



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0092117
(43) 공개일자 2025년06월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0185951
(22) 출원일자 2024년12월13일
심사청구일자 2024년12월13일
- (30) 우선권주장
1020230181864 2023년12월14일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
김윤기
대전광역시 유성구 대학로 291, 외국인교수아파트 A607
황현정
대전광역시 서구 월평북로 13 은뜰마을아파트 20 2동 1207호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
파도특허법인유한회사

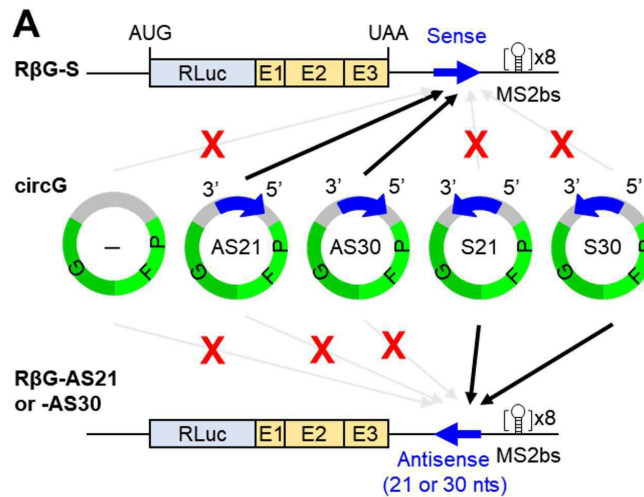
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 Circular RNA를 이용한 표적 mRNA 발현 저해

(57) 요약

본 발명은 표적 mRNA를 빠르게 분해하는 새로운 방법을 다루는 것으로서, 표적 mRNA 3' UTR에 EJC를 가지는 원형 RNA를 인위적으로 결합시켜 표적 mRNA의 선택적 분해를 통한 해당 유전자 발현을 감소시키는 기술이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/06 (2018.01)

C12N 2310/14 (2025.05)

C12N 2310/532 (2013.01)

(72) 발명자

부성호

서울특별시 중구 다산로 32 남산타운아파트 14동
1202호

신민경

서울특별시 동대문구 제기로 131 107동 1901호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711199645

과제번호 2022M3E5F1017965

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 Lariat-cap을 가지는 RNA를 이용한 백신 플랫폼 개발

과제수행기관명 한국과학기술원

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

표적 mRNA를 제거하기 위하여 표적 mRNA의 비번역 부위 (untranslated Region; UTR)에 상보적으로 결합할 수 있도록 세포 외에서 (*in vitro*) 합성하거나, 또는 세포 내에서 백스플라이싱 (back-splicing)을 통해 생성된, 원형 형태의 뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드는 RNA 또는 이를 코딩하는 DNA인, 뉴클레오타이드.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드는 상기 표적 mRNA의 3' 비번역 부위 (3' -untranslated Region; UTR)에 상보적으로 결합하는 것인, 뉴클레오타이드.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드는 상기 표적 mRNA의 종결 코돈으로부터 100 뉴클레오타이드 이상 떨어진 표적 mRNA에 상보적으로 결합하는 것인, 뉴클레오타이드.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 원형 형태의 뉴클레오타이드는 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 인자들과 결합하는 것인, 뉴클레오타이드.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 엑손 접합 복합체는 eIF4A3, MNL51, Y14, MAGOH 로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인, 뉴클레오타이드.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 원형 형태의 뉴클레오타이드는 circNMD를 유도하는 것인, 뉴클레오타이드.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 circNMD는 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)에 의한 것인, 뉴클레오타이드.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 circNMD는 상기 원형 형태의 뉴클레오타이드와 표적 mRNA에 각각 결합하는 RNA 결합 단백질 간의 상호결합

을 통해 상기 원형 형태의 뉴클레오타이드와 표적 mRNA를 결합시켜 유도되는 것인, 뉴클레오타이드.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 원형 형태의 뉴클레오타이드를 포함하는, 표적 뉴클레오타이드 제거용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드는 RNA 또는 이를 코딩하는 DNA인, 표적 뉴클레오타이드 제거용 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 원형 형태의 뉴클레오타이드를 포함하는, 표적 뉴클레오타이드를 제거하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드는 RNA 또는 이를 코딩하는 DNA인, 표적 뉴클레오타이드를 제거하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제9항의 원형 형태의 뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는, 세포사멸 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 세포사멸 관련 질환은, 자가면역질환, 뇌신경계 질환, 이식편대숙주 질환, 장기이식거부반응, 천식, 아토피, 또는 급성 또는 만성염증 질환인, 약학 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 뇌신경계 질환은 신경 퇴행성 질환 또는 신경 염증성 질환인, 약학 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 신경 퇴행성 질환 또는 신경염증성 질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 니만-피크병(Niemann-Pick disease), 프리온병(prion disease), 크로이츠펔트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 전두측두치매, 루이치매, 근위축성 측삭경화증(AlzAmyotrophic lateral sclerosis), 부신생물증후군(Paraneoplastic syndrome), 피질기저퇴행증, 다계통위축병, 진행성핵상마비, 신경계 자가면역질환, 척수 소뇌 실조(spino cerebell arataxia), 염증성 및 신경병증성 통증, 뇌혈관 질환, 척수 손상(spinal cord injury) 및 타우병증(tauopathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 약학 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제9항의 원형 형태의 뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 자가포식 (Autophagy) 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 자가포식 매개 질환은 암, 뇌신경계 질환, 당뇨, 심근세포사멸 질환, 비만 및 바이러스 감염으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 약학 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 암은 위암, 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 유방암, 전이암, 전립선암, 췌장암, 흑색종 또는 폐암인, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 4차 산업 관련 기술로서 차세대 바이오 의약품에 관한 것으로, 원형 RNA (Circular RNA)를 이용한 표적 mRNA 발현 저해에 관한 것이다. 구체적으로 첨단재생바이오재생법 제2조 제5호에서 정의한 첨단 바이오의약품으로서, 원형 RNA (Circular RNA)를 이용하여 표적 mRNA의 발현을 저해 또는 억제하기 위한 유전자치료제이다.

배경 기술

[0003] 진핵 세포내에서 발생하는 여러 생물학적 기능들 (biological function)은 DNA에서 mRNA로 mRNA에서 단백질로 이어지는 중심 원리 (central dogma)에 의해서 조절된다. 이 때, mRNA의 안정성과 품질 관리는 최종적으로 만들어지는 단백질의 양과 질을 결정하게 되는 요소로 작용하며, 세포 안에서 매우 엄격하게 조절된다.

[0004] 세포내에는 일반적으로 잘 알려져있는 5' cap과 3' poly(A) 꼬리 구조가 있는 선형 mRNA (linear RNA) 뿐만 아니라 동그란 형태의 RNA가 존재하며 이를 원형 RNA (circular RNA)라고 한다. 원형 RNA는 일반적인 스플라이싱 (splicing)이 아닌 백스플라이싱 (back splicing)이 일어나게 되었을 때 형성되며 선형 mRNA와 달리 5' cap과 3' poly(A) 꼬리를 가지고 있지 않아 엑소리보뉴클리아제 (exoribonuclease) 저항성을 가져 더욱 안정한 형태를 가진다.

[0005] 한편, 난센스 매개 mRNA 붕괴(Nonsense mediated mRNA decay; NMD)는 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 인자들과 난센스 매개 mRNA 붕괴 인자인 UPF1, UPF2, PNRC2 등 난센스 매개 mRNA 붕괴를 유도할 수 있는 단백질들이 복합체를 이루고 엔도리보뉴클라이제 (endoribonuclease)인 SMG6, 엑소리보뉴클리아제 (exoribonuclease)인 SMG5, SMG7 등에 의해 미성숙 종결코돈 (premature termination codon; PTC)을 갖는 잘못된 mRNA가 분해되는 기전이다.

[0006] 최근 마이크로 RNA (microRNA)와 같이 특정 질병에 관련된 유전자의 mRNA를 빠르게 분해하여 해당 유전자의 발현을 억제하는 기전이 치료제로써 적용될 수 있다는 가능성들이 제시되고 있어 mRNA 안정성 조절을 통한 질병 치료제 개발에 많은 관심과 연구가 집중되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 목적은 표적 mRNA에 3' 비번역 부위에 상보적으로 결합하여 상기 표적 mRNA를 분해하는 원형 RNA (Circular RNA)를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 원형 RNA를 유효성분으로 포함하는 세포사멸 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 원형 RNA를 유효성분으로 포함하는 자가포식 (Autophagy) 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0011]

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명에 기재된 다양한 실시예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하거나 모호하게 하지 않기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. 한 가지 실시예에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 실시예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 실시예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현한 실시예의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 실시예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 실시예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0015]

[0016] 본 발명에서는 염기서열을 기반으로 원형 RNA와 mRNA의 결합을 유도하였다. 이를 통해 EJC를 가지는 원형 RNA가 mRNA와 결합하면 NMD 현상이 유도되어 mRNA의 분해가 일어남을 밝혔으며 이러한 기작을 circNMD 라 명명하였다. 또한, 이처럼 염기서열을 기반으로 한 circNMD 현상 뿐 만 아니라, 다른 다양한 방법들을 통하여 결합을 유도했을 때도 circNMD 현상이 일어날 가능성이 있다.

[0017] 첫째, 원형 RNA와 mRNA에 각각 결합하는 RNA 결합 단백질 간의 상호결합을 통해 두 RNA를 결합시켜 circNMD를 유도한다. 구체적으로 도 10(i-iii)에서 나타난 바와 같이, 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)가 표적 mRNA의 3' UTR에 위치시키는 것이 circNMD 현상에서 중요하므로, 반드시 표적 mRNA에 상보적으로 결합하는 원형 형태의 RNA가 아니더라도 원형 형태의 RNA와 표적 mRNA에 각각 결합하는 다양한 RNA 결합 단백질 간의 다양한 상호결합을 통해 NMD가 활성화되는 circNMD 현상이 일어날 수 있다.

[0018] 둘째, *In vitro*에서 원형 RNA를 합성하고 인위적으로 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)가 위치하게 함으로써, 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)를 가지는 원형 RNA를 합성한다. 생산한 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)를 가지는 원형 RNA를 세포에 다시 도입시켜 circNMD를 유도한다. 인위적으로 EJC가 위치하게 하는 방법으로는, EJC 구성성분과 결합할 수 있는 RNA aptamer를 사용할 수 있다. 또는 dCas13과 퓨전(fusion)된 EJC구성 단백질, 상기 원형 RNA와 염기쌍 결합을 이룰 수 있는 가이드 RNA를 함께 발현하여 원형 RNA에 EJC를 위치하게 할 수 있다.

[0019]

[0020] 1. 표적 mRNA에 상보적으로 결합하여 상기 표적 mRNA를 분해하는 원형 RNA (Circular RNA)

[0021] 본 발명의 일 구현예에서는, 표적 mRNA에 상보적으로 결합하여 상기 표적 mRNA를 분해하는 원형 RNA (Circular RNA)를 제공한다.

[0022] 본 발명에서 상기 “원형 RNA (Circular RNA)” 라 함은, 일반적으로 잘 알려져 있는 5' cap과 3' poly(A) 꼬리 구조가 있는 선형 mRNA (linear RNA) 가 아니라 동그란 형태의 RNA가 존재하며 이를 원형 RNA (circular RNA)라고 한다. 원형 RNA는 일반적인 스플라이싱 (splicing)이 아닌 백스플라이싱 (back splicing)을 통해 형성되며 선형 mRNA와 달리 5' cap과 3' poly(A) 꼬리를 가지고 있지 않아 엑소리보뉴클리아제 (exoribonuclease) 저항성을 가져 더욱 안정하다.

[0023] 본 발명에서 상기 “표적 mRNA” 라 함은 특정 질병에 관련된 유전자의 mRNA 뿐만 아니라, 특정 유전자를 코딩하고 있는 RNA를 의미한다. 표적 RNA는 tRNA (transfer RNA), mRNA (messenger RNA), rRNA (ribosomal RNA), 다양한 small noncoding RNAs, long noncoding RNAs, virus/bacteria 등 병원체의 RNA genome 내지는 이들이 만들어내는 RNA 또는 인위적으로 유전자 재조합 방법에 의해 만들어지는 리보-폴리뉴클레오티드 (ribo-polynucleotide)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특히, 생명공학, 의학, 약학 등에 유용한 후보물질이나, 생체 내 작용을 일으키는 물질의 RNA 등일 수 있다. 구체적으로, 상기 표적 RNA는 자연적으로 존재하는 서열이거나 새로이 변형된 서열일 수 있고, 박테리오파지의 MS2 RNA, HIV 바이러스의 트랜스-활성 반응 요소 (Trans-activation response element; TAR) RNA, 또는 인간의 철-반응 요소 (iron-responsive element; IRE) RNA의 또

는 이의 변이형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 "표적 RNA"는 "타겟 RNA"와 혼용하여 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 일부 구현예에서, 상기 원형 RNA는 상기 표적 mRNA와 상보적인 결합을 하는 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 상보적인 결합은 선택적으로 적어도 하나 이상의 미스매치(mismatch) 결합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 원형 RNA는 상기 표적 mRNA와 혼성화하거나 상보적인 결합을 하는 서열로, 이때 상기 상보적인 결합은 0 내지 5개의 미스매치를 포함할 수 있다. 또는 상기 원형 RNA는 상기 표적 mRNA에 대해 적어도 70% 이상 상보적인 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.

[0026] 일 구현예로서, 상기 원형 RNA는 상기 표적 mRNA에 대해 적어도 70% 내지 75%, 적어도 70% 내지 80%, 적어도 70% 내지 85%, 적어도 70% 내지 90%, 적어도 70% 내지 95%, 적어도 70% 내지 100%, 적어도 75% 내지 80%, 적어도 75% 내지 85%, 적어도 75% 내지 90%, 적어도 75% 내지 95% 또는 적어도 75% 내지 100% 상보적인 서열일 수 있다. 또는 상기 원형 RNA는 상기 표적 mRNA에 대해 적어도 80% 내지 85%, 적어도 80% 내지 90%, 적어도 80% 내지 95%, 적어도 80% 내지 100%, 적어도 85% 내지 90%, 적어도 85% 내지 95% 또는 적어도 85% 내지 100% 상보적인 서열일 수 있다. 또는 상기 원형 RNA는 상기 표적 mRNA에 대해 적어도 90% 내지 95%, 적어도 90% 내지 100% 또는 적어도 95% 내지 100% 상보적인 서열일 수 있다. 또는 상기 원형 RNA는 상기 표적 mRNA에 대해 적어도 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 상보적인 서열일 수 있다.

[0027] 본 발명의 다른 구현예에서는, 표적 mRNA를 제거하기 위하여 표적 mRNA의 비번역 부위 (untranslated Region; UTR)에 상보적으로 결합할 수 있도록 세포 외에서 (*in vitro*) 합성하거나, 또는 세포 내에서 백스플라이싱 (back-splicing)을 통해 생성한 서열을 포함하는, 원형 형태의 뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명에서 제공하는 원형 형태의 뉴클레오타이드는 세포 외에서 (*in vitro*)에서 합성하여 세포에 주입하거나, 세포 내에서 백스플라이싱(back-splicing)을 통해서 발현되어도 표적 mRNA의 3' 비번역 부위에 결합함으로써 표적 mRNA를 제거할 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현예에서는 상기 뉴클레오타이드는 RNA 또는 이를 코딩하는 DNA인, 뉴클레오타이드를 제공한다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 상기 원형 RNA 또는 원형 형태의 뉴클레오타이드는 상기 표적 mRNA의 3' 비번역 부위 (Untranslated Region; UTR)에 상보적으로 결합하는 원형 RNA를 제공한다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 상기 뉴클레오타이드는 상기 표적 mRNA의 종결 코돈으로부터 100 뉴클레오타이드 이상 떨어진 표적 mRNA에 상보적으로 결합하는 것인, 뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명의 또 다른 구현예에서는 종결 코돈으로부터 150 뉴클레오타이드 이상, 200 뉴클레오타이드 이상, 250 뉴클레오타이드 이상, 300 뉴클레오타이드 이상 떨어진 표적 mRNA에 상보적으로 결합하는 것인, 뉴클레오타이드를 제공한다. 종결 코돈으로부터 너무 가까운 곳에 상보적으로 결합하는 경우, mRNA의 종결 코돈으로부터 50-55 뉴클레오타이드 뒤쪽에 존재하는 엑손 접합 복합체를 인지할 수 없기 때문에 mRNA의 양을 감소시킬 수 없다.

[0031] 본 발명에서 상기 "3' 비번역 부위 (Untranslated Region; UTR)"라 함은 번역 종결 코돈 뒤에 오는 메신저 RNA(mRNA) 부분을 의미하며, 상기 3' 비번역 부위에는 종종 전사 후 유전자 발현에 영향을 미치는 조절 영역이 포함되어 있다. 3'-비번역 부위 내의 조절 영역은 폴리아데닐화, 번역 효율성, 국소화 및 mRNA의 안정성에 영향을 미칠 수 있으며 3'-비번역 부위에는 조절 단백질과 마이크로 RNA (miRNA) 모두에 대한 결합 부위가 포함되어 있다. miRNA는 3'-비번역 부위 내의 특정 부위에 결합함으로써 번역을 억제하거나 전사체의 분해를 직접 유발함으로써 다양한 mRNA의 유전자 발현을 감소시킬 수 있다. 본 발명에 따른 원형 RNA는 상기 3'-비번역 부위에 결합함으로써 번역을 억제하거나 전사체의 분해를 직접 유발함으로써 다양한 mRNA의 유전자 발현을 감소시킬 수 있다. 3'-비번역 부위에는 억제 단백질에 결합하여 mRNA의 발현을 억제하는 침묵 영역도 존재한다. 3'-비번역 부위는 또한 단백질을 유인하여 mRNA를 세포골격과 결합시키거나, 이를 세포핵으로 또는 세포핵으로부터 운반하거나, 다른 유형의 국소화를 수행하는 서열을 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 상기 원형 RNA와의 결합을 통하여 상기 표적 mRNA에 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)가 결합할 수 있도록, 원형 RNA를 제공한다.

[0033] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 상기 원형 형태의 뉴클레오타이드는 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 인자들과 결합하는 것인, 뉴클레오타이드를 제공한다.

- [0034] 본 발명에서 상기 “엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)”는 RNA 스플라이싱 동안 함께 결합된 두 엑손의 접합부에 결합하는 단백질 복합체이다. 상기 엑손 접합 복합체는 번역, 감시, 결합된 mRNA의 위치 파악 및 m6A 메틸화에 큰 영향을 미치고 엑손 접합 복합체는 스플라이싱 중에 먼저 mRNA에 침착된 다음 세포질로 운반된다. 그곳에서 엑손 접합 복합체는 mRNA의 전사 후 조절에 중요한 역할을 한다. 엑손 접합 복합체는 mRNA 경로에 필요한 다른 요소에 대한 결합 플랫폼 역할을 하는 안정적인 이중사량체 코어로 구성된다. 엑손 접합 복합체의 핵심에는 아데노신 삼인산(ATP) 유사체에 결합된 단백질 진핵 개시 인자 eIF4A3(DEAD-box RNA 헬리카제)과 추가 단백질인 MAGOH, MLN51 및 Y14가 포함되어 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 상기 엑손 접합 복합체는 eIF4A3, MNL51, Y14, MAGOH 로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인, 뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0036] 즉, 진핵 세포내에서 전사 과정을 통해 DNA에서 mRNA가 만들어지면, 다양한 인자들에 의해서 해당 mRNA의 안정성이 결정된다. mRNA의 구조, 염기서열, mRNA 결합 단백질, 그리고 internal RNA 변형 등을 비롯한 다양한 요소들에 의하여 mRNA 안정성이 달라지며 mRNA의 안정성은 유전자 발현의 조절로 이어진다.
- [0037] 본 발명에서는 표적 mRNA를 빠르게 분해하는 새로운 방법에 대하여 다루고 있다. 엑손 접합 복합체가 결합되어 있는 원형 RNA (EJC loaded circular RNA) 또는 원형 형태의 뉴클레오타이드가 표적 mRNA의 3' 비번역 부위에 결합할 경우 해당 mRNA가 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)의 표적이 되어 빠르게 분해되고 그 결과 해당 유전자의 발현 감소를 유도할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 상기 엑손 접합 복합체는, 상기 원형 RNA와 결합하는 것인, 원형 RNA를 제공한다.
- [0039] 본 발명에서는 RNA 안정성을 실험적으로 확인할 수 있는 표적 리포터 mRNA와 해당 리포터 mRNA의 3' UTR에 상보적으로 결합할 수 있는서열을 가지며 엑손 접합 복합체를 가지는 원형 RNA를 제작하였다. 즉, 엑손 접합 복합체를 가지는 원형 RNA를 인위적으로 표적 mRNA의 3' 비번역 부위에 결합시켜 해당 mRNA를 빠르게 분해하는 리포터 시스템을 구축하였고, 이를 HeLa 세포주에 도입하였다. 그 후, quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 실험법을 통하여 mRNA의 양을 정량적으로 관찰하였다. 그 결과 표적 mRNA의 3' 비번역 부위에 결합하는 원형 RNA에 의해서 표적 mRNA가 빠르게 분해되는 것을 발견하였다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 구현예에서는 상기 엑손 접합 복합체는 eIF4A3, MNL51, RNPS1, Y14, SRm160, Aly/REF, Magoh, DEK로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인, 원형 RNA를 제공한다,
- [0041] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 상기 원형 형태의 뉴클레오타이드는 circNMD를 유도하는 것인, 뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0042] 본 발명에서 상기 “circNMD”라 함은 EJC를 가지는 원형RNA가 mRNA와 결합하면 NMD 현상이 유도되어 mRNA의 분해가 일어나는 기작을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서는 염기서열을 기반으로 원형 RNA와 mRNA의 결합을 유도하였다. 이를 통해 원형RNA가 mRNA와 결합하면 NMD 현상이 유도되어 mRNA의 분해가 일어나는 기작을 밝혔으며 이러한 기작을 circNMD라 명명하였다. 또한, 이처럼 염기서열을 기반으로 한 circNMD 현상 뿐 만 아니라, 다른 다양한 방법들을 통하여 결합을 유도했을 때도 circNMD 현상이 일어날 가능성이 있다.
- [0043] 첫째, 원형 RNA와 mRNA에 각각 결합하는 RNA 결합 단백질 간의 상호결합을 통해 두 RNA를 결합시켜 circNMD를 유도한다. 구체적으로 도 10(i-iii)에서 나타난 바와 같이, 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)가 표적 mRNA의 3' UTR에 위치시키는 것이 circNMD 현상에서 중요하므로, 반드시 표적 mRNA에 상보적으로 결합하는 원형 형태의 RNA가 아니더라도 원형 형태의 RNA와 표적 mRNA에 각각 결합하는 다양한 RNA 결합 단백질 간의 다양한 상호결합을 통해 NMD가 활성화되는 circNMD 현상이 일어날 수 있다.
- [0044] 둘째, *In vitro*에서 원형 RNA를 합성하고 인위적으로 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)가 위치하게 함으로써, 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)를 가지는 원형 RNA를 합성한다. 생산한 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)를 가지는 원형 RNA를 세포에 다시 도입시켜 circNMD를 유도한다. 인위적으로 EJC가 위치하게 하는 방법으로는, EJC 구성성분과 결합할 수 있는 RNA aptamer를 사용할 수 있다. 또는 dCas13과 퓨전(fusion)된 EJC구성 단백질, 상기 원형 RNA와 염기쌍 결합을 이룰 수 있는 가이드 RNA를 함께 발현하여 원형 RNA에 EJC를 위치하게 할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 상기 circNMD는 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)에 의한 것인, 뉴클레오타이드를 제공한다.

- [0046] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 상기 표적 mRNA 분해는 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)에 의한 것인, 원형 RNA를 제공한다.
- [0047] 본 발명에서 상기 “난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)”는 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 인자들과 난센스 매개 mRNA 붕괴 인자인 UPF1, UPF2, PNRC2 등 난센스 매개 mRNA 붕괴를 유도할 수 있는 단백질들이 복합체를 이루고 엔도리보뉴클라아제 (endoribonuclease)인 SMG6, 엑소리보뉴클라아제 (exoribonuclease)인 SMG5, SMG7 등에 의해 미성숙 종결코돈 (premature termination codon; PTC)을 갖는 잘못된 mRNA가 분해되는 기전이다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 구현예에서는, 상기 circNMD는 상기 원형 형태의 뉴클레오타이드와 표적 mRNA에 각각 결합하는 RNA 결합 단백질 간의 상호결합을 통해 상기 원형 형태의 뉴클레오타이드와 표적 mRNA를 결합시켜 유도되는 것인, 뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 구현예에서는 상기 원형 형태의 뉴클레오타이드를 포함하는, 표적 뉴클레오타이드 제거용 조성물을 제공한다.
- [0051] *본 발명의 또 다른 구현예에서는 상기 뉴클레오타이드는 RNA 또는 이를 코딩하는 DNA인, 표적 뉴클레오타이드 제거용 조성물을 제공한다.
- [0052]
- [0053] 본 발명의 일 구현예에서는, 전술하는 원형 형태의 뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는, 표적 뉴클레오타이드를 제거하는 방법을 제공한다. 상기 뉴클레오타이드를 세포 외에서 제작하여 세포에 투여, 세포 내에서 발현 또는 대상체에 투여하면 표적 뉴클레오타이드를 효과적으로 제거할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일 구현예에서는, 상기 뉴클레오타이드는 RNA 또는 이를 코딩하는 DNA인, 표적 뉴클레오타이드를 제거하는 방법을 제공한다.
- [0055]
- [0056] **2. 상기 원형 RNA를 유효성분으로 포함하는 세포사멸 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물**
- [0057] 본 발명의 일 구현예에서는 상기 원형 RNA를 유효성분으로 포함하는 세포사멸 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 일 구현예에서는 원형 형태의 뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 세포사멸 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0059] 본 발명에서 제공하는 상기 원형 RNA는 세포사멸과 관련된 *BCL2L11* 유전자와 상보적으로 결합하여, 상기 단백질의 발현을 억제함으로써, 세포사멸을 감소시킨다.
- [0060] 본 발명에서 상기 *BCL2L11* 유전자에 의해 암호화된 단백질은 BCL-2 단백질 계열에 속하고, BCL-2 계열 구성원은 이종이량체 또는 동종이량체를 형성하고 다양한 세포 활동에 관여하는 항 세포사멸 조절자 또는 세포사멸 촉진 조절자 역할을 한다. 이 유전자에 의해 암호화된 단백질은 Bcl-2 상동성 도메인 3(BH3)을 포함하고 이는 BCL2, BCL2L1/BCL-X(L) 및 MCL1을 포함한 BCL-2 단백질 계열의 다른 구성원과 상호작용하고 세포사멸 활성화제로 작용하는 것으로 나타났다. 이 유전자의 발현은 신경 성장 인자(NGF)뿐만 아니라 포크헤드 전사 인자 FKHR-L1(FoxO3a)에 의해 유도될 수 있는데, 이는 신경 세포 및 림프구 세포사멸에서 이 유전자의 역할을 시사한다. 마우스 대응물에 대한 형질전환 연구에서는 이 유전자가 흉선세포 음성 선택에서 세포사멸의 필수적인 개시자로서 기능한다는 것을 시사한다.
- [0061] 본 발명에서 상기 “세포 사멸 (Apoptosis)”은 예정된 단계를 통해 세포가 자연적으로 죽는 경우를 말한다. 상기 세포자살, 세포자멸사, 또는 세포 사멸 (Apoptosis)은 다세포 생물체에서 볼 수 있는 세포예정사 (Programmed cell death)의 일종이다. 세포자살은 세포 형태와 내부의 생화학적 변화로 말미암아 세포가 죽는 것으로 정리된다. 이 과정은 세포의 팽창과 균열, 세포막의 변화, 핵 단편화, 염색질 응축과 염색체 절단, 그리고 해당 세포가 다른 세포에게 먹혀 처리되는 것으로 끝난다. 갑작스럽게 세포가 피해를 입어 야기되는 세포사인 괴사(Necrosis)와 대조적으로 세포자살은 생물체에 해를 끼치지 않으며 생명주기에 유익한 것이다. 인간 배 (胚, embryo)의 분화 과정에서 손가락과 발가락, 각 10개의 형성은 세포자살이 작용하는 대표적 사례이다. 세포

질에 있는 많은 단백질들이 세포자살 경로에 관여하고(CAD 단백질), 이들은 정상 상태에서 억제자와 결합해있다가 세포자살 유발 물질에 의해 활성화된다.

[0062]

[0063]

본 발명의 다른 구현예에서는, 상기 세포사멸 관련 질환은, 자가면역질환, 이식편대숙주 질환, 장기이식 거부반응, 천식, 아토피, 또는 급성 또는 만성 염증 질환인, 약학 조성물을 제공한다.

[0064]

실제 세포 안에 존재하는 mRNA와 circular RNA도 같은 현상이 일어나는지 알아보기 위하여, 마이크로어레이와 RNA in situ conformation sequencing (RIC-seq) data 분석을 통해 세포 안에서 서로 결합할 가능성이 높은 mRNA와 원형 RNA 후보들을 찾았다. 그 중에서 BCL2L1 mRNA는 hsa_circ_0002082 또는 hsa_circ_0008496과 같은 본 발명에서 제공하는 원형 RNA와의 결합을 통하여 mRNA 안정성이 감소되며, 이를 통해 세포 사멸 (apoptosis) 과 같은 세포내 기능에도 영향을 미치는 것을 확인하였다.

[0065]

신경세포는 체내의 다른 세포와는 달리 생성된 세포의 절반 가량이 발생단계동안 죽는다. 이는 제한된 trophic factor에 대한 경쟁의 결과로 synaptic terminal에서 표적 뉴론과 정확한 시냅스 연결을 이루는 세포만 선별적으로 생존하게 되기 때문으로 알려져 있다. 또한 성체의 뇌에서 생존조건의 악화시 (예: 외부의 스트레스) 많은 신경세포들이 죽는 것이 배양신경세포나 *in vivo* 뇌의 관찰을 통한 연구에서 보고되어 있는데, 많은 경우 이것은 세포사멸 기전에 의한다는 것이 확인되었다. 그러므로 이와 같은 세포사멸 기전에 따라 발생하는 상기 신경 퇴행성 질환 또는 신경 염증성 질환에 대하여 본 발명에서 제공하는 원형 RNA가 세포사멸을 억제함으로써 예방 및 치료 효과를 발휘할 수 있으며, 상기 신경 퇴행성 질환 또는 신경 염증성 질환에는 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 니만-피크병(Niemann-Pickdisease), 프리온병(prion disease), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 전두측두 치매, 루이치매, 근위축성 측삭경화증(AlzAmyotrophiclateral sclerosis), 부신생물증후군(Paraneoplastic syndrome), 피질거저퇴행증, 다계통위축병, 진행성핵상마비, 신경계 자가면역질환, 척수 소뇌 실조(spinocerebell arataxia), 염증성 및 신경병증성 통증, 뇌혈관 질환, 척수 손상(spinal cord injury) 및 타우병증(tauopathy)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066]

본 발명에서 상기 “자가면역질환”은 자가 면역으로 나타나는 질병이다. 즉, 정상적인 화학 물질과 신체의 일부 세포들에 대해 면역계가 잘못된 반응을 일으킨 것이다. 바꾸어 말하면 면역반응이 실수를 한 것으로 건강한 세포를 해롭게 보고 그들을 공격하여 세포사멸 등을 일으키는 것이다. 본 발명에서 제공하는 원형 RNA는 세포사멸을 억제함으로써 건강한 세포에 대해서 세포사멸을 일으키는 상기 자가면역 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 상기 자가면역 질환에는 류마티스 관절염뿐만 아니라 1형 당뇨병(인슐린 의존성), 전신성 루푸스, 크론병, 건선 등이 있다.

[0067]

[0068]

3. 상기 원형 RNA를 유효성분으로 포함하는 자가포식 (Autophagy) 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

[0069]

본 발명의 일 구현예에서는, 상기 원형 RNA를 유효성분으로 포함하는 자가포식 (Autophagy) 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0070]

본 발명에서 상기 “자가포식(Autophagy)”은 진핵생물 세포 내에서 일어나는 생명현상으로, 세포 구성 요소의 파괴 및 재활용을 통해 세포의 항상성을 유지하는 생명현상 중 하나이며 세포 내 구성요소가 오토파고솜 (autophagosome)이라는 이중막에 집합되고, 리소솜(lysosome)에 의해 분해되는 전반적인 과정을 일컫는 용어이다.

[0071]

본 발명에서는 세포 내에 자연적으로 존재하는 ATG5나 ATG7 mRNA와 결합하는 서열을 갖는 원형 RNA를 제작하여 세포 안에서 인위적으로 과발현시킨 결과, 해당 mRNA의 안정성이 빠르게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 이 과정을 통해 자가포식(autophagy)이라는 세포 내 기능이 억제되는 효과를 확인하였다.

[0072]

상기 자가포식(autophagy)은 외부의 다양한 스트레스 환경에서 세포 내부의 불필요하거나 기능을 하지 못하는 단백질, 세포소기관, 영양소 등을 라이소솜(lysosome)에 의해 분해시켜 세포의 항상성을 유지하기 위한 세포 내 분해기전이다. 세포의 항상성 유지에 중요한 기능을 하는 자가포식은 다양한 동물모델 및 인체 유래 질환모델 연구를 통하여 암, 퇴행성 뇌질환, 당뇨, 노화 등 여러 질병과 밀접한 연관성을 가지고 있다는 것이 알려져 있다. 따라서 자가포식의 조절은 관련된 여러 질병을 치료할 수 있는 새로운 약물 작용점 및 치료법 개발을 위한 중요한 타겟으로 관심을 받고 있다. 특히 자가포식은 암의 발생과 성장에 있어 정상세포에서는 암의 형성을 억

제하는 기능을 나타내고 있으며 암이 형성된 이후에는 오히려 암의 성장 및 항암치료에 저항성을 나타내는 역할을 하는 것으로 알려짐에 따라 암의 발생과 단계에 따른 자가포식의 정밀한 조절기전의 이해 및 조절 물질 개발이 큰 관심을 받고 있다. 또한 암줄기 세포(Cancer Stem Cell)의 유지, 생성, 분화의 과정에서 다른 세포들과 달리 자가포식 활성화에 크게 의존하는 것이 최근 연구를 통하여 알려짐으로써 자가포식의 조절은 항암치료의 새로운 패러다임을 제공해 줄 것으로 기대되고 있다.

[0073] 본 발명의 다른 구현예에서는, 상기 자가포식 매개 질환은 암, 뇌신경계 질환, 당뇨, 심근세포사멸 질환, 비만 및 바이러스 감염으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 약학 조성물을 제공한다.

[0074] 본 발명에 있어서, 심근세포사멸 질환은 심근 세포의 사멸로 인한 심혈관계 질환을 의미한다. 이는 심장 및 혈관 등의 순화계통 질환의 통칭으로 고혈압, 허혈성 심장질환, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 뇌졸중, 부정맥 등이 있으며, 연령, 당뇨, 비만, 흡연 등에 의해 발생한다. 정상적인 심혈관계 기능을 위해 자가포식은 반드시 필요한 세포 기전이나, 과도한 자가포식은 상기 질환을 유발할 수 있다.

[0075] 본 발명에 있어서, 암(cancer)은 악성 종양으로서 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리를 의미한다. 상기 암의 예로서, 상기 암은 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상이며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0076] 본 발명의 또 다른 구현예에서는 상기 뇌신경계 질환은 신경 퇴행성 질환 또는 신경 염증성 질환인, 약학 조성물을 제공한다.

[0077] 본 발명의 또 다른 구현예에서는 상기 신경 퇴행성 질환 또는 신경 염증성 질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 니만-피크병(Niemann-Pick disease), 프리온병(prion disease), 크로이츠펔트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 전두측두치매, 루이치매, 근위축성 측삭경화증(AlzAmyotrophic lateral sclerosis), 부신생물증후군(Paraneoplastic syndrome), 피질기저퇴행증, 다계통위축병, 진행성핵상마비, 신경계 자가면역질환, 척수 소뇌 실조(spinocerebell arataxia), 염증성 및 신경병증성 통증, 뇌혈관 질환, 척수 손상(spinal cord injury) 및 타우병증(tauopathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 약학 조성물을 제공한다.

[0078]

[0079] 또한, 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0080] 한편, 이에 제한되지 않으나, 상기 질환의 예방 또는 치료 방법은 하나 이상의 질환에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 투여하는 것을 더 포함하는 병용 요법일 수 있다.

[0081] 본 발명에서 상기 "병용"은 동시, 개별 또는 순차 투여를 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 상기 투여가 순차 또는 개별적인 경우, 2차 성분 투여의 간격은 상기 병용의 이로운 효과를 잃지 않도록 하는 것이어야 한다.

[0082] 본 발명에서 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0083] 본 발명에서 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들

어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[0084] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0085] 본 발명에 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 안구에 직접 투여하거나, 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 안구에 직접 투여하는 것이 더 바람직하다.

[0086] 본 발명에서 상기 "비경구"란, 안구에 직접 투여하거나, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다. 안구에 직접 투여하는 것이 바람직하다.

[0087] 본 발명의 조성물의 "용법 및 용량"은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[0088] 본 발명에서 제공하는 원형 형태의 뉴클레오타이드는 유전물질의 발현에 영향을 주기 위하여 투여하는 것으로서, 원형 형태의 뉴클레오타이드를 함유한 의약품이다. 구체적으로 인체 또는 대상체에 전달하고자 하는 유전물질(원형 형태의 뉴클레오타이드)이 유효성분에 해당하며, 체내에서 유전자 편집을 일으킬 수 있다.

발명의 효과

[0090] 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)를 가지는 원형 RNA를 이용한 표적 mRNA 분해 촉진 기술은 결합하는 염기서열의 수정을 통해 손쉽게 원하는 표적 mRNA를 특정할 수 있다는 것과, 세포 내 존재하는 엑소리보뉴클리아제 (exoribonuclease)에 저항성이 있는, 즉 선형 RNA 보다 더욱 안정한, 원형 형태의 RNA를 이용한다는 장점이 있다. 따라서 mRNA 안정성 조절을 기반으로 한 치료제 기술 개발에 큰 효용가치가 있을 것으로 기대된다.

[0091] 또한, 본디 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)는 3' UTR에 결합하지 아니하며, 3' UTR이 아닌 곳에 결합하면 NMD가 일어나지 아니한다. 그러나 세포 내에서 DNA로부터 RNA가 전사 (transcription)과정을 통해 생성된 후, 백스플라이싱 (back-splicing)을 통해 원형 RNA가 생성되는 경우, 자연스럽게 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)가 원형 RNA에 결합된다. 이 원형 RNA가 표적 mRNA의 3' UTR에 결합할 수 있는 경우, NMD가 활성화되어 목표로 하는 표적 mRNA를 특이적으로 분해할 수 있다.

[0092] 구체적으로 첫째, 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)를 가지는 원형 RNA의 선형 RNA 결합부위를 수정함으로써, 표적 mRNA의 한계 없이 원하는 모든 mRNA를 표적하는 것이 가능하다. 즉, mRNA의 염기서열을 알기만 하면 모든 mRNA를 선택적으로 표적 할 수 있다.

[0093] 둘째, 원형 RNA를 이용하기 때문에 안정성이 높다. 원형 RNA는 엑소리보뉴클리아제 (exoribonuclease)에 저항성이 있으므로 선형 RNA보다 안정성이 높다. 따라서 원형 RNA를 이용하는 것은 선형 RNA를 이용하는 것 보다 치료물질의 안정성 면에서 뛰어나다.

[0094] 셋째, mRNA 안정성 조절을 기반으로 한 치료 기술 개발에 도움이 될 수 있다. 인위적으로 만든 원형 RNA를 이용하여 표적 mRNA를 특이적으로 분해함으로써, 각종 질병의 치료제 개발이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0096]

도 1a는 실시예 1-1의 실험 모식도를 나타낸 것이다.

도 1b는 선형 리포터 mRNA와 결합하는 원형 이펙터 RNA (circular effector RNA)가 선형 리포터 mRNA와 함께 존재할 때 그 선형 리포터 mRNA의 양이 감소함을 보여주는 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 1c는 도 1b와 동일한 실험을, 결합 염기 서열의 방향을 바꾸어 실험한 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 2a는 실시예 1-2의 실험 모식도를 나타낸 것이다.

도 2b는 선형 리포터 mRNA에 결합되어 있는 원형 이펙터 RNA (circular effector RNA)의 상대적 양을 도시한 것이다.

도 3a는 실시예 2의 실험 모식도를 나타낸 것이다.

도 3b는 원형 이펙터 RNA (circular effector RNA)가 다양한 부위에 결합하는 각 선형 리포터 mRNA와 함께 존재할 때, 각 선형 리포터 mRNA의 양 변화를 보여주는 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 4a는 실시예 3의 실험 모식도를 나타낸 것이다.

도 4b는 정제된 리포터 mRNA와 결합하는 다양한 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 인자들의 웨스턴 블롯팅 실험결과를 나타낸 것이다.

도 4c는 eIF4A3로 번역 침강되었음을 확인한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 것이다.

도 4d는 eIF4A3로 번역 침강했을 때 결합되어 있는 원형 이펙터 RNA의 양을 나타낸 것이다.

도 4e는 eIF4A3로 번역 침강했을 때 결합하고 있는 선형 리포터 mRNA의 양을 나타낸 것이다.

도 5a는 난센스 매개 mRNA 붕괴(Nonsense mediated mRNA decay; NMD) 인자들을 감소시켰을 때 나타나는 선형 리포터 mRNA양 변화를 관찰한 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 난센스 매개 mRNA 붕괴(Nonsense mediated mRNA decay; NMD) 주요인자 감소에 따른 선형 리포터 mRNA 안정성 변화를 관찰한 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 5c는 NMD 주요인자 감소에 따른 선형 리포터 mRNA 안정성 변화를 결합 염기 서열의 방향을 바꾸어 진행한 실험 결과이다.

도 6a는 실시예 5에서 실시한 마이크로어레이 실험 모식도를 나타낸 것이다.

도 6b는 마이크로어레이를 통해 찾은 선형 RNA 개수와 원형 RNA의 개수를 보여주는 벤 다이어그램이다.

도 6c는 RIC-seq을 통해 동정한 mRNA와 원형 RNA 사이의 결합 쌍을 나타낸 것이다.

도 7a는 siRNA를 이용하여 각 원형 RNA 양을 감소시킨 경우, 표적하는 BCL2L11 mRNA의 양을 나타내는 실험 결과이다.

도 7b는 원형 RNA를 감소시킨 후, 세포사멸 된 세포 비율을 정량적으로 나타낸 그래프이다.

도 7c는 원형 RNA를 감소시킨 후 세포사멸 된 세포를 염색한 이미지를 나타낸 것이다.

도 8a는 실시예 6-2에서 제작한 원형 이펙터 RNA 모식도를 나타낸 것이다.

도 8b는 원형 RNA를 과발현 했을 때, BCL2L11 mRNA의 양을 나타낸 것이다.

도 8c는 원형 RNA를 과발현시키고 세포사멸이 발생한 세포 비율을 정량적으로 나타낸 그래프를 나타낸 것이다.

도 8d는 원형 RNA를 과발현시키고 세포사멸 된 세포를 염색한 이미지를 나타낸 것이다.

도 9a는 ATG5 mRNA 3' UTR에 결합하도록 제작한 두 원형 이펙터 RNA 모식도이다.

도 9b는 두 종류의 원형 이펙터 RNA를 각각 그리고 함께 발현시켰을 때 ATG5 mRNA의 양이 감소하며, 두 종류의 원형 이펙터 RNA를 함께 넣어주었을 때 그 효과가 더욱 강화됨을 나타내는 실험 결과이다.

도 9c는 mRNA가 감소함에 따라 해당 단백질의 양도 감소하며, 그로 인해 자가 포식 현상이 억제되는 것을 보여

주는 실험 결과이다.

도 10은 본 발명을 나타내는 모식도이다. 구체적으로 도 10(i)는 기존에 알려진 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)를 나타낸 것이고, 도 10(ii)는 본 발명에서 제공하는 원형 형태의 RNA가 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)와 함께 표적 RNA의 3' 비번역 부위 (3' -untranslated Region; UTR)에 결합하여 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)를 활성화시키는 것을 나타낸 그림이다. 이러한 현상을 본 명세서에서 circNMD이라고 명명하였다. 도 10(iii)는 본 발명에서 제공하는 원형 형태의 RNA와 표적 mRNA에 공통적으로 결합하는 RNA 결합 단백질을 매개로 두 RNA를 결합시켜 circNMD를 유도하는 것을 나타낸 그림이다.

도 11은 선형 리포터 mRNA와 원형 이펙터 RNA 결합을 방해하면 선형 mRNA의 양 감소가 나타나지 않음을 확인한 결과이다. 구체적으로 도 11a는 실험 모식도이고, 도 11b는 선형 리포터 mRNA 또는 원형 이펙터 RNA와 결합하는 ASO를 처리하면, 선형 리포터 mRNA가 원형 이펙터 RNA와 결합하지 못하여 선형 리포터 mRNA 양 감소가 나타나지 않음을 보여주는 실험결과이다.

도 12는 정상적인 원형 이펙터 RNA의 형성을 억제하면 선형 리포터 mRNA 감소 현상이 나타나지 않음을 확인한 결과이다. 구체적으로, 도 12a 실험 모식도이고, 도 12b는 원형 이펙터 RNA가 만들어 질 때에만 선형 리포터 mRNA 양 감소 현상이 나타남을 보여주는 실험 결과이며, 도 12c는 상기 도 12b의 실험에 대하여 결합 서열의 방향을 바꾸어 실험한 결과이다.

도 13은 종결 코돈으로부터 100 뉴클레오타이드 이상 떨어진 위치에 원형 이펙터 RNA가 결합하여야 선형 mRNA 감소 현상이 나타남을 확인한 결과이다. 구체적으로 도 13a는 실험 모식도이고, 도 13b는 선형 리포터 mRNA 3' UTR의 다양한 위치에 원형 RNA가 결합하도록 하였을 때, 선형 리포터 mRNA의 종결 코돈으로부터 100 뉴클레오타이드 이상 떨어진 곳에 원형 이펙터 RNA가 결합해야만 선형 리포터 mRNA의 양 감소가 나타남을 확인한 실험 결과이다.

도 14는 원형 이펙터 RNA 결합 부위가 많을수록 선형 리포터 mRNA 감소 현상이 더 크게 나타남을 확인한 결과이다. 구체적으로 도 14a는 실험 모식도이고, 도 14b는 원형 이펙터 RNA와 결합할 수 있는 부위가 더 많을수록 선형 리포터 mRNA의 양이 더 크게 감소한 것을 확인한 실험 결과이다.

도 15는 선형 리포터 mRNA와 결합하는 원형 이펙터 RNA의 개수가 많을수록 선형 리포터 mRNA의 양이 더욱 크게 감소됨을 확인한 결과이다. 구체적으로, 도 15a는 실험 모식도이고, 도 15b는 선형 리포터 mRNA와 결합하는 원형 이펙터 RNA의 갯수가 많을수록 선형 리포터 mRNA의 양이 더욱 감소함을 보여주는 실험 결과이다.

도 16은 원형 RNA와 표적 mRNA의 결합을 방해하면 세포사멸이 증가함을 확인한 결과이다. 구체적으로 도 16a는 hsa_circ_0008496 그리고 hsa_circ_0002082와의 결합 부위에 특이적인 ASO에 대한 모식도이고, 도 16b는 ASO 처리 후 증가한 *BCL2L11* mRNA 양을 나타낸 그래프이며, 도 16c는 ASO 처리 후 세포사멸 된 세포 비율을 정량적으로 나타낸 그래프이고, 도 16d는 ASO 처리 후 세포사멸 된 세포를 염색한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0097] 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 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0098]

[0099] **[실시예]**

[0100] **[실시예 1] 원형 RNA (Circular RNA) 결합에 의한 선형 리포터 mRNA 감소 현상**

[0101] **[실시예 1-1] 원형 RNA (circular RNA) 결합에 의한 선형 리포터 mRNA 양 감소 확인**

[0102] 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)가 일어나기 위해서는 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)가 종결 코돈의 뒷 부분 (downstream), 즉 3' 비번역 부위 (Untranslated Region; UTR)에 결합하는 것이 중요하다. 이 점을 고려하여 도 1a에서 나타낸 바와 같이, 역접합 (back-splicing)으로 인해 엑손 접합 복합체를 가지는 원형 RNA (circularRNA)가 mRNA의 종결 코돈 (stop codon) 뒤쪽 부위인 3' 비번역 부위에 결합할 수 있도록 선형 (linear) 리포터 mRNA와 원형 이펙터 RNA (circular effector RNA)를 제작하

였다.

[0103] 즉, 선형 리포터 mRNA의 3' 비번역 부위에 21개의 염기쌍이 상보적으로 결합하는 원형 이펙터 안티센스 (circular effector antisense) AS21과 30개의 염기서열과 결합하는 원형 이펙터 안티센스 AS30을 선형 리포터와 함께 HeLa 세포주에 발현시킨 후, 각 선형 리포터 mRNA의 양을 확인하였다.

[0104]

[0105] 그 결과, 도 1b와 도 1c에 나타난 바와 같이, 선형 리포터 mRNA와 결합할 수 있는 원형 이펙터 RNA (circular effector RNA)를 선형 리포터 mRNA와 함께 발현시켰을 때, 그 상기 리포터 mRNA의 양이 감소함이 관찰되는 반면, 결합할 수 없는 염기서열을 갖는 원형 이펙터 RNA에 의해서는 그 양의 변화를 관찰할 수 없었다.

[0106]

[0107] **[실시예 1-2] 선형 리포터 mRNA와 원형 RNA (circular RNA) 결합 여부 확인**

[0108] 함께 발현시킨 원형 이펙터 RNA (circular effector RNA)가 선형 리포터 mRNA에 직접적으로 결합되어 있는지 확인하기 위해 실험하였다. 도 2a에 나타난 바와 같이 MS2 결합 서열 (MS2 binding sequence; MS2bs)를 가지고 있어 MS2-HA-MBP 단백질이 결합할 수 있는 리포터 mRNA와 MS2-HA-MBP 단백질, 그리고 세가지 서로 다른 결합 서열을 갖는 원형 이펙터 RNA를 세포에 동시에 발현시켰다.

[0109]

[0110] 그 결과 도 2b에 나타난 바와 같이, MBP와 강력하게 결합하는 아밀로스 비드 (amylose bead)로 MBP 풀다운 분석 (MBP-pull down assay)을 진행한 결과 선형 리포터 mRNA와 상보적인 염기서열을 가지고 있는 원형 이펙터 RNA (circular effector RNA)가 선형 리포터 mRNA에 가장 많이 결합하는 것으로 나타났다.

[0111]

[0112] **[실시예 1-3] 안티센스 올리고 뉴클레오타이드를 이용한 선형 리포터 mRNA와 원형 이펙터 (effector) RNA결합 방해 확인**

[0113] 선형 리포터 mRNA와 원형 이펙터 RNA의 결합을 방해하고자, 도 11a에 나타난 바와 같이, 선형 리포터 mRNA 또는 원형 이펙터 RNA에 각각 결합하는 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide; ASO)를 제작하였다.

[0114]

[0115] 그 결과 도 11b에 나타난 바와 같이, 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide; ASO)를 이용하여 선형 리포터 mRNA와 원형 이펙터 RNA의 결합을 방해하게 되면 선형 리포터 mRNA의 감소 효과가 나타나지 않았음을 확인하였다.

[0116]

[0117] **[실시예 1-4] 이펙터 RNA의 형태에 따른 선형 리포터 mRNA의 감소 효과 확인**

[0118] 원형 RNA를 생성하는 백스플라이싱 과정은 엑손 양쪽 끝의 반복서열을 통해 일어난다. 그러므로 도 12a에 나타난 바와 같이, 엑손 양쪽 끝에 반복서열이 존재하여 정상적인 원형 이펙터 RNA가 생성되는 경우와 한쪽 반복서열을 제거하여 원형 이펙터 RNA가 제대로 생성되지 못하도록 한 경우를 비교하였다.

[0119]

[0120] 그 결과 도 12b 및 12c에 나타난 바와 같이, 정상적으로 생성된 원형 이펙터 RNA가 선형 리포터 mRNA와 결합하면, 선형 리포터 mRNA의 양이 감소되는 반면, 반복서열의 제거로 인해 정상적인 원형 이펙터 RNA가 생성되지 않으면 선형 mRNA의 양이 감소되지 않음을 관찰하였다.

[0122] **[실시예 2] 상기 결합의 위치와 개수에 따른 선형 리포터 mRNA의 감소 현상**

[0123] **[실시예 2-1] 상기 결합이 3' UTR에 존재할 때만 특이적으로 유도되는 선형 리포터 mRNA의 감소 현상**

[0124] 원형 이펙터 RNA (Circular effector RNA)가 선형 리포터 mRNA의 어느 위치에 결합할 때 선형리포터 mRNA의 양을 감소시키는지 확인하고자 하였다. 도 3a에 나타난 바와 같이, 원형 이펙터 RNA (Circular effector RNA)가

선형 리포터 mRNA의 5' 비번역 부위, 코딩 서열 (coding sequence; CDS), 3' 비번역 부위에 결합할 수 있도록 하는 각각의 선형 리포터 mRNA를 제작하였다.

[0125]

[0126]

그 결과 도 3b에 나타난 바와 같이, 원형 이펙터 RNA (Circular effector RNA)가 선형 리포터 mRNA의 3' 비번역 부위에 결합할 때만 그 선형 리포터 mRNA의 양이 감소됨을 관찰하였고, 그 외의 부위에 결합할 때는 감소 현상이 관찰되지 않았음을 확인하였다.

[0127]

[0128]

[실시예 2-2] 상기 결합이 종결 코돈으로부터 100 뉴클레오타이드 이상 떨어진 곳에 존재할 때에만 특이적으로 유도되는 선형 리포터 mRNA 감소 효과 확인

[0129]

난센스 매개 mRNA 붕괴 과정은 mRNA의 종결 코돈으로부터 50-55 뉴클레오타이드 뒤쪽에 존재하는 엑손 접합 복합체를 인지함으로써 일어난다. 그러므로 도 13a에 나타난 바와 같이, 선형 mRNA의 3' UTR의 다양한 부위에 엑손 접합 복합체를 가지는 원형 이펙터 RNA가 결합하도록 하여 그 선형 리포터 mRNA의 감소 현상을 확인하였다.

[0130]

[0131]

그 결과 도 13b에 나타난 바와 같이, 원형 이펙터 RNA가 선형 리포터 mRNA의 종결 코돈으로부터 적어도 100 뉴클레오타이드 이상 떨어진 곳에 결합해야만 선형 리포터 mRNA의 양을 감소시킴을 관찰하였다.

[0132]

[0133]

[실시예 2-3] 상기 결합 부위의 개수를 증가시켰을 때의 강화된 선형 리포터 mRNA 감소 효과 확인

[0134]

선형 리포터 mRNA의 3' UTR에 원형 이펙터 RNA 결합 부위의 개수를 늘렸을 때, 선형 리포터 mRNA의 감소 효과가 강화되는지 확인하기 위하여 도 14a에 나타난 바와 같이, 종결 코돈으로부터 100, 150, 그리고 200 뉴클레오타이드 떨어진 위치에 결합 염기 서열을 삽입하였다.

[0135]

[0136]

그 결과 도 14b에 나타난 바와 같이, 원형 이펙터 RNA가 결합할 수 있는 부위가 1군데 존재할 때보다 3군데 존재할 때, 선형 리포터 mRNA의 감소 현상이 더 크게 나타남을 관찰하였다.

[0137]

[0138]

[실시예 2-4] 선형 리포터 mRNA와 결합하는 원형 이펙터 RNA의 개수에 따른 강화된 선형 리포터 mRNA 양 감소 현상 확인

[0139]

선형 리포터 mRNA에 결합하는 여러 원형 이펙터 RNA를 넣어줬을 때 선형 리포터 mRNA 양 감소 효과가 강화되는지를 확인하기 위하여, 도 15a에 나타난 바와 같이, 종결 코돈으로부터 100, 150, 그리고 200 뉴클레오타이드 떨어진 부위에 결합하는 세가지 원형 이펙터 RNA를 제작하였다.

[0140]

[0141]

그 결과 도 15b에 나타난 바와 같이, 선형 리포터 mRNA의 양이 각각의 원형 이펙터 RNA를 발현시켰을 때보다 세가지 원형 이펙터 RNA를 모두 함께 발현시켰을 때 더 크게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0142]

[0143]

[실시예 3] 원형 이펙터 RNA를 통한 선형 리포터 mRNA와 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 간의 결합

[0144]

[실시예 3-1] MBP 풀다운 분석 (MBP-pull down)으로 선형 리포터 mRNA와 원형 이펙터 RNA의 결합 확인

[0145]

선형 리포터 mRNA에 붙은 원형 이펙터 RNA가 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)를 포함하고 있는지 확인하고자 하였다. 도 2a에서 진행한 실험을 바탕으로, 도 4a에 나타난 바와 같이 풀다운 (pull down) 된 선형 리포터 mRNA에 존재하는 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 인자들을 웨스턴 블롯팅 실험을 이용하여 확인하고자 하였다.

[0146]

- [0147] 실험 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이, 선형 리포터 mRNA와 결합하는 염기서열을 갖는 원형 이펙터 RNA가 함께 존재하는 경우에만 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 주요인자인 eIF4A3, Y14, MAGOH, MLN51이 존재함을 확인할 수 있었다. 이는 원형 이펙터 RNA와의 결합을 통해 선형 리포터 mRNA가 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)와 결합하게 됨 의미한다.
- [0148]
- [0149] **[실시예 3-2] 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 면역 침강법(immunoprecipitation; IP)으로 선형 리포터 mRNA와 원형 이펙터 RNA의 결합 확인**
- [0150] 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)를 가지는 원형 RNA가 선형 리포터 mRNA와 결합하고 있는지 확인하기 위하여, 도 4a에 나타난 바와 같이, 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 주요인자 중 하나인 eIF4A3로 면역 침강법 (immunoprecipitation; IP)을 진행하여 결합하고 있는 선형 리포터 mRNA의 양을 측정하고자 했다.
- [0151]
- [0152] 실험 결과, 도 4c 내지 도 4e에 나타난 것과 같이, 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC) 주요인자 중 하나인 eIF4A3는 원형 RNA와 결합하고 있으며, 그 원형 RNA는 선형 리포터 mRNA와 결합하고 있음을 확인하였다.
- [0153]
- [0154] **[실시예 4] 원형 이펙터 RNA에 의해 유도되는 선형 리포터 mRNA의 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD) 현상**
- [0155] 선형 리포터 mRNA의 3' 비번역 부위 (Untranslated Region; UTR)에 결합하는 원형 이펙터 RNA에 의한 선형 리포터 mRNA의 양 감소 현상이 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)에 의한 것인지 확인하고자 하였다.
- [0156] 즉, 도 5a, 5b 및 도 5c에서 나타난 바와 같이, 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD) 인자들을 siRNA를 이용하여 그 단백질 양을 감소시킨 후, 원형 이펙터 RNA에 의해 선형 리포터 mRNA의 양이 감소되는 현상이 관찰되는지 실험하였다.
- [0157]
- [0158] 실험 결과, 도 5a에서 나타난 바와 같이 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD) 인자들을 감소시킨 경우, 원형 이펙터 RNA에 의한 선형 리포터 mRNA 양의 감소 현상이 관찰되지 않았으며, 도 5b에서 나타난 바와 같이 그 선형 리포터 mRNA의 안정성 또한 증가함이 관찰되었다. 이는 선형 이펙터 RNA에 의해 발생하는 선형 리포터 mRNA의 분해 현상이 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)에 의해서 나타나는 것임을 의미한다. 그리고 이렇게 엑손 접합 복합체 (exon junction complex; EJC)를 가지는 원형 RNA가 선형 mRNA의 3' 비번역 부위 (Untranslated Region; UTR)에 결합하여 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD)가 일어나는 현상을 원형 RNA에 의해 유도되는 난센스 매개 mRNA 붕괴 (Nonsense mediated mRNA decay; NMD), 즉, circNMD라고 명명하였다.
- [0160] **[실시예 5] 마이크로어레이와 RIC-seq을 이용한 circNMD의 표적 mRNA와 원형 RNA 동정**
- [0161] 마이크로어레이 (Microarray)는 형광 염료 (dye)를 이용하여 세포 안에 존재하는 mRNA의 종류와 양을 알 수 있는 실험 방법이다. 그리고 RIC-seq은 RNA 결합 단백질을 통해 서로 결합하고 있는 RNA들을 찾을 수 있는 실험 방법이다. 이 두 가지 실험을 통해 얻은 데이터를 종합적으로 분석하여 세포 내에서 서로 결합하고 있는 mRNA와 원형 RNA를 동정하였다.
- [0162]
- [0163] 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타난 바와 같이 mRNA의 5' cap 구조에 결합하는 단백질인 캡 결합 단백질 (cap binding protein 80; CBP80)와 진핵생물 번역 개시 인자 (eukaryotic translation initiation factor 4E; eIF4E)로 면역 침강법을 진행하였을 때 결합되어 나오는 mRNA와 원형 RNA가 어떤 것들이 있는지 마이크로 어레이를 통해 확인하였다.

- [0164] 또한, 도 6c에서 나타난 바와 같이 CircNMD에 의한 영향을 확인하기 위하여 SMG6의 양을 감소시켰을 때 증가한 mRNA만을 분석하였다. 그리고 RNA-RNA 결합을 알 수 있는 RIC-seq 데이터 분석을 통해 mRNA와 결합하고 있는 원형 RNA들을 분석하였다. 이를 통해 어떠한 mRNA가 어떠한 원형 RNA와 결합하는지를 분석하였다.
- [0165]
- [0166] **[실시예 6] CircNMD 기전의 세포 내 기능 규명**
- [0167] **[실시예 6-1] 원형 RNA 감소 현상이 세포에 미치는 영향 - 원형 RNA를 감소시키면 세포 사멸 증가 확인**
- [0168] 상기 실시예 5에서 확인한 도 6을 통해 찾은 hsa_circ_0002082와 hsa_circ_0008496 원형 RNA는 공통적으로 BCL2L1 mRNA의 3' 비번역 부위 (UntranslatedRegion; UTR)에 결합하여 BCL2L1 mRNA의 circNMD를 유도한다. 그리고 BCL2L1 단백질은 세포사멸을 증가시키는 역할을 한다.
- [0169] 그러므로 도 7에서 나타난 바와 같이, 세포 내에 존재하는 hsa_circ_0002082와 hsa_circ_0008496의 양을 감소시키기 위하여 원형 RNA 특이적인 siRNA를 이용해 각 circRNA의 양을 감소시킨 후, BCL2L1 mRNA의 양 변화를 관찰하고자 하였고, 그에 따른 세포사멸 정도를 관찰하고자 세포내 세포사멸 정도를 확인할 수 있는 TUNEL 분석 (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay; TUNEL assay) 실험을 진행하였다.
- [0170]
- [0171] 실험 결과, 도 7a 내지 도 7c에서 나타난 바와 같이 각 원형 RNA를 감소시켰을 때 표적으로 하는 BCL2L1 mRNA의 양이 증가함을 관찰하였고, 그에 따라 세포사멸이 증가함을 확인하였다.
- [0172]
- [0173] **[실시예 6-2] 원형 RNA와의 결합이 세포에 미치는 영향 - 원형 RNA와 표적 mRNA의 결합을 방해하면 세포사멸이 증가**
- [0174] 도 16a에 나타난 바와 같이, BCL2L1 mRNA와 hsa_circ_0008496의 결합을 억제하는 ASO와 BCL2L1 mRNA와 hsa_circ_0002082의 결합을 억제하는 ASO를 각각 그리고 함께 처리했을 때 세포 사멸이 어떻게 변화하는지를 관찰하였다.
- [0175]
- [0176] 실험 결과 도 16b 내지 도 16d에 나타난 바와 같이, 각 원형 RNA와의 결합 부위에 특이적인 ASO를 처리하였을 때 BCL2L1 mRNA 양이 증가함을 관찰하였고, 그에 따라 세포사멸이 증가함을 확인하였다.
- [0177]
- [0178] **[실시예 6-3] 원형 RNA 과발현이 세포에 미치는 영향 - 원형 RNA를 과발현시키면 세포사멸이 감소**
- [0179] 상기 실시예 6-1의 도 7과 반대로 원형 RNA의 양을 증가시켰을 때 세포사멸 정도의 차이를 확인하기 위해서, 도 8a와 같이 BCL2L1 mRNA에 결합할 수 있는 두 종류의 원형 RNA를 세포에 도입하였다. Endogenous BCL2L1 mRNA에 결합할 수 있도록 circG-BCL2L1-c8496와 circG-BCL2L1-c2082 두 종류의 원형 RNA를 제작하였다. 이어서, 세포사멸을 야기하는 ABT-737이라는 약품을 처리한 후, 도입해 준 원형RNA에 의한 효과를 관찰하였다.
- [0180]
- [0181] 실험 결과, 도 8b 내지 도 8d에 나타난 바와 같이 ABT-737을 처리하여 증가한 BCL2L1 mRNA의 양과 세포사멸이 BCL2L1 mRNA에 결합할 수 있는 원형 RNA를 도입해 준 상황에서는 다시 감소하는 것을 관찰하였다.
- [0182]
- [0183] **[실시예 6-4] 인위적으로 넣어준 원형 RNA에 의한 circNMD 효과 - 특정 유전자의 mRNA 양 감소**
- [0184] 세포 내에 존재하는 mRNA에 결합하는 원형 RNA를 *in vitro*에서 합성하여 인위적으로 넣어줌으로써 circNMD 기전을 통해 표적하는 mRNA의 양을 선택적으로 감소시킬 수 있는지 확인하고자 하였다. 이를 위하여, ATG5는 자가포식을 증가시키는 기능을 하는 단백질인 바, 세포 내에 존재하는 mRNA에 결합하는 원형 이펙터 RNA를 인위적으로 넣어줌으로써 표적 mRNA의 양을 감소시킬 수 있는지 확인하고자 도 9a에 나타난 바와 같이 ATG5 mRNA의 3' UTR에 결합할 수 있는 두 종류의 원형 RNA를 제작하였다
- [0185] 한편, 원형 이펙터 RNA를 세포에 도입하여 ATG5 mRNA의 양이 감소되는지 여부와 그에 따른 자가포식 감소를 실

험으로 확인해보았다. 또한 이 경우에도 다양한 원형 이펙터 RNA를 넣어주었을 때 그 효과가 더욱 강화되는지 확인해보았다.

[0186]

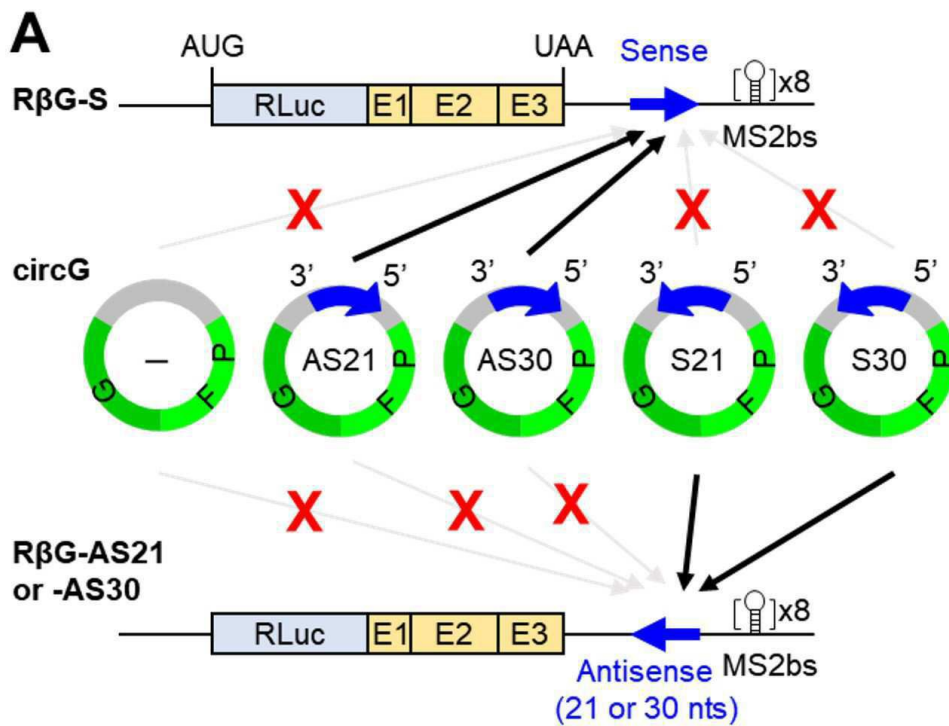
[0187] 그 결과 도 9b 및 도 9c에 나타난 바와 같이, 원형 이팩터 RNA를 인위적으로 발현시켜 특정 mRNA의 양을 감소시킬 수 있으며, 해당 단백질의 양 또한 감소시켜 자가 포식이라는 세포 내 기능을 조절할 수 있다는 것을 밝혔다.

[0188]

[0189] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

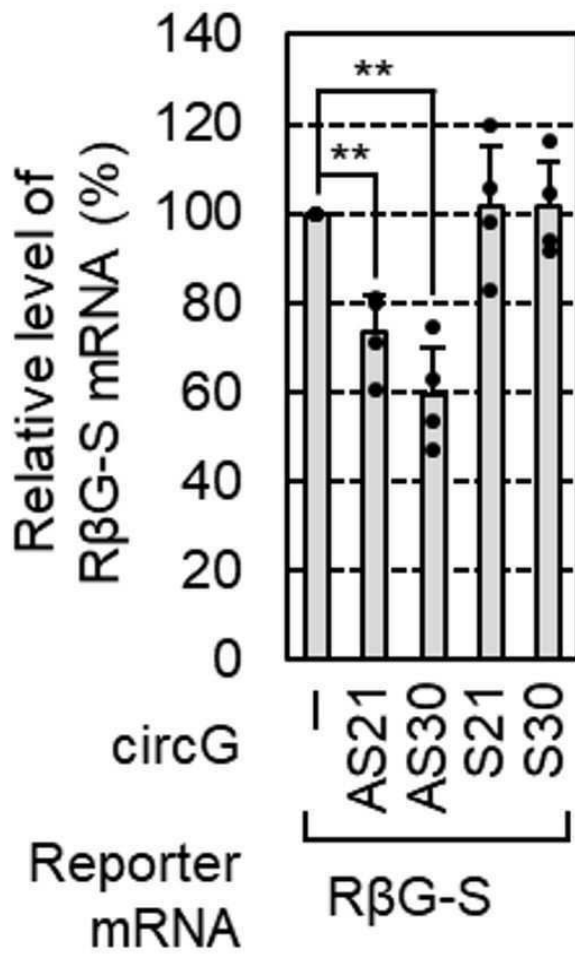
도면

도면 1a



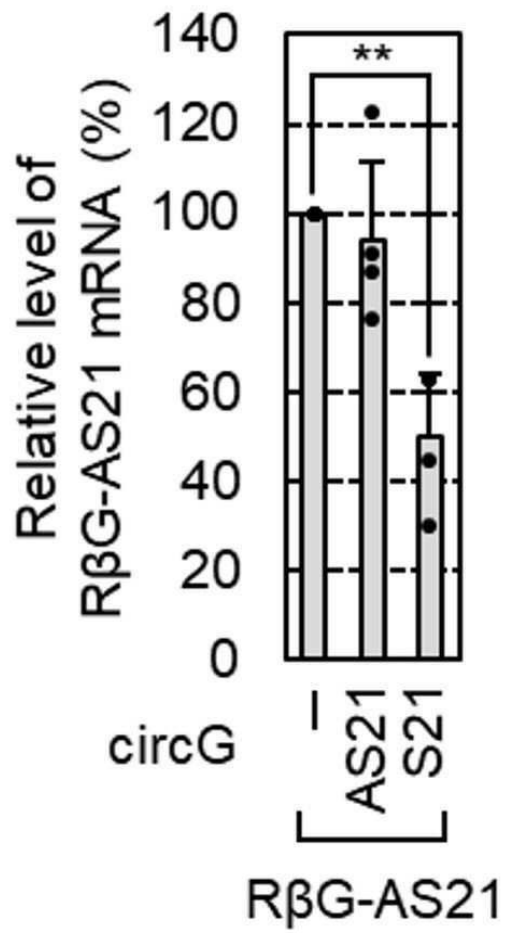
도면1b

B



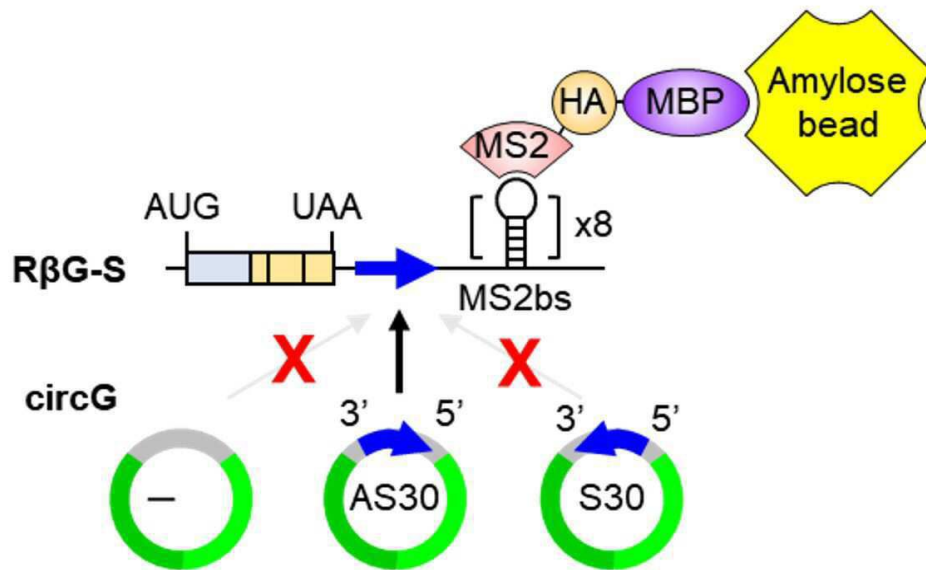
도면1c

C

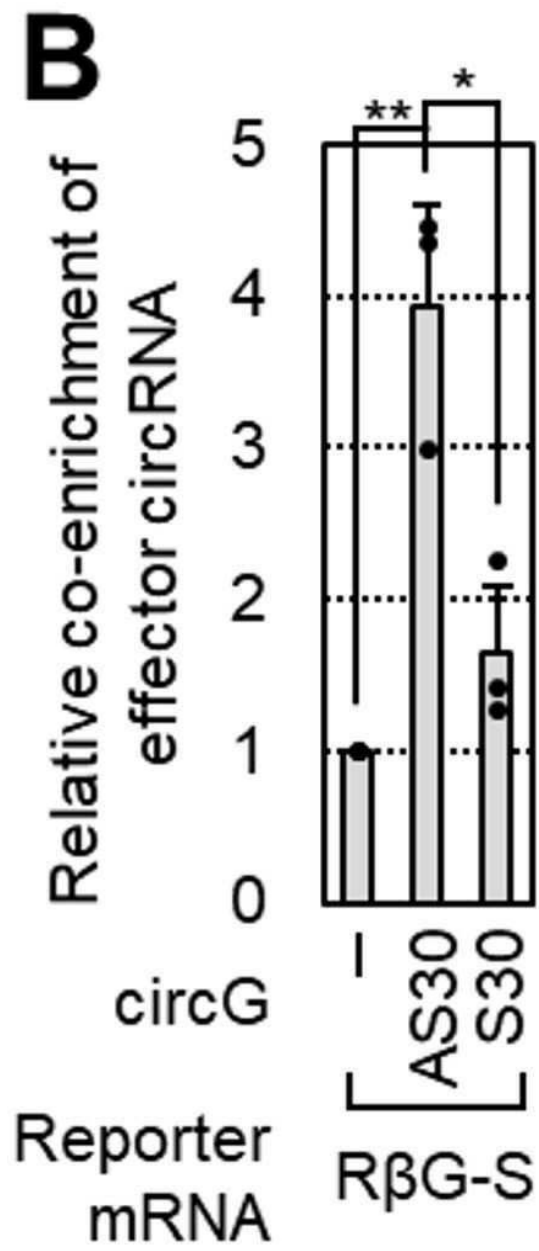


도면2a

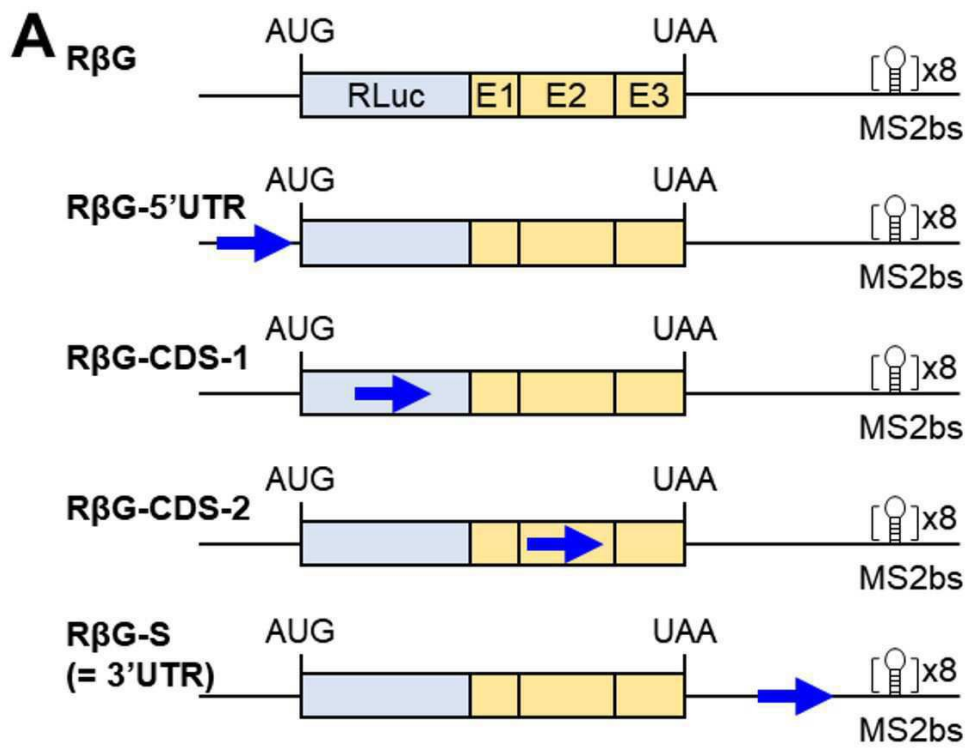
A



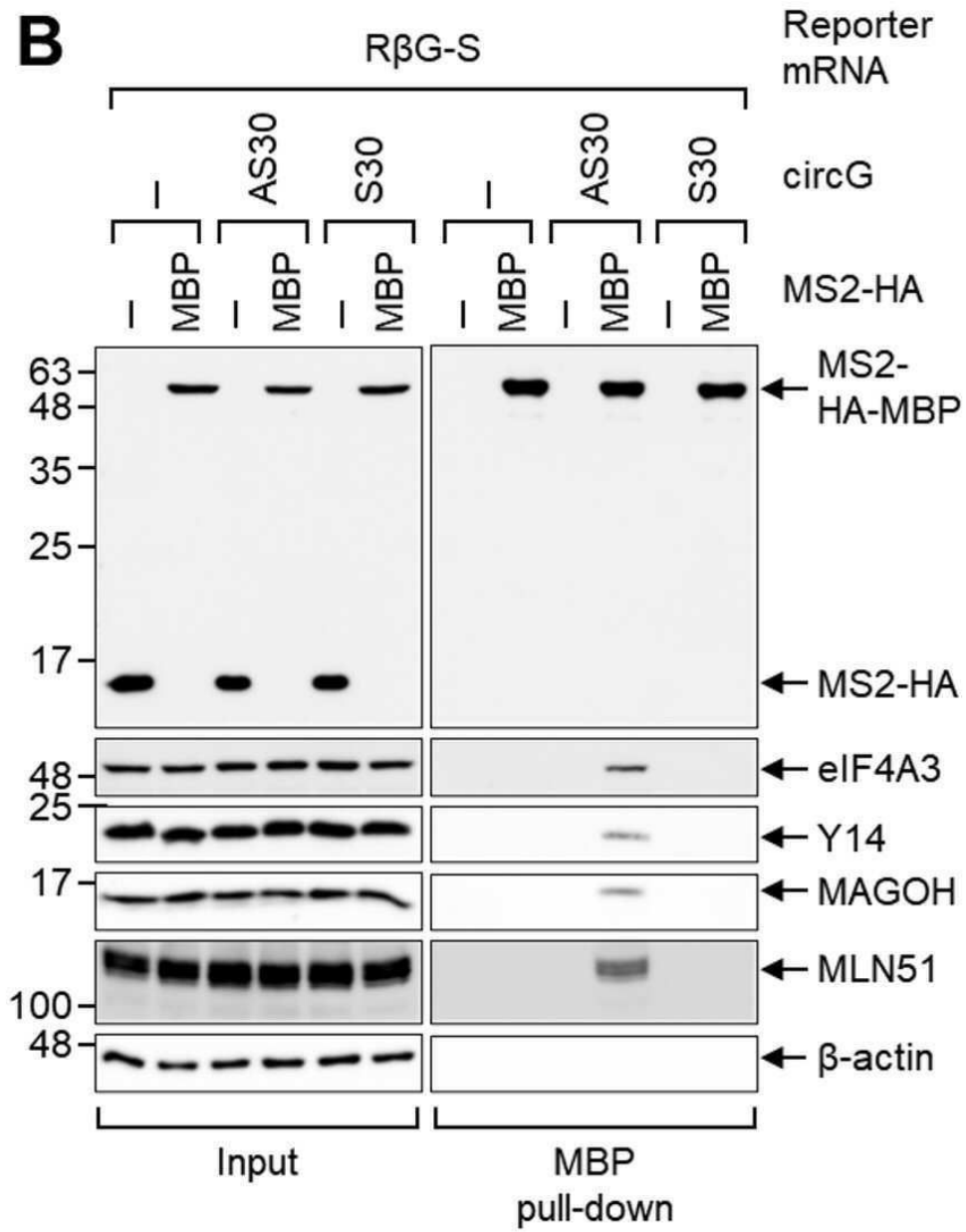
도면2b



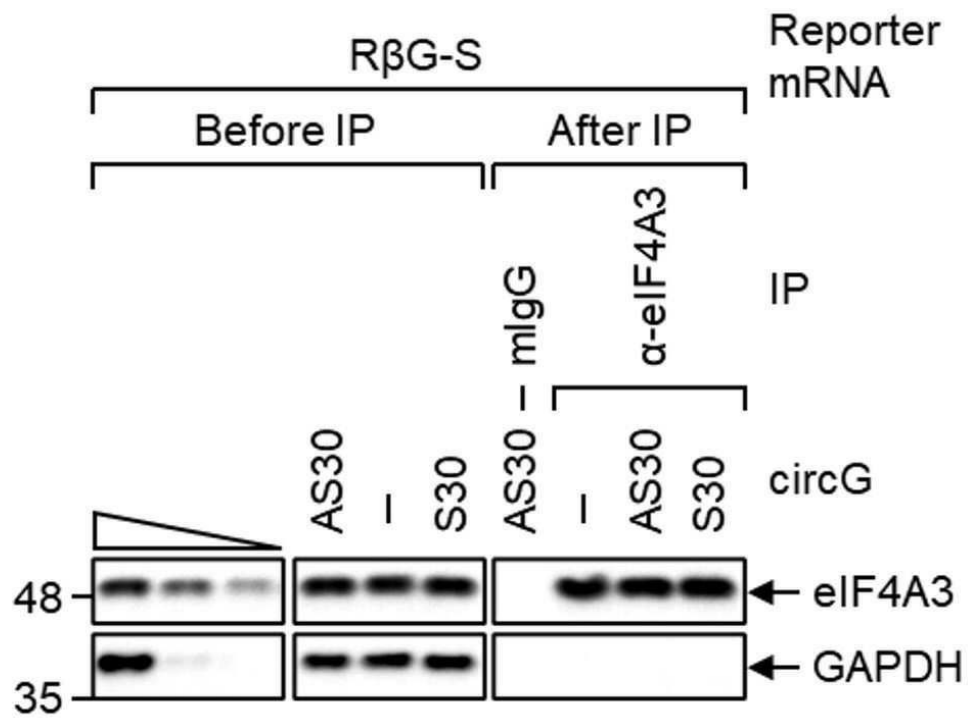
도면3a



도면4b

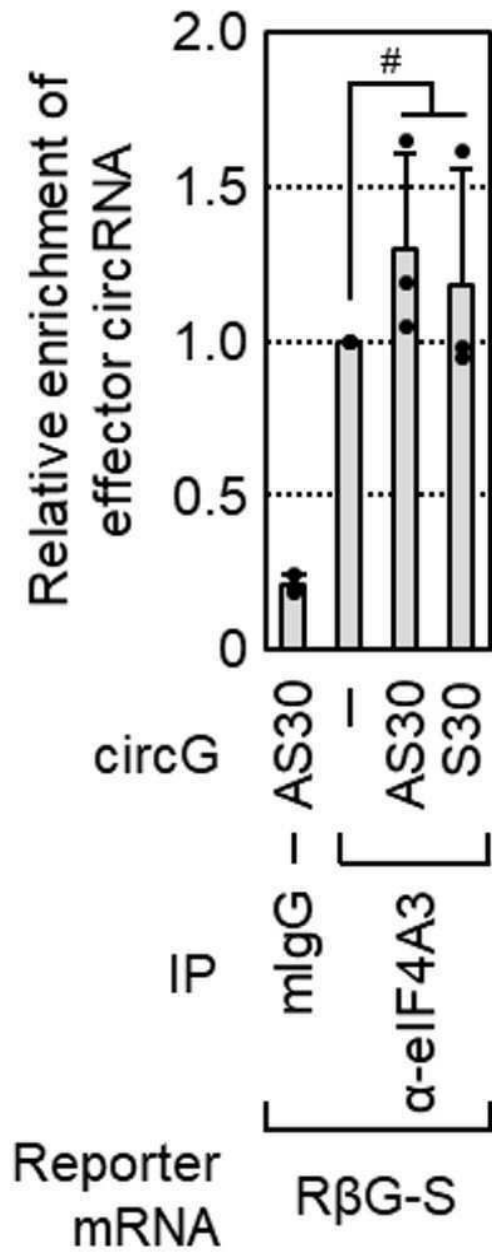


도면4c

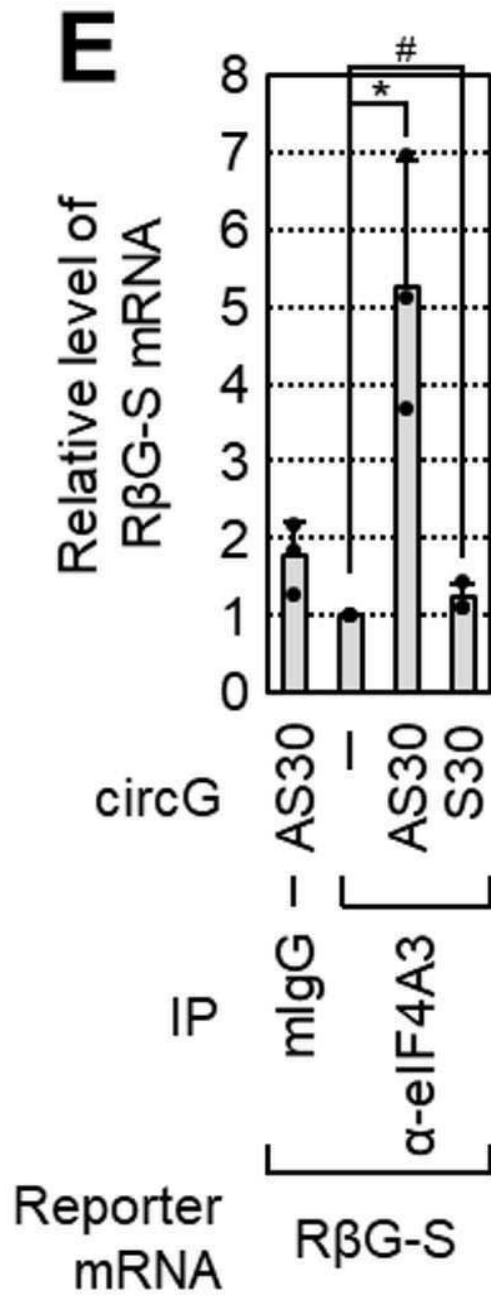


도면4d

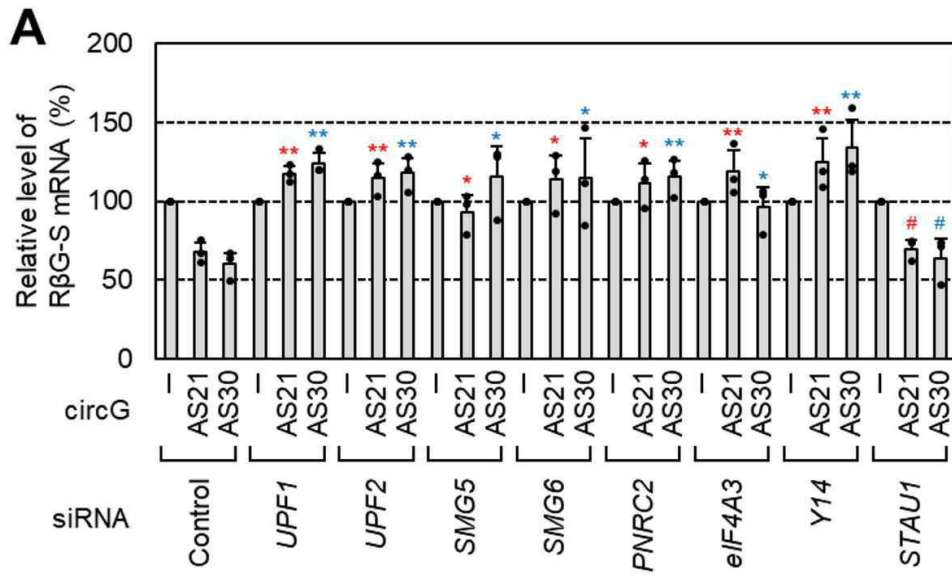
D



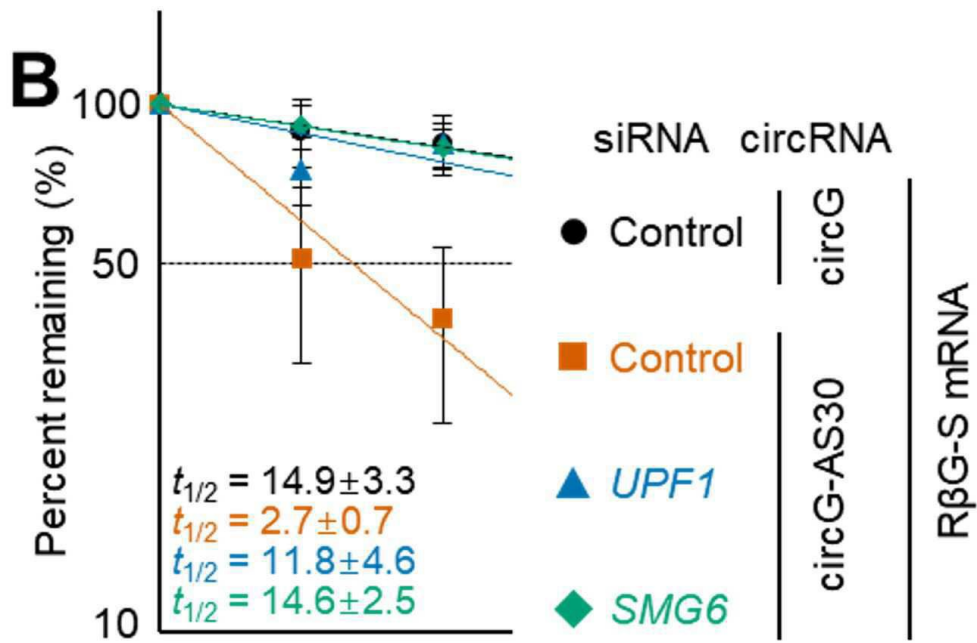
도면4e



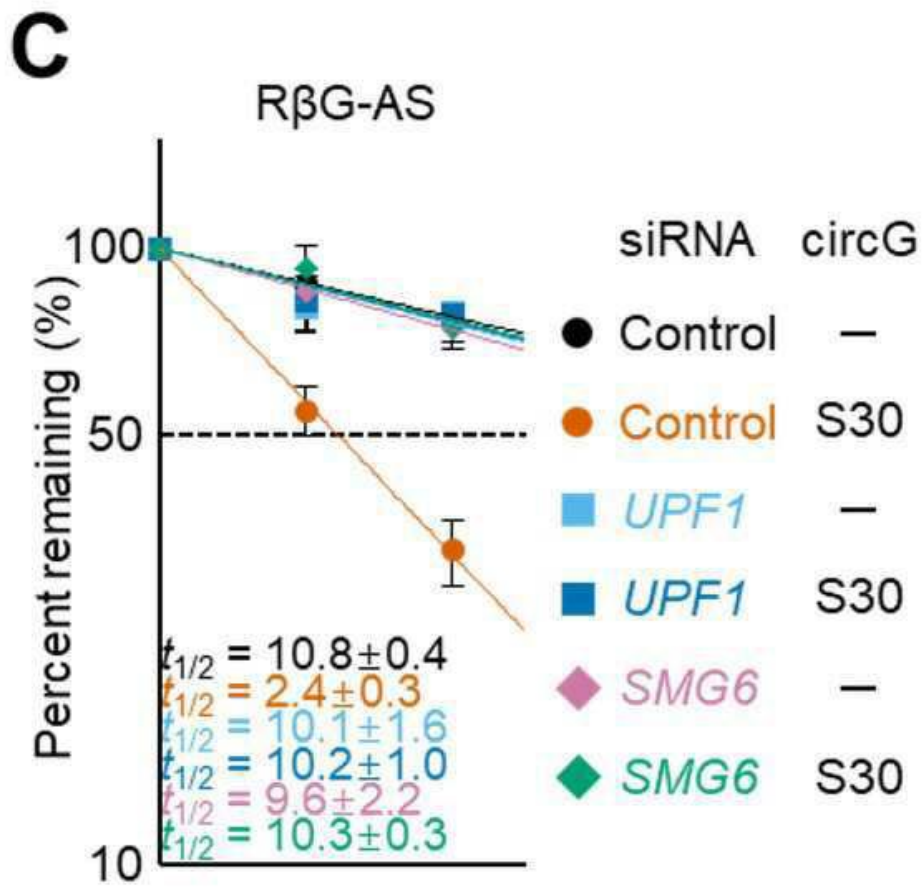
도면5a



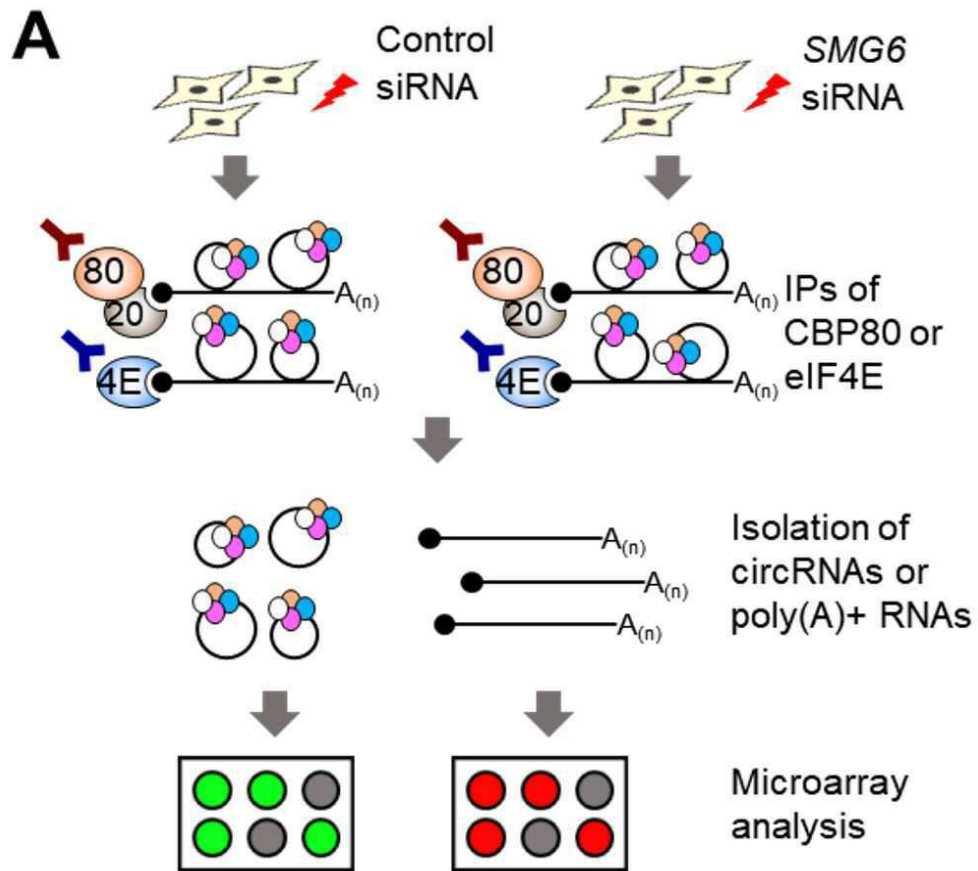
도면5b



도면5c

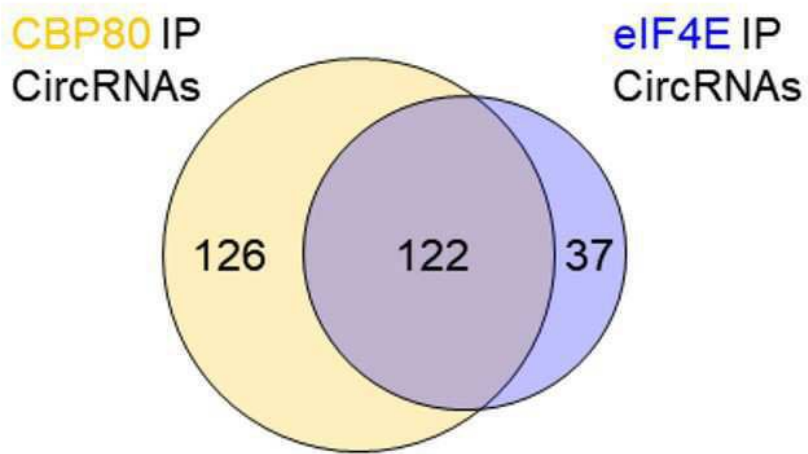
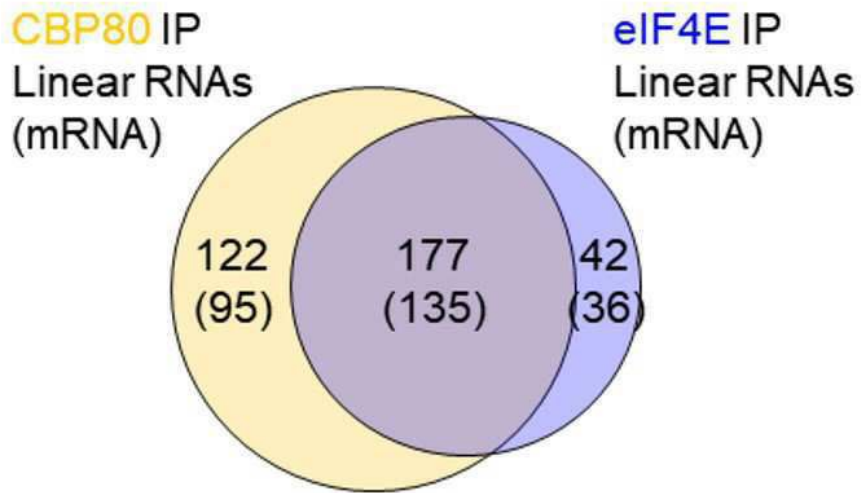


도면6a

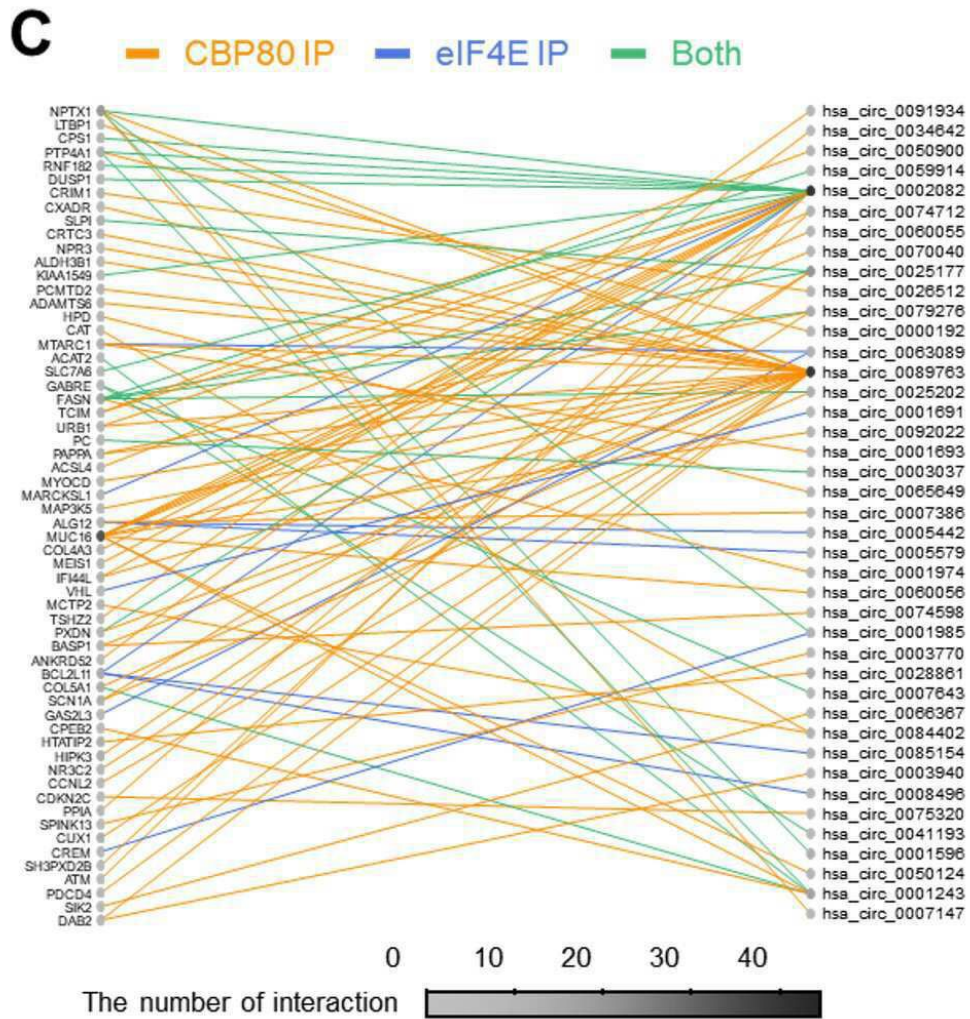


도면6b

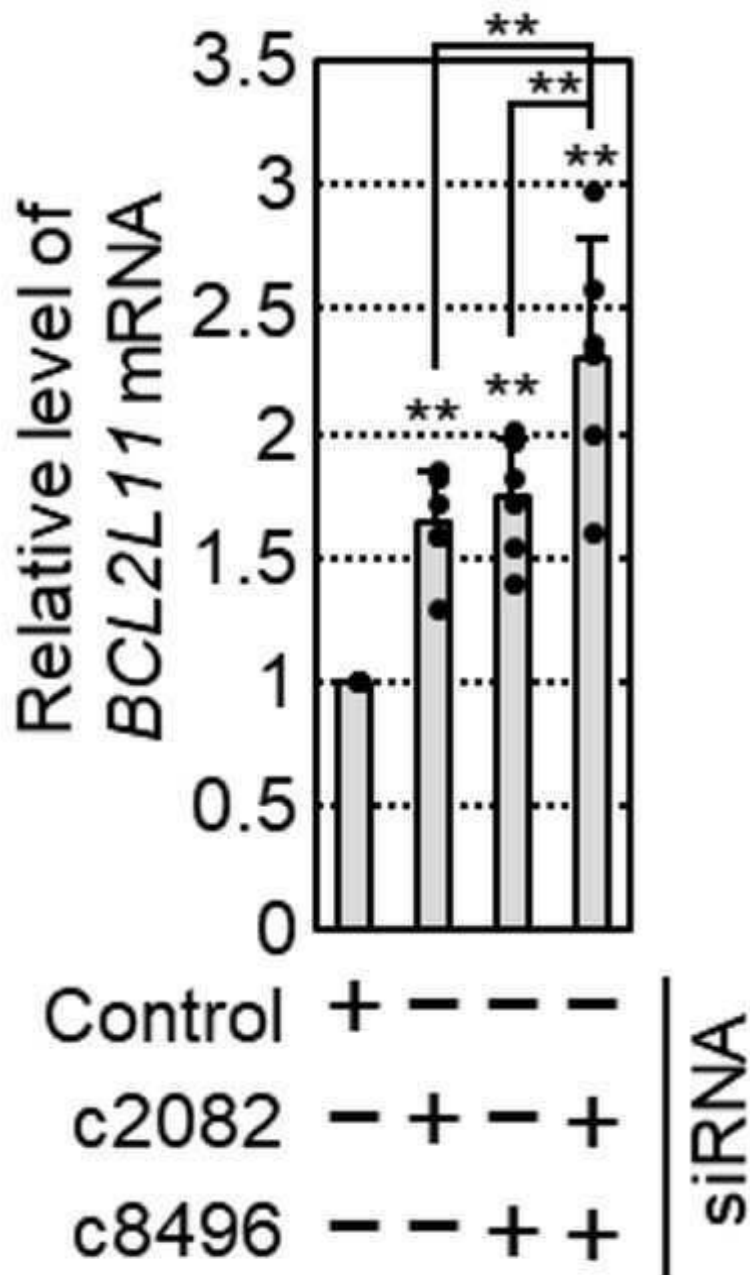
B



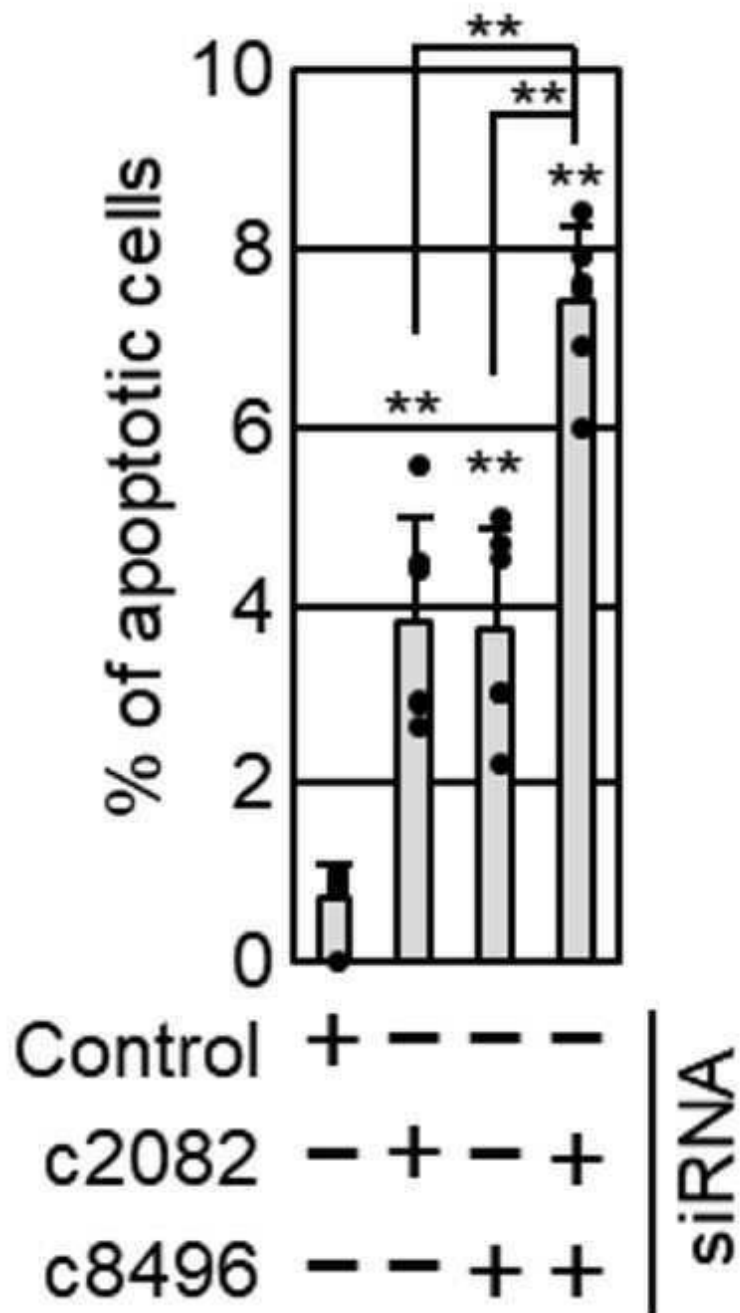
도면6c



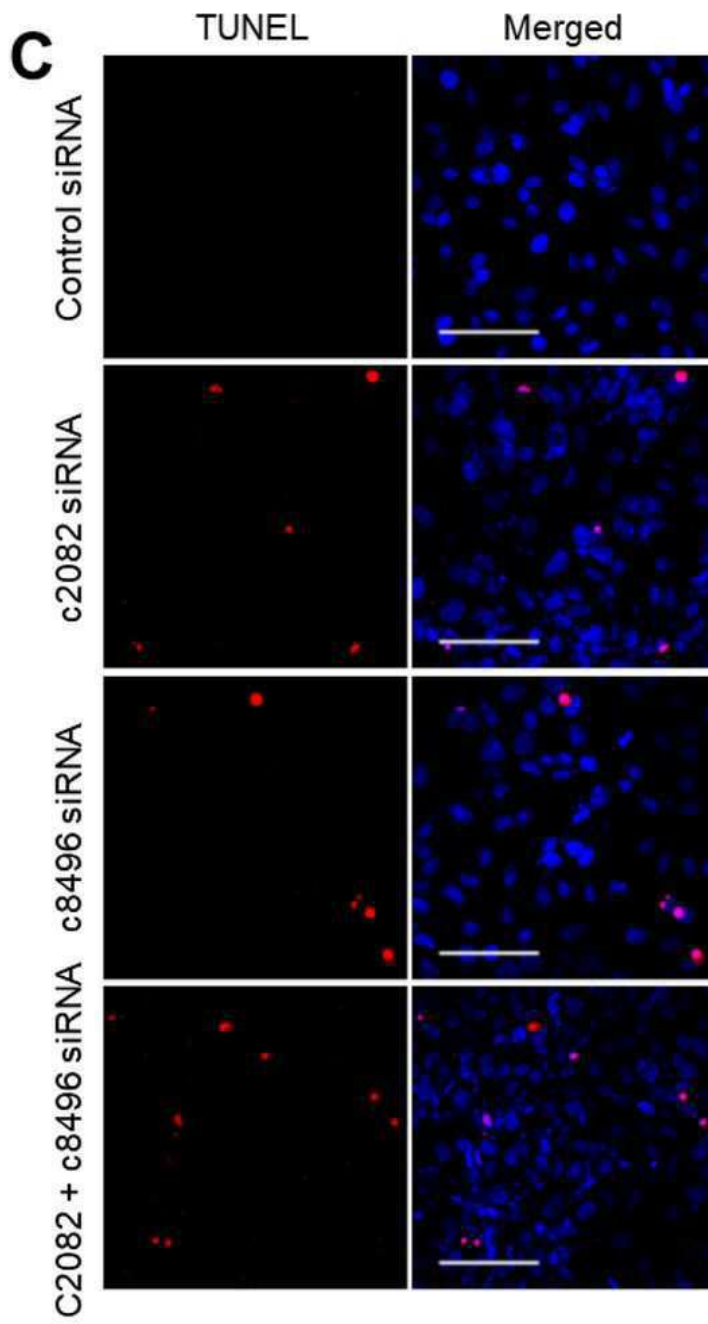
도면7a



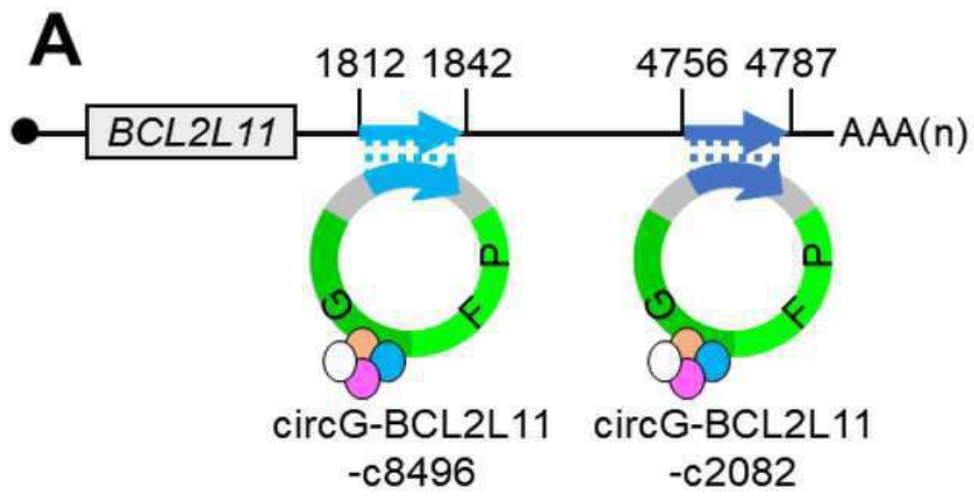
도면7b



도면7c

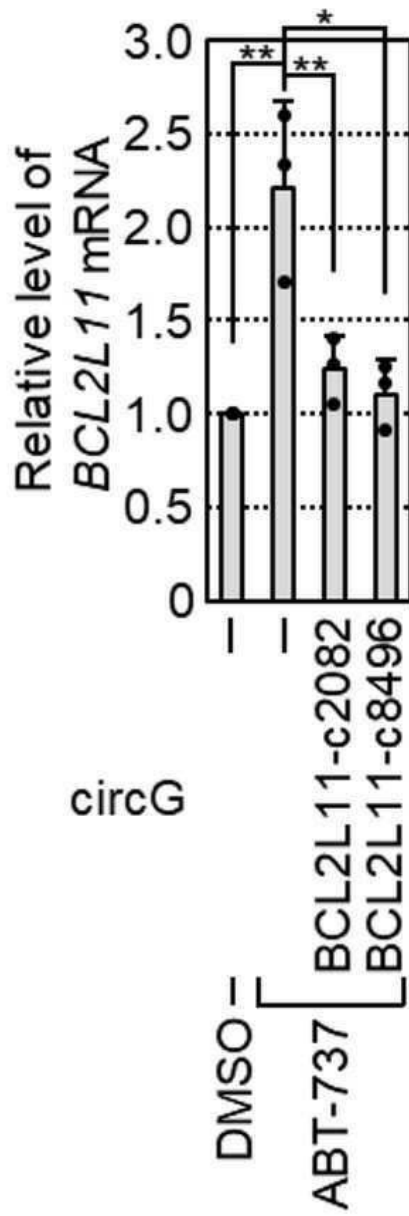


도면8a

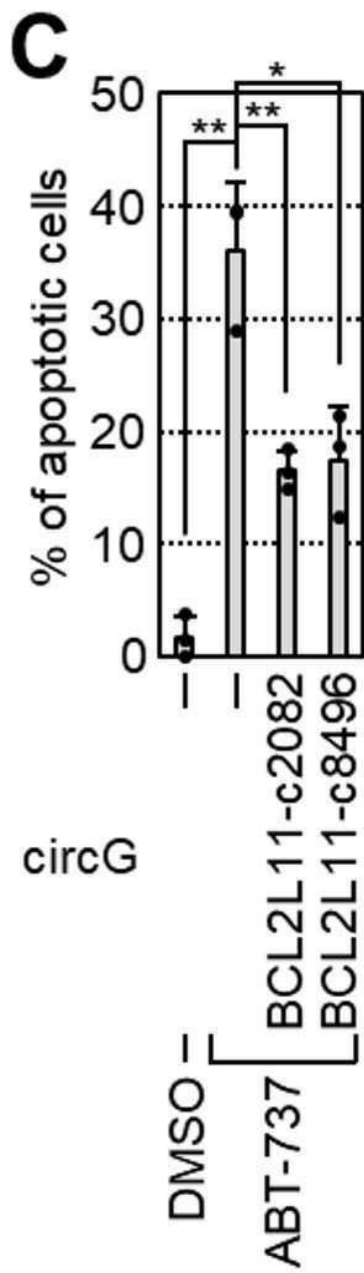


도면8b

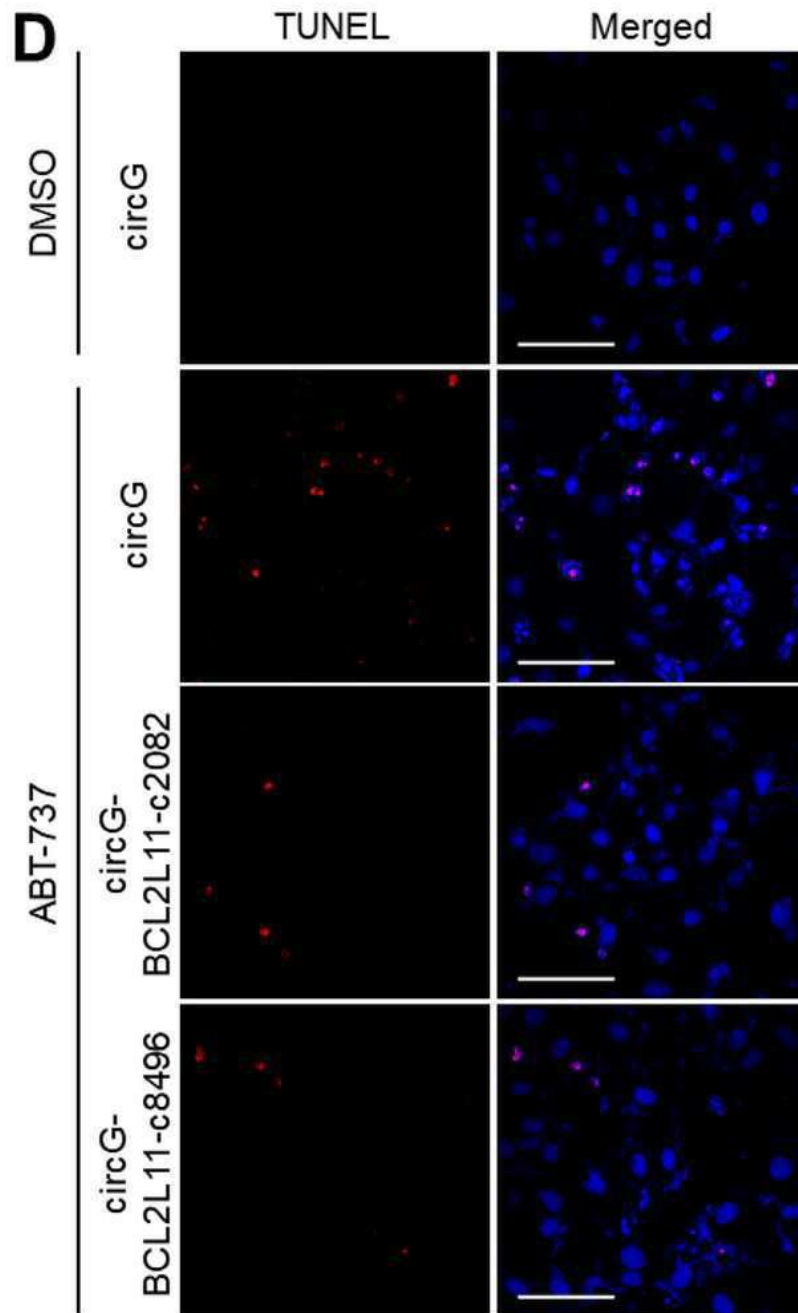
B



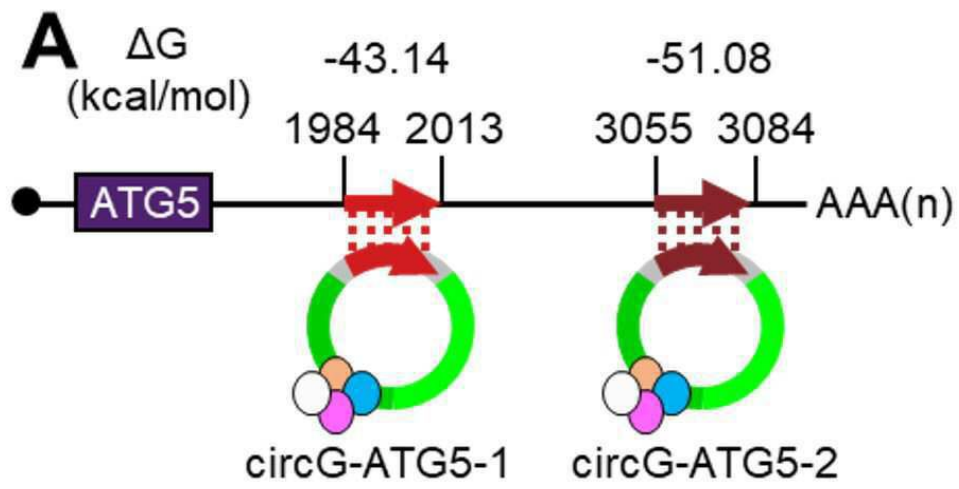
도면8c



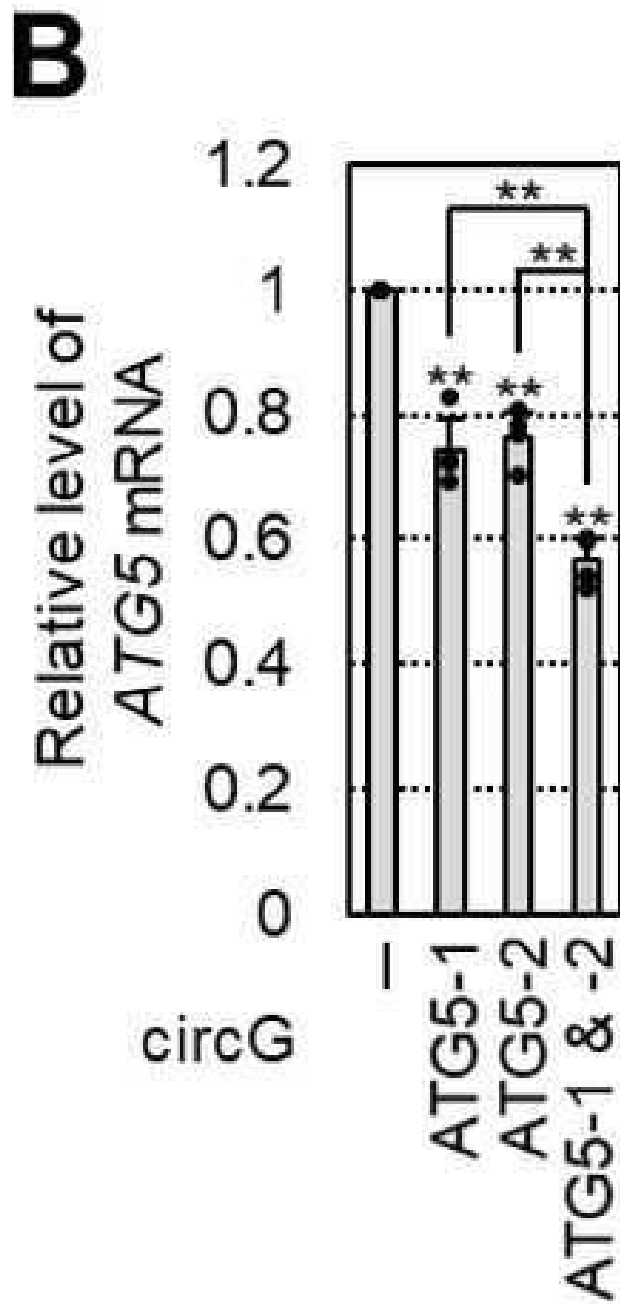
도면8d



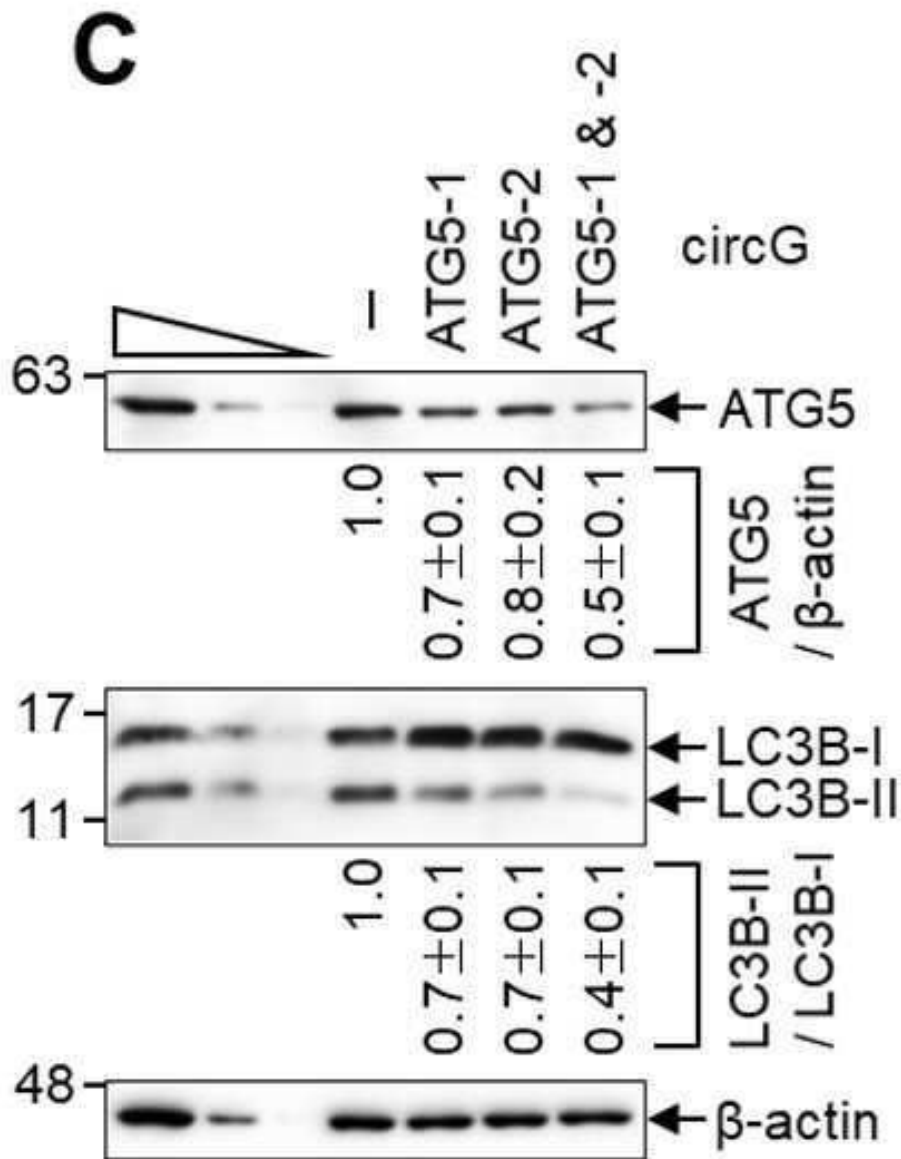
도면9a



도면9b

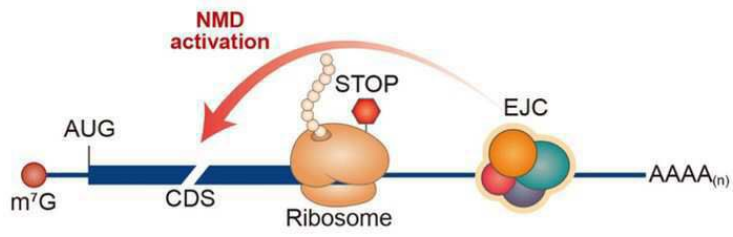


도면9c

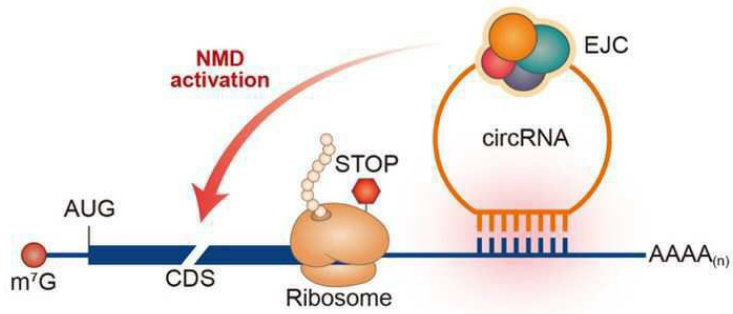


도면10

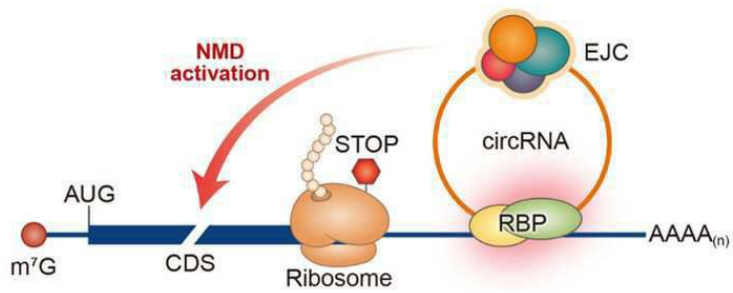
(i)



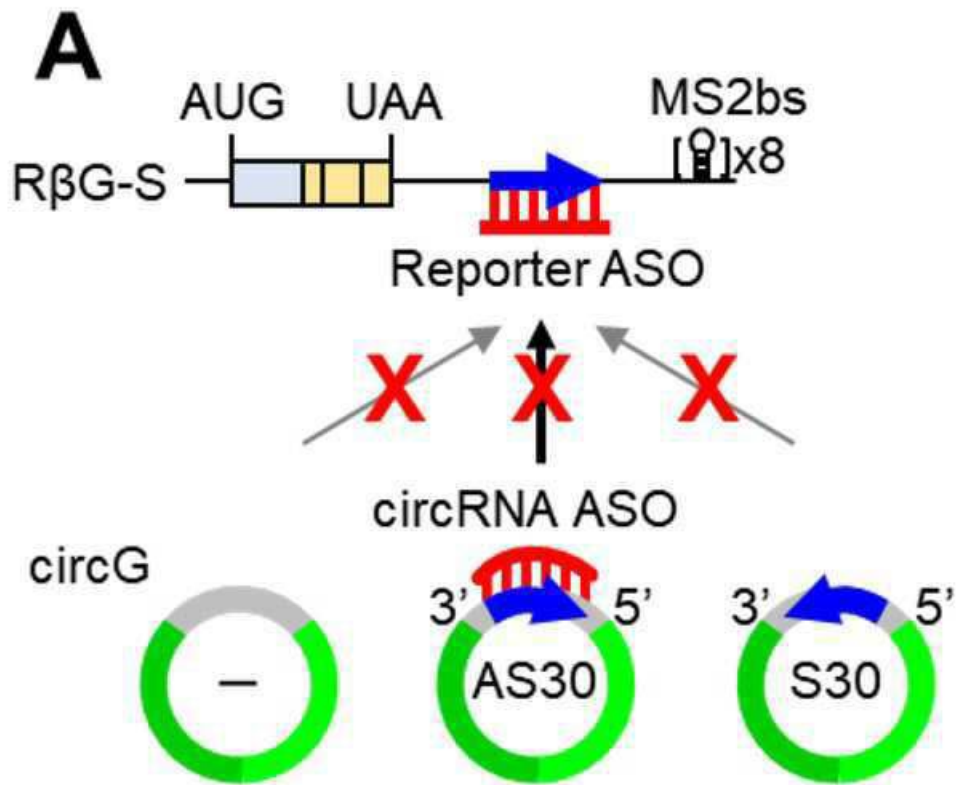
(ii)



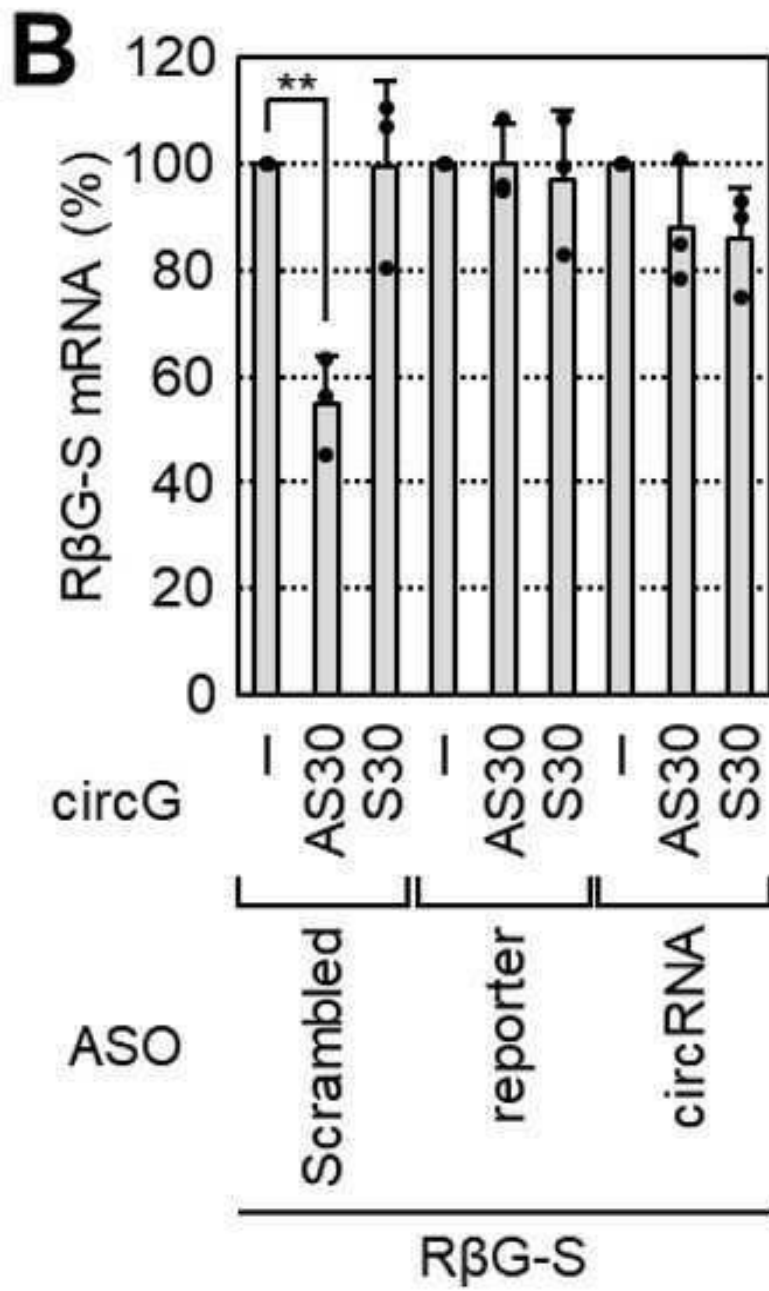
(iii)



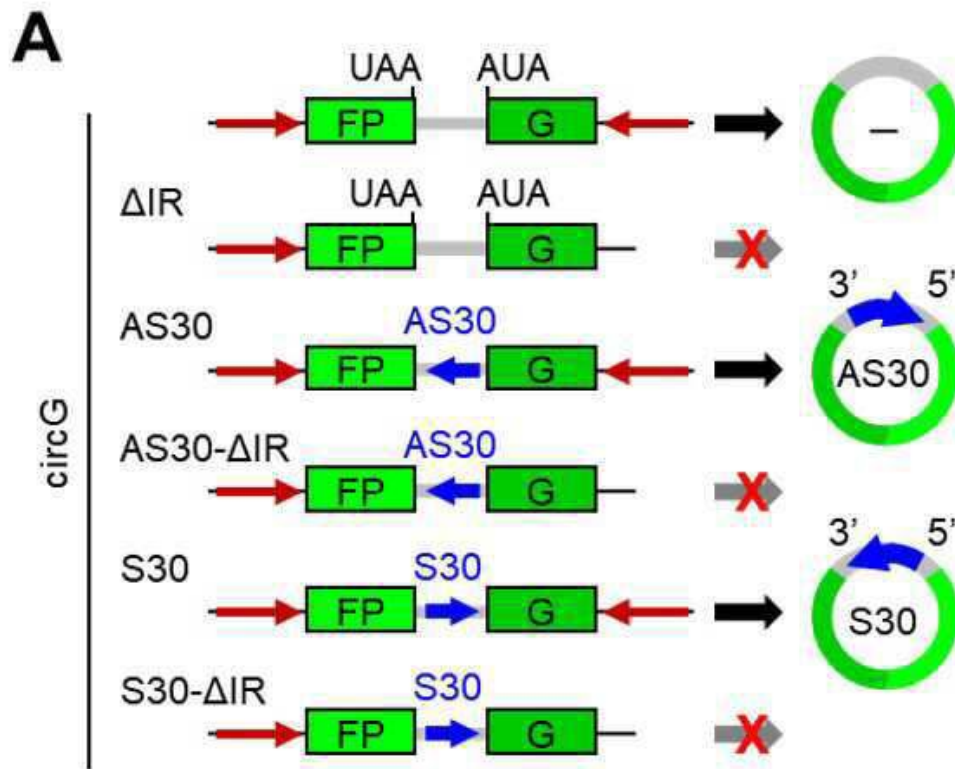
도면11a



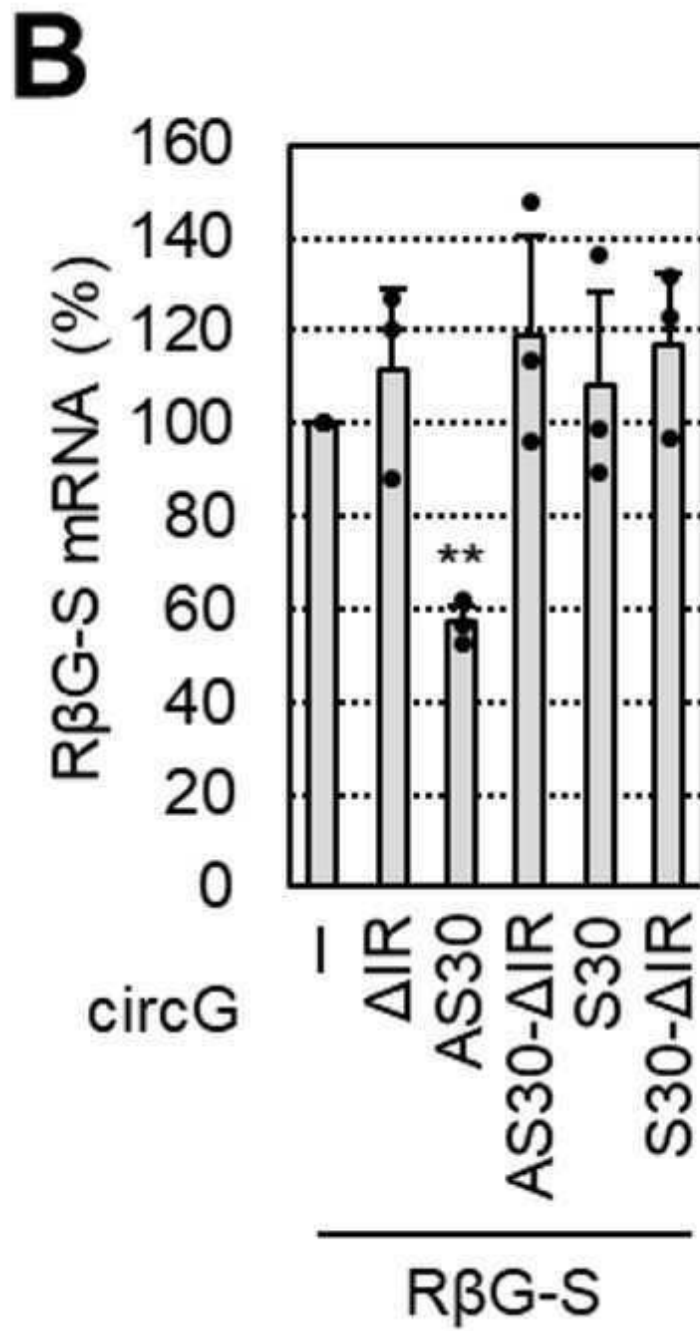
도면11b



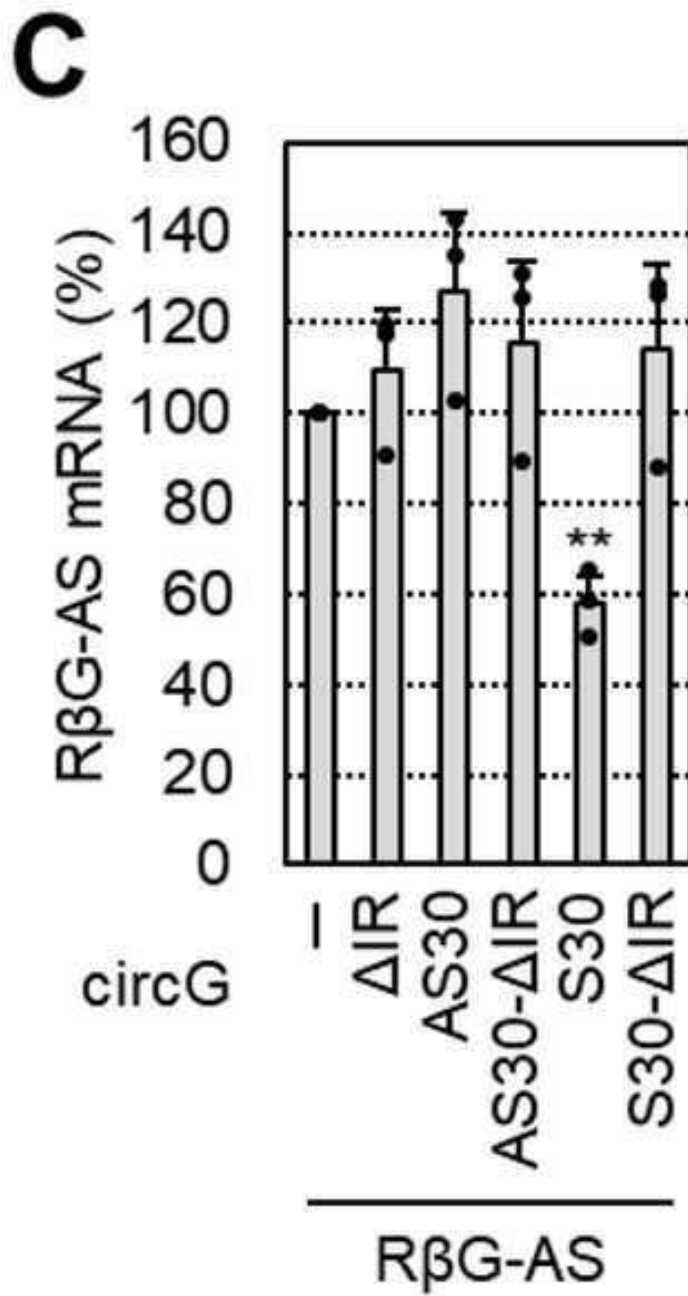
도면12a



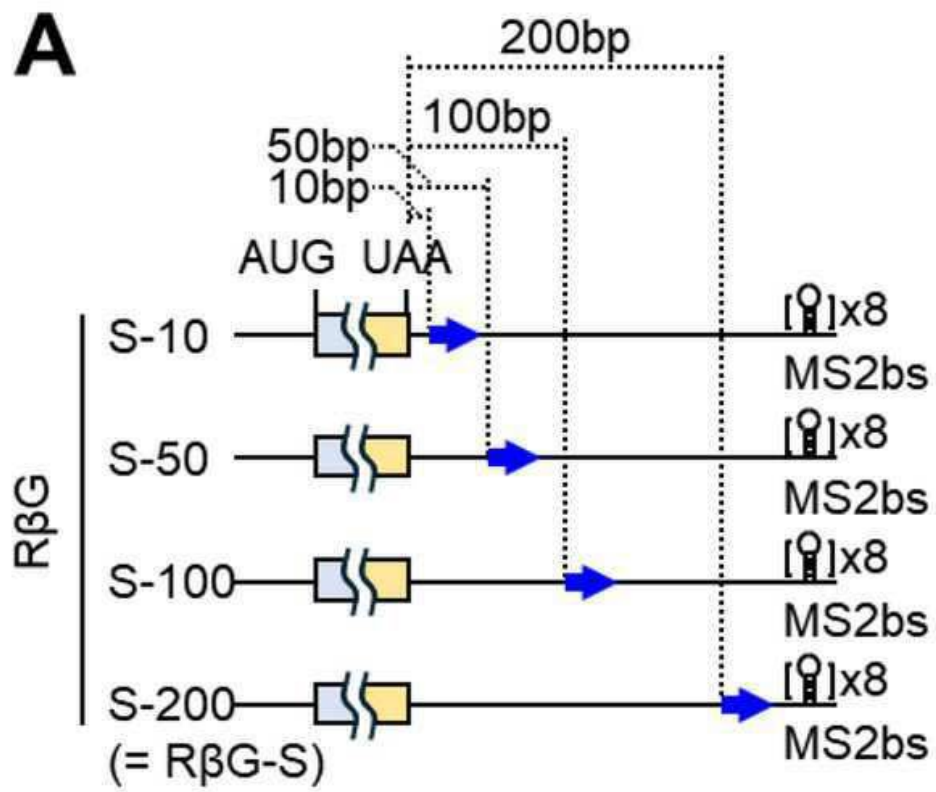
도면12b



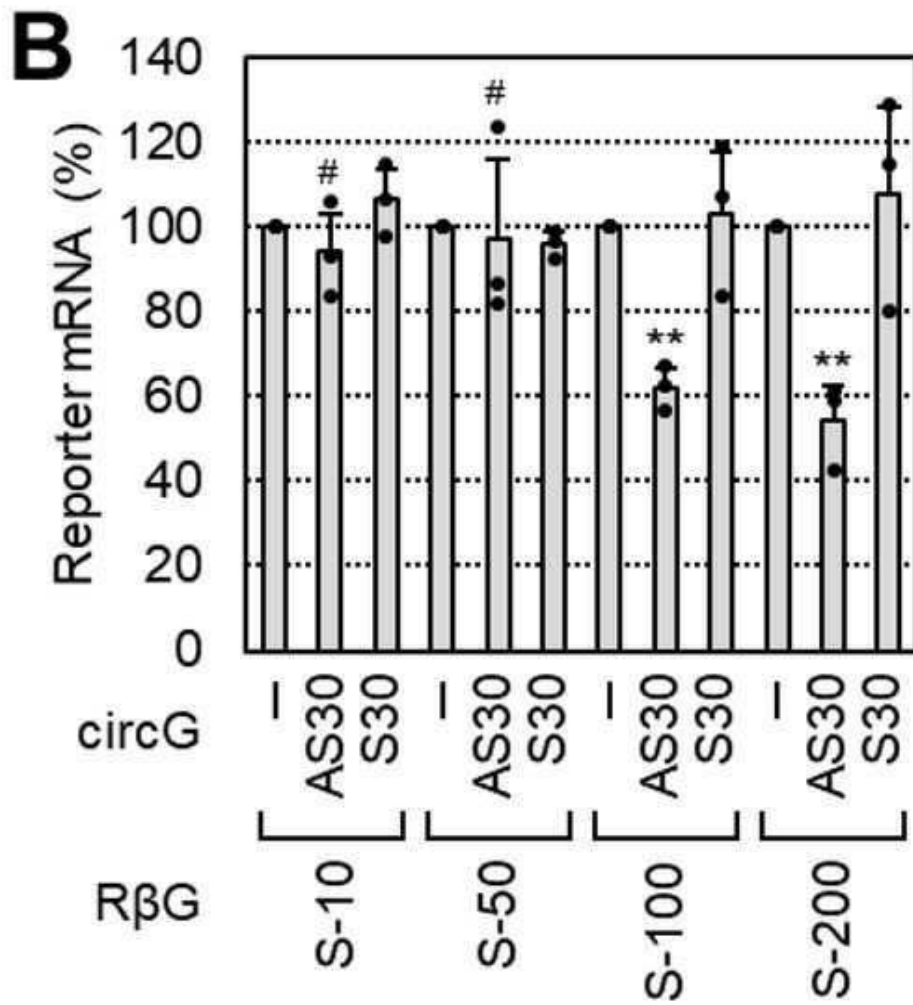
도면12c



도면13a

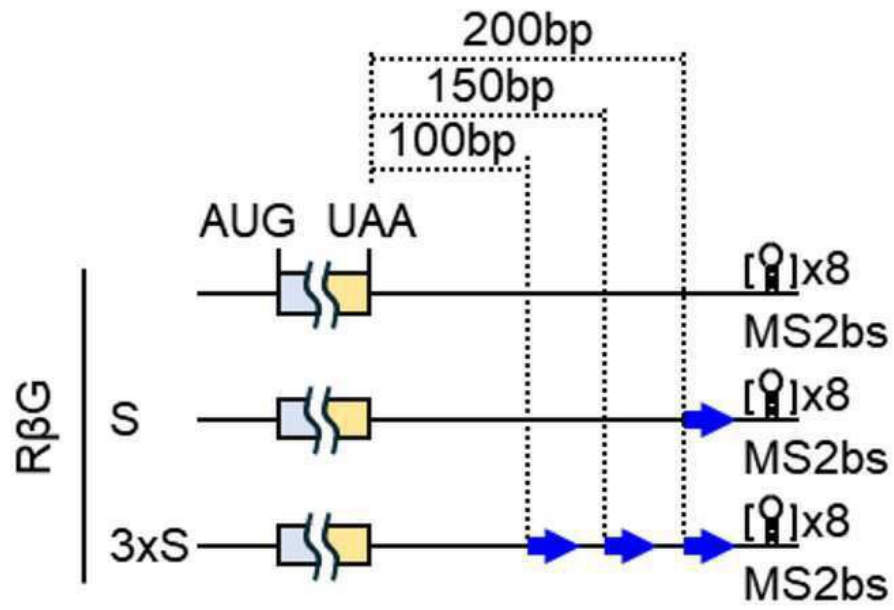


도면13b

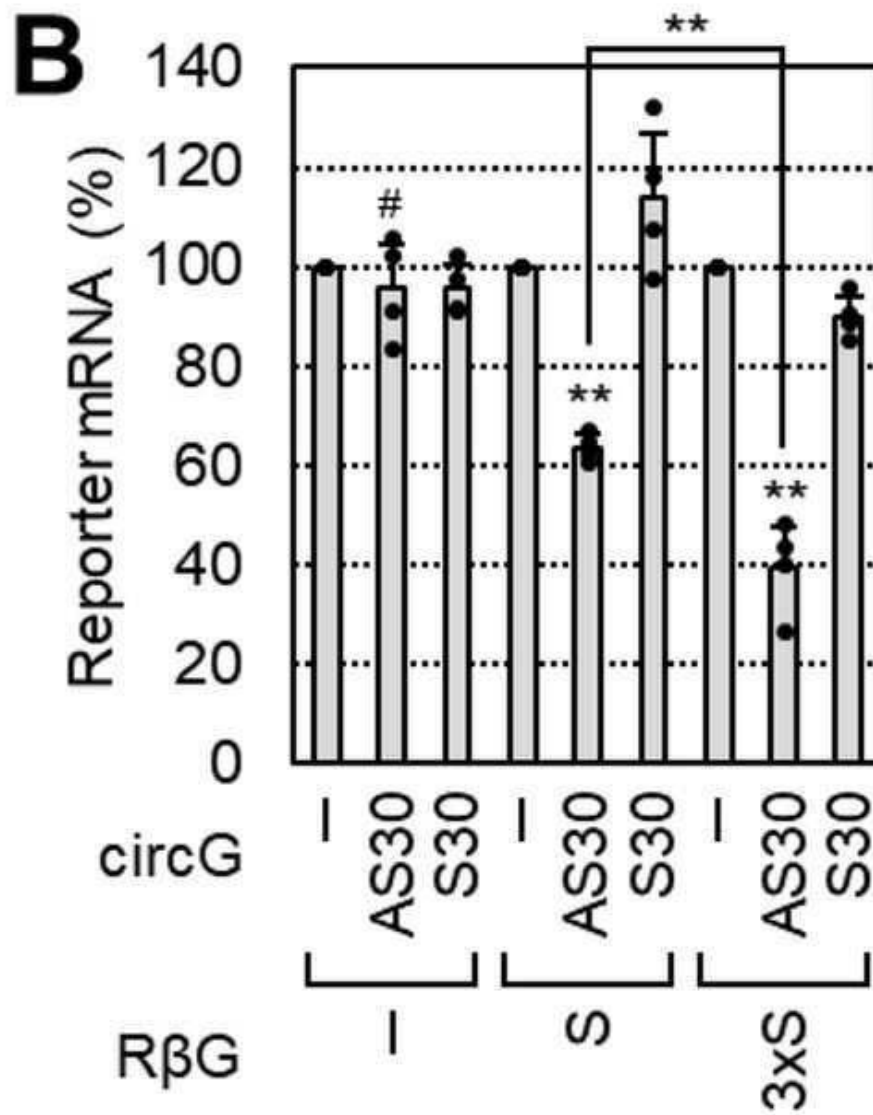


도면14a

A

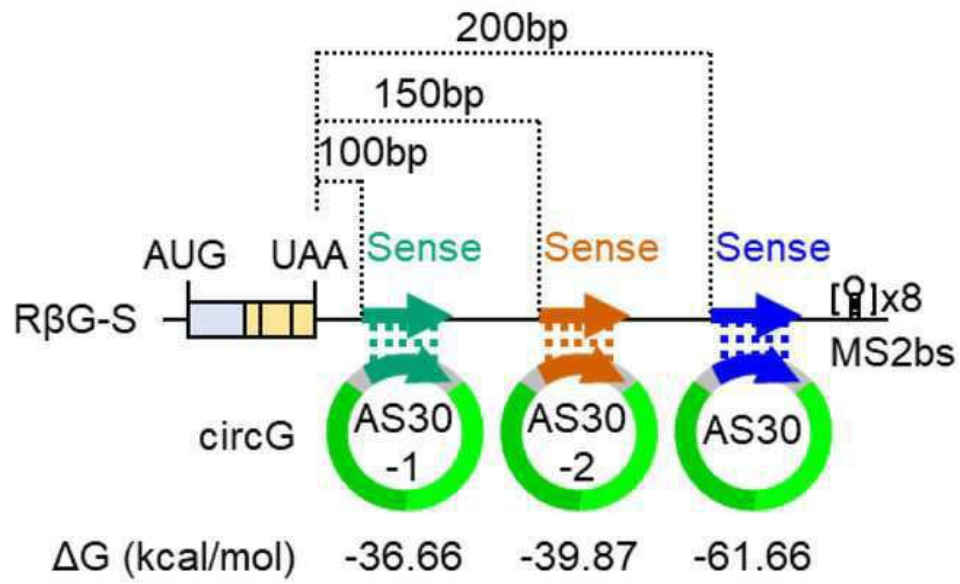


도면14b

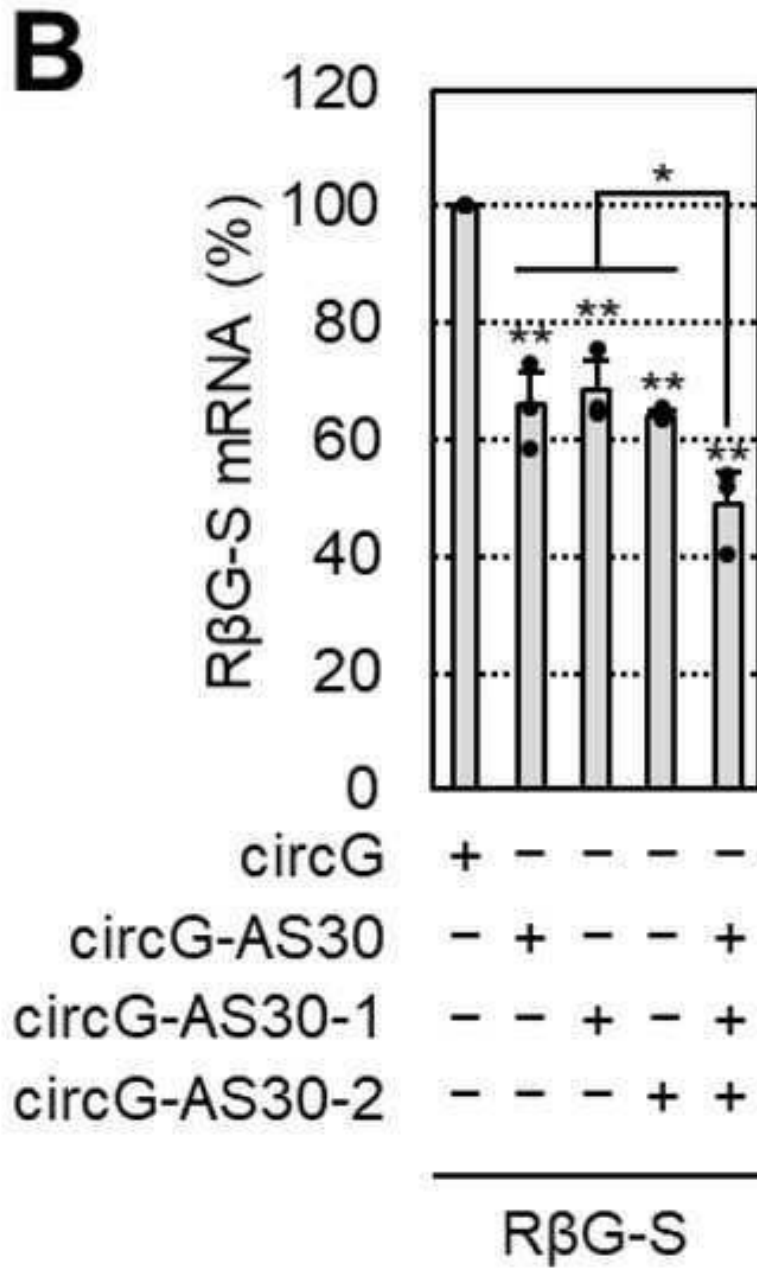


도면 15a

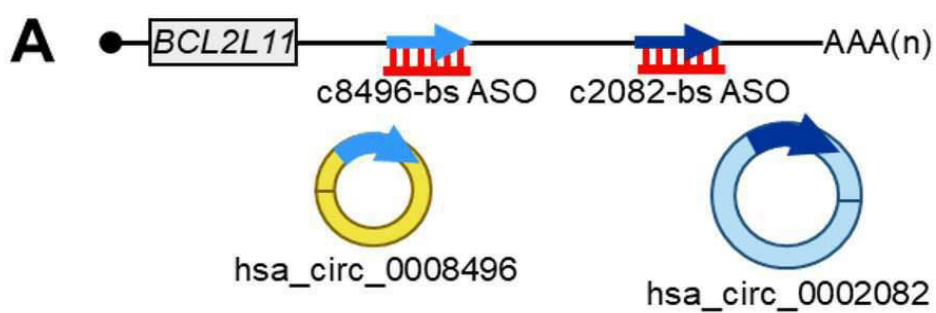
A



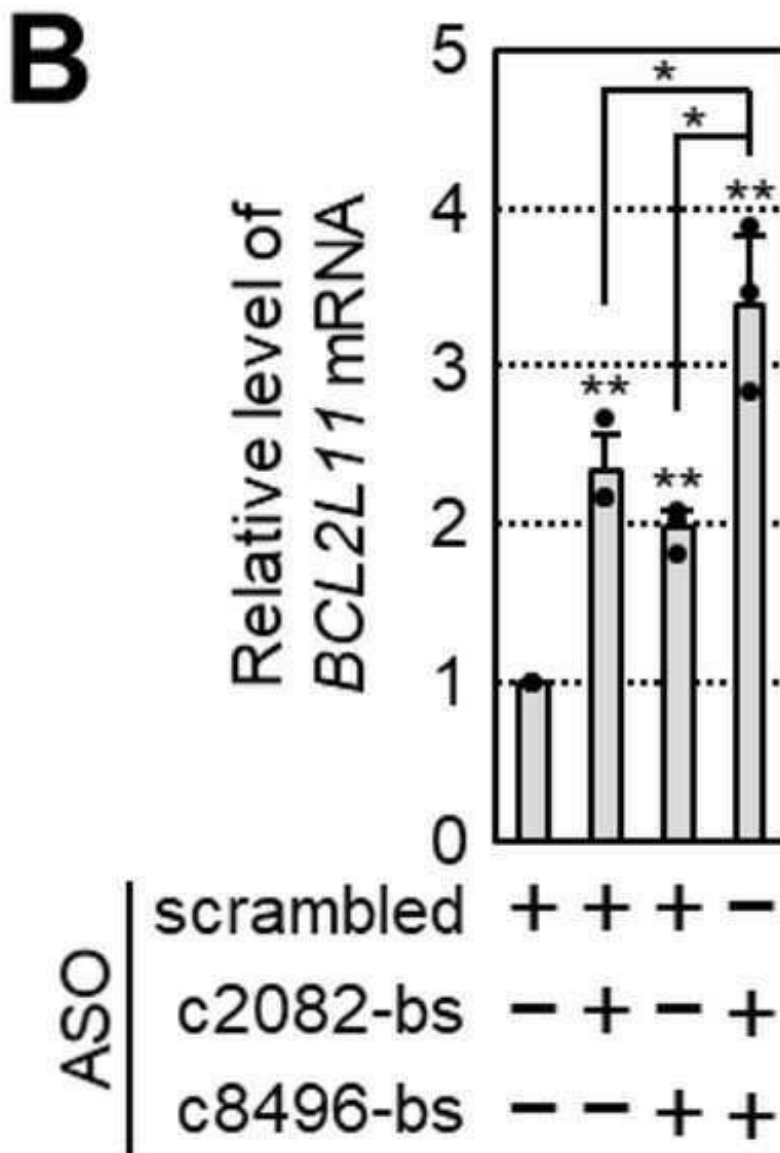
도면15b



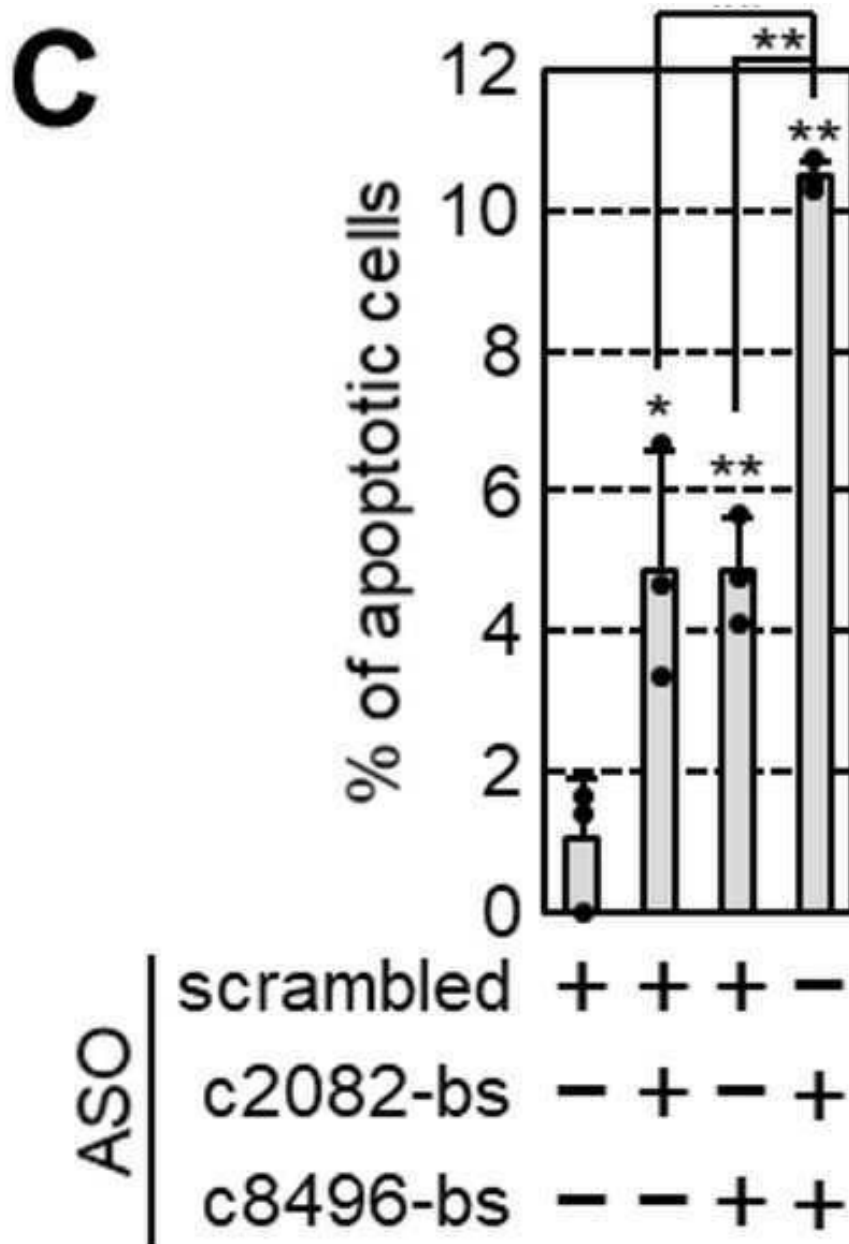
도면16a



도면16b



도면16c



도면16d

