(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0124103
(43) 공개일자 2017년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *B82Y 5/00* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
B82Y 5/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0055736
(22) 출원일자 2017년04월28일
심사청구일자 2017년04월28일
(30) 우선권주장
1020160053193 2016년04월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이혁진
서울특별시 마포구 백범로 205, 104동 504호 (신공덕동, 마포펜트라우스)
김보영
인천광역시 남동구 에코중앙로 163, 707동 502호 (논현동, 에코메트로7단지아파트)
장보라
서울특별시 강서구 양천로 452, A동 1303호 (등촌동)
(74) 대리인
안소영

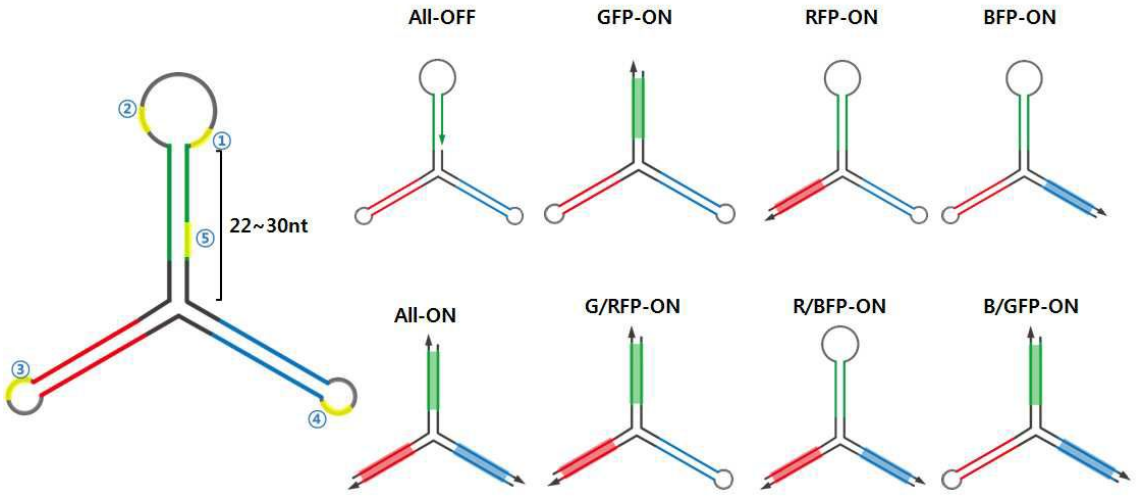
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **유전자 침묵효과가 강화된 다이서 기질로서의 RNA 나노구조체 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 유전자 억제효과가 강화된 다이서 기질로서의 RNA 나노구조체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 RNA 나노구조체는 복수 개의 서로 동일하거나 상이한 RNAi 서열을 하나의 RNA 나노구조체 내에 포함하여 여러 유전자의 발현을 선택적, 동시다발적, 그리고 효과적으로 조절할 수 있다. 또한 본 발명의 RNA 나노구조체의 제조시 RNA 나노구조체의 루프의 개방 또는 폐쇄를 조절함으로써 RNAi 서열의 활성화를 계획적으로 조절할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/141 (2013.01)
C12N 2310/34 (2013.01)
C12N 2310/51 (2013.01)
C12N 2310/531 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A1A1A05027352
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-일반연구자지원사업-신진연구(후속연구지원)
연구과제명 핵산 자기조립을 통한 새로운 페러다임의 표적 지향성 침묵 유전자 전달체 개발
기 여 율 40/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2015.09.01 ~ 2018.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012K1A1A2A01056092
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 국제협력사업-글로벌개방혁신연구센터
연구과제명 삼차원 DNA 구조체 기반 고효율 siRNA 전달체 기술 개발
기 여 율 30/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.12.01 ~ 2017.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014M3C1A3054153
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업-첨단융합기술개발사업-미래유망융합기술파이오니어사업
연구과제명 나노 DNA 구조체 기반 분자물질 전달기술 개발 및 생체 내 거동 평가 연구
기 여 율 30/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2015.03.01 ~ 2016.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

방사형으로 뻗은 K 개의 팔(arm)을 갖는 RNA 나노구조체로서,

K는 3≤K≤90의 정수이고,

각 팔은 스템(stem) 및 루프(loop)로 구성되고,

1) 각 팔의 스템은 코어(core) 및 RNAi 서열(RNAi sequence)로 구성되고,

ⅰ. 상기 코어는 2-20 nt(nucleotide) 길이이고,

ii. 상기 RNAi 서열은 임의의 유전자에 대한 센스 서열과 안티센스 서열이 이중가닥을 이룬 것으로서, 19 또는 20 nt 길이이고,

상기 안티센스 서열은 5′ -말단 또는 5′ -말단에서 두 번째 뉴클레오티드에 U(우라실)-A(아데닌) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 갖고, 상기 센스 서열은 5′ -말단에 G(구아닌)-C(시토신) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 갖고,

상기 안티센스 서열의 5′ -말단으로부터 7개의 뉴클레오티드(시드 영역(seed region)) 내에 4개 이상의 U(우라실)-A(아데닌) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 포함하고,

2) 각 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열은 서로 동일하거나 상이하고

3) 각 팔의 루프는 2-30 nt로 구성되고, 각각 개방(open) 또는 폐쇄(closed)되어 있고, 루프가 개방된 경우 RNAi 서열의 3′ 말단에 2-10 nt 길이의 단일가닥 RNA(오버행(overhang))를 갖는 RNA 나노구조체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 각 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열은 센스 서열의 5′ -말단이 루프 방향으로 향하거나 또는 안티센스 서열의 5′ -말단이 루프 방향으로 향하는 RNA 나노구조체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 각 팔의 루프가 개방된 경우 RNAi 서열의 3′ 말단에 2 nt 길이의 단일가닥 RNA(오버행(overhang)을 갖는 RNA 나노구조체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 각 팔의 스템에 포함된 코어는 G(구아닌)-C(시토신) 콘텐츠(G-C contents)가 50% 이상인 RNA 나노구조체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 K는 3 또는 4인 RNA 나노구조체.

청구항 6

1. 방사형으로 뻗은 K 개의 팔(arm)을 갖는 원형(circular) DNA 주형가닥을 제조하는 단계로서,

K는 3≤K≤90의 정수이고,

각 팔은 스템(stem) 및 루프(loop)로 구성되고,

1) 각 팔의 스템은 코어(core) 및 RNAi 서열(RNAi sequence)로 구성되고,

ⅰ. 상기 코어는 2-20 nt(nucleotide) 길이이고,

ii. 상기 RNAi 서열은 임의의 유전자에 대한 센스 서열과 안티센스 서열이 이중가닥을 이룬 것으로서, 19 또는 20 nt 길이이고,

상기 안티센스 서열은 5′ -말단 또는 5′ -말단에서 두 번째 뉴클레오티드에 U(우라실)-A(아데닌) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 갖고, 상기 센스 서열은 5′ -말단에 G(구아닌)-C(시토신) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 갖고,

상기 안티센스 서열의 5′ -말단으로부터 7개의 뉴클레오티드(시드 영역(seed region)) 내에 4개 이상의 U(우라실)-A(아데닌) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 포함하고,

2) 각 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열은 서로 동일하거나 상이하고

3) 각 팔의 루프는 2-30 nt로 이루어지고, 1 이상의 루프는 8-30 nt로 이루어지는, 단계;

2. 상기 1) 단계에서 제조된 원형 DNA 주형가닥에 RNA 폴리머라제(RNA polymerase)를 처리하여 RCT(Rolling Circle Transcription)에 의하여 증폭 RNA 산물을 얻는 단계;

3. 상기 증폭 RNA 산물에 DNaseI를 처리하여 원형 DNA 주형가닥을 제거하는 단계; 및

4. 상기 원형 DNA 주형가닥이 제거된 증폭 RNA 산물에 1종 이상의 DNA 헬퍼(helper)를 처리하고, RNaseH를 처리하여 DNA 헬퍼와 RNA/DNA 이중가닥을 형성한 부분을 절단하는 단계;및

5. 상기 절단된 증폭 RNA 산물의 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노구조체를 얻는 단계를 포함하는, 방사형으로 뻗은 K개의 팔(arm)을 갖는 RNA 나노구조체를 제조하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 1단계는

a) 원형 DNA 주형가닥의 루프가 될 부분을 사이에 두고 양 쪽에 임의의 유전자에 대한 센스 서열과 상기 유전자에 대한 안티센스 서열이 각각 존재하고, 센스 서열과 안티센스 서열 말단에 각각 원형 DNA 주형가닥에서 코어가 될 부분이 존재하는 K 개의 DNA 주형가닥을 준비하는 단계;

b) 상기 K 개의 DNA 주형가닥을 혼성화하여 서로 상보적인 서열 간에 서로 결합되도록 함으로써 K 개의 닉(nick)을 갖는 DNA 주형가닥을 제조하는 단계; 및

c) 상기 K 개의 닉을 갖는 DNA 주형가닥에 DNA 리가아제(DNA ligase)를 처리하여 원형 DNA 주형가닥을 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 4 단계에서 상기 DNA 헬퍼는 2 - 30 nt 길이로 적어도 4개의 비변형된 부분을 포함하는 3'-말단, 5'말단 또는 중간부분의 뉴클레오티드가 2′ -O-메틸화된 것인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 2 단계에서 상기 RNA 폴리머라아제는 T7-RNA 폴리머라아제인 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 2 단계에서 RNA 폴리머라제와 함께 프라이머를 처리하여 RCT에 의하여 증폭 RNA 산물을 얻고, 여기에서 상기 프라이머는 8-30 nt 길이의 DNA 주형가닥의 루프에 상보적인 12-30 nt 길이의 핵산 서열로 구성된 방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 1 단계에서 원형 DNA 주형가닥 중 1 이상의 루프는 RNA 폴리머라제가 인식하는 RNA 폴리머라제 프로모터(promoter) 서열을 포함하는 방법.

청구항 12

제6항에 있어서, 상기 K는 3 또는 4인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유전자 침묵효과가 강화된 다이서 기질로서의 RNA 나노구조체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생물학적 유전정보를 저장하고 전달하는 유전체로 인식되어 오던 핵산은 최근 핵산의 상보적 서열에 의한 자가 조립 (self assembly) 성질을 바탕으로 한 기능성 생체고분자로서의 가능성을 인정받고 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] 특히 특정 질병의 경우 RNA 간섭 (RNA interference, RNAi)에 의해 효과적으로 질병이 치료될 수 있다는 것이 알려지면서 암 및 다양한 유전자 질병에 대하여 RNA 약물을 활용하여 치료하고자 하는 시도가 있으며, 효과적 유전자 침묵을 달성하기 위해 다양한 핵산 구조체에 대한 연구가 진행되었다. RNA 간섭의 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 타겟 mRNA를 분해시키거나 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 광범위한 연구가 진행되어왔다.

[0004] 소간섭 RNA (siRNA) 와는 별도로 25-35 bp 의 긴 길이를 갖는 dsRNA의 경우, 세포질 내 효소 단백질인 다이서 (Dicer)에 의하여 인식이 되며 19-20 bp 소간섭 RNA로의 변환을 통해 효과적인 타겟 유전자의 침묵효과를 나타내는 것으로 발표되었다. 이러한 상대적으로 긴 길이를 갖는 dsRNA의 경우 "다이서 기질 RNA (Dicer Substrate RNA)" 라는 명칭으로 이용되었다. RNA 간섭 현상에서의 다이서 단백질은 마이크로 RNA (miRNA 및 shRNA)를 적절한 크기로 자르는 역할과 RNA 간섭을 일으키기 위한 RNA-induced silencing complex (RISC)를 구성하는 것을 돕는 역할로 정의할 수 있다. 이러한 RISC 형성을 다이서가 도와주는 작용을 통해 다이서 기질 RNA의 경우 일반적인 siRNA에 비하여 더 효과적인 유전자 침묵현상을 나타낸다고 보고가 되었다.

[0005] 그러나 이와 같이 침묵 RNA를 이용하는 질병 치료방법에 있어서, RNA 약물의 비교적 큰 분자량 (예, 13-20 kDa) 및 폴리음이온성 특징 (예, 40 음전하의 포스페이트)에 의해 생체 내에 RNA 약물을 효과적으로 전달할 수 없다는 한계점이 지속적으로 문제되어 왔다. 또한 나출 (naked) RNA는 세포막을 자유로이 통과할 수 없을 뿐만 아니라 변형되지 않은 나출 RNA들은, 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. 이러한 방법으로 RNA의 백본 (backbone), 염기 또는 당 (sugar)에 대한 몇몇 화학적 변형은 siRNA 안정도 및 활성을 향상시키도록 이용되어왔다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Kuriyan and O'Donnell. J Mol Biol. 1993; 234: 915~925

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 유전자 침묵효과가 강화된 다이서 기질로서의 RNA 나노구조체를 제공한다.

[0008] 본 발명은 상기 RNA 나노구조체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 상기 RNA 나노구조체를 이용하여 세포 내 발현되는 여러 타겟 유전자를 선택적, 동시다발적, 그리고 효과적으로 조절할 수 있음을 보여준다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 방사형으로 뻗은 K 개의 팔 (arm)을 갖는 RNA 나노구조체를 제공한다. 여기에서 K는 3≤K≤90의 정수이다.

[0011] 본 발명의 RNA 나노구조체의 각 팔은 스템 (stem) 및 루프 (loop)로 구성되고,

[0012] 1) 각 팔의 스템은 코어(core) 및 RNAi 서열(RNAi sequence)로 구성되고,

[0013] ⅰ. 상기 코어는 2-20 nt (nucleotide) 길이이고,

[0014] ⅱ. 상기 RNAi 서열은 임의의 유전자에 대한 센스 서열과 안티센스 서열이 이중가닥을 이룬 것으로서, 19 또는 20 nt 길이이고,

[0015] 상기 안티센스 서열은 5′ -말단에 또는 5′ -말단에서 두 번째 뉴클레오티드에 U(우라실)-A(아데닌) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 갖고, 상기 센스 서열은 5′ -말단에 G(구아닌)-C(시토신) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 갖고,

[0016] 상기 안티센스 서열의 5′ -말단으로부터 7개의 뉴클레오티드(시드 영역(seed region)) 내에 4개 이상의 U(우라실)-A(아데닌) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 포함하고,

[0017] 2) 각 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열은 서로 동일하거나 상이하고

[0018] 3) 각 팔의 루프는 2-30 nt로 구성되고, 각각 개방(open) 또는 폐쇄(closed)되어 있고, 루프가 개방된 경우 RNAi 서열의 3′ 말단에 2-10 nt 길이의 단일가닥 RNA(오버행(overhang))를 갖는다.

[0019] 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 RNA 나노구조체에서 상기 각 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열은 안티센스 서열의 5′ -말단이 루프 방향으로 향하는 것일 수 있고("Forward 구조체") 또는 센스 서열의 5′ -말단이 루프 방향으로 향하는 것일 수 있다("Reverse 구조체").

[0020] 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 RNA 나노구조체에서 상기 각 팔의 루프가 개방된 경우 3′ 말단에 2 nt 길이의 단일가닥 RNA(오버행(overhang)을 가질 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 RNA 나노구조체에서, 상기 각 팔의 코어는 G(구아닌)-C(시토신) 콘텐츠(G-C contents)가 50% 이상인 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 RNA 나노구조체에서 상기 K는 3 또는 4일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명은

[0024] 1. 방사형으로 뻗은 K 개의 팔(arm)을 갖는 원형(circular) DNA 주형가닥을 제조하는 단계로서,

[0025] K는 3≤K≤90의 정수이고,

[0026] 각 팔은 스템(stem) 및 루프(loop)로 구성되고,

[0027] 1) 각 팔의 스템은 코어(core) 및 RNAi 서열(RNAi sequence)로 구성되고,

[0028] ⅰ. 상기 코어는 2-20 nt (nucleotide) 길이이고,

[0029] ⅱ. 상기 RNAi 서열은 임의의 유전자에 대한 센스 서열과 안티센스 서열이 이중가닥을 이룬 것으로서, 19 또는 20 nt 길이이고,

[0030] 상기 안티센스 서열은 5′ -말단 또는 5′ -말단에서 두 번째 뉴클레오티드에 U(우라실)-A(아데닌) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 갖고, 상기 센스 서열은 5′ -말단에 G(구아닌)-C(시토신) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 갖고,

[0031] 상기 안티센스 서열의 5′ -말단으로부터 7개의 뉴클레오티드(시드 영역(seed region)) 내에 4개 이상의 U(우라실)-A(아데닌) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드를 포함하고,

[0032] 2) 각 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열은 서로 동일하거나 상이하고,

[0033] 3) 각 팔의 루프는 2-30 nt로 이루어지고, 그 중 1 이상의 루프는 8-30 nt로 이루어지는, 단계;

[0034] 2. 상기 1) 단계에서 제조된 원형 DNA 주형가닥에 RNA 폴리머라제(RNA polymerase)를 처리하여 RCT(Rolling Circle Transcription)에 의하여 증폭 RNA 산물을 얻는 단계;

[0035] 3. 상기 증폭 RNA 산물에 DNaseI를 처리하여 원형 DNA 주형가닥을 제거하는 단계; 및

[0036] 4. 상기 원형 DNA 주형가닥이 제거된 증폭 RNA 산물에 1종 이상의 DNA 헬퍼(helper)를 처리하고, RNaseH를 처리하여 DNA 헬퍼와 RNA/DNA 이중가닥을 형성한 부분을 절단하는 단계; 및

[0037] 5. 상기 절단된 증폭 RNA 산물의 자가조립(self assembly)을 통해 RNA 나노구조체를 얻는 단계를 포함하는, 방사형으로 뻗은 K개의 팔(arm)을 갖는 RNA 나노구조체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명의 방법의 일 구현예로서, 상기 1 단계는

[0039] a) 원형 DNA 주형가닥의 루프가 될 부분을 사이에 두고 양 쪽에 임의의 유전자에 대한 센스 서열과 상기 유전자에 대한 안티센스 서열이 각각 존재하고, 센스 서열과 안티센스 서열 말단에 각각 원형 DNA 주형가닥에서 코어가 될 부분이 존재하는 K 개의 DNA 주형가닥을 준비하는 단계;

[0040] b) 상기 K 개의 DNA 주형가닥을 혼성화하여 상보적인 서열들 간에 서로 결합되도록 함으로써 K 개의 닉(nick)을 갖는 DNA 주형가닥을 제조하는 단계; 및

[0041] c) 상기 K 개의 닉을 갖는 DNA 주형가닥에 DNA 리가아제(DNA ligase)를 처리하여 원형 DNA 주형가닥을 제조하는 단계를 포함할 수 있다.

[0042] 그러나 원형 DNA 주형가닥을 제조하는 방법은 이에 제한되지 않는다.

[0043] 본 발명의 방법의 일 구현예로서, 상기 4 단계에서 상기 DNA 헬퍼는 2 - 30 nt 길이일 수 있으며, 특정 부분의 뉴클레오티드가 2′ -O-메틸화된 것일 수 있다. 상기 특정 부분은 적어도 4개의 비변형된 부분을 포함하는 3'-말단, 5'말단 또는 임의의 중간부분일 수 있다.

[0044] 본 발명의 방법의 일 구현예로서, 상기 2 단계에서 상기 RNA 폴리머라아제는 T7-RNA 폴리머라아제일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않으며, 임의의 RNA 폴리머라아제가 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 방법의 일 구현예로서, 상기 2 단계에서 RNA 폴리머라제와 함께 프라이머를 처리하여 RCT에 의하여 증폭 RNA 산물을 얻을 수 있는데, 여기에서 상기 프라이머는 8-30 nt 길이의 DNA 주형가닥의 루프에 상보적인 12-30 nt 길이의 RNA 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0046] 본 발명의 방법의 일 구현예로서, 상기 1 단계에서 원형 DNA 주형가닥 중 1 이상의 루프는 RNA 폴리머라제가 인식하는 RNA 폴리머라제 프로모터(promoter) 서열을 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 K는 3 또는 4일 수 있다. 그러나 K는 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 RNA 나노구조체를 제공한다.

[0049] 본 발명은 상기 RNA 나노구조체를 이용하여 타겟 유전자의 발현을 억제하는 방법을 제공한다.

[0050] 본 발명은 상기 RNA 나노구조체를 대상체에 투여하여 타겟 유전자의 발현을 억제시킴으로써 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의해 치료될 수 있는 질병의 종류에는 제한이 없으나, 예컨대 갑상선암, 위암, 대장암, 폐암, 간암, 유방암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 비호지킨 림프종 등의 혈액암을 포함하는 각종 암, 류머티스성 관절염, 건선, 크론병 등을 포함하는 자가면역질환, 유전성 ATTR 아밀로이드증(Hereditary ATTR Amyloidosis)을 포함하는 아밀로이드증(Amyloidosis), 혈우병(Hemophilia) 및 기타 출혈성 장애(Bleeding Disorder), 감염성 질환을 포함하는, 보체-매개 질병(Complement-Mediated Disease), 간성 포르피린증(Hepatic Porphyria), 알파 1 항트립신 결핍증(Alpha-1 Antitrypsin Deficiency), 원발성 수산과잉뇨증(Primary Hyperoxaluria Type 1), 베타-지중해빈혈(Beta-Thalassemia), 철분 과다 장애(Iron Overload Disorder), 유전성 혈관부종(Hereditary Angiodema) 등이 될 수 있다. 또한 본 발명은 그 외 각종 유전적 투약 프로그램(Genetic Medicine Program)에서 활용될 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명은 유전자 억제효과가 강화된 다이서 기질로서의 RNA 나노구조체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본

발명의 RNA 나노구조체는 복수 개의 서로 동일하거나 상이한 RNAi 서열을 하나의 RNA 나노구조체 내에 포함하여 여러 유전자의 발현을 선택적, 동시다발적, 그리고 효과적으로 조절할 수 있다. 또한 본 발명의 RNA 나노구조체의 제조 시 RNA 나노구조체의 루프의 개방 또는 폐쇄를 조절함으로써 RNAi 서열의 활성화를 계획적으로 조절할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 본 발명의 방법에 의해 생산되는 RNA 나노구조체 중 팔(arm)이 3개인 Y자형 나노구조체를 나타낸 모식도이다. 예시적으로 각 가지에 포함된 RNAi 서열은 형광 단백질인 GFP, RFP, BFP에 대한 RNAi 서열로 표시하였다.

도 2는 본 발명의 방법에 의해 생산된 RNA 나노구조체의 모식도이다.

도 3은 RNA 나노구조체의 팔(arm)의 스템에 포함된 RNAi 서열이 구조체에서 절단된 경우를 나타낸 모식도이다. RNAi 서열은 센스 서열과 안티센스 서열이 염기쌍을 이룬 19 bp, 그리고 센스 서열과 안티센스 서열 각각의 3′-말단에 2 nt 오버행(overhang)을 갖는다.

도 4는 Forward 구조체(좌측)와 Reverse 구조체(우측)를 나타낸 모식도이다.

도 5는 RNA 나노구조체의 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열의 설계를 나타낸 모식도이다. 본 발명의 RNA 나노구조체는 상단의 도와 같이 설계되어 있다.

도 6은 RNAi 서열이 19+2 nt의 Reverse 구조체를 나타낸 것이다.

도 7은 RNAi 서열이 19+2 nt의 Forward 구조체를 나타낸 것이다.

도 8은 RNAi 서열이 20+2 nt의 Reverse 구조체를 나타낸 것이다.

도 9는 RNAi 서열이 20+2 nt의 Forward 구조체를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 RNA 나노구조체가 대상체에 투여되었을 때 유전자 침묵을 일으키는 기전을 나타낸 도이다.

도 11은 원형 DNA 주형가닥을 제조하고 RCT에 의하여 RNA 나노구조체를 제조하고 1 이상의 루프에 DNA 헬퍼가 상보적으로 결합하여 RNaseH에 의해 루프가 개방된 RNA 나노구조체를 제조하는 방법을 나타낸 도이다.

도 12는 DNA 주형가닥에서 닉(nick)이 루프에 존재하는 경우(좌측)와 닉이 스템에 존재하는 경우(우측)를 나타낸 도이다.

도 13은 닉이 스템에 존재하는 DNA 주형가닥의 구조를 보다 자세히 나타낸 도이다.

도 14는 본 발명의 RNA 나노구조체 제조방법에서 RNA 폴리머라제가 결합하는 기전을 나타낸 모식도이다. 도 14의 ①은 원형 DNA 주형가닥의 루프에 RNA 폴리머라제가 결합할 수 있는 프로모터가 존재하는 경우이고, ②는 원형 DNA 주형가닥의 루프에 상보적으로 결합하는 적절한 프라이머를 사용하여 이중가닥을 형성시켜 RNA 폴리머라제가 이를 인식하여 결합하도록 하는 경우이고, ③은 원형 DNA 주형가닥의 루프 자체를 버블 구조로 인식하여 RNA 폴리머라제가 이를 인식하여 결합하는 경우이다.

도 15는 본 발명의 헬퍼프리 Y RNA 나노구조체 합성 과정을 나타낸 모식도이다.

도 16은 루프의 개방 또는 폐쇄에 따른 본 발명의 다양한 RNA 나노구조체의 PAGE 분석결과를 나타낸 것으로, RCT 증폭산물(a) 및 RNaseH 처리 후 자가조립 산물(b)의 PAGE 분석결과를 나타낸 도이다.

도 17은 헬퍼프리 Y RNA 나노구조체의 PAGE 분석결과를 나타낸 도이다.

도 18은 본 발명의 원형 DNA 주형가닥을 이용한 RCA 증폭산물 및 자가조립 RNA 나노구조체의 AFM 이미지를 나타낸 도이다.

도 19는 GFP의 mRNA에서 RNAi 서열의 적절한 타겟을 설정한 부분을 나타낸 도이다.

도 20은 GFP에 대한 RNAi 서열인 19+2 siGFP, 23+2 siGFP, 23+2 siGFP after Dicer의 GFP 유전자 발현 억제 효과(좌측 도) 및 유전자 침묵 효능(우측 도)을 나타낸 그래프이다.

도 21은 GFP에 대한 RNAi 서열을 포함하는 Y자형 RNA 나노구조체인 25+2Y-RNA와 상기 25+2Y-RNA를 미리 in vitro에서 다이서로 처리한 것인 25+2Y-RNA after Dicer의 GFP 유전자 발현 억제 효과(좌측 도) 및 유전자 침묵 효능(우측 도)을 나타낸 그래프이다.

도 22는 FACS를 이용한 본 발명의 RNA 나노구조체의 유전자 침묵효능을 나타낸 그래프이다.

도 23은 3D FACS plot을 이용한 본 발명의 RNA 나노구조체의 유전자 조절효과를 나타낸 도이다.

도 24는 2nt-오버행에 따른 다이서 프로세싱을 비교한 도이다.

도 25는 다이서 기질이 되는 Y 나노구조체와 비-다이서 Y 나노구조체의 예상 메커니즘의 모식도(a), Y 나노구조체의 팔 길이에 따른 다이서 프로세싱(b)과 유전자 억제효과(c), 및 다이서 기질 Y 나노구조체의 장기간 유전자 억제효과(d)를 나타낸 도이다.

도 26은 표적 유전자 GAPDH에 대한 유전자 침묵 효과를 확인하기 위하여 사용된 Linear DsiGDH, pre-Let7 siGDH 및 siY-GDH의 모식도이다.

도 27은 표적 유전자 GAPDH에 대한 Linear DsiGDH, pre-Let7 siGDH 및 siY-GDH의 유전자 침묵 효능을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 상세히 설명한다. 그러나 하기의 설명은 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0054] **RNA 나노구조체**

[0055] 이하에서 본 발명의 RNA 나노구조체의 구조에 대하여 설명한다.

[0056] **(1) 전체적인 구조**

[0057] 본 발명의 RNA 나노구조체는 방사형으로 뻗은 K 개의 팔(arm)을 갖고 있다. 본원 명세서에서 방사형이란 K 개의 팔이 방사형으로 뻗어나간 형태(즉, 중앙의 한 점에서 2차원 또는 3차원 상에서 사방으로 거미줄이나 바퀴살처럼 뻗어나간 형태)를 갖게 된다. K는 $3 \leq K \leq 90$의 정수일 수 있다. 예를 들어, K가 3인 경우, 본 발명의 RNA 나노구조체는 Y 형태를 갖게 된다. K가 4인 경우, 본 발명의 RNA 나노구조체는 + 형태를 갖게 된다. 그러나 K는 3 또는 4에 제한되지 않는다.

[0058] 본 발명의 RNA 나노구조체는 그 구조로 인하여 엔도뉴클레아제, 엑소뉴클레아제와 같은 체내 뉴클레아제(nuclease)에 대한 저항성이 증가되어 혈중 안정성이 증가된다는 장점이 있다. 또한 각 팔의 길이 및 팔의 수를 조절함으로써 크기를 조절할 수 있어, EPR(Enhanced Permeability and Retention) 효과를 기대할 수 있다. 여기에서 EPR 효과란 특정한 크기를 갖는 분자가 정상 조직보다 종양 조직에 축적되는 경향이 있는 것을 의미한다. 또한 나노구조체의 크기에 따라 축적되는 장기가 달라지는 것으로 알려져 있으므로(Nature Biotechnology 33, 941-951 (2015)), 각 팔의 길이 및 팔의 수를 조절함으로써 타겟 장기를 설정할 수 있다.

[0059] 본 발명의 RNA 나노구조체의 각 팔은 스템(stem) 및 루프(loop)로 구성된다. 각 팔의 스템 부분은 코어(core) 부분 및 RNAi 서열 부분을 포함한다. 각 팔의 스템에는 1개 이상, 바람직하게는 1개의 RNAi 서열이 포함되어 있는데, 각 RNAi 서열은 각 팔의 루프 부분이 개방(open)되면 활성화될 수 있다. 즉, 각 팔의 루프 부분은 1종 이상의 DNA 헬퍼에 상보적인 부분을 1개 이상 갖고 있어서, 제조 과정에서 DNA 헬퍼와 결합하여 RNA/DNA 결합을 이룬 부분이 RNaseH에 의해 절단되어 개방될 수 있다. 본 발명의 RNA 나노구조체는 이와 같이 하나의 구조체 내에 복수 개의 서로 다른 RNAi 서열을 포함하여 여러 유전자의 발현을 동시에 침묵시킬 수 있으며, 하나의 구조체 안에 복수 개의 RNAi 서열이 포함되어 있기 때문에 RNAi 서열의 국소적 농도(local concentration)가 증가되어 다이서의 결합 친화성(binding affinity)이 증가한다는 장점이 있다.

[0060] 도 1 및 도 2는 본 발명의 RNA 나노구조체의 일예를 나타낸 모식도이다. 도 1에서는 방사형으로 뻗은 3개의 팔을 갖는 Y 형태의 RNA 나노구조체를 나타내었다. 각 팔에 RNAi 서열의 활성화 여부를 색상, 형광 등으로 확인할 수 있도록 하는 지표 서열을 포함시킬 수 있다. 예를 들어 형광 단백질인 GFP에 대한 RNAi 서열, RFP에 대한 RNAi 서열, BFP에 대한 RNAi 서열 등을 이용할 수 있으며, 도 1에서는 각각을 녹색, 적색, 청색으로 표시하였다.

[0061] 도 1의 좌측 도에서 ① 내지 ⑤로 표시한 부분이 RNaseH에 의해 절단될 수 있는 부분에 해당한다. 각 루프에는 1개 이상의 절단될 수 있는 부분이 존재하는데, 도 1에 나타낸 RNA 나노구조체의 경우 상단의 팔에 포함된 GFP에 대한 RNAi 서열의 크기가 상대적으로 크고, RNA 폴리머라제가 결합할 수 있도록 상단의 루프를 길게 하였으므로 2개의 절단될 수 있는 부분을 갖고 하단의 2개 루프에는 각각 1개씩 절단될 수 있는 부분을 갖는 것으로

하였다. 절단될 수 있는 부분의 수는 RNA 나노구조체의 크기 및 DNA 헬퍼의 종류 등에 따라 적절히 조절될 수 있다. 또한 본 발명의 RNA 나노구조체 제조 시 RNA 폴리머라제에 의해 증폭된 산물이 각각 RNA 나노구조체를 이루기 위해서는 적어도 1개 부분에서 절단되어야 하는데, 이 때 절단될 부분에는 제한이 없으나, 예를 들어 도 1에 ⑤로 표시한 바와 같이 어느 하나의 팔의 스템 부분에 절단될 부분을 위치시킬 수 있다.

[0062] 도 1의 좌측의 RNA 나노구조체에서, ⑤ 부분만 절단되면 "All-OFF" 상태, 즉 RNA 나노구조체로서 입체 구조는 이루었으나 각 팔에 포함된 RNAi 서열 중 어떤 것도 활성화되지 않은 상태가 된다. ①과 ② 부분이 절단되면 "GFP-ON" 상태, 즉 GFP가 삽입된 팔의 RNAi 서열만 활성화된 상태가 된다. ③ 부분만 절단되면 "RFP-ON" 상태가 되고, ④ 부분만 절단되면 "BFP-ON" 상태가 된다. ①, ②, ③, ④ 부분이 모두 절단되면 "All-ON", 즉 모든 팔에 포함된 RNAi 서열이 활성화된 상태가 되고, ①, ②, ③ 부분이 절단되면 "GFP, RFP-ON", ③, ④ 부분이 절단되면 "RFP, BFP-ON", ①, ②, ④ 부분이 절단되면 "BFP, GFP-ON" 상태가 된다.

[0063] 이와 같이 가장 간단한 3개의 팔을 갖는 Y 자형의 RNA 나노구조체로도 총 8가지 조합으로 RNAi 서열 활성화를 조절할 수 있는 장점이 있다. K 개의 팔을 갖는 RNA 나노구조체의 경우, 2^K 가지로 RNAi 서열의 활성화를 조절할 수 있다.

[0064] **(2) 각 팔(arm)의 구조**

[0065] 본 발명의 RNA 나노구조체의 각 팔(arm)의 스템은 21-40 nt(nucleotide) 길이가 될 수 있다. 길이가 길면 체내에서 면역반응을 유발할 가능성이 높아지는 경향이 있으므로, 예컨대 21-30 nt 길이가 될 수 있다.

[0066] 본 발명의 RNA 나노구조체의 각 팔은 스템(stem) 및 루프(loop)로 구성되며, 스템은 다시 코어(core)와 RNAi 서열로 구성된다.

[0067] 도 2에서 확인되는 바와 같이, 코어(core)는 방사형으로 각 팔이 뻗어나간 본 발명의 RNA 나노구조체에서 각 팔이 만나는 중심부에 위치한다. 각 팔에서 코어(core)는 2-20 nt 길이, 바람직하게는 2-10 nt 길이로서, 임의의 RNA 서열이 될 수 있다. 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 RNA 나노구조체의 안정성을 증가시키기 위하여, 코어 부분은 G/C 콘텐츠(G/C contents)가 높은 임의의 서열이 될 수 있다. 한편 코어는 임의의 이중가닥 RNA 서열로 구성될 수 있는데, 여기에서 이중가닥 RNA 서열은 서로 50-100% 상보적인 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0068] 각 팔에서 루프는 2-30 nt, 예컨대 12-24 nt로 이루어질 수 있으며, 각 팔의 루프는 각각 개방(open) 또는 폐쇄(closed)되어 있을 수 있다. 각 팔의 루프에는 1종 이상의 DNA 헬퍼에 상보적인 서열이 1개 이상 포함되어 있어서, DNA 헬퍼의 결합 시 RNA/DNA 이중가닥을 형성한 부분이 RNaseH에 의해 절단되어 루프가 개방될 수 있다. RNaseH에 의해 절단된 부분은 도 2에 나타낸 바와 같이 3′ -말단에 2-10 nt 길이의 단일가닥 RNA, 즉 오버행(unpaired overhang, 오버행)을 갖게 된다. 이와 같이 오버행이 존재하는 경우, 체내에서 다이서(Dicer)에 의해 인식되어 절단될 가능성이 높아진다.

[0069] 다이서는 2개의 도메인(PAZ domain 및 catalytic domain)을 가진 효소인데, 그 중 PAZ domain을 통해 dsRNA를 인식하고 catalytic domain에 의해 그 dsRNA를 절단한다. 이 때 dsRNA의 5′ -말단 또는 3′ -말단으로부터 counting하여 대략 21 nt(19nt+2nt 오버행) 또는 22 nt(20nt+2nt 오버행) 지점을 절단하는 것으로 알려져 있다. 즉, 21 nt에서 절단된 dsRNA 및 22 nt에서 절단된 dsRNA가 혼합물로서 발생할 수 있다. 한편 5′ -말단으로부터 counting하는 것이 3′ -말단으로부터 counting하는 것보다 좀 더 우세하다는 보고가 있다.

[0070] 도 3은 본 발명의 RNA 나노구조체의 팔이 다이서에 의해 절단된 경우를 나타낸 모식도로서, 19 bp(base pair) 길이의 RNAi 서열로 이루어진 스템에서 센스 서열 및 안티센스 서열의 3′ -말단에 2 nt 길이의 오버행이 존재하는 것을 보여준다. 즉, 본 발명의 RNA 나노구조체의 스템에서 루프가 개방되었을 때 3′ -말단에 2-10 nt 길이의 오버행이 존재하여 다이서에 의해 용이하게 인식되어 절단되고, 다이서는 절단부의 3′ -말단에 2 nt 길이의 오버행을 남긴다.

[0071] 각 팔에서 스템(stem)은 센스 서열과 안티센스 서열이 이중가닥을 이룬 RNAi 서열을 포함한다. RNAi 서열의 길이는 19 nt 또는 20 nt이다.

[0072] 본 발명의 RNA 나노구조체의 각 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. Y 형태의 RNA 나노구조체의 각 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열이 모두 서로 상이한 경우, 상기 RNA 나노구조체 내에는 각 RNAi 서열이 1:1:1의 비율로 포함될 수 있다. 2개의 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열은 서로 동일하고 다른 하나의 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열은 상이한 경우, 상기 RNA 나노구조체 내에는 각 RNAi 서열이 2:1의 비율로 포함될 수 있다. 이와 같이 본 발명은 RNA 나노구조체 내에 포함된 RNAi 서열의 비율을 임의로 정확히 조절할 수

있다.

[0073] 각 팔에서 스템에 포함된 RNAi 서열은 안티센스 서열의 5′ -말단이 루프 방향으로 향하거나("Forward 구조체"로 명명, 도 4의 좌측 도), 또는 센스 서열의 5′ -말단이 루프 방향으로 향할("Reverse 구조체"로 명명, 도 4의 우측 도) 수 있다. Forward 구조체, reverse 구조체 모두 우수한 유전자 침묵 효과를 나타낼 수 있다. Forward 구조체가 될지, reverse 구조체가 될지 여부는 본 발명의 RNA 나노구조체 제조 시 DNA 주형을 어떻게 설계하느냐에 따라 결정될 수 있다.

[0074] 본 발명에 있어서, 각 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열의 열역학적 안정성을 조절함으로써 RNAi 서열의 효율을 증가시킬 수 있다. 본 발명의 RNA 나노구조체의 각 팔의 RNAi 서열이 활성화되어 있는 경우 대상체에 투여되었을 때 다이서에 의해 적절한 길이로 절단된 다음에, 또는 다이서에 의한 절단 과정을 거치지 않고 바로 RISC에 로딩되고, RISC에서 촉매 부위에 해당하는 단백질인 Ago2 (Argonaute 2)는 로딩된 RNAi 서열에서 열역학적으로 강한 가닥을 자르고 열역학적으로 약한 가닥을 남긴다. 따라서 본 발명의 RNA 나노구조체에서는 RNAi 서열에서 타겟 유전자에 대한 안티센스 서열이 열역학적으로 약한 가닥이 되도록 설계함으로써 RNAi 서열의 유전자 침묵 효율을 향상시킬 수 있다.

[0075] 도 5의 상단에 나타낸 바와 같이, 다이서에 의해 절단되는 부분에 안티센스 서열의 5′ -말단이 존재하고, 상기 안티센스 서열의 5′ -말단에는 아데닌(Adenine)-우라실(Urasil) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드가 존재하고, 센스 서열의 5′ -말단에는 열역학적으로 강한 구아닌(Guanine)-시토신(Cytosine) 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드가 존재하고, 추가적으로 안티센스 서열의 5′ -말단으로부터 존재하는 7개의 뉴클레오티드(즉, 시드 영역(seed region)) 중 4개 이상(약 57% 이상)의 뉴클레오티드에 A-U 염기쌍을 이룬 뉴클레오티드가 존재하도록 하는 경우, 유전자 침묵 효율이 우수한 RNAi 서열이 될 수 있다.

[0076] 반대로, 도 5의 하단에 나타낸 바와 같이, 다이서에 의해 절단되는 부분에 존재하는 안티센스 서열의 5′ -말단으로부터 G-C 염기쌍이 4개 이상 존재하고, 개방된 루프의 이중가닥 RNA에서 센스 서열의 5′ -말단에 A-U 염기쌍이 존재하도록 하는 경우, 타겟 유전자에 대한 안티센스 서열이 Ago2에 의해 절단되고 센스 서열만이 남게 되어 유전자 침묵 효율이 낮은 RNAi 서열이 된다.

[0077] 도 6 내지 9에는 K개(K=3)의 팔을 갖는 RNA 나노구조체를 나타내었다. 다이서에 의한 RNAi 서열의 절단은 19+2 nt 또는 20+2 nt로 될 수 있고(즉, 19 또는 20 nt 길이의 RNAi 서열과, RNAi 서열의 3′ -말단의 2 nt 오버행), 또한 RNA 나노구조체에서 RNAi 서열의 방향에 따라 Forward 구조체 및 Reverse 구조체가 모두 가능하므로, 도 6에는 K 개의 팔을 갖는, 19+2 nt의 Reverse 구조체, 도 7에는 19+2 nt의 Forward 구조체, 도 8에는 20+2 nt의 Reverse 구조체, 도 9에는 20+2 nt의 Forward 구조체를 각각 나타내었다.

[0078] 한편 다이서에 의한 절단이 19+2 nt, 20+2 nt 모두 일어날 수 있다는 점을 고려하여, RNA 나노구조체에서 RNAi 서열의 19 nt 지점과 20 nt 지점에 모두 A-U 염기쌍이 존재하도록 설계하는 것도 가능하다. 즉, RNAi 서열의 안티센스 서열의 5′ -말단 또는 5′ -말단에서 두 번째 뉴클레오티드 둘 다에 A-U 염기쌍이 존재하도록 설계할 수도 있다.

[0079] 본 발명의 RNA 나노구조체에 포함될 수 있는 RNAi 서열은 세포 내로 전달되었을 때 상보적인 mRNA상의 저하를 유도하여 특정 유전자의 발현을 저해시키는 것으로, 질병의 치료에 효과를 나타낼 수 있는 것이면 제한 없이 사용할 수 있다. 이와 같은 RNAi 서열의 예시는 EGFR-siRNA, anti-VEGF anti-GFP, anti-Luc, anti-EGF, anti-FVII, anti-ApoB 등이 있으며, 이러한 예시적인 RNAi 서열은 당 분야에 널리 알려져 있다. 또한 RNAi 서열의 전사, 증폭 및 나노구조체 형성이 효과적으로 일어났는지 용이하게 확인하기 위해, RFP, BFP, GFP와 같은 형광단백질, Luc(Firefly Luciferase) 등을 사용할 수도 있다.

[0080] 본 발명의 RNAi 서열에서 센스 서열과 안티센스 서열은 원칙적으로 서로 100% 상보적이나, off-targeting을 감소시키기 위하여 RNAi 부분 중 센스가닥의 어느 부분을 바꾸어 un-matched한 부분을 만들 수 있으며, 최종적으로는 어느 한 팔(arm)을 이루는 서열들은 서로 50% 이상 상보적일 수 있다.

[0081] **RNA 나노구조체의 유전자 침묵(gene silencing) 기전**

[0082] 본 발명의 RNA 나노구조체가 대상체에 투여되었을 때 유전자 침묵을 일으키는 기전은 다음과 같다(도 10의 모식도 참조).

[0083] 본 발명의 RNA 나노구조체의 각 팔의 스템의 길이가 일정 길이 이상으로 긴 경우, 예컨대 20-25 nt보다 긴 경우, RNA 나노구조체가 대상체에 투여되었을 때 각 팔의 스템은 "Long dsRNA"로 인식되어 다이서(Dicer)에 의

해 절단되어 길이가 20-25 nt로 조정된다(단계 ①, Dicer processing). 본 발명의 RNA 나노구조체는 스템 절단 시 노출되는 RNAi 서열의 3′ -말단에 2 nt 오버행이 존재하여 다이서에 의해 용이하게 인식되며, 각 팔의 스템의 길이가 20-25 nt 이상, 예컨대 27 nt인 경우 다이서에 의해 더욱 잘 인식될 수 있다. 이렇게 다이서에 의해 절단된 각 팔의스템에 포함된 RNAi 서열의 3′ -말단에 2 nt 길이의 오버행이 생긴다. 만약 각 팔의 스템의 길이가 충분히 짧은 경우 단계 ①을 거치지 않고 바로 다음 단계로 진행된다. 다이서에 의해 절단된 RNA 나노구조체의 각 팔의 스템은 다이서 및 TRBP (the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein)에 의해 매개되는 RLC (RISC-loading complex)를 통해 RISC (RNA-induced silencing complex)에 로딩된다(단계 ②). 이 과정에서, 인간 등의 척추동물에서는 TRBP가 dsRNA에서 열역학적으로 약한 가닥이 Ago2에 의해 가이드 RNA로 인식될 수 있도록 재배치되는 비대칭적 센싱 (Asymmetry sensing)이 일어난다.

[0084] RISC는 dsRNA를 인식하여 로딩하는 리보뉴클레오프로틴인데, RISC에서 촉매 부위에 해당하는 단백질인 Ago2 (Argonaute 2)가 로딩된 dsRNA에서 열역학적으로 강한 가닥을 절단하고 (passenger RNA), 열역학적으로 약한 가닥을 남긴다(guide RNA)(단계 ③). 본 발명의 RNA 나노구조체의 각 팔의 스템에 포함된 RNAi 서열은 안티센스 서열이 열역학적으로 약한 가닥이 되도록 설계되어 있기 때문에 높은 효율로 센스 서열이 절단되고 안티센스 서열이 남게 된다. 안티센스 서열은 타겟 유전자의 mRNA를 인식하여(단계 ④) 이에 상보적으로 결합하여 dsRNA를 형성하여 절단됨으로써 유전자 침묵이 일어난다(단계 ⑤).

[0085] **RNA 나노구조체의 제조 방법**

[0086] 본 발명의 RNA 나노구조체는 다음과 같은 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0087] **(1) RNA 나노구조체의 제조 방법 개요**

[0088] 도 11은 본 발명의 RNA 나노구조체를 제조하는 방법을 모식도로서 나타낸 것이다. 먼저, 도 11의 상단 중앙과 같은 원형의 DNA 주형가닥(circular DNA template strand)을 준비한다. 상기 원형 DNA 주형가닥은 K 개의 팔을 갖고 있으며(K는 3≤K≤90의 정수) 각 팔의 스템(stem)에는 코어 및 RNAi 서열이 포함되고, 각 팔에 존재하는 루프(loop) 중 1 이상에는 RNA 폴리머라제가 결합할 수 있으며, 또한 1종 이상의 DNA 헬퍼에 상보적인 서열이 1개 이상 포함된다.

[0089] 상기 원형 DNA 주형가닥에 RNA 폴리머라제를 처리하면, 원형 DNA 주형가닥에 대하여 RCT(Rolling Circle Transcription)가 일어나 증폭 RNA 산물이 생성된다. 여기에 DNaseI를 처리하여 원형 DNA 주형가닥을 제거하고, 1종 이상의 DNA 헬퍼를 처리하면, DNA 헬퍼가 상기 증폭 RNA 산물에서 상보적인 부분에 결합하여 RNA/DNA 이중가닥을 형성하고, RNaseH 처리에 의해 이중가닥을 형성한 부분이 절단됨으로써 증폭 RNA 산물이 RNA 나노구조체를 이루고 RNA 나노구조체에서 1 이상의 루프가 개방(open)될 수 있다. 개방된 루프의 3′ -말단에는 2 nt 오버행이 존재하게 된다.

[0090] 상기 방법과 같이 RNA 나노구조체를 제조한 후, 원하는 구조체가 잘 만들어졌는지 확인하기 위하여 변형 PAGE 젤 분석(Denaturing PAGE gel anaylsis)을 통해 확인할 수 있다.

[0091] **(2) 원형 DNA 주형가닥의 제조 방법**

[0092] 상기 (1)에서 원형 DNA 주형가닥은 K 개의 팔을 갖고 있으며(3≤K≤90의 정수) 각 팔의 스템(stem)에는 코어 및 RNAi 서열이 포함되고, 각 팔의 루프에 1종 이상의 DNA 헬퍼에 상보적인 서열이 1개 이상 포함되고, 각 팔에 존재하는 루프(loop) 중 1 이상에는 RNA 폴리머라제가 결합할 수 있는 부분을 포함하는 것이면 어떤 방법에 의해 제조된 것이든 본 발명의 RNA 나노구조체의 제조 방법에서 사용될 수 있다.

[0093] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 원형 DNA 주형가닥은 다음과 같은 K 개의 DNA 주형가닥을 사용하여 제조할 수 있다(K는 3≤K≤90의 정수). 각 DNA 주형가닥 내에는 원형 DNA 주형가닥의 루프가 될 부분을 사이에 두고 양 쪽에 센스 서열과 안티센스 서열이 존재하고, 센스 서열과 안티센스 서열 끝에 각각 원형 DNA 주형가닥에서 코어가 될 부분이 존재한다. 예컨대 어느 하나의 DNA 주형가닥은 중앙에 루프 부분이 존재하고, 루프 부분의 한쪽에 A 유전자에 대한 센스 서열, 다른 한쪽에 A 유전자에 대한 안티센스 서열이 존재하고, 각각 센스 서열과 안티센스 서열 끝에 코어의 일부가 존재할 수 있다. 각 DNA 주형가닥의 루프가 될 부분은 DNA 헬퍼(helper) 서열에 상보적인 부분을 1개 이상 포함한다. 또한 각 DNA 주형가닥 중 1 이상의 루프(loop)가 될 부분에는 RNA 폴리머라제가 결합할 수 있다. 상기와 같이 각 DNA 주형가닥 내에 RNAi 서열을 구성하는 센스 서열과 안티센스 서열이 포함되는 경우, K 개의 DNA 주형가닥을 혼합하였을 때 도 12의 우측 도 및 도 13과 같이 K 개의 닉(nick)이 원형 DNA 주형가닥의 스템 부분에 존재하게 된다. 이 경우 각각의 닉에서 5′ -말단과 3′ -말단의 거리가 서로 가깝기 때문에, 별도로 프라이머를 사용하지 않고도 DNA 리가아제에 의하여 5′ -말단과 3′ -말단이 연결되어 도

11의 중앙 상단과 같이 원형 DNA 주형가닥으로 만들 수 있다. 이 때, 구조체 형태를 안정하게 형성할 수 있도록 구조체의 중심으로부터 닉까지 9 nt 이상, 닉에서 루프의 시작점까지 9 nt 이상의 길이가 되도록 설계할 수 있다(도 13 참조. 도 13에서, x≥9 및 y≥9). 그러나 닉의 위치는 적절히 조정될 수 있다.

[0094] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 원형 DNA 주형가닥은 다음과 같은 K 개의 DNA 주형가닥을 사용하여 제조할 수 있다(K는 3≤K≤90의 정수). 어느 하나의 DNA 주형가닥에 포함된 센스 서열은 다른 하나의 DNA 주형가닥에 포함된 안티센스 서열과 서로 상보적으로 결합하여 RNAi 서열을 구성할 수 있다. 예컨대 어느 하나의 DNA 주형가닥은 중앙에 코어 부분이 존재하고, 코어 부분의 한쪽에 A 유전자에 대한 센스 서열, 다른 한쪽에 B 유전자에 대한 안티센스 서열이 존재하고, 각각 센스 서열과 안티센스 서열 끝에 루프의 일부가 존재할 수 있다. 각 DNA 주형가닥의 루프가 될 부분은 DNA 헬퍼(helper) 서열에 상보적인 부분을 1개 이상 포함한다. 또한 생성된 원형 DNA 주형가닥에서 1 이상의 루프(loop)에는 RNA 폴리머라제가 결합할 수 있다. 상기와 같은 K 개의 DNA 주형가닥 간에 상보적인 부분들끼리 서로 결합하는 경우, 도 12의 좌측 도와 같이 K 개의 닉(nick)이 원형 DNA 주형가닥의 루프 부분에 존재하게 된다. 이 경우 각각의 닉에서 5′ -말단과 3′ -말단의 거리가 다소 멀기 때문에, 적절한 프라이머를 사용하여 거리를 가깝게 만들어 준 후 DNA 리가아제를 처리하면 5′ -말단과 3′ -말단이 연결되어 도 11의 중앙 상단과 같이 원형 DNA 주형가닥으로 만들 수 있다.

[0095] 본 발명의 방법에서 사용되는 DNA 주형가닥은, 상기 방법에 의해 제조되는 RNA 나노구조체가 RNA 폴리머라제가 결합하는 부분, 1종 이상의 DNA 헬퍼에 상보적인 부분, RNAi 서열을 구성하는 센스 서열 및 안티센스 서열 등을 포함하도록 설계될 수 있으며, 이 때 K 개의 DNA 주형가닥 내에 각 부분이 나누어 포함되고, DNA 리가아제에 의해 연결되면서 원형 DNA 주형가닥 내에서 완성된 서열로 구성될 수도 있다.

[0096] **(3) RNA 폴리머라제가 결합하는 부분의 구조**

[0097] 본 발명의 RNA 나노구조체를 제조하는 방법에서, 상기 (1)에서와 같이 원형 DNA 주형가닥의 루프 중 1 이상에 RNA 폴리머라제가 결합할 수 있는 부분이 존재하여 상기 부분에 RNA 폴리머라제가 결합하여 RCT(Rolling Circle Transcription)가 일어나 증폭 RNA 산물이 생성된다. 이 때 RNA 폴리머라제가 결합할 수 있는 부분은 도 14에 나타낸 바와 같이 3가지 구조를 가질 수 있다.

[0098] 먼저, 루프 중 1 이상에 RNA 폴리머라제에 대한 프로모터(promoter)가 포함될 수 있다(도 14의 ①). 예를 들어, RNA 폴리머라아제로 T-7 RNA 폴리머라아제를 사용하는 경우, T-7 RNA 폴리머라아제의 프로모터 서열, 예컨대 5′ -TAATACGACTCACTATAGGGAT-3′ 일 수 있다. 이와 같은 RNA 합성에 사용가능한 RNA 폴리머라제와 이의 프로모터 서열을 당 분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져 있다.

[0099] 또는, 루프 중 1 이상에 상보적인 12-30 nt 길이, 예컨대 12-22 nt 길이의 프라이머를 RNA 폴리머라제와 함께 처리하면, 상기 프라이머와 루프의 DNA가 이중가닥 핵산을 형성한 부분에 RNA 폴리머라제가 결합할 수 있다(도 14의 ②). 뿐만 아니라, RNA 폴리머라제는 이중가닥 핵산이 서로 분리되어 발생한 버블(bubble)에 결합하는 특성이 있어, 프로모터나 프라이머가 없더라도 루프 자체를 버블로 인식하여 결합할 수 있다(도 14의 ③).

[0100] 상기 ① 내지 ③ 중 어떤 구조이든지 간에, RNA 폴리머라제가 결합하기 위해서는 8 nt 이상의 서열이 필요하다. 따라서 본 발명의 RNA 나노구조체를 제조하는 방법에서 사용되는 원형 DNA 주형가닥의 루프 중 1 이상은 8-24 nt로 이루어진다. 그 외 루프는 2-24 nt 길이일 수 있다.

[0101] **(4) DNA 헬퍼 설계**

[0102] 본 발명의 RNA 나노구조체를 제조하는 방법에서, DNA 헬퍼는 임의의 길이를 갖는 서열이 될 수 있다. 본 발명의 RNA 나노구조체의 각 루프는 2-30 nt로 이루어지기 때문에, DNA 헬퍼 역시 2-30 nt 길이를 갖는 임의의 DNA 서열이 될 수 있다. 예컨대 9-18 nt, 바람직하게는 9-12 nt 길이의 DNA 헬퍼를 사용할 수 있다.

[0103] DNA 헬퍼로서 2′ -O-메틸 DNA 헬퍼를 사용하는 경우, 2′ -O-메틸기로 치환된 부분은 RNaseH에 의해 잘리지 않기 때문에 절단될 부분을 정확하게 특정할 수 있다. 본 발명의 DNA 헬퍼는 4 개 이상의 DNA가 메틸화되지 않은 뉴클레오티드를 가지며, 그 외의 DNA는 메틸화되거나 또는 메틸화되지 않은 것일 수 있다. 본 발명의 일 구현예로서, 9 nt 길이의 DNA 헬퍼의 3′ -말단에서부터 5 nt가 메틸화된 헬퍼를 사용할 수 있다. 본 발명의 다른 구현예로서, 12 nt 길이의 DNA 헬퍼에서 5′ -말단에서부터 4-7 nt가 메틸화된 DNA 헬퍼를 사용할 수 있다. 그러나 메틸화 정도는 이에 제한되지 않으며, 사용되는 효소 및 DNA 주형에 따라 DNA 헬퍼의 메틸화를 다양하게 할 수 있다.

[0104] RNaseH의 타겟은 RNA/DNA 이중가닥 중에서 RNA 가닥이므로, 상기 DNA 헬퍼는 재사용 (reusable) 가능하다. 따라

서 본 발명의 방법에서 사용되는 DNA 헬퍼의 수는 증폭된 RNA산물보다 적어도 문제되지 않는다. 예를 들어서 본 발명의 RNA 구조체 제조방법에서, 각 DNA 헬퍼는 0.1 μM 농도로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0105] 한편 DNA 헬퍼에 따라 제조된 RNA 나노구조체의 오버행의 길이가 결정될 수 있다. DNA 헬퍼가 증폭된 RNA 산물에 결합하는 위치에 따라서 RNase H에 의해 절단되는 위치가 달라지기 때문이다. 본 발명에 있어서 DNA 헬퍼는 제조된 RNA 나노구조체의 오버행이 2-10 nt, 바람직하게는 2 nt 길이가 되도록 설계될 수 있다.

[0106] 본 발명에 있어서 "RNAi 서열(RNAi sequence)"은 RNA 간섭(RNA interference) 현상을 유발하는 임의의 이중가닥 RNA(dsRNA) 서열을 의미한다. 본 발명의 RNAi 서열은 소간섭 RNA(siRNA)를 포함한다. 본 발명의 RNAi 서열에 의해 임의의 타겟 유전자의 mRNA가 침묵(silencing)되어, mRNA가 코딩하고 있는 단백질의 발현이 억제될 수 있다.

[0107] 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.

[0108] 이상 본 명세서에 기재된 수치값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0109] 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.

[0110] **실시예 1. 2′ -O-methyl DNA 헬퍼를 이용한 RNA 나노 구조체 대량 생산 방법 1**

[0111] **1.1. 원형 DNA 주형 가닥의 준비**

[0112] RNA 나노구조체를 대량 생산하기 위하여 주형으로 80 nt, 64 nt, 그리고 64 nt 단위의 strand 1, strand 2, strand 3(이하 표 1에서 RV_Strand1, RV_Strand2, RV_Strand3) 가닥을 사용하였다. 그리고 생산된 RNA 나노구조체의 각 팔(arm)에 각각 결합할 수 있는 5 종의 2′ -O-메틸 9 nt DNA 헬퍼 (H1(L)_9 nt, H2(G)_9 nt, H3(R)_9 nt, H4(B)_9 nt, H5(stem)_9 nt)를 사용하였다. 한편 RNaseH에 의해 잘리는 부분을 특정하기 위하여, 일부가 메틸레이션된 2′ -O-메틸 DNA 헬퍼를 사용하였다.

[0113] 구체적인 DNA 서열 및 9 nt 헬퍼 서열은 다음의 표 1과 같다.

[0114] **[표 1]**

가닥	서열 (5 ′ → 3′)	서열번호
RV_Strand1(G′ -G)	5′ -/5phos/AACTTCAGGGTCAGCTTGCTCGAAATACCATGCCCTCGAACGAGCAAGCTGACCCTGAAGTTAAAGCGTGCGTGAACATT-3′	서열번호 1
RV_Strand2(R′ -R)	5′ -/5phos/TGTAGATTGACTTGAACTCTCGAACGAGAGTTCAAGTCAATCTACAAATGTTCACCGGTCGAAA-3′	서열번호 2
RV_Strand3(B′ -B)	5′ -/5phos/TCTTGGCGTTTGCGATCAGTCGAACGACTGATCGCAAACGCCAAGATTTCGACCGGCACGCTTT-3′	서열번호 3
H1 (L)_9nt	AATA**CCATG**	서열번호 4
Rv_H2 (G)_9nt	ACGA**GCAAG**	서열번호 5
Rv_H3 (R)_9nt	ACGA**GAGTT**	서열번호 6
Rv_H4 (B)_9nt	ACGA**CTGAT**	서열번호 7
Rv_H5 (Stem)_9nt	GCGT**GCGTG**	서열번호 8

(G: 센스-GFP, G′: 안티센스-GFP, R: 센스-RFP, R′: 안티센스-RFP, B: 센스-BFP, B′: 안티센스-BFP, Phos: 인산기)

[0115]

[0116] 5′ 끝에 인산기가 있는 상기 80 nt, 64 nt, 그리고 64 nt 단일가닥 DNA(Integrated DNA Technologies, IDT) 주형가닥 각각에서 루프 부분을 음영으로 표시하고, 9 nt DNA 헬퍼(helper)가 인식하여 결합하는 증폭된 RNA 가닥 서열과 상보적인 서열을 밑줄로 표시하였다. 상기 9 nt DNA 헬퍼(Bioneer Corporation)에서 굵은 글씨로 표시한 부분이 2′ -O-메틸화된 부분에 해당한다. 각 DNA 주형가닥은 내부에 RNAi 서열의 센스 서열과 안티센스 서열을 포함하고 있다. 여기에서 Strand1은 안티센스-GFP(G′) 및 센스-GFP(G), Strand2는 안티센스-RFP(R′) 및 센스-RFP(R), Strand3는 안티센스-BFP(B′) 및 센스-BFP(B)를 지표서열로 포함하고 있다.

[0117] 본 실시예에서 사용한 T4 DNA 리가아제, T7 RNA 폴리머라제, 피로포스파타제(Pyrophosphatase), 및 RNaseH는 모두 New England Biolabs(NEB)에서 구입하여 사용하였다.

[0118] RNA 나노구조체를 만들기 위한 구체적인 과정은 다음과 같다. 먼저 5′ 말단에 인산기가 있는, 표 1의 3개의 80 nt, 64 nt, 64 nt 단일가닥 주형 DNA strand1, strand2, strand3을 각각 60 pmole 씩 10 mM ATP를 포함하는 T4 DNA 리가아제(T4 DNA Ligase)에 대한 2 μL 10x 완충액(500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 및 10 mM ATP) 및 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 3개를 혼성화 시켰다. 혼성화 후 1μL의 T4 DNA 리가아제 (400 U/μL)를 첨가하여 thermal cycler 내에서 25℃에서 4시간 동안 배양(incubation) 하여 각각의 닉(nick)의 3′ -말단과 5′ -말단이 서로 이어지게 함으로써 원형 DNA 주형가닥으로 만들었다. 65℃에서 10분간 열을 가하여 T4 DNA 리가아제를 불활성화하여 단계를 마치고 이 생성물을 다음의 핵산무한전사 반응에 사용하였다.

[0119] **1.2. 원형 DNA 주형가닥의 핵산 무한 전사 과정**

[0120] 1.1의 원형 DNA 주형가닥 2 μL를, 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 μL 25 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 원형 DNA 주형가닥의 18 nt 루프 부분(Strand1의 루프에 존재)에서부터 원형 DNA 주형가닥과 상보적인 RNA 가닥을 증폭하도록 하였다. 그 후 65℃ 10분 동안 열을 가하여 T7 RNA 폴리머라제를 불활성화시킴으로써 반응을 종결시켰다.

[0121] **1.3. DNaseI 처리에 의한 DNA 주형가닥 제거**

[0122] DNA 주형가닥을 제거하지 않으면 RNaseH 처리단계에서 DNA 주형가닥이 헬퍼로 작용하여 증폭된 RNA가 파괴될 수 있으므로, 하기 과정을 통하여 DNA 주형가닥을 제거하였다.

[0123] RCA 생성물 (20 μL)을 4 μL 10X DNaseI 완충액(100 mM Tris-Hcl, 25 mM $MgCl_2$ 및 5 mM $CaCl_2$), 15 μL DEPC-처리된 탈이온수(DW) 그리고 1 μL DNaseI (2 U/μL)와 혼합하였다. 이 혼합물을 thermal cycler 내에서 37℃에서 1시간동안 배양하면서 DNaseI이 DNA 주형가닥을 분해하도록 하였다. 그 후 65℃에서 10분 동안 열을 가하여 DNaseI을 불활성화시킴으로써 반응을 종결시켰다.

[0124] **1.4. 9nt 2'-O-메틸 헬퍼 혼성화 및 RNaseH에 의한 절단 후 자가조립**

[0125] **1.4.1. "All-ON" Y RNA 나노구조체 합성**

[0126] 1.3.에서 수득한 DNaseI 생성물 (40 μL)을 8 μL 10× RNaseH 반응 완충액 (750mM KCl, 500 mM Tris-HCl (pH 8.3), 30 mM $MgCl_2$, 및 100 mM DTT), 10 μM의 9nt 2′ -O-메틸 DNA 헬퍼 1, 2, 3, 4(표 1의 H1(L)_9nt, H2(G)_9nt, H3(R)_9nt, H4(B)_9nt) 각각 0.8 μL, 그리고 22.8 μL DEPC-처리된 탈이온수(DW)와 혼합하였다. 이 혼합물에 6 μL RNaseH (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 불활성화 시키고, 이 생성물을 - 1.5 ℃/min이 속도로 95℃에서 10℃로 온도를 감소시킴으로써 잘려진 RNA 가닥간의 자가조립이 이루어지도록 하였다.

[0127] 그 결과 생성된 "All-ON" Y RNA 나노구조체는 모식도를 도 1에 나타내었다. 도 1의 좌측 도에서, ①, ②, ③, 및 ④ 부분에 각각 DNA 헬퍼 1, 2, 3, 4가 결합하였는데, 여기에서 GFP에 대한 RNAi 서열이 포함된 팔은 루프의 길이가 길기 때문에 2개의 DNA 헬퍼(헬퍼 1 및 2)를 사용하여 루프를 개방(open)하였고, 나머지 2개 루프에는 각각 1개의 DNA 헬퍼를 사용하여 개방하여, "All-ON" Y RNA 나노구조체가 제조된 것이다.

[0128] **1.4.2. "GFP-ON", "RFP-ON", "BFP-ON" Y RNA 나노구조체 합성**

[0129] 9nt 2'-O-메틸 DNA 헬퍼 1과 2를 각각 0.8 μL 처리한 점을 제외하고, 1.4.1.과 동일한 과정을 통해 "GFP-ON" Y RNA 나노구조체를 제조하였다. 즉, 도 1의 좌측 도에서 ① 및 ② 부분에만 DNA 헬퍼가 결합하여 루프가 개방되어 "GFP-ON" 상태이고 BFP, RFP 부분은 루프가 폐쇄(closed) 상태로 유지되어 "OFF" 상태인 Y RNA 나노구조체가 제조되었다.

[0130] 또한 9nt 2'-O-메틸 DNA 헬퍼 3을 0.8 μL 처리한 점을 제외하고, 1.4.1.과 동일한 과정을 통해 "RFP-ON" Y

RNA 나노구조체를 제조하였다.

[0131] 그리고 9nt 2'-O-메틸 DNA 헬퍼 4를 0.8 μL 처리한 점을 제외하고, 1.4.1.과 동일한 과정을 통해 "BFP-ON" Y RNA 나노구조체를 제조하였다.

[0132] **1.4.3. "All-OFF" Y RNA 나노구조체 합성**

[0133] 9nt 2'-O-메틸 DNA 헬퍼 5를 0.8 μL 처리한 점을 제외하고, 1.4.1.과 동일한 과정을 통해 "ALL-OFF" Y RNA 나노구조체를 제조하였다. 즉, 도 1의 좌측 도에서 ⑤ 부분에만 DNA 헬퍼가 결합하여, 모든 루프가 폐쇄된 "OFF" 상태인 Y RNA 나노구조체가 제조되었다.

[0134] 상기 실시예의 각 단계별로 사용된 실험 변수 및 조건들을 하기 표 2에 정리하여 나타내었다.

[0135] **[표 2]**

단계	변수	조건
연결(Ligation)	주형 DNA와 프라이머의 반응 비	1:1 ~ 1:4.5
	template DNA 용액 내 최종농도	1 μM
	T4 DNA 리가제 (400 U/μL)	400~ 1600 U
	또는 Circligase unit(100 U/μL)	
	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 힐퍼 양	50 pmole~ 10 nmole
	RNaseH unit (5 U/μL)	5~ 175 U
	온도	37 ℃
	시간	1~ 16시간

[0136]

[0137] **실시예 2. 2′ -O-methyl DNA 헬퍼를 이용한 RNA 나노 구조체 대량 생산 방법 2**

[0138] **2.1. 원형 DNA 주형 가닥의 준비**

[0139] RNA 나노구조체를 대량 생산하기 위하여 주형으로 각각 72 nt 단위의 strand 1, strand 2, strand 3 가닥을 사용하였다. 그리고 생산된 RNA 나노구조체의 각 팔에 각각 결합할 수 있는 3 종의 2′ -O-메틸 32 nt 오픈 DNA 헬퍼 (Open DNA helper (G)_32 nt, Open DNA helper (R)_32 nt, Open DNA helper (B)_32 nt) 및 3 종의 30 nt 프로텍트 RNA 헬퍼(Protect RNA helper (G)_30 nt, Protect RNA helper (R)_30 nt, Protect RNA helper (B)_30 nt)를 사용하였다.

[0140] 구체적인 DNA 서열 및 32 nt 오픈 DNA 헬퍼, 30nt 프로텍트 RNA 헬퍼 서열은 다음의 표 3과 같다.

[0141] [표 3]

가닥	서열 (5' →3')	서열번호
Strand1 (G-R)	5' -/5phos/AGGGTCAGCTTGCATTACTACCCTCACTACTCCTGGCAAGCTGACCCTGAAGTTATCACCCGTCGTTCCATG-3'	서열번호 9
Strand2 (R-B)	5' -/5phos/TGCACCTTGAAGCATTCTACTACTCTTACCCGCTGGCTTCAAGGTGCACATGGAACGACGGCACGTTCTTGG-3'	서열번호 10
Strand3 (B-G)	5'- /5phos/CGTTTGCGATCAGACTACCTTTACTACTCACCC TGCTGATCGCAAACGCCAAGAACGTGCGGTGATAACTTC-3'	서열번호 11
Open DNA helper (G)_32nt	AGC**UUGC**ATTACTACCCTCACTA**CUCC**TGGCA	서열번호 12
Open DNA helper (R)_32nt	TTGA**AGCA**TTCTACTACTCTTAC**CCGC**TGGCT	서열번호 13
Open DNA helper (B)_32nt	CGA**UCAG**ACTACCTTTACTACTC**ACCC**TGCTG	서열번호 14
Protect RNA helper (G)_30nt	UUGCAUUACUACCCUCACUACUCCUGGCAA	서열번호 15
Protect RNA helper (G)_30nt	AAGCAUUCUACUACUCUUACCCGCUGGCUU	서열번호 16
Protect RNA helper (G)_30nt	UCAGACUACCUUUACUACUCACCCUGCUGA	서열번호 17

[0142]

[0143] 5′ 끝에 인산기가 있는 상기 72 nt 단일가닥 DNA(Integrated DNA Technologies, IDT) 주형가닥 각각에서 루프 부분을 음영으로 표시하고, DNA 헬퍼가 인식하여 결합하는 증폭된 RNA 가닥 서열과 상보적인 서열을 밑줄로 표시하였다.

[0144] 상기 32 nt 오픈 헬퍼(Integrated DNA Technologies, IDT)에서 굵은 글씨로 표시한 부분이 2′ -O-메틸화된 부분에 해당하며, 상기 30 nt 프로텍트 헬퍼(Bioneer)는 증폭된 RNA의 루프 부분 전체와 루프를 기준으로 양쪽으로 5 nt 팔 부분을 감싸는 상보적인 서열이다. 상기 DNA 주형가닥은 내부에 안티센스-GFP(G'), 센스-GFP(G), 안티센스-RFP(R'), 센스-RFP(R), 안티센스-BFP(B'), 및 센스-BFP(B')를 지표서열로 포함하고 있다.

[0145] 본 실시예에서 사용한 EXO3 엑소뉴클레아제, T4 DNA 리가아제, T7 RNA 폴리머라제, 파이로포스파타제(Pyrophosphatase) 및 RNaseH는 모두 New England Biolabs(NEB)에서 구입하여 사용하였으며, RNase 억제제는 Thermo Fisher에서 구입하여 사용하였다.

[0146] 본 실시예에서 사용된 DNA 주형은 도 12의 우측에서 나타낸 바와 같이, 3 개의 닉(Nick)을 가지고 있으며, 여기에는 T4 DNA 리가아제에 의하여 원형을 형성하며 연결될 수 있도록 5' 인산, 3'-OH 말단이 존재한다. 또한 형성되는 3개의 루프부분은 20 nt로 T7 RNA 폴리머라제가 각각의 루프를 인식하여 핵산무한전사과정이 일어날 수 있도록 하고, 3개의 팔(arm) 부분 중 스템 부분에 각각 siRNA 서열이 위치하여 별도의 siRNA 로딩 없이 증폭 형성되는 구조체 자체가 siRNA 전달체로서 기능할 수 있도록 설계하였다. RNA 나노구조체를 만들기 위한 구체적인 과정은 다음과 같다.

[0147] 먼저 5′ 말단에 인산기가 있는, 표 3의 각각 72 nt 단일가닥 주형 DNA strand1, strand2, strand3을 각각 60 pmole 씩 10 mM ATP를 포함하는 T4 DNA 리가아제(T4 DNA Ligase)에 대한 2 μL 10x 완충액(500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 및 10 mM ATP) 및 13 μL DEPC-처리된 탈이온수(DW) 상에서 thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 -1.0℃/s의 속도로 95℃ (3분)에서 4℃까지 온도를 감소시켜, 주형가닥 3개를 혼성화 시켰다. 혼성화 후 1 μL의 T4 DNA 리가아제 (400 U/μL)를 첨가하여 thermal cycler 내에서 25℃에서 12 시간 동안 배양(incubation) 하여 각각의 닉(nick)의 3′ -말단과 5′ -말단이 서로 이어지게 함으로써 원형 DNA 주형가닥으로 만들었다. 65℃에서 10분간 열을 가하여 T4 DNA 리가아제를 불활성화하여 단계를 마치고 이 생성물을 다음의 핵산무한전사 반응에 사용하였다. 그 다음, 원형으로 연결되지 않은 되지 않은 잉여가닥을 제거하기 위하여 EXO3 뉴클레아제를 37 ℃에서 2 시간 동안 처리하였다.

[0148] **2.2. 원형 DNA 주형가닥의 핵산 무한 전사 과정**

[0149] 2.1의 원형 DNA 주형가닥 3.5 μL를, 2 μL 10x RNA Pol 반응 완충액 (400 mM Tris-HCl (pH 7.9), 60 mM $MgCl_2$, 20 mM 스페르미딘, 그리고 100 mM DTT), 0.8 μL 25 mM rNTPs, 0.8 μL 피로포스파타제 (0.1 U/μL), 0.5 μL RNase 억제제, 그리고 4 μL T7 RNA 폴리머라제(50 U/μL)와 혼합하였다. 이 혼합물을 thermal cycler

내에서 37℃에서 16 시간동안 배양하면서 T7 RNA 폴리머라제가 원형 DNA 주형가닥의 20 nt 루프 부분에서부터 원형 DNA 주형가닥과 상보적인 RNA 가닥을 증폭하도록 하였다. 그 후 65℃ 10분 동안 열을 가하여 T7 RNA 폴리머라제를 불활성화시킴으로써 반응을 종결시켰다.

[0150] **2.3. DNaseI 처리에 의한 DNA 주형가닥 제거**

[0151] RCA 생성물 (20 μL)을 1 μL DNaseI (2 U/μL)와 혼합하였다. 이 혼합물을 thermal cycler 내에서 37℃에서 20 분간 배양하면서 DNaseI이 DNA 주형가닥을 분해하도록 하였다. 그 다음, EDTA를 5 mM이 되도록 넣어준 후, 95℃에서 3 분 동안 열을 가하여 DNaseI을 불활성화시킴으로써 반응을 종결시켰다.

[0152] **2.4. RNaseH에 의한 절단 후 자가조립**

[0153] **2.4.1. "All-ON" Y RNA 나노구조체 합성**

[0154] 2.3.에서 수득한 DNaseI 생성물 (20 μL)을 4 μL 10× RNaseH 반응 완충액 (750 mM KCl, 500 mM Tris-HCl (pH 8.3), 30 mM MgCl2, 및 100 mM DTT), 2 μM의 32 nt 2'-O-메틸 DNA 헬퍼G, R, B(표 3의 Open DNA helper (G)_32nt, Open DNA helper (R)_32nt, Open DNA helper (B)_32nt) 4 μL, 그리고 14.5 μL DEPC-처리된 탈이온수와 혼합하였다, 상기 혼합물에 2 μL RNase H (5 U/μL)를 첨가하고 thermal cycler 내에서 37℃에서 2 시간 동안 배양하여 RNA/DNA 이중가닥 중 RNA가닥이 절단되도록 하였다. 그 후 65℃에서 20분간 열을 가하여 효소를 불활성화 시키고, 이 생성물을 - 1.2 ℃/min이 속도로 95℃에서 4℃로 온도를 감소시킴으로써 잘려진 RNA 가닥 간의 자가조립이 이루어지도록 하였다.

[0155] **2.4.2. "GFP-ON", "RFP-ON", "BFP-ON" Y RNA 나노구조체 합성**

[0156] 2 μM의 32 nt 2'-O-메틸 DNA 오픈 헬퍼(G)와 10 μM의 30 nt RNA 프로텍트 헬퍼(R, B)를 혼합하여 4 μL 처리한 점을 제외하고, 상기 2.4.1.과 동일한 과정을 통해 "GFP-ON" Y RNA 나노구조체를 제조하였다. 즉, GFP 부분에만 DNA 오픈 헬퍼가 결합하여 루프가 개방되어 "GFP-ON" 상태이고, BFP, RFP 부분은 RNA 프로텍트 헬퍼가 결합하여 루프가 폐쇄 상태로 유지되어 "OFF" 상태인 Y RNA 나노구조체가 제조되었다.

[0157] 또한 2 μM의 32 nt 2'-O-메틸 DNA 오픈 헬퍼(R)와 2 μM의 10 μM의 30 nt RNA 프로텍트 헬퍼(G, B)를 혼합하여 4 μL 처리한 점을 제외하고, 2.4.1.과 동일한 과정을 통해 "RFP-ON" Y RNA 나노구조체를 제조하였다.

[0158] 그리고 2 μM의 32 nt 2'-O-메틸 DNA 오픈 헬퍼(B)와 2 μM의 10 μM의 30 nt RNA 프로텍트 헬퍼(G, R)를 혼합하여 4 μL 처리한 점을 제외하고, 2.4.1.과 동일한 과정을 통해 "BFP-ON" Y RNA 나노구조체를 제조하였다.

[0159] **2.4.3. "GFP/RFP-ON", "GFP/BFP-ON", "BFP/RFP-ON" Y RNA 나노구조체 합성**

[0160] 2 μM의 32 nt 2'-O-메틸 DNA 오픈 헬퍼(G, R)와 10 μM의 30 nt RNA 프로텍트 헬퍼(B)를 혼합하여 4 μL 처리한 점을 제외하고, 상기 2.4.1.과 동일한 과정을 통해 "GFP/RFP-ON" Y RNA 나노구조체를 제조하였다. 즉, GFP 및 RFP 부분에 DNA 오픈 헬퍼가 결합하여 루프가 개방되어 "GFP/RFP-ON" 상태이고, BFP 부분은 RNA 프로텍트 헬퍼가 결합하여 루프가 폐쇄 상태로 유지되어 "OFF" 상태인 Y RNA 나노구조체가 제조되었다.

[0161] 또한 2 μM의 32 nt 2'-O-메틸 DNA 오픈 헬퍼(G, B)와 2 μM의 10 μM의 30 nt RNA 프로텍트 헬퍼(R)를 혼합하여 4 μL 처리한 점을 제외하고, 2.4.1.과 동일한 과정을 통해 "GFP/BFP-ON" Y RNA 나노구조체를 제조하였다.

[0162] 그리고 2 μM의 32 nt 2'-O-메틸 DNA 오픈 헬퍼(B, R)와 2 μM의 10 μM의 30 nt RNA 프로텍트 헬퍼(G)를 혼합하여 4 μL 처리한 점을 제외하고, 2.4.1.과 동일한 과정을 통해 "BFP/RFP-ON" Y RNA 나노구조체를 제조하였다.

[0163] **2.4.4. "헬퍼프리 (Helper-Free)" Y RNA 나노구조체 합성**

[0164] 0.5 μL의 RNase H를 반응 혼합물에 추가로 첨가한 점을 제외하고, 2.1의 원형 DNA 주형가닥을 이용하여 상기 2.2.와 동일한 과정을 통해 헬퍼프리 Y RNA 나노구조체를 제조하였다.

[0165] 상기 2.2.의 원형 DNA 주형가닥과 상보적인 RNA 가닥의 증폭 과정에서 RNaseH를 첨가하여 함께 반응시키면, 잉여 DNA 주형가닥의 루프 부분이 증폭산물에 특이적으로 결합하여 헬퍼로 작용할 수 있다(도 15). RNaseH는 이 DNA 주형가닥과 RNA 산물이 결합했을 때, 루프 서열에 상보적인 RNA 특정부분을 절단하고 이 가닥들이 Y 구조를 형성한다. 이러한 헬퍼프리 RNA 나노구조체의 제조방법은 2'-O-메틸 헬퍼를 이용한 생산방법에 비해 추가 단계 없이 대량의 Y 나노구조체를 생성할 수 있다.

[0166] **2.4.5. Y RNA 나노구조체의 확인**

[0167] 상기 2.4.1 내지 2.4.3.에서 수득한 모든 Y RNA 나노구조체를 상온에서 1 X Tris-borate-EDTA (TBE) 완충액으로 10 % PAGE를 통해 확인하였다. 겔은 Gel red로 염색하였고, Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 겔 이미지를 얻었었으며, 결과를 도16에 나타내었다.

[0168] 도 16에 나타낸 바와 같이, Y RNA 나노구조체의 각 루프의 개방 또는 폐쇄에 따라 상이한 크기를 가짐을 확인하였다.

[0169] 또한, 2.4.4의 방법으로 수득한 헬퍼프리 Y RNA 나노구조체에 대해 상기와 동일한 방법으로 겔 이미지를 얻었으며, G(+0) 헬퍼를 사용하여 비교한 결과를 도 17에 나타내었다.

[0170] 도 17에 나타낸 바와 같이, 헬퍼의 유무에 상관없이 특정위치에 Y 나노구조체가 생성됨을 확인하였다.

[0171] **2.5. 자가조립 Y 나노구조체의 AFM 이미지**

[0172] 2.4.1에서 수득한 3.75 μL의 Y RNA 나노구조체 (0.2 μM)를 21.25 μL 1x 반응 완충액 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 및 1 mM ATP)에 희석하고, mica (Pelco Mica sheets, Ted Pella Corp.)를 얇게 떼어서 그 위에 분주하였다. 30분 배양 후, mica 표면을 DEPC-처리 탈이온수로 세척한 후, 질소 가스로 즉시 건조시켰다. 그 후 Park NX-10 ADM(Park Systems Corp. Korea)의 non-contact mod에서 NC-NCH 팁(Park Systems Corp. Korea)을 이용하여 Y 나노구조체에 대한 AFM 이미지를 얻었으며, 결과를 도 18에 나타내었다.

[0173] 도 18의 좌측 도는 원형 DNA 주형가닥의 RCT 증폭산물을 나타낸 이미지로, 이는 T7 RNA 폴리머라제에 의해 증폭되어 길게 연장된 단일가닥 RNA를 나타냄을 알 수 있다. 도 18의 우측 도는 RNaseH 처리에 의한 자가조립 Y 나노구조체를 나타낸 이미지로, 절단/어닐링 과정을 거치면서 고루 분산된 나노 크기의 구 모양을 나타냄을 관찰하였다.

[0174] **실시예 3. RNAi 서열에 의한 유전자 침묵**

[0175] **3-1. RNAi 서열에 의한 GFP 유전자 침묵**

[0176] 상기 'RNA 나노구조체' 항목의 '(2) 각 팔(arm)의 구조'에서 설명한 바와 같은 방식으로 GFP 유전자에 대한 RNAi 서열을 설계하였다. 이 때, 약 700 nt 길이의 GFP의 mRNA 중에서 본 발명의 RNA 나노구조체의 스템에 포함시키기에 적합하도록 19-20 nt 길이의 연속적인 부분을 선택하되, 센스 서열의 5′ -말단(또는 안티센스 서열의 3′ -말단)이 G 또는 C이고, 센스 서열의 3′ -말단(또는 안티센스 서열의 5′ -말단)이 A 또는 U인 동시에, 안티센스 서열의 5′ -말단으로부터 7개의 뉴클레오티드 중에서 4개 이상이 A 또는 U인 부분을 선택하였다. 그 결과, 도 19에 노란 하이라이트로 표시한 부분이 본 발명의 RNAi 서열의 타겟이 되기에 적합한 것으로 확인하였다.

[0177] Bioneer 사에 의뢰하여 2종의 GFP에 대한 RNAi 서열을 준비하였다. 양성 대조군인 "19+2 siGFP"은 19 nt 길이에 2 nt 오버행을 갖는 GFP에 대한 RNAi 서열 (다이서의 기질이 될 수 없는 linear dsRNA), 또는 "23+2 siGFP"는 23 nt 길이에 2 nt 오버행을 갖는 GFP에 대한 RNAi 서열(다이서의 기질이 될 수 있는 linear dsRNA)이다. 각각의 센스 서열 및 안티센스 서열은 다음의 표와 같다.

[0178] **[표 4]**

[0179]

명칭		서열	서열번호
19+2 siGFP	센스	5’-GCAAGCUGACCCUGAAGUUdTdT-3’	서열번호 18
	안티센스	5’-AACUUCAGGGUCAGCUUGCdTdT-3’	서열번호 19
23+2 siGFP	센스	5’-CGAGCAAGCUGACCCUGAAGUUAAA-3’	서열번호 20
	안티센스	5’-UAACUUCAGGGUCAGCUUGCUCGUU-3’	서열번호 21

[0180] 또한 상기 "23+2 siGFP" 서열을 in vitro 상에서 다이서로 처리하여 "23+2 siGFP after Dicer"을 준비하였다. 음성 대조군(NC)에는 아무것도 처리하지 않았다.

[0181] 유전자 침묵효과에 대한 실험을 수행하였다. GFP를 과발현하고 있는 KB-세포를 12 웰 플레이트에 $1x10^5$개/well 농도로 분주하고, 하루 뒤에 상기 "19+2 siGFP", "23+2 siGFP" "23+2 siGFP after Dicer" 또는 NC 3 nM을 Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Invitrogen)와 함께 처리하였다. 48시간 뒤에 형광발현 정도를 FACSCalibur system (BD biosciences) 장비를 통해 측정한 후 flowJo program을 통해서 유전자 침묵효과를 분석하고, 결과를 도 20에 나타내었다.

[0182] 도 20의 좌측 도는 음성 대조군의 GFP 발현을 100%로 보았을 때 상대적 GFP 발현을 나타낸 그래프인데, 23+2 siGFP는 다이서 기질이 되므로, 19+2 siGFP보다 더 강화된 유전자 발현 억제 효과를 보였고, 23+2 siGFP after

Dicer는 19+2 siGFP와 유사한 유전자 발현 억제효과가 나타났다.

[0183] 도 20의 우측 도는 양성 대조군인 19+2 siGFP의 유전자 침묵 효능을 100%로 보았을 때 상대적 유전자 침묵 효능을 나타낸 그래프인데, 여기에서 23+2 siGFP의 유전자 침묵 효능은 약 23+2 siGFP after Dicer보다 높게 나타났다. 이는 23+2 siGFP after Dicer는 미리 다이서에 의해 절단되어 19+2 nt 또는 20+2 nt 길이로 절단되어 세포에 처리된 것이기 때문에 Dicer-mediated RISC loading이 일어나지 않아 유전자 침묵 효능이 감소된 것으로 생각된다.

[0184] **3-2. RNAi 서열을 포함한 RNA 나노구조체에 의한 GFP 유전자 침묵**

[0185] 19 nt 길이 및 2 nt 오버행을 갖는 GFP에 대한 RNAi 서열을 설계하였다. 그리고 상기 RNAi 서열을 포함시켜 실시예 2에 기재된 방법에 따라 3개의 팔을 갖는 RNA 나노구조체("25+2Y-RNA")를 제조하였다. 또한 상기 25+2Y-RNA를 in vitro 상에서 다이서로 처리하여 "25+2Y-RNA after Dicer"를 준비하였다. 구체적인 25+2Y-RNA 서열은 다음의 표 5와 같다.

[0186] **[표 5]**

[0187]

명칭		서열	서열번호
25+2Y_1	RNA	5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUAUCACCGCACGUUCUUGGCGUUUGCGAUCAGCA-3'	서열번호 22
25+2Y_2	RNA	5'-CUGAUCGCAAACGCCAAGAACGUGCCGUCGUUCCAUGUGCACCUUGAAGCCA-3'	서열번호 23
25+2Y_3	RNA	5'-GCUUCAAGGUGCACAUGGAACGACGGGUGAUAACUUCAGGGUCAGCUUGCCA-3'	서열번호 24

[0188] 유전자 침묵효과에 대한 실험을 수행하였다. GFP를 과발현하고 있는 KB-세포를 12 웰 플레이트에 $1x10^5$개/well 농도로 분주하고, 하루 뒤에 상기 "25+2Y-RNA", "25+2Y-RNA after Dicer" 1.5 nM을 Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Invitrogen)와 함께 처리하였다. 음성 대조군(NC)에는 아무것도 처리하지 않았다. 48시간 뒤에 형광발현 정도를 FACSCalibur system (BD biosciences) 장비를 통해 측정한 후 flowJo program을 통해서 유전자 침묵 효과를 분석하고, 결과를 도 21에 나타내었다.

[0189] 도 21의 좌측 도는 음성 대조군의 GFP 발현을 100%로 보았을 때 상대적 GFP 발현을 나타낸 그래프인데 다이서 기질이 되는 25+2Y-RNA의 유전자 발현 억제 효과에 비해서 25+2Y-RNA after Dicer의 유전자 발현 억제 효과가 감소하였다.

[0190] 도 21의 우측 도는 25+2Y-RNA의 유전자 침묵 효능을 100%로 보았을 때 상대적 유전자 침묵 효능을 나타낸 그래프인데, 여기에서 25+2Y-RNA after Dicer의 유전자 침묵 효능은 25+2Y-RNA보다 현저히 낮게 나타났다. 이는 25+2Y-RNA after Dicer는 미리 다이서에 의해 절단되어 19+2 nt 또는 20+2 nt 길이로 절단되어 세포에 처리된 것이기 때문에 Dicer-mediated RISC loading이 일어나지 않아 유전자 침묵 효능이 감소된 것으로 생각된다.

[0191] **3-3. RNAi 서열을 포함한 RNA 나노구조체의 ON/OFF에 의한 GFP 유전자 침묵**

[0192] 나노구조체의 ON/OFF에 의한 유전자 침묵효과 확인을 위해서 GFP-KB 세포를 12-웰 플레이트에 1.0×10^6cells/well의 농도로 분주하였다. 24시간 배양 후, IDT에서 합성 주문한 25+2 Y 나노구조체와 실시예 2.4.2에서 수득한 RFP-ON Y 나노구조체, 실시예 2.4.3에서 수득한 R/GFP-ON 나노구조체 및 실시예 2.4.1에서 수득한 All-ON 나노구조체를 각각 최종농도 1 nM의 샘플을 3 ul Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen)과 20분간 상온에서 혼합한 후, 세포에 처리한 뒤 48시간 후에 GFP-KB 세포의 GFP 발현정도를 FACS Calibur system (BD biosciences)으로 측정하였다. GFP 유전자 침묵효과는 flowJo program을 사용하여 분석하였으며, 결과를 도 22에 나타내었다.

[0193] 도 22에 나타낸 바와 같이, RFP-ON Y 나노구조체는 GFP 루프가 닫혀있기 때문에 유전자 침묵 작용이 나타나지 않았으며, 이와 달리 R/GFP-ON 및 R/G/BFP-ON Y 나노구조체는 GFP 루프가 개방되어 있기 때문에 합성 Y 나노구조체와 동일하게 GFP 유전자에 대해 유전자 침묵 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0194] **3-4. ON/OFF RNA 나노구조체를 이용한 Programmable 유전자조절**

[0195] Hela 세포를 DMEM 배지(10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신)의 12-웰 플레이트에 1.0×10^6cells/well의 농도로 분주하였다. 24시간 배양 후, 900 ul 배지로 교환하고, Hela 세포에 RFP, BFP 및 GFP를 동시에 발현하기 위해 각각의 in vitro transcribed mRNA를 stemfect와 함께 형질주입하였다. 그 다음, 10 pmole의 개별적인 RFP, GFP, BFP siRNA 혼합물과 2.4.1에서 수득한 All-ON Y 나노구조체 샘플을 3 ul Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen)과 함께 50 ul DPBS에서 상온에서 20분간 혼합한 후 처리하였다. 그 다음, 48 시간 후에 각 형광단

백질의 발현을 BD LSRFORTESSA (BD Biosciences, USA)로 측정하고, 이를 flowJo program을 사용하여 분석하였다. 형광이미지는 confocal microscope (Nikon A1, Japan)를 사용하였으며, 결과를 도 23에 나타내었다.

[0196] 도 23에서 나타낸 바와 같이, 개별적인 siRNA 혼합물 처리한 군(b)은 세포 내 존재하는 siRNA 비율이 상이하나, Y 나노구조체를 처리한 군(c)은 RFP, GFP 및 BFP siRNA의 비율이 1:1:1로 동일함을 확인하였다.

[0197] **실시예 4. Y 나노구조체를 이용한 다이서 기질 RNA의 효과**

[0198] **4-1. 2 nt-오버행에 따른 다이서 프로세싱**

[0199] 2 nt-오버행이 없는 19+0 nt ("19+0Y-RNA") 및 23+0 nt ("23+0Y-RNA"), 2 nt-오버행이 있는 19+2 nt ("19+2Y-RNA") 및 23+2 nt ("23+2Y-RNA")의 Y 나노구조체를 IDT (Integrated Device Technology, USA)에서 합성주문하였다. 구체적인 19+0Y-RNA, 23+0Y-RNA, 19+2Y-RNA 및 23+2Y-RNA의 서열은 다음의 표 6과 같다.

[0200] **[표 6]**

[0201]

명칭		서열	서열번호
19+0Y_1	RNA	5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUUCUUGGCGUUUGCGAUCAG-3'	서열번호 25
19+0Y_2	RNA	5'-CUGAUCGCAAACGCCAAGAUCCAUGUGCACCUUGAAGC-3'	서열번호 26
19+0Y_3	RNA	5'-GCUUCAAGGUGCACAUGGAAACUUCAGGGUCAGCUUGC-3'	서열번호 27
23+0Y_1	RNA	5'- TTGATTAACGCCCAGCGTTTTCACGAAGAGTTCAAGTCCATCTACA -3'	서열번호 28
23+0Y_2	RNA	5'- AAGTCGTGCTGCTTCATGTTTTGTGAAAACGCTGGGCGTTAATCAA -3'	서열번호 29
23+0Y_3	RNA	5'- TGTAGATGGACTTGAACTCTTCGCAAAACATGAAGCAGCACGACTT -3'	서열번호 30
19+2Y_1	RNA	5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUUCUUGGCGUUUGCGAUCAGCA-3'	서열번호 31
19+2Y_2	RNA	5'-CUGAUCGCAAACGCCAAGAUCCAUGUGCACCUUGAAGCCA-3'	서열번호 32
19+2Y_3	RNA	5'-GCUUCAAGGUGCACAUGGAAACUUCAGGGUCAGCUUGCCA-3'	서열번호 33
23+2Y_1	RNA	5'- GCAAGCUGACCCUGAAGUUAUCAACGUUCUUGGCGUUUGCGAUCAGCA -3'	서열번호 34
23+2Y_2	RNA	5'- CUGAUCGCAAACGCCAAGAACGUUCGUUCCAUGUGCACCUUGAAGCCA -3'	서열번호 35
23+2Y_3	RNA	5'- GCUUCAAGGUGCACAUGGAACGAUGAUAACUUCAGGGUCAGCUUGCCA -3'	서열번호 36

[0202] 상기 0.3 μg의 19+0 nt, 19+2 nt, 23+0 nt 및 23+2 nt의 Y 나노구조체 각각을 재조합 인간 다이서 효소키트 (Genlantis, USA)를 사용하여 37 ℃에서 6 시간동안 반응시킨 후, 모든 생성물을 상온에서 1 X Tris-borate-EDTA (TBE) 완충액 15 % PAGE를 통해 확인하였다. 겔은 Gel red (Biotium, USA)로 염색하였고, Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 겔 이미지를 얻어, 결과를 도 24에 나타내었다.

[0203] 도 24에 나타난 바와 같이, 2 nt-오버행이 있는 Y 나노구조체는 2 nt-오버행이 없는 Y 나노구조체에 비하여 다이서 프로세싱이 더 잘 이루어짐을 확인하였다. 이는 오버행이 존재하는 경우, 다이서에 의해 Y 나노구조체가 용이하게 인식되어 절단될 가능성이 높아짐을 알 수 있다.

[0204] **4-2. 팔(arm)의 길이에 따른 유전자 억제효과**

[0205] 2 nt-오버행이 있는 19+2 nt (서열번호 31 내지 33), 23+2 nt (서열번호 34 내지 36) 및 25+2 nt (서열번호 22 내지 24)의 Y 나노구조체를 상기 실시예 1의 방법으로 합성주문하였다. 상기 0.3 μg의 19+2 nt, 23+2 nt 및 25+2 nt의 Y 나노구조체 각각을 재조합 인간 다이서 효소 키트 (Genlantis, USA)를 사용하여 실시예 4.1과 동일한 방법으로 Y 나노구조체의 겔 이미지를 얻었으며, 결과를 도 25b에 나타내었다.

[0206] 도 25b에 나타난 바와 같이, Y 나노구조체의 19 nt는 다이서에 의해 잘리지 않음을 확인하였다.

[0207] 다음으로, Y 나노구조체의 팔 길이에 따른 유전자 침묵효과를 확인하였다. 먼저, GFP-KB 세포를 RPMI 배지 (10 % 소태아혈청, 1 % 페니실린/스트렙토마이신)로 96 검정 플레이트에 0.1 × 10^6 cells/웰 기준으로 100 %, 70 % 50 %의 농도로 각각 분주하였다. 상기 세포를 24 시간 배양 후, 각각 0.05 pmole, 0.5 pmole, 2.5 pmole의 샘플을 1.5 ul Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen)과 20분간 상온에서 혼합한 후 450 μl의 RPMI 배지를 첨가하여 500 μl로 맞춘 후, 상기 세 가지 농도의 샘플을 한 웰 당 100 μl씩 처리하였다(N=4). Infinite㎢ 200 PRO NanoQuant (Tecan)의 bottom reading mode를 사용해서 48 시간 (2일), 96 시간 (4일), 144 시간(6일) 후의 GFP 발현을 측정하였다. 형광 발현분석은 Two-way ANOVA analysis (GraphPad Prism 5)를 이용하여 다이서-기질이 되는 군과 그렇지 않은 군 (19+2 dsGFP)의 상관관계를 통해 유의성을 검정하였고, 결과를 도 25c 및 d에 나타내었다.

[0208] 도 25c에서 확인되는 바와 같이, 19+2 Y 나노구조체, 23+2 Y 나노구조체 및 25+2 Y 나노구조체는 19+2 dsGFP와 비교하여 농도 의존적으로 유전자 억제능이 현저히 상승하였음을 확인하였다.

[0209] 또한, 도 25d에서 확인되는 바와 같이, 25+2 Y 나노구조체는 19+2 dsGFP와 비교하여 0.2 nM과 1 nM에서 유전자

억제효과가 현저히 상승하였으며, 이러한 상승된 억제효과는 장기간 지속적임을 확인하였다.

[0210] **4-3. RNA 구조에 따른 유전자 억제효과**

[0211] GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 이용하여 나노구조체의 구조에 따른 유전자 억제 실험을 수행하였다.

[0212] TRBP (the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein) 및 PACT (protein kinase RNA activator)는 다이서의 cofactor로서, 체내에 존재하고 있는 miRNA의 경우 dicer/TRBP complex 또는 Dicer/PACT complex 중 어떤 형태를 형성하든지와 무관하게 다이서 프로세싱이 잘 일어나지만, 선형 다이서 기질 dsRNA의 경우 Dicer/TRBP complex를 형성하면 정상적으로 다이서 프로세싱이 일어나나 dicer/PACT complex를 형성하면 오히려 다이서 프로세싱이 저해된다고 보고된 바 있다(Lee et al., Nucleic Acids Research, 2013, Vol. 41, No. 13).

[0213] 각기 다른 구조를 갖는 RNA 구조체로서, Linear Dicer substrate dsRNA인 "Linear DsiGDH", pre-miRNA 구조를 모방한 siRNA인 "Pre-let 7 siGDH" 및 본 발명에 따른 RNA 나노구조체인 "25+2Y-RNA"(이하, 'siY-GDH'라 함) 총 3종의 RNA 구조체를 IDT에서 합성주문하였으며, 각 RNA 구조체의 서열은 다음의 표 7과 같다.

[0214] **[표 7]**

[0215]

구조체	서열 (5' → 3')	서열번호
Linear DsiGDH	센스: 5' -GGUCAUCCAUGACAACUUUGGUAUCUCCCAGUGGUG-3'	서열번호 37
	안티센스: 5' -CACCACUGGGAGAUACCAAAGUUGUCAUGGAUGACCUU-3'	서열번호 38
Pre-let 7 siGDH	5' - GGUCAUCCAUGACAACUUUGGUUUAGGGUCACACCCACCACUGGGAGAUACCAAAGUUGUCAUG GAUGACCUU-3'	서열번호 39
siY-GDH	Y1: 5'-GGUCAUCCAUGACAACUUUAUCACCGCACGUTCCTTGAAGAAGATGGTGCCA-3'	서열번호 40
	Y2: 5'-GCACCAUCUUCUUCAAGGAACGUGCCGUCGUATGATATAGACGTTGTGGCCA-3'	서열번호 41
	Y3: 5'-GCCACAACGUCUAUAUCAUACGACGGGUGAUAAAGUUGUCAUGGAUGACCCA-3'	서열번호 42

[0216] 상기 각 RNA를 상보적인 가닥끼리 1xPBS (Gibco, #10010023)에 1 uM이 되도록 넣고, 95 ℃에서 3 분 동안 배양시킨 뒤 4℃까지 냉각시킴으로써 혼성화하였다.

[0217] 다음으로 Normal HeLa 세포, TRBP K/O 세포 및 PACT K/O 세포를 6 웰 플레이트에 DMEM 배지 (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin)을 이용하여 0.3×10^{6} cell/well density로 분주하고, 24 시간 뒤 각각의 샘플을 1 nM로 처리하였다. 그 다음, 24시간 후 TRIzol (Invitrogen)을 사용하여 mRNA을 추출하고, mRNA 2.5 ug 기준으로 SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen)의 프로토콜에 따라 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (Enynomics), GAPDH forward/reverse 프라이머와 b-actin forward/reverse 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 시행하였다. GAPDH의 Cq값을 b-actin으로 보정하고, ΔΔCq를 계산하여 유전자 발현 정도를 분석하였으며, 그 결과를 도 27에 나타내었다.

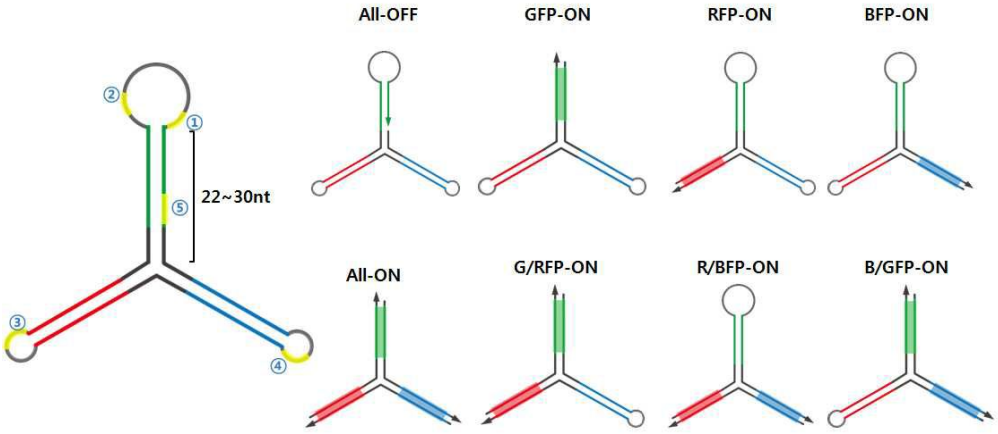
[0218] 도 27에 나타낸 바와 같이, linear DsiGDH의 경우 정상 HeLa 세포에서 20 % 정도의 유전자 침묵효과를 보였으나, TRBP를 knock out (K/O) 세포에서 급격하게 침묵효과가 억제된 것이 확인된 반면, PACT K/O에서는 Dicer/TRBP에 의해서만 Dicer processing일 일어나므로 유전자 침묵효과가 증가된 것을 알 수 있었다.

[0219] 또한, pre-Let7 siGDH의 경우, linear DsiGDH와 다르게 TRBP K/O 세포에서도 유전자 침묵효과가 거의 변하지 않으므로, Dicer/PACT complex에 의한 Dicer processing 억제가 일어나지 않는 것을 확인하였다.

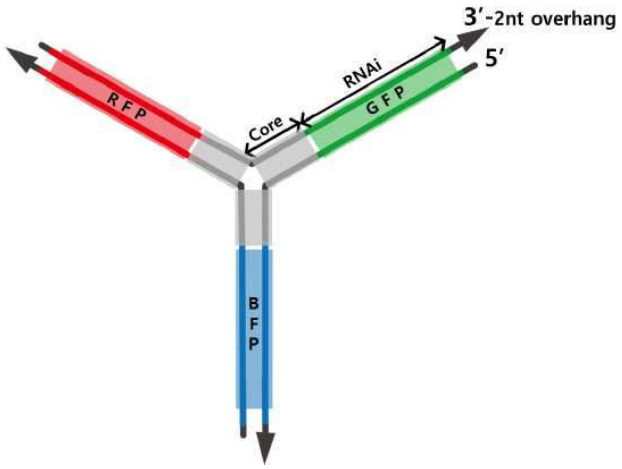
[0220] 또한, siY-GDH의 경우, 일반적인 linear DsiRNA와 다르게 Dicer/PACT complex에 의해서 processing이 저해되지 않았으며 pre-let7 miRNA와 비슷한 동태를 보이는 것을 확인하였다.

도면

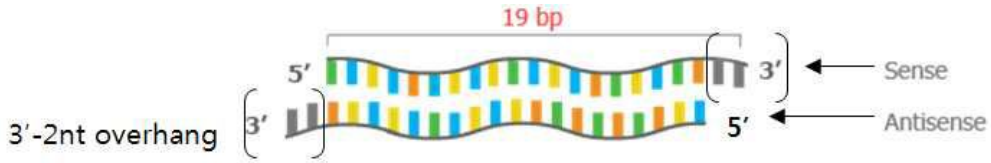
도면1



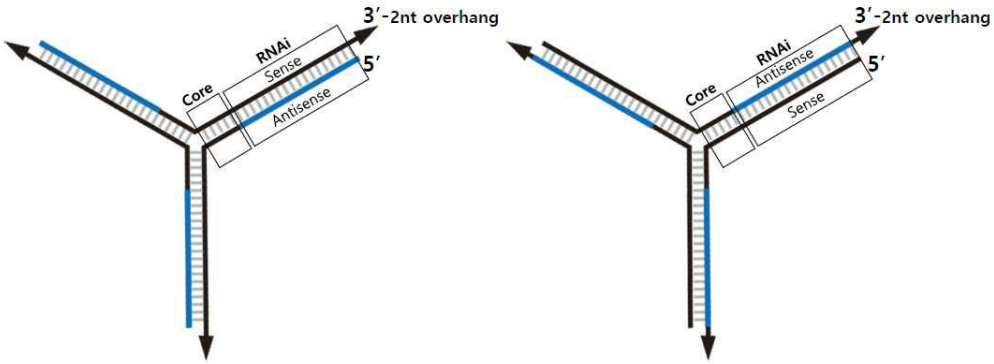
도면2



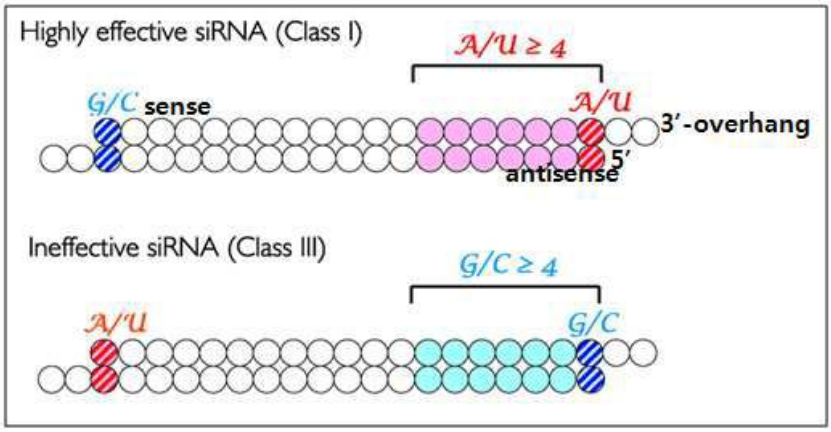
도면3



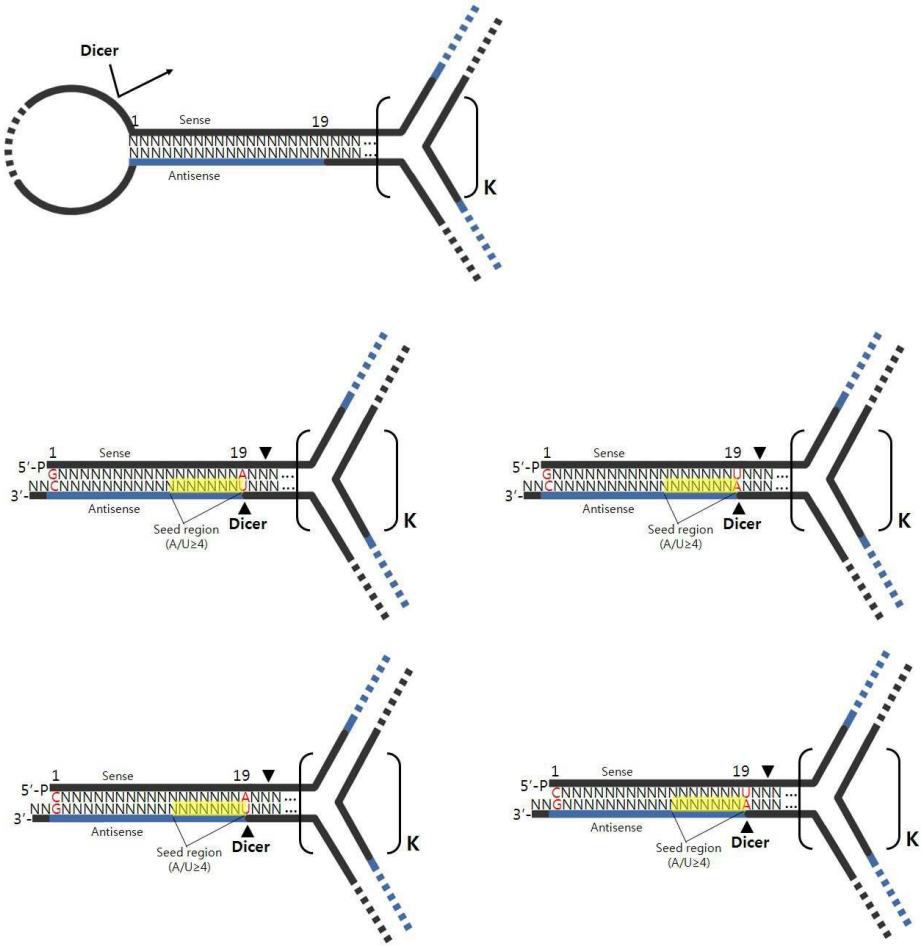
도면4


3′-2nt overhang
RNAi
Sense
Antisense
Core
5′
3′-2nt overhang
RNAi
Antisense
Sense
Core
5′

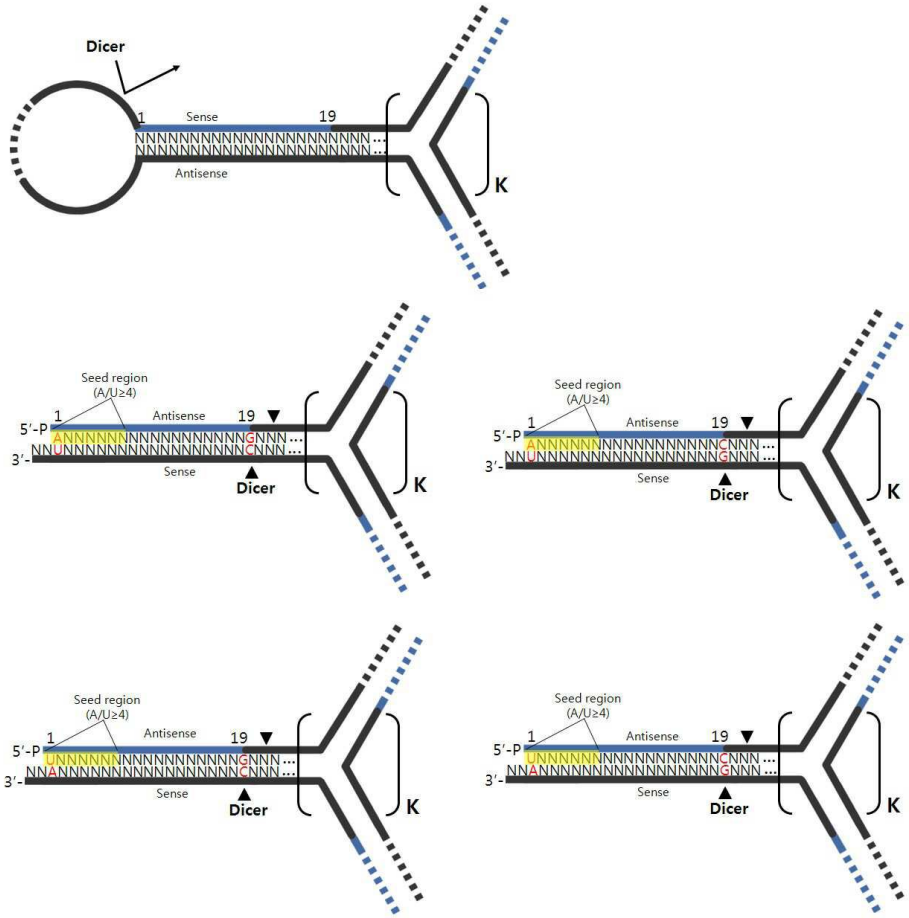
도면5


Highly effective siRNA (Class I)
A/U ≥ 4
G/C sense
A/U
3′-overhang
5′
antisense
Ineffective siRNA (Class III)
G/C ≥ 4
A/U
G/C

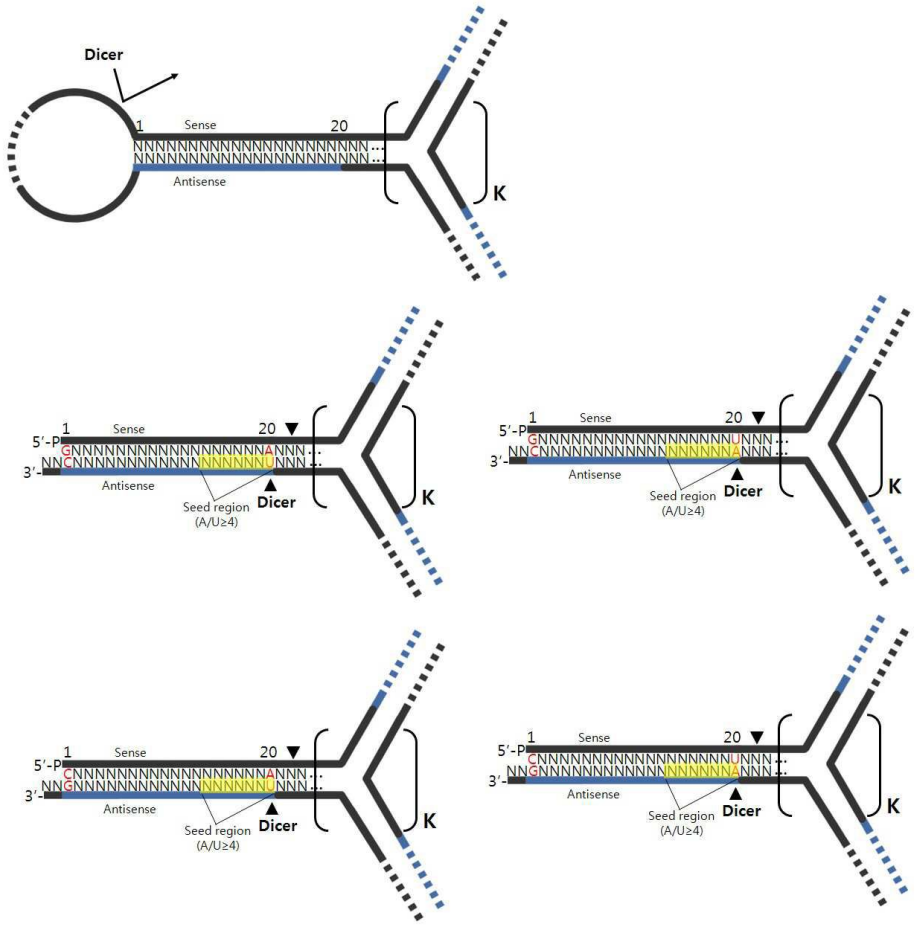
도면6



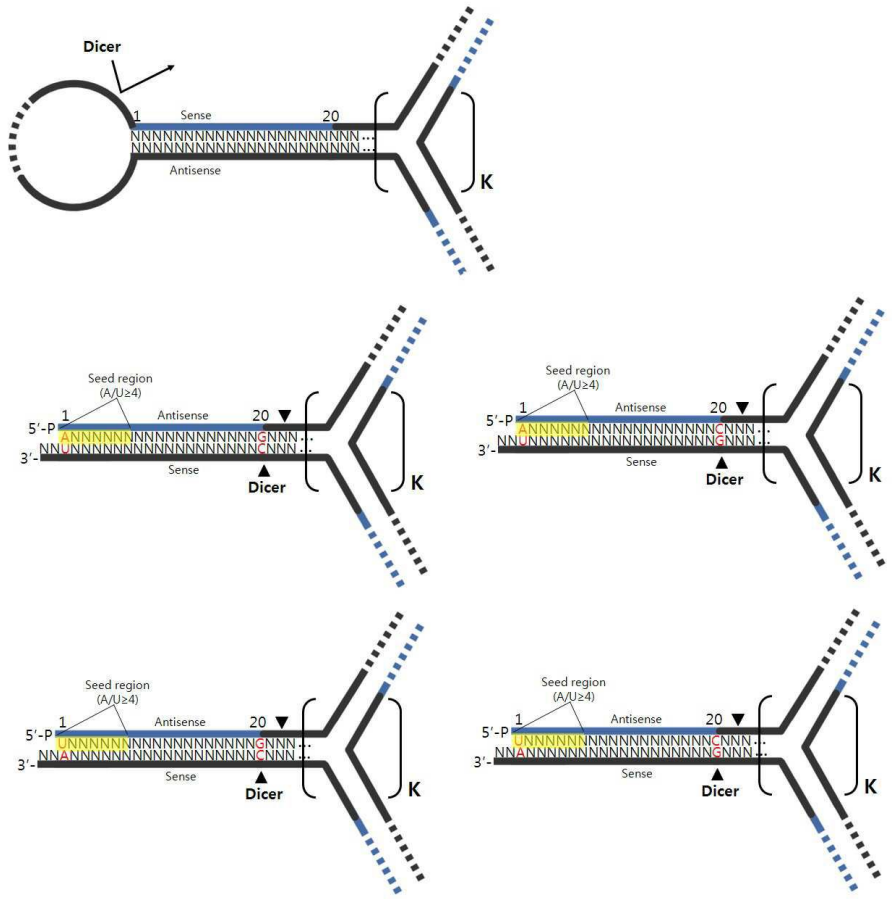
도면7


Dicer
1
Sense
19
Antisense
K
Seed region
(A/U≥4)
5′-P
3′-
Antisense
Sense
Dicer
K

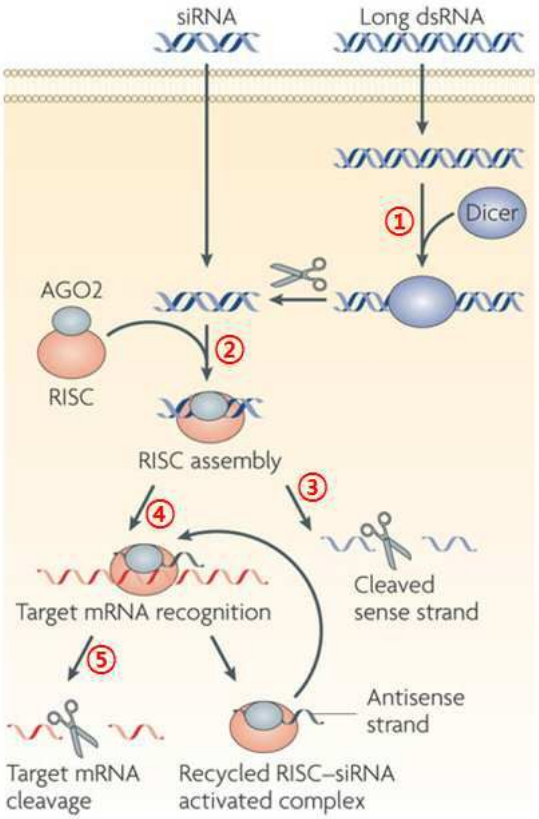
도면8



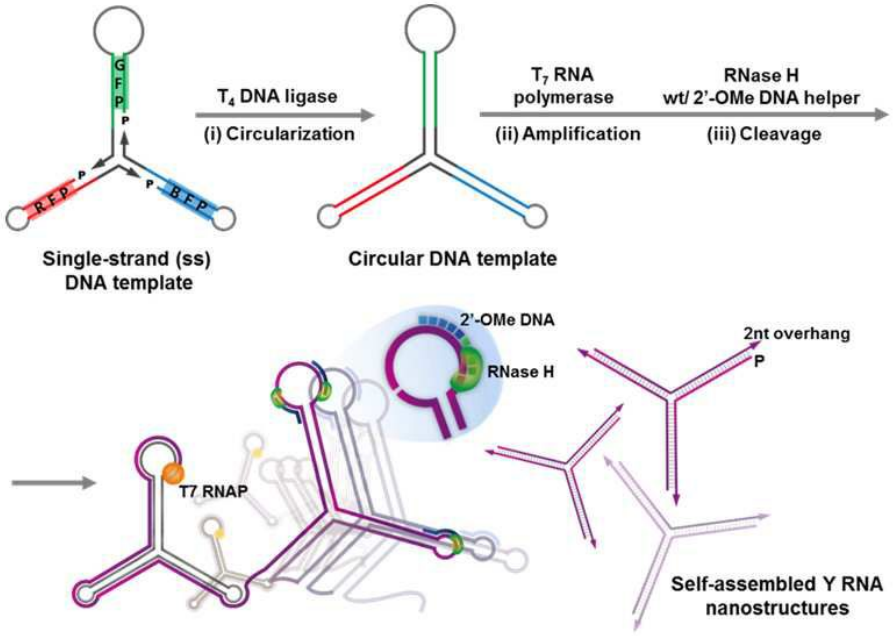
도면9


Dicer
1
Sense
20
Antisense
K
Seed region
(A/U≥4)
5′-P
3′-
Dicer
Seed region
(A/U≥4)
Seed region
(A/U≥4)
Seed region
(A/U≥4)

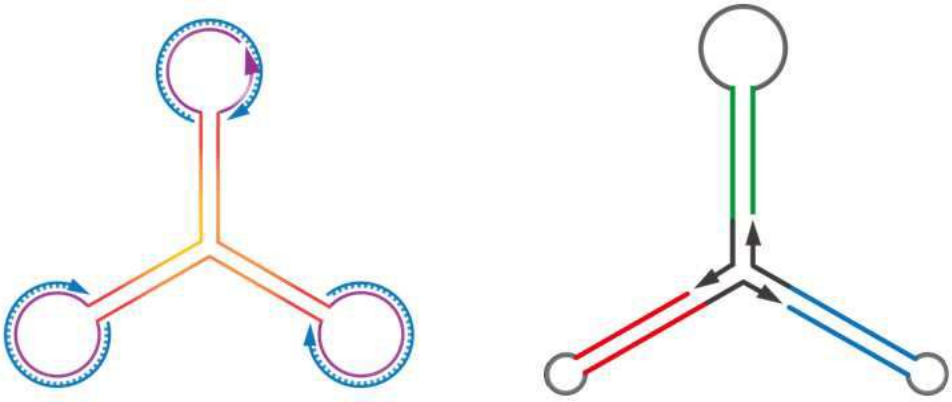
도면10


siRNA
Long dsRNA
Dicer
AGO2
RISC
RISC assembly
Cleaved
sense strand
Target mRNA recognition
Antisense
strand
Target mRNA
cleavage
Recycled RISC–siRNA
activated complex

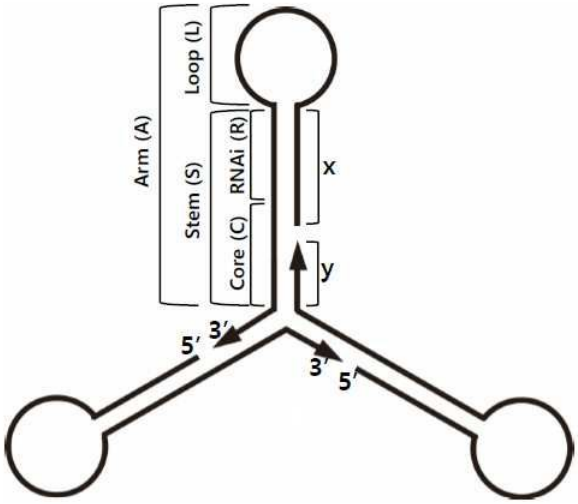
도면11


T4 DNA ligase
(i) Circularization
T7 RNA
polymerase
(ii) Amplification
RNase H
wt/ 2'-OMe DNA helper
(iii) Cleavage
Single-strand (ss)
DNA template
Circular DNA template
2'-OMe DNA
RNase H
2nt overhang
T7 RNAP
Self-assembled Y RNA
nanostructures

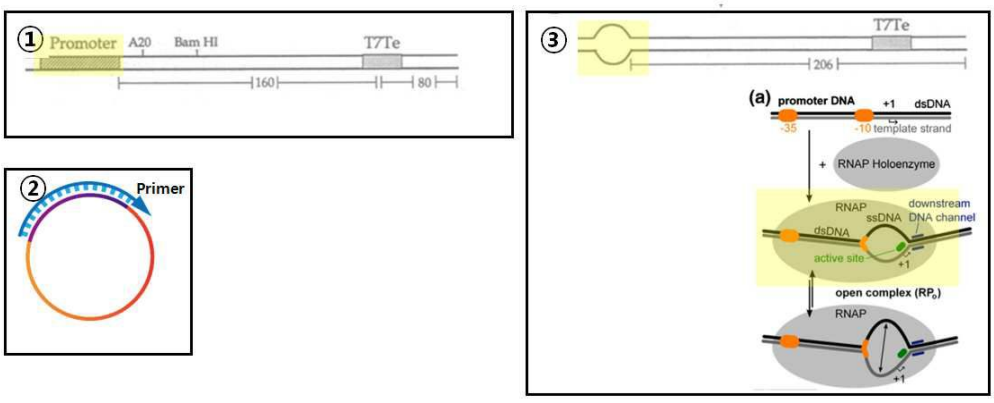
도면12



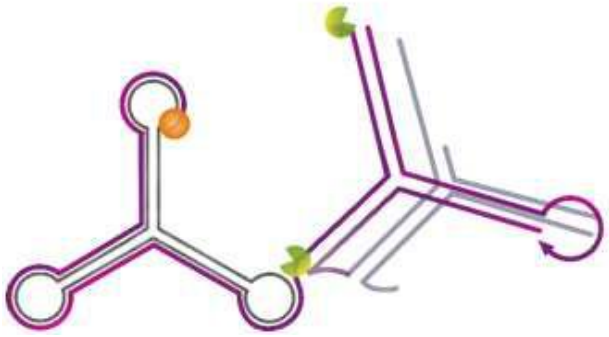
도면13



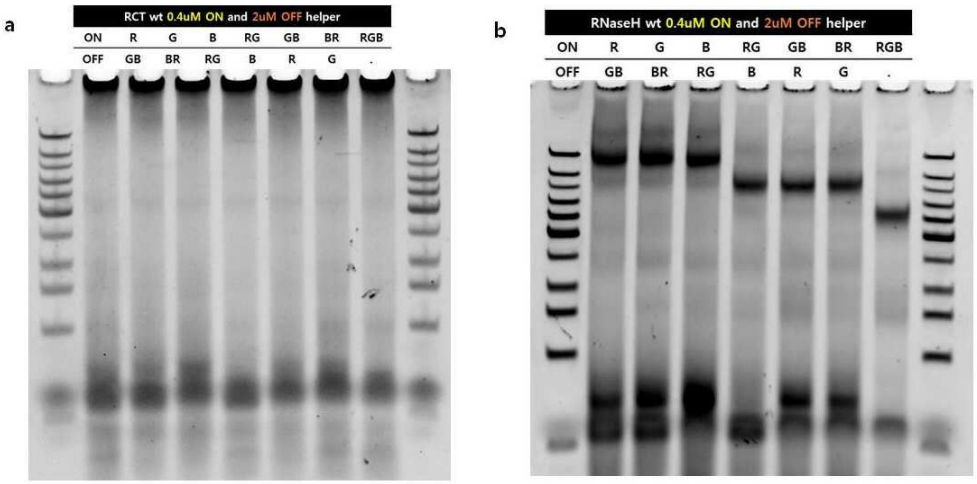
도면14



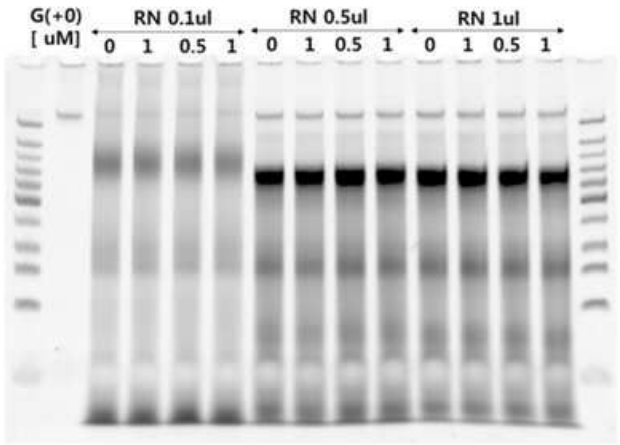
도면15



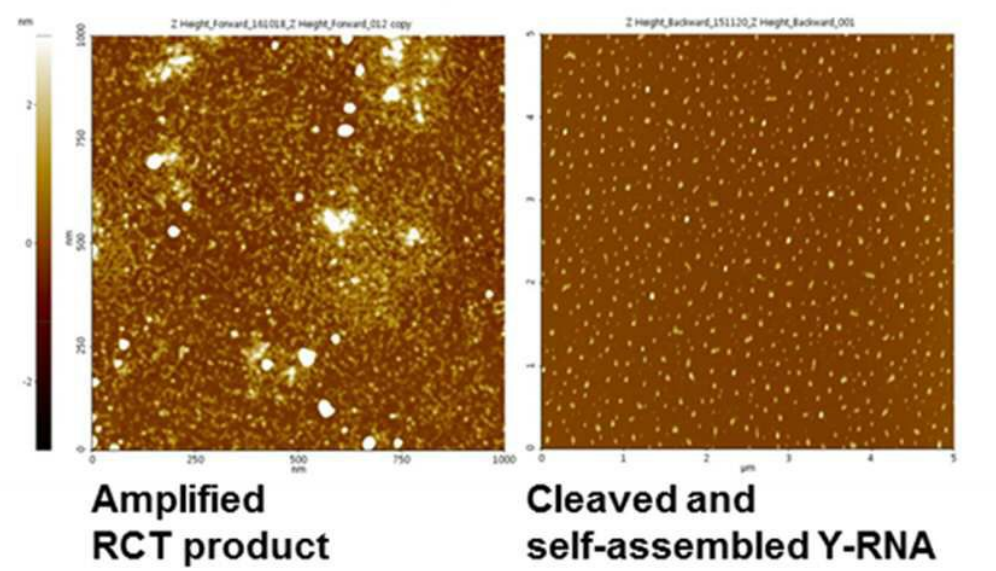
도면16



도면17



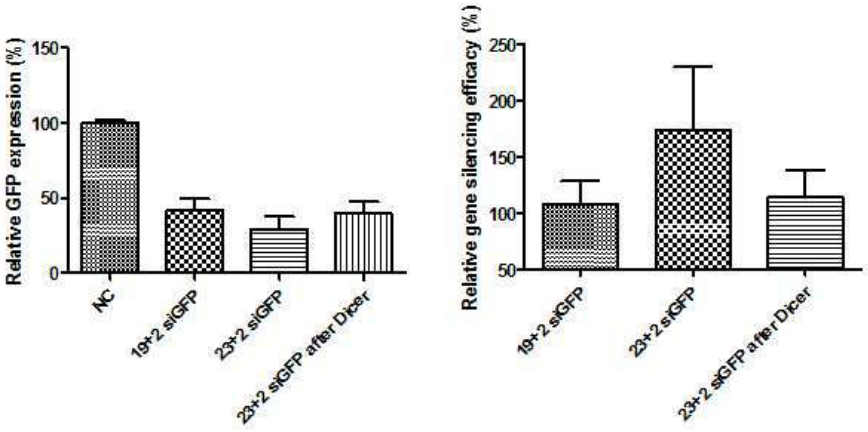
도면18



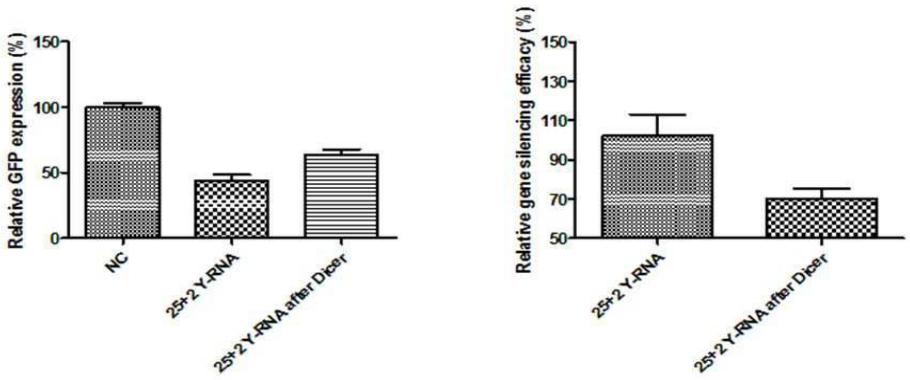
도면19

5'-
AUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGCUGUUCACCGGGGUGGUGCCCAUCCUGGUCGAGCUGGACGGCGACGUAAACGGCCACAAGUUCA
GCGUGUCCGGCGAGGGCGAGGGCGAUGCCACCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCAUCUGCACCACCGGCAAGCUGCCCGUGCCC
UGGCCCACCCUCGUGACCACCCUGACCUACGGCGUGCAGUGCUUCAGCCGCUACCCCGACCACAUGAAGCAGCACGACUUCUUCAAG
UCCGCCAUGCCCGAAGGCUACGUCCAGGAGCGCACCAUCUUCUUCAAGGACGACGGCAACUACAAGACCCGCGCCGAGGUGAAGUUC
GAGGGCGACACCCUGGUGAACCGCAUCGAGCUGAAGGGCAUCGACUUCAAGGAGGACGGCAACAUCCUGGGGCACAAGCUGGAGUA
CAACUACAACAGCCACAACGUCUAUAUCAUGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAUCAAGGUGAACUUCAAGAUCCGCCACAACAUCGA
GGACGGCAGCGUGCAGCUCGCCGACCACUACCAGCAGAACACCCCCAUCGGCGACGGCCCCGUGCUGCUGCCCGACAACCACUACCUG
AGCACCCAGUCCGCCCUGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAUCACAUGGUCCUGCUGGAGUUCGUGACCGCCGCCGGGAUCACU
CUCGGCAUGGACGAGCUGUACAAGUAA-3'

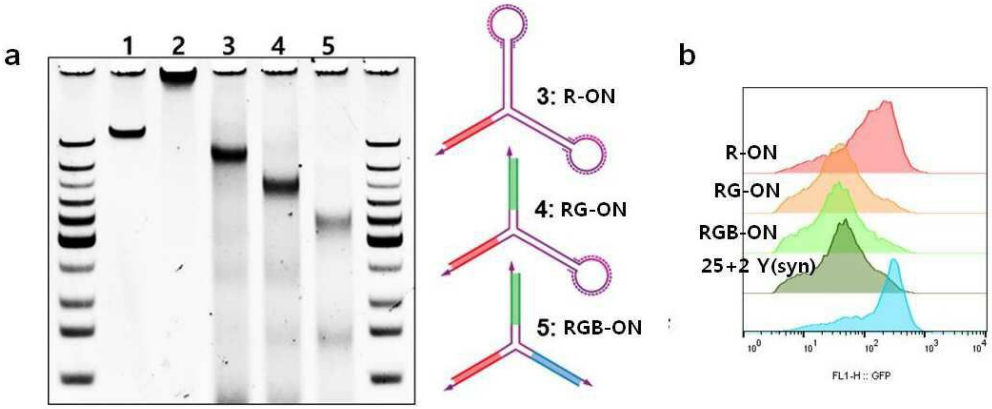
도면20



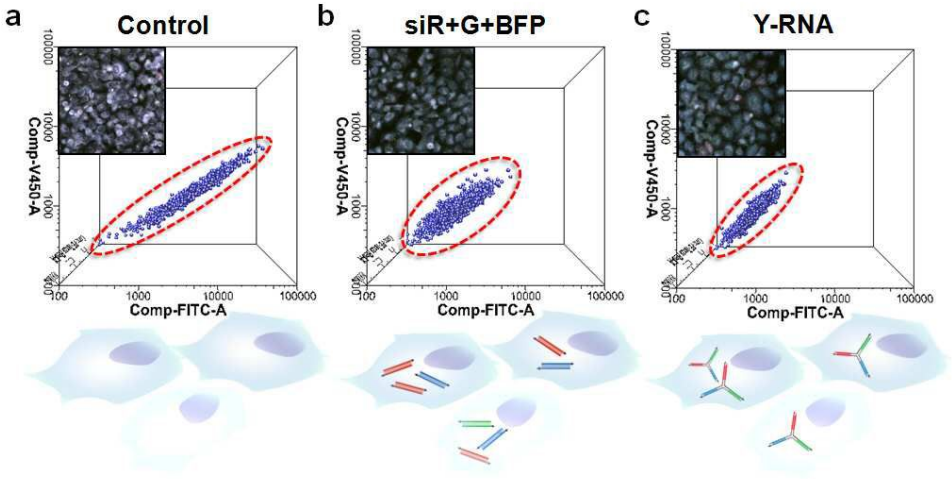
도면21



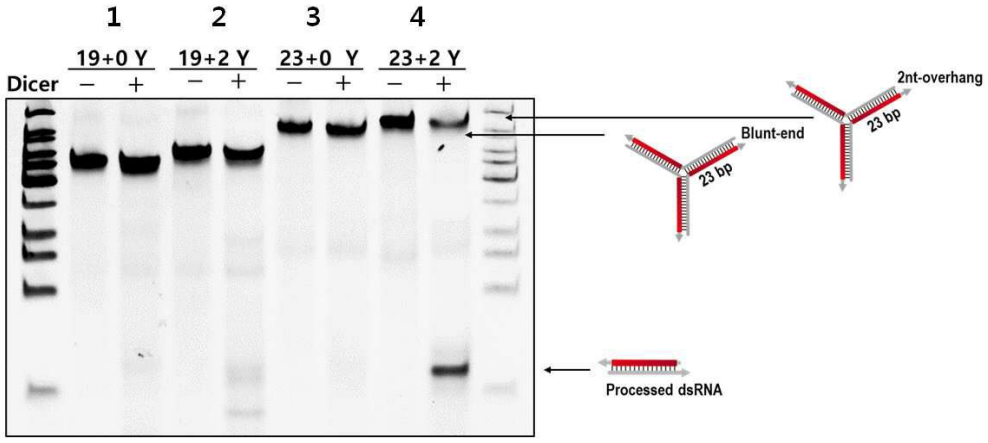
도면22



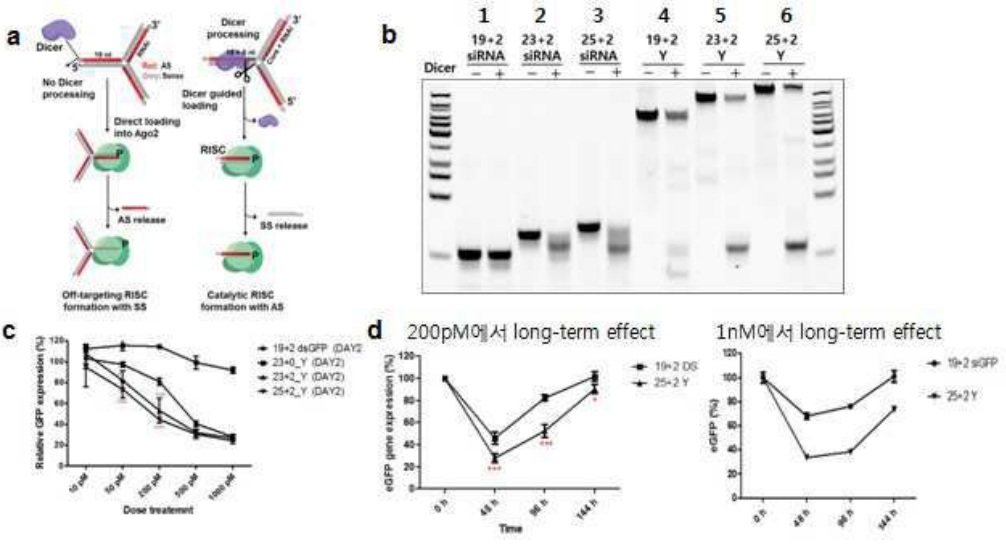
도면23



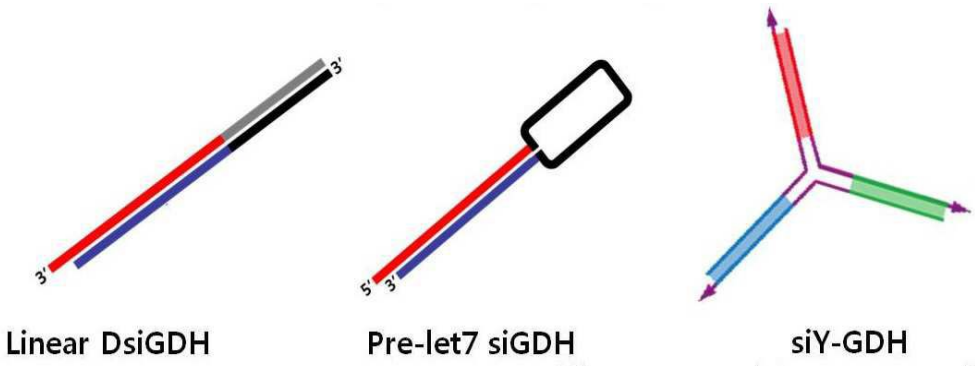
도면24



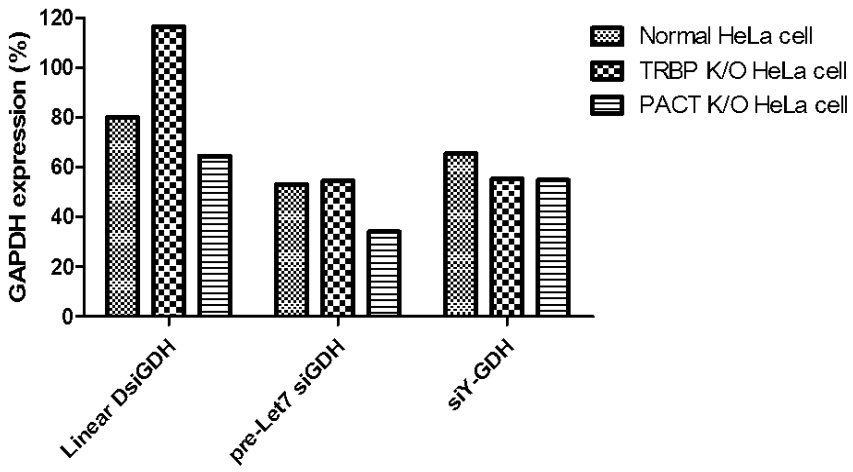
도면25



도면26



도면27



서 열 목 록

<110> EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> Dicer Substrate RNA Nanostructures for Enhanced Gene Silencing Effect and Process for Preparation Thereof

<130> P16-036-REA-EWHA

<150> KR 10-2016-0053193

<151> 2016-04-29

<160> 42

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RV Strand1

<400> 1

aacttcaggg tcagcttgct cgaaatacca tgccctcgaa cgagcaagct gaccctgaag 60

ttaaagcgtg cgtgaacatt 80

<210> 2

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RV Strand2

<400> 2

tgtagattga cttgaactct cgaacgagag ttcaagtcaa tctacaaatg ttcaccggtc 60

gaaa 64

<210> 3

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RV Strand3

<400> 3

tcttggcgtt tgcgatcagt cgaacgactg atcgcaaacg ccaagatttc gaccggcacg 60

cttt 64

<210> 4

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA Helper 1

<400> 4

aataccatg 9

<210> 5

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA Helper 2

<400> 5

acgagcaag 9

<210> 6

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA Helper 3

<400> 6

acgagagtt 9

<210> 7

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA Helper 4

<400> 7

acgactgat 9

<210> 8

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA Helper 5

<400> 8

gcgtgcgtg 9

<210> 9

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Strand1

<400> 9

agggtcagct tgcattacta ccctcactac tcctggcaag ctgaccctga agttatcacc 60

cgtcgttcca tg 72

<210> 10

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Strand2

<400> 10

tgcaccttga agcattctac tactcttacc cgctggcttc aaggtgcaca tggaacgacg 60

gcacgttctt gg 72

<210> 11

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Strand3

<400> 11

cgtttgcgat cagactacct ttactactca ccctgctgat cgcaaacgcc aagaacgtgc 60

ggtgataact tc 72

<210> 12

<211> 32

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Open DNA helper G

<400> 12

agcuugcatt actaccctca ctacucctgg ca 32

<210> 13

<211> 32

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Open DNA helper R

<400> 13

ttgaagcatt ctactactct tacccgctgg ct 32

<210> 14

<211> 32

<212

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Open DNA helper B

<400> 14

cgaucagact acctttacta ctcaccctgc tg 32

<210> 15

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protect RNA helper G

<400> 15

uugcauuacu acccucacua cuccuggcaa 30

<210> 16

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protect RNA helper G

<400> 16

aagcauucua cuacucuuac ccgcuggcuu 30

<210> 17

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protect RNA helper G

<400> 17

ucagacuacc uuuacuacuc acccugcuga 30

<210> 18

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 19+2 siGFP sense

<400> 18

gcaagcugac ccugaaguu 19

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 19+2 siGFP antisense

<400> 19

aacuucaggg ucagcuugc 19

<210> 20

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23+2 siGFP sense

<400> 20

cgagcaagcu gacccugaag uuaaa 25

<210> 21

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23+2 siGFP antisense

<400> 21

uaacuucagg gucagcuugc ucguu 25

<210> 22

<211

> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 25+2 Y1 RNA

<400> 22

gcaagcugac ccugaaguua ucaccgcacg uucuuggcgu uugcgaucag ca 52

<210> 23

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 25+2 Y2 RNA

<400> 23

cugaucgcaa acgccaagaa cgugccgucg uuccaugugc accuugaagc ca 52

<210> 24

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 25+2 Y3 RNA

<400> 24

gcuucaaggu gcacauggaa cgacggguga uaacuucagg gucagcuugc ca 52

<210> 25

<211> 38

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 19+0 Y1 RNA

<400> 25

gcaagcugac ccugaaguuu cuuggcguuu gcgaucag 38

<210> 26

<211> 38

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 19+0 Y2 RNA

<400> 26

cugaucgcaa acgccaagau ccaugugcac cuugaagc 38

<210> 27

<211> 38

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 19+0 Y3 RNA

<400> 27

gcuucaaggu gcacauggaa acuucagggu cagcuugc 38

<210> 28

<211> 46

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23+0 Y1 RNA

<400> 28

ttgattaacg cccagcgttt tcacgaagag ttcaagtcca tctaca 46

<210> 29

<211> 46

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23+0 Y2 RNA

<400> 29

aagtcgtgct gcttcatgtt ttgtgaaaac gctgggcgtt aatcaa 46

<210> 30

<211> 46

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23+0 Y3 RNA

<400> 30

tgtagatgga cttgaactct tcgcaaaaca tgaagcagca cgactt 46

<210> 31

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 19+2 Y1 RNA

<400> 31

gcaagcugac ccugaaguuu cuuggcguuu gcgaucagca 40

<210> 32

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 19+2 Y2 RNA

<400> 32

cugaucgcaa acgccaagau ccaugugcac cuugaagcca 40

<210> 33

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 19+2 Y3 RNA

<400> 33

gcuucaaggu gcacauggaa acuucagggu cagcuugcca 40

<210> 34

<211> 48

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23+2 Y1 RNA

<400> 34

gcaagcugac ccugaaguua ucaacguucu uggcguuugc gaucagca 48

<210> 35

<211> 48

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23+2 Y2 RNA

<400> 35

cugaucgcaa acgccaagaa cguucguucc augugcaccu ugaagcca 48

<210> 36

<211> 48

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23+2 Y3 RNA

<400> 36

gcuucaaggu gcacauggaa cgaugauaac uucaggguca gcuugcca 48

<210> 37

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linear DsiGDH sense

<400> 37

ggucauccau gacaacuuug guaucuccca guggug 36

<210> 38

<211> 38

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linear DsiGDH antisense

<400> 38

caccacuggg agauaccaaa guugucaugg augaccuu 38

<210> 39

<211> 73

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pre-let 7 siGDH

<400> 39

ggucauccau gacaacuuug guuuaggguc acacccacca cugggagaua ccaaaguugu 60

cauggaugac cuu 73

<210> 40

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siY-GDH Y1

<400> 40

ggucauccau gacaacuuua ucaccgcacg utccttgaag aagatggtgc ca 52

<210> 41

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siY-GDH Y2

<400> 41

gcaccaucuu cuucaaggaa cgugccgucg uatgatatag acgttgtggc ca 52

<210> 42

<211> 52

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siY-GDH Y3

<400> 42

gccacaacgu cuauaucaua cgacggguga uaaaguuguc auggaugacc ca 52