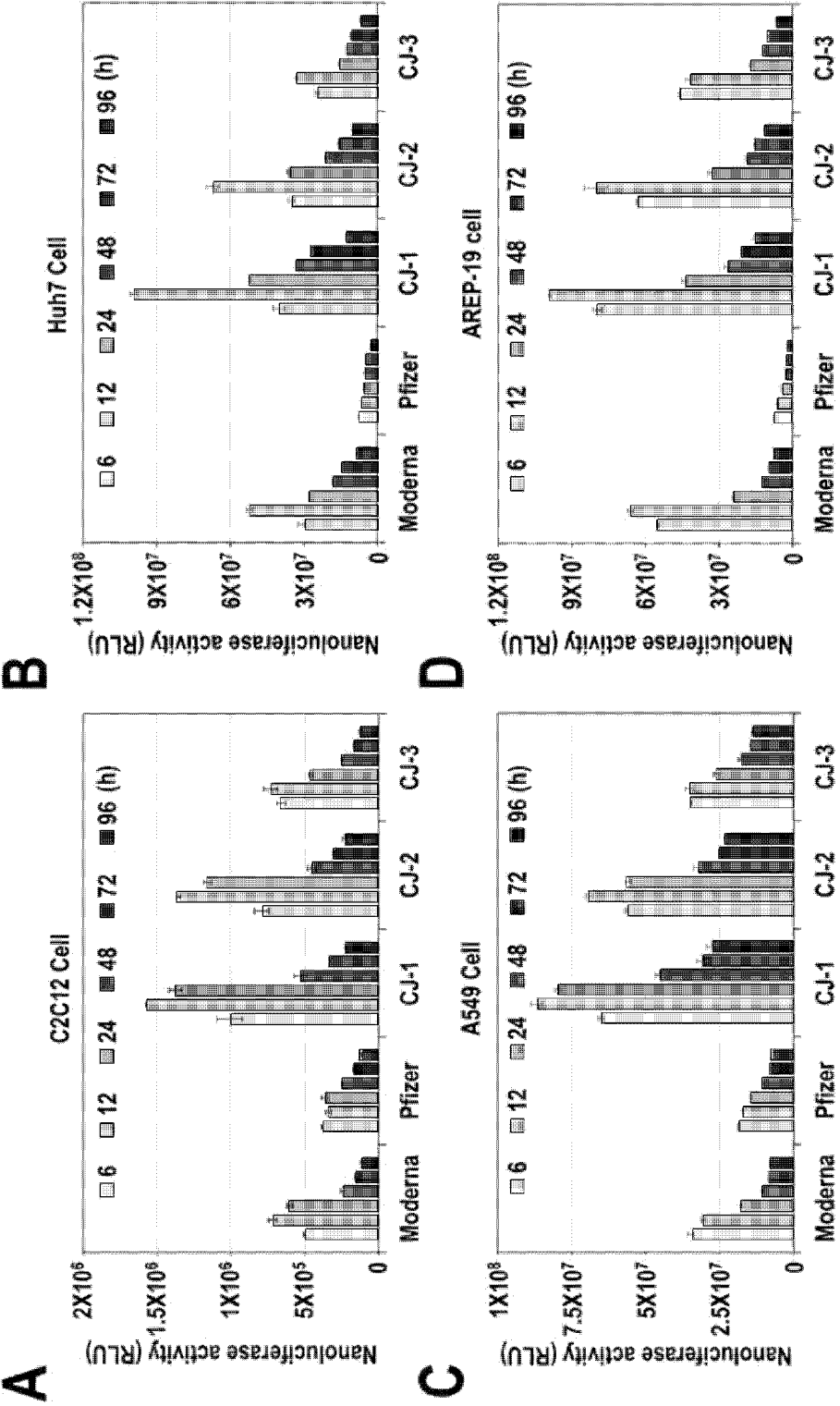
C



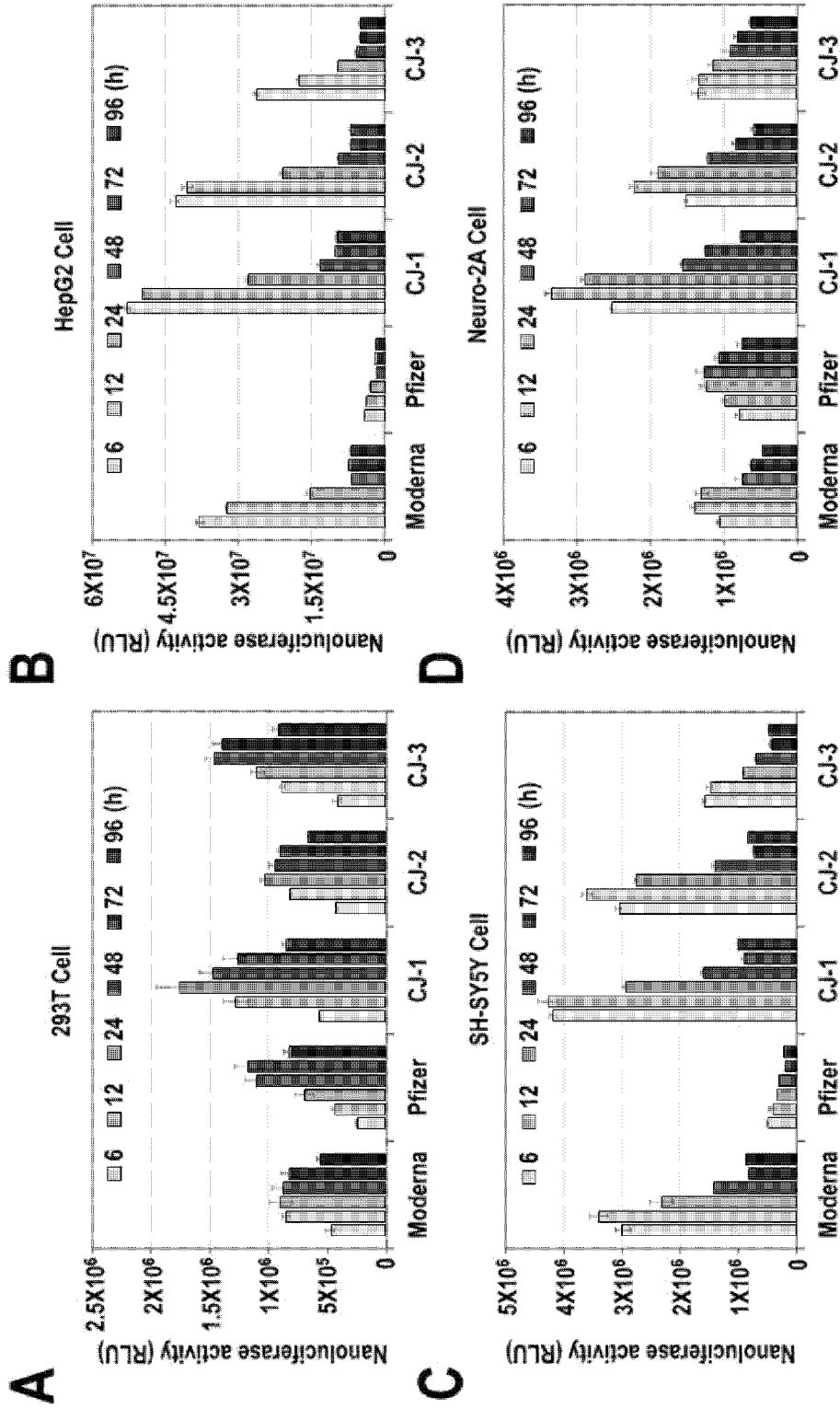
D



[도7]



[58]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/006580

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/113(2010.01); A61K 35/17(2015.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: mRNA 구조체(mRNA structure), ζ-글로빈(ζ-globin), 3'-UTR, 백신(vaccine), BBV(black beetle virus), PPRV(peste des petits ruminants virus), IRES, 발현(expression)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2022-0159909 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 05 December 2022 (2022-12-05) See abstract; paragraphs [0003], [0015] and [0027]; SEQ ID NO: 3; and claims 1, 2, 4 and 13-17.	1-13
Y	HE, Z. et al. Structural determinants of human ζ-globin mRNA stability. Journal of hematology & oncology. 2014, vol. 7, thesis no.:35, pp. 1-11. See abstract; figure 1; and pages 2 and 8.	1-13
Y	ZHAO, T. et al. Impact of poly(A)-tail G-content on Arabidopsis PAB binding and their role in enhancing translational efficiency. Genome biology. 2019, vol. 20, thesis no.:189, pp. 1-12. See abstract; figure 3; and pages 3, 7 and 8.	1-13
Y	RUSSELL, J. E. et al. Sequence Divergence in the 3' Untranslated Regions of Human ζ- and α-Globin mRNAs Mediates a Difference in Their Stabilities and Contributes to Efficient α-to-ζ Gene Developmental Switching. Molecular and Cellular Biology. 1998, vol. 18, no. 4, pp. 2173-2183. See abstract; and pages 2173-2176, 2178, 2179 and 2182.	1-13
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 September 2024		Date of mailing of the international search report 06 September 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2021-0065065 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 03 June 2021 (2021-06-03) See entire document.	1-13
A	DASMAHAPATRA, B. et al. pBD7, a novel cell-free expression vector with efficient translation initiation signal. Nucleic acids research. 1987, vol. 15, no. 9, p. 3933. See entire document.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/006580

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/006580

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2022-0159909	A	05 December 2022	WO	2022-250430	A1	01 December 2022
KR	10-2021-0065065	A	03 June 2021	CN	114846145	A	02 August 2022
				EP	4067495	A1	05 October 2022
				JP	2023-503636	A	31 January 2023
				JP	7451705	B2	18 March 2024
				US	2022-0290176	A1	15 September 2022
				WO	2021-107647	A1	03 June 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/113(2010.01); A61K 35/17(2015.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: mRNA 구조체(mRNA structure), ζ-글로빈(ζ-globin), 3'-UTR, 백신(vaccine), BBV(black beetle virus), PPRV(peste des petits ruminants virus), IRES, 발현(expression)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2022-0159909 A (한국생명공학연구원) 2022.12.05 요약, 단락 [0003], [0015], [0027]; 서열번호 3; 청구항 1, 2, 4, 13-17	1-13
Y	HE, Z. 등, 'Structural determinants of human ζ-globin mRNA stability', Journal of hematology & oncology, 2014, 7권, 논문번호:35, 페이지 1-11 초록; 도면 1; 페이지 2, 8	1-13
Y	ZHAO, T. 등, 'Impact of poly (A)-tail G-content on Arabidopsis PAB binding and their role in enhancing translational efficiency', Genome biology, 2019, 20권, 논문번호:189, 페이지 1-12 초록; 도면 3; 페이지 3, 7, 8	1-13
Y	RUSSELL, J. E. 등, 'Sequence Divergence in the 3' Untranslated Regions of Human ζ-and α-Globin mRNAs Mediates a Difference in Their Stabilities and Contributes to Efficient α-to-ζ Gene Developmental Switching', Molecular and Cellular Biology, 1998, 18권, 4호, 페이지 2173-2183 초록; 페이지 2173-2176, 2178, 2179, 2182	1-13
A	KR 10-2021-0065065 A (한국생명공학연구원) 2021.06.03 전체 문헌	1-13

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2024년09월06일(06.09.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년09월06일(06.09.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동,
정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김태운

전화번호 +82-42-481-3326

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0159909 A	2022/12/05	WO 2022-250430 A1	2022/12/01
KR 10-2021-0065065 A	2021/06/03	CN 114846145 A	2022/08/02
		EP 4067495 A1	2022/10/05
		JP 2023-503636 A	2023/01/31
		JP 7451705 B2	2024/03/18
		US 2022-0290176 A1	2022/09/15
		WO 2021-107647 A1	2021/06/03