

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 6월 18일 (18.06.2020)

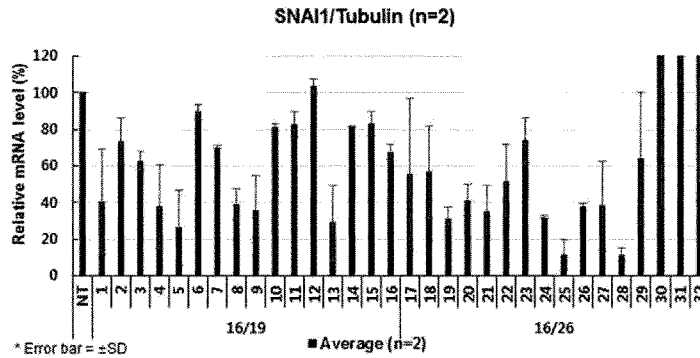


(10) 국제공개번호
WO 2020/122534 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 15/113 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/017332
- (22) 국제출원일: 2019년 12월 10일 (10.12.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0158453 2018년 12월 10일 (10.12.2018)KR
- (71) 출원인: 올릭스 주식회사 (OLIX PHARMACEUTICALS, INC.) [KR/KR]; 16226 경기도 수원시 영통구 대학로 17 1014호, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 이동기 (LEE, Dong-Ki); 06600 서울시 서초구 서초중앙로 188 C-2010, Seoul (KR). 박준현 (PARK, June Hyun); 16281 서울시 수원시 장안구 금당로39번길 34 208-503, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 리앤목 특허법인 등 (Y.P.LEE,MOCK & PARTNERS et al.); 06292 서울시 강남구 언주로30길 13 데림아크로텔 12층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: ASYMMETRIC SIRNA FOR INHIBITING EXPRESSION OF SNAI1

(54) 발명의 명칭: SNAI1의 발현을 억제하는 비대칭 SIRNA



(57) Abstract: The present invention relates to asymmetric siRNA for inhibiting the expression of SNAI1 (Snail1), and a use thereof and, more specifically, to: asymmetric siRNA, which comprises an antisense strand comprising a sequence complementary to mRNA encoding SNAI1, and a sense strand forming a complementary bond with the antisense strand; and a pharmaceutical composition for preventing or treating fibrosis or cancer, containing the asymmetric siRNA. The present invention allows the selection of asymmetric siRNA which modulates transcription factor SNAI1 (Snail1), a key factor of EMT closely related to tissue regeneration and fibrosis and cancer occurrence and metastasis, by functioning to inhibit the expression of E-cadherin, and allows chemical modification so that cytotoxicity caused by a carrier is removed and more efficient inhibition of gene expression *in vivo* is enabled, thereby being effectively usable as an agent for preventing or treating fibrosis or cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 SNAI1(Snail1)의 발현을 억제하는 비대칭 siRNA 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 SNAI1을 코딩하는 mRNA와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥과, 상기 안티센스 가닥과 상보적 결합을 형성하는 센스 가닥을 포함하는 비대칭 siRNA 및 상기 비대칭 siRNA를 포함하는 섬유화 또는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, E-카데린의 발현을 억제하는 기능을 함으로써 조직의 재생과 섬유화, 암의 발생 및 전이와 밀접한 연관이 있는 EMT의 핵심인자인 전사인자 SNAI1(Snail1)을 조절하는 비대칭 siRNA를 선별하고, 화학적으로 변형시켜 전달체로 인한 세포독성을 제거하고 *in vivo*에서 보다 효율적인 유전자 발현의 억제를 가능하게 함으로써, 섬유화 또는 암의 예방 또는 치료제로 유용하게 사용할 수 있다.

WO 2020/122534 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

명세서

발명의 명칭: SNAI1의 발현을 억제하는 비대칭 siRNA

기술분야

- [1] 본 발명은 SNAI1(Snail1)의 발현을 억제하는 비대칭 siRNA 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 SNAI1을 코딩하는 mRNA와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥과, 상기 안티센스 가닥과 상보적 결합을 형성하는 센스 가닥을 포함하는 비대칭 siRNA 및 상기 비대칭 siRNA를 포함하는 섬유화 또는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 섬유화(fibrosis)는 정상 조직에 상처가 생겨 기능이 저하되면서 딱딱하게 굳는 현상을 말하며 폐섬유화, 망막하섬유화, 간섬유화 등을 예로 들 수 있다. 대표적으로 폐섬유화증(PF, pulmonary fibrosis)은 폐 조직에 염증이 생겨 이로 인해 폐 조직이 굳어가면서 호흡 장애가 발생하는 호흡기 질환이다. 섬유화가 심해지면 폐의 산소 교환 기능이 저하되고, 증상이 진행될수록 폐포가 파괴되면서 폐가 정상 기능을 하지 못한다. 특발성 폐섬유화(IPF, Idiopathic pulmonary fibrosis)는 특히 불명의 원인으로 PF가 진행되어, 진단 후 2-6년의 기대수명을 가지는 매우 치명적인 질병으로 현재 이에 대한 실질적인 치료방법은 폐 이식 수술이 유일하여 unmet medical needs가 매우 높다.
- [4] 상피세포가 전이능력과 침윤능력을 가지는 세포로 변환하는 과정을 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition; EMT)라고 한다. EMT는 상피세포가 간엽세포로 바뀌는 것으로, 한 종류의 세포가 다른 종류의 세포로 분화하는 세포 형성성(cell plasticity)의 한 가지 형태이다(Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J Clin Invest 2009;119:1429-1437). 이러한 EMT는 척추동물과 무척추동물 모두에서의 배아발생 동안에 조직과 기관의 발생을 포함하는 형태학적 발생의 기본적인 현상으로 간주된다. 이와 유사한 현상은 성인의 상처 치유 과정에서도 발견되며, 최근에 EMT가 태생기의 조직 형성과 분화 외에도 조직의 재생과 섬유화, 암의 발생과 전이 과정에 다양한 역할을 한다는 사실이 밝혀지고 있다.
- [5] 암의 진행과정에서는 종양세포의 국소적 침습(local invasion)과 전이가 일어나는데, 이 과정에서 상피성 종양세포의 EMT가 동반된다. 이 과정에서 간엽성 표현형을 나타내기 위해 특정 유전자의 전사 프로그램이 변화하며, 세포의 이동성이 증가하고, 세포-세포 사이, 혹은 세포-세포외기질 사이 상호작용이 변화한다고 알려져 있다.
- [6] EMT에서 가장 초기에 일어나고 중요한 과정은 E-cadherin(E-카테린)에서 N-cadherin으로 전환하는 cadherin switch이다. E-cadherin은 막성 당단백질로 세포

외 영역은 인접 세포의 E-cadherin 분자와 결합하여 세포 간의 부착을 유지하고, 세포 내 영역은 α -, β - 및 p120 catenin과 결합하여 상피세포의 극성과 세포골격을 형성한다. EMT로 E-cadherin이 소실되면 상피세포 간의 tight junction이 느슨해지고, 세포골격이 재구성되어 액틴과 액틴 스트레스 섬유의 변화가 일어나서 세포극성이 소실되고, matrix metalloprotease(MMP)에 의해 세포 외 기질이 분해되어 상피세포가 간질로 이동한다. 전사인자 Snail1(SNAI1)은 이러한 E-cadherin의 발현을 억제하는 기능을 함으로써, EMT의 핵심인자로 인식되고 있다.

[7]

[8] 이에 본 발명자들은 SNAI1의 발현을 억제시킬 수 있는 SNAI1 표적 비대칭 siRNA를 선별하고, 전달체의 도움 없이 세포 내로 전달되며 핵산가수분해효소에 대한 저항성이 높은 siRNA를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, SNAI1을 타겟으로 하는 siRNA들을 디자인하였으며, 스크리닝을 통해 가장 효율적으로 SNAI1을 억제시키는 siRNA를 선별하고, modification을 통해 세포 내 전달 문제를 극복할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[9]

[10] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[11]

[12] **발명의 요약**

[13] 본 발명의 목적은 SNAI1(Snail1)의 발현을 특이적으로 억제하는 비대칭 siRNA(asymmetric shorter duplex siRNA, asiRNA)를 제공하는 데 있다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 상기 비대칭 siRNA를 포함하는 섬유화의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 섬유화의 예방 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 비대칭 siRNA를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 암의 예방 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 섬유화 또는 암의 예방 또는 치료를 위한 상기 비대칭 siRNA의 용도를 제공하는 데 있다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 섬유화 또는 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 비대칭 siRNA의 사용을 제공하는 데 있다.

[18]

[19] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SNAI1(Snail1)을 코딩하는 mRNA와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥과, 상기 안티센스 가닥과 상보적 결합을 형성하는 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥의 5' 말단 및 센스 가닥의 3' 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 것을 특징으로 하는 siRNA를 제공한다.

- [20] 본 발명은 또한, 상기 siRNA를 포함하는 섬유화의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [21] 본 발명은 또한, 상기 siRNA를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [22] 본 발명은 또한, 상기 siRNA를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 섬유화의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [23] 본 발명은 또한, 상기 siRNA를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [24] 본 발명은 또한, 섬유화 또는 암의 예방 또는 치료를 위한 상기 비대칭 siRNA의 용도를 제공한다.
- [25] 본 발명은 또한, 섬유화 또는 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 비대칭 siRNA의 사용을 제공한다.

[26]

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 SNAI1을 표적으로 하는 43종의 서열에 대한 asiRNA의 유전자억제 효율을 나타낸 것으로, A549 cells에 각 염기 서열을 표적으로 하는 asiRNA를 0.3nM transfection 한 뒤 24시간 후에 qRT-PCR을 이용하여 SNAI1 mRNA의 발현 정도를 측정하였다. 도 1A와 도 1B는 각각 독립적인 실험 데이터이다.
- [28] 도 2는 SNAI1을 표적으로 하는 4종의 서열에 대한 asiRNA의 유전자억제 효율을 나타낸 것으로, #41은 negative control로 사용되었다. Panc-1 cells 와 A549 cells에 각 염기 서열을 표적으로 하는 asiRNA를 10nM transfection 한 뒤 48시간 후에 western blot을 이용하여 SNAI1 단백질의 발현 정도를 측정하였다. 도 2A는 western blot 데이터이고, 도 2B는 도 2A의 western blot 데이터를 ImageJ를 이용하여 SNAI1 단백질의 발현양을 housekeeping gene인 vinculin으로 normalization 한 뒤 normal sample에 대한 상대적인 SNAI1 단백질의 발현양을 나타낸 그래프이다.
- [29] 도 3은 SNAI1 표적 asiRNA 길이 변형체의 단백질 발현 억제 효율을 나타낸 것으로, Panc-1 cells에 각 염기 서열을 표적으로 하는 asiRNA를 5nM transfection 한 뒤 48시간 후에 western blot을 이용하여 SNAI1 단백질의 발현 정도를 측정하였다. 도 3A 및 도 3B는 western blot 데이터이고, 도 3C는 도 3A와 도 3B의 western blot 데이터를 ImageJ를 이용하여 housekeeping gene인 vinculin으로 normalization 한 뒤 non-treated sample에 대한 상대적인 SNAI1 발현양을 나타낸 그래프이다.
- [30] 도 4는 SNAI1을 표적으로 하는 다양한 chemical modification이 추가된 32종의 cp-asiRNA의 유전자억제 효율을 나타낸 것으로, A549 cells에 각 염기 서열을 표적으로 하는 cp-asiRNA를 1 μ M incubation 한 뒤 24시간 후에 qRT-PCR을 이용하여 SNAI1 mRNA의 발현 정도를 측정하였다. 그래프는 2회 반복 실험의

평균과 SD를 나타낸다.

- [31] 도 5는 SNAI1을 표적으로 하는 cp-asiRNA의 유전자억제 효율을 나타낸 것으로, A549 cells에 각 염기 서열을 표적으로 하는 cp-asiRNA를 1 μ M-3 μ M incubation 한 뒤 48시간 후에 Western blot을 이용하여 SNAI1 단백질의 발현 정도를 측정하였다.
- [32] 도 6은 SNAI1를 표적하는 cp-asiRNA의 SNAI1 단백질 억제 효과 확인을 위한 동물 실험 모식도 및 조건을 나타낸 것이다.
- [33] 도 7은 SNAI1를 표적하는 cp-asiRNA의 SNAI1 단백질 발현 억제 효과를 나타낸 것이다.
- [34]
- [35] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**
- [36] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [37]
- [38] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [39] "RNAi(RNA interference; RNA 간섭)"란, 목적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 가닥과 이것과 상보적인 서열을 가지는 가닥으로 구성되는 이중가닥 RNA(dsRNA)를 세포 등에 도입하여 목적 유전자 mRNA의 분해를 유도함으로써 목적 유전자의 발현을 억제하는 메커니즘을 의미한다.
- [40] "siRNA(small interfering RNA; 짧은 간섭 RNA)"란, 서열 특이적으로 효율적인 유전자 발현 억제(gene silencing)를 매개하는 짧은 이중 가닥의 RNA(dsRNA)를 의미한다.
- [41] "안티센스 가닥(antisense strand)"이란 관심 있는 목적 핵산(target nucleic acid)에 실질적으로 또는 100% 상보적인 폴리뉴클레오티드로서, 예를 들어 mRNA(messenger RNA), mRNA가 아닌 RNA 서열(e.g., microRNA, piwiRNA, tRNA, rRNA 및 hnRNA) 또는 코딩 또는 비코딩 DNA 서열과 전체로서 또는 일부로서 상보적일 수 있다.
- [42] "센스 가닥(sense strand)"이란 목적 핵산과 동일한 핵산 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로서, mRNA(messenger RNA), mRNA가 아닌 RNA 서열(e.g., microRNA, piwiRNA, tRNA, rRNA 및 hnRNA) 또는 코딩 또는 비코딩 DNA 서열과 전체로서 또는 일부로서 동일한 폴리뉴클레오티드를 말한다.
- [43] "유전자"란 최광의의 의미로 간주되어야 하며, 구조 단백질 또는 조절 단백질을 암호화할 수 있다. 이때, 조절단백질은 전사인자, 열 충격단백질 또는 DNA/RNA 복제, 전사 및/또는 번역에 관여하는 단백질을 포함한다. 본 발명에 있어서, 발현 억제의 대상이 되는 목적 유전자는 바이러스 게놈에 내재된 것으로, 동물 유전자로 통합되거나 염색체 외 구성요소로서 존재할 수 있다.

예컨대, 목적 유전자는 HIV 게놈상의 유전자일 수 있다. 이 경우, siRNA 분자는 포유동물 세포 내 HIV 유전자의 번역을 불활성화시키는데 유용하다.

- [44] 본 발명의 용어 "상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition; EMT)"란, 상피세포가 세포극성(cell polarity) 및 세포-세포 부착성(cell-cell adhesion)을 잃고 전이성 및 침윤성을 획득하여 다양한 형태의 세포로 분화할 수 있는 다분화능 간질세포(multipotent stromal cell)인 중간엽세포화하는 과정을 의미한다. 상기 EMT는 중배엽 형성(mesoderm formation) 및 신경관형성(neural tube formation)을 포함한 많은 발달과정에 필수적이다. 또한 EMT는 상처 치유(wound healing), 조직의 섬유화(organ fibrosis) 및 암진행(cancer progression)에 있어서 전이(metastasis)의 개시(initiation)에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [45] EMT에서 나타나는 중요한 현상 중 하나는 E-카데린(E-cadherin)의 손실이다. 상기 E-카데린을 직접 또는 간접적으로 억제할 수 있는 많은 전사인자(transcription factors; TFs)가 알려져 있다. SNAI1/Snail 1, SNAI2/Snail 2, ZEB1, ZEB2, E47 및 KLF8은 E-카데린 프로모터에 결합하여 이의 전사를 억제하는 한편, Twist, Goosecoid, E2.2(a.k.a. TCF4), 호메오박스 단백질 SIX1 및 FOXC2는 간접적으로 E-카데린을 억제한다. 이외에 EMT를 유도하는 다른 신호전달경로로는 TGF- β , FGF, EGF, HGF, Wnt/베타-카테닌 및 노치(notch)가 관여하는 것들이 있다.
- [46]
- [47] 본 발명의 일 실시예에서, E-카데린의 발현을 억제할 수 있는 전사인자 SNAI1을 타겟으로 하는 asiRNA를 디자인하고 가장 knockdown efficiency가 좋은 asiRNA를 선별하였다. 또한 선별된 asiRNA의 염기서열 길이를 최적화 하였으며, modification을 도입하여 asiRNA가 세포 관통능을 가지고 핵산가수분해효소에 저항성을 가지도록 변형시켜, SNAI1 발현을 효율적으로 억제할 수 있는 cp-asiRNA를 선별하였다.
- [48]
- [49] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, SNAI1(Snail1)을 코딩하는 mRNA와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥과, 상기 안티센스 가닥과 상보적 결합을 형성하는 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥의 5' 말단 및 센스 가닥의 3' 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 것을 특징으로 하는 siRNA에 관한 것이다.
- [50] 본 발명에서의 siRNA는 일반적인 RNAi(RNA interference) 작용을 가지는 모든 물질을 포함하는 개념이다. RNAi는 1998년 Fire 연구그룹에 의해 *Caenorhabditis elegans*에서 최초로 발견된 세포 내 유전자 조절 방식으로, 작용 기전은 세포 내로 투입된 RNA 이중 가닥 중 안티센스 가닥이 표적 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합함으로써 표적 유전자 분해를 유도한다고 알려져 있다. 그 중 synthetic RNA interference(siRNA)는 "*in vitro*"에서 유전자의 발현을 억제하는 방법 중에 하나이다. 19-21bp의 siRNA는 이론적으로는 거의 모든 유전자에 대한

선택적 억제가 가능하여 암, 희귀질환, 섬유화, 바이러스성 감염 등의 다양한 유전자 관련 질환 치료제로서 개발 가능한 기술이다. 포유동물에서 siRNA를 사용한 생체 내 치료를 첫 시도한 경우는 2002년 중반이었으며, 그 이후로 응용 연구에 대한 많은 시도로 생체 내 치료에 관한 논문은 90개 이상 보고되었다.

- [51] 그러나 가능성과 반대로 최근 siRNA 기법의 부작용 및 단점이 계속적으로 보고되어 있으며 RNAi 기반으로 치료제의 개발이 이루어지기 위해서는 1) 효과적인 전달시스템의 부재 2) 오프-타겟 효과 3) 면역반응 유도 4) 세포 내 RNAi 기구 포화과 같은 장벽을 극복해야 할 필요성이 있다. siRNA가 표적 유전자의 발현을 직접적으로 조절할 수 있는 효과적인 방법임에도 불구하고 이와 같은 문제들로 인해 치료제 개발에 어려움을 겪고 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 출원인은 비대칭 siRNA(asymmetric shorter duplex siRNA, asiRNA) 구조 관련 기술을 개발한 바 있다(WO 2009/078685). asiRNA는 19+2 구조에 비해 짧은 이중나선 길이를 갖는 비대칭 RNAi 유도 구조이다. 기존에 siRNA가 갖는 오프-타겟 효과, RNAi 기작의 포화, TLR3에 의한 면역반응 등의 문제점들을 극복한 기술이며, 이에 따라 RNAi 신약 개발에 유력한 플랫폼이 될 수 있다. 또한, 화학적, 구조적 변형(chemical, structural modification)이 더해져서 별도의 전달 시스템 없이 세포 내로 자가 전달이 가능하여 기존에 siRNA 전달을 하는 시스템이 갖는 문제점들을 극복함으로써 효과적인 차세대 치료제로 개발이 가능하다.
- [52] 이를 바탕으로, 본 발명에서는 센스 가닥 및 상기 센스 가닥과 상보적인 안티센스 가닥을 포함하는 비대칭 siRNA를 제시하며, 본 발명에 따른 siRNA는 오프-타겟 효과, RNAi 기작의 포화, TLR3에 의한 면역반응 등의 문제를 일으키지 않아 안정적으로 높은 전달 효율을 유지하면서, 목적하는 정도로 유효하게 SNAI1 표적 유전자에 대한 발현을 억제할 수 있다.
- [53] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA는 상기 센스 가닥은 15-17nt의 길이를 가지고, 상기 안티센스 가닥은 16nt 이상의 길이를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 안티센스 가닥은 16-31nt의 길이를 가지는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 19-26nt의 길이를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 센스 가닥의 길이는 16nt, 이와 상보적인 안티센스 가닥의 길이는 19nt, 24nt 또는 26nt인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [54] 상기 센스 가닥의 3' 말단 및 안티센스 가닥의 5' 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성한다. 안티센스 가닥의 3' 말단은 예를 들어 1-15nt의 오버행(overhang)을 포함할 수 있다.
- [55] 본 발명의 일 실시예에서, SNAI1의 발현을 억제시키기 위하여 43개의 asiRNA를 디자인하였고, mRNA level과 protein level의 억제를 확인하였다.
- [56] 본 발명에 있어서, 상기 센스 가닥은 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67,

- 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83 및 85로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [57] 구체적으로, 서열번호 35, 47, 49 및 51로 구성된 군에서 선택되는 센스 가닥 및 상기 센스 가닥과 상보적인 안티센스 가닥을 포함하는 siRNA가 SNAIL 발현 억제 효과가 가장 좋은 것을 확인하였다.
- [58] 본 발명에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 및 102로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다. 구체적으로는, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 36, 48, 50, 52, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 및 102로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [59] 더욱 구체적으로, 상기 센스 가닥은 서열번호 35 또는 51이고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 92, 100 또는 101인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱 바람직하게는, 상기 센스 가닥은 서열번호 51이고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 100 또는 101인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [60]
- [61] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [62] 일반적인 siRNA는 포스페이트 백본 구조에 의한 높은 음전하 및 높은 분자량 등의 이유로 세포막을 통과할 수 없고 혈액에서의 빠른 분해 및 제거되어 실제 표적 부위에 RNAi 유도를 위한 충분한 양을 전달하는데 어려움이 있다. 현재 *in vitro* 전달의 경우 cationic lipids와 cationic polymers들을 이용한 높은 효율의 delivery 방법이 많이 개발되어 있지만, *in vivo*의 경우에는 *in vitro*만큼의 높은 효율로 siRNA를 전달하기 어렵고, 생체 내에 존재하는 다양한 단백질들과 상호작용에 의하여 siRNA 전달 효율이 감소하는 문제점이 있다.
- [63] 이에, 본 발명자들은 비대칭 siRNA 구조에 화학적 변형을 도입하여 별도의 전달체 없이 효과적이고 세포 내 전달을 할 수 있는 자가 전달능을 가진 asiRNA 구조체(cp-asiRNA)를 개발하였다.
- [64] 본 발명에 있어서, 상기 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에서 화학적 변형은 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다: 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(메틸), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F(불소), -O-2-메톡시에틸 -O-프로필(propyl), -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, -O-3-디메틸아미노프로필로 치환; 뉴클레오티드 내 당(sugar) 구조의 산소가 황으로 치환; 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형; PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid) 또는 UNA(unlocked nucleic acid) 형태로의 변형; 및 인산기(phosphate group), 친유성

화합물(lipophilic compound) 또는 세포 침투 펩타이드 결합.

- [65] 본 발명에 있어서, 상기 친유성 화합물(lipophilic compound)은 콜레스테롤, 토크페롤 및 탄소수 10개 이상의 장쇄지방산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는 콜레스테롤인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [66] 본 발명의 실시예에서, 상기 화학적 변형은 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 중 2개 이상의 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -OCH₃(methoxy) 또는 -F(불소)로 치환되는 변형; 센스 또는 안티센스 가닥에서 10% 이상의 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 변형; 센스 가닥의 3' 말단에 콜레스테롤 결합; 또는 안티센스 가닥의 5' 말단에 인산기(phosphate group) 결합일 수 있다. 이를 통해 siRNA의 생체 내 안정성을 향상시킬 수 있다. 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -OCH₃(methoxy)로 치환되거나 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트로 변형되면, 핵산분해효소에 대한 저항성을 높일 수 있고, 콜레스테롤 결합을 통해 세포막과 결합하게 됨으로써 세포 내로 siRNA의 전달을 용이하게 할 수 있다.
- [67] 구체적으로, 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 중 2개 이상의 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -OCH₃(methoxy) 또는 -F(불소)로 치환되는 변형; 센스 또는 안티센스 가닥에서 10% 이상의 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 변형; 및 센스 가닥의 3' 말단에 콜레스테롤 결합;으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다.
- [68] 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -OCH₃(methoxy)로 치환되는 변형과 관련하여, 센스 가닥의 5' 말단에 위치하는 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -OCH₃(methoxy)로 치환될 수 있다. 또한, 센스 가닥의 5'말단에서 3' 말단 방향으로 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -OCH₃(methoxy)로 치환된 2'-O-메틸 뉴클레오시드(2'-O-methylated nucleoside)가 연속적 또는 비연속적으로 포함될 수 있다. 상기 센스 가닥에서 2'-O-메틸 뉴클레오시드(2'-O-methylated nucleoside)가 비변형 뉴클레오시드와 교대로 포함될 수 있다. 상기 센스 가닥에서 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 연속적 2'-O-메틸 뉴클레오시드가 비변형 뉴클레오시드와 교대로 포함될 수 있다. 상기 센스 가닥에서 2'-O-메틸 뉴클레오시드가 예를 들어 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 2-8개 또는 8개 존재할 수 있다.
- [69] 상기 안티센스 가닥의 5' 말단에서 3' 말단 방향으로 2'-O-메틸 뉴클레오시드(2'-O-methylated nucleoside)가 연속적 또는 비연속적으로 포함될 수 있다. 상기 안티센스 가닥에서 2'-O-메틸 뉴클레오시드(2'-O-methylated nucleoside)가 비변형 뉴클레오시드와 교대로 포함될 수 있다. 상기 안티센스 가닥에서 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 연속적 2'-O-메틸 뉴클레오시드가 비변형 뉴클레오시드와 교대로 포함될 수 있다. 상기 안티센스 가닥에서

2'-O-메틸 뉴클레오시드가 예를 들어 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 2-7개 존재할 수 있다.

- [70] 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트로의 변형과 관련하여, 센스 가닥에서 라이보뉴클레오티드 사이의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상이 포스포로티오에이트로 변형될 수 있다. 경우에 따라서, 센스 가닥에서 라이보뉴클레오티드 사이의 결합 전부(100%)가 포스포로티오에이트로 변형될 수 있다.
- [71] 상기 안티센스 가닥에서 라이보뉴클레오티드 사이의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상이 포스포로티오에이트로 변형될 수 있다. 경우에 따라서, 안티센스 가닥에서 라이보뉴클레오티드 사이의 결합 전부(100%)가 포스포로티오에이트로 변형될 수 있다.
- [72] 바람직하게는, 상기 센스 가닥은 하기 표의 (a) 내지 (i)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나이고, 안티센스 가닥은 하기 표의 (j) 내지 (s)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.

[73]

	서열 (5'→3')
(a)	mCCmGAmAGmCCmAmCmAmGmGC*mU*mG*/chol/
(b)	mC(2'-F-C)mG(2'-F-A)mA(2'-F-G)mC(2'-F-C)mA(2'-F-C)mA(2'-F-C)mG(2'-F-C)*mU*(2'-F-G)*/chol/
(c)	mC*(2'-F-C)*mG(2'-F-A)mA(2'-F-G)mC(2'-F-C)mA(2'-F-C)mA(2'-F-C)mG(2'-F-C)*mU*(2'-F-G)*/chol/
(d)	mC*mC*mGmAmA(2'-F-G)mC(2'-F-C)(2'-F-A)(2'-F-C)mAmCmGmC*mU*mG*/chol/
(e)	mGUmUUmAmUmUGmAmUmUmUC*mA*A*/chol/
(f)	mG(2'-F-U)mU(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-G)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-C)*mA*(2'-F-A)*/chol/
(g)	mG*(2'-F-U)*mU(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-G)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-C)*mA*(2'-F-A)*/chol/
(h)	mG*mU*mUmUmA(2'-F-U)(2'-F-U)GA(2'-F-U)mAmUmUmC*mA*mA*/chol/
(i)	mGmUmUmUmAmUmUGAmUmUmUmC*A*A*/chol/
(j)	P-CAGCGUGUGGCUUCG*mG*mA*mU*mG
(k)	P-mC(2'-F-A)mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
(l)	P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
(m)	P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mGmUmG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mUmCmG*mG*mA*mU*mG
(n)	P-UUGAAUAUCAUAUAAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
(o)	P-mU(2'-F-U)mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
(p)	P-mU*(2'-F-U)*mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)

[74]	(q)	P-mU*(2'-F-U)*mGmAmA(2'-F-U)mA(2'-F-U)(2'-F-C)mAmA(2'-F-U)mAmAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
	(r)	P-UUGAAUAUCAAAUAAmA*mC*mU*mG*U
	(s)	P-mU(2'-F-U)GAA(2'-F-U)A(2'-F-U)(2'-F-C)AA(2'-F-U)AAA*(2'-F-C)*(2'-F-U)*G*U

[75] 상기 서열에서 *는 포스포로티오에이트 결합(phosphorothioated bond), m은 2'-O-메틸(Methyl), 2'-F-는 2'-플루오르(Fluoro), /chol/은 콜레스테롤, P-는 5'-인산기(Phosphate group)를 의미한다.

[76] 더욱 바람직하게는, 상기 센스 가닥은 상기 표의 (e), (g) 또는 (i)이며, 안티센스 가닥은 상기 표의 (o), (p), (r) 또는 (s)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[77] 가장 바람직하게는, 본 발명의 siRNA는 하기의 센스 가닥 및 안티센스 가닥으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 센스 가닥 상기 표의 (e) 및 안티센스 가닥 상기 표의 (p); 센스 가닥 상기 표의 (g) 및 안티센스 가닥 상기 표의 (o); 센스 가닥 상기 표의 (e) 및 안티센스 가닥 상기 표의 (r); 및 센스 가닥 상기 표의 (i) 및 안티센스 가닥 상기 표의 (s).

[78] 본 발명에 있어서, 상기 안티센스 가닥의 5' 말단에 인산기가 한 개 내지 세 개 결합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[79]

[80] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 siRNA를 포함하는 섬유화의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[81] 본 발명에 있어서, 상기 섬유화는 망막하섬유화, 폐섬유화, 간섬유화, 심근섬유화 또는 신장섬유화인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, EMT가 관여하는 것으로 알려진 섬유화의 예방 또는 치료용 조성물로 제한없이 사용할 수 있다.

[82] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 siRNA를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[83] 본 발명에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암, 결장암 또는 전립선암인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, EMT가 관여하는 것으로 알려진 암의 예방 또는 치료용 조성물로 제한없이 사용할 수 있다.

[84] 상기 약학 조성물은 유효성분인 siRNA 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 본 발명의 유효성분과 양립 가능하여야 하며, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 한 성분 또는 둘 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있고, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제,

분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형으로 제제화 할 수 있다. 특히, 동결건조(lyophilized)된 형태의 제형으로 제제화하여 제공하는 것이 바람직하다. 동결건조 제형 제조를 위해서 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 알려져 있는 방법이 사용될 수 있으며, 동결건조를 위한 안정화제가 추가될 수도 있다.

- [85] 상기 약학 조성물의 투여방법은 통상의 환자의 증후와 질병의 심각도에 기초하여 본 기술분야의 통상의 전문가가 결정할 수 있다. 또한, 산제, 정제, 캡슐제, 액제, 주사제, 연고제, 시럽제 등의 다양한 형태로 제제화 할 수 있으며 단위-투여량 또는 다-투여량 용기, 예를 들면 밀봉된 앰플 및 병 등으로 제공될 수도 있다.
- [86] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 구강, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 장관, 설하 또는 국소 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 방법, 배설율 또는 질병의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 본 기술분야의 통상의 전문가가 용이하게 결정할 수 있다. 또한, 임상 투여를 위해 공지 기술을 이용하여 본 발명의 조성물을 적합한 제형으로 제제화할 수 있다.
- [87]
- [88] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 siRNA의 치료적 유효량을 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 섬유화의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [89] 또한, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 siRNA의 치료적 유효량을 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [90] 본 발명은 또 다른 관점에서, 섬유화의 예방 또는 치료를 위한 상기 siRNA의 용도에 관한 것이다.
- [91] 본 발명은 또 다른 관점에서, 섬유화 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 siRNA의 사용에 관한 것이다.
- [92] 본 발명은 또 다른 관점에서, 암의 예방 또는 치료를 위한 상기 siRNA의 용도에 관한 것이다.
- [93] 본 발명은 또 다른 관점에서, 암 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 siRNA의 사용에 관한 것이다.
- [94] 본 발명에 따른 예방 또는 치료방법, 용도 및 사용에 포함되는 구성은 앞서 설명한 발명에 포함되는 구성과 동일하므로, 위 설명은 예방 또는 치료방법, 용도 및 사용에도 동일하게 적용될 수 있다.
- [95]

[96] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[97]

[98] 실시예 1: SNAIL을 표적으로 하는 RNAi 유도 이중 가닥 핵산 분자 43종 스크리닝

[99] SNAIL을 표적으로 하는 고 효율의 RNAi 간섭을 유도하는 이중 가닥의 핵산 분자를 확보하기 위해 SNAIL 유전자에 대한 표적서열선정 후 asiRNA를 디자인하였다. asiRNA 구조는 일반적으로 알려진 siRNA와 비교하여 서로 다른 secondary structure, GC contents(%), 5' end stability difference 등을 가지고 있어 일반적인 siRNA 디자인 프로그램을 사용하여 asiRNA의 염기 서열을 디자인하는 경우 최적화된 asiRNA의 디자인이 다소 어려울 수 있다. 따라서 본 연구의 asiRNA는 다음과 같은 방법으로 진행하였다. NCBI database 검색을 통해 SNAIL 유전자 정보를 획득하였다(mRNA accession number: NM_005985). 동물실험을 고려하여 mouse와 공통표적을 가지는 염기 서열 기준으로 homology 100%를 보이는 염기 서열을 우선 선발한 후 antisense strand에서 seed region(5' 기준 2번-8번 염기서열 부분)을 제외한 부분에서의 1개의 mismatch를 허용하는 염기 서열 또한 추가로 선발하여 총 43종의 asiRNA를 디자인 후 OliX Inc.(Korea)에서 10nmole scale로 합성하였다. 합성된 asiRNA는 95°C 5분, 37°C 25분 incubation 과정을 거쳐 annealing 하였고, 12% Polyacrylamide Gel Electrophoresis(PAGE) 후 ChemiDoc UV transilluminator(Biorad)를 통해 QC를 하였다.

[100]

[101] [표1]

SNAI1을 표적으로 하는 43종의 asiRNA 염기 서열

43종		Sequence(5'→3')			
No.	Name	Sense(16 mer)	서열 번호	Antisense(24 mer)	서열 번호
1	asiSNAI1 1	AGGCCACCUCUGGC	1	GCCAGCAGGUGGGCCUGGUCGUAG	2
2	asiSNAI1 2	CAGGCCACCUCUGG	3	CCAGCAGGUGGGCCUGGUCGUAGG	4
3	asiSNAI1 3	CCAGGCCACCUCUG	5	CAGCAGGUGGGCCUGGUCGUAGGG	6
4	asiSNAI1 4	ACCAGGCCACCUCU	7	AGCAGGUGGGCCUGGUCGUAGGGC	8
5	asiSNAI1 5	GACCAGGCCACCUC	9	GCAGGUGGGCCUGGUCGUAGGGCU	10
6	asiSNAI1 6	CGACCAGGCCACCUG	11	CAGGUGGGCCUGGUCGUAGGGCUG	12
7	asiSNAI1 7	ACGACCAGGCCACCU	13	AGGUGGGCCUGGUCGUAGGGCUGC	14
8	asiSNAI1 8	UACGACCAGGCCACC	15	GGUGGGCCUGGUCGUAGGGCUGCU	16
9	asiSNAI1 9	CUACGACCAGGCCAC	17	GUGGGCCUGGUCGUAGGGCUGCUG	18
10	asiSNAI1 10	CCUACGACCAGGCCA	19	UGGGCCUGGUCGUAGGGCUGCUGG	20
11	asiSNAI1 11	CCCUACGACCAGGCC	21	GGGCCUGGUCGUAGGGCUGCUGGA	22
12	asiSNAI1 12	GCCCUACGACCAGGCC	23	GGCCUGGUCGUAGGGCUGCUGGAA	24
13	asiSNAI1 13	AGCCCUACGACCAGGC	25	GCCUGGUCGUAGGGCUGCUGGAAG	26
14	asiSNAI1 14	CAGCCCUACGACCAGG	27	CCUGGUCGUAGGGCUGCUGGAAGG	28
15	asiSNAI1 15	GCAGCCCUACGACCAG	29	CUGGUCGUAGGGCUGCUGGAAGGU	30
16	asiSNAI1 16	GAAGCCACACGCUGCC	31	GGCAGCGUGUGGCUUCGGAUGUGC	32
17	asiSNAI1 17	CGAAGCCACACGCUGC	33	GCAGCGUGUGGCUUCGGAUGUGCA	34
18	asiSNAI1 18	CCGAAGCCACACGCUG	35	CAGCGUGUGGCUUCGGAUGUGCAU	36
19	asiSNAI1 19	UCCGAAGCCACACGCU	37	AGCGUGUGGCUUCGGAUGUGCAUC	38
20	asiSNAI1 20	AUCCGAAGCCACACGC	39	GCGUGUGGCUUCGGAUGUGCAUCU	40
21	asiSNAI1 21	CAUCCGAAGCCACACG	41	CGUGUGGCUUCGGAUGUGCAUCUU	42
22	asiSNAI1 22	AUUGAUUUCAAUAAA	43	UUUAUUGAAUAUCAAUAAACUGUA	44
23	asiSNAI1 23	UAUUGAUUUCAAUAA	45	UUAUUGAAUAUCAAUAAACUGUAC	46

[102]

24	asiSNAI1 24	UUAUUGAUUAUCAUA	47	UAUUGAAUAUCAAAUAAACUGUACA	48
25	asiSNAI1 25	UUUAUUGAUUAUCAAU	49	AUUGAAUAUCAAAUAAACUGUACAU	50
26	asiSNAI1 26	GUUUAUUGAUUAUCA	51	UUGAAUAUCAAAUAAACUGUACAUA	52
27	asiSNAI1 27	AGUUUAUUGAUUAUCA	53	UGAAUAUCAAAUAAACUGUACAUAU	54
28	asiSNAI1 28	AGCAGCCCUACGACCA	55	UGGUCGUAGGGCUGCUGGAAGGUA	56
29	asiSNAI1 29	CAGCAGCCCUACGACC	57	GGUCGUAGGGCUGCUGGAAGGUAA	58
30	asiSNAI1 30	CCAGCAGCCCUACGAC	59	GUCGUAGGGCUGCUGGAAGGUAAA	60
31	asiSNAI1 31	UCCAGCAGCCCUACGA	61	UCGUAGGGCUGCUGGAAGGUAAAC	62
32	asiSNAI1 32	UCCAGCAGCCCUACG	63	CGUAGGGCUGCUGGAAGGUAAACU	64
33	asiSNAI1 33	CUUCCAGCAGCCCUAC	65	GUAGGGCUGCUGGAAGGUAAACUC	66
34	asiSNAI1 34	UGCUGGCAGCCAUCCC	67	GGGAUGGCUGCCAGCAGGUGGGCC	68
35	asiSNAI1 35	CUGCUGGCAGCCAUCC	69	GGAUGGCUGCCAGCAGGUGGGCCU	70
36	asiSNAI1 36	ACAUCCGAAGCCACAC	71	GUGUGGCUUCGGAUGUGCAUCUUG	72
37	asiSNAI1 37	CACAUCCGAAGCCACA	73	UGUGGCUUCGGAUGUGCAUCUUGA	74
38	asiSNAI1 38	GCACAUCCGAAGCCAC	75	GUGGCUUCGGAUGUGCAUCUUGAG	76
39	asiSNAI1 39	AAGCCACACGCUGCCC	77	GGGCAGCGUGUGGCUUCGGAUGUG	78
40	asiSNAI1 40	UAGGCCCUGGCUGCUA	79	UAGCAGCCAGGGCCUAGAGAAGGC	80
41	asiSNAI1 41	CUAGGCCCUGGCUGCU	81	AGCAGCCAGGGCCUAGAGAAGGCC	82
42	asiSNAI1 42	UCUAGGCCCUGGCUGC	83	GCAGCCAGGGCCUAGAGAAGGCCU	84
43	asiSNAI1 43	CUCUAGGCCCUGGCUG	85	CAGCCAGGGCCUAGAGAAGGCCUU	86

[103]

실시예 2: SNAI1를 표적으로 하는 RNAi 유도 이중 가닥의 핵산 분자 스크리닝

[104]

mRNA 수준에서 유전자 억제 효율을 확인하기 위해, 선정된 43종의 asiRNA를 이용하여 A549 세포 주에 0.3nM 농도로 transfection 한 후 qRT-PCR을 수행하여 SNAI1 mRNA의 발현 정도를 측정하였다. A549 세포주는 F-12K Nutrient Mixture(Gibco), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), 100 units/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin 조건에서 배양하였다. A549 세포를 24-well plate에 3x10⁴ cells/well로 seeding 해주고 asiRNA(0.3nM, OliX Inc.) 와 RNAiMax(2µl/ml, Invitrogen Inc.)를 이용하여 총 volume 500µl Opti-MEM 조건에서 Invitrogen 제공 프로토콜에 따라 transfection을 수행하였다. 24시간 뒤, Tri-RNA reagent(FAVORGEN)를 이용해 total RNA를 추출한 다음 High-capacity cDNA reverse transcription kit(Applied Biosystems)를 이용해 cDNA를 합성하였고, StepOne real-time PCR system 기계로 power SYBR green PCR master Mix(Applied

Biosystems)와 표 2의 Primer를 이용해 SNAI1 유전자 발현 정도를 확인하였다.

[105]

[106] [표2]

SNAI1 qPCR Primer 염기 서열 정보

Name		Sequence(5'→3')	서열번호
Human Tubulin	Forward	GACCAAGCGTACCATCCA	87
	Reverse	CACGTTTGGCATAATCAGG	88
Human SNAI1	Forward	CGAGTGGTCTTCTGCGCTA	89
	Reverse	GGGCTGCTGGAAGGTAAACT	90

[107] SNAI1을 표적으로 하는 43종의 서열에 대한 asiRNA의 유전자억제 효율을 도 1에 나타내었다. 그 결과 최소 n=2에서 50% 이상 mRNA knockdown 효능을 보인 4종(#18, 24, 25, 26)의 candidate를 선발하여 단백질 수준에서의 유전자 억제 효율 정도를 확인하는 단계를 진행하였다.

[108]

[109] 43종의 asiRNA screening 결과를 통해 최소 n=1에서 50% 이상 knockdown 효능을 보인 9종(#15, 17, 18, 22, 24, 25, 26, 27, 28)을 선별하여 10nM 농도에서 transfection 후 western blot을 통해 protein knockdown을 확인하였다. Panc-1 세포주는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), 100 units/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin 조건에서 배양하였다. A549 및 Panc-1 세포를 6-well plate에 9×10^4 cells/well로 seeding하고 asiRNA(10nM, OliX Inc.)와 RNAiMax(2µl/ml, Invitrogen Inc.)를 이용하여 총 volume 2ml Opti-MEM 조건에서 Invitrogen 제공 프로토콜에 따라 transfection을 수행하였다. 48시간 후에 RIPA buffer(Sigma)를 이용해 cell lysis를 한 후 BCA protein assay kit(Invitrogen)로 단백질을 정량 하였다. 15% SDS-PAGE를 사용하여 각 샘플마다 20µg 단백질을 60V에서 30분, 110V에서 1시간을 분리 과정 후, PVDF membrane(Bio-rad)으로 300mA에서 2시간 동안 transfer 하였다. Transfer 후에 membrane을 5% skim milk에서 1시간 blocking 해준 후 SNAI1 antibody(Cell Signaling) 1:1000으로 4°C에서 12시간 동안 반응하였다. 다음 날 anti-rabbit Goat antibody-HRP(Santa cruz) 1:5000으로 1시간 반응시킨 후 ChemiDoc(BioRad)을 사용해 SNAI1 단백질 발현 정도를 비교할 수 있었다.

[110] 본 실험으로 4종(#18, 24, 25, 26)의 asiRNA 물질이 SNAI1 단백질 발현을 약 70% knockdown 시키는 것을 확인하였으며(도 2), 반복실험을 통해서 경향성이 유지되는 것을 확인하였다. 선정된 4종의 asiRNA 염기 서열을 이용하여 length optimization 단계로 진행하였다.

[111]

[112] 실시예 3: SNAI1을 표적으로 하는 RNAi 유도 이중 가닥의 핵산 분자 16종

design을 통한 염기 서열 길이 최적화

[113] 실시예 2에서 도출된 4종의 asiRNA 염기 서열을 기반으로 antisense 서열의 길이를 screening 시 사용한 길이인 24 mer, 가능한 길이인 19 및 26 mer, 최대 효율을 보일 것으로 보이는 예측되는 21 mer로 설정하여 총 16종의 염기서열을 디자인하였다.

[114]

[115] [표3]

SNAI1을 표적으로 하는 16종의 asiRNA 염기 서열

asiRNA			Sequence(5'→3')		
No.	asiSNAI1	AS Length	S(16 mer)	AS	서열 번호
1	asiSNAI1 18	24	(서열번호 35)	CAGCGUGUGGCUUCGGAUGUGCAU	36
2		26		CAGCGUGUGGCUUCGGAUGUGCAUCU	91
3		19		CAGCGUGUGGCUUCGGAUG	92
4		21		CAGCGUGUGGCUUCGGAUGUG	93
5	asiSNAI1 24	24	(서열번호 47)	UAUUGAAUAUCAAAUAAACUGUACA	48
6		26		UAUUGAAUAUCAAAUAAACUGUACAUA	94
7		19		UAUUGAAUAUCAAAUAAACU	95
8		21		UAUUGAAUAUCAAAUAAACUGU	96
9	asiSNAI1 25	24	(서열번호 49)	AUUGAAUAUCAAAUAAACUGUACA	50
10		26		AUUGAAUAUCAAAUAAACUGUACAUAU	97
11		19		AUUGAAUAUCAAAUAAACUG	98
12		21		AUUGAAUAUCAAAUAAACUGUA	99
13	asiSNAI1 26	24	(서열번호 51)	UUGAAUAUCAAAUAAACUGUACAUA	52
14		26		UUGAAUAUCAAAUAAACUGUACAUAUA	100
15		19		UUGAAUAUCAAAUAAACUGU	101
16		21		UUGAAUAUCAAAUAAACUGUAC	102

[116] 실시예 4: SNAI1을 표적으로 하는 RNAi 유도 이중 가닥의 핵산 분자 스크리닝을 통한 length optimization

[117] Panc-1 세포를 6-well plate에 9×10^4 cells/well로 seeding 해주고 asiRNA(10nM, OliX Inc.)와 RNAiMax(2 μ l/ml, Invitrogen Inc.)를 이용하여 총 volume 2ml Opti-MEM 조건에서 Invitrogen 제공 프로토콜에 따라 transfection을 수행하였다. 48시간 후에 RIPA buffer(Sigma)를 이용해 cell lysis를 한 후 BCA protein assay

kit(Invitrogen)로 단백질을 정량 하였다. 15% SDS-PAGE를 사용하여 각 샘플마다 20 μ g 단백질을 60V에서 30분, 110V에서 1시간 동안 분리한 후 PVDF membrane(Bio-rad)으로 300mA 에서 2시간 동안 transfer 하였다. Transfer 후에 membrane을 5% skim milk에서 1시간 blocking 해준 후 SNAI1 antibody(Cell Signaling) 1:1000으로 4°C에서 12시간 동안 반응하였다. 다음 날 anti-rabbit Goat antibody-HRP(Santa cruz) 1:5000으로 1시간 반응한 후 ChemiDoc UV transilluminator(BioRad)를 사용해 SNAI1 단백질 발현양을 확인할 수 있었다(도 3). 결과적으로 3종(asiSNAI1 18(19 mer), asiSNAI1 26(26 mer), asiSNAI1 26(19 mer))의 후보를 선정하였다(표 4).

[118]

[119] [표4]

Length optimization 결과 선정된 후보 물질 3종의 염기 서열

asiRNA			Sequence (5'→3')	
No.	asiSNAI1	AS length	Sense(16mer)	Antisense
3	asiSNAI1 18	19	CCGAAGCCACACGCUG (서열번호 35)	CAGCGUGUGGCCUUCGGAUG (서열번호 92)
14	asiSNAI1 26	26	GUUUUAUUGAUUUCAA (서열번호 51)	UUGAAUAUCAAAUAAACUGUACAUUA (서열번호 100)
15	asiSNAI1 26	19	GUUUUAUUGAUUUCAA (서열번호 51)	UUGAAUAUCAAAUAAACUGU (서열번호 101)

[120] 실시예 5: SNAI1 유전자를 표적하는 세포 관통능(cell-penetrating ability)이 있는 cp-asiRNA 32종 스크리닝

[121] SNAI1을 표적으로 하는 3종의 asiRNA에 cholesterol의 위치는 고정시키고, 2'OMe, 2'F(Fluoro), PS(phosphothioate bond)의 위치와 개수에 따라 16가지 modification pattern을 가진 SNAI1 cp-asiRNA을 디자인 후 Dharmacon Inc.(USA)에서 합성하였다. cp-asiRNA는 endocytosis 효율 및 stability를 높여 delivery vehicle의 도움 없이도 높은 효율로 세포막을 투과하여 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 합성된 cp-asiRNA는 95°C 5분, 37°C 25분 incubation 과정을 거쳐 annealing 하였고 12% Polyacrylamide Gel Electrophoresis(PAGE) 후 ChemiDoc UV transilluminator(BioRad)를 통해 QC 하였다.

[122]

[123] [표5]

SNAI1을 표적으로 하는 32종의 cp-asirRNA 염기 서열

32종		Sequence (5'→3')	
Name	No.	Sense (16 mer)	Antisense
OLX201D-018	1	mCCmGAmAGmCCm	P-CAGCGUGUGGCUUCG*mG*mA*mU*mG
	2	ACmACmGC*mU*mG */chol/	P-mC(2'-F-A)mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
	3		P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
	4		P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mGmUmG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mUmCmG*mG*mA*mU*mG
	5	mC(2'-F-	P-CAGCGUGUGGCUUCG*mG*mA*mU*mG
	6	C)mG(2'-F-A)mA(2'-F-G)mC(2'-F-	P-mC(2'-F-A)mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
	7	C)mA(2'-F-C)mA(2'-F-C)mG(2'-F-	P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
	8	C)*mU*(2'-F-G)*/chol/	P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mGmUmG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mUmCmG*mG*mA*mU*mG
	9	mC*(2'-F-	P-CAGCGUGUGGCUUCG*mG*mA*mU*mG
	10	C)*mG(2'-F-A)mA(2'-F-G)mC(2'-F-	P-mC(2'-F-A)mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
	11	C)mA(2'-F-C)mA(2'-F-	P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-

[124]

		C)mG(2'-F-	G)*mA*(2'-F-U)*mG
	12	C)*mU*(2'-F-G)*chol/	P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mGmUmG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mUmCmG*mG*mA*mU*mG
	13	mC*mC*mGmAmA(P-CAGCGUGUGGCUUCG*mG*mA*mU*mG
	14	2'-F-G)mC(2'-F-C)(2'-F-A)(2'-F-	P-mC(2'-F-A)mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
	15	C)mAmCmGmC*mU*mG*/chol/	P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
	16		P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mGmUmG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mUmCmG*mG*mA*mU*mG
OLX201D-026	17	mGUmUUmAUmUGm	P-UUGAAUAUCAAAUAAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
	18	AUmAUmUC*mA*A*/chol/	P-mU(2'-F-U)mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
	19		P-mU*(2'-F-U)*mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
	20		P-mU*(2'-F-U)*mGmAmA(2'-F-U)mA(2'-F-U)(2'-F-C)mAmA(2'-F-U)mAmAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
	21	mG(2'-F-	P-UUGAAUAUCAAAUAAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
	22	U)mU(2'-F-U)mA(2'-F-	P-mU(2'-F-U)mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-

[125]

		U)mU(2'-F-G)mA(2'-F-	C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
23		U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-C)*mA*(2'-F-A)*/chol/	P-mU*(2'-F-U)*mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
24			P-mU*(2'-F-U)*mGmAmA(2'-F-U)mA(2'-F-U)(2'-F-C)mAmA(2'-F-U)mAmAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
25	mG*(2'-F-		P-UUGAAUAUCAAAUAAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
26	U)*mU(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-G)mA(2'-F-		P-mU(2'-F-U)mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
27	U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-C)*mA*(2'-F-A)*/chol/		P-mU*(2'-F-U)*mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
28			P-mU*(2'-F-U)*mGmAmA(2'-F-U)mA(2'-F-U)(2'-F-C)mAmA(2'-F-U)mAmAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
29	mG*mU*mUmUmA(P-UUGAAUAUCAAAUAAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
30	2'-F-U)(2'-F-U)GA(2'-F-U)mAmUmUmC*mA*mA*/chol/		P-mU(2'-F-U)mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
31			P-mU*(2'-F-U)*mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-

[126]

		U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
	32	P-mU*(2'-F-U)*mGmAmA(2'-F-U)mA(2'-F-U)(2'-F-C)mAmA(2'-F-U)mAmAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
m: 2'-O-Methyl, F: 2'-Fluoro, P: 5'-Phosphate, *: phosphorothioated bond, /chol/: Cholesterol		

[127] 실시예 6: SNAI1 유전자를 표적하는 세포 관통능이 있는 cp-asiRNA 스크리닝
 [128] mRNA 수준에서 유전자 억제 효율을 확인하기 위해, 위의 32종의 cp-asiRNA를 이용하여 A549 세포주에 1 μ M 농도로 incubation(free uptake) 한 후 qRT-PCR을 수행하여 SNAI1의 발현 정도를 측정하였다.

[129] A549 세포를 24-well plate에 3x10⁴ cells/well로 seeding 해주고 32종의 cp-asiRNA를 Opti-MEM media 조건에서 1 μ M 으로 24시간 incubation 한 뒤, Tri-RNA reagent(FAVORGEN)를 이용해 total RNA를 추출한 다음 High-capacity cDNA reverse transcription kit(Applied Biosystems)를 이용해 cDNA를 합성하였고, StepOne real-time PCR system 기계로 power SYBR green PCR master Mix(Applied Biosystems)와 표 2의 primer를 이용해 SNAI1 발현 정도를 확인하였다(도 4). 그 결과 높은 효능을 보인 상위 12종(#1, 5, 8, 9, 13, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 28)의 candidate를 선발하였다.

[130]

[131] 32종의 ap-asiRNA screening 결과를 통해 상위 12종(#1, 5, 8, 9, 13, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 28)을 선별하여 1, 1.5, 3 μ M 농도 처리 후 western blot을 실시하였다.

[132] A549 세포를 12-well plate에 4x10⁴ cells/well로 seeding 해주고 12종의 cp-asiRNA를 Opti-MEM media 조건에서 1, 1.5, 3 μ M 으로 24시간 incubation 한 뒤, F-12K Nutrient Mixture(Gibco), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), 100 units/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 조건으로 media를 교체하였고, media 교체 24시간 후에 protein 수준에서 SNAI1 발현을 확인하였다(도 5). 실험 결과 효력 기준 상위 2종(#19, #26)을 선정하였다(표 6).

[133]

[134] [표6]

SNAI1을 표적으로 하는 2종의 cp-asiRNA 염기 서열

2종		Sequence(5'→3')	
No.	Name	Sense	Anti-sense
19	OLX201D-026-19	mGUUUUmAUmUGmAUmAUmU C*mA*A*/chol/	P-mU*(2'-F-U)*mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
26	OLX201D-026-26	mG*(2'-F-U)*mU(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-G)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-C)*mA*(2'-F-A)*chol/	P-mU(2'-F-U)mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
m: 2'-O-Methyl, F: 2'-Fluoro, P: 5'-Phosphate, *: phosphorothioated bond, /chol/: Cholesterol			

- [135] 실시예 7: SNAI1 유전자를 표적하는 세포 관통능이 있는 cp-asiRNA의 SNAI1 억제 효과 확인
- [136] 상기 실시예 6에서, asiSNAI1 26(26 mer)에 화학적 변형을 도입한 cp-asiRNA의 SNAI1 발현 억제 효과가 높은 것을 고려할 때, asiSNAI1 26(19 mer)(표 4의 서열번호 51의 sense 서열 및 서열번호 101의 antisense 서열)에 화학적 변형을 도입한 cp-asiRNA의 효과 또한 높을 것으로 예상되었다. 이에 따라, asiSNAI1 26(19 mer)에 실시예 5와 같은 방법으로 화학적 변형을 도입하여 세포 관통능이 있는 cp-asiRNA인 OLX201D-026-33 및 OLX201D-026-34를 추가로 합성하였다(표 7).
- [137]

[138] [표7]

In vivo 단백질 억제 효과 평가를 위한 후보 물질로 선정된 cp-asiRNA 염기 서열

Sequence (5'→3')	
Name	Sense Anti-sense
OLX201D-026-33	mGUmUUmAUmUGmAUmAUmU C*mA*A*/chol/ P-UUGAAUAUCAAAUAAmC*mU*mG*U
OLX201D-026-34	mGmUmUmUAmUmUGAmUAmU mUmC*A*A*/chol/ P-mU(2'-F-U)GAA(2'-F-U)A(2'-F-U)(2'-F-U) C)AA(2'-F-U)AAA*(2'-F-C)*(2'-F-U)*G*U

m: 2'-O-Methyl, F: 2'-Fluoro, P: 5'-Phosphate, *: phosphorothioated bond, /chol/: Cholesterol

[139] 상기 표 7의 OLX201D-026-33 및 OLX201D-026-34와 실시예 6에서 선정된 OLX201D-026-26을 대상으로 마우스 피부 조직 내에서의 타겟 단백질 억제 효력을 평가하였다.

[140] 대상 동물은 올릭스 기업부설연구소 실험동물실에서 C57BL/6(6주령, 수컷, OrientBio) 마우스를 1주일간 순화한 후, 7주령 동물을 시험에 사용하였다. 각 후보 물질은 0.5x PBS를 vehicle 용매로 사용하여 10mg/ml stock solution으로 조제하였고, 0.3, 1.0 및 2.0mg/100 μ l 3개 농도로 희석하여 마우스 피부에 100 μ l씩 1회 투여하였으며, 각 투여 부위간 간격은 최소 3cm로 유지하였다. 투여 3일째 마우스를 희생하고, 8-mm biopsy punch(BP-80F, Kai medical)를 사용하여 투여 부위의 피부 조직을 채취하였다(도 6 및 표 8).

[141]

[142] [표8]

In vivo 단백질 억제 효과 평가를 위한 실험 조건

Group	Treatment	Concentration of test item	Dose of test item	Injection volume	N=	Sacrifice
1	Non-treatment Vehicle (0.5x PBS)	3mg/mL	0.3mg/site	0.1mL	2	Day 3
2	OLX201D-026-26	10mg/mL	1.0mg/site			
3	OLX201D-026-33 OLX201D-026-34	20mg/mL	2.0mg/site			

[143] 채취한 조직을 1x PBS에 3회 washing 후, RIPA buffer(Sigma-Aldrich)를 넣고 homogenizer를 이용하여 tissue lysis를 한 후, BCA protein assay kit(Invitrogen)로 단백질을 정량하였다. Western blotting을 통한 단백질 분석을 위해 10%

SDS-PAGE를 사용하여 각 샘플마다 30 μ g 단백질을 60V에서 30분, 110V에서 1시간 분리한 후, PVDF membrane(Bio-Rad)으로 250mA에서 2시간 동안 transfer시켰다. Transfer 후 membrane을 5% skim-milk에서 1시간 blocking 준 후, SNAI1 antibody(Cell Signaling) 1:1000으로 4°C에서 12시간, anti-rabbit Goat antibody-HRP(Santacruz) 1:5000으로 1시간 반응시킨 후, ChemiDoc(BioRad)을 사용해 SNAI1 단백질 발현 정도를 확인하였다.

[144] 그 결과, 3종의 cp-asiRNA 모두 타겟 단백질 SNAI1의 생성을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다(도 7).

[145]

산업상 이용가능성

[146] 본 발명에 따르면, E-카테린의 발현을 억제하는 기능을 함으로써 조직의 재생과 섬유화, 암의 발생 및 전이와 밀접한 연관이 있는 EMT의 핵심인자인 전사인자 SNAI1(Snail1)을 조절하는 비대칭 siRNA를 선별하고, 화학적으로 변형시켜 전달체로 인한 세포독성을 제거하고 *in vivo*에서 보다 효율적인 유전자 발현의 억제를 가능하게 함으로써, 섬유화 또는 암의 예방 또는 치료제로 유용하게 사용할 수 있다.

[147]

[148] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[149]

서열목록 Free Text

[150] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] SNAI1(Snail1)을 코딩하는 mRNA와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥과, 상기 안티센스 가닥과 상보적 결합을 형성하는 센스 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 가닥의 5' 말단 및 센스 가닥의 3' 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 센스 가닥은 15-17nt의 길이를 가지고, 상기 안티센스 가닥은 16nt 이상의 길이를 가지는 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 16-31nt의 길이를 가지는 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 19-26nt의 길이를 가지는 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 센스 가닥은 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83 및 85로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 센스 가닥은 서열번호 35, 47, 49 및 51로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 및 102로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 36, 48, 50, 52, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 및 102로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 siRNA의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 화학적 변형은 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA:
뉴클레오타이드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(메틸),
-OCH₃(methoxy), -NH₂, -F(불소), -O-2-메톡시에틸 -O-프로필(propyl),
-O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필,
-O-3-디메틸아미노프로필로 치환;
뉴클레오타이드 내 당(sugar) 구조의 산소가 황으로 치환;
뉴클레오타이드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate),

보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형;

PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid) 또는 UNA(unlocked nucleic acid) 형태로의 변형; 및

인산기(phosphate group), 친유성 화합물(lipophilic compound) 또는 세포 침투 펩타이드 결합.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 친유성 화합물(lipophilic compound)은 콜레스테롤, 토크페롤 및 탄소수 10개 이상의 장쇄지방산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 siRNA.

[청구항 12] 제9항에 있어서,
 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 중 2개 이상의 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -OCH₃(methoxy) 또는 -F(불소)로 치환되는 변형;
 센스 또는 안티센스 가닥에서 10% 이상의 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 변형;
 센스 가닥의 3' 말단에 콜레스테롤 결합; 및
 안티센스 가닥의 5' 말단에 인산기(phosphate group) 결합;으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

[청구항 13] 제12항에 있어서,
 상기 센스 가닥은 하기 표의 (a) 내지 (i)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나이고,
 안티센스 가닥은 하기 표의 (j) 내지 (s)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 siRNA.

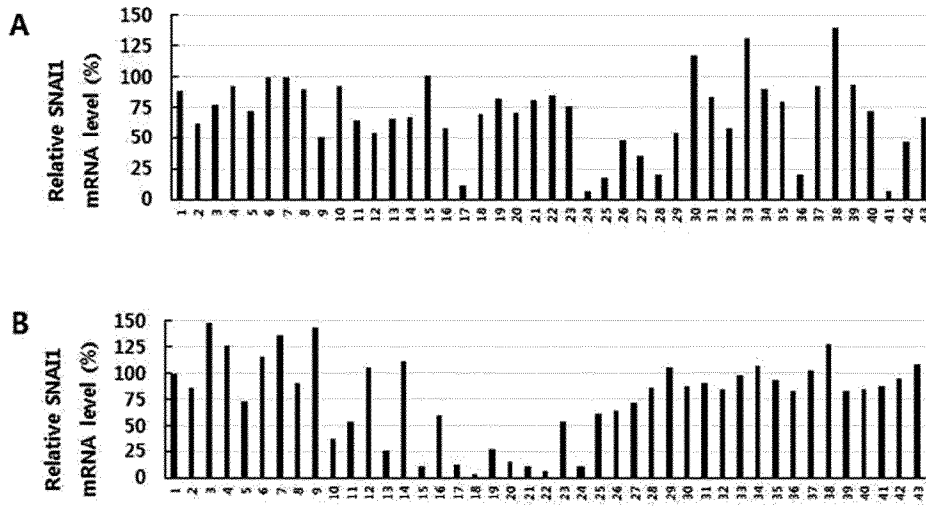
	서열 (5'→3')
(a)	mCCmGAmAmCCmAmCmGC*mU*G*/chol/
(b)	mC(2'-F-C)mG(2'-F-A)mA(2'-F-G)mC(2'-F-C)mA(2'-F-C)mA(2'-F-C)mG(2'-F-C)*mU*(2'-F-G)*/chol/
(c)	mC*(2'-F-C)*mG(2'-F-A)mA(2'-F-G)mC(2'-F-C)mA(2'-F-C)mA(2'-F-C)mG(2'-F-C)*mU*(2'-F-G)*/chol/
(d)	mC*mC*mGmAmA(2'-F-G)mC(2'-F-C)(2'-F-A)(2'-F-C)mAmCmGmC*mU*mG*/chol/
(e)	mGUmUUmAmUmUGmAmUmUmC*mA*A*/chol/
(f)	mG(2'-F-U)mU(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-G)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-C)*mA*(2'-F-A)*/chol/
(g)	mG*(2'-F-U)*mU(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-G)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mU(2'-F-C)*mA*(2'-F-A)*/chol/
(h)	mG*mU*mUmUmAmA(2'-F-U)(2'-F-U)GA(2'-F-U)mAmUmUmC*mA*mA*/chol/
(i)	mGmUmUmUmUmUGAmUmUmUmC*A*A*/chol/
(j)	P-CAGCGUGUGCUUCG*mG*mA*mU*mG
(k)	P-mC(2'-F-A)mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
(l)	P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mG(2'-F-U)mG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mU(2'-F-C)mG*(2'-F-G)*mA*(2'-F-U)*mG
(m)	P-mC*(2'-F-A)*mG(2'-F-C)mG(2'-F-U)mGmUmG(2'-F-G)mC(2'-F-U)mUmCmG*mG*mA*mU*mG
(n)	P-UUGAAUAUCAUAUAAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
(o)	P-mU(2'-F-U)mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
(p)	P-mU*(2'-F-U)*mG(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-U)mC(2'-F-A)mA(2'-F-U)mA(2'-F-A)mA(2'-F-C)mU(2'-F-G)mU(2'-F-A)mC(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)*mU*(2'-F-A)
(q)	P-mU*(2'-F-U)*mGmAmA(2'-F-U)mA(2'-F-U)(2'-F-C)mAmA(2'-F-U)mAmAmAmCmUmGmUmAmCmA*mU*mA*mU*mA
(r)	P-UUGAAUAUCAUAUAAmA*mC*mU*mG*U
(s)	P-mU(2'-F-U)GAA(2'-F-U)A(2'-F-U)(2'-F-C)AA(2'-F-U)AAA*(2'-F-C)*(2'-F-U)*G*U

(상기 서열에서 *는 포스포로티오에이트 결합(phosphorothioated bond),

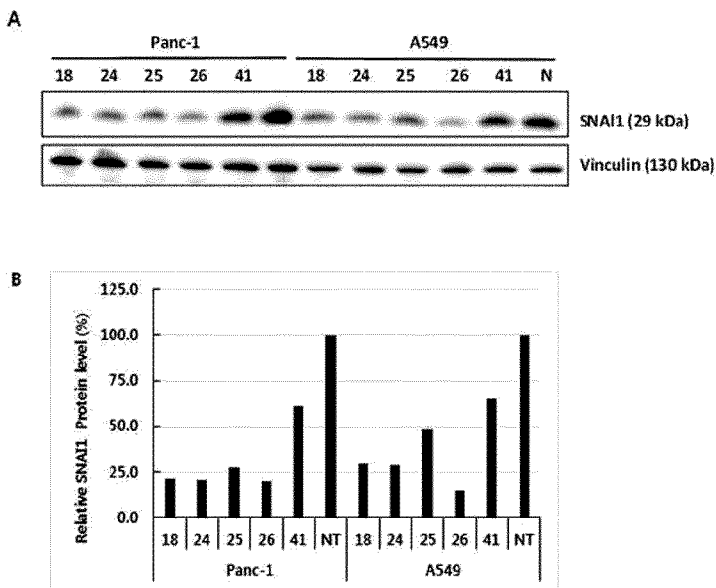
m은 2'-O-메틸(Methyl), 2'-F-는 2'-플루오르(Fluoro), /chol/은 콜레스테롤, P-는 5'-인산기(Phosphate group)를 의미함)

- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 센스 가닥은 상기 표의 (e), (g) 및 (i)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나이며, 안티센스 가닥은 상기 표의 (o), (p), (r) 및 (s)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 siRNA는 세포 관통능(cell-penetrating ability)을 가지는 것을 특징으로 하는 siRNA.
- [청구항 16] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 siRNA를 포함하는 섬유화의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 섬유화는 망막하섬유화, 폐섬유화, 간섬유화, 심근섬유화 또는 신장섬유화인 것을 특징으로 하는 섬유화의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 18] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 siRNA를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암, 결장암 또는 전립선암인 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

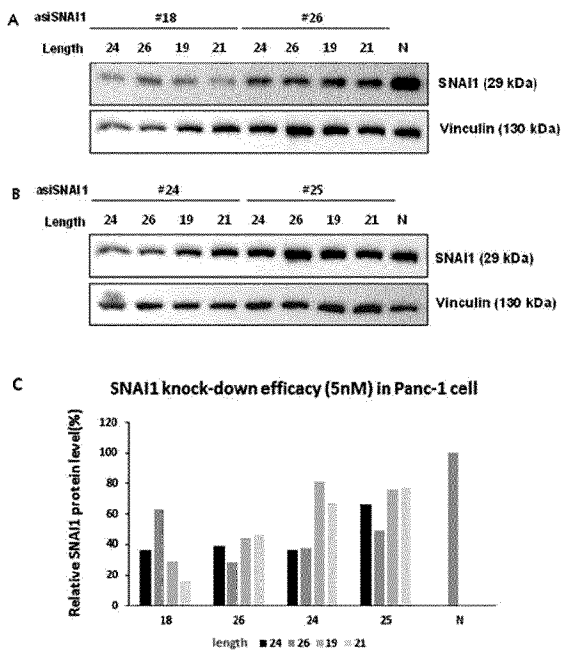
[도1]



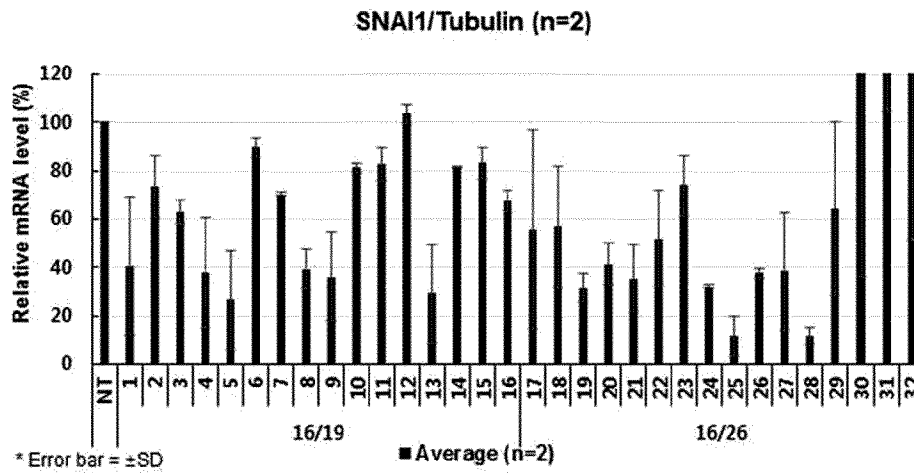
[도2]



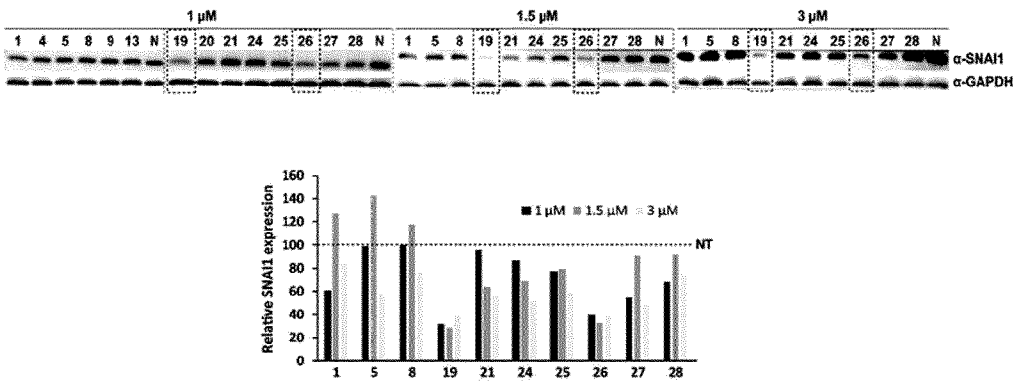
[도3]



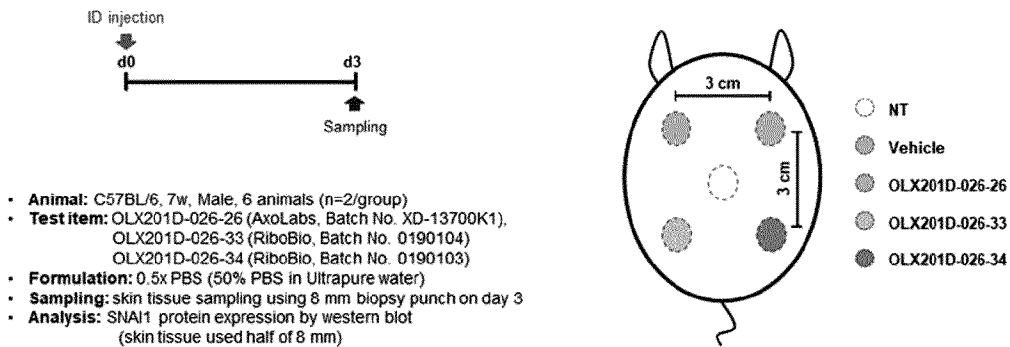
[도4]



[도5]

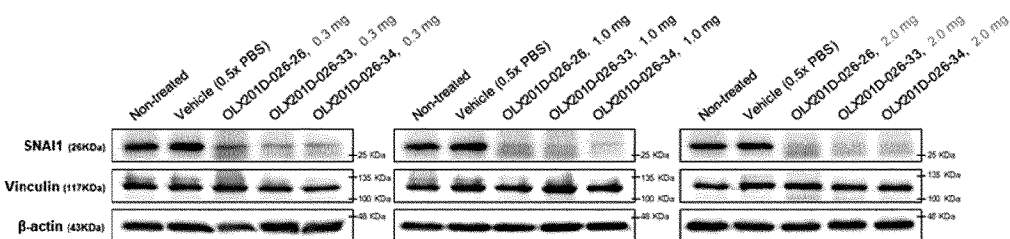


[도6]



[도7]

- **Lysis:** RIPA buffer (Sigma, Cat #. R0278) with protease inhibitor cocktail (Roche, Cat #. 11836153001), Homogenizer (IKA-T10 model) method
- **Sample:** Reducing condition, 30 μg loading
- **Gel:** 10% SDS-PAGE, 1.5mm, 10comb
- **Blocking:** 5% skim milk (BD, Cat # 232100) in TBST
- **Antibody:** SNAI1 (cell signaling, Cat# 3879, Lot # 12, 1:1000 ratio), β-actin (Santa cruz, Cat # sc47778, Lot # 12116, 1:4000 ratio), Vinculin (Santa cruz, Cat # sc73614, Lot # A0419, 1:4000 ratio), Dilution solution is 3% BSA (Bioworld, Cat # 22070008-3) in TBST



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/017332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/113; A61K 48/00; C12N 15/87; A61K 31/7088; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: SNAI1, siRNA, fibrosis, cancer, anti sense strand, sense strand, chemical modification

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HEMMATZADEH, M. et al. Snail-1 Silencing by siRNA Inhibits Migration of TE-8 Esophageal Cancer Cells Through Downregulation of Metastasis-Related Genes. Adv. Pharm. Bull. Electronic publication on 29 August 2018, vol. 8, no. 3, pages 437-445 See abstract; pages 438, 441; table 1; figures 1-2.	1-19
Y	KR 10-2018-0128423 A (OLIX PHARMACEUTICALS, INC.) 03 December 2018 See abstract; claims 1-51; paragraph [0008].	1-19
Y	NCBI. GenBank Accession No. NM_005985.4. Homo sapiens snail family transcriptional repressor 1 (SNAI1). mRNA. 22 November 2018 See the entire document.	5-8,13-14
Y	MUSAVI SHENAS, S. M. H. et al. SiRNA-mediated silencing of Snail-1 induces apoptosis and alters micro RNA expression in human urinary bladder cancer cell line. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2017, vol. 45, no. 5, pages 969-974 See abstract; pages 970-971, 973; tables 1-2; figures 1-4.	1-19
Y	US 2006-0134787 A1 (ZAMORE, P. D. et al.) 22 June 2006 See claims 1-10, 29-39; paragraphs [0035]-[0044], [0064]-[0067], [0114]-[0120]; figures 1-2.	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 MARCH 2020 (17.03.2020)

Date of mailing of the international search report

17 MARCH 2020 (17.03.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/017332

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2018-0128423 A	03/12/2018	CA 3020487 A1	19/10/2017
		CN 109072238 A	21/12/2018
		EP 3443093 A2	20/02/2019
		JP 2019-513384 A	30/05/2019
		US 10301628 B2	28/05/2019
		US 2017-0298358 A1	19/10/2017
		US 2019-0367925 A1	05/12/2019
		WO 2017-178883 A2	19/10/2017
		WO 2017-178883 A3	23/08/2018
		US 2006-0134787 A1	22/06/2006
US 2012-0322846 A1	20/12/2012		
US 2014-0287491 A1	25/09/2014		
US 2018-0187194 A1	05/07/2018		
US 9879253 B2	30/01/2018		
WO 2005-062937 A2	14/07/2005		
WO 2005-062937 A3	05/01/2006		

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 15/113(2010.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/113; A61K 48/00; C12N 15/87; A61K 31/7088; A61P 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: SNAI1(Snai1), siRNA, 섬유화(fibrosis), 암(cancer), 안티센스 가닥(antisense strand), 센스 가닥(sense strand), 화학적 변형(chemical modification)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	HEMATZADEH, M. 등, `Snail-1 Silencing by siRNA Inhibits Migration of TE-8 Esophageal Cancer Cells Through Downregulation of Metastasis-Related Genes', Adv. Pharm. Bull., 전자공개 2018.08.29, 8권, 3호, 페이지 437-445 초록; 페이지 438, 441; 표 1; 도면 1-2	1-19
Y	KR 10-2018-0128423 A (올릭스 주식회사) 2018.12.03 요약; 청구항 1-51; 단락 [0008]	1-19
Y	NCBI, GenBank Accession No. NM_005985.4, `Homo sapiens snail family transcriptional repressor 1 (SNAI1), mRNA', 2018.11.22 전체 문헌	5-8,13-14
Y	MUSAVI SHENAS, S. M. H. 등, `SiRNA-mediated silencing of Snail-1 induces apoptosis and alters micro RNA expression in human urinary bladder cancer cell line', Artif. Cells Nanomed. Biotechnol., 2017, 45권, 5호, 페이지 969-974 초록; 페이지 970-971, 973; 표 1-2; 도면 1-4	1-19
Y	US 2006-0134787 A1 (ZAMORE, P. D. 등) 2006.06.22 청구항 1-10, 29-39; 단락 [0035]-[0044], [0064]-[0067], [0114]-[0120]; 도면 1-2	1-19

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

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 " & " 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2020년 03월 17일 (17.03.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 03월 17일 (17.03.2020)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150
---	------------------------------------

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0128423 A	2018/12/03	CA 3020487 A1	2017/10/19
		CN 109072238 A	2018/12/21
		EP 3443093 A2	2019/02/20
		JP 2019-513384 A	2019/05/30
		US 10301628 B2	2019/05/28
		US 2017-0298358 A1	2017/10/19
		US 2019-0367925 A1	2019/12/05
		WO 2017-178883 A2	2017/10/19
		WO 2017-178883 A3	2018/08/23
		US 2006-0134787 A1	2006/06/22
US 2012-0322846 A1	2012/12/20		
US 2014-0287491 A1	2014/09/25		
US 2018-0187194 A1	2018/07/05		
US 9879253 B2	2018/01/30		
WO 2005-062937 A2	2005/07/14		
WO 2005-062937 A3	2006/01/05		