



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년10월23일
(11) 등록번호 10-0865062
(24) 등록일자 2008년10월17일

(51) Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01) C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

- (21) 출원번호 10-2007-7004747
- (22) 출원일자 2007년02월27일
심사청구일자 2007년02월27일
번역문제출일자 2007년02월27일
- (65) 공개번호 10-2007-0041601
- (43) 공개일자 2007년04월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2005/015831
국제출원일자 2005년08월24일
- (87) 국제공개번호 WO 2006/025419
국제공개일자 2006년03월09일
- (30) 우선권주장
JP-P-2004-00254824 2004년09월01일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌
Biomacromolecules, vol.4, no.5, pp1426-1432*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
도쿠리쓰교세이호징 가가쿠 기주쓰 신코 기코
일본 사이타마켄 가와구치시 혼쇼 4쵸메 1번 8고
- (72) 발명자
나가사키 유키오
일본 이바라키켄 모리야시 게이키다이 3-5-17
가타오카 가즈노리
일본 도쿄도 나카노쿠 가미사기노미야 5-17-22
오이시 모토이
일본 지바켄 나가레야마시 니시후카이 848-1 구란
듀루 히루마에이-201
- (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 20 항

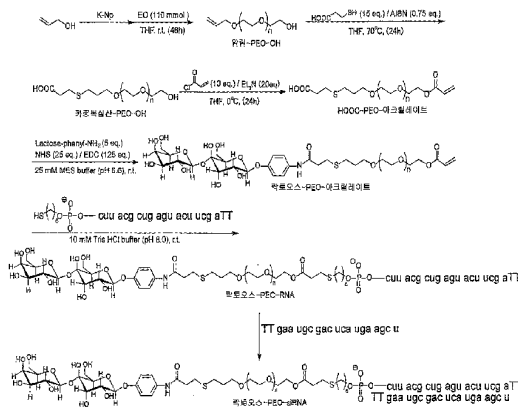
심사관 : 김은희

(54) PEO 와 2 개 사슬 핵산의 콘주게이트

(57) 요약

효과적인 유전자의 표적 세포로의 딜리버리 수단인, 폴리(에틸렌옥사이드) 수식 올리고 또는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 2 개 사슬 핵산과 폴리 양이온 화합물을 함유하여 이루어지는 폴리 이온 콤플렉스가 제공된다.

도면



특허청구의 범위

청구항 1

(A) 상보성을 갖는 2 종의 올리고 또는 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 2 개 사슬 핵산으로서, 그의 1 종의 올리고 또는 폴리뉴클레오티드의 말단에 폴리(에틸렌옥사이드)사슬을 갖는 세그먼트가 공유 결합하고 있는 2 개 사슬 핵산, 및

(B) 폴리아민을 함유하여 이루어지는 폴리 양이온 화합물을 함유하여 이루어지는 폴리 이온 컴플렉스.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 폴리아민을 함유하여 이루어지는 폴리 양이온 화합물이 분자 간에 적어도 1 개의 디설파이드 결합에 의해 가교되어 있는 폴리 이온 컴플렉스.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 2 개 사슬 핵산에 있어서의 포스페이트에서 유래하는 음이온과 폴리아민을 함유하여 이루어지는 폴리 양이온 화합물에 있어서의 아민 잔기에서 유래하는 양이온의 비가 0.5/1 ~ 1/10 인 폴리 이온 컴플렉스.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 폴리 이온 컴플렉스가 수성 매체 중에서 미셀의 형태로 존재하는 폴리 이온 컴플렉스.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 2 개 사슬 핵산이 RNA/RNA, DNA/RNA 및 DNA/DNA 로 이루어지는 군에서 선택되는 대합물(對合物)인 폴리 이온 컴플렉스.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 2 개 사슬 핵산이 siRNA 인 폴리 이온 컴플렉스.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 올리고 또는 폴리뉴클레오티드의 말단에 폴리(에틸렌옥사이드)사슬을 갖는 세그먼트가 공유 결합한 2 개 사슬 핵산이, 일반식 (1) :



(식 중, NT 는 리보스의 3' 또는 5' 말단에 있어서 인산 에스테르 결합을 통하여 L_1-L_2-PEO 에 결합한 올리고 또는 폴리뉴클레오티드 잔기를 표시하고,

L_1 은 NH, 산소 원자 또는 황 원자에 의해 1 또는 2 이상의 지점에서 중단되어 있어도 되는 총 원자수 3 ~ 30 의 알킬렌기를 표시하고,

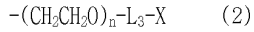
L_2 는 생리학적 조건 하에서 개열할 수 있는 결합을 갖는 연결기를 표시하고,

PEO 는 L_2 의 미결합 말단에 연결기를 경우에 따라 개재하여, 수소 원자, 알킬기, 아르알킬기, 관능기 또는 리간드 잔기를 담지하는 폴리(에틸렌옥사이드)기를 표시한다.) 로 표시되는 화합물의 NT 부에 상보성을 갖는 올리고 또는 폴리뉴클레오티드가 하이브리다이즈하여 siRNA를 형성하고 있는, 폴리 이온 콤플렉스.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

-PEO 가 식 (2)



(식 중, L_3 은 단결합, 카르보닐 또는 L_1 에 대하여 정의한 것과 동일한 의미의 연결기를 표시하고,

X 는 수소 원자, C_1-C_6 알킬, 히드록시- C_1-C_6 알킬, 카르복시- C_1-C_6 알킬, 아세탈 또는 케탈화 포르말- C_1-C_6 알킬, 아미노- C_1-C_6 알킬, 말레이미드- C_1-C_6 알킬, 카르보닐이미노페닐, 알릴 및 이들의 관능기를 통하여 리간드가 결합한 부분으로 이루어지는 군에서 선택되고, 그리고 n 이 5 ~ 500 의 정수이다) 로 표시되는 폴리 이온 콤플렉스.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

올리고 또는 폴리뉴클레오티드 잔기가 10 ~ 50 의 뉴클레오티드로 이루어지는 RNA 또는 DNA 에서 유래하는 폴리 이온 콤플렉스.

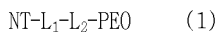
청구항 10

제 1 항에 있어서,

폴리아민을 함유하여 이루어지는 폴리 양이온 화합물이 1 또는 복수의 SH 기가 측쇄에 도입된 폴리리신, 폴리테트라민, 폴리메타크릴산디메틸아미노에틸, 올리고아르기닌, tat (TransActivator of Transcription : 전사활성제) 펩티드 및 KALA 펩티드로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리 이온 콤플렉스.

청구항 11

일반식 (1)



(식 중, NT 는 리보스의 3' 또는 5' 말단에 있어서 인산 에스테르 결합을 통하여 L_1-L_2-PEO 에 결합한 올리고 또는 폴리뉴클레오티드 잔기를 표시하고,

L_1 은 산소 원자 또는 황 원자에 의해 1 또는 2 이상의 지점에서 중단되어 있어도 되는 총 원자수 3 ~ 30 의 알킬렌기를 표시하고,

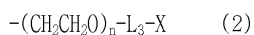
L_2 는 생리학적 조건 하에서 개열할 수 있는 결합을 갖는 연결기를 표시하고,

PEO 는 L_2 의 미결합 말단에 연결기를 경우에 따라 개재하여, 수소 원자, 알킬기, 아르알킬기, 관능기 또는 리간드 잔기를 담지하는 폴리(에틸렌옥사이드)기를 표시한다.) 로 표시되는 화합물의 NT 부에 상보성을 갖는 올리고 또는 폴리뉴클레오티드가 하이브리다이즈하여 2 개 사슬 핵산부를 형성하고 있는 핵산 콘주게이트.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

-PEO 가 식 (2)



(식 중, L_3 은 단결합, 카르보닐 또는 L_1 에 대하여 정의한 것과 동일한 의미의 연결기를 표시하고,

X 는 수소 원자, C₁-C₆알킬, 히드록시-C₁-C₆알킬, 카르복시-C₁-C₆알킬, 아세탈 또는 케탈화 포르밀-C₁-C₆알킬, 아미노-C₁-C₆알킬, 말레이미드-C₁-C₆알킬, 및 카르보닐이미노페닐기 그리고 이들 기에 있어서의 관능기를 통하여 리간드가 결합한 부분으로 이루어지는 군에서 선택되고,

n 이 5 ~ 500 의 정수이다)

로 표시되는 핵산 콘주게이트.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

NT 가 15 ~ 30 의 리보뉴클레오티드 또는 테옥시리보뉴클레오티드로 이루어지는 핵산으로 이루어지는 군에서 선택되고, 그 NT 부에 상보성을 갖는 올리고뉴클레오티드가 15 ~ 30 의 리보뉴클레오티드이고, 그리고 L₂ 가 -O(CH₂)_a-OCO(CH₂)_bS(CH₂)_c- 또는 -O(CH₂)_a-S-S(CH₂)_c- 의 연결기로서, a, b 및 c 는, 서로 독립적으로 2 ~ 8 의 정수인 핵산 콘주게이트.

청구항 14

제 11 항에 있어서,

NT 와 그것에 상보성을 갖는 올리고뉴클레오티드로 이루어지는 2 개 사슬 핵산 부분이 siRNA 에 상당하는 핵산 콘주게이트.

청구항 15

제 1 항에 기재된 이온 콤플렉스로서, 상기 올리고 또는 폴리뉴클레오티드가 결합하고 있지 않은 폴리(에틸렌옥시드)사슬의 말단측에 리간드가 공유 결합하고 있고, 그 리간드가 포유 동물의 세포 표면에 결합할 수 있는 당 또는 펩티드인 상기 이온 콤플렉스.

청구항 16

제 15 항에 기재된 이온 콤플렉스로서, 리간드가 락토오스인 상기 이온 콤플렉스.

청구항 17

제 1 항에 기재된 폴리 이온 콤플렉스로서, 올리고 또는 폴리뉴클레오티드의 말단에 폴리(에틸렌옥시드)사슬을 갖는 세그먼트가 공유 결합한 화합물이 일반식 (1) :



식 중, NT 는 리보스의 3' 또는 5' 말단에 있어서 인산 에스테르 결합을 통하여 L₁-L₂-PEO 에 결합한 올리고 또는 폴리뉴클레오티드 잔기를 표시하고,

L₁ 은 NH, 산소 원자 또는 황 원자에 의해 1 또는 2 이상의 지점에서 중단되어 있어도 되는 총 원자수 3 ~ 30 의 알킬렌기를 표시하고,

L₂ 는 생리학적 조건 하에서 개열할 수 있는 결합을 갖는 연결기를 표시하고,

PEO 는 L₂ 의 미결합 말단에 연결기를 경우에 따라 개재하여, 포유 동물의 세포 표면에 결합할 수 있는 당 및 펩티드로 이루어지는 군에서 선택되는 리간드 잔기를 담지하는 폴리(에틸렌옥시드)기를 표시한다,

로 표시되는 것을 특징으로 하는, 상기 이온 콤플렉스.

청구항 18

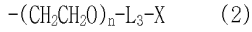
제 17 항에 기재된 이온 콤플렉스로서, 리간드가 락토오스이며, NT 가 15 ~ 30 의 리보뉴클레오티드 또는 테옥시리보뉴클레오티드로 이루어지는 핵산으로 이루어지는 군에서 선택되고, 그 NT 부에 상보성을 갖는 올리고뉴클레오티드가 15 ~ 30 의 리보뉴클레오티드이고,

그리고 L₂ 가 O(CH₂)_a-OCO(CH₂)_bS(CH₂)_c- 또는

-O(CH₂)_a-S-S(CH₂)_c- 의 연결기로서, a, b 및 c 는, 서로 독립적으로 2 ~ 8 의 정수이며, 또한, NT 와 그것에 상보성을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 이루어지는 2 개 사슬 핵산 부분이 siRNA 에 상당하는, 상기 이온 콤플렉스.

청구항 19

제 11 항에 기재된 핵산 콘주게이트로서, -PEO 가 식 (2)



(식 중, L₃ 은 단결합, 카르보닐 또는 L₁ 에 대하여 정의한 것과 동일한 의미의 연결기를 표시하고, X 는 수소 원자, C₁-C₆알킬, 히드록시-C₁-C₆알킬, 카르복시-C₁-C₆알킬, 아세탈 또는 케탈화 포르밀-C₁-C₆알킬, 아미노-C₁-C₆알킬, 말레이미드-C₁-C₆알킬, 및 카르보닐이미노페닐기 그리고 이들 기에 있어서의 관능기를 통하여 리간드가 결합한 부분으로 이루어지는 군에서 선택되고, 그리고 n 이 5 ~ 500 의 정수이며, 또한, NT 가 15 ~ 30 의 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드로 이루어지는 핵산으로 이루어지는 군에서 선택되고, 그 NT 부에 상보성을 갖는 올리고뉴클레오타이드가 15 ~ 30 의 리보뉴클레오타이드이며,

그리고 L₂ 가 -O(CH₂)_a-OCO(CH₂)_bS(CH₂)_c- 또는

-O(CH₂)_a-S-S(CH₂)_c- 의 연결기로서, a, b 및 c 는, 서로 독립적으로 2 ~ 8 의 정수이며, 또한, 리간드가 락토오스인 상기 핵산 콘주게이트.

청구항 20

제 19 항에 기재된 핵산 콘주게이트로서, NT 와 그것에 상보성을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 이루어지는 2 개 사슬 핵산 부분이 siRNA 에 상당하는 상기 핵산 콘주게이트.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은, 폴리(에틸렌옥사이드) 로 수식된 2 개 사슬 핵산의 콘주게이트 및 그 콘주게이트와 폴리아민을 함유하여 이루어지는 폴리 양이온 화합물의 폴리 이온 콤플렉스 (PIC 라고도 한다) 에 관한 것이다. 이러한 콘주게이트 및 PIC 는 생화학, 화학 요법, 특히, 다중 다양한 동물 세포에 있어서 표적으로 하는 유전자의 발현을 억제하는 방법에 있어서 유리하게 사용된다.

배경기술

<2> 유전자 특이적 치료법에 사용되는 유전자, 또는 표적 mRNA 에 사용할 수 있는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드는, 치료제로서 주목받아 왔다. 그러나, 그 유전자나 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 (ODN) 는, 그것들을 표적 부위에 딜리버리 할 때의, 예를 들어, ODN 와 혈장 단백질과의 비특이적 상호 작용, ODN 의 우선적인 간 및 신장으로의 삽입에 수반되는 표적 세포로의 삽입 효율의 낮음, 유전자 및 ODN 의 뉴클레아제에 의한 분해에 대한 안정성의 낮음 등의 각종 장애 때문에, 치료에 있어서, 그다지 기대한 효과를 얻지 못했다.

<3> 이러한 장애를 성공리에 제거할 수 있는 수단으로서, 안티센스 DNA 와 티올레이트화(thiolated) 폴리(에틸렌글리콜)-block-폴리(L-리신) 으로 형성된 블록 코폴리머 미셀 또는 폴리 이온 콤플렉스 (PIC) 미셀이 제안되었다 (예를 들어, 하기의 특허 문헌 1, 비특히 문헌 1 또는 비특히 문헌 2, 참조.). 또, 산분해성 β-프로피오네이트 결합을 통하여 형성된 ODN-폴리(에틸렌글리콜)콘주게이트, 또, 그 콘주게이트와 선 형상 폴리(에틸렌이민) 의 PIC 미셀도, 상기 장애를 제거할 수 있는 유력한 후보이다 (예를 들어, 하기, 비특히 문헌 3, 참조.). 상기 블록 코폴리머를 사용하는 PIC 미셀은, 주로 플라스미드 DNA 또는 안티센스 DNA (1 개 사슬) 의 안정화 또는 딜리버리용 캐리어로서, 또, 비특히 문헌 3 에서는, 주로 안티센스 DNA 의 안정화를 향상시키기 위하여 사용되고 있다.

<4> 한편, 세포의 인터페론 유도를 일으키지 않는다고 여겨지는 Small interference RNA (siRNA) 라고 칭해지는 2

개 사슬의 RNA 분자는, 배양 세포에 있어서 효율적으로 RNAi (배열 특이적 RNA 간섭 또는 배열 특이적 유전자 발현 저해) 를 일으키고, RNAi 활성이 안티센스 DNA 보다 유의하게 높은 점에서 치료약의 후보 물질로서 주목되고 있다 (예를 들어, 하기, 비특허 문헌 4 및 비특허 문헌 5, 참조.). 또, siRNA 의 센스사슬을 DNA 로 치환한 2 개 사슬 DNA/RNA 에 있어서도 RNAi 가 일어나는 경우도 보고되어 있다 (예를 들어, 하기, 비특허 문헌 6, 참조.). 그러나, 이들 2 개 사슬 핵산도 안티센스 DNA 와 마찬가지로 혈 중에서의 분해나 신장으로의 흡수, 배설이 일어나는 것이 보고되어 있다 (예를 들어, 하기, 비특허 문헌 7, 참조.).

- <5> 위에서 인용한 문헌의 리스트:
- <6> 특허 문헌 1: 일본 공개특허공보 2001-146556호
- <7> 비특허 문헌 1: Biomacromolecules 2001, 2, 491 ~ 497
- <8> 비특허 문헌 2: J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 2355-2361
- <9> 비특허 문헌 3: Biomacromolecules 2003, 4, 1426-1432
- <10> 비특허 문헌 4: Nature 2001, 411, 494-498
- <11> 비특허 문헌 5: Biochemical and Biophysical Research Communications 2002, 296(2002), 1000-1004
- <12> 비특허 문헌 6: FEBS Letters 2002, 521, 195-199
- <13> 비특허 문헌 7: Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter 2004, 14, 1139-1143

발명의 상세한 설명

- <14> 발명의 개시
- <15> 본 발명의 목적은, 특히 상기 2 개 사슬 핵산의 생물학적 환경 하에서의 불안정성을 개선하고, 또한 동물 세포에 대한 효율이 좋은 삽입을 가능하게 하는 수단을 제공하는 것에 있다. 2 개 사슬 핵산 중 어느 일방의 올리고 또는 폴리뉴클레오티드의 말단에 폴리(에틸렌옥사이드)사슬을 갖는 세그먼트를 공유 결합시켜 수식하고, 이렇게 하여 수식한 2 개 사슬 핵산의 콘주게이트와 폴리 양이온 화합물을 수성 매체 중에서 혼합하면, 자동적으로 회합(會合)하여 폴리 이온 콤플렉스 (PIC) 미셀이 형성된다. 이렇게 하여 얻어진 PIC 에서는, 그 중의 2 개 사슬 핵산이 생물학적 환경 하에서 안정화되고, 또한 동물 세포로의 삽입 효율이 높아지는 것을 알 수 있었다.
- <16> 따라서 본 발명에 의하면,
- <17> (A) 상보성을 갖는 2 종의 올리고 또는 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 2 개 사슬 핵산으로서, 적어도 1 종의 올리고 또는 폴리뉴클레오티드의 말단에 폴리(에틸렌옥사이드)사슬을 갖는 세그먼트가 공유 결합하고 있는 2 개 사슬 핵산 (이하, 성분 A 라고도 한다.), 및
- <18> (B) 폴리아민을 함유하여 이루어지는 폴리 양이온 화합물 (이하, 성분 B 라고도 한다.) 를 함유하여 이루어지는 폴리 이온 콤플렉스가 제공된다.
- <19> 또한, 본 발명의 폴리 이온 콤플렉스 (PIC) 는, 수성 매체 중에서 미셀의 형태로 존재할 수 있는지, 그 PIC 를 형성하는 폴리 양이온 화합물로서 적어도 1 개 이상의 메르캡토기 (-SH) 를 측쇄에 갖는 화합물을 사용하여 형성한 PIC 에서는, 이들의 화합물 간에서 적어도 1 개의 디설파이드 결합 (-SS-) 으로 가교한 PIC 미셀을 제공할 수 있다. 이러한 PIC 미셀은 구조 상의 안정성이 향상된 양태의 것으로서 제공된다.
- <20> 본 발명의 PIC 는 수성 매체 (예를 들어, 생리 식염액, 인산 완충화 생리 식염수 (PBS) 중에서 미셀을 형성할 수 있는 것이면, 성분 A 와 성분 B 의 함유율은 한정되지는 않지만, 성분 A 의 2 개 사슬 핵산에 있어서의 포스페이트에서 유래하는 음이온과 성분 B 의 폴리 양이온 화합물에 있어서의 아민 잔기에서 유래하는 양이온의 비가 0.5/1 ~ 1/10 인 PIC 가 바람직한 양태의 것으로서 제공된다. PIC 미셀 전체가 약간 포지티브로 하전되어 있으면, 그 미셀의 동물 세포로의 삽입 효율이 높아지는 경우가 자주 있다.
- <21> 2 개 사슬 핵산은, 각각, 상보성을 갖는 2 종의 올리고 또는 폴리리보뉴클레오티드와 올리고 또는 폴리리보뉴클레오티드와의 대합물 (RNA/RNA), 올리고 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드와 올리고 또는 폴리리보뉴클레오티드와의 대합물 (DNA/RNA), 그리고 올리고 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드와 올리고 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드와의 대합물 (DNA/DNA) 로부터 선택된다.

- <22> 본 발명에 관하여 사용하는 핵산, 뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 테옥시리보뉴클레오티드, RNA 및 DNA 라는 용어는, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 있는 의미를 갖는다. 본 명세서에서는, 올리고 또는 폴리 리보뉴클레오티드라는 용어는 RNA 와 호환 가능하게 사용되고 있고, 그리고 올리고 또는 폴리테옥시리보뉴클레오티드라는 용어는 DNA 와 호환 가능하게 사용되고 있다.
- <23> 성분 A 의 올리고 또는 폴리뉴클레오티드 말단에 폴리(에틸렌옥사이드)사슬을 갖는 세그먼트가 공유 결합한 화합물은, 보다 구체적으로는 하기의 일반식 (1) 로 표시할 수 있다.
- <24> $NT-L_1-L_2-PEO$ (1)
- <25> 식 중, NT 는 리보스의 3' 또는 5' 말단에 있어서 인산 에스테르 결합을 통하여 L_1-L_2-PEO 에 결합한 올리고 또는 폴리뉴클레오티드 잔기를 표시하고,
- <26> L_1 은 산소 원자 또는 황 원자에 의해 1 또는 2 이상의 지점에서 중단되어 있어도 되는 총 원자수 3 ~ 30 의 알킬렌기를 표시하고,
- <27> L_2 는 생리학적 조건 하에서 개열할 수 있는 결합을 갖는 연결기를 표시하고,
- <28> PEO 는 L_2 의 미결합 말단에 연결기를 경우에 따라 개재하여, 수소 원자, 알킬기, 아르알킬기, 관능기 또는 리간드 잔기를 담지하는 폴리(에틸렌옥사이드)기를 표시한다.
- <29> 보다 구체적인 양태의 성분 A 로서는, 상기 일반식 (1) 에 있어서의 -PEO 가 식 (2):
- <30> $-(CH_2CH_2O)_n-L_3-X$ (2)
- <31> 로 표시되고, 여기서, L_3 은 단결합, 카르보닐 또는 L_1 에 관하여 정의한 것과 동일한 연결기를 표시하고,
- <32> X 는 C_1-C_6 알킬, 히드록시- C_1-C_6 알킬, 카르복시- C_1-C_6 알킬, 아세탈 또는 케탈화 포르밀- C_1-C_6 알킬, 아미노- C_1-C_6 알킬, 말레이미드- C_1-C_6 알킬, 카르보닐이미노페닐, 알릴 및 이들의 관능기를 통하여 리간드가 결합된 부분으로 이루어지는 군에서 선택되고, 그리고
- <33> n 이 5 ~ 500 의 정수인, 화합물을 들 수 있다.
- <34> 한편, 성분 B 의 폴리아민을 함유하여 이루어지는 폴리 양이온 화합물은, 한정되지는 않지만, 1 또는 복수의 SH 기가 도입된 폴리리신, 폴리에틸렌이민, 폴리메타크릴산디메틸아미노에틸, 올리고아르기닌, tat (TransActivator of Transcription : 전사 활성체) 펩티드 및 KALA 펩티드로 이루어지는 군에서 선택된다. 이들 폴리아민을 함유하여 이루어지는 폴리 양이온 화합물의 분자량은, 성분 A 와 일체가 되어 PIC 미셀을 형성하는 것이면, 제한없이 사용할 수 있다. 그러나, 폴리리신을 예로 들면, 일반적으로, 500 ~ 100000, 바람직하게는 1000 ~ 50000, 보다 바람직하게는 5000 ~ 25000 일 수 있다. 다른 폴리아민을 함유하여 이루어지는 폴리 양이온에 대하여 바람직한 분자량은, 상기 폴리리신의 예를 참고하여, 필요에 따라, 소(小)실험을 행함으로써 결정할 수 있다. 1 또는 복수의 SH 기가 측쇄에 도입된 폴리리신에서는, 리신 단위 10, 바람직하게는 5 개당 SH 기가 1 개가 되도록 선정된 것을 들 수 있다.
- <35> 또, 다른 양태의 본 발명으로서,
- <36> 일반식 (1):
- <37> $NT-L_1-L_2-PEO$ (1)
- <38> (식 중, NT 는 리보스의 3' 또는 5' 말단에 있어서 인산 에스테르 결합을 통하여 L_1-L_2-PEO 에 결합된 올리고 또는 폴리뉴클레오티드 잔기를 표시하고,
- <39> L_1 은 산소 원자 또는 황 원자에 의해 1 또는 2 이상의 지점에서 중단되어 있어도 되는 총 원자수 3 ~ 30 의 알킬렌기를 표시하고,
- <40> L_2 는 생리학적 조건 하에서 개열할 수 있는 결합을 갖는 연결기를 표시하고,
- <41> PEO 는 L_2 의 미결합 말단에 연결기를 경우에 따라 개재하여, 수소 원자, 알킬기, 아르알킬기, 관능기 또는 리

간드 잔기를 담지하는 폴리(에틸렌옥사이드)기를 표시한다.) 로 표시되는 화합물의 NT 부에 상보성을 갖는 올리고 또는 폴리뉴클레오티드가 하이브리다이즈하여 2 개 사슬 핵산부를 형성하고 있는 핵산 콘주게이트도 제공된다.

<42> 바람직한 양태의 콘주게이트는, 상기 식 중의 -PEO 가, 상기 기술한 PIC 에 관하여 설명한 식 (2)

<43> $-(CH_2CH_2O)_n-L_3-X$ (2)

<44> 로 표시되는 것을 들 수 있다.

실시예

<58> 이하, 구체적으로 예를 들어, 본 발명을 더욱 설명한다.

<59> 실시예 1: 알릴-PEO-OH 의 제조

<60> 아르곤 하, 가지형 플라스크 중, 실온에서, 개시제 알릴알코올 1.0mmol (0.07ml) 을 용매 테트라히드로푸란 (THF) 25ml 에 마이크로시린지에서 첨가하고, K-나프탈렌 1.0mmol (0.325mol/1-THF 용액, 3.1ml) 을 첨가하여 10 분간 메탈화를 실시하였다. 이어서, 에틸렌옥사이드 (EO) 110mmol (5.5ml) 을 첨가하여 수냉 하에서 2 일간 교반하고, 음이온 개환 중합을 실시하였다. 디에틸에테르 침전 (21), 흡인 여과, 벤젠 동결 건조에 의해 정제시켰다. 이 생성물의 수량은 4.4g (98%) 이었다.

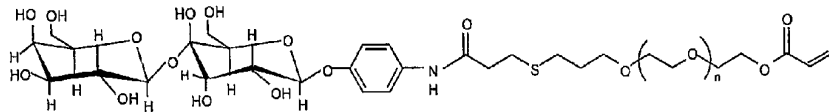
<61> 실시예 2: 카르복실산-PEO-OH 의 제조

<62> 알릴-PEO-OH 1.0mmol (4.3g, $M_n = 4340$), 3-메르카프토프로판산 15mmol (1.6g, 15 배 몰량) 및 아조비스이소부티로니트릴 (AIBN) 0.75mol (0.12g, 0.75 배 몰량) 을 THF 30ml 중에 용해시키고, 동결 탈기를 3 회 행하였다. 다음으로, 아르곤 하 70°C 에서 2 일간 반응시켰다. 그 후, 2-프로판올 침전 (21), 원심 분리 (5000 × g, 45 분간), 순수에 대한 투석 (구획 분자량 3500, 1, 2, 4, 6, 8, 12 시간 후에 물을 교환), 수동결 건조에 의해 정제시켰다. 이 생성물의 수량은 3.6g (82%) 이었다.

<63> 실시예 3: 카르복실산-PEO-아크릴레이트의 제조

<64> 아르곤 하, 가지형 플라스크 중, 실온에서, 아크릴로일클로라이드 4.5mmol (0.36ml, 10 배 몰량) 을 THF 5ml 에 용해시켰다. 다음으로, 그 용액에 카르복실산-PEO-OH 0.45mmol (2.0g, $M_n = 4380$) 및 트리에틸아민 9.0mmol (1.3ml, 20 배 몰량) 을 THF 15ml 에 녹인 용액을 0°C 에서 1 시간에 걸쳐 적하하였다. 그 후, 차광 하 0°C 에서 1 일 반응을 행한 후, 2-프로판올 침전 (11), 원심 분리 (5000 × g, 45 분간), 순수에 대한 투석 (구획 분자량 3500, 1, 2, 4, 6, 8, 12 시간 후에 물을 교환), 수동결 건조에 의해 정제시켰다. 이 생성물의 수량은 1.6g (72%) 이었다.

<65> 실시예 4: 락토오스-PEO-아크릴레이트의 제조



<66>

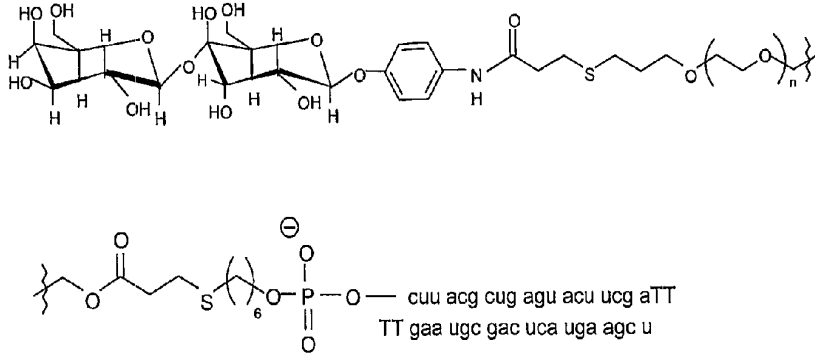
<67> 가지형 플라스크 중, 실온에서, 카르복실산-PEO-아크릴레이트 22 μmol (0.1g, $M_n = 4450$), 4-아미노페닐 β-D-락토피라노사이드 111 μmol (48mg, 5 배 몰량), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염 (EDC) 2.8mmol (0.53g, 125 배 몰량) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS) 0.55mmol (64mg, 25 배 몰량) 을 용매 25mM4-모르폴리노에탄 황산 완충 용액 5ml (pH 6.6) 에 용해시켜, 실온에서 1 일 반응시켰다. 그 후, 2-프로판올 침전 (200ml), 원심 분리 (5000 × g, 45 분간), 순수에 대한 투석 (구획 분자량 3500, 1, 2, 4, 6, 8, 12 시간 후에 물을 교환), 수동결 건조에 의해 정제시켰다. 이 생성물의 수량은 69mg (67%) 이었다.

<68> 겔 투과 크로마토그래피의 측정에 의해, 얻어진 폴리머는 단봉성이고, 그 수평균 분자량은 4630 이며, 이론 분자량 5490 과 거의 일치되었다.

<69> 또한 얻어진 폴리머의 중수 (D₂O) 중에서의 ¹H-NMR (프로톤핵 자기 공명) 스펙트럼에 의해, 이 폴리머의 평균 분자량은 5530 으로 계산되었다. 또 이 폴리머는 에틸렌옥사이드 골격을 주사슬에 갖고, α-말단에 락토오스

기, ω-말단에 아크릴레이트기를 갖는 헤테로텔레케릭 폴리에틸렌옥사이드인 것이 확인되었다 (도 2 참조).

<70> 실시예 5: 락토오스-PEO-siRNA 콘쥬게이트의 제조



<71>

<72> 5' 미만 SH 수식 센스사슬 RNA 30nmol (193μg, 그라이나 재팬으로부터 구입) 과 락토오스-PEO-아크릴레이트 0.3 μmol (1.6mg, 10 배 몰량) 을 시험관에 첨가하여 아르곤 치환을 행하였다. 이어서, 10nM 트리스-염산 완충 용액 (pH 8) 300μl 및 1mM 의 트리페닐포스핀-N,N-디메틸포름아미드 (DMF) 용액 60μl (2 배 몰량) 를 마이크로 시린지에서 첨가하고, 실온에서 2 일간 마이켈 부가 반응시켰다. 또, 음이온 교환 크로마토그래피에 의해, RNA 의 소비와 RNA-PEO 콘쥬게이트의 생성을 확인하였다. 그 후, 음이온 교환 칼럼 크로마토그래피 (Mono Q HR 10/10) 에 의한 분리 채취, 순수에 대한 투석 (구획 분자량 3500, 1, 2, 4, 6, 8, 12 시간 후에 물을 교환) 을 1 일 행함으로써 정제시켰다. 이 UV 측정에 의한 생성물의 수량은 89% 였다. 또한, 얻어진 RNA-PEO 콘쥬게이트 27nmol 과 안티센스사슬 RNA 27nmol (그라이나 재팬으로부터 구입) 을 10mM 인산 완충 용액 (pH 7.4, 어닐링 buffer) 270μl 에 용해시키고, 95℃ 에서 3 분간 어닐링시킴으로써, 락토오스-PEO-siRNA 콘쥬게이트를 정량적으로 얻었다.

<73> 실시예 6: SH 화 폴리리신의 제조.

<74> 평균 중합도 40 의 L-폴리리신 브롬화수소산염 5.1 μmol (42mg), 트라우트 시약 51 μmol (7.0mg, 폴리리신의 아미노기에 대하여 0.25 배 몰량) 및 트리에틸아민 4.5mmol (0.65ml) 을 순수 4ml 에 용해시키고, 실온에서 2 일간 반응시켰다. 다음으로, 순수에 대한 투석 (구획 분자량 3500, 1, 2, 4, 6, 8, 12 시간 후에 물을 교환), 수동결 건조에 의해 정제시켰다. 이 생성물의 수량은 40mg (82%) 이었다.

<75> 또한, 얻어진 폴리머의 중수 (D₂O) 중에서의 ¹H-NMR (프로톤 핵자기 공명) 스펙트럼에 의해, 이 폴리머에 대한 SH 기 (트라우트 시약) 의 수식수는, 평균 중합도 40 당 9 개의 SH 기가 도입되어 있는 것이 확인되었다.

<76> 실시예 7: 락토오스-PEO-siRNA 콘쥬게이트와 폴리리신으로 이루어지는 폴리 이온 콤플렉스 (PIC) 미셀의 제조.

<77> 락토오스-PEO-siRNA 콘쥬게이트 10nmol 및 폴리리신 (평균 중합도 = 40) 12nmol 을, 각각 10mM 트리스-염산 완충 용액 (pH 7.4) 에 용해시킨 후, 0.1μm 의 필터에 의해 여과하여 찌꺼기를 제거하였다. 다음으로, 이들 용액을 폴리리신의 정전하와 락토오스-PEO-siRNA 콘쥬게이트의 부전하의 비가 1(N/P = 1) 이 되도록 혼합하였다. 또한, 10mM 트리스-염산 완충 용액 (pH 7.4, 0.3M NaCl) 을 혼합액과 동량 첨가하고, 12 시간 정지하여 PIC 미셀을 형성시켰다.

<78> 실시예 8: 락토오스-PEO-siRNA 콘쥬게이트와 SH 화 폴리리신으로 이루어지는 S-S 가교 폴리 이온 콤플렉스 (PIC) 미셀의 제조.

<79> 락토오스-PEO-siRNA 콘쥬게이트 10nmol 및 SH 화 폴리리신 (평균 중합도 = 40) 12nmol 을, 각각 10mM 트리스-염산 완충 용액 (pH 7.4) 에 용해시킨 후, 0.1μm 의 필터에 의해 여과하여 찌꺼기를 제거하였다. 이 SH 화 폴리리신 용액에, 0.1 μM 의 디티오프레이톨 (DTT) 의 10mM 트리스-염산 완충 용액 (pH 7.4) 12.5μl (SH 기의 3 배 몰당량) 을 첨가하여 실온에서 30 분간 환원 반응시켰다. 다음으로, 폴리리신의 정(正)전하와 락토오스-PEO-siRNA 콘쥬게이트의 부(負)전하의 비가 1(N/P = 1) 이 되도록 혼합하고, 0.5% 디메틸설폭사이드 (DMSO) 를 함유하고 있는 10mM 트리스-염산 완충 용액 (pH 7.4) 에 대하여 투석 (구획 분자량 3500) 을 2 일간 행하였다. 또한, 0.15M NaCl 을 함유하고 있는 10mM 트리스-염산 완충 용액 (pH 7.4) 에 대하여 투석 (구획 분자량 3500) 1 일간 행함으로써, S-S 가교 PIC 미셀을 형성시켰다.

- <80> 락토오스-PEO-RNA 콘주게이트, 락토오스-PEO-siRNA 콘주게이트, PIC 미셀 및 S-S 가교 PIC 미셀의 조제의 확인은, 12% 아크릴아미드 전기 영동에 의해 행하였다 (도 3 참조). 그 결과, 락토오스-PEO-RNA 콘주게이트 및 락토오스-PEO-siRNA 콘주게이트의 전기 영동 밴드는, 대응하는 1 개 사슬 RNA 및 2 개 사슬 RNA (siRNA) 의 밴드보다 늦는 것으로부터, 콘주게이트의 조제가 확인되었다 (레인 1 과 3, 레인 2 와 4 의 비교). 또, PIC 미셀 및 S-S 가교 PIC 미셀의 전기 영동 밴드는, 원점 부근에서 확인된 것으로부터, PIC 미셀 및 S-S 가교 PIC 미셀의 조제가 확인되었다. (레인 4 와 5, 레인 4 와 6 의 비교).
- <81> 실시예 9: 락토오스-PEO-siRNA 콘주게이트 및 락토오스-PEQ-DNA/RNA 콘주게이트 PIC 미셀의 RNAi 효과.
- <82> 24 웰 폴리스티렌제 세포 배양 플레이트 (팔콘사 제조) 에, 인간 간암 세포 (Huh7cell) 를 5×10^4 cell/well 과 종하고, 24 시간 배양한 후, 시판되고 있는 유전자 도입 시약인 Lipofect AMINE (1.22 μ l/well, 인비트로젠사 제조) 를 사용하여 반딧불이 루시페라아제 플라스미드 DNA (pGL3, 0.084 μ g/well, 프로메가사 제조) 와 레닐라 루시페라아제 플라스미드 DNA (pRL-TK, 0.75 μ g/well, 프로메가사 제조) 의 리포터 유전자를 세포에 트랜스펙션하였다. 다음으로, 반딧불이 루시페라아제 유전자에 대한 배열을 갖는 PIC 미셀 용액 (실시예 7 에서 조제함), S-S 가교 PIC 미셀 용액 (실시예 8 에서 조제함) 및 콘주게이트 단독의 용액을 소정량 첨가하여 (배지 농도 환산 100nM), 24 시간 세포와 접촉시켰다. 배지 교환한 후, 추가로 24 시간 배양한 후, 세포를 회수하여 양 리포터 유전자의 발현량을 Dual Luciferase Reporter Assay System (프로메가사 제조) 에 의해 측정하여 안티센스 효과를 평가하였다 (n = 3).
- <83> 이상의 결과를 도 4 에 나타내었다. DNA/RNA 단독, siRNA 단독 및 락토오스-PEO-DNA/RNA 콘주게이트 단독에 서는, RNAi 효과를 전혀 나타내지 않는 것이 확인되었다. 한편, 락토오스-PEO-siRNA 콘주게이트에 있어서는, RNAi 효과를 나타내는 것이 확인되었다.
- <84> PIC 미셀 및 S-S 가교 PIC 미셀에서는, 전체적으로 RNAi 효과를 나타내는 것이 확인되었다. 또, siRNA 를 갖는 PEO 콘주게이트의 PIC 미셀은, DNA/RNA 를 갖는 PEO 콘주게이트 PIC 미셀보다, 높은 RNAi 효과를 나타내는 것이 확인되었다. 또한, siRNA 를 갖는 PEO 콘주게이트의 S-S 가교 PIC 미셀도 마찬가지로 높은 RNAi 효과를 나타내는 것이 확인되었다.

산업상 이용 가능성

- <85> 본 발명의 PIC 미셀은, siRNA 를 표적 세포 또는 조직에 효율적으로 송달할 수 있기 때문에, 의료업, 의약 제조업 등에서 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <45> 도 1 은, 락토오스-PEO-siRNA 콘주게이트의 합성 스킴이다.
- <46> 도 2 는, 락토오스-PEO-아크릴레이트의 H-NMR 에 의한 측정 결과이다.
- <47> 도 3 은, 락토오스-PEO-RNA 콘주게이트, 락토오스-PEO-siRNA 콘주게이트, PIC 미셀 및 S-S 가교 PIC 미셀의 12 % 아크릴아미드 겔 전기 영동일한 의미 결과를 표시하는 도면을 대신하는 사진이다.
- <48> 도 4 는, 100nM 에 있어서의 락토오스-PEO-DNA/RNA 콘주게이트, 락토오스-PEO-siRNA 콘주게이트, PIC 미셀 및 S-S 가교 PIC 미셀의 RNAi 효과의 결과이다.

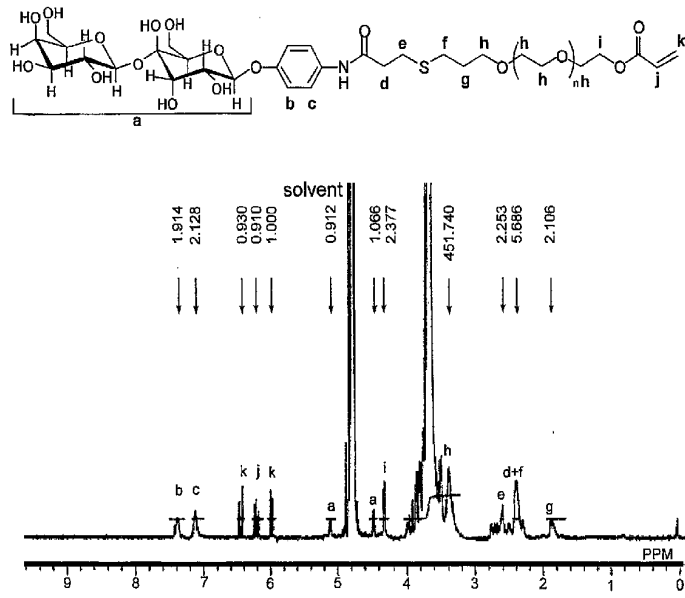
발명의 상세한 설명

- <50> 올리고 또는 폴리뉴클레오티드에 있어서의 「올리고머 (또는 올리고) 또는 폴리」 라는 용어는, PIC 를 형성하고, 그리고 수성 매체 중에서 PIC 미셀을 형성하는 사슬길이를 갖는 것을 모두 포함하는 목적에서 사용하고 있다. 따라서, 한정되지는 않지만, 구체적으로는, 뉴클레오티드 단위가 10 ~ 5000, 바람직하게는 18 ~ 50, 특히 바람직하게는 siRNA 의 뉴클레오티드 단위에 근사하도록 21 ~ 22 이며, 이들 2 종의 사슬이 형성하는 2 개 사슬에 있어서는, 3' 말단 및 5' 말단에 1 ~ 2 개의 뉴클레오티드가 오버행되어 있는 형태에 있는 것이 바람직하다.
- <51> 본 발명에서 말하는 「상보성을 갖는다」 란, 2 개 사슬의 전체에 걸쳐서, 반드시 모든 각 뉴클레오티드의 대합이 서로 엄밀하게 상보성을 갖는 것을 의미하는 것이 아니라, 구체적으로는, 염기쌍으로 표시하면, 모든 각 뉴클레오티드의 대합이, 아데닌 (A) 과 우라실 (U), 또는 구아닌 (G) 과 시토신 (C), 또는 아데닌 (A) 과 티민 (T) 및 구아닌 (G) 과 시토신 (C) 중 어느 것으로 형성되어 있는 것까지 필요로 하는 것은 아니고, 높은 스트린

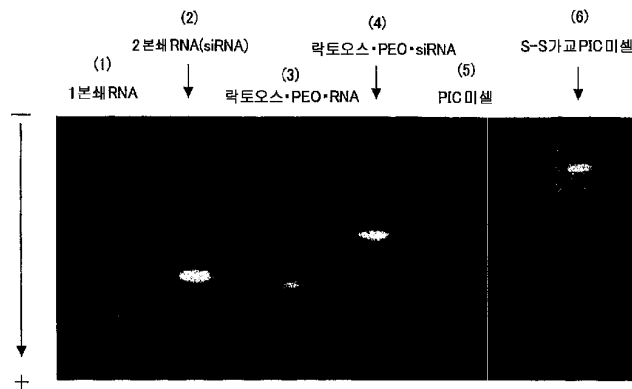
전트 조건 하에서 2 개 사슬 핵산이 하이브리다이징하는 것도 포함하는 개념으로 사용하고 있다.

- <52> 이러한 올리고 또는 폴리뉴클레오티드의 말단에 공유 결합하는 폴리(에틸렌옥사이드)사슬을 갖는 세그먼트는, 상기 일반식 (1) 에 있어서의 $-L_1-L_2-PEO$ 로 표시되는 부분이 구체적인 것으로서 해당된다. 여기서, L_1 , L_2 및 PEO 는, 이미, 일반식 (1) 에 관하여 정의한 바와 같이, 또, -PEO 의 바람직한 양태는, 식 (2) 로 표시되는 것이다. 이들 정의에 있어서의 「산소 원자 또는 황 원자에 의해 1 또는 2 이상의 지점에서 중단되어 있어도 되는 총 원자수 3 ~ 30 의 알킬렌기」 에는, 예를 들어, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2-(O-CH_2CH_2)_2-$, $-CH_2CH_2-S-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2-S-(CH_2)_6-$ 등을 들 수 있다. 또, 「생리적 조건 하에서 개열할 수 있는 결합을 갖는 연결기」 에 있어서의 그 결합은, 예를 들어, 엔드솜에 있어서의 낮은 pH (6.0 ~ 5.0) 에서 개열할 수 있는 몇 가지의 에스테르 결합 또는 환원 조건하 또는 환원성 물질의 존재하에서 개열할 수 있는 디설파이드 결합을 들 수 있다. 이러한 결합을 갖는 연결기는, 연결기 중의 어느 위치에 그 결합을 가지고 있어도 되는데, 예를 들어, $-OCH_2CH_2OCO-CH_2-$, $-OCH_2CH_2SSCH_2-$, $-OCH_2CH_2CH_2OCO-CH_2-$, $-SCH_2CH_2COO-CH_2-$, $-OCH_2CH_2NHCH_2COO-CH_2-$ 등을 들 수 있다.
- <53> -PEO 가 식 (2): $-(CH_2CH_2O)_n-L_3-X$ 로 표시하는 경우의 정의에 있어서의 C_1-C_6 알킬, 히드록시- C_1-C_6 알킬 등에서 말하는 알킬 또는 알킬 부분은, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-헥실 등, 및 이것들에서 유래하는 부분을 의미한다. L_3 은 상기 L_1 에 관하여 정의하는 연결기를 포함하고, 그들 이외로서는, $-O-Ph-NHCO-$ (Ph 는 페닐을 표시한다.), $-OCH_2CH_2NHCO-$, $-NHCOCH_2CH_2-$ 등일 수도 있다. X 에서 말하는, 「아세탈 또는 케탈화 포르밀」 은, 포르밀 또는 알데히드의 보호된 형태를 의미하고, 또, 「카르복시」, 「아미노」 는, 펩티드 합성 등에서 관용되는 보호기로 보호되어 있어도 된다. 또, 이들 관능기를 통하여 (아미드, 에스테르, 에테르 결합을 형성하여) 결합된 리간드로서는, 어느 일정한 세포 표면에 결합할 수 있는 당 또는 펩티드일 수 있고, 또 항체, 항원, 하프텐, 호르몬 등일 수도 있다.
- <54> 이상에 의해 특정되는 PIC 또는 PIC 미셀은, 수성 매체 중에서 성분 A 와 성분 B 를 간단하게 혼합하는 것만으로 형성할 수 있다. 또, 성분 A 도 될 수 있는 본 발명의 콘주게이트는, 예를 들어, 본 발명자 중 일부가 저자에 포함되는 비특허 문헌 3 에 기재된 방법으로 폴리(에틸렌옥사이드)사슬 함유 세그먼트로 수식한 1 개 사슬 핵산을 조제한 후, 그 핵산부에 대한 상보성사슬을 하이브리다이징함으로써 조제할 수 있다.
- <55> 한편, 성분 B 의 폴리 양이온 중 폴리아민의 측쇄에 SH 기를 도입하기 위해서는, 역시, 본 발명자 중 일부가 저자에 포함되는 비특허 문헌 1 및 2 에 기재하는 방법에 준하여 폴리아민을 처리함으로써 실시할 수 있다.
- <56> 2 개 사슬 핵산을 형성하는 올리고 또는 폴리뉴클레오티드는, 동물, 특히 포유 동물 중 몇 가지의 유전자의 센스사슬 및 안티센스사슬 중 하나일 수 있다. 이러한 유전자로서는, 이미 각종 질환의 치료 목적으로 제공되어 온 안티센스 DNA 가 대상으로 해온 유전자일 수 있다. 이러한 유전자로서는, 한정되지는 않지만, 비소세포 폐암 등에 관계가 있는 PKC α , 악성 흑색종 등에 관계가 있는 BCL-2, 크론씨병에 관계가 있는 ICAM-1, C 형 간염에 관계가 있는 HCV, 관절 류머티즘, 건선에 관계가 있는 TNF α , 천식에 관계가 있는 아데노신 A1 수용체, 난소암 등에 관계가 있는 c-raf kinase, 췌장암 등에 관계가 있는 H-ras, 관동맥 질환암에 관계가 있는 c-myc, 대장암에 관계가 있는 PKA RI α , 에이즈에 관계가 있는 HIV, 고형암에 관계가 있는 DNA 메틸-트랜스페라아제, 암에 관계가 있는 VEGF 수용체, 신장암에 관계가 있는 리보뉴클레오티드 환원 효소, CMV 성 망막염에 관계가 있는 CMV IE2, 전립선암에 관계가 있는 MMP-9, 악성 신경교종에 관계가 있는 TGF β 2, 다발성 경화증에 관계가 있는 CD49d, 당뇨병에 관계가 있는 PTP-1B, 암에 관계가 있는 c-myc, 유방암 등에 관계가 있는 EGFR, 암에 관계가 있는 mdr1, autotaxin 및 GLUT-1 의 유전자를 들 수 있다.
- <57> 예를 들어, 본 발명의 PIC 에 있어서의 2 개 사슬 핵산의 일방이, 상기 유전자의 센스사슬 또는 안티센스사슬의 일부인 경우에는, 본 발명의 PIC 를 사용하여 이러한 유전자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있다. 따라서 본 발명은, 상기 유전자의 발현에 수반되는 질환의 치료에 유용하다.

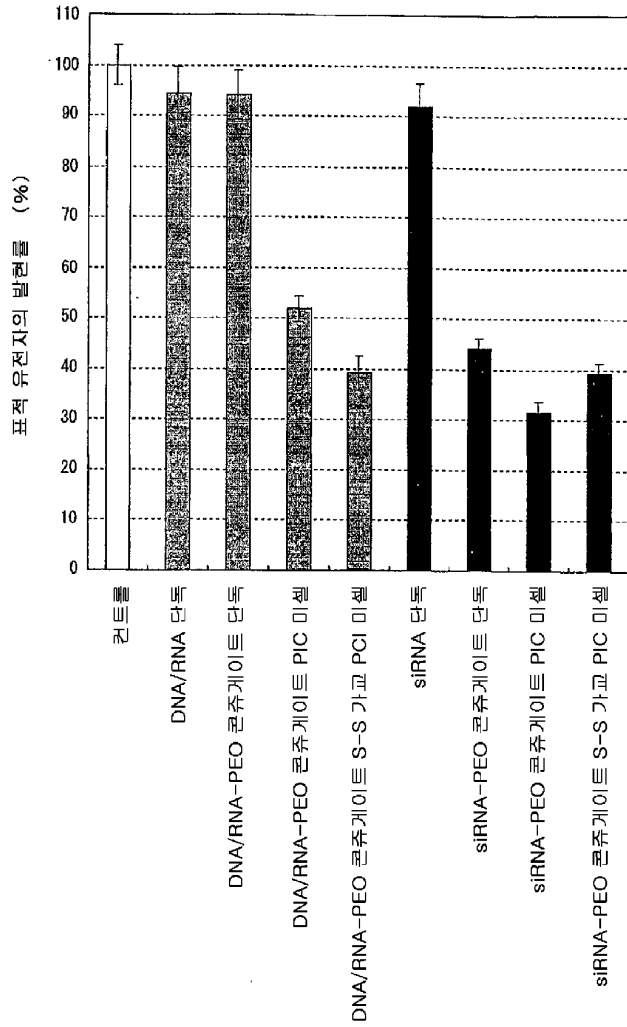
도면2



도면3



도면4



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> Conjugate of PEO with Double-stranded Nucleic Acid

<130> K-31JST-N

<150> JP 2004-254824

<151> 2004-09-01

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized Referring to the Sequence of Photinus pyralis (DNA/RNA)

<300>

<301> Sayda M. Elbashir, Jens Harborth, Winfried Lendeckel, Abdullah Yalcin,
Klaus Weber & Thomas Tuschl

<302> Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured

mammalian cells

<303> Nature

<304> 411

<306> 494-498

<307> 2001-05-24

<400> 1

cuuacgcuga guacuucgat t

21