



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월06일
 (11) 등록번호 10-1337579
 (24) 등록일자 2013년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7000533(분할)
 (22) 출원일자(국제) 2005년03월04일
 심사청구일자 2012년01월06일
 (85) 번역문제출일자 2012년01월06일
 (65) 공개번호 10-2012-0008094
 (43) 공개일자 2012년01월25일
 (62) 원출원 특허 10-2006-7020986
 원출원일자(국제) 2005년03월04일
 심사청구일자 2010년03월04일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2005/007447
 (87) 국제공개번호 WO 2005/087926
 국제공개일자 2005년09월22일
 (30) 우선권주장
 60/550,504 2004년03월05일 미국(US)
 60/553,920 2004년03월17일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 WO2003007957 A2
 WO2003007075 A1
 전체 청구항 수 : 총 14 항

(73) 특허권자
베니텍 리미티드
 오스트레일리아 멜버른 빅 3000 콜린스 스트리트
 356 레벨 16
 (72) 발명자
로엘빙크 페트러스 더블류.
 미국 캘리포니아 95008 캠프벨 마이클 드라이브
 180
수히 데이빗 에이.
 미국 캘리포니아 94552 카스트로 밸리 캐년 테라스
 드라이브 22751
콜리칼로프 알렉산더 에이.
 미국 캘리포니아 95070 사라토가 몽페레 웨이
 18591
 (74) 대리인
박장원

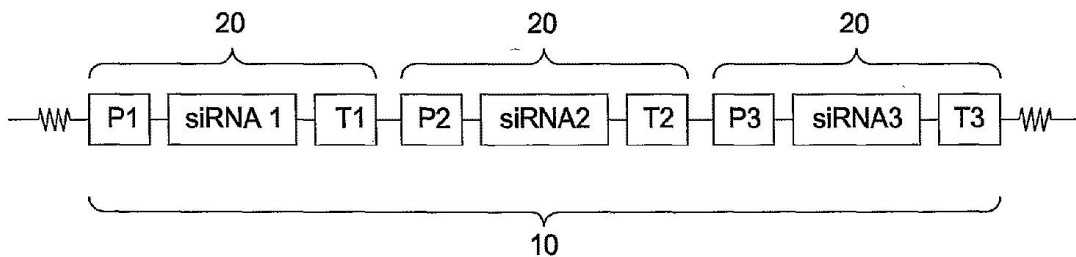
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 RNA i 제제의 동시 전달을 위한 다중 프로모터 발현 카세트

(57) 요약

본 발명은 바람직하게는 포유동물의 세포에게 RNAi를 생체내 동시 전달하기 위한 다중 프로모터 발현 카세트를 제공한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

적어도 3종의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들을 포함하는 다중 프로모터 발현 카세트를 포함하는 유전 구조물로서, 여기서 각각의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분은 프로모터 요소, 터미네이터 요소 및 상기 프로모터 요소와 터미네이터 요소에 작동적으로 링크된 RNAi 종을 코딩하는 서열을 포함하며, RNAi 종 중 적어도 하나는 SEQ ID NO: 19에 의해 코딩된 것인, 적어도 3종의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들을 포함하는 다중 프로모터 발현 카세트를 포함하는 유전자 구조물.

청구항 2

제1항에 있어서, RNAi 종 중 적어도 하나는 SEQ ID NO: 6에 의해 코딩된 것인 유전자 구조물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유전자 구조물은 이 구조물을 감염성 바이러스 입자 내로 패키징하는데 필요한 요소들을 부가적으로 포함하는 것인 유전자 구조물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분 중의 터미네이터 요소들 중 2개의 서열은 서로 다른 것인 유전자 구조물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분 중 프로모터 요소들 중 2개의 서열은 서로 다른 것인 유전자 구조물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 3개 이상의 RNAi 종은 변이체들 간의 단일 염기 다형 (SNPs) 서열을 갖는 핵산 서열을 표적으로 하며, 각각의 RNAi 종은 변이체의 1개 이상의 서브세트를 표적화할 수 있는 것인 유전자 구조물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 3개 이상의 RNAi 종은 급속한 돌연변이를 일으키는 핵산 서열들을 표적으로 하는 것인 유전자 구조물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, RNAi 종의 서열은 핵산 서열의 1개 이상의 변이체를 표적으로 하는 것인 유전자 구조물.

청구항 9

제1항에 있어서, RNAi 종은 표적 핵산의 서열에 기초하고, RNAi 치료에 내성을 일으키는 점 돌연변이를 갖는 서열에 부가적으로 기초하는 것인 유전자 구조물.

청구항 10

세포에서 발현되는 1종 이상의 C형 간염 바이러스 핵산 표적을 억제하는 방법으로서, 상기 세포를 제1항 또는 제2항에 기재된 유전자 구조물과 접촉시키는 것을 포함하여 이루어지며, 여기서 각각의 RNAi 종들은 SEQ ID NO. 1 내지 SEQ ID NO. 30으로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 표적의 서열과 적어도 70%의 서열 상동성을 갖는 것인 방법.

청구항 11

세포 내에서 발현되는 1종 이상의 C형 간염 바이러스 핵산 표적을 변형시키는 방법으로서, 상기 방법은:

- a) 제1항 또는 제2항에 기재된 유전자 구조물을 바이러스 입자 내로 패키징하는 공정;
 - b) 상기 바이러스 입자를 상기 세포에 전달하는 공정; 및
 - c) 변형될 핵산 표적이 발현하는데 충분한 조건 하에서, 제1항 또는 제2항에 기재된 다중 프로모터 발현 카세트로부터 3가지 이상의 RNAi 중들을 발현시키는 공정
- 을 포함하여 이루어지는 것인, 세포내에서 발현되는 1종 이상의 C형 간염 바이러스 핵산 표적을 변형시키는 방법.

청구항 12

세포 내에서 발현되는 1종 이상의 C형 간염 바이러스 핵산 표적을 변형시키는 방법으로서, 상기 방법은:

- a) 제1항 또는 제2항에 기재된 유전자 구조물을 비바이러스 입자 내로 패키징하는 공정;
 - b) 상기 비바이러스 입자를 상기 세포에 전달하는 공정; 및
 - c) 변형될 핵산 표적이 발현하는데 충분한 조건 하에서, 제1항 또는 제2항에 기재된 다중 프로모터 발현 카세트로부터 3가지 이상의 RNAi 중들을 발현시키는 공정
- 을 포함하여 이루어지는 것인, 세포 내에서 발현되는 1종 이상의 C형 간염 바이러스 핵산 표적을 변형시키는 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 기재된 유전자 구조물과 제약상 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하여 이루어지는, 세포 내에서 발현되는 1종 이상의 C형 간염 바이러스 핵산 표적을 변형시킴으로써 C형 간염 바이러스를 억제하기 위한 의약 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 기재된 유전자 구조물과 제약상 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하여 이루어지는, C형 간염 바이러스를 억제하기 위한 의약 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] [0001]본 출원은 2004년 3월 17일에 출원된 미국 가특허출원 제 60/553,920호와 2004년 3월 5일에 출원된 미국 가특허출원 제 60/550,504호에 기초하여 우선권을 주장하며, 상기 2 출원의 내용은 본 발명에 통합되어 있다.

배경기술

[0003] 서열 특이적 방법으로 유전자 발현을 억제하기 위한 이중 가닥 RNA의 이용은 신약 개발에 일대 혁신을 일으켰다. 포유동물에서 RNA 간섭 또는 RNAi는 생체내 세포의 긴, 이중 가닥 RNA의 효소적인 절단에 의하여 유도된 작은 간섭 RNA(small interfering RNAs)라고 불리워지는, 19- 내지 29-뉴클레오티드 길이의 이중 가닥 RNA 분자에 의해 매개된다. RNAi 제제들은 세포 밖에서 화학적으로 또는 효소적으로 합성되어서 세포로 운반되거나 (예를 들어, Fire 외, Nature, 391: 806-11 (1998); Tuschl 외, Gene and Dev., 13: 3191-97 (1999); 및 Elbashir 외, Nature, 411: 494-498 (2001) 참조), 또는 세포의 적당한 벡터에 의해 생체내에서 발현될 수 있다(예를 들어, McCaffrey 외, Nature Biotech. 21 (6): 639-644 (2003) 참조).

[0004] 그러나, 인간을 대상으로, 유효한 치료 수단으로서 비변형 RNAi를 생체내 전달하고자 할 경우, 몇가지 기술적 장애에 직면하게 된다. 먼저, 세포와 혈청의 뉴클리아제로 인해, 생체내에 주입된 RNA의 반감기는 약 70 초에 불과하다. (예를 들어, Kurreck, Eur. J. Bioch. 270: 1628-44 (2003) 참조). 화학적 변형을 이용함으로써 주입된 RNA의 안정성을 향상시키려는 시도가 있어왔다; 그러나, 화학적 변형이 세포독성 효과를 증가시키는 사례가 몇가지 있었다. 한가지 특정예로서, 포스페이트가 하나 걸러 포스포티오에이트로 대체되어 있는 RNAi 2 본체의 투여량에 대해 세포들은 내성을 나타내지 못하였다 (Harborth 외, Antisense Nucleic Acid Drug Rev.

13(2): 83-105 (2003)). 또 다른 장애는 조직 특이적인 전달이 가능하냐는 것과, 치료 반응을 일으키는데 충분한, 그러나 독성적이지는 않은 양으로 RNAi 제제를 전달할 수 있는가이다.

[0005] [0004] 표적 세포를 감염시켜, RNAi 분자를 전달하여 본래의 위치에서 (in situ) 발현시킬 수 있는 바이러스계 벡터 시스템의 사용을 비롯하여, RNAi 전달을 위해 몇가지 옵션이 연구되고 있다. 일반적으로 약 70개 뉴클레오타이드로 된 소형 RNA는 바이러스 벡터 골격으로부터 짧은 헤어핀 전구체 (shRNA: short hairpin)로서 전사되고, 이 shRNA는 다이스(Dicer) 효소에 의해 가공되어 적당한 활성 RNAi종 (RNAi species)으로 변환된다. 바이러스계 전달 접근법은 조직 특이성을 발생시키기 위해 바이러스의 표적화 특성을 이용하며, 일단 적절히 표적화가 이루어지면, 치료적 유효량을 달성하는데 충분한 양의 RNAi종을 발생하기 위해 내인성 세포기구에 의존한다.

[0006] [0005] 현재, 표적 서열을 전달하는데 있어서 가장 널리 사용되는 바이러스는 레트로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV) 또는 아데노바이러스 (Ad)로부터 유래된 시스템에 기초한 것들이다. 이들 벡터들은 모두 비교적 대형의 삽입물을 운반할 수 있고 치료적으로 합리적인 역가량으로 제조될 수 있다. 그러나, 어떠한 시스템이든지 간에, 암의 발달과 관련한 우려 (Cavazzana-Calvo 외, Science, 288:669-72 (2000)) 뿐만 아니라, 바람직하지 못한 숙주 면역 반응 및 그로 인해 환자에 독성을 미치게 된다는 문제점을 안고 있다. RNAi를 전달하는데 유용한 또 다른 바이러스는 아데노부속 바이러스 (AAV: adeno-associated virus)이다.

[0007] [0006] RNAi 요법의 한가지 바람직한 응용 분야는 항바이러스제로서 사용하는 것이다. 일반적으로 RNA 바이러스의 복제는 RNA/DNA-의존성 RNA 폴리머라제에 의존한다. 이러한 RNA/DNA 폴리머라제는 바이러스 게놈의 복제 충실성이 비교적 낮기 때문에, 그로 인한 기능적 결과는 예외적으로 많은 수의 돌연변이를 갖는 게놈을 발생시킨다. 이것은 다시 급속히 진화하는 자손 비리온으로 하여금, 통상적인 면역학적 제제와 화학적 항바이러스 제제를 피할 수 있게 해준다. 따라서, 저분자 요법에서 관찰되는 효과와 마찬가지로, RNAi 요법의 상대적인 강도와 효능은 장기간 치료가 이루어지는 동안 바이러스 진화에 따라 감소할 수 있다. 한 연구에서, 단일 뉴클레오타이드 변이를 가졌던 HIV 탈출 돌연변이가, 발현된 shRNA의 전달 후 35일만에 나타났다 (Boden 외, J. Virol. 77(21): 11531-11535 (2003)). 또 다른 연구에서, 폴리오바이러스 돌연변이는 미리 합성된 RNAi로 형질감염시켜 놓은 세포에서 감염 후 겨우 54시간 만에 검출될 수 있었다. 아직까지도 바이러스 내에서 복수개의 표적 서열에 대해 두개의 RNAi를 동시 전달하는 것은 탈출 변이체의 개시를 심각하게 지연시킨다 (Gitlin 외, Nature 418:430-434 (2002) 참조).

[0008] [0007] 따라서, 본 발명이 속한 기술 분야에서는, 안정하고 효과적인 RNAi 요법의 개발이 요구되고 있다. 본 발명은 이러한 요구를 충족시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 발명의 개요

*[0008] 본 발명은 표적 세포에 RNAi종 또는 제제를 전달하기 위한 혁신적인 조성물 및 방법에 관한 것이다. RNAi종은 바람직하게는 바이러스 전달계를 통해 전달되는 다중 프로모터 발현 구조물의 일부이다. 하나의 구조물 당 3종 이상의 RNAi 제제가 사용되므로, 본 발명은 개체에 변이체 간 서열 상이성 (SNPs)을 갖는 표적 유전자를 전달하는데 특히 유용한데, 이는 도입된 각각의 RNAi 제제가 변이체의 1 이상의 서브세트를 표적화 할 수 있기 때문이다. 마찬가지로, 본 발명의 조성물 및 방법 역시 RNA에 기초한 바이러스 제제에 의해 야기되는 질병과 같이, 급속하게 돌연변이되는 병원체에 의해 일어나는 질병 상태를 치료하는데 있어서도 유용하다; 즉, 바이러스 탈출 돌연변이들이 서로 다른 3종 이상의 RNAi 서열들의 효과를 회피할 가능성은 별로 없기 때문이다.

[0011] [0009] 따라서, 본 발명의 구체예들은 적어도 3종의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들을 함유하는 다중 프로모터 발현 카세트를 제공하며, 여기서 각각의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분은 프로모터 요소, 터미네이터 요소 및 프로모터 요소와 터미네이터 요소에 작동적으로 링크된 RNAi종을 포함하며, 이 때 상기 RNAi종들은 서로 상이한 것들이다. 이러한 구체예의 다양한 바람직한 측면은, 이 다중 프로모터 발현 카세트의 프로모터 요소 각각의 서열이 서로 다르다는 것이다. 이 구체예의 또 다른 측면은, 다중 프로모터 발현 카세트의 터미네이터 요소 각각의 서열이 서로 다르고/다르거나, 각각의 터미네이터 요소들은 자연에서 그것과 짝을 이루는 프로모터 요소와 동일한 유전자로부터 취해진다는 것이다. 또한, 이 구체예의 한 측면에서, 본 발명은 감염성 바이러스 입자

내로 치료 벡터를 패키징하는데 필요한 요소들을 함유하는 다중 프로모터 발현 구조물을 제공한다.

[0012] [0010] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 세포 내에서 발현되는 1종 이상의 핵산 표적들을 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은: 1종 이상의 핵산 표적들을 억제하는 RNAi 제제들을 3종 이상 발현하는 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트를 바이러스 벡터 내로 합체시켜 바이러스계 RNAi 전달 구조물을 제조하는 공정; 상기 바이러스 RNAi 전달 구조물을 바이러스 입자 내로 패키징하는 공정; 상기 바이러스 입자를 세포 내로 전달하는 공정; 및 상기 다중 프로모터 발현 카세트로부터 3종 이상의 RNAi 제제를 발현시키는 공정을 포함하여 이루어진다. 본 발명의 이 구체예의 다양한 측면에서, 발현되는 1종 이상의 핵산 표적들은 세포 내에서 암 상태와 같은 질병 상태를 개시하거나 유지하는데 필요한 유전자들을 발현시키는 것들이다. 본 발명의 이 구체예의 다른 측면에서, 발현되는 1종 이상의 핵산 표적들은 병원체에 의해 세포의 감염을 유지하거나 세포를 감염시키는데 필요한 유전자들을 발현시키는 것들이다. 또는, 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트는 비바이러스계 벡터 내로 제공되어 기술 분야에 공지인 비바이러스 방법을 이용하여 세포로 전달될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0013] [0033] 본 발명의 조성물과 방법을 설명하기에 앞서, 본 발명은 이하에 설명된 특정 방법론, 산물, 장치, 및 인자들로 한정되는 것이 아님이 전제되어야 한다. 이는, 이러한 방법, 장치 및 포물레이션들은 변할 수 있기 때문이다. 또한, 본 발명에 사용된 용어들은 특정 구체예를 설명하기 위한 목적에서 비롯된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명은 오직 첨부된 특허청구범위에 의해서만 그 범위가 정해진다.

[0014] [0034] 본 명세서에서, 단수형 "a," "and," 및 "the"는 그 문맥상 특별히 달리 읽히지 않는 한, 복수형도 포괄하는 것이다. 따라서, 예컨대, "인자 (a factor)"라 함은 하나의 인자 또는 여러가지 인자들의 혼합을 가리키는 것이고, "그 제조 방법 (the method of production)"이라 함은 당업자에게 알려진 균등한 공정과 방법을 모두 포괄하는 것이며, 기타의 용례도 마찬가지이다.

[0015] [0035] 달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술용어와 과학용어들은 본 발명이 속한 분야의 당업자가 공통적으로 이해하고 있는 것과 동일한 의미를 갖는 것이다. 본 명세서에 언급된 모든 문헌들은 그 문헌에 설명되고, 본 발명과 관련하여서도 사용될 수 있는 디바이스, 포물레이션 및 방법론들을 설명 및 개시하기 위한 목적으로, 아무 제한 없이 참고적으로 본 명세서에 통합된 것이다.

[0016] [0036] 다음의 설명에서, 본 발명을 보다 명쾌하게 이해시키기 위해 여러가지 특정한 구체예를 제시하였다. 그러나, 당업자라면 본 발명이 이들 한두가지 상세 없이도 실시될 수 있음을 이해할 것이다. 또 다른 경우, 본 발명이 속한 기술 분야의 당업자에게 잘 알려진 특성과 공정들은 본 발명을 애매하게 만드는 것을 피하기 위해 따로 설명하지 않았다.

[0017] [0037] 본 발명은 단일 발현 구조물을 이용하여 3종 이상의 서로 다른 RNAi 제제들을 세포에 동시에 전달하기 위한 혁신적이고도 확고한 유전 조성물에 관한 것이다. 이 조성물과 방법은 안정하고도 지속적으로 표적 핵산을 억제하게 해준다.

[0018] [0038] 본 발명에서는, 대체로 기술 분야 범위 내의 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술, 세포 생물학 및 바이러스학의 통상적인 방법들이 이용된다. 이러한 기술은 예컨대, Manias, Fritsch & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning : A Practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover, ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)) ; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. 1986); 및 RNA Viruses: A practical Approach, (Alan, J. Cann, Ed., Oxford University Press, 2000)와 같은 문헌에 상세히 설명되어 있다.

[0019] [0039] "벡터"는 다른 DNA 세그먼트가 부착될 수 있는 플라스미드, 파지, 바이러스 구조물 또는 코스미드와 같은 레플리콘이다. 벡터는 세포에서 DNA 세그먼트를 형질도입하거나 발현하는데 이용된다.

[0020] [0040] "프로모터" 또는 "프로모터 서열"이란 세포에서 RNA 폴리머라제와 결합하여 메신저 RNA, 리보솜 RNA, 핵소체 RNA의 소핵 또는 모든 종류의 모든 RNA 폴리머라제 I, II, 또는 III에 의해 전사된 모든 종류의 RNA와 같은 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 코딩 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역이다.

[0021] [0041] 어떤 세포가 외인성 또는 이종의 핵산이나 벡터에 의해 "형질전환되다 (transformed)" "형질도입되다 (transduced)" 또는 "형질감염되다 (transfected)" 라고 하는 것은, 그러한 핵산이 예컨대 형질감염 제제와의 복합체로서, 또는 바이러스 입자 내에 패키징되어 그 세포 내로 도입되었음을 가리키는 것이다. 형질전환 DNA는

세포의 게놈 내로 합체 (공유적으로 링크됨)될 수도 있고 되지 않을 수도 있다. 진핵세포와 관련하여, 안정하게 형질전환된 세포는 형질전환 DNA가 숙주 세포 염색체 내로 합체되거나 또는 염색체 밖에서 유지되어, 그 형질전환 DNA가 세포 복제 동안 딸 세포들에 의해 유전되는 세포이거나, 또는 지속적인 에피솜이 존재할 경우, 비복제, 분화된 세포이다.

- [0022] [0042] "RNA 간섭" 또는 "RNAi"라 함은 이중가닥 RNA 분자 또는 짧은 헤어핀 RNA가 이들이 실질적으로 또는 모든 상동성을 공유하는 핵산 서열의 발현을 변경시키는 것을 칭하는 것이다. "RNA 중" 또는 "RNAi 제제"라는 용어는 RNAi를 유발하는 명확한 RNA 서열을 가리키며; "RNAi 발현 카세트"라는 용어는 3종 이상의 RNAi종들을 포함하는 본 발명의 구체예에 따른 카세트를 가리킨다.
- [0023] [0043] 도 1은 본 발명에 따른 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물들이 사용될 수 있는 한가지 방법 100의 공정들을 나타내는 단순화된 흐름도이다. 먼저, 공정 200에서, 특정 질병 표적을 조준해서 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트를 제작한다. 이어서, 공정 300에서, 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트를 적절한 바이러스 전달 구조물과 라이게이션시킨다. 이어서 공정 400에서 이 바이러스계 RNAi 발현 전달 구조물을 바이러스 입자 내로 패키징하고, 공정 500에서 처리하게 될 표적 세포 내로 이 바이러스 입자들을 전달한다. 각각의 공정 및 성분들에 관한 상세는 이하에 제시하였다.
- [0024] [0044] 본 발명에 따른 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물은 당업자에게 알려진 여러가지 상이한 프로토콜에 의해 합성적으로 또는 효소적으로 만들어서, 예컨대, Sambrook 외., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)에 설명된 바와 같은 표준 재조합 DNA 기술을 이용하여, 그리고 예컨대, United States Dept. of HHS, National Institute of Health (NIH) Guidelines for Recombinant DNA Research에 설명된 조절방법 하에서 정제할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 이 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트는 포스포르아미데이트를 이용하여 합성하거나, 기술 분야에 잘 알려진 프로토콜을 이용한 유사한 화학에 의해 합성하는 것이 좋다.
- [0025] [0045] 도 2A 및 2B는 본 발명의 구체예에 따른 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트의 단순화된 개략도이다. 도 2A는 세계의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들 (20에 나타냄)을 갖는 다중 프로모터 발현 카세트 (10)의 구체예를 도시하며, 도 2B는 다섯개의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들(20에 나타냄)을 갖는 다중 프로모터 발현 카세트 (10)의 구체예를 도시한 것이다. P1, P2, P3, P4 및 P5는 프로모터 요소들을 나타낸다. RNAi1, RNAi2, RNAi3, RNAi4, 및 RNAi5는 서로 다른 다섯가지 RNAi종들의 서열을 나타낸다. T1, T2, T3, T4, 및 T5는 종결 요소들을 나타낸다. 본 발명에 따른 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트는 3가지 이상의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들을 함유할 수 있으며, 여기서 여하한 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트 내에 포함되는 상기 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들의 갯수는 예컨대, 선택된 전달계의 패키징 사이즈 (예컨대, AAV와 같은 몇몇 바이러스들은 비교적 엄격한 사이즈 제한을 갖는다); 세포 독성, 및 최대 효율 (즉, 예컨대 4개의 RNAi 서열을 발현시키는 것과 10개의 RNAi 서열을 발현시키는 것이 치료적으로 동등한 효과를 나타낼 수 있다)에 따라 제한된다.
- [0026] [0046] 카세트를 구성하는 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들 중 세계 이상의 RNAi종들은 모두 서로 다른 서열을 갖는다; 즉, RNAi1, RNAi2, RNAi3, RNAi4 및 RNAi5는 모두 서로 다르다. 그러나, 어떤 카세트에서든지 프로모터 요소는 같을 수 있다 (즉, P1, P2, P3, P4 및 P5 중 두개 이상의 서열은 서로 같을 수 있다); 어떤 카세트 내의 모든 프로모터들은 서로 다를 수 있다; 또는 어떤 카세트 내에서 오직 한번만 나타나는 프로모터 요소와 두번 이상 나타나는 프로모터 요소와의 조합도 있을 수 있다. 마찬가지로, 어떤 카세트에서 종결 요소들 역시 서로 동일할 수 있다 (즉, 예컨대 T1, T2, T3, T4 및 T5 중 두개 이상의 서열은, 인접하는 4개 이상의 T 잔기 스트레치와 같이 서로 같을 수 있다); 어떠한 카세트 중 모든 종결 요소들은 서로 다를 수 있다; 또는 어떤 카세트 내에서 오직 한번만 나타나는 종결 요소와 두번 이상 나타나는 종결 요소와의 조합도 있을 수 있다. 바람직하게는, 어떤 카세트를 구성하는 각각의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분에 있어서 프로모터 요소들과 종결 요소들은, 성분 및/또는 카세트 간의 DNA 재조합 이벤트 가능성을 감소시키기 위해, 모두 상이한 것이 좋다. 또한, 바람직한 구체예에서, 각각의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분에 사용되는 프로모터 요소와 종결 요소는 서로 부합되는 것이 좋다; 즉, 프로모터와 터미네이터 요소들은 이들이 자연발생하는 동일한 유전자로부터 취해지는 것이 좋다.
- [0027] [0047] 도 3A, 3B 및 3C는 짧은 snRNA를 발현하는 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트의 또 다른 구체예를 구성하는 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 도시한 것이다. snRNA는 센스 가닥과 안티센스 가닥이 헤어핀 루프에 의해 링크되어 있는 WKfq는 이분체이다. 일단 발현되면, snRNA는 RNAi종으로 가공된다. 박스 A, B 및 C는 세가지 서로 다른 프로모터 요소들을 나타내고, 화살표는 전사 방향을 가리킨다. TERM 1, TERM 2, 및 TERM 3은 세가지

서로 다른 종결 서열을 나타내고, shRNA-1, shRNA-2 및 shRNA-3은 세가지 서로 다른 shRNA 종을 나타낸다. 이들 구체에 중의 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트들은 A로 표시된 박스로부터 화살 표시된 Term3으로 연장된다. 도 3A는 카세트 내에서 세가지 프로모터/RNAi/터미네이터 성분 (20)들이 모두 동일 방향임을 가리키는 반면, 도 3B는 shRNA-1과 shRNA-2에 대한 프로모터/RNAi/터미네이터는 같은 방향을, 그리고 shRNA-3의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분은 반대 방향을 나타냄을 보여준다 (즉, 카세트의 두가닥 모두에서 전사가 일어남).

[0028] [0048] 도 3C는 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들 간의 거리를 늘리기 위해 DNA 대역에 의해 분리된 각각의 카세트들을 도시한다. "스터퍼(stuffer)" DNA로 알려진 삽입된 DNA는 5 내지 5000 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 프로모터들 사이에는 스템퍼 단편이 하나 이상 있을 수 있다. 스템퍼 단편이 여러개인 경우, 이들의 길이는 서로 같거나 다를 수 있다. 스템퍼 DNA 단편의 서열은 서로 다른 것이 바람직하다. 스템퍼 DNA 단편은 본 발명의 다중 프로모터 카세트의 크기를 증가시켜, 대응하는 전달 벡터에 적절히 들어맞게 하는데 이용될 수 있다. 스템퍼의 길이는 다중 프로모터 카세트와 연관된 특정 벡터의 사이드 요구사항에 의해 좌우된다. 예컨대, 일례에서 AAV 벡터의 사이드 요구사항을 적절히 만족하기 위해 스템퍼 단편의 길이는 총 4000 뉴클레오타이드 (nt)이다. 또 다른 구체예에서, 자가 상보적인 AAV 벡터의 사이드 요구사항을 적절히 만족시키기 위한 스템퍼 단편의 길이는 총 2000 nt이다. 다른 변형예 역시 이용가능하다.

[0029] [0049] 도 3D 및 3E는 헤어핀 루프 없이 RNAi 종들을 발현시키는 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트의 또 다른 구체예를 구성하는 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 도시한 것이다. 두 도면에서, P1, P2, P3, P4, P5 및 P6는 프로모터 요소를 나타낸다 (화살표는 전사 방향을 가리킨다); 또한 T1, T2, T3, T4, T5, 및 T6는 종결 요소를 가리킨다. 두 도면 모두에서, RNAi1 센스와 RNAi1 안티센스 (a/s)가 상보체이고, RNAi2 센스와 RNAi2 a/s가 상보체이며, RNAi3 센스와 RNAi3 a/s가 상보체이다.

[0030] [0050] 도 3D에 도시된 구체예에서, 세개의 RNAi 센스 서열은 모두 하나의 가닥으로부터 전사되는 반면 (P1, P2 및 P3을 경유해서), 세개의 RNAi a/s 서열은 상보 가닥 (P4, P5, P6을 경유해서)으로부터 전사된다. 이 특별한 구체예에서, RNAi1 a/s (T4)의 종결 요소는 프로모터 P1과 RNAi 1 센스 서열 사이에 위치한다; 한편, RNAi1 센스의 종결 요소는 RNAi 1 a/s 서열과 그의 프로모터, P4 사이에 위치한다. 이 모티프는 도 3D에 도시된 상부 가닥이 (+) 가닥으로, 하부 가닥이 (-) 가닥으로 지정되면, 왼쪽에서 오른쪽으로 움직이는 요소들은 P1 (+), T4 (-), RNAi1 (센스 및 a/s), T1 (+), P4 (-), P2 (+), T5 (-), RNAi2 (센스 및 a/s), T2 (+), P5 (-), P3 (+), T6 (-), RNAi3 (센스 및 a/s), T3 (+), 및 P6 (-)가 되도록 반복된다.

[0031] [0051] 도 3E에 도시된 또 다른 구체예에서, 모든 RNAi 센스 및 안티센스 서열들은 동일한 가닥으로부터 전사된다. 당업자라면 특정한 응용 뿐만 아니라, 그의 조합 또는 변형을 위해, 도 3A 내지 도 3E에 도시된 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트의 어떤 구체예든 이용가능함을 이해할 것이다.

[0032] [0052] 몇가지 구체예에서, 강도를 달리하는 프로모터들을 사용할 수 있다. 예컨대, 세가지 이상의 강력한 프로모터 (예컨대 Pol III 타입 프로모터)를 사용하면, 예컨대, 이용가능한 뉴클레오타이드 풀 또는 전사에 필요한 다른 세포 성분들의 고갈로 인해 세포에 부담이 될 수 있다. 이에 더해, 또는 다른 방법으로, 강력한 프로모터들을 몇가지 사용하면, 세포에서 RNAi 체계의 발현이 독성 수준으로 일어날 수 있다. 따라서, 몇가지 구체예에서, 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트의 프로모터들 중 하나 이상은 그 카세트 내의 다른 프로모터들보다 약한 것일 수 있다. 프로모터들은 또한 분자 기술이나 또는 예컨대 조절 요소를 통해 보다 약한 전사 수준을 얻기 위해 추가로 변형되어도 좋고, 변형되지 않아도 좋다.

[0033] [0053] 프로모터는 조직 특이적이거나 세포 특이적일 수 있다. "조직 특이적"이라는 용어가 프로모터에 쓰일 때는, 그 프로모터가, 목적 뉴클레오타이드 서열을 특정 조직 (예컨대, 간)에서만 선택적으로 발현시킬 수 있어서, 다른 종류의 조직 (예컨대, 뇌)에서는 목적하는 것과 동일한 뉴클레오타이드 서열의 발현이 비교적 일어나지 않도록 할 수 있음을 가리킨다. 이러한, 조직 특이적인 프로모터에는 Ick, 미오게닌 또는 thy1과 같은 프로모터가 포함된다. "세포 특이적"이라는 용어가 프로모터에 적용될 때는, 그 프로모터가, 목적 뉴클레오타이드 서열을 특정 유형의 세포에서만 선택적으로 발현시킬 수 있어서, 동일 조직의 다른 유형의 세포에서는 목적하는 것과 동일한 뉴클레오타이드 서열의 발현이 비교적 일어나지 않도록 할 수 있음을 가리킨다 (예컨대, Higashibata 외, *J. Bone Miner. Res.* Jan 19(1) : 78-88 (2004); Hoggatt 외, *Circ. Res.*, Dec. 91 (12): 1151-59 (2002); Sohal 외, *Circ. Res.* Jul 89(1) : 20-25 (2001); and Zhang 외, *Genome Res.* Jan 14(1) : 79-89 (2004) 참조). "세포 특이적"이라는 용어가 프로모터에 사용될 때는 그 프로모터가 단일 조직의 어떤 부위에서 목적하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 선별적으로 촉진시킬 수 있음을 의미하기도 한다. 또는 프로모터는 구조적이거나, 조절적일 수 있다. 덧붙여, 프로모터는 다른 종류의 특이성을 갖도록 변형될 수도 있다.

- [0034] [0054] "구조적인 (constitutitve)"라는 표현이 프로모터에 대해 사용될 경우, 그 프로모터는 자극원 (예컨대, 열충격, 화학물질, 빛, 등) 없이, 작동적으로 링크된 핵산 서열을 전사시킬 수 있음을 가리킨다. 일반적으로, 구조적 프로모터는 코딩 서열을 실제로 모든 세포나 조직에서 발현시킬 수 있다. RNAi종을 전사하는데 사용되는 프로모터는 바람직하게는 RNA 폴리머라제 II에 의해 조절되는 유비퀴틴, CMV, β -액틴, 히스톤 H4, EF-1알파 또는 pgk 유전자, EH는 RNA 폴리머라제 I에 의해 조절되는 프로모터 요소와 같은 구조 프로모터인 것이 바람직하다. 바람직한 구체예로, U6 프로모터 (예컨대, U6-1, U6-8, U6-9), H1 프로모터, 7SL 프로모터, 인간의 Y 프로모터 (hY1, hY3, hY4 (Maraia 외, Nucleic Acids Res 22 (15): 3045-52 (1994)) 및 hY5 (see Maraia 외, Nucleic Acids Res 24 (18): 3552- 59 (1994) 참조), 인간의 MRP-7-2 프로모터, 아데노바이러스 VA1 프로모터, 인간의tRNA 프로모터, 5s 리포솜 RNA 프로모터, 및 이들 프로모터의 여하한 기능적 하이브리드 및 조합물과같이, RNA 폴리머라제 III에 의해 조절되는 프로모터를 사용하는 것이 좋다.
- [0035] [0055] 또는, 몇몇 구체예에서, RNAi종의 유도성(inducible) 발현을 가능케하는 프로모터들을 선택하는 것이 최 적일 수 있다. 이러한 프로모터를 사용하는 유도성 발현을 위한 시스템 중 몇가지가 기술 분야에 알려져 있으며, 비제한적인 예로 테트라사이클린 반응 시스템 및 *lac* 오퍼레이터-리프레서 시스템 (WO 03/022052 A1; 및 US 2002/0162126 A1 참조), 엑디손 조절형 시스템 또는 글루코코르티코이드, 프로제스틴, 에스트로젠, RU-486, 스테로이드, 갑상선 호르몬, 시클릭 AMP, 시토카인, 칼시페롤 유형의 레귤레이터들, 또는 메탈로티오네 인 프로모터 (무기 금속에 의해 조절됨)를 들 수 있다.
- [0036] [0056] 목적 유전자의 발현을 증가시키기 위해, 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물 내에 하나 이상의 인헨서가 존재해도 무방하다. 본 발명의 구체예에 사용되는데 적합한 인헨서로는 Apo E HCR 인헨서, 최근 설명 된 바 있는 (예컨대 Xia 외, Nucleic Acid Res 31-17 (2003)) CMV 인헨서, 및 당업자에게 알려져 있는 기타의 인헨서를 들 수 있다.
- [0037] [0057] 본 발명의 일구체예에서, ApoE 인헨서 요소는 본 발명의 다중 프로모터 카세트에 첨가될 수 있다. ApoE 인헨서는 아포리포단백질 E 또는 ApoE로부터 파생된 약 155 염기쌍(bp)으로 된 인헨서 요소이다. ApoE 인헨서의 1 이상의 카피를 본 발명의 다중 프로모터 카세트 중의 제1, 제2 및/또는 제3 프로모터의 상류나 하류 (또는 존 재한다면, 네개 이상의 프로모터의 상류나 하류에)에 부가할 수 있다. ApoE는 리포단백질 입자의 결합, 내재화 (internalization) 및 이화를 매개하는 아포리포단백질이며 간 조직의 ApoE 수용체와 저밀도 리포단백질 (ApoB/E) 수용체의 리간드이기도 하다. ApoE 유전자와 연관된 유전적 인헨서는 간에서 특이적으로 핵산의 전사 를 증가시킬 수 있는 진핵세포 조절 요소이다. ApoE 인헨서는 간에 특이적인 프로모터로부터 상류 또는 하류로 2000 뉴클레오타이드만큼 떨어져서 위치할 수 있고, 하나 이상의 카피로서 존재할 수 있다.
- [0038] [0058] 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트가 코딩하는 RNAi 서열은 포유동물 세포에서 무독한 짧은 이 중가닥 RNA인 소형 간섭 RNA의 발현을 결과시킨다. 본 발명의 RNAi종의 길이는 이들이 세포 독성을 나타내지 않 는 한, 특히 제한되지 않는다. RNAi는 예컨대 15 내지 49 bp 길이일 수 있고, 바람직하게는 15 내지 35 bp 길이, 더욱 바람직하게는 19 내지 29 bp 길이인 것이 좋다. RNAi의 이중가닥 RNA 부분들은 완전히 상동적일수도 있고, 또는 서열 불일치 (각각의 가닥 상에 대응하는 뉴클레오타이드가 상보적이지 않음), 팽출 (bulge) (한쪽 가닥에, 대응하는 상보적 뉴클레오타이드가 없음) 등으로 인해, 쌍을 이루지 않는 부분을 함유할 수도 있다. 이 와 같이 쌍을 이루지 않는 부분은 RNAi 이분쇄 형성 또는 효능을 유의적으로 간섭하지 않는 정도에서 관용될 수 있다.
- [0039] [0059] 본 발명에 따른 RNAi종의 종점은 RNAi가 표적 유전자를 효과적으로 침묵시키는 한, 블런트 또는 점착종 단 (오버행잉)일 수 있다. 점착종단 (오버행잉) 말단 구조는 3' 오버행에 국한되는 것이 아니라, 얻어진 RNAi가 RNAi 효과를 도입할 수 있는 한, 5' 오버행잉 구조도 포괄된다. 또한, 오버행잉 뉴클레오타이드의 수는 얻어진 RNAi가 RNAi 효과를 유도할 수 있는 한, 그 숫자가 어떻든 무방하다. 예컨대, 존재할 경우, 그 오버행은 1 내지 8개의 뉴클레오타이드로 구성될 수 있고; 바람직하게는 2 내지 4개의 뉴클레오타이드로 이루어질 수 있다.
- [0040] [0060] 본 발명에 사용되는 RNAi종들은 이중가닥 RNA의 말단이 단일 가닥 링커 RNA에 의해 연결된, 스템-루프 구조의 전구체 (shRNA)를 가질 수 있다. snRNA에서 이 단일가닥 루프 부분의 길이는 5 내지 20 bp이며, 바람직 하게는 5 내지 9 bp 길이인 것이 좋다.
- [0041] [0061] 전사된 핵산 서열은 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트의 표적이 될 수 있다. 마찬가지로 RNAi 의 표적은 발달단계의 유전자 (예컨대, 부착 분자, 시클린 키나아제 억제제, Wnt 패밀리 멤버, 날개형 헬릭스 패밀리 멤버, Hox 패밀리 멤버, 시토카인/림포카인 및 이들의 수용체, 성장/분화 인자 및 이들의 수용체, 뉴로 트랜스미터 및 이들의 수용체); 종양유전자 (예컨대, ABL1, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1 R, ERBA,

ERBB, EBRB2, ETS1, ETS1, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN,MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS,PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3, 및 YES); 종양 서프레서 유전자 (예컨대, APC, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB1, TP53, 및 WT1); 및 효소 (예컨대, ACC 신타제 및 옥시다제, ACP 탈포화효소 및 히드록실라제, ADP-글루코스 피로포틸라제, ATP아제, 알코올 데히드로게나제, 아밀라제, 아밀로글루코시다제, 카탈라제, 셀룰라제, 찰콘 신타제, 키티나제, 시클로옥시게나제, 데카르복실라제, 텍스트리나제, DNA 및 RNA 폴리머라제, 갈락토시다제, 글루카나제, 글루코스 옥시다제, 그라놀-결합 전분 신타제, GTP아제, 헬리카제, 헤미셀룰라제, 인터그라제, 이눌리나제, 인버타제, 이소머라제, 키나아제, 락타제, 리파아제, 리폭시게나제, 리소자임, 토팔린 신타제, 옥토파인 신타제, 펙틴스터라제, 피옥시다제, 포스파타제, 포스포리파제, 포스포틸라제, 피타아제, 식물성장 조절 신타제, 폴리갈락투로나제, 단백질 및 펩타이드, 폴룰라나제, 레킴비나제, 역전사효소제, RUBISCOs, 토포이소머라제 및 자일라나제); 캡시드 및 엔벨롭 단백질과 같은 바이러스 구조 유전자; 복제 또는 구조적 특성과 연관된 바이러스 유전자, 또는 복제 또는 구조적 특성과 관련이 있는 다른 병원균으로부터 유도된 유전자를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 이에 더해, 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트는 SCA와 같은 보통염색체 우성 질환의 병인학에 책임이 있는 대립유전자, 헌팅톤 질환에 책임이 있는 대립 유전자, 또는 불완전 골생성증에 책임이 있는 콜라겐 유전자 대립유전자에 독특한 표적 특이적 서열을 표적화하는데 이용될 수 있다. 본 발명의 한가지 중요한 측면은 siRNA에 의해 소거된 바이러스 감염이 감염된 세포에 전혀 해를 미치지 않을 수 있다는 것이다 (Gitlin 외, *Nature* 418: 430-434 (2002)). 본 발명의 이러한 특성은 종래 방법과 구별되는 것으로, 종래 방법에서는 포유동물 숙주로부터 바이러스를 소거하면 감염된 세포가 면역계의 작용이나, 바이러스에 의해 유발된 세포자멸사(apoptosis)에 의해 파괴된다 (Guidotti 외, *Annu. Rev. Immunol.* 19: 65-91 (2001)). 따라서, 본 발명의 이러한 측면은 비세포변성 바이러스 소거를 가능케하는 효과적인 RNAi 체제를 제공해준다.

[0042] [0062] RNAi종의 서열은 표적 핵산 서열의 유전자 서열에 기초해서 선택하며; 바람직하게는, 보존된 표적 핵산 서열 대역에 기초하는 것이 좋다. 예컨대, 바이러스 감염 치료용 또는 RNAi 백신 구축에 필요한 RNAi 서열을 선택할 경우, 선택된 서열들은 종과 종 사이 또는 심지어는 바이러스의 아종 간에도 보존되는 것들이다. 바이러스는 급속히 돌연변이하는 것으로 알려져 있기 때문에, 보존된 서열을 선택하는 것이 경시적으로도 RNAi의 효능을 유지하는데 유리하다. 암 또는 기타 질병을 치료하기 위한 RNAi 서열을 선택할 경우, 그 서열은 유전자 또는 발암유전자의 변이체들 간에 보존되는 서열인 것이 좋다.

[0043] [0063] 비교를 위한 서열의 정렬 방법 및 RNAi종 선택은 기술 분야에 잘 알려져 있다. 2개 이상의 서열 간의 상동성 백분율을 결정하는 것은 수학적 알고리즘을 이용하여 수행할 수 있다. 이러한 수학적 알고리즘의 바람직한 비제한적인 예로 Myers와 Miller의 알고리즘 (1988); Pearson과 Lipman의 유사성 탐색법 (1988); 및 Karlin과 Altschul의 방법 (1993)을 들 수 있다. 바람직하게는, 이들 수학적 알고리즘의 컴퓨터 작업을 이용하는 것이 좋다. 이러한 작업 프로그램으로는 PC/Gene 프로그램의 CLUSTAL (Intelligenetics사 (Mountain View, Calif.)로부터 입수 가능); ALIGN 프로그램 (Version 2.0), GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, Megalign (Jotun Hein, Martinez, Needleman-Wunsch 알고리즘 사용), DNASTar Lasergene (www.dnastar.com 참조) 및 Wisconsin Genetics Software Package, Version 8의 TFASTA (Genetics Computer Group (GCG) (575 Science Drive, Madison, Wis., USA)로부터 입수 가능)을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 이들 프로그램을 이용하는 정렬 방법은 디폴트 변수 또는 작업자가 선택한 변수들을 이용하여 수행할 수 있다. CLUSTAL 프로그램은 Higgins에 의해 잘 설명된 바 있다. ALIGN 프로그램은 Myers와 Miller의 알고리즘에 기초한 것이고; BLAST 프로그램은 Karlin과 Altschul의 알고리즘에 기초한 것이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해공중 입수가능하다.

[0044] [0064] 서열 비교에 있어서, 일반적으로 하나의 서열을 기준 서열로 삼아서 테스트 서열을 이것과 비교한다. 서열 비교 알고리즘을 이용할 경우, 테스트 서열과 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요하다면 서브서열 좌표를 지정한 다음, 서열 알고리즘 프로그램 변수를 지정한다. 그러면, 서열 비교 알고리즘이 지정된 프로그램 변수에 기초해서, 기준 서열에 대한 테스트 서열(들)의 서열 상동성 백분율을 계산해 낸다.

[0045] [0065] 일반적으로, RNAi에 의한 표적 서열의 억제에 RNAi 분자의 센스 가닥과 표적 서열 사이에 고도의 서열 상동성을 필요로 한다. 몇가지 구체예에서, 이러한 상동성은 약 70%를 상회하고, 이보다 더 높게 약 75%를 상회할 수도 있다. 바람직하게는, 상동성은 약 80%를 상회하는 것이 좋고, 더욱 좋기로는 85%보다 높거나, 심지어 90%를 상회하면 더욱 좋다. 더욱 바람직하게는, 표적 서열과 RNAi의 센스 가닥과의 서열 상동성은 약 90% 초과, 91% 초과, 92% 초과, 93% 초과, 94% 초과, 95% 초과, 96% 초과, 97% 초과, 98% 초과 또는 99%를 초과하는 것이 좋다. 바이러스 감염을 표적화하는데 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 사용하는 구체예에서, 그 바이러스의

다양한 아종의 계놈들 사이의 상동성은, 심지어 보존 대역에서조차, 15 내지 30개의 연속 뉴클레오타이드에 대해 90% 수준에도 미치지 못하며, 심지어는 80%에도 못미친다. 이러한 경우, 어떤 아종의 표적 서열과 RNAi의 센스 가닥 사이의 서열 상동성은 80% 이하이다.

[0046] [0066] 이와 반대로, 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물은 중, 아종 또는 변이체 간의 서열 상동성이 높지 않은 생명체의 유전자를 표적화하는 경우 특히 유용한데, 이는, 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트 내의 각각의 RNAi종들이 변이체 또는 아종의 표적 유전자(들) 또는 서브세트의 여러 부분들을 지향하는데 이용될 수 있기 때문이다.

[0047] [0067] 표적 서열의 보존된 대역에 기초해서 RNAi 서열을 선택하는 것에 더해, RNAi 서열의 선택을 다른 인자에 기초하여 실시할 수도 있다. 요구되는 표적 서열의 특성에 기초해서 RNAi에 효과적인 서열들을 동정하기 위한 선택 기준을 마련하려는 시도가 여러가지로 행해졌음에도 불구하고 (예컨대, 퍼센트 GC 함량, 번역 개시 코돈으로부터의 위치, 또는 제안된 RNAi의 상동성을 찾기 위한 *in silico* 서열 데이터베이스 서치에 기초한 서열 유사성, 열역학적 페어링 기준), 현재로서는, 무수한 RNAi 서열 후보들 가운데 어떤 것이 요구되는 표적에 상응할지를 고도의 신뢰성으로 예측하기란 불가능하며, 실제로, RNA 침묵(silencing) 반응이 도출될 것이다. 그 대신, 개별적으로 특이적인 RNAi 폴리뉴클레오타이드 서열 후보들을 만들어서 표적하는 표적의 발현을 간섭하는지를 알아볼 수 있다.

[0048] [0068] 현재의 항바이러스 요법의 주요한 문제점은 일반적으로 탈출 돌연변이(escape mutants)로서 알려진 내성 변이체들의 출현이다 (Gitlin 외 *J. of Viro.* 79; 1027-1035, (2005)). 본 발명의 한가지 측면은 이러한 탈출 돌연변이의 출현을 막는다. 본 발명의 몇가지 구체예에서는 바이러스 감염 치료를 위한 복수개의 RNAi 서열의 선택은 감염된 세포를 RNAi의 단일 서열로 치료시 탈출 돌연변이의 출현에 기초한다. 탈출 돌연변이의 출현은 세포가 바이러스로 감염된 후 RNAi의 단일 서열을 함유하는 발현 구조물을 이용하여 조사된다. 출현하는 내성 바이러스를 함유하는 세포들을 수확해서 바이러스 계놈의 서열을 결정한다. 시퀀싱에 의해 바이러스 억제에 저항하는 것으로 나타나는 우점 돌연변이들이 밝혀진다. 표적 유전자의 유전자 서열에 기초한 RNAi 서열 및 이에 부가적으로, RNAi 치료에 대항하여 발생하는 점 돌연변이의 서열을 함유하는 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물이 생산된다.

[0049] [0069] 전술한 바와 같이, 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트의 RNAi 코딩 대역은 터미네이터 요소와 작동적으로 링크되어 있다. 한가지 예로서, 터미네이터는 4개 이상의 티미딘 잔기 스트레치를 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 사용되는 터미네이터 요소들은 모두 상이하고 그 터미네이터가 유래된 유전자로부터의 프로모터 요소와 맷치된다. 이러한 터미네이터에는 SV40 poly A, Ad VA1 유전자, 5S 리보솜 RNA 유전자 및 인간의 t-RNA용 터미네이터가 포함된다. 또한, RNA pol II 프로모터와 터미네이터의 경우 흔히 행해지는 것처럼, 프로모터와 터미네이터들을 혼합하여 맷치시켜도 좋다.

[0050] [0070] 이에 더해, 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트는 프로모터, RNAi 및 터미네이터 요소들이 쉽게 제거되거나 치환될 수 있도록, 복수개의 클로닝 자리 및/또는 독특한 제한효소 자리가 전략적 위치되도록 배치할 수 있다. 나아가, 이 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트는 전략적으로 위치된 제한효소 자리 및/또는 상보적 스티키 말단을 이용하여 소형 올리고뉴클레오타이드 성분들로 조립될 수도 있다. 본 발명의 구체예에 따른 한가지 접근을 위한 베이스 벡터는 모든 자리가 독특한 (이것이 반드시 필요하지는 않다) 멀티링커를 갖는 플라스미드로 이루어진다. 이어서, 다시 어닐링된 프라이머 쌍을 각각의 개별적인 프로모터의 하류의 특징적인 자리에 삽입하여, 삼중 (triple) 발현 카세트 구조물을 얻는다. 삽입물은 그 삼중 발현 카세트 삽입물과 나란히 배치된 두개의 독특한 효소 자리 (같거나 다름)를 이용하여 예컨대 AAV 백본 내로 이동시킬 수 있다.

[0051] [0071] 도 1의 공정 300에서, 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트를 전달 벡터 내로 라이게이션시킨다. 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트가 삽입되어 고효율 형질도입 및 여러가지 세포 종류에서 RNAi 체제를 발현하는데 사용되는 구조물들이 바이러스로부터 파생되며 바이러스 전달에 공존가능하다. 이 구조물의 제조는 기술 분야에 잘 알려진 적절한 유전공학적 기법을 이용하여 수행할 수 있으며, 그 비제한적인 예로서 PCR 표준 기술, 올리고뉴클레오타이드 합성, 제한 엔도뉴클리아제 절단, 라이게이션, 형질전환, 플라스미드 정제 및 DNA 시퀀싱을 들 수 있다. 구조물은 바람직하게는 예컨대, 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 바이러스 입자 내로 패키징하는데 필요한 서열 및/또는 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 표적 서열의 계놈 내로 합체시켜주는 서열을 포함하는 것이 좋다. 이 바이러스 구조물은 또한 바이러스를 복제 및 전파시켜주는 유전자를 함유할 수도 있으며, 바람직한 구체예에서 이러한 유전자는 *in trans*로 공급될 것이다. 이에 더해, 이 바이러스 구조물은 천연 형태 또는 변형 형태로 합체된 공지의 여하한 생물의 계놈으로부터의 유전자나 유전자 서열을 함유할 수도 있다. 예컨대, 바람

직한 바이러스 구조물은 세균에서 그 구조물을 복제하는데 유용한 서열들을 포함한다.

[0052] [0072] 이 구조물은 또한 추가적인 유전적 요소를 함유할 수도 있다. 구조물에 포함될 수 있는 요소들의 종류는 제한되지 않으며 당업자가 임의로 선택할 수 있다. 예컨대, 추가적인 유전적 요소들로는 GFP 또는 RFP와 같은 형광 마커 단백질에 대한 하나 이상의 유전자와 같은 리포터 유전자; 베타-갈락토시다제, 루시페라제, 베타-글루쿠로니다제, 클로람페니칼 아세틸 트랜스페라제 또는 분비된 배(胚)의 알칼라인 포스파타제와 같은 쉽게 측정 가능한 효소; 또는 호르몬이나 시토키인처럼 그에 대해 면역분석법을 용이하게 이용할 수 있는 단백질을 들 수 있다. 본 발명의 구체예에서 유용할 수 있는 다른 유전적 요소들로는 아데노신 데아미나제, 아미노글리코딕 포스포트랜스페라제, 디히드로폴레이트 리덕타제, 하이그로마이신-B-포스포트랜스페라제와 같이 세포의 선택적인 성장 어드밴티지를 제공하는 단백질을 코딩하는 것들, 또는 영양요구균주에서 결여된 생합성 능력을 제공해주는 단백질을 코딩하는 것들을 들 수 있다. 만일 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트와 함께 리포터 유전자가 포함될 경우, 내부 리보솜 도입 위치 (IRES: internal ribosomal entry site) 서열이 포함될 수 있다. 바람직하게는, 이들 추가적인 유전적 요소들이 독립적인 프로모터/인핸서와 작동적으로 링크되어 제어되는 것이 좋다.

[0053] [0073] 적절한 여하한 바이러스에 기초한 바이러스 전달계를 이용하여 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 전달할 수 있다. 또한, 하이브리드 바이러스계를 사용할 수도 있다. 바이러스 전달계의 선택은 전달을 위해 표적화된 조직, 그 계의 형질도입 효율, 병원성, 면역학적 및 독성 측면 등과 같은 다양한 변수들에 의해 좌우된다. 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물에 의해 간섭받을 수 있는 질병 표적들의 다양성으로 말미암아, 모든 적용에 적합한 단일 바이러스계는 있을 수 없음이 명백하다. 본 발명에 사용하기 위한 바이러스 전달계를 선택하는 경우, 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 함유하는 바이러스 입자들은 바람직하게는: 1) 반복적으로 그리고 안정하게 번식하고; 2) 높은 역가로 정제될 수 있으며; 3) 표적화된 전달을 매개할 수 있고 (다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 광범한 전파 없이 목적하는 조직이나 장기로 전달); 4) 구조적 또는 조절적인 방식으로 발현될 수 있는 것이 좋다.

[0054] [0074] 일반적으로, 유전자 치료법에서 사용되는 바이러스계 중 가장 널리 사용되는 5가지 부류는 이들의 게놈이 숙주의 세포 염색질 내로 합체되는지 (발암 레트로바이러스 및 렌티바이러스) 또는 염색체외 에피솜으로서 그 세포의 핵에서 주로 존속하는지 (아데노-관련 바이러스, 아데노바이러스 및 헤르페스바이러스)에 따라 크게 두 그룹으로 나뉜다. 이러한 구별법은 특정 용도에 있어서 각각의 바이러스가 적합한지를 따지는 중요한 결정인자이다; 비-합체성 벡터는 특정 환경 하에서, 비증식 세포에서 지속적으로 유전자 발현을 매개하지만, 합체성 벡터는 분할 세포에서 안정한 유전자 변형이 유지될 필요가 있을 경우, 선택 도구가 된다.

[0055] [0075] 예컨대, 본 발명의 일 구체예에서, 파르보바이러스과 (Parvoviridae)로부터 유래된 바이러스가 이용된다. 이 파르보바이러스는 약 5000 뉴클레오타이드 길이의 게놈을 갖는 작은 단일 가닥의 비엔벨롭형 DNA 바이러스과이다. 이 과에 속하는 것들로는 아데노-관련 바이러스 (AAV: adeno-associated virus)를 들 수 있는데, 이것은 생산적인 감염 사이클을 개시 및 유지하기 위해서는, 정의상 다른 바이러스 (전형적으로는 아데노바이러스 또는 헤르페스바이러스)와 공감염을 필요로 하는 의존성 파르보바이러스이다. 이러한 헬퍼 바이러스가 없어도, AAV는 수용체-매개형 결합 및 내면화에 의해 표적 세포를 감염 또는 형질도입할 수 있으므로 해서, 비분할 및 분할 세포의 두가지 모두에서 핵에 침투할 수 있다.

[0056] [0076] 일단 핵 안에서 들어오면, 그 바이러스는 외피를 벗고, 트랜스유전자가 여러가지 형태로 발현된다 - 가장 지속적인 유형은 환형 모노머이다. AAV는 안정하게 형질도입된 1-5% 세포의 게놈 내로 합체된다 (Nakai 외., *J. Virol.*, 76: 11343-349 (2002)). 트랜스유전자의 발현은 예외적으로 안정적일 수 있으며, 팩터 IX의 AAV 전달에 관한 어떤 연구에서, 개 모델은 이 바이러스를 1회 직접 주입받은 후 5.0년 동안 그 단백질을 치료적 수준으로 지속적으로 발현한 것으로 나타났다. 자손 바이러스는 헬퍼 바이러스의 부재 하에서는 AAV 감염으로부터 생산되지 않으므로, 형질도입 범위는 오직 그 바이러스에 감염된 최초의 세포만으로 국한된다. 바로 이 때문에 AAV는 본 발명에 있어서 바람직한 유전자 요법을 위한 벡터가 된다. 또한, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 헤르페스 심플렉스 바이러스와 달리, AAV는 사람에게 대해 병원성과 독성이 없는 것으로 나타났다 (Kay 외., *Nature*, 424: 251 (2003) and Thomas 외., *Nature Reviews, Genetics* 4: 346-58 (2003)).

[0057] [0077] 일반적으로, AAV의 게놈은 단지 두개의 유전자만을 함유한다. "rep" 유전자는 DNA 복제에 이용되는 적어도 네가지 별개 단백질을 코딩한다. "cap" 유전자 산물은 차별적으로 스플라이스되어 바이러스의 캡시드를 구성하는 세가지 단백질들을 생산시킨다. 게놈을 발생기 바이러스 내로 패키징할 때, 역방위 말단 반복 (ITRs) 만이 절대적인 (obligate) 서열이고, rep 및 cap은 게놈으로부터 결실되어 선택된 이중 서열로 대체될 수 있다. 그러나, AAV에 기초한 이중 구조물을 복제하여 발생기 바이러스 내로 패키징하는데 필요한 단백질을 생산하기

위해서는, rep 단백질과 cap 단백질이 *in trans*로 제공되어야 한다. 전술한 아데노바이러스나 헤르페스 바이러스와 같은 헬퍼 바이러스와의 공감염에 의해 일반적으로 제공되는 헬퍼 기능 역시 하나 이상의 DNA 발현 플라스미드 형태로 *in trans*로 제공될 수 있다. 이 계놈을 보통 오직 2개의 유전자만을 코딩하므로, 전달 비히클로서의 AAV의 패키징 능력이 4.5 단일 가닥 킬로베이스 (kb)로 국한된다는 것은 그다지 놀라운 것은 아니다. 그러나, 비록 이러한 사이즈 제한이 대체 유전자 요법에서 전달될 수 있는 유전자에 제약을 가할 수 있을지 몰라도, RNAi와 같은 소형 서열을 패키징 및 발현하는데는 어떠한 악영향도 미치지 않는다.

[0058] [0078] RNAi 응용을 위한 AAV의 유용성은, p53과 카스파제 8 발현을 억제하기 위해 AAV를 이용하여 shRNA를 생체외에서 전달하는 실험을 통해 입증되었다 (Tomar 외., *Oncogene*. 22: 5712-15 (2003)). 적절한 서열들을 내용물을 제거한(gutted) AAV-2 벡터 내로 클로닝한 후, 감염성 AAV 비리온을 HEK293 세포에서 발생시켜 HeLa S3 세포를 감염하는데 이용하였다. 내인성 카스파제 8 및 p53의 농도가 트투투여량 의존적으로 감소하는 것이 입증되었다. Boden 등은 또한, 소모된 배지에서 p24 생산량에 의해 평가되는 바와 같이, AAV를 이용해서 shRNA를 생체외 전달하여 조직 배양 시스템에서 HIV 복제를 억제하는데 사용한 바 있다 (Boden 외., *J. Virol.* 77 (21): 115231-35 (2003))

[0059] [0079] 그러나, AAV를 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 위한 비히클로서 사용할 경우의 문제점 역시 짚고 넘어가야 할 것이다. 예컨대, 인구 집단은 다양한 비율로 특정 AAV 혈청형에 대한 무력화 항체 (neutralizing antibodies)를 보유할 수 있다. 그러나, 개체가 무력화 항체를 생성하는 비율이 크게 감소된 혈청형을 비롯하여, AAV 혈청형은 몇가지가 있기 때문에, 다른 혈청형을 이용하거나, 슈도 타이핑을 이용할 수 있다. 적어도 8종의 혈청형이 특징화된 바 있고, 다른 12종은 분리는 되었으나, 아직까지 그 특징이 자세히 밝혀지지 않았다. 또 다른 제약 사항은 AAV에 대한 가능한 면역 반응 결과로 인해, AAV에 기초한 요법이 오직 1회만 투여될 수 있다는 것이다; 그러나, 또 다른 비인간 유래형 혈청형을 사용하면 반복 투여가 가능하다. 투여 경로, 혈청형, 및 전달되는 계놈 조성물 모두가 조직 특이성에 영향을 미친다.

[0060] [0080] 변형되지 않은 AAV 시스템을 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물과 함께 사용하는데 있어서의 또 다른 제약 사항은 형질도입이 비효율적일 수 있다는 것이다. 생체내에서 안정한 형질도입은 세포의 5-10%로 국한된다. 그러나, 안정한 형질도입 수준을 증가시키는 다른 방법이 기술 분야에 알려져 있다. 그 한가지 접근법은 슈도타이핑(psudotyping)을 이용하는 것인데, 여기서는 AAV-2 계놈을 다른 혈청형으로부터 유래된 cap 단백질을 이용해서 패키징한다. 예컨대, AAV-5 캡 유전자를 그에 대응하는 AAV-2 대신 사용함으로써, Mingozzi 등은 안정한 형질도입 비율을 간세포의 약 15%까지 증가시켰다 (Mingozzi 외., *J. Virol.* 76 (20): 10497-502 (2002)). Thomas 등은 AAV8 캡시드 유전자를 이용하여 마우스 간세포의 30% 이상에 생체내 형질도입시켰다 (Thomas 외., *J. Virol.* in press). Grimm 등 (*Blood*, 2003-02-0495)은 조직 배양 연구를 위해 AAV-2를 AAV-1, AAV-3B, AAV-4, AAV-5, 및 AAV-6으로 철저히 슈도타이핑시켰다. 트랜스유전자 발현의 최고 수준은 AAV-6으로 슈도타이핑된 비리온으로부터 유도되었는데; AAV-2에 비해 거의 2000%나 더 높은 트랜스유전자 발현이 달성되었다. 따라서, 본 발명은 높은 형질도입 수준을 달성하는 한편 그에 대응하는 RNAi 다중 프로모터 발현 구조물의 발현을 증가시킬 목적으로 슈도타이핑된 AAV 바이러스를 사용하는 것을 고려한다.

[0061] [0081] 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물에 사용하기에 유용한 또 다른 바이러스 전달체는 레트로 바이러스과로부터 유래된 바이러스에 기초한 것이다. 레트로바이러스에는 두가지 독특한 특성이 있는 단일가닥 RNA 동물 바이러스들이 있다. 먼저, 레트로바이러스의 계놈은 2 카피의 RNA로 이루어진 이배체이다. 둘째로, 이 RNA는 비리온-관련 효소인 역전사효소에 의해 이중가닥 DNA로 전사된다. 이 이중가닥 DNA 또는 프로바이러스는 이어서 숙주 세포 내로 합체되어 모세포로부터 딸세포로, 숙주 계놈의 안정하게 합체된 성분으로서 전달된다.

[0062] [0082] 몇몇 구체예에서, 렌티바이러스는 본 발명에서 사용하기에 바람직한 레트로바이러스과의 일원이다. 렌티 바이러스 벡터는 종종 소포성 스티타이트 바이러스 당단백질 (VSV-G: vesicular steatitis virus glycoprotein)으로 슈도타이핑되며, 인간의 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS)의 병원체인 인간 면역결핍 바이러스 (HIV); 양에서 폐렴 또는 뇌염 (비스나)을 일으키는 비산-매디 (visan-maedi); 말에서 자가면역성 용혈빈혈 및 뇌병증을 일으키는 말의 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV); 고양이에서 면역 결핍증을 일으키는 고양이의 면역결핍 바이러스 (FIV); 소에서 림프절병증과 림프구증가증을 일으키는 소의 면역결핍 바이러스 (BIV); 및비인간 영장류에서 면역결핍증 및 뇌병증을 일으키는 원숭이의 면역결핍 바이러스 (SIV)로부터 파생된다. HIV에 기초하는 벡터들은 일반적으로 모 계놈을 < 5%로 유지하며, 계놈의 < 25%는 패키징 구조물 내로 합체되어, 복제능이 있는 복귀 HIV의 발생 가능성을 최소화시킨다. 장말단 반복 서열 하루에 조절 요소들이 결실됨으로써 해서, 벡터 운동성에 필요한 패키징 시그널의 전사가 제거된 자가 불활성화 벡터의 개발로 생물 안정성이 부가적으로 증진되

어 왔다.

- [0063] [0083] 레트로바이러스 RNA 게놈의 역전사는 세포질에서 일어난다. C형 레트로바이러스와 달리, 다른 바이러스 인자들과의 복합체 형태의 렌티바이러스 cDNA - 개시전 복합체로 알려짐- 는 핵막 전반에서 전좌가 가능하며 비분할 세포를 형질도입할 수 있다. 이 바이러스 cDNA의 구조적 특징 - DNA 플랩 - 은 효율적인 핵 도입에 기여하는 것으로 보인다. 이 플랩은 바이러스 폴리머라제 유전자에 위치한 중앙 폴리퓨린 도관 (cPPT)의 인테그리티에 의존하므로, 대부분의 렌티바이러스-유도형 벡터들은 이 서열을 갖고 있다. 렌티바이러스는 광범한 친화성, 낮은 염증 잠재력을 가지며 합체된 벡터를 결과시킨다. 이 바이러스의 주요한 제약 사항은 그 합체가 어떤 용액에서 발암을 초래할 수 있다는 것이다. 렌티바이러스 벡터 사용시 주요한 장점은 유전자 운반이 대부분의 조직이나 세포 유형에서 지속적이라는 것이다.
- [0064] [0084] RNAi 제제를 발현하는데 사용되는 렌티바이러스계 구조물은 바람직하게는 렌티바이러스의 5' 및 3' 장말 단반복물 (LTRs)로부터의 서열을 포함하는 것이 좋다. 더욱 바람직하게는, 바이러스 구조물은 렌티바이러스로부터 불활성화 또는 자가-불활성화된 3' LTR을 포함하는 것이 좋다. 3' LTR은 기술분야의 여러 공지 방법에 의해 자가 불활성화되도록 만들어질 수 있다. 바람직한 구체예에서, 3' LTR의 U3 요소는 그의 인헨서 서열이 결실된 것이 좋으며; 바람직하게는 TATA 박스, Sp1 및 NF- κ B와 B 자리가 결실된 것이 좋다. 3' LTR의 자가 불활성화 결과로 인해, 숙주 게놈 내로 통합되는 프로바이러스는 불활성화된 5'LTR을 함유하게 된다. 이 LTR 서열은 여하한 종류의 렌티바이러스로부터 유래되는 LTR 서열이어도 무방하다. 렌티바이러스에 기초한 구조물은 또한 MMLV 또는 MSCV, RSV 또는 포유동물 유전자에 대한 서열을 포함할 수 있다. 또한, 렌티바이러스의 5' LTR로부터의 U3 서열은 바이러스 구조물의 프로모터 서열로 대체될 수 있다. 이것은 패키징 세포주로부터 회수된 바이러스의 역가를 증가시켜 줄 수 있다. 인헨서 서열 역시 포함되어도 좋다.
- [0065] [0085] 당업자에게 알려진 다른 바이러스 또는 비바이러스계를 이용하여 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트를 목적하는 세포 내로 전달할 수 있으며 그 예로, 숙주 세포내로의 합체를 통해 생체내에서 바이러스-코딩된 트랜스유전자를 안정하게 유지하는 유전자 고갈된 아데노바이러스-트랜스포존 벡터(Yant 외., Nature Biotech. 20: 999-1004 (2002) 참조); 신드비스 바이러스 또는 쉘리키 포레스트 바이러스로부터 유래된 시스템 (Perri 외 J. Virol. 74 (20): 9802-07 (2002) 참조; 뉴캐슬병 바이러스 또는 센다이 바이러스로부터 유래된 시스템; 또는 세균성 DNA 서열이 없는 미니-서클 DNA 벡터 (Chen 외, Molecular Therapy. 8 (3): 495-500 (2003) 참조)를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 미국특허 공개 2004/0214329호에 설명된 미니-서클 DNA는 고도의 핵산 전사를 지속적으로 제공하는 벡터를 설명하고 있다. 이 환형 벡터는 발현-침묵 세균 서열이 없다는 특징을 가지며, 발현 카세트에 더해, 무방향성 위치-특이적 재조합 산물 서열을 포함할 수 있다.
- [0066] [0086] 이에 더해, 두가지 이상의 바이러스계의 유용한 특성들을 합치기 위해 하이브리드 바이러스계를 사용할 수 있다. 예컨대, 야생형 AAV의 위치 특이적인 합체 머쉬너리를 아데노바이러스의 효과적인 내면화 및 핵 표적화 특성과 커플링시킬 수 있다. AAV는 아데노바이러스나 헤르페스바이러스 존재 하에서, 생산적인 복제 사이클을 수행하지만; 헬퍼 기능 부재하에서는 AAV 게놈은 염색체 19 상의 특정 자리로 합체된다. AAV 게놈의 합체에는 AAV rep 단백질의 발현이 요구된다. 통상적인 AAV 벡터들은 rep을 포함하여 모든 바이러스 유전자가 결실되어 있기 때문에, 염색체 19 내로 특이적으로 합체될 수 없다. 그러나, 이 특성을 적절한 하이브리드계에서 이용할 수 있다. 또한, 위치 특이적 재조합을 가능케 하는 유전자 요소와 같이, 바이러스 전달계에서 소망되는 특성을 얻기 위하여 비바이러스 유전자 요소들을 이용할 수 있다.
- [0067] [0087] 도 1의 공정 400에서는, 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 바이러스 입자 내로 패키징한다. 기술분야에 공지인 방법을 이용함으로써 그 게놈이 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물의 카피를 함유하는 감염성 바이러스 입자들을 생산할 수 있다. 도 4A와 4B는 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 전달을 위해 바이러스 입자 내로 패키징하는 또 다른 방법을 도시한다. 도 4A에 도시된 방법은 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 바이러스 입자 내로 합체시키는데 필요한 바이러스 단백질을 *in trans*로 안정적으로 발현시키는 패키징 세포와 특정 바이러스 전달계에 대해 필요하거나 또는 바람직한 다른 서열들 (예컨대 복제, 구조 단백질 및 바이러스 조립에 필요한 서열들) 및 조직 유입을 위한 바이러스 유도형 또는 인공 리간드를 이용한다. 도 4A에서, 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트는 바이러스 전달 벡터에 라이게이션되어 (공정 300), 결과적인 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물은 패키징 세포를 형질감염시키는데 이용된다 (공정 410). 이어서 이 패키징 세포는 바이러스 서열을 복제하여, 바이러스 단백질을 발현시키고, 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 감염성 바이러스 입자 내로 패키징한다 (공정 420). 패키징 세포주는 바이러스 단백질을 발현시킬 수 있는 세포주이면 어느 것이든 무방하며 예컨대, 293, HeLa, A549, PerC6, D17, MDCK, BHK, 빙 체리, 피닉스, Cf2Th, 또는 당업자에 의해 개발된 것으로 알려진 기타의 세포주를 들 수 있으나 이들로 한정되는 것은 아니다. 예컨대

미국 특허 제 6,218,181호에는 한가지 패키징 세포주가 설명되어 있다.

[0068] [0088] 또는, 필요한 바이러스 단백질을 안정적으로 발현하지 못하는 세포주들을 2 이상의 구조물로 공형질감염시켜 기능적 입자들을 효과적으로 생산할 수 있다. 이들 구조물들 중 하나는 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 함유하고, 다른 플라스미드(들)은 세포가 다른 헬퍼 기능 뿐만 아니라 기능적 바이러스 (복제 및 패키징 구조물)를 생산하게 하는데 필요한 단백질을 코딩하는 핵산을 포함한다. 도 4B에 도시된 방법에는 패키징에, 바이러스 복제 및 패키징 유전자들을 안정적으로 발현하지 않는 세포들을 이용한다. 이 경우, 프로모터 RNAi 발현 구조물을 바이러스 전달 벡터에 라이게이션시키고 (공정 300), 이어서 감염성 바이러스 입자를 복제 및 생산하는데 필요한 바이러스 서열들을 발현하는 1 이상의 벡터로 공형질감염시킨다 (공정 430). 세포는 바이러스 서열들을 복제하고, 바이러스 단백질을 발현하여 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 감염성 바이러스 입자 내로 패키징한다 (공정 420).

[0069] [0089] 패키징 세포주 또는 복제 및 패키징 구조물은 엔벨롭 유전자 산물을 발현하지 않을 수 있다. 이들 구체예에서, 엔벨롭 유전자를 코딩하는 유전자는 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물로 공형질감염되는 별개의 구조물 상에 제공될 수 있다. 엔벨롭 단백질은 부분적으로는 바이러스 입자의 숙주 범위에 책임이있으므로, 바이러스를 슈도타이핑시킬 수 있다. 전술한 바와 같이, "슈도타이핑된" 바이러스는 그의 게놈이 유래된 바이러스와는 다른 바이러스로부터 엔벨롭 단백질이 유래된 바이러스 입자이다. 당업자라면 사용된 바이러스 전달계와 표적화하고자 하는 세포를 고려해서 적절한 슈도타입을 선택할 수 있다. 특이적인 숙주 범위를 부여하는데 더해서, 선택된 슈도타입은 바이러스를 매우 높은 역가로 농축시킬 수 있다. 바이러스는 또는 특이적인 종으로 감염을 국한시키는 동종숙주역 (ecotropic) 엔벨롭 단백질로 슈도타이핑될 수 있다 (예컨대, 동종숙주역 엔벨롭은 예컨대 쥐의 세포만을 감염시킬 수 있는 반면, 양생 (amphotropic) 엔벨롭은 예컨대, 인간과 쥐의 세포를 두가지 모두 감염시킬 수 있다). 또한, 간세포에 어시알로당단백질, 또는 수용체 매개형 결합에 트랜스페린과 같이, 세포 특이적인 표적화에 유전적으로 변형된 리간드를 이용할 수 있다.

[0070] [0090] 패키징 세포주에서 생산된 후, 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트를 함유하는 바이러스 입자들을 정제 및 정량한다 (적정). 정제 전략에는 밀도 구배 원심분리 또는 바람직하게는 컬럼 크로마토그래피법이 이용된다.

[0071] [0091] 본 발명의 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트는 질병을 치료하기 위한 치료제로서 또는 질병을 예방하기 위한 백신으로서 특히 유용하다. 예컨대, 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 암세포 또는 종양 내로 도입하여 발암/종양유발 표현형의 유지에 필요한 유전자 발현을 억제할 수 있다. 마찬가지로, 이 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 바이러스와 같은 병원체로 감염된 세포 내로 도입하여 그 병원체를 유지하는데 필요한 1종 이상의 유전자들의 유전자 발현을 억제할 수 있다. 질병을 예방하거나 또는 다른 병인학에서, 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을, 그 질환 또는 병인학의 개시 또는 유지에 필요한 유전자를 표적화하는 백신으로서 사용할 수 있다.

[0072] [0092] 본 발명의 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물은 고형 종양과 백혈병을 비롯한 암을 치료하는데 이용될 수 있으며, 예컨대: 아푸도마, 이소종, 기관지암, 악성 카르시노이드 증후군, 카르시노이드 심장 질환, 암종 (예컨대, 위커암종, 기저세포암종, 기저편평암종, 브라운-피어스암종, 관암종, 얼리히 종양, 인 시투 암종, 크랩스 2 암종, 머켈 세포암종, 점액성 암종, 비소세포 폐암종, 귀리세포 암종, 유두상암종, 경화형 암종, 세기관지 암종, 기관지원성 암종, 편평세포 암종 및 이행세포 암종), 조직구 질환, 백혈병 (예컨대, B 세포, 혼합 세포, 무표지 세포, T 세포, 만성 T 세포, HLTV-II 관련, 급성 임파구, 만성 임파구, 비만세포 및 골수), 악성 히스티오사이토시스, 호지킨 질환, 면역증식성 수형, 비호지킨 임파종, 형질세포종, 세망내피종, 흑색종, 연골모세포종, 연골종, 연골육종, 섬유종, 섬유육종, 거대세포종, 조직구종, 지방종, 지방육종, 중피종, 점액종, 점액육종, 골연화증, 골연화육종, 어빙 육종, 율활막종, 샘섬유종, 샘임파종, 암육종, 척삭족, 두개인 두종, 미분화세포종, 과오종, 간엽종, 중간콩팥종, 근육종, 사기질모세포종, 시멘트종, 치아종, 기형종, 가슴샘종, 영양막종양, 샘암종, 샘종, 쓸개관암, 진주종, 원주종, 낭샘암종, 낭샘종, 파립층세포종양, 음양모세포종, 간암, 땀샘종, 도세포종양, 레이디 세포 종양, 유두종, 세르톨리 세포종양, 난포막세포종양, 평활근종, 평활근육종, 근육모세포종, 자궁근종, 근육종, 횡문근종, 횡문근육종, 뇌실막세포종, 신경절신경종, 신경아교종, 속질모세포종, 수막종, 신경집종, 신경모세포종, 신경상피종, 신경섬유종, 신경종, 부신절종, 부신절종 눈크로마핀, 혈관각화종, 호산구증가혈림프관증식, 혈관경화증, 혈관종증, 사구맥관종, 혈관내피종, 혈관종, 혈관주위 세포종, 혈관육종, 림프관종, 림프관근종, 림프관육종, 크롬친화세포종, 송과체종, 암육종, 연골육종, 엽상종양, 섬유육종, 혈관육종, 평활근육종, 백혈육종, 지방육종, 림프관육종, 근육종, 점액육종, 난소암종, 횡문근육종, 육종 (예컨대, 어빙육종, 실험 육종, 카포시 육종 및 비만세포 육종), 신생물 (예컨대, 뼈, 지방, 소화관계, 직장결장, 간, 췌장, 뇌하수체, 고환, 눈, 두부 및 경부, 중추신경계, 귀, 골반, 호흡관 및 비뇨생식),

신경섬유종증, 및 자궁목형성이상증, 및 세포가, 죽지 않거나 형질전환되는 기타 증상을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물은 화학요법 외과 기술, 냉동요법, 온열요법, 방사능요법 등과 같은 다른 치료 방법론과 조합적으로 사용될 수도 있다.

[0073] [0093] 병원체의 복제, 병원체의 전달 또는 감염 유지와 관련된 유전자는 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물의 표적이 될 수 있다. 이러한 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 이용하여 병원체에 의한 감염 위험이 있는 세포를 치료하거나 (예컨대, 백신) 또는 이미 감염된 세포를 치료할 수 있다. 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물 및 방법에 의해 치료될 수 있는 병원체로는 파르보바이러스과, 파포바이러스과 (파필로마 바이러스 등), 아테노바이러스과, 헤르페스바이러스과 (헤르페스바이러스 1형 내지 7형), 폭스바이러스과, 헤파드나바이러스과, 피코르나바이러스과 (콕사키 A 및 콕사키 B 바이러스 및 ECHO바이러스), 칼리시바이러스과, 레오바이러스과, 토가바이러스과 (뇌염 바이러스), 플라비바이러스과 (뇌염 바이러스), 아레나바이러스과, 레트로바이러스과, 분야바이러스과, 코로나바이러스과, 오르토미조바이러스과, 파라믹소바이러스과, 람도바이러스과 및 필로바이러스과의 바이러스, 세균 전반, 미코박테리아, 곰팡이, 팔시파름, 트리포노조마 쉬스토소마 등을 들 수 있다.

[0074] [0094] 도 1의 공정 500에서, 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 치료하고자 하는 세포에 전달한다. 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물은 세포 내로 시험관내 또는 생체의 방법에 의해 도입한 다음 치료에 영향을 미치는 동물에게 전달하거나 또는 생물, 장기, 또는 세포에 직접 생체내 투여에 의해 투여한다. 바이러스 감염에 의한 전달이 바람직한 전달법이다; 그러나, 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 전달하는데 적절한 방법이면 어떤 방법이든 무방하다. 다중 프로모터 카세트를 포함하는 벡터를 편리한 프로토콜에 따라 포유동물 숙주에게 투여할 수 있으며, 기술 분야에는, 이러한 프로토콜이 몇가지 알려져 있다.

[0075] [0095] 바이러스 감염, 마이크로주사 또는 수포 융합을 비롯한 몇가지 경로에 의해 핵산을 조직이나 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. Furth 등, *Anal. Biochem.* 115 (205): 365-368 (1992)에 설명된 바와 같은 근육내 투여를 위해 주사법을 이용할 수 있다. 금미립자를 DNA로 피복한 후 피부 세포 내로 충격을 가하는 방법을 설명한 문헌 (예컨대, Tang 외, *Nature*.356: 152-154 (1992))에 설명된 바와 같이, 핵산을 금미립자 상에 피복시켜, 입자 충격기 또는 "유전자총"에 의해 피내 전달할 수 있다.

[0076] [0096] 본 발명의 방법에 유용한 또 다른 전달 방법은 Davis 등의 미국특허 제6,509,323호에 설명된 CyclosetTM 기술을 이용하는 것이다. CyclosetTM 기술 플랫폼은 사이클로텍스트린으로 알려진 글루코스의 컵모양의 사이클릭 반복 분자에 기초한 것이다. 사이클로텍스트린 분자의 "컵"은 다른 분자들과 함께 "함유물 복합체"를 형성할 수 있으므로, CyclosetTM 폴리머를 다른 분자들과 결합시켜 안정성을 증가시키거나 표적 리간드를 부가시킬 수 있다. 또한, 사이클로텍스트린은 일반적으로 사람에게 대해 안정한 것으로 밝혀졌고 (개별적인 사이클로텍스트린은 FDA가 승인한 경구 및 IV 약물에서 용해도를 증가시킨다), 약물 등급으로 싼값에 대량 구매할 수 있다. 이 폴리머들은 물에 매우 잘 녹고, 비독성이며 치료량 수준에서 비면역원성일 뿐만 아니라, 반복 투여해도 그러하다. 이 폴리머들은 리포좀보다 훨씬 과량일 수 있는 약물 부하량으로, 광범위한 소분자 치료제를 담지하도록 쉽게 응용될 수 있다.

[0077] [0097] 다중 프로모터 카세트를 포함하는 벡터들은 이들을 오일, 합성 지방산 글리세라이드, 프로필렌 글리콜 또는 고지방산의 에스테르와 같은 수성 또는 비수성 용매 중에서; 필요한 경우 가용화제, 등장제, 현탁제, 유화제, 안정화제, 및 방부제와 같은 통상적인 첨가제와 함께, 용해, 현탁 또는 유화시킴으로써 주사용 또는 투여용 제제로 조성시킬 수 있다.

[0078] [0098] 또한, 다중 프로모터 카세트를 포함하는 벡터들을 약학적으로 허용되는 적절한 담체 또는 희석제와 조합시켜 약학적 조성물로서 조성시킬 수도 있다. 약학적 제형에서, 다중 프로모터 카세트를 함유하는 이 벡터들을 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물들과 조합시키거나 연계하여 투여할 수도 있다. 당업자라면 다중 프로모터 카세트를 함유하는 벡터의 투여량이 전달 비히클의 특성, 표적 세포의 형질도입의 상대적 용이성, 표적 세포에서의 RNAi종의 발현 수준 등에 대한 함수로서 가변적임을 이해할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0079] [0011] 전술한 본 발명의 특징, 장점 및 목적은 상기한 발명의 요약란에 설명된 바와 같이 달성되었으며 첨부된 도면과 이하의 상세한 설명 및 실시예에 비추어 보다 자세히 이해될 수 있을 것이다. 그러나, 첨부된 도면들은 본 발명의 특정 구체예만을 도시한 것일 뿐, 본 발명은 이들과 균등하게 효과적인 다른 구체에도 가능하므로,

본 발명의 범위가 이들 구체예나 도면들로 한정되는 것은 아니다.

[0012] 도 1은 본 발명에 따라 RNAi종을 전달하기 위한 방법의 일 구체예를 단순화시킨 블록 다이어그램도이다.

[0013] 도 2A 및 2B는 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트의 구체예를 단순화시켜 도해적으로 나타낸 도면이다.

[0014] 도 3A 및 3B는 shRNA 전구체로서 RNAi 제제를 전달하는 다중 발현 카세트의 두가지 구체예를 도시한 것이다. 도 3C는 프로모터RNAi/터미네이터 성분들 사이에 삽입된 스테퍼 대역을 포함하는 다중 발현 카세트의 구체예를 도시한 것이다. 도 3D 및 3E는 shRNA 전구체 없이 RNAi를 전달하는 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트의 구체예를 도시한다.

[0015] 도 4A는 바이러스 입자 내에 패키징된 다중 프로모터 RNAi 발현 벡터를 제조하는 한가지 방법을 단순화시켜 도시한 것이다. 도 4B는 바이러스 입자 내에 패키징된 다중 프로모터 RNAi 발현 벡터를 제조하는 또 다른 방법을 단순화시켜 도시한 것이다.

[0016] 도 5는 테스트 제조합 AAV (rAAV) 발현 구조물과 루시페라제 리포터 구조물의 일 구체예를 도시한 것이다.

[0017] 도 6은 본 발명의 일 구체예에 따라 자가 상보적인 (scAAV) RNAi 발현 벡터를 도시한 것이다.

[0018] 도 7은 테스트 구조물과 리포터 구조물을 대표적으로 도식적으로 나타낸 것이다.

[0019] 도 8A는 전술한 실험에서 테스트된 RNAi 제제의 위치를 보여주는 HCV 계놈을 도시한 것이다. 도 8B는 비구조적 단백질에 대한 유전자 요소들을 함유하는 루시페라제-HCV 융합 레플리콘을 도시한 것이다. 도 8B는 비구조 단백질에 대한 유전자 요소들을 함유하는 루시페라제-HCV 융합 레플리콘을 도식적으로 나타낸 것이다. 도 8C는 구조 단백질과 비구조 단백질에 대한 HCV 유전자 요소들을 함유하는 루시페라제-HCV 융합 레플리콘을 도식적으로 나타낸 것이다.

[0020] 도 9는 RNAi 제제들을 테스트하는데 유용한 두개의 루시페라제-HCV 융합 리포터 플라스미드를 도식적으로 나타낸 도면이다. 좌측의 구조물은 루시페라제 유전자에 융합된 100 bp HCV 서열을 하나 포함하는 반면; 우측의 구조물은 루시페라제 유전자에 융합된 서로 다른 100 bp HCV 서열을 3가지 보여준다. 100 bp 대역 내에 함유된 서열을 표적화하는 RNAi 제제들은, 효과적인 경우, HCV-루시페라제 전자 산물을 분해함으로써 해서, 루시페라제 발현을 감소 (어쩌면 제거) 시킨다.

[0021] 도 10은 다양한 RNAi 제제, 프로모터 요소 및 터미네이터 요소들의 모듈 어셈블리에 유용한 독특한 제한 효소 자리를 보여주는 3종 프로모터 카세트의 일 구체예를 도시한 것이다.

[0022] 도 11A는 도 3B에 도시된 3종 프로모터 카세트 타입의 서열 (SEQ ID NO 31)의 일례이다. 도 11B/11C는 도 3C에 도시된 3종 프로모터 카세트 타입의 서열 (SEQ ID NO 32)의 일례이다.

[0023] 도 12는 HCV의 서로 다른 5가지 100 bp 대역들을 표적화하는 여러가지 RNAi 제제들에 의한 루시페라제 발현 억제를 상대적인 광 유닛 (RLU: relative light units)로 측정된 결과를 도시한 것이다.

[0024] 도 13은 여러가지 RNAi 제제들에 의한 루시페라제 발현의 억제 결과를 백분율 억제값으로서 나타낸 도면이다.

[0025] 도 14는 HCV의 5' 대역으로부터의 100 bp 서열의 여러가지 세그먼트를 표적화하는 4가지 서로 다른 RNAi 제제들을 테스트하기 위해 수행된 실험 결과의 재생성을 나타낸 도면이다.

[0026] 도 15는 HCV의 5' 대역의 100 bp 서열의 여러가지 세그먼트를 표적화하는 5종의 서로 다른 RNAi 제제들에 대한 루시페라제 발현 억제 백분율의 변화를 형질감염 24시간 후 및 48시간 후에 비교하여 도시한 것이다.

[0027] 도 16은 HCV의 5' 대역의 100 bp 서열의 여러가지 세그먼트를 표적화하는 2종의 서로 다른 RNAi 제제들에 대한 루시페라제 발현 억제 백분율의 변화를 형질감염 24시간 후 및 48시간 후에 비교하여 도시한 것으로, 5종의 서로 다른 RNAi 제제들은 HCV의 3' 대역의 100 bp 서열의 여러가지 세그먼트들을 표적화하고, 하나의 RNAi 제제는 HCV의 오픈 리딩 프레임 대역 중의 100 bp 서열의 세그먼트를 표적화한다.

[0028] 도 17A 및 17B는 세가지 Pol III 프로모터의 강도를 평가하는 데이터를 도시한 것이다. 반딧불 루시페라제 mRNA (McCfrey 외, 2002)에 특이적인 shRNA 서열을 지시된 Pol III 프로모터 조절 하에 삽입하였다. 얻어진 플라스미드 DNA를 루시페라제 리포터 플라스미드와 함께 Huh7 세포 (도 17A) 또는 293 세포 (도 17B)내로 공형

질감염시켰다 (co-transfected). 루시페라제 농도를 형질감염 72시간 후에 측정하였다. 도 3B로부터의 3중 프로모터 구조물 (각 패널 상의 우측의 세가지 구조물)에 shRNA를 구동하는 프로모터를 표시하였다.

[0029] 도 18은 루시페라제-HCV 융합 리포터 플라스미드 분석에서 서로 다른 siRNA 제제들을 이용한 루시페라제 발현 억제를 나타낸 것이다. 루시페라제-HCV 리포터 플라스미드를 Huh7 세포 내로 각각의 siRNA 제제들로 공동트랜스펙션시킨 다음 48시간 후에 루시페라제 활성을 측정하였다.

[0030] 도 19는 서브게놈 루시페라제-HCV 융합 레플리콘에 대한 선별된 siRNA 제제의 활성을 도시한 것이다. 테스트된 siRNA 제제들을 미량의 pGL3Control DNA (형질감염 효능에 대한 대조군으로서)과 함께 293T 세포 내로 형질감염시켰다. 레닐라 루시페라제와 반딧불 루시페라제의 두가지 모두의 농도를 48시간 후에 측정하였다.

[0031] 도 20은 하나 또는 두개의 활성 프로모터를 포함하는 프로모터/shRNA 카세트를 포함하는 플라스미드로 공동형질감염시킨 후 루시페라제-HCV 리포터 플라스미드로부터의 루시페라제 신호의 억제 백분율을 도시한 도면이다.

[0032] 도 21은 하나, 두개 또는 세개의 활성 프로모터/shRNA 카세트를 포함하는 플라스미드들을 이용하여 공동형질감염 시킨 후, 코딩 대역 C12 (상), 코딩 대역 C-9 (중), 또는 5'6 대역 (하)을 함유하는 루시페라제-HCV 리포터 플라스미드로부터의 루시페라제 신호의 억제 백분율을 도시한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080] [0099] 본 발명의 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물에 의해 치료될 수 있는 질병 중 한 가지는 C형 간염 바이러스(HCV) 감염이다. 질병관리예방센터(Centers for Disease Control and Prevention)의 통계에 따르면, 미국 인구의 거의 2%인 약 4백만명이 현재 HCV에 감염되었다. HCV 감염자의 대부분은 처음에는 증상을 보이지 않는다. 그러나 80% 이상이 만성적이고 점진적인 간질환을 보이고 마침내는 간경화증이나 간세포성 육종에 이른다. HCV는 미국 내에서 간 이식의 주요한 원인 증상이고 매년 8000명 내지 10000명의 미국인이 이로 인해 사망한다. 세계보건기구(World Health Organization)는 전 세계적으로 1억 7천만명 이상이 감염되었을 것으로 추산하고, 어떤 국가에서는 많게는 인구의 10-30%가 감염된 것으로 평가하고 있다.

[0081] [0100] HCV는 양성 센스의 단일 가닥 외피 보유형 RNA 바이러스로서 플라비바이러스과에 속한다. HCV의 감염 주기는 일반적으로 수용체-매개 부착과 내입에 의하여 바이러스 입자가 세포로 들어가면서 시작된다. 세포질에서 외피제거된 후 계놈을 이루는 RNA의 양성 가닥은 숙주 세포의 번역 기구와 직접적으로 반응한다. 5' 캡 메틸화 없이, 이 RNA는 내부 리보솜 결합 부위(IRES) 역할을 하고 번역과정의 첫 단계로서 40S 서브유닛을 직접적으로 결합하게 하는 5' 비번역 부위(UTR)에서 광범위한 2차 구조를 형성한다.

[0082] [0101] 길이가 약 9600 뉴클레오티드인 HCV 계놈은 다기능단백질(polyprotein)이라고 불리는 하나의 긴 오픈 리딩 프레임을 코딩한다(도 8A 참조). 바이러스 단백질은 다기능 단백질로부터 연결된 전구물질로서 생산되고, 이어서 다양한 종류의 바이러스 효소와 세포성 효소에 의하여 절단되어 성숙한 산물로 된다. 코딩된 유전자로서 코어 및 외피 당단백질을 포함하는 구조 단백질을 들 수 있는데, 이는 이들이 자손 비리온에서 필수적인 구조 요소이기 때문에 붙여진 이름이다. 또한 RNA-의존 RNA 중합효소처럼 중요한 기능을 하는 비구조 단백질도 역시 생산된다. 바이러스 복제 기구는 양성 센스 RNA를 음성 가닥 중간체로 전사하는 감염된 세포질 내에서 이루어진다. 따라서, HCV 계놈 RNA는 자신의 복제를 위한 주형으로서 기능할 뿐만 아니라, 바이러스가 코딩하는 단백질의 번역을 위한 메신저 RNA로서도 기능한다. 음성 가닥은 다시 RNA의 양성 가닥으로 전사되어 세포 내에서 양성 가닥을 많은 수로 증폭한다. 이 단계에서, 양성 가닥은 숙주 세포 번역 기구와 한 번 더 상호 작용할 수도 있고, 만일 구조 단백질이 충분히 축적되어 있다면 비리온으로 패키징 될 수 있다. 그 다음에 세포로부터 배출되어, 바이러스는 감염 주기를 반복한다.

[0083] [0102] **실시에 1: shRNA 서열의 생체 내 전달을 위한 AAV-2 발현 벡터의 개발**

[0084] [0103] 감염 입자에 의한 shRNA 전달을 시험하기 전에 적당한 발현 플라스미드를 제작하여 검증한다. 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 설계할 때에는 적어도 두 가지 점이 고려될 수 있다. 1) 구조물은 효율적으로 패키징 되어 자손 비리온이 되어야 한다. 그리고 2) 플라스미드는 shRNA 발현을 많이 시켜야 한다. 뿐만 아니라, 다양한 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 시험하기 위해서는 형질감염과 형질도입 효율을 평가하기 위한 수단이 있어야 한다.

[0085] [0104] rep 서열과 cap 서열이 제거된 AAV-2 벡터는 바이러스 RNAi 발현 구조물을 위한 기본 골격(이하, rAAV 벡터)을 제공한다. 이 벡터는 AAV 연구에 광범위하게 사용되어 왔고 효율적인 패키지를 위한 필요 조건이 잘 알

려져 있다. U6 및 H1 프로모터에 의해 각각 추진된 동일한 shRNA의 억제 정도가 큰 폭으로 상이하다는 보고가 있음에도 불구하고, 이들 프로모터를 이용하여 shRNA 서열을 발현시킨다. 그러나 벡터 구조물이란 것은, 그러한 변이가 보이면 프로모터를 쉽게 바꿀 수 있는 그런 것이다.

- [0086] [0105] 사실상 여는 바이러스 전달 시스템처럼, rAAV 벡터도 효율적으로 패키징되기 위하여는 어떤 크기 조건을 만족해야 한다. 일반적으로, rAAV 벡터는 4300 내지 4900 뉴클레오티드의 길이를 가져야 한다(McCarty 외, Gene Ther. 8: 1248-1254 (2001)). rAAV 벡터 크기가 상기 한계에 미달하면, '스터퍼(stuffer)' 단편이 첨가되어야 한다(Muzyczka 외, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158: 970129 (1992)). 또는, rAAV 다중 프로모터 RNAi 발현 구조체는 둘 또는 그 이상의 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트로 구성될 수도 있다.
- [0087] [0106] 본 발명의 rAAV 벡터 구체예에서, 각각의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분의 길이는 약 400 뉴클레오티드 인데, 발현 카세트당 많은 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들을 포함할 공간을 충분히 갖는다. 또는, 감염된 인자를 통하여 전달된 rAAV 발현 구조물에 의한 표적 세포의 형질 도입 효율의 정량 뿐만 아니라 rAAV 발현 구성체의 형질감염 효율을 평가하기 위하여, rAAV 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물 내에 하나 이상의 선별 마커 카세트를 설계할 수 있다.
- [0088] [0107] 최초의 시험 발현 구조물은, 리포터 구조물로부터 루시페라제 활성을 저해하는 능력이 있는 서열로부터 디자인된 shRNA 중의 발현을 이끌어낸다. (Elbashir 외, Embo. J. 20 (23): 6877-6888 (2001) 참조). 프로모터, shRNA, 및 터미네이터 서열을 포함하는 RNAi 카세트의 요소들은 짧으며 길이가 긴, 상보적인 올리고 뉴클레오티드를 이용하여 독립적으로 드 노보(*de novo*) 조립된 다음, 복수의 클로닝 사이트를 이용하는 바이러스 벡터로 클로닝된다. 루시페라제의 생산을 코딩하는, 상업적으로 시판되는 입수가 가능한 발현 플라스미드는 표적 서열을 하향 조절하는 shRNA의 능력을 확인하기 위하여 리포터로서 기능한다(도 5. 참조).
- [0089] [0108] 비록 루시페라제에 대응하는 shRNA가 이전에 확인된 바 있지만, 생체 내에서 이 구조물을 시험하기에 앞서 rAAV-전달된 shRNA의 효능을 생체 외에서 평가한다. 테스트 구조물과 리포터 구조물을 표준 기술을 사용하여 허용된 세포 내로 형질감염시킨다. 이 실험에서는 루시페라제-특이적인 shRNA를 아무 관련이 없는 shRNA 서열로 교체시킨 rAAV 발현 구조물을 음성 대조군으로 이용한다. 형질감염 효율의 상대적 백분율은 형광현미경 검사를 이용하여 선택적인 마커의 수준을 측정함으로써 직접적으로 평가한다. shRNA의 억제 활성을 평가하기 위해서, 표준적 상업 키트를 이용하여 루시페라제 활성을 측정한다. 또는, 병행 실험 플레이트로부터 수탁하여 정제한 RNA에 대해 정량적인 실시간 PCR 분석(Q-PCR)을 행한다. 무관계한 shRNA 종류로 처리된 세포의 용해질에서 회수된 활성에 비하여 90% 이상 활동이 감소하면, shRNA가 매우 기능적임을 가리키는 것이다.
- [0090] [0109] 마우스의 간에 형질감염시킨 루시페라제 리포터 시스템에 미치는 shRNA의 효과를 측정하기 위하여, McCaffrey의 연구(McCaffrey 외, Nature. 418: 38-39 (2002) 참조)와 유사한 후속 실험들을 수행한다. 유체역학적 형질감염 방법 (고압 꼬리 정맥 주입)에 의해 마우스에 전달된 핵산은 우선적으로 간에 국소화된다. 세포 배양에서 공형질감염(co-transfection)을 제어하는 원칙과 같이, 하나의 혼합물로부터 유래하는 복수의 플라스미드를 동시 주입하면 종종 발현 구조물 모두가 동일한 세포 내로 침투 할 수 있다. 따라서, 비록 꼬리 정맥 주입 과정은 간 내에서 간세포의 5-40%만 감염시킨다고 증명되었지만(McCaffrey 외, Nature Biotech. 21 (6): 639-644 (2003)), 공주입(co-injection) 리포터 시스템과 발현 구조물을 동일한 같은 세포로 전달할 수 있게 해준다.
- [0091] [0110] 루시페라제를 표적으로 하는 shRNA 서열을 갖는 rAAV 발현 구조물을 루시페라제 유전자를 코딩하는 리포터 구조물과 함께 주입한다. 음성 대조군이 투여되는 동물에서는, 무관한 shRNA를 갖는 발현 구조물이 리포터 구조물과 함께 주입한다. 7일 후, 마우스를 죽이고 간을 적출한다. 간의 일부에서 생성된 용해질에서 루시페라제의 활성을 측정한다. 간의 남은 부분은 자료의 표준화를 위한 마커 단백질 발현을 결정하기 위한 조직 분석 뿐만 아니라 Q-PCR 측정에 이용된다. 형질감염 효율을 측정하기 위한 대체적인 방법은, 인간 $\alpha 1$ -항트립신(hAAT) 같은 분비된 단백질을 위한 세 번째 마커 플라스미드가 함께 주입된 마우스에서 얻은 혈청의 ELISA 측정을 포함할 수 있다(Yant 외, Nature Genetics. 25: 35-41 (2000), McCaffrey 외, Nature Biotech. 21 (6): 639-644 (2003) 참조).
- [0092] [0111] 네이키드 DNA 플라스미드의 공형질감염을 이용함으로써 발현 구조물이 마우스 모델의 생체 내에서 뿐만 아니라, 생체 외에서 세포 배양 시스템 모두에서 기능적이라는 것이 입증되면, 감염성 입자로 패키징되는 rAAV 발현 구조물에 대한 시험을 시작한다. 감염성 입자는 시판되는 AAV 무헬퍼(helper-free) 시스템으로부터 제조하는데, 이 시스템은 다음의 3가지 서로 다른 발현 구조물에 의한 공형질감염을 필요로 한다: 1) 루시페라제에 대한 shRNA를 발현하는 rAAV 구조물(AAV ITRs가 병렬되어 있다.), 2) AAV *rep* 및 *cap* 유전자를 코딩하는 구조물,

및 3) 역가가 높은 바이러스 생산에 필요한 헬퍼 아데노바이러스 유전자를 조절하는 발현 구조물. 표준 정제 과정을 거쳐서, 실험에 사용할 바이러스 입자를 준비한다.

- [0093] [0112] 마우스에 rAAV 입자를 주입하기 전에, 마우스의 간에 리포터 시스템을 수립시킨다. 동물마다 서로 다른 형질감염 효율의 차이를 조절하기 위해, hAAT에 대한 발현 플라스미드 뿐만 아니라 루시페라제 리포터 구조물을 전달하기 위한 유체역학 형질감염을 이용한다. 리포터 활성을 충분한 정도로 수행하기 위하여 며칠간 마우스들을 쉬게 한다.
- [0094] [0113] 루시페라제 리포터 활성을 간에서 확립한 후, rAAV 입자를 문맥이나 꼬리 정맥 주사를 통해 정상적인 C57B1/6 마우스에게 주입한다. 무관한 shRNA의 발현 구조물을 산생하는 rAAV 입자들을 음성 대조군으로 사용한다. 먼저, 마우스에게 비교적 다량의 (2×10^{12} 벡터 게놈 (vg))을 주입하고, 후속 실험에서는 그 양을 줄여 투여량-반응 곡선을 만든다. 7일 내지 10일 경과 후, 마우스들을 희생시키고 간을 적출한 다음 혈청 시료를 수집한다. 앞서 설명한 루시페라제 분석 및 QPCR 방법을 이용함으로써, 분리된 간으로부터 간의 루시페라제 활성 및 RNA의 상대적 수준을 측정한다. 또한, 간 조직의 슬라이스 시리즈 중의 마커 단백질을 측정함으로써 형질도입의 효율을 평가한다.
- [0095] [0114] 실험 결과는 매우 유동적일 수 있다. 유체역학적 형질감염 공정은 간세포의 5-40%를 형질감염시킬 수 있는 것으로 평가된 바 있다. AAV-2 전달 공정에 의한 간 세포의 형질도입은 형질도입 효율이 5-10%임을 보여준 바 있다. 비록 AAV가 꼬리 정맥 주사법에 의해 먼저 형질감염된 동일한 풀의 간세포들을 우선적으로 형질도입하기는 하지만, 각각의 기술이 영향을 미치는 세포들의 서브세트는 겹치지 않을 수 있다. 전자의 경우가 발생하면, 무관한 shRNA 종으로 형질도입된 마우스에 비해 루시페라제 활성이 감소된 것이 관찰된다. 후자가 일어나면, 루시페라제 활성이 감소되지 않는 것으로 관찰된다.
- [0096] [0115] 3종 발현 구조물에 의해 전달되는 AAV 입자는 시험관내에서 루시페라제-HCV 융합 리포터를 억제한다는 것이 입증되어야 한다. 도 9에 도시된 리포터 구조물들 중 하나로 관용적인 조직 배양 세포들을 형질감염시킨다. 또한, 각각의 공형질감염 혼합물을 hAAT를 코딩하는 플라스미드로 강화시킨다. 인큐베이션한지 48시간 후, HCV에 대해 3종 프로모터 shRNA 발현 플라스미드를 산생하는 감염성 입자들을 세포들에 투여한다. 3가지 무관한 shRNA 종들을 발현하는 3종 프로모터 구조물을 함유하는 AAV 입자들을 음성 대조군으로 사용한다. 루시페라제 활성 측정을 이용하여 AAV-유도된 shRNA가 고도로 기능적임을 입증한다.
- [0097] [0116] 실시예 2: 간 조직의 AAV 형질도입 효율을 증진시키기 위한 변형
- [0098] [0117] 비록 AAV계 벡터가 소망되는 서열들을 간세포에 전달할 수 있는 것으로 입증된 바 있지만, 이들 조직 내에서 발생하는 형질도입의 상대적인 수준은 전통적으로 낮은 편이었다. 혈액 인자 IX를 전달 및 발현하기 위해 AAV-2를 사용하는 혈우병에 대한 현행 임상 연구에 있어서, 이것은 의미있는 주제는 아니다. 혈우병 치료에 있어서, 단지 분비된 단백질 수준을 치료적 수준으로 보완하는 것만이 중요하다. 이러한 보완은 소망되는 단백질을 유의적인 수준으로 발현할 수 있는 소수의 형질도입된 세포로부터 유래할 수 있다. 그러나, RNAi 작용 메카니즘은 세포 내부에 국한된 것이어서 그 효과가 세포에서 세포로 직접 전해지지는 않기 때문에, AAV 발현 shRNA를 치료제로서 이용하기 위해서는 형질도입 효율을 증가시켜야만 한다.
- [0099] [0118] McCarty 등은 캡시드 유전자 내에 동일한 발현 카세트의 플러스 가닥과 마이너스 가닥을 모두 갖는 자가상보적인 AAV 벡터 (scAAV)를 생산할 수 있었다 (*Gene Ther.* 8: 1248-1254 (2001)). 이것은 5' ITR은 돌연변이시키고 3' ITR은 그대로 유지시킴으로써 달성된 것이었다. 말단 레절루션 자리 다른 비필수적 AAV 서열을 돌연변이시키거나 결실시킴으로써, 야생형 AAV와 이 구조물에 의한 재조합 가능성을 제거시켜, 복제가 3' ITR에서 개시되는 DNA 주형이 만들어진다. 일단 복제 기구가 5' ITR에 도달하면, 레절루션이 일어나지 않고, 복제가 3' ITR로 계속된다. 그 결과 얻어진 산물은 플러스 가닥과 그에 상보적인 마이너스 가닥을 모두 가지면서도, 효과적으로 패키징된다. scAAV 벡터를 사용함으로써, 간 세포의 형질도입을 전체 간세포의 30%까지 증가시켰다 (Fu 외. *Molec. Therapy.* 8 (6): 911-7. (2003)). 수조내 전달될 경우, 소뇌 내의 푸르키니에 세포의 50% 이상이 scAAV 입자에 의해 형질도입되었다. Thomas 등은 자가상보적인 벡터는, 이들에 대응하는 단일 가닥 AAV 대응물을 더 많은 양으로 마우스간에 주입했을 때 보다 더, 마우스 간에서 루시페라제 트랜스유전자 발현 수준을 50배나 더 높일 수 있었음을 보여주었다 (Thomas 외, *J. Virol.* (in press)). 비록 그 수준이 약간씩 저하되긴 하였지만, 발현 벡터 간의 상대적인 차이는 주사 후 거의 1년간 20배를 유지하였다.
- [0100] [0119] 이와 유사한 전략을 본 발명에서 사용한다. rAAV 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 패키징하는 것과 관련한 사이즈 제한 때문에, 치료 서열 전달에 사용될 수 있는 여유분량 - 다른 바이러스 전달계에 비해 이미 상

당히 적은 편이다 - 은 scAAV 사용에 따라 절반 정도로 줄어든다. 따라서, 4500 뉴클레오타이드를 패키징할 수 있는 대신, 그 한계는 2250 뉴클레오타이드로 저감된다. 이와는 별도로, 다중 프로모터 RNAi 발현 카세트의 사이즈는 이러한 구조물을 가능케 한다. scAAV 내의 주요 요소들을 도 6에 도해적으로 표시하였다.

[0101] [0120] 형질도입 효율을 비약적으로 증가시키기 위해 AAV 전달계의 다른 변형법들이 사용된 바 있으며, 여기에는, rAAV-2 벡터 계놈을 다른 혈청형으로부터 유래한 Cap 단백질로 패키징함으로써 슈도타입 바이러스 입자를 생산하는 것이 포함된다. Cap 단백질은 모든 혈청형 중에서 가장 잘 특징화된 편이기 때문에, AAV-1 내지 AAV-6의 Cap 단백질들은 AAV-2 벡터를 슈도타입화하는데 가장 널리 사용된다. 이러한 슈도타입 전략을 사용함으로써 얻어지는 장점에도 불구하고, 간세포의 형질도입 효율의 역치는 전체 집단의 단지 15% 까지 증가될 수 있을 뿐이다. 그러나, AAV의 다른 많은 혈청형들이 분리 및 동정되었으나, 인정가능한 정도로 특징화되지는 못하였다. 예컨대, 이들 중 한가지는 본래 레수스 원숭이의 심장 조직으로부터 분리된 AAV-8이다. 형질도입에 미치는 신규한 cap 단백질의 효능을 측정하려는 시도에서, 단일 가닥 AAV-2 계놈이 AAV-8 cap에 의해 슈도타입된 슈도타입형 바이러스를 만들었다. 이 벡터는 감염성 입자의 양을 점차 증가시키면서 주입한 후, 마우스 간의 형질도입의 상대적 효율을 평가하기 위해 LacZ 유전자를 운반한다. 그 결과 (Thomas 외, *J. Virol.* 78(6):3110-22. (2004))를 다음 표 1에 요약하였다.

표 1

AAV-2/2 및 AAV-2/8 투여량 반응 (% 베타-gal 양성 간세포)					
투여량 (v.g./마우스)					
벡터	5 X 10 ¹⁰	3 X 10 ¹⁰	1.8 X 10 ¹¹	3.9 X 10 ¹²	7.2 X 10 ¹²
AAV-2/2 LacZ	0.6 ± 0.4%	3.0 ± 0.5%	8.1 ± 1.0%	8.9 ± 1.0%	NA
AAV-2/8 LacZ	8.1 ± 1.8%	14.9 ± 3.4%	65.8 ± 9.1%	NA	97.4 ± 0.3%

[0102] [0121] 주입되는 대조군 AAV-2/2 입자의 투여량이 증가됨에 따라, 간세포의 형질도입도 약간 증가한다; 그러나, 형질도입의 상한 역치는 10% 한계 부근을 여전히 고수한다. 놀랍게도, 슈도타입된 AAV-2/8 입자는 그 입자의 최소 투여량; 즉, AAV-2/2 대응물보다 30-80배나 더 낮은 투여량에서도 간세포의 8%를 형질도입시켰다. 또한, AAV-2/8에 대한 형질도입 효능에 있어서의 투여량 의존적인 증가는 최대 투여량에서는 AAV-2/2의 형질도입 효능보다 97%나 더 높은 것이었다. 이 범위의 형질도입 효능은 RNAi를 조직 내의 세포에 효과적으로 전달할 수 있게 해 주는 수준이다.

[0104] [0122] 이와 유사한 AAV 변형을 rAAV RNAi 발현 구조물에 대해 일으킨다. 이들 단순한 변형들을 통합한 후, 바이러스 스톱을 마우스 모델 시스템에서 테스트하기 위해 만든다. 다음의 rAAV RNAi 실험용 바이러스 스톱을 시험한다: 단일 가닥 AAV-2/2; 단일 가닥 AAV-2/8; 자가상보적 AAV-2/2; 및 자가 상보적 AAV-2/8.

[0105] [0123] 무관한 shRNA 서열을 발현하는 rAAV 벡터를 산생하는 대응하는 바이러스 입자들을 만들어서 음성 대조군으로서 사용한다. 루시페라제 활성의 상대 수준의 대폭적인 감소는 형질도입 효능의 증가와 연관이 있다.

[0106] [0124] 실시예 3A: 루시페라제 HCV 융합 플라스미드에 대한 RNAi 제제의 선택 및 테스트

[0107] [0125] HCV에 대한 치료제로서 유용한 shRNA를 선택하는 것은 간단한 문제가 아니다. 탈출 돌연변이가 발생한다는 문제 뿐만 아니라, 높은 돌연변이 비율로 인해 바이러스를 산생하는 감염 개체 집단에서, 그 표현형이 뉴클레오타이드 서열 기준으로 31-34%나 상이하다는, 비교적 큰폭의 서열 다양성이 야기된다. 아형 (주어진 표현형 내의 종들)은 전장 계놈 서열 비교에 기초할 때, 20-23% 상이할 수 있다. 따라서, 보존도가 높은 바이러스 계놈 대역을 동정하여 치료 능력을 최대한 확보하는 것이 바람직하다. 서열들을 어떻게 정렬시키고 치료적으로 알맞은 대역을 어떻게 선택할 것인가에 관한 일례로서, HCV 유전형 1b 바이러스에 대응하는 30 전장 서열을 공공 데이터베이스로부터 추출해서 Jotun Hein 법 및 MegAlign 분석 소프트웨어 (DNASTAR)를 이용하여 정렬하였다. 예컨대 5' UTR 중의 대역 (뉴클레오타이드 75-112)과 같이 보존도가 높은 대역이 동정되었다.

[0108] [0126] 후보 서열들을 선택하기 위해, 공개된 모든 독립적인 전장 또는 근전장 HCV 서열들의 정렬을 수행하였다. 현재 공지의 모든 유전형을 대표하는 이러한 서열 중 입수가능한 것은 200개가 넘는다. RNAi 치료

제의 선택 및 개발을 위한 몇가지 후보 대역들이 현재 존재하며 그 중에서도 5' 및 3'UTR 대역이 HCV 게놈 중에서 가장 고도로 보존된 대역이라는 것이 여러 문헌에 잘 나타나있다. 이들 비코딩 서열은 세포 번역 복합체 단백질 또는 조절 단백질과의 잠재적인 입체구조적 간섭으로 인해 표적화하기에 최적인 서열은 아닐 수 있다는 인식에도 불구하고, Yokota 등은 이미 레플리콘 시스템에서 5'UTR을 표적화하는 고도로 기능적인 RNAi를 이미 동정한 바 있다. (*EMBO Rep.* 4 (6): 602-608 (2003)). 비록 21개 뉴클레오타이드 (shRNA 중들에 있어서 표적화 서열의 대응하는 사이즈)의 개별적인 스트래치 내에서 절대적인 상동성을 갖는 몇개인가의 대역들을 동정해내는 것이 바람직하긴 하겠지만, 오늘날까지의 분석에 의하면 이러한 보존 정도는 모든 유전형에 걸친 경우는 차치하더라도, 특정 유전형의 다양한 아형에서조차 일어나지 않는 것으로 입증되었다. 따라서, 선택은 대역의 80% 이상이 절대적인 보존을 유지하는 게놈의 세그먼트를 포함할 수 있다. 전임상 후보들을 최종적으로 구성함에 있어서, 세가지 독립적인 shRNA의 발현은 서열 다양성을 상쇄하며, 단일 전달 비히클 내에 함유된 복합 요법을 가능케 해준다.

[0109] [0127] 또는, 모든 HCV 유전형 분석시 선택 기준을 충족하는 보존 대역이 동정되지 않을 경우, 미국의 감염 집단의 거의 3/4를 차지하며, 아프리카를 제외하고는 전세계에 걸쳐 우점적인 유전형인 유전형 1 (1a 및 1b)만으로 서열 분석을 국한시킬 수 있다. 덧붙여, 현재 가장 효과적인 항HCV 요법인 리바비린 (구아노신 유사체)과 페길화 인터페론과의 복합체는 유전형 1에 대해서 다소 비효율적이지만, 다른 유전형에 대해서는 매우 효율적이다. 그러므로, 대안적인 치료법을 가장 필요로 하는 것은 가장 큰 환자 집단이다. 서열 정렬은 단지 상동성만을 드러낼 뿐이므로, 상대적인 GC 함량 및 서열 데이터베이스에서 조사할 때 교차 특이성 결여와 같은 다른 선택 기준을 테스트하고자 하는 최종 RNAi 제제를 선택하는데 이용한다.

[0110] [0128] 예컨대, 한 실험에서, HCV 아형 1a 및 1b로부터 복수개의 서열에 대해 정렬을 실시하였다. 몇몇 보존된 대역들은 테스트를 위한 RNAi 제제를 선택하기에 충분히 길이가 긴 것으로 동정되었다 (> 19 뉴클레오타이드). 5'UTR과 3'UTR 대역은 가장 잘 보존된 대역이었다. 동정된 상동성 대역들이 상당히 길었기 때문에, 정렬 역시 상이한 유전형들 간에 실시되었다. 두가지 정렬 결과를 조합하여 보편적으로 보존된 대역을 선택할 수 있다. 'A' 또는 'U' 또는 'G' 및 'C'의 긴 스트래치와 같은 몇몇 대역들은 RNAi 제제를 이용하여 표적화하는데 쉽지 않고, 추가의 선택을 위한 "유자격(qualified)" 대역으로서 남는다. 고려된 HCV의 모든 유전형에 있어서 전체 코딩 대역 (오픈 리딩 프레임) 중 단 하나의 보편적으로 보존된 대역만이 동정되었다; 따라서, 대부분의 경우 표적에 대해 선택된 서열들은 아형 1a와 1b에서 보존된 서열들이다.

[0111] [0129] 일단 "유자격" 대역으로 동정되면, RNAi 제제의 안티센스 가닥의 5' 말단은 3' 말단에 비해 자유 에너지가 더 적다는 기준을 적용하여, 각각의 RNAi 서열들을 동정한다. "이웃쌍 자유 에너지" 규칙을 적용하여 그때까지 선택된 잠재적인 모든 RNAi 제제의 5' 및 3' 말단 모두의 마지막 5개 뉴클레오타이드에 대한 자유 에너지를 계산하였다. 그 결과, 총 30개의 잠재적인 RNAi 제제들이 동정되었다: 10개는 5' UTR (5'-n), 12개는 오픈 리딩 프레임 ORF (C-n), 그리고 8개는 3'UTR (3'-n) (표 2 참조). HCV 게놈 상에서의 이들 RNAi 표적 자리의 상대적인 위치를 도 8A에 도시하였다.

표 2

RNAi 서열				
RNAi 제제	RNAi 서열	SE ID NO.	Luc 리포터 플라스미드	HCV 위치
5'-1	gCTGTGAGGAACTACTGTCT	SEQ ID NO. 1	20	IRES 43-62
5'-2	GTCTAGCCATGGCGTTAGT	SEQ ID NO. 2	--	IRES 77-95
5'-3	GGAGAGCCATAGTGGTCTG	SEQ ID NO. 3	16, 20	IRES 131-149
5'-4	GCGGAACCGGTGAGTACAC	SEQ ID NO. 4	16	IRES 150-168
5'-5	GTCTGCGGAACCGGTGAGTA	SEQ ID NO. 5	16	IRES 146-165
5'-6	GCGAAAGGCCTTGTGGTACT	SEQ ID NO. 6	16, 17	IRES 270-289
5'-7	GATAGGGTGCTTGCGAGTG	SEQ ID NO. 7	16	IRES 295-313
5'-8	GAGGTCTCGTAGACCGTGCA	SEQ ID NO. 8	16, 17	IRES 319-338
5'-9	gCTTGTGGTACTGCCTGATA	SEQ ID NO. 9	--	IRES 279-298
5'-10	gCTGCCTGATAGGGTGCTTG	SEQ ID NO. 10	17	IRES 289-307
C-1	AGATCGTTGGTGGAGTTTA	SEQ ID NO. 11	--	코어 427-445
C-2	gTTGGGTAAGGTCATCGATA	SEQ ID NO. 12	--	코어 696-714
C-3	GCCGACCTCATGGGGTACAT	SEQ ID NO. 13	18	코어 732-752
C-4	GGTTGCTCTTCTCTATCT	SEQ ID NO. 14	--	코어 852-870
C-5	GGGATATGATGATGAACTG	SEQ ID NO. 15	--	NS1 1300-1318
C-6	GGATGAACCGGCTAATAGC	SEQ ID NO. 16	--	NS4B 6085-6113
C-7	GGAGATGGGCGGCAACATC	SEQ ID NO. 17	--	NS5A 7046-7064
C-8	GTCTTCACGGAGGCTATGA	SEQ ID NO. 18	--	NS5B 8610-8629
C-9	GTCAACTCCTGGCTAGGCAA	SEQ ID NO. 19	--	NS5B 8811-8830
C-10	gTCCACAGTACTCTCCAGG	SEQ ID NO. 20	--	NS5B 9019-9037
C-11	gCCTCTTCAACTGGGCAGTA	SEQ ID NO. 21	--	NS5B 9170-9188
C-12	AGCTTAAACTCACTCCAAT	SEQ ID NO. 22	--	NS5B 9196-9214
3'-1	GCTCCATCTTAGCCCTAGT	SEQ ID NO. 23	19	5-23*
3'-2	gTCCATCTTAGCCCTAGTCA	SEQ ID NO. 24	19	7-25*

[0112]

3'-3	GTCACGGCTAGCTGTGAAA	SEQ ID NO. 25	19	22-40*
3'-4	ACGGCTAGCTGTGAAAGGT	SEQ ID NO. 26	19	25-43*
3'-5	GCTGTGAAAGGTCCTGTGAG	SEQ ID NO. 27	19	32-50*
3'-6	GGTCCGTGAGCCGCATGAC	SEQ ID NO. 28	--	41-59* ^
3'-7	GCCGCATGACTGCAGAGAGT	SEQ ID NO. 29	--	50-69* ^
3'-8	ACTGGCCTCTCTGCAGATCA	SEQ ID NO. 30	--	76-95* ^

‡소문자는 HCV 융합 레플리콘이나 HCV 게놈에 대응하지 않는 서열을 가리킨다.

[0113]

표 3

[0114]

루시페라제-HCV 융합 플라스미드	
루시페라제-HCV 융합 플라스미드	HCV 표적 대역
#20	5'1 내지 5'5
#16	5'3 내지 5'10
#17	5'6 내지 5'10
#12	5'7 내지 5'10, 코딩-1
#18	코딩-3
#19	3'1 내지 3'8
C2&4	코딩-2, 코딩-4
C5	코딩-5
C6	코딩-6
C7	코딩-7
C8	코딩-8
C9	코딩-9
C10	코딩-10
C11&12	코딩-11, 코딩-12
C6-C9-C12-3'1	코딩-6, 코딩-9, 코딩-12, 3'1

[0115]

[0131] 선택된 RNAi 서열의 효능을 테스트하기 위해, RNAi 제제들을 루시페라제-HCV 융합 플라스미드와 함께 배양된 세포에 직접 전달하였다. 이 실험에서 사용된 루시페라제-HCV 융합 플라스미드의 도해도를 도 9의 왼쪽 패널에 나타내었다. 이것은 RNAi 제제가 유래된 HCV 대역, 즉 HCV 표적 서열에 대응하는 핵산의 100 bp 스트래치에 융합된 반딧불 루시페라제 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 포함한다. 이 100 bp 대역 내의 서열에 지향된 RNAi 제제는, 효과적이라면, 루시페라제-HCV 전사 산물을 분해함으로써 해서, 루시페라제 발현을 감소시키거나 소거한다. 표 3은 대응하는 루시페라제-HCV 융합 플라스미드들과 사용된 HCV 표적 대역들을 몇가지 수록한 것이다.

[0116]

[0132] 미리 합성된 siRNA 제제들을 Dharmacon, Inc. (Lafayette, CO)로부터 구입하였다. Huh7 세포들을 형질감염 24시간 전에 웰 당 9.5×10^5 세포의 비율로 12-웰 플레이트에 접종하였다. 형질감염시 세포들은 ~30-40% 농도였다. 350 μ l OptiMEM (Invitrogen Inc.) 배지를 15 μ l Nova FECTOR (VennNova, Pompano Beach, FL)와 혼합하고, 실온에서 1시간 인큐베이션하였다. 50 μ l OptiMEM을 0.05 μ g pRL-SV40 (Promega), 0.45 μ g Luc-HCV 리포터 플라스미드, 및 2 μ l의 적절한 RNAi 제제 (20 μ M 스톱)과 혼합하였다. NovaFECTOR 용액을 DNA/RNAi 혼합물에 첨가하고 실온에서 15분간 인큐베이션시켰다. 세포들을 OptiMEM으로 1회 행구고 400 μ l의 NovaFECTOR/DNA/RNAi 혼합물로 형질감염시켰다. 이어서 세포들을 37°C, 5% CO₂ 분위기에서 1.5 시간 동안 인큐

배이션시켰다. 완전 배지 1 밀리리터를 각 웰에 첨가하고, 다시 2.5시간 동안 인큐베이션시키면서, 이 동안 배지를 신선한 완전 배지로 갈아주었다. 추가 인큐베이션은 2일간 계속하였다.

- [0117] [0133] 2일 후, 제조자의 이중 루시페라제 프로토콜 (Promega, Madison, WI)에 따라 배지를 흡입하고 세포를 용해시켜(lysed) 루시페라제 발현을 측정하였다. 표준화된 루시페라제 상대 광유닛 (RLUs) 대 미지의 내인성 표적을 갖는 비특이적 RNAi종으로 형질감염된 세포들에 기초하여 억제 백분율을 구하였다. 루시페라제-HCV 융합 플라스미드로 공형질감염시킨 pRL-SV40 플라스미드로부터의 레닐라 루시페라제 활성의 발현에 기초해서 형질감염 효율의 차이를 표준화시켰다.
- [0118] [0134] 도 12는 HCV의 서로 다른 5가지 100 bp 대역을 표적으로 하는 여러가지 RNAi 제제들에 의한 루시페라제 발현 억제 결과를 상대적인 광 유닛으로 나타낸 도면이고; 도 13은 도 12의 데이터를 백분율로 나타낸 루시페라제 발현 억제 결과이다. 이들 결과를 살펴보면, 선택된 RNAi 제제들 모두가 적어도 50% 억제를 달성하였음을 알 수 있으며, 플라스미드의 절반 이상은 80%를 상회하는 비율로 루시페라제 발현을 억제하였음을 알 수 있다.
- [0119] [0135] 도 14는 HCV의 5' 대역의 100 bp 서열의 여러가지 세그먼트를 표적화하는 서로 다른 4가지 RNAi 제제 (5'-1, 5'-2, 5'-3 및 5'-4)를 테스트하는 실험 결과의 재생성을 보여준다. 테스트된 각각의 제제들이 모두가 뛰어난 재생성을 나타냈음을 알 수 있다.
- [0120] [0136] 도 15는 HCV의 5' 대역의 100 bp 서열의 여러가지 세그먼트들을 표적으로 하는 서로 다른 5종의 RNAi 제제 (5'-3, 5'-4, 5'-5, 5'-6 및 5'-7)로 형질감염시킨지 24시간 및 48 시간 경과 후의 루시페라제 발현 억제 백분율의 변화를 도시한 것이다.
- [0121] [0137] 도 16은 HCV의 5' 대역의 100 bp 서열의 여러가지 세그먼트들을 표적으로 하는 서로 다른 2종의 RNAi 제제 (5'-1 및 5'-3), HCV의 3' 대역의 100 bp 서열의 여러가지 세그먼트들을 표적으로 하는 서로 다른 5종의 RNAi 제제(3'-1, 3'-2, 3'-3, 3'-4 및 3'-5), 및 HCV의 오픈 리딩 프레임 대역의 100 bp 서열의 세그먼트를 표적으로 하는 하나의 RNAi 제제 (C-3)으로 형질감염시킨 후 44 시간 및 72시간 경과 후의 루시페라제 발현 억제 백분율의 변화를 도시한 도면이다. 72시간 후의 억제 수준은 44시간 후의 억제 수준과 비교할 때 약 10 퍼센트 이내로 차이가 날 뿐이다.
- [0122] [0138] 도 18은 루시페라제-HCV 융합 플라스미드에서 HCV 게놈의 여러가지 대역에 표적화된 광범위한 RNAi 제제들로 처리한 루시페라제 억제 결과를 도시한 것이다. RNAi 제제를 이용하여 Huh7 세포 내로 공형질감염시킨지 48 시간 후에, 루시페라제 활성을 측정하였다. 이 데이터로부터 RNAi 제제는 HCV 게놈의 모든 대역들을 효과적으로 표적화할 수 있음과 따라서 루시페라제 리포터 신호를 강력하게 억제할 수 있음을 알 수 있다.
- [0123] [0139] 실시예 3B 루시페라제 HCV 레플리콘 시스템에 대한 RNAi 제제의 선택 및 테스트
- [0124] [0140] HCV 복제의 개별적인 공정들이 많이 이해되고 있지만, 최근까지도 이 바이러스의 생활 주기를 전파시킨 조직 배양 시스템은 없었기 때문에, 이 바이러스에 대한 연구는 매우 어렵다. 그러나, 시험관내 레플리콘 시스템은 개발된 바 있다 (예컨대, Rice 등의 미국특허 제 5,585,258호; 6,472,180호; 및 6,127,116호 참조). 레플리콘은 HCV 게놈 RNA의 자가 복제 부분으로서 복제의 선택 및 검증을 위한 마커 유전자를 함유할 수 있다. HCV-RNA 구조물을 연속 전파를 지지하는 세포주 내로 형질감염시킨다. 감염 주기 공정에 따라, RNA는 세포 기구에 의해 번역되어 게놈 복제에 필요한 바이러스 단백질 뿐만 아니라, 선별가능한 마커 (존재한다면)도 생산한다. 전장 레플리콘과 서브-게놈 레플리콘이 생산되었으며, 비구조 단백질만이 책임이 있긴 하지만, 기능적인 것으로 나타났다. RNA의 자가 복제 특성은 구조 유전자의 발현과 관계없이 유지되었다. 전장 HCV 게놈을 발현하는 레플리콘이 존재 한다고 해도, 코어 단백질과 엔벨롭 단백질은 이 게놈을 효과적으로 감염 입자로 패키징하지 못하기 때문에 - 바이러스의 패키징, 배출 및 재진입 단계에 관한 모델 연구가 제대로 이루어지지 않게 된다. 이와 무관하게, 레플리콘은 HCV가 이용하는 생물학과 메카니즘의 일부를 재생할 수 있다.
- [0125] [0141] 루시페라제나 이러한 다른 리포터를 이용하는 것에 더해, 또는 그의 대안으로서, 레플리콘 활성 수준을 여러가지 다른 방법으로 측정할 수 있다. 시판되는 HCV-특이적인 모노클로날 항체 패널을 이용하여 면역형광 현미경으로 비구조 단백질의 상대적인 수준을 관찰함으로써, HCV 복제 억제율을 평가할 수 있다. 대안적으로, 또는, 이에 더해, Q-PCR을 이용하여 각각의 형질감염 조건으로부터의 HCV 게놈 RNA의 상대 수준을 측정할 수 있다.
- [0126] [0142] 루시페라제-HCV 융합 레플리콘에 의해 형질전환된 세포주에서 레닐라 루시페라제 발현을 측정함으로써 2] 게놈 RNA의 복제를 억제할 수 있는 siRNA 제제의 능력을 테스트하였다. 5종의 siRNA는 대응하는 서열들이 없었기 때문에, 서브게놈 레플리콘 시스템에서 테스트할 수 없었기 때문에, 단지 비특이적 대조군으로서 테스트에

포함시켰다. 루시페라제-HCV 레플리콘의 도해적 다이어그램을 도 8B 및 8C에 도시하였다. 세포들을 96-웰 플레이트에 접종하고; 24시간 동안 인큐베이션시킨 다음, HCV 레플리콘 활성을 억제하는 것으로 알려진 인터페론 알파 2B (IFN)(Blight 외. Science. 290: 1972-74 (2000))를 ml 당 100 유닛의 농도로 특정 웰에 첨가하였다. 다시 48시간 인큐베이션시킨 후, 배지를 버리고 세포 추출물을 *in situ*로 제조하여 루시페라제 활성을 평가하였다. 루시페라제 활성은 루시페라제-mRNA 수준에 정확하게 상응한다 (데이터 표시하지 않음). RNAi 제제를 테스트함에 있어서, 루시페라제-HCV 레플리콘 (도 8B에 도시함)을 함유하는 293 세포들을 HCV 계놈에서 여러가지 대역을 표적으로 하는 RNAi 제제로도 형질감염시킨다. 48시간 후에 세포들을 수확하여, 추출물을 얻고 루시페라제 활성의 상대적인 수준을 평가하였다. 도 19는 루시페라제-HCV 레플리콘의 여러가지 대역에 지향된 siRNA 제제들에 의한 루시페라제 억제 결과를 도시한 것이다. 코딩 대역 C-1 내지 C-5에 지향된 RNAi 제제들은 루시페라제-HCV 레플리콘에 표적을 갖지 않고 단지 부가적인 비특이적 대조군 역할을 한다. 다시 한번 HCV 계놈의 모든 대역 내의 표적들은 siRNA 제제의 효과적인 억제 자리로서 작용할 수 있다.

[0127] [0143] 일단 몇가지 고도로 기능적인 RNAi를 선택하여 개별적으로 테스트한 후, 이들을 레플리콘 시스템을 산생하는 세포 내로 3중 형질감염시킨다. 대조군 한가지는 같은 갯수의 무관한 RNAi종들의 형질감염을 병행하는 것으로 이루어진다. 삼중 형질감염의 억제 활성을 오직 하나의 RNAi종만으로 형질감염된 일련의 플레이트로부터 얻은 활성과 비교한다.

[0128] [0144] 세가지 RNAi 제제들이 검증되며, 각각의 대응하는 shRNA의 코딩 서열들을 긴, 상보적 자가-어닐링 올리고뉴클레오타이드로부터 만들어서 삼중 프로모터 AAV 벡터의 각각의 자리로 클로닝시킨다. 이어서, 이 구조물들 간 조직에서 최고의 형질도입 효율을 나타낸 시스템을 이용하는 본 명세서에 설명된 방법에 따라, 바이러스 입자 내로 패키징한다. 이 삼중 프로모터 카세트의 각각의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분의 전장은 짧으며 (~400 뉴클레오타이드); 세개의 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들이 한데 연결되어, 1200~1300 뉴클레오타이드 길이의 서열이 결과되는데, 이 정도의 길이는 자가 상보적인 AAV의 사이즈 상한에 훨씬 못 미치는 것이다.

[0129] [0145] 이들 입자의 억제 활성을 레플리콘을 산생하는 세포주에 대해 테스트한다. 세가지 무관한 shRNA 종을 발현하는 삼중 프로모터 구조물의 제조는 음성 대조군 역할을 한다. shRNA 서열의 효능을 전술한 분석 기법에 의해 모니터링한다.

[0130] 실시예 4: 삼중 프로모터 발현 구조물의 개발

[0131] [0146] 삼중 프로모터 발현 구조물의 제작은 개별적인 shRNA 종들을 필적할만한 수준으로 발현시키는, 세가지 독립적인 프로모터와 터미네이터 서열들을 포함한다. 프로모터 요소의 반복은 합체된 발현 카세트를 재조합 이벤트에 민감하게 만들 수 있기 때문에; 세가지 서로 다른 프로모터와 터미네이터들을 동정하여 검증한다. 작은 핵 RNA 및 트랜스퍼 RNA의 합성은 pol III-특이적인 프로모터의 조절 하에서 RNA 폴리머라제 III(pol III)에 의해 지향된다. 이들 조절 요소들에 의해 지향된 전사물들은 비교적 풍부하기 때문에, U6 및 H1 유전자로부터 유래된 것들을 포함하여 pol III 프로모터들은 shRNA 발현을 구동하는데 이용되어왔다 (예컨대, Domitrovich 및 Kunkel. Nucl. Acids Res. 31 (9): 2344-52 (2003); Boden 외. Nucl. Acids Res. 31 (17): 5033- 38 (2003a); 및 Kawasaki 외. Nucleic Acids Res. 31 (2): 700-7 (2003) 참조).

[0132] [0147] 먼저, 하나의 개별적인 프로모터들을 함유하는 벡터들에서, pol III-특이적 서열의 상대적인 프로모터 강도를 평가한다 (도 7에 도시). 각각의 프로모터 구조물은 루시페라제 활성을 기능적으로 억제하는 것으로 입증된 바 있는 shRNA의 발현을 구동한다 (Elbashir 외. Nature. 411: 494-498 (2001a)). shRNA의 발현에 U6 프로모터를 사용하는 것이 성공적임을 입증하는 데이터는 풍부하기 때문에, 이것을 다른 프로모터들의 상대 강도를 평가하는데 표준으로서 삼았다. 테스트된 프로모터들의 대다수는 길이가 200-300 뉴클레오타이드 범위로 길이가 상당히 짧은 것들이다. 길이가 긴, 중복 올리고뉴클레오타이드들을 이용하여 프로모터와 터미네이터를 *de novo* 합성한 다음 shRNA에 병행되는 복수개의 클로닝 자리로 클로닝시킨다. 프로모터는, 그 프로모터를 취한 유전자의 하류에 자연발생되는 터미네이션 신호와 쌍을 이룬다.

[0133] [0148] 공형질감염된 시판되는 루시페라제 리포터인 pGL3Control (도 7에 도시됨) 또는 pRLSV40 (Promega, Madison, WI)의 활성 감소에 의해, 각각의 프로모터의 상대 강도를 시험관내 평가한다. 테스트 구조물과 리포터 구조물을 표준 기술을 이용하여 관용적인 세포 내로 형질감염시킨다. 대조군은 루시페라제에 대한 기능적인 shRNA가 무관한 shRNA 서열로 대체된 테스트 프로모터 구조물로 구성된다. 형질감염 효율 변동을 평가하기 위해, 분비 단백질인 인간의 $\alpha 1$ -안티트립신 (hAAT)를 코딩하는 세번째 구조물을 세포 내로 공형질감염시킨다. shRNA의 억제 활성을 평가하기 위해, 시판되는 표준 키트 (Promega, Madison, WI)를 이용하여 루시페라제 활성을 측정한다. shRNA-매개에 의한 루시페라제 발현의 감소 및, hAAT 수준으로의 평준화에 의해 프로모터 강도를

간접 측정할 수 있다. 이에 대안적으로, 또는 이에 부가해서, 병행 실험 플레이트로부터 수확되어 정제한 RNA에 대해 루시페라제 RNA 수준을 정량적으로 실시간 PCR 분석 (Q-PCR)하였다.

[0134] [0149] 일단 적절한 프로모터와 터미네이터 쌍이 동정되면, 최종적인 삼중 프로모터 RNAi 발현 카세트를 설계한다. 프로모터 세개가 모두 탄뎀 어레이로 있거나 또는 시계 및 반시계 배열 (즉, 카세트 DNA의 상부가닥과 하부가닥으로부터 전사됨) 또는 그의 변형 배치를 갖는 것을 포함하여, 최종 벡터의 몇가지 디자인을 테스트한다. 이러한 배치 중 세가지를 도 3A, 3B 및 3C에 나타내었다.

[0135] [0150] 도 3B 및 3C에 도시된 배치를 갖는 구조물을 세포 내로 형질감염시켜 루시페라제 활성 측정법에 따라 억제 활성을 테스트한다. 서로 다른 RNAi종들을 구동하는 2개 이상의 프로모터들은 부가적 또는 상승적인 억제 효과를 결과시킬 수 있기 때문에, 삼중 프로모터 발현 구조물 콘텍스트 내의 각각의 프로모터의 기능과 상대 강도를 평가하기 위해, 표 4에 상술된 바와 같은 발현 카세트의 변형체를 만들었다. 이들 종들을 이용하여, 삼중 발현 구조물 중 각각의 프로모터로부터 구동된 shRNA의 억제 효과를 루시페라제 분석에 의해 측정하였다. 또는, 각각의 프로모터에 의해 구동되는 상대적인 전사 수준을 평가하기 위해 Q-PCR을 이용한다. 헤어핀-RNA의 자가상보적 특성으로 인해, 이들 RNA 전사물의 직접적인 Q-PCR 측정이 대체로 방해받겠지만, 도 3D 및 3E에 도시된 바와 같이, 카세트를 갖는 바이러스계 다중 프로모터 RNAi 발현 구조물을 이용하여 shRNA 대신 벡터 내로 사이즈가 대략 동일한 서로 다른 세가지 비헤어핀 전사물들 벡터 내로 치환시킬 수 있다.

[0136] [0151] 다음의 RNA Pol III 클래스 3 프로모터들, 즉: U6-1, U6-8, U6-9, H1 Long, Human Y4, Human Y5를 선정, 합성하여, 단일 또는 다중 프로모터 구조물 내로 클로닝시켰다. 루시페라제 특이적인 shRNA는 단일 프로모터 구조물의 하류 또는 삼중 프로모터 구조물 중의 프로모터들 중 어느 하나의 하류에 클로닝시켰다 (표 4).

[0137] [0152] 형질감염한지 72 시간 후, 제조자의 이중 루시페라제 프로토콜 (Promega, Madison, WI)에 따라 배지를 흡입하고 세포를 용해시켜(lysed) 루시페라제 발현을 측정하였다. 표준화된 루시페라제 상대 광유닛 (RLUs) 대 가상(mock) 처리된 세포 (음성 대조군)에 기초하여 억제 백분율을 구하였다. 각 실험에서 가상/음성 대조군으로서 무관한 RNAi 제제를 사용하였다. 표적 플라스미드로 공형질감염된 pRL-SV40 플라스미드로부터 발현된 레닐라 루시페라제의 발현에 기초해서, 형질감염 효능에 대한 루시페라제 RLU를 표준화시켰다.

[0138] [0153] 모든 프로모터들은 Huh 7 세포에서의 도 3C형 (17A)의 구조물과 293 세포에서의 도 3B형 (17B) 구조물 두가지 모두에서 비슷하게 활성적인 것으로 나타났다. 억제 특성은 shRNA에 대해 단일 및 다중 프로모터 컨텍스트에서 유사함을 알 수 있다. 이 데이터는 shRNA의 억제가 삼중 프로모터 컨텍스트에서, 그리고 Huh7 세포와 293 세포 모두에서 필적할만함을 보여주었다.

표 4

[0139]

각각의 발현 카세트에 있어서 상대적인 억제도를 평가하기 위해 사용된 도 3B 및 도 3C에 도시된 유형의 구조물들 중 프로모터/shRNA 삽입물			
구조물	프로모터/shRNA		
	A	B	C
	U6-1	U6-8	U6-9
구조물 I	shRNA-LUC	공란	공란
구조물 II	공란	sh-RNA-LUC	공란
구조물 III	공란	공란	shRNA-LUC

[0140] [0155] 도 3B에 도시된 유형의 프로모터/shRNA/터미네이터 카세트를 갖는 플라스미드들을 이용하여 다중 프로모터 발현 카세트로부터 발현된 shRNA 제제의 상대적인 억제 기여도를 평가하였다. HCV 게놈의 서로 다른 대역들을 표적으로 하는 shRNA 구조물을 포함하는 플라스미드들을 열가지 프로모터 조절 하에 작동적으로 위치시킨다. 표 5는 어떤 shRNA가 불활성적인 위치 B에서 프로모터의 조절 하에 shRNA 제제를 비롯한 각각의 프로모터들의 조절을 받는지를 보여준다. 루시페라제유전자에 링크된 5'-3 내지 5'-10 대역으로부터의 HCV 서열을 함유하는 루시페라제-HCV 융합 플라스미드 #16을 다중 프로모터 구조물과 함께 Huh7 세포 내로 공형질감염시켰다. 도 20은 다중 프로모터/이중 shRNA 발현 구조물로 공형질감염되었을 때의 루시페라제 억제 증가를 단일 프로모터에 링크된 단일 shRNA를 포함하는 구조물의 경우와 비교한 도면이다.

표 5

[0141]

다중 프로모터 발현 카세트에 있어서 개별적인 프로모터와 이중 프로모터의 상대적인 억제도를 평가하기 위해 사용된 도 3B에 도시된 유형의 구조물들 중 프로모터/shRNA 삽입물			
구조물	프로모터/shRNA		
	A U6-9	B 불활성	C U6-8
구조물 I	5-'3	5-'1	공란
구조물 II	5-'3	C-12	공란
구조물 III	5-'3	5-'8	공란
구조물 IV	5-'3	5-'8	5'-6

[0142]

[0157] 실시예 4B: shRNA 삼중 프로모터 구조물의 시험관내 테스트

[0143]

[0158] 도 3C에 도시된 유형의 삼중 프로모터 카세트를 다음의 프로모터들을 이용하여 만들었다: 위치 A에서는 U6-9, 위치 B에서는 U6-1, 그리고 위치 C에서는 U6-8. 이 프로모터들은 HCV 게놈의 여러가지 위치들을 표적으로 하는 shRNA 서열들의 전사를 구동하거나 또는 '공란(empty)' 배열에서 T's 스트렛치를 그 다음에 가져서 프로모터 관독(read-through)를 막았다. 대조군으로서 사용된 단일 프로모터/shRNA 구조물들을 U6-1 프로모터를 이용하여 제작하였다. 단일 또는 삼중 프로모터 구조물을 상이한 HCV 표적 대역을 함유한 루시페라제-HCV 리포터 플라스미드로 공형질감염시켰다. 도 21은 HCV 게놈의 여러가지 대역들을 표적으로 하는 단일 또는 다중 프로모터 구조물과, HCV 게놈의 표적 대역으로부터의 서열을 함유하는 세가지 루시페라제-HCV 융합 플라스미드들 중 하나로 공형질감염시킨 후의 루시페라제 억제 결과를 도시한 것이다. 루시페라제 활성은 Huh7 세포내로 공형질감염시킨후 72 시간 경과 후에 측정하였다. 도 21의 상부 그래프는, HCV의 C-12 대역에 특이적인 shRNA는 HCV의 코딩 대역 C-12를 함유하는 루시페라제 리포터 플라스미드에 대해 적절한 억제 활성을 나타냄을 보여준다. HCV의 다른 대역에 특이적인 shRNA가 본 발명의 다중 프로모터 카세트의 일부로서 또는 단독으로 발현된 경우, 비특이적인 억제는 관찰되지 않는다. 루시페라제-HCV 리포터 플라스미드가 HCV의 코딩 대역 C-9로부터의 서열을 함유하는 중간 그래프에서도 유사한 결과를 볼 수 있다. 이 경우, 단일 프로모터 또는 삼중 프로모터 카세트로부터 발현된 C-9 대역에 특이적인 shRNA는 시험된 shRNA 제제들 중 가장 강력한 억제 활성을 나타내었다. 하부 그래프는 단일 또는 삼중 프로모터 구조물과 HCV의 5'6 대역을 함유하는 리포터 플라스미드로 공형질감염시킨 루시페라제 억제 결과를 도시한다. 가장 강력한 억제는 단일 또는 다중 프로모터 구조물의 5'6 표적에 특이적인 노코를 함유하는 구조물로부터 결과된 것임을 알 수 있다. 본 발명의 삼중 프로모터 구조물은 특이적인 유전자 표적을 효과적으로 억압한다.

[0144]

[0159] 실시예 5: shRNA 삼중 프로모터 구조물 제제의 생체내 테스트

[0145]

[0160] 유체역학적 꼬리 정맥 주사법을 이용하여, 도 3C에 도시된 유형의 다중 프로모터/shRNA 플라스미드 DNA와 적절한 반딧불 루시페라제 HCV 융합 리포터 플라스미드로 마우스의 간을 공형질감염시킴으로써 본 발명의 다중 프로모터 구조물의 생체내 평가를 실시하였다. 이 실험에서 사용된 다중 프로모터/shRNA 플라스미드는 HCV의 코딩 9, 코딩 12 및 5'8 위치를 표적으로 하는 shRNA 종의 발현을 제어하였다. 음성 대조군 마우스에 리포터 구조물 및 무관한 shRNA를 주사하였다. 또한, 레닐라 루시페라제 단백질을 발현하는 플라스미드를 마우스에게 주사하였다. 이 단백질은 마우스 간의 형질감염 효율을 정규화하는데 이용하였다. 주사한지 48시간 후, 동물들을 희생시키고, 간을 적출하였다. Promega 루시페라제 키트를 이용하여, 간 용해물을 반딧불 루시페라제 활성과 레닐라 루시페라제 활성에 대해 평가하였다. 헤어핀 구조물로부터의 shRNA 발현에 의해 유발된 억제 수준을 음성 대조군에 대해 평가한다. 표 6에 나타낸 결과는 본 발명의 삼중 프로모터 구조물이 리포터 신호를 생체내에서 효과적으로 억제함을 보여준다.

표 6

[0146]

삼중 프로모터/shRNA 플라스미드에 의한 반딧불 루시페라제 신호의 억제 백분율

그룹 #	n	플라스미드 발현 shRNA (5 ug/마우스)	리포터 플라스미드 (12 ug/마우스)	반딧불 루시페라제 RLU (레닐라에 대해 표준화된)	비특이적 shRNA 대조군과 비교한 삼중 shRNA에 의한 억제%
21	5	삼중 프로모터/shRNA (5'8a, C-9, C-12a)	C-9 (pBen71)	0.05	98%
23	5	단일 비특이적 5'3 (비특이적 shRNA)	C-9 (CBen71)	3.20	n/a
25	5	삼중 프로모터/shRNA (5'8a, C-9, C-12a)	C-11/12 (pBen73)	1.00	93%
27	5	단일 비특이적 5'-3 (비특이적 shRNA)	C-11/12 (pBen73)	15.10	n/a

[0147] [0162] HCV 서열에 대해 표적화된 shRNA를 발현하는 벡터를 함유하는 감염성 AAV 입자들을 꼬리 정맥 또는 간의 문맥을 통해 주사함으로써 정상 마우스에게 전달한다. 3종의 무관한 shRNA를 발현하는 감염성 AAV 입자들은 음성 대조군 역할을 한다. 먼저, 상당히 높은 투여량의 바이러스, 예컨대, 2×10^{12} 벡터 게놈을 사용하여 투여량 반응 곡선을 만든다. 적절한 반딧불 루시페라제-HCV 융합 리포터 플라스미드를 유체역학적 꼬리 정맥 주사 공정을 이용하여 수차례에 걸쳐 주사한다. 리포터 플라스미드를 주사한지 48-72시간 후, 마우스들을 희생시키고 간을 수확하여 혈청 시료를 수집한다. AAV 전달된 shRNA의 효능을 평가하기 위해 반딧불 루시페라제 활성을 벤치마크로서 이용한다. 또한, 동물들 간의 형질감염 효율을 측정하기 위해 레닐라 루시페라제의 간의 수준 또는 hAAT 혈청 수준을 모니터링한다. 이 치료에 의해 일반적인 간독성이 유발되지는 않음을 확실히 하기 위해, 간 효소인 알라닌 아미노트랜스페라제, 아스파테이트 아미노트랜스페라제 및 종양 괴사인자 알파의 혈청 농도를 측정한다.

[0148] 실시예 6: 생체내 복제 HBV 모델 시스템에 대한 shRNA의 AAV 전달 테스트

[0149] [0163] HCV에 대한 AAV 전달된 shRNA 발현 구조물의 효능을 평가하기 위한 이상적인 소형 동물 모델은 없다. 그러나, 대체 모델 시스템에서 AAV 발현 RNAi 구조물을 테스트하여 간에서의 바이러스 복제의 억제 정도를 평가할 수는 있을 것이다. 이러한 모델에서는 전달된 shRNA의 서열 조성물들이 반드시 달라야하지만, AAV 삼중 프로모터 발현 벡터와 패키징 요소를 비롯한 이 시스템의 나머지는 변함없이 유지된다. B형 간염 바이러스 (HBV)에 대한 모델 시스템으로 이용한다. HBV를 표적화하기 위한 삼중 프로모터 AAV 발현 구조물에 포함시키고자 하는 shRNA 서열의 선택은 이제까지 공개된 shRNA 서열의 효능에 기초한다 (McCaffrey 외. *Nature Biotech.* 21 (6): 639-644 (2003); Ying 외. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309 (2): 482-484 (2003); Klein 외. *Gastroent.* 125(1) : 9-18 (2003); 및 Shlomai 외 *Hepatology.* 37 (4): 764-70(2003)). 이어서, 3가지 HBV-특이적인 shRNA를 구동하는 삼중 프로모터를 갖는 적절한 AAV 발현 구조물을 전술한 방법에 따라 바이러스 입자 내로 패키징한다.

[0150] [0164] 먼저 마우스에게 HBV 게놈 서열을 산생하는 발현 플라스미드를 유체역학적 형질감염 공정에 의해 주사하여 HBV 복제를 확립시킨다. 형질감염 효율을 평가하기 위하여, hAAT를 코딩하는 플라스미드를 혼합하여 함께 주사한다. ELISA 분석에 의해, 레트로-오비탈 플렉서스 출혈에 의해 수집된 혈청 중 B형 간염 바이러스 표면 항원 (HBsAg) 및 HBV 코어 항원 (HBcAg)의 외관에 의해 HBV 활성의 초기 지표를 평가한다.

[0151] [0165] 마우스 간에서 HBV 복제 확립에 이어, HBV shRNA를 코딩하는 삼중 프로모터 구조물을 패키징하는 AAV 바이러스 입자들을 꼬리 정맥 주사 또는 간문맥 주사를 이용하여 마우스에 도입한다. 3종의 HBV-비관련 shRNA를 코딩하는 AAV 발현 구조물을 산생하는 AAV 바이러스 입자들을 음성 대조군으로서 이용한다. 실험 말기에, HBsAg 및 HBcAg 단백질의 양의 하향 조절에 관해 혈청 시료들을 모니터링한다. 별법으로, 또는 이에 부가하여, Q-PCR에 의해 HBV RNA의 상대 수준에 대해 간 조직을 평가한다. ELISA에 의해 알라닌 아미노트랜스페라제, 아스파테이트 아미노트랜스페라제 및 종양 괴사 인자 알파에 대해 혈청을 모니터링함으로써 전신적인 간 독성을 평가한다.

[0152] [0166] 도 10은 RNAi중 또는 터미네이터 요소들을 삽입 또는 제거하거나 또는U6-9, pU6 또는 U6-8 프로모터를 스위치 아웃시키는데 유용한 독특한 제한효소 자리들을 도시하는 삼중 프로모터 카세트 전구체의 일례를 도시한

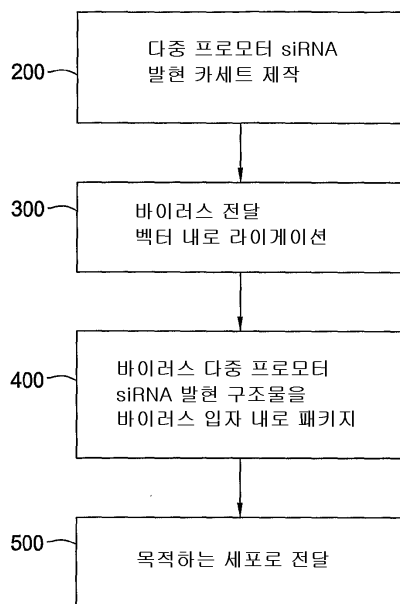
것이다. 또한, 화살표는 각각의 삼중 프로모터/RNAi/터미네이터 성분들의 전사 방향을 가리킨다. 도 11A 및 11B/11C는 본 발명의 전구체 프로모터 카세트의 두가지 구체예의 뉴클레오타이드 서열 (각각 SEQ ID NO 31 및 32)을 도시한 것이다. 도 10은 U6-9, pU6 또는 U6-8 프로모터의 위치는 물론 본 발명의 전구체 프로모터 카세트의 제한효소 자리도 함께 보여준다.

[0153] [0167] 이제까지 특정 구체예를 참조로 본 발명을 설명하였으나, 당업자라면 본 발명의 진정한 정신과 범위를 벗어남이 없이, 다양한 변화가 가해질 수 있음과동등한 범위로 대체가능함을 이해할 수 있을 것이다. 또한, 특정 상황, 재료 또는 공정을 본 발명의 목적, 정신 및 범위에 부합시키기 위해 많은 변형이 가해질 수 있다. 이러한 모든 변형은 본 발명의 범위 내에 포함된다.

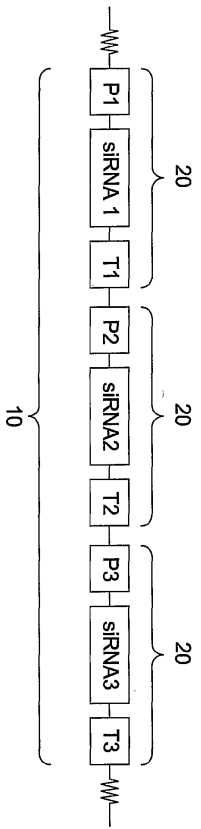
[0154] [0168] 본 명세서에서 인용된 모든 참고문헌들은 본 발명의 이해를 돕기 위해 그 내용이 전체로서 통합되는 것으로서, 본 발명 범위가 이들 문헌에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

도면

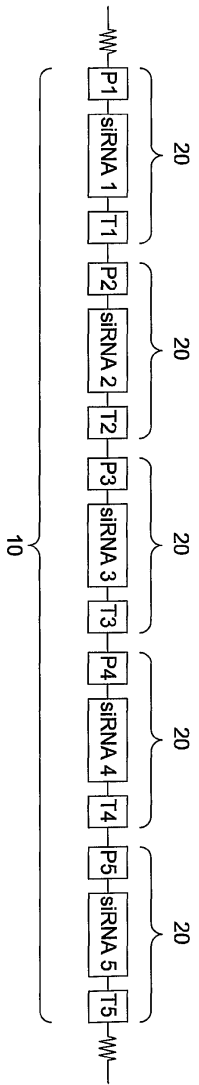
도면1



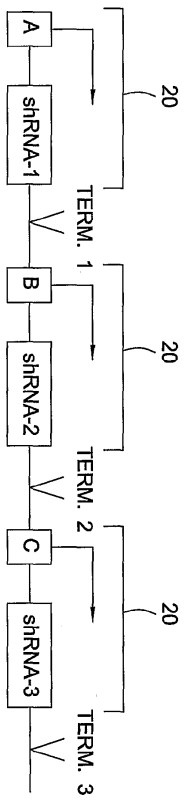
도면2a



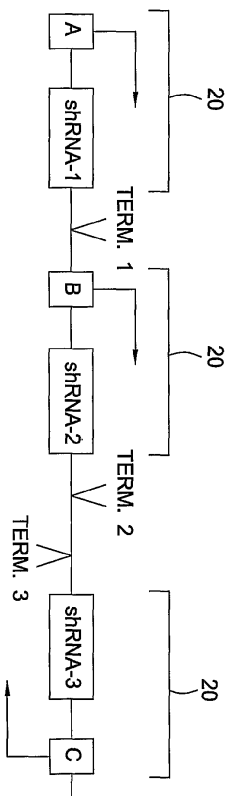
도면2b



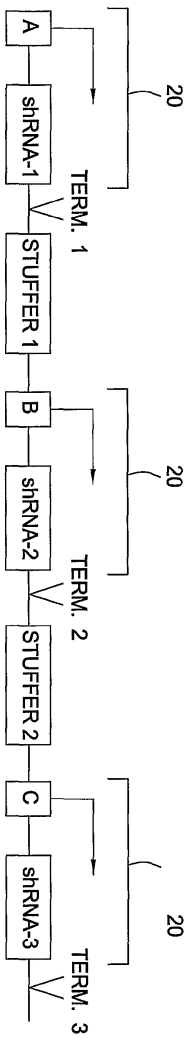
도면3a



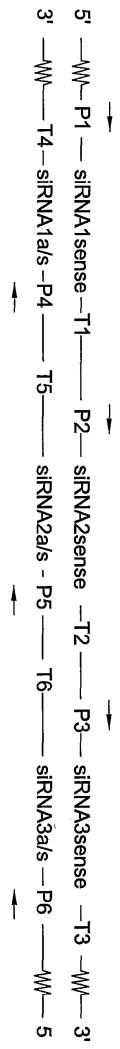
도면3b



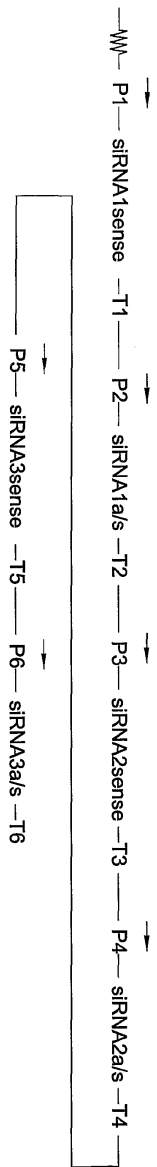
도면3c



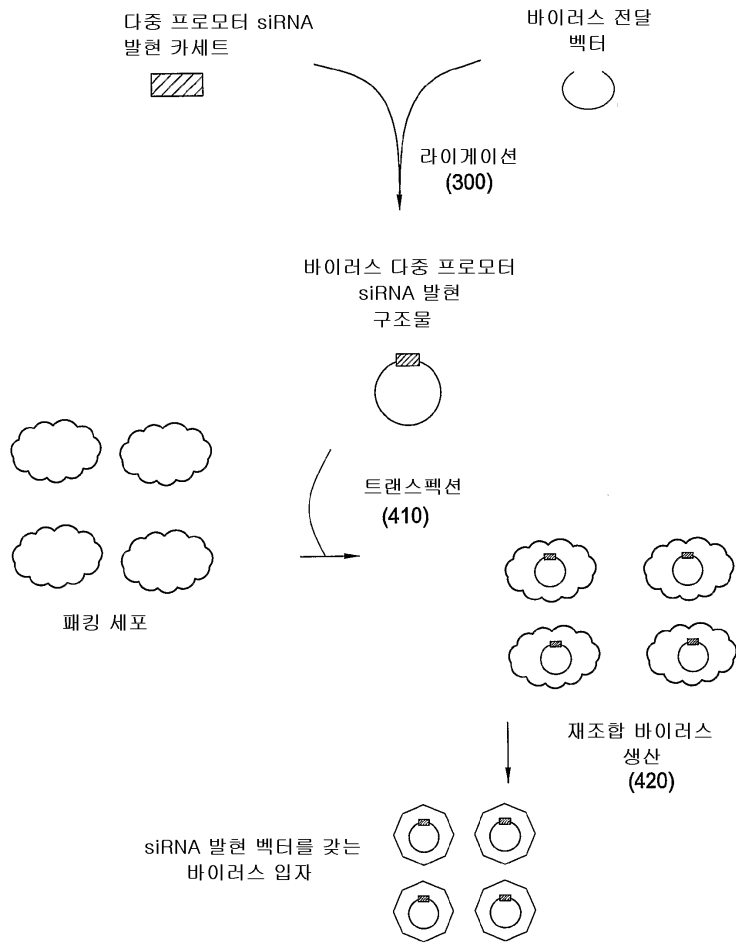
도면3d



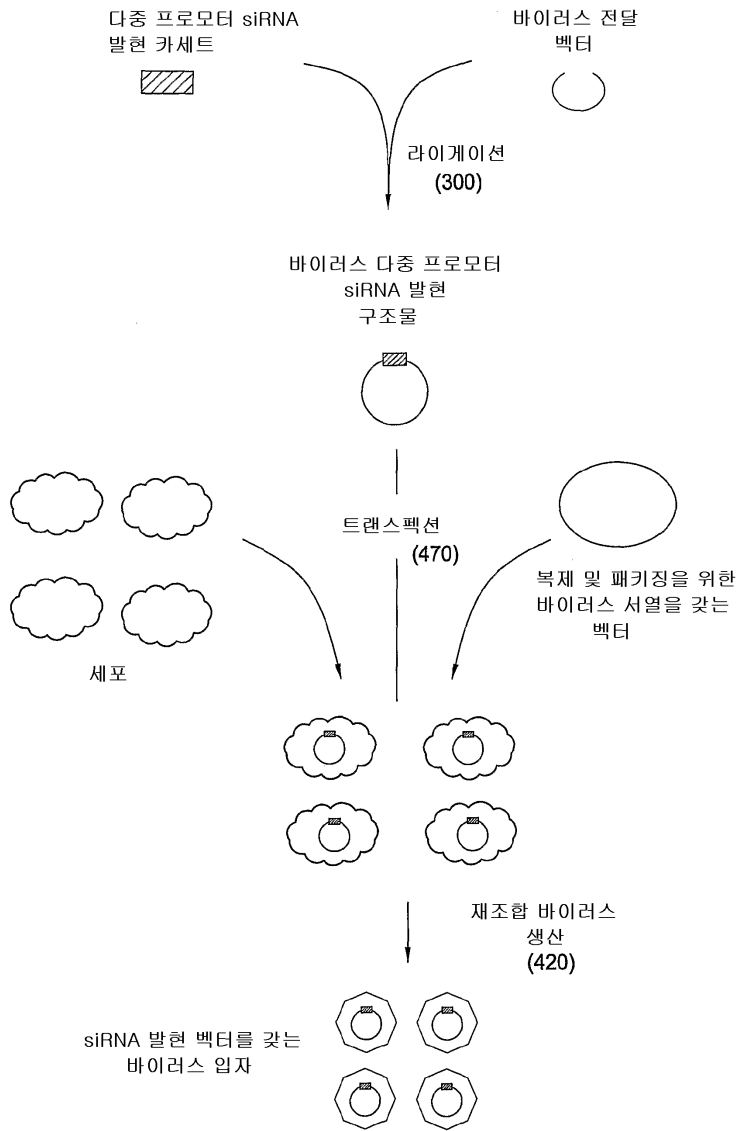
도면3e



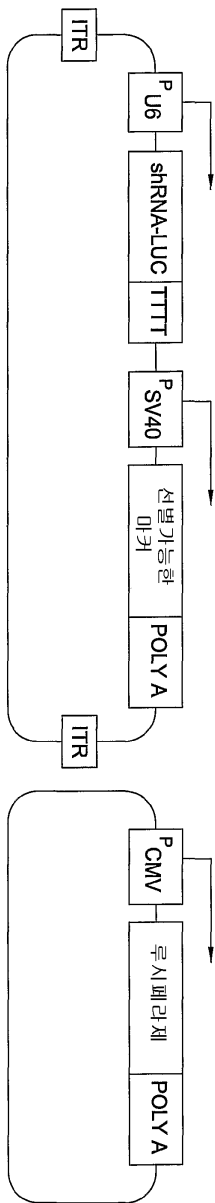
도면4a



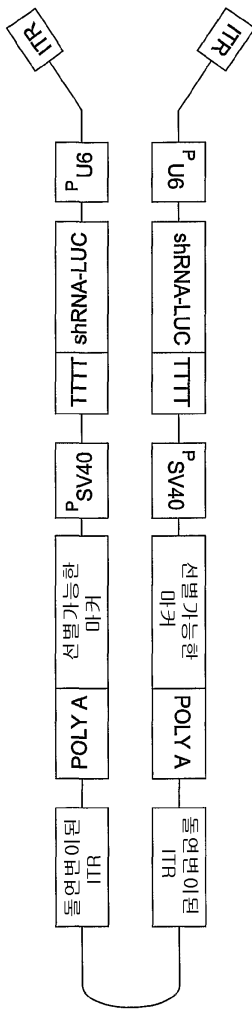
도면4b



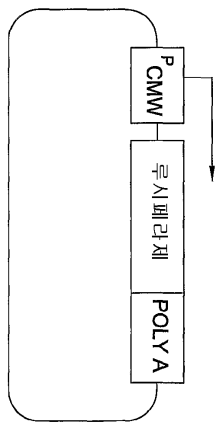
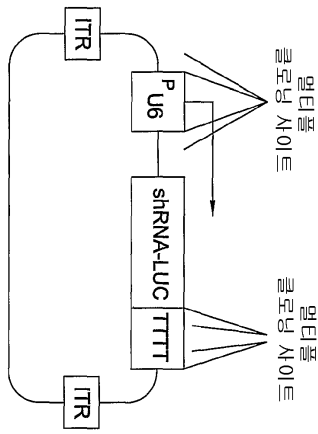
도면5



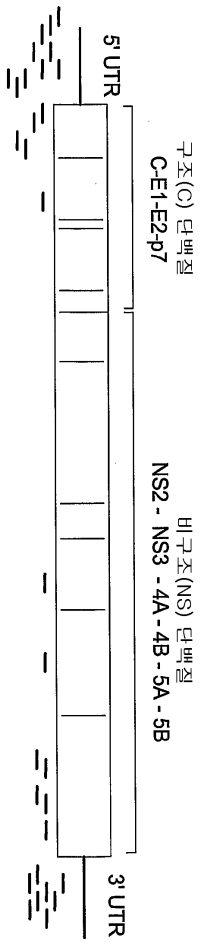
도면6



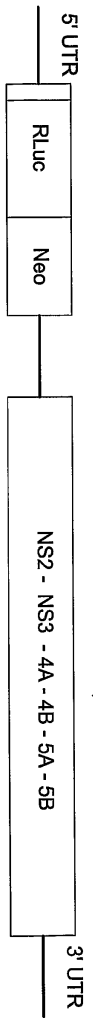
도면7



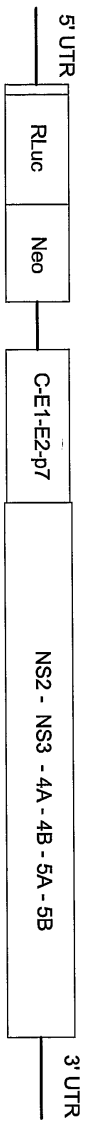
도면8a



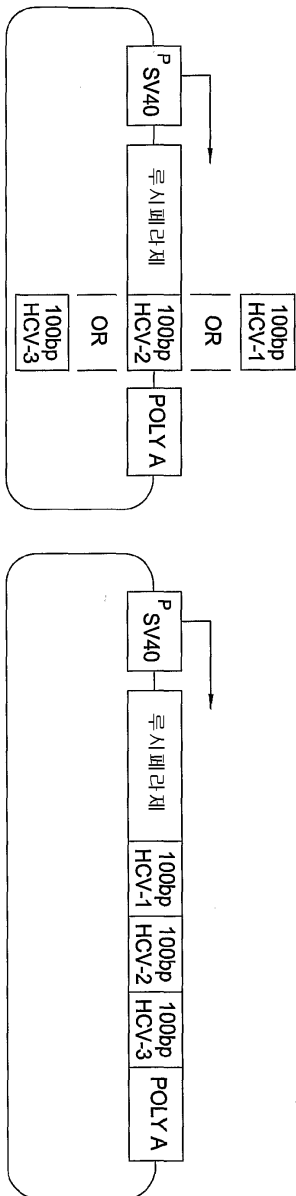
도면8b



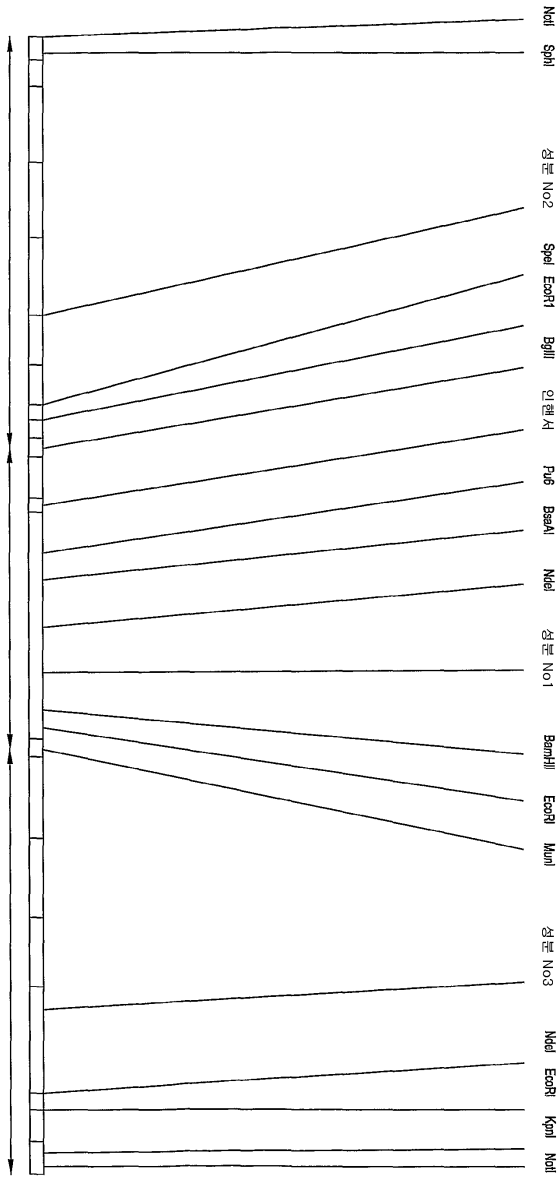
도면8c



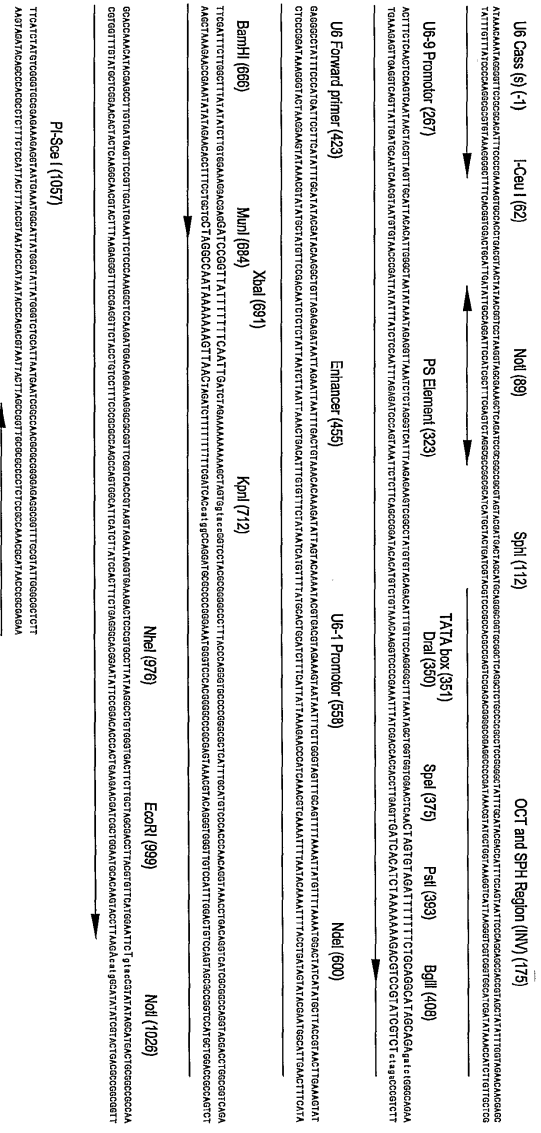
도면9



도면10



도면 11a



도면 11b



BanHI
 NheI (1008)
 GGAGTTTCAGATTTTAAATTAATGTTTTAAATGGAGTATGCAATAGCTTACCGTAACTTGAAGTATTTGGATTTTCCTGGCTTAAATATATCTTGGAAAAGCAGAGATCC
 CCATCAAAAGCTCAAAATTTTATATACAAATTTTACCTGATAGTATAGGAAATGGCAATGCAATTTCAATAAAGTAAAGAACCAAAATATATAGAACACCTTCTCTCTTAGG

MunI (1092)

GGT T A T T T T T C a a t t g t a c a g c t c i g t a g c g g t a a c c a t g c g t a t t t g a c a c a g a a g g a a c t a g g g a a a g g c a t t a g g t c a t t c a a g c g a
 C C A A T A A A A A A A G t t a a c a t g c g a g a c c a t c g c a t t a a c t a a c t g t g c t t c c i t g a t c c c i t t c c g t a a t c a g t a a a g t t c g g c t

HPRT Intron 1 MunI StuI (1233)

a a t t c a c a t g t g t a g a a t c c a g a t t c a t g c t g a c c g a t g c c c a g a t a t a g a a a t g a n a t c t g t t c c t t a c c t t c a a g a a a t t c t t a a c c g
 t a a g t g t a c a c g a t c t a g g t c t a a g g t a c g a c t g g c t a c g g g t c t a t a t c t t t a c t c t t a g a c c a g g a a t g y a a g t t c t t g t a a c a a t t g y c
 t a a t c a g c c t c t g t a t c t t a g c t c a a c c t c a e t g y t t t t t c t t g t t g t t g a a c c g y c a a g c t g c t g c c t c c t c a a c e g t t c t g a t c a
 a t t a g t c g g a g a c c a t a g a a t c g a g t g y g a g t g a c c a a a a g a a c a a c a a c t t g y c c g y t t c g a c g a c c g y a g y a g g a g t t g y c a a g a c t a g t
 t g c t t g c t a a a a t a g t c a a a c c c c g g c a g t t a a t a t a t g c t t t a g c c t g c t t a t a t a g a t t a t t t g t t g t t t g y c a a t g a c c t g y c t a a c t g
 a c g a a c g a t t t a t c a g t t t g y g g c c g t c a a t t a t a c g a a a t c g a a a t a a t a a t a a a a c a a a a c g t t a c t g y a c c g a t g y a c

XbaI (1503)

t t g t t t c e c a c t a a a a c t t t t a a g g c a g g A A T T G A T C T A G A A A A A A A A A A A A G C T A G T G t a c c e g e t C C T A C G C G e e g e c c t T T A C C A g e g t G e c c c e g e c c
 a a a a a a g g g t g a t t t g a a a a t t c c g t c e c t T A A C T A G A T C T T T T T T T T T T T T T T T T T T C G A T C A C e t g g C A G G A T C C C C C G e g A A T G e g T C C C A C G G e g c c c g e g

U6-8 promoter (1729)

T C A T T T G C A T G T C C C A C C C A A C G G T A A A C C T G A C A G E T A T C G E C C A G E T A C A G A C T T G C A G E T C A G A C C A A C A A C A T A C E H A G C C T T G T G A T G A G T T C C G T T G C A T G A A A T
 A G T A A A C G T A C A G E G T G G E T T G T C C A T T T G E A T T G E A C T G E C C A G T G E C C G A T C A T G E C T G E A C C C A G T C T G E T G E T T T G T A T G E C T C G A A C A C T A C A G G C A A C G T A C T T T A

NheI (1793)

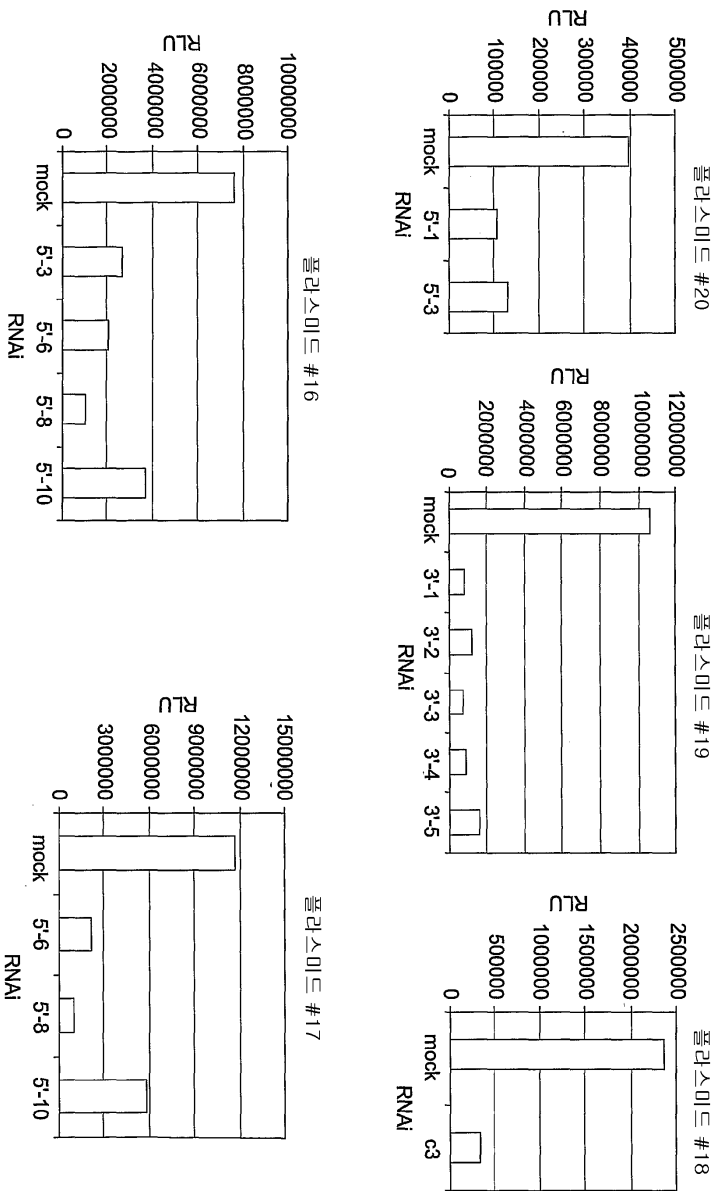
T G T C C C A A A G G C T C C A A A T G G A C A G G A A G G G C C G E T T G C G T A C C G T A A G T A A G T A A G A A G A C T C C G T T T A A G G C T G T G A G T G A C T T C T T G G T A G E A N C
 A G A G E G T T T C C G A G E T T T A C T G T C G T T T C C C G C C C A A G C C A T G C A T T C T A T C C A C T T T C T G A G G C A C A G G A A T A T T C C G E A C A C C A C T G A A G A A C C A T C G C T G G

EcoRI (1818)

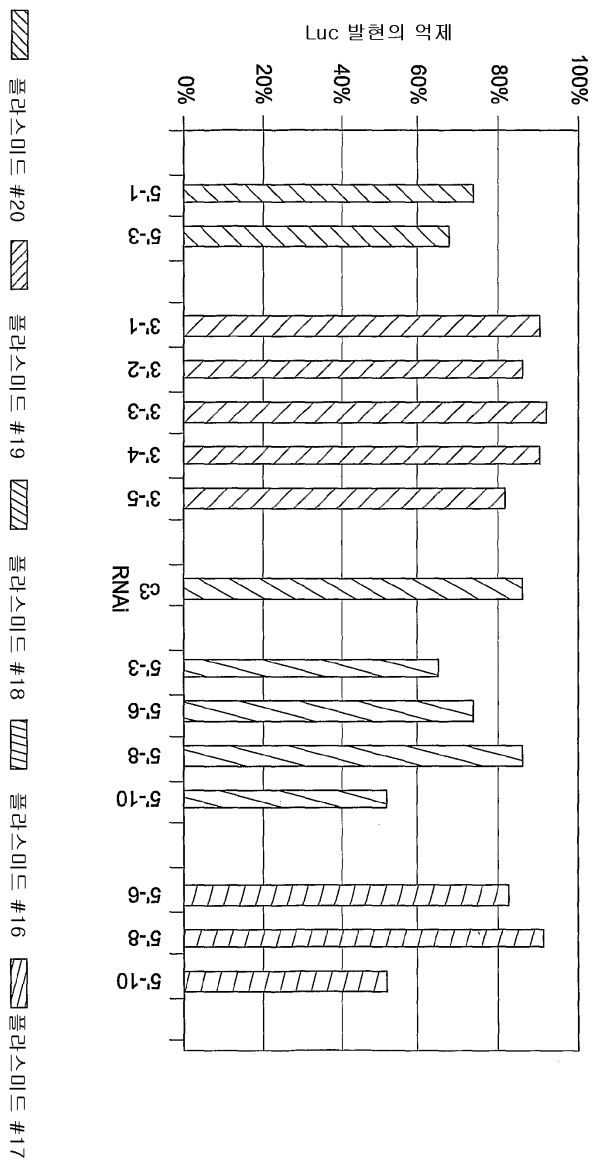
T T A C G T G T T A T G E A A T T C T G A C C G T A T A T G C A T G A C T G C C C C A A T T T C A T T A T G T C G E G T C C G A G A A A G A G A G T A A T G A A T G E C A T T A T G E G T A T T A T G E G T C T C A T T A A T G A A T C G C C A A C
 A A T G C A G T A C C T T T A A G A A A G A T A T A T C G A T G A C C G C C G G T A A G T A G A T A C A C C C C C C C C T T T C C A T T A C C T T T A C C G T A A T A C C C A T A A T A C C C A G A C G T A A T T A C T T A A C C C G T T G
 G C C G C G G G C G G T T T C C G T A T T G G C C G C T C T T
 G C C C C C C C C C A A A C G A A T A C C C G C G A G A A

도면 11c

도면12

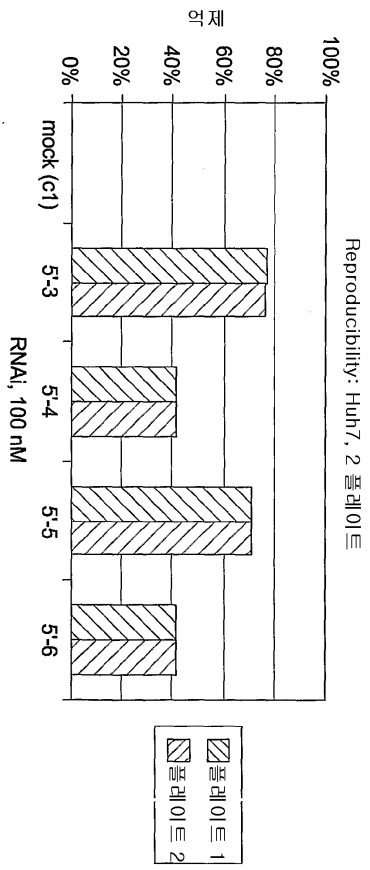


도면13

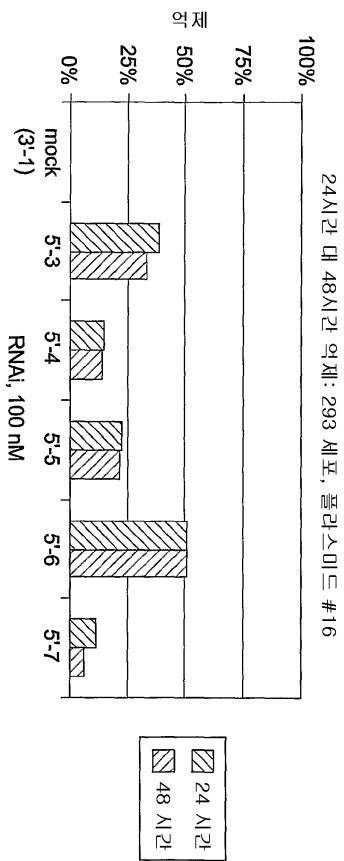


RNAis에 의한 루시페라제 발현의 억제 1회 실험

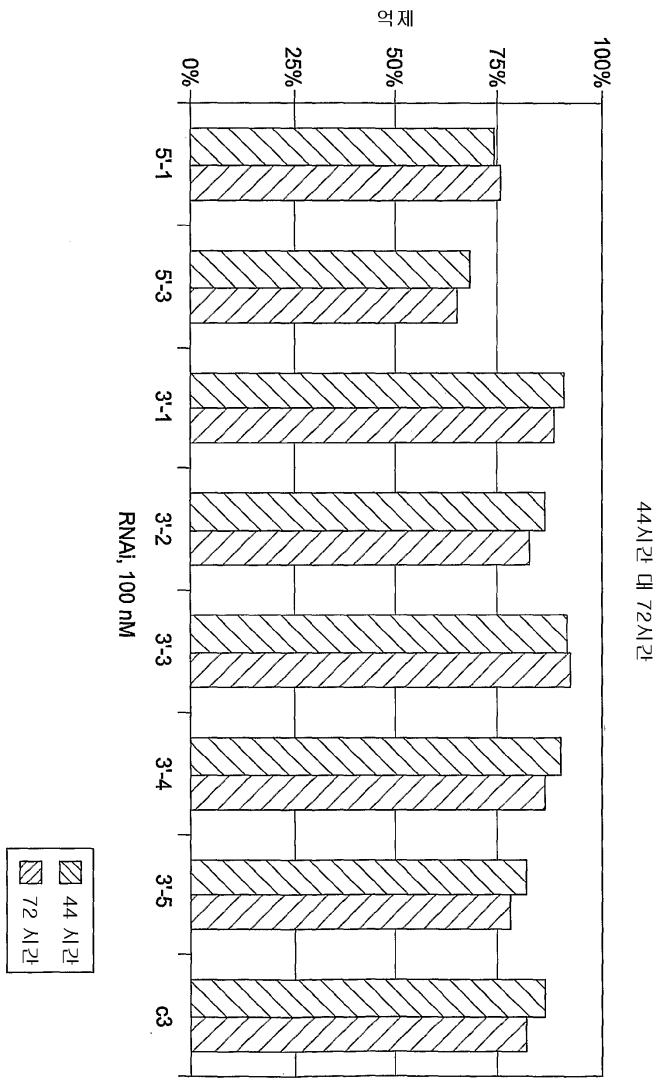
도면14



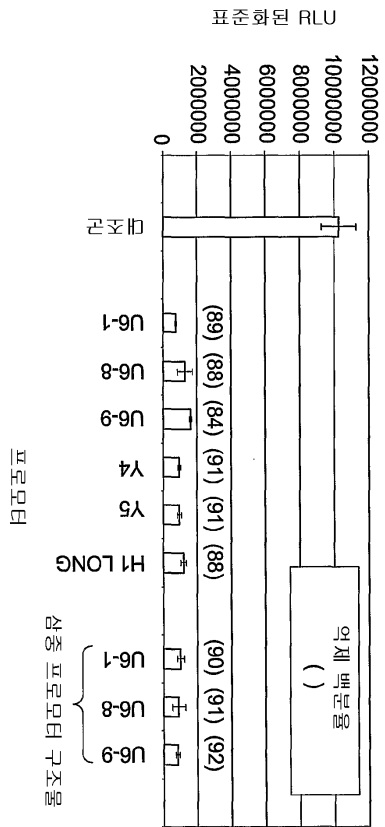
도면15



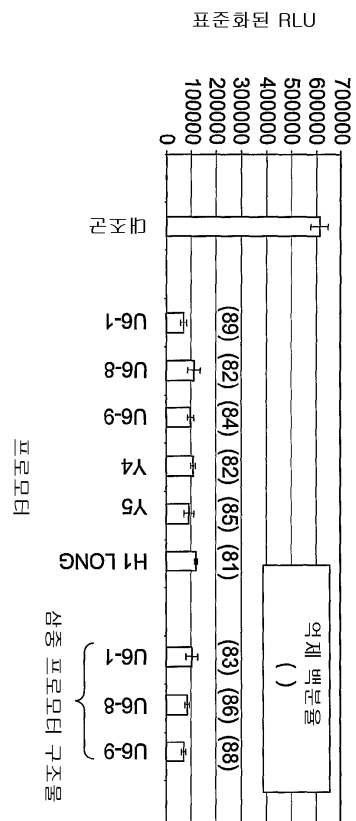
도면16



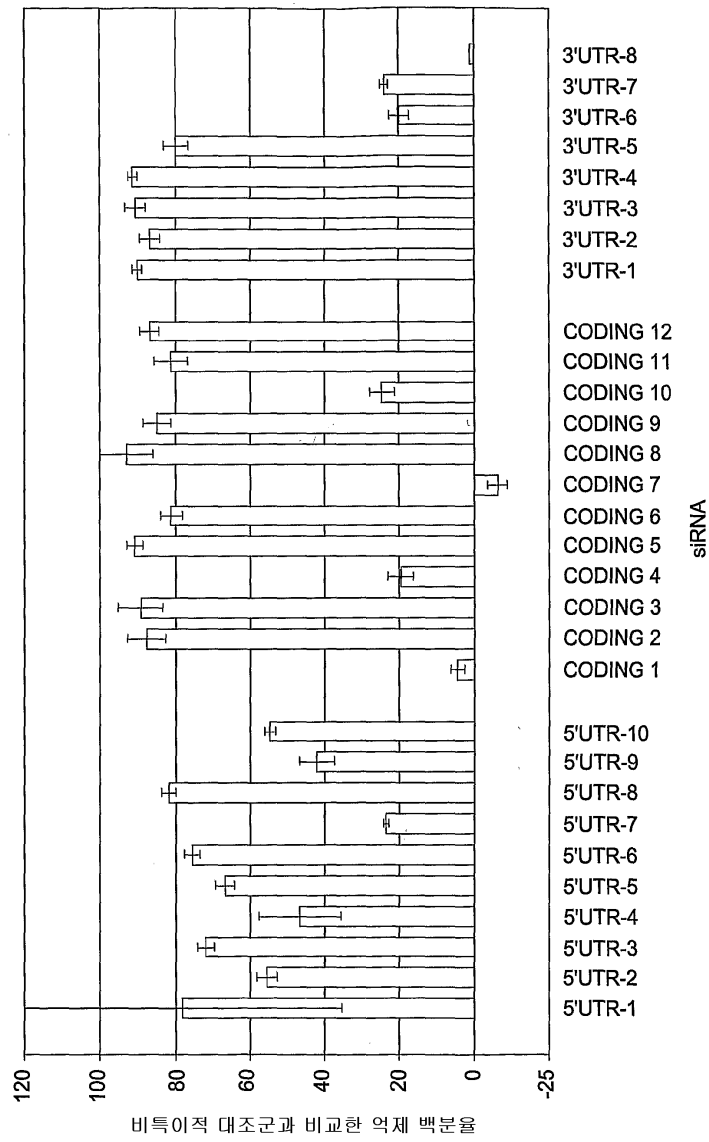
도면17a



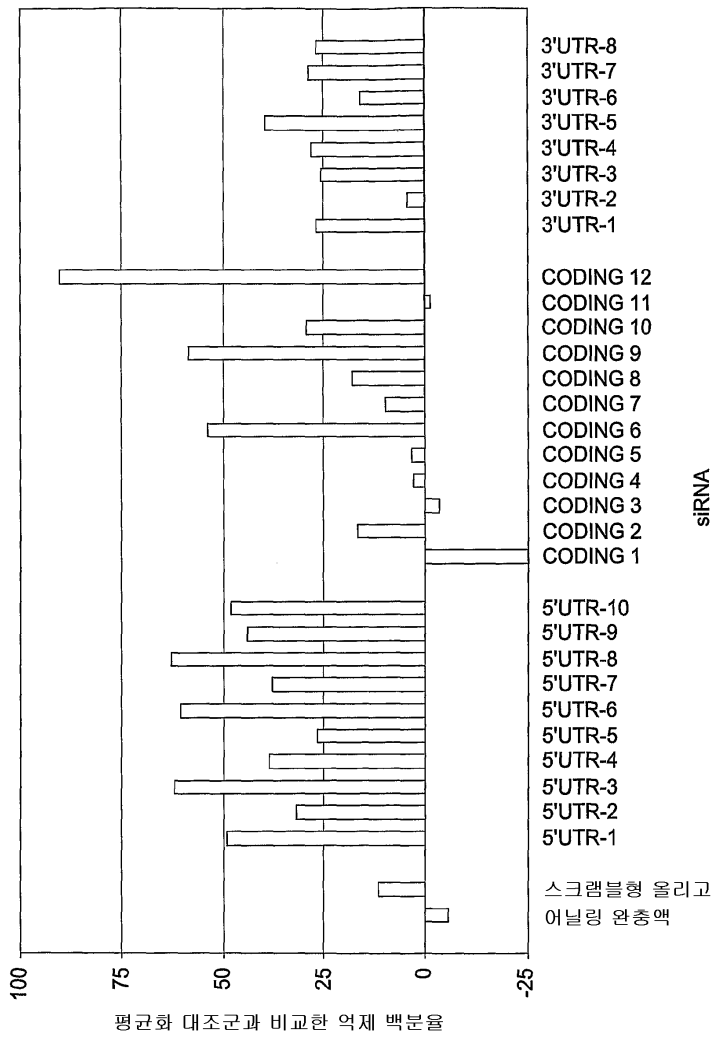
도면17b



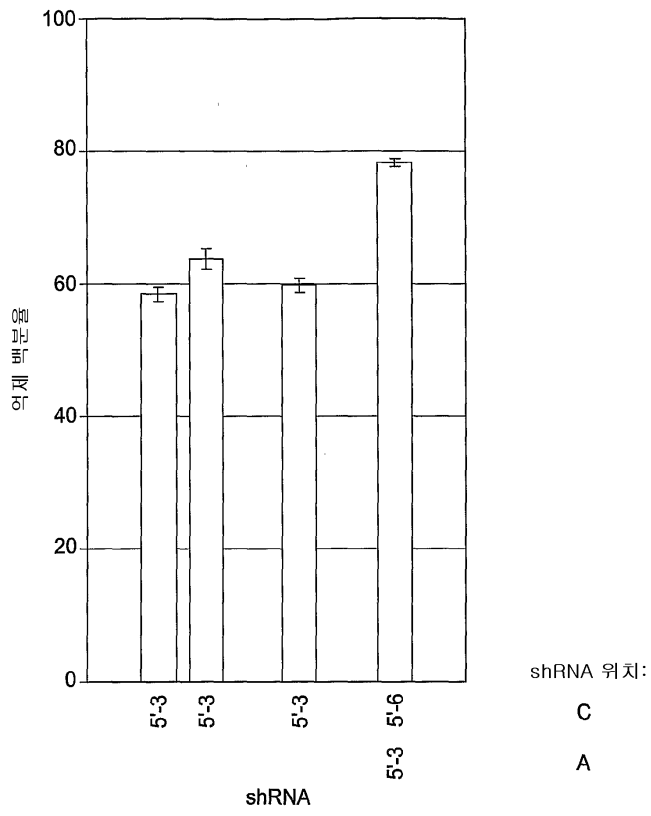
도면18



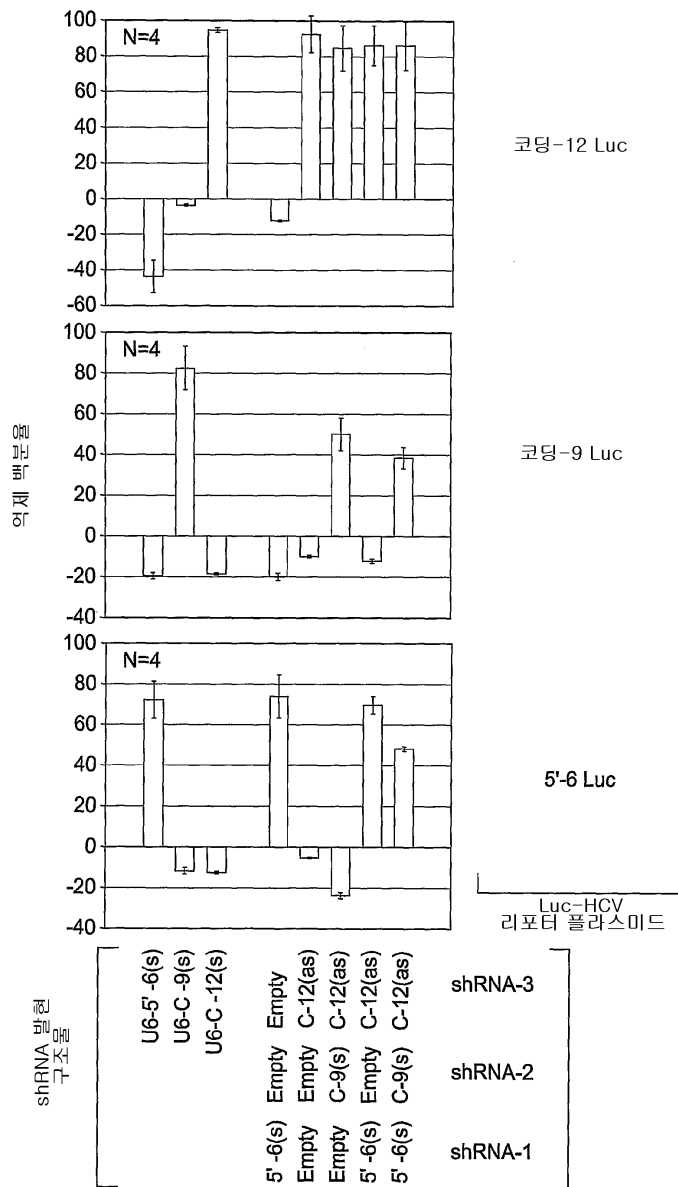
도면19



도면20



도면21



서열 목록

[서열목록 전자과일 첨부](#)