



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2017-0141257  
(43) 공개일자 2017년12월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/113* (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/1131* (2013.01)  
*A61K 31/713* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7035149
- (22) 출원일자(국제) 2016년05월06일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년12월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2016/050340
- (87) 국제공개번호 WO 2016/176745  
국제공개일자 2016년11월10일
- (30) 우선권주장  
2015901617 2015년05월06일 오스트레일리아(AU)  
62/319,971 2016년04월08일 미국(US)

- (71) 출원인  
**베니텍 바이오파마 리미티드**  
호주 뉴 사우스 웨일즈 2060 노스 시드니 마운트 스트리트 99 스위트 1201
- (72) 발명자  
**마오 톤**  
미국 캘리포니아 밀브래  
**카오 시-쥬**  
미국 캘리포니아 94043 마운틴 뷰 애스터 코트 702  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
**리엔목특허법인**

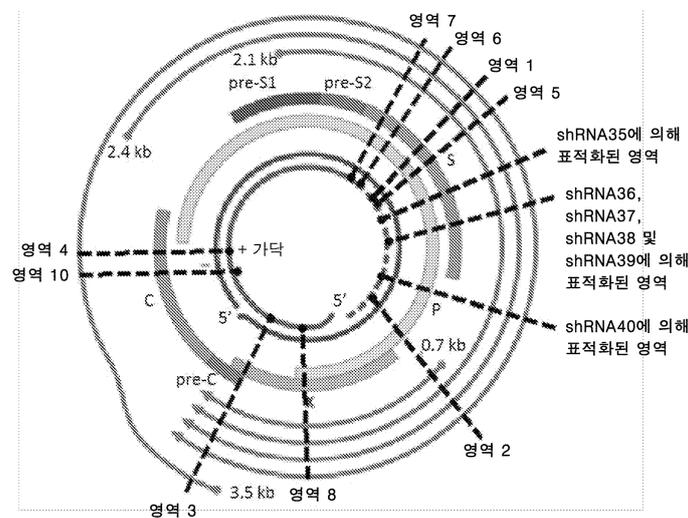
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **B형 간염 바이러스 (HBV) 감염의 치료를 위한 시약 및 이의 용도**

**(57) 요약**

본 개시내용은 B형 간염 바이러스 (HBV) 감염의 치료를 위한 RNA 간섭 (RNAi) 시약, 이를 포함하는 조성물, 및 HBV로 감염된 개체를 치료하기 위한 이의 용도에 관한 것이다.

**대표도 - 도1**



(52) CPC특허분류

*C12N 2310/14* (2013.01)

*C12N 2310/51* (2013.01)

*C12N 2310/531* (2013.01)

*C12N 2320/11* (2013.01)

(72) 발명자

**수히 데이비드**

미국 캘리포니아 94583 샌 라몬 허스트 코트 32

**그레이엄 마이클**

미국 캘리포니아 94403 샌 마테오 파크 플레이스

1125 아파트먼트 217

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA로서, 상기 효과기 서열은 B형 간염 바이러스 (HBV) 게놈의 영역에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고, 상기 영역은 서열번호:1-10 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는, RNA.

**청구항 2**

제1항에 있어서, RNA는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 RNA:

- 서열번호:11에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:12에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:13에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:14에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:15에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:16에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:17에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:18에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:19에 제시된 효과기 서열 및 하기에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:20;
- 서열번호:21에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:22에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:23에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:24에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:25에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:26에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:27에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:28에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:29에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:30에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:31에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:32에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:33에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:34에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:35에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:36에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:37에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:38에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:39에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:40에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:41에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:42에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:43에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:44에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:45에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:46에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:47에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:48에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:49에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:50에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA; 및
- 서열번호:51에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:52에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 RNA는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)인, RNA.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 효과기 서열 및 효과기 보체 서열 사이에 위치한 루프 서열을 포함하는, RNA.

**청구항 5**

제3항 또는 제4항에 있어서, shRNA는 서열번호:65-98 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 RNA.

**청구항 6**

하기를 포함하는 복수의 RNA:

(a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 RNA; 및

(b) 하기로부터 선택되는 적어도 하나의 RNA:

(i) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 RNA; 또는

(ii) 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA로서, 상기 효과기 서열은 서열번호:54, 56, 58, 60, 62 및 64 중 어느 하나에 제시된 RNA 서열에 실질적으로 상보적이고,

여기서 (a)에서의 RNA 및 (b)에서의 RNA는 상이한 효과기 서열을 포함하는 복수의 RNA.

**청구항 7**

제6항에 있어서, (b)(ii)에서의 RNA는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 복수의 RNA:

서열번호:53에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:54에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;

서열번호:55에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:56에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;

서열번호:57에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:58에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;

서열번호:59에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:60에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;

서열번호:61에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:62에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA; 및

서열번호:63에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:64에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA.

**청구항 8**

제6항 또는 제7항에 있어서, 복수의 RNA는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)인 복수의 RNA.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 효과기 서열 및 효과기 보체 서열 사이에 위치한 루프 서열을 포함하는 복수의 RNA.

**청구항 10**

제8항 또는 제9항에 있어서,

(a) 적어도 하나의 RNA는 제5항에 따른 shRNA이고;

(b) 적어도 하나의 RNA는 하기로부터 선택되며:

(i) 제5항에 따른 shRNA; 또는

(ii) 서열번호:99-104 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 shRNA, 및

여기서 (a)에서의 shRNA 및 (b)에서의 shRNA는 상이한, 복수의 RNA.

**청구항 11**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 RNA를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 12**

하기를 포함하는 복수의 핵산:

(a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 RNA를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 제1 핵산; 및

(b) 하기로부터 선택되는 RNA를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 제2 핵산:

- (i) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 RNA; 또는
- (ii) 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA로서, 상기 효과기 서열은 서열번호:54, 56, 58, 60, 62 및 64 중 어느 하나에 제시된 RNA 서열에 실질적으로 상보적이고, 상기 제1 및 제2 핵산에 의해 코딩된 RNA는 상이한 효과기 서열을 포함하는 복수의 핵산.

**청구항 13**

제12항에 있어서, (b)(ii)에서의 RNA는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 복수의 핵산:

- 서열번호:53에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:54에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:55에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:56에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:57에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:58에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:59에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:60에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- 서열번호:61에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:62에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA; 및
- 서열번호:63에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:64에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA.

**청구항 14**

제12항 또는 제13항에 있어서, 각각의 핵산에 의해 코딩된 RNA는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)인 복수의 핵산.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 각각의 핵산에 의해 코딩된 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열 사이에 위치한 루프 서열을 포함하는 복수의 핵산.

**청구항 16**

제14항 또는 제15항에 있어서,

- (a) 제1 핵산은 제5항에 따른 shRNA를 코딩하는 DNA 서열을 포함하고;
- (b) 제2 핵산은 하기로부터 선택되는 shRNA를 코딩하는 DNA 서열을 포함하며:
  - (i) 제5항에 따른 shRNA; 또는
  - (ii) 서열번호:99-104 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 shRNA, 및
 상기 제1 및 제2 핵산에 의해 코딩된 shRNA는 상이한, 복수의 핵산.

**청구항 17**

제11항에 따른 핵산을 포함하는 DNA-지향 RNA 간섭 (ddRNAi) 작제물.

**청구항 18**

복수의 DNA-지향 RNA 간섭 (ddRNAi) 작제물로서,

- (a) 적어도 하나의 ddRNAi 작제물은 제12항(a)에 정의된 바와 같은 복수의 핵산 중 제1 핵산을 포함하고;
- (b) 적어도 하나의 ddRNAi 작제물은 제12항(b)에 정의된 바와 같은 복수의 핵산 중 제2 핵산을 포함하는 복수의 DNA-지향 RNA 간섭 (ddRNAi) 작제물.

**청구항 19**

적어도 2개의 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 코딩하는 DNA-지향 RNA 간섭 (ddRNAi) 작제물로서, ddRNAi 작제물은 하기를 포함하는 ddRNAi 작제물:

- (a) 제1 shRNA를 코딩하는 제11항에 따른 핵산; 및
- (b) 제2 shRNA를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 핵산으로서, 상기 제2 shRNA는 적어도 17개 뉴클레오타이드 길

이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 상기 효과기 서열은 B형 간염 바이러스의 게놈에 의해 코딩된 RNA 전사체의 영역에 실질적으로 상보적이며;

상기 제1 및 제2 shRNA는 상이한 ddRNAi 작제물.

**청구항 20**

제19항에 있어서, ddRNAi 작제물은 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 복수의 핵산을 포함하는, ddRNAi 작제물.

**청구항 21**

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 ddRNAi 작제물은 제3 shRNA를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 핵산을 포함하고, 상기 제3 shRNA는 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하며, 상기 효과기 서열은 B형 간염 바이러스의 게놈에 의해 코딩된 RNA 전사체의 영역에 실질적으로 상보적이고,

상기 제3 shRNA는 제1 및 제2 shRNA와 상이한 ddRNAi 작제물.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 제3 shRNA를 코딩하는 핵산은 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 복수의 핵산 내의 핵산 중 어느 하나로부터 선택되는 핵산인 ddRNAi 작제물.

**청구항 23**

제19항에 있어서, 상기 ddRNAi 작제물은 하기를 포함하고:

- (a) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 핵산;
  - (b) 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 복수의 핵산 내의 핵산 중 어느 하나로부터 선택되는 핵산; 및
  - (c) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 핵산,
- 여기서 각각의 shRNA는 서로 상이한 ddRNAi 작제물.

**청구항 24**

제19항에 있어서, 상기 ddRNAi 작제물은 5'에서 3' 방향으로 하기를 포함하는 ddRNAi 작제물:

- (a) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제1 핵산;
- (b) 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제2 핵산; 및
- (c) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제3 핵산.

**청구항 25**

제19항에 있어서, 상기 ddRNAi 작제물은 5'에서 3' 방향으로 하기를 포함하는 ddRNAi 작제물:

- (a) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제1 핵산;
- (b) 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제2 핵산; 및
- (c) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제3 핵산.

**청구항 26**

제17항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, shRNA를 코딩하는 각 핵산의 업스트림에 RNA pol III 프로모터를 포함하는, ddRNAi 작제물.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 또는 각각의 RNA pol III 프로모터는 U6 및 H1 프로모터로부터 선택되는, ddRNAi 작제물.

**청구항 28**

제17항 내지 제27항 중 어느 한 항의 ddRNAi 작제물을 포함하는 발현 벡터.

**청구항 29**

복수의 발현 벡터로서:

- (a) 적어도 하나의 발현 벡터는 제18항(a)에 정의된 바와 같은 ddRNAi 작제물을 포함하고; 및
- (b) 적어도 하나의 발현 벡터는 제18항(b)에 정의된 바와 같은 ddRNAi 작제물을 포함하는 복수의 발현 벡터.

**청구항 30**

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 또는 각각의 발현 벡터는 플라스미드 또는 미니서클인 발현 벡터 또는 복수의 발현 벡터.

**청구항 31**

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 또는 각각의 발현 벡터는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이러스 벡터인 발현 벡터 또는 복수의 발현 벡터: 아데노 관련 바이러스 (AAV) 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 (AdV) 벡터 및 렌티바이러스 (LV) 벡터.

**청구항 32**

제28항 또는 제30항 또는 제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 또는 각각의 발현 벡터는 양이온성 DNA 결합 중합체와 복합체화되는 발현 벡터 또는 복수의 발현 벡터.

**청구항 33**

제11항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 DNA 지향 RNA 간섭 (ddRNAi) 작제물 또는 제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터를 포함하는 조성물.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물.

**청구항 35**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 RNA 또는 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 복수의 RNA 또는 제11항에 따른 핵산 또는 제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 복수의 핵산 또는 제18항 또는 제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 ddRNAi 작제물 또는 제19항에 따른 복수의 ddRNAi 작제물 또는 제28항 또는 제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는 제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 복수의 발현 벡터 또는 제33항 또는 제34항에 따른 조성물의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 B형 간염 바이러스 (HBV) 감염을 치료하는 방법.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 대상은 급성 HBV 감염을 겪고 있는 방법.

**청구항 37**

제35항에 있어서, 대상은 만성 HBV 감염을 겪고 있는 방법.

**청구항 38**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 RNA 또는 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 복수의 RNA 또는 제11항에 따른 핵산 또는 제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 복수의 핵산 또는 제18항 또는 제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 ddRNAi 작제물 또는 제19항에 따른 복수의 ddRNAi 작제물 또는 제28항 또는 제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는 제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 복수의 발현 벡터 또는 제33항 또는 제34항에 따른 조성물의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 B

형 간염 바이러스(HBV) 부하를 감소시키는 방법.

**청구항 39**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 RNA 또는 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 복수의 RNA 또는 제11항에 따른 핵산 또는 제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 복수의 핵산 또는 제18항 또는 제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 ddRNAi 작제물 또는 제19항에 따른 복수의 ddRNAi 작제물 또는 제28항 또는 제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는 제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 복수의 발현 벡터 또는 제33항 또는 제34항에 따른 조성물의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 겪고 있는 대상에서 B형 간염 바이러스 (HBV) 감염과 관련된 증상의 중증도를 감소시키는 방법.

**청구항 40**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 RNA 또는 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 복수의 RNA 또는 제11항에 따른 핵산 또는 제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 복수의 핵산 또는 제18항 또는 제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 ddRNAi 작제물 또는 제19항에 따른 복수의 ddRNAi 작제물 또는 제28항 또는 제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는 제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 복수의 발현 벡터 또는 제33항 또는 제34항에 따른 조성물의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 이로 감염된 대상에서 B형 간염 바이러스 (HBV)의 감염력을 감소시키는 방법.

**청구항 41**

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 하나 이상의HBV 유전자의 발현을 억제하는 것을 포함하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원 데이터**

[0002] 본원은 하기로부터 우선권을 주장하며: 호주 가출원 제2015901617호 (2015년 5월 6일 출원됨) 및 미국 가출원 제62/319,971호 (2016년 4월 8일 출원됨), 그 전체 내용은 그 전체가 참고로 본원에 포함되어 있다.

[0003] **기술 분야**

[0004] 본 개시내용은 B형 간염 바이러스 (HBV) 감염의 치료를 위한 RNA 간섭 (RNAi) 시약, 이를 포함하는 조성물, 및 HBV로 감염된 개체를 치료하기 위한 이의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] HBV는 심각하고 흔한 감염성 간 질환으로서, 전 세계적으로 수백만 명의 사람들에게 영향을 미친다. HBV는 헤파드나비리데 (Hepadnaviridae)에 속하는 간친화성 (hepatotropic) DNA 바이러스이다. 상기 바이러스 게놈의 전체 길이는 약 3.2kb이며, 표면 항원 ("S 유전자"), 코어 항원 ("C 유전자"), DNA 중합효소 ("P 유전자") 및 "X 유전자"로 불리는 결정되지 않은 기능의 유전자를 포함하는 4개의 열린 해독틀 (ORF)을 갖는다. 전 세계적으로 20억명이 넘는 사람들이 인생의 어느 순간에 HBV로 감염되었고, 이들 중 약 3억 5천-4억 명은 만성적으로 감염된 상태로 있고 바이러스의 보균자이다. HBV 감염은 급성 및 만성 B형 간염을 유발할 수 있고, 결국 만성 간 부전, 간경변, 및 간 세포암의 발병을 야기할 수 있다. 또한, HBV 보균자는 수년 동안 상기 질환을 전염시킬 수 있다. 만성 HBV 감염을 갖는 사람 즉, 보균자는 비보균자보다 간 세포암의 발생 위험성이 적어도 12배 더 높고, HBV는 세계 주요 간암의 60-80%를 유발한다. 결과적으로, HBV는 공지된 인간 발암물질로서 담배에 이어 두 번째로 높다.

[0006] HBV 백신이 이용가능하지만, 인구 내의 HBV 감염률은 여전히 높다. 또한, 만성 HBV 감염에 대한 현재의 요법은 대다수의 만성 감염 환자에서 바이러스 유전자 발현 및 복제에 대해 제한된 억제 효과만을 갖는다. 만성 HBV 감염에 대한 기존 요법의 또 다른 한계는 약물에 대한 바이러스 내성의 발달이다.

[0007] 이런 이유로, HBV 감염을 치료하는 새로운 치료제가 필요하다.

[0008] **요약**

[0009] 본 개시내용은 HBV 감염의 치료 및/또는 예방을 위한 기존의 백신 및 치료제가 *예컨대*, 요법에 대한 바이러스 내성의 발달 및/또는 HBV의 유전형 사이에 요법에 대한 반응에서의 변화로 인해, 장기 치료가 필요한 경우, 이들의 효능이 제한된다는 인식에 일부 기초한다. 본 개시내용은 HBV 게놈에 의해 생산된 RNA 전사체의 하나 이상의 보존 영역 즉, HBV의 복수의 상이한 유전형 중 보존 영역을 표적화하는 RNAi 시약을 제공한다. 본 발명자들은 이들 RNAi 시약이 하기 유전자의 발현을 억제하는 효과적이라는 것을 보여주었다: HBV 유전자 *예컨대*, HBV로 감염된 세포에서 HBV pol 유전자. 예를 들어, 본 개시내용의 예시적인 RNAi 시약은 활성 HBV를 갖는 HepG2.2.15 세포에서 HBV 유전자 전사체의 발현을 억제하거나 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, 본 개시내용의 예시적인 RNAi 시약은 HBV 유전자 전사체의 발현을 억제하거나 감소시키고, 세포내 및 세포외 HBV DNA를 감소시키며, HBV가 접종된 인간 간세포 및 HBV로 감염된 PXB 키메라 마우스에서 HBV 공유결합 폐환형 DNA (cccDNA)를 감소시키는 것으로 나타났다. 본 발명자들에 의한 이러한 발견은 HBV에 의해 발현된 핵산 및/또는 단백질의 발현을 억제하거나 감소시키는 새로운 화합물 및 *예컨대*, 대상에서 HBV 감염을 치료하기 위한 이러한 화합물의 용도를 제공한다.

[0010] 따라서, 본 개시내용은 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA를 제공하며, 상기 효과기 서열은 HBV 게놈의 영역에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고, 상기 영역은 서열번호:1-10 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함한다. 예를 들어, 효과기 서열은 30개 미만의 뉴클레오타이드 길이일 것이다. 예를 들어, 적합한 효과기 서열은 17-29개 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다.

[0011] 효과기 서열은, 상기 효과기 서열이 실질적으로 상보적인 서열번호:1-10 중 어느 하나에 제시된 서열에 대해 4개의 염기쌍 미스매치를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 효과기 서열은, 상기 효과기 서열이 실질적으로 상보적인 서열번호:1-10 중 어느 하나에 제시된 서열에 대해 3개의 염기쌍 미스매치를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 효과기 서열은, 상기 효과기 서열이 실질적으로 상보적인 서열번호:1-10 중 어느 하나에 제시된 서열에 대해 2개의 염기쌍 미스매치를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 효과기 서열은, 상기 효과기 서열이 실질적으로 상보적인 서열번호:1-10 중 어느 하나에 제시된 서열에 대해 1개의 염기쌍 미스매치를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 효과기 서열은 서열번호:1-10 중 어느 하나에 제시된 서열 내의 동등한 길이의 영역에 100% 상보적이다.

[0012] 일 예에서, RNA는 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0013] 하기를 포함하는 RNA: (i) 효과기 서열이 서열번호:12에 제시된 서열과 이합체를 형성할 수 있는 한, 선택적으로 1, 2, 3 또는 4개의 염기 미스매치를 제외하고, 서열번호:12에 제시된 서열에 상보적인 효과기 서열; 및 (ii) 효과기 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 효과기 보체 서열;

[0014] 하기를 포함하는 RNA: (i) 효과기 서열이 서열번호:14에 제시된 서열과 이합체를 형성할 수 있는 한, 선택적으로 1, 2, 3 또는 4개의 염기 미스매치를 제외하고, 서열번호:14에 제시된 서열에 상보적인 효과기 서열; 및 (ii) 효과기 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 효과기 보체 서열;

[0015] 하기를 포함하는 RNA: (i) 효과기 서열이 서열번호:16에 제시된 서열과 이합체를 형성할 수 있는 한, 선택적으로 1, 2, 3 또는 4개의 염기 미스매치를 제외하고, 서열번호:16에 제시된 서열에 상보적인 효과기 서열; 및 (ii) 효과기 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 효과기 보체 서열;

[0016] 하기를 포함하는 RNA: (i) 효과기 서열이 서열번호:18에 제시된 서열과 이합체를 형성할 수 있는 한, 선택적으로 1, 2, 3 또는 4개의 염기 미스매치를 제외하고, 서열번호:18에 제시된 서열에 상보적인 효과기 서열; 및 (ii) 효과기 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 효과기 보체 서열;

[0017] 하기를 포함하는 RNA: (i) 효과기 서열이 서열번호:20에 제시된 서열과 이합체를 형성할 수 있는 한, 선택적으로 1, 2, 3 또는 4개의 염기 미스매치를 제외하고, 서열번호:20에 제시된 서열에 상보적인 효과기 서열; 및 (ii) 효과기 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 효과기 보체 서열;

[0018] 하기를 포함하는 RNA: (i) 효과기 서열이 서열번호:22에 제시된 서열과 이합체를 형성할 수 있는 한, 선택적으로 1, 2, 3 또는 4개의 염기 미스매치를 제외하고, 서열번호:22에 제시된 서열에 상보적인 효과기 서열; 및 (ii) 효과기 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 효과기 보체 서열;

[0019] 하기를 포함하는 RNA: (i) 효과기 서열이 서열번호:24에 제시된 서열과 이합체를 형성할 수 있는 한, 선택적으로





할 수 있는 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA.

- [0056] 예를 들어, 본 개시내용의 RNA의 효과기 보체 서열은 동족 효과기 및 효과기 보체 서열이 이합체를 형성할 수 있는 한, 상응하는 효과기 서열에 대해 1, 2, 3 또는 4개의 미스매치를 포함할 수 있다.
- [0057] 또 다른 예에서, RNA는 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:
- [0058] 서열번호:11에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:12에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0059] 서열번호:13에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:14에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0060] 서열번호:15에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:16에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0061] 서열번호:17에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:18에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0062] 서열번호:19에 제시된 효과기 서열 및 하기에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:20;
- [0063] 서열번호:21에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:22에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0064] 서열번호:23에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:24에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0065] 서열번호:25에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:26에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0066] 서열번호:27에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:28에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0067] 서열번호:29에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:30에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0068] 서열번호:31에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:32에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0069] 서열번호:33에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:34에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0070] 서열번호:35에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:36에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0071] 서열번호:37에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:38에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0072] 서열번호:39에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:40에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0073] 서열번호:41에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:42에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0074] 서열번호:43에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:44에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0075] 서열번호:45에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:46에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0076] 서열번호:47에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:48에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0077] 서열번호:49에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:50에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA; 및
- [0078] 서열번호:51에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:52에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA.
- [0079] 일 예에서, RNA는 RNAi 시약이다.
- [0080] 본 개시내용의 RNA는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)의 형태로 제공될 수 있다. shRNA로서 제공되는 경우, 본 개시내용의 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열 사이에 위치한 루프 서열을 포함할 수 있다. 적합한 루프 서열은 본 기술분야에서 공지된 것으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용에 따른 shRNA는 서열번호:65-98 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함할 수 있다.
- [0081] 대안적으로, 본 개시내용의 RNA는 짧은 간섭 RNA (siRNA) 이합체 또는 이중 가닥의 RNA (dsRNA)의 형태로 제공될 수 있다.
- [0082] 본 개시내용에 따른 RNA는 HBV를 치료하기 위한 다른 치료제와 함께 조합되거나 사용될 수 있음이 본 기술분야의 숙련가에 의해 이해될 것이다. 따라서, 본 개시내용은 HBV를 치료하기 위한 하나 이상의 다른 제제와 조합된 본원에 기재된 RNA를 제공한다. 일 예에서, 하기를 포함하는 복수의 RNA가 제공된다:
- [0083] (a) 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 RNA; 및
- [0084] (b) 하기로부터 선택되는 적어도 하나의 RNA;
- [0085] (i) 본원에 기재된 RNA에 따른 RNA; 또는

- [0086] (ii) 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA로서, 상기 효과기 서열은 서열번호:54, 56, 58, 60, 62 및 64 중 어느 하나에 제시된 RNA 서열에 실질적으로 상보적이고;
- [0087] 여기서 (a)에서의 RNA 및 (b)에서의 RNA는 상이한 효과기 서열을 포함하는 복수의 RNA.
- [0088] 일 예에서, 본 개시내용의 복수의 RNA는 하기를 포함한다:
- [0089] (a) 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 RNA:
- [0090] 서열번호:11에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:12에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0091] 서열번호:13에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:14에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0092] 서열번호:15에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:16에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0093] 서열번호:17에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:18에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0094] 서열번호:19에 제시된 효과기 서열 및 하기에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:20;
- [0095] 서열번호:21에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:22에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0096] 서열번호:23에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:24에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0097] 서열번호:25에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:26에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0098] 서열번호:27에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:28에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0099] 서열번호:29에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:30에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0100] 서열번호:31에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:32에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0101] 서열번호:33에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:34에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0102] 서열번호:35에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:36에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0103] 서열번호:37에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:38에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0104] 서열번호:39에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:40에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0105] 서열번호:41에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:42에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0106] 서열번호:43에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:44에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0107] 서열번호:45에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:46에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0108] 서열번호:47에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:48에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0109] 서열번호:49에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:50에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA; 및
- [0110] 서열번호:51에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:52에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA; 및
- [0111] (b) 하기로부터 선택되는 적어도 하나의 RNA:
- [0112] (i) (a)에 기재된 군으로부터 선택되는 RNA; 또는
- [0113] (ii) 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA로서, 상기 효과기 서열은 서열번호:54, 56, 58, 60, 62 및 64 중 어느 하나에 제시된 RNA 서열에 실질적으로 상보적이고;
- [0114] 여기서 (a)에서의 RNA 및 (b)에서의 RNA는 상이한 효과기 서열을 포함하는 복수의 RNA.
- [0115] 예를 들어, 서열번호:54, 56, 58, 60, 62 및 64 중 어느 하나에 제시된 RNA 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열은 30 미만의 뉴클레오타이드 길이일 것이다. 예를 들어, 적합한 효과기 서열은 17-29개 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다.
- [0116] 본 개시내용에 따른 복수의 RNA는 최대 10개의 RNA, 예컨대 2개의 RNA 또는 3개의 RNA 또는 4개의 RNA 또는 5개의 RNA 또는 6개의 RNA 또는 7개의 RNA 또는 8개의 RNA 또는 9개의 RNA 또는 10개의 RNA를 포함할 수 있다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 RNA 중 2개를 포함한다. 또 다른 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 RNA 중 3개를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 RNA 중 4개를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는

본원에 기재된 RNA 중 5개를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 RNA 중 6개를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 RNA 중 7개를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 RNA 중 8개를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 RNA 중 9개를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 RNA 중 10개를 포함한다.

- [0117] 일 예에서, 본원에 기재된 복수의 RNA는 단일 조성물로 제공된다.
- [0118] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 복수의 RNA는 다수의 조성물로서 제공된다. 예를 들어, 복수 중 각각의 RNA는 별개로 제공될 수 있다. 대안적으로, 복수 중 적어도 하나의 RNA는 별개로 제공될 수 있고 복수 중 2개 이상은 조성물에 함께 제공될 수 있다.
- [0119] 본원에 기재된 바와 같이, 서열번호:54, 56, 58, 60, 62 및 64 중 어느 하나에 제시된 RNA 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하는 RNA는 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:
- [0120] 서열번호:53에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:54에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0121] 서열번호:55에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:56에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0122] 서열번호:57에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:58에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0123] 서열번호:59에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:60에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0124] 서열번호:61에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:62에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA; 및
- [0125] 서열번호:63에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:64에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA.
- [0126] 본원에 기재된 복수의 RNA에서 적어도 하나 또는 각각의 RNA는 shRNA의 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용은 복수의 shRNA를 제공할 수 있다. 따라서, 복수의 RNA에서 하나 이상의 RNA는 상응하는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열 사이에 위치한 루프 서열을 포함할 수 있다. 적합한 루프 서열은 본 기술분야에서 공지된 것으로부터 선택될 수 있다. 대안적으로, 적합한 스템 루프가 새롭게 개발될 수 있다.
- [0127] 일 예에서, 본 개시내용에 따른 복수의 RNA는 하기를 포함할 수 있다:
- [0128] (a) 서열번호:65-98 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 shRNA인 적어도 하나의 RNA; 및
- [0129] (b) 하기로부터 선택되는 적어도 하나의 RNA:
- [0130] (i) 서열번호:65-98 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 shRNA인 RNA; 또는
- [0131] (ii) 서열번호:99-104 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 shRNA; 및
- [0132] 여기서 (a)에서의 shRNA 및 (b)에서의 shRNA는 상이한 복수의 RNA.
- [0133] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 일 예에서, 핵산은 DNA 서열을 포함한다. 일 예에서, 핵산은 DNA이다.
- [0134] 본 개시내용은 또한 하기를 포함하는 복수의 핵산을 제공한다:
- [0135] (a) 본원에 기재된 바와 같은 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 제1 핵산; 및
- [0136] (b) 하기로부터 선택되는 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 제2 핵산:
- [0137] (i) 본원에 기재된 바와 같은 RNA; 또는
- [0138] (ii) 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA로서, 상기 효과기 서열은 서열번호:54, 56, 58, 60, 62 및 64 중 어느 하나에 제시된 RNA 서열에 실질적으로 상보적이고; 및
- [0139] 상기 제1 및 제2 핵산에 의해 코딩된 RNA는 상이한 효과기 서열을 포함하는 복수의 핵산. 예를 들어, 제2 핵산에 의해 코딩된 RNA는 30개 미만의 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열을 포함한다. 예를 들어, 적합한 효과기 서열은 17-29개 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다.
- [0140] 일 예에서, 제1 및 제2 핵산은 동일한 폴리뉴클레오타이드의 별개의 부분을 형성한다 (즉, 일련의 공유 결합된 뉴클레오타이드 잔기). 또 다른 예에서, 제1 및 제2 핵산은 상이한 폴리뉴클레오타이드의 부분을 형성한다.
- [0141] 본원에 기재된 바와 같이, 서열번호:54, 56, 58, 60, 62 및 64 중 어느 하나에 제시된 RNA 서열에 실질적으로

상보적인 효과기 서열을 포함하는 RNA는 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

- [0142] 서열번호:53에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:54에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0143] 서열번호:55에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:56에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0144] 서열번호:57에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:58에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0145] 서열번호:59에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:60에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA;
- [0146] 서열번호:61에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:62에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA; 및
- [0147] 서열번호:63에 제시된 효과기 서열 및 서열번호:64에 제시된 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA.
- [0148] 일 예에서, 핵산 중 하나 이상은 shRNA를 코딩한다. 예를 들어, 각각의 핵산은 shRNA를 코딩한다. 일 예에서, 상기 또는 각각의 핵산은 또한 효과기 서열 및 효과기 보체 서열 사이에 위치한 루프 서열을 코딩한다. 적합한 루프 서열은 숙련자에게 명백할 것이고/것이거나 본원에 기재될 것이다.
- [0149] 일 예에서, 복수의 핵산은 하기를 포함한다:
- [0150] (a) 서열번호:65-98 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 제1 핵산; 및
- [0151] (b) 하기로부터 선택되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 제2 핵산:
- [0152] (i) 서열번호:65-98 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 shRNA; 또는
- [0153] (ii) 서열번호:99-104 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 shRNA; 및
- [0154] 상기 제1 및 제2 핵산에 의해 코딩된 shRNA는 상이한 복수의 핵산.
- [0155] 본 개시내용에 따른 상기 또는 각각의 핵산은 하나 이상의 전사 종결자 서열을 포함하거나, 또는 이와 작동가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 상기 또는 각각의 핵산은 RNA를 코딩하는 서열의 3' 말단에 전사 종결자 서열을 포함할 수 있다. 이러한 서열은 본 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있을 것이나, 'TTTTT' 또는 'TTTTTT' 를 포함할 수 있다.
- [0156] 대안적으로, 또는 부가적으로, 본 개시내용에 따른 상기 또는 각각의 핵산은 하나 이상의 전사 개시자 서열을 포함하거나, 하나 이상의 전사 개시자 서열과 작동가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 상기 또는 각각의 핵산은 RNA를 코딩하는 서열의 5' 말단에 전사 개시자 서열을 포함할 수 있다. 이러한 서열은 본 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있을 것이나, 'G' 를 포함할 수 있다.
- [0157] 대안적으로, 또는 부가적으로, 본 개시내용에 따른 상기 또는 각각의 핵산은 예컨대, 클로닝 또는 발현 벡터 내로 핵산(들)의 클로닝을 용이하게 하기 위해 하나 이상의 제한 부위를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 핵산은 본 개시내용의 RNA를 코딩하는 서열의 업스트림 및/또는 다운스트림에 제한 부위를 포함할 수 있다. 적합한 제한 효소 인식 서열은 본 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있을 것이다. 그러나, 일 예에서, 본 개시내용의 핵산(들)은 5' 말단에, 즉, RNA를 코딩하는 서열의 업스트림에, BamH1 제한 부위 (GGATCC), 및 3' 말단에, 즉, RNA를 코딩하는 서열의 다운스트림에, EcoR1 제한 부위 (GAATTC)를 포함할 수 있다.
- [0158] 본 개시내용에 따른 핵산은 또한 상기 핵산에 의해 코딩되는 본 개시내용의 하나 이상의 RNA를 발현할 수 있는 DNA-지향 RNA 간섭 (ddRNAi) 작제물의 형태로 제공될 수 있거나, 또는 상기 작제물 내에 포함될 수 있다. 이와 관련하여, 본 개시내용의 핵산을 포함하는 하나 이상의 ddRNAi 작제물이 또한 제공된다.
- [0159] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 shRNA를 각각 코딩하는 복수의 ddRNAi 작제물이 제공되며, 여기서:
- [0160] (a) 복수의 ddRNAi 작제물 중 적어도 하나는 본원에 기재된 바와 같은 복수의 핵산 중 제1 핵산을 포함하고;
- [0161] (b) 복수의 ddRNAi 작제물 중 적어도 하나는 본원에 기재된 바와 같은 복수의 핵산 중 제2 핵산을 포함하며;
- [0162] 상기 제1 및 제2 핵산은 서로 상이하다.
- [0163] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 적어도 2개의 shRNA를 코딩하고, 여기서 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:
- [0164] (a) 서열번호:65-98 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 제1 shRNA를 코딩하는 핵산; 및
- [0165] (b) 제2 shRNA를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 핵산으로서, 상기 제2 shRNA는 적어도 17개 뉴클레오타이드 길

이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 상기 효과기 서열은 B형 간염 바이러스의 게놈에 의해 코딩된 RNA 전사체의 영역에 실질적으로 상보적이며;

- [0166] 상기 제1 및 제2 shRNA는 상이한 ddRNAi 작제물.
- [0167] 예를 들어, 제2 shRNA는 30개 미만의 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열을 포함한다. 예를 들어, 적합한 효과기 서열은 17-29개 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다.
- [0168] 일 예에서, 적어도 2개의 shRNA를 코딩하는 ddRNAi 작제물은 본원에 기재된 복수의 핵산을 포함한다.
- [0169] 또 다른 예에서, 적어도 2개의 shRNA를 코딩하는 ddRNAi 작제물은 제3 shRNA를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 핵산을 포함하고, 상기 제3 shRNA는 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하며, 상기 효과기 서열은 B형 간염 바이러스의 게놈에 의해 코딩된 RNA 전사체의 영역에 실질적으로 상보적이고,
- [0170] 상기 제3 shRNA는 제1 및 제2 shRNA와 상이한 ddRNAi 작제물.
- [0171] 예를 들어, 제3 shRNA는 30개 미만의 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열을 포함한다. 예를 들어, 적합한 효과기 서열은 17-29개 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다.
- [0172] 본 개시내용의 예시적인 형태에서, 제3 shRNA를 코딩하는 핵산은 본원에 기재된 복수의 핵산 내의 핵산 중 어느 하나로부터 선택되는 핵산이다.
- [0173] 본 개시내용의 ddRNAi 작제물의 일 예는 하기를 포함한다:
- [0174] (a) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 핵산:
- [0175] (b) 본원에 기재된 복수의 핵산 내의 핵산 중 어느 하나로부터 선택되는 핵산; 및
- [0176] (c) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 핵산;
- [0177] 여기서 (b)에서의 핵산은 (a) 및 (c)에서의 핵산에 의해 코딩되는 shRNA와 상이한 shRNA를 코딩한다.
- [0178] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:
- [0179] (a) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제1 핵산:
- [0180] (b) 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제2 핵산; 및
- [0181] (c) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제3 핵산.
- [0182] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:
- [0183] (a) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제1 핵산:
- [0184] (b) 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제2 핵산; 및
- [0185] (c) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제3 핵산.
- [0186] 본 개시내용의 예시적인 ddRNAi 작제물은 5' 에서 3' 방향으로 하기를 포함한다:
- [0187] (a) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제1 핵산:
- [0188] (b) 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제2 핵산; 및
- [0189] (c) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제3 핵산.
- [0190] 본 개시내용의 추가의 예시적인 ddRNAi 작제물은 5' 에서 3' 방향으로 하기를 포함한다:
- [0191] (a) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제1 핵산:
- [0192] (b) 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제2 핵산; 및
- [0193] (c) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제3 핵산.
- [0194] 일 예에서, 본원에 기재된 바와 같은 ddRNAi 작제물은 본 개시내용의 shRNA를 코딩하는 상기 또는 각각의 핵산에 작동가능하게 연결된 단일 프로모터를 포함한다.

- [0195] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 shRNA를 코딩하는 각각의 핵산은 별개의 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터(들)는 shRNA(들)을 코딩하는 각각의 핵산(들)의 업스트림에 위치한다. 다수의 프로모터를 포함하는 ddRNAi 작제물에서, 프로모터는 동일하거나 상이할 수 있다. 예시적인 프로모터는 RNA pol III 프로모터, 예를 들어, U6 및 H1 프로모터이다.
- [0196] 별개의 프로모터에 각각 연결된 3개의 shRNA를 코딩하는 핵산을 포함하는 ddRNAi 작제물의 일 예에서, 상기 핵산 중 2개에 연결된 프로모터는 동일하고, 제3 핵산에 연결된 프로모터는 상이하다. 예를 들어, shRNA를 코딩하는 3개의 핵산을 포함하는 상기 기재된 ddRNAi 작제물의 맥락에서, 제1 및 제3 핵산은 동일한 별개의 프로모터에 연결되고 제2 핵산은 상이한 프로모터에 연결된다.
- [0197] 별개의 프로모터에 각각 연결된 3개의 shRNA를 코딩하는 핵산을 포함하는 ddRNAi 작제물의 일 예에서, 상기 프로모터 모두는 동일하다.
- [0198] 본 개시내용의 예시적인 ddRNAi 작제물은 5' 에서 3' 방향으로 하기를 포함한다:
- [0199] (a) U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제1 핵산:
- [0200] (b) U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제2 핵산; 및
- [0201] (c) U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제3 핵산.
- [0202] 본 개시내용의 추가의 예시적인 ddRNAi 작제물은 5' 에서 3' 방향으로 하기를 포함한다:
- [0203] (a) U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제1 핵산:
- [0204] (b) U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제2 핵산; 및
- [0205] (c) U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 제3 핵산.
- [0206] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 ddRNAi 작제물을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0207] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 ddRNAi 작제물을 각각 포함하는 복수의 발현 벡터를 제공한다. 예를 들어, 복수의 발현 벡터 중 하나 이상은 본원에 개시된 바와 같은 복수의 ddRNAi 작제물을 포함한다. 또 다른 예에서, 복수의 발현 벡터 각각은 본원에 개시된 바와 같은 복수의 ddRNAi 작제물을 포함한다. 추가 예에서, 복수의 발현 벡터 각각은 본원에 기재된 바와 같이 단일 ddRNAi 작제물을 포함한다. 본 단락에서 진술한 방법 중 어느 것에서, 복수의 발현 벡터는 본 개시내용에 따른 복수의 shRNA를 집합적으로 발현할 수 있다.
- [0208] 일 예에서, 상기 또는 각각의 발현 벡터는 플라스미드 또는 미니서클이다.
- [0209] 일 예에서, 플라스미드 또는 미니서클 또는 발현 벡터 또는 ddRNAi 작제물은 양이온성 DNA 결합 중합체와 함께 중합체화된다.
- [0210] 또 다른 예에서, 상기 또는 각각의 발현 벡터는 바이러스 벡터이다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 (AdV) 및 렌티바이러스 (LV) 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0211] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 ddRNAi 작제물 및/또는 발현 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다. 일 예에서, 조성물은 또한 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0212] 본 개시내용은 또한 대상에서 HBV 감염을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 RNA, 복수의 RNA, 핵산, 복수의 핵산, ddRNAi 작제물, 복수의 ddRNAi 작제물, 발현 벡터, 복수의 발현 벡터 및/또는 조성물의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0213] 본 개시내용은 또한 HBV로 감염된 대상에서 HBV 바이러스 부하를 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 RNA, 복수의 RNA, 핵산, 복수의 핵산, ddRNAi 작제물, 복수의 ddRNAi 작제물, 발현 벡터, 복수의

발현 벡터 및/또는 조성물의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

- [0214] 본 개시내용은 또한 HBV 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 겪는 대상에서 상기 증상의 중증도를 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 RNA, 복수의 RNA, 핵산, 복수의 핵산, ddRNAi 작제물, 복수의 ddRNAi 작제물, 발현 벡터, 복수의 발현 벡터 및/또는 조성물의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0215] 본 개시내용은 이로 감염된 대상에서 HBV의 감염력을 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 RNA, 복수의 RNA, 핵산, 복수의 핵산, ddRNAi 작제물, 복수의 ddRNAi 작제물, 발현 벡터, 복수의 발현 벡터 및/또는 조성물의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0216] 본 개시내용은 또한 만성 간 부전, 간경변, 및/또는 간 세포암을 발생시키는 HBV 감염을 겪는 대상의 위험성을 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 RNA, 복수의 RNA, 핵산, 복수의 핵산, ddRNAi 작제물, 복수의 ddRNAi 작제물, 발현 벡터, 복수의 발현 벡터 및/또는 조성물의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0217] 본원에 기재된 임의의 방법에 따르면, 일 예에서, 대상은 급성 HBV 감염을 겪는다. 대안적으로, 일 예에서, 대상은 만성 HBV 감염을 겪는다.
- [0218] 일 예에서, 본원에 기재된 방법은 대상에서 HBV 게놈에 의해 코딩된 하나 이상의 전사체의 발현을 억제하는 것을 포함한다.
- [0219] 일 예에서, 본 개시내용의 RNA, 복수의 RNA, 핵산, 복수의 핵산, ddRNAi 작제물, 복수의 ddRNAi 작제물, 발현 벡터, 복수의 발현 벡터 및/또는 조성물이 투여되는 대상은 HBV 감염을 치료하기 위한 또 다른 치료제를 이용한 치료를 이미 받았다. 예를 들어, 대상 및/또는 HBV는 HBV 감염을 치료하는 것으로 알려진 다른 체제를 이용한 치료에 대해 불응성이거나 내성이다.
- [0220] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 RNA, 복수의 RNA, 핵산, 복수의 핵산, ddRNAi 작제물, 복수의 ddRNAi 작제물, 발현 벡터, 복수의 발현 벡터 및/또는 조성물은 HBV 감염을 치료하는 것으로 알려진 또 다른 치료제와 조합하여 즉, 보조 요법으로서 투여된다.
- [0221] 일 예에서, 본 개시내용의 조성물은 키트로 제공된다. 예를 들어, 본 개시내용의 조성물은 HBV 감염을 치료하는 것으로 알려진 하나 이상의 다른 치료제와 함께 포장된다. 이러한 다른 치료제는 본 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있을 것이다. 또 다른 예에서, 조성물은 본 개시내용의 방법에서 사용하기 위한 설명서와 함께 포장된다.
- [0222] 본 개시내용은 또한, 하기에서 본원에 기재된 RNA, 복수의 RNA, 핵산, 복수의 핵산, ddRNAi 작제물, 복수의 ddRNAi 작제물, 발현 벡터, 복수의 발현 벡터 및/또는 조성물의 용도를 제공한다: 예컨대, 대상에서 HBV 감염을 치료하기 위한 약제의 제조 및/또는 본원에 개시된 방법. 일 예에서, 대상은 급성 HBV 감염을 겪는다. 대안적인 예에서, 대상은 만성 HBV 감염을 겪는다.
- [0223] 본 개시내용은 또한 요법에서 사용하기 위한 본원에 기재된 RNA, 복수의 RNA, 핵산, 복수의 핵산, ddRNAi 작제물, 복수의 ddRNAi 작제물, 발현 벡터, 복수의 발현 벡터 및/또는 조성물을 제공한다. 예를 들어, RNA, 복수의 RNA, 핵산, 복수의 핵산, ddRNAi 작제물, 복수의 ddRNAi 작제물, 발현 벡터, 복수의 발현 벡터 및/또는 조성물은 대상에서 HBV 감염을 치료하는데 하기 위한 및/또는 본원에 기재된 방법에서 사용하기 위한 것일 수 있다. 대상은 급성 HBV 감염을 겪을 수 있다. 대안적인 예에서, 대상은 만성 HBV 감염을 겪을 수 있다.
- [0224] 본원에 기재된 임의의 예에 따른 HBV의 치료는 대상에서 HBV 바이러스 부하를 감소시키는 것, HBV 감염과 관련된 증상의 중증도를 감소시키는 것 및/또는 대상에서 HBV의 감염력을 감소시키는 것 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일 예에서, 약제는 상기 약제가 투여되는 대상에서 HBV 유전자 전사 생성물을 감소시킬 것이다.
- [0225] **도면의 간단한 설명**
- [0226] 도 1은 HBV 게놈의 지도 및 siRNA 표적 영역의 위치를 나타낸다. 내부의 원은 HBV 게놈을 나타내고, 이들 주위의 박스는 표시된 단백질 코딩 서열을 나타내며, 외부의 굵은 화살표는 HBV mRNA를 나타낸다. 표 1에 열거된 고도의 보존 영역 (영역 1 내지 영역 10) 및 표 4에서 부가적인 shRNA (shRNA 3, 8 및 11)에 의해 표적화된 영역의 위치가 점선으로 표시되어 있다.
- [0227] 도 2는 루시퍼라제 리포터 분석 시스템에서 각각 shRNA9, shRNA15 및 shRNA27의 안티센스 및 센스 서열을 갖는

siRNA의 HBV 억제 활성을 예시한다.

- [0228] 도 3은 HepG2.2.15 세포에서 HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역으로부터의 HBV 전사체를 억제하는 각각 shRNA9, shRNA27 및 shRNA27의 안티센스 및 센스 서열을 갖는 siRNA의 활성을 예시한다.
- [0229] 도 4는 중합효소 유전자 및 각각의 HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 대한 HBV siRNA의 위치를 나타낸다.
- [0230] 도 5 (a)-(b)는 루시퍼라제 리포터 분석 시스템에서 루시퍼라제 단백질 발현을 억제하는 shRNA1, shRNA4, shRNA15, shRNA18, shRNA35, shRNA36 및 shRNA39로 명명된 shRNA의 능력을 예시하며; (c)-(d)는 루시퍼라제 리포터 분석에서 루시퍼라제 단백질 발현을 억제하는 shRNA5, shRNA6, shRNA7, shRNA8, shRNA35, shRNA26, shRNA27, shRNA30 및 shRNA40으로 명명된 shRNA의 능력을 예시하고; (e)-(f)는 루시퍼라제 리포터 분석에서 루시퍼라제 단백질 발현을 억제하는 shRNA9, shRNA10, shRNA11, shRNA12, shRNA33, shRNA34, shRNA19, shRNA20, shRNA23 및 shRNA24로 명명된 shRNA의 능력을 예시한다.
- [0231] 도 6 (a)-(j)는 루시퍼라제 리포터 분석 시스템에서 용량 의존적 방식으로 루시퍼라제 단백질 발현을 억제하는 shRNA1, shRNA15, shRNA40, shRNA27, shRNA30, shRNA9 및 shRNA20으로 명명된 shRNA의 능력을 예시한다.
- [0232] 도 7 (a)-(j)는 루시퍼라제 리포터 분석 시스템에서 용량 의존적 방식으로 루시퍼라제 단백질 발현을 억제하는 shRNA1, shRNA15, shRNA40, shRNA27, shRNA30, shRNA9 및 shRNA20으로 명명된 shRNA의 능력을 예시한다.
- [0233] 도 8 (a)-(j)는 일정한 수준의 DNA가 세포 내로 형질감염되고 있음을 보장하기 위하여 비특이적 필러 (filler) 플라스미드로 공동 형질감염된 HEK293 세포에서 루시퍼라제 리포터 분석 시스템에서 용량 의존적 방식으로 루시퍼라제 단백질 발현을 억제하는 shRNA1, shRNA15, shRNA40, shRNA27, shRNA30, shRNA9 및 shRNA20으로 명명된 shRNA의 능력을 예시한다.
- [0234] 도 9 (a)-(b)는 루시퍼라제 리포터 분석 시스템에서 루시퍼라제 단백질 발현을 억제하는 shRNA9, shRNA13, shRNA14, shRNA20, shRNA21 및 shRNA22로 명명된 shRNA를 발현하는 ddRNAi 작제물의 능력을 예시한다.
- [0235] 도 10은 HBV AdV로 형질도입 후 세포당 발현된 shRNA의 수를 결정하는 qPCR에 의해 수득된 표준 곡선을 나타낸다.
- [0236] 도 11(a)-(d)는 하기에서 각각 shRNA14, shRNA15, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 shRNA에 대한 발현 수준을 나타낸다: (i) 다양한 MOI에서 개별적으로 각각의 shRNA를 발현하는 HBV shRNA AdV 벡터로 형질도입된 HepG2.2.15 세포; (ii) 다양한 MOI에서 각각 shRNA14, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 shRNA를 발현하는 3개의 HBV shRNA AdV 벡터로 동시에 형질도입된 HepG2.2.15 세포; 및 (iii) 다양한 MOI에서 각각 shRNA14, shRNA15 및 shRNA28로 명명된 shRNA를 발현하는 3개의 HBV shRNA AdV 벡터로 동시에 형질도입된 HepG2.2.15 세포.
- [0237] 도 12(a)-(f)는 하기로 형질도입된 HepG2.2.15 세포에서 GAPDH의 발현 대비 HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역에서 HBV 전사체의 억제 수준을 예시한다: (a) shRNA14를 발현하는 HBV shRNA AdV 벡터; (b) shRNA15를 발현하는 HBV shRNA AdV 벡터; (c) shRNA37을 발현하는 HBV shRNA AdV 벡터; (d) shRNA28을 발현하는 HBV shRNA AdV 벡터; (e) 다양한 MOI에서 각각 shRNA14, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 shRNA를 발현하는 3개의 HBV shRNA AdV 벡터; 및 (f) 다양한 MOI에서 각각 shRNA14, shRNA15 및 shRNA28로 명명된 shRNA를 발현하는 3개의 HBV shRNA AdV 벡터.
- [0238] 도 13(a)-(d)는 하기에서 각각 shRNA14, shRNA15, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 shRNA에 대한 발현 수준을 나타낸다: (i) MOI 100에서 개별적으로 각각의 shRNA14, shRNA15, shRNA37 또는 shRNA28을 발현하는 HBV shRNA AdV 벡터로 형질도입된 HepG2.2.15 세포; (ii) MOI 100에서 각각 shRNA14, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 3개의 shRNA를 발현하는 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 형질도입된 HepG2.2.15 세포; 및 (iii) MOI 100에서 각각 shRNA14, shRNA15 및 shRNA28로 명명된 3개의 shRNA를 발현하는 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 동시에 형질도입된 HepG2.2.15 세포.
- [0239] 도 14(a)-(f)는 하기로 형질도입된 HepG2.2.15 세포에서 GAPDH의 발현 대비 HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역에서 HBV 전사체의 억제 수준을 예시한다: (a) shRNA14를 발현하는 HBV shRNA AdV 벡터; (b) shRNA15를 발현하는 HBV shRNA AdV 벡터; (c) shRNA37을 발현하는 HBV shRNA AdV 벡터; (d) shRNA28을 발현하는 HBV shRNA AdV 벡터; (e) shRNA14, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 3개의 shRNA를 발현하는 삼중 HBV shRNA AdV 벡터; 및 (f) shRNA14, shRNA15 및 shRNA28로 명명된 3개의 shRNA를 발현하는 삼중 HBV shRNA AdV 벡터.
- [0240] 도 15는 HBV로 접종되고, MOI 10에서 shRNA14, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 3개의 shRNA를 발현하는 삼중 HBV

shRNA AdV 벡터로 처리된 인간 간세포에 대해 하기를 나타낸다: (a) shRNA14, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 shRNA에 대한 발현 수준; (b) HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역에서 HBV 전사체의 억제 수준; (c) 세포내 및 세포외의 HBV DNA의 수준; (d) HBV 항원 HBcAg 및 HBsAg에 상응하는 영역에서 세포외의 HBV 전사체의 수준; 및 (e) cccDNA의 수준.

[0241] 도 16은 56일의 기간 동안 (i) 식염수만으로 처리된 그룹 1 (대조군), (ii) 중간 용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 2, 및 (iii) 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 3의 동물에서의 세포외의 HBV DNA의 혈청 수준 (로그 카피/mL로 표현됨)을 나타내는 플롯이다.

[0242] 도 17은 56일의 기간 동안 (i) 식염수만으로 처리된 그룹 1 (대조군), (ii) 중간 용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 2, 및 (iii) 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 3의 동물에서의 세포외의 HBV DNA의 혈청 수준 (로그 카피/mL로 표현됨)을 나타내는 플롯이다.

[0243] 도 18은 56일의 기간 동안 (i) 식염수만으로 처리된 그룹 1 (대조군), (ii) 중간 용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 2, 및 (iii) 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터의 고용량으로 처리된 그룹 3의 동물에서의 HBsAg의 혈청 수준 (IU/mL)을 나타내는 플롯이다.

[0244] 도 19는 56일의 기간 동안 (i) 식염수만으로 처리된 그룹 1 (대조군), (ii) 중간 용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 2, 및 (iii) 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 3의 동물에서의 HBeAg의 혈청 수준 (IU/mL)을 나타내는 플롯이다.

[0245] 도 20은 처리 후 56일에 (i) 식염수만으로 처리된 그룹 1 (대조군), (ii) 중간 용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 2, 및 (iii) 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 3의 동물에서의 세포내 HBV DNA의 수준 (세포내 HBV DNA의 카피/100ng DNA)을 나타낸다. 이 도면은 대조군 식염수 처리 대비 중간 및 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터에 의한 세포내 HBV DNA의 억제 수준을 예시한다.

[0246] 도 21은 처리 후 56일에 (i) 식염수만으로 처리된 그룹 1 (대조군), (ii) 중간 용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 2, 및 (iii) 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 그룹 3의 동물에서의 세포내 cccDNA의 수준 (HBV cccDNA의 카피/100ng DNA)을 나타낸다. 이 도면은 대조군 식염수 처리 대비 중간 및 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터에 의한 세포내 HBV cccDNA의 억제 수준을 예시한다.

[0247] 도 22는 중간 및 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터를 이용한 처리 후 56일에 삼중 HBV shRNA AdV 벡터 (각각 shRNA14, shRNA 37 및 shRNA28)에 의해 발현된 shRNA에 상응하는 HBV 바이러스 전사체의 억제 수준을 예시한다.

[0248] **서열 목록의 핵심**

[0249] 서열번호:1: 영역 1로 명명된 HBV 게놈 내의 표적 영역에 대한 DNA 서열.

[0250] 서열번호:2: 영역 2로 명명된 HBV 게놈 내의 표적 영역에 대한 DNA 서열.

[0251] 서열번호:3: 영역 3으로 명명된 HBV 게놈 내의 표적 영역에 대한 DNA 서열.

[0252] 서열번호:4: 영역 4로 명명된 HBV 게놈 내의 표적 영역에 대한 DNA 서열.

[0253] 서열번호:5: 영역 5로 명명된 HBV 게놈 내의 표적 영역에 대한 DNA 서열.

[0254] 서열번호:6: 영역 6으로 명명된 HBV 게놈 내의 표적 영역에 대한 DNA 서열.

[0255] 서열번호:7: 영역 7로 명명된 HBV 게놈 내의 표적 영역에 대한 DNA 서열.

[0256] 서열번호:8: 영역 8로 명명된 HBV 게놈 내의 표적 영역에 대한 DNA 서열.

[0257] 서열번호:9: 영역 9로 명명된 HBV 게놈 내의 표적 영역에 대한 DNA 서열.

[0258] 서열번호:10: 하기로 명명된 HBV 게놈 내의 표적 영역에 대한 DNA 서열: 영역 10.

[0259] 서열번호:11: shRNA1 및 shRNA4로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.

[0260] 서열번호:12: shRNA1 및 shRNA4로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.

[0261] 서열번호:13: shRNA2로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.

- [0262] 서열번호:14: 하기로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열: shRNA2.
- [0263] 서열번호:15: shRNA3으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0264] 서열번호:16: 하기로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열: shRNA3.
- [0265] 서열번호:17: shRNA5 및 shRNA6로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0266] 서열번호:18: shRNA5 및 shRNA6으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0267] 서열번호:19: shRNA7 및 shRNA8로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0268] 서열번호:20: shRNA7 및 shRNA8로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0269] 서열번호:21: shRNA9 및 shRNA10으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0270] 서열번호:22: shRNA9 및 shRNA10으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0271] 서열번호:23: shRNA11 및 shRNA12로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0272] 서열번호:24: shRNA11 및 shRNA12로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0273] 서열번호:25: shRNA13으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0274] 서열번호:26: shRNA13으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열
- [0275] 서열번호:27: shRNA14로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0276] 서열번호:28: shRNA14로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열
- [0277] 서열번호:29: shRNA15 및 shRNA18로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0278] 서열번호:30: shRNA15 및 shRNA18로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0279] 서열번호:31: shRNA16으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0280] 서열번호:32: shRNA16으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0281] 서열번호:33: shRNA17로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0282] 서열번호:34: shRNA17로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0283] 서열번호:35: shRNA19 및 shRNA20으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0284] 서열번호:36: shRNA19 및 shRNA20으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0285] 서열번호:37: shRNA21로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0286] 서열번호:38: shRNA21로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0287] 서열번호:39: shRNA22로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0288] 서열번호:40: shRNA22로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0289] 서열번호:41: shRNA23 및 shRNA24로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0290] 서열번호:42: shRNA23 및 shRNA24로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0291] 서열번호:43: shRNA25 및 shRNA26으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0292] 서열번호:44: shRNA25 및 shRNA26으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0293] 서열번호:45: shRNA27 및 shRNA30으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0294] 서열번호:46: shRNA27 및 shRNA30으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0295] 서열번호:47: shRNA28 및 shRNA31로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0296] 서열번호:48: shRNA28 및 shRNA31로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0297] 서열번호:49: shRNA29 및 shRNA32로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.

- [0298] 서열번호:50: shRNA29 및 shRNA32로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0299] 서열번호:51: shRNA33 및 shRNA34로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0300] 서열번호:52: shRNA33 및 shRNA34로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0301] 서열번호:53: shRNA35로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0302] 서열번호:54: shRNA35로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0303] 서열번호:55: shRNA 36으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0304] 서열번호:56: shRNA35로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0305] 서열번호:57: shRNA37로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0306] 서열번호:58: shRNA37로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0307] 서열번호:59: shRNA38로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0308] 서열번호:60: shRNA38로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0309] 서열번호:61: shRNA39로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0310] 서열번호:62: shRNA39로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0311] 서열번호:63: shRNA40으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 서열.
- [0312] 서열번호:64: shRNA40으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 효과기 보체 서열.
- [0313] 서열번호:65: shRNA1로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열.
- [0314] 서열번호:66: shRNA2로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0315] 서열번호:67: shRNA3으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0316] 서열번호:68: shRNA4로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0317] 서열번호:69: shRNA5로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0318] 서열번호:70: shRNA6으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0319] 서열번호:71: shRNA7로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0320] 서열번호:72: shRNA8로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0321] 서열번호:73: shRNA9로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0322] 서열번호:74: shRNA10으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0323] 서열번호:75: shRNA11로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0324] 서열번호:76: shRNA12로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0325] 서열번호:77: shRNA13으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0326] 서열번호:78: shRNA14로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0327] 서열번호:79: shRNA15로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0328] 서열번호:80: shRNA16으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0329] 서열번호:81: shRNA17로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0330] 서열번호:82: shRNA18로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0331] 서열번호:83: shRNA19로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0332] 서열번호:84: shRNA20으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0333] 서열번호:85: shRNA21로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열

- [0334] 서열번호:86: shRNA22로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0335] 서열번호:87: shRNA23으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0336] 서열번호:88: shRNA24로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0337] 서열번호:89: shRNA25로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0338] 서열번호:90: shRNA26으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0339] 서열번호:91: shRNA27로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0340] 서열번호:92: shRNA28로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0341] 서열번호:93: shRNA29로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0342] 서열번호:94: shRNA30으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0343] 서열번호:95: shRNA31로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0344] 서열번호:96: shRNA32로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0345] 서열번호:97: shRNA33으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0346] 서열번호:98: shRNA34로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0347] 서열번호:99: shRNA35로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0348] 서열번호:100: shRNA36으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0349] 서열번호:101: shRNA37로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0350] 서열번호:102: shRNA38로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0351] 서열번호:103: shRNA39로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0352] 서열번호:104: shRNA40으로 명명된 shRNA에 대한 RNA 서열
- [0353] 서열번호:105: pBL183\_HBV\_삼중\_V2에 대한 DNA 서열
- [0354] 서열번호:106: pBL183\_HBV\_삼중\_V1에 대한 DNA 서열
- [0355] **상세한 설명**
- [0356] 일반
- [0357] 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 구체적으로 언급되거나 맥락이 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 특징, 물질의 조성물, 단계의 그룹 또는 특징의 그룹 또는 물질의 조성물들에 대한 언급은 하나 및 복수(즉 하나 이상)의 이들 단계, 특징, 물질의 조성물, 단계의 그룹 또는 특징의 그룹 또는 물질의 조성물들을 포함하는 것으로 간주될 것이다.
- [0358] 본 기술분야의 숙련가는 본 개시내용이 구체적으로 기술된 것 이외의 변화 및 변형에 민감하다는 것을 이해할 것이다. 본 개시내용은 이러한 모든 변화 및 변형을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 개시내용은 또한 본 명세서에서 언급되거나 표시된 단계, 특징, 조성물 및 화합물 모두를 개별적으로 또는 총괄적으로 포함하거나 상기 단계 또는 특징의 임의 및 모든 조합 또는 임의의 2개 이상을 포함한다.
- [0359] 본 개시내용은 본원에 기재된 특정 실시예에 의해 범위가 한정되지 않으며, 이는 단지 예시의 목적을 위한 것이다. 기능적으로 동등한 생성물, 조성물 및 방법이 본 개시내용의 범위에 명확히 포함된다.
- [0360] 본원에서 본 개시내용의 임의의 예는 달리 명시적으로 언급되지 않는 한, 본 개시내용의 임의의 다른 예에 준용되는 것으로 간주될 것이다.
- [0361] 달리 명시적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 기술분야 (예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학, 및 생화학)에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 간주될 것이다.
- [0362] 달리 나타내지 않는 한, 본 개시내용에서 이용되는 재조합 DNA, 재조합 단백질, 세포 배양, 및 면역학적 기술은

본 기술분야의 숙련자에게 널리 알려진 표준 절차이다. 이러한 기술은 하기에서와 같은 출처의 문헌을 통해 기술되고 설명된다: J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook 등 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M.Glover 및 B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 및 1996), 및 F.M. Ausubel 등 (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지 모든 업데이트 포함), Ed Harlow 및 David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988), 및 J.E.Coligan 등 (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (현재까지 모든 업데이트 포함).

[0363] 본 명세서 전반에 걸쳐, 맥락이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다", 또는 "포함하는"과 같은 변화는 언급된 단계 또는 요소 또는 정수 또는 단계 또는 요소 또는 정수의 그룹을 포함하는 것이며 임의의 다른 단계 또는 요소 또는 정수 또는 요소 또는 정수의 그룹을 배제하는 것이 아닌 것으로 이해된다.

[0364] 용어 “및/또는”, 예컨대, “X 및/또는 Y”는 “X 및 Y” 또는 “X 또는 Y” 중 어느 하나를 의미하는 것으로 이해될 것이며, 두 가지 의미 또는 어느 하나의 의미를 명시적으로 뒷받침하는 것으로 간주될 것이다.

[0365] 선택된 정의

[0366] "RNA"는 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 분자를 의미한다. "리보뉴클레오타이드"는 β-D-리보-푸라노스 모이어티의 2' 위치에 하이드록실 그룹을 갖는 뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 용어는 이중 가닥의 RNA, 단일 가닥의 RNA, 단리된 RNA, 예컨대 부분적으로 정제된 RNA, 본질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA, 재조합으로 생산된 RNA, 뿐만 아니라 하나 이상의 뉴클레오타이드의 부가, 결실, 치환 및/또는 변경에 의해 자연적으로 존재하는 RNA와 상이한 변경된 RNA를 포함한다. 이러한 변경은 비-뉴클레오타이드 물질을, 예컨대 siNA의 말단(들)에 또는 내부에, 예를 들어 RNA의 하나 이상의 뉴클레오타이드에 부가하는 것을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 RNA 분자 내의 뉴클레오타이드는 또한 비-표준 뉴클레오타이드, 예컨대 비-자연적으로 존재하는 뉴클레오타이드 또는 화학적으로 합성된 뉴클레오타이드 또는 테옥시뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이러한 변경된 RNA는 유사체 또는 자연적으로 존재하는 RNA의 유사체로 지칭될 수 있다. 일 예에서, RNA 내의 모든 잔기는 리보뉴클레오타이드이다.

[0367] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “RNAi 시약”은 "RNA 간섭" 또는 "RNAi"를 유발할 수 있는 RNA를 지칭한다.

[0368] 용어 "RNA 간섭" 또는 "RNAi"는 일반적으로 세포의 세포질에서 이중 가닥의 RNA (dsRNA)에 의해 개시되는 유전자 발현의 RNA-의존적 침묵을 지칭한다. dsRNA 분자는 표적 핵산 서열의 전사 생성물을 감소시키거나 억제하여, 유전자를 침묵시킨다.

[0369] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이중 가닥의 RNA" 또는 "dsRNA"는 이합체 구조를 가지며 서로 유사한 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA 분자를 지칭한다. 효과기 서열 및 효과기 보체 서열은 단일 RNA 가닥이거나 또는 별개의 RNA 가닥일 수 있다. "효과기 서열" (종종 “가이드 가닥”으로 지칭됨)은 표적 서열에 실질적으로 상보적이며, 이는 본 경우에 HBV 게놈의 RNA 전사 생성물의 영역이다. “효과기 서열”은 또한 “안티센스 서열”로 지칭될 수 있다. “효과기 보체 서열”은 효과기 서열에 어닐링되어 이합체를 형성할 수 있도록 효과기 서열에 충분히 상보적일 것이다. 이와 관련하여, 효과기 보체 서열은 표적 서열의 영역에 실질적으로 상동일 것이다. 숙련자에게 명백한 바와 같이, 용어 “효과기 보체 서열”은 또한 “효과기 서열의 보체” 또는 센스 서열로 지칭될 수 있다.

[0370] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이합체"는 2개의 상보적인 또는 실질적으로 상보적인 핵산 (예컨대, RNA)에서의 영역, 또는 단일 가닥의 핵산 (예컨대, RNA)에서 2개의 상보적인 또는 실질적으로 상보적인 영역을 지칭하며, 이는 상보적인 또는 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열 사이에 안정화된 이합체를 허용하는 왓슨-크릭 염기쌍 또는 임의의 다른 방식에 의해 서로 염기쌍을 형성한다. 이합체 영역 내에, 100% 상보성이 요구되지 않고; 실질적인 상보성이 허용된다는 것이 숙련자에 의해 이해될 것이다. 실질적인 상보성은 79% 이상의 상보성을 포함할 수 있다. 예를 들어, 19개의 염기쌍으로 이루어진 이합체 영역에서의 단일 미스매치 (즉, 18개의 염기쌍 및 하나의 미스매치)는 94.7% 상보성을 야기하여, 이합체 영역이 실질적으로 상보적이게 한다. 또 다른 예에서, 19개의 염기쌍으로 이루어진 이합체 영역에서의 2개의 미스매치 (즉, 17개의 염기쌍 및 2개의 미스매치)는 89.5% 상보성을 야기하여, 이합체 영역이 실질적으로 상보적이게 한다. 또 다른 예에서, 19개의 염기쌍으로 이루어진 이합체 영역에서의 3개의 미스매치 (즉, 16개의 염기쌍 및 3개의 미스매치)는 84.2% 상보성

을 야기하여, 이합체 영역이 실질적으로 상보적이게 한다.

- [0371] dsRNA는 스템 루프를 불리는 적어도 2 뉴클레오타이드 서열에 의해 연결된 효과기 서열 및 효과기 보체 서열로 구성된 이합체 영역을 갖는, 헤어핀 또는 스템 루프 구조로서 제공될 수 있다. dsRNA가 헤어핀 또는 스템 루프 구조로서 제공되는 경우, 그것은 "헤어핀 RNA" 또는 "짧은 헤어핀 RNAi 제제" 또는 "shRNA"로서 지칭될 수 있다.
- [0372] 본원에 사용된 바와 같이, 서열과 관련하여 용어 "상보적"은 구아닌 (G)이 시토신 (C)과 쌍을 이루고, 아데닌 (A)이 우라실 (U) 또는 티민 (T)과 쌍을 이루는 왓슨-크릭 염기쌍에 의한 서열의 보체를 지칭한다. 서열은 또 다른 서열의 전체 길이에 상보적일 수 있거나, 또는 또 다른 서열의 특정 부분 또는 길이에 상보적일 수 있다. 본 기술분야의 숙련가는 U가 RNA에 존재할 수 있고, T가 DNA에 존재할 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, RNA 또는 DNA 서열 내의 A는 RNA 서열 내의 U 또는 DNA 서열 내의 T와 쌍을 이룰 수 있다.
- [0373] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로 상보적"은 핵산 서열 사이에, 예컨대, 효과기 서열 및 효과기 보체 서열 사이에 또는 효과기 서열 및 표적 서열 사이에 안정하고 특이적인 결합이 일어나도록 충분한 정도의 상보성 또는 정확한 쌍 형성을 나타내기 위해 사용된다. 핵산의 서열은 그의 표적 또는 보체의 서열과 100% 상보적일 필요는 없는 것으로 이해된다. 상기 용어는 오버행을 제외하고 또 다른 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 일부 경우, 서열은 1-2개의 미스매치를 제외하고 다른 서열에 상보적이다. 일부 경우, 서열은 1개의 미스매치를 제외하고 상보적이다. 일부 경우, 서열은 2개의 미스매치를 제외하고 상보적이다. 다른 경우, 서열은 3개의 미스매치를 제외하고 상보적이다. 또 다른 경우, 서열은 4개의 미스매치를 제외하고 상보적이다.
- [0374] 본 개시내용의 RNA의 맥락에서 사용된 바와 같이, 용어 "코딩된"은 RNA가 DNA 주형으로부터 전사될 수 있다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 본 개시내용의 RNA를 코딩하는 핵산은 각각의 RNA의 전사를 위한 주형으로서 작용하는 DNA 서열을 포함할 것이다.
- [0375] 용어 "DNA-지향 RNAi 작제물" 또는 "ddRNAi 작제물"은 전사될 때, RNAi를 유발하는 RNA 분자를 생산하는 DNA 서열을 포함하는 핵산을 지칭한다. ddRNAi 작제물은 적어도 2개의 뉴클레오타이드의 스템 루프에 의해 연결된 이합체 영역을 갖는 헤어핀 구조로 자가-어닐링될 수 있는 단일 RNA, 즉, shRNA로서, 또는 다수의 shRNA를 갖는 단일 RNA로서 또는 단일 shRNA로서 각각 폴딩될 수 있는 다수의 RNA 전사체로서 전사되는 핵산을 포함할 수 있다. ddRNAi 작제물은 발현 벡터 내에 있을 수 있으며, 즉, 예컨대, 프로모터에 작동가능하게 연결된, "ddRNAi 발현 작제물" 일 수 있다. 일 예에서, ddRNAi 작제물은 DNA만을 포함한다.
- [0376] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된" 또는 "작동가능한 연결" (또는 유사한 것)은 코딩 핵산 서열이 코딩 서열의 발현을 용이하게 하는 방식으로, 조절 서열, 예컨대, 프로모터에 연결되거나 이와 결합되는 것을 의미한다. 조절 서열은 프로모터, 인핸서, 및 당해 분야에서 인식되고 코딩 서열의 발현을 지시하도록 선택되는 다른 발현 제어 요소를 포함한다.
- [0377] "벡터"는 핵산을 세포 내로 도입하기 위한 비히클을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 벡터는, 비제한적으로, 플라스미드, 파자미드, 바이러스, 박테리아, 및 바이러스 또는 박테리아 공급원으로부터 유래된 비히클을 포함한다. "플라스미드"는 원형의 이중 가닥의 DNA 분자이다. 본 개시내용에 따라 사용하기 위한 유용한 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기서 이중 DNA 서열이 하나 이상의 바이러스 유전자 또는 이의 부분을 결실시키기 위해 변형될 수 있는 바이러스 게놈 내로 삽입된다. 특정 벡터는 숙주 세포에서 자발적으로 복제할 수 있다 (예컨대, 숙주 세포에서 기능하는 복제 원점을 갖는 벡터). 다른 벡터는 숙주 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합될 수 있고, 따라서 숙주 게놈과 함께 복제된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "발현 벡터"는 본 개시내용의 RNA 분자를 발현할 수 있는 벡터를 의미하는 것으로 이해될 것이다.
- [0378] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료" 및 이의 변화는 임상 병리학 과정 동안 치료되는 개체 또는 세포의 자연 경과를 변경시키도록 설계된 임상 개입을 지칭한다. 치료의 바람직한 효과는 질환 진행 속도를 감소시키는 것, 질환 상태를 개선하거나 완화시키는 것, 및 차도 또는 개선된 예후를 포함한다. HBV 감염의 치료는 HBV로 감염된 대상에서 HBV 바이러스 부하를 감소시키는 것, HBV 감염과 관련된 증상의 중증도를 감소시키는 것, 및 대상에서 HBV의 감염력을 감소시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 상기 치료 결과 중 하나 이상이 달성되면 개체는 성공적으로 "치료된다".
- [0379] "치료적 유효량"은 특정 질환 (예컨대, HBV 감염)의 측정가능한 개선을 달성하는데 필요한 적어도 최소 농도 또는 양이다. 본원에서 치료적 유효량은 환자의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유발하는 RNA, ddRNAi 또는 발현 작제물의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 또한 RNA,

ddRNAi 또는 발현 억제물의 임의의 독성 또는 해로운 효과가 치료적으로 유의한 효과보다 큰 것이다.

[0380] 본원에 사용된 바와 같이, “대상” 또는 “환자”는 HBV로 감염된 인간 또는 비-인간 동물일 수 있다. “비-인간 동물”은 영장류, 가축 (예컨대, 양, 말, 소, 돼지, 당나귀), 동반 동물 (예컨대, 개 및 고양이와 같은 애완동물), 실험실 시험 동물 (예컨대, 마우스, 토끼, 랫트, 기니아 피그), 수행 동물 (예컨대, 경주마, 낙타, 그레이하운드) 또는 가축 야생 동물일 수 있다. 일 예에서, 대상 또는 환자는 포유동물이다. 일 예에서, 대상 또는 환자는 영장류이다. 일 예에서, 대상 또는 환자는 인간이다.

[0381] 용어 “감소된 발현”, “발현 감소” 등은 표적 유전자 예컨대, HBV pol 유전자 또는 다른 HBV 유전자로부터 단백질 및/또는 mRNA 생성물의 수준의 부재 또는 식별가능한 감소를 지칭한다. 상기 감소는 절대적일 필요는 없지만, 본 개시내용의 RNA에 의해 영향을 받은 RNAi의 결과로서 검출가능하거나 식별가능한 변화에 대해 충분한 부분적인 감소일 수 있다. 상기 감소는 RNA, ddRNAi 억제물 또는 발현 억제물이 결합된 세포에 비해 표적 핵산으로부터 mRNA 및/또는 단백질 생성물의 수준의 감소를 결정함으로써 측정될 수 있고, 이는 1%, 5% 또는 10% 정도로 작을 수 있거나, 또는 절대적, 즉, 100% 억제될 수 있다. 상기 감소의 효과는 외형적 특성 즉, 세포 또는 유기체의 양적 및/또는 질적 표현형의 조사에 의해 결정될 수 있고, 또한 본 개시내용의 ddRNAi 억제물의 투여 후에 바이러스 부하의 평가를 포함할 수 있다.

[0382] RNAi를 위한 제제

[0383] 일 예에서, 본 개시내용은 RNA, 즉, RNAi를 유발할 수 있는 RNA를 제공하며, 상기 RNA는 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 상기 효과기 서열은 표 1에 제시된 HBV 게놈의 영역에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다. 예를 들어, 본 개시내용의 RNA는 30개 미만의 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열을 포함할 것이다. 예를 들어, 적합한 효과기 서열은 17-29개 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다.

[0384] 일 예에서, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 1에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 1에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 4개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 1에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 3개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 1에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 2개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 1에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 1개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 1에 의해 코딩된 RNA 전사체에 100% 상보적일 수 있다.

[0385] 일 예에서, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 2에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 2에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 4개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 2에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 3개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 2에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 2개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 2에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 1개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 2에 의해 코딩된 RNA 전사체에 100% 상보적일 수 있다.

[0386] 일 예에서, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 3에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 3에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 4개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 3에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 3개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 3에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 2개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 3에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 1개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 3에 의해 코딩된 RNA 전사체에 100% 상보적일 수 있다.

[0387] 일 예에서, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 4에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 4에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 4개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 4에 의해 코딩된 RNA 전사체에



에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 3개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 10에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 2개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 10에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고 이에 대해 1개의 미스매치 염기를 함유할 수 있다. 예를 들어, 효과기 서열은 표 1에 제시된 영역 10에 의해 코딩된 RNA 전사체에 100% 상보적일 수 있다.

- [0394] 일 예에서, 본 개시내용의 RNA는 본원에 기재된 바와 같이 표 1에 제시된 영역 1, 영역 5, 영역 9, 영역 4 또는 영역 6에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하는 RNA이다.
- [0395] 일 예에서, 본 개시내용의 RNA는 짧은 간섭 RNA (siRNA) 이합체 또는 이중 가닥의 RNA (dsRNA)이다.
- [0396] 일 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA, 즉, RNAi를 유발할 수 있는 복수의 RNA를 제공하며, 여기서 각각의 RNA는 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 여기서 각각의 RNA의 효과기 서열은 표 1에 제시된 HBV 게놈의 영역에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다. 예를 들어, 복수 중에서 각각의 RNA는 30개 미만의 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열을 포함한다. 예를 들어, 적합한 효과기 서열은 17-29개 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다.
- [0397] 본 개시내용에 따른 복수의 RNA는 본원에 기재된 바와 같은 최대 10개의 RNA를 포함할 수 있다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 2개의 RNA를 포함한다. 또 다른 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 3개의 RNA를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 4개의 RNA를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 5개의 RNA를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 6개의 RNA를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 7개의 RNA를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 8개의 RNA를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 9개의 RNA를 포함한다. 일 예에서, 복수의 RNA는 본원에 기재된 10개의 RNA를 포함한다.
- [0398] 따라서, 본 개시내용에 따른 복수의 RNA는 표 1에 제시된 HBV 게놈의 영역에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 RNA를 포함할 수 있다.
- [0399] 일 예에서, 본원에 기재된 복수의 RNA는 단일 조성물로서 함께 제공된다.
- [0400] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 복수의 RNA는 다수의 조성물로서 제공된다. 예를 들어, 복수 중 각각의 RNA는 별개로 제공될 수 있다. 대안적으로, 복수 중 적어도 하나의 RNA는 별개로 제공될 수 있고 복수 중 2개 이상은 조성물에 함께 제공될 수 있다.
- [0401] 일 예에서, 복수 내의 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 1에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다.
- [0402] 일 예에서, 복수에서 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 5에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다.
- [0403] 일 예에서, 복수에서 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 9에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다.
- [0404] 일 예에서, 복수에서 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 4에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다.
- [0405] 일 예에서, 복수에서 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 6에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다.
- [0406] 일 예에서, 복수 내의 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 9에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고, 복수 내의 또 다른 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 4에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다.
- [0407] 일 예에서, 복수 내의 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 9에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이고, 복수 내의 또 다른 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 4에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이며, 복수 내의 또 다른 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 5에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이다.
- [0408] 일 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA 즉, RNAi를 유발할 수 있는 복수의 RNA를 제공하며, 여기서:

- [0409] (i) 적어도 하나의 RNA는 적어도 17개 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 여기서 각각의 RNA의 효과기 서열은 표 1에 제시된 HBV 게놈의 영역에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적이며;
- [0410] (ii) 적어도 하나의 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 여기서 각각의 RNA의 효과기 서열은 표 4에서 “효과기”로 표시된 컬럼에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다. 일 예에서, RNA의 효과기 보체 서열은 표 4에서 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다.
- [0411] 예를 들어, 각각의 RNA는 30개 미만의 뉴클레오타이드 길이의 효과기 서열을 포함한다. 예를 들어, 적합한 효과기 서열은 17-29개 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다.
- [0412] 일 예에서, (i)에서의 RNA는 표 1에서 영역 1에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하고, (ii)에서의 RNA는 서열번호:57에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열을 포함한다. 일 예에서, (ii)에서의 RNA는 서열번호:58에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0413] 일 예에서, (i)에서의 RNA는 표 1에서 영역 5에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하고, (ii)에서의 RNA는 서열번호:57에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열을 포함한다. 일 예에서, (ii)에서의 RNA는 서열번호:58에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0414] 일 예에서, (i)에서의 RNA는 표 1에서 영역 9에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하고, (ii)에서의 RNA는 서열번호:57에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열을 포함한다. 일 예에서, (ii)에서의 RNA는 서열번호:58에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0415] 일 예에서, (i)에서의 RNA는 표 1에서 영역 4에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하고, (ii)에서의 RNA는 서열번호:57에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열을 포함한다. 일 예에서, (ii)에서의 RNA는 서열번호:58에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0416] 일 예에서, (i)에서의 RNA는 표 1에서 영역 6에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하고, (ii)에서의 RNA는 서열번호:57에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열을 포함한다. 일 예에서, (ii)에서의 RNA는 서열번호:58에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0417] 일 예에서, (i)에서의 RNA는 표 1에서 영역 9에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하고, (i)에서의 또 다른 RNA는 표 1에서 영역 4에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하며, (ii)에서의 RNA는 서열번호:57에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열을 포함한다. 일 예에서, (ii)에서의 RNA는 서열번호:58에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0418] 일 예에서, (i)에서의 RNA는 표 1에서 영역 9에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하고, (i)에서의 또 다른 RNA는 표 1에서 영역 4에 의해 코딩된 RNA 전사체에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하며, 복수 내의 또 다른 RNA의 효과기 서열은 표 1에서 영역 5에 의해 코딩된 RNA 전사체이고, (ii)에서의 RNA는 서열번호:57에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열을 포함한다. 일 예에서, (ii)에서의 RNA는 서열번호:58에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0419] 본 개시내용에 따른 예시적인 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하며, 상기 효과기 서열은 표 2에서 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 효과기 보체 서열에 실질적으로 상보적이다.
- [0420] 일 예에서, 본 개시내용은 4개의 염기 미스매치를 제외하고, 표 2에서 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하는, RNA 즉 RNAi를 유발할 수 있는 RNA를 제공한다.
- [0421] 일 예에서, 본 개시내용은 3개의 염기 미스매치를 제외하고, 표 2에서 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하는, RNA 즉 RNAi를 유발할 수 있는 RNA를 제공한다.
- [0422] 일 예에서, 본 개시내용은 2개의 염기 미스매치를 제외하고, 표 2에서 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하는, RNA 즉 RNAi를 유발할 수 있는 RNA를 제공한다.
- [0423] 일 예에서, 본 개시내용은 단일 염기 미스매치를 제외하고, 표 2에서 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하는, RNA 즉 RNAi를 유발할 수 있는 RNA를 제공한다.
- [0424] 본 개시내용의 RNA가 1, 2, 3, 또는 4개의 미스매치를 제외하고 표 2에서 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하는 경우, 효과기 서열은 표 2에서의 상응하는 효과기 보

체 서열과 여전히 이합체를 형성할 수 있을 것이다.

- [0425] 일 예에서, 본 개시내용은 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA, 즉, RNAi를 유발할 수 있는 RNA를 제공하며, 상기 효과기 서열은 표 2에서 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 100% 상보적이다. 일 예에서, RNA의 효과기 보체 서열은 이의 효과기 서열에 실질적으로 상보적이다. 예를 들어, RNA의 효과기 보체 서열은 동족 효과기 서열에 대해 1, 2, 3 또는 4개의 미스매치를 포함할 수 있지만, 이들과 여전히 이합체를 형성할 수 있다.
- [0426] 본 개시내용에 따른 예시적인 RNA는 표 2에 기재된 바와 같은 상응하는 효과기 및 효과기 보체 서열을 포함한다. 일 예에서, RNA의 상응하는 효과기 및 효과기 보체 서열은 예컨대, 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 이합체화된 별개의 핵산 (dsRNA)으로 제공될 수 있다.
- [0427] 일 예에서, 본 개시내용은 RNA, 즉, RNAi를 유발할 수 있는 RNA를 제공하며, 여기서 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 상기 효과기 서열은 표 2에 “효과기”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 이루어진다. 일 예에서, 효과기 보체 서열은 표 2에서 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성된다.
- [0428] 본 개시내용의 예시적인 RNA는 하기에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열: 서열번호:47 및 서열번호:48에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0429] 본 개시내용의 예시적인 RNA는 하기에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열: 서열번호:27 및 서열번호:28에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0430] 본 개시내용의 예시적인 RNA는 하기에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열: 서열번호:29 및 서열번호:30에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0431] 본 개시내용의 예시적인 RNA는 하기에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열: 서열번호:11 및 서열번호:12에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0432] 본 개시내용의 예시적인 RNA는 하기에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열: 서열번호:45 및 서열번호:46에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0433] 본 개시내용의 예시적인 RNA는 하기에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열: 서열번호:35 및 서열번호:36에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0434] 본 개시내용의 예시적인 RNA는 하기에 제시된 서열로 이루어진 효과기 서열: 서열번호:21 및 서열번호:22에 제시된 서열로 이루어진 효과기 보체 서열을 포함한다.
- [0435] 일 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA, 즉, RNAi를 유발할 수 있는 복수의 RNA를 제공하며, 여기서 각각의 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 여기서 각각의 RNA의 효과기 서열은 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 효과기 보체 서열에 실질적으로 상보적이다. 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 효과기 보체 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하는 예시적인 RNA가 본원에 기재되어 있다.
- [0436] 일 예에서, 각각의 RNA의 효과기 서열은 표 2에 “효과기”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 이루어진다. 일 예에서, 각각의 RNA의 효과기 보체 서열은 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 이루어진다.
- [0437] 일 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA, 즉, RNAi를 유발할 수 있는 복수의 RNA를 제공하며, 여기서:
- [0438] (i) 적어도 하나의 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 여기서 RNA의 효과기 서열은 표 2에 “효과기”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성되며 (일 예에서, 각각의 RNA의 효과기 보체 서열은 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성됨); 및
- [0439] (ii) 적어도 하나의 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 여기서 RNA의 효과기 서열은 표 4에 “효과기”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성된다 (일 예에서, 각각의 RNA의 효과기 보체 서열은 표 4에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성됨).
- [0440] 본 개시내용의 예시적인 복수의 RNA는 하기를 포함한다:
- [0441] (i) 하기에 제시된 서열로 이루어지는 효과기 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:47 및 서열번호:48에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열; 및

- [0442] (ii) 하기에 제시된 서열로 이루어지는 효과기 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:27 및 서열번호:28에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열.
- [0443] 본 개시내용의 예시적인 복수의 RNA는 하기를 포함한다:
- [0444] (i) 하기에 제시된 서열로 이루어지는 효과기 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:47 및 서열번호:48에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열;
- [0445] (ii) 하기에 제시된 서열로 이루어지는 효과기 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:27 및 서열번호:28에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열; 및
- [0446] (iii) 하기에 제시된 서열로 이루어지는 효과기 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:29 및 서열번호:30에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열.
- [0447] 본 개시내용의 예시적인 복수의 RNA는 하기를 포함한다:
- [0448] (i) 하기에 제시된 서열로 이루어지는 효과기 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:47 및 서열번호:48에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열;
- [0449] (ii) 하기에 제시된 서열로 이루어지는 효과기 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:27 및 서열번호:28에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열; 및
- [0450] (iii) 하기에 제시된 서열로 이루어지는 효과기 서열을 포함하는 RNA: 서열번호:57 및 서열번호:58에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열.
- [0451] 본 개시내용의 RNA는 합성적 RNA 또는 DNA-지향 RNA (ddRNA) 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 합성적 RNA는 본 기술분야에서 공지된 방법에 의해, 예컨대 전형적인 올리고뉴클레오타이드 합성에 의해 제조될 수 있고, siRNA 제제의 반감기 및/또는 효능을 증가시키고/시키거나 보다 강한 전달 제형을 가능하게 하는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 많은 화학적 변형은 본 기술분야에 공지되어 있으며 잘 기재되어 있다.
- [0452] 일 예에서, 본 개시내용의 RNA의 실질적으로 모든 뉴클레오타이드가 변형된다. 다른 예에서, 본 개시내용의 RNA의 모든 뉴클레오타이드가 변형된다. "실질적으로 모든 뉴클레오타이드가 변형된" 본 개시내용의 RNA는 완전히 변형되는 것이 아니라 주로 변형되며 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0453] 일 예에서, 본 개시내용의 RNA는 이합체의 하나 또는 두 가닥의 3'-말단, 5'-말단, 또는 양 말단에 하나 이상의 오버행 영역 및/또는 캡핑 그룹을 포함한다. 오버행 영역은 1-6개 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어 2-6개 뉴클레오타이드 길이, 1-5개 뉴클레오타이드 길이, 2-5개 뉴클레오타이드 길이, 1-4개 뉴클레오타이드 길이, 2-4개 뉴클레오타이드 길이, 1-3개 뉴클레오타이드 길이, 2-3개 뉴클레오타이드 길이, 또는 1-2개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 오버행은 한 가닥이 다른 가닥보다 긴 결과일 수 있거나, 또는 동일한 길이의 가닥이 엇갈린 결과일 수 있다. 오버행은 표적 mRNA와 미스매치를 형성할 수 있거나 또는 그것은 표적화되는 유전자 서열에 상보적일 수 있거나 또는 또 다른 서열일 수 있다. 제1 및 제2 가닥은 또한, 예컨대, 부가적인 염기에 의해 연결되어 헤어핀을 형성할 수 있거나, 또는 다른 비-염기 링커에 의해 연결될 수 있다.
- [0454] 일 예에서, RNA의 오버행 영역 내의 뉴클레오타이드는 각각 독립적으로 변형되거나 변형되지 않은 뉴클레오타이드이며, 이는, 비제한적으로 2'-당 변형된, 예컨대 2-F, 2'-O-메틸, 티미딘 (T), 데옥시-티민 (dT), 2'-O-메톡시에틸-5-메틸우리딘 (Teo), 2'-O-메톡시에틸아데노신 (Aeo), 2'-O-메톡시에틸-5-메틸시티딘 (m5 Ceo), 및 이의 임의의 조합을 포함한다. 예를 들어, dTdT는 어느 한 가닥의 어느 한쪽 말단에 대한 오버행일 수 있다. 오버행은 표적 mRNA와 미스매치를 형성할 수 있거나 또는 그것은 표적화되는 유전자 서열에 상보적일 수 있거나 또는 또 다른 서열일 수 있다.
- [0455] RNA의 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 두 가닥의 5'- 또는 3'-오버행은 인산화될 수 있다. 일부 예에서, 오버행 영역(들)은 동일하거나 상이할 수 있는 2개의 뉴클레오타이드 사이에 포스포포티오에이트를 갖는 2개의 뉴클레오타이드를 함유한다.
- [0456] 일 예에서, RNA는 그의 전반적인 안정성에 영향을 미치지 않으면서 RNA의 간섭활성을 강화시킬 수 있는 단일 오버행만을 함유한다. 예를 들어, 단일 가닥의 오버행은 효과기 서열의 3' -말단에 또는 대안적으로, 효과기 보체 서열의 3' -말단에 위치한다. 일 예에서, RNA는 또한 효과기 보체 서열의 5'-말단 (또는 효과기 서열의

3'-말단) 또는 그 반대에 위치한 평활 말단 (blunt end)을 포함한다.

- [0457] 변형은, 예를 들어, 말단 변형, 예컨대, 5'-말단 변형 (인산화, 접합, 역 결합) 또는 3'-말단 변형 (접합, DNA 뉴클레오타이드, 역 결합 등); 염기 변형, 예컨대, 안정화 염기, 불안정화 염기, 또는 확대된 레퍼토리의 파트너와 염기쌍을 형성하는 염기를 이용한 대체, 염기 (무염기 (abasic) 뉴클레오타이드)의 제거, 또는 접합된 염기; 당 변형 (예컨대, 2'-위치 또는 4'-위치에서) 또는 당의 치환; 및/또는 포스포디에스테르 연결의 변형 또는 대체를 포함하는 백본 변형을 포함한다. 본 개시내용에서 유용한 RNA의 특정 예는, 비제한적으로 변형된 백본을 함유하거나 또는 천연 뉴클레오사이드간 연결을 함유하지 않는 RNA를 포함한다. 변형된 백본을 갖는 RNA는, 특히, 백본 내에 인 원자를 갖지 않는 RNA를 포함한다. 본 명세서의 목적을 위해, 그리고 종종 본 기술분야에서 언급되는 바와 같이, 이들의 뉴클레오사이드간 백본 내에 인 원자를 갖지 않는 변형된 RNA 역시 올리고뉴클레오사이드로 간주될 수 있다. 일부 예에서, 변형된 RNA는 그의 뉴클레오사이드간 백본 내에 인 원자를 가질 것이다. 인 함유 연결의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 미국 특허 제 7,015,315호; 제7,041,816호; 제7,273,933호; 제7,321,029호; 및 미국 특허 RE39464.
- [0458] 내부에 인 원자를 포함하지 않는 변형된 RNA 백본은 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오사이드간 연결, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오사이드간 연결, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 뉴클레오사이드간 연결에 의해 형성된 백본을 갖는다. 이들은 모폴리노 연결 (뉴클레오사이드의 당 부분으로부터 일부 형성됨); 실록산 백본; 설과이드, 설폭사이드 및 설폰 백본; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 알켄 함유 백본; 설과메이트 백본; 메틸렌아미노 및 메틸렌하이드라지노 백본; 설포네이트 및 설폰아미드 백본; 아미드 백본; 및 혼합된 N, O, S 및 CH<sub>2</sub> 성분 부분을 갖는 다른 것을 갖는 것을 포함한다. 이들 올리고뉴클레오사이드의 예시적인 형태를 교시하는 대표적인 미국 특허는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 미국 특허 제5,663,312호; 제5,633,360호; 제5,677,437호; 및 제 5,677,439호.
- [0459] 일 예에서, 본 개시내용의 RNA는, 예컨대 하기에 기재된 변형되지 않은 또는 천연 염기만을 포함한다.
- [0460] 다른 예에서, 본 개시내용의 RNA는 RNA 모방체를 포함하거나 RNA 모방체이며, 예컨대, 뉴클레오타이드 단위의 백본이 신규한 그룹으로 대체된다. 상기 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 이러한 한 가지 올리고머성 화합물인, 우수한 혼성화 특성을 갖는 것으로 나타난 RNA 모방체는 펩타이드 핵산 (PNA)으로 지칭된다. PNA 화합물에서, RNA의 당 백본은 아미드 함유 백본, 특히 아미노에틸글리신 백본으로 대체된다. 핵염기는 유지되고 백본의 아미드 부분의 아자 질소 원자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합된다. PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 미국 특허 제5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호.
- [0461] 변형된 RNA는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 본원에 특징적인 RNA, 예컨대, dsRNA는 2'-위치에 하기 중 하나를 포함할 수 있고: OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알키닐; 또는 O-알킬-O-알킬, 여기서 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환된 또는 비치환된 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알킬 또는 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알케닐 및 알키닐일 수 있다. 예시적인 적합한 변형은 O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, 및 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>를 포함하고, 여기서 n 및 m은 1 내지 약 10이다.
- [0462] RNA는 또한 핵염기 (본 기술분야에서 간단히 "염기"로도 종종 지칭됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "변형되지 않은" 또는 "천연" 핵염기는 퓨린 염기 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 염기 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 변형된 핵염기는 다른 합성적 및 천연 핵염기, 예컨대 데옥시-티민 (dT), 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (유사우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-다아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함한다. \*
- [0463] RNA는 또한 하나 이상의 잠긴 핵산 (locked nucleic acid; LNA)을 포함하도록 변형될 수 있다. 잠긴 핵산은 리보스 모이어티가 2' 및 4' 탄소를 연결하는 여분의 다리를 포함하는 변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드이다. 이 구조는 효과적으로 3'-엔도 구조 형태의 리보스를 "잠근다". 잠긴 핵산을 siRNA에 부가하는 것은

혈청에서의 siRNA 안정성을 증가시키고, 오프-표적 효과를 감소시키는 것으로 나타났다 (Elmen, J. 등, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1): 439-447).

- [0464] 잠재적으로 안정화시키는 RNA의 말단에 대한 변형은 N-(아세틸아미노카프로일)-4-하이드록시프롤리놀 (Hyp-C6-NHAc), N-(카프로일-4-하이드록시프롤리놀 (Hyp-C6), N-(아세틸-4-하이드록시프롤리놀 (Hyp-NHAc), 티미딘-2'-0-데옥시티미딘 (에테르), N-(아미노카프로일)-4-하이드록시프롤리놀 (Hyp-C6-아미노), 2-도코사노일-우리딘-3'--포스페이트, 역전된 염기 dT(idT) 등을 포함할 수 있다. 이 변형의 개시내용은 하기에서 발견될 수 있다: PCT 공개 제WO 2011/005861호.
- [0465] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 예시적인 RNA (예컨대, 표 2 및/또는 표 4에 제시된 바와 같음)는 각각의 RNA가 단일 연속 서열을 형성하도록 효과기 서열 및 효과기 보체 서열 사이에 위치한 스템 루프 서열을 포함하는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)로서 제공될 수 있다. 스템 루프 서열은 효과기 서열 및 효과기 보체 서열이 서로 어닐링할 수 있게 하는 충분한 길이이다. 적합한 스템 루프 서열은, 예를 들어 본 기술분야에 공지된 것으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용에 따른 shRNA는, 선택적으로 본원에 기재된 바와 같이 변형된, 표 3에 제시된 서열을 포함할 수 있다.
- [0466] 일 예에서, 본 개시내용의 RNA는 화학적으로 합성된다. 올리고뉴클레오타이드 (예컨대, 특정 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드가 결합된 올리고뉴클레오타이드의 부분)는, 예를 들어 하기에 기재된 바와 같이 본 기술분야에서 공지된 프로토콜을 사용하여 합성된다: Caruthers 등, 1992, *Methods in Enzymology* 211, 3-19, WO 99/54459, Wincott 등, 1995, *Nucleic Acids Res.*23, 2677-2684, Wincott 등, 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59, Brennan 등, 1998, *Biotechnol Bioeng.*, 61, 33-45, and Brennan, 미국 특허 제6,001,311호. 올리고뉴클레오타이드의 합성은 5'-말단에 디메톡시트리틸, 및 3'-말단에 포스포르아미다이트와 같은, 일반적인 핵산 보호 및 결합 그룹을 사용한다.
- [0467] 변형되지 않은 RNA는 하기 문헌에 기재된 바와 같은 절차를 사용하여 합성된다: Usman 등, 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7845; Scaringe 등, 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 5433. 이러한 합성은 본 개시내용의 특정 RNA에 사용될 수 있는 5'-말단의 디메톡시트리틸, 및 3'-말단의 포스포르아미다이트와 같은, 일반적인 핵산 보호 및 결합 그룹을 사용한다.
- [0468] 특정 예에서, 본 개시내용의 RNA는 하기에 기재된 방법에 따라 합성되고, 탈보호화되고, 분석된다: 미국 특허 제6,995,259호, 제6,686,463호, 제6,673,918호, 제6,649,751호, 및/또는 제6,989,442호.
- [0469] 대안적인 예에서, 본 개시내용의 RNA는 개별 성분으로서 합성되고, 예를 들어, 하기에 의해 합성후에 연결된다: 라이케이션에 의해 (Moore 등, 1992, *Science* 256, 9923 또는 WO 93/23569), 또는 합성 및 탈보호 후 혼성화에 의해.
- [0470] 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다. 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:95에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다.
- [0471] 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다.
- [0472] 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다. 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:82에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다.
- [0473] 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:65에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다. 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:68에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다.
- [0474] 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:91에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다. 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:94에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다.
- [0475] 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:83에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다. 일 예에서, 예시적인 shRNA는 서열번호:84에 제시된 서열을 포함하거나 구성된다.
- [0476] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0477] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:95에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다. 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를

포함한다.

- [0478] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0479] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:82에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0480] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:65에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0481] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:68에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0482] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:91에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0483] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:94에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0484] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:83에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0485] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 서열번호:84에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0486] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 하기를 포함한다:
- [0487] (i) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA;
- [0488] (ii) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA; 및
- [0489] (iii) 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA.
- [0490] 일 예에서, 본 개시내용의 다른 RNA는 서열번호:79, 82, 65, 68, 91, 94, 83 또는 84에 제시된 서열을 포함하는 shRNA이다.
- [0491] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 하기를 포함하거나 구성된다:
- [0492] (i) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA;
- [0493] (ii) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA; 및
- [0494] (iii) 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA.
- [0495] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 제공하며, 상기 복수는 하기를 포함하거나 구성된다:
- [0496] (i) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA;
- [0497] (ii) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA; 및
- [0498] (iii) 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA.
- [0499] *ddRNAi*
- [0500] 본 개시내용의 RNA는 핵산으로부터 전사될 수 있다. 따라서, 일 예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 RNA를 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0501] 일 예에서, 핵산은 DNA이다.
- [0502] 또 다른 예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 복수의 RNA를 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0503] 또 다른 예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 복수의 RNA를 코딩하는 복수의 핵산을 제공한다. 예를 들어, 상기 복수 중 각각의 핵산은 본원에 기재된 단일 RNA를 코딩할 수 있다. 또 다른 예에서, 하나 이상의 핵산은 복수의 RNA를 코딩하고, 예컨대, 상기 복수 중 하나의 핵산은 본 개시내용의 둘 이상의 RNA를 코딩하며, 상기 복수 중 또 다른 핵산은 본 개시내용의 하나 이상의 RNA를 코딩한다.

- [0504] 일 예에서, 본원에 기재된 복수의 핵산은, 예컨대 단일 조성물에서 함께 제공된다.
- [0505] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 복수의 핵산은 다수의 성분, 예컨대, 다수의 조성물로서 제공된다. 예를 들어, 복수 중 각각의 핵산은 별개로 제공될 수 있다. 대안적으로, 본 개시내용의 적어도 3개의 핵산이 제공되는 예에서, 핵산 중 적어도 하나는 별개로 제공될 수 있고, 복수 중 둘 이상은 함께 제공될 수 있다.
- [0506] 일부 예에서, 본 개시내용의 핵산은 예컨대, RNA의 전사를 용이하게 하는 하나 이상의 부가적인 요소를 포함한다. 예를 들어, 핵산은 본 개시내용의 RNA를 코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 다른 요소, 예컨대, 전사 종결자는 본 기술분야에 공지되어 있고/있거나 본원에 기재되어 있다.
- [0507] 일 예에서, 핵산은 DNA-지향 RNAi (ddRNAi) 작제물이다.
- [0508] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 RNA를 코딩하는 서열을 포함한다.
- [0509] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 본 개시내용의 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하는 RNA를 코딩하는 서열을 포함한다. 예시적인 효과기 서열 및 효과기 보체 서열은 표 2에 제시되어 있다.
- [0510] 예를 들어, 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일 예에서, 두 개의 서열은 동일한 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일 예에서, 두 개의 서열은 상이한 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0511] 일 예에서, 본 개시내용은 효과기 서열을 코딩하는 서열 및 효과기 보체 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 효과기 서열은 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 효과기 보체 서열에 실질적으로 상보적이다. 예를 들어, 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 효과기 보체 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열은 표 2에서 상응하는 효과기 보체 서열과 이합체화될 때 0, 1, 2, 3 또는 4개의 미스매치를 포함할 수 있다.
- [0512] 일 예에서, 본 개시내용은 4개의 염기 미스매치를 제외하고, 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공한다.
- [0513] 일 예에서, 본 개시내용은 3개의 염기 미스매치를 제외하고, 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공한다.
- [0514] 일 예에서, 본 개시내용은 2개의 염기 미스매치를 제외하고, 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공한다.
- [0515] 일 예에서, 본 개시내용은 단일 염기 미스매치를 제외하고, 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공한다.
- [0516] 일 예에서, 본 개시내용은 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 효과기 서열은 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 100% 상보적이다. 일 예에서, ddRNAi 작제물은 ddRNAi 작제물에 의해 코딩된 효과기 서열에 실질적으로 상보적인 효과기 보체 서열을 코딩하는 서열을 포함한다.
- [0517] 본 개시내용의 예시적인 ddRNAi 작제물은 표 2에 기재된 바와 같은 상응하는 효과기 및 효과기 보체 서열을 코딩하는 서열을 포함한다.
- [0518] 일 예에서, 본 개시내용은 효과기 서열을 코딩하는 서열 및 효과기 보체 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 효과기 서열은 표 2에서 “효과기”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 이루어진다. 일 예에서, 효과기 보체 서열은 표 2에서 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성된다.
- [0519] 본 개시내용의 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: 서열번호:47에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열 및 서열번호:48에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열.
- [0520] 본 개시내용의 또 다른 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: 서열번호:27에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열 및 하기에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열: 서열번호:28.
- [0521] 본 개시내용의 추가의 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: 서열번호:29에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열 및 서열번호:30에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열.
- [0522] 본 개시내용의 추가의 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: 서열번호:11에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열 및 서열번호:12에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열.

- [0523] 본 개시내용의 추가의 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: 서열번호:45에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열 및 서열번호:46에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열.
- [0524] 본 개시내용의 추가의 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: 서열번호:35에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열 및 서열번호:36에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열.
- [0525] 본 개시내용의 추가의 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: 서열번호:21에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열 및 서열번호:22에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열을 코딩하는 서열.
- [0526] 또 다른 예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 복수의 RNA를 코딩하거나 또는 본 개시내용의 RNA 및 RNAi를 유발할 수 있는 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공한다.
- [0527] 일 예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 복수의 RNA를 코딩하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 여기서 각각의 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 여기서 적어도 하나의 (또는 각각의) RNA의 효과기 서열은 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 실질적으로 상보적이다. 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 기재된 서열에 “실질적으로 상보적인” 효과기 서열을 포함하는 본 개시내용의 예시적인 RNA는 기재되었고, 본 개시내용의 본 실시예에 준용되는 것으로 간주될 것이다. 그러나, 일 예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 복수의 RNA를 코딩하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 여기서 각각의 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 여기서 적어도 하나의 (또는 각각의) RNA의 효과기 서열은 표 2에 “효과기”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성된다. 일 예에서, 적어도 하나의 (또는 각각의) RNA의 효과기 보체 서열은 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성된다.
- [0528] 일 예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 복수의 RNA를 코딩하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 여기서:
- [0529] (i) 적어도 하나의 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 여기서 RNA의 효과기 서열은 표 2에 “효과기”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성되며 (일 예에서, 각각의 RNA의 효과기 보체 서열은 표 2에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성됨); 및
- [0530] (ii) 적어도 하나의 RNA는 효과기 서열 및 효과기 보체 서열을 포함하고, 여기서 RNA의 효과기 서열은 표 4에 “효과기”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성된다 (일 예에서, 각각의 RNA의 효과기 보체 서열은 표 4에 “효과기 보체”로 표시된 컬럼에 제시된 서열로 구성됨).
- [0531] RNA의 예시적인 조합이 본원에 기재되어 있으며 이는 본 개시내용의 본 실시예에 준용되는 것으로 간주될 것이다.
- [0532] 본 개시내용의 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:
- [0533] (i) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 서열: 서열번호:47에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:48에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열; 및
- [0534] (ii) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 서열: 서열번호:27에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:28에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열.
- [0535] 본 개시내용의 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:
- [0536] (i) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 서열: 서열번호:47에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:48에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열;
- [0537] (ii) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 서열: 서열번호:27에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:28에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열; 및
- [0538] (iii) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 서열: 서열번호:29에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:30에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열.
- [0539] 예를 들어, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 5' - 3' 방향으로 하기를 포함할 수 있다:
- [0540] (i) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 DNA 서열: 서열번호:27에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:28에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열;
- [0541] (ii) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 DNA 서열: 서열번호:29에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:30에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열; 및

- [0542] (iii) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 DNA 서열: 서열번호:47에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:48에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열.
- [0543] ddRNAi 작제물에서 (i) 내지 (iii)에서의 RNA를 코딩하는 DNA 서열 각각은 또한 ddRNAi 작제물에서 별개의 프로모터, 예컨대, U6 또는 H1 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0544] 본 개시내용의 또 다른 예시적인 ddRNAi는 하기를 포함한다:
- [0545] (i) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 서열: 서열번호:47에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:48에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열;
- [0546] (ii) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 서열: 서열번호:27에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:28에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열; 및
- [0547] (iii) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 서열: 서열번호:57에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:58에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열.
- [0548] 예를 들어, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 5' - 3' 방향으로 하기를 포함할 수 있다:
- [0549] (i) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 DNA 서열: 서열번호:27에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:28에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열;
- [0550] (ii) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 DNA 서열: 서열번호:57에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:58에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열; 및
- [0551] (iii) 하기를 포함하는 RNA를 코딩하는 DNA 서열: 서열번호:47에 제시된 서열로 구성되는 효과기 서열 및 서열번호:48에 제시된 서열로 구성되는 효과기 보체 서열.
- [0552] ddRNAi 작제물에서 (i) 내지 (iii)에서의 RNA를 코딩하는 DNA 서열 각각은 또한 ddRNAi 작제물에서 별개의 프로모터, 예컨대, U6 또는 H1 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0553] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 shRNA를 코딩하는 서열을 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 프로모터, 예컨대, U6 또는 H1 프로모터에 작동가능하게 연결된 표 3에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함한다.
- [0554] 예를 들어, ddRNAi 작제물은 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0555] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 서열번호:95에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0556] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0557] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0558] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 서열번호:82에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0559] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 서열번호:65에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0560] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 서열번호:68에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0561] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 서열번호:91에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0562] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 서열번호:94에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0563] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 서열번호:83에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함

할 수 있다.

- [0564] 일 예에서, ddRNAi 작제물은 서열번호:84에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0565] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 표 3에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다. 예를 들어, 다른 RNA는 shRNA, 예컨대, 표 3 또는 표 5에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA일 수 있다.
- [0566] 일 예에서, 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다. 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:95에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0567] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0568] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0569] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:82에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0570] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:65에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0571] 일 예에서, 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:68에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0572] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:91에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0573] 일 예에서, 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:94에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0574] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:83에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0575] 일 예에서, 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 서열번호:84에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA 및 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 포함한다.
- [0576] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 하기를 포함한다:
- [0577] (i) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA;
- [0578] (ii) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA; 및
- [0579] (iii) 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA.
- [0580] 일 예에서, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물에 의해 코딩된 다른 RNA는 서열번호:79, 82, 65, 68, 91, 94, 83 또는 84에 제시된 서열을 포함하는 shRNA이다.
- [0581] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 하기를 포함한다:
- [0582] (i) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA;
- [0583] (ii) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA; 및

- [0584] (iii) 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA.
- [0585] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 하기를 포함한다:
- [0586] (i) 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA;
- [0587] (ii) 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA; 및
- [0588] (iii) 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA.
- [0589] 상기에 논의된 바와 같이, ddRNAi 작제물은 일반적으로 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 RNA (예컨대, 본 개시내용의 shRNA)를 코딩하는 서열을 포함한다. 종종 ddRNAi 작제물은 벡터, 예컨대, 플라스미드 또는 미니플라스미드 또는 바이러스 벡터 내에 있다.
- [0590] 일 예에서, ddRNAi 작제물에서 복수의 RNA (예컨대, shRNA)를 코딩하는 서열은 동일한 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 상기 작제물은 동일한 프로모터의 다수의 카피를 포함할 수 있고, 각 카피는 본 개시내용의 상이한 RNA를 코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0591] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 RNA에 작동가능하게 연결된 각각의 프로모터는 상이하다. 예를 들어, 3개의 RNA (예컨대, 3개의 shRNA)를 코딩하는 ddRNAi 작제물에서, 상기 RNA를 코딩하는 3개의 서열은 각각 상이한 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0592] 추가의 예에서, 3개 이상의 RNA (예컨대, shRNA)를 코딩하는 ddRNAi 작제물에서, 상기 RNA를 코딩하는 서열 중 2개 (또는 이상)는 동일한 프로모터에 연결되고, 상기 RNA를 코딩하는 서열 중 1개 (또는 이상)는 상이한 프로모터에 연결된다.
- [0593] 일 예에서, 프로모터 항시적 프로모터이다. 프로모터와 관련하여 용어 "항시적"은 프로모터가 특정 자극 (예컨대, 열 충격, 화합물, 빛 등)의 부재하에 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 전사를 유도할 수 있다는 것을 의미한다. 전형적으로, 항시적 프로모터는 실질적으로 임의의 세포 및 임의의 조직에서 코딩 서열의 발현을 유도할 수 있다. 본 개시내용의 RNA를 전사하는데 사용되는 프로모터는 RNA 중합효소 II에 의해 제어되는 유비퀴틴, CMV,  $\beta$ -액틴, 히스톤 H4, EF-1 $\alpha$  또는 pgk 유전자를 위한 프로모터, 또는 RNA 중합효소 I에 의해 제어되는 프로모터 요소를 포함한다.
- [0594] 일 예에서, Pol II 프로모터, 예컨대 CMV, SV40, U1,  $\beta$ -액틴 또는 하이브리드 Pol II 프로모터가 사용된다.
- [0595] 또 다른 예에서, RNA 중합효소 III에 의해 제어되는 프로모터, 예컨대 U6 프로모터 (U6-1, U6-8, U6-9), H1 프로모터, 7SL 프로모터, 인간 Y 프로모터 (hY1, hY3, hY4 (Marais, 등, *Nucleic Acids Res* 22(15): 3045-52(1994) 참고) 및 hY5 (Marais, 등, *Nucleic Acids Res* 24(18): 3552-59(1994) 참고), 인간 MRP-7-2 프로모터, 아데노바이러스 VA1 프로모터, 인간 tRNA 프로모터, 또는 5s 리보솜 RNA 프로모터가 사용된다.
- [0596] 본 개시내용의 ddRNAi 작제물에서 사용하기 위한 적합한 프로모터는 하기에 기재되어 있다: 미국 특허 제 8,008,468호 및 미국 특허 제8,129,510호.
- [0597] 일 예에서, 프로모터는 RNA pol III 프로모터이다. 예를 들어, 프로모터는 U6 프로모터이다. 또 다른 예에서, 프로모터는 H1 프로모터이다.
- [0598] 본 개시내용의 복수의 RNA (예컨대, 본 개시내용의 shRNA)를 코딩하는 ddRNAi 작제물의 경우, RNA 중 적어도 하나를 코딩하는 서열은 U6 프로모터에 작동가능하게 연결되고 RNA 중 적어도 하나의 다른 것을 코딩하는 서열은 H1 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0599] 본 개시내용의 3개의 RNA (예컨대, 본 개시내용의 shRNA)를 코딩하는 ddRNAi 작제물의 경우, RNA 중 2개를 코딩하는 서열은 U6 프로모터에 작동가능하게 연결되고 RNA 중 다른 것을 코딩하는 서열은 H1 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 5' 에서 3' 방향으로 고려할 때, 제1 및 제3 서열은 U6 프로모터에 작동가능하게 연결되고 제2 서열은 H1 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0600] 또 다른 예에서, RNA 중 2개를 코딩하는 서열은 각각 H1 프로모터에 작동가능하게 연결되고 RNA 중 다른 것을 코딩하는 서열은 U6 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 5' 에서 3' 방향으로 고려할 때, 제1 및 제3 서열은 H1 프로모터에 작동가능하게 연결되고 제2 서열은 U6 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

- [0601] 일 예에서, 작제물 내의 프로모터는 U6 프로모터이다. 예를 들어, 프로모터는 U6-1 프로모터이다. 예를 들어, 프로모터는 U6-8 프로모터이다. 예를 들어, 프로모터는 U6-9 프로모터이다.
- [0602] 일부 예에서, 가변적인 길이의 프로모터가 사용된다. 예를 들어, 2개 이상의 강한 프로모터 (예컨대, Pol III-유형 프로모터)의 사용은 예컨대, 전사에 필요한 이용가능한 뉴클레오타이드 또는 다른 세포 성분의 집단을 고갈시킴으로써, 세포에 부담을 지울 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 몇 개의 강한 프로모터의 사용은 세포에서 RNAi 제제의 발현의 독성 수준을 유발할 수 있다. 따라서, 일부 예에서 다중-프로모터 ddRNAi 작제물에서 하나 이상의 프로모터는 작제물에서 다른 프로모터보다 더 약하거나, 또는 작제물에서 모든 프로모터는 최대 비율 미만으로 RNA를 발현할 수 있다. 프로모터는 또한 다양한 분자 기술을 사용하여, 또는 예컨대, 다양한 조절 요소의 변형을 통해 변형되어, 전사의 더 약한 수준 또는 더 강한 수준을 달성할 수 있다. 감소된 전사를 달성하는 한 가지 수단은 프로모터 활성을 제어하는 것으로 공지된 프로모터 내의 서열 요소를 변형시키는 것이다. 예를 들어, 근접 서열 요소 (PSE)는 인간 U6 프로모터의 활성화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Domitrovich, 등, *Nucleic Acids Res* 31: 2344-2352 (2003)). 강한 프로모터, 예컨대 인간 U6-1, U6-8 또는 U6-9 프로모터 내에 존재하는 PSE 요소를 약한 프로모터, 예컨대 인간 U6-7 프로모터로부터의 요소로 대체하는 것은 하이브리드 U6-1, U6-8 또는 U6-9 프로모터의 활성을 감소시킨다. 이 접근법은 본 출원에 기재된 실시예에서 사용되었지만, 이 결과를 달성하는 다른 수단이 본 기술분야에 공지되어 있다.
- [0603] 본 개시내용의 일부 예에서 유용한 프로모터는 조직-특이적 또는 세포-특이적일 수 있다. 프로모터에 적용될 때 용어 "조직 특이적"은 상이한 유형의 조직 (예컨대, 근육)에서 관심있는 동일한 뉴클레오타이드 서열의 발현의 상대적 부재하에 관심있는 핵산의 선택적 전사를 특정 유형의 조직 (예컨대, 간 조직)으로 유도할 수 있는 프로모터를 지칭한다. 프로모터에 적용될 때 용어 "세포-특이적"은 동일한 조직 내에서 상이한 유형의 세포에서 관심있는 동일한 뉴클레오타이드 서열의 발현의 상대적 부재하에 특정 유형의 세포에서 관심있는 핵산의 선택적 전사를 유도할 수 있는 프로모터를 지칭한다.
- [0604] 일 예에서, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 RNA(들)의 발현을 증가시키는 하나 이상의 인헨서를 부가적으로 포함할 수 있다. 본 개시내용의 예에서 사용하기 위한 적절한 인헨서는 Apo E HCR 인헨서, CMV 인헨서 (Xia *et al*, *Nucleic Acids Res* 31-17(2003)), 및 본 기술분야의 숙련자에게 공지된 다른 인헨서를 포함한다. 본 개시내용의 ddRNAi 작제물에서 사용하기 위한 적합한 인헨서는 하기에 기재되어 있다: 미국 특허 제8,008,468호.
- [0605] 추가의 예에서, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 본 개시내용의 RNA를 코딩하는 핵산에 연결된 전사 종결자를 포함할 수 있다. 다수의 RNA를 코딩하는 ddRNAi 작제물의 경우, 각 핵산에 연결된 종결자는 동일하거나 상이할 수 있다. 일 예에서, 종결자는 4개 이상 또는 5개 이상 또는 6개 이상의 T 잔기의 연속적인 구간이다.
- [0606] 일부 예에서, 상이한 프로모터가 사용되는 경우, 종결자는 상이할 수 있고, 종결자가 유래된 유전자로부터의 프로모터에 매치된다. 이러한 종결자는 SV40 poly A, AdV VA1 유전자, 5S 리보솜 RNA 유전자, 및 인간 t-RNA를 위한 종결자를 포함한다. 또한, 프로모터 및 종결자는 RNA pol II 프로모터 및 종결자를 이용하여 일반적으로 수행되는 바와 같이, 혼합되거나 매치될 수 있다.
- [0607] 일 예에서, 다수의 RNA를 코딩하는 ddRNAi 작제물에서 각 프로모터/RNA 코딩 서열/종결자 성분 내의 프로모터 및 종결자는 성분들 간의 DNA 재조합 사건의 가능성을 감소시키기 위해 모두 상이하다.
- [0608] 일 예에서, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 U6 프로모터에 작동가능하게 연결되고 적어도 4개의 티미딘 잔기 예컨대, 하기를 포함하는 종결자에 연결된 본 개시내용의 RNA를 코딩하는 서열을 포함한다: 4 또는 5 또는 6개의 티미딘 잔기. 일 예에서, RNA를 코딩하는 서열은 또한 단일 구아닌을 포함하는 전사 개시자에 연결된다.
- [0609] 일 예에서, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 프로모터, 예컨대, U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 표 3에 제시된 서열로 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함한다. 일 예에서, shRNA를 코딩하는 서열은 종결자, 예컨대, 적어도 4개의 티미딘 잔기, 예컨대 4 또는 5 또는 6개의 티미딘 잔기를 포함하는, 종결자에 연결된다. 일 예에서, shRNA를 코딩하는 서열은 전사 개시자, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 연결된다.
- [0610] 하나의 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함한다: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 서열.
- [0611] 또 다른 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기에 작동가능하게 연결된 하기에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함한다: 서열번호:78: U6 프로모터 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결

자. 또 다른 예시적인 ddRNAi 작제물은 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함한다: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자. 또 다른 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 (i) 프로모터, 예컨대, U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 표 3에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열, 및 (ii) 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열을 포함한다. 일 예에서, (i)에서의 서열은, 예컨대, 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자에 연결된다. 일 예에서, (i)에서의 서열은, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 연결된다. 일 예에서, (i)에서의 서열은, 예컨대, 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자에 연결되고, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 연결된다. 일 예에서, (ii)에서의 서열은, 예컨대, 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자에 연결된다. 일 예에서, (ii)에서의 서열은, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 연결된다. 일 예에서, (i) 및 (ii)에서의 서열은, 예컨대, 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자에 각각 연결된다. 일 예에서, (i) 및 (ii)에서의 서열은, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 각각 연결된다. 일 예에서, (i) 및 (ii)에서의 서열은, 예컨대, 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자에 연결되고, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 각각 연결된다.

[0612] 일 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및 (ii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열. 일 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및 (ii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열.

[0613] 일 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및 (ii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열.

[0614] 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:

[0615] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자;

[0616] (ii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및

[0617] (iii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열.

[0618] 일 예에서, (iii)에서의 다른 RNA는 표 3 또는 5에 제시된 shRNA이다.

[0619] 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi를 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:

[0620] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자;

[0621] (ii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결

자; 및

- [0622] (iii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자.
- [0623] 예를 들어, 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi를 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 5'에서 3' 방향으로 하기를 포함한다:
- [0624] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자;
- [0625] (ii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및
- [0626] (iii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자.
- [0627] 복수의 RNA를 코딩하는 본 개시내용의 예시적인 ddRNAi 작제물은 서열번호:105에 제시된 서열을 포함한다.
- [0628] 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi를 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:
- [0629] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자;
- [0630] (ii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및
- [0631] (iii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자.
- [0632] 예를 들어, 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi를 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 5'에서 3' 방향으로 하기를 포함한다:
- [0633] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자;
- [0634] (ii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및
- [0635] (iii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자.
- [0636] 복수의 RNA를 코딩하는 본 개시내용의 예시적인 ddRNAi 작제물은 서열번호:106에 제시된 서열을 포함한다.
- [0637] 또 다른 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 (i) 프로모터, 예컨대, U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 표 3에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열, 및 (ii) 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열을 포함한다. 일 예에서, (i)에서의 서열은, 예컨대, 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자에 연결된다. 일 예에서, (i)에서의 서열은, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 연결된다. 일 예에서, (i)에서의 서열은, 예컨대, 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자에 연결되고, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 연결된다. 일 예에서, (ii)에서의 서열은, 예컨대, 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자에 연결된다. 일 예에서, (ii)에서의 서열은, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 연결된다. 일 예에서, (i) 및 (ii)에

서의 서열은 예컨대, 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자에 각각 연결된다. 일 예에서, (i) 및 (ii)에서의 서열은, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 각각 연결된다. 일 예에서, (i) 및 (ii)에서의 서열은, 예컨대, 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자에 연결되고, 예컨대, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자에 각각 연결된다.

- [0638] 일 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및 (ii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열. 일 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및 (ii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열.
- [0639] 일 예에서, 본 개시내용은 복수의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다: (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및 (ii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열.
- [0640] 또 다른 예에서, 본 개시내용은 RNA 즉, RNAi를 유발할 수 있는 RNA를 각각 코딩하는 복수의 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수에서 ddRNAi 작제물 중 적어도 하나는 본 개시내용의 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물이다. 예를 들어, 상기 복수 중 적어도 하나의 ddRNAi 작제물은 프로모터, 예컨대, U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 표 3에 기재된 shRNA를 코딩하는 서열을 포함한다.
- [0641] 일 예에서, 본 개시내용은 2개 이상의 ddRNAi 작제물을 포함하는 복수의 ddRNAi 작제물을 제공하며, 각각은 본 개시내용의 RNA를 코딩하는 서열을 포함한다. 예를 들어, 상기 복수 중 각각의 ddRNAi 작제물은 프로모터, 예컨대, U6 프로모터에 작동가능하게 연결된 표 3에 기재된 shRNA를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0642] 일 예에서, 복수의 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:
- [0643] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 서열; 및
- [0644] (ii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물; 또는
- [0645] (iii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자.
- [0646] 일 예에서, 복수의 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:
- [0647] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및
- [0648] (ii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물; 또는
- [0649] (iii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자.
- [0650] 또 다른 예에서, 복수의 ddRNAi 작제물은 하기를 포함한다:
- [0651] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을

포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및

[0652] (ii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물; 또는

[0653] (iii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자.

[0654] 본 개시내용은 또한 복수의 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 하기를 포함한다:

[0655] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자;

[0656] (ii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및

[0657] (iii) 프로모터 및 적어도 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자 및 선택적으로 전사 개시자 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 적어도 하나의 다른 RNA를 코딩하는 서열을 포함하는, ddRNAi 작제물.

[0658] 본 개시내용은 또한 복수의 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 하기를 포함한다:

[0659] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자;

[0660] (ii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및

[0661] (iii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:79에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자.

[0662] 본 개시내용은 또한 복수의 ddRNAi 작제물을 제공하며, 상기 복수는 하기를 포함한다:

[0663] (i) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:92에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 티미딘 잔기를 포함하는 종결자;

[0664] (ii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:78에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터 및 6개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자; 및

[0665] (iii) 하기에 작동가능하게 연결된 서열번호:101에 제시된 서열을 포함하거나 구성되는 shRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 ddRNAi 작제물: U6 프로모터, 단일 구아닌 잔기를 포함하는 전사 개시자 서열 및 5개의 연속적인 티미딘 잔기를 포함하는 종결자.

[0666] 또한, 상기 또는 각각의 ddRNAi 작제물은 프로모터, RNA 코딩 서열 및/또는 종결자 요소가 쉽게 제거되거나 대체되도록, 전략적으로 위치한 하나 이상의 다중 클로닝 부위 및/또는 독특한 제한 부위를 포함할 수 있다. 상기 또는 각각의 ddRNAi 작제물은 전략적으로 위치한 제한 부위 및/또는 상보적인 접착성 말단을 사용하여 더 작은 올리고뉴클레오타이드 성분으로부터 조립될 수 있다. 본 개시내용에 따른 한 가지 접근법을 위한 기본 벡터는 모든 부위가 독특한 (이것이 절대 요건은 아님에도 불구하고) 다중링커를 갖는 플라스미드를 포함한다. 연속적으로, 각각의 프로모터는 그의 지정된 독특한 부위 사이에 삽입되어 하나 이상의 프로모터를 갖는 기본 카세트 생성하며, 이들 모두는 가변적인 배향을 가질 수 있다. 연속적으로, 다시, 어닐링된 프라이머 쌍은 각각의 개별적인 프로모터의 다운스트림에 있는 독특한 부위 내로 삽입되어, 단일-, 이중- 또는 다중-발현 카세트 작제물을 생성한다. 상기 삽입물은 단일-, 이중- 또는 다중-발현 카세트 삽입물에 축적하는 2개의 독특한 제한 효소 부위 (동일하거나 상이한 것)를 사용하여, 예컨대 AdV 백본 내로 이동될 수 있다.

[0667] 상기 또는 각각의 작제물의 생성은 비제한적으로 PCR의 표준 기술, 올리고뉴클레오타이드 합성, 제한 엔도뉴클

레아제 소화, 라이게이션, 형질전환, 플라스미드 정제, 및 DNA 시퀀싱을 포함하는, 본 기술분야에서 공지된 임의의 적합한 유전적 조작 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 상기 또는 각각의 작제물이 바이러스 작제물인 경우, 상기 작제물은, 예를 들어, ddRNAi 작제물을 바이러스 입자 내로 패키징하는데 필요한 서열 및/또는 ddRNAi 작제물을 표적 세포 계층 내로 통합하는 것을 허용하는 서열을 포함한다. 일부 예에서, 상기 또는 각각의 바이러스 작제물은 부가적으로 바이러스의 복제 및 증식을 허용하는 유전자를 함유하지만, 이러한 유전자는 도중에 공급될 것이다. 또한, 상기 또는 각각의 바이러스 작제물은 천연 형태로 혼입되거나 변형된 임의의 공지된 유기체의 계층으로부터의 유전자 또는 유전적 서열을 함유할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 작제물은 박테리아에서 작제물의 복제에 유용한 서열을 포함할 수 있다.

[0668] 상기 또는 각각의 작제물은 또한 부가적인 유전적 요소를 함유할 수 있다. 작제물에 포함될 수 있는 요소의 유형은 어떤 식으로든 제한되지 않으며 본 기술분야의 숙련가에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 추가의 유전적 요소는 리포터 유전자, 예컨대 GFP 또는 RFP와 같은 형광 마커 단백질에 대한 하나 이상의 유전자; 쉽게 분석되는 효소, 예컨대 베타-갈락토시다제, 루시페라제, 베타-글루쿠로니다제, 클로람페니콜 아세틸 전달효소 또는 분비된 배아 알칼리 포스파타제; 또는 면역분석이 용이하게 이용가능한 단백질, 예컨대 호르몬 또는 사이토카인을 포함할 수 있다.

[0669] 본 개시내용의 구현예에서 유용할 수 있는 다른 유전적 요소는 세포에 선택적 성장 이점을 제공하는 단백질을 코딩하는 것, 예컨대 아데노신 탈아미노효소, 아미노글리코사이드 포스포트랜스퍼라제, 디하이드로폴레이트 환원효소, 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제, 약물 내성, 또는 영양요구주에서 누락된 생합성 능력을 제공하는 단백질을 코딩하는 유전자를 포함한다. 리포터 유전자가 상기 또는 각각의 작제물과 함께 포함되는 경우, 내부 리보솜도입 부위 (IRES) 서열이 포함될 수 있다. 일 예에서, 추가의 유전적 요소는 독립적인 프로모터/인핸서와 작동가능하게 연결되고 이에 의해 제어된다. 또한, 박테리아에서 작제물의 증식을 위한 적합한 복제 원점이 이용될 수 있다. 복제 원점의 서열은 일반적으로 ddRNAi 작제물 및 다른 유전적 서열과 구별된다. 이러한 복제 원점은 본 기술분야에서 공지되어 있으며, pUC, ColE1, 2-micron 또는 SV40 복제 원점을 포함한다.

[0670] 발현 작제물

[0671] 일 예에서, 본 개시내용의 ddRNAi 작제물은 발현 작제물 내에 포함된다.

[0672] 일 예에서, 발현 작제물은 발현 벡터이다.

[0673] 일 예에서, 발현 벡터는, 예컨대, 본 기술분야에 공지된 플라스미드이다. 일 예에서, 적합한 플라스미드 발현 벡터는, 예컨대 U6 프로모터 및 근접 서열 요소 7 (PSE7)을 갖는 pSsh 벡터이다.

[0674] 일 예에서, 발현 벡터는 미니-서클 DNA이다. 미니-서클 DNA는 하기에 기재되어 있다: 미국특허 공개 제 2004/0214329호. 미니-서클 DNA는 지속적으로 높은 수준의 핵산 전사에 유용하다. 원형 벡터는 발현-침묵 박테리아 서열이 없는 것을 특징으로 한다. 예를 들어, 미니-서클 벡터는 복제 원점이 결여되고, 박테리아 플라스미드에서 일반적으로 발견되는 약물 선별 마커, 예컨대 β-락타마제, tet 등이 결여된다는 점에서 박테리아 플라스미드 벡터와 상이하다. 그 결과, 미니서클 DNA는 크기가 더 작아져 더 효율적인 전달을 가능하게 한다.

[0675] 일 예에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터이다.

[0676] 임의의 적절한 바이러스에 기반한 바이러스 벡터는 본 개시내용의 ddRNAi를 전달하는데 사용될 수 있다. 또한, 하이브리드 바이러스 시스템이 사용될 수 있다. 바이러스 전달 시스템의 선택은 전달을 위해 표적화된 조직, 시스템의 형질도입 효율, 병원성, 면역학적 우려 및 독성 우려 등과 같은 다양한 매개변수에 좌우될 것이다.

[0677] 유전자 요법에서 사용되는 바이러스 시스템의 일반적으로 사용되는 계열은 그들의 계층이 숙주 세포 크로마틴 내로 통합되는지 (온코레트로바이러스 및 렌티바이러스) 또는 주로 염색체의 에피솜으로서 세포 핵에 지속되는지 (아데노 관련 바이러스, 아데노바이러스 및 헤르페스바이러스)에 따라 2개의 그룹으로 분류될 수 있다. 일 예에서, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 숙주 세포의 크로마틴 내로 통합된다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 외염색체 에피솜으로서 숙주 세포의 핵에 지속된다.

[0678] 일 예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 (AdV) 벡터이다. 아데노바이러스는 중간 크기의 이중 가닥의 비-피막 DNA 바이러스이며, 26-48 Kbp의 선형 계층을 갖는다. 아데노바이러스는 수용체 매개 결합 및 내재화에 의해 표적 세포로 들어가, 비-분열 및 분열 세포 모두에서 핵을 통과한다. 아데노바이러스는 생존 및 복제를 위해 숙주 세포에 크게 의존하며 숙주의 복제 기계를 사용하여 척추동물 세포의 핵에서 복제할 수 있다.

[0679] 일 예에서, 바이러스 벡터는 파르보비리대 (Parvoviridae) 계열로부터 유래된다. 파르보비리대는 작은 단일 가

닥의 비-피막 DNA 바이러스의 계열이며, 약 5000 뉴클레오타이드 길이의 게놈을 갖는다. 상기 계열 구성원 중에는 아데노 관련 바이러스 (AAV)가 포함된다. 일 예에서, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 AAV이다. AAV는 생산적인 감염 주기를 개시하고 유지하기 위해 일반적으로 또 다른 바이러스 (전형적으로 아데노바이러스 또는 헤르페스바이러스)와의 공동 감염을 필요로 하는 의존적인 파르보바이러스이다. 이러한 헬퍼 바이러스의 부재시, AAV는 수용체 매개 결합 및 내재화에 의해 표적 세포를 감염시키거나 형질도입시켜 비분열 및 분열 세포 모두에서 핵을 통과하는데 여전히 유능하다. 자손 바이러스는 헬퍼 바이러스의 부재시 AAV 감염으로부터 생산되지 않기 때문에, 형질도입의 정도는 바이러스로 감염된 초기 세포에만 한정된다. 이 특징은 AAV를 본 개시내용을 위한 바람직한 벡터로 만든다. 또한, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 헤르페스 심플렉스 바이러스와 달리, AAV는 인간 병원성 및 독성이 결여된 것으로 보인다 (Kay, 등, *Nature*. 424: 251 (2003)). 게놈은 일반적으로 2개의 유전자만을 코딩하므로, 전달 비히클로서, AAV가 4.5 단일 가닥의 킬로염기 (kb)의 패키징 능력에 의해 제한된다는 것은 놀랍지 않다. 그러나, 이 크기 제한이 대체 유전자 요법을 위해 전달될 수 있는 유전자를 제한할 수 있음에도 불구하고, 이는 더 짧은 서열, 예컨대 shRNA의 패키징 및 발현에 부정적으로 영향을 미치지 않는다.

[0680] 본 개시내용의 ddRNAi 작제물과 함께 유용한 또 다른 바이러스 전달 시스템은 계열 레트로비리대로부터의 바이러스에 기반한 시스템이다. 레트로바이러스는 2개의 독특한 특징을 특징으로 하는 단일 가닥의 RNA 동물 바이러스를 포함한다. 첫째, 레트로바이러스의 게놈은 RNA의 2개의 카피로 구성된 2배체이다. 둘째, 이 RNA는 비리온 관련 효소 역전사효소에 의해 이중 가닥의 DNA로 전사된다. 이후, 이 이중 가닥의 DNA 또는 프로바이러스는 숙주 게놈 내로 통합될 수 있고 숙주 게놈의 안정적으로 통합된 성분으로서 모 세포로부터 자손 세포로 전달될 수 있다.

[0681] 일부 예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스이다. 렌티바이러스 벡터는 종종 소낭성 스테아타이트 바이러스 당단백질 (vesicular steatitis virus glycoprotein; VSV-G)로 슈도타이핑(pseudotyping)되고, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV); 양에서 뇌염 (visna) 또는 폐렴을 유발하는 비산-마에디 (visan-maedi); 말에서 자가면역 용혈성 빈혈 및 뇌병증을 유발하는 말 감염 빈혈 바이러스 (EIAV); 고양이에서 면역 결핍을 유발하는 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV); 소에서 림프절병증 및 림프구증가증을 유발하는 소 면역결핍 바이러스 (BIV); 및 비-인간 영장류에서 면역 결핍 및 뇌병증을 유발하는 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV)로부터 유래되었다. HIV에 기반한 벡터는 일반적으로 모 게놈의 <5%를 유지하고, 게놈의 <25%는 패키징 작제물 내로 통합되며, 이는 회귀 복제-유능 HIV (reverting replication-competent HIV)의 생성 가능성을 최소화한다. 생물안정성은 다운스트림 긴-말단-반복 서열 내에 조절 요소의 결실을 함유하여 벡터 동원에 필요한 패키징 신호의 전사를 제거하는 자가 불활성화 벡터의 개발에 의해 추가로 증가되었다. 렌티바이러스 벡터의 사용의 주요 이점 중 하나는 유전자 전달이 형질도입된 세포의 세포 분열 후에도, 대부분의 조직 또는 세포 유형에서 지속된다는 것이다.

[0682] 본 개시내용의 RNA를 발현하는데 사용되는 렌티바이러스 기반의 작제물은 렌티바이러스의 5' 및 3' 긴 말단 반복 (LTR)으로부터의 서열을 포함한다. 일 예에서, 바이러스 작제물은 렌티바이러스로부터의 불활성화된 또는 자가 불활성화 3' LTR을 포함한다. 3' LTR은 본 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 자기 불활성화될 수 있다. 예를 들어, 3' LTR의 U3 요소는 그의 인핸서 서열, 예컨대, TATA 박스, Sp1 및 NF-카파 B 부위의 결실을 함유한다. 자기 불활성화 3' LTR의 결과로서, 숙주 게놈 내로 통합되는 프로바이러스는 불활성화된 5' LTR을 포함할 것이다. LTR 서열은 임의의 종으로부터의 임의의 렌티바이러스로부터의 LTR 서열일 수 있다. 렌티바이러스 기반의 작제물은 또한 MMLV 또는 MSCV, RSV 또는 포유동물 유전자에 대한 서열을 포함할 수 있다. 또한, 렌티바이러스 5' LTR로부터의 U3 서열은 바이러스 작제물에서 프로모터 서열과 대체될 수 있다. 이것은 패키징 세포주로부터 회수된 바이러스의 역가를 증가시킬 수 있다. 인핸서 서열이 또한 포함될 수 있다.

[0683] 비제한적으로 하기를 포함하는 본 기술분야의 숙련자에게 공지된 다른 바이러스 또는 비-바이러스 시스템이 본 개시내용의 ddRNAi 또는 핵산을 관심있는 세포에 전달하는데 사용될 수 있다: 유전자-결실된 아데노바이러스-트랜스포손 벡터 (Yant, 등, *Nature Biotech.*20: 999-1004 (2002) 참고); 신드비스 바이러스 (Sindbis virus) 또는 쉴리키 포레스트 바이러스 (Semliki forest virus)로부터 유래된 시스템 (Perri, et al, *J.Virol.*74(20): 9802-07 (2002) 참고); 뉴캐슬병 바이러스 또는 센다이 바이러스 (Sendai virus)로부터 유래된 시스템.

[0684] 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 작제물의 시험

[0685] 세포 배양 모델

[0686] HBV는 배양에서 세포를 감염시키지 않는다. 그러나, HBV DNA (두미 (head-to-tail) 이량체로서 또는 >100%의 "초과길이 (overlength)" 게놈으로서)의 HuH7 또는 Hep G2 간세포 내로의 형질감염은 배지 내로 방출된 HBV의

바이러스 유전자 발현 및 생산을 야기한다. 이러한 세포주의 예는 완전한 HBV 게놈 (혈청형 ayw, 유전자형 D)을 안정적으로 갖는 HepG2 인간 간 세포암 세포주의 하위-세포주인 HepG2.2.15이다. HepG2.2.15는 모든 HBV 바이러스 RNA 및 단백질을 발현하고, 바이러스 게놈을 생산하며, 바이러스 유사 입자를 분비한다. 본원에 예시된 바와 같이, 본 개시내용의 RNA의 활성은 RNA를 세포에 투여한 후, HBV 게놈에 의해 코딩된 RNA 또는 단백질의 발현 수준을 측정함으로써 결정된다. 세포내 HBV 유전자 발현은 HBV RNA의 경우 Taqman™ 분석 또는 다른 실시간 PCR 분석에 의해 또는 HBV 단백질의 경우 ELISA에 의해 분석될 수 있다. 세포의 바이러스는 DNA의 경우 PCR에 의해 또는 단백질의 경우 ELISA에 의해 분석될 수 있다. 항체는 HBV 표면 항원 및 코어 단백질에 대해 상업적으로 이용가능하다. 형질감염 효율 및 샘플 회수의 차이를 정규화하기 위한 다양한 방법이 본 기술분야에서 공지되어 있다. 일차 인간 간세포를 사용한 세포 배양 시스템에서의 최근 발전은 HBV 치료제의 활성을 결정하기 위한 가능성을 보였다.

- [0687] 본 개시내용의 RNA의 부재와 비교하여 적어도 50%까지 HBV 게놈에 의해 코딩된 RNA 또는 단백질의 발현을 감소시키는 본 개시내용의 RNA는 본 개시내용의 방법에서 유용한 것으로 간주된다.
- [0688] 동물 모델
- [0689] HBV 복제를 연구하는데 이용가능한 몇 가지 작은 동물 모델이 있다. 하나는 HBV-감염된 간 조직을 조사된 마우스 내로 이식하는 것이다. 바이러스혈증 (PCR에 의해 HBV DNA를 측정함으로써 입증된 바와 같음)은 이식 후 8일에 처음으로 검출되고 18-25일에 최대이다 (Ilan 등, 1999, *Hepatology*, 29, 553-562).
- [0690] HBV를 발현하는 형질전환 마우스가 또한 잠재적인 항-바이러스를 평가하기 위한 모델로서 사용되어 왔다. HBV DNA는 형질전환 마우스의 간 및 혈청 모두에서 검출가능하다 (Morrey 등, *Antiviral Res.*, 42, 97-108, 1999).
- [0691] 추가적인 모델은 HBV로 형질감염된 Hep G2 세포를 이용하여 누드 마우스에서 피하 종양을 확립하는 것이다. 종양은 접종 후 약 2주 이내에 발생하고 HBV 표면 및 코어 항원을 발현한다. HBV DNA 및 표면 항원은 또한 종양 보유 마우스의 순환에서 검출된다 (Yao 등, *J. Viral Hepat.*, 3, 19-22, 1996).
- [0692] 추가의 모델은 간 질환 (uPA/SCID)을 갖는 면역결핍 마우스가 인간 간세포로 이식된 마우스의 키메라 그룹인 PXB 마우스를 사용하는 것이다. uPA/SCID 마우스는 유의한 간 독성을 나타내기 때문에, 건강한 인간 세포를 이식하는 것은 인간 간세포가 70 내지 90%를 차지하는 건강하고 기능적인 간을 갖는 마우스의 생산을 야기할 수 있다. PXB 마우스는 간에서 정상적인 조직학적 구조를 나타내고 인간 간 세포의 많은 특징을 나타내기 때문에, 마우스는 키메라 간 조직에서 활성 HBV 감염을 유지할 수 있다.
- [0693] 추가의 모델은 모델에 공급된 인간 간세포가 인간 간의 구조와 생리학을 모방하는 방식으로 조립되는 3차원 세포 배양 플랫폼인 퀀텀 (Quantum) B 모델을 사용하는 것이다. 상기 모델은 간 간세포로만 구성되기 때문에, 그것은 B형 간염의 최초의 장기 안정적인 인간 완전 바이러스 생활 주기 모델이며 HBV 감염 생활 주기의 일부 중요한 특징을 재현하는 것으로 여겨진다.
- [0694] 전술한 동물 모델 중 어느 것은 HBV 감염을 치료하거나 감소시키는데 있어서 본 개시내용의 RNA의 효능을 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0695] 담체
- [0696] 일부 예에서, 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 담체와 함께 조성물에 존재한다.
- [0697] 일부 예에서, 담체는 지질 기반의 담체, 양이온성 지질, 또는 리포솜 핵산 복합체, 리포솜, 마이셀, 비로솜 (virosome), 지질 나노입자 또는 이의 혼합물이다.
- [0698] 일부 예에서, 담체는 중합체 기반의 담체, 예컨대 양이온성 중합체-핵산 복합체이다.
- [0699] 추가 예에서, 담체는 사이클로덱스트린 기반의 담체, 예컨대 사이클로덱스트린 중합체-핵산 복합체이다.
- [0700] 추가 예에서, 담체는 단백질 기반의 담체, 예컨대 양이온성 펩타이드-핵산 복합체이다.
- [0701] 또 다른 예에서, 담체는 지질 나노입자이다. 예시적인 나노입자는, 예를 들어, US 제7514099호에 기재되어 있다.
- [0702] 일부 예에서, 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 양이온성 지질/콜레스테롤/PEG-C-DMA/DSPC (예컨대, 40/48/2/10 비율), 양이온성 지질/콜레스테롤/PEG-DMG/DSPC (예컨대, 40/48/2/10 비율), 또는 양이온성 지질/콜레스테롤/PEG-DMG (예컨대, 60/38/2 비율)를 포함하는 지질 나노입자 조성물을 이용하여 제형화된다.

일부 예에서, 양이온성 지질은 DMA 중의 Octyl CL, DMA 중의 DL, L-278, DLinKC2DMA, 또는 MC3이다.

- [0703] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 WO 제2010/021865호; WO 제2010/080724호; WO 제2010/042877호; WO 제2010/105209호 또는 WO 제2011/022460호에 기재된 양이온성 지질 제형 중 어느 것을 이용하여 제형화된다.
- [0704] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은, 예컨대, RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물의 전달을 용이하게 하는 또 다른 화합물에 접합되거나 이와 복합체화된다. 이러한 접합체의 비제한적인 예는 US 제2008/0152661호 및 US 제2004/0162260호에 기재되어 있다 (예컨대, CDM-LBA, CDM-Pip-LBA, CDM-PEG, CDM-NAG, 등).
- [0705] 또 다른 예에서, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)은 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물에 공유결합된다. 부착된 PEG는 임의의 분자량, 예컨대, 약 100 내지 약 50,000 달톤 (Da)일 수 있다.
- [0706] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 예를 들어, WO 제96/10391호; WO 제96/10390호; 또는 WO 제96/10392호에 개시된 바와 같이, 폴리(에틸렌 글리콜) 지질을 함유하는 표면-변형된 리포솜 (PEG-변형된, 또는 긴-순환하는 리포솜 또는 스텔스 (stealth) 리포솜)을 포함하는 담체를 이용하여 제형화된다.
- [0707] 일부 예에서, 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 폴리에틸렌이민 또는 이의 유도체, 예컨대 폴리에틸렌이민-폴리에틸렌글리콜-N-아세틸갈락토사민 (PEI-PEG-GAL) 또는 폴리에틸렌이민-폴리에틸렌글리콜-트리-N-아세틸갈락토사민 (PEI-PEG-triGAL) 유도체를 이용하여 제형화되거나 이와 복합체화될 수 있다. 일 예에서, 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 하기에 기재된 바와 같이 제형화된다: 미국특허 출원 공개 제2003/0077829호.
- [0708] 다른 예에서, 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 하기에 기재된 바와 같이 막 파괴제와 복합체화된다: 미국특허 출원 공개 제2001/0007666호.
- [0709] 다른 담체는 사이클로덱스트린 (예를 들어, Gonzalez 등, 1999, *Bioconjugate Chem.*, 10, 1068-1074; 또는 WO 제03/46185호 참고), 폴리(락틱-co-글리콜릭)산 (PLGA) 및 PLCA 미소구체 (예를 들어 US 제2002130430호 참고)를 포함한다.
- [0710] 치료 조성물 및 방법
- [0711] 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 HBV 감염을 예방하거나 치료하기 위한 조성물에서 사용된다. 본 개시내용의 치료용 조성물은 단독으로 사용될 수 있거나 다른 항바이러스 제제를 포함하는 하나 이상의 물질과 조합하여 사용될 수 있다. 현재, 라미부딘 (lamivudine), 아데포비어 디피복실 (adefovir dipivoxil), 및 인터페론 알파가 HBV 치료용으로 승인되었다. 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 다른 승인된 약물과 상이한 기전을 통해 HBV에 대해 작용하므로, 본 개시내용의 제제 및 다른 항바이러스의 조합 요법은 약물 내성의 발달, 예컨대, 장기간 라미부딘 요법의 주요 우려 문제인 라미부딘 내성의 발달을 실질적으로 감소시키면서 요법의 효능을 유의하게 증가시킬 것으로 예상된다.
- [0712] 조성물은 바람직하게는 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물의 생물학적 안정성을 증가시키는 물질 및/또는 간세포를 선택적으로 투과하는 조성물의 능력을 증가시키는 물질을 포함할 것이다. 본 개시내용의 치료용 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체 (예컨대, 생리학적 식염수)에서 투여될 수 있고, 이는 투여 방식 및 경로, 및 표준 약제학적 관행에 기초하여 선택된다. 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자는 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물을 포함하는 약제학적 조성물을 용이하게 제형화할 수 있다. 일부 경우, 등장성 제형이 사용된다. 일반적으로, 등장성을 위한 첨가물은 염화나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 솔비톨 및 락토스를 포함한다. 일부 경우, 인산 완충 염수와 같은 등장성 용액이 바람직하다. 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다. 일부 예에서, 혈관수축제가 제형에 첨가된다. 본 개시내용에 따른 조성물은 멸균 및 무발열원성으로 제공된다. 적합한 약제학적 담체 뿐만 아니라 약제학적 제형에서 사용하기 위한 약제학적 필수품은 하기 문헌에 기재되어 있다: Remington: The Science and Practice of Pharmacy (formerly Remington's Pharmaceutical Sciences), Mack Publishing Co., a standard reference text in this field, and in the USP/NF.
- [0713] 투여 경로는, 비제한적으로, 근육내, 복강내, 피내, 피하, 정맥내, 척추강내, 동맥내, 안내 및 경구뿐만 아니라 경피 또는 흡입 또는 좌제에 의한 것을 포함한다. 예시적인 투여 경로는 정맥내, 근육내, 경구, 복강내, 피내, 동맥내 및 피하 주사를 포함한다. 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물의 전달을 위한 생체내 간제

포의 표적화된 형질감염은 락토실 스페르민 (모노 또는 트리락토실화) 및 콜레스테릴 스페르민 (0.8의 충전 비율로 DNA에 대해 스테르민을 함유함)의 혼합물 (예컨대, 35%/65% 비율)과 복합체화된 본원에 기재된 바와 같은 DNA 또는 RNA 발현 벡터를 포함하는 조성물을 이용한 IV 주사를 통해 달성될 수 있다. 이러한 조성물은 억제학적 적용에 유용하며, 적합한 멸균, 비-발열원성 비히클, 예컨대, 비경구 투여, 예컨대, 하기, 및 복강내 투여를 위한, 주사용 완충 염수에서 용이하게 제형화될 수 있다: IV (IV 주입 포함), IM, SC. 특정 조성물에서, 표적화 스페르민 없이, 콜레스테릴 스페르민 단독과 같은 엔도솜 분해성 스페르민 (endosomolytic spermine)과 복합체화된 본 개시내용의 ddRNAi 작제물; 복강내 주사 또는 주입과 같은 일부 투여 경로는 ddRNAi 작제물의 효과적인 전달 및 형질감염, 및 RNA의 발현을 달성할 수 있다.

[0714] 특수하게 제형화된 전달 비이클 내에 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물을 포함하는 멸균 억제학적 조성물의 복강내 투여 (예컨대, 초음파 유도 복강내 주사)는 간세포를 포함하는 간의 세포들의 흡수를 촉진하는 유리한 전달 경로일 수 있다.

[0715] 억제학적 조성물의 부피, 농도, 및 제형뿐만 아니라 투여량 요법은 염증 반응과 같은 독성을 최소화하면서 세포 전달을 최대화하도록 구체적으로 조정될 수 있다. 상응하는 낮은 농도의 활성 성분을 갖는, 예컨대 상대적으로 큰 부피 (5, 10, 20, 50 ml 이상)뿐만 아니라 코르티코스테로이드와 같은 항-염증 화합물의 포함이 원하는 경우 이용될 수 있다.

[0716] HBV 감염된 개체에서, 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 바이러스에 대한 면역원성을 증강시키도록 설계된 치료용 백신접종 프로토콜과 함께 전-치료로서 유용한 것으로 예상된다. 또한 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물은 노출에 대한 직업적 또는 다른 가능성으로 인해 HBV에 대한 노출의 높은 위험성에 있다고 간주되는 개체에게의 주기적 투여의 요법에서 예방에 유용하다.

[0717] 키트

[0718] 본 개시내용은 또한 키트 내의 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물을 제공한다. 키트는 용기를 포함할 수 있다. 키트는 전형적으로 그의 투여를 위한 설명서와 함께 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물을 함유한다. 일부 예에서, 키트는 하나를 초과하는 본 개시내용의 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물 및 /또는 본 개시내용의 또 다른 RNA 또는 ddRNAi 또는 발현 작제물을 함유한다.

표 1 - HBV 게놈 내의 표적 영역

영역 ID	영역 서열 (5' - 3')	서열번호:
영역 1	CATCC TGCTGCTATGCCTCA	서열번호:1
영역 2	TTTGCTGACGCAACCCCACTGG	서열번호:2
영역 3	AAGCCTCCAAGCTGTGCCTT	서열번호:3
영역 4	GCAGGTCCCCTAGAAAGAAGAACTCCCTGCCCTCA	서열번호:4
영역 5	CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTTCC	서열번호:5
영역 6	CTCGTGGTGGACTTCTCTCA	서열번호:6
영역 7	CTCGTGTACAGGGGGGTTTTT	서열번호:7
영역 8	CCGTGTGCACTTCGGCTTCACCTCTGCACGT	서열번호:8
영역 9	TACGTCCCCTCGGGCGCTGAATC	서열번호:9
영역 10	AAATGCCCCCTATCTTATCA	서열번호:10

[0719]

표 2 -RNA 이합체

shRNA ID	호파기 (5' - 3')	서열번호:	호파기 보체 (5' - 3')	서열번호:
shRNA1	UGAGGCAUAGCAGCAGGAUG	서열번호:11	CAUCCUGCUGCUAUGCCUCA	서열번호:12
shRNA2	GAUGAGGCAUAGCAGCAGGA	서열번호:13	UCCUGCUGCUAUGCCUCAUC	서열번호:14
shRNA3	GAGGCAUAGCAGCAGGAUGC	서열번호:15	GCAUCCUGCUGCUAUGCCUC	서열번호:16
shRNA4	UGAGGCAUAGCAGCAGGAUG	서열번호:11	CAUCCUGCUGCUAUGCCUCA	서열번호:12
shRNA5	CCAGUGGGGUUGCGUCAGC	서열번호:17	GCUGACGCACCCCCACUGG	서열번호:18
shRNA6	CCAGUGGGGUUGCGUCAGC	서열번호:17	GCUGACGCACCCCCACUGG	서열번호:18
shRNA7	AAGGCACAGCUUGGAGGCUU	서열번호:19	AAGCCUCCAAGCUGUGCCUU	서열번호:20
shRNA8	AAGGCACAGCUUGGAGGCUU	서열번호:19	AAGCCUCCAAGCUGUGCCUU	서열번호:20
shRNA9	GAGUUCUUCUUCUAGGGGACC	서열번호:21	GGUCCCCUAGAGAGACUC	서열번호:22
shRNA10	GAGUUCUUCUUCUAGGGGACC	서열번호:21	GGUCCCCUAGAGAGAAACUC	서열번호:22
shRNA11	GAGGGAGUUCUUCUUCUAGGG	서열번호:23	CCCUAGAAGAAGAACCUCUC	서열번호:24
shRNA12	GAGGGAGUUCUUCUUCUAGGG	서열번호:23	CCCUAGAAGAAGAACCUCUC	서열번호:24
shRNA13	GCGAGUUCUUCUUCUAGGGGA	서열번호:25	UCCCUAGAGAGAACUCGCG	서열번호:26
shRNA14	UUCUUCUUCUAGGGGACCTUGC	서열번호:27	GCAGGUCCCUAGAGAAAGAA	서열번호:28
shRNA15	ACAAACGGGCAACAUACCUUG	서열번호:29	CAAGGUUUGUUGCCCGUUUGU	서열번호:30
shRNA16	GGACAAACGGGCAACAUACCU	서열번호:31	AGGUUUGUUGCCCGUUUGUCC	서열번호:32
shRNA17	GACAAACGGGCAACAUACCUU	서열번호:33	AAGGUUUGUUGCCCGUUUGUC	서열번호:34

shRNA ID	효과기 (5' - 3')	서열번호:	효과기 보체 (5' - 3')	서열번호:
shRNA18	ACAAACGGGGCAACAACCUUG	서열번호:29	CAAGGUAUGUUGCCCGUUUGU	서열번호:30
shRNA19	UGAGAGAAGUCCACCACGAG	서열번호:35	CUCGUGGUGGACUUCUCUCA	서열번호:36
shRNA20	UGAGAGAAGUCCACCACGAG	서열번호:35	CUCGUGGUGGACUUCUCUCA	서열번호:36
shRNA21	AUUGAGAGAAGUCCACCACG	서열번호:37	CGUGGUGGACUUCUCUCAAU	서열번호:38
shRNA22	AGAGAGUCCACCACGAGUC	서열번호:39	GACUCGUGGUGGACUUCUCU	서열번호:40
shRNA23	AAACCCCGCCUGUAACACGAG	서열번호:41	CUCGUGUACAGGGGGUUU	서열번호:42
shRNA24	AAACCCCGCCUGUAACACGAG	서열번호:41	CUCGUGUACAGGGGGUUU	서열번호:42
shRNA25	UGCAGAGGUGAAGCGAAGUGC	서열번호:43	GCACUUCGGUUCACCCUCUGCA	서열번호:44
shRNA26	UGCAGAGGUGAAGCGAAGUGC	서열번호:43	GCACUUCGGUUCACCCUCUGCA	서열번호:44
shRNA27	GAUUCAGCCCGACGGGACGU	서열번호:45	ACGUCCCGUCGGGCGUGAUC	서열번호:46
shRNA28	GGAUUCAGCCCGACGGGACG	서열번호:47	CGUCCCGUCGGGCGUGAAUCC	서열번호:48
shRNA29	AUUCAGCCCGACGGGACGUA	서열번호:49	UACGUCCCGUCGGGCGUGAAU	서열번호:50
shRNA30	GAUUCAGCCCGACGGGACGU	서열번호:45	ACGUCCCGUCGGGCGUGAUC	서열번호:46
shRNA31	GGAUUCAGCCCGACGGGACG	서열번호:47	CGUCCCGUCGGGCGUGAAUCC	서열번호:48
shRNA32	AUUCAGCCCGACGGGACGUA	서열번호:49	UACGUCCCGUCGGGCGUGAAU	서열번호:50
shRNA33	UGAAAGAUAGGGGCAUUU	서열번호:51	AAAUCCCCUAUCUUAUCA	서열번호:52
shRNA34	UGAAAGAUAGGGGCAUUU	서열번호:51	AAAUCCCCUAUCUUAUCA	서열번호:52

[0721]

표 3 - shRNA

shRNA ID	shRNA 서열 (5' - 3')	서열번호:
shRNA1	CAUCCUGCUGCUAUGCCUCACAAGAGAUAGAGGCAUAGCAGCAGGAUG	서열번호:65
shRNA2	UCCUGCUGCUAUGCCUCAUCCAAAGAGAGAUAGGCAUAGCAGCAGGA	서열번호:66
shRNA3	GCAUCCUGCUGCUAUGCCUCAAGAGAGAGGCAUAGCAGCAGGAUGC	서열번호:67
shRNA4	UGAGGCAUAGCAGCAGGAUGCAAGAGAGACUCCUGCUGCUAUGCCUCA	서열번호:68
shRNA5	GCUGACGCAACCCACCACUGGCAAGAGACCAGUGGGGGUUGCUCAGC	서열번호:69
shRNA6	CCAGUGGGGUUGCGUCAGCCAAAGAGAGCUGACGCAACCCACUGG	서열번호:70
shRNA7	AAGCCUCCAAAGCUGUGCCUUUGUUAAGGCACAGCUUGGAGGCUU	서열번호:71
shRNA8	AAGGCACAGCUUGGAGGCUUUGUCUUAAGCCUCCAAGCUGUGCCUU	서열번호:72
shRNA9	GGUCCCCUAGAAGAAGAACUCUCCAAGAGAGAGUUCUUCUAGGGGACC	서열번호:73
shRNA10	GAGUUCUUCUAGGGGACCCAAAGAGAGGUCCCCUAGAAGAAGAACUC	서열번호:74
shRNA11	CCUAGAAGAAGAACUCCUCCAAGAGAGAGGAGUUCUUCUAGGG	서열번호:75
shRNA12	GAGGAGUUCUUCUAGGGCAAGAGACCCUAGAAGAAGAACUCCUUC	서열번호:76
shRNA13	UCCCCUAGAAGAAGAACUCGCCAAGAGAGGAGUUCUUCUAGGGGA	서열번호:77
shRNA14	GCAGGUCCCCUAGAAGAAGAACAGAUUCUUCUAGGGGACCUCG	서열번호:78
shRNA15	CAAGGUAGUUGCCCGUUCUCAAAGAGAGACAAACGGGCAACAUACCUUG	서열번호:79
shRNA16	AGGUAGUUGCCCGUUCUCCAAAGAGAGGACAAACGGGCAACAUACCU	서열번호:80
shRNA17	AAGGUAGUUGCCCGUUCUCCAAGAGAGACAAACGGGCAACAUACCUU	서열번호:81

[0722]

[0723]

shRNA ID	shRNA 서열 (5' - 3')	서열번호:
shRNA18	ACAAACGGGCAACAUAACCUUGCAAGAGACAAGGUUUGUUGCCCGUUUGU	서열번호:82
shRNA19	CUCGUGGUGGACUUCUCUCACACAAGAGAUAGAGAAAGUCCACCACGAG	서열번호:83
shRNA20	UGAGAGAAAGUCCACCACGAGCAAGAGACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	서열번호:84
shRNA21	AUUGAGAGAAAGUCCACCACGCAAGAGACGUGGUGGACUUCUCUCAAU	서열번호:85
shRNA22	AGAGAAGUCCACCACGAGUCCAAAGAGAGACUCGUGGUGGACUUCUCU	서열번호:86
shRNA23	CUCGUGUUAACAGGGGGUUUUUGUCUUAAAACCCCGCCUGUAACACGAG	서열번호:87
shRNA24	AAACCCCGCCUGUAACACGAGUGUGCUUCUCUGUUAACAAGCGGGGUTUU	서열번호:88
shRNA25	GCACUUCGCUUCACCUUGCACAAGAGAGUAGCAGAGGUAGAGCGAAGUJC	서열번호:89
shRNA26	UGCAGAGGUGAAGCGAAGUGCCAAAGAGAGACUUCGCUUCACCUUCGCA	서열번호:90
shRNA27	ACGUCCCGUCGGCGUGAAUCUGUGCUUGAUUCAGCGCCGACGGGACCGU	서열번호:91
shRNA28	CGUCCCGUCGGCGUGAAUCCUGUGCUUGGAUUCAGCGCCGACGGGACG	서열번호:92
shRNA29	UACGUCCCGUCGGCGUGAAUUGUGCUUAUUCAGCGCCGACGGGACGUA	서열번호:93
shRNA30	GAUUCAGCGCCGACGGGACGUGUGCUUACGUCCCGUCGGCGUGAAUC	서열번호:94
shRNA31	GGAUUCAAGCGCCGACGGGACGUGUCUUCGUCCCGUCGGCGUGAAUCC	서열번호:95
shRNA32	AUUCAGCGCCGACGGGACGUAUGUGCUUACGUCCCGUCGGCGUGAAU	서열번호:96
shRNA33	AAAUGCCCUAUCUUAUCAUGUGCUUUGAUAAAGAUAGGGGCAUUU	서열번호:97
shRNA34	UGAUAAGAUAGGGGCAUUUUUGUCUUAUUAGCCCCUAUCUUAUCA	서열번호:98

표 4 - 추가의 RNA 이합체

shRNA ID	효과기 (5' - 3')	서열번호:	효과기 보체 (5' - 3')	서열번호:
shRNA35	UGAGGCCACUCCCAUAGGUU	서열번호:53	AUACCUAUGGAGUGGGCCUCA	서열번호:54
shRNA36	GGAAAGCCUACGACCACUGA	서열번호:55	UCAGUGGUUCGUAAGGCUUUC	서열번호:56
shRNA37	GGAAAGCCUACGACCACUG	서열번호:57	CAGUGGUUCGUAAGGCUUUC	서열번호:58
shRNA38	GGGAAAAGCCUACGAAACCACU	서열번호:59	AGUGGUUCGUAAGGCUUUC	서열번호:60
shRNA39	GGAAAGCCUACGACCACUG	서열번호:61	CAUUGUUUCGUCGGGCUUUC	서열번호:62
shRNA40	CCGGC/MCGGGG/MAGGUUC	서열번호:63	GAAACCUUUACCCCGUUGCCCGG	서열번호:64

표 5 - 추가의 shRNAs

shRNA ID	shRNA 서열 (5' - 3')	서열번호:
shRNA35	AUACCUAUGGAGUGGGCCUCAAGAGAUGAGGCCACUCCAUAGGUU	서열번호:99
shRNA36	UCAGUGGUUCGUAAGGCUUUCCAAAGAGAGAAAAGCCUACGAAACCACUGA	서열번호:100
shRNA37	CAGUGGUUCGUAAGGCUUUCUCCCAAGAGAGGGAAGCCUACGAAACCACUG	서열번호:101
shRNA38	AGUGGUUCGUAAGGCUUUCUCCCAAGAGAGGGAAGCCUACGAAACCACU	서열번호:102
shRNA39	GGAAAGCCUACGAAACCACUGCAAGACAUUGUUUCGUCGGGCUUUC	서열번호:103
shRNA40	GAAACCUUUACCCCGUUGCCCGCAAGACCCGGGCAACGGGUAAAGGUUC	서열번호:104

[0724]

[0725]

[0726]

[0727]

실시예

실시예 1 -ddRNAi 작제물의 설계를 위한 표적 영역

ddRNAi 작제물의 설계를 위한 잠재적인 표적에 해당하는 서열을 전장 HBV 게놈으로부터 확인하였다. 요약하면, HBV 서열의 데이터베이스를 비독점의 공공 도메인 소스로부터 검색된 서열로부터 컴파일하였다. 초기 수집물을 검색 용어 {B형 간염 바이러스 완전 게놈} 및 {B형 간염 바이러스 완전 게놈 + 유전자형}를 사용하여 Genbank의 Release 202.0(2014년 6월 15일)로부터 컴파일하였고; 인간 HBV 서열만이 포함되었다. 초기 서열 정렬을 서열 어셈블리 (Sequence Assembly), Clustal, MUSCLE 및 SEQUENCHER, Release 5.0.1 / 5.2를 사용하여 수행하였다. 초기 정렬을 수동으로 수행하여 포매팅 유래의 서열 차이 (예컨대, 서열 시작 부위의 편차), 인공 바이러스 서열 (예컨대, HBV 기반의 작제물), 명백한 이상치 (outlier) (예컨대, 불량한 품질의 서열을 나타내는 Ns와의 불량한 정렬 또는 정렬) 및 중복된 항목을 포함하는, 부정확하게 주석이 달린 서열을 제거하였다. 모든 HBV 유전형 (A-H)을 나타내는 4345 서열이 있었던 나머지 서열을 CLUSTALW (빠른 것 및 느린 것 모두) 및 Megalign, Lasergene, Release 12를 사용하여 재정렬하였다. 정렬을 대상으로 모든 유전형에 대해 가장 높은 보존 (적어도 18/20 뉴클레오타이드)의 영역을 스캐닝하였다. 10개의 가장 고도의 보존 영역을 shRNA의 설계를 위한 표적으로서 선택하였다. 확인된 표적 영역의 서열이 표 1에 나타나 있다.

[0728] **실시예 2 - siRNA 이합체**

[0729] 표 1에 기재된 표적 영역에 실질적으로 상보적인 효과기 서열을 포함하는 siRNA 이합체를 설계하였고, 이는 표 2에 나타나 있다. siRNA 이합체를 2개의 뉴클레오타이드 3' dTdT 오버행을 갖도록 합성하였다.

[0730] **실시예 3 - 이중-루시퍼라제 리포터 분석에서 siRNA의 활성**

[0731] HBV 전사체의 발현을 억대운시키는 본 개시내용의 siRNA의 효능을 시험하기 위해, 이중-루시퍼라제 리포터 분석을 HEK293 세포에서 수행하였다.

[0732] pGL3 루시퍼라제 리포터 벡터에 기초한 플라스미드 리포터 작제물을 영역 4, 영역 5 또는 영역 9 각각을 표적화하는 HBV siRNA에 대해 제자하였다. 각 말단에 20bp 축접 서열을 갖는 영역 4, 영역 5 또는 영역 9에 대한 HBV shRNA 표적 서열을 pGL3-대조군 벡터 (Promega, Madison, WI) 상에 삽입하여 루시퍼라제 리포터 작제물을 생성하였다. 상기 삽입물을 루시퍼라제 리포터 유전자의 3' UTR 내의 FseI 및 XbaI 제한 효소 부위를 사용하여 서브클로닝하였다.

[0733] 이중-루시퍼라제 리포터 분석을 HEK293 세포에서 수행하였다. HEK293 세포주를 ATCC (Manassas, VA)로부터 구입하였다. HEK293 세포를 5% CO2를 갖는 37 °C 습식 인큐베이터에서 10% 우태아혈청, 2mM 글루타민, 페니실린 (100U/mL), 및 스트렙토마이신 (100 µg/mL)을 함유하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 요약하면, HEK293 세포를 형질감염 1일 전에 96-웰 배양 플레이트 내로 웰당 2x10<sup>4</sup> 세포의 밀도로 시딩하였다.

[0734] 각각 shRNA9, shRNA15 및 shRNA27로 명명된 shRNA의 안티센스 및 센스 서열을 갖는 HBV siRNA 및 이들의 상응하는 루시퍼라제 리포터 작제물을 제조사의 설명서에 따라 리포펙타민 2000 시약 (Life Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 HEK293 세포 내로 공동 형질감염시켰다. 형질감염의 각 웰의 경우, 1 또는 2 pmol의 하나의 HBV siRNA, 10ng의 상응하는 루시퍼라제 리포터 작제물 및 1ng의 레닐라 (Renilla) 리포터 작제물 (로딩 대조군으로서 작용함)을 0.3uL의 리포펙타민 2000을 사용하여 공동 형질감염시켰다. 형질감염후 48시간에, 세포 용해물을 수집하고 이중 루시퍼라제 리포터 분석 시스템 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 분석하였다. 반딧불/레닐라 활성 비율을 각 웰에 대해 결정하고, 무관한 siRNA, 즉 siGlo 대조군에 대해 정규화함으로써 siRNA의 억제 효율을 계산하였다. siGlo 대조군 대비 HBV siRNA shRNA9, shRNA15 및 shRNA27 각각의 센스 및 안티센스 가닥에 대한 HEK293 세포에서 HBV 리포터 작제물의 백분율 억제가 표 8에 나타나 있으며 도 2에 예시되어 있다.

[0735] **표 8. 이중-루시퍼라제 리포터 분석에서 shRNA9, shRNA15 및 shRNA27의 안티센스 및 센스 서열을 갖는 siRNA의 억제 활성**

siRNA	siRNA 가닥	HBV 리포터의 % 억제	
		1pmol siRNA	2pmol siRNA
shRNA9	안티센스	89.71	86.87
	센스	6.57	7.98
shRNA15	안티센스	91.47	92.27
	센스	6.03	7.40
shRNA27	안티센스	84.61	84.75
	센스	-8.73	-1.29

[0736]

[0737] 표 8 및 도 2로부터 명백한 바와 같이, 1pmol 정도로 낮은 양으로 존재하는 경우에도, 각각 shRNA9, shRNA15 및 shRNA27로 명명된 shRNA의 안티센스 및 센스 서열을 갖는 예시적인 siRNA는 HEK293 세포에서 pGL3 루시퍼라제 리포터 벡터로부터 발현된 루시퍼라제의 수준을 하향조절하였다.

[0738] **실시예 4 - HepG2.2.15 세포에서 발현된 HBV 항원에 대한 siRNA의 활성**

[0739] HBV 유전자의 발현을 억대운시키는 본 개시내용의 siRNA의 효능을 시험하기 위해, HepG2.2.15를 본 개시내용의 대표적인 siRNA로 형질감염시키고 HBV 유전자 발현의 억제를 분석하였다.

[0740] HepG2.2.15는 완전한 HBV 게놈을 안정적으로 갖는 HepG2 인간 간 세포암 세포주의 하위-세포주이다 (혈청형 ayw, 유전자형 D). HepG2.2.15는 모든 HBV 바이러스 RNA 및 단백질을 발현하고, 바이러스 게놈을 생산하며, 바이러스 유사 입자를 분비한다. HepG2.2.15 세포를 하기에 의해 제공받았다: 조지타운 대학의 브렌트 코르바

(Brent Korba) 박사.HepG2.2.15 세포를 4% 우태아혈청, 4mM 글루타민, 페니실린 (100U/mL), 및 스트렙토마이신 (100 μg/mL)이 보충된 RPMI1640 배지에서 유지시키고 5% CO<sub>2</sub>의 분위기에서 37 °C 습식 인큐베이터에서 증식시켰다.

[0741] 세포를 리포펙타민 RNAiMax 시약 (Life Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 현탁액에서 각각 shRNA9, shRNA15 및 shRNA27로 명명된 shRNA의 안티센스 및 센스 서열을 갖는 HBV siRNA로 형질감염시켰다. 형질감염을 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 각각의 형질감염을 위해, HepG2.2.15 세포를 24-웰 배양 플레이트 상에 웰 당 9x10<sup>4</sup> 세포의 밀도로 시딩하고 1.5uL 리포펙타민 RNAiMax를 사용하여 5 pmol의 하나의 HBV siRNA로 형질감염시켰다. 형질감염 72시간 후, RNA를 위해 세포를 채집하였다.

[0742] 총 RNA를 miRNeasy 미니 키트 (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 단리하였다. 총 RNA를 NanoDrop 1000 분광광도계 (Thermo Scientific)를 사용하여 정량하고 10 ng/μl의 작업 농도로 희석하였다. 100 나노그램의 총 RNA를 제조사의 설명서에 따라 고성능 cDNA 역전사 키트 (Life Technologies, Carlsbad, CA)를 사용하여 cDNA를 합성하는데 사용하였다.

[0743] HBV 항원 HBsAg, HBcAg, HbxAg, 및 GAPDH 내의 영역의 양적 PCR 증폭을 파워 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스 (Life Technologies) 및 표 9에 열거된 하기 프라이머 세트를 사용하여 수행하였다. 표준 실시간 PCR 조건을 사용하였다: 95 °C에서 10분간 초기 변성 후 95 °C에서 15초 및 60 °C에서 1분의 40 사이클.

[0744] 표 9 - RT-qPCR을 위한 프라이머 세트

HBV 항원	프라이머	서열 (5' - 3')
HBsAg	HBsAg_fwd	ATGTTGCCCGTTTGTCTCT
	HBsAg_rev	CCGTCCGAAGGTTTGGTACA
HBxAg	HBxAg_fwd	CGTCCTTTGTTTACGTCCCG
	HBxAg_rev	AGTCCGCGTAAAGAGAGGTG
HBcAg	HBcAg_fwd	CCACCAAATGCCCTATCCT
	HBcAg_rev	ATTGAGACCTTCGTCTGCGA
GAPDH	GAPDH_fwd	ACACCATGGGGAAGGTGAAG
	GAPDH_rev	GTGACCAGGCGCCAATA

[0745]

[0746] HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역에서의 HBV 전사체의 억제 수준을 GAPDH mRNA의 수준과 비교하여 결정하였다. HBsAg, HBcAg, HbxA mRNA 발현의 백분율 억제를 음성 대조군, 이 경우 siGlo siRNA (Dharmacon)와 비교하여 계산하였다. HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역에서의 HBV 전사체의 억제 수준이 표 10에 나타나 있고 도 3에 예시되어 있다. 도 4는 HBV 중합효소 유전자 및 각각의 HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 대한 HBV siRNA의 위치를 나타낸다.

[0747] 표 10. siRNA에 의한 HepG2.2.15 세포에서 HBV 항원의 발현의 억제

하기에 상응하는 siRNA	HBV 항원	억제 (%)
shRNA9	HBsAg	19.88
	HBxAg	28.02
	HBcAg	65.78
shRNA15	HBsAg	81.26
	HBxAg	83.23
	HBcAg	61.77
shRNA27	HBsAg	60.46
	HBxAg	72.15
	HBcAg	17.37

[0748]

- [0749] **실시예 5 - 이중-루시퍼라제 리포터 분석에서 ddRNAi 발현 작제물의 활성**
- [0750] HBV 전사체를 녹다운시키는 본 개시내용의 shRNA를 발현하는 ddRNAi 발현 작제물의 효능을 시험하기 위해, 이중-루시퍼라제 리포터 분석을 HEK293 세포에서 수행하였다.
- [0751] 초기 스크린을 수행하여 하기 26개의 본 개시내용의 shRNA에 대한 가닥 선호를 결정하였다: shRNA1, shRNA4, shRNA15, shRNA18, shRNA35, shRNA36, shRNA39, shRNA5, shRNA6, shRNA7, shRNA8, shRNA25, shRNA26, shRNA30, shRNA40, shRNA9, shRNA10, shRNA11, shRNA12, shRNA33, shRNA34, shRNA19, shRNA20, shRNA23 및 shRNA24.
- [0752] pGL3 루시퍼라제 리포터 벡터에 기반한 플라스미드 리포터 작제물을 26개 shRNA 서열 각각의 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 대해 제작하였다. 각 말단에 20bp 측정 서열을 갖는 각각의 shRNA (적절한 경우)의 센스 가닥 서열 또는 안티센스 가닥 서열을 pGL3-대조군 벡터 (Promega, Madison, WI) 내로 삽입하여 루시퍼라제 리포터 작제물을 생성하였다. 상기 삽입물을 루시퍼라제 리포터 유전자 이후의 FseI 및 XbaI 제한 효소 부위를 사용하여 서브클로닝하였다.
- [0753] HEK293 세포주를 ATCC (Manassas, VA)로부터 구입하였다. HEK293 세포를 5% CO<sub>2</sub>를 갖는 37 °C 습식 인큐베이터에서 10% 우태아혈청, 2mM 글루타민, 페니실린 (100U/mL), 및 스트렙토마이신 (100 µg/mL)을 함유하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 요약하면, HEK293 세포를 형질감염 1일 전 96-웰 배양 플레이트 내로 웰당 2x10<sup>4</sup> 세포의 밀도로 시딩하였다.
- [0754] 각각의 shRNA의 경우, 각각의 shRNA 서열을 U6 프로모터 및 근접 서열 요소 7 (PSE7)을 갖는 pSsh 벡터 내로 삽입하여 ddRNAi 발현 작제물을 제작하였다. U6 프로모터는 인간 U6-1, U6-8 또는 U6-9 서열에 기반하였다. 각 웰의 형질감염을 위해, 상응하는 ddRNAi 발현 작제물 및 2개의 루시퍼라제 리포터 작제물 중 하나를 하기를 사용하여 10: 1의 비율로 HEK293 세포 내로 공동 형질감염시켰다 (ddRNAi 발현 작제물: 루시퍼라제 리포터 작제물): 제조사의 설명서에 따라 0.3uL의 리포펙타민 2000 시약 (Life Technologies, Carlsbad, CA). 세포를 또한 1ng의 레닐라 리포터 작제물 (형질감염 대조군으로 작용함)로 형질감염시켰다. 형질감염후 48시간에, 세포 용해물을 수집하고 이중 루시퍼라제 리포터 분석 시스템 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 분석하였다. 반딧불/레닐라 활성 비율을 각 웰에 대해 결정하였다. 리포터 발현의 백분율 억제율 U6-9cont로 불리는 인간 또는 마우스 서열에 대해 상동성이 없는 무작위 비-표적화 서열을 발현시키기 위해 U6-9 프로모터를 사용한 작제물과 비교하여 계산하였다. U6-9cont를 서열 CGTCGGTACCACAAGCAAGATCGGCAGTAAGAAGATGGCGTATATATTATGAAAGGTACCGAGATTGGCCATTCGGAGTGTTTAGTCGACCAAAGTATGAT를 발현하도록 설계하였다. 실험을 2반복 수행하였다.
- [0755] 각각의 루시퍼라제 리포터 작제물로부터 루시퍼라제 단백질의 발현을 억제하는 각각의 shRNA의 능력이 도 5a-5f에 예시되어 있다.
- [0756] 각각의 루시퍼라제 리포터 작제물로부터 루시퍼라제 단백질의 발현을 억제하는 그들의 능력에 기초하여 추가 시험을 위해 분석된 26개 shRNA 중 7개 즉, shRNA1, shRNA15, shRNA36, shRNA27, shRNA30, shRNA9 및 shRNA20을 선택하였다. 이들 7개의 shRNA를 9점 용량 반응 곡선에 적용하여 헤어핀의 과다기능적 특성을 평가하였다. 2개의 용량 곡선 실험을 수행하였다:
- [0757] 실험 1: HEK293 세포를 1: 1 내지 1: 5000 범위의 shRNA: 표적 비율로 형질감염시켰고;
- [0758] 실험 2: HEK293 세포를 10: 1 내지 1: 500 범위의 shRNA: 표적 비율로 형질감염시켰다.
- [0759] 실험 1 및 2 각각에서, 7개의 shRNA를 안티센스 가닥에 의한 루시퍼라제 활성의 억제를 검출하기 위해 설계된 루시퍼라제 리포터 작제물 즉, 센스 가닥 서열에 대해 시험하였다. 리포터 작제물을 상기 기재된 바와 같이 설계하였다. 각각의 shRNA에 대한 ddRNAi 발현 작제물은 또한 상기 기재된 바와 같았다.
- [0760] 실험 1
- [0761] HEK293 세포를 형질감염 1일 전에 96-웰 배양 플레이트 내로 웰당 2.5x10<sup>4</sup> 세포의 밀도로 시딩하였다. 7개의 ddRNAi 발현 작제물 각각의 경우, HEK293 세포를 함유하는 웰을 제조사의 설명서에 따라 0.3uL의 리포펙타민 2000 시약 (Life Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 50ng, 25ng, 10ng, 2.5ng, 0.83ng, 0.28ng, 0.09ng, 0.03ng, 또는 0.01ng의 각각의 ddRNAi 발현 작제물 및 50ng의 상응하는 루시퍼라제 리포터 작제물로 공동 형질감염시켰다. 세포를 또한 1ng의 레닐라 리포터 작제물 (로딩 대조군으로서 작용함)로 형질감염시켰다.

형질감염후 48시간에, 세포 용해물을 수집하고 이중 루시퍼라제 리포터 분석 시스템 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 분석하였다. 반딧불/레닐라 활성 비율을 각 웰에 대해 결정하고, ddRNAi 발현 작제물의 억제 효율을 계산하였다.

[0762] 용량 의존적 방식으로 각각의 루시퍼라제 리포터 작제물로부터 루시퍼라제의 발현을 억제하는 ddRNAi 발현 작제물 각각의 능력이 도 6a-6j에 예시되어 있다.

[0763] 실험 2

[0764] HEK293 세포를 형질감염 1일 전에 96-웰 배양 플레이트 내로 웰당  $2.5 \times 10^4$  세포의 밀도로 시딩하였다. 7개의 ddRNAi 발현 작제물 각각의 경우, HEK293 세포를 함유하는 웰을 제조사의 설명서에 따라 0.3uL의 리포펙타민 2000 시약 (Life Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 100ng, 50ng, 20ng, 5ng, 1.67ng, 0.56ng, 0.19ng, 0.06ng, 또는 0.02ng의 각각의 ddRNAi 발현 작제물 및 10ng의 상응하는 루시퍼라제 리포터 작제물로 공동 형질감염시켰다. 세포를 또한 1ng의 레닐라 리포터 작제물 (로딩 대조군으로서 작용함)로 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간에, 세포 용해물을 수집하고 이중 루시퍼라제 리포터 분석 시스템 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 분석하였다. 반딧불/레닐라 활성 비율을 각 웰에 대해 결정하고, ddRNAi 발현 작제물의 억제 효율을 계산하였다.

[0765] 용량 의존적 방식으로 각각의 루시퍼라제 리포터 작제물로부터 루시퍼라제의 발현을 억제하는 ddRNAi 발현 작제물 각각의 능력이 도 7a-7j에 예시되어 있다.

[0766] **실시예 6 -필러 플라스미드로 공동 형질감염된 ddRNA의 과다기능적 특성**

[0767] 이후, 실시예 5에 기재된 7개의 선도 ddRNAi 작제물의 과다기능적 특성을 HEK293 세포에서 U69-PSE7fix-Random100 (pBL-153) 필러 플라스미드로 공동 형질감염될 때 평가하였다.

[0768] pGL3 루시퍼라제 리포터 벡터에 기반한 플라스미드 리포터 작제물을 이전에 기재된 바와 같이 ddRNAi 작제물의 7개의 shRNA 서열 각각의 센스 및 안티센스 가닥에 대해 제조하였다.

[0769] 이전에 기재된 방법에 따라 배양된 HEK293 세포를 형질감염 1일 전에 96-웰 배양 플레이트 내로 웰당  $2.5 \times 10^4$  세포의 밀도로 시딩하였다. 7개의 ddRNAi 발현 작제물 각각의 경우, HEK293 세포를 함유하는 웰을 제조사의 설명서에 따라 0.3uL의 리포펙타민 2000 시약 (Life Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 (i) 50ng, 25ng, 10ng, 2.5ng, 0.83ng, 0.28ng, 0.09ng, 0.03ng, 또는 0.01ng의 각각의 ddRNAi 발현 작제물, (ii) 최종 DNA 함량을 50ng으로 조절하기 위한 다양한 양의 필러 플라스미드, 및 (iii) 50ng의 상응하는 루시퍼라제 리포터 작제물로 공동 형질감염시켰다. 세포를 또한 1ng의 레닐라 리포터 작제물 (로딩 대조군으로서 작용함)로 형질감염시켰다. 형질감염후 48시간에, 세포 용해물을 수집하고 이중 루시퍼라제 리포터 분석 시스템 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 분석하였다. 반딧불/레닐라 활성 비율을 각 웰에 대해 결정하고, ddRNAi 발현 작제물의 억제 효율을 계산하였다.

[0770] 필러 플라스미드로 공동 형질감염될 때 용량 의존적 방식으로 각각의 루시퍼라제 리포터 작제물로부터 루시퍼라제의 발현을 억제하는 ddRNAi 발현 작제물 각각의 능력이 도 8a-8j에 예시되어 있다.

[0771] **실시예 7 - 변이체 shRNA의 HBV 억제 활성**

[0772] 하기로 명명된 shRNA 각각에 대해 2개의 변이체 shRNA를 설계하고 제조하였다: shRNA 9 (서열번호:73) 및 shRNA20 (서열번호:84). 제조된 변이체는 하기와 같았다:

[0773] shRNA13 (서열번호:77);

[0774] shRNA14 (서열번호:78);

[0775] shRNA21 (서열번호:85); 및

[0776] shRNA22 (서열번호:86).

[0777] 원래의 shRNA 서열 및 변이체 shRNA 서열 각각을 하나는 U69-PSE7-U68 하이브리드 프로모터를 포함하고 다른 하나는 U69-PSE7 프로모터를 포함하는 2개의 pPsh 벡터 내로 삽입하여 ddRNAi 작제물을 제조하였다. 그리고 나서, 이중-루시퍼라제 리포터 분석을 HEK293 세포에서 수행하여 HBV 유전자의 발현을 낮추는 다양한 shRNA의 효능을 시험하였다.

[0778] 루시퍼라제 리포터 작제물을 이전에 기재된 방법에 따라 ddRNAi 발현 작제물 각각에서 shRNA의 센스 및 안티센스 가닥에 대해 제조하였다.

[0779] HEK293 세포를 5% CO<sub>2</sub>를 갖는 37 °C 습식 인큐베이터에서 10% 우태아혈청, 2mM 글루타민, 페니실린 (100U/mL), 및 스트렙토마이신 (100 µg/mL)을 함유하는 DMEM 배지에서 배양하였다. HEK293 세포를 형질감염 전 1일에 96-웰 배양 플레이트 내로 웰당 2x10<sup>4</sup> 세포의 밀도로 시딩하였다.

[0780] 각 웰의 형질감염을 위해, 10ng의 상응하는 ddRNAi 발현 작제물 및 100ng의 2개의 루시퍼라제 리포터 작제물 중 하나를 제조사의 설명서에 따라 0.3uL의 리포펙타민 2000 시약 (Life Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 HEK293 세포 내로 공동 형질감염시켰다. 세포를 또한 5ng의 레닐라 리포터 작제물 (로딩 대조군으로 작용함)로 형질감염시켰다. 형질감염후 48시간에, 세포 용해물을 수집하고 이중 루시퍼라제 리포터 분석 시스템 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 분석하였다. 반딧불/레닐라 활성 비율을 각 웰에 대해 결정하고, 각각의 shRNA의 억제 효율을 계산하였다. 각각의 루시퍼라제 리포터 작제물로부터 루시퍼라제 단백질의 발현을 억제하는 각각의 shRNA의 능력이 도 9a-9b에 예시되어 있다.

[0781] **실시예 8 - AdV-shRNA 벡터의 제조**

[0782] shRNA14, shRNA15, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 shRNA에 대한 HBV shRNA 서열을 합성하고 변형된 U6-1, U6-8, 또는 U6-9 프로모터의 다운스트림에 클로닝하였다. 전체 발현 카세트를 벡터 Biolabs (Malvern, PA)로부터의 바이러스 생성을 위한 아데노바이러스 (AdV) 작제물 내로 서브클로닝하였다.

[0783] **실시예 9 - HepG2.2.15 세포에서 HBV 전사체의 shRNA Nickdown**

[0784] HBV shRNA AdV 벡터를 실시예 8에 따라 shRNA14, shRNA15, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 shRNA에 대해 제조하였다.

[0785] HepG2.2.15 세포를 HBV shRNA AdV 벡터를 이용한 차후의 형질도입을 위해 실시예 4에 기재된 방법에 따라 제조하였다. 이후, HepG2.2.15 세포를 세포 현탁액에서 HBV shRNA AdV 벡터로 형질감염시키고 24-웰 플레이트 상에서 배양하였다. 요약하면, 각 웰은 1.0 x 10<sup>5</sup> HepG2.2.15 세포 및 하기 MOI의 HBV shRNA AdV 벡터 중 하나의 현탁액을 함유하였다: 6, 15, 30, 60, 90, 또는 120.삼중 HBV shRNA 발현 카세트를 이용한 처리를 자극하기 위해, 세포 배양을 또한 각각의 하기 MOI의 3개의 HBV shRNA 아데노바이러스로 동시에 감염시켰다: 2, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 또는 90.자극된 삼중 HBV shRNA 발현 카세트는 (i) shRNA14/shRNA15/shRNA28 및 (ii) shRNA14/shRNA37/shRNA28이었다. 형질도입 후, 세포를 5% CO<sub>2</sub>에서 37 °C에서 72시간 동안 배양한 후, 각각 Qiagen miRNeasy 미니 키트 및 QiAmp DNA 미니 키트 (Valencia, CA)를 사용하여 RNA 및 DNA 추출을 위해 채집하였다.

[0786] 총 RNA를 miRNeasy 미니 키트 (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 단리하였다. 총 RNA를 NanoDrop 1000 분광광도계 (Thermo Scientific)를 사용하여 정량하고 10 ng/µl의 작업 농도로 희석하였다.

[0787] AdV 벡터에 의한 shRNA의 생성을 Qiagen의 miScript PCR 시스템 (Valencia, CA)을 사용하여 측정하였다. 각각의 RT-qPCR 분석의 경우, 50ng의 총 RNA를 Qiagen의 miScript II RT 키트를 사용하여 cDNA로 전환시켰다. 이후, shRNA의 정량적 PCR을 표 11에 제시된 커스텀 프라이머 및 하기 실시간 PCR 조건으로 Qiagen miScript SYBR 그린 PCR 키트를 사용하여 수행하였다: 95 °C에서 15분간 초기 변성 후 94° C에서 15초, 55 °C에서 30초 및 70 °C에서 30초의 40 사이클.

[0788] **표 11. shRNA 발현을 정량하기 위한 커스텀 프라이머**

프라이머	서열 (5' - 3')
shRNA15_fwd	ACAAACGGGCAACATACCTTG
shRNA37_fwd	GGGAAAGCCCTACGAACCACTG
shRNA28_fwd	GGATTCAGCGCCGACGGGACG
shRNA14_fwd	TTCTTCTTCTAGGGGACCTGC

[0789] 다양한 shRNA의 발현 수준을 결정하는 것을 돕기 위해, shRNA로부터의 가공될 것으로 예측된 가이드 RNA 서열 (표 12)에 대해 qPCR 표준 분석을 개발하였다.

[0791] 표 12. 가이드 RNA 서열

프라이머	서열 (5' - 3')
shRNA15_std	ACAAACGGGCAACAUACCUUG
shRNA37_std	GGGAAAGCCCUACGAACCACUG
shRNA28_std	GGAUUCAGCGCCGACGGGACG
shRNA14_std	UUCUUCUUCUAGGGGACCUGC

[0792]

[0793]

이들 분석을 위한 표준 곡선을 공지된 양의 이들 가이드 RNA를 증폭시킴으로써 생성하였고, 이는 도 10에 나타나 있다. 세포당 RNA 카피 수를 각 세포에서 20ng 총 RNA의 예측에 기초하여 계산하였다. 세포당 shRNA 카피를 다양한 MOI에서 개별적으로 발현될 때 및 다양한 MOI에서 삼중 조합에서 동시에 발현될 때 shRNA14, shRNA15, shRNA37 및 shRNA28의 각각에 대해 결정하였다 (도 11a-11d). 전반적으로, 삼중 HBV shRNA Adv 조합으로 형질도입된 세포에서 개별적인 shRNA 발현은 동등한 용량, 예컨대, 하기의 단일 HBV shRNA Adv 벡터로 형질도입된 세포보다 1.5-2.0배 더 낮았다: 30의 MOI 대 MOI 30+30+30.

[0794]

그 후, GAPDH mRNA의 수준 대비, HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역에서 HBV 전사체의 억제 수준을 각 샘플에 대해 HBV mRNA 전사체 수준을 GAPDH mRNA에 정규화함으로써 결정하였다. 요약하면, 100ng의 총 RNA를 제조사의 설명서에 따라 고성능 cDNA 역전사 키트 (Life Technologies, Carlsbad, CA)를 사용하여 cDNA를 합성하는데 사용하였다. HBV 항원 HBsAg, HBcAg, HbxAg, 및 GAPDH 내의 영역의 양적 PCR 증폭을 파워 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스 (Life Technologies) 및 표 9에 열거된 프라이머 세트를 사용하여 수행하였다. 표준 실시간 PCR 조건을 사용하였다: 95 °C에서 10분간 초기 변성 후 95 °C에서 15초 및 60 °C에서 1분의 40 사이클.

[0795]

다양한 MOI에서, 개별적으로 발현될 때, 및 삼중 조합으로 동시에 발현될 때 shRNA14, shRNA15, shRNA37 및 shRNA28 각각에 대하여, GAPDH mRNA의 수준 대비 HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역에서의 HBV 전사체의 억제 수준이 도 12a-12f에 예시되어 있다. 도 12a-12f로부터 명백한 바와 같이, 삼중 조합은, 특히 더 낮은 동등한 용량으로서 도입될 때, 단일 shRNA 작제물 대비 HBV RNA의 유의하게 더 좋은 억다운을 나타내었다.

[0796]

**실시예 10 - HepG2.2.15 세포에서 HBV 전사체의 shRNA 억다운**

[0797]

단일 HBV shRNA Adv 벡터를 실시예 8에 따라 각각 shRNA14, shRNA15, shRNA37 및 shRNA28로 명명된 shRNA에 대해 제조하였다.

[0798]

각각 삼중 HBV shRNA 발현 카세트를 포함하는 2개의 삼중 HBV shRNA Adv 벡터를 또한 제조하였다. 삼중 HBV shRNA 발현 카세트는 (i) shRNA14/shRNA15/shRNA28 및 (ii) shRNA14/shRNA37/shRNA28 각각을 코딩하는 서열, 및 3개의 변형된 U6 프로모터 (즉, U6-1, U6-8, 또는 U6-9 프로모터)를 포함하였고, 하나는 상기 카세트에서 각 shRNA 코딩 서열의 바로 업스트림에 위치하였다. 삼중 HBV shRNA 발현 카세트를 각각 합성하였고 벡터 Biolabs (Malvern, PA)로부터의 바이러스 생성을 위한 아데노바이러스 (Adv) 작제물 내로 서브클로닝하였다.

[0799]

HepG2.2.15 세포를 실시예 4에 기재된 방법에 따라 제조하였다. 이후, HepG2.2.15 세포를 세포 현탁액에서 단일 또는 삼중 HBV shRNA Adv 벡터로 감염시키고 24-웰 플레이트 상에서 배양하였다. 요약하면, 각 웰은 1.2 x 10<sup>5</sup> HepG2.2.15 세포 및 MOI 100의 단일 또는 삼중 HBV shRNA Adv 벡터 중 하나의 현탁액을 함유하였다. 형질도입 후, 세포를 72시간, 96시간, 120시간 및 144시간 동안 5% CO<sub>2</sub>에서 37 °C에서 배양한 후, 각각 Qiagen miRNeasy 미니 키트 및 QiAmp DNA 미니 키트 (Valencia, CA)를 사용하여 RNA 및 DNA 추출을 위해 채집하였다.

[0800]

총 RNA를 실시예 9에 기재된 방법에 따라 단리하고 제조하였다. Adv 벡터에 의한 shRNA의 생성을 또한 실시예 9에 기재된 방법에 따라 측정하였다.

[0801]

세포당 shRNA 카피를 MOI 100의 단일 또는 삼중 HBV shRNA Adv 벡터(들)로부터 발현될 때 shRNA14, shRNA15, shRNA37 및 shRNA28의 각각에 대해 결정하였다 (도 13a-d). 전반적으로, 72시간에 삼중 HBV shRNA Adv 벡터로 형질도입된 세포에서의 개별적인 shRNA 발현은 단일 HBV shRNA Adv 벡터로 형질도입된 세포와 대등하였다. shRNA15 및 shRNA37는 형질도입 6일 후에도 계속 축적된 반면, shRNA14 및 shRNA28 발현 수준은 5일에 정체 상태인 것으로 보였다.

[0802]

이후, GAPDH mRNA의 수준 대비, HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역에서 HBV 전사체의 억제 수준을 실시예 9에 기재된 방법에 따라 각 샘플에 대해 HBV mRNA 전사체 수준을 GAPDH mRNA에 대해 정규화함으로써

결정하였다.

- [0803] 72시간, 96시간, 120시간 및 144시간에 MOI 100의 단일 또는 삼중 HBV shRNA AdV 벡터(들)로부터 발현될 때 shRNA14, shRNA15, shRNA37 및 shRNA28의 각각에 대해, GAPDH mRNA의 수준 대비 HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역에서의 HBV 전사체의 억제 수준이 도 14a-f에 예시되어 있다. 도 14a-14f로부터 명백한 바와 같이, 삼중 HBV shRNA AdV 벡터는 72시간 (3일)에 상응하는 단일 shRNA 벡터 대비 HBV RNA의 유의하게 더 좋은 억다운을 나타내었다. 모든 단일 HBV shRNA AdV 벡터는 연장된 시간 과정으로 증가된 억다운 수준을 나타내었고 144시간 (6일)에 삼중 HBV shRNA AdV 벡터와 대등하였다. 144시간에, shRNA14/shRNA37/shRNA28을 발현하는 삼중 HBV shRNA AdV 벡터는 HBsAg 및 HbxAg 영역에서 90%가 넘는 억다운 및 HBcAg 영역에서 80%와 가까운 억다운을 달성하였다.
- [0804] **실시예 11 - 시험관내에서 HBV 전사체의 억제**
- [0805] 본 발명자들은 HBV 접종물로 새롭게 감염된 세포 모델에서 shRNA14/shRNA37/shRNA28을 발현하는 삼중 HBV shRNA AdV 벡터가 공유결합 폐환형 DNA (cccDNA) 형성에 미치는 효과를 결정하였다.
- [0806] shRNA14/shRNA37/shRNA28을 발현하는 삼중 HBV shRNA AdV 벡터를 실시예 10에 따라 제조하였다.
- [0807] 인간 간세포를 인간 간세포로 고도로 대체된 간 (즉, 인간화된 간)을 갖는 키메라 마우스인 PhoenixBio 마우스 모델 (PXB-mice<sup>®</sup>)로부터 단리하였다. 상기 단리된 인간 간세포 (PXB-세포)를 접종 전 1일에 24-웰 배양 플레이트 내로 웰당  $4.0 \times 10^5$  세포의 밀도로 시딩하였다. 이후, 0일에 PXB-세포에 HBV를 접종하였다. 접종 후, 세포에 (i) 하기 MOI의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터: 10, 30, 60 및 100 또는 (ii) 하기 MOI의 AdV 벡터 백본: 10, 30, 60 및 100을 처리하거나, 또는 (iii) 처리를 하지 않았고, 이후 6, 11 및 16일 동안 5% CO<sub>2</sub>에서 37 °C에서 배양한 다음, Qiagen miRNeasy 미니 키트 및 QiAmp DNA 미니 키트 (Valencia, CA)를 사용하여 각각 RNA 및 DNA 추출을 위해 채집하였다.
- [0808] MOI 10의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터가 접종된 PXB-세포의 경우, 세포당 shRNA 카피를 실시예 9에 기재된 방법에 따라 처리 후 6일, 11일 및 16일에 shRNA14, shRNA37 및 shRNA28 각각에 대해 결정하였다 (도 15a). HBV 전사체의 효과적인 억다운 (78-85%)이 삼중 HBV shRNA AdV 벡터의 처리 후 6일에 관찰되었고, 이 억다운은 처리 후 16일에 97-99%까지 증가하는 것으로 관찰되었다. 6일 및 16일 사이에 HBV 전사체의 억다운의 이러한 증가는 AdV 벡터에 의한 shRNA의 생성의 부수적인 증가와 일치하는 것으로 나타났다.
- [0809] HBV 항원 HBsAg, HBcAg 및 HbxAg에 상응하는 영역에서의 HBV 전사체의 억제 수준을 AdV 백본만으로 처리된 세포 대비 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 세포에 대해 실시예 9에 기재된 방법에 따라 측정하였다 (도 15b).
- [0810] 삼중 HBV shRNA AdV 벡터 처리 후 세포내 및 세포외 HBV DNA의 수준을 또한 실시간 PCR 분석에 의해 측정하였고, 이는 도 15c에 예시되어 있다. 세포내 및 세포외 HBV DNA에서 각각 85% 및 1 로그 하락이 처리 후 11일에 관찰되었다.
- [0811] HBV 항원 HBsAg 및 HBcAg에 상응하는 영역에서의 HBV 전사체의 수준을 실시예 9에 기재된 방법에 따라 측정하였고, 그 결과가 도 15d에 예시되어 있다. 세포외 HBcAg 및 HBsAg의 수준은 AdV 백본 대조군과 비교하여 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 세포에서 11일에 약 90%까지 하락하는 것으로 관찰되었다.
- [0812] cccDNA의 수준을 또한 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리 후 PXB-세포에서 측정하였고, 그 결과가 도 15e에 예시되어 있다. 처리 후 11일에, cccDNA의 66% 감소가 AdV 백본 대조군으로 처리된 HBV 감염된 PXB-세포 및 처리되지 않은 PXB-세포와 비교하여 삼중 HBV shRNA AdV 벡터로 처리된 HBV 감염된 PXB-세포에서 관찰되었다.
- [0813] **실시예 12 - 생체내에서 HBV 전사체의 억제**
- [0814] (i) HBV 바이러스 전사체의 발현, (ii) 세포외 HBsAg 및 HBeAg, (iii) 세포외 및 세포내 HBV DNA, 및 (iv) cccDNA의 형성에 대한 shRNA14/shRNA37/shRNA28을 발현하는 삼중 HBV shRNA AdV 벡터의 생체내 효과를 HBV 접종물로 새롭게 감염된 PXB 마우스 모델에서 결정하였다.
- [0815] **방법**
- [0816] shRNA14/shRNA37/shRNA28을 발현하는 삼중 HBV shRNA AdV 벡터를 실시예 10에 따라 제조하였다.
- [0817] 키메라 PXB 마우스 (PXB-mice<sup>®</sup>)를 PhoenixBio로부터 수득하였다. 모든 마우스를  $23 \pm 5^\circ \text{C}$  및  $55 \pm 25\%$  습도의

습도에서 개별적으로 사육하고, 12시간 명암 주기에 노출시키고, 실험 내내 임의로 급수하였다.

[0818] 요약하면, 19-23주령의 수컷 PXB 마우스에게 HBV 유전자형 C를 접종하고 4주간 인큐베이션하여 기저 HBV 감염을 확립하였다. 기저 HBV 감염을 결정하기 위해, -28일, -21일, -14일 및 -7일 (즉, 접종 후 각각 0일, 7일, 14일 및 21일)에 마우스로부터 혈액을 채취하고, 이로부터 HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg의 인간 알부민 (h-Alb) 농도 및 혈청 농도를 결정하였다.

[0819] 각 시점에 Intramedic™ 폴리에틸렌 튜빙 (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)을 사용하여 안와정맥총 (retro-orbital plexus)/부비강 (sinus)을 통한 이소푸란 (Escain®, Mylan, Osaka, Japan) 마취하에 동물로부터 혈액을 수집하였다.

[0820] 혈액 h-Alb 농도를 측정하기 위해, 2 µL의 전혈을 식염수에서 희석하고, 임상 화학 분석기 (BioMajesty™ Series JCA-BM6050, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 라텍스 응집 면역확탁계측기 (latex agglutination immunonephelometry)를 사용하여 혈액 h-Alb 농도를 측정하는데 사용하였다 (LZ Test “Eiken” U-ALB, Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan).

[0821] 전혈을 원심분리하여 HBV DNA 정량, HBsAg 및 HBeAg 분석을 위한 혈청을 분리하였다.

[0822] 혈청 HBV DNA를 측정하기 위해, HBV DNA를 SMITESTEX-R&D 핵산 추출 키트를 사용하여 5 µL의 혈청으로부터 추출하였다 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD., Nagoya, Japan). 이후, 정제된 DNA를 20 µL 뉴클레아제가 없는 물 (Ambion)에 용해시켰다. HBV-감염된 PXB-마우스로부터의 혈청을 HBV DNA 표준으로서 사용하였다. 합성적 HBV DNA를 사용하여 HBV DNA 표준의 농도를 결정하고, 이후, 이를 혈청 HBV DNA 수준의 정량에 사용하였다. HBV DNA를 HBV DNA 표준으로부터 추출하고 적절한 희석 후 실시간 PCR에 사용하였다. 이 연구를 위해, 사용된 표준의 범위는 4.0E<sup>+04</sup> 내지 2.0E<sup>+09</sup> 카피/mL였다.

[0823] 혈청 HBV DNA 농도를 결정하기 위한 실시간 PCR을 TaqMan 고속 진전된 마스터 믹스 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.) 및 ABI Prism 7500 서열 검출기 시스템 (Applied Biosystems)을 사용하여 수행하였다. PCR 반응 혼합물을 5 µL의 추출된 DNA에 첨가하였다. 50 °C에서 2분 동안 우라실-N-글리코실라제의 초기 활성화 후 95 °C에서 20초 동안 중합효소 활성화를 수행하였다. 차후 PCR 증폭은 ABI 7500 서열 검출기에서 사이클당 95 °C에서 3초 동안 변성 및 60 °C에서 32초 동안 어닐링 및 연장의 53 사이클로 구성되었다. 평균 혈청 HBV DNA 수준을 2개의 별개의 웰의 값으로부터 계산하였다.

[0824] 실시간 PCR을 위해 사용된 프라이머 및 프로브는 하기와 같다:

확인	표적 위치	서열 정보		
		염료	5' 뉴클레오타이드 3'	염료
정방향 프라이머	166-186	해당없음	CACATCAGGATTCCTAGGACC	해당없음
역방향 프라이머	344-325	해당없음	AGGTTGGTGAGTGATTGGAG	해당없음
TaqMan 프로브	242-267	6-FAM	CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC	TAMRA

[0825] 이 분석의 가장 낮은 정량 한계는 4.0E<sup>+04</sup> 카피/mL 혈청이었다.

[0827] 혈청 HBsAg 농도를 하기를 사용하여 SRL, Inc.(Tokyo, Japan)에 의해 결정하였다: 화학발광 면역분석 (CLIA) developed by Abbott에 의해 개발된 화학발광 면역분석 (CLIA) (ARCHITECT® SY스텝). 희석 인자는 30이었고, 이 분석의 측정 범위는 0.05 내지 250 IU/mL였다. 30배 희석된 샘플의 경우, 측정 범위를 1.5 내지 7500 IU/mL 이 되도록 조정하였다.

[0828] 혈청 HBeAg 농도를 하기를 사용하여 SRL, Inc.(Tokyo, Japan)에 의해 결정하였다: 화학발광 면역분석 (CLIA) developed by Abbott에 의해 개발된 화학발광 면역분석 (CLIA) (ARCHITECT® SY스텝). 희석 인자는 30이었고, 이 분석의 가장 낮은 정량 한계는 0.5 S/CO이었다. 30배 희석된 샘플의 경우, 가장 낮은 정량 한계를 15 S/CO가 되도록 조정하였다.

[0829] 동물이 하기 기준을 만족하면 차후 처리 실험에 포함시켰다:

[0830] (i) -1일 (즉, HBV 접종 후 27일)에 15g 이상의 체중을 가지고;

- [0831] (ii) -7일 (즉, HBV 접종 후 21일)에 적어도  $1.0E^{+6}$  카피/mL의 혈청 HBV DNA 농도를 가지며;
- [0832] (iii) -7일 (즉, HBV 접종 후 21일)에 10mg/mL 이상의 h-Alb 측정을 갖는다.
- [0833] 기저 HBV 감염이 확립되고 상기 기준을 만족한 마우스를 3개의 처리 그룹 즉, 처리 그룹 1-3 (그룹당 n=4)에 두었다. 그룹 간의 편차를 최소화하기 위해, 그룹 구성을 체중에 대한 수학적 평균 값 및 혈액 h-Alb 농도 및 혈청 HBV DNA 농도에 대한 기하학적 평균 값에 기초하여 무작위 배정하였다.
- [0834] 처리 그룹은 하기와 같았다:
- [0835] 그룹 1: 비처리;
- [0836] 그룹 2: IV 주사에 의해 꼬리 정맥에 전달된,  $2.00E^{+11}$  vg/mL의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터를 함유하는, 10  $\mu$ L/g 체중의 용량 부피를 갖는 단일 볼루스; 및
- [0837] 그룹 3: IV 주사에 의해 꼬리 정맥에 전달된,  $2.00E^{+12}$  vg/mL 삼중 HBV shRNA AdV 벡터를 함유하는, 10  $\mu$ L/g 체중의 용량 부피를 갖는 단일 볼루스
- [0838] 처리의 투여 후 (0일), 동물을 추가 56일 동안 인큐베이션하였다. 이 시간 동안 8주 동안 1주일 기준으로 (처리 후 7일, 14일, 21일, 28일, 35일, 42일, 49일 및 56일) 혈액을 채취하고, 기재된 방법을 사용하여 실시간 PCR에 의해 세포의 HBsAg, 세포의 HBeAg 및 세포의 HBV DNA의 혈청 농도를 결정하였다.
- [0839] 56일에 혈액 샘플링을 완료한 후, 생존한 모든 동물을 이소플란 마취하에 두고 심장 천자 및 방혈에 의해 희생시켰다.
- [0840] 희생되면, 마우스로부터 전체 간을 채취하고 칭량하였다. 3 내지 5 mm 두께의 절편을 좌측 측엽으로부터 수득하고 한 면에 약 1 내지 2 mm의 정육면체로 절단하였다. 이들 간 정육면체를 라벨된 튜브 내로 옮기고 가능한 신속하게 하기에 침지시켰다: RNAlater® 용액 (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). 간 샘플을 4° C에서 밤새  $\geq 5$  부피의 RNAlater®에서 인큐베이션하여 상기 용액이 조직을 투과하도록 하였다. 인큐베이션 후, RNAlater® 용액을 제거하고, 간 HBV DNA 수준의 이후 정량을 위해 간 조각을 80 °C에 보관하였다.
- [0841] 처리 후 간 HBV DNA의 수준을 결정하기 위해, DNeasy® 혈액 & 조직 키트를 사용하여 동결된 RNAlater®-보존된 간 조직으로부터 HBV DNA를 추출하였다 (Qiagen K.K., Tokyo, Japan). DNA를 200  $\mu$ L 뉴클레아제가 없는 물에 용해시키고, 이후, DNA 용액의 농도를 BioPhotometer 6131을 사용하여 결정하였다 (Eppendorf Co., Ltd., Tokyo, Japan). DNA 용액의 농도를 뉴클레아제가 없는 물을 사용하여 20 ng/ $\mu$ L로 조정하였다.
- [0842] 이후, 간 HBV cccDNA 농도를 측정하기 위한 실시간 PCR을 TaqMan 고속 진전된 마스터 믹스 및 ABI Prism 7500 서열 검출기 시스템을 사용하여 수행하였다. 요약하면, PCR 반응 혼합물을 5  $\mu$ L의 추출된 DNA에 첨가하였다. PCR 반응을 탁겐베르그 (Takkenberg) 조건에 기초하여 수행하였다. 50 °C에서 2분 동안 우라실-N-글리코실라제의 초기 활성화 후 95 °C에서 20초 동안 중합효소 활성화를 수행하였다. ABI 7500 서열 검출기에서 사이클당 95 °C에서 3초 및 60 °C에서 32초에서 차후 55 사이클의 PCR 증폭을 수행하였다. 평균 HBV cccDNA 수준을 2개의 별개의 웰의 값으로부터 계산하였다. HBV 전체-게놈 서열을 함유하는 플라스미드를 HBV cccDNA 정량을 위한 표준 샘플로서 사용하였다. 사용된 표준의 범위는  $1.0E^{+02}$  내지  $1.0E^{+05}$  카피/100 ng DNA였다.
- [0843] 실시간 PCR을 위해 사용된 프라이머 및 프로브는 하기와 같다:

확인	표적 위치	서열 정보		
		염료	5' 뉴클레오타이드 3'	염료
정방향 프라이머	1545-1563	해당없음	CTCCCCGTCTGTGCCTTCT	해당없음
역방향 프라이머	1900-1883	해당없음	GCCCCAAAGCCACCCAAG	해당없음
TaqMan 프로브	1602-1628	6-FAM	CGTCGCATGGARACCACCGTGAACGCC	TAMRA

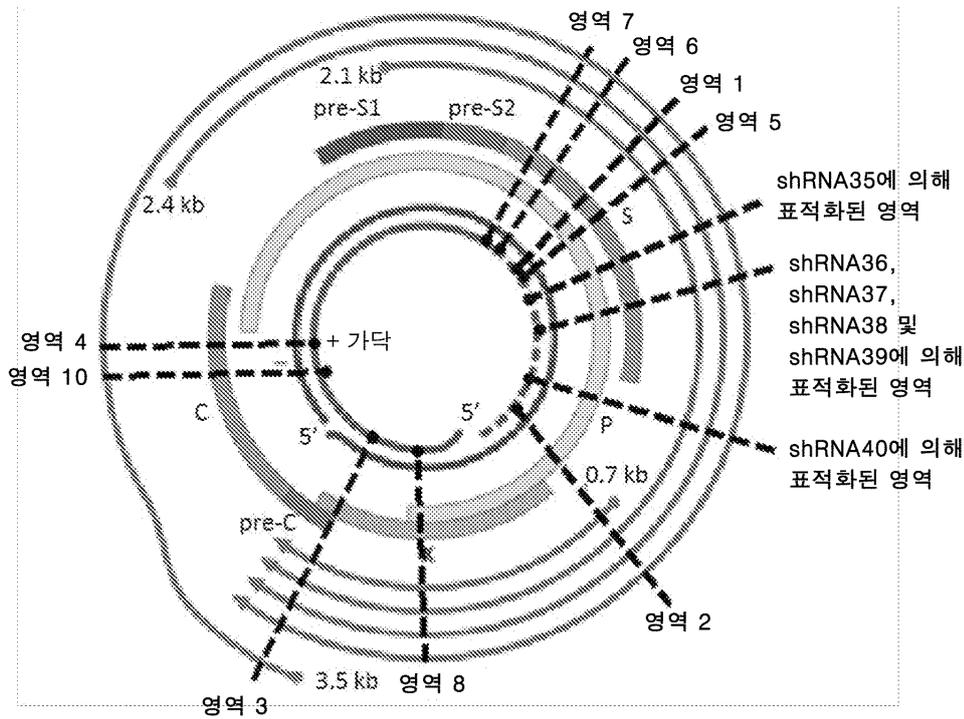
[0844] 이 분석의 가장 낮은 정량 한계는 추출된 DNA 용액에서  $1.0E^{+02}$  카피/100 ng DNA였다.

[0846] 결과

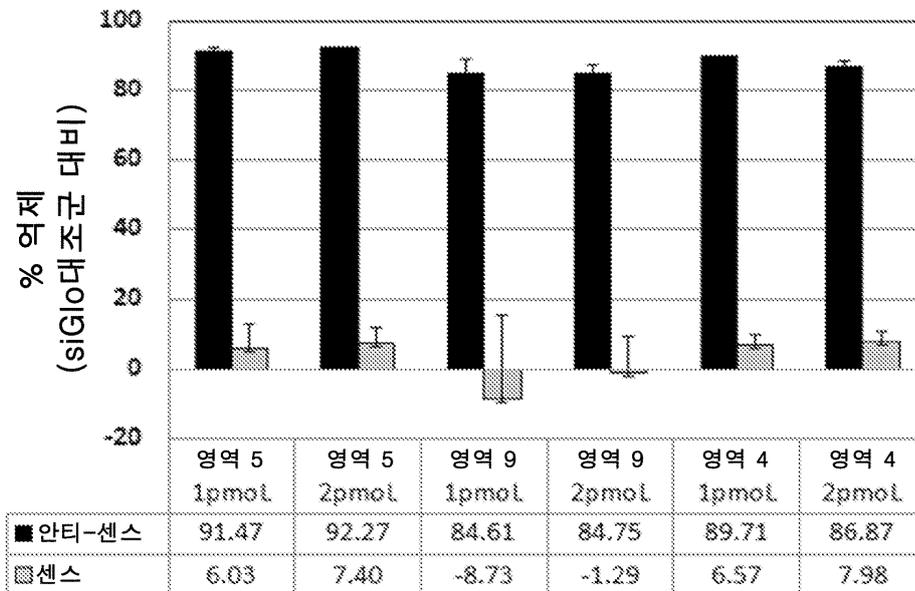
- [0847] 모든 동물은 처리 내내 초기 수준의 80%를 넘는 체중을 유지하였다. 또한, 그룹 2 및 3에서 체중의 가장 낮은 평균 값은 치료를 받지 않는 대조군 그룹보다 약간 더 낮았다.
- [0848] 도 16 및 17로부터 명백한 바와 같이, 삼중 HBV shRNA AdV 벡터를 투여받고 있는 처리 그룹의 동물은 대조군 처리를 투여받은 그룹 1의 동물 대비 실험 과정 내내 혈청 HBV DNA의 꾸준한 감소를 나타내었다. 56일에, 중간 용량 처리를 투여받고 있는 동물 (그룹 2)은 혈청 HBV DNA에서 평균 0.59 로그 및 74.4% 감소를 나타내었고, 높은 용량 처리를 투여받고 있는 동물 (그룹 3)은 혈청 HBV DNA에서 평균 1.83 로그 및 98.5% 감소를 나타내었다.
- [0849] 유사하게, HBsAg 및 HBeAg의 혈청 농도는 대조군 처리를 받은 그룹 1의 동물 대비 삼중 HBV shRNA AdV 벡터 처리 후에 꾸준히 감소되었다 (도 18 및 19). 56일에, 중간 용량 처리를 투여받고 있는 동물 (그룹 2)은 HBsAg 및 HBeAg의 혈청 수준에서 각각 78.4% 및 63.6%의 평균 감소를 나타내었고, 고용량 처리를 받고 있는 동물 (그룹 3)은 HBsAg 및 HBeAg의 혈청 수준에서 각각 97.6% 및 92.6%의 평균 감소를 나타내었다.
- [0850] 56일에 세포내 HBV DNA 및 cccDNA의 수준은 또한 대조군 처리를 투여받고 있는 동물 (그룹 1)과 비교하여 중간 및 고용량 처리에 있는 동물 (각각 그룹 2 및 3)의 경우 감소된 것으로 나타났다. 예를 들어, 도 20에 예시된 바와 같이, 중간 및 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터를 이용한 처리는 56일에 세포내 HBV DNA의 카피 수에서, 각각 48.6% 및 94.9% 감소를 야기하였다. 유사하게, 도 21은 중간 및 고용량의 삼중 HBV shRNA AdV 벡터를 이용한 처리가 56일에 cccDNA의 카피 수에서 각각 36.9% 및 57.7% 감소를 야기하였음을 보여준다.
- [0851] 삼중 HBV shRNA AdV 벡터에 의해 발현된 shRNA (즉, shRNA14, shRNA 37 및 shRNA28)에 상응하는 HBV 바이러스 전사체의 억제 수준을 또한 실시간 PCR에 의해 56일에 측정하였다. 도 22에 나타난 바와 같이, shRNA14, shRNA 37 및 shRNA28에 상응하는 바이러스 RNA는 대조군 처리를 투여받은 그룹 1로부터의 동물에서의 HBV 바이러스 전사체의 발현 수준과 비교하여 중간 용량으로 처리된 그룹 2에서의 동물에서 39.4%, 39.2% 및 53.3%로 감소하였다. 마찬가지로, 도 23은 shRNA14, shRNA 37 및 shRNA28에 상응하는 바이러스 RNA가 대조군 처리를 투여받은 그룹 1로부터의 동물에서의 HBV 바이러스 전사체의 발현 수준과 비교하여 고용량으로 처리된 그룹 3의 동물에서 86.2%, 82.0% 및 89.1%로 감소하였음을 보여준다.
- [0852] 현 연구의 결과에 기초하여, 삼중 HBV shRNA AdV 벡터는 인간화된 간을 갖는 HBV 감염된 PXB-마우스에 투여될 때 혈청 HBV DNA, 혈청 HBsAg, 혈청 HBeAg 및 간 HBV DNA의 바이러스 매개변수에 대해 명확한 효과를 가지는 것으로 나타났다. 이들 항바이러스 효과는  $2.00E^{+12}$  vg/kg (그룹 2) 및  $2.00E^{+13}$  vg/kg (그룹 3)의 투여량에서 관찰되었고, 이는 상이한 투여량에서 삼중 HBV shRNA AdV 벡터의 효능을 입증한다.
- [0853] 본 개시내용의 광범위한 일반적인 범위를 벗어나지 않으면서, 상기 기재된 구현예에 다양한 변화 및/또는 변형이 이뤄질 수 있음이 본 기술분야의 숙련가에 의해 인식될 것이다. 따라서, 본 구현예는 모든 측면에서 예시적이며 제한적이지 않은 것으로 간주되어야 한다.

도면

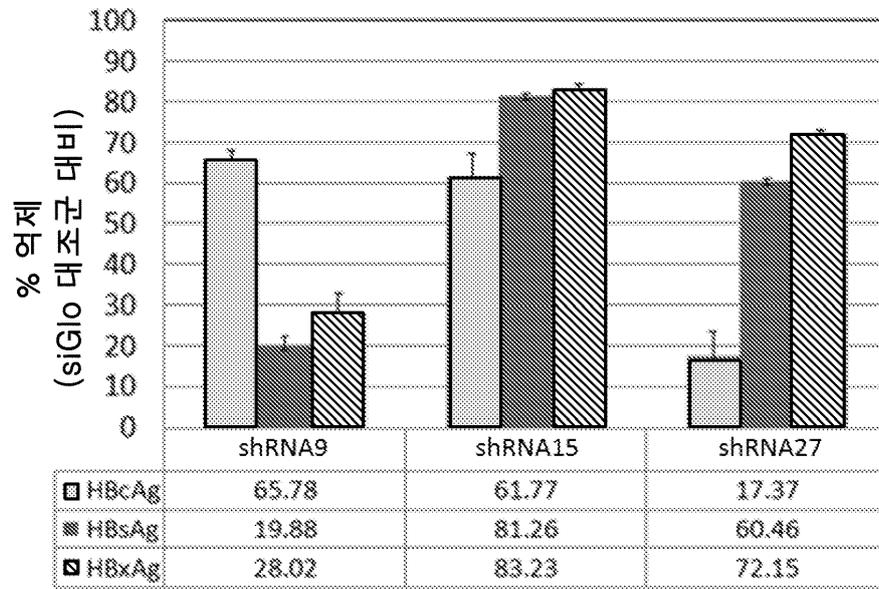
도면1



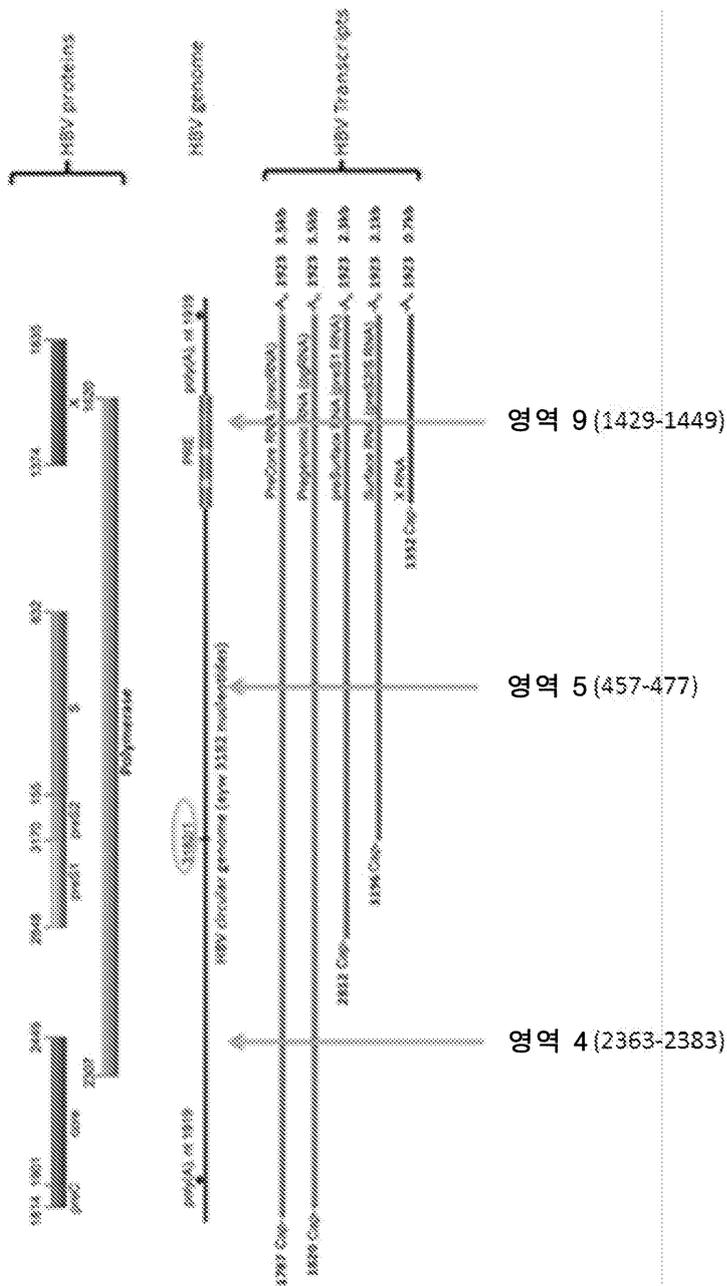
도면2



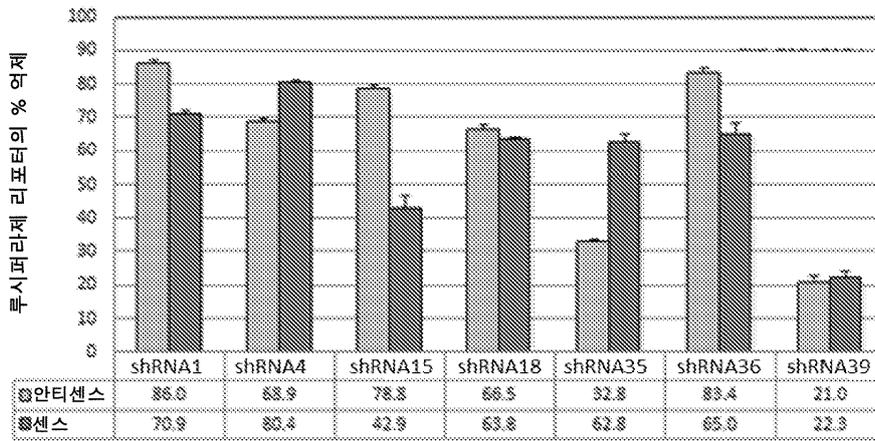
도면3



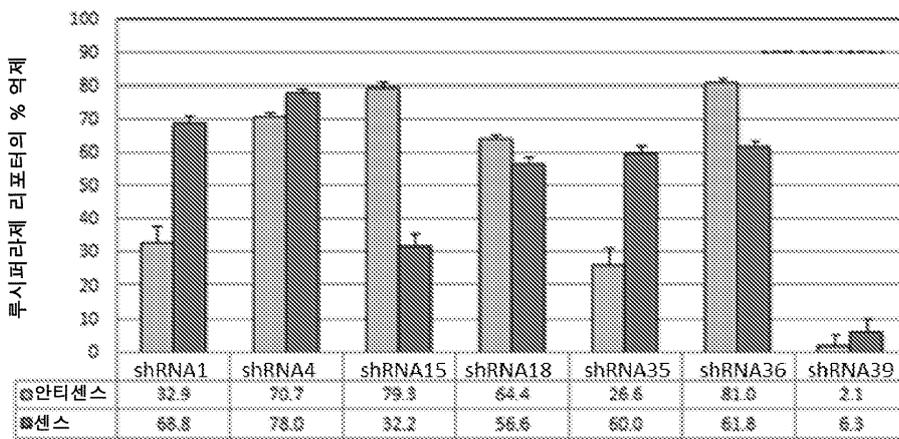
도면4



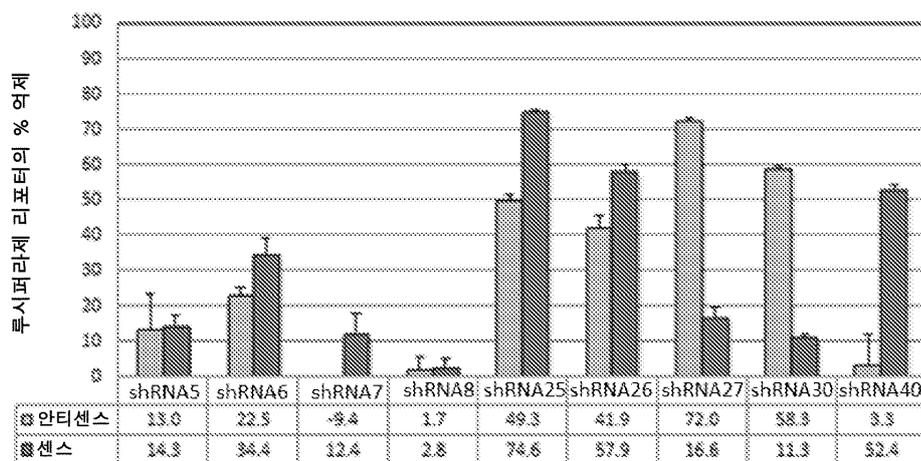
도면5a



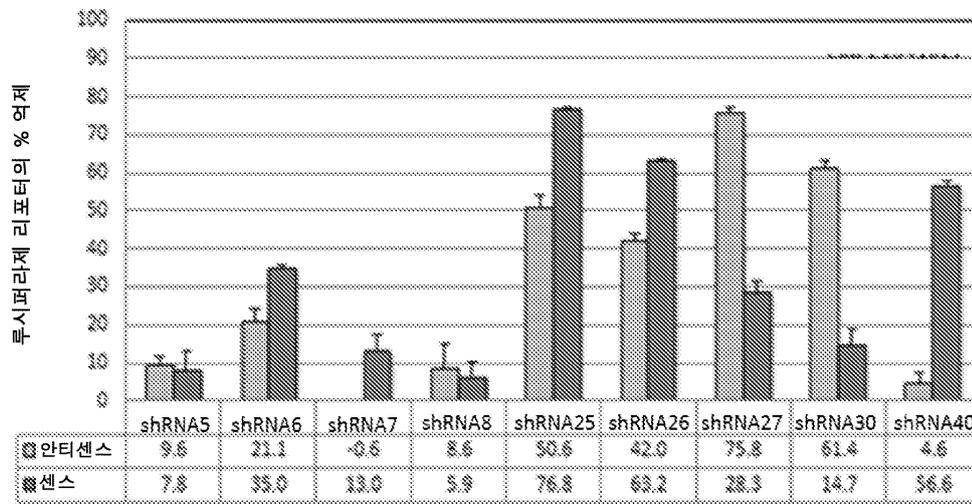
도면5b



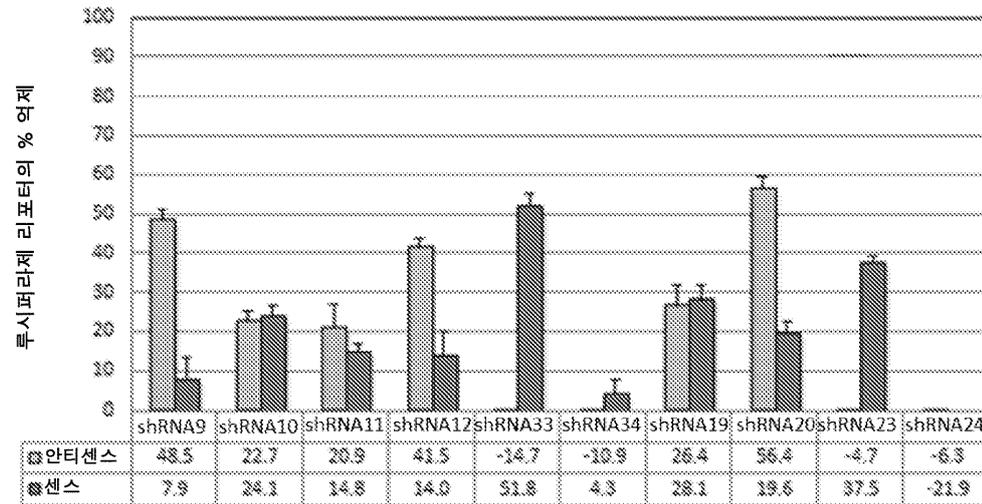
도면5c



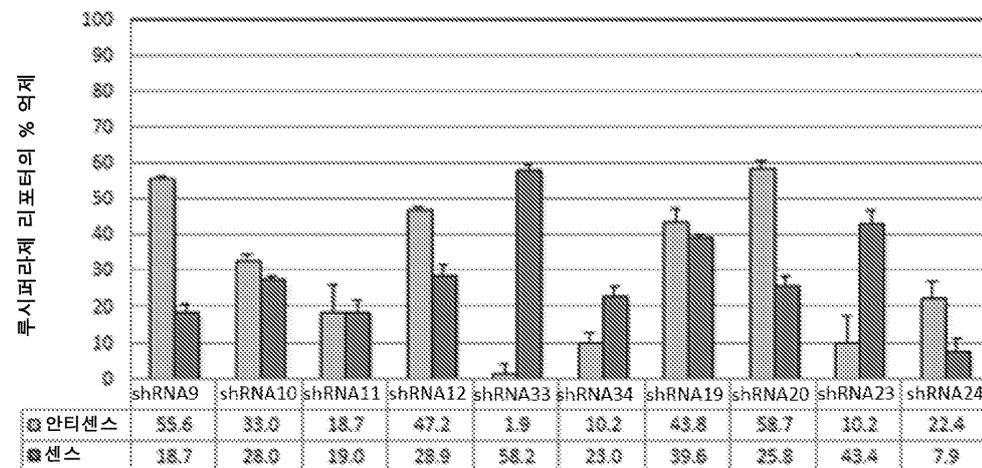
도면5d



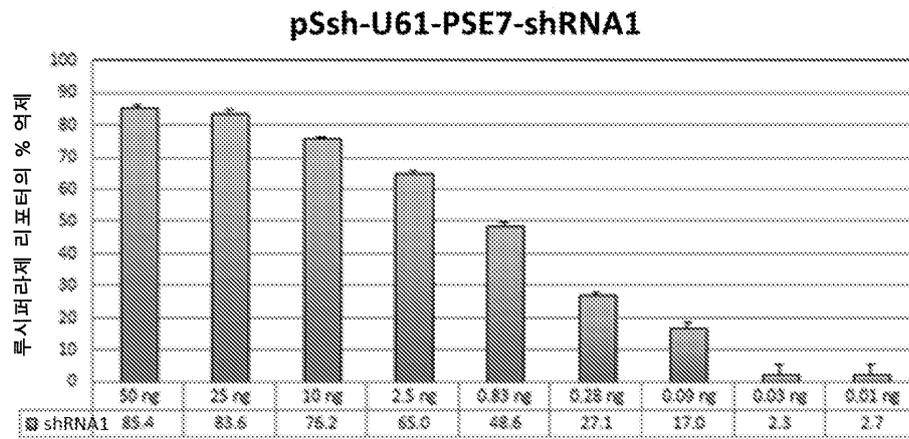
도면5e



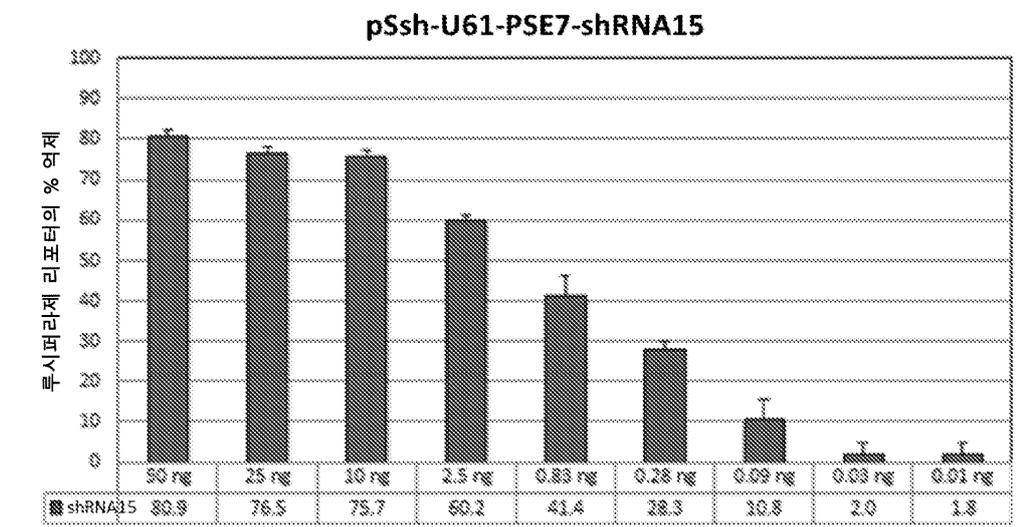
도면5f



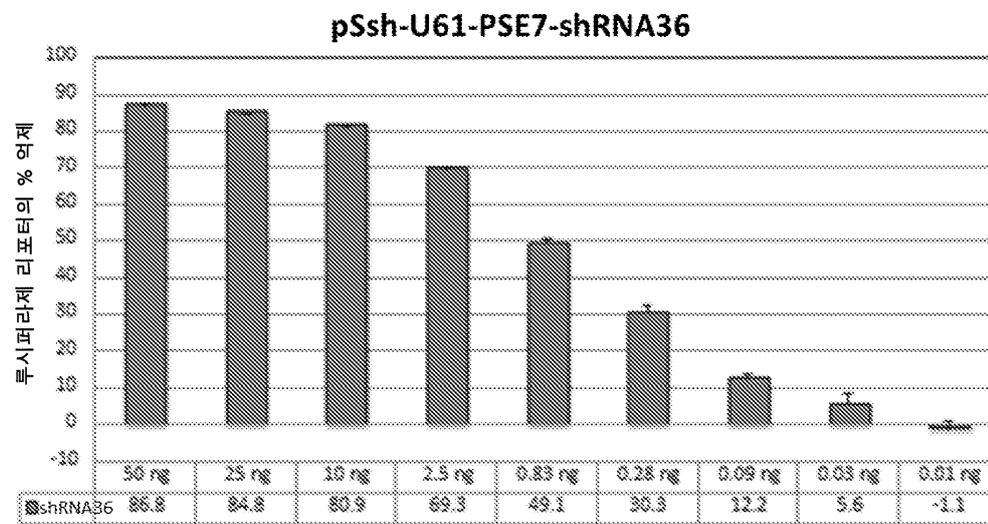
도면6a



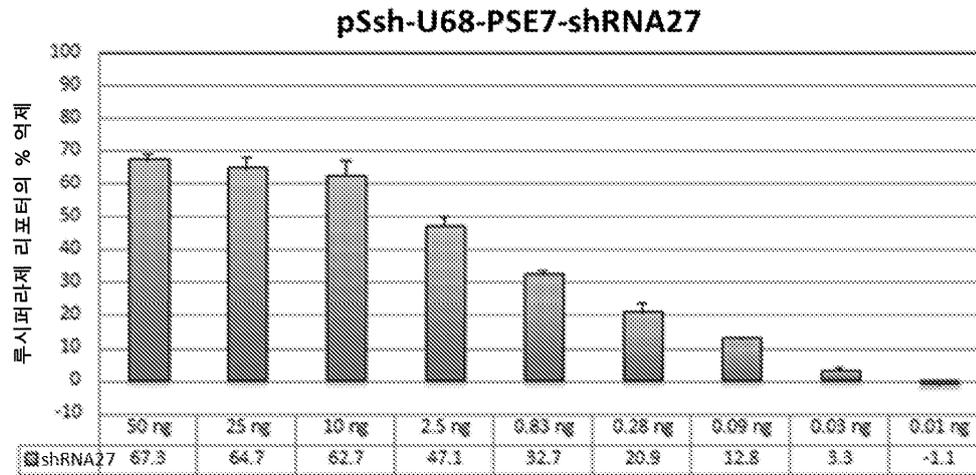
도면6b



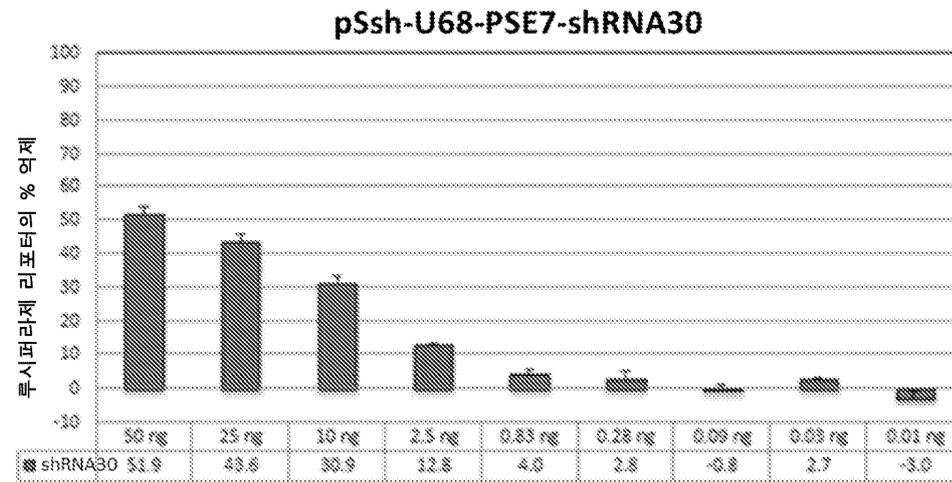
도면6c



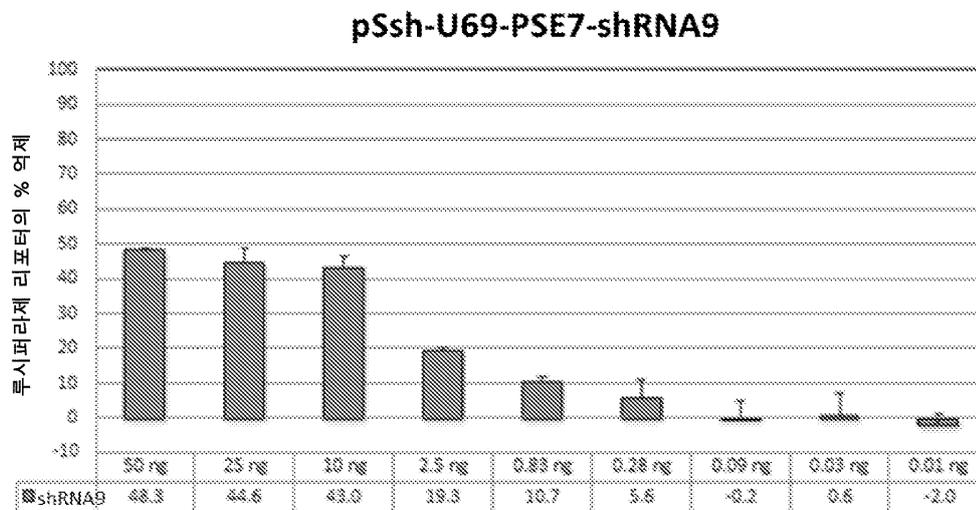
도면6d



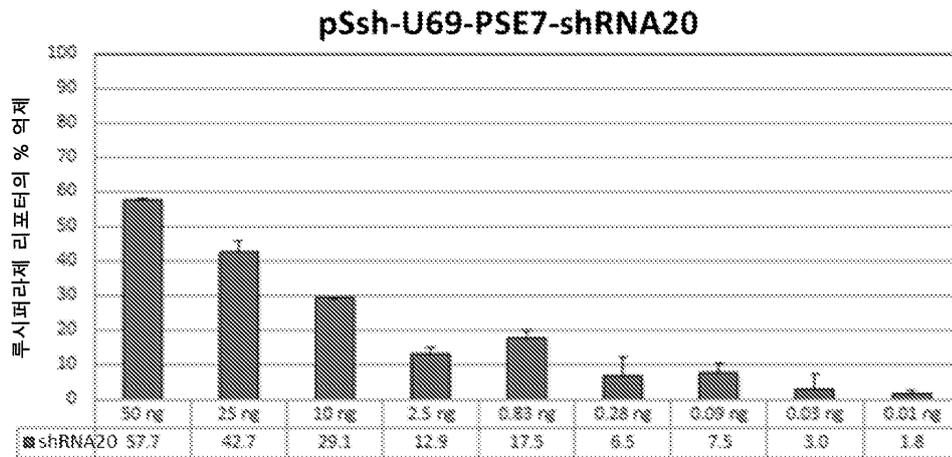
도면6e



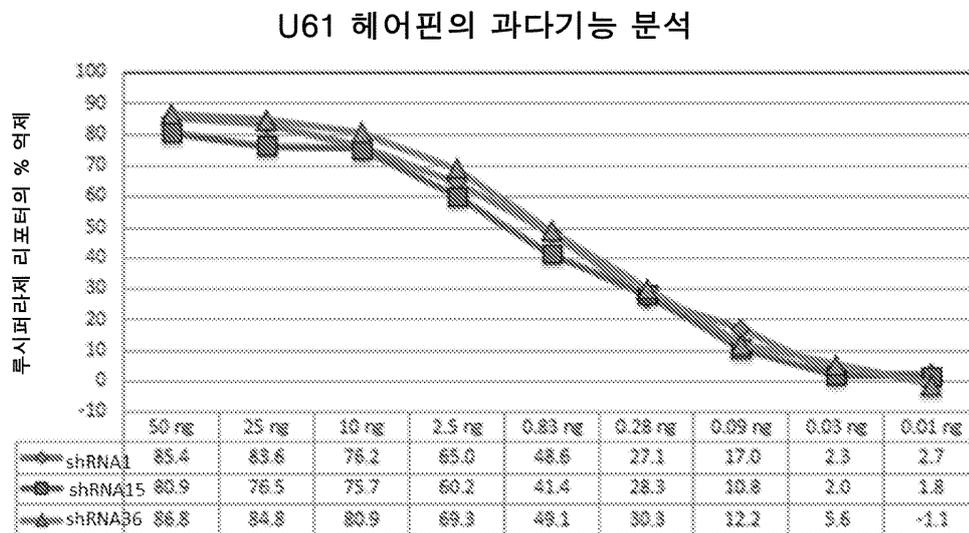
도면6f



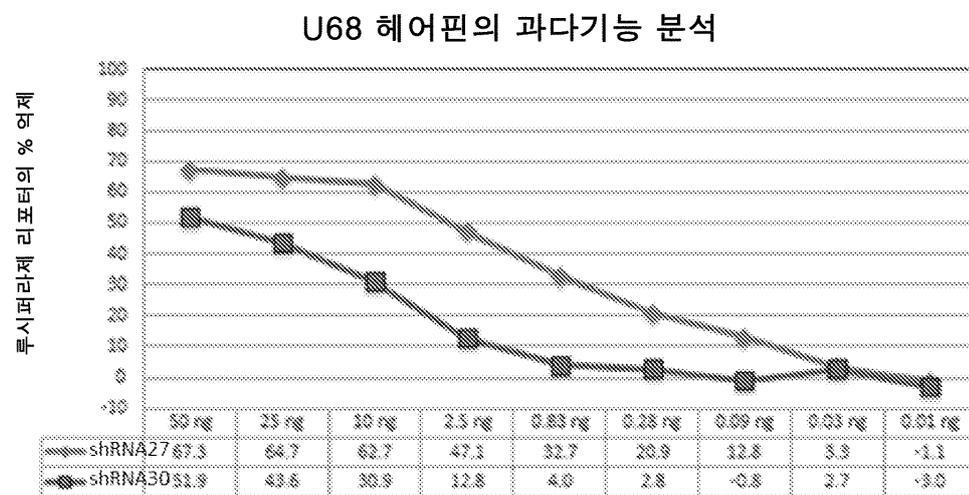
도면6g



도면6h

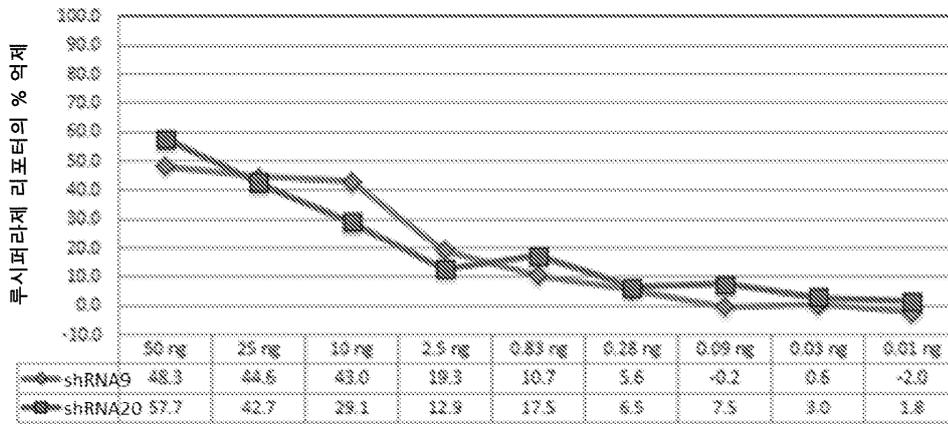


도면6i



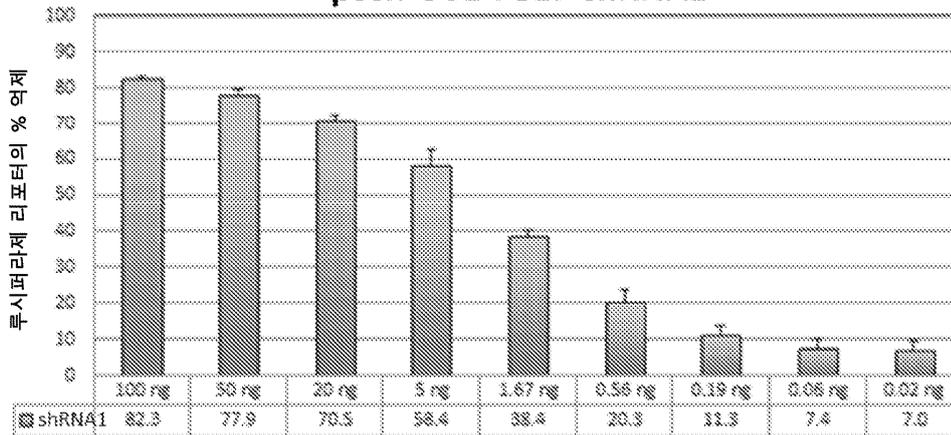
도면6j

U69 헤어핀의 과다기능 분석



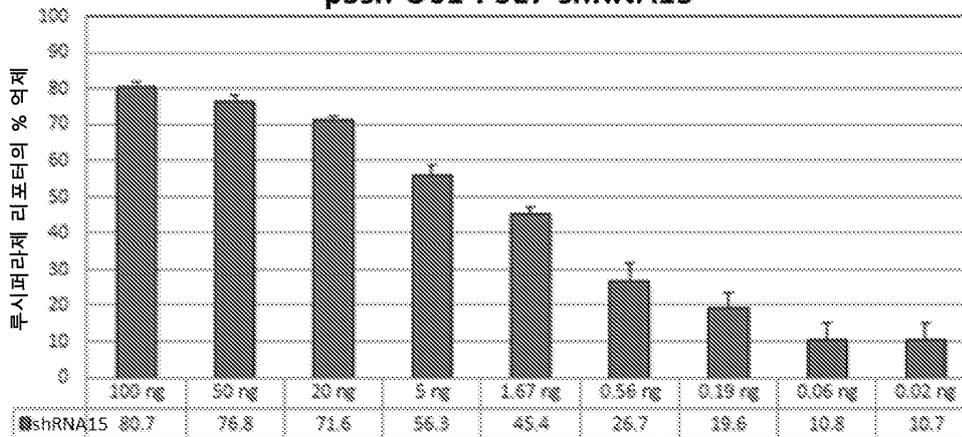
도면7a

pSsh-U61-PSE7-shRNA1

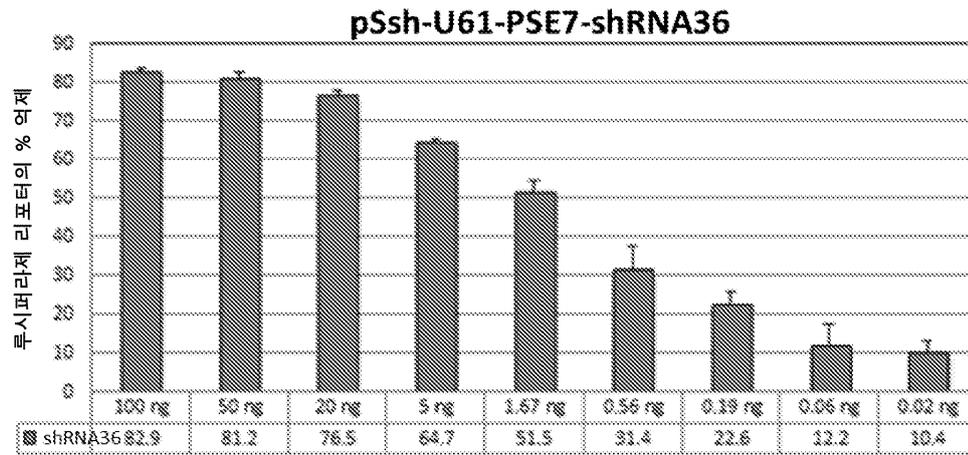


도면7b

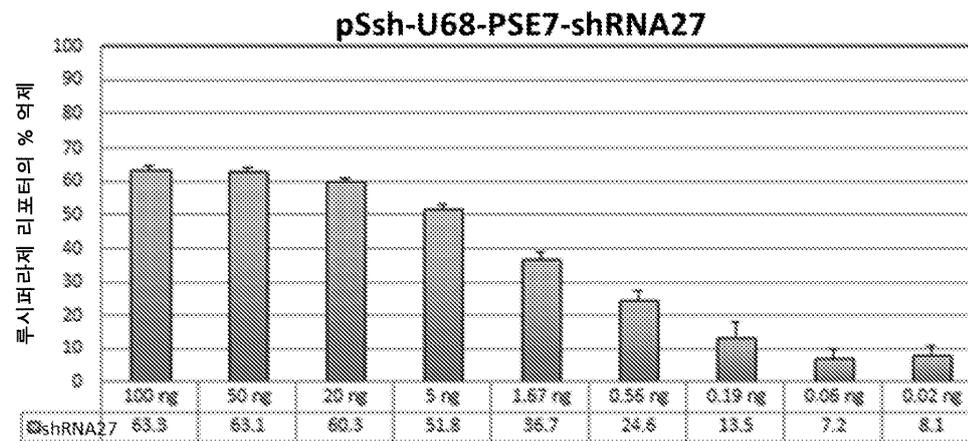
pSsh-U61-PSE7-shRNA15



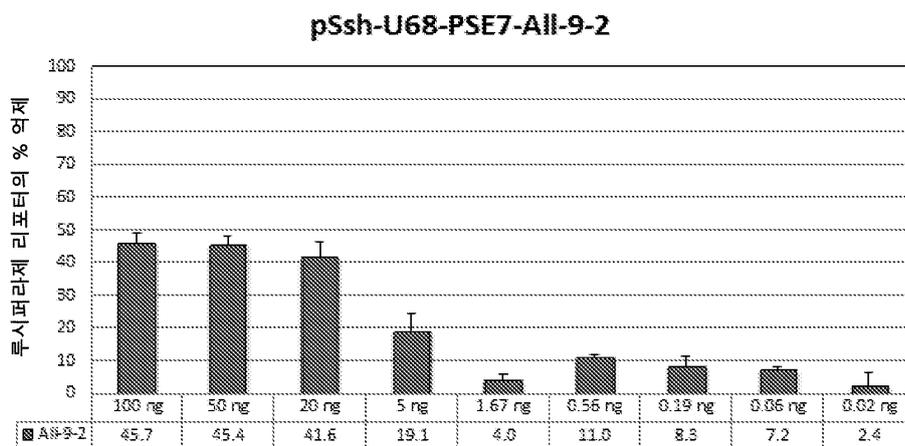
도면7c



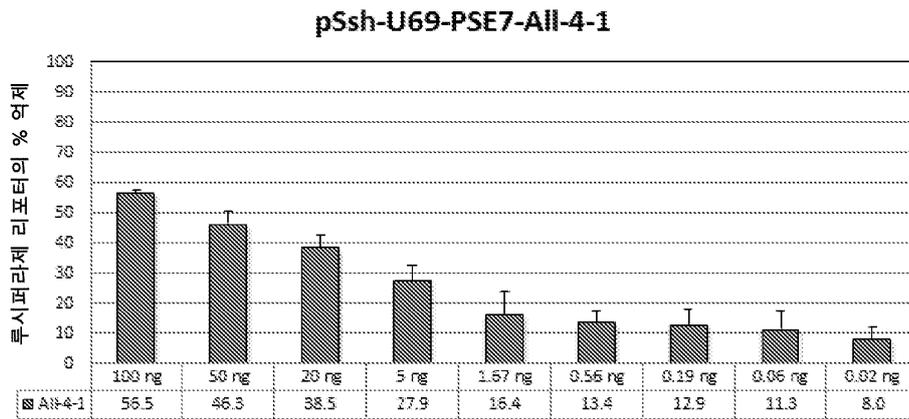
도면7d



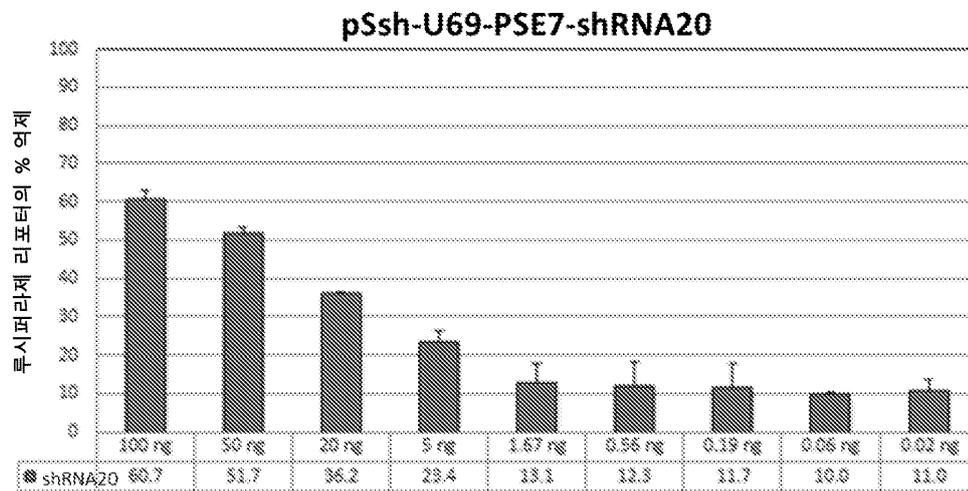
도면7e



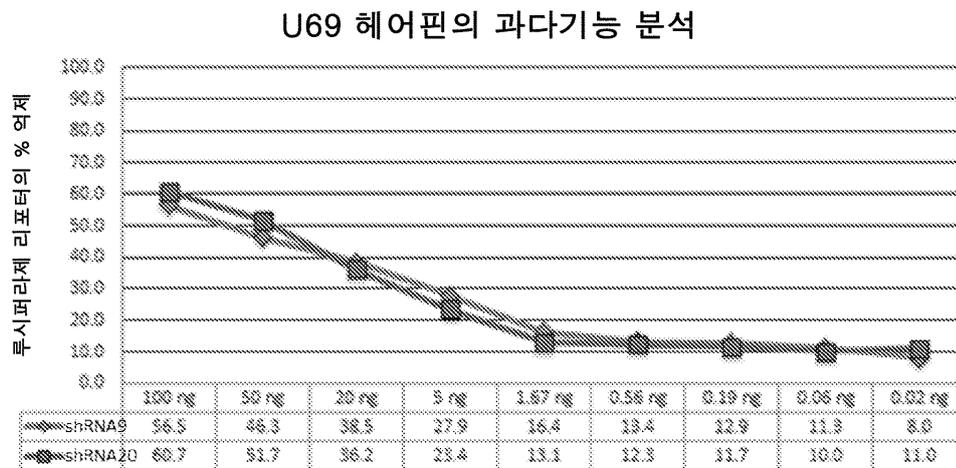
도면7f



도면7g

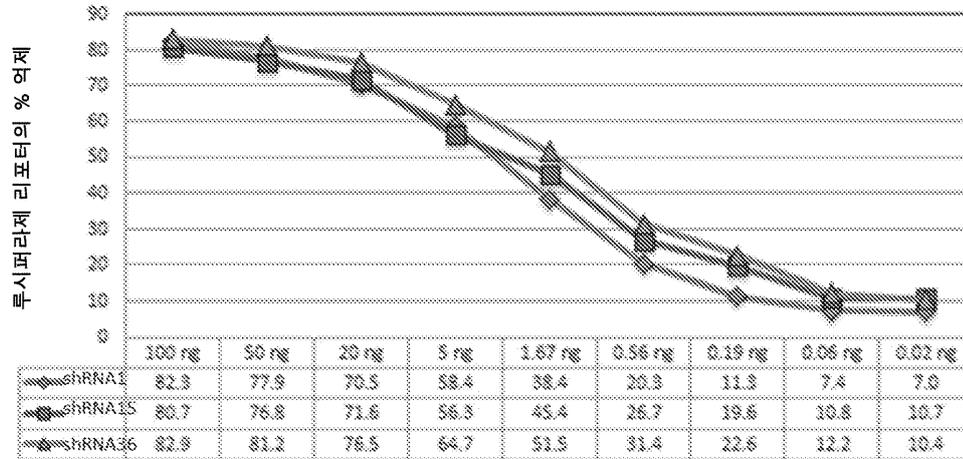


도면7h



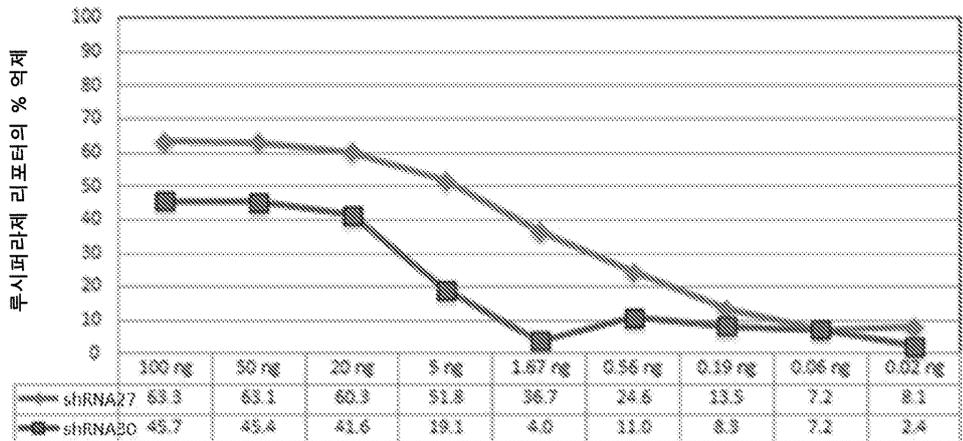
도면7i

U61 헤어핀의 과다기능 분석



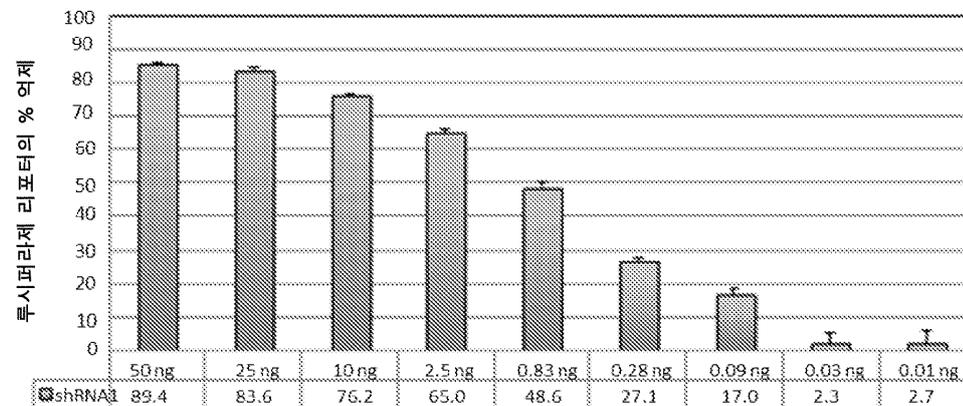
도면7j

U68 헤어핀의 과다기능 분석

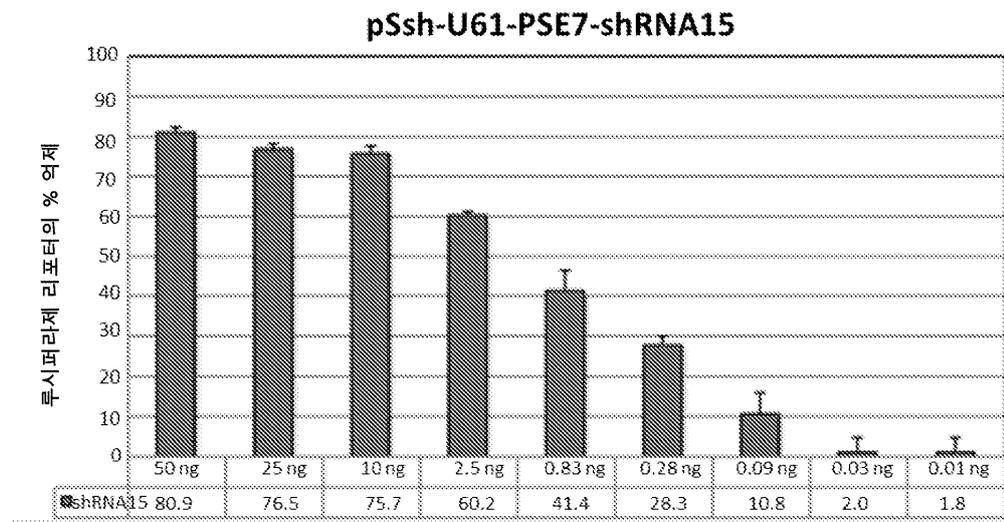


도면8a

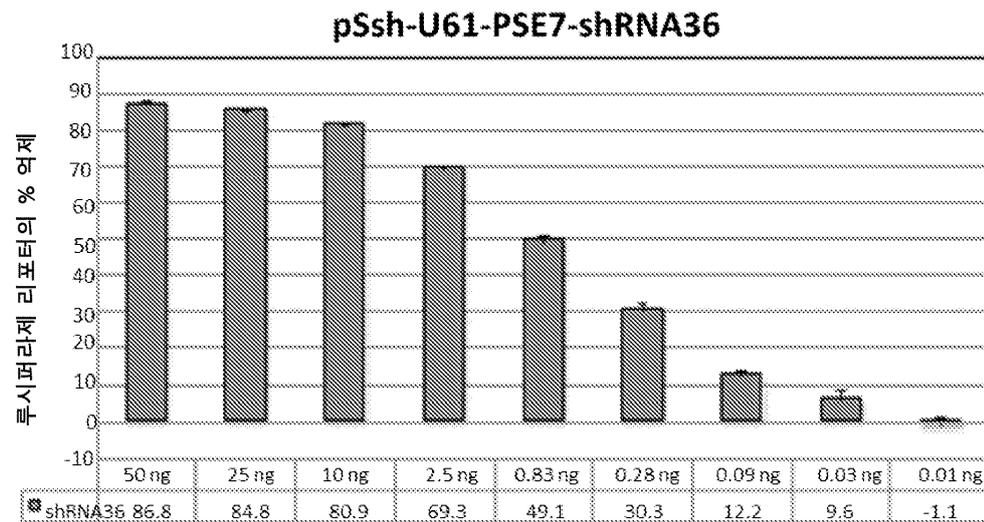
pSsh-U61-PSE7-shRNA1



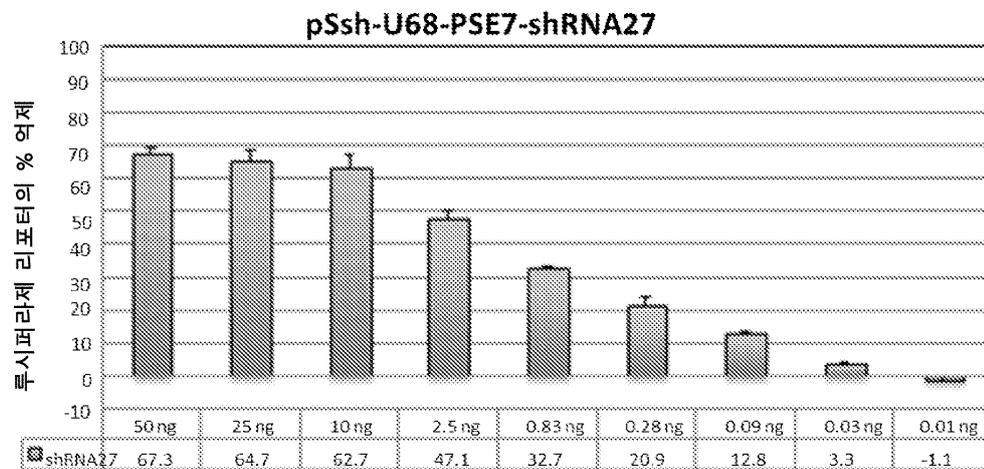
도면8b



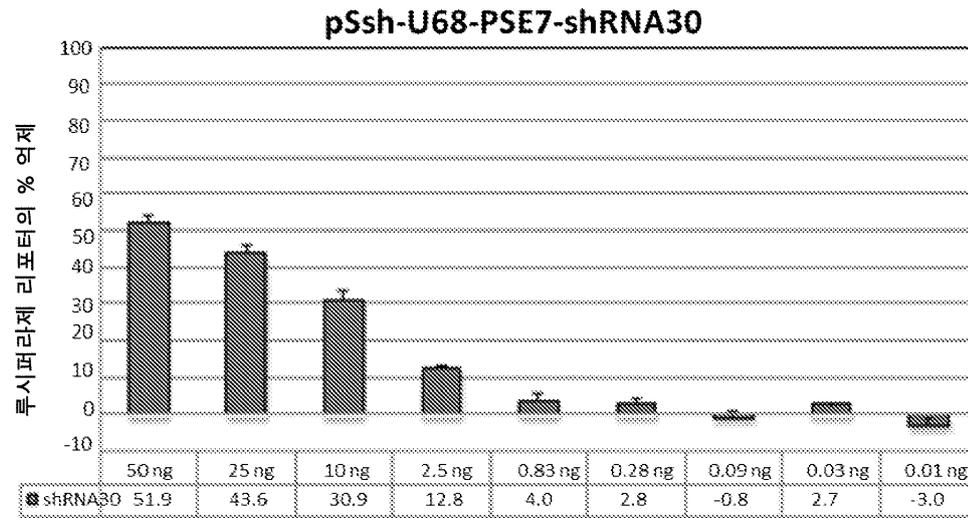
도면8c



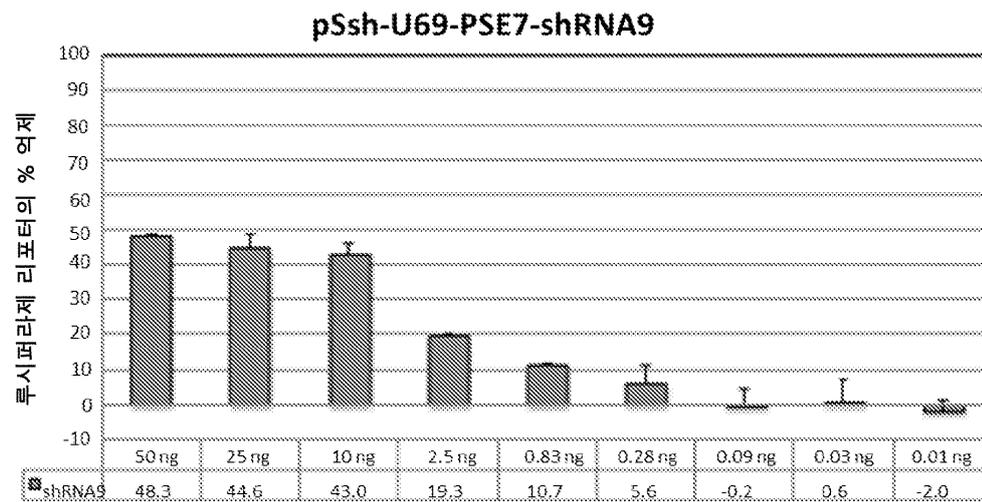
도면8d



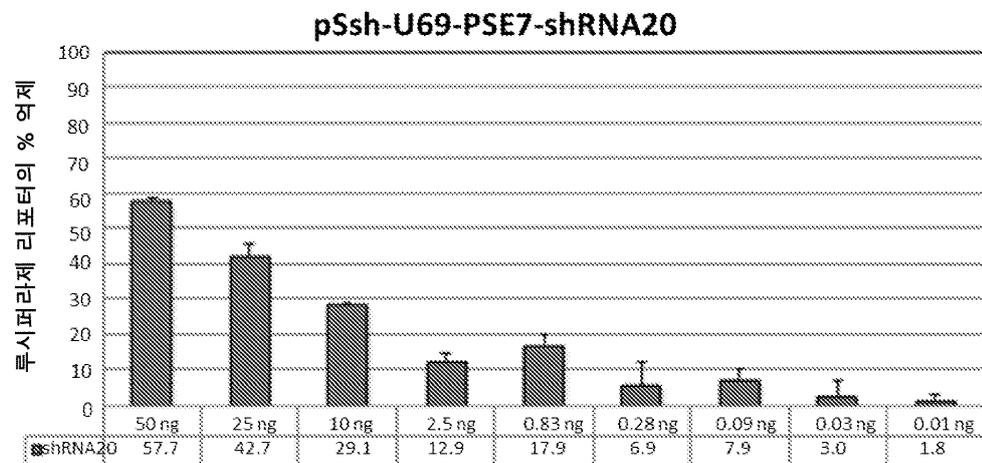
도면8e



도면8f

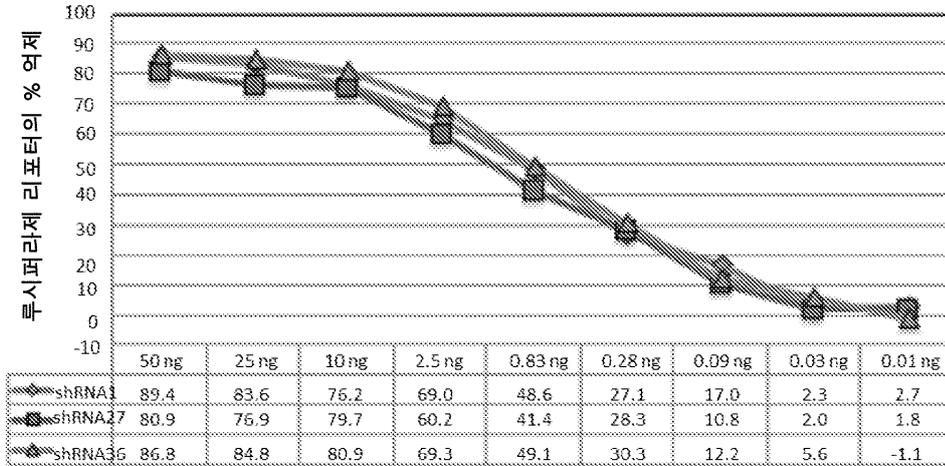


도면8g



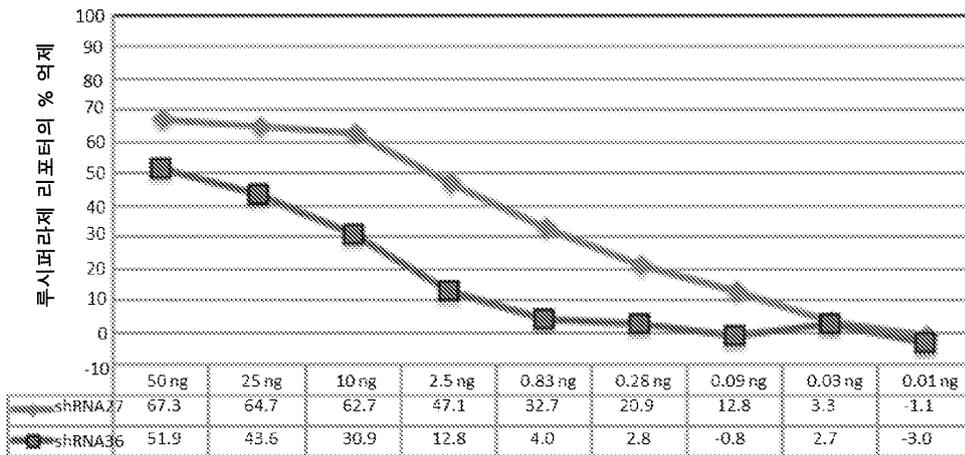
도면8h

U61 헤어핀의 과다기능 분석



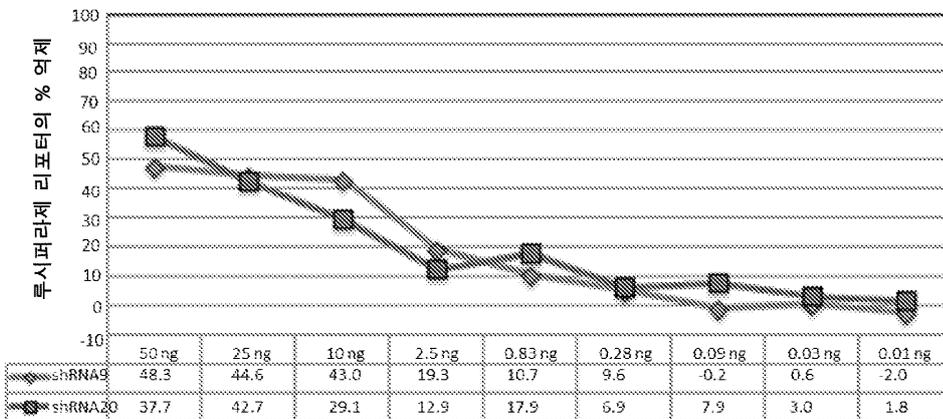
도면8i

U68 헤어핀의 과다기능 분석



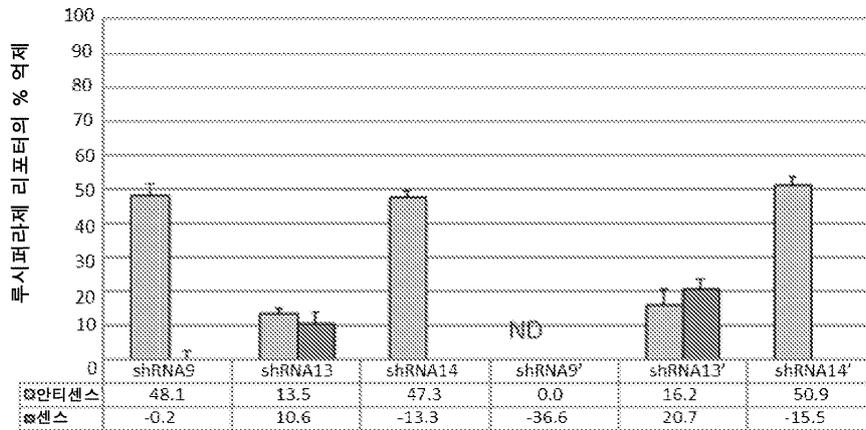
도면8j

U69 헤어핀의 과다기능 분석



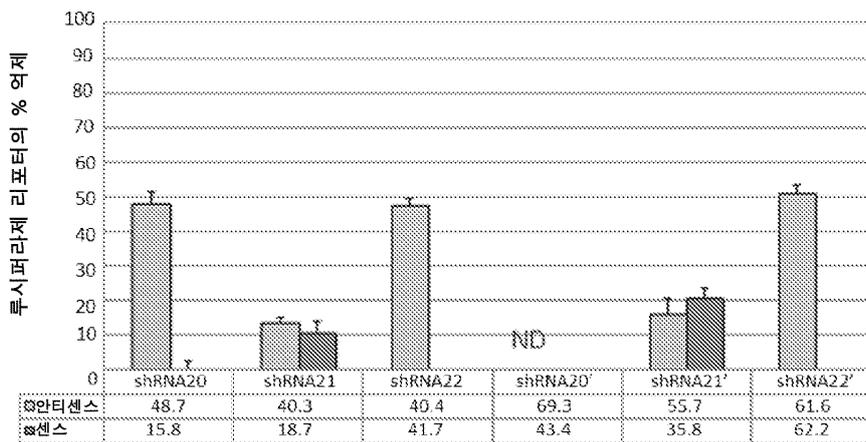
도면9a

U69 shRNA9 변이체

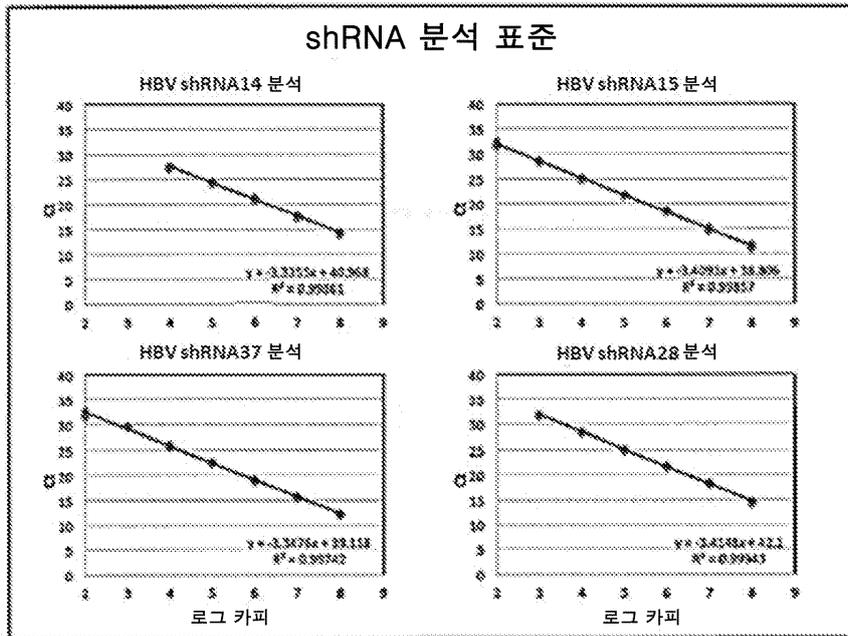


도면9b

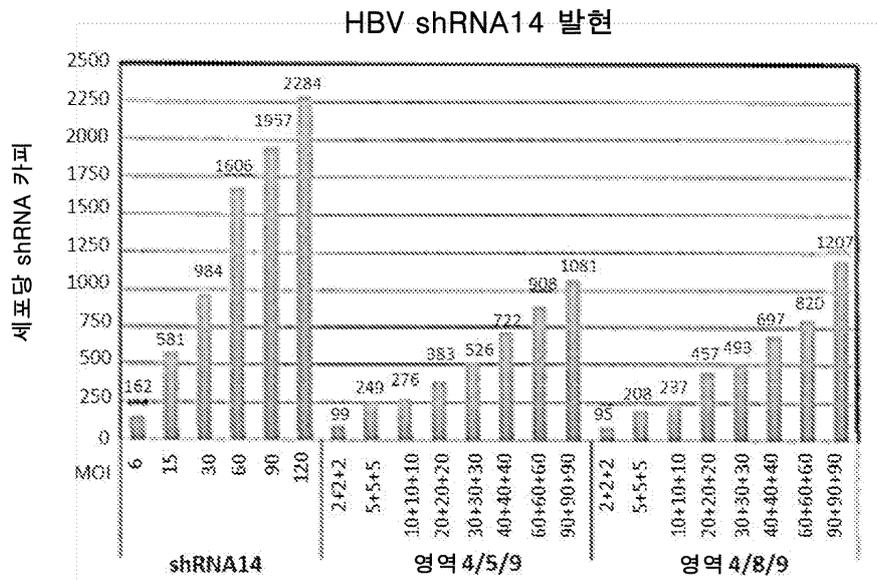
U69 shRNA20 변이체



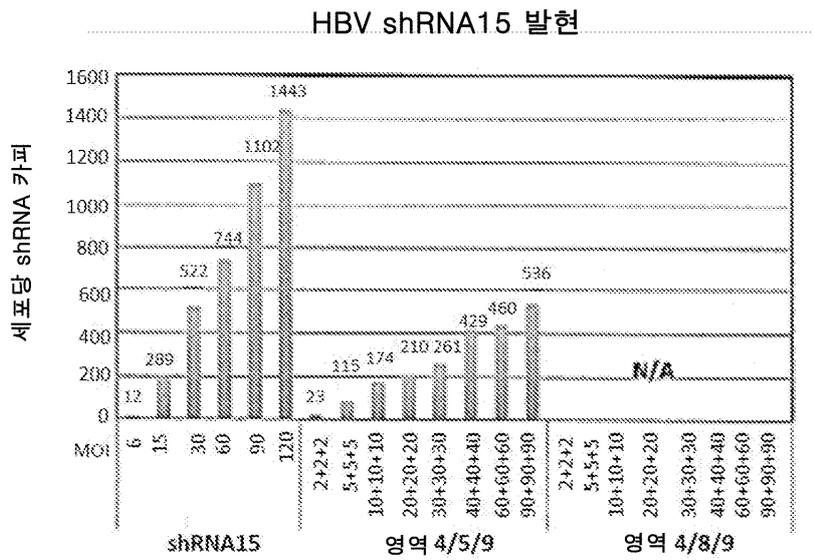
도면10



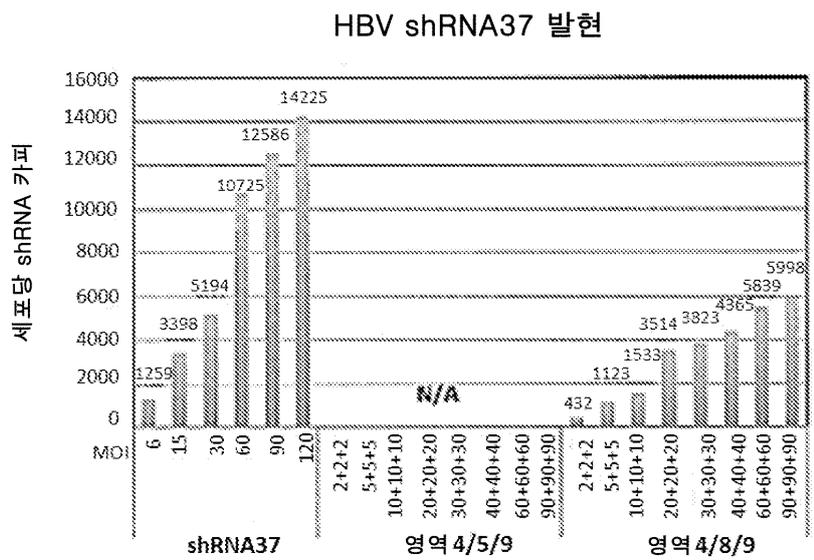
도면11a



도면11b

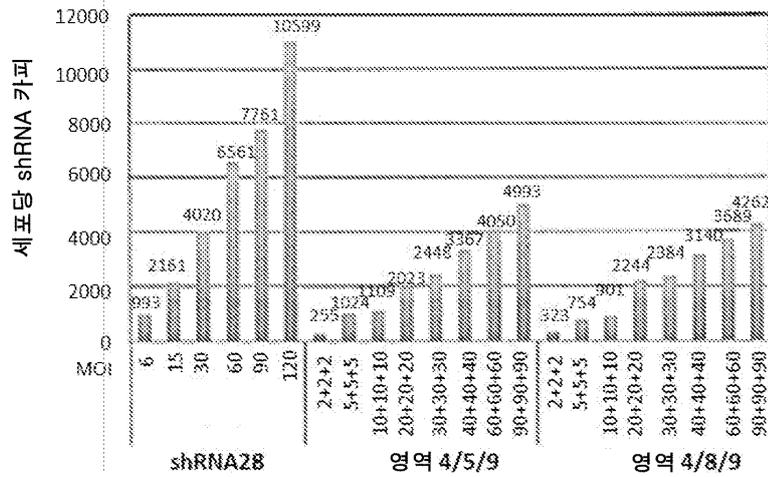


도면11c



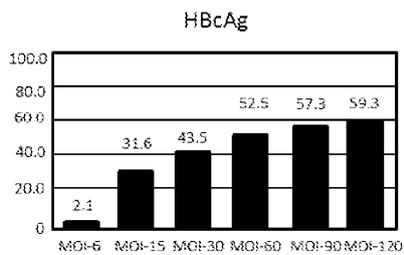
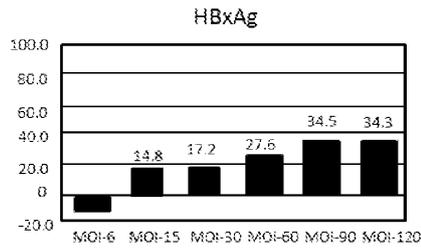
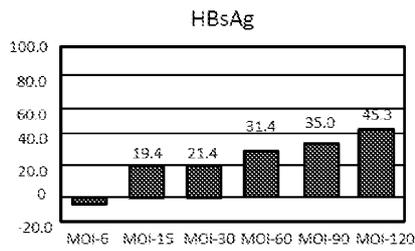
도면11d

HBV shRNA28 발현



도면12a

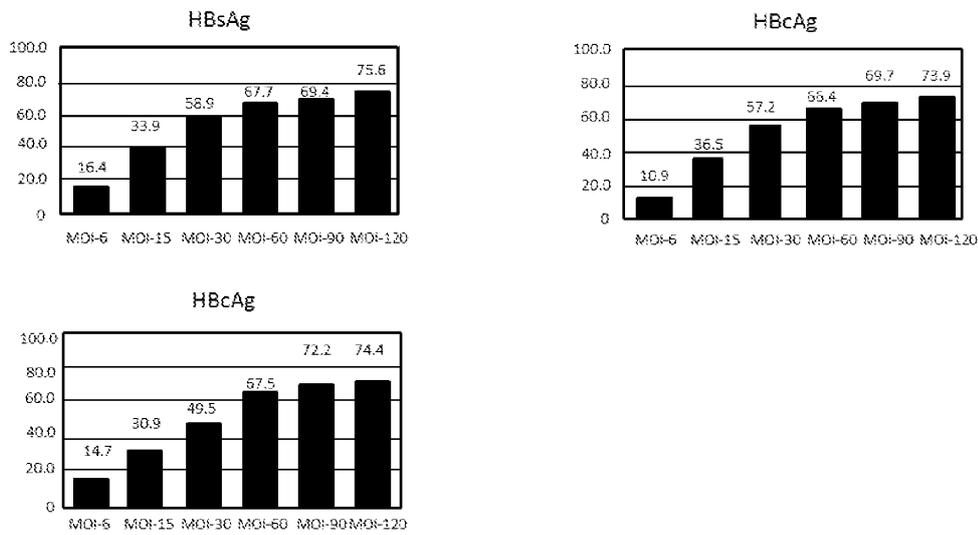
shRNA14: HBV 전사체의 % 억제



주: 영역 4는 코어 영역을 표적화함

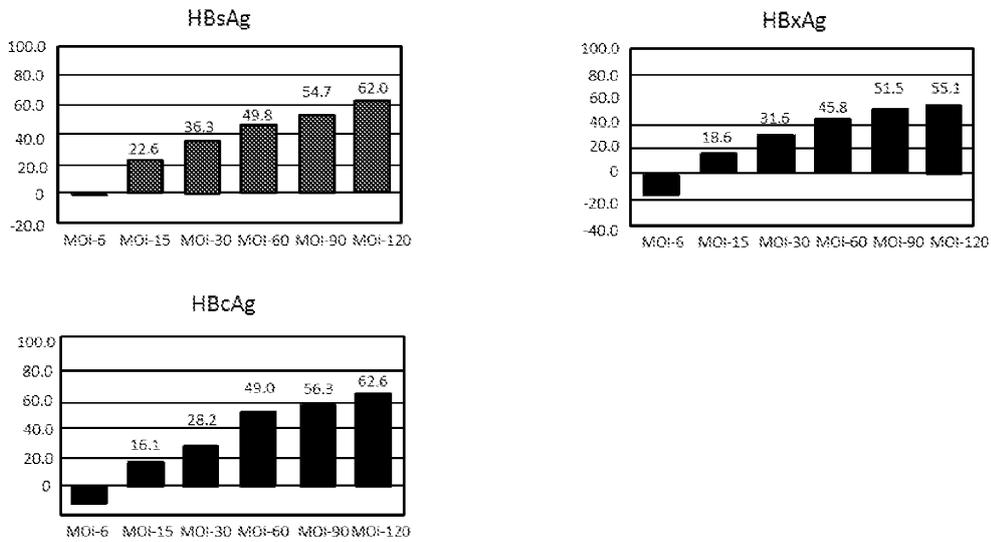
도면12b

shRNA37: HBV 전사체의 % 억제



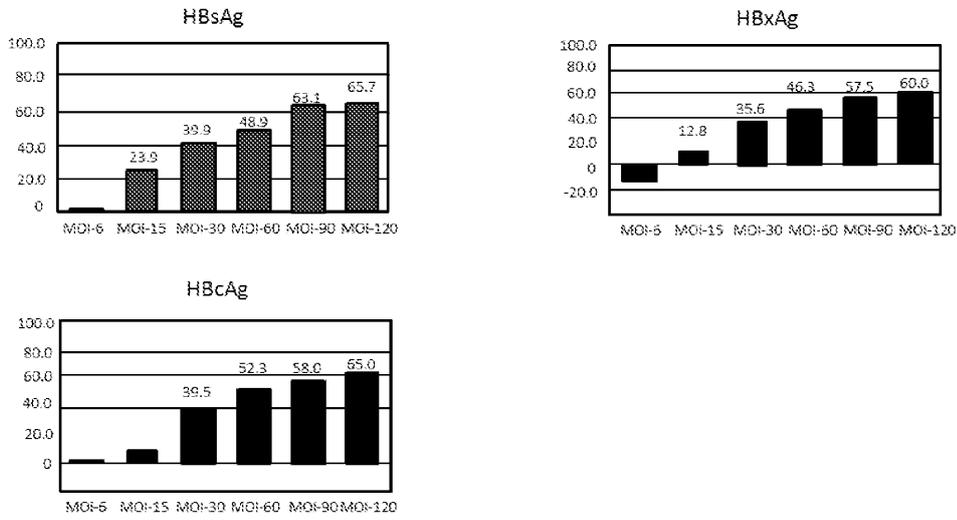
도면12c

shRNA15: HBV 전사체의 % 억제



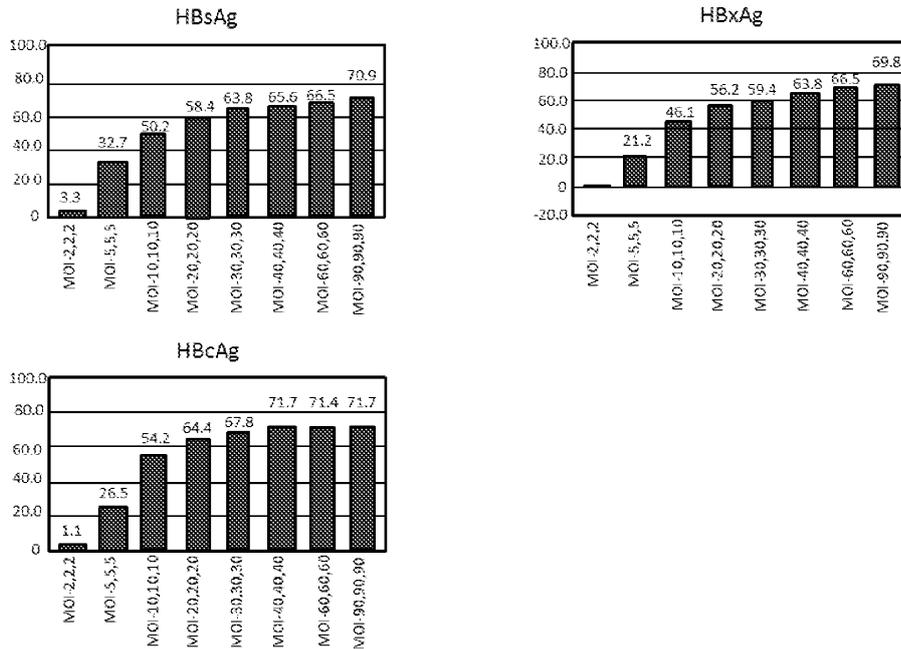
도면12d

shRNA28: HBV 전사체의 % 억제



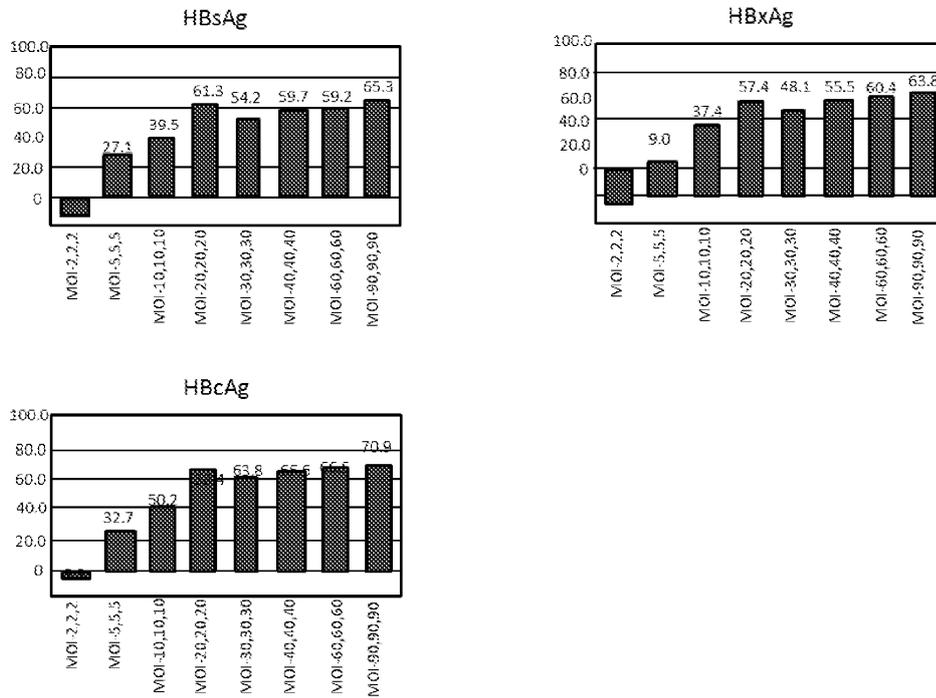
도면12e

영역 4/8/9 삼중: HBV 전사체의 % 억제



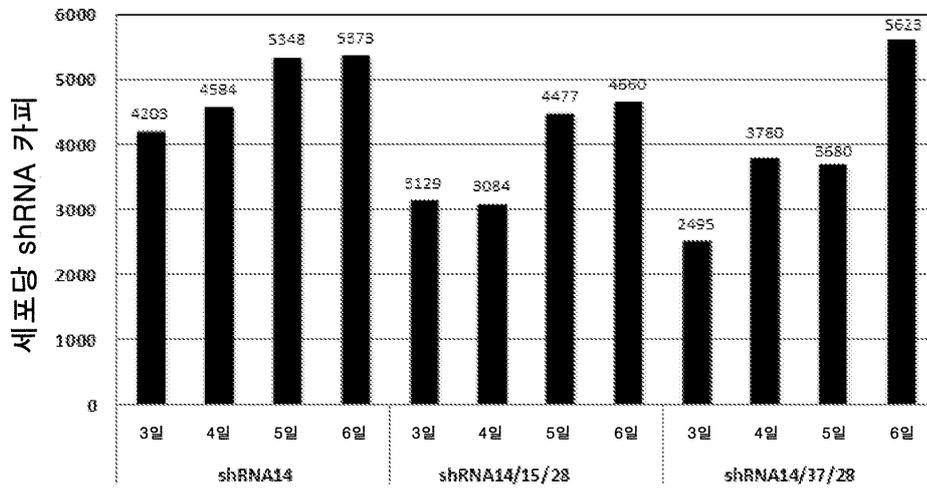
도면12f

영역 4/5/9 삼중: HBV 전사체의 % 억제

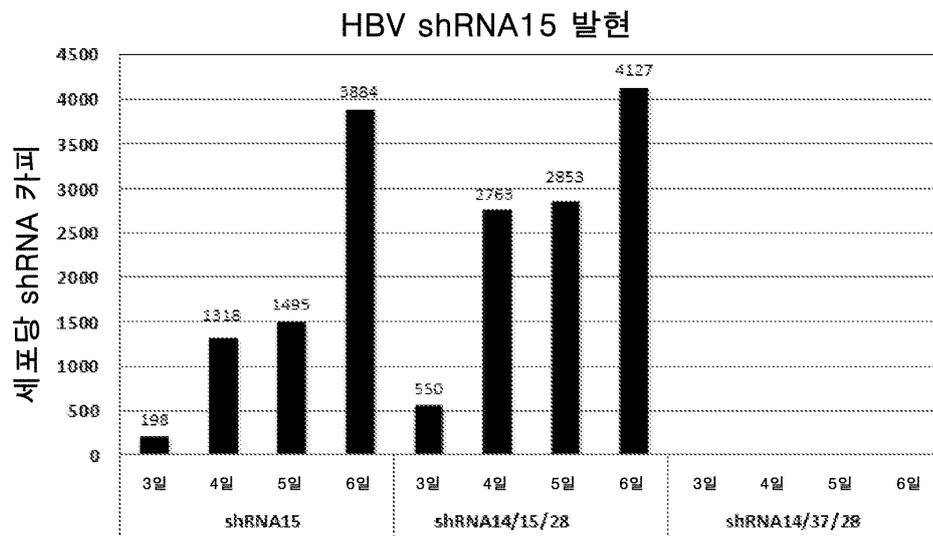


도면13a

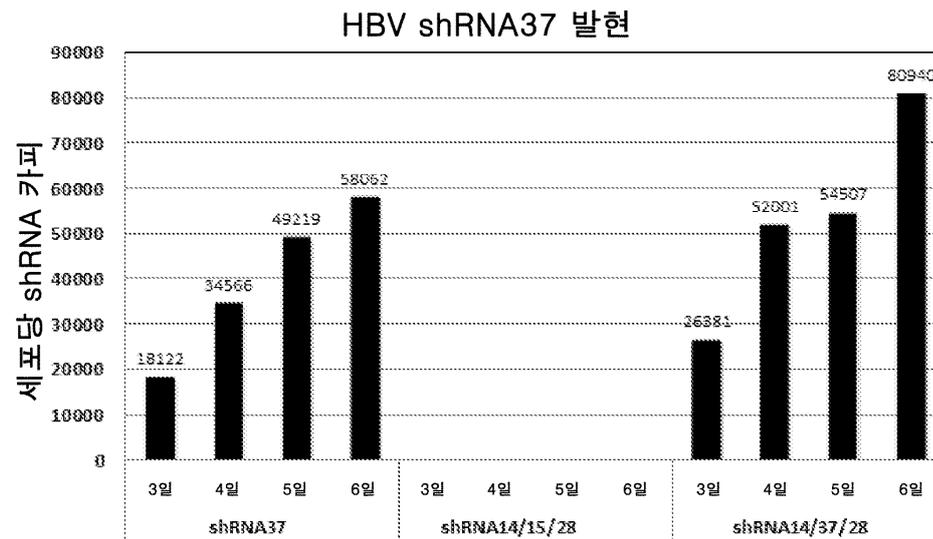
HBV shRNA14 발현



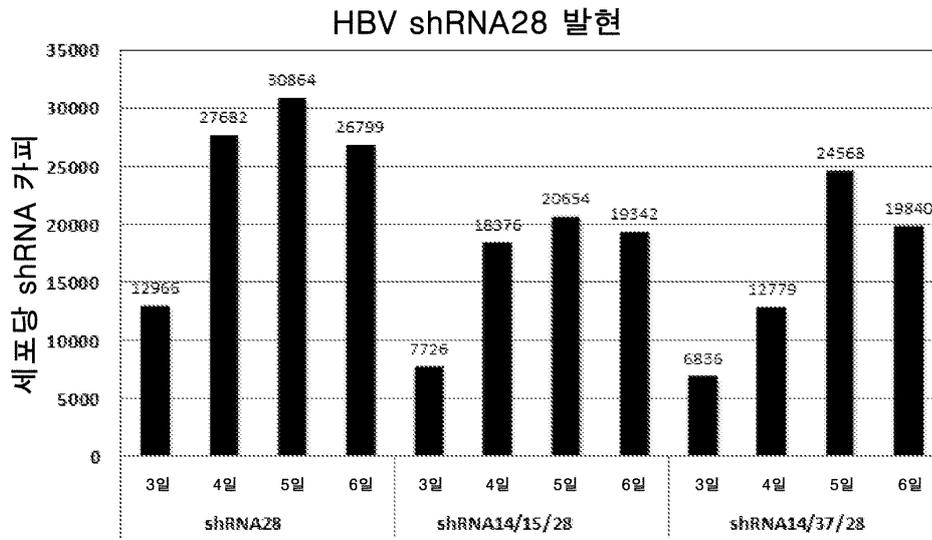
도면13b



도면13c

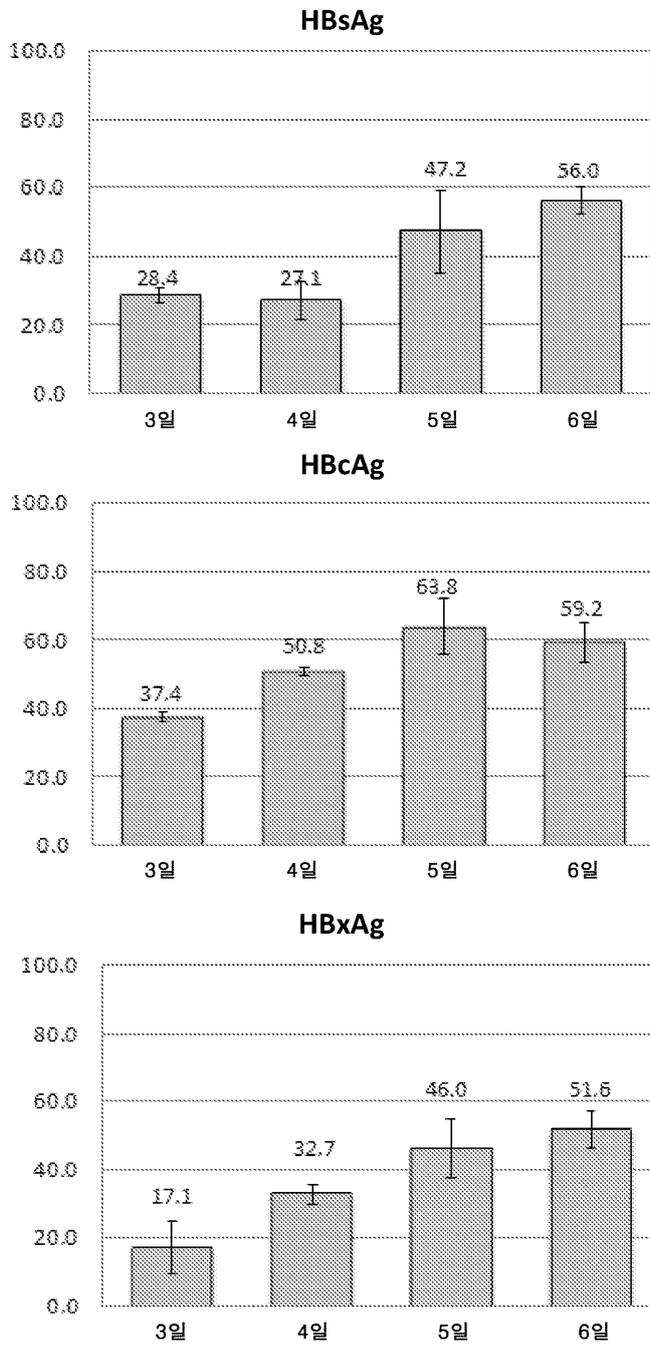


도면13d



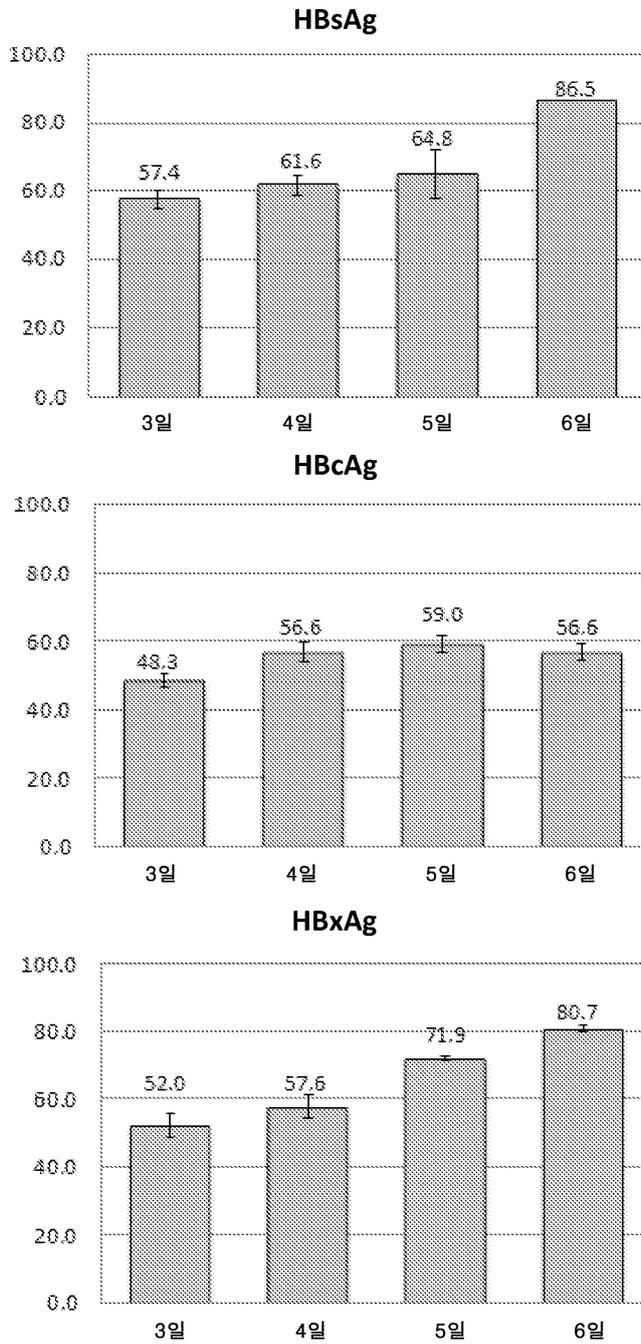
도면14a

HBV 전사체의 shRNA14 % 억제



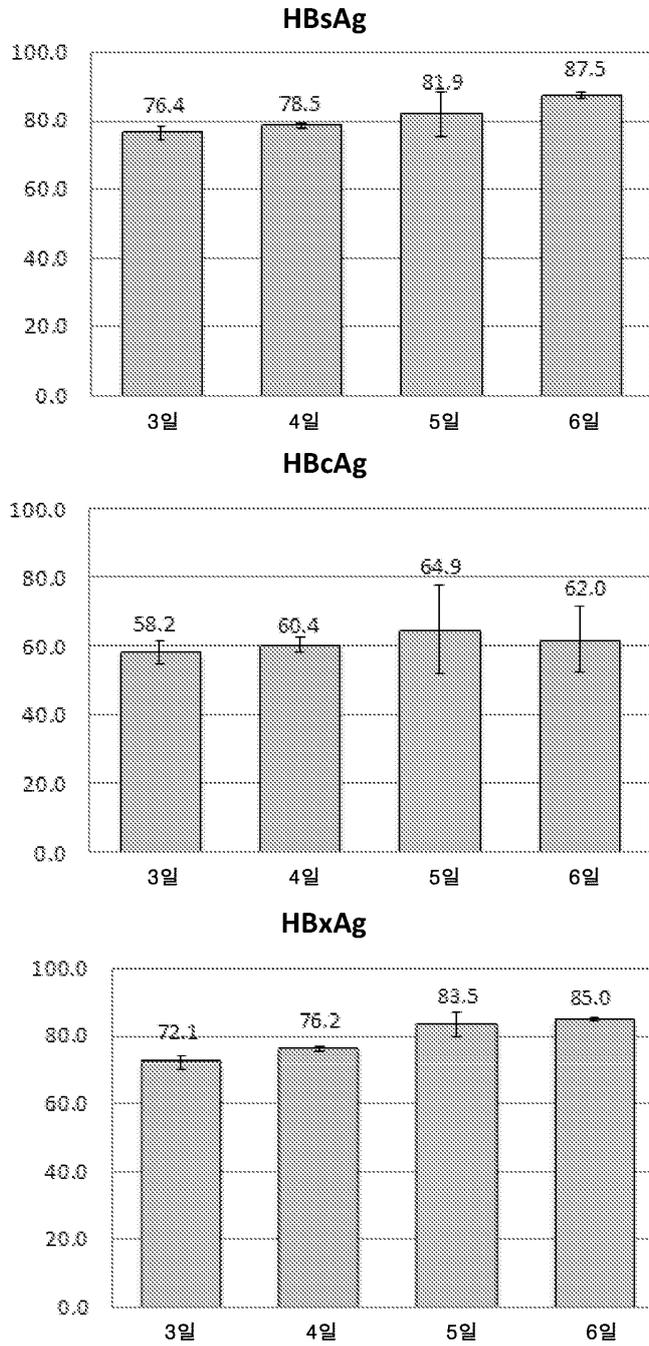
도면14b

HBV 전사체의 shRNA15 % 억제



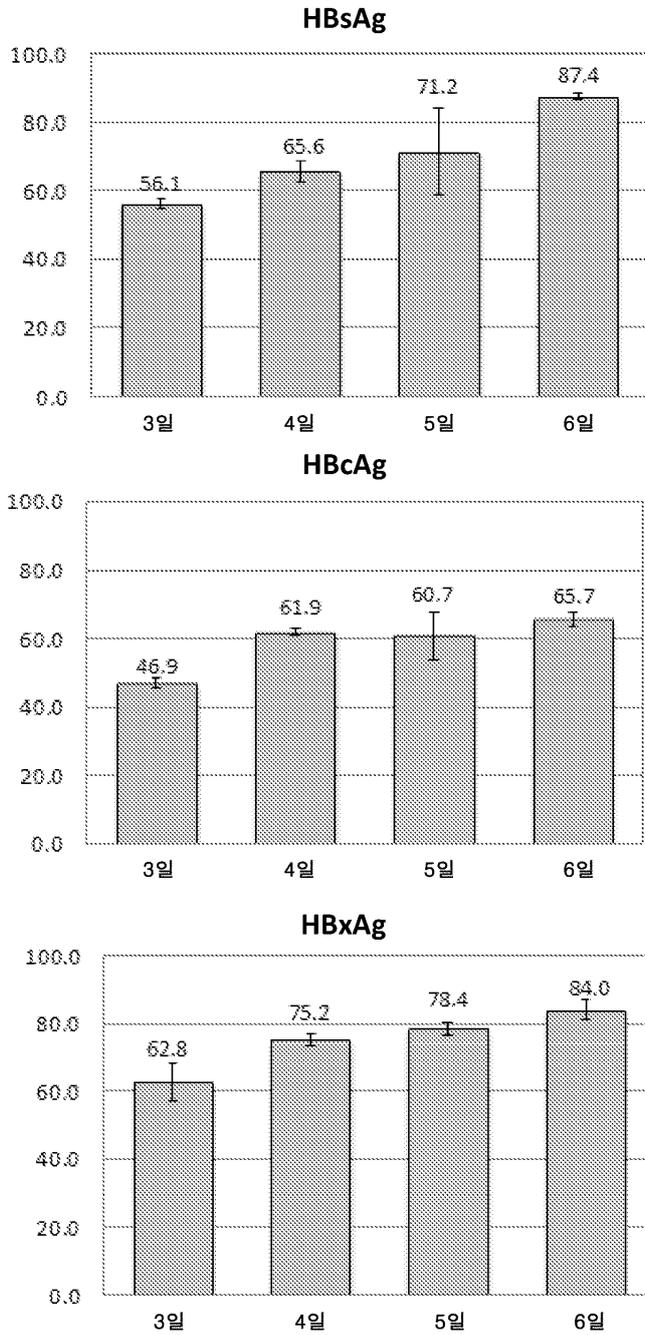
도면14c

HBV 전사체의 shRNA37 % 억제



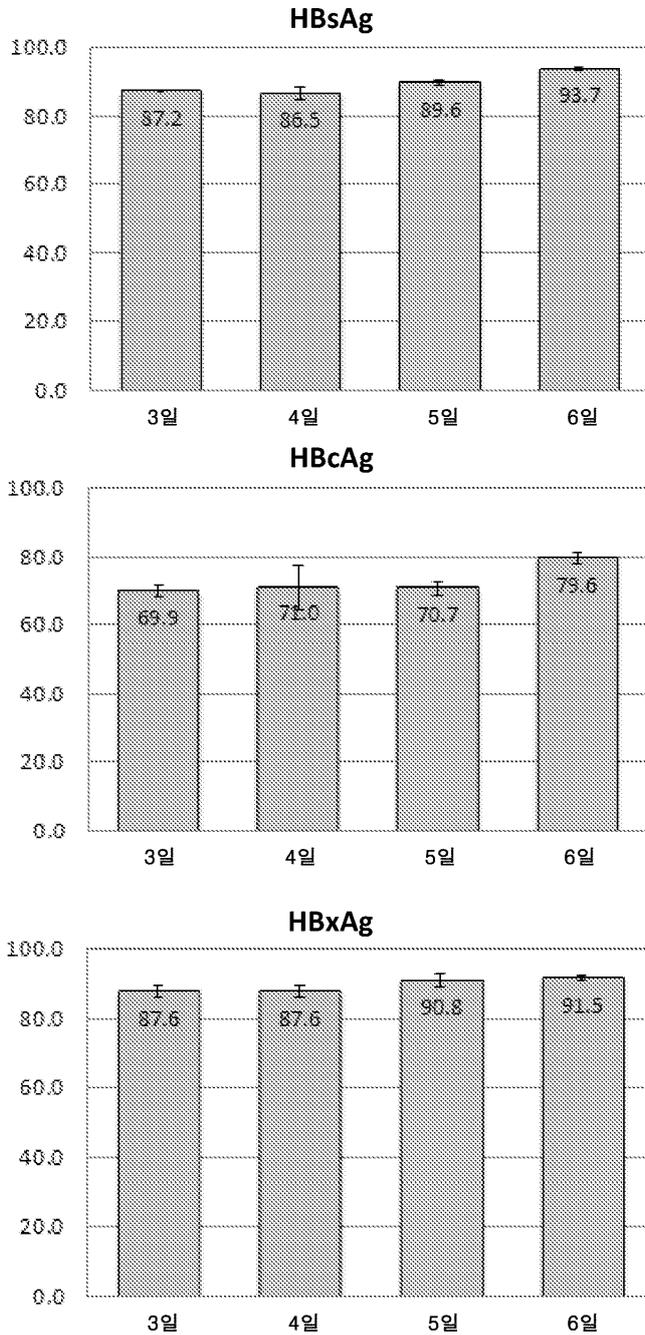
도면14d

HBV 전사체의 shRNA28 % 억제



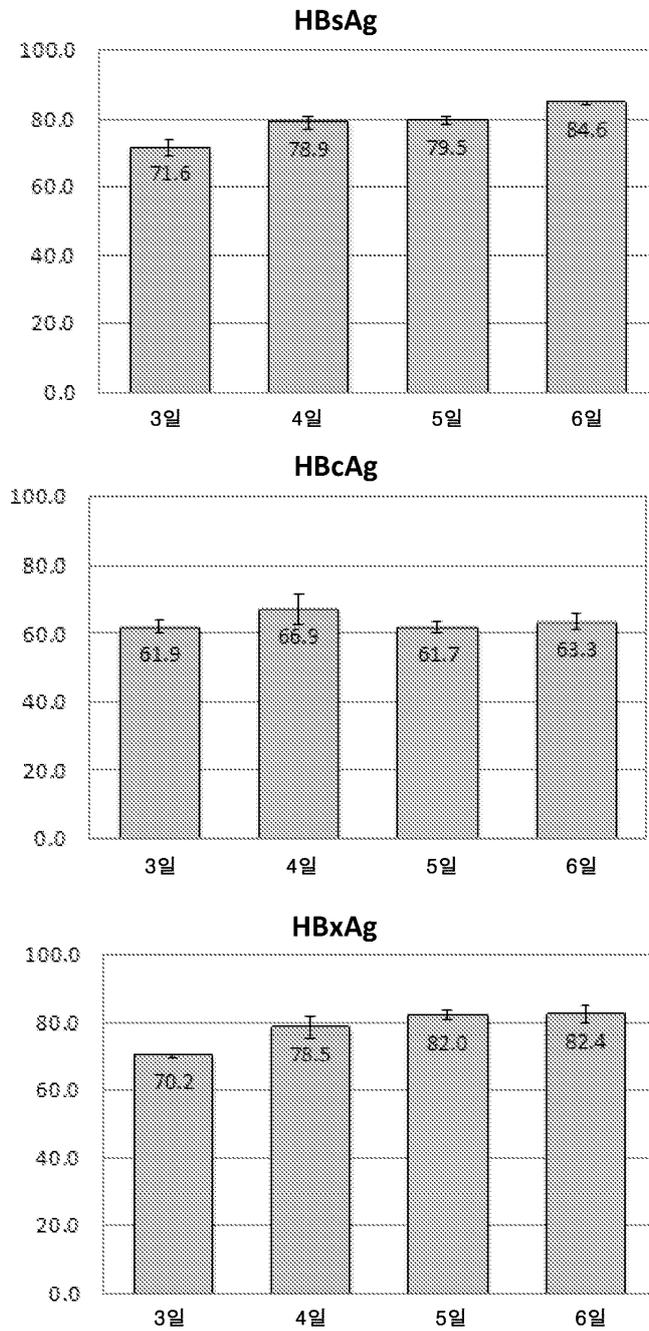
도면14e

HBV 전사체의 shRNA14/37/28 % 억제

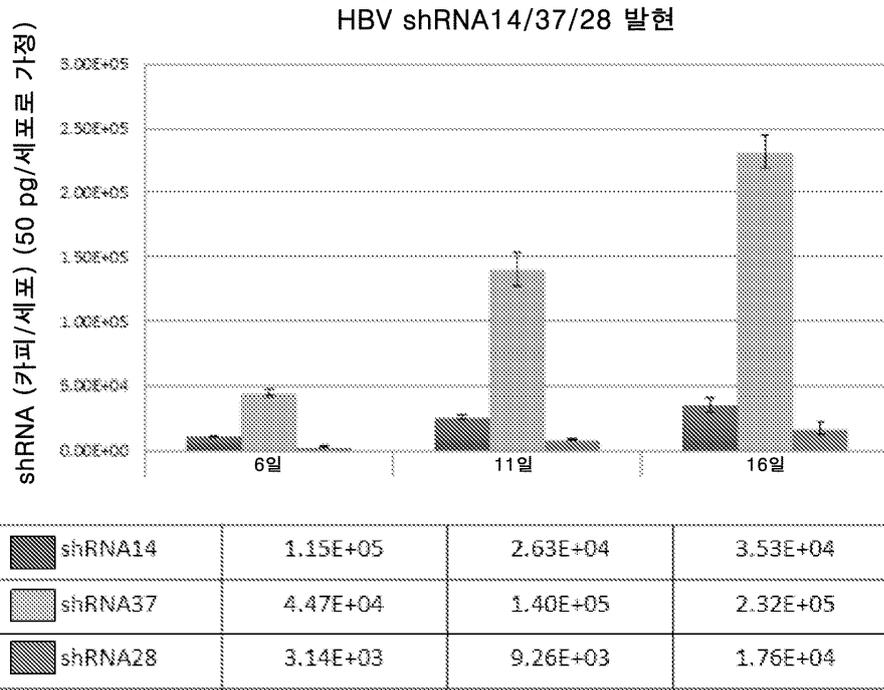


도면14f

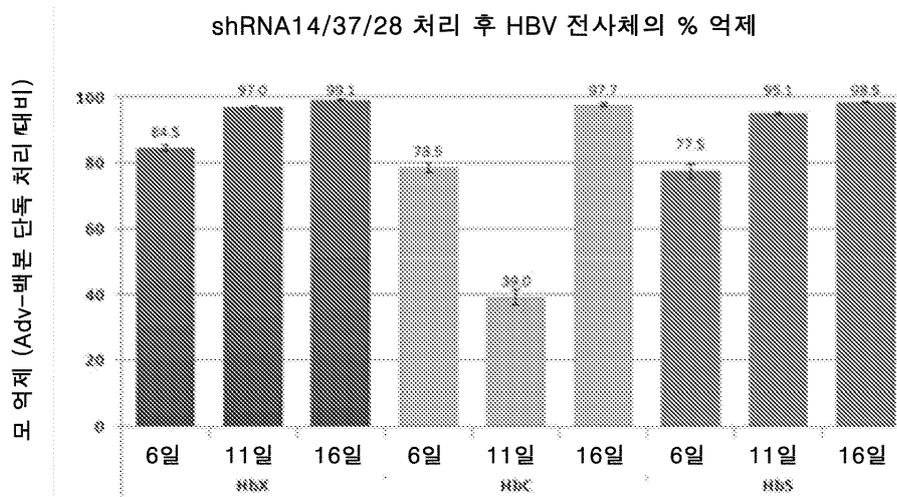
HBV 전사체의 shRNA14/15/28 % 억제



도면15a

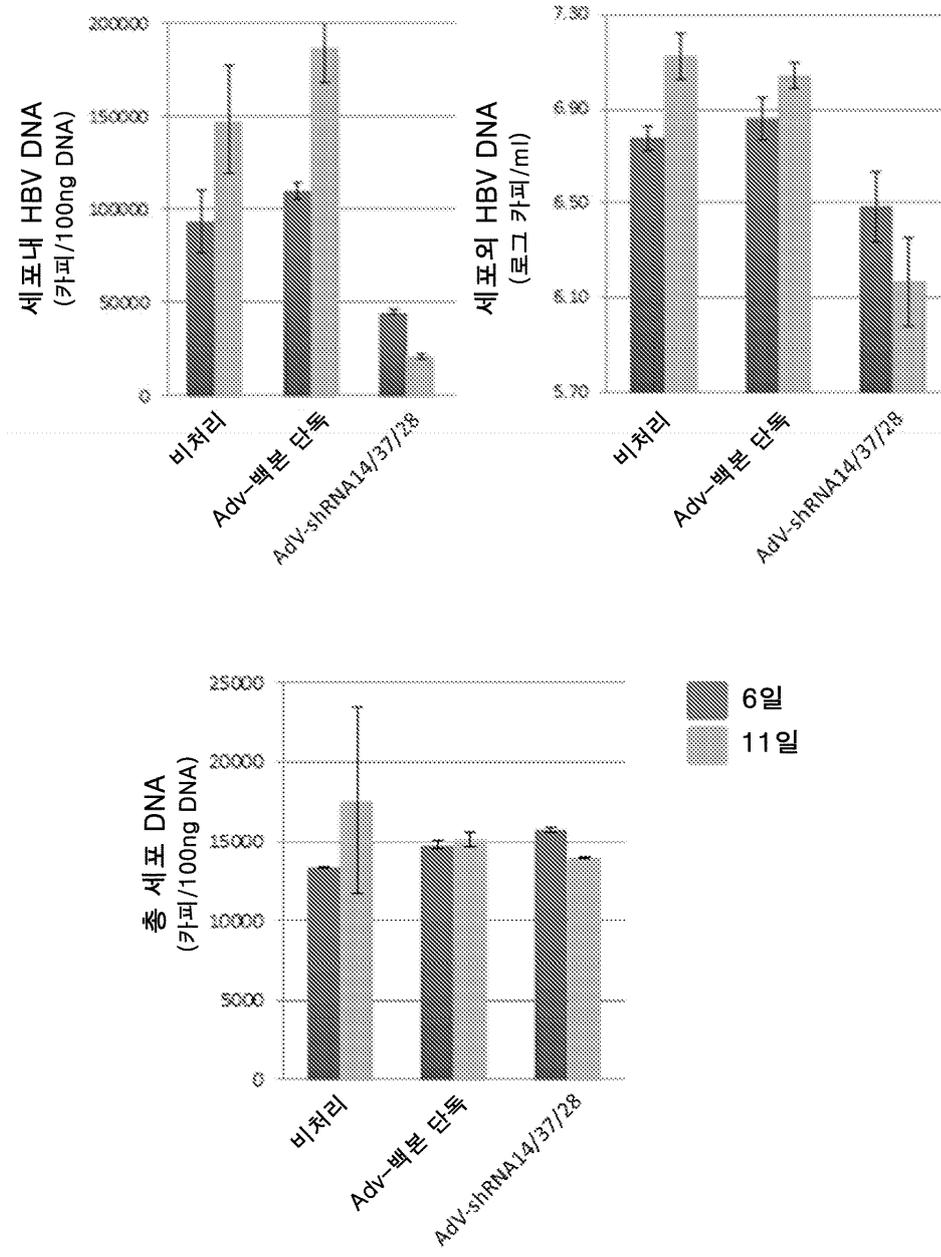


도면15b



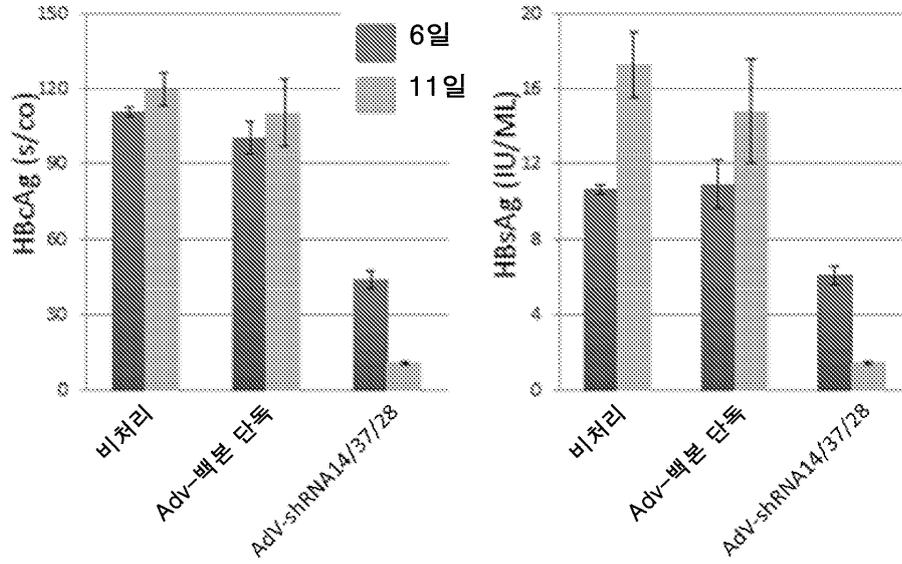
도면15c

세포내 및 세포외 HBV 발현



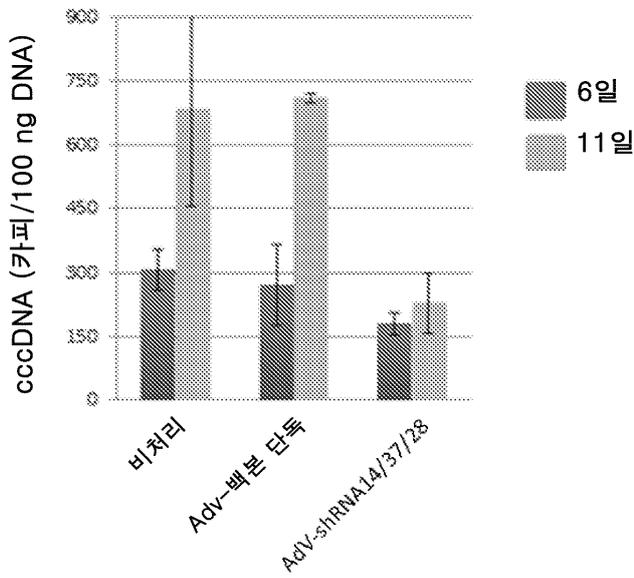
도면15d

세포외 HBV 전사체 발현

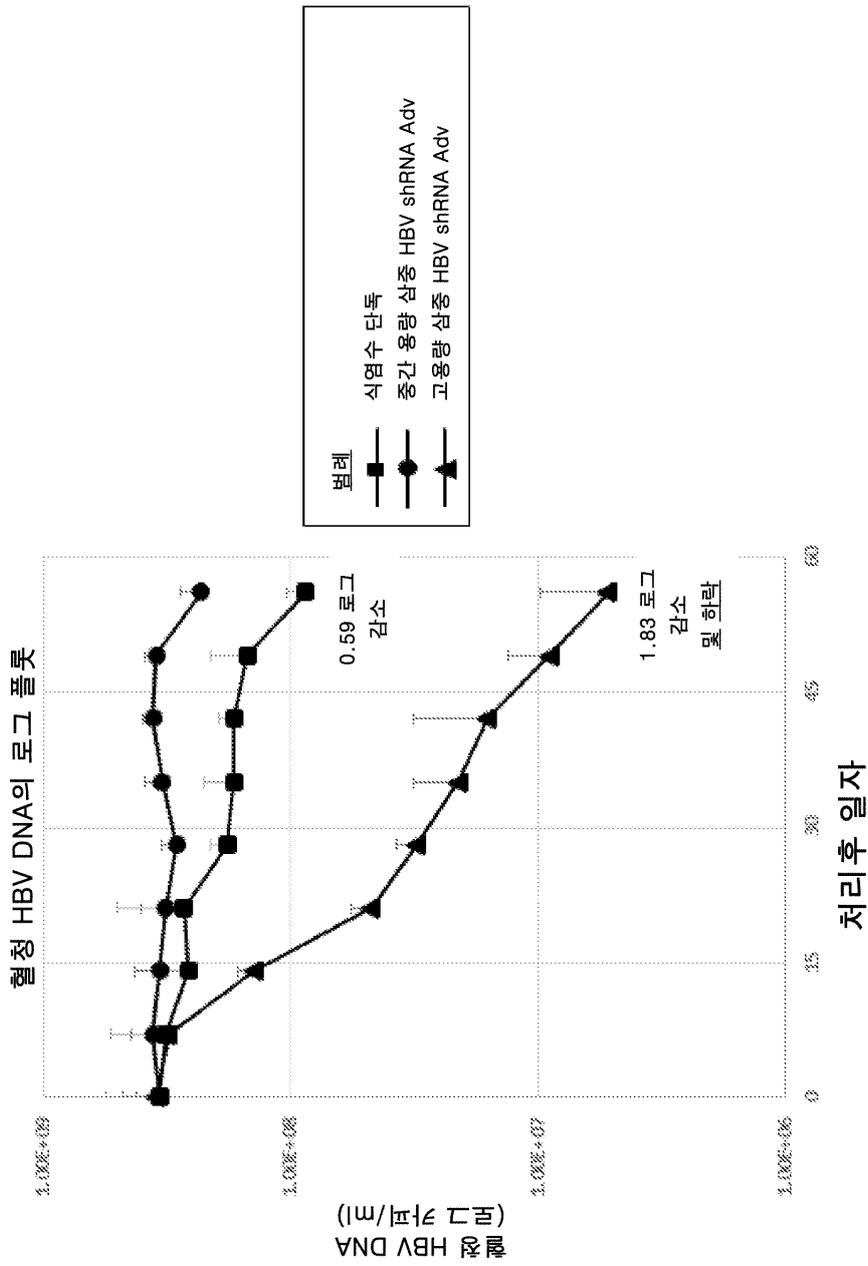


도면15e

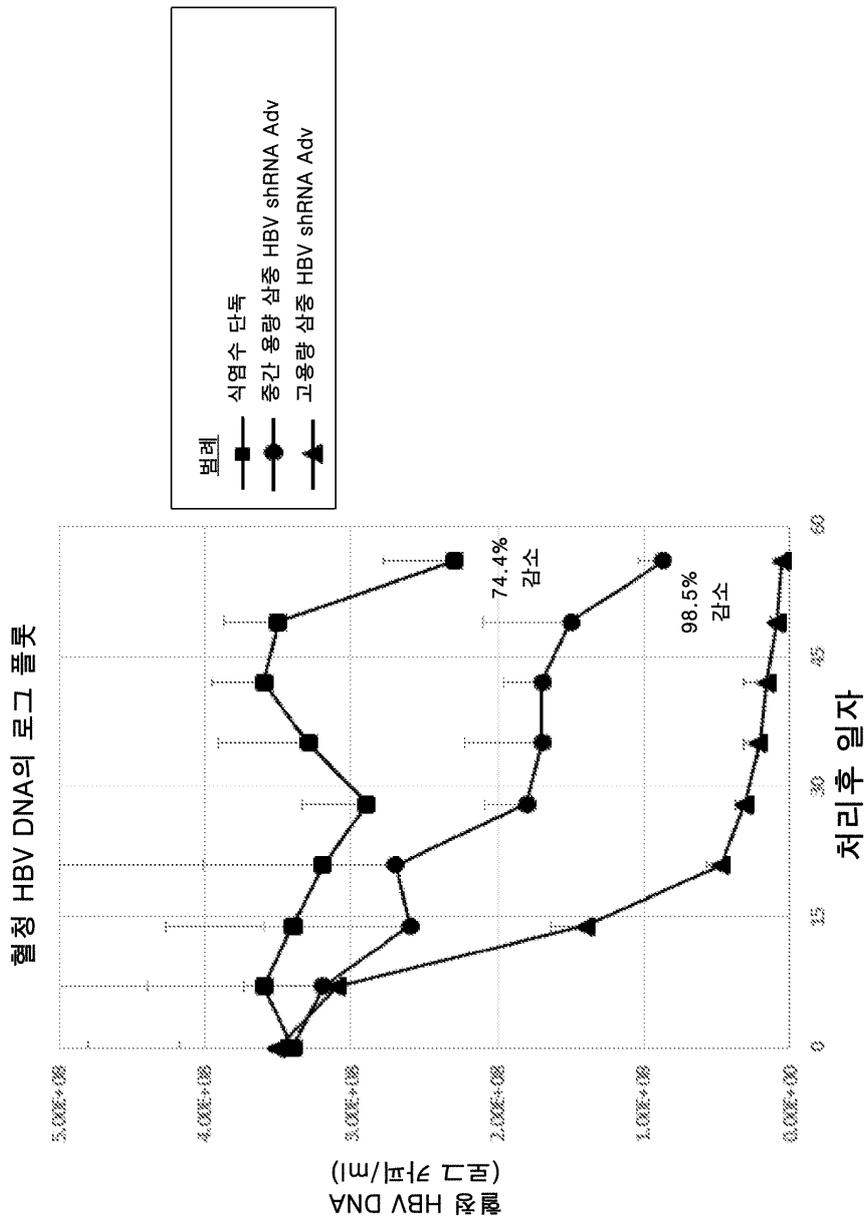
cccDNA 발현



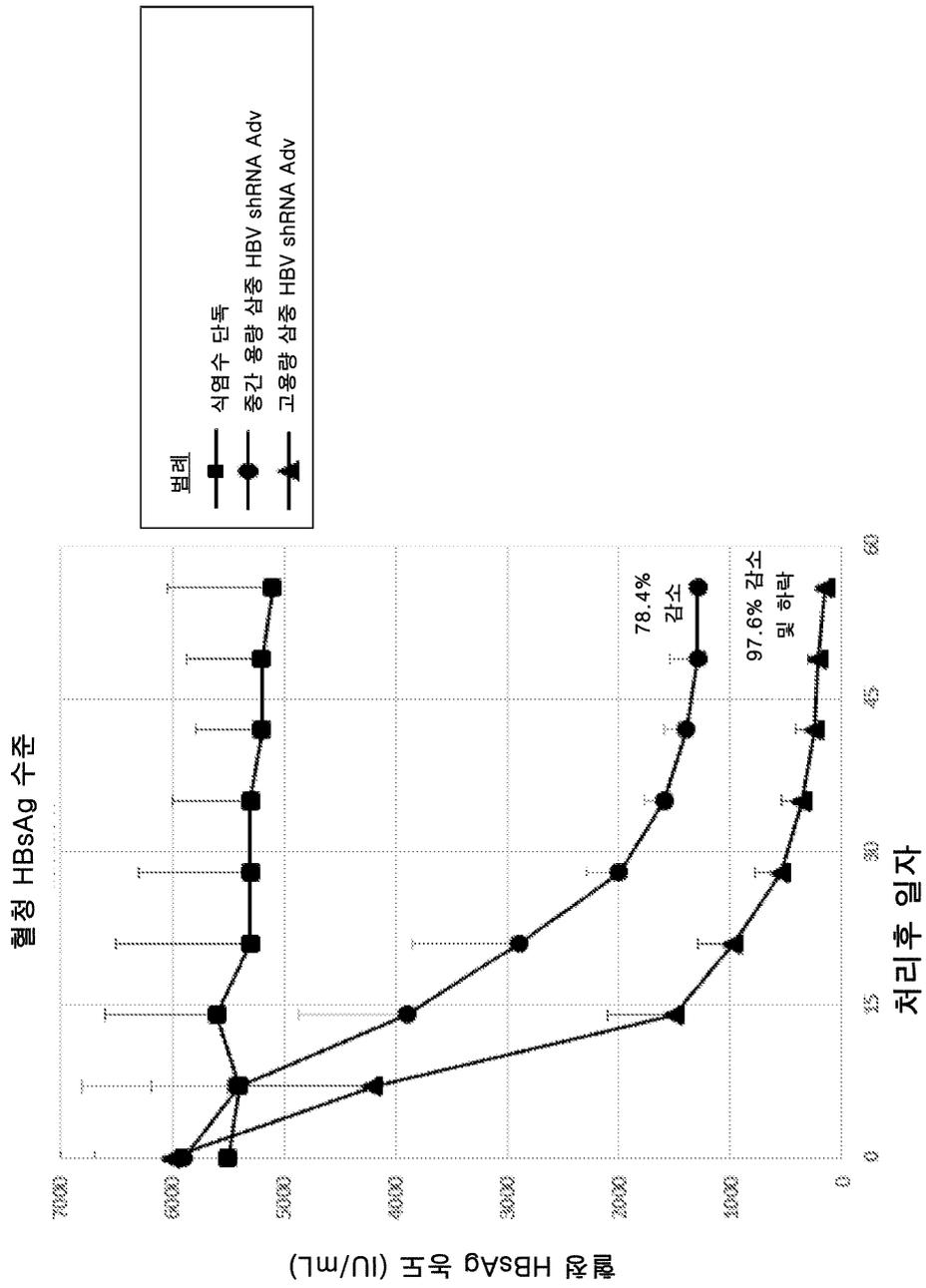
도면16



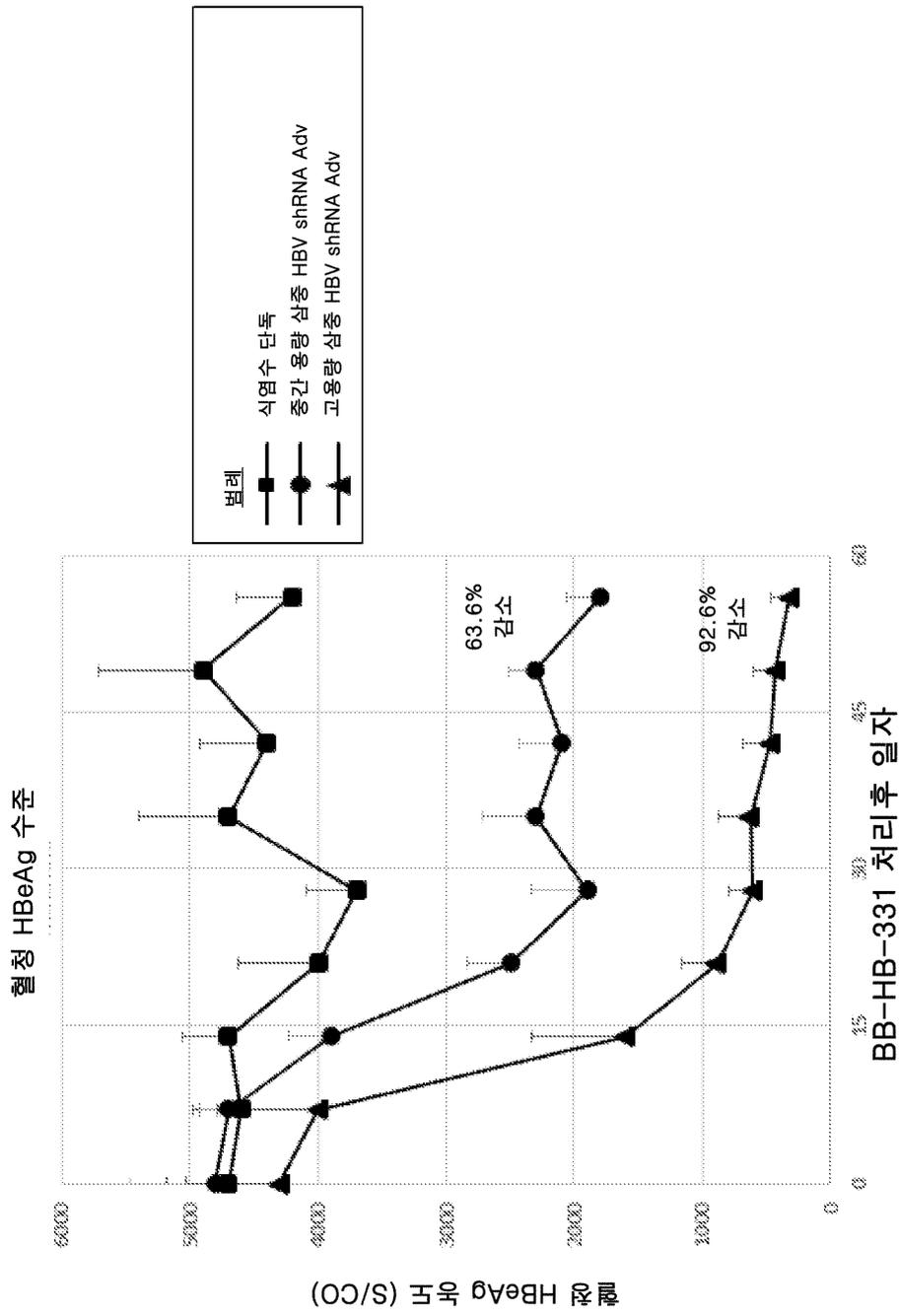
도면17



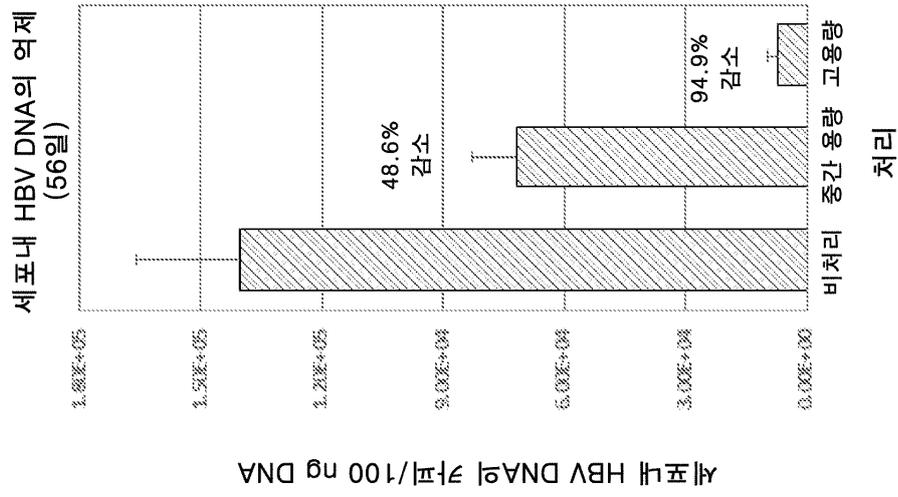
도면18



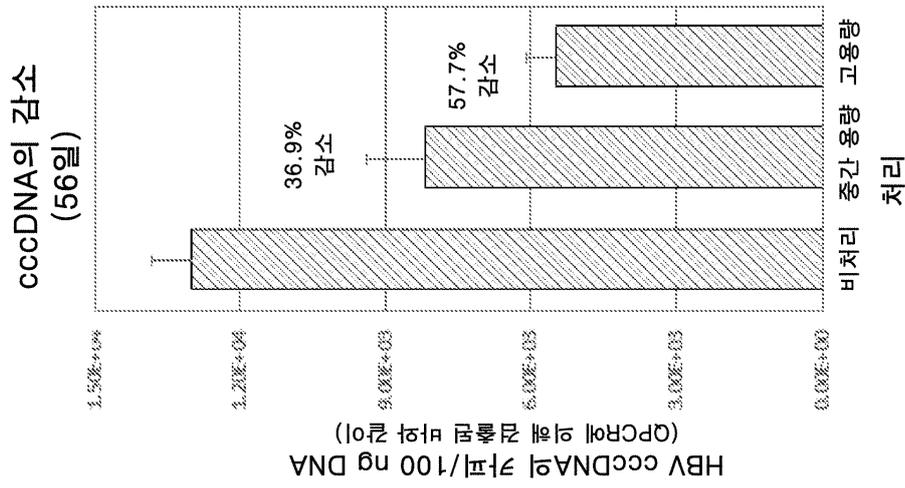
도면19



도면20

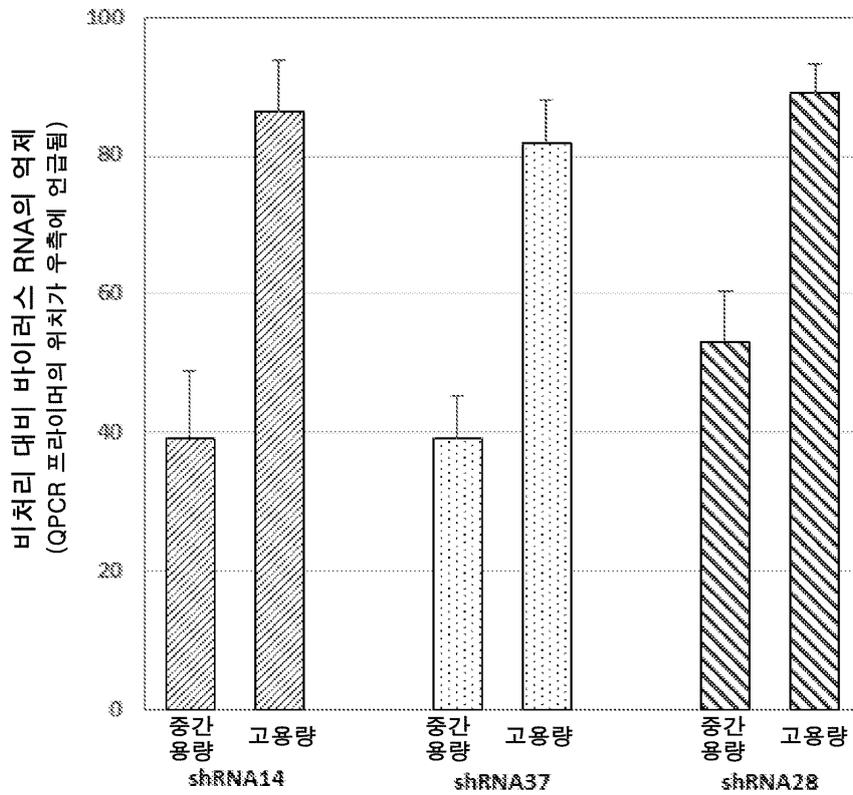


도면21



도면22

56일에 바이러스 RNA의 억제



서열 목록

- <110> Benitec Biopharma Limited
- <120> Reagents for treatment of hepatitis B virus (HBV) infection and use thereof
- <130> 173107
- <150> AU 2015901617
- <151> 2015-05-06
- <150> US 62/319,971
- <151> 2016-04-08
- <160> 106
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Region 1
- <400> 1

catcctgctg ctatgcctca	20
<210> 2	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Region 2	
<400> 2	
tttgctgacg caacccccac tgg	23
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Region 3	
<400> 3	
aagcctcaa gctgtgcctt	20
<210> 4	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Region 4	
<400> 4	
ggtccctag aagaagaact ccctgcctc a	31
<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Region 5	
<400> 5	
caaggtatgt tgcccgtttg tcc	23
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Region 6  
 <400> 6  
 ctcggtggtgg acttctctca 20  
 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Region 7  
 <400> 7  
 ctcgtgttac aggcggggtt ttt 23  
  
 <210> 8  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Region 8  
 <400> 8  
 ccgtgtgac ttcgcttcac ctctgcacgt 30  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Region 9  
 <400> 9  
 tacgtcccgt cggcgtgaat c 21  
 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Region 10  
 <400> 10  
 aaatgccct atcttatca 19  
  
 <210> 11  
 <211> 20

<212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector sequence for shRNA1 and shRNA4  
 <400> 11  
 ugaggcauag cagcaggaug 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector complement sequence for shRNA1 and shRNA4  
 <400> 12  
 cauccugcug cuaugccuca 20  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> Effector sequence for shRNA2  
 <400> 13  
 gaugaggcau agcagcagga 20  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector complement sequence for shRNA2  
 <400> 14  
 uccugcugcu augccucauc 20  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector sequence for shRNA3  
 <400> 15  
 gaggcauagc agcaggaugc 20

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector complement sequence for shRNA3  
 <400> 16  
 gcauccugcu gcuaugccuc 20  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector sequence for shRNA5 and shRNA6  
 <400> 17  
 ccaguggggg uugcgucagc 20  
 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector complement sequence for shRNA5 and shRNA6  
 <400> 18  
 gcugacgcaa cccccacugg 20  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector sequence for shRNA7 and shRNA8  
 <400> 19  
 aaggcacagc uuggaggcuu 20  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector complement sequence for shRNA7 and shRNA8

<400> 20  
aagccuccaa gcugugccuu 20

<210> 21  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Effector sequence for shRNA9 and shRNA10

<400> 21  
gaguucuucu ucuaggggac c 21

<210> 22  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Effector complement sequence for shRNA9 and shRNA10

<400> 22  
gguccccuag aagaagaacu c 21

<210> 23  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Effector sequence for shRNA11 and shRNA12

<400> 23  
gagggaguuc uucuucuagg g 21

<210> 24  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Effector complement sequence for shRNA11 and shRNA12

<400> 24  
cccuagaag aagaacucc uc 22

<210> 25  
<211> 21  
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Effect sequence for shRNA13

<400> 25

gcgaguuccu cuucuagggg a 21

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Effect complement sequence for shRNA13

<400> 26

uccccuagaa gaagaacug c 21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Effector sequence for shRNA14

<400> 27

uucuucuucu aggggaccug c 21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Effector complement sequence for shRNA14

<400> 28

gcaggucucc uagaagaaga a 21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Effector sequence for shRNA15 and shRNA18

<400> 29

acaaacgggc aacauaccu g 21

<210> 30

<211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector complement sequence for shRNA15 and shRNA18  
 <400> 30  
 caagguaugu ugccccguuug u 21  
 <210> 31  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector sequence for shRNA16  
 <400> 31  
 ggacaaacgg gcaacauacc u 21  
 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector complement sequence for shRNA16  
 <400> 32  
 agguauguug cccguuuguc c 21  
 <210> 33  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector sequence for shRNA17  
 <400> 33  
 gacaaacggg caacauaccu u 21  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector complement sequence for shRNA17  
 <400> 34

aagguauguu gcccguuugu c	21
<210> 35	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Effector sequence for shRNA19 and shRNA20	
<400> 35	
ugagagaagu ccaccacgag	20
<210> 36	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Effector complement sequence for shRNA19 and shRNA20	
<400> 36	
cucguggugg acuucucuca	20
<210> 37	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Effector sequence for shRNA21	
<400> 37	
auugagagaa guccaccacg	20
<210> 38	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Effector complement sequence for shRNA21	
<400> 38	
cgugguggac uucucucaau	20
<210> 39	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Effector sequence for shRNA22  
 <400> 39  
 agagaagucc accacgaguc 20

<210> 40  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector complement sequence for shRNA22  
 <400> 40  
 gacucguggu ggacuucucu 20

<210> 41  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector sequence for shRNA23 and shRNA24  
 <400> 41  
 aaaccccgcc uguaacacga g 21

<210> 42  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector complement sequence for shRNA23 and shRNA24  
 <400> 42  
 cucguguuac aggcgggguu u 21

<210> 43  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector sequence for shRNA25 and shRNA26  
 <400> 43  
 ugcagaggug aagcgaagug c 21

<210> 44  
 <211> 20

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Effector complement sequence for shRNA25 and shRNA26	
<400>	44	
	gcacuucgcu ucacucugca	20
<210>	45	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Effector sequence for shRNA27 and shRNA30	
<400>	45	
	gaucagcgcc gacgggacgu	20
<210>	46	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Effector complement sequence for shRNA27 and shRNA30	
<400>	46	
	acgucccguc ggcgcugaau c	21
<210>	47	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Effector sequence for shRNA28 and shRNA31	
<400>	47	
	ggauucagcg cgcacgggac g	21
<210>	48	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Effector complement sequence for shRNA28 and shRNA31	
<400>	48	
	acgucccguc ggcgcugaau cc	22

<210> 49  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector sequence for shRNA29 and shRNA32  
 <400> 49  
 auucagcgcc gacgggacgu a 21  
 <210> 50  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector complement sequence for shRNA29 and shRNA32  
 <400> 50  
 uacgucccg ucgcgugaa u 21  
 <210> 51  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector sequence for shRNA33 and shRNA34  
 <400> 51  
 ugauaagaua ggggcauuu 19  
 <210> 52  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector complement sequence for shRNA33 and shRNA34  
 <400> 52  
 aaaugcccu aucuuauca 19  
 <210> 53  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Effector sequence for shRNA35

<400> 53  
 ugaggccac ucuccauaggu au 22

<210> 54  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector complement sequence for shRNA35

<400> 54  
 auaccuaugg gagugggccu ca 22

<210> 55  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector sequence for shRNA36

<400> 55  
 ggaaagcccu acgaaccacu ga 22

<210> 56  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 ><223> Effector complement sequence for shRNA36

<400> 56  
 ucagugguuc guaggcuuu cc 22

<210> 57  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector sequence for shRNA37

<400> 57  
 gggaaagccc uacgaaccac ug 22

<210> 58  
 <211> 22  
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector complement sequence for shRNA37  
 <400> 58  
 cagugguucg uaggcuuuc cc 22  
  
 <210> 59  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector sequence for shRNA38  
 <400> 59  
 ggggaaagcc cuacgaacca cu 22  
 <210> 60  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector complement sequence for shRNA38  
 <400> 60  
 agugguucgu agggcuuucc cc 22  
 <210> 61  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 ><223> Effector sequence for shRNA39  
 <400> 61  
 gggaaagccc uacgaaccac ug 22  
 <210> 62  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector complement sequence for shRNA39  
 <400> 62  
 cauuguuucu cgggcuuucc c 21  
 <210> 63

<211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector sequence for shRNA40  
 <400> 63  
 ccgggcaacg ggguaaaggu uc 22

<210> 64  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Effector complement sequence for shRNA40  
 <400> 64  
 gaaccuuuac cccguugccc gg 22

<210> 65  
 <211> 47  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA1 sequence  
 <400> 65  
 cauccugcug cuaugccuca caagagauga ggcauagcag caggaug 47

<210> 66  
 <211> 47  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA2 sequence  
 <400> 66  
 uccugcugcu augccucauc caagagagau gaggcauagc agcagga 47

<210> 67  
 <211> 47  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA3 sequence  
 <400> 67

gcauccgcu gcuaugccuc caagagagag gcuaugcagc aggaugc 47

<210> 68

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA4 sequence

<400> 68

ugaggcauag cagcaggaug caagagacau ccugcugcua ugccuca 47

<210> 69

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA5 sequence

<400> 69

gcugacgcaa cccccacugg caagagacca guggggguug cgucagc 47

<210> 70

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA6 sequence

<400> 70

ccaguggggg uugcgucagc caagagagcu gacgcaacc ccacugg 47

<210> 71

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA7 sequence

<400> 71

aagccuccaa gcugugccuu ugugcuuaag gcacagcuug gaggcuu 47

<210> 72

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA8 sequence  
 <400> 72  
 aaggcacagc uuggaggcuu ugugcuuaag ccuccaagcu gugccuu 47  
 <210> 73  
 <211> 49  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA9 sequence  
 <400> 73  
 gguccccuag aagaagaacu ccaagagaga guucuucuuc uaggggacc 49  
 <210> 74  
 <211> 49  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA10 sequence  
 <400> 74  
 gguccccuag aagaagaacu ccaagagaga guucuucuuc uaggggacc 49  
 <210> 75  
 <211> 50  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA11 sequence  
 <400> 75  
 ccccuagaag aagaacuccc uccaagagag agggaguucu ucuucuaggg 50  
 <210> 76  
 <211> 50  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA12 sequence  
 <400> 76  
 gagggaguuc uucuucuagg gcaagagacc ccuagaagaa gaacuccuc 50  
 <210> 77  
 <211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA13 sequence

<400> 77

uccccuagaa gaagaacucg ccaagagagc gaguucuucu ucuagggga 49

<210> 78

<211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA14 sequence

<400> 78

gcaggucccc uagaagaaga acaagagauu cuucuucuag gggaccucg 49

<210> 79

<211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA15 sequence

<400> 79

caagguaugu ugcccguuug ucaagagaac aaacgggcaa cauaccuu 49

<210> 80

<211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA16 sequence

<400> 80

agguauguug cccguuuguc ccaagagagg acaaacgggc aacauaccu 49

<210> 81

<211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA17 sequence

<400> 81

aagguauguu gcccguuugu ccaagagaga caaacgggca acauaccuu 49

<210> 82  
 <211> 49  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA18 sequence  
 <400> 82  
  
 acaaacgggc aacauaccuu gcaagagaca agguauguug cccguuugu 49  
 <210> 83  
 <211> 47  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA19 sequence  
 <400> 83  
  
 cucguggugg acuucucuca caagagauga gagaagucca ccacgag 47  
 <210> 84  
 <211> 47  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA20 sequence  
 <400> 84  
  
 ugagagaagu ccaccacgag caagagacuc gugguggacu ucucuca 47  
 <210> 85  
 <211> 47  
 <212> RNA  
  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA21 sequence  
 <400> 85  
  
 auugagagaa guccaccacg caagagacgu gguggacuuc ucucaau 47  
 <210> 86  
 <211> 47  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA22 sequence

<400> 86  
agagaagucc accacgaguc caagagagac ucguggugga cuucucu 47

<210> 87  
<211> 49  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> shRNA23 sequence  
<400> 87  
cucguguuac aggcgggguu ucaagagaaa accccgccug uaacacgag 49

<210> 88  
<211> 49  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> shRNA24 sequence  
<400> 88  
aaacccgcc uguaacacga gcaagagacu cguguuacag gcgggguuu 49

<210> 89  
<211> 48  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> shRNA25 sequence  
<400> 89  
gcacuucgcu ucacucugca caagagaugc agaggugaag cgaagugc 48

<210> 90  
<211> 48  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> shRNA26 sequence  
<400> 90  
ugcagaggug aagcgaagug ccaagagagc acuucgcuuc acucugca 48

<210> 91  
<211> 49  
<212> RNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA27 sequence  
 <400> 91  
 acgucgccguc ggcgcugaau cugugcuuga uucagcgccg acgggacgu 49  
 <210> 92  
 <211> 49  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA28 sequence  
 <400> 92  
 cgucgccguc ggcgcugaau cugugcuugg auucagcgcc gacgggacg 49  
 <210> 93  
 <211> 49  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA29 sequence  
 <400> 93  
 uacgucgccg cgcgcugaa uugugcuuau ucagcgccga cgggacgua 49  
 <210> 94  
 <211> 49  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA30 sequence  
 <400> 94  
 gauucagcgc cgacgggacg uugugcuuac gucccgucgg gcugaauc 49  
 <210> 95  
 <211> 49  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA31 sequence  
 <400> 95  
 ggauucagcg ccgacgggac gugugcuucg ucccgucggc gcugaauc 49  
 <210> 96

<211> 49  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA32 sequence  
 <400> 96  
 auucagcgcc gacgggacgu augugcuuuu cgucccgucg ggcgugaau 49  
 <210> 97  
 <211> 45  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA33 sequence  
 <400> 97  
 aaaugccccc aucuaucau gugcuuugau aagauagggg cauuu 45  
 <210> 98  
 <211> 45  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA34 sequence  
 <400> 98  
 ugauaagaua ggggcuuuuu gugcuuuuuu gccccuauca uauca 45  
 <210> 99  
 <211> 51  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA35 sequence  
 <400> 99  
 auaccuauagg gagugggccu cacaagagau gaggccacu ccuauaggua u 51  
 <210> 100  
 <211> 51  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA36 sequence  
 <400> 100  
 ucagugguuc guagggcuuu cccaagagag gaaagccua cgaaccacug a 51

<210> 101  
 <211> 51  
 <212>  
 > RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA37 sequence  
 <400> 101  
 cagugguucg uaggguuuc cccaagagag ggaaagccu acgaaccacu g 51  
 <210> 102  
 <211> 51  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA38 sequence  
 <400> 102  
 agugguucgu agggcuuucc cccaagagag ggaaagccc uacgaaccac u 51  
 <210> 103  
 <211> 50  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA39 sequence  
 <400> 103  
 gggaaagccc uacgaaccac ugcaagagac auuguuucuc gggcuuucc 50  
 <210> 104  
 <211> 51  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> shRNA40 sequence  
 <400> 104  
 gaaccuuuac cccguugccc ggcaagagac cgggcaacgg gguaaagguu c 51  
 <210> 105  
 <211> 1856  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> pBL184\_HBV\_Triple\_V2

<220><221> misc\_feature

<222> (696)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (699)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 105

gcatgcaggg cggatgaggct caggctctgc cccgcctccg gggctatttg catacgacca 60

tttccagtaa ttcccagcag ccaccgtagc tatatttggg agaacaacga gcactttctc 120

aactccagtc aataactacg ttagttgcat tacacattgg gctaataata atagaggtta 180

aatctctagg tcatttaaga gaacgggtcac cgtaaggaaa acaaatgaaa agactcccgt 240

gccttataag gcctgtgggt gacttcttct caacggatcc gcaggtcccc tagaagaaga 300

acaagagatt ctcttctag gggacctgct ttttagatc tgttcggctt tacgtcacgc 360

gagggcgcca gggaggacgg aatggcgggg tttgggtgg gtcctcctc gggggagccc 420

tgggaaaaga ggactgcgtg tgggaagaga aggtggaat ggcgttttg ttgacatgtg 480

ccgcctgcga gcgtgctcg gggaggggcc gagggcagat tcgggaatga tggcgcgggg 540

tggggcgctg ggggcttct cgggagaggc ccttcctgg aagttagggg tgcgatggtg 600

aggttctcgg ggcacctctg gagggcctc ggcacggaaa gcgaccacct gggagggcgt 660

gtggggacca ggttttgct ttagtttgc acacdnadna actgtagtcc atctttatgg 720

agatgctcat ggctcattg aagccccacg gatctgggca ggaagagggc ctatttccca 780

tgattcctc atatttgc atacgataca aggctgttag agagataatt agaattaatt 840

tgactgtaaa cacaaagata ttagtataaa atactgacg tagaaagtaa taatttctg 900

ggtagtttgc agtttataaa ttatgtttta aaatggacta tcatatggtt accgtaagga 960

aaacaaatga tttcgatttc ttggctttat atatcttgtg gaaaggacga ggatccgcaa 1020

ggtatgttgc ccgtttgca agagaacaaa cgggcaacat acctgtttt ttctagagaa 1080

ttgtacagct ctggtagcgg taaccatgcg tatttgacac acgaaggaac tagggaaaag 1140

gcattaggtc atttcaagc gaaattcaca tgtgctagaa tccagattcc atgctgaccg 1200

atgccccagg atatagaaaa tgagaatctg gtccttacct tcaagaacat tettaaccgt 1260

aatcagcctc tggatctta gctccacct cactggtttt ttcttgtttg ttgaaccggc 1320

caagctgctg gctcctcc tcaaccgttc tgatcatgct tgctaaaata gtcaaaacce 1380

cggccagtta aatagcttt agcctgcttt attatgatta ttttgttgt tttggcaatg 1440

acctggctac ctgttgtttc tcccactaaa actttttaag ggcagggaaat tgatctagaa 1500  
 aaaaaaagc tagtggtagc ggtcctacgc ggggcccttt acccaggggtg ccccgggcgc 1560  
 tcatttgcac gtcccaccca acaggtaaac ctgacaggtc atcgcgcca ggtacgacct 1620  
 cggtcagagc accaaacata cgagccttgt gatgagtcc gttgcatgaa attctcccaa 1680  
 aggctccaag atggacagga aaggcgcggg ttcggtcacc gtaaggaaaa caaatgaaaa 1740  
  
 gactcccgtg ccttataagg cctgtgggtg acttcttctc aacggatccg cgtcccgtcg 1800  
 gcgctgaatc ctgtgcttgg attcagcgcc gacgggacgt ttttctaga gaattc 1856  
 <210> 106  
 <211> 1851  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> pBL183\_HBV\_Triple\_V1  
 <400> 106  
  
 gcatgcaggg cggtagcggt caggctctgc cccgcctccg gggtatttg catacgacca 60  
 tttccagtaa ttcccagcag ccaccgtagc tatatttggg agaacaacga gcactttctc 120  
 aactccagtc aataactacg ttagttgcat tacacattgg gctaataata atagaggtta 180  
  
 aatctctagg teatttaaga gaacggtcac cgtaaggaaa acaaatgaaa agactcccgt 240  
 gccttataag gcctgtgggt gacttcttct caacggatcc gcaggtcccc tagaagaaga 300  
 acaagagatt cttcttctag gggacctgct tttttagatc tgttcggctt tacgtcacgc 360  
 gagggcggca gggaggacgg aatggcgggg tttgggtggg gtcctcctc gggggagccc 420  
 tgggaaaaga ggactgcgtg tgggaagaga aggtggaat ggcgttttgg ttgacatgtg 480  
 ccgcctgcga gcgtgctcgc gggaggggccc gagggcagat tcgggaatga tggcgcgggg 540  
 tggggcgtg ggggctttct cgggagaggc ccttcctggg aagtttgggg tgcgatggtg 600  
  
 aggttctcgg ggcacctctg gagggcctc ggcacgaaa gcgaccacct gggagggcgt 660  
 gtggggacca ggttttgctt ttagttttgc acacactgta gttcatcttt atggagatgc 720  
 tcatggcctc attgaagccc cacggatctg ggcaggaaga gggcctatct cccatgattc 780  
 cttcatatct gcatatacga tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg 840  
 taaacacaaa gatattagta caaaatacgt gacgtagaaa gtaataatct cttgggtagt 900  
 ttgcagtttt aaaattatgt tttaaatgg actatcatat ggttaccgta aggaaaacaa 960  
 atgatttcca tttcttggct ttatatatct tgtggaaagg acgaggatcc gcagtggttc 1020  
  
 glagggcttt cccaagaga gggaaagccc tacgaaccac tgttttctc gagaattgta 1080

cagctctggg agcggtaacc atgcgtattt gacacacgaa ggaactaggg aaaaggcatt	1140
aggtcatttc aagccgaat tcacatgtgc tagaatccag attccatgct gaccgatgcc	1200
ccaggatata gaaaatgaga atctggctct taccttcaag aacattctta accgtaatca	1260
gctctggta tcttagctcc accctcactg gtttttctt gttgttgaa cggccaagc	1320
tgctggcctc ctcctcaac cgttctgac atgcttgcta aaatagtaa aacccggcc	1380
agttaaatat gcttagcct gctttattat gattattttt gttgttttgg caatgacctg	1440
gctacctgtt gtttctcca ctaaaacttt ttaagggcag ggaattgac tagaaaaaa	1500
aaagctagtg gtaccgtcc tacgcggggc cctttacca ggggtccccg ggcgctcatt	1560
tgcatgtccc acccaacagg taaacctgac aggtcatcgc ggccaggta gacctcggtc	1620
agagcaccaa acatacgagc cttgtgatga gttccgtgc atgaaattct cccaaaggct	1680
ccaagatgga caggaaagg cgcggttcgg tcaccgtaag gaaaacaaat gaaaagactc	1740
ccgtgcctta taaggcctgt gggtgacttc ttctcaacgg atccgcgtcc cgtcggcgct	1800
gaatcctgtg cttggattca gcgccgacgg gacgtttttt ctagagaatt c	1851