

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 8월 14일 (14.08.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/123384 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/113 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/001053
- (22) 국제출원일: 2014년 2월 7일 (07.02.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0014075 2013년 2월 7일 (07.02.2013) KR
- (71) 출원인: 고려대학교산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김준 (KIM, Joon); 135-838 서울시 강남구 선릉로 222 대치아이파크아파트 106-901, Seoul (KR). 김학동 (KIM, Hag Dong); 440-709 경기도 수원시 장안구 경수대로 976 번길 22 한일타운아파트 108-602, Gyeonggi-do (KR). 이세현 (LEE, Se Hyun); 158-780 서울시 양천구 목동중앙북로 8길 111 금호베스트빌 104-311, Seoul (KR). 양희웅 (YANG, Hee-Woong); 136-075 서울시 성북구 인촌로 22길 5 JJ 빌리지 209호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young) 등; 135-748 서울시 강남구 테헤란로 123 여삼빌딩 11층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

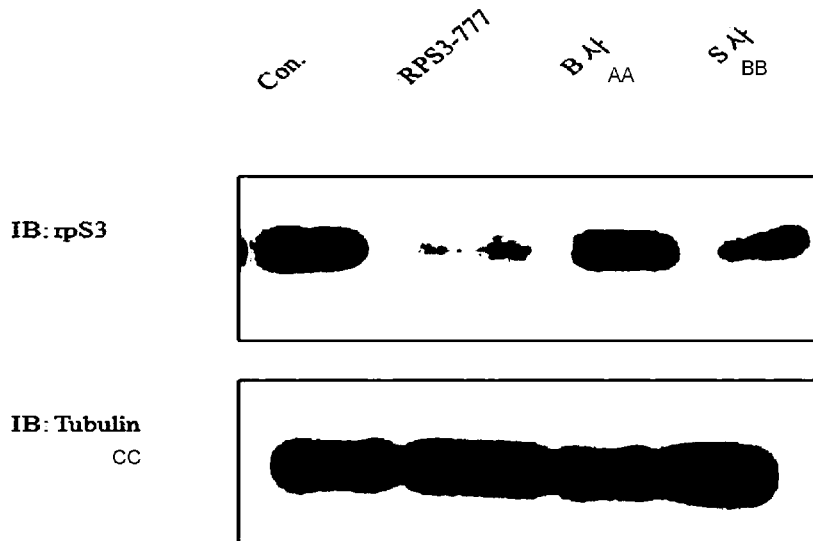
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: SMALL INTERFERENCE RNA FOR INHIBITING INTRACELLULAR EXPRESSION OF RIBOSOMAL PROTEIN S3

(54) 발명의 명칭 : 세포 내 rpS3 발현 억제를 위한 siRNA



AA ... B company
BB ... S company
CC ... IB: Tubulin

(57) Abstract: The present invention relates to a small interference RNA (siRNA) specifically inhibiting the expression of a ribosomal protein existing in cells, and more specifically, to a siRNA specifically inhibiting the expression of ribosomal protein S3 (rpS3), which endogenously exists in cells, and affecting a protein, which is overexpressed by tagging. The siRNA of the present invention has excellent economic and efficient aspects compared with a conventional commercialized product.

(57) 요약서: 본 발명은 세포 내에 존재하는 리보솜 단백질의 발현을 특이적으로 억제하는 짧은 간섭(small interference RNA; siRNA)에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포내 내재적으로 존재하는 rpS3 단백질의 발현은 특이적으로 억제시키고, 태깅(tagging)되어 과발현되는 단백질에는 영향을 미치지 않는 siRNA에 관한 것이다. 본 발명의 siRNA은 종래 상업화된 상품에 비해 경제적 및 효율적 측면에서 우수한 효과가 있다.



— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 세포 내 rpS3 발현 억제를 위한 siRNA

기술분야

- [1] 본 발명은 세포 내에 존재하는 리보솜 단백질의 발현을 특이적으로 억제할 수 있는 특정부위에 결합하는 siRNA(small interference RNA)에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 단백질은 세포신호로부터 기관의 작용을 위한 조직의 재편성에 이르는 모든 생리과정에 관여한다. 그래서 세포 내에서 단백질 합성은 매우 중요한 과정인데, 이러한 기능을 리보솜이 담당한다. 리보솜은 아미노산을 연결하여 단백질 합성을 담당하는 세포 소기관으로 많은 리보솜단백질들과 리보솜 RNA(ribosomal RNA)의 결합으로 만들어지는 거대한 복합체로 이루어져 있다.
- [4] rpS3(Ribosomal protein S3)는 리보솜의 구성성분으로 40S 서브유닛(subunit)의 외부 표면에 위치하며 개시인자(initiation factor) eIF2와 eIF3에 교차연결(cross-link)되어 있다. rpS3는 N-말단 부위에 핵 위치화 신호(nuclear localization signal)를 가지고 있는데, 이것은 rpS3의 세포질에서의 기능과 핵에서의 회복(repair)능을 가지고 있다는 것을 의미한다. 또한, 많은 리보솜 단백질들은 복제, 전사, RNA 프로세싱, DNA 회복(repair), 악성 형질전환(malignant transformation) 등의 두 번째 기능을 가지고 있다.
- [5] rpS3 유전자는 인간 염색체 11번의 11q13.3 - q13.5에 위치한다. 특이할 점은 rpS3 유전자는 결장직장암(colorectal cancer) 환자에서 과발현된다는 보고가 있다. 그러므로 rpS3의 유전자 산물은 대장암에서는 과발현되며, 다른 암과도 관련이 되어 있을 가능성이 매우 높다. 이 뿐 아니라 11q13.3-q13.5 부위의 연구는 자주 유전자의 구조적 이상(structural abnormality), 증폭(amplification)이 일어나고, 다발성 내분비 신생물 타입 I(multiple endocrine neoplasia type I), 유방암(breast carcinoma), B 세포 신생종양과 같은 인체 암의 발생시에 과발현 되는 현상이 있다 (Pogue-Geile *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 3842-3849, 1991).
- [6] siRNA(small interference RNA)는 RNAi(RNA interference)를 유도하는 물질로서 십여 개에서 수십 개 정도의 염기서열로 구성된 짧은 이중사슬의 RNA를 말한다. RNA 간섭(interference)(“RNAi”)은 다수의 진핵세포 생물체에 보존되어 있는 전사후 유전자 조절 방법으로, 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA와 이것과 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA로 구성되는 이중사슬 RNA(double strand RNA)를 세포 등에 도입하여 선택적으로 표적 유전자의 mRNA의 분해를 유도하거나 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 현상을 말한다. RNAi는 세포에 존재하는 짧은(즉, 30개 미만의 뉴클레오타이드) 이분쇄 RNA(“dsRNA”) 분자에 의해 유도된다 (Fire A. *et al.*, *Nature*, 391: 806-811,

1998). 이와 같이 RNAi는 선택적으로 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 종래의 비효율적인 상동 재조합에 의한 유전자 파괴 방법을 대신하는 간단한 유전자 녹-다운(knock down) 방법으로서 상당한 관심을 모으고 있다. siRNA를 세포 내로 주입시켜 이 siRNA와 염기서열이 상보적인 표적 유전자의 mRNA의 유전자 발현을 억제하게 된다.

- [7] siRNA 및 표적화 mRNA는 표적 mRNA를 절단하는 RNA-유도된 사일런싱 컴플렉스(RNA-induced silencing complex; "RISC")에 결합한다. siRNA는 다-전환을 효소처럼 명백하게 재활용되는데, 1개의 siRNA 분자는 대략 1000개의 mRNA 분자의 절단을 유도할 수 있다. 따라서 siRNA 매개된 RNAi는 표적 유전자의 발현을 억제하는데 이용되는 현재의 다른 기술들보다 효과적이다.
- [8] 그러나, RNAi 기술은 모든 유전자의 RNA에 적용됨으로써 선택적 발현 억제가 가능할 것이라는 애초의 기대와는 달리, 근래 대규모의 RNAi 탐색 과정에서 일부 유전자는 알려지지 않은 이유로 인해 RNAi 기술이 적용되지 않음이 밝혀지고 있다 (Krueger *et al.*, *Oligonucleotides*, 17:237-250, 2007). 또한, 지난 수 년 간의 데이터베이스를 바탕으로 통계 분석을 통해 siRNA 서열을 예측하는 알고리즘이 개발되고 있으나, 컴퓨터 알고리즘이 불완전하기 때문에 이를 이용하여 인 실리코(in silico) 방법으로 결정된 모든 siRNA가 실제 세포 및 생체 중에서 표적 mRNA를 효과적으로 억제하는 것은 아니며 실험을 통한 검증을 통해서만 가장 효율적인 siRNA를 결정할 수 있다는 것이 알려져 있다 (Derek *et al.*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8:377-402, 2006).
- [9] 이와 같이, 이론적으로 예상되는 siRNA가 반드시 목표로 하는 mRNA의 능력을 효과적으로 억제시키지는 않으며, 고효율의 siRNA 염기서열을 찾아야 치료 목적을 달성할 수 있기 때문에, 표적 mRNA 상에서 억제 효율이 높은 특정 타겟 부위 (hyperactive target)을 찾는 것이 매우 중요하다. 또한, 한 유전자의 mRNA 당 다수의 타겟 부위를 선정하여 siRNA를 제조하고 적어도 세포 수준에서 직접적으로 이들의 효과를 확인함으로써 발현 억제 효능이 우수한 최적 위치의 서열을 발굴하는 과정이 필요하다.
- [10] 따라서, 본 발명에서는 리보솜 단백질(ribosomal protein S3; rpS3)의 발현을 억제시키는 siRNA를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, rpS3내 특정 타겟 부위에 결합하는 rpS3 siRNA를 제작하고, 상기 제작된 siRNA가 시판중인 상품에 비해 내재 rpS3 (endogenous rpS3) 단백질의 발현을 억제시키는데 효과가 탁월하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [11]
- [12] 발명의 요약
- [13] 본 발명의 목적은 rpS3의 발현을 특이적으로 억제시키는 siRNA를 제공하는데 있다.
- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 가지는 rpS3 mRNA의 777 내지 795번째 염기서열 또는 796 내지 914번째 염기서열에

결합하는 rpS3 단백질에 대한 siRNA를 제공한다.

[15]

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 세포내 침투된 rpS3 siRNA의 효능(efficiency)을 확인한 결과를 나타낸 것이다 (lane 1: Scramble, lane 2: RPS3-203, lane 3: RPS3-635, lane 4: RPS3-777, lane 5: RPS3-796).

[17] 도 2는 rpS3 siRNA의 효능(efficiency)을 비교한 결과를 나타낸 것이다 (lane1: Control, lane 2: RPS3-777, lane 3: B사, lane 4: S사).

[18] 도 3은 siRNA에 의해 영향을 받지 않는 rpS3를 발현하는 안정한 세포(stable cell)를 확인한 결과를 나타낸 것이다 (lane 1: Scramble, lane 2: RPS3-203, line 3: RPS3-635, lane 4: RPS3-777, lane 5: RPS3-796).

[19]

[20] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[21] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[22] 본 발명에서는, 과발현되는 단백질에는 영향을 미치지 않으며, 세포 내 원래 존재하는 rpS3 단백질 (endogenous rpS3)의 발현을 특이적으로 억제시키는 효능이 탁월한 siRNA를 제작하였다.

[23] 본 발명에서는, 제작된 rpS3의 siRNA가 세포 내로 침투되었을 경우에 효율적으로 작동하는지를 확인하기 위하여, 여러 가지 동물세포를 이용하여 대조군으로 쓰이는 스크램블(scramble) siRNA, 기존에 본 연구진이 rpS3 단백질을 타겟으로 제작한 siRPS-203, 635 및 본 발명에서 제작한 siRPS3-777 및 796 등을 각 siRNA를 세포 내로 침투시켜 실제 세포 내에 존재하는 rpS3 단백질의 양을 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 통해 측정하였다. 그 결과, 대조군으로 사용된 스크램블(scramble) siRNA는 세포 내 rpS3 단백질의 양적인 변화를 보이지 못한 반면에, 본 발명에서 새롭게 제작된 777 및 796 siRNA는 rpS3 단백질의 양적인 변화를 매우 크게 억제시킨다는 것을 확인하였으며, 게다가 기존에 사용되어져 오던 203 및 635 siRNA 보다 더 많은 양의 단백질을 억제시키는 것을 확인하였다 (도 1).

[24] 즉, 본 발명의 일 실시예에서 siRPS3-777 및 796이 rpS3 단백질의 발현량을 특이적으로 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[25] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1의 염기서열을 가지는 rpS3 mRNA의 777 내지 795번째 염기서열 및 796 내지 914번째 염기서열로 이루어지는 군에서 선택되는 타겟 염기서열에 결합하여 rpS3 단백질의 발현을

- 억제하는 siRNA(서열번호 2 및 3)에 관한 것이다.
- [26] 본 발명에 따른 siRNA는 15 내지 21 뉴클레오타이드 길이를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [27] 본 발명에서 용어, “siRNA”란 표적 mRNA의 절단을 통하여 표적 mRNA의 분해를 유도하거나 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 짧은 이중사슬의 RNA를 의미한다.
- [28] 본 발명에 따른 rpS3 mRNA의 777 내지 795 번째 및 796 내지 914 번째 염기서열에 결합하는 siRNA는 각각 서열번호 2 및 3으로 표시된다.
- [29] 본 발명의 siRNA는 표적 mRNA와 완전히 상보적 결합을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음) 또는 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 본 발명 siRNA를 이루는 뉴클레오타이드 길이는 rpS3의 활성 및 발현을 방해할 수 있는, 10 내지 40 뉴클레오타이드, 바람직하게는 15 내지 30 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 19 내지 21 뉴클레오타이드 길이의 이중가닥 RNA일 수 있다.
- [30] 본 발명에서 siRNA의 길이는 뉴클레오타이드가 이중가닥(페어링)을 이루는 길이를 말한다. 본 발명 siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단이 모두 가능하다.
- [31] 점착 말단 구조는 3' 말단 쪽이 돌출(overhang)한 구조와 5' 말단쪽이 돌출한 구조가 모두 가능하다. 돌출하는 뉴클레오타이드 수는 한정되지 않으나, 예를 들어 1 내지 8 뉴클레오타이드, 바람직하게는 1 내지 4 뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, siRNA는 표적 유전자의 발현 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서, 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 dTdT, UU, 또는 이중가닥 형성부에서 계속해서 rpS3 mRNA와 일치하는 또는 상보적인 서열 등을 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.
- [32] 본 발명의 siRNA는 생체 내 핵산 분해효소에 의한 빠른 분해를 막고 생체 내 안정성을 높이기 위해 당업계에 알려진 일반적인 방법으로 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, siRNA에 포함되는 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 당(ribose ring)의 2'-위치의 수산기를 수소 원자, 할로젠 원자, -O-알킬기, -O-아실기 또는 아미노기, 구체적으로는 H, OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br, I 등으로 수식하거나 (이 때 R은 알킬 또는 아릴, 바람직하게는 탄소수 1~6의 알킬기, R'은 알킬렌, 바람직하게는 탄소수 1~6의 알킬렌일 수 있다), 인산 백분을 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 포스포로아미데이트, 또는 보라노포스페이트 등으로 수식할 수 있다.
- [33] 상기 화학적 변형은, 본 발명의 siRNA에 포함되는 적어도 하나의

뉴클레오티드가 LNA (locked nucleic acid), UNA(unlocked nucleic acid), 몰포리노(morpholino), PNA (peptide nucleic acid) 중 어느 하나의 핵산 유사체 형태를 가지도록 치환된 것임을 특징으로 할 수 있다. 이들 LNA, UNA, PNA, 몰포리노 등의 제조는 본 발명에서 제공하는 siRNA 서열 정보를 바탕으로 당업계에 알려진 지식에 의하여 제조할 수 있으며, 기존의 문헌을 참고할 수 있다 (Veedu RN, Wengel J., *Chem Biodivers*, 7(3):536-42, 2010; Demidov VV., *Trends Biotechnol*, 21(1):4-7, 2003; Shantanu Karkare *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 71:575-586, 2006).

- [34] siRNA의 화학적 변형의 일례로, siRNA 센스 또는 안티센스 가닥의 포스포디에스테르 결합을 보라노포스페이트(boranophosphate) 또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 치환하여 핵산 분해에 대한 저항성을 높일 수 있다. 일례로, siRNA 센스 또는 안티센스 가닥의 3' 말단 또는 5' 말단 또는 양 말단, 바람직하게는 RNA의 종결 위치, 예컨대, 3' 말단 돌출부(예컨대 (dT)_n, n=1-5, 바람직하게는 2-4의 정수)에만 도입할 수 있다.
- [35] 다른 일례로, siRNA 센스(sense) 또는 안티센스 가닥의 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에 ENA(Ethylene bridge nucleic acid) 혹은 LNA(Locked nucleic acid)를 도입하는 방법이 있으며, 바람직하게는 siRNA 센스 (sense) 가닥의 5' 말단에 도입할 수 있다. 이를 통해 RNAi 능력에 영향을 미치지 않고 siRNA 안정성을 증가시키고 면역 반응 및 비특이적 억제 효과를 줄일 수 있다.
- [36] 본 발명의 siRNA는 이의 활성을 저하시키지 않는 변화를 갖는 기능적 등가물인, 하나 이상의 치환, 삽입, 결실 및 이들의 조합을 갖는 변형체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 siRNA는 각 해당 서열번호의 siRNA와 80% 이상의 상동성을 나타낼 수 있으며, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 나타내는 것을 포함할 수 있다. 이러한 상동성은 당 분야에 널리 공지된 컴퓨터 알고리즘, 예를 들어 Align 또는 BLAST 알고리즘을 이용하여 뉴클레오타이드의 서열을 표적 유전자의 상응하는 부분과 비교하여 용이하게 결정할 수 있다.
- [37] 본 발명의 siRNA는 기본적으로 두 가닥의 RNA가 쌍을 이루어 이중가닥을 형성하는 완전한 형태, 즉 인 비트로(in vitro)에서 siRNA를 직접 합성한 뒤 트랜스펙션(transfection)을 통해 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 플라스미드계 shRNA 벡터와 PCR-유도 siRNA 발현 카세트 등에 의한 트랜스펙션에 이용될 수 있도록 짧은 헤어핀을 갖는 구조로 변형된 형태일 수 있다.
- [38] siRNA를 제조하는 방법으로, 직접 화학적으로 합성하는 방법 (Sui G *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:5515-5520, 2002), 인 비트로(in vitro) 전사를 이용하여 합성하는 방법 (Brummelkamp TR *et al.*, *Science*, 296:550-553, 2002), 인 비트로 전사에 의해 합성된 긴 이중-가닥 RNA를 RNaseIII 패밀리 효소를 이용하여 절단하는 방법(Paul CP *et al.*, *Nature Biotechnology*, 20:505-508, 2002) 등 당업계에

공지된 다양한 방법에 의해 합성할 수 있다.

- [39] 본 발명에서는 본 발명에 따른 siRNA가 판매되는 siRNA와 효율적인 면에서 어떠한 차이가 있는지 확인하기 위하여, 동일한 양의 siRNA를 마우스 섬유아세포(mouse fibroblast) 내로 침투시켜 실제 세포 내에 존재하는 rpS3 단백질의 양을 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 통해 수행하였다. 그 결과, rpS3 단백질의 양적 변화는 매우 컸으며, B 사의 siRNA는 전반적으로 효율이 적은 반면, S사의 제품은 약 50~60% 가량 단백질의 양을 줄였지만, 본 발명의 siRNA는 약 80~90% 가량의 rpS3 단백질의 녹 다운(knock down)의 효과가 있음을 확인하였다 (도 2).
- [40] 본 발명에 따른 siRNA는 인간(human), 마우스(mouse) 및 원숭이(monkey) 세포까지 용이하게 사용할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [41] 아울러, 본 발명에서는 세포 내에 원래 존재하는 rpS3 단백질만을 조절하고, 외부로부터 들어온 과발현되는 rpS3 단백질에는 영향을 주지 않는 siRNA 시스템 구축하고자, HT1080 세포에 Flag가 tagging된 rpS3 construct (DNA)를 침투시킨 뒤, DNA가 들어간 세포만을 획득하기 위해 G418 (800 ug/ml)을 처리하여 단일세포(single cell)를 얻었다.
- [42] 상기 세포에서의 siRNA의 효과 및 태깅(tagging)된 단백질의 발현 정도를 확인하기 위하여, 스크램블(scramble) 또는 RPS3-77 및 796 siRNA를 처리하여 rpS3 단백질 및 Flag-rpS3 단백질의 양 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 통해 측정하였다. 그 결과, 대조군인 스크램블(scramble)에 의해서는 아무 영향이 없었으며, RPS3-777 및 796에 의해서 내재성(endogenous) rpS3의 존재량이 억제하지만, 플렉(Flag)이 태깅(tagging)된 rpS3 단백질의 양이 오히려 증가되는 것을 확인하였다 (도 3).
- [43] 이러한 결과로부터 안정적으로 발현 양이 증가된 Flag-rpS3 단백질이 야생형(wild-type) 외에도 다른 돌연변이종(mutant-type)도 발현 양을 증가시켜서, 이 단백질이 생물학적으로 어떤 기능을 보이는지 연구할 수 있는 시스템을 구축할 수 있다.
- [44] 따라서 본 발명에 따른 siRNA는 내재적으로 존재하는 rpS3 단백질의 발현은 억제시키고, 태깅(tagging)되어 과발현되는 단백질에는 영향을 미치지 않는 것을 특징으로 한다.
- [45] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [46]
- [47] 실시예 1: siRNA에 대한 타겟 서열(target sequence) 탐구
- [48]
- [49] siRNA의 타겟(target) 부위를 찾기 위해서 rpS3 DNA 서열(DNA sequence)의

타겟 서열(target sequenc)을 찾아주는 프로그램에 대입하여 결과들을 비교/분석하였다(Ambion, Promega, OligoEngine, dharmacon).

- [50] rpS3 DNA 서열(DNA sequence)을 세 부분으로 구분하여, 실제로 단백질로 합성되는 부분과 그 외에 앞 (5'-UTR), 뒤 (3'-UTR) 부분으로 나누었다. rpS3 단백질의 과발현을 위해 만들어진 플라스미드(plasmid)는 실제로 단백질로 만들어지는 부분으로만 만들어져 있다. 그리고 엑손(exon)이지만, 해독(translation)이 되지 않는 엑손-7(exon-7)을 포함한 3'-UTR에서 siRNA 효율(siRNA efficiency)이 높은 타겟 서열(target sequenc)을 찾아주는 프로그램을 사용하였다 (Ambion, Promega, dharmacon). 또한 인간(human)과 마우스(mouse)의 DNA 서열(DNA sequence)을 각각 대입하여서 공통적으로 효율(eficiency)이 높게 나타나는 타겟 서열(target sequenc)을 조사하였다.
- [51] 타겟으로 했을 경우에 높은 효과를 얻을 수 있는 예상 서열 중에서 각 프로그램에서 공통적으로 제시된 부분을 이용하여 siRNA 타겟 서열로 결정하였다. 결정된 서열의 siRNA는 dharmacon 제조사를 통해서 합성하였다. 대조군인 Control siRNA는 국내의 Bioneer 제조사의 AccuTarget™ Negative control siRNA를 사용하였다.
- [52] siRPS3-777(RPS3-777, siRNA777, 777)은 rpS3 mRNA의 777~795 부분을 타겟으로 하며, siRPS3-796(RPS3-796, siRNA796, 796)는 rpS3 mRNA의 796~914 부분을 타겟으로 하도록 합성하였다 (표 1).

[53]

[54] 표 1

[Table 1]

siRNA oligo	siRNA sequence		Sequence 길이
siRPS3-777	CAG CTG TAT TCT GGA GTC T	서열번호 2	19 Mer
siRPS3-796	GGA TGT TGC TCT CTA AAG A	서열번호 3	19 Mer

[55]

[56] 실시예 2: siRNA를 통한 세포내 rpS3 발현양 조절

[57]

- [58] 제작된 rpS3의 siRNA가 세포내로 침투되었을 경우에 효율적으로 작동하는지를 확인하기 위하여, 여러 가지 동물세포(mammalian cell)를 이용하여 실험하였다. 각 siRNA (200pmole)를 리포펙타민(Lipofectamine) RNAiMAX (Invitrogen) 8μl를 이용하여 역방향 트랜스펙션(reverse transfection) 방법을 통해 세포내로 침투시켜 주었다. 이때 각 동물세포의 수는 60mm 디쉬(dish)에 약 20,000개의 세포가 들어가도록 하였다. 트랜스펙션(transfection)시키고, 16시간이 지난 후에 세포를 수득(harvest)하여 실제 세포내 존재하는 rpS3 단백질의 양을

웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 통해 확인하였다.

[59] 동물세포인 HeLa(KCLB 10002)와 293T(KCLB 21573) 세포에 대조군으로 쓰이는 스크램블(scramble) siRNA와 기존에 본 연구진이 rpS3 단백질을 타겟으로 만들었던 RPS3-203(203) 및 635(635)와 함께, 본 실시예에서 제작된 siRPS3-777 및 796을 침투시켰다.

[60] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 대조군으로 사용된 스크램블(scramble) siRNA는 세포내 rpS3단백질의 양적인 변화를 보이지 못한 반면에, 본 발명에 따른 RPS3-777 및 796은 기존에 사용되어져 오던 RPS3-203 및 635 보다 rpS3 단백질의 발현량을 더욱 억제시키는 것을 확인할 수 있었다.

[61]

[62] 실시예 3: 시판중인 siRNA(mouse)와의 비교

[63]

[64] 여러 회사들에 의해서 많은 단백질들에 대한 siRNA가 판매되고 있다. 이중 인간(Human) 뿐만 아니라, 실험에 많이 사용되는 마우스 세포주(mouse cell line)를 대비하여 마우스 rpS3 단백질을 타겟으로 하는 siRNA도 제약회사에서 판매되고 있다. 본 실시예에서는 실시예 1에서 제작된 siRNA(siRPS3-777)가 시판중인 siRNA와 효율적인 면에서 어떠한 차이가 있는지 알아보기 위해, 동일한 양(200pmole)의 siRNA를 마우스 섬유아세포(mouse fibroblast cell)에 투입시켜서 그 효율을 비교하였다.

[65] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, B사의 siRNA는 전반적으로 효율이 적은 반면, S사의 제품은 약 50~60% 가량 단백질의 양을 억제시켰지만, 본 발명에 따른 siRNA(RPS3-777)는 약 80~90% 가량의 rpS3 단백질의 녹 다운(knock down)의 효과를 나타냈다.

[66]

[67] 실시예 4: 안정적인 siRNA-resistant rpS3를 발현하는 세포의 구축

[68]

[69] 실제로 실험을 진행할 시에는 원래의 단백질 (WT)과 그 기능을 변화시킨 변형(mutant) 단백질의 비교가 매우 중요하다. 따라서 본 실시예에서는 둘 사이의 비교를 위해 태깅(tagging) 시스템을 이용해 단백질 과발현을 유도하였다. 그런데, 이때에 과발현을 시켜도 내재적으로(endogenous) 존재하는 단백질로 인해 정확한 분석이 곤란하다. 따라서 본 실시예에서는 태깅(tagging)된 단백질이 침투를 받지 못하는 siRNA 시스템을 구축하고자 하였다.

[70] 먼저 rpS3 과발현 세포를 만들기 위해서 HT1080 세포에 플랙(Flag)이 태깅(tagging)된 rpS3 컨스트럭트(construct) (DNA)를 침투시킨 뒤, DNA가 들어간 세포만을 선별(selection)하기 위해 G418 (800 ug/ml)을 처리하여 단일 세포(single cell)를 획득하였다. 이렇게 얻어진 세포는 특정 단백질을 안정적으로 발현하는 특징을 갖게 되기 때문에 “안정한 세포(stable cell)”라고 한다. 이 세포에서 siRNA의 효과 및 태깅(tagging)된 단백질의 발현 정도를 확인하기 위하여,

스크램블(scramble) 또는 RPS3-777 및 796 siRNA를 처리하였다.

- [71] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, siRNA를 처리한 결과는 이전과 마찬가지로 대조군인 스크램블(scramble)에 의해서는 아무 영향이 없었으며, 야생형 세포주에서 siRNA에 의해서 기존에 사용되어져 오던 siRNA 및 본 발명에 따른 siRNA가 모두 내재(endogenous) rpS3의 발현량을 감소하였지만, 플랙(Flag)이 태깅(tagging)된 rpS3 단백질의 양에 있어서, 203(RPS3-203) 및 635(RPS3-635)에서는 감소한 반면, 777(RPS3-777) 및 796(RPS3-796)에서는 오히려 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이는 안정되게 발현되는 Flag-rpS3도 내재성(endogenous) rpS3와 함께 양적인 조절을 받고 있음을 말해주는 것이다. 이러한 방법으로 안정적으로 발현 양이 증가된 Flag-rpS3 단백질이 야생형(wild-type) 외에 다른 돌연변이(mutant-type)에서도 발현 양을 증가시켜서, 이 단백질이 생물학적으로 어떤 기능을 보이는지 연구할 수 있는 시스템을 구축하였다. rpS3단백질 이외의 다른 단백질에도 적용가능하며, siRNA를 이용하여 얻은 결과를 본 실시례와 같은 방법을 통해 다시 한 번 확인할 수 있기 때문에, siRNA를 이용한 실험에서 가장 문제가 되는 오프-타겟 효과(off-target effect)를 배제할 수 있는 장점이 있다.

[72]

산업상 이용가능성

- [73] 본 발명에 의한 siRNA는 세포내 내재적으로 존재하는 rpS3 단백질의 발현은 특이적으로 억제시키고, 태깅(tagging)되어 과발현되는 단백질에는 영향을 미치지 않는 siRNA로써, 종래 상업화된 상품에 비해 rpS3의 발현 억제능이 탁월하므로 경제적 및 효율적 측면에서 우수한 효과가 있다.

[74]

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

[76]

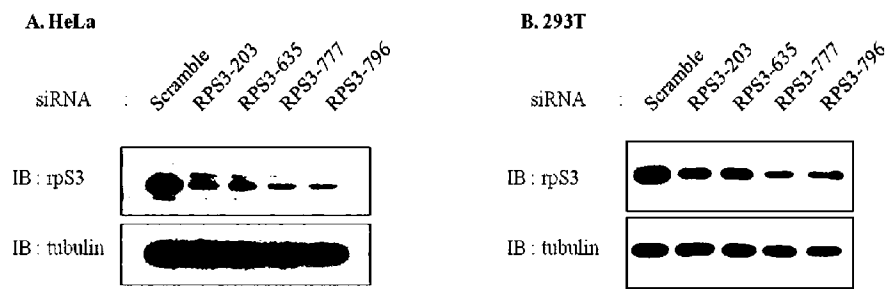
서열목록 Free Text

- [77] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 염기서열을 가지는 rpS3 mRNA의 777 내지 795번째 염기서열 또는 796 내지 914번째 염기서열에 결합하는 rpS3 단백질에 대한 siRNA.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 15 내지 21 뉴클레오타이드 길이를 가지는 rpS3 단백질에 대한 siRNA.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 rpS3 mRNA의 777 내지 795 번째 염기서열에 결합하는 siRNA는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 rpS3 단백질에 대한 siRNA.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 rpS3 mRNA의 796 내지 914 번째 염기서열에 결합하는 siRNA는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 rpS3 단백질에 대한 siRNA.

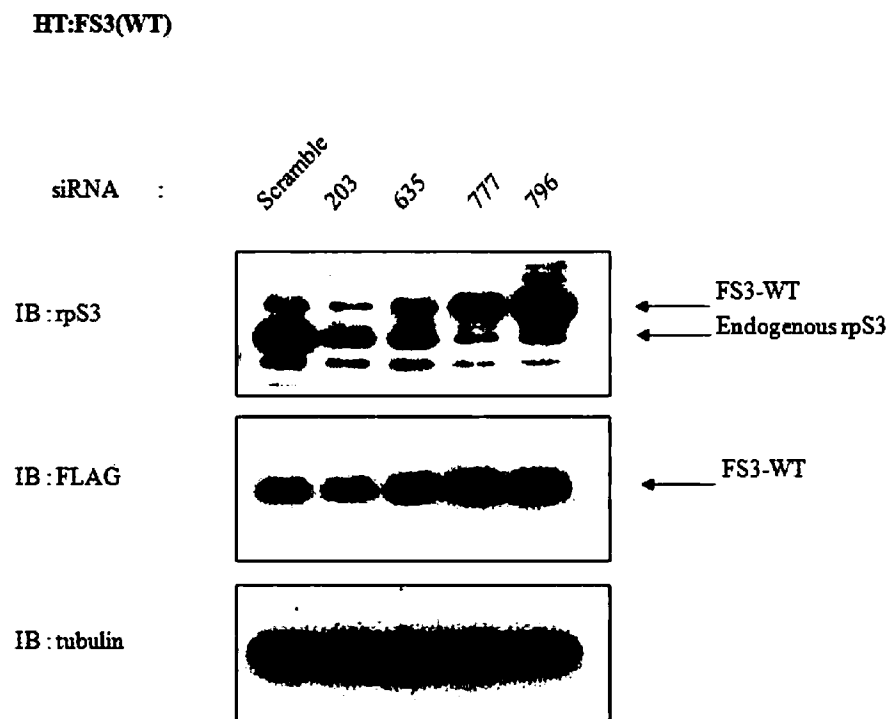
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/001053

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/113; A61K 31/7105; C07H 21/02; A61K 39/21; C12N 15/11

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: rpS3, ribosomal protein S3, siRNA, knockdown, expression

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2010-0090341 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 16 August 2010 See paragraph [0012], table 1, claims 1, 2, figure 1 etc.	1-4
A	WAN, F. et al., "Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kB complexes that mediates selective gene regulation", Cell, vol. 131, pp. 927-939 (30 November 2007) See abstract, figures 2, 7, Experimental procedures	1-4
A	HEGDE, V. et al., "Knockdown of ribosomal protein S3 protects human cells from genotoxic stress", DNA Repair, vol. 6, pp. 94-99 (online 17 October 2006) See abstract, figures 2-4, Materials and methods	1-4
A	KR 10-2010-0015529 A (UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA 12 February 2010 See abstract, paragraphs [0014]-[0018], claim 1	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 MAY 2014 (26.05.2014)

Date of mailing of the international search report

27 MAY 2014 (27.05.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/001053

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0090341 A	16/08/2010	NONE	
KR 10-2010-0015529 A	12/02/2010	CA 2680589 A1	18/09/2008
		EP 2134374 A2	23/12/2009
		EP 2134374 B1	20/11/2013
		EP 2546651 A1	16/01/2013
		EP 2550976 A2	30/01/2013
		EP 2550976 A3	03/04/2013
		JP 2010-521439A	24/06/2010
		US 2010-0081704 A1	01/04/2010
		US 2013-0041012 A1	14/02/2013
		US 2013-0041013 A1	14/02/2013
		US 2013-0041014 A1	14/02/2013
		US 8232085 B2	31/07/2012
		WO 2008-110624 A2	18/09/2008
		WO 2008-110624 A3	27/11/2008
		WO 2008-110624 A9	18/09/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/113(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/113; A61K 31/7105; C07H 21/02; A61K 39/21; C12N 15/11

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: rpS3, ribosomal protein S3, siRNA, knockdown, expression

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2010-0090341 A (고려대학교 산학협력단) 2010.08.16 식별번호 [0012], 표 1, 청구항 1, 2, 도면 1 등 참조	1-4
A	WAN, F. 외 11명, "Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kB complexes that mediates selective gene regulation", Cell, Vol. 131, pp. 927-939 (2007.11.30.) 초록, 그림 2, 7, Experimental procedures 참조	1-4
A	HEGDE, V. 외 2명, "Knockdown of ribosomal protein S3 protects human cells from genotoxic stress", DNA Repair, Vol. 6, pp. 94-99 (online 2006.10.17.) 초록, 그림 2-4, Materials and methods 참조	1-4
A	KR 10-2010-0015529 A (유니베르시타 데글리 스투디 디 밀라노-비코카) 2010.02.12 요약, 식별번호 [0014]~[0018], 청구항 1 참조	1-4



추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.



대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 05월 26일 (26.05.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 05월 27일 (27.05.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

조영균

전화번호 +82-42-481-8298



제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐ 서면

☒ 전자적 형태

b. 제출시기

☒ 출원시 국제출원에 포함

☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0090341 A	2010/08/16	없음	
KR 10-2010-0015529 A	2010/02/12	CA 2680589 A1	2008/09/18
		EP 2134374 A2	2009/12/23
		EP 2134374 B1	2013/11/20
		EP 2546651 A1	2013/01/16
		EP 2550976 A2	2013/01/30
		EP 2550976 A3	2013/04/03
		JP 2010-521439A	2010/06/24
		US 2010-0081704 A1	2010/04/01
		US 2013-0041012 A1	2013/02/14
		US 2013-0041013 A1	2013/02/14
		US 2013-0041014 A1	2013/02/14
		US 8232085 B2	2012/07/31
		WO 2008-110624 A2	2008/09/18
		WO 2008-110624 A3	2008/11/27
		WO 2008-110624 A9	2008/09/18