



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0019391
(43) 공개일자 2010년02월18일

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0072891

(22) 출원일자 2009년08월07일

심사청구일자 2009년08월07일

(30) 우선권주장

1020080077875 2008년08월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김태우

대구광역시 달서구 성당1동 58-19

김진희

경기도 안산시 단원구 고잔동 대우마이빌 327호

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 24 항

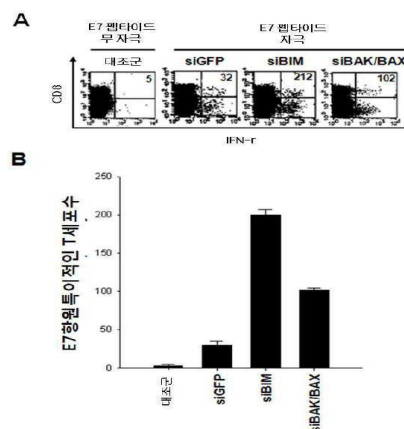
(54) CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA

(57) 요약

본 발명은 caspase-8 또는 BH3-온리 단백질에 특이적으로 반응하여 항암면역제제로 이용되는 면역세포들의 세포자멸을, 바람직하게는 CTL 매개성 세포자멸을 효율적으로 억제하여 면역반응을 증강시키고 암을 치료하는 siRNA, siRNA가 형질주입된 세포, 및 이들을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 siRNA, 이를 포함하는 조성물, 본 발명의 siRNA가 형질주입된 세포, 이를 포함하는 조성물 등은 caspase-8 또는 BH-3 only 단백질, 그 중에서도 BIM, BID, BAD, BIK, 및 HRK의 발현을 선택적으로 억제함으로써, 면역세포의 수명을 증가시켜, 면역반응을 증강시키고, 암치료 효능을 증가시킨다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 60의 센스서열 및 각각의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 세포자멸 경로에 관여하는 단백질에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 1종 이상의 siRNA.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포자멸 경로에 관여하는 단백질은 caspase-8 또는 BH3 온리 단백질인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 BH3 온리 단백질은 BIM (BCL-2-interacting mediator of death), BID (BH3 interacting domain death agonist), BAD (Bcl-2-associated death protein), BIK (Bcl-2 interacting killer), 및 HRK (hara-kiri)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 BIM에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 1의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 2의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 3의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 4의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 5의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 6의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 7의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 8의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 9의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 10의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 BID에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 11의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 12의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 13의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 14의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 15의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 16의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 17의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 18의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 19의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 20의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 BAD에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 21의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 22의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 23의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 24의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 25의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 26의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 27의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 28의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 29의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 30의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 BIK에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 31의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 32의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 33의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 34의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 35의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 36의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 37의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 38의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 39의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 40의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 HRK에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 41의 센스 서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 42의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 43의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 44의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 45의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 46의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 47의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 48의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 49의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 50의 센스 서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 caspase-8에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 51의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 52의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 53의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 54의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 55의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 56의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 57의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 58의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 59의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 60의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 siRNA를 포함하는 면역세포의 세포자멸 억제제.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 면역세포는 수지상세포(dendritic cell), T세포, B 세포, 및 NK(natural killer) 세포로 구성된 군으로부터 선택된 것인 세포자멸 억제제.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 siRNA를 포함하는 면역반응 증강용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가적으로 포함하는 면역반응 증강용 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 siRNA를 포함하는 암치료용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암은 인유두종바이러스(human papilloma virus)유래의 비뇨생식기암, 두경부암, 피부암, 호흡기암, 및 소화기암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 암치료용 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 암은 자궁경부암, 편평세포암, 구강암, 및 비세포소암 으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 암치료용 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가적으로 포함하는 암치료용 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 siRNA를 포함하는 DNA 백신.

청구항 19

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 siRNA가 형질주입된 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 세포는 수지상세포(dendritic cell), T세포, B 세포, 및 NK(natural killer) 세포로 구성된 군으로부터 선택된 것인 세포.

청구항 21

제19항의 세포를 포함하는 면역반응 증강용 조성물.

청구항 22

제19항의 세포를 포함하는 암치료용 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 암은 인유두종바이러스(human papilloma virus)유래의 비뇨생식기암, 두경부암, 피부암, 호흡기암, 및 소화기암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 암치료용 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 암은 자궁경부암, 편평세포암, 구강암, 및 비세포소암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 암치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 caspase-8 또는 세포자멸인자 중 하나인 BH3-온리 단백질에 특이적으로 결합하여 항암면역제제로 이용되는 면역세포들, 바람직하게는 CTL 매개성 세포 자멸을 효율적으로 억제하여 면역반응을 증강시키고 암을 치료하는 siRNA, siRNA가 형질주입된 세포, 및 이들을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암(cancer)은 증식력이 강하며 전이성이 높아 생명을 위협하는 악성종양(malignant tumor)을 지칭한다. 우리 몸을 구성하는 60조의 세포 중 백 개에서 천 개의 세포는 유전적 이상을 가지고 있을 것으로 추정할 수 있으며, 이들 이상세포들은 소위 경찰로 비유할 수 있는 면역감시체계(immune surveillance)에 의해 계속적으로 제거됨으로서 우리 몸의 항상성이 유지된다. 그러나 많은 유전자의 이상이 중첩되었을 경우에 세포는 증식과 사멸을 일정하게 유지하는 항상성(homeostasis)을 상실하고 비정상적으로 증식을 계속하여 암이라고 하는 질환으로 발전된다. 이러한 사실에 근거하여 암은 유전적 변이 세포를 사멸하는 면역 기능 이상으로 발생하는 면역학적 질환으로 볼 수 있다.

[0003] 현재 암의 치료는 수술, 방사선, 항암제 요법 등을 통해 주로 치료되고 있으나 각각의 치료법마다 단점과 심각한 부작용들이 보고됨에 따라 보다 획기적이고 새로운 암 치료법의 개발이 절실히 요구되고 있다. 또한, 전통적인 암 치료는 환자의 고통을 수반하기 때문에 환자의 삶의 질에 있어서 많은 문제점을 갖고 있다.

[0004] 이러한 현실에서 새로운 대안으로 부작용이 거의 없는 면역요법이 주목을 받고 있으며, 특히 최근 분자생물학의 발전으로 면역학에서도 많은 획기적인 연구 성과가 얻어지면서 새로운 항암면역치료(cancer immunotherapy)가 시도되고 있다. 이러한 시도는 암을 면역질환으로 가정할 때 매우 합리적인 항암요법이 될 수 있을 것으로 기대한다.

[0005] 항암면역치료는 암 특이 항원(tumor specific antigen) 또는 암 관련 항원(tumor associated antigen)에 대한 면역반응을 유도하여 암 특이성 독성 면역세포(killer T cell)에 의해 암세포를 제거하는 것을 말한다.

[0006] 항암면역을 유도하는 면역제제들을 유형별로 구분하면, 종양세포, 정제된 종양항원, 싸이토카인과 보조자극 강화제, 바이러스성 벡터, DNA백신, 수지상세포에 기반한 세포치료제 등이 있으며, 이 중 DNA백신과 수지상세포를

기반으로 한 면역제제들이 많은 주목을 받고 있다.

- [0007] 많은 임상적 보고들에 따르면 수지상세포 면역제제는 임상시험에서 어떠한 심각한 부작용도 유발하지 않는 매우 안전한 항암제임을 보여 주고 있다 (Mayordomo JI et al., Nat Med 1995; 1: 1297-1302, Nestle FO et al, Nat Med 1998;4:328-332). 이는 환자의 삶의 질의 향상이라는 현대 의학의 목적과도 일치하는 고무적인 임상 시험 결과이다. 그러나 치료 효능은 아직 다소 기대에 미치지 못하여 추가적인 개선이 계속되어야 할 것으로 사료 된다.
- [0008] 항암면역세포 백신들의 효능이 좋지 않은 원인 중 하나로 생체내로 주입된 면역세포들이 자가 활성화에 의해 또는 주변의 종양 세포들에 의해 세포자멸 자극을 받고 이로 인하여 제 기능을 다 하지 못하고 면역세포들이 세포자멸 되는 것을 들 수 있다. 예를 들어, 수지상세포 백신의 경우 수지상세포에 의해 활성화 된 세포 독성 T세포들에 의해 수지상세포들 자신이 공격을 받아 그 기능을 다 하지 못하고 세포자멸 되며, T세포 백신의 경우는 활성화된 T세포들이 세포 표면에 Fas와 FasL을 동시에 발현하여 FasL의 신호를 받아 세포자멸에 이른다. 이러한 관점에서 볼 때 면역세포 백신의 효능 증강을 위해 면역세포를 세포자멸 공격으로부터 보호하는 것은 면역세포 백신의 효능을 증강시킬 수 있는 좋은 방법 중 하나로 사료된다.
- [0009] 세포자멸(Apoptosis, Programmed cell death)은 면역계의 세포성 발달과 항상성 유지에 있어 필수적이다. 이러한 면역세포의 세포자멸은 일반적인 발달과정뿐만 아니라 병원체의 자극에 반응하여서도 작용하게 된다. 포유동물은 cysteine protease인 캐스페이즈를 필요로 하는 두 세포사멸 경로를 갖는다.
- [0010] 이 세포사멸 경로는 BCL-2 superfamily에 의해 조절되는 데, 이는 pro-apoptotic 분자들 및 anti-apoptotic 분자들로 구성된다. pro-apoptotic 분자들에는 BAX, BAK, BOK, BH3-only 단백질 등이 있고, BH3-only 단백질은 BCL-2 homology 3(BH3) domain으로 알려진 death domain을 공통적으로 가지고 있으며, 이들은 내부, 외부의 세포사멸자극의 상위 조절자로 작용하며, BH3-only 단백질에는 BIM, BIK, BID, BAD, BMF, HRK, Noxa 및 Puma 등을 들 수 있다. Anti apoptotic분자들에는 BCL-2, BCL-xL, BCL-w, Mcl-1 및 A1이 있다.
- [0011] 세포자멸경로(apoptotic pathway)는 BH3 interacting domain death agonist(BID), BCL-2-interacting mediator of death(BIM)과 같은 pro-apoptotic BH3-only 단백질들의 활성화 후에 시작된다. 활성화된 BIM, BID는 Bcl-2 homologous antagonist killer(BAK) 과 Bcl-2 associated x protein(BAX)를 활성화 시키고 미토콘드리아로 부터 cytochrome c가 분비 되도록 한다. apoptosome에서는 cytochrome c, APAF-1, dATP 및 캐스페이즈-9을 oligomerize하여, 캐스페이즈-9 활성화를 유도한다. 이 효소들은 캐스페이즈-3, caspase-7 같은 하부 apoptotic cascade를 유지하게 된다.
- [0012] 세포자멸 extrinsic pathway는 death receptor와 그 ligand에 의해 시작되는 데, death receptor로는 Fas 수용체, tumor necrosis factor receptor (TNFR) 및 tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 등이 있다. 이들의 ligation후, death-including signaling complex(DISC)가 형성되고, DISC는 pro-caspase 8의 유입을 유도하여 캐스페이즈들을 활성화 시킨다. caspase-8은 다시 캐스페이즈-3과 캐스페이즈-7 같은 실제 세포사멸인자들을 활성화 시켜 세포자멸을 유도하게 된다.
- [0013] 세포독성 T 림프구 매개성 세포자멸은 granzyme/perforin 매개성 intrinsic 경로와 Fas/FasL 매개성 extrinsic 경로 두 경로를 통해서 이루어진다. killer cell로부터 분비된 perforin과 serine protease인 granzyme은 미토콘드리아로 부터 다양한 pro-apoptotic 분자들의 분비를 유도한다. 대표적인 pro-apoptotic Bcl-2 분자로 BAK, BAX 및 BIM이 있다. Fas/FasL 결합에 의해 BID 분자가 truncation되고 caspase-8의 활성화가 유도 된다. pro-apoptotic 분자인 BIM과 BID는 anti-apoptotic 분자인 BCL-xL, BCL-2, BAK 및 BAX 등과 결합할 수 있다. 이러한 것을 통해 볼 때 BIM과 BID는 intrinsic과 extrinsic 세포자멸 자극을 조절 할 수 있을 것으로 사료된다.
- [0014] 이에, 본 발명자들은 CTL 매개성 세포자멸에 있어 중추적인 역할을 하는 인자인 BIM, BID, BAK, BAX 및 caspase-8 등의 발현을 small interfering RNA를 통해 억제함으로써 수지상세포 등의 CTL매개성 세포자멸을 억제할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0015] pro-apoptotic 분자인 BAK과 BAX의 siRNA를 동시에 이용한 DNA백신 및 수지상세포백신의 효능 증강이 개시된 바 있으나 (미국특허출원 제2007-0773162호 참조), 본 발명자들은 BIM siRNA의 단독 사용으로 BAK 및 BAX siRNA 동시 사용에 필적할 만한 효과를 얻는 기술적 진보를 이루어 본 발명에 이르렀다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0016] 본 발명의 목적은 caspase-8 또는 세포자멸 유도 인자 중 하나인 BH3-only 단백질, 그 중에서도 BIM(BCL-2-interacting mediator of cell death), BID(BH3 interacting domain death agonist), BAD(Bcl-2-associated death protein), BIK(Bcl-2 interacting killer), 및 HRK(hara-kiri)에 특이적으로 반응하여 세포자멸, 바람직하게는 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA를 제공하는 데 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적은 상기 siRNA를 형질 주입한 면역세포 및 이들을 포함하는 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 면역세포들의 세포자멸을 효율적으로 억제하여 면역유도능을 증강시키고 항암 효과 또한 증가시키는 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

- [0019] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 60의 센서서열 및 각각의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 세포자멸 경로에 관여하는 단백질에 특이적으로 반응하여 세포자멸을 억제하는, 바람직하게는 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 1종 이상의 siRNA를 제공한다.
- [0020] 본 발명에서 있어서, 세포자멸 경로에 관여하는 단백질은 caspase-8 또는 BH3 온리 단백질을 들 수 있으며, BH3 온리 단백질은 BIM (BCL-2-interacting mediator of death), BID (BH3 interacting domain death agonist), BAD (Bcl-2-associated death protein), BIK (Bcl-2 interacting killer), 및 HRK (hara-kiri)로 이루어진 군 으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0021] 상기 목적에 따라, 본 발명은 면역세포의 세포자멸을, 바람직하게는 CTL 매개성 세포자멸을 억제하기 위해, caspase-8 또는 세포자멸유도인자인 BH3-only 단백질, 특히 BIM, BID, BAD, BIK, 및 HRK 특이적인 siRNA, 이 를 포함하는 조성물 등을 제공한다.
- [0022] 상기 다른 목적에 따라, 본 발명은 면역세포의 세포자멸을, 바람직하게는 CTL 매개성 세포자멸을 억제하기 위한, caspase-8 또는 세포자멸유도인자인 BH3-only 단백질, 특히 BIM, BID, BAD, BIK, 및 HRK 특이적인 siRNA가 형질주입된 세포, 이를 포함하는 조성물 등을 제공한다.
- [0023] 상기 또 다른 목적에 따라 본 발명은 면역세포의 세포자멸 억제가 필요한 대상의 caspase-8 또는 BH3-only 단백질의 발현 또는 기능을 억제하여 세포자멸을, 바람직하게는 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0024] 이하, 본 발명은 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0025] 본 발명에 사용된 용어 ‘BH3-only 단백질’은 BCL-2 family 단백질 중 pro-apoptotic 분자 중 하나로, BCL-2 homology 3(BH3) domain으로 알려진 death domain을 공통적으로 가지고 있으며, 이들은 내부, 외부의 세포사멸 자극의 상위 조절자로 작용하고, BIM, BIK, BID, BAD, BMF, HRK, Noxa 및 Puma 등을 들 수 있다.
- [0026] ‘caspase-8’은 CD95 receptor (Fas/APO-1)과 tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) 매개성 세포자멸에 의해 p18과 p10의 단편으로 활성화 되며, 활성화된 caspase-8은 캐스페이즈-1,-3,-6 그리고 -7과 같은 하위 단계의 이펙터(effector) 캐스페이즈들을 활성화 시킨다. 캐스페이즈-3는 DNA 분절화(fragmentation)와 세포 수축(shrinkage)같은 직접적인 세포 자멸을 유도 한다.
- [0027] ‘siRNA’는 이중가닥 RNA가 다이스(Dicer) 효소에 의해 절단되어 생성되는 18~23 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 당해 단백질의 발현을 억제하는 데 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 siRNA는 생체내 핵산 분해효소에 의한 빠른 분해를 막기 위해 화학적으로 변형된 siRNA를 포함하는 것으로 해석된다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다.
- [0029] 본 발명에서는 BH3-only 단백질의 발현을 억제하는 물질로 BH3-only 단백질 특이적인 17~23 염기쌍으로 구성된 siRNA를 제공하며, 바람직하게는 BIM, BID, BAD, BIK, 및 HRK 특이적인 siRNA를 제공한다.
- [0030] 본 발명의 BIM에특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 1의 센서서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 2의 센서서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 3의 센서서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 4의 센서서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 5의 센서서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 6의

센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 7의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 8의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 9의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 10의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA이다.

[표 1a] BIM 특이적인 siRNA 서열

Position (mouse)	Sequence	
458-475	sense	5'-GGAGGGUGUUUGCAAAUG-3' (서열번호: 1)
	antisense	5'-CAUUUGCAAACACCCUCC-3'
486-508	sense	5'-AAGGAGGGTGTGCAAATGATT-3' (서열번호: 2)
	antisense	5'-TTCCTCCACAACGTTACTAA-3'
523-545	sense	5'-GACCACCCTCAAATGGTTATCTT-3' (서열번호: 3)
	antisense	5'-CTGGTGGGAGTTACCAATAGAA-3'
526-548	sense	5'-CACCTCAAATGGTTATCTTACA-3' (서열번호: 4)
	antisense	5'-GTGGGAGTTACCAATAGAATGT-3'
109-131	sense	5'-CAGACAGAACCGCAAGGAATCC-3' (서열번호: 5)
	antisense	5'-GTCTGTCTGGCGTTCATTAGG-3'

[표 1b] BIM 특이적인 siRNA 서열

Position (human)	Sequence	
406-428	sense	5'-CAGGCTGAACCTGCAGATATGCG-3' (서열번호: 6)
	antisense	5'-GTCCGACTTGGACGTCTATACGC-3'
309-331	sense	5'-GAGCCAGCACCCATGAGTTGTG-3' (서열번호: 7)
	antisense	5'-CTCGGGTCGTGGGTACTCAACAC-3'
317-339	sense	5'-CACCCATGAGTTGTGACAAATCA-3' (서열번호: 8)
	antisense	5'-GTGGGTACTCAACACTGTTAGT-3'
37-59	sense	5'-GACCGAGAAGGTAGACAATTGCA-3' (서열번호: 9)
	antisense	5'-CTGGCTCTCCATCTGTTAACGT-3'
529-551	sense	5'-GACCACCCACGAATGGTTATCTT-3' (서열번호: 10)
	antisense	5'-CTGGTGGGTGCTTACCAATAGAA-3'

본 발명의 BID에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 siRNA는 서열번호 11의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 12의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 13의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 14의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 15의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 16의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 17의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 18의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 19의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 20의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA이다.

[표 2a] BID 특이적인 siRNA 서열

Position (mouse)	Sequence	
1465-1483	sense	5'-GUCUGACACACUGUCUUGG-3' (서열번호: 11)
	antisense	5'-CCAAGACAGUGUGUCAGAC-3'
467-489	sense	5'-TAGCCGCACAGTTCATGAATGGC-3' (서열번호: 12)
	antisense	5'-ATCGCGTGTCAAGTACTTACCG-3'
527-549	sense	5'-AAGCCCTTGATGAGGTGAAGACA-3' (서열번호: 13)
	antisense	5'-TTCGGGAACACTCCACTTCTGT-3'
263-285	sense	5'-AACTGCCTGTGCAAGCTTACTGG-3' (서열번호: 14)
	antisense	5'-TTGACGGACACGTTCAATGACC-3'
330-352	sense	5'-CAGCCGCTCCTTCAACCAAGGAA-3' (서열번호: 15)
	antisense	5'-GTCGGCGAGGAAGTTGGTTCCTT-3'

[0038] [표 2b] BID 특이적인 siRNA 서열

[0039]

Position (human)	Sequence	
60-82	sense	5'-GAGGAGCACAGTGC GGATTCTGT-3' (서열번호: 16)
	antisense	5'-CTCCTCGTGT CACGCCTAAGACA-3'
334-356	sense	5'-CACTCCCGCTTGGGAAGAATAGA-3' (서열번호: 17)
	antisense	5'-GTGAGGGCGAACCTTCTTATCT-3'
544-566	sense	5'-CAGGCCTACCCTAGAGACATGGA-3' (서열번호: 18)
	antisense	5'-GTCCGGATGGGATCTCTGTACCT-3'
171-193	sense	5'-CAGGGATGAGTGCATCACAACC-3' (서열번호: 19)
	antisense	5'-GTCCCTACTCAGTAGTGTGG-3'
696-718	sense	5'-GAGGAGCTTAGCCAGAAATGGGA-3' (서열번호: 20)
	antisense	5'-CTCCTCGAATCGGTCTTACCCT-3'

[0040] 본 발명의 BAD에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 21의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 22의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 23의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 24의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 25의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 26의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 27의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 28의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 29의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 30의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA이다.

[0041] [표 3a] BAD 특이적인 siRNA 서열

[0042]

Position (mouse)	Sequence	
574-596	sense	5'-TAGAGGTGCCGGCACCTAACTG-3' (서열번호: 21)
	antisense	5'-ATCTCCACGGCCGTGGGATTGAC-3'
451-473	sense	5'-CAGGCCTCCAGGATCCAAATGGG-3' (서열번호: 22)
	antisense	5'-GTCCGGAGGTCCTAGGTTTACCC-3'
424-446	sense	5'-AAGGGCTGGAGGACTTATCAGCC-3' (서열번호: 23)
	antisense	5'-TTCCCGACCTCCTGAATAGTCGG-3'
578-600	sense	5'-GACCAGCAGCCAGAGTATGTTTC-3' (서열번호: 24)
	antisense	5'-CTGGTCGTCGGGTCTCATACAAG-3'
423-445	sense	5'-GAAGGGCTGGAGGACTTATCAGC-3' (서열번호: 25)
	antisense	5'-CTTCCCGACCTCCTGAATAGTCG-3'

[0043] [표 3b] BAD 특이적인 siRNA 서열

[0044]

Position (human)	Sequence	
379-401	sense	5'-AAGGGACTTCTCTGCCCCAAGAG-3' (서열번호: 26)
	antisense	5'-TTCCCTGAAGGAGCGGGCTTCTC-3'
22-44	sense	5'-GAGCCGAGTGAGCAGGAAGACTC-3' (서열번호: 27)
	antisense	5'-CTCGGCTCACTCGTCTTCTGAG-3'
345-367	sense	5'-GAGGATGAGTGACGAGTTGTGG-3' (서열번호: 28)
	antisense	5'-CTCCTACTCACTGCTCAAACACC-3'
95-117	sense	5'-CAGGCTCCGGCAAGCATCATCGC-3' (서열번호: 29)
	antisense	5'-GTCCGAGGCCGTTCTAGTAGCG-3'
429-451	sense	5'-AAGCTCCAGCTGGACGCGAGTCT-3' (서열번호: 30)
	antisense	5'-TTCGAGGTCGACCTGCGCTCAGA-3'

[0045] 본 발명의 BIK에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 31의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 32의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 33의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 34의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 35의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호

호 36의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 37의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 38의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 39의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 40의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA이다.

[표 4a] BIK 특이적인 siRNA 서열

Position (mouse)	Sequence	
297-319	sense	5'-CAGCTGCCTGGGATTGCTATACA-3' (서열번호: 31)
	antisense	5'-GTCGACGGACCCTAACGATATGT-3'
98-120	sense	5'-TATGGCCAGAGACGTCATCAAGA-3' (서열번호: 32)
	antisense	5'-ATACCGGTCTCTGCAGTAGTTCT-3'
711-733	sense	5'-CAGGAGCATTACTGGCTAAGTGC-3' (서열번호: 33)
	antisense	5'-GTCCTCGTAATGACCGATTCACG-3'
80-102	sense	5'-CATGTCGGAGGCGAGACTTATGG-3' (서열번호: 34)
	antisense	5'-GTACAGCCTCCGCTCTGAATACC-3'
576-598	sense	5'-GAGGTGCCGGCACCCTAACTGAG-3' (서열번호: 35)
	antisense	5'-CTCCACGGCCGTGGGATTGACTC-3'

[표 4b] BIK 특이적인 siRNA 서열

Position (human)	Sequence	
895-917	sense	5'-GAGGAGCAGGAGTGCTCAATAAA-3' (서열번호: 36)
	antisense	5'-CTCCTCGTCCCTCAGAGTTATTT-3'
859-881	sense	5'-GATGCCCTCGGCAAAGAATCTAC-3' (서열번호: 37)
	antisense	5'-CTACGGGAGCCGTTTCTTAGATG-3'
301-323	sense	5'-CAGCCTGGGTCTGGCTTTCATCT-3' (서열번호: 38)
	antisense	5'-GTCGGACCCAGACCGAAAGTAGA-3'
299-321	sense	5'-CACAGCCTGGGTCTGGCTTTCAT-3' (서열번호: 39)
	antisense	5'-GTGTCGGACCCAGACCGAAAGTA-3'
36-58	sense	5'-GAGGAGAAATGTCTGAAGTAAGA-3' (서열번호: 40)
	antisense	5'-CTCCTCTTTACAGACTTCATTCT-3'

본 발명의 HRK에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 41의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 42의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 43의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 44의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 45의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 46의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 47의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 48의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 49의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 50의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA이다.

[표 5a] HRK 특이적인 siRNA 서열

Position (mouse)	Sequence	
297-319	sense	5'-CAGCTGCCTGGGATTGCTATACA-3' (서열번호: 41)
	antisense	5'-GTCGACGGACCCTAACGATATGT-3'
98-120	sense	5'-TATGGCCAGAGACGTCATCAAGA-3' (서열번호: 42)
	antisense	5'-ATACCGGTCTCTGCAGTAGTTCT-3'
711-733	sense	5'-CAGGAGCATTACTGGCTAAGTGC-3' (서열번호: 43)
	antisense	5'-GTCCTCGTAATGACCGATTCACG-3'
207-229	sense	5'-GAGTGCCTGGAAGGCAGAAACCA-3' (서열번호: 44)
	antisense	5'-CTCACGCACCTTCCGTCTTTGGT-3'
576-598	sense	5'-GAGGTGCCGGCACCCTAACTGAG-3' (서열번호: 45)
	antisense	5'-CTCCACGGCCGTGGGATTGACTC-3'

[0053] [표 5b] HRK 특이적인 siRNA 서열

[0054]

Position (human)	Sequence	
565-587	sense	5'-CAGCGCCTGGAGCGATCGTAGAA-3' (서열번호: 46)
	antisense	5'-GTCGCGGACCTCGTAGCATCTT-3'
381-403	sense	5'-CAGGCGGAACCTGTAGGAACGCG-3' (서열번호: 47)
	antisense	5'-GTCCGCCTTGAACATCCTTGCGC-3'
462-484	sense	5'-AACCCCTGTGTCCTTGGAGAAAGC-3' (서열번호: 48)
	antisense	5'-TTGGGACACAGGAACCTCTTTCG-3'
542-564	sense	5'-GAGAAGGAAGTGGAGAGTAAAGA-3' (서열번호: 49)
	antisense	5'-CTCTTCCTTCACCTCTCATTCT-3'
104-126	sense	5'-GAGCGAGGCCAGCGGTCATGTGC-3' (서열번호: 50)
	antisense	5'-CTCGCTCCGGTCGCCAGTACACG-3'

[0055] 본 발명의 caspase-8에 특이적으로 반응하여 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA는 서열번호 51의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 52의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 53의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 54의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 55의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 56의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 57의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 58의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호 59의 센스서열 및 그의 안티센스 서열, 및 서열번호 60의 센스서열 및 그의 안티센스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것인 CTL 매개성 세포자멸을 억제하는 siRNA이다.

[0056] [표 6a] caspase-8 특이적인 siRNA 서열

[0057]

Position (mouse)	Sequence	
297-319	sense	5'-AACCTGGTATATTCAGTCACTTT-3' (서열번호: 51)
	antisense	5'-AAAGTGACTGAATATACCAGGTT-3'
820-842	sense	5'-AAGACCTTTAAGGAGCTTCATTT -3' (서열번호: 52)
	antisense	5'-AAATGAAGCTCCTTAAAGGTCTT-3'
1260-1282	sense	5'-AACCTGGTATATTCAGTCACTTT -3' (서열번호: 53)
	antisense	5'-AAAGTGACTGAATATACCAGGTT-3'
388-410	sense	5'-AAATGTAAGCTGGAAGATGACTT -3' (서열번호: 54)
	antisense	5'-AAGTCATCTTCCAGCTTACATTT-3'
301-323	sense	5'-TACAGGGTCATGCTCTTAAAGCT -3' (서열번호: 55)
	antisense	5'-AGCTTAAAGAGCATGACCCTGTA-3'

[0058] [표 6b] caspase-8 특이적인 siRNA 서열

[0059]

Position (human)	Sequence	
399-421	sense	5'-AAGGGTCATGCTCTATCAGATTT -3' (서열번호: 56)
	antisense	5'-AAATCTGATAGAGCATGACCCTT-3'
704-726	sense	5'-AATCACAGACTTTGGACAAAGTT -3' (서열번호: 57)
	antisense	5'-AACTTTGTCCAAAGTCTGTGATT-3'
378-400	sense	5'-GAGGGTCGATCATCTATTAATAA -3' (서열번호: 58)
	antisense	5'-TTATTAATAGATGATCGACCCTC-3'
601-623	sense	5'-AAGAGCCTGCTGAAGATAATCAA -3' (서열번호: 59)
	antisense	5'-TTGATTATCTTCAGCAGGCTCTT-3'
600-622	sense	5'-CAAGAGCCTGCTGAAGATAATCA -3' (서열번호: 60)
	antisense	5'-TGATTATCTTCAGCAGGCTCTTG-3'

[0060] 본 발명의 보다 바람직한 siRNA는 서열번호:6의 센스 서열 및 그의 안티센스 서열로 구성된 siRNA, 서열번호:16

의 센스 서열 및 그의 안티센스 서열로 구성된 siRNA, 및 서열번호:26의 센스 서열 및 그의 안티센스 서열, 서열번호:36의 센스 서열 및 그의 안티센스 서열로 구성된 siRNA, 서열번호:46의 센스 서열 및 그의 안티센스 서열로 구성된 siRNA, 및 서열번호:56의 센스 서열 및 그의 안티센스 서열로 구성된 siRNA이다.

- [0061] 본 발명은 상기 siRNA 중 1종 이상의 siRNA를 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법을 제공한다.
- [0062] 본 발명은 상기 siRNA 중 1종 이상의 siRNA를 포함하는 면역세포의 세포자멸 억제제를 제공한다.
- [0063] 본 발명에 의한 면역세포의 세포자멸 억제제는 수지상세포(dendritic cell), T세포, B 세포, 및 NK(natural killer) 세포 등의 세포자멸 억제제를 포함한다.
- [0064] 본 발명은 상기 세포 자멸 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법을 제공한다.
- [0065] 본 발명은 또한 상기 siRNA 중 1종 이상의 siRNA를 포함하는 면역반응 증강용 조성물, 또는 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가적으로 포함하는 면역반응 증강용 조성물을 제공한다.
- [0066] 본 발명은 상기 siRNA 중 1종 이상의 siRNA를 포함하는 암치료용 조성물, 또는 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가적으로 포함하는 암치료용 조성물을 제공하며, 상기 암은 인유두종바이러스(human papilloma virus)유래의 비노생식기암, 두경부암, 피부암, 호흡기암, 소화기암 등을 들 수 있다. 보다 바람직하게 상기 암은 자궁경부암, 편평세포암, 구강암, 비세포소암 등을 들 수 있다.
- [0067] 본 발명에 있어서 ‘암 치료’는 암의 예방 및 억제를 모두 포함한다.
- [0068] 본 발명은 상기 암 치료용 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암치료 방법을 제공한다.
- [0069] 본 발명에서 사용되는 ‘약제학적으로 허용되는 부형제’에는 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합을 포함한다. 이러한 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 추가적으로 제제화 될 수 있다.
- [0070] 본 발명은 또한 상기 siRNA 중 1종 이상을 포함하는 DNA 백신을 제공한다.
- [0071] 본 발명의 DNA 백신은 상기 siRNA 중 1종 이상을 포함하는 DNA백신으로, caspase-8 또는 BH3 only protein의 발현 저하를 통해 면역 반응을 증강시키는 경우를 포함한다.
- [0072] 본 발명은 상기 DNA 백신을 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법을 제공한다.
- [0073] 본 발명은 상기 siRNA 중 1종 이상의 siRNA가 형질주입된 형질전환된 세포를 제공한다. 본 발명의 형질전환된 세포에는 수지상세포(dendritic cell), T세포, B 세포, 및 NK(natural killer) 세포를 들 수 있다.
- [0074] 본 발명은 또한 상기 세포를 포함하는 면역반응 증강용 조성물 또는 암 치료용 조성물을 제공하며, 상기 암은 인유두종바이러스(human papilloma virus)유래의 비노생식기암, 두경부암, 피부암, 호흡기암, 소화기암 등을 들 수 있다. 보다 바람직하게 상기 암은 자궁경부암, 편평세포암, 구강암, 비세포소암 등을 들 수 있다.
- [0075] 본 발명은 상기 형질전환된 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강 방법 또는 암 치료방법을 제공하며, 상기 암은 인유두종바이러스(human papilloma virus)유래의 비노생식기암, 두경부암, 피부암, 호흡기암, 소화기암 등을 들 수 있다. 보다 바람직하게 상기 암은 자궁경부암, 편평세포암, 구강암, 비세포소암 등을 들 수 있다.
- [0076] 본 발명의 조성물은 종래 공지의 항암 화학요법제를 추가적으로 포함함으로써 병용 효과를 기대할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 조성물은 세포 내로의 도입효율을 증강시키기 위해 공지의 핵산 전달체와 함께 세포내로 도입될 수 있다.
- [0078] 본 발명에 있어서, 상기 siRNA의 치료상 유효량은 암 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 투여되는 핵산의 종류, 제형, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별, 식이, 투여시간, 투여경로 및 치료기간, 동시에 사용되는 화학 항암제 등의 약물을 포함하는 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인에게 상기 암 치료용 조성물은 예컨대 1일 1회 투여시 0.05mg/kg ~ 4mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0079] 본 발명의 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 이를 위하여 본 발명에 의한 siRNA에 추가적으로 다른 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 의한 조성물의 제형은 정제, 환제, 산제, 새세이, 엘릭서제, 현탁제, 유제, 액제, 시럽제, 에어로졸, 캡셀제, 멸균주사제, 멸균 산

제 등의 형태일 수 있으며, 바람직하게는 정맥주사, 피하주사, 내피주사, 근육주사 등의 주사제로 제제화된다.

효 과

[0080] 본 발명에 따른 siRNA, 이를 포함하는 조성물, 본 발명의 siRNA가 형질주입된 세포, 이를 포함하는 조성물 등은 caspase-8 또는 BH-3 only 단백질, 그 중에서도 BIM, BID, BAD, BIK, 및 HRK의 발현을 선택적으로 억제함으로써, 면역세포의 수명을 증가 시켜, 면역반응을 증강시키고, 암치료 효능을 증가 시킨다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0081] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0082] **실시예 1- siRNA의 형질주입 확인**

[0083] 본 발명에 있어서, siRNA는 (주)바이오니아(<http://www.bioneer.co.kr/>)에 의뢰하여 제조하였으며, 구체적으로는 다음과 같다. β -시아노에틸 포스포라미다이트(β -cyanoethyl phosphoramidite)를 이용하여 DNA 구조의 골격을 이루는 포스포디에스터 결합을 연결해가는 방법을 사용하여 siRNA를 합성하였다(참조: Sinha et al., Nucleic Acids Research, 12:4539-4557, 1984). 상세하게는, RNA 합성기(Perceptive Biosystems 8909, PE Biosystems, USA)를 사용하여, 뉴클레오티드가 부착된 고정지지체 상에서, 차단제거(deblocking), 결합(coupling), 산화(oxidation) 및 캡핑(capping)으로 이루어지는 일련의 과정을 반복하여 원하는 길이의 RNA를 포함하는 반응물을 수득하였다. 이어, 전기 반응물을 Daisogel C18(Daiso, Japan)을 사용한 HPLC LC918(Japan Analytical Industry, Japan)에 적용하여, RNA를 분리하고 이를 MALDI-TOF 질량 흡광분석기(Shimadzu, Japan)에 적용하여, 합성하고자 하는 염기서열과 부합하는지 확인하였다. 그런 다음, 센스와 안티센스 RNA가닥을 결합시켜서, 목적하는 이중가닥 siRNA를 각각 제조하였다

[0084] 하기 표 7의 siRNA(Bioneer, daejeon, korea)를 각각 E7항원을 발현하는 수지상세포주 DC-Sig/E7/LAMP-1 (Tae Heung Kang et al., Immunology Letters; 2006: 106: 126-134)에 5×10^5 세포당 3ug의 siRNA를 리포펙타민 2000 (Invitrogen, MD, USA)을 이용하여 형질 주입하여 형질전환된 수지상세포를 얻고, 형질 전환된 수지상세포에서 추출한 50ug의 단백질을 western blot을 통해 siRNA전달 효율을 확인하고 그 결과를 도 1에 나타내었다. 형질 전환된 수지상세포를 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 650 mM NaCl, 5% Triton X-100, 200 mM phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, 0.02 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM benzamidine)에 넣은 후 균질화시키고 13,000 xg에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 총 단백질 50 ug을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하여 분리한 후 membrane transfer시켰다. 1차 항체로 rabbit BIM, BID, BAK, BAX, caspase-8 polyclonal antibody (Santa Cruz), 2차 항체로 anti-rabbit Ig horseradish peroxidase-linked whole antibody (Amersham Biosciences, UK)를 반응시킨 후 ECL western blot detection reagent (Amersham Biosciences, UK)를 반응시켜 영상을 얻었으며 internal control로 β -actin 을 이용하였다.

[0085] [표 7] 수지상세포 형질 주입에 사용된 siRNA

[0086]

siRNA	Position	Sequence	
BIM 특이적	458-475	sense	GGAGGGUGUUUGCAAUG (서열번호: 1)
		antisense	CAUUUGCAAACCCUCC
BID 특이적	1465-1483	sense	GUCUGACACACUGUCUUGG(서열번호: 11)
		antisense	CCAAGACAGUGUGUCAGAC
BAK 특이적	310-329	sense	UGCCUACGAACUCUUCACC(서열번호: 61)
		antisense	GGUGAAGAGUUCGUAGGCA
BAX 특이적	217-236	sense	UAUGGAGCUGCAGAGGAUG(서열번호: 62)
		antisense	CAUCCUCUGCAGCUCCAUA
caspase-8특이적	297-319	sense	AACCTGGTATATTCAGTCACTTT(서열번호: 51)
		antisense	AAAGTGACTGAATATACCAGTT

[0087] **실시예 2- siRNA의 면역 반응 증강 여부 시험**

- [0088] C57BL/6 생쥐군(암컷, 5주령, n=5)에 상기 실시예 1에서 얻은 DC-Sig/E7/LAMP-1 수지상 세포주 1×10^6 개를 50ul OPTI-MEM배지(Invitrogen, MD, USA)에 현탁하여 발바닥에 주사하였다. 상기 면역은 1주일 간격으로 2차례 진행 하고 마지막 면역 7일 후, 비장세포를 적출하여 1ug/ml 농도의 E749-57 펩타이드 자극 후 CD8+, IFN- γ + E7 특 이 CD8 T 세포 반응을 FACS (Becton Dickinson Immunocytometry systems, Mountain view, CA) analysis를 통 해 확인하였다 (도 2 참조). 도 2에서와 같이, 표 1 기재 siRNA 중에서도 특히 BIM 분자를 표적화 한 siRNA 투 여 군에서 현저하게 높은 항원 특이적인 면역 반응 (대조군과 대비 6배 이상)이 관찰되었다.
- [0089] **실시예 3 - BIM 및 BAK/BAX 특이적 siRNA의 면역반응 증강 정도 비교**
- [0090] 실시예 1에서와 동일한 방법으로, 표 7 기재 BIM 특이적 siRNA 및 BAK/BAX 특이적 siRNA(BAK:BAX=3ug:3ug)를 5×10^5 세포당 3ug의 siRNA를 리포펙타민 2000 (Invitrogen, MD, USA)을 이용하여 형질 주입하여 형질전환된 수지 상세포를 얻은 후, 실시예2에서와 동일한 방법으로 두 차례 면역 후 비장세포에서 항원 특이적인 면역 반응을 확인 하고 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 보는 바와 같이 BAK/BAX 두개의 분자를 동시에 표적화한 경 우보다 BIM 단독을 표적화 하였을 때, 약 2배 정도 항원 특이적인 면역 유도능이 증가 하는 것이 확인되었다.
- [0091] **실시예 4 - 세포자멸 억제능 시험**
- [0092] 표 7 기재 BIM 특이적 siRNA 또는 BAK/BAX 특이적 siRNA (BAK:BAX=3ug:3ug)를 5×10^5 세포당 3ug의 siRNA를 리 포펙타민 2000 (Invitrogen, MD, USA)을 이용하여 형질 주입하여 형질전환된 수지상세포를 얻은 후, 형질 주입 된 수지상세포주의 세포독성 림프구로부터 공격에 대한 내성을 확인하기 위해 GFP 특이적 siRNA (sense: GCAUCAAGGUGAACUCAA antisense: UUGAAGUUCACCUUGAUGC)가 처리된 수지상세포주를 대조군으로 하여 세포자멸 비 율을 다음과 같은 방법으로 확인하였다.
- [0093] GFP 특이적 siRNA (대조군)가 형질주입된 수지상세포주 (DC-Sig/E7/LAMP-1)를 대조군으로 하고, E7 특이 CD8 T cell을 effector로 사용하여 BIM 및 BAK/BAX 특이적 siRNA가 형질 주입된 E7을 발현하는 수지상세포주를 각기 다른 E:T 비율 (T cell: DC 비율=12.5:1, 2.5:1, 0.5:1 or 0.1: 1)로 포함하는 배지에서 4시간과 16시간 배양 후 세포자멸세포를 검출하여 세포자멸비율(백분율)을 산출하였다. 세포자멸세포의 검출은 T cell 과 DC의 반응 후 PE-conjugated Rabbit Anti-Active 캐스페이즈-3 Antibody Kit (Becton Dickinson, Mountain View, CA)을 이용하여 유세포분석기 (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA) 분석을 통해 전체 세 포 중 CD8-, active 캐스페이즈-3+인 세포의 수를 백분율로 분석하여 백분율을 결정하였다(도 4 참조). 시험된 전체 비율에서 BAK/BAX siRNA가 처리된 수지상세포주 보다 BIM siRNA가 처리된 수지상세포주에서 높은 세포자멸 저항성을 획득한 것을 확인하였으며, 16시간 반응 후 BAK/BAX siRNA가 처리된 수지상세포주 보다 BIM siRNA가 처리된 수지상세포가 각각의 비율에서 10% 이상 높은 세포자멸 저항성을 획득한 것을 확인 할 수 있었다. 따라 서, 공격의 세포자멸인자인 BAK/BAX를 표적화하여 발현을 억제하는 것 보다 BIM을 단독으로 표적화함으로써 T 세포의 공격으로부터 보다 강력한 세포자멸 내성을 유도할 수 있음을 확인하였다.
- [0094] **실시예 5 - 면역반응 증강여부 시험**
- [0095] Pro-apoptotic 단백질 특이적 siRNA의 형질주입에 의한 수지상세포의 면역반응 증강효과를 확인하기 위해, GFP 특이적 siRNA를 형질주입한 수지상세포주를 음성 대조군으로 하여, E7 특이 CD8 T cell line을 1 ug/ml의 E7 peptide (RAHYNIVTF, Anygen, Gwangju, Korea)를 처리한 수지상세포들과 12.5:1의 Effector : Target 비율로 섞어 16시간 배양 한 후 활성화된 CD8+ T cell line의 백분율을 구하였다. 이때, T cell line의 활성화는 유세포 분석기 (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA)를 사용하여 PE-conjugated Rabbit Anti-INF-gamma Antibody Kit(Becton Dickinson, Mountain View, CA)을 이용하여 intracellular INF-gamma의 발현을 확인하여 전체 세포 중 CD8+, IFN-r+ 세포의 수를 백분율로 나타내었다(도 5 참조). 도 5에서 보는 바와 같이 BIM 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포 군에서 BAK/BAX 특이적 siRNA가 처리된 수지상세포 군보다 2배 이 상으로 T세포들을 활성화 시키는 것을 확인하였다. 이를 통해, BAK/BAX를 표적화하는 것 보다 BIM을 표적화 함으로써 면역반응 유도능이 증강된 수지상세포를 얻을 수 있음을 알 수 있다.
- [0096] **실시예 6 - 항암 치료 효과 평가**
- [0097] 1×10^5 개의 TC-1(Olson et al., 2003; Jeong et al., 1997)을 C57BL/6생쥐 (암컷, 5주령, n=5)복부 표피에 각 각 주입하고, 주입 3일 및 10일 쯤에 두 차례 실시예 3에서와 동일한 방법으로 얻은 BIM 및 BAK/BAX 특이적 siRNA로 각각 형질 주입된 수지상세포를 한 마리당 2×10^6 개씩 50ul OPTI-MEM 배지에 혼탁하여 발바닥에 주사하

여 면역 후, 종양 체적을 종양세포 주입 3일, 10일, 13일, 16일 및 19일 켄에caliber(Mitutoyo, Japan)로 각각 측정하였다 (도 6 참조). 도 6에서와 같이, 대조군 siRNA를 형질주입한 수지상 세포로 면역한 군은 물론, BAK/BAX 특이적 siRNA를 형질 주입한 수지상세포로 면역한 군 보다도 BIM 특이적 siRNA로 형질 주입한 수지상 세포로 면역한 군에서의 종양 체적이 유의적으로 작음($P<0.05$) 을 확인할 수 있었다.

[0098] **실시예 7 - 골수 유래 수지상세포를 통한 면역반응 증강 여부 및 항암 치료 효과 평가**

[0099] 마우스 골수에서 단핵세포들을 분리하여 1000IU/ml GM-CSF (Creasene, Korea), 500IU/ml IL-4 (Creasene, Korea), 10% Fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT), 100 IU/ml 페니실린 (Hyclone, Logan, UT) 및 100 ug/ml 스트렙토마이신 (Hyclone, Logan, UT)이 포함된 배양액에서 6일 동안 배양하여 분화 시킨 골수 유래의 수 지상세포에 형질주입한 것을 제외하고는 실시예 5 및 실시예 6에서와 동일한 방법으로 실험하여 항원 특이적인 면역 반응 증강여부와 항암활성을 확인하였다. 도 7에서와 같이 BIM 특이적 siRNA가 형질주입된 골수유래 수지 상세포로 면역된 군에서 BAK/BAX 특이적 siRNA 형질주입된 수지상세포로 면역된 군에 비해 약 두 배 증가된 암 항원 특이적인 CD8 T 세포 반응을 확인하였다.

[0100]

[0101] **실시예 8 - T세포를 통한 항암 치료 효과 평가**

[0102] Retroviral vector pMSCV (clontech, USA)에 siRNA를 만들어 내는 H1과 U6 promoter를 삽입하여 siRNA를 발현 하는 retroviral system을 구축 하였다. 이 siRNA를 만들어 내는 retroviral system을 이용하여 표 7 기재 BIM, BID, BAK, BAX 그리고 caspase-8 siRNA가 발현되는 E7항원 특이적인 T세포주를 확립하였다.

[0103] C57BL/6 생쥐(암컷, 5주령, $n=5$)에 마우스 자궁경부암세포주 TC-1(Olson et al., 2003; Jeong et al., 1997)을 마리당 5×10^5 개씩 복부 피하에 주사하여 종양을 형성시키고, 종양 주입 7일 후 각각의 siRNA를 발현하는 E7항 원 특이적인 상기 T세포주를 마리당 2×10^6 개씩 꼬리 정맥으로 주사한 후 실시예6에서와 같이 종양 크기를 측정하 였다 (도 8 참조). 도 8에서와 같이, 수지상세포와 마찬가지로 T세포에도 caspase-8 또는 BIM 특이적 siRNA를 형질주입하여 T세포 내의 pro-apoptotic 인자인 BIM의 발현을 억제시킴으로써 T세포의 세포자멸을 억제하여 수 명을 연장시켜 종양 치료 효능이 증가 되는 것을 확인 할 수 있다.

[0104] **실시예 9 - 인간 BIM siRNA의 형질주입 확인**

[0105] 인간수지상세포를 확립하기 위해 사람의 말초혈액을 채혈하여 Ficoll-plus(Amersham biosciences)을 이용하여 림프구들을 분리하였다. 분리된 림프구들 중 수지상세포로 분화가 가능한 단핵구를 분리하기 위해 CD14 MicroBeads(milteny biotec)을 이용하여 CD14양성(CD14+)인 단핵구들을 분리하였다. 분리된 CD14양성 단핵구들 을 1000U/ml의 IL-4(peprotech)와 GM-CSF(peprotech)이 포함된 배양액(RPMI1640 배지, HyClone, 미국.)에서 2 일에 한번씩 새로운 배양액으로 교체해 주며 6일간 배양하여 단핵구들을 수지상세포로 분화시켰다. 하기 표 8의 인간 BIM siRNA(Bioneer, daejeon, Korea) 및 대조군으로 GFP siRNA를 각각 상기 인간 말초혈액에서 분화 시 킨 수지상세포에 5×10^5 세포당 3ug의 siRNA를 리포펙타민 2000 (Invitrogen, MD, USA)을 이용하여 형질 주입하여 형질전환된 수지상세포를 얻고, 형질 전환된 수지상세포에서 추출한 50ug의 단백질을 western blot을 통해 siRNA전달 효율을 확인하고 그 결과를 도 9에 나타내었다. 형질 전환된 수지상세포를 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 650 mM NaCl, 5% Triton X-100, 200 mM phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, 0.02 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM benzamidin)에 넣은 후 균질화시키고 13,000 xg에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 총 단백질 50 ug을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하여 분리한 후 membrane transfer시켰다. 1차 항체로 rabbit BIM polyclonal antibody (Santa Cruz), 2차 항체로 anti-rabbit Ig horseradish peroxidase-linked whole antibody (Amersham Biosciences, UK)를 반응시킨 후 ECL western blot detection reagent (Amersham Biosciences, UK)를 반응시켜 영상을 얻었으며 internal control 로 β -actin을 이용하였다.

[0106] [표 8] 수지상세포 형질 주입에 사용된 siRNA

[0107]

siRNA	Position	Sequence
BIM 특이적	406-428	sense 5'-CAGGCTGAACCTGCAGATATGCG-3' (서열번호: 6)
		antisense 5'-GTCCGACTTGGACGTCTATACGC-3'

[0108] **실시예 10 - 인간 BIM siRNA의 시험관 내 생존률 증강 여부 시험**

[0109] 실시예 9와 동일한 siRNA 형질주입법으로 BIM 또는 GFP siRNA가 형질 주입된 인간수지상세포의 시험관내 생존능을 DNA와 결합 하는 형광성 색소로, 세포막 손상을 입은 세포 자멸세포를 측정 가능한 PI (propidium iodide)(SIGMA)염색을 통해 확인하였다. 각각의 siRNA가 처리된 수지상세포를 GM-CSF가 결핍된 배양액에서 (1000U/ml의 IL-4가 첨가된 RPMI1640 배양액) 1, 3, 5일 동안 배양하며 세포 사멸을 PI 염색 이용하여 확인하였다. 보다 구체적으로, 1×10^6 개의 세포를 0.3ug/ml농도의 PI 용액에 넣어 4℃에서 5분간 염색 하여, 유세포분석기로 PI+세포들을 백분율로 나타내었다. 결과, GM-CSF가 결핍된 배양액에서 5일간 배양하였을 때 BIM siRNA가 형질 주입된 수지상세포의 생존률이 대조군에 비하여 역시 현저히 높은 것을 확인하였다.

[0110] **실시예 11 - 인간 BIM siRNA의 생체내 생존률 증강 여부 시험**

[0111] 실시예 9와 동일한 siRNA 형질주입법으로 BIM 또는 GFP siRNA가 형질 주입된 인간수지상세포의 생체내 생존률 확인을 위해 각각의 siRNA가 처리된 수지세포를 CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester, invitrogen)로 labeling후 면역결핍마우스 (SCID, Charles River Laboratories)의 발바닥에 근육주사로 면역 하고 48시간 후에 간, 정강이 림프절, 비장, 신장 그리고 폐조직을 cell strainer에 넣고 갈아 single cell로 분리 하여 얻은 생존해 있는 수지상세포들을 유세포 분석기를 이용하여 전체 중 CFSE+세포들을 백분율로 분석 확인하였다. 그 결과 도 10에서 보는 바와 같이 정강이 림프절과 비장에서 면역한 수지상세포들이 생존해 있는 것이 확인되었으며, BIM siRNA가 형질 주입된 수지상세포를 면역한 그룹의 마우스 조직에서 대조군에 비하여 1.5배 이상 많은 수지상세포가 생존해 있는 것이 확인되었다.

[0112] **실시예 12 - BIM 특이적 siRNA의 수지상세포 표현형변화에 미치는 영향 비교**

[0113] BIM siRNA가 형질주입된 수지상세포의 특성 분석을 위해 수지상세포의 기능과 직접적으로 관련이 있는 HLA DR (BD Bioscience), CD40 (BD Bioscience), CD80 (BD Bioscience), CD86 (BD Bioscience), 그리고 CD1 (BD Bioscience)의 발현을 유세포분석기로 분석하여 각 항체 +인 세포들의 형광 광도를 그래프로 나타낸 결과 도 11에서 보는 바와 같이 대조군인 GFP siRNA가 처리된 그룹이나 siRNA를 처리 하지 않은 그룹의 수지상세포와 BIM siRNA가 처리된 수지상세포 그룹의 표현형에는 변화가 없는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 인간 수지상세포에 siRNA형질 주입을 통해 수지상세포 특이적인 표면인자 발현에는 영향을 미치지 않음이 확인되었다.

도면의 간단한 설명

[0114] 도 1은 siRNA를 수지상세포주에 형질주입한 후 각 siRNA의 전달을 확인한 결과이다.

[0115] 도 2는 각 수지상세포주를 투여에 따른 항원 특이적 면역반응을 관찰한 결과이다.

[0116] 도 3은 BIM 또는 BAK/BAX 특이적 siRNA가 형질주입된 수지상 세포주 투여에 따른 항원 특이적 면역반응 증강 정도를 비교한 결과이다.

[0117] 도 4는 각 수지상세포주의 투여에 따른 세포자멸 억제능을 관찰한 결과이다.

[0118] 도 5는 각 수지상세포주의 투여에 따른 T 세포 활성화율을 세포내 IFN- γ 의 발현율로 나타낸 그래프이다.

[0119] 도 6은 각 수지상세포주 투여에 따른 종양 체적의 감소를 나타낸 그래프이다.

[0120] 도 7은 각 골수 유래 수지상세포주 투여에 따른 면역반응 증강 여부 및 항암 활성을 확인한 결과이다.

[0121] 도 8은 T세포 adoptive transfer 투여에 따른 종양 체적의 감소를 나타낸 그래프이다.

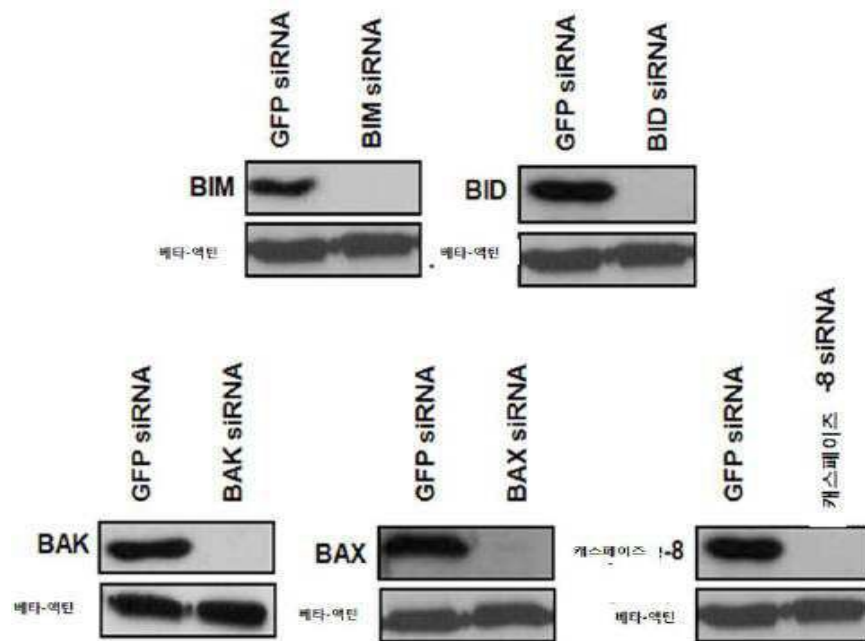
[0122] 도 9는 인간 단핵구 유래의 수지상세포에 BIM siRNA 형질 주입 후 siRNA의 전달을 확인한 결과이다.

[0123] 도 10은 인간 단핵구 유래의 수지상세포에 BIM siRNA 형질 주입 후 생체 내에서 생존률을 확인한 결과이다.

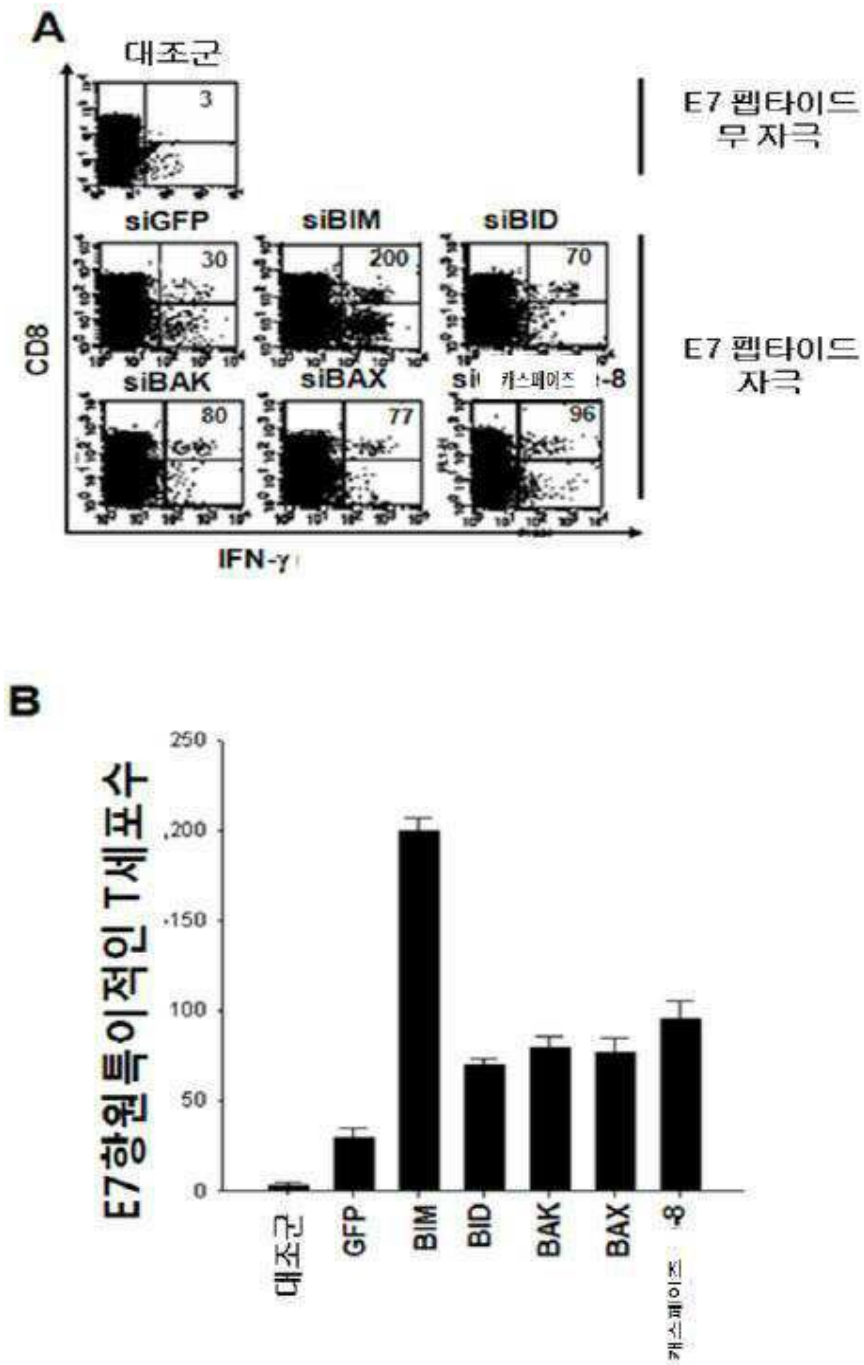
[0124] 도 11은 인간 단핵구 유래의 수지상세포에 BIM siRNA 형질 주입 후 수지상세포의 표현형변화 여부를 확인한 결과이다.

도면

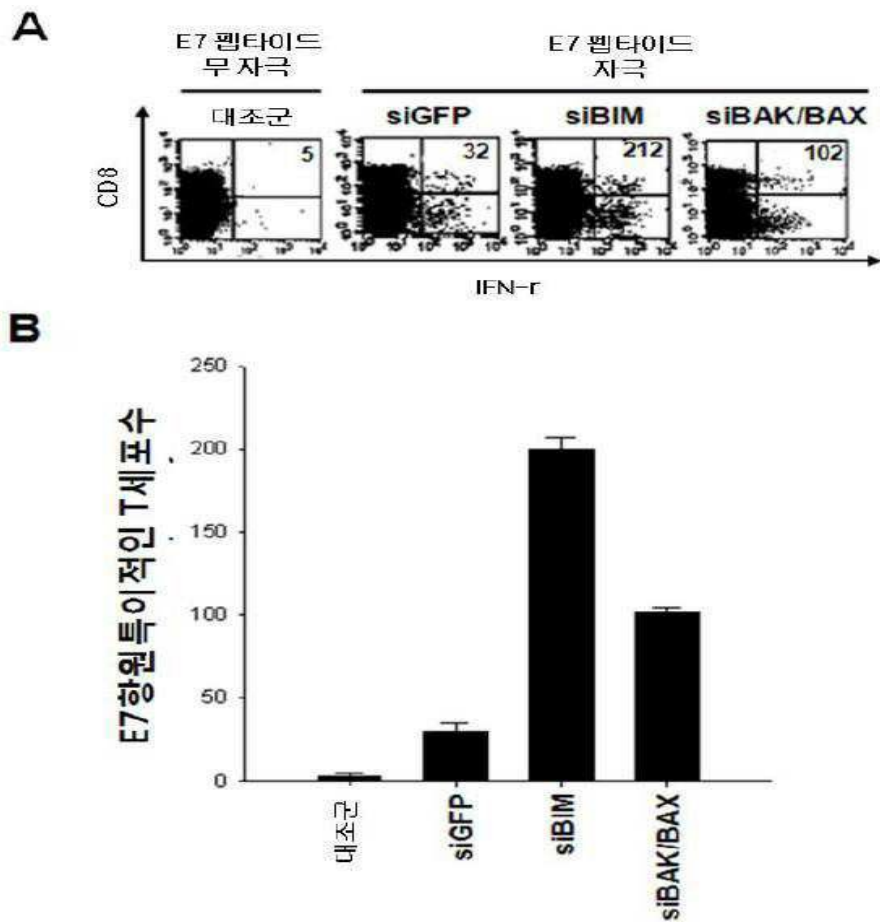
도면1



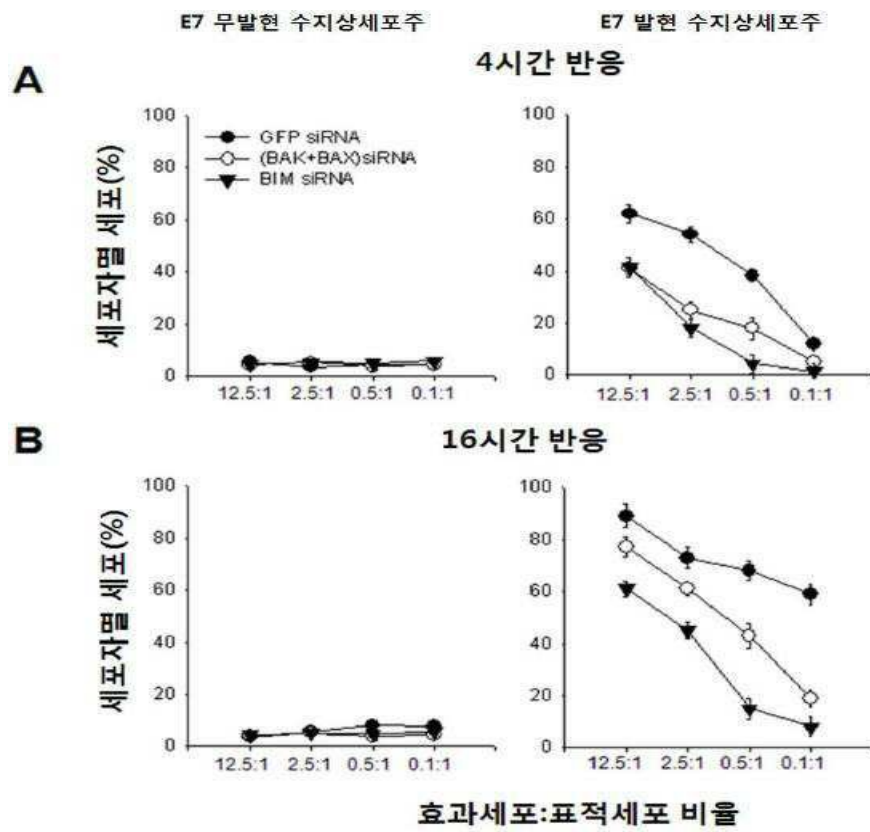
도면2



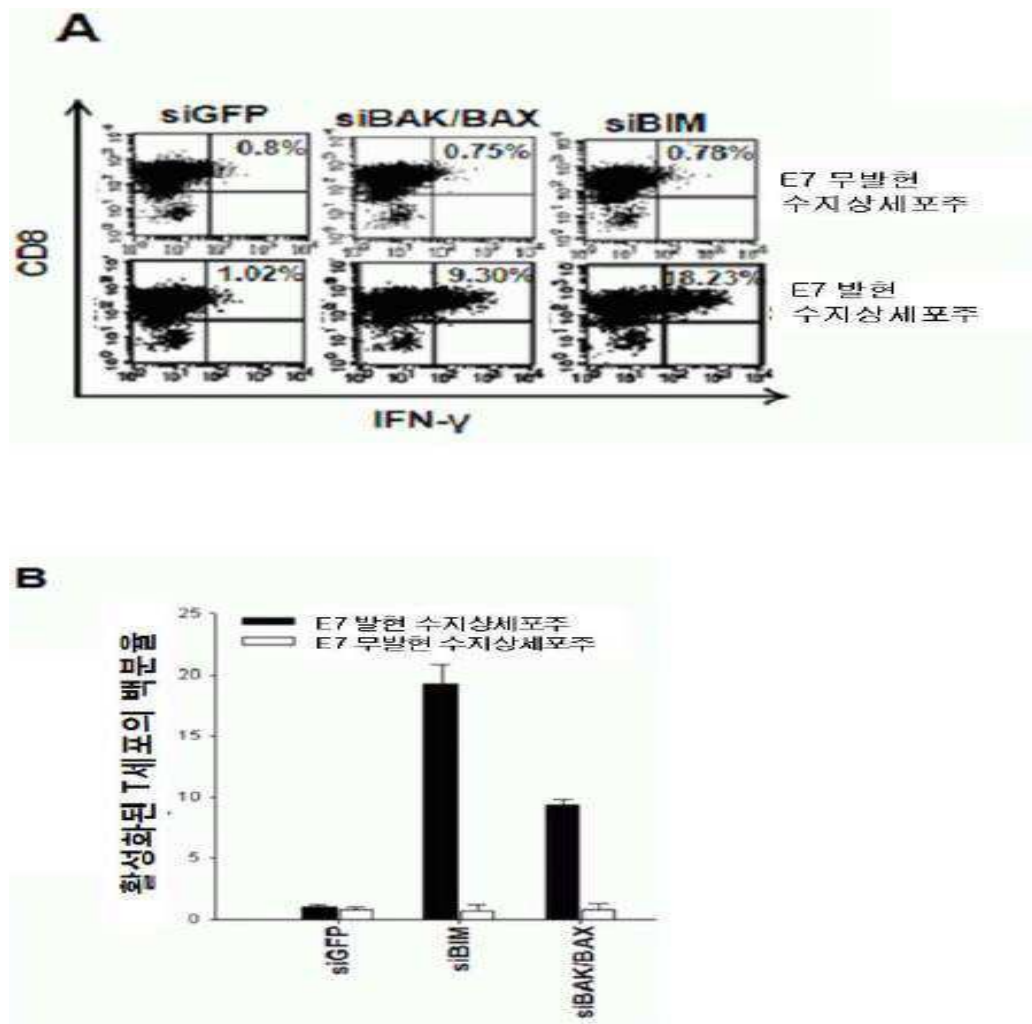
도면3



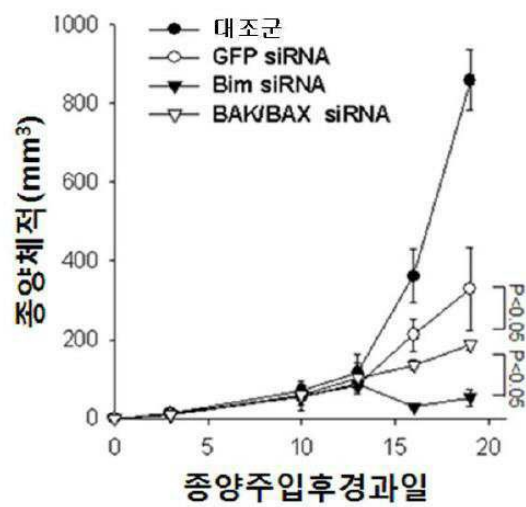
도면4



도면5



도면6

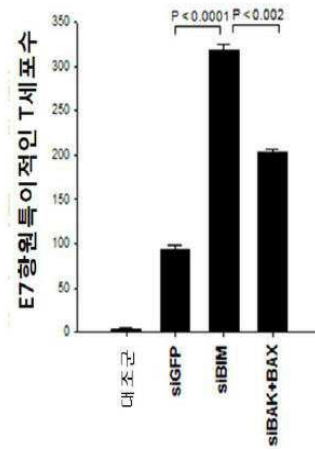


도면7

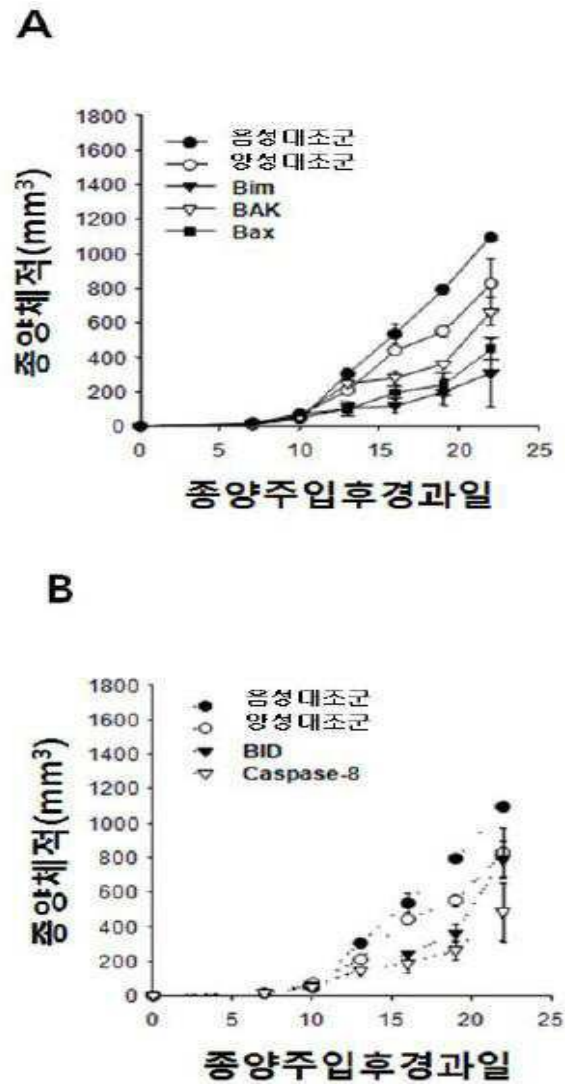
A



B



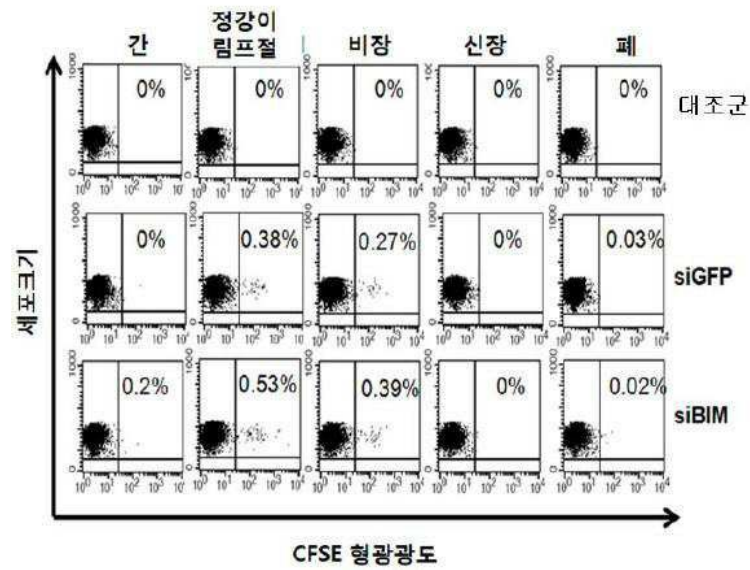
도면8



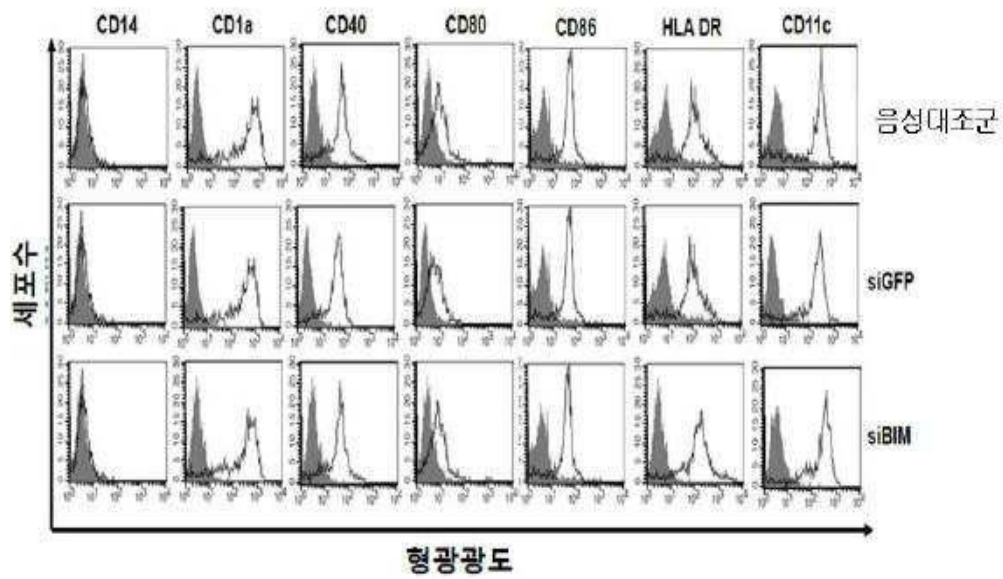
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
- <120> siRNA to inhibit CTL mediated apoptosis
- <130> P08-037-KRU
- <150> KR2008-0077875

<151> 2008-08-08

<160> 62

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 1

ggagggguguu ugcaaaug

18

<210> 2

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 2

aaggagggtg ttgcaaatg att

23

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>
<223> siRNA

<400> 3
gaccaccctc aaatgggttat ctt 23

<210> 4
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>
<223> siRNA

<400> 4
caccctcaaa tgggttatctt aca 23

<210> 5
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>
<223> siRNA

<400> 5
cagacagaac cgcaaggtaa tcc 23

<210> 6
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<220>
 <223> siRNA

<400> 6
 caggctgaac ctgcagatat gcg 23

<210> 7
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<220>
 <223> siRNA

<400> 7
 gagcccagca cccatgagtt gtg 23

<210> 8
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<220>
 <223> siRNA

<400> 8
cacccatgag ttgtgacaaa tca 23

<210> 9
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 9
gaccgagaag gtagacaatt gca 23

<210> 10
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 10
gaccacccac gaatggttat ctt 23

<210> 11
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 11

gucugacaca cugucuugg

19

<210> 12

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 12

tagccgcaca gttcatgaat ggc

23

<210> 13

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 13

aagcccttga tgaggtgaag aca

23

<210> 14

<211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Mus musculus

<220>
 <223> siRNA

<400> 14
 aactgcctgt gcaagcttac tgg 23

<210> 15
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Mus musculus

<220>
 <223> siRNA

<400> 15
 cagccgctcc ttcaaccaag gaa 23

<210> 16
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<220>
 <223> siRNA

<400> 16
gaggagcaca gtgcggattc tgt 23

<210> 17
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 17
cactcccgct tgggaagaat aga 23

<210> 18
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 18
caggcctacc ctagagacat gga 23

<210> 19
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>

<223> siRNA

<400> 19

cagggatgag tgcatacaaa acc

23

<210> 20

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<220>

<223> siRNA

<400> 20

gaggagctta gccagaaatg gga

23

<210> 21

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 21

tagagtgcc ggcaccctaa ctg

23

<210> 22

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 22

caggcctcca ggatccaaat ggg

23

<210> 23

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 23

aagggtgga ggacttatca gcc

23

<210> 24

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 24

gaccagcagc ccagagtatg ttc 23

<210> 25
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Mus musculus

<220>
 <223> siRNA

<400> 25
 gaaggcctgg aggacttgc agc 23

<210> 26
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<220>
 <223> siRNA

<400> 26
 aagggacttc ctcgcccga gag 23

<210> 27
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 27
gagccgagtg agcaggaaga ctc

23

<210> 28
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 28
gaggatgagt gacgagtttg tgg

23

<210> 29
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 29
caggctccgg caagcatcat cgc

23

<210> 30
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 30
aagctccagc tggacgcgag tct 23

<210> 31
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>
<223> siRNA

<400> 31
cagctgcctg ggattgctat aca 23

<210> 32
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>
<223> siRNA

<400> 32
tatggccaga gacgtcatca aga 23

<210> 33
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Mus musculus

<220>
 <223> siRNA

<400> 33
 caggagcatt actggctaag tgc 23

<210> 34
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Mus musculus

<220>
 <223> siRNA

<400> 34
 catgtcggag gcgagactta tgg 23

<210> 35
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 35
gaggtgccgg caccctaact gag

23

<210> 36
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 36
gaggagcagg agtgctcaat aaa

23

<210> 37
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 37
gatgccctcg gcaaagaatc tac

23

<210> 38
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 38
cagcctgggt ctggctttca tct 23

<210> 39
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 39
cacagcctgg gtctggcttt cat 23

<210> 40
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 40
gaggagaaat gtctgaagta aga 23

<210> 41
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Mus musculus

<220>
 <223> siRNA

<400> 41
 cagctgcctg ggattgctat aca 23

<210> 42
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Mus musculus

<220>
 <223> siRNA

<400> 42
 tatggccaga gacgtcatca aga 23

<210> 43
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Mus musculus

<220>
 <223> siRNA

<400> 43
caggagcatt actggctaag tgc 23

<210> 44
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>
<223> siRNA

<400> 44
gagtgcgtgg aaggcagaaa cca 23

<210> 45
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>
<223> siRNA

<400> 45
gaggtgccgg caccctaact gag 23

<210> 46
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<220>

<223> siRNA

<400> 46

cagcgcttg agcgatcgta gaa

23

<210> 47

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<220>

<223> siRNA

<400> 47

caggcggaac ttgtaggaac gcg

23

<210> 48

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<220>

<223> siRNA

<400> 48

aaccctgtgt ccttgagaa agc

23

<210> 49

<211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<220>
 <223> siRNA

<400> 49
 gagaaggaag tggagagtaa aga 23

<210> 50
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens

<220>
 <223> siRNA

<400> 50
 gagcgaggcc agcggtcatg tgc 23

<210> 51
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Mus musculus

<220>
 <223> siRNA

<400> 51
aacctggtat attcagtcac ttt 23

<210> 52
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>
<223> siRNA

<400> 52
aagaccttta aggagcttca ttt 23

<210> 53
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>
<223> siRNA

<400> 53
aacctggtat attcagtcac ttt 23

<210> 54
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 54

aaatgtaagc tggaagatga ctt

23

<210> 55

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 55

tacagggtca tgctctttaa gct

23

<210> 56

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<220>

<223> siRNA

<400> 56

aagggtcatg ctctatcaga ttt

23

<210> 57

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<220>

<223> siRNA

<400> 57

aatcacagac ttgacaaa gtt

23

<210> 58

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<220>

<223> siRNA

<400> 58

gagggtcgat catctattaa taa

23

<210> 59

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens

<220>

<223> siRNA

<400> 59

aagagcctgc tgaagataat caa

23

<210> 60
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapiens

<220>
<223> siRNA

<400> 60
caagagcctg ctgaagataa tca

23

<210> 61
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>
<223> siRNA

<400> 61
ugccuacgaa cucuucacc

19

<210> 62
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mus musculus

<220>

<223> siRNA

<400> 62

uauggagcug cagaggaug

19