



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월02일

(11) 등록번호 10-2828978

(24) 등록일자 2025년06월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01) A61K 9/127 (2025.01)

A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)

C12N 15/117 (2010.01) C12N 5/09 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)

A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7025399

(22) 출원일자(국제) 2019년02월01일

심사청구일자 2022년01월27일

(85) 번역문제출일자 2020년09월02일

(65) 공개번호 10-2020-0116976

(43) 공개일자 2020년10월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2019/016413

(87) 국제공개번호 WO 2019/152884

국제공개일자 2019년08월08일

(30) 우선권주장

62/625,623 2018년02월02일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20150017207 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 11 항

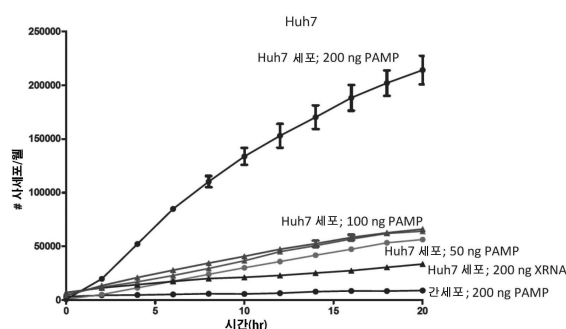
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 트리파르타이트 모티프 함유 단백질 16(TRIM16) 신호전달을 유도하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 개시는 세포에서 트리파르타이트(tripartite) 모티프 함유 단백질 16(TRIM16) 활성을 유도하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 이 활성은 암 세포에서의 프로그래밍된 세포사에서 나타날 수 있다. 상기 조성물은 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 함유 핵산 분자를 포함한다. PAMP 함유 분자는 말단 트리포스페이트를 포함하는 5'-아암 영역, 적어도 8개의 연속 우라실 잔기를 포함하는 폴리우라실 코어, 및 적어도 8개의 핵산 잔기를 포함하는 3'-아암을 포함할 수 있고, 이때 3'-아암 영역의 가장 5'측 핵산 잔기는 우라실이 아니고, 3'-아암 영역은 적어도 30% 우라실 잔기이다. 상기 조성물은, 부가적인 면역치료제와의 조합을 포함하여, 다른 암 치료제와의 조합으로 사용될 수 있거나 함께 병용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61K 9/127 (2025.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/02 (2018.01)
C12N 15/117 (2013.01)
C12N 5/0693 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Selina K. Sutton. University of New South Wales 박사학위 논문(2014. March).*

Annals of Oncology. 2017. Vol.28. No.8, pp.1756-1766.*

JP2005526778 A

Nature. 2008. Vol.454, No.7203, pp.523-527.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 함유 핵산 분자를 포함하는 약학 조성물로서, 상기 방법이 치료 유효량의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 함유 핵산 분자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 PAMP 함유 핵산 분자가 서열번호 2의 서열을 포함하는 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, PAMP 함유 핵산 분자가 대상체 내의 암 세포에서 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I) 유사 수용체(RLR)와 TRIM16의 상호작용을 유도하는 것인 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, RLR과 TRIM16의 상호작용이 암 세포에서 세포사 신호전달을 유도하는 것인 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, RLR이 RIG-I인 약학 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 방법이 유효량의 인터페론(IFN)을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 방법이 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된 TRIM16 코딩 서열을 포함하는 핵산을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 프로모터 서열은 대상체 내 암 세포에서 코딩된 TRIM16의 발현

을 유도할 수 있는 것인 약학 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 암이 췌장암, 방광암, 대장암, 유방암, 전립선암, 신장암, 간세포암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 위암, 식도암, 두경부암, 흑색종, 신경내분비암, CNS 암, 뇌 종양, 골암 및 연조직 육종으로부터 선택되는 고형 종양 암인 약학 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 암이 혈액암인 약학 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 방법이 암에 대한 면역치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 면역치료제가 암 특이적 항체 또는 이의 기능성 단편, 면역 체크포인트 억제제, 및 CAR T 세포 치료제를 비롯한 입양 세포 치료제를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 대상체가 인간인 약학 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원의 교차참조
- [0002] 본원은 전체 내용이 본원에 참고로 포함된, 2018년 2월 2일에 출원된 미국 가출원 제62/625623호의 이익을 주장한다.
- [0003] 서열목록에 대한 진술
- [0004] 본원과 관련된 서열목록은 페이퍼 카피 대신에 텍스트 포맷으로 제공되고 본 명세에 참고로 포함된다. 서열목록을 포함하는 텍스트 파일의 명칭은 68142_Seq_final_2019-01-31.txt이다. 상기 텍스트 파일은 29 KB이고; 2019년 1월 31일에 생성되었고; 본 명세서의 출원 시 EFS-Web을 통해 제출되었다.
- [0005] 정부 실시권의 진술
- [0006] 본 발명은 국립보건원(NIH)에 의해 부여된 승인 번호 R01 AI118916 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 일부 권리를 갖는다.

배경 기술

- [0007] 암은 세포가 세포 주기를 제어하는 능력을 상실함으로써, 비정상적인 제어되지 않는 세포 성장을 초래하는 것을 특징으로 한다. 형질전환된 세포는 그의 분열 및 성장을 조절하는 능력뿐만 아니라, 건강한 세포에서 프로그래밍된 세포사(PCD)를 유도하는 전형적인 신호에 반응하는 능력도 종종 상실한다. 전통적인 암 치료 전략은 암성 조직(예를 들면, 종양)을 제거하는 수술, 및 체내에서 주로 암 세포에 영향을 미치는 독성 조성물의 투여를 포함한다. 대상체의 면역 시스템의 조성물 및/또는 신호전달 경로를 활용하여 암 세포를 공격하는 면역치료제의 개발은 크게 진전되었다. 이러한 치료 방법은 예를 들면, 독성 탑재물(payload)을 함유하는 암 특이적 항체의 투여, 암 세포가 암 세포에 대한 숙주 반응을 차단하거나 방해하지 못하게 하는 체크포인트 억제제의 투여, 및 변경된 면역 세포를 사용하여 암 세포에 대한 숙주 면역 반응을 특이적으로 시작하고 표적화하는 CAR T 방법을 포함하는 입양 세포 요법을 포함한다.
- [0008] 그러나, 항암 요법에 있어서 많은 진전이 있지만, 독성 부작용, 암 세포의 내성, 질환의 재발, 및 많은 치료의 비경제성 및 비접근성에 관한 문제는 남아있다. 따라서, 최소한의 비표적 부위 독성을 나타내면서 세포의 사멸을 촉진하는 암 치료에 대한 필요성이 남아있다. 더욱이, 건강관리의 접근성 및 수반된 비용의 감소를 보장하기 위해, 많은 유형의 암들에 넓게 적용될 수 있고 사례별로 맞춤화를 요구하지 않는 치료에 대한 필요성이 남아있다. 본 개시는 이 필요성 및 관련 필요성을 다룬다.

발명의 내용

- [0009] 이 요약은 하기 상세한 설명에 추가로 기재된 단순화된 형태로 업선된 개념을 도입하기 위해 제공된다. 이 요약은 청구된 보호대상의 핵심 특징을 확인하기 위한 것이 아니고, 청구된 보호대상의 범위를 결정하는 데 있어서

보조수단으로서 사용되기 위한 것도 아니다.

- [0010] 한 양태에서, 본 개시는 세포에서 트리파르타이트(tripartite) 모티프 함유 단백질 16(TRIM16) 활성을 유도하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 세포를 유효량의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 함유 핵산 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다. PAMP 함유 핵산 분자는 말단 트리포스페이트를 포함하는 5'-아암 영역, 적어도 8개의 연속 우라실 잔기를 포함하는 폴리우라실 코어, 및 적어도 8개의 핵산 잔기를 포함하는 3'-아암 영역을 포함한다. 3'-아암 영역의 가장 5'측 핵산 잔기는 우라실이 아니고, 3'-아암 영역은 적어도 30% 우라실 잔기이다.
- [0011] 일부 실시양태에서, 폴리우라실 코어는 8개 내지 30개의 우라실 잔기들로 구성된다. 일부 실시양태에서, 3'-아암 영역의 가장 5'측 핵산 잔기는 사이토신 잔기 또는 구아닌 잔기이다. 일부 실시양태에서, 3'-아암 영역은 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 우라실 잔기이다. 일부 실시양태에서, 3'-아암 영역은 적어도 7개의 연속 우라실 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 5'-아암 영역은 말단 트리포스페이트와 폴리우라실 코어 사이에 배치된 하나 이상의 핵산 잔기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 5'-아암 영역은 말단 트리포스페이트로 구성되고, 이때 말단 트리포스페이트는 폴리우라실 코어의 5'-말단에 직접 연결된다. 일부 실시양태에서, 말단 트리포스페이트, 5'-아암 영역의 하나 이상의 핵산 잔기, 및 폴리우라실 코어는 C형 간염 바이러스에서 자연 발생적으로 함께 존재하지 않는다.
- [0012] 일부 실시양태에서, PAMP 함유 핵산 분자는 세포에서 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I) 유사 수용체(RLR)와 TRIM16의 상호작용을 유도한다. 일부 실시양태에서, RLR과 TRIM16의 상호작용은 세포에서 세포사 신호전달을 유도한다. 일부 실시양태에서, RLR은 RIG-I이다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포를 인터페론(IFN)과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포를, 세포에서 코딩된 TRIM16의 발현을 유도할 수 있는 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된 TRIM16 코딩 서열을 포함하는 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 코딩된 TRIM16은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0014] 일부 실시양태에서, TRIM16 활성은 프로그래밍된 세포사의 유도를 포함한다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 세포는 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 고형 종양 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 췌장암, 방광암, 대장암, 유방암, 전립선암, 신장암, 간세포암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 위암, 식도암, 두경부암, 흑색종, 신경내분비암, CNS 암, 뇌 종양, 골암 및 연조직 육종으로부터 선택되는 고형 종양 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 혈액암 세포이다.
- [0016] 일부 실시양태에서, 세포를 시험관내에서 유효량의 PAMP 함유 핵산 분자와 접촉시킨다. 일부 실시양태에서, 세포를 포유동물 대상체의 생체내에서 유효량의 PAMP 함유 핵산 분자와 접촉시킨다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 암에 대한 면역치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역치료제는 암 특이적 항체 또는 이의 기능성 단편, 면역 체크포인트 억제제, 및 CAR T 세포 치료제를 포함하는 입양 세포 치료제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0017] 또 다른 양태에서, 본 개시는 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료 유효량의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 함유 핵산 분자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. PAMP 함유 핵산 분자는 말단 트리포스페이트를 포함하는 5'-아암 영역, 적어도 8개의 연속 우라실 잔기를 포함하는 폴리우라실 코어, 및 적어도 8개의 핵산 잔기를 포함하는 3'-아암 영역을 포함한다. 3'-아암 영역의 가장 5'측 핵산 잔기는 우라실이 아니고, 이때 3'-아암 영역은 적어도 30% 우라실 잔기이다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 폴리우라실 코어는 8개 내지 30개의 우라실 잔기들로 구성된다. 일부 실시양태에서, 3'-아암 영역의 가장 5'측 핵산 잔기는 사이토신 잔기 또는 구아닌 잔기이다. 일부 실시양태에서, 3'-아암 영역은 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 우라실 잔기이다. 일부 실시양태에서, 3'-아암 영역은 적어도 7개의 연속 우라실 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 5'-아암 영역은 말단 트리포스페이트와 폴리우라실 코어 사이에 배치된 하나 이상의 핵산 잔기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 5'-아암 영역은 말단 트리포스페이트로 구성되고, 이때 말단 트리포스페이트는 폴리우라실 코어의 5'-말단에 직접 연결된다. 일부 실시양태에서, 말단 트리포스페이트, 5'-아암 영역의 하나 이상의 핵산 잔기, 및 폴리우라실 코어는 C형 간염 바이러스에서 자연 발생적으로 함께 존재하지 않는다.
- [0019] 일부 실시양태에서, PAMP 함유 핵산 분자는 대상체 내의 암 세포에서 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I) 유사 수용체(RLR)와 TRIM16의 상호작용을 유도한다. 일부 실시양태에서, RLR과 TRIM16의 상호작용은 암 세포에서 세포

사 신호전달을 유도한다. 일부 실시양태에서, RLR은 RIG-I이다.

- [0020] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 유효량의 인터페론(IFN)을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체 내의 암 세포에서 코딩된 TRIM16의 발현을 유도할 수 있는 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된 TRIM16 코딩 서열을 포함하는 핵산을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 암은 췌장암, 방광암, 대장암, 유방암, 전립선암, 신장암, 간세포암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 위암, 식도암, 두경부암, 흑색종, 신경내분비암, CNS 암, 뇌 종양, 골암 및 연조직 육종으로부터 선택되는 고형 종양 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 암에 대한 면역치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역치료제는 암 특이적 항체 또는 이의 기능성 단편, 면역 체크포인트 억제제, 및 CAR T 세포 치료제를 포함하는 입양 세포 치료제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0023] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 함유 핵산 분자와 인터페론(IFN)의 조합을 포함하는 치료 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, IFN은 1형 IFN이다. 일부 실시양태에서, IFN은 폐길화된 IFN이다. 일부 실시양태에서, IFN은 IFN 람다이다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 TRIM16 코딩 핵산을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 리포솜 내에 제제화된다.
- [0024] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 함유 핵산 분자와, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 TRIM16 코딩 핵산의 조합을 포함하는 치료 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 인터페론(IFN)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, IFN은 1형 IFN이다. 일부 실시양태에서, IFN은 폐길화된 IFN이다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 리포솜 내에 제제화된다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 상기 양태들 및 본 발명의 수반된 장점들 대다수는 하기 상세한 설명을 첨부된 도면과 함께 참조함으로써 더 잘 이해되게 되기 때문에 더 용이하게 파악될 것이다.

도 1a 내지 1d는 PAMP RNA가 선천성 면역 신호전달 및 카스파제(caspase) 활성을 상이한 용량 범위에서 용량의 의존적 방식으로 유도한다는 것을 예증한다. 도 1a는 HCV PAMP RNA의 모든 용량에서 인간 간세포암종(Huh7) 세포에서의 선천성 면역 신호전달의 용량 의존적 활성화, 및 아포토시스의 용량 의존적 유도를 보여주는 웨스턴 블롯이다. 도 1b는 카스파제 활성의 활성화에 상응하는 세포사의 유도를 보여주는 세포사 분석을 그래프로 예증한다. 막대 그래프는 20시간 후 세포사의 백분율을 보여준다. 도 1c는 PAMP RNA에 의해 유도된 선천성 면역 신호전달의 활성화 및 카스파제 활성화에 대한 상이한 역치를 보여주는 웨스턴 블롯이다. 도 1d는 200 ng의 역치까지 세포사 유도의 용량 의존적 증가를 보여주는 세포사 분석을 그래프로 예증한다. 막대 그래프는 20시간 후 세포사의 백분율을 보여준다.

도 2a 내지 2c는 HCV PAMP RNA에 의한 아포토시스 유도가 RIG-I에 의존하고 고전적인 카스파제 의존적 경로를 통해 활성화된다는 것을 예증한다. 도 2a는 RIG-I의 녹아웃이 HCV PAMP RNA에 의한 아포토시스의 유도를 레스큐한다는 것을 그래프로 예증한다(도 2a-1). 아포토시스는 RIG-I 의존적 카스파제 활성화에 의해 유도되고, 아포토시스는 범-카스파제 억제 화합물인 zVAD를 사용한 처리에 의해 저해된다(도 2a-2). 모의체(mock)에 비해, * $P < 0.05$ 및 **** $P < 0.0001$. 도 2b는 zVAD를 사용한 처리가 HCV PAMP RNA에 의해 유도된 아포토시스를 레스큐하나 그의 선천성 면역 반응 활성화를 변경시키지 않는다는 것을 예증하는 웨스턴 블롯이다. 도 2c는 RIG-I의 부재가 HCV PAMP RNA에 반응한 p53 의존적 전구아포토시스 유전자 NOXA 및 PUMA의 전사 활성화를 저해한다는 것을 그래프로 예증한다.

도 3a 내지 3c는 I형 IFN 경로가 RIG-I 매개 아포토시스 유도에 있어서 역할을 한다는 것을 예증한다. 도 3a는 I형 IFN 수용체 쉐인 IFNAR1의 녹다운이 RIG-I 매개 아포토시스 유도를 부분적으로 저해한다는 것을 그래프로 예증한다. 도 3b는 IFNAR 세포 및 RIG-I KO 세포 둘 다에서 선천성 면역 반응의 유도가 손상된다는 것을 보여주는 웨스턴 블롯이다. 도 3c는 백시니아 바이러스에 의해 코딩된, IFNAR 신호전달의 정제된 단백질 억제제인 B18R에 의한 I형 IFN 신호전달의 차단이 RIG-I 매개 아포토시스 유도의 손상을 유발한다는 것을 예증한다(좌측). 웨스턴 블롯은 B18R에 의한 I형 IFN 신호전달의 차단을 보여준다(우측). Huh7 + PAMP에 비해, * $P < 0.05$.

도 4a 내지 4e는 TRIM16이 RIG-I의 신규 상호작용제임을 예증한다. 도 4a는 센다이(Sendai) 바이러스에 의한 활

성화 후 RIG-I에 결합하는 단백질을 확인하기 위한 워크플로우를 체계적으로 예증한다. 도 4b는 RIG-I의 N-말단이 TRIM16에의 결합에 필요함을 예증하는 웨스턴 블롯을 보여준다. 도 4c는 RIG-I의 CARD 도메인이 TRIM16에의 결합에 필요하고 충분하다는 것을 예증하는 웨스턴 블롯을 보여준다. 도 4d는 TRIM16의 N-말단 B-박스 도메인이 RIG-I에의 결합에 필요하고 충분하다는 것을 예증하는 웨스턴 블롯을 보여준다. *는 비특이적 밴드를 표시한다. 도 4b는 RIG-I와 TRIM16 사이의 상호작용의 요약을 도시하는 밀그램이다.

도 5a 내지 5d는 TRIM16이 숙주 선천성 면역 반응에 관여하지 않음을 예증한다. 도 5a는 TRIM16의 녹아웃이 PAMP 매개 선천성 면역 반응에 영향을 미치지 않음을 예증하는 웨스턴 블롯을 보여준다. 도 5b는 대조적으로 TRIM25의 녹아웃이 PAMP 매개 선천성 면역 반응을 저해함을 예증하는 웨스턴 블롯이고; 좌측 패널 세트는 웨스턴 블롯을 보여주는데, 이때 대조군 세포(EV)는 PAMP에 반응하나, TRIM25 KO 세포는 PAMP에 반응하지 않는다. 도 5b의 우측 패널은 TRIM25 KO 세포에서 PAMP 신호전달의 상실을 도시하는 그래프를 보여준다. 도 5c는 TRIM16이 항시적 활성 N-RIG에 의해 유도된 RIG-I 매개 선천성 면역 반응에 있어서 역할을 하지 않음을 예증하는 웨스턴 블롯이다. 도 5d는 TRIM16이 센다이 바이러스에 의해 유도된 선천성 면역 반응에 있어서 역할을 하지 않음을 그래프로 예증한다.

도 6a 및 6b는 TRIM16이 RIG-I 매개 아포토시스 유도에 관여하나, TRIM25는 관여하지 않음을 예증한다. 도 6a는 TRIM16의 녹아웃이 HCV PAMP RNA에 의한 아포토시스의 유도를 손상시킴을 예증한다. EV + PAMP에 비해, * $P < 0.05$. 대조적으로, 도 6b는 TRIM25의 녹아웃이 아포토시스의 유도에 유의미한 영향을 미치지 않음을 예증한다.

도 7a 및 7b는 PAMP RNA 처리가 HepG2(도 7a) 및 Huh7(도 7b) 간세포암종 세포의 종양용해성 파괴를 유도하나, 일차 간세포에 영향을 미치지 않음을 예증한다(도 7b). 세포를 표시된 양의 PAMP RNA 또는 xRNA(음성 대조군)로 처리하고 투과성/사멸하는 또는 사멸된 세포를 표시하는 사이토스(Sytox) 그린 염료 흡수에 대해 모니터링하였다. 데이터를 20시간 과정에 걸쳐 사세포의 수로서 작도한다. PAMP 처리는 종양 세포의 종양용해성 파괴를 특이적으로 유도하나(HepG2 및 Huh7 세포는 인간 암종 유래 세포임), 정상 비암성 세포(일차 인간 간세포)의 종양용해성 파괴를 특이적으로 유도하지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 개시는 RIG-I 유사 수용체(RLR) 신호전달의 유도가 선천성 면역 반응의 유발을 야기할 수 있을 뿐만 아니라, 암 세포에서 아포토시스를 선택적 유도할 수도 있다는 것을 보여준 연구에 기반한다. 이 작업은 암과 싸우기 위한 신규 치료 전략을 제공한다.
- [0027] 선천성 면역는 감염에 대한 신체의 제1선 방어이다. 선천성 면역 반응은 질환 야기 병원체를 제거하는 데 결정적인 강한 지속성 면역 반응을 위한 효과적인 후천성 면역 및 면역 기억의 프로그래밍에도 필수적이다. 바이러스 감염에 대한 선천성 면역 반응의 핵심 성분은 인터페론 조절 인자(IRF)3의 활성화 및 1형 인터페론(IFN)의 유도이다. IRF3은 항바이러스 유전자의 발현을 유도하고 IFN도 유도한다. 항바이러스 유전자는 감염된 세포에서 바이러스 복제를 억제할 수 있지만, IFN은 항바이러스 활성 및 면역 조절 활성을 갖는 수백 개의 인터페론 자극된 유전자(ISG)들의 발현을 통해 감염된 세포 및 이웃 방관자 세포 둘 다에서 바이러스 복제의 억제를 유도한다. IFN에 의한 바이러스 감염 억제 이외에, 바이러스에 감염된 세포의 프로그래밍된 사멸은 바이러스 전파를 방지하는 데 기여할 수 있다. 따라서, IRF3 작용, IFN 작용 및 세포사 신호전달의 조합은 아직 규명되지 않은 기전을 통해 바이러스 제어의 상승작용적 프로그램을 부여한다. 본 개시는 IFN과 세포사 신호전달 사이의 상호작용을 확인하는 연구에 기반한다. 이 노력은 IFN과 세포사 반응 사이의 연관성이 종양 성장을 제어하는 치료 전략을 위해 활용될 수 있다는 것을 확립하였다.
- [0028] IRF 활성화 및 IFN의 유도는 Toll 유사 수용체(TLR), RIG-I 유사 수용체(RLR), Nod 유사 수용체(NLR) 또는 한형 GMP-AMP 합성효소(cGAS)/인터페론 유전자의 자극제(STING)를 비롯한 세포 패턴 인식 수용체(PRR)에 의한 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)의 인식에 의해 바이러스 감염 초기에 유발된다. PRR은 궁극적으로 인터페론 조절제 인자(IRF)3/7 및 핵 인자 카파 B(NF- κ B)를 통해 전사 기전을 활성화시켜 선천성 면역 활성화를 유도하는 세포 내 신호전달 캐스케이드를 유발하는 바이러스 PAMP 또는 PAMP 생성물을 검출한다. 특히, RNA 바이러스는 주로 PAMP RNA 모티프를 인식하고 이에 결합하는 세포질 RNA 헬리카제(helicase)인 RLR의 작용을 통해 감지된다. RIG-I는 MDA5 및 LGP2도 포함하는 RLR 패밀리의 공인된 구성원이다. RIG-I은 5'-트리포스페이트(5'ppp), 및 RNA 분자를 비-자가로서 표시하는 짧은 dsRNA 구조 모티프 및/또는 폴리우리딘 모티프를 함유하는 RNA를 인식한다. RIG-I 단백질 구조는 중심에 위치한 DExH-박스 헬리카제 도메인, N-말단에 위치한 2개의 카스파제 동원 도메인(CARD)들, 및 리간드 결합이 항바이러스 방어를 유도하는 그의 변경된 입체구조인 신호전달-켜짐(on) 상태를 유발할 때까지 분자를 폐쇄된 신호전달-꺼짐(off) 상태로 유지함으로써 신호전달을 조절하는 C-말단 리프레

서(repressor) 도메인을 갖는다. 폴리우리딘 및 단일 가닥 RNA 구조에 의해 표시되는 PAMP 모티프는 C형 간염 바이러스(HCV) RNA 내에서의 RIG-I 인식 및 결합에 대해 이미 특징규명되었다. 세포 전달을 위해 제제화될 때, 5'ppp를 함유하는 이 모티프(PAMP-RNA로서 지칭됨)의 합성 변형은 RIG-I에 의해 결합되어 RIG-I 신호전달을 유도하는 강력한 특이적 RIG-I 아고니스트이다. PAMP-RNA는 항바이러스 및 면역 항상 활성을 제거하여 바이러스 감염을 제어하는 RIG-I 매개 선천성 면역 작용을 유도한다.

[0029] PAMP-RNA의 인식 및 결합 시, RIG-I은 IRF3, IRF7 및 NF- κ B 전사 인자를 비롯한 잠재적 전사 인자를 다운스트림 활성화시켜, 핵으로의 이들의 전위 및 전사 프로그램의 유도를 야기하는, RIG-I과 미토콘드리아 항바이러스 신호전달(MAVS) 단백질의 결합을 부여하는 신호전달 보조인자와 용이하게 상호작용할 수 있게 하는 입체구조 변화를 겪는다. RIG-I 신호전달 경로는 TRAF3, TRAF2, TRAF6, TANK, SIKE, NEMO/IKK γ , FADD, RIP1, HDAC6, TRADD, 카스파제 8/10 및 STING/MITA/MPYS를 비롯한 다양한 RIG-I 또는 MAVS 상호작용 파트너들에 의해 조절될 뿐만 아니라, 음성 신호전달 조절제, 예컨대, RNF125, ISG15, DAK, Atg12-Atg5, NLRX1, 카스파제-1, 및 여러 탈유비퀴틴화 효소, 아세틸화 효소, 단백질 키나제 및 단백질 포스포타제에 의해서도 조절된다. 연구 또한 RIG-I 신호전달이 RIG-I 유비퀴틴화 또는 유리 유비퀴틴과의 상호작용, 및 가역적 인산화 및 아세틸화를 통해서도 통제된다는 것을 보여주었다.

[0030] 트리파르타이트 모티프(TRIM) 패밀리의 단백질들은 항바이러스 면역, 자가면역 및 암에 있어서의 역할을 비롯한 E3 유비퀴틴 리가제 활성 및 다양한 생물학적 기능들을 갖는 70개 이상의 패밀리를 구성원으로 이루어진다. TRIM 패밀리를 구성원들은 E2 접합 효소를 인식하는 유전자(RING) 도메인, 일부 구성원들에서 자가-회합을 매개하는 적어도 하나의 B-박스 도메인, 및 TRIM 이량체화에 필수적인 코일드-코일(CC) 도메인을 포함하는 공유된 보존된 서열을 갖는다. 구성원들은 특이적 기질 상호작용을 매개할 수 있는 가변 C-말단 도메인을 갖는다. 많은 TRIM 패밀리를 구성원들은 TLR 및 RLR 신호전달 경로를 조절하는 것으로 공지되어 있다. 노출된 RIG-I CARD 도메인이 TRIM25의 C-말단 SPRY 도메인에 의해 결합될 때, 패밀리를 구성원 TRIM25는 RIG-I의 K63-폴리유비퀴틴화로 RIG-I 신호전달을 조절한다. RIG-I의 폴리유비퀴틴화는 RIG-I과 MAVS의 상호작용 및 후속 다운스트림 신호전달을 촉진함으로써, TRIM25를 RIG-I 선천성 면역 활성화의 핵심적인 보조인자로서 배정한다. RIG-I과 다른 TRIM 패밀리를 구성원의 상호작용은 특징규명되어 있지 않다.

[0031] 선행 연구는 RIG-I 활성화가 다양한 기전들로 세포사를 유도할 수 있음을 보여주었다. RLR 신호전달은 필수적인 아포토시스 조절제인 Bcl-2 패밀리를 구성원인 Puma 및 Noxa의 유도를 통해 프로그래밍된 세포사를 유발할 수 있다. 또 다른 일련의 연구들은 전구아포토시스 단백질 BAX에 결합하고, 이 단백질이 미토콘드리아로 전위되고 사이토크롬 C의 방출 및 후속 카스파제 활성화를 유발하도록 유도하는, RLR 신호전달 경로에 의한 IRF3의 활성화를 요구하는, RLR에 의해 유도된 IRF3 매개 아포토시스 경로(RIPA)를 기술하였다. 흥미롭게도, RIPA는 IRF3 전사 활성과 무관하고 TRAF2 및 TRAF6 의존적 기전에 의한 유비퀴틴화 복합체 LUBAC로의 동원 후 IRF3 유비퀴틴화에 의존한다. RIG-I 활성화는 RIG-I CARD 도메인과 인플라마솜(inflammasome) 성분의 상호작용을 통해 인플라마솜에 의해 유도된 피로토시스(pyroptosis)를 유발하여 카스파제-1을 활성화시키고 항염증성 사이토카인 IL-1 β 및 IL-18을 방출시킬 수도 있다. 따라서, RIG-I의 PAMP 인식이 프로그래밍된 세포사를 유발할 수 있다는 것은 분명하지만, RIG-I 활성화가 세포사에 비해 선천성 면역 신호전달을 유발하는지를 확인하는 기전은 현재 이해되어 있지 않다.

[0032] 이하에 더 상세히 기재된 바와 같이, 이 작업은 RIG-I에 의해 유도된 세포사를 담당하는 분자 결정인자를 규명하기 위해 RIG-I 세포사 신호전달의 체계적 연구 내에서 세포사를 유도하는 PAMP-RNA의 능력을 다루었다. PAMP-RNA 용량 적정 연구는 선천성 면역 활성화에 비해 RIG-I에 의해 유도된 세포사를 유발하기 위한 역치 용량을 규명하였다. RNA-PAMP는 IFN 처리에 의해 향상된 RIG-I 및 카스파제 의존적 신호전달을 통해 세포사를 유도하였다. 단백질체학 기반 스크린을 이용하여, PAMP-RNA 및 RIG-I에 의해 유도된 세포사에 필수적인 신규 RIG-I 결합 파트너인 TRIM16을 확인하였다. 추가로, TRIM16은 PAMP-RNA에 반응하여 세포사 신호전달을 유도하기 위해 RIG-I CARD에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, TRIM16은 신규 PAMP 민감성 세포사 경로를 규명하는 RIG-I 신호전달의 보조인자인 것으로 입증된다. 이것은 RLR 신호전달이 암 세포에서 세포사를 특이적으로 유도하기 위한 신규 치료 표적이라는 것을 입증하는 데 활용된다.

[0033] 상기 설명에 따라, 한 양태에서, 본 개시는 세포에서 트리파르타이트 모티프 함유 단백질 16(TRIM16) 활성을 유도하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, TRIM16 활성은 세포를 유효량의 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I) 유사 수용체 활성화제와 접촉시킴으로써 유도된다. 일부 실시양태에서, RLR 활성화제는 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)을 함유하는 핵산 분자이다. 따라서, 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 세포를 유효량의 PAMP 함유 핵산 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다. PAMP 함유 핵산 분자는 일반적으로 본원에서 핵산 PAMP로서도 지칭될 수

있다. 본원에서 사용된 바와 같이, PAMP는 세포에서 RLR의 활성화를 야기하는, RLR에 의해 인식되는 병원체 관련 분자 패턴, 즉 핵산 분자의 구조/서열에서의 패턴이다. 일부 실시양태에서, RLR은 RIG-I이다. 본 개시에 의해 포괄되는 예시적 PAMP 및 PAMP 함유 핵산 분자는 PAMP에 의한 선천성 면역 반응 신호전달의 유도를 다루고 전체적으로 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공개 제2015/0017207호 및 제2018/0104325호에 개시되어 있다. 본 개시에 의해 포괄되는 PAMP 함유 핵산의 요소 및 예시적 실시양태는 여기서 다루어진다.

[0034] 예비 사항으로서, 본원에서 사용된 용어 "핵산"은 단량체 유닛 또는 "잔기"의 중합체를 지칭한다. 핵산의 단량체 서브유닛 또는 잔기는 질소성 염기(즉, 핵염기), 오탄당 및 포스페이트 기를 각각 함유한다. 각각의 잔기의 정체성은 전형적으로 각각의 잔기의 핵염기(또는 질소성 염기) 구조의 정체성을 언급함으로써 본원에 표시되어 있다. 정규 핵염기는 아데닌(A), 구아닌(G), 타이민(T), 우라실(U)(RNA에서 타이민(T) 잔기 대신) 및 사이토신(C)을 포함한다. 그러나, 본 개시의 핵산은 당분야에서 잘 알려진 바와 같이 임의의 변형된 핵염기, 핵염기 유사체 및/또는 비정규 핵염기를 포함할 수 있다. 핵산 단량체 또는 잔기의 변형은 비정규 서브유닛 구조를 초래하는, 핵산 단량체 또는 잔기의 구조에서의 임의의 화학적 변화를 포괄한다. 이러한 화학적 변화는 예를 들면, (예컨대, 게놈 DNA 또는 RNA에 대한) 후성적 변형, 또는 방사선, 화학적 또는 다른 수단으로부터 비롯된 손상으로부터 비롯될 수 있다. 변형으로부터 비롯될 수 있는 비정규 서브유닛의 예증적 및 비제한적 예는 우라실(DNA의 경우), 5-메틸사이토신, 5-하이드록시메틸사이토신, 5-포르메틸사이토신, 5-카르복시사이토신, b-글루코실-5-하이드록시-메틸사이토신, 8-옥소구아닌, 2-아미노-아데노신, 2-아미노-데옥시아데노신, 2-티오타이미딘, 피롤로-피리미딘, 2-티오사이티딘 또는 무염기 손상 부위를 포함한다. 무염기 손상 부위는 데옥시리보스 골격을 따라 존재하나 염기를 결여하는 위치이다. 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체, 예컨대, 펩타이드 핵산(PNA) 및 포스포로티오에이트 DNA는 자연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 핵산에 하이브리드화한다.

[0035] 핵염기가 부착되는 오탄당은 핵산의 유형에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 상기 당은 DNA에서 데옥시리보스이고 RNA에서 리보스이다. 본원의 일부 경우, 핵산 잔기는 뉴클레오사이드 구조와 관련하여, 예컨대, 아데노신, 구아노신, 5-메틸우리딘, 우리딘 및 사이티딘으로서 지칭될 수도 있다. 뿐만 아니라, 뉴클레오사이드에 대한 대안적 명명법은 오탄당의 유형을 암시하기 위해 핵염기 앞에 "리보" 또는 "데옥시리보"를 표시하는 것도 포함한다. 예를 들면, 본원에서 종종 사용된 "리보사이토신"은 그 잔기에서 리보스 당이 RNA 분자에 존재함을 표시하기 때문에 사이티딘 잔기와 동등하다. 핵산 중합체는 데옥시리보뉴클레오타이드(DNA) 중합체, 또는 mRNA를 비롯한 리보뉴클레오타이드(RNA) 중합체일 수 있거나 이들을 포함할 수 있다. 핵산은 PNA 중합체, 또는 본원에 기재된 임의의 중합체 유형들의 조합일 수도 있거나 이들을 포함할 수도 있다(예를 들면, 상이한 당을 갖는 잔기를 함유할 수 있다).

[0036] 일부 실시양태에서, PAMP 함유 핵산은 합성 핵산이다. 이 문맥에서, 용어 "합성"은 핵산의 비천연 특성을 의미한다. 이러한 핵산은 표준 합성 기법을 이용함으로써 드 노보 합성될 수 있다. 대안적으로, 핵산 PAMP는 당분야에서 잘 알려진 재조합 기술을 이용함으로써 자연 발생 병원체 서열로부터 생성될 수 있거나 유래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 핵산 PAMP 구축물의 서열은 자연 발생 서열이 아니다.

[0037] 일부 실시양태에서, PAMP 함유 핵산은 RNA 구축물이다. 이 실시양태들 중 일부 실시양태에서, PAMP 함유 핵산은 HCV 폴리-U/UC 영역으로부터 유래하거나 이 영역의 서열을 반영하고, 이 문맥에서 일반적으로 폴리-U/UC PAMP-RNA 구축물로서 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리-U/UC PAMP-RNA 구축물은 합성 구축물이다.

[0038] 본 개시의 PAMP 함유 핵산은 일반적으로 (a) 말단 트리포스페이트를 포함하는 5'-아암 영역; (b) 폴리우라실 코어(폴리-U 코어로서도 지칭됨); 및 (c) 3'-아암 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 3개의 영역들(a, b 및 c)은 단일 핵산 중합체 거대분자로 공유결합된다. 공유결합은 직접적(산재된 링커 서열(들)이 없음) 또는 간접적(산재된 링커 서열(들)이 있음) 공유결합일 수 있다. 한 실시양태에서, 5'-아암 영역은 폴리-U 코어의 5'-말단에 공유결합된다. 한 실시양태에서, 3'-아암 영역은 폴리-U 코어의 3'-아암 영역에 공유결합된다. 중합체는 단일 또는 이중 가닥일 수 있거나, 단일 가닥 부분과 이중 가닥 부분을 겸비할 수 있다.

[0039] 한 실시양태에서, 폴리-U 코어는 적어도 8개의 연속 우라실 잔기를 포함한다. 추가 실시양태에서, 8개 내지 30개의 연속 우라실 잔기들, 예컨대, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개의 연속 우라실 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리-U 코어는 8개 초과 12개의 연속 우라실 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리-U 코어는 12개 이상의 연속 우라실 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-U 코어는 복수의 연속 우라실 잔기들, 예컨대, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개의 연속 우라실 잔기들로 구성된다.

- [illegible]

따라서, 일부 실시양태에서, PAMP 함유 핵산 분자는 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I) 유사 수용체(RLR) 활성화를 유도할 수 있다. 한 실시양태에서, RLR은 RIG-I이다. 당분야에서 통상의 기술을 갖는 자는 이하에 더 상세히 기재된 바와 같이, 예컨대, RLR에 의해 조절되는 공지된 다운스트림 유전자의 전사를 어세이함으로써 RLR의 활성화를 용이하게 확인할 수 있을 것이다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, RLR 활성화는 IFN β 또는 ISG54 발현의 증가에 의해 확립될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, RLR 활성화는 IRF-3 인산화의 증가에 의해 확립될 수 있다.

[0046] 이하에 더 상세히 기재된 바와 같이, 단백질체학 분석은 세포사 신호전달을 특이적으로 유발하는 핵심 RLR 결합 파트너로서 TRIM16을 확인하였다. 따라서, PAMP에 의해 유도되는 RLR(예를 들면, RIG-I) 신호전달은 프로그래밍된 세포사를 유발할 수 있는 RLR-TRIM16 상호작용을 포함한다. 따라서, 상기 방법은 PAMP 함유 핵산 분자가 세포에서 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I) 유사 수용체(RLR)와 TRIM16의 상호작용을 유도하는 실시양태를 포괄한다. 예시적 TRIM16은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 98% 또는 약 99% 서열 동일성을 갖는 기능성 변이체를 갖는다. 기능성 변이체는 단백질에서의 임의의 서열 변이에도 불구하고 단백질이 TRIM16의 활성을 보유한다는 것을 표시한다. 예를 들면, EBBP로서도 알려진 TRIM16은 여러 암들에서의 중앙 진행의 억제를 비롯한 다수의 생물학적 과정들에 관여하는 에스트로겐 반응성 유전자로서 이전에 특징규명되고 확인되었다. 본원에 개시된 연구는 RLR(예를 들면, RIG-I)/TRIM16 상호작용이 프로그래밍된 세포사 신호전달을 유도한다는 것을 입증한다. 따라서, 유도된 TRIM16 활성은 궁극적으로 프로그래밍된 세포사를 야기할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포에서 프로그래밍된 세포사를 유도하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, PAMP 함유 핵산 분자는 약 80 ng/ml 이상의 농도에서 세포와 접촉하여 세포에서 프로그래밍된 세포사를 유도한다.

[0047] 따라서, 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포를 적어도 약 80 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 예컨대, 100 ng/ml 내지 250 ng/ml 농도의 PAMP 함유 핵산 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포를 적어도 약 80 ng/ml, 약 90 ng/ml, 약 100 ng/ml, 약 110 ng/ml, 약 120 ng/ml, 약 130 ng/ml, 약 140 ng/ml, 약 150 ng/ml, 약 160 ng/ml, 약 170 ng/ml, 약 180 ng/ml, 약 190 ng/ml, 약 200 ng/ml, 약 210 ng/ml, 약 220 ng/ml, 약 230 ng/ml, 약 240 ng/ml, 약 250 ng/ml, 약 260 ng/ml, 약 270 ng/ml, 약 280 ng/ml, 약 290 ng/ml, 약 300 ng/ml, 약 310 ng/ml, 약 320 ng/ml, 약 330 ng/ml, 약 340 ng/ml, 약 350 ng/ml, 약 360 ng/ml, 약 370 ng/ml, 약 380 ng/ml, 약 390 ng/ml, 약 400 ng/ml, 약 410 ng/ml, 약 420 ng/ml, 약 430 ng/ml, 약 440 ng/ml, 약 450 ng/ml, 약 460 ng/ml, 약 470 ng/ml, 약 480 ng/ml, 약 490 ng/ml 및 약 500 ng/ml 농도의 PAMP 함유 핵산 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0048] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포를 인터페론(IFN)과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, IFN은 1형 IFN이다. 일부 실시양태에서, IFN은 폐결화된 IFN이다. 일부 실시양태에서, IFN은 IFN 램다이다.

[0049] 일부 실시양태에서, 세포는 ml당 약 5 내지 약 1500 유닛의 IFN, 예컨대, ml당 약 100 내지 약 1000 유닛의 IFN, 예컨대, ml당 약 100 내지 약 500 유닛의 IFN, 예컨대, ml당 약 200 내지 약 1000 유닛의 IFN, 예컨대, ml당 약 300 내지 약 700 유닛의 IFN, 예컨대, ml당 약 500 내지 약 1000 유닛의 IFN과 접촉한다. IFN의 예시적 용량은 ml당 약 100 유닛의 IFN, ml당 약 200 유닛의 IFN, ml당 약 300 유닛의 IFN, ml당 약 400 유닛의 IFN, ml당 약 500 유닛의 IFN, ml당 약 600 유닛의 IFN, ml당 약 700 유닛의 IFN, ml당 약 800 유닛의 IFN, ml당 약 900 유닛의 IFN, ml당 약 1000 유닛의 IFN, ml당 약 1200 유닛의 IFN, 및 ml당 약 1500 유닛의 IFN을 포함한다. 본원에서 용어 "유닛"의 사용은 국제 유닛을 지칭한다.

[0050] TRIM16 활성은 TRIM16을 코딩하는 핵산을 세포에게 제공함으로써 용이해질 수 있거나 더 향상될 수 있다. 상기 표시된 바와 같이, 예시적 TRIM16 단백질 서열은 서열번호 1에 기재된 서열 또는 이와 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 98% 또는 약 99% 서열 동일성을 갖는 기능성 변이체이다. 따라서, 핵산은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 98% 또는 약 99% 서열 동일성을 갖는 기능성 변이체를 코딩하는 임의의 핵산일 수 있다. 상기 핵산은 세포에서 코딩된 TRIM16의 발현을 유도할 수 있는 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 용어 "프로모터"는 유전자 및/또는 이의 스플라이스 변이체 이소폼의 전사(발현)를 활성화시킬 수 있는 조절 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 프로모터는 전형적으로 유전자의 업스트림에 위치되나, 유전자에 인접한 다른 영역에 위치될 수 있거나 심지어 유전자 내에 위치될 수 있다. 프로모터는 전형적으로 전사 복합체의 어셈블리에 참여하는 RNA 중합효소 및 하나 이상의 전사 인자에 대한 결합 부위를 함유한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "작동 가능하게 연결된"은 프로모터가 세포의 전사 기구에 의한 코딩 핵산의 전사를 활성화시킬 수 있는 방식으로 프로모터 및 코딩 핵산이 서로에 대해 상대적으로 배열되고 위치된다는 것을 표시한다. 프로모터는 항시성 프로모터 또는 유도성 프로모터일 수 있다. 항시성

프로모터는 표적 세포의 특성 및 세포질에서 이용될 수 있는 특정 전사 인자에 근거하여 결정될 수 있다. 다양한 프로모터들이 당분야에서 공지되어 있고 통상적으로 사용되고 있기 때문에, 당분야에서 통상의 기술을 갖는 자는 의도된 목적에 근거하여 적절한 프로모터를 선택할 수 있다.

- [0051] 세포는 TRIM16 활성이 요구되는 임의의 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 암 세포이다. 암 세포는 고형 종양 또는 혈액암으로부터 유래할 수 있다.
- [0052] 대표적인 고형 종양은 췌장암, 방광암, 대장암, 유방암, 전립선암, 신(신장)암, 간세포암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 위암, 식도암, 두경부암, 흑색종, 신경내분비암, CNS 암, 뇌 종양, 골암, 연조직 육종이다. 대표적인 혈액암은 백혈병, 림프종 및 골수종을 포함한다.
- [0053] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포가 시험관내에서 유효량의 PAMP 함유 핵산 분자와 접촉하도록 수행될 수 있다. 전형적으로, 하나 이상의 세포는 적합한 배양 배지에서 유지된다. 소정량의 PAMP 함유 핵산 분자는 세포의 계속된 배양에 적합한 담체 중의 원하는 농도로 배양 배지 중의 세포에게 투여된다.
- [0054] 다른 실시양태에서, 상기 방법은 생체내에서, 예컨대, TRIM16 활성의 유도로부터 이익을 얻을 질환 또는 상태를 갖는 인간 또는 비인간 포유동물 대상체(예컨대, 또 다른 영장류, 말, 개, 고양이, 마우스, 래트, 기니 피그, 토끼 등)에서 수행될 수 있다. RLR(예를 들면, RIG-I)의 충분한 PAMP 신호전달을 통한 TRIM16의 활성화가 아포토시스를 유발한다는 점을 고려할 때, 상기 방법은 상기 질환 또는 상태가 암, 예컨대, 고형 종양 암 또는 혈액암인 대상체에서 유리하게 수행된다. 본 개시에 의해 포괄되는 예시적 암은 췌장암, 방광암, 대장암, 유방암, 전립선암, 신(신장)암, 간세포암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 위암, 식도암, 두경부암, 흑색종, 신경내분비암, CNS 암, 뇌 종양, 골암, 연조직 육종 및 골수종을 비롯한 전술된 암들을 포함한다. 이 생체내 실시양태에서, 유효량의 PAMP 함유 핵산을 특정 질환(예를 들면, 암)에 적절한 방식으로 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 조합 요법의 한 양태이므로, 면역치료제, 예컨대, 암 특이적 항체 또는 이의 기능성 단편, 면역 체크포인트 억제제, 및 CAR T 세포 치료제를 비롯한 입양 세포 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0055] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시는 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료 유효량의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 함유 핵산 분자를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0056] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료"는 대상체(예를 들면, 인간 또는 비인간 포유동물, 예컨대, 또 다른 영장류, 말, 개, 마우스, 래트, 기니 피그, 토끼 등)의 질환, 장애 또는 상태(예를 들면, 전술된 바와 같은 암)의 의학적 관리를 지칭한다. 치료는 경감, 완화, 증상의 감소 또는 대상체가 질환 또는 상태를 더 잘 견딜 수 있게 만드는 것, 퇴행 또는 감퇴 속도의 늦춤, 또는 퇴행으로 인한 쇠약의 감소와 같은 임의의 파라미터를 비롯한, 질환 또는 상태(예를 들면, 암)의 치료 또는 호전에 있어서 성공의 임의의 징후를 포괄할 수 있다. 구체적으로, 암과 관련하여, 용어 치료는 치료를 받지 않은 경우에 비해 암 성장 속도의 늦춤 또는 억제, 또는 재발 가능성의 감소를 포괄할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 환자에서 다소 검출 가능한 정도의 암 세포사를 야기하는 것을 포괄한다. 증상의 치료 또는 호전은 의사에 의한 검사의 결과를 비롯한 객관적 또는 주관적 파라미터에 근거할 수 있다. 따라서, 용어 "치료"는 질환 또는 상태(예를 들면, 암)와 관련된 증상 또는 상태를 완화시키거나, 이러한 증상 또는 상태의 발생을 방지시키거나 억제하기 위한 본 개시의 조성물의 투여를 포함한다. 용어 "치료 효과"는 대상체에서 질환 또는 상태, 질환 또는 상태의 증상, 또는 질환 또는 상태의 부작용의 호전, 감소 또는 제거를 지칭한다. 용어 "치료 유효"는 치료 효과를 야기하고 용이하게 결정될 수 있는 조성물의 양을 지칭한다.
- [0057] 일부 실시양태에서, PAMP 함유 핵산 분자는 말단 트리포스페이트를 포함하는 5'-아암 영역, 적어도 8개의 연속 우라실 잔기를 포함하는 폴리우라실 코어, 및 적어도 8개의 핵산 잔기를 포함하는 3'-아암 영역을 포함하고, 이때 3'-아암 영역의 가장 5'측 핵산 잔기는 우라실이 아니고, 3'-아암 영역은 적어도 30% 우라실 잔기이다. 상기 제공된, PAMP 함유 핵산 분자의 상세한 설명은 간결함을 위해 여기서 반복되지 않는다. 기재된 바와 같이, PAMP 함유 분자는 대상체 내의 암 세포에서 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I) 유사 수용체(RLR)와 TRIM16의 상호작용을 유도하는 기능을 한다. 일부 실시양태에서, RLR은 RIG-I이다. RLR과 TRIM16의 상호작용은 대상체 내의 암 세포에서 세포사 신호전달을 유도한다.
- [0058] 인터페론(IFN)은 프로그래밍 세포사 신호전달과 상승작용적으로 상호작용하여 세포 및 심지어 종양의 파괴를 향상시킬 수 있음이 입증되었다. 실제로, 후술된 연구는 (RLR/TRIM16 상호작용의 자극을 통해) PAMP에 의해 유

도된 세포사가 IFN 처리의 추가에 의해 더 향상되는 카스파제 의존적 세포사를 유도한다는 것을 확립한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 치료 방법은 유효량의 인터페론(IFN)을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, IFN은 1형 IFN이다. 일부 실시양태에서, IFN은 페길화된 IFN이다. 일부 실시양태에서, IFN은 IFN 램다이다.

[0059] IFN은 당분야에서 통상의 기술을 갖는 자에 의해 결정된 임의의 치료 유효량으로 투약될 수 있다. 예시적 용량 범위는 mL 당 약 5 내지 약 1500 유닛의 IFN, 예컨대, mL 당 약 100 내지 약 1000 유닛의 IFN, 예컨대, mL 당 약 100 내지 약 500 유닛의 IFN, 예컨대, mL 당 약 200 내지 약 1000 유닛의 IFN, 예컨대, mL 당 약 300 내지 약 700 유닛의 IFN, 예컨대, mL 당 약 500 내지 약 1000 유닛의 IFN을 포함한다. IFN의 예시적 용량은 mL 당 약 100 유닛의 IFN, mL 당 약 150 유닛의 IFN, mL 당 약 200 유닛의 IFN, mL 당 약 250 유닛의 IFN, mL 당 약 300 유닛의 IFN, mL 당 약 350 유닛의 IFN, mL 당 약 400 유닛의 IFN, mL 당 약 450 유닛의 IFN, mL 당 약 500 유닛의 IFN, mL 당 약 550 유닛의 IFN, mL 당 약 600 유닛의 IFN, mL 당 약 650 유닛의 IFN, mL 당 약 700 유닛의 IFN, mL 당 약 750 유닛의 IFN, mL 당 약 800 유닛의 IFN, mL 당 약 850 유닛의 IFN, mL 당 약 900 유닛의 IFN, mL 당 약 950 유닛의 IFN, mL 당 약 1000 유닛의 IFN, mL 당 약 1200 유닛의 IFN, 및 mL 당 약 1500 유닛의 IFN을 포함한다. 본원에서 용어 "유닛"의 사용은 국제 유닛을 지칭한다.

[0060] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된 TRIM16 코딩 서열을 포함하는 핵산을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 전술된 바와 같이, 상기 핵산은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 98% 또는 약 99% 서열 동일성을 갖는 기능성 변이체를 포함하는 TRIM16 단백질을 코딩할 수 있다. 프로모터는 암 세포에서 TRIM의 발현을 유도하도록 작동하게끔 선택될 수 있다. 이러한 프로모터는 당분야의 통상의 지식에 따라 의도된 표적 암 세포 유형에서 유도성 또는 항시성 발현을 이끌어내도록 배열될 수 있다. 핵산(및 프로모터)는 암 세포에서의 코딩 핵산의 전달 및 발현을 용이하게 하기에 적절한 벡터 내로 혼입될 수 있다. 벡터는 바이러스 벡터, 원형 핵산 구축물(예를 들면, 플라스미드) 또는 나노입자일 수 있다. 다양한 바이러스 벡터들이 당분야에서 공지되어 있고 본 개시에 의해 포괄된다. 예를 들면, 전체적으로 본원에 각각 참고로 포함된 문헌(Machida, C. A. (ed.), *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey (2003)); 및 문헌(Muzyczka, N., (ed.), *Current Topics in Microbiology and Immunology: Viral Expression Vectors*, SpringerVerlag, Berlin, Germany (2012))을 참조한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다. AAV 벡터의 구체적인 실시양태는 AAV2.5 혈청형을 포함한다.

[0061] 상기 방법은 암 세포가 필요한 TRIM16 신호전달 경로를 유지하는 한, 임의의 형태의 암(예를 들면, 고형 종양 또는 혈액암)을 치료하는 데 유용할 수 있다. 이 양태에 의해 포괄되는 예시적 암은 전술되어 있고, 췌장암, 방광암, 대장암, 유방암, 전립선암, 신(신장)암, 간세포암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 위암, 식도암, 두경부암, 흑색종, 신경내분비암, CNS 암, 뇌 종양, 골암, 연조직 육종 및 골수종을 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0062] PAMP 함유 핵산의 기능적 효과가 세포에서의 프로그래밍된 세포사 신호전달의 유도라는 점을 고려할 때, 이 양태의 방법은 특히 다른 항암 요법과의 조합에 적용될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 상기 방법은 항암 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 항암 치료제는 대상체 내의 암 세포에 대한 입증 가능한 치료 효과를 갖는 임의의 독소, 소분자 또는 대분자 치료제일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 암에 대한 면역치료제, 예컨대, 암 특이적 항체 또는 이의 기능성 단편, 면역 체크포인트 억제제, 및 CAR T 세포 치료제를 비롯한 입양 세포 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 개시된 PAMP 함유 핵산은 IFN 및/또는 TRIM16 코딩 핵산을 비롯한 추가 항암 치료제와 동시에 또는 따로 투여될 수 있다.

[0063] 또 다른 양태에서, 본 개시는 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 함유 핵산 분자 및 추가 치료제를 포함하는 치료 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, PAMP 함유 핵산 분자는 말단 트리포스페이트를 포함하는 5'-아암 영역, 적어도 8개의 연속 우라실 잔기를 포함하는 폴리우라실 코어, 및 적어도 8개의 핵산 잔기를 포함하는 3'-아암 영역을 포함하고, 이때 3'-아암 영역의 가장 5'측 핵산 잔기는 우라실이 아니고 3'-아암 영역은 적어도 30% 우라실 잔기이다. 상기 제공된, PAMP 함유 핵산 분자의 더 상세한 설명은 간결함을 위해 여기서 반복되지 않는다. 기재된 바와 같이, PAMP 함유 분자는 대상체 내의 암 세포에서 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I) 유사 수용체(RLR)와 TRIM16의 상호작용을 유도하는 기능을 한다. 일부 실시양태에서, RLR은 RIG-I이다. RLR과 TRIM16의 상호작용은 대상체 내의 암 세포에서 세포사 신호전달을 유도한다.

[0064] 한 실시양태에서, 추가 치료제는 더 상세히 전술된 바와 같이 인터페론(IFN)일 수 있다. 일부 실시양태에서,

IFN은 1형 IFN이다. 일부 실시양태에서, IFN은 폐결화된 IFN이다. 일부 실시양태에서, IFN은 IFN 람다이다. 한 실시양태에서, 추가 치료제는 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된 TRIM16 코딩 서열을 포함하는 핵산이다. 전술된 바와 같이, 상기 핵산은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 98% 또는 약 99% 서열 동일성을 갖는 기능성 변이체를 포함하는 TRIM16 단백질을 코딩할 수 있다. 프로모터는 암 세포에서 TRIM의 발현을 유도하도록 작동하게끔 선택될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 치료 조성물은 PAMP 함유 핵산, IFN, 및 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된 TRIM16 코딩 핵산을 포함한다.

[0065] 본 개시는 대상체(예를 들면, 암을 갖는 포유동물 대상체)에서 생체내 치료 환경에 적용하기 위한 투여 방법에 적절한 방식으로 구성된 치료 조성물의 제제를 포괄한다. 투여는 경구, 비경구, 척수내, 수조내, 경막하, 직장, 피내, 경피, 근육내 또는 국소 투여를 포함하나 이들로 제한되지 않는, 당분야에서 공지된 임의의 절차에 의한 투여일 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 투여는 종양내 투여이다. 전달을 용이하게 하기 위해, 치료 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 함께 다양한 조성물들로 제제화될 수 있다. "약학적으로 허용 가능한"은 선택된 담체, 부형제 또는 희석제가 PAMP 함유 핵산 분자 및 임의의 추가 치료제의 생물학적 활성 또는 조성물의 수용자에게 불리한 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

[0066] 당분야의 통상의 기술 및 지식에 따라, 개시된 PAMP 함유 핵산, 및 IFN, 코딩 핵산 및/또는 이 핵산을 포함하는 벡터, 독소, 면역요법 화합물 등을 비롯한 추가 치료제는 임의의 적절한 치료 전달 시스템 또는 형태로 제제화될 수 있다. 예시적 비제한적 전달 시스템은 항원의 전달에 유리한, 예를 들면, 입자 및/또는 매트릭스일 수 있는 입자 제제, 예컨대, 유하액, 마이크로입자 및 나노입자, 및 리포솜 등을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 개시된 PAMP 함유 핵산 및 추가 치료제는 리포솜 전달 포맷으로 제제화된다. 리포솜 제제의 예시적 적용은 전체적으로 본원에 참고로 포함된 문헌(Yallapu, U., et al., Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review, *Pharmaceutics* 9(2):12 (2017))에 기재되어 있다.

[0067] 일반적 정의

[0068] 본원에 구체적으로 정의되어 있지 않은 한, 본원에서 사용된 모든 용어들은 본 개시의 분야에서 숙련된 자에게 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 실시자는 정의 및 당분야의 용어에 대하여 특히 문헌(Ausubel, F.M., et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (2010)), 문헌(Coligan, J.E., et al. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York (2010)), 문헌(Mirzaei, H. and Carrasco, M. (eds.), *Modern Proteomics - Sample Preparation, Analysis and Practical Applications in Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer International Publishing, 2016), 및 문헌(Comai, L, et al., (eds.), *Proteomic: Methods and Protocols in Methods in Molecular Biology*, Springer International Publishing, 2017)을 참조한다.

[0069] 편의를 위해, 본원의 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에서 사용된 일부 용어들은 여기에 제공된다. 발명의 범위가 청구범위에 의해서만 제한되기 때문에, 정의는 구체적인 실시양태를 설명하는 것을 돕기 위해 제공되고 청구된 발명을 제한하기 위한 것이 아니다.

[0070] 본 개시가 대안만을 지칭하기 위한 정의 및 "및/또는"을 뒷받침할지라도, 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은, 대안만을 지칭하는 것으로 명확히 표시되어 있거나 대안들이 서로 배타적임이 명확히 표시되어 있지 않은 한, "및/또는"을 의미하기 위해 사용된다.

[0071] 달리 구체적으로 인지되어 있지 않은 한, 단수형 용어는 청구범위 또는 명세서에서 용어 "포함하는"과 함께 사용될 때 하나 이상을 의미한다.

[0072] 문맥이 달리 명확히 요구하지 않은 한, 설명 및 청구범위 전체에 걸쳐 용어 "포함한다", "포함하는" 등은 배타적 또는 총망라적 의미와 대조적으로 "포함하나 이들로 제한되지 않는"의 의미를 표시하기 위한 포괄적 의미로 해석되어야 한다. 단수 또는 복수를 사용하는 용어는 각각 복수 및 단수도 포함한다. 용어 "약"은 언급된 기준 수보다 약간의 편차만큼 더 높거나 낮은 범위 내의 수를 표시한다. 예를 들면, "약"은 표시된 기준 수보다 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 더 높고/높거나 낮은 범위 내의 수를 지칭할 수 있다.

[0073] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩타이드" 또는 "단백질"은 단량체가 아미드 결합을 통해 함께 연결된 아미노산 잔기인 중합체를 지칭한다. 아미노산이 알파-아미노산일 때, L-광학 이성질체 또는 D-광학 이성질체가 사용될 수 있고, L-이성질체가 바람직하다. 본원에서 사용된 용어 폴리펩타이드 또는 단백질은 임의의 아미노산 서열을 포괄하고 변형된 서열, 예컨대, 당단백질을 포함한다. 용어 폴리펩타이드는 구체적으로 자연 발생 단백질뿐만 아니라 재조합 또는 합성에 의해 생성된 단백질도 커버하기 위한 것이다.

- [0074] 숙련된 자는 변경으로 인해 아미노산이 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환되는 경우 서열에서 단일 아미노산 또는 일정 퍼센트의 아미노산을 변경시키거나, 추가하거나 결실시키는, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 추가가 "보존적으로 변형된 변이체"라는 것을 인식할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산들을 제공하는 보존적 아미노산 치환 표는 당분야에서 통상의 기술을 갖는 자에게 잘 알려져 있다. 하기 6개의 군들은 서로에 대한 보존적 치환인 것으로 간주되는 아미노산들의 예이다:
- [0075] (1) 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T),
- [0076] (2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E),
- [0077] (3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q),
- [0078] (4) 아르기닌(R), 라이신(K),
- [0079] (5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V), 및
- [0080] (6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W).
- [0081] 서열 동일성의 언급은 2개의 중합체 서열들, 예컨대, 단백질 서열들의 유사성의 정도를 다룬다. 서열 동일성의 측정법은 인정된 알고리즘 및/또는 기법을 이용함으로써 당분야에서 통상의 기술을 갖는 자에 의해 용이하게 달성될 수 있다. 서열 동일성은 전형적으로 비교 윈도우 상에서 2개의 최적으로 정렬된 서열들을 비교함으로써 측정되고, 이때 비교 윈도우 내의 펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열의 부분은 2개의 서열들의 최적 정렬을 위해 (추가 또는 결실을 포함하지 않은) 기준 서열에 비해 추가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 퍼센트는 두 서열들에서 동일한 아미노산 잔기 또는 핵산 염기가 존재하는 위치의 수를 측정하여 일치된 위치의 수를 산출하고, 일치된 위치의 수를 비교 윈도우 내의 위치의 총수로 나누고 결과를 100과 곱하여 서열 동일성의 퍼센트를 산출함으로써 계산된다. 이러한 비교를 수행하기 위해 다양한 소프트웨어 유래 알고리즘들, 예컨대, BLAST N 또는 BLAST P를 용이하게 입수할 수 있다.
- [0082] 개시된 방법 및 조성물을 위해 사용될 수 있거나, 개시된 방법 및 조성물과 함께 사용될 수 있거나, 개시된 방법 및 조성물의 제조에 사용될 수 있거나, 개시된 방법 및 조성물의 생성물인 물질, 조성물 및 성분이 개시된다. 이 물질들의 조합, 서브세트, 상호작용, 군 등이 개시될 때, 이 화합물들의 각각의 모든 단일 조합 및 순열이 명확히 개시되지 않을 수 있을지라도, 다양한 개별 조합들 및 집합적 조합들 각각이 구체적으로 고려될 것으로 생각된다. 이 개념은 기재된 방법의 단계들을 포함하나 이들로 제한되지 않는, 본 개시의 모든 양태들에 적용된다. 따라서, 임의의 상기 실시양태들의 구체적인 요소들은 다른 실시양태들의 요소와 조합될 수 있거나 다른 실시양태들의 요소 대신에 사용될 수 있다. 예를 들면, 수행될 수 있는 다양한 추가 단계들이 있는 경우, 이 추가 단계들 각각은 임의의 구체적인 방법 단계들 또는 개시된 방법의 방법 단계들의 조합과 함께 수행될 수 있고, 각각의 이러한 조합 또는 조합의 서브세트는 구체적으로 고려되고 개시된 것으로 간주되어야 할 것이라고 생각된다. 추가로, 본원에 기재된 실시양태들은 임의의 적합한 물질, 예컨대, 본원의 다른 곳에 기재되어 있거나 당분야에서 공지된 물질을 사용함으로써 실시될 수 있을 것으로 생각된다.
- [0083] 본원에서 인용된 간행물들 및 인용된 간행물들의 주제는 전체적으로 본원에 구체적으로 참고로 포함된다.
- [0084] PAMP-RNA를 사용한 RLR 신호전달의 유도가 프로그래밍된 세포사를 유도할 수 있고 암 특이적 환경에 적용될 수 있다는 것을 입증하는 연구가 이하에 기재되어 있다.
- [0085] 도입
- [0086] 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I)는 바이러스 RNA에서 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)에 결합함으로써 세포질 병원체 인식 수용체로서 작용한다. RIG-I에 의한 바이러스 RNA 인식을 위한 분자 시그니처는 RNA 바이러스 복제 동안 감염된 세포의 세포질에서 축적되는 바이러스 RNA 생성물 내에서 발견되는 폴리우리딘(폴리-U) 풍부 RNA 모티프 및 짧은 이중 가닥(ds) RNA 모티프를 포함하는, 5'-트리포스페이트(5'ppp)를 함유하는 특정 모티프로서 확인되었다. 본 발명자들은 RIG-I에 의해 특이적으로 인식되고 결합되는, C형 간염 바이러스(HCV) RNA의 폴리-U 모티프에 기반한 합성 5'ppp RNA RIG-I 리간드(PAMP-RNA)를 이전에 개발하였다. RIG-I의 PAMP-RNA 활성화는 RIG-I 이펙터 기능을 매개하여 선천성 면역을 유도하고 항바이러스 치료제 및 면역 아쥬번트(adjuvant) 작용을 제공하는 세포내 신호전달 캐스케이드를 유발한다.
- [0087] 이 연구는 RIG-I의 PAMP-RNA 활성화가 아포토시스성 세포사를 유도할 수 있다는 놀라운 발견을 입증한다. PAMP-RNA 작용의 용량 범위 연구는 저용량 PAMP-RNA 수준이 RIG-I에 의한 선천성 면역 활성화를 유발하는 반면, 증가

된 PAMP-RNA 수준은 세포사의 RIG-I 신호전달을 매개하였다는 것을 보여주었다. 이것은 PAMP-RNA 민감성 및 작용의 신규 세포사 경로를 보여주었다. 단백질체학 분석은 RIG-I 신호전달을 통해 PAMP-RNA에 의해 유도되는 세포사를 특이적으로 유도하는 핵심 RIG-I 결합 파트너로서 TRIM16을 확인하였다. TRIM16은 세포사 신호전달을 위해 필요하였으나 RIG-I에 의한 선천성 면역 활성화를 위해서는 필요하지 않았다. 추가로, TRIM16 매개 세포사는 I형 인터페론(IFN)에 의해 더 향상되었다. 이 연구는 TRIM16이 PAMP-RNA 처리에 반응하여 세포사를 유도하는 RIG-I 결합 파트너임을 입증한다. 따라서, PAMP-RNA 신호전달 및 TRIM16/RIG-I/IFN 축은 암 치료에 적용하기 위한 세포사의 신규 중앙 억제 프로그램으로서 입증된다.

[0088] 결과

[0089] HCV PAMP RNA에 의해 유도된 아폽토시스는 용량 의존적이다.

[0090] 연구는 RIG-I 아고니스트가 선천성 면역 신호전달 활성화 및 아폽토시스 둘 다를 유도할 수 있다는 것을 발견하였다. PAMP-RNA를 사용하여 이를 확인하기 위해, 용량 적정 연구를 수행하여 Huh7 세포에서 각각의 생물학적 사건을 유도하기 위해 요구된 PAMP-RNA의 양을 평가하였다(도 1a 내지 1d). 흥미롭게도, IRF3에 의해 유도된 ISG56 및 ISG15의 발현 및 IFN 의존적 IFITM1의 유도에 의해 입증된 바와 같이, 선천성 면역 신호전달은 10 ng/ml 이상의 역치에서 유도되었지만, PAMP-RNA에 의해 유도된 세포사의 IncuCyte[®] 분석은 100 ng/ml의 최소 농도에서 일어났다. 이 적정 연구는 PAMP-RNA가 200 ng/ml에서 최대 수준의 세포사를 유도하였음을 표시한다(도 1c 및 1d). 따라서, 나머지 연구를 위해 RIG-I 매개 아폽토시스를 유도하고 PAMP-RNA로 세포사를 유도하기 위한 최적 농도로서 200 ng/ml를 사용하였다.

[0091] PAMP-RNA에 의한 아폽토시스의 유도는 RIG-I 및 카스파제 의존적이다.

[0092] PAMP-RNA가 RIG-I 의존적 신호전달을 유도함을 확인하고 PAMP-RNA에 의해 유도된 RIG-I 신호전달_ENREF_27에 대한 세포사 반응에서의 카스파제 활성화의 역할을 평가하기 위해, HCV PAMP에 의해 유도된 세포사 및 카스파제 활성화의 정도를, 범-카스파제 억제제 zVAD로 처리되었거나 처리되지 않은 RIG-I 녹다운 세포 및 빈 벡터 대조군 세포에서 평가하였다. 실제로, RIG-I 녹아웃 세포에서의 RIG-I의 상실은 PAMP-RNA에 의해 유도된 세포사를 저해하였지만, PAMP-RNA 처리 전 빈 벡터 대조군 세포의 zVAD 처리는 유도된 세포사의 빈도를 감소시켰다(도 2a-1 및 2a-2). 선천성 면역 신호전달 단백질 발현의 면역블롯 분석은 zVAD 처리가 PAMP-RNA에 의한 ISG56의 유도에 영향을 미치지 않았음을 보여주었는데, 이는 카스파제의 억제가 이 세포들에서 PAMP-RNA에 의해 유발된 선천성 면역 반응을 억제하지 않는다는 것을 시사한다(도 2b). 나아가, 상기 세포에서의 RIG-I의 상실은 RIG-I 의존적 아폽토시스 동안 유도되는 것으로 알려져 있는 p53 의존적 전구아폽토시스 유전자 NOXA 및 PUMA의 발현을 감소시켰다(도 3c). 따라서, PAMP-RNA는 RIG-I 및 카스파제 의존적 과정을 통해 세포사를 유도할 수 있다.

[0093] I형 IFN 경로는 PAMP-RNA 매개 세포사에 관여한다.

[0094] 세포사의 PAMP-RNA 신호전달에 대한 IFN의 영향을 확인하기 위해, Huh7 대조군 세포 및 IFNAR 또는 RIG-I을 결여하는 세포에서 세포사를 평가하였다. IFNAR의 상실은 PAMP-RNA에 의해 유발된 RIG-I 매개 세포사 유도를 부분적으로 저해하는 것으로 밝혀졌다(도 3a). 이 발견은 I형 IFN 신호전달의 억제제인 B18R로 전처리된 Huh7 세포에서의 RIG-I 매개 아폽토시스 유도의 부분적 손상에 의해서도 확인되었다(도 3b).

[0095] TRIM16은 신규 RIG-I 결합 인자이다.

[0096] PAMP-RNA에 의한 세포 선천성 면역 또는 세포사 신호전달에 관여하는 RIG-I의 가능한 보조인자를 확인하기 위해, 센다이 바이러스(SeV)에 의한 RIG-I 활성화 후 RIG-I 결합 단백질에 대해 P85CH8 세포의 단백질체학 스크린을 수행하였다(도 4a). SeV는 강력한 RIG-I 활성화제이므로, 이 연구에서 PAMP-RNA 대용물로서 사용되어 세포 배양물에서의 RIG-I의 강하고 균일한 활성화를 제공하였다. 세포를 FLAG-태깅된 RIG-I 구축물 또는 FLAG 구축물 대조군으로 형질감염시키고 모의 감염시켰거나 SeV로 감염시켰다. 16시간 후, RIG-I 및 RIG-I 관련 단백질을 FLAG 친화성 정제로 분리하고 LC/MS-MS로 확인하였다. 스크린을 통해 선천성 면역의 공지된 RIG-I 상호작용제, 예컨대, OASL을 확인하였다. 중요한 것은, 분석을 통해 FLAG-RIG-I과 관련된 5개의 독특한 펩타이드 서열들을 확인하였으나, TRIM16인 E3 유비퀴틴 리가제에 상응하는 FLAG 비드만은 확인되지 않았다는 것이다. TRIM16은 RIG-I과 상호작용하는 것으로 이전에 알려져 있지 않다. RIG-I-FLAG 및 TRIM16 V5 구축물을 발현하는 HEK293 세포에서의 공면역침전을 이용하여, TRIM16과 RIG-I의 상태가 결합 파트너라는 것을 확인하였다(도 4b). RIG-I과 TRIM16의 상호작용에 필수적인 도메인을 각각의 단백질로부터의 공발현된 절두 돌연변이체들의 공면역침전 분석으로 더 맵핑하였다. 이 분석은 RIG-I CARD 도메인(아미노산 1 내지 176)이 RIG-I과 TRIM16의 회합에 필요하고 충분하다는 것을 보여주었다(도 4c). 마찬가지로, TRIM16 절두를 이용한 상호간 공면역침전은 TRIM16의 B-박스

도메인이 TRIM16과 RIG-I의 회합에 필요하고 충분하다는 것을 보여주었다(도 4d).

[0097] TRIM16의 상실은 RIG-I에 의한 선천성 면역 반응 유도에 영향을 미치지 않는다.

[0098] 선천성 면역 신호전달에 있어서 TRIM16의 가능한 역할을 밝히기 위해, PAMP-RNA에 의해 유도된 선천성 면역 활성화에 대한 TRIM16 상실의 영향을 평가하였다. TRIM16의 CRISPR/cas9 표적화된 녹아웃을 이용하여 Huh7 세포에서 TRIM16 발현을 고갈시켰다. RIG-I 또는 TRIM25(RIG-I 신호전달의 양성 조절제)의 발현을 녹아웃시키도록 조작된 Huh7 세포주와 대조적으로, 2개의 상이한 CRISPR/cas9 표적화 서열들로부터의 Huh7 TRIM16 KO 세포주들은 둘 다 RIG-I 반응성 유전자 ISG56, ISG15, IFN β 및 TNF α 의 유도에 의해 입증된 바와 같이 PAMP-RNA에 의한 RIG-I 선천성 면역 신호전달의 강력한 유도를 나타내었다(도 5a 및 5b). 더욱이, TRIM16 발현의 상실은 우성 활성 형태의 RIG-I(N-RIG)의 존재 하에서 또는 SeV 감염 후 RIG-I 다운스트림 선천성 신호전달 프로그램에 영향을 미치지 않았다(도 5c 및 5d). 종합하면, 이 실험들은 TRIM16이 RIG-I에 의해 유도된 숙주 선천성 면역 신호전달 과정에 관여하지 않는다는 것을 입증한다.

[0099] TRIM16은 RIG-I 매개 아폽토시스에 관여하나, TRIM25는 관여하지 않는다.

[0100] TRIM16이 PAMP-RNA에 의해 유도된 RIG-I 매개 세포사에 특이적으로 관여하는지를 확인하기 위해, PAMP-RNA에 의해 유도된 세포사에 대한 TRIM16 상실의 영향을 평가하였다. TRIM16 KO 및 TRIM25 KO Huh7 세포를 PAMP-RNA, 카스파제 억제제(ZVAD) 또는 이들 둘 다로 처리하고 실시간 영상화 세포사 어세이로 평가하였다. TRIM16 상실 또는 ZVAD 처리는 대조군에 비해 PAMP-RNA에 의해 유도된 세포사를 억제하였다(도 6a). 대조적으로, TRIM25 발현의 상실은 PAMP-RNA에 의해 유도된 세포사의 정도에 영향을 미치지 않았다(도 6b). 이 연구는 PAMP-RNA가 신규 RIG-I 결합 파트너 TRIM16을 통해 RIG-I 매개 아폽토시스성 세포사의 신호를 특이적으로 전달한다는 것을 보여준다.

[0101] PAMP-RNA 매개 세포사는 암 세포에 특이적이다.

[0102] RLR(예를 들면, RIG-I) 매개 프로그래밍된 세포사 신호전달이 건강한 세포 및 암 세포에 동등하게 영향을 미치는지를 확인하기 위해, PAMP RNA를 간암 세포주 및 정상 일차 인간 간세포 둘 다에 노출시켰다. 구체적으로, HEPG2 및 Huh7 간세포암종 세포 및 일차 간세포를 증가하는 양의 PAMP RNA 또는 xRNA(음성 대조군으로서 사용됨)로 처리하였고 투과성/사멸하는 또는 사멸된 세포를 표시하는 사이토스 그린 염료 흡수에 대해 적어도 24시간의 과정에 걸쳐 모니터링하였다. PAMP 처리는 종양 세포(즉, 인간 암종 유래의 세포인 HepG2 및 Huh7 세포)의 종양용해성 파괴를 특이적으로 유도하나, 정상 비암성 일차 인간 간세포의 파괴를 유도하지 않는 것으로 관찰되었다. 구체적으로, 도 7a 및 7b는 PAMP RNA 처리가 HepG2(도 7a) 및 Huh7(도 7b) 간세포암종 세포의 종양용해성 파괴를 유도하나, 일차 간세포(도 7b)에는 영향을 미치지 않는다는 것을 예증한다.

[0103] 이것은 건강한 세포가 RLR(예를 들면, RIG-I)을 통해 PAMP에 의해 유도된 프로그래밍된 세포사 신호전달에 불응성을 나타냄을 입증한다. 따라서, 암 세포는 건강한 세포에서의 비표적 부위 독성을 최소화하거나 예방하면서 파괴되도록 특이적으로 표적화될 수 있다.

[0104] 고찰

[0105] 이 연구는 TRIM16이 PAMP-RNA/RIG-I 경로에서 세포사 신호전달의 이펙터라는 것을 입증한다. 이 데이터는 PAMP-RNA 및 다른 RIG-I 리간드가 RIG-I을 활성화시켜 TRIM16에의 결합을 부여하는 TRIM16 작용의 모델을 뒷받침한다. 결과적으로, TRIM16은 카스파제의 다운스트림 활성화를 유도하여 아폽토시스성 세포사를 매개한다. RIG-I 매개 세포사의 유도가 선천성 면역 활성화의 RIG-I 신호전달보다 더 높은 용량의 PAMP-RNA에서 일어난다는 것은 조직 및 유기체를 보호하기 위해 감염된 세포를 제거하는 아폽토시스와 대조적으로 세포를 감염으로부터 보호하는 선천성 면역의 상이한 작용을 강조할 가능성이 있다. 따라서, 세포 및 조직의 고용량 PAMP-RNA 처리는 세포사 결과를 유도하는 전략을 위한 방법을 제시하고, 이때 TRIM16은 PAMP-RNA/RIG-I 신호전달의 세포사 촉을 매개한다.

[0106] (EBBP로서도 알려진) TRIM16은 다수의 생물학적 과정들에 관여하는 에스트로겐 반응성 유전자로서 일찍 확인되었다. TRIM16은 스트레스에 의해 유도된 단백질 응집체의 조절 및 내막 손상 항상성에서의 자가포식의 조절에 맵핑되었다. TRIM16은 각질세포 분화 및 레티노이드 대사와 연관되어 있다. 한 연구는 류마티스성 관절염에서 TRIM16 발현과 활막의 과형성 사이의 상관관계를 발견하였다. 또 다른 연구는 TRIM16이 인플라마솜 성분 카스파제 1 및 NLRP1과 상호작용하여 IL-1 β 분비를 향상시킴을 발견하였는데, 이는 TRIM16이 인플라마솜 조절에 있어서 역할을 한다는 것을 암시한다. 그러나, 가장 주목할 만한 것은, TRIM16이 암에서의 종양 억제와 현저히 연관되어 있다는 것이다. TRIM16 매개 종양 억제의 여러 기전들이 밝혀졌다. 폐암, 난소암 및 유방암 세포 모델 시

시스템에서의 연구는 TRIM16이 종양 촉진 소닉 헤지호그(sonic hedgehog) 경로를 하향조절함으로써 종양 진행 동안 상피가 중간엽으로 전이하는 것(EMT)을 억제함을 발견하였다. 마찬가지로, 간세포암종 및 전립선암의 세포 모델은 TRIM16이 세포-세포 부착 분자 E-카드헤린의 발현을 조절하는 전사 억제제를 억제함으로써 EMT를 억제한다는 것을 보여주었다. 흑색종에서의 TRIM16의 연구는 TRIM16이 IFN-베타 1 생성을 조절함으로써 증식 및 이동을 억제한다는 것을 발견하였다. 연구는 TRIM16이 종양에서 중간 필라멘트 패밀리의 구성원 비멘틴(vimentin)의 안정성을 조절하고 피부암 세포 이동을 감소시키고 세포 주기를 억제함으로써 신경모세포종 성장을 억제하는 것으로 보인다는 것도 발견하였다. 마지막으로, 유방암 세포주에서의 연구는 TRIM16의 과다발현이 카스파제-2의 활성화를 통해 아포토시스를 유도함을 발견하였다.

[0107] 주황색 점박이 바리(orange spotted grouper)로부터 클로닝되었고 호모 사피엔스와 29% 동일성을 갖는 어류 TRIM16L 유전자가 어류 세포에서 선천성 면역 신호전달을 길항하는 것으로 확인되었다는 것은 주목할 만하다. 대조적으로, 이 연구는 인간 TRIM16의 상실이 PAMP-RNA/RIG에 의한 선천성 면역 활성화의 유도에 영향을 미치지 않음을 발견하였다. 선천성 면역 반응에 있어서 어류 TRIM16과 인간 TRIM16 사이의 이 기능 차이는 서열 동일성의 결여에 기인할 가능성이 있는 반면, 어류 TRIM16L 단백질은 B-박스 도메인을 결여하고 RIG-I에 결합할 것으로 예상되지 않으나, 어류 선천성 면역에 대한 상이한 작용을 부여할 가능성이 있다.

[0108] 흥미롭게도, 본 연구는 HCV PAMP에 의해 유도된 세포사가 IFN에 부분적으로 의존한다는 것을 보여주었는데, 이 결과는 RIPA가 IFN과 무관하다는 것을 보여준 선행 연구와 직접적으로 대조된다. 임의의 특정 이론에 의해 구속받고자 하지는 않지만, 이 명확한 차이는 두 연구들에서의 상이한 세포주들의 사용에 기인할 가능성이 있으나, IFN이 세포사 신호전달을 향상시킬 수 있다는, IFN 전구아포토시스 작용과 일치하는 결과를 보여주는 데 기여한다. RIG-I 그 자체가 ISG이기 때문에, IFN은 TRIM16의 다운스트림 개입을 위해 RIG-I 수준을 증가시켜 PAMP-RNA 신호전달 강도를 향상시키는 데 기여할 수 있다. 대안적으로, 다른 ISG는 PMPA-RNA 신호전달과 협력하여 TRIM16 세포사 표현형을 향상시킬 수 있다.

[0109] 요약하면, 이 연구는 PAMP-RNA에 의해 유도된 세포사 신호전달을 매개하는 신규 RIG-I 결합 파트너로서 TRIM16을 확인하였다. 효과는 암 세포에 특이적인 것으로 관찰되었고 동일한 유래 조직의 건강한 세포에는 부정적으로 영향을 미치지 않았다. 따라서, 세포사 결과를 유도하기 위해 PAMP-RNA로 이 신규 RIG-I/TRIM16 경로를 표적화하는 것은 암 세포에서의 세포사를 유도하는 것을 목적으로 하는 치료 방법을 위한 실행가능한 전략이다.

[0110] 하기 실시예는 본 개시를 제한하기 위한 것이 아니라 예증하기 위한 목적으로 제공된다.

[0111] 실시예 1

[0112] 예시적 방법 및 재료

[0113] 세포 배양, 억제제 및 바이러스

[0114] 인간 Huh 7 간세포암종, 일차 불멸화된 인간 PH5CH8 간세포 및 인간 배아 신장 HEK293 세포를 "완전 DMEM"(10% 태아 소 혈청(FBS), 10 mM L-글루타민, 5 mM 피루브산나트륨, 항생제-항진균제 용액 및 5x 비필수 아미노산으로 보충된 돌베코의 변형된 이글 배지(DMEM))에서 성장시켰다. 센다이 바이러스(SenV)의 칸텔(Cantell) 변종으로부터의 세포를 인정된 프로토콜에 따라 유지하였다. 어세이를 위해, 상기 세포를 모의 처리하였거나, 리포솜 내에 제제화된 PAMP 또는 XRNA로 형질감염시켰거나, 항시적 활성 RIG-I(N-RIG)로 형질감염시켰거나, 표시된 횡수만큼 100 HAU/ml의 SenV로 감염시킨 후, 카스파제 3/7 활성의 인큐사이트 분석으로 세포사를 분석하였거나, 면역블롯 및 qRT-PCR 분석을 위해 세포 용해물을 수거하였다(전체적으로 본원에 각각 참고로 포함된 문헌(Kentsis, A. & Borden, K.L. Construction of macromolecular assemblages in eukaryotic processes and their role in human disease: linking RINGs together. *Curr Protein Pept Sci* 1, 49-73 (2000)), 및 문헌(Diaz-Griffero, F., et al., A B-box 2 surface patch important for TRIM5alpha self-association, capsid binding avidity, and retrovirus restriction. *J Virol* 83, 10737-10751 (2009))에 기재됨), 억제제를 하기 농도로 사용하였다: 1:1000으로 사용된 zVAD(SM-Biochemicals), TNFa(Peprotech)[400 μ l의 총 배지/웰과 함께 0.5 μ l의 TNF/웰], 및 백시니아 바이러스 B18R 담체 무함유 제조합 단백질(eBioscience)[1 μ g/ml]. 억제제를 PAMP 또는 XRNA 형질감염 3시간 전에 첨가하였다.

[0115] 면역블롯 분석

[0116] 1 μ M 오카다산, 1 μ M 포스파타제 억제제 콕테일 II(Calbiochem) 및 10 μ M 프로테아제 억제제(Sigma)로 보충된, 얼음 상의 MCLB 용해 완충제(50 mM Tris HCl[pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.5% NP-40)에서 세포를 용해시킨 후, 10분 동안 16,000 x g에서 4°C 원심분리하여 용해물을 정화함으로써 면역블롯 분석용 단백질 추출물을 준비하였

다. SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 이은 면역블롯팅으로 동등한 단백질 양을 분리하였다. 면역블롯 분석을 위해 하기 일차 항체들을 사용하였다: PARP(Cell Signaling Technologies), RIG-I Alme-1(Adipogen), ISG56(유티 사우스웨스턴 안티바디 코어(UT Southwestern Antibody Core) 시설에서 제조된 rb-a-IFIT1 #971), IFITM1(Protein Tech), ISG15(Cell Signaling Technologies), 액틴(Millipore), pSTAT1 Y701(Cell Signaling Technologies), FLAG(Sigma), 및 V5(Life Technologies). 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 680/790 당나귀 항-토끼 항체 및 당나귀 항-마우스 항체(Jackson ImmunoResearch)를 이차 항체로서 사용하였다.

[0117] 면역침전

[0118] PH5CH8 또는 293 세포에서 FLAG-RIG-I 및 TRIM16-V5 전체 길이 또는 돌연변이체 구축물을 외생적으로 발현시킨 후, 4°C에서 하룻밤 동안 α-FLAG 아가로스 비드(Sigma) 및 α-V5 접합된 아가로스 비드(Sigma)를 사용하여 세포 추출물을 면역침전시켰다. 면역침전 후, MCLB 용해 완충제를 사용하여 샘플을 3회 세척한 후 용출하였다. 용출물을 5분 동안 끓였고 SDS 겔 전기영동을 이용하여 분리하고 면역블롯팅으로 분석하였다. α-V5(Life Technologies) 및 α-FLAG(Sigma)를 일차 항체로서 사용하였고 하룻밤 동안 항온처리하였다. 알렉사 플루오르 680/790 당나귀 항-토끼 항체 및 당나귀 항-마우스 항체(Jackson ImmunoResearch)를 이차 항체로서 사용하였다.

[0119] 세포사 분석

[0120] 세포를 웰당 100 k 세포로 24웰 디쉬 상에 시딩하였다. 세포사 및/또는 투과성을 어세이하기 위해 세포를 100 nM 사이토스(Sytox)(#S7020, Thermo Fischer)로 처리하였고, 총 세포 수를 어세이하기 위해 별도의 웰에서 세포를 사이토-그린(Syto-Green)(S7559, Thermo Fischer)으로 처리하였다. 인큐사이트 영상화 플랫폼(Essen Bioscience)으로 세포를 영상화하였다. 각각의 시점에서, 웰당 9개의 영상을 촬영하였다. 각각의 처리를 이중 또는 삼중으로 실시하였다. 실시의 거의 시작시점부터 2시간에 걸쳐 사이토-그린 카운트의 평균을 산출함으로써 퍼센트 세포사를 계산하였다. 상기 카운트의 평균은 반복실험에 의해 산출되었고 사이토스 카운트를 정규화하여 퍼센트 세포사를 계산하는 데 사용되었다.

[0121] 카스파제 3/7 어세이

[0122] 인큐사이트 영상화 플랫폼(전술됨) 및 카스파제-Glo[®] 3/7 어세이 시스템(Promega) 상에서 카스파제 3/7 그린 아포토시스 어세이 시약(Essen)을 사용하여 카스파제 3/7 활성을 측정하였다. 사용 및 분석을 제조사의 지시에 따라 수행하였다.

[0123] 구축물 및 세포 형질감염

[0124] RIG-I 절두 돌연변이체 구축물은 이전에 제조되었고 기재되었다(PMID: 16585524, PMID: 17190814). PCR 기반 클로닝 전략을 이용하여 TRIM16 절두 돌연변이체를 제조하였다. TRIM16 cDNA 제조를 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드 서열은 요청 시 입수될 수 있다. *TransIT*[®]-mRNA 형질감염 키트(Mirus Bio LLC)를 사용하여, 세포를 기재된 2 μg/ml PAMP-RNA¹⁰ (PMID: 18548002), 대조군 XRNA(PAMP-RNA에 인접하고 길이가 PAMP-RNA와 동등하나 RIG-I에 결합하지 않고 RIG-I 신호전달도 유도하지 않는, C형 간염 바이러스로부터 유래한 5'ppp 함유 RNA 모티프¹⁰), TRIM16을 코딩하는 cDNA 구축물(전체 길이 또는 절두된 돌연변이체) 또는 RIG-I(전체 길이 또는 절두된 돌연변이체)로 형질감염시켰다.

[0125] RT-qPCR

[0126] 세포를 RLT 완충제(Qiagen)로 수거하였고 RNeasy 키트(Qiagen)를 사용하여 총 세포 RNA를 정제하였다. iScript cDNA 합성 키트(Bio-rad)를 사용하여 무작위 및 올리고(dT) 프라이밍 둘 다로 정제된 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 7300 또는 비이아(Viia) 7 RT-PCR 기계(Applied Biosystems)를 이용하여 SYBR 그린 상대적 정량 방법으로 RNA 수준을 측정하였다. 하우스킵핑 유전자 RPLP0 또는 POLR2A의 각각의 CT 값을 차감함으로써 샘플을 정규화하였고, 비처리된 대조군에 비해 특정 유전자의 배수 유도를 계산하였다. 프라이머 서열은 표 1에 나열되어 있다.

[0127] 닉다운 세포주의 생성

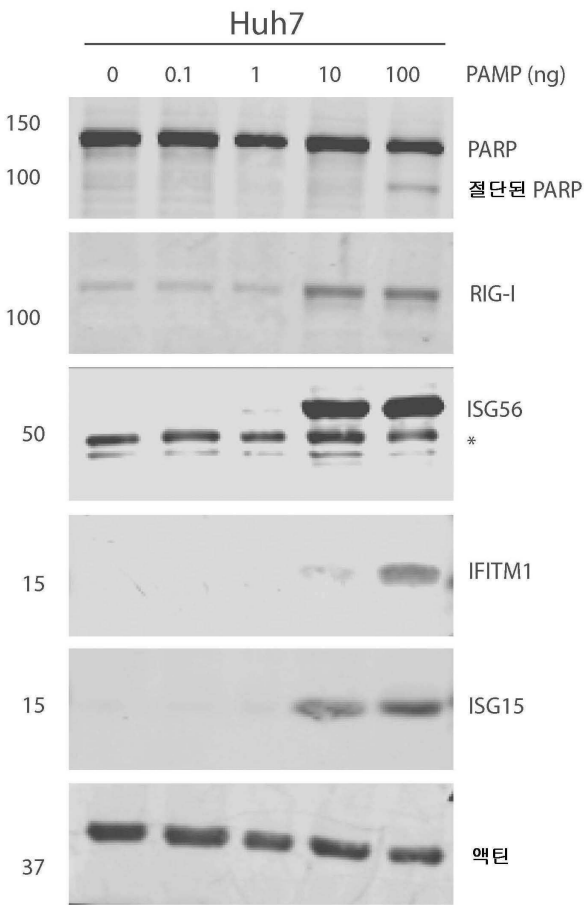
[0128] CRISPR 및 비표적화 가이드 RNA(대조군), 또는 RIG-I 또는 IFN 수용체 왜(IFNAR)의 닉아웃을 위한 가이드 RNA를 발현하는 Huh7 세포는 이전에 기재되었다(PMID: 27841874). 각각의 특정 닉다운 닉아웃 세포 집단을 생성하기 위해 하기 세트의 가이드 RNA들을 사용하여 CRISPR, 및 TRIM16 또는 TRIM25에 특이적인 가이드 RNA를 발현하는

Huh7 세포를 선택하였다:

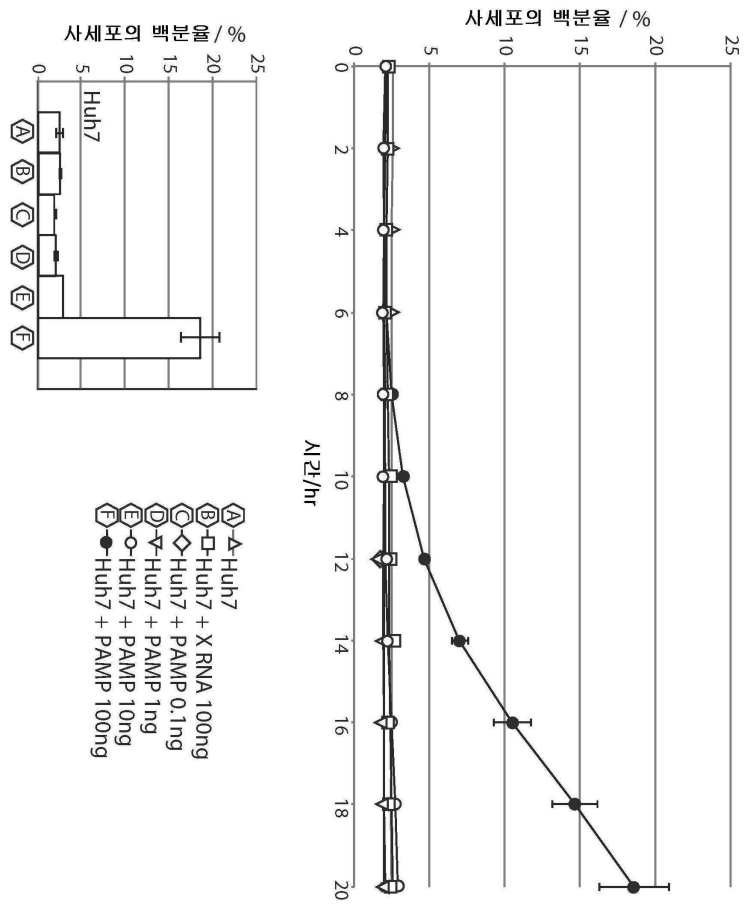
- [0129] TRIM16 가이드 RNA 5'에서 3'으로; 각각 엑손 6을 표적화함
- [0130] GTCGGTGTCTCAGAGGTCAAAG(서열번호)
- [0131] GGTGTCTCAGAGGTCAAAGCGG(서열번호)
- [0132] GTCGGTGTCTCAGAGGTCAAAG(서열번호)
- [0133] TRIM25 가이드 RNA 5'에서 3'으로; 각각 엑손 3을 표적화함
- [0134] GATGACTGCAAACAGAAAGG(서열번호)
- [0135] TCAGATGACTGCAAACAGAA(서열번호)
- [0136] GCAGCTACCAACAAGAATACA(서열번호)
- [0137] 전형적으로, 유전자당 3개의 독립적인 gRNA들을 선택하였다. 인퓨전(InFusion) 클로닝(TaKaRa)을 통해 gRNA 서열을 pRRL-empty-gRNA-Cas9-T2A-Puro 벡터³² 내로 서브클로닝하였다. 구축물을 스핀펙션으로 Huh7 세포 내로 형질도입하였고, 푸로마이신 선택으로 폴리클론 집단을 단리하였다. 그 다음, 푸로마이신 내성 세포를 RNA 및 면역블롯 분석으로 스크리닝하여, 관심 있는 유전자가 충분히 녹아들었음을 검증하였다.
- [0138] 단백질체학 분석
- [0139] PH5CH8 세포를 전술된 바와 같이 전체 길이 FLAG-RIG-I로 형질감염시키고 모의 감염시키거나 센다이 바이러스로 감염시켜 16시간 동안 RIG-I(100 HAU/ml)을 활성화시켰다. 그 후, 세포를 수거하여 단백질 추출물을 생성하였다. 200 μ g의 각각의 단백질 추출물을 항-FLAG-친화성 비드(Sigma)와 혼합하고 2시간 동안 4°C에서 항온처리하였다. 그 후, 비드를 150 mM NaCl 함유 트리스 완충 식염수로 3회 세척한 후, 250 mM NaCl 함유 트리스 완충 식염수로 3회 추가 세척하였다. 그 다음, 비드와 과량의 FLAG 펩타이드의 항온처리를 통해 결합된 단백질을 용출하였다. 그 후, RIG-I 및 RIG-I-단백질 복합체를 확인하기 위해 용출물 용액을 탠덤 액체 크로마토그래피 질량 분광측정(LC-MS/MS)으로 분석하였다. TRIM16에 대한 5개의 독특한 펩타이드들을 확인하였다.
- [0140] 통계학적 분석
- [0141] 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6 소프트웨어(GraphPad, 캘리포니아주 라 줄라 소재)를 이용하여 통계학적 분석을 수행하였다. 각각의 실험에서 변수의 수 및 시점에 따라, 군들 사이의 평균 차이의 통계학적 분석을 스튜던트 *t*-검정 또는 다원 변량 분석(ANOVA)에 이은 본페로니(Bonferroni) 사후 분석으로 수행하였다. 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 분석을 로그-순위 검정으로 분석하였다. 평균 생존 및 임상 증상의 비교를 비대응 *t*-검정으로 분석하였다. 구체적인 통계학적 검정, *P* 값 및 샘플 크기는 도면 범례에 표시되어 있다.
- [0142] 예증적 실시양태들이 예증되고 기재되어 있지만, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 이들을 다양하게 변화시킬 수 있다는 것이 인식될 것이다.
- [0143] 독점 재산권 또는 독점권이 청구된 본 발명의 실시양태는 다음과 같이 정의된다.

도면

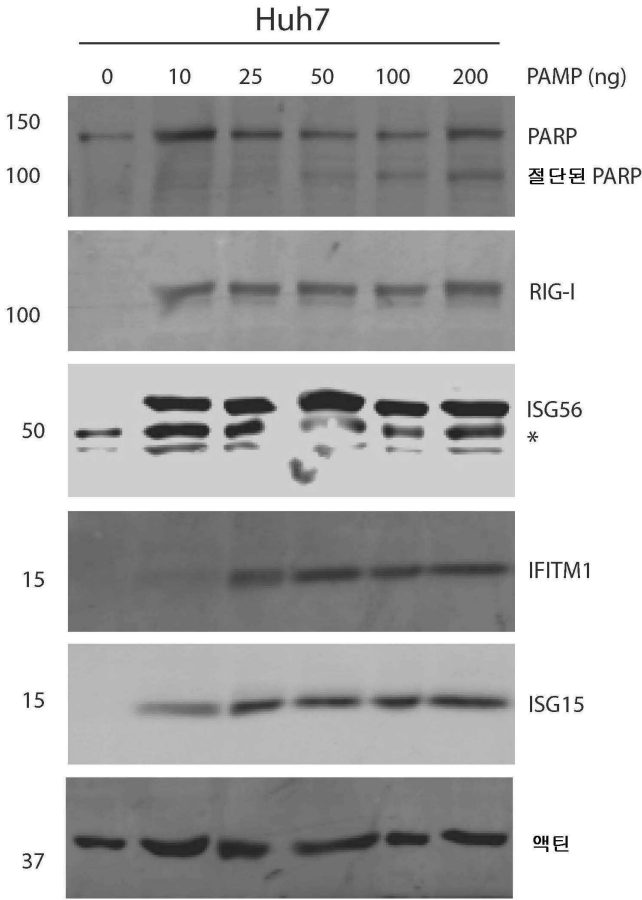
도면1a



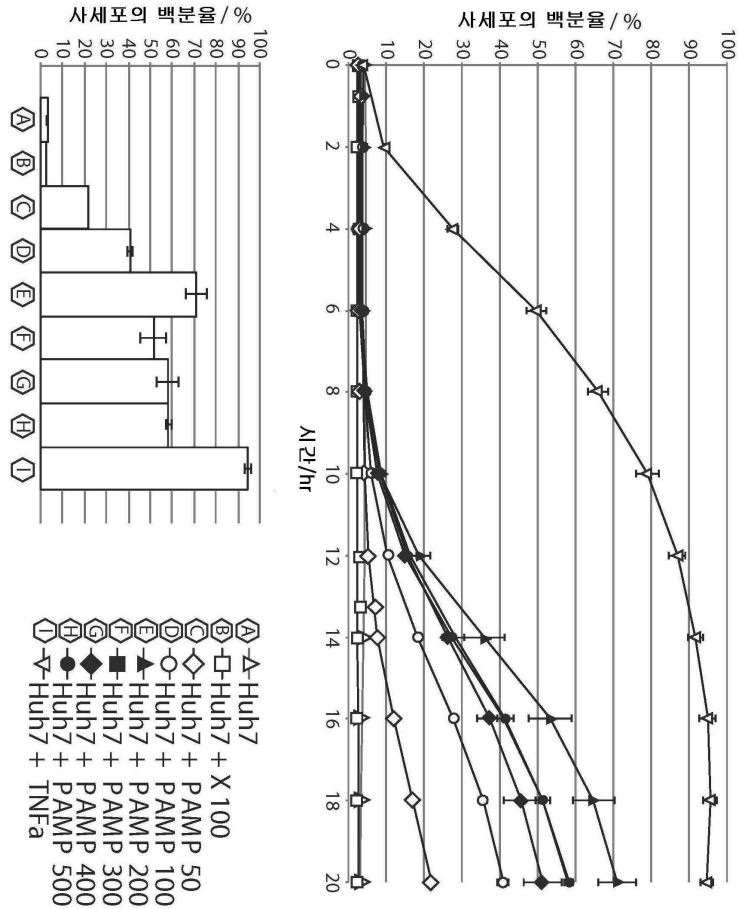
도면1b



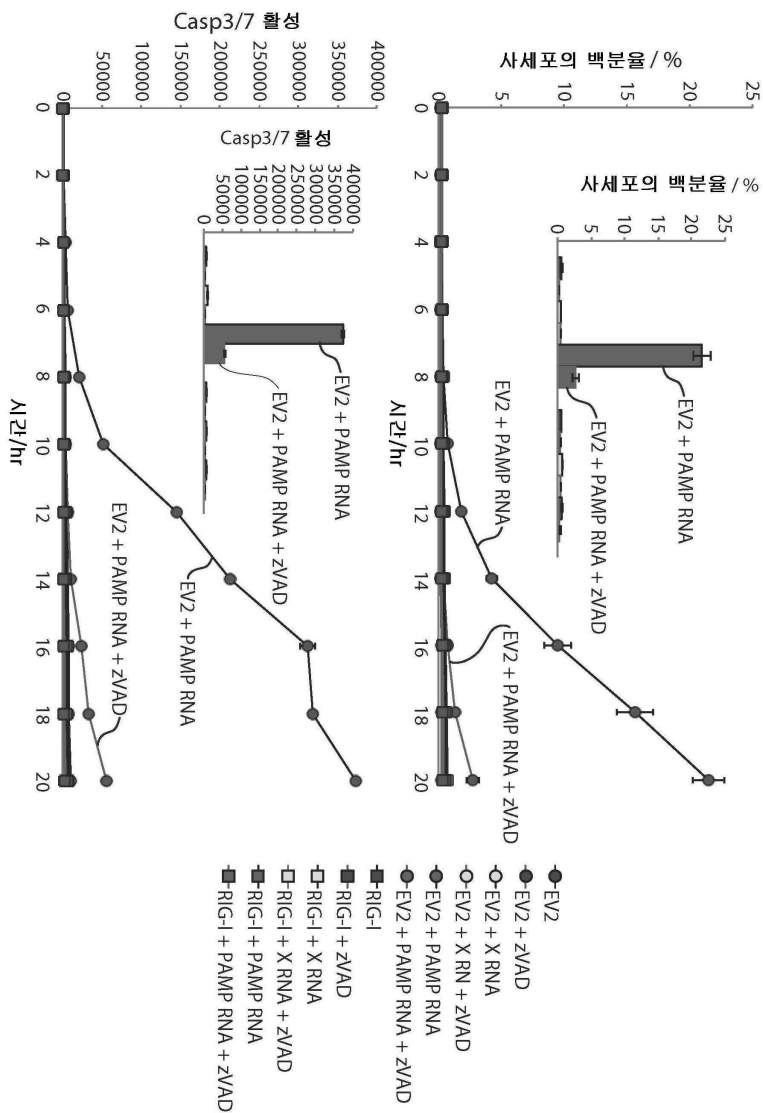
도면1c



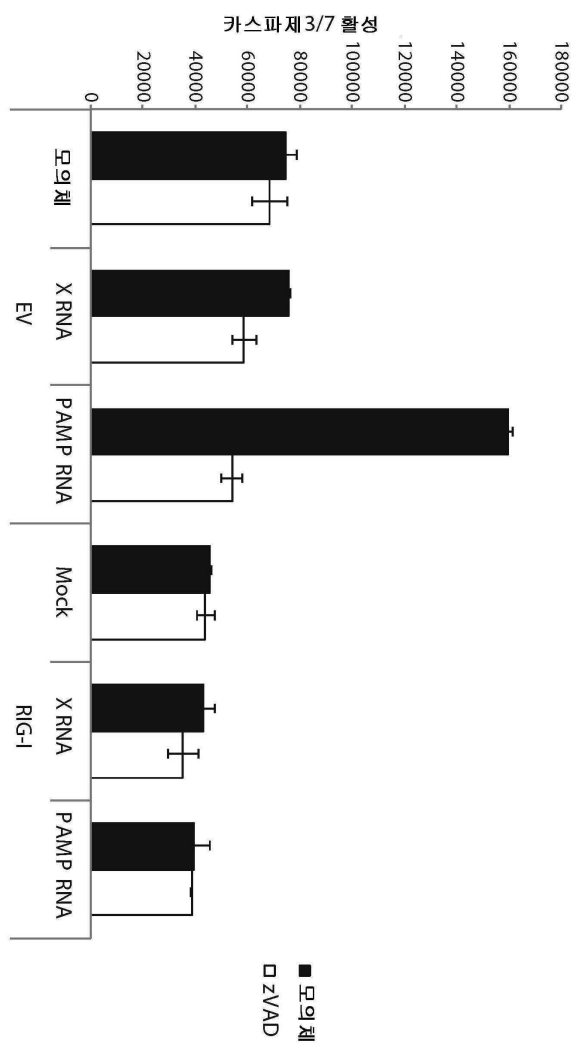
도면1d



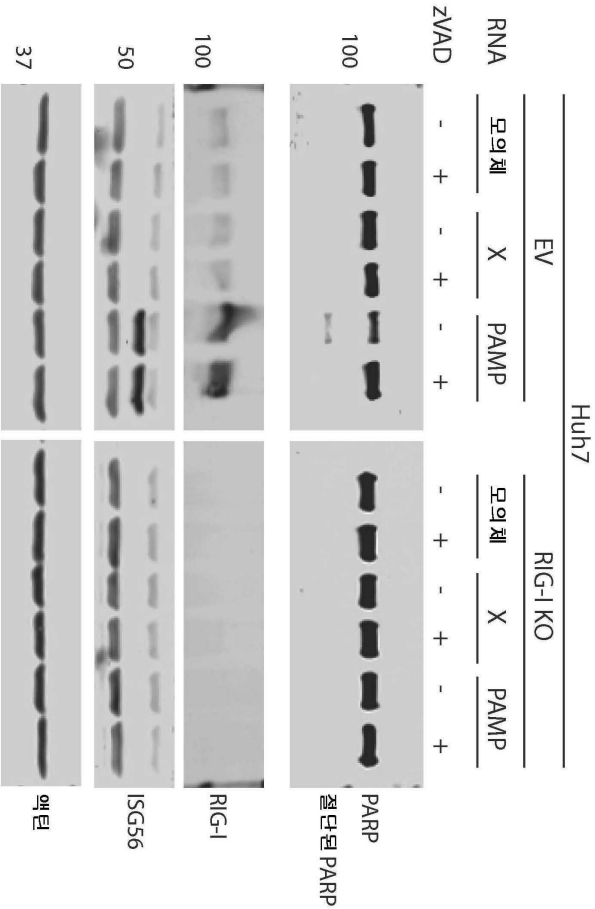
도면2aa



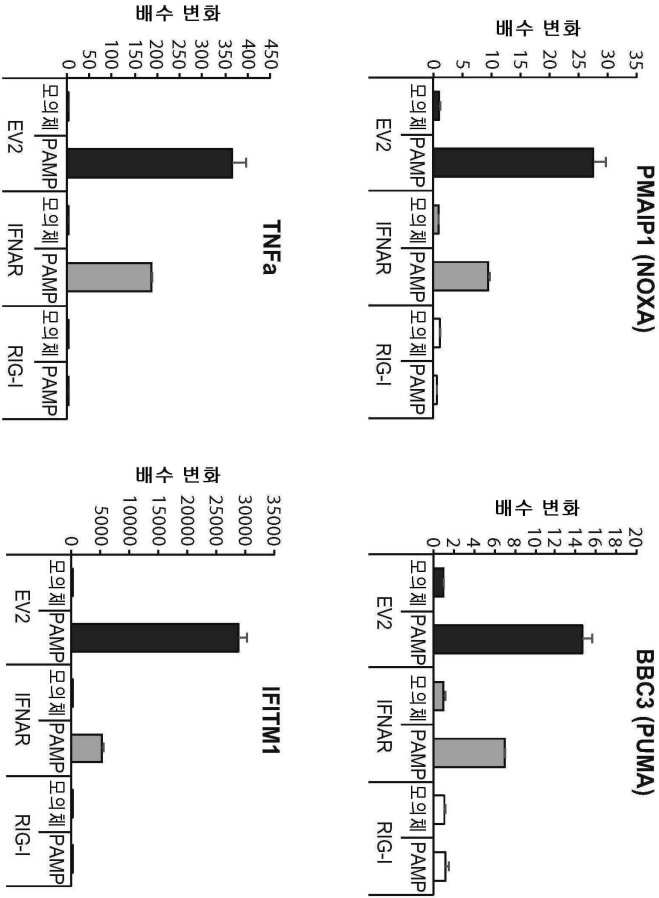
도면2ab



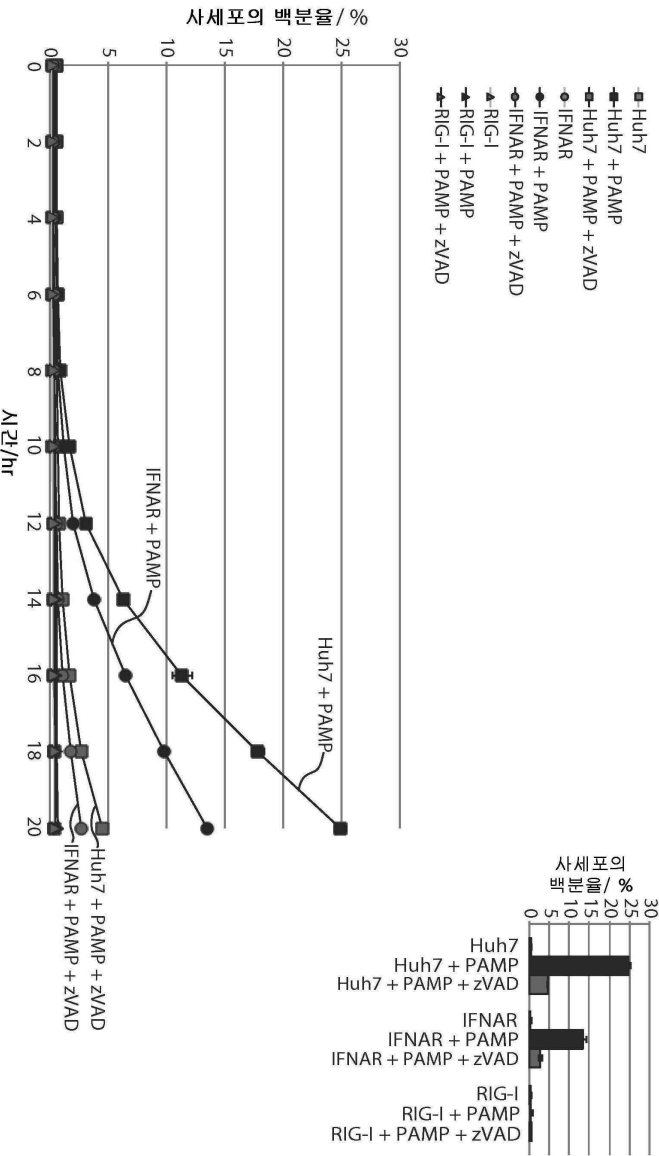
도면2b



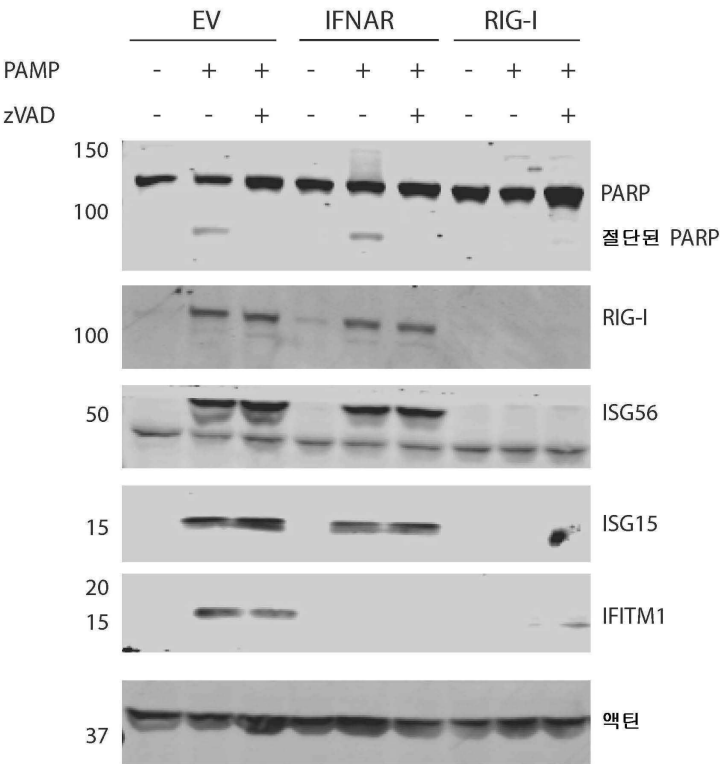
도면2c



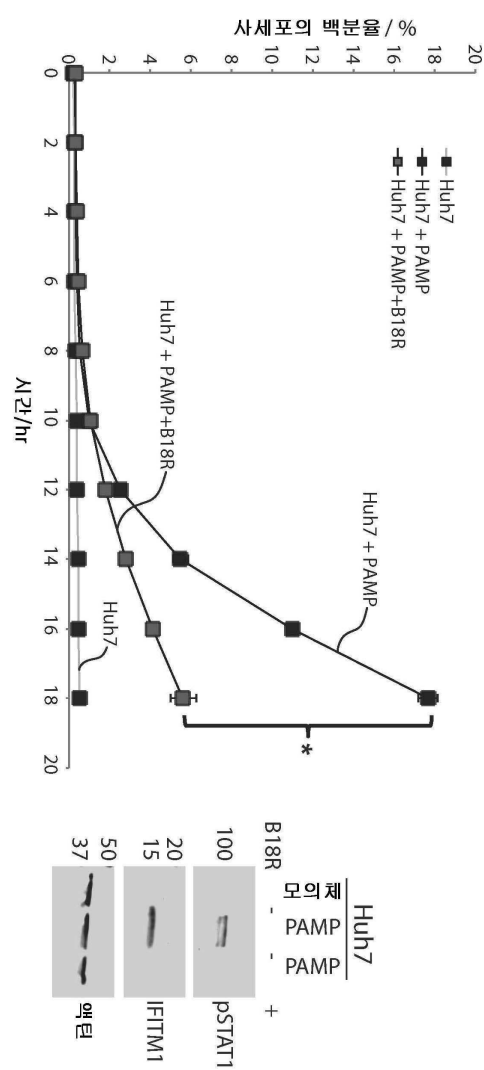
도면3a



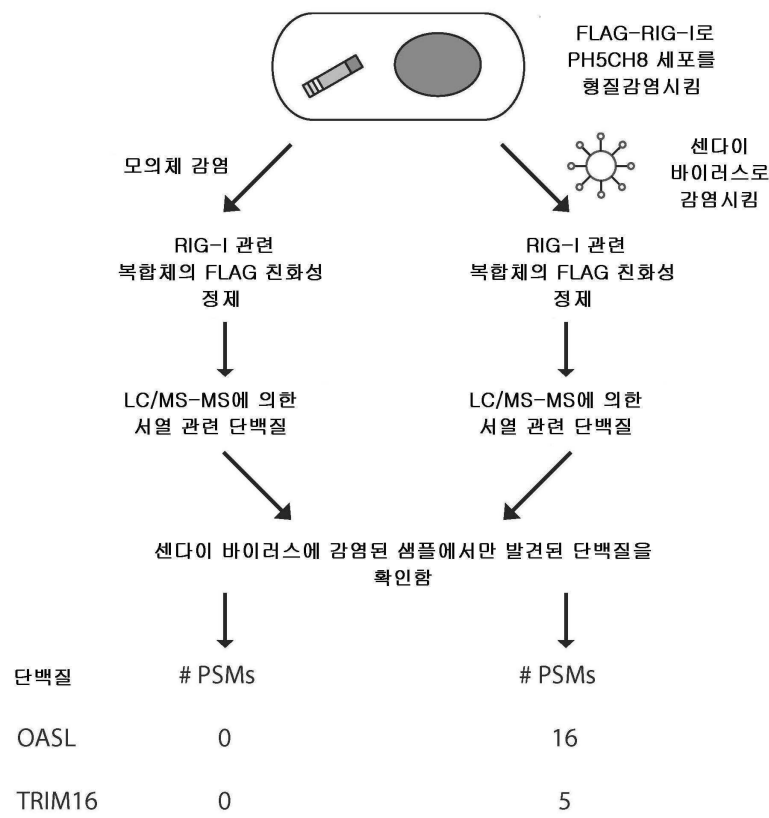
도면3b



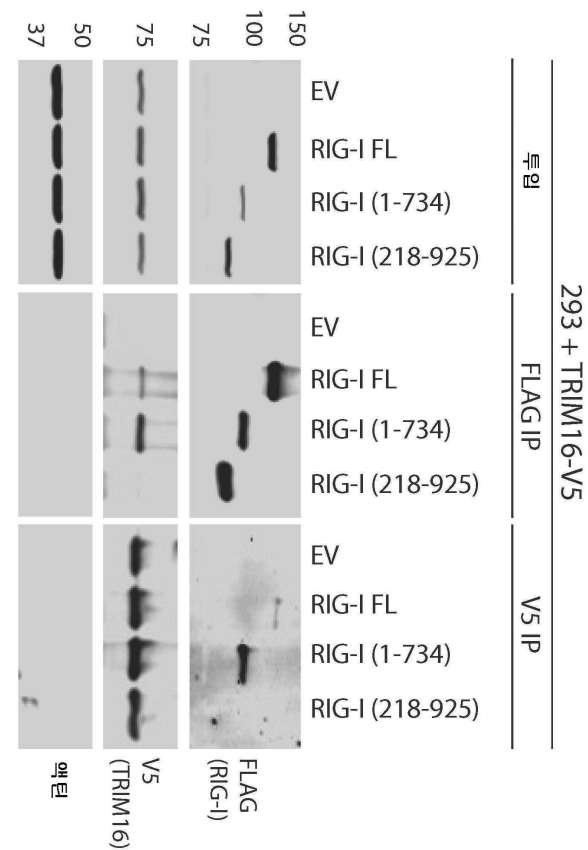
도면3c



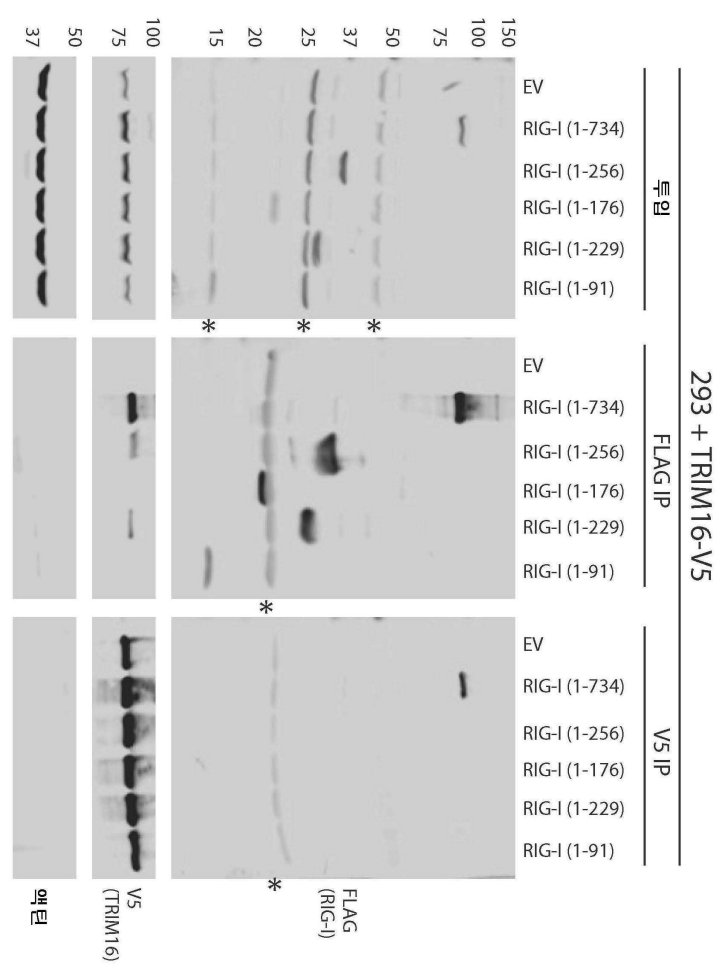
도면4a



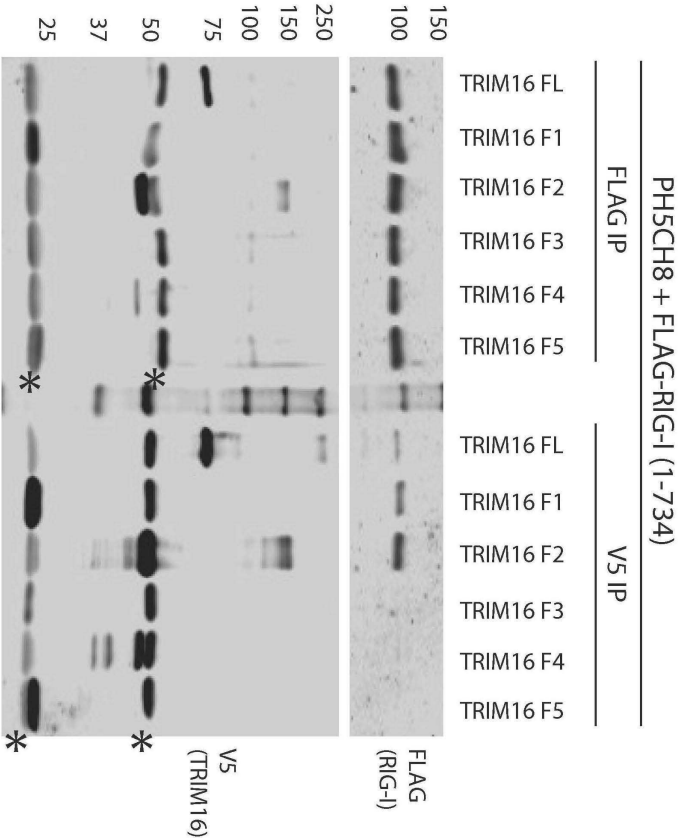
도면4b

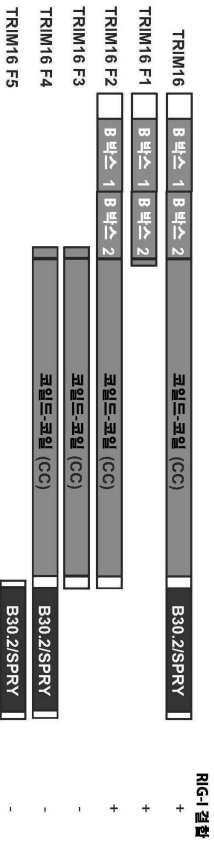
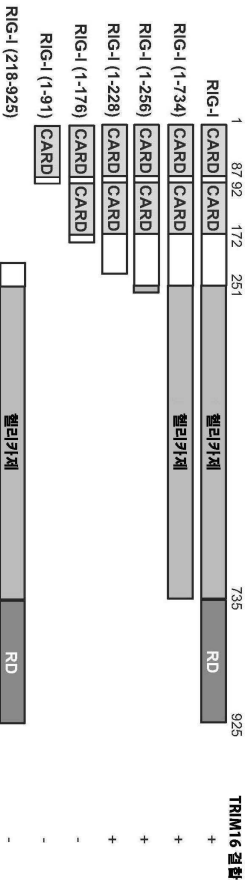


도면4c

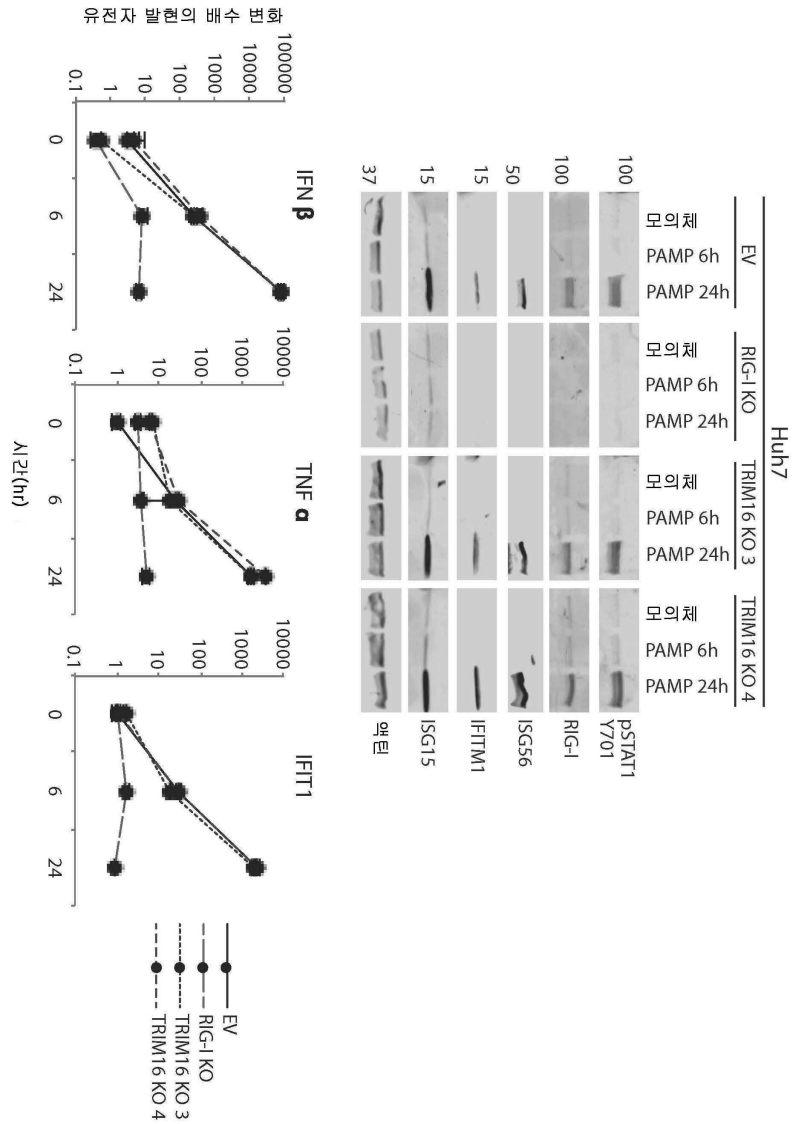


도면4d

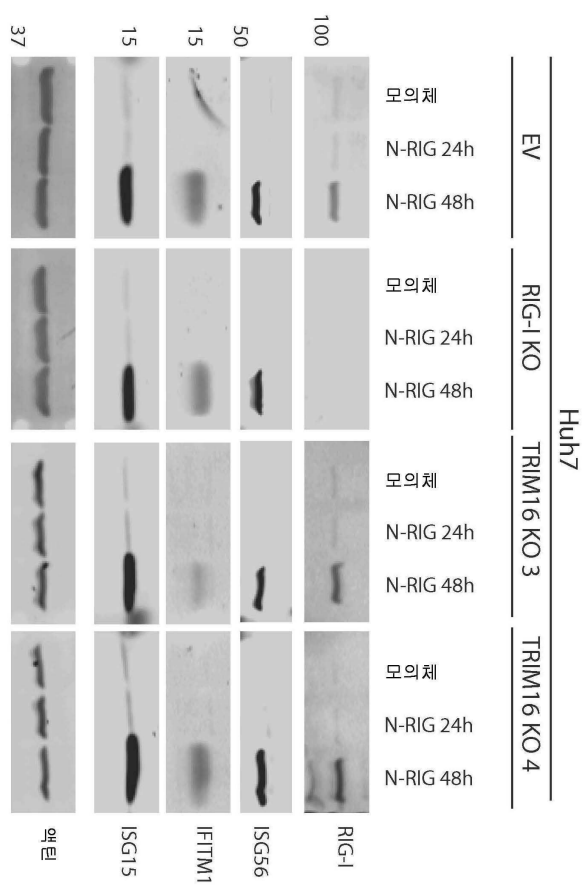




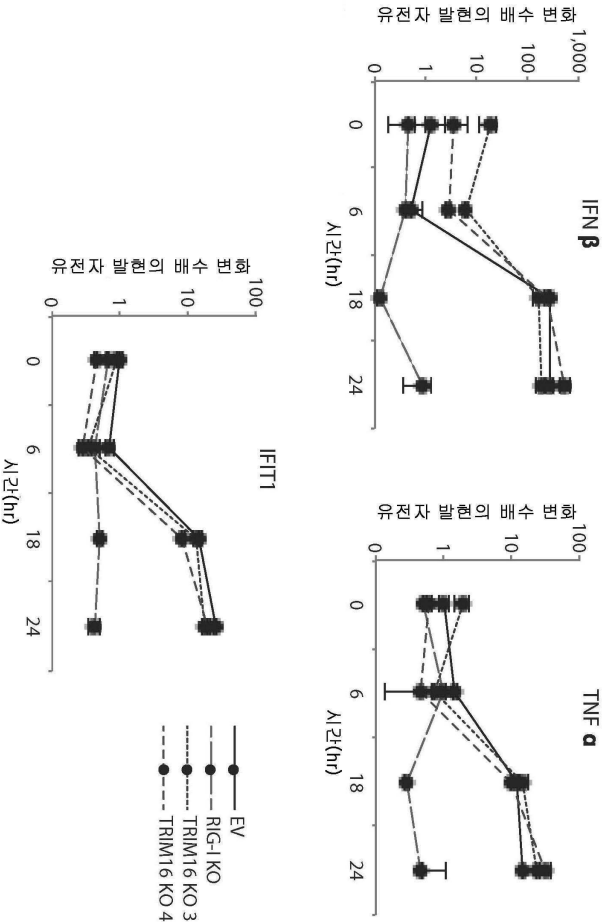
도면5a



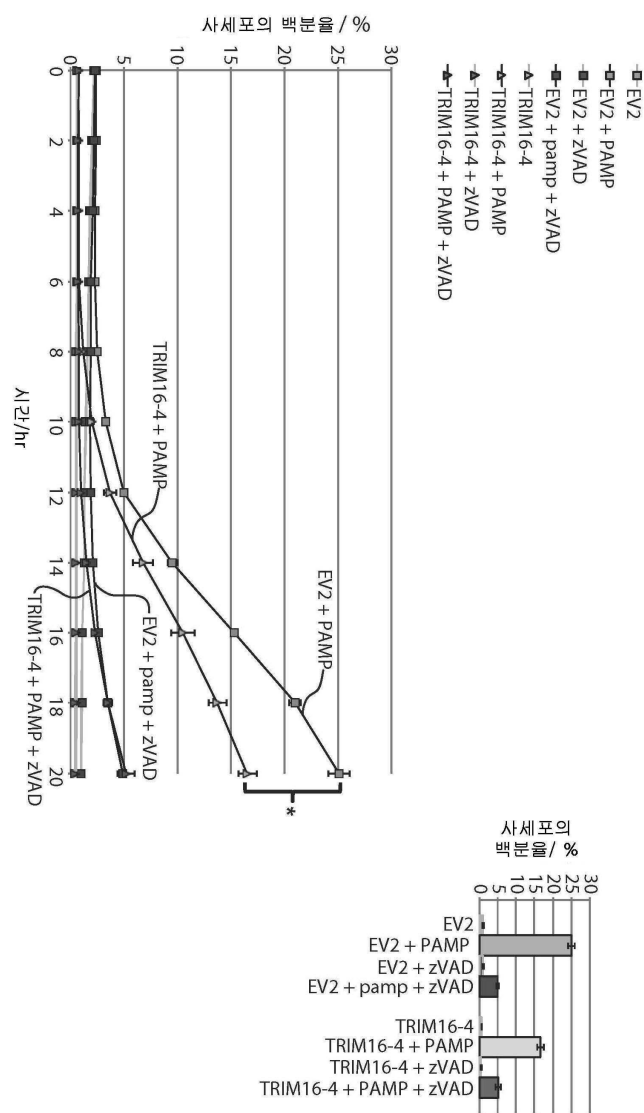
도면5c



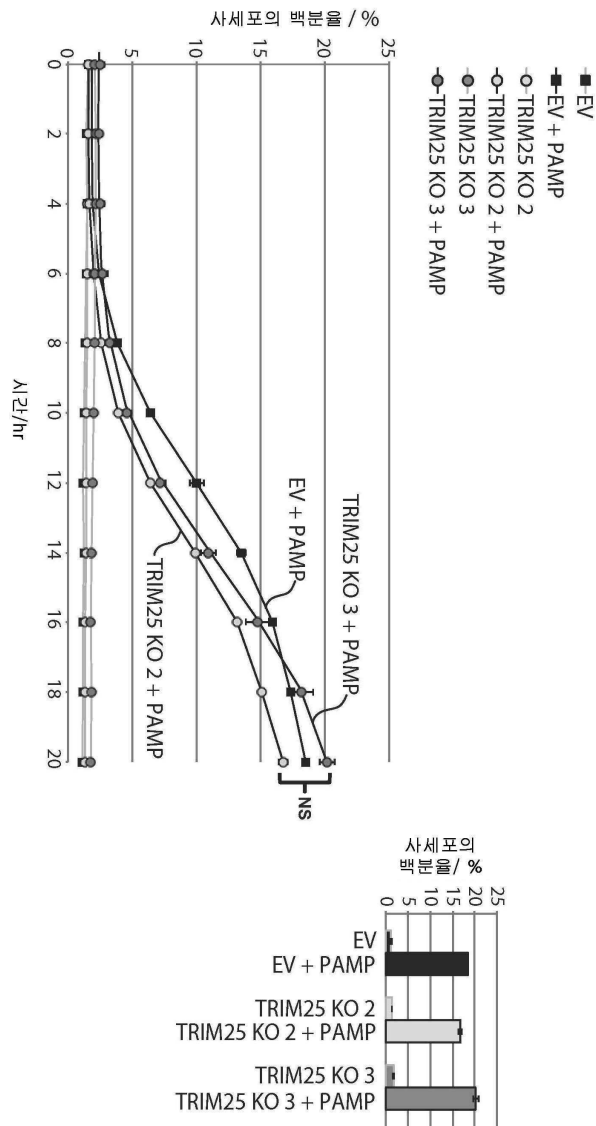
도면5d



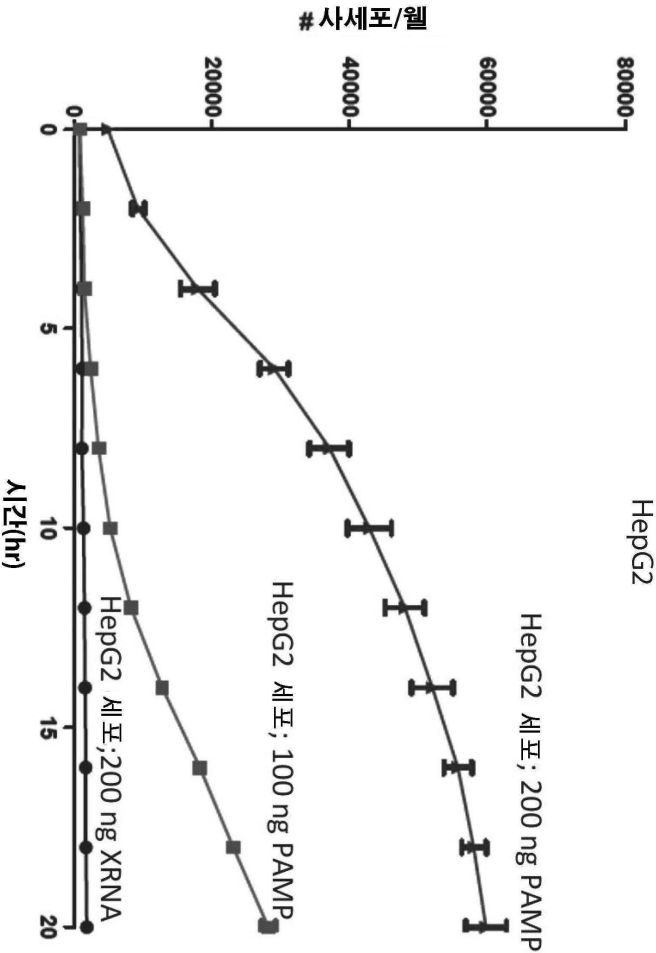
도면6a



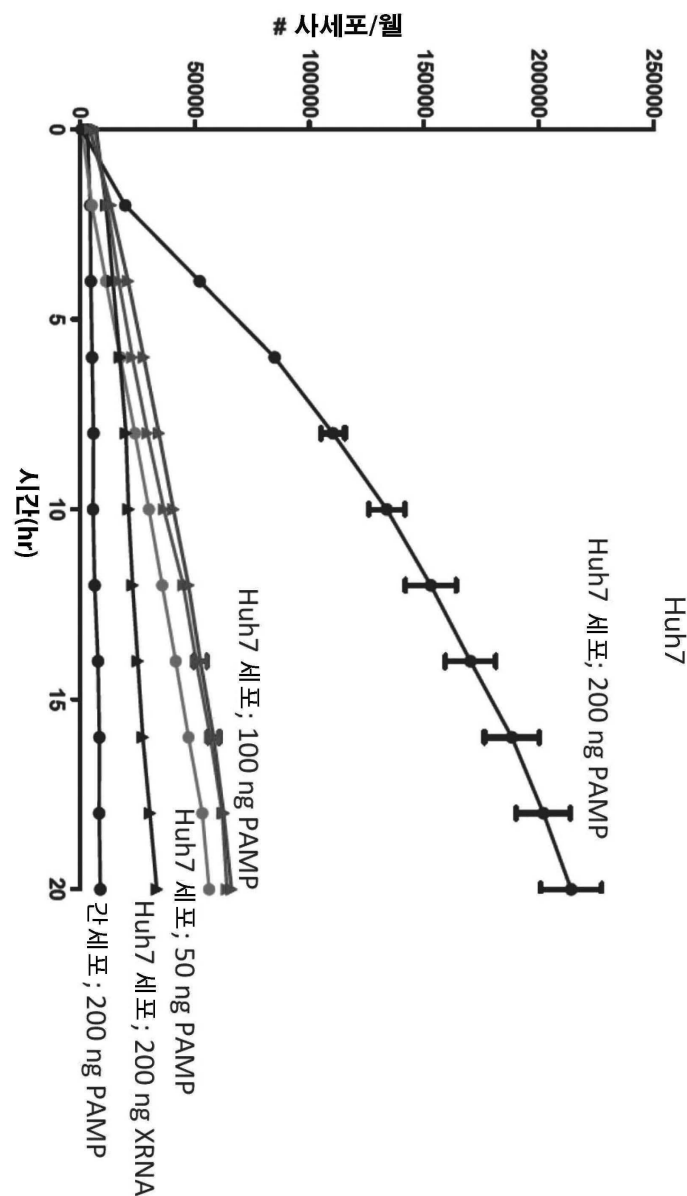
도면6b



도면7a



도면7b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> University of Washington
Gale, M.J.
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR INDUCING TRIPARTITE MOTIF-CONTAINING PROTEIN 16 (TRIM16) SIGNALING
- <130> UWOTL-1-68142
- <150> US 62/625,623
- <151> 2018-02-02
- <160> 91
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 564

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Glu Leu Asp Leu Met Ala Pro Gly Pro Leu Pro Arg Ala Thr

1 5 10 15

Ala Gln Pro Pro Ala Pro Leu Ser Pro Asp Ser Gly Ser Pro Ser Pro

20 25 30

Asp Ser Gly Ser Ala Ser Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Gly Ser Ser

35 40 45

Glu Lys Leu Gly Arg Glu Thr Glu Glu Gln Asp Ser Asp Ser Ala Glu

50 55 60

Gln Gly Asp Pro Ala Gly Glu Gly Lys Glu Val Leu Cys Asp Phe Cys

65 70 75 80

Leu Asp Asp Thr Arg Arg Val Lys Ala Val Lys Ser Cys Leu Thr Cys

85 90 95

Met Val Asn Tyr Cys Glu Glu His Leu Gln Pro His Gln Val Asn Ile

100 105 110

Lys Leu Gln Ser His Leu Leu Thr Glu Pro Val Lys Asp His Asn Trp

115 120 125

Arg Tyr Cys Pro Ala His His Ser Pro Leu Ser Ala Phe Cys Cys Pro

130 135 140

Asp Gln Gln Cys Ile Cys Gln Asp Cys Cys Gln Glu His Ser Gly His

145 150 155 160

Thr Ile Val Ser Leu Asp Ala Ala Arg Arg Asp Lys Glu Ala Glu Leu

165 170 175

Gln Cys Thr Gln Leu Asp Leu Glu Arg Lys Leu Lys Leu Asn Glu Asn

180 185 190

Ala Ile Ser Arg Leu Gln Ala Asn Gln Lys Ser Val Leu Val Ser Val

195 200 205

Ser Glu Val Lys Ala Val Ala Glu Met Gln Phe Gly Glu Leu Leu Ala

210 215 220

Ala Val Arg Lys Ala Gln Ala Asn Val Met Pro Phe Leu Glu Glu Lys

225 230 235 240

Glu Gln Ala Ala Leu Asn Gln Ala Asn Gly Ile Lys Ala His Leu Glu

245 250 255

Tyr Arg Ser Ala Glu Met Glu Lys Ser Lys Gln Glu Leu Glu Arg Met

260 265 270

Ala Ala Ile Ser Asn Thr Val Gln Phe Leu Glu Glu Tyr Cys Lys Phe

275 280 285

Lys Asn Thr Glu Asp Ile Thr Phe Pro Ser Val Tyr Val Gly Leu Lys

290 295 300

Asp Lys Leu Ser Gly Ile Arg Lys Val Ile Thr Glu Ser Thr Val His

305 310 315 320

Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asn Tyr Lys Lys Lys Leu Gln Glu Phe Ser

325 330 335

Lys Glu Glu Glu Tyr Asp Ile Arg Thr Gln Val Ser Ala Val Val Gln

340 345 350

Arg Lys Tyr Trp Thr Ser Lys Pro Glu Pro Ser Thr Arg Glu Gln Phe

355 360 365

Leu Gln Tyr Ala Tyr Asp Ile Thr Phe Asp Pro Asp Thr Ala His Lys

370 375 380

Tyr Leu Arg Leu Gln Glu Glu Asn Arg Lys Val Thr Asn Thr Thr Pro

385 390 395 400

Trp Glu His Pro Tyr Pro Asp Leu Pro Ser Arg Phe Leu His Trp Arg

405 410 415

Gln Val Leu Ser Gln Gln Ser Leu Tyr Leu His Arg Tyr Tyr Phe Glu

420 425 430

Val Glu Ile Phe Gly Ala Gly Thr Tyr Val Gly Leu Thr Cys Lys Gly

435 440 445

Ile Asp Arg Lys Gly Glu Glu Arg Asn Ser Cys Ile Ser Gly Asn Asn

450 455 460
Phe Ser Trp Ser Leu Gln Trp Asn Gly Lys Glu Phe Thr Ala Trp Tyr

465 470 475 480
Ser Asp Met Glu Thr Pro Leu Lys Ala Gly Pro Phe Arg Arg Leu Gly

485 490 495
Val Tyr Ile Asp Phe Pro Gly Gly Ile Leu Ser Phe Tyr Gly Val Glu

500 505 510
Tyr Asp Thr Met Thr Leu Val His Asn Phe Ala Cys Lys Phe Ser Glu

515 520 525
Pro Val Tyr Ala Ala Phe Trp Leu Ser Lys Lys Glu Ser Ala Ile Arg

530 535 540
Ile Val Asp Leu Gly Glu Glu Pro Glu Lys Pro Ala Pro Ser Leu Val

545 550 555 560
Val Thr Ala Pro

<210> 2

<211> 105

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 2

ggccauccug uuuuuuuuccc uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu 60

uuuuuuuccc uuuuuuuuuu cucuuuuuuu cccuuuuccuu cccuuu 105

<210> 3

<211> 107

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 3

acuguuccuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu 60

uuuuuuuccc cuuuuuuccc uucucacuu auucuacuu cuuuuuuu 107

<210> 4

<211> 105
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic RNA
 <400> 8
 ggccauccug uuuuuuuucc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu uuuccuuuu 60
 uuuuuuuuu cuuuuuuuu ccccccccc ccccccccc ccccc 105

<210> 9
 <211> 105
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic RNA
 <400> 9
 ggccauccug uuuuuuuucc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
 uuuccuuuuu uuuccuuuuu uuuccuuuuu ccccccccc ccccc 105

<210> 10
 <211> 62
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic RNA
 <400> 10
 ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccuu uuuuuuuuccu 60
 cu 62

<210> 11
 <211> 62
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic RNA
 <400> 11
 ccccccccc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccuu uuuuuuuuccu 60
 cu 62

<210> 12
 <211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 12

ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cccccccccc 60

cc 62

<210> 13

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 13

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uu 62

<210> 14

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 14

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uu 62

<210> 15

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 15

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

cu 62

<210> 16

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 16

uuuuuuuuug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccuu uuuuuuuuccu 60
cu 62

<210> 17

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 17

uuuuuuuuug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccuu uuuuuuuuccu 60
cu 62

<210> 18

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 18

gguuuuuccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccuuu uuuuuuuuuuu 60
uu 62

<210> 19

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 19

ggccaucug uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccuu uuuuuuuuccu 60
cu 62

<210> 20

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 20

ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

cu 62

<210> 21

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 21

ggccauccug uuuuuuuuuu cccuuuuuuu uuuccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

cu 62

<210> 22

<211> 62

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 22

ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuc cccuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

cu 62

<210> 23

<211> 105

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 23

ggccauccug uuuuuuuuucc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuucc uuuuuuuuuc cccuuuuuuu cccuuuuuuu cccuuuuuuu cccuuuuuuu 105

<210> 24

<211> 35

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 24	
ggccauucuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuu	35
<210> 25	
<211> 116	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
><223> Synthetic RNA	
<400> 25	
ggccauccc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60
uuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu ucucuucuu uuuuuuuuucc uuuuuu	116
<210> 26	
<211> 101	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 26	
ggccguuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60
uuuuuuuuu uuuuuuuuucc cuuuuuuuuu uuuuuuuuu u	101
<210> 27	
<211> 105	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 27	
ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60
uuuuuuuuu uuuuuuuuucc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu	105
<210> 28	
<211> 131	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 28	
ggccaucccc cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60

ggccauuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60
uuuuuuuuuu cccuuuuuuu cuuuuuu	87
<210> 33	
<211> 96	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 33	
agccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu uucuuuuccu	60
uccuucuuuu uuuccuuucu uuuuuccuuc uuuaau	96
<210> 34	
<211> 101	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 34	
ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuggu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60
uuuuuuuuucc uuuccuucuu uuuuuuuuuu ucccucuuua u	101
<210> 35	
<211> 87	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 35	
ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uccuucuuuu	60
uccuuuuuuu uuucuuuccu cuuuuau	87
<210> 36	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 36	

ggccaaccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	100
<210> 37	
<211> 109	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 37	
ggccaaccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	109
<210> 38	
<211> 34	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 38	
ggccaaccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuu	34
<210> 39	
<211> 74	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 39	
ggccaauuuu cccccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60
uuuuuuuuuu uuuu	74
<210> 40	
<211> 81	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 40	
ggccaauuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuucuuuuu uuuuuuuuu	60

uuuguuuuuu cuucuccuuu u	81
<210> 41	
<211> 107	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 41	
ggccaucccc cuuuuuuuuu uuuuuccgcu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuu	107
<210> 42	
<211> 109	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 42	
ggccaucccc cuuuuuuuuu uuuuuccgcu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuu	109
<210> 43	
<211> 35	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 43	
ggccauucuu uuuuuuuuuu uuuuucuuuu uuuuuuuuuu	35
<210> 44	
<211> 48	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 44	
ggccaucccc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccuu uuuuuuuu	48
<210> 45	
<211> 100	

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 45

ggccauccug uuuuuuuuccc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 100

<210> 46

<211> 112

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 46

ggccguccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 112

<210> 47

<211> 145

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 47

ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 120

ccuuuuuuu ccuuuuuuu uuuuuuuu 145

<210> 48

<211> 95

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 48

ggccauuccu guuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 95

<210> 49

<211> 72

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

 $\langle 400 \rangle$

49

ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuccu cuuuuuuuccu uuuuuuuccu 60

uccuucuuua au 72

<210> 50

<211> 87

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 50

ggccauuucc uguuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uccuucuuuu 60

uccuuuuuc uuucuuccuu cuuuauu 87

<210> 51

<211> 143

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 51

ggccauuuucc uguuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu

60

uuuCuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uCCuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuCuuuuCCu uCuuuuuuuCC 120

uuuuuuuuucc uuuccuuuuu aau 143

<210> 52

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 52

ggccauuucc uguuuuuuuuu uuuuuuucccu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu 60

uuuuuuucuuu ccuucuuuuu uuuccuuucu uuuccuuccu ucuuuuau 108

<210> 53

<211> 82

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 53

ggcauccugu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uu 82

<210> 54

<211> 130

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 54

acacuccauu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 120

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 130

<210> 55

<211> 129

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 55

guccuucugu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 120

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 129

<210> 56

<211> 57

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 56

ggguccuuu guuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 57

<210> 57

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 57

agccauuucc uguuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu cuuuuuuuuuu uuuuuuuccuu 60

uccuucuuuu uuuccuuucu uuuucccuuc uuuaau 96

<210> 58

<211> 115

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 58

ggccauuucc uguuuuuuuuuu uuuuuuuuguu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuccuuucc uuuuuuuuuuuu uuuuuuccuu uuuau

115

<210> 59

<211> 107

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 59

ggccauccug uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uucuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu cuuuuuuuuuuu 60

[illegible]

<210> 60

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 60

[illegible]

uuuucccuu uuuucuuuc uuuuuccuu uuuaau 96

<210> 61

 $\langle 211 \rangle$ 111

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 61

gcuaacuguu cccccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu cccuuuuuuu uccuuuuuca ucuuuuuuca cuuuuuuuuu u 111

<210> 62

<211> 107

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 62

gcuaacuguu cccccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu uucuuuuuuu auuuuuuuuu cuuuuuuu 107

<210> 63

<211> 92

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 63

gcuaacuguu cccccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uccuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu accuuuuuuu acuuuuuuuu cu 92

<210> 64

<211> 111

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 64

gcuaacaguu ucuuuuuuuu uuuuuuuuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuca ccuuuuuuuu cuuuuuuuuu u 111

<210> 65

<211> 77

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 65

gcuaauuucc uuauuguuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuucuuuc cauuuccuuc cuucuuacuu 60

сасиуиаси исиуиуи 77

<210> 66

<211> 124

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 66

gcuaacuguu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuccuuu ccuuucuuuc uuaccuuacu uuacauucuu 120

uucu 124

<210> 67

<211> 119

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 67

gcuaacuguu ccuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuu ccccccuccc cuuuucucac cuuuuuuuac uuuuuuuu 119

<210> 68

<211> 93

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 68

gcuaacuguu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuuu uuucuuuuucu 60

uuuuuuuuuu uuuuacucua cuuuacuuuu uuu 93

<210> 69

<211> 129

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 69

gcuaacuguu cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuccuucu uuuuuuuuac cuuauuuuucc 120

uuuuuuuuuu 129

<210> 70

<211> 86

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400>

> 70

gcuaacuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 86

<210> 71

<211> 133

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 71

gcuaacuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 120

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 133

<210> 72

<

211> 144

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 72

gcuaacuguc ccuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 120

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 144

<210> 73

<211> 119
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic RNA
 <400> 73
 gcuaacuguc cccccccuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cccuucuuu uccuucuuu cuuauuuuu uccuucuu 119

<210> 74
 <211> 88
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic RNA
 <400> 74
 gcuaacuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
 cuuucuuuuu uuuuuuuuuu uccuucuu 88

<210> 75
 <211> 101
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic RNA
 <400> 75
 gcuaacuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cccuucuuu cuuucuuuu u 101

<210> 76
 <211> 86
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic RNA
 <400> 76
 gcuaaguuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
 guuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuu 86

<210> 77
 <211> 105

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 77

ggccauccug uuuuuuuuccc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuccc uuuuuuuuuu cucuuuuuuu cccuuuucuuu cccuuu 105

<210> 78

<211> 79

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 78

ccauuuuuuu uuuuuuuuuu uuguuuuuuu uuuuuuuuuu uuucuuuccu ucuuuccuga 60

cuuuuuuuuu uccuucuuu 79

<210> 79

<211> 116

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 79

ccauuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuugu 60

uuguuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuccuucu uuccugacuu uuaauuuucc uucuuu 116

<210> 80

<211> 84

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 80

ggccauuuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuaccu uuuuuucuuu 60

uuuuuuuuuu cccuucuuuu uauu 84

<210> 81

<211> 74

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 81

ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu acccuuuuuu cucuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

ccuucuuuuu uaau 74

<210> 82

<211> 38

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 82

ggccauuuuc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu ucuuuuau 38

<210> 83

<211> 53

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 83

ggccauuuuc uuuuuuuuuu cucuuuuuuu uuuuuuuuuu uauuuuucuu aau 53

<210> 84

<211> 82

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 84

ggccauuuuc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuccuuuuuu uuuuuuccuc uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu auuuuucuuu au 82

<210> 85

<211> 82

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 85

ggccauuuuc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuccuuuuuu uuucucuuuu	60
uuuuuuuuuu auuuuucuuu au	82
<210> 86	
<211> 85	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 86	
ggccaucug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuucc	60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuu	85
<210> 87	
<211> 59	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 87	
gguccuaagu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu cuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuu	59
<210> 88	
<211> 62	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 88	
gguccuaagu uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuuuuuu uuuuuuuuu	60
uu	62
<210> 89	
<211> 74	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic RNA	
<400> 89	
gguccuaagu uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuuuuuu uuuuuuuuu	60
uuuuuuuuu cuuuu	74

<210> 90

<211> 95

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 90

ggccauuucu guuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuguuuuccuu 60

uuuuuuuccuu uucuuuuuuu uuucucccu uuaau 95

<210> 91

<211> 70

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic RNA

<400> 91

ggccauuucu guuuuuuuuu uuuuuuuuuc cuucuuuuuc cuuuuuuuu uuuuuuuuuc 60

uccuuuaau 70