



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월08일

(11) 등록번호 10-2727666

(24) 등록일자 2024년11월04일

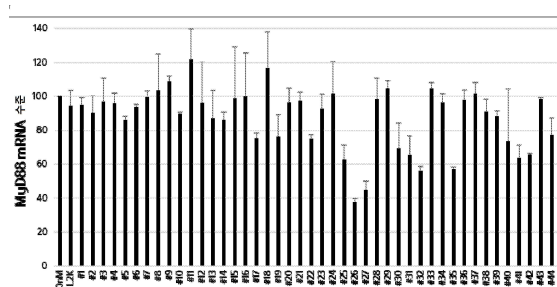
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12N 15/113** (2010.01) **A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
**C12N 15/113** (2013.01)  
**A61K 31/7088** (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7015145  
(22) 출원일자(국제) 2016년11월15일  
심사청구일자 2021년10월15일
- (85) 번역문제출일자 2018년05월29일  
(65) 공개번호 10-2018-0071362  
(43) 공개일자 2018년06월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2016/001745  
(87) 국제공개번호 WO 2017/085550  
국제공개일자 2017년05월26일
- (30) 우선권주장  
62/255,878 2015년11월16일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO2013176477 A1\*  
WO2014043291 A1\*  
US20130190387 A1  
WO2012078536 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
**올릭스 주식회사**  
경기도 성남시 수정구 대왕판교로 953(고등동)
- (72) 발명자  
**홍선우**  
경기도 용인시 수지구 동천로113번길 10, 1201동 2303호(동천동, 한빛마을 래미안 이스트팰리스 2단지)  
**홍이수**  
경기도 수원시 영통구 법조로 38 (하동) 102동 3208호  
**황지혜**  
경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 85 (이의동, 써밋플레이스 광고, 광고c1호반베르디움) 202동 305호
- (74) 대리인  
**리엔목특허법인**

전체 청구항 수 : 총 29 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **MyD88 또는 TLR3을 타겟팅하는 RNA 복합체를 이용한 연령-관련 황반 변성의 치료****(57) 요약**

일부 양태에서, 본 발명은 골수 분화 일차 반응 유전자(Myeloid differentiation primary response gene) 88(MyD88) 및/또는 톨-유사 수용체(Toll-like receptor) 3 (TLR3)을 억제하며 연령-관련 황반 변성(AMD)의 치료에서 유용한 RNA 복합체를 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 그러한 RNA 복합체를 포함하는 약학 조성물 및 그러한 RNA 복합체와 약학 조성물의 이용 방법을 제공한다.

**대표도 - 도1**

(52) CPC특허분류

**A61K 9/0048** (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/313 (2013.01)

C12N 2310/321 (2013.01)

C12N 2310/351 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

MyD88 mRNA 서열에 서열 상보성을 갖는 적어도 19 뉴클레오티드(nt) 길이의 안티센스 채 및 상기 안티센스 채에 서열 상보성을 갖는 16 nt 길이의 센스 채를 포함하며, 상기 안티센스 채 및 센스 채는 안티센스 채의 5' 말단과 센스 채의 3' 말단이 블런트(blunt) 말단을 형성하는 복합체를 형성하는 RNA 복합체로서,

상기 안티센스 채의 서열은 서열번호 54 또는 서열번호 56을 포함하고,

상기 센스 채의 서열은 서열번호 53 또는 서열번호 55이고,

상기 센스 채의 3' 말단에 콜레스테롤 모이어티가 부착된 것인, RNA 복합체.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 안티센스 채가 19 내지 21 nt 길이인 RNA 복합체.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 안티센스 채가 24 내지 121 nt 길이인 RNA 복합체.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 상기 안티센스 쇄의 서열은 서열번호 54 또는 서열번호 95이고, 상기 센스 쇄의 서열은 서열번호 53인, RNA 복합체.

#### 청구항 14

제 1항에 있어서, 상기 안티센스 쇄의 서열은 서열번호 56 또는 서열번호 98이고, 상기 센스 쇄의 서열은 서열번호 55인, RNA 복합체.

#### 청구항 15

제1항에 있어서, RNA 복합체가 세포에 의한 MyD88 발현을 억제할 수 있는 RNA 복합체.

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

삭제

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

삭제

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

제1항에 있어서, RNA 복합체가 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함하는 RNA 복합체.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 2'-O-메틸화 뉴클레오시드가 센스 쇄의 3' 말단에 위치되는 RNA 복합체.

#### 청구항 23

제21항에 있어서, 센스 쇄의 3' 말단 영역이 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함하는 RNA 복합체.

#### 청구항 24

제21항에 있어서, 2'-O-메틸화 뉴클레오시드가 안티센스 쇄의 3' 말단에 위치되는 RNA 복합체.

#### 청구항 25

제21항에 있어서, 안티센스 쇄의 3' 말단 영역이 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함하는 RNA 복합체.

#### 청구항 26

제21항에 있어서, 2'-O-메틸화 뉴클레오시드가 센스 쇄의 3' 말단 및 안티센스 쇄의 3' 말단에 위치되는 RNA 복합체.

#### 청구항 27

제21항에 있어서, 센스 쇄의 3' 말단 영역이 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함하고 안티센스 쇄의 3' 말단 영역이 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함하는 RNA 복합체.

#### 청구항 28



제1항에 있어서, RNA 복합체가 포스포로티오에이트 결합을 포함하는 RNA 복합체.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, RNA 복합체의 센스 쇠 내의 리보뉴클레오티드 간의 결합의 적어도 25%가 포스포로티오에이트 결합인 RNA 복합체.

#### 청구항 30

제28항에 있어서, RNA 복합체의 센스 쇠 내의 리보뉴클레오티드 간의 결합의 적어도 50%가 포스포로티오에이트 결합인 RNA 복합체.

#### 청구항 31

제28항에 있어서, RNA 복합체의 센스 쇠 내의 리보뉴클레오티드 간의 결합의 적어도 75%가 포스포로티오에이트 결합인 RNA 복합체.

#### 청구항 32

제28항에 있어서, RNA 복합체의 센스 쇠 내의 리보뉴클레오티드 간의 결합의 전부가 포스포로티오에이트 결합인 RNA 복합체.

#### 청구항 33

제28항에 있어서, RNA 복합체의 안티센스 쇠 내의 리보뉴클레오티드 간의 결합의 적어도 25%가 포스포로티오에이트 결합인 RNA 복합체.

#### 청구항 34

제28항에 있어서, RNA 복합체의 안티센스 쇠 내의 리보뉴클레오티드 간의 결합의 적어도 50%가 포스포로티오에이트 결합인 RNA 복합체.

#### 청구항 35

제28항에 있어서, RNA 복합체의 안티센스 쇠 내의 리보뉴클레오티드 간의 결합의 적어도 75%가 포스포로티오에이트 결합인 RNA 복합체.

#### 청구항 36

제28항에 있어서, RNA 복합체의 안티센스 쇠 내의 리보뉴클레오티드 간의 결합의 전부가 포스포로티오에이트 결합인 RNA 복합체.

#### 청구항 37

제28항에 있어서, RNA 복합체가 전달 비히클의 부재하에서 세포의 세포막을 침투할 수 있는 RNA 복합체.

#### 청구항 38

제1항에 있어서, RNA 복합체가 세포독성이 아닌 RNA 복합체.

#### 청구항 39

삭제

#### 청구항 40

삭제

#### 청구항 41

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

**청구항 50**

삭제

**청구항 51**

제1항의 RNA 복합체 및 약학적 허용 담체를 포함하는 연령-관련 황반 변성(AMD) 치료용 약학 조성물.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 조성물이 유리체내 전달되는 약학 조성물.

**청구항 53**

제51항에 있어서, 약학 조성물이 점안제인 약학 조성물.

**청구항 54**

삭제

**청구항 55**

제51항에 있어서, 상기 AMD는 습성 AMD인 약학 조성물.

**청구항 56**

제51항에 있어서, 상기 AMD는 건성 AMD인 약학 조성물.

**청구항 57**

삭제

## 청구항 58

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 그 전체가 참고로 본원에 포함되는, 2015년 11월 16일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/255,878호에 대한 우선권의 이익을 주장한다.

### 배경 기술

[0003] 연령-관련 황반 변성(AMD)은 눈의 황반 내의 망막 색소 상피 내벽의 변성으로부터 야기되어, 시력 상실을 유도하는 질병이다. 황반은 눈의 안쪽을 덮고 있는 광-민감성 조직으로 구성된 망막 내의 작은 영역이며 중심사에서 중요한 역할을 한다. AMD는 전세계적으로 실명의 주요 원인 중 하나이다.

[0004] AMD는 "습성" 및 "건성" 형태로 발생한다. 습성 AMD는 망막에서의 비정상적인 혈관 성장의 결과이다. 습성 AMD에서는, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 양의 증가가 이러한 신혈관형성에 기여하여, 치료 옵션은 VEGF 억제제의 사용을 포함한다. 하지만, VEGF 억제제로 치료받은 많은 환자가 지도모양망막위축(geographic atrophy)(GA)을 일으키며, 이는 치료 수년 이내에 후기 건성 황반 변성의 주요 증상이다. 건성 AMD의 질병 발병기전은 명확하지 않으며 건성 AMD를 위해 이용가능한 의학적 치료가 현재로서는 없다. 따라서, 습성 및 건성 황반 변성 둘 모두를 치료할 수 있는 치료제의 개발이 필요하다.

### 발명의 내용

### 해결하려는 과제

### 과제의 해결 수단

[0005] MyD88 및 TLR3은 건성 AMD 및 습성 AMD 둘 모두의 개시에서 중요한 역할을 한다. 건성 황반 변성의 치료에서 효과적이지 못한 VEGF 항체와 달리, MyD88 또는 TLR3을 타겟팅하는 치료제는 습성 및 건성 황반 변성 둘 모두를 치료하기 위해 이용될 수 있다.

[0006] 일부 양태에서, 본 발명은 골수 분화 일차 반응 유전자(Myeloid differentiation primary response gene) 88(MyD88) 및/또는 톨-유사 수용체(Toll-like receptor) 3 (TLR3)을 억제하며 연령-관련 황반 변성(AMD)(예를 들어, 습성 및/또는 건성 AMD)의 치료에서 유용한 RNA 복합체를 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 그러한 RNA 복합체를 포함하는 약학 조성물 및 그러한 RNA 복합체와 약학 조성물의 이용 방법을 제공한다.

[0007] 일부 양태에서, 본 발명은 MyD88 mRNA 서열(예를 들어, 인간 MyD88 mRNA 서열)에 서열 상보성을 가진 안티센스 쇄 및 안티센스 쇄에 서열 상보성을 가진 센스 쇄를 포함하는 RNA 복합체를 제공한다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 세포에 의한 MyD88 발현을 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 세포에 의한 MyD88 생성을 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 비대칭의 짧은 간섭 RNA(asymmetric short interfering RNA)(asiRNA)이다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 긴 비대칭의 짧은 간섭 RNA(lasiRNA)이다.

[0008] 일부 실시형태에서, 안티센스 쇄는 적어도 19 뉴클레오티드(nt) 길이이다. 일부 그러한 실시형태에서, 안티센스 쇄는 19 내지 21 nt 길이(즉, 19, 20 또는 21 nt 길이)이다. 다른 그러한 실시형태에서, 안티센스 쇄는 적어도 24 nt 길이(예를 들어, 24 내지 121 nt 길이), 예를 들어, 31 nt 길이이다. 일부 실시형태에서, 적어도 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 nt의 안티센스 쇄가 MyD88 mRNA 서열에 상보적이다. 일부 실시형태에서, 센스 쇄는 15 내지 17 nt 길이(즉, 15 nt 길이, 16 nt 길이 또는 17 nt 길이)이다. 일부 실시형태에서, 적어도 15 nt, 적어도 16 nt 또는 적어도 17 nt의 센스 쇄가 안티센스 쇄의 서열에 상보적이다. 대표적인 RNA 복합체는 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5 또는 표 6에 열거된 RNA 복합체를 포함한다.

[0009] 일부 양태에서, 본 발명은 TLR3 mRNA 서열(예를 들어, 인간 TLR3 mRNA 서열)에 서열 상보성을 갖는 안티센스 쇄

및 안티센스 쇠에 서열 상보성을 갖는 센스 쇠를 포함하는 RNA 복합체를 제공한다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 세포에 의한 TLR3 발현을 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 세포에 의한 TLR3 생성을 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 비대칭의 짧은 간섭 RNA(asiRNA)이다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 긴 비대칭의 짧은 간섭 RNA (lasiRNA)이다.

[0010] 일부 실시형태에서, 안티센스 쇠는 적어도 19 뉴클레오타이드(nt) 길이이다. 일부 그러한 실시형태에서, 안티센스 쇠는 19 내지 21 nt 길이(즉, 19, 20 또는 21 nt 길이)이다. 다른 그러한 실시형태에서, 안티센스 쇠는 적어도 24 nt 길이(예를 들어, 24 내지 121 nt 길이)이다. 일부 실시형태에서, 적어도 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 nt의 안티센스 쇠가 TLR3 mRNA 서열에 상보적이다. 일부 실시형태에서, 센스 쇠는 15 내지 17 nt 길이(즉, 15 nt 길이, 16 nt 길이 또는 17 nt 길이)이다. 일부 실시형태에서, 적어도 15 nt, 적어도 16 nt 또는 적어도 17 nt의 센스 쇠가 안티센스 쇠의 서열에 상보적이다. 대표적인 RNA 복합체는 표 7, 표 8 또는 표 10에 열거된 RNA 복합체를 포함한다.

[0011] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체는 화학적 변형을 포함하며, 상기 변형은 전달 비히클의 부재하에서 세포막의 침투를 촉진한다. 일부 실시형태에서, 변형은 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트 결합 및/또는 콜레스테롤 모이어티이다. 일부 그러한 실시형태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 센스 쇠의 3' 말단에 위치된다. 일부 그러한 실시형태에서, 센스 쇠의 3' 말단 영역은 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드(예를 들어, 3' 말단의 6 뉴클레오타이드 이내에 2, 3, 4, 5 또는 6개의 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드)를 포함한다. 다른 실시형태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 안티센스 쇠의 3' 말단에 위치된다. 일부 그러한 실시형태에서, 안티센스 쇠의 3' 말단 영역은 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드(예를 들어, 3' 말단의 6 뉴클레오타이드 이내에 2, 3, 4, 5 또는 6개의 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드)를 포함한다. 일부 실시형태에서는, 센스 쇠의 3' 말단 영역 및 안티센스 쇠의 3' 말단 영역 둘 모두가 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드를 포함한다. 대표적인 RNA 복합체는 표 3, 표 4, 표 5, 표 6, 표 8 또는 표 10에 열거된 변형된 RNA 복합체를 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 세포독성이 아니다.

[0012] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체는 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체의 센스 쇠 내의 리보뉴클레오타이드 사이의 결합의 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 그러한 실시형태에서, RNA 복합체의 센스 쇠 내의 리보뉴클레오타이드 사이의 결합의 전부가 포스포로티오에이트 결합이다. 유사하게, 일부 실시형태에서, RNA 복합체의 안티센스 쇠 내의 리보뉴클레오타이드 사이의 결합의 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 그러한 실시형태에서, RNA 복합체의 안티센스 쇠 내의 리보뉴클레오타이드 사이의 결합의 전부가 포스포로티오에이트 결합이다.

[0013] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체는 콜레스테롤 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 센스 쇠의 3' 말단에 부착된다.

[0014] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 눈에 투여를 위해 제형화된다(예를 들어, 점안제로서). 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 유리체내(intravitreal) 전달을 위해 제형화된다.

[0015] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체 및/또는 약학 조성물과 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에 의한 MyD88 및/또는 TLR3 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 세포는 인간 개체(예를 들어, 습성 또는 건성 AMD를 가진 인간 개체)의 눈에 존재한다. 일부 양태에서, 본 발명은 개체에게, 예를 들어, 눈에, 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체 및/또는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함하는, AMD(예를 들어, 습성 AMD 및/또는 건성 AMD)에 대해 인간 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체 및/또는 약학 조성물은 유리체내 주사에 의해 눈에 투여된다.

## 발명의 효과

## 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 MyD88을 타겟팅하는 예시적인 asiRNA의 유전자 사일런싱(silencing) 효율을 보여준다. asiRNA는 0.3 nM의 농도로 HeLa 세포내로 형질감염되었으며, 24시간 후, 실시간 PCR을 이용하여 MyD88 mRNA 발현 정도가 결정되

었다. 세 번의 반복 실험의 평균 및 표준 편차가 도시된다.

도 2는 MyD88을 타겟팅하는 예시적인 asiRNA의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. asiRNA는 0.3 nM, 0.1 nM, 0.03 nM 및 0.01 nM의 농도로 HeLa 세포내로 형질감염되었으며, 24시간 후, 실시간 PCR을 이용하여 MyD88 mRNA 발현 정도가 결정되었다. 세 번의 반복 실험의 평균 및 표준 편차가 도시된다.

도 3은 MyD88을 타겟팅하는 상이한 안티센스 쉘 길이(19, 21 또는 31 뉴클레오티드)를 가진 예시적인 asiRNA의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. asiRNA는 0.1 nM, 0.03 nM 또는 0.01 nM의 농도로 HeLa 세포내로 형질감염되었으며, 24시간 후, 실시간 PCR을 이용하여 MyD88 mRNA 발현 정도가 결정되었다. 세 번의 반복 실험의 평균 및 표준 편차가 도시된다.

도 4는 MyD88을 타겟팅하는 예시적인 asiRNA에 의한 MyD88 단백질 발현의 억제를 보여준다. asiRNA는 3 nM 또는 10 nM의 농도로 A549 또는 HeLa 세포 내로 형질감염되었으며, 48시간 후, 단백질이 추출되고 웨스턴 블롯이 수행되었다. 패널 (a)는 형질감염 후 48시간에 A549 세포에서 MyD88 단백질 발현 수준을 도시한다. 패널 (b)는 형질감염 후 48시간에 HeLa 세포에서 MyD88 단백질 발현 수준을 도시한다.(NT = 무처리, L2K = 형질감염 대조군).

도 5는 2'-O-메틸화 변형을 함유한 예시적인 asiRNA의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. asiRNA는 0.1 nM 또는 0.03 nM의 농도로 HeLa 세포 내로 형질감염되었으며, 24시간 후, MyD88 mRNA 발현 정도가 실시간 PCR을 이용하여 결정되었다.

도 6은 다양한 화학적 변형이 적용된 예시적인 MyD88-타겟팅 세포 침투 asiRNA(cp-asiRNA, 또는 cp-asiMyD88)의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. cp-asiRNA는 1  $\mu$ M의 농도에서 HeLa 세포의 존재하에서 형질감염 비히클없이 항온처리되고, 48시간 후, 실시간 PCR을 이용하여 MyD88 mRNA 발현 정도가 결정되었다. 세 번의 반복 실험의 평균 및 표준 편차가 도시된다.

도 7은 예시적인 cp-asiRNA에 의한 MyD88 단백질 발현의 억제를 보여준다. cp-asiRNA는 형질감염 비히클없이 HeLa 세포와 접촉되고, 48시간 후, 단백질이 추출되고 웨스턴 블롯이 수행되었다.(NT = 무처리).

도 8은 다양한 화학적 변형이 적용된 예시적인 cp-asiRNA의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. cp-asiRNA는 1  $\mu$ M의 농도에서 HeLa 세포의 존재하에서 형질감염 비히클없이 항온처리되고, 48시간 후, 실시간 PCR을 이용하여 MyD88 mRNA 발현 정도가 결정되었다. 세 번의 반복 실험의 평균 및 표준 편차가 도시된다.

도 9는 예시적인 cp-asiRNA에 의한 MyD88 단백질 발현의 억제를 보여준다. cp-asiRNA는 형질감염 비히클없이 HeLa 세포와 접촉되고, 48시간 후, 단백질이 추출되고 웨스턴 블롯이 수행되었다.(NT = 무처리, RiM = 형질감염 시약 단독, NC = 음성 대조군).

도 10은 상이한 안티센스 쉘 길이(21 또는 19 뉴클레오티드)를 가지며 2'-O-메틸화 변형을 함유한 cp-asiRNA의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. 각각의 cp-asiRNA는 1  $\mu$ M의 농도에서 HeLa 세포의 존재하에서 형질감염 비히클없이 항온처리되고, 48시간 후, 실시간 PCR을 이용하여 MyD88 mRNA 발현 정도가 결정되었다.

도 11은 예시적인 cp-asiRNA에 의한 MyD88 단백질 발현의 억제를 보여준다. cp-asiRNA는 1 $\mu$ M 또는 3 $\mu$ M의 농도에서 HeLa 세포의 존재하에서 형질감염 비히클없이 항온처리되고, 48시간 후, 단백질이 추출되고 웨스턴 블롯이 수행되었다.(NT = 무처리).

도 12는 톨-유사 수용체 3(TLR3)을 타겟팅하는 예시적인 asiRNA의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. asiRNA는 0.1 nM의 농도로 HaCaT 세포 내로 형질감염되며, 24시간 후, qRT-PCR을 이용하여 TLR3 mRNA 발현 정도가 결정되었다. 두 번의 반복 실험의 평균 및 표준 편차가 도시된다.

도 13은 TLR3을 타겟팅하는 예시적인 asiRNA의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. asiRNA는 0.1 nM의 농도로 HaCaT 세포 내로 형질감염되고, 24시간 후, qRT-PCR을 이용하여 TLR3 mRNA 발현 정도가 결정되었다. 두 번의 반복 실험의 평균 및 표준 편차가 도시된다.

도 14는 TLR3을 타겟팅하는 예시적인 asiRNA의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. asiRNA는 0.3 nM의 농도로 HaCaT 세포 내로 형질감염되고, 24시간 후, qRT-PCR을 이용하여 TLR3 mRNA 발현 정도가 결정되었다.

도 15는 예시적인 asiRNA에 의한 TLR3 단백질 발현의 억제를 보여준다. asiRNA는 10 nM의 농도로 HaCaT 세포 내로 형질감염되고, 48시간 후, 웨스턴 블롯을 이용하여 TLR3 단백질 발현 정도가 결정되었다.

도 16은 예시적인 cp-asiRNA에 의해 24시간 동안 처리된 HaCaT 세포의 이미지를 보여준다. cp-asiRNA는 1 $\mu$ M에서

항온처리되었으며, 24시간 후, HaCaT 세포의 형태가 이클립스(ECLIPSE) 100(니콘(Nikon))에 의해 영상화되었다.

도 17은 다양한 화학적 변형이 적용된 예시적인 TLR3-타겟팅 세포 침투 asiRNA(cp-asiRNA, 또는 cp-asiTLR3)의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. 1 $\mu$ M 농도의 cp-asiRNA가 HaCaT 세포와 항온처리되었으며, 48시간 후, qRT-PCR을 이용하여 TLR3 mRNA 발현 정도가 측정되었다. 두 번의 반복 실험의 평균 및 표준 편차가 도시된다.

도 18은 예시적인 cp-asiRNA에 의한 TLR3 단백질 발현의 억제를 보여준다. 표시된 cp-asiRNA가 형질감염 비히클 없이 HaCaT 세포와 접촉되었으며, 48시간 후, 단백질이 추출되고 웨스턴 블롯이 수행되었다.(NT = 무처리).

도 19는 예시적인 cp-asiRNA에 의한 TLR3 mRNA 및 단백질 발현의 억제를 보여준다. 표시된 cp-asiRNA가 형질감염 비히클 없이 HaCaT 세포와 접촉되었으며, 48시간 후, qRT-PCR 및 웨스턴 블롯을 이용하여 TLR3 발현 정도가 결정되었다.

도 20은 예시적인 cp-asiRNA에 의한 TLR3 단백질 발현의 억제를 보여준다. 표시된 cp-asiRNA가 형질감염 비히클 없이 HaCaT 세포와 접촉되었으며, 48시간 후, 단백질이 추출되고 웨스턴 블롯이 수행되었다.(NT = 무처리).

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 일반적 사항

일부 양태에서, 본 발명은 MyD88 및/또는 TLR3 발현을 억제하고 따라서 AMD(예를 들어, 습성 AMD 및/또는 건성 AMD)의 치료를 위해 유용한 비대칭 RNA 복합체(예를 들어, asiRNA 또는 lasiRNA)를 제공한다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 형질감염 비히클이 필요없이 세포에 침투할 수 있도록 화학적으로 변형된다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6, 표 8 또는 표 10에 열거된 RNA 복합체이다. 일부 양태에서, 본 발명은 그러한 RNA 복합체를 포함하는 약학 조성물 및 그러한 RNA 복합체 및 약학 조성물을 이용하는 방법을 제공한다.

MyD88은 면역 반응을 활성화하는 단백질 중 하나로서 건성 AMD 및 습성 AMD 둘 모두의 개시에서 중요한 역할을 하는 단백질이다. 건성 황반 변형의 치료에서 비효과적인, VEGF를 타겟팅하는 이전의 AMD 치료법과 달리, MyD88을 타겟팅하는 치료법은 습성 및 건성 AMD 둘 모두를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 인간 MyD88 cDNA 서열이 하기에 제공된다.

### 인간 MyD88 cDNA 서열.

```

1   agattcctac ttcttacgcc cccacatca cccgcctcga gacctcaagg gtagaggtgg
61  gcacccccgc ctccgcactt ttgctcgggg ctccagattg tagggcaggg cggcgcttct
121 cggaaaagcga aagccggcgg ggccggggcgg gtgccgcagg agaaagagga agcgctggca
181 gacaatgcga cccgaccgcg ctgaggctcc aggaccgccc gccatggctg caggaggtcc
241 cggcgcgggg tctgcggcc cggtctcttc cacatcctcc ctccccctgg ctgctctcaa
301 catgagagtg cggcgccgcc tgtctctgtt cttgaacgtg cggacacagg tggcgccga
361 ctggaccgcg ctggcgagg agatggactt tgagtacttg gagatccggc aactggagac
421 acaagcggac cccactggca ggctgctgga cgctggcag ggacgccctg ggcctctgt
481 aggccgactg ctcgagctgc ttaccaagct gggccgcgac gacgtgctgc tggagctggg
541 acccagcatt gaggaggatt gccaaaagta tatcttgaag cagcagcagg aggaggctga
601 gaagccttta caggtggccg ctgtagacag cagtgtccca cggacagcag agctggcggg
661 catcaccaca cttgatgacc ccctggggca tatgcctgag cgtttcgatg ccttcactctg
721 ctattgcccc agcgacatcc agtttgtgca ggagatgatc cggcaactgg aacagacaaa
781 ctatcgactg aagtttgtgt tgtctgaccg cgatgtcctg cctggcacct gtgtctggtc
841 tattgctagt gagctcatcg aaaagaggtg ccgccggatg gtggtggttg tctctgatga
901 ttacctgcag agcaaggaat gtgacttcca gaccaaattt gcaactcagcc tctctccagg
961 tgcccatcag aagcgactga tccccatcaa gtacaaggca atgaagaaag agttccccag

```



```

1021 catcctgagg ttcatcactg tctgcgacta caccaacccc tgcaccaaat cttgggttctg
1081 gactcgcctt gccaaaggcct tgtccctgcc ctgaagactg ttctgaggcc ctgggtgtgt
1141 gtgtatctgt ctgacctgtc atgtacttct gccctgcctc ctcctttcgt tgtaggaggga
1201 atctgtgtct tacttacctc tcaattcctg gagatgccaa cttcacagac acgtctgcag
1261 cagctggaca tcacatttca tgtcctgcat ggaaccagtg gctgtgagtg gcatgtccac
1321 ttgctggatt atcagccagg aactataga acaggaccag ctgagactaa gaaggaccag
1381 cagagccagc tcagctctga gccattcaca catcttcacc ctcagtttcc tcacttgagg
1441 agtgggatgg ggagaacaga gtagtagctgt gtttgaatcc ctgtaggaaa tgggtgaagca
1501 tagctctggg tctcctgggg gagaccaggc ttggctgcgg gagagctggc tgttgctgga
1561 ctacatgctg gccactgctg tgaccacgac actgctgggg cagcttcttc cacagtgatg
1621 cctactgatg cttcagtgcc tctgcacacc gccattcca cttcctcctt cccacagggg
1681 cagggtgggga agcagtttgg cccagcccaa ggagaccca ccttgagcct tatttcctaa
1741 tgggtccacc tctcatctgc atctttcaca cctcccagct tctgccaac cttcagcagt
1801 gacaagtccc caagagactc gcctgagcag cttgggctgc ttttcatttc cacctgtcag
1861 gatgcctgtg gtcagtctct cagctccacc tggcatgaga agggatcctg gcctctggca
1921 tattcatcaa gtatgagttc tggggatgag tcaactgtaat gatgtgagca gggagccttc
1981 ctacctgggg cactgcaga gagctttccc accaactttg taccttgatt gcctacaaa
2041 gttattttgt tacaacagc gaccatataa aagcctcctg ccccaaagct tgtgggcaca
2101 tgggcacata cagactcaca tacagacaca cacatatatg tacagacatg tactctcaca
2161 cacacaggca ccagcatata cacgtttttc taggtacagc tcccaggaac agctaggtgg
2221 gaaagtccca tcaactgagg agcctaacca tgtccctgaa caaaaattgg gcaactcatc
2281 attccttttc tcttgtgtcc ctactcattg aaaccaaact ctggaaagga cccaatgtac
2341 cagtatttat acctctaata aagcacagag agaggaagag agctgcttaa actcacacaa
2401 caatgaactg cagacacagc tgttctctcc ctctctcctt cccagagcaa ttatacttt
2461 accctcaggc tgtcctctgg ggagaagggt ccatggctct aggtgtctgt gccccagac
2521 agaccctagg accctaaatc caatagaaaa tgcatatctt tgctccactt tcagccaggc
2581 tggagcaagg taccttttct taggatcttg ggagggaatg gatgccctc tctgcatgat
2641 cttgttgagg catttagctg ccatgcacct gtccccctt aatactgggc attttaaagc
2701 catctcaaga ggcattctct acatgttttg tacgcattaa aataatttca aagatatctg
2761 agaaaagccg atatttgcca ttcttcctat atcctggaat atatcttgca tcctgagttt
2821 ataataataa ataattttct accttgga aaataaaaaa aa

```

[0022]

[0023]

톨-유사 수용체 3(TLR3)은 타입 1 막관통성 시그널링 분자로서 선천적 면역계에서 중추적인 역할을 한다. TLR3 리간드는 RNA 바이러스의 증식에 의해 형성된 이중쇄 RNA 및 dsRNA 유사체인 폴리이노신-폴리시티딜(polyI:C)를 포함한다. 건성 AMD를 앓고 있는 개인에서는, dsRNA 타입인 alu-RNA가 망막 상피 세포에서 축적된다. 건강한 개인에 비하여, 습성 AMD를 앓고 있는 사람들은 말초 혈액 단핵 세포에서 TLR3의 발현 수준이 높아서, TLR3이 건성 및 습성 AMD 둘 모두의 발병기전에서 밀접하게 연관됨을 나타낸다. 예시적인 인간 MyD88 cDNA 서열은 하기에 제공된다.

[0024]

인간 TLR3 cDNA 서열.

```

1 cacttttcgag agtgccgtct atttgccaca cacttccctg atgaaatgtc tggatttgga
61 ctaaagaaaa aaggaaaggc tagcagtcac ccaacagaat catgagacag actttgcctt
121 gtatctactt ttggggggggc cttttgccct ttgggatgct gtgtgcatcc tccaccacca
181 agtgcactgt tagccatgaa gttgctgact gcagccacct gaagttgact caggtaaccg
241 atgatctacc cacaacata acagtgttga accttaccba taatcaactc agaagattac
301 cagccgccaa cttcacagg tatagccagc taactagctt ggatgtagga tttaacacca
361 tctcaaaact ggagccagaa ttgtgccaga aacttcccat gttaaaagtt ttgaacctcc
421 agcacaatga gctatctcaa ctttctgata aaacctttgc cttctgcacg aatttgactg
481 aactccatct catgtccaac tcaatccaga aaattaaaaa taatcccttt gtcaagcaga

```

[0025]

```

541 agaattttaat cacattagat ctgtctcata atggcttgct atctacaaaa ttaggaactc
601 aggttcagct ggaaaatctc caagagcttc tattatcaaa caataaaaatt caagcgctaa
661 aaagtgaaga actggatatc ttgtccaatt catcttttaa aaaattagag ttgtcatoga
721 atcaaattaa agagttttct ccagggtggt ttacagcaat tggaagatta ttggcctct
781 ttctgaacaa tgtccagctg ggcccagcc ttacagagaa gctatgtttg gaattagcaa
841 acacaagcat tcggaatctg tctctgagta acagccagct gtccaccacc agcaatacaa
901 ctttcttggg actaaagtgg acaaactcga ctatgctcga tctttcctac aacaacttaa
961 atgtggttg taacgattcc tttgcttggc ttccacaact agaataatttc ttccatagagt
1021 ataataatat acagcatttg ttttctcact ctttgcacgg gcttttcaat gtgagggtacc
1081 tgaatttgaa acgggtctttt actaaacaaa gtatttccct tgccctcactc cccaagattg
1141 atgatttttc ttttcagtgg ctaaaatggt tggagcacct taacatggaa gataatgata
1201 ttccaggcat aaaaagcaat atgttcacag gattgataaa cctgaaatac ttaagtctat
1261 ccaactcctt tacaagtttg cgaactttga caaatgaaac atttgtatca ctgtctcatt
1321 ctcccttaca catactcaac ctaaccaaga ataaaatctc aaaaatagag agtgatgctt
1381 tctcttggtt gggccaccta gaagtacttg acctgggcct taatgaaatt gggcaagaac
1441 tcacaggcca ggaatggaga ggtctagaaa atattttcga aatctatctt tcctacaaca
1501 agtacctgca gctgactagg aactcctttg ccttggtccc aagccttcaa cgactgatgc
1561 tccgaagggt ggccctttaa aatgtggata gctctccttc accattccag cctcttcgta
1621 acttgaccat tctggatcta agcaacaaca acatagccaa cataaatgat gacatgttgg
1681 agggcttga gaaactagaa attctcgatt tgcagcataa caacttagca cggctctgga
1741 aacacgcaaa ccoctggtgtt cccattttat tcctaaaggg tctgtctcac ctccacatoc
1801 ttaacttgga gtccaacggc tttgacgaga tcccagttga ggtcttcaag gatttatttg
1861 aactaaagat catcgattta ggattgaata atttaaacac acttccagca tctgtcttta
1921 ataatcaggt gtctctaaag tcattgaacc ttcagaagaa tctcataaca tccgttgaga
1981 agaaggtttt cgggccagct ttcaggaacc tgactgagtt agatatgcgc tttaatccct
2041 ttgattgcac gtgtgaaagt attgcctggt ttgttaattg gattaacgag acccatacca
2101 acatccctga gctgtcaagc cactaccttt gcaacactcc acctcactat catggggttc
2161 cagtgaact ttttgatata tcatcttgca aagacagtgc cccctttgaa ctctttttca
2221 tgatcaatac cagtatcctg ttgattttta tctttattgt acttctcatc cactttgagg
2281 gctggaggat atctttttat tggaaatggt cagtacatcg agttcttggg ttcaaagaaa
2341 tagacagaca gacagaacag tttgaatatg cagcatatat aattcatgcc tataaagata
2401 aggattgggt ctgggaacat ttctcttcaa tggaaaagga agaccaatct ctcaaatttt
2461 gtctggaaga aagggaactt gaggcgggtg tttttgaact agaagcaatt gttacagca
2521 tcaaaagaag cagaaaaatt atttttggtt taacacacca tctattaaaa gaccattat
2581 gcaaaagatt caaggtacat catgcagttc aacaagctat tgaacaaaat ctggattcca
2641 ttatattggt tttccttgag gagattccag attataaact gaaccatgca ctctgtttgc
2701 gaagaggaa gtttaaatct cactgcatct tgaactggcc agttcagaaa gaacggatag
2761 gtgcctttcg tcataaattg caagtgcac ttggatccaa aaactctgta cattaaattt
2821 atttaaatat tcaattagca aaggagaaac tttctcaatt taaaaagttc tatggcaaat
2881 ttaagttttc cataaaggtg ttataatttg tttattcata tttgtaaatg attatatctt
2941 atcacaatta catctcttct aggaaaatgt gtctccttat ttcaggccta tttttgacaa
3001 ttgacttaat tttacccaaa ataaaacata taagcacgta aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

[0026]

[0027]

일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNA 복합체는 asiRNA 또는 lasiRNA이다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 asiRNA는 19-21 nt 안티센스 쇄 및 13-17 nt 센스 쇄를 가진 이중쇄 비대칭 짧은 간섭 RNA 분자를 말한다. asiRNA에 대한 추가적인 정보는 미국 특허 공개 제2012/0238017호 및 Chang *et al.*, *Mol. Ther.* 17:725-732 (2009)에서 찾을 수 있으며, 그 각각은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 lasiRNA는 13-21 nt 센스 쇄 및 24 nt 보다 큰 안티센스 쇄를 가진 이중쇄 긴 비대칭 간섭 RNA 분자를 말한다. lasiRNA에 대한 추가적인 정보는 미국 특허 공개 제2013/0273657호에서 찾을 수 있으며, 그 전체는 참고로 본원에 포함된다.

[0028]

일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNA 복합체는 리포좀, 양이온성 중합체, 세포 침투 펩티드(CPP), 단백질 전달 도메인(protein transduction domain)(PTD), 항체 및/또는 앵타머와 같은 전달 비히클을 이용하여 세포에 전달된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNA 복합체는 세포에서 MyD88 및/또는 TLR3 억제를 매개하기 위하여 그러한 전달 비히클의 사용이 필요하지 않도록 화학적으로 변형된다. 그러한 RNA 복합체는 본 명세서에서 세포-침투 asiRNA(cp-asiRNA) 또는 세포-침투 lasiRNA(cp-lasiRNA)로 지칭된다.

[0029]

정의

[0030]

편의상, 명세서, 실시예 및 첨부 청구범위에서 사용되는 일부 용어가 여기에 모여 있다.

[0031]

관사("a" 및 "an")는 그 관사의 문법적 대상 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)를 지칭하기 위하여 본 명세서에서 사용된다. 예를 들어, "요소"는 하나의 요소 또는 하나보다 많은 요소를 의미한다.



- [0032] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "투여하는"은 개체에게 약학 제제 또는 조성물을 제공하는 것을 의미하며, 의료 전문가에 의한 투여 및 자가-투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "간섭 핵산", "억제 핵산"은 상호교환적으로 사용된다. 간섭 핵산은 일반적으로 염기-페어링(base pairing) 모이어티가 왓슨-크릭 염기 페어링에 의해 핵산(전형적으로 RNA) 내의 타겟 서열에 하이브리드화하여 타겟 서열 내에 핵산:올리고머 헤테로듀플렉스를 형성하도록 하는 서브유닛간 연결에 의해 연결된, 염기-페어링 모이어티를 각각 보유한 환형 서브유닛의 서열을 포함한다. 간섭 RNA 분자는 안티센스 분자, siRNA 분자, asiRNA 분자, lasiRNA 분자, 단일쇄 siRNA 분자, miRNA 분자 및 shRNA 분자를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 그러한 간섭 핵산은 mRNA의 번역을 차단하거나 억제하기 위하여 또는 천연 pre-mRNA 스플라이스 프로세싱을 억제하거나 타겟팅된 mRNA의 분해를 유도하기 위하여 설계될 수 있으며, 간섭 핵산이 하이브리드화하는 타겟 서열에 "지시되거나" "타겟팅되는" 것으로 말할 수 있다. 간섭 핵산은 예를 들어, 펩티드 핵산(PNA), 잠긴 핵산(locked nucleic acid)(LNA), 2'-O-메틸 올리고뉴클레오타이드 및 RNA 간섭 제제(siRNA 제제)를 포함할 수 있다. RNAi 분자는 일반적으로 타겟 분자와 헤테로듀플렉스를 형성함으로써 작용하며, 이는 선택적으로 분해되거나 "넉다운"되어, 타겟 RNA를 불활성화시킨다. 일부 조건하에서, 간섭 RNA 분자는 또한 전사물 번역의 억제 및/또는 전사물의 전사의 억제에 의해 타겟 전사물을 불활성화시킬 수 있다. 간섭 핵산이 상술한 방식으로 타겟의 핵산에 대해 타겟팅될 경우, 단백질과 같은 생물학적 관련 타겟에 "대해 타겟팅되는" 것으로 보다 일반적으로 말한다.
- [0034] 용어 "폴리뉴클레오타이드", 및 "핵산"은 상호교환적으로 사용된다. 그들은 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 또는 그의 유사체 어느 것이든, 임의의 조합 및 임의의 길이의, 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 말한다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 삼차원 구조를 가질 수 있으며, 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오타이드의 비제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 연관 분석으로부터 정의된 유전자좌들(유전자좌), 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 트랜스퍼 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지형 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 분리된 DNA, 임의의 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 메틸화 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 존재한다면, 뉴클레오타이드 구조에의 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 라벨링 성분과의 접합에 의해서와 같이, 추가로 변형될 수 있다. 본 발명에서 제공되는 모든 핵산 서열에서, U 뉴클레오타이드는 T 뉴클레오타이드와 상호교환가능하다.
- [0035] 본 명세서에서 사용될 때 어구 "약학적-허용 담체"는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제 또는 용매 캡슐화 물질과 같은, 약학적-허용 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다.
- [0036] 올리고뉴클레오타이드는 만일 올리고머가 생리학적 조건하에서, 실질적으로 45°C 초과, 또는 적어도 50°C, 또는 적어도 60°C-80°C 또는 더 높은 T<sub>m</sub>으로, 타겟에 하이브리드화한다면, 타겟 폴리뉴클레오타이드에 "특이적으로 하이브리드화"한다. 그러한 하이브리드화는 엄격한 하이브리드화 조건에 상응한다. 소정의 이온 강도 및 pH에서, T<sub>m</sub>은 타겟 서열의 50%가 상보성 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 온도이다. 다시, 그러한 하이브리드화는 타겟 서열에 대한 안티센스 올리고머의 정확한 상보성에서만 아니라 "거의" 또는 "실질적" 상보성에서 발생할 수 있다.
- [0037] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "개체"는 치료 또는 치료법을 위해 선택된 인간 또는 비인간 동물을 의미한다.
- [0038] 본 명세서에서 사용될 때 어구 "치료적-유효량" 및 "유효량"은 임의의 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 유효성/위해성 비로 개체에서 적어도 세포의 하위집단에서 원하는 치료 효과를 생산하기 위해 효과적인 제제의 양을 의미한다.
- [0039] 개체에서 질병을 "치료하는" 또는 질병을 가진 개체를 "치료하는" 것은 약학적 치료, 예를 들어, 약물의 투여에 개체를 노출시켜, 질병의 적어도 한 가지 증상이 감소되거나 악화가 방지되도록 하는 것을 말한다.
- [0040] 본 명세서에서 사용될 때, 질환 또는 병태를 "예방"하는 치료제는 질환 또는 병태의 개시 전에 통계적 샘플에게 투여될 경우 미처리 대조 샘플에 비하여 처리된 샘플에서 질환 또는 병태의 발생을 감소시키거나, 또는 미처리 대조 샘플에 비하여 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 심각성을 감소시키거나 개시를 지연시키는 화합물을 말한다.
- [0041] RNA 복합체
- [0042] 일부 양태에서, 본 발명은 MyD88 또는 TLR3 mRNA를 타겟팅하고 세포에 의한 MyD88 또는 TLR3 발현을 억제하는

RNA 복합체를 제공한다. 인간 MyD88 및 TLR3 mRNA의 핵산 서열은 명세서 마지막의 서열목록에서 제공된다.

- [0043] 일부 양태에서, 본 발명은 MyD88 또는 TLR3 mRNA 서열(예를 들어, 인간 MyD88 또는 TLR3 mRNA 서열)에 서열 상보성을 가진 안티센스 채 및 안티센스 채에 서열 상보성을 가진 센스 채를 포함하는 RNA 복합체를 제공한다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 세포에 의한 MyD88 또는 TLR3 발현을 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 비대칭의 짧은 간섭 RNA(asiRNA)이다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 긴 비대칭의 짧은 간섭 RNA(lasiRNA)이다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6, 표 8 또는 표 10에 열거된 RNA 복합체이다. 본 명세서에 개시된 RNA 복합체는 RNA 염기, 비-RNA 염기 또는 RNA 염기와 비-RNA 염기의 혼합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 제공되는 일부 RNA 복합체는 주로 RNA 염기로 구성될 수 있지만 또한 DNA 염기 또는 비-천연 발생 뉴클레오티드를 함유할 수 있다.
- [0044] 일부 실시형태에서, 안티센스 채는 적어도 19 뉴클레오티드(nt) 길이이다. 일부 실시형태에서, 안티센스 채는 19 내지 21 nt 길이(즉, 19, 20 또는 21 nt 길이)이다. 일부 실시형태에서, 적어도 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 nt의 안티센스 채는 MyD88 또는 TLR3 mRNA 서열에 상보적이다. 완벽한 상보성이 필요하지는 않다. 일부 실시형태에서, 안티센스 채는 MyD88 또는 TLR3 mRNA 서열에 완벽하게 상보적이다.
- [0045] 일부 실시형태에서, 안티센스 채는 적어도 24 nt 길이(예를 들어, 적어도 25 nt 길이, 적어도 26 nt 길이, 적어도 27 nt 길이, 적어도 28 nt 길이, 적어도 29 nt 길이, 적어도 30 nt 길이 또는 적어도 31 nt 길이)이다. 일부 실시형태에서, 안티센스 채는 124 nt 이하 길이이다(예를 들어, 100 nt 이하 길이, 90 nt 이하 길이, 80 nt 이하 길이, 70 nt 이하 길이, 60 nt 이하 길이, 50 nt 이하 길이 또는 40 nt 이하 길이). 일부 실시형태에서, 안티센스 채는 31 nt 길이이다. 일부 실시형태에서, 적어도 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 29, 30 또는 31 nt의 안티센스 채가 MyD88 또는 TLR3 mRNA 서열에 상보적이다. 완벽한 상보성이 필요하지는 않다. 일부 실시형태에서, 안티센스 채는 MyD88 또는 TLR3 mRNA 서열에 완벽하게 상보적이다.
- [0046] 일부 실시형태에서, 센스 채는 15 내지 17 nt 길이(즉, 15 nt 길이, 16 nt 길이 또는 17 nt 길이)이다. 일부 실시형태에서, 적어도 15 nt, 적어도 16 nt 또는 적어도 17 nt의 센스 채가 안티센스 채의 서열에 상보적이다. 일부 실시형태에서 센스 채는 안티센스 채의 서열에 완벽하게 상보적이다.
- [0047] 일부 실시형태에서, 안티센스 채 및 센스 채는 안티센스 채의 5' 말단과 센스 채의 3' 말단이 블런트(blunt) 말단을 형성하는 복합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 안티센스 채 및 센스 채는 안티센스 채의 5' 말단이 센스 채의 3' 말단을 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 nt 만큼) 오버행(overhang)하는 복합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 안티센스 채와 센스 채는 센스 채의 5' 말단이 안티센스 채의 3' 말단을 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 nt 만큼) 오버행하는 복합체를 형성한다.
- [0048] 일부 실시형태에서, RNA 복합체의 안티센스 채 및/또는 센스 채는 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6, 표 8 또는 표 10에 열거된 서열로부터 선택된 센스 채 서열 및/또는 안티센스 채 서열을 갖는다.
- [0049] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체는 화학적 변형을 포함하며, 상기 변형은 전달 비히클의 부재하에서 세포막의 침투를 촉진한다. 일부 실시형태에서, 변형은 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트 결합 또는 콜레스테롤 모이어티이다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 표 2 또는 표 4에 열거된 변형된 RNA 복합체이다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 세포독성이 아니다.
- [0050] 본 명세서에 개시된 RNA 복합체는 다양한 올리고뉴클레오타이드 화학을 이용할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 화학의 예는, 비제한적으로, 펩티드 핵산(PNA), 연결된 핵산(LNA), 포스포로티오에이트, 2'-O-Me-변형 올리고뉴클레오타이드 및 모르폴리노 화학을 포함하며 전술한 것 중 임의의 것의 조합을 포함한다. 일반적으로, PNA 및 LNA 화학은 2'-O-Me 올리고뉴클레오타이드에 비하여 그들의 상대적으로 높은 타겟 결합 강도 때문에 더 짧은 타겟팅 서열을 이용할 수 있다. 포스포로티오에이트 및 2'-O-Me-변형 화학은 종종 조합되어 포스포로티오에이트 백본을 가진 2'-O-Me-변형 올리고뉴클레오타이드를 생성한다. 예를 들어, PCT 공개 제WO/2013/112053호 및 제WO/2009/008725호를 참고하며, 그 각각은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.
- [0051] 펩티드 핵산(PNA)은 백본이 피리미딘 또는 퓨린 염기가 부착된 N-(2-아미노에틸) 글리신 단위로 이루어지며 테옥시리보스 백본과 구조적으로 동종형태인 DNA 유사체이다. 천연 피리미딘 및 퓨린 염기를 함유한 PNA는 왓슨-크릭 염기-페어링 규칙에 따라 상보성 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화하며, 염기쌍 인식 면에서 DNA를 모방한다. PNA의 백본은 포스포다이에스테르 결합이 아닌 펩티드 결합에 의해 형성되어, 그들이 안티센스 응용에 적합하도록 한다(하기의 구조 참고). 백본은 비하전되어, 정상보다 큰 열 안정성을 나타내는 PNA/DNA 또는 PNA/RNA 듀플렉스를 야기한다. PNA는 뉴클레아제 또는 프로테아제에 의해 인식되지 않는다.

- [0052] 천연 구조로의 라디칼 구조 변화에도 불구하고, PNA는 DNA 또는 RNA에 헬릭스 형태로 서열-특이적 결합을 할 수 있다. PNA의 특징은 상보성 DNA 또는 RNA와의 높은 결합 친화성, 단일-염기 미스매치에 의해 야기된 불안정화 효과, 뉴클레아제 및 프로테아제에 대한 저항성, 염 농도와 무관한 DNA 또는 RNA와의 하이브리드화 및 호모퓨린 DNA와의 트리플렉스 형성을 포함한다. 파나진(PANAGENE).TM.은 그의 사유 Bts PNA 단량체(Bts; 벤조티아졸-2-설폰닐기) 및 사유 올리고머화 방법을 개발하였다. Bts PNA 단량체를 이용하는 PNA 올리고머화는 탈보호, 커플링 및 캡핑(capping)의 반복 사이클로 구성된다. PNA는 본 기술분야에 알려진 임의의 기술을 이용하여 합성적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,969,766호, 제7,211,668호, 제7,022,851호, 제7,125,994호, 제7,145,006호 및 제7,179,896호를 참고하라. 또한 PNA의 제조를 위하여 미국 특허 제5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호를 참고하라. PNA 화합물의 추가 교시는 Nielsen *et al.*, *Science*, 254:1497-1500, 1991에서 찾을 수 있다. 전술한 문헌의 각각은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.
- [0053] 간접 핵산은 또한 "잠긴 핵산" 서브유닛(LNA)을 함유할 수 있다. "LNA"는 가교된 핵산(BNA)으로 불리는 변형의 부류의 구성원이다. BNA는 C3-엔도(북측) 당 퍼커(sugar pucker)내에 리보스 고리의 형태를 잠그는 공유 결합을 특징으로 한다. LNA의 경우, 가교는 2'-O와 4'-C 위치 사이의 메틸렌으로 이루어진다. LNA는 백본 예비조직화 및 염기 적층(base stacking)을 향상시켜 하이브리드화 및 열 안정성을 증가시킨다.
- [0054] LNA의 구조는 예를 들어, Wengel, *et al.*, *Chemical Communications* (1998) 455; *Tetrahedron* (1998) 54:3607, 및 *Accounts of Chem. Research* (1999) 32:301; Obika, *et al.*, *Tetrahedron Letters* (1997) 38:8735; (1998) 39:5401, 및 *Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008) 16:9230에서 찾을 수 있다. 본 발명에서 제공되는 화합물은 하나 이상의 LNA를 포함할 수 있으며; 일부 경우에, 화합물은 전적으로 LNA로 이루어질 수 있다. 개별 LNA 뉴클레오시드 서브유닛의 합성 및 올리고뉴클레오티드 내로의 그들의 포함을 위한 방법은 예를 들어, 미국 특허 제7,572,582호, 제7,569,575호, 제7,084,125호, 제7,060,809호, 제7,053,207호, 제7,034,133호, 제6,794,499호, 및 제6,670,461호에서 개시되며, 그 각각은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 전형적인 서브유닛간 링커는 포스포다이에스테르 및 포스포로티오에이트 모이어티를 포함하며; 대안적으로는, 비-인 함유 링커가 이용될 수 있다. 일 실시형태는 각 LNA 서브유닛이 DNA 서브유닛에 의해 분리되는 LNA-함유 화합물이다. 일부 화합물은 서브유닛간 링커가 포스포로티오에이트인, 교번하는 LNA 및 DNA 서브유닛으로 이루어진다.
- [0055] 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 콜레스테롤 모이어티에 연결된다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 센스 채의 3' 말단에 부착된다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 안티센스 채의 3' 말단에 부착된다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 센스 채의 5' 말단에 부착된다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 안티센스 채의 5' 말단에 부착된다.
- [0056] 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함한다. 2'-O-메틸화 뉴클레오시드는 리보스 분자의 2'-OH 잔기에 메틸기를 보유한다. 2'-O-Me-RNA는 RNA와 동일한(또는 유사한) 거동을 보여주지만, 뉴클레아제 분해로부터 보호된다. 2'-O-Me-RNA는 또한 추가 안정화를 위해 포스포티오에이트 올리고뉴클레오티드(PTO)와 조합될 수 있다. 2'-O-Me-RNA(포스포다이에스테르 또는 포스포티오에이트)는 본 기술분야의 일상적 기술에 따라 합성될 수 있다(예를 들어, Yoo *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 32:2008-16, 2004를 참고하며, 이는 참고로 본원에 포함된다).
- [0057] 일부 실시형태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오시드는 센스 채의 3' 말단에 위치된다. 일부 실시형태에서, 센스 채의 3' 말단 영역은 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드(예를 들어, 3' 말단의 6 뉴클레오시드 이내에 2, 3, 4, 5 또는 6개의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오시드는 안티센스 채의 3' 말단에 위치된다. 일부 실시형태에서, 안티센스 채의 3' 말단 영역은 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드(예를 들어, 3' 말단의 6 뉴클레오시드 이내에 2, 3, 4, 5 또는 6개의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드)를 포함한다. 일부 실시형태에서는, 센스 채의 3' 말단 영역 및 안티센스 채의 3' 말단 영역 둘 모두가 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 센스 채는 비변형 뉴클레오시드와 교번하는 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 센스 채는 비변형 뉴클레오시드와 교번하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드의 연속 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 안티-센스 채는 비변형 뉴클레오시드와 교번하는 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 안티-센스 채는 비변형 뉴클레오시드와 교번하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드의 연속 서열을 포함한다.
- [0058] 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. "포스포로티오에이트"(또는 S-올리고)는 비가교 산소 중 하나가 황에 의해 치환된, 정상 DNA의 변이체이다. 뉴클레오티드간 결합의 황화는 5'에서 3'으로 및 3'에서 5'으로의 DNA POL 1 엑소뉴클레아제, 뉴클레아제 S1 및 P1, RNase, 혈청 뉴클레아제 및 뱀독

포스포다이에스터라제를 비롯한 엔도- 및 엑소뉴클레아제의 작용을 감소시킨다. 포스포로티오에이트는 두 가지 주요 경로에 의해 만들어진다: 하이드로젠 포스포네이트에 대한 카본 다이설파이드 내의 원소 황의 용액의 작용에 의해, 또는 테트라에틸티우람 다이설파이드(TETD) 또는 3H-1,2-벤조다이티올-3-온 1,1-다이옥사이드(BDTD)로 포스파이트 트리에스테르를 황화시키는 방법에 의해서이다(예를 들어, Iyer *et al.*, *J. Org. Chem.* 55, 4693-4699, 1990 참고). 후자의 방법은 대부분의 유기 용매에서의 원소 황의 불용성의 문제 및 카본 다이설파이드의 독성을 피한다. TETD 및 BDTD 방법은 또한 더 높은 순도의 포스포로티오에이트를 생성한다.

- [0059] 일부 실시형태에서, RNA 복합체의 센스 쇠 내의 리보뉴클레오타이드 간의 결합의 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체의 센스 쇠 내의 리보뉴클레오타이드 간의 결합의 전부가 포스포로티오에이트 결합이다.
- [0060] 일부 실시형태에서, RNA 복합체의 안티센스 쇠 내의 리보뉴클레오타이드 간의 결합의 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체의 안티센스 쇠 내의 리보뉴클레오타이드 간의 결합의 전부가 포스포로티오에이트 결합이다.
- [0061] 본 명세서에 개시된 RNA 복합체는 세포와 접촉되거나 유기체(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 대안적으로, RNA 복합체를 인코딩하는 작제물(construct) 및/또는 벡터가 세포 또는 유기체와 접촉되거나 그 안으로 도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0062] 본 명세서에 개시된 RNA 복합체는 본 기술분야에 알려진 임의의 적절한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNA 복합체는 화학 합성 또는 인 비트로 전사에 의해 제조된다.
- [0063] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 눈의 전달을 위해 제형화된다(예를 들어, 점안제로서). 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 유리체내 전달을 위해 제형화된다.
- [0064] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 AMD의 치료를 위한 두번째 제제(예를 들어, 베바시주맙(bevacizumab), 라니비주맙(ranibizumab), 페갑타닙(pegaptanib) 및/또는 아플리베르셉트(aflibercept)와 같은 항-VEGF 치료제)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 형질감염 비히클을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 전달 비히클(예를 들어, 리포솜, 양이온성 중합체, 세포 침투 펩티드(CPP), 단백질 전달 도메인(PTD), 항체 및/또는 앵타머)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 개시된 RNA 복합체 다수(예를 들어, 둘 이상)의 조합을 포함한다.
- [0065] 이들 제형 또는 조성물의 제조 방법은 본 명세서에 개시된 RNA 복합체를 담체 및 선택적으로 하나 이상의 보조 성분과 연합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 본 명세서에 개시된 제제를 액체 담체와 균일하게 그리고 완전하게 연합시킴으로써 제조된다.
- [0066] 치료 방법
- [0067] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체와 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에 의한 MyD88 및/또는 TLR3 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체는 변형된 RNA 복합체이고 세포는 형질감염 비히클의 부재하에서 RNA 복합체와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 세포는 전달 비히클(예를 들어, 리포솜, 양이온성 중합체, 세포 침투 펩티드(CPP), 단백질 전달도메인(PTD), 항체 및/또는 앵타머)의 존재하에서 RNA 복합체와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 세포는 인간 개체의 눈에 존재한다. 일부 실시형태에서, 개체는 AMD(예를 들어, 습성 AMD 또는 건성 AMD)를 가진다.
- [0068] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체 또는 약학 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, AMD(예를 들어, 습성 AMD 또는 건성 AMD)에 대해 인간 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체 또는 약학 조성물은 개체의 눈에 투여된다. 일부 실시형태에서, RNA 복합체 또는 약학 조성물은 개체에 의해 자가-투여된다.
- [0069] 본 방법에서, 본 명세서에 개시된 RNA 복합체는 예를 들어, 전달 시약과 조합되어, (예를 들어, cp-asiRNA 및 cp-lasiRNA를 위한) 전달 비히클없이 핵산으로서, 및/또는 본 명세서에 개시된 RNA 복합체를 발현하는 서열을 포함하는 핵산으로서 개체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 기술분야에 알려진 임의의 핵산 전달 방법은 본 명세서에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 적합한 전달 시약은 예를 들어, 미러스 트랜짓(Mirus Transit) TKO 친유성 시약; 리포펙틴; 리포펙타민; 셀펙틴(cellfectin); 폴리양이온(polycation)(예를 들어, 폴리리신), 아테로콜라겐(atelocollagen), 나노플렉스(nanoplexe) 및 리포솜을 포함하지만 이에 제한되지 않는



다. 핵산 분자를 위한 전달 비히클로서 아테로콜라겐의 이용은 Minakuchi *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 32(13):e109 (2004); Hanai *et al.* *Ann NY Acad Sci.*, 1082:9-17 (2006); 및 Kawata *et al.* *Mol Cancer Ther.*, 7(9):2904-12 (2008)에 개시되며, 그 각각은 그 전체가 본원에 포함된다. 예시적인 간섭 핵산 전달 시스템은 미국 특허 제8,283,461호, 제8,313,772호, 제8,501,930호, 제8,426,554호, 제8,268,798호 및 제8,324,366호에서 제공되며, 그 각각은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0070] 본 명세서에 개시된 방법의 일부 실시형태에서, 리포솜은 본 명세서에 개시된 RNA 복합체를 개체에게 전달하기 위하여 이용된다. 본 명세서에 개시된 방법에서 사용하기 적합한 리포솜은 표준 소포-형성 지질로부터 형성될 수 있으며, 이러한 지질은 일반적으로 중성 또는 음으로 하전된 인지질 및 스테롤, 예를 들어, 콜레스테롤을 포함한다. 지질의 선택은 일반적으로 원하는 리포솜 크기 및 혈류에서 리포솜 반감기와 같은 인자를 고려하여 가이드된다. 예를 들어, Szoka *et al.* (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467; 및 미국 특허 제4,235,871호, 제4,501,728호, 제4,837,028호, 및 제5,019,369호에 개시된 바처럼, 리포솜 제조를 위한 다양한 방법이 알려져 있으며, 상기 문헌의 전체 내용은 참고로 본원에 포함된다.

[0071] 본 방법에서 사용하기 위한 리포솜은 또한 단핵 대식세포계("MMS") 및 세망내피계("RES")에 의한 제거를 피하기 위하여 변형될 수 있다. 그러한 변형된 리포솜은 표면 상에 또는 리포솜 구조내로 포함된 옵소닌작용-억제 모이어티를 가진다.

[0072] 본 명세서에 개시된 리포솜의 제조에서 사용하기 위한 옵소닌작용-억제 모이어티는 전형적으로 리포솜 막에 결합된 큰 친수성 중합체이다. 본 명세서에서 사용될 때, 옵소닌작용 억제 모이어티는 예를 들어, 리포솜막 자체 내로 지질-가용성 고정제(anchor)의 삽입에 의해, 또는 막지질의 활성기에의 직접 결합에 의해, 리포솜 막에 화학적으로 또는 물리적으로 부착될 경우 리포솜 막에 "결합"된다. 이들 옵소닌작용-억제 친수성 중합체는 MMS 및 RES에 의한 리포솜의 흡수를 유의하게 감소시키는 보호성 표면층을 형성하며; 예를 들어, 미국 특허 제 4,920,016호에 개시되며 그 전체 내용은 참고로 본원에 포함된다.

[0073] 일부 실시형태에서, 리포솜을 변형하기 위하여 적합한 옵소닌작용 억제 모이어티는 수평균 분자량이 약 500 내지 약 40,000 달톤, 또는 약 2,000 내지 약 20,000 달톤인 수용성 중합체이다. 그러한 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리프로필렌 글리콜(PPG) 유도체; 예를 들어, 메톡시 PEG 또는 PPG, 및 PEG 또는 PPG 스테아레이트; 합성 중합체, 예를 들어, 폴리아크릴아미드 또는 폴리 N-비닐 피롤리돈; 선형, 분지형, 또는 덴드리머성 폴리아미도아민; 폴리아크릴산; 폴리아알콜, 예를 들어, 카르복실 또는 아미노기가 화학적으로 연결된 폴리비닐알콜 및 폴리자일리톨, 및 강글리오사이드, 예를 들어, 강글리오사이드 GM1을 포함한다. PEG, 메톡시 PEG, 또는 메톡시 PPG의 공중합체, 또는 그 유도체 또한 적합하다. 또한, 옵소닌작용 억제 중합체는 PEG 및 폴리아미노산, 다당류, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌아민, 또는 폴리뉴클레오티드 중 어느 것의 블록 공중합체일 수 있다. 옵소닌작용 억제 중합체는 또한 아미노산 또는 카르복실산, 예를 들어, 갈락투론산, 글루쿠론산, 만누론산, 히아루론산, 펙트산, 뉴라민산, 알긴산, 카라기난을 함유한 천연 다당류; 아민화 다당류 또는 올리고당(선형 또는 분지형); 또는 예를 들어, 카본산의 유도체와 반응되어 카르복실기와 연결된 카르복실화 다당류 또는 올리고당일 수 있다. 일부 실시형태에서, 옵소닌작용-억제 모이어티는 PEG, PPG, 또는 그 유도체이다. PEG 또는 PEG-유도체로 변형된 리포솜은 때로는 "폐길화(PEGylated) 리포솜"으로 불린다.

[0074] 본 명세서에 개시된 약학 조성물은 국소, 유리체내, 경구 및 비경구를 비롯한 임의의 적합한 투여 경로에 의해 전달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 일반적으로 (예를 들어, 경구 또는 비경구 투여를 통해) 전달된다. 일부 다른 실시형태에서, 약학 조성물은 눈의 직접 투여를 통해 국부적으로 전달된다.

[0075] 약학 조성물 내의 RNA 복합체의 실제 투여량 수준은 환자에 대한 독성없이, 구체적 환자, 조성물 및 투여 양상을 위해 원하는 치료 반응을 이루기에 효과적인 RNA 복합체의 양을 얻기 위하여 변화될 수 있다.

[0076] 선택된 투여량 수준은 이용되는 구체적 제제의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 이용되는 구체적 화합물의 배출 또는 대사 속도, 치료 기간, 이용되는 구체적 화합물과 조합되어 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 병태, 일반적 건강 및 이전 병력, 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사한 인자들을 비롯한 다양한 인자에 의존할 것이다.

[0077] 본 기술분야의 통상의 기술수준의 의사는 요구되는 약학 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 원하는 치료 효과를 이루기 위하여 요구되는 것보다 낮은 수준에서 약학 조성물에 이용되는 제제의 투여량을 처방 및/또는 투여하고 원하는 효과가 이루어질 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다.

[0078] 일반적으로, 본 명세서에 개시된 RNA 복합체의 적합한 일일 투여량은 치료 효과를 생산하기 위하여 효과적인 최저 투여량인 RNA 복합체의 양일 것이다. 그러한 유효 투여량은 일반적으로 상술한 인자에 의존할 것이다.

[0079] 실시예

[0080] 실시예 1: MyD88-특이적 비대칭 작은 간섭 RNA에 대한 스크리닝

[0081] 높은 효율로 MyD88을 억제하는 비대칭의 작은 간섭 RNA(asiRNA)를 동정하기 위하여, 44가지의 asiRNA를 합성하고 스크리닝하였다. 스크리닝된 asiRNA의 핵산 서열이 표 1에 제공된다.

[0082] 표 1: 예시적인 MyD88-타겟팅 asiRNA를 위한 핵산 서열.

asiRNA 서열
MyD88#1(S) : 5' GGCGGCCGACUGGACC 3'
MyD88#1(AS) : 5' GGUCCAGUCGGCCGCCACC 3'
MyD88#2(S) : 5' UGGCGGCCGACUGGAC 3'
MyD88#2(AS) : 5' GUCCAGUCGGCCGCCACCU 3'
MyD88#3(S) : 5' GUGGCGGCCGACUGGA 3'
MyD88#3(AS) : 5' UCCAGUCGGCCGCCACCUG 3'
MyD88#4(S) : 5' CUGGCGGAGGAGAUGG 3'
MyD88#4(AS) : 5' CCAUCUCCUCCGCCAGCGC 3'
MyD88#5(S) : 5' GCUGGCGGAGGAGAUG 3'
MyD88#5(AS) : 5' CAUCUCCUCCGCCAGCGCG 3'
MyD88#6(S) : 5' AGUACUUGGAGAUCCG 3'
MyD88#6(AS) : 5' CGGAUCUCCAAGUACUCAA 3'
MyD88#7(S) : 5' GAGUACUUGGAGAUCC 3'
MyD88#7(AS) : 5' GGAUCUCCAAGUACUCAA 3'
MyD88#8(S) : 5' GCCUUUACAGGUGGCC 3'
MyD88#8(AS) : 5' GGCCACCUGUAAAGGCUUC 3'
MyD88#9(S) : 5' AGCCUUUACAGGUGGC 3'
MyD88#9(AS) : 5' GCCACCUGUAAAGGCUUCU 3'
MyD88#10(S) : 5' AAGCCUUUACAGGUGG 3'
MyD88#10(AS) : 5' CCACCUGUAAAGGCUUCUC 3'
MyD88#11(S) : 5' GAAGCCUUUACAGGUG 3'
MyD88#11(AS) : 5' CACCUGUAAAGGCUUCUCA 3'
MyD88#12(S) : 5' AGAAGCCUUUACAGGU 3'
MyD88#12(AS) : 5' ACCUGUAAAGGCUUCUCAG 3'
MyD88#13(S) : 5' AGAUGAUCCGGCAACU 3'
MyD88#13(AS) : 5' AGUUGCCGGAUCAUCUCCU 3'
MyD88#14(S) : 5' GAGAUGAUCCGGCAAC 3'
MyD88#14(AS) : 5' GUUGCCGGAUCAUCUCCUG 3'
MyD88#15(S) : 5' GGAGAUGAUCCGGCAA 3'
MyD88#15(AS) : 5' UUGCCGGAUCAUCUCCUGC 3'
MyD88#16(S) : 5' AGGAGAUGAUCCGGCA 3'
MyD88#16(AS) : 5' UGCCGGAUCAUCUCCUGCA 3'
MyD88#17(S) : 5' CAGGAGAUGAUCCGGC 3'

[0083]

MyD88#17(AS) : 5' GCCGGAUCAUCCUGCAC 3'
MyD88#18(S) : 5' GCAGGAGAUGAUCCGG 3'
MyD88#18(AS) : 5' CCGGAUCAUCCUGCACA 3'
MyD88#19(S) : 5' UGCAGGAGAUGAUCCG 3'
MyD88#19(AS) : 5' CGGAUCAUCCUGCACAA 3'
MyD88#20(S) : 5' GUGCAGGAGAUGAUCC 3'
MyD88#20(AS) : 5' GGAUCAUCCUGCACAAA 3'
MyD88#21(S) : 5' UGUGCAGGAGAUGAUC 3'
MyD88#21(AS) : 5' GAUCAUCCUGCACAAAC 3'
MyD88#22(S) : 5' UUGUGCAGGAGAUGAU 3'
MyD88#22(AS) : 5' AUCAUCCUGCACAAACU 3'
MyD88#23(S) : 5' UUUGUGCAGGAGAUGA 3'
MyD88#23(AS) : 5' UCAUCCUGCACAAACUG 3'
MyD88#24(S) : 5' GUUUGUGCAGGAGAUG 3'
MyD88#24(AS) : 5' CAUCCUGCACAAACUGG 3'
MyD88#25(S) : 5' AGUUUGUGCAGGAGAU 3'
MyD88#25(AS) : 5' AUCUCCUGCACAAACUGGA 3'
MyD88#26(S) : 5' GUGACUCCAGACCAA 3'
MyD88#26(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACAUU 3'
MyD88#27(S) : 5' UGUGACUCCAGACA 3'
MyD88#27(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAUUC 3'
MyD88#28(S) : 5' AUGUGACUCCAGACC 3'
MyD88#28(AS) : 5' GGUCUGGAAGUCACAUUCC 3'
MyD88#29(S) : 5' AAUGUGACUCCAGAC 3'
MyD88#29(AS) : 5' GUCUGGAAGUCACAUUCCU 3'
MyD88#30(S) : 5' GAAUGUGACUCCAGA 3'
MyD88#30(AS) : 5' UCUGGAAGUCACAUUCCUU 3'
MyD88#31(S) : 5' GGAAUGUGACUCCAG 3'
MyD88#31(AS) : 5' CUGGAAGUCACAUUCCUUG 3'
MyD88#32(S) : 5' AGGAAUGUGACUCCA 3'
MyD88#32(AS) : 5' UGGAAGUCACAUUCCUUGC 3'
MyD88#33(S) : 5' AAGGAAUGUGACUCC 3'
MyD88#33(AS) : 5' GGAAGUCACAUUCCUUGCU 3'
MyD88#34(S) : 5' CAAGGAAUGUGACUUC 3'
MyD88#34(AS) : 5' GAAGUCACAUUCCUUGCUC 3'
MyD88#35(S) : 5' GCAAGGAAUGUGACUU 3'
MyD88#35(AS) : 5' AAGUCACAUUCCUUGCUCU 3'
MyD88#36(S) : 5' AGCAAGGAAUGUGACU 3'
MyD88#36(AS) : 5' AGUCACAUUCCUUGCUCUG 3'
MyD88#37(S) : 5' GAGCAAGGAAUGUGAC 3'

[0084]

MyD88#37(AS) : 5' GUCACAUUCCUUGCUCUGC 3'
MyD88#38(S) : 5' AGAGCAAGGAAUGUGA 3'
MyD88#38(AS) : 5' UCACAUUCCUUGCUCUGCA 3'
MyD88#39(S) : 5' CAGAGCAAGGAAUGUG 3'
MyD88#39(AS) : 5' CACAUUCCUUGCUCUGCAG 3'
MyD88#40(S) : 5' GUCCCUGCCCUGAAGA 3'
MyD88#40(AS) : 5' UCUUCAGGGCAGGGACAAG 3'
MyD88#41(S) : 5' UGUCCCUGCCCUGAAG 3'
MyD88#41(AS) : 5' CUUCAGGGCAGGGACAAGG 3'
MyD88#42(S) : 5' UUGUCCCUGCCCUGAA 3'
MyD88#42(AS) : 5' UUCAGGGCAGGGACAAGGC 3'
MyD88#43(S) : 5' GCACCUGUGUCUGGUC 3'
MyD88#43(AS) : 5' GACCAGACACAGGUGCCAG 3'
MyD88#44(S) : 5' GGCACCUGUGUCUGGU 3'
MyD88#44(AS) : 5' ACCAGACACAGGUGCCAGG 3'

[0085]

[0086]

표 1에 열거된 asiRNA를 2분 동안 95℃에서 그리고 1시간 동안 37℃에서 1x siRNA 듀플렉스 버퍼(에스티팜(STpharm))에서 항온처리하였다. 적절한 쉐 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 스크리닝을 위하여, 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(집코(Gibco)) 및 100 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 돌베코스 변형 이글스 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)(집코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다. 형질감염 하루 전에,  $2.0 \times 10^4$  HeLa 세포를 24-웰 플레이트에 접종하였다. HeLa 세포를 제조사의 설명서에 따라 리포펙타민(Lipofectamine) 2000(인비트로젠(Invitrogen))을 이용하여 0.3 nM의 asiRNA로 형질감염시켰다.

[0087]

형질감염된 세포에서 MyD88 mRNA 수준을 형질감염 후 24시간에 실시간 PCR을 이용하여 측정하였다. 구체적으로, RNAiso Plus(타카라(TaKaRa))를 이용하여 전체 RNA를 추출한 후, 추출된 RNA 500 ng을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 고성능(High-capacity) cDNA 역전사 키트(어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 희석한 후, 스텝원(StepOne) 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템즈)을 제조사의 설명서에 따라 이용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. MyD88 유전자의 증폭을 파워 SYBR Premix Ex Taq(타카라)를 이용하여 검출하였다. GAPDH를 내부 대조군으로서 증폭시켰다. 하기의 프라이머 서열을 이용하였다:

[0088]

인간 *GAPDH*-전방 5' -GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3'

[0089]

인간 *GAPDH*-역방 5' -GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3'

[0090]

인간 *MyD88*-전방 5' - AAG TTA TTT GTT TAC AAA CAG CGA CCA -3'

[0091]

인간 *MyD88*-역방 5' - GGA AGA ATG GCA AAT ATC GGC T -3'

[0092]

44가지 asiRNA의 각각에 의한 MyD88 억제 수준이 도 1에 제공된다. asiRNA 서열 중 세 가지인 asiMyD88(26), asiMyD88(27) 및 asiMyD88(32)를 후속 연구에서 사용하기 위하여 선택하였다.

[0093]

실시예 2: MyD88-타겟팅 asiRNA를 이용한 MyD88 mRNA 발현 수준의 억제

[0094]

asiRNA 서열 중 세 가지인 asiMyD88(26), asiMyD88(27) 및 asiMyD88(32)를 상이한 농도에서 MyD88 발현을 억제하는 그들의 능력에 대해 시험하였다. asiRNA를 2분 동안 95℃에서 그리고 1시간 동안 37℃에서 1x siRNA 듀플렉스 버퍼(에스티팜)에서 항온처리하였다. 적절한 쉐 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 스크리닝을 위하여, 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(집코) 및 100 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 돌베코스 변형 이글스 배지(집코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다. 형질감염 하루 전에,  $2.0 \times 10^4$  HeLa 세포를 24-웰 플레이트에 접종하였다. HeLa 세포를 제조사의 설명서에 따라 리포펙타민 2000(인비트로젠)을 이용하여 asiRNA로 형질감염시켰다.

[0095]

상이한 농도의 3가지 asiRNA에 의한 MyD88 억제 수준이 도 2에 제공된다. 도 2에 나타난 대로, 낮은 농도의 asiMyD88(26) 및 asiMyD88(27)이 최고 수준의 MyD88 억제를 나타냈다. asiMyD88(26) 및 asiMyD88(27)을 후속 연구에서의 사용을 위해 선택하였다.



[0096] 실시예 3: asiRNA의 변형

[0097] 상이한 안티센스 채 길이를 가진 다양한 잠재적 asiMyD88 구조를 합성하고 MyD88 발현을 억제하는 그들의 능력에 대해 시험하였다.(표 2)

[0098] **표 2. 추가의 asiRNA 서열.**

MyD88#26(S) : 5' GUGACUCCAGACCAA 3'
MyD88#26(19AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACAUU 3'
MyD88#26(21AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACAUUCC 3'
MyD88#26(31AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACAUUCCUUGCUCUGCA 3'
MyD88#27(S) : 5' UGUGACUCCAGCCA 3'
MyD88#27(19AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAUUC 3'
MyD88#27(21AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAUUCCU 3'
MyD88#27(31AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAUUCCUUGCUCUGCAG 3'

[0099]

[0100] 표 2에 열거된 asiRNA를 2분 동안 95℃에서 그리고 1시간 동안 37℃에서 1x siRNA 듀플렉스 버퍼(에스티팜)에서 항온처리하였다. 적절한 채 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 스크리닝을 위하여, 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(김코) 및 100 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(김코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다. 형질감염 하루 전에,  $2.0 \times 10^4$  HeLa 세포를 24-웰 플레이트에 접종하였다. HeLa 세포를 제조사의 설명서에 따라 리포펙타민 2000(인비트로젠)을 이용하여 0.3 nM의 asiRNA로 형질감염시켰다.

[0101] 형질감염된 세포에서 MyD88 mRNA 수준을 형질감염 후 24시간에 실시간 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. 구체적으로, RNAiso Plus(타카라)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 후, 추출된 RNA 500 ng을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 고성능 cDNA 역전사 키트(어플라이드 바이오시스템즈)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 희석한 후, 스탬핀 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템즈)을 제조사의 설명서에 따라 이용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. MyD88 유전자의 증폭을 파악 SYBR Premix Ex Taq(타카라)를 이용하여 검출하였다. GAPDH를 내부 대조군으로서 증폭시켰다.

[0102] 6가지 asiRNA의 각각에 의한 MyD88 억제 수준이 도 3에 제공된다. asiMyD88(26) 및 asiMyD88(27)의 21 뉴클레오타이드 안티센스가 최고 수준의 MyD88 억제를 나타냈다. 21 뉴클레오타이드 안티센스를 후속 연구에서의 사용을 위하여 선택하였다.

[0103] 실시예 4: MyD88-특이적 asiRNA를 이용한 MyD88 단백질의 억제

[0104] MyD88 단백질의 억제에 대한 asiMyD88의 효능을 시험하였다.

[0105] asiRNA를 2분 동안 95℃에서 그리고 1시간 동안 37℃에서 1x siRNA 듀플렉스 버퍼(에스티팜)에서 항온처리하였다. 적절한 채 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다.

[0106] 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(김코) 및 100 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(김코)에서 배양된 A549 세포(ATCC) 및 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다. 형질감염 하루 전에,  $5.0 \times 10^4$  A549 세포 또는 HeLa 세포를 12-웰 플레이트에 접종하였다. A549 세포 및 HeLa 세포를 제조사의 설명서에 따라 리포펙타민<sup>TM</sup> RNAiMAX(인비트로젠)을 이용하여 10 nM 및 3 nM의 asiRNA로 형질감염시켰다. 24시간 후, OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 교체하였다.

[0107] asiRNA 형질감염 후 48시간에, MyD88 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통해 결정하였다. 요약하면, 형질감염된 A549 세포 및 HeLa 세포를 RIPA 버퍼(GE)로 용해시켰다. A549 세포의 전체 단백질 추출물 15 µg 또는 HeLa 세포의 전체 단백질 추출물 30 µg을 12% SDS-PAGE 젤 상에 로딩하고 120 V에서 전기영동하였다. 전기영동 후, 300 mA에서 1시간 동안 메탄올(머크(Merck))에 의해 이미 활성화된 PVDF 막(바이오-라드(Bio-rad))으로 단백질을 옮겼다. 5% 탈지유(서울 우유)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 막을 차단한 후, 항-MyD88 항체(앱캠(Abcam)) 및 항-β-액틴 항체(산타 크루즈(Santa Cruz))를 함유한 5% 탈지유에서 4℃에서 밤새 항온처리하였다.

그 후 막을 10분동안 1x TBST로 3회 세척하고 HRP-접합된 이차 항체를 가진 5% 탈지유에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 막을 10분 동안 1x TBST로 세척하고 1분 동안 1x ECL로 처리하였다. 그 후, 케미독(Chemidoc) 장비(바이오-라드)를 이용하여 MyD88 및  $\beta$ -액틴 밴드를 영상화하였다.

[0108] 웨스턴 블롯 분석의 결과가 도 4에 도시된다. A549 세포 및 HeLa 세포의 모든 asiMyD88 형질감염 세포주에서, 80% 이상의 MyD88 단백질 억제가 확인되었다(도 4).

[0109] 실시예 5: MyD88 asiRNA의 화학적 변형

[0110] asiRNA에 화학적 변형이 적용되었다. 하기에 개시된 바처럼, 일부 변형은 엔도사이토시스 및 asiRNA의 안정성을 개선하였다. 4가지 asiRNA(표 3)를 HeLa 세포에서의 MyD88 mRNA 억제에 대해 시험하였다.

[0111] **표 3. 변형된 asiRNA 서열. m = 2'-O-메틸 RNA**

MyD88#26(16S-1) : 5' mGUmGAmCUmUCmCAmGAmCCmAA 3'
MyD88#26(19AS-1) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmAmCmAmUmU 3'
MyD88#26(21AS-1) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmAmCmAmUmUmCmC 3'
MyD88#27(16S-1) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmACmCA 3'
MyD88#27(19AS-1) : 5' UGGUCUGGAAGUCAmCmAmUmUmC 3'
MyD88#27(21AS-1) : 5' UGGUCUGGAAGUCAmCmAmUmUmCmCmU 3'

[0112]

[0113] 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(김코) 및 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(김코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다. 형질감염 하루 전에,  $2.0 \times 10^4$  HeLa 세포를 24-웰 플레이트에 접종하였다. HeLa 세포를 제조사의 설명서에 따라 리포펙타민 2000(인비트로젠)을 이용하여 형질감염시켰다. 24시간 후, HeLa 세포에서 MyD88 mRNA 수준을 결정하였다.

[0114] asiRNA 각각에 의한 MyD88 억제 수준이 도 5에 제공된다. 변형된 MyD88(27)이 최고 수준의 MyD88 억제를 나타냈다.

[0115] 실시예 6: 자가-전달을 위한 asiRNA의 화학적 변형

[0116] asiRNA에 화학적 변형을 적용하고 변형된 asiRNA의 세포 전달을 다른 전달 비히클의 부재하에서 시험하였다. 하기에 개시된 대로, 일부 변형은 엔도사이토시스 및 asiRNA의 안정성을 개선하였다. 그러한 세포 침투 asiRNA(cp-asiRNAs)는 전달 비히클의 부재하에서 세포내로 전달될 수 있다.

[0117] 24가지 잠재적 cp-asiRNA(표 4)를 HeLa 세포에서의 MyD88 mRNA 억제에 대해 스크리닝하였다. 각각의 잠재적 cp-asiRNA를 전달 비히클없이 1  $\mu$ M에서 HeLa 세포와 항온처리하고 실시간 PCR에 의해 MyD88 mRNA 수준을 측정하였다.

[0118] **표 4. 자가-전달 및 MyD88 억제에 대해 시험된 변형된 asiRNA 서열.**

[0119] m = 2'-O-메틸 RNA, \* = 포스포로티오에이트 결합

cp-asiMyD88#26-1(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-1(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACA*U*U*C*U 3'
cp-asiMyD88#26-2(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-2(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACA*U*mU*mC*mC 3'
cp-asiMyD88#26-3(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-3(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACmA*mU*mU*mC*mC 3'
cp-asiMyD88#26-4(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-4(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmAmCmA*mU*U*C*U 3'
cp-asiMyD88#26-5(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-5(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmAmCA*U*U*C*U 3'
cp-asiMyD88#26-6(S) : 5' mGUmGAmCmUmCmCmGAmCC*mA*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-6(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACA*U*U*C*U 3'
cp-asiMyD88#26-7(S) : 5' mGUmGAmCmUmCmCmGAmCC*mA*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-7(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACA*U*mU*mC*mC 3'
cp-asiMyD88#26-8(S) : 5' mGUmGAmCmUmCmCmGAmCC*mA*A* 클레스테롤 3'

[0120]

cp-asiMyD88#26-8(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACmA*mU*mU*mC*mC 3'
cp-asiMyD88#26-9(S) : 5' mGUmGAmCmUmCmCmGAmCC*mA*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-9(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmAmCmA*mU*U*C*U 3'
cp-asiMyD88#26-10(S) : 5' mGUmGAmCmUmCmCmGAmCC*mA*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-10(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmAmCA*U*U*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-1(S) : 5' UGUGACUCCAGAC*C*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-1(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAU*U*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-2(S) : 5' UGUGACUCCAGAC*C*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-2(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAU*U*mC*mC*mU 3'
cp-asiMyD88#27-3(S) : 5' UGUGACUCCAGAC*C*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-3(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAmU*mU*mC*mC*mU 3'
cp-asiMyD88#27-4(S) : 5' UGUGACUCCAGAC*C*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-4(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCAmCmAmU*mU*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-5(S) : 5' UGUGACUCCAGAC*C*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-5(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCAmCmAU*U*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-6(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-6(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAU*U*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-7(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-7(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAU*U*mC*mC*mU 3'
cp-asiMyD88#27-8(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-8(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAmU*mU*mC*mC*mU 3'
cp-asiMyD88#27-9(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-9(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCAmCmAmU*mU*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-10(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-10(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCAmCmAU*U*C*U 3'

[0121]

[0122] 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(김코) 및 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(김코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다.

[0123] 표 4에 열거된 잠재적 cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(김코)에서 95℃에서 2분 동안 그리고 37℃에서 1시간동안 혼돈처리하였다. 적절한 쇼 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다.

- [0124] 형질감염 하루 전에,  $2.0 \times 10^4$  HeLa 세포를 24-웰 플레이트에 접종하였다. 처리 직전에, HeLa 세포를 1x DPBS (깁코)로 세척한 후 OPTI-MEM 버퍼에서 잠재적 cp-asiRNA의 존재하에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다.
- [0125] asiRNA 처리 48시간 후, MyD88 mRNA 발현 수준을 결정하였다.
- [0126] 20가지 잠재적 cp-asiRNA 각각에 의한 MyD88 억제 수준이 도 6에 제공된다. 시험된 잠재적 cp-asiRNA 중에서, cp-asiRNA(26)-1 및 cp-asiRNA(27)-7이 최고 수준의 MyD88 억제를 나타냈다.
- [0127] 실시예 7: MyD88-특이적 cp-asiRNA를 이용한 MyD88 단백질의 억제
- [0128] MyD88 단백질의 억제에 대한 cp-asiRNA의 효능을 시험하였다. 각각의 잠재적 cp-asiRNA를 전달 비히클없이 1  $\mu$  M에서 HeLa 세포와 항온처리하고 웨스턴 블롯에 의해 MyD88 단백질 수준을 측정하였다.
- [0129] 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(깁코) 및 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(깁코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다. cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(깁코)에서 95°C에서 2분 동안 그리고 37°C에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 쉐 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 형질감염 하루 전에,  $5.0 \times 10^4$  HeLa 세포를 12-웰 플레이트에 접종하였다. 처리 직전에, HeLa 세포를 1x DPBS(깁코)로 세척한 후 OPTI-MEM 버퍼에서 잠재적 cp-asiRNA의 존재하에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다.
- [0130] asiRNA 처리 48시간 후, MyD88 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통해 결정하였다. 요약하면, 처리된 HeLa 세포를 RIPA 버퍼(GE)로 용해시켰다. 30  $\mu$ g의 전체 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE 젤 상에 로딩하고 120 V에서 전기영동하였다. 전기영동 후, 단백질을 300 mA에서 1시간 동안 메탄올(머크)에 의해 이미 활성화된 PVDF 막(바이오-라드)으로 옮겼다. 5% 탈지유(서울 우유)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 막을 차단한 후, 항-MyD88 항체(앵캠) 및 항- $\gamma$ -튜불린(베틀(Bethyl))을 함유한 5% 탈지유에서 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 그 후 막을 10분 동안 1x TBST로 3회 세척하고 HRP-접합된 이차 항체를 가진 5% 탈지유에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 막을 10분 동안 1x TBST로 세척하고 1분 동안 1x ECL로 처리하였다. 그 후, 케미독 장비(바이오-라드)를 이용하여 MyD88 및  $\gamma$ -튜불린 밴드를 영상화하였다.
- [0131] 웨스턴 블롯 분석의 결과가 도 7에 도시된다. 모든 cp-asiMyD88(27)-4 및 cp-asiMyD88(27)-7 항온처리된 세포 수가 60% 이상의 MyD88 단백질 억제를 나타냈었다(도 7).
- [0132] 실시예 8: MyD88-특이적 cp-asiRNA를 이용한 MyD88 단백질의 억제
- [0133] 안티센스 쉐 내에 상이한 수의 포스포로티오에이트 결합을 가진 다양한 잠재적 cp-asiMyD88 구조를 합성하고 MyD88 발현을 억제하는 그들의 능력에 대해 시험하였다(표 5).
- [0134] 표 5. 추가의 cp-asiRNA 서열



[0135] m = 2'-O-메틸 RNA, \* = 포스포로티오에이트 결합

cp-asiMyD88#26-11(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-11(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCA*C*A*U*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-12(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-12(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCA*C*mA*mU*mU*mC*mC 3'
cp-asiMyD88#26-13(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-13(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmA*mC*mA*mU*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-14(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-14(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmA*mC*A*U*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-15(S) : 5' mGUmGAmCmUmCmCmGAmCC*mA*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-15(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCA*C*A*U*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-16(S) : 5' mGUmGAmCmUmCmCmGAmCC*mA*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-16(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCA*C*mA*mU*mU*mC*mC 3'
cp-asiMyD88#26-17(S) : 5' mGUmGAmCmUmCmCmGAmCC*mA*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-17(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmA*mC*mA*mU*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-18(S) : 5' mGUmGAmCmUmCmCmGAmCC*mA*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-18(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmA*mC*A*U*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#27-11(S) : 5' UGUGACUCCAGAC*C*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-11(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCAC*A*U*U*C*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-12(S) : 5' UGUGACUCCAGAC*C*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-12(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCAmC*mA*mU*mU*C*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-13(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-13(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCAC*A*U*U*mC*mC*mU 3'

[0136]

cp-asiMyD88#27-14(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-14(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCAmC*mA*mU*mU*C*C*U 3'

[0137]

[0138] 표 5에 열거된 잠재적 cp-asiRNA 각각의 1  $\mu$ M이 HeLa 세포에서 MyD88 mRNA를 억제하는 능력을 시험하였다. 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(집코) 및 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(집코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다. 표 5에 열거된 잠재적 cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(집코)에서 95℃에서 2분 동안 그리고 37℃에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 쉐 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 형질감염 하루 전에,  $2.0 \times 10^4$  HeLa 세포를 24-웰 플레이트에 접종하였다. 처리 직전에, HeLa 세포를 1x DPBS(집코)로 세척한 후 OPTI-MEM 버퍼에서 잠재적 cp-asiRNA의 존재하에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다. asiRNA 처리 48시간 후, MyD88 mRNA 발현 수준을 결정하였다.

[0139] 도 8에 나타난 대로, 센스 쉐 상에 3개의 포스포로티오에이트 결합 및 안티센스 쉐 상에 4개의 포스포로티오에이트 결합을 함유한 MyD88 mRNA 잠재적 cp-asiRNA(26), 센스 쉐 상에 3개의 포스포로티오에이트 결합 및 안티센스 쉐 상에 3개의 2'-O-메틸화 및 4개의 포스포로티오에이트 결합을 함유한 cp-asiRNA(27)가 최고 수준의 MyD88 억제를 나타냈다.

[0140] 실시예 9: 추가의 MyD88-특이적 cp-asiRNA를 이용한 MyD88 단백질의 억제

[0141] MyD88 단백질의 억제에 대한 cp-asiRNA의 효능을 시험하였다. 각각의 잠재적 cp-asiRNA를 전달 비히클없이 3  $\mu$ M에서 HeLa 세포와 항온처리하고 웨스턴 블롯에 의해 MyD88 단백질 수준을 결정하였다. 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(집코) 및 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(집코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다. cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(집코)에서 95℃에서 2분 동안 그리고 37℃에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 쉐 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 형질감염 하루 전에,  $5.0 \times 10^4$  HeLa 세포를 12-웰 플레이트에 접종하였다. 처리 직전에, HeLa 세포를 1x DPBS(집코)로 세척한 후

OPTI-MEM 버퍼에서 잠재적 cp-asiRNA의 존재하에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다.

[0142] asiRNA 처리 48시간 후, MyD88 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯에 의해 결정하였다. 요약하면, 처리된 HeLa 세포를 RIPA 버퍼(GE)로 용해시켰다. 30  $\mu$ g의 전체 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE 젤 상에 로딩하고 120 V에서 전기영동하였다. 전기영동 후, 단백질을 300 mA에서 1시간 동안 메탄올(머크)에 의해 이미 활성화된 PVDF 막(바이오-라드)으로 옮겼다. 5% 탈지유(서울 우유)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 막을 차단한 후, 항-MyD88 항체(앱캠) 및 항- $\gamma$ -튜불린(벤틸)을 함유한 5% 탈지유에서 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 그 후 막을 10분동안 1x TBST로 3회 세척하고 HRP-접합된 이차 항체를 가진 5% 탈지유에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 막을 10분 동안 1x TBST로 세척하고 1분 동안 1x ECL로 처리하였다. 그 후, 케미독 장비(바이오-라드)를 이용하여 MyD88 및  $\gamma$ -튜불린 밴드를 영상화하였다.

[0143] 웨스턴 블롯 분석의 결과가 도 9에 도시된다. 모든 cp-asiMyD88 항온처리된 세포주가 50% 이상의 MyD88 단백질 억제력을 나타냈다. 또한, cp-asiMyD88(26)-10 및 cp-asiMyD88(27)-2가 다른 cp-asiMD88보다 MyD88 억제 능력에서 더 높은 효율을 갖는 것으로 나타났다(도 9).

[0144] 실시예 10: 추가의 MyD88 cp-asiRNA 구조

[0145] 상이한 쇠 길이 및 2'-O-메틸화 변형 및 포스포로티오에이트 결합 수를 가진 다양한 잠재적 cp-asiMyD88 구조를 합성하고 MyD88 발현을 억제하는 그들의 능력에 대해 시험하였다(표 6).

[0146] **표 6. 추가의 cp-asiRNA 서열(m = 2'-O-메틸 RNA, \* = 포스포로티오에이트 결합)**

cp-asiMyD88#26-13(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-13(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmA*mC*mA*mU*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-19(S) : 5' GUGACUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-19(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGU*C*mA*mC*mA*mU*U 3'
cp-asiMyD88#27-14(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-14(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCAmC*mA*mU*mU*C*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-15(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#27-15(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUC*A*mC*mA*mU*mU*C 3'

[0147]

[0148] 표 6에 열거된 잠재적 cp-asiRNA 각각의 1  $\mu$ M 또는 3  $\mu$ M이 HeLa 세포에서 MyD88 mRNA를 억제하는 능력을 시험하였다. 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(집코) 및 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(집코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다. 표 6에 열거된 잠재적 cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(집코)에서 95°C에서 2분 동안 그리고 37°C에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 쇠 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 형질감염 하루 전에,  $2.0 \times 10^4$  HeLa 세포를 24-웰 플레이트에 접종하였다. 처리 직전에, HeLa 세포를 1x DPBS(집코)로 세척한 후 OPTI-MEM 버퍼에서 잠재적 cp-asiRNA의 존재하에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다. asiRNA 처리 48시간 후, MyD88 mRNA 발현 수준을 결정하였다.

[0149] 도 10에 나타난 대로, 21 뉴클레오타이드 안티센스 쇠 상에 4개의 2'-O-메틸화 및 6개의 포스포로티오에이트 결합을 함유하는 MyD88 mRNA 잠재적 cp-asiRNA(26), 19 뉴클레오타이드 안티센스 쇠 상에 4개의 2'-O-메틸화 및 6개의 포스포로티오에이트 결합을 함유하는 cp-asiRNA(27)가 최고 수준의 MyD88 억제를 나타냈다.

[0150] 실시예 11: 추가의 MyD88-특이적 cp-asiRNA를 이용한 MyD88 단백질의 억제

[0151] MyD88 단백질의 억제에 대한 cp-asiRNA의 효능을 시험하였다. 각각의 잠재적 cp-asiRNA를 전달 비히클없이 1  $\mu$ M 및 3  $\mu$ M에서 HeLa 세포와 항온처리하고 웨스턴 블롯에 의해 MyD88 단백질 수준을 결정하였다. 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(집코) 및 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(집코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다. cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(집코)에서 95°C에서 2분 동안 그리고 37°C에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 쇠 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다.

[0152] 형질감염 하루 전에,  $5.0 \times 10^4$  HeLa 세포를 12-웰 플레이트에 접종하였다. 처리 직전에, HeLa 세포를 1x DPBS(집코)로 세척한 후 OPTI-MEM 버퍼에서 잠재적 cp-asiRNA의 존재하에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때

asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다. asiRNA 처리 48시간 후, MyD88 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통해 결정하였다. 요약하면, 처리된 HeLa 세포를 RIPA 버퍼(GE)로 용해시켰다. 30  $\mu$ g의 전체 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE 젤 상에 로딩하고 120 V에서 전기영동하였다. 전기영동 후, 단백질을 300 mA에서 1 시간 동안 메탄올(머크)에 의해 이미 활성화된 PVDF 막(바이오-라드)으로 옮겼다. 5% 탈지유(서울 우유)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 막을 차단한 후, 항-MyD88 항체(엠펙) 및 항- $\gamma$ -튜불린(베타)을 함유한 5% 탈지유에서 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 그 후 막을 10분동안 1x TBST로 3회 세척하고 HRP-접합된 이차 항체를 가진 5% 탈지유에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 막을 10분 동안 1x TBST로 세척하고 1분 동안 1x ECL로 처리하였다. 그 후, 케미독 장비(바이오-라드)를 이용하여 MyD88 및  $\gamma$ -튜불린 밴드를 영상화하였다.

[0153] 웨스턴 블롯 분석의 결과가 도 11에 도시된다. 모든 3  $\mu$ M cp-asiMyD88 항온처리된 세포주가 50% 이상의 MyD88 단백질 억제에 나타났다. 또한, cp-asiMyD88(26)-13이 다른 cp-asiMD88보다 MyD88 억제 능력에서 더 높은 효율을 갖는 것으로 나타났다(도 11).

[0154] 실시예 12: 톨-유사 수용체 3 특이적 비대칭 작은 간섭 RNA를 위한 스크리닝

[0155] 높은 효율로 톨-유사 수용체 3을 억제하는 비대칭 작은 간섭 RNA(asiRNA)를 동정하기 위하여, 100개의 asiRNA를 합성하고 스크리닝하였다. 스크리닝된 asiRNA의 핵산 서열이 표 7에 제공된다.

[0156] 표 7: 예시적인 톨-유사 수용체 3 타겟팅 asiRNA를 위한 핵산 서열.

TLR3 asiRNA 서열			
명칭	서열 (5'-3')	명칭	서열 (5'-3')
TLR3asiRNA S(1)	AUCUUCCUACAACAA	TLR3asiRNA AS(1)	UUGUUGUAGGAAAGAUCGAGC
TLR3asiRNA S(2)	UCUUUCCUACAACAAC	TLR3asiRNA AS(2)	GUUGUUGUAGGAAAGAUCGAG
TLR3asiRNA S(3)	GGCCCUUAAAAAUGUG	TLR3asiRNA AS(3)	CACAUUUUUAAGGGCCACCCU
TLR3asiRNA S(4)	GCCCUUAAAAAUGUGG	TLR3asiRNA AS(4)	CCACAUUUUUAAGGGCCACCC
TLR3asiRNA S(5)	CCCUUAAAAAUGUGGA	TLR3asiRNA AS(5)	UCCACAUUUUUAAGGGCCACC
TLR3asiRNA S(6)	CCUUAAAAAUGUGGAU	TLR3asiRNA AS(6)	AUCCACAUUUUUAAGGGCCAC
TLR3asiRNA S(7)	CUUAAAAAUGUGGAUA	TLR3asiRNA AS(7)	UAUCCACAUUUUUAAGGGCCA
TLR3asiRNA S(8)	UCGUAAUUGACCAUU	TLR3asiRNA AS(8)	AAUGGUCAAGUUACGAAGAGG
TLR3asiRNA S(9)	CGUAAUUGACCAUUC	TLR3asiRNA AS(9)	GAAUGGUCAAGUUACGAAGAG
TLR3asiRNA S(10)	GUAACUUGACCAUUCU	TLR3asiRNA AS(10)	AGAAUGGUCAAGUUACGAAGA
TLR3asiRNA S(11)	UAACUUGACCAUUCUG	TLR3asiRNA AS(11)	CAGAAUGGUCAAGUUACGAAG
TLR3asiRNA S(12)	AACUUGACCAUUCUGG	TLR3asiRNA AS(12)	CCAGAAUGGUCAAGUUACGAA
TLR3asiRNA S(13)	ACUUGACCAUUCUGGA	TLR3asiRNA AS(13)	UCCAGAAUGGUCAAGUUACGA

[0157]

TLR3asiRNA S(14)	AACAACAACAUAGCCA	TLR3asiRNA AS(14)	UGGCUAUGUUGUUGUUGCUUA
TLR3asiRNA S(15)	ACAACAACAAGCCAA	TLR3asiRNA AS(15)	UUGGCUAUGUUGUUGUUGCUU
TLR3asiRNA S(16)	CAACAACAAGCCAAC	TLR3asiRNA AS(16)	GUUGGCUAUGUUGUUGUUGCU
TLR3asiRNA S(17)	AACAACAAGCCAACA	TLR3asiRNA AS(17)	UGUUGGCUAUGUUGUUGUUGC
TLR3asiRNA S(18)	ACAACAAGCCAACAU	TLR3asiRNA AS(18)	AUGUUGGCUAUGUUGUUGUUG
TLR3asiRNA S(19)	CAACAAGCCAACAU	TLR3asiRNA AS(19)	UAUGUUGGCUAUGUUGUUGUU
TLR3asiRNA S(20)	AACAUAGCCAACAUAA	TLR3asiRNA AS(20)	UUAUGUUGGCUAUGUUGUUGU
TLR3asiRNA S(21)	ACAUAGCCAACAUA	TLR3asiRNA AS(21)	UUUAUGUUGGCUAUGUUGUUG
TLR3asiRNA S(22)	AUAGCCAACAUAUAAUG	TLR3asiRNA AS(22)	CAUUUAUGUUGGCUAUGUUGU
TLR3asiRNA S(23)	UAGCCAACAUAUAAUGA	TLR3asiRNA AS(23)	UCAUUUAUGUUGGCUAUGUUG
TLR3asiRNA S(24)	AAUCUCUCAAUUUUUG	TLR3asiRNA AS(24)	CAAAAUUUAGAGAUUGGUCU
TLR3asiRNA S(25)	UGCACUCUGUUUGCGA	TLR3asiRNA AS(25)	UCGCAAACAGAGUGCAUGGUU
TLR3asiRNA S(26)	GCACUCUGUUUGCGAA	TLR3asiRNA AS(26)	UUCGCAAACAGAGUGCAUGGU
TLR3asiRNA S(27)	CACUCUGUUUGCGAAG	TLR3asiRNA AS(27)	CUUCGCAAACAGAGUGCAUGG
TLR3asiRNA S(28)	ACUCUGUUUGCGAAGA	TLR3asiRNA AS(28)	UCUUCGCAAACAGAGUGCAUG
TLR3asiRNA S(29)	CUCUGUUUGCGAAGAG	TLR3asiRNA AS(29)	CUCUUCGCAAACAGAGUGCAU
TLR3asiRNA S(30)	UCUGUUUGCGAAGAGG	TLR3asiRNA AS(30)	CCUCUUCGCAAACAGAGUGCA
TLR3asiRNA S(31)	CUGUUUGCGAAGAGGA	TLR3asiRNA AS(31)	UCCUCUUCGCAAACAGAGUGC
TLR3asiRNA S(32)	UGUUUGCGAAGAGGAA	TLR3asiRNA AS(32)	UUCCUCUUCGCAAACAGAGUG
TLR3asiRNA S(33)	GUUUGCGAAGAGGAAU	TLR3asiRNA AS(33)	AUUCUCUUCGCAAACAGAGU
TLR3asiRNA S(34)	UUUGCGAAGAGGAAUG	TLR3asiRNA AS(34)	CAUUCUCUUCGCAAACAGAG
TLR3asiRNA S(35)	UUGCGAAGAGGAAUGU	TLR3asiRNA AS(35)	ACAUUCUCUUCGCAAACAGA
TLR3asiRNA S(36)	UGCGAAGAGGAAUGUU	TLR3asiRNA AS(36)	AACAUUCUCUUCGCAAACAG
TLR3asiRNA S(37)	GCGAAGAGGAAUGUUU	TLR3asiRNA AS(37)	AAACAUUCUCUUCGCAAACA
TLR3asiRNA S(38)	CGAAGAGGAAUGUUUA	TLR3asiRNA AS(38)	UAAACAUUCUCUUCGCAAAC
TLR3asiRNA S(39)	GAAGAGGAAUGUUUAA	TLR3asiRNA AS(39)	UUAAACAUUCUCUUCGCAAA
TLR3asiRNA S(40)	AAGAGGAAUGUUUAAA	TLR3asiRNA AS(40)	UUUAAACAUUCUCUUCGCAA
TLR3asiRNA S(41)	AGAGGAAUGUUUAAU	TLR3asiRNA AS(41)	AUUUAAACAUUCUCUUCGCA
TLR3asiRNA S(42)	GAGGAAUGUUUAAUUC	TLR3asiRNA AS(42)	GAUUUAAACAUUCUCUUCGCG
TLR3asiRNA	AGGAAUGUUUAAUUCU	TLR3asiRNA	AGAUUUAAACAUUCUCUUCG

[0158]



S(43)		AS(43)	
TLR3asiRNA S(44)	GGAAUGUUUAAAUCUC	TLR3asiRNA AS(44)	GAGAUUUAAACAUCCUCUUC
TLR3asiRNA S(45)	CUUGAACUGGCCAGUU	TLR3asiRNA AS(45)	AACUGGCCAGUUCAAGAUGCA
TLR3asiRNA S(46)	UUGAACUGGCCAGUUC	TLR3asiRNA AS(46)	GAACUGGCCAGUUCAAGAUGC
TLR3asiRNA S(47)	UGAACUGGCCAGUUCA	TLR3asiRNA AS(47)	UGAACUGGCCAGUUCAAGAUG
TLR3asiRNA S(48)	GAACUGGCCAGUUCAG	TLR3asiRNA AS(48)	CUGAACUGGCCAGUUCAAGAU
TLR3asiRNA S(49)	AACUGGCCAGUUCAGA	TLR3asiRNA AS(49)	UCUGAACUGGCCAGUUCAAGA
TLR3asiRNA S(50)	ACUGGCCAGUUCAGAA	TLR3asiRNA AS(50)	UUCUGAACUGGCCAGUUCAAG
TLR3asiRNA S(51)	CUGGCCAGUUCAGAAA	TLR3asiRNA AS(51)	UUUCUGAACUGGCCAGUUCAA
TLR3asiRNA S(52)	UGGCCAGUUCAGAAAAG	TLR3asiRNA AS(52)	CUUUCUGAACUGGCCAGUUCA
TLR3asiRNA S(53)	GGCCAGUUCAGAAAAGA	TLR3asiRNA AS(53)	UCUUUCUGAACUGGCCAGUUC
TLR3asiRNA S(54)	GCCAGUUCAGAAAAGAA	TLR3asiRNA AS(54)	UUCUUUCUGAACUGGCCAGUU
TLR3asiRNA S(55)	CCAGUUCAGAAAAGAAC	TLR3asiRNA AS(55)	GUUCUUUCUGAACUGGCCAGU
TLR3asiRNA S(56)	CAGUUCAGAAAAGAACG	TLR3asiRNA AS(56)	CGUUCUUUCUGAACUGGCCAG
TLR3asiRNA S(57)	AGUUCAGAAAAGAACGG	TLR3asiRNA AS(57)	CCGUUCUUUCUGAACUGGCCA
TLR3asiRNA S(58)	GUUCAGAAAAGAACGGA	TLR3asiRNA AS(58)	UCCGUUCUUUCUGAACUGGCC
TLR3asiRNA S(59)	UUCAGAAAAGAACGGAU	TLR3asiRNA AS(59)	AUCCGUUCUUUCUGAACUGGC
TLR3asiRNA S(60)	UCAGAAAAGAACGGAUA	TLR3asiRNA AS(60)	UAUCCGUUCUUUCUGAACUGG
TLR3asiRNA S(61)	AAUUGCAAGUAGCACU	TLR3asiRNA AS(61)	AGUGCUACUUGCAAUUUAUGA
TLR3asiRNA S(62)	AUUGCAAGUAGCACUU	TLR3asiRNA AS(62)	AAGUGCUACUUGCAAUUUAUG
TLR3asiRNA S(63)	UUGCAAGUAGCACUUG	TLR3asiRNA AS(63)	CAAGUGCUACUUGCAAUUUAU
TLR3asiRNA S(64)	UGCAAGUAGCACUUGG	TLR3asiRNA AS(64)	CCAAGUGCUACUUGCAAUUUA
TLR3asiRNA S(65)	GCAAGUAGCACUUGGA	TLR3asiRNA AS(65)	UCCAAGUGCUACUUGCAAUUU
TLR3asiRNA S(66)	CAAGUAGCACUUGGAU	TLR3asiRNA AS(66)	AUCCAAGUGCUACUUGCAAUU
TLR3asiRNA S(67)	AAGUAGCACUUGGAUC	TLR3asiRNA AS(67)	GAUCCAAGUGCUACUUGCAAU
TLR3asiRNA S(68)	UGCCCCCUUGAACUC	TLR3asiRNA AS(68)	GAGUUCAAAGGGGGCACUGUC
TLR3asiRNA S(69)	UCUGGGAACAUUUCUC	TLR3asiRNA AS(69)	GAGAAAUGUCCAGACCCAA
TLR3asiRNA S(70)	CAGCAUCAAAGAAGC	TLR3asiRNA AS(70)	GCUUCUUUUGAUGCUGUUAAC
TLR3asiRNA S(71)	CACGUGUGAAAGUAUU	TLR3asiRNA AS(71)	AAUACUUUCACACGUGCAAUC
TLR3asiRNA S(72)	GUCUCACCUCCACAUC	TLR3asiRNA AS(72)	GAUGUGGAGGUGAGACAGACC

[0159]

TLR3asiRNA S(73)	UGUCUCACCUCCACAU	TLR3asiRNA AS(73)	AUGUGGAGGUGAGACAGACCC
TLR3asiRNA S(74)	AGAUUCAAGGUACAUC	TLR3asiRNA AS(74)	GAUGUACCUUGAAUCUUUUGC
TLR3asiRNA S(75)	GGAAACACGCAAACCC	TLR3asiRNA AS(75)	GGGUUUGCGUGUUUCCAGAGC
TLR3asiRNA S(76)	UGGAAACACGCAAACC	TLR3asiRNA AS(76)	GGUUUGCGUGUUUCCAGAGCC
TLR3asiRNA S(77)	UUGAGAAACUAGAAAU	TLR3asiRNA AS(77)	AUUUCUAGUUUCUAGAGCCC
TLR3asiRNA S(78)	CUUGAGAAACUAGAAA	TLR3asiRNA AS(78)	UUUCUAGUUUCUAGAGCCCU
TLR3asiRNA S(79)	AACAUCCGUUGAGAAG	TLR3asiRNA AS(79)	CUUCUCAACGGAUGUUAUGAG
TLR3asiRNA S(80)	GUGCCCCCUUGAACU	TLR3asiRNA AS(80)	AGUUCAAAGGGGGCACUGUCU
TLR3asiRNA S(81)	AGUGCCCCCUUGAAC	TLR3asiRNA AS(81)	GUUCAAGGGGGCACUGUCUU
TLR3asiRNA S(82)	CAGUGCCCCCUUGAA	TLR3asiRNA AS(82)	UUCAAGGGGGCACUGUCUUU
TLR3asiRNA S(83)	GGAGGAUAUCUUUUUA	TLR3asiRNA AS(83)	UAAAAAGAUAUCCUCCAGCCC
TLR3asiRNA S(84)	UGGAGGAUAUCUUUUU	TLR3asiRNA AS(84)	AAAAAGAUAUCCUCCAGCCCU
TLR3asiRNA S(85)	ACUGAACCAUGCACUC	TLR3asiRNA AS(85)	GAGUGCAUGGUUCAGUUUAUA
TLR3asiRNA S(86)	UGAACCAUGCACUCUG	TLR3asiRNA AS(86)	CAGAGUGCAUGGUUCAGUUUA
TLR3asiRNA S(87)	GAACCAUGCACUCUGU	TLR3asiRNA AS(87)	ACAGAGUGCAUGGUUCAGUUU
TLR3asiRNA S(88)	AACCAUGCACUCUGUU	TLR3asiRNA AS(88)	AACAGAGUGCAUGGUUCAGUU
TLR3asiRNA S(89)	ACCAUGCACUCUGUUU	TLR3asiRNA AS(89)	AAACAGAGUGCAUGGUUCAGU
TLR3asiRNA S(90)	CCAUGCACUCUGUUUG	TLR3asiRNA AS(90)	CAAACAGAGUGCAUGGUUCAG
TLR3asiRNA S(91)	CAUGCACUCUGUUUGC	TLR3asiRNA AS(91)	GCAAACAGAGUGCAUGGUUCA
TLR3asiRNA S(92)	CUGCAUCUUGAACUGG	TLR3asiRNA AS(92)	CCAGUUCAAGAUGCAGUGAGA
TLR3asiRNA S(93)	ACUGCAUCUUGAACUG	TLR3asiRNA AS(93)	CAGUUCAAGAUGCAGUGAGAU
TLR3asiRNA S(94)	CACUGCAUCUUGAACU	TLR3asiRNA AS(94)	AGUUCAAGAUGCAGUGAGAUU
TLR3asiRNA S(95)	UCACUGCAUCUUGAAC	TLR3asiRNA AS(95)	GUUCAAGAUGCAGUGAGAUUU
TLR3asiRNA S(96)	UAAAUUGCAAGUAGCA	TLR3asiRNA AS(96)	UGCUACUUGCAAUUUAUGACG
TLR3asiRNA S(97)	AUAAAUUGCAAGUAGC	TLR3asiRNA AS(97)	GCUACUUGCAAUUUAUGACGA
TLR3asiRNA S(98)	CGUCAUAAAUUGCAAG	TLR3asiRNA AS(98)	CUUGCAAUUUAUGACGAAAGG
TLR3asiRNA S(99)	UCGUCAUAAAUUGCAA	TLR3asiRNA AS(99)	UUGCAAUUUAUGACGAAAGGC
TLR3asiRNA S(100)	UUCGUCAUAAAUUGCA	TLR3asiRNA AS(100)	UGCAAUUUAUGACGAAAGGCA

[0160]

[0161]

표 7에 열거된 asiRNA를 어닐링 버퍼(바이오니어 인크.(Bioneer Inc.), 대한민국)에서 95℃에서 2분동안 그리고 37℃에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 왜 어닐링은 UV 투과조명기를 이용하여 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 스크린을 위하여, 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(FBS, 김코) 및 100 units/ml 페니실린 및 100µg/ml 스트렙토마이신을 함유한 돌베코스 변형 이글스 배지(DMEM, 김코)에서 배양된 5X10<sup>3</sup> HaCaT 세포(ATCC)를 96웰 플레이트에 접종하였다. HaCaT 세포를 제조사의 설명서에 따라 RNAiMAX(인비트로젠 인크.)를 이용하여 0.1 nM의 asiRNA로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포에서 TLR3 mRNA 수준을 형질감염 후 24시간에 qRT-PCR을 이용하여 측정하였다. 구체적으로, 전체 RNA를 토요보(TOYOBO) 용해 시약을 이용하여 추출한 후, 반응 혼합물의 1/5 부피를 토요보 RT 시약(토요보 수퍼프랩(SuperPrep))을 이용한 cDNA 합성을 위해 이용하였다. 합성된 cDNA를 희석한 후, 정량적 RT-PCR을 선더버드(THUNDERBIRD)® Probe qPCR Mix(토요보)를 이용하여 수행하였다. 타겟 유전자의 증폭은 TLR3 택맨(TaqMan)® Probe (Hs01551078\_m1) 및 18S 택맨® Probe (Hs03928985\_g1)를 이용하여 검출하였다.

[0162]

100가지의 asiRNA의 각각에 의한 TLR3 억제의 발현 수준이 도 12에 제공된다. asiRNA 서열 중 17가지인 asiRNA (13), asiRNA (25), asiRNA (26), asiRNA (28), asiRNA (32), asiRNA (33), asiRNA (37), asiRNA (38), asiRNA (39), asiRNA (53), asiRNA (58), asiRNA (60), asiRNA (71), asiRNA (77), asiRNA (78), asiRNA (82) 및 asiRNA (83)을 후속 연구에서 사용하기 위해 선택하였다.

[0163]

[0164]

실시예 13: 자가-전달을 위한 asiRNA의 화학적 변형

[0165]

실시예 12에서 선택된 asiRNA에 화학적 변형을 적용하고, 변형된 asiRNA의 세포 전달을 다른 전달 비히클의 부재하에서 시험하였다. 하기에 개시된 바처럼, 일부 변형은 엔도사이토시스 및 asiRNA의 안정성을 개선하였다. 그러한 세포 침투 asiRNA(cp-asiRNAs)는 전달 비히클의 부재하에서 세포내로 전달될 수 있다. 상기에 개시한 방법을 이용하여 결정된, 세포에 의한 TLR3 mRNA의 발현은 도 13 및 14에 제공되며 TLR3 단백질 수준이 도 15에 제공된다. 세포의 형태학은 도 16에 도시된다.

[0166]

HaCaT 세포에서 톨-유사 수용체 3(TLR3) mRNA 억제에 대해 잠재적 cp-asiRNA(표 8)를 스크리닝하였다. 각각의 잠재적 cp-asiRNA를 전달 비히클없이 1  $\mu$ M 및 3  $\mu$ M에서 인간 피부 각질세포 세포주인 HaCaT 세포와 항온처리하고, qRT-PCR 및 웨스턴 블롯 연구에 의해 TLR3 발현 수준을 측정하였다.

[0167]

표 8: 자가-전달 및 TLR3 억제에 대해 시험된 변형된 asiRNA 서열. (m= 2'-O-메틸 RNA. \*= 포스포로티오에이트 결합)

명 칭	센스 (5' to 3')
TLR3cp-asiRNA S 25	mUGmCmCUmCUmGUUmGC*mG*A* 클레스테롤
TLR3cp-asiRNA AS 25(2,4)	UCGCAAACAGAGUGmCmAU*G*G*U*U
TLR3cp-asiRNA AS 25(4,4)	UCGCAAACAGAGUGmCmAUmU*mG*G*U*U
TLR3cp-asiRNA AS 25(7,4)	UCGCAAACAGAGUGmCmAUmU*mG*mG*mU*mU
TLR3cp-asiRNA S 28	mACmUCmUGmUUmUGmCGmAA*mG*A* 클레스테롤
TLR3cp-asiRNA AS 28(2,4)	UCUUCGCAAACAGAmGmUG*C*A*U*G
TLR3cp-asiRNA AS 28(4,4)	UCUUCGCAAACAGAmGmUmG*mC*A*U*G
TLR3cp-asiRNA AS 28(7,4)	UCUUCGCAAACAGAmGmUmG*mC*mA*mU*mG
TLR3cp-asiRNA S 32	mUGmUUmUGmCGmAAmGAmGG*mA*A* 클레스테롤
TLR3cp-asiRNA AS 32(2,4)	UUCCUCUUCGCAAAmCmAG*A*G*U*G
TLR3cp-asiRNA AS 32(4,4)	UUCCUCUUCGCAAAmCmAmG*mA*G*U*G
TLR3cp-asiRNA AS 32(7,4)	UUCCUCUUCGCAAAmCmAmG*mA*mG*mU*mG
TLR3cp-asiRNA S 33	mGUUmUUmGCmGAmAGmAGmGA*mA*U* 클레스테롤
TLR3cp-asiRNA AS 33(2,4)	AUUCCUCUUCGCAAmAmCA*G*A*G*U
TLR3cp-asiRNA AS 33(4,4)	AUUCCUCUUCGCAAmAmCmA*mG*A*G*U
TLR3cp-asiRNA AS 33(7,4)	AUUCCUCUUCGCAAmAmCmA*mG*mA*mG*mU
TLR3cp-asiRNA S 39	mGAmAGmAGmGAmAUmGUUmU*mA*A* 클레스테롤
TLR3cp-asiRNA AS 39(2,4)	UUAACAUAUCCUCUmUmCG*C*A*A*A
TLR3cp-asiRNA AS 39(4,4)	UUAACAUAUCCUCUmUmCmG*mC*A*A*A
TLR3cp-asiRNA AS 39(7,4)	UUAACAUAUCCUCUmUmCmG*mC*mA*mA*mA
TLR3cp-asiRNA S 53	mGGmCCmAGmUUmCmAGmAA*mG*A* 클레스테롤
TLR3cp-asiRNA AS 53(2,4)	UCUUCUGAACUGGmCmCA*G*U*U*C
TLR3cp-asiRNA AS 53(4,4)	UCUUCUGAACUGGmCmCmA*mG*U*U*C
TLR3cp-asiRNA AS 53(7,4)	UCUUCUGAACUGGmCmCmA*mG*mU*mU*mC
TLR3cp-asiRNA S 58	mGUUmCmAGmAAmAGmAAmCG*mG*A* 클레스테롤
TLR3cp-asiRNA AS 58(2,4)	UCCGUUCUUUCUGAmAmCU*G*G*C*C
TLR3cp-asiRNA AS 58(4,4)	UCCGUUCUUUCUGAmAmCmU*mG*G*C*C
TLR3cp-asiRNA AS 58(7,4)	UCCGUUCUUUCUGAmAmCmU*mG*mG*mC*mC
TLR3cp-asiRNA S 60	mUCmAGmAAmAGmAAmCGmGA*mU*A* 클레스테롤
TLR3cp-asiRNA AS 60(2,4)	UAUCCGUUCUUUCUmGmA*A*C*U*G*G
TLR3cp-asiRNA AS 60(4,4)	UAUCCGUUCUUUCUmGmA*A*mC*U*G*G
TLR3cp-asiRNA AS 60(7,4)	UAUCCGUUCUUUCUmGmA*A*mC*mU*mG*mG

[0168]

[0169]

HaCaT 세포(ATCC)를 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(FBS, 기코) 및 100 units/ml 페니실린 및 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(DMEM, 기코)에서 배양하였다. 표 8에 열거된 잠재적인 cp-asiRNA를 OPTI-MEM(기코)에서 95°C에서 2분 동안 그리고 37°C에서 1시간동안 항온처리하였다. 잠재적인 cp-asiRNA의 적절한 쇄 어닐링은 젤 전기영동에 의해 확인하였다.

[0170]

cp-asiRNA 처리일에,  $5 \times 10^4$  세포를 24-웰 플레이트에 접종한 후, OPTI-MEM에서 잠재적 cp-asiRNA의 존재하에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 cp-asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다. 24시간 후, HaCaT 세포 내의 TLR3 mRNA 수준을 qRT-PCR을 이용하여 결정하였다. 구체적으로, RNAiPlus®(타카라)를 이용하

여 전체 RNA를 추출한 후, 500 ng의 반응 혼합물을 이용하여 고성능 cDNA 역전사 키트(어플라이드 바이오시스템즈)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 희석한 후, 파워 SYBR 그린 PCR Master mix(어플라이드 바이오시스템즈)를 이용하여 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 하기 프라이머 서열을 이용하였다:

**표 9: 프라이머 서열**

명칭	전방 역방	서열 (5'-3')	크기
인간 GAPDH	전방	GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT	186
	역방	GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG	
인간 TLR3 (통·유사 수용체 3)	전방	TGC CCC CTT TGA ACT CTT TT	298
	역방	AAA AAC ACC CGC CTC AAA GT	

cp-asiRNA 항온처리 48시간 후, TLR3 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통해 결정하였다. 요약하면, 처리된 HaCaT 세포를 포유동물 단백질 추출 버퍼(지이 헬스케어(GE Healthcare))를 이용하여 용해시켰다. 10 $\mu$ g의 전체 단백질 추출물을 8% SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 120 V에서 전기영동하였다. 전기영동 후, 단백질을 300 mA에서 1시간 동안 메탄올(머크)에 의해 이미 활성화된 PVDF 막(바이오-라드)으로 옮겼다. 5% 탈지유(서울 우유)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 막을 차단한 후, 항-TLR3 항체(앱캠) 및 항- $\gamma$ -튜불린 항체(베틸)를 함유한 5% 탈지유에서 4℃에서 밤새 항온처리하였다. 그 후 막을 10분동안 TBST로 3회 세척하고 HRP-접합된 이차 항체(산타 크루즈)를 가진 5% 탈지유에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 막을 10분 동안 TBST로 세척하고 ECL 기질(썬도 사이언티픽(Thermo scientific))로 처리하였다. 그 후, 케미독 장비(바이오-라드)를 이용하여 타겟 단백질 밴드를 영상화하였다.

24개의 잠재적인 cp-asiRNA의 각각에 의한 TLR3 억제 수준이 도 17 및 18에 제공된다. 시험된 잠재적 cp-asiRNA 중에서, cp-asiTLR3 39(2, 4)을 후속 연구를 위해 선택하였다.

#### 실시예 14: 추가의 TLR3 cp-asiRNA 구조

상이한 쇠 길이를 가진 다른 잠재적 cp-asiTLR3 구조를 합성하여 TLR3 발현을 억제하는 그 능력에 대해 시험하였다(표 10).

**표 10: 추가의 cp-asiRNA 서열(m= 2'-O-메틸 RNA. \*= 포스포로티오에이트 결합).**

명칭	서열 (5' to 3')
TLR3cp-asiRNA S 39	mGAmAGmAGmGAmAUmGUmUU*mA*A* 콜레스테롤
TLR3cp-asiRNA AS 39 (19)	UUAAACAUCCUCUmU*mC*G*C*A
TLR3cp-asiRNA AS 39(2,4)	UUAAACAUCCUCUmUmCG*C*A*A*A

표 10에 열거된 잠재적 cp-asiRNA 각각의 투여량에 따른 HaCaT 세포 내의 TLR3 발현을 억제하는 능력을 시험하였다. HaCaT 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS, 김코) 및 100 units/ml 페니실린과 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신을 함유한 돌베코스 변형 이글스 배지(DMEM, 김코)에서 배양하였다. 표 10에 열거된 잠재적인 cp-asiRNA를 OPTI-MEM(김코)에서 95℃에서 2분 동안 그리고 37℃에서 1시간동안 항온처리하였다. 잠재적인 cp-asiRNA의 적절한 쇠 어닐링은 겔 전기영동을 통해 확인하였다. cp-asiRNA 처리일에, 5 x 10<sup>4</sup> 세포를 24-웰 플레이트에 접종한 후, OPTI-MEM에서 잠재적 cp-asiRNA의 존재하에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 cp-asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다. 24시간 후, HaCaT 세포 내의 TLR3 발현 수준을 결정하였다.

도 19에 나타난 대로, 21 뉴클레오타이드 안티센스 쇠로 이루어진 TLR3 발현 잠재적 cp-asiRNA 및 19 뉴클레오타이드 안티센스 쇠로 이루어진 잠재적 cp-asiRNA는 유사한 수준의 TLR3 억제를 나타냈다. cp-asiTLR3 (39) 21 및 cp-asiTLR3 (39) 19를 추가 실험을 위해 선택하였다.

TLR3 단백질의 생산에 대한 저농도의 cp-asiTLR3 (39) 21 및 cp-asiTLR3 (39) 19의 효능을 시험하였다. cp-asiRNA를 OPTI-MEM(김코)에서 95℃에서 2분 동안 그리고 37℃에서 1시간동안 항온처리하였다. 잠재적인 cp-asiRNA의 적절한 쇠 어닐링은 겔 전기영동을 통해 확인하였다. HaCaT 세포(ATCC)를 10% 태아 소 혈청(FBS, 김코) 및 100 units/ml 페니실린과 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신을 함유한 돌베코스 변형 이글스 배지(DMEM, 김코)에서 배양하였다. 처리일에, 5 x 10<sup>4</sup> HaCaT 세포를 12-웰 플레이트에 접종한 후, OPTI-MEM에서 잠재적 cp-



asiRNA의 존재하에서 배양하였다.

[0183] 24시간 후, HaCaT 내의 TLR3 단백질 수준을 웨스턴 블롯을 통해 결정하였다. 요약하면, 처리된 HaCaT 세포를 포유동물 단백질 추출 버퍼(지이 헬스케어)를 이용하여 용해시켰다. 10 $\mu$ g의 전체 단백질 추출물을 8% SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 120 V에서 전기영동하였다. 전기영동 후, 단백질을 300 mA에서 1시간 동안 메탄올(머크)에 의해 이미 활성화된 PVDF 막(바이오-라드)으로 옮겼다. 5% 탈지유(서울 우유)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 막을 차단한 후, 항-TLR3 항체(애플) 및 항- $\gamma$ -튜불린 항체(베틸)를 함유한 5% 탈지유에서 4℃에서 밤새 항온처리하였다. 그 후 막을 10분동안 TBST로 3회 세척하고 HRP-접합된 이차 항체(산타 크루즈)를 가진 5% 탈지유에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 막을 10분 동안 TBST로 세척하고 ECL 기질(써모 사이언티픽)로 처리하였다. 그 후, 케미독 장비(바이오-라드)를 이용하여 타겟 단백질 밴드를 영상화하였다.

[0184] 도 20에 나타난 대로, 21 뉴클레오타이드 안티센스 쇄를 가진 TLR3 발현 잠재적 cp-asiRNA 및 19 뉴클레오타이드 안티센스 쇄를 가진 잠재적 cp-asiRNA가 저 농도에서 유사한 수준의 TLR3 억제를 나타냈다.

[0185] **참고에 의한 포함**

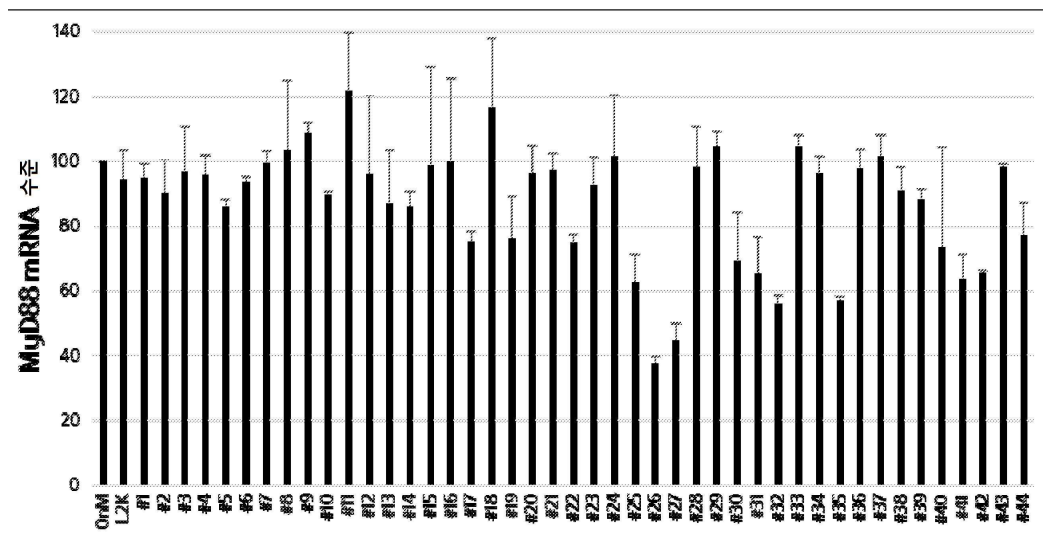
[0186] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 나타내진 것처럼 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 상충되는 경우, 본 명세서의 임의의 정의를 비롯한 본 출원이 우선할 것이다.

[0187] 균등물

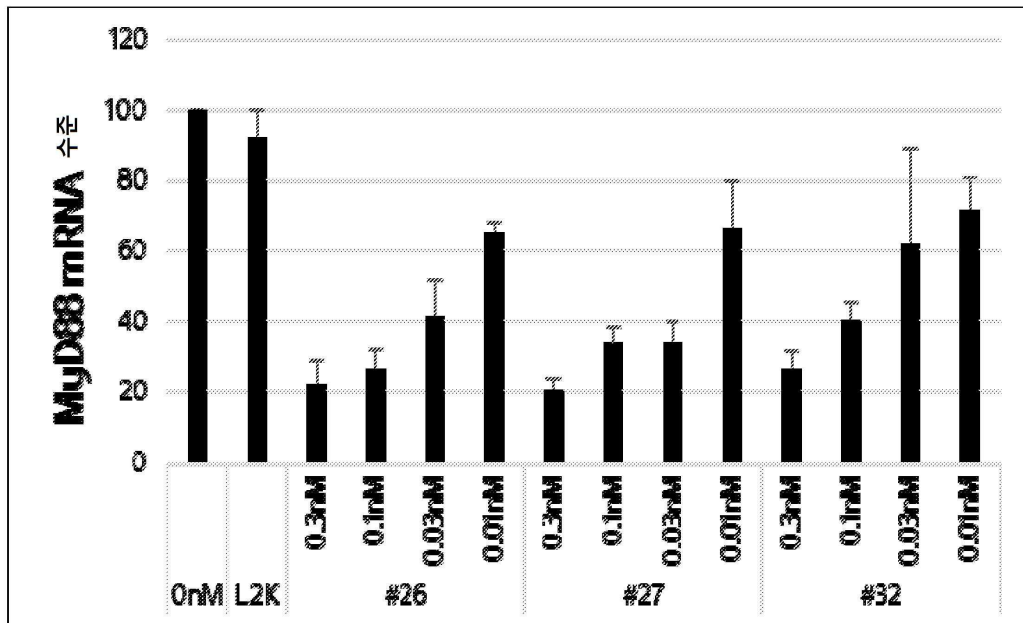
[0188] 당업자는 일상적 실험을 이용하여 본 명세서에 개시된 발명의 구체적 실시형태에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 균등물은 하기 청구범위에 의해 포함되는 것이다.

## 도면

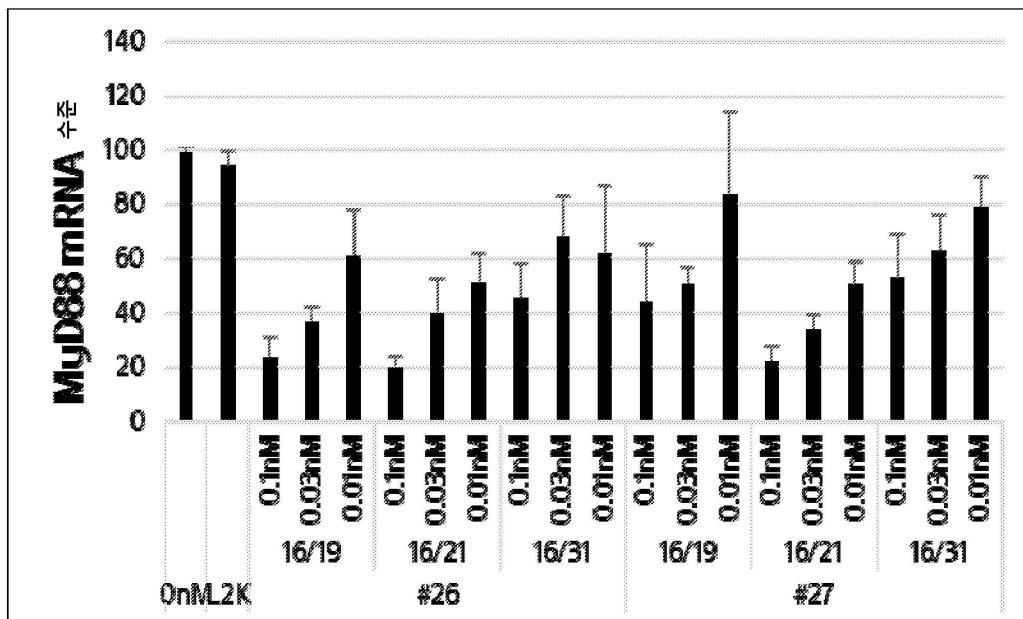
### 도면1



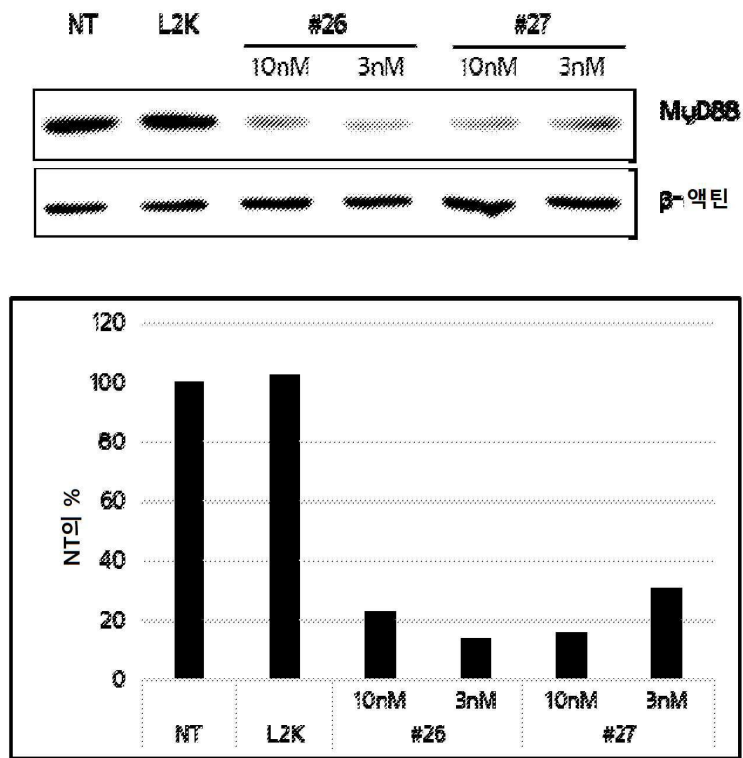
도면2



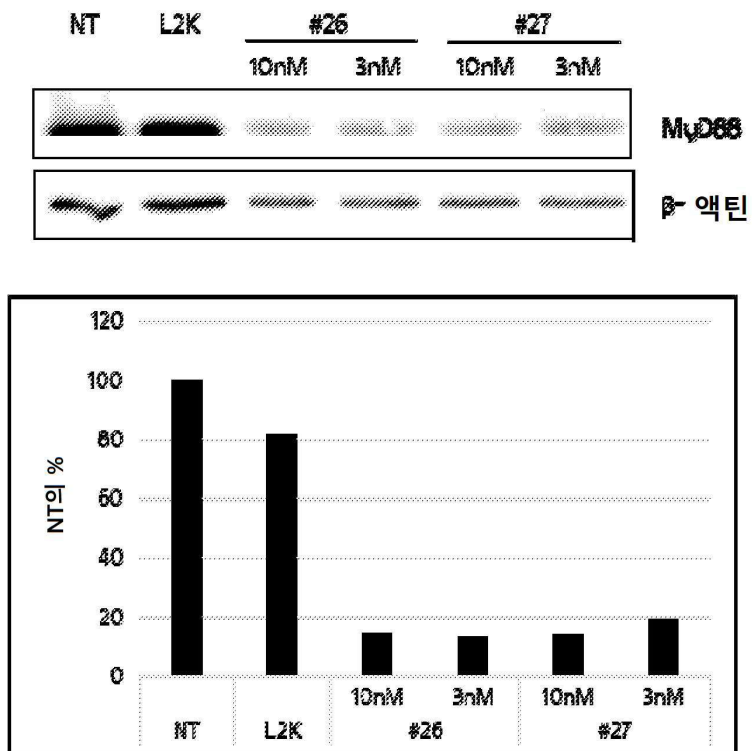
도면3



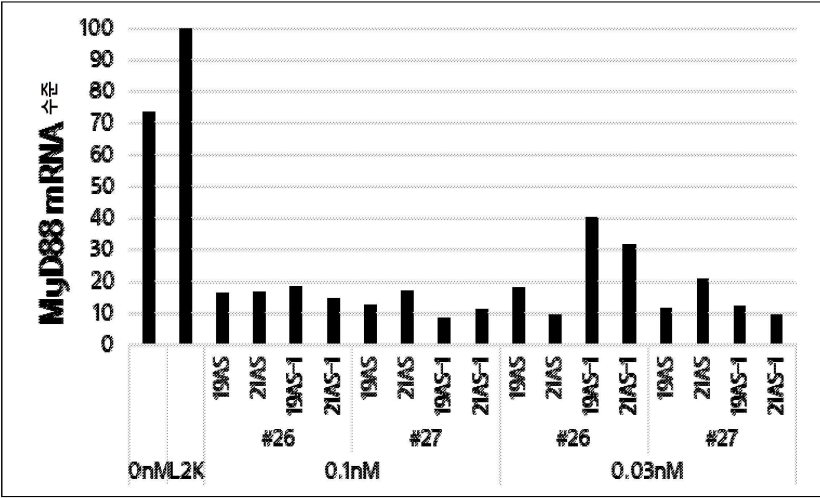
도면4a



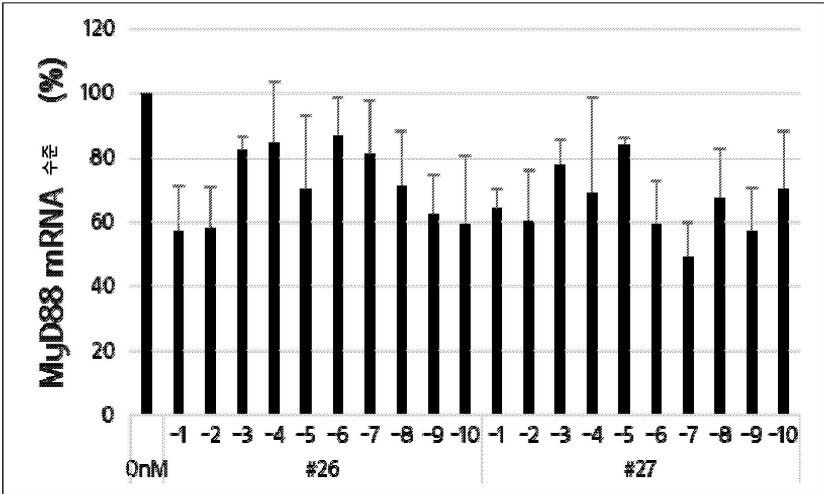
도면4b



도면5

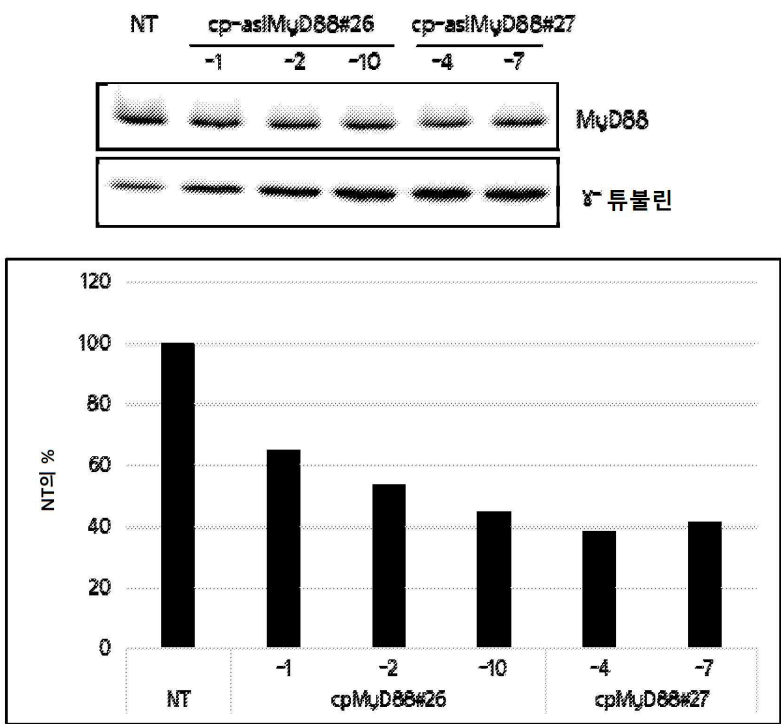


도면6

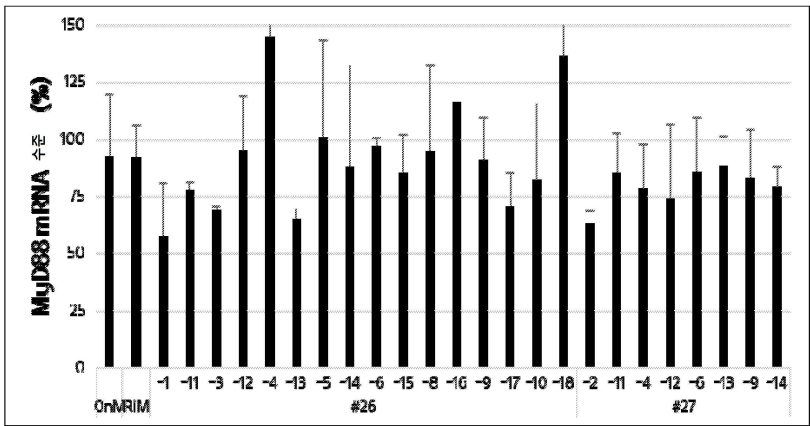




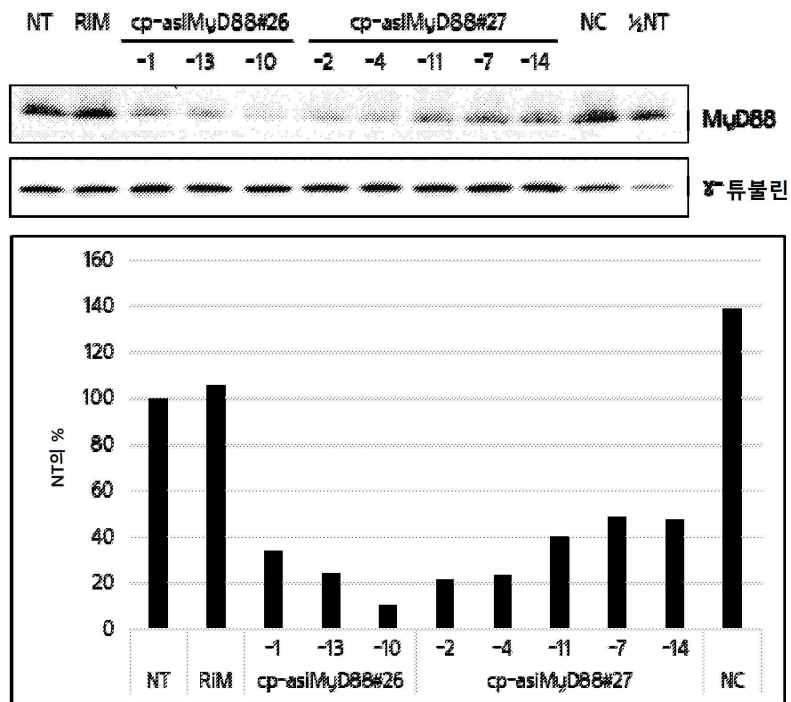
도면7



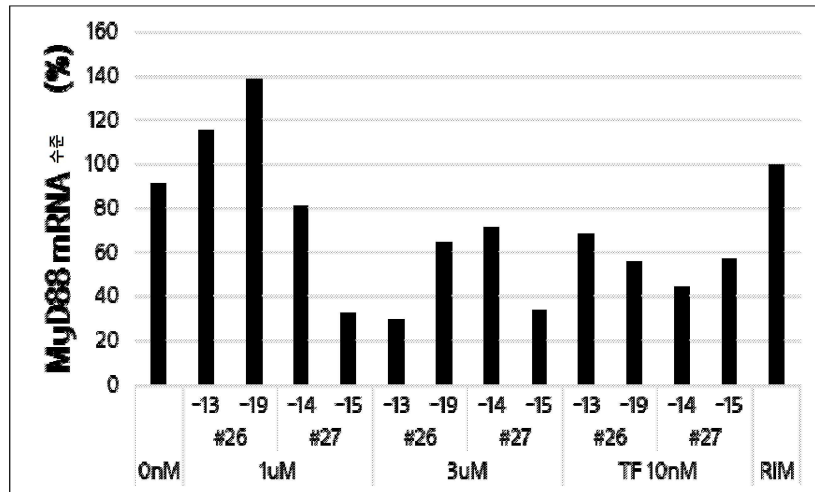
도면8



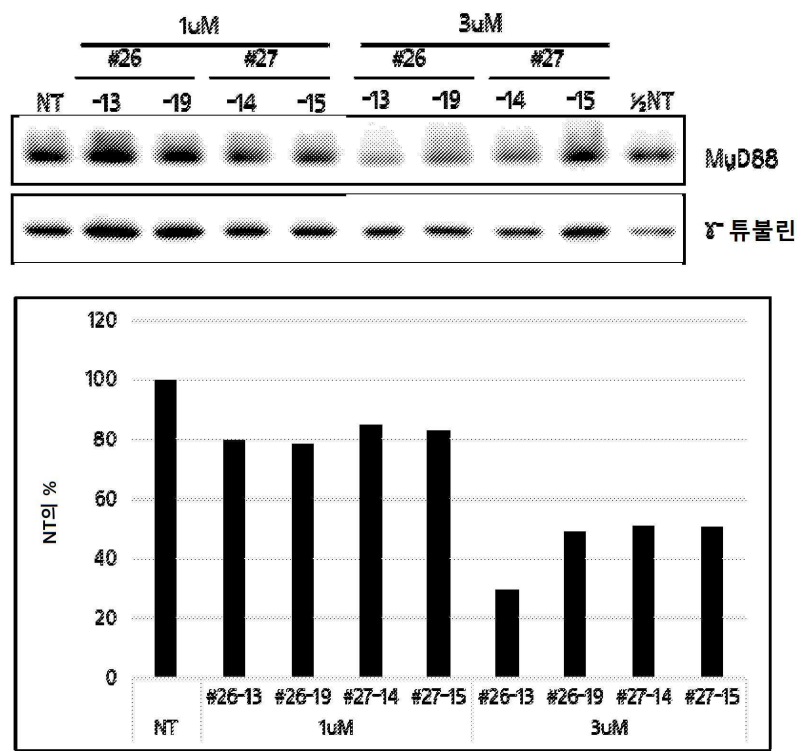
도면9



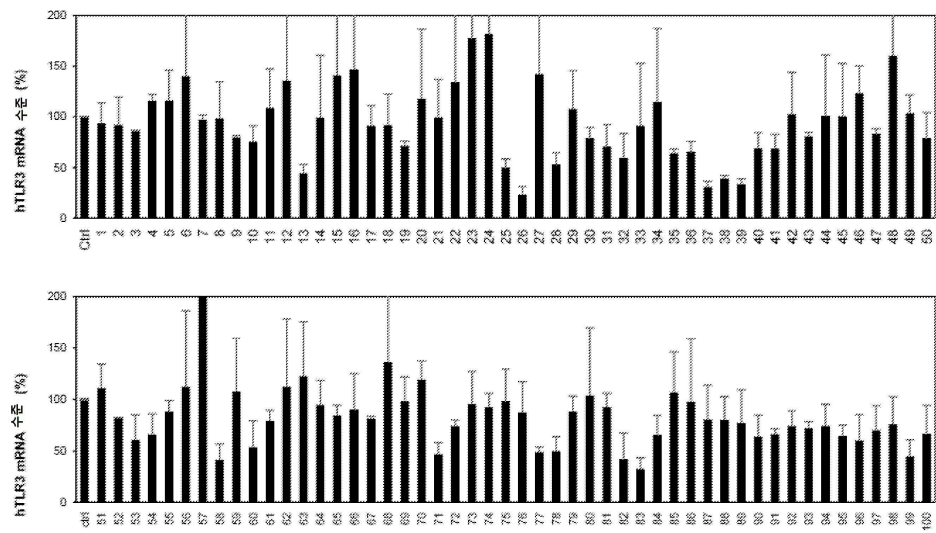
도면10



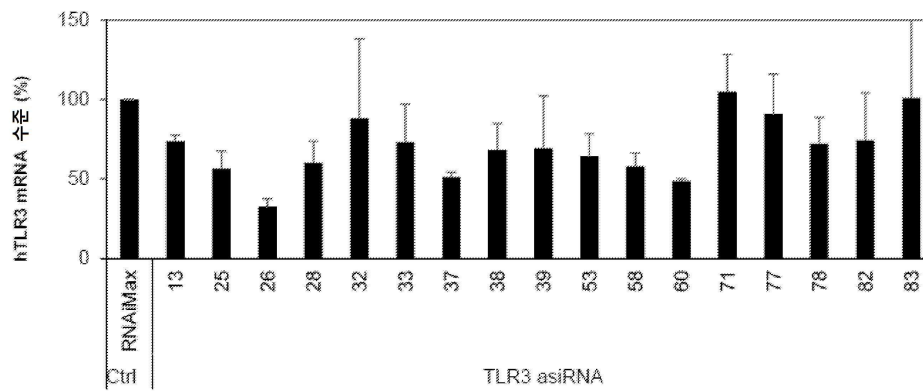
도면11



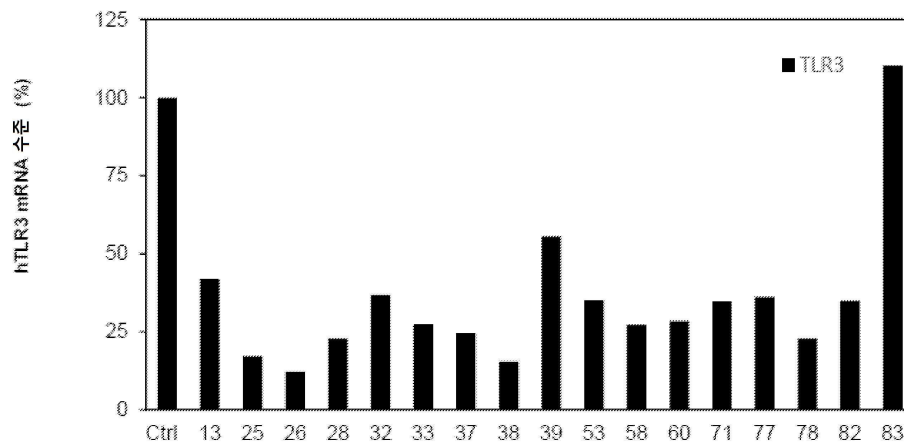
도면12



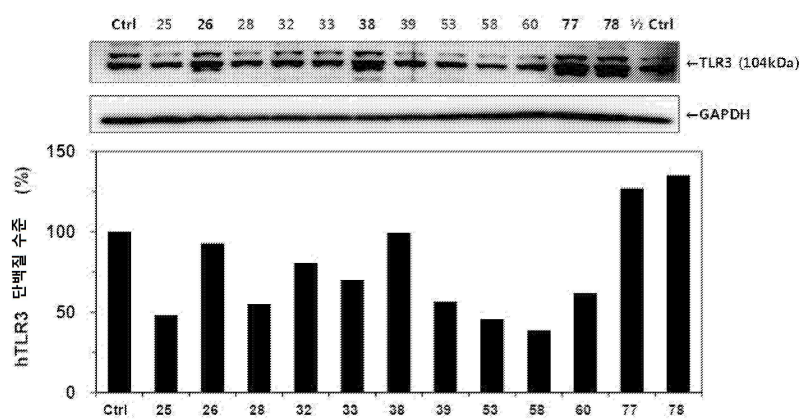
도면13



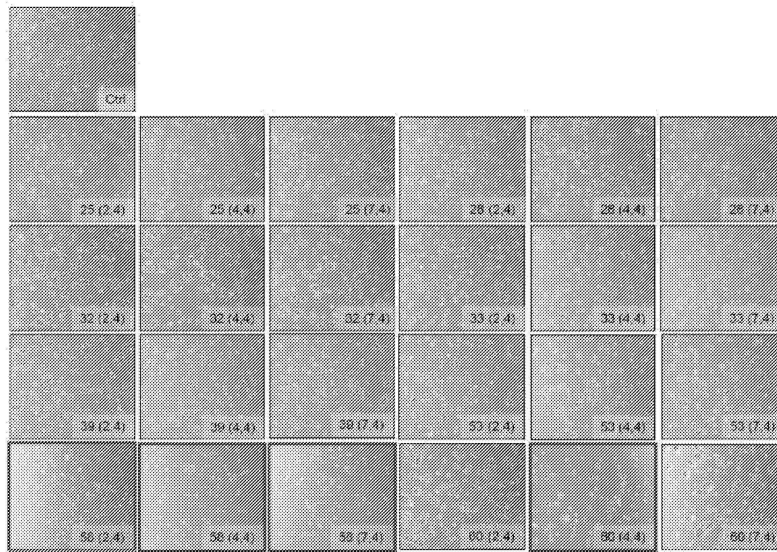
도면14



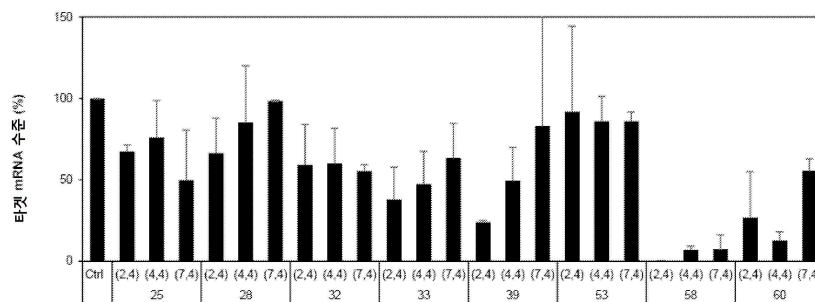
도면15



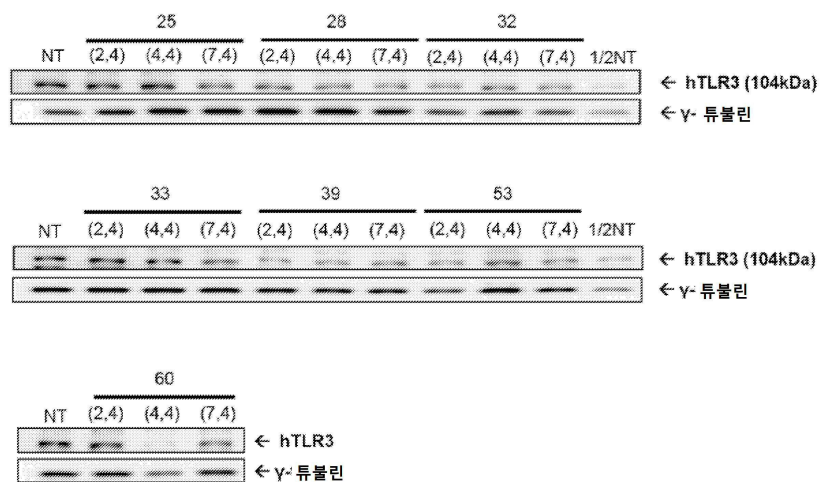
도면16



도면17

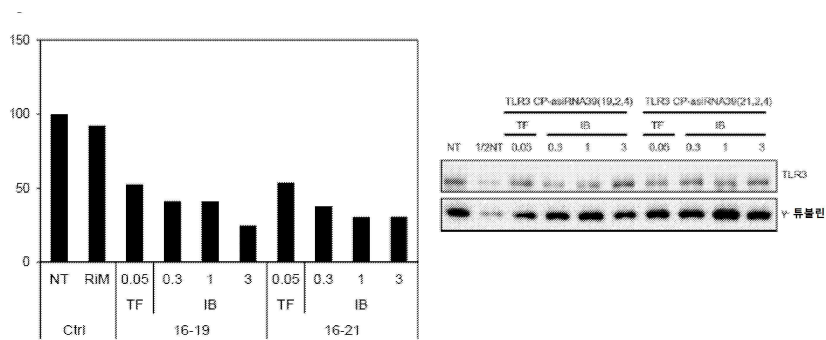


도면18

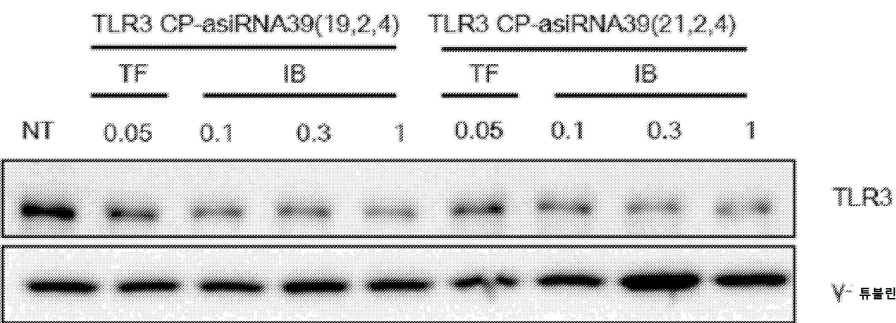




도면19



도면20



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> LEE, DONG KI

HONG, SUN WOO

HONG, ISU

HWANG, JIHYE

<120> TREATMENT OF AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION USING RNA COMPLEXES

THAT TARGET MYD88 OR TLR3

<130> OPH-00601 (32896-00601)

<140> 15/352,322

<141> 2016-11-15

<150> 62/255,878

<151> 2015-11-16

<160> 414

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2862

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

agattcctac ttcttacgcc ccccatcatca cccgcctcga gacctcaagg gtagaggtagg      60
gcacccccgc ctccgcactt ttgctcgggg ctccagattg tagggcaggg cggcgcttct      120

cggaaagcga aagccggcgg ggccggggcgg gtgccgcagg agaaagagga agcgctggca      180
gacaatgcga cccgaccgag ctgaggctcc aggaccgccc gccatggctg caggaggctcc      240
cggcgcgggg tctgcggccc cggctctctc cacatctctc cttcccttgg ctgctctcaa      300
catgcgagtg cggcgccgcc tgtctctgtt ctgaacgtg cggacacagg tggcgccga      360
ctggaccgag ctggcgagg agatggactt tgagtacttg gagatccggc aactggagac      420
acaagcggac cccactggca ggctgctgga cgctggcag ggacgccctg gcgcctctgt      480
aggccgactg ctcgagctgc ttaccaagct ggcccgcgac gacgtgctgc tggagctggg      540

accagcatt gaggaggatt gccaaaagta tatcttgaag cagcagcagg aggaggctga      600
gaagccttta caggtaggag ctgtagacag cagtgtcca cggacagcag agctggcggg      660
catcaccaca ctgatgacc ccctggggca tatgctgag cgtttcgat ccttcacttg      720
ctattgcccc agcgacatcc agtttgtgca ggagatgatc cggcaactgg aacagacaaa      780
ctatcgactg aagttgtgtg tgtctgaccg cgatgtcttg cctggcacct gtgtctggtc      840
tattgtagtg gagctcatcg aaaagaggtag ccgccgatg gtggtggttg tctctgatga      900
ttacctgcag agcaaggaat gtgacttcca gaccaaattt gcaactcagc tctctccagg      960

tgcccatcag aagcgactga tccccatcaa gtacaaggca atgaagaaag agttccccag      1020
catcctgagg ttcatcactg tctgcgacta caccaacccc tgcaccaaat ctgggttctg      1080
gactgcctt gccaggcct tgtccctgcc ctgaagactg ttctgaggcc ctgggtgtgt      1140
gtgtatctgt ctgctgtcc atgtacttct gccctgcctc ctctttcgt ttagaggagga      1200
atctgtgtct tacttacctc tcaattcctg gagatgcaa cttcacagac acgtctgcag      1260
cagctggaca tcacatttca tgtctgcat ggaaccagtg gctgtgagtg gcatgtccac      1320
ttgtctgatt atcagccagg acactataga acaggaccag ctgagactaa gaaggaccag      1380

cagagccagc tcagctctga gccattcaca catcttcacc ctgagtttcc tcaactgagg      1440
agtgggatgg ggagaacaga gagtagctgt gtttgaatcc ctgtaggaaa tggtagaagca      1500
tagctctggg tctcctgggg gagaccaggc ttggctgcgg gagagctggc tgttgctgga      1560
ctacatgctg gccactgctg tgaccacgac actgtggggg cagcttcttc cacagtgatg      1620

```

cctactgatg cttcagtgcc tctgcacacc gccattcca cttctcctt cccacaggg 1680  
caggtgggga agcagtttgg ccagcccaa ggagaccca cttgagcct tatttcctaa 1740  
tgggtccacc tctcatctgc atctttcaca cctccagct tctgccaac cttcagcagt 1800

gacaagtccc caagagactc gcctgagcag ctgggctgc tttcatttc cacctgtcag 1860  
gatgcctgtg gtcatgtctt cagctccacc tggcatgaga agggatcctg gcctctggca 1920  
tattcatcaa gtatgagttc tgggatgag tctctgtaat gatgtgagca gggagccttc 1980  
ctccctgggc cacctgcaga gagctttccc accaactttg taccttgatt gccttacaaa 2040  
gttatttgtt tacaacacgc gaccatataa aagcctcctg ccccaaagct tgtgggcaca 2100  
tgggcacata cagactcaca tacagacaca cacatatatg tacagacatg tactctcaca 2160  
cacacaggca ccagcataca cagtttttc taggtacagc tcccaggaac agctaggtgg 2220

gaaagtccca tctctgaggg agcctaacca tctcctgaa caaaaattgg gcactcatct 2280  
attccttttc tcttgtgtcc ctactcattg aaaccaaact ctggaaagga cccaatgtac 2340  
cagtatttat acctctaag aagcacagag agaggaagag agctgcttaa actcacacaa 2400  
caatgaactg cagacacagc tgttctctcc ctctctcctt cccagagcaa ttatacttt 2460  
accctcaggc tctcctctgg ggagaagggt ccatggctct aggtgtctgt gcccaggac 2520  
agaccctagg accctaaac caatagaaaa tgcatactt tgcctcactt tcagccaggc 2580  
tggagcaagg taccttttct taggatcttg ggagggaatg gatgcccctc tctgcatgat 2640

cttgttgagg catttagctg ccatgcacct gtccccctt aatactgggc attttaagc 2700  
catctcaaga ggcatcttct acatgttttg tacgattaa aataatttca aagatatctg 2760  
agaaaagccg atatttgcca ttcttctat atcctggaat atatcttgca tcctgagttt 2820  
ataataataa ataataattct accttgga aa aaaaaaaaa aa 2862

<210> 2  
<211> 3057  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 2

cactttcgag agtgccgtct atttccaca cacttccctg atgaaatgtc tggatttga 60  
ctaaagaaaa aaggaaaggc tagcagtcac ccaacagaat catgagacag actttgcctt 120

glatctactt ttgggggggc cttttgcct tgggatgct gtgtgcatcc tccaccacca 180  
agtgcactgt tagccatgaa gttgtgact gcagccacct gaagttagct caggtaccg 240  
atgatctacc cacaacata acagtgttga accttaccca taatcaactc agaagattac 300

cagccgccaa cttcacaaagg tatagccagc taactagctt ggatgtagga tttaacacca 360  
tctcaaaact ggagccagaa ttgtgccaga aacttcccat gttaaaagt ttgaacctcc 420  
agcacaatga gctatctcaa ctttctgata aaacctttgc cttctgcacg aatttgactg 480  
aactccatct catgtccaac tcaatccaga aaattaaaaa taatcccttt gtcaagcaga 540

agaatttaat cacattagat ctgtctcata atggcttgtc atctacaaaa ttaggaactc 600  
aggttcagct ggaaaatctc caagagcttc tattatcaaa caataaaatt caagcgctaa 660  
aaagtgaaga actggatatc ttgccaatt catctttaaa aaaattagag ttgtcatcga 720  
atcaaattaa agagttttct ccagggtgtt ttcacgcaat tggaagatta ttggcctct 780  
ttctgaacaa tgtccagctg ggtccagacc ttacagagaa gctatgtttg gaattagcaa 840  
acacaagcat tcggaatctg tctctgagta acagccagct gtccaccacc agcaatacaa 900  
ctttcttggg actaaagtgg acaaatctca ctatgctcga tctttctac aacaacttaa 960

atgtggttgg taacgattcc ttgtctggc ttccacaact agaatatctc ttcctagagt 1020  
ataataatat acagcatttg ttttctcact ctttgcacgg gcttttcaat gtgaggtacc 1080  
tgaatttgaa acggtctttt actaaacaaa gtatttccct tgcctcactc cccaagattg 1140  
atgatttttc ttttcagtgg ctaaaatgtt tggagcacct taacatggaa gataatgata 1200  
ttccaggcat aaaaagcaat atgttcacag gattgataaa cctgaaatac ttaagtctat 1260  
ccaactcctt tacaagtttg cgaactttga caaatgaaac atttgatca cttgtcatt 1320  
ctcccttaca catactcaac ctaaccaaga ataaaatctc aaaaatagag agtgatgctt 1380

tctcttgggt gggccaccta gaagtacttg acctgggcct taatgaaatt gggcaagaac 1440  
tcacaggcca ggaatggaga ggtctagaaa atattttcga aatctatctt tcctacaaca 1500  
agtacctgca gctgactagg aactcctttg ctttgggtccc aagccttcaa cgactgatgc 1560  
tccgaagggt ggcccttaaa aatgtggata gctctccttc accattccag cctcttcgta 1620  
acttgacct tctggatcta agcaacaaca acatagccaa cataaatgat gacatgttgg 1680  
agggtcttga gaaactagaa attctcgatt tgcagcataa caacttagca cggctctgga 1740  
aacacgcaaa cctggtggtt cccatttatt tcttaaaggg tctgtctcac ctccacatcc 1800

ttaacttga gtccaacggc tttagcagaga tcccagtga ggtcttcaag gatttatttg 1860  
aactaaagat catcgattta ggattgaata atttaaacac acttccagca tctgtcttta 1920  
ataatcaggt gtctctaaag tcatigaacc ttcagaagaa tctcataaca tccgttgaga 1980  
agaaggtttt cgggccagct ttcaggaacc tgactgagtt agatatgcgc tttaatccct 2040  
ttgattgcac gtgtgaaagt attgcctggt ttgttaattg gattaacgag acccatacca 2100  
acatccctga gctgtcaagc cactaccttt gcaaacctcc acctcactat catgggttcc 2160

cagtggagact ttttgataca tcatcttgca aagacagtgc cccctttgaa ctctttttca 2220

tgatcaatac cagtatcctg ttgatTTTTA tctttattgt acttctcatc cactttgagg 2280

gctggaggat atctttttat tggaatgttt cagtacatcg agttcttggt ttcaaagaaa 2340

tagacagaca gacagaacag tttgaatatg cagcatatat aattcatgcc tataaagata 2400

aggattgggt ctgggaacat ttctcttcaa tggaaaagga agaccaatct ctcaaatttt 2460

gtctggaaga aagggaacttt gaggcgggtg tttttgaact agaagcaatt gttaacagca 2520

tcaaaagaag cagaaaaatt atttttgtta taacacacca tctattaaaa gaccattat 2580

gcaaaagatt caaggtacat catgcagttc aacaagctat tgaacaaaat ctggattcca 2640

ttatatgggt tticcttgag gagattccag attataaact gaaccatgca ctctgtttgc 2700

gaagaggaat gttaaatct cactgcatct tgaactggcc agttcagaaa gaacggatag 2760

gtgcctttcg tcataaattg caagtagcac ttggatccaa aaactctgta cattaaattt 2820

atttaaatat tcaattagca aaggagaaac ttctcaatt taaaaagttc tatggcaaat 2880

ttaagttttc cataaagggt ttataatttg ttattcata ttgttaaag attatattct 2940

atcacaatta catctcttct aggaaaatgt gtctccttat ttcaggccta tttttgacaa 3000

ttgacttaat ttaccctaaa ataaacata taagcacgta aaaaaaaaa aaaaaaa 3057

<210> 3

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 3

ggcggccgac uggacc 16

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 4

gguccagucg gccgccacc 19

<210> 5



<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 5

uggcgccga cggac

16

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 6

guccagucgg ccgccacu

19

<210> 7

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 7

guggcgccg acugga

16

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 8

uccagucggc cgccaccug

19

<210> 9

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 9

cuggcggagg agaugg 16

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 10

ccaucuccuc cgccagcgc 19

<210> 11

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 11

gcuggcggag gagaug 16

<210> 12

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 12

caucuccucc gccagcgcg 19

<210> 13

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 13

aguacuugga gauccg 16

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 14

cggauccucca aguacucuaa 19

<210> 15

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 15

gaguacuugg agaucc 16

<210> 16

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 16

ggaucuccaa guacucaaa 19

<210> 17

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 17  
gccuuuacag guggcc 16  
<210> 18  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 18  
ggccaccugu aaaggcuuc 19  
<210> 19  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 19  
agccuuuaca gguggc 16  
<210> 20  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 20  
gccaccugua aaggcuucu 19  
<210> 21  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 21

aagccuuuac aggugg 16

<210> 22

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 22

ccaccuguaa aggcucuc 19

<210> 23

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 23

gaagccuuua caggug 16

<210> 24

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 24

caccuguaaa ggcucuca 19

<210> 25

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 25



agaagccuuu acaggu	16
<210> 26	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 26	
accuguaaag gcuucucag	19
<210> 27	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 27	
agaugauccg gcaacu	16
<210> 28	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 28	
aguugccgga ucaucuccu	19
<210> 29	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 29	
gagaugaucc ggcaac	16

<210> 30  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 30  
 guugccggau cauccug 19

<210> 31  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 31  
 ggagaugauc cggcaa 16

<210> 32  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 32  
 uugccggau aucuccug 19

<210> 33  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 33  
 aggagaugau ccggca 16

<210> 34

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 34

ugccggauca ucuccugca 19

<210> 35

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 35

caggagauga uccggc 16

<210> 36

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 36

gccggaucau cuccugcac 19

<210> 37

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 37

gcaggagaug auccgg 16

<210> 38

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 38

ccggaucauc uccugcaca 19

<210> 39

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 39

ugcaggagau gauccg 16

<210> 40

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 40

cggaucaucu ccugcaca 19

<210> 41

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 41

gugcaggaga ugaucc 16

<210> 42

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 42

ggaucaucuc cugcacaaa

19

<210> 43

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 43

ugugcaggag augauc

16

<210> 44

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 44

gaucaucucc ugcacaaac

19

<210> 45

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 45

uugugcagga gaugau

16

<210> 46

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic



oligonucleotide

<400> 46

aucaucuccu gcacaaacu 19

<210> 47

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 47

uuugugcagg agauga 16

<210> 48

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 48

ucaucuccug cacaaacug 19

<210> 49

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 49

guuugucag gagaug 16

<210> 50

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 50  
caucuccugc acaaacugg 19  
<210> 51  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 51  
aguuugugca ggagau 16  
<210> 52  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 52  
aucuccugca caaacugga 19  
<210> 53  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 53  
gugacuucca gaccaa 16  
<210> 54  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 54

uuggucugga agucacauu	19
<210> 55	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 55	
ugugacuucc agacca	16
<210> 56	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 56	
uggucuggaa gucacauuc	19
<210> 57	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 57	
augugacuuc cagacc	16
<210> 58	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 58	
ggucuggaag ucacauucc	19

<210> 59  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 59  
 aaugugacuu ccagac 16  
 <210> 60  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 60  
 gucuggaagu cacauccu 19  
 <210> 61  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 61  
 gaaugugacu uccaga 16  
 <210> 62  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 62  
 ucuggaaguc acauccuu 19  
 <210> 63  
 <211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 63

ggaaugugac uuccag

16

<210> 64

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 64

cuggaaguca cauuccuug

19

<210> 65

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 65

aggaauguga cuucca

16

<210> 66

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 66

uggaagucac auuccuugc

19

<210> 67

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 67

aaggaaugug acuucc 16

<210> 68

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 68

ggaagucaca uuccuugcu 19

<210> 69

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 69

caaggaaugu gacuuc 16

<210> 70

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 70

gaagucacau uccuugcuc 19

<210> 71

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence



<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 71  
gcaaggaug ugacuu 16  
<210> 72  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 72  
aagucacauu ccuugcucu 19  
<210> 73  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 73  
agcaaggaau gugacu 16  
<210> 74  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 74  
agucacauuc cuugcucug 19  
<210> 75  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 75

gagcaaggaa ugugac 16

<210> 76

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 76

gucacauucc uugcucugc 19

<210> 77

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 77

agagcaagga auguga 16

<210> 78

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 78

ucacauuccu ugcucugca 19

<210> 79

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 79

cagagcaagg aaugug	16
<210> 80	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 80	
cacauuccuu gcucugcag	19
<210> 81	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 81	
guccugccc ugaaga	16
<210> 82	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 82	
ucuucagggc agggacaag	19
<210> 83	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 83	
uguccugcc cugaag	16

<210> 84

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 84

cuucagggca gggacaagg

19

<210> 85

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 85

uugucccugc ccugaa

16

<210> 86

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 86

uucagggcag ggacaaggc

19

<210> 87

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 87

gcaccugugu cugguc

16

<210> 88

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 88

gaccagacac aggugccag 19

<210> 89

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 89

ggcaccugug ucuggu 16

<210> 90

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 90

accagacaca ggugccagg 19

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer

<400> 91

gagtcaacgg atttggtcgt 20

<210> 92

<211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     primer  
 <400> 92  
 gacaagcttc ccgttctcag 20  
 <210> 93  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     primer  
 <400> 93  
 aagttatttg ttacaaaca gcgacca 27  
 <210> 94  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     primer  
 <400> 94  
 ggaagaatgg caaatatcgg ct 22  
 <210> 95  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     oligonucleotide  
 <400> 95  
 uuggucugga agucacauuc c 21  
 <210> 96  
 <211> 31  
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 96

uuggucugga agucacauuc cuugcucugc a 31

<210> 97

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 97

ugugacuucc agacca 16

<210> 98

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 98

uggucuggaa gucacauucc u 21

<210> 99

<211> 31

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 99

uggucuggaa gucacauucc uugcucugca g 31

<210> 100

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence



<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide <400> 100 gugacuucca gaccaa	16
<210> 101 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial Sequence <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide <400> 101 uuggucugga agucacauu	19
<210> 102 <211> 21 <212> RNA <213> Artificial Sequence <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide <400> 102 uuggucugga agucacauuc c	21
<210> 103 <211> 16 <212> RNA <213> Artificial Sequence <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide <400> 103 ugugacuucc agacca	16
<210> 104 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial Sequence <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	

oligonucleotide

<400> 104

uggucuggaa gucacauuc 19

<210> 105

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 105

uggucuggaa gucacauucc u 21

<210> 106

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 106

gugacuucca gaccaa 16

<210> 107

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 107

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 108

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 108	
gugacuucca gaccaa	16
<210> 109	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 109	
uuggucugga agucacauuc c	21
<210> 110	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 110	
gugacuucca gaccaa	16
<210> 111	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 111	
uuggucugga agucacauuc c	21
<210> 112	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 112	

gugacuucca gaccaa	16
<210> 113	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 113	
uuggucugga agucacauuc c	21
<210> 114	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 114	
gugacuucca gaccaa	16
<210> 115	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 115	
uuggucugga agucacauuc c	21
<210> 116	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 116	
gugacuucca gaccaa	16
<210> 117	

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 117

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 118

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 118

gugacuucca gaccaa 16

<210> 119

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 119

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 120

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 120

gugacuucca gaccaa 16

<210> 121

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 121

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 122

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 122

gugacuucca gaccaa 16

<210> 123

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 123

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 124

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 124

gugacuucca gaccaa 16

<210> 125

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 125

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 126

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 126

ugugacuucc agacca 16

<210> 127

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 127

uggucuggaa gucacauucc u 21

<210> 128

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 128

ugugacuucc agacca 16

<210> 129

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence



<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 129  
uggucuggaa gucacauucc u 21  
<210> 130  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 130  
ugugacuucc agacca 16  
<210> 131  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 131  
uggucuggaa gucacauucc u 21  
<210> 132  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 132  
ugugacuucc agacca 16  
<210> 133  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 133

uggucuggaa gucacauucc u 21

<210> 134

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 134

ugugacuucc agacca 16

<210> 135

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 135

uggucuggaa gucacauucc u 21

<210> 136

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 136

ugugacuucc agacca 16

<210> 137

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 137

uggucuggaa gucacauucc u	21
<210> 138	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 138	
ugugacuucc agacca	16
<210> 139	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 139	
uggucuggaa gucacauucc u	21
<210> 140	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 140	
ugugacuucc agacca	16
<210> 141	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 141	
uggucuggaa gucacauucc u	21

<210> 142  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 142  
 ugugacuucc agacca 16

<210> 143  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 143  
 uggucuggaa gucacauucc u 21

<210> 144  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 144  
 ugugacuucc agacca 16

<210> 145  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 145  
 uggucuggaa gucacauucc u 21

<210> 146

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 146

gugacuucca gaccaa 16

<210> 147

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 147

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 148

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 148

gugacuucca gaccaa 16

<210> 149

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 149

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 150

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 150

gugacuucca gaccaa 16

<210> 151

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 151

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 152

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 152

gugacuucca gaccaa 16

<210> 153

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 153

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 154

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 154

gugacuucca gaccaa

16

<210> 155

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 155

uuggucugga agucacauuc c

21

<210> 156

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 156

gugacuucca gaccaa

16

<210> 157

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 157

uuggucugga agucacauuc c

21

<210> 158

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 158

gugacuucca gaccaa 16

<210> 159

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 159

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 160

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 160

gugacuucca gaccaa 16

<210> 161

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 161

uuggucugga agucacauuc c 21

<210> 162

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide



<400> 162

ugugacuucc agacca 16

<210> 163

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 163

uggucuggaa gucacauucc u 21

<210> 164

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 164

ugugacuucc agacca 16

<210> 165

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 165

uggucuggaa gucacauucc u 21

<210> 166

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 166

ugugacuucc agacca	16
<210> 167	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 167	
uggucuggaa gucacauucc u	21
<210> 168	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 168	
ugugacuucc agacca	16
<210> 169	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 169	
uggucuggaa gucacauucc u	21
<210> 170	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 170	
gugacuucca gaccaa	16

<210> 171  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 171  
 uuggucugga agucacauuc c 21  
 <210> 172  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 172  
 gugacuucca gaccaa 16  
 <210> 173  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 173  
 uuggucugga agucacauu 19  
 <210> 174  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 174  
 ugugacuucc agacca 16  
 <210> 175  
 <211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 175

uggucuggaa gucacauucc u 21

<210> 176

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 176

ugugacuucc agacca 16

<210> 177

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 177

uggucuggaa gucacauuc 19

<210> 178

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 178

aucuuuccua caacaa 16

<210> 179

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 179

uuguuguagg aaagaucgag c 21

<210> 180

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 180

ucuuuccuac aacaac 16

<210> 181

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 181

guuguuguag gaaagaucga g 21

<210> 182

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 182

ggcccuuaaa aaugug 16

<210> 183

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 183  
cacauuuuuu agggccaccc u 21  
<210> 184  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 184  
gcccuuaaaa augugg 16  
<210> 185  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 185  
ccacauuuuu aagggccacc c 21  
<210> 186  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 186  
cccuuaaaaa ugugga 16  
<210> 187  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 187

uccacauuuu uaaggccac c 21

<210> 188

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 188

ccuuaaaaau guggau 16

<210> 189

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 189

auccacauuu uuaaggcca c 21

<210> 190

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 190

cuuaaaaug uggaua 16

<210> 191

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 191

uauccacauu uuuaagggcc a	21
<210> 192	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 192	
ucguaacuug accauu	16
<210> 193	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 193	
aauggucaag uuacgaagag g	21
<210> 194	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 194	
cguaacuuga ccuuc	16
<210> 195	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 195	
gaauggucaa guuacgaaga g	21



<210> 196	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 196	
guaacuugac cauucu	16
<210> 197	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 197	
agaauuguca aguuacgaag a	21
<210> 198	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 198	
uaacuugacc auucug	16
<210> 199	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 199	
cagaaugguc aaguuacgaa g	21
<210> 200	

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 200

aacuugacca uucugg 16

<210> 201

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 201

ccagaauggu caaguuacga a 21

<210> 202

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 202

acuugaccau ucugga 16

<210> 203

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 203

uccagaaugg ucaaguuacg a 21

<210> 204

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 204

aacaacaaca uagcca 16

<210> 205

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 205

uggcuauguu guuguugcuu a 21

<210> 206

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 206

acaacaacau agccaa 16

<210> 207

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 207

uuggcuaugu uguuguugcu u 21

<210> 208

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 208

caacaacaua gccaac

16

<210> 209

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 209

guuggcuaug uuguuguugc u

21

<210> 210

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 210

aacaacauag ccaaca

16

<210> 211

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 211

uguuggcuau guuguuguug c

21

<210> 212

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 212  
acaacauagc caacau 16

<210> 213  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 213  
auguuggcua uguuguuguu g 21

<210> 214  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 214  
caacauagcc aacaua 16

<210> 215  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 215  
uauguuggcu auguuguugu u 21

<210> 216  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 216

aacauagcca acauaa 16

<210> 217

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 217

uuauuguugc uauuguug u 21

<210> 218

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 218

acauagccaa cauaaa 16

<210> 219

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 219

uuuauuguug cuauuguu g 21

<210> 220

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 220  
auagccaaca uaaaug 16  
<210> 221  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 221  
cauuuauugu ggcuauugu u 21  
<210> 222  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 222  
uagccaacau aaauga 16  
<210> 223  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 223  
ucauuuauugu ugguauugu g 21  
<210> 224  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 224

aaucucucaa auuuug	16
<210> 225	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 225	
caaaaauuga gagauugguc u	21
<210> 226	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 226	
ugcacucugu uugcga	16
<210> 227	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 227	
ucgcaaacag agugcauggu u	21
<210> 228	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 228	
gcacucuguu ugcgaa	16
<210> 229	



<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 229

uucgcaaaca gagugcaugg u

21

<210> 230

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 230

cacucuguuu gcgaag

16

<210> 231

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 231

cuucgcaaac agagugcaug g

21

<210> 232

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 232

acucuguuug cgaaga

16

<210> 233

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 233

ucuucgcaaa cagagugcau g 21

<210> 234

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 234

cucuguuugc gaagag 16

<210> 235

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 235

cucuucgcaa acagagugca u 21

<210> 236

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 236

ucuguuugcg aagagg 16

<210> 237

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 237

ccucuucgca aacagagugc a 21

<210> 238

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 238

cuguuugcga agagga 16

<210> 239

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 239

uccucuucgc aaacagagug c 21

<210> 240

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 240

uguuugcgaa gaggaa 16

<210> 241

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 241  
uuccucuucg caaacagagu g 21  
<210> 242  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 242  
guuugcgaag aggaau 16  
<210> 243  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 243  
auuccucuuc gcaaacagag u 21  
<210> 244  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 244  
uuugcgaaga ggaaug 16  
<210> 245  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 245

cauuccucuu cgcaaacaga g 21

<210> 246

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 246

uugcgaagag gaaugu 16

<210> 247

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 247

acauuccucu ucgcaaacag a 21

<210> 248

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 248

ugcgaagagg aauguu 16

<210> 249

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 249

aacauuccuc uucgcaaaca g	21
<210> 250	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 250	
gcgaagagga auguuu	16
<210> 251	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 251	
aaacauuccu cuucgcaaac a	21
<210> 252	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 252	
cgaagaggaa uguuuu	16
<210> 253	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 253	
uaaacaaucc ucuucgcaaa c	21

<210> 254  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 254  
 gaagaggaau guuuuaa 16

<210> 255  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 255  
 uuuaacauuc cucuucgcaa a 21

<210> 256  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 256  
 aagaggaug uuuaaa 16

<210> 257  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 257  
 uuuaaacaau ccucuucgca a 21

<210> 258

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 258

agaggaaugu uaaaau 16

<210> 259

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 259

auuuuaacau uccucuucgc a 21

<210> 260

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 260

gaggaauguu uaaauc 16

<210> 261

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 261

gauuuuaaca uuccucuucg c 21

<210> 262

<211> 16



<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 262

aggaauguuu aaau cu 16

<210> 263

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 263

agauuuuaac auuccucuuc g 21

<210> 264

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 264

ggaauguuua aaucuc 16

<210> 265

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 265

gagauuuuaa cauuccucu c 21

<210> 266

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 266

cuugaacugg ccaguu

16

<210> 267

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 267

aacuggccag uucaagauc a

21

<210> 268

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 268

uugaacuggc caguuc

16

<210> 269

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 269

gaacuggcca guucaagaug c

21

<210> 270

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide  
 <400> 270  
 ugaacuggcc aguuca 16  
 <210> 271  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 271  
 ugaacuggcc aguucaagau g 21  
 <210> 272  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 272  
 gaacuggcca guucag 16  
 <210> 273  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 273  
 cugaacuggc caguucaaga u 21  
 <210> 274  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 274  
aacuggccag uucaga 16

<210> 275  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 275  
ucugaacugg ccaguucaag a 21

<210> 276  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 276  
acuggccagu ucagaa 16

<210> 277  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 277  
uucugaacug gccaguuca g 21

<210> 278  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 278

cuggccaguu cagaaa	16
<210> 279	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 279	
uuucugaacu ggccaguuca a	21
<210> 280	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 280	
uggccaguuc agaaag	16
<210> 281	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 281	
cuuucugaac uggccaguuc a	21
<210> 282	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 282	
ggccaguuca gaaaga	16

<210> 283  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 283  
 uuuuucugaa cuggccaguu c 21  
 <210> 284  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 284  
 gccaguucag aaagaa 16  
 <210> 285  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 285  
 uuuuuucuga acuggccagu u 21  
 <210> 286  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 286  
 ccaguucaga aagaac 16  
 <210> 287  
 <211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 287

guucuuucug aacuggccag u

21

<210> 288

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 288

caguucagaa agaacg

16

<210> 289

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 289

cguucuuucu gaacuggcca g

21

<210> 290

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 290

aguucagaaa gaacgg

16

<210> 291

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 291

ccguucuuuc ugaacuggcc a

21

<210> 292

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 292

guucagaaag aacgga

16

<210> 293

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 293

uccguucuuu cugaacuggc c

21

<210> 294

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 294

uucagaaaga acggau

16

<210> 295

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence



<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 295  
auccguucuu ucugaacugg c 21  
<210> 296  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 296  
ucagaaagaa cggaua 16  
<210> 297  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 297  
uauccguucu uucugaacug g 21  
<210> 298  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 298  
aaauugcaagu agcacu 16  
<210> 299  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 299

agugcuacuu gcaauuuuag a 21

<210> 300

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 300

auugcaagua gcacuu 16

<210> 301

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 301

aagugcuacu ugcaauuuau g 21

<210> 302

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 302

uugcaaguag cacuug 16

<210> 303

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 303

caagugcuac uugcauuua u	21
<210> 304	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 304	
ugcaaguagc acuugg	16
<210> 305	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 305	
ccaagugcua cuugcauuu a	21
<210> 306	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 306	
gcaaguagca cuugga	16
<210> 307	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 307	
uccaagugcu acuugcauuu u	21

<210> 308

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 308

caaguagcac uuggau

16

<210> 309

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 309

auccaagugc uacuugcaau u

21

<210> 310

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 310

aaguagcacu uggauc

16

<210> 311

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 311

gauccaagug cuacuugcaa u

21

<210> 312

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 312

ugcccccuuu gaacuc 16

<210> 313

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 313

gaguucaaag ggggcacugu c 21

<210> 314

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 314

ucugggaaca uuucuc 16

<210> 315

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 315

gagaaauguu cccagaccca a 21

<210> 316

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 316

cagcaucaaa agaagc 16

<210> 317

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 317

gcuucuuuug augcuguuaa c 21

<210> 318

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 318

cacgugugaa aguauu 16

<210> 319

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 319

aaacuuaa cacgugcaau c 21

<210> 320

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 320

gucucaccuc cacauc

16

<210> 321

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 321

gauguggagg ugagacagac c

21

<210> 322

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 322

ugucucaccu ccacau

16

<210> 323

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 323

auguggaggu gagacagacc c

21

<210> 324

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 324  
agauucaagg uacauc 16

<210> 325  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 325  
gauguaccuu gaaucuuuug c 21

<210> 326  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 326  
ggaaacacgc aaaccc 16

<210> 327  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 327  
ggguuugcgu guuuccagag c 21

<210> 328  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic



oligonucleotide

<400> 328

uggaaacacg caaacc 16

<210> 329

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 329

gguuugcgug uuuccagagc c 21

<210> 330

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 330

uugagaaacu agaaau 16

<210> 331

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 331

auuucuaguu ucucaagacc c 21

<210> 332

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 332	
cuugagaaac uagaaa	16
<210> 333	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 333	
uuucuaguuu cucaagaccc u	21
<210> 334	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 334	
aacauccguu gagaag	16
<210> 335	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 335	
cuucucaacg gauguuauga g	21
<210> 336	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 336	

gugcccccuu ugaacu	16
<210> 337	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 337	
aguucaaaagg gggcacuguc u	21
<210> 338	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 338	
agugccccc uugaac	16
<210> 339	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 339	
guucaaaaggg ggcacugucu u	21
<210> 340	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 340	
cagugccccc uuugaa	16
<210> 341	

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 341

uucaaagggg gcacugucu u

21

<210> 342

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 342

ggaggauauc uuuuuu

16

<210> 343

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 343

uaaaaagaua uccuccagcc c

21

<210> 344

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 344

uggaggauau cuuuuu

16

<210> 345

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 345

aaaaagauau ccuccagccc u 21

<210> 346

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 346

acugaaccuau gcacuc 16

<210> 347

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 347

gagugcaugg uucaguuuau a 21

<210> 348

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 348

ugaaccaugc acucug 16

<210> 349

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 349

cagagugcau gguucaguuu a 21

<210> 350

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 350

gaaccaugca cucugu 16

<210> 351

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 351

acagagugca ugguucaguu u 21

<210> 352

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 352

aaccaugcac ucuguu 16

<210> 353

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 353  
aacagagugc augguucagu u 21  
<210> 354  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 354  
accaugcacu cuguuu 16  
<210> 355  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 355  
aaacagagug caugguucag u 21  
<210> 356  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 356  
ccaugcacuc uguuug 16  
<210> 357  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide	
<400> 357	
caaacagagu gcaugguuca g	21
<210> 358	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 358	
caugcacucu guuugc	16
<210> 359	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 359	
gcaaacagag ugcaugguuc a	21
<210> 360	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 360	
cugcaucuug aacugg	16
<210> 361	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 361	



ccaguucaag augcagugag a	21
<210> 362	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 362	
acugcaucuu gaacug	16
<210> 363	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 363	
caguucaaga ugcagugaga u	21
<210> 364	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 364	
cacugcaucu ugaacu	16
<210> 365	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 365	
aguucaagau gcagugagau u	21

<210> 366  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
         oligonucleotide  
 <400> 366  
 ucacugcauc uugaac 16

<210> 367  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
         oligonucleotide  
 <400> 367  
 guucaagaug cagugagauu u 21

<210> 368  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
         oligonucleotide  
 <400> 368  
 uaaaauugcaa guagca 16

<210> 369  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
         oligonucleotide  
 <400> 369  
 ugcuaacuugc aaauuaugac g 21

<210> 370

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 370

auaaaauugca aguagc 16

<210> 371

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 371

gcuacuugca auuuugacg a 21

<210> 372

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 372

cgucauaaaau ugcaag 16

<210> 373

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 373

cuugcauuuu augacgaaag g 21

<210> 374

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 374

ucgucauaaa uugcaa 16

<210> 375

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 375

uugcaauuuu ugacgaaagg c 21

<210> 376

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 376

uucgucauaa auugca 16

<210> 377

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 377

ugcaauuuau gacgaaaggc a 21

<210> 378

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 378

ugcacucugu uugcga

16

<210> 379

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 379

ucgcaaacag agugcauggu u

21

<210> 380

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 380

ucgcaaacag agugcauggu u

21

<210> 381

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 381

ucgcaaacag agugcauggu u

21

<210> 382

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide	
<400> 382	
acucuguuug cgaaga	16
<210> 383	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 383	
ucuucgcaaa cagagugcau g	21
<210> 384	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 384	
ucuucgcaaa cagagugcau g	21
<210> 385	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 385	
ucuucgcaaa cagagugcau g	21
<210> 386	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	

<400> 386  
 uguuugcgaa gaggaa 16  
 <210> 387  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 387  
 uuccucuucg caaacagagu g 21  
 <210> 388  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 388  
 uuccucuucg caaacagagu g 21  
 <210> 389  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 389  
 uuccucuucg caaacagagu g 21  
 <210> 390  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 390

guuugcgaag aggaau	16
<210> 391	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 391	
auuccucuuc gcaaacagag u	21
<210> 392	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 392	
auuccucuuc gcaaacagag u	21
<210> 393	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 393	
auuccucuuc gcaaacagag u	21
<210> 394	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 394	
gaagaggaau guuuua	16



<210> 395  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 395  
 uuaaacauuc cucuucgcaa a 21  
 <210> 396  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 396  
 uuaaacauuc cucuucgcaa a 21  
 <210> 397  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 397  
 uuaaacauuc cucuucgcaa a 21  
 <210> 398  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 398  
 ggccaguca gaaaga 16  
 <210> 399  
 <211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 399

ucuuucugaa cuggccaguu c

21

<210> 400

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 400

ucuuucugaa cuggccaguu c

21

<210> 401

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 401

ucuuucugaa cuggccaguu c

21

<210> 402

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 402

guucagaaag aacgga

16

<210> 403

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 403

uccguucuuu cugaacuggc c 21

<210> 404

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 404

uccguucuuu cugaacuggc c 21

<210> 405

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 405

uccguucuuu cugaacuggc c 21

<210> 406

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 406

ucagaaagaa cggaaua 16

<210> 407

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 407  
uauccguucu uucugaacug g 21  
<210> 408  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 408  
uauccguucu uucugaacug g 21  
<210> 409  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 409  
uauccguucu uucugaacug g 21  
<210> 410  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
<400> 410  
tgcccccttt gaactctttt 20  
<210> 411  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer	
<400> 411	
aaaaacaccc gcctcaaagt	20
<210> 412	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 412	
gaagagggaau guuuua	16
<210> 413	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 413	
uuaaacauuc cucuucgca	19
<210> 414	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 414	
uuaaacauuc cucuucgcaa a	21