

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 10월 27일 (27.10.2022) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2022/225353 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/005736
- (22) 국제출원일: 2022년 4월 21일 (21.04.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2021-0052010 2021년 4월 21일 (21.04.2021) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이혁진 (LEE, Hyukjin); 06557 서울특별시 서초구 방배로37길 26-9, 102동 207호, Seoul (KR). 김현숙 (KIM, Hyunsook); 08089 서울특별시 양천구 목동서로 340, 906동 608호, Seoul (KR). 장보라 (JANG, Bora); 08323 서울특별시 구로구 구일로10길 27, B동 1438호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울특별시 강남구 테헤란로 115, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

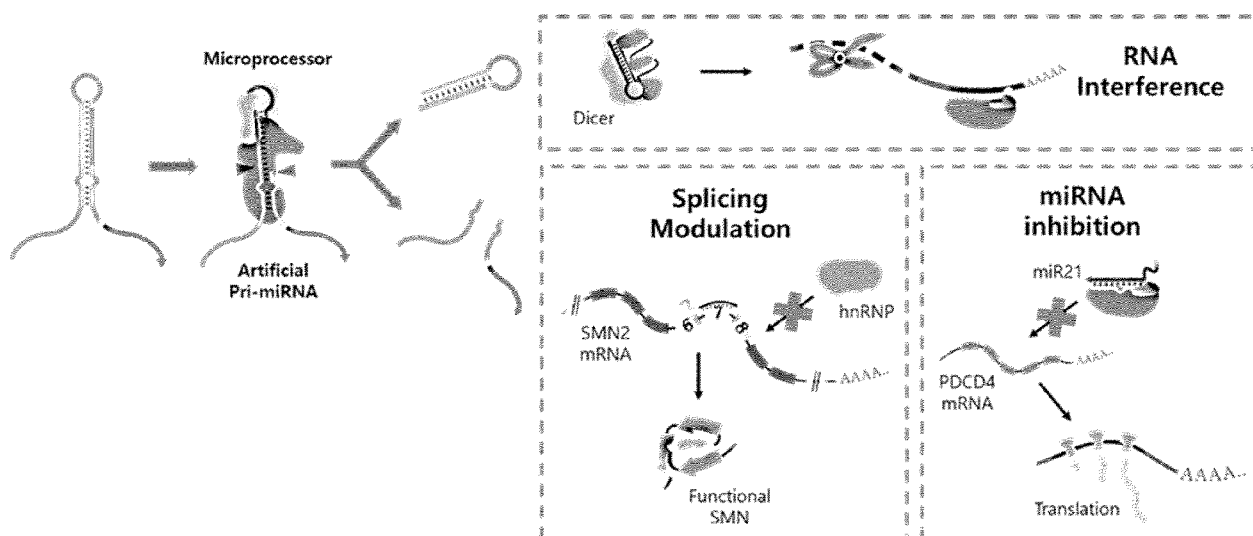
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, 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 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: MULTIFUNCTIONAL NUCLEIC ACID STRUCTURE FOR TARGET GENE MODULATION AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭: 타겟 유전자 조절을 위한 다기능성 핵산 구조체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present application relates to a multifunctional nucleic acid structure for target gene modulation and uses thereof, wherein a structure according to one example is capable of both effectively reducing the expression of a first target gene, as well as additionally modulating selective splicing, degrading mRNA of a second target gene, and/or inhibiting miRNA action.

(57) 요약서: 본 출원은 타겟 유전자 조절을 위한 다기능성 핵산 구조체 및 이의 용도에 관한 것으로, 일 예에 따른 구조체는, 제1 타겟 유전자의 발현을 효과적으로 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라, 추가적으로 선택적 스플라이싱을 조절, 제2 타겟 유전자의 mRNA를 분해, 및/또는 miRNA의 작용을 억제할 수 있다.



WO 2022/225353 A1

명세서

발명의 명칭: 타겟 유전자 조절을 위한 다기능성 핵산 구조체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 관련 출원(들)과의 상호 인용
- [2] 본 출원은 2021년 4월 21일자 대한민국 특허출원 제10-2021-0052010호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 대한민국 특허출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [3] 본 출원은 표적 유전자 조절을 위한 다기능성 핵산 구조체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[4]

배경기술

- [5] RNA 간섭은 동물에서 짧은 간섭 RNA(siRNA) 등에 의해 매개되는 서열-특이적인 전사후 유전자 침묵(silencing) 과정으로 타겟 유전자(목적 유전자)의 mRNA와 상동인 서열을 갖는 센스 가닥과 이와 상보적인 서열을 갖는 안티센스 가닥으로 구성되는 이중가닥 RNA는 세포 등에 도입되어 목적 유전자의 mRNA 분해를 유도하여 목적 유전자의 발현을 억제한다.
- [6] RNAi 분야는 실질적으로 모든 유전자의 발현을 억제시킬 수 있어 리보자임 등보다 훨씬 더 큰 잠재력을 가진 것으로 평가되고, 기존의 약물로 치료가 어려웠던 질병에 대해서 제약없이 치료제로 사용될 수 있어 난치질환에 대한 새로운 해결책으로 부상하여 RNAi 치료제는 차세대 미래 신약 기술로 인정받고 있어, 효과적인 RNAi 활성을 갖는 핵산 구조체에 대한 연구가 활발하다.
- [7] 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 19~30 nt 길이를 갖는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드 DNA로 세포 내 mRNA에 상보적 결합 및 RNaseH에 의한 mRNA 분해작용을 통해 단백질 발현을 억제할 수 있다. 또한, ASO의 경우 세포 핵에서 유전자의 alternative splicing을 유도함으로써 교정된 유전자 발현을 실현할 수 있으므로 관련 연구가 활발히 진행되고 있다.

[8]

[9] 선행기술문헌

[10] 특허문헌

[11] (특허문헌 1) 대한민국 공개특허 제10-2007-0028363호

[12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 출원의 하나의 목적은
- [14] 스템-루프 구조를 포함하고,

- [15] 상기 스템-루프 구조는 33 내지 38bp 길이의 이중가닥 폴리뉴클레오타이드를 갖는 스템 구조 및 3 내지 25nt 길이의 단일가닥 폴리뉴클레오타이드를 갖는 루프 구조를 포함하고,
- [16] 상기 스템 구조는 제1 타겟 유전자와 상보적인 서열을 포함하는 20 내지 25nt 길이의 안티센스 영역을 포함하는 구간과, 상기 안티센스 영역을 포함하는 구간에 상보적으로 결합할 수 있는 20 내지 25nt 길이의 센스 영역을 포함하는 구간을 포함하고,
- [17] 상기 스템 구조는 스템 구조의 5' 말단으로부터 13nt 이후에 상기 센스 영역을 포함하고,
- [18] 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단에서 연장된 5 내지 30nt 길이의 폴리뉴클레오타이드 및 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 5 내지 30nt 길이의 폴리뉴클레오타이드를 포함하고,
- [19] 하기 (1) 내지 (4)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 특징을 포함하는, 핵산 구조체:
- [20] (1) 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들 모두는 ASO(antisense oligonucleotide) 서열 또는 anti-miRNA 서열을 포함;
- [21] (2) 상기 센스 영역의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 안티센스 영역의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들 모두는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함;
- [22] (3) 상기 스템 구조는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함; 및
- [23] (4) 상기 루프 구조는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함.
- [24] 본 출원의 다른 목적은 상기 핵산 구조체를 포함하는, 유전자 발현 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [25] 본 출원의 다른 목적은 상기 핵산 구조체를 포함하는, 암, 증식성 질환, 소화기 질환, 신장 질환, 신경 질환, 정신 질환, 혈액 및 종양 질환, 심혈관 질환, 호흡기 질환, 내분비 질환, 감염 질환, 근골격 질환, 산부인과 질환, 비뇨생식기 질환, 피부 질환, 및 안과 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[26]

과제 해결 수단

- [27] 본 명세서에서, "RNAi(RNA interference)" 또는 "RNA 간섭"이란, 일반적으로 당 업계에 공지되어 있는 바와 같이 짧은 간섭 핵산 분자에 의해 매개되어 세포 내 유전자의 발현을 억제하거나 하향 조절하는 생물학적 과정을 의미하고, 예를 들면 타겟 유전자(target gene)의 mRNA와 상동인 서열을 갖는 가닥과 이와

상보적인 서열을 가지는 가닥으로 구성되는 이중가닥 RNA(dsRNA)를 세포 등에 도입하여 타겟 유전자 mRNA의 분해를 유도함으로써 타겟 유전자의 발현을 억제하는 메커니즘을 의미할 수 있다. "siRNA(small interfering RNA)"란, 서열 특이적으로 효율적인 유전자 침묵(gene silencing)을 매개하는 짧은 이중 가닥의 RNA(dsRNA)를 의미한다.

- [28] 본 명세서에서, “안티센스올리고(ASO)”란 세포에서 발현되는 mRNA의 서열에 상보적으로 결합하여 mRNA의 RNase H에 의한 분해나 선택적 스플라이싱(Alternative splicing)을 억제하는 화학적으로 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 혹은 리보뉴클레오타이드로 이루어진 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [29] 본 명세서에서, “anti-miRNA”는 miRNA에 상보적인, 변형된 뉴클레오타이드를 포함한 짧은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드로 표적 miRNA와 이중 가닥을 형성하여 RNase H를 통한 miRNA의 분해 또는 RISC에 기반한 miRNA의 기작 저해를 통하여 miRNA의 작용을 차단하는 핵산을 의미한다.
- [30] 본 명세서에서, “핵산(nucleic acid)” 또는 “폴리뉴클레오타이드”는 단일 또는 이중가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드, 및 그들의 폴리머를 의미하고, 공지된 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 백본 잔기 또는 결합(linkage)을 함유하는 핵산을 포함한다. 예를 들면, 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드는 단일-, 이중- 또는 다중-가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 혼성체, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기 또는 다른 천연, 화학적 또는 생화학적으로 변형된, 비-천연 또는 유도체화된 뉴클레오타이드 염기를 포함하는 폴리머를 포함한다.
- [31] 본 명세서에서, “뉴클레오타이드”는 당엽계에 인지되어 있는 바와 같이 사용된다. 뉴클레오타이드는 일반적으로 염기, 당 및 포스페이트 모이어티를 포함한다. 염기는 당엽계에 널리 공지되어 있는 천연 염기 (표준) 또는 변형된 염기일 수 있다. 이러한 염기는 일반적으로 뉴클레오타이드 당 모이어티의 1' 위치에 위치한다. 추가로, 뉴클레오타이드는 비변형되거나, 또는 당, 포스페이트 및/또는 염기 모이어티에서 변형될 수 있다.
- [32] 본 명세서에서, “뉴클레오타이드”는 천연 염기(natural bases, standard), 및 이 기술분야에 잘 알려진 변형된 염기를 포함하고, 이 기술분야에서 인식되는 것으로 사용된다. 상기 염기는 일반적으로 뉴클레오타이드 당 모이어티의 1' 위치에 위치한다. 뉴클레오타이드는 일반적으로 염기, 당 및 인산염(phosphate) 그룹을 포함한다. 뉴클레오타이드는 당, 인산염, 및/또는 염기 모이어티가 비변형되거나 또는 변형될 수 있다(뉴클레오타이드 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 비-천연 뉴클레오타이드, 비-표준 뉴클레오타이드 등).
- [33] 본 명세서에서, “혼성화 가능한” 또는 “상보적” 또는 “실질적으로 상보적”이라는 것은, 온도 및 용액 이온 세기의 적절한 인비트로 및/또는 인비보 조건하에 핵산(예를 들면, RNA, DNA)이 다른 핵산에 서열-특이적, 역평행

- (antiparallel) 방식(즉, 핵산이 상보적 핵산에 특이적으로 결합)으로 비-공유적으로 결합하는, 즉 Watson-Crick 염기쌍 및/또는 G/U 염기쌍을 형성하거나, "어닐링(anneal)"하거나, 또는 "혼성화"할 수 있는 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 것을 의미한다. 표준 Watson-Crick 염기-페어링(base-pairing)은 하기를 포함한다: 아데닌(A)과 티미딘(T)의 페어링, 아데닌(A)과 우라실(U)의 페어링, 및 구아닌(G)과 시토신(C)의 페어링 [DNA, RNA]. 또한, 2개의 RNA 분자(예: dsRNA) 사이의 혼성화를 위해, 및 DNA 분자와 RNA 분자의 혼성화를 위해: 구아닌(G)은 또한 우라실(U)과 염기쌍을 이룰 수 있다. 예를 들면, G/U 염기-페어링은 mRNA의 코돈과 tRNA 안티-코돈의 염기-페어링의 문맥에서 유전 코드의 축퇴(degeneracy) (즉, 중복 (redundancy))를 부분적으로 담당한다.
- [34] 본 명세서에서, “안티센스 영역” 또는 “안티센스 가닥(antisense strand)”이란 타겟 유전자(예를 들면, 제1 타겟 유전자)의 전체 또는 일부에 실질적으로 또는 100% 상보적인 폴리뉴클레오타이드로서, 예를 들어 mRNA(messenger RNA), mRNA가 아닌 RNA 서열(예를 들면, microRNA, piwiRNA, tRNA, rRNA, 및 hnRNA, siRNA, miRNA, shRNA, DsiRNA, lsiRNA, ss-siRNA, piRNA, endo-siRNA 또는 asiRNA) 또는 코딩 또는 비코딩 DNA 서열과 전체로서 또는 일부로서 상보적일 수 있다. 상기 “안티센스 가닥”과 “가이드 가닥(guide strand)”은 교환되어 사용될 수 있다. 상기 가이드 가닥은 표적을 저해할 용도로 서열이 정해진 단일가닥 부분으로, 실질적으로 아고너트(Argonaute) 단백질에 주로 결합하여, 아고너트 복합체가 표적 유전자를 인식하도록 가이드를 해주는 역할을 한다.
- [35] 본 명세서에서, “센스 영역” 또는 “센스 가닥(sense strand)”이란 타겟 유전자의 전체 또는 일부와 동일한 핵산 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드로서, mRNA(messenger RNA), mRNA가 아닌 RNA 서열(예를 들면, microRNA, piwiRNA, tRNA, rRNA 및 hnRNA, siRNA, miRNA, shRNA, DsiRNA, lsiRNA, ss-siRNA, piRNA, endo-siRNA 또는 asiRNA) 또는 코딩 또는 비코딩 DNA 서열과 전체로서 또는 일부로서 동일한 폴리뉴클레오타이드를 말한다. 상기 “센스 가닥”과 “운반자 가닥(passenger strand)”은 교환되어 사용될 수 있다. 상기 운반자 가닥은 일 예에 따른 핵산 분자 중 가이드 가닥과 이중가닥 구조를 이루면서, 가이드 가닥이 아고너트 단백질과 결합할 수 있도록 도와주는 운반자 역할을 한다.
- [36] 본 명세서에서, “다이스 기질 핵산”, “다이스 기질 RNA(리보핵산)”은 RNA 간섭(RNAi) 경로에서 다이스에 의해 인식되어 프로세싱될 것으로 고려되는 핵산을 의미한다.
- [37] 본 명세서에서, “화학적 변형”은 천연 핵산, 뉴클레오타이드, DNA, 및/또는 RNA의 뉴클레오타이드와 상이한 뉴클레오타이드의 화학 구조의 임의의 변형을 지칭한다.
- [38] 본 명세서에서, 센스 영역(가닥), 안티센스 영역(가닥), 또는

폴리뉴클레오타이드 가닥의 5' 말단으로부터 n번째 위치에 존재하는(또는 n번째 위치의) 뉴클레오타이드는 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 폴리뉴클레오타이드 가닥의 5' 말단으로부터 계수하여 n번째에 위치하는 뉴클레오타이드를 의미한다.

[39] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[40]

[41] 일 양상은

[42] 스템-루프 구조를 포함하고,

[43] 상기 스템-루프 구조는 33 내지 38bp 길이의 이중가닥 폴리뉴클레오타이드를 갖는 스템 구조 및 3 내지 25nt 길이의 단일가닥 폴리뉴클레오타이드를 갖는 루프 구조를 포함하고,

[44] 상기 스템 구조는 제1 타겟 유전자와 상보적인 서열을 포함하는 20 내지 25nt 길이의 안티센스 영역을 포함하는 구간과, 상기 안티센스 영역을 포함하는 구간에 상보적으로 결합할 수 있는 20 내지 25nt 길이의 센스 영역을 포함하는 구간을 포함하고,

[45] 상기 스템 구조는 스템 구조의 5' 말단으로부터 13nt 이후에 상기 센스 영역을 포함하고,

[46] 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단에서 연장된 5 내지 30nt 길이의 폴리뉴클레오타이드 및 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 5 내지 30nt 길이의 폴리뉴클레오타이드를 포함하고,

[47] 하기 (1) 내지 (4)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상 (예컨대, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 또는 4종 모두)의 특징을 포함하는, 핵산 구조체:

[48] (1) 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들 모두는 ASO(antisense oligonucleotide) 서열 또는 anti-miRNA 서열을 포함;

[49] (2) 상기 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들 모두는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함;

[50] (3) 상기 스템 구조는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함; 및

[51] (4) 상기 루프 구조는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함.

[52] 본 명세서에서, 스템 구조의 하단 분기점은, 센스 영역을 포함하는 구간에서, 상기 구간의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열 쪽으로 이어지는 스템 구조의 말단 부분, 또는, 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 상기 구간의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열 쪽으로 이어지는 스템 구조의 말단 부분을 의미할 수 있다.

[53] 본 명세서에서 스템 구조의 상단 분기점은, 센스 영역을 포함하는 구간에서,

루프 구조로 이어지는 스템 구조의 말단 부분, 또는, 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 루프 구조로 이어지는 스템 구조의 말단 부분을 의미할 수 있다.

[54] 본 명세서에서, 스템 구조의 5' 말단은 앞에서 설명한 스템 구조의 하단 분기점 중, 센스 영역을 포함하는 구간에서, 상기 구간의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열 쪽으로 이어지는 스템 구조의 말단 부분을 의미할 수 있다. 즉, 상기 스템 구조의 5' 말단은 스템 구조의 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단을 의미할 수 있다.

[55] 본 명세서에서, 스템 구조의 3' 말단은 앞에서 설명한 스템 구조의 하단 분기점 중, 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 상기 구간의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열 쪽으로 이어지는 스템 구조의 말단 부분을 의미할 수 있다. 즉, 상기 스템 구조의 3' 말단은 스템 구조의 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단을 의미할 수 있다.

[56] 일 예에 따른 핵산 구조체는 스템-루프 구조를 포함하며, 스템 구조는 제1 타겟 유전자와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 영역 (또는 상기 안티센스 영역을 포함하는 구간)과, 상기 안티센스 영역에 상보적으로 결합할 수 있는 센스 영역 (또는 상기 센스 영역을 포함하는 구간)을 포함할 수 있다.

[57] 상기 스템 구조는 25 내지 50bp, 25 내지 45bp, 25 내지 40bp, 25 내지 39bp, 25 내지 38bp, 25 내지 37bp, 25 내지 36bp, 25 내지 35bp, 30 내지 50bp, 30 내지 45bp, 30 내지 40bp, 30 내지 39bp, 30 내지 38bp, 30 내지 37bp, 30 내지 36bp, 30 내지 35bp, 31 내지 40bp, 31 내지 39bp, 31 내지 38bp, 31 내지 37bp, 31 내지 36bp, 31 내지 35bp, 32 내지 40bp, 32 내지 39bp, 32 내지 38bp, 32 내지 37bp, 32 내지 36bp, 32 내지 35bp, 33 내지 40bp, 33 내지 39bp, 33 내지 38bp, 33 내지 37bp, 33 내지 36bp, 33 내지 35bp, 34 내지 40bp, 34 내지 39bp, 34 내지 38bp, 34 내지 37bp, 34 내지 36bp, 34 내지 35bp, 예컨대 35bp 길이의 이중가닥 핵산일 수 있다.

[58] 상기 스템 구조는 일부 서열이 미스매칭되어 버블 구조를 갖는 것일 수 있다.

[59] 일 예에 따른 핵산 구조체는 pri-miRNA 와 유사한 작용을 위해 하기 (1) 내지 (3) 로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상 (1종 이상, 2종 이상, 또는 3종 모두)의 특징을 포함할 수 있다:

[60] (1) 상기 스템 구조는 스템 구조의 하단 분기점으로부터 1 내지 13nt, 1 내지 10nt, 1 내지 8nt, 1 내지 7nt, 1 내지 6nt, 1 내지 5nt, 2 내지 13nt, 2 내지 10nt, 2 내지 8nt, 2 내지 7nt, 2 내지 6nt, 2 내지 5nt, 10nt, 9nt, 8nt, 7nt, 6nt, 또는 5nt에 미스매칭 되어 버블 구조를 갖는 GHG 서열이 존재함 (H는 버블을 형성하는 서열임);

[61] (2) 상기 구조체의 스템 구조의 상단 분기점에는 스템 구조의 마지막 서열부터 루프 구조로 이어지는 4 nt 길이의 UGUG 서열을 포함; 및

[62] (3) 상기 구조체의 스템 구조의 하단 분기점에는 스템 구조의 5' 말단(또는 3' 말단)에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 가닥의 마지막 서열부터 스템이 시작하는 첫번째 서열로 이어지는 2 nt 길이의 UG 서열을 포함.

[63] 상기 스템 구조는 스템 구조의 5' 말단으로부터 13nt 이후에 센스 영역을 포함할

수 있다. 상기 센스 영역은 20 내지 25nt, 20 내지 24nt, 20 내지 23nt, 20 내지 22nt, 20 내지 21nt, 21 내지 25nt, 21 내지 24nt, 21 내지 23nt, 21 내지 22nt, 또는 21nt일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[64] 일 예에서, 상기 센스 영역을 포함하는 구간은 19 내지 70 nt(nucleotide), 20 내지 70 nt, 21 내지 70 nt, 22 내지 70 nt, 23 내지 70 nt, 25 내지 70 nt, 19 내지 66 nt, 20 내지 66 nt, 21 내지 66 nt, 22 내지 66 nt, 23 내지 66 nt, 25 내지 66 nt, 19 내지 60 nt, 20 내지 60 nt, 21 내지 60 nt, 22 내지 60 nt, 23 내지 60 nt, 25 내지 60 nt, 19 내지 55 nt, 20 내지 55 nt, 21 내지 55 nt, 22 내지 55 nt, 23 내지 55 nt, 25 내지 55 nt, 19 내지 52 nt, 20 내지 52 nt, 21 내지 52 nt, 22 내지 52 nt, 23 내지 52 nt, 25 내지 52 nt, 19 내지 50 nt, 20 내지 50 nt, 21 내지 50 nt, 22 내지 50 nt, 23 내지 50 nt, 25 내지 50 nt, 19 내지 45 nt, 20 내지 45 nt, 21 내지 45 nt, 22 내지 45 nt, 23 내지 45 nt, 25 내지 45 nt, 19 내지 40 nt, 20 내지 40 nt, 21 내지 40 nt, 22 내지 40 nt, 23 내지 40 nt, 25 내지 40 nt, 19 내지 38 nt, 20 내지 38 nt, 21 내지 38 nt, 22 내지 38 nt, 23 내지 38 nt, 25 내지 38 nt, 19 내지 36 nt, 20 내지 36 nt, 21 내지 36 nt, 22 내지 36 nt, 23 내지 36 nt, 25 내지 36 nt, 19 내지 35 nt, 20 내지 35 nt, 21 내지 35 nt, 22 내지 35 nt, 23 내지 35 nt, 25 내지 35 nt, 19 내지 30 nt, 20 내지 30 nt, 21 내지 30 nt, 22 내지 30 nt, 23 내지 30 nt, 25 내지 30 nt, 19 내지 28 nt, 20 내지 28 nt, 21 내지 28 nt, 22 내지 28 nt, 23 내지 28 nt, 25 내지 28 nt, 19 내지 25 nt, 20 내지 25 nt, 21 내지 25 nt, 22 내지 25 nt, 23 내지 25 nt, 또는 25 nt 길이의 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[65] 일 예에서, 상기 안티센스 영역을 포함하는 구간은 20 내지 70 nt, 21 내지 70 nt, 22 내지 70 nt, 23 내지 70 nt, 25 내지 70 nt, 27 내지 70 nt, 20 내지 66 nt, 21 내지 66 nt, 22 내지 66 nt, 23 내지 66 nt, 25 내지 66 nt, 27 내지 66 nt, 20 내지 60 nt, 21 내지 60 nt, 22 내지 60 nt, 23 내지 60 nt, 25 내지 60 nt, 27 내지 60 nt, 20 내지 55 nt, 21 내지 55 nt, 22 내지 55 nt, 23 내지 55 nt, 25 내지 55 nt, 27 내지 55 nt, 20 내지 52 nt, 21 내지 52 nt, 22 내지 52 nt, 23 내지 52 nt, 25 내지 52 nt, 27 내지 52 nt, 20 내지 50 nt, 21 내지 50 nt, 22 내지 50 nt, 23 내지 50 nt, 25 내지 50 nt, 27 내지 50 nt, 20 내지 45 nt, 21 내지 45 nt, 22 내지 45 nt, 23 내지 45 nt, 25 내지 45 nt, 27 내지 45 nt, 20 내지 40 nt, 21 내지 40 nt, 22 내지 40 nt, 23 내지 40 nt, 25 내지 40 nt, 27 내지 40 nt, 20 내지 38 nt, 21 내지 38 nt, 22 내지 38 nt, 23 내지 38 nt, 25 내지 38 nt, 27 내지 38 nt, 20 내지 36 nt, 21 내지 36 nt, 22 내지 36 nt, 23 내지 36 nt, 25 내지 36 nt, 27 내지 36 nt, 20 내지 35 nt, 21 내지 35 nt, 22 내지 35 nt, 23 내지 35 nt, 25 내지 35 nt, 27 내지 35 nt, 20 내지 30 nt, 21 내지 30 nt, 22 내지 30 nt, 23 내지 30 nt, 25 내지 30 nt, 27 내지 30 nt, 20 내지 27 nt, 21 내지 27 nt, 22 내지 27 nt, 23 내지 27 nt, 25 내지 27 nt, 27 nt, 19 내지 25 nt, 20 내지 25 nt, 21 내지 25 nt, 22 내지 25 nt, 23 내지 25 nt 또는 20 내지 25 nt 길이의 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[66] 일 예에서 상기 안티센스 영역은 상기 센스 영역에 상보적인 서열을 포함할 수 있고, 예를 들면, 상기 안티센스 영역은 상기 센스 영역과 결합(혼성화)할 수 있도록, 상기 센스 가닥의 전부 또는 일부의 핵산 서열과 60% 이상, 65% 이상,

70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 98.5% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상, 또는 100% 상보적인 핵산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어질 수 있다.

[67]

[68] 일 예에 따른 핵산 구조체의 스템-루프 구조는 루프 구조를 포함할 수 있으며, 상기 루프 구조는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드를 포함하거나 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드로 이루어질 수 있다. 상기 루프 구조는 2 내지 30nt, 2 내지 27nt, 2 내지 25nt, 2 내지 23nt, 2 내지 20nt, 2 내지 16nt, 3 내지 30nt, 3 내지 27nt, 3 내지 25nt, 3 내지 23nt, 3 내지 20nt, 3 내지 16nt, 5 내지 30nt, 5 내지 27nt, 5 내지 25nt, 5 내지 23nt, 5 내지 20nt, 5 내지 16nt, 7 내지 30nt, 7 내지 27nt, 7 내지 25nt, 7 내지 23nt, 7 내지 20nt, 7 내지 16nt, 10 내지 30nt, 10 내지 27nt, 10 내지 25nt, 10 내지 23nt, 10 내지 20nt, 또는 10 내지 16nt, 예컨대 16nt 길이의 단일가닥 폴리뉴클레오타이드를 포함하거나 상기 범위 길이의 단일가닥 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 것일 수 있다.

[69] 일 예에서 상기 루프 구조는 상기 센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단(또는 5' 말단)과 상기 안티센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단(또는 3' 말단)이 연결되어 존재하는 것일 수 있다.

[70]

[71] 일 예에 따른 핵산 구조체는 스템 구조의 하단 분기점에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 즉, 상기 핵산 구조체는 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단(또는 3' 말단)에서 연장된 폴리뉴클레오타이드, 및/또는 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단(또는 5' 말단)에서 연장된 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[72] 본 명세서에서, 연장된 폴리뉴클레오타이드는 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단(또는 3' 말단)에서 연장된 폴리뉴클레오타이드, 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단(또는 5' 말단)에서 연장된 폴리뉴클레오타이드, 또는 이들 모두를 의미할 수 있다.

[73] 상기 핵산 구조체에서, 상기 연장된 폴리뉴클레오타이드는 상기 루프 구조가 형성된 스템 구조의 말단과 다른 쪽의 말단에 존재한 것일 수 있다.

[74] 일 예에서 상기 연장된 폴리뉴클레오타이드는 3 내지 35 nt, 5 내지 35 nt, 7 내지 35 nt, 10 내지 35 nt, 13 내지 35 nt, 15 내지 35 nt, 3 내지 30 nt, 5 내지 30 nt, 7 내지 30 nt, 10 내지 30 nt, 13 내지 30 nt, 15 내지 30 nt, 3 내지 25 nt, 5 내지 25 nt, 7 내지 25 nt, 10 내지 25 nt, 13 내지 25 nt, 15 내지 25 nt, 3 내지 23 nt, 5 내지 23 nt, 7 내지 23 nt, 10 내지 23 nt, 13 내지 23 nt, 15 내지 23 nt, 3 내지 20 nt, 5 내지 20 nt, 7 내지 20 nt, 10 내지 20 nt, 13 내지 20 nt, 15 내지 20 nt, 3 내지 17 nt, 5 내지 17 nt, 7 내지 17 nt, 10 내지 17 nt, 13 내지 17 nt, 15 내지 17 nt, 3 내지 15 nt, 5 내지 15 nt, 7 내지 15 nt, 10 내지 15 nt, 또는 13 내지 15 nt 길이일 수 있다.

- [75] 상기 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열은 서로 상보적으로 결합하지 않는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열과 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열은 서로 상보적으로 결합하지 않는 것일 수 있다.
- [76] 상기 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열은, ASO(antisense oligonucleotide, 안티센스 올리고뉴클레오타이드) 서열 및/또는 anti-miRNA(항-miRNA, 항-miR) 서열을 포함할 수 있다. 일 예에서, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들 모두는 ASO 서열 또는 anti-miRNA 서열을 포함할 수 있다. 상기 ASO 서열 또는 상기 anti-miRNA 서열은 제2 타겟 유전자의 발현을 조절(증가 및/또는 감소)할 수 있도록 제2 타겟 유전자의 전체 또는 일부 서열과 상보적인 서열을 포함할 수 있다.
- [77] 상기 ASO 서열을 일 예에 따른 핵산 구조체 내의 상기 위치에 포함함으로써, 일 예에 따른 핵산 구조체(구조체 내의 ASO 서열)는 제2 타겟 유전자의 mRNA 서열과 서로 상보적으로 결합하여, 제2 타겟 유전자의 mRNA를 분해시키고/시키거나 제2 타겟 유전자의 선택적 스플라이싱을 조절(증가 및/또는 감소)하는 것일 수 있다.
- [78] 상기 anti-miRNA 서열을 일 예에 따른 핵산 구조체 내의 상기 위치에 포함함으로써, 일 예에 따른 핵산 구조체(구조체 내의 anti-miRNA 서열)는 제2 타겟 유전자의 miRNA(제2 타겟 유전자와 결합하여 제2 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있는 miRNA) 서열과 서로 상보적으로 결합하여 제2 타겟 유전자의 miRNA(제2 타겟 유전자와 결합하여 제2 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있는 miRNA)의 작용을 억제할 수 있다.
- [79] 일 예에 따른 핵산 구조체가 세포 내의 DGCR8 및/또는 드로샤의 복합체에 의해 내생적으로 절단될 경우, 상기 ASO 서열 및/또는 anti-miRNA 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 가닥이 별도로 분리되어 ASO 및/또는 anti-miRNA 활성을 나타낼 수 있고, 이러한 ASO 및/또는 anti-miRNA 활성은 세포의 핵막 안에서 일어날 수 있다.
- [80] 일 예에 따른 핵산 구조체의 연장된 폴리뉴클레오타이드 내에 포함되는 ASO 서열 또는 anti-miRNA 서열은, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단으로부터, 또는 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단으로부터 3nt 이후, 4nt 이후, 5nt 이후, 6nt 이후, 7nt 이후, 8nt 이후, 9nt 이후, 또는 10nt 이후에 도입될 수 있다. 다른 예에서, 핵산 구조체의 연장된 폴리뉴클레오타이드 내에 포함되는 ASO 서열 또는 anti-miRNA 서열은 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단 또는 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단과 3nt 이상, 4nt 이상, 5nt 이상, 6nt

이상, 7nt 이상, 8nt 이상, 9nt 이상, 또는 10nt 이상 떨어져 있는 것일 수 있다. 상기 ASO 서열 또는 상기 anti-miRNA 서열이 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단 또는 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단으로부터 상기 수치범위에 따라 도입되는 경우, 그렇지 않은 경우와 비교하여 (예컨대, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단 또는 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단과 1nt 이후, 또는 2nt 이후에 도입되는 경우) 드로샤의 작용을 저해하지 않거나, 또는 유전자 억제 효과가 더 우수할 수 있다.

[81]

[82] 일 예에 따른 핵산 구조체는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 스템 구조 (센스 영역을 포함하는 구간, 또는 안티센스 영역을 포함하는 구간), 상기 루프 구조, 및/또는 상기 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열 (스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단(또는 3' 말단)에서 연장된 폴리뉴클레오타이드, 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단(또는 5' 말단)에서 연장된 폴리뉴클레오타이드, 또는 이들 모두)은 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[83] 일 예에 따른 핵산 구조체는, 스템 구조, 루프 구조, 및/또는 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열에 있어서, C (cytidine, 사이티딘), 및/또는 A (adenine, 아데닌) 서열이 화학적으로 변형된 것일 수 있다.

[84] 일 예에 따른 핵산 구조체는, 루프 구조, 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들 모두에 있어서, C (cytidine, 사이티딘), 및/또는 A (adenine, 아데닌) 서열이 화학적으로 변형된 것일 수 있다.

[85] 일 예에서 상기 스템 구조는 “특정 위치”에서 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 스템 구조 중 센스 영역을 포함하는 구간에서 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드의 “특정 위치”는 하기의 위치를 의미하는 것일 수 있다:

[86] (1) 스템 구조의 5' 말단 (즉, 스템 구조 중 센스 영역을 포함하는 구간에서 스템이 끝나는 하단 분기점(상보적으로 결합하지 않는 연장된 폴리뉴클레오타이드 쪽으로 이어지는 스템 구조의 말단)으로부터 14, 17, 18, 20, 및 27번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 (예를 들면, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 또는 5종 모두)의 위치; 또는

[87] (2) 스템 구조 중 센스 영역을 포함하는 구간에서 스템이 끝나는 상단 분기점(루프 구조로 이어지는 스템 구조의 말단)으로부터 9, 16, 18, 19, 및 22번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 (예를 들면, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 또는 5종 모두)의 위치.

[88] 일 예에서 상기 스템 구조에 포함되는 안티센스 영역의 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드의 “특정 위치”는 하기의 위치를 의미하는 것일 수 있다:

[89] (1) 스템 구조의 5' 말단 (즉, 스템 구조 중 센스 영역을 포함하는 구간에서

스탬이 끝나는 하단 분기점(상보적으로 결합하지 않는 연장된 폴리뉴클레오타이드 쪽으로 이어지는 스탬 구조의 말단)으로부터 15, 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 (예를 들면, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 5종 이상, 6종 이상, 7종 이상, 또는 8종 모두)의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 안티센스 영역에서의 위치; 또는

- [90] (2) 스탬 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간에서 스탬이 끝나는 상단 분기점(루프 구조로 이어지는 스탬 구조의 말단)으로부터 10 내지 13, 15, 17, 20, 및 21번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 (예를 들면, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 5종 이상, 6종 이상, 7종 이상, 또는 8종 모두)의 위치.

[91]

- [92] 본 명세서에서, 스탬 구조의 5' 말단 (즉, 스탬 구조 중 센스 영역을 포함하는 구간에서 스탬이 끝나는 하단 분기점(상보적으로 결합하지 않는 연장된 폴리뉴클레오타이드 쪽으로 이어지는 스탬 구조의 말단)으로부터 계수된 위치와 상보적으로 결합하는 스탬 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간에서의 위치는, 스탬 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간에서 스탬이 끝나는 상단 분기점(루프 구조로 이어지는 스탬 구조의 말단)을 기준으로 계수된 위치와 하기 표 1에 기재된 바와 같이 상응(혼용)될 수 있다. 예를 들면, 스탬 구조의 5' 말단 (즉, 스탬 구조 중 센스 영역을 포함하는 구간에서 스탬이 끝나는 하단 분기점(상보적으로 결합하지 않는 연장된 폴리뉴클레오타이드 쪽으로 이어지는 스탬 구조의 말단)으로부터 15번째 위치와 상보적으로 결합하는 스탬 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간에서의 위치는, 스탬 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간에서 스탬이 끝나는 상단 분기점 (루프 구조로 이어지는 스탬 구조의 말단)으로부터 21번째 위치와 상응(혼용)될 수 있다.

[93] [표1]

스택 구조의 5' 말단 (즉, 스택 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간과 상보적으로 결합하는 스택 구조 중 센스 영역을 포함하는 구간에서 스택이 끝나는 하단 분기점(연장된 폴리뉴클레오타이드 쪽으로 이어지는 스택 구조의 말단))을 기준으로 계수된 위치	스택 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간에서 스택이 끝나는 상단 분기점(루프 구조로 이어지는 스택 구조의 말단)을 기준으로 계수된 위치
1	35
2	34
3	33
4	32
5	31
6	30
7	29
8	28
9	27
10	26
11	25
12	24
13	23
14	22
15	21
16	20
17	19
18	18
19	17
20	16
21	15
22	14
23	13

24	12
25	11
26	10
27	9
28	8
29	7
30	6
31	5
32	4
33	3
34	2
35	1

- [94] 일 예에 따른 핵산 구조체의 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 14, 17, 18, 20, 및 27번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 (예컨대, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 또는 5종 모두)의 위치에 화학적으로 변형(chemical modification)된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [95] 안티센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 15, 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 (예컨대, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 5종 이상, 6종 이상, 7종 이상, 또는 8종 모두)의 위치 {또는, 스템 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간에서 스템이 끝나는 상단 분기점(루프 구조로 이어지는 스템 구조의 말단)으로부터 10 내지 13, 15, 17, 20, 및 21번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 (예를 들면, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 5종 이상, 6종 이상, 7종 이상, 또는 8종 모두)의 위치}에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [96] 일 예에 따른 핵산 구조체의 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 14번째 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [97] 일 예에 따른 핵산 구조체의 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 14번째 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [98] 일 예에 따른 핵산 구조체의 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 17, 18, 20, 및 27번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 (예컨대, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 또는 4종 모두)의 위치에 화학적으로 변형(chemical modification)된 뉴클레오타이드를 포함하고,

- [99] 안티센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 19, 21, 및 23 내지 26번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 (예컨대, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 5종 이상, 또는 6종 모두)의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [100] 하기 (1) 내지 (3)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것일 수 있다:
- [101] (1) 센스 영역을 포함하는 구간에서, 스템 구조의 5' 말단으로부터 14번째 위치에 존재하는 뉴클레오타이드,
- [102] (2) 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 스템 구조의 5' 말단으로부터 15번째 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 존재하는 뉴클레오타이드, 및
- [103] (3) 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 스템 구조의 5' 말단으로부터 16번째 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 존재하는 뉴클레오타이드.
- [104] 일 예에 따른 핵산 구조체는 하기 (1) 내지 (4)로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 핵산 구조체일 수 있다:
- [105] (1) 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 14, 17, 18, 20, 및 27번째의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [106] 안티센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 15, 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, 핵산 구조체;
- [107] (2) 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 17, 18, 20, 및 27번째의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [108] 안티센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 15, 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, 핵산 구조체;
- [109] (3) 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 17, 18, 20, 및 27번째의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [110] 안티센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, 핵산 구조체; 및
- [111] (4) 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 17, 18, 20, 및 27번째의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [112] 안티센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 19, 21, 및 23 내지 26번째의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, 핵산 구조체.

- [113] 일 예에 따른 핵산 구조체는, 스템 구조의 5' 말단으로부터 1 내지 13, 15, 16, 19, 21 내지 26, 및 28번째 이상 (예를 들어, 28 내지 35번째)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함, 및/또는,
- [114] 안티센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 1 내지 14, 17, 18, 20, 22, 및 27번째 이상 (예를 들어, 28 내지 35번째)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 위치{또는, 스템 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간에서 스템이 끝나는 상단 분기점(루프 구조로 이어지는 스템 구조의 말단)으로부터 9번째 이하 (예를 들어, 1 내지 9번째), 14, 16, 18, 19, 및 22번째 이상 (예를 들어, 22 내지 35번째)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 위치}에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [115] 일 예에 따른 핵산 구조체는 앞에서 설명한 스템 구조의 화학적 변형에 추가적으로, 루프 구조, 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들 모두에 있어서, C (cytidine, 사이티딘), 및/또는 A (adenine, 아데닌) 서열이 화학적으로 변형된 것일 수 있다.
- [116] 일 예에 따른 핵산 구조체는 상기 센스 영역의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 안티센스 영역의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 상기 루프 구조로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 서열은 C (사이티딘) 및/또는 A (아데닌) 서열에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [117] 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 14, 17, 18, 20, 및 27번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [118] 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 15, 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다.
- [119]
- [120] 상기 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형되지 않았다는 것은 천연적 또는 자연적으로 존재하는 핵산에 포함되는 뉴클레오타이드와 동일한 구성을 갖는 것을 의미할 수 있다.
- [121] 본 명세서에서, 뉴클레오타이드(또는 핵산)가 화학적으로 변형되었다는 것은 뉴클레오타이드(또는 핵산)에 포함되는 당, 염기, 뉴클레오타이드 간의 결합 부위, 또는 이의 조합이 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 상기 화학적 변형 방법은 특별히 제한되지 않으며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 당업자라면 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 뉴클레오타이드(또는 핵산)를 합성하고 변형시킬 수 있다. 핵산 분자로 도입될 수 있는 변형된 염기의 비제한적 예로, 히포잔틴(hypoxanthine), 퓨린,

피리딘-4-온, 피리딘-2-온, 페닐, 수도우라실, 2,4,6-트리메톡시 벤젠, 3-메틸우라실, 디하이드로유리딘, 나프틸, 아미노페닐, 5-알킬시티딘(예를 들면 5-메틸시티딘), 5-알킬유리딘(예를 들면 리보티미딘), 5-할로유리딘(예를 들면 5-브로모유리딘) 또는 6-아자피리미딘(azapyrimidines) 또는 6-알킬피리미딘(예를 들면 6-메틸유리딘), 프로핀(propyne), 및 기타 (Burgin, et al., Biochemistry 35:14090, 1996; Uhlman & Peyman, supra)을 포함한다. "변형된 염기"는 1' 위치의 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신 및 우라실 외의 뉴클레오타이드 염기 또는 그 동등물을 의미한다.

- [122] 상기 화학적 변형은 상기 핵산 분자에 포함되는 적어도 1종의 뉴클레오타이드의 리보스의 2' 위치의 히드록실기가 수소원자, 불소원자, -O-알킬기, -O-아실기, 및 아미노기 중 어느 하나로 치환되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이에 제한되지 않고 핵산 분자의 전달능을 높이기 위해서라면 -Br, -Cl, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N₃ 및 -CN (R= alkyl, aryl, alkylene) 중 어느 하나로도 치환될 수 있다.
- [123] 일 예에서, 상기 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형되었다는 것은 뉴클레오타이드에 포함되는 당의 구조가 LNA(Locked Nucleic Acid)로 변형되거나 당의 잔기가 2'-O-메틸, 2'-메톡시에톡시, 2'-플루오로, 2'-알릴, 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸], 4'-티오, 4'-CH₂-O-2'-브리지(bridge), 4'-(CH₂)₂-O-2'-브리지, 2'-아미노, 및 2'-O-(N-메틸카르바메이트)(methlycarbamate)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1종 이상으로 변형된 것일 수 있다.
- [124] 일 예에 따른 핵산 구조체는 하기 (1) 내지 (8)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 특징을 나타내는 것일 수 있고, 구체적으로, 모든 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형되지 않은 핵산 구조체, 기존에 알려진 방법 (예를 들면, 교대 변형 방법(Alternating modification) 및/또는 C/U 서열-기반 변형 방법(C/U sequence-based modification))으로 화학적 변형된 핵산 구조체과 비교하였을 때, 하기 (1) 내지 (8)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 효과를 유지, 증가, 또는 감소한 것일 수 있다:
- [125] (1) 인비트로 및/또는 인비보에서 상기 핵산 DGCR8, 드로샤, 및/또는 다이서의 상호 작용 유지 및/또는 증가(예를 들면, DGCR8, 드로샤, 및/또는 다이서에 의한 핵산 구조체의 절단 속도 유지 및/또는 증가);
- [126] (2) 인비트로에서 타겟 유전자 침묵 활성의 유지 및/또는 증가;
- [127] (3) 인비보에서 타겟 유전자 침묵 활성의 증가;
- [128] (4) 오프-타겟 효과(off-target effect) 감소;
- [129] (5) 생체 내의 뉴클레아제(nuclease, 예를 들면 RNase)에 의한 분해(degradation) 감소;
- [130] (6) 세포 내 흡수(uptake) 증가;
- [131] (7) 인비트로 및/또는 인비보에서 안정성 증가 (예를 들면, 혈청 안정성 (serum stability) 증가); 및/또는

- [132] (8) 면역반응 (예를 들면, 상기 핵산 구조체에 의한 엔도솜 내의 TLR 수용체 활성화에 의한 면역 유도 반응, 또는 세포질로 나온 핵산 구조체의 PKR 활성화에 의한 면역 반응 등) 감소.
- [133] 일 예에 따른 핵산 구조체는 인 비트로에서 유전자 침묵 억제 효과가 감소하지 않으면서, 인 비보에서 면역 반응이 감소하여 치료제로서 유용하게 사용할 수 있다.
- [134] 상기 교대 변형 방법(Alternating modification)은 인접한 뉴클레오타이드를 번갈아 가면서 화학적으로 변형시키는 방법이다. 예를 들면, 상기 교대 변형 방법에 의하면, 센스 가닥의 5' 말단으로부터 홀수 번째 위치한 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형되고, 센스 가닥의 5' 말단으로부터 짝수 번째 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 상기 C/U 서열-기반 변형 방법(C/U sequence-based modification)은 C를 포함하는 뉴클레오타이드 및 U의 염기를 포함하는 뉴클레오타이드를 화학적으로 변형시키는 방법이다.
- [135] 상기 "오프-타겟 효과(Off-target effect)"란 센스 가닥에 의해 타겟 외의 mRNA의 분해가 발생하게 되는 경우 센스 가닥에 의해 예상치 못한 타겟 외의 mRNA의 분해 내지 타겟 외의 유전자의 발현 억제 효과 및 안티센스 가닥이 잘못된 타겟과 결합하여 타겟 외의 mRNA의 분해 내지 타겟 외의 유전자의 발현 억제효과를 모두 포함할 수 있다.
- [136] 일 예에서 상기 핵산 구조체는 동일한 표적 유전자에 대한 siRNA (길이가 짧기 때문에 다이스에 의해 프로세싱 되지 않는 유전자 조절 활성을 갖는 dsRNA)와 비교하였을 때, 상기 (1) 내지 (8) 로 이루어지는 군 중에서 선택되는 1종 이상의 효과가 유지, 증가, 또는 감소한 것일 수 있다.
- [137]
- [138] 일 예에 따른 핵산 구조체는 DGCR8 및/또는 드로샤 (예를 들면, DGCR8 및 드로샤의 복합체)에 의해 내생적으로 절단될 수 있다. 또한 일 예에 따른 핵산 구조체는 DGCR8 및/또는 드로샤(예를 들면, DGCR8 및 드로샤의 복합체)와 다이스에 의해 순차적으로 절단될 수 있다. 상기 DGCR8 및/또는 드로샤에 의한 절단은 세포의 핵막 내에서 이루어지는 것일 수 있고, 상기 다이스에 의한 절단은 세포질에서 이루어지는 것일 수 있다.
- [139] 본 명세서에서 "드로샤"는 단일가닥-스텝-루프 구조를 포함한 헤어핀 구조 RNA 또는 Pri-miRNA(primary-microRNA)를 절단하여 스텝-루프 구조를 가진 핵산(Pre-miRNA)을 제조할 수 있는 RNase III 패밀리 중 엔도리보뉴클레아제(endoribonuclease)를 의미할 수 있다.
- [140] 본 명세서에서 "DGCR8"은 드로샤와 결합하여 단백질 복합체를 형성하는 단백질로 이중가닥 RNA 결합 도메인을 이용하여 드로샤의 pri-miRNA의 결합을 안정화시켜 드로샤의 RNA 절단 과정을 돕는 이중가닥 RNA 결합 단백질(dsRBD)을 의미할 수 있다.

- [141] 본 명세서에서, “다이서(dicer)”는 dsRNA 또는 dsRNA-함유 분자, 예를 들면 이중-가닥 RNA(dsRNA) 또는 Pre-miRNA(precursor-microRNA)를 절단하여 핵산 단편 19-25 nt(뉴클레오타이드) 길이의 이중가닥 핵산(예를 들면 유전자 침묵 활성을 나타낼 수 있는 miRNA 또는 siRNA)을 제조할 수 있는 RNase III 패밀리에 속한 엔도리보뉴클레아제(endoribonuclease)를 의미할 수 있다.
- [142] 일 예에 따른 핵산 구조체는 대상체에 투여되었을 때 핵 내의 드로샤 및 DGCR8 단백질 복합체에 의해 센스 영역의 GHG 미스매칭 서열 기준 5' 말단(또는 3' 말단) 방향으로 4bp 위치의 이중가닥 부위가 절단되어 pre-miRNA 유사체가 되어 세포질로 방출될 수 있다(단계 1: 드로샤 및 DGCR8 복합체에 의한 processing).
- [143] 일 예에서, 드로샤에 의해 절단된 pre-miRNA 유사체(또는 절단된 산물, 절단된 생성물) 중 안티센스 가닥의 3' 말단(또는 5' 말단)에 1 내지 5 nt, 2 내지 5 nt, 2 내지 4 nt, 2 내지 3 nt, 또는 2 nt 길이의 오버행이 생길 수 있다.
- [144] 상기 세포질로 방출된 pre-miRNA 유사체는 스템-루프 구조를 포함하고, 스템 구조는 센스 영역 및 안티센스 영역을 포함하며, 각 센스 영역 및/또는 안티센스 영역이 일정 길이 (예를 들면, 19 nt, 20 nt, 21 nt, 22 nt, 23nt, 24 nt, 또는 25 nt) 이상으로 길어, “long dsRNA(double strand RNA)”로 인식되어 다이서(Dicer)에 의해 절단되어 길이가 약 19 내지 25 nt로 조정될 수 있다(단계 2; Dicer processing).
- [145] 본 명세서에서, “대상체”, “개체”, 또는 “환자”는 일 예에 따른 핵산 구조체를 투여할 수 있는 유기체를 의미할 수 있다. 상기 대상체는 포유동물(예를 들면, 인간) 또는 포유류 세포(예를 들면 인간 세포)일 수 있고, 체외이식 세포의 공여자 또는 수용자인 유기체, 또는 세포 그 자체일 수 있다.
- [146] 본 명세서에서 “드로샤 절단 부위”는 드로샤 및 DGCR8 단백질 복합체가 일 예에 따른 핵산 구조체를 절단하는 부위를 의미한다. 일 예에서, 드로샤는 두 개의 RNase III 도메인을 함유하고, 이는 전형적으로 스템 구조에 포함된 센스 및 안티센스 영역(가닥) 모두를 절단할 수 있다.
- [147] 본 명세서에서, “다이서 절단 부위”는 드로샤 및 DGCR8 단백질 복합체가 절단한 산물을 다이서가 절단하는 부위를 의미한다. 일 예에서, 다이서는 두 개의 RNase III 도메인을 함유하고, 이는 전형적으로 스템 구조에 포함된 센스 및 안티센스 영역(가닥) 모두를 절단할 수 있다.
- [148] 일 예에 따른 핵산 구조체는 센스 영역의 5' 말단으로부터 16번째 이후(16번째 이상의 위치)에 존재하는 뉴클레오타이드 및 이에 상보적으로 결합하는 안티센스 영역의 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형되지 아니하여, 다이서에 의해 용이하게 인식되는 것일 수 있다.
- [149] 일 예에서, 다이서에 의해 절단된 이중가닥 핵산(또는 절단된 산물, 절단된 생성물) 중 센스 영역(가닥)의 3' 말단(또는 5' 말단)에 1 내지 5 nt, 2 내지 5 nt, 2 내지 4 nt, 2 내지 3 nt, 또는 2 nt 길이의 오버행이 생길 수 있다.

- [150] 절단된 이중가닥 핵산(또는 절단된 산물, 절단된 생성물)은 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 로딩될 수 있다(단계 3). 이 과정에서, 인간 등의 척추동물에서는 TRBP가 절단된 이중가닥 핵산에서 열역학적으로 약한 가닥이 Ago2에 의해 가이드 RNA로 인식될 수 있도록 재배치되는 비대칭적 센싱(Asymmetry sensing)이 일어난다.
- [151] RISC는 이중가닥 핵산을 인식하여 로딩하는 리보뉴클레오프로틴으로서, RISC에서 촉매 부위에 해당하는 단백질인 Ago2(Argonaute 2)가 로딩된 이중가닥 핵산에서 열역학적으로 강한 가닥(passenger RNA)을 절단하고, 열역학적으로 약한 가닥을 남긴다(guide RNA)(단계 4). 상기 스템 구조에 포함된 안티센스 영역의 서열(안티센스 서열)은 열역학적으로 약한 가닥이 되도록 설계되어 있기 때문에 높은 효율로 센스 서열이 절단되고 안티센스 서열이 남게 된다. 안티센스 서열은 타겟 유전자의 mRNA를 인식하여(단계 5) 이에 상보적으로 결합하여 dsRNA를 형성하여 절단됨으로써 유전자 침묵이 일어날 수 있다(단계 6).
- [152] 일 예에서, 상기 드로샤 및 DGCR8 단백질 복합체가 절단한 산물은 다이서에 의해 적절한 길이(예를 들면 19 내지 30 nt, 20 내지 30 nt, 22 내지 27 nt)로 절단될 수 있고, 상기 적절한 길이는 '20 내지 25'+2 nt (예를 들면, 19+2 nt, 20+2 nt, 21+2 nt, 22+2 nt, 23+2 nt, 24+2 nt, 또는 25+2 nt (예를 들면, 센스 가닥의 3' 말단에 2 nt 오버행 구조를 갖는 핵산)일 수 있다.
- [153] 일 구체예에 따르면 모든 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형되지 않은 핵산 구조체(대조군)이나 기존에 알려진 방법(예를 들면, 교대 변형 방법(Alternating modification) 및/또는 C/U 서열-기반 변형 방법(C/U sequence-based modification))으로 화학적 변형된 핵산 구조체 대비 일 예에 따른 핵산 구조체는 인비트로 및/또는 인비보에서 다이서 반응 속도가 유사하거나 증가된 것일 수 있다. 상기 다이서 절단율(%) 또는 다이서 반응 속도 분석은 공지된 방법으로 평가될 수 있다. 일 구체예에서, 다이서 반응 속도 분석에서 상기 핵산 구조체 10pmole, 재조합 인간 다이서(Recombinant human Dicer) 5 pmole, 1 μ l의 다이서 반응 완충액(300 mM Tris-HCl(pH 6.8), 500 mM NaCl), 2 μ l의 DEPC-처리된 탈이온수(DW), 2 μ l의 25 mM $MgCl_2$ 과 혼합하고, 37 °C에서 12시간 동안 배양한 후, 각 샘플을 채취하여 전기영동을 통하여 다이서 기질 밴드 두께를 측정하여, 다이서 절단(%) 정도를 계산하여 다이서 반응 속도를 분석할 수 있다. 상기 방법으로 다이서 절단율(%)을 계산시 일 예에 따른 핵산 구조체의 드로샤 절단 생성물은 다이서와 1시간 동안 반응하여 40 내지 60%가 절단되고, 다이서와 2시간 동안 반응하여 90 내지 100%가 절단될 수 있다.
- [154] 일 예에 따른 핵산 구조체는 동일한 타겟 유전자에 대한 siRNA, 모든 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형되지 않은 핵산 구조체나 기존에 알려진 방법(예를 들면, 교대 변형 방법(Alternating modification) 및/또는 C/U 서열-기반

변형 방법(C/U sequence-based modification))으로 화학적 변형된 핵산 구조체보다 인비트로 및/또는 인비보에서 유전자 침묵 활성이 증가한 것일 수 있다.

- [155] 상기 "siRNA (small interfering RNA)"란, 서열 특이적으로 효율적인 유전자 발현 억제(gene silencing)를 매개하는 짧은(예를 들면 19 nt) 이중 가닥의 RNA(dsRNA)를 의미한다. 일 예에 따른 핵산 구조체는 드로샤 및 DGCR8 단백질 복합체의 기질이 될 수 있다는 점에서 siRNA와 차이가 있고, 일 예에 따른 핵산 구조체가 드로샤 및 DGCR8 단백질 복합체와 다이스에 의해 순차적으로 절단되어 생성된 산물을 siRNA의 일종으로 이해될 수 있다.
- [156] 일 예에 따른 핵산 구조체는 스템 구조에 제1 타겟 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 안티센스 영역을 포함하고 있어, 드로샤 및 DGCR8 단백질 복합체와 다이스에 의해 순차적으로 절단되어 생성된 산물을 통해 제1 타겟 유전자의 발현을 조절할 수 있다.
- [157] 상기 제1 타겟 유전자 또는 전술한 제2 타겟 유전자(ASO 서열 및/또는 anti-miRNA 서열에 의해 발현이 조절되는 유전자)는 단백질 코딩 유전자, 원종양유전자, 종양유전자, 종양 억제인자 유전자, 및 세포 신호전달 유전자에서 선택되는 것일 수 있다.
- [158]
- [159] 다른 양상은 상기 핵산 구조체를 포함하는, 유전자 발현 억제용 조성물을 제공할 수 있다. 상기 핵산 구조체에 대해서는 전술한 바와 같다. 또 다른 양상은 상기 핵산 구조체 및/또는 상기 유전자 발현 억제용 조성물을 대상체에 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 타겟 유전자의 발현 억제 방법을 제공한다. 상기 타겟 유전자의 발현 억제 방법은 상기 투여하는 단계 이전에 유전자의 발현 억제를 필요로 하는 개체를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 다른 양상은 상기 핵산 구조체를 유전자 발현 억제용 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [160] 일 예에서 상기 타겟 유전자의 발현 억제 방법은 인비트로에서 타겟 세포에서 타겟 유전자의 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- [161] 상기 유전자는 단백질 코딩 유전자, 원종양유전자, 종양유전자, 종양 억제인자 유전자, 및 세포 신호전달 유전자에서 선택되는 것일 수 있다.
- [162] 일 예에서 상기 유전자 발현 억제용 조성물은 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 지질 분자, 리포솜, 미셀, 양이온성 지질, 양이온성 고분자, 리간드 접합, 양이온성 금속으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [163] 일 예에서 상기 핵산 구조체는 직접 처리되거나, 양이온성 지질과 복합체를 형성하거나 리포솜 내로 패키징 되어 전달될 수 있고, 예를 들면 리포솜 내의 캡슐화, 이온영동법, 또는 생분해성 중합체, 히드로겔, 시클로덱스트린, 폴리(락트-코-글리콜)산(PLGA) 및 PLGA 미세구, 생분해성 나노캡슐 및 생체결합성 미세구와 같은 다른 비히클 내로의 혼입을 비롯하여 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 세포 및/또는 대상체에 투여될 수 있다.

- [164] 상기 "리포솜"은 하나 이상의 이중층, 예를 들어, 하나의 이중층 또는 복수의 이중층에 배열된 양친매성 지질로 구성된 비히클을 지칭한다. 리포솜은 친유성 물질 및 수성의 내부로부터 형성된 막을 가지는 단일막 및 다중막 비히클을 포함한다. 수성 부위는 핵산 분자를 포함한다. 친유성 물질은 수성 내부를, 전형적으로 핵산 분자를 포함하지 않는 수성 외부로부터 분리하지만, 일부 예들에서는 포함할 수 있다. 리포솜은 활성 성분들을 작용 부위에 수송 및 전달하는 데 유용하다. 리포솜 막이 생물학적 막과 구조상 유사하기 때문에, 리포솜이 조직에 적용되는 경우, 리포솜의 이중층은 세포막의 이중층과 융합된다. 리포솜 및 세포의 병합이 진행됨에 따라, 핵산 분자를 포함하는 내부의 수성 내용물은 핵산 분자가 타겟 유전자에 특이적으로 결합하여 RNAi를 매개할 수 있는 세포 내로 전달된다. 일 예에서, 리포솜은 핵산 분자를 특정 유형의 세포로 지시하기 위해, 특이적으로 타겟화된다.
- [165] 상기 "미셀"은, 분자의 소수성 부분이 모두 안으로 향해 있어서 친수성 부분은 주변의 수성상과 접촉한 상태로 있는 양친매성 분자가 구형 구조로 배열되어 있는 분자 조립의 특정 유형으로서 정의된다. 환경이 소수성인 경우, 반대의 배열이 존재한다.
- [166]
- [167] 다른 양상은 상기 핵산 구조체를 포함하는 질환의 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 또 다른 양상은 상기 핵산 구조체를 포함하는 암 또는 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것일 수 있다. 상기 핵산 구조체에 대해서는 전술한 바와 같다. 상기 핵산 구조체 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 양상은 상기 약학적 조성물을 대상체에 약학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 질환의 예방 또는 치료방법을 제공할 수 있다. 상기 치료방법은 상기 투여하는 단계 이전에 질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 다른 양상은 상기 핵산 구조체의 암 또는 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [168] 상기 질환은 유전적 질환 및/또는 비유전적 질환을 포함하는 것일 수 있다.
- [169] 상기 질환은 암, 증식성 질환, 소화기 질환, 신장 질환, 신경 질환, 정신 질환, 혈액 및 종양 질환, 심혈관 질환, 호흡기 질환, 내분비 질환, 감염 질환, 근골격 질환, 산부인과 질환, 비뇨생식기 질환, 피부 질환, 및 안과 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [170] 상기 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있고, 예컨대, 이에 제한되지 않지만, 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 위암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암,

전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 골육종 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [171] 상기 증식성 질환은 골수 증식성 질환(Myeloproliferative Disease; MPD), 일차골수 섬유증, 만성 골수증식성 질환 (예컨대, 진성 적혈구 증다증(Polycythemia vera), 진성혈소판증가증, 특발성 혈소판 증다증(Essential Thrombocythemia), 만성 골수성 백혈병(Chronic Myeloid Leukemia), 및/또는 특발성 골수 섬유화증(Idiopathic Myelofibrosis)), 재생 불량성 빈혈(Aplastic Anemia) (예컨대, 중증 재생 불량성 빈혈(Severe Aplastic Anemia)) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [172] 상기 소화기 질환은 소화성궤양(Peptic Ulcer Disease, PUD), 위식도역류질환(Gastroesophageal Reflux Disease), 변비, 설사, 과민성대장 증후군(Constipation, Diarrhea and Irritable Bowel Syndrome), 오심과 구토(Nausea and Vomiting), 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease), 췌장염(Pancreatitis), 간경변증과 합병증(Liver Cirrhosis and Complications), 바이러스성 간염(Viral Hepatitis), 약물유발성 간손상(Drug-Induced Liver Injury) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [173] 상기 신장 질환은 체액 및 전해질 불균형(Fluid and Electrolyte Disorders), 산-염기 장애(Acid-base Disorders), 약물 유발성 신장질환(Drug-Induced Kidney Disease), 신기능장애(Renal Impairment), 급성신손상(Acute Kidney Injury), 만성신장병(Chronic Kidney Disease) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [174] 상기 신경 질환은 두통(Headache), 뇌전증(Epilepsy), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [175] 상기 정신 질환은 주요우울장애(Major Depressive Disorder), 조현병(Schizophrenia), 범불안장애, 공황장애(Generalized Anxiety Disorder, Panic Disorder), 양극성장애(Bipolar Disorder), 주의력결핍 과잉행동장애(Attention Deficit Hyperactivity Disorder), 알코올, 니코틴, 카페인 중독(Alcohol, Nicotine, and Caffeine Addiction), 수면장애(Sleep Disorder), 섭식장애(Eating disorders) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [176] 상기 혈액 및 종양 질환은 빈혈(Anemias), 폐암(Lung Cancer), 위암(Gastric Cancer), 대장직장암(Colorectal Cancer), 유방암(Breast Cancer), 부인암(Gynecologic Cancers), 전립선암(Prostate Cancer), 백혈병(Leukemias), 림프종(Lymphomas) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [177] 상기 심혈관 질환은 고혈압(Hypertension), 심부전(Heart Failure), 허혈성 심질환(Ischemic Heart Diseases), 급성관상동맥증후군(Acute Coronary Syndrome, ACS), 부정맥(Arrhythmias), 이상지질혈증(Dyslipidemia), 뇌졸중(Stroke), 정맥

혈전색전증(Venous Thromboembolism), 말초혈관질환(Peripheral Arterial Disease), 혈액량 감소성 쇼크(Hypovolemic Shock) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [178] 상기 호흡기 질환은 천식(Asthma), 만성 폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease), 알레르기비염(Allergic Rhinitis) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [179] 상기 내분비 질환은 당뇨병(Diabetes Mellitus), 갑상선 질환(Thyroid Disorder), 뇌하수체 및 부신질환(Pituitary & Adrenal Gland Disorders) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [180] 상기 감염 질환은 상기도 감염(Upper respiratory tract infection), 폐렴(Pneumonia), 요로감염(Urinary tract infection), 결핵(Tuberculosis), 뇌수막염(Meningitis), 위장관 및 복강 내 감염(Gastrointestinal/Intraabdominal Infections), 피부 연조직 감염(Skin and Soft tissue Infection), 표재성 진균감염증 / 심부진균증(Superficial Fungal Infections / Deep mycoses), 패혈증(Sepsis), 성매개감염(Sexually Transmitted Infection, STI) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [181] 상기 근골격 질환은 골관절염(Osteoarthritis), 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 골다공증(Osteoporosis), 통풍과 고요산혈증(Gout and Hyperuricemia) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [182] 상기 산부인과 질환은 임신과 수유 중의 약물사용(Drug Use in Pregnancy and Lactation), 폐경(Menopause), 요실금(Urinary Incontinence) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [183] 상기 비뇨생식기 질환은 전립선비대증(Benign Prostatic Hyperplasia), 전립선염(Prostatitis) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [184] 상기 피부 질환은 아토피 피부염(Atopic Dermatitis), 건선(Psoriasis) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [185] 상기 안과 질환은 녹내장(Glaucoma) 등일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [186] 본 명세서에서, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자(대상체)에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 약학적 조성물들의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여 시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 지속성 제제는

활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

- [187] 일 예에 따르면, 상기 약학적 조성물 또는 방법에 있어서, 상기 약학적 조성물 또는 상기 핵산 구조체를 포함하는 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 및 부형제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제와 함께 제공될 수 있다.
- [188] 상기 약학적으로 허용되는 담체는, 약학적 조성물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 약학적 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [189] 상기 조성물(약학적 조성물 또는 유전자 발현 억제용 조성물)은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [190] 상기 조성물의 적절한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [191] 상기 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.1 내지 1000 mg/kg, 또는 0.1 내지 200mg/kg 범위 내일 수 있다. 예를 들면, 0.1 내지 100nmole 농도로 이중핵산 분자를 포함하는 조성물을 0.1 내지 1000 mg/kg, 1 내지 500 mg/kg, 또는 1 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여하거나 수회에 나누어 투여할 수 있다. 상기 1일 투여량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [192] 본 명세서에서, "약학적 유효량" 또는 "유효량"은 상기 유효성분(일 예에 따른 핵산 구조체)이 소망하는 효과(예를 들면, 타겟 유전자의 발현을 억제시키거나 암 또는 증식성 질환을 예방 및/또는 치료하는 효과)를 나타낼 수 있는 양을 의미하며, 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

- [193] 상기 약학적 조성물은 당해 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [194] 또한, 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [195] 상기 유전자 발현 억제용 조성물, 또는 약학적 조성물의 투여 대상이나 상기 유전자 발현 억제 방법, 예방 또는 치료 방법의 투여 대상 환자(대상체)는 인간, 원숭이 등의 영장류 또는 래트, 마우스 등의 설치류 등을 포함하는 포유류, 또는 상기 포유류로부터 분리된 세포 또는 조직 또는 이의 배양물일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [196] **발명의 효과**
- [197] 일 예에 따른 구조체는, 제1 타겟 유전자의 발현을 효과적으로 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라, 추가적으로 선택적 스플라이싱을 억제, 제2 타겟 유전자의 mRNA를 분해, 및/또는 miRNA의 작용을 억제할 수 있다.
- [198] **도면의 간단한 설명**
- [199] 도 1a 및 도 1b는 일 예에 따른 핵산 구조체(pri-miRNA 구조체)의 서열 및 구조를 나타낸다. 구체적으로 도 1a는 일 예에 따른 핵산 구조체(pri-miRNA 구조체)를 디자인하기 위한 모식도를 나타낸다. 도 1a에서 밑줄로 표시된 서열은 드로샤 인식 모티프를 나타내고, 음영으로 표시된 서열은 안티센스 서열을 나타내며, 테두리로 표시된 서열은 센스 서열을 나타내며, 그 외 나머지 서열은 pri-miRNA의 나머지 부분을 구성하기 위해 적용될 수 있는 무작위로 구성된 리보뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 도 1b는 GFP 타겟(상단 구조체) 및 HPRT 타겟(하단 구조체)하는 일 예에 따른 핵산 구조체(pri-miRNA 구조체)를 나타낸다. 도 1c는 두 가닥으로 분리되어 있는 GFP 타겟 및 HPRT 타겟 pri-miRNA 각 군의 단일 가닥과 각 군의 두 가닥을 T4 RNA ligase2(NEB)를 이용하여 연결시킨 후 반응하지 않은 단일 가닥을 제거한 샘플을 PAGE gel로 분리한 결과(좌측 젤사진)와 그 모식도(우측 그림)를 나타낸다.
- [200] 도 2a 내지 도 2c는 드로샤 및 다이서에 의해 일 예에 따른 핵산 구조체(siRNA 전구체)가 성공적으로 절단되는지에 대한 결과를 나타낸다. 구체적으로 도 2a는 인간 세포에서 분리한 드로샤와 다이서 효소의 활성화에 의한 자연적으로 발생하는 miRNA 전구체인 pri-miR Let 7B와 다이서 효소의 기질로 잘 알려진 25

bp 길이의 이중가닥과 2 nt 오버행 구조를 가진 Dicer substrate siGFP(25+2 Linear)의 절단 결과물을 PAGE gel로 분리한 결과(좌측 젤사진)와 그 모식도(우측 그림)를 나타내고, 도 2b는 pri-miR Let 7B의 드로샤 절단 부위와 다이서 기질인 Dicer substrate linear 리보핵산의 다이서 절단 부위를 나타내며, 도 2c는 드로샤 및 다이서 효소의 활성화에 의해 pri-miGFP 혹은 pri-miHPRT가 순차적으로 절단된 결과물을 PAGE gel로 분리한 결과(좌측 젤사진)와 그 모식도(우측 그림)를 나타낸다.

- [201] 도 3 및 도 4는 siRNA, 그리고 pri-miRNA의 세포 내 유전자 억제 효율을 나타내는 결과이다.
- [202] 도 3은 HCT116 세포주에서 pri-miHPRT에 의한 HPRT1 mRNA의 발현 감소 정도를 RT-PCR을 이용하여 측정한 후 대조군 (PBS 군)의 HPRT1 mRNA 발현량을 100%로 기준하여 비교한 결과를 나타낸다.
- [203] 도 4는 KB-GFP 세포주 (KB 세포에서 유전자 조작되어 GFP 형광 단백질을 지속적으로 발현하는 stable cell line) 에서 pri-miGFP에 의한 GFP의 발현 감소 정도를 GFP 평균형광강도(Mean fluorescence intensity, MFI)를 FACS를 이용하여 측정한 후 대조군 (PBS 군)의 GFP 평균형광강도를 100%로 기준하여 비교하여 나타낸 결과이다.
- [204] 도 5는 HCT116 야생형(WT), 그리고 HCT116 Drosha 녹아웃(KO) 세포주에서 pri-miHPRT에 의한 HPRT1 mRNA의 발현 감소 정도를 비교한 결과를 나타낸다.
- [205] 도 6은 Non-Mod, SS-Mod, ST-Mod, Seq-Mod, PP-Mod, PP(-1)-Mod, PP(-2)-Mod, 그리고 PP(-3)-Mod 군의 구조, 서열, 및 화학적 변형 여부를 나타낸 모식도이다. 도 6에서 테두리로 표시된 서열은 2'-OH 잔기가 2'-O-Methyl기로 변형된 뉴클레오타이드 위치를 나타낸다.
- [206] 도 7a 및 도 7b는 두 가닥으로 분리되어 있는 도 6의 각 군의 각각의 단일 가닥과 도 6의 각 군의 두 가닥을 T4 RNA ligase2(NEB)를 이용하여 연결시킨 후 반응하지 않은 단일 가닥을 제거한 샘플을 PAGE gel로 분리한 결과를 나타낸다.
- [207] 도 8은 KB-GFP 세포주에서 도 6의 각 군의 리보핵산에 의한 GFP 발현량 감소를 FACS를 이용하여 측정한 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 8의 상단 그래프는 Non-Mod, SS-Mod, ST-Mod, Seq-Mod, 그리고 PP-Mod군의 타겟 유전자 침묵 효과를 비교한 그래프이고, 도 8의 하단 그래프는 SS-Mod, Seq-Mod, PP-Mod, PP(-1)-Mod, PP(-2)-Mod, 그리고 PP(-3)-Mod 군의 타겟 유전자 침묵 효과를 비교한 그래프이다.
- [208] 도 9a는 도 6의 각 군의 리보핵산이 시간에 따라 드로샤 효소의 활성화에 의해 절단되어 생성물이 형성되는 것을 PAGE gel을 이용하여 분리하여 확인한 결과와 이에 대한 모식도를 나타내며, 도 9b는 각 군의 리보핵산의 드로샤 절단 생성물이 시간에 따라 다이서 효소의 활성화에 의해 절단되어 생성물이 형성되는 것을 PAGE gel을 이용하여 분리하여 확인한 결과와 이에 대한 모식도를 나타낸다. 도 9c는 도 6의 각 군의 리보핵산이 시간에 따라 C57bl/6NCrSlc mouse

혈청 내에 존재하는 Nuclease에 의해 분해되는 것을 PAGE gel을 이용하여 확인한 결과(상단)와 각 시간 별 분해되지 않고 남아있는 RNA 구조체의 밴드 강도를 0분을 1로 기준하여 나타낸 그래프(하단)이다. 도 9d는 각 군의 리보핵산에 의한 인간 면역세포 (Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)에서 TNF- α 의 발현량을 측정하여 화학적 변형에 따른 핵산 구조체의 면역 유도 감소를 비교한 결과이다.

- [209] 도 10a는 pri-miHPRT에 제2 타겟 유전자 조절 기능을 부여하기 위해 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 부위에 ASO1 혹은 ASO2가 도입된 pri-miHPRT ASO1(상단) 과 pri-miHPRT ASO2(하단) 두 가지 핵산 구조체의 구조 및 서열을 나타낸다. 도 10a에서 테두리로 표시된 서열은 SMN2-ASO (the survival motor neuron 2 유전자에 대한 Antisense oligonucleotide)로서 기능하는 DNA로 이루어진 서열 부위를 표시한 것으로, 테두리 내의 서열 중 음영으로 표시된 서열은 당 구조가 LNA로 치환된 서열을 나타내며 *가 표시된 서열은 phosphodiester bond가 phosphorothioate bond로 치환된 서열을 나타내며, 그외 테두리 내의 나머지 서열은 DNA 서열을 나타낸다.
- [210] 도 10b는 pri-miHPRT의 5' 말단 단편과 ASO1가 적용된 HPRT 3' 말단 단편 혹은 ASO2가 적용된 HPRT 3' 말단 단편 두 가닥을 T4 RNA ligase2(NEB)를 이용하여 연결시켜 pri-miHPRT ASO1과 pri-miHPRT ASO2 두 가지 핵산 구조체를 만든 후 반응하지 않은 단일 가닥을 제거한 샘플을 PAGE gel로 분리한 결과(좌측 젤사진)와 그 모식도(우측 그림)를 나타낸다.
- [211] 도 11은 pri-miHPRT ASO1과 pri-miHPRT ASO2 각 군의 리보핵산이 드로사 효소의 활성화에 의해 절단되어 생성물이 형성되는 것을 PAGE gel을 이용하여 분리하여 확인한 결과를 나타낸다.
- [212] 도 12는 HCT116 세포주에서 pri-miHPRT ASO1과 pri-miHPRT ASO2에 의한 SMN2 Δ 7 mRNA (Exon 7이 스플라이싱에 의해 제거된 SMN2 mRNA)와 HPRT1 mRNA의 발현 감소 정도를 나타낸다. 구체적으로, 각 군의 리보핵산을 HCT116 세포에 처리하였을 경우 HPRT1 mRNA의 발현량을 비교한 결과(좌측 주황색 그래프)와 SMN2 Δ 7 mRNA의 발현량을 비교한 결과와(우측 하늘색 그래프)를 나타낸다. SMN2 Δ 7 mRNA 발현량은 RT-PCR을 이용하여 측정한 SMN2 full mRNA 발현량을 이용하여 보정하였다.
- [213] 도 13은 HCT116 세포주에서 세포주에서 pri-miHPRT, pri-miHPRT ASO2 그리고 3' ASO에 의한 SMN2 Δ 7 mRNA의 발현량 변화 정도를 확인하기 위해 SMN2 mRNA의 Exon 6 내지 8 부위의 PCR 증폭과 PAGE gel을 이용하여 확인한 결과이다.
- [214] 도 14a는 pri-miHPRT에 제2 타겟 유전자 조절 기능을 부여하기 위해 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 부위에 Anti-miR21이 도입된 pri-miHPRT Anti-miR21의 구조 및 서열을 나타낸다. 도 14a에서 테두리로

표시된 서열은 Anti-miR21으로서 기능하는 DNA로 이루어진 서열 부위를 표시한 것으로, 테두리 내의 서열 중 음영으로 표시된 서열은 당 구조가 LNA로 치환된 서열을 나타낸다.

- [215] 도 14b는 pri-miHPRT의 5' 말단 단편과 Anti-miR21가 적용된 HPRT 3' 말단 단편 두 가닥을 T4 RNA ligase2(NEB)를 이용하여 연결시켜 pri-miHPRT Anti-miR21을 만든 후 반응하지 않은 단일 가닥을 제거한 샘플을 PAGE gel로 분리한 결과(좌측 젤사진)와 그 모식도(우측 그림)를 나타낸다.
- [216] 도 15는 pri-miHPRT와 pri-miHPRT Anti-miR21 각 군의 리보핵산이 시간에 따라 드로샤 효소의 활성화에 의해 절단되어 생성물이 형성되는 것을 PAGE gel을 이용하여 분리하여 확인한 결과를 나타낸다.
- [217] 도 16은 HCT116 세포주에서 pri-miHPRT, pri-miHPRT Anti-miR21, 그리고 3' Anti-miR21 각 군의 리보핵산을 HCT116 세포에 처리하였을 경우 miR21의 발현량과 HPRT1 mRNA의 발현량을 비교한 결과를 나타낸다. miR21 발현량은 RT-PCR을 이용하여 측정된 U6 snRNA 발현량을 이용하여 보정하였다
- [218] 도 17은 HCT116 세포주에서 세포주에서 pri-miHPRT, pri-miHPRT Anti-miR21 그리고 Anti-miR21에 의한 PDCD4 발현량과 내부 대조군인 Vinculin의 발현량 변화 정도를 확인하기 위해 Western Blot을 이용하여 확인한 결과이다.
- [219] 도 18는 일 예에 따른 구조체가 세포 내에 도입되어, 타겟 유전자를 침묵시키고, 추가적으로 ASO 활성화 및 Anti-miRNA 활성을 나타낼 수 있는 과정의 모식도를 나타낸다.

[220]

발명의 실시를 위한 형태

- [221] 본 발명은 하기 실시예를 들어 더욱 자세히 설명할 것이나, 하기 실시예로 권리범위가 한정되는 의도는 아니다.
- [222]
- [223] 실시예 1. siRNA 전구체의 제조
- [224] 아래 표 2에 기재된 RNA 가닥을 IDT 또는 바이오니아에 주문하여, 화학적으로 합성된 것을 구매하여 사용하였다.
- [225] 아래 표 2에 기재된 siGFP 및 siHPRT는 pri-miRNA의 유전자 억제 효과를 기존 짧은 길이의 siRNA와 비교하기 위하여 제조하였다. 표 2에 기재된 Dicer substrate siGFP는 다이스 기질 핵산으로 세포로부터 분리한 다이스 효소의 활성을 확인하기 위하여 제조하였다.

[226] [표2]

Sample Name		Sequence (5'→3')	서열번호
siGFP	Sense	GCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT	서열번호 1
	Antisense	AACUUCAGGGUCAGCUUGCdTdT	서열번호 2
siHPRT	Sense	CAGACUUUGUUGGAUUUGAdTdT	서열번호 3
	Antisense	UCAAUCCAACAAAGUCUGdTdT	서열번호 4
Dicer substrate siGFP	Sense	GCAAGCUGACCCUGAAGUUAUCAC C	서열번호 5
	Antisense	GGUGAUAACUUCAGGGUCAGCUUG CCA	서열번호 6
pri-miLet7B	5' fragment	CAAGGCCGGGCCUGGCGGGGUGAG GUAGUAGGUUGUGUGGUUUCAGG GCAGUGAUGUUGCCCCUCGGAAGA UAACUAUAC	서열번호 7
	3' fragment	AACCUACUGCCUUCCCUGAGGAGC CCAGUGACA	서열번호 8
pri-miGFP	5' fragment	CCAUUCCCAGCCCUUGCGCUACUC CACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUC AUGUGGACAGGUAAGGAGAUGAA CUUCAGG	서열번호 9
	3' fragment	GUCAGCUUGCCGUGGCGUAGCGCU CAAUCCCUAUAGUG	서열번호 10
pri-miHPRT	5' fragment	CCAUUCCCAGCCCUUGCGCUACUC CAUGCCAGACUUUGUUGGAUUUGA AUGUGGACAGGUAAGGAGAUUCA AAUCCAAC	서열번호 11
	3' fragment	AAAGUCUGGCAUGGCGUAGCGCUC AAUCCCUAUAGUG	서열번호 12

[227] 상기 표 2에서 dT는 디옥시티미딘(deoxythymidine)을 의미한다.

[228] siGFP, siHPRT, Dicer substrate siGFP의 경우 Antisense, Sense 가닥을 각각 10 μ M 농도가 되도록 1X PBS buffer 상에서 혼합한 후 thermal cycler (Bio-Rad T100TM)을 이용하여 95 °C에서 3분 후 -1.0 °C/s의 속도로 95 °C에서 4 °C까지 온도를 감소시켜 혼성화 시켰다.

- [229] 각 유전자 타겟의 3' fragment에 해당하는 가닥은 T4 Polynucleotide Kinase(NEB)를 이용하여 37 °C에서 2시간 동안 반응시켜 RNA의 5' 말단을 phosphorylation 시킨 것을 사용하였다. 5' fragment 가닥과 phosphorylation 된 3' fragment 가닥을 각각 10 μ M 농도가 되도록 1X PBS 수용액 상에서 혼합하고, 95 °C에서 3분 후 -1.0 °C/s의 속도로 95 °C에서 4 °C까지 온도를 감소시켜 혼성화 시켰다. 혼성화된 RNA 혼합물에 T4 RNA ligase(NEB)를 이용하여 25 °C에서 12시간 반응시켜 이중 가닥의 Nick 구조를 연결시켜, pri-miRNA 구조체를 제조하였다.
- [230] 연결된 RNA 생성물은 10 μ l당 2X RNA loading dye(NEB) 10 μ l와 섞어서 70 °C에서 20분간 Denaturing 시켜 PAGE gel 전기영동 시킬 샘플을 준비하였다. 8% Urea가 첨가된 15% Polyacrylamide gel에서 200V 40분 동안 gel running 하여 ligase에 의해 반응이 되지 않은 RNA 가닥들과 분리시켰다. Gel red(Biotium)로 gel을 염색 후 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 연결된 생성물의 RNA band 부분을 확인하였다. siRNA 전구체는 5' fragment, 3' fragment 가닥이 연결된 부분의 RNA에 해당하는 band의 PAGE gel 부분을 잘라내어 1X Tris-Borate-EDTA buffer(TBE buffer)에 24시간 shaking 하여 분리된 것을 사용하였다.
- [231] 도 1a 및 도 1b는 일 예에 따른 핵산 구조체(pri-miRNA 구조체)의 서열 및 구조를 나타낸다. 구체적으로 도 1a는 일 예에 따른 핵산 구조체(pri-miRNA 구조체)를 디자인하기 위한 모식도를 나타낸다. 도 1a에서 밑줄로 표시된 서열은 드로샤 인식 모티프를 나타내고, 음영으로 표시된 서열은 안티센스 서열을 나타내며, 테두리로 표시된 서열은 센스 서열을 나타내며, 그 외 나머지 서열은 pri-miRNA의 나머지 부분을 구성하기 위해 적용될 수 있는 무작위로 구성된 리보뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 도 1b는 GFP 타겟(상단 구조체) 및 HPRT 타겟(하단 구조체)하는 일 예에 따른 핵산 구조체(pri-miRNA 구조체)를 나타낸다.
- [232] Ligase 처리 후 분리된 pri-miGFP 그리고 pri-miHPRT 와 반응시키지 않은 각각의 군의 5' fragment, 3' fragment 각각의 가닥을 0.5 pmol씩 2X RNA loading dye(NEB) 5 μ l와 섞어서 70 °C에서 20분간 Denaturing 시켜 PAGE gel 전기영동시킬 샘플을 준비하였다. 8% Urea가 첨가된 15% Polyacrylamide gel에서 200V 40분 동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻어 그 결과를 도 1c에 나타내었다.
- [233] 도 1c에 나타난 바와 같이, Ligase 처리 후 분리된 샘플에는 반응하지 않은 단일 가닥이 제거되었으며 길이가 연장되어 반응하지 않은 가닥보다 상단 위치에 밴드가 나타남을 확인하였다.
- [234]
- [235] 실시예 2.**In-vitro Cleavage** 실험을 위한 다이서, 드로샤 효소 분리
- [236] 드로샤 효소 분리를 위해 pXO-Drosha-flag, pXO-DGCR8-HA(서울대학교 김빛내리 교수님 연구실 제공) plasmid를 각각 10 μ g씩 Opti-MEM(Gibco)에

희석한 후 lipofectamine 2000(Invitrogen) 15 μ L을 넣어 전체 혼합액의 부피가 1 ml이 되도록 섞어준 뒤 5분간 상온에 두었다. 섞어준 plasmid와 lipofectamine 2000 혼합액을 100 mm Round plate에 2.0×10^6 cells/plate 밀도로 DMEM medium(10% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin)에 배양한 HEK293T 세포(인간 신장 유래 세포, GE dharmacon)에 plasmid transfection 시켰다.

- [237] plasmid transfection 후 48시간 후에 flag-Drosha, HA-DGCR 단백질 복합체가 발현된 세포는 DMEM 배지를 제거해준 후 5ml의 DPBS(Hyclone, without calcium magnesium)로 2회 세척하여 세포 표면의 배지를 모두 제거해 주었다. 500 μ L의 1X IP buffer(20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl)로 표면이 덮힌 round plate에 cell scraper (SPL)를 이용하여 긁어내어 배양된 HEK293T 세포를 모두 떼어낸 후 Eppendorf tube(Axygen)에 옮겨주었다. 초음파파쇄기(Branson S-450D)로 Sonication(10% amplitude, 5 sec running, 5 sec cooling, total 30 sec, Ice 상에서 진행)시켜 세포를 모두 파쇄하였다. 파쇄된 세포 lysate는 centrifugation(SmartR17, 13000xg, 15 min, 4 $^{\circ}$ C)하여 가라앉은 debris를 모두 제거한 상층액을 사용하였다.

- [238] 잘 흔들어진 ANTI-FLAG M2 Affinity Gel(invitrogen) 10 μ L를 ep tube에 옮겨준 후 1 ml의 1X IP buffer를 넣고 3회 inversion 시켜주었다. 3000xg에서 30초 centrifuge 시켜준 후 가라앉은 Affinity gel을 제외한 상층액을 제거하여 affinity gel을 세척하였다. 해당 단계를 3회 반복한 affinity gel에 HEK293T lysate 상층액을 넣고 섞어준 후 4 $^{\circ}$ C 조건에서 shaking incubation 하였다. Shaking incubation 하는 동안 flag-Drosha, HA-DGCR8 단백질 복합체들은 flag peptide에 선택적인 항원-항체 반응을 통해 affinity gel에 붙게 된다. 2시간 후 3000xg에서 30초 centrifuge 하여 affinity gel을 가라앉혀 상층의 lysate를 제거해준 후 세척 단계를 8회 반복하여 affinity gel에 붙지 않은 단백질을 제거해주었다. 이렇게 만들어진 affinity gel 10 μ L에 Elution buffer(Flag-peptide(invitroge) 0.3 g/mL 농도로 희석해준 1X IP buffer)을 50 μ L 섞어준 후 4 $^{\circ}$ C 조건에서 shaking incubation 하여 affinity gel에 붙은 단백질을 분리하였다. 2시간 뒤 혼합물을 centrifugation 하여 flag-Drosha, HA-DGCR8 단백질 복합체가 들어있는 용액을 얻었다.

[239]

- [240] 다이스 효소 분리를 위해서 pCAGGS-hsDicer(Addgene) 10 μ g을 Opti-MEM(Gibco)에 희석한 후 lipofectamine 2000 15 μ L을 넣어 전체 혼합액의 부피가 1 ml이 되도록 섞어준 뒤 5분간 상온에 두었다. 섞어준 plasmid와 lipofectamine 2000 혼합액은 100 mm Round plate에 2.0×10^6 cells/plate 밀도로 DMEM medium에 배양한 HEK293T 세포에 처리하였다. 이후 과정은 드로샤 효소 분리 과정과 동일하게 진행되었다.

[241]

- [242] 실시예 3. 드로샤 효소를 이용한 **in-vitro Cleavage** 실험

- [243] 상기 실시예 1에서 제조한 RNA 샘플 1 pmole 당 상기 실시예 2에서 분리한 HEK293T 세포로부터 분리한 드로샤 효소 6 μ L, 1 μ L 50 mM $MgCl_2$, Ribolock

RNase inhibitor(Thermofisher) 0.2 μ l, 1X IP buffer을 넣어 총 10 μ l이 되도록 섞은 혼합물을 thermal cycler 내에서 37 °C에서 2시간 동안 배양하여 드로샤가 pri-miRNA를 절단하도록 하였다. 반응이 완료된 샘플 10 μ l은 6X DNA loading dye(NEB) 2 μ l와 섞어서 PAGE gel 전기영동 시킬 샘플을 준비하였다. 15well짜리 15% polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)의 각 well에 12 μ l씩 로딩하였다. 200V 50분동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻어 그 결과를 도 2a 및 도 2c에 나타내었다. 도 2a의 우측 그림 및 도 2b, 및 도 2c의 우측 그림은 상기 제조한 pri-miRNA(pri-miR-Let7B, pri-miGFP, pri-miHPRT)가 드로샤에 의해 절단되는 모식도를 나타낸다. 도 2a에 나타난 바와 같이 드로샤에 의해 상기에서 제조한 자연적으로 발생하는 primary miRNA 구조를 모방한 pri-miR-Let7B가 성공적으로 절단되어 약 76 nt의 단편이 확인되어 세포로부터 분리한 드로샤 효소가 정상적으로 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 도 2c에 나타난 바와 같이, 드로샤에 의해 상기에서 제조한 pri-miRNA가 성공적으로 절단되어 약 62 nt의 단편이 확인되었다. 상기에서 제조한 pri-miRNA가 드로샤의 기질로서 작용할 수 있음을 확인하였다.

[244]

[245] 실시예 4. 다이스 효소를 이용한 in-vitro Cleavage 실험

[246] 상기 실시예 3에서 드로샤 효소에 의하여 잘린 pri-miRNA가 들어있는 반응물 또는 상기 실시예 1에서 제조한 Dicer substrate siGFP 10 μ l(1 pmole)에 proteinase K(Sigma) 0.5 μ l 섞어준 후 37 °C에서 30분 두었다. 이후 95 °C에서 3분 후 -1.0 °C/s의 속도로 95 °C에서 4 °C까지 온도를 감소시켜 혼합물 내에 들어있는 모든 단백질의 활성을 제거하여 pri-miRNA의 드로샤 절단에 의한 생성물(pri-miRNA Droscha Cleaved)을 준비하였다. 1X IP buffer(5 mM MgCl₂ 추가됨)에 희석한 10 pmole 혹은 pri-miRNA Droscha Cleaved가 들어있는 반응물 10.5 μ l에 상기 실시예 2에서 HEK293T 세포로부터 분리한 다이스 효소 2 μ l을 섞어 총 12.5 μ l이 되도록 섞은 혼합물을 thermal cycler 내에서 37 °C에서 2시간 동안 배양하여 다이스에 의한 Cleavage 반응이 일어나도록 하였다. 반응이 완료된 샘플은 6X DNA loading dye(NEB) 2.5 μ l와 섞어서 PAGE gel 전기영동 시킬 샘플을 준비하였다. 15well짜리 15% PAGE Gel의 각 well에 샘플을 15 μ l씩 로딩하였다. 200V 50분동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻어 그 결과를 도 2a 및 도 2c에 나타내었다. 도 2a에 나타난 바와 같이 다이스 절단에 의해 상기에서 제조한 Dicer substrate siGFP가 성공적으로 절단되어 약 20 bp의 RNA 이중가닥 단편이 확인되어 세포로부터 분리한 다이스 효소가 정상적으로 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 도 2c에 나타난 바와 같이, pri-miRNA 가 드로샤 절단에 의해 생성된 생성물은 다이스에 의해 성공적으로 절단되어 약 20 bp의 RNA 이중가닥 단편이 확인되었다. 상기 결과로부터 일 예에 따라 제조한 pri-miRNA가 드로샤 절단에 의해 생성된 생성물이 다이스의 기질로서 작용 가능함을 확인하였다.

[247]

[248] 실시예 5. 실시간 중합효소연쇄반응(Real Time(RT)-PCR)을 이용한 유전자 침묵효과 확인 (HPRT target)

[249] 유전자 침묵 효과를 확인하기 위해 HCT116 세포(인간 대장암 유래 세포주)를 RPMI medium(10% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin)와 함께 96well transparent culture plate에 0.1×10^6 cells/well의 밀도로 seeding 하였다. 실시예 1에서 제조한 두 가지 RNA 샘플 siHPRT, 그리고 pri-miHPRT 샘플을 0.05 pmole(최종 0.1 nM 농도), 0.25 pmole(최종 0.5 nM 농도), 0.5 pmole(최종 1 nM 농도), 2.5 pmole(최종 5 nM 농도) 그리고 5 pmole(최종 10 nM 농도)씩을 DPBS(without calcium magnesium)에 희석하여 부피가 총 48.5 μ l가 되도록 해주었고 1.5 μ l Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen)과 5분 간 상온에서 혼합 후 450 μ l의 RPMI 배지를 더해 주어 500 μ l로 맞추는 뒤 두 가지 샘플을 한 well당 100 μ l씩 처리해주었다(N=4).

[250] 처리 후 48 시간 뒤에 CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TAKARA)를 이용하여 세포에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Takara)와 Forward Primer 및 Reverse primer와 섞어 최종 부피가 20 μ l가 되도록 준비하였다. 이 때, RT-PCR용 primer는 두 가지 RNA 샘플에 의한 침묵효과를 확인하고자 하는 HPRT gene에 대한 forward, reverse primer 및 결과 보정을 위한 내부 대조군으로 사용할 GAPDH gene에 대한 forward, reverse primer 총 4가지를 준비하였다. 각각의 프라이머 서열은 하기 표 3에 기재하였고, 바이오니아에 주문하여, 화학적으로 합성된 것을 구매하여 사용하였다.

[251] RT-CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(Biorad)를 이용하여 PCR 증폭반응을 수행하였다. 증폭은 42 °C에서 5분, 95 °C에서 10초 후, 95 °C 5초, 60 °C 30초, 72 °C 30초 사이클을 40번 반복하였다. Ct는 threshold cycle을 의미하며 HPRT mRNA의 평균 Ct값에서 내부 대조군 GAPDH mRNA의 평균 Ct값을 빼준 것을 Δ Ct라 하고, 샘플 RNA를 처리한 실험군과 Lipofectamine RNAiMAX만을 처리한 음성 대조군의 Δ Ct차이를 $\Delta\Delta$ Ct(delta-delta Ct)라 한다. $\Delta\Delta$ Ct 계산법을 이용하여 HPRT mRNA 발현양의 변화를 구하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[252] [표3]

Sample Name	Sequence (5'->3')	서열번호
HPRT1 FW	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAG	서열번호 13
HPRT1 RV	GGCTTATATCCAACACTTCGTGGG	서열번호 14
GAPDH FW	GGATTTGGTCGTATTGGG	서열번호 15
GAPDH RV	GGAAGATGGTGATGGGATT	서열번호 16

[253] 도 3에 나타난 바와 같이, 농도별로 세포에 처리하여 PBS군을 기준으로 HPRT1

mRNA 발현양을 bar graph로 나타내었을 때 pri-miHPRT 군의 HPRT1 mRNA 발현양이 siHPRT와 유사한 경향으로 감소하였으며 이는 pri-miRNA의 유전자 침묵활성에 의해 타겟 유전자 발현양이 감소했음을 의미한다.

[254]

[255] 실시예 6. FACS를 이용한 유전자 침묵효과 확인 (GFP target)

[256] 유전자 침묵 효과를 확인하기 위해 GFP 형광 단백질을 stable 하게 발현하는 변형된 KB 세포인 GFP-KB 세포를 RPMI 배지와 함께 24 well culture plate에 0.5×10^6 cells/well의 밀도로 seeding하였다. siGFP 그리고 pri-miGFP 두 가지 RNA 샘플을 0.05 pmole(최종 0.1 nM 농도), 0.25 pmole(최종 0.5 nM 농도), 0.5 pmole(최종 1nM 농도), 2.5pmole(최종 5nM 농도) 그리고 5 pmole(최종 10nM 농도)씩 DPBS(without calcium magnesium)에 희석하여 부피가 총 145.5 μ l가 되도록 해주었고 4.5 μ l Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen)과 5분 간 상온에서 혼합 후 450 μ l의 RPMI로 배양된 각 well 처리하였다. 48시간 배양 후에 각 well의 GFP-KB 세포의 GFP발현정도는 각 well의 세포를 Tryple Express(Gibco)로 떼어내어 Novocyte 2060R Flow cytometer(ACEA Biosciences)으로 측정하였다. ACEA NovoExpress software를 이용하여 GFP 유전자 침묵효과를 분석하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[257] 도 4에 나타난 바와 같이, 농도별로 세포에 처리하여 PBS군을 기준으로 GFP 발현양을 bar graph로 나타내었을 때 상기 실시예 5와 같은 경향성을 보인다. 이 또한 pri-miRNA 구조체가 적절한 침묵효능을 유도하기 위해선 대부분을 핵 내로 전달하여 순차적 절단을 일으키기 위한 pri-RNA 구조체에 추가적인 변형이 필요함을 알 수 있다. 도 4에 나타난 바와 같이, 농도별로 세포에 처리하여 PBS군을 기준으로 GFP 발현양을 bar graph로 나타내었을 때 pri-miGFP 군의 GFP 발현양이 siGFP와 유사한 경향으로 감소하였으며 이는 pri-miGFP의 유전자 침묵활성에 의해 GFP 발현양이 감소했음을 의미한다. 이는 pri-miRNA의 타겟 서열이 변경되어도 유사한 경향의 유전자 침묵활성을 보임을 의미한다.

[258]

[259] 실시예 7. 실시간 중합효소연쇄반응(Real Time(RT)-PCR)을 이용한 드로샤 Knock-Out HCT116 세포와 야생형 HCT116 세포에서의 유전자 침묵효과 확인 (HPRT target)

[260] 세포에서의 드로샤 단백질의 유무에 따른 siRNA 전구체의 유전자 침묵 효과를 확인하기 위해 야생형 HCT116 세포(WT)와 드로샤 Knock-Out HCT116 세포(Drosha KO) 각각을 RPMI medium(10% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin)와 함께 96 well transparent culture plate에 0.1×10^6 cells/well의 밀도로 seeding 하였다. 실시예 1에서 제조한 pri-miHPRT 샘플을 0.5 pmole(최종 0.5 nM 농도), 1 pmole(최종 1 nM 농도), 그리고 5 pmole(최종 5 nM 농도)을 DPBS(without calcium magnesium)에 희석하여 부피가 총 97 μ l가 되도록 해주었고 3 μ l Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen)과 5분 간 상온에서 혼합 후

900 μ l의 RPMI 배지를 더해주어 1000 μ l로 맞춘 뒤 샘플을 Drosha KO 세포와 WT 세포를 배양중인 한 well당 100 μ l씩 4회 처리해주었다(N=4).

[261] 처리 후 48 시간 뒤에 CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TAKARA)를 이용하여 세포에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Takara)와 Forward Primer 및 Reverse primer와 섞어 최종 부피가 20 μ l가 되도록 준비하였다. 이 때, RT-PCR용 primer는 한 가지 RNA 샘플에 의한 침묵효과를 확인하고자 하는 HPRT gene에 대한 forward, reverse primer 및 결과 보정을 위한 내부 대조군으로 사용할 GAPDH gene에 대한 forward, reverse primer 총 4가지를 준비하였다.

[262] RT-CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(Biorad)를 이용하여 PCR 증폭반응을 수행하였다. 증폭은 42 °C에서 5분, 95 °C에서 10초 후, 95 °C 5초, 60 °C 30초, 72 °C 30초 사이클을 40번 반복하였다. Ct는 threshold cycle을 의미하며 HPRT mRNA의 평균 Ct값에서 내부 대조군 GAPDH mRNA의 평균 Ct값을 빼준 것을 Δ Ct라 하고, 샘플 RNA를 처리한 실험군과 Lipofectamine RNAiMAX만을 처리한 음성 대조군의 Δ Ct차이를 $\Delta\Delta$ Ct(delta-delta Ct)라 한다. $\Delta\Delta$ Ct 계산법을 이용하여 HPRT mRNA 발현량의 변화를 구하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[263] 도 5에 나타난 바와 같이, 농도별로 세포에 처리하여 각 세포군의 PBS군을 기준으로 HPRT1 mRNA 발현량을 bar graph로 나타내었을 때 상기 실시예 5 (도 3)와 같은 경향성을 보인다. 야생형 HCT116 세포 (WT 군)에 비해서 Drosha KO 군의 HPRT1 mRNA 발현량이 유의미하게 높았으며 이는 pri-miHPRT의 유전자 침묵 활성이 Drosha KO 군에서 WT 군에 비해 감소했음을 의미한다. 따라서 pri-miRNA 구조체가 세포 내에서 효과적인 유전자 억제를 일으키기 위해서 드로샤의 작용이 필요함을 알 수 있다.

[264]

[265] 실시예 8. 화학적으로 변형된 siRNA 전구체 제조 (GFP target)

[266] 아래 표 4에 기재된 각각의 RNA 가닥을 IDT에서 화학적으로 합성된 것을 사용하였다. 아래 표 4에서 표에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오타이드는 리보오스 당의 2'-OH기를 2'-O-메틸기로 화학적으로 변형된 것을 의미한다.

[267] [표4]

Sample Name		Sequence (5'→3')	서열번호
Non-Mod	5' fragment	CCAUUCCCAGCCCUUGCGCUACUCCA CGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCAUG UGGACAGGUAAGGAGAUGAACUUCAGG	서열번호 17
	3' fragment	GUCAGCUUGCCGUGGCGUAGCGCUC AAUCCCUAUAGUG	서열번호 18
SS-Mod	5' fragment	<u>CCAUUCCCAGCCCUUGCGCUACUCC</u> ACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU GUGG <u>ACAGGU</u> <u>AA</u> GGAGAUGAACUUC AGG	서열번호 19
	3' fragment	GUCAGCUUGCCGUGGCGUAGCGCUC <u>AAUCCCUAU</u> AGUG	서열번호 20
ST-Mod	5' fragment	CCAUUCCCAGCCCUUG <u>CGCUACUCC</u> <u>ACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU</u> GUGGACAGGUAAGGAGA <u>UGAACUUC</u> <u>AGG</u>	서열번호 21
	3' fragment	GUC <u>AGCUUGCCGUGGCGUAGCGCUC</u> AAUCCCUAUAGUG	서열번호 22
Seq-Mod	5' fragment	<u>CCAUUCCCAGCCCUUGCGCUACUCC</u> <u>ACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU</u> GUGG <u>ACAGGU</u> <u>AA</u> GGAGA <u>UGAACUUC</u> <u>AGG</u>	서열번호 23
	3' fragment	GUC <u>AGCUUGCCGUGGCGUAGCGCUC</u> <u>AAUCCCUAU</u> AGUG	서열번호 24
PP-Mod	5' fragment	<u>CCAUUCCCAGCCCUUGCGCUACUCC</u> ACGG <u>CAAGCUGACCCUGAAGUUCAU</u> GUGG <u>ACAGGU</u> <u>AA</u> GGAGAUGAACUUC <u>AGG</u>	서열번호 25
	3' fragment	<u>GUCAGCUUGCCGUGGCGUAGCGCUC</u> <u>AAUCCCUAU</u> AGUG	서열번호 26
PP(-1)-Mod	5' fragment	<u>CCAUUCCCAGCCCUUGCGCUACUCC</u> ACGG <u>CAAGCUGACCCUGAAGUUCAU</u> GUGG <u>ACAGGU</u> <u>AA</u> GGAGAUGAACUUC	서열번호 27

		<u>AGG</u>	
	3' fragment	<u>GUCAGCUUGCCGUGGCGUAGCGCUC</u> <u>AAUCCCUAUAGUG</u>	서열번호 28
PP(-2)- Mod	5' fragment	<u>CCAUUCCCAGCCCCUUGCGCUACUCC</u> <u>ACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU</u> <u>GUGGACAGGUAAAGGAGAUGAACUUC</u> <u>AGG</u>	서열번호 29
	3' fragment	<u>GUCAGCUUGCCGUGGCGUAGCGCUC</u> <u>AAUCCCUAUAGUG</u>	서열번호 30
PP(-3)- Mod	5' fragment	<u>CCAUUCCCAGCCCCUUGCGCUACUCC</u> <u>ACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU</u> <u>GUGGACAGGUAAAGGAGAUGAACUUC</u> <u>AGG</u>	서열번호 31
	3' fragment	<u>GUCAGCUUGCCGUGGCGUAGCGCUC</u> <u>AAUCCCUAUAGUG</u>	서열번호 32

- [268] Non-Mod의 경우 상기 실시예 1에서 제조한 pri-miGFP와 동일한 샘플로서, 화학적 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하고, SS-Mod는 스템을 형성하지 않는 부위 (즉, 핵산 구조체의 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열 및 루프 구조)에서 C, A 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고, ST-Mod는 스템을 형성한 부위 (핵산 구조체의 스템 구조)에서 C, A 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며, Seq-Mod는 핵산 구조체의 가닥 전체 (핵산 구조체의 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 스템 구조, 및 루프 구조)의 C, A 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [269] 구체적으로, SS-Mod는 스템을 형성하지 않는 부위 (연장된 폴리뉴클레오타이드 서열 및 루프 구조)에서 C, A 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하여 5' fragment 가닥은 서열번호 19의 5' 말단부로부터 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 55, 56, 57, 61, 62, 및 65번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며 3' fragment 가닥은 서열번호 20의 5' 말단부로부터 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 및 35번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [270] ST-Mod는 스템을 형성한 부위 (스템 구조)에서 C, A 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하여 5' fragment 가닥은 서열번호 21의 5' 말단부로부터 17, 19, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 34, 37, 38, 39, 40, 43, 44, 48, 49, 67, 70, 71, 72, 75, 및 76번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며 3' fragment 가닥은 서열번호 22의 5' 말단부로부터 3, 4, 6, 10, 11, 16, 19, 21, 및 23번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [271] Seq-Mod는 핵산 구조체의 가닥 전체의 C, A 서열에 변형된 뉴클레오타이드를

포함하여 5' fragment 가닥은 서열번호 23의 5' 말단부로부터 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 34, 37, 38, 39, 40, 43, 44, 48, 49, 55, 56, 57, 61, 62, 65, 67, 70, 71, 72, 75, 및 76번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며 3' fragment 가닥은 서열번호 24의 5' 말단부로부터 3, 4, 6, 10, 11, 16, 19, 21, 23, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 및 35번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.

- [272] PP-Mod는 스템을 형성하지 않는 부위 (즉, 핵산 구조체의 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열 및 루프 구조)에서 C, A 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [273] 스템 구조의 5' 말단{또는, 스템을 형성한 부위에서 센스 영역을 포함하는 구간에서 스템이 끝나는 하단 분기점(상보적으로 결합하지 않는 연장된 폴리뉴클레오타이드 쪽으로 이어지는 스템 구조의 말단)}으로부터 14, 17, 18, 20, 및 27번째의 위치, 및
- [274] 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 스템 구조의 5' 말단으로부터 15, 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치{또는, 스템 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간에서 스템이 끝나는 상단 분기점(루프 구조로 이어지는 스템 구조의 말단)}으로부터 10 내지 13, 15, 17, 20, 및 21번째 위치}에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [275] 상기 PP-Mod의 5' fragment 가닥은 서열번호 25의 5' 말단부로부터 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 29, 32, 33, 35, 42, 55, 56, 57, 61, 62, 65, 76, 77, 및 78번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며 3' fragment 가닥은 서열번호 26의 5' 말단부로부터 1, 3, 5, 8, 9, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 및 35번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [276] PP(-1)-Mod는 스템을 형성하지 않는 부위에서 C, A 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [277] 스템 구조의 5' 말단{또는, 스템을 형성한 부위에서 센스 영역을 포함하는 구간에서 스템이 끝나는 하단 분기점(상보적으로 결합하지 않는 연장된 폴리뉴클레오타이드 쪽으로 이어지는 스템 구조의 말단)}으로부터 17, 18, 20, 및 27번째의 위치, 및
- [278] 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 스템 구조의 5' 말단으로부터 15, 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [279] 상기 PP(-1)-Mod의 5' fragment 가닥은 서열번호 27의 5' 말단부로부터 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 32, 33, 35, 42, 55, 56, 57, 61, 62, 65, 76, 77, 및 78번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며 3' fragment 가닥은 서열번호 28의 5' 말단부로부터 1, 3, 5, 8, 9, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 및 35번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [280] PP(-2)-Mod는 스템을 형성하지 않는 부위에서 C, A 서열에 변형된

- 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [281] 스템 구조의 5' 말단{또는, 스템을 형성한 부위에서 센스 영역을 포함하는 구간에서 스템이 끝나는 하단 분기점(상보적으로 결합하지 않는 연장된 폴리뉴클레오타이드 쪽으로 이어지는 스템 구조의 말단)}으로부터 17, 18, 20, 및 27번째 위치, 및
- [282] 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 스템 구조의 5' 말단으로부터 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [283] 상기 PP(-2)-Mod의 5' fragment 가닥은 서열번호 29의 5' 말단부로부터 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 32, 33, 35, 42, 55, 56, 57, 61, 62, 65, 76, 77, 및 78번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며 3' fragment 가닥은 서열번호 30의 5' 말단부로부터 1, 3, 5, 8, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 및 35번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [284] PP(-3)-Mod는 스템을 형성하지 않는 부위에서 C, A 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고,
- [285] 스템 구조의 5' 말단{또는, 스템을 형성한 부위에서 센스 영역을 포함하는 구간에서 스템이 끝나는 하단 분기점(상보적으로 결합하지 않는 연장된 폴리뉴클레오타이드 쪽으로 이어지는 스템 구조의 말단)}으로부터 17, 18, 20, 및 27번째 위치, 및
- [286] 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 스템 구조의 5' 말단으로부터 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [287] 상기 PP(-3)-Mod의 5' fragment 가닥은 서열번호 31의 5' 말단부로부터 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 32, 33, 35, 42, 55, 56, 57, 61, 62, 65, 76, 77, 및 78번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며 3' fragment 가닥은 서열번호 32의 5' 말단부로부터 1, 3, 5, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 및 35번째 서열에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [288] Non-Mod, SS-Mod, ST-Mod, Seq-Mod, PP-Mod, PP(-1)-Mod, PP(-2)-Mod, 및 PP(-3)-Mod 군의 구조, 서열, 및 화학적 변형 여부를 도 6에 나타내었다.
- [289]
- [290] 각각의 3' fragment 가닥은 T4 Polynucleotide Kinase(NEB)를 이용하여 37 °C에서 2시간 동안 반응시켜 RNA의 5' 말단을 phosphorylation 시킨 것을 사용하였다. 각각의 modification pattern에 해당하는 5' fragment 가닥과 phosphorylation 된 3' fragment 가닥을 각각 10 μM 농도가 되도록 1X PBS 수용액 상에서 혼합하고, thermal cycler (Bio-Rad T100TM)을 이용하여 95 °C에서 3분 후 -1.0 °C/s의 속도로 95 °C에서 4 °C까지 온도를 감소시켜 혼성화시켰다. 혼성화된 RNA 혼합물에 T4 RNA ligase(NEB)를 이용하여 25 °C에서 12시간 반응시켜 이중 가닥의 Nick 구조를 연결시켰다. 연결된 RNA 생성물은 10 μl당 2X RNA loading dye(NEB) 10

μl와 섞어서 70 °C에서 20분간 Denaturing 시켜 PAGE gel 전기영동시킬 샘플을 준비하였다. 8% Urea가 첨가된 15% Polyacrylamide gel에서 200V 40분 동안 gel running 하여 ligase에 의해 반응이 되지 않은 RNA 가닥들과 분리시켰다. Gel red(Biotium)로 gel을 염색 후 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 연결된 생성물의 RNA band 부분을 확인하였다. siRNA 전구체(일 예에 따른 핵산 구조체, pri-miRNA)는 5' fragment, 3' fragment 가닥이 연결된 부분의 RNA에 해당하는 band의 PAGE gel 부분을 잘라내어 1X TBE buffer에 24시간 shaking 하여 분리된 것을 사용하였다.

[291] Ligase 처리 후 분리된 Non-Mod, SS-Mod, ST-Mod, Seq-Mod, 그리고 PP-Mod와 반응시키지 않은 각각의 군의 5' fragment, 3' fragment 각각의 가닥을 0.5 pmol씩 2X RNA loading dye(NEB) 5 μl와 섞어서 70 °C에서 20분간 Denaturing 시켜 PAGE gel 전기영동시킬 샘플을 준비하였다. 8% Urea가 첨가된 15% Polyacrylamide gel에서 200V 40분 동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻어 그 결과를 도 7a, 및 도 7b에 나타내었다.

[292] 도 7a 및 도 7b에 나타난 바와 같이, Ligase 처리 후 분리된 샘플에는 반응하지 않은 단일 가닥이 제거되었으며 길이가 연장되어 반응하지 않은 가닥보다 상단 위치에 밴드가 나타남을 확인하였다.

[293]

[294] 실시예 9.화학적 변형 패턴에 따른 시간 별 **in-vitro Drosha Cleavage** 반응량 확인 실험

[295] 서열에 화학적 변형 (2'-O-Methyl modification)이 적용된 pri-miRNA의 시간 별 드로샤에 의해 잘리는 정도를 비교하기 위해 상기 실시예 8에서 제조한 각각의 샘플 (Non-mod, SS-Mod, ST-Mod, Seq-Mod, 및 PP-Mod) 5 pmole에 HEK293T 세포로부터 분리한 드로샤 효소 30 μL, 5 μl 50 mM MgCl₂, Ribolock RNase inhibitor(Thermofisher) 1 μl, 1X IP buffer를 넣어 총 50 μl이 되도록 섞은 혼합물을 thermal cycler 내에서 37 °C에 배양하여 드로샤가 pri-miRNA를 절단하도록 하였다. 반응 후 0, 30, 60, 120분 뒤에 각 샘플에서 10 μl씩 채취하였다. 시간 별로 채취한 샘플 10 μl은 6X DNA loading dye(NEB) 2 μl와 섞어서 PAGE gel 전기영동시킬 샘플을 준비하였다. 15well짜리 15% polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)의 각 well에 12 μl씩 로딩하였다. 200V 50분동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻어 그 결과를 도 9a에 나타내었다.

[296] 도 9a에 나타난 바와 같이, 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하지 않은 Non-mod 군은 모든 siRNA 전구체가 드로샤 효소에 의해 바로 잘려 생성물로 전환되었지만, 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 다른 군(SS-mod, ST-mod, Seq-Mod, 및 PP-Mod 군)은 드로샤 효소에 의해 잘려 모두 생성물로 전환되기까지 2시간 이상의 시간이 필요한 것을 확인하였다. 이를 통해, pri-miRNA에 안정성을 부여하기 위해 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드(2'-O-Methyl modification)를 적용하였을 경우 드로샤의 작용을

저해하였음을 확인하였다.

[297]

[298] 실시예 10. FACS를 이용한 유전자 침묵효과 확인 (GFP target)

[299] 유전자 침묵 효과를 확인하기 위해 GFP 형광 단백질을 stable 하게 발현하는 변형된 KB 세포인 GFP-KB 세포(GFP 형광 단백질 발현 세포)를 RPMI 배지와 함께 12 well culture plate에 1.0×10^6 cells/well의 밀도로 seeding하였다. 실시예 8에서 제조한 Non-Mod, SS-Mod, ST-Mod, Seq-Mod, PP-Mod, PP(-1)-Mod, PP(-2)-Mod, 및 PP(-3)-Mod의 여덟 가지 화학적 변형된 pri-miRNA 샘플들을 0.25 pmole(최종 0.5nM 농도), 그리고 2.5 pmole(최종 5nM 농도)씩 DPBS(without calcium magnesium)에 희석하여 부피가 총 145.5 μ l가 되도록 해주었고 4.5 μ l Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen)과 5분 간 상온에서 혼합 후 450 μ l의 RPMI로 배양된 각 well에 50 μ l씩 처리하였다. 48시간 배양 후에 각 well의 GFP-KB 세포의 GFP 발현정도는 각 well의 세포를 Tryple Express(Gibco)로 떼어내어 Novocyte 2060R Flow cytometer(ACEA Biosciences)으로 측정하였다. ACEA NovoExpress software로 GFP 유전자 침묵효과를 분석하고, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 통계적 분석은 Two-way ANOVA analysis(Graphpad Prism 7)로 화학적으로 변형된 pri-miGFP들 간 타겟 유전자에 대한 유전자 침묵 활성을 비교하였다.

[300] 도 8 상단 그래프에 나타난 바와 같이, ST-Mod 군 또는 Seq-Mod 군은 Non-mod 군보다 타겟 유전자에 대한 유전자 침묵 활성이 현저히 떨어지는 확인할 수 있었다. PP-Mod 및 SS-Mod를 처리한 군은 GFP의 발현이 감소하여 우수한 유전자 침묵 효과가 나타남을 확인하였다.

[301] 도 8 하단 그래프에 나타난 바와 같이, PP-Mod와 PP-Mod의 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단에서 연장된 단일가닥 부위에서 단일가닥 부위가 시작하는 하단 분기점으로부터 3'말단 쪽으로 각각 1개(14nt), 2개(14 그리고 15nt), 혹은 3개(14, 15 그리고 16nt) 제외한 PP(-1)-Mod, PP(-2)-Mod, 혹은 PP(-3)-Mod는 PP-Mod 와 유사한 수준의 유전자 침묵 활성을 보여줌을 확인하였다.

[302] 이를 통해 스템 부위에 화학적 변형을 포함할 경우 pri-miRNA의 유전자 억제 효과가 저해될 수 있으나, 위치 특이적인 화학적 변형을 도입한 siRNA 전구체인 PP-Mod 군은 pri-miRNA의 유전자 억제 효과가 저해되지 않음을 확인하였다.

[303]

[304] 실시예 11. 화학적 변형의 패턴에 따른 시간 별 in-vitro Dicer Cleavage 반응량 확인 실험

[305] 화학적 Modification이 적용된 pri-miRNA의 드로샤 Cleavage 반응물들이 다이서에 의해서 잘리는 정도를 비교하기 위해서 각 pri-miRNA 샘플 5 pmole에 드로샤 효소 40 μ L, 5 μ l 50 mM MgCl₂, Ribolock RNase inhibitor(Thermofisher) 1 μ l, 그리고 1X IP buffer을 넣어 총 50 μ l이 되도록 섞어 37 °C에서 2시간 동안

반응시킨 후 proteinase K를 이용한 불활성화 과정을 거쳤다. 드로샤에 의해 절단된 산물이 다이스에 의해 절단되는 과정의 모식도를 도 8a에 나타내었다. 반응을 마친 혼합물에 다이스 효소 8 μ l를 넣어 37 °C에서 반응시킨 후 0, 30, 60, 120분 뒤에 각 샘플에서 12.5 μ l씩 채취하였다. 시간 별로 채취한 샘플은 6X DNA loading dye(NEB) 2.5 μ l와 섞어서 PAGE gel 전기영동 시킬 샘플을 준비하였다. 15well짜리 15% PAGE Gel의 각 well에 15 μ l씩 로딩하였다. 200V 50분동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻었고, 그 결과를 도 9b에 나타내었다. 도 9b에 나타난 바와 같이, 스템 부위에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 ST-mod 군 또는 Seq-Mod 군에서 성숙된 siRNA 생산량이 현저히 감소하였다. 그러나 스템 부위에 위치 특이적으로 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 PP-Mod 군에서는 비변형군인 Non-Mod 군 또는 스템을 형성하지 않는 부위에서 변형된 SS-Mod 군과 유사하게, 모든 드로샤 절단 산물이 다이스에 의해 절단되어 성숙된 siRNA를 생산하였다.

[306] 도 9a와 도 9b의 결과를 통해 스템 부위에 A와 C 서열 특이적으로 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 경우, 다이스에 의한 절단 과정이 저해됨으로 인해 유전자 침묵 활성이 감소하였으나, 스템 부위에 다이스의 작용을 저해하지 않는 위치 특이적인 화학적 변형을 도입한 siRNA 전구체인 PP-Mod 군은 Non-Mod 군 또는 SS-Mod 군과 유사하게 모든 드로샤 절단 산물이 다이스에 의해 절단되어 성숙된 siRNA를 생산하는 것을 확인하였다.

[307]

[308] 실시예 12. 화학적 변형의 패턴에 따른 시간 별 Serum stability 확인 실험.

[309] 뉴클레오타이드에 화학적 변형이 적용된 pri-miRNA의 혈청 내 Nuclease에 의해서 분해되는 정도를 확인하기 위해 아무 처리하지 않은 C57bl/6NCrSlc (female, 18-22g) mouse의 혈액을 채취한 뒤 4 °C, 2000 g, 15 min간 원심분리로 혈청을 분리한다. 상기 실시예 8에서 준비한 oligo 5.5 pmole을 MgCl₂와 C57bl/6NCrSlc mouse 혈청, 4.4 μ L 그리고 PBS 와 혼합하여 최종 부피가 44 μ L가 되게 맞추어 준다. 이 때 각 샘플의 최종 농도는 0.125 μ l, MgCl₂의 최종 농도는 5 mM이다. 37 °C에서 2 시간 동안 배양하면서 serum 내 각 oligo의 stability를 비교하고자 했다. 반응 후 0, 10, 30, 60, 120분 쯤에 각 샘플에서 8 μ l씩 채취하여 1X TBE buffer 2 μ l, 6X gel loading dye(NEB) 2 μ l와 혼합하여 각 시간에서 반응을 멈추게 하였다. 15well짜리 15% PAGE Gel의 각 well에 15 μ l씩 로딩하였다. 200V 50분동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻었고, 그 결과를 도 9c 왼쪽에 나타내었다. 각 군에서 oligo가 serum nuclease에 의해 시간 별로 분해되는 정도를 비교하기 위해 Image Lab software(biorad)를 이용하여 각각의 modification pattern 별로 화살표로 표시된 구간에 나타난 밴드들의 band intensity 값을 측정하였고, 0분의 band intensity 값을 1로 하여 나머지 시간대의 band intensity 값을 도 9c 오른쪽의 그래프로 나타내었다. 도

9c에 나타난 바와 같이, Non-Mod 군 혹은 ST-Mod 군의 경우, 혈청을 처리하고 10분 만에 대부분의 리보핵산 구조체가 분해되어 혈청 내 안정성이 개선되지 아니함을 확인하였다. 단일 가닥부위와 스템 부위에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함한 Seq-Mod 군 또는 PP-Mod 군은 2시간 이후에도 분해되지 않은 리보핵산 구조체가 남아있는 것을 확인하여 화학적 변형에 따른 혈청 내 Nuclease에 대한 저항성이 있음을 확인하였다. SS-Mod 군의 경우, 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 단일 가닥 부위에 제한적으로 적용하였음에도 2시간 이후에 분해되지 않은 리보핵산 구조체가 남아있어 혈청 내 안정성이 향상됨을 확인하였다.

[310] 도 8과 9c의 결과를 통해 SS-Mod, 및 PP-Mod에 따른 변형 패턴이 pri-miRNA 전구체의 혈청 내 안정성을 개선할 수 있는 화학적 변형 패턴임을 확인하였다.

[311]

[312] 실시예 13. 화학적 변형의 패턴에 따른 면역원성 분석 (Immune assay)

[313] 서열에 화학적 변형 (2'-O-Methyl modification)에 의한 pri-miRNA의 면역 유도 감소 효과를 살펴보기 위해 PBMC (human Peripheral blood mononuclear cells, ATCC)을 RPMI 배지(10% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin)와 함께 24 웰 플레이트에 5×10^5 cells/well의 농도로 450 μ l씩 분주하였다. 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하여 세포를 안정화시킨 후, 각 웰에 상기 실시예 8에서 제조한 네가지 화학적으로 변형된 pri-miRNA 샘플(Non-mod, Seq-Mod, 및 PP-Mod) 250 pmole(최종 500nM 농도)씩 DPBS(without calcium magnesium)에 희석하여 부피가 총 144 μ l가 되도록 해주었고 6 μ l Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen)과 5분 간 상온에서 혼합 후 450 μ l의 RPMI로 배양된 각 well에 50 μ l씩 처리해주어 PBMC를 transfection 시켰다. 50 μ l의 PBS만 처리해준 웰(도 9d에서 NC)과 핵산 없이 Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) 만 처리해준 (도 9d에서 Lipo-only) 웰의 세포를 대조군으로 사용했다. 이 때 각 pri-miRNA 샘플 당 처리해준 웰 수는 n=3으로 cytokine 정량 분석 후 통계적 유의성을 구하였다.

[314] 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 추가 배양 후, 배지를 모아 400g 4°C 5min간 원심분리 하여 상층액을 분리하였다. 상층액에 들어 있는 인간 TNF- α 및 IFN- α 의 양을 효소 면역 분석법을 이용하여 정량하고 그 결과를 도 9d에 나타내었다. 상층액의 cytokine 분석은 Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit(R&D system) 를 이용하였고 제조사의 매뉴얼을 따라서 진행 후 Infinite M200 Pro(Tecan)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 분석은 One-way ANOVA analysis(Graphpad Prism 7)로 Non-Mod pri-miGFP와 화학적으로 변형된 pri-miGFP들 간 면역반응 유도 정도를 비교하였다

[315] 도 9d의 결과를 통해, PBMC 세포주에 화학적으로 변형되지 않은 pri-miRNA인 Non-Mod 군 (도 9d에서 Non-Mod)을 처리한 경우 아무 것도 처리하지 않은 군 (NC) 또는 대조군 (도 9d에서 Lipo-only)과 비교하여 면역반응에 의해 면역

사이토카인의 일종인 TNF- α 의 발현의 증가가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. pri-miRNA에 A와 C 서열 특이적으로 화학적으로 변형을 도입한 Seq-Mod 군이나 pri-miRNA의 스템 부위에 다이스의 작용을 저해하지 않는 위치 특이적인 화학적 변형을 도입한 PP-Mod 군의 경우, 면역반응의 저하로 인해 TNF- α 의 발현의 증가가 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 핵산 구조체의 이중가닥 부위에 화학적 변형을 도입하는 경우 생체 내 면역원성으로서 인식이 저해된다는 내용의 기존 논문(Journal of Controlled Release 343 (2022) 57-65)과 일관된 결과를 보여주었다.

[316] 도 8의 결과에서, SS-Mod 군 및 PP-Mod 군의 경우 스템 부위에 A와 C 서열 특이적으로 화학적으로 변형을 도입한 Seq-Mod 군보다 우수한 유전자 억제 활성을 가졌으며, 도 9c 및 도 9d의 결과를 통해 화학적 변형을 도입하지 않은 pri-miRNA(Non-Mod)에 비해 우수한 혈청 내 안정성과 낮은 면역원성을 보이므로 생체 내 치료제로서 적용하기에 적합함을 확인할 수 있었다.

[317]

[318] 실시예 14. 화학적으로 변형된 ASO 서열이 포함된 siRNA 전구체 제조

[319] 아래 표 5에 기재된 각각의 RNA가닥을 IDT에서 화학적으로 합성된 것을 사용하였다. 아래 표 5에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오타이드는 SMN2-ASO (the survival motor neuron 2 유전자에 대한 Antisense oligonucleotide)로서 기능하는 DNA로 이루어진 서열 부위를 표시한 것으로 [+] 표시된 것은 리보오스 당을 LNA (Locked Nucleic Acid)로 변형된 것이고 뉴클레오타이드 서열 사이에 *로 표시된 부분 phosphodiester bond가 phosphorothioate bond로 변형된 것임을 의미한다.

[320] [표5]

Sample Name	Sequence (5'->3')	서열번호
3' SMN2- ASO1	AAAGUCUGGCAUGGCGUAGCGCUCT*[+C]*[+A]* C*[+T]*[+T]*T*[+C]*[+A]*T*[+A]*[+A]*T*[+G]*[+ C]*T*[+G]*[+G]	서열번호 33
3' SMN2- ASO2	AAAGUCUGGCAUGGCGUAGCGCUCAAUCC T*[+ C]*[+A]*C*[+T]*[+T]*T*[+C]*[+A]*T*[+A]*[+A]*T *[+G]*[+C]*T*[+G]*[+G]	서열번호 34

[321] 실시예 1, 표 2의 pri-miHPRT 를 구성하는 pri-miHPRT 5' fragment 가닥 [서열번호 11]과 3' SMN2-ASO1 혹은 3' SMN2-ASO2를 혼성화하여 ASO를 도입한 siRNA 전구체인 pri-miHPRT ASO1 혹은 pri-miHPRT ASO2를 제조하였다. 이 때, 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 부위에서 단일가닥 부위가 시작하는 하단 분기점으로부터

3'말단 쪽으로 2개 뉴클레오타이드 이후에 SMN2 ASO를 도입한 균을 pri-miHPRT ASO1, 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 부위에서 단일가닥 부위가 시작하는 하단 분기점으로부터 3'말단 쪽으로 7개 뉴클레오타이드 이후에 SMN2 ASO를 도입한 균을 pri-miHPRT ASO2로 명명하였다. 상기 pri-miHPRT ASO1 및 pri-miHPRT ASO2의 구조를 도 10a에 나타내었다.

- [322] 상기 pri-miHPRT ASO1 는 서열번호 33의 5' 말단으로부터 26, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 및 42번째 서열에 변형된 당을 포함한다. 상기 pri-miHPRT ASO1 는 서열번호 33의 5' 말단으로부터 25 내지 42번째 핵산 사이의 phosphodiester bond가 phosphorothioate bond로 변형되었다.
- [323] 상기 pri-miHPRT ASO2는 서열번호 34의 5' 말단으로부터 31, 32, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 46, 및 47번째 서열에 변형된 당을 포함한다. 상기 pri-miHPRT ASO2는 서열번호 34의 5' 말단으로부터 30 내지 47번째 핵산 사이의 phosphodiester bond가 phosphorothioate bond로 변형되었다.
- [324] 각각의 가닥은 T4 Polynucleotide Kinase(NEB)를 이용하여 37 °C에서 2시간 동안 반응시켜 RNA의 5' 말단을 phosphorylation 시킨 것을 사용하였다. 각각의 phosphorylation 된 가닥과 실시예 1의 표 2의 pri-miHPRT 를 구성하는 pri-miHPRT 5' fragment 가닥 [서열번호 11]을 각각 10 μ M 농도가 되도록 1X PBS 수용액 상에서 혼합하고, thermal cycler (Bio-Rad T100™)을 이용하여 95 °C에서 3분 후 -1.0 °C/s의 속도로 95 °C에서 4 °C까지 온도를 감소시켜 혼성화시켰다. 혼성화된 RNA 혼합물에 T4 RNA ligase(NEB)를 이용하여 25 °C에서 12시간 반응시켜 이중 가닥의 Nick 구조를 연결시켰다. 연결된 RNA 생성물은 10 μ l당 2X RNA loading dye(NEB) 10 μ l와 섞어서 70 °C에서 20분간 Denaturing 시켜 PAGE gel 전기영동시킬 샘플을 준비하였다. 8% Urea가 첨가된 15% Polyacrylamide gel에서 200V 40분 동안 gel running 하여 ligase에 의해 반응이 되지 않은 RNA 가닥들과 분리시켰다. Gel red(Biotium)로 gel을 염색 후 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 연결된 생성물의 RNA band 부분을 확인하였다. pri-miHPRT ASO1 그리고 pri-miHPRT ASO2는 5' fragment, 3' fragment 가닥이 연결된 부분의 RNA에 해당하는 band의 PAGE gel 부분을 잘라내어 1X TBE buffer에 24시간 shaking 하여 분리된 것을 사용하였다.
- [325] Ligase 처리 후 분리된 pri-miHPRT ASO1, pri-miHPRT ASO2와 반응시키지 않은 pri-miHPRT 5' fragment, 3' SMN2 ASO1, 그리고 3' SMN2 ASO2 각각의 가닥을 0.5 pmol씩 2X RNA loading dye(NEB) 5 μ l와 섞어서 70 °C에서 20분간 Denaturing 시켜 PAGE gel 전기영동시킬 샘플을 준비하였다. 8% Urea가 첨가된 15% Polyacrylamide gel에서 200V 40분 동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻어 그 결과를 도 10b에 나타내었다.
- [326] 도 10b에 나타난 바와 같이, Ligase 처리 후 분리된 pri-miHPRT ASO1, pri-miHPRT ASO2 샘플에는 반응하지 않은 단일 가닥이 제거되었으며 길이가

연장되어 반응하지 않은 가닥보다 상단 위치에 밴드가 나타남을 확인하였다.

[327]

[328] 실시예 15. 화학적으로 변형된 ASO 서열이 포함된 siRNA 전구체의 시간 별 in-vitro Drosha Cleavage 반응량 확인 실험

[329] 뉴클레오타이드에 화학적 변형이 적용되지 않은 pri-miHPRT 혹은 다른 화학적 변형이 적용된 pri-miHPRT (pri-miHPRT ASO1 그리고 pri-miHPRT ASO2)의 시간 별 드로샤에 의해 잘리는 정도를 비교하기 위해 상기 실시예 8에서 제조한 각각의 샘플 2 pmole에 HEK293T 세포로부터 분리한 드로샤 효소 30 μ L, 5 μ L 50 mM $MgCl_2$, Ribolock RNase inhibitor(ThermoFisher) 1 μ L, 1X IP buffer을 넣어 총 50 μ L이 되도록 섞은 혼합물을 thermal cycler 내에서 37 °C에 배양하여 드로샤가 pri-miRNA를 절단하도록 하였다. 반응 후 30분 뒤에 각 샘플에서 12.5 μ L씩 채취하였다. 상기 제조한 각각의 샘플 0.5 pmole에 HEK293T 세포로부터 분리한 드로샤 효소와 6X DNA loading dye(NEB)와 1:5 비율로 섞어 활성을 제거한 드로샤 효소 7.5 μ L, 1.25 μ L 50mM $MgCl_2$, Ribolock RNase inhibitor(ThermoFisher) 0.25 μ L, 1X IP buffer을 넣어 총 12.5 μ L이 되도록 섞은 혼합물을 반응의 대조군으로서 사용하였다. 채취한 샘플 혹은 대조군 샘플은 12.5 μ L은 6X DNA loading dye(NEB) 2.5 μ L와 섞어서 PAGE gel 전기영동 시킬 샘플을 준비하였다. 15well짜리 15% polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)의 각 well에 15 μ L씩 로딩하였다. 200V 50분동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻어 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[330] 도 11에 나타난 바와 같이, 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 폴리뉴클레오타이드 부위가 시작하는 하단 분기점으로부터 2개 뉴클레오타이드 이후에 SMN2 ASO를 도입한 pri-miHPRT ASO1 군은 드로샤 절단 생성물이 형성되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 또한 안티센스 영역의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 부위가 시작하는 분기점으로부터 단일가닥 부위의 7개 뉴클레오타이드 이후에 SMN2 ASO를 도입한 pri-miHPRT ASO2 군은 pri-miHPRT군과 유사하게 siRNA 전구체가 드로샤에 의해 절단되어 생성물이 형성된 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 제2 타겟 유전자 조절 기능을 부여하기 위해 pri-miRNA의 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 폴리뉴클레오타이드 부위에 화학적으로 변형된 서열을 도입할 경우 단일 가닥 부위가 시작하는 하단 분기점으로부터 3' 말단 쪽으로 7개의 화학적으로 변형되지 않은 서열 이후에 ASO를 도입하는 것이 드로샤의 작용을 저해하지 않음을 확인하였다.

[331]

[332] 실시예 16. 화학적으로 변형된 ASO 서열이 포함된 siRNA 전구체의 유전자 억제효과와 선택적 스플라이싱 억제효과 확인

[333] pri-miHPRT ASO1 혹은 pri-miHPRT ASO2의 유전자 침묵 효과와 스플라이싱 억제 효과의 동시 발현을 확인하기 위해 HCT116 세포를 RPMI medium(10% Fetal

bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin)와 함께 96well transparent culture plate에 0.1×10^6 cells/well의 밀도로 seeding 하였다. pri-miHPRT, pri-miHPRT ASO2 그리고 단일 가닥 SMN2-ASO2 세 가지 샘플을 0.25 pmole(최종 0.5 nM 농도)씩 DPBS(without calcium magnesium)에 희석하여 부피가 총 48.5 μ l가 되도록 해주었고 1.5 μ l Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen)과 5분 간 상온에서 혼합 후 450 μ l의 RPMI 배지를 더해 주어 500 μ l로 맞춘 뒤 3가지 샘플을 한 well당 100 μ l씩 처리해주었다(N=4).

[334] 처리 후 48 시간 뒤에 CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TAKARA)를 이용하여 세포에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Takara)와 Forward Primer 및 Reverse primer와 섞어 최종 부피가 20 μ l가 되도록 준비하였다.

[335] 이 때, RT-PCR용 primer는 3가지 RNA 샘플에 의한 유전자 침묵효과를 확인하고자 하는 HPRT gene에 대한 forward, reverse primer 및 결과 보정을 위한 내부 대조군으로 사용할 GAPDH gene에 대한 forward, reverse primer 총 4가지를 준비하였으며 또한 3가지 RNA 샘플에 의한 스플라이싱 억제 효과를 확인하고자 하는 7번 exon이 제거된 SMN2 mRNA(SMN2 Δ 7) 대한 forward, reverse primer 및 7번 exon이 제거되지 않은 SMN2 mRNA(SMN2 full)에 대한 forward, reverse primer 총 4가지를 준비하였다. SMN2 Δ 7 그리고 SMN2 full에 대한 primer 서열은 하기 표 6에 기재하였고, 바이오니아에 주문하여, 화학적으로 합성된 것을 구매하여 사용하였다. RT- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(Biorad)를 이용하여 PCR 증폭반응을 수행하였다. 증폭은 42 °C에서 5분, 95 °C에서 10초 후, 95 °C 5초, 60 °C 30초, 72 °C 30초 사이클을 40번 반복하였다. 측정된 Ct값으로 $\Delta\Delta$ Ct 계산법을 이용하여 HPRT mRNA의 발현량, 그리고 SMN2 full의 발현량 대비 SMN2 Δ 7의 발현량의 변화를 구하고, 그 결과를 도 12의 그래프에 나타내었다.

[336] [표6]

Sample Name	Sequence (5'→3')	서열번호
SMN2 Δ 7 FW	TCTGGACCACCAATAATTCCCC	서열번호 35
SMN2 Δ 7 RV	ATGCCAGCATTTCCATATAATAGCC	서열번호 36
SMN2 full FW	GCTATCATACTGGCTATTATATGGGTT TT	서열번호 37
SMN2 full RV	CTCTATGCCAGCATTTCTCCTTAAT	서열번호 38

[337] 도 12의 아래쪽 그래프에 나타난 바와 같이, pri-miHPRT의 스템 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 폴리뉴클레오타이드 부위에 단일 가닥 부위가 시작하는 하단 분기점으로부터 2개 뉴클레오타이드 이후에 SMN2 ASO를 도입한 pri-miHPRT ASO1군은 화학적

변형된 뉴클레오타이드가 도입되지 않은 pri-miHPRT군에 비해 HPRT1 mRNA 발현량이 덜 감소한 것으로 보아 유전자 억제 기능이 손실된 것을 확인할 수 있었다. 또한 pri-miHPRT의 스템 구조 중 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 폴리뉴클레오타이드 부위에 단일 가닥 부위가 시작하는 하단 분기점으로부터 7개 뉴클레오타이드 이후에 SMN2 ASO를 도입한 pri-miHPRT ASO2군은 pri-miHPRT군과 유사하게 HPRT1 mRNA 발현량을 감소시켜 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드가 도입되었음에도 유전자 억제 활성이 유지됨을 확인할 수 있었다.

[338] 도 12의 위쪽 그래프에 나타난 바와 같이, pri-miHPRT ASO1 및 pri-miHPRT ASO2는 pri-miHPRT 5' fragment [서열번호 11]와 ligation 되지 않은 단일 가닥 상태의 3' SMN2-ASO1(SMN2-ASO1) 및 3' SMN2-ASO2(SMN2-ASO2)와 동일한 수준의 동일한 수준의 스플라이싱 억제 효과를 보임을 확인하였다.

[339] 도 11과 도 12의 결과를 통해 pri-miRNA의 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 폴리뉴클레오타이드 부위에 ASO를 도입할 경우, 단일 가닥 부위가 시작하는 하단 분기점으로부터 7개의 화학적으로 변형되지 않은 서열 이후에 도입하는 것이 드로샤의 작용을 저해하지 않으므로, 유전자 억제 효과의 저해 없이 siRNA 전구체의 기능과 제2 타겟 유전자 조절 기능을 효과적으로 발현시킬 수 있음을 확인하였다.

[340]

[341] 실시예 17. 화학적으로 변형된 ASO 서열이 포함된 siRNA 전구체에 의한 SMN2 mRNA의 Exon 7 발현 확인

[342] SMN2-ASO가 도입된 pri-miHPRT(pri-miHPRT ASO2)의 스플라이싱 억제 효과로 인한 SMN2 mRNA의 exon 7 보존을 확인하기 위해 HCT116 세포를 RPMI medium(10% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin)와 함께 96well transparent culture plate에 0.1×10^6 cells/well의 밀도로 seeding 하였다. pri-miHPRT, pri-miHPRT ASO2 그리고 단일 가닥 SMN2-ASO2 세 가지 샘플을 0.5 pmole(최종 5 nM 농도)씩 DPBS(without calcium magnesium)에 희석하여 부피가 총 8.5 μ l가 되도록 해주었고 1.5 μ l Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen)과 5분 간 상온에서 혼합 후 90 μ l의 RPMI 배지를 더해 주어 100 μ l로 맞추는 뒤 3가지 샘플을 한 well당 100 μ l씩 처리해주었다.

[343] 처리 후 48 시간 뒤에 CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TAKARA)를 이용하여 세포에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Takara)와 Forward Primer 및 Reverse primer와 섞어 최종 부피가 20 μ l가 되도록 준비하였다.

[344] 이 때, PCR용 primer는 3가지 RNA 샘플에 의한 SMN2 Exon 7 스플라이싱을 확인하고자 하는 SMN2 mRNA의 exon 6, 7, 8 구간에 대한 forward, reverse primer 및 결과 보정을 위한 내부 대조군(loading control)으로 사용할 GAPDH gene에 대한 forward, reverse primer 총 4가지를 준비하였다. SMN2 exon 6 내지 8구간에

대한 primer(SMN2 E5F, SMN2 E8R)서열은 아래 표 7에 기재된 것을 사용하였고, GAPDH에 대한 primer 서열은 표 3에 기재된 것을 사용하였다. 하기에 사용된 primer들은 바이오니아에 주문하여, 화학적으로 합성된 것을 구매하여 사용하였다. RT- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(Biorad)를 이용하여 PCR 증폭반응을 수행하였다. 증폭은 42 °C에서 5분, 95 °C에서 10초 후, 95 °C 5초, 60 °C 30초, 72 °C 30초 30 사이클 반복하였다.

[345] [표7]

Sample Name	Sequence (5'→3')	서열번호
SMN2 E5F	CTGCCTCCATTTCTTCTG	서열번호 39
SMN2 E8R	TGGTGTTCATTAGTGCTGCTC	서열번호 40

[346] SMN2 mRNA의 exon 6~8 구간에 대한 PCR 증폭 산물 혹은 GAPDH에 대한 증폭 산물의 길이를 확인하기 위해서 각각의 샘플로부터 5 µl를 취하여 1X TBE buffer 5 µl 그리고 6X loading dye (NEB) 2 µl와 혼합하여 총 12 µl를 만들어 PAGE gel 전기영동 시킬 샘플을 준비하였다. 15% PAGE gel의 각 well에 로딩하여 200V 50분 동안 전기영동 한 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻었다. 위와 동일한 실험을 3회 수행하여 3개의 이미지를 얻었고 그 중 하나를 도 13에 나타내었다. 각 이미지에서 얻은 Band의 두께는 Image Lab software(biorad)를 이용하여 intensity를 측정하였고, 각 군에서 exon 7 스플라이싱 정도를 비교하기 위해 SMN2 mRNA의 exon 6~8 구간에 대한 PCR 증폭 산물을 나타내는 PAGE gel에서 [상단의 밴드 intensity/하단의 밴드 intensity]를 계산하였다. control 군에서 측정된 값을 1로 하여 각 군에서의 값의 평균값과 표준오차 값을 상단의 그래프로 나타내었다.

[347] 도 13에 나타난 바와 같이, 상단의 밴드는 선택적 스플라이싱에 의해 Exon 7이 제거된 SMN2 Δ7 mRNA에 해당하는 것이고 하단의 밴드는 스플라이싱이 진행되지 않아 Exon 7이 포함된 SMN2 full mRNA에 해당하는 것이다. SMN2-ASO가 도입되지 않은 pri-miHPRT 군은 하단 밴드의 두께가 대조군 (NC)과 유사한 것을 확인하였고 3' SMN2 ASO2 군은 하단의 밴드의 두께가 얇아지고 상단 밴드의 두께가 두꺼워져 SMN2 mRNA의 스플라이싱 억제를 통해 Exon 7이 포함된 SMN2 full mRNA 발현을 증가시킴을 확인하였다. pri-miHPRT ASO2는 단일 가닥의 3' SMN2 ASO와 유사한 경향을 보여 스플라이싱 억제 효과로 인해 Exon 7이 포함된 SMN2 full mRNA 발현량을 증가시킴을 확인하였다.

[348]

[349] 실시예 18. 화학적으로 변형된 anti-miR21 서열이 포함된 siRNA 전구체 제조

[350] 아래 표 8에 기재된 각각의 RNA가닥을 IDT에서 화학적으로 합성된 것을 사용하였다. 아래 표 8에서 표에서 볼드체 및 밑줄로 표시된 뉴클레오타이드는

Anti-miR21로서 기능하는 DNA로 이루어진 서열 부위를 표시한 것으로 [+] 표시된 것은 리보오스 당을 LNA로 변형된 것임을 의미한다.

[351] [표8]

Sample Name	Sequence (5'→3')	서열번호
3' Anti-miR21	AAAGUCUGGCAUGGCGUAGCGCUCAAUCC[+] <u>G[+A][+T][+A][+A][+G][+C][+T]</u>	서열번호 41

[352] 실시예 1, 표 2의 pri-miHPRT 를 구성하는 pri-miHPRT 5' fragment 가닥과 Anti-miR21을 혼성화하여 siRNA 전구체를 제조하였다. 이 때, 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 부위에서 단일가닥 부위가 시작하는 하단 분기점으로부터 3'말단 쪽으로 7개 뉴클레오타이드 이후에 Anti-miR21을 포함한 군을 "pri-miHPRT Anti-miR21"으로 명명하였다. 상기 pri-miHPRT Anti-miR21의 구조를 도 14a에 나타내었다.

[353] 상기 pri-miHPRT Anti-miR21는 서열번호 41의 30 내지 37번째 서열의 당이 변형되었다.

[354] 상기 표 8의 가닥은 T4 Polynucleotide Kinase(NEB)를 이용하여 37 °C에서 2시간 동안 반응시켜 RNA의 5' 말단을 phosphorylation 시킨 것을 사용하였다. phosphorylation 된 3' anti-miR21 가닥과 표 2의 pri-miHPRT 를 구성하는 pri-miHPRT 5' fragment 가닥 [서열번호 11]을 각각 10μM 농도가 되도록 1X PBS 수용액 상에서 혼합하고, thermal cycler (Bio- Rad T100TM)을 이용하여 95 °C에서 3분 후 -1.0 °C/s의 속도로 95 °C에서 4 °C까지 온도를 감소시켜 혼성화시켰다. 혼성화된 RNA 혼합물에 T4 RNA ligase(NEB)를 이용하여 25 °C에서 12시간 반응시켜 이중 가닥의 Nick 구조를 연결시켰다. 연결된 RNA 생성물은 10 μl당 2X RNA loading dye(NEB) 10 μl와 섞어서 70 °C에서 20분간 Denaturing 시켜 PAGE gel 전기영동시킬 샘플을 준비하였다. 8% Urea가 첨가된 15% Polyacrylamide gel에서 200V 40분 동안 gel running 하여 ligase에 의해 반응이 되지 않은 RNA 가닥들과 분리시켰다. Gel red(Biotium)로 gel을 염색 후 Gel Doc™ EZ (Bio-Rad)로 연결된 생성물의 RNA band 부분을 확인하였다. pri-miHPRT Anti-miR21는 5' fragment, 3' fragment 가닥이 연결된 부분의 RNA에 해당하는 band의 PAGE gel 부분을 잘라내어 1X TBE buffer에 24시간 shaking 하여 분리된 것을 사용하였다.

[355] Ligase 처리 후 분리된 pri-miHPRT Anti-miR21와 반응시키지 않은 pri-miHPRT 5' fragment, 그리고 3' Anti-miR21 각각의 가닥을 0.5 pmol씩 2X RNA loading dye(NEB) 5 μl와 섞어서 70 °C에서 20분간 Denaturing 시켜 PAGE gel 전기영동시킬 샘플을 준비하였다. 8% Urea가 첨가된 15% Polyacrylamide gel에서

200V 40분 동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻어 그 결과를 도 14b에 나타내었다.

- [356] 도 14b에 나타난 바와 같이, Ligase 처리 후 분리된 pri-miHPRT Anti-miR21 샘플에는 반응하지 않은 단일 가닥이 제거되었으며 길이가 연장되어 반응하지 않은 가닥보다 상단 위치에 밴드가 나타남을 확인하였다.

[357]

- [358] 실시예 19. 화학적으로 변형된 anti-miR21 서열이 포함된 siRNA 전구체의 시간 별 in-vitro Droscha Cleavage 반응량 확인 실험

- [359] 화학적으로 변형된 Anti-miR21가 도입된 pri-miHPRT (pri-miHPRT Anti-miR21)와 화학적 변형이 도입되지 않은 pri-miHPRT의 시간 별 드로샤에 의해 잘리는 정도를 비교하기 위해 상기 실시예 8에서 제조한 각각의 샘플 2 pmole에 HEK293T 세포로부터 분리한 드로샤 효소 30 μ L, 5 μ L 50 mM $MgCl_2$, Ribolock RNase inhibitor(Thermofisher) 1 μ L, 1X IP buffer을 넣어 총 50 μ L이 되도록 섞은 혼합물을 thermal cycler 내에서 37 °C에 배양하여 드로샤가 pri-miRNA를 절단하도록 하였다. 반응 후 30분 뒤에 각 샘플에서 12.5 μ L씩 채취하였다. 상기 제조한 각각의 샘플 0.5 pmole에 HEK293T 세포로부터 분리한 드로샤 효소와 6X DNA loading dye(NEB)와 1:5 비율로 섞어 활성을 제거한 드로샤 효소 7.5 μ L, 1.25 μ L 50 mM $MgCl_2$, Ribolock RNase inhibitor(Thermofisher) 0.25 μ L, 1X IP buffer을 넣어 총 12.5 μ L이 되도록 섞은 혼합물을 반응의 대조군으로서 사용하였다. 채취한 샘플 혹은 대조군 샘플은 12.5 μ L은 6X DNA loading dye(NEB) 2.5 μ L와 섞어서 PAGE gel 전기영동 시킬 샘플을 준비하였다. 15well짜리 15% polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)의 각 well에 15 μ L씩 로딩하였다. 200V 50분동안 gel running 후 gel을 Gel red로 염색하여 Gel Doc™ EZ로 gel 이미지를 얻어 그 결과를 도 15에 나타내었다.

- [360] 도 15에 나타난 바와 같이, pri-miHPRT Anti-miR21이 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드가 도입되지 않은 pri-miHPRT와 같이 반응한 siRNA 전구체가 모두 드로샤에 의해 잘려 생성물이 형성된 것을 확인하였다. 도 11과 도 15를 통해, 제2 타겟 유전자 조절 기능을 부여하기 위해 pri-miRNA의 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 단일가닥 폴리뉴클레오타이드 부위에 화학적으로 변형된 anti-miR21 서열을 도입할 경우 단일 가닥 부위가 시작하는 하단 분기점으로부터 3'말단 쪽으로 7개의 화학적으로 변형되지 않은 서열 이후에 도입하는 것이 드로샤의 작용을 저해하지 않음을 확인하였다.

[361]

- [362] 실시예 20. 화학적으로 변형된 Anti-miR21 서열이 포함된 siRNA 전구체의 유전자 억제효과와 miR21 억제효과 확인

- [363] pri-miHPRT anti-miR21의 유전자 침묵 효과와 miR21 억제 효과의 동시 발현을 확인하기 위해 HCT116 세포를 RPMI medium(10% Fetal bovine serum, 1%

Penicillin/Streptomycin)와 함께 96well transparent culture plate에 0.1×10^6 cells/well의 밀도로 seeding 하였다. pri-miHPRT, pri-miHPRT anti-miR21 그리고 단일 가닥 3' anti-miR21 세 가지 샘플을 0.25 pmole(최종 0.5 nM 농도)씩 DPBS(without calcium magnesium)에 희석하여 부피가 총 48.5 μ l가 되도록 해주었고 1.5 μ l Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen)과 5분 간 상온에서 혼합 후 450 μ l의 RPMI 배지를 더해 주어 500 μ l로 맞춘 뒤 3가지 샘플을 한 well당 100 μ l씩 처리해주었다(N=4).

[364] 처리 후 48 시간 뒤에 CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TAKARA)를 이용하여 세포에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 및 M-MLV reverse transcriptase kit (Biorad)와 miR21 또는 U6 snRNA에 대한 Stem-Loop primer를 이용하여 최종 부피가 20 μ l가 되도록 준비하였다. 42 °C에서 5분, 37 °C에서 1시간 동안 처리하여 cDNA를 합성하였으며 95 °C 5분 처리하여 효소를 불활성화 하였다. 추출한 RNA 및 miR21 cDNA를 One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Takara)와 Forward Primer 및 Reverse primer와 섞어 최종 부피가 20 μ l가 되도록 준비하였다.

[365] 이 때, RT-PCR용 primer는 3가지 RNA 샘플에 의한 유전자 침묵효과를 확인하고자 하는 HPRT gene에 대한 forward, reverse primer 및 결과 보정을 위한 내부 대조군으로 사용할 GAPDH gene에 대한 forward, reverse primer 총 4가지를 준비하였으며 또한 3가지 RNA 샘플에 의한 miR21 억제 효과를 확인하고자 하는 miR21에 대한 Stem-Loop primer(miR21 Stem-Loop), miR21 과 Stem-loop primer에 의해 형성된 DNA template 에 대한 forward, reverse primer (miR21 FW, RV) 및 결과 보정을 위한 내부 대조군으로 사용할 U6 snRNA에 대한 Stem-Loop primer(U6 Stem-Loop), U6 snRNA와 Stem-loop primer에 의해 형성된 DNA template 에 대한 forward, reverse primer (U6 FW, RV) 총 6가지를 준비하였다. primer 서열은 하기 표 9에 기재하였고, 바이오니아에 주문하여, 화학적으로 합성된 것을 구매하여 사용하였다. miR21은 RT-CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(Biorad)를 이용하여 PCR 증폭반응을 수행하였다. 증폭은 42 °C에서 5분, 95 °C에서 10초 후, 95 °C 5초, 60 °C 30초, 72 °C 30초 사이클을 40번 반복하였다. 측정된 Ct값으로 $\Delta\Delta C_t$ 계산법을 이용하여 HPRT mRNA의 발현량, 그리고 miR21의 발현량의 변화를 구하고, 그 결과를 도 16의 그래프에 나타내었다.

[366] [표9]

Sample Name	Sequence (5'→3')	서열번호
miR21 Stem-Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACTCAACA	서열번호 42
miR21 FW	CGGCGGTAGCTTATCAGACTGATGT	서열번호 43
miR21 RV	GTGCAGGGTCCGAGGT	서열번호 44
U6 Stem-Loop	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT	서열번호 45
miR21 FW	CTCGCTTCGGCAGCACA	서열번호 46
miR21 RV	AACGCTTCACGAATTTGCGT	서열번호 47

[367] 도 16에 나타난 바와 같이, Anti-miR21이 도입된 pri-miHPRT (pri-miHPRT Anti-miR21)는 화학적 변형이 도입되지 않은 pri-miHPRT와 동일한 수준의 유전자 억제 효과를 가짐과 동시에 단일 가닥의 3' anti-miR21(anti-miR21)과 동일한 수준의 miR21 억제 효과를 확인하였다.

[368]

[369] 실시예 21. 화학적으로 변형된 Anti-miR21 서열이 포함된 siRNA 전구체에 의한 miR21 downstream gene expression 발현 확인

[370] pri-miHPRT anti-miR21의 miR21 억제 효과에 의한 miR21 조절 유전자의 발현을 확인하기 위해 HCT116 세포를 RPMI medium(10% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin)와 함께 12well transparent culture plate에 1.0×10^6 cells/well의 밀도로 seeding 하였다. pri-miHPRT, pri-miHPRT anti-miR21 그리고 단일 가닥 3' anti-miR21 세 가지 샘플을 5 pmole(최종 5 nM 농도) 씩 DPBS(without calcium magnesium)에 희석하여 부피가 총 97 μ l가 되도록 해주었고 3 μ l Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen)과 5분 간 상온에서 혼합 후 900 μ l의 RPMI에 배양된 각 well에 100 μ l씩 처리해주었다. 처리 후 48 시간 뒤에 각 well의 PDCD4 발현 정도를 비교하기 위해 CellLytic™ M (Sigma)를 이용하여 세포를 용해시킨 후 4 °C 12000 rcf로 15분 원심분리 후 상층액만 취하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Bradford reagent (Thermo)를 이용하여 농도를 측정한 후 동일한 농도로 단백질을 희석하여 5x protein sample buffer (Elpis biotech)와 총 50 μ l가 되도록 섞은 후 95 °C에서 5분 동안 Denaturing하여 준비하였다. 15well짜리 12% SDS PAGE gel의 각 well에 15 μ l씩 로딩하였다. 80V 30분, 이후 120V 2시간 동안 gel running 후 SDS-PAGE gel 상에 전기영동 된 단백질을 200V 1시간동안 nitrocellulose membrane으로 transfer 시켰다. 단백질이 transfer 된 membrane은 TTBS buffer에 5%로 희석시킨 Skim milk 를 이용하여 40분 간 blocking 하였다. PDCD4에 대한 rabbit 숙주의 1차 항체 (anti-PDCD4, Cell Signaling Technology) 및 결과 보정을 위한 내부 대조군으로 사용할 Vinculin에

대한 mouse 숙주의 1차 항체 (anti-Vinculin, Abcam) 각각을 1:2000 및 1:5000 부피 비로 5% BSA TTBS buffer에 희석한 후 4 °C 12시간 동안 membrane과 shaking하여 처리하였다. 이후 Horseradish peroxidase(HRP)가 conjugation 된 두 가지 항체 anti-Rabbit IgG(Abcam)와 anti-Mouse IgG(Abcam)를 5% Skim milk TTBS buffer에 1:5000 부피 비로 희석하여 anti-PDCD4를 처리한 membrane과 anti-Vinculin를 처리한 membrane 각각에 상온에서 2시간 동안 shaking 하여 처리하였다. 1 ml의 ECL solution (Abfrontier)으로 각각의 membrane을 처리 후 Chemi-Doc MP™ (Bio-Rad)로 Chemiluminescence를 Detection 하여 protein band 부분을 확인하여 그 결과를 도 17에 나타내었다. 위와 동일한 실험을 3회 수행하여 3개의 이미지를 얻었고 그 중 하나를 도 13에 나타내었다. 각 이미지에서 얻은 Band의 두께는 Image Lab software(biorad)를 이용하여 intensity를 측정하였고, 각 군에서 PDCD4 발현량을 비교하기 위해 $[PDCD4 \text{ band intensity}/Vinculin \text{ band intensity}]$ 를 계산하였다. control 군에서 측정된 값을 1로 하여 각 군에서의 값의 평균값과 표준오차 값을 상단의 그래프로 나타내었다.

- [371] 도 17에 나타난 바와 같이, 각 군에서 miR21에 의해 하향조절되는 유전자 중 하나인 PDCD4 단백질의 발현량 변화를 확인하였다. Anti-miR21가 도입되지 않은 pri-miHPRT 군은 PDCD4 발현량이 Control 군과 유의한 차이가 없음을 확인하였고 pri-miHPRT Anti-miR21 군은 PDCD4의 발현량이 Control 군에 비해 유의하게 증가하여 miR21 저해를 통해 PDCD4 발현을 증가시킴을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 스템-루프 구조를 포함하고,
 상기 스템-루프 구조는 33 내지 38bp 길이의 이중가닥
 폴리뉴클레오타이드를 갖는 스템 구조 및 3 내지 25nt 길이의 단일가닥
 폴리뉴클레오타이드를 갖는 루프 구조를 포함하고,
 상기 스템 구조는 제1 타겟 유전자와 상보적인 서열을 포함하는 20 내지
 25nt 길이의 안티센스 영역을 포함하는 구간과, 상기 안티센스 영역을
 포함하는 구간에 상보적으로 결합할 수 있는 20 내지 25nt 길이의 센스
 영역을 포함하는 구간을 포함하고,
 상기 스템 구조는 스템 구조의 5' 말단으로부터 13nt 이후에 상기 센스
 영역을 포함하고,
 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단에서 연장된 10
 내지 30nt 길이의 폴리뉴클레오타이드 및 상기 스템 구조에서 안티센스
 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 10 내지 30nt 길이의
 폴리뉴클레오타이드를 포함하고,
 하기 (1) 내지 (4)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 특징을
 포함하는, 핵산 구조체:
 (1) 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단에서 연장된
 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을
 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는
 이들 모두는 ASO(antisense oligonucleotide) 서열 또는 anti-miRNA 서열을
 포함;
 (2) 상기 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 3' 말단에서
 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들 모두는 화학적으로 변형된
 뉴클레오타이드를 포함;
 (3) 상기 스템 구조는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함; 및
 (4) 상기 루프 구조는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5'
 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열과 상기 스템 구조에서
 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단에서 연장된
 폴리뉴클레오타이드 서열은 서로 상보적으로 결합하지 않는 것인, 핵산
 구조체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템
 구조의 5' 말단으로부터 14, 17, 18, 20, 및 27번째로 이루어진 군으로부터
 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형(chemical modification)된
 뉴클레오타이드를 포함하고,
 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5'

말단으로부터 15, 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, 핵산 구조체.

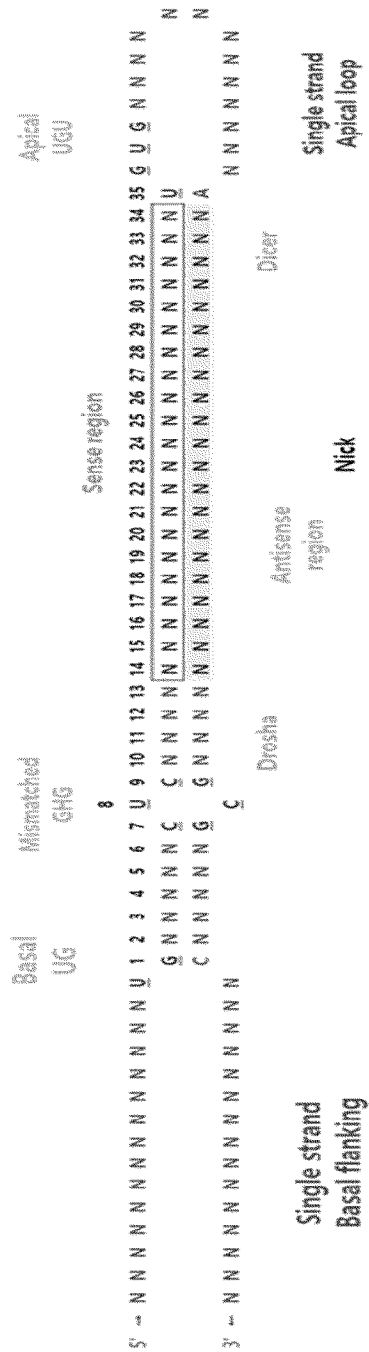
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 14번째 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 14번째 위치에 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 하기 (1) 내지 (3)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인, 핵산 구조체:
- (1) 센스 영역을 포함하는 구간에서, 스템 구조의 5' 말단으로부터 14번째 위치에 존재하는 뉴클레오타이드,
 - (2) 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 스템 구조의 5' 말단으로부터 15번째 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치, 및
 - (3) 안티센스 영역을 포함하는 구간에서, 스템 구조의 5' 말단으로부터 16번째 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치.
- [청구항 7] 제3항에 있어서, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 1 내지 13, 15, 16, 19, 21 내지 26, 및 28 내지 35번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에, 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 8] 제3항에 있어서, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 1 내지 14, 17, 18, 20, 22, 및 27 내지 35번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에, 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 센스 영역의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 안티센스 영역의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 상기 루프 구조로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 서열은 C (사이티딘) 및 A (아데닌) 서열에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 센스 영역의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 안티센스 영역의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 상기 루프 구조는 C (사이티딘) 및 A (아데닌) 서열에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인,

핵산 구조체.

- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 센스 영역의 5' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 안티센스 영역의 3' 말단에서 연장된 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 상기 루프 구조로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 서열은 C (사이티딘) 및 A (아데닌) 서열에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 14, 17, 18, 20, 및 27번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 화학적으로 변형(chemical modification)된 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간은 스템 구조의 5' 말단으로부터 15, 16, 19, 21, 및 23 내지 26번째로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, 핵산 구조체.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드는, 뉴클레오타이드에 포함되는 당의 구조가 LNA(Locked Nucleic Acid)로 변형되거나, 또는, 뉴클레오타이드에 포함되는 당의 잔기가 2'-O-메틸, 2'-메톡시에톡시, 2'-플루오로, 2'-알릴, 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸], 4'-티오, 4'-CH₂-O-2'-브리지(bridge), 4'-(CH₂)₂-O-2'-브리지, 2'-아미노, 및 2'-O-(N-메틸카르바메이트)(methlycarbamate)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1종 이상으로 변형된 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 13] 제1항에 있어서, DGCR8 및 드로샤의 복합체에 의해 내생적으로 절단될 수 있는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 복합체 및 다이서에 의해 순차적으로 절단될 수 있는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 제1 타겟 유전자의 발현을 조절하는, 핵산 구조체.
- [청구항 16] 제1항에 있어서, 상기 제1 타겟 유전자는 단백질 코딩 유전자, 원종양유전자, 종양유전자, 종양 억제인자 유전자, 및 세포 신호전달 유전자에서 선택되는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 17] 제1항에 있어서, 상기 ASO 서열은 제2 타겟 유전자의 mRNA 서열과 서로 상보적으로 결합하여, 제2 타겟 유전자의 mRNA를 분해시키는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 18] 제1항에 있어서, 제2 타겟 유전자의 선택적 스플라이싱을 유도하는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 19] 제1항에 있어서, 상기 anti-miRNA 서열은 제2 타겟 유전자의 miRNA 서열과 서로 상보적으로 결합하여 제2 타겟 유전자의 miRNA의 작용을

- 억제하는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 20] 제1항에 있어서, 상기 ASO 서열 또는 상기 anti-miRNA 서열은, 상기 스템 구조에서 센스 영역을 포함하는 구간의 5' 말단으로부터 7nt 이후, 또는 상기 스템 구조에서 안티센스 영역을 포함하는 구간의 3' 말단으로부터 7nt 이후에 도입되는 것인, 핵산 구조체.
- [청구항 21] 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 핵산 구조체를 포함하는, 유전자 발현 억제용 조성물.
- [청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 유전자는 단백질 코딩 유전자, 원종양유전자, 종양유전자, 종양 억제인자 유전자, 및 세포 신호전달 유전자에서 선택되는 것인, 유전자 발현 억제용 조성물.
- [청구항 23] 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 핵산 구조체를 포함하는, 암, 증식성 질환, 소화기 질환, 신장 질환, 신경 질환, 정신 질환, 혈액 및 종양 질환, 심혈관 질환, 호흡기 질환, 내분비 질환, 감염 질환, 근골격 질환, 산부인과 질환, 비뇨생식기 질환, 피부 질환, 및 안과 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[51a]



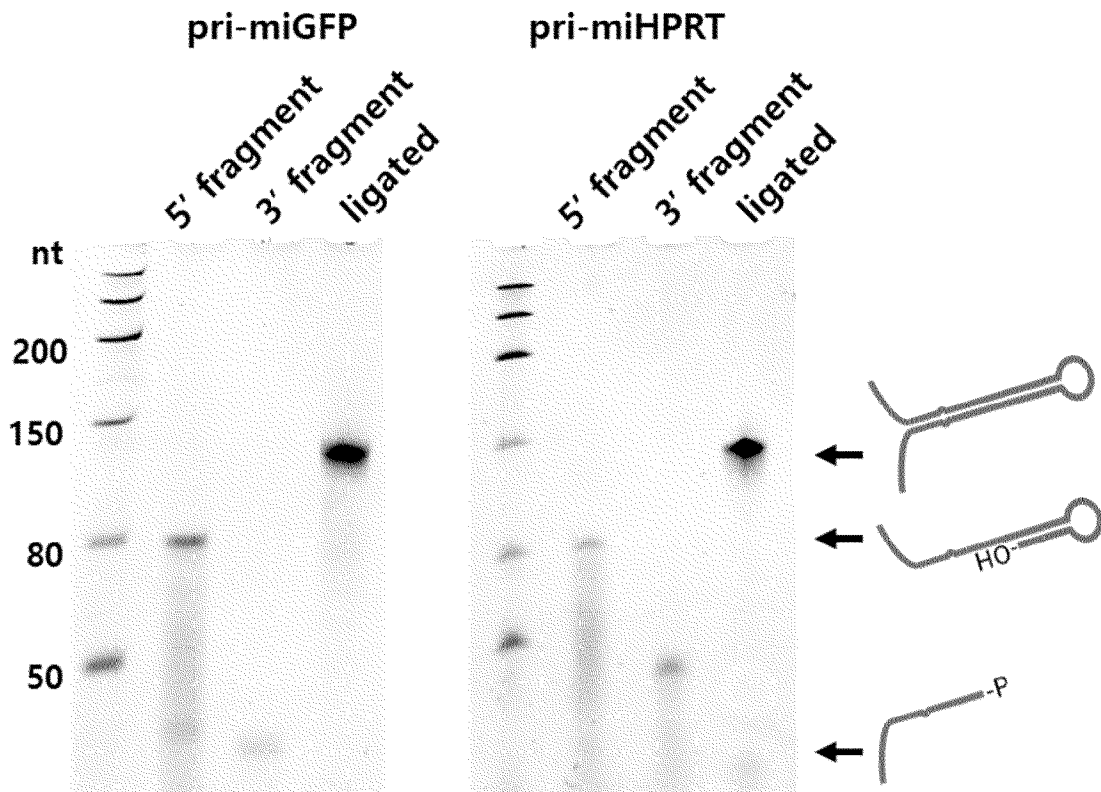
8

5' → C C A U U C C C A G C C C U U 1 2 3 4 5 6 7 U 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 G U G G A C A
G C G C U A C C C A C G C A A G C U G A C C C U G A G U U C A U G
C G C G A U G G U G C C G U C G A C U G G A C U C A A G U A G
3' ← G U G A U A U C C C U A A C U C G A G G A A U

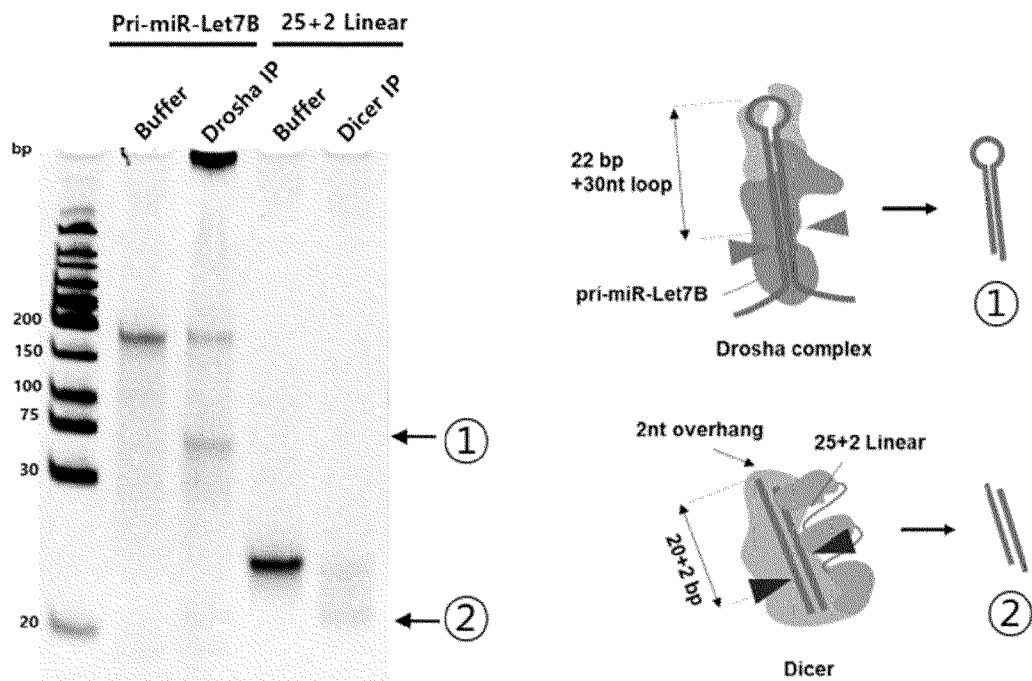
8

5' → C C A U U C C C A G C C C U U 1 2 3 4 5 6 7 U 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 G U G G A C A
G C G C U A C C C A U G C C A G A C U U G U U G G A U U G A A U G
C G C G A U G G U A C G G U C U G A A A C A A C C U A A C U A G
3' ← G U G A U A U C C C U A A C U C G A G G A A U

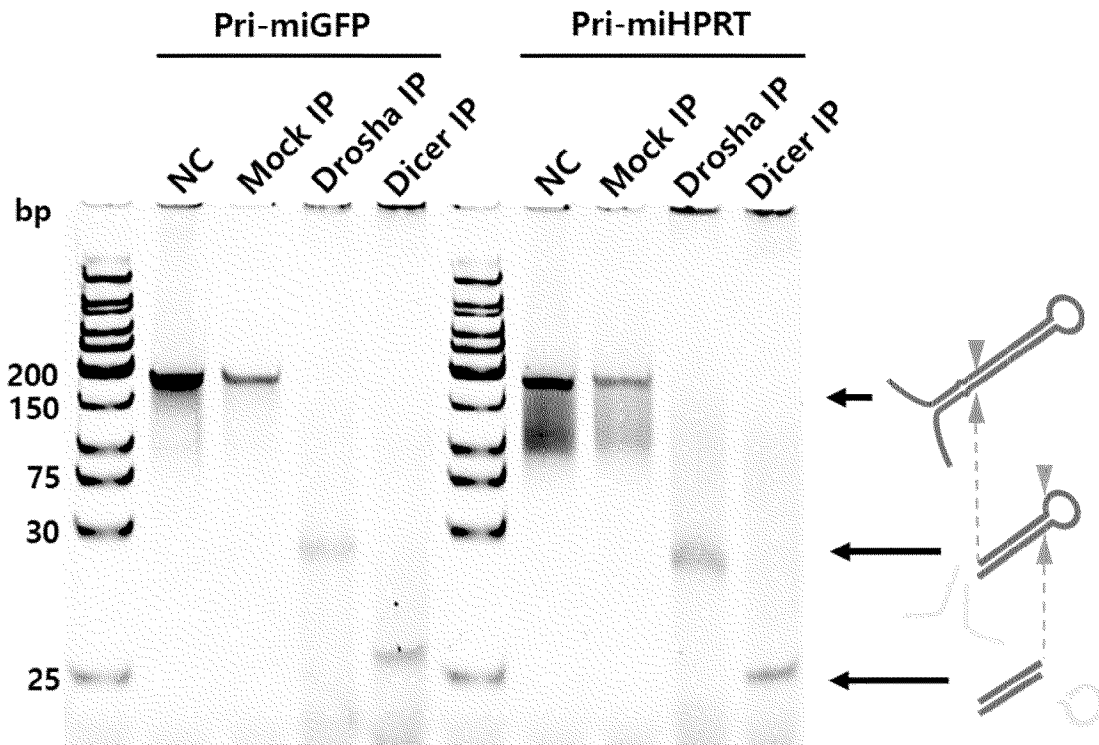
[도1c]



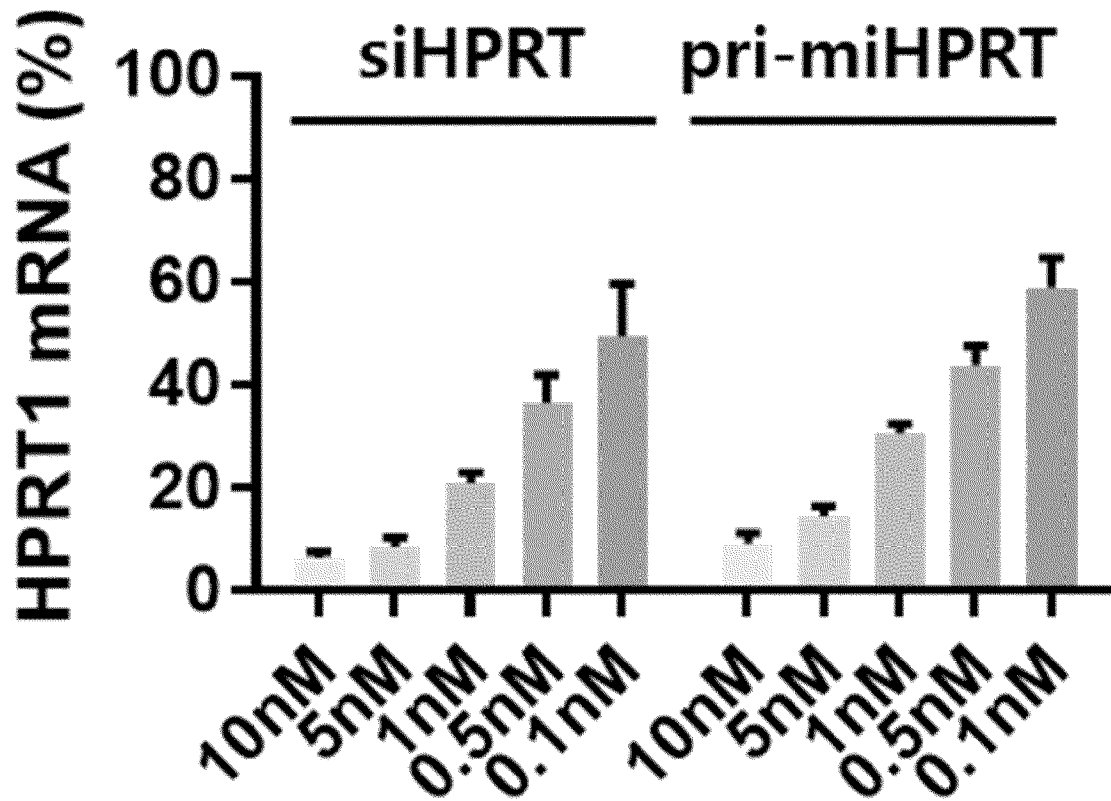
[도2a]



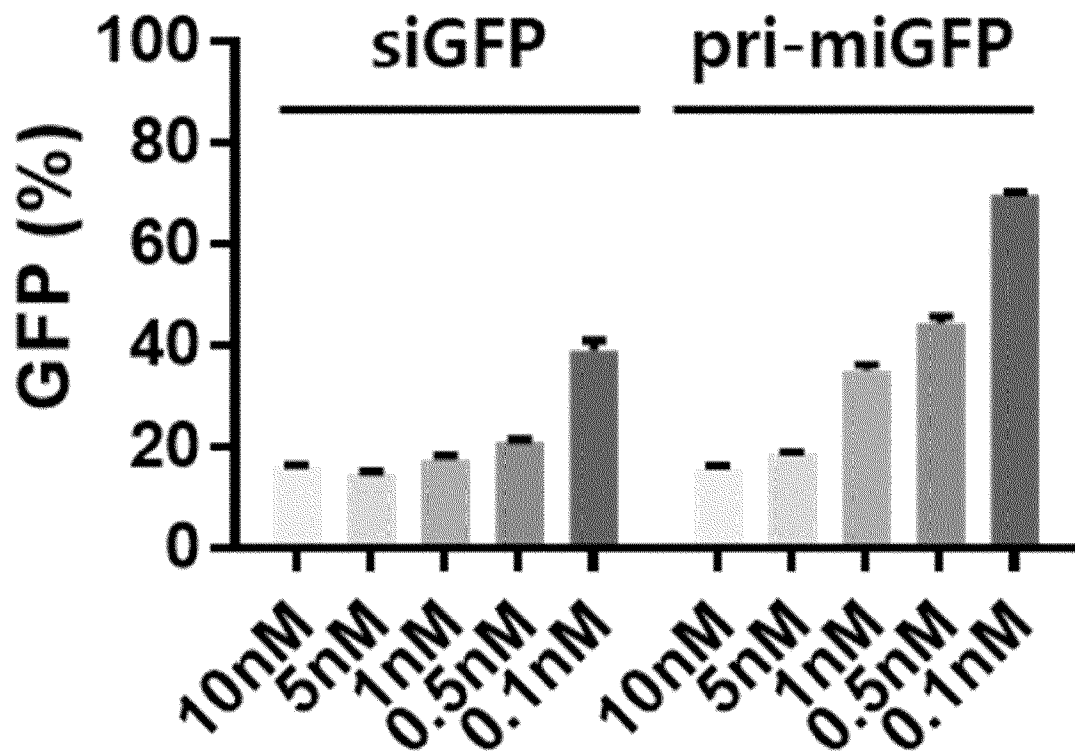
[도2c]



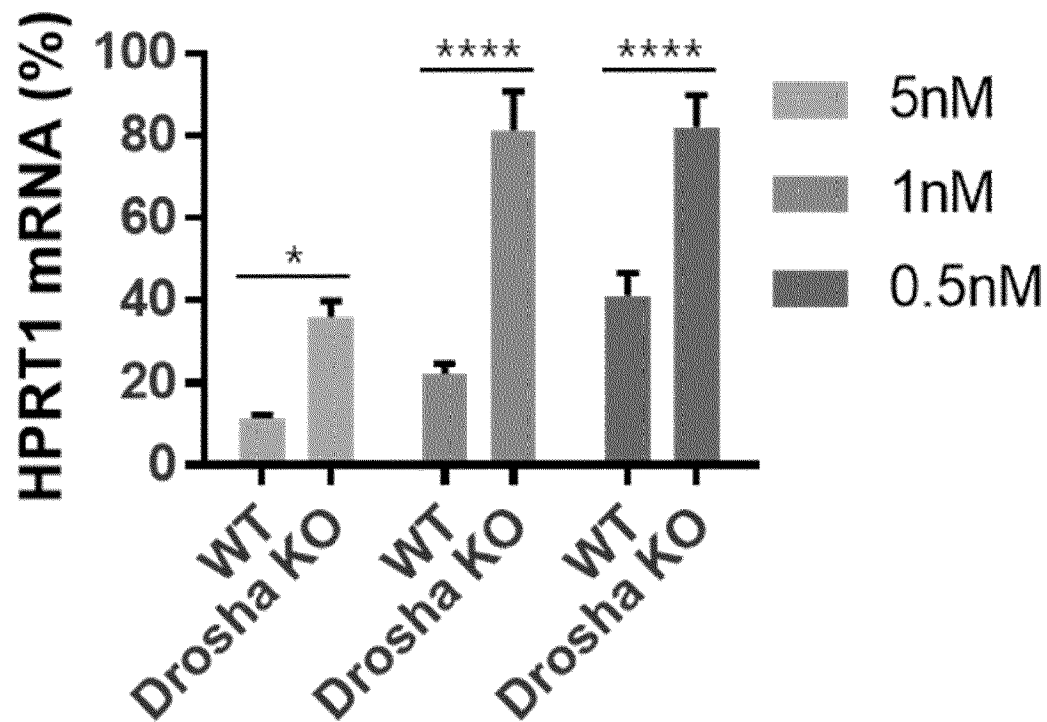
[도3]



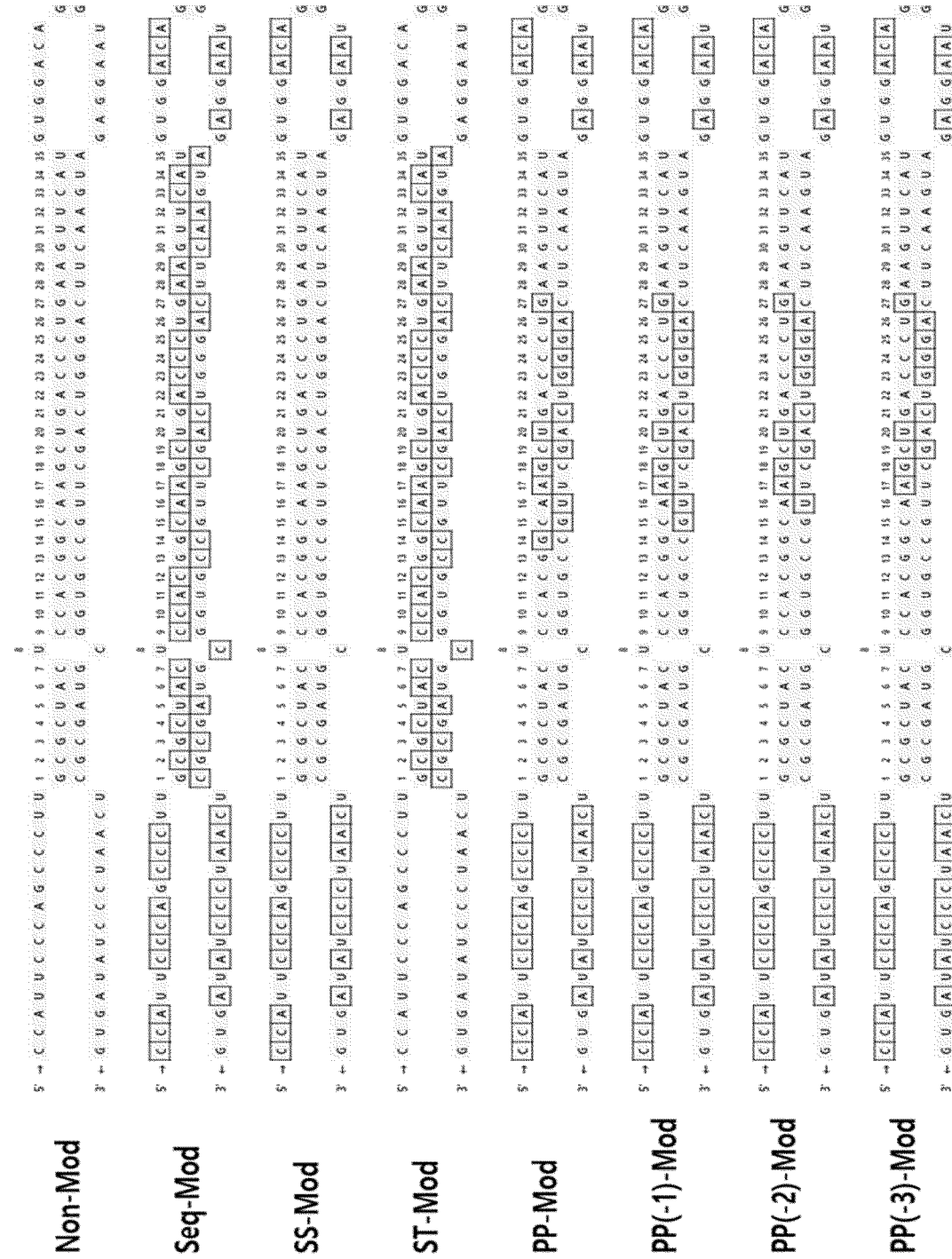
[도4]



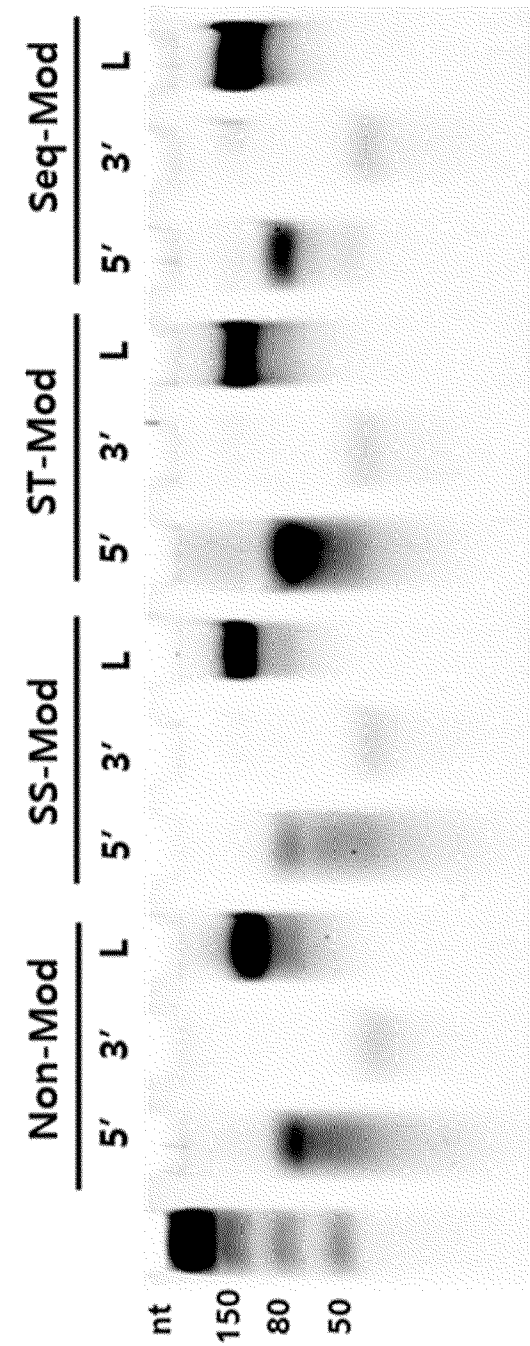
[도5]



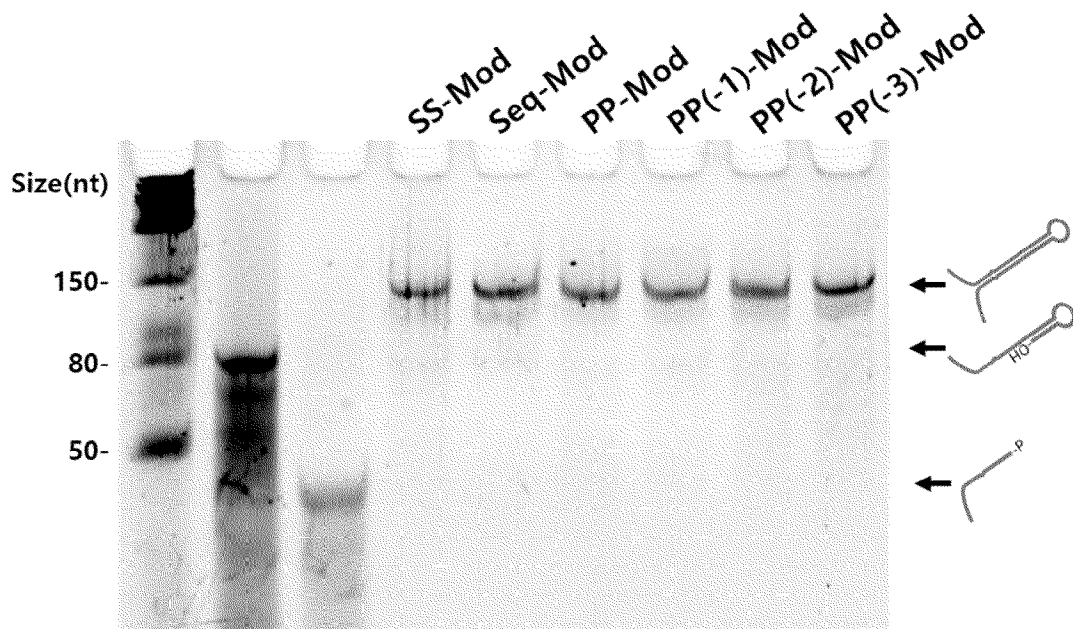
[도6]



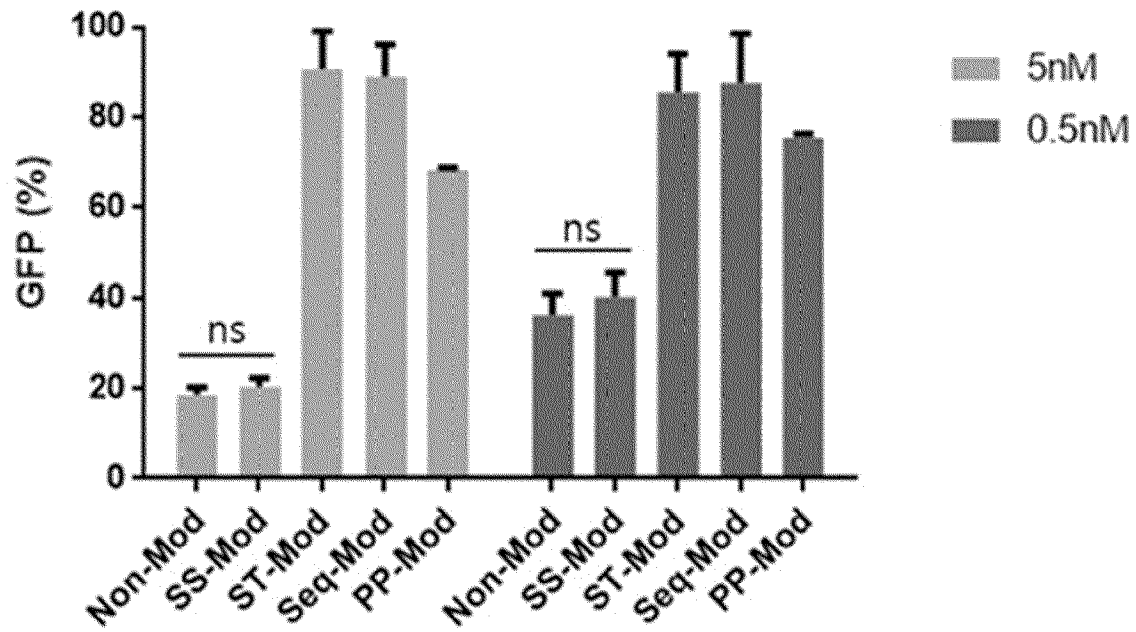
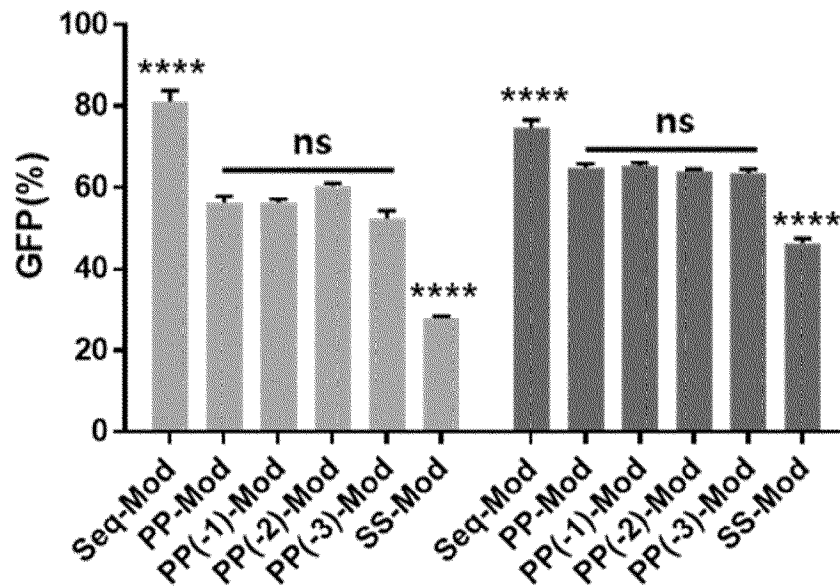
[도7a]



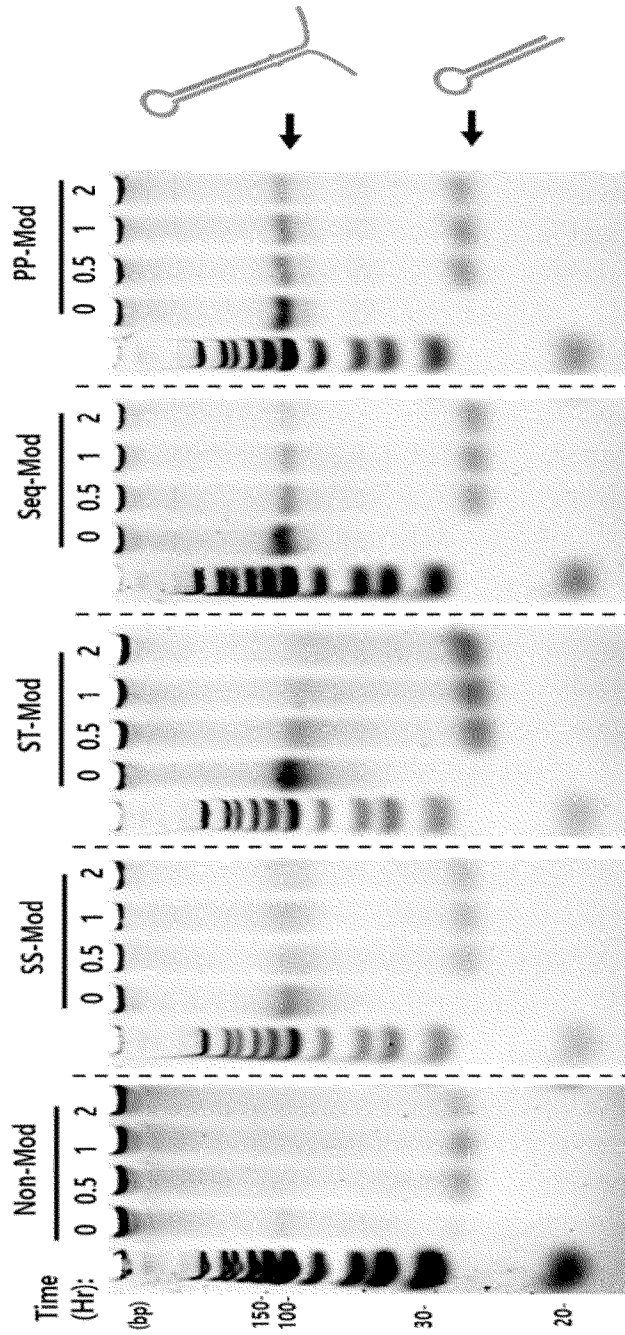
[도7b]



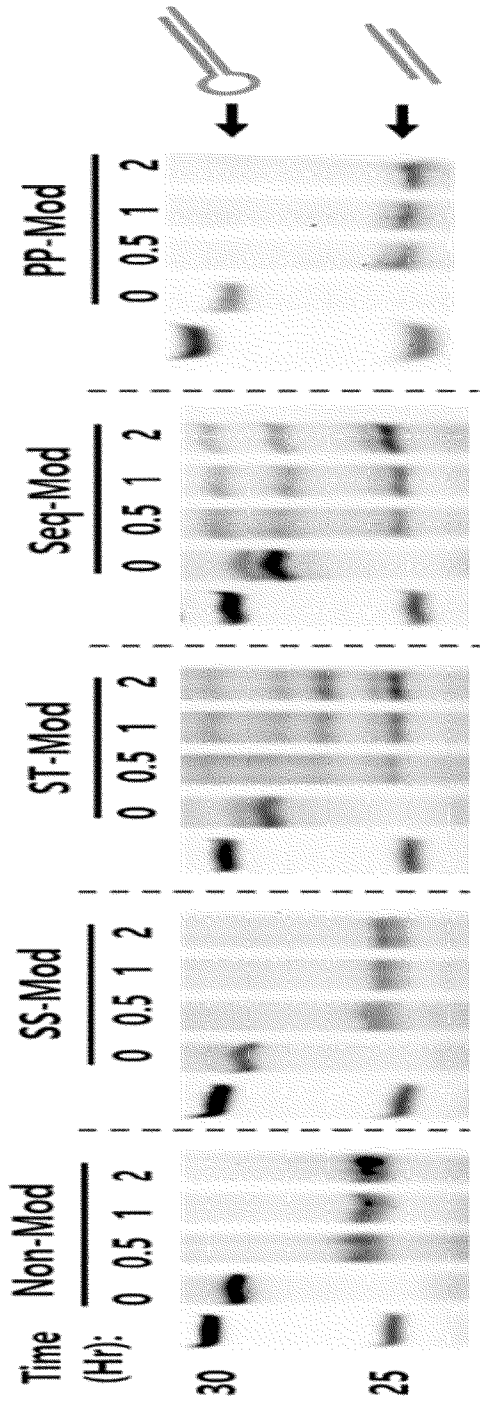
[도8]



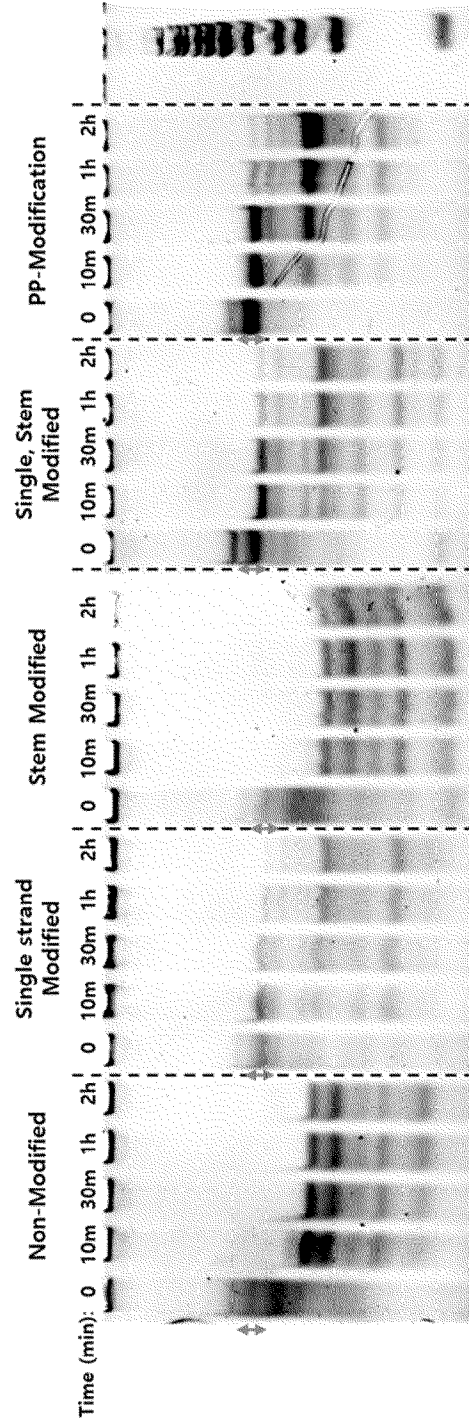
[도9a]



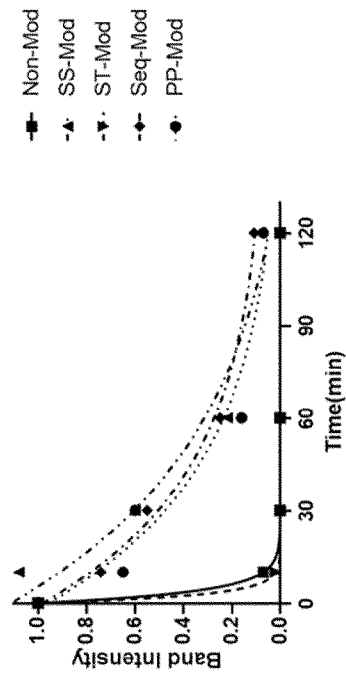
[도9b]



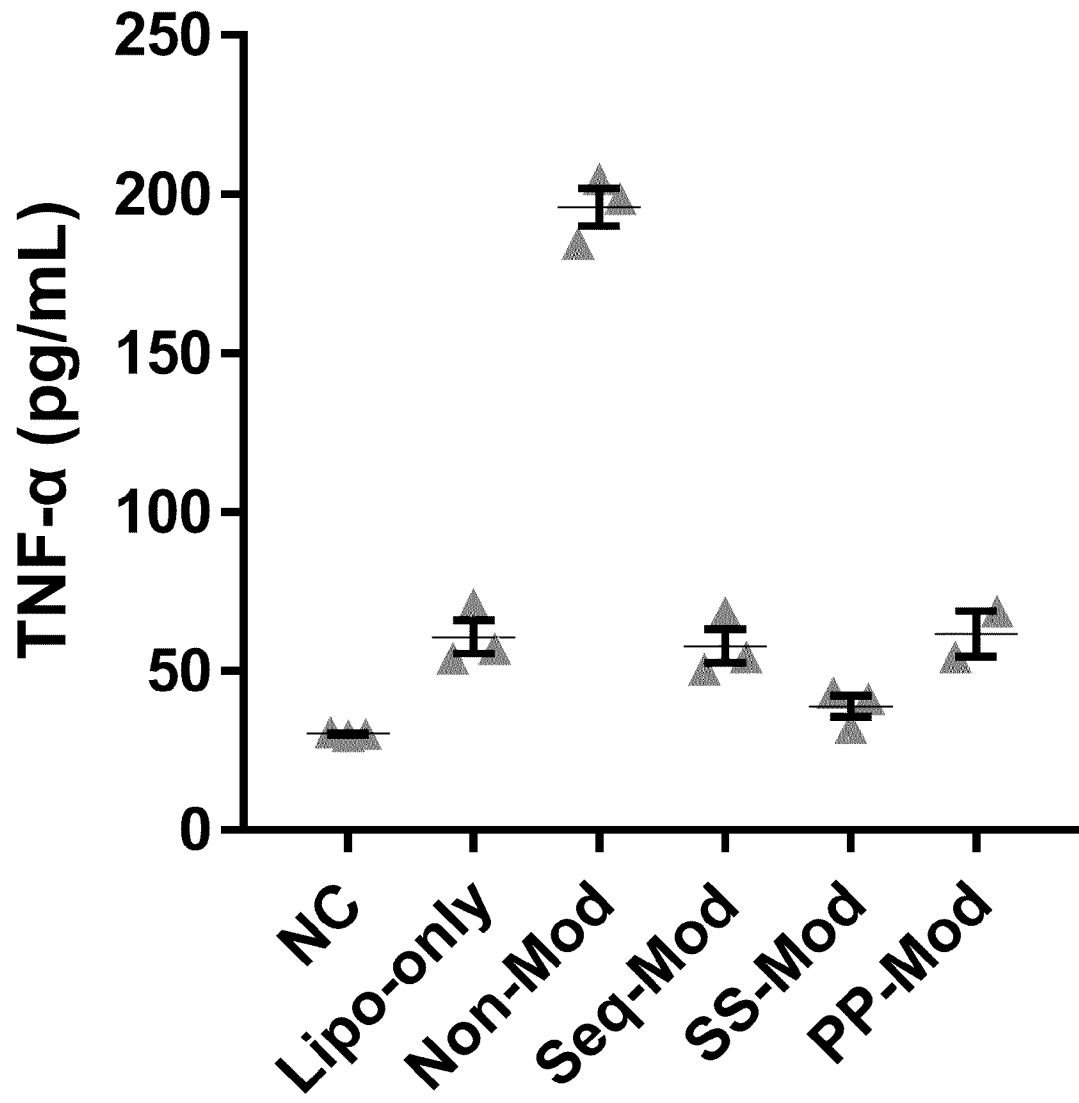
[도9c]



Serum stability



[도9d]



[도10a]

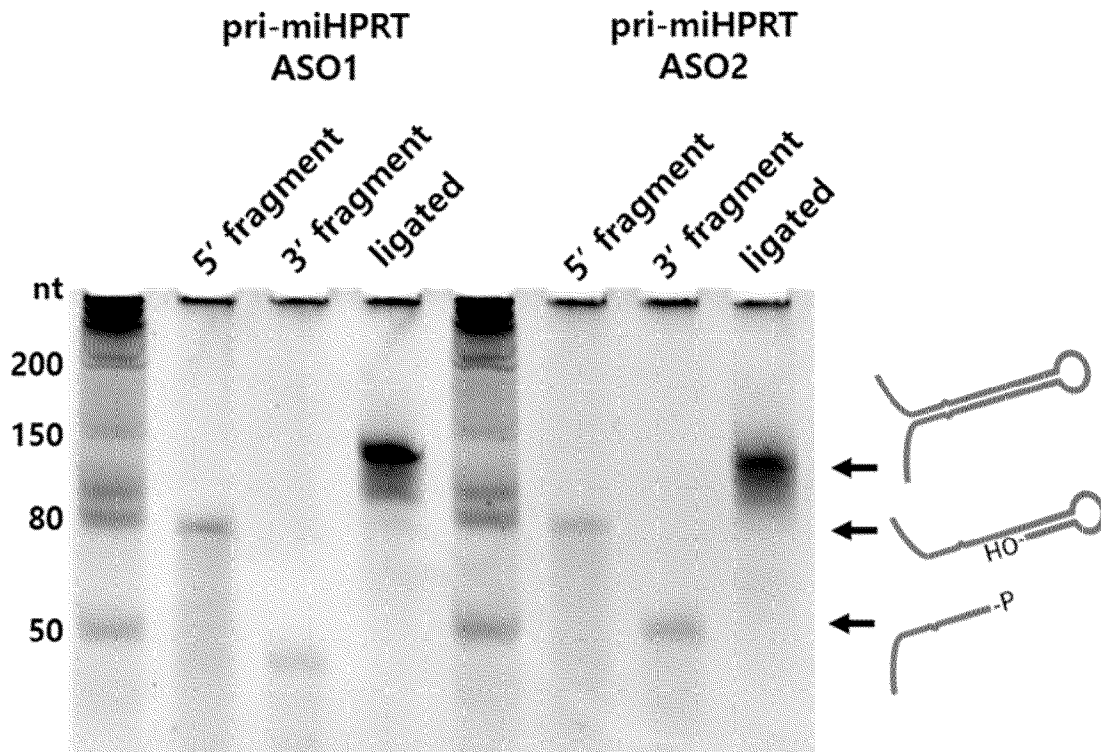
Pri-miHPRT ASO1

5' C C A U U C C C A G C C C U U
 G C G C U A C C C A U G C C A G A C U U U G U U G G A U U U G A A U G
 C G C G A U G G G U A C G G U C U G A A C A A C C U A A C U U A G A G G A A U G
 3' G G T C G T A A T A C T T T C A C T C U
 20 # 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

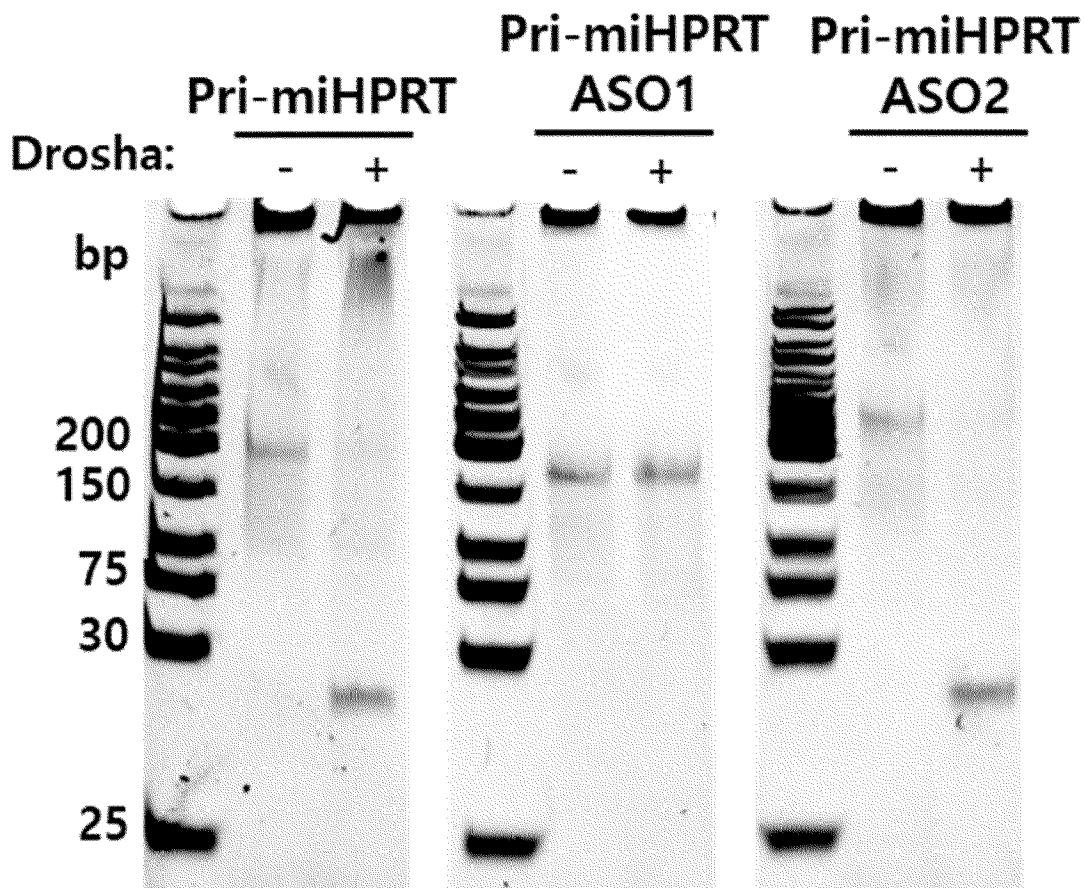
Pri-miHPRT ASO2

5' C C A U U C C C A G C C C U U
 G C G C U A C C C A U G C C A G A C U U U G U U G G A U U U G A A U G
 C G C G A U G G G U A C G G U C U G A A C A A C C U A A C U U A G A G G A A U G
 3' G G T C G T A A T A C T T T C A C T C U
 25 24 23 22 21 20 # 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

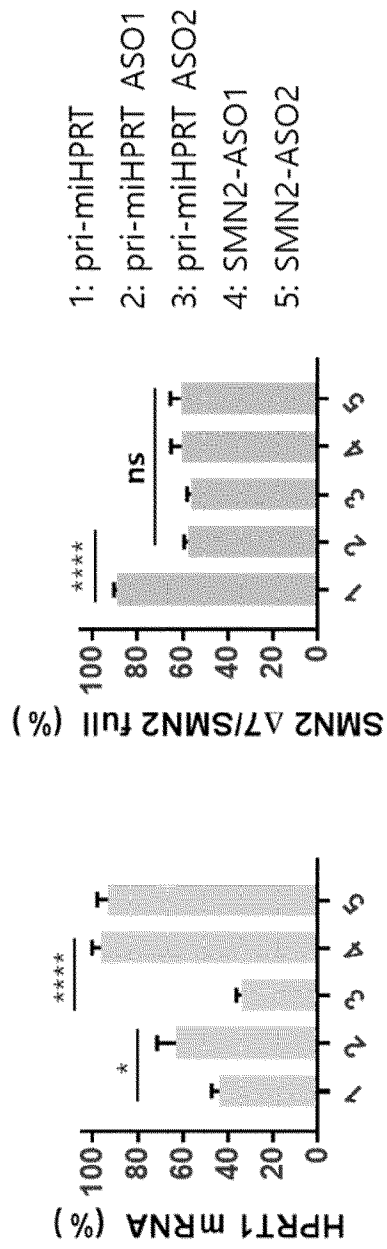
[도10b]



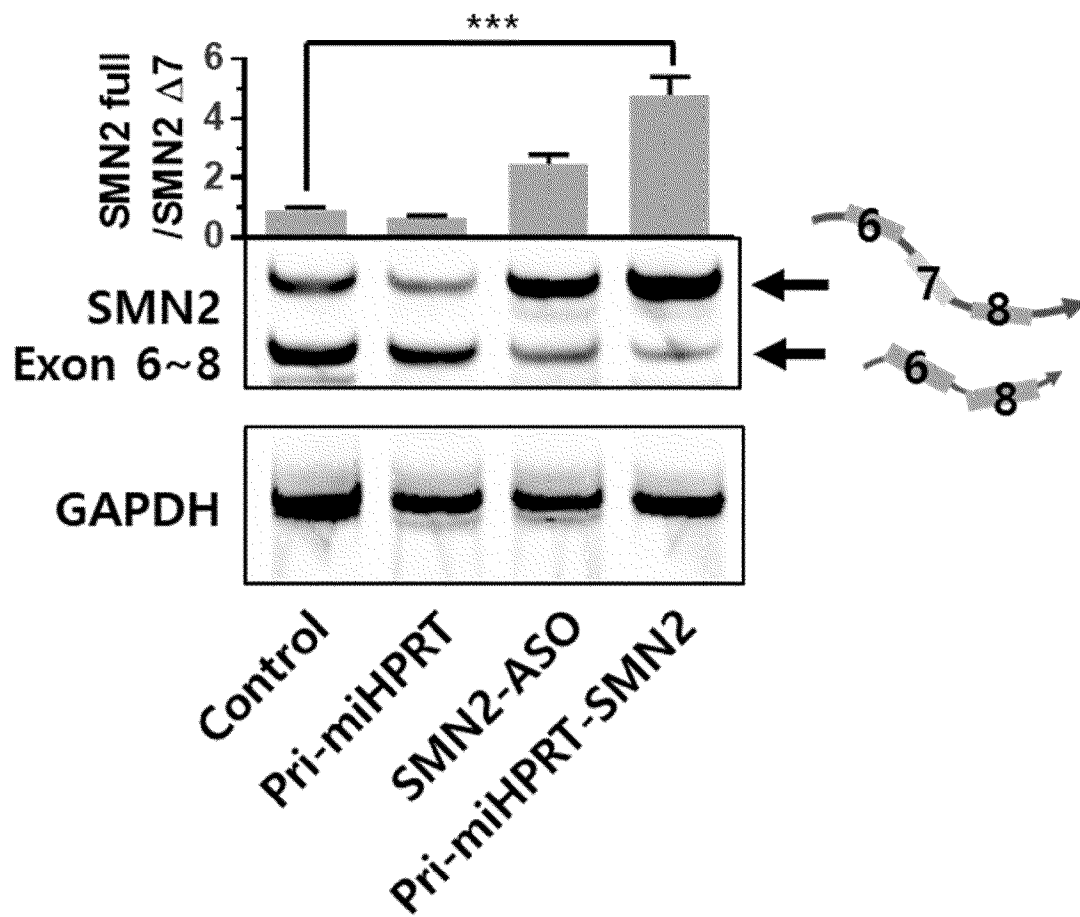
[도11]



[도12]



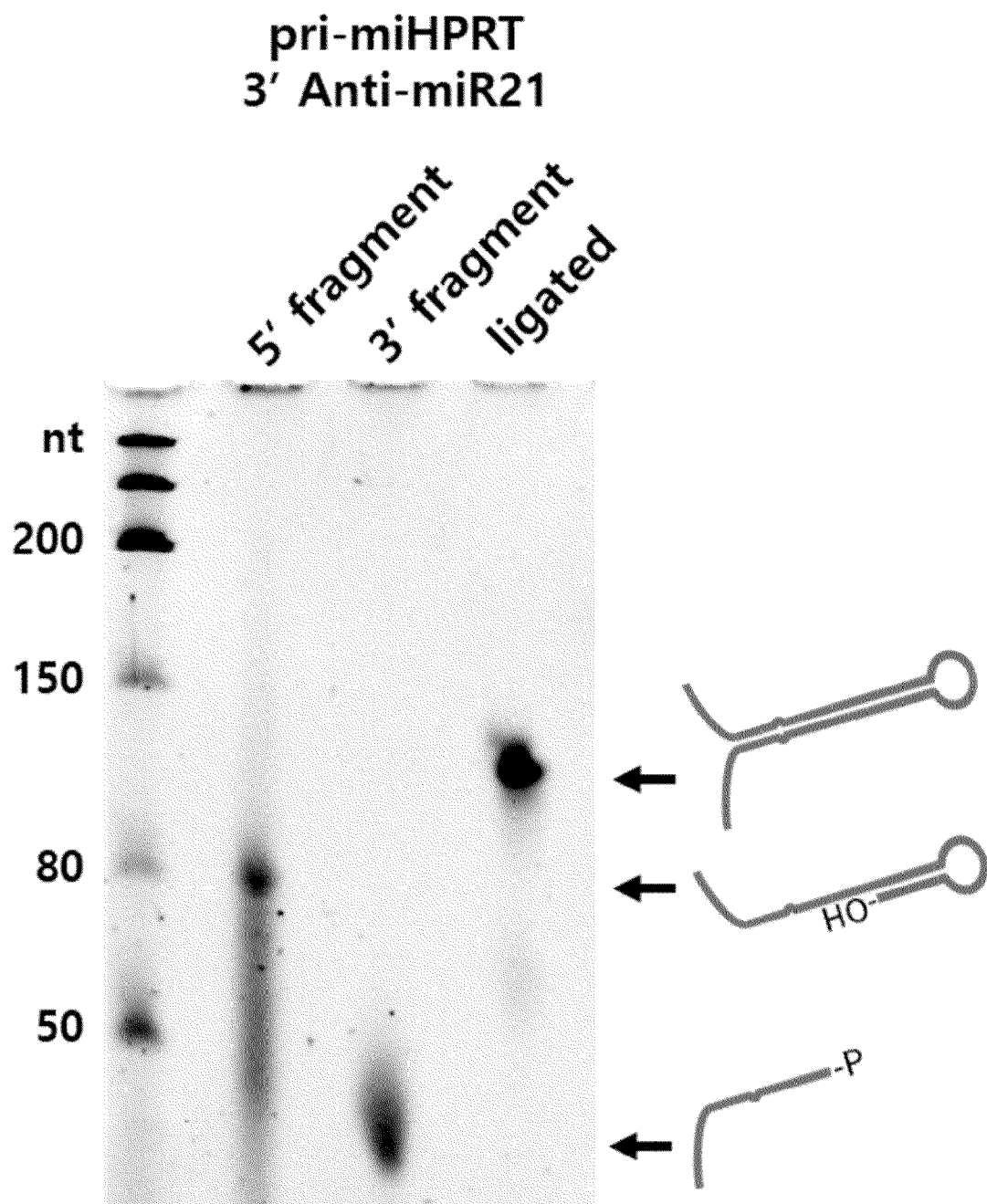
[도13]



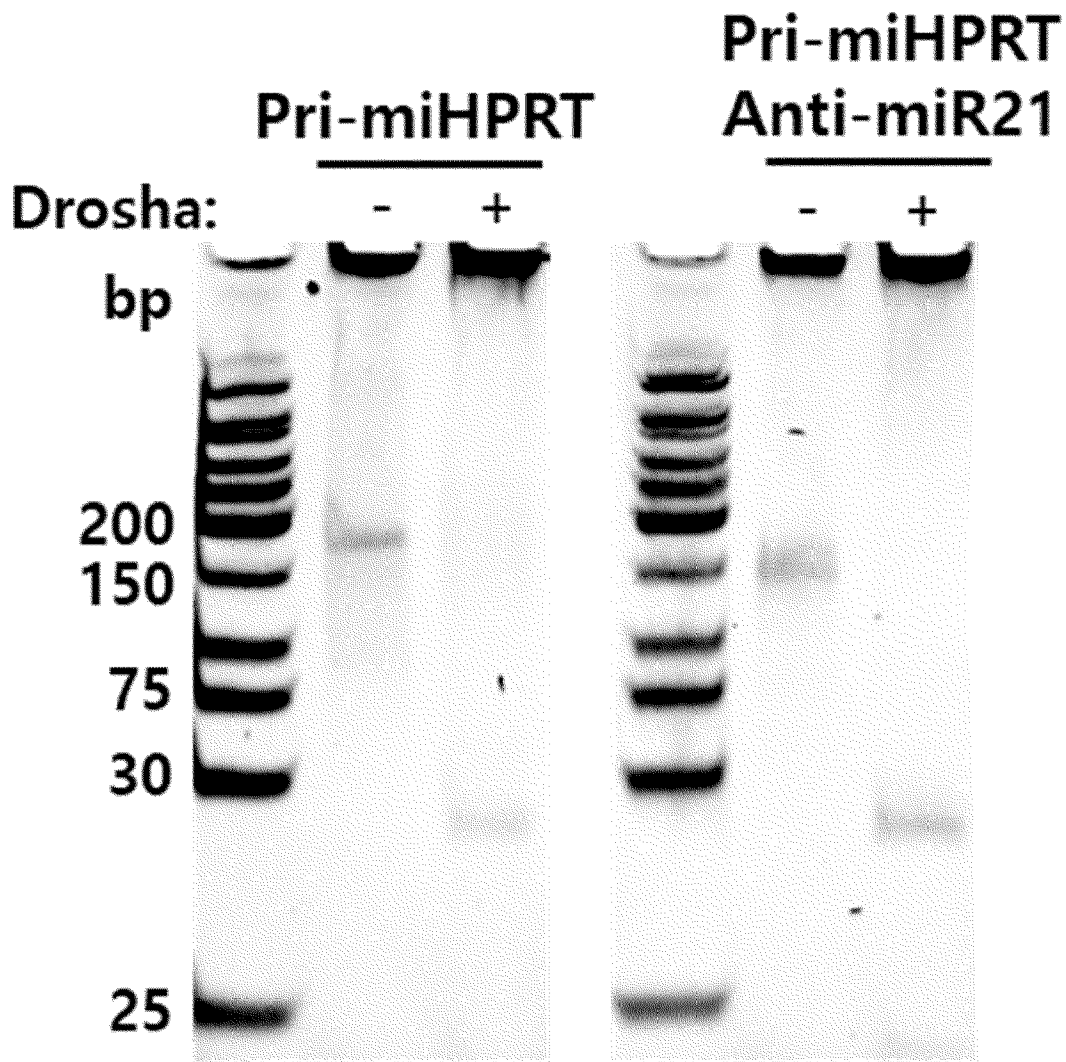
[도 14a]

5' C C A U U C C C A G C C C U U	U	G U G G A C A	G
	G C G C U A C	C C A U G C C A G A C U U U G U U G G A U U U G A A U	G
	C G C G A U G	G G U A C G G U C U G A A C A C C U A A C U U A	G
3' T C G A A T A G C C U A A C U	C	G A G G A A U	
15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1			

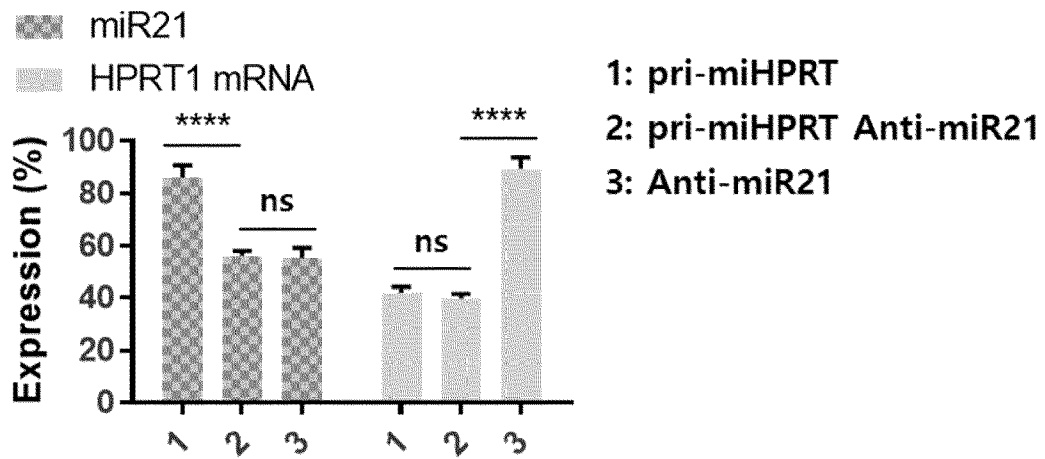
[도14b]



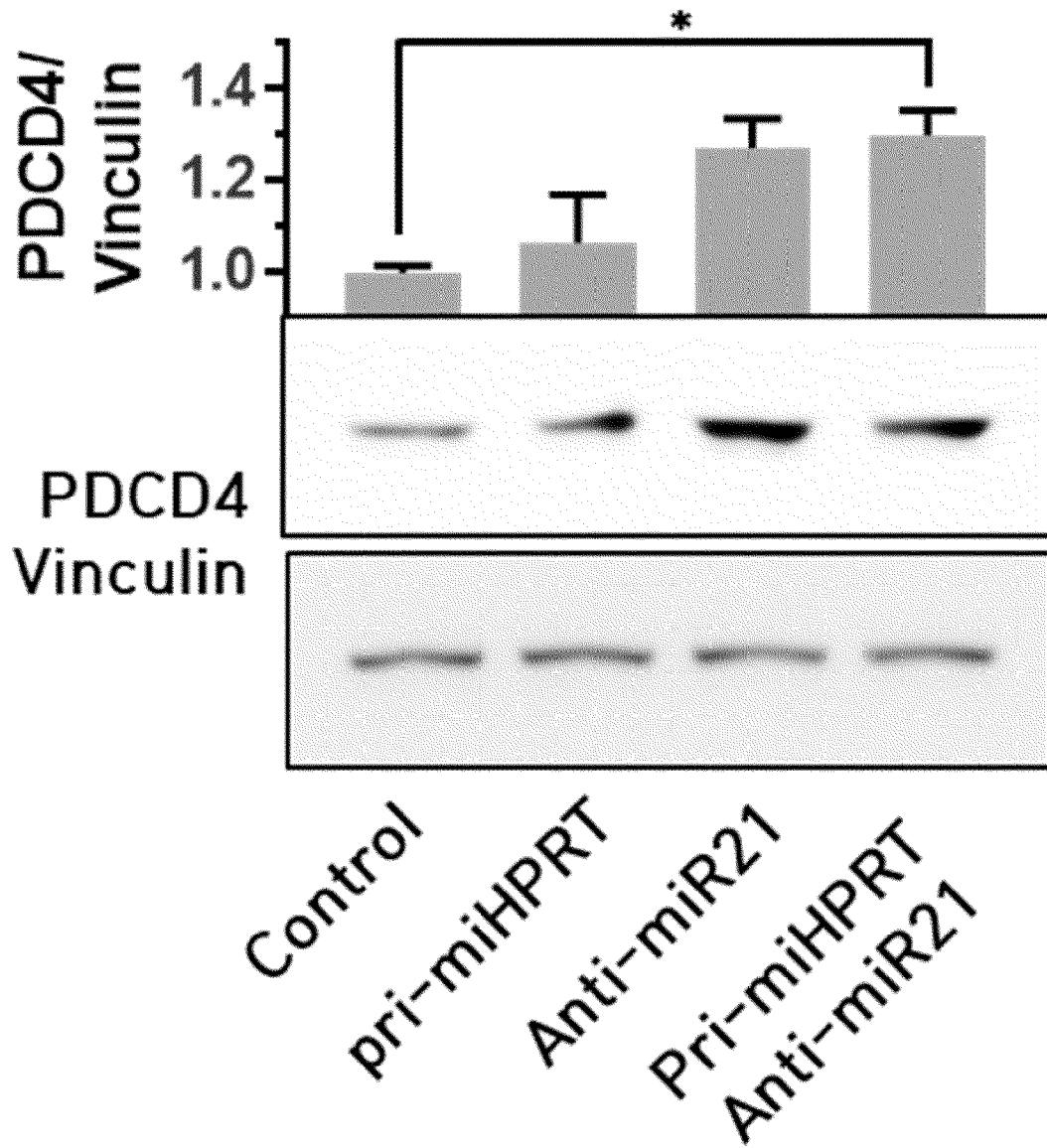
[도15]



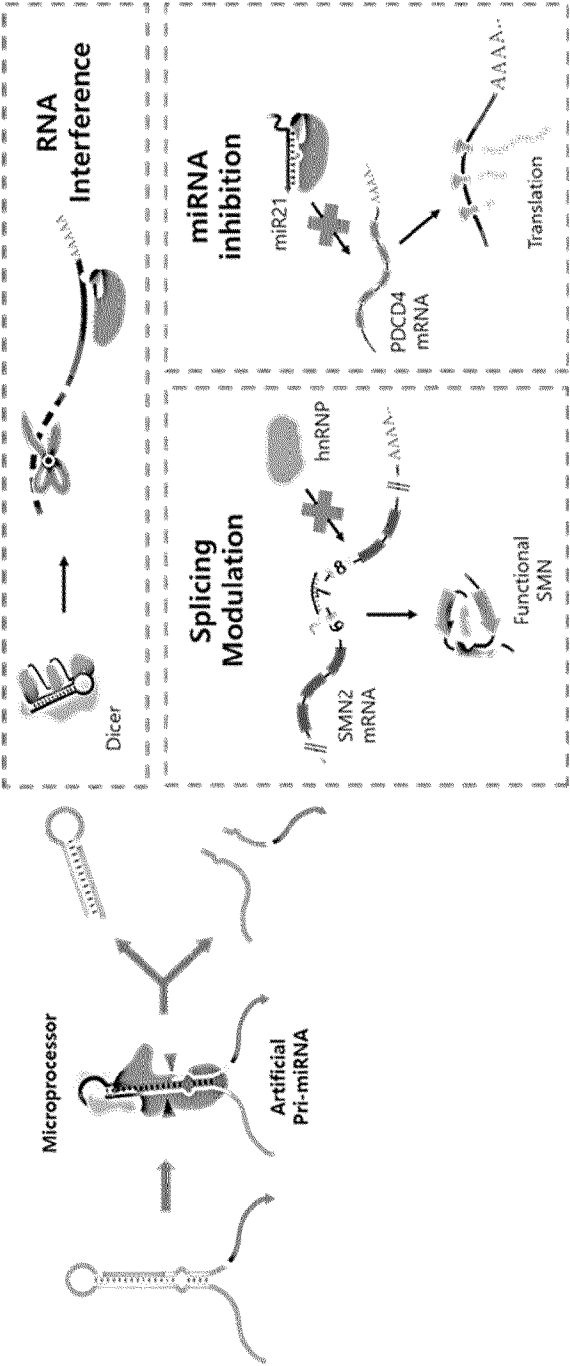
[도16]



[도17]



[도18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/005736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/10(2006.01)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(2010.01); C12N 15/82(2006.01) 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: 스템-루프(stem-loop), 센스(sense), 안티센스(antisense), 화학적 변형(chemical modification), ASO(antisense oligonucleotide), 마이크로 RNA(micro RNA)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2017-0082534 A (VOYAGER THERAPEUTICS, INC.) 14 July 2017 (2017-07-14) See claims 1 and 15-18; paragraphs [0019], [0050]-[0052], [0139], [0151]-[0155] and [0348]-[0354]; and figure 1.	1-2,13-16,21-23
Y		9-10,12
A		3-8,11,17-20
Y	CHIU, Y.-L. et al. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. RNA. 2003, vol. 9, pp. 103 4-1048. See abstract; page 1036, right column; and figure 3.	9-10,12
A	BOFILL-DE ROS, X. et al. Structural differences between Pri-miRNA paralogs promote alternative drosha cleavage and expand target repertoires. Cell Reports. 08 January 2019, vol. 26, pp. 447-459. See entire document.	1-23
A	WO 2019-161449 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC et al.) 29 August 2019 (2019-08-29) See entire document.	1-23
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 25 July 2022		Date of mailing of the international search report 26 July 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/005736**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STENVANG, J. et al. Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. Silence. 2012, vol. 3, pp. 1-17. See entire document.	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/005736

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/005736

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0082534	A	14 July 2017	AU	2015-346164	A1	18 May 2017
				AU	2015-346164	B2	30 January 2020
				AU	2020-202530	A1	07 May 2020
				AU	2020-202530	B2	08 July 2021
				AU	2021-245194	A1	04 November 2021
				BR	112017010088	A2	17 September 2019
				CA	2975583	A1	19 May 2016
				CN	107207556	A	26 September 2017
				CN	107207556	B	08 December 2020
				CN	112375760	A	19 February 2021
				CN	112410338	A	26 February 2021
				CN	112410339	A	26 February 2021
				DK	3218386	T3	07 June 2021
				EP	3218386	A1	20 September 2017
				EP	3218386	B1	17 March 2021
				EP	3907287	A1	10 November 2021
				ES	2878451	T3	18 November 2021
				HK	1244284	A1	03 August 2018
				IL	251910	A	29 June 2017
				IL	251910	B	31 August 2021
				IL	284949	A	31 August 2021
				JP	2017-533715	A	16 November 2017
				JP	2021-100435	A	08 July 2021
				JP	6863891	B2	21 April 2021
				US	10570395	B2	25 February 2020
				US	11198873	B2	14 December 2021
				US	2017-0314028	A1	02 November 2017
				US	2020-0199597	A1	25 June 2020
				WO	2016-077689	A1	19 May 2016
WO	2019-161449	A1	29 August 2019	AR	115258	A1	16 December 2020
				AU	2019-224179	A1	10 September 2020
				BR	112020016995	A2	29 December 2020
				CA	3091625	A1	29 August 2019
				CN	112204141	A	08 January 2021
				EP	3755801	A1	30 December 2020
				US	2021-0254058	A1	19 August 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/10(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/113(2010.01); C12N 15/82(2006.01) 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: 스템-루프(stem-loop), 센스(sense), 안티 센스(antisense), 화학적 변형 (chemical modification), ASO(antisense oligonucleotide), 마이크로 RNA(micro RNA)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2017-0082534 A (보이저 테라퓨틱스, 인크.) 2017.07.14 청구항 1, 15-18; 단락 [0019], [0050]-[0052], [0139], [0151]-[0155], [0348]-[0354]; 도면 1	1-2,13-16,21-23
Y		9-10,12
A		3-8,11,17-20
Y	CHIU, Y.-L. 등, 'siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis', RNA, 2003, 9권, 1034-1048 페이지 초록; 페이지 1036, 우컬럼; 도면 3	9-10,12
A	BOFILL-DE ROS, X. 등, 'Structural differences between Pri-miRNA paralogs promote alternative drosha cleavage and expand target repertoires', Cell Reports, 2019.01.08, 26권, 447-459 페이지 전체 문헌	1-23
A	WO 2019-161449 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC 등) 2019.08.29 전체 문헌	1-23
☒ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년07월25일(25.07.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년07월26일(26.07.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	STENVANG, J. 등, 'Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides', Silence, 2012, 3권, 1-17 페이지 전체 문헌	1-23

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. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

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

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0082534 A	2017/07/14	AU 2015-346164 A1	2017/05/18
		AU 2015-346164 B2	2020/01/30
		AU 2020-202530 A1	2020/05/07
		AU 2020-202530 B2	2021/07/08
		AU 2021-245194 A1	2021/11/04
		BR 112017010088 A2	2019/09/17
		CA 2975583 A1	2016/05/19
		CN 107207556 A	2017/09/26
		CN 107207556 B	2020/12/08
		CN 112375760 A	2021/02/19
		CN 112410338 A	2021/02/26
		CN 112410339 A	2021/02/26
		DK 3218386 T3	2021/06/07
		EP 3218386 A1	2017/09/20
		EP 3218386 B1	2021/03/17
		EP 3907287 A1	2021/11/10
		ES 2878451 T3	2021/11/18
		HK 1244284 A1	2018/08/03
		IL 251910 A	2017/06/29
		IL 251910 B	2021/08/31
		IL 284949 A	2021/08/31
		JP 2017-533715 A	2017/11/16
		JP 2021-100435 A	2021/07/08
		JP 6863891 B2	2021/04/21
		US 10570395 B2	2020/02/25
		US 11198873 B2	2021/12/14
		US 2017-0314028 A1	2017/11/02
		US 2020-0199597 A1	2020/06/25
		WO 2016-077689 A1	2016/05/19
WO 2019-161449 A1	2019/08/29	AR 115258 A1	2020/12/16
		AU 2019-224179 A1	2020/09/10
		BR 112020016995 A2	2020/12/29
		CA 3091625 A1	2019/08/29
		CN 112204141 A	2021/01/08
		EP 3755801 A1	2020/12/30
		US 2021-0254058 A1	2021/08/19