



등록특허 10-2727666



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월08일  
(11) 등록번호 10-2727666  
(24) 등록일자 2024년11월04일

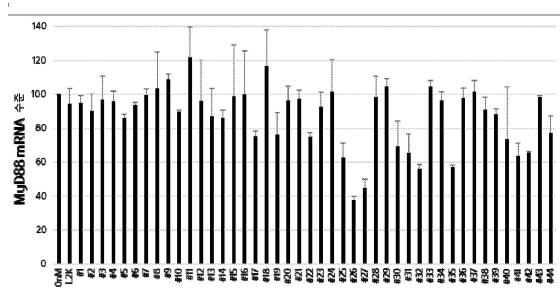
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/113* (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/113* (2013.01)  
*A61K 31/7088* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7015145
- (22) 출원일자(국제) 2016년11월15일  
심사청구일자 2021년10월15일
- (85) 번역문제출일자 2018년05월29일
- (65) 공개번호 10-2018-0071362
- (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 2 단지)  
**황이수**  
경기도 수원시 영통구 법조로 38 (하동) 102동 3208호  
**황지혜**  
경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 85 (이의동, 써밋플레이스 광교, 광교c1호반베르디움) 202동 305호
- (74) 대리인  
**리앤목특허법인**

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.

**대 표 도 - 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 쇄 및 상기 안티센스 쇄에 서열 상보성을 갖는 16 nt 길이의 센스 쇄를 포함하며, 상기 안티센스 쇄 및 센스 쇄는 안티센스 쇄의 5' 말단과 센스 쇄의 3' 말단이 블런트(blunt) 말단을 형성하는 복합체를 형성하는 RNA 복합체로서,

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

상기 센스 쇄의 서열은 서열번호 53 또는 서열번호 55이고,

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

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

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

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 안티센스 쇄가 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'-0-메틸화 뉴클레오시드를 포함하는 RNA 복합체.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 2'-0-메틸화 뉴클레오시드가 센스 쇄의 3' 말단에 위치되는 RNA 복합체.

**청구항 23**

제21항에 있어서, 센스 쇄의 3' 말단 영역이 다수의 2'-0-메틸화 뉴클레오시드를 포함하는 RNA 복합체.

**청구항 24**

제21항에 있어서, 2'-0-메틸화 뉴클레오시드가 안티센스 쇄의 3' 말단에 위치되는 RNA 복합체.

**청구항 25**

제21항에 있어서, 안티센스 쇄의 3' 말단 영역이 다수의 2'-0-메틸화 뉴클레오시드를 포함하는 RNA 복합체.

**청구항 26**

제21항에 있어서, 2'-0-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'-0-메틸화 뉴클레오시드를 포함하고 안티센스 쇄의 3' 말단 영역이 다수의 2'-0-메틸화 뉴클레오시드를 포함하는 RNA 복합체.

**청구항 28**

제1항에 있어서, RNA 복합체가 포스포로티오에이트 결합을 포함하는 RNA 복합체.

#### 청구항 29

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

#### 청구항 30

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

#### 청구항 31

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

#### 청구항 32

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

#### 청구항 33

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

#### 청구항 34

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

#### 청구항 35

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

#### 청구항 36

제28항에 있어서, RNA 복합체의 안티센스 쪋 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

관련 출원

[0001] 본 출원은 그 전체가 참고로 본원에 포함되는, 2015년 11월 16일에 출원된 미국 특허 출원 제62/255,878호에 대한 우선권의 이익을 주장한다.

#### 배경 기술

[0002] 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 중심시에서 중요한 역할을 한다. AMD는 전세계적으로 설명의 주요 원인 중 하나이다.

[0003] 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

[0004] 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.

[0005] 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.

[0006] 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.

[0007] 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.

[0008] 일부 양태에서, 본 발명은 TLR3 mRNA 서열(예를 들어, 인간 TLR3 mRNA 서열)에 서열 상보성을 갖는 안티센스 쇄

및 안티센스 쇄에 서열 상보성을 갖는 센스 쇄를 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 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)이다. 일부 실시형태에서, 적어도 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 nt의 안티센스 쇄가 TLR3 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 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'-0-메틸화 뉴클레오시드, 포스포로티오에이트 결합 및/또는 콜레스테롤 모이어티이다. 일부 그러한 실시형태에서, 2'-0-메틸 뉴클레오시드는 센스 쇄의 3' 말단에 위치된다. 일부 그러한 실시형태에서, 센스 쇄의 3' 말단 영역은 다수의 2'-0-메틸화 뉴클레오시드(예를 들어, 3' 말단의 6 뉴클레오시드 이내에 2, 3, 4, 5 또는 6개의 2'-0-메틸화 뉴클레오시드)를 포함한다. 다른 실시형태에서, 2'-0-메틸 뉴클레오시드는 안티센스 쇄의 3' 말단에 위치된다. 일부 그러한 실시형태에서, 안티센스 쇄의 3' 말단 영역은 다수의 2'-0-메틸화 뉴클레오시드(예를 들어, 3' 말단의 6 뉴클레오시드 이내에 2, 3, 4, 5 또는 6개의 2'-0-메틸화 뉴클레오시드)를 포함한다. 일부 실시형태에서는, 센스 쇄의 3' 말단 영역 및 안티센스 쇄의 3' 말단 영역 둘 모두가 다수의 2'-0-메틸화 뉴클레오시드를 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 쇄 내의 리보뉴클레오티드 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 쇄 내의 리보뉴클레오티드 사이의 결합의 전부가 포스포로티오에이트 결합이다. 유사하게, 일부 실시형태에서, RNA 복합체의 안티센스 쇄 내의 리보뉴클레오티드 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 쇄 내의 리보뉴클레오티드 사이의 결합의 전부가 포스포로티오에이트 결합이다.

[0013] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 RNA 복합체는 콜레스테롤 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 센스 쇄의 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 눈에의 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 쇄 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'-0-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 쇄 길이(21 또는 19 뉴클레오티드)를 가지며 2'-0-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 1uM 또는 3uM의 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 1uM에서

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 as iRNA(cp-asiRNA, 또는 cp-asiTLR3)의 유전자 사일런싱 효율을 보여준다. 1 μM 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 블로트이 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 블로트을 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 블로트이 수행되었다.(NT = 무처리).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

일반적 사항

[0018]

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, as iRNA 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.

[0019]

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.

[0020]

인간 MyD88 cDNA 서열.

```

1      agattcctac ttcttacgccc cccccacatca cccgcctcga gacctaagg gtagaggtgg
61     gcaccccccgc ctccgcactt ttgctcgaaaa ctccagattt tagggcagggg cggcgcttct
121    cggaaagcga aagccggcgaa ggcggggcgaa gtgcccggagg agaaagagga agcgcgtggca
181    gacaatgcga cccgacccggc ctgaggctcc aggacccggcc gccatggctg caggaggtcc
241    cggcgcccccc tctgcggccccc cgggtctccctc cacaatccctcc cttccctgg ctgctctcaa
301    catgcgagtg cggcgccggcc tttctgtttt cttgaacgtg cggacacagg tggcgccccgg
361    ctggacccggc ctggcgggagg agatggactt tgtagtacttg gagatccggc aactggagac
421    acaaggcggac cccactggca ggctgtggca cgccctggcag ggacgcctcg gcgcctctgt
481    aggccgactg ctcgagactgc ttaccaagttt gggccggcgcac gacgtgtgc tggagctggg
541    acccagcatt gaggaggatt gccaaaagttatcttgaag cagcagcagg aggaggctga
601    gaagccctta cagggtggcccg ctgttagacag cagtgtccca cggacacggcag agctggcgaa
661    catcaccaca ctgtatgacc ccctggggca tatgccttgatcg cgtttcgatcg ccttcattcg
721    ctattggcccc agcgacatcc agtttggca ggagatgtatcg cggcaactgg aacagacaaa
781    ctatcgactg aagttgtgtg tgtctgaccg cgtatgtcccg cctggcacct gtgtctggc
841    tattgttagt gagctcatcg aaaagaggtg ccggccggatg gtgggtgggtt tctctgtatga
901    ttacctgcag agcaaggaat gtgacttcca gaccaaattt gcactcagcc tctctccagg
961    tgcccatcg aagcgactga tccccatcaa gtacaaggca atgaagaaag agttccccag

```

[0021]

```

1021 catcctgagg ttcatcactg tctgcgacta caccaacccc tgcaccaaat cttggttctg
1081 gactcgccct gccaaggccct tgccttgcc ctgaagactg ttctgaggcc ctgggtgtgt
1141 gtgtatctgt ctgcctgtcc atgtacttct gcctgcctc ctcccttcgt ttaggagga
1201 atctgtgctc tacttacctc tcaattctg gagatgccaa cttcacagac acgtctgcag
1261 cagctggaca tcacattca tgcctgcat ggaaccagtg gctgtgagtg gcatgtccac
1321 ttgctggatt atcagccagg acactataga acaggaccag ctgagactaa gaaggaccag
1381 cagagccagc tcagctctga gccattcaca catcttcacc ctcagttcc tcacttgagg
1441 agtggatgg ggagaacaga gagtagctgt gtttgaatcc ctgtaggaaa tggtaagca
1501 tagctctggg ttcctgggg gagaccaggc ttggctgccc gagagctggc ttttgctgga
1561 ctacatgctg gcctactgctg tgaccacgc actgctgggg cagtttcc cacagtgtatg
1621 cctactgatg ctctcgtgcc tctgcacacc gccttccca ctccctcctt cccacacggg
1681 caggtgggaa agcagttgg cccagccaa ggagacccca ctttgagcct tatttcctaa
1741 tgggtccacc ttcctatctgc atcttcaca cttccctagct tctgcccac ctccagcagt
1801 gacaagtccc caagagactc gcctgagcag cttggctgc ttttcatttc cacctgtcag
1861 gatgcctgtg gtcatgctct cagctccacc tggcatgaga agggatcctg gcctctggca
1921 tattcatcaa gtatgatgtc tggggatgag tcaactgtaat gatgtgagca gggagccttc
1981 ctccctgggc cacctgcaga gagcttccc accaactttg taccttgatt gccttacaaa
2041 gttatttggt tacaacacgc gaccatataa agcctcctg ccccaaagct tggggcaca
2101 tgggcacata cagactcaca tacagacaca cacatataatg tacagacatg tactctcaca
2161 cacacaggca ccagcataca cacgttttc taggtacagc tccctggaa acgttaggtgg
2221 gaaagtccc tcactgaggg agcctaacca tgcctgaa caaaattgg gcactcatct
2281 attcccttcc tcttgcgtcc ctactcatttgc aaacccaaact ctggaaagga cccatgtac
2341 cagtatttat acctctaattt aagcacagag agaggaagag agctgctaa actcacacaa
2401 caatgaactg cagacacagc tggctctcc ctctctcctt cccagagcaa tttatacttt
2461 accctcaggc tgcctctgg ggagaaggtg ccatggctt aggtgtctgt gcccaggac
2521 agaccctagg acccttaattt caatagaaaa tgcataatctt tgctccactt tcagccaggc
2581 tggagcaagg taccttttctt taggatcttgg gggggaaatg gatgcctc tctgcatgat
2641 cttgttgagg catttagctg ccatgcaccc tgcctt aataactggc atttaaagc
2701 catctcaaga ggcatttttctt acatgttttgc tacgcattaa aataatttca aagatatctg
2761 agaaaagccg atatttgcca ttcttcctt atcctggaaat atatcttgca tcctgagttt
2821 ataataataa ataatattctt accttggaaa aaaaaaaaaaa 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      cactttcgag agtgcctgtct atttgcacaca cacttccctg atgaaatgtc tggattttgg
61     ctaaaaaaaa aaggaaaggc tagcagtcat ccaacagaat catgagacag actttgcctt
121    gtatctactt ttggggggggc cttttgcctt ttggatgtct gtgtgcattcc tccaccacca
181    agtgactgt tagccatgaa gttgctgact gcagccaccc gaagttgact caggtacccg
241    atgatctacc cacaacacata acagtgtga accttacccca taatcaactc agaagattac
301    cagccgccaa cttcacaagg tatagccagc taactagctt ggatgttagga tttaacacca
361    tctcaaaact ggagccagaa ttgtgcaga aacttcccat gttaaaagtt ttgaacctcc
421    agcacaatga gctatctcaa ctttctgata aaacctttgc cttctgcacg aatttgactg
481    aactccatct catgtccaaac tcaatccaga aaattaaaaaa taatccctt gtcaagcaga

```

[0025]

541 agaatttaat cacatttagat ctgtctcata atggcttgc atctacaaaa ttaggaactc  
 601 aggttcagct gaaaaatctc caagagcttc tattatcaa caataaaatt caagcgctaa  
 661 aaagtgaaga actggatatc tttgccaatt catcttaaa aaaatttagag ttgtcatcga  
 721 atcaaattaa agagtttct ccagggtgtt ttcacgcaat tggagatta tttggcctct  
 781 ttctgaacaa tgccagctg ggtcccagcc ttacagagaa gctatgttg gaatttagcaa  
 841 acacaagcat tcgaaatctg tctctgagta acagccagct gtccacacc agcaatacaa  
 901 ctttcttggg actaaagtgg acaaactctca ctatgctcga tcttcctac aacaacttaa  
 961 atgtggttgg taacgattcc tttgcttggc ttccacaact agaatatttc ttcttagagt  
 1021 ataataat acagcattt tttctcaact cttgcacgg gctttcaat gtgaggtacc  
 1081 tgaatttgaa acggttttt actaaacaaa gtatttccct tgccctactc cccaagattg  
 1141 atgattttc tttcagttg ctaaaatgtt tgagcacct taacatggaa gataatgata  
 1201 ttccaggcat aaaaagcaat atgttcacag gattgataaa cctgaaatac ttaagtctat  
 1261 ccaactcctt tacaagtttgcgaacttga caaatgaaac atttgtatca ctgtctcatt  
 1321 ctcccttaca catactcaac ctaaccaga ataaaatctc aaaaatagag agtgatgctt  
 1381 tctcttggg gggccaccta gaagtacttgc acctgggcct taatgaaatt gggcaagaac  
 1441 tcacaggcca ggaatggaga ggtctagaaa atatttcga aatctatctt tcctacaaca  
 1501 agtacctgca gctgacttagg aactcccttgccttggcc aagccttcaa cgactgtgc  
 1561 tccgaagggt gggcccttaaa aatgtggata gcttccttc accattccag ccttcgtt  
 1621 acttgaccat tctggatcta agcaacaaca acatagccaa cataatgtat gacatgttgg  
 1681 agggcttga gaaactagaa attctcgatt tgccagcataa caacttagca cggtcttgg  
 1741 aacacgcaaa ccctgggttgccttgcattt tccctaaaggg tctgtctcac ctccacatcc  
 1801 ttaacttggaa gttcaacggc tttgacgaga tccctgttgc ggttcaag gatttatttgc  
 1861 aactaaagat catcgatttgc ggttgcataa atttaaacac acttccagca tctgtcttta  
 1921 ataatcaggt gtctctaaag tcatttgcataa ttcagaagaa tctcataaca tccgttgg  
 1981 agaaggttttt cggggccagct ttccggaaacc tgacttagtt agatatgcgc ttatccct  
 2041 ttgattgcac gtgtgaaagt attgccttgc ttgttatttgc gattaacgag acccatacca  
 2101 acatccctga gctgtcaagc cactacccctt gcaacactcc acctcactat catgggttcc  
 2161 cagttagact ttttgatatac tcatttgcataa aagacagtgc ccccttgcataa ctcttttca  
 2221 ttagtcaatac cagtatccctg ttgatttttgc tctttatttgc acttctcatac cacttttgg  
 2281 gctggaggat atctttttat tggatgtttt cagtagatcg agttcttgc ttccaaagaaa  
 2341 tagacagaca gacagaacag tttgatatgc cagcatat aattcatgca tataaaagata  
 2401 aggattgggt ctgggaacat ttctcttcaaa tgaaaagga agaccaatct ctccaaatttt  
 2461 gtctggaaaga aaggggactttt gaggcgggttgc ttttgcactt agaagcaattt gtttacagca  
 2521 tcaaaaagaag cagaaaaatttatttttgcataa taacacacca tctttaaaa gaccattat  
 2581 gcaaaaagattt caaggtacat catgcagttc aacaagctat tgaacaaaat ctggattcca  
 2641 ttatatttgc tttccttgc ttttgcactt gtttgcatttgcatttgc tctgttttgc  
 2701 gaagaggaat gtttgcactt cactgcataa tgaacttgc gtttgcatttgcatttgc  
 2761 gtgccttgc ttttgcactt cactgcataa tgaacttgc gtttgcatttgcatttgc  
 2821 atttaaatat tcaatttgcataa aaggagaaac ttttgcactt gtttgcatttgcatttgc  
 2881 ttaagtttgcataaagggttgc ttttgcactt gtttgcatttgcatttgc  
 2941 atcacaatttgcataaagggttgc ttttgcactt gtttgcatttgcatttgc  
 3001 ttgacttaat ttttgcataaagggttgc ttttgcactt gtttgcatttgcatttgc

[0026]

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 간접 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 간접 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 앱타마와 같은 전달 비히클을 이용하여 세포에 전달된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNA 복합체는 세포에서 MyD88 및/또는 TLR3 억제를 막개하기 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.

정의

[0030]

편의상, 명세서, 실시예 및 첨부의 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 "간접 핵산", "억제 핵산"은 상호교환적으로 사용된다. 간접 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. 간접 RNA 분자는 안티센스 분자, siRNA 분자, asRNA 분자, lasiRNA 분자, 단일쇄 siRNA 분자, miRNA 분자 및 shRNA 분자를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 그러한 간접 핵산은 mRNA의 변역을 차단하거나 억제하기 위하여 또는 천연 pre-mRNA 스플라이스 프로세싱을 억제하거나 타겟팅된 mRNA의 분해를 유도하기 위하여 설계될 수 있으며, 간접 핵산이 하이브리드화하는 타겟 서열에 "지시되거나" "타겟팅되는" 것으로 말할 수 있다. 간접 핵산은 예를 들어, 펩티드 핵산(PNA), 잠긴 핵산(locked nucleic acid)(LNA), 2'-O-메틸 올리고뉴클레오티드 및 RNA 간접 제제(siRNA 제제)를 포함할 수 있다. RNAi 분자는 일반적으로 타겟 분자와 헤�테로듀플렉스를 형성함으로써 작용하며, 이는 선택적으로 분해되거나 "넉다운"되어, 타겟 RNA를 불활성화시킨다. 일부 조건하에서, 간접 RNA 분자는 또한 전사물 변역의 억제 및/또는 전사물의 전사의 억제에 의해 타겟 전사물을 불활성화시킬 수 있다. 간접 핵산이 상술한 방식으로 타겟의 핵산에 대해 타겟팅될 경우, 단백질과 같은 생물학적 관련 타겟에 "대해 타겟팅되는" 것으로 보다 일반적으로 말한다.
- [0034] 용어 "폴리뉴클레오티드", 및 "핵산"은 상호교환적으로 사용된다. 그들은 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드 또는 그의 유사체 어느 것이든, 임의의 조합 및 임의의 길이의, 뉴클레오티드의 중합체 형태를 말한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 삼차원 구조를 가질 수 있으며, 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오티드의 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 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 분리된 DNA, 임의의 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 존재한다면, 뉴클레오티드 구조에의 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 라벨링 성분과의 접합에 의해서와 같이, 추가로 변형될 수 있다. 본 발명에서 제공되는 모든 핵산 서열에서, U 뉴클레오티드는 T 뉴클레오티드와 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 비허클을 의미한다.
- [0036] 올리고뉴클레오티드는 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 폴리뉴클레오티드에 "특이적으로 하이브리드화"한다. 그러한 하이브리드화는 엄격한 하이브리드화 조건에 상응한다. 소정의 이온 강도 및 pH에서, T<sub>m</sub>은 타겟 서열의 50%가 상보성 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화하는 온도이다. 다시, 그러한 하이드리드화는 타겟 서열에 대한 안티센스 올리고머의 정확한 상보성에서뿐만 아니라 "거의" 또는 "설질적" 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 유익성/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 쇄 및 안티센스 쇄에 서열 상보성을 가진 센스 쇄를 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 쇄는 적어도 19 뉴클레오티드(nt) 길이이다. 일부 실시형태에서, 안티센스 쇄는 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 쇄는 MyD88 또는 TLR3 mRNA 서열에 상보적이다. 완벽한 상보성이 필요하지는 않다. 일부 실시형태에서, 안티센스 쇄는 MyD88 또는 TLR3 mRNA 서열에 완벽하게 상보적이다.
- [0045] 일부 실시형태에서, 안티센스 쇄는 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 쇄는 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 쇄는 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 쇄가 MyD88 또는 TLR3 mRNA 서열에 상보적이다. 완벽한 상보성이 필요하지는 않다. 일부 실시형태에서, 안티센스 쇄는 MyD88 또는 TLR3 mRNA 서열에 완벽하게 상보적이다.
- [0046] 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. 일부 실시형태에서 센스 쇄는 안티센스 쇄의 서열에 완벽하게 상보적이다.
- [0047] 일부 실시형태에서, 안티센스 쇄 및 센스 쇄는 안티센스 쇄의 5' 말단과 센스 쇄의 3' 말단이 블런트(blunt) 말단을 형성하는 복합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 안티센스 쇄 및 센스 쇄는 안티센스 쇄의 5' 말단이 센스 쇄의 3' 말단을 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 nt 만큼) 오버hang(overhang)하는 복합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 안티센스 쇄와 센스 쇄는 센스 쇄의 5' 말단이 안티센스 쇄의 3' 말단을 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 nt 만큼) 오버hang하는 복합체를 형성한다.
- [0048] 일부 실시형태에서, RNA 복합체의 안티센스 쇄 및/또는 센스 쇄는 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6, 표 8 또는 표 10에 열거된 서열로부터 선택된 센스 쇄 서열 및/또는 안티센스 쇄 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'-0-메틸화 뉴클레오시드, 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 올리고뉴클레오티드 화학을 이용할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 화학의 예는, 비제한적으로, 웨티드 핵산(PNA), 연결된 핵산(LNA), 포스포로티오에이트, 2'0-Me-변형 올리고뉴클레오티드 및 모르폴리노 화학을 포함하며 전술한 것 중 임의의 것의 조합을 포함한다. 일반적으로, PNA 및 LNA 화학은 2'0-Me 올리고뉴클레오티드에 비하여 그들의 상대적으로 높은 타겟 결합 강도 때문에 더 짧은 타겟팅 서열을 이용할 수 있다. 포스포로티오에이트 및 2'-0-Me-변형 화학은 종종 조합되어 포스포로티오에이트 백본을 가진 2'0-Me-변형 올리고뉴클레오티드를 생성한다. 예를 들어, PCT 공개 제WO/2013/112053호 및 제WO/2009/008725호를 참고하며, 그 각각은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.
- [0051] 웨티드 핵산(PNA)은 백본이 피리미딘 또는 퓨린 염기가 부착된 N-(2-아미노에틸) 글리신 단위로 이루어지며 데옥시리보스 백본과 구조적으로 동종형태인 DNA 유사체이다. 천연 피리미딘 및 퓨린 염기를 함유한 PNA는 왓슨-크릭 염기-페어링 규칙에 따라 상보성 올리고뉴클레오티드에 하이브리드화하며, 염기쌍 인식 면에서 DNA를 모방한다. PNA의 백본은 포스포다이에스테르 결합이 아닌 웨티드 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-설포닐기) 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. 일부 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 쇄의 3' 말단에 부착된다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 안티센스 쇄의 3' 말단에 부착된다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 센스 쇄의 5' 말단에 부착된다. 일부 실시형태에서, 콜레스테롤 모이어티는 안티센스 쇄의 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 포스포로티오에이트)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 쇄의 3' 말단에 위치된다. 일부 실시형태에서, 센스 쇄의 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 쇄의 3' 말단에 위치된다. 일부 실시형태에서, 안티센스 쇄의 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 쇄의 3' 말단 영역 및 안티센스 쇄의 3' 말단 영역 둘 모두가 다수의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 센스 쇄는 비변형 뉴클레오시드와 교번하는 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 센스 쇄는 비변형 뉴클레오시드와 교번하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 2'-O-메틸화 뉴클레오시드의 연속 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 안티-센스 쇄는 비변형 뉴클레오시드와 교번하는 2'-O-메틸화 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 안티-센스 쇄는 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 액소뉴클레아제, 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 쇄 내의 리보뉴클레오티드 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 쇄 내의 리보뉴클레오티드 간의 결합의 전부가 포스포로티오에이트 결합이다.

[0060] 일부 실시형태에서, RNA 복합체의 안티센스 쇄 내의 리보뉴클레오티드 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 쇄 내의 리보뉴클레오티드 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 눈에의 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, 리포좀, 양이온성 중합체, 세포 침투 웨პ티드(CPP), 단백질 전달 도메인(PTD), 항체 및/또는 앱타머)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 보조성분과 연합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 본 명세서에 개시된 제제를 액체 담체와 균일하게 그리고 완전하게 연합시킴으로써 제조된다.

#### 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, 리포좀, 양이온성 중합체, 세포 침투 웨პ티드(CPP), 단백질 전달도메인(PTD), 항체 및/또는 앱타머)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-as1RNA 및 cp-las1RNA를 위한)전달 비히클 없이 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 트랜싯(Mirus Transit) TKO 친유성 시약; 리포펙틴; 리포펙타민; 셀펙틴(cellfectin); 폴리양이온(polycation)(예를 들어, 폴리리신), 아테로콜라겐(atelocollagen), 나노플렉스(nanoplexe) 및 리포좀을 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 간접 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, 리포좀은 본 명세서에 개시된 RNA 복합체를 개체에게 전달하기 위하여 이용된다. 본 명세서에 개시된 방법에서 사용하기 적합한 리포좀은 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 리포좀 크기 및 혈류에서 리포좀 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, 리포좀 제조를 위한 다양한 방법이 알려져 있으며, 상기 문헌의 전체 내용은 참고로 본원에 포함된다.

[0071]

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

[0072]

본 명세서에 개시된 리포좀의 제조에서 사용하기 위한 옵소닌작용-억제 모이어티는 전형적으로 리포좀 막에 결합된 큰 친수성 중합체이다. 본 명세서에서 사용될 때, 옵소닌작용 억제 모이어티는 예를 들어, 리포좀 막 자체내로 지질-가용성 고정제(anchor)의 삽입에 의해, 또는 막지질의 활성기에의 직접 결합에 의해, 리포좀 막에 화학적으로 또는 물리적으로 부착될 경우 리포좀 막에 "결합"된다. 이를 옵소닌작용-억제 친수성 중합체는 MMS 및 RES에 의한 리포좀의 흡수를 유의하게 감소시키는 보호성 표면층을 형성하며; 예를 들어, 미국 특허 제4,920,016호에 개시되며 그 전체 내용은 참고로 본원에 포함된다.

[0073]

일부 실시형태에서, 리포좀을 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; 폴리알콜, 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 리포좀은 때로는 "페길화(PEGylated) 리포좀"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 눈에의 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(asRNA)를 동정하기 위하여, 44가지의 asRNA를 합성하고 스크리닝하였다. 스크리닝된 asRNA의 핵산 서열이 표 1에 제공된다.

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

asRNA 서열
MyD88#1(S) : 5' GGCGGCCGACUGGGACC 3'
MyD88#1(AS) : 5' GGUCCAGUCGGCCGCCACC 3'
MyD88#2(S) : 5' UGGCGGCCGACUGGGAC 3'
MyD88#2(AS) : 5' GUCCAGUCGGCCGCCACCU 3'
MyD88#3(S) : 5' GUGGCGGCCGACUGGA 3'
MyD88#3(AS) : 5' UCCAGUCGGCCGCCACCU 3'
MyD88#4(S) : 5' CUGGCGGAGGAGAUGG 3'
MyD88#4(AS) : 5' CCAUCUCCUCCGCCAGCGC 3'
MyD88#5(S) : 5' GCUGGCGGAGGAGAUGG 3'
MyD88#5(AS) : 5' CAUCUCCUCGCCAGCGCG 3'
MyD88#6(S) : 5' AGUACUUGGAGAUCCG 3'
MyD88#6(AS) : 5' CGGAUCUCCAAGUACUCAA 3'
MyD88#7(S) : 5' GAGUACUUGGAGAUC 3'
MyD88#7(AS) : 5' GGAUCUCCAAGUACUAAA 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' AAGCCUUUACAGGUGGG 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' GCCGGAUCAUCUCCUGCAC 3'
MyD88#18(S) : 5' GCAGGAGAUGAUCCGG 3'
MyD88#18(AS) : 5' CCGGAUCAUCUCCUGCAC 3'
MyD88#19(S) : 5' UGCAGGAGAUGAUCCG 3'
MyD88#19(AS) : 5' CGGAUCAUCUCCUGCACAA 3'
MyD88#20(S) : 5' GUGCAGGAGAUGAUCC 3'
MyD88#20(AS) : 5' GGAUCAUCUCCUGCACAAA 3'
MyD88#21(S) : 5' UGUGCAGGAGAUGAUC 3'
MyD88#21(AS) : 5' GAUCAUCUCCUGCACAAAC 3'
MyD88#22(S) : 5' UUGUGCAGGAGAUGAU 3'
MyD88#22(AS) : 5' AUCAUCUCCUGCACAAACU 3'
MyD88#23(S) : 5' UUUGUGCAGGAGAUGA 3'
MyD88#23(AS) : 5' UCAUCUCCUGCACAAACUG 3'
MyD88#24(S) : 5' GUUUGUGCAGGAGAUG 3'
MyD88#24(AS) : 5' CAUCUCCUGCACAAACUGG 3'
MyD88#25(S) : 5' AGUUUGUGCAGGAGAU 3'
MyD88#25(AS) : 5' AUCUCCUGCACAAACUGGA 3'
MyD88#26(S) : 5' GUGACUUCCAGACCAA 3'
MyD88#26(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACAUU 3'
MyD88#27(S) : 5' UGUGACUUCCAGACA 3'
MyD88#27(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAUUC 3'
MyD88#28(S) : 5' AUGUGACUUCCAGACC 3'
MyD88#28(AS) : 5' GGUCUGGAAGUCACAUUCC 3'
MyD88#29(S) : 5' AAUGUGACUUCCAGAC 3'
MyD88#29(AS) : 5' GUCUGGAAGUCACAUUCCU 3'
MyD88#30(S) : 5' GAAUGUGACUUCCAGA 3'
MyD88#30(AS) : 5' UCUGGAAGUCACAUUCCUU 3'
MyD88#31(S) : 5' GGAAUGUGACUUCCAG 3'
MyD88#31(AS) : 5' CUGGAAGUCACAUUCCUUG 3'
MyD88#32(S) : 5' AGGAAUGUGACUUCCA 3'
MyD88#32(AS) : 5' UGGAAGUCACAUUCCUUGC 3'
MyD88#33(S) : 5' AAGGAAUGUGACUUCC 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'

MyD88#37(AS) : 5' GUCACAUUCCUUGCUCUGC 3'
MyD88#38(S) : 5' AGAGCAAGGAAUGUGA 3'
MyD88#38(AS) : 5' UCACAUUCCUUGCUCUGC 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' ACCAGACACAGGUGGCCAGG 3'

[0085]

표 1에 열거된 asRNA를 2분 동안 95°C에서 그리고 1시간 동안 37°C에서 1x siRNA 듀플렉스 베퍼(에스티팜(STpharm))에서 항온처리하였다. 적절한 쇄 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 스크리닝을 위하여, 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(집코(Gibco)) 및 100 µg/ml 폐니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 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(인비트로겐(Invitrogen))을 이용하여 0.3 nM의 asRNA로 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 회석한 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 asRNA의 각각에 의한 MyD88 억제 수준이 도 1에 제공된다. asRNA 서열 중 세 가지인 asiMyD88(26), asiMyD88(27) 및 asiMyD88(32)를 후속 연구에서 사용하기 위하여 선택하였다.

[0093]

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

[0094]

asRNA 서열 중 세 가지인 asiMyD88(26), asiMyD88(27) 및 asiMyD88(32)를 상이한 농도에서 MyD88 발현을 억제하는 그들의 능력에 대해 시험하였다. asRNA를 2분 동안 95°C에서 그리고 1시간 동안 37°C에서 1x siRNA 듀플렉스 베퍼(에스티팜)에서 항온처리하였다. 적절한 쇄 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 스크리닝을 위하여, 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(집코) 및 100 µg/ml 폐니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 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(인비트로겐)을 이용하여 asRNA로 형질감염시켰다.

[0095]

상이한 농도의 3가지 asRNA에 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 쇄 길이를 가진 다양한 잠재적 asirMyD88 구조를 합성하고 MyD88 발현을 억제하는 그들의 능력에 대해 시험하였다.(표 2)

[0098] 표 2. 추가의 asirNA 서열.

MyD88#26(S) : 5' GUGACUUCCAGACCAA 3'
MyD88#26(19AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACAUU 3'
MyD88#26(21AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCACAUUCC 3'
MyD88#26(31AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAUUCCUUGCUGCA 3'
MyD88#27(S) : 5' UGUGACUUCCAGCCA 3'
MyD88#27(19AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAUUC 3'
MyD88#27(21AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAUUCC 3'
MyD88#27(31AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAUUCCUUGCUCUGCAG 3'

[0099]

[0100] 표 2에 열거된 asirNA를 2분 동안 95°C에서 그리고 1시간 동안 37°C에서 1x siRNA 듀플렉스 버퍼(에스티팜)에서 항온처리하였다. 적절한 쇄 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 스크리닝을 위하여, 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(집코) 및 100 µg/ml 폐니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 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(인비트로겐)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 회석한 후, 스텝원 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.

[0102] 6가지 asirNA의 각각에 의한 MyD88 억제 수준이 도 3에 제공된다. asirMyD88(26) 및 asirMyD88(27)의 21 뉴클레오티드 안티센스가 최고 수준의 MyD88 억제를 나타냈다. 21 뉴클레오티드 안티센스를 후속 연구에서의 사용을 위하여 선택하였다.

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

[0104] MyD88 단백질의 억제에 대한 asirMyD88의 효능을 시험하였다.

[0105] asirNA를 2분 동안 95°C에서 그리고 1시간 동안 37°C에서 1x siRNA 듀플렉스 버퍼(에스티팜)에서 항온처리하였다. 적절한 쇄 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다.

[0106] 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(집코) 및 100 µg/ml 폐니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(집코)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™ RNAiMAX(인비트로겐)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 블로트를 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°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(Chemidoc) 장비(바이오-라드)를 이용하여 MyD88 및  $\beta$ -액틴 밴드를 영상화하였다.

[0108] 웨스턴 블로트 분석의 결과가 도 4에 도시된다. A549 세포 및 HeLa 세포의 모든 asimyD88 형질감염 세포주에서, 80% 이상의 MyD88 단백질 억제가 확인되었다(도 4).

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.

표 3. 변형된 asirNA 서열. m = 2'-0-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(깁코) 및 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(깁코)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(인비트로겐)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.

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.

표 4. 자가-전달 및 MyD88 억제에 대해 시험된 변형된 asirNA 서열.

[0119]

m = 2'-0-메틸 RNA, \* = 포스포로티오에이트 결합

cp-asiMyD88#26-1(S) : 5' GUGACUUCCAGACC*A*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#26-1(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACA*U*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-2(S) : 5' GUGACUUCCAGACC*A*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#26-2(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACA*U*mU*mC*mC 3'
cp-asiMyD88#26-3(S) : 5' GUGACUUCCAGACC*A*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#26-3(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACmA*mU*mU*mC*mC 3'
cp-asiMyD88#26-4(S) : 5' GUGACUUCCAGACC*A*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#26-4(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACmAmCmA*mU*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-5(S) : 5' GUGACUUCCAGACC*A*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#26-5(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACmAmCA*U*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-6(S) : 5' mGUmGAmCUMUCmCAmGAmCC*mA*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#26-6(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACA*U*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-7(S) : 5' mGUmGAmCUMUCmCAmGAmCC*mA*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#26-7(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACA*U*mU*mC*mC 3'
cp-asiMyD88#26-8(S) : 5' mGUmGAmCUMUCmCAmGAmCC*mA*A* 클레스테를 3'

[0120]

cp-asiMyD88#26-8(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACmA*mU*mU*mC*mC 3'
cp-asiMyD88#26-9(S) : 5' mGUmGAmCUMUCmCAmGAmCC*mA*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#26-9(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACmAmCmA*mU*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-10(S) : 5' mGUmGAmCUMUCmCAmGAmCC*mA*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#26-10(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACmAmCA*U*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#27-1(S) : 5' UGUGACUUCCAGAC*C*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#27-1(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAU*U*C*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-2(S) : 5' UGUGACUUCCAGAC*C*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#27-2(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAU*U*mC*mC*mU 3'
cp-asiMyD88#27-3(S) : 5' UGUGACUUCCAGAC*C*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#27-3(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAmU*mU*mC*mC*mU 3'
cp-asiMyD88#27-4(S) : 5' UGUGACUUCCAGAC*C*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#27-4(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACmAmU*mU*U*C*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-5(S) : 5' UGUGACUUCCAGAC*C*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#27-5(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACmAU*U*C*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-6(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#27-6(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAU*U*C*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-7(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#27-7(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAU*U*mC*mC*mU 3'
cp-asiMyD88#27-8(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#27-8(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACAmU*mU*mC*mC*mU 3'
cp-asiMyD88#27-9(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#27-9(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACmAmU*mU*U*C*C*U 3'
cp-asiMyD88#27-10(S) : 5' mUGmUGmACmUUmCCmAGmAC*mC*A* 클레스테를 3'
cp-asiMyD88#27-10(AS) : 5' UGGUCUGGAAGUCACmAU*U*C*C*U 3'

[0121]

[0122]

100 mm 세포 배양 디ッシュ내의 10% 태아 소 혈청(집코) 및 100 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(집코)에서 배양된 HeLa 세포(ATCC)를 이용하였다.

[0123]

표 4에 열거된 잠재적 cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(집코)에서 95°C에서 2분 동안 그리고 37°C에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 쇄 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 베퍼에서 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 베퍼(깁코)에서 95°C에서 2분 동안 그리고 37°C에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 쇄 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 베퍼에서 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 베퍼(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(앱캡) 및 항- $\gamma$ -튜불린(베틸(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 주가 60% 이상의 MyD88 단백질 억제를 나타냈다(도 7).
- [0132] 실시예 8: MyD88-특이적 cp-asiRNA를 이용한 MyD88 단백질의 억제
- [0133] 안티센스 쇄 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]

 $m = 2'-0$ -메틸 RNA, \* = 포스포로티오에이트 결합

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

[0137]

[0138]

표 5에 열거된 잠재적 cp-asiRNA 각각의  $1 \mu M$  HeLa 세포에서 MyD88 mRNA를 억제하는 능력을 시험하였다.  $100 \mu M$  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 베퍼(집코)에서  $95^{\circ}C$ 에서 2분 동안 그리고  $37^{\circ}C$ 에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 쇄 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 베퍼에서 잠재적 cp-asiRNA의 존재하에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 asRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다. asRNA 처리 48시간 후, MyD88 mRNA 발현 수준을 결정하였다.

[0139]

도 8에 나타난 대로, 센스 쇄 상에 3개의 포스포로티오에이트 결합 및 안티센스 쇄 상에 4개의 포스포로티오에이트 결합을 함유한 MyD88 mRNA 잠재적 cp-asiRNA(26), 센스 쇄 상에 3개의 포스포로티오에이트 결합 및 안티센스 쇄 상에 3개의  $2'-0$ -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  $3 \mu M$ 에서 HeLa 세포와 항온처리하고 웨스턴 블로트에 의해 MyD88 단백질 수준을 결정하였다.  $100 \mu M$  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 베퍼(집코)에서  $95^{\circ}C$ 에서 2분 동안 그리고  $37^{\circ}C$ 에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 쇄 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(앰캡) 및 항- $\gamma$ -튜불린(베틸)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 억제를 나타냈다. 또한, cp-asiMyD88(26)-10 및 cp-asiMyD88(27)-2가 다른 cp-asiMyD88보다 MyD88 억제 능력에서 더 높은 효율을 갖는 것으로 나타났다(도 9).

#### 실시예 10: 추가의 MyD88 cp-asiRNA 구조

[0145] 상이한 쇄 길이 및 2'-0-메틸화 변형 및 포스포로티오에이트 결합 수를 가진 다양한 잠재적 cp-asiMyD88 구조를 합성하고 MyD88 발현을 억제하는 그들의 능력에 대해 시험하였다(표 6).

표 6. 추가의 cp-asiRNA 서열( $m = 2'-0$ -메틸 RNA, \* = 포스포로티오에이트 결합)

cp-asiMyD88#26-13(S) : 5' GUGACUUCCAGACC*A*A* 클레스테롤 3'
cp-asiMyD88#26-13(AS) : 5' UUGGUCUGGAAGUCmA*mC*mA*mU*U*C*C 3'
cp-asiMyD88#26-19(S) : 5' GUGACUUCCAGACC*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 쇄 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 뉴클레오티드 안티센스 쇄 상에 4개의 2'-0-메틸화 및 6개의 포스포로티오에이트 결합을 함유하는 MyD88 mRNA 잠재적 cp-asiRNA(26), 19 뉴클레오티드 안티센스 쇄 상에 4개의 2'-0-메틸화 및 6개의 포스포로티오에이트 결합을 함유하는 cp-asiRNA(27)가 최고 수준의 MyD88 억제를 나타냈다.

#### 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 쇄 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 블로트를 통해 결정하였다. 요약하면, 처리된 HeLa 세포를 RIPA 버퍼(GE)로 용해시켰다. 30 µg의 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(앱캡) 및 항-γ-튜불린(베틸)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 γ-튜불린 밴드를 영상화하였다.

[0153] 웨스턴 블로트 분석의 결과가 도 11에 도시된다. 모든 3 µM cp-asiMyD88 항온처리된 세포주가 50% 이상의 MyD88 단백질 억제를 나타냈다. 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(asRNA)를 동정하기 위하여, 100개의 asRNA를 합성하고 스크리닝하였다. 스크리닝된 asRNA의 핵산 서열이 표 7에 제공된다.

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

TLR3 asRNA 서열			
명칭	서열 (5'-3')	명칭	서열 (5'-3')
TLR3asiRNA S(1)	AUCUUUCCUACAACAA	TLR3asiRNA AS(1)	UUGUUGUAGGAAAGAUCGAGC
TLR3asiRNA S(2)	UCUUUCCUACAACAAAC	TLR3asiRNA AS(2)	GUUGUUGUAGGAAAGAUCGAG
TLR3asiRNA S(3)	GGCCCUUAAAAAUGUG	TLR3asiRNA AS(3)	CACAUUUUUAAGGCCACCCU
TLR3asiRNA S(4)	GCCCUCUAAAAAUGUGG	TLR3asiRNA AS(4)	CCACAUUUUUAAGGCCACCC
TLR3asiRNA S(5)	CCCUUAAAAAUGUGGA	TLR3asiRNA AS(5)	UCCACAUUUUUAAGGCCACC
TLR3asiRNA S(6)	CCUUAAAAAUGUGGAU	TLR3asiRNA AS(6)	AUCCACAUUUUUAAGGCCAC
TLR3asiRNA S(7)	CUUAAAAAUGUGGUA	TLR3asiRNA AS(7)	UAUCCACAUUUUUAAGGCCA
TLR3asiRNA S(8)	UCGUAACUUGACCAUU	TLR3asiRNA AS(8)	AAUGGUCAAGUUACGAAGAGG
TLR3asiRNA S(9)	CGUAACUUGACCAUUC	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)	ACAACAACAUAGCCAA	TLR3asiRNA AS(15)	UUGGCUAUGUUGUUGUUGCUU
TLR3asiRNA S(16)	CAACAACAAGCCAAC	TLR3asiRNA AS(16)	GUUGGCUAUGUUGUUGUUGCU
TLR3asiRNA S(17)	AACAACAAGCCAACA	TLR3asiRNA AS(17)	UGUUGGCCAUGUUGUUGUUGC
TLR3asiRNA S(18)	ACAACAUAGCCAACAU	TLR3asiRNA AS(18)	AUGUUGGCCAUGUUGUUGUUG
TLR3asiRNA S(19)	CAACAUAGCCAACAU	TLR3asiRNA AS(19)	UAUGUUGGCCAUGUUGUUGUU
TLR3asiRNA S(20)	AACAUAGCCAACAUAA	TLR3asiRNA AS(20)	UUAUGUUGGCCAUGUUGUUGU
TLR3asiRNA S(21)	ACAUAGCCAACAUAAA	TLR3asiRNA AS(21)	UUUAUGUUGGCCAUGUUGUUG
TLR3asiRNA S(22)	AUAGCCAACAUAAAUG	TLR3asiRNA AS(22)	CAUUUAUGUUGGCCAUGUUGU
TLR3asiRNA S(23)	UAGCCAACAUAAAUGA	TLR3asiRNA AS(23)	UCAUUUAUGUUGGCCAUGUUG
TLR3asiRNA S(24)	AAUCUCUCAAAUUUUG	TLR3asiRNA AS(24)	CAAAAUUUGAGAGAUUGGUCU
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)	CCCUUCGCAAACAGAGUGCA
TLR3asiRNA S(31)	CUGUUUGCGAAGAGGA	TLR3asiRNA AS(31)	UCCUCUUCGCAAACAGAGUGC
TLR3asiRNA S(32)	UGUUUGCGAAGAGGAA	TLR3asiRNA AS(32)	UUCCUCUUCGCAAACAGAGUG
TLR3asiRNA S(33)	GUUUGCGAAGAGGAAU	TLR3asiRNA AS(33)	AUUCCUCUUCGCAAACAGAGU
TLR3asiRNA S(34)	UUUGCGAAGAGGAAUG	TLR3asiRNA AS(34)	CAUUCUCUUCGCAAACAGAG
TLR3asiRNA S(35)	UUGCGAAGAGGAAUGU	TLR3asiRNA AS(35)	ACAUUCUCUUCGCAAACAGA
TLR3asiRNA S(36)	UGCGAAGAGGAAUGUU	TLR3asiRNA AS(36)	ACAUUCUCUUCGCAAACAG
TLR3asiRNA S(37)	GCGAAGAGGAAUGUUU	TLR3asiRNA AS(37)	AAACAUUCUCUUCGCAAACA
TLR3asiRNA S(38)	CGAAGAGGAAUGUUUA	TLR3asiRNA AS(38)	AAAACAUUCUCUUCGCAAAC
TLR3asiRNA S(39)	GAAGAGGAAUGUUUAA	TLR3asiRNA AS(39)	UUAAAACAUUCUCUUCGCAA
TLR3asiRNA S(40)	AAGAGGAAUGUUUAAA	TLR3asiRNA AS(40)	UUUAAAACAUUCUCUUCGCAA
TLR3asiRNA S(41)	AGAGGAAUGUUUAAA	TLR3asiRNA AS(41)	AUUAAAACAUUCUCUUCGCA
TLR3asiRNA S(42)	GAGGAAUGUUUAAAUC	TLR3asiRNA AS(42)	GAUUAAAACAUUCUCUUCG
TLR3asiRNA	AGGAAUGUUUAAAUCU	TLR3asiRNA	AGAUUUAAAACAUUCUCUUCG

S(43)		AS(43)	
TLR3asiRNA S(44)	GGAAUGUUAAAUCUC	TLR3asiRNA AS(44)	GAGAUUUAAACAUUCCUCUUC
TLR3asiRNA S(45)	CUUGAACUGGCCAGUU	TLR3asiRNA AS(45)	AACUGGCCAGUCAAGAUGCA
TLR3asiRNA S(46)	UUGAACUGGCCAGUUC	TLR3asiRNA AS(46)	GAACUGGCCAGUCAAGAUGC
TLR3asiRNA S(47)	UGAACUGGCCAGUUC	TLR3asiRNA AS(47)	UGAACUGGCCAGUCAAGAUG
TLR3asiRNA S(48)	GAACUGGCCAGUUCAG	TLR3asiRNA AS(48)	CUGAACUGGCCAGUCAAGAU
TLR3asiRNA S(49)	AACUGGCCAGUUCAGA	TLR3asiRNA AS(49)	UCUGAACUGGCCAGUCAAGA
TLR3asiRNA S(50)	ACUGGCCAGUUCAGAA	TLR3asiRNA AS(50)	UUCUGAACUGGCCAGUCAAG
TLR3asiRNA S(51)	CUGGCCAGUUCAGAAA	TLR3asiRNA AS(51)	UUUCUGAACUGGCCAGUCAA
TLR3asiRNA S(52)	UGGCCAGUUCAGAAAG	TLR3asiRNA AS(52)	CUUUCUGAACUGGCCAGUCA
TLR3asiRNA S(53)	GGCCAGUUCAGAAAGA	TLR3asiRNA AS(53)	UCUUUCUGAACUGGCCAGUUC
TLR3asiRNA S(54)	GCCAGUUCAGAAAGAAC	TLR3asiRNA AS(54)	UUUUUCUGAACUGGCCAGUU
TLR3asiRNA S(55)	CCAGUUCAGAAAGAAC	TLR3asiRNA AS(55)	GUUCUUUCUGAACUGGCCAGU
TLR3asiRNA S(56)	CAGUUCAGAAAGAACG	TLR3asiRNA AS(56)	CGUUUUUCUGAACUGGCCAG
TLR3asiRNA S(57)	AGUUCAGAAAGAACGG	TLR3asiRNA AS(57)	CCGUUCUUUCUGAACUGGCCA
TLR3asiRNA S(58)	GUUCAGAAAGAACGGA	TLR3asiRNA AS(58)	UCCGUUCUUUCUGAACUGGCC
TLR3asiRNA S(59)	UUCAGAAAGAACGGAU	TLR3asiRNA AS(59)	AUCCGUUCUUUCUGAACUGGC
TLR3asiRNA S(60)	UCAGAAAGAACGGAU	TLR3asiRNA AS(60)	UAUCCGUUCUUUCUGAACUGG
TLR3asiRNA S(61)	AAUUGCAAGUAGCACU	TLR3asiRNA AS(61)	AGUGCUACUUGCAUUUAUGA
TLR3asiRNA S(62)	AUUGCAAGUAGCACUU	TLR3asiRNA AS(62)	AAGUGCUACUUGCAUUUAUG
TLR3asiRNA S(63)	UUGCAAGUAGCACUUG	TLR3asiRNA AS(63)	CAAGUGCUACUUGCAUUUAU
TLR3asiRNA S(64)	UGCAAGUAGCACUUGG	TLR3asiRNA AS(64)	CCAAGUGCUACUUGCAUUUA
TLR3asiRNA S(65)	GCAAGUAGCACUUGGA	TLR3asiRNA AS(65)	UCCAAGUGCUACUUGCAUUU
TLR3asiRNA S(66)	CAAGUAGCACUUGGAU	TLR3asiRNA AS(66)	AUCCAAGUGCUACUUGCAAUU
TLR3asiRNA S(67)	AAGUAGCACUUGGAUC	TLR3asiRNA AS(67)	GAUCCAAGUGCUACUUGCAAU
TLR3asiRNA S(68)	UGCCCCUUUGAACUC	TLR3asiRNA AS(68)	GAGUCAAAGGGGGCACUGUC
TLR3asiRNA S(69)	UCUGGGAACAUUUCUC	TLR3asiRNA AS(69)	GAGAAAUGUUCCAGACCCAA
TLR3asiRNA S(70)	CAGCAUAAAAGAACG	TLR3asiRNA AS(70)	GCUUCUUUUGAUGCUGUUAAAC
TLR3asiRNA S(71)	CACGUGUGAAAGUAUU	TLR3asiRNA AS(71)	AAUACUUUCACACGUGCAAUC
TLR3asiRNA S(72)	GUCUCAACCUCCACAUC	TLR3asiRNA AS(72)	GAUGUGGGAGGUGAGACAGACC

[0159]

TLR3asiRNA S(73)	UGUCUCACCUCCACAU	TLR3asiRNA AS(73)	AUGUGGAGGUGAGACAGACCC
TLR3asiRNA S(74)	AGAUUCAAGGUACAU	TLR3asiRNA AS(74)	GAUGUACCUUGAAUCUUUGC
TLR3asiRNA S(75)	GGAAACACGCAAACCC	TLR3asiRNA AS(75)	GGGUUGCGUGUUUCCAGAGC
TLR3asiRNA S(76)	UGGAAACACGCAAACCC	TLR3asiRNA AS(76)	GGUUUGCGUGUUUCCAGAGCC
TLR3asiRNA S(77)	UUGAGAAACUAGAAA	TLR3asiRNA AS(77)	AUUCUAGUUUCUCAAGACCC
TLR3asiRNA S(78)	CUUGAGAAACUAGAAA	TLR3asiRNA AS(78)	UUUCUAGUUUCUCAAGACCCU
TLR3asiRNA S(79)	AAACAUCCGUUGAGAAG	TLR3asiRNA AS(79)	CUUCUCAACGGAUGUUAUGAG
TLR3asiRNA S(80)	GUGCCCCCUUUGAACU	TLR3asiRNA AS(80)	AGUUCAAAGGGGGCACUGUCU
TLR3asiRNA S(81)	AGUGCCCCCUUUGAAC	TLR3asiRNA AS(81)	GUUCAAAGGGGGCACUGUCUU
TLR3asiRNA S(82)	CAGUGCCCCCUUUGAA	TLR3asiRNA AS(82)	UUCAAAGGGGGCACUGUCUU
TLR3asiRNA S(83)	GGAGGAAUACUUUUUA	TLR3asiRNA AS(83)	AAAAAAAGAUAUCCUCCAGCCC
TLR3asiRNA S(84)	UGGAGGAAUACUUUUU	TLR3asiRNA AS(84)	AAAAAAGAUAUCCUCCAGCCC
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)	AACACUGCACUCUGUU	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)	GCAACACAGAGUGCAUGGUUCA
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)	UAAAUGCAAGUAGCA	TLR3asiRNA AS(96)	UGCUACUUGCAUUUAUGACG
TLR3asiRNA S(97)	AUAAAUGCAAGUAGC	TLR3asiRNA AS(97)	GCUACUUGCAUUUAUGACGA
TLR3asiRNA S(98)	CGUCAAAAUGCAAG	TLR3asiRNA AS(98)	CUUGCAUUUAUGACGAAAGG
TLR3asiRNA S(99)	UCGUCAAAAUGCAA	TLR3asiRNA AS(99)	UUGCAUUUAUGACGAAAGGC
TLR3asiRNA S(100)	UUCGUCAAAAUGCA	TLR3asiRNA AS(100)	UGCAUUUAUGACGAAAGGCA

[0160]

[0161]

표 7에 열거된 asirRNA를 어닐링 버퍼(바이오니어 인크.(Bioneer Inc.), 대한민국)에서 95°C에서 2분동안 그리고 37°C에서 1시간동안 항온처리하였다. 적절한 쇄 어닐링은 UV 투과조명기를 이용하여 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 스크린을 위하여, 100 mm 세포 배양 디쉬내의 10% 태아 소 혈청(FBS, 갑코) 및 100 units/ml 페니실린 및 100 $\mu$ g/ml 스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 변형 이글스 배지(DMEM, 갑코)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 asirRNA로 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 수퍼프렙(SuperPrep))을 이용한 cDNA 합성을 위해 이용하였다. 합성된 cDNA를 회석한 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 asirRNA의 각각에 의한 TLR3 억제의 발현 수준이 도 12에 제공된다. asirRNA 서열 중 17가지인 asirRNA (13), asirRNA (25), asirRNA (26), asirRNA (28), asirRNA (32), asirRNA (33), asirRNA (37), asirRNA (38), asirRNA (39), asirRNA (53), asirRNA (58), asirRNA (60), asirRNA (71), asirRNA (77), asirRNA (78), asirRNA (82) 및 asirRNA (83)을 후속 연구에서 사용하기 위해 선택하였다.

[0163]

[0164]

실시예 13: 자가-전달을 위한 asRNA의 화학적 변형

[0165]

실시예 12에서 선택된 asRNA에 화학적 변형을 적용하고, 변형된 asRNA의 세포 전달을 다른 전달 비히클의 부재하에서 시험하였다. 하기에 개시된 바처럼, 일부 변형은 엔도사이토시스 및 asRNA의 안정성을 개선하였다. 그러한 세포 침투 asRNA(cp-asRNAs)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-asRNA(표 8)를 스크리닝하였다. 각각의 잠재적 cp-asRNA를 전달 비히클없이 1  $\mu$ M 및 3  $\mu$ M에서 인간 피부 각질세포 세포주인 HaCaT 세포와 항온처리하고, qRT-PCR 및 웨스턴 블로트 연구에 의해 TLR3 발현 수준을 측정하였다.

[0167]

표 8: 자가-전달 및 TLR3 억제에 대해 시험된 변형된 asRNA 서열. (m= 2'-0-메틸 RNA. \*= 포스포로티오에이트 결합)

명칭	센스 (5' to 3')
TLR3cp-asRNA S 25	mUGmCAmCUMCUMGUmUUmGC*mG*A* <b>콜레스테롤</b>
TLR3cp-asRNA AS 25(2,4)	UCGCAAACAGAGUGmCmAU*G*G*U*U
TLR3cp-asRNA AS 25(4,4)	UCGCAAACAGAGUGmCmAmU*mG*G*U*U
TLR3cp-asRNA AS 25(7,4)	UCGCAAACAGAGUGmCmAmU*mG*mG*mU*mU
TLR3cp-asRNA S 28	mACmUCmUGmUUmUGmCGmAA*mG*A* <b>콜레스테롤</b>
TLR3cp-asRNA AS 28(2,4)	UCUUCGCAAACAGAmGmUG*C*A*U*G
TLR3cp-asRNA AS 28(4,4)	UCUUCGCAAACAGAmGmUmG*mC*A*U*G
TLR3cp-asRNA AS 28(7,4)	UCUUCGCAAACAGAmGmUmG*mC*mA*mU*mG
TLR3cp-asRNA S 32	mUGmUUmUGmCGmAAmGAmGG*mA*A* <b>콜레스테롤</b>
TLR3cp-asRNA AS 32(2,4)	UUCCUCUUCGCAAAmCmAG*A*G*U*G
TLR3cp-asRNA AS 32(4,4)	UUCCUCUUCGCAAAmCmAmG*mA*G*U*G
TLR3cp-asRNA AS 32(7,4)	UUCCUCUUCGCAAAmCmAmG*mA*mG*mU*mG
TLR3cp-asRNA S 33	mGUmUUmGAmGAmGA*mA*U* <b>콜레스테롤</b>
TLR3cp-asRNA AS 33(2,4)	AUUCCUCUUCGCAAAmAmCA*G*A*G*U
TLR3cp-asRNA AS 33(4,4)	AUUCCUCUUCGCAAAmAmCmA*mG*A*G*U
TLR3cp-asRNA AS 33(7,4)	AUUCCUCUUCGCAAAmAmCmA*mG*mA*mG*mU
TLR3cp-asRNA S 39	mGAmGAmGAmAUMGUmUU*mA*A* <b>콜레스테롤</b>
TLR3cp-asRNA AS 39(2,4)	UUAACAUUCCUCUmUmCG*C*A*A*A
TLR3cp-asRNA AS 39(4,4)	UUAACAUUCCUCUmUmCmG*mC*A*A*A
TLR3cp-asRNA AS 39(7,4)	UUAACAUUCCUCUmUmCmG*mC*mA*mA*mA
TLR3cp-asRNA S 53	mGGmCCmAGmUUmCmAmGAmAA*mG*A* <b>콜레스테롤</b>
TLR3cp-asRNA AS 53(2,4)	UCUUUCUGAACUGGmCmCA*G*U*U*C
TLR3cp-asRNA AS 53(4,4)	UCUUUCUGAACUGGmCmCmA*mG*U*U*C
TLR3cp-asRNA AS 53(7,4)	UCUUUCUGAACUGGmCmCmA*mG*mU*mU*mC
TLR3cp-asRNA S 58	mGUmUCmAGmAAmAGmAAmCG*mG*A* <b>콜레스테롤</b>
TLR3cp-asRNA AS 58(2,4)	UCCGUUCUUUCUGAmAmCU*G*G*C*C
TLR3cp-asRNA AS 58(4,4)	UCCGUUCUUUCUGAmAmCmU*mG*G*C*C
TLR3cp-asRNA AS 58(7,4)	UCCGUUCUUUCUGAmAmCmU*mG*mG*mC*mC
TLR3cp-asRNA S 60	mUCmAGmAAmAGmAAmCGmGA*mU*A* <b>콜레스테롤</b>
TLR3cp-asRNA AS 60(2,4)	UAUCCGUUCUUUCUmGmAA*C*U*G*G
TLR3cp-asRNA AS 60(4,4)	UAUCCGUUCUUUCUmGmAmA*mC*U*G*G
TLR3cp-asRNA AS 60(7,4)	UAUCCGUUCUUUCUmGmAmA*mC*mU*mG*mG

[0168]

[0169]

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

[0170]

cp-asRNA 처리일에,  $5 \times 10^4$  세포를 24-웰 플레이트에 접종한 후, OPTI-MEM에서 잠재적 cp-asRNA의 존재하에서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 cp-asRNA-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 회석한 후, 파워 SYBR 그린 PCR Master mix(어플라이드 바이오시스템즈)를 이용하여 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 하기 프라이머 서열을 이용하였다:

표 9: 프라이머 서열

명칭		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 (툴-유사 수용체 3)	전방	TGC CCC CTT TGA ACT CTT TT	298
	역방	AAA AAC ACC CGC CTC AAA GT	

[0172] cp-asiRNA 항온처리 48시간 후, TLR3 단백질 발현 수준을 웨스턴 블로트를 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 젤 상에 로딩하고 120 V에서 전기영동하였다. 전기영동 후, 단백질을 300 mA에서 1시간 동안 메탄올(마크)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(앱캡) 및 항- $\gamma$ -튜불린 항체(베틸)를 함유한 5% 탈지유에서 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 그 후 막을 10분동안 TBST로 3회 세척하고 HRP-접합된 이차 항체(산타크루즈)를 가진 5% 탈지유에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 막을 10분 동안 TBST로 세척하고 ECL 기질(써모 사이언티픽(Thermo scientific))로 처리하였다. 그 후, 케미독 장비(바이오-라드)를 이용하여 타겟 단백질 랜드를 영상화하였다.

[0173] 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.

[0174]

#### 실시예 14: 추가의 TLR3 cp-asirNA 구조

[0175] [0176] 상이한 쇄 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'-0-메틸 RNA. \*= 포스포로티오에이트 결합).

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

[0177]

[0178] 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 둘베코스 변형 이글스 배지(DMEM, 김코)에서 배양하였다. 표 10에 열거된 잠재적인 cp-asirNA를 OPTI-MEM(김코)에서 95°C에서 2분 동안 그리고 37°C에서 1시간동안 항온처리하였다. 잠재적인 cp-asirNA의 적절한 쇄 어닐링은 젤 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.

[0179] [0180] 도 19에 나타난 대로, 21 뉴클레오티드 안티센스 쇄로 이루어진 TLR3 발현 잠재적 cp-asirNA 및 19 뉴클레오티드 안티센스 쇄로 이루어진 잠재적 cp-asirNA는 유사한 수준의 TLR3 억제를 나타냈다. cp-asiTLR3 (39) 21 및 cp-asiTLR3 (39) 19를 추가 실험을 위해 선택하였다.

[0181] TLR3 단백질의 생산에 대한 저농도의 cp-asiTLR3 (39) 21 및 cp-asiTLR3 (39) 19의 효능을 시험하였다. cp-asirNA를 OPTI-MEM(김코)에서 95°C에서 2분 동안 그리고 37°C에서 1시간동안 항온처리하였다. 잠재적인 cp-asirNA의 적절한 쇄 어닐링은 젤 전기영동을 통해 확인하였다. HaCaT 세포(ATCC)를 10% 태아 소 혈청(FBS, 김코) 및 100 units/ml 페니실린과 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신을 함유한 둘베코스 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 블로트를 통해 결정하였다. 요약하면, 처리된 HaCaT 세포를 포유동물 단백질 추출 버퍼(지이 헬스케어)를 이용하여 용해시켰다. 10 $\mu$ g의 전체 단백질 추출물을 8% SDS-PAGE 젤상에 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(앱캡) 및 항- $\gamma$ -튜불린 항체(베틸)를 함유한 5% 탈지유에서 4°C에서 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 뉴클레오티드 안티센스 쇄를 가진 TLR3 발현 잠재적 cp-asiRNA 및 19 뉴클레오티드 안티센스 쇄를 가진 잠재적 cp-asiRNA가 저 농도에서 유사한 수준의 TLR3 억제를 나타냈다.

#### 참고에 의한 포함

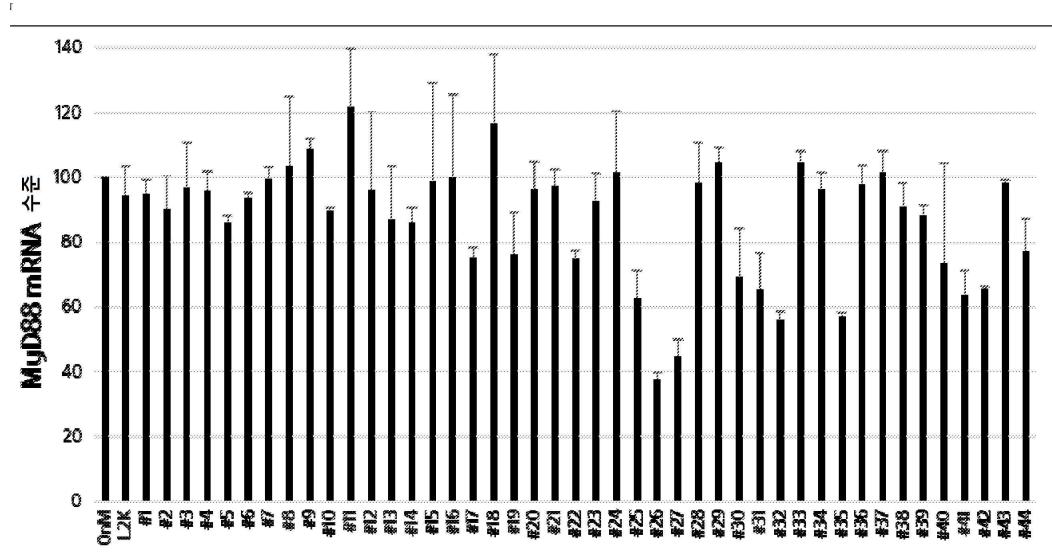
[0185] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특히 및 특허 출원은 각 개별 간행물, 특히 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 나타내진 것처럼 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 상충되는 경우, 본 명세서의 임의의 정의를 비롯한 본 출원이 우선할 것이다.

#### 균등물

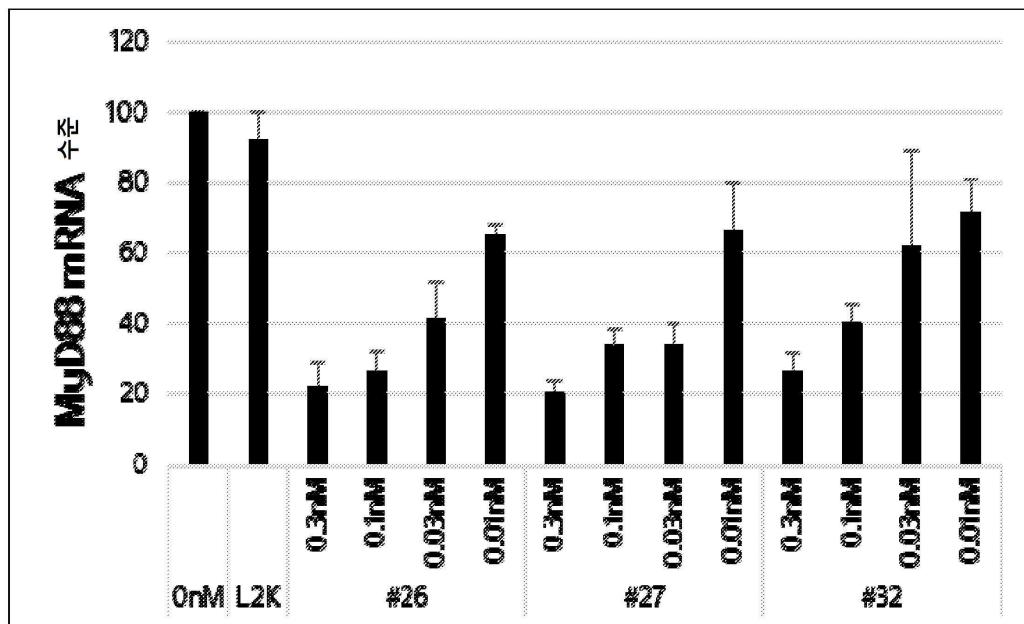
[0186] 당업자는 일상적 실험을 이용하여 본 명세서에 개시된 발명의 구체적 실시형태에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 균등물은 하기 청구범위에 의해 포함되는 것이다.

#### 도면

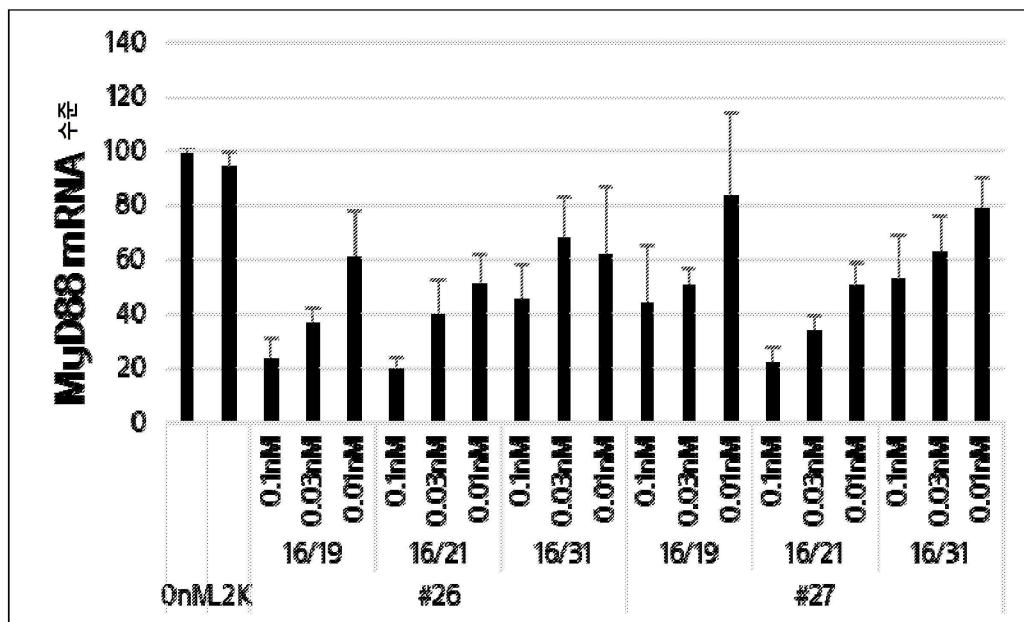
##### 도면1



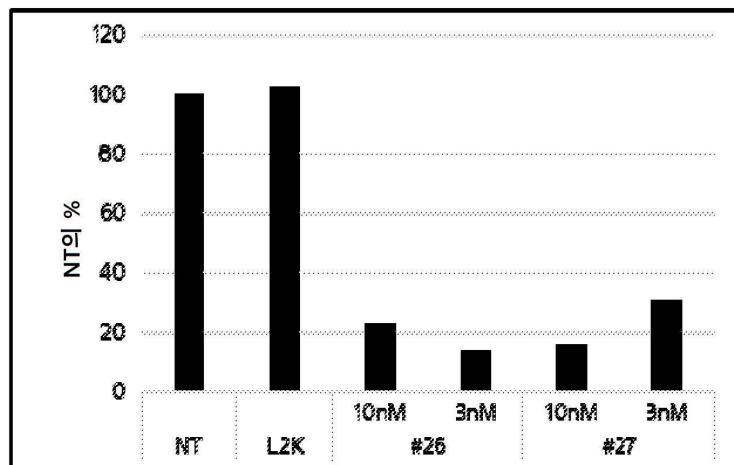
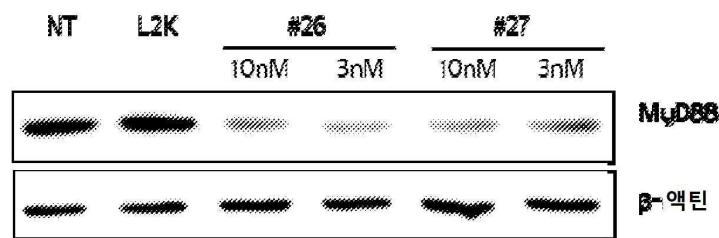
도면2



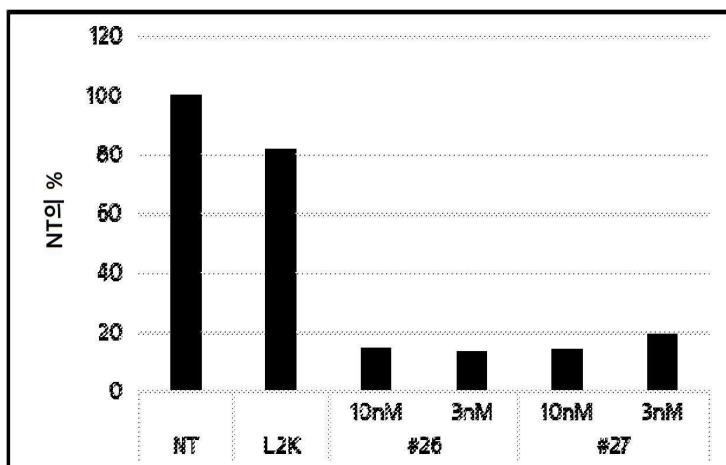
도면3



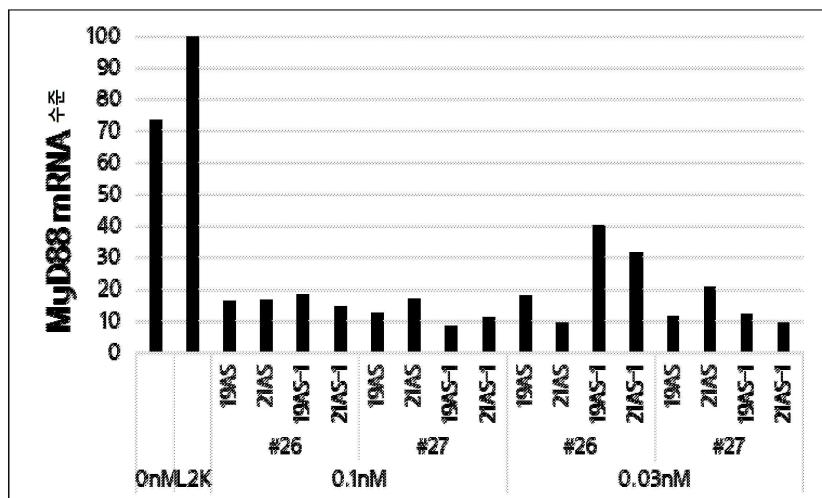
## 도면4a



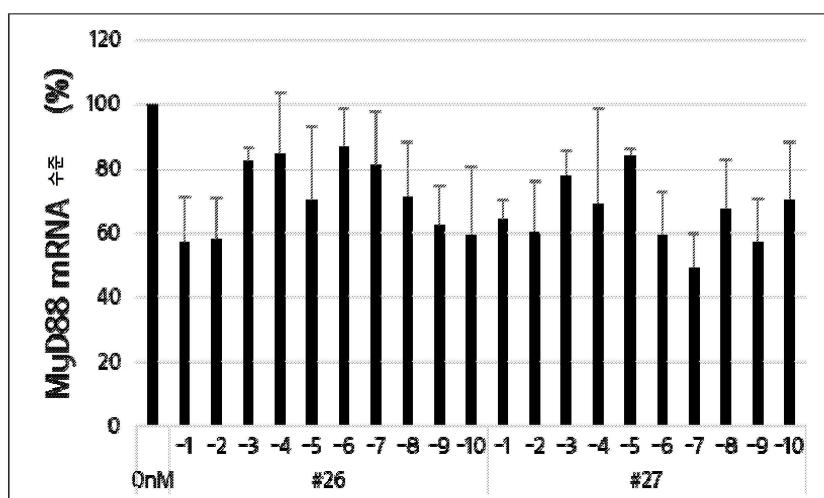
## 도면4b



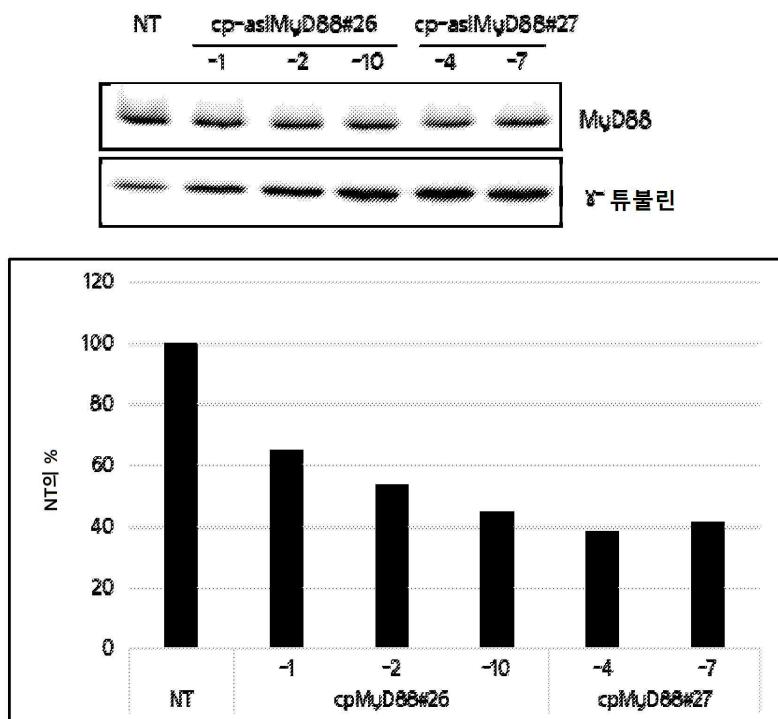
도면5



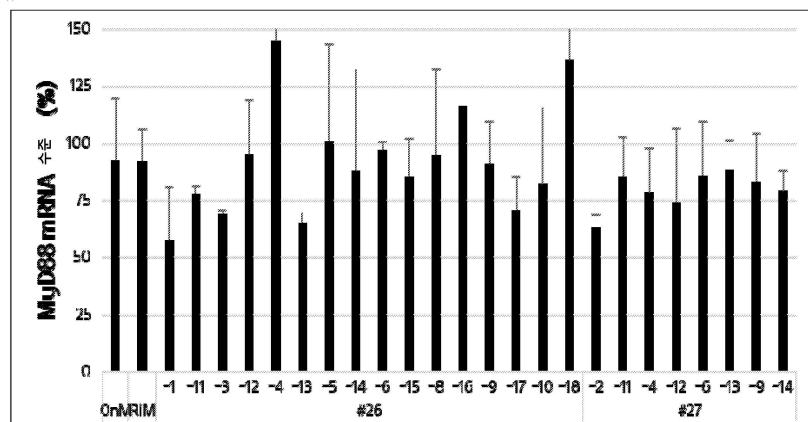
도면6



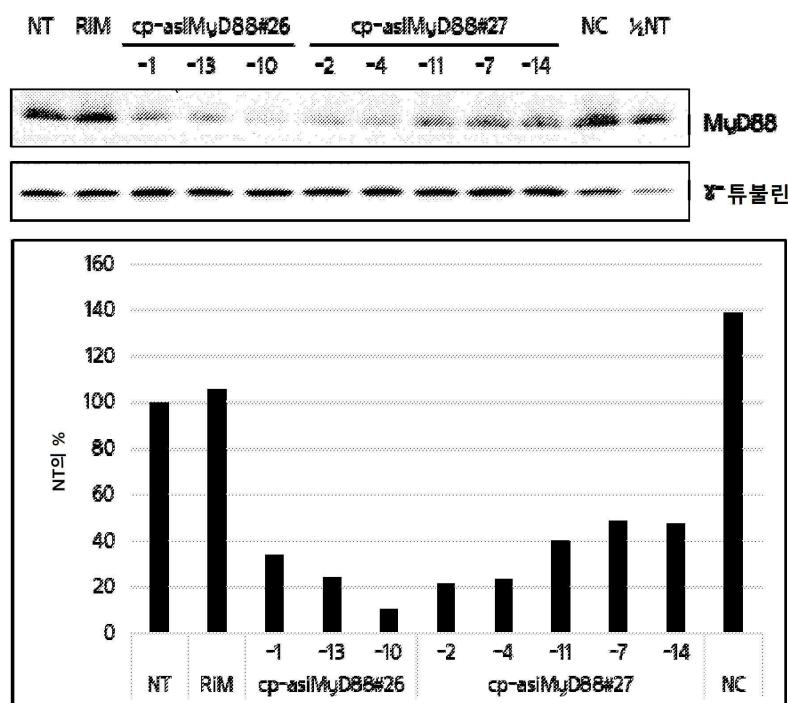
## 도면7



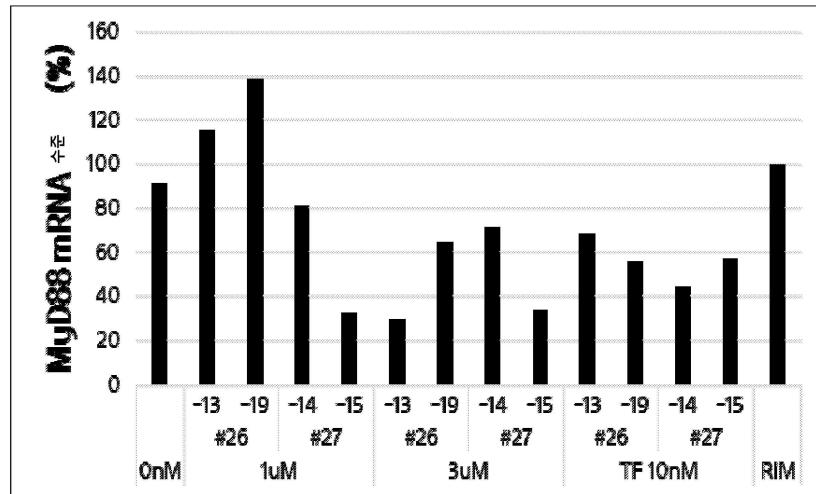
## 도면8



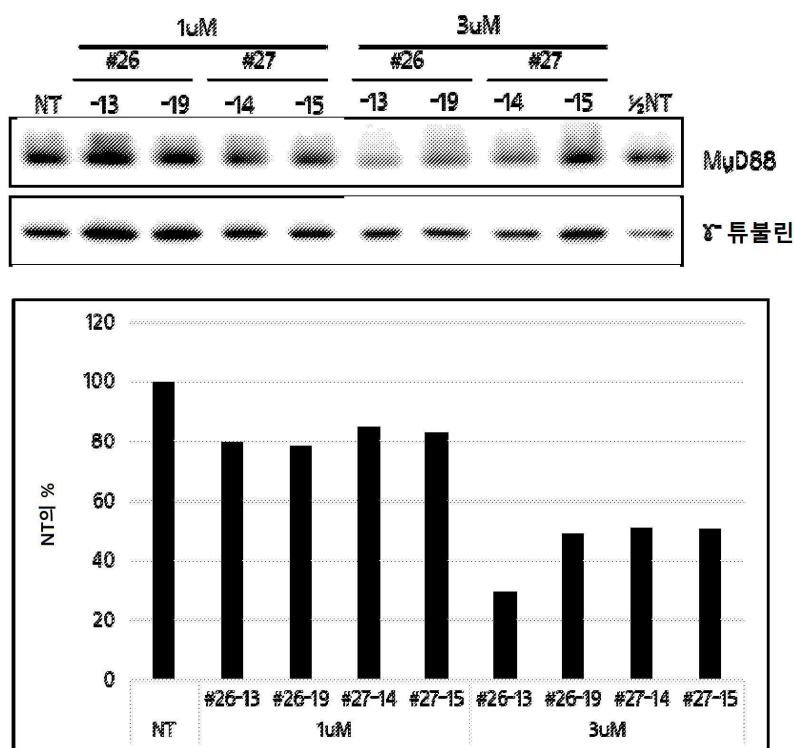
## 도면9



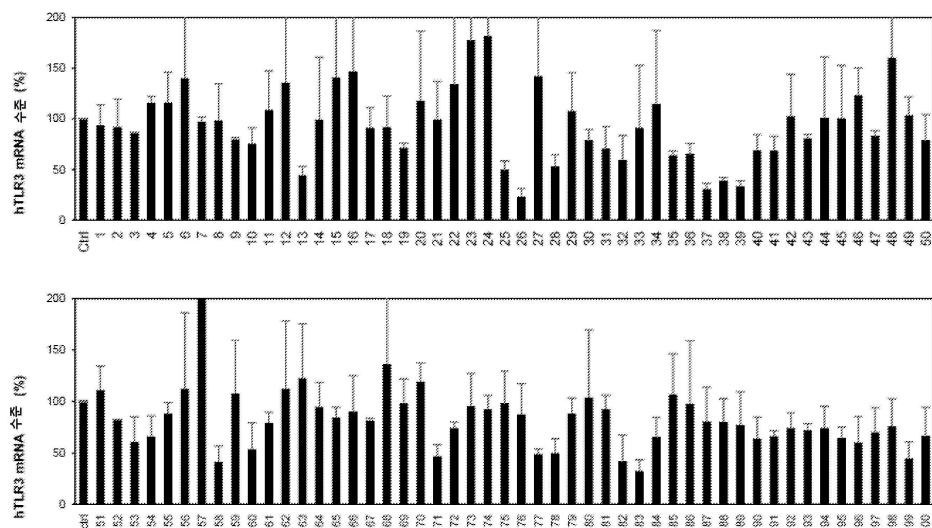
## 도면10



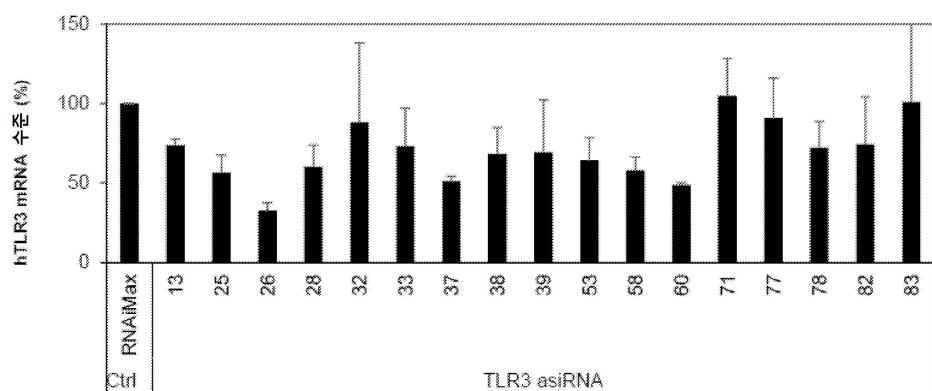
도면11



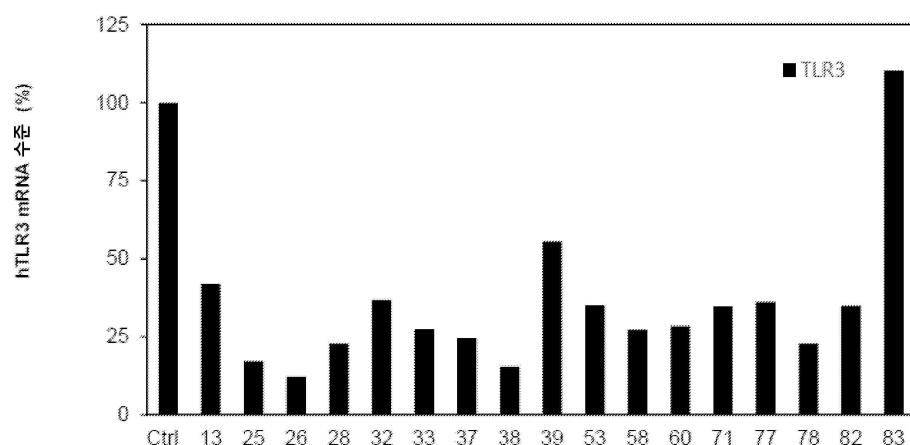
도면12



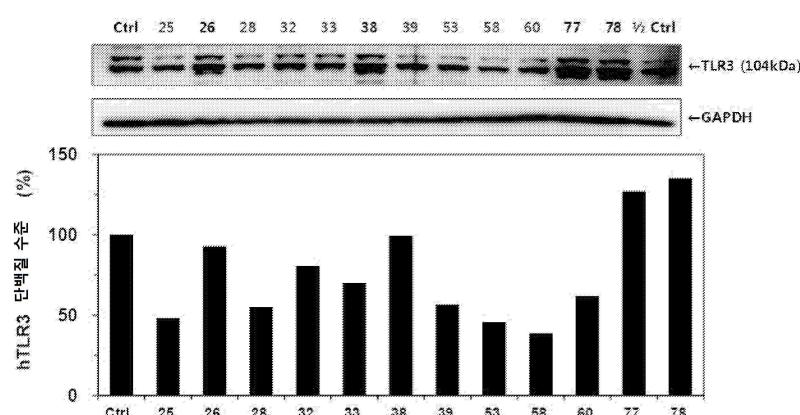
도면13



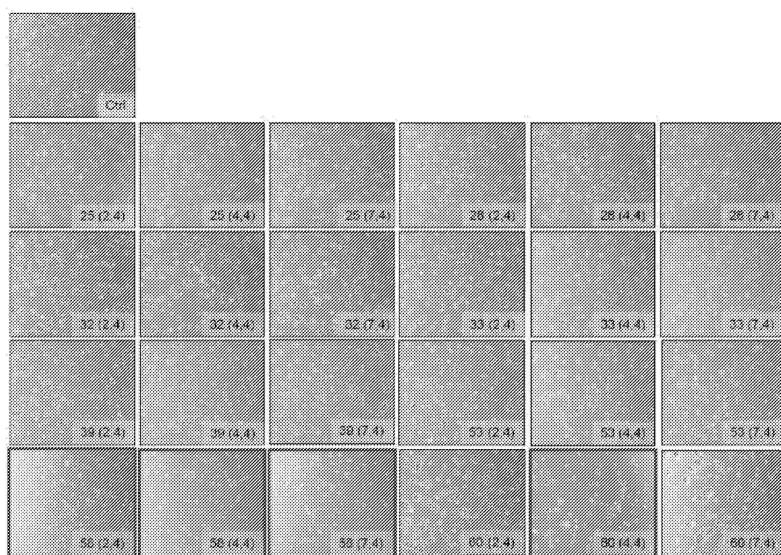
도면14



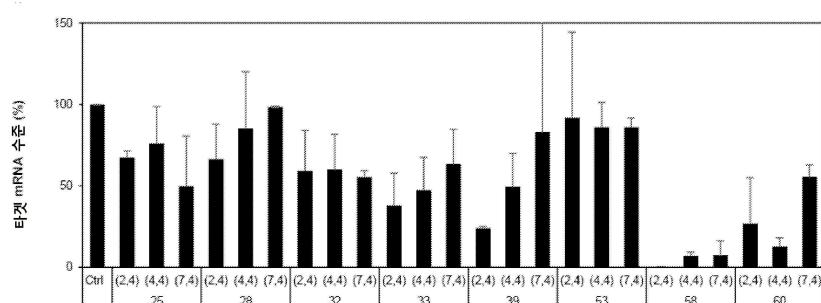
도면15



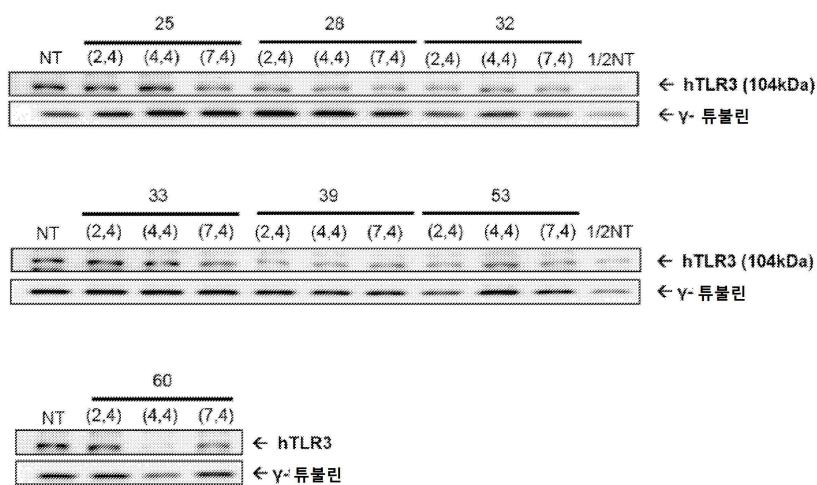
## 도면16



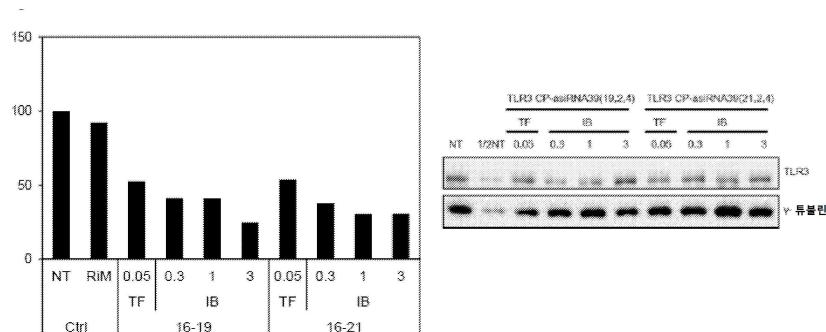
도면17



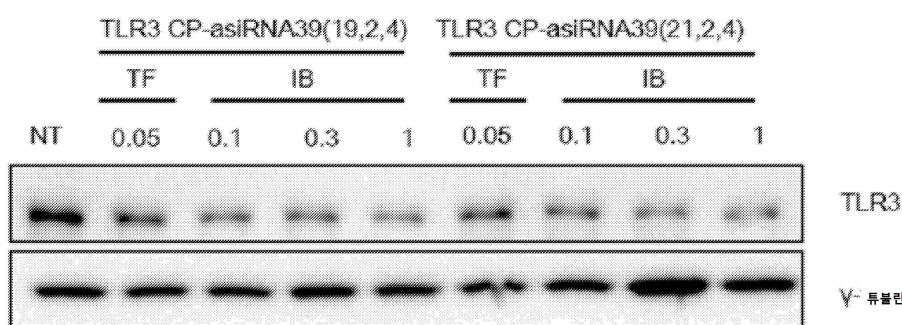
도면18



## 도면19



## 도면20



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; LEE, DONG KI

HONG, SUN WOO

HONG, ISU

HWANG, JIHYE

&lt;120&gt; TREATMENT OF AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION USING RNA COMPLEXES

THAT TARGET MYD88 OR TLR3

&lt;130&gt; OPH-00601 (32896-00601)

&lt;140&gt; 15/352,322

&lt;141&gt; 2016-11-15

&lt;150&gt; 62/255,878

&lt;151&gt; 2015-11-16

&lt;160&gt; 414

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2862

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

agattctac ttcttacgcc ccccacatca cccgcctcg aacctcaagg gtagagggtgg	60
gcaccccccgc ctccgcactt ttgctcgggg ctccagattt tagggcaggg cggcgcttct	120
cgaaaaagcga aagccggcgg ggcggggcgg gtgcgcagg agaaagagga agcgcgtggca	180
gacaatgcga cccgaccgcg ctgaggctcc aggaccgccc gccatggctg caggaggctcc	240
cggcgcgggg tctgcggccc cggctccctc cacatccctcc ctccccctgg ctgcctctcaa	300
catgcgagtgc cggcgcgcgc tgtctctgtt cttgaacgtg cggacacagg tggcggcga	360
ctggaccgcg ctggcggagg agatggactt tgagttactt gggatccggc aactggagac	420
acaagcggac cccactggca ggctgctgga cgcctggcag ggacgcctg ggcctctgt	480
aggccgactg ctgcgactgc ttaccaagct gggccgcac gacgtgctgc tggagctggg	540
acccagcatt gaggaggatt gccaaaagta tatcttgaag cagcagcagg aggaggctga	600
gaaggcctta caggtggccg ctgttagacag cagtgtccca cggacacgcg agctggcggg	660
catcaccaca ctgtatgacc ccctggggca tatgccttag cgtttcgatg ctttcattctg	720
ctattgcccc agcgcacatcc agtttgtgca ggagatgatc cggcaactgg aacagacaaa	780
ctatcgactg aagtttgtgtg tgtctgaccg cgtatgcctg cctggcacct gtgtctggc	840
tattgttagt gagtcatcg aaaagaggtg cgcggatg gtggtggttg tctctgtatga	900
ttacctgcag agcaaggaat gtgacttcca gaccaattt gcactcagcc tctctccagg	960
tgcccatcag aagcgactga tccccatcaa gtacaaggca atgaagaaag agttccccag	1020
catcctgagg ttcatcactg tctgcgacta caccaacccc tgcaccaaat ctgggtctg	1080
gactcgccct gccaaggcct tgcctgcctc ctgaagactg ttctgaggcc ctgggtgtgt	1140
gtgtatctgt ctgcctgtcc atgtacttct gcccgcctc ctcccttcgt tgttaggagga	1200
atctgtgttc tacttacctc tcaattcctg gagatgccaa ctacacagac acgtctgcag	1260
cagctggaca tcacattca tgcctgcat ggaaccagtg gctgtgagtg gcatgtccac	1320
ttgctggatt atcagccagg acactataga acaggaccag ctgagactaa gaaggaccag	1380
cagagccagc tcagctctga gccattcaca catttcacc ctcaatggc tcacttgggg	1440
agtggatgg ggagaacaga gagtagctgt gtttgaatcc ctgttaggaaa tggtaagca	1500
tagctctggg tctcctgggg gagaccaggc ttggctgcgg gagagctggc tggctgga	1560
ctacatgctg gccactgctg tgaccacgc actgctgggg cagcttcttc cacagtgtat	1620

cctactgatg cttcagtgcc tctgcacacc gcccattcca cttccctcctt ccccacaggg	1680
caggtgggaa agcagtttg cccagccaa ggagaccca cttgagcct tatttcctaa	1740
tgggtccacc tctcatctgc atcttcaca cctcccagct tctgccaac cttcagcagt	1800
gacaagtccc caagagactc gcctgagcag cttgggctgc tttcatttc cacctgtcag	1860
gatgcctgtg gtcatgtct cagctccacc tggcatgaga agggatcctg gcctctggca	1920
tattcatcaa gtatgagttc tggggatgag tcactgtaat gatgtgagca gggagcctc	1980
ctccctggc cacctgcaga gagcttccc accaacttg taccttgatt gccttacaaa	2040
gttatttgtt tacaacacgc gaccatataa aagcctcctg cccaaagct tgtggcaca	2100
tgggcacata cagactcaca tacagacaca cacatatatg tacagacatg tactctcaca	2160
cacacaggca ccagcataca cacgttttc taggtacagc tcccaggaac agcttaggtgg	2220
gaaagtccca tcactgaggg agcctaacca tgtccctgaa caaaaattgg gcactcatct	2280
attcctttc tcttgttcc ctactcattt aacccaaact ctggaaagga cccaatgtac	2340
cagtatttat acctctaattt aagcacagag agaggaagag agctgcttaa actcacacaa	2400
caatgaactg cagacacagc tggctctcc ctctcctt cccagagcaa ttatacttt	2460
accctcaggc tgtcctctgg ggagaagggtg ccatggtctt aggtgtctgt gccccaggac	2520
agaccctagg accctaaatc caatagaaaa tgcataattt tgctccactt tcagccaggc	2580
tggagcaagg tacctttct taggatcttgg gggggaaatg gatgccctc tctgcatgat	2640
cttggggagg catttagctg ccatgcacct gtccccctt aatactggc attttaaaggc	2700
catctcaaga ggcattttct acatgttttgc tacgcattaa aataatttca aagatatactg	2760
agaaaaagccg atatttgcctt ttcttcctat atcctggaat atatcttgca tcctgagttt	2820
ataataataa ataattattt accttggaaa aaaaaaaaaaa aa	2862
<210> 2	
<211> 3057	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
cacttcgag agtgcgtct atttgcaca cacttcctg atgaaatgtc tggatttggaa	60
ctaaagaaaa aaggaaaggc tagcagtcat ccaacagaat catgagacag actttgcctt	120
gtatctactt ttggggggc ctttgcctt ttggatgct gtgtgcattcc tccaccacca	180
agtgcactgt tagccatgaa gttgctgact gcagccacct gaagttgact caggtaccgg	240
atgatctacc cacaacata acagtgttga accttaccca taatcaactc agaagattac	300

cagccgccaa cttcacaagg tatagccagc taactagctt ggatgttagga tttaacacca	360
tctcaaaaact ggagccagaa ttgtgccaga aacttccat gttaaaagtt ttgaacctcc	420
agcacaatga gctatctcaa ctttctgata aaaccttgc cttctgcacg aatttgactg	480
aactccatct caigtccaaac tcaatccaga aaattaaaaa taatccctt gtcaaggcaga	540
agaatttaat cacattagat ctgtctcata atggcttgc atctacaaaa ttaggaactc	600
aggttcagct ggaaaatctc caagagctc tattatcaa caataaaatt caagcgctaa	660
aaagtgaaga actggatatc ttgccaatt catcttaaa aaaatttagag ttgtcatcga	720
atcaaattaa agagtttct ccaggggtt ttcacgcaat tggaaagatta tttggctct	780
ttctgaacaa tgtccagctg ggtcccagcc ttacagagaa gctatgttig gaattagcaa	840
acacaagcat tcggaatctg tctctgagta acagccagct gtccaccacc agcaatacaa	900
ctttcttggg actaaagtgg acaaatctca ctatgtcga tcttcctac aacaacttaa	960
atgtggttgg taacgattcc ttgcttggc ttccacaact agaatatttc ttccctagagt	1020
ataataatat acagcatttgc ttttctcaact ctttgcacgg gctttcaat gtgaggtacc	1080
tgaatttgaa acggctttt actaaacaaa gtattccct tgctctact cccaaaggattg	1140
atgatttttc ttttcagttgg ctaaaatgtt tggagcacct taacatggaa gataatgata	1200
ttccaggcat aaaaagcaat atgttcacag gattgataaa cctgaaatac ttaagtctat	1260
ccaaactcctt tacaagtttgc gaaactttga caaatgaaac atttgtatca ctgtcatt	1320
ctcccttaca catactcaac ctaaccaaga ataaaatctc aaaaatagag agtgtatgtt	1380
tctcttgggtt gggccaccta gaagttacttg acctggcct taatgaaatt gggcaagaac	1440
tcacaggcca ggaatggaga ggtctagaaa atatttcga aatctatctt tcctacaaca	1500
agtacctgca gctgactagg aactccttg ctttggccc aagcctcaa cgactgtatgc	1560
tccgaagggtt gggccctaaa aatgtggata gctctccttc accattccag cctttcgta	1620
acttgaccat tcggatcta agcaacaaca acatagccaa cataaatgtat gacatgttgg	1680
agggtcttga gaaactagaa attctcgatt tgcagcataa caacttagca cggctctgga	1740
aacacgcaaa ccctgggtt cccattttt tcctaaaggg tctgtctcacttccacatcc	1800
ttaacttgga gtccaaacggc tttgacgaga tcccagttga ggtcttcaag gatttatttg	1860
aactaaagat catcgattta ggattgaata atttaaacac acttccagca tctgtcttta	1920
ataatcaggt gctctaaag tcattgaacc ttcaagagaa tctcataaca tccgttgaga	1980
agaaggttt cggggccagct ttcaaggaacc tgactgagtt agatatgcgc tttaaatccct	2040
ttgattgcac gtgtgaaagt attgcctggt ttgttaattt gattaacgag acccatacca	2100
acatccctga gctgtcaagc cactacctt gcaacactcc acctcactat catggttcc	2160

cagtgagact tttgataca tcatcttgc aagacagtgc ccccttgaa ctcttttca 2220

tgatcaatac cagtatcctg ttgattttt tctttattgt acttctcatc cacttggagg 2280  
 gctggaggat atcttttat tggatgttt cagtagatcg agttcttggt ttcaaagaaa 2340  
 tagacagaca gacagaacag tttgaatatg cagcatatat aattcatgcc tataaagata 2400  
 aggattgggt ctgggaacat ttcttcaa tggaaaagga agaccaatct ctcaaatttt 2460  
 gtctggaaga aaggacttt gaggcgggtg ttttgaact agaagcaatt gttaacagca 2520  
 tcaaaagaag cagaaaattt attttgtta taacacacca tctattaaa gaccattat 2580  
 gcaaaagatt caaggtacat catgcagttc aacaagctat tgaacaaaat ctggattcca 2640

ttatattgggt ttccctttag gagattccag attataaact gaaccatgca ctctgttgc 2700  
 gaagagaaat gtttaatct cactgcatct tgaactggcc agttcagaaa gaacggatag 2760  
 gtgccttcg tcataaattt caagtagcac ttggatccaa aaactctgta cattaaattt 2820  
 atttaaatat tcaatttagca aaggagaaac ttctcaatt taaaaagttc tatggcaat 2880  
 ttaagtttc cataaagggtg ttataattt tttattcata tttgtaaatg attatattct 2940  
 atcacaatta catctttctt agggaaatgt gtctccttat ttcaggccta ttttgacaa 3000  
 ttgacttaat ttacccaaa ataaaacata taagcacgtt aaaaaaaaaa aaaaaaaa 3057

<210> 3

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 3

ggcgcccgac 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

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 5

uggcgccga cuggac

16

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 6

guccagucgg ccgccaccu

19

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 7

guggcgccg acugga

16

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 8

uccagucggc cgccaccug

19

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 9

cuggcggagg agaugg

16

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 10

ccaucuccuc cgccagcgc

19

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 11

gcugcggag gagaug

16

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 12

caucuccuc gccagcgcg

19

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; 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

cggaucucca aguacucaa 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 guacucaa 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 aaggcuuc 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 aggcuucuc 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 ggcuucuca 19  
<210> 25  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 25

agaagccuuu acagg	16
<210> 26	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 26	
accuguaag 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 caucuccug

19

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

ggagaugauc cgcaa 16

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

uugccggauc 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

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 38

ccggaucauc uccugcaca

19

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 39

ugcaggagau gauccg

16

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 40

cggaucaucu ccugcaca

19

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 41

gugcaggaga ugaucc

16

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 42

ggaucaucuc cugcacaaa

19

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 43

ugugcaggag augauc

16

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 44

gaucaucucc ugcacaaaac

19

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 45

uugugcagga gaugau

16

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; 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 cacaacug 19  
 <210> 49  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide  
 <400> 49  
 guuugugcag gagaug 16  
 <210> 50  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

&lt;400&gt; 50

caucuccugc acaaacugg 19

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 51

aguuugugca ggagau 16

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 52

aucuccugca caaacugga 19

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 53

gugacuucca gaccaa 16

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 59

aaugugacuu ccagac

16

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 60

gucuggaagu cacauuccu

19

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 61

gaaugugacu uccaga

16

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 62

ucuggaaguc acauuccuu

19

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 63

ggaaugugac uuccag

16

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 64

cuggaaguca cauuccuug

19

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 65

aggaauguga cuucca

16

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 66

uggaagucac auuccuugc

19

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; 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

gcaaggaaug 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

agcaaggaaau 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

gucccgcccc ugaaga 16

<210> 82

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 82

ucuuucagggc agggacaag 19

<210> 83

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 83

ugucccugcc cugaag 16

<210> 84  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 84

cuucaggcaggca 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

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 88

gaccagacac aggugccag

19

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 89

ggcaccugug ucuggu

16

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 90

accagacaca ggugccagg

19

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

&lt;400&gt; 91

gagtcAACGG ATTGGTCGT

20

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 92

gacaagcttc ccgttctcag

20

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 93

aagtatttg ttacaaaca gcgacca

27

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 94

ggaagaatgg caaatatcg ct

22

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 95

uuggucugga agucacauuc c

21

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 96

uuggucugga agucacauuc cuugcucugc a 31

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 97

ugugacuucc agacca 16

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 98

uggucuggaa gucacauucc u 21

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 99

uggucuggaa gucacauucc uugcucugca g 31

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 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

&lt;400&gt; 108

gugacuucca gaccaa

16

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 109

uuggucugga agucacauuc c

21

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 110

gugacuucca gaccaa

16

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 111

uuggucugga agucacauuc c

21

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 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	

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 117

uuggucugga agucacauuc c

21

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 118

gugacuucca gaccaa

16

&lt;210&gt; 119

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 119

uuggucugga agucacauuc c

21

&lt;210&gt; 120

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 120

gugacuucca gaccaa

16

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 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

uggucugga 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

uggucugaa gucacaucc 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

uggucugaa gucacaucc 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  
 uggucugga 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  
 uggucugga agucacauuc c 21  
 <210> 162  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

&lt;400&gt; 162

ugugacuucc agacca

16

&lt;210&gt; 163

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 163

uggucuggaa gucacauucc u

21

&lt;210&gt; 164

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 164

ugugacuucc agacca

16

&lt;210&gt; 165

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 165

uggucuggaa gucacauucc u

21

&lt;210&gt; 166

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 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  
 gugacuuucca 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

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 175

uggucuggaa gucacauucc u

21

&lt;210&gt; 176

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 176

ugugacuucc agacca

16

&lt;210&gt; 177

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 177

uggucuggaa gucacauuc

19

&lt;210&gt; 178

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 178

aucuuuccua caacaa

16

&lt;210&gt; 179

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 179

uuguuguagg aaagaucgag c 21

&lt;210&gt; 180

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 180

ucuuuccuac aacaac 16

&lt;210&gt; 181

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 181

guuguuguag gaaagaucga g 21

&lt;210&gt; 182

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 182

ggccuuuaaa aaugug 16

&lt;210&gt; 183

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

<400> 183

cacauuuua 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 aaggccacc 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  
uccacacauuu uaagggccac c 21  
<210> 188  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 188  
ccuuaaaaaau guggau 16  
<210> 189  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
  
oligonucleotide  
<400> 189  
auccacacuuu uuaagggcc a 21  
<210> 190  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 190  
cuuaaaaa aug uggaaua 16  
<210> 191  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 191

uauccacauu uuuuagggcc a

21

&lt;210&gt; 192

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 192

ucguaacuug accauu

16

&lt;210&gt; 193

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 193

aauggucaag uuacgaagag g

21

&lt;210&gt; 194

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 194

cguaacuuga ccauuc

16

&lt;210&gt; 195

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 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  
 agaaaggguca 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  
 cagaaagguc 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

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 208

caacaacaua gcacaa 16

&lt;210&gt; 209

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 209

guuggcuaug uuguuguugc u 21

&lt;210&gt; 210

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 210

aacaacauag ccaaca 16

&lt;210&gt; 211

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 211

uguuggcuaau guuguuguug c 21

&lt;210&gt; 212

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 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  
 uuauuguaggc uauguuguug 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  
 uuuauuguagg cuauuguuu 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  
 cauuuauuguu ggcuauguug 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  
 ucauuuaugu uggcuauguu 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	
caaaaauuuga	gagauugguc	u
<210>	226	21
<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
<210>	228	21
<211>	16	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic		
oligonucleotide		
<400>	228	
gcacucuguu	ugcgaa	16
<210>	229	

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 229

uucgcaaaca gagugcaugg u

21

&lt;210&gt; 230

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 230

cacucuguuu gcgaag

16

&lt;210&gt; 231

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 231

cuucgcaaac agagugcaug g

21

&lt;210&gt; 232

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 232

acucuguuug cgaaga

16

&lt;210&gt; 233

&lt;211&gt; 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 233

ucuuucgcaaa 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 aaggagg

16

<210> 237

<211> 21

<212> RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 237

ccucuucgca aacagagugc a 21

&lt;210&gt; 238

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 238

cuguuugcga agagga 16

&lt;210&gt; 239

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 239

uccucuucgc aaacagagug c 21

&lt;210&gt; 240

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 240

uguuugcgaa gagaa 16

&lt;210&gt; 241

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 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 ggaau 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 uguuua	16
<210> 253	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

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

<400> 253	
uaaacauucc ucuucgcaaa c	21

<210> 254  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 254  
 gaaaggaaau 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  
 aagaggaaug uuuaaaa 16

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

<210> 258

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 258

agaggaaugu uuuaau

16

&lt;210&gt; 259

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 259

aauuaaaacau uccucuuucgc a

21

&lt;210&gt; 260

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 260

gaggaauguu uaaauc

16

&lt;210&gt; 261

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 261

gauuuuaaaca uuccucuuucg c

21

&lt;210&gt; 262

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 262

aggaauguuu aaaucu

16

&lt;210&gt; 263

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 263

agauuuuaac auuccucuuc g

21

&lt;210&gt; 264

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 264

ggaauguuua aaucuc

16

&lt;210&gt; 265

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 265

gagauuuaaa cauuccucuu c

21

&lt;210&gt; 266

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 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 uucaagaugc 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 aguua  
 16  
 <210> 271  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide  
 <400> 271  
 ugaacuggcc aguuaaggau 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 caguuaaga u  
 21  
 <210> 274  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

&lt;400&gt; 274

aacuggccag uucaga

16

&lt;210&gt; 275

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 275

ucugaacugg ccagucaag a

21

&lt;210&gt; 276

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 276

acuggccagu ucagaa

16

&lt;210&gt; 277

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 277

uucugaacug gccagucaa g

21

&lt;210&gt; 278

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 283

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 283

ucuuuucugaa cuggccaguu c

21

&lt;210&gt; 284

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 284

gccaguuucag aaagaa

16

&lt;210&gt; 285

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 285

uucuuuucuga acuggccagu u

21

&lt;210&gt; 286

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 286

ccaguucaga aagaac

16

&lt;210&gt; 287

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 287

guucuuucug aacuggccag u

21

&lt;210&gt; 288

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 288

caguucagaa agaacg

16

&lt;210&gt; 289

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 289

cguucuuuucu gaacuggcca g

21

&lt;210&gt; 290

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 290

aguucagaaa gaacgg

16

&lt;210&gt; 291

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 291

ccguucuuuc ugaacuggcc a 21

&lt;210&gt; 292

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 292

guucagaaag aacgga 16

&lt;210&gt; 293

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 293

uccguucuuu cugaacuggc c 21

&lt;210&gt; 294

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 294

uucagaaaga acggau 16

&lt;210&gt; 295

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 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 cggaaua 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

aauugcaagu agcacu 16

<210> 299

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide  
<400> 299

agugcuacuu gcaauuuuug 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

uugcaagauag cacuug 16

<210> 303

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 303

caagugcuac uugcaauuu u

21

&lt;210&gt; 304

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 304

ugcaaguagc acuugg

16

&lt;210&gt; 305

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 305

ccaagugcua cuugcaauuu a

21

&lt;210&gt; 306

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 306

gcaaguagca cuugga

16

&lt;210&gt; 307

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 307

uccaagugcu acuugcaauu 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

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 312

ugccccuuu gaacuc 16

&lt;210&gt; 313

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 313

gagucaaag gggcacugu c 21

&lt;210&gt; 314

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 314

ucugggaaca uuucuc 16

&lt;210&gt; 315

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 315

gagaaauguu cccagaccca a 21

&lt;210&gt; 316

&lt;211&gt; 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

aauacuuuca 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

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 aaacc 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

auuuucuaguu ucucaagacc c 21  
<210> 332  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 332

cuugagaaac uagaaa

16

&lt;210&gt; 333

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 333

uuucuaguuu cucaagaccc u

21

&lt;210&gt; 334

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 334

aacauccguu gagaag

16

&lt;210&gt; 335

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 335

cuucucaacg gauguuauga g

21

&lt;210&gt; 336

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 336

gugcccccuu ugaacu	16
<210> 337	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 337	
aguucaaagg 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	
guucaaaggg ggcacugucu u	21
<210> 340	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 340	
cagugcccc uuugaa	16
<210> 341	

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 341

uucaaagggg gcacugucuu u 21

&lt;210&gt; 342

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 342

ggaggauauc uuuuuua 16

&lt;210&gt; 343

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 343

aaaaaaagaua uccuccagcc c 21

&lt;210&gt; 344

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 344

uggaggauau cuuuuu 16

&lt;210&gt; 345

&lt;211&gt; 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

acugaacctau 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

ugaacctaugc 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 gcaugguca 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  
 acugcaucu 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  
 aguuaaggau 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

ugcuacuugc aauuuauagac g

21

<210> 370

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 370

auaaauugca aguagc

16

&lt;210&gt; 371

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 371

gcuacuugca auuuauugacg a

21

&lt;210&gt; 372

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 372

cgucauaau ugcaag

16

&lt;210&gt; 373

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 373

cuugcaauuu augacgaaag g

21

&lt;210&gt; 374

&lt;211&gt; 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

uugcaauuuua ugacgaaagg c

21

<210> 376

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 376

uucgucauua 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

&lt;400&gt; 386

uguuugcgaa gagaa 16

&lt;210&gt; 387

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 387

uuccucuucg caaacagagu g 21

&lt;210&gt; 388

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 388

uuccucuucg caaacagagu g 21

&lt;210&gt; 389

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 389

uuccucuucg caaacagagu g 21

&lt;210&gt; 390

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 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	
gaagagggaa guuua	16

&lt;210&gt; 395

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 395

uuaaacauuc cucuucgcaa a

21

&lt;210&gt; 396

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 396

uuaaacauuc cucuucgcaa a

21

&lt;210&gt; 397

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 397

uuaaacauuc cucuucgcaa a

21

&lt;210&gt; 398

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 398

ggccaguuca gaaaga

16

&lt;210&gt; 399

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 399

ucuuucugaa cuggccaguu c

21

&lt;210&gt; 400

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 400

ucuuucugaa cuggccaguu c

21

&lt;210&gt; 401

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 401

ucuuucugaa cuggccaguu c

21

&lt;210&gt; 402

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 402

guucagaaag aacgga

16

&lt;210&gt; 403

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 403

uccguucuuu cugaacuggc c 21

&lt;210&gt; 404

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 404

uccguucuuu cugaacuggc c 21

&lt;210&gt; 405

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 405

uccguucuuu cugaacuggc c 21

&lt;210&gt; 406

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 406

ucagaaaagaa cggaua 16

&lt;210&gt; 407

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 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

tgcggcccttt 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  
gaagaggaaau 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