



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0133812
(43) 공개일자 2022년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/713 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/1131 (2013.01)

A61K 31/713 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0037009

(22) 출원일자 2022년03월25일

심사청구일자 2022년03월25일

(30) 우선권주장

1020210038673 2021년03월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

지성욱

서울특별시 강남구 광평로34길 35, 202동 403호
(수서동, 강남더샵포레스트아파트)

구도운

인천광역시 연수구 인천타워대로 253-25, 102동
3004호(송도동, 아트원 푸르지오)

(74) 대리인

이명진

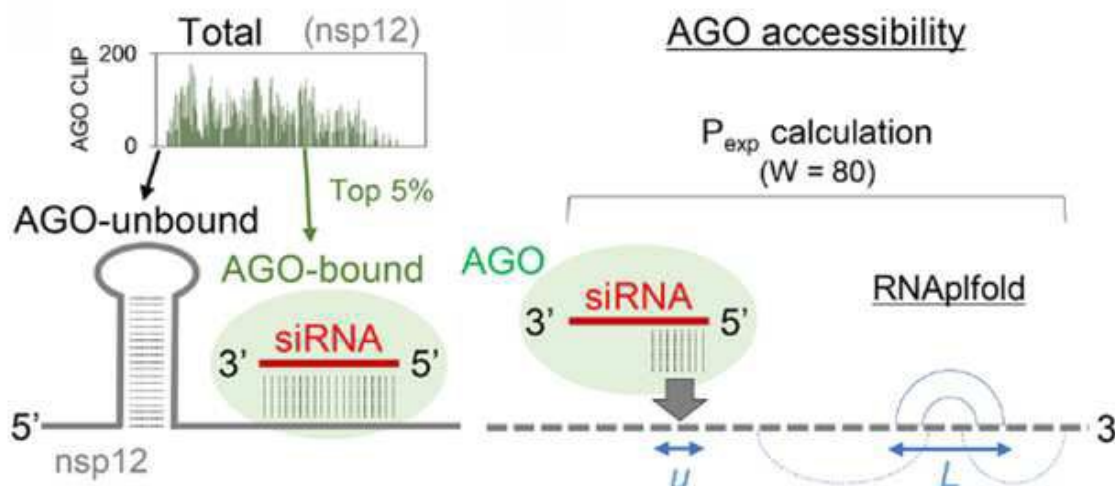
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 마이크로RNA 유사 활성을 가지는 코로나바이러스 감염증-19 예방 또는 치료용 siRNA 및 이를 포함하는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 마이크로RNA 유사 활성을 가지는 코로나바이러스 감염증-19 예방 또는 치료용 siRNA 및 이를 포함하는 약학적 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 SARS-CoV-2에 대한 siRNA는 siRNA를 디자인함에 있어 기존에 고려되지 않았던 AGO 단백질의 접근성을 추가함으로써 RNA 바이러스의 접힘 구조를 예측하여 표적에 정확하게 작용할 수 있도록 AGO-CLIP 분석을 도입하여 디자인되었으며, SARS-CoV-2의 보존된 영역을 표적으로 한다. 또한, 발명에 따른 siRNA는 SARS-CoV-2에 있어서 심각한 문제로 여겨지는 폐 섬유화를 억제하는 miRNA의 발단 서열이 도입되어, 바이러스 증식을 막는 것과 동시에 폐 섬유화를 억제하는 miRNA 유사 활성을 가지는 바, SARS-CoV-2의 바이러스 증식을 억제할 뿐만 아니라 SARS-CoV-2와 관련된 질환을 치료할 수 있는 치료제로서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도2c



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)의 RNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA(siRNA)로서,

상기 siRNA는 이중가닥 중 어느 하나의 단일가닥에 있어서

1) SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 아고너트(Argonaute, AGO) 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하며,

2) 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 위치에 특정 마이크로RNA의 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 염기 서열을 순서대로 포함하는 것을 특징으로 하고,

상기 특정 마이크로RNA는 SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 AGO 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하고, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19)에 의한 폐 손상을 개선하는 기능을 가진 것을 특징으로 하는, siRNA.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 siRNA는 SARS-CoV-2의 활성 또는 복제를 억제하고, COVID-19에 의한 폐 손상을 개선하는 것을 특징으로 하는, siRNA.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 siRNA는 마이크로RNA 유사 활성으로 COVID-19에 의한 폐 손상을 개선하는 것을 특징으로 하는, siRNA.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 마이크로RNA는 miR-27a, miR-193a-5p, miR-151, miR-486, miR-455, miR-455-5p, 및 miR-151-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, siRNA.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 폐 손상은 폐 섬유화인 것을 특징으로 하는, siRNA.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 7, 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 13, 및 서열번호 15로 이루어진 군으로부터 선택

된 하나 이상의 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, siRNA.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 AGO 단백질이 접근 가능한 특정 위치는 SARS-CoV-2의 보존된 영역에서 RNA 접합의 노출 확률(P_{exp})이 0.1 내지 1인 염기 서열 부위인 것을 특징으로 하는, siRNA.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 SARS-CoV-2의 보존된 영역은 비구조 단백질 12(non-structure protein 12, nsp12), nsp3, 및 nsp5 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, siRNA.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 SARS-CoV-2의 보존된 영역은 RNA-의존적 RNA 합성 효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)를 암호화하는 nsp12 영역인 것을 특징으로 하는, siRNA.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 siRNA는 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 위치에 순서대로 UCACAG(서열번호 49) 염기 서열을 포함하거나; 5' 말단에서 3번째부터 8번째까지 위치에 순서대로 GGUCUU(서열번호 50) 또는 AGACUG(서열번호 51)를 포함하는 것을 특징으로 하는, siRNA.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 siRNA를 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 siRNA는 SARS-CoV-2 바이러스의 활성 또는 복제를 억제하고, COVID-19에 의한 폐 손상을 개선하는 것을 특징으로 하는, COVID-19 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 siRNA를 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료용 키트.

청구항 14

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)의 RNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA(siRNA)의 제조 방법으로서,

a) siRNA의 이중가닥 중 어느 하나의 단일가닥에 있어서, SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 아고너트(Argonaute, AGO) 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하는 siRNA를 디자인하는 단계; 및

b) 상기 siRNA의 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 위치에 특정 마이크로RNA의 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 염기 서열을 순서대로 도입하는 단계를 포함하고,

상기 특정 마이크로RNA는 SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 AGO 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하고, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19)에 의한 폐 손상을 개선하는 기능을 가진 것을 특징으로 하는, siRNA의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이크로RNA 유사 활성을 가지는 코로나바이러스 감염증-19 예방 또는 치료용 siRNA 및 이를 포함하는 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)는 현재의 코로나바이러스 감염증 2019(COVID-19) 범유행의 원인이 되며, 여기서 인간 사이의 급속한 확산은 전 세계 건강을 계속 위협하고 있다. COVID-19의 주요 위험은 급성 호흡곤란 증후군을 동반한 치명적인 폐 손상으로, 이는 특발성 폐 섬유증으로 진행되어 호흡 기능 상실을 초래할 수 있다. 현재 COVID-19에 대한 효과적인 치료법이 없기 때문에, SARS-CoV-2 감염에서 전섬유화 경로(profibrotic pathways)를 약화시키는 항 섬유화 약물이 제안되고 있다. 그럼에도 불구하고, COVID-19의 효과적인 치료를 위해서는 SARS-CoV-2 감염의 비활성화와 폐 섬유증으로의 진행 예방이 모두 필요한 실정이다.

[0004] SARS-CoV-2는 최대 29,800개의 염기로 구성된 양성 센스 단일 가닥(positive-sense single-strand) 게놈 RNA(gRNA)로 구성된다. 이의 세포로의 진입은 표면 스파이크(S) 단백질과 숙주의 안지오텐신 전환 효소 2 간의 상호작용에 의해 매개된다. 그런 다음, 감염 gRNA는 두 개의 오픈 리딩 프레임(ORF1a 및 ORF1b)으로부터 폴리펩타이드로 번역되고 추가로 단백질 분해 도메인을 통해 16개의 비구조 단백질(non-structure protein, nsp)로 절단된다. 바이러스 복제를 위해서는 양성 센스 gRNA가 RNA 의존 RNA 중합효소(RdRP)에 의해 복제를 위한 주형 역할을 하는 음성 센스 gRNA로 복사되어야 한다. SARS-CoV-2의 RdRP는 nsp12에 인코딩되어 있으며 SARS-CoV-2 수명 주기를 위해 필수적이다. 따라서, RdRP는 종종 항바이러스 약물(예: Remdesivir)의 개발을 위해 치료적 표적이 되어왔다.

[0005] 본질적으로, 숙주 세포는 여러 항바이러스 방어 메커니즘을 포함하고, 그 중 하나는 RNA 간섭(RNAi)이다. 작은 간섭 RNA(Small interfering RNA, siRNA)는 아고너트(Argonaute, AGO)에 로딩하여 특정 표적 유전자에 대한 RNA 간섭(RNAi)을 유도할 수 있으며, 완벽한 서열 상보성을 통해 표적 mRNA의 절단을 유발하고, 포유류를 포함한 많은 유기체는 바이러스에 대항하여 RNAi를 유도하기 위해 바이러스 유래 siRNA를 사용한다. SARS-CoV-2는 단일 가닥 RNA를 게놈으로 가지고 있기 때문에, 다른 RNA 바이러스(예: TKM-Ebola, 에볼라 바이러스에 대한 siRNA 약물)에서 볼 수 있듯이 RNAi에 민감하게 나타난다. 이에, SARS-CoV-2를 표적으로 하는 siRNA는 자연적으로 효과적이고 특이적인 치료제로서 개발하는데 유리하다.

[0006] 바이러스 감염 시 내인성의 작은 비암호화 RNA(small non-coding RNA)인 microRNA(miRNA)도 항바이러스 RNAi를 유발할 수 있다. 항바이러스 활성과 관련하여, miRNA는 생물학적 경로에서 표적 mRNA의 역할에 따라 다양한 병태생리학적 기능을 발휘한다. 예를 들어, miR-27, miR-29, miR-486 및 miR-455와 같은 miRNA는 바이러스 감염 시 폐 섬유화를 촉진하는 TGF- β 신호전달 경로의 여러 유전자를 표적으로 하여 폐 섬유화를 약화시키며, 따라서 이러한 miRNA의 항섬유화 활성은 COVID-19 치료에 도움이 될 수 있다.

[0007] RNAi에 사용되는 miRNA는 특히 5' 말단으로부터 2번째부터 8번째 뉴클레오타이드 사이의 발단 지역(seed regio

n)을 통해 최소 6개의 연속된 염기 배열로 수백개의 타겟 mRNA와 결합하여 표적으로 인식하고, 이들의 발현을 억제하여 생물학적인 기능을 나타낸다. 이러한 표적 결합 위치를 발단 사이트(seed site)라고 한다. 반면에, siRNA는 miRNA와 달리 ~19개의 염기 모두가 타겟 mRNA에 상보결합하여 표적으로 인식하고, 이들의 발현을 억제하여 생물학적인 기능을 나타낸다. 그러나 siRNA는 세포 내 작용을 위해 miRNA와 동일한 RISC(RNA-induced silencing complex)를 사용하기 때문에, RISC 중에서도 핵심 단백질인 아고너트(Argonaute, AGO)는 siRNA를 miRNA와 동일하게 취급하여 발단 사이트 기반 표적 인식 및 기능을 수행할 수 있다. 따라서 의도한 표적 외에도 siRNA의 발단 지역이 다른 유전자를 비특이적으로 저해시키는데, 이를 miRNA 유사 오프-타겟(off-target) 현상이라 한다.

[0008] 따라서, 비염기(abasic) 피벗(pivot) 치환을 포함한 화학적 변형이 오프-타겟을 성공적으로 예방한 경우 miRNA-유사 오프-타겟 현상을 평가하고 제어해야 한다. 그러나, miRNA 모방 활성은 항암 siRNA 약물의 개발에서 나타난 바와 같이 특정 기능을 가진 miRNA와 동일한 발단 서열을 포함함으로써 siRNA에서 유리하게 배열될 수 있다.

[0009] 즉, siRNA를 일반적인 치료제로 사용하기 위해서는 miRNA 유사 오프-타겟 현상을 반드시 고려해야 하나, 역으로 이를 활용하여 질병을 악화시킬 수 있는 miRNA 발단 지역을 siRNA에 포함시켜주면 siRNA를 치료제로 활용함에 있어 시너지효과를 기대할 수 있다. 그러나, 종래 기술은 상기 방법을 사용함에 있어 의도한 miRNA에 대한 miRNA-유사 효과를 확인할 수 없고, 이를 도입한 siRNA의 효과 또한 충분히 검증하지 못하였다. 기존의 AGO-CLIP 결과에 따르면 mRNA 내부에 miRNA 발단 지역과 상보결합하는 부위가 있더라도 AGO가 접근할 수 없는 지역이 존재한다. 따라서, siRNA에 miRNA 유사 효과를 활용하기 위해서는 mRNA에 대한 AGO 단백질의 접근성을 고려해야 하는데, 종래 기술은 이에 대한 접근이 없어 의도한 기술에 대한 효과를 충분히 검증하지 못하였다. 이에, miRNA 유사 오프-타겟 현상을 siRNA에 활용하기 위해서는 AGO 단백질의 접근성을 고려해야 하며, 이를 토대로 miRNA 유사 오프-타겟을 활용한 siRNA를 설계하는 것이 중요하다.

[0010] siRNA와 miRNA는 모두 동일한 RNAi 이펙터인 AGO를 공유하기 때문에, 위치 점유 및 병태생리학적 기능을 이해하기 위해 전체 전사체에 AGO 결합을 매핑하는 것이 중요하다. 이를 위해, 가교결합(crosslinking) 면역침강(immunoprecipitation)을 통해 분리된 AGO 관련 RNA의 염기서열 분석(AGO CLIP)이 생물정보학 분석과 함께 개발되었으며, miRNA 산화에 의해 인식되는 것은 물론 정규 및 비정규 miRNA 표적 사이트를 포함하는 miRNA 반응 요소를 발견하기에 충분히 민감한 것으로 입증되었다. 바이러스 감염 시, AGO CLIP은 miRNA 표적 및 이들의 15 가지 다른 RNA 바이러스에서 그들의 병리학적 역할을 이해하는데 도움을 주었다. 또한, CLIP를 사용하여 분석된 AGO 결합 miRNA 표적 사이트는 RNAi에 대한 접근 가능한 표적 영역을 정의할 수 있으므로 siRNA의 가변적 민감도를 극복할 수 있게 한다. 이는 표적 mRNA의 구조적 접근성이 siRNA에 영향을 미칠 수 있기 때문에 RNA 접힘의 노출 확률을 계산하여 추정할 수 있다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 AGO CLIP 분석을 사용하여 AGO 단백질의 접근성을 예측하고, SARS-CoV-2를 침묵시키고 항섭유화 miRNA 활성을 나타내는 잠재적인 siRNA를 설계함으로써 이를 COVID-19 치료에 활용하고자 하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) N Engl J Med. 2020 Feb 20;382(8):727-733.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명자들은 miRNA 유사 오프-타겟 현상을 역으로 이용하여 siRNA를 질병에 대한 치료제로 활용함에 있어, 종래 기술은 mRNA 내부에 miRNA 발단 지역과 상보결합하는 부위가 있더라도 AGO가 접근할 수 없는 지역이 존재하여 siRNA의 miRNA 유사 효과를 충분히 검증하지 못한 문제점을 해결하고, AGO-CLIP 분석을 이용하여 SARS-CoV-2에 대한 억제 효과 및 miRNA 유사 활성으로 항섭유화 활성을 나타내는 siRNA를 개발하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0015] 이에, 본 발명의 목적은 코로나바이러스 감염증-19 예방 또는 치료를 위한 작은 간섭 RNA(siRNA) 및 이의 제조

방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 감염증-19 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.

[0018] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)의 RNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA(siRNA)로서,

[0021] 상기 siRNA는 이중가닥 중 어느 하나의 단일가닥에 있어서

[0022] 1) SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 아고너트(Argonaute, AGO) 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하며,

[0023] 2) 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 위치에 특정 마이크로RNA의 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 염기 서열을 순서대로 포함하는 것을 특징으로 하고,

[0024] 상기 특정 마이크로RNA는 SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 AGO 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하고, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19)에 의한 폐 손상을 개선하는 기능을 가진 것을 특징으로 하는, siRNA를 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)의 RNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA(siRNA)의 제조 방법으로서,

[0028] a) siRNA의 이중가닥 중 어느 하나의 단일가닥에 있어서, SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 아고너트(Argonaute, AGO) 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하는 siRNA를 디자인하는 단계; 및

[0029] b) 상기 siRNA의 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 위치에 특정 마이크로RNA의 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 염기 서열을 순서대로 도입하는 단계를 포함하고,

[0030] 상기 특정 마이크로RNA는 SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 AGO 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하고, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19)에 의한 폐 손상을 개선하는 기능을 가진 것을 특징으로 하는, siRNA의 제조 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 siRNA는 SARS-CoV-2의 활성 또는 복제를 억제하고, COVID-19에 의한 폐 손상을 개선할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 siRNA는 마이크로RNA 유사 활성으로 COVID-19에 의한 폐 손상을 개선할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 마이크로RNA는 miR-27a, miR-193a-5p, miR-151, miR-486, miR-455, miR-455-5p, 및 miR-151-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 폐 손상은 폐 섬유화일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 siRNA는 서열번호 7, 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 13, 및 서열번호

15로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0036] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 AGO 단백질이 접근 가능한 특정 위치는 SARS-CoV-2의 보존된 영역에서 RNA 접합의 노출 확률(P_{exp})이 0.1 내지 1인 염기 서열 부위인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 SARS-CoV-2의 보존된 영역은 비구조 단백질 12(non-structure protein 12, nsp12), nsp3, 및 nsp5 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 SARS-CoV-2의 보존된 영역은 RNA-의존적 RNA 합성 효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)를 암호화하는 nsp12 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 siRNA는 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 위치에 순서대로 UCACAG(서열 번호 49) 염기 서열을 포함하거나;
- [0040] 5' 말단에서 3번째부터 8번째까지 위치에 순서대로 GGUCUU(서열번호 50) 또는 AGACUG(서열번호 51)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 개선 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0042] 또한, 본 발명은 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는 조성물의 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0043] 또한, 본 발명은 상기 siRNA의 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0045] 본 발명에 따른 SARS-CoV-2에 대한 siRNA는 siRNA를 디자인함에 있어 기존에 고려되지 않았던 AGO 단백질의 접근성을 추가함으로써 RNA 바이러스의 접합 구조를 예측하여 표적에 정확하게 작용할 수 있도록 AGO-CLIP 분석을 도입하여 디자인되었으며, SARS-CoV-2의 보존된 영역을 표적으로 한다. 또한, 발명에 따른 siRNA는 SARS-CoV-2에 있어서 심각한 문제로 여겨지는 폐 섬유화를 억제하는 miRNA의 발단 서열이 도입되어, 바이러스 증식을 막는 것과 동시에 폐 섬유화를 억제하는 miRNA 유사 활성을 가지는 바, SARS-CoV-2의 바이러스 증식을 억제할 뿐만 아니라 SARS-CoV-2와 관련된 질환을 치료할 수 있는 치료제로서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 miR-27a 발단 서열을 포함하도록 설계된 siRNA(27/RdRP)의 서열을 나타낸 도면이다.
- 도 2a는 RdRP 서열의 계통발생학적 분석을 바탕으로 SARS-CoV-2와 서열 유사성을 갖는 것으로 분류된 해당 RNA 바이러스의 AGO CLIP 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 2b는 SARS-CoV-2에 있는 nsp12의 대응 영역에 정렬된 SARS-CoV-2와 관련된 6가지 RNA 바이러스의 RdRP에서의 AGO 결합 영역 및 컴파일된 AGO CLIP 리드값(각 위치의 리드 카운트의 중간값)을 나타낸 도면이다.
- 도 2c는 AGO 접근성 예측을 위한 도식을 나타낸 것이다.
- 도 2d는 nsp12에서 추정된 AGO 결합 영역과 비결합 영역의 AGO CLIP 클러스터를 비교한 도면이다.
- 도 2e는 nsp12에서 두 염기쌍 위치 사이의 지정된 최대 거리(L)와 상기 거리 내에서 발단 사이트의 길이(u)에 따른 평균 P_{exp} 및 표적 부위의 접근성($\log_{10}(P_{exp})$)을 비교한 도면이다.
- 도 2f는 nsp12에서 AGO 결합 영역과 비결합 영역 사이의 P_{exp} 차이를 확인한 도면이다.
- 도 2g는 AGO 결합 영역 vs. AGO 비결합 영역에 대한 최적화된 매개변수($u=8$, $L=20$) 조건에서 P_{exp} 의 누적 분포 함수(CDF)를 나타낸 도면이다.

도 2h는 AGO 결합 영역 vs. AGO 비결합 영역에 대한 최적화된 매개변수($u=8$, $L=20$) 조건에서 표적 부위의 접근성($\log_{10}(P_{\text{exp}})$) 분포를 확인한 도면이다.

도 2i는 AGO 결합 영역 vs. AGO 비결합 영역에 대한 여러 가지 매개변수 조건에서 CDF를 나타낸 도면이다.

도 2j는 AGO 결합 영역 vs. nsp12의 전체 영역에 대한 여러 가지 매개변수 조건에서 표적 부위의 접근성 분포 및 CDF를 나타낸 도면이다.

도 2k 및 2l은 AGO 결합 영역 vs. nsp12의 전체 영역에 대한 최적화된 매개변수($u=8$, $L=20$) 조건에서 CDF 및 표적 부위의 접근성 분포를 나타낸 도면이다.

도 3a는 SARS-CoV-2의 추정 AGO 접근 가능 영역 확인 및 이를 통한 항섭유증 miRNA의 발단 서열을 포함하는 강력한 siRNA의 설계 과정을 나타낸 도면이다.

도 3b는 추정 AGO 접근 가능 영역($P_{\text{exp}} > 0.1$)을 표적으로 하는 13개의 설계된 siRNA 서열 목록을 나타낸 도면이다.

도 3c는 nsp3를 표적으로 하며, miR-151의 발단 서열을 가진 151/nsp3의 표적 효과 및 miRNA 유사 효과를 확인하기 위해, 루시퍼라제 리포터 분석을 통해 IC_{50} 를 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3d는 nsp3(193/nsp3) 및 nsp5(193/nsp5)를 표적으로 하는 siRNA의 표적 효과를 대상으로 한 루시퍼라제 리포터 분석을 통해 IC_{50} 를 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3e는 miR-193a-5p의 검증된 표적으로서 COL1A1 전사체 수준을 측정하여 193/nsp3 및 193/nsp5의 miRNA-유사 활성을 확인한 도면이다.

도 3f는 SARS-CoV-2의 nsp12 영역에 위치한 이전에 보고된 항섭유화 miRNA의 발단 사이트를 나타낸 도면이다.

도 3g는 인체 감염 사례 중 nsp12 영역에서 SARS-CoV-2 gRNA의 위치 보존률($n=5475$)(상단 패널) 및 RNA 바이러스의 AGO CLIP 데이터에서 유래된 추정 AGO 접근성을 나타낸 도면이다(하단 패널).

도 3h는 miR-486을 가진 486/RdRP의 서열을 나타낸 도면이다.

도 3i 및 3j는 A549 세포 및 HeLa 세포에서 27/RdRP 표적 사이트를 대상으로 한 루시퍼라제 리포터 분석 결과(도 3i) 및 A549 세포에서 486/RdRP 표적 사이트를 대상으로 한 루시퍼라제 리포터 분석 결과(도 3j)를 확인한 도면이다.

도 3k는 GenBank에서 5475개 SARS-CoV-2 서열의 다중 서열 정렬로부터 계산된 27/RdRP(상단 패널) 및 486/RdRP 부위(하단 패널)의 서열 보존율을 확인한 도면이다.

도 4a는 NT, miR-27a 및 27/RdRP의 형질감염 후 얻은 RNA-Seq 리드의 맵핑 비율을 나타낸 도면이다.

도 4b는 27/RdRP로 형질감염된 A549 세포에서 추정 miR-27 표적에 대해 RNA-Seq를 사용한 CDF 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 4c는 27/RdRP 발현 하에 3'UTR에 6mer 발단 사이트를 포함하는 추정 miR-27 표적의 볼케이노 플롯(volcano plot) 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 4d는 27/RdRP로 형질감염된 A549 세포에서 하향 조절된 DEG의 GO 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 4e는 miR-27a로 형질감염된 A549 세포에서 추정 miR-27 표적에 대해 RNA-Seq를 사용한 CDF 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 4f는 miR-27a 발현 하에 3'UTR에 6mer 발단 사이트를 포함하는 추정 miR-27 표적의 볼케이노 플롯(volcano plot) 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 4g는 miR-27a로 형질감염된 A549 세포에서 하향 조절된 DEG의 GO 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 4h는 도 4i의 중첩 분석에 사용된 무작위 대조군(1000번 섞임)을 나타낸 도면이다.

도 4i는 도 4h의 무작위 대조군을 사용하여 27/RdRP 및 miR-27a 사이에서 차등적으로 하향 조절된 표적을 중첩 분석으로 비교하여 나타낸 도면이다.

도 4j는 도 4i에서 확인한 27/RdRP 및 miR-27a 사이에서 중첩하는 하향 조절된 DEG의 GO 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 4k는 27/RdRP 및 miR-27a 발현 사이에서 차등적으로 하향 조절된 표적에서의 유의적인 중첩을 확인한 도면이다.

도 5a는 섬유아세포로 miR-27a 및 27/RdRP의 형질감염 후 TGF- β 처리가 섬유아세포에 미치는 영향을 확인한 도면이다.

도 5b는 섬유아세포로 miR-27a 및 27/RdRP 형질감염 후 COL1A1 mRNA의 상대적 수준을 확인한 도면이다.

도 5c는 A549 세포에 형질감염된 SARS-CoV-2 nsp12 전사체의 27/RdRP에 의한 상대적 수준 변화를 확인한 도면이다.

도 5d는 nsp12 RNA 단편을 27/RdRP 또는 486/RdRP 표적 사이트로 동시 형질감염시켜 27/RdRP 또는 486/RdRP의 존재 하에서 표적 RNA의 비율(상대적인 RNA 수준)을 상대적으로 측정된 결과를 나타낸 도면이다.

도 5e는 SARS-CoV-2 nsp12의 예측된 RNA 2차 구조를 나타낸 도면이다.

도 5f는 항섬유화 miRNA(n= 5) 및 신뢰도가 높은 인간 miRNA(n= 897)를 포함한 특정 miRNA에 대한 검색 가능 기능을 갖춘 SARS-CoV-2 siRNA용 웹 서버 화면 및 이를 이용하여 노출 확률(P_{exp})과 추론된 AGO 결합을 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명의 일 실험예에서는 COVID-19를 치료하기 위해 SARS-CoV-2에 대한 강력한 siRNA 서열을 설계하였다. RNA 침묵 효과를 확실히 하기 위해, SARS-CoV-2 gRNA에서 AGO 표적 사이트 접근성을 고려하였으며, RNA-의존적인 RNA polymerase(RdRP)를 암호화하는 RNA 바이러스 중 가장 보존된 영역(nsp12)을 중심으로 계통발생학적 거리를 추정하여 SARS-CoV-2와 서열 유사성을 갖는 것으로 분류된 해당 RNA 바이러스의 AGO CLIP 결과를 선택하였다. 발단 사이트 내에서 노출된 부위의 길이(u = 6, 7, 또는 8)와 다양한 범위의 최대 로컬 염기쌍(L = 20, 40, 및 60)을 사용하여 RNA 바이러스의 AGO CLIP 결과를 분석한 결과, ~20 뉴클레오타이드 길이의 siRNA(L = 20) 범위 내에서 전체 발단 사이트의 길이가 u = 8인 경우 SARS-CoV-2의 RNA 접합의 노출 확률(P_{exp})이 다른 조건보다 우수한 최적의 조건임 확인하여, 상기 최적화된 매개 변수로 AGO 접근성 예측 정확도를 증가시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 1 참조).

[0049] 본 발명의 다른 실험예에서는 nsp12에서 정의된 AGO 결합을 기반으로, 최적화된 매개변수(u = 8, L = 20)로 P_{exp} 를 계산하여 SARS-CoV-2 gRNA에서 모든 위치의 AGO 접근성을 추가로 예측하였다. 그 결과, SARS-CoV-2에서 보고된 염기서열 변화가 없는 AGO 접근 가능 영역(P_{exp} > 0.1)을 선택한 후(2-8 위치에서 100 % 보존), 13개의 siRNA 서열이 항섬유화 miRNA인 miR-27, miR-193-5p, miR-486, miR-151, 및 miR-455의 발단 서열을 갖는 것을 확인하였는 바, 이들은 miRNA 유사 활성으로 항섬유화 활성을 나타내고 SARS-CoV-2를 억제하는 siRNA로 작용할 것으로 기대되었다(실험예 2 참조).

[0050] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 상기 13개의 siRNA 중에서, 그들의 표적 억제 및 miRNA 유사 활성에 대해 AGO 접근성이 높은(P_{exp} > 0.5) 151/nsp3, 193/nsp3, 및 193/nsp5를 이용하여, 루시퍼라제 리포터 분석을 통해 이들의 표적 사이트에 대한 IC_{50} 를 측정한 결과, 모두 SARS-CoV-2 표적 사이트를 효율적으로 침묵시킬 수 있음을 확인하였으며, 151/nsp3의 경우, miR-151 발단 사이트를 가진 루시퍼라제 리포터를 사용하여 이의 miRNA-유사 활성을 확인하였다. 또한, miR-193a-5p의 발단 사이트를 포함하는 타입 I 콜라겐의 주요 성분인 COL1A1의 전사체 수준을 측정한 결과, 193/nsp3 및 193/nsp5가 항섬유화 miRNA 유사 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 다만, nsp12에 의해 암호화되는 RdRP 단백질은 바이러스 복제에 필수적이기 때문에, 본 발명에서는 miR-27 발단 사이트를 가진 nsp12를 표적으로 하는 siRNA(27/RdRP)에 초점을 맞추었으며, 27/RdRP가 SARS-CoV-2 표적 사이트에 대해 높은 침묵 효과를 가지는 것을 확인하였다(실험예 3 참조).

[0051] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 27/RdRP가 항섬유화 miRNA-유사 활성을 가지는 것을 확인하였으며, 유전자 온톨로지 분석에 의해 miR-27의 표적이 세포사멸, 분화, 미토콘드리아 조절, 및 증식과 함께 TGF- β 신호 전달 경로에 의해 매개되는 폐 섬유증에서 기능하는 것으로 나타났으며, miR-27 표적의 하향 조절은 A549 세포에서의 miR-27a 발현에 의해 유도되었고, 27/RdRP에 의해 조절되는 유사한 기능적 네트워크가 풍부한 것으로 나타났다.

이에, SARS-CoV-2를 표적으로 하는 siRNA가 항섬유화 miRNA와 동일한 발단 서열을 포함함으로써 잠재적으로 전 섬유화 경로를 억제할 수 있는 방식으로 miRNA-유사 활성을 유도할 수 있음을 입증하였으며, 27/RdRP의 miRNA-유사 활성은 전체적으로 miR-27a와 같이 기능하고, 잠재적으로 폐 세포에서 항섬유화 활성을 부여하며, 이러한 조절은 TGF- β 반응을 약화시킴으로써 매개될 수 있음을 확인하였다(실험예 4 참조).

[0052] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 27/RdRP 발현이 있을 때 TGF- β 처리가 섬유아세포에 미치는 영향을 조사한 결과, TGF- β 처리는 폐 섬유아세포인 MRC-5의 분화를 유도했지만, 27/RdRP 및 miR-27a의 형질감염에 의해 분화가 억제되는 것을 확인하였다. 또한, miR-27a 형질감염 및 27/RdRP 형질감염에서 COL1A1 mRNA 수준이 유의적으로 감소되어, 27/RdRP가 항섬유화 miR-27a로 기능함으로써 폐 섬유화를 예방할 수 있음을 확인하였다. 아울러, 27/RdRP가 nsp12 전사체를 현저하게 감소시키는 것을 확인하였으며, 이는 AGO 접근성 및 RNA 접합의 노출 확률이 더 낮은 486/RdRP과 비교했을 때 더 뛰어난 것을 알 수 있었다. 이에, 상기 결과로부터 SARS-CoV-2를 억제하고 항섬유화 miR-27 활성을 통해 폐 섬유화를 예방하는데 있어 27/RdRP의 강력한 활성을 확인하였으며, SARS-CoV-2를 대상으로 설계된 모든 추정 siRNA의 사용을 용이하게 하기 위해, 검색 기능과 함께 항섬유화 miRNA(n=5)의 발단 서열뿐만 아니라 신뢰도가 높은 인간 miRNA(n= 897)의 발단 서열을 포함하는 siRNA의 서열 정보를 제공하는 웹 서버(<http://clip.korea.ac.kr/covid19>)를 구축하였다(실험예 5 참조).

[0054] 이에, 본 발명은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)의 RNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA(siRNA)로서,

[0055] 상기 siRNA는 이중가닥 중 어느 하나의 단일가닥에 있어서

[0056] 1) SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 아고너트(Argonaute, AGO) 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하며,

[0057] 2) 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 위치에 특정 마이크로RNA의 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 염기 서열을 순서대로 포함하는 것을 특징으로 하고,

[0058] 상기 특정 마이크로RNA는 SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 AGO 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하고, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19)에 의한 폐 손상을 개선하는 기능을 가진 것을 특징으로 하는, siRNA를 제공한다.

[0059] 본 발명에 있어서, “코로나바이러스 감염증-19(COVID-19)”는 SARS-CoV-2가 일으키는 중증 호흡기 증후군이다. 2019년 12월에 중국에서 첫 사례가 보고되었고, 전 세계적으로 퍼져나가면서 유행병으로 자리잡았다. COVID-19의 증상은 다양하지만 발열, 기침, 두통, 피로, 호흡 곤란, 후각 및 미각 상실 등이 있다. 증상은 바이러스에 감염된 지 1~14일 안에 나타난다. 특히 감염된 사람 중 3분의 1은 무증상 감염자로 눈에 띄는 증상이 나타나지 않는다. 환자로 분류될 만큼 눈에 띄는 81%의 사람들은 경증에서 중증의 증상이 발생하며, 14%의 사람들은 호흡 곤란, 저산소증 등 증상이 발생하며, 5%의 사람들은 호흡기 부전, 쇼크 등 심각한 증상이 발생한다. 고령자는 심각한 증상이 발생할 확률이 더 높으며, 일부 사람들은 회복 후 긴 시간동안 접한 COVID-19 때문에 장기 손상이 관찰되었다.

[0060] 본 발명에 있어서, “작은 간섭 RNA(siRNA)”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNA 간섭(RNA interference, RNAi) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥(운반자 가닥)과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥(가이드 가닥)으로 구성된다.

[0061] 본 발명에 있어서, “마이크로RNA(miRNA)”는 번역 수준에서 유전자 발현을 억제하는 자연 발생적이고, ~21개의 염기로 구성된 소형의 비코딩 RNA를 의미한다. 마이크로RNA는 표적 핵산의 3' 비번역 영역 내의 표적 부위에 결합함으로써 유전자 발현을 억제하여 RNA간섭을 유도한다.

[0062] 본 발명에 있어서, 상기 염기 서열을 “순서대로 포함” 한다는 의미는 예컨대 COVID-19의 증상을 개선하는 기능을 가진 마이크로RNA의 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지의 염기 서열이 UCACAG일 경우, siRNA의 이중가닥 중 어느 하나의 단일가닥에 있어서 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 위치에 상기 UCACAG 서열을 그대로 포함한다는 의미이다.

[0063] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)의 RNA에 상보적으

로 결합하는 작은 간섭 RNA(siRNA)의 제조 방법으로서,

- [0064] a) siRNA의 이중가닥 중 어느 하나의 단일가닥에 있어서, SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 아고너트(Argonaute, AGO) 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하는 siRNA를 디자인하는 단계; 및
- [0065] b) 상기 siRNA의 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 위치에 특정 마이크로RNA의 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 또는 3번째부터 8번째까지의 염기 서열을 순서대로 도입하는 단계를 포함하고,
- [0066] 상기 특정 마이크로RNA는 SARS-CoV-2의 보존된 영역으로서 AGO 단백질이 접근 가능한 특정 위치에 상보적으로 결합하고, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19)에 의한 폐 손상을 개선하는 기능을 가진 것을 특징으로 하는, siRNA의 제조 방법을 제공한다.
- [0067] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA는 SARS-CoV-2의 활성 또는 복제를 억제하고, COVID-19에 의한 폐 손상을 개선할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 본 발명에 있어서, siRNA는 세포안에서 아고너트에 로딩된 후 의도한 표적과 완벽하게 결합하여 해당 mRNA를 잘라 강력하게 발현을 억제하지만, 동시에 마이크로RNA와 동일하게 작용하여 의도하지 않은 수백개의 표적도 인식하게 된다. 이를 “마이크로RNA 유사 오프-타겟(miRNA-like off-target) 활성” 이라고 한다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA는 폐 손상과 관련된 마이크로RNA의 발단 서열과 동일한 서열을 포함하여 마이크로RNA 유사 오프-타겟(off-target) 활성으로 인한 마이크로RNA 유사 활성으로 COVID-19의 증상인 폐 손상을 개선할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 마이크로RNA는 miR-27a, miR-193a-5p, miR-151, miR-486, miR-455, miR-455-5p, 및 miR-151-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 폐 손상은 폐 섬유화일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0072] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 상기 siRNA는 TGF- β 신호 전달에서 기능하는 miR-27의 표적 mRNA를 억제하여 전섬유화 경로를 억제함으로써 폐 섬유화에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0073] 본 발명에 있어서, “섬유화”는 생체의 조직에서 세포외 매트릭스 단백질(주로 콜라겐)이 침착되는 것을 의미하며, “섬유증”은 생체의 조직에서의 섬유화가 그 조직의 경화나 기능장애를 초래하는 정도에 도달한 상태를 의미한다.
- [0074] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 7, 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 13, 및 서열번호 15로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0075] 본 발명에 있어서, 상기 AGO 단백질이 접근 가능한 특정 위치는 SARS-CoV-2의 보존된 영역에서 RNA 접합의 노출 확률(P_{exp})이 0.1 내지 1인 염기 서열 부위인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 노출 확률(P_{exp})은 RNAfold를 사용하여 구하였으며, 발단 사이트 내에서 노출된 부위의 길이(u)를 6 내지 16, 6 내지 14, 6 내지 12, 6 내지 10, 6 내지 8, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 16, 8 내지 14, 8 내지 12, 8 내지 10, 최소 8 이상, 또는 8, 및 최대 로컬 염기쌍(L)을 20 내지 60, 20 내지 40, 최소 20 이상, 또는 20으로 계산할 수 있으며, 본 발명의 일 실험예에 따르면 $u=8$, $L=20$ 으로 계산할 경우 AGO 접근성 예측 정확도를 증가시킬 수 있어, 바람직할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 본 발명에 있어서, 상기 SARS-CoV-2의 보존된 영역은 비구조 단백질 12(non-structure protein 12, nsp12), nsp3, 및 nsp5 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 상기 SARS-CoV-2의 보존된 영역은 RNA-의존적 RNA 합성 효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)를 암호화하는 nsp12 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0078] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA는 5' 말단에서 2번째부터 7번째까지 위치에 순서대로 UCACAG(서열번호 49) 염기 서열을 포함하거나;
- [0079] 5' 말단에서 3번째부터 8번째까지 위치에 순서대로 GGUCUU(서열번호 50) 또는 AGACUG(서열번호 51)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0080] 본 발명에 있어서, “발단 지역(seed region)” 또는 “발단 서열(seed sequence)”은 마이크로RNA 또는 siRNA

의 5' 말단 기준 1번째부터 8번째, 2번째부터 8번째, 2번째부터 7번째, 또는 3번째부터 8번째 사이의 최소한 6개 이상의 연속적인 염기 서열을 의미한다.

- [0081] 본 발명에 있어서, “발단 사이트(seed site)”는 마이크로RNA 또는 siRNA의 발단 지역의 염기 서열에 상보적으로 결합하는 표적 mRNA의 서열을 의미한다.
- [0082] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0083] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [0085] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0086] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0087] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.
- [0088] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.
- [0089] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제,

착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

- [0090] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.
- [0091] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [0092] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비셀파이드 0.1%, 소듐포름알데히드 설포실레이트, 지오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비셀파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠프시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.
- [0093] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위템솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스펀, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움 (Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.
- [0094] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0095] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0096] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비용, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0097] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0098] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예

를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

- [0099] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0100] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [0101] 본 발명에 있어서, “키트”는 상기 본 발명에 따른 siRNA를 포함함으로써, COVID-19를 예방 또는 치료할 수 있도록 하는 도구를 의미한다. 본 발명의 키트에는 상기 siRNA 외에도 COVID-19의 예방 또는 치료 방법에 통상적으로 필요한 다른 구성성분, 조성물, 용액, 장치 등이 포함될 수 있다. 이때, 상기 siRNA는 1회 이상 횟수에 제한 없이 처리할 수 있으며, 이를 처리하는 선후에는 제한이 없고, 동시에 진행될 수도 있고 미시에 진행될 수도 있다. 본 발명에 있어서, 상기 키트는 컨테이너; 지시서; 및 상기 siRNA를 포함할 수 있다. 상기 컨테이너는 상기 siRNA를 포장하는 역할을 할 수 있고, 보관 및 고정하는 역할을 할 수도 있다. 상기 컨테이너의 재질은 예컨대, 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있고, 이들은 부분적 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 처음에는 용기의 일부분이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있으며, 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 지시서를 포함할 수 있다.
- [0102] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 개선 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0103] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 siRNA를 유효성분으로 포함하는 조성물의 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0104] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 siRNA의 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0105] 본 발명에 있어서, “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0106] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0107] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0108] 본 발명에 있어서, “포함하는”이라는 용어가 사용될 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [0110] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0112] **[실시예]**
- [0113] **실시예 1. 생물정보학 및 통계 분석**
- [0114] 생물정보학 분석에 Python 스크립트(Biopython) 및 Integrative Genomics Viewer(IGV)를 사용하였고, RNA-Seq 분석은 Curflinks 및 Curffdiff를 사용하여 수행하였다.

[0115] 모든 실험 그룹에 대해 표준 실험실 관행 무작위화 절차를 사용하였고 조사자들은 실험과 결과 평가 동안 할당된 할당량에 대해 눈가림 방법을 사용하지 않았다. 윌콕슨 순위 합계 검정(Wilcoxon rank-sum test)(양측), 콜모고로프-스미르노프 검정(Kolmogorov-Smirnov test)(양측), t-검정(t-test)(독립적 양측) 및 카이-제곱 검정(chi-square test)을 포함한 모든 통계 테스트는 R(<https://www.r-project.org/>), SciPy(<http://www.scipy.org/>) 또는 엑셀을 사용하여 수행하였다. 값은 평균 $\pm$ 표준편차로 표시되고, 달리 명시되지 않는 한 통계적 유의성은 대조군, 등분산에 관하여 P -값 = 0.05로 설정되었으며, 생물학적으로 독립된 표본에서도 반복되었다($n \geq 3$).

[0117] **실시예 2. SARS-CoV-2의 서열 분석**

[0118] GenBank에서 감염된 인간 숙주 유래 SARS-CoV-2 gRNA($n = 5475$; 2020년 6월 7일)의 다양한 염기서열 분석 결과를 다운로드 받아(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>) 다중 염기서열 정렬 프로그램인 MAFFT를 사용하여 정렬하였고, gRNA를 슬라이딩하면서 각 위치별로 6뉴클레오타이드씩 보존율(%)을 계산하였으며, 크기는 miRNA 발단(seed) 서열의 최소 길이를 반영하였다. 상기 보존율은 IGV를 사용하여 SARS-CoV-2 gRNA(NC_045512; GenBank의 참조 서열)에서의 위치와 함께 시각화되었다.

[0120] **실시예 3. SARS-CoV-2에 대한 AGO CLIP 데이터의 메타 분석**

[0121] SARS-CoV-2(NC_045512, 위치 13442-16236; nsP12), HCV(NC_009823, 위치 7667-9439; NS5B), HAV(M59808, 위치 5929-7395; 3D), CVB(NC_038307, 위치 5912-7297; 3Dpol), SINV(NC_001547, 위치 5751-7598; nsP4), CHIKV(NC_004162, 위치 5648-7498; nsP4) 및 VEEV(NC_001449, 위치 5703-7520; nsP4)에 대하여 RNA 바이러스의 RdRP를 인코딩하는 RNA 염기서열을 GenBank에서 검색하였다. 클러스터 오메가(clustal omega) 프로그램을 사용하여 모든 염기서열을 분석하여 다양한 염기서열 정렬을 실시하였고, 이러한 정렬은 PHYLIP 패키지(DNAdist and ProtDist)를 사용하여 인접 계통 발생 트리를 생성하는데 추가로 적용하였다. 계통발생학적 분석 결과를 바탕으로 SARS-CoV-2의 nsP12 염기서열과 관련된 RNA 바이러스가 선정되었다.

[0122] AGO CLIP 데이터의 메타 분석을 위해, SARS-CoV-2에 있는 nsP12 영역의 쌍별 서열 정렬은 다른 바이러스에 대해 상기에서 설명한 대로(즉, 감염된 숙주 세포에서 AGO CLIP 실험이 수행된 곳) 처음에 각 RdRP 영역에 대해 수행되었다. 특히 실험에 사용된 Ago2 항체가 항-pan Ago 항체로 판명되어 이를 AGO의 데이터로 참고하였다. 원래 HCV($n=7$; GSM2041566, GSM2041567, GSM2041568, GSM2041569, GSM2041570, GSM2041571, GSM2041572), HAV($n=7$; GSM2041645, GSM2041646, GSM2041647, GSM2041648, GSM2041649, GSM2041650, GSM2041651), CVB($n=4$; GSM2041622, GSM2041623, GSM2041624, GSM2041625), SINV($n=6$; GSM2041626, GSM2041627, GSM2041628, GSM2041629, GSM2041630, GSM2041631), CHIKV($n=4$; GSM2041632, GSM2041633, GSM2041636, GSM2041637), 및 VEEV($n=2$; GSM2041640, GSM2041641)에 대한 GEO 데이터베이스에서 유래된 AGO CLIP 데이터를 직접 검색한 후, 바이러스 계통에 매핑된 컴파일된 리드 카운트의 조정은 쌍별 염기서열 정렬 결과를 사용하여 SARS-CoV-2의 nsP12 영역으로 올렸다. 그런 다음 카운트를 사용하여 bedGraph 파일을 생성하고 IGV를 사용하여 추가로 분석하였다.

[0124] **실시예 4. SARS-CoV-2의 노출 확률 계산**

[0125] siRNA 표적 부위의 노출 확률(P_{exp})은 RNAplfold 프로그램을 사용하여 측정하였다. 80개 뉴클레오타이드-긴 창($W=80$, 이전에 최적으로 정의됨) 내의 모든 국소 구조에 대한 분배 함수는 두 염기쌍(base-pairing) 위치 사이의 지정된 최대 거리(L) 내에서 사전 정의된 길이(u)의 표적 부위의 접근성($\log_{10}(P_{exp})$)을 유도하기 위해 계산되었다.

[0126] 최적의 접힘 파라미터를 선택하기 위해, AGO-결합 두 세트 및 AGO-비결합 또는 총 영역(AGO CLIP 데이터의 메타 분석에 의한 SARS-CoV-2의 nsP12에서 정의됨) 사이의 노출 확률에서의 차이(ΔP_{exp})를 조사하였다. 이때, siRNA 표적 접근성에 대해 이전에 정의한 길이($u=16$)와 비교하여 다른 제약 조건($L=20, 40$, 및 60)으로 발단 사이트(seed site)의 길이($u=6, 7$, 및 8)를 고려하여 차이를 조사하였다. P -값은 R에서 윌콕슨 순위 합계 검정을 사용하여 계산하였다. 항염유성 miRNA(miR-27, miR-193a-5p, miR-486, miR-151 및 miR-455)의 발단 서열(2-8번 위

치에서 6mer 이상)을 가진 siRNA를 설계하기 위해 SARS-CoV-2 gRNA(NC_045512)의 siRNA 접근 가능 영역($P_{exp} > 0.1$)에서 표적 사이트를 선택하였다($u=8$, $L=20$).

[0128] 실시예 5. RNA 합성

[0129] siRNA 및 miRNA는 Bioneer(한국)에서 제공하는 맞춤형 RNA 합성 서비스를 사용하여 합성하였고(표 1 참조), 합성된 RNA의 품질과 그 변형은 제조업체에 의해 모니터링, 보고, 및 확인되었다.

표 1

Name	Description	Sequences	서열번호
NT (MI0000038)	Guide	5'p UCACAØCCUCCUAGAAAGA(dT)(dT) 3'	1
	Passenger	5'p UCUUUØUAGGAGGUUGUGA(dT)(dT) 3'	2
miR-27a (MI0000085)	Guide	5'p UUCACAGUGGCUAAGUCC(dT)(dT) 3'	3
	Passenger	5'p mGmGAACUAGCCACUGUGAA(dT)(dT) 3'	4
miR-193a-5p (MIMAT0004614)	Guide	5'p UGGGUCUUUGCGGGCGAGA (dT)(dT) 3'	5
	Passenger	5'p UCUCGCCCCGAAAGACCCA(dT)(dT) 3'	6
151/nsp3	Guide	5'p UAAGACUGGUCAGUAGGAU(dT)(dT) 3'	7
	Passenger	5'FAM AUCCUACUGACCAGUCUUC(dT)(dT)3'	8
193/nsp3	Guide	5'p UUGGUCUUUUAACUGUAG(dT)(dT) 3'	9
	Passenger	5'FAM CUACAGUUUAAAAGACCAA(dT)(dT) 3'	10
193/nsp5	Guide	5'p AUGGUCUUGUGUAGAGGU(dT)(dT) 3'	11
	Passenger	5'FAM ACCUCUAAACACAAGACCAU(dT)(dT) 3'	12
27/RdRP	Guide	5'p UUCACAGAAUUGUACUGUU(dT)(dT) 3'	13
	Passenger	5'p mAmACAGUACAAUUCUGUGAA(dT)(dT) 3'	14
486/RdRP	Guide	5'p UCCUGUAUACGACAUCAGU(dT)(dT) 3'	15
	Passenger	5'p mAmCUGAUGUCGUUAUACAGGA(dT)(dT) 3'	16

[0131] (Ø는 비염기 테옥시뉴클레오타이드(dSpacer), m은 2'-O 메틸 수식(modification), (dT)는 티미딘 테옥시뉴클레오타이드(thymidine deoxynucleotide), FAM은 6-플루오레세인 아미다이트(6-fluorescein amidite)를 의미한다.)

[0133] 음성 대조군으로서 cel-miR-67 서열(예쁜 꼬마선충(Caenorhabditis elegans) 특이적 miRNA; 5'-CGCUCAUUCUGCCGUUGUUAUG-3' (서열번호 17))에서 유래된 비표적 miRNA(NT)를 2개의 티미딘 테옥시뉴클레오타이드(dT) 돌출부와 함께 siRNA로 합성하였다. 그런 다음, miRNA-유사 억제를 피하기 위해, siRNA는 앞서 보고된 바와 같이 양쪽 가닥에 비염기 중심(abasic pivot)(비염기 테옥시뉴클레오타이드, dSpacer(Ø), 6번 위치)을 포함하도록 추가로 변형시켰다.

[0134] miRNA의 이중체(duplex), miR-27a, 및 miR-193a-5p는 2개의 뉴클레오타이드 돌출부를 고려하여 miRbase의 인간 miRNA 주석에 따라 합성했고, RNA-Seq 분석의 경우 miR-27a 서열을 miRbase의 주석에 따라 합성하였다. 그러나, 이의 운반 가닥(passenger strands)은 siRNA의 형태로 1번 및 2번 위치에 2'-O 메틸화(2'OMe)를 포함하여, 운반 가닥으로부터 발단(seed)-매개 억제를 방지한다. miR-27a 발단 서열을 포함하도록 설계된 siRNA(27/RdRP)는 도 1에서와 같이 합성되었고, 이러한 siRNA는 또한 운반 가닥에서 2'OMe를 포함한다. siRNA 및 miRNA 서열에 대한 자세한 내용은 상기 표 1에 기재하였다.

[0136] 실시예 6. 세포 배양, 형질감염, 및 처리

[0137] 인간 상피성 폐암 세포주 A549(한국 세포주 은행)는 RPMI-1640(Hyclone)에서 배양했고, 인간 폐 섬유아세포 세포주 MRC-5(한국 세포주 은행)를 MEM(Hyclone)에서 배양하였으며, HeLa(한국 세포주 은행) 세포는 DMEM(Hyclone) 배지에서 배양하였다. 모든 배지에 10 % 소태아혈청(FBS; Gibco), 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(Welgene)을 보충하였고, 37 °C 에서 5 % CO₂의 조건으로 배양하였다.

[0138] 달리 명시되지 않는 한, siRNA 또는 miRNA(50 nM)의 형질감염은 제조업체가 제공한 일반적인 프로토콜에 따라

리포펙타민(Lipofectamine) RNAiMAX(Invitrogen)를 사용하여 수행하였고, 리포펙타민 3000을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 플라스미드 벡터와 RNA를 공동 감염시켰다.

[0139] 형질감염 전에 세포를 시딩하기 위해, 카운테스 II 자동세포 계수기(Countess II Automated Cell Counter)(Invitrogen)를 사용하여 세포 수를 정량화 하였고, 달리 명시되지 않는 한 세포는 형질감염 24시간 후에 수확하였다.

[0140] 폐 섬유아세포 세포주의 분화를 유도하기 위해, 6-웰 플레이트에 있는 20만개의 세포를 리포펙타민 RNAiMAX(Invitrogen)를 사용하여 50 nM RNA로 형질감염 시킨 다음 2.5 ng/mL의 인간 재조합 변형 성장 인자(transforming growth factor- β 1)(TGF- β , Sigma-Aldrich)를 24시간 후에 첨가하였다. 세포 형태는 도립 현미경(Leica DMI8)을 사용하여 조사하였다.

[0142] 실시예 7. 루시페라제 리포터 구축

[0143] RNAi-매개 억제제의 효율성을 측정하기 위해, psiCheck-2 벡터(Promega)를 사용하여 레닐라 루시페라제(Renilla luciferase)의 3' 비번역 영역(3'UTR)에 삽입된 표적 사이트를 갖는 루시페라제 리포터를 구축하였다. 따라서, 서로 다른 표적 사이트(볼드체로 표시)를 포함하는 합성 이중 DNA 올리고(Bionics, 한국)를 다음과 같이 표시된 대로 XhoI 및 NotI 사이트를 통해 psiCheck-2 플라스미드에 클로닝하였다:

[0144] 151/nsp3, forward: 5' -TCG AGA TGA AGT TGC GAG AGA CTT GTC ACT ACA GTT TAA AAG ACC AAT AAA **TCC TAC TGA CCA GTC TTC** TTA CAT CGT TGA TAG TGT TAC AGT GAA GAA TGG TTC CAT CCA TCT GC-3' (서열번호 18), reverse: 5' -GGC CGC AGA TGG ATG GAA CCA TTC TTC ACT GTA ACA CTA TCA ACG ATG TAA **GAA GAC TGG TCA GTA GGA TTT ATT GGT CTT TTA AAC TGT AGT GAC AAG TCT CTC GCA ACT TCA TC-3'** (서열번호 19);

[0145] 193/nsp3, forward: 5' -TCG AGG CTG GTA GTA CAT TTA TTA GTG ATG AAG TTG CGA GAG ACT TGT CAC **TAC AGT TTA AAA GAC CAA** TAA ATC CTA CTG ACC AGT CTT CTT ACA TCG TTG ATA GTG TTA CAG GC-3' (서열번호 20), reverse: 5' -GGC CGC CTG TAA CAC TAT CAA CGA TGT AAG AAG ACT GGT CAG TAG GAT TTA **TTG GTC TTT TAA ACT GTA GTG ACA AGT CTC TCG CAA CTT CAT CAC TAA TAA ATG TAC TAC CAG CC-3'** (서열번호 21);

[0146] 193/nsp5, forward: 5' -TCG AGA ACT CTT AAT GAC TTT AAC CTT GTG GCT ATG AAG TAC AAT TAT GAA **CCT CTA ACA CAA GAC CAT** GTT GAC ATA CTA GGA CCT CTT TCT GCT CAA ACT GGA ATT GCC GTT GC-3' (서열번호 22), reverse: 5' -GGC CGC AAC GGC AAT TCC AGT TTG AGC AGA AAG AGG TCC TAG TAT GTC AAC **ATG GTC TTG TGT TAG AGG TTC ATA ATT GTA CTT CAT AGC CAC AAG GTT AAA GTC ATT AAG AGT TC-3'** (서열번호 23);

[0147] 151-seed, forward: 5' -TCG AGC **AGT CTA ACA GTC TAT ACA GTC TAA TCA GTC TAA ACA GTC TAT** GC-3' (서열번호 24), reverse: 5' -GGC CGC ATA **GAC TGT TTA GAC TGA TTA GAC TGT ATA GAC TGT TAG ACT** GC-3' (서열번호 25);

[0148] 486/RdRP, forward: 5' -TCG AGA **CTG ATG TCG TAT ACA GGA** GC-3' (서열번호 26), reverse: 5' -GGC CGC **TCC TGT ATA CGA CAT CAG TC-3'** (서열번호 27);

[0149] 27/RdRP, forward: 5' -TCG AGA **ACA GTA CAA TTC TGT GAA** GC-3' (서열번호 28), reverse: 5' -GGC CGC **TTC ACA GAA TTG TAC TGT TC-3'** (서열번호 29).

[0151] 실시예 8. 루시페라제 리포터 분석

[0152] 루시페라제 리포터 분석은 이전에 보고된 바와 같이 수행하였다.

[0153] 즉, psiCheck-2 플라스미드를 리포펙타민 3000을 사용하여 서로 다른 양의 이중 RNA(최대 100 nM)로 공동 형질 감염 시켰다. 형질감염 24시간 후 제조업체의 프로토콜에 따라 Dual-Luciferase Reporter Assay 시스템 및 GloMax-Multi Detection 시스템(Promega)을 사용하여 상대 활성(반딧불이 루시페라제로 표준화된 Renilla 루시페라제 활성)을 반복 측정하였다(n= 6). 최대 억제 농도의 절반(IC₅₀)은 SciPy(Scipy.optimize.curve_fit())를 사용하여 시그모이드(sigmoid) 함수에 대한 비선형 최소 제곱 피팅을 통해 계산하였다. 최소 제곱이 함수를 적합시키지 못한 경우 회귀선으로부터 근사 IC₅₀을 추정하였다.

[0155] **실시예 9. RNA-Seq 분석**

[0156] RNA-Seq 라이브러리는 가닥 변위 정지/결찰 방법을 사용하여 큰 RNA로부터 구성되었다. 즉, 제조업체의 프로토콜에 따라 1.5 μ g의 큰 RNA(RNeasy Mini Kit(Qiagen))를 사용하여 추출, 폴리아데닐화된 mRNA를 10 μ L의 Dynabead Oligo(dT)₂₅로 추출하였다. 그 후, 정제된 mRNA 10 ng을 제조업체의 지침에 따라 CORALL Total RNA-Seq Library Prep Kit(Lexogen)를 이용하여 RNA-Seq 라이브러리를 준비하는데 사용하였다. cDNA가 구축된 후 상기 라이브러리를 최적 주기가 가장 낮은 PCR을 사용하여 증폭시켰고, 이는 SYBR Green I(1:10,000; Invitrogen)의 Q5 Highfidelity 2 X Master Mix(New England Biolabs)로의 추가와 함께 qPCR(Rotor-Gene Q; Qiagen)을 수행함으로써 결정되었다. 증폭된 라이브러리의 품질은 Fragment Analyzer(Advanced Analytical Technologies)를 사용하여 확인하였으며 크기 분포와 양을 추정하였다. Qubit DNA HS 검사 키트(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 라이브러리 농도를 교차 확인한 후 준비된 멀티플렉스 라이브러리를 MiniSeq 시스템(Illumina)을 사용하여 75개의 단일 말단 리드(SE75)로 모으고 배열하였으며, 모든 서열 데이터는 SRA 데이터베이스(SRP270828)에 축적되었다.

[0157] 탈-멀티플렉스된 염기서열 리드는 RefSeq 유전자 주석으로 STAR(star--out-SAMtype BAM SortedByCoordinate--outSAMAttrIHstart 0--outFilterType BySJout--outFilterMultimapNmax 20--outFilterIntronMotifs RemoveNoncanonicalUnannotated--outMultimapperOrder Random--alignSJoverhangMin 8--alignSJBoverhangMin 1)를 사용하여 인간 게놈(hg19)과 정렬시켰다. 리드의 시작에서 처음 12개의 뉴클레오티드는 제조업체에서 지시한 대로 맵핑 전에 잘라내었다.

[0158] Cufflinks(cufflinks -b -G--compatible-hits-norm--library-type fr-secondstrand)를 사용하여 RPKM(reads per kilobase of transcript per million mapped reads)으로 전사 풍부도를 정량화하였으며, 동일한 실험 조건에서 그룹에 매핑 결과를 공급하면서 Cuffdiff(Cuffdiff -FDR = 0.1 -b--compatiblehits-norm--library-type fr-secondstrand)를 사용하여 차등 발현의 통계적 유의성(P -값)을 도출하였다. 통계적 유의성(P -값)을 가진 차등 발현 유전자(DEG)를 식별하기 위해 유의한 상태의 값만 선택하고 추가로 분석하였다.

[0160] **실시예 10. CDF 및 볼케이노 플롯 분석**

[0161] 주어진 이중 RNA의 형질감염에 따른 miRNA-유사 표적 억제 경향을 조사하기 위해, Cufflinks에서 도출된 RPKM 값을 사용하여 배수 변화($\log_2$ 비율)에 따른 누적 분포 함수(cumulative distribution function, CDF)를 분석하였다.

[0162] 추정되는 miRNA 표적은 3'UTR(UCSC 게놈 브라우저에서 다운로드한 RefSeq에 의해 주석이 달림)에 기원이 같은 발단 사이트가 포함된 경우 선택되었고, 달리 명시되지 않는 한 7mer-A1 발단 사이트(1번 위치에서 A를 가지고 2-8번 위치에 일치함)는 일반적으로 검색되었다. "No site"는 이의 mRNA 서열에서 발단 사이트(2-8번 위치)로부터 6mer 부위가 일치하지 않는 전사체를 나타낸다. "Cont site"는 3'UTR(즉, 뉴클레오티드가 중심(pivot)과 정렬되어야 하는 위치(6번 위치))에서 대조군 부위를 가진 "No site" 전사체의 하위 집합이 장애를 달성하기 위해 동일한 뉴클레오티드로 치환되었음을 나타낸다.

[0163] 전체 mRNA는 mRNA의 발현을 위해 선택하였으며(Cufflinks; $RPKM \leq 0.1$), KS 테스트는 전체 mRNA 또는 대조군 부위에 상대적인 SciPy(scipy.stats.ks_2samp())를 사용하여 수행하였다. 볼케이노 플롯(volcano plot)은 Cuffdiff에서 도출된 배수 변화 및 유의성($-\log_{10}(P\text{-값})$)을 계산하여 분석했고, 컷오프는 DEG를 선택하는데 사용하였다.

[0165] **실시예 11. 유전자 온톨로지 분석**

[0166] 유전자 온톨로지(GO) 분석은 일치하는 대조군 세트($RPKM > 0$ 및 $\log_2(\text{볼륨}) > 2$ 로 선택되고, 상기 볼륨은 다양한 조건에서의 평균 RPKM임)에서 발현된 전사체의 배경 하에 하향 조절된 DEG(volcano plot 분석에 의해 선택됨)의 공급과 함께 DAVID를 사용하여 유전자 온톨로지(GO) 분석을 수행하였으며, 달리 표시되지 않는 한 기본 매개변수가 사용되었다.

[0167] GO 분석 결과(EASE 점수 < 0.15 또는 0.2)는 생물학적 공정 용어(term)의 네트워크에서 REVIGO를 사용하여 시각화하였다. 너비(width)에 기초하여 유사성의 정도를 나타내기 위해 매우 유사한 GO 용어를 연결한 상호 연결된 그래프도 분석하였다.

[0169] **실시예 12. 27/RdRP의 중첩 분석 및 miR-27a가 하향 조절된 표적**

[0170] RNA-Seq 데이터에서, 27/RdRP 또는 miR-27a 발현(3' UTR에서 6mer(2-7번 위치) 발단 사이트)에 따른 하향 조절된 표적 전사체($P < 0.05$ 또는 $\log_2$ 배수 < -0.5)를 총 발현 전사체(RPKM > 0 및 $\log_2$ (볼륨) > 2)로부터 선택하였다.

[0171] 27/RdRP 및 miR-27a 의존적인 표적 전사체 사이에서 중첩의 통계적 유의성을 확인하기 위해, chi-square test(scipy.stats.chisquare)를 사용하여 P-값을 결정하기 위해 평균 무작위 중첩 수(Python, random.shuffle())을 사용하여 DEG에서 1000번의 무작위 서플링 반복)를 계산하였다.

[0172] 중첩하는 표적 전사체의 GO 분석은 27/RdRP 및 miR-27a(RPKM > 0 및 $\log_2$ (볼륨) > 2로 선택됨) 둘 다에서 발현된 전사체의 배경과 함께 DAVID를 사용하여 수행하였다. GO 분석 결과는 REVIGO에 의해 시각화되거나 낮은 분류 엄격성으로 클러스터링 되었다(표 2 참조).

표 2

Enrichment Score: 0.6882429821410878				
Term	description	%	P-value	Fold Enrichment
GO:1990001	inhibition of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	0.7009	0.0350	9.6186
GO:0090307	mitotic spindle assembly	0.7009	0.4482	1.9900
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	3.2710	0.5492	1.0687
Enrichment Score: 0.22745527382629274				
Term	description	%	P-value	Fold Enrichment
GO:0042787	protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process	1.8692	0.4390	1.2719
GO:0000209	protein polyubiquitination	1.8692	0.5946	1.0993
GO:0043161	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	1.8692	0.7960	0.8947
Enrichment Score: 0.2026436186035105				
Term	description	%	P-value	Fold Enrichment
GO:0000086	G2/M transition of mitotic cell cycle	1.8692	0.3274	1.4250
GO:0007067	mitotic nuclear division	2.3364	0.7687	0.9161
GO:0051301	cell division	2.1028	0.9800	0.6206
Enrichment Score: 0.19995661378199037				
Term	description	%	P-value	Fold Enrichment
GO:000122	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	4.9065	0.4837	1.0773
GO:0006351	transcription, DNA-templated	10.5140	0.6685	0.9694
GO:0045892	negative regulation of transcription, DNA-templated	3.0374	0.7771	0.9061
Enrichment Score: 0.12605122814189287				
Term	description	%	P-value	Fold Enrichment
GO:0006406	mRNA export from nucleus	1.1682	0.6852	1.0807
GO:0031124	mRNA 3'-end processing	0.7009	0.6856	1.2825
GO:0006369	termination of RNA polymerase II transcription	0.7009	0.8109	0.9950
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	2.1028	0.8221	0.8657
Enrichment Score: 0.10135290136731931				
Term	description	%	P-value	Fold Enrichment
GO:0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	1.4019	0.5131	1.2684
GO:0006364	rRNA processing	2.3364	0.7116	0.9667
GO:0019083	viral transcription	1.1682	0.8188	0.8906
GO:0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	1.1682	0.8450	0.8512
GO:0006412	translation	1.4019	0.9850	0.5576
GO:0006413	translational initiation	0.7009	0.9908	0.4580

[0173]

[0175] **실시예 13. SARS-CoV-2 nsp12 이차 구조 예측**

- [0176] SARS-CoV-2 nsp12 gRNA 서열은 GenBank(NC_045512:13442-16236)에서 다운로드 받았고, 기본 매개변수로 mfold 프로그램(버전 3.6)을 사용하여 이차 구조를 예측하였다. nsp12의 표적 사이트와 혼성화하는 27/RdRP 및 486/RdRP 발단 영역(2-8번 위치)의 최소 자유 에너지는 RNAduplex(버전 2.4.15)를 사용하여 계산하였다.
- [0178] **실시예 14. 정량적 RT-PCR 분석**
- [0179] 총 RNA는 RNase-프리 DNase 세트(Qiagen)로 컬럼 상(on-column) DNA 절단을 통해 RNeasy Mini Kit(Qiagen)를 사용하여 분리하였다. SuperScript III 역전사 효소(Reverse Transcriptase) 및 oligo(dT) 프라이머를 사용하여 역전사를 수행하였으며, qPCR은 Rotor-Gene Q(Qiagen)의 COL1A1 mRNA에 대한 QuantiNova SYBR Green PCR 키트(Qiagen) 및 제작 프라이머를 사용하여 수행하였다. 사용한 프라이머는 다음과 같다: forward: 5' -GCC AAG ACG AAG ACA TCC CA-3' (서열번호 30), reverse: 5' -CGT CAT CGC ACA ACA CCT TG-3' (서열번호 31).
- [0180] 모든 반응은 표준 2단계 사이클링 프로토콜로 세 번 실행하였다. 상대적인 정량화는 GAPDH(forward: 5' -TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3' (서열번호 32), reverse: 5' -GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3' (서열번호 33))로 Δ CT 방법을 사용하여 수행하였다.
- [0182] **실시예 15. siRNA에 의해 침묵된 SARS-CoV-2 표적 RNA의 정량화**
- [0183] nsp12 전사체를 준비하기 위해, 바이오닉스(한국)에 의해 제공된 맞춤형 합성 서비스를 사용하여 5' 말단이 T7 프로모터(5' -GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG G-3' (서열번호 34))와 융합된 nsp12 전사체(NC_045512, 위치 13442-16236; ~ 2.8 kb)의 DNA를 합성하였다. 그런 다음, Q5 High-Fidelity 2 × Master Mix(New England Biolabs)를 사용하여 PCR을 통해 생성물을 추가로 증폭시켰다(forward: 5' -GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA T-3' (서열번호 35), reverse: 5' -CTG TAA GAC TGT ATG CGG TG-3' (서열번호 36)).
- [0184] 표적 사이트가 없는 대조 전사체의 역할을 하기 위해 PCR을 사용하여 pLVX EF1alpha-SARS-CoV-2-nsp12-2 × Strep-IRES-Puro 플라스미드로부터 증폭된 코돈 최적화 nsp12의 T7 프로모터 함유 DNA를 생산하였다(forward: 5' -GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT GTC AGC AGA CGC ACA AAG-3' (서열번호 37), reverse: 5' -CTG CAG GAC GGT GTG AGG C-3' (서열번호 38)).
- [0185] 그런 다음, QIAquick Gel Extraction 키트(Qiagen)를 사용하여 정제한 후, DNA를 시험관 내 전사를 위한 주형으로 사용하였으며, 상기 전사는 제조업체에서 제공한 프로토콜에 따라 T7 RiboMAX Express RNAi 시스템을 사용하여 수행하였다. DNA 주형을 RQ1 RNase-프리 DNase(Promega)로 37 °C에서 30분 동안 처리함으로써 절단시키고, 합성된 RNA는 RNA Clean & Concentrator 키트(Zymo Research)를 사용하여 정제하였으며, 추가로 Poly(A) Tailing 키트(Invitrogen)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 폴리아데닐화 하였다.
- [0186] RNA Clean & Concentrator 키트(Zymo Research)로 정제한 후, 제조업체의 프로토콜에 따라 추출된 RNA 전사체(250 ng)를 50 nM siRNA와 함께 리포펙타민(Lipofectamine) 3000(Invitrogen)을 사용하여 A549 세포(0.2×10^6 세포)로 공동 형질감염(co-transfection)시켰으며, 24시간 후 전체 RNA를 QIAzol(Qiagen)을 사용하여 정제한 다음, 이소프로판올(isopropanol) 침전을 거쳤다. 형질감염된 RNA의 양은 qPCR을 사용하여 측정하였고, SuperScript III 역전사 효소(Invitrogen) 및 올리고(dT) 프라이머를 사용하여 역전사를 실시하였다. qPCR은 QuantiNova SYBR Green PCR 키트(Qiagen) 및 Rotor-Gene Q를 이용한 제작 프라이머(nsp12, forward: 5' -AGG TGA ACG TGT ACG CCA AG-3' (서열번호 39), reverse: 5' -CTG GCG TGG TTT GTA TGA AA-3' (서열번호 40); codon-optimised nsp12, forward: 5' -GAC TTC GTC GAA AAC CCT GA-3' (서열번호 41), reverse: 5' -CGT AAG CAC ACC AAC AAT GC-3' (서열번호 42))를 사용하여 실시하였다. 모든 반응은 표준 2단계 사이클링 프로토콜로 세 번 실행되었으며, 상대 정량화는 코돈 최적화(codon-optimised) nsp12에 의해 정규화된 nsp12로 Δ CT 방법을 사용하여 계산하였다.
- [0187] SARS-CoV-2의 nsp12를 표적으로 하는 2개의 siRNA(27/RdRP 및 486/RdRP)의 활성을 비교하기 위해, 측면에 $\pm$ 43개의 뉴클레오티드가 있는 각각의 온-타겟 사이트(27/RdRP 또는 486/RdRP)를 포함하는 RNA 단편을 시험관 내 전사를 사용하여 생산하였다. 즉, T7 프로모터(서열번호 34) 하에서 SARS-CoV-2 RdRP(NC_045512; 위치 13961-14065, 27/RdRP 표적 사이트; 위치 13479-13583, 486/RdRP 표적 사이트)의 DNA 단편을 합성하고(바이오닉스, 한국), T7 RiboMAX Express RNAi 시스템(Promega)에 대한 주형으로 사용하였다.

- [0188] QIAzol 및 이소프로판올 침전을 사용하여 정제 후, 제조업체의 프로토콜에 따라 리포펙타민 3000을 사용하여 합성된 RNA 단편(60 ng)을 50 nM siRNA와 A549 세포(0.2×10^6 세포)로 공동 형질감염 시켰다. 24시간 후, 세포를 miRNeasy Mini 키트(Qiagen)를 사용하여 작은(small) RNA(< 200 뉴클레오타이드) 분리를 위해 채취하였다. 정제된 작은 RNA는 상기 13961-14065 위치를 역전사 시킬 수 있는 서열(5' -CTA ATG TCA GTA CAC CAA CA-3' (서열번호 43)) 또는 상기 13479-13583 위치를 역전사 시킬 수 있는 서열(5' -TTA GCA AAA CCA GCT ACT TTA TC-3' (서열번호 44))을 보유하고 있는 RNA 단편에 대한 특이적 프라이머와 함께 SuperScript III 역전사 효소를 사용하여 역전사 시켰다. 27/RdRP vs. 486/RdRP 표적 사이트를 포함하는 RNA 단편의 상대적인 양은 qPCR을 사용하여 측정하였고, qPCR은 QuantiFast SYBR Green PCR 키트(Qiagen) 및 Rotter-Gene Q를 이용한 제작 프라이머(27/RdRP, forward: 5' -TAC GCC AAC TTA GGT GAA CG-3' (서열번호 45), reverse: 5' -CCA ACA ATA CCA GCA TTT CG-3' (서열번호 46); 486/RdRP, forward: 5' -GTG TAA GTG CAG CCC GTC TT-3' (서열번호 47), reverse: 5' -TGT CAA AAG CCC TGT ATA CGA C-3' (서열번호 48))를 사용하여 실시하였다.
- [0189] 모든 qPCR 반응은 표준 2단계 사이클링 프로토콜을 사용하여 3번 수행되었고, 상대 정량화는 $\Delta\Delta CT$ 방법을 사용하여 수행되었다. 특히, 486/RdRP 단편은 27/RdRP 단편에 대한 대조군으로 사용되었고 그 반대의 경우도 마찬가지였다.
- [0191] **실시예 16. SARS-CoV-2에 대한 siRNA 웹서버 구축**
- [0192] SARS-CoV-2에 대한 siRNA 웹서버(<http://clip.korea.ac.kr/covid19>)는 Python 및 MySQL의 Django 프레임워크(<https://www.djangoproject.com/>)를 사용하여 구축하였다. 웹 인터페이스는 HTML, CSS 및 JavaScript 구성요소를 사용하여 구현하였으며, JavaScript 구성요소는 JQuery 라이브러리(<http://jquery.com/>)를 사용하였다.
- [0194] **[실험예]**
- [0195] **실험예 1. SARS-CoV-2에서 AGO 접근성의 AGO CLIP 기반 전가**
- [0196] COVID-19를 치료하기 위해 SARS-CoV-2에 대한 강력한 siRNA 서열을 설계하였다. RNA 침묵 효과를 확실히 하기 위해, SARS-CoV-2 gRNA에서 AGO 표적 사이트 접근성을 고려하기로 했는데, 이는 서열 유사성으로 인한 다른 RNA 바이러스 감염의 AGO CLIP 결과에서 추론할 수 있다(도 2a 참조).
- [0197] 특히, 도 2a에 나타낸 바와 같이 RNA-의존적인 RNA polymerase(RdRP)를 암호화하는 RNA 바이러스 중 가장 보존된 영역을 중심으로 계통발생학적 거리를 추정하여 SARS-CoV-2와 서열 유사성을 갖는 것으로 분류된 해당 RNA 바이러스의 AGO CLIP 결과를 선택하였다.
- [0198] 그런 다음, 도 2b에 나타낸 SARS-CoV-2 RdRP 유전자(nsp12)에 대한 선택된 AGO CLIP 리드(read)값을 취합하였다. 여기서 SARS-CoV-2로서 동일한 *Pisoniviricetes* 강(class)에 속하는 헤파토바이러스(hepatovirus, HAV) 및 엔테로바이러스 B(enterovirus B, CVB), 및 C형 간염 바이러스(hepatitis C virus, HCV)는 일차 정렬로 선택되었다(도 2b의 상단 패널). 또한, 먼 관계에 있는 *Togaviridae* 과(family)인 신드비스 바이러스(Sindbis virus, SINV), 치쿤군야 바이러스(Chikungunya virus, CHIKV), 및 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV)도 선택되었다(도 2b의 중간 패널).
- [0199] AGO 결합 영역의 유사한 패턴이 관련 RNA 바이러스 전체에서 관찰되었기 때문에, 그들의 AGO CLIP 리드를 공통 AGO 결합에 통합했으며, 이는 보존된 서열, 특히 중요한 RdRP 유전자에 대한 코딩에서 잠재적으로 보존되고, 결국 SARS-CoV-2에 대한 생화학적 CLIP 실험을 수행하지 않고 nsp12 영역에서 AGO 접근성(accessibility)의 전가(imputation)를 가능하게 하였다(도 2b의 하단 패널).
- [0200] 이러한 보존된 nsp12 영역을 제외하고, SARS-CoV-2에서 AGO 결합은 다른 RNA 바이러스의 AGO CLIP 데이터로부터 유래될 수 없다. 이에, 도 2c에 나타낸 바와 같이, nsp12에서 추정된 AGO 결합을 사용하여 단일 가닥 사이트에서 확률 계산을 최적화할 수 있는 로컬 RNA 접합을 기반으로 AGO 접근성을 예측해야 하며, 본 발명에서는 80개 뉴클레오타이드-긴 창($W=80$)을 슬라이딩하여 로컬 RNA 접합의 노출 확률(P_{exp})을 먼저 계산하였다.
- [0201] 발단 사이트(2-8번 위치)에 대한 염기쌍은 AGO 표적 상호 작용을 개시하기 때문에, 먼저 발단 사이트 내에서 노출된 부위의 길이($u=6, 7$, 또는 8)를 명시하고, 이전 연구로부터 siRNA에 대해 사전 정의된 길이($u=16$)를 사

용하여 다른 부위와 비교하였다. 또한, 표적 접근성($\log_{10}(P_{\text{exp}})$)을 계산하기 위해 다양한 범위의 최대 로컬 염기 쌍($L=20, 40$, 및 60)을 사용하였다. 관련 RNA 바이러스(도 2a 내지 2c)의 AGO-CLIP 데이터를 재분석함으로써 추론된 nsp12에서 도 2d에 나타난 바와 같이 예측된 AGO 결합 영역(상위 5%)을 AGO 비결합 영역(복제 불가능 AGO CLIP 리드)과 비교하였으며, 도 2e에서 u 와 L 값에 따라 비교한 결과, 도 2f에 나타난 바와 같이 ~20 뉴클레오타이드 길이의 siRNA($L=20$) 범위 내에서 전체 발단 사이트의 길이가 $u=8$ 인 경우 P_{exp} 가 다른 제한 조건보다 우수한 최적의 조건임 확인하였다. 최적화된 매개변수의 결과는 nsp12에서 통계적 유의성이 표시된 것들($-\log_{10}(P\text{-값}) > 1.3$, $P < 0.05$, Wilcoxon rank-sum test) 중 AGO 결합 영역과 AGO 비결합 영역 사이의 평균 P_{exp} 값이 가장 큰 차이($\Delta P_{\text{exp}} = 0.038$)를 나타내었다.

[0202] 최적화된 매개변수($u=8$, $L=20$) 하에서, 도 2h에 나타난 표적 접근성 분포($P=0.033$, Wilcoxon ranksum test)에서와 같이 도 2g에 나타난 P_{exp} 의 누적 분포 함수(CDF)에서 동일하게 뚜렷한 차이가 관찰되었으며, 여기서 도 2i에 나타난 바와 같이 염기쌍의 범위를 넓히거나($u=8$, $L=40$) siRNA의 거의 전체 길이($u=16$, $L=20$ 또는 40)의 접근성을 고려하지 않는 것이 결과를 향상시켰다. 또한, AGO 결합 영역(상위 5%로 정의됨)을 전체와 비교했을 때, 도 2j에 나타난 다른 영역보다는 도 2k 및 2l에 나타난 바와 같이 최적화된 매개변수($u=8$, $L=20$)에 의해 뚜렷한 차이($P=0.045$)가 관찰되었고, 도 2f의 결과를 참고하면 최적화된 매개변수에 의해 평균 P_{exp} 값이 가장 큰 차이를 나타내었다는 바, 이러한 결과는 상기 최적화된 매개 변수로 AGO 접근성 예측 정확도를 증가시킬 수 있음을 뒷받침한다.

[0204] 실험예 2. 항섬유증 miRNA-유사 활성을 갖는 강력한 SARS-CoV-2 siRNA의 설계

[0205] nsp12에서 정의된 AGO 결합을 기반으로, 최적화된 매개변수($u=8$, $L=20$)로 P_{exp} 를 계산하여 SARS-CoV-2 gRNA에서 모든 위치의 AGO 접근성을 추가로 예측하였다. RNA 바이러스는 바이러스 복제 및 증식 중에 자주 돌연변이가 일어나지만, 중요한 역할을 하는 영역은 상대적으로 보존된다. 따라서, siRNA는 바이러스 gRNA의 불변 영역을 표적으로 하여 인체 전파에 있어서 일관된 효과를 보장해야 한다. 이에, 인체 감염에서 보고된 SARS-CoV-2 서열의 다중 서열 정렬 분석을 통해 염기서열 보존율을 고려하였다($n=5475$). 궁극적으로, 이는 siRNA 타겟팅에서 피해야 할 몇 가지 돌연변이 핫스팟을 드러냈다.

[0206] SARS-CoV-2의 추정 AGO 접근 가능 영역 확인 및 이를 통한 항섬유증 miRNA의 발단 서열을 포함하는 강력한 siRNA의 설계 과정을 도 3a에 나타내었다.

[0207] miRNA는 AGO 의존적인 표적 억제를 매개하기 때문에 siRNA는 불가피하게 발단 서열 매치를 통해 miRNA-유사 오프-타겟(off-target) 현상을 발휘한다. COVID-19에서 치명적인 폐 섬유증을 예방하기 위해, 이러한 miRNA-유사 활성을 유리하게 배열하고자 이전에 폐 섬유증 모델에서 이들의 하향 조절에 의해 확인된 항섬유화 miRNA(miR-27a, miR-193-5p, miR-486, miR-151 및 miR-455)의 발단 서열을 가진 siRNA를 설계하였다.

[0208] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이 SARS-CoV-2에서 보고된 염기서열 변화가 없는 AGO 접근 가능 영역($P_{\text{exp}} > 0.1$)을 선택한 후(2-8 위치에서 100% 보존), 13개의 siRNA 서열이 miR-27($n=2$), miR-193-5p($n=3$), miR-486($n=2$), miR-151($n=4$), 및 miR-455($n=2$)의 발단 서열을 갖는 것을 확인하였다. 이들은 항섬유화 miRNA 활성을 나타내고 SARS-CoV-2를 억제하는 siRNA로 작용할 것으로 기대되었다.

[0210] 실험예 3. 항섬유증 miRNA 활성을 가지고 SARS-CoV-2를 표적으로 하는 siRNA 확인

[0211] 도 3b에 나타난 13개의 설계된 siRNA 중에서, 처음에는 그들의 표적 억제 및 miRNA-유사 활성에 대해 AGO 접근성이 높은($P_{\text{exp}} > 0.5$) 3개의 siRNA, 즉, nsp3를 표적으로 하는 miR-151 모방 siRNA(이하 "151/nsp3", $P_{\text{exp}} = 0.55$, 도 3c), 및 nsp3(193/nsp3, $P_{\text{exp}} = 0.65$, 도 3d) 및 nsp5(193/nsp5, $P_{\text{exp}} = 0.64$, 도 3d)를 표적으로 하는 miR-193a-5p 모방 siRNA를 확인하였다.

[0212] 루시퍼라제 리포터 분석을 사용하여 측면 서열을 포함하는 표적 사이트(± 45 뉴클레오타이드)를 억제하는 반수 최대 억제 농도(IC_{50})를 측정된 결과, 도 3c 및 도 3d에 나타난 바와 같이, 이 3개의 siRNA가 모두 SARS-CoV-2 표적 사이트를 효율적으로 침묵시킬 수 있음을 확인하였다(IC_{50} [151/nsp3] = 0.31 nM , 도 3c의 상부 패널; IC_{50}

[193/nsp3] = 0.34 nM, IC_{50} [193/nsp5] = 0.38 nM, 도 3d). 151/nsp3의 경우, miR-151 발단 사이트를 가진 루시퍼라제 리포터를 사용하여 이의 miRNA-유사 활성을 확인하였다(IC_{50} = 5.59 nM, 도 3c의 하부 패널).

[0213] 항섬유화 miRNA 유사 활성에 대한 섬유화 관련 표적 유전자를 조사하기 위해 타입 I 콜라겐의 주요 성분인 COL1A1을 선택했으며, 이의 3'UTR은 miR-193a-5p의 발단 사이트를 포함한다(1-8번 위치; 도 3e). 따라서, miR-193a-5p의 검증된 표적으로서 COL1A1 전사체 수준을 측정하여 193/nsp3 및 193/nsp5의 miRNA-유사 활성을 조사한 결과, 도 3e에 나타난 바와 같이 miR-193a-5p를 인간 폐 섬유아세포 MRC-5로 형질감염 시킴으로써 COL1A1 mRNA를 침묵된 것과 유사한 수준으로 억제할 수 있음을 확인하였으며, 전체적으로 SARS-CoV-2를 표적으로 하고 항섬유증 miRNA를 모방하는 여러 가지 설계된 siRNA 서열에 의해 매개되는 효과적인 표적 억제를 검증하였다(NT 대비 $P < 0.05$, $n \geq 3$).

[0214] nsp12에 의해 암호화되는 RdRP 단백질은 바이러스 복제에 필수적이기 때문에 종종 항바이러스제의 치료 표적이 되어왔다. 따라서, miR-27 발단 사이트를 가진 nsp12(도 3b)를 표적으로 하는 siRNA(이하 "27/RdRP")에 초점을 맞췄으며, 이는 특히 AGO 결합 영역의 정점에 위치하고, 서열 변화가 없었다(도 3a 및 3b). 비록 27/RdRP만 nsp12 영역에서 AGO 접근 가능한 것으로 선택되었지만($P_{exp} > 0.1$; 도 3a), 4개의 추가 siRNA는 AGO 접근성과 관계없이 도 3f에 나타난 항섬유화 miRNA(miR-27a, miR-486, miR-151 및 miR-455)의 발단 서열과 일치하는 표적 사이트를 갖도록 설계할 수 있다(도 3g). 도 3g에서 빨간색 화살표는 27/RdRP의 표적 위치를 나타내며 회색은 486/RdRP의 표적 위치를 나타낸다.

[0215] 또한, 도 1에 나타난 27/RdRP 외에도 도 3h에 나타난 miR-486 발단 서열(486/RdRP)을 가진 siRNA는 침묵 활성에 대한 실험 테스트의 가치가 있을 수 있는 한계점 바로 아래($P = 0.072$; 도 3f)인 한계 접근성을 보였다. 해당 siRNA 표적 사이트를 대상으로 한 루시퍼라제 리포터 분석 결과, 27/RdRP의 경우 도 3i에 나타난 바와 같이 A549 세포에서 $IC_{50} = 0.34$ nM이었고, HeLa 세포에서 $IC_{50} = 0.28$ nM이었으며, 486/RdRP의 경우 도 3j에 나타난 바와 같이 A549 세포에서 $IC_{50} = 0.13$ nM로 모두 높은 효율의 표적 억제가 관찰되었다.

[0216] 그러나, 486/RdRP의 표적 사이트는 도 3k에 나타난 바와 같이 발단 서열 매치 영역 내에서 SARS-CoV-2 염기서열의 중요한 변화를 포함하고 있는 것을 확인하였으며, 이는 RNAi 활성에 해로운 것으로 보고되었다.

[0218] 실험예 4. 항섬유화 miRNA-유사 활성에 대한 27/RdRP의 전사체 전장 검증

[0219] 27/RdRP의 siRNA 활성을 확인한 후, RNA 시퀀싱을 수행하여 이의 전사체 전장 miRNA-유사 활성을 도 4a에 나타난 바와 같이 확인하였다(RNA-Seq). CDF 분석 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이 3' 비번역 영역(3'UTR)에 발단 사이트를 보유하고 있는 것으로 추정되는 miR-27 표적 전사체는 27/RdRP가 인간 상피 폐 세포 A549에 형질감염 되었을 때 유의하게 하향 조절되었다($P = 2.9 \times 10^{-24}$, Kolmogorov-Smirnov test, 대조군 형질감염(non-targeting miRNA; NT) 대비). 차등적으로 발현된 유전자(DEG; $P < 0.05$, Cuffdiff)에서 추정되는 miR-27 표적(3'UTR의 miR-27 발단 사이트) 중 대부분은 도 4c에 나타난 바와 같이 27/RdRP($n = 371$ vs. 145)에 의해 하향 조절되었다($\log_2$ Fold change < 0).

[0220] 또한, 유전자 온톨로지(GO) 분석 결과, 도 4d에 나타난 바와 같이 27/RdRP의 miR-27 표적(3'UTR에서 miR-27 발단 사이트를 가진 하향 조절된 DEG)이 세포사멸, 분화, 미토콘드리아 조절, 및 증식과 함께 TGF- β 신호 전달 경로에 의해 매개되는 폐 섬유증에서 기능하는 것으로 나타났으며, 도 4e 및 도 4f에 나타난 바와 같이 miR-27 표적의 하향 조절은 A549 세포에서의 miR-27a 발현에 의해 유도되었고, 도 4g에 나타난 바와 같이 27/RdRP에 의해 조절되는 유사한 기능적 네트워크가 풍부한 것으로 나타났다.

[0221] 27/RdRP 및 miR-27a(도 4c 및 4f) 사이의 차등 하향 조절 표적($\log_2$ fold change < 0 , 3'UTR에서 miR-27 발단 사이트, $P < 0.05$)은 도 4h에 나타난 무작위 대조군(1000번 섞임)과 비교하여 상당히 중첩된 것을 도 4i에 나타난 바와 같이 확인하였고($n = 135$; $P = 9.85 \times 10^{-3}$, chi-square test), 섬유화와 관련된 유전자 온톨로지 기능(예: TGF- β 신호전달 경로, 세포사멸, 분화, 미토콘드리아 조절, 및 세포주기 조절; 도 4j)이 풍부하였다. 도 4k에 나타난 바와 같이, 동일한 유의적인 중첩($P = 3.23 \times 10^{-81}$)은 또한 fold change에 의해서만 선택된 하향 조절된 DEG 표적에서 관찰되었다($\log_2$ fold change < -0.5 , 3'UTR에서 miR-27 발단 사이트). miR-27 표적은 거짓 양성(false positive)을 포함할 수 있는 3'UTR의 발단 사이트를 확인하여 간단히 선택되었지만, 27/RdRP 형질감염

(도 4b 및 4c) 및 miR-27a 형질감염(도 4e 및 4f)에서는 표적 억제의 유의한 경향이 관찰되었다.

[0222] 또한, 27/RdRP 또는 miR-27a 발현(도 4c 및 4f)에 따른 DEG에서 추정 miR-27 표적(3'UTR의 발단 사이트)의 주요 하향 조절은 표적 억제로부터 2차 효과를 반영할 수 있는 상향 조절된 DEG에 대조적으로 miR-27 표적으로서 일차 효과를 반영한다. 27/RdRP와 miR-27a 사이에 중첩되는 일치된 2차 효과는 부분적으로 중첩되는 하향 조절 및 이들의 유전자 온톨로지만을 살펴보는 것으로 조사될 수 있다. 이러한 결과는 SARS-CoV-2를 표적으로 하는 siRNA가 항섬유화 miRNA와 동일한 발단 서열을 포함함으로써 잠재적으로 전섬유화 경로를 억제할 수 있는 방식으로 miRNA-유사 활성을 유도할 수 있음을 입증하였다.

[0223] 상기로부터, 27/RdRP의 miRNA-유사 활성은 전체적으로 miR-27a와 같이 기능하는 것으로 입증될 수 있으며, 잠재적으로 폐 세포에서 항섬유화 활성을 부여하고, 이러한 조절은 TGF- β 반응을 약화시킴으로써 매개될 수 있다.

[0225] 실험예 5. SARS-CoV-2를 표적으로 하는 27/RdRP의 항섬유화 siRNA 활성 검증

[0226] 섬유화가 결정적으로 TGF- β 신호전달 경로에 의해 조절된다는 것은 잘 알려져 있으며, 이는 세포 외 기질에서 콜라겐 축적을 특징으로 한다. 본 발명에서 27/RdRP가 주로 TGF- β 신호 전달에서 기능하는 miR-27 표적 mRNA를 전체적으로 억제할 수 있다는 것을 발견했기 때문에(도 4d), 27/RdRP 발현이 있을 때 TGF- β 처리가 섬유아세포에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이 TGF- β 처리는 폐 섬유아세포인 MRC-5의 분화를 유도했지만, 27/RdRP 및 miR-27a의 형질감염에 의해 분화가 억제되는 것을 확인하였다.

[0227] 또한, 27/RdRP 발현이 있을 때 타입 I 콜라겐의 주요 성분을 암호화하고 3'UTR(도 3e의 왼쪽 패널)에 miR-27a 발단 사이트를 가지고 있는 COL1A1 전사체의 수준을 확인한 결과, 도 5b에 나타난 바와 같이 miR-27a 형질감염 및 27/RdRP 형질감염에서 COL1A1 mRNA 수준이 유의적으로 감소되어, 27/RdRP가 항섬유화 miR-27a로 기능함으로써 폐 섬유화를 예방할 수 있음을 확인하였다.

[0228] 마지막으로, SARS-CoV-2에 대한 이의 침묵 활성에 대해 27/RdRP를 검증하기 위해, SARS-CoV-2의 동일한 nsp12 전사체를 시험관 내에서 합성하고 바이러스 감염의 모방체로서 A549 폐 세포에 이소성으로 도입하였다. 표적 억제의 높은 효율성이 27/RdRP 및 486/RdRP(도 3j 및 3k)에서 관찰되었지만, 이는 루시퍼라제 리포터가 어떠한 측면 서열도 없이 20 nt 길이의 표적 사이트만 포함하고 있기 때문에 국소 RNA 접힘에 다른 영향을 미칠 수 있다. 이에, SARS-CoV2 염기서열의 맥락에서 해당 사이트들을 다시 검증하였다.

[0229] 그 결과, 도 5c에 나타난 바와 같이 대조군 전사체(27/RdRP 사이트가 없는 코돈 최적화 nsp12 구성체)와 비교하여 형질감염된 nsp12 전사체를 정량화함으로써, 27/RdRP가 nsp12 전사체를 현저하게 감소시키는 것을 확인하였다.

[0230] 또한, 도 5d에 나타난 바와 같이 국소 접힘을 고려한 RNA 단편에 대한 27/RdRP의 억제 효과는 486/RdRP로 억제 가능한 RNA 단편의 양에 대비해 측정되었으며, 단지 43개의 뉴클레오타이드 측면 영역을 가진 것 만으로도, 27/RdRP 표적 사이트를 포함하는 RNA 단편의 유의한 억제를 나타내었다(NT 대비 $P < 0.05$, $n \geq 3$).

[0231] 27/RdRP 및 486/RdRP 모두 측면 서열 없이 표적 사이트(20개 뉴클레오타이드)만을 함유하는 루시퍼라제 리포터에서 유사한 억제 활성을 나타내었지만(도 3j 및 3k), 486/RdRP는 측면 서열을 고려했을 때, 27/RdRP와 비교해 거의 침묵 활성이 없었으며, 이는 로컬 RNA 접힘(전체 전사체 또는 표적 사이트 유래 $\pm$ 43 뉴클레오타이드를 가짐)에 영향을 받을 수 있다(도 5c 및 5d).

[0232] 486/RdRP에서 이러한 차이는 CLIP 데이터에서 추론한 AGO 접근성의 부족과 로컬 RNA 접힘의 낮은 노출 확률($P_{exp} < 0.1$; 도 3f)로 설명할 수 있다. 실제로, 도 5e에 나타난 바와 같이 SARS-CoV-2 nsp12의 예측된 RNA 2차 구조에서(mfold 프로그램에 의해 예측), 국소 염기쌍의 27/RdRP 발단 사이트(1.4 kcal/mol, RNAduplex 프로그램으로 추정됨)는 486/RdRP 발단 사이트(-1.4 kcal/mol)의 안정적인 2차 구조와는 대조적으로 매우 불안정하다. 도 5e에서 표적 사이트 서열은 노란색으로 강조 표시 하였다.

[0233] 전반적으로, SARS-CoV-2를 억제하고 항섬유화 miR-27 활성을 통해 폐 섬유화를 예방하는데 있어 27/RdRP의 강력한 활성을 검증하였다. 또한, SARS-CoV-2를 대상으로 설계된 모든 추정 siRNA의 사용을 용이하게 하기 위해, 도 5f에 나타난 바와 같이 검색 기능과 함께 항섬유화 miRNA($n = 5$)의 발단 서열뿐만 아니라 신뢰도가 높은 인간 miRNA($n = 897$)의 발단 서열을 포함하는 siRNA의 서열 정보를 제공하는 웹 서버(<http://clip.korea.ac.kr/covid19>)를 구축하였다. SARS-CoV-2 gRNA에서 총 14,028개의 표적 사이트(항섬유화

miRNA, n= 75; 신뢰도가 높은 인간 miRNA, n= 13,953)가 식별되어 노출 확률(P_{exp})을 제공하고, 이는 AGO 결합 영역을 암시하였다.

[0235]

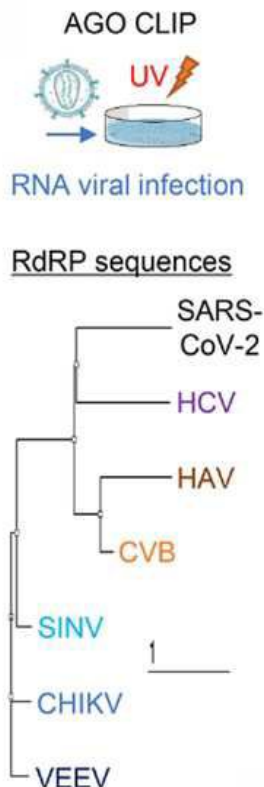
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예 및 실험예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

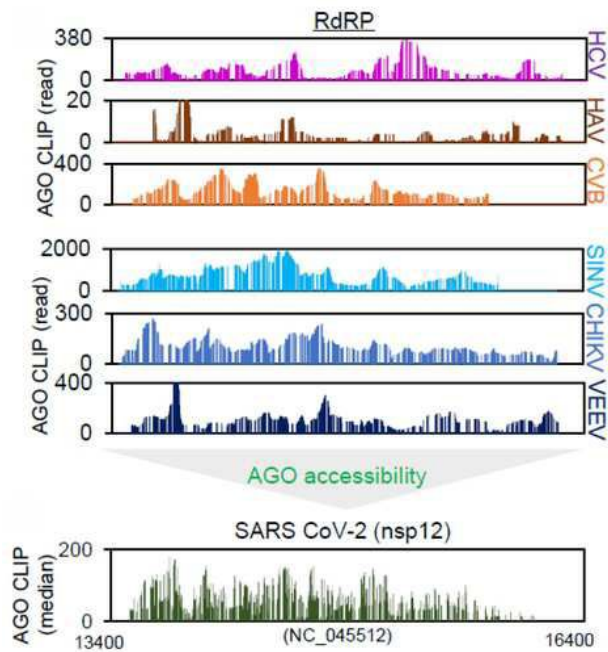
도면1



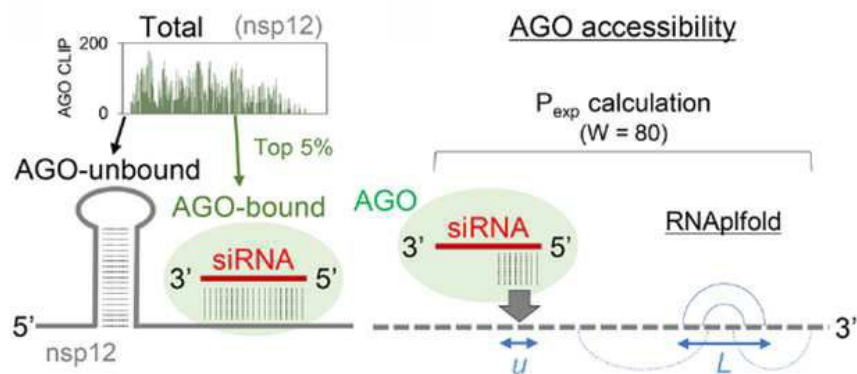
도면2a



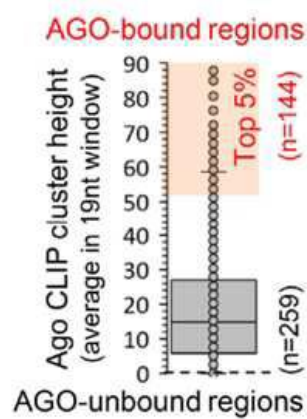
도면2b



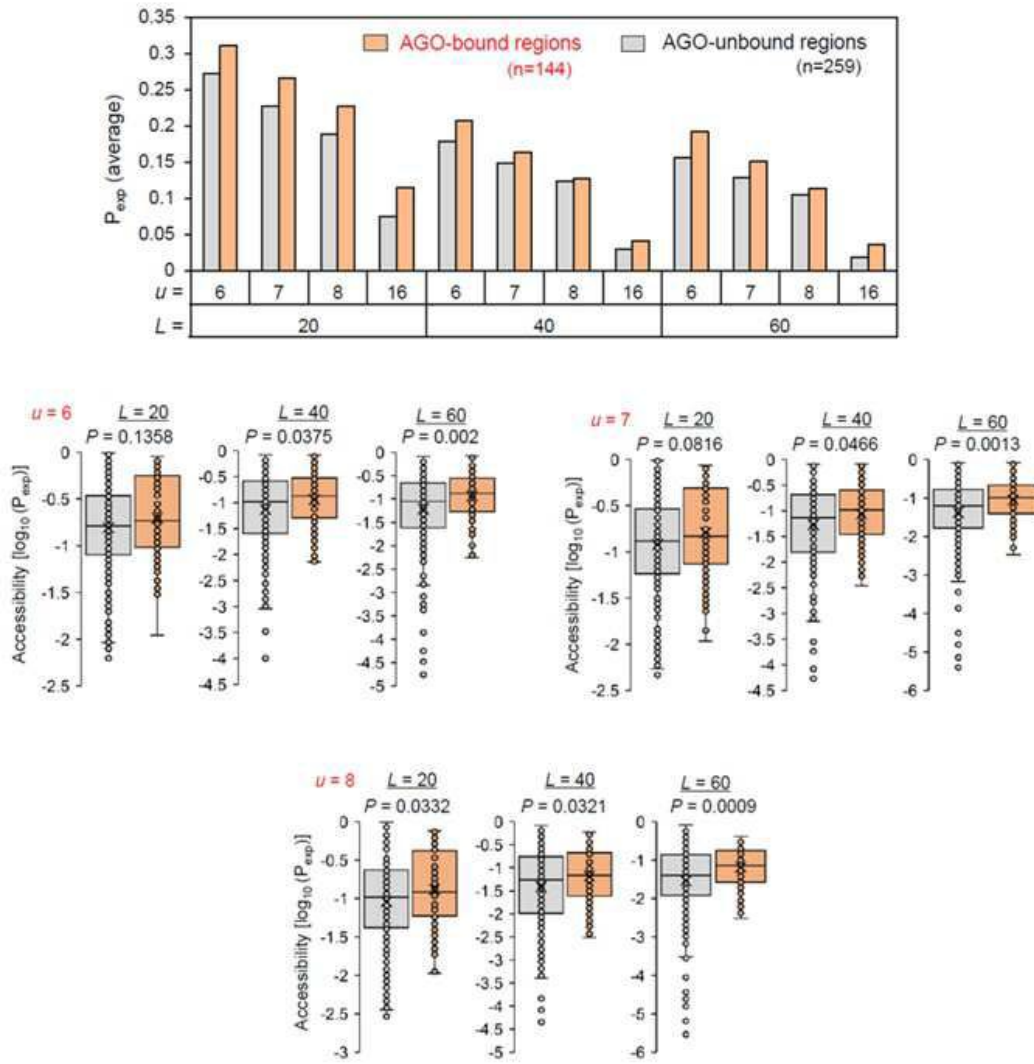
도면2c



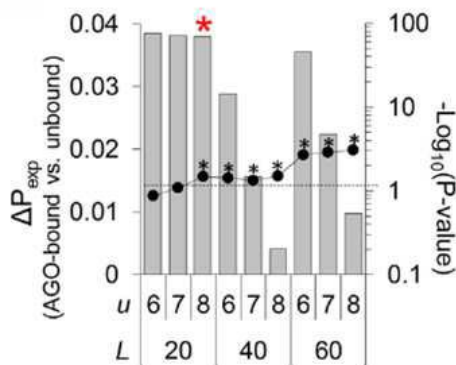
도면2d



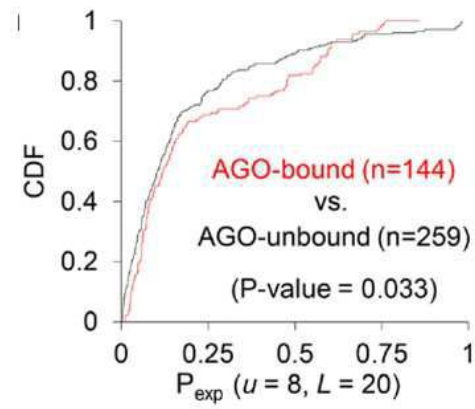
도면2e



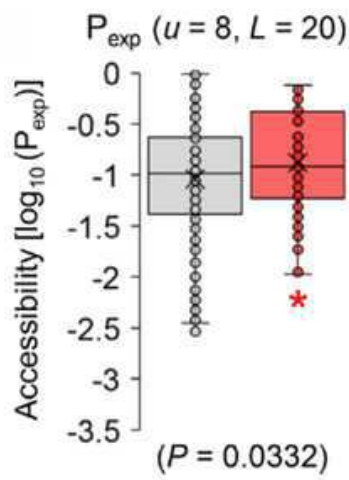
도면2f



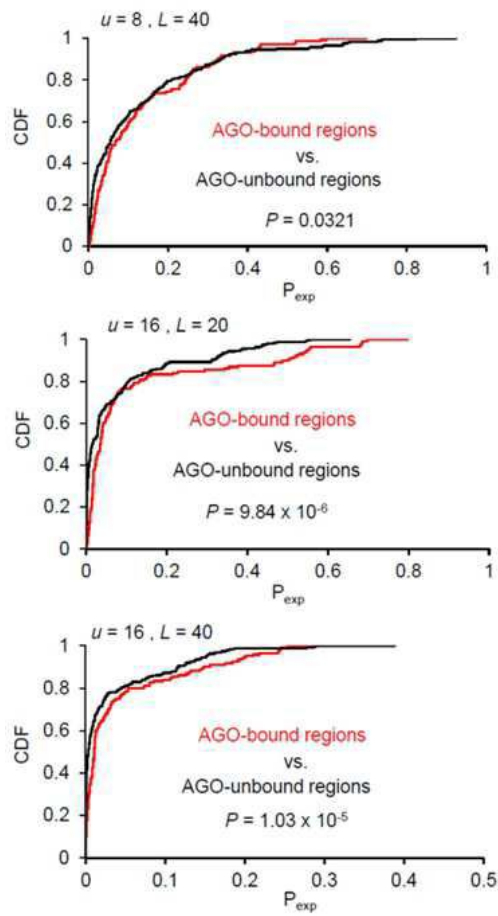
도면2g



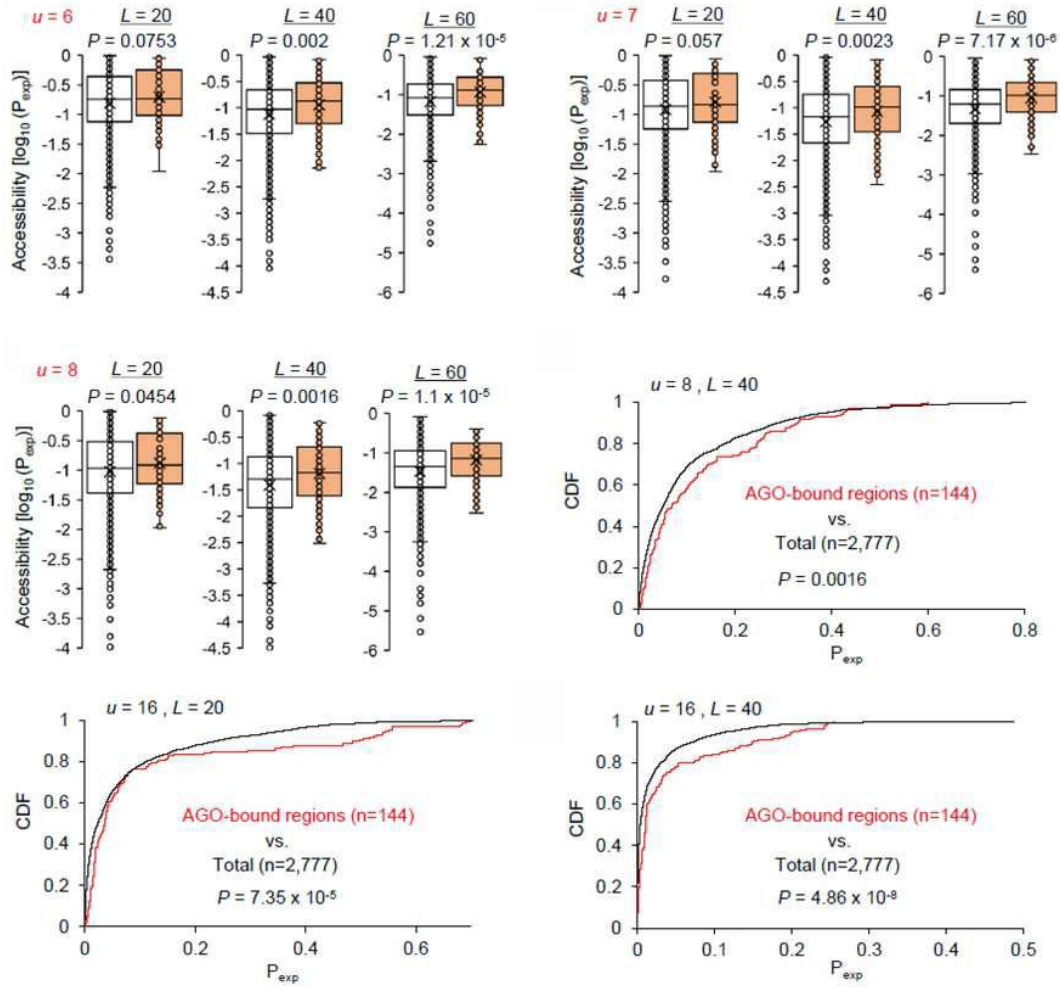
도면2h



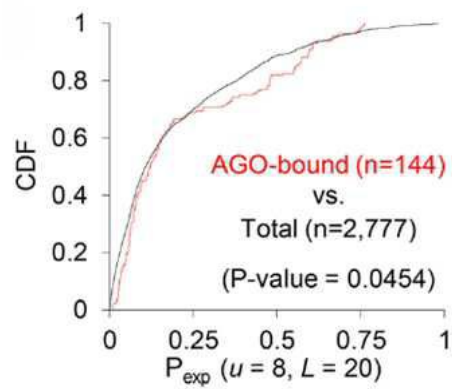
도면2i



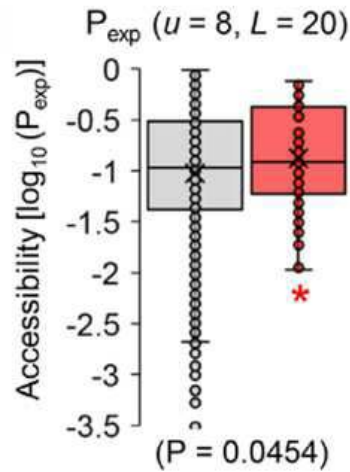
도면2j



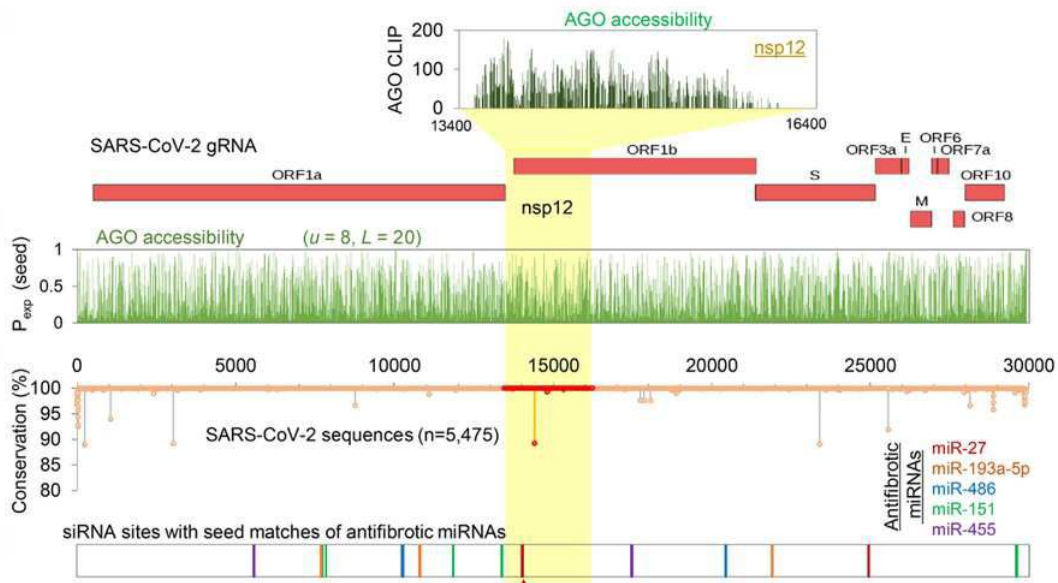
도면2k



도면21



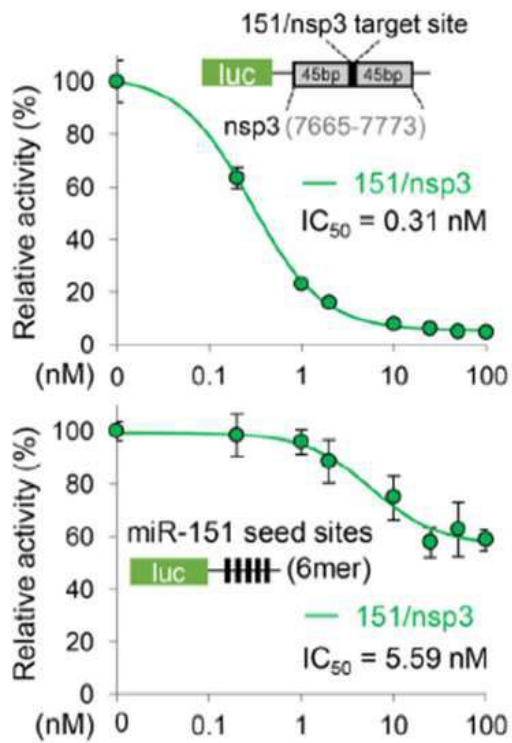
도면3a



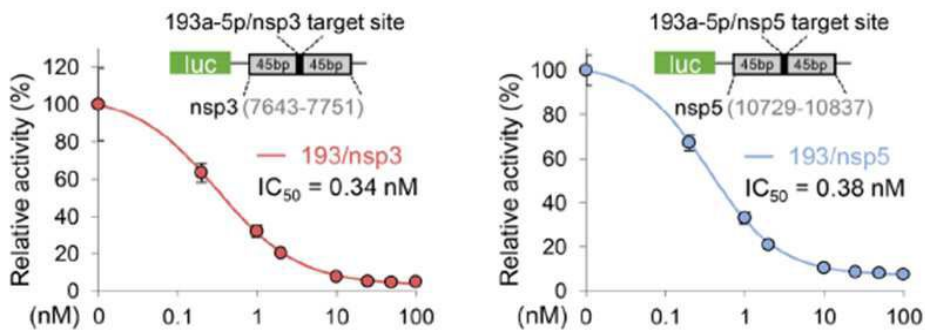
도면3b

miRNA name	Seed match	Seed sequence	Start	End	siRNA target sequence	Start	End	P_{exp}	Coding gene
miR-455	6mer (3-8)	UGUGCC	5579	5584	UUAUGUACAUGGGCACACU	5568	5586	0.130	nsp3
miR-193a-5p	6mer (3-8)	GGUCUU	7699	7704	CUACAGUUUAAAAGACCAA	7688	7706	0.650	nsp3
miR-151	6mer (3-8)	AGACUG	7721	7726	AUCCUACUGACCAGUCUUC	7710	7728	0.550	nsp3
miR-486	7mer (2-8)	CCUGUAC	10256	10262	AUAAUUCUUGGUACAGGC	10245	10263	0.142	nsp5
miR-193a-5p	6mer (3-8)	GGUCUU	10785	10790	ACCUCUAAACACAAGACCAU	10774	10792	0.640	nsp5
miR-151	8mer (1-8)	UUAGACUG	11840	11847	UAGCCACUGUACAGUCUAA	11829	11847	0.134	nsp6 / nsp7
miR-151	6mer (3-8)	AGACUG	13368	13373	ACUUAAAAACACAGUCUGU	13357	13375	0.134	nsp10
miR-27a	6mer (2-7)	UCACAG	14016	14021	AACAGUACAAUUCUGUGAU	14004	14022	0.114	nsp12
miR-455	6mer (2-7)	AUGUGC	17462	17467	UACCUGCACCACGCACAUU	17450	17468	0.139	nsp13
miR-486	6mer (3-8)	CUGUAC	20438	20443	UCCUAUGGACAGUACAGUU	20427	20445	0.269	nsp15
miR-193a-5p	8mer (1-8)	UGGGUCUU	21899	21906	CUUUAGAUUCGAAGACCCA	21888	21906	0.219	S
miR-27a	7mer (2-8)	UCACAGU	24936	24942	UGUGUCUGGUAACUGUGAU	24925	24943	0.131	S
miR-151	6mer (2-7)	UAGACU	29600	29605	UUUACGAUUAUAGUCUAC	29588	29606	0.244	ORF10

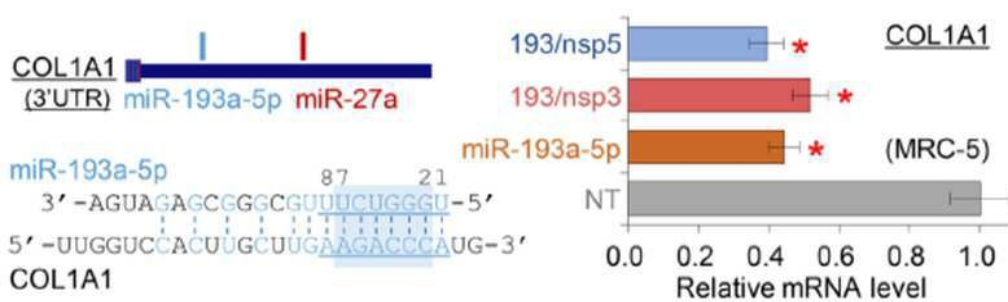
도면3c



도면3d



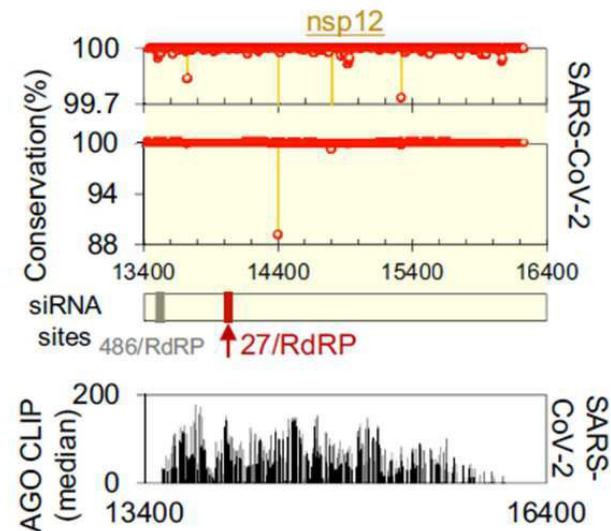
도면3e



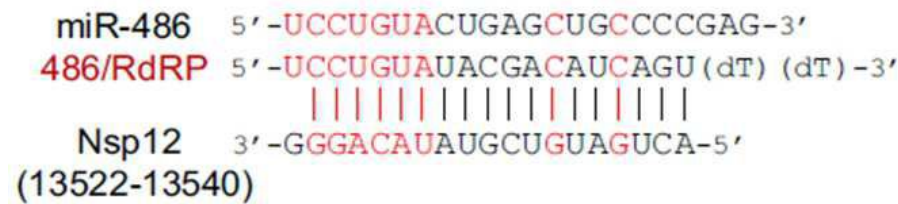
도면3f

	miRNA name	Seed[2:8]	SARS-CoV-2 nsp12 (RdRP)			P _{exp}
			Seed seq	Seed type	Start End	
Antifibrotic miRNAs	miR-27	UCACAGU	CUGUGA	6mer (2-7)	14016 14021	0.1144388
	miR-486	CCUGUAC	UACAGG	6mer (2-7)	13534 13539	0.0717184
	miR-455-5p	AUGUGCC	GGCACA	6mer (3-8)	13507 13512	0.0192605
	miR-455-5p	AUGUGCC	GGCACA	6mer (3-8)	15233 15238	0.0029344
	miR-151-3p	UAGACUG	CAGUCU	6mer (3-8)	16226 16231	0.0883392

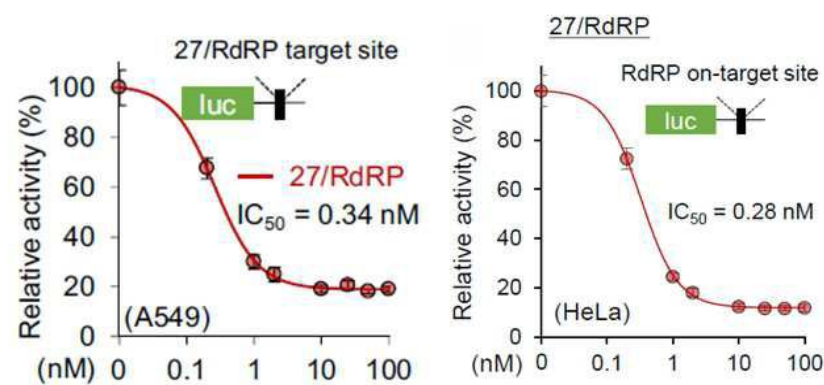
도면3g



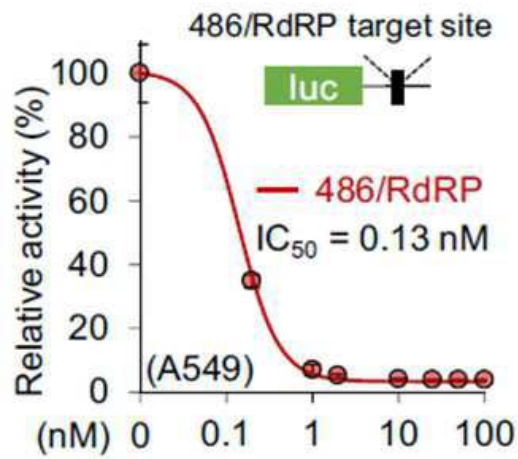
도면3h



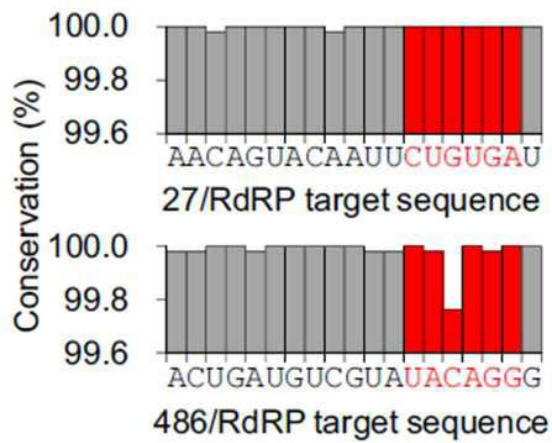
도면3i



도면3j



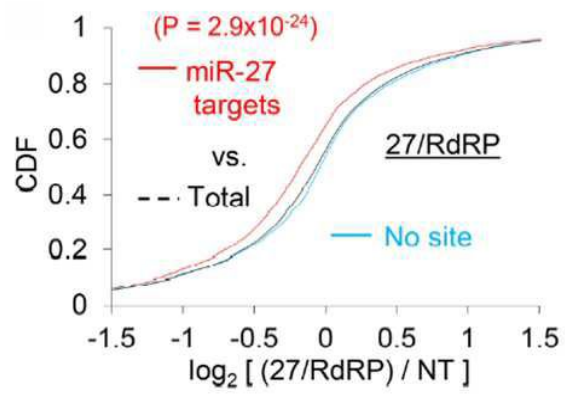
도면3k



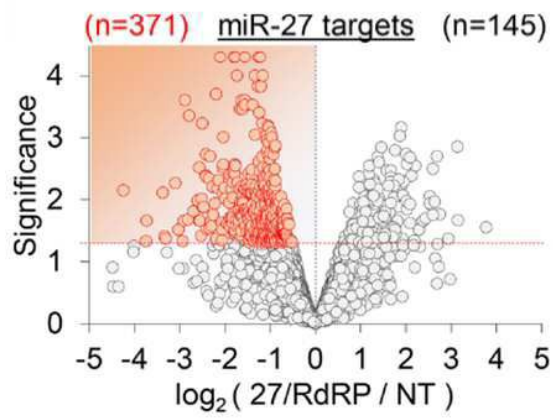
도면4a

Sample name	Cell	Transfection	Total read	Mapped read (RefSeq)	%
A549-NT	A549	NT	9,743,989	8,552,897	88
A549-27	A549	miR-27a	10,314,649	8,918,644	86
A549-27/RdRP	A549	27/RdRP	9,499,606	8,208,187	86

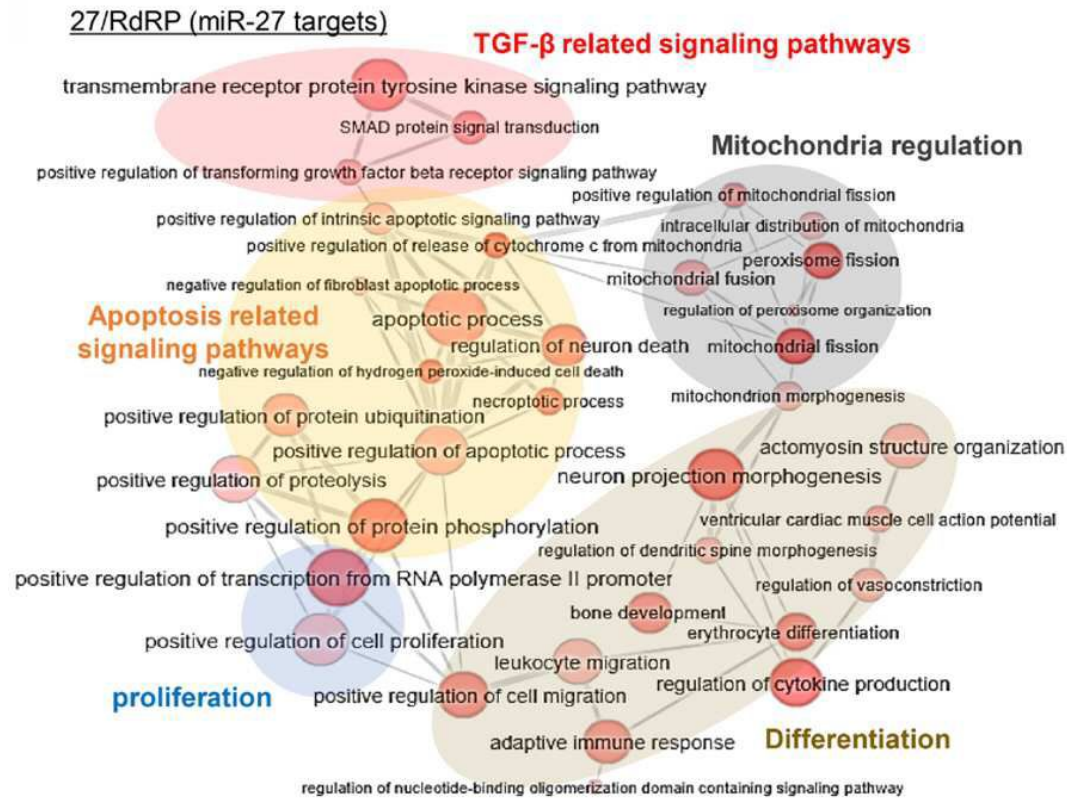
도면4b



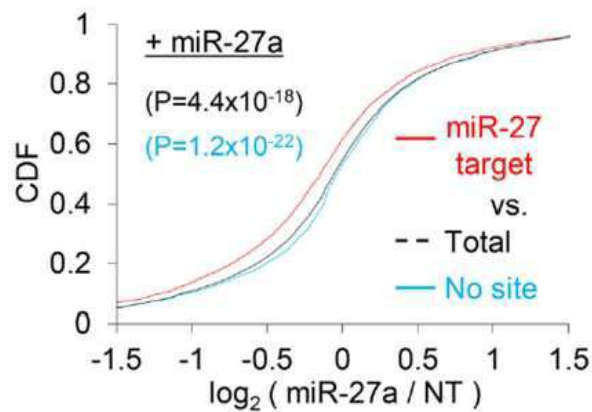
도면4c



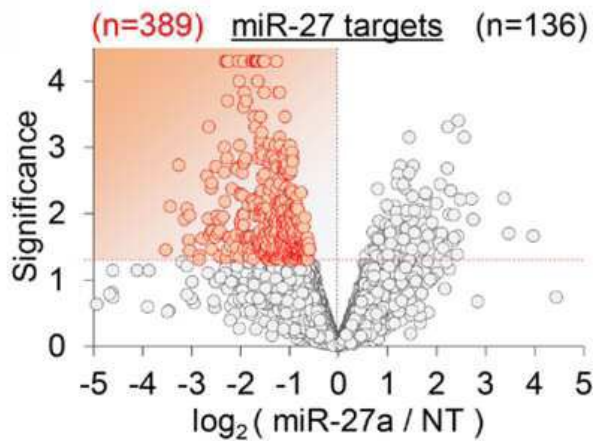
도면4d



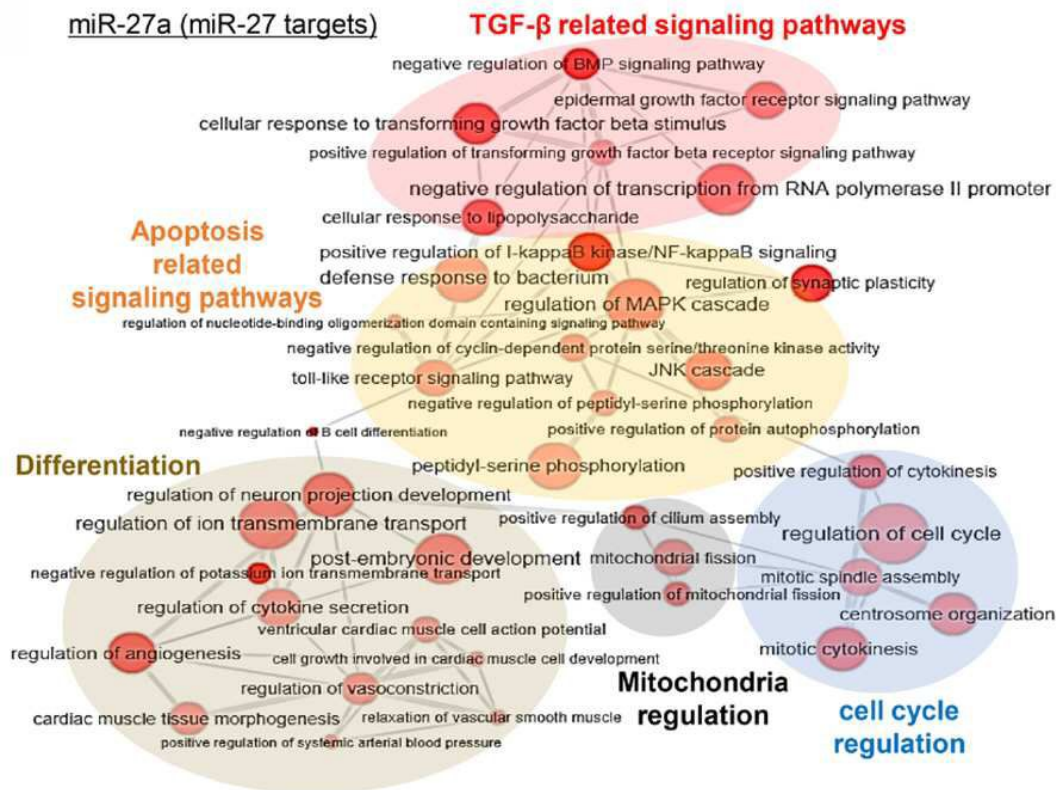
도면4e



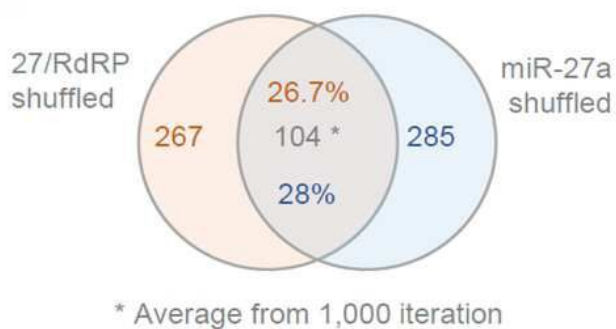
도면4f



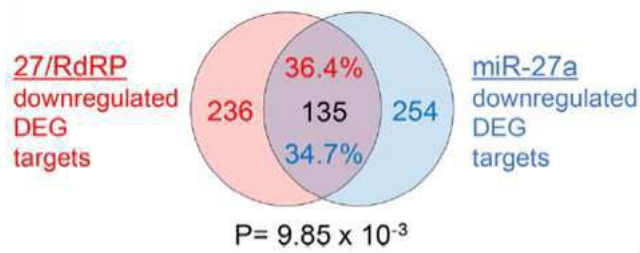
도면4g



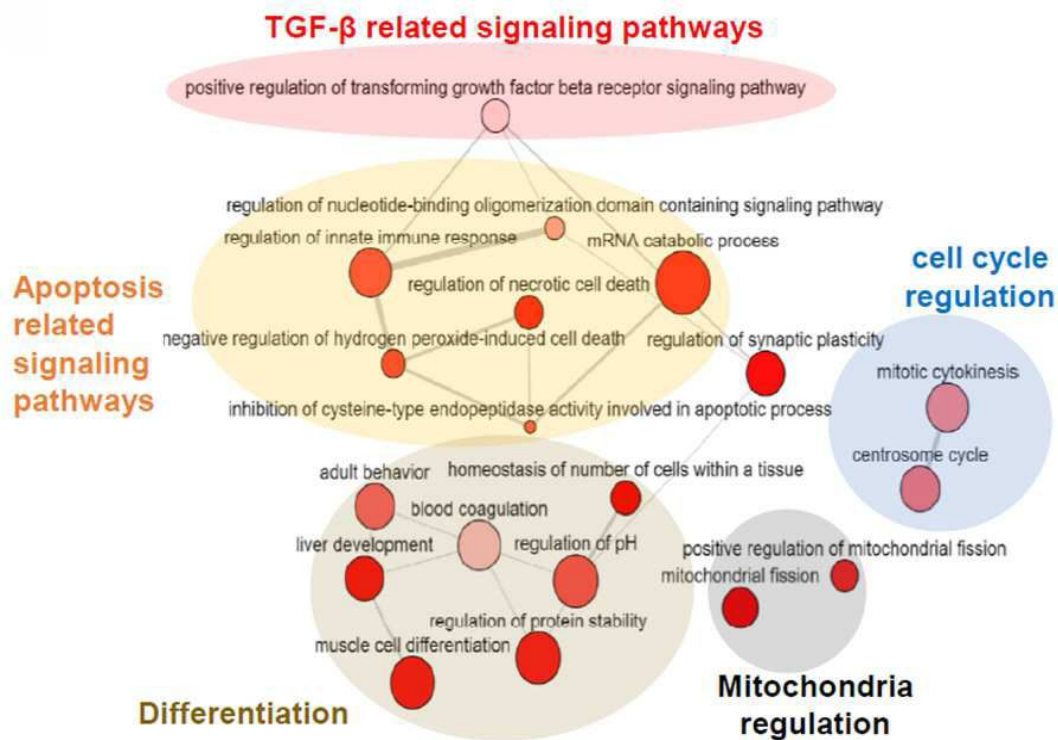
도면4h



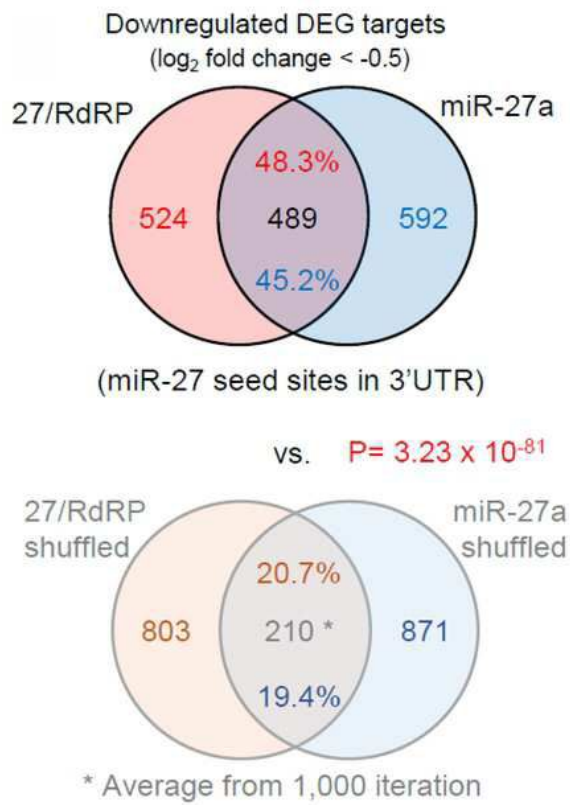
도면4i



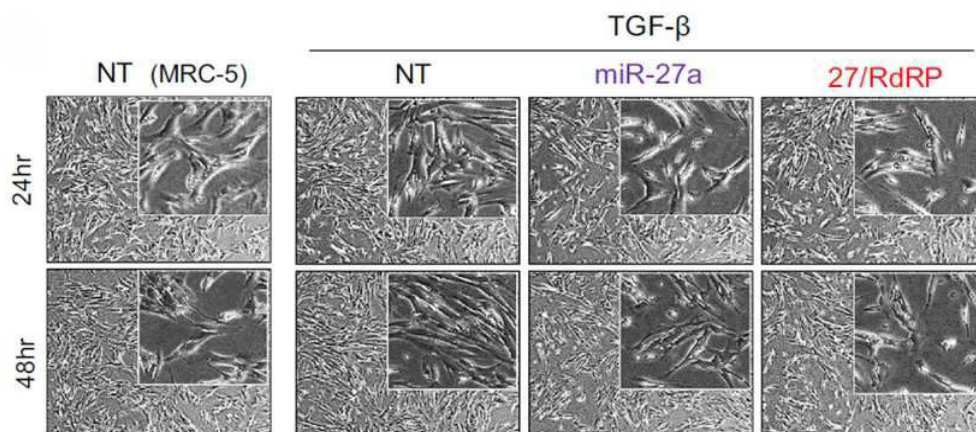
도면4j



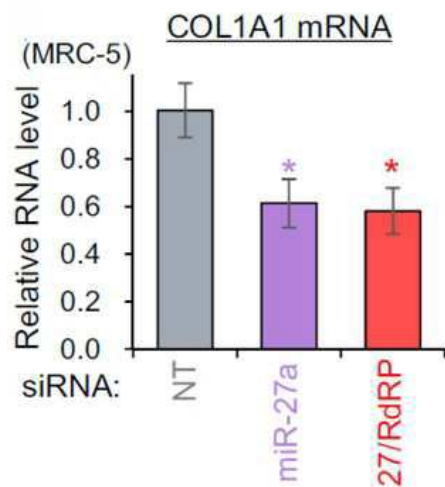
도면4k



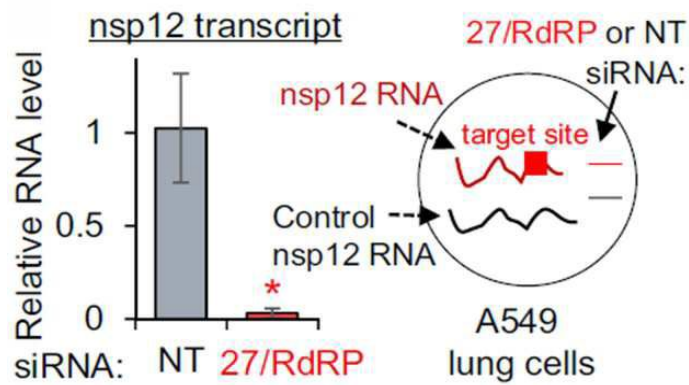
도면5a



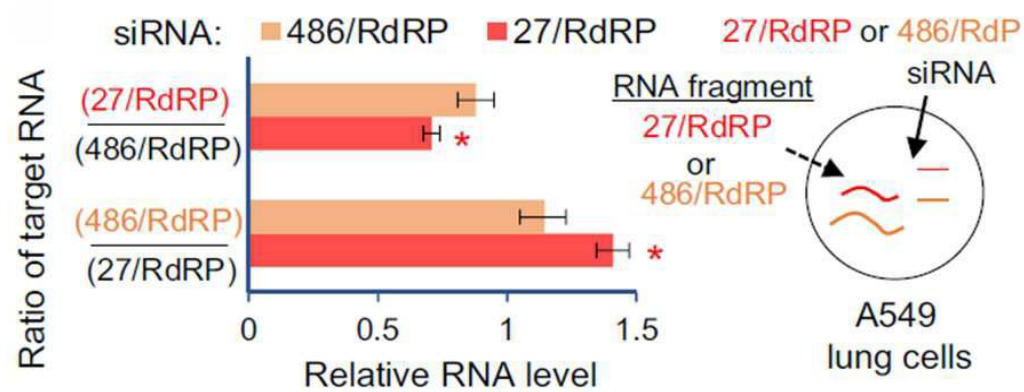
도면5b



도면5c



도면5d



<220><221> misc_feature

<222> (6)

<223> n is dSpacer

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> thymidine deoxynucleotide

<400> 1

ucacancuc cuagaaagat t

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NT passenger

<220><221> misc_feature

<222> (6)

<223> n is dSpacer

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> thymidine deoxynucleotide

<400> 2

ucuuunuagg agguugugat t

21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-27a guide

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> thymidine deoxynucleotide

<400> 3

uucacagugg cuaaguucct t

21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-27a passenger
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl modification
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)

<223> thymidine deoxynucleotide
 <400> 4

ggaacuuagc cacugugaat t

21

<210> 5
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-193a-5p guide
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> thymidine deoxynucleotide
 <400> 5

ugggucuuug cgggcgagat t

21

<210> 6
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-193a-5p passenger

<220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> thymidine deoxynucleotide
 <400> 6

ucucgccgc aaagacccat t

21

<210> 7
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 151/nsp3 guide
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> thymidine deoxynucleotide
 <400> 7
 uaagacuggu caguaggaut t 21
 <210> 8
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> 151/nsp3 passenger
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)
 <223> 6-fluorescein amidite is added
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> thymidine deoxynucleotide
 <400> 8
 auccuacuga ccagucuuct t 21
 <210> 9
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 193/nsp3 guide
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> thymidine deoxynucleotide
 <400> 9
 uuggucuuuu aaacuguagt t 21

 <210> 10
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 193/nsp3 passenger
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)
 <223> 6-fluorescein amidite is added
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> thymidine deoxynucleotide
 <400> 10

cuacaguuuu aaagaccaat t

21

<210> 11
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 193/nsp5 guide
 <220><221> misc_feature
 <222>

> (20)..(21)

<223> thymidine deoxynucleotide
 <400> 11

auggucuugu guuagaggut t

21

<210> 12
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 193/nsp5 passenger
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)
 <223> 6-fluorescein amidite is added
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> thymidine deoxynucleotide
 <400> 12

accucuaaca caagaccaut t	21
<210> 13	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 27/RdRP guide	
<220><221> misc_feature	
<222> (20)..(21)	
<223> thymidine deoxynucleotide	
<400> 13	
uucacagaau uguacuguut t	21
<210> 14	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 27/RdRP passenger	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(2)	
<223> 2'-O-methyl modification	
<220><221> misc_feature	
<222> (20)..(21)	
<223> thymidine deoxynucleotide	
<400> 14	
aacaguacaa uucugugaat t	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 486/RdRP guide	
<220><221> misc_feature	
<222> (20)..(21)	
<223> thymidine deoxynucleotide	
<400> 15	

uccuguauac gacaucagut t	21
<210> 16	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 486/RdRP passenger	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(2)	
<223> 2'-O-methyl modification	
<220><221> misc_feature	
<222> (20)..(21)	
<223> thymidine deoxynucleotide	
<400> 16	
acugaugucg uauacaggat t	21
<210> 17	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> cel-miR-67	
<400> 17	
cgcucauucu gccgguuguu aug	23
<210> 18	
<211> 116	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 151/nsp3 forward	
<400> 18	
tcgagatgaa gttgcgagag acttgctact acagtttaaa agaccaataa atcctactga	60
ccagtccttct tacatcggtg atagtgttac agtgaagaat ggttccatcc atctgc	116
<210> 19	
<211> 116	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> 151/nsp3 reverse

<400> 19

ggccgcagat ggatggaacc attcttcact gtaacactat caacgatgta agaagactgg 60

tcagtaggat ttattggtct tttaaactgt agtgacaagt ctctcgcaac ttcate 116

<210> 20

<211> 116

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 193/nsp3 forward

<400> 20

tcgaggctgg tagtacattt attagtgatg aagttgagag agacttgtca ctacagtta 60

aaagaccaat aaatcctact gaccagtctt cttacatcgt tgatagtgtt acaggc 116

<210> 21

<211> 116

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 193/nsp3 reverse

<400> 21

ggccgcctgt aacactatca acgatgtaag aagactggtc agtaggattt attggtcttt 60

taaactgtag tgacaagtct ctgcgaactt catcactaat aaatgtacta ccagcc 116

<210> 22

<211> 116

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 193/nsp5 forward

<400> 22

tcgagaactc ttaatgactt taaccttgtg gctatgaagt acaattatga acctctaaca 60

caagaccatg ttgacatact aggacctctt tctgctcaaa ctggaattgc cgttgc 116

<210> 23

<211> 116

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 193/nsp5 reverse

<400> 23
ggccgcaacg gcaattccag tttagacaga aagaggtcct agtatgtcaa catggcttg 60
tgttagaggt tcataattgt acttcatagc cacaaggta aagtcattaa gaggttc 116

<210> 24
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 151-seed forward
<400> 24
tcgagcagtc taacagtcta tacagtctaa tcagtctaaa cagtctatgc 50
<210> 25
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 151-seed reverse
<400> 25
ggccgcatag actgtttaga ctgattagac tgtatagact gttagactgc 50
<210> 26
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 486/RdRP forward
<400> 26
tcgagactga tgcgtatac aggagc 26
<210> 27
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 486/RdRP reverse
<400> 27
ggccgctcct gtatacgaca tcagtc 26
<210> 28
<211> 26

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	27/RdRP forward	
<400>	28	
	tcgagaacag tacaattctg tgaagc	26
<210>	29	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	27/RdRP reverse	
<400>	29	
	ggccgcttca cagaattgta ctgttc	26
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COL1A1 forward	
<400>	30	
	gcccaagacga agacatccca	20
<210>	31	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COL1A1 reverse	
<400>	31	
	cgtcatcgca caacaccttg	20
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH forward	
<400>	32	
	tgaccacca actgcttagc	20

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH reverse
 <400> 33
 ggcatggact gtggtcatga g 21
 <210> 34
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7 promoter
 <400> 34
 ggatcctaatac gactcact atagg 25
 <210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7 promoter+nsp12 transcript forward
 <400> 35
 ggatcctaatac gactcact at 22
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7 promoter+nsp12 transcript reverse
 <400> 36
 ctgtaagact gtatgcggtg 20
 <210> 37
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7 promoter-containing DNA of codon-optimised nsp12 forward

<400>	37	
ggatccta at acgactcact ataggatgtc agcagacgca caaag		45
<210>	38	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	T7 promoter-containing DNA of codon-optimised nsp12 reverse	
<400>	38	
ctgcaggacg gtgtgaggc		19
<210>	39	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	nsp12 forward	
<400>	39	
aggtgaacgt gtacccaag		20
<210>	40	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	nsp12 reverse	
<400>	40	
ctggcgtggt ttgtatgaaa		20
<210>	41	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	codon-optimised nsp12 forward	
<400>	41	
gacttcgtcg aaaaccctga		20
<210>	42	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> codon-optimised nspl2 reverse

<400> 42

cgtaagcaca ccaacaatgc 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequeunce for reverse transcription of 13961-14065 of SARS-CoV-2

RdRP

<400> 43

ctaatgtcag tacaccaaca 20

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequeunce for reverse transcription of 13479-13583 of SARS-CoV-2

RdRP

<400> 44

ttagcaaaac cagctacttt atc 23

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 27/RdRP forward

<400> 45

tacgccaact taggtgaacg 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 27/RdRP reverse

<400> 46

ccaacaatac cagcatttcg	20
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 486/RdRP forward	
<400> 47	
gtgtaagtgc agcccgctctt	20
<210> 48	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 486/RdRP reverse	
<400> 48	
tgtcaaaagc cctgtatacg ac	22
<210> 49	
<211> 6	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-27a seed	
<400> 49	
ucacag	6
<210> 50	
<211> 6	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-193a-5p seed	
<400> 50	
ggucuu	6
<210> 51	
<211> 6	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> miR-151 seed

<400> 51

agacug

6