(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월24일
(11) 등록번호 10-2379204
(24) 등록일자 2022년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0179036
(22) 출원일자 2020년12월18일
심사청구일자 2020년12월18일
(56) 선행기술조사문헌
OLIGONUCLEOTIDES,제18권,187-200면(2008) 1부.*
KR1020170124103 A
KR1020120034610 A
KR1020110110776 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이혁진
서울특별시 서초구 방배로37길 26-9, 102동 207호(방배동, 쌍용예가클래식)
장보라
서울특별시 구로구 구일로10길 27, B동 1438호(구로동, SK허브수)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

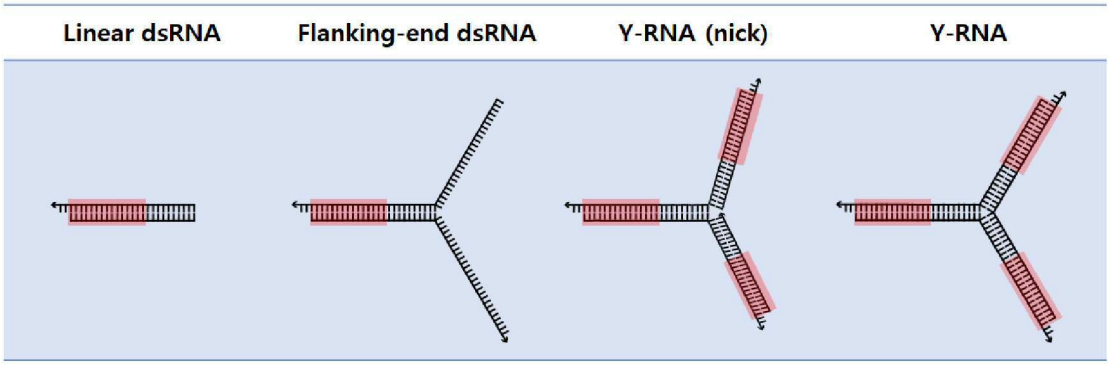
전체 청구항 수 : 총 25 항 심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **유전자 침묵 활성이 증가된 핵산 분자 및 이의 이용**

(57) 요 약

본 발명은 유전자 침묵 활성이 증가된 핵산 분자 및 이의 이용에 관한 것으로, 특정 위치에서 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 핵산 분자 또는 방사형으로 핵산 분자는 효과적으로 타겟 유전자에 대한 유전자 침묵활성 및 생체 내 안정성이 증가된 것일 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
C12N 2310/321 (2013.01)
(72) 발명자
김현숙
서울특별시 양천구 목동서로 340, 906동 608호(신정동, 목동신시가지아파트9단지)
장혜진
경상남도 창원시 의창구 도계로50번길 6-33, 5동 306호(도계동, 한효해바라기아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711114860
과제번호 2018R1A5A2025286
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 섬유화질환 제어 연구센터
기 여 율 30/100
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2020.03.01~2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711116223
과제번호 2019M3A9H1103786
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 세포 표면 나노코팅 및 세포 내 소기관 강화 기술을 기반으로 한 차세대 베타세포 치료제 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2020.04.01~2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711113839
과제번호 2020R1A2C2004364
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 기질 리보핵산 구조 연구를 통한 혁신적 유전자치료제 개발
기 여 율 40/100
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2020.03.01~2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

23 내지 30nt 길이의 센스 가닥 및 상기 센스 가닥에 상보적인 서열을 포함하는 25 내지 35nt 길이의 안티센스 가닥을 포함하고,

상기 센스 가닥은 5’ 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 및 14번째로 이루어진 군으로부터 선택된 4종 이상의 위치에 화학적으로 변형(chemical modification)된 뉴클레오티드를 포함하고,

상기 센스 가닥은 5' 말단으로부터 9번째의 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함하고,

상기 안티센스 가닥은 상기 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 7번째 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치에, 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함하고,

상기 안티센스 가닥은 상기 센스 가닥의 5' 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째의 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는,

이중가닥 핵산 분자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 센스 가닥은 5’ 말단으로부터 1번째 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 센스 가닥은 5’ 말단으로부터 1번째 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 당의 잔기가 2'-O-메틸, 2'-메톡시에톡시, 2'-플루오로, 2'-알릴, 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸], 4'-티오, 4'-CH2-O-2'-브리지(bridge), 4'-(CH2)2-O-2'-브리지, 2'-LNA, 2'-아미노, 및 2'-O-(N-메틸카르바메이트)(methlycarbamate)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1종 이상으로 변형된 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 센스 가닥은 5’ 말단으로부터 2, 3, 6, 8 내지 13, 및 15 내지 30번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에, 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 상기 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 1, 4, 5, 9, 및 14 내지 30번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치에, 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 다이서(dicer)에 의해 내생적으로 절단될 수 있는 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 센스 가닥의 3’ 말단 및 상기 안티센스 가닥의 5’ 말단은 블런트 말단(blunt end)를 형성하는, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 센스 가닥 또는 상기 안티센스 가닥의 3’ 말단, 5’ 말단, 또는 양쪽 말단에 1 내지 5 nt 길이의 돌출부(overhang)를 갖는 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 돌출부(overhang)에 존재하는 뉴클레오티드는 화학적으로 변형되지 않은 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 이중가닥 핵산 분자는 단일 가닥 뉴클레오티드가 헤어핀(hairpin)을 형성한 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 타겟 유전자의 전체 또는 일부의 서열과 상보적인 서열을 포함하는 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 타겟 유전자의 발현을 조절하는, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 14

제 12 항에 있어서, 상기 타겟 유전자는 단백질 코딩 유전자, 원종양유전자, 종양유전자, 종양 억제인자 유전자, 및 세포 신호전달 유전자에서 선택되는 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 센스 가닥의 3’ 말단에 1 내지 30nt의 폴리뉴클레오티드를 추가적으로 포함하고,

상기 안티센스 가닥의 5’ 말단에 1 내지 30nt의 폴리뉴클레오티드를 추가적으로 포함하는, 이중가닥 핵산분자.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 센스가닥의 3’ 말단에서 연장된 폴리뉴클레오티드와 상기 안티센스 가닥의 5’ 에서 연장된 폴리뉴클레오티드는 서로 상보적으로 결합하지 않는 것인, 이중가닥 핵산 분자.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 이중가닥 핵산 분자를 2 내지 4개 포함하는, 방사형 핵산 분자.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 이중가닥 핵산 분자를 2개 포함하고,

제1 이중가닥 핵산 분자의 센스 가닥의 3’ 말단과 제2 이중가닥 핵산 분자의 안티센스 가닥의 5’ 말단이 연결되거나,

제1 이중가닥 핵산 분자의 안티센스 가닥의 5’ 말단과 제2 이중가닥 핵산 분자의 센스 가닥의 3’ 말단이 연결되거나,

이의 조합인, 방사형 핵산 분자.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 이중가닥 핵산 분자를 3개 포함하고,

하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어지는 군에서 선택된 2종 이상의 특징을 포함하는 것인, 방사형 핵산 분자:

(i) 제1 이중가닥 핵산 분자의 센스 가닥의 3' 말단과 제2 이중가닥 핵산 분자의 안티센스 가닥의 5' 말단이 연결;

(ii) 제1 이중가닥 핵산 분자의 안티센스 가닥의 5' 말단과 제3 이중가닥 핵산 분자의 센스 가닥의 3' 말단이 연결; 및

(iii) 제2 이중가닥 핵산 분자의 센스 가닥의 3' 말단과 제3 이중가닥 핵산 분자의 안티센스 가닥의 5' 말단이 연결.

청구항 20

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 이중가닥 핵산 분자; 상기 이중가닥 핵산 분자를 2 내지 4개 포함하는 방사형 핵산 분자; 또는 이의 조합을 포함하는, 유전자 발현 억제용 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 유전자는 단백질 코딩 유전자, 원종양유전자, 종양유전자, 종양 억제인자 유전자, 및 세포 신호전달 유전자에서 선택되는 것인, 유전자 발현 억제용 조성물.

청구항 22

(1) 제n 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함하는 23 내지 30nt 길이의 센스 영역((n-S) 영역), 제 m 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 25 내지 35nt 길이의 안티센스 영역((m-AS) 영역), 또는 이의 조합을 포함하는 폴리뉴클레오티드 가닥을 x개 합성하는 단계로서,

상기 (n-S) 영역은 5' 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 및 14번째로 이루어진 군으로부터 선택된 4종 이상의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하고,

상기 (n-S) 영역은 5' 말단으로부터 9번째의 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함하고,

상기 (m-AS) 영역은 다른 폴리뉴클레오티드 가닥의 센스 영역 (m-S)과 상보적으로 결합하고,

상기 (m-AS) 영역은 상기 (m-S) 영역의 5' 말단으로부터 7번째 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치에, 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함하고,

상기 (m-AS) 영역은 상기 (m-S) 영역의 5' 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째의 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하고,

상기 x는 1 내지 5에서 선택된 정수이고,

상기 n과 m은 1 내지 5에서 선택된 정수인,

x개의 폴리뉴클레오티드 가닥을 합성하는 단계; 및

(2) 상기 단계에서 제조한 x개의 폴리뉴클레오티드 가닥을 90 내지 100℃에서 1 내지 10℃로 온도를 감소시키는 조건에서 반응시켜 혼성화시키는 단계를 포함하는,

증가된 생체 내 안정성을 갖는 핵산 분자의 제조방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 (n-S) 영역은 5' 말단으로부터 1번째 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 제조방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 (n-S) 영역은 5' 말단으로부터 1번째 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 제조방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 당의 잔기가 2'-O-메틸, 2'-메톡시에톡시, 2'-플루오로, 2'-알릴, 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸], 4'-티오, 4'-CH_2-O-2'-브리지(bridge), 4'-$(CH_2)_2$-O-2'-브리지, 2'-LNA, 2'-아미노, 및 2'-O-(N-메틸카르바메이트)(methlycarbamate)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1종 이상으로 변형된 것인, 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 유전자 침묵활성이 증가된 핵산 분자 및 이의 이용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] RNA 간섭은 동물에서 짧은 간섭 RNA(siRNA) 등에 의해 매개되는 서열-특이적인 전사후 유전자 침묵(silencing) 과정으로 타겟 유전자(목적 유전자)의 mRNA와 상동인 서열을 갖는 센스 가닥과 이와 상보적인 서열을 갖는 안티센스 가닥으로 구성되는 이중가닥 RNA는 세포 등에 도입되어 목적 유전자의 mRNA 분해를 유도하여 목적 유전자의 발현을 억제한다.

[0003] 25 내지 35 뉴클레오티드 길이를 갖는 이중-가닥 RNA(dsRNA) 약제는 포유류 세포에서 표적 유전자 발현의 유효한 저해제로서 알려져 있고, 이중 가닥의 RNA(dsRNA)를 세포 안으로 집어 넣어주면, 다이서(Dicer)라는 리보핵산 가수분해효소에 의해 잘려 21-23bp의 작은 RNA로 전환된다. 잘린 작은 RNA 형태를 siRNA(short interfering RNA) 라고 부르며. 세포질에서 잘린 siRNA는 RISC(RNA induced silencing complex) 복합체와 결합한 후 활성화된 Argonaute-2 에 의해 센스가닥을 분해한다. 활성화된 RISC 복합체와 결합된 안티센스 가닥이 표적하고 있는 mRNA와 상보적으로 결합하여 분해시키고 최종적으로 단백질의 형성을 방해한다.

[0004] RNAi 분야는 실질적으로 모든 유전자의 발현을 억제 시킬 수 있어 리보자임 등보다 훨씬 더 큰 잠재력을 가진 것으로 평가되고, 기존의 약물로 치료가 어려웠던 질병에 대해서 제약없이 치료제로 사용될 수 있어 난치질환에 대한 새로운 해결책으로 부상하여 RNAi 치료제는 차세대 미래 신약 기술로 인정받고 있다.

[0005] 그러나 이러한 기대에도 불구하고, RNAi 치료제는 다양한 문제점들로 인해 치료제로서의 개발이 제한 받고 있는 상황이다. 그 문제점으로서 siRNA의 생체 내 불안정(예를 들면 세포 내 뉴클레아제에 의한 분해), 전달의 비효율, 비 특이적인 작용(예를 들면, 너무 긴 길이의 dsRNA는 비특이적으로 결합을 하여 인터페론 반응을 유도)등은 RNAi 치료제의 치료효과를 현저히 저해시킨다. 이러한 RNAi의 한계를 극복하기 위해 RNA 안정성을 높이는 연구가 계속 진행되고 있다. 따라서 이러한 RNAi 치료제의 생물학적 장벽을 극복하면서도 유전자 침묵 활성이 증가된 dsRNA의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2007-0028363호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 출원의 발명자들은 특정 위치의 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시킨 이중가닥 핵산 분자 또는 상기 이중가닥 핵산 분자를 방사형으로 뻗은 K 개 (예를 들면, $2 \leq K \leq 4$, K는 정수)의 팔(arm) 부분에 포함하는 방사형 핵산 분자는 인비트로(*in vitro*) 및/또는 인비보(*in vivo*)에서 타겟 유전자에 대한 유전자 침묵(gene silencing) 활성이 현저히 우수해진 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 본 출원의 일 목적은 특정 위치의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형된 센스 가닥 및 상기 센스 가닥에 상보적인 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함하는 이중가닥 핵산 분자를 제공하는 것이다.

[0009] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 이중가닥 핵산 분자를 포함하는, 방사형 핵산 분자를 제공하는 것이다.

[0010] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 이중가닥 핵산 분자 및/또는 상기 방사형 핵산 분자를 포함하는 유전자 발현 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 이중가닥 핵산 분자 및/또는 상기 방사형 핵산 분자의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 명세서에서, "RNAi(RNA interference)" 또는 "RNA 간섭"이란, 일반적으로 당 업계에 공지되어 있는 바와 같이 짧은 간섭 핵산 분자에 의해 매개되어 세포 내 유전자의 발현을 억제하거나 하향 조절하는 생물학적 과정을 의미하고, 예를 들면 타겟 유전자(target gene)의 mRNA와 상동인 서열을 갖는 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 가닥으로 구성되는 이중가닥 RNA(dsRNA)를 세포 등에 도입하여 타겟 유전자 mRNA의 분해를 유도함으로서 타겟 유전자의 발현을 억제하는 메카니즘을 의미할 수 있다. "siRNA(small interfering RNA)"란, 서열 특이적으로 효율적인 유전자 침묵(gene silencing)을 매개하는 짧은 이중 가닥의 RNA(dsRNA)를 의미한다.

[0013] 본 명세서에서, "핵산(nucleic acid)" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일 또는 이중가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드, 및 그들의 폴리머를 의미하고, 공지된 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 백본 잔기 또는 결합(linkage)를 함유하는 핵산을 포함한다. 예를 들면, 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 단일-, 이중- 또는 다중-가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 혼성체, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기 또는 다른 천연, 화학적 또는 생화학적으로 변형된, 비-천연 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 폴리머를 포함한다.

[0014] 본 명세서에서, "뉴클레오티드"는 천연 염기(natural bases, standard), 및 이 기술분야에 잘 알려진 변형된 염기를 포함하고, 이 기술분야에서 인식되는 것으로 사용된다. 상기 염기는 일반적으로 뉴클레오티드 당 모이어티의 1'위치에 위치한다. 뉴클레오티드는 일반적으로 염기, 당 및 인산염(phosphate) 그룹을 포함한다. 뉴클레오티드는 당, 인산염, 및/또는 염기 모이어티가 비변형되거나 또는 변형될 수 있다(뉴클레오티드 유사체, 변형된 뉴클레오티드, 비-천연 뉴클레오티드, 비-표준 뉴클레오티드 등).

[0015] 본 명세서에서, "혼성화 가능한" 또는 "상보적" 또는 "실질적으로 상보적"이라는 것은, 온도 및 용액 이온 세기의 적절한 인비트로 및/또는 인비보 조건하에 핵산(예를 들면, RNA, DNA)이 다른 핵산에 서열-특이적, 역평행 (antiparallel) 방식(즉, 핵산이 상보적 핵산에 특이적으로 결합)으로 비-공유적으로 결합하는, 즉 Watson-Crick 염기쌍 및/또는 G/U 염기쌍을 형성하거나, "어닐링(anneal)"하거나, 또는 "혼성화"할 수 있는 뉴클레오티드의 서열을 포함하는 것을 의미한다. 표준 Watson-Crick 염기-페어링(base-pairing)은 하기를 포함한다: 아데닌(A)과 티미딘(T)의 페어링, 아데닌(A)과 우라실(U)의 페어링, 및 구아닌(G)과 시토신(C)의 페어링 [DNA, RNA]. 또한, 2개의 RNA 분자(예: dsRNA) 사이의 혼성화를 위해, 및 DNA 분자와 RNA 분자의 혼성화를 위해: 구아닌(G)은 또한 우라실(U)과 염기쌍을 이룰 수 있다. 예를 들면, G/U 염기-페어링은 mRNA의 코돈과 tRNA 안티-코돈의 염기-페어링의 문맥에서 유전 코드의 축퇴(degeneracy) (즉, 중복 (redundancy))를 부분적으로 담당한다.

[0016] 본 명세서에서, "안티센스 가닥(antisense strand)"이란 타겟 유전자의 전체 또는 일부에 실질적으로 또는 100% 상보적인 폴리뉴클레오티드로서, 예를 들어 mRNA(messenger RNA), mRNA가 아닌 RNA 서열(예를 들면, microRNA, piwiRNA, tRNA, rRNA, 및 hnRNA, siRNA, miRNA, shRNA, DsiRNA, lsiRNA, ss-siRNA, piRNA, endo-siRNA 또는 asiRNA) 또는 코딩 또는 비코딩 DNA 서열과 전체로서 또는 일부로서 상보적일 수 있다. 상기 "안티센스 가닥"과 "가이드 가닥(guide strand)"은 교환되어 사용될 수 있다. 상기 가이드 가닥은 표적을 저해할 용도로 서열이 정해진 단일가닥 부분으로, 실질적으로 아고너트(Argonaute) 단백질에 주로 결합하여, 아고너트 복합체가 표적 유전자를 인식하도록 가이드를 해주는 역할을 한다.

[0017] 본 명세서에서, "센스 가닥(sense strand)"이란 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 핵산 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로서, mRNA(messenger RNA), mRNA가 아닌 RNA 서열(예를 들면, microRNA, piwiRNA, tRNA, rRNA 및 hnRNA, siRNA, miRNA, shRNA, DsiRNA, lsiRNA, ss-siRNA, piRNA, endo-siRNA 또는 asiRNA) 또는 코딩 또는 비코딩 DNA 서열과 전체로서 또는 일부로서 동일한 폴리뉴클레오티드를 말한다. 상기 "센스 가닥"과 "운반자 가닥(passenger strand)"은 교환되어 사용될 수 있다. 상기 운반자 가닥은 일 예에 따른 핵산 분자 중 가이드 가닥과 이중가닥 구조를 이루면서, 가이드 가닥이 아고너트 단백질과 결합할 수 있도록 도와주는 운반자 역할을

한다.

[0018] 본 명세서에서, “다이서 기질 핵산”, “다이서 기질 RNA(리보핵산)”은 RNA 간섭(RNAi) 경로에서 다이서 효소에 의해 인식되어 프로세싱될 것으로 고려되는 핵산을 의미한다.

[0019] 본 명세서에서, “화학적 변형”은 천연 핵산, 뉴클레오티드, DNA, 및/또는RNA의 뉴클레오티드와 상이한 뉴클레오티드의 화학 구조의 임의의 변형을 지칭한다.

[0020] 본 명세서에서, 센스 가닥(영역), 안티센스 가닥(영역), 또는 폴리뉴클레오티드 가닥의 5’ 말단으로부터 n번째 위치에 존재하는(또는 n번째 위치의) 뉴클레오티드는 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 폴리뉴클레오티드 가닥의 5’ 말단으로부터 계수하여 n번째에 위치하는 뉴클레오티드를 의미한다.

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0023] 일 양상은 센스 가닥 및 상기 센스 가닥(예를 들면 센스 가닥의 전부 또는 일부)에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하고, 상기 센스 가닥 및/또는 상기 안티센스 가닥에서 특정 위치의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형(chemical modification)된, 이중가닥 핵산 분자; 또는

[0024] 상기 이중가닥 핵산 분자를 복수 개(예를 들면, 2 내지 5개) 포함하는 방사형 핵산 분자(예를 들면, 방사형으로 뻗은 K개의 팔을 포함하고, 각 팔 부분에 상기 핵산 분자를 포함하는, 방사형 핵산 분자)를 제공할 수 있다.

[0025] 일 예에서, 상기 센스 가닥은 19 내지 70nt(nucleotide), 20 내지 70nt, 21 내지 70nt, 22 내지 70nt, 23 내지 70nt, 25 내지 70nt, 19 내지 66nt, 20 내지 66nt, 21 내지 66nt, 22 내지 66nt, 23 내지 66nt, 25 내지 66nt, 19 내지 60nt, 20 내지 60nt, 21 내지 60nt, 22 내지 60nt, 23 내지 60nt, 25 내지 60nt, 19 내지 55nt, 20 내지 55nt, 21 내지 55nt, 22 내지 55nt, 23 내지 55nt, 25 내지 55nt, 19 내지 52nt, 20 내지 52nt, 21 내지 52nt, 22 내지 52nt, 23 내지 52nt, 25 내지 52nt, 19 내지 50nt, 20 내지 50nt, 21 내지 50nt, 22 내지 50nt, 23 내지 50nt, 25 내지 50nt, 19 내지 45nt, 20 내지 45nt, 21 내지 45nt, 22 내지 45nt, 23 내지 45nt, 25 내지 45nt, 19 내지 40nt, 20 내지 40nt, 21 내지 40nt, 22 내지 40nt, 23 내지 40nt, 25 내지 40nt, 19 내지 38nt, 20 내지 38nt, 21 내지 38nt, 22 내지 38nt, 23 내지 38nt, 25 내지 38nt, 19 내지 36nt, 20 내지 36nt, 21 내지 36nt, 22 내지 36nt, 23 내지 36nt, 25 내지 36nt, 19 내지 35nt, 20 내지 35nt, 21 내지 35nt, 22 내지 35nt, 23 내지 35nt, 25 내지 35nt, 19 내지 30nt, 20 내지 30nt, 21 내지 30nt, 22 내지 30nt, 23 내지 30nt, 25 내지 30nt, 19 내지 28nt, 20 내지 28nt, 21 내지 28nt, 22 내지 28nt, 23 내지 28nt, 25 내지 28nt, 19 내지 25nt, 20 내지 25nt, 21 내지 25nt, 22 내지 25nt, 23 내지 25nt, 또는 25nt 길이의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0026] 일 예에서, 상기 안티센스 가닥은 20 내지 70nt, 21 내지 70nt, 22 내지 70nt, 23 내지 70nt, 25 내지 70nt, 27 내지 70nt, 20 내지 66nt, 21 내지 66nt, 22 내지 66nt, 23 내지 66nt, 25 내지 66nt, 27 내지 66nt, 20 내지 60nt, 21 내지 60nt, 22 내지 60nt, 23 내지 60nt, 25 내지 60nt, 27 내지 60nt, 20 내지 55nt, 21 내지 55nt, 22 내지 55nt, 23 내지 55nt, 25 내지 55nt, 27 내지 55nt, 20 내지 52nt, 21 내지 52nt, 22 내지 52nt, 23 내지 52nt, 25 내지 52nt, 27 내지 52nt, 20 내지 50nt, 21 내지 50nt, 22 내지 50nt, 23 내지 50nt, 25 내지 50nt, 27 내지 50nt, 20 내지 45nt, 21 내지 45nt, 22 내지 45nt, 23 내지 45nt, 25 내지 45nt, 27 내지 45nt, 20 내지 40nt, 21 내지 40nt, 22 내지 40nt, 23 내지 40nt, 25 내지 40nt, 27 내지 40nt, 20 내지 38nt, 21 내지 38nt, 22 내지 38nt, 23 내지 38nt, 25 내지 38nt, 27 내지 38nt, 20 내지 36nt, 21 내지 36nt, 22 내지 36nt, 23 내지 36nt, 25 내지 36nt, 27 내지 36nt, 20 내지 35nt, 21 내지 35nt, 22 내지 35nt, 23 내지 35nt, 25 내지 35nt, 27 내지 35nt, 20 내지 30nt, 21 내지 30nt, 22 내지 30nt, 23 내지 30nt, 25 내지 30nt, 27 내지 30nt, 20 내지 27nt, 21 내지 27nt, 22 내지 27nt, 23 내지 27nt, 25 내지 27nt, 또는 27nt길이의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0027] 일 예에서 상기 안티센스 가닥은 상기 센스 가닥에 상보적인 서열을 포함할 수 있고, 예를 들면, 상기 안티센스 가닥은 상기 센스 가닥과 결합(혼성화)할 수 있도록, 상기 센스 가닥의 전부 또는 일부의 핵산 서열과 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 98.5% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상, 또는 100% 상보적인 핵산서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함할 수 있다.

[0028] 일 예에서 상기 이중가닥 핵산(또는 방사형 핵산 분자)에 포함되는 센스 가닥의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드의 “특정 위치”는 하기의 위치를 의미하는 것일 수 있다:

[0029] (1) 이중가닥 핵산 분자에 포함되는 센스 가닥의 5’ 말단 (또는 상기 이중가닥 핵산 분자가 다이서에 의해 프로세싱되어 절단된 산물 중 센스 가닥의 5’ 말단)으로부터 1, 4, 5, 7, 및 14번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 (예를 들면, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 또는 5종 모두)의 위치.

[0030] 일 예에서 상기 이중가닥 핵산(또는 방사형 핵산 분자)에 포함되는 안티센스 가닥의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드의 “특정 위치”는 하기의 위치를 의미하는 것일 수 있다:

[0031] (1) 상기 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상(예를 들면, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 5종 이상, 6종 이상, 7종 이상, 또는 8종 모두)의 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 안티센스 가닥에서의 위치; 또는

[0032] (2) 상기 이중가닥 핵산 분자가 다이서에 의해 절단되어 생성된 산물 중 안티센스 가닥 5’ 말단을 기준으로, 8 내지 11, 13, 15, 18, 및 19번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상(예를 들면, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 5종 이상, 6종 이상, 7종 이상, 또는 8종 모두)의 위치.

[0033] 본 명세서에서, 상기 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 계수된 위치와 상보적으로 결합하는 안티센스 가닥에서의 위치는, 다이서에 의해 절단되어 생성된 산물(또는 절단된 산물, 절단된 생성물) 중 안티센스 가닥의 5’ 말단을 기준으로 계수된 위치와 하기 표 1에 기재된 바와 같이 상응(혼용)될 수 있다. 예를 들면, 상기 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 2번째 위치와 상보적으로 결합하는 안티센스 가닥에서의 위치는, 다이서에 의해 절단되어 생성된 산물(또는 절단된 산물, 절단된 생성물) 중 안티센스 가닥의 5’ 말단으로부터 19번째 위치와 상응(혼용)될 수 있다.

표 1

[0034]

이중가닥 핵산 중 안티센스 가닥과 상보적으로 결합하는 센스 가닥의 5'말단을 기준으로 계수된 위치	절단된 산물 중 안티센스 5'말단을 기준으로 계수된 위치
1	20
2	19
3	18
4	17
5	16
6	15
7	14
8	13
9	12
10	11
11	10
12	9
13	8
14	7
15	6
16	5
17	4
18	3
19	2
20	1

[0035] 일 양상은 센스 가닥 및 상기 센스 가닥의 전부 또는 일부에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하고,

[0036] 상기 센스 가닥은 5’ 말단으로부터 4, 5, 7, 및 14번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형(chemical modification)된 뉴클레오티드를 포함하고,

[0037] 상기 안티센스 가닥은 상기 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 이중가닥 핵산 분자를 제공할 수 있다.

[0038] 일 예에서 상기 이중가닥 핵산 분자가 포함하는 상기 센스 가닥은 5’ 말단으로부터 1번째 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드(예를 들면, 당의 잔기가 2'-O-메틸로 변형된 뉴클레오티드) 또는 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0039] 일 구체예에 따른 이중가닥 핵산 분자는 하기 특징을 갖는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함할 수 있다:

[0040] 상기 센스 가닥은 5’ 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 및 14번째 위치에 화학적으로 변형(chemical modification)된 뉴클레오티드를 포함하고,

[0041] 상기 안티센스 가닥은 상기 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치 (또는 절단된 생성물 중 안티센스 가닥 5’ 말단을 기준으로, 8 내지 11, 13, 15, 18, 및 19번 위치)에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함함.

[0042] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자가 포함하는 상기 센스 가닥은 5’ 말단으로부터 2, 3, 6, 8 내지 13, 및 15번째 이상(예를 들면 15 내지 36번째 또는 15 내지 25번째)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0043] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자가 포함하는 상기 안티센스 가닥은, 상기 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 9, 및 14 번째 이상(예를 들면, 14 내지 36번째 또는 14 내지 25번째)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치 또는

[0044] 다이서에 의해 절단되어 생성된 산물 중 안티센스 가닥의 5’ 말단을 기준으로 7번째 이하 (예를 들면, 1 내지 7번째), 12번째, 14번째, 16번째, 17번째, 및 20번째 이상 (예를 들면 20 내지 22번째)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0045] 상기 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되지 않았다는 것은 천연적 또는 자연적으로 존재하는 핵산에 포함되는 뉴클레오티드와 동일한 구성을 갖는 것을 의미할 수 있다.

[0046] 일 구체예에서, 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 9번째 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함하는 센스 가닥을 포함하는 이중가닥 핵산의 경우, 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 9번째 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함하는 센스 가닥을 포함하는 이중가닥 핵산 보다 유전자 침묵 활성이 우수할 수 있다.

[0047] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자(또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자)은 하기 (1) 내지 (8)로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 특징을 나타내는 것일 수 있고, 구체적으로, 모든 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되지 않은 이중가닥 핵산이나 기존에 알려진 방법(예를 들면, 교대 변형 방법(Alternating modification) 및/또는 C/U 서열-기반 변형 방법(C/U sequence-based modification))으로 화학적 변형된 이중가닥 핵산과 비교하였을 때, 하기 (1) 내지 (8)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 효과를 유지, 증가, 또는 감소한 것일 수 있다:

[0048] (1) 인비트로 및/또는 인비보에서 상기 이중가닥 핵산과 다이서의 상호 작용 유지 및/또는 증가(예를 들면, 다이서에 의한 이중가닥 핵산의 절단 속도 유지 및/또는 증가);

[0049] (2) 인비트로에서 타겟 유전자 침묵 활성의 유지 및/또는 증가;

[0050] (3) 인비보에서 타겟 유전자 침묵 활성의 증가;

[0051] (4) 오프-타겟 효과(off-target effect) 감소;

[0052] (5) 생체 내의 뉴클레아제(nuclease, 예를 들면 RNase)에 의한 분해(degradation) 감소;

[0053] (6) 세포 내 흡수(uptake) 증가;

[0054] (7) 인비트로 및/또는 인비보에서 안정성 증가 (예를 들면, 혈청 안정성 (serum stability) 증가); 및/또는

[0055] (8) 면역반응(예를 들면, 상기 이중가닥 핵산 분자에 의한 엔도좀 내의 TLR 수용체 활성에 의한 면역 유도 반응, 또는 세포질로 나온 이중가닥 핵산 분자의 PKR 활성에 의한 면역 반응 등) 감소.

[0056] 상기 교대 변형 방법(Alternating modification)은 인접한 뉴클레오티드를 번갈아 가면서 화학적으로 변형시키는 방법이다. 예를 들면, 상기 교대 변형 방법에 의하면, 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 홀수 번째 위치한 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되고, 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 짝수 번째 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 상기 C/U 서열-기반 변형

방법(C/U sequence-based modification)은 C를 포함하는 뉴클레오티드 및 U의 염기를 포함하는 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시키는 방법이다.

[0057] 상기 "오프-타겟 효과(Off-target effect)"란 이중가닥 핵산의 센스 가닥에 의해 타겟 외의 mRNA의 분해가 발생하게 되는 경우 센스 가닥에 의해 예상치 못한 타겟 외의mRNA의 분해 내지 타겟 외의 유전자의 발현 억제 효과 및 이중가닥 핵산의 안티센스 가닥이 잘못된 타겟과 결합하여 타겟 외의 mRNA의 분해 내지 타겟 외의 유전자의 발현 억제효과를 모두 포함할 수 있다.

[0058] 일 예에서 상기 이중가닥 핵산 분자(또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자)는 동일한 표적 유전자(타겟 유전자)에 대한 siRNA (길이가 짧기 때문에 다이서에 의해 프로세싱 되지 않는 유전자 조절 활성을 갖는 dsRNA)와 비교하였을 때, 상기 (1) 내지 (8) 로 이루어지는 군 중 1종 이상의 효과가 유지, 증가, 또는 감소한 것일 수 있다.

[0059] 본 명세서에서 뉴클레오티드(또는 핵산)가 화학적으로 변형되었다는 것은 뉴클레오티드(또는 핵산)에 포함되는 당, 염기, 뉴클레오티드 간의 결합 부위, 또는 이의 조합이 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 상기 화학적 변형 방법은 특별히 제한되지 않으며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 당업자라면 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 뉴클레오티드(또는 핵산)를 합성하고 변형시킬 수 있다. 핵산 분자로 도입될 수 있는 변형된 염기의 비제한적 예로, 히포잔틴(hypoxanthine), 퓨린, 피리딘-4-온, 피리딘-2-온, 페닐, 수도우라실, 2,4,6-트리메톡시 벤젠, 3-메틸 우라실, 디하이드로유리딘, 나프틸, 아미노페닐, 5-알킬시티딘(예를 들면 5-메틸시티딘), 5-알킬유리딘(예를 들면 리보티미딘), 5-할로유리딘(예를 들면 5-브로모유리딘) 또는 6-아자피리미딘(azapyrimidines) 또는 6-알킬피리미딘(예를 들면 6-메틸유리딘), 프로핀(propyne), 및 기타 (Burgin, et al., Biochemistry 35:14090, 1996; Uhlman & Peyman, supra)을 포함한다. "변형된 염기"는 1'위치의 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신 및 우라실 외의 뉴클레오티드 염기 또는 그 동등물을 의미한다.

[0060] 상기 화학적 변형은 상기 핵산 분자에 포함되는 적어도 1종의 뉴클레오티드의 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 수소원자, 불소원자, -O-알킬기, -O-아실기, 및 아미노기 중 어느 하나로 치환되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이에 제한되지 않고 핵산 분자의 전달능을 높이기 위해서라면 -Br, -Cl, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N3 및 -CN (R= alkyl, aryl, alkylene) 중 어느 하나로도 치환될 수 있다.

[0061] 일 예에서, 상기 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 당의 잔기가 2'-O-메틸, 2'-메톡시에톡시, 2'-플루오로, 2'-알릴, 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸], 4'-티오, 4'-CH2-O-2'-브리지(bridge), 4'-(CH2)2-O-2'-브리지, 2'-LNA, 2'-아미노, 및 2'-O-(N-메틸카르바메이트)(methylcarbamate)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1종 이상으로 변형된 것일 수 있다.

[0062] 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자 (또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자)는 다이서(dicer)에 의해 내생적으로 절단될 수 있다.일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자 (또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자)는 다이서 기질 핵산이 될 수 있다. 본 명세서에서, “다이서(dicer)”는 dsRNA 또는 dsRNA-함유 분자, 예를 들면 이중-가닥 RNA(dsRNA) 또는 Pre-miRNA(precursor-microRNA)를 절단하여 핵산 단편 19-25 뉴클레오티드 길이의 이중가닥 핵산(예를 들면 유전자 침묵 활성을 나타낼 수 있는 miRNA 또는 siRNA)을 제조할 수 있는 RNase Ⅲ 패밀리 중 엔도리보뉴클레아제(endoribonuclease)를 의미할 수 있다.

[0063] 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자(또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자에 포함되는 이중가닥 핵산 분자)가 포함하는 각 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥이 일정 길이 (예를 들면, 19nt, 20nt, 21nt, 22nt, 23mt, 24nt, 또는 25nt) 이상으로 길어, 대상체에 투여되었을 때 상기 이중가닥 핵산 분자가 “long dsRNA(double strand RNA)”로 인식되어 다이서(Dicer)에 의해 절단되어 길이가 약 19 내지 25nt로 조정될 수 있다(단계 ①; Dicer processing).

[0064] 본 명세서에서,“대상체", “개체”, 또는 “환자”는 일 예에 따른 핵산 분자(이중가닥 핵산 분자 및/또는 방사형 핵산 분자)를 투여할 수 있는 유기체를 의미할 수 있다. 상기 대상체는 포유동물(예를 들면, 인간) 또는 포유류 세포(예를 들면 인간 세포)일 수 있고, 체외이식 세포의 공여자 또는 수용자인 유기체, 또는 세포 그 자체일 수 있다.

[0065] 본 명세서에서, “다이서 절단 부위”는 다이서가 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자 (또는 방사형 핵산 분자)에서 절단하는 부위를 의미한다. 일 예에서, 다이서는 두 개의 RNase Ⅲ 도메인을 함유하고, 이는 전형적으로 이중가닥 핵산 분자(예를 들면 이중가닥 RNA)의 센스 및 안티센스 가닥 모두를 절단할 수 있다.

[0066] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자는 센스 가닥의 5' 말단으로부터 16번째 이후(16번째 이상의 위치)에 존재하는 뉴클레오티드 및 이에 상보적으로 결합하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되지 아니하

여, 다이서에 의해 용이하게 인식되는 것일 수 있다.

[0067] 일 구체예에 따른 이중가닥 핵산 분자 또는 방사형 핵산 분자 중 팔에 포함되는 이중가닥 핵산 분자는 다이서에 의해 절단되어 절단된 이중가닥 핵산을 생성할 수 있다. 일 구체예에서, 다이서에 의해 절단된 이중가닥 핵산 (또는 절단된 산물, 절단된 생성물) 중 센스 가닥의 3′ 말단에 1 내지 5 nt, 2 내지 5 nt, 2 내지 4 nt, 2 내지 3 nt, 또는 2nt 길이의 오버행이 생길 수 있다.

[0068] 절단된 이중가닥 핵산(또는 절단된 산물, 절단된 생성물)은 다이서 및 TRBP(the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein)에 의해 매개되는 RLC(RISC-loading complex)를 통해 RISC(RNA-induced silencing complex)에 로딩될 수 있다(단계 ②). 이 과정에서, 인간 등의 척추동물에서는 TRBP가 절단된 이중가닥 핵산에서 열역학적으로 약한 가닥이 Ago2에 의해 가이드 RNA로 인식될 수 있도록 재배치되는 비대칭적 센싱(Asymmetry sensing)이 일어난다.

[0069] RISC는 이중가닥 핵산을 인식하여 로딩하는 리보뉴클레오프로틴으로서, RISC에서 촉매 부위에 해당하는 단백질인 Ago2(Argonaute 2)가 로딩된 이중가닥 핵산에서 열역학적으로 강한 가닥(passenger RNA)을 절단하고, 열역학적으로 약한 가닥을 남긴다(guide RNA)(단계 ③). 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자 (또는 방사형 핵산 분자)에 포함된 안티센스 서열은 열역학적으로 약한 가닥이 되도록 설계되어 있기 때문에 높은 효율로 센스 서열이 절단되고 안티센스 서열이 남게 된다. 안티센스 서열은 타겟 유전자의 mRNA를 인식하여(단계 ④) 이에 상보적으로 결합하여 dsRNA를 형성하여 절단됨으로써 유전자 침묵이 일어날 수 있다(단계 ⑤).

[0070] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자(또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자에 포함되는 이중가닥 핵산 분자)는 대상체 또는 세포에 투여되어 다이서에 의해 적절한 길이(예를 들면 19 내지 30nt, 20 내지 30nt, 22 내지 27 nt)로 절단될 수 있고, 상기 적절한 길이는 '20 내지 25' +2nt (예를 들면, 19+2nt, 20+2nt, 21+2nt, 22+2nt, 23+2nt, 24+2nt, 또는 25+2nt (예를 들면, 센스 가닥의3' 말단에 2nt 오버행 구조를 갖는 핵산)일 수 있다.

[0071] 일 구체예에 따르면 모든 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되지 않은 이중가닥 핵산(대조군)이나 기존에 알려진 방법(예를 들면, 교대 변형 방법(Alternating modification) 및/또는 C/U 서열-기반 변형 방법(C/U sequence-based modification))으로 화학적 변형된 이중가닥 핵산 대비 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자(또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자)는 인비트로 및/또는 인비보에서 다이서 반응 속도가 유사하거나 증가된 것일 수 있다. 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자 (또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자)의 다이서 절단율(%) 또는 다이서 반응 속도 분석은 공지된 방법으로 평가될 수 있다. 일 구체예에 따르면, 다이서 반응 속도 분석에서 상기 이중가닥 핵산 분자(또는 방사형 핵산 분자) 10pmole, 재조합 인간 다이서(Recombinant human Dicer), 다이서 반응 완충액(Tris-HCl(pH 6.5-7.0) 및 NaCl), DEPC-처리된 탈이온수(DW), $MgCl_2$ 등과 혼합하고, 35 ~ 40℃에서 8 ~ 24시간 동안 배양한 후, 각 샘플을 채취하여 전기영동을 통하여 다이서 기질 밴드 두께를 측정하여, 다이서 절단(%) 정도를 계산하여 다이서 반응 속도를 분석할 수 있다. 일 예에서, 상기 방법으로 다이서 절단율(%)을 계산시 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자 또는 방사형 핵산 분자는 다이서와 1시간 동안 반응하여 40 내지 60%가 절단되고, 다이서와 3시간 동안 반응하여 60 내지 80%가 절단되며, 다이서와 6시간 동안 반응하여 90 내지 100%가 절단될 수 있다.

[0072] 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자(또는 방사형 핵산 분자)는 동일한 타겟 유전자에 대한 siRNA, 모든 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되지 않은 이중가닥 핵산이나 기존에 알려진 방법(예를 들면, 교대 변형 방법(Alternating modification) 및/또는 C/U 서열-기반 변형 방법(C/U sequence-based modification))으로 화학적 변형된 이중가닥 핵산 보다 인비트로 및/또는 인비보에서 유전자 침묵 활성이 증가한 것일 수 있다.

[0073] 상기 "siRNA (small interfering RNA)"란, 서열 특이적으로 효율적인 유전자 발현 억제(gene silencing)를 매개하는 짧은(예를 들면 19 nt) 이중 가닥의 RNA(dsRNA)를 의미한다. 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자 (또는 방사형 핵산 분자)는 긴 길이의 이중가닥 RNA로서 다이서 기질이 될 수 있다는 점에서 siRNA와 차이가 있고, 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자(또는 방사형 핵산 분자)가 다이서에 의해 절된되어 생성된 산물을 siRNA의 일종으로 이해될 수 있다.

[0074] 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자(또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자에 포함되는 이중가닥 핵산 분자)에서 상기 센스 가닥의 3' 말단 및 상기 안티센스 가닥의 5' 말단은 블런트 말단(blunt end)를 형성하는 것일 수 있다.

[0075] 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자(또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자에 포함되는 이중가닥 핵산 분자에 포함되는 이중가닥 핵산 분자)에서 상기 센스 가닥 및/또는 상기 안티센스 가닥의 3' 말단, 5' 말단, 또는 양쪽 말단에 1 내지 5 nt, 2 내지 5 nt, 2 내지 4 nt, 2 내지 3 nt, 또는 2nt 길이의 돌출부(overhang)를 갖는 것일

수 있다. 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자(또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자)는 상기 안티센스 가닥의 3' 말단에 오버행을 포함하여 다이서 프로세싱의 정확도가 우수할 수 있다. 상기 "돌출부" 또는 "오버행(overhang)"은 이중가닥 핵산 분자의 두 가닥 사이에 염기쌍이 형성되지 않은 뉴클레오티드 서열의 말단 부분을 의미할 수 있다.

[0076] 일 예에서, 상기 돌출부에 존재하는 뉴클레오티드는 화학적으로 변형되지 않은 것일 수 있다.

[0077] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자는 단일 가닥 뉴클레오티드가 헤어핀(hairpin) 또는 스템-루프(stem-loop)를 형성한 것일 수 있다.

[0078] 상기 센스 가닥은 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 34, 서열번호 44, 서열번호 51, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 또는 서열번호 67을 포함할 수 있다. 상기 안티센스 가닥은 서열번호 25, 서열번호 28, 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 52, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66, 또는 서열번호 68을 포함하는 것일 수 있다.

[0079] 본 명세서에서, 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 폴리뉴클레오티드 가닥이 "특정 염기서열을 포함한다" 함은 상기 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 폴리뉴클레오티드 가닥이 상기 특정 염기서열 또는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함하는 것을 의미할 수 있다.

[0080] 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자가 포함하는 센스 가닥은 타겟 유전자(또는 타겟 유전자의 mRNA)의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함할 수 있다. 상기 센스 가닥은 타겟 유전자의 핵산 서열(염기서열)과 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 98% 이상, 99.5% 이상, 또는 99.9% 이상, 또는 100%의 상동성(또는 동일성)을 갖는 핵산 서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함할 수 있다.

[0081] 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자가 포함하는 안티센스 가닥은 타겟 유전자(또는 타겟 유전자의 mRNA)의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 안티센스 가닥은 타겟 유전자와 결합(혼성화)할 수 있도록, 결합하고자 목적하는 타겟 유전자(또는 타겟 유전자의 mRNA)의 전부 또는 일부의 핵산 서열과 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 98.5% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상, 또는 100% 상보적인 핵산서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함할 수 있다.

[0082] 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자(또는 방사형 핵산 분자)는 타겟 유전자의 발현을 조절하는 것일 수 있고, 구체적으로 타겟 유전자의 mRNA 및/또는 단백질로의 발현을 감소(억제 또는 저해)시킬 수 있다. 상기 타겟 유전자는 상기 이중가닥 핵산 분자에 의해 유전자의 mRNA 및/또는 단백질 발현을 조절하고자 목적하는 대상이 되는 유전자로서, 상기 타겟 유전자는 내인성(endogeneous) 유전자이거나 세포 내에서 발현 벡터 등을 이용하여 발현시킨 삽입 유전자(transgene)일 수 있다.

[0083] 일 예에서, 상기 타겟 유전자는 단백질 코딩 유전자, 원종양유전자, 종양유전자, 종양 억제인자 유전자, 및 세포 신호전달 유전자에서 선택되는 것일 수 있다.

[0084] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자(또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자)는 상기 타겟 유전자에 대한 IC50 값은 0.001mg/kg 이상, 0.005 mg/kg 이상, 0.007 mg/kg 이상, 0.009 mg/kg 이상, 0.01 mg/kg 이상 0.05mg/kg 이하, 0.03mg/kg 이하, 0.028mg/kg 이하, 0.025mg/kg 이하, 0.02mg/kg 이하, 0.015mg/kg 이하, 0.01mg/kg 이하, 0.001 내지 0.045mg/kg, 0.005 내지 0.045mg/kg, 0.007 내지 0.045mg/kg, 0.009 내지 0.045mg/kg, 0.01 내지 0.045mg/kg, 0.001 내지 0.04mg/kg, 0.005 내지 0.04mg/kg, 0.007 내지 0.04mg/kg, 0.009 내지 0.04mg/kg, 0.01 내지 0.04mg/kg, 0.001 내지 0.035mg/kg, 0.005 내지 0.035mg/kg, 0.007 내지 0.035mg/kg, 0.009 내지 0.035mg/kg, 0.01 내지 0.035mg/kg, 0.001 내지 0.03mg/kg, 0.005 내지 0.03mg/kg, 0.007 내지 0.03mg/kg, 0.009 내지 0.03mg/kg, 또는 0.01 내지 0.03mg/kg 일 수 있다. 상기 이중가닥 핵산 분자(또는 일 예에 따른 방사형 핵산분자)는 상기 타겟 유전자에 대한 IC50 값은 동일한 타겟 유전자에 대한 siRNA, 모든 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되지 않은 이중가닥 핵산이나 기존에 알려진 방법(예를 들면, 교대 변형 방법(Alternating modification) 및/또는 C/U 서열-기반 변형 방법(C/U sequence-based modification))으로 화학적 변형된 이중가닥 핵산 보다 1.1 배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.5배 이상, 2배 이상, 2.5배 이상, 3 배 이상, 15배 이하, 12배 이하, 10배 이하, 8배 이하, 5배 이하, 1.1 내지 15배, 1.5 내지 15배, 2 내지 15배, 2.5 내지 15배, 3 내지 15배, 1.1 내지 12배, 1.5 내지 12배, 2 내지 12배, 2.5 내지 12배, 3 내지 12배, 1.1 내지 10배, 1.5 내지 10배, 2 내지 10배, 2.5 내지 10배, 3 내지 10배, 1.1 내지 9배, 1.5 내지 9배, 2 내지 9배, 2.5 내

지 9배, 3 내지 9배, 1.1 내지 8배, 1.5 내지 8배, 2 내지 8배, 2.5 내지 8배, 3 내지 8배, 1.1 내지 5배, 1.5 내지 5배, 2 내지 5배, 2.5 내지 5배, 또는 3 내지 5배 낮을 수 있다.

[0085] 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자는 상기 센스 가닥 및/또는 상기 안티센스의 3' 말단 및/또는 5' 말단에 1 내지 30nt, 2 내지 30n, 5 내지 30nt, 10 내지 30nt, 20 내지 30nt, 25 내지 30nt, 1 내지 27nt, 2 내지 27nt, 5 내지 27nt, 10 내지 27nt, 20 내지 27nt, 25 내지 27nt, 1 내지 25nt, 2 내지 25nt, 5 내지 25nt, 10 내지 25nt, 또는 20 내지 25nt 길이의 폴리뉴클레오티드를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥에서 추가적으로 연장된 폴리뉴클레오티드는 전부 또는 일부가 서로 상보적으로 결합하거나, 상보적으로 결합하지 않을 수 있다. 상기 범위의 길이의 폴리뉴클레오티드를 추가적으로 포함함에도, 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자의 활성(예를 들면, 유전자 침묵 활성)에는 영향이 없을 수 있다.

[0086] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자는

[0087] 상기 센스 가닥의 3' 말단에 상기 범위 (예를 들면, 1 내지 30nt)의 폴리뉴클레오티드를 추가적으로 포함하고,

[0088] 상기 안티센스 가닥의 5' 말단에 상기 범위(예를 들면, 1 내지 30nt)의 폴리뉴클레오티드를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 센스가닥의 3' 말단에서 연장된 뉴클레오티드와 상기 안티센스 가닥의 5' 에서 연장된 뉴클레오티드는 서로 상보적으로 결합하지 않는 것일 수 있고, 이 경우 일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자는 플랭킹 말단(flanking-end dsRNA)를 갖질 수 있으며, 상기 플랭킹 말단 구조의 이중가닥 핵산 분자의 일 예는 도 9에 도시하였다.

[0090] 다른 양상은, 상기 이중가닥 핵산 분자를 포함하는 방사형 핵산 분자를 제공할 수 있다. 일 예에 따른 방사형 핵산 분자는 상기 이중가닥 핵산 분자를 2개 내지 5개, 2개 내지 4개, 또는 2개 내지 3개 포함하는 것일 수 있다. 일 예에 따른 방사형 핵산 분자에 포함되는 이중가닥 핵산 분자는 전술한 바와 같다.

[0091] 상기 방사형 핵산 분자는 방사형으로 뻗은 K개(예를 들면, K는 2≤K≤5, 2≤K≤4, 또는 2≤K≤3의 정수)의 팔(arm)을 포함하는 핵산 분자로서, 각 팔은 상기 이중가닥 핵산 분자를 포함할 수 있고, 중심부 및/또는 말단부로 상기 이중가닥 핵산 분자에서 연장된 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일 예에서 상기 각 팔은 상기 이중가닥 핵산 분자에서 각각 중심부 및/또는 말단부로의 방향으로 1 내지 30nt, 2 내지 30n, 5 내지 30nt, 10 내지 30nt, 20 내지 30nt, 25 내지 30nt, 1 내지 27nt, 2 내지 27nt, 5 내지 27nt, 10 내지 27nt, 20 내지 27nt, 25 내지 27nt, 1 내지 25nt, 2 내지 25nt, 5 내지 25nt, 10 내지 25nt, 또는 20 내지 25nt 길이의 연장된 폴리뉴클레오티드를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 각 팔에 포함된 이중가닥 핵산분자의 핵산 서열은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 상기 각 팔은 각각 개방(open) 되거나 스템-루프 구조(또는 헤어핀 구조)를 갖는 폐쇄(closed)된 것일 수 있다.

[0092] 본 명세서에서, 방사형이란 K 개의 팔이 방사형으로 뻗어나간 형태(즉, 중앙의 한 점에서 2차원 또는 3차원 상에서 사방으로 거미줄이나 바퀴살과 같이 뻗어나간 형태)를 갖는 구조를 의미할 수 있다. 상기 K는 2≤K≤5, 2≤K≤4, 또는 2≤K≤3의 정수일 수 있다. 예를 들면, 상기 K가 3인 경우, 상기 핵산 분자는 Y 형태의 구조를 나타내고, 상기 K 가 4인 경우, 상기 핵산 분자는 +형태의 구조를 나타내며, 상기 K가 5인 경우, 상기 핵산 분자는 * 형태의 구조를 나타낼 수 있다.

[0093] 상기 방사형으로 뻗은 K개의 팔(arm)을 포함하는 방사형 핵산 분자는 그 구조로 인하여, 체내 뉴클레아제(nuclease; 예를 들면 엔도뉴클레아제, 엑소뉴클레아제)에 대한 저항성이 증가되어 혈중 안정성이 증가될 수 있다. 또한 각 팔의 길이 및 팔의 수를 조절하여 핵산 분자의 크기를 조절할 수 있어 EPR(Enhanced Permeability and Retention) 효과를 나타낼 수 있다. 상기 EPR 효과란 특정한 크기를 갖는 분자가 정상 조직 보다 종양 조직에 축적되는 경향이 있는 것을 의미한다. 핵산 분자의 크기에 따라 축적되는 장기의 종류가 상이한 것으로 알려져 있는 바 각 팔의 길이 및/또는 팔의 수를 조절하여 상기 방사형으로 뻗은 K개의 팔을 포함하는 핵산분자가 축적되는 타겟 장기를 설정할 수 있다.

[0094] 일 예에 따른 방사형 핵산 분자는 상기 이중가닥 핵산 분자를 포함할 수 있고, 상기 이중가닥 핵산 분자는 각각 다이서 기질로서 다이서에 의해 절단되어 타겟 유전자에 대한 침묵활성을 나타낼 수 있는 절단된 생성물(cleaved product)이 제조될 수 있다. 일 예에 따른 방사형 핵산 분자는 방사형으로 뻗은 K개의 팔을 포함할 수 있고, 팔에 상기 이중가닥 핵산 분자를 포함할 수 있으며, 최대 K개(1개 이상 내지 K개 이하)의 타겟에 대한 유전자 침묵 활성을 나타낼 수 있는 절단된 생성물을 제조할 수 있다. 상기 방사형 핵산 분자는 하나의 분자 내에 복수개의 동일하거나 서로 다른 서열을 포함하는 이중가닥 핵산을 포함하여 복수 개의 유전자 발현을 선택적, 동시 다발적, 및/또는 효율적으로 조절(예를 들면, 감소)할 수 있다.

[0095] 상기 팔에 포함되는 이중가닥 핵산 분자는 특정 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하고 있어, 상기 방사형으로 핵산 분자는 모든 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되지 않은 이중가닥을 포함하는 핵산 분자 또는 기존에 알려진 방법(예를 들면, 교대 변형 방법(Alternating modification) 또는 C/U 서열-기반 변형 방법(C/U sequence-based modification))으로 화학적 변형된 이중가닥 핵산을 포함하는 핵산 분자 보다 하기 (1) 내지 (8)로 이루어지는 군 중 1종 이상의 효과를 유지, 증가, 또는 감소시키는 것일 수 있다:

[0096] (1) 인비트로 및/또는 인비보에서 상기 방사형으로 뻗은 K개의 팔을 포함하는 핵산 분자과 다이서의 상호 작용 유지 및/또는 증가(예를 들면, 다이서에 의한 이중가닥 핵산의 절단 속도 유지 및/또는 증가);

[0097] (2) 인비트로에서 타겟 유전자 침묵 활성의 유지 및/또는 증가;

[0098] (3) 인비보에서 타겟 유전자 침묵 활성의 증가;

[0099] (4) 오프-타겟 효과(off-target effect) 감소;

[0100] (5) 생체 내의 뉴클레아제(nuclease, 예를 들면 RNase)에 의한 분해(degradation) 감소;

[0101] (6) 세포 내 흡수(uptake) 증가;

[0102] (7) 인비트로 및/또는 인비보에서 안정성 증가 (예를 들면, 혈청 안정성 (serum stability) 증가); 및/또는

[0103] (8) 면역반응(예를 들면, 상기 핵산 분자에 의한 엔도좀 내의 면역 유도 반응, 또는 세포질로 나온 핵산 분자의 PKR 활성에 의한 면역 반응 등) 감소.

[0104] 상기 방사형으로 뻗은 K개 (예를 들면, 2≤K≤3의 정수)의 팔을 포함하는 방사형 핵산 분자는 하나의 분자 내에 복수 개의 서로 다른 이중가닥 핵산을 포함하여 다이서와의 결합 친화성(binding affinity)이 증가된 것일 수 있다.

[0105] 상기 방사형 핵산 분자의 각 팔에 포함된 이중가닥 핵산 분자는 포함하는 염기서열이 서로 동일(동일한 타겟 유전자에 대해 유전자 침묵활성을 가짐)하거나 서로 상이(상이한 타겟 유전자에 대해 유전자 침묵활성을 가짐)할 수 있다. 일 예에서 Y 형태의 방사형 핵산 분자의 각 팔에 포함된 이중가닥 핵산 분자의 염기서열이 모두 서로 상이한 경우, 상기 핵산 분자로부터 제조될 수 있는 절단된 생성물 (다이서에 의해 절된된 산물의 형태)는 서로 다른 3종의 생성물이 1:1:1의 비(예를 들면, 몰비)로 존재할 수 있다. 일 예에서 Y 형태의 방사형 핵산 분자의 2개의 팔의 스템에 포함된 이중가닥 핵산 분자의 염기서열이 동일하고 다른 하나의 팔의 스템에 포함된 이중가닥 핵산의 서열이 상이한 경우, 상기 핵산 분자로부터 제조될 수 있는 절단된 생성물은 서로 다른 2종의 생성물이 2:1의 비(예를 들면, 몰비)로 존재할 수 있다. 일 예에 따르면, 상기와 같이, 방사형 핵산 분자에 포함된 이중가닥 핵산 분자의 종류(서열)을 조절하여 상기 핵산 분자로부터 제조할 수 있는 절단된 생성물(유전자 침묵활성을 나타낼 수 있는 절단된 생성물)의 비율을 임의로 조절할 수 있다.

[0106] 상기 방사형 핵산 분자는 다이서(dicer)에 의해 내생적으로 절단될 수 있고, 일 예에 따르면, 상기 방사형 핵산 분자의 팔에 포함된 이중가닥 핵산 분자를 다이서가 내생적으로 절단할 수 있다. 일 예에 따르면 각 팔의 스템에 포함된 이중가닥 핵산 분자의 서열의 열역학적 안정성을 조절하여, 유전자 침묵 활성을 갖는 이중가닥 핵산 분자의 효율을 증가시킬 수 있다.

[0107] 일 예에서 상기 방사형 핵산 분자는 세포, 조직, 및/또는 대상체에 투여되었을 때 각 팔에 포함된 이중가닥 핵산 분자는 다이서에 의해 적절한 길이로 절단된 후 바로 RISC에 로딩되고, RISC에서 촉매부위에 해당하는 Ago2(Argonaute 2)는 로딩된 이중가닥 핵산 분자의 서열에서 열역학적으로 강한 가닥을 자르고 열역학적으로 약한 가닥을 남길 수 있다. 따라서 상기 팔에 포함된 이중가닥 핵산 분자의 서열에서 타겟 유전자에 대한 안티센스 가닥의 서열이 역역학적으로 약한 가닥이 되도록 설계하여 상기 핵산 분자의 유전자 침묵 효과(효율)를 증가시킬 수 있다.

[0108] 상기 방사형 핵산 분자에 포함되는 이중가닥 핵산 분자에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0109] 일 예에 따른 방사형 핵산 분자는,

[0110] 상기 이중가닥 핵산 분자를 2개 (예를 들면, 제1 이중가닥 핵산 분자 및 제2 이중가닥 핵산 분자) 포함하고,

[0111] 제1 이중가닥 핵산 분자 중 센스 가닥의 3’ 말단과 제2 이중가닥 핵산 분자 중 안티센스 가닥의 5’ 말단이 연결되거나,

[0112] 제1 이중가닥 핵산 분자 중 안티센스 가닥의 5’ 말단과 제2 이중가닥 핵산 분자 중 센스 가닥의3’ 말단이 연결되거나,

[0113] 이의 조합의 특징(제1 이중가닥 핵산 분자 중 센스 가닥의 3’ 말단과 제2 이중가닥 핵산 분자 중 안티센스 가닥의 5’ 말단이 연결되고, 제1 이중가닥 핵산 분자 중 안티센스 가닥의 5’ 말단과 제2 이중가닥 핵산 분자 중 센스 가닥의3’ 말단이 연결된)을 가질 수 있다.

[0114] 일 예에 따른 방사형 핵산 분자는

[0115] 상기 이중가닥 핵산 분자를 3개 (예를 들면, 제1 이중가닥 핵산 분자, 제2 이중가닥 핵산 분자, 및 제3 이중가닥 핵산 분자) 포함하고,

[0116] 하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어지는 군에서 선택된 2종 이상의 특징을 포함하는 것일 수 있다:

[0117] (i) 제1 이중가닥 핵산 분자의 센스 가닥의 3’ 말단과 제2 이중가닥 핵산 분자의 안티센스 가닥의 5’ 말단이 연결;

[0118] (ii) 제1 이중가닥 핵산 분자의 안티센스 가닥의 5’ 말단과 제3 이중가닥 핵산 분자의 센스 가닥의 3’ 말단이 연결; 및

[0119] (iii) 제2 이중가닥 핵산 분자의 센스 가닥의 3’ 말단과 제3 이중가닥 핵산 분자의 안티센스 가닥의 5’ 말단이 연결.

[0120] 일 예에 따라 상기 이중가닥 핵산 분자를 3개 포함하고, 상기 (i) 내지 (iii)으로 이루어지는 군에서 선택된 2종의 특징을 갖는 방사형 핵산 분자는 중심부에 하나의 닉(nick)을 갖는 Y 형 구조를 가질 수 있다. 일 예에 따라 상기 이중가닥 핵산 분자를 3개 포함하고, 상기 (i) 내지 (iii)의 특징을 모두 갖는 방사형 핵산 분자는 닉을 포함하지 않는 Y 형 구조를 가질 수 있다. 일 예에 따른 닉을 갖는 Y형 구조의 방사형 핵산분자 및 닉을 포함하지 않는(닉을 갖지 않는) Y형 구조의 방사형 핵산분자를 도 9에 도시하였다.

[0121] 상기에서, 제n 이중가닥 핵산 분자의 센스 가닥의 3’ 말단과 제m 이중가닥 핵산 분자의 안티센스 가닥의 5’ 말단이 연결되었다는 것은, 상기 센스 가닥에서 3’ 말단의 뉴클레오티드와 상기 안티센스 가닥의 5’ 말단의 뉴클레오티드가 서로 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)으로 연결된 것을 의미할 수 있다.

[0122] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자 (또는 일 예에 따른 방사형 핵산 분자가 포함하는 상기 이중가닥 핵산분자)의 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 1번째 뉴클레오티드는 G 또는 C일 수 있다.

[0123] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자 (또는 일 예에 따른 상기 방사형 핵산 분자가 포함하는 상기 이중가닥 핵산분자)의 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 20번째 뉴클레오티드는 A 또는 U(T)일 수 있다.

[0124] 일 예에서, 상기 이중가닥 핵산 분자 (또는 일 예에 따른 상기 방사형 핵산 분자가 포함하는 상기 이중가닥 핵산분자)의 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 14 내지 21번째의 뉴클레오티드 중에서 4개 이상이 U(T) 또는 A일 수 있다.

[0126] 다른 양상은 상기 이중가닥 핵산 분자 및/또는 상기 방사형 핵산 분자를 포함하는, 유전자 발현 억제용 조성물을 제공할 수 있다.

[0127] 상기 유전자는 단백질 코딩 유전자, 원종양유전자, 종양유전자, 종양 억제인자 유전자, 및 세포 신호전달 유전자에서 선택되는 것일 수 있다.

[0128] 일 예에서 상기 유전자 발현 억제용 조성물은 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 지질 분자, 리포좀, 미셀, 양이온성 지질, 양이온성 고분자, 리간드 접합, 양이온성 금속으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

[0129] 일 예에서 상기 이중가닥 핵산 분자 및/또는 상기 방사형 핵산 분자는 직접 처리되거나, 양이온성 지질과 복합체를 형성하거나 리포좀 내로 패키징 되어 전달될 수 있고, 예를 들면 리포좀 내의 캡슐화, 이온영동법, 또는 생분해성 중합체, 히드로겔, 시클로덱스트린, 폴리(락트-코-글리콜)산(PLGA) 및 PLCA 미세구, 생분해성 나노캡슐 및 생체결합성 미세구와 같은 다른 비히클 내로의 혼입을 비롯하여 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 세포 및/또는 대상체에 투여될 수 있다.

[0130] 상기 "리포좀"은 하나 이상의 이중층, 예를 들어, 하나의 이중층 또는 복수의 이중층에 배열된 양친매성 지질로

구성된 비히클을 지칭한다. 리포좀은 친유성 물질 및 수성의 내부로부터 형성된 막을 가지는 단일막 및 다중막 비히클을 포함한다. 수성 부위는 핵산 분자를 포함한다. 친유성 물질은 수성 내부를, 전형적으로 핵산 분자를 포함하지 않는 수성 외부로부터 분리하지만, 일부 예들에서는 포함할 수 있다. 리포좀은 활성 성분들을 작용 부위에 수송 및 전달하는 데 유용하다. 리포좀 막이 생물학적 막과 구조상 유사하기 때문에, 리포좀이 조직에 적용되는 경우, 리포좀의 이중층은 세포막의 이중층과 융합된다. 리포좀 및 세포의 병합이 진행됨에 따라, 핵산 분자를 포함하는 내부의 수성 내용물은 핵산 분자가 타겟 유전자에 특이적으로 결합하여 RNAi를 매개할 수 있는 세포 내로 전달된다. 일 예에서, 리포좀은 핵산 분자를 특정 유형의 세포로 지시하기 위해, 특이적으로 타겟화된다.

[0131] 상기 "미셀"은, 분자의 소수성 부분이 모두 안으로 향해 있어서 친수성 부분은 주변의 수성상과 접촉한 상태로 있는 양친매성 분자가 구형 구조로 배열되어 있는 분자 조립의 특정 유형으로서 정의된다. 환경이 소수성인 경우, 반대의 배열이 존재한다.

[0132] 또 다른 양상은 상기 이중가닥 핵산 분자, 상기 방사형 핵산 분자, 및/또는 상기 유전자 발현 억제용 조성물을 대상체에 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 타겟 유전자의 발현 억제 방법을 제공한다. 상기 타겟 유전자의 발현 억제 방법은 상기 투여하는 단계 이전에 유전자의 발현 억제를 필요로 하는 개체를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0133] 일 예에서 상기 타겟 유전자의 발현 억제 방법은 인비트로에서 타겟 세포에서 타겟 유전자의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0134] 또 다른 양상은 상기 이중가닥 핵산 분자, 및/또는 상기 방사형 핵산 분자을 포함하는 암 또는 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것일 수 있다. 상기 이중가닥 핵산 분자, 상기 방사형으로 뻗은 K개의 팔을 포함하는 핵산분자 이외에 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0135] 또 다른 양상은 상기 약학적 조성물을 대상체에 약학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 증식성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공할 수 있다. 상기 치료방법은 상기 투여하는 단계 이전에 암 또는 증식성 질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0136] 본 명세서에서, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자(대상체)에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 약학적 조성물들의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여 시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 지속성 제제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0137] 일 예에 따르면, 상기 약학적 조성물 또는 방법에 있어서, 상기 약학적 조성물 또는 상기 이중가닥 핵산 분자, 및/또는 상기 방사형 핵산 분자을 포함하는 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 및 부형제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 첨가제와 함께 제공될 수 있다.

[0138] 상기 약학적으로 허용되는 담체는, 약학적 조성물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 약학적 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0139] 상기 조성물(약학적 조성물 또는 유전자 발현 억제용 조성물)은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0140] 상기 조성물의 적절한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간,

투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0141] 상기 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.1 내지 1000 mg/kg, 또는 0.1 내지 200mg/kg 범위 내일 수 있다. 예를 들면, 0.1 내지 100nmole 농도로 이중핵산 분자를 포함하는 조성물을 0.1 내지 1000 mg/kg, 1 내지 500 mg/kg, 또는 1 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수 있고 수회에 나누어 투여할 수 있다. 상기 1일 투여량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0142] 본 명세서에서, "약학적 유효량" 또는 “유효량”은 상기 유효성분(일 예에 따른 이중가닥 핵산 분자 및/또는 방사형으로 뻗은 K개의 팔을 포함하는 핵산분자)이 소망하는 효과(예를 들면, 타겟 유전자의 발현을 억제시키거나 암 또는 증식성 질환을 예방 및/또는 치료하는 효과)를 나타낼 수 있는 양을 의미하며, 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0143] 상기 약학적 조성물은 당해 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0144] 또한, 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0145] 상기 유전자 발현 억제용 조성물, 또는 약학적 조성물의 투여 대상이나 상기 유전자 발현 억제 방법, 예방 또는 치료 방법의 투여 대상 환자(대상체)는 인간, 원숭이 등의 영장류 또는 래트, 마우스 등의 설치류 등을 포함하는 포유류, 또는 상기 포유류로부터 분리된 세포 또는 조직 또는 이의 배양물일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0147] 또 다른 양상은 특정 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드 가닥을 x개(예를 들면, x는 1 내지 5에서 선택된 정수) 합성하는 단계; 및 상기 x 개의 가닥을 혼성화시키는 단계를 포함하는, 핵산 분자 (예를 들면, 증가된 생체 내 안정성 및/또는 증가된 유전자 침묵 활성을 갖는 핵산 분자)의 제조방법을 제공할 수 있다. 상기 방법으로 제조할 수 있는 핵산 분자는 전술한 상기 이중가닥 핵산 분자 또는 상기 방사형 핵산 분자의 특징을 가질 수 있다.

[0148] 상기 합성하는 단계에서 제조된 폴리뉴클레오티드 가닥은 제n 타겟 유전자의 전체 또는 일부 서열과 동일한 서열을 포함하는 센스 영역((n-S(sense) 영역) 및 제 m 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역(m-AS(antisense) 영역), 또는 이의 조합(상기 n-S 영역 및 상기 m-AS 영역)을 포함할 수 있다. 상기 n, x, m은 양의 정수일 수 있고 예를 들면, 1 내지 5에서 선택된 정수일 수 있다.

[0149] 상기 “센스 영역”은 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 영역으로서, 전술한 “센스 가닥”의 특징을 가질 수 있다. 상기 센스 영역은 타겟 유전자(예를 들면, 타겟 유전자의 mRNA)의 핵산 서열(염기서열)과 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 98% 이상, 99.5% 이상, 또는 99.9% 이상, 또는 100%의 상동성(또는 동일성)을 갖는 핵산 서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함할 수 있다.

[0150] 상기 “안티센스 영역”은 타겟 유전자의 전체 또는 일부에 실질적으로 또는 100% 상보적인 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 영역으로서, 전술한 “안티센스 가닥”의 특징을 가질 수 있다. 상기 안티센스 영역은 타겟 유전자와 결합(혼성화)할 수 있도록, 결합하고자 목적하는 타겟 유전자(예를 들면, 타겟 유전자의 mRNA)의 전부 또는 일부의 핵산 서열과 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 98.5% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상, 또는 100% 상보적인 핵산서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함할 수 있다.

[0151] 일 예에서 상기, 안티센스 영역은 다른(별개의) 폴리뉴클레오티드 가닥에 포함된 센스 영역과 상보적으로 결합할 수 있고, 구체적으로 다른 폴리뉴클레오티드 가닥에 포함된 센스 영역의 핵산 서열과 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 98.5% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상, 또는 100% 상보적인 핵산서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함할 수 있다.

[0152] 일 예에서, 상기 센스 영역은 19 내지 70nt(nucleotide), 20 내지 70nt, 21 내지 70nt, 22 내지 70nt, 23 내지 70nt, 25 내지 70nt, 19 내지 66nt, 20 내지 66nt, 21 내지 66nt, 22 내지 66nt, 23 내지 66nt, 25 내지 66nt, 19 내지 60nt, 20 내지 60nt, 21 내지 60nt, 22 내지 60nt, 23 내지 60nt, 25 내지 60nt, 19 내지 55nt, 20 내지 55nt, 21 내지 55nt, 22 내지 55nt, 23 내지 55nt, 25 내지 55nt, 19 내지 52nt, 20 내지 52nt, 21 내지 52nt, 22 내지 52nt, 23 내지 52nt, 25 내지 52nt, 19 내지 50nt, 20 내지 50nt, 21 내지 50nt, 22 내지 50nt, 23 내지 50nt, 25 내지 50nt, 19 내지 45nt, 20 내지 45nt, 21 내지 45nt, 22 내지 45nt, 23 내지 45nt, 25 내지 45nt, 19 내지 40nt, 20 내지 40nt, 21 내지 40nt, 22 내지 40nt, 23 내지 40nt, 25 내지 40nt, 19 내지 38nt, 20 내지 38nt, 21 내지 38nt, 22 내지 38nt, 23 내지 38nt, 25 내지 38nt, 19 내지 36nt, 20 내지 36nt, 21 내지 36nt, 22 내지 36nt, 23 내지 36nt, 25 내지 36nt, 19 내지 35nt, 20 내지 35nt, 21 내지 35nt, 22 내지 35nt, 23 내지 35nt, 25 내지 35nt, 19 내지 30nt, 20 내지 30nt, 21 내지 30nt, 22 내지 30nt, 23 내지 30nt, 25 내지 30nt, 19 내지 28nt, 20 내지 28nt, 21 내지 28nt, 22 내지 28nt, 23 내지 28nt, 25 내지 28nt, 19 내지 25nt, 20 내지 25nt, 21 내지 25nt, 22 내지 25nt, 23 내지 25nt, 또는 25nt 길이의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0153] 일 예에서, 상기 안티센스 영역은 20 내지 70nt, 21 내지 70nt, 22 내지 70nt, 23 내지 70nt, 25 내지 70nt, 27 내지 70nt, 20 내지 66nt, 21 내지 66nt, 22 내지 66nt, 23 내지 66nt, 25 내지 66nt, 27 내지 66nt, 20 내지 60nt, 21 내지 60nt, 22 내지 60nt, 23 내지 60nt, 25 내지 60nt, 27 내지 60nt, 20 내지 55nt, 21 내지 55nt, 22 내지 55nt, 23 내지 55nt, 25 내지 55nt, 27 내지 55nt, 20 내지 52nt, 21 내지 52nt, 22 내지 52nt, 23 내지 52nt, 25 내지 52nt, 27 내지 52nt, 20 내지 50nt, 21 내지 50nt, 22 내지 50nt, 23 내지 50nt, 25 내지 50nt, 27 내지 50nt, 20 내지 45nt, 21 내지 45nt, 22 내지 45nt, 23 내지 45nt, 25 내지 45nt, 27 내지 45nt, 20 내지 40nt, 21 내지 40nt, 22 내지 40nt, 23 내지 40nt, 25 내지 40nt, 27 내지 40nt, 20 내지 38nt, 21 내지 38nt, 22 내지 38nt, 23 내지 38nt, 25 내지 38nt, 27 내지 38nt, 20 내지 36nt, 21 내지 36nt, 22 내지 36nt, 23 내지 36nt, 25 내지 36nt, 27 내지 36nt, 20 내지 35nt, 21 내지 35nt, 22 내지 35nt, 23 내지 35nt, 25 내지 35nt, 27 내지 35nt, 20 내지 30nt, 21 내지 30nt, 22 내지 30nt, 23 내지 30nt, 25 내지 30nt, 27 내지 30nt, 20 내지 27nt, 21 내지 27nt, 22 내지 27nt, 23 내지 27nt, 25 내지 27nt, 또는 27nt길이의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0154] 상기 합성하는 단계에서 합성된 x개의 폴리뉴클레오티드 가닥(제1 가닥, 제2 가닥 … 제x 가닥, 예를 들면, x는 1≤x≤5의 정수)은 특정 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하도록 합성될 수 있다. 상기 센스 영역은 5’ 말단으로부터 4, 5, 7, 및 14번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이(예를 들면, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 모두)상의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 안티센스 영역은 상보적으로 결합하는 다른(별개의) 폴리뉴클레오티드 가닥의 센스 영역 영역의 5’ 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13(예를 들면, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 5종 이상, 6종 이상, 7종 이상, 또는 8종 모두)번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치(또는 절단된 생성물 중 안티센스 가닥 5'말단을 기준으로, 8 내지 11, 13, 15, 18, 및 19번 위치)에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일 예에서, 상기 (n-S) 영역은 5’ 말단으로부터 1번째 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하거나 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 화학적 변형에 대해서는 전술한 바와 같고, 구체적으로 상기 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 당의 잔기가 2'-O-메틸, 2'-메톡시에톡시, 2'-플루오로, 2'-알릴, 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸], 4'-티오, 4'-CH2-O-2'-브리지(bridge), 4'-(CH2)2-O-2'-브리지, 2'-LNA, 2'-아미노, 및 2'-O-(N-메틸카르바메이트)(methlycarbamate)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1종 이상으로 변형된 것일 수 있다.

[0155] 일 예에서, 상기 센스 영역은 5'말단으로부터 2, 3, 6, 8내지 13, 및 15 번째 이상(예를 들면 15 내지 35번째 또는 15 내지 25번째)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0156] 일 예에서, 상기 안티센스 영역은 상보적으로 결합하는 다른(별개의)폴리뉴클레오티드 가닥의 상기 센스 영역의 5' 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 9, 및 14이상(예를 들면, 14 내지 35번째)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치 또는 다이서에 의해 절단되어 생성된 산물 중 안티센스 가닥의 5'말단을 기준으로 7번째 이하 (예를 들면, 1 내지 7번째), 12번째, 14번째, 16번째, 17번째, 및 20번째 이상 (예를 들면 20 내지 22번째)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0157] 상기 폴리뉴클레오티드를 가닥을 합성하는 단계는 당업계에 알려진 방법으로 수행될 수 있으며, 예를 들면, nucleoside phosphoramidites를 사용하는 방법, Koster 의해 개발된 b-cyanoethyl phosphoramidite를 이용하여

DNA 구조의 골격을 이루는 phosphodiester 결합을 연결해가는 'phosphite triester' 방법 등으로 수행될 수 있다.

[0158] 상기 합성하는 단계에서 제조된 x개의 폴리뉴클레오티드 가닥 중에서 하나의 가닥이 포함하는 센스 영역은 다른 가닥의 안티센스 영역과 서로 상보적으로 결합할 수 있으며, 적어도 한쌍 이상의 가닥이 상보적으로 결합되도록 x개의 폴리뉴클레오티드 가닥이 디자인될 수 있다.

[0159] 일 예에 따른 제조방법에서 상기 x가 2인 경우,

[0160] 상기 합성하는 단계는,

[0161] 제1 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함하는 센스 영역 (1-S) 영역 및/또는 제2 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역 (2-AS)을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 가닥 및

[0162] 제2 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함하는 센스 영역 (2-S) 영역 및/또는 제1 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역 (1-AS)을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 가닥을 합성할 수 있다. 일 구체예에서 상기 (1-S) 영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 가닥 및 상기 (1-AS)를 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 가닥을 합성하고, 이를 혼성화하여 제조한 핵산분자는 플랭킹 말단(flanking end)을 갖는 형태의 핵산 분자일 수 있고, 상기 플랭킹 말단을 갖는 형태의 핵산 분자의 일 예를 도 9에 도시하였다.

[0163] 일 예에 따른 제조방법에서 상기 x가 3인 경우,

[0164] 상기 합성하는 단계는,

[0165] 제1 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함하는 센스 영역 (1-S) 영역 및/또는 제2 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역 (2-AS)을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 가닥,

[0166] 제2 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함하는 센스 영역 (2-S) 영역 및/또는 제3타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역 (3-AS)을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 가닥, 및

[0167] 제 3 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함하는 센스 영역 (3-S) 영역 및/또는 제1 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역 (1-AS)을 포함하는 제3 폴리뉴클레오티드 가닥을 합성할 수 있다.

[0168] 일 구체예에서 상기 (1-S) 영역 및 상기 (2-AS) 영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 가닥, 상기 (2-S) 영역 및 상기 (3-AS)를 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 가닥, 및 상기 (3-S) 영역 및 상기 (1-AS) 영역을 포함하는 제3 폴리뉴클레오티드 가닥을 합성하고, 상기 제 1 내지 제3 폴리뉴클레오티드 가닥을 혼성화하여 제조한 핵산분자는 Y형 구조의 방사형 핵산 분자일 수 있고, 상기 Y형 구조의 방사형 핵산 분자의 일 예를 도 9에 도시하였다.

[0169] 일 예에 따른 제조방법에서 상기 x가 4인 경우,

[0170] 상기 합성하는 단계는,

[0171] 제1 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함하는 센스 영역 (1-S) 영역 및/또는 제2 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역 (2-AS)을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 가닥,

[0172] 제2 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함하는 센스 영역 (2-S) 영역 및/또는 제3타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역 (3-AS)을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 가닥,

[0173] 제 3 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함하는 센스 영역 (3-S) 영역 및/또는 제4 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역 (4-AS)을 포함하는 제3 폴리뉴클레오티드 가닥, 및

[0174] 제 4타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 서열을 포함하는 센스 영역 (4-S) 영역 및/또는 제1 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역 (1-AS)을 포함하는 제4폴리뉴클레오티드 가닥을 합성할 수 있다.

[0175] 일 구체예에서, 상기 제1 타겟 유전자와 제 4 타겟 유전자는 동일한 것일 수 있고,

[0176] 상기 (1-S) 영역 및 상기 (2-AS) 영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 가닥, 상기 (2-S) 영역 및 상기 (3-AS)를 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 가닥, 및 상기 (3-S) 영역을 포함하는 제3 폴리뉴클레오티드 가닥, 및 영

역 (1-S)와 상보적으로 결합 가능한 (4-AS)을 포함하는 제4 뉴클레오티드 가닥을 합성하고, 상기 제 1 내지 제4 폴리뉴클레오티드 가닥을 혼성화하여 제조한 핵산 분자는 중심 (중앙, center)에 닉(nick)을 갖는 Y형 구조의 방사형 핵산 분자일 수 있고, 상기 닉(nick)을 갖는 Y형 구조의 방사형 핵산 분자의 일 예를 도 9에 도시하였다.

[0177] 일 예에 따른 제조 방법은 상기 합성하는 단계에서 제조한 x개의 폴리뉴클레오티드 가닥을 혼성화시키는 단계를 포함할 수 있고,

[0178] 상기 혼성화시키는 단계는 통상의 방법에 의해 수행될 수 있으며, 일 예에 따르면, 70 내지 120℃, 80 내지 110℃, 90 내지 110℃, 또는 90 내지 100℃에서, 0 내지 30℃, 0 내지 25℃, 0 내지 20℃, 1 내지 15℃, 또는 1 내지 10℃까지 온도를 감소시키는 조건에서 반응시켜 혼성화시킬 수 있다. 상기 혼성화시키는 단계에서 온도를 감소시키는 것은 -0.01 내지 30℃/s, -0.05 내지 20℃/s, -0.1 내지 15℃/s, 또는 -0.1 내지 10℃/s 의 속도로 온도를 감소시키는 것일 수 있다.

[0179] 상기 혼성화 단계은 당업자에게 공지되어 있는 조건(예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)] 참조)으로 수행될 수 있다. 일 예에서 엄격한 혼성화 조건은 42℃에서 50% 포름아미드, 5xSSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5x 덴하르트(Denhardt's) 용액, 10% 덱스트란 술페이트, 및 20 μg/mL 폴리뉴클레오티드 가닥을 포함하는 용액 중에서 밤새 인큐베이션하고 이어서 약 65℃에서 0.1xSSC 중에서 필터를 세척하는 것을 포함한다.

[0180] 다른 예는,

[0181] 19 내지 36nt 길이의 센스 가닥 및 상기 센스 가닥에 상보적인 서열을 갖는 21 내지 38 nt 길이의 안티센스 가닥을 포함하고,

[0182] 상기 센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥은 하기 위치 중 1 이상의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인:

[0183] (1) 상기 센스 가닥에서 5’ 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 및 14번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치; 및

[0184] (2) 상기 안티센스 가닥에서 상기 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치,

[0185] 이중가닥 핵산 분자를 제조하는 단계를 포함하는, 증가된 생체 내 안정성을 갖는 이중가닥 핵산의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0186] 또 다른 양상은 하기 단계를 포함하는 이중 가닥 핵산 분자(예를 들면, 증가된 생체 내 안정성 및/또는 증가된 유전자 침묵 활성을 갖는 핵산 분자) 또는 방사형 핵산 분자의 제조방법을 제공할 수 있다:

[0187] 또 다른 양상은,

[0188] (1) 제n 타겟 유전자와 동일한 서열을 포함하는 영역(영역 n-S) 및 제 m 타겟 유전자와 상보적인 서열을 포함하는 영역(영역 m-AS)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 가닥(strand)를 합성하는 단계로서,

[0189] 상기 영역 n-S 및 상기 영역 m-AS는 하기 위치 중 1 이상의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하며:

[0190] a) 상기 영역 n-S에서 5’ 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 및 14번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치; 및

[0191] b) 상기 영역 m-AS에서 이와 상보적으로 결합하는 다른 폴리뉴클레오티드(상기 제m타겟 유전자와 동일한 서열을 포함하는 영역을 포함하는 별개의 폴리뉴클레오티드) 가닥의 5’ 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치,

[0192] 상기 제n타겟 유전자와 제m 타겟 유전자는 동일하거나 동일하지 않은 유전자인, 폴리뉴클레오티드 가닥을 합성하는 단계;

[0193] (2) 상기 폴리뉴클레오티드 가닥을 제조하는 단계((1) 단계)를 K번 반복하여 K개의 폴리뉴클레오티드 가닥을 합

성하는 단계;

[0194] (3) 상기 (2) 단계에서 합성된 K개의 폴리뉴클레오티드 가닥을 혼성화시키는 단계를 포함하고,

[0195] (3) 방사형으로 뻗은 K개의 팔(arm)을 포함하는 핵산 분자로서,

[0196] 상기 K는 2≤K≤4의 정수이고,

[0197] 각 팔은 상기 이중가닥 핵산 분자를 포함하고,

[0198] 각 팔에 포함된 이중가닥 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열은 서로 동일하거나 상이하며,

[0199] 상기 영역 n-S은 전술한 일 예에 따른 이중가닥 핵산이 포함하는 센스 가닥과 동일한 역할을 하는 것일 수 있고, 상기 영역 m-AS는 전술한 일예에 따른 이중가닥 핵산이 포함하는 안티센스 가닥과 동일하거나 유사한 역할을 하는 것일 수 있다.

[0200] 상기 (3) 단계는 혼성화를 통해 제 1타겟 유전자에 대한 동일한 서열을 포함하는 영역(영역 1-1)과 상기 제1타겟 유전자에 대한 상보적인 서열을 포함하는 영역(영역 1-2)이 상보적으로 결합되고,

[0201] 상기 영역 1-1과 상기 영역 1-2는 별개의 폴리뉴클레오티드 가닥에 포함되는 것일 수 있다.

[0202] 상기 (3) 단계의 혼성화 단계에 대해서는 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0203] 특정 위치에서 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 핵산 분자 또는 방사형으로 핵산 분자는 효과적으로 타겟 유전자에 대한 유전자 침묵활성 및 생체 내 안정성이 증가된 것일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0204] 도 1은 일 예에 따라 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 핵산 분자를 나타낸다.

도 2는 일 예에 따라 P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 핵산 분자를 나타낸다.

도 1 및 도 2에서 SS는 센스 가닥(sense strand)를 의미하고 AS는 안티센스 가닥(antisense strand)를 의미하며 녹색으로 표시된 부분은 화학적으로 변형시킨 뉴클레오티드를 의미하고, 회색으로 표시된 부분은 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드를 의미한다.

도 3은 이중가닥 핵산 분자가 포함하는 화학적으로 변형시킨 뉴클레오티드의 위치에 따른 유전자 침묵 활성을 나타낸다.

도 4는 실시예 2에서 제조한 화학적으로 변형시킨 뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 핵산 분자를 나타낸다.

도 5a 및 도 5b는 도 3에 나타난 위치의 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시킨 이중가닥 핵산 분자의 다이서 반응 속도(좌측 그래프) 및 유전자 침묵 활성(우측 그래프)을 나타낸다.

도 6은 기존 방법에 따라 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시킨 이중가닥 핵산 분자를 나타낸다.

도 7은 도 6에 나타난 위치의 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시킨 이중가닥 핵산 분자의 다이서 반응 속도(좌측 그래프) 및 유전자 침묵 활성(우측 그래프)을 나타낸다.

도 8은 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 9번째 위치의 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시킴에 따른 이중가닥 핵산의 유전자 침묵 활성을 나타낸다.

도 9는 일 예에 따른 위치 특이적으로 화학적 변형 방법이 적용될 수 있는 다양한 구조의 다이서 기질 RNA를 나타낸다. 도 9에서 붉은색 박스로 표시된 부분은 일 예에 따른 특정 위치에서의 화학적 변형이 도입될 수 있는 부분을 의미한다.

도 10은 일 예에 따라 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 선형 dsRNA의 다이서 반응 속도(좌측 그래프) 및 유전자 침묵 활성(우측 그래프)을 나타낸다.

도 11은 일 예에 따라 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 다양한 구조의 다이서 기질 RNA 구조체의 혈청 안

정성을 측정한 결과를 나타낸다.

도 12는 일 예에 따라 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 다양한 구조의 다이서 기질 RNA 구조체의 면역 유도성을 평가한 결과를 나타낸다.

도 13은 일 예에 따라 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 선형 dsRNA의 인비트로 및 인비보에서 다양한 타겟에 대한 유전자 침묵 활성을 나타낸다.

도 14는 일 예에 따라 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 플랭킹 말단을 갖는 dsRNA의 인비트로에서 타겟(HRRT)에 대한 유전자 침묵 활성을 나타낸다.

도 15는 일 예에 따라 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 Y-RNA 구조체의 인비보에서 타겟(FVII)에 대한 유전자 침묵 활성을 나타낸다.

도 16은 일 예에 따라 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 Y-RNA (nick) 구조체의 인비보에서 다양한 타겟(FVII 및 TTR)에 대한 유전자 침묵 활성을 나타낸다.

도 17 및 도 18은 각각 FVII 및 TTR에 대한 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 다이서 기질 RNA의 농도에 따른 인비보에서 유전자 침묵 효과를 측정한 결과를 나타낸다.

도 19는 일 예에 따른 P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형에서 각 위치에 따른 유전자 침묵 효과 비교 결과를 나타낸다.

도 20 내지 도 24는 일 예에 따른 P(-1)P 위치 특이적 화학적 변형에 따른 결과를 나타낸다.

도 20은 일 예에 따라 P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 선형 dsRNA의 인비트로 유전자 침묵 활성을 나타낸다.

도 21은 일 예에 따라 P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 선형 dsRNA의 인비트로 및 인비보에서 다양한 타겟에 대한 유전자 침묵 활성을 나타낸다.

도 22는 일 예에 따라 P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 Y-RNA (nick) 구조체의 인비보에서 다양한 타겟(FVII 및 TTR)에 대한 유전자 침묵 활성을 나타낸다.

도 23 및 도 24는 각각 FVII 및 TTR에 대한 P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 다이서 기질 RNA의 농도에 따른 인비보에서 유전자 침묵 효과를 측정한 결과를 나타낸다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0205] 본 발명은 하기 실시예를 들어 더욱 자세히 설명할 것이나, 하기 실시예로 권리범위가 한정되는 의도는 아니다.

[0207] **실시예 1. 안티센스 가닥에서의 화학적 변형 위치에 따른 유전자 침묵 효과**

[0208] **실시예 1-1. 안티센스 가닥에서 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 다이서 기질 RNA의 제조**

[0209] 25 내지 35bp의 긴 길이를 갖는 이중가닥 RNA(double strand RNA; 이하, dsRNA)의 경우 세포질 내 효소 단백질인 다이서(Dicer)에 의해 인식되고 20 내지 25bp 정도로 절단되어 타겟 유전자의 침묵효과를 나타내고, 다이서는 dsRNA를 20+2 또는 21+2의 길이로 자른다고 알려져 있다.

[0210] HPRT 및 GFP를 타겟으로 하는 dsRNA를 제조할 수 있는 다이서 기질 RNA 중 센스 가닥의 5’ 말단으로부터 7번째 위치 또는 8번째 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치의 뉴클레오티드가 변형(뉴클레오티드에 포함된 당(sugar ring)의 2’-OH기를 2’-O-메틸기(2’-OMe)로 변형)된 안티센스 가닥을 바이오니아(BIONEER)에서 주문하여 사용하였다. 센스가닥의 5’ 말단으로부터 7번째 및 8번째 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 뉴클레오티드의 안티센스에서의 위치는 각각 다이서 기질 RNA의 안티센스의 5’ 말단으로부터 19번째 위치 및 18번째 위치와 동일하였다. 이하, 센스가닥의 5’ 말단으로부터 7번째 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치의 뉴클레오티드가 2’-O-메틸기로 변형된 안티센스 가닥은 ‘19’ OME 안티센스 가닥’로 명명하고, 센스가닥의 5’ 말단으로부터 8번째 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치의뉴클레오티드가 2’-O-메틸기로 변형된 안티센스 가닥는 ‘18’ OME 안티센스 가닥’으로 명명하였다.

[0211] HPRT 및 GFP를 타겟으로 하는 cleaved product를 제조할 수 있는 다이서 기질 RNA 중 화학적으로 변형되지 않은

뉴클레오티드로 이루어진 센스 가닥 및 안티센스 가닥 또한 바이오니아에서 주문하여 사용하였다. 화학적으로 변형되지 않은 센스 가닥 및 안티센스 가닥과 화학적으로 변형된 뉴클레오티드의 위치가 표시된 안티센스 가닥의 염기 서열을 표 2(HPRT 타겟 sequence) 및 표 3(GFP 타겟 sequence)에 기재하였다. 하기 표 2 및 표 3에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2'-OH기를 2'-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 2

[0213]

가닥	서열 (5'→3')	서열번호
센스 가닥 (변형되지 않음)	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 1
변형되지 않은 안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
18' OME 안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACA**A**AGUCUGGCA	서열번호 3
19' OME 안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAA**G**UCUGGCA	서열번호 4
18/19' OME 안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACA**AG**UCUGGCA	서열번호 5

표 3

[0214]

가닥	서열 (5'→3')	서열번호
센스 가닥 (변형되지 않음)	GCAAGCUGACCCUGAAGUUAUCACC	서열번호 6
변형되지 않은 안티센스 가닥	GGUGAUAACUUCAGGGUCAGCUUGCCA	서열번호 7
18' OME 안티센스 가닥	GGUGAUAACUUCAGGGU**C**AGCUUGCCA	서열번호 8
19' OME 안티센스 가닥	GGUGAUAACUUCAGGGUC**A**GCUUGCCA	서열번호 9

[0215] 다이서 기질 RNA를 제조하기 위해, 하기의 조합으로 각 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 각각 100pmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켰다:

[0216] (1) HPRT 타겟으로 하는 다이서 기질dsRNA: (a) 센스 가닥/변형되지 않은 안티센스 가닥; (b) 센스 가닥/5'으로부터 18번째 뉴클레오티드가 변형된 안티센스 가닥; (c) 센스가닥/5'으로부터 19번째 뉴클레오티드가 변형된 안티센스 가닥; 및 (d) 센스 가닥/5'으로부터 18번째 및 19번째 뉴클레오티드가 변형된 안티센스 가닥

[0217] (2) GFP 타겟으로 하는 다이서 기질 dsRNA: (a) 센스 가닥/안티센스 가닥; (b) 센스 가닥/ 5'으로부터 18번째 뉴클레오티드가 변형된 안티센스 가닥; 및 (c) 센스 가닥/ 5'으로부터 19번째 뉴클레오티드가 변형된 안티센스 가닥.

[0219] **실시예 1-2. 인비트로에서 RT-PCR을 통한 유전자 침묵효과 확인**

[0220] 본 실시예에서, 인비트로(*in vitro*)에서의 실시예 1-1에서 제조한 다이서 기질 RNA의 HPRT 유전자 침묵 효과를 실시간 중합효소연쇄반응 (Real Time(RT)-PCR)을 통해 확인하고자 하였다.

[0221] GFP-KB 세포(GFP(Green fluorescent protein) 발현되도록 제조된 KB 세포)를 RPMI 배지(10% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin)와 함께 96 well transparent culture plate에 0.1 × 10^6 cells/well의 농도로 분주하였다. 24시간 동안 동안 37℃, 5% CO_2조건에서 배양 후 상기 실시예 1-1에서 제조한 HPRT 타겟으로 하는 다이서 기질dsRNA 샘플 4종을 최종 조성물(500㎕) 내 RNA 양이 0.1pmole이 되도록 각각 Lipofectamine ® RNAiMAX(Invitrogen) 과 혼합 후 5분간 상온에서 방치하고, 추가적으로 450㎕의 RPMI 배지를 더해주어 500㎕로 맞춘 뒤 4가지 샘플을 한 웰 당 100㎕씩 처리하여(N=4) 상기 다이서 기질 RNA 샘플을 GFP-KB 세포에 트랜스펙션(transfection)시켰다.

[0222] 그 후 24 시간 동안 배양 후에 CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR(TAKARA)를 이용하여 dsRNA 샘플이 트랜스펙션된 GFP-KB 세포에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II(Takara)와 Forward Primer 및 Reverse primer와 혼합하여 최종 부피가 20㎕가 되도록 준비하였다. 사용한 프라이머 서열은 하기 표 4에 기재하였다. 이 때, RT-PCR용 샘플은 상기 실시예 1-1에서 제조한 다이서 기질 RNA 에 의한 침묵효과를 확인하고자 하는 HPRT 유전자에 대한 샘플 및 결과 보정을 위한 내부 대조군으로 사용할 GAPDH 유전자에 대한 샘플을 준비하였다. RT-CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(Biorad)를 이용하여 PCR 증폭반응을 수행하였다. 증폭은 42℃에서 5분, 95℃에서 10초 후, 95℃ 5초, 60℃ 30초, 72℃ 30초 사이클을 40번 반복하였다. Ct는 threshold cycle을 의미하며, HPRT mRNA의 평균 Ct값에서 내부 대조군 GAPDH

mRNA의 평균 Ct값을 빼준 것을 ΔCt라 하고, 샘플 dsRNA를 처리한 실험군과 RNA를 따로 처리하지 않은 음성 대조군의 ΔCt차이를 ΔΔCt라 한다. delta-delta Ct 계산법을 이용하여 HPRT 발현양의 변화를 구하고, 그 결과값을 도 3의 좌측 그래프에 나타내었다. 분석은 Ordinary one-way ANOVA analysis(Graphpad Prism 6)로 변형된 다이서 기질 RNA처리 군과 변형되지 않은 다이서 기질 RNA 처리 군간의 상관관계를 통하여 유의성을 검증하였다.

표 4

[0223]

명칭	서열(5'->3')	서열번호
HRRT_Forward	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAG	서열번호 10
HRRT_Reverse	GGCTTATATCCAACACTTCGTGGG	서열번호 11
GAPDH_Foward	GGATTTGGTCGTATTGGG	서열번호 12
GAPDH_Reverse	GGAAGATGGTGATGGGATT	서열번호 13

[0224] 도 3의 좌측 그래프에 나타난 바와 같이, 안티센스의 5' 말단으로부터 18번째 뉴클레오티드를 변형시킨 다이서 기질 dsRNA처리군(18' OME)은 변형되지 않은 다이서 기질dsRNA 샘플 처리군(NN) 보다 유전자 침묵효과가 감소하지 않았다. 그러나, 안티센스의 5' 말단으로부터 19번째 뉴클레오티드를 변형시킨 다이서 기질 dsRNA처리군(19' OME)은 NN 보다 유의미하게 HPRT mRNA 발현양이 현저히 증가하였으며, 이는 안티센스의 5' 말단으로부터 18번째 및 19번째 뉴클레오티드를 변형시킨 다이서 기질 dsRNA처리군(18/19' OME)에서도 마찬가지 결과를 나타내었다. 이로부터 안티센스의 5' 말단으로부터 19번째 뉴클레오티드를 변형시킨 것이 다이서 기질 RNA의 유전자 침묵효과를 현저히 감소시킨 것을 알 수 있었다.

[0226] **실시예1-3. 인비트로에서 FACS를 이용한 유전자 침묵효과 확인**

[0227] 본 실시예에서, 인비트로(in vitro)에서의 실시예 1-1에서 제조한 다이서 기질 dsRNA의 GFP 유전자 침묵 효과를 FACS(Fluorescence activated cell sorting)를 통해 확인하고자 하였다.

[0228] GFP-KB 세포를 RPMI 배지와 함께 12 well culture plate에 1.0×10^6 cells/well의 농도로 분주하였다. 24시간 동안 37℃, 5% CO_2조건에서 배양 후, 상기 실시예 1-1에서 제조한 GFP를 타겟으로 하는 다이서 기질 dsRNA 샘플 3종을 0.2pmole씩 Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) 3㎕과 혼합 후 5분간 상온에서 방치하고, 추가적으로 최종농도가 0.2nM이 되도록GFP-KB 세포가 분주된 웰에 세포에 처리한 뒤 48시간 동안 배양하였다. 그 후 GFP-KB 세포의 GFP발현정도를 Novocyte 2060R Flow cytometer(ACEA Biosciences)으로 측정하고, ACEA NovoExpress software로 GFP 발현양을 분석하여 그 결과를 도 3의 우측 그래프에 나타내었다.

[0229] 도 3의 우측 그래프에 나타난 바와 같이, 안티센스의 5' 말단으로부터 18번째 뉴클레오티드를 변형시킨 다이서 기질 RNA처리군(18' OME)은 변형되지 않은 다이서 기질dsRNA 샘플 처리군(NN) 보다 유전자 침묵효과가 감소되지 않았다. 그러나, 안티센스의 5' 으로부터 19번째 뉴클레오티드를 변형시킨 다이서 기질 RNA처리군(19' OME)은 NN 보다 유의미하게 GFP 발현양이 현저히 높았다. 이로부터 안티센스의 5' 말단으로부터 19번째 뉴클레오티드를 변형시킨 것이 유전자 침묵효과를 현저히 감소시킨 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과는 상기 실시예 1-2의 결과와 유사하므로, 유전자 서열에 따른 영향은 없는 것으로 해석된다.

[0230] 따라서, 실시예 1-2 및 1-3의 결과를 바탕으로, 다이서 기질 RNA 중 안티센스 5' 말단으로부터 19번째 위치의 뉴클레오티드 (=센스의 5' 말단으로부터 7번째 위치의 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치의 뉴클레오티드)는 화학적으로 변형시키지 않고, 안티센스 5' 말단으로부터 18번째 위치의 뉴클레오티드(=센스 가닥의 5' 말단으로부터 8번째 위치의 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형시켜 이후 실험을 진행하였다.

[0232] **실시예 2. 화학적 변형의 위치에 따른 효과**

[0233] 본 실시예에서 다이서 기질 RNA 중 센스 가닥 5' 말단으로부터 15번째 이내에 존재하는 뉴클레오티드가 변형된 경우, 16 내지 18번째 뉴클레오티드가 변형된 경우, 및 19 내지 21 번째 뉴클레오티드가 변형된 경우에 다이서 반응 속도 및 인비트로에서 유전자 침묵 효과를 측정하였다.

[0235] **실시예 2-1. 화학적으로 변형된 다이서 기질 RNA 제조**

[0236] HPRT를 타겟으로 하는 cleaved dsRNA를 제조할 수 있는 다이서 기질 RNA를 3 부분을 나누어 각각을 변형시킨 다

이서 기질 RNA를 제조하였다: (1) 변형시키지 않은 다이서 기질RNA (이하, 대조군), (2) 센스 가닥의 5' 말단으로부터 21 내지 23번째에 존재하는 뉴클레오티드 및 센스 가닥의 5' 말단으로부터 19 내지 21 번째 위치의 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치에 존재하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드를 변형시킨 다이서 기질 RNA (이하, 19 내지 21bp 변형군), (3) 센스 가닥의 5' 말단으로부터 15번째 이내에 존재하는 뉴클레오티드 및 이와 상보적으로 결합하는 위치에 존재하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드를 변형시킨 다이서 기질 RNA (이하, ~15bp 변형군), 및 (4) 상기 (3)의 변형 위치에 추가적으로 센스 가닥의 5' 말단으로부터 16내지 18번째 뉴클레오티드 및 이와 상보적으로 결합하는 위치에 존재하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드까지 변형시킨 다이서 기질 RNA (이하, ~15bp + 16 내지 19bp 변형군). 각 군의 구체적인 변형 위치는 하기 표 5에 기재하였다. 하기 표 5에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2' -OH기를 2' -O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 5

[0238]

가닥		서열 (5' →3')	서열번호
변형 없음	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 1
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
19-21bp 변형	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGA**AGU**GC	서열번호 14
	안티센스 가닥	GCAC**UUC**AAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 15
~15bp 변형	센스 가닥	**CC**AGA**CUUUGUU**GGAUUUGAAGUGC	서열번호 16
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUC**C**AA**C**AAAGUCUGG**C**A	서열번호 17
~15bp + 16-19bp 변형	센스 가닥	**CC**AGA**CUUUGUU**GGA**UUU**GAAGUGC	서열번호 18
	안티센스 가닥	GCACUU**C**AAAUC**C**AA**C**AAAGUCUGG**C**A	서열번호 19

[0239] 상기 표 5의 염기서열로 이루어진 센스 가닥 및 안티센스 가닥과 표 5에 표시된 위치의 뉴클레오티드가 변형(2' -O-메틸기)된 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 바이오니아에서 주문한 센스 가닥과 안티센스 가닥을 각각 100 pmole을 혼합하고, thermal cycler(Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켰다.

[0241] **실시예 2-2. 다이서 반응 속도 분석(Dicer kinetic analysis)**

[0242] 상기 실시예 2-1에서 제조한 4종의 다이서 기질 RNA 샘플10pmole씩을 재조합 인간 다이서(Recombinant human Dicer) 5 pmole, 1㎕의 다이서 반응 완충액(300mM Tris-HCl(pH 6.8), 500mM NaCl), 2㎕의 DEPC-처리된 탈이온수(DW), 2㎕의 25mM $MgCl_2$과 혼합하고, 이 혼합물을 thermal cycler 내에서 37℃에서 6시간 동안 배양하여 다이서가 다이서 기질RNA 를 절단하도록 하였다.

[0243] 반응 0, 1, 3, 6시간 후에 각 샘플에서 1㎕씩 채취하여 1X Tris-borate-EDTA(TBE) buffer 8㎕, 6X gel loading dye(Biolabs) 2㎕와 혼합하여 전기영동용 샘플을 준비하였다. 15well짜리 10% PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)의 각 well에 11㎕씩 로딩하였다. 40분 동안 200V로 gel running 후 gel을 Gel red(Biotium)로 염색하여 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 겔 이미지를 얻었다. 반응0시간을 기준으로 하여 다이서 기질 밴드 두께 변화를 이용하여 Dicer cleavage(%) 정도를 계산하고 그 결과를 도 5a 및 도 5b의 좌측 그래프에 기재하였다.

[0244] 도 5a 및 도 5b의 좌측 그래프에 나타난 바와 같이, 19-21bp 변형군은 변형되지 않은 화학적 변형되지 않은 대조군 보다 다이서 기질 RNA의 다이서 프로세싱 속도가 감소하였고, ~15bp + 16-19bp 변형군은 ~15bp 변형군 보다 다이서 기질 RNA의 다이서 프로세싱 속도는 감소하였다.

[0246] **실시예 2-3. 인비트로에서 RT-PCR을 통한 유전자 침묵 효과 확인**

[0247] 본 실시예에서 상기 실시예 2-1에서 제조한 4종의 다이서 기질 RNA를 상기 실시예 1-2 방법과 유사하게 GFP-KB 세포에 처리하고, 인비트로에서 타겟 유전자인 HRRT에 대한 침묵 효과를 RT-PCR을 통해 측정하여 그 결과를 도 5a 및 도 5b의 우측 그래프에 나타내었다. 분석은 Ordinary one-way ANOVA analysis(Graphpad Prism 6)로 각 변형된 다이서 기질RNA 처리군과 변형되지 않은 다이서 기질 RNA 처리군과의 상관관계를 통하여 유의성을 검증하였다.

[0248] 도 5a 및 도 5b의 우측 그래프에 나타난 바와 같이, 19-21bp 변형군은 변형되지 않은 화학적 변형되지 않은 대조군 보다 유전자 침묵 효과가 현저히 감소하였으며, ~15bp + 16-19bp 변형군은 ~15bp 변형군 보다 유전자 침묵 효과가 감소하였다.

[0249] 따라서, 이후의 실시예에서는 센스 가닥의 5' 말단으로부터 15번째 이내의 뉴클레오티드 및 이에 상보적으로 결합하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시킨 다이서 기질 RNA에 대해 실험을 진행하였다.

[0251] **실시예 3. 센스 가닥에서 5' 말단으로부터 15번째 이내에 존재하는 뉴클레오티드에 화학적 변형에 따른 효과**

[0252] 센스 가닥에서 5' 말단으로부터 15번째 이내에 존재하는 뉴클레오티드 및 및 이와 상보적으로 결합하는 위치에 존재하는 안티센스 가닥의 화학적 변형에 따른 효과를 살펴보기 위하여, 본 실시예에서 기존의 화학적 변형 방법으로 알려진 (1) C 및 U 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시키는 C/U 서열 기반 변형 방법(C/U sequence-based modification) 및 (2) 센스와 안티센스 가닥에서 교대로 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시키는 교대 변형 방법(Alternating modification)을 이용하여 HPRT를 타겟으로 하는 다이서 기질 dsRNA를 제조하고 이의 다이서 반응 속도 및 인비트로에서 유전자 침묵 효과를 측정하였다. C/U 서열 기반 변형 방법과 교대 변형 방법에 따른 다이서 기질 RNA의 화학적 변형 위치를 도 6에 나타내었다. 도 6에서 적색으로 표시된 위치의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 나타낸다.

[0254] **실시예 3-1. 화학적으로 변형된 다이서 기질 RNA의 제조**

[0255] 상기 실시예 2의 결과를 바탕으로 센스 가닥의 5' 말단으로부터 15번째 이내의 뉴클레오티드 및 이에 상보적으로 결합하는 위치에 존재하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시킨 다이서 기질 RNA에 대해 실험을 진행하고자 하였다.

[0256] HPRT를 타겟으로 하는 다이서 기질 dsRNA 의 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 뉴클레오티드를 (1) C/U 서열-기반 변형 방법(C/U sequence-based modification) 및 (2) 교대 변형 방법(Alternating modification)을 이용하여, 하기 표 6에 기재된 위치의 뉴클레오티드를 변형시킨 센스 및 안티센스 가닥을 바이오니아에서 주문하여 사용하였다. 하기 표 6에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2' -OH기를 2' -O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 6

[0258]

가닥		서열 (5' →3')	서열번호
변형되지 않음 (Non-mod)	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 1
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
C/U 서열 기반 변형 (C/U-mod)	센스 가닥	**CC**AGA**CUUU**G**UU**GGAUUUGAAGUGC	서열번호 20
	안티센스 가닥	GCACUUCAAA**UCC**AA**C**AAAG**UCU**GG**C**A	서열번호 21
교대 변형 (Alternating -mod)	센스 가닥	C**C**A**G**A**C**U**U**G**U**U**GG**AUUUGAAGUGC	서열번호 22
	안티센스 가닥	GCACUUCAAA**U**C**C**A**A**C**A**A**AG**U**C**U**GG**CA	서열번호 23

[0259] 바이오니아에서 주문한 센스 가닥과 안티센스 가닥을 각각 100 pmole씩 혼합하고, thermal cycler(Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켰다.

[0261] **실시예 3-2. 다이서 반응 속도 분석(Dicer kinetic analysis)**

[0262] 상기 실시예 3-1에서 제조한3종의 다이서 기질 RNA 샘플을 사용하여 상기 실시예 2-2방법과 같이, Dicer cleavage(%) 정도를 계산하고 그 결과를 도 7의 좌측 그래프에 나타내었다.

[0263] 도 7에 나타난 바와 같이, 센스 가닥의 5' 말단으로부터 15번째 이내의 뉴클레오티드 및 이에 상보적으로 결합하는 위치에 존재하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시킨 다이서 기질 RNA는 변형 방법(C/U 서열-기반 변형 방법 또는 교대 변형 방법)에 상관 없이 변형되지 않은 다이서 기질 RNA 와 비교하였을 때 다이서 프로세싱 속도는 감소하지 않았다.

[0265] **실시예 3-3. 인비트로에서 RT-PCR을 통한 유전자 침묵효과**

[0266] 본 실시예에서 상기 실시예 3-1에서 제조한 3종의 다이서 기질 RNA를 상기 실시예 1-2 방법과 유사하게 GFP-KB 세포에 처리하고, 인비트로에서 타겟 유전자인 HRRT에 대한 침묵 효과를 RT-PCR을 통해 측정하여 그 결과를 도 7의 우측 그래프에 나타내었다. 분석은 Ordinary one-way ANOVA analysis(Graphpad Prism 6)로 각 변형된 다이서 기질RNA 처리군과 변형되지 않은 다이서 기질 RNA 처리군과의 상관관계를 통하여 유의성을 검증하였다.

[0267] 도 7에 나타난 바와 같이, C/U 서열-기반 변형 방법 또는 교대 변형 방법에 의해, 센스 가닥의 5' 말단으로부터 15번째 이내의 뉴클레오티드 및 이에 상보적으로 결합하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형된 다이서 기질 RNA는 모두 인비트로에서 유전자 침묵 효과가 감소되었다.

[0269] **실시예 4. 센스 가닥에서 5' 말단으로부터 9번째에 존재하는 뉴클레오티드 변형에 따른 효과**

[0270] 센스 가닥의 5' 말단으로부터 15번째 이내의 뉴클레오티드 및 이에 상보적으로 결합하는 위치에 존재하는 안티센스 가닥의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되었음에도 다이서 프로세싱 속도 및 인비트로에서 유전자 침묵 효과를 감소시키지 않으면서, 인비보에서 유전자 침묵 효과를 증가시킬 수 있는 화학적 변형 방법을 고안하고자 하였다.

[0272] **실시예 4-1. 위치 특이적으로 변형된 다이서 기질 RNA 제조**

[0273] 하기 표 7에 기재된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 5' 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 및 14번째 위치가 화학적으로 변형된 센스 가닥과 상기 센스 가닥의 가닥의 5' 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째 위치의 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형된 안티센스 가닥을 포함하도록 위치 특이적 방법으로 다이서 기질 dsRNA를 제조하였고, 이를 추후 실시예에서 P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형 방법으로 지칭하였다. 위치 특이적 변형 방법에서, 다이서 기질 RNA 중 5' 말단으로부터 9번째 위치의 뉴클레오티드가 변형된 경우 유전자 침묵 및 다이서 절단 과정에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 하기 표 7에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2'-OH기를 2'-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 7

[0275]

가닥		서열 (5'->3')	서열번호
변형되지 않음	센스 가닥	GCAAGCUGACCCUGAAGUUAUCACC	서열번호 6
	안티센스 가닥	GGUGAUAACUUCAGGGUCAGCUUGCCA	서열번호 7
위치 특이적 변형 (9'-OMe 포함)	센스 가닥	**G**CA**AG**C**U**G**A**CCCU**G**AAGUUAUCACC	서열번호 24
	안티센스 가닥	GGUGAUAACUUC**AGGG**U**C**A**G**CU**UG**CCA	서열번호 25
위치 특이적 변형 (9'-OMe 미포함)	센스 가닥	**G**CA**AG**C**U**GACCCU**G**AAGUUAUCACC	서열번호 26
	안티센스 가닥	GGUGAUAACUUC**AGGG**U**C**A**G**CU**UG**CCA	서열번호 25

[0276] 바이오니아에서 주문한 센스 가닥과 안티센스 가닥을 각각 100 pmole씩 혼합하고, thermal cycler(Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜, (1) 화학적으로 변형되지 않은 대조군 (non-mod), (2) 9'-OMe의 화학적 변형을 추가적으로 포함하는 P(+1)P 위치 특이적으로 변형된 다이서 기질 dsRNA (PP wt 9nt mod), (3) 9'-OMe 화학적 변형을 포함하지 않는 P(+1)P 위치 특이적으로 변형된 다이서 기질 dsRNA (PP wo 9nt mod)를 제조하였다.

[0278] **실시예 4-2. FACS를 이용한 유전자 침묵효과 확인**

[0279] 상기 실시예 4-1에 제조한 다이서 기질 dsRNA 샘플 3종을 GFP-KB 세포에 처리하고, 실시예 1-3의 방법과 유사하게 인비트로에서 타겟 유전자인 GFP의 발현양을 FACS를 통해 측정하여, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0280] 도 8에 나타난 바와 같이, 9'-OMe의 화학적 변형을 추가적으로 포함하는 P(+1)P 위치 특이적으로 변형된 다이서 기질 dsRNA 는 화학적으로 변형되지 않은 다이서 기질 RNA 대비 GFP에 대한 유전자 침묵 효과가 감소하였다. 반면에, 9'-OMe 화학적 변형을 포함하지 않는 P(+1)P 위치 특이적으로 변형된 다이서 기질 dsRNA는 화학적 변형되지 않은 다이서 기질 RNA 대비 GFP에 대한 유전자 침묵효과가 감소하지 않았다.

[0282] **실시예 5. P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 다이서 기질 RNA**

[0283] 상기 실시예 3 및 4의 결과를 바탕으로, 5' 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 및 14번째 위치가 화학적으로 변형된 센스 가닥과 상기 센스 가닥의 가닥의 5' 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째 위치의 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형된 안티센스 가닥을 포함하도록 위치 특이적 방법으로 다이서 기질 dsRNA를 제조하였고, 이를 추후 실시예에서 P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형 방법으로 지칭하였다.

[0284] P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 다이서 기질 dsRNA를 제조하고 이의 다이서 반응 속도 및 인비트로에

서 유전자 침묵 효과를 측정하였다. 일 예에 따른 위치 특이적인 방법으로 화학적 변형시킨 다이서 기질 dsRNA의 구조의 예를 도 9에 도시하였다.

[0286] **실시예 5-1. 위치 특이적으로 화학적 변형시킨 다이서 기질 RNA 의 제조**

[0287] Cleaved dsRNA(다이서에 의해 절단된 생성물 dsRNA, cleaved product)를 제조할 수 있는 선형 다이서 기질 RNA를 제조하기 위하여, 하기 표 8에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 8에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2'-OH기를 2'-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 8

[0288]

가닥		서열 (5'→3')	서열번호
화학적 변형되지 않음 (NN)	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 1
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
P(+1)P 위치 특이적 변형	센스 가닥	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGC	서열번호 27
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 28
C/U 서열 기반 변형	센스 가닥	**CC**AGA**CUUUG**U**U**GGAUUUGAAGUGC	서열번호 20
	안티센스 가닥	GCACUUCAAA**UCC**AA**C**AAAG**UCU**GG**C**A	서열번호 21
교대 변형	센스 가닥	C**C**A**G**AC**UU**G**U**G**G**AUUUGAAGUGC	서열번호 22
	안티센스 가닥	GCACUUCAAA**UCC**AA**C**A**A**AG**UCU**GG**C**A	서열번호 23

[0289] 바이오니아에서 주문한 센스 가닥과 안티센스 가닥을 각각 100 pmole씩 혼합하고, thermal cycler(Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화하여, HRRT를 타겟으로 하는 cleaved dsRNA를 제조할 수 있는 (1) 화학적 변형되지 않은 대조군 (NN), (2) P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 다이서 기질 선형 dsRNA (P(+1)P), (3) C/U 서열 기반 화학적 변형된 다이서 기질 선형dsRNA (CU-mod), 및 (4) 교대 변형 방법에 따라 화학적 변형된 다이서 기질 선형 dsRNA (Alt-mod)를 제조하였다.

[0291] **실시예 5-2. 인비트로에서 P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형에 따른 다이서 반응 속도 분석 및 유전자 침묵 효과 측정**

[0292] 상기 실시예 5-1에서 제조한 다이서 기질 RNA 샘플 4종을 사용하여 상기 실시예 2-2 방법과 같이 Dicer cleavage(%) 정도를 계산하고, 그 결과를 도 10의 좌측 그래프에 나타내었고, 인비트로에서 타겟 유전자인 HRRT에 대한 침묵 효과를 RT-PCR을 통해 측정하여 그 결과를 도 10의 우측 그래프에 나타내었다.

[0293] 도 10의 좌측 그래프에 나타난 바와 같이, 화학적으로 변형되지 않은 다이서 기질 RNA, 교대 변형 방법에 따른 다이서 기질 RNA, 및 상기 실시예 5-1의 방법과 같이 위치 특이적으로 변형시킨 다이서 기질 RNA는 모두 다이서 프로세싱 속도가 감소하지 않았다. 도 10의 우측 그래프에 나타난 바와 같이, 인비트로 상에서 위치 특이적으로 화학적 변형된(P(+1)P) 다이서 기질 RNA의 유전자 침묵 효과는 변형되지 않은 다이서 기질 RNA 대비 감소하지 않았다. 반면, 교대 변형 방법 및 C/U 서열 기반 변형 방법으로 화학적 변형된 다이서 기질 RNA 의 경우에는 변형되지 않은 다이서 기질 RNA 대비 유전자 침묵효과는 감소하였다.

[0295] **실시예 6. P(+1)P위치 특이적으로 화학적 변형된 다이서 기질 RNA의 혈청 안정성 평가**

[0296] P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형된 다양한 구조의 다이서 기질 RNA 구조체 (선형 dsRNA, Y-RNA 구조체, 및 닉(nick)을 포함하는 Y-RNA 구조체)에 대한 혈청 안정성을 평가하고자 하였다.

[0298] **실시예 6-1. 화학적 변형된 다이서 기질 RNA 제조**

[0299] Cleaved dsRNA를 제조할 수 있는 다양한 다이서 기질 RNA를 제조하기 위하여, 하기 표 9에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥과 siRNA 를 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 9에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2'-OH기를 2'-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 9

[0300]

가닥		서열 (5'→3')	서열번호
siRNA (19+2, 화학적 변형되지 않음)	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGTT	서열번호 29
	안티센스 가닥	CAAAUCCAACAAAGUCUGGTT	서열번호 30

화학적 변형되지 않은 다이서 기질 선형 RNA	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 1
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
P(+1)P 위치 특이적 변형된 선형 RNA	센스 가닥	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGC	서열번호 27
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 28
P(+1)P 위치 특이적 변형된 Y-RNA (nick)	가닥 1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGA**CU** **UG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 31
	가닥 2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUAG**AG** **CA**A**G**A**A**CA**CU**GCA	서열번호 32
	가닥 3(mTTR sense)	**C**AG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 34
	가닥 4 (HPRT, antisense)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 28
P(+1)P 위치 특이적 변형된 Y-RNA	가닥 1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGA**CU** **UG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 31
	가닥 2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUAG**AG** **CA**A**G**A**A**CA**CU**GCA	서열번호 32
	가닥 3(mTTR/HPRT)	**C**AG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACGGCACUUCAAAUC**CA** **AC**AAAG**U**C**UG**GCA	서열번호 33

[0301] 센스 가닥과 안티센스 가닥을 각각 100 pmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜 siRNA와 선형 dsRNA를 제조하였다.

[0302] Y-RNA 구조체 또는 닉을 갖는 Y-RNA 구조체는 3개 또는 4개의 가닥을 각각 100pmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜 제조하였다. Y-RNA 구조체는 각각 HRRT, FVII, mTTR을 타겟으로 하는 cleaved dsRNA를 제조할 수 있는 선형 dsRNA를 팔(arm)에 포함하는 방사형 구조의 핵산 구조체이다. 닉을 갖는 Y-RNA 구조체는 HRRT, FVII, mTTR을 타겟으로 하는 cleaved dsRNA를 제조할 수 있는 선형 dsRNA를 팔(arm)에 포함하는 방사형 구조의 핵산 구조체로서 중심부에 닉 (nick, 틈)을 갖는다. 선형 dsRNA, Y-RNA, 닉을 갖는 Y-RNA 구조체의 구조는 도 9에 나타내었다.

[0304] **실시예 6-2. 혈청 안정성 평가 (Serum stability test)**

[0305] 아무 처리하지 않은 C57bl/6NCrSlc (female, 18-22g) 마우스의 혈액을 채취한 뒤 4℃, 2000g 조건으로 15 분 동안 원심분리하고, 혈청을 분리하였다. 상기 실시예 6-1에서 준비한 RNA 샘플 11pmole을 $MgCl_2$와 마우스 혈청 (mouse serum)에 넣고 최종 부피가 44㎕가 되도록 맞추어 주었다. 이 때 RNA 샘플의 최종 농도는 0.25 μM, $MgCl_2$의 최종 농도는 5mM였다. 37℃에서 10 시간 동안 배양하면서 혈청 내 각 RNA 샘플의 안정성(stability)을 비교하였다. 반응 후 0, 2, 4, 6, 8, 10시간 째에 각 샘플에서 4㎕씩 채취하여 0.5M EDTA 1㎕, 1X TBE buffer 6㎕, 6X gel loading dye(Biolabs) 2.2㎕와 혼합하여 각 시간에서 반응을 멈추게 했다. 10% 나 15% PAGE gel에 well당 13.2㎕씩 로딩하여 150V, 30분 또는 200V, 40분동안 gel running 하였다. Gel red(Biotium)로 gel을 염색 후 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 겔 이미지를 얻고 그 결과를 도 11의 우측 이미지로 나타내었다. 0시간 기준 oligo band 두께 변화를 이용하여 혈청 안정성을 계산하고 그 결과를 그래프로서 도 11의 좌측 그래프로 나타내었다.

[0306] 도 11에 나타난 바와 같이, 다이서 기질 선형 dsRNA(NN)는 siRNA 보다 혈청 안정성이 우수하며, 다이서 기질 dsRNA가 일 예에 따른 위치 특이적 방법으로 화학적 변형된 경우 선형 구조체(P(+1)P), Y-RNA 구조체(P(+1)P Y-RNA), 및 닉을 갖는 Y-RNA 구조체(P(+1)P Y-RNA (nick)) 모두 화학적 변형되지 않은 다이서 기질(NN) 보다 혈청 안정성이 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0308] **실시예 7. P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 다이서 기질 RNA의 면역 유도성 평가**

[0309] **실시예 7-1. 화학적으로 변형된 다이서 기질 RNA 제조**

[0311] Cleaved dsRNA 를 제조할 수 있는 다양한 다이서 기질 RNA를 제조하기 위하여, 하기 표 10에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥과 siRNA 를 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 10에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2'-OH기를 2'-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 10

[0312]

가닥			서열 (5' →3')	서열번호
siRNA (19+2, 화학적 변형되지 않음)	HPRT	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGTT	서열번호 29
		안티센스 가닥	CAAAUCCAACAAAGUCUGGTT	서열번호 30
	mTTR	센스 가닥	CAGUGUUCUUGCUCUAUAATT	서열번호 35
		안티센스 가닥	UUAUAGAGCAAGAACACUGTT	서열번호 36
	FVII	센스 가닥	GGAUCAUCUCAAGUCUUACTT	서열번호 37
		안티센스 가닥	GUAAGACUUGAGAUGAUCCTT	서열번호 38
화학적 변형되지 않은 다이서 기질 선형 RNA (NN)	HPRT	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 1
		안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
	mTTR	센스 가닥	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACG	서열번호 39
		안티센스 가닥	CGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 40
	FVII	센스 가닥	GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACC	서열번호 41
		안티센스 가닥	GGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 42
P(+1)P 위치 특이적 변형된 다이서 기질 선형 RNA	HPRT	센스 가닥	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGC	서열번호 27
		안티센스 가닥	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**AG**U**C**UG**GCA	서열번호 28
	mTTR	센스 가닥	**C**AG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 34
		안티센스 가닥	CGUCUAUUAUAG**AGCA**AG**A**ACA**CU**GCA	서열번호 43
	FVII	센스 가닥	**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACC	서열번호 44
		안티센스 가닥	GGUGAUGUAAGA**CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 45
화학적 변형되지 않은 Y-RNA	가닥 1 (HPRT/FVII)		CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 46
	가닥 2 (FVII/mTTR)		GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACCCGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 47
	가닥 3 (mTTR/HPRT)		CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACGGCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 48
P(+1)P 위치 특이적 변형된 Y-RNA	가닥 1 (HPRT/FVII)		**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGA**CU**UG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 31
	가닥 2 (FVII/mTTR)		**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUAG**AG**CA**A**G**A**A**C**A**CU**GCA	서열번호 32
	가닥 3(mTTR/HPRT)		**C**AG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACGGCACUUCAAAUC**CA**AC**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 33
화학적 변형되지 않은 Y-RNA (nick)	가닥 1 (HPRT/FVII)		CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 46
	가닥 2 (FVII/mTTR)		GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACCCGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 47
	가닥 3 (mTTR sense)		CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACG	서열번호 39
	가닥 4 (HPRT,antisense)		GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
P(+1)P 위치 특이적 변형된 Y-RNA (nick)	가닥 1 (HPRT/FVII)		**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGA**CU**UG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 31
	가닥 2 (FVII/mTTR)		**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUAG**AG**CA**A**G**A**A**C**A**CU**GCA	서열번호 32
	가닥 3 (mTTR sense)		**C**AG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 34
	가닥 4 (HPRT,antisense)		GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**AG**U**C**UG**GCA	서열번호 28

[0313] 센스 가닥과 안티센스 가닥을 각각 500 pmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜, siRNA와 선형 dsRNA를 제조하였다.

[0314] Y-RNA 구조체 또는 닉을 갖는 Y-RNA 구조체는 3개 혹은 4개의 가닥을 각각 100pmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜 제조하였다.

[0316] **실시예 7-2. 면역 분석 (Immune assay)**

[0317] P(+1)P 위치 특이적 방법으로 변형한 다이서 기질 RNA의 면역 유도 감소 효과를 살펴보기 위해 상기 실시예 7-1에서 제조한 다이서 기질 RNA를 포함하는 지질 나노입자를 제조하였다. 서열에 의한 면역 유도 효과의 차이를 줄이기 위해 선형의 다이서 기질 RNA의경우 Y-RNA의 3개의 각 팔(arm)에 지닌 HPRT, mTTR, FVII 3가지 target에 대한 oligo들을 1:1:1로 섞어서 사용하였다.

[0318] 지질을 함유하는 에탄올상과 1에서 준비한 핵산 샘플을 함유하는 수용액상을 50mM sodium acetate buffer에 1:3(에탄올상:수용액상)의 부피 비율로 pipetting으로 혼합하여 지질 나노입자(lipid nanoparticle)를 합성하였다. 에탄올상은 이온화 가능한 지질인 C12-200(Wuxi AppTec (Shanghai, China)), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphochloine (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), cholesterol (Sigma), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (Avanti)를 50:10:38.5:1.5의 몰비율로 함유하며 C12-200과 핵산의 무게 비율은 5:1이었다.

[0319] 제조된 지질 나노입자의 농도는 리보그린 분석(Ribogreen assay)을 통하여 측정하였다. Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit (Invitrogen)을 이용하여 제조사의 매뉴얼 대로 리보그린 분석을 진행하였고 LNP의 캡슐화 효율을 계산하여 cell에 처리해 줄 최종 LNP 양을 결정하였다.

[0320] ATCC 사에서 구입한 human Peripheral blood mononuclear cells(PBMCs)을 RPMI 배지(10% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin)와 함께 24 well plate에 5×10^5cells/well의 농도로 450㎕씩 분주하였다. 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하여 세포를 안정화 시킨 후, 각 well에 상기에서 제조한 지질 나노입자를 최종 농도가 100nM이 되도록 50㎕씩 처리해주어 PBMCs를 transfection 시켰다. 50㎕의 배지만 처리해준 well과 핵산 없이 lipid 구성 성분만 처리해준 well의 세포를 대조군으로 사용했다. 이 때 각 다이서 기질 RNA 샘플 당 처리해준 well 수는 n=3으로 cytokine 정량 분석 후 통계적 유의성을 구하고자 하였다.

[0321] 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건에서 추가 배양 후, 배지를 모아 400g 4℃ 5min간 원심분리 하여 상층액을 분리하였다. 상층액에 들어 있는 인간 TNF-α 및 IFN -α의 양을 효소 면역 분석법을 이용하여 정량하였다. 상층액의 cytokine 분석은 Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit(R&D system), Human IFN Alpha ELISA Kit(PBL Assay Science)를 이용하였고 제조사의 매뉴얼을 따라서 진행 후 Infinite M200 Pro(Tecan)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 분석은 One-way ANOVA analysis(Graphpad Prism 6)로 non-modification conventional siRNA(19+2)와 다른 Dicer substrate RNA들 및 Position specific modification Y-RNA간 면역반응 유도 정도를 비교하고 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0322] 도 12에 나타난 바와 같이, 일 예에 따라 위치 특이적으로 dsRNA 기질에 화학적 변형이 도입된, 선형 구조체(P(+1)P), Y-RNA 구조체(P(+1)P Y-RNA), 및 닉을 갖는 Y-RNA 구조체(P(+1)P Y-RNA(nick))에서 모두 화학적 변형되지 않은 구조체(NN, NN Y-RNA, NN Y-RNA(nick)) 대비 면역 유도 정도가 감소하였다, 이로부터, 일 예에 따라 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 다이서 기질 RNA는 생체 내에서 안정성이 증가하는 동시에 면역유도성은 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0324] **실시예 8. P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 다이서 기질 선형 RNA**

[0326] **실시예 8-1. 화학적 변형된 다이서 기질 RNA 제조**

[0327] Cleaved dsRNA 를 제조할 수 있는 선형 다이서 기질 RNA를 제조하기 위하여, 하기 표 11 및 표 12에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥과 siRNA 를 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 11 및 표 12에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2'-OH기를 2'-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다. 표 11은 인비트로 유전자 침묵 활성을 살펴보기 위해 제조된 선형 다이서 기질 RNA 에 대한 서열이고, 표

12은 인비보 유전자 침묵 활성을 살펴보기 위해 제조된 선형 다이서 기질 RNA에 대한 서열을 나타낸다.

표 11

[0329]

가닥			서열 (5’ →3’)	서열번호
HPRT target	화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 1
		안티센스	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
	P(+1)P 변형된 선형 RNA	센스	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 27
		안티센스	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 28
eGFP target	화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스	GCAAGCUGACCCUGAAGUUAUCACC	서열번호 6
		안티센스	GGUGAUAACUUCAGGGUCAGCUUGCCA	서열번호 7
	P(+1)P 변형된 선형 RNA	센스	GCAAGCUGACCCUGAAGUUAUCACC	서열번호 26
		안티센스	GGUGAUAACUUCAGGGUCAGCUUGCCA	서열번호 25
TP53 target	화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스	ACCAGGGCAGCUACGGUUUAAGUGC	서열번호 49
		안티센스	GCACUUAAACCGUAGCUGCCCUGGUCA	서열번호 50
	P(+1)P 변형된 선형 RNA	센스	ACCAGGGCAGCUACGGUUUAAGUGC	서열번호 51
		안티센스	GCACUUAAACCGUAGCUGCCCUGGUCA	서열번호 52

표 12

[0330]

가닥			서열 (5’ →3’)	서열번호
FVII target	화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스	GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACC	서열번호 41
		안티센스	GGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 42
	P(+1)P 변형된 선형 RNA	센스	GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACC	서열번호 44
		안티센스	GGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 45
Mouse TTR target	화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACG	서열번호 39
		안티센스	CGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 40
	P(+1)P 변형된 선형 RNA	센스	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACG	서열번호 34
		안티센스	CGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 43

[0331] 센스 가닥과 안티센스 가닥을 같은 몰수로 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜 선형 구조를 갖는 다이서 기질 RNA 를 제조하였다.

[0333] **실시예 8-2. 유전자 침묵 효과 측정**

[0335] **(RT-PCR을 이용한 인비트로 유전자 침묵효과 확인) - HRRT 및 TP53 타겟**

[0336] 상기 실시예 8-1에서 제조한 선형 다이서 기질 RNA(표 11)를 상기 실시예 1-2의 방법과 유사하게 RT-PCR을 통해 타겟 유전자인 HRRT 및 TP53 에 대한 유전자 침묵 효과를 측정하고, 그 결과를 도 13에 나타내었다. TP53에 대한 프라이머 서열은 하기 표 13에 기재하였다.

표 13

[0337]

명칭	서열(5'->3')	서열번호
TP53_Foward	TTCCGAGAGCTGAATGAGGC	서열번호 53
TP53_Reverse	GAAGTGGAGAATGTCAGTCTGAGTC	서열번호 54

[0338] **(FACS를 이용한 인비트로 유전자 침묵효과 확인) - GFP 타겟**

[0339] 상기 실시예 8-1에서 제조한 선형 다이서 기질 RNA(표 11)를 GFP-KB 세포에 처리하고, 실시예 1-3의 방법과 유사하게 인비트로에서 타겟 유전자인 GFP의 발현양을 FACS를 통해 측정하여, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0341] **(ELISA를 이용한 인비보 유전자 침묵 효과 확인) - TTR 타겟**

[0342] 상기 실시예 8-1에서 제조한 선형 다이서 기질 RNA를 포함하는 지질 나노 입자를 제조하였다. 지질을 함유하는 에탄올상과 1에서 준비한 핵산 샘플을 함유하는 수용액상을 50mM acetate buffer에 1:3(에탄올상:수용액상)의 부피 비율로 microfluidic chip에서 혼합하여 지질 나노입자(lipid nanoparticle)를 합성하였다. 에탄올상은

이온화 가능한 지질인 C12-200(Wuxi AppTec (Shanghai, China)), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphochloine (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), cholesterol (Sigma), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (Avanti)를 50:10:38.5:1.5의 몰비율로 함유하며 C12-200과 핵산의 무게 비율은 5:1이었다. 6주령의 C57bl/6NCrSlc 마우스(Charles River Labs, female, 18-22g)에 상기에서 제조한 지질 나노 입자를 0.01mg/kg의 용량으로 꼬리 정맥 주사(tail IV injection)하였다. 각 샘플 그룹 당 마우스 3마리에 주입하였고 mTTR 분석 시 대조군으로 사용할 마우스 3마리, TTR 발현율 계산 시 normalization을 위해 사용할 PBS 주입 마우스는 3마리였다. Injection한 지 72시간 후 마우스의 뺨에서 채혈하여 마우스의 혈장(plasma)을 얻었다. Mouse 혈중 TTR 농도 정량에는 Mouse Prealbumin ELISA kit (ALPCO)를 이용하였다. 제조사 매뉴얼 대로 혈장 샘플을 희석하여 반응 진행 후 Infinite M200 Pro(Tecan)로 450nm에서 흡광도를 측정하고 TTR 농도를 정량하여 그 결과를 도 13에 나타내었다. 분석은 one-way ANOVA analysis(Graphpad Prism 6)로 위치 특이적 변형이 유전자 침묵 효과에 미치는 영향을 확인하였다.

[0344] **(발색 분석(Chromogenic assay)을 이용한 인비보 유전자 침묵 효과 확인) - FVII 타겟**

[0345] 사용한 동물은 태어난 지 6주된 C57bl/6NCrSlc (Charles River Labs, female, 18-22g)로 mouse 무게는 20g이라고 보고, 상기와 같이 각 RNA 샘플 (FVII 타겟)들을 지질 나노입자로 제형화하여, RNA 0.03mg/kg의 용량으로 100ul씩 tail IV injection을 이용하여 주입하였다. 각 샘플 군당 mouse 3마리에 주입하였고 FVII 분석 시 standard curve를 얻기 위한 mouse 3마리, positive control로 사용할 PBS 주입 mouse는 3마리였다. Injection한 지 72시간 후 mouse의 뺨에서 채혈하여 쥐의 plasma를 얻었다. 혈중 FVII 발현양 분석은 COASET Factor VII kit (Chromogenix)를 이용하였고 Infinite M200 Pro(Tecan)로 405nm에서 흡광도를 측정하고, FVII 발현양을 분석하여 그 결과를 도 13에 나타내었다. 분석은 one-way ANOVA analysis(Graphpad Prism 6)로 대조군 (화학적 변형되지 않은 다이서 기질 RNA)과 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 다이서 기질 RNA의 인비보 유전자 침묵효과 차이의 유의성을 확인하였다.

[0347] 도 13에 나타난 바와 같이, 인비트로 상에서 일 예에 따른 위치 특이적으로 화학적 변형된 dsRNA는 유전자 침묵 활성이 대조군 대비 감소되지 않았으며, 인 비보 상에서 위치 특이적으로 화학적 변형된 dsRNA는 유전자 침묵활성이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 결과는 다양한 유전자를 타겟으로 하는 서열을 포함하는 경우에도 유사한 결과를 나타내므로 일 예에 따른 위치 특이적 화학적 방법에서 유전자 서열에 따른 영향은 없는 것으로 해석된다.

[0349] **실시예 9. P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 플랭킹 말단을 갖는 dsRNA (flanking end dsRNA)의 유전자 침묵 효과**

[0350] 본 실시예에서 플랭킹 말단을 갖는 다이서 기질 RNA 에 P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형시킨 경우 유전자 침묵 효과를 살펴 보고자 하였다. 플랭킹 말단을 갖는 다이서 기질 RNA 구조체는 도 9에 예시적으로 도시하였다.

[0352] **실시예 9-1. 화학적 변형을 갖는 dsRNA 제조**

[0353] Cleaved dsRNA 를 제조할 수 있는 플랭킹 말단을 갖는 다이서 기질 RNA를 제조하기 위하여, 하기 표 14에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 14에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2'-OH기를 2'-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 14

[0354]

가닥		서열 (5'→3')	서열번호
화학적 변형되지 않은 flanking end dsRNA	가닥 1 (HPRT/FVII)	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 46
	가닥 2 (mTTR/HPRT)	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACGGCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 48
P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 flanking end dsRNA	가닥 1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGA**CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 31
	가닥 2 (mTTR/HPRT)	**C**AG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACGGCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 33

[0355] 가닥 1과 가닥 2를 각각 100 pmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜, 플랭킹 말단을 갖는 dsRNA

를 제조하였다.

[0357] **실시예 9-2. RT-PCR을 이용한 인비트로에서의 유전자 침묵효과 비교**

[0358] 상기 실시예 9-1에서 제조한 플랭킹 말단을 갖는 다이서 기질 RNA을 상기 실시예 1-2의 방법과 유사하게 GFP-KB 세포에 처리하고, 인비트로에서 타겟 유전자인 HRRT에 대한 침묵 효과를 RT-PCR 을 통해 측정하여 그 결과를 도 14에 나타내었다. 분석은 Ordinary one-way ANOVA analysis(Graphpad Prism 6)로 각 화학적 변형되지 않은 대조군 대비 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 플랭킹 말단을 갖는 다이서 기질RNA 처리 군 간의 상관관계를 통하여 유의성을 검증하였다.

[0359] 도 14에 나타난 바와 같이, 인비트로상에서 일 예에 따른 위치 특이적 방법으로 P(+1)P 화학적 변형된 플랭킹 말단을 갖는 다이서 기질 dsRNA는 유전자 침묵 효과가 대조군 대비 유사하였다.

[0361] **실시예 10. P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 Y-RNA 구조체의 인비보 유전자 침묵 효과**

[0362] 본 실시예에서 P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형된 다이서 기질 Y-RNA 구조체의 인비보에서의 유전자 침묵 효과를 살펴 보고자 하였다. Y-RNA 구조체는 도 9에 예시적으로 도시하였다.

[0364] **실시예 10-1. 화학적 변형된 다이서 기질 dsRNA 제조**

[0365] Cleaved dsRNA 를 제조할 수 있는 플랭킹 말단을 갖는 다이서 기질 RNA를 제조하기 위하여, 하기 표 15에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 15에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2’-OH기를 2’-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 15

[0367]

가닥		서열 (5’→3’)	서열번호
화학적 변형되지 않은 Y-RNA	가닥 1 (HPRT/FVII)	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 46
	가닥 2 (FVII/mTTR)	GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACCCGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 47
	가닥 3(mTTR/HPRT)	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACGGCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 48
P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 Y-RNA	가닥 1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGA**CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 31
	가닥 2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUAG**AGCA**A**G**A**A**CA**CU**GCA	서열번호 32
	가닥 3(mTTR/HPRT)	**C**AG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACGGCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 33

[0368] 상기 표 15의 3개의 가닥을 1nmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜, Y-RNA 구조체를 제조하였다.

[0370] **실시예 10-2. 인비보에서 유전자 침묵 효과 측정**

[0371] 상기 실시예 8-2와 유사한 방법으로, 상기 실시에 10-1에서 제조한 Y-RNA 다이서 기질 Y-RNA 구조체를 포함하는 지질 나노입자를 제조하고, 이를 RNA 샘플 0.03mg/kg의 용량으로 6주된 C57bl/6NCrSlc (Charles River Labs, female, 18-22g)로 마우스에 100ul씩 tail IV injection으로 주입하였다.

[0372] 각 샘플 군당 mouse 3마리에 주입하였고 FVII 분석 시 standard curve를 얻기 위한 mouse 3마리, positive control로 사용할 PBS 주입 mouse는 3마리였다. Injection한 지 72시간 후 mouse의 뺨에서 채혈하여 쥐의 plasma를 얻었다. 혈중 FVII 발현양 분석은 COASET Factor VII kit (Chromogenix)를 이용하였고 Infinite M200 Pro(Tecan)로 405nm에서 흡광도를 측정하고, FVII 발현양을 분석하여 그 결과를 도 15에 나타내었다. 분석은 one-way ANOVA analysis(Graphpad Prism 6)로 대조군 (화학적 변형되지 않은 다이서 기질 Y-RNA)과 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 다이서 기질 Y-RNA의 인비보 유전자 침묵효과 차이의 유의성을 확인하였다.

[0373] 도 15에 나타난 바와 같이, 일 예에 따른 방법으로 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 Y-RNA 구조체는 생체 내에서 유전자 침묵 효과가 증가되었다.

[0375] **실시예 11. P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 닉을 갖는 Y-RNA 구조체의 인비보 유전자 침묵 효과**

[0376] 본 실시예에서 닉(nick)을 갖는 다이서 기질 Y-RNA 에 P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형시킨 경우 유전자 침묵 효과를 살펴 보고자 하였다. 닉(nick)을 갖는 다이서 기질 Y-RNA 구조체는 도 9에 예시적으로 도시하였다

[0378] **실시예 11-1. 화학적 변형된 다이서 기질 dsRNA 제조**

[0379] Cleaved dsRNA 를 제조할 수 있는 닉(nick)을 갖는 다이서 기질 Y-RNA 를 제조하기 위하여, 하기 표 16에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 16에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2' -OH기를 2' -O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 16

[0381]

가닥		서열 (5' →3')	서열목록
화학적 변형 되지 않은 Y-RNA (nick)	가닥 1 (HPRT/FVII)	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGACU UGAGAUGAUCCCA	서열번호 46
	가닥 2 (FVII/mTTR)	GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACCCGUCUAUUAUAGAG CAAGAACACUGCA	서열번호 47
	가닥 3(mTTR 센스)	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACG	서열번호 39
	가닥 4 (HPRT 안티센스)	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 Y-RNA (nick)	가닥 1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGA**CU** **UG**AG**U**GA**UC**CCA	서열번호 31
	가닥 2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUAG**AG** **CA**AG**AA**CA**CU**GCA	서열번호 32
	가닥 3(mTTR 센스)	**C**AG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 34
	가닥 4 (HPRT 안티센스)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**AG**U**C**UG**GCA	서열번호 28

[0382] 상기 표 16의 4개의 가닥을 1nmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화 시켜, 닉을 갖는 Y-RNA 구조체를 제조하였다.

[0384] **실시예 11-2. 인비보에서 유전자 침묵 효과 측정**

[0385] 상기 실시예 8-2와 유사한 방법으로, 상기 실시에 10-1에서 제조한 다이서 기질 Y-RNA 구조체를 포함하는 지질 나노입자를 제조하고, 이를 RNA 샘플 0.03mg/kg의 용량으로 6주된 C57bl/6NCrSlc (Charles River Labs, female, 18-22g)로 마우스에 100ul씩 tail IV injection으로 주입하였다. 상기 실시예 8-2와 유사하게, 발색 분석 및 ELISA방법을 이용하여 FVII 및 TTR의 발현양을 측정하고, 그 결과를 도 16에 나타내었다. .

[0386] 도 16에 나타난 바와 같이, 일 예에 따른 방법으로 P(+1)P위치 특이적으로 화학적 변형된 닉을 갖는Y-RNA 구조체는 서열(타겟)에 상관없이 모두 대조군 대비 인비보 유전자 침묵 효과가 증가되었다.

[0388] **실시예 12. P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형된 다이서 기질 RNA의 농도에 따른 인비보 유전자 침묵 효과**

[0389] 본 실시예에서 P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형된, 다이서 기질 Y-RNA 구조체 및 닉을 갖는 Y-RNA 구조체를 제조하고, 이의 농도에 따른 인비보에서의 유전자 침묵 효과를 살펴 보고자 하였다. Y-RNA 구조체는 도 9에 예시적으로 도시하였다.

[0391] **실시예 12-1. 화학적 변형된 다이서 기질 dsRNA 제조**

[0392] Cleaved dsRNA 를 제조할 수 있는 다양한 구조를 갖는 다이서 기질 RNA(선형 dsRNA, Y-RNA, 닉을 갖는 Y-RNA)를 제조하기 위하여, 하기 표 17및 표 18에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 17 및 표 18에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2' -OH기를 2' -O-메틸기로 변형된 것을 의미한다. 하기 표 17에 기재된 가닥은 FVII를 타겟으로 하는 siRNA 및 다이서 기질 RNA 를 제조하기 위한 것이고, 하기 표 18에 기재된 가닥은 TTR 을 타겟으로 하는 siRNA 및 다이서 기질 RNA를 제조하기 위한 것이다.

표 17

[0393]

가닥		서열 (5' →3')	서열번호
siRNA (19+2)	센스 가닥	GGAUCAUCUCAAGUCUUACTT	서열번호 37
	안티센스 가닥	GUAAGACUUGAGAUGAUCCTT	서열번호 38
화학적 변형되지 않은 다이서 기질 선형 RNA (NN)	센스 가닥	GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACC	서열번호 41
	안티센스 가닥	GGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 42
P(+1)P 위치 특이적 변형된 다이서 기질 선형 RNA	센스 가닥	**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACC	서열번호 44
	안티센스 가닥	GGUGAUGUAAGA**CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 45
C/U sequence-based modification	센스 가닥	GGA**UC**A**UCUC**AAG**UC**UUACAUCACC	서열번호 55
	안티센스 가닥	GGUGAUGUAAGA**CUU**GAGA**U**GA**UCCC**A	서열번호 56
P(+1)P 위치 특이적 변형된 Y-RNA	가닥 1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGA **CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 31
	가닥 2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUAG **AGCA**AGA**A**CA**CU**GCA	서열번호 32
	가닥 3 (mTTR/HPRT)	**C**AG**UG**UUCUUGCU**C**UAUAAUAGACGGCACUUCAAAUC **CAAC**AA**A**G**U**C**UG**GCA	서열번호 33
P(+1)P 위치 특이적 변형된 Y-RNA (nick)	가닥 1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGA **CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 31
	가닥 2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUAG **AGCA**AGA**A**CA**CU**GCA	서열번호 32
	가닥 3(mTTR sense)	**C**AG**UG**UUCUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 34
	가닥 4 (HPRT antisense)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 28

표 18

[0394]

가닥		서열 (5' →3')	서열번홍
siRNA (19+2)	센스 가닥	CAGUGUUCUUGCUCUAUAATT	서열번호 35
	안티센스 가닥	UUAUAGAGCAAGAACACUGTT	서열번호 36
화학적 변형되지 않은 다이서 기질 선형 RNA (NN)	센스 가닥	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACG	서열번호 39
	안티센스 가닥	CGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 40
P(+1)P 위치 특이적 변형된 Y-RNA (nick)	가닥 1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAU GUAAGA**CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 31
	가닥 2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUA UUAUAG**AGCA**AGA**A**CA**CU**GCA	서열번호 32
	가닥 3(mTTR, sense)	**C**AG**UG**UUCUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 34
	가닥 4 (HPRT,antisense)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 28

[0395] 센스 가닥과 안티센스 가닥을 10 nmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜, siRNA 와 선형 dsRNA를 제조하였다.

[0396] Y-RNA 구조체 또는 닉을 갖는 Y-RNA 구조체는 3개 혹은 4개의 가닥을 5nmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화 시켜 제조하였다.

[0398] **실시예 12-2. 농도에 따른 인비보 유전자 침묵 효과**

[0399] 상기 실시예 8-2와 유사한 방법으로, 상기 실시에 12-1에서 제조한 다양한 구조의 다이서 기질 RNA를 포함하는 지질 나노입자를 제조하고, 이를 RNA 샘플 기준으로 다양한 용량(0.03mg/kg 내지 0.3mg/kg)으로 6주된 C57bl/6NCrSlc (Charles River Labs, female, 18-22g)로 마우스에 100ul씩 tail IV injection으로 주입하였다. TTR 타겟에 대한 인비보 유전자 침묵 효과는 대조군으로서 siRNA, 화학적 변형하지 않은 선형 dsRNA와 P(+1)P

위치 특이적으로 화학적 변형된 선형 dsRNA 및 P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 닉을 갖는 Y-RNA에 대해 수행하였다.

[0400] 상기 실시예 8-2와 유사하게, 발색 분석 및 ELISA방법을 이용하여 FVII 및 TTR의 발현양을 측정하고, 그 결과를 각각 도 17 및 도 18에 그래프로 나타내었다. 또한, 각 대조군 및 실험군에서 FVII 및 TTR의 발현을 억제하는 IC50 값을 계산하여 그 결과를 각각 도 17 및 도 18에 표로 기재하였다.

[0402] 도 17 및 도 18에 나타난 바와 같이, P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 선형 다이서 기질 dsRNA (P(+1)P), Y-RNA 구조체 (P(+1)P Y-RNA), 닉을 갖는 Y-RNA 구조체(P(+1)P Y-RNA(nick)) 모두 대조군 (NN) 보다 인비보에서 타겟 단백질의 발현 억제 효과가 우수하였고, IC50농도도 현저히 낮았으며, 이러한 효과는 서열(타겟)에 상관없이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0404] **실시예 13. P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형에서 각 위치에 따른 유전자 침묵 효과**

[0405] 본 실시예에서 센스 가닥의 5' 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 및 14번째 위치의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되고 안티센스 가닥에서 상기 센스 가닥의 가닥의 5' 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째 위치의 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형된 P(+1)P 위치 특이적 화학적 변형 방법과 관련하여, 센스가닥에서의 각 위치의 화학적 변형이 유전자 침묵 활성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

[0407] **실시예 13-1. P(+1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 닉을 갖는 Y-RNA 구조체 제조**

[0409] Cleaved dsRNA 를 제조할 수 있는 닉을 갖는 Y-RNA를 제조하기 위하여, 하기 표 19에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 19에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2'-OH기를 2'-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 19

[0410]

가닥		서열 (5'→3')	서열번호
Position modified(PP) Y-RNA (nick)	Strand1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAG ACUUGAGAUGA**UC**CCA	서열번호 31
	Strand2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**AUCUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUA G**AGCA**AGAA**C**A**CU**GCA	서열번호 32
	Strand3 (mTTR sense)	**C**AG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 34
	Strand4 (HPRT, antisense)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**AG**U**C**UG**GCA	서열번호 28
Position modified(-4) Y-RNA (nick)	Strand1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAG ACUUGAGAUGA**UC**CCA	서열번호 31
	Strand2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**AUCUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUA G**AGCA**AGAA**C**A**CU**GCA	서열번호 32
	Strand3 (mTTR sense)	**C**AG**U**GU**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 57
	Strand4 (HPRT, antisense)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**AG**U**C**UG**GCA	서열번호 28
Position modified(-5) Y-RNA (nick)	Strand1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAG ACUUGAGAUGA**UC**CCA	서열번호 31
	Strand2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**AUCUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUA G**AGCA**AGAA**C**A**CU**GCA	서열번호 32
	Strand3 (mTTR sense)	**C**AG**U**GU**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 58
	Strand4 (HPRT, antisense)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**AG**U**C**UG**GCA	서열번호 28
Position modified(-7) Y-RNA (nick)	Strand1 (HPRT/FVII)	**C**CA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAG ACUUGAGAUGA**UC**CCA	서열번호 31
	Strand2 (FVII/mTTR)	**G**GA**UC**AUCUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUA G**AGCA**AGAA**C**A**CU**GCA	서열번호 32
	Strand3 (mTTR sense)	**C**AG**UG**UUCUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 59
	Strand4 (HPRT, antisense)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**AG**U**C**UG**GCA	서열번호 28

Position modified(-14) Y-RNA (nick)	Strand1 (HPRT/FVII)	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 31
	Strand2 (FVII/mTTR)	GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACCCGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 32
	Strand3 (mTTR sense)	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACG	서열번호 60
	Strand4 (HPRT, antisense)	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 28

[0411] 상기 표 19의 4개 가닥을 1nmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화 시켜, 다이서 기질이 될 수 있는 닉을 갖는 Y-RNA 구조체를 제조하였다. 제조된 닉을 갖는 Y-RNA구조체는, 다이서에 의해 절단되어 Cleaved dsRNA를 제조할 수 있는 팔(arm)을 3개 포함하였다. 닉을 갖는 Y-RNA 구조체의 각 팔이 P(+1)P 위치 특이적으로 변형된 군, P(+1)P 위치에서 각각 센스 가닥의 5' 말단으로부터 4, 5, 7, 및 14번째 위치가 화학적으로 변형되지 않은 군 (각각 P(-4)P, P(-5)P, P(-7)P, P(-14)P 군으로 명명함)이 제조되었다.

[0413] **실시예 13-2. 인비보 유전자 침묵 효과**

[0414] 상기 실시예 8-2와 유사한 방법으로, 상기 실시예 13-1에서 제조한 닉을 갖는 Y-RNA 구조체를 포함하는 지질 나노입자를 제조하고, 이를 RNA 샘플 0.03mg/kg의 용량으로 6주된 C57bl/6NCrSlc (Charles River Labs, female, 18-22g)로 마우스에 100ul씩 tail IV injection으로 주입하였다. 상기 실시예 8-2와 유사하게, ELISA방법을 이용하여 TTR의 발현양을 측정하고, 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[0415] 도 19에 나타난 바와 같이, Y-RNA 구조체의 팔에서 센스 가닥의 5' 말단으로부터 1, 4, 5, 7, 및 14번째 위치의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형된 P(+1)P 군의 인비보 유전자 침묵 효과가 제일 우수하였으며, 센스 가닥의 4, 5, 7, 및 14번째 위치가 각각 화학적으로 변형되지 않은 P(-4)P, P(-5)P, P(-7)P, P(-14)P 군은 인비보 유전자 침묵 효과가 감소하였다.

[0417] **실시예 14. P(-1)P 위치 특이적 화학적 변형된 다이서 기질 dsRNA**

[0418] 본 실시예에서 다이서 기질 RNA에서, 센스 가닥의 5' 말단으로부터 4, 5, 7, 및 14번째 위치의 뉴클레오티드를 화학적으로 변형시키고, 안티센스 가닥에서 상기 센스 가닥의 가닥의 5' 말단으로부터 2, 3, 6, 8, 및 10 내지 13번째 위치의 뉴클레오티드와 상보적으로 결합하는 위치의 뉴클레오티드를 위치 특이적으로 화학적 변형시키는 경우 (이를 추후 실시예에서 P(-1)P 위치 특이적 화학적 변형 방법으로 지칭함) 유전자 침묵 효과를 살펴보고자 하였다.

[0420] **실시예 14-1. 화학적으로 변형된 다이서 기질 dsRNA 제조**

[0421] cleaved dsRNA를 제조할 수 있는 선형 다이서 기질 RNA를 제조하기 위하여, 하기 표 20에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 20에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2' -OH기를 2' -O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 20

[0422]

가닥		서열 (5' →3')	서열번호
화학적 변형되지 않음 (NN)	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 1
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
P(-1)P 위치 특이적 변형	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 61
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 62
C/U 서열 기반 변형	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 20
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 21
교대 변형	센스 가닥	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 22
	안티센스 가닥	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 23

[0423] 상기 표 20의 센스 가닥과 안티센스 가닥을 100 pmole을 섞고 thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 -1.0℃/s의 속도로 95℃ (3분)에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜, HRRT를 타겟으로 하는 cleaved dsRNA를 제조할 수 있는 (1) 화학적 변형되지 않은 대조군 (NN), (2) P(-1)P 위치 특이적으로 화학적

변형된 다이서 기질 선형 dsRNA (P(-1)P), (3) C/U 서열 기반 화학적 변형된 다이서 기질 선형dsRNA (CU-mod), 및 (4) 교대 변형 방법에 따라 화학적 변형된 다이서 기질 선형 dsRNA (Alt-mod)를 제조하였다.

[0425] **실시예 14-2. RT-PCR을 이용한 유전자 침묵효과 비교**

[0426] 상기 실시예 14-1에서 제조한 3종의 다이서 기질 RNA를 상기 실시예 1-2 방법과 유사하게 GFP-KB 세포에 처리하고, 인비트로에서 타겟 유전자인 HRRT에 대한 침묵 효과를 RT-PCR을 통해 측정하여 그 결과를 도 20에 나타내었다.

[0427] 도 20에 나타난 바와 같이, 일 예에 따른 P(-1)P 위치 특이적인 방법으로 화학적 변형된 다이서 기질 dsRNA경우 대조군 대비 인비트로에서 유전자 침묵 효과가 감소하지 않았으나, 다른 화학적 변형 방법의 경우에는 인비트로에서 유전자 침묵 효과가 감소하였다.

[0429] **실시예 15. P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형이 도입된 선형 dsRNA**

[0430] 본 실시예에서 P(-1)P 위치 특이적 화학적 변형된, 선형 다이서 기질 RNA 를 제조하고, 상기 화학적 변형된 선형 다이서 기질 RNA의 인비트로 또는 인비보에서 유전자 침묵 효과를 살펴보고자 하였다.

[0432] **실시예 15-1. 위치 특이적으로 화학적 변형된 dsRNA 제조**

[0433] Cleaved dsRNA 를 제조할 수 있는 선형 다이서 기질 RNA를 제조하기 위하여, 하기 표 21 및 표 22에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 21및 표 22에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2’-OH기를 2’-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다. 표 21은 인비트로 유전자 침묵 활성을 살펴보기 위해 제조된 선형 다이서 기질 RNA 에 대한 서열이고, 표 22은 인비보 유전자 침묵 활성을 살펴보기 위해 제조된 선형 다이서 기질 RNA에 대한 서열을 나타낸다.

표 21

[0435]

가닥			서열 (5’ →3’)	서열번호
HPRT target	화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGC	서열번호 1
		안티센스	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
	P(-1)P 변형된 선형 RNA	센스	CCA**G**A**C**U**U**UGUUG**G**AUUUGAAGUGC	서열번호 61
		안티센스	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 62
eGFP target	화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스	GCAAGCUGACCCUGAAGUUAUCACC	서열번호 6
		안티센스	GGUGAUAACUUCAGGGUCAGCUUGCCA	서열번호 7
	P(-1)P 변형된 선형 RNA	센스	GCA**AG**C**U**GACCCU**G**AAGUUAUCACC	서열번호 63
		안티센스	GGUGAUAACUUC**AGGG**UC**A**G**C**U**UG**CCA	서열번호 64

표 22

[0436]

가닥			서열 (5’ →3’)	서열번호
FVII target	화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스	GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACC	서열번호 41
		안티센스	GGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 42
	P(-1)P 변형된 선형 RNA	센스	GGA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACC	서열번호 65
		안티센스	GGUGAUGUAAGA**CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 66
Mouse TTR target	화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACG	서열번호 39
		안티센스	CGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 40
	P(-1)P 변형된 선형 RNA	센스	CAG**UGU**U**C**UUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 67
		안티센스	CGUCUAUUAUAG**AGCA**A**G**AA**C**A**CU**GCA	서열번호 68

[0437] 센스 가닥과 안티센스 가닥을 같은 몰수로 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜 선형 구조를 갖는 다이서 기질 RNA 를 제조하였다.

[0439] **실시예 15-2. 유전자 침묵 효과 측정**

[0440] 상기 실시예 15-1에서 제조한 P(-1)P 화학적 변형이 도입된 선형 다이서 기질 RNA 을 이용하여, 실시예 8-2의 방법과 유사하게, HRRT 및 GFP 타겟에 대한 인비트로 유전자 침묵 활성을 측정하고, FVII 및 TTR 타겟에 대해서

는 인비보 유전자 침묵 활성을 측정하고, 그 결과를 도 21에 나타내었다. FVII를 타겟으로 하는 다이서 기질 RNA는 마우스에 0.03mg/kg 농도로 주사되었고, TTR을 타겟으로 하는 다이서 기질 RNA는 마우스에 0.01mg/kg 농도로 주사되었다.

[0441] 도 21에 나타난 바와 같이, P(-1)P 화학적 변형이 도입된 선형 다이서 기질 RNA는 인비트로상에서 유전자 침묵 활성이 대조군 대비 감소하지 않았고 인비보에서는 대조군 보다 현저히 우수한 타겟 유전자의 침묵 활성을 나타내었다.

[0443] **실시예 16. P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형이 도입된 Y-RNA(nick)**

[0444] 본 실시예에서 닉(nick)을 갖는 다이서 기질 Y-RNA 에 P(-1)P 위치 특이적 화학적 변형시킨 경우 유전자 침묵 효과를 살펴 보고자 하였다. 닉(nick)을 갖는 다이서 기질 Y-RNA 구조체는 도 9에 예시적으로 도시하였다.

[0446] **실시예 16-1. 화학적 변형된 다이서 기질 RNA 제조**

[0447] Cleaved dsRNA 를 제조할 수 있는 닉(nick)을 갖는 다이서 기질 Y-RNA 를 제조하기 위하여, 하기 표 23에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 23에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2’-OH기를 2’-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다.

표 23

[0448]

가닥		서열 (5’->3’)	서열번호
화학적 변형되지 않은 Y-RNA (nick)	Strand1 (HPRT/FVII)	CCAGACUUUGUUGGAUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 46
	Strand2 (FVII/mTTR)	GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACCCGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 47
	Strand3 (mTTR, sense)	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACG	서열번호 39
	Strand4 (HPRT, antisense)	GCACUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCA	서열번호 2
P(-1)P 화학적 변형된 Y-RNA (nick)	Strand1 (HPRT/FVII)	CCA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUAAGA**C** **UUGA**G**A**U**GA**U**C**CCA	서열번호 69
	Strand2 (FVII/mTTR)	GGA**U**C**A**U**C**UCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUAUAG**A** **GCA**AG**A**ACA**CU**GCA	서열번호 70
	Strand3 (mTTR, sense)	CAG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 67
	Strand4 (HPRT,antisense)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 62

[0449] 상기 표 23의 4개의 가닥을 2nmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화 시켜, 닉을 갖는 Y-RNA 구조체를 제조하였다. 상기에서 제조한 닉을 갖는 Y-RNA 구조체는 HRRT, FVII, mouse TTR을 타겟할 수 있는 cleaved dsRNA를 제조할 수 있는 팔(arm)을 포함한다.

[0451] **실시예 16-2. 인비보에서 유전자 침묵 활성 측정**

[0452] 상기 실시예 8-2의 방법과 유사하게 P(-1)P 화학적 변형이 도입된 닉을 갖는 다이서 기질 Y-RNA 인비보에서 유전자 침묵 활성을 측정하고, 그 결과를 도 22에 나타내었다.

[0453] 상기 실시예 8-2와 유사한 방법으로, 상기 실시에 16-1에서 제조한 다이서 기질 Y-RNA 구조체를 포함하는 지질 나노입자를 제조하고, 6주된 C57bl/6NCrSlc (Charles River Labs, female, 18-22g)로 마우스에 tail IV injection으로 주입하였다. 상기 실시예 8-2와 유사하게, 발색 분석 및 ELISA방법을 이용하여 FVII 및 TTR의 발현양을 측정하고, 그 결과를 도 22에 나타내었다. FVII를 타겟으로 하는 다이서 기질 RNA는 마우스에 0.03mg/kg 농도로 주사되었고, TTR을 타겟으로 하는 다이서 기질 RNA는 마우스에 0.01mg/kg 농도로 주사되었다.

[0454] 도 22에 나타난 바와 같이, 일 예에 따른 방법으로 P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 닉을 갖는 Y-RNA 구조체는 서열(타겟)에 상관없이 모두 대조군 대비 인비보 유전자 침묵 효과가 증가되었다.

[0456] **실시예 17. P(-1)P 위치 특이적 화학적 변형된 다이서 기질 RNA의 농도에 따른 인비보 유전자 침묵 효과**

[0458] 본 실시예에서 P(-1)P 위치 특이적 화학적 변형된, 다이서 기질 Y-RNA 구조체 및 닉을 갖는 Y-RNA 구조체를 제조하고, 이의 농도에 따른 인비보에서의 유전자 침묵 효과를 살펴 보고자 하였다. Y-RNA 구조체는 도 9에 예시적으로 도시하였다.

[0460] **실시예 17-1. 화학적 변형된 다이서 기질 dsRNA 제조**

[0462] Cleaved dsRNA 를 제조할 수 있는 다양한 구조를 갖는 다이서 기질 RNA(선형 dsRNA, 닉을 갖는 Y-RNA)를 제조하기 위하여, 하기 표 24및 표 25에 표시된 위치에서 화학적 변형된 뉴클레오티드로 이루어지는 가닥을 바이오니아에 주문하여 사용하였다. 하기 표 24및 표 25에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 당의 2'-OH기를 2'-O-메틸기로 변형된 것을 의미한다. 하기 표 24에 기재된 가닥은 FVII를 타겟으로 하는 siRNA 및 다이서 기질 RNA 를 제조하기 위한 것이고, 하기 표 25에 기재된 가닥은 TTR 을 타겟으로 하는 siRNA 및 다이서 기질 RNA 를 제조하기 위한 것이다.

표 24

[0464]

가닥		서열 (5' →3')	서열번호
Conventional siRNA (19+2)	센스 가닥	GGAUCAUCUCAAGUCUUACTT	서열번호 37
	안티센스 가닥	GUAAGACUUGAGAUGAUCCTT	서열번호 38
화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스 가닥	GGAUCAUCUCAAGUCUUACAUCACC	서열번호 41
	안티센스 가닥	GGUGAUGUAAGACUUGAGAUGAUCCCA	서열번호 42
P(-1)P 변형된 선형 RNA	센스 가닥	GGA**UC**AUCUCAAG**U**CUUACAUCACC	서열번호 65
	안티센스 가닥	GGUGAUGUAAGA**CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 66
C/U 서열 기반 변형된 선형 RNA	센스 가닥	GGA**UC**A**UCUC**AAG**UC**UUACAUCACC	서열번호 55
	안티센스 가닥	GGUGAUGUAAGA**CUU**GAGA**U**GA**UCCC**A	서열번호 56
P(-1)P 화학적 변형된 Y-RNA (nick)	가닥 1 (HPRT/FVII)	CCA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUA AGA**CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 69
	Strand2 (FVII/mTTR)	GGA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUA UAG**AGCA**A**G**A**A**CA**CU**GCA	서열번호 70
	Strand3 (mTTR, sense)	CAG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 67
	Strand4 (HPRT,antisense)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 62

표 25

[0465]

가닥		서열 (5' →3')	서열번호
Conventional siRNA (19+2)	센스 가닥	CAGUGUUCUUGCUCUAUAATT	서열번호 35
	안티센스 가닥	UUAUAGAGCAAGAACACUGTT	서열번호 36
화학적 변형되지 않은 선형 RNA	센스 가닥	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAUAGACG	서열번호 39
	안티센스 가닥	CGUCUAUUAUAGAGCAAGAACACUGCA	서열번호 40
P(-1)P 변형된 선형 RNA	센스 가닥	CAG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 67
	안티센스 가닥	CGUCUAUUAUAG**AGCA**A**G**A**A**CA**CU**GCA	서열번호 68
P(-1)P 화학적 변형된 Y-RNA (nick)	가닥 1 (HPRT/FVII)	CCA**GA**C**U**UUGUUG**G**AUUUGAAGUGCGGUGAUGUA AGA**CUUG**A**G**A**U**GA**UC**CCA	서열번호 69
	Strand2 (FVII/mTTR)	GGA**UC**A**U**CUCAAG**U**CUUACAUCACCCGUCUAUUA UAG**AGCA**A**G**A**A**CA**CU**GCA	서열번호 70
	Strand3 (mTTR, sense)	CAG**UG**U**U**CUUGCU**C**UAUAAUAGACG	서열번호 67
	Strand4 (HPRT, antisense)	GCACUUCAAAUC**CAAC**A**A**A**G**UC**UG**GCA	서열번호 62

[0466] 센스 가닥과 안티센스 가닥을 10 nmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화시켜, siRNA 와 선형 dsRNA를 제조하였다.

[0467] 닉을 갖는 Y-RNA 구조체는 3개 혹은 4개의 가닥을 5nmole씩 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이

용하여 95℃에서 3분 후 -1.0℃/s의 속도로 95℃에서 4℃까지 온도를 감소시켜 이중 가닥으로 혼성화 시켜 제조하였다.

[0469] **실시예 17-2. 농도에 따른 유전자 침묵 효과**

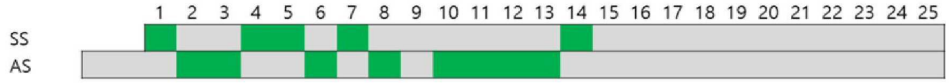
[0470] 상기 실시예 8-2와 유사한 방법으로, 상기 실시예 17-1에서 제조한 다양한 구조의 다이서 기질 RNA를 포함하는 지질 나노입자를 제조하고, 이를 RNA 샘플 기준으로 다양한 용량(0.03mg/kg 내지 0.3mg/kg)으로 6주된 C57bl/6NCrSlc (Charles River Labs, female, 18-22g)로 마우스에 100ul씩 tail IV injection으로 주입하였다. TTR 타겟에 대한 인비보 유전자 침묵 효과는 대조군으로서 siRNA, 화학적 변형하지 않은 선형 dsRNA와 P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 선형 dsRNA 및 P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 닉을 갖는 Y-RNA에 대해 수행하였다.

[0471] 상기 실시예 8-2와 유사하게, 발색 분석 및 ELISA방법을 이용하여 FVII 및 TTR의 발현양을 측정하고, 그 결과를 각각 도 23및 도 24에 그래프로 나타내었다. 또한, 각 대조군 및 실험군에서 FVII 및 TTR의 발현을 억제하는 IC50 값을 계산하여 그 결과를 각각 도 23 및 도 24에 표로 기재하였다.

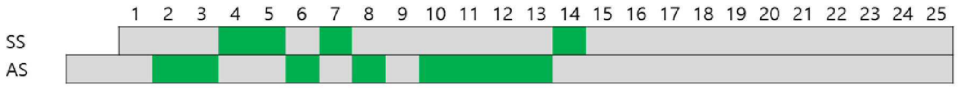
[0473] 도 23 및 도 24에 나타난 바와 같이, P(-1)P 위치 특이적으로 화학적 변형된 선형 다이서 기질 dsRNA (P(-1)P), 닉을 갖는 Y-RNA 구조체(P(-1)P Y-RNA(nick)) 모두 대조군 (NN) 보다 인비보에서 타겟 유전자에 대한 침묵 활성이 우수하였고, IC50농도도 현저히 낮았으며, 이러한 효과는 서열(타겟)에 상관없이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 더욱이, 도 23에 나타난 바와 같이, 기존에 알려진 C/U 서열 기반 화학적 변형 방법 보다 P(-1)P 위치 특이적으로 화학 변형된 선형 dsRNA, 닉을 갖는 Y-RNA 구조체의 FVII 발현 억제 효과가 현저히 우수하였고, IC50 농도도 현저히 낮았다.

도면

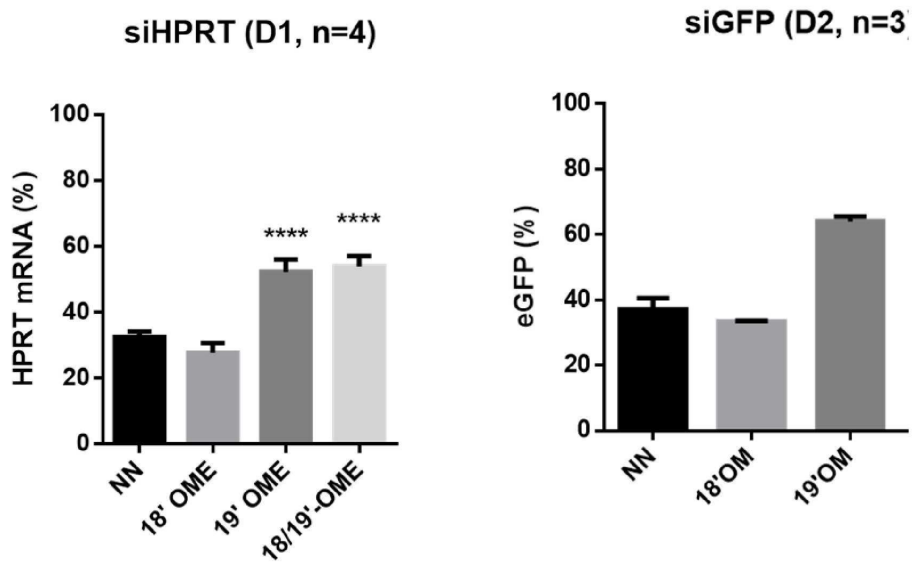
도면1



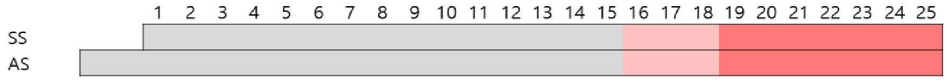
도면2



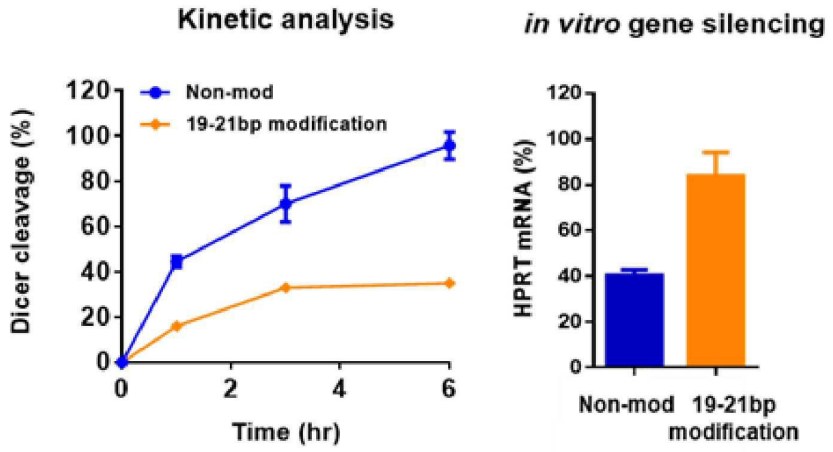
도면3


siHPRT (D1, n=4)
HPRT mRNA (%)
100
80
60
40
20
0
****
****
NN
18' OME
19' OME
18/19'-OME
siGFP (D2, n=3
eGFP (%)
100
80
60
40
20
0
NN
18'OM
19'OM

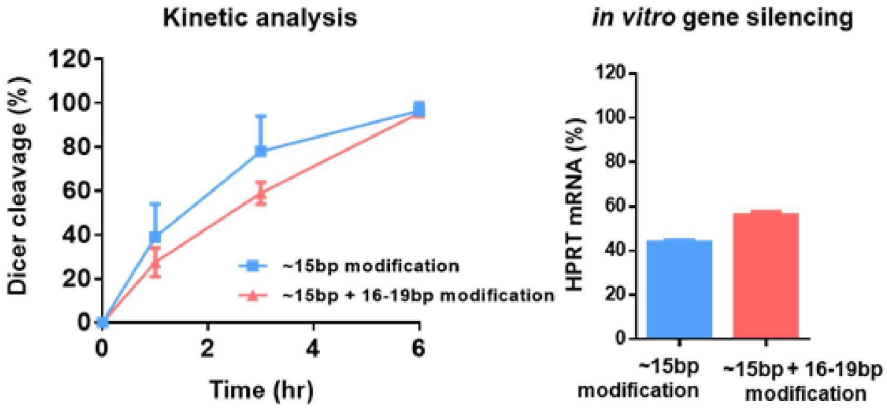
도면4


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
SS
AS

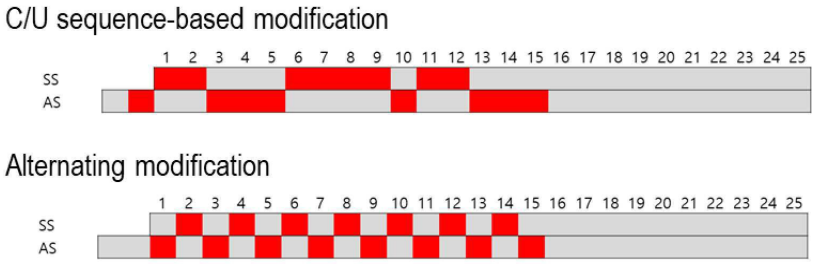
도면5a


Kinetic analysis
Dicer cleavage (%)
120
100
80
60
40
20
0
Non-mod
19-21bp modification
0
2
4
6
Time (hr)
in vitro gene silencing
HPRT mRNA (%)
120
100
80
60
40
20
0
Non-mod
19-21bp modification

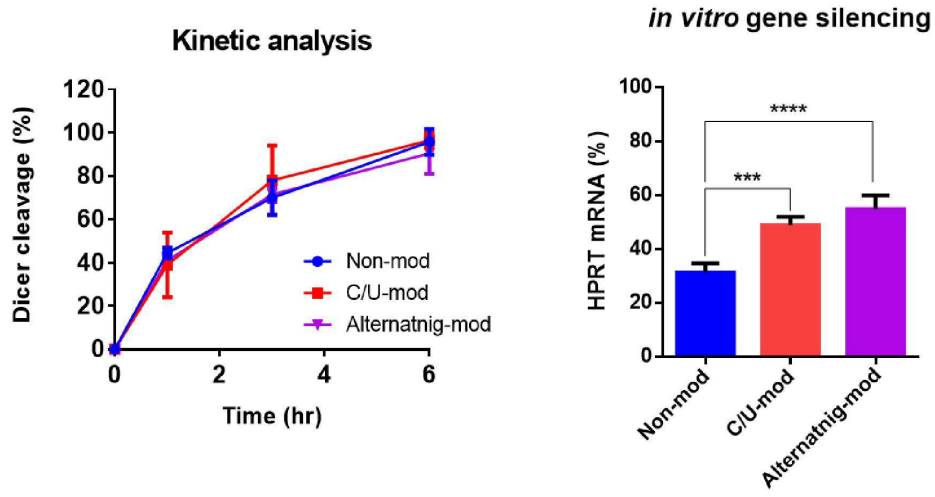
도면5b


Kinetic analysis
Dicer cleavage (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
Time (hr)
~15bp modification
~15bp + 16-19bp modification
in vitro gene silencing
HPRT mRNA (%)
120
100
80
60
40
20
0
~15bp modification
~15bp + 16-19bp modification

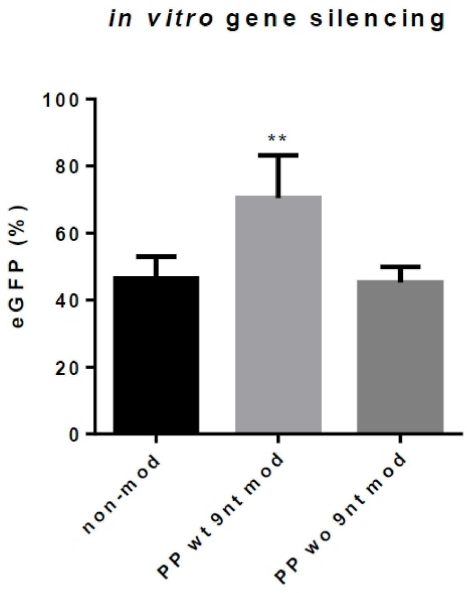
도면6


C/U sequence-based modification
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
SS
AS
Alternating modification
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
SS
AS

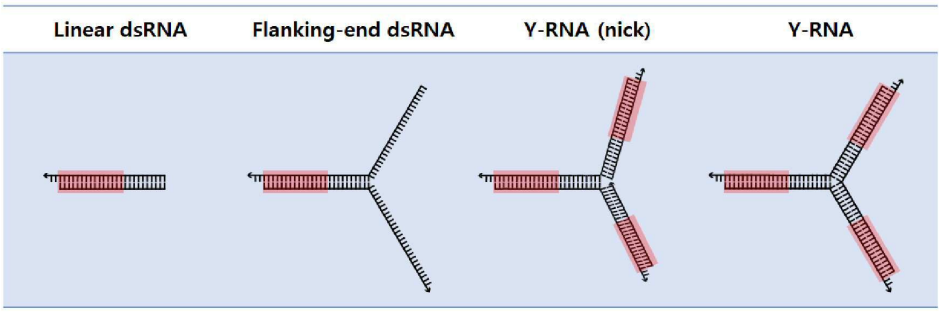
도면7


Kinetic analysis
Dicer cleavage (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
Time (hr)
Non-mod
C/U-mod
Alternatnig-mod
in vitro gene silencing
HPRT mRNA (%)
100
80
60
40
20
0
****
***
Non-mod
C/U-mod
Alternatnig-mod

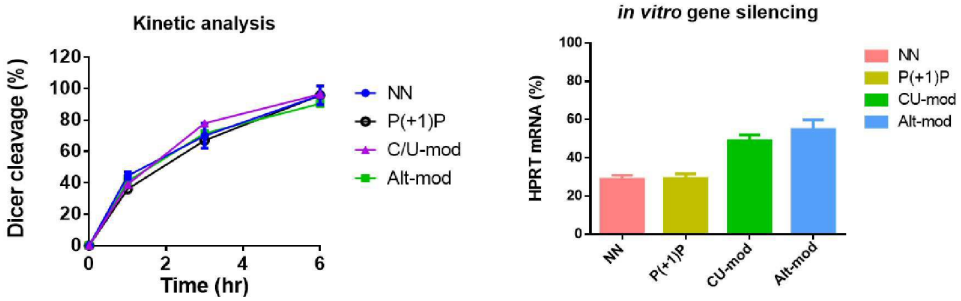
도면8


in vitro gene silencing
eGFP (%)
100
80
60
40
20
0
**
non-mod
PP wt 9nt mod
PP wo 9nt mod

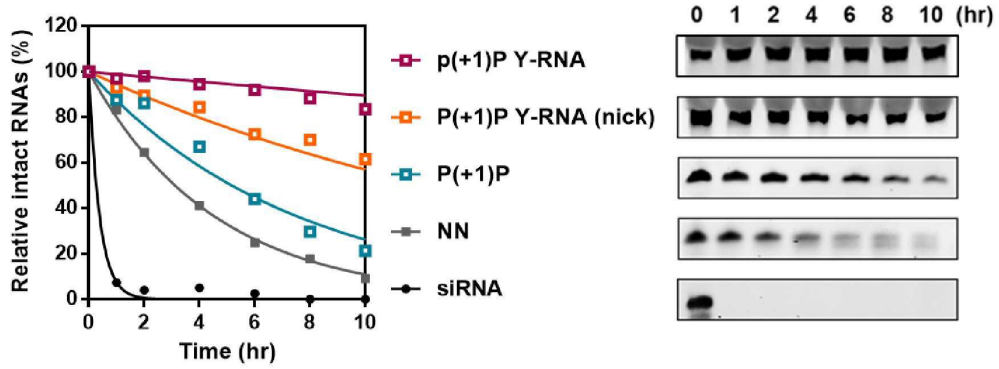
도면9


Linear dsRNA
Flanking-end dsRNA
Y-RNA (nick)
Y-RNA

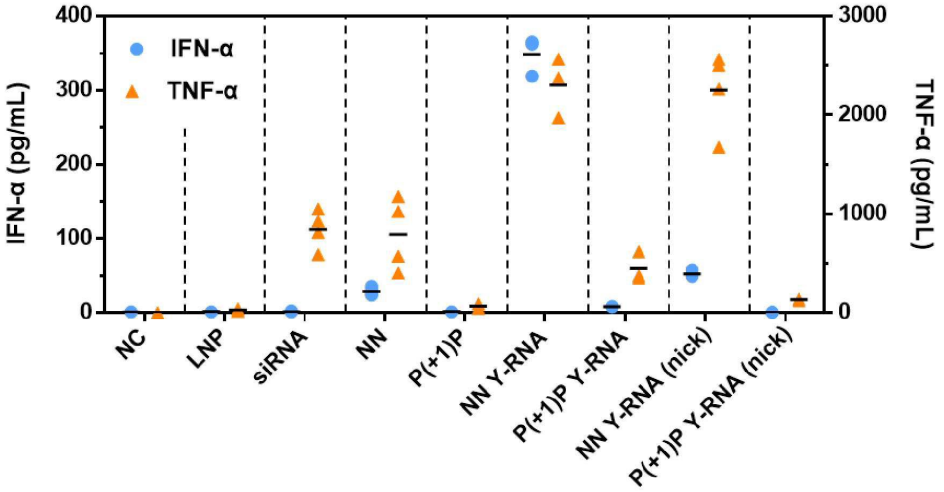
도면10


Kinetic analysis
Dicer cleavage (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
Time (hr)
NN
P(+1)P
C/U-mod
Alt-mod
in vitro gene silencing
HPRT mRNA (%)
100
80
60
40
20
0
NN
P(+1)P
CU-mod
Alt-mod
NN
P(+1)P
CU-mod
Alt-mod

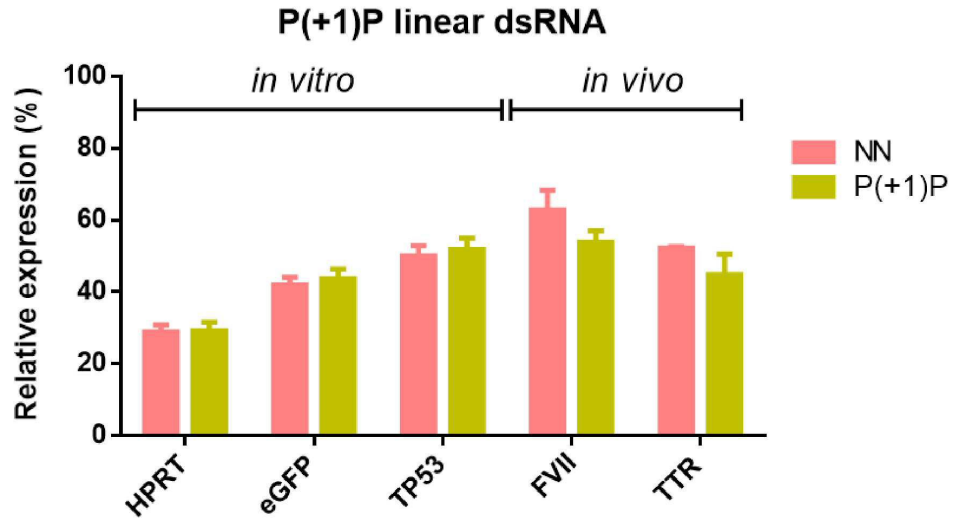
도면11



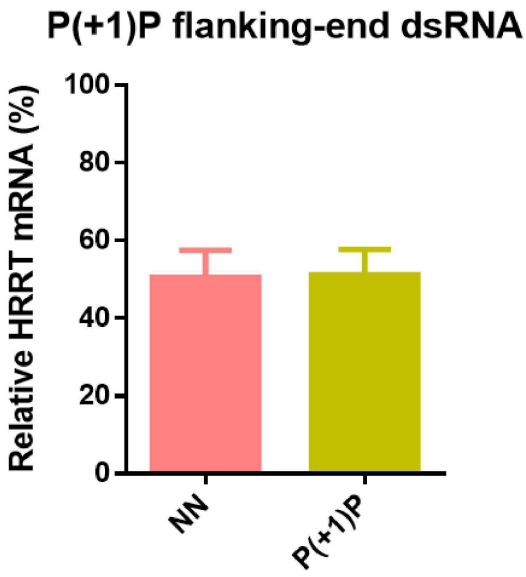
도면12



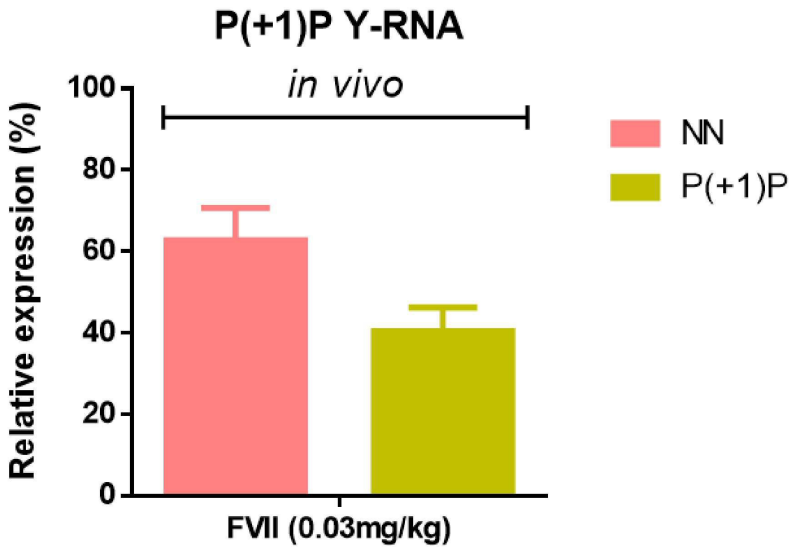
도면13



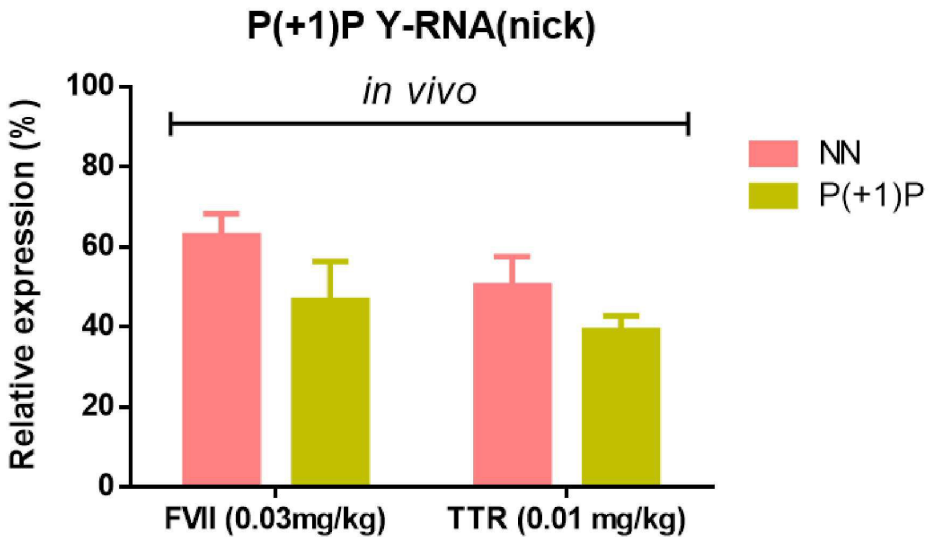
도면14


P(+1)P flanking-end dsRNA
Relative HRRT mRNA (%)
100
80
60
40
20
0
NN
P(+1)P

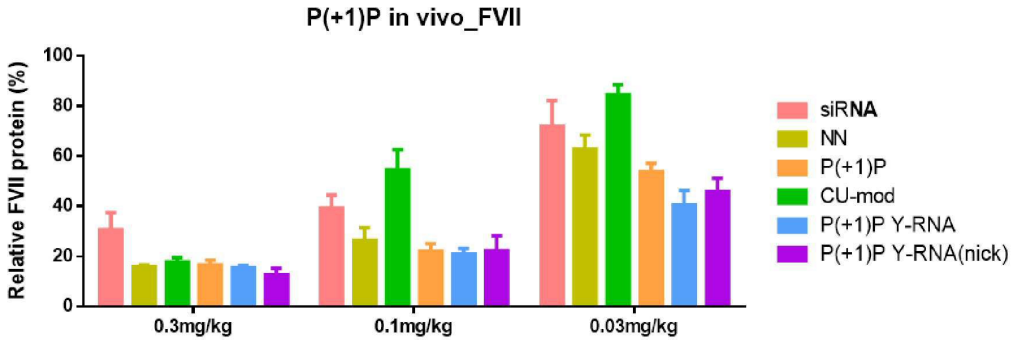
도면15


P(+1)P Y-RNA
in vivo
Relative expression (%)
100
80
60
40
20
0
FVII (0.03mg/kg)
NN
P(+1)P

도면16

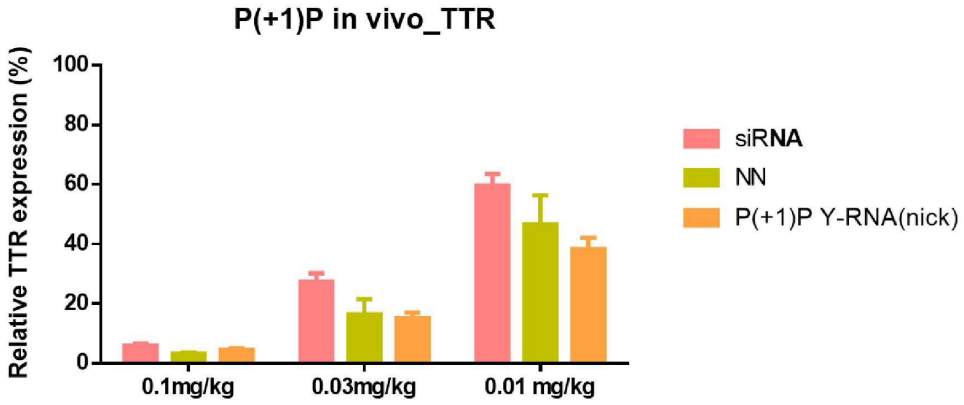


도면17



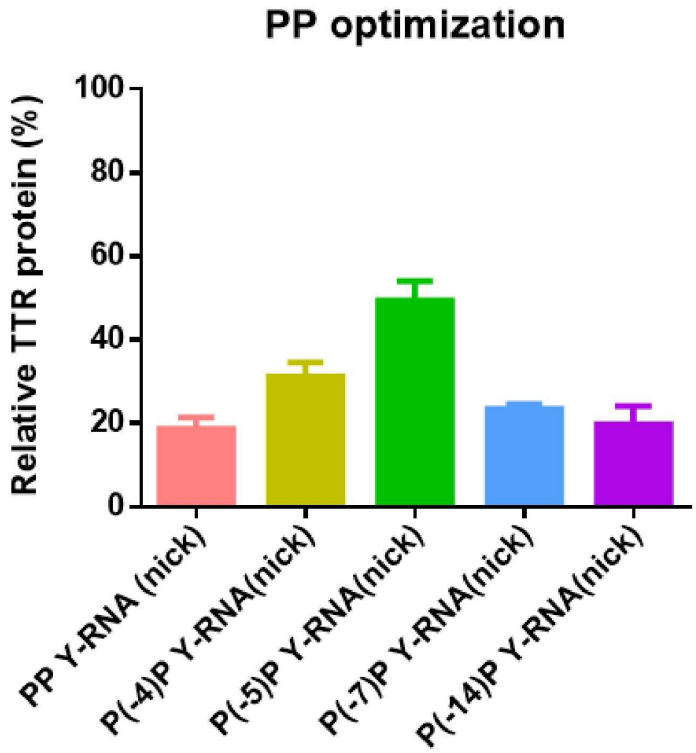
	siRNA	NN	CU-mod	P(+1)P	P(+1)P Y-RNA	P(+)P Y-RNA (nick)
IC50 (mg/kg)	0.085	0.046	0.108	0.033	0.014	0.028

도면18

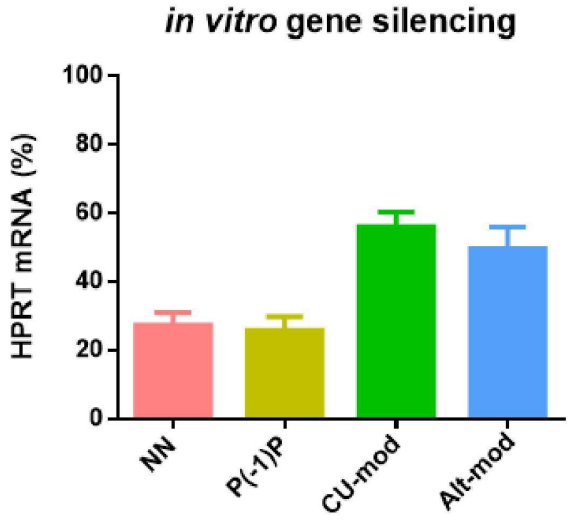


	siRNA	NN	P(+1)P Y-RNA (nick)
IC50 (mg/kg)	0.014	0.009	0.007

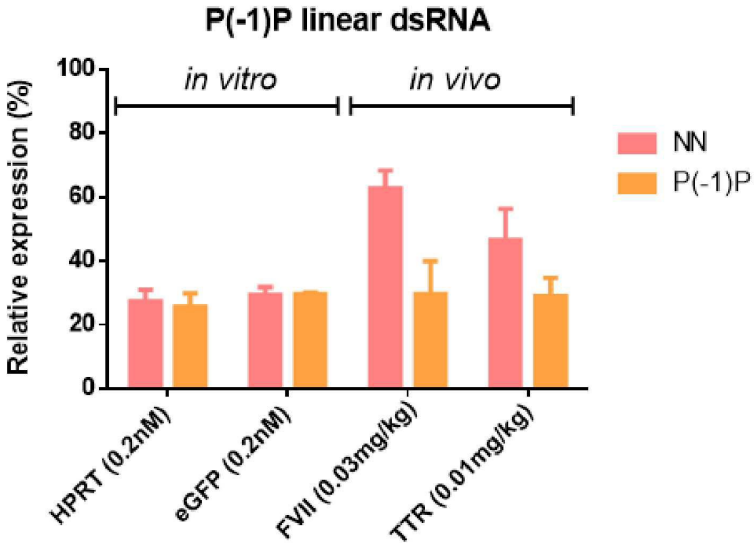
도면19



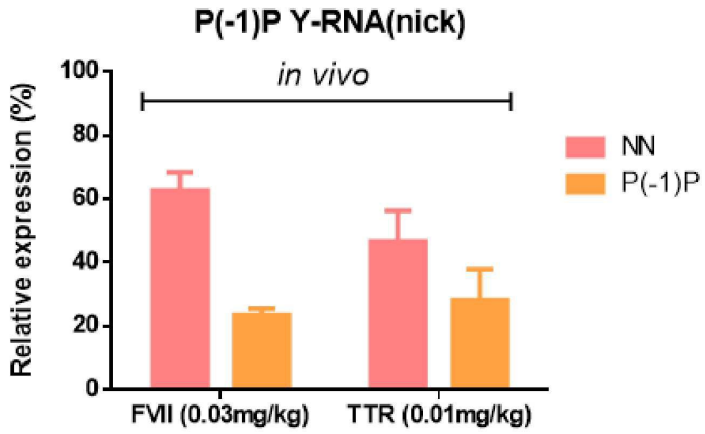
도면20


in vitro gene silencing
HPRT mRNA (%)
100
80
60
40
20
0
NN
P(-1)P
CU-mod
Alt-mod

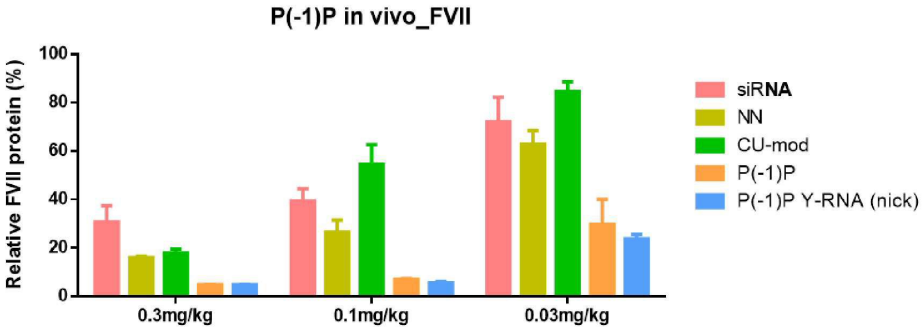
도면21


P(-1)P linear dsRNA
Relative expression (%)
in vitro
in vivo
100
80
60
40
20
0
NN
P(-1)P
HPRT (0.2nM)
eGFP (0.2nM)
FVII (0.03mg/kg)
TTR (0.01mg/kg)

도면22

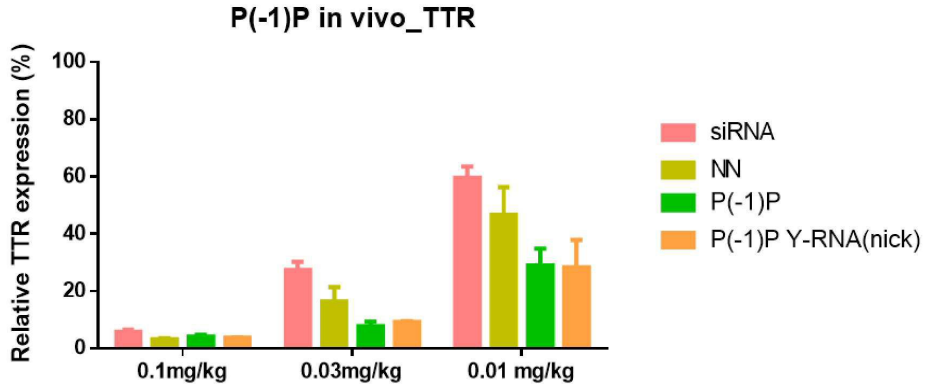


도면23



	siRNA	NN	CU-mod	P(-1)P	P(-1)P Y-RNA (nick)
IC50 (mg/kg)	0.085	0.046	0.108	0.015	0.011

도면24



	siRNA	NN	P(-1)P	P(-1)P Y-RNA (nick)
IC50 (mg/kg)	0.014	0.009	0.005	0.005

서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Nucleic Acid Molecules with Increased Gene Silencing Activity and Uses Thereof

<130> DPP20193304KR

<160> 70

<170> koPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_HRRT_non_modi

<400> 1

ccagacuuug uuggauuuga agugc 25

<210> 2

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

antisense_HRRT_non_modi

<400> 2

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210> 3

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_18_Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<400> 3

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210> 4

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_19_Ome

<220><221> modified_base

<222> (19)

<223> 2'-Ome

<400> 4

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210> 5

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_18_19_Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)..(19)

<223> 2'-Ome

<400> 5

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210> 6

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_GFP_non_modi

<400

> 6

gcaagcugac ccugaaguua ucacc 25

<210> 7

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_GFP_non_modi

<400> 7

ggugauaacu ucagggucag cuugcca 27

<210> 8

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_GFP_18_Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<400> 8

ggugauaacu ucagggucag cuugcca 27

<210> 9

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_GFP_19_Ome

<220><221> modified_base

<222> (19)

<223> 2'-Ome

<400> 9

ggugauaacu ucagggucag cuugcca 27

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HRRT_Forward_primer

<400> 10

gactttgctt tccttggtca g 21

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> HRRT_Reverse_primer

<400> 11

ggcttatatc caacacttcg tggg 24

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_Forward_primer

<400> 12

ggatttggtc gtattggg 18

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_Reverse_primer

<400> 13

ggaagatggt gatgggatt 19

<210> 14

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_HRRT_19-21bp_modi

<220><221> modified_base

<222> (21)..(23)

<223> 2'-Ome

<400> 14

ccagacuuug uuggauuuga agugc 25

<210> 15

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_19-21bp_modi

<220><221> modified_base

<222> (5)..(7)

<223> 2'-Ome

<400> 15

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210> 16

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_HRRT_~15bp_modi

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (2)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (6)..(9)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (11)..(12)

<223> 2'-Ome

<400> 16

ccagacuuug uuggauuuga agugc 25

<210> 17

<211> 27

<212> RNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_~15bp_modi

<220><221> modified_base

<222> (13)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (26)

<223> 2'-Ome

<400> 17

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210> 18

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_HRRT_~15bp+19-21bp_modi

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (2)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (6)..(9)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (11)..(12)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (16)..(18)

<223> 2'-Ome

<400> 18

ccagacuuug uuggauuuga agugc 25

<210> 19

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_~15bp+19-21bp_modi

<220><221

> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (13)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (26)

<223> 2'-Ome

<400> 19

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210> 20

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_HRRT_C/U_modi

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (6)..(9)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (11)..(12)

<223> 2'-Ome

<400> 20

ccagacuuug uuggauuuga agugc 25

<210> 21

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_C/U_modi

<220><221> modified_base

<222> (11)..(13)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222

> (21)..(23)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (26)

<223> 2'-Ome

<400> 21

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210> 22

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_HRRT_Alt_modi

<220><221> modified_base

<222> (2)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (6)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (8)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (10)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (12)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 22

ccagacuuug uuggauuuga agugc 25

<210> 23

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_Alt_modi

<220><221> modified_base

<222> (11)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (13)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (15)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (17)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (19)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (21)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (25)

<223> 2'-Ome

<400> 23

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210

> 24

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_GFP_P(+1)P_9_Ome

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (9)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 24

gcaagcugac ccugaaguua ucacc 25

<210> 25

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_GFP_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (13)..(16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> 2'-Ome

<400> 25

ggugauaacu ucagggucag cuugcca 27

<210> 26

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_GFP_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 26

gcaagcugac ccugaaguua ucacc 25

<210> 27

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_HRRT_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 27

ccagacuuug uuggauuuga agugc 25

<210> 28

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (13)..(16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> 2'-Ome

<400> 28

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> sense_HRRT_siRNA

<400> 29

ccagacuuug uuggauuugt t 21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_siRNA

<400> 30

caaauccaac aaagucuggt t 21

<210> 31

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> strand1_Y-RNA_HRRT/FVII_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221

> modified_base

<222> (4)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (38)..(41)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (43)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (45)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (48)..(49)

<223> 2'-Ome

<

400> 31

ccagacuuug uuggauuuga agugcgguga uguaagacuu gagaugaucc ca 52

<210> 32

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> strand2_Y-RNA_FVII/mTTR_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (38)..(41)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (43)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (45)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (48)..(49)

<223> 2'-Ome

<400> 32

ggaucaucuc aagucuuaca ucacccgucu auuauagagc aagaacacug ca 52

<210> 33

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> strand3_Y-RNA_mTTR/HRRT_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (38)..(41)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (43)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (45)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (48)..(49)

<223> 2'-Ome

<400> 33

caguguucuu gcucuauaau agacggcacu ucaaauccaa caaagucugg ca 52

<210> 34

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_mTTR_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 34

caguguucuu gcucuauaau agacg 25

<210> 35

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_mTTR_siRNA

<400> 35

caguguucuu gcucuauaat t 21

<210> 36

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_mTTR_siRNA

<400> 36

uuauagagca agaacacugt t 21

<210> 37

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_FVII_siRNA

<400> 37

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 38

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_FVII_siRNA

<400> 38

guaagacuug agaugaucct t 21

<210> 39

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_mTTR_non_modi

<400> 39

caguguucuu gcucuauaau agacg 25

<210> 40

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_mTTR_non_modi

<400> 40

cgucuauuau agagcaagaa cacugca 27

<210> 41

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_FVII_non_modi

<400> 41

ggaucaucuc aagucuuaca ucacc 25

<210> 42

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_FVII_non_modi

<400> 42

ggugauguaa gacuugagau gauccca 27

<210> 43

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_mTTR_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (13)..(16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> 2'-Ome

<400> 43

cgucuauuau agagcaagaa cacugca 27

<210> 44

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_FVII_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 44

ggaucaucuc aagucuuaca ucacc 25

<210> 45

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_FVII_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (13)..(16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> 2'-Ome

<400> 45

ggugauguaa gacuugagau gauccca 27

<210> 46

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> strand1_Y-RNA_HRRT/FVII_non_modi

<400> 46

ccagacuuug uuggauuuga agugcgguga uguaagacuu gagaugaucc ca 52

<210> 47

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> strand2_Y-RNA_FVII/mTTR_non_modi

<400> 47

ggaucaucuc aagucuuaca ucacccgucu auuauagagc aagaacacug ca 52

<210> 48

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> strand3_Y-RNA_mTTR/HRRT_non_modi

<400> 48

caguguucuu gcucuauaau agacggcacu ucaaauccaa caaagucugg ca 52

<210> 49

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> sense_TP53_non_modi

<400> 49

accagggcag cuacgguuua agugc 25

<210> 50

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_TP53_non_modi

<400> 50

gcacuuaaac cguagcugcc cugguca 27

<210> 51

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_TP53_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 51

accagggcag cuacgguuua agugc 25

<210> 52

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_TP53_P(+1)P

<220><221> modified_base

<222> (13)..(16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<220><221

> modified_base

<222> (20)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> 2'-Ome

<400> 52

gcacuuaaac cguagcugcc cugguca 27

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TP53_Forward_primer

<400> 53

ttccgagagc tgaatgaggc 20

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TP53_Reverse_primer

<400> 54

gaagtggaga atgtcagtct gagtc 25

<210> 55

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_FVII_C/U_modi

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)..(10)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> 2'-Ome

<400> 55

ggaucaucuc aagucuuaca ucacc 25

<210> 56

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_FVII_C/U_modi

<220><221> modified_base

<222> (13)..(15)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)..(26)

<223> 2'-Ome

<400> 56

ggugauguaa gacuugagau gauccca 27

<210> 57

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_mTTR_P(+1)P_(-4)

<220

><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 57

caguguucuu gcucuauaau agacg 25

<210> 58

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_mTTR_P(+1)P_(-5)

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 58

caguguucuu gcucuauaau agacg 25

<210> 59

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_mTTR_P(+1)P_(-7)

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223

> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 59

caguguucuu gcucuauaau agacg 25

<210> 60

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_mTTR_P(+1)P_(-14)

<220><221> modified_base

<222> (1)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<400> 60

caguguucuu gcucuauaau agacg 25

<210> 61

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_HRRT_P(-1)P

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 61

ccagacuuug uuggauuuga agugc 25

<210> 62

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_HRRT_P(-1)P

<220>

<221> modified_base

<222> (13)..(16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> 2'-Ome

<400> 62

gcacuucaaa uccaacaaag ucuggca 27

<210> 63

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_GFP_P(-1)P

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 63

gcaagcugac ccugaaguua ucacc 25

<210> 64

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_GFP_P(-1)P

<220><221> modified_base

<222> (13)..(16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> 2'-Ome

<400> 64

ggugauaacu ucagggucag cuugcca 27

<210> 65

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_FVII_P(-1)P

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 65

ggaucaucuc aagucuuaca ucacc 25

<210> 66

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_FVII_P(-1)P

<220><221> modified_base

<222> (13)..(16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> 2'-Ome

<400> 66

ggugauguaa gacuugagau gauccca 27

<210> 67

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense_mTTR_P(-1)P

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<400> 67

caguguucuu gcucuauaau agacg 25

<210> 68

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense_mTTR_P(-1)P

<220>

<221> modified_base

<222> (13)..(16)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (18)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (20)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (23)..(24)

<223> 2'-Ome

<400> 68

cgucuauuau agagcaagaa cacugca 27

<210> 69

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> strand1_Y-RNA_HRRT/FVII_P(-1)P

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (38)..(41)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (43)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (45)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (48)..(49)

<223> 2'-Ome

<400> 69

ccagacuuug uuggauuuga agugcgguga uguaagacuu gagaugaucc ca 52

<210> 70

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> strand2_Y-RNA_FVII/mTTR_P(-1)P

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (14)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (38)..(41)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (43)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (45)

<223> 2'-Ome

<220><221> modified_base

<222> (48)..(49)

<223> 2'-Ome

<400> 70

ggaucaucuc aagucuuaca ucacccgucu auuauagagc aagaacacug ca 52