

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024 년 10 월 10 일 (10.10.2024) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/210405 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/113* (2010.01) *C12N 15/63* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/004007
- (22) 국제출원일: 2024 년 3 월 29 일 (29.03.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2023-0043659 2023 년 4 월 3 일 (03.04.2023) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김윤기 (KIM, Yoon Ki); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 신민경 (SHIN, Min-

Kyung); 02463 서울특별시 동대문구 제기로 131, 107동 1902호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 파도특허법인유한회사 (PADO IP LAW PLLC); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로78길 16, 노벨빌딩 9층, Seoul (KR).

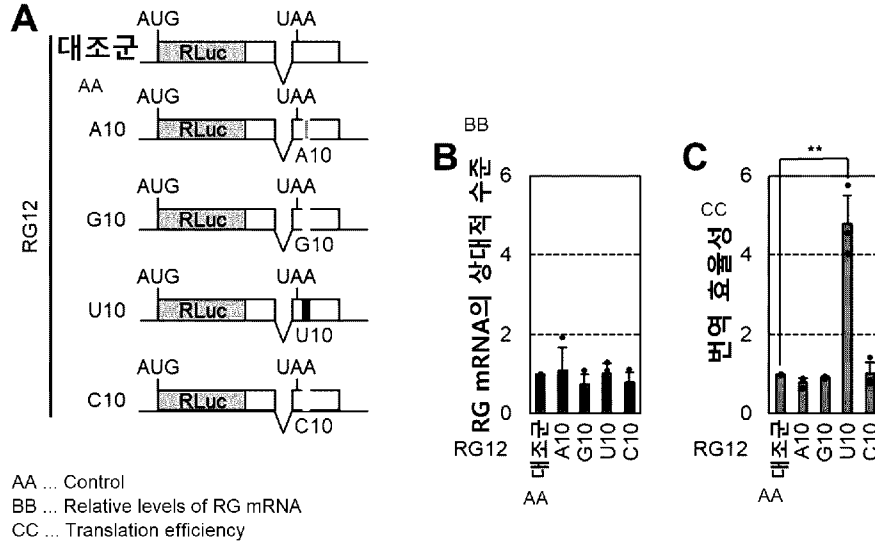
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,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

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

(54) Title: MRNA 3'UTR SEQUENCE FOR INDUCING INCREASED MRNA TRANSLATION

(54) 발명의 명칭: mRNA 번역 증가를 유도하는 mRNA 3'UTR 서열

[도 2]



(57) Abstract: When proteins are made from mRNAs, various factors determine the efficiency of protein formation from mRNAs. The efficiency of mRNA translation can be determined by various factors such as activation levels of intracellular translation factors, base sequences and RNA structures present in mRNA, and the degree of RNA modification(s). The present invention relates to a new base sequence for increasing the efficiency of mRNA translation. Particularly, if a U-rich base sequence is present after a translation termination codon, translation factors eIF4G, eRF1 and eRF3 are more efficiently recruited, and thus increased protein translation is induced.

(57) 요약서: mRNA에서 단백질이 만들어질 때, 다양한 인자들이 mRNA로부터 단백질이 만들어지는 효율을 결정하게 된다. 세포내 번역 인자들의 활성 정도, mRNA 내에 존재하는 염기서열 및 RNA 구조, RNA 변형(modification) 정도 등 다양한 요소에 의해 mRNA 번역 효율이 결정될 수 있다. 본 발명에서는 mRNA 번역의 효율을 증가시키는 새로운 염기서열을 다룬다. 구체적으로는 번역 종결코돈 뒤에 U-rich 염기서열이 존재할 경우, 번역인자인 eIF4G, eRF1, eRF3를 더 효율적으로 끌어오게 되고, 그 결과 단백질 번역의 증가를 유도한다.

[다음 쪽 계속]



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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

발명의 설명

발명의 명칭: mRNA 번역 증가를 유도하는 mRNA 3'UTR 서열 기술분야

- [1] 본 발명은 mRNA 번역 증가를 유도하는 mRNA 3'UTR 서열, 구체적으로는 3' UTR (Untranslated region)에 유리딘 서열을 포함하여 mRNA의 안정성과 단백질 번역 효율을 증가시키는 뉴클레오타이드, 번역 효율을 증가시키는 방법, 및 이를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 진핵세포에서의 단백질 번역 (protein synthesis)은 주로 mRNA의 5' 말단에 존재하는 캡 (Cap) 구조에 의해 유도된다. 많은 세포내 인자들이 mRNA의 5'-cap 구조로 리보솜(ribosome)을 끌어오는 데에 관여하고, 최종적으로 단백질 번역을 개시를 유도하게 된다. 최근 코로나바이러스에 대한 백신으로서 mRNA 백신이 널리 사용된 이후, mRNA를 이용한 질병 치료제 개발에 많은 연구개발이 집중되고 있다. 주로 mRNA의 안정성을 높여서, 최종적으로 발현되는 단백질의 양을 증가시키는 기술 개발에 초점을 맞추고 있는 상황이다. 반면에, 동일한 안정성을 가지는 mRNA라고 할지라도 단백질 번역 효율이 높을 경우 더 많은 단백질이 만들어 질 수 있게 되고, 그만큼 질병 치료 또는 백신으로서 효용 가치가 높아질 것이다.
- [4] NMD란, 많은 종류의 유전자 발현조절 기전 중, 특히 mRNA의 양질조절 (quality control)에 관여하는 대표적인 기전으로 Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD)가 잘 알려져 있다. NMD 기전은 mRNA 상에서 비정상인 단백질 종결코돈 (Premature termination codon; PTC)이 생성됐을 경우, 이 mRNA를 인식해 최종적으로 세포내에서 제거하는 기전이다. 만약 PTC를 가지는 mRNA가 NMD 기전에 의해 인식이 되지 않을 경우, mRNA는 정상길이의 단백질보다 짧은 단백질을 발현하게 되고, 이렇게 생성된 짧은 단백질이 dominant-negative effect를 지닐 수 있는 단백질이라면 정상 단백질의 기능을 억제함으로써 세포의 기능을 저해할 수 있다. 즉, NMD 기전은 세포에게 해를 줄 수 있는 비정상적인 짧은 단백질의 발현을 mRNA 상에서 미리 인식하고 이를 제거하는 일종의 품질검증 기전이라고 볼 수 있다. 현재까지 보고된 모든 유전병의 약 30%는 PTC에 기인하는 것으로 알려져 있다. mRNA 상에 생성된 PTC의 대부분은 NMD 기전과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각할 수 있다. 뿐만 아니라, 최근에는 NMD 기전과 발암과정과의 연관성에 관한 보고가 축적되고 있다. NMD의 작용 기전 연구는 많은 종류의 유전병 및 암의 치료제 개발을 위해 전세계적으로 많은 실험실에서 연구를 진행 중이다.

[5]

발명의 내용

기술적 과제

- [6] 본 발명의 일 목적은, 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈 뒤, 3' UTR (Untranslated region)에 유리딘 (uridine)을 포함하는, 뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 다른 목적은, 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈 뒤, 3' UTR에 유리딘 (uridine)을 삽입하는 단계; 를 포함하는, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은, 목적하는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하고, 상기 목적하는 단백질을 코딩하는 서열의 단백질 번역 종결코돈 뒤, 3' UTR에 유리딘 (uridine)을 포함하는, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터를 제공하는 것이다.
- [9]
- [10] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 이하, 본원에 기재된 다양한 구현예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구현예는 이들 특이적 상세사항 중 하나 이상, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. “한 가지 구현예” 또는 “구현예”에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구현예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 “한 가지 구현예” 또는 “구현예”의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구현예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구현예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [13] 명세서 내에 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [14]
- [15] 본 발명에서는 nonsense-mediated mRNA decay (NMD)의 표적이 되는 특정 리포터 mRNA의 3'UTR 내에 인위적으로 10개의 무작위 서열을 가지는 리포터 mRNA를 제작하였다. 즉, NMD를 일으키는 단백질 번역 조기종결코돈(premature

translation termination codon)의 바로 뒤에 410의 서로 다른 염기서열을 가지는 리포터를 인위적으로 제작하였고, 이를 HeLa 세포주에 도입하였다. 그 후, mRNA의 안정성에 영향을 주는 염기서열을 next-generation sequencing 기법을 통해 탐색하였다. 그 결과 조기종결코돈의 바로 뒤에 Uracil을 10개 (U10)를 가질 경우 리포터 mRNA가 매우 안정화되는 것을 발굴하였다. NMD는 단백질 번역과 직접적인 관련성이 있기 때문에, 위에서 찾은 U10 서열이 단백질 번역에 미치는 영향을 조사한 결과, 단백질 번역 종결코돈의 바로 뒤에 존재하는 U10의 서열은 단백질 번역 효율을 증가시킬 수 있었다. 단백질 번역 종결코돈의 바로 뒤에 존재하는 U10 서열은 단백질 번역의 개시, 연장 과정보다는 번역종결 과정에 직접적으로 영향을 주는 것으로 확인되었다. 본 발명은 mRNA의 번역 효율을 높이기 위한 방법을 다루는 것으로서, 단백질 번역 종결코돈의 바로 뒤에 uridine이 많은 서열 (U-rich sequence)를 삽입하여 단백질의 발현량을 증가시킬 수 있는 기술이다.

[16]

[17] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 120nt 이하인, 뉴클레오타이드를 제공한다. 바람직하게는 상기 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 105nt 이하, 더 바람직하게는 90nt 이하인 것인 바람직하나 이에 제한되지 않는다.

[18]

[19] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 유리딘의 길이는 6nt 이상인, 뉴클레오타이드를 제공한다. 바람직하게는 상기 유리딘의 길이는 10nt 이상인 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다.

[20]

[21] 본 발명에서 용어 핵산(nucleic acid)은 DNA(deoxyribonucleic acid), 및 RNA(ribonucleic acid)를 포함하는 개념이다. 용어 폴리뉴클레오타이드 혹은 폴리뉴클레오타이드와 동의어로 사용된다. 바람직하게는 당/인산 백본의 포스포디에스터(phosphodiester) 결합에 의해 서로 공유결합된 뉴클레오타이드 모노머를 포함하여 이루어진 폴리머이다. 또는 염기 변형된, 당 변형된, 또는 백본 변형된 DNA 또는 RNA를 포함한다. 그러나 본 발명의 목적을 고려할 때, 바람직하게는 본 발명에서 핵산은 RNA, 특히 mRNA를 의미하는 것일 수 있다. 관련된 개념으로서 본 발명에서 발현을 목적하는 핵산이란 발현을 목적하는 타겟 서열과 상응하는 의미일 수 있으며, 본 발명의 단백질 번역 효율 증가 방법 등을 이용하여 번역을 증가시키기 원하는 타겟 mRNA 서열일 수 있다.

[22]

[23] 본 발명에서 용어 인공 핵산(artificial nucleic acid)은 본디 자연계에 존재하지 않는 비천연 핵산 분자로 이해될 수 있다. 상기 인공 핵산은 자연계에 존재하지 않는 서열로 100% 구성되거나, 또는 자연계에 존재하는(야생형) 서열 일부와

자연계에 존재하지 않는 서열 일부가 혼합되어 구성될 수 있다. 자연계에 존재하는 서열로만 구성되는 경우에, 서열은 서로 다른 종(species)로부터 유래한 서열들의 혼합일 수 있다. 자연계에 존재하는 서열 일부와 자연계에 존재하지 않는 서열 일부가 혼합되어 구성되는 경우에, 자연계에 존재하는 서열은 1종 이상의 종(species)로부터 유래한 서열의 혼합일 수 있다. 인공 핵산은 이의 개별 서열의 자연적으로 발생하지 않는 변형, 예를 들어 자연적으로 발생하지 않는 뉴클레오타이드의 구조적 변형 때문에 비-천연적일 수 있다. 또한 인공 핵산은 DNA 분자, RNA 분자, 또는 DNA 및 RNA 부분을 포함하는 하이브리드 분자일 수 있다. 본 발명에서 목적하는 핵산, 특히 mRNA의 안정화 또는 mRNA의 번역 증가를 위해 이용되는 핵산은 단일 종(species)으로부터 유래한 서열에 인위적인 변형이 가해진 것이거나, 또는 서로 다른 종(species)로부터 유래한 서열들이 혼합된 인공 핵산일 수 있다. 상기 인공 핵산은 벡터(vector)의 일종으로 이해될 수 있다. 본 발명의 맥락에서 벡터는 핵산 안정화를 위해 선별된 인공 핵산을 포함하는 것일 수 있다. 이러한 벡터는 저장 벡터, 발현 벡터, 클로닝 벡터, 수송 벡터 등일 수 있다. 저장 벡터는 핵산 분자, 예를 들어 mRNA 분자의 간편한 저장을 허용하는 벡터이다. 발현 벡터는 RNA, 예를 들어 mRNA, 또는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질과 같은 발현 생산물의 생산에 사용될 수 있다. 클로닝 벡터는 전형적으로 벡터 내로 핵산 서열을 합체하는데 사용될 수 있는 클로닝 부위를 포함하는 벡터이다. 클로닝 벡터는 예를 들어 플라스미드 벡터 또는 박테리오파지 벡터일 수 있다. 수송 벡터는 세포 또는 유기체 내로 핵산 분자를 수송하는데 적합한 벡터로서, 예를 들어 바이러스 벡터일 수 있다. 본 발명의 맥락에서 벡터는 예를 들어 RNA 벡터 또는 DNA 벡터일 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 또는 바이러스 벡터인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 벡터는 목적하는 DNA 또는 RNA(예를 들어 mRNA) 핵산을 세포 내, 바람직하게는 진핵 세포 내로 도입시켜, 도입 대상체의 본래 형질을 변화시키는 데 이용될 수 있다. 이를 형질전환(transfection)이라 명명한다. 상기 형질전환은 세포 내로, 바람직하게는 포유동물 세포 등의 진핵 세포 내로 핵산 분자를 도입하기 위한 통상의 기술자에게 알려진 어느 방법으로 수행될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 전기천공, 양이온성 지질 및/또는 리포솜에 기초한 리포펙션(lipofection), 칼슘 포스페이트 침전, 나노입자 기초의 형질주입, 바이러스 기초의 형질주입, 또는 DEAE-덱스트란 또는 폴리에틸렌이민 등과 같은 양이온성 폴리머 기초의 형질주입을 포함한다. 또는 상기 형질전환은 바이러스, 예를 들면 렌티바이러스를 이용하여 수행될 수 있다. 상기와 같은 방법으로 형질전환되어 본래의 형질이 변화된 도입 대상체를 형질전환체라 명명한다.

- [24] 본 명세서에서 용어 "숙주세포" 또는 "세포주"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에

의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.

[25] 본 발명의 숙주세포는 바람직하게는 세균(bacteria)세포, CHO 세포, HeLa 세포, HEK293 세포, BHK-21 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, NIH3T3 세포 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[26] 본 발명의 상기 포함하여 mRNA의 안정성과 단백질 번역 효율을 증가시키는 뉴클레오타이드, 번역 효율을 증가시키는 방법, 및 이를 포함하는 벡터는 목적하는 개체의 면역 증강(immunity-boosting)을 위해 이용될 수 있다. 상기 면역 증강은 박테리아 표면, 바이러스 입자, 종양 항원 등의 특징적인 성분과 같은 선택된 항원에 대해 원하는 면역 반응이 증폭되는 것을 의미한다. 자연적으로, 또는 인위적으로 면역 반응이 증폭되도록 유도할 수 있으며, 인위적인 면역 반응 증폭의 경우 백신 투여가 가장 일반적인 방법이다. 백신(vaccine)은 전형적으로 적어도 하나의 항원, 바람직하게는 면역원을 제공하는 예방 또는 치료적 물질로 이해된다. 항원 또는 면역원은 백신 접종에 적합한 어느 물질로부터 유래(derived)될 수 있다. 예를 들어, 항원 또는 면역원은 박테리아 또는 바이러스 입자 등으로부터, 또는 종양 또는 암 조직으로부터 유래될 수 있다. 항원 또는 면역원은 생체 내 적응 면역 시스템을 자극한다. 종래에는 항원 또는 면역원 유래의 단백질, 또는 펩타이드를 생체 내 적응 면역 시스템의 자극원으로 이용하는 백신이 주를 이루었으나, 최근 핵산을 자극원으로 이용하고자 하는 시도가 지속되고 있다. 특히 mRNA는 DNA와 달리 핵 내로 들어갈 필요없이 세포질에서 바로 일시적으로 원하는 단백질이 발현될 수 있다는 장점이 있으므로, 보건/의료 분야에서 새로운 치료 방법으로 주목받고 있다. 예를 들어 신종감염병의 경우 mRNA의 염기서열만 바꿈으로써 빠른 백신 제조가 용이하고, 백신으로 사용되는 mRNA는 사람세포 내에서 단백질을 발현한 후 짧은 시간 내에 제거되므로 DNA 백신에 비해 탁월한 안전을 기대할 수 있다. 그러나 mRNA는 DNA에 비해 구조적으로 안정도가 낮아 산업적으로 이용하기에 한계가 있는 실정이다. COVID-19에서 처음으로 시도된 mRNA 백신의 경우 half-life가 약 4시간 정도로 불안정하여 충분한 양의 단백질 발현을 위해 1회 접종시 약 30~100ug의 mRNA 투여가 필요하였고, 이러한 단위 다량의 mRNA 투여는 개체에 따라 다양한 부작용을 야기하는 원인이 되었다. 따라서 이러한 종래 문제의 해결을 위한 관점에서, 본 발명의 mRNA의 안정성과 단백질 번역 효율을 증가시키는 뉴클레오타이드, 이를 포함하는 벡터, 또는 인공 핵산은 목적하는 면역 증강을 위해 적합한 항원 또는 면역원 유래의 핵산과 함께 백신으로서 투여될 수 있다. 이러한 경우에, 3' UTR에 존재하는 유리딘 서열은 핵산 백신에서 항원 유전 정보의 단백질 번역 종결코돈으로부터 3' 측에 위치하는 것이 바람직하다. 더하여, 핵산 백신의 안정성을 향상시키고, 생체 내에서 항원이 효율적으로 합성될 수 있도록 하므로, 적은 양의 백신 투여로도 질병 치료 및 예방에 높은 효과를 기대할 수 있다. 또한 기대하는 치료 효과를

충족하기 위해 투여되는 백신의 용량이 적어지므로 백신 생산가를 낮추는 효과를 기대할 수 있다. 상기 백신은 기대하는 효과의 부스팅을 위해 추가로 어쥬번트(component)를 포함할 수 있다. 어쥬번트는 전형적으로 약물 또는 백신과 같은, 다른 제제의 효과를 변형하거나 강화할 수 있는 약학적 및/또는 면역학적 제제이다. 이는 넓은 의미로 해석되고 물질의 넓은 범위를 나타낸다. 전형적으로, 이들 물질은 항원의 면역성을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 어쥬번트는 선천적 면역 시스템에 의해 인식될 수 있으며, 선천적 면역 반응을 유도할 수 있다. 포함하여 mRNA의 안정성과 단백질 번역 효율을 증가시키는 뉴클레오타이드를 포함하는 본 발명의 인공 서열, 또는 백신은 포함되는 항원 또는 면역원의 종류에 따라 그 용도가 무한히 확장될 수 있다. 예를 들어, 항원 또는 면역원으로 바이러스 유래의 핵산을 포함시키는 경우에, 상기 백신은 해당 바이러스의 백신이다. 일례로 상기 항원 또는 면역원이 SARS-CoV-2 바이러스 유래인 경우에 해당 백신은 코로나바이러스 감염증(COVID-19) 백신이다. 상기 항원 또는 면역원이 인플루엔자 바이러스(Influenza virus A, B, 또는 C) 유래인 경우에, 해당 백신은 독감 백신이다. 상기 항원 또는 면역원이 유두종바이러스 또는 파필로마바이러스(papillomavirus) 유래인 경우에, 해당 백신은 자궁경부암 백신이다.

[27]

[28] 본 발명의 상기 mRNA의 안정성과 단백질 번역 효율을 증가시키는 뉴클레오타이드, 번역 효율을 증가시키는 방법, 및 이를 포함하는 벡터는 목적하는 개체의 면역을 증강시킴으로서, 목적하는 질환의 예방 또는 치료를 위해 일종의 약학적 조성물(pharmaceutical composition)로 이용될 수 있다.

[29]

[30] 본 발명의 상기 mRNA의 안정성과 단백질 번역 효율을 증가시키는 뉴클레오타이드, 번역 효율을 증가시키는 방법, 및 이를 포함하는 벡터는 특정 mRNA 또는 특정 단백질의 양적인 부족에 기인하는 다양한 유전병 및 질병의 예방 또는 치료를 위해 일종의 약학적 조성물(pharmaceutical composition)로 이용될 수 있다.

[31]

[32] 본 발명의 상기 mRNA의 안정성과 단백질 번역 효율을 증가시키는 뉴클레오타이드, 번역 효율을 증가시키는 방법, 및 이를 포함하는 벡터는 기존 DNA를 이용한 다양한 질병치료법의 대체재로 이용될 수 있다.

[33]

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

[35]

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.

- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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, 유효제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 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.
- [39] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 유효제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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 한번 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, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[43]

[44] 본 발명의 일 구체예에서는, 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈 뒤, 3' UTR (Untranslated region)에 유리딘 (uridine)을 포함하는, 뉴클레오타이드를 제공한다.

[45] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 목적하는 핵산은 mRNA 서열인 것인, 뉴클레오타이드를 제공한다.

[46] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 120nt 이하인, 뉴클레오타이드를 제공한다.

[47] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 105nt 이하인, 뉴클레오타이드를 제공한다.

[48] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 유리딘의 길이는 6nt 이상인, 뉴클레오타이드를 제공한다.

[49] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 유리딘의 길이는 10nt 이상인, 뉴클레오타이드를 제공한다.

[50] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 방법은 RNA 백신 또는 치료용 mRNA의 단백질 번역 효율을 증가시키는 것인, 뉴클레오타이드를 제공한다.

[51] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈 뒤, 3' UTR에 유리딘 (uridine)을 삽입하는 단계; 를 포함하는, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.

[52] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 목적하는 핵산은 mRNA 서열인 것인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.

[53] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 120nt 이하인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.

[54] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 105nt 이하인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.

[55] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 유리딘의 길이는 6nt 이상인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.

[56] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 유리딘의 길이는 10nt 이상인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.

- [57] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 방법은 RNA 백신 또는 치료용 mRNA의 단백질 번역 효율을 증가시키는 것인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [58] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 목적하는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하고, 상기 목적하는 단백질을 코딩하는 서열의 단백질 번역 종결코돈 뒤, 3' UTR에 유리딘 (uridine)을 포함하는, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터를 제공한다.
- [59] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 목적하는 단백질을 코딩하는 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 120nt 이하인, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터를 제공한다.
- [60] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 목적하는 단백질을 코딩하는 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 105nt 이하인, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터를 제공한다.
- [61] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 유리딘의 길이는 6nt 이상인, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터를 제공한다.
- [62] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 유리딘의 길이는 10nt 이상인, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터를 제공한다.
- [63] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 벡터는 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터인 것인, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터를 제공한다.
- [64]
- [65] 이하 상기 본 발명을 실시예에 입각하여 상세히 설명한다.
- [66]

발명의 효과

- [67] *In vitro*에서 생산된 mRNA를 치료용으로 사용하기 위해서는 mRNA가 안정해야 하고, 동시에 mRNA로부터 많은 양의 단백질이 생성되어야 한다. 본 발명에서 제시하는 U-rich 서열을 이용한 단백질 번역 효율 증가 기술은 염기서열의 수정을 통해 손쉽게 적용 가능하다는 큰 장점이 있다. 따라서 mRNA를 기반으로 한 백신 개발 및 치료용 기술 개발에 큰 활용가치가 있을 것으로 기대된다.
- [68]

도면의 간단한 설명

- [69] 도 1a 내지 도 1i는 NMD 리포터 mRNA를 이용한 염기서열 탐색 결과를 나타낸 것이다. 구체적으로 도 1a는 실험 모식도를 나타낸 것이고 도 1b는 대조군 siRNA와 UPF1 siRNA 처리 시, 유사한 정도의 리포터 라이브러리가 생성됐음을 보여주는 밴다이어그램이다. 도 1c는 대부분의 리포터 mRNA가 UPF1의 발현 저해에 의해 증가됨을 보여주는 그림이다 도 1d 내지 도 1i는 U-rich 서열을 가지는 리포터 mRNA는 UPF1 의존성이 없음을 보여주는 분석결과를 나타낸

것이다. 즉, Uridine이 60% 이상일 때, 리포터 mRNA는 UPF1 의존성이 없음을 보여준다.

[70] 도 2는 뉴클레오타이드 종류에 따른 선별적 번역 증가 실험결과를 나타낸 결과이다. 구체적으로 (A)는 실험 모식도를 나타낸 것이고, (B)는 리포터 mRNA의 상대적 수준은 차이가 없음을 보여주는 qRT-PCR 결과이며, (C)는 단백질 번역 효율을 비교한 결과로서 U10은 다른 A10, G10, C10과 비교하여 단백질 번역 효율을 약 5배 가량 증가시킴을 보여주는 결과이다.

[71] 도 3는 NMD 리포터에서 단백질 번역 종결코돈과 U10 사이의 거리의 중요성을 보여주는 실험결과이다. 구체적으로 (A)는 실험 모식도를 나타낸 것이고, (B)는 각 리포터에서의 NMD 효율을 나타낸 것이다.

[72] 도 4는 역시 NMD 리포터에서 단백질 번역 종결코돈과 U10 사이의 거리의 중요성을 보여주는 실험결과이다. 구체적으로 (A)는 실험 모식도를 나타낸 것이고, (B)는 리포터 mRNA의 상대적 수준은 차이가 없음을 보여주는 qRT-PCR 결과이며, (C)는 단백질 번역 효율을 비교한 결과로서 단백질 번역 종결코돈과 U10의 거리가 90 염기서열 이하일 경우 효과적으로 단백질 번역을 증가시킴을 보여주는 결과이다.

[73] 도 5는 연속적인 U 10개 (U10) 또는 U 50개 (U50)을 가지는 리포터를 실험한 결과이다. 구체적으로 (A)는 리포터 모식도를 나타낸 것이고, (B)는 리포터 mRNA의 상대적 수준은 차이가 없음을 보여주는 qRT-PCR 결과이며, (C)는 단백질 번역 효율을 비교한 결과로서 U10과 U50는 단백질 번역 효율을 모두 약 6배 가량 증가시킴을 보여주는 결과이다.

[74] 도 6은 IRES를 이용한 U10의 단백질 번역 효율을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 구체적으로 (A)는 리포터 모식도를 나타낸 것이고, (B)는 리포터 mRNA의 상대적 수준은 차이가 없음을 보여주는 qRT-PCR 결과이며, (C)는 단백질 번역 효율을 비교한 결과로서 EMCV IRES의 경우 단백질 번역 효율이 약 6배 가량 증가되었음을 보여주는 결과이다.

[75] 도 7은 eIF4G 면역침강법 (Immunoprecipitation; IP)을 통한 U10 리포터와 eIF4G 간의 결합을 보여주는 실험 결과이다. 구체적으로 (A)는 4EGI-1 없는 상태에서의 eIF4G 면역침강법 결과이며 (B)는 4EGI-1 처리한 상태에서의 eIF4G 면역침강법 결과이다.

[76] 도 8은 U10 리포터 mRNA와 종결인자의 특이적인 결합을 보여주는 실험결과를 나타낸 것이다. 구체적으로 (A)는 U10 리포터 mRNA 모식도이고, (B)는 리포터 mRNA의 정제를 위해 사용한 MS2-HA-MBP의 모식도이며, (C)는 정제된 리포터 mRNA와 결합하는 다양한 번역인자의 웨스턴 블랏 실험결과를 나타낸 것이다.

[77]

발명의 실시를 위한 형태

[78] 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 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[79]

[80] 실시예 1. NMD 리포터를 이용한 mRNA 안정성에 영향을 주는 염기서열 탐색

[81] 난센스 돌연변이 매개 RNA 분해 (Nonsense-mediated mRNA decay; NMD)은 단백질 번역 효율에 의해 결정되는 세포내 현상으로서, 번역이 잘될수록 NMD 리포터 mRNA의 양이 줄어들게 된다. 이를 이용하여 도 1과 같이 NMD 리포터 mRNA의 번역 조기종결코돈 (premature translation termination codon; PTC)의 바로 뒤쪽에 10개의 연속적인 무작위 서열을 가지는 리포터 mRNA를 제작하였다.

[82] 즉, NMD를 일으키는 단백질 번역 조기종결코돈의 바로 뒤에 4¹⁰의 서로 다른 염기서열을 가지는 리포터를 인위적으로 제작하였다. 제작된 리포터 mRNA를 HeLa 세포주에서 발현시킨 후, 각 리포터 mRNA의 안정성을 차세대 염기서열분석 (next-generation sequencing; NGS) 기법을 이용하여 조사하였다. 특히, NMD의 중요한자인 UPF1이 존재하는 상태와 UPF1의 발현이 저해된 상태를 비교함으로써 NMD 효율을 분석하였다.

[83] 실험결과, 대부분의 NMD 리포터 mRNA는 UPF1의 발현 저해에 따라 양이 증가하였다. 반면에 U-rich 염기서열을 가지는 리포터 mRNA의 경우, UPF1 (Regulator of nonsense transcripts 1 단백질, UPF1 유전자에 의해 암호화)에 대한 의존도가 없음을 알 수 있었다. 이 결과는 번역 종결코돈의 뒤에 U-rich 염기서열을 가지는 경우 NMD의 표적이 되지 않음을 의미한다.

[84]

[85] 실시예 2. U, A, G, C 중 단백질 번역 효율을 향상시키는 뉴클레오타이드 확인

[86] 마찬가지로 U-rich 염기서열에 의한 번역 효율의 변화를 직접적으로 모니터링 하기위해 NMD 리포터가 아닌 일반적인 mRNA 리포터를 사용하였다. 다양한 리포터를 제작한 후 단백질 종결코돈 뒤에 존재하는 U, A, G, C 중 mRNA 번역 효율을 향상시키는 뉴클레오타이드는 무엇인지 확인하기 위하여 실험을 진행하였다.

[87] 그 결과, 도 2에서 알 수 있는 것과 같이 단백질 종결코돈 뒤에 존재하는 U10, A10, G10, C10을 비교한 결과, U10, A10, G10, C10의 상대적인 mRNA 양은 비슷하였으나, 오직 U10만이 유의미하게 mRNA의 번역효율을 향상시킴을 알 수 있었다.

[88]

[89] 실시예 3. 단백질 번역 종결코돈과 U-rich 염기서열 간의 거리의 중요성에 관한 실험

- [90] 이와 같이, U-rich 염기서열이 mRNA 안정성에 영향을 주는지 확인한 후, 이 실험에서는 10개의 연속된 Uridine 서열 (U10)로 이루어진 NMD 리포터 mRNA를 사용하여 단백질 번역 종결코돈과 U10 사이의 거리에 따른 상대적인 mRNA의 안정성을 살펴보았다.
- [91] 그 결과 도 3에서 알 수 있는 것과 같이, U10의 존재에 의한 NMD 저해는 단백질 번역 종결코돈과 U10 사이의 거리가 중요함을 규명하였다. 구체적으로 단백질 번역 종결코돈과 U10 사이의 거리가 90 뉴클레오타이드 (nucleotides) 이하일 경우 효율적인 NMD 저해가 관찰되는 반면, 단백질 번역 종결코돈과 U10 사이의 거리가 120 뉴클레오타이드 이상일 경우 NMD 저해효과가 사라짐을 알 수 있었다. 즉, 단백질 번역 종결코돈과 U10 사이의 거리가 120 뉴클레오타이드 이상일 경우, mRNA가 불안정해짐을 확인하였다.
- [92] 또한, 도 4에서 알 수 있는 것과 같이, 도 3에서 살펴본 실험결과와 유사하게 단백질 번역 종결코돈과 U10의 거리가 90 염기서열 이하일 경우 효과적으로 단백질 번역을 증가시킴을 확인하였다.
- [93]
- [94] 실시예 4. U-rich 염기서열의 길이에 따른 mRNA 번역 증가 효율에 관한 실험
- [95] U-rich 염기서열에 의한 번역 효율의 변화를 직접적으로 모니터링 하기 위해 NMD 리포터가 아닌 일반적인 mRNA 리포터를 사용하였다. 다양한 리포터를 제작한 후 단백질 종결코돈 뒤에 존재하는 U-rich 염기서열의 길이에 따라 mRNA 번역 효율이 차이가 나는지 확인하기 위하여 실험을 진행하였다.
- [96] 그 결과, 도 4에서 알 수 있는 것과 같이 단백질 종결코돈 뒤에 존재하는 U10 또는 U50 서열은 비슷한 정도로 단백질 번역 효율을 약 6배 이상 증가시킴을 알 수 있었다. 또한, 비록 도 3에는 포함되지 아니하였으나 U100 이상도 mRNA 번역 효율을 향상시킴을 알 수 있었다. 그러므로 단백질 종결코돈 뒤에 존재하는 U-rich 염기서열은 도 1에서 알 수 있는 것과 같이 U6 이상부터 mRNA 단백질 번역 효율을 향상시키며, mRNA 번역 효율을 향상시키는 U-rich 염기서열의 최대 길이는 특별한 한계가 없음을 알 수 있었다.
- [97]
- [98] 실시예 5. eIF4G 번역 인자를 통한 U-rich 염기서열의 번역 증가 기전 규명
- [99] U-rich 염기서열에 의한 번역 효율의 증가가 번역의 어떤 과정을 영향을 주는가를 결정하기 위해 IRES (internal ribosome entry site)를 가지는 리포터를 사용하여 mRNA의 상대적 레벨과 mRNA의 번역 효율을 확인하였다. 실험 결과, 도 6에서 확인할 수 있는 것과 같이, EMCV(encephalomyocarditis virus, 뇌심근염 바이러스) IRES의 경우 U10에 의한 mRNA 번역 증가가 관찰되어 약 6배 가량 mRNA의 번역 효율을 향상 시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [100]
- [101] 실시예 6. 번역 종결코돈의 뒤에 U10 서열을 가지는 mRNA와 eIF4G의 결합 분석

- [102] eIF4G가 U10을 통한 번역에 관련한다는 사실을 바탕으로 U10 서열을 가지는 mRNA에 eIF4G가 더 잘 결합하는가를 실험하였다. eIF4G는 eIF4E와의 결합을 통해 mRNA의 5'말단에 존재할 수 있다. 이를 배제하기 위해서 eIF4E-eIF4G 결합을 저해하는 화합물인 4EGI-1 (EMD Chemicals, San Diego, CA) 500uM 을 처리한 것과 처리하지 않은 것을 비교하였다.
- [103] 실험 결과, 도 7에서 알 수 있는 것과 같이 eIF4G 항체 (토끼 혈청에서 얻은 다클론 항체; 참고논문 Molecular and Cellular Biology, Mar. 2005, p. 2450-2462) 5ul을 이용하여 eIF4G를 면역침강법 (immunoprecipitation; IP)을 한 결과, 4EGI-1 처리한 상황에서도 U10을 가지는 리포터 mRNA와 eIF4G 간의 특이적인 결합을 관찰할 수 있었다. 이는 U10에 eIF4G가 직간접적으로 결합함을 의미한다. 4EGI-1 처리한 상황에서도 U10을 가지는 리포터 mRNA와 eIF4G 간의 특이적인 결합을 관찰할 수 있었다. 이는 U10에 eIF4G가 결합함을 의미한다.
- [104]
- [105] 실시예 7. 번역 종결코돈의 뒤에 U10 서열을 가지는 mRNA는 번역종결인자인 eRF1, eRF3와 더 안정한 결합을 형성
- [106] U10을 가지는 리포터에서 증가하는 번역의 분자생물학적 기전을 알아보기 위해 U10을 가지는 리포터를 세포에서 직접 정제한 이후, 이 리포터와 결합하는 번역인자를 조사하였다. 이를 위하여 eIF4E-eIF4G와의 결합을 통한 단백질 결합을 배제하기 위해서 모든 과정에서 4EGI-1 화합물을 처리하였다. 도 8(A)에서 나타난 모식도와 같이 U10 리포터 mRNA의 3'UTR에는 MS2 결합단백질이 결합할 수 있는 MS-결합 서열을 삽입하였다. 동시에 MS2-HA-MBP 단백질을 세포에 발현시켰다. 그림 8(B)에서 나타난 바와 같이, 발현된 MS2-HA-MBP 단백질은 MS2를 통해 리포터 mRNA의 MS2-결합 서열에 결합을 하고, MBP는 MBP 비드에 강력한 결합을 하게 된다. 이러한 원리를 이용하여 세포내에서 발현된 U10 리포터 mRNA를 정제하였고, 정제된 샘플에 존재하는 번역인자들을 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다.
- [107] 실험 결과, 도 8(c)에서 알 수 있는 것과 같이, 번역 종결코돈 뒤에 U10을 가지는 리포터 mRNA에서는 번역종결인자인 eRF1, eRF3가 상대적으로 더 많이 존재함을 알 수 있었다. 이는 U10이 존재할 경우, 단백질 번역 종결이 더 활발히 일어나고, 그 결과 단백질 번역 효율이 증가함을 의미한다.

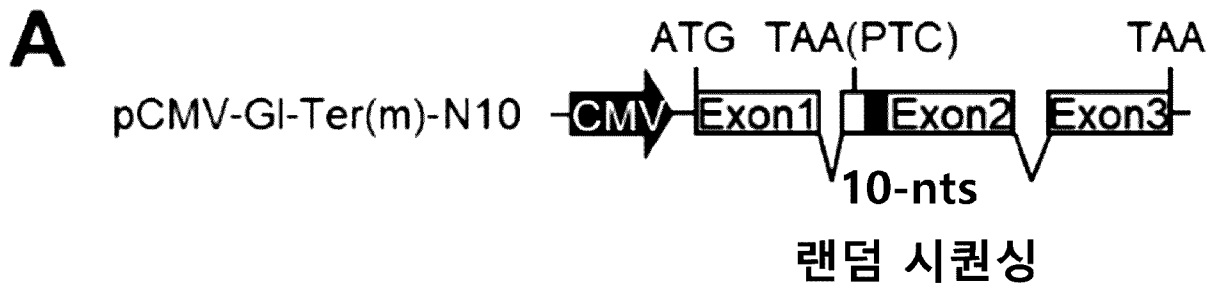
청구범위

- [청구항 1] 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈 뒤, 3' UTR (Untranslated region)에 유리딘 (uridine)을 포함하는, 뉴클레오타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 목적하는 핵산은 mRNA 서열인 것인, 뉴클레오타이드.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 120nt 이하인, 뉴클레오타이드.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 105nt 이하인, 뉴클레오타이드.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 유리딘의 길이는 6nt 이상인, 뉴클레오타이드.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 유리딘의 길이는 10nt 이상인, 뉴클레오타이드.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 방법은 RNA 백신 또는 치료용 mRNA의 단백질 번역 효율을 증가시키는 것인, 뉴클레오타이드.
- [청구항 8] 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈 뒤, 3' UTR에 유리딘 (uridine)을 삽입하는 단계; 를 포함하는, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 목적하는 핵산은 mRNA 서열인 것인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 120nt 이하인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 목적하는 핵산 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 105nt 이하인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 유리딘의 길이는 6nt 이상인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,

상기 유리딘의 길이는 10nt 이상인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법.

- [청구항 14] 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 방법은 RNA 백신 또는 치료용 mRNA의 단백질 번역 효율을 증가시키는 것인, 목적하는 핵산의 단백질 번역 효율을 증가시키는 방법.
- [청구항 15] 목적하는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하고, 상기 목적하는 단백질을 코딩하는 서열의 단백질 번역 종결코돈 뒤, 3' UTR에 유리딘 (uridine)을 포함하는, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 목적하는 단백질을 코딩하는 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 120nt 이하인, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 목적하는 단백질을 코딩하는 서열의 단백질 번역 종결코돈과 유리딘 사이의 거리는 105nt 이하인, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 유리딘의 길이는 6nt 이상인, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 유리딘의 길이는 10nt 이상인, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터.
- [청구항 20] 제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 벡터는 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터인 것인, 목적하는 단백질의 번역 효율 증가용 벡터.
- [청구항 21] 제15항 내지 제19항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는, 목적하는 단백질의 발현을 증가시키는 것을 목적으로 하는 세포주.

[정정을 위한 대체 용지]
[도1a]



10-nts 랜덤 라이브러리 구축



UPF1이 고갈되지 않거나 고갈된
HeLa 세포로 라이브러리를 형질감염



전체 세포 RNA 정제



cDNA 합성 및 PCT 증폭



PAGE 추출

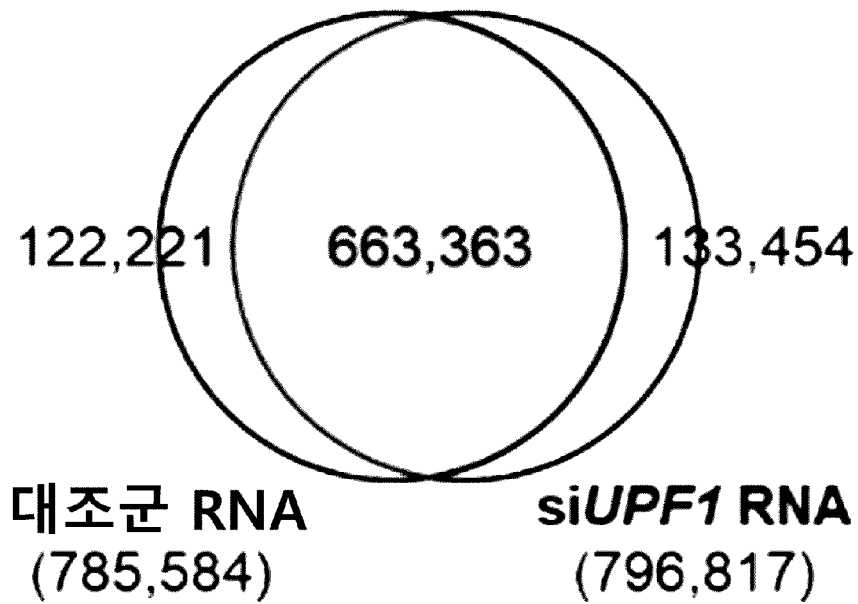


NGS를 위한 어댑터 연결

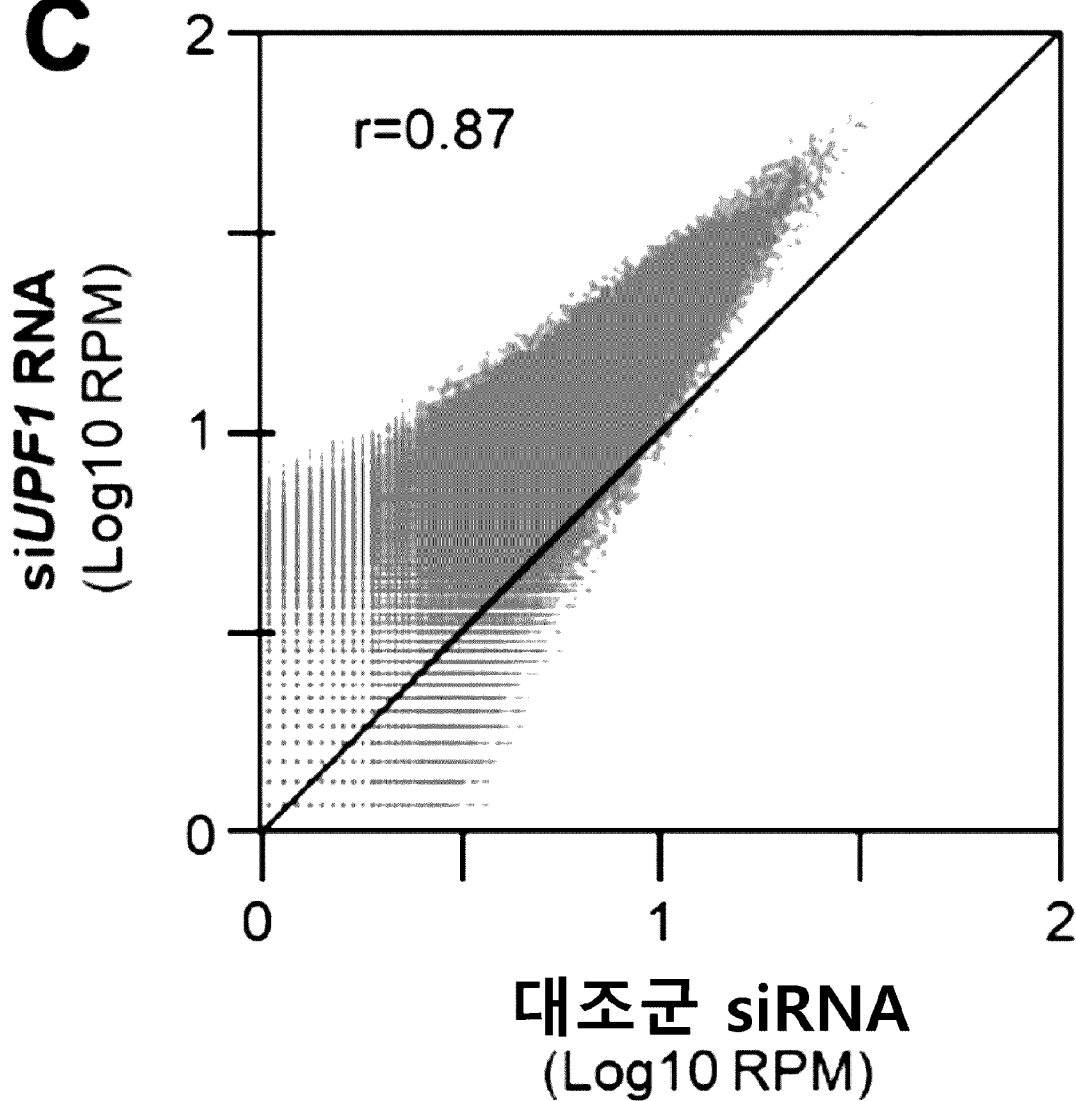


NGS 및 생물정보학 분석

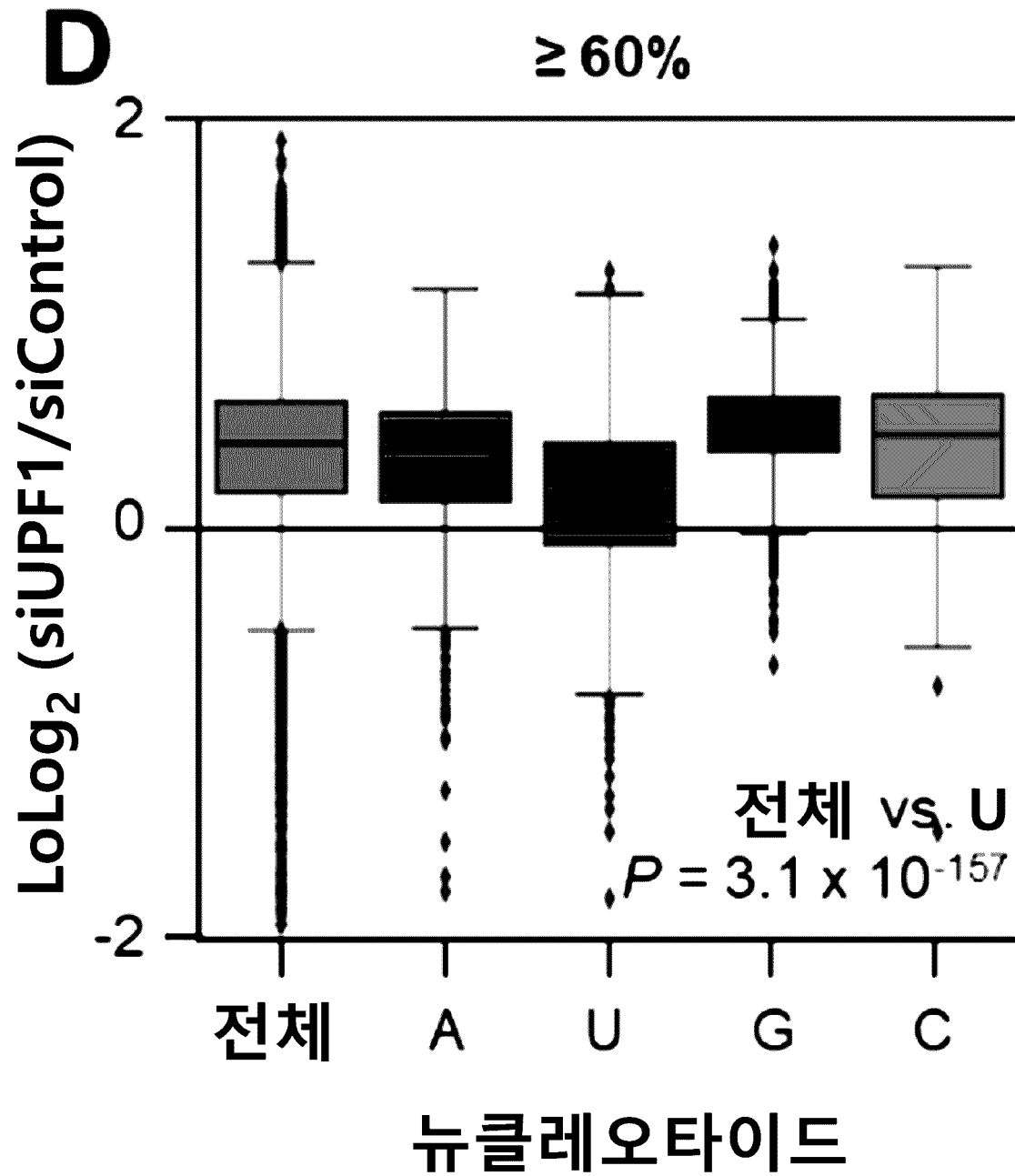
[도1b]

B

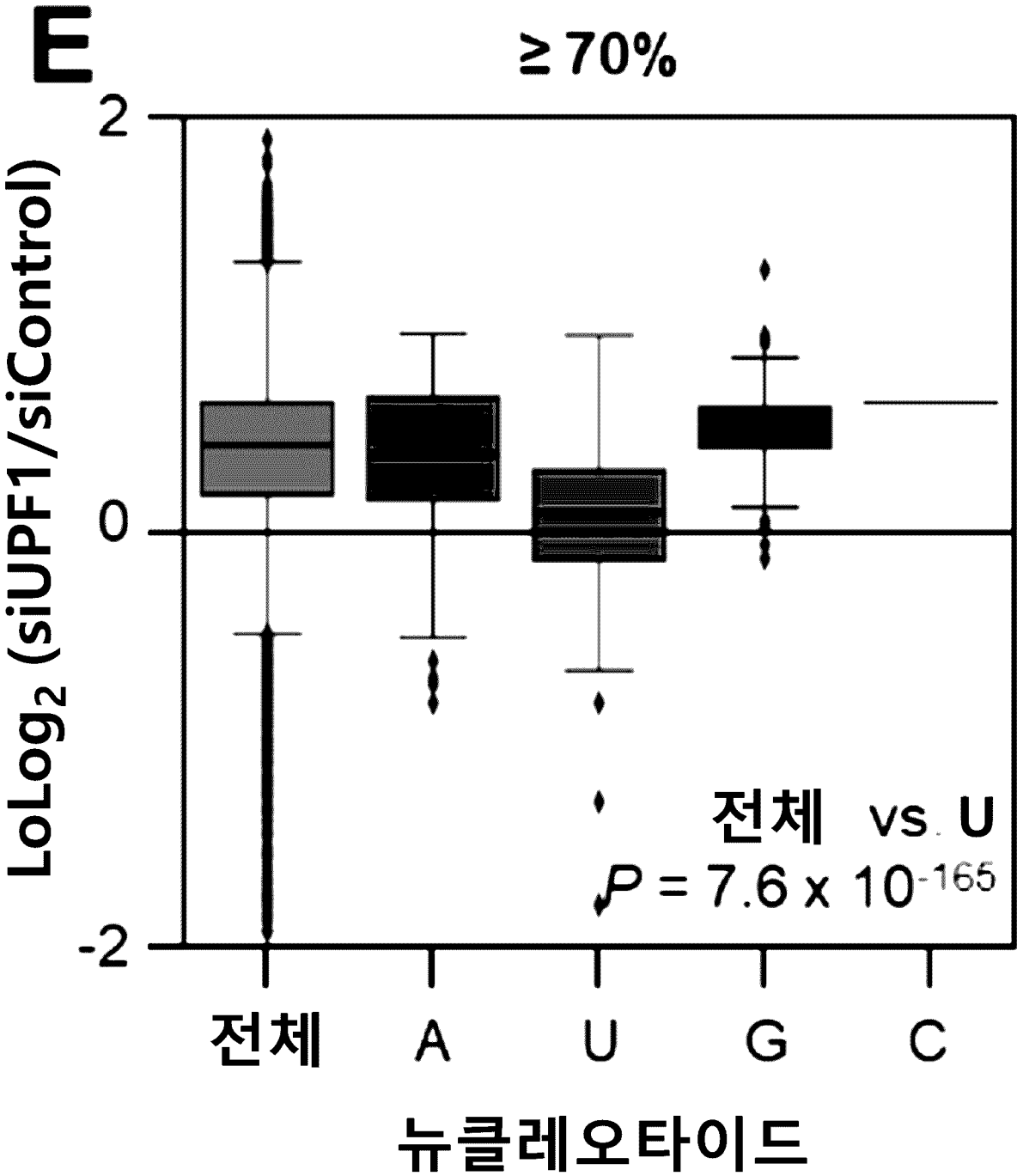
[도1c]

C

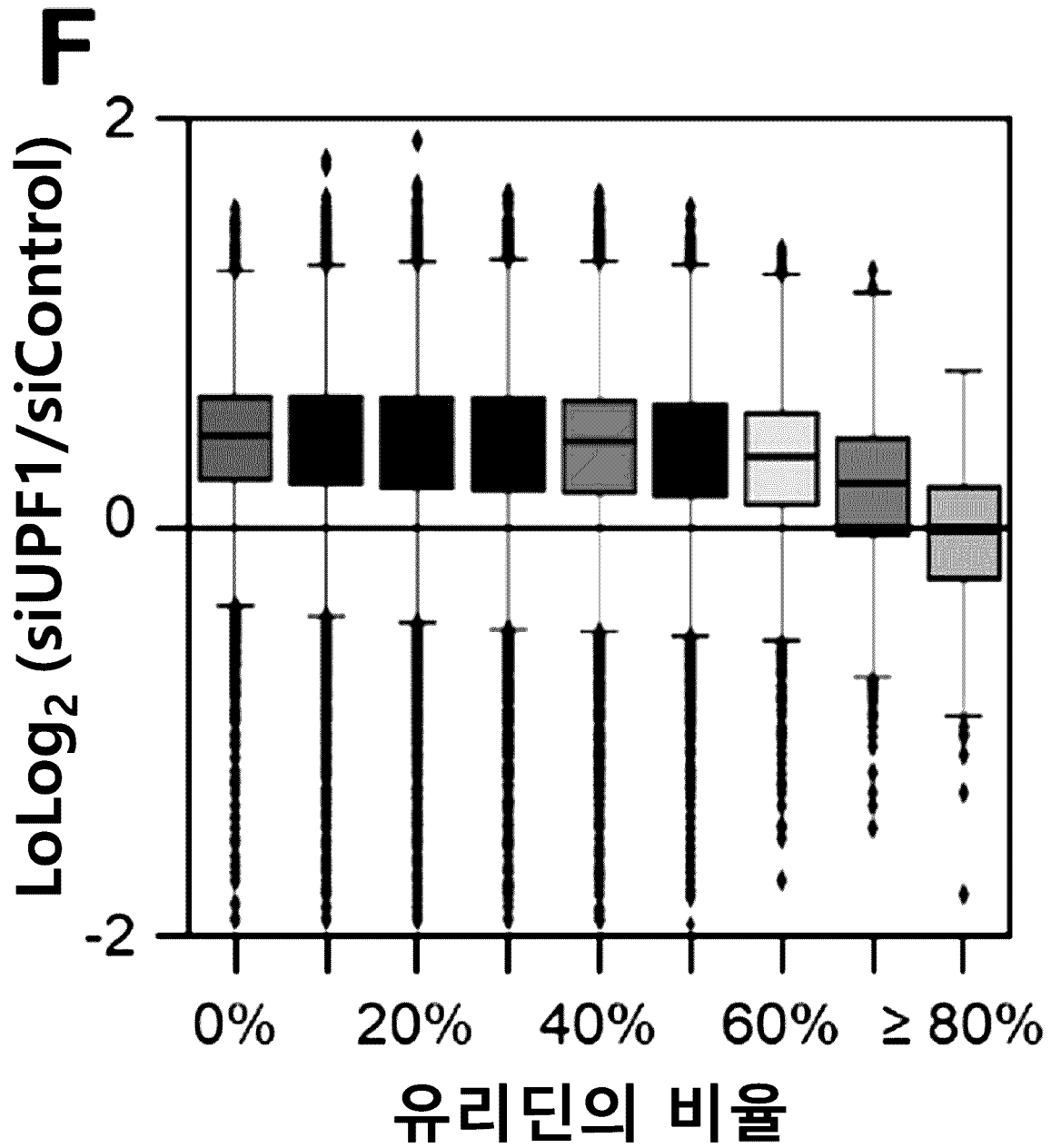
[도1d]



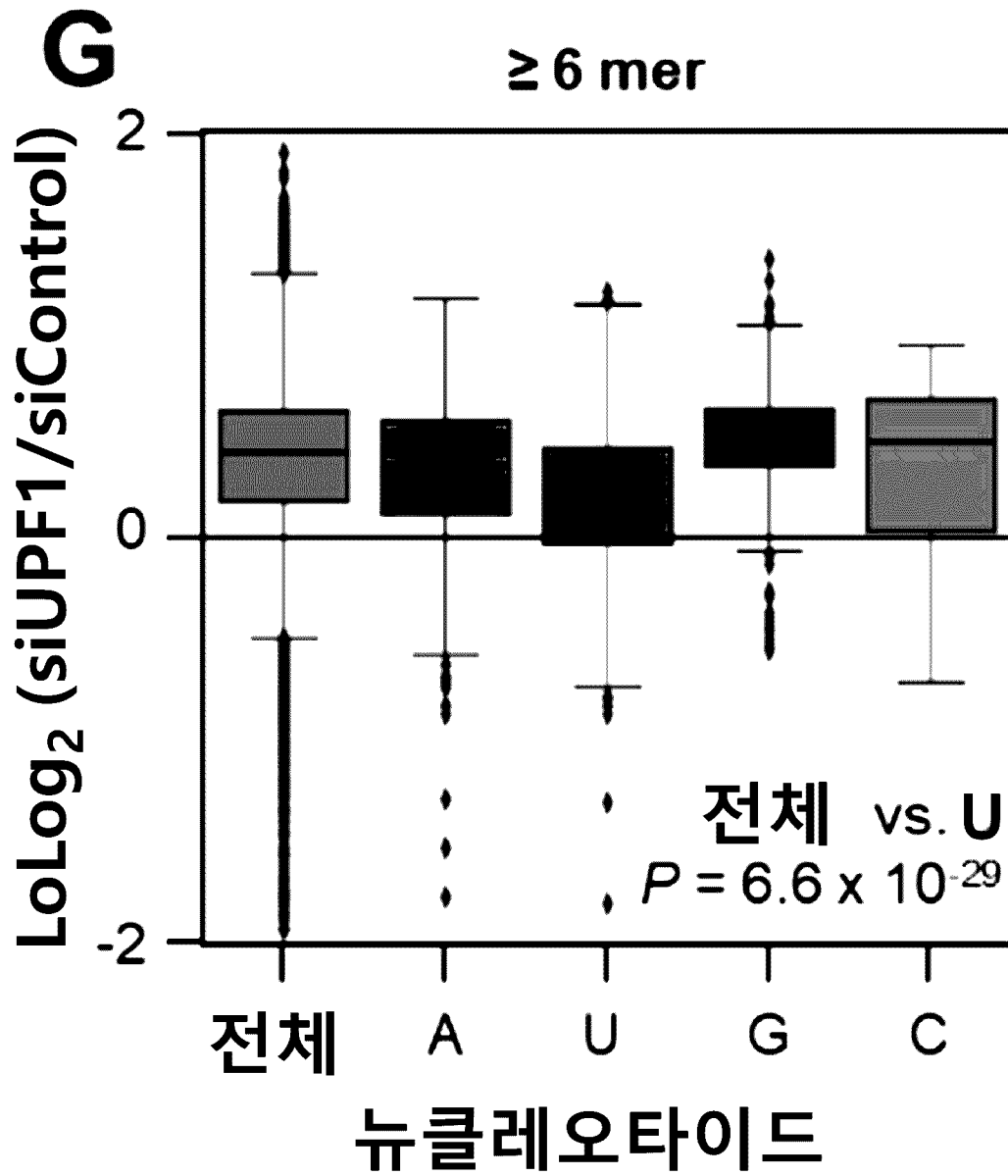
[도1e]



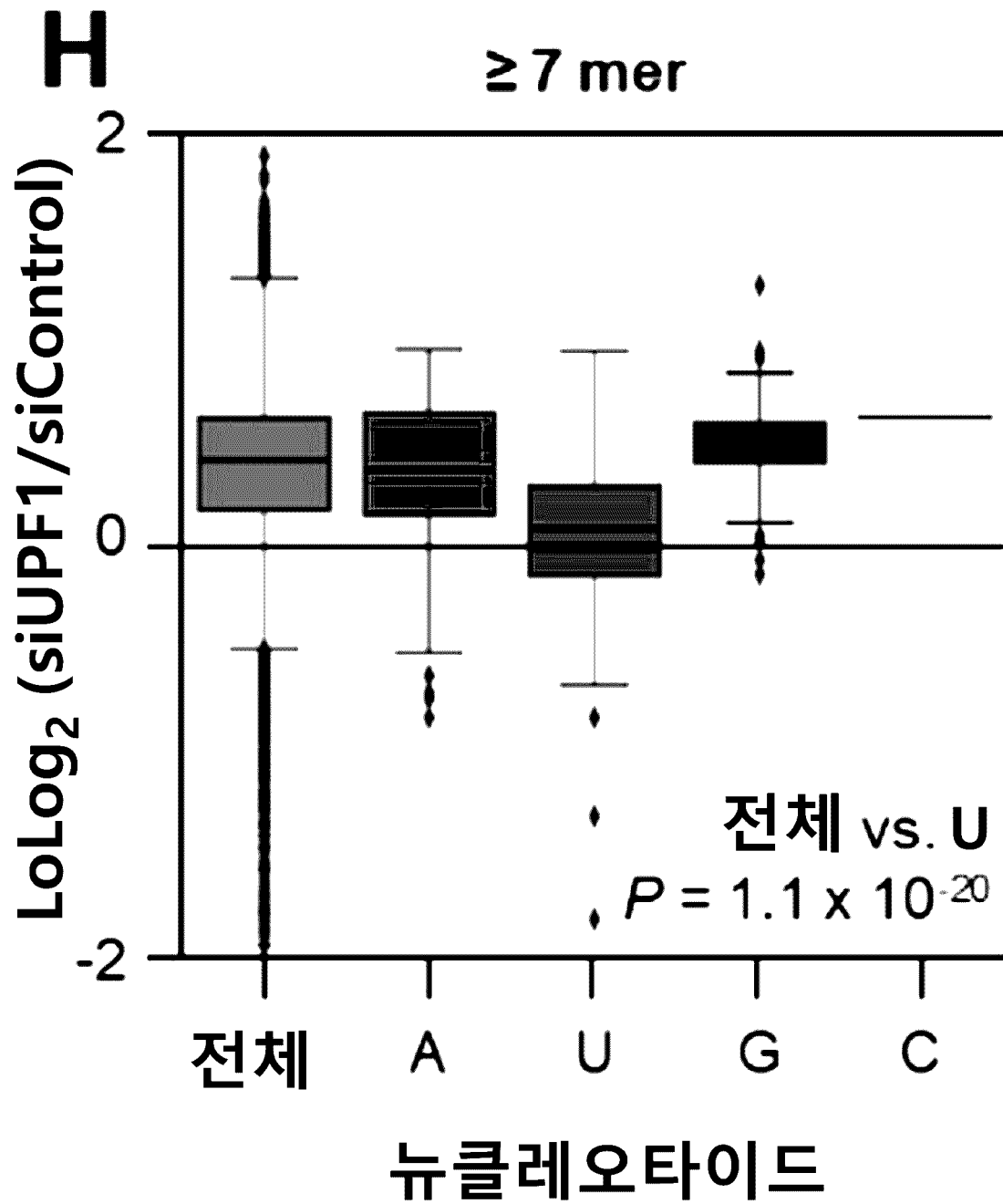
[도 1f]



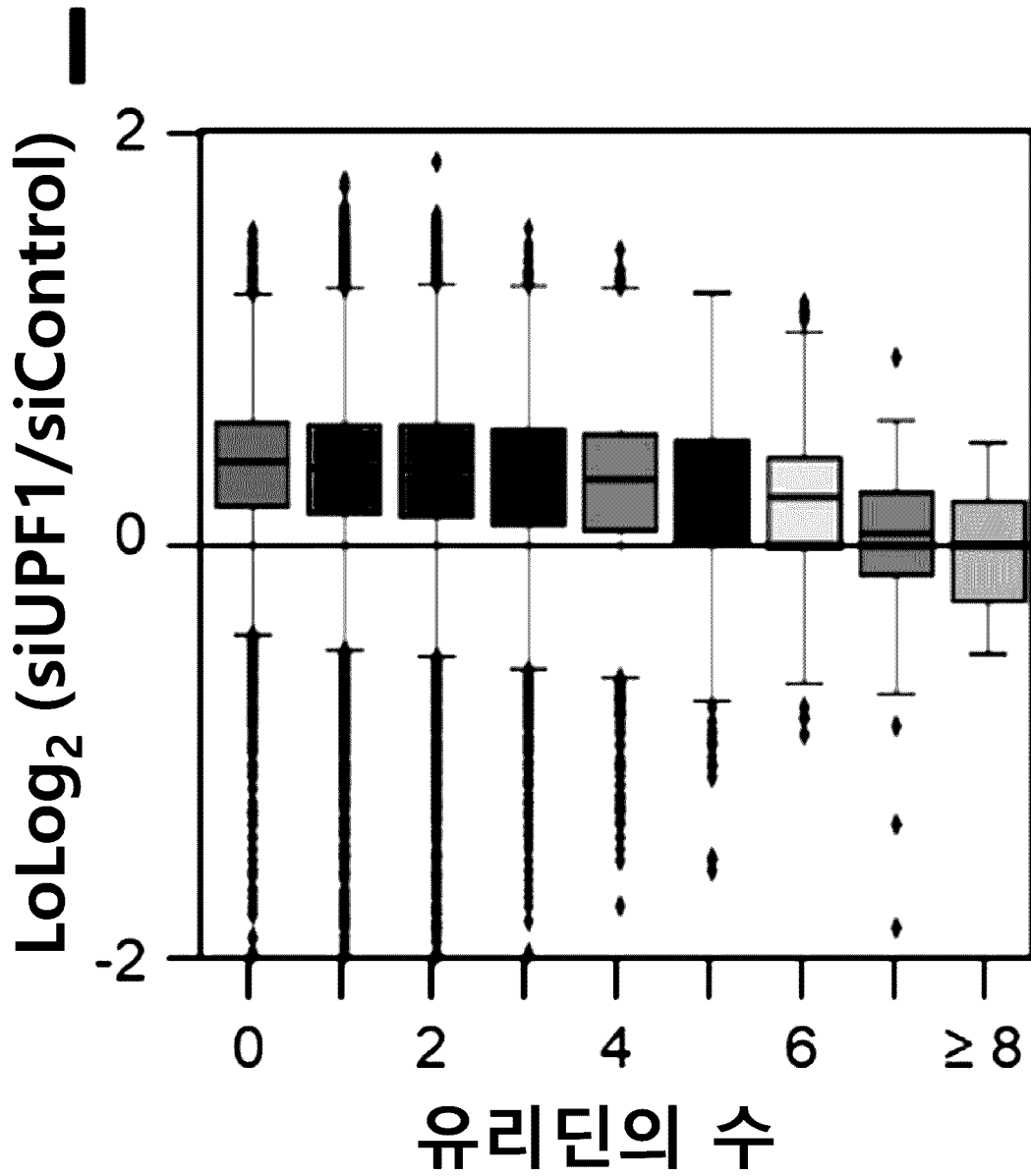
[도 1g]



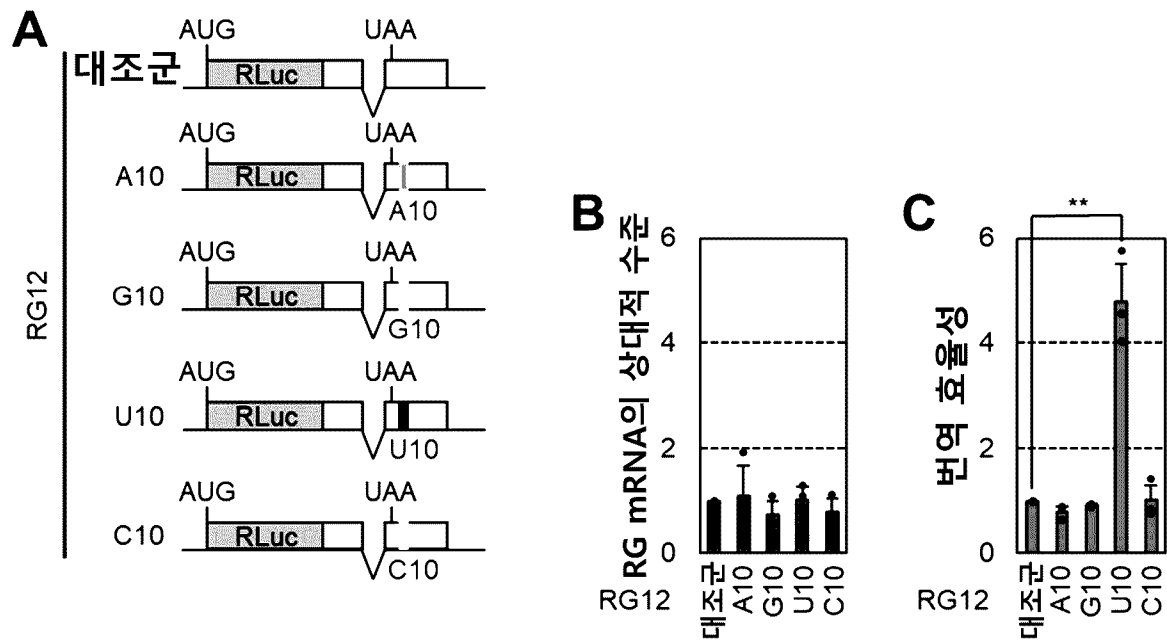
[도 1h]



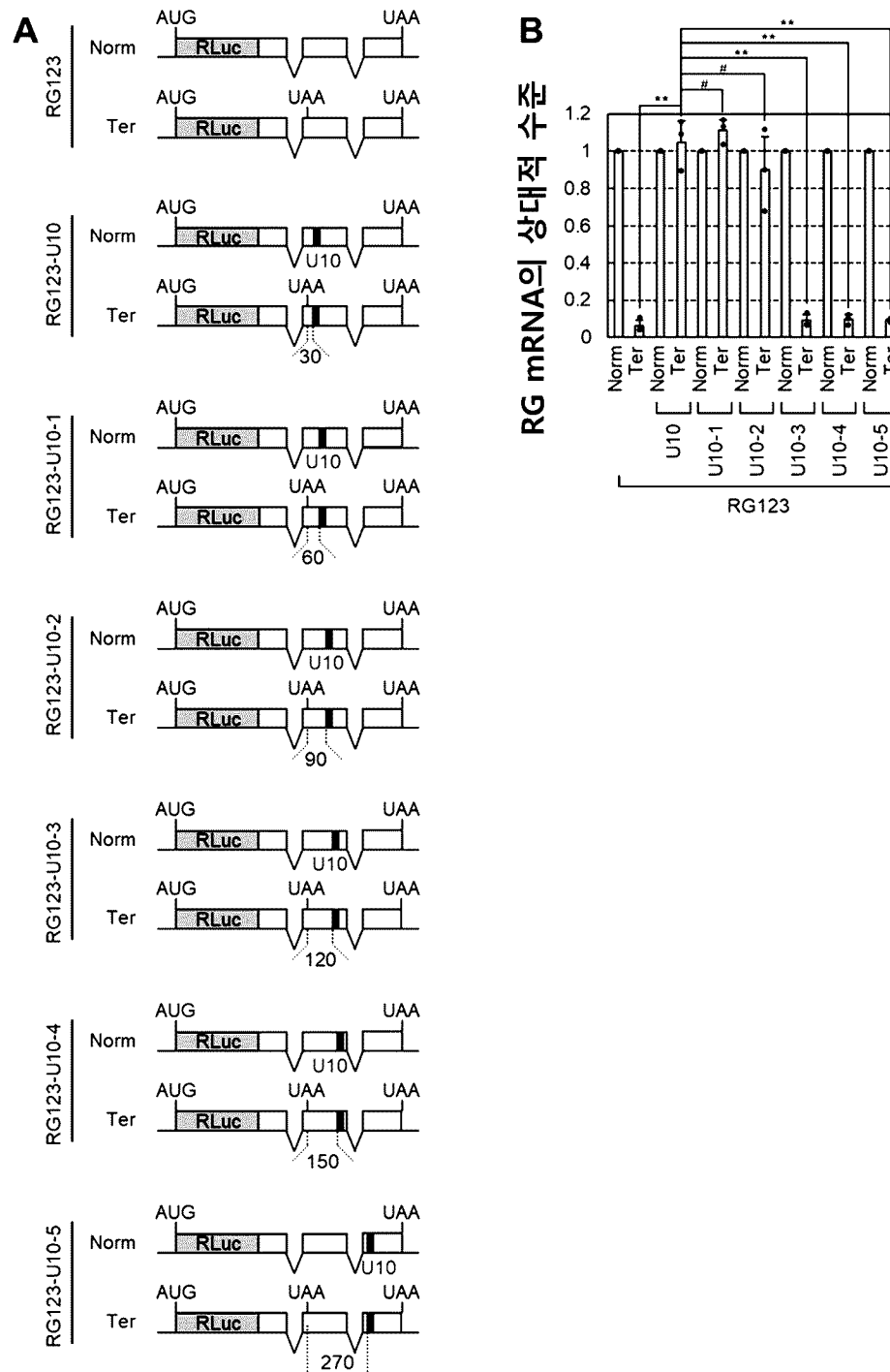
[도 1i]



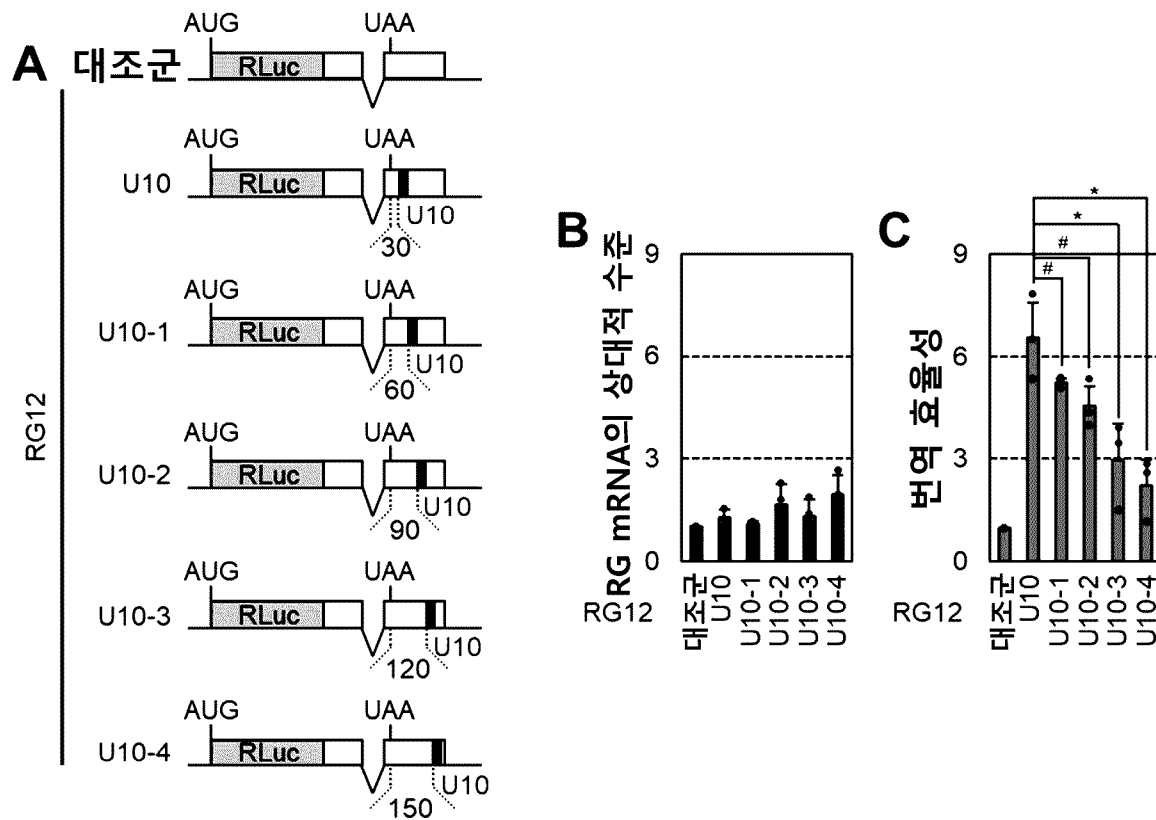
[도 2]



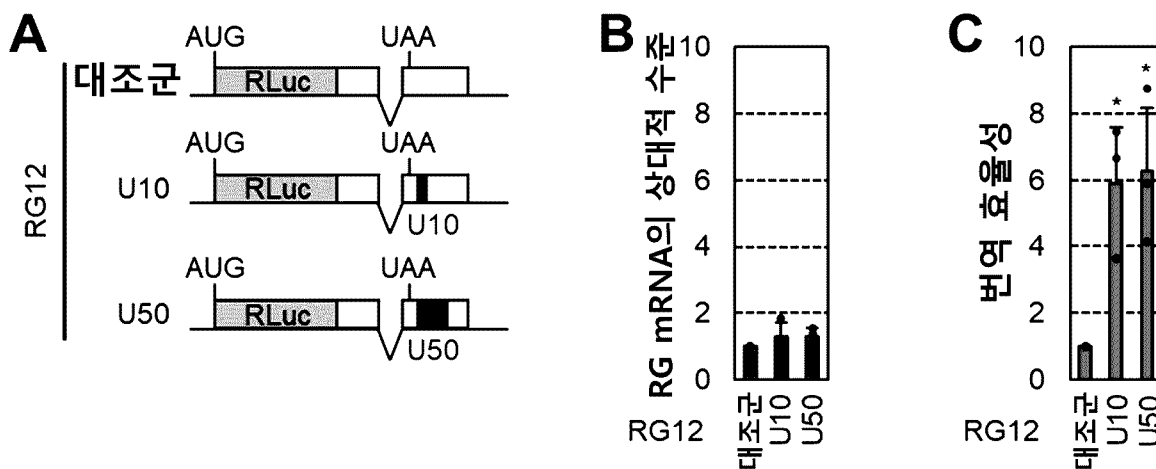
[도 3]



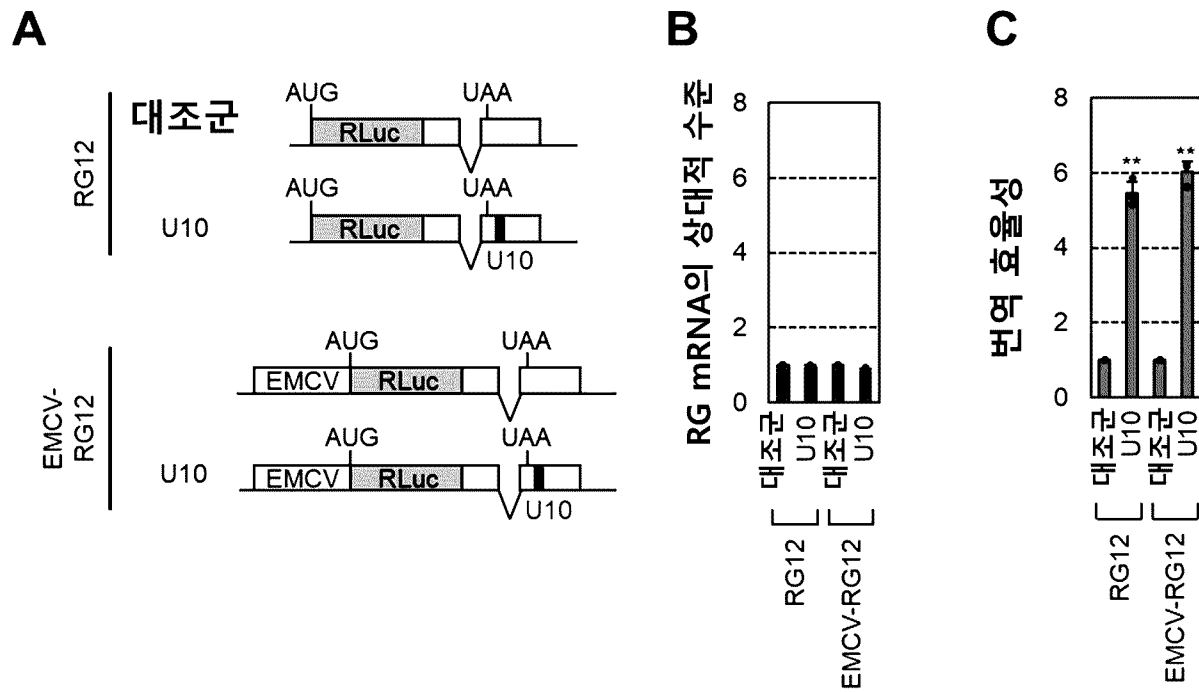
[도 4]



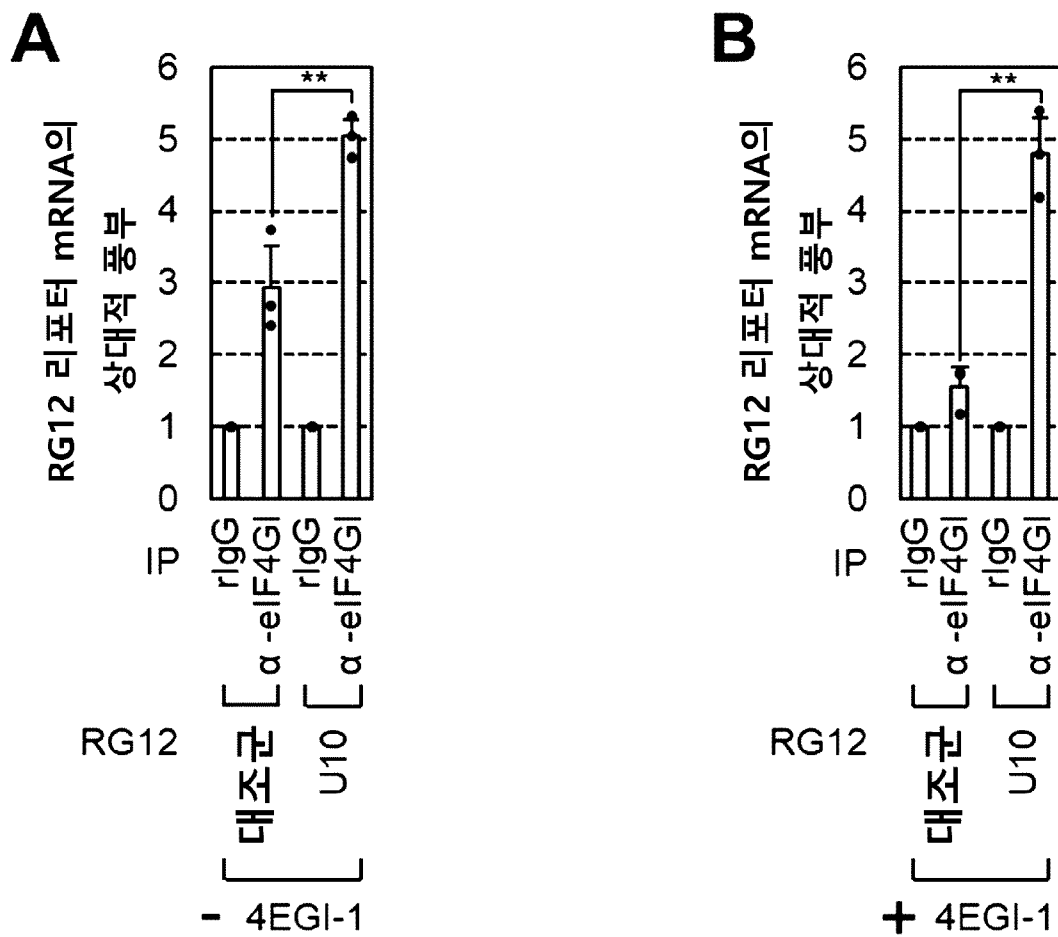
[도 5]



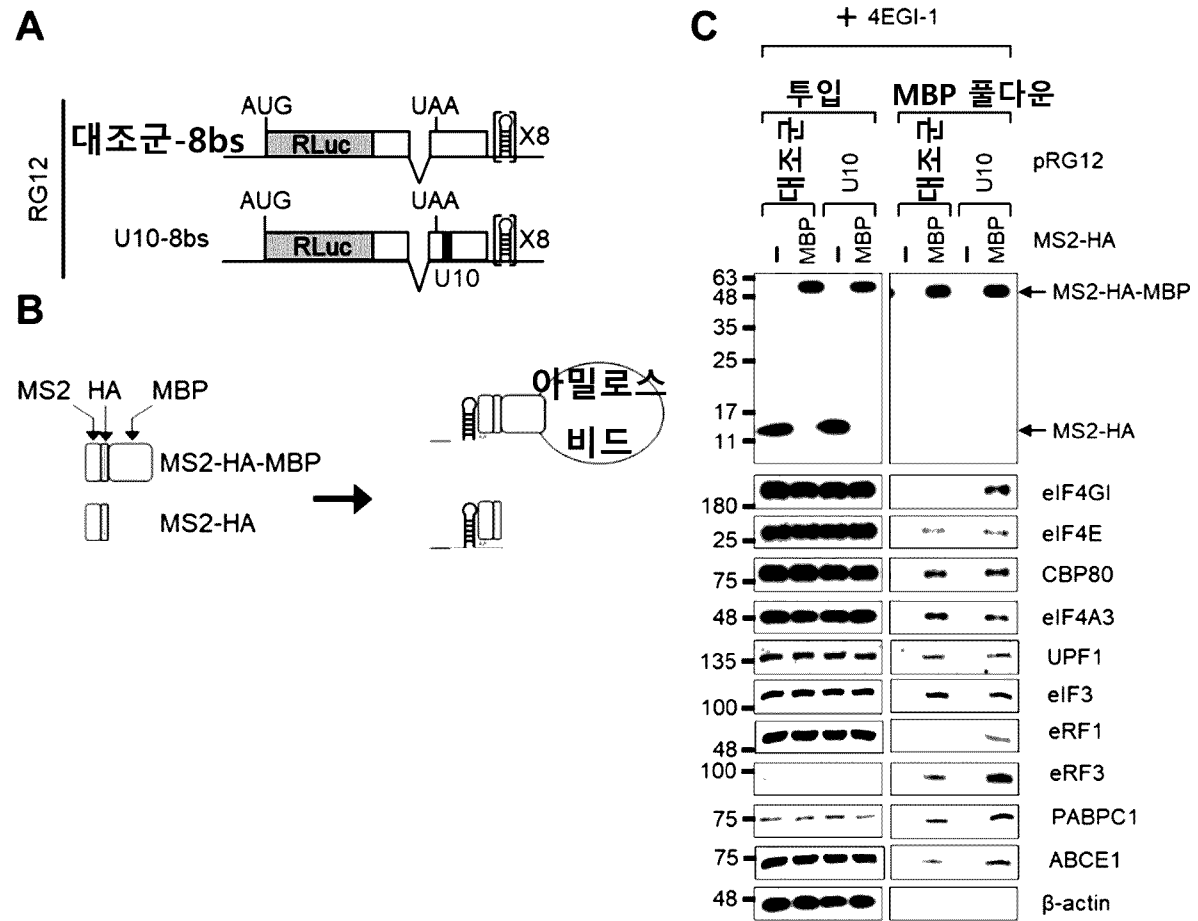
[도 6]



[도 7]



[도 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/004007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/113(2010.01); A61K 39/12(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12N 15/67(2006.01); G16B 5/00(2019.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 번역 효율(translation efficiency), 종결 코돈(stop codon), 3' 비번역 영역(3' untranslated region, 3'UTR), 유리딘(uridine), 뉴클레오타이드(nucleotide)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WIKLUND, Lisa. Role of the 3' UTR in translation and stability of HCV and HPV mRNAs. 2002, pp. 1-54. See pages 23, 27 and 37.	1,2 3,4,7-11,14-17,20,21 5,6,12,13,18,19
Y	KR 10-2018-0035789 A (ETHRIS GMBH) 06 April 2018 (2018-04-06) See claim 1; and paragraphs [0001]-[0084] and [0168].	3,4,7-11,14-17,20,21
A	US 2022-0127626 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 28 April 2022 (2022-04-28) See entire document.	1-21
A	US 2022-0387628 A1 (MODERNATX, INC.) 08 December 2022 (2022-12-08) See entire document.	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

“D” document cited by the applicant in the international application

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

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

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

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

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2024

Date of mailing of the international search report

22 July 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2022-0307040 A1 (CUREVAC AG) 29 September 2022 (2022-09-29) See entire document.	1-21
PX	KR 10-2624969 B1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 16 January 2024 (2024-01-16) See claims 1-4, 6-11, 13-17, 19 and 20. 'This document is a published earlier application that serves as a basis for claiming priority of the present international application.'	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/004007

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2018-0035789	A	06 April 2018	CN	107849574	A	27 March 2018
				EP	3112469	A1	04 January 2017
				EP	3317415	A1	09 May 2018
				JP	2018-519830	A	26 July 2018
				JP	6752234	B2	09 September 2020
				KR	10-2581977	B1	22 September 2023
				US	11136585	B2	05 October 2021
				US	2019-0194669	A1	27 June 2019
				WO	2017-001554	A1	05 January 2017

US	2022-0127626	A1	28 April 2022	None			

US	2022-0387628	A1	08 December 2022	EP	3986480	A1	27 April 2022
				WO	2020-263985	A1	30 December 2020

US	2022-0307040	A1	29 September 2022	EP	3230458	A1	18 October 2017
				EP	3708668	A1	16 September 2020
				EP	4023755	A1	06 July 2022
				US	11149278	B2	19 October 2021
				US	11286492	B2	29 March 2022
				US	2023-0313207	A1	05 October 2023
				WO	2016-091391	A1	16 June 2016

KR	10-2624969	B1	16 January 2024	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/113(2010.01); A61K 39/12(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12N 15/67(2006.01); G16B 5/00(2019.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 번역 효율(translation efficiency), 종결 코돈(stop codon), 3' 비번역 영역(3' untranslated region, 3'UTR), 유리딘(uridine), 뉴클레오타이드(nucleotide)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	WIKLUND, LISA, "Role of the 3' UTR in translation and stability of HCV and HPV mRNAs", 2002, 페이지 1-54 페이지 23, 27, 37	1,2 3,4,7-11,14-17,20,21 5,6,12,13,18,19
Y	KR 10-2018-0035789 A (에트리스 게엠베하) 2018.04.06 청구항 1; 및 단락 [0001]-[0084], [0168]	3,4,7-11,14-17,20,21
A	US 2022-0127626 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 2022.04.28 전체 문헌	1-21
A	US 2022-0387628 A1 (MODERNATX, INC.) 2022.12.08 전체 문헌	1-21
A	US 2022-0307040 A1 (CUREVAC AG) 2022.09.29 전체 문헌	1-21
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년07월19일(19.07.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년07월22일(22.07.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0035789 A	2018/04/06	CN 107849574 A	2018/03/27
		EP 3112469 A1	2017/01/04
		EP 3317415 A1	2018/05/09
		JP 2018-519830 A	2018/07/26
		JP 6752234 B2	2020/09/09
		KR 10-2581977 B1	2023/09/22
		US 11136585 B2	2021/10/05
		US 2019-0194669 A1	2019/06/27
		WO 2017-001554 A1	2017/01/05
US 2022-0127626 A1	2022/04/28	없음	
US 2022-0387628 A1	2022/12/08	EP 3986480 A1	2022/04/27
		WO 2020-263985 A1	2020/12/30
US 2022-0307040 A1	2022/09/29	EP 3230458 A1	2017/10/18
		EP 3708668 A1	2020/09/16
		EP 4023755 A1	2022/07/06
		US 11149278 B2	2021/10/19
		US 11286492 B2	2022/03/29
		US 2023-0313207 A1	2023/10/05
		WO 2016-091391 A1	2016/06/16
KR 10-2624969 B1	2024/01/16	없음	