(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0029005
(43) 공개일자 2018년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01) *A61K 47/54* (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) *B82Y 5/00* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/10 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0026504(분할)
(22) 출원일자 2018년03월06일
심사청구일자 2018년03월07일
(62) 원출원 특허 10-2017-0133145
원출원일자 2017년10월13일
심사청구일자 2017년10월13일
(30) 우선권주장
1020140142589 2014년10월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이혁진
서울특별시 마포구 백범로 205, 101동 506호 (신공덕동, 마포펜트라우스)
김보영
인천광역시 남동구 에코중앙로 163, 707동 502호 (논현동, 에코메트로7단지아파트)
장보라
서울특별시 마포구 토정로2길 12, 401호 (합정동, 더하우스3차)
(74) 대리인
안소영

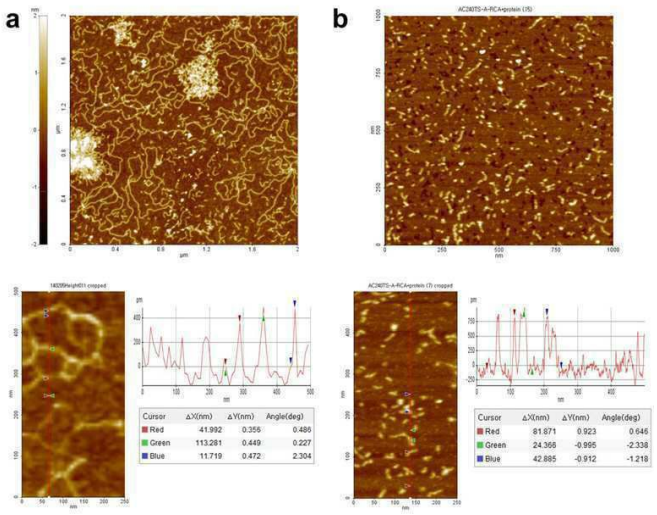
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 나노구조체의 대량생산방법 및 이의 약물전달체로서의 활용**

(57) 요 약

본 발명은 DNA 또는 RNA 핵산 나노구조체의 대량생산방법 및 이와 같은 방법으로 제조된 핵산 나노구조체의 활성제 전달용도에 관한 것이다. 본 발명의 DNA 나노구조체 또는 RNA 나노구조체의 대량 생산법에 따르면, 증폭 주형 내에 절단 위치가 존재함으로써 위치특이적 절단을 통해 원하는 핵산을 높은 효율로 대량생산할 수 있고, 이를 이용하여 목적하는 활성제를 세포 내로 용이하게 전달할 수 있거나, 주형 내에 목적하는 siRNA 서열을 직접 포함하여 siRNA 전달을 할 수 있는 나노구조체를 직접 생산할 수 있으므로, 효율적인 핵산 증폭을 달성하여 핵산 나노구조체를 대량 생산하고, 활성제를 세포 내로 전달하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 47/50 (2017.08)
A61K 47/549 (2017.08)
C12N 15/113 (2013.01)
B82Y 5/00 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014M3C1A3054153
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업-첨단융합기술개발사업-미래유망융합기술파이오니어사업
연구과제명 나노 DNA 구조체 기반 분자물질 전달기술 개발 및 생체내 거동 평가 연구
기 여 율 33/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2014.09.15 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A1A1A05027352
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-일반연구자지원사업-신진연구(후속연구지원)
연구과제명 핵산 자기조립을 통한 새로운 페러다임의 표적 지향성침묵유전자 전달체 개발
기 여 율 34/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2017.09.01 ~ 2018.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012K1A1A2A01056092
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 국제협력사업-글로벌개방혁신연구센터
연구과제명 삼차원 DNA 구조체 기반 고효율 siRNA 전달체 기술 개발
기 여 율 33/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.12.01 ~ 2017.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) (P-M_k-N_k) 내지 (P-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열이 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드를 DNA 리가아제로 처리하여 서열의 말단부가 연결된 원형 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 원형 DNA 주형에 DNA 폴리머라아제를 처리하여 단위 서열에 상보적인 서열이 반복되는 증폭 산물을 얻는 단계;

3) 증폭산물에 형성된 제한효소 인식부위를 제한효소로 절단하여 증폭된 서열 집단을 얻는 단계; 및

4) 증폭된 서열집단의 자가조립(self assembly)을 통해 DNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 DNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

(여기에서 P는 제한효소 인식 부위를 포함하는 프라이머 결합 서열이고,

M 및 N은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고,

N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며,

K는 $3 \leq K \leq 90$ 이하의 정수,

$n=\{n \mid 1 \leq n \leq k-1\}$인 정수} 이다)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 DNA 폴리머라아제는 Bst DNA 폴리머라아제, 엑소뉴클레아제 마이너스, Tth DNA 폴리머라아제, 피로파지 (PyroPhage TM) 3173 DNA 폴리머라아제, BcaBEST DNA 폴리머라아제 및 파이(Phi) 29 DNA 폴리머라아제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, DNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 3) 단계의 상기 제한효소 인식부위는 회문구조 (palindromic)인, DNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제한효소는 BamHI, HindIII, EcoRI, EcoRII, TaqI, NotI, Sau3AI, PvuII, SmaI, HaeIII, HgaI, EcoRV, KpnI, EcoP15I, AluI, XbaI, StuI, SphI, SpeI, ScaI, SalI, SacI, KpnI, EcoP15I 및 PstI로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, DNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 5) DNA 나노구조체에 활성제를 결합시키는 단계;를 추가적으로 포함하는 DNA 나노구조체의 대량생산방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 만들어지는 접착성 말단(sticky end)을 갖는 DNA 나노구조체.

청구항 7

제5항의 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 DNA 나노구조체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 활성제는 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 소분자

및 약물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 활성제 전달용 DNA 나노구조체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 약물은 mitonafide, amonafide, 비스나프탈이미드(bisnaphthalimide), 엘립티신(Ellipticine), 9-methoxyellipticine, Ditercalinium 다우노마이신(daunomycin), ametantrone, 미톡산트론(mitoxantrone), 독소루비신(doxorubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 에키노마이신(echinomycin), Benzimidazo[1,2-c]quinazoline 및 imidazodiquinolinium cation naphthalimides 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 항암제인, 활성제 전달용 DNA 나노구조체.

청구항 10

1) (P-M_k-N_k) 내지 (P-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열 각각에 DNA 리가아제를 처리하여 서열의 말단부가 연결된 K개의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 원형 DNA 주형에 DNA 폴리머라아제를 처리하여 단위 서열에 상보적인 서열이 반복되는 증폭 산물을 얻는 단계;

3) 증폭 산물에 형성된 제한효소 인식부위를 제한효소로 절단하여 증폭된 K개의 서열 집단을 얻는 단계; 및

4) K개의 집단을 혼합하고, 서열 간 자가조립(self assembly)을 통해 DNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 DNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

(여기에서 P는 제한효소 인식 부위를 포함하는 프라이머 결합 서열이고,

M 및 N은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고,

N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며,

K는 $3 \leq K \leq 90$ 이하의 정수,

$n=\{n \mid 1 \leq n \leq k-1\}$인 정수} 이다)

청구항 11

제10항에 있어서, 5) 단계의 DNA 나노구조체에 활성제를 결합시키는 단계;를 추가적으로 포함하는 DNA 나노구조체의 대량생산방법.

청구항 12

제10항의 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 DNA 나노구조체.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 활성제는 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 소분자 및 약물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 활성제 전달용 DNA 나노구조체.

청구항 14

1) (Pr-M_k-N_k) 내지 (Pr-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열에 DNA 리가아제를 처리하여 서열의 말단부가 연결된 하나의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 원형 DNA 주형에 RNA 폴리머라아제를 처리하여 주형 DNA의 단위서열과 상보적인 서열이 반복되는 증폭 RNA 산물을 얻는 단계;

3) 증폭 RNA 산물에 DNA 헬퍼(helper) 서열을 첨가하여 DNA/RNA 이중 가닥을 형성시키는 단계;

4) DNA/RNA 이중가닥을 RNase H로 절단하여, 단위서열에 상보적인 서열 혼합물을 얻는 단계; 및

5) 증폭된 단위서열 상보적인 서열 혼합물 내에서 단위서열 간 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 RNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

(여기에서 Pr은 RNA 폴리머라아제가 인식하는 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열이며,

M 및 N은 15 내지 25nt 길이의 siRNA 서열이고,

N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며,

K는 3≤K≤90 이하의 정수,

n={n| 1≤n≤k-1}인 정수} 이다)

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 RNA 폴리머라아제는 T7-RNA 폴리머라아제인, RNA 나노구조체의 대량생산방법.

청구항 16

제14항의 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 RNA 나노구조체.

청구항 17

제16항에 있어서, siRNA 서열이 포함된 것을 특징으로 하는, RNA 나노구조체.

청구항 18

제16항에 있어서, 활성제가 추가로 결합된 RNA 나노구조체.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 활성제는 미토나피드(mitonafide), 아모나피드(amonafide), 비스나프탈이미드(bisnaphthalimide), 엘립티신(Ellipticine), 9-메톡시엘립티신(9-methoxyellipticine), 디테르칼리늄(Ditercalinium), 다우노마이신(daunomycin), 아메탄트론(ametantrone), 미톡산트론(mitoxantrone), 독소루비신(doxorubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 에키노마이신(echinomycin), 벤지미다조[1,2-c]퀴나졸린([Benzimidazo[1,2-c]quinazoline) 및 이미다조디퀴놀리늄 양이온 나프탈이미드(imidazodiquinolinium cation naphthalimides) 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 항암제인, RNA 나노구조체.

청구항 20

1) (Pr-M_k-N_k) 내지 (Pr-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열 각각에 DNA 리가아제 또는 circligase 를 처리하여 K개의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 각각의 원형 DNA 주형에 RNA 폴리머라아제를 처리하여 주형 DNA의 단위서열과 상보적인 서열이 반복되는 개별적인 증폭 RNA 산물을 얻는 단계;

3) 증폭 RNA 산물에 각각 DNA 헬퍼(helper) 서열을 첨가하여 DNA/RNA 이중 가닥을 형성시키는 단계;

4) DNA/RNA 이중가닥을 RNase H로 절단하여, 단위서열에 상보적인 서열 집단을 얻는 단계; 및

5) 증폭된 단일 서열 집단을 혼합시켜 서열 간 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노 구조체를 얻는 단계; 를 포함하는 RNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

(여기에서 Pr은 RNA 폴리머라아제가 인식하는 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열이며,

M 및 N은 15 내지 25nt 길이의 siRNA 서열이고,

N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N1은 M_k와 상보적인 서열이며,

K는 3≤K≤90 이하의 정수,

n={n| 1≤n≤k-1}인 정수} 이다)

청구항 21

제20항의 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 RNA 나노구조체.

청구항 22

제21항에 있어서, 활성제가 추가로 결합된 RNA 나노구조체.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 DNA 헬퍼는 3’ 말단 및 5’ 말단으로부터 각각 1개 내지 6개의 뉴클레오티드가 2’-O-메틸화된 것인 방법.

청구항 24

1) (P-제1부분-제2부분)으로 표시되는 K개의 단위 서열이 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드를 DNA 리가아제로 처리하여 상기 폴리뉴클레오티드의 5’ 말단과 3’ 말단이 연결된 하나의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 상기 원형 DNA 주형에 DNA 폴리머라아제를 처리하여 RCA(Rolling Circle Amplication)에 의하여 증폭 산물을 얻는 단계;

3) 상기 증폭산물에 형성된 제한효소 인식부위를 제한효소로 절단하여 증폭된 서열 집단을 얻는 단계; 및

4) 증폭된 서열집단의 자가조립(self assembly)을 통해 DNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 DNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

(여기에서 P는 제한효소 인식 부위를 포함하는 프라이머 결합 서열이고,

상기 폴리뉴클레오티드에서 3’ 말단에서 첫 번째에 위치하는 단위 서열을 제외한 어느 하나의 단위 서열의 제2부분은 그 단위 서열의 3’ 말단에 연결된 다른 하나의 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이며, 상기 폴리 뉴클레오티드에서 3’ 말단에서 첫 번째에 위치하는 단위 서열의 제2부분은 상기 폴리뉴클레오티드에서 5’ 말단에서 첫 번째에 위치하는 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이고,

각 단위 서열의 제1부분과 제2부분은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고,

K는 $3 \leq K \leq 90$ 이하의 정수이다.)

청구항 25

1) (P-제1부분-제2부분)으로 표시되는 K개의 단위 서열 각각을 DNA 리가아제로 처리하여 각각의 단위서열의 5’ 말단과 3’ 말단이 연결된 K 개의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 상기 각각의 원형 DNA 주형에 DNA 폴리머라아제를 처리하여 RCA(Rolling Circle Amplication)에 의하여 증폭 산물을 얻는 단계;

3) 상기 증폭 산물에 형성된 제한효소 인식부위를 제한효소로 절단하여 증폭된 K 개의 서열 집단을 얻는 단계; 및

4) 상기 K 개의 서열집단을 혼합하고, 서열 간 자가조립(self assembly)을 통해 DNA 나노 구조체를 얻는 단계; 를 포함하는 DNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

(여기에서 P는 제한효소 인식 부위를 포함하는 프라이머 결합 서열이고,

어느 하나의 단위 서열의 제2부분은 다른 하나의 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이며,

각 단위 서열의 제1부분과 제2부분은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고,

K는 $3 \leq K \leq 90$ 이하의 정수이다.)

청구항 26

1) (P-제1부분-제2부분)으로 표시되는 K개의 단위 서열을 혼합하여 서로 상보적인 부분끼리 결합하도록 하여 K개의 닉(nick)을 가지는 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 상기 DNA 주형을 DNA 리가아제로 처리하여 각각의 닉이 연결된 원형 DNA 주형을 제조하는 단계;

3) 상기 원형 DNA 주형에 DNA 폴리머라아제를 처리하여 RCA(Rolling Circle Amplication)에 의하여 증폭 산물

을 얻는 단계;

4) 상기 증폭산물에 형성된 제한효소 인식부위를 제한효소로 절단하여 증폭된 서열 집단을 얻는 단계; 및

5) 증폭된 서열집단의 자가조립(self assembly)을 통해 DNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 DNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

(여기에서 P는 제한효소 인식 부위를 포함하는 프라이머 결합 서열이고,

어느 하나의 단위 서열의 제2부분은 다른 하나의 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이며,

각 단위 서열의 제1부분과 제2부분은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고,

K는 3≤K≤90 이하의 정수이다.)

청구항 27

1) (Pr-제1부분-제2부분)으로 표시되는 K개의 단위 서열이 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드를 DNA 리가아제로 처리하여 상기 폴리뉴클레오티드의 5’ 말단과 3’ 말단이 연결된 하나의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 상기 원형 DNA 주형에 RNA 폴리머라아제를 처리하여 RCA(Rolling Circle Amplication)에 의하여 증폭 RNA 산물을 얻는 단계;

3) 상기 증폭 RNA 산물에 DNA 헬퍼(helper) 서열을 첨가하여 DNA/RNA 이중 가닥을 형성시키는 단계;

4) DNA/RNA 이중가닥을 RNase H로 절단하여, 증폭된 서열 집단을 얻는 단계; 및

5) 증폭된 서열집단의 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 RNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

(여기에서 핵산은 DNA 또는 RNA이고,

Pr은 RNA 폴리머라아제가 인식하는 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열이며,

상기 폴리뉴클레오티드에서 3’ 말단에서 첫 번째에 위치하는 단위 서열을 제외한 어느 하나의 단위 서열의 제2부분은 그 단위 서열의 3’ 말단에 연결된 다른 하나의 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이며, 상기 폴리 뉴클레오티드에서 3’ 말단에서 첫 번째에 위치하는 단위 서열의 제2부분은 상기 폴리뉴클레오티드에서 5’ 말단에서 첫 번째에 위치하는 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이고,

각 단위 서열의 제1부분과 제2부분은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고,

K는 3≤K≤90 이하의 정수이다.)

청구항 28

1) (Pr-제1부분-제2부분)으로 표시되는 K개의 단위 서열 각각을 DNA 리가아제로 처리하여 각각의 단위서열의 5’ 말단과 3’ 말단이 연결된 K 개의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 상기 각각의 원형 DNA 주형에 RNA 폴리머라아제를 처리하여 RCA(Rolling Circle Amplication)에 의하여 증폭 RNA 산물을 얻는 단계;

3) 상기 증폭 RNA 산물에 DNA 헬퍼(helper) 서열을 첨가하여 DNA/RNA 이중 가닥을 형성시키는 단계;

4) DNA/RNA 이중가닥을 RNase H로 절단하여, 증폭된 K 개의 서열 집단을 얻는 단계; 및

5) 상기 K 개의 서열집단을 혼합하고, 서열 간 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 RNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

(Pr은 RNA 폴리머라아제가 인식하는 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열이며,

어느 하나의 단위 서열의 제2부분은 다른 하나의 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이며,

각 단위 서열의 제1부분과 제2부분은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고,

K는 3≤K≤90 이하의 정수이다.)

청구항 29

1) (Pr-제1부분-제2부분)으로 표시되는 K개의 단위 서열을 혼합하여 서로 상보적인 부분끼리 결합하도록 하여 K개의 닉(nick)을 가지는 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 상기 DNA 주형을 DNA 리가아제로 처리하여 각각의 닉이 연결된 원형 DNA 주형을 제조하는 단계;

2) 상기 원형 DNA 주형에 RNA 폴리머라아제를 처리하여 RCA(Rolling Circle Amplication)에 의하여 증폭 RNA 산물을 얻는 단계;

3) 상기 증폭 RNA 산물에 DNA 헬퍼(helper) 서열을 첨가하여 DNA/RNA 이중 가닥을 형성시키는 단계;

4) DNA/RNA 이중가닥을 RNase H로 절단하여, 증폭된 서열 집단을 얻는 단계; 및

5) 증폭된 서열집단의 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 RNA 나노구조체의 대량 생산 방법.

(여기에서 Pr은 RNA 폴리머라아제가 인식하는 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열이며,

어느 하나의 단위 서열의 제2부분은 다른 하나의 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이며,

각 단위 서열의 제1부분과 제2부분은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고,

K는 3≤K≤90 이하의 정수이다.)

청구항 30

방사형으로 뻗은 K 개의 가지(branch)를 갖는 핵산 나노구조체로서,

각 가지는 이중가닥 핵산을 포함하고,

각 가지 말단에 단일가닥 핵산이 존재하는 핵산 나노구조체.

(상기 핵산은 DNA 또는 RNA이고,

각 가지는 3 내지 300 nt 길이이고,

K는 3≤K≤90 이하의 정수이다.)

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 K는 3이고,

상기 핵산 나노구조체는 Y 형태를 이루는 나노구조체.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 단일가닥 핵산의 1 내지 K개에 활성제가 결합된 나노구조체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 DNA 또는 RNA 핵산 나노구조체의 대량생산방법 및 이와 같은 방법으로 제조된 핵산 나노구조체의 약물전달체로서의 활용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생물학적 유전정보를 저장하고 전달하는 유전체로 인식되어 오던 핵산은 최근 핵산의 상보적 서열에 의한 자가조립(self assembly) 성질을 바탕으로 한 기능성 생체고분자로서의 가능성을 인정 받고 있으며, 이를 이용하여 나노크기의 정교한 구조체를 만드는 등 다양한 기술분야에서 연구가 이루어지고 있다. 이와 같이 제조되는 핵산 나노구조물은 단순히 나노구조체 자체를 제조하는데서 그치는 것이 아니라 치료분야, 의료진단, 범죄의학분야, 환경 분야 등 다양한 분야에 대한 적용가능성을 가지고 있어 그 잠재력이 매우 큰 연구 분야이다.

[0003] 게놈을 복제하기 위해 박테리오파지 파이 29에서 요구되는 단 하나의 효소는 그의 DNA 폴리머라아제로, 이는 합

성된 가닥의 복제 개시 및 신장(elongation)을 모두 촉매할 수 있는 66KDa 모노머성 단백질이다. 개시를 위하여, 이 폴리머라아제는 "말단"(TP)으로서 알려진 단백질에 결합되어, 파이 29 DNA의 말단을 인식하고 TP-dAMP 공유결합 복합체의 형성을 촉매한다. 10개의 뉴클레오티드들의 중합 후, 상기 DNA 폴라머라아제/TP 이종이합체(heterodimer)는 해리되고, DNA로부터의 가닥의 신장이 실시된다. 복제성 DNA 폴리머라아제들은 효소 및 DNA간의 결합을 안정화시키는 보조(accessory) 단백질들과의 상호작용을 필요로 한다(Kuriyan and O'Donnell. J Mol Biol. 1993; 234: 915~925). 한편, 상기 DNA 폴리머라아제들은, 헬리카제(helicase) 유형 단백질들에 기능적 연합을 요구하기 때문에 복제되지 않는 DNA 가닥의 분리시 상기 중합에 연결될 필요가 있다. 이러한 의미에서, 상기 박테리오파지 파이 29의 DNA 폴리머라아제는 그를 독특하게 만드는 다양한 고유한 기능적 특징, 즉 높은 가공성, 높은 가닥 분리능 및 높은 정확성 등을 갖는다.

[0004] 이러한 모든 특징들은, 이 폴리머라아제의 이용에 근거하여 이중가닥 DNA(dsDNA)를 증폭하는 매우 다양한 등온 과정(즉, 항온)의 프로토콜들의 개발을 이끌어왔다. 간단한 구조에서, 상기 파이 29 DNA 폴리머라아제의 원형의 단일가닥 DNA(ssDNA)를 이용하는 능력은 롤링 서클법(rolling circle method)(또는 RCA-롤링 서클 증폭)에 의한 DNA의 증폭을 가능하게 하여, 긴 길이의 단일가닥 DNA 분자들을 생산할 수 있게 한다. 그러나 이와 같은 DNA 증폭 방법에 관한 보고에도 불구하고 보다 적은 양의 핵산으로부터 출발하여 핵산을 효과적으로 증폭하고, 특히 특정한 기능성을 가지고 있는 핵산을 빠르고 정확하게 증폭하여 활용할 수 있도록 하는 기술의 개발에 대한 요구가 지속적으로 있다.

[0005] 특히 특정 질병의 경우 RNA 간섭에 의해 효과적으로 질병이 치료될 수 있다는 것이 알려지면서 암 및 다양한 유전자 질병에 대하여 siRNA를 활용하여 치료하고자 하는 시도가 있으며, 이를 효과적으로 전달하기 위한 기능을 가진 전달용도의 핵산 구조체에 대한 시도가 있다. RNA 간섭(RNAi)의 발견은 생물학과 약학의 완전히 새로운 분야의 길을 열어놓았다. 표적 유전자를 특이적으로 침묵시키는 RNAi의 능력은 기초적인 연구를 위한 새로운 도구일 뿐만 아니라 RNAi에 기반한 약들의 개발을 위한 구상을 불러일으키는 결과를 낳았다. RNAi는 서열 특이적 결합을 통해 mRNA를 표적화하여 표적 mRNA의 저하를 가져오거나 그의 번역을 억제하여서, 단백질 발현의 상실로 이어진다. 이는 소간섭 RNA(small interfering RNA)(siRNA)로 불리는 작은 19-21 bp dsRNA 분자의 도입을 통해 약학적으로 달성된다. 10년 전 이런 발견으로부터, siRNA는 암, 신경변성(neurodegenerative) 및 전염성 질병과 같은 다양한 질병의 치료에 대한 활용도에 대하여 시험관 내에서 광범위하게 연구되어왔다.

[0006] 그러나 이와 같이 siRNA를 이용하는 질병 치료방법에 있어서, siRNA의 비교적 큰 분자량(예, 13 kDa) 및 폴리음이온성 특징(예, 40 음전하의 포스페이트)에 의해 생체내에서 siRNA를 효과적으로 전달할 수 없다는 한계점이 지속적으로 문제되어 왔다. 나출(naked) siRNA는 세포막을 자유로이 통과할 수 없을 뿐만 아니라 변형되지 않은 나출 siRNA들은, 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제에 의해 신속히 분해되기 때문에 혈액 및 혈청에서 상대적으로 불안정하며, 즉 짧은 생체 내 반감기를 가진다는 문제점 또한 보고되었으며 이를 해결하기 위하여 유전자-침묵 활성에 부정적 영향을 미치지 않고 생물학적 안정도를 향상시키기 위한 화학적 변형을 RNA 이중 구조에 행하는 방법이 보고되었다. 또는 대안적으로, 세포 섭취율을 향상시킬 뿐만 아니라 생물학적 안정도를 제공하는 전달 시스템으로 제형화될 수 있다. RNA의 백본(backbone), 염기 또는 당(sugar)에 대한 몇몇 화학적 변형은 siRNA 안정도 및 활성을 향상시키도록 이용되어왔다. 그러나 이와 같은 전달 시스템에 있어서 세포 내 작용부위에 siRNA의 접근을 촉진시키는 것에 대한 필요성이 지속적으로 문제되고 있다.

[0007] 이러한 문제점을 해결하기 위하여 음으로 하전된 siRNA 뉴클레오티드와 입자들 간의 효과적인 상호작용을 보장하고 그들의 세포 내로의 진입을 촉진하기 위한 양이온성 입자를 사용하는 방법이 연구되었다. 그러나 이러한 양이온성 입자들의 전신성으로 siRNA를 전달될 경우, 세망내피계의(RES) 기관(reticuloendothelial organ)에 의한 신속한 섭취에 의해 관심 부위로 이러한 입자들의 전달이 효과적으로 일어날 수 없다는 문제점이 있는 것으로 보고되었다.

[0008] 이에 따라 siRNA를 로딩하여 전달하기 위한 나노전달체에 대한 연구가 시도되었다. 그러나 이러한 목적으로 사용된 임상적으로 관련 있는 나노캐리어의 수는 부족하고, 주된 장애들이 여전히 해결되지 못한 채 남아있으며, 특히 비경구적 경로의 투여를 통한 그들의 효과적인 전달에 대한 문제가 여전히 남아있다. siRNA는, 완전한 치료학적 잠재성을 이용하기 위해 적절한 나노캐리어의 응용이 가장 필요한 친수성 생-고분자 부류를 대표한다.

[0009] 따라서 세포 내로 소분자, 즉 약물 또는 siRNA를 효과적으로 전달하여 유전적 질병, 예컨대 암을 치료할 수 있는 방법에 대한 연구의 필요성이 여전히 있으며, 이를 효과적으로 전달하기 위한 가장 효율적인 약물 전달용 구조체에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 활성제를 세포내로 효과적으로 전달하기 위한 핵산 나노구조체에 대하여 연구하던 중, 특정 서열을 가진 DNA를 주형으로 하여 DNA 또는 RNA를 증폭시키는 경우 핵산의 자가조립성질에 의하여 DNA 또는 RNA 나노구조체를 매우 높은 효율로 증폭시켜 얻을 수 있으며 이것이 활성제 전달을 위해 사용할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 특정 단위 서열을 원형 주형으로 제조하여 단위 서열에 상보적인 서열이 반복되는 주형 DNA 증폭산물을 얻고 이의 절단 및 자가조립 과정을 통해 복제된 DNA 나노구조체를 대량으로 생산하기 위한 DNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 또한 본 발명의 목적은 상기와 같은 방법에 의하여 만들어지는 접착성 말단을 갖는 활성제 전달용 DNA 나노구조체를 제공하는 것이다.

[0013] 또한 본 발명의 목적은 복수개의 특정 단위 서열을 각각 원형 주형으로 제조하고 이를 증폭함으로써 단위 서열에 상보적인 서열이 반복되는 주형 DNA 증폭 산물을 얻고 이를 절단하고 혼합하여 자가조립시킴으로써 DNA 나노구조체를 대량 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 또한 본 발명의 목적은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 DNA 나노구조체를 제공하는 것이다.

[0015] 또한 본 발명의 목적은 복수개의 특정 단위 서열을 하나의 원형 DNA 주형으로 제조하고 이를 RNA 폴리머라아제로 전사시켜 주형 DNA 단위서열과 상보적인 서열이 반복되는 증폭 RNA 산물을 얻고, 이를 절단하고 자가조립시켜 RNA 나노구조체를 대량 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 또한 본 발명의 목적은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 RNA 나노구조체를 제공하는 것이다.

[0017] 또한 본 발명의 목적은 특정 단위 서열을 갖는 복수개의 단위 서열을 각각 복수개의 원형 DNA 주형으로 제조하고 이를 RNA 폴리머라아제로 전사시켜 주형 DNA 단위서열과 상보적인 서열이 반복되는 개별적인 증폭 RNA 산물을 얻고, 이를 절단하고 혼합시켜 자가조립시킴으로써 RNA 나노구조체를 대량 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 또한 본 발명의 목적은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 RNA 나노구조체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) $(P\text{-}M_k\text{-}N_k)$ 내지 $(P\text{-}M_{(K-n)}\text{-}N_{(K-n)})$로 표시되는 K개의 단위 서열이 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드를 DNA 리가아제로 처리하여 서열의 말단부가 연결된 원형 DNA 주형을 제조하는 단계; 2) 원형 DNA 주형에 DNA 폴리머라아제를 처리하여 단위 서열에 상보적인 서열이 반복되는 증폭 산물을 얻는 단계; 3) 증폭산물에 형성된 제한효소 인식부위를 제한효소로 절단하여 증폭된 서열 집단을 얻는 단계; 및 4) 증폭된 서열집단의 자가조립(self assembly)을 통해 DNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 DNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다 (여기에서 P는 제한효소 인식 부위를 포함하는 프라이머 결합 서열이고, M 및 N은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고, N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며, K는 $3 \leq K \leq 90$ 이하의 정수, $n=\{n \mid 1 \leq n \leq k-1\}$인 정수} 이다).

[0020] 상기 방법의 폴리뉴클레오티드에 대해 보다 구체적으로 설명하면, '$(P\text{-}M_k\text{-}N_k)$ 내지 $(P\text{-}M_{(K-n)}\text{-}N_{(K-n)})$로 표시되는 K개의 단위 서열이 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드' 에서 $(P\text{-}M_k\text{-}N_k)$, $(P\text{-}M_{(K-n)}\text{-}N_{(K-n)})$는 각각의 단위 서열을 지칭하는 것인데, 각 단위 서열은 'P(프라이머 결합 서열로서, 내부에 제한효소 인식 부위를 포함함)-제1부분-제2부분' 으로 나타낼 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드에서 3' 말단에서 첫 번째에 위치하는 단위 서열을 제외한 어느 하나의 단위 서열의 제2부분은 그 단위 서열의 3' 말단에 연결된 다른 하나의 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이며, 상기 폴리 뉴클레오티드에서 3' 말단에서 첫 번째에 위치하는 단위 서열의 제2부분은 상기 폴리뉴클레오티드에서 5' 말단에서 첫 번째에 위치하는 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이다. 상기 폴리뉴클레오티드는 K개의 단위 서열이 연결된 것이므로 'P-제1부분-제2부분' 의 구성을 갖는 단위 서열이 K개(K는 $3 \leq K \leq 90$ 이하의 정수)가 연결된 구조를 갖는 단일가닥 폴리뉴클레오티드가 될 수 있다.

[0021] 또한 상기 방법에서 '원형 DNA 주형' 에 대해 보다 구체적으로 설명하면, 상기 방법의 폴리뉴클레오티드를 DNA

리가아제로 처리하여 5’ 말단과 3’ 말단이 서로 연결된 것을 의미한다. 그런데 상기 폴리뉴클레오티드 내부에 서로 상보적인 서열부분들이 존재하기 때문에 도 2의 좌측 상단에 기재된 바와 같이 원형 내부에서 서로 상보적인 서열 부분들끼리 결합한 형태가 된다.

[0022] 또한 본 발명은 상기 DNA 폴리머라아제가 Bst DNA 폴리머라아제, 엑소뉴클레아제 마이너스, Tth DNA 폴리머라아제, 피로파지 (PyroPhage TM) 3173 DNA 폴리머라아제, BcaBEST DNA 폴리머라아제 및 파이(Phi) 29 DNA 폴리머라아제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, DNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다.

[0023] 또한 본 발명은 제한효소 인식부위가 회문구조 (palindromic)인, DNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다.

[0024] 또한 본 발명은 상기 제한효소가 BamHI, HindIII, EcoRI, EcoRII, TaqI, NotI, Sau3AI, PvuII, SmaI, HaeIII, HgaI, EcoRV, KpnI, EcoP15I, AluI, XbaI, StuI, SphI, SpeI, ScaI, SalI, SacI, KpnI, EcoP15I 및 PstI로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, DNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다.

[0025] 또한 본 발명은 상기 대량 생산 방법에 있어서 5) DNA 나노구조체에 활성제를 결합시키는 단계;를 추가적으로 포함하는 DNA 나노구조체의 대량생산방법을 제공한다.

[0026] 또한 본 발명은 DNA 나노구조체의 대량생산방법에 의하여 만들어지는 접착성 말단을 갖는 DNA 나노구조체를 제공한다.

[0027] 상기 DNA 나노구조체의 구조를 보다 자세히 설명하면 하기와 같다. 상기 DNA 나노구조체에서 어느 한 단위 서열의 제2부분은 다른 한 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이므로, 생성되는 핵산은 단위 서열의 개수와 동일한 수의 이중가닥(double-stranded) 핵산 가지가 방사형으로 뻗어 나간 형태(즉, 중앙의 한 점에서 2차원 또는 3차원상에서 사방으로 거미줄이나 바퀴살처럼 뻗어 나간 형태)를 갖게 된다. 또한 각각의 단위 서열에 존재하는 P 부분은 제조된 핵산 나노구조체의 각 가지 말단에 단일가닥 핵산으로 존재하게 되는데, 이 부분은 다른 활성제가 부착될 수 있는 점착성 말단(sticky end)으로 작용하게 된다. 이하에서 설명하는 K 개의 단위 서열 각각을 주형으로 하여 DNA 나노구조체를 제조하는 방법이나, 하나의 폴리뉴클레오티드 또는 K 개의 단위 서열 각각을 주형으로 하여 RNA 나노구조체를 제조하는 방법에 의해 제조되는 RNA 나노구조체 역시 마찬가지로 단위 서열의 개수와 동일한 수의 이중가닥 핵산 가지가 방사형으로 뻗어 나간 형태를 갖게 되고, 각각의 가지 끝에 점착성 말단으로 작용할 수 있는 단일가닥 핵산이 존재하는 구조를 갖는다.

[0028] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 K가 3인 경우, 즉 3개의 단위 서열이 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드를 이용하여 핵산 나노구조체를 생산하였을 경우, 생산된 핵산 나노구조체는 Y 형태를 이루게 된다. 상기 핵산은 DNA 또는 RNA가 될 수 있다.

[0029] 또한 본 발명은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 DNA 나노구조체를 제공한다.

[0030] 또한 본 발명은 상기 활성제가 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 소분자 및 약물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 활성제가 결합된 DNA 나노구조체를 제공한다.

[0031] 또한 본 발명은 상기 약물은 mitonafide, amonafide, 비스나프탈이미드(bisnaphthalimide), 엘립티신(Ellipticine), 9-methoxyellipticine, Ditercalinium, 다우노마이신(daunomycin), ametantrone, 미톡산트론(mitoxantrone), 독소루비신(doxorubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 에키노마이신(echinomycin), Benzimidazo[1,2-c]quinazoline 및 imidazodiquinolinium cation naphthalimides 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 항암제인, 활성제가 결합된 DNA 나노구조체를 제공한다. 또한 특히 가장 바람직한 예는 독소루비신과 아드리아마이신일 수 있다.

[0032] 또한 본 발명은 1) (P-M_k-N_k) 내지 (P-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열 각각에 DNA 리가아제를 처리하여 서열의 말단부가 연결된 K개의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계; 2) 원형 DNA 주형에 DNA 폴리머라아제를 처리하여 단위 서열에 상보적인 서열이 반복되는 증폭 산물을 얻는 단계; 3) 증폭 산물에 형성된 제한효소 인식부위를 제한효소로 절단하여 증폭된 K개의 서열 집단을 얻는 단계; 및 4) K개의 집단을 혼합하고, 서열 간 자가조립(self assembly)을 통해 DNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 DNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다 (여기에서 P는 제한효소 인식 부위를 포함하는 프라이머 결합 서열이고, M 및 N은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고, N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며, K는 $3 \leq K \leq 90$ 이하의 정수, $n=\{n \mid 1 \leq n \leq k-1\}$인 정수} 이다).

[0033] 상기 방법에 대해 보다 구체적으로 설명하면, 상기 방법은 K 개의 단위 서열이 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드

를 사용하는 것이 아니라, K 개의 단위 서열 각각을 사용하여 원형 주형을 제조한다. (P-M_k-N_k), (P-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)과 같은 각각의 단위 서열은 'P(프라이머 결합 서열로서, 내부에 제한효소 인식 부위를 포함함)-제1부분-제2부분' 으로 표시할 수 있으며, 어느 하나의 단위 서열의 제2부분은 다른 하나의 단위 서열의 제1부분과 서로 상보적이다. 이와 같이 단위 서열 각각이 원형 주형이 되는 경우에는 주형 단계에서 내부에 상보적인 결합을 형성하지 않기 때문에 DNA 폴리머라아제가 결합을 푸는데 소비되는 에너지가 상대적으로 감소하여 DNA 나노구조체가 더 높은 효율로 생성될 수 있다는 장점이 있다. 또한 경우에 따라 하나의 긴 폴리뉴클레오티드를 합성하는 것보다 짧은 단위 서열을 각각 합성하여 사용하는 것이 더욱 경제적일 수 있다는 장점도 있다.

[0034] 또한 본 발명은 (P-제1부분-제2부분)으로 표시되는 K개의 단위 서열을 혼합하여 서로 상보적인 부분끼리 결합하도록 하여 K개의 닉(nick)을 가지는 DNA 주형을 제조하는 단계;

[0035] 2) 상기 DNA 주형을 DNA 리가아제로 처리하여 각각의 닉이 연결된 원형 DNA 주형을 제조하는 단계로 원형 DNA 주형을 제조할 수도 있다. 이하의 단계는 상기에서 서술한 것과 마찬가지로 RCA를 통해 증폭하고 제한효소로 절단함으로써 수행될 수 있다.

[0036] 또한 본 발명은 5) 단계의 DNA 나노구조체에 활성제를 결합시키는 단계;를 추가적으로 포함하는 DNA 나노구조체의 대량생산방법을 제공한다.

[0037] 또한 본 발명은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 DNA 나노구조체를 제공한다.

[0038] 또한 본 발명은 상기 활성제가 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 소분자 및 약물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 활성제가 결합된 DNA 나노구조체를 제공한다.

[0039] 또한 본 발명은 1) (Pr-M_k-N_k) 내지 (Pr-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열에 DNA 리가아제를 처리하여 서열의 말단부가 연결된 하나의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계; 2) 원형 DNA 주형에 RNA 폴리머라아제를 처리하여 주형 DNA의 단위서열과 상보적인 서열이 반복되는 증폭 RNA 산물을 얻는 단계; 3) 증폭 RNA 산물에 DNA 헬퍼(helper) 서열을 첨가하여 DNA/RNA 이중 가닥을 형성시키는 단계; 4) DNA/RNA 이중가닥을 RNase H로 절단하여, 단위서열에 상보적인 서열 혼합물을 얻는 단계; 및 5) 증폭된 단위서열 상보적인 서열 혼합물 내에서 단위서열 간 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 RNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다 (여기에서 Pr은 RNA 폴리머라아제가 인식하는 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열이며, M 및 N은 15 내지 25nt 길이의 siRNA 서열이고, N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며, K는 3≤K≤90 이하의 정수, n={n| 1≤n≤k-1}인 정수} 이다).

[0040] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 DNA 헬퍼는 3' 말단 및 5' 말단으로부터 각각 1개 내지 6개의 뉴클레오티드가 2'-O-메틸화된 것일 수 있다.

[0041] 각각의 단위 서열을 의미하는 (Pr-M_k-N_k), (Pr-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)는 앞서 설명한 바와 같이 'Pr(RNA 폴리머라아제가 인식하는 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열)-제1부분-제2부분' 으로도 표현할 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 어느 한 단위 서열의 제2부분은 다른 단위서열의 제1부분과 상보적이다.

[0042] 상기에서 '(Pr-M_k-N_k) 내지 (Pr-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열에 DNA 리가아제를 처리하여 서열의 말단부가 연결된 하나의 원형 DNA 주형'에 대해 보다 구체적으로 설명하면, 단위 서열 간 상보적인 부분들끼리 서로 결합하여 K 개의 닉(nick)을 갖는 주형이 되고, 여기에 DNA 리가아제를 처리하여 닉이 서로 연결되어 하나의 원형 DNA 주형을 이룬 것을 의미한다.

[0043] 본 발명은 또한 K개의 단위 서열 각각에 DNA 리가아제를 처리하여 K 개의 원형 DNA 주형을 제조하고, 각각의 원형 DNA 주형에 대해 RCA로 증폭한 후 증폭된 서열 집단을 혼합하여 자가 조립을 통해 RNA 나노구조체를 생산하는 방법을 제공한다. K 개의 원형 DNA 주형을 제조하고 각각에 대해 RCA로 증폭하고 서열집단을 제조한다는 것 외에 구체적인 방법은 앞서 서술한 바와 같이 수행될 수 있다.

[0044] 또한 본 발명은 상기 RNA 폴리머라아제가 T7-RNA 폴리머라아제인, RNA 나노구조체의 대량생산방법을 제공한다.

[0045] 또한 본 발명은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 RNA 나노구조체를 제공한다.

[0046] 또한 본 발명은 siRNA 서열이 포함된 것을 특징으로 하는, RNA 나노구조체를 제공한다.

[0047] 또한 본 발명은 상기 RNA 나노구조체에 활성제가 추가로 결합된 RNA 나노구조체를 제공한다.

[0048] 또한 본 발명은 상기 활성제는 mitonafide, amonafide, 비스나프탈이미드(bisnaphthalimide), 엘립티신(Ellipticine), 9-methoxyellipticine, Ditercalinium, 다우노마이신(daunomycin), ametantrone, 미톡산트론(mitoxantrone), 독소루비신(doxorubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 에키노마이신(echinomycin), Benzimidazo[1,2-c]quinazoline 및 imidazodiquinolinium cation naphthalimides 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 항암제인, RNA 나노구조체를 제공한다.

[0049] 또한 본 발명은 1) (Pr-M_k-N_k) 내지 (Pr-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열 각각에 DNA 리가아제 또는 circligase 를 처리하여 K개의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계; 2) 각각의 원형 DNA 주형에 RNA 폴리머라아제를 처리하여 주형 DNA의 단위서열과 상보적인 서열이 반복되는 개별적인 증폭 RNA 산물을 얻는 단계; 3) 증폭 RNA 산물에 각각 DNA 헬퍼(helper) 서열을 첨가하여 DNA/RNA 이중 가닥을 형성시키는 단계; 및 4) DNA/RNA 이중가닥을 RNase H로 절단하여, 단위서열에 상보적인 서열 집단을 얻는 단계; 및 5) 증폭된 단일 서열 집단을 혼합시켜 서열 간 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 RNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다 (여기에서 Pr은 RNA 폴리머라아제가 인식하는 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열이며, M 및 N은 15 내지 25nt 길이의 siRNA 서열이고, N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며, K는 3≤K≤90 이하의 정수, n={n| 1≤n≤k-1}인 정수} 이다).

[0050] 각각의 단위 서열을 의미하는 (Pr-M_k-N_k), (Pr-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)는 앞서 설명한 바와 같이 'Pr-제1부분-제2부분' 으로도 표현할 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 어느 한 단위 서열의 제2부분은 다른 단위서열의 제1부분과 상보적이다.

[0051] 또한 본 발명은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 RNA 나노구조체를 제공한다.

[0052] 또한 본 발명은 상기 RNA 나노구조체에 활성제가 추가로 결합된 RNA 나노구조체를 제공한다.

발명의 효과

[0053] 본 발명의 DNA 나노구조체 또는 RNA 나노구조체의 대량 생산법에 따르면, 증폭 주형 내에 절단 위치가 존재함으로써 위치특이적 절단을 통해 원하는 핵산을 기반으로 하는 나노구조체를 높은 효율로 대량생산할 수 있고, 이를 이용하여 목적하는 활성제를 세포 내로 용이하게 전달할 수 있거나, 주형 내에 목적하는 siRNA 서열을 직접 포함하여 siRNA 전달을 할 수 있는 나노구조체를 직접 생산할 수 있으므로, 효율적인 핵산 증폭을 달성하여 핵산 나노구조체를 대량 생산하고, 활성제를 세포 내로 전달하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 돌출 점착말단에 siRNA를 로딩하여 약물 전달체로 활용하는 예시를 나타낸 도이다.

도 2는 단일가닥 DNA 주형을 통해 Y-형태 DNA 나노구조체를 증폭하는 방법을 간략하게 나타낸 도이다.

도 3은 10% PAGE를 통해 대량생산방법 각 단계에서 생성되는 산물들을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (L: DNA ladder, 1: 프라이머, 2: Y-DNA 주형, 3: 혼성화된 Y-DNA/프라이머 산물, 4: 원형 Y-DNA 주형, 5: RCA 산물, 6: 절단되고/자가조립된 산물, 7: 정제된 Y-DNA 산물)

도 4는 AFM 이미지를 이용하여 생성된 Y-형태의 나노구조체를 확인한 결과를 나타낸 도이다

(a: RCA 산물; 상단: 파이 29 DNA 폴리머라아제에 의해 증폭되어 연장된 단일가닥 DNA, 하단: 증폭된 가닥과 단일 가닥 핵산 높이 비교 결과/ b: 자가조립된 Y-형태 나노구조체; 상단: 절단/연결 과정을 거치며 분산된 나노크기의 구모양, 하단: 높이 확인을 통한 이중가닥 확인).

도 5의 a는 10% PAGE 분석을 통해 Y-형태 DNA/FA-siRNA 나노구조체를 확인한 결과를 나타낸 도이다(L: DNA ladder, 1:Y-DNA 나노구조체, 2: Y-DNA 구조체 접합 FA-siRNA의 혼성화).

도 5의 b는 GFP-KB 세포 감염을 통해 유전자 전달체의 유전자 침묵 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5의 c는 GFP-KB 세포와 Y-FA-siRNA를 배양한 후 형광현미경을 통해 유전자 침묵 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 3개의 단일가닥 DNA 주형을 통해 Y-형태 DNA 나노구조체를 증폭하는 방법을 간략하게 나타낸 도이다.

도 7은 10% PAGE 분석을 통해 대량생산방법 각 단계에서 생성되는 산물들을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (L:

DNA ladder).

도 8은 Y1 내지 Y3 혼성화를 통해 Y-형태 DNA 나노구조체의 형성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 DNA 주형의 형태와 이의 서열 모식도이다.

도 10은 단일가닥 DNA 주형을 통해 Y-형태 RNA 나노구조체를 대량생산하는 과정을 간략하게 나타낸 도이다.

도 11은 5 % PAGE 분석을 통해 대량생산방법 각 단계에서 생성되는 산물들을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (L: DNA ladder, 1: S1, 2: S1+S2, 3: Y DNA 주형(S1+S2+S3), 4: 프라이머, 5: 혼성화된 Y-DNA/프라이머 산물, 6: 원형 Y-DNA 주형, 7: RCT 산물, 8; 18nt DNA 헬퍼 혼성화 및 RNase 처리후 절단 가닥, Y-RNA 구조체)

도 12는 3개의 단일가닥 DNA 주형을 통해 Y-형태 RNA 나노구조체를 대량 생산하는 방법을 간략하게 나타낸 것이며, 도 12a는 Circligase를 이용한 방법을, 도 12b는 T4 DNA 리가아제를 이용한 방법을 나타낸 도이다.

도 13은 5 % PAGE 분석을 통해 대량생산방법 각 단계에서 생성되는 산물들을 확인한 결과를 나타낸 도이다(A: 리가아제, B: circligase).

도 14는 단일가닥 DNA 주형을 통해 Y-형태 RNA 나노구조체를 대량생산하는 과정을 간략하게 나타낸 도로서, 2'-O-메틸화된 DNA 헬퍼를 이용함을 나타낸 도이다.

도 15는 10% PAGE 분석을 통해 대량생산방법 각 단계에서 생성되는 산물들을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 16은 GFP-KB 세포와 Y-형태 RNA 나노구조체를 처리한 후 Flow Cytometry를 통해 유전자 침묵 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 본 발명은 1) (P-M_k-N_k) 내지 (P-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열이 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드를 DNA 리가아제로 처리하여 서열의 말단부가 연결된 원형 DNA 주형을 제조하는 단계; 2) 원형 DNA 주형에 DNA 폴리머라아제를 처리하여 단위 서열에 상보적인 서열이 반복되는 증폭 산물을 얻는 단계; 3) 증폭산물에 형성된 제한효소 인식부위를 제한효소로 절단하여 증폭된 서열 집단을 얻는 단계; 및 4) 증폭된 서열 집단의 자가조립(self assembly)을 통해 DNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 DNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다 (여기에서 P는 제한효소 인식 부위를 포함하는 프라이머 결합 서열이고, M 및 N은 3 내지 300nt 길이의 단일가닥 DNA 서열이고, N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며, K는 $3 \leq K \leq 90$ 이하의 정수, $n=\{n \mid 1 \leq n \leq k-1\}$인 정수} 이다).

[0056] 본 발명의 대량 생산방법에 따르면 DNA 및 RNA 나노 구조체를 높은 효율로 대량 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 나노구조체 내부에 절단서열이 존재하여 원하는 단위 서열을 간단한 방법을 통해 수득할 수 있거나 나노구조체 내부에 siRNA 서열을 자체적으로 포함함으로써 별도의 로딩 공정없이 siRNA 전달체를 높은 효율로 생산할 수 있는 우수성이 있다.

[0057] 본 발명의 "단위 서열"은 핵산의 무한 복제 또는 전사과정에서 반복적으로 나타나는 서열을 말하며, 3 내지 500nt 길이의 핵산 서열일 수 있고, 바람직하게는 9 내지 300nt, 바람직하게는 9 내지 200nt 길이의 핵산 서열일 수 있다. 또한 본 발명의 단위 서열은 이에 제한되는 것은 아니나 바람직하게는 단일가닥 폴리뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 단일가닥 DNA 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0058] 본 발명의 단위 서열은 핵산의 무한 복제 또는 전사 과정을 통해 반응을 정지시킬 때까지 무한 복제 또는 전사가 가능하며 복제 또는 전사된 주형에서 절단 과정을 통해 단위 서열 단위의 복제 서열 또는 이에 상보적인 전사 서열이 대량 얻어질 수 있다.

[0059] 상기 DNA 나노구조체의 대량 생산방법에서의 단위 서열은 "(P-M_k-N_k) 내지 (P-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)"와 같이 표현될 수 있다.

[0060] 여기에서 P는 엔도뉴클라아제(endonuclease) 제한효소 인식 부위를 포함하는 프라이머 결합 서열로서, 이와 상보적인 서열의 프라이머가 프라이머 결합 서열을 인식하고 결합함으로써 단위 서열의 3' OH 말단과 5'-인산염 말단이 서로 가깝게 위치하여 이 후 DNA 리가아제에 의하여 연결되는 것을 도울 수 있다. 이와 같은 프라이머 결합 서열의 길이는 제한효소 인식 부위를 포함하고 상기와 같은 역할을 다할 수 있다면 제한없이 사용할 수 있으나, 예시적으로 6 내지 40nt일 수 있고, 바람직하게는 12nt 내지 30nt 일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서

는 예시적인 프라이머 서열로서 'TTCAAGGCGAGGTAGCTGCAGGG(서열번호 2)'로 표시되는 프라이머가 인식하는 서열을 단위서열 내에 포함하고 있다. 상기 서열번호 2의 프라이머 서열에는 제한효소 인식 부위인 CTGCAG 서열이 포함되어 있음을 확인할 수 있다.

[0061] 상기 방법에서의 단위 서열 "(P-M_k-N_k) 내지 (P-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)"은 모든 단위 서열들이 하나로 연결된 선형 폴리뉴클레오티드 가닥의 형태인 것이 바람직하며, 본 발명의 DNA 나노구조체 제조과정에서 5' 인산염 말단과 3' OH 말단의 연결을 통해 하나로 연결된 원형의 주형을 형성할 수 있다.

[0062] 또한 상기 단위 서열의 "(P-M_k-N_k) 내지 (P-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)"에서 M과 N은 선형의 단일가닥 DNA 폴리뉴클레오티드인 것이 가장 바람직하며, M 및 N은 3 내지 300nt 길이, 바람직하게는 6 내지 200nt 길이, 더욱 바람직하게는 6 내지 100nt 길이의 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0063] P와 M, N 으로 표시되는 폴리뉴클레오티드는 당분야에 널리 알려진 바와 같이 3' 말단의 하이드록실기에 뉴클레오티드가 포스포디에스터 결합에 의하여 연결된 형태이며, 이와 같은 연결이 본 발명의 명세서에서는 예컨대 P-M_k-N_k와 같이 표현된다. 이와 같은 연결에 있어서, P, M, N의 폴리뉴클레오티드 사이에는 본 발명의 목적하는 바를 저해하지 않는한 짧은 길이의 임의의 뉴클레오티드가 또한 삽입될 수 있다.

[0064] 상기 단위 서열에서 N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이다. 예시적으로, K가 5인 경우, N_5는 M_4, N_4는 M_3와, N_3는 M_2와, N_2는 M_1과, N_1은 M_5와 상보적인 서열일 수 있으며, K가 4인 경우, N_4는 M_3와, N_3는 M_2와, N_2는 M_1과, N_1은 M_4와 상보적인 서열일 수 있음을 의미한다.

[0065] 본 발명에 있어서, "상보적인 서열"은 서로 상보적 결합을 이루는 특징을 유지할 수 있다면 100% 상보적 서열 외에 60 내지 100%의 상보적 서열, 바람직하게는 80% 내지 100% 상보적 서열, 더욱 바람직하게는 90 내지 100% 상보적 서열, 더더욱 바람직하게는 95% 내지 100%의 상보적 서열로 이루어지는 것을 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명의 일 실시예에서는 K=3 인 경우, N_3는 M_2와, N_2는 M_1과, N_1은 M_3와 상보적인 서열을 갖는 3개의 단위 서열이 서로 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드를 개시하고 있으며, 이는 서열번호 1의 159 nt 길이 폴리뉴클레오티드 서열로 표시된다.

[0067] 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열을 단위 서열로 표시하면 다음과 같이 pho-M_3-N_3-M_2-N_2-M_1-N_1로 표시될 수 있다. 즉, 단위 서열이 서로 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드는 K의 내림차순 순으로 정렬되어 하나로 연결된 폴리뉴클레오티드인 것이 바람직하다.

[0068] 이와 같이 상보적인 서열들은 5' 말단과 3' 말단의 연결에 의한 주형 DNA 제조시 상호 상보적 서열을 인식하여 결합할 수 있으며, 이를 통해 예컨대 Y 자 형태의 주형과 같은 특정한 형태를 갖는 주형이 형성될 수 있도록 할 수 있다.

[0069] 상기 "DNA 폴리머라아제"는 DNA 주형으로부터 단위 서열이 반복되는 주형 DNA 증폭 산물을 생산할 수 있는 것이면 당분야에 알려진 것을 제한없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 Bst DNA 폴리머라아제, 엑소뉴클레아제 마이너스, Tth DNA 폴리머라아제, 피로파지 (PyroPhage TM) 3173 DNA 폴리머라아제, BcaBEST DNA 폴리머라아제 및 파이(Phi) 29 DNA 폴리머라아제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 파이(Phi) 29 DNA 폴리머라아제일 수 있다. 상기 파이(Phi) 29 DNA 폴리머라아제는 원형의 단일가닥 DNA 주형을 이용하여 롤링 서클법(rolling circle method)(또는 RCA-롤링 서클 증폭)에 의한 DNA의 증폭을 가능하게 하며, 상기 단위서열이 반복되는 긴 길이의 단일 가닥 DNA 분자들을 생산할 수 있다.

[0070] 또한 본 발명에 있어서, DNA 증폭 산물에 형성되는 "제한효소 인식부위"는 회문구조 (palindromic)를 형성하는 것이 바람직하다. "회문구조"는 DNA 분자상의 염기배열이 오른쪽이나 왼쪽 어느곳에서 읽어도 구조가 동일한 것을 말한다. 이와 같은 제한효소 인식부위는 단위 서열의 프라이머 서열 내부에 포함되어 있는 제한효소 서열 부위에 의하여 증폭된 서열 내에 반복적으로 존재하게 되며, 제한효소에 의하여 인식되어 단위 서열 단위로 정확한 위치 특이적 절단을 가능하게 한다. 이와 같은 제한효소 인식부위의 존재는 제한 효소 처리만으로 간단하게 원하는 단위 서열을 얻을 수 있는 장점이 있다.

[0071] 또한 본 발명에 있어서, "제한효소"는 폴리뉴클레오티드 서열 내부의 특정 제한효소자리를 인식하고 절단하는 엔도뉴클레아제(endonuclease)인 것이 바람직하다. 또한 바람직하게는 엔도뉴클라아제 중 BamHI, HindIII, EcoRI, EcoRII, TaqI, NotI, Sau3AI, PvuII, SmaI, HaeIII, HgaI, EcoRV, KpnI, EcoP15I, AluI, XbaI, StuI,

SphI, SpeI, ScaI, SalI, SacI, KpnI, EcoP15I 및 PstI로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 본 발명에서는 바람직한 일예로서 PstI를 이용한다. 상기 엔도뉴클레아제가 인식하고 절단하는 제한효소 인식 서열은 당 분야에 공지되어 있으며, 당업자라면 용이하게 도출할 수 있다.

[0072] 상기 제한효소는 단위 서열을 반복하여 포함하고 있는 증폭된 긴 폴리뉴클레오티드 서열에서 제한효소 인식부위를 인식하여 특이적으로 절단하며, 이에 따라 단위서열 단위로 절단된 서열이 대량 수득될 수 있다. 특히 본 발명의 제한효소는 절단된 폴리뉴클레오티드 서열을 비 대칭적으로 절단하는 것이 바람직하며, 이에 따라 얻어지는 증폭된 단위 서열 집단은 각각 접착성 말단(sticky end)을 갖는 단위 서열 폴리뉴클레오티드로 이루어질 수 있다.

[0073] 또한 본 발명은 상기 대량 생산방법으로 제조된 DNA 나노구조체에 활성제를 결합시키는 단계를 추가적으로 포함하는 DNA 나노구조체의 대량생산방법을 제공한다.

[0074] 본 발명의 방법을 통해 증폭 및 절단되어 얻어지는 단위 서열 집단은 접착성 말단(sticky end)을 갖는 단위 서열 폴리뉴클레오티드로 이루어지므로, 접착성 말단 부위에 활성제를 쉽게 로딩(loading)할 수 있는 장점이 있다.

[0075] 따라서 본 발명은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제가 결합된 DNA 나노구조체를 제공한다.

[0076] 본 발명에 있어서, "활성제"는 만들어진 DNA 나노구조체에 로딩될 수 있고, 나노구조체에 의하여 세포 내로 전달됨으로써 이의 목적하는 효과를 발현할 수 있는 물질이라면 제한없이 포함가능하나, 바람직하게는 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 소분자 및 약물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 항암제, 조영제 등과 같은 약물이거나, 예컨대 mitonafide, amonafide, 비스나프탈이미드(bisnaphthalimide), 엘립티신(Ellipticine), 9-methoxyellipticine, Ditercalinium, 다우노마이신(daunomycin), ametantrone, 미톡산트론(mitoxantrone), 독소루비신(doxorubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 에키노마이신(echinomycin), Benzimidazo[1,2-c]quinazoline, imidazodiquinolinium cation naphthalimides 등과 같은 약물일 수 있고, 이와 같이 로딩되어 전달될 수 있는 활성제는 "Intercalators as Anticancer Drugs(A. Ramos 외, Current Pharmaceutical Design, 2001, 7, 1745-1780)"에 다양하게 기재되어 있으며, 이와 같이 나노구조체에 로딩가능한 약물의 예시가 전체로서 본 발명에 참조로 인용될 수 있다.

[0077] 또한 본 발명은 1) (P-M_k-N_k) 내지 (P-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열 각각에 DNA 리가아제를 처리하여 서열의 말단부가 연결된 K개의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계; 2) 원형 DNA 주형에 DNA 폴리머라아제를 처리하여 단위 서열에 상보적인 서열이 반복되는 증폭 산물을 얻는 단계; 3) 증폭 산물에 형성된 제한효소 인식부위를 제한효소로 절단하여 증폭된 K개의 서열 집단을 얻는 단계; 및 4) K개의 집단을 혼합하고, 서열 간 자가조립(self assembly)을 통해 DNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 DNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다 (여기에서 P는 제한효소 인식 부위를 포함하는 프라이머 결합 서열이고, M 및 N은 3 내지 300nt 길이의 단일 가닥 DNA 서열이고, N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며, K는 $3 \leq K \leq 90$ 이하의 정수, $n=\{n \mid 1 \leq n \leq k-1\}$인 정수} 이다).

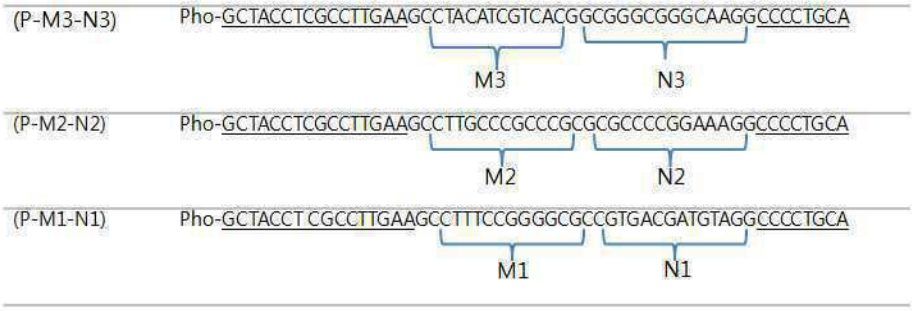
[0078] 상기 DNA 나노구조체의 대량 생산방법에서는 K개의 단위 서열을 개별적으로 K개의 원형 DNA 주형으로 제조하여 DNA 나노구조체를 대량생산함으로써, 개별 단위서열에 존재하는 상보적인 서열들이 DNA 주형 단계에서 상보적인 결합을 형성하지 않고 이에 따라 제한효소 인식부위 외에는 결합을 이루고 있는 부분이 없는 특징이 있다. 그러므로 DNA 폴리머라아제가 결합을 푸는데 소비되는 에너지가 상대적으로 감소한다는 장점이 있으며, 이에 따라 DNA 나노구조체가 더 높은 효율로 생성될 수 있다.

[0079] 상기 K 개의 단위 서열은 각각 서열의 말단부가 서열의 프라이머 인식 부위에 결합하는 프라이머 및 DNA 리가아제에 의하여 연결되어 K 개의 원형 DNA 주형으로 제조되며, 이는 개별적으로 증폭되어 단위 서열 (P-M_k-N_k) 내지 (P-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$) 가 각각의 증폭 서열 내에서 반복될 수 있다.

[0080] 본 발명에 있어서 예컨대 K가 5인 경우, (P-M_5-N_5), (P-M_4-N_4), (P-M_3-N_3), (P-M_2-N_2), (P-M_1-N_1)의 5개의 개별 단위 서열이 이용될 수 있으며 이는 개별적으로 원형의 DNA 주형을 이루어 총 5개 종류의 DNA 주형을 형성할 수 있다. 또한, K=4인 경우 (P-M_4-N_4), (P-M_3-N_3), (P-M_2-N_2), (P-M_1-N_1)의 4개의 개별 단위서열이 이용될 수 있으며, 이는 총 4개 종류의 DNA 주형을 형성할 수 있다. 따라서 각각의 단위서열들은 증폭에 의하여 총 K개의

증폭된 단위서열 상보적인 서열 집단을 형성할 수 있다.

[0081] 본 발명의 일 예에서는 K가 3 인 경우의 단위 서열들 (P-M_3-N_3), (P-M_2-N_2), (P-M_1-N_1)을 개시하고 있으며, 이는 각각 서열번호 3 내지 5에 기재하였다. 보다 구체적으로 단위 서열 서열번호 3 내지 5에서 상보적 특징으로 가진 부분을 표시하면 다음과 같다. 하기에서 확인할 수 있는 바와 같이, N_3는 M_2에, N_2는 M_1에, N_1은 M_3에 각각 상보적이다.



[0082]

[0083] 즉 본 제조방법에 따라 주형 DNA에 대한 증폭을 수행하면, 각각 p-M_3-N_3-p-M_3-N_3-p-M_3-N_3과 같이 반복되는 폴리뉴클레오티드, p-M_2-N_2-p-M_2-N_2-p-M_2-N_2 와 같이 반복되는 폴리뉴클레오티드, p-M_1-N_1-p-M_1-N_1-p-M_1-N_1과 같이 반복되는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 3개의 단위 서열에 상보적인 증폭 산물을 얻을 수 있다.

[0084] 이와 같이 얻어지는 단위 서열에 상보적인 증폭 산물은 반복되는 프라이머 인식부위를 포함하고 있으며, 여기에는 제한효소 인식부위 서열이 포함되어 있다. 따라서 본 방법에 의하여 생산되는 증폭된 폴리뉴클레오티드 서열은 폴리뉴클레오티드 서열 내부의 특정 제한효소 부위를 인식하고 절단하는 "제한효소", 바람직하게는 엔도뉴클레아제(endonuclease)에 의하여 각 단위 서열을 포함하도록 특이적으로 절단될 수 있고, 이에 따라 단위 서열에 상보적인 서열 단위로 절단된 서열이 대량 수득될 수 있다. 특히 본 발명의 제한효소는 절단된 폴리뉴클레오티드 서열을 비 대칭적으로 절단하는 것이 바람직하며, 이에 따라 얻어지는 증폭된 서열 집단은 각각 접착성 말단(sticky end)을 갖는 단위 서열에 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어질 수 있다.

[0085] 이와 같이 절단된 서열 집단을 혼합하면, 각 서열에 존재하는 상호 상보적인 서열의 존재에 의하여 폴리뉴클레오티드의 자가조립이 일어나게 되며, 이에 따라 DNA 나노 구조체가 형성될 수 있다.

[0086] 또한 본 발명은 상기 대량 생산방법에 있어서, 제조된 DNA 나노구조체에 활성제를 결합시키는 단계를 추가적으로 포함하는 DNA 나노구조체의 대량생산방법을 제공한다.

[0087] 또한 본 발명은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 DNA 나노구조체를 제공한다.

[0088] 상기 활성제는 만들어진 DNA 나노구조체에 로딩될 수 있고, 나노구조체에 의하여 세포 내로 전달됨으로써 이의 목적하는 효과를 발현할 수 있는 물질이라면 제한없이 포함가능하나, 바람직하게는 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 소분자 및 약물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 항암제, 조영제 등과 같은 약물이거나, 예컨대 mitonafide, amonafide, 비스나프탈이미드(bisnaphthalimide), 엘립티신(Ellipticine), 9-methoxyellipticine, Ditercalinium, 다우노마이신(daunomycin), ametantrone, 미톡산트론(mitoxantrone), 독소루비신(doxorubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 에키노마이신(echinomycin), Benzimidazo[1,2-c]quinazoline 및 imidazodiquinolinium cation naphthalimides 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 약물일 수 있다. 또한 특히 가장바람직한 예는 독소루비신과 아드리아마이신일 수 있다.

[0089] 또한 본 발명은 1) (Pr-M_k-N_k) 내지 (Pr-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열에 DNA 리가아제를 처리하여 서열의 말단부가 연결된 하나의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계; 2) 원형 DNA 주형에 RNA 폴리머라아제를 처리하여 주형 DNA의 단위서열과 상보적인 서열이 반복되는 증폭 RNA 산물을 얻는 단계; 3) 증폭 RNA 산물에 DNA 헬퍼(helper) 서열을 첨가하여 DNA/RNA 이중 가닥을 형성시키는 단계; 4) DNA/RNA 이중가닥을 RNase H로 절단하여, 단위서열에 상보적인 서열 혼합물을 얻는 단계; 및 5) 증폭된 단위서열 상보적인 서열 혼합물 내에서 단위서열간 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 RNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다 (여기에서 Pr은 RNA 폴리머라아제가 인식하는 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열이며, M 및 N은

15 내지 25nt 길이의 siRNA 서열이고, N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며, K는 3≤K≤90 이하의 정수, n={n| 1≤n≤k-1}인 정수} 이다)

[0090] 상기 Pr 은 RNA 폴리머라아제가 인식하는 부위이며, RNA 폴리머라아제 프로모터 서열로 구성되는 것이 바람직하다. 즉, RNA 폴리머라아제로 T-7 RNA 폴리머라아제를 사용하는 경우, Pr 부분은 T-7 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열인 것이 바람직하며, 이와 같은 RNA 합성에 사용가능한 RNA 폴리머라아제와 이의 프로모터 서열을 당 분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져 있다.

[0091] 본 발명의 일 예에서는 바람직한 RNA 폴리머라아제로 T-7 RNA 폴리머라아제를 개시하고 있으며, 이의 프로모터 서열로 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAT-3'을 개시한다. 이와 같은 서열은 본 발명의 RNA 나노구조체 대량 생산방법에 사용되는 단위 서열 내에 나누어 포함될 수 있으며, 단위 서열이 DNA 리가아제에 의해 연결되면서 완성된 서열로 구성될 수 있다.

[0092] 본 발명의 (Pr-M_k-N_k) 내지 (Pr-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열은 DNA 리가아제의 작용에 의하여 서열의 5'-인산염과 3'-OH 말단부가 연결된 하나의 원형 DNA 주형을 형성할 수 있다. 이와 같은 단위 서열의 길이는 15 내지 500nt 길이의 핵산 서열일 수 있고, 바람직하게는 20 내지 300nt, 바람직하게는 20 내지 200nt 길이의 핵산 서열일 수 있다. 또한 본 발명의 단위 서열은 이에 제한되는 것은 아니나 바람직하게는 단일가닥 폴리뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 단일가닥 DNA 폴리뉴클레오티드 일 수 있다.

[0093] 또한 본 발명의 M 및 N은 특히 15 내지 25nt 길이의 "siRNA 서열"인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 18nt 내지 25nt 길이일 수 있으며 이 길이를 벗어나는 경우 세포내로의 전달 효율 또는 정확도가 떨어질 수 있다. 즉 본 발명의 RNA 대량 생산방법에 이용되는 단위 서열은 단위 서열 내에 siRNA 서열이 포함되어 있으므로, 이를 직접적으로 전사 및 증폭하는 과정을 통해 제조된 폴리뉴클레오티드 자체에 siRNA가 포함된 구조체를 대량 생산할 수 있으며, 별도의 활성제 로딩(loading) 단계를 수행하지 않고 직접적인 siRNA 전달체로 사용할 수 있는 장점이 있다.

[0094] 상기 언급한 바와 같이, M과 N은 siRNA 서열인 것이 바람직하므로, N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이라는 언급은 N_k는 $M_{(K-1)}$ 과 서로 센스-안티센스 서열이며, N_1은 M_k와 서로 센스-안티센스 서열이라는 것을 의미한다.

[0095] 이와 같이 사용될 수 있는 M과 N은 siRNA 분자의 짧은 서열로 세포 내로 전달되었을 때 상보적인 mRNA상의 저하를 유도하여 특정 유전자의 발현을 저해시키는 것으로, 암과 같은 유전적 질병의 치료에 효과를 나타낼 수 있는 것이면 제한없이 사용할 수 있다. 이와 같은 siRNA의 예시는 EGFR-siRNA, anti-VEGF anti-GFP, anti-Luc, anti-EGF, anti-FVII, anti-ApoB 등이 있으며, 이러한 예시적인 siRNA는 당분야에 널리 알려져 있다.

[0096] 본 발명의 일예에서는 siRNA의 전사, 증폭 및 나노구조체 형성이 효과적으로 일어났는지 확인하기에 용이한 siRNA의 예시로서 RFP(red fluorescent protein), Luc(Firefly Luciferase) 및 GFP(Green fluorescent protein)에 대한 센스, 안티센스 siRNA 서열을 사용하였으며, 예컨대 Pr-M_3-N_3는 Pr- 센스RFP- 센스Luc, Pr-M_2-N_2 는 Pr- 안티센스Luc-센스GFP이고 Pr-M_1-N_1 은 Pr- 안티센스GFP- 안티센스RFP 일 수 있다.

[0097] Pr과 M, N 으로 표시되는 폴리뉴클레오티드는 당분야에 널리 알려진 바와 같이 3' 말단의 하이드록실기에 뉴클레오티드가 포스포디에스터 결합에 의하여 연결된 형태이며, 이와 같은 연결이 본 발명의 명세서에서는 예컨대 Pr-M_k-N_k와 같이 표현된다. 이와 같은 연결에 있어서, P, M, N의 폴리뉴클레오티드 사이에는 본 발명의 목적하는 바를 저해하지 않는한 짧은 길이의 임의의 뉴클레오티드 또한 삽입될 수 있으며 이는 1 내지 20nt, 바람직하게는 1 내지 15nt, 더욱 바람직하게는 1 내지 10nt 길이일 수 있다.

[0098] 따라서 본 발명의 RNA 대량생산 방법에 따르면, RNA 폴리머라아제를 처리하여 주형 DNA 단위 서열과 상보적인 서열이 반복되는 증폭 RNA 산물을 얻을 수 있으며, 이와 같은 증폭 RNA 산물은 예컨대 K가 5인 경우 pho-Pr-M_5-N_5-Pr-M_4-N_4-Pr-M_3-N_3-Pr-M_2-N_2-Pr-M_1-N_1로 표시되는 DNA 주형으로부터 상보적인 RNA 서열이 반복적으로 전사됨으로써 증폭된 긴 RNA 폴리뉴클레오티드 서열로 얻어질 수 있다.

[0099] 또한 본 발명의 단위서열 내에는 DNA/RNA 결합을 생성하는 DNA 헬퍼(helper)가 결합할 수 있는, 증폭될 RNA 가닥과 상보적인 서열이 구성으로 포함된다. 이러한 서열은 RNA 폴리머라아제에 의하여 RNA 로 전사되고, 이에 상보적인 DNA 헬퍼 서열이 결합될 수 있다. 따라서 반복적인 단위서열을 갖도록 전사된 증폭된 폴리뉴클레오티드

서열에 DNA 헬퍼를 첨가하면 DNA 헬퍼가 Pr 서열로부터 전사된 RNA 서열 내에 존재하는 특이적 인식부위에 결합할 수 있으며, 이를 통해 Pr 서열 부위 특이적으로 DNA/RNA 이중가닥이 형성된다. 본 발명의 일 예에서는 사용될 수 있는 DNA 헬퍼로 18nt 로 구성된 TAATACGACTCACTATAG를 개시하고 있으나, 전사 및 증폭된 RNA 폴리뉴클레오티드 가닥에서 Pr 서열 부위 특이적으로 DNA/RNA 이중가닥을 형성할 수 있는 것이면, 이에 제한됨 없이 사용할 수 있다.

[0100] 상기와 같이 형성된 DNA/RNA 이중 가닥은 이와 같은 이중가닥을 특이적으로 절단할 수 있는 RNase H의 타깃이 될 수 있으며, RNase H에 의하여 절단되는 경우 단위서열에 상보적인 서열의 단일가닥 폴리뉴클레오티드의 혼합물이 대량 수득될 수 있다.

[0101] 이와 같이 증폭된 단위서열에 상보적인 서열 혼합물은 단위 서열 내에 존재하는 상보적인 서열의 결합에 의하여 RNA 나노구조체로 형성될 수 있다.

[0102] 따라서 본 발명은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 RNA 나노구조체를 제공한다.

[0103] 상기 RNA 나노구조체는 siRNA 서열이 포함된 것을 특징으로 하는 RNA 나노구조체로, 전사되고 증폭된 서열 내에 siRNA 서열이 포함되어 있으므로 별도의 siRNA 로딩 없이도 세포 내로 활성제인 siRNA를 전달할 수 있는 장점이 있다.

[0104] 또한 본 발명은 상기 방법에 의하여 만들어지는 RNA 나노구조체에 활성제가 추가로 결합된 RNA 나노구조체를 제공한다.

[0105] 상기 활성제는 만들어진 RNA 나노구조체에 로딩될 수 있고, 나노구조체에 의하여 세포 내로 전달됨으로써 이의 목적하는 효과를 발현할 수 있는 물질이라면 제한없이 포함가능하나, 바람직하게는 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 소분자 및 약물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 항암제, 조영제 등과 같은 약물이거나, 예컨대 mitonafide, amonafide, 비스나프탈이미드(bisnaphthalimide), 엘립티신(Ellipticine), 9-methoxyellipticine, Ditercalinium, 다우노마이신(daunomycin), ametantrone, 미톡산트론(mitoxantrone), 독소루비신(doxorubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 에키노마이신(echinomycin), Benzimidazo[1,2-c]quinazoline 및 imidazodiquinolinium cation naphthalimides 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 항암제일 수 있다. 특히 가장 바람직한 예는 독소루비신과 아드리아마이신일 수 있다.

[0106] 또한 본 발명은 1) (Pr-M_k-N_k) 내지 (Pr-$M_{(K-n)}$-$N_{(K-n)}$)로 표시되는 K개의 단위 서열 각각에 DNA 리가아제 또는 circligase 를 처리하여 K개의 원형 DNA 주형을 제조하는 단계; 2) 각각의 원형 DNA 주형에 RNA 폴리머라아제를 처리하여 주형 DNA의 단위서열과 상보적인 서열이 반복되는 개별적인 증폭 RNA 산물을 얻는 단계; 3) 증폭 RNA 산물에 각각 DNA 헬퍼(helper) 서열을 첨가하여 DNA/RNA 이중 가닥을 형성시키는 단계; 및 4) DNA/RNA 이중가닥을 RNase H로 절단하여, 단위서열에 상보적인 서열 집단을 얻는 단계; 및 5) 증폭된 단일 서열 집단을 혼합시켜 서열 간 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노 구조체를 얻는 단계;를 포함하는 RNA 나노구조체의 대량 생산 방법을 제공한다 (여기에서 Pr은 RNA 폴리머라아제가 인식하는 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열이며, M 및 N은 15 내지 25nt 길이의 siRNA 서열이고, N_k는 $M_{(K-1)}$과 상보적인 서열이며, N_1은 M_k와 상보적인 서열이며, K는 3≤K≤90 이하의 정수, n={n| 1≤n≤k-1}인 정수} 이다).

[0107] 상기 본 발명의 RNA 나노구조체 대량 생산방법에 따르면 총 K개의 단위 서열이 개별적으로 원형의 DNA 주형을 생성할 수 있고 이는 DNA 리가아제 또는 circligase 의 처리에 의해 이루어질 수 있다.

[0108] 이와 같은 원형의 DNA 주형이 생성되면 RNA 폴리머라아제에 의하여 DNA 주형에 상보적인 RNA 서열이 RCA(Rolling circle transcription)에 의하여 무한 전사되어 증폭된 서열이 생성될 수 있으며, 예컨대 K가 3인 경우 (Pr-M_3-N_3), (P-M_2-N_2), (P-M_1-N_1)의 3개의 개별 단위 서열에 대한 상보적인 서열이 반복되는 3개의 증폭 RNA 산물이 얻어질 수 있다.

[0109] 이와 같은 증폭 RNA 산물에 각각 DNA 헬퍼 서열을 첨가하여 DNA/RNA 이중 가닥을 형성시킬 수 있으며, DNA 헬퍼 서열은 상기 증폭 RNA 산물의 헬퍼서열 인식부위에서 RNA/DNA 이중 결합을 형성할 수 있는 것이면, 제한없이 사용할 수 있다.

[0110] 상기와 같이 DNA/RNA 이중가닥이 형성되면, 이는 RNase H에 의하여 특이적인 절단이 가능하며, 이에 따라 단위서열에 상보적인 서열이 대량으로 얻어질 수 있다. 이와 같이 대량으로 얻어진 증폭된 단위서열에 상보적인 서

열을 혼합하면, 각 단위 서열 내에 존재하는 안티센스(antisense), 센스(sense) siRNA의 상보성을 이용하여 자가조립이 일어날 수 있으며, 이를 통해 RNA 나노구조체가 얻어질 수 있다.

[0111] 또한 본 발명은 상기 방법에 의하여 만들어지는 활성제 전달용 RNA 나노구조체를 제공한다. 상기 RNA 나노구조체는 siRNA 서열이 포함된 것을 특징으로 하는 RNA 나노구조체로, 전사되고 증폭된 서열 내에 siRNA 서열이 포함되어 있으므로 별도의 siRNA 로딩 없이도 세포 내로 활성제인 siRNA를 전달할 수 있는 장점이 있다.

[0112] 또한 본 발명은 상기 방법에 의하여 만들어지는 RNA 나노구조체에 활성제가 추가로 결합된 RNA 나노구조체를 제공한다.

[0113] 상기 활성제는 만들어진 RNA 나노구조체에 로딩될 수 있고, 나노구조체에 의하여 세포 내로 전달됨으로써 이의 목적하는 효과를 발현할 수 있는 물질이라면 제한없이 포함가능하나, 바람직하게는 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 소분자 및 약물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 siRNA 및 이의 화학적 유도체, 항암제, 조영제 등과 같은 약물이거나, 예컨대 mitonafide, amonafide, 비스나프탈이미드(bisnaphthalimide), 엘립티신(Ellipticine), 9-methoxyellipticine, Ditercalinium, 다우노마이신(daunomycin), ametantrone, 미톡산트론(mitoxantrone), 독소루비신(doxorubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 에키노마이신(echinomycin), Benzimidazo[1,2-c]quinazoline 및 imidazodiquinolinium cation naphthalimides 로 이루어진 군에서 선택된 1종이상의 항암제일 수 있다. 또한 특히 가장 바람직한 예는 독소루비신과 아드리아마이신일 수 있다.

[0114] 본 발명에 따른 "DNA 나노구조체" 및 "RNA 나노구조체"는 서열에 활성제, 바람직하게는 siRNA와 같은 활성제를 서열에 직접적으로 로딩하거나, 서열 내에 자체적으로 포함함으로써 세포 내로 활성물질을 효과적으로 전달할 수 있다.

[0115] 또한 본 발명은 상기와 같이 제조된 DNA 나노구조체에 활성제를 로딩시켜 체내 또는 세포 내로 전달하는 방법을 제공한다.

[0116] 또한 본 발명은 상기와 같이 제조된 RNA 나노구조체를 체내 또는 세포 내로 전달하는 방법을 제공한다.

[0117] 본 발명에 따른 체내 또는 세포 내 전달에 따라 활성제, 바람직하게는 siRNA 가 세포 내로 효과적으로 전달될 수 있으며, 표적 유전자를 침묵시킴으로써 질병의 치료와 같은 목적을 달성할 수 있다.

[0118] 이상 본 명세서에 기재된 수치값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0119] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0120] **실시예 1. DNA 나노구조체 대량 생산방법 1 및 활용**

[0121] **1.1 원형 DNA 주형가닥의 제조**

[0122] 주형으로 사용되는 DNA 단일 가닥의 서열을 서열번호 1에 나타내었다. 주형 DNA 가닥은 159개의 뉴클레오티드로 이루어져 있으며, 원형 형태로 연결되기 위하여 5' 말단에 인산기를 3' 말단에 OH기를 가지고 있다. 주형 DNA 가닥은 프라이머가 인식할 수 있는 프라이머 결합서열과 제한효소 인식부위를 각각 포함한다. 보다 구체적으로 서열번호 1에서 프라이머가 인식하는 서열 및 pstI 제한 효소가 인식하는 자리를 하기 표 1에 나타내었다.

[0123] [표 1]

[0124]

가닥	서열 (5'→ 3')
159 nt Y-DNA	Pho-GCTACCTCGCCTTGAAGCCTACATCGTCACGGCGGGCGGGCAAGGCCCCTGCAGC TACCTCGCCTTGAAGCCTTGCCCGCCCGCGCGCCCCGGAAAGGCCCCTGCAGCTACCT CGCCTTGAAGCCTTTCCGGGGCGCCGTGACGATGTAGGCCCCTGCA

[0125] 상기 표 1에서 밑줄 친 부위는 프라이머가 결합하는 위치로 총 3개의 프라이머가 결합될 수 있고, pstI 제한 효소가 인식하는 자리는 회색 음영으로 나타냈었다. 선형의 DNA 주형을 원형 DNA 주형으로 만들기 위하여, DNA 주형 40pmole 과 프라이머(서열번호 2) 120pmol을 36㎕ 1x 반응 완충액 (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 및 1 mM ATP) 상에서 (thermal cycler(Bio- Rad, T100TM)을 이용하여 -1.5℃/s의 속도로 95℃

(5분)에서 10℃까지 온도를 감소시켜 혼성화 시켜주었다. 그 후 4㎕의 T4 DNA 리가아제(New England Biolabs, NEB)를 400 U/㎕ 첨가하고 20℃에서 12시간 동안 배양시켜 단일가닥 DNA 주형을 원형 주형으로 만들어 주었으며, 이는 프라이머에 의해 인접하게 된 5' 말단의 인산기와 3' 말단의 OH기가 이인산에스테르기를 형성하면서 일어난다. 이 후 0℃에서 10분간 열을 가하여 효소를 불활성화하는 과정을 수행하였으며, 이 과정을 통해 생성된 생성물을 주형으로 하여 핵산무한복제 반응에 사용하였다.

[0126] **1.2 원형 DNA 주형가닥을 이용한 핵산 무한복제**

[0127] 상기 1.1에서 제조된 5 ㎕ 원형 DNA 주형가닥을 4 ㎕ 10x 반응 완충액 (400 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM KCl, 100 mM $MgCl_2$, 50 mM $(NH_4)_2SO_4$, 및 40 mM DTT), 25 ㎕ 25 mM dNTPs, 3 ㎕ DEPC-처리된 탈이온수 그리고 3 ㎕ RepliPHITM 파이29(phi29) DNA 폴리머라아제 (100 U/㎕) (Epicentre Technologies Corporation, Madison)와 혼합하였다. 이 혼합물을 30℃에서 18시간 동안 배양하면서 효소가 원형 DNA 주형가닥으로부터 상보적인 DNA가닥을 무한 복제시킬 수 있도록 하였다. 증폭은 각 프라이머의 3' 말단에서부터 일어나며 DNA 주형과 상보적인 단위가 반복된다. 그 후 80℃ 조건에서 20분 동안 열을 가하여 반응을 종결시켰다.

[0128] **1.3 위치 특이적 절단 및 자가조립을 이용한 DNA 나노 구조체의 제조**

[0129] 상기 1.2의 증폭 공정을 통해 생산된 합성된 DNA 가닥에서 원하는 가닥을 얻기 위하여 위치 특이적 절단을 수행하였다. 위치 특이적 절단은 복제된 DNA 서열 내에 존재하는 제한부위를 제한효소가 인식하여 절단하도록 함으로써 수행하였으며, 보다 구체적으로 다음과 같다. 합성된 DNA 가닥(40 ㎕)을 8 ㎕ 10X NEBuffer 3 (500 mM Tris-HCl (pH 7.9), 100 mM $MgCl_2$, 1000 mM NaCl, 및 10 mM DTT), 2 ㎕ DEPC-처리된 탈이온수와 30 ㎕ PstI 제한효소 (30 U/㎕)에 혼합한 후 37℃에서 15시간 동안 배양하였다. 증폭된 가닥 내 또는 가닥 사이에는 DNA 주형에 삽입되어 있었던 제한위치가 회문구조 (palindromic)를 형성하여 존재하고 있으며, 이와 같은 제한위치인 5'-CTGCAG-3' 를 PstI 제한효소가 인식하여 절단하여 3개의 가닥으로 구성된 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 가닥 집단을 생성시켰다. 이와 같은 PstI 제한효소 인식에 의하여 별도의 헬퍼 가닥(helper strand)를 추가해주지 않아도 절단이 용이하게 일어날 수 있다. 그 후 95℃에서 10분간 열을 가하여 효소를 불활성화 시켰으며, -0.5℃/분 속도로 95℃에서 10℃로 온도를 점차적으로 감소시킴으로써 절단된 가닥들이 자가 조립을 통해 20nt 길이의 돌출 점착말단(5'-overhang sticky end)를 갖는 Y 형태의 DNA 나노 구조체로 형성될 수 있도록 하였다. 이와 같은 돌출 점착 말단을 갖는 DNA 나노구조체는 해당 노출 서열 부위에 상보적인 서열과 전달 물질 컨쥬게이트를 로딩할 수 있는 장점이 있으므로, siRNA 와 같은 약물의 전달에 유용하게 사용될 수 있다. 이와 같은 활용에 관한 예시를 도 1에 나타내었다.

[0130] 상기와 같은 DNA 나노 구조체 제조 방법을 도 2 에 간략하게 도식화하였다.

[0131] **1.4 제조된 Y 형태 DNA 나노구조체의 정제 및 확인**

[0132] 생성된 Y 형태의 DNA 나노구조체 정제를 위하여, Y 형태 DNA 나노구조체(80 ㎕)에 25 ㎕ 10x 로딩 염색약을 넣은 후 1 X Tris-borate-EDTA (TBE) 완충액 10% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)의 10개 웰에 10.5 ㎕씩 로딩하였다. 150V 30분 동안 겔에 내려준 뒤 SYBR® Gold (Invitrogen)로 염색하여 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 겔 이미지를 확인하였다. 이미지에서 Y-형태 DNA 나노구조체 밴드 위치와 일치하는 겔 부분만 잘라내어 2x2mm 정도의 작은 크기로 겔을 나눠주었다. 50 mL 튜브에 겔 조각과 2 ml 1X 인산염완충액 (PBS)을 넣어 겔조각이 잠기게 하고 오븐(Thelco Laboratory oven, Precision Scientific)에서 55℃에서 48시간 정도 방치하여 겔 내의 Y-형태 DNA 나노구조체가 1x PBS상으로 확산되도록 하였다. 3,000 mw 원심분리필터(Amicon® Ulatra, Ultracel ®-3k)에 용출 용액을 500 ㎕씩 담고 4℃에서 13500 rpm으로 25분 동안 원심분리(eppendorf, centrifuge 5415 R)하면 Y-DNA 나노구조체는 필터 안에 남고, 1x PBS용매는 필터 밖으로 빠져나가 약 60 ㎕로 농축된다. 같은 원심분리 필터 내에서 용출 용액을 모두 원심분리하고 최종적으로 남은 60 ㎕을 교반 (GILSON®, GVLab®)하여 1.5ml ep 튜브에 뒤집어서 꼽고 원심분리하였다(Cole-Parmer, Personal Microcentrifuge). 최대한 많은 Y-형태 DNA 나노구조체를 얻기 위해서 한번 용출한 겔에 2 ml 1x PBS를 다시 담아 용출과 농축단계를 한번 더 진행하였다.

[0133] 모든 생성물은 상온에서 1 X Tris-borate-EDTA (TBE) 완충액 10 % PAGE를 통해 확인되었으며, 겔을 SYBR® Gold (Invitrogen)로 염색하고 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 겔 이미지를 얻었다.

[0134] 결과를 도 3 에 나타내었다.

[0135] 도 3에 나타낸 바와 같이, 10% PAGE 분석 결과 반응 각 단계에서 DNA 합성 및 증폭이 일어나며, 최종적으로 Y

형태의 DNA 나노구조체가 형성되는 것이 확인되었다. 레인(lane) 3에서는 Y-DNA/프라이머 혼성화 산물이 확인되며, 레인 4에서는 형성된 원형 DNA 주형에 의하여 밴드의 위치가 위쪽으로 이동하고, 레인 5에서는 증폭이 이루어진 결과 가닥들이 겔을 빠져나오지 못하고 웰에 걸려있는 것을 알 수 있다. 레인 6에서는 절단된/자가조립 산물이 확인되며, 이러한 밴드 중 특히 2번 레인의 Y-DNA 주형가닥과 비슷한 위치에 위치하는 밴드가 목적으로 하는 Y 형태의 증폭된 DNA 인 것으로 확인되었다.

[0136] 또한 자가 조립된 Y 형태의 나노 구조체의 형태를 분석하기 위하여 AFM 이미지 및 선택 분석을 수행하였다. 1 μL AFM 샘플 (1 μM)을 30 μL 완충액 (40 mM HEPES-HCl (pH 7) 및 10 mM $NiCl_2$)에 용해시키고 mica(Pelco Mica sheets, Ted Pella Corp.)를 얇게 1장 떼어서 그 위에 떨어뜨려주었다. 30분 배양 후 mica 표면을 DEPC-처리된 탈 이온수(DW)로 씻어준 후 질소 가스로 즉시 건조시켰다. 그 후 Park NX-10 ADM(Park Systems Corp. Korea)의 non-contact mod에서 NC-NCH tip(Park Systems Corp. Korea)을 이용하여 이미지를 얻었다.

[0137] 결과를 도 4에 나타내었다.

[0138] 도 4에 나타낸 바와 같이, AFM 이미지 및 선택 분석 상에서 길게 증폭된 단일 가닥 DNA 증폭 산물과 자가 조립된 Y-형태의 나노구조체가 모두 분명하게 확인되었으며, 본 방법에 따른 증폭 방법에 따라 Y-형태의 나노구조체가 형성되었음을 시각적으로 확인하였다. 도 4의 a 는 파이 29 DNA 폴리머라아제에 의하여 증폭된 산물을 나타내며, 이와 같은 증폭된 가닥의 높이가 약 0.45nm 로 나타나 증폭 산물이 단일 가닥임을 확인하였다. 또한 도 4의 b는 증폭된 산물의 절단 및 자가조립에 의하여 형성된 Y 형태 DNA 나노구조체에 관한 것으로 분산된 나노크기의 구의 모양이 관찰되었고 측정된 높이가 약 1.04nm 로 나타나 단일 가닥의 약 2배 높이인 유전체, 즉 이중 가닥 핵산 구조가 형성되었음이 확인되었다.

[0139] **1.5. 증폭지수와 Y 형태 나노구조체 생성지수 확인**

[0140] 상기 1.2의 방법으로 증폭된 가닥을 에탄올 침전에 의해 얻었다. 보다 구체적으로 에탄올 침전 방법은 다음과 같다. PCR 튜브에 있는 증폭된 가닥 (40 μL)을 1.7ml ep 튜브에 옮겨 담고 여기에 100 μL 100% 에탄올과 200 μL 5M 아세트산 암모늄(ammonium acetate)을 추가한 후 냉동고(-5 ℃)에서 10분간 방치하였다. 그 후 원심분리기(Eppendorf, 5415 R)를 사용하여 4 ℃에서 15000rpm으로 15분간 원심분리 하면 바닥에 가라앉은 침전(pallet)이 확인된다. 이 침전을 제외한 상층액을 제거하고 500 μL 70% 에탄올을 넣어준 다음 섞어주지 않고 바로 4 ℃에서 15000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 침전을 제외한 상층액을 제거하고 질소로 살살 퍼지(purge)를 해주어 에탄올을 날려 증폭된 DNA 침전을 완전히 말려주었다.

[0141] 얻어진 침전을 40 μL DEPC-처리된 DW에 녹였다. 이 용액의 1 μL을 50배로 희석시킨 후 1 cm path length에서 OD260을 측정한 결과 3.78으로 나타났다. Y-형태 DNA 주형의 흡광계수(extinction coefficient) 값은 1,414,900 L/mole·cm 로, Beer-Lamber 법에 근거하여 증폭된 산물의 농도는 다음과 같이 계산된다. OD260 (3.78)/Ext.Coefficient (1,414,900 L/mole·cm) x path length (1 cm) = 2.67 μM. 최종적으로 증폭된 산물의 양은 5340 pmol (2.67 μM x 50 x 40 μL)이었다.

[0142] 즉, 5 pmole DNA 주형으로부터 1068배의 상보적인 DNA 가닥이 증폭되었음이 확인되며, 이의 증폭지수는 1068 이었다. 자가조립 된 Y-형태 DNA의 수율을 정량화하기 위해서 5340 pmole 증폭산물을 이용하여 80 ℃ 에서 절단/자가조립 과정을 수행하였다. 1 μL (66.75 pmole)를 10% PAGE로 내렸을 때, Image Lab software (Bio-Rad)에서 Y-형태 DNA로 예상되는 밴드의 강도가 19.2%로 측정되었다. 5 pmole Y-형태 DNA 주형으로부터 Y-형태 DNA 나노구조체의 최종생산량은 1125.28 pmole (66.75 pmole x 0.214 x 80)였다. 따라서 이의 생성지수는 205.1 이었다.

[0143] 상기와 같이, DNA 주형으로부터 증폭시수 1068, 생성지수 205.1 의 DNA 가 합성되었으며, 이를 통해 본원 발명의 DNA 증폭 방법이 빠른 속도로 다량의 DNA를 합성하는데 매우 효과적인 방법임을 확인하였다.

[0144] **1.6 제조된 Y-형태 DNA 나노구조체의 활용- Y-형태 DNA/FA-siRNA 나노구조체**

[0145] 상기 실시예 1.1 내지 1.4를 통해 제조된 정제된 Y-형태 DNA 나노구조체와 siRNA-FA 컨쥬게이트를 결합하여 유전자침묵 효과를 확인하였다. siRNA-FA 컨쥬게이트는 "Ligand-Targeted Delivery of Small Interfering RNAs to Malignant Cells and Tissues(Oligonucleotide Therapeutics: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1175: 32-39 (2009), Mini Thomas 외)"의 방법을 참고하여 제작하였다. 사용된 siRNA는 센스 GFP 및 안티센스 GFP siRNA로 각각의 서열은 다음과 같다.

[0146] -안티센스GFP siRNA:

[0147] rArArGrUrCrGrUrGrCrUrGrCrUrUrCrArUrGrUTTTGCAGCTACCTCGCCTTGAA

[0148] -센스 GFP siRNA : rArCrArUrGrArArGrCrArGrCrArCrGrArCrUrUTT

[0149] 제작된 siRNA-FA 컨쥬게이트를 Y-형태 DNA 나노구조체와 siRNA-FA 컨쥬게이트=1:3 몰비율로 넣고 1X phosphate buffered saline (PBS)상에서 상온에서 2시간동안 방치하여 Y-형태 DNA 나노구조체의 돌출 점착말단에 FA-siRNA가 결합된 Y-형태 DNA/FA-siRNA 나노구조체를 제조하였다. 제조된 Y-형태 DNA/FA-siRNA 나노구조체가 siRNA를 효과적으로 전달하는 전달체 역할을 수행할 수 있는 지 확인하기 위하여, 이의 유전자 침묵효과를 다음과 같이 확인하였다.

[0150] GFP-과발현 KB세포(GFP-KB 세포)에 엽산 수용체(folic acid repceptor)를 과발현 시키기 위해서 최소 일주일 동안 엽산(folic acid)이 없는 RPMI 배지 (10 % FBS, 1 % Glutamax)에서 배양시켰다. 유전자 침묵효과 확인을 위해서 GFP-KB 세포를 6-웰 배양 플레이트에 3.0 x 10^5cells/well의 농도로 깔았다. 24시간 배양 후, 10% 혈청이 있는 일반 성장 배지에 Y-형태 나노구조체에 siRNA가 결합된 Y-형태 DNA/FA-siRNA 나노구조체 샘플을 siRNA 기준으로 50 과 100 nM으로 24시간 동안 세포에 처리하였다. GFP-KB 세포의 GFP발현정도는 FACSCalibur system (BD biosciences)으로 측정하였고, GFP 유전자 침묵효과는 flowJo 프로그램을 사용하여 분석하였다. 아무것도 처리하지 않은 세포(음성 대조군)와 Y-형태 DNA/FA-siRNA 나노구조체 (100nM)을 처리한 세포의 형광이미지는 Zeiss Axiovert 200 microscope (Carl Zeiss)으로 얻었다.

[0151] 결과를 도 5에 나타내었다.

[0152] 도 5의 a 에서 확인되는 바와 같이, 10% PAGE 분석에 의하여 레인 1에서 Y-형태 DNA 나노구조체를, 레인 2에서 혼성화된 Y-형태 DNA/FA-siRNA 나노구조체가 확인되었다. 또한 도 5의 b 및 C 에서 확인할 수 있는 바와 같이, GFP-KB 세포 감염을 통한 실험에서 Y-형태 DNA 나노구조체가 없는 엽산-siRNA 만을 100nM 전달시킨 실험군은 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군과 차이가 없었으나, 엽산-siRNA 컨주게이트를 로딩시킨 Y-형태 DNA/FA-siRNA 나노구조체는 siRNA 기준 50nM에서 25%, 100nM에서 40% 정도 농도 의존적인 형광 감소가 관찰되었다. 이는 Y-형태 DNA/FA-siRNA 나노구조체에서 Y-형태 DNA 나노 구조체가 엽산의 위치 밀도(local density)를 증가시켜 세포 표면의 엽산 수용체와의 상호작용을 증가시킴으로써 세포 내로의 siRNA 전달을 촉진시키기 때문인 것으로 생각되었다. 상기와 같은 결과에 따라 본 발명에서 제조된 Y 형태의 DNA 나노구조체는 증폭공정에 따라서 형성되는 돌출 점착말단에 의하여 siRNA와 같은 전달 표적물질을 로딩시킬 수 있고, 이를 통해 세포 내로 표적물질을 효과적으로 전달하는데 매우 유용하게 사용될 수 있음이 확인되었다.

[0153] **실시예 2. DNA 나노구조체 대량 생산방법 2.**

[0154] 상기 실시예 1의 Y-DNA 나노구조체 증폭 방법을 일부 변형하여 DNA 증폭을 통한 Y-DNA 나노구조체를 제조하였다. 실시예 1과 달리 증폭을 위한 DNA 주형으로 하나의 단일 가닥 DNA가 아닌 총 3개로 나누어진 DNA 가닥, 즉 하기 Y1, Y2, Y3 를 주형으로 사용하였으며, 사용된 주형의 서열정보는 다음과 같다. 또한 각각의 주형가닥을 서열번호 3 내지 5에 표시하였다.

[0155] [표 2]

[0156]

가닥	서열 (5'→ 3')
53 nt Y_1 DNA	Pho-GCTACCTCGCCTTGAAGCCTACATCGTCACGGCGGGCGGGCAAGGCCCCTGCA
53 nt Y_2 DNA	Pho-GCTACCTCGCCTTGAAGCCTTGCCCGCCCGCGCGCCCCGGAAAGGCCCCTGCA
53 nt Y_3 DNA	Pho-GCTACCT CGCCTTGAAGCCTTTCCGGGGCGCCGTGACGATGTAGGCCCCTGCA

[0157] 상기 서열 중 프라이머 결합 부위는 밑줄로 표시하였으며, pstI 제한효소 인식 서열은 음영으로 표시하였다. 상기에서 확인할 수 있는 바와 같이 각각의 DNA 주형 서열 Y1 내지 Y3은 제한효소 인식자리를 서열 내에 포함한다.

[0158] 상기 3개의 주형가닥을 각각 별개의 튜브에서 실시예 1과 동일한 방법으로 증폭을 수행하였다. 즉, 각각의 서열에 대하여 서열번호 2 프라이머를 혼성화한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 T4 DNA 리가아제를 이용하여 원형의 주형으로 만들어 주었다. 이 후, 실시예 1.2와 동일한 시약, 조건을 이용한 방법에 따라 파이 29 DNA 폴리머라아제를 이용한 증폭을 수행하였다. 각 프라이머의 3' 말단으로부터 DNA 가 증폭되어 Y-DNA 주형과 상보적인 단위가 반복되는 증폭 산물이 생성되었으며, 이 때 증폭된 가닥 내, 가닥 사이에는 DNA 주형에 삽입되어 있었던 제한위치가 회문구조 (palindromic)(5'-CTGCAG-3')를 형성한다.

[0159] 이와 같이 형성된 회문구조를 인식하여 절단하는 과정을 상기 실시예 1.3과 동일한 방법으로 수행하였다. pstI가 제한효소인식 부위를 인식하여 절단함으로써 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 집단이 각각의 튜브에서 생성되었고 이는 Y1, Y2, Y3 주형 서열 각각에 대한 폴리뉴클레오티드 집단이다. 따라서 실시예 1의 방법과 달리, 증폭 생성된 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 사이에 자가조립되는 과정이 없이 생성된 Y1, Y2, Y3 폴리뉴클레오티드 집단을 실시예 1.4와 같은 방법으로 정제하였다. 이 후 얻어진 3개의 폴리뉴클레오티드들을 같은 몰 농도로 혼합한 후, 혼성화 과정을 거쳐서 최종적으로 20nt 돌출 점착말단을 갖는 Y-형태의 DNA 나노 구조체를 얻었다. 이와 같은 DNA 증폭을 통한 Y-형태 DNA 나노구조체 제조 방법을 도 6에 간략하게 도시하였다.

[0160] 이와 같은 3개의 주형을 이용한 증폭 방법은 원형 주형 내에 PstI 인식부위 외에 추가적으로 서열간 결합을 형성하는 부분이 없으므로 파이 29 폴리머라아제에 의한 증폭 과정에서의 에너지 소비가 감소하므로 핵산 증폭 효율을 더욱 개선할 수 있으므로 Y-형태 DNA 나노구조체의 제조 효율을 최종적으로 증가시킬 수 있다.

[0161] ***2.2 제조된 Y 형태 DNA 나노구조체의 확인**

[0162] 2.1의 방법으로 증폭되어 제조된 Y형태 DNA 나노구조체가 실제로 반응산물을 형성하는지 여부를 확인하기 위하여 실시예 1과 동일하게 10% PAGE 분석을 수행하였다.

[0163] 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0164] 도 7 에 나타낸 바와 같이, 단일 가닥 DNA 주형인 Y1, Y2, Y3에서 반응이 진행되면서 원형의 DNA가 형성되는 것이 밴드로 확인되었으며, 증폭과 절단 단계에서 모두 밴드의 변화가 관찰되었다. 절단 과정 이후에는 단일 가닥 DNA 주형과 비슷한 위치에 형성되는 밴드가 나타나는 것을 통해 주형과 동일한 DNA 가 증폭되었음을 알 수 있었다. 도 7에서 확인되는 단일 가닥 DNA 주형과 비슷한 위치에 형성되는 증폭 산물을 정제하여 Y1, Y2, Y3를 혼성화시킨 후 실제로 Y-형태 DNA 나노 구조체가 형성되는지 확인한 도 8의 결과에서도 Y1+Y2, Y2+Y3, Y1+Y3, Y1+Y2+Y3로 혼성화된 Y자 형태의 나노구조체의 밴드가 확인되었다. 특히 Y1+Y2+Y3로 혼성화된 Y 형태 DNA 나노구조체를 나타내는 밴드의 위치는 앞서 실시예 1에서 확인한 단일 가닥 DNA 주형 및 이를 증폭한 자가조립 Y 형태 나노구조체의 밴드 위치와 동일하므로 모두 같은 서열의 주형 또는 증폭 DNA를 가지고 있다는 것을 확인하였다. 상기와 같은 결과를 통해, 실시예 2.1의 방법에 따라 표적 핵산의 증폭이 효과적으로 일어났음을 알 수 있었다.

[0165] **실시예 3. RNA 나노구조체 대량 생산방법 1**

[0166] **3.1 원형 DNA 주형 가닥의 준비**

[0167] RNA를 대량 생산하기 위하여 주형으로 68nt 단위의 S1, S2, S3 가닥을 사용하였다. 구체적인 DNA 단위 서열은 다음의 표 3과 같다.

[0168] [표 3]

[0169]

가닥	서열 (5'→ 3')
68 nt S1 (R-L)	Pho-CTATAGGGATTGTAGATGGACTTGAACTCTTCGTGAAAACGCTGGGCGTTAATCAATAATACGACTCA
68 nt S2 (L'-G)	Pho-CTATAGGGATTTGATTAACGCCCAGCGTTTTCACAAAACATGAAGCAGCACGACTTTAATACGACTCA
68 nt S3 (G'-R')	Pho-CTATAGGGATAAGTCGTGCTGCTTCATGTTTTGCGAAGAGTTCAAGTCCATCTACATAATACGACTCA

[0170] (R: 센스-RFP, R'-안티센스-RFP, L: 센스-Luc, L':안티센스-Luc, G: 센스-GFP, G'-안티센스-GFP, Pho: 인산기)

[0171] 상기 서열 S1, S2, S3는 각각 서열번호 6 내지 8 에 나타내었으며, 프라이머가 결합하는 위치를 밑줄로 표시하고, 18nt DNA 헬퍼(helper)가 인식하여 결합하는 증폭된 RNA 가닥 서열과 상보적인 서열을 음영으로 표시하였다. 사용한 주형 중 S1은 센스-RFP(R), 센스-Luc,(L)를, S2는 안티센스-Lu(L')과 센스-GFP(G) 그리고 S3는 안티센스-GFP(G') 및 안티센스-RFP(R')를 지표서열로 포함하고 있다. 이와 같은 지표서열의 서열은 하기 표 4와 같다.

[0172] [표 4]

가닥	서열 (5'→ 3')	
루시퍼라아제	센스	rArArCrGrCrUrGrGrGrCrGrUrUrArArUrCrArA
	안티센스	rUrUrGrArUrUrArArCrGrCrCrCrArGrCrGrUrU
GFP	센스	rArCrArUrGrArArGrCrArGrCrArCrGrArCrUrU
	안티센스	rArArGrUrCrGrUrGrCrUrGrCrUrUrCrArUrGrU
RFP	센스	rUrGrUrArGrArUrGrGrArCrUrUrGrArArCrUrC
	안티센스	rGrArGrUrUrCrArArGrUrCrCrArUrCrUrArCrA

r: 리보뉴클레오티드 서열

[0173]

[0174] 증폭을 위한 DNA 주형은 세 개의 S1, S2, S3 가닥이 서로 혼성화가 되어 헤어핀 루프(hairpin Loop) 구조를 이루도록 하며, 주형의 구체적인 형태와 이의 서열모식도를 도 9에 나타내었다. 도 9에 나타낸 바와 같이 주형으로 사용되는 DNA 주형은 3개의 절단부(Nick)을 가지고 있으며, 여기에는 T4 DNA 리가아제에 의하여 원형을 형성하며 연결될 수 있도록 5' 인산, 3'-OH 말단이 존재한다. 또한 형성되는 루프 부분에는 T7 프로모터 서열이 위치될 수 있도록 하였으며, 3개의 팔(arm)부분에는 각각 siRNA 서열이 위치하여 별도의 siRNA 로딩없이 증폭 형성되는 구조체 자체가 siRNA 전달체로서 기능할 수 있도록 설계하였다. 구체적인 이의 제조 과정은 다음과 같다. 먼저 5' 끝에 인산기가 있는 3개의 68nt 단일가닥 주형 DNA S1,S2,S3 20pmole과 프라이머 30 pmole을 2 μL 10x Buffer for T4 DNA Ligase with 10 mM ATP (500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 및 10 mM ATP) 그리고 13 μL DEPC-처리된 탈이온수 (DW)상에서 thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 -1.0℃/s의 속도로 95℃ (2분)에서 10℃까지 온도를 감소시켜, 주형가닥 3개와 프라이머를 혼성화시킨다. 혼성화 후 1μL의 T4 DNA 리가아제 (400 U/μL)를 첨가하여 thermal cycler 내에서 25℃에서 1시간 동안 배양(incubation) 하여 선형의 주형 DNA를 원형으로 만든다. 65℃에서 10분간 열을 가하여 효소를 불활성화하여 단계를 마치고 이 생성물을 다음의 핵산무한복제 반응에 사용한다.

[0175] **3.2 원형 DNA 주형가닥을 이용한 핵산 무한전사**

[0176] 3.1에서 제조된 10 μL 원형 DNA 주형가닥을 2 μL 10x RNAPol 반응 완충액 (400 mM Tris-HCl (pH 7.9), 60 mM MgCl2, 20 mM 스페르미딘(spermidine), 100 mM DTT), 3 μL 25 mM rNTPs, 3 μL DEPC-처리된 탈이온수 (DW) 및 2 μL T7 RNA 폴리머라아제 (50 U/μL)와 혼합한다. 이 혼합물을 thermal cycler 내에서 37℃에서 1시간동안 배양하면서 T7 RNA 폴리머라아제가 주형의 루프부위에 위치한 T7 프로모터서열 3' 말단에서부터 원형 DNA 주형가닥과 상보적인 RNA가닥을 증폭시키도록 하였다. 그 후 65℃ 10분동안 열을 가하여 반응을 종결시킨다.

[0177] **3.3 위치 특이적 절단 및 자가조립을 이용한 RNA 나노 구조체의 제조**

[0178] 증폭된 RNA 증폭 생성물 (19 μL)을 3 μL 10X RNase H 반응 완충액(750mM KCl, 500 mM Tris-HCl (pH 8.3), 30 mM MgCl2, 그리고 100 mM DTT), 및 5.5 μL DEPC-처리된 탈이온수 (DW)와 혼합하였다. 이 혼합물에 초음파발생장치 (sonicator, BRANSON 5510)를 사용하여 음파처리(sonication)를 3분 동안 수행하고, 그 뒤 교반(GILSON , GVLab®) 및 스핀다운(spin down)(Cole-Parmer, Personal Microcentrifuge)하는 과정을 5번 반복하여 DNA 헬퍼가 잘 붙을 수 있도록 증폭된 RNA 가닥을 풀어주었다. RNA를 특이적으로 절단하여 원하는 서열을 얻기 위해서 무작위적 절단이 아닌 위치 인식 및 절단을 할 수 있는 RNase H를 이용하였으며, RNase H가 RNA/DNA 가닥을 인식하고 절단하는 성질을 가지므로, 이와 같은 가닥 형성을 위하여 DNA 헬퍼를 사용하였다. 사용한 DNA 헬퍼의 서열은 서열번호 10에 나타내었으며, TAATACGACTCACTATAG로 이루어져 있다. 50 pmole 18nt DNA 헬퍼를 첨가하고 thermal cycler 로 -1.5℃/s의 속도로 95℃ (2분)에서 10℃까지 온도를 감소시켜, 증폭된 RNA가닥과 DNA 헬퍼를 혼성화시켰다. 혼성화 과정이 끝나면 1 μL RNase H (5 U/μL)를 첨가하고 thermal cycler 내에서 37℃에서 6시간동안 배양하여 RNA/DNA 이중가닥을 중 RNA가닥을 절단시켰다. 절단된 RNA는 처음의 S1, S2, S3 단위로 나누어지며, 단일가닥 폴리뉴클레오티드 풀을 형성한다. 그 후 65℃ 20분간 열을 가하여 효소를 불활성화 시키고, 이 생성물을 - 1.5 ℃/min이 속도로 95℃에서 10℃로 온도를 감소시킴으로써 잘려진 RNA 가닥간의 자가조립이 이루어지도록 하였다.

[0179] 상기와 같은 Y-형태 RNA 나노구조체 형성의 과정을 도 10에 간략하게 도식화 하였으며, 사용된 실험 단계 별 각 변수 및 조건에 대하여 하기 표 5에 정리하여 나타내었다.

[0180] [표 5]

단계	변수	조건
연결(Ligation)	주형 DNA와 프라이머의 반응 비	1: 1 ~ 1: 4.5
	template DNA 용액 내 최종농도	1 μM
	T4 DNA 리가아제 (400 U/μL) 또는 Circligase unit(100 U/μL)	400~ 1600 U
	온도	16~ 25 ℃
	시간	1시간~ 14시간
엑소뉴클레아제 I(Exonuclease I)	엑소뉴클레아제 I unit (20 U/μL)	20 U
	온도	37 ℃
	시간	30분~ 1시간
증폭 (Amplification)	원형 주형의 양	1~ 5 pmol
	25mM rNTP양	75~ 201 nmol
	T7 RNAP unit (50 U/μL)	50~ 200 U
	온도	37 ℃
	시간	1~ 20시간
절단(Cleavage)	sonication 조건	1~ 5분, 5번
	18nt 헬퍼 양	50 pmole~ 10 nmole
	RNaseH unit (5 U/μL)	5~ 175 U
	온도	37 ℃
	시간	1~ 16시간

[0181]

[0182] **3.3 제조된 Y 형태 RNA 나노구조체의 정제 및 확인**

[0183] 제조된 Y 형태 RNA 나노구조체의 정제하고 확인하였다. 상온에서 1 X Tris-borate-EDTA (TBE) 완충액 5 % PAGE를 통해 확인하였으며, 겔은 GelRed™ (Biotium)로 염색하였고 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 겔 이미지를 얻었다. 이 외 구체적인 조건 및 방법은 상기 실시예 1.4에서 사용한 방법과 동일하게 수행하였다.

[0184] 결과를 도 11에 나타내었다.

[0185] 도 11에 나타낸 바와 같이, 레인 3에서는 S1+S2+S3가 연결된 Y-형태 DNA 주형이 형성되는 것이 확인되었으며, 레인 8에서는 RNase H 처리 후 잘려지고 자가조립된 Y-형태 RNA 구조체 산물들이 확인되었다. 즉, 증폭방법 과정에 따라 주형의 생성 및 최종 산물의 생성이 모두 의도한바와 같이 이루어졌음이 확인되었다.

[0186] **3.4 Y 형태 RNA 나노구조체 증폭 지수 확인**

[0187] 생성물로부터 증폭된 가닥을 이소프로판올(isopropanol) 침전에 의해 얻었다. 구체적으로 PCR 튜브에 있는 RCT 생성물 (40 μL)을 1.7ml ep 튜브에 옮겨 담고 40 μL 5M 아세트산 암모늄(ammonium acetate)과 500 μL 이소프로판올(99.8%) 용액을 넣고 냉동고(-5 ℃)에서 20분간 방치하였다. 그 후 원심분리기(Eppendorf, 5415 R)를 사용하여 4 ℃에서 13000rpm으로 10분간 원심분리하면 바닥에 가라앉은 침전(pallet)이 보인다. 이 침전을 제외한 상층액을 제거하고 500 μL 70% 에탄올을 넣어준 다음 섞어주지 않고 바로 4 ℃에서 13000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 침전을 제외한 상층액을 제거하고 speed vacuum pump(Scanvac)를 사용하여 1500rpm으로 원심분리를 하면서 15분간 침전을 완전히 건조시켰다. 이 후 얻어진 침전을 30 μL DEPC-처리된 DW에 녹였다. 이 용액의 1 μL을 10배로 희석시킨 후 1 mm path length에서 OD260을 Nanodrop(IMPLEN)측정한 결과 2.193으로 나타났다. 증폭된 RNA의 흡광 계수(extinction coefficient) 값은 2,653,200 L/mole · cm 로, Beer-Lamber 법에 근거하여 증폭된 산물의 농도는 다음과 같이 계산되었다. OD260 (2.193)/Ext.Coefficient (2,653,200 L/mole · cm) x path length (0.1 cm) = 8.26 μM. 최종적으로 증폭된 산물의 양은 2,480 pmol (8.26 μM x 10 x 30 μL) 이었다. 이러한 결과는 1 pmole DNA 주형으로부터 2480배의 상보적인 RNA 가닥이 증폭되었음을 의미한다. 따라서 증폭지수는 2,480 이었다.

[0188] 이와 같은 결과에 따라, 본 발명의 방법을 이용하여 DNA 주형으로부터 siRNA를 포함하는 Y-형태 RNA 나노구조체가 매우 효과적으로 전사되고 증폭될 수 있음을 알 수 있었다.

[0189] **실시예 4. RNA 나노구조체 대량 생산방법 2**

[0190] 상기 실시예 3의 Y-RNA 나노구조체 증폭 방법을 일부 변형하여 증폭된 Y-RNA 나노구조체를 제조하였다.

[0191] DNA 주형으로 총 3개로 나누어진 DNA 가닥, 즉 S1, S2, S3 (서열번호 6 내지 8) 을 주형으로 사용하는 것은 동일하게 하였으나, 이와 같은 3개의 서열들을 상보적 결합을 통해 Y자 형태의 주형을 형성하도록 하는 것이 아니라 각 서열이 원형의 주형을 생성하게 하여 개별적인 S1, S2, S3 서열의 증폭을 수행하고 이를 혼성화 하는 방법을 이용하였다. 보다 구체적으로 다음과 같다.

[0192] **4.1 원형 DNA 주형의 제조**

[0193] 원형 DNA 주형은 다음 두가지 방법 중 어느 것으로든 수행할 수 있다.

[0194] 첫 번째 방법으로 T4 DNA 리가아제를 사용하는 방법을 이용하였다. 5' 끝에 인산기가 있는 68nt 단일가닥 주형 DNA S1,S2,S3 20pmole과 프라이머 20 pmole을 10 mM ATP을 갖는 2 μL 10x T4 DNA 리가아제용 완충액 (500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl2, 100 mM DTT, 및 10 mM ATP) 및 14 μL DEPC-처리된 탈이온수 (DW)상에서 thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 -1.5℃/s의 속도로 95℃ (2분)에서 10℃까지 온도를 감소시켜, 주형가닥 3개와 프라이머를 각각 PCR 튜브에서 혼성화시켰다. 혼성화 후 1μL의 T4 DNA 리아가아제 (400 U/μL)를 첨가하여 thermal cycler 내에서 25℃에서 1시간 동안 배양하여 선형의 주형 DNA를 원형으로 만들어주었다. 65℃에서 10분간 열을 가하여 효소를 불활성화하였다.

[0195] 두 번째 방법으로 Circligase™ ssDNA 리가아제를 사용하였다. 5' 끝에 인산기가 있는 68nt 단일가닥 주형 DNA S1,S2,S3 20pmole을 각각 PCR 튜브에서 2 μL CircLigase™ 10X 반응완충액 (0.5M MOPS (pH 7.5), 0.1M KCl, 50 mM $MgCl_2$, 및 10 mM DTT), 1 μL 1mM ATP, 1 μL 50mM $MnCl_2$ 그리고 14 μL DEPC-처리된 탈이온수 (DW)상에서 혼합 후 1μL의 CircLigase™ ssDNA 리가아제 (100 U/μL)를 첨가하여 thermal cycler 내에서 60℃에서 1시간 동안 배양(incubation)하여 단일가닥 DNA 주형을 원형으로 만든다. 80℃에서 10분간 열을 가하여 효소를 불활성화한다.

[0196] 미반응 선형 DNA 가닥을 제거하고 원형 DNA 주형만을 이후 반응에 사용하기 위하여, 생성된 원형 주형 10 μL를 2 μL 10x 엑소뉴클레아제 I 반응 완충액 (670 mM Glycine-KOH (pH 9.5), 67mM $MgCl_2$, 100mM 2-머캅토에탄올), 7 μL DEPC-처리된 탈이온수 (DW) 그리고 1μL 엑소뉴클레아제 I (E.coli) (20 U/μL)과 함께 혼합하였다. 이 혼합물을 thermal cycler 내에서 37℃에서 1시간동안 배양하면서 원형으로 되지 못한 선형의 DNA가닥을 분해시켰다. 그 후 80 ℃에서 20분간 열을 가하여 반응을 종결하여 선형의 DNA는 제거하고 원형의 DNA 주형만을 남겼다.

[0197] **4.2 원형 DNA 주형가닥의 핵산 무한 전사**

[0198] T4 DNA 리가아제를 사용한 방법에 의하여 생성된 10 μL 원형 DNA 주형가닥을 2 μL 10x RNAPol 반응 완충액 (400 mM Tris-HCl (pH 7.9), 60 mM MgCl2, 20 mM 스페르미딘(spermidine), 및 100 mM DTT), 2 μL 25 mM rNTPs, 3 μL DEPC-처리된 탈이온수(DW) 그리고 3 μL T7 RNA 폴리머라아제 (50 U/μL)와 혼합하였다.

[0199] Circligase™ ssDNA 리가아제를 사용한 방법에 의하여 생성된 10 μL 원형 DNA 주형가닥 (5 pmole)에 5 pmole 프라이머(서열번호 10)를 첨가하여 혼성화 시킨 후 2 μL 10x RNAPol 반응 완충액(400 mM Tris-HCl (pH 7.9), 60 mM MgCl2, 20 mM 스페르미딘, 및 100 mM DTT), 2 μL 25 mM rNTPs, 2.5 μL DEPC-처리된 탈이온수 (DW) 그리고 3 μL T7 RNA 폴리머라아제(50 U/μL)와 혼합한다. 이와 같은 원형의 DNA 주형과 T7 RNA 폴리머라아제의 혼합물을 각각 thermal cycler 내에서 37℃에서 3시간동안 배양하면서 T7 RNA 폴리머라아제가 프라이머의 3' 말단에서부터 원형 DNA 주형가닥과 상보적인 RNA가닥을 증폭시킨다. 이와 같은 과정은 RCT(Rolling circle transcription) 방법에 의하여 수행하였다. 그 후 65℃ 10분 동안 열을 가하여 반응을 종결시킨다.

[0200] **4.3 위치 특이적 절단 및 자가조립을 이용한 RNA 나노 구조체의 제조**

[0201] RCA 생성물 (19 μL)을 3 μL 10X RNase H 반응 완충액 (750mM KCl, 500 mM Tris-HCl (pH 8.3), 30 mM $MgCl_2$, 그리고 100 mM DTT), 그리고 4 μL DEPC-처리된 탈이온수 (DW)와 혼합한다. 이 혼합물에 초음파발생장치 (sonicator, BRANSON 5510)를 사용하여 음파처리(sonication)를 3분 동안 수행하고 끝나면 vortex(GILSON®, GVLab®) 및 spin down(Cole-Parmer, Personal Microcentrifuge)하는 과정을 5번 반복하여 DNA 헬퍼가 잘 붙을 수 있도록 증폭된 RNA 가닥을 풀어주었다. 그 후 300 pmole 18nt DNA 헬퍼를 첨가하고 thermal cycler 로 -1.5 ℃/s의 속도로 95℃ (2분)에서 10℃까지 온도를 감소시켜, 증폭된 RNA가닥과 DNA 헬퍼를 혼성화시켰다. 그 후

RNase H (5 U/μL)를 첨가하여 thermal cycler 내에서 37℃에서 10시간동안 배양하면서 RNA/DNA 이중가닥 중 RNA가닥을 자른다. 이와 같은 절단에 의하여 증폭된 RNA 가닥들은 처음 주형의 단위인 S1, S2, S3로 절단되며, 단일가닥 폴리뉴클레오티드 집단을 형성하였다. 이 후 65℃ 20분간 열을 가하여 효소를 불활성화 시킨다. 잘려진 가닥 생성물을 부피비율 1 : 1 : 1 로 0.5 μL씩과 8.5 μL 1x 인산완충액(PBS)상에서 - 1.5 ℃/min이 속도로 95℃에서 10℃로 온도를 감소시키면서 혼성화하여 RNA 가닥간의 자가 조립이 이루어지도록 하였다.

[0202] 상기와 같은 Y형태 RNA 나노구조체 증폭 방법을 도 12a(circligase) 및 도12b(T4 DNA 리가아제)에 간략하게 도식화하였으며, 각 단계별로 사용된 실험 변수 및 조건들을 하기 표 6에 정리하여 나타내었다.

[0203] [표 6]

단계	변수	조건	조건
연결(Ligation)	주형 DNA와 프라이머의 반응 비	1: 1 ~ 1: 1.5	1: 1
	template DNA 용액 내 최종농도	1~ 10 μM	0.5~ 1 μM
	T4 DNA 리가아제 (400 U/μL)	400 U	-
	Circligase unit(100 U/μL)	-	100 U
	온도	20~ 25 ℃	25 ℃
	시간	1시간~ 14시간	1시간~ 14시간
엑소뉴클레아제 I(Exonuclease I)	엑소뉴클레아제 I unit (20 U/μL)	20 U	20 U
	온도	37 ℃	37 ℃
	시간	30분~ 1시간	1시간
증폭 (Amplification)	원형 주형의 양	1~ 10 pmol	1~ 10 pmol
	25mM rNTP양	40~ 50 nmol	40~ 50 nmol
	T7 RNAP unit (50 U/μL)	50~ 150 U	50~ 150 U
	온도	37 ℃	37 ℃
	시간	1~ 20시간	1~ 3시간
절단(Cleavage)	sonication 조건	1 ~ 3분, 5번	1~ 3분, 5번
	18nt 헬퍼 양	30~ 500 pmole	30~ 500 pmole
	RNaseH unit (5 U/μL)	5~ 35U	5 U
	온도	37 ℃	37 ℃
	시간	1~ 16시간	1~ 10시간

[0204]

[0205] **4.4 Y RNA 나노 구조체의 정제 및 확인**

[0206] 본 발명의 방법에 따라 Y RNA 나노구조체가 형성되는지 확인하기 위하여 10% PAGE 분석을 수행하였다. 이는 상온에서 1 X Tris-borate-EDTA (TBE) buffers 10 % PAGE를 통해 확인되었으며, 겔은 GelRed™ (Biotium)로 염색하였고 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 이미지를 얻었다. 이 외 구체적인 조건 및 방법은 상기 실시예 1.4에서 사용한 방법과 동일하게 수행하였다.

[0207] 결과를 도 13에 나타내었다.

[0208] 도 13에서는 T4 리가아제를 이용하여 주형을 생산한 방법(A)과 circligase 이용하여 주형을 생산하는 방법(B)에 따른 반응 과정을 각각 나누어 나타내었다. 도 14의 A에서 확인할 수 있는 바와 같이 원형화(circularization)에 의하여 원형의 DNA 주형이 형성되는 것이 해당 레인에서 확인되며, S1, S2, S3 DNA 주형에 상응하는 RNA 가닥이 증폭되어 형성되는 것이 확인된다. 또한 절단된 각 RNA 가닥이 혼성화를 통해 절단된 S1, S2, S3의 혼성화 형태인 cS1+cS2+cS3의 밴드를 형성하는 것이 확인되었다. 마찬가지로 도 14의 B에서 확인할 수 있는 바와 같이 circligase를 이용한 방법에서도 최종적으로 cS1+cS2+cS3의 밴드가 형성되는 것이 확인되었다.

[0209] **실시예 5. RNA 나노구조체 대량 생산방법 3 - 2′ -O-methyl DNA 헬퍼를 이용한 RNA 나노 구조체 대량 생산 방법**

[0210] Y 형태 RNA 나노구조체를 대량으로 생산하였다. T7 RNA 폴리머라제를 이용한다는 점은 실시예 3 및 4와 동일하나, 2′ -O-methyl DNA 헬퍼를 이용하였다는 차이점이 있다.

[0211] **5.1 원형 DNA 주형 가닥의 준비**

[0212] RNA를 대량 생산하기 위하여 주형으로 198nt의 단일가닥 DNA를 사용하였다. 구체적인 DNA 서열, 프라이머 및 9nt 헬퍼는 다음의 표 7 같다.

[0213] [표 7]

[0214]

가닥	서열 (5'→ 3')
198 nt R'-G-G'-L-L'-R	Pho- TAGTGAGTCGTATTAGAGTTCAAGTCCATCTACAGCGTGAACATGAAGCAGCACGACTTATCCCTATA GTGAGTCGTATTAAAGTCGTGCTGCTTCATGTTCAGCCAACGCTGGGCGTTAATCAAATCCCTATAGTG AGTCGTATTATTGATTAACGCCCAGCGTTGGCCGCTGTAGATGGACTTGAACTCATCCCTA
Primers (22 nt)	TAATACGACTCACTATAGGGAT
9nt helper	**ATC**CCT**ATA**

[0215] (R: 센스-RFP, R'-안티센스-RFP, L: 센스-Luc, L' : 안티센스-Luc, G: 센스-GFP, G'-안티센스-GFP, Pho: 인산기)

[0216] 5' 끝에 인산기가 있는 상기 198 nt 단일가닥 DNA와 프라이머는 Integrated DNA Technologies, IDT에서 구입하였고, 상기 9nt 헬퍼는 Bioneer Corporation에서 구입하였다.

[0217] 프라이머가 결합하는 위치를 밑줄로 표시하고, 9nt DNA 헬퍼(helper)가 인식하여 결합하는 증폭된 RNA 가닥 서열과 상보적인 서열을 음영으로 표시하였다. 9nt DNA 헬퍼에서 굵은 글씨로 표시한 부분이 2'-O-메틸화된 부분에 해당한다. 사용한 주형은 안티센스-RFP(R'), 센스-GFP(G), 안티센스-GFP(G'), 센스-Luc(L), 안티센스-Lu(L'), 및 센스-RFP(R)를 지표서열로 포함하고 있다. 이와 같은 지표서열의 서열은 상기 표 3에 표시된 것과 동일하다.

[0218] 이하 실험에 사용한 T4 DNA 리가아제, T7 RNA 폴리머라제, 피로포스파타제(Pyrophosphatase), 및 RNase H는 모두 New England Biolabs(NEB)에서 구입하여 사용하였다.

[0219] 상기 198 nt 단일가닥 주형 80 pmole과 상기 프라이머 240 pmole을 T4 DNA 리가아제에 대한 2 μL 10x 완충액과 10 mM ATP (500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 및 10 mM ATP) 상에서 thermal cycler (Bio-Rad T100TM)을 이용하여 -1.0℃/s의 속도로 95℃ (2분)에서 10℃까지 온도를 감소시켜, 단일가닥 주형과 프라이머를 혼성화시켰다. 혼성화 후 2 μL의 T4 DNA 리가아제(50 U/μL)를 첨가하여 thermal cycler 내에서 25℃에서 1시간 동안 배양(incubation) 하여 선형의 주형 DNA를 원형으로 만들었다. 65℃에서 10분간 열을 가하여 효소를 불활성화시켜 반응을 종결시켰다.

[0220] **5.2 원형 DNA 주형가닥의 핵산 무한 전사 과정**

[0221] 2 μL 원형 DNA 주형가닥을 2 μL 10x RNAPol 반응 완충액 (400 mM Tris-HCl (pH 7.9), 60 mM $MgCl_2$, 20 mM 스페르미딘, 그리고 100 mM DTT), 0.8 μ25 mM rNTPs, 10.4 μL DEPC-처리된 탈이온수(DW), 0.8 μL 피로포스파타제 (0.1 U/μL) 그리고 4 μL T7 RNA 폴리머라제(50 U/μL) 와 혼합하였다. 이 혼합물을 thermal cycler 내에서 37℃에서 18시간 동안 배양하면서 T7 RNA 폴리머라제가 프라이머의 3' 말단에서부터 원형 DNA 주형가닥과 상보적인 RNA가닥을 증폭시켰다. 그 후 65℃ 10분동안 열을 가하여 효소를 불활성화시킴으로써 반응을 종결시켰다.

[0222] **5.3 DNaseI 처리에 의한 DNA 주형가닥 제거**

[0223] DNA 주형가닥을 제거하지 않으면 RNaseH 처리단계에서 DNA 주형가닥이 헬퍼로 작용하여 증폭된 RNA가 파괴될 수 있으므로, 하기 과정을 통하여 DNA 주형가닥을 제거하였다.

[0224] RCA 생성물 (20 μL)을 4 μ10X DNaseI 완충액(100 mM Tris-Hcl, 25 mM $MgCl_2$ 및 5 mM $CaCl_2$), 15 μL DEPC-처리된 탈이온수(DW) 그리고 1 μDNaseI (2 U/μL)와 혼합하였다. 이 혼합물을 이 혼합물을 thermal cycler 내에서 37℃에서 1시간 동안 배양하면서 DNase I이 DNA 주형가닥을 분해하도록 하였다. 그 후 65℃ 10분동안 열을 가하여 효소를 불활성화시킴으로써 반응을 종결시켰다.

[0225] **5.4 9nt 2'-O-메틸 헬퍼 혼성화 및 RNase H에 의한 절단 후 자가조립**

[0226] DNaseI 생성물 (40 μL)을 8 μ10X RNase H 반응 완충액 (750mM KCl, 500 mM Tris-HCl (pH 8.3), 30 mM $MgCl_2$, 및 100 mM DTT), 0.2 μL 9nt 2'-O-메틸 DNA 헬퍼 (10 μL 그리고 25.8 μL DEPC-처리된 탈이온수(DW)와 혼합하였다. 이 혼합물에 6 μL RNase H (5 U/μL)를 첨가하고 thermal cycler 내에서 37℃에서 18시간동안 배양하여 RNA/DNA 이중가닥 중 RNA가닥이 절단되도록 하였다. 그 후 65℃ 20분간 열을 가하여 효소를 불활성화시키고, 이 생성물을 - 1.5 ℃/min이 속도로 95℃에서 10℃로 온도를 감소시킴으로써 잘려진 RNA 가닥간의 자가

조립이 이루어지도록 하였다.

[0227] 상기와 같은 Y형태 RNA 나노구조체 증폭 방법을 도 14에 도식화하였으며, 각 단계별로 사용된 실험 변수 및 조건들을 하기 표 8에 정리하여 나타내었다.

[0228] [표 8]

단계	변수	조건
연결(Ligation)	주형 DNA와 프라이머의 반응 비	1: 3
	주형 DNA 용액 내 최종농도	1~ 4 μM
	T4 DNA 리가아제 (400 U/μL)	50~ 1600 U
	온도	16~ 25 ℃
	시간	1시간~ 14시간
증폭 (Amplification)	원형 주형의 양	1~ 8 pmole
	25mM rNTP양	75~ 201 nmole
	Pyrophosphatase (0.1 U/μL)	0.04~ 0.08 U
	T7 RNAP unit (50 U/μL)	50~ 200 U
	온도	37 ℃
	시간	1~ 20시간
절단(Cleavage)	2'-O-methyl DNA helper nucleotide 범위	9~ 18 nt
	9nt 헬퍼 양	1 pmole~ 10 pmole
	RNaseH unit (5 U/μL)	5~ 175 U
	온도	37 ℃
	시간	1~ 16시간

[0229]

[0230] 도 14에 나타낸 바와 같이, 상기 방법은 실시예 3의 방법(도 10 참조)과 동일하나 사용한 DNA 헬퍼가 상이하다. 상기 방법에서 사용한 2' -O-메틸 DNA 헬퍼는 2' -O-메틸기로 치환된 부분이 RNaseH에 의해 잘리지 않기 때문에 RNA 가닥과 더욱 안정적으로 혼성화될 수 있다. 상기 방법에서는 9nt DNA 헬퍼(5' - TAA TAC GAC -3, 굵은 글씨가 메틸화된 부분)를 사용하였으며, 그 외 12nt 또는 18nt 길이의 DNA 헬퍼도 사용할 수 있다.

[0231] **5.5 Y 형태 RNA 나노 구조체의 정제 및 확인**

[0232] 본 발명의 방법에 따라 Y 형태 RNA 나노구조체가 형성되는지 확인하기 위하여 10% PAGE 분석을 수행하였다. 이는 상온에서 1 X Tris-borate-EDTA (TBE) buffers 10 % PAGE를 통해 확인되었으며, 겔은 GelRed™ (Biotium)로 염색하였고 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 이미지를 얻었다. 이 외 구체적인 조건 및 방법은 상기 실시예 1.4에서 사용한 방법과 동일하게 수행하였다.

[0233] 결과를 도 15에 나타내었다.

[0234] 도 15에서 좌측의 L은 Ladder, 레인 1은 프라이머를 나타낸다. 레인 2는 DNA 주형을 나타내며, 레인 3은 DNA 주형과 프라이머가 혼성화된 것을 나타내고, 레인 4는 원형화된 DNA 주형과 프라이머가 혼성화된 것을 나타낸다. 즉, 연결(ligation)이 되어 원형화되면 밴드의 위치가 조금 더 위쪽으로 이동하게 된다. 레인 5는 RCA 산물을 나타내는데, 증폭된 RCA 산물이 겔 상에서 고르게 이동하지 못하고 웰에 걸려 이와 같은 양상을 나타낸다. 레인 6은 RCA 산물이 절단되고 자가조립된 후를 나타낸 것으로서, 밴드가 다양하게 나타나나 그 중에서 본 발명의 방법에 의해 생산되는 핵산 나노구조체의 밴드는 대략 레인 2에서 DNA 주형과 유사한 위치에서 밴드이다.

[0235] **5.6 Y 형태 RNA 나노 구조체의 유전자 침묵 효과 확인**

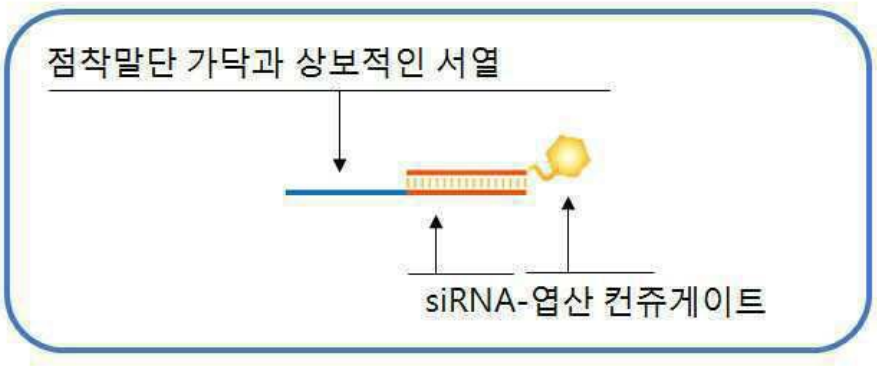
[0236] GFP-과발현 KB세포(GFP-KB 세포)를 엽산(folic acid)이 없는 RPMI 배지 (10 % FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1 % Glutamax)에 배양하였다. 상기 GFP-KB 세포를 6-웰 배양 플레이트에 3.0×10^5 cells/well의 농도로 분주하였다. 24시간 배양 후, 10% 혈청이 포함된 정상 성장 (normal growth) 배지에 실험군에는 상기 5.5에서 생산된 Y-RNA 나노구조체 10nM를 리포펙타민(lipofectamine) RNAiMAX와 복합체를 이룬 후 24시간 동안 처리하고, 양성 대조군에는 이중가닥 GFP siRNA를 리포펙타민(lipofectamine) RNAiMAX와 복합체를 이룬 후 24시간 동안 처리하였다.

[0237] GFP-KB 세포의 GFP 발현 정도는 FACSCalibur system (BD biosciences)으로 측정하였고, GFP 유전자 침묵효과는 flowJo program을 사용하여 분석하였다.

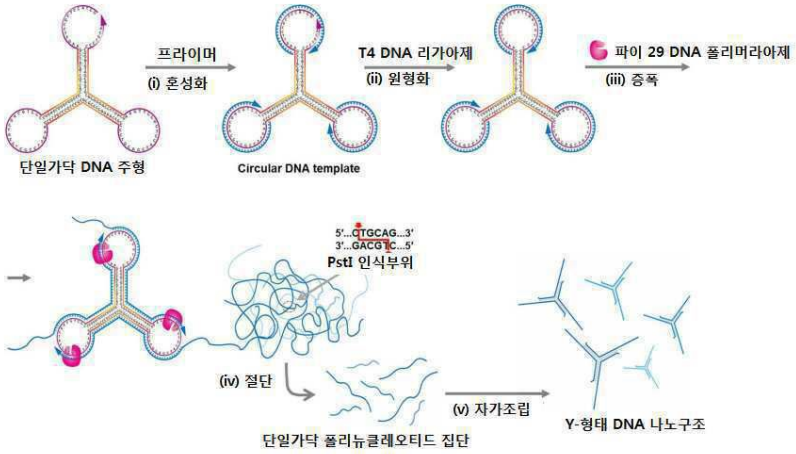
[0238] 결과는 도 16에 나타내었다. 도 16의 좌측 도는 양성 대조군에 대한 결과로서, GFP에 대해 약 63%의 침묵 효과가 나타나는 것을 알 수 있다. 도 16의 우측 도는 실험군에 대한 결과로서, 약 27%의 침묵 효과가 나타나는 것을 알 수 있다.

도면

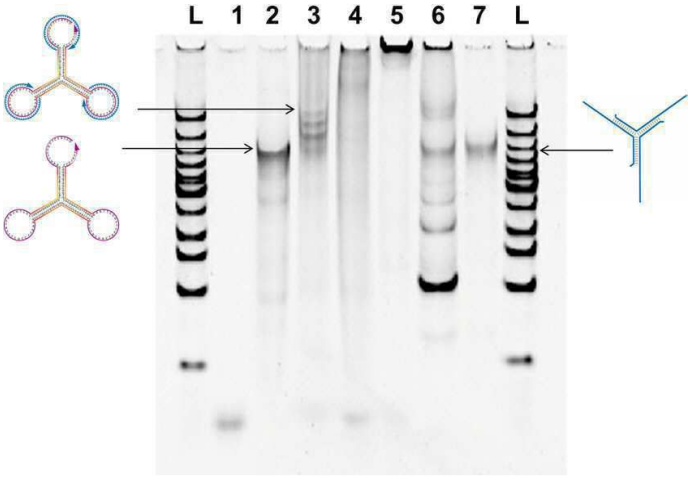
도면1



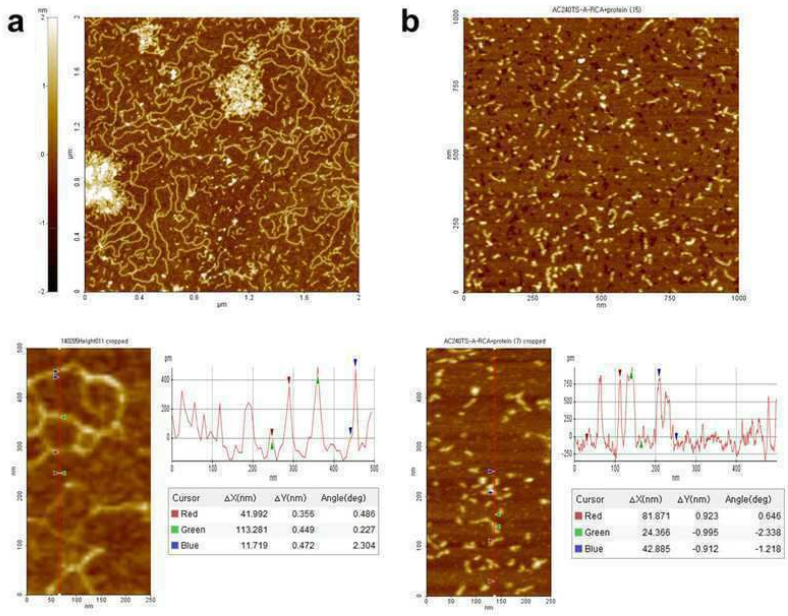
도면2



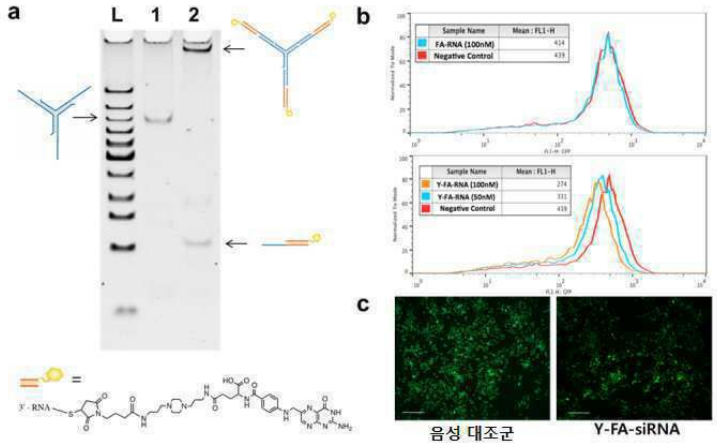
도면3



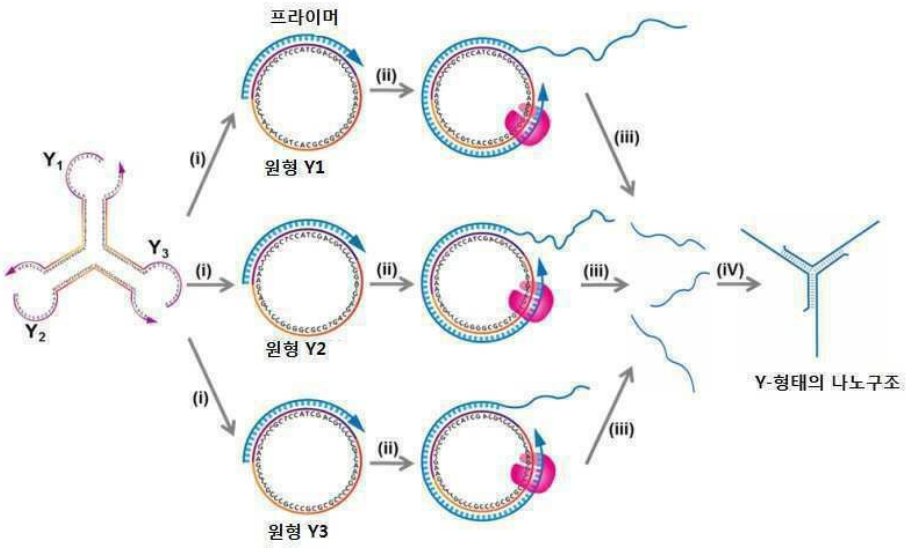
도면4


a
b
Cursor ΔX(nm) ΔY(nm) Angle(deg)
Red 41.992 0.356 0.486
Green 113.281 0.449 0.227
Blue 111.719 0.472 2.304
Cursor ΔX(nm) ΔY(nm) Angle(deg)
Red 81.871 0.923 0.646
Green 24.366 -0.995 -2.338
Blue 42.885 -0.912 -1.218

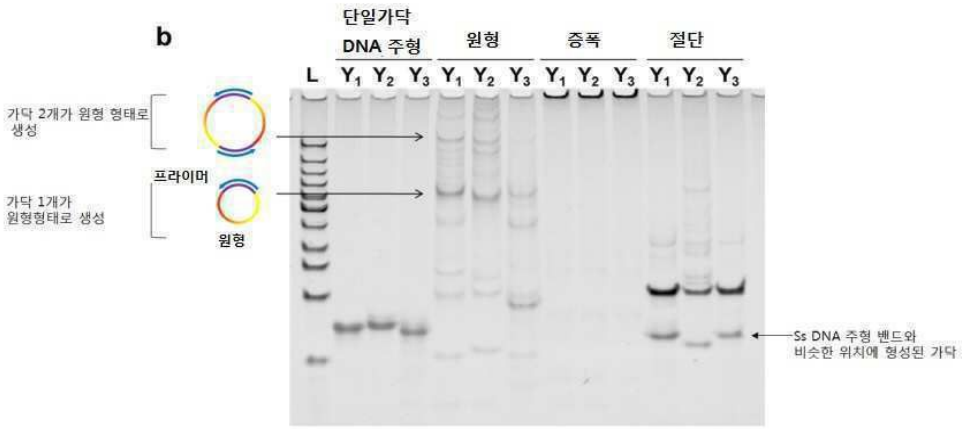
도면5


a
L
1
2
b
Sample Name Mean : FL1-H
FA-RNA (100nM) 414
Negative Control 439
Sample Name Mean : FL1-H
Y-FA-RNA (100nM) 274
Y-FA-RNA (50nM) 331
Negative Control 439
c
음성 대조군
Y-FA-siRNA

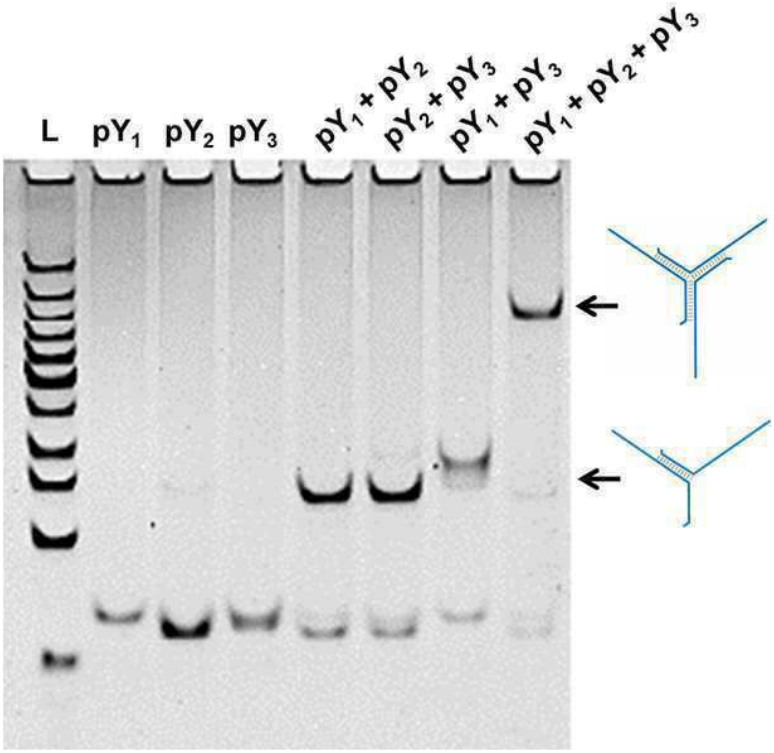
도면6


프라이머
(i)
(ii)
(iii)
(iv)
원형 Y1
원형 Y2
원형 Y3
Y1
Y2
Y3
Y-형태의 나노구조

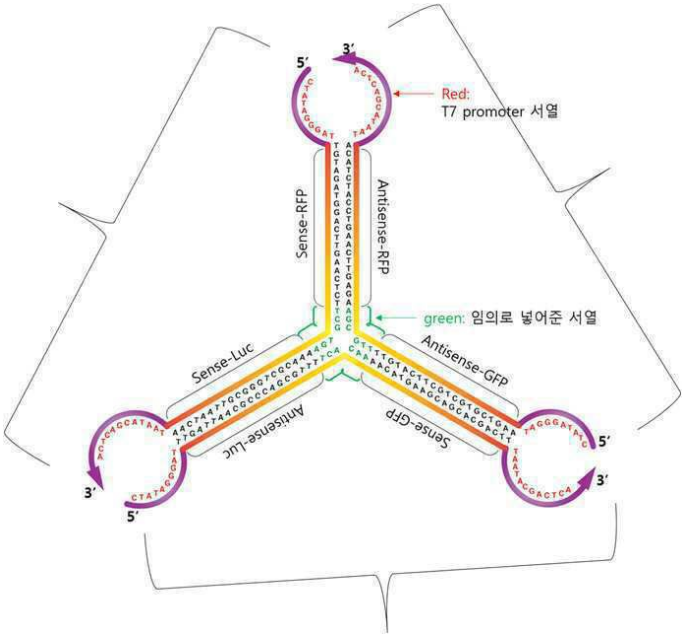
도면7


b
단일가닥
DNA 주형
원형
증폭
절단
L
Y1 Y2 Y3 Y1 Y2 Y3 Y1 Y2 Y3 Y1 Y2 Y3
가닥 2개가 원형 형태로 생성
프라이머
가닥 1개가 원형형태로 생성
원형
Ss DNA 주형 밴드와 비슷한 위치에 형성된 가닥

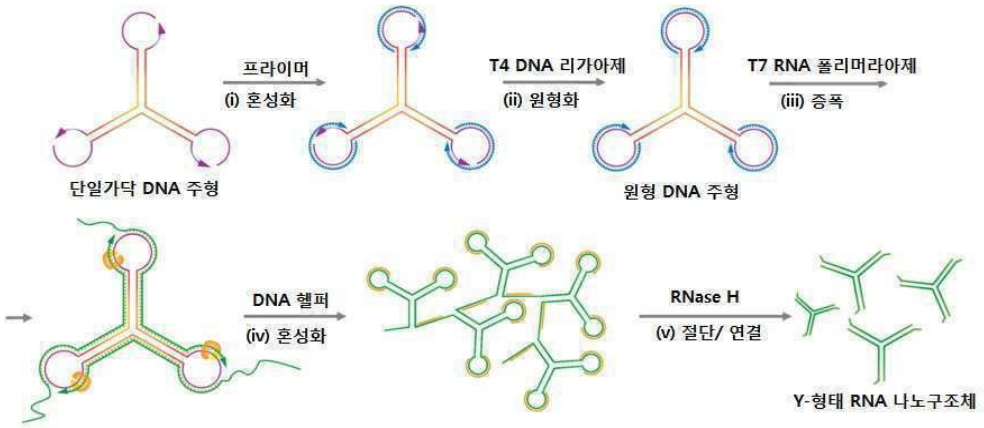
도면8


L
pY1
pY2
pY3
pY1+pY2
pY2+pY3
pY1+pY3
pY1+pY2+pY3

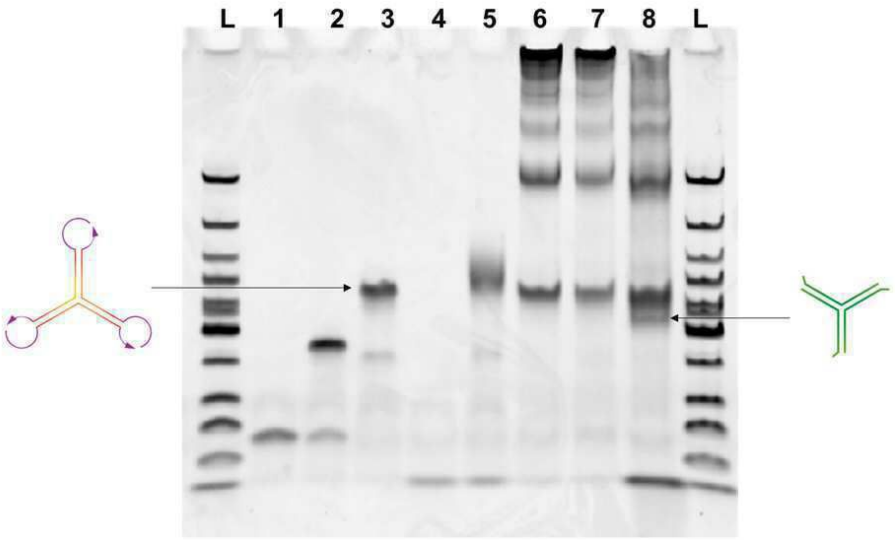
도면9


5′
3′
Red:
T7 promoter 서열
Sense-RFP
Antisense-RFP
green: 임의로 넣어준 서열
Sense-Luc
Antisense-GFP
Antisense-Luc
Sense-GFP
3′
5′
5′
3′

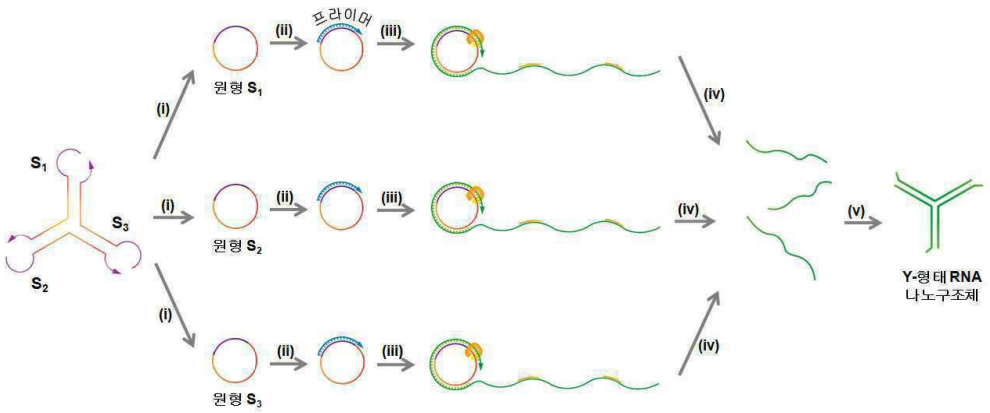
도면10



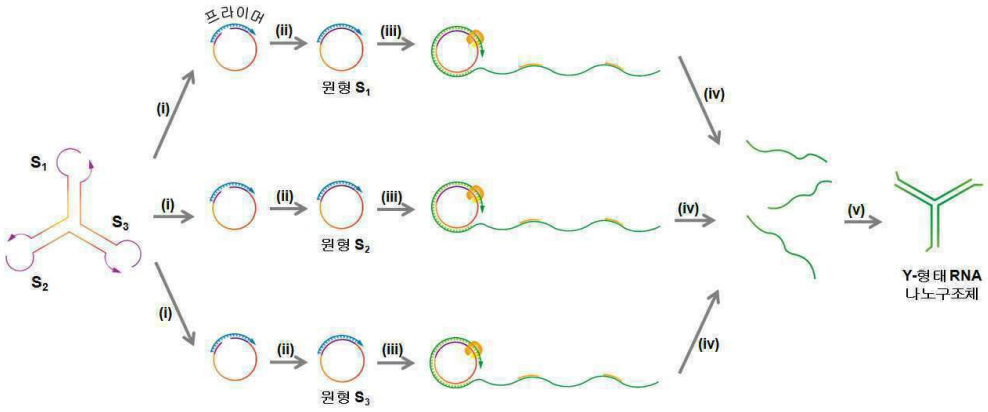
도면11



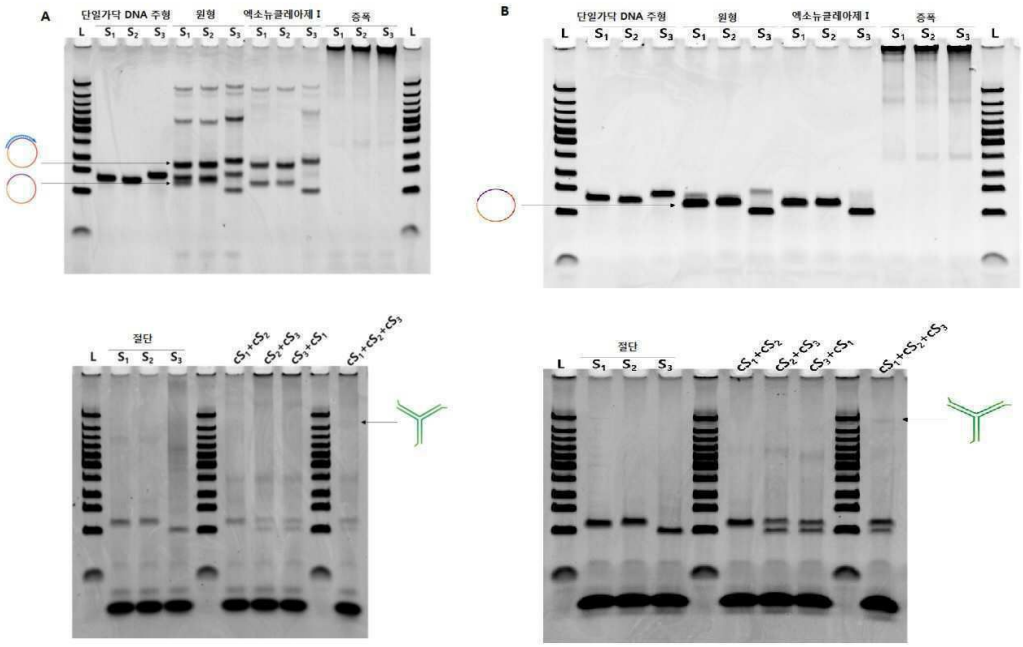
도면12a



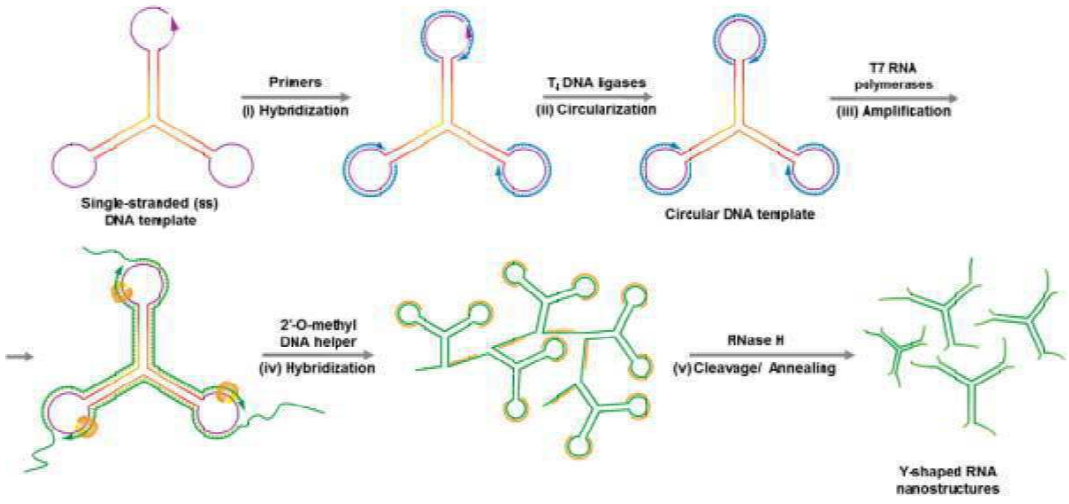
도면12b



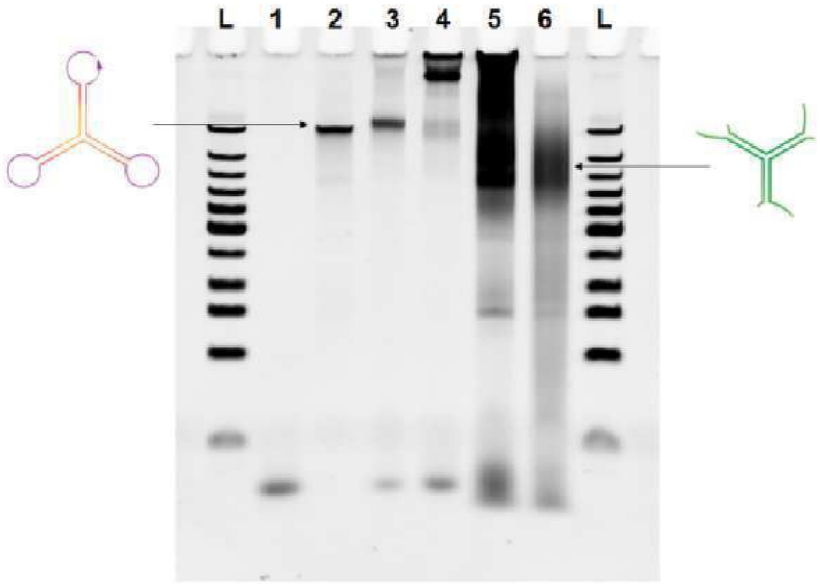
도면13



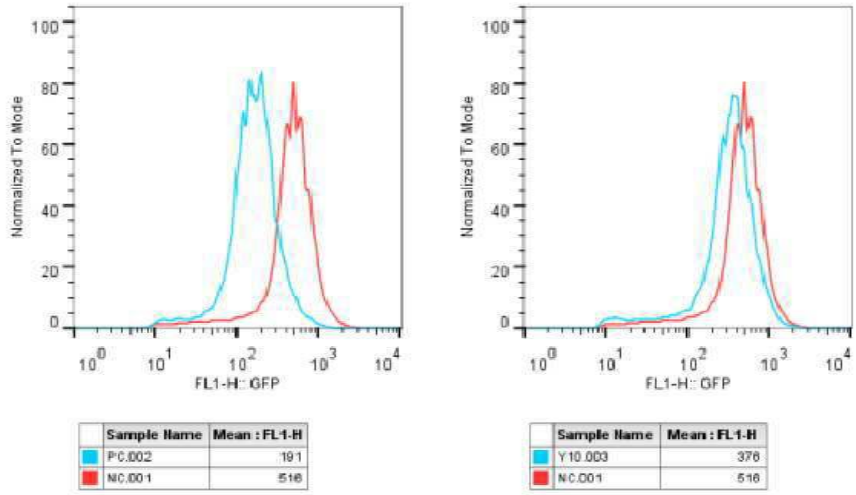
도면14



도면15



도면16



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Method for mass production of nucleic acid nanostructure and use thereof in drug delivery systems

<130> P14-091-REA-EWHA-DA2

<150> KR 10-2014-0142589

<151> 2014-10-21

<160> 10

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA template

<400> 1

gctacctcgc cttgaagcct acatcgtcac ggcgggcggg caaggcccct gcagctacct 60

cgccttgaag ccttgcccgc ccgcgcgccc cggaaaggcc cctgcagcta cctcgccttg 120

aagcctttcc ggggcgccgt gacgatgtag gcccctgca 159

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ttcaaggcga ggtagctgca ggg 23

<210> 3

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA template Y1

<400> 3

gctacctcgc cttgaagcct acatcgtcac ggcgggcggg caaggcccct gca 53

<210> 4

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA template Y2

<400> 4

gctacctcgc cttgaagcct tgcccgcccg cgcgccccgg aaaggcccct gca 53

<210> 5

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA template Y3

<400> 5

gctacctcgc cttgaagcct ttccggggcg ccgtgacgat gtaggcccct gca 53

<210> 6

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA template S1

<400> 6

ctatagggat tgtagatgga cttgaactct tcgtgaaaac gctgggcgtt aatcaataat 60

acgactca 68

<210> 7

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA template S2

<400> 7

ctatagggat ttgattaacg cccagcgttt tcacaaaaca tgaagcagca cgactttaat 60

acgactca 68

<210> 8

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA template S3

<400> 8

ctatagggat aagtcgtgct gcttcatgtt ttgcgaagag ttcaagtcca tctacataat 60

acgactca 68

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

atccctatag tgagtcgtat ta 22

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> helper

<400> 10

taatacgact cactatag 18