	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2008-0106554 (43) 공개일자 2008년12월08일
(51) Int. Cl. <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>C07H 21/00</i> (2006.01) <i>A61K 31/713</i> (2006.01) <i>A61P 31/20</i> (2006.01)		(71) 출원인 노파르티스 아게 스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
(21) 출원번호 10-2008-7023178		(72) 발명자 벤슨, 존 미국 02132 메사추세츠주 웨스트 록스베리 모델 스트리트 26
(22) 출원일자 2008년09월23일 심사청구일자 없음 번역문제출일자 2008년09월23일		브람라게, 비르기트 독일 95326 쿨름바흐 요한-에크-스트라쎄 11 (뒷면에 계속)
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/007241 국제출원일자 2007년03월23일		(74) 대리인 양영준, 위혜숙
(87) 국제공개번호 WO 2007/111998 국제공개일자 2007년10월04일		
(30) 우선권주장 60/785,837 2006년03월24일 미국(US) 60/825,782 2006년09월15일 미국(US)		

전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) HPV 감염을 치료하기 위한 D S RNA 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 유두종 바이러스 (HPV) 감염을 치료하기 위한 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA)에 관한 것이다. 상기 dsRNA는 길이가 뉴클레오타이드 30개 미만, 일반적으로 뉴클레오타이드 19-25개이고, HPV E1, HPV E6 및 인간 E6AP 유전자에서 선택된 HPV 표적 유전자의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열의 안티센스 가닥을 포함한다. 또한 본 발명은 상기 dsRNA를 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제약 조성물; 상기 제약 조성물을 사용하여 HPV 감염 및 E6AP 유전자의 발현에 의해 야기되는 질환을 치료하는 방법; 및 세포 내에서의 HPV 표적 유전자의 발현을 억제하는 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

피츠제럴드, 케빈

미국 02446 메사추세츠주 브루크라인 에이피티.
202 윌리엄즈 스트리트 40

탄, 파멜라

독일 95326 쿨름바흐 칼테 마르터 8

포른로허, 한스-페터

독일 95448 바이로이트 알베르트-아인슈타인-링 4
3아

특허청구의 범위

청구항 1

서로 상보적인 2개 이상의 서열을 포함하고, 센스 가닥은 제1서열을 포함하고 안티센스 가닥은 E6AP를 코딩하는 mRNA의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 상보성 영역을 포함하는 제2서열을 포함하며, 상기 상보성 영역의 길이가 뉴클레오티드 30개 미만이고, E6AP를 발현하는 세포와의 접촉 시 E6AP 유전자의 발현을 적어도 40%만큼 억제하는, 세포 내에서의 인간 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1서열이 표 1로 구성된 군으로부터 선택되고, 상기 제2서열이 표 1로 구성된 군으로부터 선택되는 dsRNA.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 dsRNA가 1개 이상의 변형 뉴클레오티드를 포함하는 dsRNA.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 dsRNA가 1개 이상의 변형 뉴클레오티드를 포함하는 dsRNA.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 변형 뉴클레오티드가 2'-O-메틸 변형 뉴클레오티드, 5'-포스포로티오에이트기를 포함하는 뉴클레오티드, 및 콜레스테릴 유도체 또는 도데칸산 비스테실아미드 기에 연결된 말단 뉴클레오티드의 군으로부터 선택되는 dsRNA.

청구항 6

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 변형 뉴클레오티드가 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오티드, 2'-데옥시-변형 뉴클레오티드, 로킹된(locked) 뉴클레오티드, 무염기성 뉴클레오티드, 2'-아미노-변형 뉴클레오티드, 2'-알킬-변형 뉴클레오티드, 모르폴리노 뉴클레오티드, 포스포르아미데이트, 및 비-천연 염기 함유 뉴클레오티드의 군으로부터 선택되는 dsRNA.

청구항 7

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 제1서열이 표 1로 구성된 군으로부터 선택되고, 상기 제2서열이 표 1로 구성된 군으로부터 선택되는 dsRNA.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 제1서열이 표 1로 구성된 군으로부터 선택되고, 상기 제2서열이 표 1로 구성된 군으로부터 선택되는 dsRNA.

청구항 9

제1항의 dsRNA를 포함하는 세포.

청구항 10

dsRNA, 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하고, 이때 dsRNA가 서로 상보적인 2개 이상의 서열을 포함하고, 센스 가닥은 제1서열을 포함하고 안티센스 가닥은 E6AP를 코딩하는 mRNA의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 상보성 영역을 포함하는 제2서열을 포함하며, 상기 상보성 영역의 길이가 뉴클레오티드 30개 미만이고, 상기 dsRNA가 E6AP를 발현하는 세포와의 접촉 시 E6AP 유전자의 발현을 적어도 20%만큼 억제하는, 생물 내에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 제약 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 dsRNA의 상기 제1서열이 표 1로 구성된 군으로부터 선택되고, 상기 dsRNA의 상기 제2서

열이 표 1로 구성된 군으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 dsRNA의 상기 제1서열이 표 1로 구성된 군으로부터 선택되고, 상기 dsRNA의 상기 제2서열이 표 1로 구성된 군으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 13

(a) 서로 상보적인 2개 이상의 서열을 포함하고, 센스 가닥은 제1서열을 포함하고 안티센스 가닥은 E6AP를 코딩하는 mRNA의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 상보성 영역을 포함하는 제2서열을 포함하며, 상기 상보성 영역의 길이가 뉴클레오타이드 30개 미만이고, E6AP를 발현하는 세포와의 접촉 시 E6AP 유전자의 발현을 적어도 40%만큼 억제하는 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA)을 세포 내로 제공하는 단계; 및

(b) 단계 (a)에서 생산된 세포를 E6AP 유전자의 mRNA 전사물의 분해를 수득하는데 충분한 시간 동안 유지시킴으로써, 세포 내에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하는 단계

를 포함하는, 세포 내에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하는 방법.

청구항 14

치료적 또는 예방적 유효량의 dsRNA를 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스의 치료, 예방 또는 관리를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 이때 dsRNA가 서로 상보적인 2개 이상의 서열을 포함하고, 센스 가닥은 제1서열을 포함하고 안티센스 가닥은 E6AP를 코딩하는 mRNA의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 상보성 영역을 포함하는 제2서열을 포함하며, 상기 상보성 영역의 길이가 뉴클레오타이드 30개 미만이고, 상기 dsRNA가 E6AP를 발현하는 세포와의 접촉 시 E6AP 유전자의 발현을 적어도 40%만큼 억제하는, HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스의 치료, 예방 또는 관리 방법.

청구항 15

dsRNA의 1개 이상의 가닥을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 조절 서열을 포함하고, 이때 dsRNA의 가닥들 중 하나가 E6AP를 코딩하는 mRNA의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적이고, dsRNA의 길이가 염기쌍 30개 미만이며, 상기 dsRNA가 E6AP를 발현하는 세포와의 접촉 시 상기 E6AP 유전자의 발현을 적어도 40%만큼 억제하는, 세포 내에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 벡터.

청구항 16

제16항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 17

서로 상보적인 2개 이상의 서열을 포함하고, 센스 가닥은 제1서열을 포함하고 안티센스 가닥은 E6AP를 코딩하는 mRNA의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 상보성 영역을 포함하는 제2서열을 포함하며, E6AP를 발현하는 세포와의 접촉 시 상기 E6AP 유전자의 발현 수준을 감소시키는, 세포 내에서의 인간 E6AP 유전자의 발현 수준을 감소시키기 위한 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA).

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 접촉이 상기 E6AP 유전자의 발현 수준을 적어도 40%만큼 감소시키는 dsRNA.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 접촉이 시험관 내에서 30 nM 이하에서 수행되는 dsRNA.

청구항 20

제17항의 dsRNA 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는, 생물 내에서의 E6AP 유전자의 발현 수준을 감소시키기 위한 제약 조성물.

청구항 21

HPV 관련 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게 치료적 유효량의 제17항의 dsRNA를 투여하는 것을 포함하는, HPV 관련 장애의 치료 방법.

청구항 22

E6AP-관련 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게 치료적 유효량의 제17항의 dsRNA를 투여하는 것을 포함하는, E6AP-관련 장애의 치료 방법.

청구항 23

표 3에 열거된 것들로부터 선택된 dsRNA.

청구항 24

제23항의 dsRNA를 포함하는 제약 조성물.

청구항 25

HPV 관련 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게 치료적 유효량의 제23항의 dsRNA를 투여하는 것을 포함하는, HPV 관련 장애의 치료 방법.

청구항 26

표 5에 열거된 것들로부터 선택된 dsRNA.

청구항 27

제26항의 dsRNA를 포함하는 제약 조성물.

청구항 28

HPV 관련 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게 치료적 유효량의 제26항의 dsRNA를 투여하는 것을 포함하는, HPV 관련 장애의 치료 방법.

청구항 29

표 7에 열거된 것들로부터 선택된 dsRNA.

청구항 30

제29항의 dsRNA를 포함하는 제약 조성물.

청구항 31

HPV 관련 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게 치료적 유효량의 제29항의 dsRNA를 투여하는 것을 포함하는, HPV 관련 장애의 치료 방법.

청구항 32

제2항, 제23항, 제26항 및 제29항의 dsRNA로부터 선택된 둘 이상의 dsRNA를 포함하는 제약 조성물.

청구항 33

HPV 관련 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게 치료적 유효량의 제32항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, HPV 관련 장애의 치료 방법.

청구항 34

제26항 또는 제29항에 있어서, 상기 dsRNA가 1개 이상의 변형 뉴클레오티드를 포함하는 dsRNA.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 변형 뉴클레오티드가 2'-O-메틸 변형 뉴클레오티드, 5'-포스포로티오에이트 기를 포함하

는 뉴클레오티드, 및 콜레스테릴 유도체 또는 도데칸산 비스테실아미드 기에 연결된 말단 뉴클레오티드의 군으로부터 선택되는 dsRNA.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 변형 뉴클레오티드가 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오티드, 2'-데옥시-변형 뉴클레오티드, 로킹된 뉴클레오티드, 무염기성 뉴클레오티드, 2'-아미노-변형 뉴클레오티드, 2'-알킬-변형 뉴클레오티드, 모르폴리노 뉴클레오티드, 포스포르아미데이트, 및 비-천연 염기 함유 뉴클레오티드의 군으로부터 선택되는 dsRNA.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA), 및 인간 유두종바이러스 (HPV) 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스, 예컨대 자궁경부암, 항문암, HPV-관련 전암성 병변, 및 생식기 사마귀를 치료하기 위해 RNA 간섭을 매개하는 것에서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 유두종바이러스 (PV)는 상피의 과증식성 병변을 유도하는, 외피가 없는 DNA 바이러스이다. 유두종바이러스는 현실적으로 광범위하게 퍼져있고, 고등 척추동물에서 인지되었다. 특히, 인간, 소, 토끼, 말 및 개에서 바이러스가 특성화되었다. 최초의 유두종바이러스는 1933년에 숨꼬리 토끼 유두종바이러스 (CRPV)로서 기술되었다. 그 이후에, 숨꼬리 토끼, 뿐만 아니라 소 유두종바이러스 유형 1 (BPV-1)이 유두종바이러스에 대한 연구를 위한 실험 원형의 역할을 하였다. 대부분의 동물 유두종바이러스는 순수하게 상피성인 증식성 병변과 관련되고, 동물에서의 대부분의 병변은 피부 병변이다. 인간에서, 100가지를 초과하는 유형의 유두종바이러스 (HPV)가 확인되었고, 이들은 감염 부위에 의해 분류되었다: 피부 상피 및 점막 상피 (구강 및 생식기 점막). 피부-관련 질환에는 편평 사마귀, 발바닥 사마귀 등이 포함된다. 점막-관련 질환에는 후두 유두종, 및 자궁목 암종을 포함하는 항문-생식기 질환이 포함된다 ([Fields, 1996, Virology, 3rd ed. Lippincott-Raven Pub., Philadelphia, N.Y.]; [Bernard, H-U., 2005. J. Clin. Virol. 328: S1-S6]).
- <3> 인간 유두종바이러스 (HPV)는 세계에서 가장 널리 퍼진 성적으로 전파되는 감염 중 하나이다. 대다수의 HPV 감염은 무해하다. 일부 유형의 HPV는 질, 자궁목, 외음부 (질의 외부 영역), 음경, 및 직장을 포함하는 남성 및 여성의 생식기 영역에서 단일 또는 다중 혹으로 나타나는 생식기 사마귀를 야기한다. HPV로 감염된 다수의 사람들은 증상이 없다.
- <4> 대부분의 HPV 아형으로 양성 병변이 초래되지만, 특정 아형은 고-위험으로 간주되고, 더욱 심각한 병변, 예컨대 자궁목 및 항문 형성이상에 이를 수 있다. 15가지의 HPV 유형이 고-위험 유형으로 최근 분류되었다 ([Munoz, N. et al. 2003. N. Engl. J. Med. 348(6):518-27]). 이러한 고-위험 아형은 유전학적으로 다양하여, 주요 바이러스 캡시드 단백질인 L1 유전자에서 >10% 서열 차이를 나타낸다 ([Bernard, H-U., 2005. J. Clin. Virol. 328: S1-S6]).
- <5> HPV로 감염된 여성은 종종 증상이 없고, 자궁목 스크리닝 후에나 병변을 발견할 수 있다. 자궁목 스크리닝은 팍(Pap) 테스트를 사용하여 일반적으로 수행된다. 팍 테스트는 비정상적인 자궁목 세포를 확인하기 위해 사용되는 자궁목 조직의 조직학적 평가이다. 팍 테스트의 일부로서, HPV 감염의 존재 및 특정 아형을 핵산을 기초로 하는 분석법 예컨대 PCR 또는 시판되는 하이브리드 캡처(Hybrid Capture) II 기술 (HCII) (Digene, Gaithersburg, Maryland, U.S.A)을 사용하여 결정할 수 있다.
- <6> 비정상적인 자궁목 세포가 확인된 경우, 이는 암으로의 진행 위험이 낮은 LSIL (저등급 편평 상피내 병변) (CIN-1 지정 세포 ("자궁목 상피내 신생물-1") 포함); 또는 암으로의 진행 가능성이 더 높은, CIN-2 및 CIN-3 지정 세포를 포함하는 HSIL (고등급 편평 상피내 병변)로 등급화된다.
- <7> 저등급 병변의 약 85%는 자발적으로 퇴행하고, 나머지는 변화하지 않거나 또는 고등급 병변으로 진행된다. 고등급 병변의 약 10%는, 치료되지 않으면, 암성 조직으로 변환될 것으로 예상된다. HPV-16 및 HPV-18이 형성이상과 가장 종종 관련되지만, 여러 다른 형질전환 HPV 아형이 또한 형성이상과 관련된다.
- <8> 최근의 연구는 HIV 양성인 동성애 남성의 89%까지가 이러한 고-위험 아형의 HPV에 감염되었을 수 있다는 것을

가리킨다. 또한 HIV 양성 환자는 아마도 동시에 다중 아형의 HPV로 감염될 것이고, 이는 형성이상 진행의 더욱 높은 위험과 관련된다.

<9> 최근 20년 간의 증거로, HPV 감염이 자궁경부암의 발달에 충분하지는 않지만 필수적이라는 것이 광범위하게 인정되었다. 자궁경부암에서의 HPV의 존재는 99.7%로 추정된다. 자궁경부암의 경우처럼 항문암에서 HPV 감염과 항문 형성이상 및 항문암의 발달 사이에 유사한 관련이 있는 것으로 생각된다. HIV 음성 항문암 환자의 한 연구에서, HPV 감염이 항문암의 88%에서 발견되었다. 2003년 미국에서, 12,200명의 신규 자궁경부암 사례 및 4,100명의 자궁경부암 사망이 4,000명의 신규 항문암 사례 및 500명의 항문암 사망과 함께 예측되었다. 광범위한 예방용 스크리닝으로 인해 자궁경부암의 발병률이 최근 40년 동안 감소하였지만, 항문암의 발병률은 증가하고 있다. 일반적인 집단보다 HIV 양성 환자에서 항문암의 발병률이 더 높기 때문에, 항문암 발병률에서의 증가는 부분적으로 HIV 감염에 기인할 수 있다. 일반적인 집단에서는 항문암의 발병률이 100,000명 당 0.9건인 한편, 동성애 남성 집단에서는 항문암의 발병률이 100,000명 당 35건이고, HIV 양성 동성애 남성 집단에서는 100,000명 당 70-100건이다. 실제로, HIV-감염 환자들 간의 항문 형성이상의 높은 유병률, 및 증가하는 항문암 경향으로 인해, <2003 USPHA/IDSA Guidelines for the Treatment of Opportunistic Infections in HIV Positive Patients>는 항문 형성이상으로 진단된 환자에 대한 치료 지침을 포함할 것이다.

<10> HPV 감염에 대한 공지된 치유법은 없다. 생식기 사마귀에 대한 치료법이 존재하지만, 이는 종종 치료 없이 소멸된다. 치료 방법은 생식기 사마귀의 크기 및 위치와 같은 인자에 좌우된다. 사용된 치료법에는, 이미퀴모드 (Imiquimod) 크림, 20% 포도필린 항유사분열 용액, 0.5% 포도필록스 용액, 5% 5-플루오로우라실 크림, 및 트리클로로아세트산이 있다. 포도필린 또는 포도필록스의 사용은 임부에겐 권장되지 않는데, 이들이 피부에 의해 흡수되어 출생 결함을 야기할 수 있기 때문이다. 5-플루오로우라실 크림의 사용 또한 임부에겐 권장되지 않는다. 작은 생식기 사마귀는 동결 (냉동수술), 소작(燒灼) (전기소작) 또는 레이저 처리에 의해 물리적으로 제거될 수 있다. 다른 치료법에 응답하지 않은 커다란 사마귀는 수술에 의해 제거할 수 있다. 생식기 사마귀는 물리적 제거 후에 되돌아오는 것으로 알려져 있다; 이러한 경우에, α -인터페론을 이러한 사마귀 내로 직접 주사하였다. 그러나, α -인터페론은 비용이 많이 들고, 이의 사용은 생식기 사마귀의 재발 비율을 감소시키지 않는다.

<11> 따라서, 효과적인 HPV 치료에 대한 충족되지 않은 요구가 존재한다. 놀랍게도, 이러한 요구를 충족시키는 화합물이 발견되었고, 또다른 이점을 또한 제공한다.

<12> 최근, 이중-가닥 RNA 분자 (dsRNA)가 RNA 간섭 (RNAi)으로 공지된 고도로 보존된 조절 메커니즘으로 유전자 발현을 차단하는 것으로 나타났다. WO 99/32619 (Fire 등)에는 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)에서의 유전자의 발현을 억제하기 위한 길이가 뉴클레오타이드 25개 이상인 dsRNA의 용도가 개시되어 있다. dsRNA는 식물 (예를 들어, WO 99/53050 (Waterhouse 등); 및 WO 99/61631 (Heifetz 등) 참조), 초파리(*Drosophila*) (예를 들어, [Yang, D., et al., Curr. Biol. (2000) 10:1191- 1200] 참조), 및 포유동물 (WO 00/44895 (Limmer); 및 DE 101 00 586.5 (Kreutzer 등) 참조)이 포함되는 또다른 생물에서 표적 RNA를 분해시키는 것으로 또한 나타났다. 현재 이러한 천연 메커니즘이 유전자의 비정상적인 또는 원치 않는 조절에 의해 야기되는 장애를 치료하기 위한 새로운 부류의 약제의 개발을 위한 초점이 되었다.

<13> PCT 공보 WO 03/008573에는 HPV 감염에 의해 야기되는 질환의 치료를 위해 핵산을 기초로 하는 의약을 개발하려는 이전의 노력이 개시되어 있다. 이러한 공보에는 세포-기반 시스템에서 HPV 복제를 억제하기 위한 HPV mRNA에 대해 지시된 2개의 siRNA의 용도가 보고되어 있다; 관련된 간행물이 [Jiang, M. et al. 2005. N. A. R. 33(18): e151]에서 발견된다.

<14> RNAi 분야에서의 상당한 진전 및 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스의 치료에서의 진전에도 불구하고, HPV 감염의 진행을 억제할 수 있고 HPV 감염과 관련된 질환을 치료할 수 있는 작용제가 여전히 요구된다. 광범위한 정도의 유전자형 다양성을 함께 나타내는 모든 고-위험 HPV 아형을 억제하도록 이같은 작용제가 디자인되어야 하기 때문에, 도전이 악화된다.

<15> 발명의 개요

<16> 본 발명은 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA)을 사용하여 HPV 번식에 필수적인 유전자 발현을 침묵시킴으로써, HPV 감염과 관련된 질환을 치료하는 문제에 대한 해법을 제공한다. E6AP는 증식을 위해 HPV가 필요로 하는 인간 숙주 종의 보존된 유전자이다.

<17> 본 발명은 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA), 뿐만 아니라 이같은 dsRNA를 사용하여 세포 또는 포유동물에서 E6AP 유

전자의 발현을 억제하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 또한 본 발명은, 예컨대 자궁경부암 및 생식기 사마귀에서, HPV 감염과 관련하여 E6AP 유전자의 발현에 의해 야기되는 병리학적 용태 및 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 dsRNA는 길이가 뉴클레오타이드 30개 미만, 일반적으로 뉴클레오타이드 19-24개이고 E6AP 유전자의 mRNA 전사물의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 영역이 있는 RNA 가닥 (안티센스 (antisense) 가닥)을 포함한다.

- <18> 한 실시양태에서, 본 발명은 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA) 분자를 제공한다. dsRNA는 서로 상보적인 2개 이상의 서열을 포함한다. dsRNA는 제1서열을 포함하는 센스(sense) 가닥 및 제2서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 안티센스 가닥은 E6AP를 코딩하는 mRNA의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 상보성 영역은 길이가 뉴클레오타이드 30개 미만, 일반적으로 뉴클레오타이드 19-24개이다. dsRNA는, E6AP를 발현하는 세포와의 접촉 시, E6AP 유전자의 발현을 적어도 40%만큼 억제한다.
- <19> 예를 들어, 본 발명의 dsRNA 분자는 표 1의 센스 서열로 구성된 군으로부터 선택된 dsRNA의 제1서열 및 표 1의 안티센스 서열로 구성된 군으로부터 선택된 제2서열로 구성될 수 있다. 본 발명의 dsRNA 분자는 천연 발생 뉴클레오타이드로 구성될 수 있거나, 또는 1개 이상의 변형 뉴클레오타이드, 예컨대 2'-O-메틸 변형 뉴클레오타이드, 5'-포스포로티오에이트 기를 포함하는 뉴클레오타이드, 및 콜레스테릴 유도체에 연결된 말단 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다. 별법적으로, 변형 뉴클레오타이드는 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오타이드, 2'-데옥시-변형 뉴클레오타이드, 로킹된(locked) 뉴클레오타이드, 무염기성(abasic) 뉴클레오타이드, 2'-아미노-변형 뉴클레오타이드, 2'-알킬-변형 뉴클레오타이드, 모르폴리노 뉴클레오타이드, 포스포르아미데이트, 및 비-천연 염기를 포함하는 뉴클레오타이드의 군으로부터 선택될 수 있다. 일반적으로, 이같은 변형 서열은 표 1의 센스 서열로 구성된 군으로부터 선택된 상기 dsRNA의 제1서열 및 표 1의 안티센스 서열로 구성된 군으로부터 선택된 제2서열을 기초로 할 것이다.
- <20> 또다른 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 dsRNA를 포함하는 세포를 제공한다. 상기 세포는 일반적으로 포유류 세포, 예컨대 인간 세포이다.
- <21> 또다른 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 dsRNA 및 제약상 허용가능한 담체 또는 전달 비히클 (vehicle)을 포함하는, 생물, 일반적으로 인간 대상에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 제약 조성물을 제공한다.
- <22> 또다른 실시양태에서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 세포 내에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하는 방법을 제공한다:
- <23> (a) 서로 상보적인 2개 이상의 서열을 포함하고, 제1서열을 포함하는 센스 가닥 및 제2서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하며, 안티센스 가닥은 E6AP를 코딩하는 mRNA의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 상보성 영역을 포함하고, 상보성 영역은 길이가 뉴클레오타이드 30개 이하, 일반적으로 뉴클레오타이드 19-24개이고, E6AP를 발현하는 세포와의 접촉 시 E6AP 유전자의 발현을 적어도 40%만큼 억제하는 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA)을 세포 내로 제공하는 단계; 및
- <24> (b) 단계 (a)에서 생산된 세포를 E6AP 유전자의 mRNA 전사물의 분해를 수득하는데 충분한 시간 동안 유지시킴으로써, 세포 내에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하는 단계.
- <25> 또다른 실시양태에서, 본 발명은 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스, 예를 들어 암 또는 생식기 사마귀의 치료, 예방 또는 관리를 필요로 하는 환자에게 치료적 또는 예방적 유효량의 하나 이상의 본 발명의 dsRNA를 투여하는 것을 포함하는, HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스, 예를 들어 암 또는 생식기 사마귀의 치료, 예방 또는 관리 방법을 제공한다.
- <26> 또다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 dsRNA 중 하나의 1개 이상의 가닥을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 조절 서열을 포함하는, 세포 내에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 벡터를 제공한다.
- <27> 또다른 실시양태에서, 본 발명은 세포 내에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 상기 벡터는 본 발명의 dsRNA 중 하나의 1개 이상의 가닥을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 조절 서열을 포함한다.
- <28> 도면의 간단한 설명

<29> 도면 없음

발명의 상세한 설명

- <30> 본 발명은 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA)을 사용하여 HPV 증식에 필수적인 유전자의 발현을 침묵시킴으로써, HPV 감염과 관련된 질환을 치료하는 문제에 대한 해법을 제공한다. 특히, 본 발명의 dsRNA는 HPV 유전자 E1 또는 E6, 또는 증식을 위해 HPV가 필요로 하는 인간 숙주 종의 보존된 유전자인 인간 E6AP를 침묵시킨다. 본원에서, 이러한 유전자들은 때때로 총괄적으로 HPV 표적 유전자로 칭해진다.
- <31> 본 발명은 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA), 뿐만 아니라 dsRNA를 사용하여 세포 또는 포유동물에서 E1, E6 또는 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 dsRNA를 사용하여 HPV 감염과 관련하여 E1, E6 또는 E6AP 유전자의 발현에 의해 야기되는 포유동물에서의 병리학적 용태 및 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. dsRNA는 RNA 간섭 (RNAi)으로 공지된 프로세스를 통해 mRNA의 서열-특이적 분해를 지시한다.
- <32> 본 발명의 dsRNA는 길이가 뉴클레오티드 30개 미만, 일반적으로 뉴클레오티드 19-24개이고 HPV 표적 mRNA 전사물의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 영역이 있는 RNA 가닥 (안티센스 가닥)을 포함한다. 이러한 dsRNA의 사용은 포유동물에서 HPV의 복제 및/또는 유지에 연루되는 유전자의 mRNA의 표적화된 분해를 가능하게 한다. 세포-기반 및 동물-기반 분석법을 사용하여, 본 발명가들은 매우 낮은 투여량의 이러한 dsRNA가 RNAi를 특이적으로 및 효율적으로 매개하여, E1, E6 또는 E6AP 유전자의 발현의 상당한 억제를 초래할 수 있다는 것을 증명하였다. 따라서, 이러한 dsRNA를 포함하는 본 발명의 방법 및 조성물은 HPV 생활 주기에 수반되는 숙주 인자 유전자를 표적으로 함으로써 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스를 치료하는데 유용하다.
- <33> HPV 표적의 서술: HPV E1 및 E6 및 인간 E6AP
- <34> 인간 숙주의 세포성 유비퀴틴 리가아제 E6AP는 자신과 바이러스의 E6 단백질의 복합체를 통해 HPV, 특히 통합 (비-에피솜) 형태의 HPV의 복제에 연루된다. E6는 세포 증식 경로를 조절하는 다수의 단백질에 결합하고, 종종 이의 분해를 일으킨다 ([Chakrabarti, O. and Krishna, S. 2003. J. Biosci. 28:337-348]). E6는 E6AP와 복합체를 이루어, 분해를 위해 중앙 억제인자 p53을 표적으로 한다 ([Scheffner, M. et al., 1990. Cell. 63:1129-1136]; 및 [Scheffner, M. et al., 1993. Cell 75:495-505]). p53을 불활성화시킴으로써, 바이러스는 감염된 세포의 p53-매개 세포자멸사를 방지하고 ([Chakrabarti and Krishna, 2003]), 원래는 p53에 의해 차단될 이러한 세포의 DNA의 복제를 용이하게 할 뿐만 아니라 ([Lepik, D. et al. 1998. J. Virol. 72:6822-6831]), 또한 게놈 통합성에 대한 p53-매개 제어를 감소시킴으로써 종양발생을 촉진한다 ([Thomas, M. et al. 1999. Oncogene. 18:7690-7700]).
- <35> E1 및 E6 모두 ["Papillomaviridae: The Viruses and Their Replication", Peter M. Howley, pp. 947-978, Fundamental Virology, 3rd ed. Bernard N. Fields, David M. Knipe, and Peter M. Howley, eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996]에 상당히 상세하게 기술되어 있다. E1 ORF는 플라스미드 DNA 복제에 필수적인 68-76 kD 단백질을 코딩한다. 전장 E1 생성물은 BPV1의 LCR 내의 복제 기원에 결합하는 인산화된 핵 단백질이다. 또한 E1은 ATP에 결합하고, 시험관내에서 E2 전사 트랜스액티베이터(transactivator) (E2TA)로 칭해지는 전장 E2 단백질에 결합함으로써, 바이러스 전사를 증강시키는 것으로 나타났다. E2에 대한 결합은 DNA 복제 기원에 대한 E1의 친화력을 또한 강화시킨다. HPV-16에서, E1은 불멸화에 대한 간접적인 효과가 있다.
- <36> E6은 약 16-19 kD의 소형 염기성 세포-형질전환 단백질이고 (예를 들어, HPV16 E6은 151개의 아미노산을 포함한다), 이는 핵 기질 및 비-핵 막 분획에 위치한다. E6 유전자 생성물은 4개의 Cys-X-X-Cys 모티프를 함유하고, 이는 아연 결합에 대한 잠재력을 가리킨다; 이는 또한 핵산 결합 단백질로 작용할 수 있다. 고-위험 HPV 예컨대 HPV-16에서, E6 및 E7 단백질은 이들의 숙주인 편평 상피 세포를 불멸화시키는데 필요충분하다. 고-위험 HPV의 E6 유전자 생성물은 p53과 복합체를 이루고, 이의 분해를 촉진하는 것으로 나타났다.
- <37> 하기의 상세한 설명은 HPV 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 dsRNA 및 dsRNA를 함유하는 조성물의 제조 및 사용 방법, 뿐만 아니라 HPV 감염에 의해 야기되는 질환 및 장애, 예를 들어 자궁경부암 및 생식기 사마귀의 치료를 위한 조성물 및 방법을 개시한다. 본 발명의 제약 조성물은 길이가 뉴클레오티드 30개 미만, 일반적으로 뉴클레오티드 19-24개이고 HPV 표적 유전자의 RNA 전사물의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 상보성 영역을 포함하는 안티센스 가닥이 있는 dsRNA를 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함한다. 본 발명의 한 실시양태는 임의로 상이한 HPV 표적 유전자를 표적으로 하는 1가지를 초과하는 dsRNA를 제약 제형에서 조합하여 사용하

는 것이다.

- <38> 따라서, 본 발명의 특정 양상은 본 발명의 dsRNA를 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제약 조성물, 상기 조성물을 사용하여 1가지 이상의 HPV 표적 유전자의 발현을 억제하는 방법, 및 상기 제약 조성물을 사용하여 HPV 감염에 의해 야기되는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- <39> I. 정의
- <40> 편의를 위해, 명세서, 실시예, 및 첨부된 청구항에서 사용된 특정 용어 및 구절의 의미가 하기에 제공된다. 본 명세서의 다른 부분에서의 용어의 용법과 본 섹션에서 제공된 이의 정의 사이에 명백한 모순이 존재하는 경우, 본 섹션에서의 정의가 우선할 것이다.
- <41> "G", "C", "A" 및 "U" 각각은 각각 구아닌, 사이토신, 아데닌 및 우라실을 염기로서 함유하는 뉴클레오타이드를 일반적으로 각각 가리킨다. 그러나, 용어 "리보뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드"는 하기에 추가로 상술된 바와 같은 변형 뉴클레오타이드, 또는 대용 대체 모이어티를 또한 지칭할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 당업자는 구아닌, 사이토신, 아데닌 및 우라실이 다른 모이어티로 이같은 대체 모이어티를 보유하는 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 염기 쌍형성 성질을 실질적으로 변경하지 않으면서 대체될 수 있다는 것을 주지할 것이다. 예를 들어, 비제한적으로, 이노신을 염기로 함유하는 뉴클레오타이드는 아데닌, 사이토신, 또는 우라실을 함유하는 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성할 수 있다. 따라서, 우라실, 구아닌, 또는 아데닌을 함유하는 뉴클레오타이드는 이노신을 예를 들어 함유하는 뉴클레오타이드로 본 발명의 뉴클레오타이드 서열에서 대체될 수 있다. 이같은 대체 모이어티를 포함하는 서열은 본 발명의 실시양태이다.
- <42> 본원에서 사용된 "E6AP"는 유비퀴틴 단백질 리가아제 E3A (ube3A, 또한 E6-관련 단백질 또는 E6AP로 지칭됨) 유전자 또는 단백질을 지칭한다. 상이한 이소형을 나타내는, E6AP에 대한 인간 mRNA 서열들이 GenBank 접속 번호 NM_130838.1, NM_130839.1, 및 NM_000462.2로 제공된다.
- <43> 본원에서 사용된 "E1"은 인간 유두종바이러스 유형 16 (HPV16) E1 유전자 (GenBank 접속 번호 NC_001526, 뉴클레오타이드 865 내지 2813)를 지칭한다. 본원에서 사용된 "E6"은 인간 유두종바이러스 유형 16 (HPV 16) E6 유전자 (GenBank 접속 번호 NC_001526, 뉴클레오타이드 65 내지 559)를 지칭한다. E1 및 E6 유전자의 다수의 변이체가 또한 공개적으로 개시되어 있다. 이러한 E1 및 E6 유전자 변이체 및 장래의 E1 및 E6 유전자 변이체는, 문맥적으로 명확하게 제외되지 않는 한, 본원에서 "E1" 및 "E6"의 사용에 포함되는 것으로 의도된다.
- <44> 본원에서 사용된 "표적 서열"은 1차 전사 생성물의 RNA 프로세싱의 생성물인 mRNA를 포함하여, HPV 표적 유전자들 중 하나의 전사 동안 형성된 mRNA 분자의 뉴클레오타이드 서열의 인접 부분을 지칭한다.
- <45> 본원에서 사용된 용어 "서열을 포함하는 가닥"은 표준 뉴클레오타이드 명명법을 사용하여 지칭된 서열에 의해 기술된 뉴클레오타이드의 사슬을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다.
- <46> 달리 지시되지 않는 한, 본원에서 사용된 용어 "상보적"은, 제1 뉴클레오타이드 서열을 제2 뉴클레오타이드 서열과 관련하여 기술하는데 사용된 경우, 당업자에게 이해될 바와 같이, 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 특정 조건 하에 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 혼성화하여 듀플렉스(duplex) 구조를 형성하는 능력을 지칭한다. 이같은 조건은, 예를 들어, 엄격한 조건일 수 있고, 이때 엄격한 조건은 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 50°C 또는 70°C에서 12-16시간에 이은 세정을 포함할 수 있다. 생물의 내부에서 마주칠 수 있는 생리학적으로 관련된 조건과 같은 기타 조건이 적용될 수 있다. 당업자는 혼성화된 뉴클레오타이드들의 최대의 적용에 따른 2개의 서열의 상보성의 테스트를 위한 가장 적합한 조건의 셋트를 결정할 수 있을 것이다.
- <47> 이는 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 제1 및 제2 뉴클레오타이드 서열의 전체 길이에 걸친 염기 쌍형성을 포함한다. 이같은 서열은 본원에서 서로에 대해 "완전하게 상보적"인 것으로 지칭될 수 있다. 그러나, 제1서열이 본원에서 제2서열에 대해 "실질적으로 상보적"인 것으로 지칭되는 경우, 2개의 서열은 완전하게 상보적일 수 있거나, 또는 최대의 적용에 가장 관련된 조건 하에 혼성화하는 능력을 유지하면서 혼성화 시 1개 이상, 일반적으로는 최대 4개, 3개 또는 2개의 미스매칭(mismatching)된 염기 쌍을 형성할 수 있다. 그러나, 2개의 올리고뉴클레오타이드가 혼성화 시 1개 이상의 단일 가닥 오버행(overhang)을 형성하도록 디자인된 경우, 이같은 오버행은 상보성의 결정과 관련하여 미스매치로 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 길이가 뉴클레오타이드 21개인 한 올리고뉴클레오타이드 및 길이가 뉴클레오타이드 23개인 또다른 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 dsRNA는, 더 긴 올리고뉴클레오타이드가 더 짧은 올리고뉴클레오타이드에 완전하게 상보적인 뉴클레오타이드 21개의 서열을 포

합하는 경우, 본 발명의 목적을 위해 "완전하게 상보적"인 것으로 지칭될 수 있다.

- <48> 본원에서 사용된 "상보적" 서열은, 혼성화하는 능력과 관련된 상기 필요조건이 만족되는 한, 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍이 아닌 염기 쌍 및/또는 비-천연 및 변형 뉴클레오타이드로부터 형성된 염기 쌍을 또한 포함할 수 있거나, 또는 전적으로 이러한 염기 쌍으로부터 형성될 수 있다.
- <49> 본원에서의 용어 "상보적", "완전하게 상보적" 및 "실질적으로 상보적"은, 사용 문맥으로부터 이해될 바와 같이, dsRNA의 센스 가닥과 안티가닥 사이, 또는 dsRNA의 안티센스 가닥과 표적 서열 사이의 염기 매칭과 관련되어 사용될 수 있다.
- <50> 본원에서 사용된, 메신저 RNA (mRNA)의 "적어도 일부분에 실질적으로 상보적인" 폴리뉴클레오타이드는 당해 mRNA (예를 들어, E6AP를 코딩)의 인접 부분에 실질적으로 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 E6AP를 코딩하는 mRNA의 중단되지 않은 부분에 서열이 실질적으로 상보적이라면 E6AP mRNA의 적어도 일부분에 상보적이다.
- <51> 본원에서 사용된 용어 "이중-가닥 RNA" 또는 "dsRNA"는 역-평행이고 실질적으로 상보적인 (상기 정의된 바와 같음) 2개의 핵산 가닥을 포함하는 듀플렉스 구조의, 리보핵산 분자의 복합체를 지칭한다. 듀플렉스 구조를 형성하는 2개의 가닥은 1개의 더 큰 RNA 분자의 상이한 부분일 수 있거나, 또는 별도의 RNA 분자일 수 있다. 별도의 RNA 분자의 경우, 이같은 dsRNA는 문헌에서 종종 siRNA ("짧은 간섭 RNA")로 지칭된다. 2개의 가닥이 1개의 더 큰 분자의 일부분이고, 따라서 한 가닥의 3'-말단과 듀플렉스 구조를 형성하는 각각의 다른 가닥의 5'-말단 사이에서 뉴클레오타이드의 중단되지 않은 사슬로 연결되는 경우, 연결 RNA 사슬은 "헤어핀 루프(hairpin loop)", "짧은 헤어핀 RNA" 또는 "shRNA"로 지칭된다. 2개의 가닥이 한 가닥의 3'-말단과 듀플렉스 구조를 형성하는 각각의 다른 가닥의 5'-말단 사이에서 뉴클레오타이드의 중단되지 않은 사슬 이외의 수단에 의해 공유결합적으로 연결되는 경우, 연결 구조물은 "링커(linker)"로 지칭된다. RNA 가닥은 뉴클레오타이드의 개수가 동일하거나 상이할 수 있다. 염기 쌍의 최대수는 dsRNA의 가장 짧은 가닥의 뉴클레오타이드 개수 빼기 듀플렉스 내에 존재하는 임의의 오버행이다. 듀플렉스 구조에 더하여, dsRNA는 1개 이상의 뉴클레오타이드 오버행을 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "dsRNA"는 다중 뉴클레오타이드에서의 실질적인 변형 및 본원에 개시되었거나 당업계에 공지된 모든 유형의 변형을 포함하여, 리보뉴클레오타이드, 뉴클레오시드간 연결, 말단-기, 캡(cap), 및 접합된 모이어티에 대한 화학적 변형을 포함할 수 있다. siRNA 유형 분자에서 사용된 바와 같이 임의의 이같은 변형은 본 명세서 및 청구항의 목적을 위해 "dsRNA"에 포함된다.
- <52> 본원에서 사용된 "뉴클레오타이드 오버행"은 dsRNA의 한 가닥의 3'-말단이 또다른 가닥의 5'-말단 너머로 연장된 경우, 또는 반대 경우에 dsRNA의 듀플렉스 구조로부터 돌출된, 쌍을 이루지 않은 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드들을 지칭한다. "블런트(blunt)" 또는 "블런트 말단"은 dsRNA의 이러한 말단에서 쌍을 이루지 않은 뉴클레오타이드가 없는 것, 즉 뉴클레오타이드 오버행이 없는 것을 의미한다. "블런트 말단" dsRNA는 이의 전체 길이에 걸쳐 이중 가닥인, 즉 분자의 어느쪽 말단에서도 뉴클레오타이드 오버행이 없는 dsRNA이다. 명확하게 하기 위해, siRNA의 3' 말단 또는 5' 말단에 접합된 화학 캡 또는 비-뉴클레오타이드 화학 모이어티는 siRNA에 오버행이 있는지 또는 siRNA가 블런트 말단인지를 결정하는데 있어서 고려되지 않는다.
- <53> 용어 "안티센스 가닥"은 표적 서열에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 dsRNA의 가닥을 지칭한다. 본원에서 사용된 용어 "상보성 영역"은 본원에 정의된 바와 같이 서열, 예를 들어 표적 서열에 실질적으로 상보적인 안티센스 가닥 상의 영역을 지칭한다. 상보성 영역이 표적 서열에 완전하게 상보적이지 않는 경우, 미스매치는 말단 영역에서 최고로 허용되고, 존재하는 경우, 일반적으로 말단 영역 또는 영역들 내에, 예를 들어, 5' 및/또는 3' 말단의 뉴클레오타이드 6개, 5개, 4개, 3개, 또는 2개 이내에 존재한다.
- <54> 본원에서 사용된 용어 "센스 가닥"은 안티센스 가닥의 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 dsRNA의 가닥을 지칭한다.
- <55> dsRNA를 지칭할 때 "세포 내로 도입하는 것"은 당업자에게 이해되는 바와 같이 세포 내로의 섭취 또는 흡수를 촉진하는 것을 의미한다. dsRNA의 흡수 또는 섭취는 원조를 받지 않은 확산성 또는 활성 세포 프로세스를 통해, 또는 보조 작용제 또는 장치에 의해 일어날 수 있다. 이러한 용어의 의미는 시험관 내의 세포에 한정되지 않는다; dsRNA는 세포가 살아 있는 생물의 일부분인 경우에 또한 "세포 내로 도입"될 수 있다. 이같은 경우에, 세포 내로의 도입은 생물에게의 전달을 포함할 것이다. 예를 들어, 생체내 전달을 위해, dsRNA는 조직 부위 내로 주사될 수 있거나, 또는 전신 투여될 수 있다. 세포 내로의 시험관내 도입은 전기천공 및 리포펙션(lipofection)과 같은 당업계에 공지된 방법을 포함한다.

<56> HPV 표적 유전자를 지칭하는 한, 용어 "침묵" 및 "발현의 억제"는, 세포 내에서 HPV 표적 유전자가 전사되고 HPV 표적 유전자의 발현이 억제되도록 처리된 제1 세포 또는 세포군으로부터 단리될 수 있는 HPV 표적 유전자로부터 전사된 mRNA의 양이 제1 세포 또는 세포군과 실질적으로 동일하지만 상기와 같이 처리되지 않은 제2 세포 또는 세포군 (대조군 세포)와 비교하여 감소되는 것에 의해 명시되는 바와 같은, HPV 표적 유전자의 발현의 적어도 부분적인 억제를 본원에서 지칭한다. 억제 정도는 일반적으로 하기의 식으로 표현된다:

$$\frac{(\text{대조군 세포 내의 mRNA}) - (\text{처리된 세포 내의 mRNA})}{(\text{대조군 세포 내의 mRNA})} \cdot 100\%$$

<57>

<58> 별법적으로, 억제 정도는 HPV 표적 유전자 전사에 기능적으로 연결된 파라미터, 예를 들어 세포에 의해 분비되는 HPV 표적 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 양, 또는 특정 표현형, 예를 들어, 세포자멸사를 나타내는 세포의 수의 감소의 관점에서 제공될 수 있다. 원칙적으로, HPV 표적 유전자 침묵은 구성적으로 또는 유전자 조작에 의해 표적을 발현하는 임의의 세포에서, 그리고 임의의 적합한 분석법에 의해 결정될 수 있다. 그러나, 소정의 dsRNA가 HPV 표적 유전자의 발현을 특정한 정도로 억제하고, 따라서 본 발명에 포함되는지를 결정하기 위해 참조문이 필요한 경우, 하기 실시예에서 제공된 분석법이 이같은 참조문으로 작용할 것이다.

<59> 예를 들어, 특정 예에서, E6AP 유전자의 발현이 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 투여에 의해 적어도 약 20%, 25%, 35%, 또는 50%만큼 억제된다. 일부 실시양태에서, E6AP 유전자가 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 투여에 의해 적어도 약 60%, 70%, 또는 80%만큼 억제된다. 일부 실시양태에서, E6AP 유전자가 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 투여에 의해 적어도 약 85%, 90%, 또는 95%만큼 억제된다. 표 2는 다양한 농도의 다양한 E6AP dsRNA 분자를 사용하여 시험관내 분석법에서 수득된 전사 억제에 대한 광범위한 값들을 제공한다. 유사하게, 표 6은 E1의 전사 억제에 대한 광범위한 값들을 제공하고, 표 8은 E6의 전사 억제에 대한 광범위한 값들을 제공한다.

<60> HPV 감염의 문맥에서 사용된 용어 "치료하다", "치료" 등은 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스로부터의 완화 또는 이러한 프로세스의 경감을 지칭한다. 이같은 기술(記述)은 HPV 감염의 예방 또는 방지, 및 HPV 감염에 의해 야기된 증상 또는 병리로부터의 완화를 위한 본 발명의 치료제의 사용을 포함한다. 본원에서 하기에 열거된 기타 용태들 (HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스 이외의 것) 중 임의의 것과 관련되는 한, 본 발명의 문맥에서, 용어 "치료하다", "치료" 등은 이같은 용태와 관련된 1가지 이상의 증상을 완화하거나 경감시키는 것 또는 이같은 용태의 진행을 느리게 하거나 역행시키는 것을 의미한다.

<61> 본원에서 사용된 구절 "치료적 유효량" 및 "예방적 유효량"은 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스 또는 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스의 명백한 증상의 치료, 예방 또는 관리에서 치료적 이점을 제공하는 양을 지칭한다. 치료적으로 효과적인 특정한 양은 일반 진료의가 쉽게 결정할 수 있고, 당업계에 공지된 인자, 예를 들어 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스의 유형, 환자의 병력 및 연령, HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스의 단계, 및 기타 항-병리학적 작용제의 투여에 따라 변할 수 있다.

<62> 본원에서 사용된 "제약 조성물"은 약리학적 유효량의 dsRNA 및 제약상 허용가능한 담체를 포함한다. 본원에서 사용된 "약리학적 유효량", "치료적 유효량" 또는 간단히 "유효량"은 의도된 약리학적, 치료적 또는 예방적 결과를 일으키는데 효과적인 dsRNA의 양을 지칭한다. 예를 들어, 질환 또는 장애와 관련된 측정가능한 파라미터에서의 25% 이상의 감소가 있는 경우 소정의 임상 치료가 효과적인 것으로 간주된다면, 상기 질환 또는 장애의 치료를 위한 약물의 치료적 유효량은 이러한 파라미터에서 25% 이상의 감소를 초래하는데 필요한 양이다.

<63> 용어 "제약상 허용가능한 담체"는 치료제의 투여를 위한 담체를 지칭한다. 이같은 담체에는 염수, 완충 염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올, 및 이의 조합물이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 이 용어는 세포 배양 배지를 명확하게 제외한다. 경구 투여되는 약물을 위해, 제약상 허용가능한 담체에는 제약상 허용가능한 부형제 예컨대 불활성 희석제, 붕해제, 결합제, 윤활제, 감미제, 향미제, 착색제 및 방부제가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 적절한 불활성 희석제에는 탄산나트륨 및 탄산칼슘, 인산나트륨 및 인산칼슘, 및 락토스가 포함되고, 옥수수 전분 및 알긴산이 적절한 붕해제이다. 결합제에는 전분 및 젤라틴이 포함될 수 있고, 윤활제 (존재하는 경우)는 일반적으로 스테아르산마그네슘, 스테아르산 또는 탈크일 수 있다. 원한다면, 위장관에서의 흡수를 지연시키기 위해 정제가 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트와 같은 재료로 코팅될 수 있다.

<64> 본원에서 사용된 "형질전환된 세포"는 이로부터 dsRNA 분자가 발현될 수 있는 벡터가 세포 내로 도입된 세포이

다.

<65> II. 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA)

<66> 한 실시양태에서, 본 발명은 세포 또는 포유동물 내에서의 HPV 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA)을 제공하고, 이때 dsRNA는 HPV 표적 유전자의 발현에서 형성된 mRNA의 적어도 일부분에 상보적인 상보성 영역을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하고, 상보성 영역은 길이가 뉴클레오타이드 30개 미만, 일반적으로 뉴클레오타이드 19-24개이며, 상기 dsRNA는 상기 HPV 표적 유전자를 발현하는 세포와의 접촉 시 상기 HPV 표적 유전자의 발현을 적어도 10%, 25%, 또는 40%만큼 억제한다.

<67> dsRNA는 충분히 상보적이어서 혼성화하여 듀플렉스 구조를 형성하는 2개의 RNA 가닥을 포함한다. dsRNA의 한 가닥 (안티센스 가닥)은 HPV 표적 유전자의 발현 동안 형성된 mRNA의 서열로부터 유래된, 표적 서열에 실질적으로 상보적이고, 일반적으로는 완전히 상보적인 상보성 영역을 포함하고, 나머지 가닥 (센스 가닥)은 안티센스 가닥에 상보적인 영역을 포함하여, 2개의 가닥이 적절한 조건 하에 조합되는 경우 혼성화하여 듀플렉스 구조를 형성한다. 일반적으로, 듀플렉스 구조의 길이는 염기쌍 15개 내지 30개, 더욱 일반적으로는 18개 내지 25개, 더욱 더 일반적으로는 19개 내지 24개, 가장 일반적으로는 19개 내지 21개이다. 유사하게, 표적 서열에 대한 상보성 영역의 길이는 뉴클레오타이드 15개 내지 30개, 더욱 일반적으로는 18개 내지 25개, 더욱 더 일반적으로는 19개 내지 24개, 가장 일반적으로는 19개 내지 21개이다. 본 발명의 dsRNA는 1개 이상의 단일-가닥 뉴클레오타이드 오버행(들)을 추가로 포함할 수 있다. dsRNA는 하기에 추가로 논의된 바와 같은 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예를 들어, 자동화 DNA 합성기를 사용하여 합성될 수 있고, 예를 들어, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.로부터 시판된다. 바람직한 실시양태에서, HPV 표적 유전자는 인간 E6AP 유전자이다. 특정 실시양태에서, dsRNA의 안티센스 가닥은 표 1의 센스 서열로부터 선택된 가닥 및 표 1의 안티센스 서열로 구성된 군으로부터 선택된 제2 서열을 포함한다. 표 1에서 제공된 표적 서열 내의 다른 곳을 표적으로 하는 별법적인 안티센스 작용제를 표적 서열 및 플랭킹(flanking) E6AP 서열을 사용하여 쉽게 결정할 수 있다.

<68> 추가적인 실시양태에서, dsRNA는 표 1에서 제공된 서열들의 군으로부터 선택된 1개 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또다른 실시양태에서, dsRNA는 이러한 군으로부터 선택된 2개 이상의 서열을 포함하고, 이때 2개 이상의 서열 중 1개는 2개 이상의 서열 중 또다른 서열에 상보적이고, 2개 이상의 서열 중 1개는 E6AP 유전자의 발현에서 생성된 mRNA의 서열에 실질적으로 상보적이다. 일반적으로, dsRNA는 2개의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 이때 1개의 올리고뉴클레오타이드는 표 1에서 센스 가닥으로 기술되고, 두번째 올리고뉴클레오타이드는 표 1에서 안티센스 가닥으로 기술된다. 표 1은 각각의 바람직한 dsRNA에 대한 듀플렉스 명칭 및 서열 번호를 제공한다.

<69> 추가적인 실시양태에서, dsRNA는 표 5 (E1 dsRNA) 또는 표 7 (E6 dsRNA)에서 제공된 서열들의 군으로부터 선택된 1개 이상의 지정된 듀플렉스 dsRNA를 포함한다.

<70> 당업자는 염기쌍 20개 내지 23개, 특히 21개의 듀플렉스 구조를 포함하는 dsRNA가 RNA 간섭을 유도하는데 특히 효과적인 것으로 환영받았음을 주지한다 ([Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888]). 그러나, 다른 이들이 더 짧거나 더 긴 dsRNA가 또한 효과적일 수 있다는 것을 발견하였다. 상기 기술된 실시양태에서, 표 1, 표 5 또는 표 7에서 제공된 올리고뉴클레오타이드 서열의 성질에 의해, 본 발명의 dsRNA는 길이가 최소한 뉴클레오타이드 21개인 1개 이상의 가닥을 포함할 수 있다. 표 1, 표 5 또는 표 7의 서열들 중 하나 빼기 한쪽 또는 양쪽 말단에서의 몇개의 뉴클레오타이드를 포함하는 더 짧은 dsRNA가 상기 기술된 dsRNA와 비교하여 유사하게 효과적일 수 있다는 것을 합리적으로 예상할 수 있다. 따라서, 표 1, 표 5 또는 표 7의 서열들 중 하나로부터의 적어도 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 또는 그 이상의 연속적인 뉴클레오타이드의 부분적인 서열을 포함하고, FACS 분석법 또는 본원에서 하기 기술된 기타 분석법에서 HPV 표적 유전자의 발현을 억제하는 능력이 전체 서열을 포함하는 dsRNA와 최대 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 또는 30% 억제만큼 상이한 dsRNA가 본 발명에 의해 구현된다. 표 1, 표 5 또는 표 7에서 제공된 표적 서열 내에서 절단되는 추가적인 dsRNA를 제공된 기준 서열 및 표적 서열을 사용하여 쉽게 제조할 수 있다.

<71> 또한, 표 1, 표 5 및 표 7에서 제공된 RNAi 작용제는 RNAi를 기초로 하는 절단에 영향을 받기 쉬운 각각의 HPV 표적 mRNA 내의 부위를 규명한다. 따라서 본 발명은 본 발명의 작용제들 중 하나가 표적으로 하는 서열 내를 표적으로 하는 RNAi 작용제를 추가로 포함한다. 본원에서 사용된 제2 RNAi 작용제는 제2 RNAi 작용제가 제1 RNAi 작용제의 안티센스 가닥에 상보적인 mRNA 내의 임의의 곳에서 메시지를 절단한다면 제1 RNAi 작용제의 서열 내를 표적으로 하는 것으로 언급된다. 이같은 제2 작용제는 HPV 표적 유전자 내의 선택된 서열에 인접한 영역으로부터 취해진 추가적인 뉴클레오타이드 서열에 커플링된 표 1, 표 5 또는 표 7에서 제공된 서열들 중 하나로

부터의 15개 이상의 인접 뉴클레오타이드로 일반적으로 구성될 것이다. 예를 들어, 표적 E6AP 유전자로부터의 다음 6개의 뉴클레오타이드와 조합된 서열 1의 마지막 15개의 뉴클레오타이드 (부가된 AA 서열을 뺀)로 표 1에서 제공된 서열들 중 하나를 기초로 하는 뉴클레오타이드 21개의 단일 가닥 작용제가 생산된다.

<72> 본 발명의 dsRNA는 표적 서열에 대한 1개 이상의 미스매치를 함유할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 dsRNA는 3개 이하의 미스매치를 함유한다. dsRNA의 안티센스 가닥이 표적 서열에 대한 미스매치를 함유하는 경우, 미스매치 영역이 상보성 영역의 중앙에 위치하지 않는 것이 바람직하다. dsRNA의 안티센스 가닥이 표적 서열에 대한 미스매치를 함유하는 경우, 미스매치가 상보성 영역의 어느 한쪽 말단으로부터 뉴클레오타이드 5개, 예를 들어 5' 또는 3' 말단으로부터의 뉴클레오타이드 5개, 4개, 3개, 2개, 또는 1개에 한정되는 것이 바람직하다. 예를 들어, HPV 표적 유전자의 영역에 상보적인 뉴클레오타이드 23개의 dsRNA 가닥에 대해, 일반적으로 dsRNA는 중앙의 13개의 뉴클레오타이드 내에 어떠한 미스매치도 함유하지 않는다. 본 발명에 기술된 방법을 사용하여 표적 서열에 대한 미스매치를 함유하는 dsRNA가 HPV 표적 유전자의 발현을 억제하는데 효과적인지 여부를 결정할 수 있다. HPV 표적 유전자의 발현을 억제하는 것에서 미스매치가 있는 dsRNA의 효능을 고려하는 것은, 특히 HPV 표적 유전자 내의 특정 상보성 영역에 바이러스 (E1 또는 E6의 경우) 또는 인간 집단 (E6AP에 대해)에서 다형성 서열 변이가 있는 것으로 공지된 경우에, 중요하다.

<73> 한 실시양태에서, dsRNA의 1개 이상의 한쪽 말단에 뉴클레오타이드 1개 내지 4개, 일반적으로 1개 또는 2개의 단일-가닥 뉴클레오타이드 오버행이 있다. 1개 이상의 뉴클레오타이드 오버행이 있는 dsRNA에는 블런트-말단 대응부보다 예상외로 우수한 억제 성질이 있다. 또한, 본 발명가들은 오직 1개의 뉴클레오타이드 오버행의 존재가 dsRNA의 간섭 활성을 이의 전체적인 안정성에 영향을 미치지 않으면서 강화한다는 것을 발견하였다. 오직 1개의 오버행만이 있는 dsRNA는 생체내에서, 뿐만 아니라 다양한 세포, 세포 배양 배지, 혈액, 및 혈청에서 특히 안정적이고 효과적인 것으로 증명되었다. 일반적으로, 단일-가닥 오버행은 안티센스 가닥의 3'-말단에 위치하거나, 또는 별법적으로 센스 가닥의 3'-말단에 위치한다. 또한 dsRNA에는 평활 말단이 있을 수 있고, 이는 일반적으로 안티 센스 가닥의 5'-말단에 위치한다. 이같은 dsRNA는 안정성 및 억제 활성이 개선되고, 따라서 낮은 투여량, 즉, 수용자의 체중 1 kg 당 5 mg/일 미만으로의 투여를 허용한다. 일반적으로, dsRNA의 안티센스 가닥의 3'-말단에는 뉴클레오타이드 오버행이 있고, 5'-말단은 블런트이다. 또다른 실시양태에서, 오버행 내의 1개 이상의 뉴클레오타이드가 뉴클레오시드 티오포스페이트로 대체된다.

<74> 또다른 실시양태에서, dsRNA가 화학적으로 변형되어 안정성이 증강된다. 본 발명의 핵산은 당업계에 잘 확립된 방법, 예컨대 거명에 의해 본원에 포함된 ["Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA]에 기술된 것들에 의해 합성 및/또는 변형될 수 있다. 화학적 변형은 2' 변형, 올리고뉴클레오타이드의 당 또는 염기의 다른 부위에서의 변형, 올리고뉴클레오타이드 사슬 내로의 비-천연 염기의 도입, 리간드 또는 화학 모이어티에 대한 공유결합 부착, 및 별법적인 결합 예컨대 티오포스페이트로의 뉴클레오타이드간 포스페이트 결합의 대체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 1개를 초과하는 이같은 변형이 사용될 수 있다.

<75> 2개의 별도의 dsRNA 가닥의 화학적 연결은 임의의 다양한 주지된 기술에 의해, 예를 들어 공유, 이온 또는 수소 결합을 도입함으로써; 소수성 상호작용, 반데르발스 또는 겹침(stacking) 상호작용에 의해; 금속-이온 배위에 의해, 또는 퓨린 유사체의 사용을 통해 달성될 수 있다. 일반적으로, dsRNA를 변형시키는데 사용될 수 있는 화학 기에는 메틸렌 블루; 2관능성 기, 일반적으로 비스-(2-클로로에틸)아민; N-아세틸-N'-(p-글리옥시벤조일)시스타민; 4-티오우라실; 및 소랄렌이 비제한적으로 포함된다. 한 실시양태에서, 링커는 헥사-에틸렌 글리콜 링커이다. 이러한 경우에, dsRNA가 고체 상 합성에 의해 생산되고, 헥사-에틸렌 글리콜 링커가 표준 방법에 따라 혼입된다 (예를 들어, [Williams, D.J., and K.B. Hall, Biochem. (1996) 35:14665-14670]). 특정 실시양태에서, 안티센스 가닥의 5'-말단 및 센스 가닥의 3'-말단이 헥사-에틸렌 글리콜 링커를 통해 화학적으로 연결된다. 또다른 실시양태에서, dsRNA의 1개 이상의 뉴클레오타이드가 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 기를 포함한다. dsRNA의 말단에서의 화학 결합은 삼중-나선 결합에 의해 일반적으로 형성된다. 표 1은 본 발명의 변형된 RNAi 작용제의 예를 제공한다.

<76> 또다른 실시양태에서, 2개의 단일 가닥 중 1개 또는 양쪽 모두에서의 뉴클레오타이드가 변형되어 세포 효소, 예를 들어, 비제한적으로, 특정 핵산분해효소의 분해 활성을 방지하거나 억제할 수 있다. 핵산에 대한 세포 효소의 분해 활성을 억제하기 위한 기술은 당업계에 공지되어 있고, 2'-아미노 변형, 2'-아미노 당 변형, 2'-F 당 변형, 2'-F 변형, 2'-알킬 당 변형, 전하를 띠지 않은 골격 변형, 모르폴리노 변형, 2'-O-메틸 변형, 및 포스포르아미데이트를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다 (예를 들어, [Wagner, Nat. Med. (1995) 1:1116-8] 참조). 따라서, dsRNA 상의 뉴클레오타이드의 1개 이상의 2'-히드록실 기가 화학 기, 일반적으로 2'-아미노 또는 2'-메틸

기로 대체될 수 있다. 또한, 1개 이상의 뉴클레오타이드가 변형되어 로킹된 뉴클레오타이드를 형성할 수 있다. 이 같은 로킹된 뉴클레오타이드는 리보스의 2'-산소를 리보스의 4'-탄소와 연결하는 메틸렌 다리를 함유한다. 로킹된 뉴클레오타이드를 함유하는 올리고뉴클레오타이드가 [Koshkin, A.A., et al., Tetrahedron (1998), 54: 3607-3630] 및 [Obika, S. et al., Tetrahedron Lett. (1998), 39: 5401-5404]에 기술되어 있다. 로킹된 뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드 내로의 도입은 상보적 서열에 대한 친화력을 개선하고, 용융 온도를 수 도만큼 증가시킨다 ([Braasch, D.A. and D.R. Corey, Chem. Biol. (2001), 8:1-7]).

<77> 리간드를 dsRNA에 접합하는 것은 이의 세포 흡수, 뿐만 아니라 특정 조직에 대한 표적화 또는 특정 유형의 세포 예컨대 질 상피에 의한 섭취를 증강시킬 수 있다. 특정 예에서, 소수성 리간드가 dsRNA에 접합되어, 세포 막의 직접적인 투과를 용이하게 한다. 별법적으로, dsRNA에 접합된 리간드는 수용체-매개 세포내이입에 대한 기질이다. 이러한 접근법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 뿐만 아니라 dsRNA 작용제의 세포 투과를 용이하게 하는데 사용되었다. 예를 들어, 콜레스테롤이 다양한 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 접합되어, 접합되지 않은 유사체와 비교하여 실질적으로 더욱 활성인 화합물이 초래되었다. [M. Manoharan Antisense & Nucleic Acid Drug Development 2002, 12, 103] 참조. 올리고뉴클레오타이드에 접합된 기타 친지성 화합물에는 1-피렌 부티르산, 1,3-비스-0-(헥사데실)글리세롤 및 메탄올이 포함된다. 수용체-매개 세포내이입을 위한 리간드의 한 예는 엽산이다. 엽산은 플레이트-수용체-매개 세포내이입에 의해 세포에 진입한다. 엽산을 보유하는 dsRNA 화합물은 플레이트-수용체-매개 세포내이입을 통해 세포 내로 효율적으로 운송될 것이다. [Li, S.; Deshmukh, H. M.; Huang, L. Pharm. Res. 1998, 15, 1540]에서 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 엽산을 부착하는 것으로 올리고뉴클레오타이드의 세포 섭취가 8배 증가하였음이 보고되었다. 올리고뉴클레오타이드에 접합된 기타 리간드에는 폴리에틸렌 글리콜, 탄수화물 클러스터(cluster), 가교제, 포르피린 접합체, 및 전달 펩티드가 포함된다.

<78> 특정 예에서, 양이온성 리간드를 올리고뉴클레오타이드에 접합시킴으로써 핵산분해효소에 대한 개선된 저항성이 초래된다. 양이온성 리간드의 대표적인 예는 프로필암모늄 및 디메틸프로필암모늄이다. 흥미롭게도, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 양이온성 리간드가 올리고뉴클레오타이드 전반에 걸쳐 분산되었을 때 mRNA에 대한 높은 결합 친화력을 유지하는 것으로 보고되었다. [M. Manoharan Antisense & Nucleic Acid Drug Development 2002, 12, 103] 및 이의 참조문헌 참조.

<79> 본 발명의 리간드-접합 dsRNA를 dsRNA 상에 연결 분자를 부착하는 것으로부터 유래된 것과 같은, 반응성의 펜던트(pendant) 관능기를 보유하는 dsRNA를 사용함으로써 합성할 수 있다. 이러한 반응성 올리고뉴클레오타이드는 시판되는 리간드, 임의의 다양한 보호기를 보유하는 합성된 리간드, 또는 연결 모이어티가 부착된 리간드와 직접적으로 반응될 수 있다. 본 발명의 방법은, 일부 바람직한 실시양태에서, 리간드와 적합하게 접합되었고 고체-지지체 재료에 추가로 부착될 수 있는 뉴클레오시드 단량체를 사용함으로써 리간드-접합 dsRNA의 합성을 용이하게 한다. 고체-지지체 재료에 임의로 부착된, 이같은 리간드-뉴클레오시드 접합체는 선택된 혈청-결합 리간드와 뉴클레오시드 또는 올리고뉴클레오타이드의 5' 위치 상에 있는 연결 모이어티의 반응을 통해 본 발명의 방법의 일부 바람직한 실시양태에 따라 제조된다. 일부 예에서, 먼저 단량체 빌딩 블록(building block)을 세공-제어 유리 지지체에 장쇄 아미노알킬 기를 통해 공유결합으로 부착한 후, 뉴클레오타이드를 고체 지지체에 결합된 단량체 빌딩 블록에 표준 고체-상 합성 기술을 통해 결합시킴으로써, 아르알킬 리간드가 dsRNA의 3'-말단에 부착된 dsRNA가 제조된다. 단량체 빌딩 블록은 뉴클레오시드 또는 고체-상 합성과 호환성인 기타 유기 화합물일 수 있다.

<80> 본 발명의 접합체에서 사용된 dsRNA는 고체-상 합성의 주지된 기술을 통해 편리하게, 그리고 일상적으로 제조될 수 있다. Applied Biosystems (Foster City, CA)가 예를 들어 포함되는 여러 판매원들이 이같은 합성을 위한 장치를 판매한다. 당업계에 공지된 이같은 합성을 위한 임의의 다른 수단들을 추가적으로 또는 별법적으로 사용할 수 있다. 유사한 기술을 사용하여 기타 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 포스포로티오에이트 및 알킬화 유도체를 제조하는 것이 또한 공지되어 있다.

<81> 특정 변형 올리고뉴클레오타이드의 합성에 관한 교시를 하기의 미국 특허에서 발견할 수 있다: 폴리아민이 접합된 올리고뉴클레오타이드에 관한 미국 특허 번호 5,138,045 및 5,218,105; 키랄(chiral) 인 결합이 있는 올리고뉴클레오타이드의 제조를 위한 단량체에 관한 미국 특허 번호 5,212,295; 골격이 변형된 올리고뉴클레오타이드에 관한 미국 특허 번호 5,378,825 및 5,541,307; 골격-변형 올리고뉴클레오타이드 및 환원성 커플링을 통한 이의 제조에 관한 미국 특허 번호 5,386,023; 3-데아자퓨린 고리 시스템을 기초로 하는 변형된 핵염기 및 이의 합성 방법에 관한 미국 특허 번호 5,457,191; N-2 치환 퓨린을 기초로 하는 변형된 핵염기에 관한 미국 특허 번호 5,459,255; 키랄 인 결합이 있는 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법에 관한 미국 특허 번호 5,521,302; 펩티드 핵산에 관한 미국 특허 번호 5,539,082; β -락탐 골격이 있는 올리고뉴클레오타이드에 관한 미국 특허 번호

5,554,746; 올리고뉴클레오타이드의 합성을 위한 방법 및 재료에 관한 미국 특허 번호 5,571,902; 알킬티오 기가 있고, 이때 이같은 기가 뉴클레오시드의 임의의 다양한 위치에서 부착된 다른 모이어티에 대한 링커로서 사용될 수 있는 뉴클레오시드에 관한 미국 특허 번호 5,578,718; 키랄 순도가 높은 포스포로티오에이트 결합이 있는 올리고뉴클레오타이드에 관한 미국 특허 번호 5,587,361 및 5,599,797; 2'-O-알킬 구아노신 및 관련 화합물 (2,6-디아미노퓨린 화합물 포함)의 제조 방법에 관한 미국 특허 번호 5,506,351; N-2 치환 퓨린이 있는 올리고뉴클레오타이드에 관한 미국 특허 번호 5,587,469; 3-테아자퓨린이 있는 올리고뉴클레오타이드에 관한 미국 특허 번호 5,587,470; 접합된 4'-데스메틸 뉴클레오시드 유사체에 관한 미국 특허 번호 5,223,168 및 미국 특허 번호 5,608,046; 골격-변형 올리고뉴클레오타이드 유사체에 관한 미국 특허 번호 5,602,240 및 5,610,289; 특허 2'-플루오로-올리고뉴클레오타이드의 합성에 관한 미국 특허 번호 6,262,241 및 5,459,255.

<82> 본 발명의 서열-특이적인 연결된 뉴클레오시드들을 보유하는 리간드-접합 dsRNA 및 리간드-분자에서, 올리고뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오시드를 적절한 DNA 합성기 상에서 표준 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드 전구체, 또는 연결 모이어티를 이미 보유하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드 접합체 전구체, 리간드 분자를 이미 보유하는 리간드-뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드-접합체 전구체, 또는 비-뉴클레오시드 리간드-보유 빌딩 블록을 사용하여 조립할 수 있다.

<83> 연결 모이어티를 이미 보유하는 뉴클레오타이드-접합체 전구체를 사용하는 경우, 서열-특이적인 연결된 뉴클레오시드들의 합성이 전형적으로 완료된 후, 리간드 분자가 연결 모이어티와 반응하여 리간드-접합 올리고뉴클레오타이드가 형성된다. 스테로이드, 비타민, 지질 및 리포터 분자와 같은 다양한 분자를 보유하는 올리고뉴클레오타이드 접합체가 이전에 기술되었다 ([Manoharan 등의 PCT 출원 WO 93/07883 참조). 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 또는 연결된 뉴클레오시드는 시판되고 올리고뉴클레오타이드 합성에서 일상적으로 사용되는 표준 포스포라미디트 및 비-표준 포스포라미디트에 더하여 리간드-뉴클레오시드 접합체로부터 유래된 포스포라미디트를 사용하여 자동 합성기에 의해 합성된다.

<84> 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오시드 내의 2'-O-메틸, 2'-O-에틸, 2'-O-프로필, 2'-O-알릴, 2'-O-아미노알킬 또는 2'-데옥시-2'-플루오로 기의 혼입은 올리고뉴클레오타이드에 증강된 혼성화 성질을 부여한다. 또한, 포스포로티오에이트 골격을 함유하는 올리고뉴클레오타이드는 핵산분해효소 안정성이 증강된다. 따라서, 본 발명의 관능화된, 연결된 뉴클레오시드는 포스포로티오에이트 골격 또는 2'-O-메틸, 2'-O-에틸, 2'-O-프로필, 2'-O-아미노알킬, 2'-O-알릴 또는 2'-데옥시-2'-플루오로 기 중 하나 또는 양쪽 모두를 포함하도록 증대될 수 있다. 당업계에 공지된 올리고뉴클레오타이드 변형 중 일부의 요약 목록을, 예를 들어, PCT 공보 WO 200370918에서 발견할 수 있다.

<85> 일부 실시양태에서, 5'-말단에 아미노 기가 있는 본 발명의 관능화된 뉴클레오시드 서열을 DNA 합성기를 사용하여 제조한 후, 선택된 리간드의 활성 에스테르 유도체와 반응시킨다. 활성 에스테르 유도체는 당업자에게 주지되어 있다. 대표적인 활성 에스테르에는 N-히드록숙신이미드 에스테르, 테트라플루오로페놀 에스테르, 펜타플루오로페놀 에스테르 및 펜타클로로페놀 에스테르가 포함된다. 아미노 기와 활성 에스테르의 반응으로 선택된 리간드가 5'-위치에 연결 기를 통해 부착된 올리고뉴클레오타이드가 생산된다. 5'-말단의 아미노 기는 5'-아미노-변형체 C6 시약을 사용하여 제조할 수 있다. 한 실시양태에서, 리간드-뉴클레오시드 포스포라미디트를 사용함으로써 리간드 분자를 5'-위치에서 올리고뉴클레오타이드에 접합시킬 수 있고, 이때 리간드는 5'-히드록시기에 직접적으로 또는 간접적으로 링커를 통해 연결된다. 이같은 리간드-뉴클레오시드 포스포라미디트가 자동 합성 절차의 끝에 전형적으로 사용되어, 5'-말단에 리간드를 보유하는 리간드-접합 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

<86> 변형된 뉴클레오시드간 연결 또는 골격의 예로는, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 기타 알킬 포스포네이트 (3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트 포함), 포스포네이트, 포스포라미데이트 (3'-아미노 포스포라미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트 포함), 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상적인 3'-5' 결합이 있는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결 유사체, 및 뉴클레오시드 단위의 인접한 쌍들이 3'-5' → 5'-3' 또는 2'-5' → 5'-2' 연결된, 극성이 역전된 것들이 포함된다. 다양한 염, 혼합 염 및 유리-산 형태가 또한 포함된다.

<87> 인 원자를 함유하는 상기 결합의 제조에 관한 대표적인 미국 특허에는 미국 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306;

5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 및 5,697,248가 포함되지만, 이에 한정되지 않고, 각각의 상기 특허는 거명에 의해 본원에 포함된다.

<88> 인 원자를 포함하지 않는 변형된 뉴클레오타이드간 결합 또는 골격 (즉, 올리고뉴클레오타이드)의 예는 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 당간(intersugar) 결합, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 시클로알킬 당간 결합, 또는 1개 이상의 단쇄 헤테로원자형 또는 헤테로고리형 당간 결합에 의해 형성된 골격을 갖는다. 이들은 모르폴리노 결합 (뉴클레오타이드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨); 실록산 골격; 술피드, 술폰사이드 및 술폰 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 술파메이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 골격; 술폰네이트 및 술폰아미드 골격; 아마이드 골격이 있는 것들; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분이 있는 기타 물질을 포함한다.

<89> 상기 올리고뉴클레오타이드의 제조에 관한 대표적인 미국 특허에는 미국 특허 번호 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 및 5,677,439가 포함되지만, 이에 한정되지 않고, 각각의 상기 특허는 거명에 의해 본원에 포함된다.

<90> 특정 예에서, 올리고뉴클레오타이드는 비-리간드 기에 의해 변형될 수 있다. 다수의 비-리간드 분자가 올리고뉴클레오타이드의 활성화, 세포 분포 또는 세포 섭취를 증강시키기 위해 올리고뉴클레오타이드에 접합되었고, 이같은 접합을 수행하기 위한 절차가 과학 문헌에서 입수가능하다. 이같은 비-리간드 모이어티는 지질 모이어티, 예컨대 콜레스테롤 ([Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553]), 담즙산 ([Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4: 1053]), 티오에테르, 예를 들어, 핵실-S-트리티티올 ([Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660:306]; [Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765]), 티오펜올레스테롤 ([Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533]), 지방족 사슬, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운테실 잔기 ([Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:111]; [Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327]; [Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49]), 인지질, 예를 들어, 디-핵사테실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-O-핵사테실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트 ([Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651]; [Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777]), 폴리아민 또는 폴리 에틸렌 글리콜 사슬 ([Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969]), 또는 아다만탄 아세트 산 ([Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651]), 팔미틸 모이어티 ([Mishra et al., Biochem. Biophys. Acta, 1995, 1264:229]), 또는 옥타데실아민 또는 핵실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 ([Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923])를 포함하였다. 이같은 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제조가 교시된 대표적인 미국 특허들이 상기에 열거되어 있다. 전형적인 접합 프로토콜은 서열의 1개 이상의 위치에 아미노링커를 보유하는 올리고뉴클레오타이드의 합성을 수반한다. 그후, 적합한 커플링 또는 활성화 시약을 사용하여 아미노 기를 접합될 분자와 반응시킨다. 고체 지지체에 여전히 지지된 올리고뉴클레오타이드로 또는 용액 상에서의 올리고뉴클레오타이드의 절단 후에 접합 반응이 수행될 수 있다. 전형적으로 HPLC에 의한 올리고뉴클레오타이드 접합체의 정제로 순수한 접합체가 산출된다. 콜레스테롤 접합체의 사용이 특히 선호되는데, 이같은 모이어티가 HPV 감염 부위인 질 상피 세포를 표적으로 하는 것을 증가시킬 수 있기 때문이다.

<91> 본 개시물은 HPV 표적 유전자를 침묵시키고 따라서 HPV 관련 장애를 치료하는데 유용한 dsRNA의 광범위한 실시양태를 기술한다. 특정 치료제의 디자인이 다양한 형태를 취할 수 있지만, 특정한 기능성 특징으로 바람직한 dsRNA가 다른 dsRNA로부터 구별될 것이다. 특히, 바람직한 본 발명의 dsRNA를 확인하기 위해 양호한 혈청 안정성, 높은 효능, 면역 응답 유도의 결여, 및 양호한 약물 유사 거동과 같은 양상들이 테스트될 것이다 (모두 당업자에 의해 측정가능함). 일부 상황에서, 바람직한 dsRNA에 이러한 기능적인 양상 모두가 존재하지는 않을 것이다. 그러나, 당업자는 이러한 변수 및 기타 변수를 최적화하여, 바람직한 본 발명의 화합물을 선택할 수 있다.

<92> 다수의 뉴클레오타이드 변형이 가능하지만, 본 발명가들은 현저하게 개선된 약리학적 이점, 면역학적 이점, 그리고 궁극적으로 치료적 이점을 제공하는 화학 변형의 패턴을 확인하였다. 표 9는 본 발명의 표 1, 표 5 및 표 7에서 제시된 듀플렉스 dsRNA와 함께 사용하는데 바람직한 화학 변형의 패턴을 제시한다. 일부 이러한 변형이 표 3에 또한 설명된다.

표 9

<93>

화학 변형 시리즈	센스 가닥에 이루어진 변형 (5'-3')	안티센스 가닥에 이루어진 변형 (5'-3')
1 (양쪽 가닥의 말단에서의 단일 포스포로티오에이트)	dTsdT	dTsdT
2 (양쪽 가닥의 말단에서의 단일 포스포로티오에이트 + 모든 피리미딘의 2'OMe 센스 가닥 변형 및 A가 이어지는 모든 U 및 A가 이어지는 모든 C의 2'OMe 변형)	dTsdT, 모든 Py에서 2'OMe	dTsdT, uA, cA에서 2'OMe
3 (양쪽 가닥의 말단에서의 단일 포스포로티오에이트 + 모든 피리미딘의 2'OMe 센스 가닥 변형 및 안티센스 가닥 상에서의 지시된 염기의 2'OMe: A가 이어지는 모든 U, A가 이어지는 모든 C A가 이어지는 모든 U, 및 A가 이어지는 모든 U)	dTsdT, 모든 Py에서 2'OMe	dTsdT, uA, cA, uG, uU에서 2'OMe
4 (센스 가닥에 접합된 콜레스테롤의 부가를 제외하고는 1과 동일)	Chol ("엑소")	dTsdT ("엑소")
5 (센스 가닥에 접합된 콜레스테롤을 제외하고는 2와 동일)	Chol ("엔도")	dTsdT, uA, cA에서 2'OMe
6 (센스 가닥에 접합된 콜레스테롤을 제외하고는 3과 동일)	Chol ("엔도")	dTsdT, uA, cA, uG, uU에서 2'OMe

<94>

백터에 코딩된 RNAi 작용제

<95>

본 발명의 dsRNA는 생체내에서 세포내에서 재조합 바이러스 백터로부터 또한 발현될 수 있다. 본 발명의 재조합 바이러스 백터는 본 발명의 dsRNA를 코딩하는 서열 및 dsRNA 서열을 발현시키기 위한 임의의 적절한 프로모터를 포함한다. 적절한 프로모터에는, 예를 들어, U6 또는 H1 RNA pol III 프로모터 서열 및 사이토메갈로바이러스 프로모터가 포함된다. 기타 적절한 프로모터의 선별은 당업계의 기술에 속한다. 본 발명의 재조합 바이러스 백터는 특정 조직 또는 특정 세포내 환경에서의 dsRNA의 발현을 위한 유도성 또는 조절가능 프로모터를 또한 포함할 수 있다. 본 발명의 dsRNA를 생체 내에서 세포에 전달하기 위해 재조합 바이러스 백터를 사용하는 것이 하기에 더욱 상세하게 논의된다.

<96>

본 발명의 dsRNA는 재조합 바이러스 백터로부터 2개의 별도의 상보적인 RNA 분자로서, 또는 2개의 상보적인 영역이 있는 단일 RNA 분자로서 발현될 수 있다.

<97>

발현될 dsRNA 분자(들)에 대한 코딩 서열을 받아들이 수 있는 임의의 바이러스 백터, 예를 들어 아데노바이러스 (AV); 아데노-관련 바이러스 (AAV); 레트로바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스 (LV), 람도바이러스, 뮤린 (murine) 백혈병 바이러스); 헤르페스 바이러스 등을 사용할 수 있다. 적합하다면, 다른 바이러스로부터의 외피 단백질 또는 다른 표면 항원으로 백터를 슈도타이핑(pseudotyping)함으로써 또는 다른 바이러스 캡시드 (capsid) 단백질로 치환함으로써 바이러스 백터의 향성(向性)을 변형시킬 수 있다.

<98>

예를 들어, 본 발명의 렌티바이러스 백터를 수포성 구내염 바이러스 (VSV), 광견병, 에볼라(Ebola), 모콜라 (Mokola) 등으로부터의 표면 단백질로 슈도타이핑할 수 있다. 상이한 캡시드 단백질 혈청형을 발현하도록 백터

를 조작함으로써 본 발명의 AAV 벡터를 상이한 세포를 표적으로 하도록 만들 수 있다. 예를 들어, 혈청형 2 게놈 상의 혈청형 2 캡시드를 발현하는 AAV 벡터는 AAV 2/2로 칭해진다. AAV 2/2 벡터 내의 이러한 혈청형 2 캡시드 유전자를 혈청형 5 캡시드 유전자로 대체하여 AAV 2/5 벡터를 생산할 수 있다. 상이한 캡시드 단백질 혈청형을 발현하는 AAV 벡터를 구축하는 기술은 당업계에 기술에 속한다; 예를 들어, 거명에 의해 전체 개시물이 본원에 포함된 [Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801] 참조.

<99> 본 발명에서 사용하기에 적절한 재조합 바이러스 벡터의 선택, dsRNA를 발현시기 위한 핵산 서열을 벡터 내로 삽입하는 방법, 및 바이러스 벡터를 당해 세포에 전달하는 방법은 당업계의 기술에 속한다. 예를 들어, 거명에 의해 전체 개시물이 본원에 포함된, [Dornburg R (1995), Gene Therap. 2: 301-310]; [Eglitis M A (1988), Biotechniques 6: 608-614]; [Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14]; [Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30]; 및 [Rubinson D A et al., Nat. Genet. 33: 401-406] 참조.

<100> 바람직한 바이러스 벡터는 AV 및 AAV로부터 유래된 것들이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 dsRNA는 U6 또는 H1 RNA 프로모터 중 하나, 또는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터를 예를 들어 포함하는 재조합 AAV 벡터로부터 2개의 별도의 상보적인 단일-가닥 RNA 분자로 발현된다.

<101> 본 발명의 dsRNA를 발현시키기 위한 적절한 AV 벡터, 재조합 AV 벡터를 구축하는 방법, 및 벡터를 표적 세포 내로 전달하는 방법이 [Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010]에 기술되어 있다.

<102> 본 발명의 dsRNA를 발현시키기 위한 적절한 AAV 벡터, 재조합 AV 벡터를 구축하는 방법, 및 벡터를 표적 세포 내로 전달하는 방법이 거명에 의해 전체 개시물이 본원에 포함된, [Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101]; [Fisher K J et al. (1996), J. Virol. 70: 520-532]; [Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826]; 미국 특허 번호 5,252,479; 미국 특허 번호 5,139,941; 국제 특허 출원 번호 WO 94/13788; 및 국제 특허 출원 번호 WO 93/24641에 기술되어 있다.

<103> III. dsRNA를 포함하는 제약 조성물

<104> 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 dsRNA 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. dsRNA를 포함하는 이러한 제약 조성물은 HPV 표적 유전자의 발현 또는 활성화와 관련된 질환 또는 장애, 예컨대 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스를 치료하는데 유용하다. 이같은 제약 조성물은 전달 방식을 기초로 제제화된다. 한 예는 자궁목에서의 국소 투여 또는 비경구 전달을 통한 전신 투여용으로 제제화된 조성물이다.

<105> 본 발명의 제약 조성물은 HPV 표적 유전자의 발현을 억제하는데 충분한 투여량으로 투여된다. 본 발명가들은 본 발명의 dsRNA를 포함하는 조성물들이, 이들의 개선된 효능으로 인해, 의외로 낮은 투여량으로 투여될 수 있다는 것을 결정하였다. 수용자의 체중 1 kg 당 5 mg dsRNA/일의 투여량이 HPV 표적 유전자의 발현을 억제 또는 저해하는데 충분하고, 사마귀 또는 자궁목 또는 항문 치료의 경우, 감염된 조직에 직접적으로 적용될 수 있다.

<106> 일반적으로, dsRNA의 적절한 용량은 수용자의 체중 1 kg 당 0.01 내지 5.0 mg/일의 범위, 일반적으로 체중 1 kg 당 1 µg 내지 1 mg/일의 범위일 것이다. 제약 조성물을 하루에 1번 투여할 수 있거나, 또는 dsRNA를 하루에 걸쳐 적합한 간격으로 2회, 3회 또는 더 많은 분할-용량으로 또는 심지어 질용(腔用) 젤의 제어 방출 제형을 통한 연속 주입 또는 전달을 사용하여 투여할 수 있다. 이러한 경우, 각각의 분할-용량 내에 함유된 dsRNA는 총 일일 투여량을 달성하기 위해 상응하여 더 적어야 한다. 수일 기간에 걸친 dsRNA의 지속 방출을 제공하는 통상적인 지속 방출 제형을 예를 들어 사용하는, 수일에 걸친 전달을 위해 투약 단위가 또한 배합될 수 있다. 지속 방출 제형은 당업계에 주지되어 있고, 본 발명의 작용제와 함께 사용될 수 있는 것과 같이 작용제의 질 전달에 특히 유용하다. 이러한 실시양태에서, 투약 단위는 일일 용량의 상응하는 배수를 함유한다.

<107> 당업자는 질환 또는 장애의 중증도, 이전의 치료, 대상의 일반적인 건강 및/또는 연령, 및 존재하는 기타 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는 특정 인자들이 대상을 효과적으로 치료하는데 필요한 투여량 및 시간조절에 영향을 미칠 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 치료적 유효량의 조성물로의 대상의 치료는 단일 치료 또는 일련의 치료를 포함할 수 있다. 본 발명에 포함되는 개별적인 dsRNA들에 대한 효과적인 투여량 및 생체내 반감기를 통상적인 방법을 사용하여 또는 본원의 다른 곳에 기술된 바와 같은 적합한 동물 모델을 사용하는 생체내 테스트를 기초로 추정할 수 있다.

<108> 본 발명가들은 HPV 유전자형의 변이성이 포함되는 다양한 이유로 인해, HPV 감염을 1가지를 초과하는 본 발명의 dsRNA로 동시에 치료하는 것이 바람직할 수 있다는 것을 인지한다. 한 실시양태에서, dsRNA의 가장 덜 복잡한 혼합물로 가장 광범위한 HPV 유전자형을 표적으로 하도록 dsRNA의 조합물이 선택된다. 1가지를 초과하는 유

형의 dsRNA를 포함하는 본 발명의 제약 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 개별적인 dsRNA의 투여량을 함유하는 것으로 예상될 것이다.

- <109> dsRNA의 조합물이 단일 투약 형태의 제약 조성물로 함께 제공될 수 있다. 별법적으로, dsRNA의 조합물이 별도의 투약 형태들로 제공될 수 있고, 이러한 경우 이들은, 가능하게는 상이한 수단에 의해, 동시에 또는 상이한 시점에 투여될 수 있다. 따라서 본 발명에서 본 발명의 dsRNA의 원하는 조합물을 포함하는 제약 조성물이 구현되고; 복합 요법의 일부분으로서 제공되도록 의도되는 단일 dsRNA의 제약 조성물이 또한 구현된다. 후자의 경우에, 복합 요법 발명은 이로 인해 조성물보다는 투여 방법이다.
- <110> 마우스 유전학에서의 진보로 다양한 인간 질환, 예컨대 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스의 연구를 위한 다수의 마우스 모델이 생성되었다. 이같은 모델은 dsRNA의 생체내 테스트, 뿐만 아니라 치료적 유효 용량의 결정에 사용된다.
- <111> 임의의 방법을 사용하여 본 발명의 dsRNA를 HPV로 감염된 세포를 함유하는 포유동물에게 투여할 수 있다. 예를 들어, 투여는 국소 투여 (예를 들어, 질, 경피 등); 경구 투여; 또는 비경구 투여 (예를 들어, 피하, 뇌실내, 근육내 또는 복강내 주사, 또는 정맥내 점적)일 수 있다. 투여는 급속 투여 (예를 들어, 주사)일 수 있거나, 또는 경시적으로 일어날 수 있다 (예를 들어, 저속 주입 또는 저속 방출 제형의 투여).
- <112> 전형적으로, HPV로 감염된 세포가 있는 포유동물을 치료하는 경우, dsRNA 분자는 질용 젤 또는 크림으로 국소적으로 투여된다. 예를 들어, 리포솜과 함께 또는 리포솜 없이 제제화된 dsRNA가 자궁목, 항문관 또는 HPV 병변 예컨대 생식기 사마귀에 직접 국소적으로 도포될 수 있다. 국소 투여를 위해, dsRNA 분자가 무균성 및 비-무균성의 수용액, 알콜과 같은 통상적인 용매 내의 비-수성 용액, 또는 액체 또는 고체 오일 베이스 내의 용액과 같은 조성물 내로 제제화될 수 있다. 이같은 용액은 완충제, 희석제, 및 기타 적절한 첨가물을 또한 함유할 수 있다. 국소 투여용 조성물은 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 점적액, 좌약, 스프레이, 액체, 및 분말의 형태로 제제화될 수 있다. 당업계에 공지된 중합체 및 투과제를 사용하여 젤 및 크림을 제제화할 수 있다. dsRNA 및 관련된 부형제를 함유하는 젤 또는 크림을 자궁목 캡, 질용 격막, 코팅된 콘돔, 글로브 등을 사용하여 자궁목에 도포할 수 있다. 통상적인 제약 담체, 수성 물질, 분말 또는 오일 베이스, 증점제 등을 첨가할 수 있다.
- <113> 비경구, 경막내 또는 뇌실내 투여를 위해, dsRNA 분자가 무균성 수용액과 같은 조성물 내로 제제화될 수 있고, 이는 완충제, 희석제 및 기타 적절한 첨가제 (예를 들어, 투과 증강제, 담체 화합물, 및 기타 제약상 허용가능한 담체)를 또한 함유할 수 있다.
- <114> 또한, 미국 특허 번호 6,271,359에 예를 들어 기술된 생물학적 또는 비생물학적 수단과 같은 비-바이러스성 방법을 사용하여 dsRNA 분자를 HPV-감염 세포를 함유하는 포유동물에게 투여할 수 있다. 비생물학적 전달은 (1) 리포솜에 본원에서 제공된 dsRNA를 로딩하는 것 및 (2) dsRNA 분자와 지질 또는 리포솜이 복합체를 형성하도록 하여 핵산-지질 또는 핵산-리포솜 복합체를 형성시키는 것을 비제한적으로 포함하는 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다. 리포솜은 시험관 내에서 세포를 형질감염시키는데 통상적으로 사용되는 양이온성 및 중성 지질로 구성될 수 있다. 양이온성 지질은 음성 전하를 띠는 핵산과 복합체를 형성하여 (예를 들어, 전하-회합되어), 리포솜을 형성할 수 있다. 양이온성 리포솜의 예로는 리포펙틴, 리포펙타민, 리포펙테이스, DOTAP (1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판), DOTMA (N-[1,2(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드), DOSPA (2,3-디올레오일옥시-N-[2-(스페르민카르복사미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄), DOGS (디옥타데실아미도 글리실 스페르민), 및 DC-cholesterol (3,[N-N',N-디메틸에틸렌디아민]-카르바모일)콜레스테롤이 비제한적으로 포함된다.
- <115> 리포솜의 형성 절차는 당업계에 주지되어 있다. 리포솜 조성물은, 예를 들어, 포스파티딜콜린, 디미리스토일 포스파티딜콜린, 디팔미토일 포스파티딜콜린, 디미리스토일 포스파티딜글리세롤, 또는 디올레오일 포스파티딜에탄올아민으로부터 형성될 수 있다. 리포펙틴(Lipofectin).RTM. (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Calif.) 및 이펙텐(Effectene).TM. (Qiagen, Valencia, Calif.)을 포함하여 수많은 친지성 작용제가 시판된다. 또한, 각각 DOPE 또는 콜레스테롤과 같은 중성 지질과 혼합될 수 있는 DDAB 또는 DOTAP와 같은 시판되는 양이온성 지질을 사용하여 전신 전달 방법을 최적화할 수 있다. 일부 경우에, [Templeton et al., Nature Biotechnology, 15: 647-652 (1997)]에 기술된 것과 같은 리포솜을 사용할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 폴리에틸렌아민과 같은 다가양이온을 사용하여 생체내 및 생체외 전달을 달성할 수 있다 ([Boletta et al., J. Am Soc. Nephrol. 7: 1728 (1996)]). 핵산을 전달하기 위한 리포솜의 사용에 관한 추가적인 정보를 미국 특허 번호 6,271,359, PCT 공보 WO 96/40964 및 [Morrissey, D. et al. 2005. Nat Biotechnol. 23(8): 1002-7]에서

발견할 수 있다.

- <116> HPV-감염 세포를 함유하는 포유동물에게 dsRNA 분자를 전달하는 또다른 비-바이러스성 방법은 리포플렉스 (lipoplex) 및 나노에멀션과 같은 양이온성 지질-기반 전달 시스템을 포함한다 (리포솜에 더하여). 추가적으로, 키토산, 폴리(L-라이신) (PLL), 폴리에틸렌이민 (PEI), 덴드리머(dendrimer) (예를 들어, 폴리아미도아민 (PANAM) 덴드리머), 및 폴록사민을 포함하지만 이에 한정되지 않는 축합성 중합체 전달 시스템 (즉, DNA-중합체 복합체, 또는 "폴리플렉스(polyplex)")을 사용할 수 있다. 추가적으로, 폴록사머(poloxamer), 젤라틴, PLGA (폴리락트산-코-글리콜산), PVP (폴리비닐피롤리돈), 및 PVA (폴리비닐 알콜)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 비-축합성 중합체 전달 시스템을 사용할 수 있다.
- <117> 상기 언급된 전달 또는 투여 기술을 위한 절차는 당업계에 주지되어 있다. 예를 들어, 축합성 중합체 전달 시스템은 음이온성 DNA 분자와 용이하게 복합체를 형성함으로써 작용한다; 예를 들어, 폴리(L-라이신) (PLL)은 음성 전하를 띠는 세포 표면과 상호작용하는 양성 전하를 띠는 복합체를 형성하고, 이어서 급속한 내재화를 겪음으로써 작용한다.
- <118> 생물학적 전달은 바이러스 벡터의 사용을 비제한적으로 포함하는 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스 및 헤르페스바이러스 벡터)를 사용하여 dsRNA 분자를 피부 세포 및 자궁목 세포에 전달할 수 있다. 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 본원에서 제공된 하나 이상의 dsRNA를 핵산을 세포에 전달하도록 이전에 개발된 다수의 상이한 바이러스 벡터들 중 하나 내로 도입할 수 있다. 이러한 생성된 바이러스 벡터를 사용하여, 예를 들어, 감염에 의해, 하나 이상의 dsRNA를 세포에 전달할 수 있다.
- <119> 본 발명의 dsRNA는 제약상 허용가능한 담체 또는 희석제 내에 제제화될 수 있다. "제약상 허용가능한 담체" (본원에서 "부형제"로 또한 지칭됨)는 제약상 허용가능한 용매, 현탁제, 또는 약리학적으로 불활성인 임의의 기타 비히클이다. 제약상 허용가능한 담체는 액체 또는 고체일 수 있고, 원하는 체적, 조도, 및 기타 관련된 운송 및 화학 성질을 제공하도록 의도되는 계획된 투여 방식에 따라 선택될 수 있다. 전형적인 제약상 허용가능한 담체에는, 예를 들어, 물; 염수 용액; 결합제 (예를 들어, 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제 (예를 들어, 락토스 및 기타 당, 젤라틴, 또는 황산칼슘; 윤활제 (예를 들어, 전분, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 아세트산나트륨); 붕해제 (예를 들어, 전분 또는 소듐 전분 글리콜레이트); 및 습윤화제 (예를 들어, 소듐 라우릴 술페이트)가 비제한적으로 포함된다.
- <120> 또한, HPV 표적 유전자를 표적으로 하는 dsRNA는 다른 분자, 분자 구조물, 또는 핵산 혼합물과 부가혼합되거나, 이들로 캡슐화되거나, 이들과 접합되거나, 또는 또다른 방식으로 이들과 회합된 dsRNA를 함유하는 조성물 내로 제제화될 수 있다. 예를 들어, E6AP 유전자를 표적으로 하는 하나 이상의 dsRNA 작용제를 함유하는 조성물이 또다른 치료제 예컨대 항-염증 약물 (예를 들어, 비-스테로이드성 항-염증 약물 및 코르티코스테로이드) 및 항-바이러스 약물 (예를 들어, 리비비린, 빈다라빈, 아시클로비르, 및 간시클로비르)를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 각질용해제와 조합된 HPV 표적 유전자에 상보적인 서열이 있는 하나 이상의 dsRNA를 함유할 수 있다. 각질용해제는 표피의 각질층을 분리하거나 느슨하게 하는 작용제이다. 각질용해제의 예로는 살리실산이 비제한적으로 포함된다. 기타 예가 미국 특허 번호 5,543,417에서 제공된다. 각질용해제는 예를 들어, 피부와 같은 조직 내로의 dsRNA의 투과를 증강시키는데 효과적인 양으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 각질용해제는 생식기 사마귀에 도포된 dsRNA가 사마귀의 도처를 투과하도록 하는 양으로 사용될 수 있다.
- <121> 예를 들어, LD50 (집단의 50%에 치사성인 용량) 및 ED50 (집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량)을 결정하기 위해, 이같은 화합물의 독성 및 치료 효능을 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 제약 절차에 의해 결정할 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비율이 치료 지수이고, 이는 LD50/ED50의 비율로 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 화합물이 선호된다.
- <122> 세포 배양 분석법 및 동물 연구로부터 수득된 데이터를 인간에서 사용하기 위한 투여량의 범위를 제제화하는데 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물의 투여량은 독성이 거의 없거나 없는 ED50을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 존재한다. 투여량은 사용된 투약 형태 및 이용된 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에서 변할 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용된 임의의 화합물에 대해, 세포 배양 분석법으로부터 초기에 치료적 유효 용량을 추정할 수 있다. 세포 배양물에서 결정된 바와 같은 IC50 (즉, 증상의 절반-최대 억제를 달성하는 테스트 화합물의 농도)을 포함하는, 화합물 또는 적합한 경우 표적 서열의 폴리펩티드 생성물의 순환 혈장 농도 범위를 달성하도록 동물 모델에서 용량이 제제화될 수 있다 (예를 들어, 폴리펩티드의 감소되는 농도를 달성). 인간에서의 유용한 용량을 더욱 정확하게 결정하는데 이같은 정보를 사용할 수 있다. 혈장에서의 수준을, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정할 수 있다.

- <123> 상기 논의된 바와 같은 개별적인 투여 또는 복수로서의 투여에 더하여, 본 발명의 dsRNA는 HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스의 치료에 효과적인 또다른 공지된 작용제와 조합되어 투여될 수 있다. 임의의 사례에서, 투여 의사는 당업계에 공지되었거나 본원에 기술된 효능의 표준 수단을 사용하여 관찰된 결과를 기초로 dsRNA의 투여량 및 투여 시기를 조정할 수 있다.
- <124> dsRNA의 조합물을 바람직한 단일 dsRNA의 확인에 사용된 것과 동일한 방법을 사용하여 시험관내에서 및 생체내에서 테스트할 수 있다. 이같은 조합물을 순수하게 생물정보학 근거를 기초로 하여 선택할 수 있고, 이때 가장 광범위한 유전자형에 걸친 적용범위를 제공하는 최소 개수의 siRNA가 선택된다. 별법적으로, 이같은 조합물을 단일 dsRNA 작용제에 대해 본원에서 기술된 것들의 방침을 따라 시험관내 또는 생체내 평가를 기초로 선택할 수 있다. dsRNA의 조합물을 테스트하기 위한 바람직한 분석법은 HPV16 양성 암 세포주 (예를 들어, [Hengstermann et al. (2005) Journal Vir. 79(14): 9296]; 및 [Butz et al. (2003) Oncogene 22: 5938]에 예를 들어 기술된 바와 같은 SiHa 또는 Caski), 또는 [Jeon et al. (1995) Journal Vir. 69(5):2989]에 예를 들어 기술된 바와 같은 기관형적 배양 시스템에서 siRNA 매개 HPV 표적 녹다운(knockdown)의 표현형 결과를 평가하는 것이다.
- <125> 본 발명가들은 HPV 감염을 치료하는데 사용될 수 있는 dsRNA의 특정한 바람직한 조합물을 확인하였다. 가장 일반적인 관점에서, dsRNA의 조합물은 표 1, 표 3, 표 5 및 표 7로부터 선택된 1가지를 초과하는 dsRNA를 포함한다. 따라서, 조합 요법에서의 표 1, 표 3, 표 5 및 표 7에서 선택된 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상의 dsRNA 듀플렉스의 용도가 본 발명에서 구현된다. 원칙적으로, 치료용 생성물의 단순성을 위해 최소 개수의 dsRNA가 바람직하다. 이는 가장 큰 개수의 해롭거나 잠재적으로 해로운 HPV 유전자형에 적용될 dsRNA가 선별되도록 하고, 실제로는 모든 이같은 HPV 유전자형에 반드시 적용되지는 않는 조합물의 선택을 정당화할 수 있다.
- <126> 하기의 dsRNA가 조합에 특히 적용가능하다:
- <127> **E1으로부터:** ND-9072; ND-9142; ND-9092; ND-9162; ND-9097; ND-9167; ND-9066; ND-9123; AL-DP-8082; AL-DP-8095;
- <128> **E6으로부터:** ND-8903; ND-8991; ND-8914; ND-9002; ND-8906; ND-8994; ND-8943; ND-9031; ND-9032; ND-8920; ND-8952; ND-8951; ND-9008; ND-9040; ND-9039; AL-DP-7783; AL-DP-7784;
- <129> **E6AP로부터:** AL-DP-7365; AL-DP-7371; AL-DP-7499; AL-DP-7545; AL-DP-7492; AL-DP-7473; AL-DP-7478; AL-DP-7554; AL-DP-7514; AL-DP-7397, ND-9300.
- <130> **HPV 감염에 의해 야기된 질환을 치료하는 방법**
- <131> 본원에 기술된 방법 및 조성물을 임상 또는 무증상(sub-clinical) 유두종바이러스 감염의 결과일 수 있는, 인간 유두종바이러스에 의해 야기된 질환 및 용태를 치료하는데 사용할 수 있다. 본원에서 때때로 "HPV 관련 장애" 또는 "HPV 감염에 의해 매개되는 병리학적 프로세스"로 칭해지는 이같은 질환 및 용태에는, 예를 들어, 상피 악성종양, 피부 암 (비-흑색종 또는 흑색종), 항문-생식기 악성종양 예컨대 자궁경부암, HPV 관련 전암성 병변 (LSIL 또는 HSIL 자궁목 조직 포함), 항문 암종, 악성 병변, 양성 병변, 유두종 암종, 유두선 낭종, 유두종 뉴로패티쿰(papilloma neuropathicum), 유두종증, 피부 및 점막 유두종, 콘딜로마, 섬유모세포성 종양, 및 유두종 바이러스와 관련된 기타 병리학적 용태가 포함된다.
- <132> 예를 들어, 본원에 기술된 조성물은 HPV에 의해 야기된 사마귀를 치료하는데 사용될 수 있다. 이같은 사마귀에는, 예를 들어, 보통 사마귀 (심상성 사마귀), 예를 들어, 손바닥, 발바닥, 및 손발톱주위 사마귀; 편평 및 실모양 사마귀; 항문, 구강, 인두, 후두 및 혀 유두종; 및 HPV 감염의 가장 심각한 징후 중 하나인, 생식기 사마귀로 또한 공지된 성병성 사마귀 (침형 콘딜로마) (예를 들어, 음경, 외음부, 질 및 자궁목 사마귀)가 포함된다. HPV DNA는 자궁목 상피내종양의 모든 등급 (CIN I-III)에서 발견될 수 있고, HPV 유형의 특정 부분 집합이 자궁목의 상피내 암종에서 발견될 수 있다. 결과적으로, 특정 HPV 유형을 함유하는, 생식기 사마귀가 있는 여성은 자궁경부암이 발달될 위험이 높은 것으로 간주된다.
- <133> 유두종바이러스 감염과 관련된 가장 일반적인 질환은 양성 피부 사마귀, 또는 보통 사마귀이다. 보통 사마귀는 일반적으로 HPV 유형 1, 2, 3, 4 또는 10을 함유한다. 유두종바이러스에 의해 야기되는 기타 용태에는, 예를 들어, 후두의 양성 상피 종양인 후두 유두종이 포함된다. HPV-6 및 HPV-11의 2가지 유두종바이러스 유형이 후두 유두종과 가장 일반적으로 관련된다. 본원에 기술된 조성물을 이러한 질환 및 용태를 치료하는데 사용할 수 있다.
- <134> 본원에 기술된 조성물을 작은 불그스름한 반점으로 나타나는 파종성 편평 사마귀를 특징으로 하는 유전학적으로

유전되는 희귀 질환인 사마귀 표피형성이상 (EV)의 치료에서 또한 사용할 수 있다.

- <135> 또한, 본원에 기술된 조성물을 HPV가 병인 작용제인 세포 형질전환으로부터 초래된 병변을 치료하는데, 예를 들어, 자궁경부암의 치료에서 사용할 수 있다.
- <136> 본원에 기술된 조성물은 HPV-유도 형성이상, 예를 들어, 음경, 외음부, 자궁목, 질, 구강, 항문, 및 인두 형성이상의 치료, 및 HPV-유도 암, 예를 들어, 음경, 외음부, 자궁목, 질, 항문, 구강, 인두 및 두경부 암의 치료에서 또한 사용될 수 있다.
- <137> 특정 dsRNA를 또다른 항암 화학요법제, 예컨대 임의의 통상적인 화학요법제와 조합하여 포함함으로써 본 발명이 또한 실행될 수 있다. 특정 결합제와 이같은 기타 작용제의 조합물은 화학요법 프로토콜의 약효를 증가시킬 수 있다. 수많은 화학요법 프로토콜이 본 발명의 방법 내로 혼입될 수 있는 것으로 당업자에게 인지될 것이다. 알킬화제, 항대사물질, 호르몬 및 길항제, 방사성동위원소, 뿐만 아니라 천연 생성물이 포함되는 임의의 화학요법제를 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물이 항생제 예컨대 독소루비신 및 기타 안트라사이클린 유사체, 질소 머스타드 예컨대 시클로포스파미드, 피리딘 유사체 예컨대 5-플루오로우라실, 시스플라틴, 히드록시우레아, 탁솔 및 이의 천연 및 합성 유도체 등과 함께 투여될 수 있다. 또다른 예로서, 혼합 종양, 예컨대 유방의 선암종 (종양이 고나도프로핀-의존적 및 고나도프로핀-비의존적 세포를 포함함)의 경우에 화합물을 류프롤리드 또는 고세렐린 (LH-RH의 합성 펩티드 유사체)과 함께 투여할 수 있다. 또다른 항신생물성 프로토콜은 테트라사이클린 화합물을 본원에서 "보조 항신생물성 양식"으로 또한 지칭되는 또다른 치료 양식, 예를 들어, 수술, 방사선조사 등과 함께 사용하는 것을 포함한다. 따라서, 본 발명의 방법은 부작용을 감소시키고 효능을 증강시키는 이점을 지니면서 이같은 통상적인 요법과 함께 사용될 수 있다.
- <138> 추가적인 별법에서, E6AP를 표적으로 하는 dsRNA를 신경 및 행동 장애를 치료하는데 사용할 수 있다. 앙겔만 (Angelman) 증후군 환자에서의 E6AP 돌연변이의 확인을 통해 E6AP가 신경 및 행동 장애에 연루되었다. 앙겔만 증후군 (AS)은 정신 지체, 언어 장애, 과도한 웃음, 발작, 운동실조, 및 특징적인 EEG 패턴을 특징으로 하는 각인형 신경행동 장애이다. ([Hitchins, M.P. et al. 2004. Am J Med Genet A. 125(2): 167-72].) 아마도, 이같은 용태를 유도하는 것은 치료의 목적이 아닐 것이다; 그보다는, 다수의 유전적 결함에서 관찰되는 바와 같이, E6AP가 신경 및 행동 용태에서 중요한 역할을 한다는 이러한 증거는 이러한 표적이 인간 병리학에서 다양한 역할을 할 수 있고, E6AP의 침묵이 다른 생화학적 결함 또는 질환을 보상할 이러한 클래스 내의 다른 질환에 대한 적절한 표적일 것 같다는 것을 또한 가리킨다. 본원에서 사용된 "E6AP 관련 장애"는 상기 언급된 HPV 관련 장애 및 기타 신경 및 행동 장애를 포함한다.
- <139> E6AP 유전자의 발현을 억제하는 방법
- <140> 또다른 양상에서, 본 발명은 포유동물에서 E6AP 유전자의 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 이 방법은 표적 E6AP 유전자의 발현이 침묵되도록 본 발명의 표 1의 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 이같은 본 발명의 dsRNA는, 높은 특이성으로 인해, 표적 E6AP 유전자의 RNA (1차 RNA 또는 프로세싱된 RNA)를 특이적으로 표적으로 한다. 이같은 dsRNA를 사용하여 이러한 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 조성물 및 방법은 본원의 다른 곳에서 기술된 바와 같이 수행될 수 있다.
- <141> 한 실시양태에서, 이 방법은 dsRNA를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하고, 이때 dsRNA는 치료될 포유동물의 E6AP 유전자의 RNA 전사물의 적어도 일부분에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 치료될 생물이 인간과 같은 포유동물인 경우, 조성물은 경구 또는 비경구 경로 (정맥내, 근육내, 피하, 경피, 기도 (에어로졸), 비강, 직장, 질 및 국소 (볼 및 설하 포함) 투여 포함)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 조성물은 국소/질 투여에 의해 또는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다.
- <142> 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어의 의미는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일하다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 방법 및 물질을 본 발명의 실행 또는 테스트에서 사용할 수 있지만, 적절한 방법 및 물질이 하기에 기술된다. 본원에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 기타 참조문헌은 전체적으로 거명에 의해 포함된다. 상충되는 경우, 본 명세서 (정의 포함)가 통제할 것이다. 또한, 물질, 방법 및 예는 오직 설명적인 것이고, 한정되는 것으로 의도되지 않는다.

실시예

- <143> E6AP 유전자의 유전자 워킹(walking)

- <144> siRNA 디자인을 수행하여 인간 유비퀴틴 단백질 리가아제 E3A (ube3A, E6AP로 또한 공지됨)를 표적으로 하는 siRNA를 확인하였다. 상이한 이소형을 나타내는 E6AP에 대한 인간 mRNA 서열 (NM_130838.1, NMJ30839.1, NM_000462.2)을 사용하였다.
- <145> BioEdit 소프트웨어의 ClustalW 다중 정렬 함수 (Thompson J.D., et al., Nucleic Acids Res. 1994, 22:467-3)]를 모든 인간 E6AP 이소형과 함께 사용하여, mRNA 서열 NM_130838.1을 가장 짧은 서열로 확인하였고, 뿐만 아니라 모든 E6AP 이소형의 효율적인 표적화에 대한 필수 조건인, 기준 서열의 위치 5에서 4491 (말단 위치)까지의 서열 보존을 확증하였다.
- <146> E6AP 기준 서열 NM_130838.1에 스페닝(spanning)된 모든 가능한 중첩되는 19량체 (siRNA 센스 가닥 서열을 나타냄)를 확인하여, 4473개의 19량체 후보물 서열이 초래되었다. 조합되어, 이러한 후보 표적 서열이 E6AP mRNA의 5'UTR, 코딩 및 3'UTR 도메인, 및 이러한 도메인들의 접합점 부위를 커버한다.
- <147> 후보물들의 풀에서 siRNA들의 순위를 매겨 선택하기 위해, 관련이 없는 표적과 상호작용하는 것에 대한 예상된 잠재력 (오프(off)-표적 잠재력)을 순위매김 파라미터로 취하였다. 오프-표적 잠재력이 낮은 siRNA가 바람직한 것으로 정의되었고, 생체 내에서 더욱 특이적인 것으로 가정되었다.
- <148> siRNA-특이적 오프-표적 잠재력을 예상하기 위해, 하기와 같이 가정하였다:
- <149> 1) 가닥의 위치 2 내지 9 (5' → 3'으로 계수) (종자 영역) 내의 표적 유전자에 대한 상보성이 이러한 가닥과 표적 유전자로부터 전사된 mRNA의 상호작용 및 이어지는 하향조절에 충분할 수 있다 ([Jackson AL, et al. Nat Biotechnol. 2003 Jun;21(6):635-7])
- <150> 2) 각각의 가닥의 위치 1 및 19는 오프-표적 상호작용에 관련되지 않는다
- <151> 3) 종자 영역은 나머지 서열보다 오프-표적 잠재력에 더욱 기여할 수 있다
- <152> 4) 가닥의 절단 부위 영역 위치 10 및 11 (5' → 3'으로 계수)은 절단 부위에 3'인 서열 (비-종자 영역)보다 오프-표적 잠재력에 더욱 기여할 수 있지만, 종자 영역만큼은 아니다
- <153> 5) 가정 1 내지 4를 고려하면서 유전자의 서열에 대한 siRNA 가닥 서열의 상보성 및 미스매치의 위치를 기초로, 오프-표적 점수를 각각의 유전자 및 각각의 가닥에 대해 계산할 수 있다
- <154> 6) 도입된 내부 변형에 의한 센스 가닥 활성의 잠재적인 불발을 가정하여, 안티센스 가닥의 오프-표적 잠재력만이 관련될 것이다
- <155> 7) 본 발명가들의 기준에 따라 가장 높은 상동성을 나타내는 유전자 (최상의 오프-표적 유전자)로부터 siRNA의 오프-표적 잠재력이 추리될 수 있고, 따라서 각각의 유전자의 오프-표적 점수로 표현될 수 있다
- <156> 잠재적인 오프-표적 유전자를 확인하기 위해, 공개적으로 입수가능한 인간 mRNA 서열에 대한 상동성 검색에 19량체 안티센스 서열을 적용하였다. 이러한 목적을 위해, fastA (버전 3.4) 검색을 인간 RefSeq 데이터베이스에 대해 모든 19량체 후보물 안티센스 서열로 수행하였다. 펄(perl) 스크립트를 사용하여 후보물 19량체 서열로부터 안티센스 서열을 생성시켰다 (펄 스크립트 2). 19량체의 전장에 걸친 상동성을 고려하고 다음 단계에서의 스크립트 분석에 적절한 출력을 포맷하기 위하여 파라미터/값 쌍 -g 30 -f 30 -L -i -H로 fastA 검색을 실행하였다. 검색으로 후보물 siRNA에 대한 잠재적인 오프-표적 유전자의 목록이 생성되었다.
- <157> 추가로, 19량체 센스 가닥 서열과 동일한 8개를 초과하는 인접한 핵염기로의 데이터베이스 입력이 완전한 19량체 길이의 상동성을 나타내면서 아마도 fastA 출력 파일로 전송될 수 있도록 하기 위하여 -E 15000 값으로 fastA 검색 파라미터를 적용하였다 (가정 1 참조).
- <158> 최상의 오프-표적 유전자 및 이의 오프-표적 점수를 확인하기 위해, fastA 출력 파일을 분석하였다. 각각의 19량체 입력 서열에 대한 하기의 오프-표적 성질을 각각의 잠재적인 오프-표적 유전자에 대해 추론하였다:
- <159> 종자 영역 내의 미스매치의 개수
- <160> 비-종자 영역 내의 미스매치의 개수
- <161> 절단 부위 영역 내의 미스매치의 개수
- <162> 각각의 오프-표적 유전자에 대한 오프-표적 점수를 하기와 같이 계산하였다:

28	AAACUUAACUCUGGUCUGGCUAA	184	AGCCAGACCCAGUAUAUGTT	340	AL-DP-7470
29	AAAUUUAUACUCUCGAGUA	185	GAUCUCGAGUAUAUAUUTT	341	AL-DP-7406
30	AAACUUUUCGAGCUUGGGA	186	UCCCAAGUCAGAAAGUUTT	342	AL-DP-7382
31	AAAAUUAAGACGUAACAUA	187	UAGGUCAGUCUAUAUUTT	343	AL-DP-7547
32	AAUGAUAAGGAGUUCUGGAA	188	UCCCAAGUCCUAUAUUTT	344	AL-DP-7490
33	AAUAGCAUAUUAACAUAUA	189	AUUUUGUAUAUAUAUUTT	345	AL-DP-7493
34	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	190	UUAUAUAUAUAUAUAUUTT	346	AL-DP-7529
35	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	191	UUAUAUAUAUAUAUAUUTT	347	AL-DP-7400
36	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	192	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	348	AL-DP-7391
37	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	193	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	349	AL-DP-7393
38	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	194	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	350	AL-DP-7511
39	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	195	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	351	AL-DP-7454
40	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	196	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	352	AL-DP-7450
41	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	197	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	353	AL-DP-7533
42	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	198	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	354	AL-DP-7485
43	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	199	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	355	AL-DP-7495
44	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	200	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	356	AL-DP-7456
45	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	201	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	357	AL-DP-7538
46	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	202	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	358	AL-DP-7377
47	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	203	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	359	AL-DP-7405
48	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	204	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	360	AL-DP-7392
49	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	205	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	361	AL-DP-7453
50	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	206	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	362	AL-DP-7366
51	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	207	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	363	AL-DP-7534
52	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	208	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	364	AL-DP-7401
53	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	209	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	365	AL-DP-7523
54	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	210	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	366	AL-DP-7555
55	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	211	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	367	AL-DP-7536
56	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	212	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	368	AL-DP-7371
57	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	213	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	369	AL-DP-7372
58	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	214	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	370	AL-DP-7370
59	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	215	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	371	AL-DP-7474
60	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	216	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	372	AL-DP-7452
61	AAUUAUUCUGGCUAGAGUA	217	AAUUAUAUAUAUAUAUUTT	373	AL-DP-7498

AAAGACGAGAUCCACUGUCAA	62	GAACGAGAUCCACUGUCATT	218	GAACGAGAUCCACUGUCATT	374	AL-DE-7551
AAUUAUCUAGUACAUUCUCAA	63	UAUUCUAGUACAUUCUCAA	219	UGAGAUUGUAGUACAUUATT	375	AL-DE-7552
AAACAUUCUAUAGACGUCACA	64	GCAUUCUAUAGACGUCATT	220	GUAGGUCUAUUGAGUAGUATT	376	AL-DE-7504
AAUCGAAUUCUAGUAGAUUAA	65	UCGAAUUCUAGUAGAUUATT	221	AUCAUUCACUAGAUUUGATT	377	AL-DE-7467
AAAGUCGAAUUCUAGUAGUAA	66	AGUCGAAUUCUAGUAGUATT	222	CAUUCACUAGAUUUGACUATT	378	AL-DE-7463
AAAGAAAGGCGUAGAUUGAUAA	67	GAAGGCGUAGAUUGAUUATT	223	AUCAAUUCUAGGCGUUCATT	379	AL-DE-7399
AAAGGCGCGUAGAUUGAUUAA	68	AAAGGCGCGUAGAUUGAUUATT	224	AAUCAUUCUAGGCGUUCATT	380	AL-DE-7501
AAAGGCGCGUAGAUUGAUUAA	69	AGGCGCGUAGAUUGAUUATT	225	AAAUCAUUCUAGGCGUUCATT	381	AL-DE-7385
AAAGCAUUAUAGAACGCUAAA	70	AGCAUUAUAGAACGCUAATT	226	UAGCGUCUAUUGAGUAGUATT	382	AL-DE-7480
AAACAAGCGUAGACGACGCUAAA	71	CAAAAGCGUAGACGACGCUAATT	227	UAGCGUCUAUUGAGUAGUATT	383	AL-DE-7528
AAACAUUGUUGUACACGAAAA	72	CCAUUGUUGUACACGAAATT	228	UUCUUGUAGACACGACGCUATT	384	AL-DE-7535
AAAGAAAGGCGCUAGAUUGAAA	73	AGAAAGGCGCUAGAUUGAATT	229	UCAAUUCUAGGCGCUUUCUATT	385	AL-DE-7403
AAAAAGCGUACACGACGCUUAA	74	AAGCGUACACGACGCUUATT	230	AAUGUGUGUAGUAGGCUATT	386	AL-DE-7380
AAAGCGUAGAUUGAUUUAAAA	75	GCGUAGAUUGAUUUAAAAATT	231	UUAAAUCAUUCUAGGCGUATT	387	AL-DE-7364
AAACGCGUAGAUUGAUUUAAAA	76	GCGUAGAUUGAUUGAUUATT	232	UGCAACACUAGACGUGCUATT	388	AL-DE-7465
AAACGCGUAGAUUGAUUUAAAA	77	GAUAGUUGUCCAGUACAAATT	233	UUUGUAGUGGACACUACUATT	389	AL-DE-7518
AAAGUAGUUGUCCAGUACAAAA	78	UUUGCGUAGAUUGUACAAATT	234	UGUAACAUUUCACGCAATT	390	AL-DE-7464
AAUUGCGUAGAUUGUACAAA	79	AGUAGUUGUACUUUUUGATT	235	CAAAAAGUAGACAUACUATT	391	AL-DE-7560
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	80	GUAGUUGUACUUUUUGATT	236	ACACAUAGGACGACUACUATT	392	AL-DE-7472
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	81	GCGUAGUAGGCUUUGCAATT	237	ACAUUAGGCUUUGACUACUATT	393	AL-DE-7461
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	82	ACGUAACCUUACGUAUGUATT	238	ACAUUAGGCUUUGACUACUATT	394	AL-DE-7459
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	83	ACGUAACCUUACGUAUGUATT	239	UACUUGAAGGCUUUGACUACUATT	395	AL-DE-7381
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	84	ACGUAACCUUACGUAUGUATT	240	UUCGAGUAGGCUUUGACUACUATT	396	AL-DE-7515
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	85	AGUAGUUGUACUUUUUGATT	241	UUCGAGUAGGCUUUGACUACUATT	397	AL-DE-7517
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	86	AAUGUAGUUGUACUUUUUGATT	242	AAUAGGCUUUGACUACUACUATT	398	AL-DE-7521
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	87	GCGUAGUAGGCUUUGACUACUATT	243	UACUUGUAGGCUUUGACUACUATT	399	AL-DE-7530
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	88	GACGAGUAGGCUUUGACUACUATT	244	ACUAGGCUUUGACUACUACUATT	400	AL-DE-7388
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	89	UAGUAGUAGGCUUUGACUACUATT	245	UAGUAGUAGGCUUUGACUACUATT	401	AL-DE-7451
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	90	UAGUAGUAGGCUUUGACUACUATT	246	UAGUAGUAGGCUUUGACUACUATT	402	AL-DE-7484
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	91	AAUAGUAGGCUUUGACUACUACUATT	247	AAUAGUAGGCUUUGACUACUACUATT	403	AL-DE-7376
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	92	AAUAGUAGGCUUUGACUACUACUATT	248	AAUAGUAGGCUUUGACUACUACUATT	404	AL-DE-7500
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	93	UAGUAGUAGGCUUUGACUACUACUATT	249	UAGUAGUAGGCUUUGACUACUACUATT	405	AL-DE-7488
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	94	UAGUAGUAGGCUUUGACUACUACUATT	250	UAGUAGUAGGCUUUGACUACUACUATT	406	AL-DE-7541
AAAGUAGUUGUACUUUUUGAA	95	UAGUAGUAGGCUUUGACUACUACUATT	251	AAUAGUAGGCUUUGACUACUACUATT	407	AL-DE-7550

AAACAACUCUCUCUCUGAGAUAAA	96	CAACUCUCUCUCUGAGUAATT	252	UAUCUCAGAGCAGAGUUGTT	408	AL-DP-7776
AAGUUGACUUAACUUAACAGAA	97	GAUUGACUUAACUUAACAGTT	253	CUGUUAAGUAAGUACAUCTT	409	AL-DP-7777
AACAUUUAUUGAUGAGAUUA	98	CAUUAUUGAUGAGAUUAATT	254	AUUCUUAUUGAUGAUUAUGTT	410	AL-DP-7510
AACCAUUAUUGAUGAGCAGUAA	99	CCAUUAUUGAUGAGCAGUATT	255	AGUGCCUUGAUAUUAUGTT	411	AL-DP-7507
AAAGUAGCAUCCUUCUUCUAA	100	AGUAGCAUCCUUCUUCUATT	256	AGAAAGGAUUGGCUUATT	412	AL-DP-7479
AAUAAUAGAACGUACUACCAA	101	UAUAAAGCUCUACUACCAATT	257	UGGUAUGAGGUUUAUUAATT	413	AL-DP-7542
AACUUCGUCACUAGUAGUCAA	102	CUUCGUCACUAGUAGUCAAATT	258	UGACUACAGUGCAGCAAGTT	414	AL-DP-7494
AAUCAUUAGUGACCAUUGAAAA	103	UCAUAGUGACCAUUGAAATT	259	UUCAUUGGUACCAUUAUATT	415	AL-DP-7531
AAUUAUUCUGUUAUUGAAAA	104	UUAUUCUGUUAUUGAAATT	260	UUCAUUAACAGCAUUAATT	416	AL-DP-7373
AAAUACGCUACUUGAGAAAA	105	AUACGCUACUUGAGAAAAATT	261	UUCAUACAGGUGCGUAUATT	417	AL-DP-7508
AAAACUAGCGAAUUGAGGAAA	106	AGCUAGCGAAUUGAGGAAATT	262	UCCUUAUUGCGUAUATT	418	AL-DP-7487
AAUACUAGCGUACUUGAGAA	107	UACAUAGCGUACUUGAGUATT	263	CAUCAAGGUGCGUAUUAATT	419	AL-DP-7375
AAUACUAGCGUACUUGAGAA	108	AAUUAACAGGGAUUAUUAATT	264	AUUAUCCUUGUUAUUAATT	420	AL-DP-7462
AAUUAUUAACAGGGAUUAUUA	109	GUUCUUGUUGUUAUUAATT	265	UUAUUAACAGCAUUAUATT	421	AL-DP-7513
AAGUUCUGUUGUUAUUAUUA	110	UGAUUGACUGAUUGUUAUUAATT	266	UAAACAUAUGUAUUAUATT	422	AL-DP-7455
AAUGAUUGACUGAUUGUUAUUA	111	UUUAUCCUGUUAUUGAAATT	267	UCCAUAUACAGGUAUUAATT	423	AL-DP-7374
AAUUAUUAUCCUGUUAUUGAAA	112	UGUCCGCUAGAGUUAUUAATT	268	GAUCAUCCUAGCCGCAUATT	424	AL-DP-7475
AAUGUCCGCUAGAGUUAUUA	113	GCUAAGCGAAUUGAGGAAATT	269	CUCCUUAUUGCGUAUATT	425	AL-DP-7369
AAGCUAGCGAAUUGAGGAA	114	GUACAUAGCGUACUUGAAATT	270	AUCAAGUAGCGUAUUAATT	426	AL-DP-7466
AAUCGAGCUUAUUAAGAUUAAA	115	UCCGAGCUUAUUAAGAUUAATT	271	UUUAUUAUUAAGUUAUATT	427	AL-DP-7491
AACUACACAGUUAACUGAATA	116	CUACACAGUUAACUGAATAATT	272	CUACAUUAACUGGUGUATT	428	AL-DP-7482
AAUUAUUAUCCGAGCAGUUAUA	117	UUUAUUAUCCGAGCAGUUAUUAATT	273	AUCAGUCCUUGAUUAUUAATT	429	AL-DP-7398
AAUUAUUAUCCGAGCAGUUAUA	118	AUUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	274	UCCAGUCCUUGAUUAUUAATT	430	AL-DP-7471
AAAGUUAUUAUCCGAGCAGUUA	119	AACGUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	275	AGUACUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	431	AL-DP-7383
AAAGUUAUUAUCCGAGCAGUUA	120	AGAAUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	276	CACUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	432	AL-DP-7367
AAAGUUAUUAUCCGAGCAGUUA	121	UCCAGUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	277	AAUCCUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	433	AL-DP-7386
AAUCAGUUAUUAUCCGAGCAGUUA	122	CUUAUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	278	CCAUAUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	434	AL-DP-7525
AAACAUUAUUAUCCGAGCAGUUA	123	ACAUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	279	UCAUAUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	435	AL-DP-7486
AAUCUUAUUAUCCGAGCAGUUA	124	UCCUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	280	CAUAUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	436	AL-DP-7539
AAUCUUAUUAUCCGAGCAGUUA	125	CAUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	281	CACUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	437	AL-DP-7483
AAUUAUUAUCCGAGCAGUUA	126	UUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	282	AUCUAUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	438	AL-DP-7503
AAUCUUAUUAUCCGAGCAGUUA	127	CCUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	283	GACUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	439	AL-DP-7537
AAUCUUAUUAUCCGAGCAGUUA	128	UGUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	284	UAGCUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	440	AL-DP-7396
AAUCUUAUUAUCCGAGCAGUUA	129	CAUCUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	285	CGUAUUAUUAUCCGAGCAGUUAATT	441	AL-DP-7404

AAUUGGCGACUUVUACGCAUAAA	130	UUGGCGACUUVUACGCAUATT	286	UAUGGUGAAAAUGGCCAATT	442	AI-DE-7543
AAUUCAGCUAUGCCAAAGGAUA	131	AUACGUAUAGCCAAAGAUATT	287	AUCCUUGGCAUACGUGAUATT	443	AI-DE-7379
AAAGGUAUACGUAACCUUA	132	AGGUAUACGUAACCUUATT	288	AAAGGUAUACGUAACCUUATT	444	AI-DE-7502
AAACUAGGUAACGUAACCUUA	133	ACUAGGUAACGUAACCUUATT	289	AUCAAUACGUAACCUUATT	445	AI-DE-7519
AAUGUACUACGUAACCUUA	134	UGUACUACGUAACCUUATT	290	CAUUCACGUAACCUUATT	446	AI-DE-7506
AAUAGAUAUCCGUAACCUUA	135	AUAGAUAUCCGUAACCUUATT	291	CUAGAUAUCCGUAACCUUATT	447	AI-DE-7457
AAUUGGUAUCCGUAACCUUA	136	UUGGUAUCCGUAACCUUATT	292	GAUUGGUAUCCGUAACCUUATT	448	AI-DE-7468
AAUAGAUUCCGUAACCUUA	137	UAGAUUCCGUAACCUUATT	293	ACUGAUUCCGUAACCUUATT	449	AI-DE-7368
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	138	UGAGUAUCCGUAACCUUATT	294	AUUAUUAUAAAGCCCUUATT	450	AI-DE-7402
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	139	ACUAGGUAUCCGUAACCUUATT	295	GAUAGGUAUCCGUAACCUUATT	451	AI-DE-7481
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	140	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	296	CUUAAACGUAACCUUATT	452	AI-DE-7465
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	141	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	297	AGGUAUCCGUAACCUUATT	453	AI-DE-7496
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	142	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	298	AGGUAUCCGUAACCUUATT	454	AI-DE-7549
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	143	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	299	AGGUAUCCGUAACCUUATT	455	AI-DE-7394
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	144	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	300	AGGUAUCCGUAACCUUATT	456	AI-DE-7477
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	145	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	301	AGGUAUCCGUAACCUUATT	457	AI-DE-7516
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	146	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	302	AGGUAUCCGUAACCUUATT	458	AI-DE-7556
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	147	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	303	AGGUAUCCGUAACCUUATT	459	AI-DE-7387
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	148	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	304	AGGUAUCCGUAACCUUATT	460	AI-DE-7524
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	149	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	305	AGGUAUCCGUAACCUUATT	461	AI-DE-7378
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	150	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	306	AGGUAUCCGUAACCUUATT	462	AI-DE-7389
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	151	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	307	AGGUAUCCGUAACCUUATT	463	AI-DE-7384
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	152	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	308	AGGUAUCCGUAACCUUATT	464	AI-DE-7497
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	153	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	309	AGGUAUCCGUAACCUUATT	465	AI-DE-7559
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	154	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	310	AGGUAUCCGUAACCUUATT	466	AI-DE-7520
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	155	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	311	AGGUAUCCGUAACCUUATT	467	AI-DE-7505
AAUAGGUAUCCGUAACCUUA	156	UUCUAGGUAUCCGUAACCUUATT	312	AGGUAUCCGUAACCUUATT	468	AI-DE-7460

dsRNA 합성

시약 공급원

시약 공급원이 본원에서 명확하게 제공되지 않지만, 이같은 시약은 분자 생물학용 시약의 임의의 공급자로부터 분자 생물학에서의 용도에 대한 품질/순도 규격으로 취득될 수 있다.

siRNA 합성

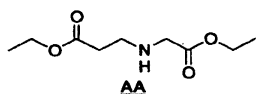
단일-가닥 RNA를 Expedite 8909 합성기 (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Germany)를 사용하고, 고체 지지체로서 세공-제어 유리 (CPG, 500Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany)를 사용하여 1 μM의 규모로 고체 상 합성에 의해 생산하였다. RNA 및 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 함유하는 RNA가 각각 상응하는 포스포르아미디트 및 2'-O-메틸 포스포르아미디트를 사용하는 고체 상 합성에 의해 생성되었다 (Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany). 표준 뉴클레오타이드 포스포르아미디트 화학 예컨대 [Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA]에 기술된 것을 사용하여 이러한 빌딩 블럭들이 선택된 부위에서 올리고리보뉴클레오타이드 사슬의 서열 내로 혼입되었다. 요오드 산화제 용액을 아세토니트릴 (1%) 내의 보케이지(Beaucage) 시약 (Chruachem Ltd, Glasgow, UK)의 용액으로 대체함으로써 포스포로티오에이트 결합이 도입되었다. 추가적인 보조 시약을 Mallinckrodt Baker (Griesheim, Germany)로부터 취득하였다.

음이온 교환 HPLC에 의한 조(粗) 올리고리보뉴클레오타이드의 탈보호 및 정제를 확립된 절차에 따라 수행하였다. 분광광도계 (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim, Germany)를 사용하여 260 nm의 파장에서의 각각의 RNA의 용액의 UV 흡수에 의해 수율 및 농도를 결정하였다. 어닐링(annealing) 완충제 (20 mM 인산나트륨, pH 6.8; 100 mM 염화나트륨) 내에서 상보적인 가닥들의 등몰량의 용액을 혼합함으로써 이중 가닥 RNA가 생성되었고, 이를 85-90℃의 수조에서 3분 동안 가열하고, 3-4시간의 기간에 걸쳐 실온으로 냉각하였다. 어닐링

된 RNA 용액을 사용할 때까지 -20℃에서 저장하였다.

<178> 3'-콜레스테롤-접합 siRNA (본원에서 -Chol-3'으로 지칭됨)의 합성을 위해, 적합하게 변형된 고체 지지체를 RNA 합성에 사용하였다. 변형된 고체 지지체를 하기와 같이 제조하였다:

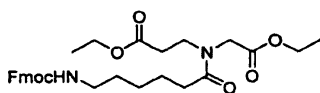
<179> 디에틸-2-아자부탄-1,4-디카르복실레이트 **AA**



<180>

<181> 수산화나트륨의 4.7 M 수용액 (50 ml)을 물 (50 ml) 내의 에틸 글리시네이트 히드로클로라이드 (32.19 g, 0.23 몰)의 교반된 빙냉 용액에 첨가하였다. 그후, 에틸 아크릴레이트 (23.1 g, 0.23 몰)를 첨가하고, TLC에 의해 반응 완료가 확인될 때까지 혼합물을 실온에서 교반하였다. 19시간 후, 용액을 디클로로메탄으로 분배시켰다 (3 × 100 ml). 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하고, 증발시켰다. 잔류물을 증류하여 AA가 산출되었다 (28.8 g, 61%).

<182> 3-{에톡시카르보닐메틸-[6-(9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐-아미노)-헥사노일]-아미노}-프로피온산 에틸 에스테르 **AB**

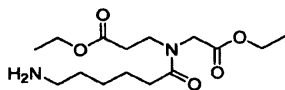


AB

<183>

<184> Fmoc-6-아미노-헥산산 (9.12 g, 25.83 mmol)을 디클로로메탄 (50 ml)에 용해시키고, 얼음으로 냉각하였다. 디이소프로필카르보디이미드 (3.25 g, 3.99 ml, 25.83 mmol)를 용액에 0℃에서 첨가하였다. 그후, 디에틸-아자부탄-1,4-디카르복실레이트 (5 g, 24.6 mmol) 및 디메틸아미노 피리딘 (0.305 g, 2.5 mmol)을 첨가하였다. 용액을 실온이 되게 하고, 추가로 6시간 동안 교반하였다. 반응 완료를 TLC에 의해 확인하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축하고, 에틸 아세테이트를 첨가하여 디이소프로필 우레아를 침전시켰다. 현탁액을 여과하였다. 여과액을 5% 수성 염산, 5% 중탄산나트륨 및 물로 세정하였다. 유기층을 합쳐서 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 농축하여 조 생성물을 제공하고, 이를 컬럼 크로마토그래피 (50 % EtOAc/헥산)로 정제하여, 11.87 g (88%)의 AB가 산출되었다.

<185> 3-[(6-아미노-헥사노일)-에톡시카르보닐메틸-아미노]-프로피온산 에틸 에스테르 **AC**

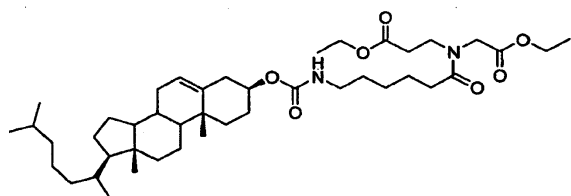


AC

<186>

<187> 3-{에톡시카르보닐메틸-[6-(9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐아미노)-헥사노일]-아미노}-프로피온산 에틸 에스테르 **AB** (11.5 g, 21.3 mmol)를 0℃에서 디메틸포름아미드 내의 20% 피페리딘에 용해시켰다. 용액을 1시간 동안 계속 교반하였다. 반응 혼합물을 진공에서 농축하고, 물을 잔류물에 첨가하고, 생성물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 조 생성물을 이의 히드로클로라이드 염으로의 전환에 의해 정제하였다.

<188> 3-({6-[17-(1,5-디메틸-헥실)-10,13-디메틸-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]펜타렌-3-일옥시카르보닐아미노]-헥사노일}에톡시카르보닐메틸-아미노)-프로피온산 에틸 에스테르 **AD**



AD

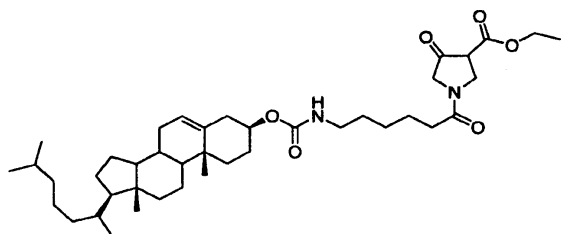
<189>

<190>

3-[(6-아미노-헥사노일)-에톡시카르보닐메틸-아미노]-프로피온산 에틸 에스테르 AC (4.7 g, 14.8 mmol)의 히드로클로라이드 염을 디클로로메탄에서 용해시켰다. 현탁액을 얼음 상에서 0℃로 냉각하였다. 현탁액에 디이소프로필에틸아민 (3.87 g, 5.2 ml, 30 mmol)을 첨가하였다. 생성된 용액에 콜레스테릴 클로로포르메이트 (6.675 g, 14.8 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 하룻밤 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄으로 희석하고, 10% 염산으로 세정하였다. 생성물을 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (10.3 g, 92%).

<191>

1-{6-[17-(1,5-디메틸-헥실)-10,13-디메틸-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a] 페난트렌-3-일옥시카르보닐아미노]-헥사노일}-4-옥소-피롤리딘-3-카르복실산 에틸 에스테르 **AE**



AE

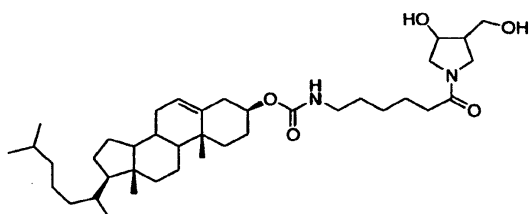
<192>

<193>

포타슘 t-부톡시드 (1.1 g, 9.8 mmol)를 30 ml의 건조 톨루엔에서 슬러리화시켰다. 혼합물을 0℃로 얼음 상에서 냉각하고, 5 g (6.6 mmol)의 디에스테르 AD를 20분 이내에 교반하면서 천천히 첨가하였다. 첨가하는 동안 온도를 5℃ 미만으로 유지하였다. 30분 동안 0℃에서 계속 교반하고, 1 ml의 빙초산에 이어서, 즉각적으로 40 ml의 물 내의 4 g의 NaH₂PO₄·H₂O를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 각각 100 ml의 디클로로메탄으로 2회 세정하고, 유기 추출물을 합쳐서 각각 10 ml의 포스페이트 완충제로 세정하고, 건조시키고, 건조 증발시켰다. 잔류물을 60 ml의 톨루엔에 용해하고, 0℃로 냉각하고, 3회의 50 ml 분량의 저온 pH 9.5 카르보네이트 완충제로 추출하였다. 수성 추출물을 인산으로 pH 3으로 조정하고, 5회의 40 ml 분량의 클로로포름으로 추출하여, 이를 합치고, 건조시키고, 건조 증발시켰다. 잔류물을 25% 에틸아세테이트/헥산을 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 1.9 g의 b-케토에스테르 (39%)가 산출되었다.

<194>

[6-(3-히드록시-4-히드록시메틸-피롤리딘-1-일)-6-옥소-헥실]-카르복산 17-(1,5-디메틸-헥실)-10,13-디메틸-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 에스테르 **AF**



AF

<195>

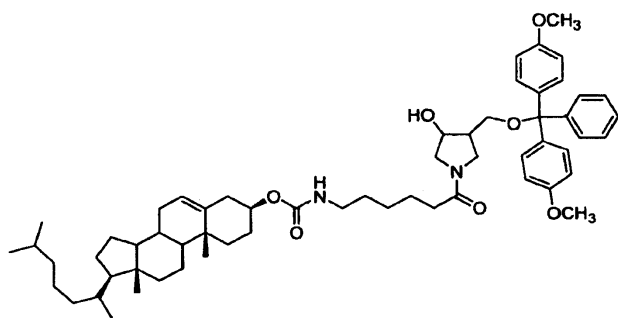
<196>

메탄올 (2 ml)을 1시간에 걸쳐 테트라히드로푸란 (10 ml) 내의 b-케토에스테르 AE (1.5 g, 2.2 mmol) 및 수소화붕소나트륨 (0.226 g, 6 mmol)의 환류 혼합물에 적가하였다. 환류 온도에서 1시간 동안 계속 교반하였다. 실온으로 냉각한 후, 1N HCl (12.5 ml)을 첨가하고, 혼합물을 에틸아세테이트 (3 × 40 ml)로 추출하였다. 에틸아세테이트 층을 합쳐서, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축하여, 생성물이 산출되었고, 이를 컬럼 크로마토그래피 (10% MeOH/CHCl₃)로 정제하였다 (89%).

<197>

(6-{3-[비스-(4-메톡시-페닐)-페닐-메톡시메틸]-4-히드록시-피롤리딘-1-일}-6-옥소-헥실)-카르복산 17-(1,5-디

메틸-헥실)-10,13-디메틸-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라테카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 에스테르 **AG**



AG

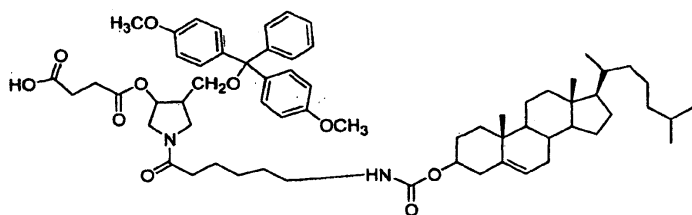
<198>

<199>

디올 **AF** (1.25 g, 1.994 mmol)을 진공에서 피리딘 (2 × 5 ml)으로 증발시킴으로써 건조시켰다. 무수 피리딘 (10 ml) 및 4,4'-디메톡시트리틸클로라이드 (0.724 g, 2.13 mmol)를 교반하면서 첨가하였다. 실온에서 하룻밤 동안 반응을 수행하였다. 메탄올의 첨가로 반응을 켜칭(quenching)시켰다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축하고, 잔류물에 디클로로메탄 (50 ml)을 첨가하였다. 유기층을 1M 수성 중탄산나트륨으로 세정하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 잔류 피리딘을 톨루엔으로의 증발에 의해 제거하였다. 조 생성물을 컬럼 크로마토그래피 (2% MeOH/클로로포름, Rf= 5% MeOH/CHCl₃에서 0.5)로 정제하였다 (1.75 g, 95%).

<200>

숙신산 모노-(4-[비스-(4-메톡시-페닐)-페닐-메톡시메틸]-1-{6-[17-(1,5-디메틸-헥실)-10,13-디메틸 2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라테카히드로-1H 시클로펜타[a]페난트렌-3-일옥시카르보닐아미노]-헥사노일}-피롤리딘-3-일) 에스테르 **AH**



AH

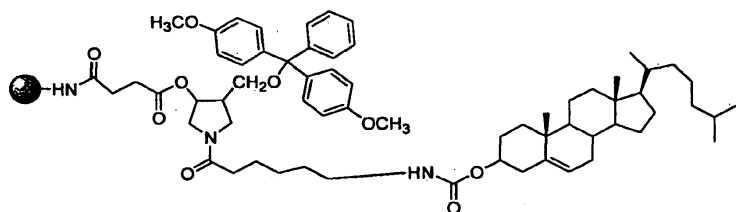
<201>

<202>

화합물 **AG** (1.0 g, 1.05 mmol)를 숙신산 무수물 (0.150 g, 1.5 mmol) 및 DMAP (0.073 g, 0.6 mmol)와 혼합하고, 진공에서 40℃에서 하룻밤 동안 건조시켰다. 혼합물을 무수 디클로로에탄 (3 ml)에 용해시키고, 트리에틸아민 (0.318 g, 0.440 ml, 3.15 mmol)을 첨가하고, 용액을 실온에서 아르곤 대기 하에 16시간 동안 교반하였다. 그후, 이를 디클로로메탄 (40 ml)으로 희석하고, 빙냉 수성 시트르산 (5 중량%, 30 ml) 및 물 (2 × 20 ml)로 세정하였다. 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 건조 농축하였다. 잔류물을 그대로 다음 단계에서 사용하였다.

<203>

콜레스테롤 유도체화 CPG **AI**



AI

<204>

<205>

숙시네이트 **AH** (0.254 g, 0.242 mmol)를 디클로로메탄/아세트니트릴의 혼합물 (3:2, 3 ml)에 용해시켰다. 이러한 용액에, 아세트니트릴 (1.25 ml) 내의 DMAP (0.0296 g, 0.242 mmol), 아세트니트릴/디클로로에탄 (3:1,

1.25 ml) 내의 2,2'-디티오-비스(5-니트로피리딘) (0.075 g, 0.242 mmol)을 연속적으로 첨가하였다. 생성된 용액에 아세트니트릴 (0.6 ml) 내의 트리페닐포스핀 (0.064 g, 0.242 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물의 색이 밝은 주황색으로 변하였다. 용액을 손목-동작 셰이커로 간략하게 진탕시켰다 (5분). 장쇄 알킬 아민-CPG (LCAA-CPG) (1.5 g, 61 mM)을 첨가하였다. 현탁액을 2시간 동안 진탕시켰다. CPG를 소결 깔때기를 통해 여과하고, 아세트니트릴, 디클로로메탄 및 에테르로 연속적으로 세정하였다. 미반응 아미노 기를 아세트산 무수물/피리딘으로 차폐시켰다. 달성된 CPG 로딩을 UV 측정에 의해 측정하였다 (37 mM/g).

<206> 5'-12-도데칸산 비스데실아미드 기 (본원에서 "5'-C32-"로 지칭됨) 또는 5'-콜레스테릴 유도체 기 (본원에서 "5'-Chol-"로 지칭됨)를 보유하는 siRNA의 합성을 WO 2004/065601에 기술된 바와 같이 수행하였고, 단, 콜레스테릴 유도체에 대해서는, 핵산 올리고머의 5'-말단에서 포스포로티오에이트 결합을 도입하기 위해 보케이지 시약을 사용하여 산화 단계를 수행하였다.

<207> **dsRNA 발현 벡터**

<208> 본 발명의 또다른 양상에서, E6AP 유전자 발현 활성을 조정하는 E6AP 특이적 dsRNA 분자가 DNA 또는 RNA 벡터 내로 삽입된 전사 단위로부터 발현된다 (예를 들어, [Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10]; 국제 PCT 공보 번호 WO 00/22113 (Skillern, 등), 국제 PCT 공보 번호 WO 00/22114 (Conrad), 및 미국 특허 번호 6,054,299 (Conrad) 참조). 이러한 트랜스진(transgene)은 선형 구축물, 원형 플라스미드 또는 바이러스 벡터로 도입될 수 있고, 이는 숙주 게놈 내로 혼입되어 게놈 내로 통합된 트랜스진으로서 유전될 수 있다. 또한 트랜스진은 염색체의 플라스미드로서 유전되도록 구축될 수 있다 ([Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292]).

<209> dsRNA의 개별적인 가닥들이 2개의 별도의 발현 벡터 상의 프로모터들에 의해 전사되어 표적 세포 내로 공동-형질감염될 수 있다. 별법적으로, dsRNA의 각각의 개별적인 가닥들이 동일한 발현 플라스미드 상에 위치하는 프로모터들에 의해 전사될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, dsRNA가 줄기 & 루프 구조를 갖도록 링커 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 연결된 역방위 반복부로서 dsRNA가 발현된다.

<210> 재조합 dsRNA 발현 벡터는 일반적으로 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터이다. dsRNA를 발현하는 바이러스 벡터를 아데노-관련 바이러스 (리뷰를 위해, [Muzyczka, et al., Curr. Topics Micro. Immunol. (1992) 158:97-129]) 참조; 아데노바이러스 (예를 들어, [Berkner, et al., BioTechniques (1998) 6:616], [Rosenfeld et al. (1991), Science 252:431-434]), 및 [Rosenfeld et al. (1992), Cell 68:143-155]) 참조; 또는 알파바이러스, 뿐만 아니라 당업계에 공지된 또다른 것들을 기초로 구축할 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 레트로바이러스를 사용하여 다양한 유전자를 상피 세포가 포함되는 다수의 상이한 세포 유형 내로 시험관 내에서 및/또는 생체 내에서 도입할 수 있다 (예를 들어, [Eglitis, et al., Science (1985) 230:1395-1398]; [Danos and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85:6460-6464]; [Wilson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018]; [Armentano et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145]; [Huber et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043]; [Ferry et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381]; [Chowdhury et al., 1991, Science 254:1802-1805]; [van Beusechem. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-19]; [Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3:641-647]; [Dai et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895]; [Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150:4104-4115]; 미국 특허 번호 4,868,116; 미국 특허 번호 4,980,286; PCT 출원 WO 89/07136; PCT 출원 WO 89/02468; PCT 출원 WO 89/05345; 및 PCT 출원 WO 92/07573 참조). 유전자를 세포의 게놈 내로 형질도입하여 게놈 내로 삽입된 유전자를 발현시킬 수 있는 재조합 레트로바이러스 벡터를 재조합 레트로바이러스 게놈을 적절한 패키징(packaging) 세포주 예컨대 PA317 및 Psi-CRIP 내로 형질감염시킴으로써 생산할 수 있다 ([Comette et al., 1991, Human Gene Therapy 2:5-10]; [Cone et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6349]). 재조합 아데노바이러스 벡터를 사용하여 적절한 숙주 (예를 들어, 래트, 햄스터, 개, 및 침팬지) 내의 광범위한 세포 및 조직을 감염시킬 수 있고 ([Hsu et al., 1992, J. Infectious Disease, 166:769]), 재조합 아데노바이러스 벡터는 유사분열적으로 활성인 세포를 감염에 필요로 하지 않는다는 장점이 또한 있다.

<211> 본 발명의 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터 내의 dsRNA 발현을 구동하는 프로모터는 진핵생물 RNA 중합효소 I (예를 들어 리보솜 RNA 프로모터), RNA 중합효소 II (예를 들어 CMV 초기 프로모터 또는 액틴 프로모터 또는 U1 snRNA 프로모터) 또는 일반적으로 RNA 중합효소 III 프로모터 (예를 들어 U6 snRNA 또는 7SK RNA 프로모터) 또는 원핵생물 프로모터, 예를 들어 T7 프로모터 (단 발현 플라스미드는 T7 프로모터로부터의 전사에 필요한 T7 RNA 중합효소를 또한 코딩한다)일 수 있다. 또한 프로모터는 체장으로 트랜스진 발현을 지시할 수 있다 (예를

들어, 체장에 대한 인슐린 조절 서열 ([Bucchini et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515]) 참조).

<212> 또한, 예를 들어, 유도성 조절 서열 및 발현 시스템 예컨대 특정 생리학적 조절인자, 예를 들어, 순환 글루코스 수준 또는 호르몬에 민감한 조절 서열을 사용함으로써, 트랜스진의 발현을 정확하게 조절할 수 있다 ([Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24]). 세포 또는 포유동물 내에서의 트랜스진 발현의 제어에 적절한, 이같은 유도성 발현 시스템은 엑디손, 에스트로젠, 프로게스테론, 테트라사이클린, 화학적인 이량체화 유도제, 및 이소프로필-베타-D1-티오갈락토피라노시드 (EPTG)에 의한 조절을 포함한다. 당업자는 dsRNA 트랜스진의 의도된 용도를 기초로 적합한 조절/프로모터 서열을 선택할 수 있을 것이다.

<213> 일반적으로, dsRNA 분자를 발현할 수 있는 재조합 벡터가 하기 기술된 바와 같이 전달되어, 표적 세포 내에서 지속된다. 별법적으로, dsRNA 분자의 일시적인 발현을 제공하는 바이러스 벡터를 사용할 수 있다. 이같은 벡터는 필요에 따라 반복적으로 투여될 수 있다. 일단 발현되면, dsRNA가 표적 RNA에 결합하여, 이의 기능 또는 발현을 조정한다. dsRNA 발현 벡터의 전달은 정맥내 또는 근육내 투여, 환자로부터 외식된 표적 세포에 투여한 후 환자 내로 재도입하는 것, 또는 원하는 표적 세포 내로 도입되도록 하는 임의의 기타 수단과 같이 전신 전달일 수 있다.

<214> 전형적으로 dsRNA 발현 DNA 플라스미드는 양이온성 지질 캐리어 (예를 들어 올리고펙타민(Oligofectamine)) 또는 비-양이온성 지질계 캐리어 (예를 들어 트랜짓(Transit)-TKO™)와의 복합체로서 표적 세포 내로 형질감염된다. 1주일 이상의 기간에 걸친 단일 E6AP 유전자 또는 다중 E6AP 유전자 상의 상이한 영역을 표적으로 하는 dsRNA-매개 녹다운을 위한 다중 지질 형질감염이 또한 본 발명에 의해 구현된다. 숙주 세포 내로의 본 발명의 벡터의 성공적인 도입을 다양한 공지된 방법을 사용하여 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 일시적인 형질감염을 리포터, 예컨대 형광 마커, 예컨대 녹색 형광 단백질 (GFP)로 신호할 수 있다. 특정 환경 요인 (예를 들어, 항생제 및 약물)에 대한 저항성, 예컨대 히그로마이신 B 저항성을 형질감염된 세포에 제공하는 마커를 사용하여 생체외 세포의 안정적인 형질감염을 확실하게 할 수 있다.

<215> 또한 E6AP 특이적 dsRNA 분자를 벡터 내로 삽입하여 인간 환자에 대한 유전자 요법 벡터로 사용할 수 있다. 유전자 요법 벡터는, 예를 들어, 정맥내 주사, 국소 투여 (미국 특허 5,328,470 참조) 또는 정위 주사 (예를 들어, [Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057] 참조)에 의해 대상에게 전달될 수 있다. 유전자 요법 벡터의 제약 제제는 적절한 희석제 내의 유전자 요법 벡터를 포함할 수 있거나, 또는 유전자 전달 비히클이 매입된 저속 방출 매트릭스를 포함할 수 있다. 별법적으로, 완전한 유전자 전달 벡터가 재조합 세포로부터 무순상으로 생산될 수 있는 경우 (예를 들어, 레트로바이러스 벡터), 제약 제제는 유전자 전달 시스템을 생산하는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.

<216> HCT-116 세포에서의 E6AP siRNA 스크리닝

<217> HCT-116 세포를 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) (Braunschweig, Germany, 카탈로그 # ACC 581)로부터 획득하여, 10% 소 태아 혈청 (FCS), 페니실린 100 U/ml, 스트렙토마이신 100 µg/ml 및 2mM L-글루타민을 함유하도록 보충된 맥코이(McCoy) (Biochrom AG, Berlin, Germany, 카탈로그 # F1015)에서 습식 인큐베이터 내에서 37°C에서 5% CO₂가 있는 대기에서 배양하였다.

<218> siRNA로의 형질감염을 위해, HCT-116 세포를 2.0×10^4 개의 세포/웰의 밀도로 96웰 플레이트에 파종하고, 직접적으로 형질감염시켰다. siRNA (단일 용량 스크린을 위해 30nM 및 3nM)의 형질감염을 제조업자가 기술한 바와 같이 리포펙타민 2000 (Invitrogen)으로 수행하였다.

<219> 형질감염 24시간 후, HCT-116 세포를 용해시키고, E6AP mRNA 발현 수준을 표준 프로토콜에 따라 퀀티진 익스플로러 키트(Quantigene Explore Kit) (Panomics, Inc. (Fremont, CA) (예전의 Genospectra, Inc.))를 사용하여 정량하였다. E6AP mRNA 수준을 GAP-DH mRNA에 표준화하였다. 각각의 siRNA에 대해, 4개의 개별적인 데이터포인트를 수집하였다. E6AP 유전자에 관련되지 않은 siRNA 듀플렉스를 대조군으로 사용하였다. 대조군 siRNA 듀플렉스로 처리된 세포에서의 E6AP mRNA 농도와 비교하여 처리된 세포에서의 E6AP mRNA 농도 백분율로 소정의 E6AP 특이적 siRNA 듀플렉스의 활성이 표현되었다.

<220> 하기의 표 2에서 결과가 제공된다. E6AP 유전자를 표적으로 하는 다수의 활성 siRNA 분자가 확인되었다.

표 2

E6AP를 표적으로 하는 dsRNA의 활성

듀플렉스 명칭	30nM에서의 평균 활성	30nM에서의 표준 편차	3nM에서의 평균 활성	3nM에서의 표준 편차
AL-DP-7545	9.35	3.36	14.04	3.82
AL-DP-7558	12.36	3.07	18.49	4.36
AL-DP-7548	12.55	5.85	18.92	4.72
AL-DP-7509	14.42	3.99	19.39	2.71
AL-DP-7492	11.25	2.53	19.61	7.89
AL-DP-7554	14.16	4.56	19.83	5.15
AL-DP-7557	16.00	6.50	19.97	7.04
AL-DP-7476	14.15	7.05	20.21	6.19
AL-DP-7514	24.01	12.46	20.54	6.13
AL-DP-7540	15.61	5.14	21.78	3.95
AL-DP-7397	13.05	5.68	22.03	11.42
AL-DP-7526	15.87	5.65	22.28	5.61
AL-DP-7473	17.22	6.09	22.65	6.64
AL-DP-7478	16.76	9.85	22.69	6.84
AL-DP-7553	23.50	5.15	23.19	3.34
AL-DP-7395	17.30	7.48	23.22	8.88
AL-DP-7522	26.16	10.71	23.51	8.18
AL-DP-7499	14.21	6.15	23.81	12.13
AL-DP-7527	24.11	5.05	23.98	8.89
AL-DP-7544	17.23	5.90	24.03	2.56
AL-DP-7489	23.56	10.21	24.54	7.57
AL-DP-7365	14.54	7.13	24.56	8.90
AL-DP-7390	16.44	6.37	24.74	6.73
AL-DP-7458	14.25	5.11	25.28	6.56
AL-DP-7532	21.47	4.18	25.48	6.40
<221>				
AL-DP-7546	17.66	4.28	25.91	7.73
AL-DP-7512	27.88	6.58	26.22	5.07
AL-DP-7470	28.22	6.50	26.31	8.12
AL-DP-7406	20.23	6.01	26.62	6.35
AL-DP-7382	17.82	7.24	26.93	9.30
AL-DP-7547	24.63	6.66	28.80	10.23
AL-DP-7490	25.94	9.32	28.95	10.29
AL-DP-7493	12.53	5.36	29.56	12.54
AL-DP-7529	17.61	8.36	29.59	10.53
AL-DP-7400	21.03	14.86	30.04	12.58
AL-DP-7391	26.74	12.00	30.06	8.07
AL-DP-7393	22.40	9.77	30.69	8.51
AL-DP-7511	26.50	6.02	30.88	6.43
AL-DP-7454	25.16	14.85	31.09	8.75
AL-DP-7450	20.09	8.43	32.10	8.57
AL-DP-7533	26.93	5.86	33.91	5.52
AL-DP-7485	27.45	4.36	34.12	10.28
AL-DP-7495	28.51	13.42	34.45	11.20
AL-DP-7456	16.82	5.62	34.54	10.30
AL-DP-7538	29.04	5.12	34.71	6.42
AL-DP-7377	22.98	8.19	35.31	12.53
AL-DP-7405	21.93	10.30	35.66	15.22
AL-DP-7392	23.83	8.93	36.14	6.31
AL-DP-7453	25.78	12.10	36.98	5.22
AL-DP-7366	19.60	7.30	37.20	13.88
AL-DP-7534	26.35	5.24	37.69	8.49
AL-DP-7401	28.74	9.10	37.75	7.70
AL-DP-7523	33.88	6.85	39.81	9.45
AL-DP-7555	29.13	8.87	40.35	6.23
AL-DP-7536	32.33	3.49	41.08	8.00
AL-DP-7371	25.49	9.83	42.19	16.08
AL-DP-7372	21.83	12.03	42.87	17.78
AL-DP-7370	24.51	12.64	43.75	14.09
AL-DP-7474	32.57	13.13	44.40	7.78
AL-DP-7452	30.12	12.02	46.66	9.19
AL-DP-7498	32.38	11.81	54.11	12.74
<222>				
AL-DP-7504	15.04	6.39	19.69	5.67
AL-DP-7467	19.81	6.42	21.66	8.12
AL-DP-7463	26.63	8.84	21.73	8.80
AL-DP-7399	15.62	8.32	22.98	7.65
AL-DP-7501	17.32	5.24	23.45	7.44
AL-DP-7385	17.60	5.11	28.00	11.84
AL-DP-7480	21.89	8.21	29.42	8.64
AL-DP-7528	26.47	2.94	30.76	10.87
AL-DP-7535	26.65	3.13	31.77	4.34

AL-DP-7403	24.10	6.21	38.79	14.41
AL-DP-7380	29.84	7.65	40.42	5.72
AL-DP-7469	17.18	7.41	21.13	6.29
AL-DP-7518	15.71	6.00	21.89	6.68
AL-DP-7464	29.18	12.30	22.13	8.99
AL-DP-7560	17.33	4.85	24.84	5.80
AL-DP-7461	30.55	8.26	25.62	9.48
AL-DP-7472	25.17	11.50	26.31	8.61
AL-DP-7459	29.60	7.71	27.27	9.68
AL-DP-7381	17.29	6.63	27.31	7.42
AL-DP-7515	32.18	10.22	29.76	6.01
AL-DP-7517	29.75	6.99	29.87	5.69
AL-DP-7521	28.60	8.06	31.68	5.72
AL-DP-7530	31.09	8.09	31.94	3.36
AL-DP-7388	22.81	3.80	32.28	6.23
AL-DP-7451	22.66	8.92	32.45	8.26
AL-DP-7484	26.77	13.00	32.84	6.95
AL-DP-7376	34.18	14.11	39.93	8.41
AL-DP-7500	32.69	8.47	41.55	13.32
AL-DP-7776	17.91	4.95	21.77	5.04
AL-DP-7777	21.10	7.60		
AL-DP-7510	34.70	5.83		
AL-DP-7507	35.11	6.78		
AL-DP-7479	35.29	13.76		
AL-DP-7542	36.32	5.00		
AL-DP-7494	38.34	12.68		
AL-DP-7531	38.58	14.26		
AL-DP-7373	39.04	16.08		
AL-DP-7508	39.95	12.87		
AL-DP-7487	40.48	15.20		
AL-DP-7375	41.19	15.06		
AL-DP-7462	41.61	17.23		
AL-DP-7513	41.69	9.15		
AL-DP-7455	43.35	12.72		
AL-DP-7374	43.37	12.26		
AL-DP-7475	43.68	11.45		
AL-DP-7369	43.99	15.44		
AL-DP-7466	44.27	15.53		
AL-DP-7491	45.06	10.32		
AL-DP-7482	45.06	12.37		
AL-DP-7398	45.79	9.50		
AL-DP-7471	46.11	13.53		
AL-DP-7383	46.87	20.08		

AL-DP-7367	46.96	16.88
AL-DP-7386	47.46	10.01
AL-DP-7525	49.60	14.11
AL-DP-7486	49.64	8.95
AL-DP-7539	49.97	12.73
AL-DP-7483	49.97	12.50
AL-DP-7503	51.28	7.08
AL-DP-7537	53.19	7.75
AL-DP-7396	54.11	13.02
AL-DP-7404	54.96	17.72
AL-DP-7543	55.48	9.23
AL-DP-7379	55.82	18.47
AL-DP-7502	56.15	16.52
AL-DP-7519	56.15	13.30
AL-DP-7506	57.24	21.04
AL-DP-7457	57.30	15.19
AL-DP-7468	57.83	15.40
AL-DP-7368	59.38	22.50
AL-DP-7402	59.57	13.42
AL-DP-7481	60.17	14.54
AL-DP-7465	61.44	28.49
AL-DP-7496	61.65	17.78
AL-DP-7549	61.90	12.36
AL-DP-7394	61.94	17.08
AL-DP-7477	63.20	14.74
AL-DP-7516	67.72	19.24
AL-DP-7556	69.49	13.89
AL-DP-7387	72.14	16.20
AL-DP-7524	72.52	19.76
AL-DP-7378	73.44	19.20
AL-DP-7389	73.74	23.83
AL-DP-7384	76.45	21.99
AL-DP-7497	77.66	22.60
AL-DP-7559	78.86	16.61
AL-DP-7520	85.45	14.83
AL-DP-7505	86.86	39.07
AL-DP-7460	100.95	22.69

<224>

<225>

E6AP를 표적으로 하는 화학적으로 변형된 dsRNA의 테스트

<226>

화학적으로 변형된 dsRNA를 테스트하여, 세포 내에서 E6AP를 코딩하는 mRNA의 발현 수준을 감소시키는 이들의 상대적인 능력을 확인하였다. HCT-116 세포에 대해 상기 기술된 분석 조건을 사용하였다. 대조군 siRNA 듀플렉스로 처리된 세포에서의 E6AP mRNA 농도와 비교하여 처리된 세포에서의 E6AP mRNA 농도 백분율로 소정의 E6AP 특이적 siRNA 듀플렉스의 활성이 표현되었다.

<227>

1. 화학적으로 변형된 dsRNA

<228>

표 3에 본 발명의 dsRNA 조성물이 기재된다. 이러한 표에서, 변형되지 않은 서열에 1개 이상의 뉴클레오타이드 변형을 함유하는 동일한 서열이 이어진다.

표 3

대문자: 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드
(단, T는 변형되지 않은 테옥시리보뉴클레오타이드)
소문자: 리보스 모이어티 상에 2'-O-메틸 치환체를 보유하는 리보뉴클레오타이드
s: 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합의 위치를 가리킨다
chol : 3' 리보뉴클레오타이드에 접합된 콜레스테롤 모이어티.
'듀플렉스 명칭'은 지시된 센스 가닥 및 지시된 안티센스 가닥의 특이적 혼성화에 의해 형성된 조성물의 명칭을 의미한다.

센스 가닥		안티센스 가닥	
서열 (5'-3')	서열 번호	서열 (5'-3')	서열 번호
AUACGAUGAAUCUACAAAATT	469	UUUUGUAGAUUCAUCGUAUTT	644
AUACGAUGAAUCUACAAAATsT	470	UUUUGUAGAUUCAUCGUAUTsT	645
AuAcGAuGAAucUAcAAAATsT	471	UUUUGuAGAUUCaUCGUAUTsT	646
AuAcGAuGAAucUAcAAAATsT	472	uuuuGuAGAuUcAUCGUAUTsT	647
			AL-DP-7545
			ND-8763
			ND-8782
			ND-8801

<229>

AUACGAUGAAUCUACAAAATTChol	473	UUUUGUAGAUUCAUCGUAUTsT	648	ND-8820
AuAcGAUGAAucuaAcAAAATTchol	474	UUUUGuAGAUUcAUCGuAUTsT	649	ND-8845
AuAcGAUGAAucuaAcAAAATTchol	475	uuuuGuAGAuUcAUCGuAUTsT	650	ND-8870
UGACUACAUCUCAAUAAATT	476	UUUAUUGAGAAUGUAGUCATT	651	AL-DP-7558
UGACUACAUCUCAAUAAATsT	477	UUUAUUGAGAAUGUAGUCATsT	652	ND-8764
uGAcuAcAuucucAAuAAATsT	478	UUuAUUGAGAAUGuAGuCATsT	653	ND-8783
uGAcuAcAuucucAAuAAATsT	479	uuuAuugAGAAuGuAGuCATsT	654	ND-8802
UGACUACAUCUCAAUAAATTchol	480	UUUAUUGAGAAUGUAGUCATsT	655	ND-8821
uGAcuAcAuucucAAuAAATTchol	481	UUuAUUGAGAAUGuAGuCATsT	656	ND-8846
uGAcuAcAuucucAAuAAATTchol	482	uuuAuugAGAAuGuAGuCATsT	657	ND-8871
AGCCUGCACGAAUGAGUUUTT	483	AAACUCAUUCGUGCAGGCUTT	658	AL-DP-7548
AGCCUGCACGAAUGAGUUUTsT	484	AAACUCAUUCGUGCAGGCUTsT	659	ND-8765
AGccuGcAcGAAuGAGuuuTsT	485	AAACUCaUUCGUGcAGGCUTsT	660	ND-8784
AGccuGcAcGAAuGAGuuuTsT	486	AAACUCaUUCGuGcAGGCUTsT	661	ND-8803
AGCCUGCACGAAUGAGUUUTTchol	487	AAACUCAUUCGUGCAGGCUTsT	662	ND-8822
AGccuGcAcGAAuGAGuuuTTchol	488	AAACUCaUUCGUGcAGGCUTsT	663	ND-8847
AGccuGcAcGAAuGAGuuuTTchol	489	AAACUCaUUCGuGcAGGCUTsT	664	ND-8872
GGAUUGUCGAAAACCACUUTT	490	AAGUGGUUUUCGACAAUCCTT	665	AL-DP-7509
GGAUUGUCGAAAACCACUUTsT	491	AAGUGGUUUUCGACAAUCCTsT	666	ND-8766
GGAuugGucGAAAAccAcuuTsT	492	AAGUGGUUUUCGAcAAUCCTsT	667	ND-8785
GGAuugGucGAAAAccAcuuTsT	493	AAGuGGuUuUCGAcAAUCCTsT	668	ND-8804
GGAUUGUCGAAAACCACUUTTchol	494	AAGUGGUUUUCGACAAUCCTsT	669	ND-8823
GGAuugGucGAAAAccAcuuTTchol	495	AAGUGGUUUUCGAcAAUCCTsT	670	ND-8848
GGAuugGucGAAAAccAcuuTTchol	496	AAGuGGuUuUCGAcAAUCCTsT	671	ND-8873
CUCUCGAGAUCCUAAUUAUTT	497	AUAAUUAGGAUCUCGAGAGTT	672	AL-DP-7492
CUCUCGAGAUCCUAAUUAUTsT	498	AUAAUUAGGAUCUCGAGAGTsT	673	ND-8767
cucucGAGAUccuAAuuAuTsT	499	AuAAUuAGGAUCUCGAGAGTsT	674	ND-8786
cucucGAGAUccuAAuuAuTsT	500	AuAAuUAGGAUCUCGAGAGTsT	675	ND-8805
CUCUCGAGAUCCUAAUUAUTTchol	501	AUAAUUAGGAUCUCGAGAGTsT	676	ND-8824
cucucGAGAUccuAAuuAuTTchol	502	AuAAUuAGGAUCUCGAGAGTsT	677	ND-8849
cucucGAGAUccuAAuuAuTTchol	503	AuAAuUAGGAUCUCGAGAGTsT	678	ND-8874
AUGUGACUUACUUAACAGATT	504	UCUGUUAAGUAAGUCACAUTT	679	AL-DP-7554
AUGUGACUUACUUAACAGATsT	505	UCUGUUAAGUAAGUCACAUTsT	680	ND-8768
AuGuGAcuuAcuuAAcAGATsT	506	UCUGUuAAGuAAGUcAcAUTsT	681	ND-8787
AuGuGAcuuAcuuAAcAGATsT	507	UCuGuuAAGuAAGUcAcAUTsT	682	ND-8806
AUGUGACUUACUUAACAGATTchol	508	UCUGUUAAGUAAGUCACAUTsT	683	ND-8825
AuGuGAcuuAcuuAAcAGATTchol	509	UCUGUuAAGuAAGUcAcAUTsT	684	ND-8850
AuGuGAcuuAcuuAAcAGATTchol	510	UCuGuuAAGuAAGUcAcAUTsT	685	ND-8875
GUUAUCUCGAGAUCCUATT	511	UAGGAUCUCGAGAGUAUACTT	686	AL-DP-7557

GUUAUCUCGAGAUCCUATsT	512	UAGGAUCUCGAGAGUAUACTsT	687	ND-8769
GuAuAcucucGAGAUccuATsT	513	uAGGAUCUCGAGAGuAuACTsT	688	ND-8788
GuAuAcucucGAGAUccuATsT	514	uAGGAUCUCGAGAGuAuACTsT	689	ND-8788
GUUAUCUCGAGAUCCUATTChol	515	UAGGAUCUCGAGAGUAUACTsT	690	ND-8826
GuAuAcucucGAGAUccuATTchol	516	uAGGAUCUCGAGAGuAuACTsT	691	ND-8851
GuAuAcucucGAGAUccuATTchol	517	uAGGAUCUCGAGAGuAuACTsT	692	ND-8851
AGGUUACCUACAUCUCAUATT	518	UAUGAGAUGUAGGUAAACCUTT	693	AL-DP-7476
AGGUUACCUACAUCUCAUATsT	519	UAUGAGAUGUAGGUAAACCUTsT	694	ND-8770
AGGuuAccuAcAucucAuATsT	520	uAUGAGAUGuAGGuAAACCUTsT	695	ND-8789
AGGuuAccuAcAucucAuATsT	521	uAuGAGAuGuAGGuAAACCUTsT	696	ND-8808
AGGUUACCUACAUCUCAUATTChol	522	UAUGAGAUGUAGGUAAACCUTsT	697	ND-8827
AGGuuAccuAcAucucAuATTchol	523	uAUGAGAUGuAGGuAAACCUTsT	698	ND-8852
AGGuuAccuAcAucucAuATTchol	524	uAuGAGAuGuAGGuAAACCUTsT	699	ND-8877
AGUACUUAUUCAGACCAGATT	525	UCUGGUCUGAAUAAGUACUTT	700	AL-DP-7514
AGUACUUAUUCAGACCAGATsT	526	UCUGGUCUGAAUAAGUACUTsT	701	ND-8771
AGuAcuuAuucAGAccAGATsT	527	UCUGGUCUGAAuAAGuACUTsT	702	ND-8790
AGuAcuuAuucAGAccAGATsT	528	UCuGGUCuGAAuAAGuACUTsT	703	ND-8809
AGUACUUAUUCAGACCAGATTChol	529	UCUGGUCUGAAUAAGUACUTsT	704	ND-8828
AGuAcuuAuucAGAccAGATTchol	530	UCUGGUCUGAAuAAGuACUTsT	705	ND-8853
AGuAcuuAuucAGAccAGATTchol	531	UCuGGUCuGAAuAAGuACUTsT	706	ND-8878
AUCCUAAUUAUCUGAAUUTT	532	AAAUUCAGUAAUUAAGGAUTT	707	AL-DP-7540
AUCCUAAUUAUCUGAAUUTsT	533	AAAUUCAGUAAUUAAGGAUTsT	708	ND-8772
AuccuAAuuAucuGAAuuuTsT	534	AAAUUCAGAuAAUuAGGAUTsT	709	ND-8791
AuccuAAuuAucuGAAuuuTsT	535	AAAuUcAGAuAAuUAGGAUTsT	710	ND-8810
AUCCUAAUUAUCUGAAUUTTChol	536	AAAUUCAGUAAUUAAGGAUTsT	711	ND-8829
AuccuAAuuAucuGAAuuuTTchol	537	AAAUUCAGAuAAUuAGGAUTsT	712	ND-8854
AuccuAAuuAucuGAAuuuTTchol	538	AAAuUcAGAuAAuUAGGAUTsT	713	ND-8879
AAGGAUAGGUGAUAGCUCATT	539	UGAGCUAUCACCUAUCCUUTT	714	AL-DP-7397
AAGGAUAGGUGAUAGCUCATsT	540	UGAGCUAUCACCUAUCCUUTsT	715	ND-8731
AAGGAuAGGuGAuAGcucATsT	541	UGAGCuAUcACCUAUCCUUTsT	716	ND-8743
AAGGAuAGGuGAuAGcucATsT	542	uGAGCuAUcACCUAUCCuuTsT	717	ND-8754
AAGGAUAGGUGAUAGCUCATTChol	543	UGAGCUAUCACCUAUCCUUTsT	718	ND-8839
AAGGAuAGGuGAuAGcucATTchol	544	UGAGCuAUcACCUAUCCUUTsT	719	ND-8864
AAGGAuAGGuGAuAGcucATTchol	545	uGAGCuAUcACCUAUCCuuTsT	720	ND-8889
GGAAGCCGGAUUCUAGAUTT	546	AAUCUAGAUCGCGCUUCCTT	721	AL-DP-7526
GGAAGCCGGAUUCUAGAUTsT	547	AAUCUAGAUCGCGCUUCCTsT	722	ND-8773
GGAAGccGGAUcuAGAuTsT	548	AAUCuAGAUCGCGCUUCCTsT	723	ND-8792
GGAAGccGGAUcuAGAuTsT	549	AAUCuAGAUCGCGCUUCCTsT	724	ND-8811
GGAAGCCGGAUUCUAGAUTTChol	550	AAUCUAGAUCGCGCUUCCTsT	725	ND-8830

GGAAGccGGAAuCuAGAuTTchol	551	AAUCuAGAUUCCGGCUUCCTsT	726	ND-8855
GGAAGccGGAAuCuAGAuTTchol	552	AAUCuAGAuUCCGGCUUCCTsT	727	ND-8880
UGCUCGGAAGUGCUUGAAATT	553	UUUCAAGCACUUCGAAGCATT	728	AL-DP-7473
UGCUCGGAAGUGCUUGAAATsT	554	UUUCAAGCACUUCGAAGCATsT	729	ND-8774
uGcuucGAAGuGcuuGAAATsT	555	UUUcAAGcACUUCGAAGcATsT	730	ND-8793
uGcuucGAAGuGcuuGAAATsT	556	uuUcAAGcACuUCGAAGcATsT	731	ND-8812
UGCUUCGGAAGUGCUUGAAATTchol	557	UUUCAAGCACUUCGAAGCATsT	732	ND-8831
uGcuucGAAGuGcuuGAAATTchol	558	UUUcAAGcACUUCGAAGcATsT	733	ND-8856
uGcuucGAAGuGcuuGAAATTchol	559	uuUcAAGcACuUCGAAGcATsT	734	ND-8881
UGGAUUGUCGAAAACCACUTT	560	AGUGGUUUUUCGACAAUCCATT	735	AL-DP-7478
UGGAUUGUCGAAAACCACUTsT	561	AGUGGUUUUUCGACAAUCCATsT	736	ND-8775
uGGAuuGucGAAAAccAcuTsT	562	AGUGGUUUUUCGAcAAUCCATsT	737	ND-8794
uGGAuuGucGAAAAccAcuTsT	563	AGuGGuuuUCGAcAAUCCATsT	738	ND-8813
UGGAUUGUCGAAAACCACUTTchol	564	AGUGGUUUUUCGACAAUCCATsT	739	ND-8832
uGGAuuGucGAAAAccAcuTTchol	565	AGUGGUUUUUCGAcAAUCCATsT	740	ND-8857
uGGAuuGucGAAAAccAcuTTchol	566	AGuGGuuuUCGAcAAUCCATsT	741	ND-8882
CGGCUAGAGAUAGUCGCUATT	567	UAGCGAUCAUCUCUAGCCGTT	742	AL-DP-7553
CGGCUAGAGAUAGUCGCUATsT	568	UAGCGAUCAUCUCUAGCCGTsT	743	ND-8776
cGGcuAGAGAuGaucGcuATsT	569	uAGCGAUcAUCUCuAGCCGTsT	744	ND-8795
cGGcuAGAGAuGaucGcuATsT	570	uAGCGAUcAUCUCuAGCCGTsT	745	ND-8795
CGGCUAGAGAUAGUCGCUATTchol	571	UAGCGAUCAUCUCUAGCCGTsT	746	ND-8833
cGGcuAGAGAuGaucGcuATTchol	572	uAGCGAUcAUCUCuAGCCGTsT	747	ND-8858
cGGcuAGAGAuGaucGcuATTchol	573	uAGCGAUcAUCUCuAGCCGTsT	748	ND-8858
ACAGUCGAAAUCUAGUGAATT	574	UUCACUAGAUUUCGACUGUTT	749	AL-DP-7395
ACAGUCGAAAUCUAGUGAATsT	575	UUCACUAGAUUUCGACUGUTsT	750	ND-8730
AcAGucGAAAuCuAGuGAATsT	576	UUcACuAGAUUUCGACUGUTsT	751	ND-8742
AcAGucGAAAuCuAGuGAATsT	577	uucACuAGAuUUCGACuGUTsT	752	ND-8753
ACAGUCGAAAUCUAGUGAATTchol	578	UUCACUAGAUUUCGACUGUTsT	753	ND-8840
AcAGucGAAAuCuAGuGAATchol	579	UUcACuAGAUUUCGACUGUTsT	754	ND-8865
AcAGucGAAAuCuAGuGAATchol	580	uucACuAGAuUUCGACuGUTsT	755	ND-8890
CUCGAGAUCCUAAUUAUCUTT	581	AGAUAUUUAGGAUCUCGAGTT	756	AL-DP-7499
CUCGAGAUCCUAAUUAUCUTsT	582	AGAUAUUUAGGAUCUCGAGTsT	757	ND-8777
cucGAGAuCCuAAuUAucTsT	583	AGAuAAUuAGGAUCUCGAGTsT	758	ND-8796
cucGAGAuCCuAAuUAucTsT	584	AGAuAAUuAGGAUCUCGAGTsT	759	ND-8815
CUCGAGAUCCUAAUUAUCUTTchol	585	AGAUAUUUAGGAUCUCGAGTsT	760	ND-8834
cucGAGAuCCuAAuUAucTTchol	586	AGAuAAUuAGGAUCUCGAGTsT	761	ND-8859
cucGAGAuCCuAAuUAucTTchol	587	AGAuAAUuAGGAUCUCGAGTsT	762	ND-8884
CACCUAACGUGGAAUGUGATT	588	UCACAUCCACGUUAGGUGTT	763	AL-DP-7365
CACCUAACGUGGAAUGUGATsT	589	UCACAUCCACGUUAGGUGTsT	764	ND-8724

cAccuAAcGuGGAAuGuGATsT	590	UcAcAUUCcACGuuAGGUGTsT	765	ND-8736
cAccuAAcGuGGAAuGuGATsT	591	UcAcAuuCcACGuuAGGuGsT	766	ND-8748
CACCUAACGUGGAAUGUGATTChol	592	UCACAUCCACGUUAGGUGTsT	767	ND-8841
cAccuAAcGuGGAAuGuGATTchol	593	UcAcAUUCcACGuuAGGUGTsT	768	ND-8866
cAccuAAcGuGGAAuGuGATTchol	594	UcAcAuuCcACGuuAGGuGsT	769	ND-8891
AAUCGUUCAUUCAUUUACATT	595	UGUAAAUGAAUGAACGAUUTT	770	AL-DP-7390
AAUCGUUCAUUCAUUUACATsT	596	UGUAAAUGAAUGAACGAUUTsT	771	ND-8727
AAucGuucAuucAuuuAcATsT	597	UGuAAAUGAAUGAACGAUUTsT	772	ND-8739
AAucGuucAuucAuuuAGATsT	598	uGuAAAuGAAuGAACGAuTsT	773	ND-8750
AAUCGUUCAUUCAUUUACATTChol	599	UGUAAAUGAAUGAACGAUUTsT	774	ND-8842
AAucGuucAuucAuuuAcATTchol	600	UGuAAAUGAAUGAACGAUUTsT	775	ND-8867
AAucGuucAuucAuuuAcATTchol	601	uGuAAAuGAAuGAACGAuTsT	776	ND-8892
AACUUUUCGUGACUUGGGATT	602	UCCCAAGUCACGAAAAGUUTT	777	AL-DP-7382
AACUUUUCGUGACUUGGGATsT	603	UCCCAAGUCACGAAAAGUUTsT	778	ND-8726
AAcuuuucGuGAcuuGGGATsT	604	UCCcAAGUCACGAAAAGUUTsT	779	ND-8738
AAcuuuucGuGAcuuGGGATsT	605	UCCcAAGUCACGAAAAGuTsT	780	ND-8749
AACUUUUCGUGACUUGGGATTChol	606	UCCCAAGUCACGAAAAGUUTsT	781	ND-8843
AAcuuuucGuGAcuuGGGATTchol	607	UCCcAAGUCACGAAAAGUUTsT	782	ND-8868
AAcuuuucGuGAcuuGGGATTchol	608	UCCcAAGUCACGAAAAGuTsT	783	ND-8893
AACAGUCGAAAUCUAGUGATT	609	UCACUAGAUUUCGACUGUUTT	784	AL-DP-7393
AACAGUCGAAAUCUAGUGATsT	610	UCACUAGAUUUCGACUGUUTsT	785	ND-8729
AAcAGucGAAAucUAGUGATsT	611	UcACuAGAUUUCGACUGUUTsT	786	ND-8741
AAcAGucGAAAucUAGUGATsT	612	UcACuAGAUuUCGACuGuTsT	787	ND-8752
AACAGUCGAAAUCUAGUGATTChol	613	UCACUAGAUUUCGACUGUUTsT	788	ND-8844
AAcAGucGAAAucUAGUGATTchol	614	UcACuAGAUUUCGACUGUUTsT	789	ND-8869
AAcAGucGAAAucUAGUGATTchol	615	UcACuAGAUuUCGACuGuTsT	790	ND-8894
ACGAUGAGUUUUGUGCUUTT	616	AAGCACAAAACUCAUUCGUTT	791	AL-DP-7366
ACGAUGAGUUUUGUGCUUTsT	617	AAGCACAAAACUCAUUCGUTsT	792	ND-8778
AcGAAuGAGuuuuGuGcuTsT	618	AAGcAcAAAACUCaUUCGUTsT	793	ND-8797
AcGAAuGAGuuuuGuGcuTsT	619	AAGcAcAAAACUCaUUCGUTsT	794	ND-8816
ACGAUGAGUUUUGUGCUUTTChol	620	AAGCACAAAACUCAUUCGUTsT	795	ND-8835
AcGAAuGAGuuuuGuGcuTTchol	621	AAGcAcAAAACUCaUUCGUTsT	796	ND-8860
AcGAAuGAGuuuuGuGcuTTchol	622	AAGcAcAAAACUCaUUCGUTsT	797	ND-8885
AAUUCGCAUGUACAGUGAATT	623	UUCACUGUACAUGCGAAUUTT	798	AL-DP-7371
AAUUCGCAUGUACAGUGAATsT	624	UUCACUGUACAUGCGAAUUTsT	799	ND-8779
AAuucGcAuGuAcAGUGAATsT	625	UUCACUGuAcAuGCGAAUUTsT	800	ND-8798
AAuucGcAuGuAcAGUGAATsT	626	uUCACuGuAcAuGCGAAuUTsT	801	ND-8817
AAUUCGCAUGUACAGUGAATTChol	627	UUCACUGUACAUGCGAAUUTsT	802	ND-8836
AAuucGcAuGuAcAGUGAATTchol	628	UUCACUGuAcAuGCGAAUUTsT	803	ND-8861
AAuucGcAuGuAcAGUGAATTchol	629	uUCACuGuAcAuGCGAAuUTsT	804	ND-8886
AAUAGAAUUCGCAUGUACATT	630	UGUACAUGCGAAUUCUAUUTT	805	AL-DP-7372
AAUAGAAUUCGCAUGUACATsT	631	UGUACAUGCGAAUUCUAUUTsT	806	ND-8780
AAuAGAAuucGcAuGuAcATsT	632	UGuAcAuGCGAAUUCuAUUTsT	807	ND-8799
AAuAGAAuucGcAuGuAcATsT	633	uGuAcAuGCGAAuUCuAUUTsT	808	ND-8818
AAUAGAAUUCGCAUGUACATTChol	634	UGUACAUGCGAAUUCUAUUTsT	809	ND-8837
AAuAGAAuucGcAuGuAcATTchol	635	UGuAcAuGCGAAUUCuAUUTsT	810	ND-8862
AAuAGAAuucGcAuGuAcATTchol	636	uGuAcAuGCGAAuUCuAUUTsT	811	ND-8887
UGGUAAccCAAUGAUGUAUTT	637	AUACAUCAUUGGGUUAACCAT	812	AL-DP-7370
UGGUAAccCAAUGAUGUAUTsT	638	AUACAUCAUUGGGUUAACCATsT	813	ND-8781
uGGuAAccCAAuGAuGuAuTsT	639	AuAcAUcAUUGGGUUAACCATsT	814	ND-8800
uGGuAAccCAAuGAuGuAuTsT	640	AuAcAUcAuUUGGGUUAACCATsT	815	ND-8819
UGGUAAccCAAUGAUGUAUTTChol	641	AUACAUCAUUGGGUUAACCATsT	816	ND-8838
uGGuAAccCAAuGAuGuAuTTchol	642	AuAcAUcAUUGGGUUAACCATsT	817	ND-8863
uGGuAAccCAAuGAuGuAuTTchol	643	AuAcAUcAuUUGGGUUAACCATsT	818	ND-8888
cucGAGAuccuAAuuAucTsT	1748	AGAuAAuuAGGAUCUCGAGTsT	1749	ND-9300

표 4에 표 3에 열거된 dsRNA의 테스트 결과가 기재된다.

표 4

듀플렉스 명칭	30nM 처리 후에 잔존하는 평균 활성	표준 편차	100pM 처리 후에 잔존하는 평균 활성	표준 편차
AL-DP-7545	6.74	1.80	18.41	4.14
ND-8763	6.28	1.79	21.38	5.93
ND-8782	7.21	1.59	23.76	7.49
ND-8801	18.52	2.58	51.10	12.01
ND-8820	9.26	1.88	58.34	10.61
ND-8845	34.08	7.03	69.28	14.97
ND-8870	30.96	5.97	77.58	12.41
AL-DP-7558	11.93	1.66	25.71	3.57
ND-8764	8.97	1.53	25.81	7.79
ND-8783	27.33	3.10	51.35	6.52
ND-8802	28.82	4.39	91.90	14.32
ND-8821	8.96	2.36	71.92	10.68
ND-8846	75.94	17.07	88.87	7.90
ND-8871	58.02	9.96	91.79	13.92
AL-DP-7548	11.23	1.92	35.58	6.27
ND-8765	8.24	1.01	45.42	10.63
ND-8784	25.07	4.28	68.74	7.10
ND-8803	45.89	10.22	97.46	12.87
ND-8822	11.59	2.94	75.22	17.11
ND-8847	64.96	9.30	100.47	16.50
ND-8872	78.50	14.11	86.77	5.96
AL-DP-7509	17.62	2.26	21.58	2.98
ND-8766	15.26	1.22	25.45	2.92
ND-8785	19.66	3.35	43.13	4.50
ND-8804	21.66	2.34	50.36	8.66
ND-8823	15.66	2.09	48.14	4.88
ND-8848	27.84	3.58	95.42	20.53
ND-8873	29.97	3.32	91.79	13.36
AL-DP-7492	11.09	1.19	19.22	3.29
ND-8767	11.90	1.73	20.65	2.66
ND-8786	11.69	1.72	19.78	2.74
ND-8805	14.97	1.46	26.41	6.08
ND-8824	11.53	1.51	43.76	5.00
ND-8849	25.37	11.97	43.95	10.44
ND-8874	16.84	2.99	53.87	6.12
AL-DP-7554	15.01	1.22	23.48	4.39
ND-8768	14.46	1.30	26.79	4.77
ND-8787	15.20	2.47	24.76	4.44
ND-8806	15.01	2.02	33.77	10.43
ND-8825	17.00	3.82	72.33	14.34
ND-8850	29.25	7.49	93.94	19.23
ND-8875	23.33	3.94	79.79	9.03
AL-DP-7557	13.10	1.34	22.30	8.07
ND-8769	11.17	1.10	24.91	4.44
ND-8788	21.84	2.02	60.20	10.58
ND-8788	23.53	1.55	69.43	13.87
ND-8826	12.81	1.35	50.68	10.86
ND-8851	36.41	3.49	116.14	48.06
ND-8851	36.42	5.05	100.91	26.50
AL-DP-7476	17.11	2.75	25.33	7.43
ND-8770	13.36	1.65	30.58	8.25

ND-8789	46.06	6.35	76.12	14.80
ND-8808	43.15	5.55	98.81	21.90
ND-8827	14.76	2.03	56.08	13.96
ND-8852	70.35	13.51	107.70	22.62
ND-8877	58.73	8.08	90.83	10.87
AL-DP-7514	15.63	2.76	18.89	0.67
ND-8771	14.96	1.69	23.31	10.62
ND-8790	15.91	1.57	31.71	2.88
ND-8809	16.79	2.80	36.42	5.40
ND-8828	14.61	2.09	53.50	8.13
ND-8853	34.20	4.88	81.95	16.33
ND-8878	26.63	2.95	87.21	33.73
AL-DP-7540	18.18	3.06	32.59	5.25
ND-8772	19.31	2.99	36.01	5.41
ND-8791	35.43	4.60	55.34	7.39
ND-8810	17.83	2.64	25.48	7.36
ND-8829	18.93	3.20	68.53	14.55
ND-8854	50.71	6.95	89.19	9.26
ND-8879	21.76	5.10	62.43	16.86
AL-DP-7397	17.10	2.37	22.44	4.36
ND-8731	17.09	2.86	31.25	8.34
ND-8743	15.89	2.29	27.33	4.67
ND-8754	19.53	2.97	41.57	9.22
ND-8839	18.18	2.95	66.39	13.77
ND-8864	19.51	3.79	59.13	5.60
ND-8889	19.91	2.30	92.91	14.85
AL-DP-7526	17.67	2.32	41.09	7.63
ND-8773	15.59	1.57	42.07	6.55
ND-8792	19.42	2.08	46.87	6.99
ND-8811	34.56	7.82	72.57	9.85
ND-8830	19.49	3.09	69.87	7.25
ND-8855	27.49	4.52	85.38	13.45
ND-8880	38.04	6.41	87.78	13.97
AL-DP-7473	15.81	2.07	31.86	6.43
ND-8774	15.81	2.61	30.89	8.60
ND-8793	14.04	1.44	25.98	2.91
ND-8812	21.16	3.28	49.59	8.12
ND-8831	19.07	3.60	75.06	16.79
ND-8856	17.86	5.51	65.08	11.14

ND-8881	28.56	6.18	83.97	12.49
AL-DP-7478	16.41	2.58	33.38	6.20
ND-8775	16.74	1.63	31.52	2.92
ND-8794	19.05	3.19	24.88	3.34
ND-8813	17.04	2.34	26.53	3.90
ND-8832	16.40	2.16	66.67	15.18
ND-8857	26.53	6.20	69.13	9.30
ND-8882	20.04	2.43	68.67	8.67
AL-DP-7553	20.83	2.66	28.97	4.93
ND-8776	21.10	2.76	29.95	5.15
ND-8795	26.00	3.54	79.53	11.78
ND-8795	25.14	3.95	80.83	12.02
ND-8833	21.76	3.23	52.28	7.24
ND-8858	33.25	7.09	92.18	20.40
ND-8858	31.50	5.36	84.22	13.01
AL-DP-7395	18.01	2.33	25.01	4.17
ND-8730	18.63	2.22	35.55	6.30
ND-8742	18.04	2.92	29.24	6.48
ND-8753	19.03	3.21	50.35	10.66
ND-8840	24.81	3.87	81.78	17.12
ND-8865	27.65	3.29	72.55	12.44
ND-8890	22.03	1.60	105.32	26.89
AL-DP-7499	12.40	1.94	25.24	3.83
ND-8777	12.78	2.14	25.07	6.35
ND-8796	11.28	0.83	21.19	2.68
ND-8815	10.85	1.12	27.56	7.33
ND-8834	9.88	1.77	48.81	8.56
ND-8859	38.05	5.09	56.68	8.15
ND-8884	38.13	7.42	75.98	15.04
AL-DP-7365	15.72	2.57	23.60	5.58
ND-8724	14.88	2.37	27.95	11.09
ND-8736	71.51	11.99	81.07	19.08
ND-8748	71.98	14.80	82.12	16.76
ND-8841	18.39	3.01	66.82	19.67
ND-8866	79.40	15.36	80.86	15.81
ND-8891	73.79	17.04	86.53	21.21
AL-DP-7390	17.45	3.14	30.46	4.87
ND-8727	17.98	3.47	44.60	4.60
ND-8739	23.47	4.83	53.99	8.89

<239>

ND-8750	25.98	3.55	83.20	10.09
ND-8842	21.10	2.77	109.29	34.23
ND-8867	44.74	4.83	91.06	22.68
ND-8892	57.70	9.50	96.07	23.52
AL-DP-7382	16.90	3.54	30.39	3.91
ND-8726	17.17	3.84	38.93	6.26
ND-8738	19.51	2.77	41.20	3.80
ND-8749	17.03	3.66	34.11	8.30
ND-8843	26.36	4.99	83.57	8.12
ND-8868	26.78	3.25	88.44	7.96
ND-8893	22.70	2.05	86.71	12.41
AL-DP-7393	24.38	3.02	38.04	7.48
ND-8729	29.07	4.34	59.65	11.35
ND-8741	68.38	7.91	87.12	8.74
ND-8752	50.68	7.27	86.26	11.15
ND-8844	36.14	5.29	102.26	16.83
ND-8869	71.02	12.42	97.57	17.41
ND-8894	52.86	8.43	106.24	17.77
AL-DP-7366	18.69	2.05	44.08	7.35
ND-8778	18.46	2.08	41.29	5.42
ND-8797	15.49	2.21	36.71	5.29
ND-8816	13.61	1.76	33.13	6.21
ND-8835	22.00	3.84	76.17	11.70
ND-8860	17.81	4.03	68.48	8.32
ND-8885	15.76	2.33	70.03	10.95
AL-DP-7371	18.77	2.20	52.94	11.86
ND-8779	19.88	2.86	56.27	9.68
ND-8798	24.79	4.89	59.87	8.65
ND-8817	26.06	2.89	85.76	15.79
ND-8836	33.17	7.60	87.15	20.65
ND-8861	78.78	18.21	88.22	14.97
ND-8886	70.66	10.62	96.55	14.35
AL-DP-7372	19.23	3.22	46.80	10.62
ND-8780	19.94	0.97	62.29	12.87
ND-8799	42.73	4.67	81.61	10.68
ND-8818	88.99	6.53	104.90	8.74
ND-8837	25.18	3.70	99.41	12.93
ND-8862	79.80	15.30	92.36	10.28
ND-8887	78.27	16.96	92.55	14.48

AL-DP-7370	20.04	1.52	46.57	9.68
ND-8781	16.68	1.83	62.43	12.82
ND-8800	41.69	5.44	77.39	12.71
ND-8819	35.98	3.15	78.56	17.49
ND-8838	21.49	3.65	84.71	30.30
ND-8863	59.44	19.74	91.91	17.80
ND-8888	49.74	16.09	97.57	15.46

HPV E1 유전자 발현을 표적으로 하는 siRNA의 디자인

표 5에 본 발명의 dsRNA 조성물이 기재된다.

대문자·리브스·모이에터 상에 2-O-메틸 리한체를 보유한 리보뉴클레오타이드 소문자·리브스·모이에터 뉴클레오타이드간 결합의 위치를 가리킨다.
3' 포스포리보뉴클레오타이드에 접합된 뉴클레티드를 모이터.
뉴클레메트 명칭은, 지시어 셀스·가다 및 지시어 안티셀스·가다의 특이적 존상화에 의해 형성된 조성물의 명칭을 의미한다.

HPV E1 기준 서열로부터의 mRNA의 표적 서열 (총 19염세의 서열 표적 부위 + 양측 말단의 AA)	서열 번호	이중 TT 오버행이 있는 센스 가닥 (표적 서열) (5'-3')	서열 번호	이중 TT 오버행이 있는 안티센스 가닥 (안대 서열) (5'-3')	서열 번호	듀플렉스 형성
AAAAAUCACAACGUGUGCGCAUUA	819	AAAUACAACGUGUGGCGAUUTT	945	UAUGGCAACAACGUGAUUUTT	1141	ND-9061
AAGAGCCUCCAAAUUUGCGUADA	820	GAGCCUCCAAAUUUGCGAUUTT	946	UAGCGAAUUUUGGAGGCUCTT	1142	ND-9062
AAUCCAGCGUGUGUGGUGUGUA	821	UGAAGCGUGUGUGUGUGUUTT	947	ACCAAGUCCAAACAGUGGATT	1143	ND-9063
AAUCCAAAUUUGCGUAGAUAACA	822	UCCAAAUUUGCGUAGAUAUAUTT	948	UGUACUAGCGCAAUUUUGGATT	1144	ND-9064
AAAAUCAACGUGUGCGAUUGGA	823	AAUCAACGUGUGCGAUUGGTT	949	CAUUCGCAACAACGUGAUUUTT	1145	ND-9065
AACCCUCCAAAUUUGCGUAGUA	824	CCUCCAAAUUUGCGUAGUAUTT	950	UACUAGCGAAUUUUUGGAGGTT	1146	ND-9066
AAAGGCCUCCAAAUUUGCGUA	825	AGAGCCUCCAAAUUUGCGUUTT	951	ACGGAUUUUUGGAGGCUCTT	1147	ND-9067
AACAACGUGUGCGAUUGUGUGAA	826	CACGUGUGUGCGAUUGUGUUTT	952	CACCAUUCGCAACAUCUGGTT	1148	ND-9068
AAAUAGUUGUAGACGUGAGAA	827	AUAAGUUGAUAGGUAUAUTT	953	UCUACCCUUAACAACUUAUUTT	1149	ND-9069
AAGGAACAAGGCGUACGGGAUAA	828	GGAAGAAGGCGUACGGGAUUTT	954	CAUCGCGAACCUCUUCUCCCTT	1150	ND-9070
AAAGGUAUGUUUGGACACAGGA	829	AAAUUAAGUUUGGACACAGGTT	955	CCUGGUGCAACAACUUAUUCUTT	1151	ND-9071
AAGGAUCAAGUGUGAGUUA	830	GGUAUCAAGUGUGAGUUTT	956	AACUCUACACCCUUGAUACCTT	1152	ND-9072

AAAACUUAUGUUAUUAUGGAAA 831 ACUUAUGUAUUAUGUGATT 957 UCCACUAUAUACUAAGUTT 1153 ND-9073
 AAGAGAUUAUUUGAAAAGCGAAA 832 GAGAUUAUUUGAAAAGCGAATT 958 UUCGCUUUCAAUAUAUCUCTT 1154 ND-9074
 AAAACACCAUUGUAGUCAGUAUAA 833 AACACCAUUGUAGUCAGUAUTT 959 AUAUGACUACUAGUGUUTT 1155 ND-9075
 AAAGCCUCCAAAUAUUGCGUAGAA 834 AGCCUCCAAAUAUUGCGUAUTT 960 CUACGCAUUAUUGGAGGCU 1156 ND-9076
 AAGCCUCCAAAUAUUGCGUAGAA 835 GCCUCCAAAUAUUGCGUAUTT 961 ACUACGCAUUAUUGGAGGCT 1157 ND-9077
 AAGUUAUGGAGACACGCCAGAA 836 GUGUAUGGAGACACGCCAATT 962 CUGCGUGUCUCCAUACACT 1158 ND-9078
 AAGUACAUAUGGCGCUACGAUAAA 837 GUACAUAUGGCGCUACGAUATT 963 UAUUGGAGGCCAUUGUAATT 1159 ND-9079
 AAUACAUAUGGCGCUACGAUAAA 838 UACAUAUGGCGCUACGAUATT 964 UUAUGGAGGCCAUUGUAATT 1160 ND-9080
 AAUGACAUAUGAGACGAUAUUA 839 UGACAUAUGAGACGAUAUATT 965 ACUAUGGUCUACUAUUGUATT 1161 ND-9081
 AAGACAUAUGAGACGAUAUUA 840 GACAUAUGAGACGAUAUATT 966 CACUAUGGUCUACUAUUGUATT 1162 ND-9082
 AAACUUCUUUGCCAAACGUAUAAA 841 ACUUCUUUGCCAAACGUAUATT 967 UUAACGUGUGCAAAAGUATT 1163 ND-9083
 AAAAUAUGACAUAUGAGACGAAA 842 AUAUAUGACAUAUGAGCATT 968 UCGUCUAUAUGUUAUUAUTT 1164 ND-9084
 AAAAUAUUGGGUAGUCCACAA 843 AAGUAUUGGGUAGUCCACTT 969 GUGAGCUACCCAAUACUUTT 1165 ND-9085
 AAACGUGUUGCGAUUGGUAUAAA 844 ACGUGUUGCGAUUGGUAUATT 970 UACACCAUUGCAACAGUUTT 1166 ND-9086
 AAGCAAAUAUUGGGUAGUCAA 845 CGAAUAUUGGGUAGUCCU 971 GACUACCCAAUAUUCUUTT 1167 ND-9087
 AACUCCAAAUAUUGCGUAUCAA 846 CUCCAAAUAUUGCGUAUATT 972 GUACUACGCAUUAUUGGAGTT 1168 ND-9088
 A AUGUACAUAUGGCGUACGAAA 847 UGGUACAUAUGGCGUACGATT 973 UCGUAGGCCAUUGUACATT 1169 ND-9089
 AAUAUAUGACAUAUGAGACUA 848 UUAUAUGACAUAUGAGUATT 974 AUCGUCUAUAUGUUAUUAUTT 1170 ND-9090
 AAACAUAUGUACGAUAGUAAA 849 ACAUAUGAGACGAUAUUAATT 975 UCACUAUGGUCUAUUAUUTT 1171 ND-9091
 AAGUGUACGAUUAUAACGAAA 850 GUGUACGAUUAUAACGATT 976 UCGUUAUAUUGUACACTT 1172 ND-9092
 AAUAAGACAUAUAACGACAAA 851 UAGACAUAUAUAACGACATT 977 UGCUGUUAUAUAUUGUUAUTT 1173 ND-9093
 AAUUGCGAUUGGUGUAUUGCUAA 852 UUGCGAUUGGUGUAUUGCUATT 978 AGCAUACACCAUUGGCAATT 1174 ND-9094
 AAUUGCGAGACUAUAUUAUAAA 853 UUGCGAGACUAUAUUAUUAATT 979 UACUAUUAUGUGUUGGCAATT 1175 ND-9095
 AAUUCAGAUUAUUAAGACCAAA 854 UUCAGAUUAUUAAGACCAATT 980 UGUCUUAUAUUAUUCUUAATT 1176 ND-9096
 AAGAGAUUAUUAAGAACGAAA 855 GGAGAUUAUUAAGAACGATT 981 UCGCUUAUAUAUUAUUCUCTT 1177 ND-9097
 AAACCAUGUAGUCAGUAUUA 856 ACCAUUGUAGUCAGUAUUAUATT 982 ACUAUACUGACUAUUAUUAUTT 1178 ND-9098
 AAGAAAGGGUACGGGAUUA 857 GAGAGGGUACGGGAUUAUATT 983 UACAUCCCGUACCCUUCUUTT 1179 ND-9099
 AAUAUAUAUACAUGUUGCGAAA 858 AUAUAUAUAUGUUGCGAATT 984 UCGCAACAGCUGUUAUUAUTT 1180 ND-9100

AAAGUUGUGCGAUVUGUGUUA	859	CGUGUGCGAUVUGUGUUAU	985	AUACACCAUUGCAACAGTT	1181	ND-9101
AAUGGGCCUACGAUAUAGACAA	860	UGGGCCUACGAUAUAGACATT	986	UGUCAUUUAUCGAAGGCCATT	1182	ND-9102
AAUUCAUUVUUAUUAUUGUGAA	861	UGCAUAUUAUUAUUAUGUGTT	987	CACCAUUAUAGUAUAUAGCATT	1183	ND-9103
AAACGAAUUAUUAUUCACAGCAA	862	CCAGAUUUAAGUUGUACGATT	988	UCGCGAAACUUAUUCUGTT	1184	ND-9104
AAAGAUUUVUUGAAACCGAAGAA	863	AGAUVUUVUGAAAGCGAAGTT	989	CUUCGCUUUCAAUUAUUCU	1185	ND-9105
AAAGUUAACGUAAGAGGGCCCAA	864	GUUACAGUAGAGGGCGCTT	990	GCGGCCUUCUACCUUGAAC	1186	ND-9106
AAAGCAAAUAGUGUAUUGUUA	865	GCCAAAUUAGUUAUGUAGTT	991	CUAAACAUCCUAUUVUUGCT	1187	ND-9107
AAAGCAUAGACCAUUGGUAACAAA	866	GCAUAGACCAUUGGUAACA	992	UUGUAUACAUUGGUCUAUG	1188	ND-9108
AAAAAUUUCGUAUUGUACAGCA	867	AAAUUUGCGUAUGUACAGCATT	993	CUGCGUAUUGGUCUAUUC	1189	ND-9109
AAAGUUAUUVUGGUAUUGUCCAA	868	AGUAUUVUGGUAUUGUCCATT	994	AGUGCAUACCCAAUAUCU	1190	ND-9110
AAAUAGCAUAGUAGACGAUUGAA	869	AUGCAUAUAGUAGACGAUAGTT	995	CUAUCGUCUAUUAUGUACU	1191	ND-9111
AAAGUAGUCCACUUAUGUAUUA	870	GUUAGUCCAUUAUGUAUAT	996	UAUACUAUAUGGACUAUC	1192	ND-9112
AAAGCAUUVAGCAUUGGUAACAAA	871	AGCAUAGCAUUGGUAACATT	997	UGUACCAUUGGUCUAUAGC	1193	ND-9113
AAUUVUCAGAAUUAAGUAAGACCAA	872	UUUCAGAAUUAAGUAAGCCTT	998	GUUCUUAUUAUUCUGAAAT	1194	ND-9114
AAUGCGAUUGGUAUUGGUCGAA	873	UGCGAUUGGUAUUGGUCGTT	999	CAGCAUAACCAUUCGCATT	1195	ND-9115
AAACCAAAUUGCGUAUUCAGACAA	874	CCAAAUUUGCGUAUUCAGATT	1000	CUGUACUACGCAUUVUUGTT	1196	ND-9116
AAAGACAGCAUAGCGUUGUUA	875	GACAGCAUAGCGUUGUUT	1001	AAACAAGCAUUGGUGUCT	1197	ND-9117
AAUUCUUAACGGAAGAAAGGGGAA	876	UGUUAACGGUAGAAAGGGCGTT	1002	CGCCCUUUAUCCUGUAACATT	1198	ND-9118
AAAGACAAUUAUUAUAGUCCUAA	877	AGACAAUUAUUAUAGUCCU	1003	AGGACUAUUAUUAUUGUCU	1199	ND-9119
AAAUUGUAUUAUUAACACAGCCAA	878	AUGUAUUAUUAACACAGCCTT	1004	GCCUGUGUUAUUAUUAUCATT	1200	ND-9120
AAAGAUUGGUAUUGGUAUAGCAA	879	AGAUUGGUAUUGGUAUAGU	1005	CAUUAUCCUUAUUAUUCATT	1201	ND-9121
AAUCUGCAAGGUCUGUAUUAUUA	880	UCGCAAGGUCUGUAUUAU	1006	AUUAUUAACAGCCUUCGAC	1202	ND-9122
AAUUCAGUAGCAGAAACGAA	881	UCAGUAGCAGAAACGAAAT	1007	UUUUGUUCUGUACUUGATT	1203	ND-9123
AAACCAUUGUAUUCAGUAUUGAA	882	CACCAUUGUAUUCAGUAUAGTT	1008	CUUAUUCAGUAUUGUGU	1204	ND-9124
AAAGACACCAUUCGCUUUGUUA	883	AGACACCAUUCGCUUUGU	1009	AAACAAGCAUUGGUCUGU	1205	ND-9125
AAAGAGGCUACGGAGUUAUUA	884	AGAGGCUACGGAGUUAUUT	1010	AUUAUUAUCCCGAACCCU	1206	ND-9126
AAAAAGUAUUAUUAUCAAACCUAA	885	AAAAAGUAUUAUUAUCAA	1011	ACGUGUAUUAUUAUUCU	1207	ND-9127
AAAAAGCAUAGCAUUGGUA	886	AAAGCAUAGCAUUGGUA	1012	UAACCAUUGCUAUGCU	1208	ND-9128

AAUUGUACA	UUUGAAUUUAUCAA	887	UUUGACA	UUUGAAUUUAU	CATT	1013	UGAAUUAU	CAAUUGACA	T	1209	ND-9129
AAUUAAGCA	UAGACCAUUGGA	888	GUAAAGCA	UAGACCAUUGG	T	1014	CCAUGGCU	AAUGCUUUA	CTT	1210	ND-9130
AAAUCAAC	GUUGGCGAU	1015	AAUCCAA	CACG	UUUGAUUU	T	1211	ND-9131			
GAGCCUCC	AAAUUGCGAU	1016	UACGCAU	UUUUGAGG	CUCT	1212	ND-9132				
UCAAAGU	UGGGAUUGG	1017	ACCAUCC	AAACG	UUGAT	1213	ND-9133				
UCCAAA	AUUUGGUA	1018	UGAAC	UACGCAU	UUUUGGAT	1214	ND-9134				
AAUCAA	CGUUGCGAU	1019	CAAUCG	CAACG	UUGAU	1215	ND-9135				
CUCCAAA	AUUUGCGAU	1020	UACUACG	CAU	UUUGAGCT	1216	ND-9136				
AGAGCCU	CCAAA	1021	ACGCAU	UUUGAGG	CUCT	1217	ND-9137				
CAACG	GUUGCGAU	1022	CACCAU	CGCAACG	UUGT	1218	ND-9138				
AUAGAU	GUAGGGAU	1023	UCUACC	UAUACAU	CUAU	1219	ND-9139				
GGGAAG	AGGUA	1024	CAUCC	GUACCU	CUCCCT	1220	ND-9140				
AGAUUA	GUUGCAGAG	1025	CCUGG	CAACU	UAUUCU	1221	ND-9141				
GGUAU	CAAGGUAGAU	1026	AACU	CUACCU	UGAUAC	1222	ND-9142				
AcuAgu	CAUuuAguGAT	1027	UCCAU	AAUuACUA	AGU	1223	ND-9143				
GAGAU	uuuuGAAAGGAA	1028	UUCGCU	UCAA	AAUUAUCU	1224	ND-9144				
AACAC	CAUGAUGA	1029	AUACUG	ACUAUGG	UUT	1225	ND-9145				
AGCCU	CCAAA	1030	CUACG	CAU	UUUGAGG	CUCT	1226	ND-9146			
GCCU	CCAAA	1031	ACUA	CGCAU	UUUGAGG	CUCT	1227	ND-9147			
GUUAU	GGAGACAGCC	1032	CUGGC	GUUCU	CCUA	CACT	1228	ND-9148			
GUACA	UUGGCGUACGAU	1033	UAUCG	UAGCC	CAUUGA	CT	1229	ND-9149			
UACA	UUGGCGUACGAU	1034	UAUCG	UAGCC	CAUUGA	CT	1230	ND-9150			
UGACA	UAGAGCAUAGU	1035	ACUA	UCGUACUA	UGUCA	CT	1231	ND-9151			
GACA	UAGAGCAUAGU	1036	CACUA	CGCUACUA	UGUC	CT	1232	ND-9152			
Acucu	UUGCCAAAGUUUA	1037	UUAAC	GUUGG	CAAGAGU	CT	1233	ND-9153			
AUAAU	GAUAGAGAGAT	1038	UGGCU	ACUAU	UGCAUUAU	CT	1234	ND-9154			
AAUuuu	GGGUAUCCACT	1039	GUGG	CUACCA	AAUUAU	CT	1235	ND-9155			
AcGu	UGCGAUUGGUAT	1040	UAC	CAUCC	CAACAGU	CT	1236	ND-9156			

CGAAAGUuuuGGUGuGuctST 1041 GACuACCCAAAuACUuUGctST 1237 ND-9157
cuccAAAAuuuGcGuAGuActST 1042 GuACuACGcCAuUuUGAGctST 1238 ND-9158
UGGuACAAuGGGccuGctST 1043 UCGAGGCCAUUGuACcATST 1239 ND-9159
uAAUGAcAuAGAGAGcGauTST 1044 AUGGUcUAcuUUGUcAUuATST 1240 ND-9160
AcAuAGuAGAcGauAGuGATST 1045 UcAUuUGGUcUAcuUUGUTST 1241 ND-9161
GuGuAGAcAuUuAAAAGATST 1046 UCGUuUuAAUUGUcUAcACTST 1242 ND-9162
uAGAcAuUuAAAAGcGATST 1047 UCGUGUuAAUAGUcUAATST 1243 ND-9163
uuGcGAuuGGuCuAuUGctST 1048 AGcAUuAcCAuUUGcCAATST 1244 ND-9164
uuGcAGAcAuAAuAGuATST 1049 uACuAUuAGUGUcUGcCAATST 1245 ND-9165
uuCGAAuuuAGuAGAcGATST 1050 UGGuCUuACuAAUUCUGATST 1246 ND-9166
GGAGAuuuuuGAAAGcGATST 1051 UCGCUUcAAAuAUUCCTST 1247 ND-9167
AccAuGuAGuAGuAGuATST 1052 ACuAUACUGAcUAUGUTST 1248 ND-9168
GAAGGGGuAcGGGAGuATST 1053 uACAUCCGUAcCCUUCST 1249 ND-9169
AuAAuAcAAcGuUGcGATST 1054 UCGAcACGUGAUUuATST 1250 ND-9170
cGuGuUGcGAuuGGuAuTST 1055 AuAcACcAUUGcAAcAGCTST 1251 ND-9171
uGGGccuAGAuAGAcATST 1056 UGUcAUuAGUAGGcCATST 1252 ND-9172
uGcAuAuAcuAuAGuGutST 1057 cACcAuAuAGuAuUgCATST 1253 ND-9173
cCAGAuUuAGuuuGcAGATST 1058 UCGUGcAAcUuAAUUGGCTST 1254 ND-9174
AGAuUuUUuGAAAGcGAGTST 1059 CUUGCGUUCAAuAAUUCUTST 1255 ND-9175
GuuAcAGGuAGAGGcGCTST 1060 GCGCCUUCuACCUUGcACTST 1256 ND-9176
GccAAAAuAGuAGuAGTST 1061 CuAAcAUcCUuUUGGCTST 1257 ND-9177
GcAuAGAcAuUGGuAAATST 1062 UUGAcCAUGGUcUAUGCTST 1258 ND-9178
AAAuUGcGAuGAcAGTST 1063 CUGCUGuACuAGcCAUUTST 1259 ND-9179
AGuAuUGGGuAGuAcAuTST 1064 AGUGAcUAcCCAAuAUUTST 1260 ND-9180
AuGAcAuGAGAcGauAGTST 1065 CuAUcGUcUAcuUUGcAUUTST 1261 ND-9181
GGuAGuccAcuAGuAuATST 1066 uAUcAUAGUGAGAcUAcCTST 1262 ND-9182
AGcAuAGAcAuUGGuAcATST 1067 UGuACcAUUGGUcUAUGUTST 1263 ND-9183
uuuCGAAuAuGAAAGcCTST 1068 GGUcUuAcuAAUUCUGAAATST 1264 ND-9184

AAAUUCAAUUAUUGUGAAGAA	889	AUUAUCAAUUAUUGAAGTT	1085	CUUACUAAUUAUUGAUATT	1281	AL-DP-8042
AAUUAUCAAUUAUUGAAGUAA	890	UAUUAUUAUUAUGAAGUTT	1086	ACUUCACUAAUUAUUGAUATT	1282	AL-DP-8043
AAAGGUUUGCAUUAUCUGAAGAA	891	GGGUUAUGCAUUAUCGAAGTT	1087	CUUACAUUAUUGCAUUAACCTT	1283	AL-DP-8044
AACAACGUUUAUUGUGUCUCAA	892	CAACGUUUAUUGUGUCUUTT	1088	GACACAUUUAUUAACGUUTT	1284	AL-DP-8045
AAAACGUUUAUUGUGUCUCAA	893	AACGUUUAUUGUGUCUCAA	1089	UGACACAUUUAUUAACGUUTT	1285	AL-DP-8046
AAAGAAAAGAUAGAGACUCUUA	894	GAAAGCAUAGAGACUCUUTT	1090	AAGAGUCUCCAUCGUUUUUTT	1286	AL-DP-8047
AAAGGGUAUGCAUUAUCUGAAA	895	GGGGUAUGCAUUAUCUGATT	1091	UCAGUAUUGCAUUAACCGCTT	1287	AL-DP-8048
AAAGGGUAUGCAUUAUCUGAAA	896	CGGGUAUGCAUUAUCUGAATT	1092	UUCAGUAUUGCAUUAACCGCTT	1288	AL-DP-8049
AAUUAUAAAAGAGAGAAAAAAA	897	UUUAUAAAAGAGAGAAAAAATT	1093	UUUUUCUGCUCGUUUUAUAAATT	1289	AL-DP-8050
AAACAUGUGUAGACAUUUAUAAA	898	ACAUGUGUAGACAUUUAUUAATT	1094	UAUAUGUCUAACAUUUGUTT	1290	AL-DP-8051
AAAUUAUAAAAGAGAGAAAAAA	899	AUUUAUAAAAGAGAGAAATT	1095	UUUUUCUGCUCGUUUUAUAAATT	1291	AL-DP-8052
AAUGUGUAGACAUUUAUAAAAGAA	900	UGUGUAGACAUUUAUAAACGTT	1096	CGUUUAUUAUGUCUACACATT	1292	AL-DP-8053
UCGGAUUGGUUAUUGCUGTST	1069	CAGCAUAACACAAUUGCATST	1265	ND-9185		
CCAAAuuugcguAuaGAcGTST	1070	CUguAcuAcGcAAUuuUGcTST	1266	ND-9186		
GAcAGcAcAuGcGuuGuuTST	1071	AAAcAAAGcAuGUGcUGcTST	1267	ND-9187		
UGuuAcAGGUAAGAGGcGTST	1072	CGCCCUUCuAcCUgUAACATST	1268	ND-9188		
AGAcAAUAAUuuAuGuCCUcTST	1073	AGAcUAUAUUAUUGUCUcTST	1269	ND-9189		
AUGAUuuuuAAcAcAGcGTST	1074	GCCUGUuuAAUAUAUcAUcTST	1270	ND-9190		
AGAUgUAuAGGUAuAGUcTST	1075	CAUCuAcCCuAcUcAcAUcUcTST	1271	ND-9191		
cUGcAAAGGGuCuGuAAuAuTST	1076	AuAuUAcAGAcCCUUGcAGcTST	1272	ND-9192		
UCAGAUgAcGAGAAcGAAATST	1077	UUUCGUUCUGUcAUcUGATST	1273	ND-9193		
ChAcAUgUAuCAGUAuAGTST	1078	CUAUAcUGAcUAcAUgUGcTST	1274	ND-9194		
AGAcAGcAcAuGcGuuGuTST	1079	AAcAAcGcAuGUGcUGcUcTST	1275	ND-9195		
AGAGGGUAcGGGAUUAuTST	1080	AUUAcAUCCGUAACCCUcUcTST	1276	ND-9196		
AAAAGuAAUAUAUcAcGUcTST	1081	AGGUUAUUAUUAUcUUUcTST	1277	ND-9197		
AAAGcAUAGAcCAUUGUAcTST	1082	uAcCAUUGGUcUAUGcUUUcTST	1278	ND-9198		
uuGuAcAuuuGAUuuAuCATST	1083	UGAUAAUUCAAUUGUAcAAcTST	1279	ND-9199		
GuAAAGcAUAGAcCAUUGcTST	1084	CCAUGGUcUAUGcUUUAcTST	1280	ND-9200		

AAUGUGUCAGGACAAAUAUATA	901	UGUGUGUCAGGACAAAUAUATA	1097	UAUUUGUGUGUGACACACATT	1293	AL-DP-8054
AAACAUUAUAAACGACGACAAA	902	ACAUAUAAACGACGACACATT	1098	UUCUGUGUGUUUAUAUGUTT	1294	AL-DP-8055
AAAGACAGCGGGUAUGGCAUUA	903	AGACAGCGGGUAUGGCAUUA	1099	AUUGGCAUACCGGUGUGUTT	1295	AL-DP-8056
AAACAGCGGGUAUGGCAUUAATA	904	GACAGCGGGUAUGGCAUUAATT	1100	UAUUGGCAUACCGGUGUGUTT	1296	AL-DP-8057
AAACAGCGGGUAUGGCAUUAATA	905	ACAGCGGGUAUGGCAUUAATT	1101	GUUUGGCAUACCGGUGUGUTT	1297	AL-DP-8058
AAAGCGGGUAUGGCAUUAATA	906	ACGGGGUAUGGCAUUAUATT	1102	CAGUAUUGGCAUACCGGUGUTT	1298	AL-DP-8059
AAACAAUUGUGUAGACAUUAUA	907	AACAAUUGUGUAGACAUUAUATT	1103	AUAAUUGUCUACACAUUGUGUTT	1299	AL-DP-8060
AAACAUUAUAAACGACGACAAA	908	CAUUAUAAACGACGACAAATT	1104	UUUCUGUGUGUUUAUAUGUTT	1300	AL-DP-8061
AAACGUUUAAUUGUGUGACAA	909	ACGUUUAAUUGUGUGUGACATT	1105	UGACACACAUUUAAACGUTT	1301	AL-DP-8062
AAAAUUGUGUGUCAGGACAAA	910	AAUUGUGUGUCAGGACAAATT	1106	UUUGUGUGUGUUAUAACGUTT	1302	AL-DP-8063
AAAGUUCUAAAAAGAAAGUAUA	911	GGUUCUAAAAAGAAAGUAUATT	1107	AUACUUUGUGUUUAUAACGUTT	1303	AL-DP-8064
AAUUGUGUAGACAUUAUAATA	912	AUGUGUAGACAUUAUAUATT	1108	GUUUAUAUUGUCUACACATT	1304	AL-DP-8065
AAAGUAAAGACCAUUUAAAGUAA	913	AGUAAAGACCAUUUAAAGUATT	1109	ACUUUAAUUGUGUCUACATT	1305	AL-DP-8066
AAUAGUAAAGACCAUUUAAAGAA	914	UAGUAAAGACCAUUUAAAGATT	1110	CUUUAAUUGUGUCUACATT	1306	AL-DP-8067
AAAGAUUAAGUAGACCAUUUAA	915	GAUUAUAGUAGACCAUUUATT	1111	UAAUUGUGUCUACUAUUGUTT	1307	AL-DP-8068
AAAAUUGUAAAGACCAUUUAA	916	AAUUAUAGUAGACCAUUUATT	1112	UUAAUUGUGUCUACUAUUTT	1308	AL-DP-8069
AAUUAUAGUAAAGACCAUUUAA	917	AUUAUAGUAAAGACCAUUUATT	1113	UUUAAUUGUGUCUACUAUUTT	1309	AL-DP-8070
AAUUAUAGUAAAGACCAUUUAA	918	UUAUUAAGUAAAGACCAUUUATT	1114	UUUAAUUGUGUCUACUAUUTT	1310	AL-DP-8071
AAAAUUAUAGUAAAGACCAU	919	AAUUAUAGUAAAGACCAUATT	1115	GAGUUCUACUUCAGUAUUTT	1311	AL-DP-8072
AAUUAUAGUAAAGACCAU	920	AUUAUAGUAAAGACCAUATT	1116	UGAGUUUCCACUUCAGUAUUTT	1312	AL-DP-8073
AAUUAUAGUAAAGACCAU	921	CAUUAUAGUAAAGACCAUATT	1117	AGUUUCCACUUCAGUAUUTT	1313	AL-DP-8074
AAUUAUAGUAAAGACCAU	922	UACUUAUAGUAAAGACCAUATT	1118	CUGAGUUUCCACUUCAGUAUUTT	1314	AL-DP-8075
AAUUAUAGUAAAGACCAU	923	ACUUAUAGUAAAGACCAUATT	1119	GCUGAGUUUCCACUUCAGUAUUTT	1315	AL-DP-8076
AAUUAUAGUAAAGACCAU	924	CUGAGUAAAGACCAUUCAGATT	1120	UGCUGAGUUUCCACUUCAGUAUUTT	1316	AL-DP-8077
AAUUAUAGUAAAGACCAU	925	UGAGUAAAGACCAUUCAGATT	1121	CUGCUGAGUUUCCACUUCAGUAUUTT	1317	AL-DP-8078
AAUUAUAGUAAAGACCAU	926	GAAGUAAAGACCAUUCAGATT	1122	UCUGCUGAGUUUCCACUUCAGUAUUTT	1318	AL-DP-8079
AAUUAUAGUAAAGACCAU	927	AAGUAAAGACCAUUCAGUAUUTT	1123	AUCUGCUGAGUUUCCACUUCAGUAUUTT	1319	AL-DP-8080
AAUUAUAGUAAAGACCAU	928	AGUAAAGACCAUUCAGUAUUTT	1124	CAUCUGCUGAGUUUCCACUUCAGUAUUTT	1320	AL-DP-8081

```

AAUUGCAUACUGAAGUGGAAA 929 AUGGCAUACUGAAGUGGATT 1125 UCCACUUCAGUAVUGCCAU 1321 AL-DE-8082
AAAAUCCUUUUUCUCAAGGAAA 930 AAUUCUUUUUCUCAAGGATT 1126 UCCUUGAGAAAAAGAUUTT 1322 AL-DE-8083
AAUCCUUUUUCUCAAGGAGUAA 931 UCCUUUUUCUCAAGGAGUATT 1127 ACUCCUUGAGAAAAAGATT 1323 AL-DE-8084
AAUCCUUUUUCUCAAGGAGGAA 932 AUCCUUUUUCUCAAGGAGUATT 1128 CGUCCUUGAGAAAAAGAUUTT 1324 AL-DE-8085
AAGCAUACUGAAGUGGAAAAA 933 GCAUACUGAAGUGGAAATT 1129 UUCCACUUCAGUAVUGCCTT 1325 AL-DE-8086
AACUUUUUCUCAAGGAGUGGAA 934 CUUUUUUCUCAAGGAGUGGTT 1130 CCAGGUCUUGAGAAAAAGTT 1326 AL-DE-8087
AACUUUUUCUCAAGGAGUGGAA 935 CCUUUUUCUCAAGGAGUGGTT 1131 CACGUCUUGAGAAAAAGTT 1327 AL-DE-8088
AAUUUUUCUCAAGGAGUGGAA 936 UUUUUUCUCAAGGAGUGGTT 1132 ACCAGUCCUUGAGAAAAATT 1328 AL-DE-8089
AAUGGAAUCCUUUUUCUCAAAA 937 UGGAUUCUUUUUCUCAATT 1133 UUGAGAAAAAGAUUUCCATT 1329 AL-DE-8090
AAGGAAUCCUUUUUCUCAAGAA 938 GGAUUCUUUUUCUCAAGTT 1134 CUUGAGAAAAAGAUUUCCCTT 1330 AL-DE-8091
AAGAAUCCUUUUUCUCAAGAA 939 GAAUUCUUUUUCUCAAGTT 1135 CCUGAGAAAAAGAUUUCCCTT 1331 AL-DE-8092
AAAAUCCUUUUUCUCAAGGACA 940 AAUCCUUUUUCUCAAGGACTT 1136 GUCCUUGAGAAAAAGAUUTT 1332 AL-DE-8093
AAUUGGCAUACUGAAGUGGAA 941 UAUGGCAUACUGAAGUGGTT 1137 CCACUUCAGUAVUGCCAUATT 1333 AL-DE-8094
AAUUGGCAUACUGAAGUGGAAA 942 UGGAUACUGAAGUGGAAATT 1138 UUCACUUCAGUAVUGCCATT 1334 AL-DE-8095
AAGCAUACUGAAGUGGAAACAA 943 GCAUACUGAAGUGGAAACTT 1139 GUUCCACUUCAGUAVUGCCTT 1335 AL-DE-8096
AAAAUUGUAGACAUUUA AAAA 944 AAUUGUAGACAUUUAUAATT 1140 UUUUAUAGUUCUACACAUUTT 1336 AL-DE-8097

```

<251>

<252>

HPV E1 유전자 발현을 표적으로 하는 siRNA의 테스트

<253>

변형되지 않은 dsRNA 및 화학적으로 변형된 dsRNA를 테스트하여, 세포 내에서 HPV E1 유전자를 코딩하는 mRNA의 발현 수준을 감소시키는 이들의 상대적인 능력을 확인하였다.

<254>

사용된 분석 조건은 하기와 같았다: C33A 세포를 ATCC로부터 획득하였다. HPV16 E6 및 E1을 코딩하는 서열을 YFP 융합 전사물질로 발현을 위해 pNAS-055 벡터 ([Husken et al., Nucleic Acids Research, 31:e102, 2003]) 내로 클로닝하였다. 생성된 플라스미드를 C33A 세포 내로 형질감염시켰고, 이러한 융합 전사물 발현하는 안정적인 세포주가 제조업자의 프로토콜 (Invitrogen)에 따라 제오신(Zeocin) 선별에 의해 유도되었다. HPV16 E6 또는 HPV16 E1에 대한 siRNA로의 형질감염을 위해, 각각의 세포를 2.0×10^4 개의 세포/웰의 밀도로 96웰 플레이트에 파종하고, 직접적으로 형질감염시켰다. siRNA (지시된 바와 같이 30nM, 3nM 또는 300pm)의 형질감염을 제조업자가 기술한 바와 같이 리포펙타민 2000® (Invitrogen)로 단일 용량에서 수행하였다.

<255>

형질감염 24시간 후, 세포를 용해시키고, 융합 YFP mRNA 발현 수준을 표준 프로토콜에 따라 YFP에 대해 지시된 프로브를 사용하여 퀀티진 익스플로러 키트 (Panomics, Inc. (Fremont, CA) (예전의 Genospectra, Inc.))를 사용하여 정량하였다. 융합-YFP mRNA 수준을 GAP-DH mRNA에 표준화하였다. 각각의 siRNA에 대해, 4개의 개별적인 데이터포인트를 수집하였다. HPV16 E1 또는 E6 유전자에 관련되지 않은 siRNA 듀플렉스를 대조군으로 사용하였다. 대조군 siRNA 듀플렉스로 처리된 세포에서의 동일한 전사물의 농도와 비교하여 처리된 세포에서의 용

합-YFP mRNA 농도 백분율로 소정의 siRNA 듀플렉스의 활성이 표현되었다.

표 6은 본 발명의 E1 dsRNA의 테스트 결과를 나타낸다.

표 6

듀플렉스 dsRNA	300pM에서의 처리 후에 잔존하는 %mRNA	표준 편차
ND-9061	41.45	10.69
ND-9062	30.67	10.43
ND-9063	61.87	22.99
ND-9064	40.79	22.73
ND-9065	68.58	28.46
ND-9066	23.51	7.60
ND-9067	37.13	13.60
ND-9068	34.50	17.21
ND-9069	40.61	12.42
ND-9070	32.61	8.73
ND-9071	30.68	11.65
ND-9072	24.38	7.47
ND-9073	76.28	15.06
ND-9074	29.11	10.42
ND-9075	27.20	11.56
ND-9076	42.06	17.88
ND-9077	51.19	9.09
ND-9078	43.42	16.63
ND-9079	25.79	4.85
ND-9080	29.33	5.67
ND-9081	36.66	4.51
ND-9082	48.67	10.47
ND-9083	39.51	12.70
ND-9084	44.28	7.54
ND-9085	55.73	9.77
ND-9086	28.90	7.93
ND-9087	28.88	5.47
ND-9088	45.35	11.67
ND-9089	49.13	12.46
ND-9090	41.76	5.88
ND-9091	31.35	9.16

ND-9092	23.79	8.74
ND-9093	47.62	9.89
ND-9094	91.33	29.84
ND-9095	43.33	8.69
ND-9096	63.53	11.44
ND-9097	30.51	4.48
ND-9098	40.76	10.57
ND-9099	37.61	9.94
ND-9100	106.18	30.69
ND-9101	37.75	16.37
ND-9102	41.98	14.66
ND-9103	98.17	14.30
ND-9104	29.61	11.44
ND-9105	29.71	6.48
ND-9106	51.42	14.12
ND-9107	78.38	28.72
ND-9108	34.69	4.19
ND-9109	97.63	14.18
ND-9110	47.58	7.48
ND-9111	65.14	15.02
ND-9112	30.24	7.33
ND-9113	31.69	10.80
ND-9114	108.54	7.17
ND-9115	87.16	14.74
ND-9116	56.35	14.69
ND-9117	33.79	8.42
ND-9118	65.12	19.60
ND-9119	33.37	12.37
ND-9120	70.98	18.74
ND-9121	39.37	10.06
ND-9122	33.24	14.79
ND-9123	20.37	7.53
ND-9124	30.47	5.18
ND-9125	26.22	5.56
ND-9126	29.86	5.15
ND-9127	84.95	22.37
ND-9128	35.14	6.10
ND-9129	49.41	15.75
ND-9130	51.54	12.31

<258>

ND-9131	45.51	7.96
ND-9132	81.48	16.52
ND-9133	46.79	13.27
ND-9134	63.22	32.12
ND-9135	118.82	19.88
ND-9136	47.83	12.16
ND-9137	65.11	15.44
ND-9138	92.31	36.27
ND-9139	42.01	10.70
ND-9140	40.54	7.24
ND-9141	101.31	24.39
ND-9142	33.83	7.06
ND-9143	86.43	16.50
ND-9144	33.94	11.74
ND-9145	41.93	12.85
ND-9146	118.24	29.81
ND-9147	69.90	30.13
ND-9148	40.74	6.28
ND-9149	65.26	10.10
ND-9150	36.62	4.85
ND-9151	27.83	4.48
ND-9152	88.99	9.86
ND-9153	66.45	33.75
ND-9154	45.42	8.86
ND-9155	63.55	8.36
ND-9156	53.00	7.71
ND-9157	32.74	7.39
ND-9158	102.06	26.87
ND-9159	59.47	10.16
ND-9160	31.23	7.52
ND-9161	84.78	36.89
ND-9162	24.83	5.17
ND-9163	26.64	5.90
ND-9164	77.97	10.06
ND-9165	59.95	25.75
ND-9166	69.74	8.15
ND-9167	23.04	5.43
ND-9168	46.16	12.02
ND-9169	62.24	11.73

<259>

ND-9170	92.69	14.72
ND-9171	46.55	6.56
ND-9172	49.39	16.23
ND-9173	98.36	37.53
ND-9174	44.90	13.73
ND-9175	69.98	18.22
ND-9176	60.73	13.02
ND-9177	70.93	10.18
ND-9178	62.53	7.70
ND-9179	76.68	31.77
ND-9180	66.35	10.48
ND-9181	78.42	12.70
ND-9182	72.09	28.88
ND-9183	58.97	28.59
ND-9184	97.06	8.62
ND-9185	85.29	16.92
ND-9186	77.52	18.17
ND-9187	60.16	36.16
ND-9188	58.61	39.92
ND-9189	69.35	30.11
ND-9190	71.87	36.13
ND-9191	81.64	18.99
ND-9192	52.76	14.33
ND-9193	25.18	8.23
ND-9194	50.69	12.78
ND-9195	40.01	10.21
ND-9196	47.41	15.85
ND-9197	94.68	24.60
ND-9198	103.12	27.52
ND-9199	50.82	15.18
ND-9200	97.72	24.20
AL-DP-8042	117.14	34.54
AL-DP-8043	131.44	38.69
AL-DP-8044	28.60	11.52
AL-DP-8045	120.81	36.35
AL-DP-8046	93.19	17.57
AL-DP-8047	66.27	5.06
AL-DP-8048	33.70	8.18
AL-DP-8049	34.31	7.16

<260>

AL-DP-8050	60.60	19.36
AL-DP-8051	66.49	12.36
AL-DP-8052	45.46	12.49
AL-DP-8053	121.92	29.06
AL-DP-8054	45.00	4.56
AL-DP-8055	51.64	9.55
AL-DP-8056	35.51	4.67
AL-DP-8057	45.89	8.82
AL-DP-8058	38.47	4.44
AL-DP-8059	34.97	7.85
AL-DP-8060	66.44	14.39
AL-DP-8061	52.17	12.80
AL-DP-8062	100.52	25.88
AL-DP-8063	43.83	8.22
AL-DP-8064	26.25	5.84
AL-DP-8065	107.74	32.53
AL-DP-8066	94.13	13.45
AL-DP-8067	107.09	17.49
AL-DP-8068	48.99	10.40
AL-DP-8069	68.14	19.39
AL-DP-8070	60.42	11.52
AL-DP-8071	71.76	13.75
AL-DP-8072	62.25	6.16
AL-DP-8073	31.33	7.21
AL-DP-8074	47.97	11.55
AL-DP-8075	51.35	14.67
AL-DP-8076	50.40	17.25
AL-DP-8077	38.99	8.15
AL-DP-8078	50.93	11.54
AL-DP-8079	32.27	10.82
AL-DP-8080	33.91	10.48
AL-DP-8081	31.45	6.72
AL-DP-8082	26.41	7.99
AL-DP-8083	86.75	6.66
AL-DP-8084	112.73	25.79
AL-DP-8085	112.33	22.53
AL-DP-8086	39.84	12.22
AL-DP-8087	104.24	29.47
AL-DP-8088	59.29	13.99

<261>

AL-DP-8089	114.08	24.06
AL-DP-8090	35.69	6.75
AL-DP-8091	47.28	12.14
AL-DP-8092	92.85	19.28
AL-DP-8093	102.59	15.83
AL-DP-8094	87.51	18.86
AL-DP-8095	27.99	8.27
AL-DP-8096	31.74	7.52
AL-DP-8097	40.29	9.18

<262>

<263> HPV E6 유전자 발현을 표적으로 하는 dsRNA의 디자인

<264> 표 7에 본 발명의 dsRNA 조성물이 기재된다.

대문자: 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 (단, T는 변형되지 않은 테오시리보뉴클레오타이드)
 소문자: 리보스 모이티 상에 2'-O-메틸 치환체를 보유하는 리보뉴클레오타이드
 s: 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 결합의 위치를 가리킨다
 choi: 3' 리보뉴클레오타이드에 접합된 플라스테를 모이티.
 '뉴클레스 명칭'은 지시된 센스 가닥 및 지시된 안티센스 가닥의 특이적 혼성화에 의해 형성된
 조성물의 명칭을 의미한다.

HPV E6 기준 서열로부터의 mRNA의 표적 서열 (총 19쌍의 표적 부위 + 양쪽 말단의 AA의 서열)	서열 번호	이중 TT 오버행이 있는 센스 가닥 (표적 서열) (5'-3')	서열 번호	이중 TT 오버행이 있는 안티센스 가닥 (안배 서열) (5'-3')	서열 번호	뉴클레스 명칭
AAUCGUGGACCGGUCGAUGUAA	1336	UCGGUGGACCGGUCGAUGUTT	1424	ACAUCGACCGGUCACCGATT	1586	ND-8899
AAAGUCGUGGACCGGUCGAUAA	1337	GGUCGUGGACCGGUCGAUTT	1425	AUCGACCGGUCACCGACTT	1587	ND-8900
AAAGGUGGACCGGUCGAUGUAAA	1338	CGGUGGACCGGUCGAUGUATT	1426	UACAUCCGACCGGUCACCGTT	1588	ND-8901
AAAGGUGGACCGGUCGAUGAA	1339	GUCGUGGACCGGUCGAUGTT	1427	CAUCGACCGGUCACCGACTT	1589	ND-8902
AAAUCAUCAAGACACGUAAGAAA	1340	AUCAUCAAGACACGUAAGATT	1428	UCUACGUGUCUUGAUGAUTT	1590	ND-8903
AAACAAGUACUCCGACGUGAA	1341	CAACAAGUACUCCGACGUGTT	1429	CACGUGCAGUAACGUGTT	1591	ND-8904
AAACAUAACAACACCGUUGUAA	1342	CAUAUAACAACACCGUUGUTT	1430	ACAACGUGUGUUGAUGGTT	1592	ND-8905
AAAGUGCAACAACUAUAUAUA	1343	GCUGCAACAACUAUAUAUUTT	1431	AUGUAUAUGUUGUUGACGTT	1593	ND-8906
AAAGUGACCGGUCGAUGUAA	1344	GGUGACCGGUCGAUGUUTT	1432	AUACAUCCGACCGGUCACCTT	1594	ND-8907
AAAAUUAUGAGUAUAGACAAA	1345	AAAUUUAUGAGUAUAGACATT	1433	UGUCUAUACUCACUAUUUTT	1595	ND-8908
AAUCAUCAAGACACGUAAGAAA	1346	UCAUCAUCAAGACACGUAAGTT	1434	CUCUACGUGUCUUGAUGATT	1596	ND-8909
AAAUACAACAACCGUUGUAA	1347	AUAACAACAACCGUUGUUTT	1435	ACAACAACGUGUUGUUGAUTT	1597	ND-8910
AAUGGACCGGUCGAUGUAA	1348	UGGACCGGUCGAUGUUGUTT	1436	ACAUAACAACGACCGGUCATT	1598	ND-8911

7

AAUACAACAACCGUUGUGGAA 1349 UACAACAACCGUUGUGGTT 1437 CACAACAAGGUUGUGUATT 1599 ND-8912
AAAGAUUCCAUAAUUAAGGAA 1350 AGAUUCCAUAAUUAAGGTT 1438 CCCUAAUUAUGAAUCUTT 1600 ND-8913
AACAAACAAGUUAUCGGAAA 1351 CAAGCAAGUUAUCGGATT 1439 UCGAGUAAUCUGUGCUTT 1601 ND-8914
AAGUAAUUAAGUGUAUUAACA 1352 GUUAUUAAGUGUAUUAACCT 1440 GUUAUUAACCUAAUUAACCT 1602 ND-8915
AAUUGCUUUUCGGAUUUUAUA 1353 UUGCUUUUCGGAUUUUAUTT 1441 AUAAAUCCGAAAGCAAACT 1603 ND-8916
AAACUUUGCUUUUCGGAUUUUA 1354 ACUUUGCUUUUCGGAUUUUTT 1442 AAUUCGAAAGCAAAAGUTT 1604 ND-8917
AACUGCAACAACUUAACUGAA 1355 CUACAACAACUUAACUGTT 1443 CAUGUAUAGUUGUUCAGATT 1605 ND-8918
AAUUGACUUUGCUUUUCGGAAA 1356 AUGACUUUGCUUUUCGGATT 1444 UCCGAAAGCAAAAGUATT 1606 ND-8919
AACGACCCAGAAAGUACCAAA 1357 CGACCCAGAAAGUACCACTT 1445 GUGUAACUUUCGGUCGTT 1607 ND-8920
AAUUAACUGCAGCUGAGUAUUA 1358 UUAACUGCAGCUGAGUAUTT 1446 AUACCUACGUCGAGUAATT 1608 ND-8921
AAGUUAACUGCAGCUGAGUAAA 1359 GUUAACUGCAGCUGAGUATT 1447 UACCUACGUCGAGUAATT 1609 ND-8922
AAUGCGACGUGAGUAUUAAGAA 1360 UCGCAGCUGAGUAUUAAGATT 1448 UCAUAUACCUACGUGCATT 1610 ND-8923
AAGUCGAGUUAUGUCUUGGAA 1361 GUUGAGUUAUGUCUUGGTT 1449 CAACAAGCAUACAUCGACTT 1611 ND-8924
AACGACGUGAGUAUUAACUAA 1362 CGACGUGAGUAUUAACUUTT 1450 AGUCAUUAACCUACGUCGTT 1612 ND-8925
AAGACUUUGCUUUUCGGAUUA 1363 GACUUUGCUUUUCGGAUUTT 1451 AUCCGAAAGCAAAAGUCTT 1613 ND-8926
AAUUAAGUGUAUUAACUGCAA 1364 UUAAGUGUAUUAACUGCATT 1452 UGACAGUUAUUAACCUAATT 1614 ND-8927
AAUUAACAAGUUAAGCACAAGAA 1365 UUAACAAGUUAAGCACAATT 1453 CUGGCAUUAACUGGUAATT 1615 ND-8928
AAGCAACAAGUUAUCGGAGUAA 1366 GCAACAAGUUAUCGGAGUUTT 1454 ACGGCAAGUUAACUGUGCTT 1616 ND-8929
AAUGCUUUUCGGAUUUUAUGCAA 1367 UGCUUUUCGGAUUUUAAGCTT 1455 GCAUAAUCCGAAAGCAATT 1617 ND-8930
AAUUAAGCAUAUAGACAUUAAA 1368 UUAAGCAUAUAGACAUUAATT 1456 UAAUGCUUAUACUCACUAATT 1618 ND-8931
AAUUAUUAAGUGUAUUAACUGAA 1369 UAAUUAAGUGUAUUAACUGTT 1457 CAGUUAUUAACCUAAUUAATT 1619 ND-8932
AAGAUUAUUGCUUUUGCAGAA 1370 GAUGAUUAUGCUUUUGCAGTT 1458 CUGCAACAAGCAUUAUCUATT 1620 ND-8933
AACCGUGCAUUAUGUCUUUGAA 1371 CCGGUGCAUUAUGUCUUUUTT 1459 CAAGCAUUAUUAAGCAGCGTT 1621 ND-8934

AAAGAGCGACCCAGAAAGUUA	1372	GGAGCGACCCAGAAAGUUA	1460	UAAACUUUCUGGUCGUCCTT	1622	ND-8935
AAAGCGACCCAGAAAGUUA	1373	GAGCGACCCAGAAAGUUA	1461	GUAAACUUUCUGGUCGUCCTT	1623	ND-8936
AAUGAGUUAAGACAUUAUUGUA	1374	UGAGUUAAGACAUUAUUGUT	1462	ACAUAUAUUGUCUAUACUCA	1624	ND-8937
AAAUUAACAACAACCGUUGGA	1375	AAUUAACAACAACCGUUGUT	1463	CACAACGCUUGUUGUAUUT	1625	ND-8938
AAAGUAGUCUUUGUCAGAUCAA	1376	GUAGUCUUUGUCAGAUCTT	1464	GAUCUGCAACAAGACAUACT	1626	ND-8939
AACUUUCUUUCGGGAUUUAAA	1377	CUUUCUUUCGGGAUUUAAT	1465	UAAAUCCGAAAAGCAAAGT	1627	ND-8940
AAUUBAGAGUAUAGACAUUA	1378	AUUBAGAGUAUAGACAUUT	1466	AAUGUCUAUACUCACUAUUT	1628	ND-8941
AAAAAGUCCAUAAUAUAGAA	1379	AAAGUCCAUAAUAUAGGTT	1467	CCUUAUUAUAGGAUUCUUT	1629	ND-8942
AAAGUCAGUAGUUCUUGUUA	1380	GGUCAGUAGUUCUUGUUT	1468	AACAAGACUAUACUACGCTT	1630	ND-8943
AACAUCAGAACAACGUAAGAAA	1381	CAUCAAGAACAACGUAAGAT	1469	UCUCUACGUGUUCUUGAUGT	1631	ND-8944
AAAAAGUUAACUGCAGCGUAAA	1382	AACAAGUUAACUGCAGCGUAT	1470	UCAAGUCGACUAUACUGUT	1632	ND-8945
AAACAGUUAACUGCAGCGUAAA	1383	ACAGUUAACUGCAGCGUAGT	1471	CUCAAGUCGACUAUACUGUT	1633	ND-8946
AAAGUGAUUUUGUUAUUAAGAA	1384	GUUGAUUUUGUUAUUAAGTT	1472	CUUAUUAACAUAUACACTT	1634	ND-8947
AAAUCAAGAACAACGUAAGAAA	1385	AUCAAGAACAACGUAAGAT	1473	UUCUCUACGUGUUCUUGAUT	1635	ND-8948
AAUUUCGGGAUUUAUGCAUAGA	1386	UUUUCGGGAUUUAUGCAUAGT	1474	CUAUGCAUAAUCCGAAAT	1636	ND-8949
AAACCCACAGAGCAACCCAGAA	1387	ACCACAGAGAGCAACCCAGT	1475	CUUGGUCGUCUUGUGGUT	1637	ND-8950
AAAGUGGGAUCCAUAVGCUAA	1388	AGAGUGGGAUCCAUAVGCU	1476	AGCAUUGGAUUCCAUUCUT	1638	ND-8951
AAUAGUGAGUUAAGACAUUAUA	1389	UAUGAGUUAAGACAUUAUT	1477	AUAUAGUCUAUACUACUA	1639	ND-8952
AAUGUGAGUUAUUAUUAAGAA	1390	UGUGAGUUAUUAUUAAGTT	1478	CUAAUUAACAUAUACACAT	1640	ND-8953
AAUUAUUAAGUGUAUUAACUAA	1391	UUAUUAUUAAGUGUAUUA	1479	AGUUAUUAACCUAAUUAAT	1641	ND-8954
AAAUUAGACUUUGCUUUUCGAA	1392	AUAUAGACUUUGCUUUUCGTT	1480	CCGAAAAAGCAAAAGUCAU	1642	ND-8955
AAAGUGAGUUAUUAUUAAGAA	1393	CGGUGAGUUAUUAUUAAGTT	1481	ACAAGACAUUAUUAAGCCT	1643	ND-8956
AAAGAGCGACCCAGAGAGCAAA	1394	CAGAGCGACCCAGAGAGCA	1482	GUCCUCCUUGGUCGUCCT	1644	ND-8957

AAUUCGCGGGAUUUAUGCAUAAA	1395	UUUUCGGGAUUUAUGCAUATT	1483	UAUGCAUAAAUCCGAAATT	1645	ND-8958
AAAAACAACUAUACAUGAUAAA	1396	AAACAACUAUACAUGAUATT	1484	AUAUCAUGUAUGUUUUTT	1646	ND-8959
AAUCCAUAUGCUUAUGUGAUA	1397	UCCAUAUGCUUAUGUGAUTT	1485	AUACAUAACAGCAUAUGATT	1647	ND-8960
AAUUAUUAUUUAUAGUGAUA	1398	UAUUAUUAUUUAUAGUGAUTT	1486	ACUACAUAUUUAAGAUAATT	1648	ND-8961
AAUUAUGAACAAAUAGAACA	1399	UAUGGAACAACAUAAGAATT	1487	GUUCAUAUGUUUCCAUAATT	1649	ND-8962
AAUUCUUGUGCAUACAUCAAA	1400	GUUCUUGUGCAUACAUCATT	1488	UGAUGAUCUGCAACAAGATT	1650	ND-8963
AAUUAUAACUGCAAAAGCCAA	1401	UAUUAUAACUGCAAAAGCCATT	1489	UGGCUUUUGACAGUAUAATT	1651	ND-8964
AAACCAAAAGAGACUGCAAUAA	1402	ACCAAAAGAGACUGCAAUATT	1490	AUUGCAGUUCUUUUGGUTT	1652	ND-8965
AAAAUUAUGAGUAUAGACAUA	1403	AAUUAUGAGUAUAGACAUTT	1491	AUGCUAUAUCUACAUAUUTT	1653	ND-8966
AAAGAUUCAAGAACACGUA	1404	CAGAUUCAAGAACACGUTT	1492	ACGUGUUCUUGAUGAUCUTT	1654	ND-8967
AAUUAUGCAUAUAUAGAGAAA	1405	UAUGCAUAUAUAUAGAGATT	1493	UCUCAUAUAUAUGCAUATT	1655	ND-8968
AAAGAUUGGAAUCCAUAUGAA	1406	AGAGAUUGGAAUCCAUAUGTT	1494	CAUAUGAUUCCAUCUUTT	1656	ND-8969
AAAGAGUAUAGACAUAUUA	1407	AGUGAUUAUAGACAUAUUTT	1495	AAUAUUGCUAUAUCUACUTT	1657	ND-8970
AAUUCUAAAUUAUGUGAUA	1408	UUCUAAAUUAUGUGAUAUTT	1496	AUACUACAUAUUUAGAATT	1658	ND-8971
AAUUGCAUAUAUAAGAUAA	1409	AUUGCAUAUAUAAGAUATT	1497	AUUCUAUAUAUAUGCAUTT	1659	ND-8972
uCGUGGACCGGUGAUGUtt	1498	AcAUCCGCGGUCcACCGAtst	1660	ND-8987		
GGuCGGUGGACCGGUGCAUtt	1499	AUGGACCGGUCcACCGACtst	1661	ND-8988		
cGGuGACCGGUGCAUGAtst	1500	uAcAUCCGCGGUCcACCGtst	1662	ND-8989		
GUGGUGACCGGUGCAUGtst	1501	cAUCCGCGGUCcACCGAtst	1663	ND-8990		
AuCAUAAGAaAcAGuGAtst	1502	uCuACGUGUcUUGAUgUttst	1664	ND-8991		
cAAcAGuUAcUGcAcGUGtst	1503	cACGUGcAGUAaCUGUGtst	1665	ND-8992		
cAAuAcAAcAAcCGuGtst	1504	AcAAcCGUUGUGUAUgUttst	1666	ND-8993		
GcuGcAAAcAAcUAcAUttst	1505	AUGUAAGUUGUUGcAcGctst	1667	ND-8994		

GGUGGACCGGUGCAUGAUAUTST 1506 AUAACUAGCAGCGGUCACCTST 1668 ND-8995
 AAAUUAUGAGUAUAGACATST 1507 UGUUUAUAUCUAUAUUTST 1669 ND-8996
 UCAUCAAAGAACAGUAGAGTST 1508 CUCUACGUGUUCUUGAUGATST 1670 ND-8997
 AUAACAACAACCGUUGUGUTST 1509 ACAACGUGUUGUGUAUTST 1671 ND-8998
 UGACCGGUGCAUGAUGUTST 1510 ACAUACUAGCAGCGGUCATST 1672 ND-8999
 UACAACAACCGUUGUGUTST 1511 CACAACAAGGUGUUGUGUATST 1673 ND-9000
 AGAUUCCAUAAUAUAAAGGTST 1512 CCCUUAUAUUAUGAAUUCUTST 1674 ND-9001
 CAAGCAACGUAUCUGCATST 1513 UCGAGUAACUGUGUGUTST 1675 ND-9002
 GUUAUAUAGGUGUAUAACTST 1514 GUUAUAACCAUAUUAATST 1676 ND-9003
 UUUUGUUUUGGGAUUUATST 1515 AUAAAUCCCGAAAAAGCAATST 1677 ND-9004
 ACUUUGUUUUGGGAUUUATST 1516 AAUCCCGAAAAAGCAAGUTST 1678 ND-9005
 CUGCAAAACAUAUAUAUTST 1517 CAUGUAUUGUUGUUGCATST 1679 ND-9006
 AUAACUUUGUUUUGGGATST 1518 UCCGAAAAAGCAAGUCATST 1680 ND-9007
 CGACCCAGAAAGUAACCATST 1519 GUGUAACUUUCUGGUGCTST 1681 ND-9008
 UUAUGCGAGAGUAGUAUTST 1520 AUACCUACGUGCGAGUAATST 1682 ND-9009
 GUUAUGCGAGAGAGUAUTST 1521 UACCUACGUGCGAGUAATST 1683 ND-9010
 UGCGAGUGAGAGUAUAGATST 1522 UCAUAUAACUACGUGGATST 1684 ND-9011
 GUCAUAUAUGUUGUUTST 1523 CAACAAGCAUAUAUCAGCATST 1685 ND-9012
 CGAGUGAGAGUAUAUAUTST 1524 AGUCAUAUAACUACGUGCTST 1686 ND-9013
 GACUUUGUUUUGGGAUUTST 1525 AAUCCGAAAAAGCAAGUCUTST 1687 ND-9014
 UUAAGUGUAUAUAUCUATST 1526 UGACAUAUAUAACCUAATST 1688 ND-9015
 UUAACCAAGUAUAUCAGTST 1527 CUGUGCAUAUAUCUGUAAATST 1689 ND-9016
 GCAACAGUAUAUCGAGCATST 1528 ACUGCGAGUAUAUCUGUCTST 1690 ND-9017
 UGUUUUUGGGAUUAUAUTST 1529 GCAUAAUCCGAAAAAGCATST 1691 ND-9018
 UUAUGAGAGUAUAACAUATST 1530 UAAUGUCUAUAUCUAUAATST 1692 ND-9019
 UAAUAAGUGUAUAUAUAUTST 1531 CAGUAAUAACCUAUAUTST 1693 ND-9020
 GAUGUAUGUUUGUAGATST 1532 CUGCAACAAGACUAUAUTST 1694 ND-9021
 CCGUGCAUGUAUGUUGUTST 1533 CAAGCAUAUAUCGACCGGTST 1695 ND-9022
 GGAGCGACCCAGAAAGUAATST 1534 UAAUUCUUGGUGCGUCCCTST 1696 ND-9023
 GAGCGACCCAGAAAGUAATST 1535 GUAACUUUCUGGUGCGUCCCTST 1697 ND-9024
 UGAGUAUAACAUAUAUAUTST 1536 ACAUAUAUGUCUAUAUCATST 1698 ND-9025
 AAUACAACAACCGUUGUTST 1537 CACAAGGUGUUGUAUUTST 1699 ND-9026
 GAUAUGUUUGUAGUAUTST 1538 GAUCGCAACAAGACUAATST 1700 ND-9027
 CUUUGUUUUGGGAUUAATST 1539 UAAUCCCGAAAAAGCAATST 1701 ND-9028
 AUUAUGAGUAUAACAUAUTST 1540 AUUGCUUAUAUCUAUAUTST 1702 ND-9029
 AAGAUUCCAUAAUAUAAGTST 1541 CCUAUAUAUGGAUAUCUTST 1703 ND-9030
 GGUCAUAUAUGUUGUTST 1542 AACAAGACUAUAUCACCTST 1704 ND-9031
 CAUCAAGAACAGUAGATST 1543 UCUCUACGUGUUCUUAUTST 1705 ND-9032
 AACAGUAUAUCGAGCATST 1544 UCACGUGCGAGUAACUGUTST 1706 ND-9033
 ACAUAUAUCGAGCATST 1545 CUCAUGUGGAGUAACUGUTST 1707 ND-9034
 GUUGUAUUUGUAUAUAUTST 1546 CUUAUAUAACAUAUAUTST 1708 ND-9035
 AUCAAGAACAGAGATST 1547 UUCUUAUCGUGUUGUAUTST 1709 ND-9036
 UUUUGGUUUUAUAUAUTST 1548 CUUAUAUAUAUAUAUTST 1710 ND-9037
 ACCCAAGAGGAGCATST 1549 CUGGUGCGUUCUGUGGUTST 1711 ND-9038
 AGAUGGAUAUAUAUTST 1550 AGCAUAUGAUAUAUCATST 1712 ND-9039
 UAGUGUAUAUAUAUTST 1551 AUAAUUGCUUAUAUCUAATST 1713 ND-9040

AAUGAUUUUGUUAUUAAGUGAA	1410	GUGAUUUUGUUAUUAAGUGTT	1572	CACCUAAUUAACAUAUCATT	1734	AL-DP-7778
AAUGAUUUUGUUAUUAAGUGUAA	1411	UGAUUUUGUUAUUAAGUGUTT	1573	ACACCUAAUUAACAUAUCATT	1735	AL-DP-7779
AAAGAUUUUGUUAUUAAGUGUAAA	1412	GAUUUGUUAUUAAGUGUAATT	1574	UACACCUAAUUAACAUAUCATT	1736	AL-DP-7780
AAAUUUUGUUAUUAAGUGUAA	1413	AUUUGUUAUUAAGUGUAUTT	1575	AUACACCUAAUUAACAUAUCATT	1737	AL-DP-7781
UGUGUGAUUUUGUUAUUUAAGTST	1552	CUAAUUAACAAAUUcACAATST	1714	ND-9041		
UUAAUUAGUGUAUUUAACUTST	1553	AGUUAUAACACCUAAUUAATST	1715	ND-9042		
AUAUGACUUUGCUUUUCCGTST	1554	CCGAAAAGCAAAGUCAUAUTST	1716	ND-9043		
CGUGCGAUGUAUGUCUUGTST	1555	ACAAAGACAUAUCGACCGTST	1717	ND-9044		
CAGACCCACAGAGCGACTST	1556	GUCCGUCUUGGUGUCCUGTST	1718	ND-9045		
UUUUCGGAUUUUAUGCAUTST	1557	UAUGCAUAAUCCCGAAATST	1719	ND-9046		
AAACAAUAUAUAUGAUUTST	1558	AUAUCAUGUAUAUGUUGUTST	1720	ND-9047		
UCCAUUAUGCUUAUGUGAUTST	1559	AUACAUAACAGCAUAUGATST	1721	ND-9048		
UAUUCUAAAAUUAUGUGAUTST	1560	ACUACAUAUUAUUAAGAUAUTST	1722	ND-9049		
UAUGGACAAACAUAUAGAACTST	1561	GUUUAUAUGUUUGUCCAUATST	1723	ND-9050		
GUCUGUUGCAGAUCAUCATST	1562	UGAUGAUCUGCAACAAACTST	1724	ND-9051		
UAUUAACUGCAAAAGCCATST	1563	UGGCUUUUGACAGUAUAUTST	1725	ND-9052		
ACCAAAAGAGAACUGCAUTST	1564	AUUGCAGUUCUUCUUUGGUTST	1726	ND-9053		
AAUUAUGUAUAUAAGCAUTST	1565	AUGUCUAUAUCUAUAUUTST	1727	ND-9054		
CAGAUCAUCAAGAACACGUTST	1566	ACGUGUUCUUGAUAUCUGTST	1728	ND-9055		
UAUGCAUAUAUAAGAGATST	1567	UCUCUAUAUAUAUGCAUATST	1729	ND-9056		
AGAGAUGGGAUCCAUUAUTST	1568	CAUAUGAUUCCAUUCUUTST	1730	ND-9057		
AGUGAUAUAAGACAUAUAUTST	1569	AUAUAUUCUAUAUCACUUTST	1731	ND-9058		
UUCUAAAAUAUGACAUTST	1570	AUACUACAUAUUAAGAATST	1732	ND-9059		
AUGCAUAUAUAAGCAUTST	1571	AUCUCUAUAUAUAUGCAUTST	1733	ND-9060		

```

AAUGGUAUUUGUUAUUAGGUAA 1414 UGUAUUUUUUAAUUAGGUTT 1576 ACCUAAUUACAUAUACACATT 1738 AL-DP-7782
AAUGUAUGGAACAACAUAUAGAAA 1415 UGUUAUGGAACAACAUAUAGATT 1577 UCUAAUGUUUGUUCCAUACATT 1739 AL-DP-7783
AAAGUAUGGAACAACAUAUAGAAA 1416 GUAUGGAACAACAUAUAGATT 1578 UUCUAUUGUUUGUCCAUACTT 1740 AL-DP-7784
AAUGGUAUCUGCAAGCAACAGAA 1417 UGUGUAUCUGCAAGCAACAGTT 1579 CUGUUUGUUGCAAGUACACATT 1741 AL-DP-7803
AAACUGCGACGUGAGGUUAUAAA 1418 ACUGCGACGUGAGGUUAUUTT 1580 AUAUACCUACGUGCGACGUTT 1742 7804
AAGAGUAUAUGACUUUGCUUAA 1419 GAGUAUAUGACUUUGCUUTT 1581 AAGCAAGUCAUAUACCUCTT 1743 AL-DP-7805
AAUGGUAUUUGUUAUUAGGAA 1420 AUGGUAUUUGUUAUUAGGUTT 1582 CAUUUAUACAUACAGCAUTT 1744 AL-DP-7807
AAUUUAUUCUAAAUAUAGUAAA 1421 UUUUAUUCUAAAUAUAGUATT 1583 UCACUAUUUUUAAGAUAAATT 1745 AL-DP-7808
AACUGCGACGUGAGGUUAUAGAA 1422 CUGCGACGUGAGGUUAUAGTT 1584 CAUUAUCCUACGUGCGAGTT 1746 AL-DP-7810
AAACGUGUGUGUAUUUGUAAA 1423 ACCGUGUGUGUAUUUGUATT 1585 UAACAAAUACACACACGUTT 1747 AL-DP-7812

```

<272>

<273>

HPV E6 유전자 발현을 표적으로 하는 siRNA의 테스트

<274>

변형되지 않은 dsRNA 및 화학적으로 변형된 dsRNA를 테스트하여, 세포 내에서 HPV E6 유전자를 코딩하는 mRNA의 발현 수준을 감소시키는 이들의 상대적인 능력을 확인하였다.

<275>

사용된 분석 조건은 하기와 같았다: C33A 세포를 ATCC로부터 획득하였다. HPV16 E6 및 E1을 코딩하는 서열을 YFP 융합 전사물로의 발현을 위해 pNAS-055 벡터 ([Husken et al., Nucleic Acids Research, 31:e102, 2003]) 내로 클로닝하였다. 생성된 플라스미드를 C33A 세포 내로 형질감염시켰고, 이러한 융합 전사물을 발현하는 안정적인 세포주가 제조업자의 프로토콜 (Invitrogen)에 따라 제오신 선별에 의해 유도되었다. HPV16 E6 또는 HPV16 E1에 대한 siRNA로의 형질감염을 위해, 각각의 세포를 2.0×10^4 개의 세포/웰의 밀도로 96웰 플레이트에 파종하고, 직접적으로 형질감염시켰다. siRNA (지시된 바와 같이 30nM, 3nM 또는 300pm)의 형질감염을 제조업자가 기술한 바와 같이 리포펙타민 2000® (Invitrogen)로 단일 용량에서 수행하였다.

<276>

형질감염 24시간 후, 세포를 용해시키고, 융합 YFP mRNA 발현 수준을 표준 프로토콜에 따라 YFP에 대해 지시된 프로브를 사용하여 퀀티진 익스플로러 키트 (Panomics, Inc. (Fremont, CA) (예전의 Genospectra, Inc.))를 사용하여 정량하였다. 융합-YFP mRNA 수준을 GAP-DH mRNA에 표준화하였다. 각각의 siRNA에 대해, 4개의 개별적인 데이터포인트를 수집하였다. HPV16 E1 또는 E6 유전자에 관련되지 않은 siRNA 듀플렉스를 대조군으로 사용하였다. 대조군 siRNA 듀플렉스로 처리된 세포에서의 동일한 전사물의 농도와 비교하여 처리된 세포에서의 용

합-YFP mRNA 농도 백분율로 소정의 siRNA 듀플렉스의 활성이 표현되었다.

표 8은 본 발명의 E6 dsRNA의 테스트 결과를 나타낸다.

표 8

듀플렉스 명칭	30nM 처리 후에 잔존하는 평균 활성	표준 편차	300pM 처리 후에 잔존하는 평균 활성	표준 편차
ND-8899	15.23	3.19	31.29	9.57
ND-8900	11.61	2.88	26.80	10.23
ND-8901	10.88	3.54	24.77	5.19
ND-8902	20.19	7.36	43.46	6.89
ND-8903	10.38	2.51	22.95	5.47
ND-8904	13.71	4.67	22.11	5.50
ND-8905	13.81	4.29	24.69	4.62
ND-8906	8.35	2.17	24.23	6.62
ND-8907	13.88	3.12	36.94	6.13
ND-8908	14.47	3.48	45.15	7.92
ND-8909	19.99	3.67	49.36	9.80
ND-8910	36.96	9.77	74.18	15.82
ND-8911	18.66	4.19	45.51	6.82
ND-8912	47.42	6.99	76.11	12.97
ND-8913	55.53	16.75	76.63	15.44
ND-8914	9.69	2.50	19.91	6.63
ND-8915	49.02	7.97	93.38	6.83
ND-8916	11.88	2.94	49.78	8.49
ND-8917	14.00	2.04	50.36	8.31
ND-8918	13.70	3.43	29.01	6.51
ND-8919	10.31	2.44	42.51	10.89
ND-8920	10.29	2.72	25.20	9.73
ND-8921	20.23	3.71	37.17	10.15
ND-8922	11.64	2.31	24.95	8.99
ND-8923	12.43	1.97	24.39	8.13

ND-8924	15.19	4.52	32.09	7.01
ND-8925	14.24	1.87	34.21	5.61
ND-8926	10.17	2.85	19.04	3.68
ND-8927	20.77	4.89	41.40	9.23
ND-8928	95.02	20.87	92.24	15.19
ND-8929	17.51	5.27	19.86	6.81
ND-8930	13.58	2.65	61.16	11.03
ND-8931	13.78	2.00	37.55	8.11
ND-8932	105.07	21.10	91.19	12.68
ND-8933	14.88	3.07	43.06	8.64
ND-8934	13.03	3.75	24.32	5.92
ND-8935	13.19	2.88	21.87	4.17
ND-8936	10.04	1.94	21.98	6.92
ND-8937	15.39	3.44	42.70	11.35
ND-8938	55.90	5.56	93.49	10.41
ND-8939	11.51	2.04	29.57	10.38
ND-8940	12.80	2.94	29.67	6.73
ND-8941	19.46	2.91	43.13	3.64
ND-8942	96.02	29.93	85.34	4.57
ND-8943	13.44	3.90	19.03	5.18
ND-8944	14.35	2.09	20.03	4.68
ND-8945	11.45	1.98	23.80	8.36
ND-8946	15.43	2.27	43.12	13.34
ND-8947	13.32	2.20	53.58	18.04
ND-8948	12.85	3.18	23.22	6.79
ND-8949	86.23	23.43	75.99	7.17
ND-8950	29.49	7.99	47.19	14.70
ND-8951	10.51	2.85	20.21	6.23
ND-8952	12.10	2.74	28.82	9.06
ND-8953	41.13	11.23	77.64	9.46
ND-8954	46.52	8.41	81.61	14.93
ND-8955	38.40	8.46	83.38	16.32
ND-8956	12.13	2.23	21.94	9.54

<279>

ND-8957	28.39	6.18	53.84	12.53
ND-8958	36.41	9.92	55.67	8.77
ND-8959	33.95	11.23	63.63	5.53
ND-8960	13.63	2.39	26.49	9.24
ND-8961	80.42	18.39	89.13	8.61
ND-8962	33.00	4.18	82.57	9.01
ND-8963	16.67	1.85	28.39	9.50
ND-8964	14.17	2.58	43.74	14.37
ND-8965	17.23	5.15	48.03	10.97
ND-8966	23.01	5.10	53.86	10.10
ND-8967	18.68	5.13	23.30	6.20
ND-8968	10.99	1.83	28.22	9.33
ND-8969	13.75	2.67	32.62	10.53
ND-8970	11.02	2.68	29.14	10.73
ND-8971	21.71	3.11	57.75	10.54
ND-8972	17.10	3.20	52.10	10.84
ND-8987	40.36	7.25	91.12	9.07
ND-8988	20.54	5.27	30.76	12.23
ND-8989	36.60	7.23	74.41	8.61
ND-8990	17.55	8.33	61.02	11.13
ND-8991	11.29	2.87	19.03	5.98
ND-8992	14.49	3.37	44.53	14.74
ND-8993	18.45	5.75	48.07	6.79
ND-8994	13.16	1.80	25.92	7.94
ND-8995	52.21	5.93	90.43	4.86
ND-8996	32.77	6.96	57.54	7.12
ND-8997	14.45	1.50	20.63	4.28
ND-8998	137.83	33.37	90.09	14.65
ND-8999	82.01	13.74	85.69	10.39
ND-9000	69.77	21.32	83.16	14.34
ND-9001	54.71	18.91	74.70	8.87
ND-9002	12.15	2.05	22.98	6.98
ND-9003	76.52	11.49	98.54	7.10

ND-9004	62.23	16.29	84.38	8.22
ND-9005	38.12	6.77	64.57	6.57
ND-9006	12.96	3.15	26.03	4.76
ND-9007	18.24	4.88	42.16	7.87
ND-9008	21.06	4.60	20.01	6.00
ND-9009	35.15	5.62	79.96	7.01
ND-9010	13.71	2.83	53.80	12.21
ND-9011	38.04	3.56	60.45	10.19
ND-9012	44.63	37.28	67.30	8.30
ND-9013	13.31	1.81	31.12	6.40
ND-9014	12.69	3.66	27.50	7.48
ND-9015	16.26	3.61	21.18	4.80
ND-9016	29.49	8.14	66.50	15.07
ND-9017	16.98	2.22	27.17	7.64
ND-9018	35.62	7.31	86.49	7.60
ND-9019	23.48	2.57	60.66	13.05
ND-9020	113.04	21.57	88.75	12.94
ND-9021	38.45	5.44	68.21	9.53
ND-9022	14.21	2.86	53.78	13.38
ND-9023	21.84	3.72	41.95	11.93
ND-9024	117.68	33.94	86.00	6.55
ND-9025	86.38	19.82	81.09	9.82
ND-9026	113.52	9.02	95.62	10.60
ND-9027	13.61	2.09	51.98	15.63
ND-9028	14.49	4.02	45.08	11.80
ND-9029	20.16	3.25	39.00	8.28
ND-9030	104.95	34.72	76.74	10.03
ND-9031	19.90	6.09	26.32	9.90
ND-9032	16.43	3.38	19.10	5.44
ND-9033	100.99	24.54	86.16	11.95
ND-9034	13.77	2.84	33.36	13.56
ND-9035	13.54	1.58	57.07	19.24
ND-9036	12.91	3.20	21.78	6.03

<281>

ND-9037	30.90	8.30	74.12	12.35
ND-9038	121.49	24.79	87.65	7.07
ND-9039	10.19	3.13	23.32	9.60
ND-9040	11.45	2.34	22.86	8.27
ND-9041	33.73	8.63	82.99	13.62
ND-9042	18.21	3.81	60.07	13.85
ND-9043	36.15	3.87	71.81	12.23
ND-9044	13.77	3.59	30.27	10.81
ND-9045	56.81	19.55	85.99	9.99
ND-9046	26.03	6.18	51.21	10.14
ND-9047	100.23	24.53	85.98	5.59
ND-9048	21.82	4.07	44.44	12.82
ND-9049	82.93	21.46	87.79	7.07
ND-9050	18.51	3.33	40.70	10.96
ND-9051	22.80	3.37	42.44	14.86
ND-9052	12.61	3.78	37.58	13.35
ND-9053	19.88	4.32	53.11	3.23
ND-9054	33.65	8.32	59.71	6.42
ND-9055	22.61	7.41	27.44	7.04
ND-9056	16.61	3.38	34.34	13.22
ND-9057	25.51	6.29	51.45	10.10
ND-9058	27.60	4.56	54.99	13.52
ND-9059	23.83	4.36	84.76	13.88
ND-9060	17.12	3.29	44.54	15.68
AL-DP-7778	19.35	8.95	63.31	14.21
AL-DP-7779	41.30	9.51	65.96	7.82
AL-DP-7780	24.01	7.52	59.43	8.85
AL-DP-7781	13.69	3.41	53.58	9.31
AL-DP-7782	31.35	5.31	65.84	10.41
AL-DP-7783	14.46	2.85	38.92	10.30
AL-DP-7784	13.52	1.52	25.09	7.89
AL-DP-7803	39.68	4.75	66.72	11.32
7804	12.56	3.96	26.81	6.28
AL-DP-7805	13.92	2.22	35.87	8.95
AL-DP-7807	35.54	4.95	70.94	11.01
AL-DP-7808	81.47	9.77	96.18	10.87
AL-DP-7810	15.14	2.12	37.66	16.19
AL-DP-7812	12.89	1.99	25.18	12.05

당업자는 본 개시물에 명확하게 기재된 것들에 대하여 하기에 첨부된 청구항의 완전한 범주로 본 발명을 실행하도록 하는 방법 및 조성물에 친숙하다.