



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0106554
(43) 공개일자 2008년12월08일

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01) C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7023178

(22) 출원일자 2008년09월23일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년09월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/007241

국제출원일자 2007년03월23일

(87) 국제공개번호 WO 2007/111998

국제공개일자 2007년10월04일

(30) 우선권주장

60/785,837 2006년03월24일 미국(US)

60/825,782 2006년09월15일 미국(US)

(71) 출원인

노파르티스 아계

스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35

(72) 발명자

벤슨, 존

미국 02132 메사추세츠주 웨스트 록스베리 모렐
스트리트 26

브람라계, 비르기트

독일 95326 쿨름바흐 요한-에크-스트라쎄 11

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) H P V 감염을 치료하기 위한 D S R N A 조성물 및 방법

(57) 요 약

본 발명은 인간 유두종 바이러스 (HPV) 감염을 치료하기 위한 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA)에 관한 것이다. 상기 dsRNA는 길이가 뉴클레오티드 30개 미만, 일반적으로 뉴클레오티드 19-25개이고, HPV E1, HPV E6 및 인간 E6AP 유전자에서 선택된 HPV 표적 유전자의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 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 월리엄즈 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'-0-메틸 변형 뉴클레오티드, 5'-포스포로티오에이트 기를 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 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 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 시험판 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'-0-메틸 변형 뉴클레오티드, 5'-포스포로티오에이트 기를 포함하

는 뉴클레오티드, 및 콜레스테릴 유도체 또는 도데칸산 비스데실아미드 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

기술 분야

<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 솜꼬리 토끼 유두종바이러스 (CRPV)로서 기술되었다. 그 이후에, 솜꼬리 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 팹(Pap) 테스트를 사용하여 일반적으로 수행된다. 팹 테스트는 비정상적인 자궁목 세포를 확인하기 위해 사용되는 자궁목 조직의 조직학적 평가이다. 팹 테스트의 일부로서, HPV 감염의 존재 및 특정 아형을 핵산을 기초로 하는 분석법 예컨대 PCR 또는 시판되는 하이브리드 캡쳐(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 환자를 간의 항문 형성이상의 높은 유병률, 및 증가하는 항문암 경향으로 인해, <2003 USPAP/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 임부에게 권장되지 않는데, 이들이 피부에 의해 흡수되어 출생 결함을 야기할 수 있기 때문이다. 5-플루오로우라실 크림의 사용 또한 임부에게 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 뉴클레오티드 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.

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 뉴클레오티드 30개 미만, 일반적으로 뉴클레오티드 19-24개이고 E6AP 유전자의 mRNA 전사물의 적어도 일부분에 실질적으로 상보적인 영역이 있는 RNA 가닥 (안티센스 (anti sense) 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 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상보성 영역은 길이가 뉴클레오티드 30개 미만, 일반적으로 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드로 구성될 수 있거나, 또는 1개 이상의 변형 뉴클레오티드, 예컨대 2'-0-메틸 변형 뉴클레오티드, 5'-포스포로티오에이트 기를 포함하는 뉴클레오티드, 및 콜레스테릴 유도체에 연결된 말단 뉴클레오티드로 구성될 수 있다. 별법적으로, 변형 뉴클레오티드는 2'-데옥시-2'-플루오로 변형 뉴클레오티드, 2'-데옥시-변형 뉴클레오티드, 로킹된(locked) 뉴클레오티드, 무염기성(abasic) 뉴클레오티드, 2'-아미노-변형 뉴클레오티드, 2'-알킬-변형 뉴클레오티드, 모르폴리노 뉴클레오티드, 포스포르아미레이트, 및 비-천연 염기를 포함하는 뉴클레오티드의 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 뉴클레오티드 30개 이하, 일반적으로 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 조절 서열을 포함하는, 세포 내에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 백터를 제공한다.

<27> 또다른 실시양태에서, 본 발명은 세포 내에서의 E6AP 유전자의 발현을 억제하기 위한 백터를 포함하는 세포를 제공한다. 상기 백터는 본 발명의 dsRNA 중 하나의 1개 이상의 가닥을 코딩하는 뉴클레오티드 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 ([Scheffher, 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 뉴클레오티드를 일반적으로 각각 가리킨다. 그러나, 용어 "리보뉴클레오티드" 또는 "뉴클레오티드"는 하기에 추가로 상술된 바와 같은 변형 뉴클레오티드, 또는 대용 대체 모이어티를 또한 지칭할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 당업자는 구아닌, 사이토신, 아데닌 및 우라실이 다른 모이어티로 이같은 대체 모이어티를 보유하는 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 염기 쌍형성 성질을 실질적으로 변경하지 않으면서 대체될 수 있다는 것을 주지할 것이다. 예를 들어, 비제한적으로, 이노신을 염기로 함유하는 뉴클레오티드는 아데닌, 사이토신, 또는 우라실을 함유하는 뉴클레오티드와 염기 쌍을 형성할 수 있다. 따라서, 우라실, 구아닌, 또는 아데닌을 함유하는 뉴클레오티드는 이노신을 예를 들어 함유하는 뉴클레오티드로 본 발명의 뉴클레오티드 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, 뉴클레오티드 865 내지 2813)를 지칭한다. 본원에서 사용된 "E6"은 인간 유두종바이러스 유형 16 (HPV 16) E6 유전자 (GenBank 접속 번호 NC_001526, 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 서열의 인접 부분을 지칭한다.

<45> 본원에서 사용된 용어 "서열을 포함하는 가닥"은 표준 뉴클레오티드 명명법을 사용하여 지칭된 서열에 의해 기술된 뉴클레오티드의 사슬을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다.

<46> 달리 지시되지 않는 한, 본원에서 사용된 용어 "상보적"은, 제1 뉴클레오티드 서열을 제2 뉴클레오티드 서열과 관련하여 기술하는데 사용된 경우, 당업자에게 이해될 바와 같이, 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 특정 조건 하에 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 혼성화하여 듀플렉스(duplex) 구조를 형성하는 능력을 지칭한다. 이같은 조건은, 예를 들어, 염격한 조건일 수 있고, 이때 염격한 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 뉴클레오티드들의 최대의 적용에 따른 2개의 서열의 상보성의 테스트를 위한 가장 적합한 조건의 셋트를 결정할 수 있을 것이다.

<47> 이는 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 제1 및 제2 뉴클레오티드 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 올리고뉴클레오티드가 혼성화 시 1개 이상의 단일 가닥 오버hang(overhang)을 형성하도록 디자인된 경우, 이같은 오버hang은 상보성의 결정과 관련하여 미스매치로 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 길이가 뉴클레오티드 21개인 한 올리고뉴클레오티드 및 길이가 뉴클레오티드 23개인 다른 올리고뉴클레오티드를 포함하는 dsRNA는, 더 긴 올리고뉴클레오티드가 더 짧은 올리고뉴클레오티드에 완전하게 상보적인 뉴클레오티드 21개의 서열을 포

함하는 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 뉴클레오티드로부터 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, 메신져 RNA (mRNA)의 "적어도 일부분에 실질적으로 상보적인" 폴리뉴클레오티드는 당해 mRNA (예를 들어, E6AP를 코딩)의 인접 부분에 실질적으로 상보적인 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 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 뉴클레오티드의 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 뉴클레오티드의 중단되지 않은 사슬 이외의 수단에 의해 공유결합적으로 연결되는 경우, 연결 구조물은 "링커(linker)"로 지칭된다. RNA 가닥은 뉴클레오티드의 개수가 동일하거나 상이 할 수 있다. 염기 쌍의 최대수는 dsRNA의 가장 짧은 가닥의 뉴클레오티드 개수 빼기 듀플렉스 내에 존재하는 임의의 오버행이다. 듀플렉스 구조에 더하여, dsRNA는 1개 이상의 뉴클레오티드 오버행을 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "dsRNA"는 다중 뉴클레오티드에서의 실질적인 변형 및 본원에 개시되었거나 당업계에 공지된 모든 유형의 변형을 포함하여, 리보뉴클레오티드, 뉴클레오시드간 연결, 말단-기, 캡(cap), 및 접합된 모이어티에 대한 화학적 변형을 포함할 수 있다. siRNA 유형 분자에서 사용된 바와 같이 임의의 이 같은 변형은 본 명세서 및 청구항의 목적을 위해 "dsRNA"에 포함된다.
- <52> 본원에서 사용된 "뉴클레오티드 오버행"은 dsRNA의 한 가닥의 3'-말단이 또다른 가닥의 5'-말단 너머로 연장된 경우, 또는 반대 경우에 dsRNA의 듀플렉스 구조로부터 돌출된, 쌍을 이루지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드들을 지칭한다. "블런트(blunt)" 또는 "블런트 말단"은 dsRNA의 이러한 말단에서 쌍을 이루지 않은 뉴클레오티드가 없는 것, 즉 뉴클레오티드 오버행이 없는 것을 의미한다. "블런트 말단" dsRNA는 이의 전체 길이에 걸쳐 이중 가닥인, 즉 분자의 어느쪽 말단에서도 뉴클레오티드 오버행이 없는 dsRNA이다. 명확하게 하기 위해, siRNA의 3' 말단 또는 5' 말단에 접합된 화학 캡 또는 비-뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 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 생물에게 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 리포택션 (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 파라메터, 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 값을 제공한다. 유사하게, 표 6은 E1의 전사 억제에 대한 광범위한 값을 제공하고, 표 8은 E6의 전사 억제에 대한 광범위한 값을 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 하기의 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 파라메터에서의 25% 이상의 감소가 있는 경우 소정의 임상 치료가 효과적인 것으로 간주된다면, 상기 질환 또는 장애의 치료를 위한 약물의 치료적 유효량은 이러한 파라메터에서 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, 봉해제, 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 봉해제이다. 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.

II. 이중-가닥 리보핵산 (dsRNA)

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 뉴클레오티드 30개 미만, 일반적으로 뉴클레오티드 19-24개이며, 상기 dsRNA는 상기 HPV 표적 유전자를 발현하는 세포와의 접촉 시 상기 HPV 표적 유전자의 발현을 적어도 10%, 25%, 또는 40%만큼 억제한다.

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 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 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.

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

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

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 올리고뉴클레오티드 서열의 성질에 의해, 본 발명의 dsRNA는 길이가 최소한 뉴클레오티드 21개인 1개 이상의 가닥을 포함할 수 있다. 표 1, 표 5 또는 표 7의 서열들 중 하나 빼기 한쪽 또는 양쪽 말단에서의 몇개의 뉴클레오티드를 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 뉴클레오티드의 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.

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 뉴클레오티드 서열에 커플링된 표 1, 표 5 또는 표 7에서 제공된 서열들 중 하나로

부터의 15개 이상의 인접 뉴클레오티드로 일반적으로 구성될 것이다. 예를 들어, 표적 E6AP 유전자로부터의 다음 6개의 뉴클레오티드와 조합된 서열 1의 마지막 15개의 뉴클레오티드 (부가된 AA 서열을 뺨)로 표 1에서 제공된 서열들 중 하나를 기초로 하는 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 5개, 예를 들어 5' 또는 3' 말단으로부터의 뉴클레오티드 5개, 4개, 3개, 2개, 또는 1개에 한정되는 것이 바람직하다. 예를 들어, HPV 표적 유전자의 영역에 상보적인 뉴클레오티드 23개의 dsRNA 가닥에 대해, 일반적으로 dsRNA는 중앙의 13개의 뉴클레오티드 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 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 뉴클레오티드 1개 내지 4개, 일반적으로 1개 또는 2개의 단일-가닥 뉴클레오티드 오버행이 있다. 1개 이상의 뉴클레오티드 오버행이 있는 dsRNA에는 블런트-말단 대응부보다 예상외로 우수한 억제 성질이 있다. 또한, 본 발명가들은 오직 1개의 뉴클레오티드 오버행의 존재가 dsRNA의 간접 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 뉴클레오티드 오버행이 있고, 5'-말단은 블런트이다. 또다른 실시양태에서, 오버행 내의 1개 이상의 뉴클레오티드가 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. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA]에 기술된 것들에 의해 합성 및/또는 변형될 수 있다. 화학적 변형은 2' 변형, 올리고뉴클레오티드의 당 또는 염기의 다른 부위에서의 변형, 올리고뉴클레오티드 사슬 내로의 바-천연 염기의 도입, 리간드 또는 화학 모이어티에 대한 공유결합 부착, 및 별법적인 결합 예컨대 티오포스페이트로의 뉴클레오티드간 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)시스스타민; 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 훈입된다 (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 헥사에틸렌 글리콜 링커를 통해 화학적으로 연결된다. 또다른 실시양태에서, dsRNA의 1개 이상의 뉴클레오티드가 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 뉴클레오티드가 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'-0-메틸 변형, 및 포스포로아미데이트를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다 (예를 들어, [Wagner, Nat. Med. (1995) 1:1116-8] 참조). 따라서, dsRNA 상의 뉴클레오티드의 1개 이상의 2'-히드록실 기가 화학 기, 일반적으로 2'-아미노 또는 2'-메틸

기로 대체될 수 있다. 또한, 1개 이상의 뉴클레오티드가 변형되어 로킹된 뉴클레오티드를 형성할 수 있다. 이 같은 로킹된 뉴클레오티드는 리보스의 2'-산소를 리보스의 4'-탄소와 연결하는 메틸렌 다리를 함유한다. 로킹된 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드가 [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 뉴클레오티드의 올리고뉴클레오티드 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 적접적인 투과를 용이하게 한다. 별법적으로, dsRNA에 접합된 리간드는 수용체-매개 세포내이입에 대한 기질이다. 이러한 접근법은 안티센스 올리고뉴클레오티드, 뿐만 아니라 dsRNA 작용제의 세포 투과를 용이하게 하는데 사용되었다. 예를 들어, 콜레스테롤이 다양한 안티센스 올리고뉴클레오티드에 접합되어, 접합되지 않은 유사체와 비교하여 실질적으로 더욱 활성인 화합물이 초래되었다. [M. Manoharan Antisense & Nucleic Acid Drug Development 2002, 12, 103] 참조. 올리고뉴클레오티드에 접합된 기타 친지성 화합물에는 1-페렌 부티르산, 1,3-비스-0-(헥사데실)글리세롤 및 메탄올이 포함된다. 수용체-매개 세포내이입을 위한 리간드의 한 예는 엽산이다. 엽산은 폴레이트-수용체-매개 세포내이입에 의해 세포에 진입한다. 엽산을 보유하는 dsRNA 화합물은 폴레이트-수용체-매개 세포내이입을 통해 세포 내로 효율적으로 운송될 것이다. [Li, S.; Deshmukh, H. M.; Huang, L. Pharm. Res. 1998, 15, 1540]에서 올리고뉴클레오티드의 3'-말단에 엽산을 부착하는 것으로 올리고뉴클레오티드의 세포 섭취가 8배 증가하였음이 보고되었다. 올리고뉴클레오티드에 접합된 기타 리간드에는 폴리에틸렌 글리콜, 탄수화물 클러스터(cluster), 가교제, 포르피린 접합체, 및 전달 웨티드가 포함된다.

<78> 특정 예에서, 양이온성 리간드를 올리고뉴클레오티드에 접합시킴으로써 핵산분해효소에 대한 개선된 저항성이 초래된다. 양이온성 리간드의 대표적인 예는 프로필암모늄 및 디메틸프로필암모늄이다. 흥미롭게도, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 양이온성 리간드가 올리고뉴클레오티드 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 올리고뉴클레오티드는 시판되는 리간드, 임의의 다양한 보호기를 보유하는 합성된 리간드, 또는 연결 모이어티가 부착된 리간드와 적접적으로 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 올리고뉴클레오티드의 5' 위치 상에 있는 연결 모이어티의 반응을 통해 본 발명의 방법의 일부 바람직한 실시양태에 따라 제조된다. 일부 예에서, 먼저 단량체 빌딩 블럭(building block)을 세공-제어 유리 지지체에 장쇄 아미노알킬 기를 통해 공유결합으로 부착한 후, 뉴클레오티드를 고체 지지체에 결합된 단량체 빌딩 블럭에 표준 고체-상 합성 기술을 통해 결합시킴으로써, 아르알킬 리간드가 dsRNA의 3'-말단에 부착된 dsRNA가 제조된다. 단량체 빌딩 블럭은 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 올리고뉴클레오티드, 예컨대 포스포로티오에이트 및 알킬화 유도체를 제조하는 것이 또한 공지되어 있다.

<81> 특정 변형 올리고뉴클레오티드의 합성에 관한 교시를 하기의 미국 특허에서 발견할 수 있다: 폴리아민이 접합된 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 번호 5,138,045 및 5,218,105; 키랄(chiral) 인 결합이 있는 올리고뉴클레오티드의 제조를 위한 단량체에 관한 미국 특허 번호 5,212,295; 골격이 변형된 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 번호 5,378,825 및 5,541,307; 골격-변형 올리고뉴클레오티드 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 올리고뉴클레오티드의 제조 방법에 관한 미국 특허 번호 5,521,302; 웨티드 핵산에 관한 미국 특허 번호 5,539,082; β -락탐 골격이 있는 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 번호

5,554,746; 올리고뉴클레오티드의 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 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 번호 5,587,361 및 5,599,797; 2'-0-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 올리고뉴클레오티드에 관한 미국 특허 번호 5,587,469; 3-데아자퓨린이 있는 올리고뉴클레오티드에 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 올리고뉴클레오티드 유사체에 관한 미국 특허 번호 5,602,240 및 5,610,289; 특히 2'-플루오로-올리고뉴클레오티드의 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, 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오시드를 적절한 DNA 합성기 상에서 표준 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 전구체, 또는 연결 모이어티를 이미 보유하는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 접합체 전구체, 리간드 분자를 이미 보유하는 리간드-뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드-접합체 전구체, 또는 비-뉴클레오시드 리간드-보유 빌딩 블록을 사용하여 조립할 수 있다.

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

<84> 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오시드 내의 2'-0-메틸, 2'-0-에틸, 2'-0-프로필, 2'-0-알릴, 2'-0-아미노알킬 또는 2'-데옥시-2'-플루오로 기의 혼입은 올리고뉴클레오티드에 증강된 혼성화 성질을 부여한다. 또한, 포스포로티오에이트 골격을 함유하는 올리고뉴클레오티드는 핵산분해효소 안정성이 증강된다. 따라서, 본 발명의 관능화된, 연결된 뉴클레오시드는 포스포로티오에이트 골격 또는 2'-0-메틸, 2'-0-에틸, 2'-0-프로필, 2'-0-아미노알킬, 2'-0-알릴 또는 2'-데옥시-2'-플루오로 기 중 하나 또는 양쪽 모두를 포함하도록 증대될 수 있다. 당업계에 공지된 올리고뉴클레오티드 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-히드록신이미드 에스테르, 테트라플루오로페놀 에스테르, 웬타플루오로페놀 에스테르 및 웬타클로로페놀 에스테르가 포함된다. 아미노 기와 활성 에스테르의 반응으로 선택된 리간드가 5'-위치에 연결 기를 통해 부착된 올리고뉴클레오티드가 생산된다. 5'-말단의 아미노 기는 5'-아미노-변형제 C6 시약을 사용하여 제조할 수 있다. 한 실시양태에서, 리간드-뉴클레오시드 포스포르아미디트를 사용함으로써 리간드 분자를 5'-위치에서 올리고뉴클레오티드에 접합시킬 수 있고, 이때 리간드는 5'-히드록시기에 직접적으로 또는 간접적으로 링커를 통해 연결된다. 이같은 리간드-뉴클레오시드 포스포르아미디트가 자동 합성 절차의 끝에 전형적으로 사용되어, 5'-말단에 리간드를 보유하는 리간드-접합 올리고뉴클레오티드를 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), 포스피네이트, 포스포르아미데이트 (3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트 포함), 티오노포스포르아미데이트, 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 뉴클레오시드간 결합 또는 골격 (즉, 올리고뉴클레오시드)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(뉴클레오시드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨); 실록산 골격; 술퍼드, 술폴시드 및 술폰 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 술파메이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 골격; 술포네이트 및 술폰아미드 골격; 아미드 골격이 있는 것들; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분이 있는 기타 물질을 포함한다.

<89> 상기 올리고뉴클레오시드의 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, 올리고뉴클레오티드는 비-리간드 기에 의해 변형될 수 있다. 다수의 비-리간드 분자가 올리고뉴클레오티드의 활성, 세포 분포 또는 세포 섭취를 증강시키기 위해 올리고뉴클레오티드에 접합되었고, 이같은 접합을 수행하기 위한 절차가 과학 문헌에서 입증 가능하다. 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, 헥실-S-트리틸티올 ([Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660:306]; [Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765]), 티오콜레스테롤 ([Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533]), 지방족 사슬, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운데실 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-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-0-헥사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트 ([Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651]; [Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777]), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬 ([Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969]), 또는 아디만탄 아세트산 ([Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651]), 팔미틸 모이어티 ([Mishra et al., Biochem. Biophys. Acta, 1995, 1264:229]), 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 ([Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Then, 1996, 277:923])를 포함하였다. 이같은 올리고뉴클레오티드 접합체의 제조가 교시된 대표적인 미국 특허들이 상기에 열거되어 있다. 전형적인 접합 프로토콜은 서열의 1개 이상의 위치에 아미노링커를 보유하는 올리고뉴클레오티드의 합성을 수반한다. 그후, 적합한 커플링 또는 활성화 시약을 사용하여 아미노 기를 접합될 분자와 반응시킨다. 고체 지지체에 여전히 지지된 올리고뉴클레오티드로 또는 용액 상에서의 올리고뉴클레오티드의 절단 후에 접합 반응이 수행될 수 있다. 전형적으로 HPLC에 의한 올리고뉴클레오티드 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 측정 가능함). 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 뉴클레오티드 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 ("액소")	dTsdT ("액소")
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>

벡터에 코딩된 RNAi 작용제

<95>

본 발명의 dsRNA는 생체내에서 세포내에서 재조합 바이러스 벡터로부터 또한 발현될 수 있다. 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 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 벡터는 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 벡터를 사용하는 것이 하기에 더욱 상세하게 논의된다.

<96>

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

<97>

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

<98>

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

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 발현시키기 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]; [Egliitis 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.

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 활성화 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 μ g 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(臘用) 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 복합적인 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 접적)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, 접적액, 죠약, 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, 중점제 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 허용 가능한 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 (디옥타데실 아미도 글리신 스페르민), 및 DC-chol (3, [N-N',N-디메틸에틸렌디아민]-카르바모일]콜레스테롤)이 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, 폴리에틸렌이민과 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 또 다른 비-바이러스성 방법은 리포플렉스 (lipoplex) 및 나노에멀션과 같은 양이온성 지질-기반 전달 시스템을 포함한다 (리포솜에 더하여). 추가적으로, 키토산, 폴리(L-라이신) (PLL), 폴리에틸레이민 (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, 혼탁제, 또는 약리학적으로 불활성인 임의의 기타 비허클이다. 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; 유후제 (예를 들어, 전분, 폴리에틸렌글리콜, 또는 아세트산나트륨); 봉해제 (예를 들어, 전분 또는 소듐 전분 글리콜레이트); 및 습윤화제 (예를 들어, 소듐 라우릴 솔레이트)가 비제한적으로 포함된다.

<120> 또한, HPV 표적 유전자를 표적으로 하는 dsRNA는 다른 분자, 분자 구조물, 또는 핵산 혼합물과 부가혼합되거나, 이들로 캡슐화되거나, 이들과 접합되거나, 또는 또 다른 방식으로 이들과 화합된 dsRNA를 함유하는 조성물 내로 제제화될 수 있다. 예를 들어, E6AP 유전자를 표적으로 하는 하나 이상의 dsRNA 작용제를 함유하는 조성물이 또 다른 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 또 다른 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 뉴타운(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 뉴로파티쿰(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 (첨형 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, 턱솔 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, 이 같은 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 침목이 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.

E6AP 유전자의 발현을 억제하는 방법

<140> 또다른 양상에서, 본 발명은 포유동물에서 E6AP 유전자의 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 이 방법은 표적 E6AP 유전자의 발현이 침목되도록 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, 특히 출원, 특히, 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.

실시 예

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 (절단 위치)까지의 서열 보존을 확증하였다.
- <146> E6AP 기준 서열 NM_130838.1에 스패닝(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 파라메터로 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. 펠(per1) 스크립트를 사용하여 후보물 19량체 서열로부터 안티센스 서열을 생성시켰다 (펠 스크립트 2). 19량체의 전장에 걸친 상동성을 고려하고 다음 단계에서의 스크립트 분석에 적절한 출력을 포맷하기 위하여 파라메터/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 파라메터를 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:

- <163> (종자 미스매치의 개수 × 10) + (절단 부위 미스매치의 개수 × 1.2) + 비-종자 미스매치의 개수
- <164> 가장 낮은 오프-표적 점수를 각각의 입력 19량체 서열에 대해 추론하고, 이어서 출력 파일로 기록하여, 입력 19량체 서열에 상응하는 모든 siRNA에 대한 오프-표적 점수의 목록이 생성되었다.
- <165> siRNA의 순위를 매기기 위해, 오프-표적 점수를 결과 표 내로 기입하였다. 모든 siRNA를 오프-표적 점수에 대한 내림차순에 따라 최종적으로 분류하였고, 열내에 3개를 초과하는 G가 있는 신장물을 함유하는 서열을 선택해서 제외하였다.
- <166> 오프-표적 점수가 3 이상인 156개의 siRNA를 선택하여 합성하였다 (표 1).

표 1

인자 기준 (인간 이소3)로 부터의 mRNA의 표적 서열	서열 번호	이중 오버 행이 있는 센스/가타 (표적 서열)	서열 번호 (표적 서열)	이중 오버 행이 있는 알터센스/가타 (인내 서열)	서열 번호 (표적 서열)	E6AP를 표적으로 하는 dsRNA 드풀렉스 평점
종 19량체의 표적 부위 + 말단들에서의 AA	1	서열 (5'-3')	서열 (5'-3')	서열 (5'-3')	서열 (5'-3')	
AAAUAACGAGAUCGAUCUACAAA	1	AUAGGAUAGAUCUACAAAATT	157	UUUUGUAGAUAGAUUCAUUTT	313	AL-DP-7545
AAAGACUACAUACAUUCAAUAAA	2	UGACUACAUUCUCAAUAAAATT	158	UUUAUUGGAAGAUGAUGUATT	314	AL-DP-7558
AGGCUGCGACGAUAGGUUAA	3	AGCCUGCGACGAUAGGUUATT	159	AAACUCAUUCGAGCAACGCUU	315	AL-DP-7548
AGGAGAUUGUCCAAACCCUUA	4	GGAUUUGUCCAAACCCUUAATT	160	AAGGGGUUUGUCCAAACUUC	316	AL-DP-7549
AACUCUUCGAGAGGUCCAUUAAA	5	CUCUCGAGAGGUCCAUUAAAATT	161	AUAUAUAGGAUCUUCGAGAGT	317	AL-DP-7492
AAAGUGACUACUACUACAGAAA	6	AUGUGACUACUACUACAGATT	162	UCUGUUAAGUAAGUACAUATT	318	AL-DP-7554
AGAGUUCUACUCUACAUUAAA	7	GUUAUCUCUAGAUUCAUUTT	163	UAGGACUUCGAGAGUUAUATT	319	AL-DP-7557
AAAGGUUACCUACAUCAUAAA	8	AGGUUACCUACUCAUCAUATT	164	UAAGGAGUUGGUUAUCCUATT	320	AL-DP-7476
AAAGUACUUAUUCAGACCAAA	9	AGUACUUAUUCAGACCAATT	165	UCUGGUCUAGAAUAGACUATT	321	AL-DP-7514
AAAUCCUAAUUAUCUGAUUAAA	10	AUCCUAUAUUAUCUGAUUUTT	166	AAAUCUAGAUUAUAGGAUTT	322	AL-DP-7540
AAAAGGAUAGGUGAUAGCUAAA	11	AAGGAUAGGUGAUAGCUATT	167	UGACUACUACCUACCUUTT	323	AL-DP-7397
AGGGAGCCGGAAUCAUAGAUAAA	12	GGAGGAGCCGGAAUCAUAGAU	168	AAUCURGAUUCGGCUUCC	324	AL-DP-7526
AAUUCUUCGAGAGGUUGUAGAAA	13	UGCUUCUUCGAGGUUGUAGAAA	169	UUCAAGACCUUCUCCGAGCATT	325	AL-DP-7473
AAUGGAUUGUCCAAACACCUAA	14	UGGAUUGUCCAAACACCUATT	170	AGUGGUUUCGACAAUCCATT	326	AL-DP-7478
AACGCCUAGAGAUGAUCCUAA	15	CGCCUAGAGAUGAUCCUATT	171	UAGGGAUCAUCUCUAGCCGTT	327	AL-DP-7553
AAACAGUGAAAUCAUCAUGUGAAA	16	ACAGUGAAAUCAUCAUGGATT	172	UACACUAGAUUUCGACUGU	328	AL-DP-7395
AAAGACAGACUGUGGUCCUAAA	17	GAUCAGACUGUGGUCCUAAA	173	UUAGACACACAGUCUACUATT	329	AL-DP-7522
AACUGGAGAUCCUAUUAUCUAA	18	CUCGAGAUCCUAUUAUCUATT	174	AGRAAUUAGGAUCUGGATT	330	AL-DP-7499
AAUAUCGUAAUUGGAGAAUAGAAA	19	UAGGUUAUAGGAGAAUAGATT	175	UCUAUUCUCCAUUACGAUATT	331	AL-DP-7527
AACUCAAAUCAUCAUUCUCAA	20	CUCUAAUCAUCAUUCUCAA	176	GGUACGGCUUACUUCUAGATT	332	AL-DP-754
AAAGGGUAGGUUACACAUACGUA	21	AGGAUAGGUUACACAUACGUA	177	GUGACCUUACUCCAUUCCUATT	333	AL-DP-7489
AACACCUUACUGGGAUAGUGAAA	22	CACCUUACUGGGAUAGUGATT	178	UCACAUUCACGGUAGGGATT	334	AL-DP-7365
AAAUUCGUUCAUCAUUCUCAA	23	AUUCGUUAUCAUCAUUCUCAA	179	UGUAUAUAGGAAGAAGGAUATT	335	AL-DP-7390
AACUCAAAUCAUCAUUCUCAA	24	CTUAGACUACUACAUUCAU	180	UACAUUUGUAGAUACGUACGTT	336	AL-DP-7458
AAUGGUAGGUUACACAUACGUA	25	UGCUACUACUACAUACGUA	181	AUCGUUAUUGUAGACAUACGTT	337	AL-DP-7532
AGAGUAGGUUAGGUACACGAGAA	26	GAUAGGUGUAGGUACACGAGAA	182	CUGUGUGUUAUACCUUACU	338	AL-DP-7546
ACCGGUAGAGAUGAUCCGUAA	27	CCGGUAGAGAUGAUCCGUAA	183	AGCGAUCAUCUCAUAGCCGTT	339	AL-DP-7512

AACAUAGUACUGGGGUUUGGUUA	28	CAUAGUACUGGGGUUUGGUUA	184	AGCCAGACCCAGAUACUAUGTT	340	AL-DB-7470
AAAUUGUAUACUCUCAGAUCAA	29	AAGUUAUACUCUGGAGAUU	185	GAUCUCCAGAGAUACUAUUTT	341	AL-DB-7106
AAACAUUUCGUGACIUGGGAA	30	AACUUCUUCGACIUGGGATT	186	UCCAGAGUGAGGAAAGAUUTT	342	AL-DB-7382
AAACAUUUCGUGACIUGGGAA	31	AAAGUAGAGGACGUSACCATT	187	UAGGGACACCUUCACUUTT	343	AL-DB-7147
AAUGAUUAGGGAGUUCUGGGAA	32	UGAUUAGGGAGUUCUGGGATT	188	UCCAGAGACCCUUAUCATT	344	AL-DB-7490
AAUCAGAAGACUCAAAUAA	33	UAGGAUAGAUUCAAAUUTT	189	AUUUGAGAUACUCAAAUUTT	345	AL-DB-7193
AAUCUGUCGGCUAGUGAUGAA	34	CUUGUCCUGGAGAAGAUGATT	190	UCAUCUCAAGCCGACAGATT	346	AL-DB-7329
AAUAGUACUCUGGCUUCCAAA	35	UAAUCUCCAGGUCCUATT	191	UAGGGACUUCGGAGGUUATT	347	AL-DB-7400
AAACUACUGGUACUCAAAUAA	36	ACUUGACGUUACAAAGUTT	192	ACAUUSGAGAUACSUCAAGUTT	348	AL-DB-7491
AAACAGUGGAAGAAUAGUGAA	37	AACAGUGGAAGAAUAGUGATT	193	UCAUCUAGAUUUCGACUGUTT	349	AL-DB-7393
AAUCAUUAUCGUUAUGGAA	38	UCAUUAUCGUUAUGGAA	194	UUCUCAUAGAUUAUGATT	350	AL-DB-7511
AAUAGUACUGGUACUCAAAUAA	39	AUAGGUACUGGUACUCCATT	195	UAGCCAGACCCAGACUUTT	351	AL-DB-7154
AAUCUACUGGUACUCAAAUAA	40	CCUACUCCGGAAAGUGACUTT	196	AGUCACAUUCACCUUUNGTT	352	AL-DB-7450
AAUUGUCCGGCUUAGAAGUAA	41	UUGUCCGGCUUAGAAGUATT	197	AUACUUCUCCGGACUUTT	353	AL-DB-7333
AAACUACUGGUACUCAAAUAA	42	ACCUACUGGUACUCAAAUUTT	198	GUACAUUCCACGUUAUGUTT	354	AL-DB-7485
AAUACAGUACUGGUACUCAAAUAA	43	UUAACAGUACUGGUACUCAAAUAA	199	ACUAGAUUUGACGUUAUATT	355	AL-DB-7195
AAUUGGUAGUACUGGUACUCAAAUAA	44	UUGGUAGUACUGGUACUCAAAUAA	200	AGACCCAGGUACUURGGCAATT	356	AL-DB-7456
AAAGACUUCUUCGUAGAAGUAA	45	GAACAUUUCGUAGAAGUATT	201	CCACAGUACAGGUAGGUUATT	357	AL-DB-7338
AAGUCCGGGUAGAAGUAA	46	GUCCGGGUAGAAGUACGTT	202	CGAUCAUCUACGGGACTT	358	AL-DB-7377
AAAGCCCAGGUUUAUUAAGAAA	47	GCCUCCAGGUUUAUUAAGATT	203	UCUUAUAAAGGUUAGGGCTT	359	AL-DB-7405
AAUCUGGUUUAUUAAGAAA	48	CUGGUCCUUAUUAAGAUATT	204	UAAUCUUAUUAAGGUUGGAGTT	360	AL-DB-7392
AAUGCCAGUACUGGUACUCAAAUAA	49	UGGCCAGUACUGGUACUCAAAUAA	205	CAGACCCAGUACUACUAGCATT	361	AL-DB-7453
AAACGAUAGAGUUUAUUGGUUAA	50	ACGAAAGAGUUUAUUGGUUUTT	206	AGACACAAACGUACUUGGUUTT	362	AL-DB-7366
AAUUCUUCUUGGUAGUUAUAA	51	UUCUUCUUGGUAGUUAUATT	207	UAAUACUCAUACGAGAAUATT	363	AL-DB-7334
AAAGAGUGGUACUAAUACUAGAA	52	AGAGUGGUACUAAUACUAGTT	208	CUAGAUUAGGUACUGGUUUTT	364	AL-DB-7101
AAUAGUACUGGUACUCAAAUAA	53	UAGGUACUGGUACUCAAAUAA	209	AGUCCAGACCCAGACUUTT	365	AL-DB-7323
AAUCGUAGGUACUAAUACUAGAA	54	CGUAGGUACUAAUACUAGTT	210	CGUCCAUUACAUACUAGCATT	366	AL-DB-7555
AAUGGUACUAAUACUAAUACUAGAA	55	UGCCAUUACAUACUAGCATT	211	CAUCAUUAGGUACUAGCATT	367	AL-DB-7336
AAAUUCGGCAUAGUACUGGUAAA	56	AUUCGGCAUAGUACUGGUAAA	212	UACATGUACUAGGUACUAGUUTT	368	AL-DB-7371
AAAUUGGUAAUUCGUAGUCAAA	57	AUAGGUAAUUCGUAGUCAAA	213	UGUACAUUAGGUACUAGUUTT	369	AL-DB-7372
AAUGGUACCCAAUAGGUCAAA	58	UGGUACCCAAUAGGUCAAA	214	AUACAUUAGGUACUAGUUTT	370	AL-DB-7370
AAAGGGGAUACUAGGUUCAA	59	AGGGGAUACUAGGUUCAA	215	GGAAACUAGGUACUAGGUUTT	371	AL-DB-7474
AAACUUCUUGGUACUUCGGGAA	60	ACTUUCUUGGUACUUCGGGAA	216	CUCCCAAGUACGAGAAGUUTT	372	AL-DB-7452
AAAGCCCUCUGGUUUAUAGAA	61	AGGCCUCUGGUUUAUAGAA	217	CUUAAAAGGUACUGGGCUTT	373	AL-DB-7498

AGAGAACGAAAAGAACACUGUCAA	62	GAACGAGAGAACACUGUCACTT	218	GAACAGAGAUUCUUCGUUCCTT	374	AL-DP-7551
AAUAUUCUCACUCAUCUUCAAA	63	UAUUCUCACUCAUCUUCATT	219	UGAGAGAUGAGUCAGAAUATT	375	AL-DP-7552
AAGCUCUCAURAGAACGCCCAA	64	GAUCUCAURAGAACGCCATT	220	GUAGCUCUCAUUAUAGAUGCTT	376	AL-DP-7504
AAUCUCAUACUUCURGUGAUGUAA	65	UGAUAUCAUCHAGUGAAGAUATT	221	AUCAUCAUCUCAUAGAUGCTT	377	AL-DP-7467
AAAGUCGAAUACUACUGAGAUGAA	66	AGUCGAAUACUACUGAGAUGTT	222	CAUCUCAUCUAGAUAUCGACATT	378	AL-DP-7463
AGAGAACGCGUAGAUUGUAAA	67	GAAGAGCGCGUAGAUUGAUATT	223	AUCAUCAUCUAGCAGCUUCCTT	379	AL-DP-7399
AAAAGGCGGCAAGAUUGUAAA	68	AAAGGCGGCAAGAUUGAUATT	224	AAUCAAUUCUAGGCCCUUATT	380	AL-DP-7501
AAGGCGGCAAGAUUGUAAA	69	AGGCGGCAAGAUUGAUATT	225	AAAUCAAUUCUAGGCCCUUATT	381	AL-DP-7385
AAAGCAUCUCAUAGAACGGAAA	70	ACGCAUCUCAUAGAACGGATT	226	UAGCGSUCUCAUAGAUGCUUATT	382	AL-DP-7480
ACACAGCGGAAUAGGAAUAAA	71	CAAGAGGAGAGCAAGGATT	227	UAGCGUUCGUCUAGCJUUGTT	383	AL-DP-7528
AACCUAUGGUGUCUAGAGGAAA	72	CCAUAGGUGUCUACAGGATT	228	UUCUGUAGAGCACACCAUGGT	384	AL-DP-7535
AAAGGAAAGGGCGUAGAUUGAAA	73	AGRAAGGCCGCAAGAUUGATT	229	UCAUAUUCUURGCCCUUUCATT	385	AL-DP-7403
AAAACCAUCUCAUCACAGUAAA	74	ACGCUACUACACCGAUATT	230	ACAGUGGGGGAGUAGGCUUATT	386	AL-DP-7380
AGCGSCUAGAUAUGAUUAAA	75	GGCGCUGAUAUAGAUUAAA	231	UAAAUAUCAUACUACGGCTT	387	AL-DP-7364
AGCAGCUGAGACUGUOUGCAA	76	GCACGIGAUACAGGUUCATT	232	UGCACACUCAUACAGGCTT	388	AL-DP-7469
AGAUGUGUGUCCAGUACAAA	77	GAUAGUGUCCAGUACATT	233	UUGUGACUGGGACACUATT	389	AL-DP-7518
AAUUUCGGAAAGUUCACAA	78	UUGCGSUGAAAGUUCATT	234	UGUACACUUCUACGGAATT	390	AL-DP-7464
AAAGCAGUUCUUCUUUGT	79	AGUAGUGUCCUUCUUUGT	235	CAAAAGAGUAGCAUCATT	391	AL-DP-7560
AGAGAUGUGUGUCCUUCUGUAA	80	GUAGUGUGUCCUUCUUGT	236	ACACAUAGAGCACACATT	392	AL-DP-7461
AGGGUGUGUCAAGCCUUCGAA	81	GUAGIGCAACCUAUCATT	237	UGCAUAVAGGCUACUACCTT	393	AL-DP-7472
AAAGGUACCUUCAAGUAAA	82	ACGUACCUUCAAGUAGUATT	238	ACACAUUGAGGGUACGATT	394	AL-DP-7459
ARACCGCGUACCUUCAAGUAA	83	ACCCGUACCUUCAAGUATT	239	UUCUGUAGGGUACGUGGTT	395	AL-DP-7381
ACACGUAAACGUGACCGGAAAA	84	CGUACGUACGACGGATT	240	UUCUCCAGGUCAGGUACUGTT	396	AL-DP-7515
AAAGUGGGUUAUACAUACUGAA	85	AGDAGGUUACAUACUGATT	241	UCAGUAUAGUAACCGUATT	397	AL-DP-7517
AAAUGUGUGUCAAGCCUAAA	86	AAUGGAGGUUACAUACUATT	242	AAUAGGGUUACAUACUATT	398	AL-DP-7521
AGCCUAAUUCACAAAGUAAA	87	GCQUAUUCACACAGUATT	243	UACUUCUUGGUUACGUAGTT	399	AL-DP-7530
AGRCACCGGUACCUUCAAGUAA	88	GRCCAGGUACCUUCAAGUATT	244	ACTUGAGGUAGGGUACGTT	400	AL-DP-7388
AAUGUAAACGGUUACUUCUAAA	89	UGUAGGUACGUACGUUACATT	245	AUGAAGGUAGGUACGUUACATT	401	AL-DP-451
AAUUAAGGCGUACGUUACUAAA	90	AUGGAAGGUAGGGUACGAGATT	246	UCAUUGGGGUAGGUUACUATT	402	AL-DP-7484
AAAUAUACACAGGGAAAUAUAA	91	AUUAUACACAGGGAAAUAUATT	247	AUUAUACACAGGGAAAUAUATT	403	AL-DP-7376
AAACUACUUAUACCUUCAAGUAA	92	ACUACUUAUACCUUCAAGUATT	248	AUCUAGGUAAUAGGUAGUATT	404	AL-DP-7500
AAUGUUCUCCGUUGGUUAAA	93	UGUUCUCCGUUGGUUAAA	249	UAAAACACACACGAGACATT	405	AL-DP-7488
AAUUUAUACGGUUAUACUAAA	94	UUUUAUACGGUUAUACUAAA	250	AGUAGUUAUACCCUUAUATT	406	AL-DP-7541
AAAGUACACGACACAAUAAA	95	AGUACAGCACAACAAUATT	251	AAUUGUGUGGUACUACUATT	407	AL-DE-7550

AACACUCUCCUGCUCUGAGAGAAA	96	CAACUCUCUCUGAGAGUATT	252	UAUCUCAGAGCCAGGAGUGTT	408	AL-DP-7776
AAGAGUGACUACUACUACAGAA	97	GAUGUCACUACUAAACAGTT	253	CUCUUAHGUAGUCACRUCTT	409	AL-DP-7777
AACAUUAUCGURAUGGAGAAUAA	98	CAUUCUUCGURAUGGAGAUATT	254	AUUCUCUACAUAGAUAAUGTT	410	AL-DP-7510
AACCUCUUAUCGAGGAGCGUAA	99	CCAUUCUACGAGGAGCGUATT	255	ACGUGCCUGAGUAAAUGTT	411	AL-DP-7507
AAGAGAGCCAAUCUCUUCUCAA	100	ACUAGCCAAUCUCUUCUCAUTT	256	AGAAGAGGAUGGCGCUCUTT	412	AL-DP-7479
AUAUAUGAGACCUACUACCAA	101	UAUAUACAGCUCUACCAUTT	257	UGGUGAGGGGUOCUUAUTT	413	AL-DP-7542
AACUUCGUCACACUGUAGUCAA	102	CUUCGUCACACUGUAGUCAA	258	UGACUACAGUAGCAGAGTT	414	AL-DP-7494
AAUCAUAGGUGGACCAAGAAGAA	103	UCAUAGGUGGACCAAGAAGTT	259	UICCAUAUACGCAAGUAAUTT	415	AL-DP-7531
AAUUAUACGAGGGGUAAUAA	104	UUAUACGAGGGGUAAUAAUTT	260	UICCAUAUACGCAAGUAAUTT	416	AL-DP-7373
AAUUCGGUACCUUAGUAGAAGAA	105	AUACGUCACCUUAGUAGAAGTT	261	UUCUACUACAGGUGGCGUATT	417	AL-DP-7508
AAAGGUAGCCGAUGAGGGAAA	106	ACCUACCCGAUAGAAGGAGTT	262	UGCCUCAUUCGGGUACUTT	418	AL-DP-7487
AUUAUACGCUUAGUAGUAGGAA	107	UACAUUCGCUUAGUAGGTT	263	CAUACAGGUAGCGUAGUATT	419	AL-DP-7375
AAAUUAUACGAGGGGUAAUAA	108	AUUAUACGAGGGGUAAUAAUTT	264	AUUAUACCUUCGUGUAAUUTT	420	AL-DP-7462
AAUGUCUCUGUUGUUGUUAAA	109	GUICUGUGUUGUUGUUAAAUTT	265	UUAACACACAGGAGACTT	421	AL-DP-7513
AAUGAUUAGCAGUAGUUTTAAA	110	UGUUAUACUAGUAGUUTTAAA	266	UAAAACAUACAGUACAAUTT	422	AL-DP-7455
AAUUAUACUCCGUUUAUUGAAA	111	UUUAUACUCCGUUUAUUGATT	267	UCCAUUAUACAGGGUAAUATT	423	AL-DP-7374
AAUGGCCUAGAGGUAGUCAA	112	UGUCCGCCUAGAGGUAGUCAUTT	268	GUICGUACUACUACGGGACATT	424	AL-DP-7475
AAUGUAGCCGAUGAGGGAGAA	113	GUCAUGCCGAUGAGGGAGAA	269	CGUCGUACUACUACGGGUAGCTT	425	AL-DP-7369
AAUGUACAUACGCUACCUUAAA	114	GUACAUACSCUACCUUCAUTT	270	AUCAACGUAGCAGUAGUACTT	426	AL-DP-7466
AAUCCAGCTUUAUACAUAAA	115	UCCAGGUUUAUACAUAAAUTT	271	UUAUCUACUUAUACGUCAUTT	427	AL-DP-7491
ACUCUACCCAGUACUACUGAGAA	116	CUACCCACCUACUACUACAGTT	272	CUCAGUACUACGUUGGUAGTT	428	AL-DP-7482
AAUUUUAUAGGAGCAGGUGUAA	117	UUUUUAUAGGAGCAGGUGUAA	273	AUACGUGCCUGGUAAUATT	429	AL-DP-7398
AAAUUAUACUAGGGCACGUGAAA	118	AAUUAUACUAGGGCACGUGAAA	274	UACGUGCCUGGUAAUATT	430	AL-DP-7471
AAAGAGGUACUACUACAGUCAA	119	AACGUACUACUACAGUCAAUTT	275	ASUACAGUAGAGUACUUTT	431	AL-DP-7383
AAAGGAUACUACGCAUGUAGGAA	120	ASUAGAUACUACGCAUGUAGGAA	276	CAUGUACUACGUAGGUACUTT	432	AL-DP-7367
AAUCAUACGUAGGCCAAAGGAA	121	UACAUACGUAGGCCAAAGGAA	277	AAUCCUUCUAGGCAUACGUATT	433	AL-DE-7386
AAUCAUACUACUACUAGUAGAA	122	CUUUAUACUACUACUAGUAGAA	278	CCAUACACAGGAGUAAAGTT	434	AL-DP-7525
AAACUUCGGUACACUACUAGUAGAA	123	ACUACUUCGGUACACUACUAGUAGAA	279	UCAUACAGGUAGGUAGUUTT	435	AL-DP-7486
AAUCCUACGUACUACUAGUAGAA	124	ACUACUACGUACUACUAGUAGAA	280	CAUACAGGUAGGUAGUUTT	436	AL-DP-7539
ACACAUUACUACGAGGAGCGUAA	125	CAUACAUUACUACGAGGAGCGUAA	281	CACGGUGCCUGGUAGGUAGUUTT	437	AL-DP-7483
AAUUAUACUACUACUAGUAGAA	126	UUAUACUACUACUAGUAGAA	282	AUACUACUACUACUAGUAGAAUTT	438	AL-DE-7503
AAACCUCUGGUACACUACUAGUAGAA	127	CCUUCUGGUACACUACUAGUAGAA	283	GAUCUACUACUACUAGUAGAAUTT	439	AL-DP-7537
AAUGUAGGGGUACAUACGUAAA	128	UGGUAGGGGUACAUACGUAAA	284	UACGGUAGGGGUACAUACGUAAAUTT	440	AL-DE-7396
ACACUUGUAGGGGUACAUACGUAAA	129	CGUAGGUAGGGGUACAUACGUAAA	285	CGUAGGUAGGGGUACAUACGUAAAUTT	441	AL-DE-7404

AAUGGGCACUUUUCACCAUAA	130	UUGGCCACUUUUCACCUATT	286	UUGGGAAAAGGCCACATT	442	AL-DF-7543
AAUCUCCAUUCCAAAGGAA	131	AUCACCUAUGCCAAAGGAUTT	287	ACCCUUGGCCAUGGGAUTT	443	AL-DF-7379
AAAGGGGUCAUUGGUUACCUAA	132	AGGGGUCAUACGUUACCUUTT	288	AGGUAGGGGUUACGUUACCUUTT	444	AL-DF-7502
AAACUAGGAGAGACAUAGUAA	133	ACUAGGAGAGACAUAGGAUTT	289	AUCAAGGUCCACCUUAGGTT	445	AL-DF-7519
AAUGUCACCUAACGUUGGAUGAA	134	UGUCACCUAACGUUGGAUGTT	290	CAUCCACGUUAGGUAGCATT	446	AL-DF-7506
AAUAGGUUCCGUUACUAGAA	135	AUAGGUUCCGUUACUAGCATT	291	CUGUACAUACGUUACUUTT	447	AL-DF-7457
AAUUGGACGUACUGGGAGACUAA	136	UUCGUACGUACUGGGAGACUTT	292	GGACUUCUCCAGAUACGACATT	448	AL-DF-7468
AAUAGAAAUUCGUAGACGURA	137	UGAUAUUCGUAGACGATT	293	ACGUACAUACGUAGGUACUATT	449	AL-DF-7368
AAUGGGGGGUUUAUUAUAAA	138	UGAGGGGGGUUUAUUAUATT	294	AUUAUAUAAAAGCCUCUATT	450	AL-DF-7402
AAACUGUUAGGGGUUACUACAA	139	ACACUGUUAGGGGUUACUACATT	295	GUAGGUACCUUACAGUGTT	451	AL-DF-7481
AAUUCUGUUCGUUACUURAGAA	140	UUCUGUUCGUUACUURAGTT	296	CUUAACACACAGGAAUACGATT	452	AL-DF-7465
AAACUGUUGGGGUACUACCGUA	141	CUGUUGGGGUACUACCGUTT	297	ACSGGUUGGUACCCUACGATT	453	AL-DF-7496
AAUUAUACUAAGGUAGGACURA	142	UUAUACUAAGGUAGGACAUTT	298	AUGUCUACCUUACGUUAATT	454	AL-DF-7549
AAUACAGUGGAAUACUAGUGAA	143	UAAACAGUGGAAUACUAGUGTT	299	CACUAGAUUUCGACGUUATT	455	AL-DF-7394
AAUGGGGUUUAUACUACUCAA	144	UGUGGGGUUUAUACUACUCAA	300	GCAUUGUUAUUGACCATT	456	AL-DF-7477
AAUCACCUAACUGGUAGUGAA	145	UUCACCUAACUGGUAGUGTT	301	CAACUACCAACGUUAGGUGATT	457	AL-DF-7516
AAUUCUUGUUAUAGGUAGGAA	146	UUCUUCUUGUUAUAGGUAGGTT	302	UCCUUCUACAUACUUAAGATT	458	AL-DF-7556
AAAUAGUAGACCCUACACCAA	147	AAUAGACCCUACACCACTT	303	GUUGGUAGUACCCGUUUAUTT	459	AL-DF-7387
AAUCAGGGGUUUAUUAUAAA	148	CUGAGGGGUUUAUUAUAAA	304	GUUAUUAUACGCCUACGATT	460	AL-DF-7524
AAAUUACGUUACAUACUACAA	149	AAAUUACGUUACAUACUACAA	305	GUUAUACGUUACGUACGATT	461	AL-DF-7378
AAUUCUAGGAGGGGUUACCAA	150	UUCUUCUACGUUACGGACTT	306	GUUCUCCAAACGUACGAAATT	462	AL-DF-7389
AAUCUGGUACGUACUACCAA	151	UCCUGGUACGUACUACCACTT	307	GUAGACUACGUACGUACGATT	463	AL-DF-7384
AAUCUACGUUACGUACGUACCAA	152	UCAUACGUUACGUACGUACCAA	308	AGGUACGUACGUACGUACUTT	464	AL-DF-7197
AAACGGCAACGUUGUACUCAA	153	CGUGCAACGUUGUACUCAA	309	AGUGACUACGUACGUACGATT	465	AL-DF-7559
AAUGCACAUAGGAGGUACCAA	154	UGCCACAUAGGAGGUACCAA	310	GUAGACCCUUCUACGUACGATT	466	AL-DF-7320
AAUUCUACAUACGUUACUUGAA	155	UUCUACAUACGUUACUUGTT	311	CGUACACGUUACUUGGUATT	467	AL-DF-7305
AAUUCGCAUGUACAGUGUACGAA	156	UUCGCAUGUACAGUGUACGTT	312	CGUACACGUUACUUGGUATT	468	AL-DF-7460

<171>

dsRNA 합성시약 공급원

<174> 시약 공급원이 본원에서 명확하게 제공되지 않지만, 이같은 시약은 분자 생물학용 시약의 임의의 공급자로부터 분자 생물학에서의 용도에 대한 품질/순도 규격으로 수득될 수 있다.

<175>

siRNA 합성

<176> 단일-가닥 RNA를 Expedite 8909 합성기 (Applied Biosystems, Applera Deutschland 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'-0-메틸 뉴클레오티드를 함유하는 RNA가 각각 상응하는 포스포르아미디트 및 2'-0-메틸 포스포르아미디트를 사용하는 고체 상 합성에 의해 생성되었다 (Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany). 표준 뉴클레오시드 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 올리고리보뉴클레오티드 사슬의 서열 내로 흔입되었다. 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 수득하였다.

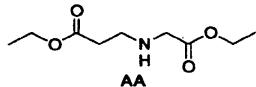
<177>

음이온 교환 HPLC에 의한 조(粗) 올리고리보뉴클레오티드의 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°C의 수조에서 3분 동안 가열하고, 3-4시간의 기간에 걸쳐 실온으로 냉각하였다. 어닐링

된 RNA 용액을 사용할 때까지 -20°C에서 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:

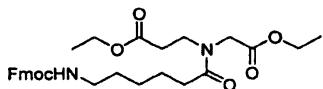
<179> 디에틸-2-아자부탄-1,4-디카르복실레이트 **AA**



<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**

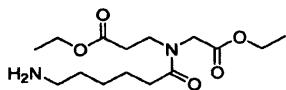


<183>

AB

<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°C에서 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 전공 하에 농축하고, 에틸 아세테이트를 첨가하여 디이소프로필 우레이를 침전시켰다. 혼탁액을 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**



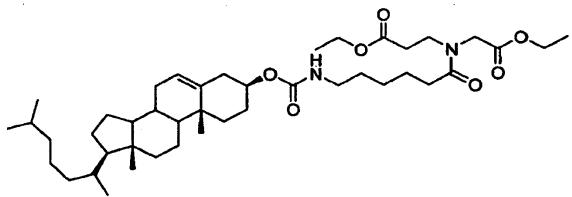
<186>

AC

<187> 3-{에톡시카르보닐메틸-[6-(9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐아미노)-헥사노일]-아미노}-프로피온산 에틸 에스테르 AB (11.5 g, 21.3 mmol)를 0°C에서 디메틸포름아미드 내의 20% 피페리딘에 용해시켰다. 용액을 1시간 동안 계속 교반하였다. 반응 혼합물을 전공에서 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]페난트렌-3-일옥시카르보닐아미노]-헥사노일}-에톡시카르보닐메틸-아미노)-프로피온산 에틸 에스테르 **AD**

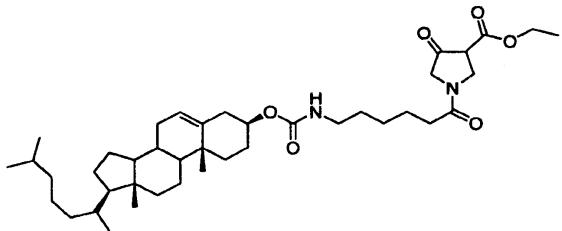
**AD**

<189>

3-[(6-아미노-헥사노일)-에톡시카르보닐메틸-아미노]-프로파온산 에틸 에스테르 AC (4.7 g, 14.8 mmol)의 히드로클로라이드 염을 디클로로메탄에서 용해시켰다. 혼탁액을 얼음 상에서 0°C로 냉각하였다. 혼탁액에 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%).

<190>

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

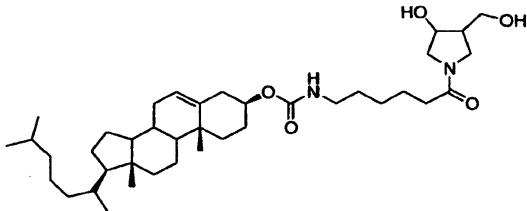
**AE**

<192>

포타슘 t-부톡시드 (1.1 g, 9.8 mmol)를 30 mL의 건조 톨루엔에서 슬러리화시켰다. 혼합물을 0°C로 얼음 상에서 냉각하고, 5 g (6.6 mmol)의 디에스테르 AD를 20분 이내에 교반하면서 천천히 첨가하였다. 첨가하는 동안 온도를 5°C 미만으로 유지하였다. 30분 동안 0°C에서 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, 건고 증발시켰다. 잔류물을 60 mL의 톨루엔에 용해하고, 0°C로 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, 건고 증발시켰다. 잔류물을 25% 에틸아세테이트/헥산을 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 1.9 g의 b-케토에스테르 (39%)가 산출되었다.

<193>

[6-(3-히드록시-4-히드록시메틸-피롤리딘-1-일)-6-옥소-헥실]-카르bam산 17-(1,5-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**

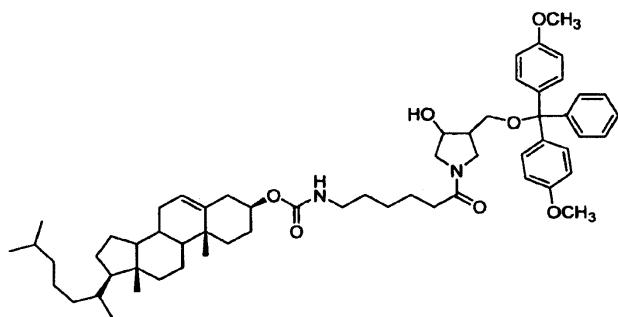
<195>

메탄올 (2 mL)을 1시간에 걸쳐 테트라하이드로푸란 (10 mL) 내의 b-케토에스테르 AE (1.5 g, 2.2 mmol) 및 수소화 봉소나트륨 (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)-카르bam산 17-(1,5-디

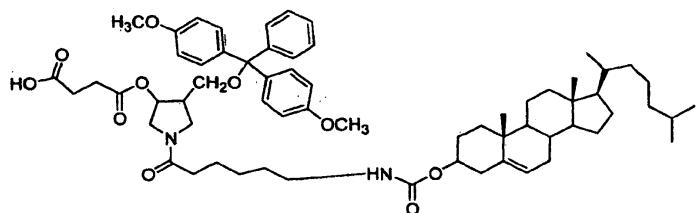
메틸-헥실)-10,13-디메틸-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 에스테르 AG



AG

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 켄칭(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, R_f = 5% MeOH/CHCl₃에서 0.5)로 정제하였다 (1.75 g, 95%).

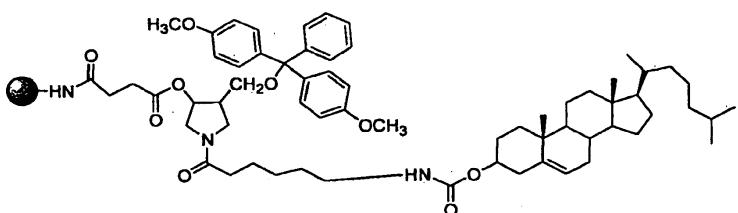
숙신산 모노-(4-[비스-(4-메톡시-페닐)-페닐-메톡시메틸]-1-{6-[17-(1,5-디메틸-헥실)-10,13-디메틸 2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H 시클로펜타[a]페난트렌-3-일옥시카르보닐아미노]-헥사노일}-페롤리딘-3-일) 에스테르 AH



AH

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°C에서 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, 건고 농축하였다. 잔류물을 그대로 다음 단계에서 사용하였다.

콜레스테롤 유도체화 CPG AI



AI

숙시네이트 AH (0.254 g, 0.242 mmol)를 디클로로메탄/아세토니트릴의 혼합물 (3:2, 3 mL)에 용해시켰다. 이러한 용액에, 아세토니트릴 (1.25 mL) 내의 DMAP (0.0296 g, 0.242 mmol), 아세토니트릴/디클로로에탄 (3:1,

1.25 mL) 내의 2,2'-디티오-비스(5-니트로파리딘) (0.075 g, 0.242 mmol)을 연속적으로 첨가하였다. 생성된 용액에 아세토니트릴 (0.6 mL) 내의 트리페닐포스핀 (0.064 g, 0.242 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물의 색이 밝은 주황색으로 변하였다. 용액을 손목-동작 쉐이커로 간략하게 진탕시켰다 (5분). 장쇄 알킬 아민-CPG (LCAA-CPG) (1.5 g, 61 mM)을 첨가하였다. 혼탁액을 2시간 동안 진탕시켰다. CPG를 소결 깔때기를 통해 여과하고, 아세토니트릴, 디클로로메탄 및 에테르로 연속적으로 세정하였다. 미반응 아미노 기를 아세트산 무수물/파리딘으로 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.

dsRNA 발현 벡터

<208> 본 발명의 또 다른 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 세포 내로 혼입되어 세포 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-형 질감염될 수 있다. 별별적으로, dsRNA의 각각의 개별적인 가닥들이 동일한 발현 플라스미드 상에 위치하는 프로모터들에 의해 전사될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, dsRNA가 줄기 & 뿐만 아니라 세포를 갖도록 링커 폴리뉴클레오티드 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 또 다른 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. Nad. 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 세포 내로 형질도입하여 세포 내로 삽입된 유전자를 발현시킬 수 있는 재조합 레트로바이러스 벡터를 재조합 레트로바이러스 세포를 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 유사 분열적으로 활성인 세포를 감염에 필요로 하지 않는다는 장점이 또한 있다.

<211> 본 발명의 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터 내의 dsRNA 발현을 구동하는 프로모터는 전핵생물 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 췌장으로 트랜스진 발현을 지시할 수 있다 (예를

들어, 췌장에 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, 에스트로겐, 프로게스테론, 테트라사이클린, 화학적인 이량체화 유도체, 및 이소프로필-베타-D1-티오갈락토파라노시드 (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 백터가 하기 기술된 바와 같이 전달되어, 표적 세포 내에서 지속된다. 별법적으로, dsRNA 분자의 일시적인 발현을 제공하는 바이러스 백터를 사용할 수 있다. 이같은 백터는 필요에 따라 반복적으로 투여될 수 있다. 일단 발현되면, dsRNA가 표적 RNA에 결합하여, 이의 기능 또는 발현을 조정한다. dsRNA 발현 백터의 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 백터의 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 백터 내로 삽입하여 인간 환자에 대한 유전자 요법 백터로 사용할 수 있다. 유전자 요법 백터는, 예를 들어, 정맥내 주사, 국소 투여 (미국 특히 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 백터의 제약 제제는 적절한 희석제 내의 유전자 요법 백터를 포함할 수 있거나, 또는 유전자 전달 비히클이 매입된 저속 방출 매트릭스를 포함할 수 있다. 별법적으로, 완전한 유전자 전달 백터가 재조합 세포로부터 무손상으로 생산될 수 있는 경우 (예를 들어, 레트로바이러스 백터), 제약 제제는 유전자 전달 시스템을 생산하는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.

HCT-116 세포에서의 E6AP siRNA 스크리닝

<217> HCT-116 세포를 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) (Braunschweig, Germany, 카탈로그 # ACC 581)로부터 수득하여, 10% 소 태아 혈청 (FCS), 폐니실린 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

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

<222>

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>

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 뉴클레오티드 변형을 학유하는 통일한 서열이 이어진다.

开3

대문자: 변형되지 않은 리보뉴클레오티드

내문자: 번역되지 않은 터보큐클레오티드
(단, T는 변형되지 않은 테온시리보뉴클레오티드)

소문자: 리보스 모이언티 산에 2'-O-메틸 치환체를 보유하는 리보뉴클레오티드

소문자: 티로스 로이터 장애 2-0-배럴 시환체를 보유하는 티
s: 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 결합의 위치를 가리킨다.

chol : 3' 리보뉴클레오티드에 접합된 콜레스테롤 모이어티

'듀플렉스 명칭'은 지시된 셰스 가닥 및 지시된 아티셰스 가닥의 특이적 혼성화에 의해

형성된 조성물의 명칭을 의미한다.

센스 가닥	안티센스 가닥			
서열 번호	서열 (5'-3')	서열 번호	서열 번호	
서열 (5'-3')	서열 (5'-3')	서열 (5'-3')	서열 (5'-3')	
AUACGAUGAACUACAAAATT	469	UUUUGUAGAUUCAU CGUAU TT	644	AL-DP-7545
AUACGAUGAACUACAAAATsT	470	UUUUGUAGAUUCAU CGUAU T sT	645	ND-8763
AuAcGAuGAAcuAcAAAATsT	471	UUUUGuAGAUUCAU CGuAU T sT	646	ND-8782
AuAcGAuGAAcuAcAAAATsT	472	UUUUGuAGAUUCAU CGuAU T sT	647	ND-8801

220

AUACGAUGAAUCUACAAAATTChol	473	UUUUGUAGAUUCAUCGUAUTsT	648	ND-8820
AuAcGAuGAAcucuAcAAAATTchol	474	UUUUGuAGAUUcAUCGuAUTsT	649	ND-8845
AuAcGAuGAAcucuAcAAAATTchol	475	uuuuGuAGAUcAUCGuAUTsT	650	ND-8870
UGACUACAUUCUCAAAUAAAATT	476	UUUAUUGAGAAUGUAGUCATT	651	AL-DP-7558
UGACUACAUUCUCAAAUAAAATTsT	477	UUUAUUGAGAAUGUAGUCATsT	652	ND-8764
uGAcuAcAaucucAAuAAATsT	478	UUuAUUGAGAAUGuAGUCATsT	653	ND-8783
uGAcuAcAaucucAAuAAATsT	479	uuuAuuGAGAAuGuAGUCATsT	654	ND-8802
UGACUACAUUCUCAAAUAAAATTChol	480	UUUAUUGAGAAUGUAGUCATsT	655	ND-8821
uGAcuAcAaucucAAuAAATTchol	481	UUuAUUGAGAAUGuAGUCATsT	656	ND-8846
uGAcuAcAaucucAAuAAATTchol	482	uuuAuuGAGAAuGuAGUCATsT	657	ND-8871
AGCCUGCACGAAUGAGUUUUTT	483	AAACUCAUUCGUGCGAGGCTT	658	AL-DP-7548
AGCCUGCACGAAUGAGUUUUTsT	484	AAACUCAUUCGUGCGAGGCTsT	659	ND-8765
AGccuGcAcGAAuGAGuuuTsT	485	AAACUcAUUCGUGcAGGCUTsT	660	ND-8784
AGccuGcAcGAAuGAGuuuTsT	486	AAACUcAuUCGuGcAGGCUTsT	661	ND-8803
AGCCUGCACGAAUGAGUUUUTTChol	487	AAACUCAUUCGUGCGAGGCTsT	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
GGAUuGucGAAAACcAcuuTsT	492	AAGUGGUUUUCGAcAAUCCTsT	667	ND-8785
GGAUuGucGAAAACcAcuuTsT	493	AAGuGGuUuUCGAcAAUCCTsT	668	ND-8804
GGAUUGUCGAAAACCACUUTTChol	494	AAGUGGUUUUCGACAAUCCTsT	669	ND-8823
GGAUuGucGAAAACcAcuuTTchol	495	AAGUGGUUUUCGAcAAUCCTsT	670	ND-8848
GGAUuGucGAAAACcAcuuTTchol	496	AAGuGGuUuUCGAcAAUCCTsT	671	ND-8873
CUCUCGAGAUCCUAAUUAUTT	497	AUAAAUAAGGAUCUCGAGAGTT	672	AL-DP-7492
CUCUCGAGAUCCUAAUUAUTsT	498	AUAAAUAAGGAUCUCGAGAGTsT	673	ND-8767
cucucGAGAuccuAAuuAuTsT	499	AuAAuUAGGAUCUCGAGAGTsT	674	ND-8786
cucucGAGAuccuAAuuAuTsT	500	AuAAuUAGGAUCUCGAGAGTsT	675	ND-8805
CUCUCGAGAUCCUAAUUAUTTChol	501	AUAAAUAAGGAUCUCGAGAGTsT	676	ND-8824
cucucGAGAuccuAAuuAuTTchol	502	AuAAuUAGGAUCUCGAGAGTsT	677	ND-8849
cucucGAGAuccuAAuuAuTTchol	503	AuAAuUAGGAUCUCGAGAGTsT	678	ND-8874
AUGUGACUUACUUAACAGATT	504	UCUGUUUAAGUAAGUCACAUTT	679	AL-DP-7554
AUGUGACUUACUUAACAGATsT	505	UCUGUUUAAGUAAGUCACAUTsT	680	ND-8768
AuGuGAcuuAcuuAAcAGATsT	506	UCUGUuAAGuAAGUcAcAUTsT	681	ND-8787
AuGuGAcuuAcuuAAcAGATsT	507	UCuGuuAGuAAGUcAcAUTsT	682	ND-8806
AUGUGACUUACUUAACAGATTChol	508	UCUGUUUAAGUAAGUCACAUTsT	683	ND-8825
AuGuGAcuuAcuuAAcAGATTchol	509	UCUGUuAAGuAAGUcAcAUTsT	684	ND-8850
AuGuGAcuuAcuuAAcAGATTchol	510	UCuGuuAGuAAGUcAcAUTsT	685	ND-8875
GUUAUCUCUCGAGAGAUCCUATT	511	UAGGAUCUCGAGAGUUAUACTT	686	AL-DP-7557

GUUAUCUCUGAGAGAUCCUATsT	512	UAGGAUCUCUGAGAGAUUAUACTsT	687	ND-8769
GuAuAcucucGAGAGuccuATsT	513	uAGGAUCUCUGAGAGuAuACTsT	688	ND-8788
GuAuAcucucGAGAGuccuATsT	514	uAGGAUCUCUGAGAGuAuACTsT	689	ND-8788
GUUAUCUCUGAGAGAUCCUATTChol	515	UAGGAUCUCUGAGAGAUUAUACTsT	690	ND-8826
GuAuAcucucGAGAGuccuATTchol	516	uAGGAUCUCUGAGAGuAuACTsT	691	ND-8851
GuAuAcucucGAGAGuccuATTchol	517	uAGGAUCUCUGAGAGuAuACTsT	692	ND-8851
AGGUUACCUACACUCAUATT	518	UAUGAGAUAGUAGGUACCUTT	693	AL-DP-7476
AGGUUACCUACACUCAUATTsT	519	UAUGAGAUAGUAGGUACCUTsT	694	ND-8770
AGGGuAccuAcAcucuAuATsT	520	uAUGAGAUAGuAGGuAACUTsT	695	ND-8789
AGGGuAccuAcAcucuAuATsT	521	uAuGAGAUGuAGGuAACUTsT	696	ND-8808
AGGUUACCUACACUCAUATTChol	522	UAUGAGAUAGUAGGUACCUTsT	697	ND-8827
AGGGuAccuAcAcucuAuATTchol	523	uAUGAGAUAGuAGGuAACUTsT	698	ND-8852
AGGGuAccuAcAcucuAuATTchol	524	uAuGAGAUGuAGGuAACUTsT	699	ND-8877
AGUACUUUUUCAGACCCAGATT	525	UCUGGUCUGAAUAAUAGUACUTT	700	AL-DP-7514
AGUACUUUUUCAGACCCAGATsT	526	UCUGGUCUGAAUAAUAGUACUTsT	701	ND-8771
AGuAcuAuucAGAccAGATsT	527	UCUGGUCUGAAuAAAGuACUTsT	702	ND-8790
AGuAcuAuucAGAccAGATsT	528	UCuGGUCuGAAuAAAGuACUTsT	703	ND-8809
AGUACUUUUUCAGACCCAGATTChol	529	UCUGGUCUGAAUAAUAGUACUTsT	704	ND-8828
AGuAcuAuucAGAccAGATTchol	530	UCUGGUCUGAAuAAAGuACUTsT	705	ND-8853
AGuAcuAuucAGAccAGATTchol	531	UCuGGUCuGAAuAAAGuACUTsT	706	ND-8878
AUCCUAAUUAUCUGAAUUTT	532	AAAUCAGAUAAAAGGAUTT	707	AL-DP-7540
AUCCUAAUUAUCUGAAUUTsT	533	AAAUCAGAUAAAAGGAUTsT	708	ND-8772
AuccuAAuuAucuGAAuuuTsT	534	AAAUCAGAUAAuAGGAUTsT	709	ND-8791
AuccuAAuuAucuGAAuuuTsT	535	AAAuUcAGAUAAuUAGGAUTsT	710	ND-8810
AUCCUAAUUAUCUGAAUUTTChol	536	AAAUCAGAUAAAAGGAUTsT	711	ND-8829
AuccuAAuuAucuGAAuuuTTchol	537	AAAUCAGAUAAuUAGGAUTsT	712	ND-8854
AuccuAAuuAucuGAAuuuTTchol	538	AAAuUcAGAUAAuUAGGAUTsT	713	ND-8879
AAGGAUAGGUGAUAGCUCATT	539	UGAGCUAUACCCUAUCCUUTT	714	AL-DP-7397
AAGGAUAGGUGAUAGCUCATsT	540	UGAGCUAUACCCUAUCCUUTsT	715	ND-8731
AAGGAuAGGuGAuAGcucATsT	541	UGAGCUAUcACCuAUCCUUTsT	716	ND-8743
AAGGAuAGGuGAuAGcucATsT	542	uGAGCUAUcACCuAUCCUuTsT	717	ND-8754
AAGGAUAGGUGAUAGCUCATTChol	543	UGAGCUAUACCCUAUCCUUTsT	718	ND-8839
AAGGAuAGGuGAuAGcucATTchol	544	UGAGCUAUcACCuAUCCUUTsT	719	ND-8864
AAGGAuAGGuGAuAGcucATTchol	545	uGAGCUAUcACCuAUCCUuTsT	720	ND-8889
GGAAGCCGGAAUCUAGAUUTT	546	AAUCUAGAUUCCGGCUUCCTT	721	AL-DP-7526
GGAAGCCGGAAUCUAGAUUTsT	547	AAUCUAGAUUCCGGCUUCCTsT	722	ND-8773
GGAAGccGGAAucuAGAuuTsT	548	AAUCuAGAUUCCGGCUUCCTsT	723	ND-8792
GGAAGccGGAAucuAGAuuTsT	549	AAUCuAGAUUCCGGCUUCCTsT	724	ND-8811
GGAAGCCGGAAUCUAGAUUTTChol	550	AAUCUAGAUUCCGGCUUCCTsT	725	ND-8830

GGAGGccGGAAucuAGAuuTTchol	551	AAUCuAGAUUCCGGCUUCCTsT	726	ND-8855
GGAGGccGGAAucuAGAuuTTchol	552	AAUCuAGAuuUCGGGCUUCCTsT	727	ND-8880
UGCUUCGAAGUGCUUGAAATT	553	UUUCAAGCACUUUCGAAGCATT	728	AL-DP-7473
UGCUUCGAAGUGCUUGAAATTsT	554	UUUCAAGCACUUUCGAAGCATsT	729	ND-8774
uGcuucGAAGuGcuuGAAATsT	555	UUUcAAGcACUUUCGAAGcATsT	730	ND-8793
uGcuucGAAGuGcuuGAAATsT	556	uuUcAAGcACuUCGAAGcATsT	731	ND-8812
UGCUUCGAAGUGCUUGAAATTchol	557	UUUCAAGCACUUUCGAAGCATsT	732	ND-8831
uGcuucGAAGuGcuuGAAATTchol	558	UUUcAAGcACUUUCGAAGcATsT	733	ND-8856
uGcuucGAAGuGcuuGAAATTchol	559	uuUcAAGcACuUCGAAGcATsT	734	ND-8881
UGGAUUGUCGAAACCACUTT	560	AGUGGUUUUCGACAAUCCATT	735	AL-DP-7478
UGGAUUGUCGAAACCACUTTsT	561	AGUGGUUUUCGACAAUCCATTsT	736	ND-8775
uGGAuuGucGAAAaccAcuTst	562	AGUGGUUUUCGAcAAUCCatst	737	ND-8794
uGGAuuGucGAAAaccAcuTst	563	AGuGGuuuUCGAcAAUCCatst	738	ND-8813
UGGAUUGUCGAAACCACUTTchol	564	AGUGGUUUUCGACAAUCCATT	739	ND-8832
uGGAuuGucGAAAaccAcuTTchol	565	AGUGGUUUUCGAcAAUCCatst	740	ND-8857
uGGAuuGucGAAAaccAcuTTchol	566	AGuGGuuuUCGAcAAUCCatst	741	ND-8882
CGGCUAGAGAUGAUCGCUATT	567	UAGCGAUCAUCUCAUAGCCGTT	742	AL-DP-7553
CGGCUAGAGAUGAUCGCUATTchol	568	UAGCGAUCAUCUCAUAGCCGTT	743	ND-8776
cGGcuAGAGAuGAucGcuATsT	569	uAGCGAUcAUCUCuAGCCGTsT	744	ND-8795
cGGcuAGAGAuGAucGcuATsT	570	uAGCGAUcAUCUCuAGCCGTsT	745	ND-8795
CGGCUAGAGAUGAUCGCUATTchol	571	UAGCGAUCAUCUCAUAGCCGTT	746	ND-8833
cGGcuAGAGAuGAucGcuATTchol	572	uAGCGAUcAUCUCuAGCCGTsT	747	ND-8858
cGGcuAGAGAuGAucGcuATTchol	573	uAGCGAUcAUCUCuAGCCGTsT	748	ND-8858
ACAGUCGAAACUAGUGAATT	574	UUCACUAGAUUUUCGACUGUTT	749	AL-DP-7395
ACAGUCGAAACUAGUGAATTsT	575	UUCACUAGAUUUUCGACUGUTsT	750	ND-8730
AcAGucGAAAucuAGuGAATsT	576	UucACuAGAUUUUCGACUGUTsT	751	ND-8742
AcAGucGAAAucuAGuGAATsT	577	uucACuAGAUuUCGAcuGUTsT	752	ND-8753
ACAGUCGAAACUAGUGAATTchol	578	UUCACUAGAUUUUCGACUGUTsT	753	ND-8840
AcAGucGAAAucuAGuGAATTchol	579	UucACuAGAUUUUCGACUGUTsT	754	ND-8865
AcAGucGAAAucuAGuGAATTchol	580	uucACuAGAUuUCGAcuGUTsT	755	ND-8890
CUCGAGAUCCUAAUUAUCUTT	581	AGAUAAAUAAGGAUCUCGAGTT	756	AL-DP-7499
CUCGAGAUCCUAAUUAUCUTsT	582	AGAUAAAUAAGGAUCUCGACTsT	757	ND-8777
cucGAGAuccuAAuuAucuTst	583	AGAuAAAUAAGGAUCUCGAGT	758	ND-8796
cucGAGAuccuAAuuAucuTst	584	AGAuAAAUAAGGAUCUCGAGT	759	ND-8815
CUCGAGAUCCUAAUUAUCUTTchol	585	AGAUAAAUAAGGAUCUCGACT	760	ND-8834
cucGAGAuccuAAuuAucuTTchol	586	AGAuAAAUAAGGAUCUCGAGT	761	ND-8859
cucGAGAuccuAAuuAucuTTchol	587	AGAuAAAUAAGGAUCUCGAGT	762	ND-8884
CACCUAACGUGGAAUGUGATT	588	UCACAUUCCACGUUAGGUGTT	763	AL-DP-7365
CACCUAACGUGGAAUGUGATsT	589	UCACAUUCCACGUUAGGUGT	764	ND-8724

cAccuAAcGuGGAuGuGATsT	590	UcAcAUUCcACGUuAGGUGTsT	765	ND-8736
cAccuAAcGuGGAuGuGATsT	591	UcAcAuuCcACGuuAGGuGTsT	766	ND-8748
CAACUAACGUGGAUUGUGATTChol	592	UCACAUUCcACGUuAGGUGTsT	767	ND-8841
cAccuAAcGuGGAuGuGATTChol	593	UcAcAUUCcACGUuAGGUGTsT	768	ND-8866
cAccuAAcGuGGAuGuGATTChol	594	UcAcAuuCcACGuuAGGuGTsT	769	ND-8891
AAUCGUCAUUCAUUACATT	595	UGUAAAUGAAUGAACGAUUTT	770	AL-DP-7390
AAUCGUCAUUCAUUACATsT	596	UGUAAAUGAAUGAACGAUUTsT	771	ND-8727
AAuucGuucAuuAcATsT	597	UGuAAAUGAAUGAACGAUUTsT	772	ND-8739
AAuucGuucAuuAcATsT	598	uGuAAAuGAAuGAACGAuuTsT	773	ND-8750
AAUCGUCAUUCAUUACATTChol	599	UGUAAAUGAAUGAACGAUUTsT	774	ND-8842
AAuucGuucAuuAcATTChol	600	UGuAAAUGAAUGAACGAUUTsT	775	ND-8867
AAuucGuucAuuAcATTChol	601	uGuAAAuGAAuGAACGAuuTsT	776	ND-8892
AAACUUUCGUGACUUGGGATT	602	UCCCAAGUCACGAAAAGUUTT	777	AL-DP-7382
AAACUUUCGUGACUUGGGATsT	603	UCCCAAGUCACGAAAAGUUTsT	778	ND-8726
AAcuuuucGuGAcuuGGGATsT	604	UCCcAAGUcACGAAAAGUUTsT	779	ND-8738
AAcuuuucGuGAcuuGGGATsT	605	UCCcAAGUcACGAAAAGuutTsT	780	ND-8749
AAACUUUCGUGACUUGGGATTChol	606	UCCCAAGUCACGAAAAGUUTsT	781	ND-8843
AAcuuuucGuGAcuuGGGATTChol	607	UCCcAAGUcACGAAAAGUUTsT	782	ND-8868
AAcuuuucGuGAcuuGGGATTChol	608	UCCcAAGUcACGAAAAGuuTsT	783	ND-8893
AACAGUCGAAACUUAUGUGATT	609	UCACUAGAUUCGACUGUUTT	784	AL-DP-7393
AACAGUCGAAACUUAUGUGATsT	610	UCACUAGAUUCGACUGUUTsT	785	ND-8729
AAcAGucGAAAcuAGuGATsT	611	UcACuAGAUUCGACUGUUTsT	786	ND-8741
AAcAGucGAAAcuAGuGATsT	612	UcACuAGAUUCGACuGuuTsT	787	ND-8752
AACAGUCGAAACUUAUGUGATTChol	613	UCACUAGAUUCGACUGUUTsT	788	ND-8844
AAcAGucGAAAcuAGuGATTChol	614	UcACuAGAUUCGACUGUUTsT	789	ND-8869
AAcAGucGAAAcuAGuGATTChol	615	UcACuAGAUUCGACuGuuTsT	790	ND-8894
ACGAAUGAGUUUUGUGCUUTT	616	AAGCACAAAACUCAUUCGUTT	791	AL-DP-7366
ACGAAUGAGUUUUGUGCUUTsT	617	AAGCACAAAACUCAUUCGUTsT	792	ND-8778
AcGAAuGAGuuuuGuGcuuTsT	618	AAGcAcAAAACuCAUUCGUTsT	793	ND-8797
AcGAAuGAGuuuuGuGcuuTsT	619	AAGcAcAAAACuCAuUCGUTsT	794	ND-8816
ACGAAUGAGUUUUGUGCUUTTChol	620	AAGCACAAAACUCAUUCGUTsT	795	ND-8835
AcGAAuGAGuuuuGuGcuuTTChol	621	AAGcAcAAAACuCAUUCGUTsT	796	ND-8860
AcGAAuGAGuuuuGuGcuuTTChol	622	AAGcAcAAAACuCAuUCGUTsT	797	ND-8885
AAUUCGCAUGUACAGUGAATT	623	UUCACUGUACAUGCGAAUUTT	798	AL-DP-7371
AAUUCGCAUGUACAGUGAATsT	624	UUCACUGUACAUGCGAAUUTsT	799	ND-8779
AAuucGcAuGuAcAGuGAATsT	625	UuAcACUGuAcAUGCGAAUUTsT	800	ND-8798
AAuucGcAuGuAcAGuGAATsT	626	uUcACuGuAcAuGCGAAUUTsT	801	ND-8817
AAUUCGCAUGUACAGUGAATTChol	627	UUCACUGUACAUGCGAAUUTsT	802	ND-8836
AAuucGcAuGuAcAGuGAATTChol	628	UuAcACUGuAcAUGCGAAUUTsT	803	ND-8861

AAuucGcAuGuAcAGuGAATTChol	629	uUcACuGuAcAuGCGAAuUTsT	804	ND-8886
AAUAGAAUUCGCAUGUACATT	630	UGUACAUGCGAAUUCUAAUUTT	805	AL-DP-7372
AAUAGAAUUCGCAUGUACATsT	631	UGUACAUGCGAAUUCUAAUUTsT	806	ND-8780
AAuAGAAuucGcAuGuAcATsT	632	UGuAcAUGCGAAUUCuAAUUTsT	807	ND-8799
AAuAGAAuucGcAuGuAcATsT	633	uGuAcAuGCGAAuUCuAAUUTsT	808	ND-8818
AAUAGAAUUCGCAUGUACATTChol	634	UGUACAUGCGAAUUCUAAUUTsT	809	ND-8837
AAuAGAAuucGcAuGuAcATTChol	635	UGuAcAUGCGAAUUCuAAUUTsT	810	ND-8862
AAuAGAAuucGcAuGuAcATTChol	636	uGuAcAuGCGAAuUCuAAUUTsT	811	ND-8887
UGGUAAACCAAUGAUGUAUTT	637	AUACAUCAUUGGGUUACCAT	812	AL-DP-7370
UGGUAAACCAAUGAUGUAUTsT	638	AUACAUCAUUGGGUUACCATsT	813	ND-8781
uGGuAAcccAAuGAuGuAuTsT	639	AuAcAUcAUUGGGuUACCATsT	814	ND-8800
uGGuAAcccAAuGAuGuAuTsT	640	AuAcAUcAuUGGGuUACCATsT	815	ND-8819
UGGUAAACCAAUGAUGUAUTTChol	641	AUACAUCAUUGGGUUACCATsT	816	ND-8838
uGGuAAcccAAuGAuGuAuTTChol	642	AuAcAUcAUUGGGuUACCATsT	817	ND-8863
uGGuAAcccAAuGAuGuAuTTChol	643	AuAcAUcAuUGGGuUACCATsT	818	ND-8888
cucGAGAuccuAAuuAucuTsT	1748	AGAuAAuuAGGAUCUCGAGTst	1749	ND-9300

표 4에 표 3에 열거된 dsRNA의 테스트 결과가 기재된다.

<233>

<234>

<235>

표 4

듀플렉스 명칭	30nM		100pM	
	처리 후에 잔존하는 평균 활성	표준 편차	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

<236>

<237>

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

<240> HPV E1 유전자 발현을 표적으로 하는 siRNA의 디자인

<241> 표 5에 본 발명의 dsRNA 조성물이 기재된다.

표 5

HPV E1 기준 서열로부터의 mRNA의 표적 서열 (총 19량체의 표적 부위 + 양쪽 끝단의 AA)	서 열 (표적 서열) 번호 (5'-3')	이중 TT 오버 헤이 있는 세스 가단 (단위 서열) 번호 (5'-3')	서 열 있는 인티 세스 가단 (단위 서열) 번호 (5'-3')	이중 TT 오버 헤이 있는 인티 세스 가단 (단위 서열) 번호 (5'-3')	서 열 번호 즉 플렉스 영점
AAAAAUCAACGUGUGUGGGAUAA	819	AAAUACACGUGUGGGCAUUT	945	AUUCGCACACGGUGGAUUTT	1141 ND-9061
AAGAGCCUCCAAUAUUGCGUAAA	820	GAGCCUCCAAUAUUGCGUATT	946	UACGCACAUUUGGGCUUTT	1142 ND-9062
AAUCAACCGUGUUSCGAUGGGUA	821	UCAACCGUGUUGCGAUGGGUTT	947	ACCAUAGCGAACCGUGUAGTT	1143 ND-9063
AAUCAAAUAUUGCGUAGUGCAA	822	UCCAAAUAUUGCGUAGACATT	948	UGUACUACGGCAAUUUGGATT	1144 ND-9064
AAAUCACAGGUGUGCGAUAGAA	823	AAUCACAGGUGUGCGAUAGTT	949	CHAUCGCAACAGGUGUAGTT	1145 ND-9065
AACCUCCAAAUAUUGCGUAGAAA	824	CCUCAAAUAUUGCGAUAGATT	950	UACUACCAAUUUGGGAGTT	1146 ND-9066
AAAGAGCCUCAAAUAUUGCGUAA	825	AGAGCCUCAAAUAUUGCGUTT	951	ACGCAACAUUUGGGAGGCTTT	1147 ND-9067
AACACACGUGUGGGCAUUGGAA	826	CAACCGUGUGGGCAUUGGTT	952	CACCAACCGCAACAGGUGTT	1148 ND-9068
AAAUAGAGCUGAATGGGAGAAA	827	AUAGAUGUGAUAGGGAGATT	953	UCUACCCUACACAUCAUUTT	1149 ND-9069
AAAGGAAGGGGUACGGGAUGAA	828	GGGAAGAGGGGUACGGGAUGTT	954	CAUCCGGUACCCGUUCUCCCTT	1150 ND-9070
AAAGAUUAGGUUUCGACGAGGA	829	AGAUUAGGUUUCGACGAGGT	955	CCUCGUCAACUUAACUTT	1151 ND-9071
AAGGUUAUCAAGGUGUAGAGUAA	830	GGUUAUCAAGGUGUAGAGUTT	956	AACUCUACACCUUAGAUACCTT	1152 ND-9072

내문자: 변형되지 않은 리보뉴클레오타드 (단, T는 변형되지 않은 매옥시리보뉴클레오타드)
소문자: 리보스 모이어티 쟁에 2'-O-메틸 카복체를 보유하는 리보뉴클레오타드
S: 포스포로티오에이트 (뉴클레오시드간 결합의 위치를 가리킨다)
chol: 3' 리보뉴클레오타드에 접합된 글래스테를 모이어티.
'즉 플렉스' 명칭은 지지점 세스 가단 및 지지점 안티 세스 가단의 특이적 혼성화에 의해 형성된
조성물의 경계를 의미한다.

AACCUUAGUGAUUAUACUGGAAA	831	ACUUAGUGAUUAUACUGGATT	957	UCCACUAAUACACUUAAGUTT	1153	ND-9073
AACACCAUGUAGUCAGUAAA	832	GAGAUUAGUAAGCGAATT	958	UCGCUUUCAAAUACUUCTT	1154	ND-9074
AAAGCCCUCCAAAUCGGUAGAA	833	AACCAUGUAGUCAGUATT	959	AUACUGACUACAUUGGUUTT	1155	ND-9075
AAAGCCCUCCAAAUCGGUAGAA	834	AGCCUCCAAAUCGGUAGTT	960	CUACGCAAUUUGGGCUTT	1156	ND-9076
AAGCCUCCAAAUCGGUAGAA	835	GCCUCCAAAUCGGUAGTT	961	ACUACGCAAUUUGGGCCTT	1157	ND-9077
AAGUGCAAUUGGCCUACGAUAAA	836	GUGUAUGGAGACACGCCAGT	962	CUGGCUGUCUCCAUACTT	1158	ND-9078
AAGUGCAAUUGGCCUACGAUAAA	837	GUACAUGGCCUACGAUATT	963	UAVCGUAGGCCAUUGUATT	1159	ND-9079
AAUACAUGGGCCUACGAUAAA	838	UACAUAGGCCUACGAUATT	964	UUAUCGUAGGCCAUUGUATT	1160	ND-9080
AUAGACAUAGUGAGACGAUAGUA	839	UGACAUAGUGAGCAUAGUTT	965	ACUAUCGUACUACUAGUCATT	1161	ND-9081
AAGACAUAGUGAGACGAUAGUA	840	GACAUAGUGAGCAUAGUTT	966	CACUAUCGUACUACUAGCTT	1162	ND-9082
AAACCUUAGCCACGUUAAA	841	ACCUUAGCCACGUUATT	967	UUAACGUUGGCAAAAGAGUTT	1163	ND-9083
AAUUAAGACAUAGUAGACGAAA	842	AUAUAGACAUAGUAGACGATT	968	UGCUUCUACUAGCUAUATT	1164	ND-9084
AAAGUAUUDGGGUAGGUACCAA	843	AAGUAUUDGGGUAGGUACTT	969	UGGGACUACCCAAUACUUTT	1165	ND-9085
AAACGUGUGCGAUUCGGUAAA	844	ACGGUGUGCGAUUCGGUATT	970	UACACCAUUCGCAACACGUTT	1166	ND-9086
AACGAAAGAUUUGGUAGUCAA	845	CGAAAGAUUUGGUAGUCTT	971	GACUACCCAAAUCACUUCGT	1167	ND-9087
AACUCCAAAUCGGGUAGUCAA	846	CUCAAAAUCGGGUAGUACTT	972	GUACUACGGAAUUUGGAGT	1168	ND-9088
AAUGGUACAUAGGGCCUACGAAA	847	UGGUACAUAGGGCCUACGATT	973	UGGUAGGGCCAUAGGUACATT	1169	ND-9089
AAUAAUGACAUAGUGAGACGAAA	848	UAUAGACAUAGUAGACGAUTT	974	AUCGUACUACUAGCUAUATT	1170	ND-9090
AAACAUAGUAGACAUAGUAAA	849	ACAUAGAGACGAUAGUGATT	975	UCAUACUACGUACUAGUTT	1171	ND-9091
AAGUGUAGACAUAAACGAAA	850	GUGUGAGCAUAAACGATT	976	UGGUUUAUAGUCUACTT	1172	ND-9092
AAUAGACAUAAACGAAA	851	UGACAUAAACGAGCATT	977	UGCUUGUUAUAAUGCUATT	1173	ND-9093
AAUUGCAGAUUGGUAGUCUAA	852	UUGCGAUUGGUAGUUGCUTT	978	ACCAUACACCAUACGGCAATT	1174	ND-9094
AAUUGCAGACACAUAGUAAA	853	UGGCAGACACAUAGUATT	979	UACAUAPAGUGUCUGCCATT	1175	ND-9095
AAUUCAGAUUAGUAGACCAA	854	UUCAGAUUAGUAGACCATT	980	UGGUUCUACUACUAGUATT	1176	ND-9096
AGGGAGAUUAGUAGACCAA	855	GGAGAUUAGUAGACGATT	981	UGGUUCUACUACUAGCCTT	1177	ND-9097
AAACAUAGUAGUAGUAGAAA	856	ACCAUAGUAGUAGUAGUTT	982	ACAUACUACUACUAGGUTT	1178	ND-9098
AAGAGAGGGGUACGGCAUGUAAA	857	GAAGAGGUACGGCAUGUATT	983	UACAUACUACUACUAGUATT	1179	ND-9099
AAUAAAUCAACGUGUGCGAAA	858	AUAAUCAACGUGUGCGATT	984	UGGCACACGUUGAUUATT	1180	ND-9100

AACGGUGUUGCGGAUUGGGUGUAUA	859	CGUGUUGCGGAUUGGGUGUAUTT	985	AUACACCAAUCCGACACCGTT	1181	ND-9101
AAUGCAUAAUACAUAAUGGUGAA	860	UGGGCCUACGCAAAUGACATT	986	UGUCAUAAUCCGAGGCCATT	1182	ND-9102
AACCAUAAUAGGUUGGACCGAA	861	UGCAUAAUACAUAAUGGCTT	987	CACCAUAAUAGGAUAUGCAATT	1183	ND-9103
AAAGAUAAUUGGAAAGGGAAGAA	862	CCAGAUAAUAGGUUGGACCGATT	988	UCGUGCAACAUAAUCUGGTT	1184	ND-9104
AAGGUACAGGUAGAAGGGCCAA	863	AGAUAAUUGGAAAGGGAAGT	989	CUUCGGUUCUACAUAAUCUTT	1185	ND-9105
AAGCCAAAUUABGUAGGUAGAA	864	GUACAGGUAGAAGGGCCTT	990	GCGCCCUUCUACCGUGAACTT	1186	ND-9106
AAGCAUAGACCAGGUACAAA	865	GCAAAUAGGAUGGUACATT	991	CUAACAUACCAUUVUGGCTT	1187	ND-9107
AAAUAUUGCGGUACACAGCAGAA	866	GCAAGACCAUUGGUACATT	992	UGUCAUCAAGGUCAUGGTT	1188	ND-9108
AAAUAUUGGUAGGUACACAGCAGAA	867	AAUUGGUAGGUACACAGTT	993	CUGCGUACUACGGCAAUUTT	1189	ND-9109
AAAUGAUUUGGUAGGUACACUAA	868	AGUAUUUGGUAGGUACUTT	994	AGUGGACUACCCAAUACUTT	1190	ND-9110
AAAGACAUAGGUAGGUAGGUAGAA	869	AUGACAUAGGUAGGUAGTT	995	CUAUGGUACUACGUAGCAUTT	1191	ND-9111
AAGGUAGGUACACUAGGUAGAA	870	GGUGGUCCACUAGGUAGUTT	996	UAUCACAUAGGGACUACCTT	1192	ND-9112
AAAGCAUAGACCAUUGGUACAAA	871	AGCAUAGACCAUUGGUACATT	997	UGUACCAAUUGGUCAUGCUTT	1193	ND-9113
AAUUCAGAAUAGGUAGACCAA	872	UUUCAGAAUAGGUAGACCTT	998	GUUCUACUAAUCUGAAUTT	1194	ND-9114
AAUGCGAUUUGGUCAUUGGUCA	873	UGCGAUUUGGUCAUUGGUCAUTT	999	CAGCAUACACCCAAUCGCATT	1195	ND-9115
AACCAAAAUUGGUAGGUAGGAGAA	874	CCAAUAUUGGGAGGUACAGTT	1000	CUGUACUACGGCAAUUUGGTT	1196	ND-9116
AGAGCAGCACAUUGGUUUUAA	875	GACAGCACAUUGGUUUUUTT	1001	AAACACGCAUUGGUUGUUTT	1197	ND-9117
AAUGGUACAGGUAGAGGGGAA	876	UGUACAGGUAGAGGGCGT	1002	CCCCCUUACUCCGUAAACATT	1198	ND-9118
AAAGACAUAAUUAUAGGUCCUTT	877	AGACAUAAUUAUAGGUCCUTT	1003	AGGACAUAAUUAUAGGUCCUTT	1199	ND-9119
AAAGAUAAUUAUACACAGCAA	878	AUGAUAAUUAUACACAGGTT	1004	GGCUUGGUUAUUAUACAUUTT	1200	ND-9120
AAAGAUUGGUAGGGGUAGGUAGAA	879	AGAUUGGUAGGGGUAGGUAGTT	1005	CAUCUACCCUACACAUUTT	1201	ND-9121
AACUCAAGGGGUAGGUAAUAA	880	CUGCAAGGGGUAGGUAAUUTT	1006	AUAUACAGACGCCUUGCAGTT	1202	ND-9122
AAUCAGAUAGGAGGAAAGAA	881	UCAGAUAGGAGGAAAGAAUTT	1007	UUUCGUUCUCCGUCAUCGATT	1203	ND-9123
AACACCAUAGGUAGGUAGGUAGAA	882	CACCAUAGGUAGGUAGGUAGTT	1008	CUAUACUGACUACAUUGGUTT	1204	ND-9124
AAAGACAGCACAUUGGUUGGUAA	883	AGACAGCACAUUGGUUGGUUTT	1009	ACAACGCAUUGGUUGGUUTT	1205	ND-9125
AAAGAGGGGUACGGGAUGGUAAUA	884	AGAGGGGUACGGGAUGGUAAUTT	1010	AUACAUCCGUACCCUUTT	1206	ND-9126
AAAAGAUAAUUAUACAAUCA	885	AAAGAUAAUUAUACAAUCAUTT	1011	ACGUUGAUUACAUACUUTT	1207	ND-9127
AAAAGCAUAGACCAUUGGUAA	886	AAAGCAUAGACCAUUGGUATT	1012	UACCAUAGGUCAUGGUUTT	1208	ND-9128

AAUUGUACAUUUGAAUUAUCAAA	887	UUGUACAUUUGAAUUAUCATT	1013	UGAUAUUAUCAAAUGUACAATT	1209	ND-9129
<u>AAGUAAAGCAUAGGACCAUUGGA</u>	<u>888</u>	<u>GUAAAGCAUAGGACCAUUGGT</u>	<u>1014</u>	<u>CRAAUGGUCUACCUUACT</u>	<u>1210</u>	<u>ND-9130</u>
AAUACACGUGuGcGAuTST	1015	AAUGGACACGGGAuGAuTST	1211	ND-9131		
GAGCUCCAAAauuGcGuATST	1016	UACGGAAUUVGGAGGCUcTST	1212	ND-9132		
uCAACGGuGUGGGGauGGTST	1017	ACCAuGCACACGGUGATST	1213	ND-9133		
uCAGAAuUGGGuAGuAcATST	1018	UGuACuACGcAAUuUGGATST	1214	ND-9134		
AuCAACGUGGGGGuGGuuGTST	1019	cauUGcACACGGuGAuTST	1215	ND-9135		
ccuCCAAAuGcGuAGuATST	1020	uACuACGGcAAUuUGGAGGTST	1216	ND-9136		
AGAGCCuCCAAAauGcGuTST	1021	ACGcAAUUVGGAGGCUcTST	1217	ND-9137		
CAACGuGuGcCCGuUUGGUGTST	1022	cACCAuUGcACACGGUGTST	1218	ND-9138		
AuAGAGuGuAGuAGGGuAGATST	1023	UcuACCCuAUAcACuCuAUtST	1219	ND-9139		
GGGAGAGGGGuACGGGAuTST	1024	CAuCCGuACCCuCuCCuTST	1220	ND-9140		
AGAuAAAGuuuGcACGGAGTST	1025	CCuGGcAACuUAAuCuAUtST	1221	ND-9141		
GGuAcuCAAGGuAGuAGuATST	1026	ACuCuACACCUuGGuACuCTST	1222	ND-9142		
AcuAGuGuAuGuAGuGGGTST	1027	UCCACuAUAcuAcuAGuTST	1223	ND-9143		
GAGAuAuGuuGAGGGGAuTST	1028	UCCGCUUuCAuAAuAAuCuTST	1224	ND-9144		
AAcAcuGuGuGuuGuAUtST	1029	AAuACuGuACuACuGGGUuTST	1225	ND-9145		
AGCCuCCAAAauGcGuAGTST	1030	CUACCCuAUuUuGGAGGCUtST	1226	ND-9146		
GCuCCuAAAauGcGuAGuTST	1031	ACuAGcAACUuUuGGAGGTST	1227	ND-9147		
GGuuAGGGAGACGGCAGTST	1032	CGGGcUGuGUuCCuACuACTST	1228	ND-9148		
GuAcuGuuGGGGuACGuAUtST	1033	uAUuGuAGGGCCuAUuGuACTST	1229	ND-9149		
uACAAuGGGGuACGuAUtST	1034	UuAUuGuAGGGCCuAUuGuTST	1230	ND-9150		
uGACauAGuAGcGuAGuAGTST	1035	AcuAUuGuuACuACuGuACTST	1231	ND-9151		
GAuAGuAGcGuAGuAGuGTST	1036	cACuACuGuuACuACuGuTST	1232	ND-9152		
AcuGuuGGGGuACGuuAUtST	1037	uAAuACGuuGGGGuACGuuGTST	1233	ND-9153		
AuAAuGuGuAGuAGuAGGTST	1038	uGGuGuuACuACuGuuAUtST	1234	ND-9154		
AAuGuuGGGuAGuGuuGTST	1039	GuGuGuuACuACuGuuAUtST	1235	ND-9155		
ACGuGuGuGGuGuGuGTST	1040	uACACCAAUuGcAAcACGuTST	1236	ND-9156		

cGAAAGuAuuuGGGuAGuctst	1041	GACuACCCAAuACUUUCGTst	1237	ND-9157
cuccAAAuuuCCguAGuctst	1042	GUACuACGCAAUUUGGTst	1238	ND-9158
uGGuACAuGGGccuACGTst	1043	UGGUAGGCCAUUGuACATst	1239	ND-9159
uAAuGACAuAGuAGACGAuTst	1044	AUGGUCAuCAUGuCAuATst	1240	ND-9160
ACAUAGuAGGGuAGuGTst	1045	UACuAUuCGuCAuAUuGTst	1241	ND-9161
GuGUAGACaAuAuuuACGTst	1046	UGGUuAuAuuUGuCAuACTst	1242	ND-9162
uAGuCAuAuAuuAACGAGGTst	1047	UGGUuCGGUuAuAuuAGuCAuTst	1243	ND-9163
uuGuGauuGGGuGuAuGuGTst	1048	AGGUuAuACACCAuCGCAuTst	1244	ND-9164
uGGGAGAGACauAuAGuGTst	1049	uACuAUuAGuGUuCGCAuTst	1245	ND-9165
uucAGAuAuuAGuAGGCAuTst	1050	UGGUuCAuACAUuCGuCAuTst	1246	ND-9166
GGAGAuAuuAGuAGGATst	1051	UCCGUuUuCAuAuAuuCUGuGTst	1247	ND-9167
AccAuGuAGuAGGuAuGuGTst	1052	ACAUuACuGGuACuAGuGTst	1248	ND-9168
GAAGAGGGGuACGGGuAGuGTst	1053	uACAUuCCGuACCCuCUCuTst	1249	ND-9169
AuAAuCAuACGuGuGGCAuTst	1054	UGGUuACACGuGUuGAuUAuTst	1250	ND-9170
cGuGuuGcGuGuGGGuGuAuTst	1055	AGuACCAuAUGGuACACGTst	1251	ND-9171
uGGGccuACGuAuGuAcGTst	1056	UGGuAUuAATGuAGGGuCATst	1252	ND-9172
uGuGuAuAuACuAuAGuGTst	1057	cACuAUuAuGuGuAuGuGTst	1253	ND-9173
ccAGAuAuAGuGuuGCACGTst	1058	UGGUuGCAuACGuAUuCUGuGTst	1254	ND-9174
AGAUuAuuGAAAGCAGGTst	1059	UCCGUuUuCAuAuAuuAUCuTst	1255	ND-9175
GuuAGGGuAGGGGuGTst	1060	GGCCGUuUuCAuACuGuACTst	1256	ND-9176
GcGuAAuAGGuAGuGuAGTst	1061	GUACuAUuACGuAUuUGGCTst	1257	ND-9177
GuuAGAccAuGGGuACATst	1062	UGGUuACGuAUuUGGUuAUuGTst	1258	ND-9178
AAuGuGGuGuACAGGTst	1063	UGGUuACGuACGGCAuUuTst	1259	ND-9179
AGuGuuGGGuAGuCCuACuTst	1064	AGUGGUACuACCCAAuACuTst	1260	ND-9180
AGuGuuAGuAGuAGuAGTst	1065	GUACuGUuACGuAUuUGGCTst	1261	ND-9181
GGuGuuGuccACuGuGuAUATst	1066	uACuACuAUuGGGuACuACuTst	1262	ND-9182
AGuGuAGAccAuGGGuACATst	1067	UGuACCAuAGGuGuAUuGTst	1263	ND-9183
uuuAGuAuuuAGuAGGAcTst	1068	GUCCuUuACuAUuCUGuAAuTst	1264	ND-9184

uCCGAuuGGuGuAuuGcuGt	1069	cAGcAAuAcCCAAUCCcAT	1265	ND-9185	
ccAAAUuGGuGuAGuAcAGT	1070	cUGuACuACGCAAUUUGGt	1266	ND-9186	
GcAGcAGcAGuGGcGuuut	1071	AAACACGGAGUGUGCUGt	1267	ND-9187	
uGuuACAGGUAGAAGGcGt	1072	GGCCUUCUACCUAGuAC	1268	ND-9188	
AGAcAAuAuuAuuAGuucut	1073	AGGACuAAuAuuAUUGuC	1269	ND-9189	
AuGAuuAuuuAACAGGcT	1074	GGCUGUGUAAAuAUuCAu	1270	ND-9190	
AGAUUGuAGGGuAGuAGt	1075	CAuCuACCCuACACuC	1271	ND-9191	
cUGcAAAGGuuGuuAuuut	1076	AuAUuACAGCCUUGGAG	1272	ND-9192	
uCAAGAUAGGAGAACGAA	1077	UuUUGUUCGUGCAuG	1273	ND-9193	
cAccAUuAGuGuAGuAGt	1078	CAuACUGACuACAGGU	1274	ND-9194	
AGACAGCcAGuGGuGuuut	1079	AAcAACGcAUGUGCUGU	1275	ND-9195	
AGAGGGuACGGGAuGAuA	1080	AuACACUCCGuACCCu	1276	ND-9196	
AAAGuAAuAAuAuuGGuA	1081	ACCUUGAUuAUuACUu	1277	ND-9197	
AAAGcAuuGACCuGuA	1082	uACCAuUGGUuCAuG	1278	ND-9198	
uGuuACuGuuGGGuuAuc	1083	uACACAUuCAuAAGuA	1279	ND-9199	
GuAAAGcAuuGACCACu	1084	CCAAuGGGUuAGuGCu	1280	ND-9200	
AAAUuCAAAuAUuAGuGA	889	AuAUuCAAAuAUuAGuAG	1085	CUuCACuAAuAUuGAu	
AAAUuCAAAuAUuAGuGA	890	uACuCAuAAuAUuGAu	1086	ACuUCACuAAuAUuGAu	
AGGGGUuGGCAuACuGA	891	TT1087	CUuCAGuAGuGGCAuAC	1281	AL-DF-8042
AAcAAcGUuAAuAGuGUG	892	uGGuAGGGCAuACuGA	1088	GGACACAUuAAACGUu	
AAACGUuAAuAGuGUG	893	AGT1087	uGACACACAUuAAACGU	1282	AL-DP-8043
AAAGAAACGGAuGGAGAC	894	uGUGUGUGUGCT1089	uGACACACAUuAAACGU	1283	AL-DP-8044
uGGGGuAUGCACAUuAA	895	uGUGUGUGUGCT1089	uGACACACAUuAAACGU	1284	AL-DF-8045
AGGGGUuAGGCAuACuGA	896	uGUGUGUGUGCT1090	uGAGuCuCCuACGUu	1285	AL-DF-8046
AAUuAAACGAGCA	897	uGUGUGUGUGCT1090	uGAGuCuCCuACGUu	1286	AL-DP-8047
AAcAAuGUGuGA	898	uGUGUGUGUGCT1091	uGAGuAUuGGCAuAC	1287	AL-DP-8048
AAUuAAACGAGCA	899	uGUGUGUGUGCT1092	uGAGuAUuGGCAuAC	1288	AL-DF-8049
AAUuAAACGAGCA	900	uGUGUGUGUGCT1093	uGAGuAUuGGCAuAC	1289	AL-DP-8050
AAUuAAACGAGCA	901	uGUGUGUGUGCT1094	uGAGuAUuGGCAuAC	1290	AL-DP-8051
AAUuAAACGAGCA	902	uGUGUGUGUGCT1095	uGAGuAUuGGCAuAC	1291	AL-DF-8052
AAUuAAACGAGCA	903	uGUGUGUGUGCT1096	uGAGuAUuGGCAuAC	1292	AL-DF-8053

AACAUUAACGAGCAGAAA	902	ACAUUAACGAGCAGAAA	901	UGUGUGUCAGGACAAUAAA	1097	UUUUUUGUCCUGACACACATT	1293	AL-DP-8054
AAAGACAGCGGGUAGGCAATT	903	AGACASCGGGUAGGCAATT	1098	UCUGUCGGUUAUAAUGUTT	1294	AL-DP-8055		
AAGACAGGGGUAGGCAAUAA	904	GACAGGGGUAGGCAAUATT	1099	AUGCCAUACCCGCGUGCTT	1295	AL-DP-8056		
AAACAGGGGUAGGCAAUACTT	905	ACAGGGGUAGGCAAUACTT	1100	UAUCCAUACCCGCGUGCTT	1296	AL-DP-8057		
AAAGGGGUAGGGCAUACGAA	906	AGCGGGUAGGGCAUACGAA	1101	GUAUUGCCAUACCCGCGUGCTT	1297	AL-DP-8058		
AAACAUGUGUAGACAUAAA	907	AACAUUGUGUAGACAUAAA	1102	CAGAUUGCCAUACCCGCGUGCTT	1298	AL-DP-8059		
AAACAUUAACGAGCAGAAA	908	CAUUAUAAACGAGCAGAAA	1103	AUAUGUCUACATAUUGUTT	1299	AL-DP-8060		
AAACGUUAAAUGUGUGCAGAA	909	ACGUUAAAUGUGUGCAGAA	1104	UUUCUGUCGUUAAAUAUGTT	1300	AL-DP-8061		
AAAAAUGUGUGUCAGGACAAA	910	AAAUGUGUGUCAGGACAAA	1105	CUGACACACAUAAAACGUTT	1301	AL-DP-8062		
AGGUUCUAAACGAGGUAAA	911	GGUUCUAAACGAGGUAAA	1106	UUGUGCCUGACACAUUUTT	1302	AL-DP-8063		
AAUGUGUGAGACAUAAAACAA	912	AUGUGUGAGACAUAAAACAA	1107	AUACUUCGUUUAUAGACCTT	1303	AL-DP-8064		
AAAGUAAGACCAUAAAAGUA	913	AGUAAGACCAUAAAAGUA	1108	GUUAUUAUGUCUACAUATT	1304	AL-DP-8065		
AAAGUAAGACCAUAAAAGUA	914	UAGUAAGACCAUAAAAGUA	1109	ACUUUAAAUGGUUUAACUTT	1305	AL-DP-8066		
AAAGAUUAGUAGACCAUAAA	915	GAUUAUAGUAGACCAUAAA	1110	CUUUAUAGGUUCUACAUATT	1306	AL-DP-8067		
AAAUUAGUAGACCAUAAA	916	AAUAGUAGACCAUAAA	1111	UAAUUGGUUCUACAUUUTT	1307	AL-DP-8068		
AAAUUAGUAGACCAUAAA	917	AAUAGUAGACCAUAAA	1112	UUAUAGGUUCUACAUUUTT	1308	AL-DP-8069		
AAAUUAGUAGACCAUAAA	918	UAGUAAGACCAUAAA	1113	UUAAAAGGUUCUACAUATT	1309	AL-DP-8070		
AAAUUAGUAGACCAUAAA	919	AAUACUGAGUGGAACUCA	1114	UUAAAAGGUUCUACAUATT	1310	AL-DP-8071		
AAAUUACUGAGUGGAACUCA	920	AUACUGAGUGGAACUCA	1115	GAGGUUUCACUCAGAUATT	1311	AL-DP-8072		
AAACAUACUAGUGGAACUCA	921	CAUACUGAGUGGAACUCA	1116	UGAGUUCUCCACUCAUATT	1312	AL-DP-8073		
AAUCUGAGUGGAACUCA	922	UUCUGAGUGGAACUCA	1117	AGUUVUCCACUCAUATT	1313	AL-DP-8074		
AAACUGAAAGUGGAACUCA	923	ACUGAAAGUGGAACUCA	1118	CUGGUUUCUCCACUCAUATT	1314	AL-DP-8075		
AACUGAAAGUGGAACUCA	924	CUGAGUGGAACUCA	1119	CGUGAGUUCUCCACUCAUATT	1315	AL-DP-8076		
AUGAGAGUGGAACUCA	925	UGAGUGGAACUCA	1120	UGCUGAGUUCUCCACUCAUATT	1316	AL-DP-8077		
AGAGAGUGGAACUCA	926	GAAGUGGAACUCA	1121	CUGCUGAGUUCUCCACUCAUATT	1317	AL-DP-8078		
AAAGUGGAACUCA	927	AUGUGGAACUCA	1122	UCUGCUGAGUUCUCCACUCAUATT	1318	AL-DP-8079		
AAAGUGGAACUCA	928	AGUGGAACUCA	1123	AUCUGCUGAGUUCUCCACUCAUATT	1319	AL-DP-8080		
AAAGUGGAACUCA	1124	AGUGGAACUCA	1320	CAUCUGCUGAGUUCUCCACUCAUATT	1320	AL-DP-8081		

AAAUGGCAAUACUGAAGUGGAA	929	AUGGCAAUACUGAAGUGGATT	1125	UCCACUUCAGAUUUGCCAUTT	1321	AL-DP-8082
AAAUAUCCUUUUUCUCAAGAAA	930	AAUCCUUUUUCUCAAGGATT	1126	UCCUUGAGAAAGAGAUUUTT	1322	AL-DP-8083
AAUCCUUUUUCUCAAGGCUAA	931	UCCUUUUUCUCAAGGACGTT	1127	ACGUCCUUGAGAAAAGGATT	1323	AL-DP-8084
AAAUCUUTUUCUCAAGGAGAA	932	AUCCUUTUUCUCAAGGACGTT	1128	CGUCCUUGAGAAAGGATT	1324	AL-DP-8085
AAGGCAAUACUGAAGUGGAAAA	933	GGCAAUACUGAAGUGGAAATT	1129	UUUCCACUUCAGAUUUGCCTT	1325	AL-DP-8086
AACUUTUUCUCAAGGAGUGGA	934	CUUUUUCUCAAGGACGUGTT	1130	CCACGUCCUUGAGAAAAGTT	1326	AL-DP-8087
AACCUTUUCUCAAGGAGCGGA	935	CCUUUTUCUCAAGGACGUGTT	1131	CACGUCCUUGAGAAAAGTT	1327	AL-DP-8088
AAUUUUUCUCAAGGACGUGGUAA	936	UUUUCCUCAAGGACGUGGTT	1132	ACCACGUCCUUGAGAAAATT	1328	AL-DP-8089
AAUGGAAAUCUUUUUCUCAAAA	937	UGGAAAUCUUUUUCUCAATT	1133	UGAGAGAAAAGGAUUCCATT	1329	AL-DP-8090
AAGGAAAUCUUUUUCUCAAGAA	938	GGAAUUCUUUUUCUCAAGTT	1134	CUGAGAGAAAAGGAUUCCTT	1330	AL-DP-8091
AAGAAAUCUUUUUCUCAAGGAA	939	GAUUCUUUUUCUCAAGTT	1135	CCUUGAGAAAAGGAUUCCTT	1331	AL-DP-8092
AAAACCUUUUUUCUCAAGGCA	940	AUCCUUTUUCUCAAGGACTT	1136	GUCCUUGAGAAAAGGAUUTT	1332	AL-DP-8093
AAUAUGGCAAUACUGAAGUGAA	941	UAUGGCAAUACUGAAGUGTT	1137	CCACUCAGUAUUGCCAUATT	1333	AL-DP-8094
AAUGGCAAUACUGAAGUGGAAA	942	UGGCAAUACUGAAGUGGAATT	1138	UCCACUUCAGUUAUUGCCATT	1334	AL-DP-8095
AAGCAAUACUGAAGUGGAACAA	943	GCAAUACUGAAGUGGAACCT	1139	GUUCCACUUCAGUUAUUGCTT	1335	AL-DP-8096
AAAUAUGGUAGACAUUAATAA	944	AAUGGUAGACAUUAATAATT	1140	UUUUAUAUGCUACACAUUTT	1336	AL-DP-8097

<251>

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 수득하였다. HPV16 E6 및 E1을 코딩하는 서열을 YFP 융합 전사물로의 발현을 위해 pNAS-055 백터 ([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 (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 퍼종하고, 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 융

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

<256> 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

<257>

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

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

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

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

<261>

<263> HPV E6 유전자 발현을 표적으로 하는 dsRNA의 디자인

<264>

표 7에 본 발명의 dsRNA 조성물이 기재된다.

내문자: 변형되지 않은 리보뉴클레오티드 (단, T는 변형되지 않은 대옥시리보뉴클레오티드)
 소문자: 리보스 모이어티 상에 2'-O-메틸 치환체를 보유하는 리보뉴클레오티드
 s: 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합의 위치를 가리킨다.
 choi: 3' 리보뉴클레오티드에 접합된 클래스테를 모이어티.
 '듀플렉스 명칭'은 지시된 샌스 가닥 및 지시된 앤티센스 가닥의 특이적 혼성화에 의해 형성된
 조성물의 명칭을 의미한다.

표 7

HPV E6 기준 서열로부터의 mRNA의 표적 서열 (총 19종의 표적 부위 + 양쪽 끝단의 AA의 서열)	서열 번호	이중 TT 오복합이 있는 샌스 가닥 (표적 서열) (5'-3')	서열 번호	이중 TT 오복합이 있는 앤티센스 가닥 (안내 서열) (5'-3')	서열 번호	듀플렉스 명칭
AUUCGGUGGACCCGUCAUGUAA 1336	UCGGUGGACCCGUCAUGUTT	1424	ACAUUCGACCCGUCCACCGATT	1586	ND-8899	
AAGGUCCGGUGGACCCGGCGAUAA 1337	GGUCGGUGGACCCGUCAUATT	1425	AUGGACCCGUCCACCGACCTT	1587	ND-8900	
AACCGGUGGACCCGGUGGCAUGUAA 1338	CGGUGGACCCGUCAUGUATT	1426	UACAUUCGACCCGUCCACCGTT	1588	ND-8901	
AAGUCGGUGGACCCGGUGGCAUGAA 1339	GUUCGGUGGACCCGUCCACCGATT	1427	CAUCGACCCGUCCACCGACTT	1589	ND-8902	
AAAUUCAUCAGAACACCCUAGAAA 1340	AUCAUCUAGAACACCCGAGATT	1428	UCAUCGUGUUCUUGAUGAATT	1590	ND-8903	
AACACAGAGUACUGCGACGUGAA 1341	CAACAGUACUGCGACGUGTT	1429	CAUCGUGGACGUACUGUGTT	1591	ND-8904	
AACAUCAUACAAACCCGUUGUA 1342	CAUCAUACAAACCGUUGUTT	1430	ACAACGGGUUGUUGUUGAUGTT	1592	ND-8905	
AAGCUGCAAACACAUUCAUAA 1343	GCUGCAAACACAUUCAUCAUTT	1431	AUGUAUAGUUGUUUGCAGCTT	1593	ND-8906	
AAGCUGGACCCGGUGGCAUGUAA 1344	GGUGGACCCGGUGGCAUGAATT	1432	AUACAUACGACCCGUCCACCTT	1594	ND-8907	
AAAAAUUAGUAGUAGUAGACAAA 1345	AAAUUAGUAGUAGUAGACATT	1433	UGUCUAUACUUCACUAAUUTT	1595	ND-8908	
AAUCAUCAGAACACCGUAGAGAA 1346	UCAUCAAGAACACCGUAGAGTT	1434	CUCUACGUGUUCUUGAUGATT	1596	ND-8909	
AAAUUCAACAAACCGUUGUGUAA 1347	AUCAACAAACCGUUGUGUTT	1435	ACACAAACGGGUUGUUGAATT	1597	ND-8910	
AAUGGACCCGGUGUAGUGUAA 1348	UGGACCCGGUGUAGUGUTT	1436	ACAUACAUCCGGGUCCATT	1598	ND-8911	

AAUACACAACAAACCGUGUGUGAA	1349	UACACACAAACCGUGUGUGTT	1437	CACACACGGUUUUGUGUATT	1599	ND-8912
AAAGAUUCCAUAAUAAUAGGGAA	1350	AGAUUCCAUAAUAAUAGGGTT	1438	CCCUUAAUUAUAGGAAUCUTT	1600	ND-8913
AACAAAGCAACAGUUAUCUGCGAA	1351	CAAGCAACAGUUAUCUGCGATT	1439	UCGCAGUAACUGUUGUCUGTT	1601	ND-8914
MAGUUAUUAUAGGUGUAAACAA	1352	GUUAUUAUAGGUGUAAUACTT	1440	GUUAUUAUACCUAAUAACTT	1602	ND-8915
AAUUGCUUUCGGGAUUAUAA	1353	UUUGCUUUCGGGAUUAUATT	1441	AUAAAUCCGAAAGCAAATT	1603	ND-8916
AAACUUUGCUUUCGGGAUUAUAA	1354	ACUUUGCUUUCGGGAUUAUUTT	1442	AAUCCGAAAGCAAAGUTT	1604	ND-8917
AACUGCAAACACAUACAUAGAA	1355	CUGCAACACACAUACAUAGTT	1443	CAUGUAUAGUUGUUGCGAGTT	1605	ND-8918
AAUAGACUTUGCUUUCGGGAAM	1356	AUGACUTUGCUUUCGGGATT	1444	UCCCGAAAGCAAAGCUAATT	1606	ND-8919
AAACGACCCAGAAGUUACACAA	1357	CGACCCAGAAGUUACACTT	1445	GUGGUACUUUCUGGUCGTT	1607	ND-8920
AAUUAUCUGGAGCAGGUAUAA	1358	UUACUGGAGCAGGAGUAUATT	1446	AUACCUACGUGCCAGUAUATT	1608	ND-8921
AAGUUAUCUGCGACGGAGGUAA	1359	GUUACUGCGACGGAGGUATT	1447	UACCUACGUGCCAGUAUACTT	1609	ND-8922
AAUCCGACGGAGGUUAUAGAA	1360	UCCGACGGAGGUUAUAGATT	1448	UCAUAUACUCACGUCGCATT	1610	ND-8923
AAUUGGAUAGUUAUGCUUUGUAA	1361	GUUGAUGUAUAGUUCUUGUATT	1449	CAACAAGCAUACAUAGACTT	1611	ND-8924
AACGACCGUGGAGGUUAUAGACUA	1362	CGACGUGGAGGUUAUAGACUTT	1450	AGCUAUUACCUACGUGCGTT	1612	ND-8925
AACACUUVUGCUUUCGGGAUUA	1363	GACUUVUGCUUUCGGGAUUTT	1451	AAUCCCGAAAGCAAAGUATT	1613	ND-8926
AAUAGGUGUAUAAUACGUCAA	1364	UAGGGUGUAUAAUACGUATT	1452	UGACGUUAUACACCUATT	1614	ND-8927
AAUUACACAGUUAUGCACAGAA	1365	UUACACAGUUAUGCACAGTT	1453	CUGUGCAUACUGUGUATT	1615	ND-8928
AAGCAACAGUUAUCUGCGACGUA	1366	GCAACAGUUAUCUGCGACGTT	1454	ACGUCCAGUAACUGUUGCTT	1616	ND-8929
AAUCCUUVUGGGAUUAUAGCAA	1367	UCCUUVUGGGAUUAUAGCTT	1455	GCAUAAUICCGAAAGCATT	1617	ND-8930
AAUUAUGAGUUAUAGACAUAA	1368	UUAUGAGUUAUAGACAUATT	1456	UAUUGCUUACUCACUATT	1618	ND-8931
AAUUAUAGGUGUAUAAUACUGAA	1369	UAUUAUAGGUGUAUAAUACGTT	1457	CAGUUAUACACCUAAUATT	1619	ND-8932
AAUAGUUAUAGCUGUUGCGAGAA	1370	GAUAGUUAUAGCUGUUGCGAGTT	1458	CUGCAACAGACAUACACTT	1620	ND-8933
AACGGGUCAUGUAUAGCUUUGT	1371	CGGGGUCAUGUAUAGCUUUGT	1459	CAAGACAUACAUGGACCGGT	1621	ND-8934

AAGGAGCGACCCAGAAAGUAAA	1372	GGAGCGACCCAGAAAGUATT	1460	UAACUUUCUGGGUCGCUCCTT	1622	ND-8935
AAGGCGACCCAGAAAGUACAA	1373	GAGCGACCCAGAAAGUACTT	1461	GUACUUUCUGGGUCGCUCCTT	1623	ND-8935
AUGAGUAUAGACAUUAUGUAA	1374	UGAGUAUAGACAUUAUGUTT	1462	ACAAUAUGUCUACUCATT	1624	ND-8937
AAAUAUACAAACCCUGUGAA	1375	AAUACAAACCAACCCUGUGAA	1463	CACAACGGUUUGGUUAUUTT	1625	ND-8938
AAGUAUGUCUUGUUCAGAUCAA	1376	GUAUGUCUUGUUCAGAUCTT	1464	GAUCUCACACAGACAUACTT	1626	ND-8939
ACUUUCGUUUUUGGGAUUUAAA	1377	CUUUGGUUUUUGGGAUUUATT	1465	UAAUCCGAAAAGCAAGTT	1627	ND-8940
AAAUAUGAGUAUAGACAUAA	1378	AUUAUGAGUAUAGACAUUTT	1466	AAUGUCUUAUCACUAAUTT	1628	ND-8941
AAAAGAUUCCAUAAUAAUAGGA	1379	AAGAUUCCAUAAUAAAGTT	1467	CCUUAUAAUAGGAAUCUUTT	1629	ND-8942
AAGGUCGAUGUAUGUCUUGUA	1380	GGUCGAUGUAUGUCUUGUTT	1468	AAACAGACAUACUCGACCTT	1630	ND-8943
AAACAUACAGAACACGUAGAGAA	1381	CAUCAAGACACGUAGAGATT	1469	UCUCUACGUGUUCUGUAGTT	1631	ND-8944
AAACAGUUACUGCGACGUGAA	1382	ACAGUUACUGCGACGUGATT	1470	UCACGUUGCGAGUACUGUUTT	1632	ND-8945
AAACAGUACUGCCGACGUGAGAA	1383	ACAGUACUGCCGACGUGAGTT	1471	CUCACCUCCGAGAACUGUTT	1633	ND-8946
AAGUGUGAUUUUGGUUAUAGGA	1384	GUGUGAUUUUGGUUAUAGGT	1472	CCUAUAUACAAACACACTT	1634	ND-8947
AAUUAAGAACACGUAGAGAAA	1385	AUCAAGAACACGUAGAGATT	1473	UUCUCUACCGUGUUCUGUAUTT	1635	ND-8948
AAUUCUGGGAUUAUAGCAUAGAA	1386	UUUCGGGAUUAUAGCAUAGTT	1474	CUAUGGAUAAAUCCCGAATT	1636	ND-8949
AAACCCACAGGAGGACCCAGAA	1387	ACCCACAGGAGGACCCAGT	1475	CUGGGUGCCUCCUGGGUTT	1637	ND-8950
AAAGGAUGGAUACAUUAUGCA	1388	AGAUGGAUACAUUAUGCTT	1476	AGCAUAGGAUUCCAUCUTT	1638	ND-8951
AAUGUGAGUAUAGACAUAA	1389	UAGUGAGUAUAGACAUATT	1477	AUAUGUCUUAUCACUATT	1639	ND-8952
AAUGUGUGAUUUGGUUAUAGAA	1390	UGUGUGAUUUGGUUAUAGTT	1478	CUAAUACAAACACATT	1640	ND-8953
AAUUAUAGGUGGUUAUACUAA	1391	UUAUAGGUGGUUAUACUTT	1479	AGUUAUACACCUUAAUATT	1641	ND-8954
AAAUAUGACUUUCUUUCGGAA	1392	AUAUGACUUUCUUUCGGTT	1480	CCGAAGAGCAAGGUUAUTT	1642	ND-8955
AACGGGUCAUAGUAUGUCUUGUA	1393	CGGUGGUCAUAGUCUUGUTT	1481	ACAAGACAUACACUGACCGTT	1643	ND-8956
ACAGGACCCACAGGAGCGACAA	1394	CAGGACCCACAGGAGCGCTT	1482	GUCCGUCCUGUGGGUCCUGTT	1644	ND-8957

AAUUCGGGAUUAUAGCAUAAA	1395	UUUCGGGAUUAUAGCAUATT	1483	UAUGCAUAAAUCCCGAAATT	1645	ND-8958
AAAACACAUACAUCAUGAURUA	1396	AAACACAUACAUCAUGAURATT	1484	AUUCAUAGUUAUAGUUGUUTT	1646	ND-8959
AAUCCAUAUAGCUGUAUGUGAUAA	1397	UCCAUAUAGCUGUAUGUGAUATT	1485	AUCACAUACAGCAUAGGATT	1647	ND-8960
AAUAVCUAAAUAUAGUGAGUA	1398	UAUUCUAAAUAUAGUGAGUTT	1486	ACUCACUAAAUAUAGAUATT	1648	ND-8961
AAUUGGAACACAUAGAACAA	1399	UAUUGGAACACAUAGAACATT	1487	GUUCUAAGUUGUUCAUATT	1649	ND-8962
AAGCUUGUUCAGCAUCAA	1400	GUUCUUGUUCAGCAUCATT	1488	UGAUGAUUCGCAACAGACTT	1650	ND-8963
AAUAVRACUGCUAACCCAA	1401	UAUVRACUGCUAACCCATT	1489	UGCCUUVUGACAGUUAUATT	1651	ND-8964
AAACCAAAGAGAACUGCAUAA	1402	ACCAAAGAGAACUGCAUATT	1490	AUGCAGUUCUCUUVUGUTT	1652	ND-8965
AAUAVUAGUGAUAGAACAUAA	1403	AAUAVUAGUGAUAGAACAUATT	1491	AUGUCUAAUCACUAAUATT	1653	ND-8966
AACGAUCAUCAAGAACGUA	1404	CAGAUCAUCAAGAACGGTT	1492	ACGUGUUCUGAUGAUGUTT	1654	ND-8967
AAUUGCAUAGUUAUAGAGAA	1405	UAUUGCAUAGUUAUAGAGATT	1493	UCUCUAAUACUAAUCAUATT	1655	ND-8968
AAAGAGAUGGAUCCAUAGUA	1406	AGAGAUGGAUCCAUAGUTT	1494	CAUAGUGAUCCCAUCUCUTT	1656	ND-8969
AAAGUGAGUAAGACAUAAUAA	1407	AGUGAGUAAGACAUAAUATT	1495	AAUAAGUUCUAAUCACUCUTT	1657	ND-8970
AAUUCUAAAUAUAGUGAGUA	1408	UUCUAAAUAUAGUGAGUATT	1496	AUCUCUAAUACUAAUAGAATT	1658	ND-8971
AAUCCAUAGAUAAUAGAGAUAA	1409	AUCCAUAGAUAAUAGAGAUATT	1497	AUCUCUAAUACUAAUAGAATT	1659	ND-8972
UCGGUGGACGGGUUGAUGUTST	1498	ACAUUGACGGGUACCGATST	1660	ND-8987		
GGucGGugGGAccGGGGuGGuA	1499	AUGGACCGGUCCACCGCTST	1661	ND-8988		
CGGugGGAccGGGGuGGuA	1500	uAGAUCAACGGGUCCACCGTST	1662	ND-8989		
GuGGGuGGAccGGGGuGGuGT	1501	cauGGACCGGUCCACCGCTST	1663	ND-8990		
AucAucAGAACACGuGATST	1502	UCAUCGGUGUUCUGAUATST	1664	ND-8991		
CAcAGGuACGGGGuGGuGT	1503	CAcGGUGCAGuAACUGUGTST	1665	ND-8992		
CAuACACAAACGuGGuGT	1504	ACACGGGUUGUUGUAGUATST	1666	ND-8993		
GCUGCAAACACUACAUATST	1505	AUGuAuAGUGUUGUUGCAGCTST	1667	ND-8994		

GGuGaccGGGGuGGuAguAUTST	1506	AuAcAUCGACGGGUCCACTST	1668	ND-8995	uGcuuuuucGGGGuuuuujGcTst	1529	GcAuaAUCCGAAAGcATst	1691	ND-9018
AAauuAGuGAGGuauAGaCTst	1507	UGCuuaUAcuCAuAAuUTst	1669	ND-8996	uAaGuGGuauAGaCAuAUst	1530	uAAUGCuuaUAcuACuAUst	1692	ND-9019
uCAuAAGAAACAGGuAGATst	1508	CUuACGuGUuUuGAuGATst	1670	ND-8997	uAauuAGGuauAuGuuAGTst	1531	cAGuuaUAcACCAuAAuAUst	1693	ND-9020
AuAcAACAACGGGuGuGuGTst	1509	AcACAACGGGUUGGUuGuAUTst	1671	ND-8998	GAuGuGuGuGuGuGuGAGTst	1532	CUGCAACAGACAGACAUst	1694	ND-9021
uGGACCGGGGuGuGuGuGuGTst	1510	AcAuAcAUCGACGGGUCCATst	1672	ND-8999	CGGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1533	CAAGACAUAcuCGACCGGTst	1695	ND-9022
uACACACAAACCGGuGuGuGTst	1511	CAACAACGGGUuUuGuGuATst	1673	ND-9000	GGACCGAACAGAAAGuGuATst	1534	uAACUuUuCGGUuGuGuCCTst	1696	ND-9023
AGAuuccAAuAuAAuAAAGGTst	1512	CCUuAuAUuAUuGGGuAUst	1674	ND-9001	GAGCACCCAGAAAGuGuACTst	1535	GuAACUuUuGGGUuGuCCTst	1697	ND-9024
CAAGAACAGuAcuGuGCGATst	1513	UCCGAGuAUAcUUGGUuGuGTst	1675	ND-9002	uGAGuGuAGGuGuGuGuGuGTst	1536	AcAAuAUuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1698	ND-9025
GuuAAuUuAGGuGuuAAuACTst	1514	GUuAAuAcACCAuAAuAAuACTst	1676	ND-9003	AAuAcAAcAAcAcGuGuGuGTst	1537	CAACAGGUuUuGGGUuGuGuGuGTst	1699	ND-9026
uuuGuuuuucGGGGuuuuAUst	1515	AAAuUCCGAAAGCAAGCATst	1677	ND-9004	GuuGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1538	GAuCUGCAAAAGAAAGAAuACTst	1700	ND-9027
cugCaaACAAcAcuAAuAcACuGTst	1516	AAuUCCGAAAGCAAGCATst	1678	ND-9005	cuuuGcuuuuucGGGGuuuuAUst	1539	uAAAuUCCGAAAGCAAGAAuACTst	1701	ND-9028
GuuGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1517	CAuGuAuGuGuGuGuGuGuGTst	1679	ND-9006	GuuGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1540	AAuGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1702	ND-9029
GuuGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1518	UCCGAAAGAAAGGuGuGTst	1680	ND-9007	AAuGuuccAAuAUuAUuGGGuAUst	1541	CCUuAuAUuAUuGGGuAUst	1703	ND-9030
CGACCCAGAAAGuGuACACTst	1519	GUuGuAAuCTuUuCGGUuGTst	1681	ND-9008	GGuGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1542	AAuAGACAAuACuUCCACTst	1704	ND-9031
uAAuGuGGGGuGuGuGuGuGTst	1520	AAuACuCAuGuGuGuGuGuGTst	1682	ND-9009	CAuCAAGAAcACGuGuAGAGTst	1543	UCUuCuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1705	ND-9032
GuuGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1521	uACuUACGuGuGuGuGuGuGTst	1683	ND-9010	AAuAGuGuAcuCGGGuGuGuGTst	1544	uCACGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1706	ND-9033
uGcGAcGuGuGuGuGuGuGuGTst	1522	UCAuAUuACuCAuGuGuGuGTst	1684	ND-9011	AcAGuGuAcuGGGGuGuGuGTst	1545	CuACGuGGGuGuGuGuGuGuGTst	1707	ND-9034
GuuGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1523	CAACAAGACAAuCAuGuGuGTst	1685	ND-9012	GuGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1546	CCuAAuUAcAAuGuGuGuGuGuGTst	1708	ND-9035
CGAcGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1524	AGGuGuAuACuGuGuGuGTst	1686	ND-9013	AAuAGAAcAcGuGuGuGuGTst	1547	UUCUuCuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1709	ND-9036
GuuGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1525	AAuCCGAAAGCAAGuGTst	1687	ND-9014	uGGGGGuuuuAuGuGuGuGTst	1548	GuAGuGuAAuUuGGGuGuGuGTst	1710	ND-9037
uAGGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1526	uGAGAGuGuGuGuGuGuGuGTst	1688	ND-9015	AccAcAGGGGuGuGuGuGuGTst	1549	CuGGGUuGuGuGuGuGuGuGTst	1711	ND-9038
uACACAGuGuGuGuGuGuGuGTst	1527	CGuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1689	ND-9016	AGuGGGuGuGuGuGuGuGuGTst	1550	AGGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1712	ND-9039
GCAACAGuGuGuGuGuGuGuGTst	1528	ACGuGGGuGuGuGuGuGuGTst	1690	ND-9017	uAGuGGGuGuGuGuGuGuGuGTst	1551	GuuGuGuGuGuGuGuGuGuGTst	1713	ND-9040

uGUGUuGAuuuGuuAAuAGTst	1552	CUAAUuACAAuCACACATst	1714	ND-9041
uuAAuAGGGuGuAuuAAcUTst	1553	AGUAAuACCCuAAuAAuATst	1715	ND-9042
AuAUAGACuGuGcuuAuwGGTst	1554	CGAAAGCCAAAGuCAuAUTst	1716	ND-9043
cGGuCGAuGuGuGuGuTst	1555	ACAAAGACAAuACuCGACCGTst	1717	ND-9044
CAGGACccACAGGAGGACTst	1556	GUCCUCCuGuGGGUCCUGTst	1718	ND-9045
uuuucGGGuuAuGcAUATst	1557	uAUGcAuAAuCCGAAATst	1719	ND-9046
AAACACAcuAuCAuGuAUtst	1558	AuAUCAuGuuAGUUGUUTst	1720	ND-9047
uccAuAuGuGuAuGuGuAUtst	1559	AuCACAcAGcAuAUGGATst	1721	ND-9048
uAUuCAuAAuAuGuGAGuTst	1560	ACuCACuAUuUuAGAAuATst	1722	ND-9049
uAUGGAACAcACauuGuGACTst	1561	GUUCuAaGuGuUCCuGuATst	1723	ND-9050
GuGuGuGcAGAcAuCATst	1562	UGAUGAUcUGCAACAGACTst	1724	ND-9051
uAUuACuGuCAAGCCATst	1563	UGGUUUuGACAGuAAuATst	1725	ND-9052
ACCAAAAGAGAACuGcAUATst	1564	AUuGcAGuGuCUCUuUUGuTst	1726	ND-9053
AAuAUAGuGuGuAUuACATst	1565	AUGUCAuAaCACAAuUTst	1727	ND-9054
cAGAuCAuAAAGAACGGuTst	1566	ACGuGuGuGAuGuuGUGTst	1728	ND-9055
uAuGcAuGuGuAUuAGGATst	1567	UCUCuAuAuACuAUcGuATst	1729	ND-9056
AGAGAUuGGGAuCCuAUuGTst	1568	CAuAUGGUuUCCuACuCUTst	1730	ND-9057
AGuGAGGuuAGAcAuAuUTst	1569	AuAAuGuGuuACuACuATst	1731	ND-9058
uucuAAuAuGuGuGuATst	1570	AuACuCAuAAuUuAGAATst	1732	ND-9059
AuGcAuGuGuAUuAGAATst	1571	AuCUCuAuAuACuAUcGuATst	1733	ND-9060
AAGUGAUuGUuAAuUAGGUAA	1410	GuGAuGuGuuAUuAGGUtt	1572	ACCUuAUuACAAuUACTT
AAuGAuUuGUuAAuUAGGUAA	1411	uGAuUuGUuAAuUAGGUtt	1573	ACCUuAUuACAAuUACTT
AGAUuUGGUuAAuUAGGUAA	1412	GAuUuGUuAAuUAGGUtt	1574	UACACCuAUuACAAuUACTT
AAuUuGUuAAuUAGGUuAA	1413	AAuUuGUuAAuUAGGUuATT	1575	UACACCuAUuACAAuUATT

AAUGUGAUUUGUUAUUAUAGGUAA	1414	UGUGAUUUGUUAUUAUAGGUTT	1576	ACCUAAUUAACAAUACATT	1738	AL-DP-7782
AAUGUAGGAAACACAAUAGAAA	1415	UGUAUGGAAACACAAUAGATT	1577	UCUAUAGGUUGUUCCAUCATT	1739	AL-DP-7783
AAGCAUGGAACACAAUAGAAA	1416	GUAGGAAACACAAUAGATT	1578	UCCUAUAGGUUGUCCAUACTT	1740	AL-DP-7784
AAUCUGUACUGCAAGCAACAGAA	1417	UGUGUACUGCAAGCAACAGTT	1579	CUGUUGGUCCAGUACACATT	1741	AL-DP-7803
AAACUCGGACGGUGGAAUAAA	1418	ACUCGGACGGUGGAAUATT	1580	AUAUACCUACGUCCAGUTT	1742	7804
AAGAGGUAAUAGCUUUGCUAA	1419	GAGGUAAUAGCUUUGCUATT	1581	AACCAAGUCAUAUACCUATT	1743	AL-DP-7805
AAAGCCUGUAGUAGUAAAUGAA	1420	AUCGUGUAGUAGUAAAUGTT	1582	CAUUAUACACAUACAGGAUTT	1744	AL-DP-7807
AAUUUAUUCUAAAUAUAGUAAA	1421	UUUAUUCUAAAUAUAGUATT	1583	UCACUAAUUAUAGAAUATT	1745	AL-DP-7808
AACCGCGACGGUGAGGUAAUAGA	1422	CUCGGACGGAGGUAAUUGTT	1584	CAUUAUACCUACGUCCAGTT	1746	AL-DP-7810
AAACUUGGUUGUUGAUUUGUAAA	1423	ACCGUUGGUUGAUUUGUATT	1585	UACACAAUACACAAACGGUTT	1747	AL-DP-7812

<272>

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 수득하였다. HPV16 E6 및 E1을 코딩하는 서열을 YFP 융합 전사물로의 발현을 위해 pNAS-055 백터 ([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 제조된 선별에 의해 유도되었다. HPV16 E6 또는 HPV16 E1에 대한 siRNA로의 형질감염을 위해, 각각의 세포를 2.0×10^4 개의 세포/웰의 밀도로 96웰 플레이트에 과종하고, 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 융

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

<277> 표 8은 본 발명의 E6 dsRNA의 테스트 결과를 나타낸다.

표 8

듀플렉스 명칭	30nM 처리 후에 잔존하는 평균 활성		300pM 처리 후에 잔존하는 평균 활성	
	표준 편차	표준 편차	표준 편차	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

<278>

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

<282>

<283>

<284>

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