(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0165509
(43) 공개일자 2024년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 48/00 (2024.01)
(21) 출원번호 10-2023-0062570
(22) 출원일자 2023년05월15일
심사청구일자 2023년05월15일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이규리
경상남도 진주시 사들로 13, 904동 405호 (충무공동, 혁신도시엘에이치아파트9단지)
손소라
경상남도 진주시 사들로 126, 401동 1803호 (충무공동, 진주혁신코오롱하늘채)
박민사
경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 109동 504호 (가좌동, 센트럴웰가)
(74) 대리인
이처영, 장제환

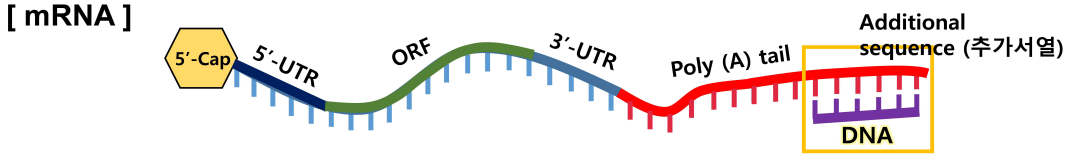
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **RNA/DNA 하이브리드 구조를 포함하는 신규 핵산 구조체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 목적 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 코딩 영역; 및 RNA/DNA 하이브리드(hybrid) 구조;를 포함하는 mRNA/DNA 구조체 및 상기 mRNA/DNA 구조체를 포함하는 백신용 또는 유전자 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 mRNA/DNA 구조체 플랫폼의 경우, mRNA에 의한 과도한 면역반응이 억제되고, 이에 따라 단백질 발현율이 증가되므로, mRNA 백신 및 유전자 치료 분야 등에서 범용적으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2320/30 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711160382
과제번호 2022M3E5F1017743
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 감염병차세대백신기초원천핵심기술개발사업
연구과제명 mRNA 세부구조별 차별화된 수정전략이 도입된 신규 mRNA 구조체 플랫폼 기술 개발
기 여 율 70/100
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2022.04.01 ~ 2025.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1475013324
과제번호 DY0002259454-22203백신안405-3
부처명 식품의약품안전처
과제관리(전문)기관명 식품의약품안전평가원
연구사업명 감염병대응혁신기술지원연구
연구과제명 새로운 mRNA 구조체 및 전달체를 이용한 백신 평가기술 개발 연구(1)
기 여 율 30/100
과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단
연구기간 2022.02.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

목적 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 코딩 영역(ORF); 및 폴리 A 테일(poly A tail)의 3' 말단에 연결된 RNA/DNA 하이브리드(hybrid) 구조;를 포함하는 mRNA/DNA 구조체로서,

상기 RNA/DNA 하이브리드 구조는 추가 RNA 서열 및; 상기 추가 RNA 서열에 상보적인 DNA 서열이 상보적으로 결합하여 이중가닥을 형성하는 것을 특징으로 함.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추가 RNA 서열은 5 내지 100개의 염기(nucleotides)를 포함하는 것을 특징으로 하는 mRNA/DNA 구조체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 DNA 서열은 폴리 A 테일 3' 말단의 폴리 A 서열 일부와 상보적인 폴리 T 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 mRNA/DNA 구조체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 DNA 서열은 6 내지 150개의 염기(nucleotides)를 포함하는 것을 특징으로 하는 mRNA/DNA 구조체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 코딩 영역의 양 말단에 연결되는 5'-비번역된 영역(5'-UTR); 3'-비번역된 영역(3'-UTR); 및 상기 5'-비번역된 영역에 연결되는 5'-캡(Cap)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 mRNA/DNA 구조체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 목적 펩타이드 또는 단백질은

(a) 치료적으로 활성인 단백질 또는 펩타이드;

(b) 종양 항원, 병원성 항원, 바이러스성 항원, 원생동물성 항원, 박테리아성 항원, 알레르기성 항원 및 자가면역 항원으로 구성된 군에서 선택된 항원; 또는

(c) 카스 단백질(Cas protein);

인 것을 특징으로 하는 mRNA/DNA 구조체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 mRNA/DNA 구조체를 포함하는 백신용 또는 유전자 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 면역유도능이 억제되고 단백질 발현 수준이 향상된 신규 핵산 구조체 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 목적 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 코딩 영역; 및 RNA/DNA 하이브리드(hybrid) 구조;를 포함하는 mRNA/DNA 구조체 및 상기 mRNA/DNA 구조체를 포함하는 백신용 또는 유전자 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 최근 몇 년간 과학 및 기술의 진보는 mRNA를 신규한 부류의 약물에 대한 유망한 후보로 만들었다. Sahin U. et al., *Nat.Publ.Gr.* 13, 759-780 (2014)은 mRNA-기반 치료제 및 약물 개발에 대한 개요를 제공하였다. mRNA는 예를 들어 항체 및 효소와 같은 단백질의 인 비보(in vivo) 생성을 유도하거나, 또는 특정 에피토프의 발현에 의해서 또는 구조적 mRNA 부분에 대한 선천적 면역 반응을 통해 면역 반응을 자극하는데 사용된다. 면역 반응 자극을 위한 mRNA의 적용은 암, AIDS를 치료하고, 거의 모든 질병에 대한 백신을 생성하는 신규한 접근법에 사용될 수 있다(Pardi, N. et al., *Nat.Publ.Gr.* 543, 248-251 (2017); Schlake T. et al., *RNA Biol.* 9, 1319-30 (2012)). 이러한 개발의 핵심은 향상된 번역 효율을 갖는 안정화된 mRNA의 강력한 인 비트로(in vitro) 생성 및 특정 형질감염 제제를 사용한 이의 세포로의 전달에 있다.

[0004] *In vitro* transcription(IVT)을 이용해 생산된 mRNA 제제는 최근 백신 또는 유전자 치료제로 잠재적인 신약 클래스로 주목 받고 있다. IVT mRNA는 핵에 수송되지 않고 세포기질(cytosol)에서 바로 기능하기 때문에 native mRNA와 유사하게 일시적으로 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다. 그러나, mRNA는 세포 내부 또는 외부에 흔하게 존재하는 핵산외부가수분해 효소(exonuclease, RNAse)에 의해 쉽게 분해(degradation)될 수 있다. 또한, 안전하고 효과적인 RNA 기반 백신 또는 치료제로서 기능하기 위해서는, 발현 수준 및 기간 측면에서 목적 단백질의 충분한 발현을 부여해야 하고, 치료 대상의 염증을 방지하고 특정 면역 반응을 피하기 위해 선천성 면역 시스템의 최소한의 자극을 부여해야 한다.

[0005] *In vivo* 환경에서의 exonuclease에 의한 mRNA 분해(degradation)는 단백질 발현에 중요한 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Caroline C Friedel, et al., *Nucleic Acids Res.* 2009 Sep;37(17):e115). 따라서, 치료용 mRNA를 제작할 때 초기 mRNA의 degradation을 회피시켜 궁극적으로 mRNA 안정성을 향상시키려는 시도가 여러 방면에서 지속적으로 수행되어 왔다. 현재까지 체내에서 치료용 mRNA 제제의 안정성 및 단백질 발현 수준을 높이기 위한 시도는 UTR(untranslated region) 변형 및 선정, 핵산 변형체(예를 들어 m1Ψ), 그리고 cap 구조체 개량에 초점을 두고 진행되어 왔다. mRNA 구조체 3' 말단에 위치한 poly A tail의 경우 exonuclease에 의한 mRNA 안정성에 가장 중요한 역할을 하고 있음에도 불구하고, COVID-19 mRNA 백신 개발 선도 기업으로 알려진 Curevac과 BioNTech에서의 연구 이외에는 연구개발이 미진한 상황이다.

[0006] 한편, 치료 RNA의 고유한 면역자극 특성이 백신의 바람직한 특징으로 여겨질 수 있는 반면, 이러한 효과는 바람직하지 않은 합병증을 유발할 수 있다. RNA 치료제를 장기간에 걸쳐 반복적으로 투여해야 하는 만성 질환의 치료에 특히 그렇다. 선천성 면역 반응을 이끌어내는 치료 RNA의 잠재적인 능력은 생체 내 적용에 대한 제한을 나타낼 수 있다.

[0007] 이러한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 mRNA에 의한 과도한 면역자극 특성은 낮추고 목적 단백질의 발현 수준은 높인 핵산 구조체 플랫폼을 개발하고자 예의 노력한 결과, 유전자 치료 및 백신 분야에 사용될 수 있는 mRNA 구조체의 poly A 말단에 추가 RNA 및 이에 상보적인 DNA를 포함하는 하이브리드(hybrid) 구조를 도입함으로써 mRNA의 화학적 변형 없이도 감소된 면역유도능 및 증가된 단백질 발현율을 나타내는 플랫폼임을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 면역유도능을 낮추고 단백질 발현 수준을 높인 신규 핵산 구조체를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산 구조체를 포함하는 백신용 약학 조성물 및 백신 요법(vaccination)을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산 구조체를 포함하는 유전자 치료용 약학 조성물 및 유전자 치료방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 또한 본 발명의 다른 목적은 백신 요법과 유전자 치료를 위한 상기 핵산 구조체의 용도 및 백신용 또는 유전자 치료용 약제 제조를 위한 상기 핵산 구조체의 사용을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 목적 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 코딩 영역(ORF); 및 폴리 A 테일(poly A tail)의 3' 말단에 연결된 RNA/DNA 하이브리드(hybrid) 구조;를 포함하는 mRNA/DNA 구조체로서, 상기 RNA/DNA 하이브리드 구조는 추가 RNA 서열 및; 상기 추가 RNA 서열에 상보적인 DNA 서열이 상보적으로 결합하여 이중가닥을 형성하는 것을 특징으로 하는 mRNA/DNA 구조체를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 mRNA/DNA 구조체를 포함하는 백신(vaccine) 또는 유전자 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 mRNA/DNA 구조체를 투여하는 단계를 포함하는 백신 요법(vaccination) 또는 유전자 치료 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 백신 또는 유전자 치료제의 제조를 위한 상기 mRNA/DNA 구조체의 사용을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 mRNA/DNA 구조체 플랫폼의 경우, RNA/DNA 하이브리드를 도입함으로써 mRNA에 의한 과도한 면역반응이 억제되고, 이에 따라 단백질 발현율이 증가되므로, mRNA 백신 및 유전자 치료 분야 등에서 범용적으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 따른 mRNA 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체를 도식화한 것이다.

도 2는 IVT mRNA 합성을 위한 pDNA 주형으로 PCR을 수행하고, Purification 후 1% agarose gel을 사용하여 전기영동한 결과로, IVT mRNA 합성을 위해 (a)는 T7 프로모터, 5'UTR, 오픈리딩프레임(ORF), 3'UTR을 포함하는 DNA 벡터(pUCIDT-AMP-DsRed Express2), (b)는 T7 프로모터, 5'UTR, ORF, 3'UTR을 포함하는 DNA 벡터(Luciferase-pcDNA3), (c)는 T7 프로모터, 5'UTR, ORF, 3'UTR을 포함하는 DNA 벡터(pUC-pc-EPO)를 전사주형으로 한 결과이다.

도 3은 IVT mRNA 합성 과정에서 생기는 불순물인 dsRNA를 제거하기 위하여 cellulose purification(셀룰로오스 정제)을 진행한 후 Dot-blot으로 dsRNA 유무를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 어닐링을 통해 mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 신규 핵산 구조체를 제조하고, RNA/DNA 하이브리드 구조가 잘 도입되었음을 확인한 도면으로, (a)는 15% PAGE 겔을 전기영동한 결과이며, (b)는 S9.6 항체(Anti-DNA-RNA Hybrid 항체)를 사용한 Dot-blot 결과이다.

도 5는 293T 세포를 사용하여 IVT mRNA 및 mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 신규 핵산 구조

체의 Firefly Luciferase 단백질 발현 능력을 확인한 결과를 나타낸 그래프로, RNA/DNA 하이브리드 구조의 서열이나 길이에 관계없이 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체에서 우수한 Firefly Luciferase 단백질 발현 능력을 나타낸 도면이다.

도 6은 Microfluidic device인 Precision Nanosystems의 NanoAssemblr® Ignite™를 사용하여 IVT mRNA 및 mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조를 포함하는 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체를 지질 나노입자(LNP)에 봉입하고, 지질 나노입자의 특성(Diameter Size, PDI, Encapsulation Efficiency%)을 나타낸 도면으로, (a)는 RFP(레드형광단백질)을 코딩하는 핵산 구조체를 지질 나노입자에 봉입한 결과이며, (b)는 EPO(적혈구형성인자)를 코딩하는 핵산 구조체를 지질 나노입자에 봉입한 결과이다.

도 7은 293T 세포를 사용하여, IVT mRNA 및 mRNA의 3’ 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조를 포함하는 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체를 지질 나노입자(LNP)로 봉입한 후, RFP 발현 능력을 시간대별로(3, 6, 18, 24, 48시간) 확인한 결과를 나타낸 그래프(a)와 단백질 발현양의 AUC 그래프(b)다.

도 8은 인간 유래 THP-1(단핵구세포주)를 대식세포로 분화를 유도한 후, IVT mRNA 및 mRNA의 3’ 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조를 포함하는 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체를 지질 나노입자(LNP)로 봉입한 후, RFP 발현 능력을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 IVT mRNA 및 mRNA의 3’ 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조를 포함하는 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체를 지질 나노입자(LNP)로 잘 감싸준 후, BALB/c 마우스를 사용하여 Retro-orbital 방법으로 주입하고 시간대별로(3, 6시간) plasma를 분리하여 ELISA로 EPO 발현 능력을 확인한 그래프(a)와 AUC(b) 그래프이다.

도 10은 IVT mRNA 및 mRNA의 3’ 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조를 포함하는 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체의 인터페론(IFN) 유도능을 확인한 결과로, 인간 유래 THP-1 Dual™ 세포(Invivogen)를 사용하였고, PMA를 사용하여 대식세포로 분화를 유도한 후, mRNA 및 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체를 각각 200ng 형질 주입(transfection)하고 18~24시간 후, 세포의 상층액(supernatant) 25㎕을 사용하여 Quanti-Luc 시험을 통하여 인터페론(IFN)을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에서는, mRNA 구조체의 poly A tail 3' 말단에 추가적으로 연결된 RNA 서열과 이에 상보적인 DNA 서열이 결합하여 이중가닥을 형성하는 RNA/DNA 하이브리드 구조를 포함하는 신규 mRNA/DNA 구조체를 이용하여, 기존 IVT mRNA에 비해 높은 단백질 발현율을 나타내고, mRNA에 의해 유도되는 과도한 면역반응을 억제시킬 수 있는 플랫폼을 개발하였다.

[0028] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 목적 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 코딩 영역(ORF); 및 폴리 A 테일(poly A tail)의 3' 말단에 연결된 RNA/DNA 하이브리드(hybrid) 구조;를 포함하는 mRNA/DNA 구조체로서, 상기 RNA/DNA 하이브리드 구조는 추가 RNA 서열 및; 상기 추가 RNA 서열에 상보적인 DNA 서열이 상보적으로 결합하여 이중가닥을 형성하는 것을 특징으로 하는 mRNA/DNA 구조체에 관한 것이다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 추가 RNA 서열은 mRNA 구조체의 poly A tail의 3' 말단에 연결된 임의의 폴리리보뉴클레오티드 서열 또는 random RNA 서열로서, UTR 또는 ORF 서열과 간섭 작용 없이 mRNA 구조체의 단백질 발현율을 증가시키는 서열이라면 제한 없이 적용 가능하다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 추가 RNA 서열은 임의의 길이의 RNA 서열일 수 있으며, 5 내지 100개의 염기(nucleotides, nt)를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 10 내지 80nt, 더욱 바람직하게는 15 내지 60nt, 가장 바람직하게는 19nt 내지 49nt를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 서열은 상기 추가 RNA 서열에 상보적인 서열을 포함하여 RNA 서열과 서로 상보적으로 결합할 수 있는 서열이라면 제한 없이 적용 가능하다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 서열은 폴리 A 테일 3' 말단의 폴리 A 서열 일부와 상보적인 폴리 T 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 즉, 상기 DNA 서열의 3' 말단은 폴리 T 서열을 포함하고 5' 말단 방향으로 상기 RNA 서열과 상보적인 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 서열은 상기 RNA 서열과 동일한 개수, 즉, 5 내지 100개의 염기를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는, 폴리 T 서열을 포함하여 6 내지 150nt, 더욱 바람직하게는 20 내지 100nt, 가장 바람직하게는 25nt 내지 60nt를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명에 있어서, 용어 'RNA/DNA 하이브리드(hybrid) 구조'는 RNA 서열과 DNA 서열이 서로 상보적으로 결합하여 이중가닥(double strand)을 형성하는 구조를 의미한다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 DNA 서열이 추가 RNA 서열과 동일한 개수의 nt를 포함하거나, mRNA 구조체의 3' 말단의 폴리 A 테일 일부와 상보적인 폴리 T 서열을 더 포함할 수 있으며, 상기 RNA/DNA 하이브리드 구조는 6 내지 150bp를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에 있어서, 용어 '폴리 A 테일'은 '폴리 (A) 서열'과 동일한 의미로 상호 교환적으로 사용된다. 상기 폴리 (A) 서열의 길이는 다양할 수 있으며, 예를 들어, 약 20 아데닌 뉴클레오티드 내지 약 300 아데닌 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 40 내지 약 200 아데닌 뉴클레오티드, 약 60, 70, 80, 90 또는 100 아데닌 뉴클레오티드와 같이 더욱 바람직하게는 약 50 내지 약 100 아데닌 뉴클레오티드와 같이, 약 20 아데닌 뉴클레오티드 내지 약 400 아데닌 뉴클레오티드의 길이를 갖는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 명세서에서 용어 "핵산"은 바람직하게 DNA 또는 RNA를 의미한다. 상기 핵산과 관련하여, "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", 및 "올리고뉴클레오티드"는 상호교환적으로 사용된다. 임의의 길이의 뉴클레오티드의 폴리머 형태, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있으며, 공지된 또는 비공지된 임의의 기능을 수행할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 예컨대, 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 폴리머의 어셈블리 전 또는 후에 가능할 수 있다.

[0041] 바람직하게는, 핵산은 당/인산 백본의 포스포디에스터 결합에 의해 서로 공유결합된 뉴클레오티드 모노머를 포함 또는 이로 이루어진 폴리머이다. "핵산"은 염기 변형된, 당 변형된 또는 백본 변형된 DNA 또는 RNA 분자와 같은, 변형된 핵산을 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 mRNA는 비변형 또는 변형 핵산을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 비변형 핵산을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0043] 상기 변형 핵산은 슈도우리딘(pseudouridine, Ψ), N1-메틸-슈도우리딘(N1-methylpseudouridine, m1Ψ), 5-메틸-우리딘(5-methyluridine, m5U), 2-티오-우리딘(2-thiouridine, s2U), 2'-O-메틸-우리딘(2′-O-methyl-U, Um), 5-메틸-시티딘(5-methylcytidine, m5C) 및 5-메톡시-우리딘(5-methoxyuridine, 5moU)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본 명세서에서, 용어 'DNA'는 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid)에 대한 약어이다. 이는 핵산 분자, 즉 뉴클레오티드로 이루어진 폴리머이다. 이들 뉴클레오티드는 보통 디옥시-아데노신-모노포스페이트, 디옥시-티미딘-모노포스페이트, 디옥시-구아노신-모노포스페이트 및 디옥시-시티딘-모노포스페이트 모노머이며, 당(디옥시리보스), 염기 및 포스페이트로 이루어지고, 특유의 백본(backbone) 구조에 의해 중합된다. 백본 구조는 전형적으로 첫째 뉴클레오티드의 당 일부, 즉 디옥시리보스 및 둘째 포스페이트 일부, 인접한 모노머 사이의포스포디에스터 결합에 의해 형성된다. 모노머의 특정한 순서, 즉 당/포스페이트 백본에 연결된 염기들의 순서는 DNA 서열로 불린다. DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥 형태에서 첫번째 가닥의 뉴클레오티드는 전형적으로 두번째 가닥의 뉴클레오티드와 혼성화하며, 예를 들어 A/T 염기쌍 및 G/C 염기쌍에 의한다.

[0045] 본 명세서에서 용어, 'RNA'는 리보핵산(ribonucleic acid)의 약어로, 핵산 분자, 즉 뉴클레오티드로 이루어진

폴리머이다. 예를 들어 mRNA(messenger RNA)를 포함한다. 뉴클레오티드는 보통 소위 백본을 통해 서로 연결된 아데노신-모노포스페이트, 우리딘-모노포스페이트, 구아노신-모노포스페이트 및 시티딘 모노포스페이트 모노머이다. 백본은 첫번째로 당, 예를 들어 리보스 및 두번째로 인접 모노머, 포스페이트 일부 사이의 포스포디에스터 결합에 의해 형성된다. 모노머들의 특이적인 연속은 RNA 서열로 불린다. 메신저 RNA는 보통 특정한 펩타이드 또는 단백질의 아미노산 서열로 번역될 수 있는 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 전형적으로, mRNA는 5'-캡, 5'UTR, 오픈리딩프레임, 3'UTR 및 폴리(A) 서열을 포함한다. 메신저 RNA를 제외하고, 전사 및/또는 번역의 조절에 포함될 수 있는 RNA의 몇몇 비코딩 형태가 존재한다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 mRNA/DNA 구조체는 상기 코딩 영역의 양 말단에 연결되는 5'-비번역된 영역(5'-UTR); 3'-비번역된 영역(3'-UTR); 및 상기 5'-비번역된 영역에 연결되는 5'-캡(Cap);으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 하기 구조식 (1) 또는 구조식 (2)의 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 구조식 (1): 5'-UTR - ORF - 3'-UTR - Poly (A) tail - RNA/DNA 하이브리드(hybrid) 구조

[0050] 구조식 (2): 5'-Cap - 5'-UTR - ORF - 3'-UTR - Poly (A) tail - RNA/DNA 하이브리드(hybrid) 구조

[0052] 본 발명에 있어서, 용어 “5'-비번역된 영역(5'-UTR)”은 오픈리딩프레임의 5'(즉 "업스트림")에 위치하며 단백질로 번역되지 않은 인공 핵산 분자를 의미한다. 5'-UTR은 전형적으로 mRNA의 오픈리딩프레임의 5'에 위치한 mRNA의 특정한 구획(section)으로 이해된다. 일반적으로, 5'-UTR은 전사 시작 부위에서 시작하며, 오픈리딩프레임의 시작 코돈의 1개 뉴클레오티드 앞에서 종결한다. 바람직하게, 5'-UTR은 20 내지 200개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 5'-UTR은 유전자 발현을 조절하기 위한 요소, 소위 조절 요소를 포함할 수 있다. 이러한 조절 요소는 예를 들어 리보좀 결합 부위일 수 있다. 5'-UTR은 예를 들어 5'-Cap의 첨가를 통해 전사후 변형될 수 있다. mRNA의 5'-UTR은 아미노산 서열로 번역되지 않는다. 5'-UTR 서열은 일반적으로 유전자 발현 과정 중 각각의 mRNA로 전사되는 유전자에 의해 코딩된다. 유전체 서열은 선택적 인트론을 포함하는 조숙 mRNA로 먼저 전사된다. 조숙 mRNA는 이후 성숙 과정 중 성숙 mRNA로 추가적으로 가공된다. 이러한 성숙 과정은 5'캡핑, 선택적 인트론으로 자르기 위한 조숙 mRNA의 스플라이싱 및 조숙 mRNA의 3'-말단의 폴리아데닐화와 같은 3'-말단의 변형 및 선택적 엔도/또는 엑소뉴클레아제 분해 등의 단계를 포함한다. 본 발명에 있어서, 5'-UTR은 시작 코돈 및 예를 들어, 5'-Cap 사이에 위치한 성숙 mRNA의 서열에 상응한다. 바람직하게, 5'-UTR은 5'-Cap에 3' 위치한 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게 5'-Cap에 3' 바로 옆에 위치한 뉴클레오티드로부터 단백질 코딩 영역의 시작 코돈에 5' 위치한 뉴클레오티드, 바람직하게 단백질 코딩 영역의 시작 코돈에 5' 바로 옆에 위치한 뉴클레오티드까지 확장하는 서열에 상응한다. 성숙 mRNA의 5'-Cap에 3' 바로 옆에 위치한 뉴클레오티드는 전형적으로 전사 시작 부위에 상응한다. 용어 "상응"은 5'-UTR 서열이 5'-UTR 서열을 정의하는데 사용되는 mRNA 서열과 같은 RNA 서열, 또는 이러한 RNA 서열에 상응하는 DNA 서열일 수 있음을 의미한다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 5'-UTR은 IRES를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명에서 용어 "IRES(Internal Ribosome Entry Site)"는 내부리보솜유입점 또는 리보솜 결합 부위로서 mRNA 상에서 고리(loop) 구조를 형성하여 Cap과 독립적인 메커니즘으로 번역(translation)의 개시를 유도함이 알려져 있다. 이를 이용하여 2개 이상의 유전자 사이에 IRES를 위치시켜 하나의 벡터로 제조하는 경우 한 개 mRNA 상에서 2개의 유전자를 각각 동시에 발현시킬 수 있다. 이에, 유전자 재조합 기술에서 타겟 유전자의 발현 유도를 위하여 IRES 영역을 삽입하는 것은 널리 이용되고 있다.

[0055] 본 발명에 있어서, 용어 “3'-비번역된 영역(3'-UTR)”은 오픈리딩프레임의 3'(즉 "다운스트림")에 위치하고 단백질로 번역되지 않는 인공 핵산 분자의 일부를 말한다. 전형적으로, 3'-UTR은 단백질 코딩 영역(ORF 또는 CDS) 및 mRNA의 폴리 (A) 서열 사이에 위치한 mRNA의 일부이다. 본 발명에 있어서, 용어 3'-UTR은 또한 RNA가 전사된 주형(template)으로 코딩되지 않은 요소를 포함할 수 있다. 3'-UTR 서열은 보통 유전자 발현 과정 중에 각각 mRNA로 전사되는 유전자에 의해 코딩된다. 유전체 서열은 선택적 인트론을 포함하는 mRNA로 우선 전사된다. mRNA는 이후 5'캡핑, 스플라이싱 및 3'-말단의 폴리아데닐화와 같은 3'-말단의 변형 및 선택적 엔도- 또는 엑소뉴클레아제 분해 등의 단계를 포함한다. 본 발명에 있어서, 3'-UTR은 단백질 코딩 영역의 정지 코돈 사이에, 바람직하게는 단백질 코딩 영역의 정지 코돈에 3' 바로 옆에 위치한 성숙 mRNA의 서열, 및 mRNA의 폴리 (A) 서열

에 상응한다. 용어 “상응”은 3'-UTR 서열은 3'-UTR 서열을 정의하는데 사용되는 mRNA 서열에서와 같이 RNA 서열, 또는 이러한 RNA 서열에 상응하는 DNA 서열일 수 있음을 의미한다. 바람직하게, 3'-UTR은 20 내지 300개 뉴클레오티드 길이를 갖는다.

[0056] 본 발명에 있어서, 용어 “5'-캡(cap)”은 mRNA의 5' 시작 부위에 위치한 5'-말단을 "덮는(caps)" 독립체 구성요소이다. 일반적으로 Cap 구조는 단백질 합성을 개시하고 핵산분해효소의 작용으로부터 mRNA를 보호하는 역할을 하며, 또한 5'-Cap은 번역에도 영향을 준다. 5'-캡은 전형적으로 변형된 뉴클레오티드에 의해, 특히 구아닌 뉴클레오티드의 유도체에 의해 형성될 수 있다. 바람직하게는, 5'-캡은 5'-5'-삼인산염 연결을 통해 5'-말단에 연결된다. 5'-캡은 메틸화될수 있으며, 예를 들어 m7GpppN, 상기 N은 5'-캡을 수송하는 핵산의 말단 5' 뉴클레오티드, 전형적으로 RNA의 5'-말단이다.

[0057] 5'-캡 구조의 추가적 예시는 글리세릴, 역 디옥시 비염기 잔기(inverted deoxy abasic residue)(일부), 4',5' 메틸렌 뉴클레오티드, 1-(베타-D-에리쓰로푸라노실) 뉴클레오티드, 4'-티오 뉴클레오티드, 카르보사이클릭 뉴클레오티드, 1,5-무수헥시톨 뉴클레오티드, L-뉴클레오티드, 알파-뉴클레오티드, 변형된 염기 뉴클레오티드, 트레오-펜토푸라노실 뉴클레오티드, 비환식(acyclic) 3',4'-세코 뉴클레오티드, 비환식 3,4-디하이드록시부틸 뉴클레오티드, 비환식 3,5 디하이드록시펜틸 뉴클레오티드, 3'-3'-역 뉴클레오티드 일부, 3'-3'-역 비염기 일부, 3'-2'-역 뉴클레오티드 일부, 3'-2'-역 비염기 일부, 1,4-부탄디올 포스페이트, 3'-포스포라미데이트, 헥실포스페이트, 아미노헥실 포스페이트, 3'-포스페이트, 3'포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 또는 브릿징(bridging) 또는 논-브릿징 메틸포스포네이트 일부를 포함한다.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 mRNA/DNA 구조체를 *In vitro* transcription(IVT) 방법으로 발현시키기 위한 DNA 벡터는 프로모터 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 5'-UTR의 업스트림에 위치할 수 있다. 상기 프로모터는 예를 들어 RNA 중합효소 프로모터와 같은, 전사를 위해 필요한 요소를 포함할 수 있다. SP6 또는 T7과 같은 파지 RNA 중합효소 프로모터, 바람직하게는 mRNA 서열을 코딩하는 T7 프로모터를 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에서, 목적 유전자의 mRNA를 IVT 방법으로 발현시키기 위한 것으로 구체적으로는 5'-T7 프로모터-5'UTR-목적 유전자-3'UTR- 폴리(dA:dT) 테일(poly(dA:dT) tail)로 구성된 주형 DNA를 제작할 수 있다.

[0062] 본 발명에 있어서, “ORF” 또는 “CDS”는 목적 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 코딩 영역을 의미한다.

[0063] 상기 목적 펩타이드 또는 단백질은

[0064] (a) 치료적으로 활성인 단백질 또는 펩타이드;

[0065] (b) 종양 항원, 병원성 항원, 바이러스성 항원, 원생동물성 항원, 박테리아성 항원, 알레르기성 항원 및 자가면역 항원으로 구성된 군에서 선택된 항원; 또는

[0066] (c) 카스 단백질(Cas protein);

[0067] 일 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 삽입된 유전자에 따라, 본 발명에 따른 mRNA/DNA 구조체는 자가면역질환, 감염성 질환, 암 또는 종양 관련 질환, 염증성 질환 등에 대한 유전자 백신 요법 용도 또는 유전자 치료용도로 사용할 수 있다.

[0068] 구체적으로 본 발명에 따른 mRNA/DNA 구조체가 백신 요법을 위한 백신으로 사용되는 경우, 상기 CDS는 인플루엔자 바이러스, 코로나 바이러스, 바리셀라 조스터 바이러스, 사람파필로마 바이러스, 지카 바이러스, 헤르페스 바이러스, 에이즈 바이러스, SFTS 바이러스, 홍역바이러스, 에볼라 바이러스, 메르스 바이러스, 간염 바이러스, 조류 인플루엔자, 광견병 바이러스 및 구제역 바이러스 등 인간과 동물에 감염을 일으킬 수 있는 바이러스 항원의 전부 또는 일부 영역을 코딩하는 영역일 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 또한 본 발명에 mRNA/DNA 구조체가 단백질 또는 항원을 발현함으로써 유전자 치료제의 개념으로 이용되는 경우, 상기 CDS는 단백질 의약품(protein drugs), 항체(antibody) 의약품, 질병 관련 항원(cancer antigen) 등의 전부 또는 일부 서열을 코딩하는 영역일 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 상기 질병 관련 항원은 4-1BB, 인테그린(integrin), 아밀로이드 베타(amyloid beta), 안지오포에틴(안지오포에틴 1 또는 2), 안지오포에틴 유사물질3, B세포 활성인자(B-cell activating factor, BAFF), B7-H3, 보체

5(complement 5), CCR4, CD3, CD4, CD6, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD52, CD62, CD79b, CD80, CGRP, 클라우딘18(Claudin-18), 보체요소 D(complement factor D), CTLA4, DLL3, EGF 수용체, 혈우병 인자, FGF23, 폴레이트(folate) 수용체, GD2, GM-CSF, HER2, HER3, 인터페론 수용체, 인터페론 감마, IgE, IGF-1 수용체, 인터루킨1, 인터루킨2 수용체, 인터루킨4 수용체, 인터루킨5, 인터루킨5 수용체, 인터루킨6, 인터루킨6 수용체, 인터루킨7, 인터루킨12/23, 인터루킨13, 인터루킨17A, 인터루킨17수용체A, 인터루킨31 수용체, 인터루킨36 수용체, LAG3, LFA3, NGF, PVSK9, PD-1, PD-L1, RANK-L, SLAMF7, 조직인자(Tissue factor), TNF, VEGF 및 VEGF 수용체로 구성된 군에서 선택될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니며,

[0071] 상기 항체 의약품은 질병과 관련된 질환 치료용으로 사용되는 항체, 바람직하게는 상기 질병 관련 항원에 대한 치료용 항체 의약품, 더욱 바람직하게는 현재 시판 중이거나 임상시험단계에 있는 의약품이라면 제한 없이 사용 가능하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 또한, 상기 단백질 의약품은 아미노산으로 구성되어 단백질의 활성을 통해 질병의 치료 또는 예방효과를 나타내는 약물로서, 항체 의약품 이외의 단백질로 이루어진 의약품을 의미하며, 사이토카인(cytokines), 치료용 효소(therapeutic enzyme), 호르몬(hormone), 수용성 수용체(soluble receptor) 및 이의 융합 단백질, 인슐린(insulin) 또는 이의 유사체(analogue), BMP(Bone Morphogenetic Protein), EPO(erythropoietin) 및 혈장 유래 단백질(serum derived protein) 등으로 구성된 군에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0073] 구체적인 예로, 상기 사이토카인은 인터페론(interferon), 인터루킨(interleukin), CSF(colony stimulating factor), TNF(tumor necrosis factor) 및 TGF(tissue growth factor) 등으로 구성된 군에서 선택될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 치료용 효소는 베타-글루코세레브로시다제(β-Glucocerebrosidase) 및 아갈시다제 베타(agalsidase β) 등이 예시될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0074] 또한 상기 수용성 수용체(soluble receptor)는 수용체의 세포외 도메인(extracellular domain)을 의미하고, 이의 융합 단백질은 상기 수용성 수용체에 항체의 Fc 영역 등이 융합된 단백질을 의미하며, TNF-α 수용성 수용체에 Fc 영역이 융합된 형태(예를 들어 에타너셉트(Etanercept)라는 성분명의 제품 등) 및 VEGF 수용성 수용체에 Fc 영역이 융합된 형태(아플리버셉트(Aflibercept)라는 성분명의 제품 및 이와 유사한 형태), CTLA-4에 Fc 영역이 융합된 형태(예를 들어 아바타셉트(Abatacept) 또는 벨라다셉트(Belatacept)라는 성분명의 제품 및 이와 유사한 형태), 인터루킨1 수용성 수용체에 Fc 영역이 융합된 형태(예를 들어 릴로나셉트(Rilonacept)라는 성분명의 제품 및 이와 유사한 형태), LFA3 수용성 수용체에 Fc 영역이 융합된 형태(예를 들어 알레파셉트(Alefacept)라는 성분명의 제품 및 이와 유사한 형태) 등이 예시될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0075] 상기 호르몬은 호르몬 결핍 등으로 인해 발생하는 질환의 치료 또는 예방을 위해 체외에서 주입하는 호르몬 또는 이의 유사체를 의미하며, 사람 성장호르몬(human growth hormone), 에스트로겐(estrogen), 프로게스테론(Progesterone) 등이 예시될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 혈장 유래 단백질은 혈장에 존재하는 단백질로, 혈장에서 추출한 것과 재조합으로 생산된 것들 모두를 의미하며, 피브리노겐(fibrinogen), 본 빌레블란트 인자(von Willebrand Factor), 알부민(albumin), 트롬빈(thrombin), FII(Factor II), FV(Factor V), FVII(Factor VII), FVIII(Factor VIII), FIX(Factor IX), FX(Factor X) 및 FXI(Factor XI) 등이 예시될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0076] 상기 카스 단백질은 CRISPR-Cas 유전자 편집제어를 위한 것으로서, Cas9, Cas13a, Cas12a, Cas12e, Cas12f, Cas12j, Cas13, adenine base editor(ABE), cytosine base editor(CBE)를 비롯한 다양한 Cas variant들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0078] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 mRNA/DNA 구조체를 포함하는 백신용 또는 유전자 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0079] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 mRNA/DNA 구조체를 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 백신 요법 또는 유전자 치료방법에 관한 것이다.

[0080] 본 발명은 또 다른 관점에서, 백신 요법과 유전자 치료를 위한 상기 mRNA/DNA 구조체의 용도에 관한 것이다.

[0081] 본 발명은 또 다른 관점에서, 백신용 또는 유전자 치료용 약제 제조를 위한 상기 mRNA/DNA 구조체의 사용에 관한 것이다.

[0083] 본 발명에서 용어 “백신”은 적어도 하나의 항원, 바람직하게는 면역원을 제공하는 예방 또는 치료적 물질로 이해된다. 항원 또는 면역원은 백신 접종에 적합한 어느 물질로부터 유래될(derived) 수 있다. 예를 들어, 항원 또는 면역원은 박테리아 또는 바이러스 입자 등으로부터 또는 종양 또는 암 조직으로부터와 같은 병원체로부터 유래될 수 있다. 항원 또는 면역원은 적응 면역 반응을 제공하는 몸의 적응 면역 시스템을 자극한다.

[0084] 본 발명의 용어 “예방”은, 상기 조성물의 투여로 질환의 발병을 막거나, 이의 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는, 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 증상의 경감 또는 완치되는 모든 행위를 의미한다.

[0086] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 mRNA를 전달하기 위한 전달 수단을 포함할 수 있다.

[0087] 본 발명에 따른 mRNA/DNA 구조체는 리포좀(liposome), LNP(lipid Nano-Particle) 또는 다양한 나노입자를 통해 전달될 수 있다.

[0088] 리포좀 또는 LNP는 양이온성 지질, 비양이온성 지질 또는 중성 지질 등을 포함하며, 추가적으로 PEG(polyethylene glycol) 또는 콜레스테롤 등의 다른 지질을 포함하는 경우도 있다. 이러한 mRNA 전달체는 US 2018/0311176 A, US 2019/0032051 A, US 2021/0046192 A, WO 2018/081480 A, WO 2020/097540 A, WO 2020/097548 A, WO 2021/007278 A 등에 구체적으로 기재되어 있으며, 본 명세서에 참조로서 도입된다.

[0089] 상기 양이온성 지질은 US 2018/0311176 A, US 2019/0032051 A 등을 통해 구체적으로 예시되어 있으며, 예를 들어 N,N-dioleyl-N,N-dimethylammonium chloride (DODAC), N,N-distearyl-N,N-dimethylammonium bromide (DDAB), N-(I-(2,3-dioleyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTAP), N-(I-(2,3-dioleyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA), N,N-dimethyl-2,3-dioleyloxy)propylamine (DODMA), 1,2-DiLinoleyloxy-N,N-dimethylaminopropane (DLinDMA), 1,2-Dilinolenyloxy-N,N-dimethylaminopropane (DLenDMA), 1,2-Dilinoleylcarbamoyloxy-3-dimethylaminopropane (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoleyoxy-3-(dimethylamino)acetoxypropane (DLin-DAC), 1,2-Dilinoleyoxy-3-morpholinopropane (DLin-MA), 1,2-Dilinoleoyl-3-dimethylaminopropane (DLinDAP), 1,2-Dilinoleylthio-3-dimethylaminopropane (DLin-S-DMA), 1-Linoleoyl-2-linoleyloxy-3-dimethylaminopropane (DLin-2-DMAP), 1,2-Dilinoleyloxy-3-trimethylaminopropane chloride salt (DLin-TMA.Cl), 1,2-Dilinoleoyl-3-trimethylaminopropane chloride salt (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoleyloxy-3-(N-methylpiperazino)propane (DLin-MPZ), 3-(N,N-Dilinoleylamino)-1,2-propanediol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleylamino)-1,2-propanedio (DOAP), 1,2-Dilinoleyloxo-3-(2-N,N-dimethylamino)ethoxypropane (DLin-EG-DMA), 1,2-Dilinolenyloxy-N,N-dimethylaminopropane (DLinDMA), 2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolane (DLin-K-DMA) 또는 이들의 유사체, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimethyl-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9, 12-dienyl)tetrahydro-3aH-cyclopenta[d][1,3]dioxol-5-amine (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(dimethylamino)butanoate (MC3), 1, 1′ -(2-(4-(2-((2-(bis(2-hydroxydodecyl)amino)ethyl)(2-hydroxydodecyl)amino)ethyl)piperazin-1-yl)ethylazanediyl)didodecan-2-ol (Tech G1), 2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolane, β-L-arginyl-2, 3-L-diaminopropionic acid-N-palmityl-N-oleylamide trihydrochloride, N′ ,N′ -dioctadecyl-N-4, 8-diaza-10-aminodecanoylglycine amide[71], 1,2-dilinoleyloxy-3-dimethylaminopropane, DLin-KC2-DMA, amino lipid 2,2-dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolane (DLin-KC2-DMA, 1), 1,2-distearloxy-/V,N-dimethylaminopropane (DSDMA), dilinoleylmethyl-4-dimethylaminobutyrate (DLin-MC3-DMA), DLin-D-DMA, C12-200, 98N12-5, (20Z,23Z)-N,N-dimethylnonacosa-20,23-dien-10-amine, (17Z,20Z)-N,N-dimemylhexacosa-17,20-dien-9-amine, (1Z,19Z)-N5N-dimethylpentacosa-16,19-dien-8-amine, (13Z,16Z)-N,N-dimethyldocosa-13,16-dien-5-amine, (12Z,15Z)-N,N-dimethylhenicosa-12,15-dien-4-amine, (14Z,17Z)-N,N-dimethyltricosa-14,17-dien-6-amine, (15Z,18Z)-N,N-dimethyltetracosa-15,18-dien-7-amine, (18Z,21Z)-N,N-dimethylheptacosa-18,21-dien-10-amine, (15Z,18Z)-N,N-dimethyltetracosa-15,18-dien-5-amine, (14Z,17Z)-N,N-dimethyltricosa-14,17-dien-4-amine, (19Z,22Z)-N,N-dimethyloctacosa-19,22-dien-9-amine, (18Z,21Z)-N,N-dimethylheptacosa-18,21-dien-8-amine, (17Z,20Z)-N,N-dimethylhexacosa-17,20-dien-7-amine, (16Z,19Z)-N,N-dimethylpentacosa-16,19-dien-6-amine, (22Z,25Z)-N,N-dimethylhentriaconta-22,25-dien-10-amine, (21Z,24Z)-N,N-dimethyltriaconta-21,24-dien-9-amine, (18Z)-N,N-dimethylheptacos-18-en-10-amine, (17Z)-N,N-dimethylhexacos-17-en-9-amine, (19Z,22Z)-

N,N-dimethyloctacosa-19,22-dien-7-amine, N,N-dimethylheptacosan-10-amine, (20Z,23Z)-N-ethyl-N-methylnonacosa-20,23-dien-10-amine, 1-[(11Z,14Z)-1-nonylicosa-11,14-dien-1-yl]pyrrolidine, (20Z)-N,N-dimethylheptacos-20-en-10-amine, (15Z)-N,N-dimethyleptacos-15-en-10-amine, (14Z)-N,N-dimethylnonacos-14-en-10-amine, (17Z)-N,N-dimethylnonacos-17-en-10-amine, (24Z)-N,N-dimethyltritriacont-24-en-10-amine, (20Z)-N,N-dimethylnonacos-20-en-10-amine, (22Z)-N,N-dimethylhentriacont-22-en-10-amine, (16Z)-N,N-dimethylpentacos-16-en-8-amine, (12Z,15Z)-N,N-dimethyl-2-nonylhenicosa-12,15-dien-1-amine, (13Z,16Z)-N,N-dimethyl-3-nonyldocosa-13,16-dien-1-amine, N,N-dimethyl-1-[(1S,2R)-2-octylcyclopropyl]eptadecan-8-amine, 1-[(1S,2R)-2-hexylcyclopropyl]-N,N-dimethylnonadecan-10-amine, N,N-dimethyl-1-[(1S,2R)-2-octylcyclopropyl]nonadecan-10-amine, N,N-dimethyl-21-[(1S,2R)-2-octylcyclopropyl]henicosan-10-amine,N,N-dimeth-yl-1-[(1S,2S)-2-{[(1R,2R)-2-pentylcyclopropyl]methyl}cyclopropyl]nonadecan-10-amine,N,N-dimethyl-1-[(1S,2R)-2-octylcyclopropyl]hexadecan-8-amine, N,N-dimethyl-[(1R,2S)-2-undecylcyclopropyl]tetradecan-5-amine, N,N-dimethyl-3-{7-[(1 S,2R)-2-octylcyclopropyl]heptyl}dodecan-1-amine, 1-[(1R,2S)-2-heptylcyclopropyl]-N,N-dimethyloctadecan-9-amine, 1-[(1S,2R)-2-decylcyclopropyl]-N,N-dimethylpentadecan-6-amine, N,N-dimethyl-1-[(1S,2R)-2-octylcyclopropyl]pentadecan-8-amine, R-N,N-dimethyl-1-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yloxy]-3-(octyloxy)propa-n-2-amine, S-N,N-dimethyl-1-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yloxy]-3-(octy-loxy)propan-2-amine, 1-{2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yloxy]-1-Roctyloxy)methyl]ethyl}pyrro-lidine, (2S)-N,N-dimethyl-1-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yloxy]-3-[(5Z)-oct-5-en-1-yloxy]propan-2-amine, 1-{2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yloxy]-1-[(octyloxy)methyl]ethyl}azet-idine, (2S)-1-(hexyloxy)-N,N-dimethyl-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-yloxy]propan-2-amine, (2S)-1-(heptyloxy)-N,N-dimethyl-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yloxy]pr-opan-2-amine, N,N-dimethyl-1-(nonyloxy)-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yloxy]propan-2-amine, N,N-dimethyl-1-[(9Z)-octadec-9-en-1-yloxy]-3-(octyloxy)propan-2-am-ine; (2S)-N,N-dimethyl-1-[(6Z,9Z,12Z)-octadeca-6,9,12-trien-1-yloxy]-3-(o-ctyloxy)propan-2-amine, (2S)-1-[(11Z,14Z)-icosa-11,14-dien-1-yloxy]-N,N-dimethyl-3-(pentyloxy)propa-n-2-amine, (2S)-1-(hexyloxy)-3-[(11Z,14Z)-icosa-11,14-dien-1-yloxy]-N,N-di-methylpropan-2-amine, 1-[(11Z,14Z)-icosa-11,14-dien-1-yloxy]-N,N-dimethyl-3-(octyloxy)propan-2-amine, 1-[(13Z,16Z)-docosa-13,16-dien-1-yloxy]-N,N-dimethyl-3-(octyloxy)pr-opan-2-amine, (2S)-1-[(13Z,16Z)-docosa-13,16-dien-1-yloxy]-3-(hexyloxy)-N,N-dimethylpro-pan-2-amine, (2S)-1-[(13Z)-docos-13-en-1-yloxy]-3-(hexyloxy)-N,N-dimethylpropan-2-amin-e, 1-[(13Z)-docos-13-en-1-yloxy]-N,N-dimethyl-3-(octyloxy)propan-2-amine, 1-[(9Z)-hexadec-9-en-1-yloxy]-N,N-dimethyl-3-(octyloxy)propan-2-amine, (2R)-N,N-dimethyl-H(1-metoyloctyl)oxy]-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yloxy]propan-2-amine, (2R)-1-[(3,7-dimethyloctyl)oxy]-N,N-dimethyl-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-di-en-1-yloxy]propan-2-amine, N,N-dimethyl-1-(octyloxy)-3-({8-[(1S,2S)-2-{[(1R,2R)-2-pentylcyclopropyl]-methyl}cyclopropyl]octyl}oxy)propan-2-amine, N,N-dimethyl-1-{[8-(2-oclylcyclopropyl)octyl]oxy}-3-(octyloxy)propan-2-am-ine and (11E,20Z,23Z)-N,N-dimethylnonacosa-11,20,2-trien-10-amine, 5-carboxyspermylglycine dioctaoleoylamide ("DOGS"), dipalmitoylphosphatidylethanolamine 5-carboxyspermyl-amide ("DPPES"), 1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium bromide (DMRIE), DMRIE-HP, Lipofectamine (DOSPA), 3b-(N-(N′,N′-dimethylaminoethane)-carbamoyl)cholesterol ("DC-Choi"), N-(1,2-dimyhstyloxyprop-3-yl)-N,N-dimethyl-N-hydroxyethyl ammonium bromide ("DMRIE"), 1,2-Dioleoyl-3-dimethylammonium-propane ("DODAP"), DMDMA, cationic lipid-based transfection reagents TransIT-TKO, LIPOFECTIN, Lipofectamine, OLIGOFECTAMINE 또는 DHARMAFECT, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, gamma-DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA (also known as DLin-C2K-DMA, XTC2, and C2K), DLin-K-C3-DM A, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, y-DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA (also known as MC2), DLin-M-C3-DMA (also known as MC3) 또는 (DLin-MP-DMA)(also known as 1-B11), 또는 이의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0090] 상기 비양이온성 지질은 US 2018/0311176 A, US 2019/0032051 A 등을 통해 구체적으로 예시되어 있으며, 예를 들어, phosphatidylglycerol, cardiolipin, diacylphosphatidylserine, diacylphosphatidic acid, N-dodecanoyl phosphatidylethanoloamine, N-succinyl phosphatidylethanolamine, N-glutaryl phosphatidylethanolamine, 또는 lysylphosphatidylglycerol일 수 있다. 경우에 따라서, 상기 비양이온성 지질은 예를 들어, distearoylphosphatidylcholine (DSPC), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC),

dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG), dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG), dioleoyl-phosphatidylethanolamine (DOPE), palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC), palmitoyloleoylphosphatidylethanolamine (POPE), dioleoyl-phosphatidylethanolamine 4-(-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (DOPE-mal), dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamine (DPPE), dimyristoylphosphoethanolamine (DMPE), distearoyl-phosphatidyl-ethanolamine (DSPE), 16-O-monomethyl PE, 16-O-dimethyl PE, 18-1-trans PE, 1-stearoyl-2-oleoyl-phosphatidyethanolamine (SOPE), cholesterol, phosphatidylglycerols, cardiolipins, diacylphosphatidylserines, diacylphosphatidic acids, N-dodecanoyl phosphatidylethanolamines, N-succinyl phosphatidylethanolamines, N-glutarylphosphatidylethanolamines, lysylphosphatidylglycerols, palmitoyloleyolphosphatidylglycerol (POPG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 상기 중성지질은 US 2018/0311176 A, US 2019/0032051 A 등을 통해 구체적으로 예시되어 있으며, 예를 들어, diacylphosphatidylcholine, diacylphosphatidylethanolamine, ceramide, sphingomyelin, dihydrosphingomyelin, cephalin, 또는 cerebrosides를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0092] 상기 mRNA 전달시 생성되는 입자의 응집을 방지하기 위해 PEG 지방을 포함할 수 있다. PEG 지방은 US 2018/0311176 A, US 2019/0032051 A 등을 통해 구체적으로 예시되어 있으며, 예를 들어, PEG-diacylglycerol(DAG), PEG-dialkyloxypropyl(DAA), PEG-phospholipid, PEG-ceramide(Cer), 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0093] 다른 측면에서, 본 발명에 따른 mRNA/DNA 구조체는 나노입자를 통해 전달될 수 있으며, 예를 들어, 금 나노입자를 통해 전달될 수 있다. 상기 금 나노입자는 표면이 변형될 수 있다. 변형에 대한 구체적 예시는 Acc Chem Res. 2019 June 18; 52(6): 1496-1506 및 Pharmaceutics 2021, 13, 900 등에 구체적으로 예시되어 있으며, 본 명세서에 참조로서 도입될 수 있다.

[0094] 상기 mRNA/DNA 구조체에 금 나노입자를 연결시키고 양이온성 endosomal disruptive polymer와 복합체를 형성하여, 세포에 전달할 수 있다(Nature Biomedical Engineering volume 1, pages 889-901(2017)). 상기 양이온성 endosomal disruptive polymer는 예를 들어, polyethylene imine, poly(arginine), poly(lysine), poly(histidine), poly-[2-{(2-aminoethyl)amino}-ethyl-aspartamide] (pAsp(DET)), poly(ethylene glycol) (PEG)와 poly(arginine)의 block co-polymer, PEG와 poly(lysine)의 block co-polymer, 또는 PEG와 poly{N-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} (PEG-pAsp(DET))의 block co-polymer일 수 있다.

[0095] 경우에 따라서 표면이 아르기닌으로 변형된 금 입자를 사용할 수 있다. 아르기닌으로 변형된 금 입자를 핵산절단효소 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 절단인자 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 함께 조립할 수 있다. 이를 통해 타겟세포의 막과 융합하여, 세포질로 이동하게 된다(ACS Nano. 2017, 11:2452-2458).

[0096] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 mRNA/DNA 구조체 전달에 펩타이드가 사용될 수 있다. 펩타이드는 핵산의 음이온성 인산기와 정전기적 상호작용하기 양이온을 가져야 하고, 인산기와 정전기 상호 작용하기 위해 양으로 하전된 아미노산을 포함할 수 있다. mRNA 전달에 사용가능한 펩타이드 구체적 내용은 AIMS Biophysics, 7(4): 323-338에 기재되어 있으며, 본 발명에 참조로서 도입될 수 있다.

[0097] 상기 mRNA/DNA 구조체 전달에 사용가능한 펩타이드로 프로타민을 포함할 수 있다. 프로타민은 고환의 정자 형성 중인 DNA의 안정성에 기여하는 양이온성 아르기닌이 풍부한 작은 핵 단백질로, 프로타민은 mRNA 분자를 안정화시켜 효율적으로 전달할 수 있다. US 9352028 B에 프로타민-mRNA 복합물이 구체적으로 기재되어 있으며, 본 명세서에 참조로 도입될 수 있다.

[0098] 세포 투과성 펩타이드(CPP)도 mRNA/DNA 구조체의 전달에 유망한 양이온 분자일 수 있다. 비제한적인 상기 양이온 분자의 예로는 아르기닌 풍부 RALA 펩타이드(WEARLARALARALARHLARALARALRACEA), RALA, LAH4(KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA) 및 LAH4-L1(KKALLAHALHLLALLALHLAHALKKA)와 같은 양친매성 CPP가 예시될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0099] 필요시 상기 리포좀 또는 LNP 이외에 mRNA 전달에 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다. 상기 펩타이드는 핵산 패키징 기능을 제공하고 DNA 또는 RNA를 세포 내 혹은 세포 외에서 분해되지 않도록 할 수 있다. 이러한 펩타이드의 예시는 US 2021/0170046 A에 구체적으로 기재되어 있으며, 본 명세서에 참조로서 도입될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0101] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양의 상기 mRNA/DNA 구조체를 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 대상 질환을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[0102] 상기 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 의미한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한 상기 약학 조성물은 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0103] 용어 "담체(carrier)"는 세포 또는 조직 내로의 mRNA/DNA 구조체의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸술폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.

[0104] 용어 "희석제(diluent)"는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다.

[0105] 본 발명에 따른 mRNA/DNA 구조체를 함유하는 약학 조성물은, 환자에게 그 자체로서 또는 병용 요법(combination therapy)에서와 같이 다른 활성 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 의약 조성물로서 투여될 수 있다.

[0107] 본 발명의 약학 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0108] 본 발명에서 사용에 적합한 약학 조성물에는, 활성 성분을 코딩하는 mRNA/DNA 구조체가 의도된 목적을 달성하기에 유효한 양으로 함유되어 있는 조성물이 포함된다. 더욱 구체적으로, 치료적 유효량은 치료될 객체의 생존을 연장하거나, 질환의 증상을 방지, 경감 또는 완화시키는데 유효한 화합물의 양을 의미한다. 치료적 유효량의 결정은, 특히, 여기에 제공된 상세한 개시 내용 측면에서, 통상의 기술자의 능력 범위 내에 있다.

[0109] 본 발명에서, "개체"는 본 발명에 따른 mRNA/DNA 구조체를 투여하여 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태 또는 질환을 앓고 있거나 그러한 위험이 있는 포유동물을 의미하며, 바람직하게는 사람을 의미한다.

[0110] 본 발명의 mRNA/DNA 구조체의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있다.

[0111] 본 명세서에 기재되어 있는 mRNA/DNA 구조체를 포함하는 조성물의 독성과 치료 효율성은, 예를 들어, LD50(군집의 50%에 대한 치사량), ED50(군집의 50%에 대해 치료 효과를 갖는 선량), IC50(군집의 50%에 대해 치료 억제 효과를 갖는 선량)을 결정하기 위하여, 세포 배양 또는 실험동물에서의 표준 제약 과정들에 의해 산정될 수 있다. 독성과 치료 효과 간의 선량 비가 치료 지수이고 이것은 LD50과 ED50(또는, IC50) 간의 비율로서 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 보이는 화합물들이 바람직하다. 이들 세포 배양 분석에서 얻어진 데이터는 인간에 사용하는 선량의 범위를 산정하는데 사용될 수 있다. 그러한 화합물들의 투여량(dosage) 또는 도포량은 바람직하게는 독성이 없거나 거의 없는 상태에서 ED50(또는, IC50)을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다.

[0112] 본 발명의 용어 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 행위를 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0113] 본 발명의 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투

여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0114] 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[0116] 본 발명에 따른 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형으로 제제화 할 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 동결건조(lyophilized)된 형태의 제형으로 제제화하여 제공되는 것이 바람직하다. 동결건조 제형 제조를 위해서 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 알려져 있는 방법이 사용될 수 있으며, 동결건조를 위한 안정화제가 추가될 수도 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 레밍톤 약학 과학(Remington's pharmaceutical Science, Mack Publishing company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질병에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0118] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0120] **실시예 1: 본 발명에 따른 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체 제조**

[0121] 실시예 1-1: IVT mRNA 합성을 위한 pDNA 주형 제조

[0122] IVT mRNA 합성을 위한 전사주형으로서 T7 프로모터(Promoter), 5'UTR, 오픈리딩프레임(Open Reading Frame), 3'UTR을 포함하는 DNA 벡터(pUCIDT-AMP-DsRed Express2, Luciferase-pCDNA3, pUC-pc-EPO)를 주형으로 각각 PCR을 수행하였다. PCR은 TOPsimple™ PCR DryMIX-Forte(Enzynomics, 한국)을 사용하여 수행하였고, 구체적인 PCR 조건은 하기 표 1과 같다. 증폭된 PCR 반응산물은 AccuPrep® PCR Purification Kit(Bioneer, 한국)를 사용하여 정제하였다.

[0123] 상기 각 반응이 끝난 후, 반응 산물을 1% 아가로스(Agarose) 겔에 100V 전압으로 30분간 전기영동하여 PCR 반응산물을 확인한 결과를 도 2에 나타냈다.

표 1

[0124]

1) PCR Mixture			
Components		Volume	
TOPsimple™PCR DryMIX-Forte		1 tube	
Template DNA (0.1~500ng/μl)		1μl	
Forward Primer (10pmol/μl)		1μl	
Reverse Primer (10pmol/μl)		1μl	
DW		Up to 20μl	
2) PCR Cycles			
Step	Temp.	Time	Cycle
Initial Denaturation	95℃	3min	1
Denaturation	95℃	30sec	30
Annealing	59℃	30sec	
Elongation	72℃	1min/kb	
Final Elongation	72℃	5min	1

[0126] 먼저, 모델 단백질인 레드형광단백질(Red Fluorescence Protein, RFP)을 코딩하는 오픈리딩프레임(Open Reading Frame) 및 3'UTR을 포함하는 DNA 벡터(pUCIDT-AMP-DsRed Express2)를 주형으로 PCR을 수행하기 위하여, 정방향 프라이머(Forward Primer, FP)는 벡터 DNA 끝부분에 존재하는 27nt의 동일 염기서열을 포함하는

것을 사용하였고, IVT mRNA 합성을 위한 DNA 주형에 폴리(dA:dT) 서열을 삽입하기 위하여 역방향 프라이머(Reverse Primer, RP)는 주형의 3'UTR의 끝부분에 binding하는 동일 염기서열 29nt에 이어 폴리(T) 테일(poly(T) tail) 120nt가 도입된 것을 사용하였다. 상기 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 사용하여 DNA 벡터(pUCIDT-AMP-DsRed Express2)를 주형으로 PCR을 수행하고 결과적으로 T7 프로모터(Promoter), 5'UTR, 오픈리딩프레임(Open Reading Frame, ORF), 3'UTR에 이어 폴리(dA:dT) 테일(poly(dA:dT) tail) 120bp가 도입된 DNA 주형을 만들었고, 이를 pRFP라고 명명하였다.

[0127] 또한, 하이브리드 구조를 도입하기 위하여 정방향 프라이머(Forward Primer, FP)는 벡터 DNA 끝부분에 존재하는 27nt의 동일 염기서열을 포함하는 것을 사용하였고, 하이브리드 구조를 도입하기 위한 추가 서열 21nt 2가지와 51nt와 이어서 폴리(T) 서열 및 vector에 프라이머를 삽입하기 위한 29nt의 동일 염기서열을 포함하는 역방향 프라이머(Reverse Primer, RP)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 DNA 주형의 3’ UTR의 3’ 말단에 이어 폴리(dA:dT) 테일(poly(dA:dT) tail) 120bp와 3가지 추가 서열이 각각 도입된 DNA 주형을 제조하였다. 이 중 추가로 도입된 서열 길이가 21bp인 각기 다른 시퀀스를 가지는 DNA 주형 2가지를 pRFP21A와 pRFP21B라고 명명하였고, 추가 서열의 길이가 51bp인 DNA 주형을 pRFP51C라고 명명하였다.

[0129] 다음으로, 모델 단백질인 루시퍼레이즈(Firefly Luciferase, Luc)를 코딩하는 오픈리딩프레임(Open Reading Frame) 및 3'UTR을 포함하는 DNA 벡터(Luciferase-pCDNA3)를 주형으로 PCR을 수행하기 위하여, 정방향 프라이머(Forward Primer, FP)는 벡터 DNA 끝부분에 존재하는 18nt의 동일 염기서열을 포함하는 것을 사용하였고, IVT mRNA 합성을 위한 DNA 주형에 폴리(dA:dT) 서열을 삽입하기 위하여 역방향 프라이머(Reverse Primer, RP)는 주형의 3'UTR의 끝부분에 binding하는 동일 염기서열 18nt에 이어 폴리(T) 테일(poly(T) tail) 120nt가 도입된 것을 사용하였다. 상기 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 사용하여 DNA 벡터(Luciferase-pCDNA3)를 주형으로 PCR을 수행하고 결과적으로 T7 프로모터(Promoter), 5'UTR, 오픈리딩프레임(Open Reading Frame, ORF), 3'UTR에 이어 폴리(dA:dT) 테일(poly(dA:dT) tail) 120bp가 도입된 DNA 주형을 만들었고, 이를 pLuc이라고 명명하였다.

[0130] 또한, 하이브리드 구조를 도입하기 위하여 정방향 프라이머(Forward Primer, FP)는 벡터 DNA 끝부분에 존재하는 18nt의 동일 염기서열을 포함하는 것을 사용하였고, 하이브리드 구조를 도입하기 위한 추가 서열 21nt 2가지와 62nt와 이어서 폴리(T) 서열 및 vector에 프라이머를 삽입하기 위한 18nt의 동일 염기서열을 포함하는 역방향 프라이머(Reverse Primer, RP)를 사용하여 PCR을 수행하였고, 그 결과 DNA 주형의 3’ UTR의 3’ 말단에 폴리(dA:dT) 테일(poly(dA:dT) tail) 120bp와 3가지 추가 서열이 각각 도입된 DNA 주형을 제조하였다. 이 중 추가로 도입된 서열 길이가 21bp인 각기 다른 시퀀스를 가지는 DNA 주형 2가지를 pLuc21A와 pLuc21B라고 명명하였고, 추가 서열의 길이가 62bp인 DNA 주형을 pLuc62C라고 명명하였다.

[0132] 다음으로, 치료용 단백질인 에리트로포이에틴(EPO, Erythropoietin)을 코딩하는 오픈리딩프레임(Open Reading Frame) 및 3'UTR을 포함하는 DNA 벡터(pUC-pC EPO)를 주형으로 PCR을 수행하기 위하여, 정방향 프라이머(Forward Primer, FP)는 벡터 DNA 끝부분에 존재하는 27nt의 동일 염기서열을 포함하는 것을 사용하였고, IVT mRNA 합성을 위한 DNA 주형에 폴리(dA:dT) 서열을 삽입하기 위하여 역방향 프라이머(Reverse Primer, RP)는 주형의 3'UTR의 끝부분에 binding하는 동일 염기서열 18nt에 이어 폴리(T) 테일(poly(T) tail) 120nt가 도입된 것을 사용하였다. 상기 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 사용하여 DNA 벡터(pUC-pC EPO)를 주형으로 PCR을 수행하고 결과적으로 T7 프로모터(Promoter), 5'UTR, 오픈리딩프레임(Open Reading Frame, ORF), 3'UTR에 이어 폴리(dA:dT) 테일(poly(dA:dT) tail) 120bp가 도입된 DNA 주형을 만들었고, 이를 pEPO이라고 명명하였다.

[0133] 또한, 하이브리드 구조를 도입하기 위하여 정방향 프라이머(Forward Primer, FP)는 벡터 DNA 끝부분에 존재하는 27nt의 동일 염기서열을 포함하는 것을 사용하였고, 하이브리드 구조를 도입하기 위한 추가 서열 21nt 2가지와 62nt와 이어서 폴리(T) 서열 및 vector에 프라이머를 삽입하기 위한 18nt의 동일 염기서열을 포함하는 역방향 프라이머(Reverse Primer, RP)를 사용하여 PCR을 수행하였고, 그 결과 DNA 주형의 3’ UTR의 3’ 말단에 폴리(dA:dT) 테일(poly(dA:dT) tail) 120bp와 3가지 추가 서열이 각각 도입된 DNA 주형을 제조하였다. 이 중 추가로 도입된 서열 길이가 21bp인 각기 다른 시퀀스를 가지는 DNA 주형 2가지를 pEPO21A와 pEPO21B라고 명명하였고, 추가 서열의 길이가 62bp인 DNA 주형을 pEPO62C라고 명명하였다.

[0135] 하이브리드 구조를 도입하기 위한 추가 서열 21nt 2가지와 62nt를 가진 폴리(T) 서열 및 향후 vector에 삽입하기 위한 18nt의 동일 염기서열을 포함하는 역방향 프라이머(Reverse Primer, RP)를 사용하여 3' UTR 바로 옆 3'에 폴리(T) 테일(poly(T) tail) 120nt와 추가 서열이 도입된 DNA 주형을 제조하였고, 추가 서열 21nt의 길이를 가진 2가지를 pEPO21A와 pEPO21B라고 명명하였고, 추가 서열 62nt의 길이를 가진 DNA 주형을 pEPO62C라고 명명하였다. 즉, 상기 정방향/역방향 프라이머는 다음 구성에 기반한 것을 사용하였다.

[0136] 정방향 프라이머1: 5'-DNA 벡터와 특이적으로 결합하는 동일 염기서열(homologous DNA sequence) 프라이머 서열-3'

[0137] 역방향 프라미어1: 5'-추가 서열(21A or 21B or 62 nt)-폴리(T)-DNA 벡터와 특이적으로 결합하는 동일 염기서열(homologous DNA sequence) 프라이머 서열-3'

[0139] 본 실시예 및 실험예에서 사용한 DNA 벡터, 모든 프라이머 서열, 어닐링 서열을 하기 표 2에 나타냈다. 모든 서열은 IDT와 바이오니아(유전자 합성서비스)로부터 제공받아 사용하였다.

표 2

[0140]

유전자 이름	서열(5'->3')	서열 번호
pUCIDT-AMP_DsRed Express2 (RFP)	TAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG GATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACG GCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCT GCAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCCAGTTCCAGTACGGC TCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCT TCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCT GCAGGACGGCACCTTCATCTACCACGTGAAGTTCATCGGCGTGAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA ATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCCGCGACGGCGTGCTGA AGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGAAGCTGAAGGGCGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAAT CTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACC TCCCACAACGAGGACTACACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGCCCGCCACCACCTGTTCC AGTAGGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCT CTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAG	1
RFP-FP(Forward Primer)	TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG	2
RFP-RP(Reverse Primer)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTCCTACTCAGGC TTTATTCAAAGACCA	3
RFP21A-RP(Reverse Primer)	AAAACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTCTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA	4
RFP21B-RP(Reverse Primer)	AAGCAAGCTGACCCTGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTCTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA	5
RFP51C-RP(Reverse Primer)	AACAGAGCGATGGGTATGTGGAGGGTTGTTAGATGGGAGATGGGTGGGGGCTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA	6

Luciferase-pcDNA3(Luc)	taatacgactcactatagggagacccaagcttggcattccggtactgttggtaaagccaccatggaa gacgccaaaaacataaagaaaggcccggcgccattctatccgctggaagatggaaccgctggagagc aactgcataaggctatgaagagatacgccctggttcctggaacaattgcttttacagatgcacatat cgaggtggacatcacttacgctgagtacttcgaaatgtccgttcggttggcagaagctatgaaacga tatgggctgaatacaaatcacagaatcgtcgtatgcagtgaaaactctcttcaattctttatgccgg tgttgggcgcgttatttatcggagttgcagttgcgcccgcgaacgacatttataatgaacgtgaatt gctcaacagtatgggcatttcgcagcctaccgtggtgttcgtttccaaaaaggggttgcaaaaaatt ttgaacgtgcaaaaaaagctcccaatcatccaaaaaattattatcatggattctaaaacggattacc agggatttcagtcgatgtacacgttcgtcacatctcatctacctcccggttttaatgaatacgattt tgtgccagagtccttcgatagggacaagacaattgcactgatcatgaactcctctggatctactggt ctgcctaaaggtgtcgctctgcctcatagaactgcctgcgtgagattctcgcatgccagagatccta tttttggcaatcaaatcattccggatactgcgattttaagtgttgttccattccatcacggttttgg aatgtttactacactcggatatttgatatgtggatttcgagtcgtcttaatgtatagatttgaagaa gagctgtttctgaggagccttcaggattacaagattcaaagtgcgctgctggtgccaaccctattct ccttcttcgccaaaagcactctgattgacaaatacgatttatctaatttacacgaaattgcttctgg tggcgctcccctctctaaggaagtcggggaagcggttgccaagaggttccatctgccaggtatcagg caaggatatgggctcactgagactacatcagctattctgattacacccgagggggatgataaaccgg gcgcggtcggtaaagttgttccatttttgaagcgaaggttgtggatctggataccgggaaaacgct gggcgttaatcaaagaggcgaactgtgtgtgagaggtcctatgattatgtccggttatgtaaacaat ccggaagcgaccaacgccttgattgacaaggatggatggctacattctggagacatagcttactggg acgaagacgaacacttcttcatcgttgaccgcctgaagtctctgattaagtacaaaggctatcaggt ggctcccgctgaattggaatccatcttgctccaacaccccaacatcttcgacgcaggtgtcgcaggt cttcccgacgatgacgccggtgaacttcccgccgccgttgttgttttggagcacggaaagacgatga cggaaaaagagatcgtggattacgtcgccagtcaagtaacaaccgcgaaaaagttgcgcggaggagt tgtgtttgtggacgaagtaccgaaaggtcttaccggaaaactcgacgcaagaaaaatcagagagatc ctcataaaggccaagaagggcggaaagatcgccgtgtaattctagagggccctattctatagtgtca cctaaatgctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgc ccctcccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgagg aaattgcatcgcattg	7
Luc-FP(Forward Primer)	GAGCTCTCTGGCTAACTA	8
Luc-RP(Reverse Primer)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTcaatgcgatgcaat ttcc	9
Luc21A-RP(Reverse Primer)	AAAACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTcaatgcgatgcaatttcc	10
Luc21B-RP(Reverse Primer)	AAGCAAGCTGACCCTGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTcaatgcgatgcaatttcc	11
Luc62C-RP(Reverse Primer)	AATGGGGGAGAGACAGAGCGATGGGTATGTGGAGGGTTGTTAGATGGGAGATGGGTGGGGGCTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTcaatgcgatgcaatttcc	12
pUC-pc-EPO(EPO)	TAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCatg ggcgtgcacgagtgccccgcctggctgtggctgctgctgagcctgctgagcctgcccctgggcctgc ccgtgctgggcgcccccccccggctgatctgcgacagccgggtgctggagcggtacctgctggaggc caaggaggccgagaacatcaccaccggctgcgccgagcactgcagcctgaacgagaacatcaccgtg cccgacaccaaggtgaacttctacgcctggaagcggatggaggtgggccagcaggccgtggaggtgt ggcagggcctggccctgctgagcgaggccgtgctgcggggccaggccctgctggtgaacagcagcca gccctgggagcccctgcagctgcacgtggacaaggccgtgagcggcctgcggagcctgaccaccctg ctgcgggccctgggcgcccagaaggaggccatcagccccccgacgccgccagcgccgccccctgc ggaccatcaccgccgacaccttccggaagctgttccgggtgtacagcaacttcctgcggggcaagct gaagctgtacaccggcgaggcctgccggaccggcgaccggtgattctagagggccctattctatagt gtcacctaaatgctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgt ttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttCCTAATAAAAT GAGGAAATTGCATCGCATTG	13
EPO-FP(Forward Primer)	TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG	2
EPO-RP(Reverse Primer)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTcaatgcgatgcaat ttcc	9
EPO21A-RP(Reverse Primer)	AAAACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTcaatgcgatgcaatttcc	10
EPO21B-RP(Reverse Primer)	AAGCAAGCTGACCCTGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTcaatgcgatgcaatttcc	11
EPO62C-RP(Reverse Primer)	AATGGGGGAGAGACAGAGCGATGGGTATGTGGAGGGTTGTTAGATGGGAGATGGGTGGGGGCTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTcaatgcgatgcaatttcc	12

RFP25A-DNA(Annealing Oligo)	AACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTT	14
RFP25B-DNA(Annealing Oligo)	GCAAGCTGACCCTGAAGTTTTTTTT	15
RFP60C-DNA(Annealing Oligo)	CAGAGCGATGGGTATGTGGAGGGTTGTTAGATGGGAGATGGGTGGGGGCTTTTTTTTTTT	16
Luc25A-DNA(Annealing Oligo)	AACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTT	14
Luc25B-DNA(Annealing Oligo)	GCAAGCTGACCCTGAAGTTTTTTTT	15
Luc65C-DNA(Annealing Oligo)	TGGGGGAGAGACAGAGCGATGGGTATGTGGAGGGTTGTTAGATGGGAGATGGGTGGGGGCTTTTT	17
EPO25A-DNA(Annealing Oligo)	AACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTT	14
EPO25B-DNA(Annealing Oligo)	GCAAGCTGACCCTGAAGTTTTTTTT	15
EPO65C-DNA(Annealing Oligo)	TGGGGGAGAGACAGAGCGATGGGTATGTGGAGGGTTGTTAGATGGGAGATGGGTGGGGGCTTTTT	17

[0142] 실시예 1-2: 각 pDNA를 주형으로 IVT mRNA 제조

[0143] 실시예1-1에서 제조한 pDNA를 사용하여 시험관 내 전사(In vitro transcription, IVT)를 수행하여 IVT mRNA를 합성하였다.

[0144] PCR을 통해 만들어진 선형화된(Linearized) 주형 DNA를 사용하여 T7 RNA 중합효소와 rATP, rUTP, rCTP, rGTP 및 캡 유사체(Cap analogue)를 포함하는 반응 용액(EZ™ MEGA T7 Transcription Kit, enzynomics, 한국)을 사용하여 시험관 내 전사를 수행하고, DNA 분해효소 I(DNase I)를 처리하여 주형 DNA를 제거하고 mRNA만을 회수하였다. 비교예로, 우리딘(uridine) 염기가 슈도우리딘(pseudouridine)으로 변형된(modified) mRNA를 합성하기 위하여 T7 RNA 중합효소와 rATP, pUTP(pseudouridine-5'-Triphosphate, Trilink, USA), rCTP, rGTP 및 캡 유사체(Cap analogue)를 포함하는 반응 용액(EZ™ MEGA T7 Transcription Kit, enzynomics, 한국)을 사용하여 시험관 내 전사를 수행하고, DNA 분해효소 I(DNase I)를 처리하여 주형 DNA를 제거하고 mRNA만을 회수하였다.

[0145] IVT mRNA 실험예와 비교예의 반응 용액을 각각 PCR 튜브에 넣고 37℃에서 2시간 배양한 후, DNA 분해효소 I(DNase I, enzynomics, 한국) 2μl를 추가하여 37℃에서 15분동안 반응시키고, 반응산물을 RNeasy Mini Kit(Qiagen, USA)를 사용하여 정제하였다. 반응 용액을 구성하는 모든 성분 및 이의 용량, 농도는 하기 표 3과 같다. 이를 통해 합성된 mRNA는 캡 유사체를 전사 반응에 첨가함으로써 생산된 5'-캡(5'-cap)을 5' 말단에 포함시켰다.

표 3

[0146]

	실험예 **unmodified mRNA**		**비교예** **modified mRNA:** **pUTP(pseudouridine-5'-triphosphate)**	
3'-O-Me-M^{7}g(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog (NEB, USA)	50mM	2.4μl	50mM	2.4μl
rATP	100mM	1.5μl	100mM	1.5μl
rCTP	100mM	1.5μl	100mM	1.5μl
rUTP	100mM	1.5μl	100mM	1.5μl
rGTP	100mM	0.3μl	100mM	0.3μl
DNA Template	0.7μg	X μl	0.7μg	X μl
10X Reaction Buffer		2μl		2μl
DEPC water		Up to 20μl		Up to 20μl
10X T7 Enzyme		2μl		2μl
Total		20μl		20μl

[0148] 실시예 1-3: mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체 제조

[0149] 실시예 1-2에서 제조한 mRNA의 폴리 (A) 테일의 3' 말단에 각기 다른 추가 서열이 도입된 IVT mRNA에 도입된 추가 서열과 상보적인 서열을 가지는 DNA 올리고를 어닐링(annealing)하여 mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체를 제조하였다. 어닐링을 위한 조건은 서열-의존적이며 환경적 변수에 따라 달라질 수 있으나, 본 실시예에서 25nt DNA 올리고를 mRNA의 3' 말단에 어닐링하기 위한 조건은 65℃에서 2차 구조를 풀어준 후, 30℃까지 온도를 천천히 내려 주고 4℃에서 패스트 쿨링(급냉)하였으며 60nt와 65nt DNA 올리고를 mRNA의 3' 말단에 어닐링하기 위한 조건은 75℃에서 2차 구조를 풀어준 후, 30℃까지 온도를 천천히 내려 주고 4℃에서 패스트 쿨링(급냉)하였다. 제조된 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체를 도 1에 간략하게 도식화하였다.

[0151] 실시예 1-4: IVT mRNA의 정제 및 확인

[0152] IVT mRNA 합성 과정에서 생기는 불순물인 dsRNA(이중나선RNA, Double strand RNA)를 제거하기 위하여 셀룰로오스 정제법(Cellulose purification, Cel-p)을 수행하였고 다음 논문을 참조하였다(*Mol Ther Nucleic Acids. 2019 Apr 15;15:26-35*). 구체적으로, 크로마토그래피 버퍼(10mM HEPES (pH 7.2), 0.1mM EDTA, 125mM NaCl, 16% ethanol)를 제조하고 버퍼 1ml당 셀룰로오스 파우더(Cellulose, sigma-Aldrich, USA) 0.2g을 넣고 10분간 상온에서 잘 섞어 슬러리 형태로 만들고, 이 슬러리 700μl를 스핀 컬럼(Nucleo-spin, Merck, Germany)으로 옮기고 14,000g에서 1분 동안 원심 분리(Centrifuge)한다. 샘플 1개당 2개의 컬럼을 만들어준다. 컬럼 아래로 내려온 용액을 버린 후, 컬럼에 새로운 500μl의 크로마토그래피 버퍼를 넣고 5분 동안 셀룰로오스 파우더를 잘 섞어주고 14,000g에서 1분 동안 원심 분리하고, 컬럼 아래로 내려온 용액을 다시 버려주면, pre-washed 셀룰로오스 컬럼이 완성된다. 100-500μg의 IVT mRNA를 500μl의 새로운 크로마토그래피 버퍼에 넣은 후, pre-washed 셀룰로오스 컬럼에 넣고 30분간 잘 섞어준 후, 14,000g에서 1분 동안 원심 분리한다. 이 과정에서 dsRNA가 셀룰로오스와 association하여 분리가 되고, ssRNA(단일가닥 RNA)만 컬럼 아래로 내려오게 된다. 내려온 용액을 다시 새 pre-washed 컬럼에 넣고 30분 동안 잘 섞어준 후에 14,000g에서 1분 동안 원심 분리한다. 내려온 용액 ssRNA를 Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter(Merck, USA)로 옮겨 14,000g에서 3분 동안 원심 분리를 진행하여 버퍼를 제거한 후, DEPC water(Enzynomics, 한국)를 Amicon Ultra-0.5 filter에 채워 다시 14,000g에서 3분 동안 원심 분리를 진행하여 크로마토그래피 버퍼를 DEPC water로 교체해준다. 셀룰로오스 정제법(Cel-p)으로 dsRNA가 잘 제거되었는지 확인하기 위하여 40bp 이상의 dsRNA에 특이적으로 결합하는 J2 항체(J2 Anti-body, Scicons, Hungary)를 사용하여 Dot-blot을 진행하였다. IVT mRNA 250ng을 1:5,000으로 희석한 J2 항체와 반응시킨 후, Chemi-Doc 이미징 장비(Bio-Rad, USA)로 dsRNA의 결합을 확인한 결과를 도 3에 나타냈다. 셀룰로오스 정제를 하지 않은 IVT mRNA(Cel-p(-))에서 dsRNA와 결합하는 J2 항체의 반응이 확인되었으나, 셀룰로오스 정제를 한 IVT mRNA(Cel-p(+))에서는 dsRNA가 잘 제거되어 J2 항체 반응이 나타나지 않았다.

[0154] 실시예 1-5: mRNA/DNA 신규 핵산 구조체의 RNA/DNA 하이브리드 구조 확인

[0155] IVT mRNA의 3' 말단의 추가 서열에 DNA 올리고가 도입되어 mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체가 잘 만들어졌는지 확인하기 위하여, DNA 올리고의 annealing 전후 물질을 15% PAGE 겔에 전기영동하여 결과를 확인하였다. 구체적으로, mRNA의 폴리 (A) 테일 말단에 추가된 서열 19nt에 이어 120nt로 구성된 폴리 (A) 테일의 일부인 3' 말단의 6개의 폴리 (A) 테일에 상보적으로 결합하는 DNA Oligo 25nt(19nt의 추가 서열-6개의 dT=25nt DNA oligo)를 어닐링하여(annealing) mRNA의 3’ 말단에 25bp의 RNA/DNA 하이브리드 이중가닥이 도입된 핵산 구조체인 mRNA/DNA25A와 mRNA/DNA25B를 제조하였고, mRNA의 폴리 (A) 테일의 일부인 11nt의 폴리 (A) 테일과 그 3' 말단에 추가된 서열 49nt에 상보적으로 결합하는 DNA 올리고 60nt(49nt의 추가 서열-11개의 dT=60nt DNA oligo)를 어닐링하여(annealing) mRNA/DNA60C를 제조하였다. DNA 올리고가 mRNA의 3' 말단에 잘 도입되었는지 확인하기 위하여 15% PAGE gel을 사용하여 DNA 올리고(25-mer, 60-mer)의 annealing 전후 밴드를 비교한 결과, annealing 후 DNA oligo가 mRNA 구조체에 잘 도입되어 모든 DNA 올리고 밴드가 사라지는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여, mRNA의 3' 폴리 (A) 테일 말단의 추가 서열에 모든 DNA 올리고가 안정적으로 결합하여 성공적으로 mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된

mRNA/DNA 신규 핵산 구조체가 DNA 올리고의 서열이나 길이에 관계없이 모두 안정적으로 형성됨을 확인하였고, 이 결과는 도 4(a)에 나타냈다.

[0156] 또한, IVT mRNA의 폴리 (A) 테일 말단의 추가 서열에 DNA 올리고가 도입되어 mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체가 잘 만들어졌는지 추가적으로 확인하기 위하여 RNA/DNA 하이브리드에 특이적으로 결합하는 S9.6 항체(Kerafast, USA)를 사용하여 Dot-blot을 진행하였다. IVT mRNA 1㎍을 1:20,000으로 희석한 S9.6 항체와 반응시킨 후, Chemi-Doc 이미징 장비(Bio-Rad, USA)로 RNA/DNA의 결합을 확인한 결과를 도 4(b)에 나타냈다. ssRNA(Single strand RNA)인 mRNA에서는 S9.6 항체에 의한 반응이 나타나지 않았으나, mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 mRNA/DNA25B와 mRNA/DNA60C 구조체에서는 S9.6 항체 반응이 나타나는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해, mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입되는 RNA/DNA 서열의 길이에 관계없이 안정적으로 형성되어 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체를 형성함을 확인하였다. 제조된 신규 핵산 구조체의 서열은 하기 표 4에 기재하였다.

표 4

[0157]

이름	서열(5'->3')	서열 번호
RFP-mRNA/DNA25A		
mRNA sequence	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGAUAGCACUGAGAACGUCAUCAA GCCCUUCAUGCGCUUCAAGGUGCACAUGGAGGGCUCCGUGAACGGCCACGAGUUCGAGAUCGAGGGCGAGGG CGAGGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCUGCAGGUGACCAAGGGCGGCCCCCUGCCCUUCGC CUGGGACAUCCUGUCCCCCCAGUUCCAGUACGGCUCCAAGGUGUACGUGAAGCACCCCGCCGACAUCCCCGA CUACAAGAAGCUGUCCUUCCCCGAGGGCUUCAAGUGGGAGCGCGUGAUGAACUUCGAGGACGGCGGCGUGGU GACCGUGACCCAGGACUCCUCCCUGCAGGACGGCACCUUCAUCUACCACGUGAAGUUCAUCGGCGUGAACUU CCCCUCCGACGGCCCCGUAAUGCAGAAGAAGACUCUGGGCUGGGAGCCCUCCACCGAGCGCCUGUACCCCCG CGACGGCGUGCUGAAGGGCGAGAUCCACAAGGCGCUGAAGCUGAAGGGCGGCGGCCACUACCUGGUGGAGUU CAAGUCAAUCUACAUGGCCAAGAAGCCCGUGAAGCUGCCCGGCUACUACUACGUGGACUCCAAGCUGGACAU CACCUCCCACAACGAGGACUACACCGUGGUGGAGCAGUACGAGCGCGCCGAGGCCCGCCACCACCUGUUCCA GUAGGCUGCCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGU CUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AGCAAGCUGACCCUGAAGUUUU	18
annealed DNA sequence	AACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTT	14
RFP-mRNA/DNA25B		
mRNA sequence	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGAUAGCACUGAGAACGUCAUCAA GCCCUUCAUGCGCUUCAAGGUGCACAUGGAGGGCUCCGUGAACGGCCACGAGUUCGAGAUCGAGGGCGAGGG CGAGGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCUGCAGGUGACCAAGGGCGGCCCCCUGCCCUUCGC CUGGGACAUCCUGUCCCCCCAGUUCCAGUACGGCUCCAAGGUGUACGUGAAGCACCCCGCCGACAUCCCCGA CUACAAGAAGCUGUCCUUCCCCGAGGGCUUCAAGUGGGAGCGCGUGAUGAACUUCGAGGACGGCGGCGUGGU GACCGUGACCCAGGACUCCUCCCUGCAGGACGGCACCUUCAUCUACCACGUGAAGUUCAUCGGCGUGAACUU CCCCUCCGACGGCCCCGUAAUGCAGAAGAAGACUCUGGGCUGGGAGCCCUCCACCGAGCGCCUGUACCCCCG CGACGGCGUGCUGAAGGGCGAGAUCCACAAGGCGCUGAAGCUGAAGGGCGGCGGCCACUACCUGGUGGAGUU CAAGUCAAUCUACAUGGCCAAGAAGCCCGUGAAGCUGCCCGGCUACUACUACGUGGACUCCAAGCUGGACAU CACCUCCCACAACGAGGACUACACCGUGGUGGAGCAGUACGAGCGCGCCGAGGCCCGCCACCACCUGUUCCA GUAGGCUGCCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGU CUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAACUUCAGGGUCAGCUUGCUU	19
annealed DNA sequence	GCAAGCTGACCCTGAAGTTTTTTTT	15
RFP-mRNA/DNA60C		

mRNA sequence	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGAUAGCACUGAGAACGUCAUCAA GCCCUUCAUGCGCUUCAAGGUGCACAUGGAGGGCUCCGUGAACGGCCACGAGUUCGAGAUCGAGGGCGAGGG CGAGGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCUGCAGGUGACCAAGGGCGGCCCCCUGCCCUUCGC CUGGGACAUCCUGUCCCCCCAGUUCCAGUACGGCUCCAAGGUGUACGUGAAGCACCCCGCCGACAUCCCCGA CUACAAGAAGCUGUCCUUCCCCGAGGGCUUCAAGUGGGAGCGCGUGAUGAACUUCGAGGACGGCGGCGUGGU GACCGUGACCCAGGACUCCUCCCUGCAGGACGGCACCUUCAUCUACCACGUGAAGUUCAUCGGCGUGAACUU CCCCUCCGACGGCCCCGUAAUGCAGAAGAAGACUCUGGGCUGGGAGCCCUCCACCGAGCGCCUGUACCCCCG CGACGGCGUGCUGAAGGGCGAGAUCCACAAGGCGCUGAAGCUGAAGGGCGGCGGCCACUACCUGGUGGAGUU CAAGUCAAUCUACAUGGCCAAGAAGCCCGUGAAGCUGCCCGGCUACUACUACGUGGACUCCAAGCUGGACAU CACCUCCCACAACGAGGACUACACCGUGGUGGAGCAGUACGAGCGCGCCGAGGCCCGCCACCACCUGUUCCA GUAGGCUGCCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGU CUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AGCCCCCACCCAUCUCCCAUCUAACAACCCUCCACAUACCCAUCGCUCUGUU	20
annealed DNA sequence	CAGAGCGATGGGTATGTGGAGGGTTGTTAGATGGGAGATGGGTGGGGGCTTTTTTTT	21
Luc-mRNA/DNA25A		
mRNA sequence	ggagacccaagcuuggcauuccgguacuguugguaaagccaccauggaagacgccaaaaacauaaagaaagg cccggcgccauucuauccgcuggaagauggaaccgcuggagagcaacugcauaaggcuaugaagagauacgc ccuggguuccuggaacaauugcuuuuacagaugcacauaucgagguggacaucacuuacgcugaguacuucga aauguccguucgguuggcagaagcuaugaaacgauaugggcugaauacaaaucacagaaucgucguaugcag ugaaaacucucuucaauucuuuaugccgguguugggcgcguuauuuaucggaguugcaguugcgcccgcgaa cgacauuuauaaugaacgugaauugcucaacaguaugggcauuucgcagccuaccgugguguucguuuccaa aaaggguugcaaaaaauuuugaacgugcaaaaaaagcucccaaucauccaaaaaauuauuaucauggauuc uaaaacggauuaccagggauuucagucgauguacacguucgucacaucucaucuaccucccgguuuuaauga auacgauuuugugccagaguccuucgauagggacaagacaauugcacugaucaugaacuccucuggaucuac uggucugccuaaaggugucgcucugccucauagaacugccugcgugagauucucgcaugccagagauccuau uuuuggcaaucaaaucauuccggauacugcgauuuuaaguguuguuccauuccaucacgguuuuggaauguu uacuacacucggauauuugauauguggauuucgagucgucuuaauguauagauuugaagaagagcuguuucu gaggagccuucaggauuacaagauucaaagugcgcugcuggugccaacccuauucuccuucuucgccaaaag cacucugauugacaaauacgauuuaucuaauuuacacgaaauugcuucugguggcgcucccccucucuaagga agucggggaagcgguugccaagagguuccaucugccagguaucaggcaaggauaugggcucacugagacuac aucagcuauucugauuacacccgaggggugauauaaaccgggcgcggucgguaaaguuguuccauuuuuuga agcgaaggguuguggaucuggauaccgggaaaacgcugggcguuaaucaaagaggcgaacugugugugagagg uccuaugauuauguccgguuauguaaacaauccggaagcgaccaacgccuugauugacaaggauggauggcu acauucuggagacauagcuuacugggacgaagacgaacacuucuucaucguugaccgccugaagucucugau uaaguacaaaggcuaucagguggcucccgcugaauuggaauccaucuugcuccaacaccccaacaucuucga cgcaggugucgcaggucuucccgacgaugacgccggugaacuucccgccgccguuguuguuuuggagcacgg aaagacgaugacggaaaaagagaucguggauuacgucgccagucaaguaacaaccgcgaaaaaguugcgcgg aggaguuguguuuguggacgaaguaccgaaaggucuuaccggaaaacucgacgcaagaaaaaucagagagau ccucauaaaggccaagaagggcggaaagaucgccguguaauucuagagggcccuauucuauagugucaccua aaugcuagagcucgcugaucagccucgacugugccuucuaguugccagccaucuguuguuugccccucccccc gugccuuccuugacccuggaaggugccacucccacuguccuuuccuaauaaaaugaggaaauugcaucgcau ugAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAGCUGACCCUGAAGUUUU	22
annealed DNA sequence	AACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTT	14
Luc-mRNA/DNA25B		

mRNA sequence	ggagacccaagcuuggcauuccgguacuguugguaaagccaccauggaagacgccaaaaacauaaagaaaggcccggcgccauucuauccgcuggaagauggaaccgcuggagagcaacugcauaaggcuaugaagagauacgccccugguuccuggaacaauugcuuuuacagaugcacauaucgagguggacaucacuuacgcugaguacuucgaaauguccguucgguuggcagaagcuaugaaacgauaugggcugaauacaaaucacagaaucgucguaugcagugaaaacucucuucaauucuuuaugccgguguugggcgcguuauuuaucggaguugcaguugcgcccgcgaacgacauuuauaaugaacgugaauugcucaacaguaugggcauuucgcagccuaccgugguguucguuccaaaaagggguugcaaaaaauuuugaacgugcaaaaaaagcucccaaucauccaaaaaauuauuaucauggauucuaaaacggauuaccagggauuucagucgauguacacguucgucacaucucaucuaccucccgguuuuaaugaauacgauuuugugccagaguccuucgauagggacaagacaauugcacugaucaugaacucccucuggaucuacuggucugccuaaaggugucgcucugccucauagaacugccugcgugagauucucgcaugccagagauccuauuuuuggcaaucaaaucauuccggauacugcgauuuuaaguguuguuccauuccaucacgguuuuggaauguuuacuacacucggauauuugauauguggauuucgagucgucuuaauguauagauuugaagaagagcuguuucugaggagccuucaggauuacaagauucaaagugcgcugcuggugccaacccuauucuccuucuucgccaaaagcacucugauugacaaauacgauuuaucuaauuuacacgaaauugcuucugguggcgcucccccucucuaaggaagucggggaagcgguugccaagagguuccaucugccagguaucaggcaaggauaugggcucacugagacuacaucagcuauucugauuacacccgaggggaugauaaaccgggcgcggucgguaaaguuguuccauuuuuugaagcgaaggguuguggaucuggaauaccgggaaaacgcugggcguuaaucaaagaggcgaacugugugugagagguccuaugauuaugucccgguuauguaaacaauccggaagcgaccaacgccuugauugacaaggauggauggcuacaauucuggagacauagcuuacuggacgaagacgaacacuucuucaucguugaccgccugaagucucugauuaaguacaaaggcuaucaggugccucccgcugaauuggaauccaucuugcuccaacaccccaacaucuucgacgcaggugucgcaggucuucccgacgaugacgccggugaacuucccgccgccguuguuguuuuggagcacggaaagacgaugacggaaaaagagaucguggauuacgucgccagucaagaacaaccgcgaaaaaguugcgcggaggaguuguguuuguggacgaaguaccgaaaggucuuaccggaaaacucgacgcaagaaaaaucagagagauccucauaaaggccaagaagggcggaaagaucgccguguaauucuagagggcccuauucuauagugucaccuaaaugcuagagcucgcugaucagccucgacugugccuucuaguugccagccaucuguuguuugccccucccccgugccuuccuugacccuggaaggugccacucccacuguccuuuccuaauaaaaugaggaaauugcaucgcauugAAA

mRNA sequence	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCaugggcgugcacgagugccccgccug gcuguggcugcugcugagccugcugagccugccccugggccugcccgugcugggcgccccccccccggcugau cugcgacagccgggugcuggagcgguaccugcuggaggccaaggaggccgagaacaucaccaccggcugcgc cgagcacugcagccugaacgagaacaucaccgugcccgacaccaaggugaacuucuacgccuggaagcggau ggaggugggccagcaggccguggaggugugggcagggccuggcccugcugagcgaggccgugcugcggggcca ggcccugcuggugaacagcagccagcccugggagccccugcagcugcacguggacaaggccgugagcggccu gcggagccugaccacccugcugcgggcccugggcgcccagaaggaggccaucagccccccgacgccgccag cgccgccccccugcggaccaucaccgccgacaccuuccggaagcuguuccggguguacagcaacuuccugcg gggcaagcugaagcuguacaccggcgaggccugccggaccggcgaccggugauucuagagggcccuauucua uagugucaccuaaaaugcuagagcucgcugaucagccucgacugugccuucuaguugccagccaucuguuguu ugccccucccccgugccuuccuugacccuggaaggugccacucccacugccuuuCCUAAUAAAAUGAggaa auugcaucgcauugAAAA

mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체에서 RNA/DNA 하이브리드 구조 부분의 서열 및 길이에 관계없이 모두 단일 가닥의 mRNA보다 높은 단백질 발현을 나타내는 것을 확인하였으며, 이 결과는 통계학적으로 유의함을 확인하였다. 통계학적 분석은 그래프패드 프리즘 6(Graphpad prism 6, *t-test*) 소프트웨어로 수행하였다.

[0162] **실시예 3: IVT mRNA 및 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체가 봉입된 지질 나노입자의 제조 및 평가**

[0163] RFP를 인코딩하는 mRNA와 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체인 mRNA/DNA25A, mRNA/DNA25B, mRNA/DNA60C와 EPO를 인코딩하는 mRNA와 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체인 mRNA/DNA25A, mRNA/DNA25B, mRNA/DNA65C를 포함하는 지질 나노입자(LNP, Lipid Nanoparticles)를 제조하기 위하여 다음의 논문을 참조하였다(*Molecular Therapy: Nucleic Acids Vol. 15 April 2019*).

[0164] 구체적으로는, 이온화 가능한 지질 SM-102(MCE, USA), 콜레스테롤(Cholesterol powder, Avanti, USA), 인지질(DSPC, 18:0 PC, Avanti, USA), DMG-PEG 2000(Avanti, USA)를 에탄올에 50:38.5:10:1.5의 몰비로 각각 용해시키고, 각각의 핵산 구조체 20㎍을 pH 5를 띄는 25mM 아세트산 나트륨 용액(Sodium acetate)에 희석시켰다. 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, DMG-PEG 2000이 용해된 에탄올과 아세트산 나트륨 수용액에 희석시킨 핵산 구조체를 1:3의 부피비로 12ml/min의 유속의 미세 유체 카트리지(Ignite NxGen Cartridge, PNI)와 장비(NanoAssemblr® Ignite™, PNI, Canada)를 사용하여 핵산 구조체가 감싸진 지질 나노입자를 제조하였다. 구체적으로 이온화 가능한 지질 SM-102와 각각의 핵산 구조체의 중량비는 1:13으로 진행하였다. 상기 핵산 구조체가 감싸진 지질 나노입자의 에탄올을 제거하고 지질 나노입자의 pH를 중성으로 맞춰 주기 위하여, 3,500 MWCO 투석 카세트(Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes, Thermo fisher, USA)에 핵산 구조체가 감싸진 지질 나노입자를 넣고 pH를 7.4~7.5로 맞춘 8% Tris-sucrose 버퍼를 사용하여 18시간 이상 투석(dialysis)하였다. 핵산 구조체가 감싸진 지질 나노입자의 크기(Size)와 다분산도(PDI, Polydispersity Index)를 측정하기 위하여 제타사이저(Zetasizer, Malvern Instrument, UK) 장비의 동적 광산란법(DLS, Dynamic light scattering)을 이용하여 측정하였다.

[0165] 각각 mRNA와 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체를 봉입시킨 지질 나노입자의 캡슐화 효율 %(Encapsulation efficiency, %)를 측정하기 위하여 Ribogreen 어세이(Quant-iT™ RiboGreen® RNA, Invitrogen, USA)를 수행하였다. 구체적으로, 지질 나노입자에 감싸진 핵산 구조체들을 1X TE 버퍼를 사용하여 5㎍/ml의 농도로 희석한 다음, 블랙 96-웰 플레이트에 50㎕씩 로딩하였다. 지질 나노입자 당 4웰씩 로딩한 후, 2웰에는 1xTE 버퍼 50㎕를 첨가하고, 2웰에는 2% Triton-X 버퍼 50㎕를 첨가한 다음, 37℃에서 10-15분간 인큐베이션을 진행하여 2% Triton-X 버퍼로 지질 나노입자를 분해하였다. Ribogreen 시약 100㎕를 웰(well)마다 처리하여 지질 나노입자 분해 전, 후 방출된 핵산의 형광값(Excitation 485nm, Emission 528nm)을 마이크로리더기(VICTOR NIVO™, Perkin Elmer, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0166] 캡슐화 효율(%)은 2% Triton-X 버퍼를 처리한 웰의 형광값에서 1X TE 버퍼만을 처리한 웰의 형광값을 빼준 후, 2% Triton-X 버퍼를 처리한 웰의 형광값으로 나눈 값에 100을 곱하여 계산하였다. 도 6(a) 및 도 6(b)에 그 결과를 나타내었으며, 모든 핵산 구조체가 지질 나노입자에 90% 이상 잘 감싸졌고, 90~110nm 지름을 갖는 균질한 지질 나노입자가 제조되었음을 확인하였다.

[0168] **실시예 4: IVT mRNA 및 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체가 봉입된 지질 나노입자의 RFP 발현 능력 평가 I**

[0169] RFP를 인코딩하는 mRNA와 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체가 지질 나노입자에 봉입된 mRNA LNP, mRNA/DNA25A LNP, mRNA/DNA25B LNP, mRNA/DNA60C LNP의 단백질 발현 능력을 평가하기 위하여 293T 세포를 사용하여 RFP 레드 형광 단백질의 발현을 확인하였다.

[0170] 구체적으로 293T 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 $2x10^4$개로 시딩(seeding)하고 18시간 이상 CO_2 인큐베이터에서 배양한 후, 각각의 핵산 구조체가 봉입된 지질 나노입자를 70ng mRNA/well의 용량으로 세포에 형질주입(transfection)하였다. 형질주입 3, 6, 18, 24, 48시간 후, 세포 내 RFP 레드 형광 단백질 발현 능력을 확인하기 위하여, 배지를 제거하고 세포 용해 버퍼(CelLytic™ M, Sigma-aldrich, USA) 100㎕를 첨가하여 세포를 용해시켜 세포 내 RFP 레드 형광단백질을 용출시킨 후, 마이크로리더기(Excitation 530nm, Emission 580nm)를 사용하여 RFP 레드 형광단백질의 형광값을 측정하였다. mRNA LNP, mRNA/DNA25A LNP, mRNA/DNA25B LNP,

mRNA/DNA60C LNP의 형광값은 아무 처리를 하지 않은 BLK의 형광값에 대비한 값을 수치화하였으며, AUC 그래프와 함께 도 7(a) 및 도 7(b)에 나타냈다. 단백질 발현 효율이 높을수록 RFP expression 값과 AUC 값이 증가하며, mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체에서 RNA/DNA 하이브리드 부분의 서열 및 길이에 관계없이 모두 단일 가닥의 mRNA보다 높은 단백질 발현을 나타내는 것을 확인하였으며, 이 결과는 통계학적으로 유의함을 확인하였다. 통계학적 분석은 그래프패드 프리즘 6(Graphpad prism 6, *t-test*) 소프트웨어로 수행하였다.

[0172] **실시예 5: IVT mRNA 및 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체가 봉입된 지질 나노입자의 RFP 발현 능력 평가 II**

[0173] RFP를 인코딩하는 mRNA와 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체를 지질 나노입자에 봉입한 mRNA LNP, mRNA/DNA25A LNP, mRNA/DNA25B LNP, mRNA/DNA60C LNP의 단백질 발현 능력을 평가하기 위하여 THP-1 인간 단핵구 세포(ATCC, USA) 세포를 사용하여 RFP 레드 형광 단백질의 발현을 확인하였다.

[0174] 구체적으로 THP-1 인간 단핵구 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 $3x10^5$개로 시딩(seeding)하고 PMA(포르볼-12-미리스테이트-13아세테이트) 5ng을 3시간 동안 처리하여 대식세포로의 분화를 유도하였다. 72시간 이상 배양한 후, 지질 나노입자에 봉입된 핵산 구조체들을 각각 100ng mRNA/well의 용량으로 세포에 형질주입(transfection)하였다. 형질주입 18시간 후, 세포 내 RFP 레드 형광 단백질 발현 능력을 확인하기 위하여, 배지를 제거하고 세포 용해 버퍼(CelLytic™ M, Sigma-aldrich, USA) 100㎕를 첨가하여 세포를 용해시켜 세포 내 RFP 레드 형광단백질을 용출시킨 후, 마이크로리더기(Excitation 530nm, Emission 580nm)를 사용하여 RFP 레드형광단백질의 형광값을 측정하였다. mRNA LNP, mRNA/DNA25A LNP, mRNA/DNA25B LNP, mRNA/DNA60C LNP의 형광값은 아무 처리를 하지 않은 BLK의 형광값에 대비한 값을 수치화한 결과를 도 8에 나타냈다. 단백질 발현 효율이 높을수록 RFP expression 값이 증가하며, mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체에서 RNA/DNA 하이브리드 부분의 서열 및 길이에 관계없이 모두 단일 가닥의 mRNA보다 높은 단백질 발현을 나타내는 것을 확인하였으며, 이 결과는 통계학적으로 유의함을 확인하였다. 통계학적 분석은 그래프패드 프리즘 6(Graphpad prism 6, *t-test*) 소프트웨어로 수행하였다.

[0176] **실시예 6: IVT mRNA 및 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체가 봉입된 지질 나노입자의 생체 내(*In-vivo*) 발현 능력 평가**

[0177] EPO(적혈구생성인자) 단백질을 인코딩하는 mRNA와 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체를 지질 나노입자에 봉입한 mRNA LNP, mRNA/DNA25A LNP, mRNA/DNA25B LNP, mRNA/DNA65C LNP와 Modified mRNA LNP의 생체 내 단백질 발현 능력을 평가하기 위하여, BALB/c 수컷 마우스(7주령, 오리엔트바이오)를 사용하였다. 지질 나노입자에 봉입된 핵산 구조체들을 각각 2㎍ mRNA의 용량으로 마우스 역안와주사법(Retro-orbital injection)으로 주입하였다. 본 실시예에서는 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체의 단백질 발현 능력을 변형된 mRNA(modified mRNA)의 단백질 발현능과 직접 비교하기 위해, mRNA의 우리딘(Uridine) 염기가 슈도우리딘(Pseudouridine)으로 변형된 mRNA를 지질 나노입자로 봉입한 후 신규 핵산 구조체와 동일한 용량으로 마우스에 주입시켰다. 주입 3시간, 6시간 후에 채혈한 뒤 원심 분리(centrifuge)하여 plasma를 분리하고 EPO 샌드위치 효소 결합 면역 흡착 분석법(ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay)으로 EPO 발현 능력을 평가하였다.

[0178] 구체적으로는, Capture EPO 항체(Human Erythropoietin Antibody pair, Abcam, UK)를 1X ELISA Carbonate 코팅 버퍼에 1:1,000으로 희석한 후, 면역-96웰 플레이트에 웰당 100㎕ 첨가한 후, 4℃에서 밤새 인큐베이션한 다음 0.05% PBST로 세척하여 항체가 잘 코팅되도록 한다. 5% 소 혈청 알부민(BSA)으로 2시간 동안 blocking 한 후, 희석한 세럼을 각각 웰에 100㎕씩 첨가하고 37℃에서 2시간 인큐베이션한 다음, 세럼을 제거하고 0.05% PBST로 2번 세척한 후, 항체를 바이오틴화(Biotin Conjugation Kit, Abcam, UK) 시킨다. 5% 소 혈청 알부민(BSA) 버퍼에 biotinylated detector 항체를 1:1,000 희석한 후, 웰당 100㎕ 첨가하고 상온에서 2시간 인큐베이션하고 난 뒤 0.05% PBST로 4번 세척한다. 5% 소 혈청 알부민(BSA) 버퍼에 바이오틴과 강하게 결합하는 streptavidin-HRP(Abcam, UK)를 1:10,000 희석하여 웰당 100㎕씩 첨가하고 차광 상태로 상온에서 30분간 인큐베이션 한 후, streptavidin-HRP를 제거하고 0.05% PBST로 4번 세척한다. 웰당 TMB 용액(TMB Substrate Solution, Thermo fisher, USA) 100㎕를 넣고 상온에서 15-30분간 인큐베이션 후, 색 바뀜이 관찰되면 반응을 멈추는 Stop 용액(Stop Solution for TMB Substrates, Thermo fisher, USA)을 100㎕ 넣고 마이크로리더기를 이용하여 450nm의

파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 9(a) 및 도 9(b)에 나타냈다.

[0179] EPO 샌드위치 ELISA 시험법을 통하여 EPO 발현을 확인하였을 때, mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체의 EPO 발현 능력이 단일 가닥의 mRNA보다 우수하다는 것을 확인하였다. mRNA/DNA 신규 핵산 구조체의 향상된 EPO 발현 능력은 Modified mRNA와 유사한 수치를 확인하였으며, 이러한 결과는 mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조를 도입시킴으로써 mRNA에의 화학적 염기 변형 없이 치료용 단백질(EPO) 발현을 증가시킬 수 있는 효과를 얻을 수 있다는 것을 의미한다.

[0181] **실시예 7: IVT mRNA 및 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체의 인터페론(IFN) 조절 효과 확인**

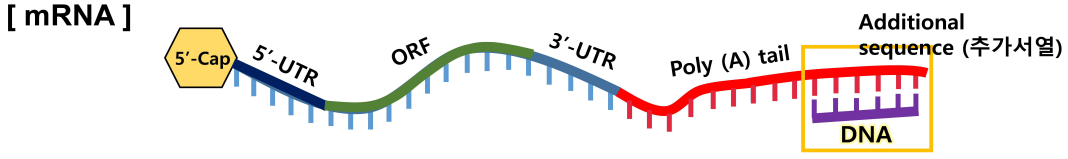
[0182] RFP를 인코딩하는 mRNA와 mRNA/DNA 하이브리드 신규 핵산 구조체인 mRNA, mRNA/DNA25A, mRNA/DNA25B, mRNA/DNA60C, Modified mRNA를 인간 단핵구 세포인 THP-1 Dual™ 세포(Invivogen, Hong-kong)를 사용하여 인터페론(IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-κ, IFN-ω)의 생성 또는 분비를 확인하였다. THP1-Dual™ 세포는 5개의 인터페론(IFN) 자극 반응 요소와 함께 인터페론 자극 유전자인 ISG54(IFN-stimulated gene) 프로모터의 제어 하에 분비된 lucia luciferase 유전자(gene)를 특징으로 하고, lucia luciferase 활성을 평가함으로써 인터페론 유도능을 확인할 수 있다.

[0183] 구체적으로, THP-1 Dual™ 세포를 96웰 플레이트에 웰(well)당 $3x10^5$개로 시딩(seeding)하고, PMA(포르볼-12-미리스테이트-13아세테이트) 5ng을 3시간 동안 처리하여 대식세포로의 분화를 유도하였다. 72시간 이상 세포를 배양한 후에 mRNA, mRNA/DNA25A, mRNA/DNA25B, mRNA/DNA60C, Modified mRNA를 각각 200ng씩 형질 주입(Transfection)하였다. 형질 주입 18~24시간 후 세포의 상층액(supernatant) 25μl를 Quanti-Luc(Invivogen, Hong-kong) 시약 75μl와 반응시켜 발광분광분석기(Luminometer)로 luciferase 활성을 측정하여 Lucia luciferase 활성 수치를 확인한 결과를 ISG54 activity(활성값)로 표현하여 도 10에 나타냈다. mRNA의 3' 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조가 도입된 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체에서 단일가닥 mRNA 구조체보다 낮은 ISG54 활성값이 측정되었다. 또한, mRNA/DNA 신규 핵산 구조체의 인터페론 유도능은 낮은 인터페론 유도능을 보인다고 잘 알려진 modified mRNA와 비교하여 통계적으로 유의하지 않은 동등한 정도의 유도능을 가지는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 mRNA의 3’ 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조를 가지는 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체가 mRNA 염기의 변형 없이도 인터페론 유도능을 modified mRNA와 비슷한 수준으로 낮추는 효과를 나타낸다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 mRNA의 3’ 말단에 RNA/DNA 하이브리드 구조를 가지는 mRNA/DNA 신규 핵산 구조체가 염기 변형되지 않은 IVT mRNA(unmodified mRNA)의 면역유도능을 변형 mRNA(modified mRNA)와 비슷한 수준으로 낮출 수 있음을 시사한다.

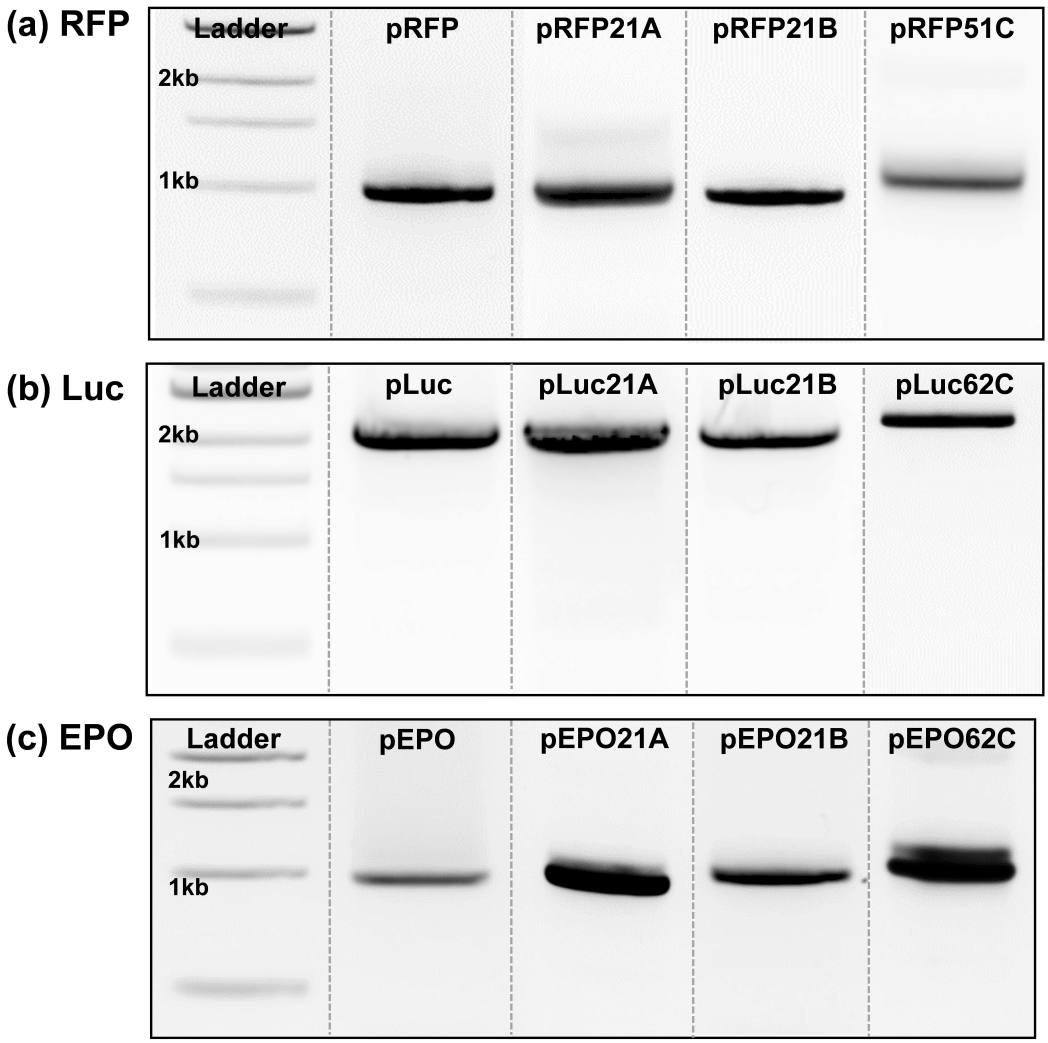
[0185] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

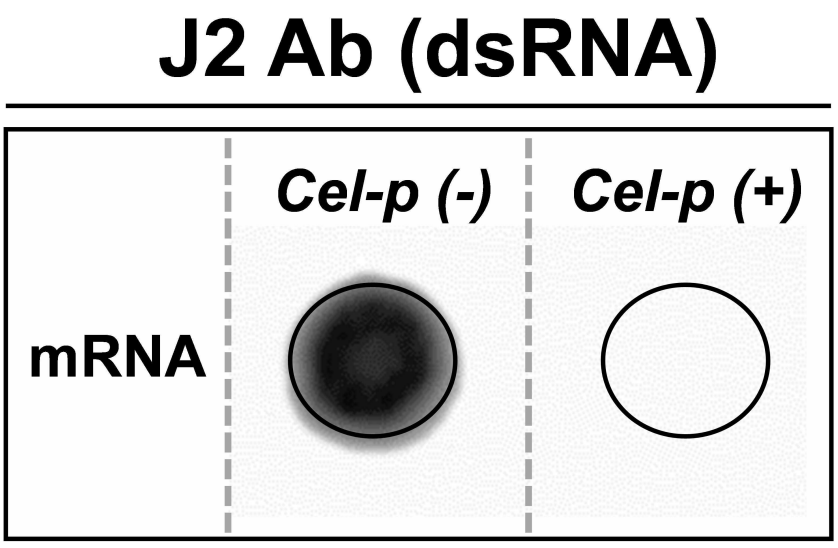
도면1



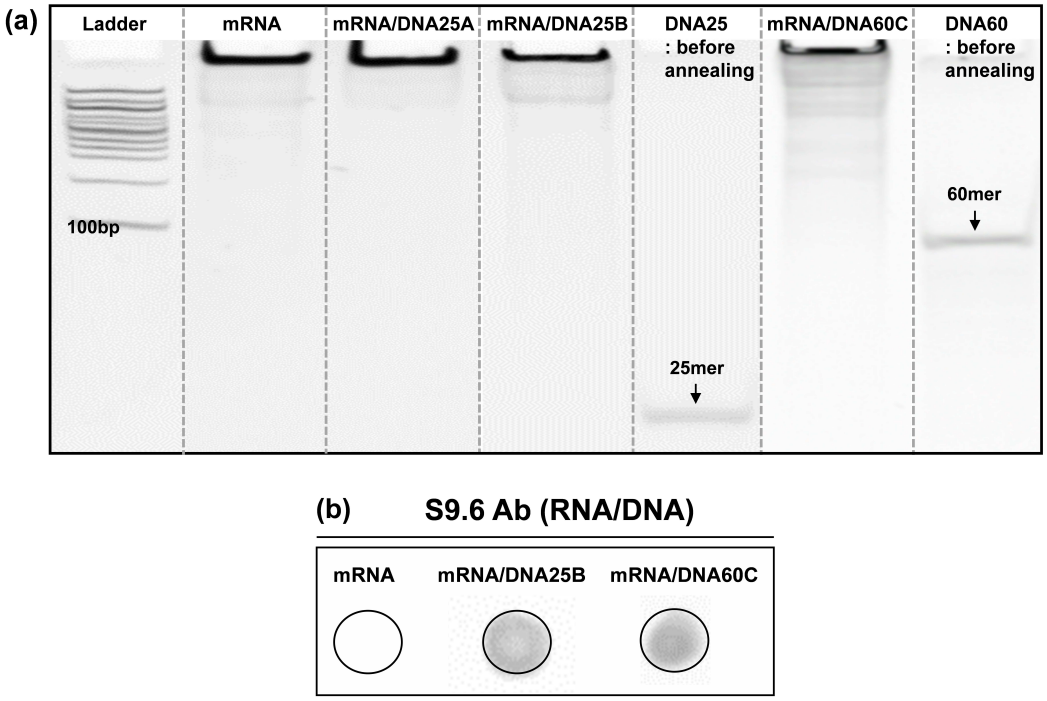
도면2


(a) RFP
Ladder
pRFP
pRFP21A
pRFP21B
pRFP51C
2kb
1kb
(b) Luc
Ladder
pLuc
pLuc21A
pLuc21B
pLuc62C
2kb
1kb
(c) EPO
Ladder
pEPO
pEPO21A
pEPO21B
pEPO62C
2kb
1kb

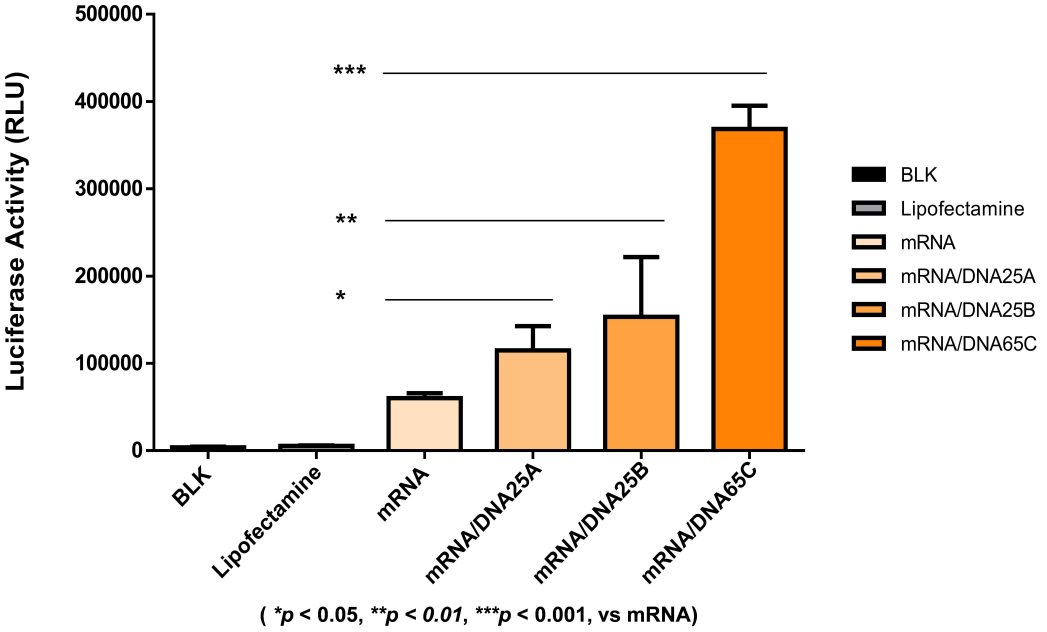
도면3


J2 Ab (dsRNA)
Cel-p (-)
Cel-p (+)
mRNA

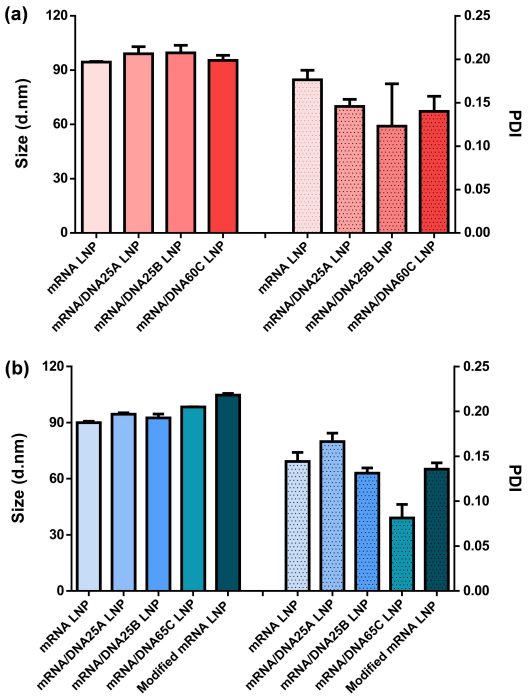
도면4


(a)
Ladder
mRNA
mRNA/DNA25A
mRNA/DNA25B
DNA25
: before
annealing
mRNA/DNA60C
DNA60
: before
annealing
100bp
60mer
25mer
(b)
S9.6 Ab (RNA/DNA)
mRNA
mRNA/DNA25B
mRNA/DNA60C

도면5


Luciferase Activity (RLU)
500000
400000
300000
200000
100000
0
***
**
*
BLK
Lipofectamine
mRNA
mRNA/DNA25A
mRNA/DNA25B
mRNA/DNA65C
BLK
Lipofectamine
mRNA
mRNA/DNA25A
mRNA/DNA25B
mRNA/DNA65C
(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, vs mRNA)

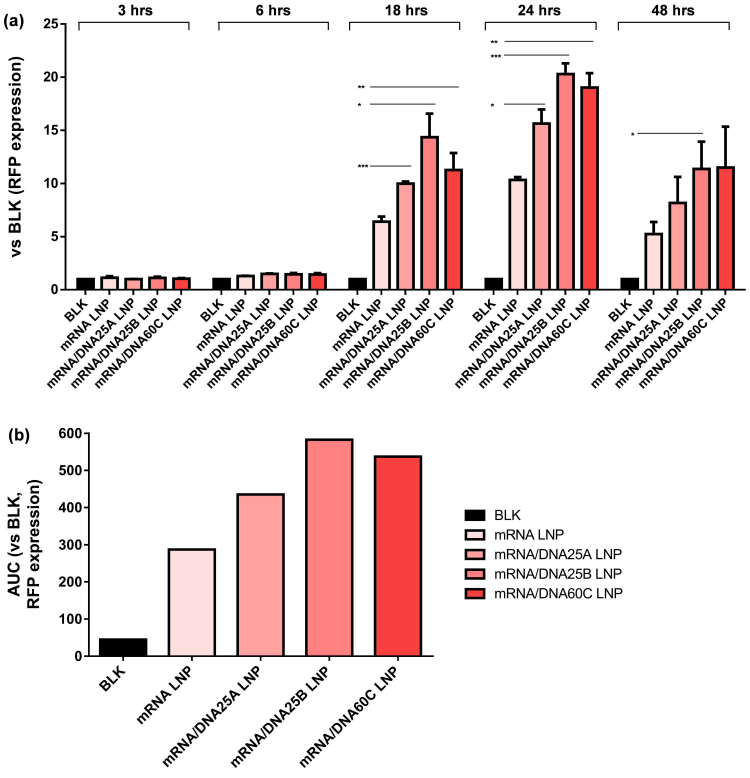
도면6



	지름 (nm)	PDI	봉입률%
mRNA LNP	94.4	0.176	92.8
mRNA/DNA25A LNP	99.0	0.146	93.9
mRNA/DNA25B LNP	99.5	0.123	94.1
mRNA/DNA60C LNP	95.3	0.140	92.4

	지름 (nm)	PDI	봉입률%
mRNA LNP	90.0	0.144	94.3
mRNA/DNA25A LNP	94.5	0.166	92.7
mRNA/DNA25B LNP	92.5	0.131	94.1
mRNA/DNA60C LNP	98.4	0.081	93.3
Modified mRNA LNP	104.7	0.136	94.1

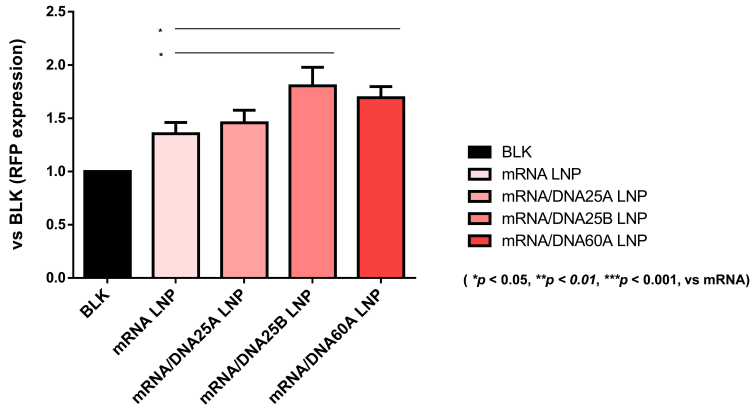
도면7



* *p*-value (vs mRNA LNP)	18hrs	24hrs	48hrs
mRNA/DNA25A LNP	0.0003	0.0210	0.1351
mRNA/DNA25B LNP	0.0263	0.0001	0.0194
mRNA/DNA60C LNP	0.0073	0.0081	0.0543

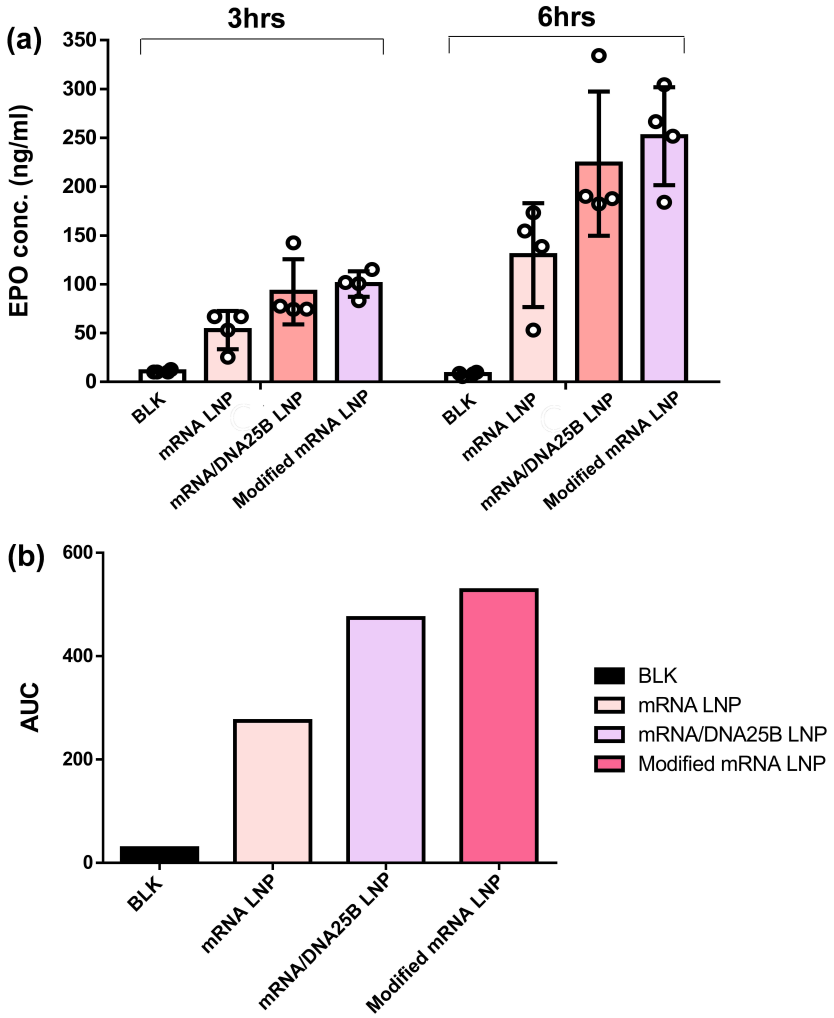
(*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, vs mRNA)

도면8

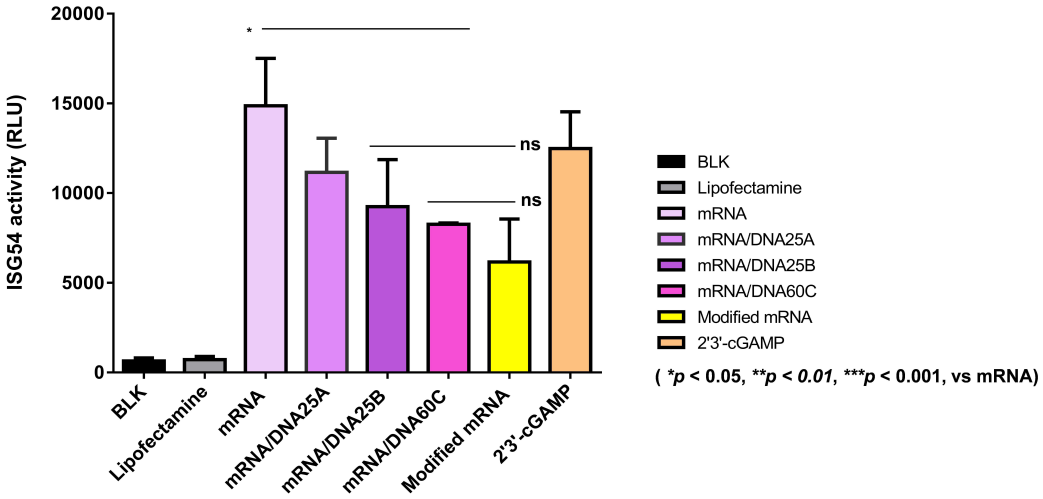


	* *p*-value (vs mRNA LNP)
mRNA/DNA25A LNP	ns
mRNA/DNA25B LNP	0.0182
mRNA/DNA60C LNP	0.0171

도면9



도면10



	* *p*-value (vs mRNA LNP)	*p*-value (vs Modified mRNA LNP)
mRNA/DNA25A LNP	0.1196	0.0474
mRNA/DNA25B LNP	0.0591	0.2073
mRNA/DNA60C LNP	0.0495	0.2681

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.