

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 1월 14일 (14.01.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/006846 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/113 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/006418
- (22) 국제출원일: 2015년 6월 24일 (24.06.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0086224 2014년 7월 9일 (09.07.2014) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-742 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 440-746 경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교내, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 신찬석 (SHIN, Chanseok); 151-741 서울시 관악구 관악로 1, 서울대학교교수아파트 122D-302, Seoul (KR). 이동기 (LEE, Dong-ki); 137-921 서울시 서초구 서초중앙로 188, C 동 2010 호, Seoul (KR). 박준현

(PARK, June Hyun); 151-897 서울시 관악구 신림로 23길 65, 205 호, Seoul (KR). 홍선우 (HONG, Sun Woo); 441-842 경기도 수원시 권선구 금곡로 45, 211 동 1905호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 302-868 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

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

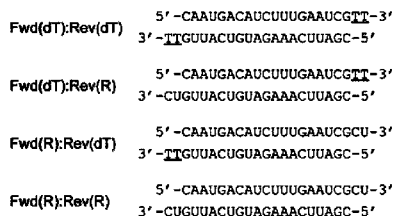
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

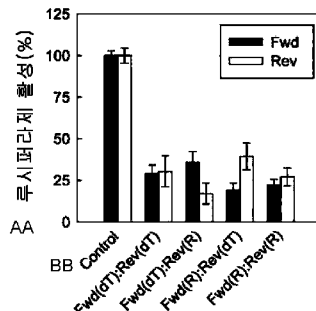
(54) Title: SIRNA MOLECULE HAVING IMPROVED SPECIFICITY FOR INHIBITING TARGET GENE EXPRESSION

(54) 발명의 명칭: 목적 유전자의 발현 억제 특이성이 증가된 siRNA 분자

A



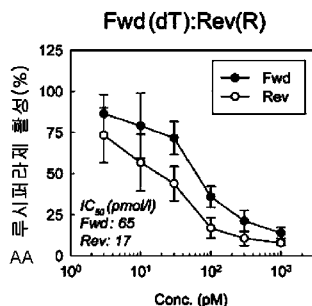
B



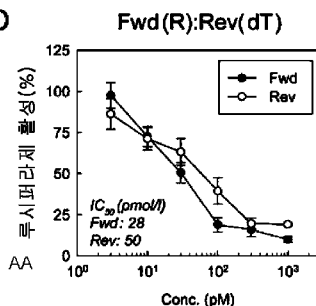
(57) Abstract: The present invention relates to a siRNA molecule having improved specificity for inhibiting target gene expression and a decreased off-target effect, the siRNA molecule having a structure of asymmetric 3'-overhangs and consisting of sense and antisense strands, wherein one of the two strands has 3'-overhangs consisting of DNA of 1 to 3 nucleotides and the other has 3'-overhangs consisting of RNA of 1 to 3 nucleotides.

(57) 요약서: 본 발명은 목적 유전자의 발현 억제 특이성이 증가되고 오프-타겟 효과가 감소된 siRNA 분자로서, 상기 siRNA 분자는 센스 및 안티센스 가닥으로 이루어져 있으며, 상기 두 가닥 중 하나의 가닥은 1 내지 3 개의 뉴클레오타이드의 DNA로 구성된 3'-오버행을 가지며, 나머지 하나의 가닥은 1 내지 3 개의 뉴클레오타이드의 RNA로 구성된 3'-오버행을 가지는 것을 특징으로 하는, 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자에 관한 것이다.

C



D



AA ... Luciferase activity
BB ... Control



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 목적 유전자의 발현 억제 특이성이 증가된 s i R N A 분자

기술분야

- [1] 본 발명은 목적 유전자의 발현 억제 특이성이 증가된 siRNA 분자에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 목적 유전자의 발현 억제 특이성이 증가되고 오프-타겟 효과가 감소된 siRNA 분자로서, 상기 siRNA 분자는 센스 및 안티센스 가닥으로 이루어져 있으며, 상기 두 가닥 중 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 DNA로 구성된 3'-오버행을 가지며, 나머지 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 RNA로 구성된 3'-오버행을 가지는 것을 특징으로 하는, 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자, 상기 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자의 제조 방법, 상기 siRNA 분자를 함유하는 유전자 발현 억제용 조성물 및 키트, 상기 siRNA 분자를 인체를 제외한 세포 내 도입시키는 단계를 포함하는 세포 내 목적 유전자의 발현 억제 방법 및 세포를 상기 siRNA 분자와 접촉시켜 siRNA에 의하여 초래되는 목적 특이적 RNA 간섭을 매개하는 단계를 포함하는, 세포에서 목적 특이적 RNA 간섭을 매개하는 인 비트로 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] RNA 간섭(RNAi, RNA interference)는 진화학적으로 보존된 전사 후 유전자 침묵의 기작으로 서열 특이적인 방법으로 mRNA 분해를 촉진한다. RNAi 기술은 기초 연구와 새로운 질병 치료제 개발을 위한 연구자들에게 많이 이용되어 지고 있다. 원형의 siRNA 듀플렉스(duplex)는 원래 Elbashir와 그의 동료들에 의해 기술되었는데(*Nature*, 2001, 411:494-498), 다이서(dicer)와 같은 RNase III 타입의 효소에 의해 처리되는 것을 연상시키는 2개의 뉴클레오티드가 대칭인 3'-오버행(overhang)을 가진 19bp를 포함하는 21개의 뉴클레오티드로 된 두 가닥 RNA이다. siRNA 듀플렉스의 두 가닥들은 먼저 Argonaute 단백질 내로 이중 가닥의 RNA로 조립되고(pre-RISC 복합체), 성숙한 RISC 복합체 형성을 위해 한 개의 가닥이 풀림(unwinding) 또는 분해(cleavage)에 의해 버려지게 된다. 이 버려지는 가닥은 패신저(passenger) 가닥 (또는 센스 가닥)으로 불리며, 반면 최종적으로 성숙한 RISC 내에 보유되는 다른 가닥은 가이드(guide) 가닥 (또는 안티센스 가닥)으로 불린다.
- [3] 2001년 처음으로 인간 체세포에서 siRNA가 성공적으로 표적 유전자를 녹다운(Knock-down)시키는 결과가 보고된 후, 현재까지 기능유전체 연구, 신약 타겟 도출 및 siRNA를 이용한 약물 개발 등에 응용되고 있다. siRNA는 기존 유전자 치료에 쓰이던 핵산보다 매우 우수한 효율로 세포내 전달이 가능하므로 기존 유전자 치료 방법의 결점인 유전자 전달 효율의 문제점을 크게 완화시킬 수

있을 것으로 기대를 모으고 있다.

- [4] 하지만, 이러한 siRNA의 높은 전망에도 불구하고, 기능성(functionality), 특이성(specificity), 운반 방법(delivery methods) 및 안정성(stability) 등의 주요 난제가 siRNA와 관련된 연구에서 해결되어야 할 주요한 부분으로 남아있다. 이 중에서, siRNA의 특이성은 다른 유전자의 발현에는 영향을 미치지 아니하며 원하는 목적 유전자를 침묵시키는 특정 siRNA의 능력을 의미하는데, 최근의 연구는 비특이적 유도효과 즉, 오프-타겟 효과(off-target effect)가 초기에 예상했던 것보다 훨씬 더 광범위하게 일어남이 확인되었다(Jackson et al., 2003, *Nat Biotechnol.* 21:635-7).
- [5] 오프-타겟 효과는 종래의 19+2 구조의 siRNA의 안티센스 가닥과 목표 mRNA의 불완전한 페어링(pairing) 또는 RISC 복합체에서 센스 가닥 도입(incorporation) 등에 의해 의도하지 않은 목표 유전자의 절단을 보이는 현상이다. 오프-타겟 효과는 바람직하지 못한 표현형을 유발할 수 있으므로, 상기 오프-타겟 효과를 최소화, 변경 또는 제거하는 신규한 방법 및 조성물은 siRNA가 효험있는 연구 및 치료적인 수단이 되는데 필요불가결한 것으로 간주되고 있다. 많은 연구에서, 주로 센스 가닥 매개 비특이적인 발현 억제를 감소시키기 위한 다양한 siRNA 변형 방법을 제안하여 왔다(Elmen et al., 2005, *Nucleic Acids Res.* 33:439; Sano et al., 2008, *Nucleic Acids Res.* 36:5812; Sun et al., 2008, *Nat Biotechnol.*, 26:1379). 그러나 화학적 변형들을 통한 siRNA의 오프-타겟 효과의 감소 방법 중 일부는 온-타겟 억제효율도 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 더욱이, 이러한 화학적 변형전략은 세포 내 발현되는 siRNA에는 확장할 수 없었다.
- [6] 본 발명자들은 이전의 연구를 통해서, RNA 오버행을 가지는 비대칭 구조의 siRNA(asiRNA, asymmetric siRNA)가 dTdT 오버행을 가지는 비대칭 구조의 siRNA 보다 유전자 침묵 효과가 우수함을 보고하였고(Hong et al., 2014, *Biochem J.*), RNA 오버행을 가지는 asiRNA가 dTdT 오버행을 가지는 siRNA 보다 AGO2-RISC 복합체 내로 보다 효율적으로 어셈블되는 것을 확인하였다. 이에 본 발명에서는 siRNA의 3'-오버행의 구조 변형을 통해 목적 유전자에 대한 특이성을 증가시키고, 오프-타겟 효과는 감소시키는 방법에 대해 연구하였다.
- [7] 한편, 한국등록특허 제0872437호에는 'RNA 간섭을 매개하는 작은 RNA 분자'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1237036호에는 '안티센스 가닥에 의한 오프-타겟 효과를 최소화한 신규한 siRNA 구조 및 그 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 목적 유전자의 발현 억제 특이성이 증가된 siRNA 분자에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은

RNA/dTdT의 비대칭적인 3'-오버행 구조를 가지는 siRNA 분자를 제작하고 세포에 처리하여 목적 유전자의 억제 효율을 확인한 결과, 본 발명에 따른 신규한 구조의 siRNA 분자가 목적 유전자에 대한 억제 효율이 높으면서도 오프-타겟 효과가 감소된 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 목적 유전자의 발현 억제 특이성이 증가되고 오프-타겟 효과가 감소된 siRNA 분자로서, 상기 siRNA 분자는 센스 및 안티센스 가닥으로 이루어져 있으며, 상기 두 가닥 중 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 DNA로 구성된 3'-오버행을 가지며, 나머지 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 RNA로 구성된 3'-오버행을 가지는 것을 특징으로 하는, 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자를 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자의 제조 방법을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자를 함유하는 유전자 발현 억제용 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자를 함유하는 유전자 발현 억제용 키트를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자를 인체를 제외한 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는 세포 내 목적 유전자의 발현 억제 방법을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 세포를 상기 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자와 접촉시켜 siRNA에 의하여 초래되는 목적 특이적 RNA 간섭을 매개하는 단계를 포함하는, 세포에서 목적 특이적 RNA 간섭을 매개하는 인 비트로 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [15] 본 발명은 RNA/dTdT의 비대칭적인 3'-오버행 구조에 의해 특이성이 증가되고 오프-타겟 효과가 감소된 새로운 구조의 siRNA 분자 및 이를 이용한 목적 유전자의 발현 억제 방법을 제공하였다. 본 발명에 따른 비대칭의 3'-오버행을 가지는 siRNA 분자는 복잡한 화학적 변형 없이 간단한 방법으로 기능성이 증가된 새로운 siRNA 구조로 그 제조 방법이 용이하며, 종래의 siRNA 분자들을 대체하여 유전자 치료 등 siRNA를 기반으로 하는 유전자 발현 억제 기법에 널리 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 siRNA 3'-오버행이 각 가닥의 RNAi 활성화에 미치는 영향을 알아본 결과로, (A)는 대칭의 또는 비대칭의 3'-오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스의 구조를 나타낸 그림으로, 밑줄은 DNA를 가리킨다. (B)는 A549 세포에서 수행한 siRNA 듀플렉스의 리포터 유전자 녹다운 활성을 확인한 결과이고, (C)와 (D)는

- Fwd(dT):Rev(R) 및 Fwd(R):Rev(dT)의 목적 유전자 녹다운 활성화에 대해 IC₅₀를 확인한 결과이다. Fwd: 정방향, Rev: 역방향, dT: dTdT 오버행, R: RNA 오버행.
- [17] 도 2는 비대칭의 RNA/dTdT 오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스의 각 가닥들에 대한 로딩 선호도를 확인한 결과로, (A)는 인 비트로(*in vitro*) 로딩 분석에 사용된 siRNA 듀플렉스 구조를 나타낸 그림이고, (B)는 FLAG-hAGO2를 발현하는 HEK293T 세포의 용해물과 (A)의 siRNA 듀플렉스를 반응시킨 후 면역침강하여 네이티브 겔 전기영동을 통해 분리한 결과이며, (C)는 겔 이동 분석(gel shift assay)을 통해 성숙한- 및 pre-RISC 복합체 형성을 시간 경과에 따라 확인한 결과이며, (D)는 인 비트로 분해 분석(*in vitro* cleavage assay)의 결과이다.
- [18] 도 3은 내인적인 센스 및 안티센스 전사에 대해서 siRNA의 3'-오버행이 RNAi 활성화에 미치는 영향을 확인한 결과로, (A)는 대칭의 또는 비대칭의 3'-오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스의 구조를 나타낸 그림으로, R은 RFXANK를 N은 NR2C2AP를 의미하며, 밑줄은 DNA를 나타낸다. (B)는 A549 세포에서 수행한 siRNA 듀플렉스의 내인성 유전자 녹다운 활성을 확인한 결과이고, (C)와 (D)는 R(dT):N(R) 및 R(R):N(dT)의 목적 유전자 녹다운 활성화에 대해 IC₅₀를 확인한 결과이다. dT: dTdT 오버행, R: RNA 오버행.
- [19] 도 4는 리포터 구조의 모식도를 나타낸 것으로, (A)는 pMIR-report 기반의 리포터 구조를, (B)는 siRNA 듀플렉스와 분석을 위해 사용한 유전자 특이적 프라이머(GSP)의 위치를 나타내는 도식이다.
- [20] 도 5는 비대칭의 3'-오버행을 가지는 siRNA의 다른 목적 유전자에 대한 RNAi 활성을 확인한 결과로, (A)는 대칭의 또는 비대칭의 3'-오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스의 구조를 나타낸 그림으로, 밑줄은 DNA를 가리킨다. (B)는 HeLa 세포에서 siRNA 듀플렉스의 리포터 유전자 녹다운 활성을 확인한 결과이다. Fwd: 정방향, Rev: 역방향, dT: dTdT 오버행, R: RNA 오버행.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [21] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 목적 유전자의 발현 억제 특이성이 증가되고 오프-타겟 효과(off-target effect)가 감소된 siRNA 분자로서, 상기 siRNA 분자는 센스 및 안티센스 가닥으로 이루어져 있으며, 상기 두 가닥 중 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 DNA로 구성된 3'-오버행(overhang)을 가지며, 나머지 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 RNA로 구성된 3'-오버행을 가지는 것을 특징으로 하는, 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자를 제공한다.
- [22] 용어 "siRNA(small interfering RNA)"는 서열 특이적으로 효율적인 유전자 발현 억제(gene silencing)를 매개하는 짧은 이중 가닥의 RNA(dsRNA)를 의미한다.
- [23] 용어 "안티센스(antisense) 가닥"은 관심 있는 목적 핵산(target nucleic acid)에 실질적으로 또는 100% 상보적인 폴리뉴클레오티드로서, 예를 들어 mRNA (messenger RNA), mRNA가 아닌 RNA 서열(microRNA, piwiRNA, tRNA, rRNA 및

hnRNA) 또는 코딩 또는 비코딩 DNA 서열과 전체로서 또는 일부로서 상보적일 수 있다. 또한, "센스(sense) 가닥"이란 목적 핵산과 동일한 핵산 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로서, mRNA, mRNA가 아닌 RNA 서열 또는 코딩 또는 비코딩 DNA 서열과 전체로서 또는 일부로서 동일한 폴리뉴클레오티드를 말한다.

- [24] 용어 "오프-타겟 효과(off-target effect)"란 본래 siRNA는 안티센스 가닥과 상보적인 서열을 갖는 mRNA의 분해를 유도하여 해당 mRNA의 유전자 발현을 억제하는 효과를 얻기 위하여 사용하는 것임에 불구하고, siRNA의 센스 가닥에 의해 타 mRNA의 분해가 발생하게 되는 경우 센스 가닥에 의해 발생하는 이러한 예상치 못한 타 mRNA의 분해 내지 해당 유전자의 발현 억제 효과 및 siRNA의 안티센스 가닥이 잘못된 타겟과 페어링하여 타 mRNA의 분해가 발생하는 안티센스 가닥에 의한 타 mRNA의 분해 내지 해당 유전자의 발현 억제효과를 모두 포함하는 것이다.
- [25] 본 발명의 일 구현 예에 따른 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자에서, 상기 siRNA 분자의 센스 및 안티센스 가닥은 각각 20 내지 22개의 뉴클레오티드의 길이를 갖고, 상기 20 내지 22개의 뉴클레오티드의 길이는 3'-오버행을 포함하는 길이를 의미한다. 또한, 상기 3'-오버행의 길이는 1 내지 3개의 뉴클레오티드 길이일 수 있으며, 바람직하게는 2개의 뉴클레오티드 길이일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 상기 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자는 센스 또는 안티센스 중 하나의 가닥은 19개의 뉴클레오티드의 길이에 3'-말단에 2개의 RNA를 오버행으로 가지며, 나머지 한 가닥은 19개의 뉴클레오티드의 길이에 3'-말단에 2개의 dTdT를 오버행으로 가지는 구조일 수 있다. 상기 2개의 RNA 오버행은 목적 유전자의 mRNA에 대응되는 서열로 이루어질 수 있다.
- [26] 또한, 본 발명은
- [27] (a) siRNA 분자를 형성할 수 있는, 미리 결정된 mRNA 목적 분자에 대해 85 내지 100%의 서열 동일성을 가지는 두 개의 RNA 가닥으로서, 상기 가닥 중 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 DNA로 구성된 3'-오버행을 가지며, 나머지 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 RNA로 구성된 3'-오버행을 갖는 것을 특징으로 하는 두 개의 RNA 가닥을 합성하는 단계; 및
- [28] (b) siRNA 분자가 형성되는 조건하에서, 목적 특이적 RNA 간섭을 할 수 있는 상기 (a) 단계의 합성된 RNA 가닥을 서로 조합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자의 제조 방법을 제공한다.
- [29] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조 방법에 있어서, 상기 RNA 분자를 합성하는 방법은 화학적 합성 방법 또는 효소적 방법일 수 있으며, 바람직하게는 화학적 합성 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. RNA 분자의 화학적 합성 방법은 당업계에 알려져 있으며, Verma 및 Eckstein(1998)에 기재된 바와 같은 화학적 합성 방법이 특히 참조될 수 있다.

- [30] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조 방법에 있어서, 상기 RNA 가닥은 각각 20 내지 22개의 뉴클레오티드의 길이를 갖고, 상기 20 내지 22개의 뉴클레오티드의 길이는 오버행을 포함하는 길이를 의미한다. 또한, 상기 3'-오버행의 길이는 1 내지 3개의 뉴클레오티드 길이일 수 있으며, 바람직하게는 2개의 뉴클레오티드 길이일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 상기 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자는 하나의 가닥은 19개의 뉴클레오티드의 길이에 3'-말단에 2개의 RNA를 오버행으로 가지며, 나머지 한 가닥은 19개의 뉴클레오티드의 길이에 3'-말단에 2개의 dTdT를 오버행으로 가지는 구조일 수 있다. 상기 2개의 RNA 오버행은 목적 유전자의 mRNA에 대응되는 서열로 이루어질 수 있다.
- [31] 본 발명의 제조 방법에 따른 상기 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자는 목적 유전자의 발현 억제 특이성이 증가되고 오프-타겟 효과가 감소된 것을 특징으로 한다.
- [32] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자를 함유하는 유전자 발현 억제용 조성물을 제공한다.
- [33] 상기 유전자 발현 억제용 조성물은 유전자 발현 억제용 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. 유전자 발현 억제용 키트는 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있으며 이들은 부분적으로 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 용기는, 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있다. 용기는 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는, 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.
- [34] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자를 인체를 제외한 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는 세포 내 목적 유전자의 발현 억제 방법을 제공한다.
- [35] 본 발명에 있어서, 상기 목적 유전자는 내인성(endogeneous) 유전자이거나 삽입유전자(transgene)일 수 있다.
- [36] 본 발명에 따른 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자는 기존의 오프-타겟 감소 효과를 가진다고 알려진 2'-OMe나 LNA 같은 화학적 변형을 필요로 하지 않는다. 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 상기 siRNA 분자를 세포 내에서 발현시키는 단계를 포함하는 유전자 발현 억제 방법에 관한 것이다.
- [37] 또한, 본 발명은
- [38] (a) 세포를 목적 특이적 RNA 간섭이 일어날 수 있는 조건하에서 본 발명의 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자와 접촉시키는 단계; 및
- [39] (b) 상기 (a) 단계의 siRNA 분자에 대응되는 서열 부분을 갖는 목적 핵산에 대하여 상기 siRNA에 의하여 초래되는 목적 특이적 RNA 간섭을 매개하는

단계를 포함하는, 세포에서 목적 특이적 RNA 간섭을 매개하는 인 비트로 방법을 제공한다.

[40] 본 발명에 따른 상기 인 비트로 방법에 있어서, 상기 siRNA는 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자이다.

[41] 또한, 본 발명에 따른 상기 인 비트로 방법에 있어서, 상기 접촉시키는 단계 (a)는 상기 이중가닥 RNA 분자를 목적 세포, 예를 들면, 세포 배양, 단세포 미생물과 같은 분리된 목적 세포 또는 다세포 개체 내의 목적 세포 또는 복수의 목적 세포로 도입하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 도입하는 단계는 담체-매개 전달, 예를 들면, 리포좀 담체 또는 주사(injection)에 의한 전달을 포함한다.

[42]

[43] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[44]

[45] 재료 및 방법

[46] siRNA

[47] 화학적으로 합성한 RNA들은 바이오니아(한국)로부터 구매하였고, 제조사의 프로토콜에 따라 조합하여 사용하였다.

[48]

[49] 세포 배양 및 siRNA 트랜스펙션

[50] A549(CCL-185) 및 HeLa(CCL-2) 세포주는 ATCC(미국)로부터 구매하였고, 10% 소태아혈청(FBS, Gibco, 미국)으로 보충한 DMEM(Gibco) 배지에서 37°C의 조건으로 배양하였다. 세포들은 지수기 성장을 유지하기 위해 주기적으로 계대배양하였다. siRNA 트랜스펙션을 위해서, 세포들을 트랜스펙션 수행 24시간 전에 12-웰 플레이트에 30~50%의 컨플루언스(confluence)가 되도록 완전 배지(complete medium)를 사용하여 플레이팅하였다. A549 세포 및 HeLa 세포 트랜스펙션을 위해 lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen, 미국)을 사용하였다.

[51]

[52] 플라스미드

[53] siRNA 듀플렉스에 상응하는 목적 서열을 포함하는 DNA

올리고뉴클레오티드는 pMIR-REPORT 루시퍼라제 벡터(Ambion, 미국)의 *SpeI* 및 *HindIII* 자리 내로 클로닝되었다(도 1 및 도 5). 각각의 올리고뉴클레오티드의 서열은 하기 표 1과 같다.

[54]

[55] 표 1

[Table 1]

이름	서열정보 (5'→3')
도 1 정방향 표적	CTAGTAGTACAGCGATTCAAAGATGTCATTGTCTC (서열번호 1)
도 1 정방향 표적	AGCTGAGACAATGACATCTTTGAATCGCTGTACTA (서열번호 2)
도 1 역방향 표적	CTAGGAGACAATGACATCTTTGAATCGCTGTACTA (서열번호 3)
도 1 역방향 표적	AGCTTAGTACAGCGATTCAAAGATGTCATTGTCTC (서열번호 4)
도 5 정방향 표적	CTAGCTCATGGGTGGAATCATATTGGA (서열번호 5)
도 5 정방향 표적	AGCTTCCAATATGATTCCACCCATGAG (서열번호 6)
도 5 역방향 표적	CTAGTCCAATATGATTCCACCCATGAG (서열번호 7)
도 5 역방향 표적	AGCTCTCATGGGTGGAATCATATTGGA (서열번호 8)

[56]

[57] 루시퍼라제 녹다운 검정

[58] 세포들을 24-웰 플레이트에 50% 컨플루언스가 되도록 완전 배지를 사용하여 플레이트하였다. 24시간 후에, siRNA 목적 자리를 포함하고 있는 pMIR-report 기반 플라스미드, pRL-SV40(1ng, Promega, 미국) 및 siRNA를 lipofectamine 2000(Invitrogen, 미국) 시약을 사용하여 함께 트랜스펙션하였다. 24시간 후에, 루시퍼라제 활성을 Dual Luciferase Report Assay System(Promega)을 사용하여 분석하였다. 결과는 20/20n 루미노미터(Turner Biosystems, 미국)를 사용하여 정량화하였다.

[59]

[60] 정량적 실시간 중합효소연쇄반응

[61] 총 RNA는 Isol-RNA lysis 시약(5 Prime, 독일)을 사용하여 추출하였고, 500ng의 RNA를 고성능 cDNA 역전사 키트(Applied Biosystems, 미국)를 사용한 cDNA 합성에 주형으로 사용하였다. 각 cDNA 반응의 균등물(1/20)을 StepOne Real-time PCR System(Applied Biosystems) 장비를 사용하여 정량적 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(quantitative real-time RT-PCR)으로 분석하였다. 유전자 특이적 프라이머를 SYBR Premix Ex Taq(Takara, 일본)과 섞어서 사용하였다. siRNA 목적 유전자의 녹다운 효율의 분석은, 목적 유전자와 내부 대조구 mRNA(*TUBA1A*) 수준을 상대적 표준 곡선 정량 방법을 사용하여 측정하였다. 본 발명에 사용된 프라이머의 정보는 하기 표 2와 같다.

[62]

[63] 표 2

[Table 2]

정량적 실시간 중합효소연쇄반응을 위한 프라이머

이름	서열 정보(5'→3')
RFXANK-정방향	CGTGACGTGGACATCAACA (서열번호 9)
RFXANK-역방향	CCTGTTGCACTTTCCGGTAT (서열번호 10)
NR2C2AP-정방향	CAGCTGCAGATCCAGTTTCA (서열번호 11)
NR2C2AP-역방향	CACTTCAGCAGCTGGTATGG (서열번호 12)
TUBA1A-정방향	GACCAAGCGTACCATCCAGT (서열번호 13)
TUBA1A-역방향	CACGTTTGGCATAATCAGG (서열번호 14)

[64]

[65] 세포 용해물(lysate) 준비

[66] FLAG-태깅된 hAGO2(human argonaute 2) 단백질을 발현하는 세포의 용해물을 준비하기 위해, HEK293T 세포(CRL-11268)를 10%(v/v) 소태아혈청으로 보충한 DMEM(Welgene, 한국)으로 5% CO₂의 37°C 조건에서 배양하였다. 배양된 HEK293T 세포에 10 μ g의 pcDNA3.1-FLAG-hAGO2를 칼슘 포스페이트 방법을 사용하여 트랜스펙션하였다. 세포를 차가운 PBS(pH 7.4)로 3회 세척한 후, 4°C에서 6,000rpm의 속도로 5분간 원심분리하여 세포를 수집하였다. 세포 펠렛을 농축세포용적의 3배 부피의 저장성(hypotonic) 용해 버퍼(25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 10 mM NaCl, 5 mM DTT, 0.1% Tween-20 및 1x EDTAfree 프로테아제 저해제 콕테일)으로 재부유시킨 후, 4°C에서 17,000rpm의 속도로 30분간 원심분리하여 정화시켰다. 상층액을 액체 질소에서 얼린 후, -80°C에 보관하였다.

[67]

[68] 인 비트로(*in vitro*) RNA 로딩 분석

[69] 방사선표지된 듀플렉스(5'-³²P-방사선 표지된 RNA 가닥을 방사선 표지 되지 않은 대응 가닥과 어닐링한 듀플렉스) 10nmole을 인 비트로 RNAi 반응액 40 μ l에 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응의 10%를 투입 분획(input fraction)으로 사용하기 위해 덜어내고, 나머지 시료는 항-FLAG M2 친화성 겔(affinity gel, Sigma-Aldrich, 미국)과 2시간 동안 가벼운 흔들림과 함께 4°C에서 배양시켰다. 레진은 10배 비드 부피의 세척 버퍼(25mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 300mM NaCl, 1.5mM MgCl₂ 및 1X 프로테아제 저해제 콕테일(Roche, 독일))로 4회 세척하였다. RNA 시료는 그 후 페놀로 추출하였고, 에탄올로 침전시켰으며, 4°C에서 15% 네이티브 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 통해 분리하였다. 인광화상(phosphorimaging)은 BAS-2500 이미지 분석기(Fujifilm, 일본)를

사용하여 수행하였고, 신호 세기는 MultiGauge(Fujifilm)를 이용하여 정량화하였다.

[70]

[71] 인 비트로 목적(target) RNA 분해 분석

[72] 목적(target) RNA의 생성을 위해, CTGF-17 목적(target) mRNA를 인 비트로 전사시켰고, mScript mRNA 생산 시스템(Epicentre, 미국)을 사용하여 구아닐리트랜스퍼라제(guanylytransferase)에 의한 5'-캡에 방사선 표지를 하고, 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 통해 정제하였다. 목적 RNA 분해 분석은 이전에 기술한 방법에 따라 수행되었는데, 간단하게 반응은 30°C에서 10nM siRNA, 2.5nM 캡-방사선 표지된 목적 RNA, 1mM ATP, 1mM MgCl₂, 0.1μg/μl 크레아틴 키나제, 25mM 크레아틴 포스페이트 및 0.4U/μl RNasin(Promega, 미국)을 사용하여 배양시켰다. siRNA 듀플렉스는 캡-표지된 목적 RNA 첨가 전에 30°C에서 20분 동안 HEK293T 세포의 용해물과 전배양시켰다. 인광화상은 BAS-2500 이미지 분석기를 사용하여 수행하였고, 신호 세기는 MultiGauge를 이용하여 정량화하였다.

[73]

[74] 인 비트로 RISC 어셈블 분석 (Gel-shift assay)

[75] 인 비트로 RISC 어셈블 분석은 이전에 기술한 방법을 따라 수행하였는데, 간단하게, 각 반응은 5μl의 세포 용해물, 3μl의 40X 반응 혼합물(Haley B et al., 2003, *Methods* 30:330-336), 1μl의 100nM 5'-³²P-방사선 표지된 작은 RNA 듀플렉스 및 1μl의 용해 버퍼로 구성되었다. 배양 후에 지시된 시간대에 상기 반응을 2μl의 헤파린 혼합물(60 mM KCl, 3mM MgCl₂, 3% PEG₈₀₀₀, 8% 글리세롤 및 4mg/ml 헤파린)을 사용하여 중지시켰다. RISC 복합체는 4°C에서 10W로 1.5 시간 동안 수직의 네이티브 겔 전기영동을 통해 분리하였다. 인광화상은 BAS-2500 이미지 분석기를 사용하여 수행하였고, 신호 세기는 MultiGauge를 이용하여 정량화하였다.

[76]

[77] 실시예 1. RNAi 활성화에 대한 siRNA 듀플렉스의 3'-오버행 구조의 영향

[78] siRNA 오버행이 각 가닥의 RNAi 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해서, 동일한 목적 서열을 가지지만 다른 종류의 오버행을 가지는 네 종류의 siRNA 듀플렉스를 고안하였다. Fwd(dT):Rev(dT) 및 Fwd(R):Rev(R) siRNA 듀플렉스는 양 가닥이 모두 각각 dTdT 및 RNA로 동일한 오버행을 가진다. 대조적으로, Fwd(dT):Rev(R) 및 Fwd(R):Rev(dT) siRNA 듀플렉스는 dTdT와 RNA의 다른 오버행을 가지는 가닥으로 구성되어 있다(도 1A). 본 발명에서는, 3'-UTR(untranslated region) 내에 양 방향으로 반딧불이(firefly) 루시퍼라제를 가지고 있는 두개의 리포터 벡터를 디자인하였다(도 4). 본 발명에서는 가이드(guide) 및 패신저(passenger) 가닥이 리포터 벡터 분석에서 매우 의존적일 것이기 때문에, 각 siRNA 듀플렉스의 정방향(forward, Fwd) 및 역방향(reverse,

Rev) 가닥이라는 용어를 사용하였다. A549 세포를 각 siRNA 듀플렉스, 반딧불이 루시퍼라제 구조 그리고 트랜스펙션 대조구로서 레닐라(*Renilla*) 루시퍼라제와 함께 트랜스펙션하였다. 반딧불이 루시퍼라제 대 레닐라 루시퍼라제의 활성을 트랜스펙션 후 24시간 켜에 분석하였다(도 1B).

- [79] 그 결과, 대칭적인 3'-오버행을 가지는 Fwd(dT):Rev(dT) 및 Fwd(R):Rev(R)와 같은 siRNA 듀플렉스는 타겟에 대한 양 가닥의 RNAi 활성이 비슷하게 나타났다. 가닥과 타겟 조합에 상관없이, 70-78%의 목적 유전자 녹다운이 관찰되었다. 그러나, 비대칭적인 3'-오버행을 가지는 Fwd(dT):Rev(R) 및 Fwd(R):Rev(dT) siRNA 듀플렉스는 두 가지 목적 서열 중 하나에 대한 뚜렷한 선호도가 확인되었다. 도 1B에 보여지는 바와 같이, Fwd(dT):Rev(R) siRNA 듀플렉스는 역방향 목적 서열(pMIR-report-Rev)에 대해 높은 억제율(83% 녹다운)을 보여주었으나, 정방향 목적 서열(pMIR-report-Fwd)에 대해서는 중간 정도의 억제율(64% 녹다운)을 보여주었다. 그에 반해서, Fwd(R):Rev(dT) siRNA 듀플렉스는 목적 서열 침묵에 대해 Fwd(dT):Rev(R) siRNA 듀플렉스와 반대되는 경향을 보여주었다(정방향 및 역방향 목적 서열에 대해서 각각 81% 및 61%의 녹다운을 보여주었다). 추가로, 비대칭적인 오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스의 각 가닥에 대한 IC₅₀ 분석을 수행하였는데, dTdT 오버행을 가지는 가닥보다 RNA 오버행을 가지는 가닥이 각각 3.8배 및 1.8배 높은 RNAi 활성도를 보여주었다(도 1C 및 1D).

- [80] 본 발명자들은 다른 오버행 구성이 일반적으로 목적 유전자 침묵에 대해서 가닥 선택도(selectivity)에 영향을 미치는지 확인해보기 위해서 추가적인 siRNA 듀플렉스 세트 및 리포터 벡터를 디자인하였다(도 5). 예상대로, Fwd(dT):Rev(R) 듀플렉스는 정방향 목적 서열(70% 녹다운) 보다 역방향 목적 서열(79% 녹다운)에 대해 상대적으로 높은 RNAi 활성을 보여주었다. 그리고 Fwd(R):Rev(dT) siRNA 듀플렉스는 각 가닥의 RNAi 활성에 있어서 극적인 차이를 보여주었는데, Fwd(R) 가닥은 목적 서열에 대해 83%의 높은 억제율을 보인 반면, Rev(dT)는 단지 22%의 목적 서열 억제율을 보여주었다. 결과적으로, 상기의 결과들은 RNA 오버행을 가지는 가닥이 RNAi 경로 동안에 가이드 가닥으로 우선적으로 처리됨을 의미했다.

[81]

- [82] 실시예 2. 비대칭 RNA/dTdT 오버행 구조를 가지는 siRNA 듀플렉스의 특이도 분석

- [83] 리포터 실험에서 관찰된 비대칭 오버행 구조를 가지는 siRNA 듀플렉스의 우선적인 침묵을 이끄는 중요한 단계를 생화학적으로 관찰하기 위해서, 가닥 선택에 대한 다른 오버행 구조를 가지는 siRNA 듀플렉스의 개개의 기여도를 평가할 수 있는 최소한의 인 비트로 시스템을 수립하였다. 여덟 개의 각기 다른 작은 RNA 듀플렉스 기질들을 합성하고, 정방향 또는 역방향 가닥에 5'-³²P-방사선 표지 된 가닥과 다른 가닥에는 방사선이 표지 되지 않은

5'-포스페이트를 가지는 각 작은 RNA 듀플렉스를 FLAG-태깅된 hAGO2를 발현하는 세포질 추출물과 반응시킨 후, 비즈가 컨쥬게이팅된 항-FLAG 항체를 사용하여 면역침강(immunoprecipitation)시켰다. 면역침강된 단백질들은 페놀 추출을 통해 제거하였고, 수거된 ³²P-방사선 표지된 작은 RNA는 개개의 단일 가닥 RNA의 어느 정도가 미성숙 siRNA 듀플렉스로부터 성숙되었는지 확인하기 위해 네이티브 겔 전기영동을 통해서 분석하였다(도 2A). 비대칭 RNA/dTdT 오버행(dT:R 또는 R:dT)을 가지는 siRNA 듀플렉스는 대칭적인 오버행을 가지는 것보다, 2-3배 높은 선택 효율로 RNA 오버행을 가진 가닥이 선택되어졌다. 이상의 결과들을 통해 앞서 수행한 리포터 실험에서와 같이 선호도가 있는 목적 침묵의 결과를 확실하게 설명할 수 있었다.

[84]

[85] 실시예 3. RNA 오버행을 가지는 가닥의 성숙 RISC 복합체와의 어셈블 및 목적 분해 선택도 분석

[86] 면역침강 분석이 Argonaute와 기능적으로 성숙한 RISC 복합체에서 미성숙한 듀플렉스를 구별할 수 없기 때문에, 성숙한 가닥들이 인 비트로에서 성숙한 RISC 복합체 내로 실제로 결합되는지를 더 조사하기 위해서 겔 이동 분석(gel shift assay)을 수행하였다. 각기 다른 siRNA 듀플렉스의 시간 경과에 따른 어셈블리는 RNA 오버행을 가지는 가닥이 dTdT 오버행을 가지는 가닥보다 훨씬 높은 RISC 복합체 수준을 형성함을 보여주었다(도 2C). 비대칭의 RNA/dTdT 오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스로부터 유래한 빠르게 이동하는 고-분자량 복합체의 축적은 대칭의 오버행을 가지는 siRNA와 비교하여, 기능적으로 성숙한 RISC 복합체 형성의 높은 수준을 진단하였다(도 2C).

[87] 본 발명자들은 이러한 기능적으로 성숙한 RISC 복합체들이 hAGO2-매개 목적 분해 작용의 높은 효율을 유도하는지 확인해보았다. 5'-³²P-캡-방사선 표지된 정방향 또는 역방향 가닥의 하나와 외인적으로 어셈블된 네 가지 다른 siRNA 듀플렉스 변이체들(R:R, dT:R, R:dT 및 dT:dT)을 포함하고 있는 세포질 추출물 내의 목적 mRNA의 배양은 hAGO2-촉매 작용에 의한 분해로 예상되는 위치에 5'-분해 산물들을 생산하였다(도 2D). 이는 다른 3'-오버행 구성이 분해 자리 위치에는 어떠한 영향도 미치지 않음을 제시하며, 이는 비대칭의 RNA/dTdT 오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스가 표준이 되는(canonical) RNAi 경로로 들어감을 의미했다. 예상대로, siRNA 듀플렉스(dT:R)는 역방향 가닥 목적(target)에 대해 대응 관계에 있는 siRNA 듀플렉스(R:dT)보다 목적 분해의 상당히 높은 효율을 보여주었고, 정방향 가닥 목적(target)에 대해서는 역 상관관계가 관찰되었다(도 2D).

[88] 본 발명자들은 3'-오버행에 특이적인 의존도를 보이는 siRNA 듀플렉스, 그리고 비대칭의 RNA/dTdT 오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스가 성숙한 RISC 복합체 내로 능률적으로 어셈블되고, 궁극적으로는 원하는 가닥의 선택적인 목적 침묵을 유도하는 것으로 확인되었다.

[89]

[90] 실시예 4. 비대칭적인 오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스에 의한 내인성의 센스 또는 안티센스 전사체의 선택적인 억제 분석

[91]

상기의 실시예 결과들은 비대칭의 오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스가 향상된 가닥-침묵 효능을 수여하는 것을 입증하였다. 이와 같은 발견을 자연적 안티센스 전사체(NAT, natural antisense transcript) 쌍 유전자들의 가닥-특이적인 녹다운에 직접적으로 적용하였다. NAT는 반대 DNA 가닥으로부터 다른 전사체(센스 전사체)까지 전사된 내인성인 RNA 분자이고, 센스 전사체와 부분적으로 겹쳐진다. 다른 연구 그룹에 의해 확인된 인간 NATs로부터, RFXANK(regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein)와 NR2C2AP(nuclear receptor 2C2-associated protein)의 NAT 쌍을 선택하여 겹쳐지는 서열을 표적하는 상응하는 siRNA 듀플렉스를 디자인하고 실험하였다(도 3A 및 도 4). 예상대로, 비대칭 오버행 듀플렉스의 가닥-특이적 목적 유전자 침묵이 관찰되었다. dTdT 오버행을 가지는 RFXANK 목적 가닥과 RNA 오버행을 가지는 NR2C2AP 목적 가닥으로 구성된 R(dT):N(R) 듀플렉스는 RFXANK와 NR2C2AP에 대해서 각각 34.2%와 76.9%의 녹다운을 보여주었다(도 3B). 대조적으로, R(R):N(dT) 듀플렉스는 목적 유전자 침묵이 RFXANK와 NR2C2AP에 대해서 각각 80.8%와 55.3%의 녹다운으로 반대의 경향을 보여주었다. 추가의 IC₅₀ 분석 또한, 비대칭 오버행 듀플렉스 모두에서 RNA 오버행을 가지는 가닥의 높은 유전자 침묵 활성을 확인해주었다(도 3C). 특히, R(dT):N(R) 듀플렉스는 RFXANK와 비교하여 NR2C2AP에 대해 극적인 선호(~100배) 결과를 보여주었고, 이를 통해 비대칭의 RNA/dTdT 오버행을 가지는 siRNA 듀플렉스가 NAT 쌍의 특정한 침묵에 대해서 높은 잠재력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

청구범위

- [청구항 1] 목적 유전자(target gene)의 발현 억제 특이성이 증가되고 오프-타겟 효과가 감소된 siRNA 분자로서, 상기 siRNA 분자는 센스 및 안티센스 가닥으로 이루어져 있으며, 상기 두 가닥 중 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 DNA로 구성된 3'-오버행을 가지며, 나머지 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 RNA로 구성된 3'-오버행을 가지는 것을 특징으로 하는, 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 센스 및 안티센스 가닥은 각각 20 내지 22개의 뉴클레오티드의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 siRNA 분자.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 3'-오버행은 2개의 뉴클레오티드의 DNA 또는 RNA로 구성된 것을 특징으로 하는 siRNA 분자.
- [청구항 4] (a) siRNA 분자를 형성할 수 있는, 미리 결정된 mRNA 목적(target) 분자에 대해 85 내지 100%의 서열 동일성을 가지는 두 개의 RNA 가닥으로서, 상기 가닥 중 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 DNA로 구성된 3'-오버행을 가지며, 나머지 하나의 가닥은 1 내지 3개의 뉴클레오티드의 RNA로 구성된 3'-오버행을 갖는 것을 특징으로 하는 두 개의 RNA 가닥을 합성하는 단계; 및
(b) siRNA 분자가 형성되는 조건하에서, 목적(target) 특이적 RNA 간섭을 할 수 있는 상기 (a) 단계의 합성된 RNA 가닥을 서로 조합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 3'-오버행이 비대칭적인 구조를 갖는 siRNA 분자의 제조 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 RNA 가닥은 각각 20 내지 22개의 뉴클레오티드의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 siRNA 분자의 제조 방법.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 3'-오버행은 2개의 뉴클레오티드의 DNA 또는 RNA로 구성된 것을 특징으로 하는 siRNA 분자의 제조 방법.
- [청구항 7] 제4항에 있어서, 상기 RNA 가닥은 화학적으로 합성되는 것을 특징으로 하는 siRNA 분자의 제조 방법.
- [청구항 8] 제4항에 있어서, 상기 siRNA 분자는 목적 유전자의 발현 억제 특이성이 증가되고 오프-타겟 효과가 감소된 것을 특징으로 하는 siRNA 분자의 제조 방법.
- [청구항 9] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 siRNA 분자를 함유하는 유전자 발현 억제용 조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 siRNA 분자를 함유하는 유전자

발현 억제용 키트.

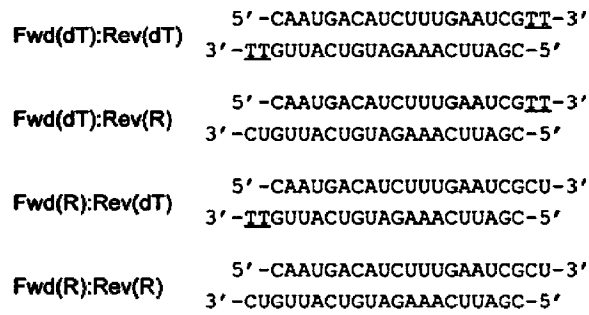
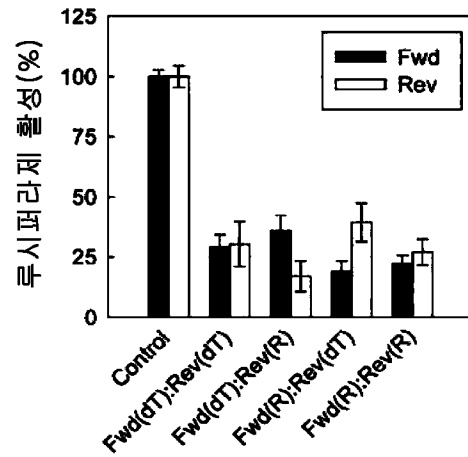
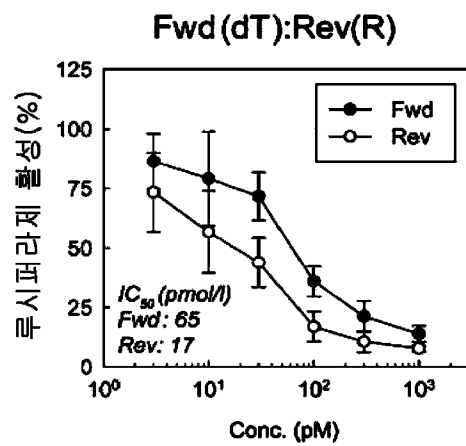
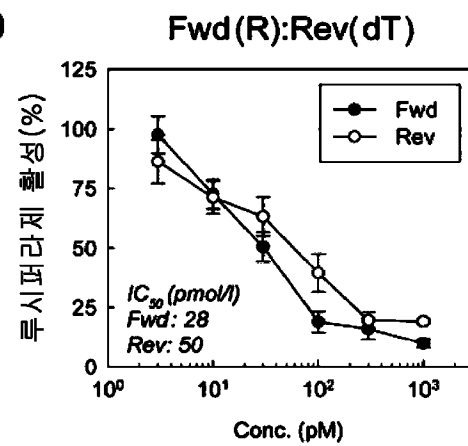
[청구항 11]

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 siRNA 분자를 인체를 제외한 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는 세포 내 목적 유전자의 발현 억제 방법.

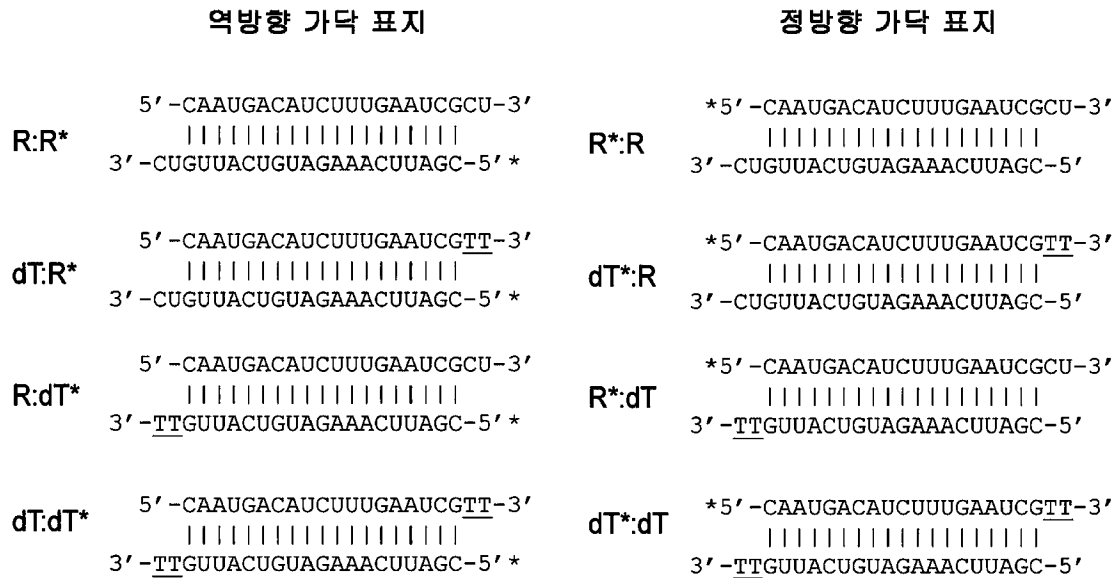
[청구항 12]

(a) 세포를 목적(target) 특이적 RNA 간섭이 일어날 수 있는 조건하에서 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 siRNA 분자와 접촉시키는 단계; 및
(b) 상기 (a) 단계의 siRNA 분자에 대응되는 서열 부분을 갖는 목적(target) 핵산에 대하여 상기 siRNA에 의하여 초래되는 목적(target) 특이적 RNA 간섭을 매개하는 단계를 포함하는, 세포에서 목적 특이적 RNA 간섭을 매개하는 인 비트로 방법.

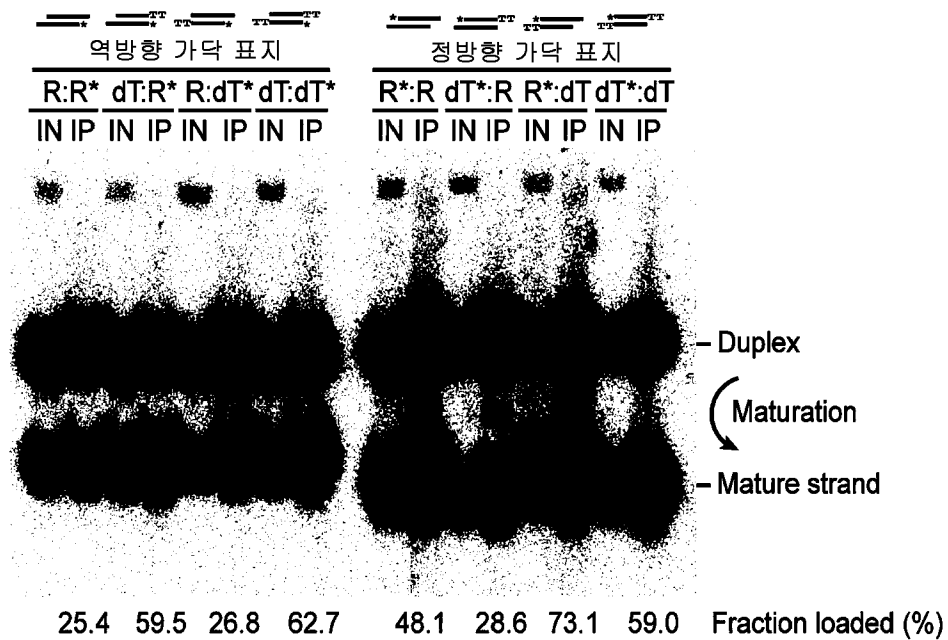
[Fig. 1]

A**B****C****D**

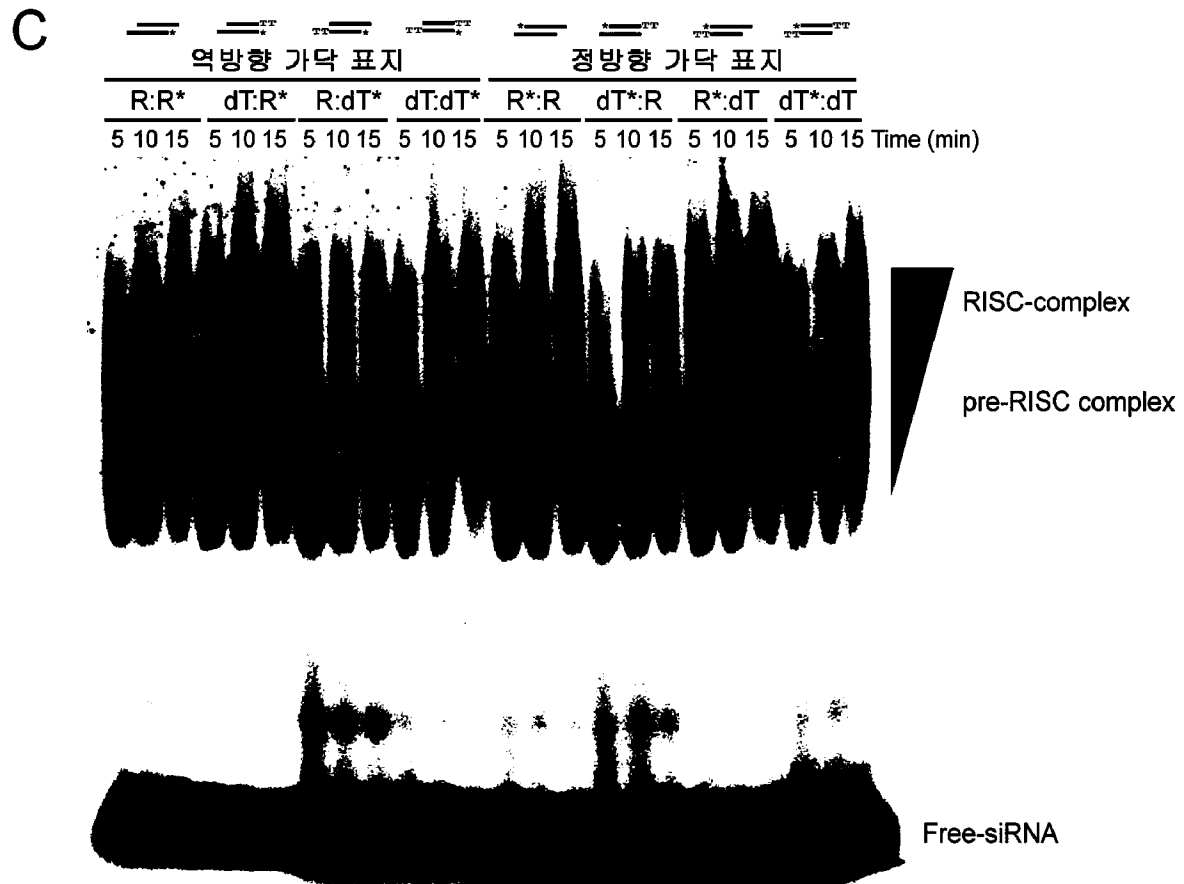
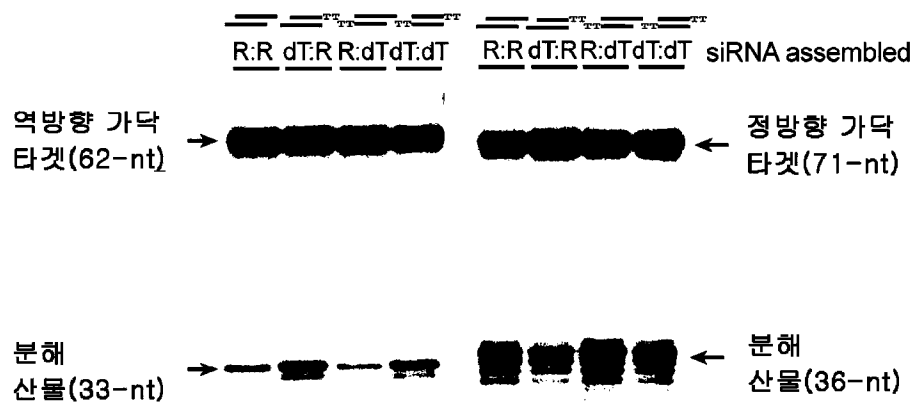
[Fig. 2a]

A**B**

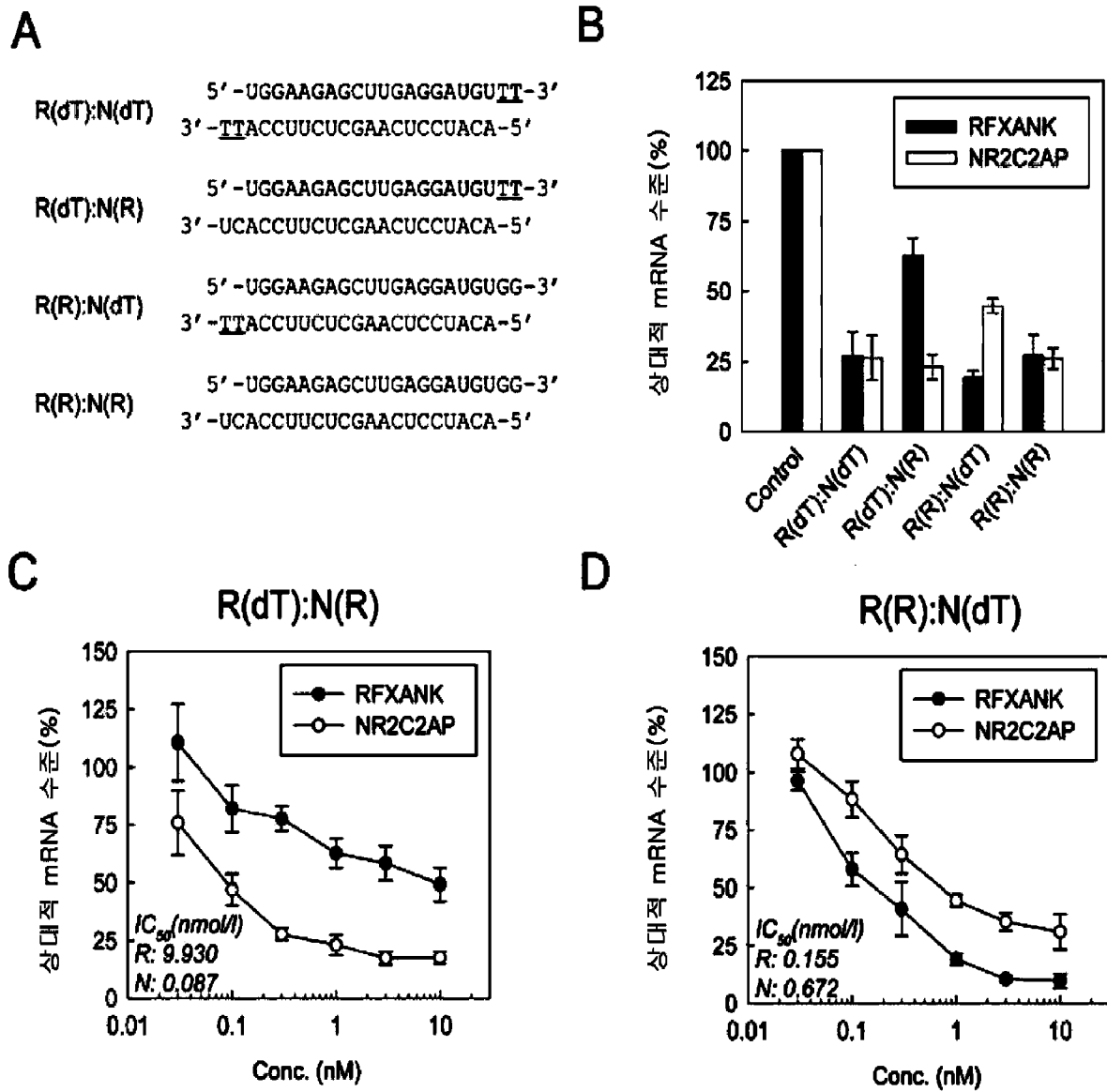
네이티브 겔 분석



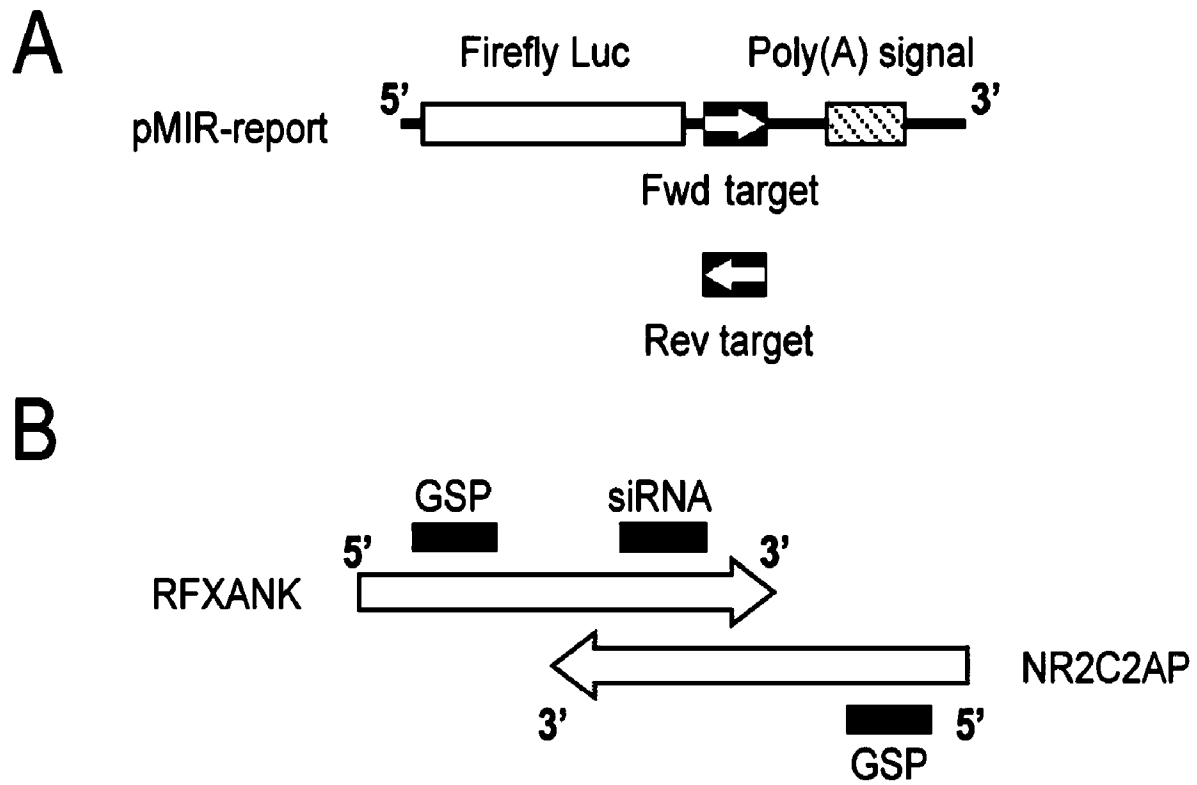
[Fig. 2b]

**D**인 비트로 분해 분석

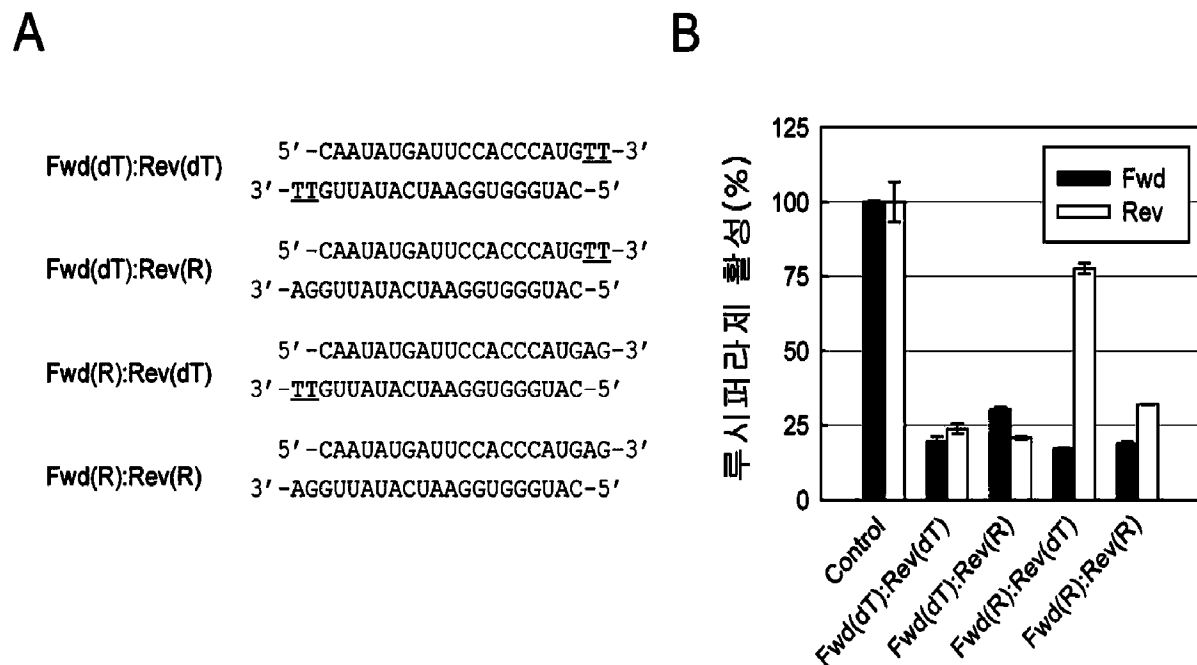
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/006418**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/113(2010.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/113

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: siRNA, off-target, 3'-overhang

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0110776 A (DICERNA PHARMACEUTICALS, INC.) 07 October 2011 See abstract and claims 1-146	1-12
A	Jiehua Zhou I et al, "Deep Sequencing Analyses of DsiRNAs Reveal the Influence of 3' Terminal Overhangs on Dicing Polarity, Strand Selectivity, and RNA Editing of siRNAs", Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2012, 1, e17 See abstract	1-12
A	Paola Posocco et al, "Impact of siRNA Overhangs for Dendrimer-Mediated siRNA Delivery and Gene Silencing", Mol. Pharmaceutics 2013, 10, pp. 3262-3273 See abstract	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"I" 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

02 NOVEMBER 2015 (02.11.2015)

Date of mailing of the international search report

02 NOVEMBER 2015 (02.11.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/006418

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0110776 A	07/10/2011	AU 2009-293636 A1	25/03/2010
		AU 2009-336191 A1	15/07/2010
		AU 2010-232410 A1	07/10/2010
		CA 2738625 A1	25/03/2010
		CA 2747013 A1	15/07/2010
		CA 2757613 A1	07/10/2010
		CA 2784252 A1	23/06/2011
		CN102325534 A	18/01/2012
		CN102497870 A	13/06/2012
		CN102575254 A	11/07/2012
		CN102575254 B	04/03/2015
		CN102753187 A	24/10/2012
		CN103555722 A	05/02/2014
		EP 2341943 A2	13/07/2011
		EP 2379083 A2	26/10/2011
		EP 2414374 A2	08/02/2012
		EP 2437751 A2	11/04/2012
		EP 2437752 A2	11/04/2012
		EP 2513334 A1	24/10/2012
		EP 2756845 A1	23/07/2014
		JP 2012-504389A	23/02/2012
		JP 2012-512651A	07/06/2012
		JP 2012-528596A	15/11/2012
		JP 2012-528882A	15/11/2012
		JP 2012-531888A	13/12/2012
		JP 2013-514089A	25/04/2013
		KR 10-2012-0034610 A	12/04/2012
		US 2010-0173973 A1	08/07/2010
		US 2010-0173974 A1	08/07/2010
		US 2010-0184841 A1	22/07/2010
		US 2010-0249214 A1	30/09/2010
		US 2010-0331389 A1	30/12/2010
		US 2011-0003881 A1	06/01/2011
		US 2011-0021604 A1	27/01/2011
		US 2011-0059187 A1	10/03/2011
		US 2011-0111056 A1	12/05/2011
		US 8349809 B2	08/01/2013
		US 8372816 B2	12/02/2013
		US 8513207 B2	20/08/2013
		WO 2010-033225 A2	25/03/2010
		WO 2010-033225 A3	05/01/2012
		WO 2010-080129 A2	15/07/2010
		WO 2010-080129 A3	16/09/2010
		WO 2010-093788 A2	19/08/2010
		WO 2010-093788 A3	07/10/2010
		WO 2010-115202 A2	07/10/2010
		WO 2010-115202 A3	09/12/2010
		WO 2010-115206 A2	07/10/2010
		WO 2010-115206 A3	25/11/2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/006418

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2010-141724 A2	09/12/2010
		WO 2010-141724 A3	03/02/2011
		WO 2010-141726 A2	09/12/2010
		WO 2010-141726 A3	27/01/2011
		WO 2010-141933 A1	09/12/2010
		WO 2011-072292 A2	16/06/2011
		WO 2011-072292 A3	29/09/2011
		WO 2011-075188 A1	23/06/2011
		WO 2011-109294 A1	09/09/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/113(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/113

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: siRNA, 오프-타겟, 3'-오버행

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0110776 A (다이서나 파마수이티컬, 인크.) 2011.10.07 요약 및 청구항 1-146 참조	1-12
A	Jiehua Zhou1 et al, "Deep Sequencing Analyses of DsiRNAs Reveal the Influence of 3' Terminal Overhangs on Dicing Polarity, Strand Selectivity, and RNA Editing of siRNAs", Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2012, 1, e17 요약 참조	1-12
A	Paola Posocco et al, "Impact of siRNA Overhangs for Dendrimer-Mediated siRNA Delivery and Gene Silencing", Mol. Pharmaceutics 2013, 10, pp.3262-3273 요약 참조	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 11월 02일 (02.11.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 11월 02일 (02.11.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

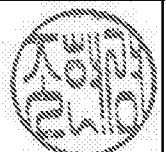
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

조현정

전화번호 +82-42-481-3323



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0110776 A	2011/10/07	AU 2009-293636 A1	2010/03/25
		AU 2009-336191 A1	2010/07/15
		AU 2010-232410 A1	2010/10/07
		CA 2738625 A1	2010/03/25
		CA 2747013 A1	2010/07/15
		CA 2757613 A1	2010/10/07
		CA 2784252 A1	2011/06/23
		CN102325534 A	2012/01/18
		CN102497870 A	2012/06/13
		CN102575254 A	2012/07/11
		CN102575254 B	2015/03/04
		CN102753187 A	2012/10/24
		CN103555722 A	2014/02/05
		EP 2341943 A2	2011/07/13
		EP 2379083 A2	2011/10/26
		EP 2414374 A2	2012/02/08
		EP 2437751 A2	2012/04/11
		EP 2437752 A2	2012/04/11
		EP 2513334 A1	2012/10/24
		EP 2756845 A1	2014/07/23
		JP 2012-504389A	2012/02/23
		JP 2012-512651A	2012/06/07
		JP 2012-528596A	2012/11/15
		JP 2012-528882A	2012/11/15
		JP 2012-531888A	2012/12/13
		JP 2013-514089A	2013/04/25
		KR 10-2012-0034610 A	2012/04/12
		US 2010-0173973 A1	2010/07/08
		US 2010-0173974 A1	2010/07/08
		US 2010-0184841 A1	2010/07/22
		US 2010-0249214 A1	2010/09/30
		US 2010-0331389 A1	2010/12/30
		US 2011-0003881 A1	2011/01/06
		US 2011-0021604 A1	2011/01/27
		US 2011-0059187 A1	2011/03/10
		US 2011-0111056 A1	2011/05/12
		US 8349809 B2	2013/01/08
		US 8372816 B2	2013/02/12
		US 8513207 B2	2013/08/20
		WO 2010-033225 A2	2010/03/25
		WO 2010-033225 A3	2012/01/05
		WO 2010-080129 A2	2010/07/15
		WO 2010-080129 A3	2010/09/16
		WO 2010-093788 A2	2010/08/19
		WO 2010-093788 A3	2010/10/07
		WO 2010-115202 A2	2010/10/07
		WO 2010-115202 A3	2010/12/09
		WO 2010-115206 A2	2010/10/07
		WO 2010-115206 A3	2010/11/25

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2010-141724 A2	2010/12/09
WO 2010-141724 A3	2011/02/03
WO 2010-141726 A2	2010/12/09
WO 2010-141726 A3	2011/01/27
WO 2010-141933 A1	2010/12/09
WO 2011-072292 A2	2011/06/16
WO 2011-072292 A3	2011/09/29
WO 2011-075188 A1	2011/06/23
WO 2011-109294 A1	2011/09/09