



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0108031
(43) 공개일자 2022년08월02일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>C12N 15/63</i> (2006.01)
<i>C12N 9/02</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12N 15/11</i> (2022.01)
<i>C12N 15/63</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7012511</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년10월16일
심사청구일자 2022년04월14일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년04월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2020/039160</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/075567
국제공개일자 2021년04월22일</p> <p>(30) 우선권주장
JP-P-2019-189929 2019년10월17일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인
공립대학법인 나고야 시립대학
일본 아이치켄 나고야시 미즈호쿠 미즈호쵸 아자
가와스미 1</p> <p>(72) 발명자
호시노 신이치
일본 4678603 아이치켄 나고야시 미즈호쿠 타나베
도리 3쵸메 1반지 코리츠다이가쿠호징 나고야 시
리츠다이가쿠 다이가쿠인 야쿠가쿠 켄큐카 내</p> <p>호소다 나오
일본 4678603 아이치켄 나고야시 미즈호쿠 타나베
도리 3쵸메 1반지 코리츠다이가쿠호징 나고야 시
리츠다이가쿠 다이가쿠인 야쿠가쿠 켄큐카 내</p> <p>(74) 대리인
특허법인와이에스장</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **인공 합성 mRNA 및 그 이용**

(57) 요약

mRNA의 번역 효율이 향상되는 기술을 제공한다. mRNA는 단백질을 코딩하는 mRNA의 5' 비번역 영역과, 상기 5' 비번역 영역에 대한 상보성이 40% 이상 80% 이하인 3' 비번역 영역을 갖는다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 9/0008 (2013.01)

C12Y 102/01009 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

단백질을 코딩하는 mRNA의 5' 비번역 영역과, 상기 5' 비번역 영역에 대한 상보성이 40% 이상 80% 이하인 3' 비번역 영역을 갖춘 인공 합성 mRNA.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질은 글리세르알데히드-3-인산 데히드로게나제와, β -글로빈과, RPS8과, LDHB로 이루어진 군으로부터 선택되는 인공 합성 mRNA.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 3' 비번역 영역은 상기 5' 비번역 영역에 대한 상보성이 50% 이상 75% 이하인 인공 합성 mRNA.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 인공 합성 mRNA를 세포 내로 도입하는 공정을 포함하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 인공 합성 mRNA가 도입된 세포.

청구항 6

단백질을 코딩하는 mRNA의 5' 비번역 영역과, 상기 5' 비번역 영역과의 상보성이 40% 이상 80% 이하인 3' 비번역 영역을 갖춘 인공 합성 mRNA를 제조하는 공정을 포함하는 인공 합성 mRNA의 제조 방법.

청구항 7

글리세르알데하이드-3-인산 데히드로게나제를 코딩하는 mRNA의 5' 비번역 영역과, 글리세르알데하이드-3-인산 디하이드로게나제를 코딩하는 mRNA의 3' 비번역 영역을 갖춘 인공 합성 mRNA.

청구항 8

글리세르알데하이드-3-인산 데히드로게나제를 코딩하는 mRNA의 5' 비번역 영역과, 글리세르알데하이드-3-인산 데히드로게나제를 코딩하는 mRNA의 3' 비번역 영역을 갖춘 mRNA를 제조하는 공정을 포함하는 인공 합성 mRNA의 제조 방법.

청구항 9

제7항에 기재된 인공 합성 mRNA를 세포에 도입하는 공정을 포함하는 방법.

청구항 10

제7항에 기재된 인공 합성 mRNA가 도입된 세포.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 인공 합성 mRNA 및 그 이용에 관한 것이다. 본 출원은 2019년 10월 17일에 출원된 일본 특허 출원 제2019-189929호에 기초한 우선권을 주장하는 것이며, 당해 특허 출원의 전체 내용은 참고로 인용된다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 지금까지 유전자 치료는 바이러스를 비롯한 DNA를 벡터로 하여 실시되어 왔지만, 게놈에 편입됨으로 인한 발암 등의 위험성이 큰 문제로서 남아 있었다. 한편, mRNA는 DNA와 달리 게놈으로의 삽입 등의 리스크가 없는 안전한 핵산 의약으로서 주목을 받고 있지만, RNA가 본래 가지는 불안정성과 번역 효율의 낮음이 결점으로서 지적되었다(예를 들면, 특허문헌 1 내지 특허문헌 3).
- [0003] 특허문헌 1에는, mRNA의 세포 내에서의 분해 기구를 해명함으로써, 이 기구의 발생을 억제하는 기술로서, 목적 유전자의 mRNA에, 2'-5'-올리고아데닐산 합성효소의 기능 억제 물질을 사용하는 방법이 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0004] (특허문헌 0001) 일본 특개 2018-74954호 공보
(특허문헌 0002) 일본 특개 2015-221026호 공보
(특허문헌 0003) 일본 특개 2015-226531호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 확실히, 특허문헌 1에 기재된 기술에 의하면, RNA가 본래 가지는 불안정성은 개선된다. 그러나, mRNA의 번역 효율의 향상에 대해서는 개선의 여지가 있었다.
- [0006] 이 때문에, 본 발명자들은 예의 연구를 진행함으로써, mRNA의 번역 효율을 향상시키는 방법을 발명하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해 이루어진 것으로, 이하의 형태로써 실현하는 것이 가능하다.
- [0008] (1) 본 발명의 하나의 형태에 의하면, 인공 합성 mRNA가 제공된다. 이 인공 합성 mRNA는 단백질을 코딩하는 mRNA의 5' 비번역 영역과, 상기 5' 비번역 영역에 대한 상보성이 40% 이상 80% 이하인 3' 비번역 영역을 갖는다.
- [0009] (2) 상기의 인공 합성 mRNA로서, 상기 단백질은 글리세르알데히드-3-인산 데히드로게나제, β-글로빈과, RPS8와 LDHB로 이루어진 군으로부터 선택되어도 된다.
- [0010] (3) 상기의 인공 합성 mRNA로서, 상기 3' 비번역 영역은 상기 5' 비번역 영역에 대한 상보성이 50% 이상 75% 이하이어도 된다.
- [0011] (4) 본 발명의 다른 형태에 의하면, 상기 인공 합성 mRNA를 세포에 도입하는 공정을 포함하는 방법이 제공된다.
- [0012] (5) 본 발명의 다른 형태에 의하면, 상기 인공 합성 mRNA가 도입된 세포가 제공된다.
- [0013] (6) 본 발명의 다른 형태에 의하면, 인공 합성 mRNA의 제조 방법이 제공된다. 이 인공 합성 mRNA의 제조 방법은 단백질을 코딩하는 mRNA의 5' 비번역 영역과, 상기 5' 비번역 영역과의 상보성이 40% 이상 80% 이하인 3' 비번역 영역을 갖는 인공 합성 mRNA를 제조하는 공정을 포함한다.
- [0014] (7) 본 발명의 다른 형태에 의하면, 인공 합성 mRNA가 제공된다. 이 인공 합성 mRNA는 글리세르알데히드-3-인산 데히드로게나제를 코딩하는 mRNA의 5' 비번역 영역과, 글리세르알데히드-3-인산 데히드로게나제를 코딩하는 mRNA의 3' 비번역 영역을 갖는다.
- [0015] (8) 본 발명의 다른 형태에 의하면, 인공 합성 mRNA의 제조 방법이 제공된다. 이 인공 합성 mRNA의 제조 방법은 글리세르알데히드-3-인산 데히드로게나제를 코딩하는 mRNA의 5' 비번역 영역과, 글리세르알데히드-3-인산 데히드로게나제를 코딩하는 mRNA의 3' 비번역 영역을 갖는 인공 합성 mRNA를 제조하는 공정을 포함한다.

[0016] (9) 본 발명의 다른 형태에 의하면, 상기 (7)의 인공 합성 mRNA를 세포에 도입하는 공정을 포함하는 방법이 제공된다.

[0017] (10) 본 발명의 다른 형태에 의하면, 상기 (7)의 인공 합성 mRNA가 도입된 세포가 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면.
- 도 2는 인공 합성 mRNA로부터의 단백질 발현량을 측정된 결과를 나타내는 도면.
- 도 3은 도 1에 나타낸 인공 합성 mRNA의 안정성을 나타내는 도면.
- 도 4는 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면.
- 도 5는 인공 합성 mRNA마다의 발현량을 나타내는 도면.
- 도 6은 인공 합성 mRNA를 신장 유래의 HEK293 세포에 도입한 경우의 인공 합성 mRNA마다의 발현량을 나타내는 도면.
- 도 7은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면.
- 도 8은 GAPDH의 UTR 서열의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 9는 LDHB의 UTR 서열의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 10은 ACAT2의 UTR 서열의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 11은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면.
- 도 12는 GAPDH의 5' UTR 서열의 결실의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 13은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면.
- 도 14는 GAPDH의 3' UTR 서열의 결실의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 15는 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면.
- 도 16은 5' UTR 28nt와 3' UTR 28nt의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 17은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면.
- 도 18은 상보성에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 19는 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면.
- 도 20은 상보성에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 21은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면.
- 도 22는 암 억제 유전자 p53을 사용한 경우에 있어서의 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 23은 얻어진 효과의 추정 메커니즘을 설명하기 위한 도면.
- 도 24는 게놈 편집 유전자 hCas9를 사용한 경우에 있어서의 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 25는 게놈 편집 유전자 hCas9를 사용한 경우에 있어서의 게놈 편집량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 26은 β-글로빈의 5' UTR을 사용한 경우에 있어서의 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 27은 RPS8의 5' UTR을 사용한 경우에 있어서의 발현량의 차이를 나타내는 도면.
- 도 28은 LDHB의 5' UTR을 사용한 경우에 있어서의 발현량의 차이를 나타내는 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] (발명을 실시하기 위한 형태)

[0020] 본 명세서의 개시는 번역 효율이 높은 인공 합성 mRNA 및 그 이용에 관한 것이다. 또한, 인위적인 조작에 의해

조제된다는 특징을 나타냄과 아울러, 세포 내(내재성) mRNA와 구별할 목적으로, 본 발명의 mRNA를 「인공 합성 mRNA」라고 부르는 경우가 있다. 여기에서, 본 명세서에 있어서, 「mRNA」란 단백질에 번역될 수 있는 염기 서열 정보와 구조를 갖는 RNA를 나타낸다. 또한, 2개의 용어 「억제」와 「저해」는 그 의미하는 바가 중복되고, 종종 치환 가능하게 사용된다. 그래서, 본 명세서에서는, 전후의 문맥으로부터 구별이 특별히 필요한 경우를 제외하고, 통일하여 용어 「억제」를 사용한다. 「번역 효율이 높다」는 것은 번역량의 증대를 의미한다.

[0021] 1. mRNA

[0022] 본 발명의 mRNA는 목적 유전자의 코드 영역(목적 유전자의 발현 산물인 단백질을 코딩하는 영역)을 갖는다. 「목적 유전자」란 본 발명의 mRNA를 이용하여 세포 내에서 발현시키는 유전자이다. 다양한 유전자를 목적 유전자로서 채용할 수 있다. 본 발명의 mRNA를 도입함으로써 목적 유전자를 발현시키는 세포를 본원에서 「표적 세포」라고도 부른다. 목적 유전자로서는, 예를 들면, 효소(예를 들면, 뉴클레아제(ZFN(징크핑거 뉴클레아제), TALEN(전자 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제), CRISPR-Cas9 등), 사이토카인, 호르몬, 신경전달 물질 등의 유전자, 그 기능 저하(예를 들면, 변이에 의한 것)나 결손 등이 질환의 원인이 되는 유전자, 정상적으로 기능을 하고 있지만 그 발현의 증강이 요망되는 유전자, 표적 세포가 본래 갖지 않는 유전자로서 그것이 발현됨으로써 표적 세포의 생존, 유지 등에 유익한 유전자, 표적 세포에 작용하여, 표적 세포가 본래 가지는 기능을 높이는 단백질 또는 표적 세포가 본래 가지는 기능과는 다른 기능을 발휘시키는 단백질을 코딩하는 유전자, 표적 세포에는 작용하지 않고, 표적 세포로부터 분비되어 주위의 세포에 작용하는 단백질(예를 들면, 세포간 네트워크에 관여하는 단백질)을 코딩하는 유전자 등을 들 수 있다. 표적 세포 및 주위의 세포에 대해서는 실질적으로 작용하지 않는 단백질을 코딩하는 유전자도 목적 유전자가 될 수 있다. 이러한 유전자로서, 예를 들면, 의약품 등에 이용되는 단백질을 코딩하는 유전자(예를 들면, 인간 에리트로포이에틴 유전자, 인간 피브리노겐 유전자, 인간 혈청 알부민 유전자, 인간 락토페린 유전자, 인간 α -글루코시다제 유전자)를 들 수 있다. 이러한 유전자를 채용함으로써, 표적 세포 내에서 의약품 등으로서 이용 가능한 재조합 단백질을 생산시키는 것이 가능하다.

[0023] 표적 세포는 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 각종 진핵 세포를 표적 세포로서 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는, 표적 세포로서, 예를 들면, 포유동물(인간, 원숭이, 소, 말, 토끼, 마우스, 래트, 기니피그, 햄스터 등)의 각종 세포, 예를 들면, 심근 세포, 평활근 세포, 지방 세포, 섬유 아세포, 골 세포, 연골 세포, 파골 세포, 실질 세포, 표피각화 세포(케라티노사이트), 상피 세포(피부표피 세포, 각막상피 세포, 결막상피 세포, 구강점막상피, 모포상피 세포, 구강점막상피 세포, 기도점막상피 세포, 장관점막상피 세포 등), 내피 세포(각막내피 세포, 혈관내피 세포 등), 신경 세포, 글리아 세포, 비장 세포, 췌장 β 세포, 메산기움 세포, 랑게르한스 세포, 간 세포, 이들의 전구 세포 또는 줄기세포, 혹은 인공 다능성 줄기세포(iPS 세포), 간엽계 줄기세포(MSC), 배성 줄기세포(ES 세포), 배성 생식세포(BG 세포), 배성 종양세포(EC 세포)) 등을 사용할 수 있습니다. 또한, 표적 세포로서, 예를 들면, 계대 세포, 특성의 세포계보로 분화 유도된 세포, 주화 세포(예를 들면, HeLa 세포, CHO 세포, Vero 세포, HEK293 세포, HepG2 세포, COS-7 세포, NIH3T3 세포, Sf9 세포) 등을 사용할 수 있다.

[0024] 생체로부터 분리된 상태의 표적 세포(즉, 단리된 표적 세포), 또는 생체를 구성한 상태의 표적 세포에 대하여 본 발명의 mRNA를 도입해도 된다. 따라서, In vitro, In vivo 및 Ex vivo의 임의의 환경하에서도 본 발명을 실시하는 것이 가능하다. 여기서 「단리된」이란 그 본래의 환경(예를 들면, 생체를 구성한 상태)로부터 취출된 상태에 있는 것을 나타낸다. 따라서 통상은 단리된 표적 세포는 배양 용기 내 또는 보존 용기 내에 존재하고, 그것으로의 in vitro에서의 인위적 조작이 가능하다. 구체적으로는, 생체로부터 분리되고, 생체 밖에서 배양 상태에 있는 세포(주화된 세포 포함)는 단리된 표적 세포로서의 적격을 갖는다. 또한, 상기의 의미에 있어서 단리된 상태에 있는 한, 조직체를 형성한 상태이더라도 단리된 세포이다.

[0025] 단리된 표적 세포는 생체(예를 들면, 환자)로부터 제조할 수 있다. 한편, 독립행정법인 이화학연구소 바이오자원 센터, 독립행정법인 제품평가기술 기반 기구, ATCC(아메리칸 타입 컬처 콜렉션), DSMZ(저먼 콜렉션 오브 마이크로오가니즘 앤 셀 컬처)) 등으로부터 입수한 세포를 단리된 표적 세포로서 사용해도 된다.

[0026] 본 발명의 mRNA는 5' 비번역 영역(5' UTR: 5' untranslated region)과 3' 비번역 영역(3' UTR: 3' untranslated region)을 갖는다.

[0027] 본 발명의 하나의 실시형태의 mRNA는 단백질을 코딩하는 mRNA의 5' UTR과, 5' UTR과의 상보성이 40% 이상 80% 이하인 3' UTR을 갖는다. 바꾸어 말하면, 본 발명의 실시형태의 mRNA는 목적 단백질을 코딩하는 번역 영역과, 목적 단백질과는 다른 단백질을 코딩하는 mRNA의 5' UTR과, 5' UTR과의 상보성이 40% 이상 80% 이하인 3' UTR을 갖는다. 이 형태로 함으로써, 번역 효율을 향상시킬 수 있다. 번역 효율을 보다 향상시키는 관점에서, 3' UTR에 있어서의 5' UTR과의 상보성이 50% 이상 75% 이하인 것이 바람직하다. 번역 효율을 향상시킬 수 있는 결과,

목적 단백질의 발현 효율을 향상시킬 수 있다.

- [0028] 단백질을 코딩하는 mRNA의 5' UTR로서는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 세포(예를 들면, HeLa 세포)당의 단백질 발현량이 10^6 분자 이상의 단백질을 코딩하는 mRNA의 5' UTR이 바람직하다. 이 단백질로서는 글리세르알데히드-3-인산 데히드로게나제와, β -글로빈과, RPS8과, LDHB로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단백질이 보다 바람직하다.
- [0029] 또한, 본 발명의 다른 실시형태의 mRNA는 글리세르알데히드-3-인산 데히드로게나제(GAPDH)를 코딩하는 mRNA의 5' UTR과, GAPDH를 코딩하는 mRNA의 3' UTR을 갖춘다. 바꾸어 말하면, 본 발명의 실시형태의 mRNA는 GAPDH를 코딩하는 mRNA의 5' UTR과, GAPDH를 코딩하는 mRNA의 3' UTR과, GAPDH가 아닌 단백질을 코딩하는 ORF(오픈 리딩 프레임)를 갖춘다. 이 형태로 함으로써, 번역 효율을 향상시킬 수 있다. 본 명세서에 있어서, 「~를 코딩하는 mRNA의 UTR」을 단순히 「~의 UTR」라고도 부른다. 예를 들면, 「GAPDH를 코딩하는 mRNA의 5' UTR」을 「GAPDH의 UTR」이라고도 부른다.
- [0030] 본 명세서에 있어서, GAPDH의 UTR로서 인간 유래의 GAPDH의 UTR을 사용하지만, 본 발명은 이것에 한정되지 않는다. GAPDH의 UTR로서, 예를 들면, 다른 생물(예를 들면, 마우스)로부터의 GAPDH의 UTR을 사용해도 된다. 또한, 본 발명의 mRNA가 갖추는 GAPDH의 UTR의 길이는 생물 유래의 GAPDH의 UTR의 7할 이상 13할 이하인 것이 바람직하고, 8할 이상 12할 이하인 것이 보다 바람직하고, 9할 이상 11할 이하인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 본 발명의 mRNA가 갖추는 GAPDH의 UTR은 생물 유래의 GAPDH의 UTR과의 일치율이 7할 이상인 것이 바람직하고, 8할 이상인 것이 보다 바람직하고, 9할 이상인 것이 더욱 바람직하다.
- [0031] 본 발명의 다른 실시형태의 mRNA는 GAPDH를 코딩하는 mRNA의 5' UTR과, 5' UTR과의 상보성이 40% 이상 80% 이하인 3' UTR을 갖춘다. 바꾸어 말하면, 본 발명의 실시형태의 mRNA는 GAPDH를 코딩하는 mRNA의 5' UTR과, 5' UTR과의 상보성이 40% 이상 80% 이하인 3' UTR과, GAPDH가 아닌 단백질을 코딩하는 ORF를 포함한다. 이 형태로 함으로써, 번역 효율을 향상시킬 수 있다. 번역 효율을 보다 향상시키는 관점에서, 3' UTR에 있어서의 5' UTR과의 상보성이 50% 이상 75% 이하인 것이 바람직하다.
- [0032] 본 실시형태의 mRNA는 그 번역에 필요한 5' 캡 구조($m^7G(7\text{-메틸구아노신})$)가 5' 말단 뉴클레오타이드에 5'-5' 삼인산교를 통해 결합한 구조) 및 폴리(A)쇄를 갖추어도 된다. 폴리(A)쇄의 길이는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 30 내지 200 염기이다. 5' 캡 구조에는 번역 개시 인자 eIF4E가 결합하고, 폴리(A)쇄에는 폴리(A)쇄 결합 단백질 PABP(폴리(A)-결합 단백질)가 결합함으로써, 양자가 뼈대 단백질인 번역 개시 인자 eIF4G를 통해 복합체를 형성함으로써, mRNA는 환형 구조를 형성한다(Wells SE, et al. Mol Cell. 1998; 2:135-140). 또한, 번역 종결 인자 eRF3은 PABP-eIF4G와 복합체를 형성함으로써 3' UTR을 루프 아웃한다(Uchida N, et al. J Biol Chem. 2002; 277: 50286-50292). 이러한 mRNA의 환상화는 번역 종결 부위와 번역 개시 부위를 물리적으로 가깝게 하여, 번역을 마친 리보솜을, 3' UTR을 거치지 않고 종지 코돈으로부터 다음의 번역 개시로 리사이클함으로써, 번역 개시의 효율에 크게 기여한다. 5' 말단 캡 구조와 폴리(A)쇄는 이러한 번역의 효율화뿐만 아니라, 엑소뉴클레아제에 의한 말단으로부터의 mRNA 분해를 저해함으로써 mRNA를 안정화하여, 번역의 효율화와 mRNA 안정화 두 과정에서 전사 후의 유전자 발현 조절에 크게 기여한다.
- [0033] 본 발명의 mRNA는, 예를 들면, in vitro 전사계, 화학 합성 등의 방법에 의해 제조할 수 있다. in vitro 전사용 키트(예를 들면, 프로메가사가 제공하는 RiboMAXsystem, 닛폰진사가 제공하는 CUGA7 in vitro 전사 키트, 라이프테크놀로지스사가 제공하는 MEGAscript T7 키트)를 이용함으로써, 간편하게 목적의 mRNA를 조제하는 것이 가능하다. 또한, 5'캡 구조의 부가에 대해서도 공지의 방법으로 행할 수 있고, 예를 들면, New England Biolabs사가 제공하는 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog를 이용할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 mRNA로서, 2종류 이상의 mRNA를 병용하는 것으로 해도 된다. 예를 들면, 특정 유전자의 코드 영역을 갖는 mRNA와, 해당 유전자의 발현 산물과 상호작용하는 발현 산물을 코딩하는 영역을 갖는 mRNA를 병용할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 mRNA의 양은, 사용 목적, 사용하는 목적 유전자의 특징, 표적 세포의 종류 등을 고려하면서, 표적 세포 내에서 충분한 양의 발현 산물이 얻어지도록 설정하면 된다. mRNA량의 예를 나타내면, 1회분의 양으로서 3cm 배양 접시당 0.5 내지 1.0 μ g의 mRNA를 함유시켜도 된다.
- [0036] 인공 합성 mRNA의 보호를 목적으로, 예를 들면, 엑소뉴클레아제 억제제, 엔도뉴클레아제 억제제, 인지질, 인산 칼슘, 폴리에틸렌민, 나노미셀 형성제인 폴리에틸렌글리콜-폴리 양이온, 완충제, 무기 염류, 2가 이온 등을

사용해도 되고, 세균의 혼입을 저지하는 것을 목적으로 항생 물질 등을 사용해도 되고, 세포의 증식능을 향진시키는 것을 목적으로, 동물 혈청, 성장인자, 당류, 비타민류, 2가 이온 등을 사용해도 된다. 또한, 제제상 허용되는 다른 성분(예를 들면, 담체, 부형제, 붕괴제, 완충제, 유화제, 현탁제, 무통화제, 안정제, 보존제, 방부제, 생리 식염수 등)을 사용해도 된다. 또한, 유효 성분의 세포 도입 효율을 향진시키는 것을 목적으로, 라이프 테크놀로지사가 제공하는 Opti-MEM 등의 특수 합성 배지를 사용해도 된다.

[0037] 2. 도입 방법

[0038] 본 발명을 이용하여 표적 세포 내에서 목적 유전자를 발현시키기 위해서는, 표적 세포에 목적 유전자의 mRNA를 도입하는 단계를 행한다.

[0039] mRNA의 표적 세포로의 도입은 공지된 방법으로 행할 수 있다. 예를 들면, 인산칼슘 공침강법, 일렉트로포레이션(Potter, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7161-7165(1984)), 리포펙션(Felgner, PL et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,7413-7417(1987)), 마이크로 인젝션(Graessmann, M. & Graessmann,A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73,366-370(1976)), Hanahan의 방법(Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166, 557-580(1983)), 아세트산 리튬법(Schiestl, R.H. et al., Curr. Genet. 16, 339-346(1989)), 프로토플라스트-폴리에틸렌글리콜법(Yelton, MM et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 1470-1474(1984)), 초음파 유전자 도입법, 양이온성 폴리 아민산을 이용한 방법(예를 들면, 일본 특개 2011-173802호 공보를 참조), 양이온성 폴리머 세그먼트와 비가전 친수성 폴리머 세그먼트를 갖는 블록 공중합체로 이루어지는 폴리이온 콤플렉스(PIC)형의 고분자 미셀을 이용한 방법(예를 들면, 일본 특개 2004-352972호 공보, 국제공개 제2012/005376호 팜플렛 참조) 등에 의해 실시할 수 있다.

[0040] 3. 용도

[0041] 본 발명의 mRNA에 의하면, 표적 세포 내에서 번역 효율이 향상하기 때문에, 목적 단백질이 고발현된다. 따라서, 본 발명은 목적 단백질의 높은 발현이 요망되는 다양한 용도에 적용 가능하다. 본 발명의 용도의 예로서, (A) 각종 바이러스성 질환(예를 들면, B형 간염, 후천성 면역부전 증후군 AIDS, 성인 T세포 백혈병)이나 유전병(예를 들면, 뒤시엔느형 근이영양증, 낭포성 섬유증, β 갈라세미아, Hurler 증후군, 망막 색소 변성증, X 연쇄형 신성 요붕증)의 치료, (B) 암면역 요법, (C) iPS 세포의 제작, (D) 줄기세포(예를 들면, iPS 세포나 ES 세포 등의 다분화능 줄기 세포) 또는 전구 세포의 분화 유도 등을 들 수 있다.

[0042] 상기 (A) 및 (B)는 소위 RNA 의약으로서 본 발명을 이용하는 것이다. (A)의 구체예로서의 B형 간염의 치료에서는, 예를 들면, 게놈에 편입된 바이러스 DNA를 절단·분해하는 뉴클레아제(ZFN, TALEN, 또는 CRISPR-Cas9) 유전자를 목적 유전자로서 편입한 mRNA를 사용함으로써, 종래의 바이러스 벡터를 사용한 방법에서 문제가 되는 발암 리스크를 수반하지 않는 바이러스 치료가 가능하게 된다. 이와 같이, 본 발명은 바이러스 제거제로서도 유용하다. 유전병의 치료에 있어서는, 예를 들면, 질환 원인 유전자(기능 저하 또는 결손에 의해 질환을 일으키는 것)를 목적 유전자로 하고, 본 발명을 적용한다. 상기 (B)의 용도에서는, 본 발명을 이용하여 암 항원의 mRNA를 항원 제시 세포에 도입하고, 암 백신을 체내에서 생산시키게 된다. 상기 (C) 및 (D)의 용도에 본 발명을 적용하면, 바이러스 벡터를 사용하지 않고 초기화 인자를 도입하는 것이 가능하게 되기 때문에, 세포의 암화의 문제를 극복할 수 있다.

[0043] 본 발명을 RNA 의약으로서 이용하는 경우의 제형화는 통상의 방법에 따라 행할 수 있다. 제형화하는 경우에는, 제제상 허용되는 다른 성분(예를 들면, 완충제, 부형제, 붕괴제, 유화제, 현탁제, 무통화제, 안정제, 보존제, 방부제, 식염수, 담체 등)을 함유시킬 수 있다. 완충제로서는 인산 완충액, 시트르산 완충액 등을 사용할 수 있다. 부형제로서는 유당, 전분, 소르비톨, D-만니톨, 백당 등을 사용할 수 있다. 붕괴제로서는 전분, 카르복시메틸셀룰로오스, 탄산칼슘 등을 사용할 수 있다. 완충제로서는 인산염, 구연산염, 아세트산염 등을 사용할 수 있다. 유화제로서는 아라비아 고무, 알긴산 나트륨, 트라칸트 등을 사용할 수 있다. 현탁제로서는 모노스테아르산 글리세린, 모노스테아르산 알루미늄, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 라우릴황산나트륨 등을 사용할 수 있다. 무통화제로서는 벤질알코올, 클로로부탄올, 소르비톨 등을 사용할 수 있다. 안정제로서는 프로필렌글리콜, 아스코르브산 등을 사용할 수 있다. 보존제로서는 페놀, 염화벤잘코늄, 벤질알코올, 클로로부탄올, 메틸파라벤 등을 사용할 수 있다. 방부제로서는 염화벤잘코늄, 파라옥시벤조산, 클로로부탄올 등을 사용할 수 있다.

[0044] 제형화하는 경우의 제형도 특별히 한정되지 않는다. 제형의 예는 주사제, 정제, 산말, 미립자, 과립제, 캡슐 및 시럽이다.

- [0045] 본 발명의 RNA 의약은 그 제형에 따라 경구 투여 또는 비경구 투여(정맥내, 동맥내, 피하, 피내, 근육내 또는 복강내 주사, 경피, 경비, 경점막 등)에 의해 대상에 적용된다. 이들의 투여 경로는 서로 배타적이지 않고, 임의로 선택되는 2개 이상을 병용해도 된다(예를 들면, 경구 투여와 동시에 또는 소정 시간 경과 후에 정맥 주사 등을 행하는 등). 여기에서의 「대상」은 특별히 한정되지 않고, 인간 및 인간 이외의 포유동물(애완동물, 가축, 실험동물을 포함한다. 구체적으로는, 예를 들면, 마우스, 래트, 기니피그, 햄스터, 원숭이, 소, 돼지, 염소, 양, 개, 고양이, 닭, 메추라기 등임)를 포함한다. 하나의 바람직한 실시태양에서는 본 발명의 RNA 약제는 인간에 적용된다.
- [0046] 본 발명의 RNA 약제의 투여량은 기대되는 치료 효과가 얻어지도록 설정된다. 치료상 유효 투여량의 설정에 있어서는, 일반적으로 환자의 증상, 연령, 성별 및 체중 등이 고려된다. 또한, 당업자라면 이들 사항을 고려하여 적당한 투여량을 설정하는 것이 가능하다. 투여 스케줄로서는, 예를 들면, 1일 1회 내지 수회, 2일에 1회, 혹은 3일에 1회 등을 채용할 수 있다. 투여 스케줄의 작성에서는, 환자의 증상이나 유효 성분의 효과 지속 시간 등을 고려할 수 있다.
- [0047] **실시예**
- [0048] 1. 목적
- [0049] 다양한 임상 응용이 기대되고 있는 인공 합성 mRNA의 표적 세포 내에서의 번역 효율의 향상을 목표로, 이하의 검토를 행했다.
- [0050] 2. 연구 재료 및 방법
- [0051] (1) 플라스미드
- [0052] RNA 트랜스팩션용의 벡터로서 pBK-5F-EGFP-pA72를 사용했다. pBK-5F-EGFP-pA72의 제조 방법으로서는 Nogimori et al., "Dom34 mediates targeting of exogenous RNA in the antiviral OAS/RNase L pathway" *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue 1, 10 January 2019, Pages 432-449에 기재된 방법을 사용했다.
- [0053] (2) 비번역 영역의 삽입
- [0054] · GAPDH의 5' UTR의 삽입
- [0055] GAPDH의 5' UTR 서열에 관해서는, 서열번호 1과 서열번호 2에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 5' UTR 서열은 서열번호 27에 나타낸다.
- [0056] · GAPDH의 3' UTR의 삽입
- [0057] GAPDH의 3' UTR 서열에 관해서는, HeLa 세포로부터 추출한 총 RNA와, 서열번호 3과 서열번호 4에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 역전사 PCR법에 의해 단리했다. 단리한 서열은 pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 3' UTR 서열은 서열번호 28에 나타낸다.
- [0058] · ACAT2의 5' UTR의 삽입
- [0059] ACAT2의 5' UTR 서열에 관해서는, HeLa 세포로부터 추출한 총 RNA와, 서열번호 5와 서열번호 6에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 역전사 PCR법에 의해 단리했다. 단리한 서열은 pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, ACAT2의 5' UTR 서열은 서열번호 29에 나타낸다.
- [0060] · ACAT2의 3' UTR의 삽입
- [0061] ACAT2의 3' UTR 서열에 관해서는, HeLa 세포로부터 추출한 총 RNA와, 서열번호 7과 서열번호 8에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 역전사 PCR법에 의해 단리했다. 단리한 서열은 pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, ACAT2의 3' UTR 서열은 서열번호 30에 나타낸다.
- [0062] · LDHB의 5' UTR의 삽입
- [0063] LDHB의 5' UTR 서열에 관해서는, HeLa 세포로부터 추출한 총 RNA와, 서열번호 9와 서열번호 10에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 역전사 PCR법에 의해 단리했다. 단리한 서열은 pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, LDHB의 5' UTR 서열은 서열번호 31에 나타낸다.
- [0064] · LDHB의 3' UTR의 삽입

- [0065] LDHB의 3' UTR 서열에 관해서는, HeLa 세포로부터 추출한 총 RNA와, 서열번호 11과 서열번호 12에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 역전사 PCR법에 의해 단리했다. 단리한 서열은 pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, LDHB의 3' UTR 서열은 서열번호 32에 나타낸다.
- [0066] · GAPDH의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR의 삽입
- [0067] GAPDH의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR 서열에 관해서는, 서열번호 13과 서열번호 14에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR 서열은 서열번호 33에 나타낸다.
- [0068] · GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 94%인 3' UTR의 삽입
- [0069] GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 94%인 3' UTR 서열에 관해서는, 서열번호 15와 서열번호 16에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 94%인 3' UTR 서열은 서열번호 34에 나타낸다.
- [0070] · GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 88%인 3' UTR의 삽입
- [0071] GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 88%인 3' UTR 서열에 관해서는, 서열번호 17과 서열번호 18에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 88%인 3' UTR 서열은 서열번호 35에 나타낸다.
- [0072] · GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 75%인 3' UTR의 삽입
- [0073] GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 75%인 3' UTR 서열에 관해서는, 서열번호 19와 서열번호 20에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 75%인 3' UTR 서열은 서열번호 36에 나타낸다.
- [0074] · GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR의 삽입
- [0075] GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR 서열에 관해서는, 서열번호 21과 서열번호 22에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR 서열은 서열번호 37에 나타낸다.
- [0076] · GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 25%인 3' UTR의 삽입
- [0077] GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 25%인 3' UTR 서열에 관해서는, 서열번호 23과 서열번호 24에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 25%인 3' UTR 서열은 서열번호 38에 나타낸다.
- [0078] · 베타-글로빈의 5' UTR 삽입
- [0079] β-글로빈의 5' UTR 서열에 관해서는, 서열번호 41 및 서열번호 42에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, β-글로빈의 5' UTR 서열은 서열번호 94에 나타낸다.
- [0080] · β-글로빈의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR의 삽입
- [0081] β-글로빈의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 43과 서열번호 44에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, β-글로빈의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR 서열은 서열번호 95에 나타낸다.
- [0082] · β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 92%인 3' UTR의 삽입
- [0083] β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 92%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 45와 서열번호 46에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 92%인 3' UTR 서열은 서열번호 96에 나타낸다.
- [0084] · β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 88%인 3' UTR의 삽입
- [0085] β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 88%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 47과 서열번호 48에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, β-글로빈의 5'

UTR 서열과 상보성이 88%인 3' UTR 서열은 서열번호 97에 나타낸다.

- [0086] · β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 74%인 3' UTR의 삽입
- [0087] β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 74%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 49와 서열번호 50에 나타내는 올리고 뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 74%인 3' UTR 서열은 서열번호 98에 나타낸다.
- [0088] · β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR의 삽입
- [0089] β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 51과 서열번호 52에 나타내는 올리고 뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR 서열은 서열번호 99에 나타낸다.
- [0090] · β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 24%인 3' UTR의 삽입
- [0091] β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 24%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 53과 서열번호 54에 나타내는 올리고 뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, β-글로빈의 5' UTR 서열과 상보성이 24%인 3' UTR 서열은 서열번호 100에 나타낸다.
- [0092] · RPS8의 5' UTR의 삽입
- [0093] RPS8의 5' UTR 서열에 관해서는, 서열번호 55와 서열번호 56에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 KpnI, XhoI 사이트에 삽입했다. 여기에서, RPS8의 5' UTR 서열은 서열번호 101에 나타낸다.
- [0094] · RPS8의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR의 삽입
- [0095] RPS8의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 57과 서열번호 58에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, RPS8의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR 서열은 서열번호 102에 나타낸다.
- [0096] · RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 93%인 3' UTR의 삽입
- [0097] RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 93%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 59와 서열번호 60에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 93%인 3' UTR 서열은 서열번호 103에 나타낸다.
- [0098] · RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 86%인 3' UTR의 삽입
- [0099] RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 86%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 61과 서열번호 62에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 86%인 3' UTR 서열은 서열번호 104에 나타낸다.
- [0100] · RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 71%인 3' UTR의 삽입
- [0101] RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 71%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 63과 서열번호 64에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 71%인 3' UTR 서열은 서열번호 105에 나타낸다.
- [0102] · RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR의 삽입
- [0103] RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 65와 서열번호 66에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR 서열은 서열번호 106에 나타낸다.
- [0104] · RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 29%인 3' UTR의 삽입
- [0105] RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 29%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 67과 서열번호 68에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 29%인 3' UTR 서열은 서열번호 107에 나타낸다.
- [0106] · RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 14%인 3' UTR의 삽입

- [0107] RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 14%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 69와 서열번호 70에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, RPS8의 5' UTR 서열과 상보성이 14%인 3' UTR 서열은 서열번호 108에 나타낸다.
- [0108] · LDHB의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR의 삽입
- [0109] LDHB의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 71과 서열번호 72에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, LDHB의 5' UTR 서열과 완전 상보인 3' UTR 서열은 서열번호 109에 나타낸다.
- [0110] · LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 93%인 3' UTR의 삽입
- [0111] LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 93%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 73과 서열번호 74에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 93%인 3' UTR 서열은 서열번호 110에 나타낸다.
- [0112] · LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 87%인 3' UTR의 삽입
- [0113] LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 87%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 75와 서열번호 76에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 87%인 3' UTR 서열은 서열번호 111에 나타낸다.
- [0114] · LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 75%인 3' UTR의 삽입
- [0115] LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 75%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 77과 서열번호 78에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 75%인 3' UTR 서열은 서열번호 112에 나타낸다.
- [0116] · LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR의 삽입
- [0117] LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 79와 서열번호 80에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR 서열은 서열번호 113에 나타낸다.
- [0118] · LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 25%인 3' UTR의 삽입
- [0119] LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 25%인 3' UTR에 관해서는, 서열번호 81과 서열번호 82에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고, pBK-5F-EGFP-pA72의 EcoRI, XbaI 사이트에 삽입했다. 여기에서, LDHB의 5' UTR 서열과 상보성이 25%인 3' UTR 서열은 서열번호 114에 나타낸다.
- [0120] · Cas9 mRNA 합성 플라스미드의 제작
- [0121] Cas9 cDNA 서열은 Mail et al "RNA-guided human genome engineering via Cas9" Science. 2013 Feb 15; 339(6121): 823-6에 기재되어 있는 hCas 플라스미드(Addgene plasmid #41815)와, 서열번호 83과 서열번호 84에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 PCR법에 의해 단리했다. 단리한 서열을 pBK-5F-EGFP-pA72의 HindIII 사이트에 삽입한 플라스미드와, 서열번호 83과 서열번호 85에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 인버스 PCR법에 의해 pBK-F-hCas9-pA72 플라스미드를 얻었다. . 여기에서, hCas9의 cDNA 서열은 서열번호 115에 나타내고, hCas9의 아미노산 서열은 서열번호 116에 나타낸다.
- [0122] · Cas9 mRNA 합성 플라스미드로의 GAPDH의 5' UTR 삽입
- [0123] pBK-F-hCas9-pA72 플라스미드와, 서열번호 86과 서열번호 87에 나타낸 올리고 뉴클레오타이드를 사용한 인버스 PCR법에 의해 GAPDH의 5' UTR을 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 5' UTR은 서열번호 27에 나타낸다.
- [0124] · Cas9 mRNA 합성 플라스미드로의 GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 75%인 3' UTR의 삽입
- [0125] pBK-F-hCas9-pA72 플라스미드와 서열번호 88과 서열번호 89에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 인버스 PCR법에 의해, GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 75%인 3' UTR을 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 75%인 3' UTR 서열은 서열번호 36에 나타낸다.
- [0126] · Cas9 mRNA 합성 플라스미드로의 GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR의 삽입

- [0127] pBK-F-hCas9-pA72 플라스미드와 서열번호 90과 서열번호 91에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 인버스 PCR법에 의해, GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR을 삽입했다. 여기에서, GAPDH의 5' UTR 서열과 상보성이 50%인 3' UTR 서열은 서열번호 37에 나타낸다.
- [0128] · p53의 cDNA의 삽입
- [0129] p53의 cDNA 서열은 U2OS 세포로부터 추출한 총 RNA와, 서열번호 25와 서열번호 26에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 역전사 PCR법에 의해 단리했다. 단리한 p53의 cDNA 서열은 pBK-5F-EGFP-pA72의 HindIII 부위에 삽입했다. 여기에서, p53의 cDNA 서열은 서열번호 39에 나타내고, p53의 아미노산 서열은 서열번호 40에 나타낸다.
- [0130] (3) RNA 합성
- [0131] 각종 pBK-5F-EGFP-pA72, 각종 pBK-5F-p53-pA72 및 각종 pBK-F-hCas9-pA72 플라스미드를, BsmBI로 처리한 것을 주형으로 하여, 5xFlag-EGFP-pA72, 5xFlag-p53-pA72 및 Flag-hCas9-pA72 mRNA를 합성했다. RNA 합성은 T7 RNA 폴리머라제(타카라 바이오 가부시키키가이샤)를 사용하여, 이 T7 RNA 폴리머라제의 취급 설명서에 따라 행했다.
- [0132] (4) 트랜스팩션
- [0133] HeLa 세포, 293T 세포, U2OS 세포는 모두 5% 태아 소 혈청을 첨가한 들베코 변형 이글 배지(닛수세이야쿠 가부시키키가이샤)를 사용하고, 5% CO₂ 존재하 37°C에서 배양했다. HeLa 세포를 약 50% 컨플루언트가 되도록 35mm 접시에 뿌린 후 24시간 동안 배양했다. 그 후, 합성한 각종 RNA를 리포펙타민 RNAiMAX(라이프테크놀로지스 재팬 가부시키키가이샤)를 사용하여, 이 취급 설명서에 따라 도입했다.
- [0134] (5) RNA의 분석
- [0135] RNA 트랜스팩션 후의 HeLa 세포로부터의 총 RNA의 분리는 구아니딘티오시안산염, 산성 페놀, 클로로포름을 사용한 방법인 AGPC(산 구아니딘 티오시안네이트-페놀-클로로포름 추출)법에 의해 행했다. 제조한 총 RNA는 아가로스 MOPS 버퍼겔(20mM MOPS(pH 7.0), 5mM 아세트산 나트륨, 1mM EDTA, 2.0% 아가로스, 2.46M 포름알데히드)에 의해 분리한 후, 20xSSC 버퍼 속에서 나일론막 Biodyne-B(니혼폴 가부시키키가이샤)에 전사했다. 전사 후의 나일론막은 UV로 고정된 후, DIG 표지 프로브를 사용하여 혼성화했다. DIG 표지 프로브의 제작 및 혼성화는 DIG RNA 라벨링 믹스(로슈 다이아그노스틱스 가부시키키가이샤) 및 DIG 세척 및 차단 버퍼 세트(로슈 다이아그노스틱스 가부시키키가이샤)를 사용하여 취급 설명서에 따라 행했다. mRNA의 검출은 화학 발광 시약 CDP-Star(로슈 다이아그노스틱스 가부시키키가이샤)를 사용하여, LAS3000mini(후지샤신필름 가부시키키가이샤)에 의해 검출했다.
- [0136] (6) 단백질의 분석
- [0137] 단백질의 세포내 발현은 이하에 나타내는 웨스턴 블롯법에 의해 행했다. 도입 후 세포로부터 단백질 라이세이트의 조절은 SDS-PAGE 샘플 버퍼(50mM Tris-HCl(pH 6.8), 4% 글리세롤, 2% SDS, 2% 2-메르캅토에탄올, 0.004% 브로모페놀 블루)를 사용하여 행했다. 단백질 라이세이트는 8, 10, 12 또는 15% 아크릴아미드를 사용하여 SDS-PAGE법으로 분리한 후 니트로셀룰로오스막 BioTrace NC(닛폰 폴 가부시키키가이샤)에 전기적으로 전사했다. 전사 후 니트로셀룰로오스막은 항Flag M2 마우스 모노클로날 항체(시그마알드리치 재팬 고도카이샤), 항GAPDH 항체(Saito et al JBC), 항PABPC1 항체(Osawa et al RNA(2012)) 및 피옥시다아제 부가 항마우스 IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) 또는 피옥시다아제 부가 항토끼 IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)와 배양했다. 니트로셀룰로오스막상의 피옥시다아제 효소 활성화는 루미놀 화학 발광법을 사용하여 LAS3000mini(후지샤신필름 가부시키키가이샤)에 의해 검출했다.
- [0138] (7) AAVS 영역 게놈 편집 효율의 정량
- [0139] 게놈 편집 효율의 정량은 이하에 나타내는 T7 엔도뉴클레아제 어세이법에 의해 행했다. AAVS 영역을 인식하는 sgRNA(서모피서사이언티픽 가부시키키가이샤)와 합성한 각종 hCas9 mRNA를 HeLa 세포에 도입했다. 도입한 세포를 50mM NaOH로 처리함으로써 게놈 DNA를 조정했다. 조정한 게놈 DNA와, 서열번호 92와 서열번호 93에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 사용한 PCR법에 의해 AAVS 게놈 서열을 증폭했다. 증폭한 게놈 서열을 열변성 후 어닐링 시킴으로써 미스매치를 포함하는 서열로 했다. 어닐링한 AAVS 게놈 서열을 T7 엔도뉴클레아제 I(뉴잉글랜드 바이오랩 가부시키키가이샤)에 의해 처리했다. 처리 후의 AAVS 게놈 서열은 아가로스겔 전기영동에 의해 분리한 후, 에티뮴브로마이드로 염색하고, Typhoon 9400(GE Healthcare, Inc.)에 의해 검출했다.
- [0140] 3. 실험 결과

[0141] (i) 실험 1

[0142] 도 1은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면이다. 도 1에 나타내는 인공 합성 mRNA는 위에서부터 GAPDH의 5' UTR 서열 및 GAPDH의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와, LDHB의 5' UTR 서열 및 LDHB의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와, ACAT2의 5' UTR 서열 및 ACAT2의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA를 나타낸다. 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 5' 말단에는 캡 구조가 부가되어 있음과 아울러, 3' 말단에는 폴리 A쇄가 72 염기 부가되어 있다. 또한, 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 단백질 코드 영역인 ORF에는, 5xFlag 태그를 부가한 EGFP(강화된 녹색 형광 단백질)를 갖는다.

[0143] 도 2는 인공 합성 mRNA로부터의 단백질 발현량을 측정된 결과를 나타내는 도면이다. 단백질 발현량은 도 1에 나타내는 인공 합성 mRNA를 HeLa 세포에 도입함으로써 측정했다. 도 2는 인공 합성 mRNA마다의 발현량을 나타낸다.

[0144] 도 2에서는, ACAT2의 UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA의 발현량을 1로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다. 도 2에서 참고로, β -글로빈의 3' UTR을 갖는 인공 합성 mRNA의 결과에 대해서도 나타낸다.

[0145] 도 2의 결과로부터, GAPDH의 UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA는, ACAT2의 UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와 비교하여, 약 10배의 발현량을 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한, 발현 효율이 높은 인공 합성 mRNA로서 표준적으로 사용되는 β -글로빈의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와 비교하여, GAPDH의 UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA는 약 5배의 발현량 보이는 것을 알 수 있었다.

[0146] 도 3은 도 1에 나타낸 인공 합성 mRNA의 안정성을 나타내는 도면이다. 도 3의 가로축은 세포에 인공 합성 mRNA를 도입한 후의 경과 시간을 나타내고, 도 3의 세로축은 세포에 인공 합성 mRNA를 도입했을 때의 mRNA의 양을 100%로 한 경우의 mRNA의 양을 나타낸다.

[0147] 도 3의 결과로부터, 어느 인공 합성 mRNA도 HeLa 세포 내에서 동일한 분해 속도를 나타내는 것을 알 수 있었다. 도 2와 도 3에 나타내는 결과로부터, GAPDH의 5' UTR 서열 및 GAPDH의 3' UTR 서열이 발휘하는 효과는 안정성이 향상된다고 하는 효과가 아니고, 번역 효율이 향상되는 효과인 것을 알 수 있었다.

[0148] (ii) 실험 2

[0149] 도 4는 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면이다. 도 4에 나타내는 인공 합성 mRNA는, 위에서부터 차례로, ACAT2의 5' UTR 서열 및 ACAT2의 3' UTR 서열을 가지는 인공 합성 mRNA와, ACAT2의 5' UTR 서열 및 GAPDH의 3' UTR 서열을 가지는 인공 합성 mRNA와, GAPDH의 5' UTR 서열 및 ACAT2의 3' UTR 서열을 가지는 인공 합성 mRNA와, GAPDH의 5' UTR 서열 및 GAPDH의 3' UTR 서열을 가지는 인공 합성 mRNA를 나타낸다. 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 5' 말단에는, 캡 구조가 부가되어 있음과 아울러, 3' 말단에는 폴리 A쇄가 72 염기 부가되어 있다. 또, 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 단백질 코드 영역인 ORF는 5xFlag 태그를 부가한 EGFP를 가진다.

[0150] 도 5는 인공 합성 mRNA마다의 발현량을 나타내는 도면이다. 단백질 발현량은 도 4에 나타내는 인공 합성 mRNA를 HeLa 세포에 도입함으로써 측정했다. 도 5에서는, ACAT2의 5' UTR 서열 및 ACAT2의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA의 발현량을 1로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.

[0151] 도 5의 결과로부터, ACAT2의 5' UTR 서열 및 ACAT2의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와 비교하여, GAPDH의 5' UTR 서열 및 ACAT2의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA는 약 10배의 발현량을 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한, ACAT2의 5' UTR 서열 및 ACAT2의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와 비교하여, GAPDH의 5' UTR 서열 및 GAPDH의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA는 약 25배의 발현량을 나타내는 것을 알 수 있었다. 즉, GAPDH의 5' UTR 서열을 가짐으로써 번역 효율의 향상 효과를 얻을 수 있지만, 또한, GAPDH의 3' UTR 서열을 가짐으로써 상승적인 번역 효율의 향상 효과가 얻어지는 것을 알 수 있었다.

[0152] 도 6은 인공 합성 mRNA를 신장 유래의 HEK293 세포에 도입한 경우의 인공 합성 mRNA마다의 발현량을 나타내는 도면이다. 도 5에 관한 실험과 비교하여, 도입하는 세포를 변경한 것 이외에는, 동일한 방법으로 실험을 행했다. 도 6의 결과로부터도, 도 5의 결과로부터 알 수 있었던 것과 동일한 경향이 보였다. 즉, GAPDH의 5' UTR 서열을 가짐으로써 번역 효율의 향상 효과를 얻을 수 있지만, 또한, GAPDH의 3' UTR 서열을 가짐으로써 상승적인 번역 효율의 향상 효과가 얻어지는 것을 알 수 있었다. 도 5와 도 6에 관한 실험 결과로부터, GAPDH의 UTR 서열을 가짐으로써 얻어지는 번역 효율의 향상 효과는 어느 세포에서도 유효하여, 세포 특이성이 없는 것을 알 수 있었다.

- [0153] (iii) 실험 3
- [0154] 도 7은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면이다. 도 7에 나타내는 인공 합성 mRNA는 위에서부터 차례로, UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA와, 5' UTR 서열을 갖지만 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA와, 5' UTR 서열을 갖지 않지만 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와, 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA를 나타낸다. 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 5' 말단에는 캡 구조가 부가되어 있음과 아울러, 3' 말단에는 폴리 A쇄가 72 염기 부가되어있다. 또한, 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 단백질 코드 영역인 ORF는 5xFlag 태그를 부가한 EGFP를 갖는다.
- [0155] 도 8은 GAPDH의 UTR 서열의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 도 9는 LDHB의 UTR 서열의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 도 10은 ACAT2의 UTR 서열의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 단백질 발현량은 도 7에 나타내는 인공 합성 mRNA를 HeLa 세포에 도입함으로써 측정했다. 도 8, 9, 10에서는 UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA의 발현량을 1로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.
- [0156] 도 8의 결과로부터, GAPDH의 5' UTR 서열 및 GAPDH의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA의 발현량은 5' UTR 서열을 갖지만 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA의 발현량과, 5' UTR 서열을 갖지 않지만 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA의 발현량의 합보다 크다. 즉, GAPDH의 5' UTR 서열과 GAPDH의 3' UTR 서열을 가짐으로써, 상승적인 번역 효율의 향상 효과가 얻어지는 것을 알 수 있었다.
- [0157] 반면, 도 9의 결과로부터, LDHB의 5' UTR 서열 및 LDHB의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA의 발현량은 5' UTR 서열을 갖지만 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA의 발현량과, 5' UTR 서열을 갖지 않지만 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA의 발현량의 합과 동등했다. 즉, LDHB의 5' UTR 서열과 LDHB의 3' UTR 서열을 가짐으로써 얻어지는 효과는 상가적인 효과에 그쳤다.
- [0158] 또한, 도 10의 결과로부터, ACAT2의 UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA의 발현량은, UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA의 발현량과 비교하여, 번역 효율이 저하되는 것을 알 수 있었다. 도 8 내지 도 10의 결과로부터, 5' UTR 서열과 3' UTR 서열을 가짐으로써 얻어지는 상승적인 번역 효율의 향상 효과는 GAPDH에 특징적인 효과인 것을 알 수 있었다.
- [0159] (iv) 실험 4
- [0160] 도 11은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면이다. 도 11에 나타내는 인공 합성 mRNA는, 위에서부터 차례로, GAPDH의 5' UTR 서열 및 GAPDH의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA(이하, 「야생형」이라고도 함)와, 5' UTR 서열을 3분할 한 부분 중 가장 5' 말단측의 부분을 결실한 인공 합성 mRNA(결실 변위체 1)와, 5' UTR 서열을 3분할한 부분 중 중앙 부분을 결실한 인공 합성 mRNA(결실 변위체 2)와, 5' UTR 서열을 3분할한 부분 중 가장 3' 말단측의 부분을 결실한 인공 합성 mRNA(결실 변위체 3)를 나타낸다. 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 5' 말단에는 캡 구조가 부가되어 있음과 아울러, 3' 말단에는 폴리 A쇄가 72 염기 부가되어있다. 또한, 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 단백질 코드 영역인 ORF는 EGFP를 갖는다.
- [0161] 도 12는 GAPDH의 5' UTR 서열의 결실의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 단백질 발현량은 도 11에 나타내는 인공 합성 mRNA를 HeLa 세포에 도입함으로써 측정했다. 도 12에서는, 야생형의 발현량을 100으로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.
- [0162] 도 13은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면이다. 도 13에 나타내는 인공 합성 mRNA는 위에서부터 차례로 GAPDH의 5' UTR 서열 및 GAPDH의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA(야생형)와 3' UTR 서열을 3분할한 부분 중 가장 5' 말단측의 부분을 결실한 인공 합성 mRNA(결실 변위체 4)와, 3' UTR 서열을 3분할한 부분 중 중앙 부분을 결실한 인공 합성 mRNA(결실 변위체 5)와, 3' UTR 서열을 3분할한 부분 중 가장 3' 말단측의 부분을 결실한 인공 합성 mRNA(결실 변위체 6)를 나타낸다. 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 5' 말단에는 캡 구조가 부가되어 있음과 아울러, 3' 말단에는 폴리 A쇄가 72 염기 부가되어있다. 또한, 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 단백질 코드 영역인 ORF는 EGFP를 갖는다.
- [0163] 도 14는 GAPDH의 3' UTR 서열의 결실의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 단백질 발현량은 도 13에 나타내는 인공 합성 mRNA를 HeLa 세포에 도입함으로써 측정했다. 도 14에 있어서, 야생형의 발현량을 100으로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.
- [0164] 도 12, 14의 결과로부터, 어느 결실 변이체에 대해서도, 야생형과 비교하여 발현 효율이 저하된 것을 알 수 있

었다. 이것으로부터, GAPDH의 5' UTR 서열 및 GAPDH의 3' UTR 서열은 모두 전체 영역이 존재하는 것이 번역 효율의 향상 효과에 기여하고 있는 것을 알 수 있었다.

[0165] (v) 실험 5

[0166] 도 15는 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면이다. 일반적으로, GAPDH의 5' UTR 서열은 GAPDH의 3' UTR 서열과 전체 영역에 걸쳐 상보성을 가지고 있다. 이 실험에서는 서로의 상보성이 특히 높은 영역인 5' UTR 서열의 일부와 3' UTR 서열의 일부를 갖는 인공 합성 mRNA를 사용했다. 구체적으로는, 5' UTR 서열로서, GAPDH의 5' UTR 서열을 3분할한 부분 중 가장 5' 말단측의 부분인 CU가 풍부한 영역(28뉴클레오티드)(이하, 「5' UTR 28nt」라고도 함)를 사용했다. GAPDH의 3' UTR 서열로서, GAPDH의 3' UTR 서열을 3분할한 부분 중 가장 5' 말단측의 부분인 AG가 풍부한 영역(28뉴클레오티드)(이하, 「3' UTR 28nt」라고도 함)을 사용했다.

[0167] 도 16은 5' UTR 28nt와 3' UTR 28nt의 유무에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 단백질 발현량은 인공합성 mRNA를 HeLa 세포에 도입함으로써 측정했다. 도 16에 있어서, 야생형의 발현량을 1로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.

[0168] 도 16의 결과로부터, 5' UTR 28nt 및 3' UTR 28nt 중 적어도 하나를 갖는 인공 합성 mRNA는 야생형에 비해 번역 효율이 저하된 것을 알 수 있었다. 이 결과로부터도, GAPDH의 5' UTR 서열 및 GAPDH의 3' UTR 서열은 모두 전체 영역이 존재하는 것이 번역 효율의 향상 효과에 기여하고 있는 것을 알 수 있었다.

[0169] (vi) 실험 6

[0170] 도 17은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면이다. 이 실험에서는 GAPDH의 5' UTR 서열을 갖고, GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 소정의 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA를 사용했다. 구체적으로는, 도 17에 나타내는 인공 합성 mRNA는 위에서부터 차례로 GAPDH의 5' UTR 서열에 94% 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와, GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 88% 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와, GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 75% 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와, GAPDH 5' UTR 서열에 대해 50% 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와, GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 25% 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA를 나타낸다. 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 5' 말단에는 캡 구조가 부가되어 있음과 아울러, 3' 말단에는 폴리 A쇄가 72 염기 부가되어있다. 또한, 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 단백질 코드 영역인 ORF는 EGFP를 갖는다.

[0171] 도 18은 상보성에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 단백질 발현량은 인공합성 mRNA를 HeLa 세포에 도입함으로써 측정했다. 도 18에 있어서, 야생형의 발현량을 1로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.

[0172] 도 18의 결과로부터, GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 50%의 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와, GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 75%의 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA가 야생형의 2.5배 이상 높은 번역 효율을 나타내는 것을 알 수 있었다.

[0173] 도 19는 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면이다. 이 실험에서는 GAPDH의 5' UTR 서열을 갖고, GAPDH의 5' UTR 서열에 100% 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA를 사용했다. 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 5' 말단에는 캡 구조가 부가되어 있음과 아울러, 3' 말단에는 폴리 A쇄가 72 염기 부가되어있다. 또한, 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 단백질 코드 영역인 ORF는 EGFP를 갖는다.

[0174] 도 20은 상보성에 기인하는 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 단백질 발현량은 인공합성 mRNA를 HeLa 세포에 도입함으로써 측정했다. 도 20에서는, 야생형의 발현량을 100으로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.

[0175] 도 20의 결과로부터, GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 100%의 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA는 단백질의 발현이 보이지 않았다. 이 결과로부터, GAPDH의 5' UTR 서열에 부분적인 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 것이 중요하다는 것을 알 수 있었다.

[0176] (vii) 실험 7

[0177] 도 21은 제작한 인공 합성 mRNA를 나타내는 도면이다. 이 실험에 사용한 인공 합성 mRNA의 5' 말단에는 캡 구조가 부가되어 있음과 아울러, 3' 말단에는 폴리 A쇄가 72 염기 부가되어있다. 또한, 이 실험은 실용화를 목적으로 하여, 단백질 코드 영역으로서 암 억제 유전자 p53의 ORF를 사용했다. ORF에는 5xFlag 태그가 추가되었다.

[0178] 도 22는 암 억제 유전자 p53을 사용한 경우의 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 단백질 발현량은 인공 합성

mRNA를 U2OS 세포에 도입함으로써 측정했다. 도 22에 있어서, GAPDH의 5' UTR 서열에 대하여 75%의 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA의 발현량을 100으로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.

- [0179] 도 22의 결과로부터, 발현 효율이 높은 인공 합성 mRNA로서 표준적으로 사용되는 β -글로빈의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA와 비교하여, 야생형은 약 4배 높은 번역 효율을 나타내는 것이 알 수 있고, GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 75% 상보성을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA는 약 10배 높은 번역 효율을 나타내는 것을 알 수 있었다.
- [0180] 도 23은 얻어진 효과의 추정 메커니즘을 설명하기 위한 도면이다. 본 실시형태의 인공 합성 mRNA는 GAPDH의 5' 비번역 영역과 GAPDH의 3' 비번역 영역을 갖는다. 또는, 본 실시형태의 인공 합성 mRNA는 5' 비번역 영역과, 5' 비번역 영역과의 상보성이 40% 이상 80% 이하인 3' 비번역 영역을 갖는다. 즉, 본 실시형태의 인공 합성 mRNA는 GAPDH의 5' UTR 서열에 대해, 3' UTR 서열은 모두 부분적인 상보성을 갖는다. 이러한 부분적인 상보성이 mRNA의 환상화를 촉진함으로써, 리보솜을 효율적으로 리사이클시키기 때문에, 번역 효율이 향상되는 것으로 생각된다.
- [0181] (viii) 실험 8
- [0182] 도 24는 게놈 편집 유전자 hCas9를 사용한 경우에 있어서의 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 도면의 세로축은 발현량(발현(배수 증가))을 나타낸다. 이 실험에서는 하기 mRNA를 사용했다. 도면은 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열을 갖지 않을 때의 발현량을 1로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.
- [0183] · 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열을 갖지 않는 게놈 편집 유전자 hCas9(대조군)
- [0184] · GAPDH 5' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0185] · GAPDH 5' UTR 서열을 갖고, GAPDH 5' UTR 서열에 대해 75% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0186] · GAPDH 5' UTR 서열을 갖고, GAPDH 5' UTR 서열에 대해 50% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0187] 도 24의 결과로부터, 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열을 갖지 않는 게놈 편집 유전자 hCas9와 비교하여, GAPDH의 5' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA는 2배 이상의 번역 효율을 나타내는 것이 알 수 있고, GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 75% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA 및 GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 50% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA는 5배 이상의 번역 효율을 나타내는 것을 알 수 있었다.
- [0188] 도 25는 게놈 편집 유전자 hCas9를 사용한 경우에 있어서의 게놈 편집량의 차이를 나타내는 도면이다. 도면의 세로축은 게놈 편집량(게놈 편집(배수 증가))을 나타낸다. 이 실험에서는 도 24와 동일한 mRNA를 사용했다. 도면은 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열을 갖지 않는 게놈 편집 유전자 hCas9의 게놈 편집량을 1로 한 경우의 게놈 편집량의 상대값을 나타낸다.
- [0189] 도 25의 결과로부터, 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열을 갖지 않는 게놈 편집 유전자 hCas9와 비교하여, GAPDH의 5' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA는 2배 이상의 게놈 편집량을 나타내는 것 알 수 있고, GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 75% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA 및 GAPDH의 5' UTR 서열에 대해 50% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA는 3배 이상의 게놈 편집량을 나타내는 것을 알 수 있었다.
- [0190] (ix) 실험 9
- [0191] 도 26은 β -글로빈의 5' UTR을 사용한 경우에 있어서의 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 도면의 세로축은 발현량(발현(배수 증가))을 나타낸다. 이 실험에서는 하기 mRNA를 사용했다. 도면은 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA의 발현량을 1로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.
- [0192] · β -글로빈의 5' UTR 서열을 갖고, β -글로빈의 5' UTR 서열에 대해 100% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0193] · β -글로빈의 5' UTR 서열을 갖고, β -글로빈의 5' UTR 서열에 대해 92% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0194] · β -글로빈의 5' UTR 서열을 갖고, β -글로빈의 5' UTR 서열에 대해 88% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0195] · β -글로빈의 5' UTR 서열을 갖고, β -글로빈 5' UTR 서열에 대해 74% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합

성 mRNA

- [0196] · β -글로빈의 5' UTR 서열을 갖고, β -글로빈의 5' UTR 서열에 대해 24% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0197] · β -글로빈의 5' UTR 서열을 갖고, 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA
- [0198] · 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA
- [0199] · GAPDH의 5' UTR 서열을 갖고, GAPDH의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0200] 도 26의 결과로부터, β -글로빈의 5' UTR 서열에 대해 74% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA 및 β -글로빈의 5' UTR 서열에 대해 50% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA가 우수한 번역 효율을 나타내는 것을 알 수 있었다.
- [0201] (x) 실험 10
- [0202] 도 27은 RPS8의 5' UTR을 사용한 경우에 있어서의 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 도면의 세로축은 발현량(발현(배수 증가))을 나타낸다. 이 실험에서는 이하의 mRNA를 사용했다. 도면은 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA의 발현량을 1로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.
- [0203] · RPS8의 5' UTR 서열을 갖고, RPS8의 5' UTR 서열에 대해 100% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0204] · RPS8의 5' UTR 서열을 갖고, RPS8의 5' UTR 서열에 대해 93% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0205] · RPS8의 5' UTR 서열을 갖고, RPS8의 5' UTR 서열에 대해 86% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0206] · RPS8의 5' UTR 서열을 갖고, RPS8의 5' UTR 서열에 대하여 71% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0207] · RPS8의 5' UTR 서열을 갖고, RPS8의 5' UTR 서열에 대해 50% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0208] · RPS8의 5' UTR 서열을 갖고, RPS8의 5' UTR 서열에 대해 29% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0209] · RPS8의 5' UTR 서열을 갖고, RPS8의 5' UTR 서열에 대해 14% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0210] · RPS8의 5' UTR 서열을 갖고, 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA
- [0211] · 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA
- [0212] · GAPDH의 5' UTR 서열을 갖고, GAPDH의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0213] 도 27의 결과로부터, RPS8의 5' UTR 서열에 대해 71% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA 및 RPS8의 5' UTR 서열에 대해 50% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA가 우수한 번역 효율을 나타내는 것을 알 수 있었다.
- [0214] (x) 실험 10
- [0215] 도 28은 LDHB의 5' UTR을 사용한 경우에 있어서의 발현량의 차이를 나타내는 도면이다. 도면의 세로축은 발현량(발현(배수 증가))을 나타낸다. 이 실험에서는 이하의 mRNA를 사용했다. 도면은 LDHB의 5' UTR 서열을 갖고 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA의 발현량을 1로 한 경우의 발현량의 상대값을 나타낸다.
- [0216] · LDHB의 5' UTR 서열을 갖고, LDHB의 5' UTR 서열에 대해 100% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0217] · LDHB의 5' UTR 서열을 갖고, LDHB의 5' UTR 서열에 대해 93% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0218] · LDHB의 5' UTR 서열을 갖고, LDHB의 5' UTR 서열에 대해 87% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0219] · LDHB의 5' UTR 서열을 갖고, LDHB의 5' UTR 서열에 대해 75% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0220] · LDHB의 5' UTR 서열을 갖고, LDHB의 5' UTR 서열에 대해 50% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0221] · LDHB의 5' UTR 서열을 갖고, LDHB의 5' UTR 서열에 대해 25% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA
- [0222] · LDHB의 5' UTR 서열을 갖고, 3' UTR 서열을 갖지 않는 인공 합성 mRNA
- [0223] 도 28의 결과로부터, LDHB의 5' UTR 서열에 대해 75% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA 및 LDHB의 5' UTR 서열에 대해 50% 상보성의 3' UTR 서열을 갖는 3' UTR 서열을 갖는 인공 합성 mRNA가 우수한 번역 효율

을 나타내는 것을 알 수 있었다.

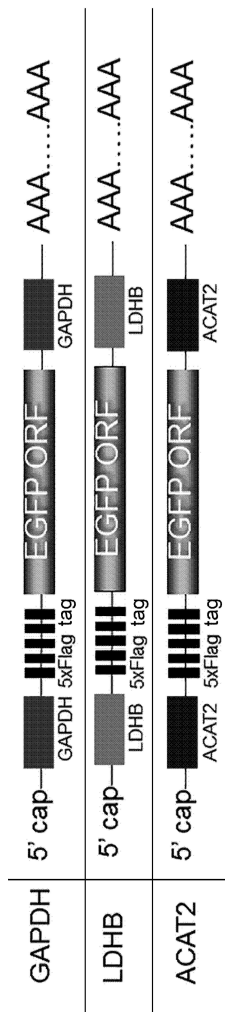
[0224] (산업상 이용가능성)

[0225] 본 발명에 의하면, 표적 세포에 도입한 인공 합성 mRNA의 번역 효율이 향상되어, 목적 유전자의 고발현이 가능하게 된다. 본 발명의 용도로서, 예를 들면, mRNA 의약(각종 바이러스성 질환의 치료, 암 면역 요법 등), iPS 세포의 제작, 줄기 세포 또는 전구 세포의 분화 유도가 상정된다.

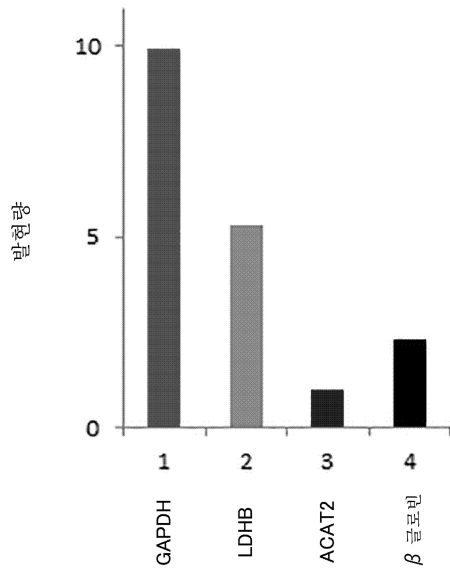
[0226] 본 발명은 상기 발명의 실시형태 및 실시예의 설명에 전혀 한정되지 않는다. 특허청구범위의 기재를 일탈하지 않고, 당업자가 용이하게 생각할 수 있는 범위에서 다양한 변형 형태도 본 발명에 포함된다. 본 명세서에서 명시한 논문, 공개특허공보 및 특허공보 등의 내용은 그 모든 내용을 원용에 의해 인용하는 것으로 한다.

도면

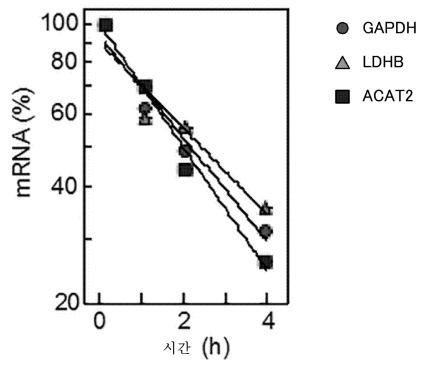
도면1



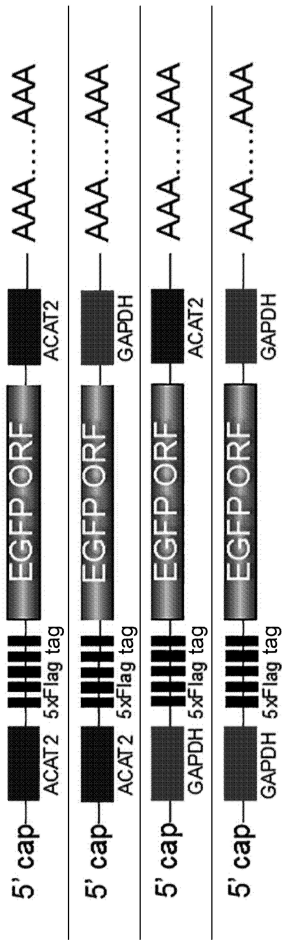
도면2



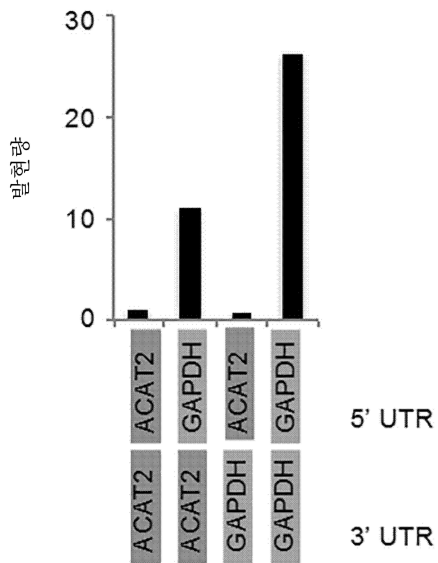
도면3



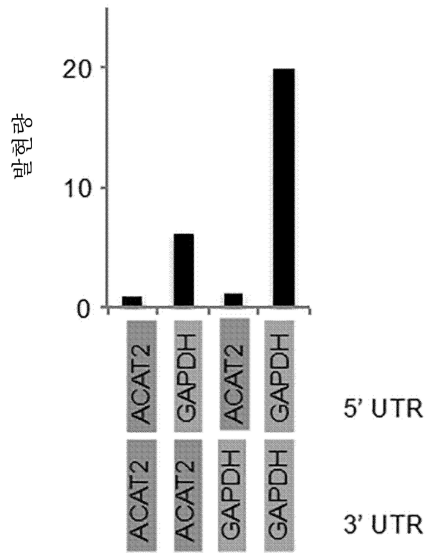
도면4



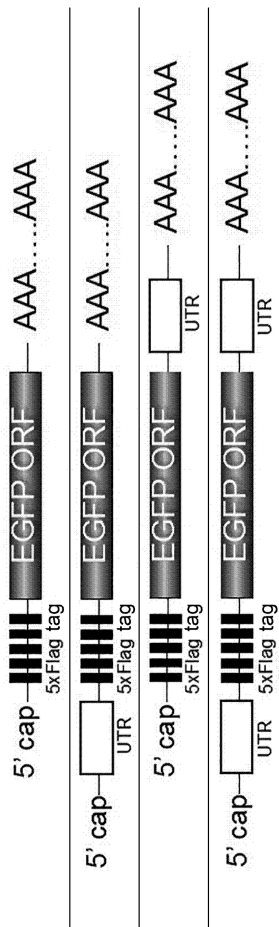
도면5



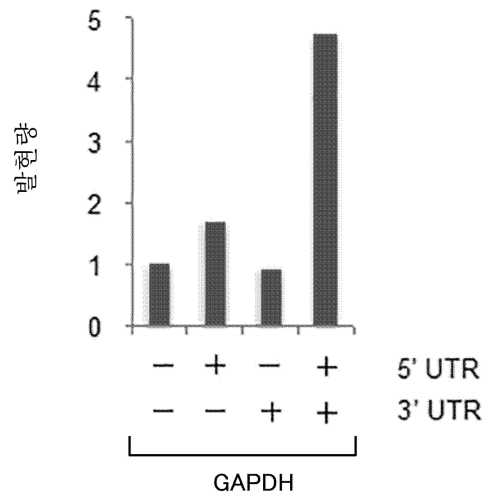
도면6



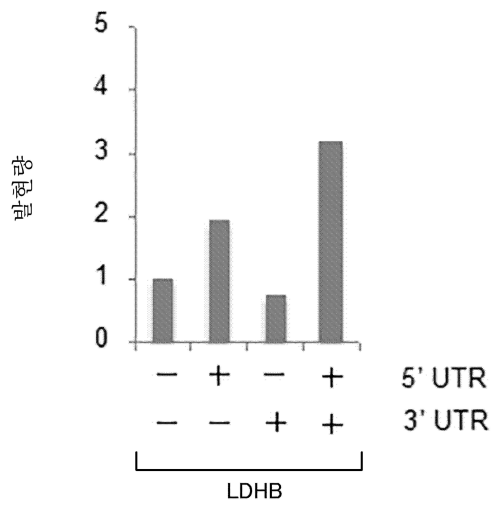
도면7



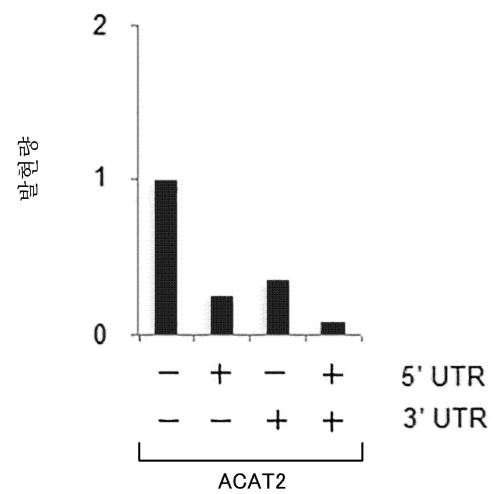
도면8



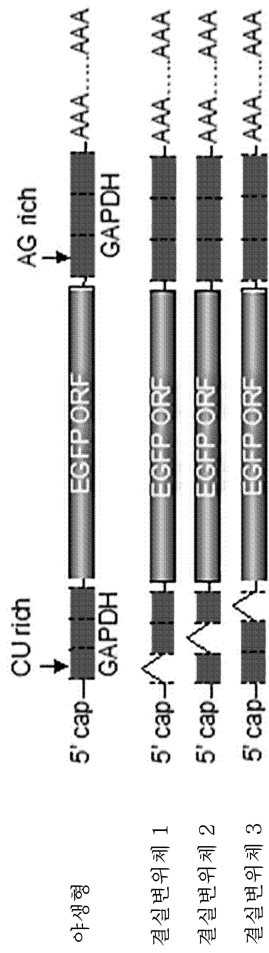
도면9



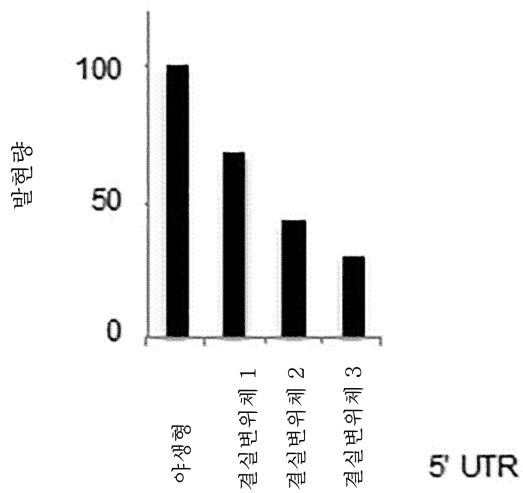
도면10



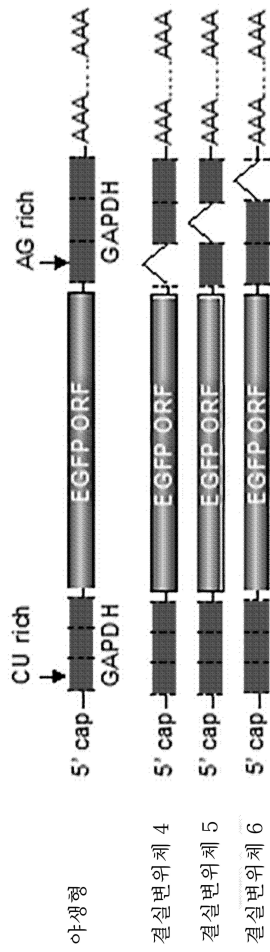
도면11



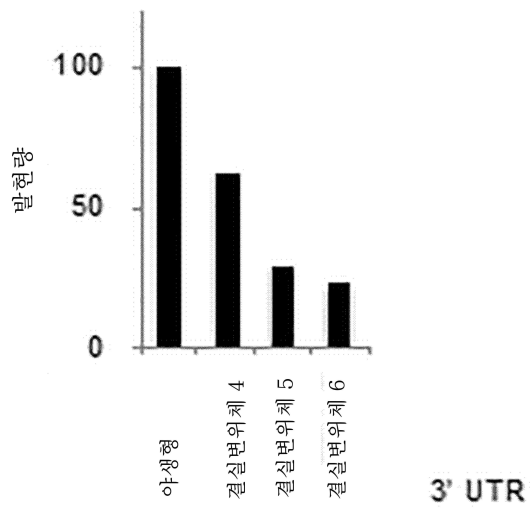
도면12



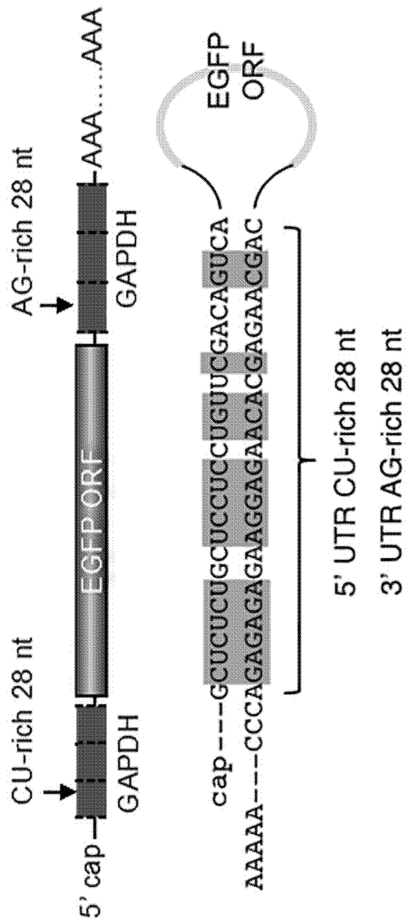
도면13



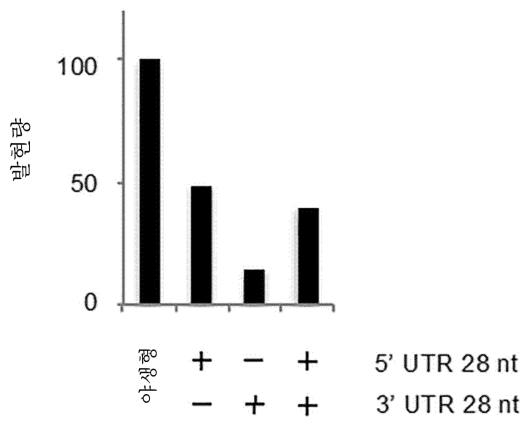
도면14



도면15



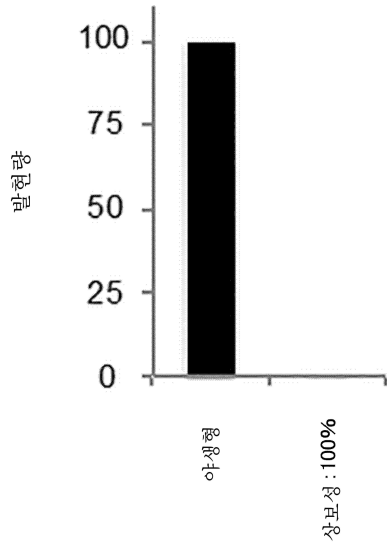
도면16



도면19



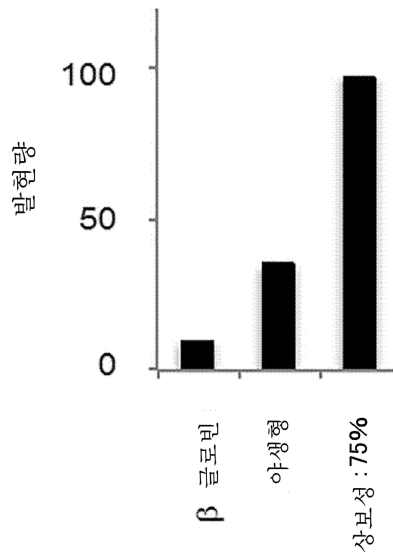
도면20



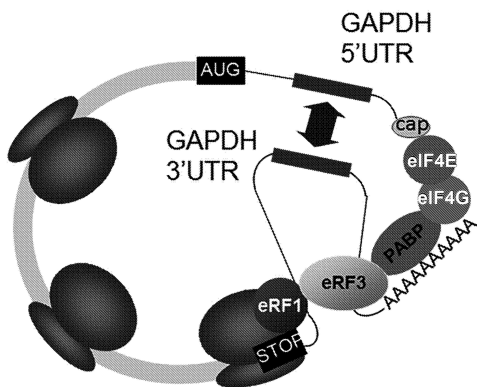
도면21



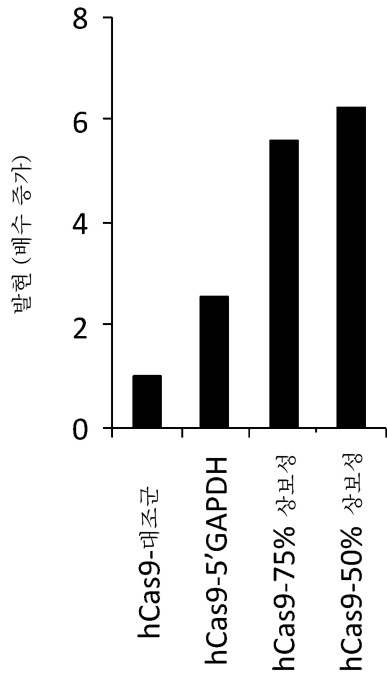
도면22



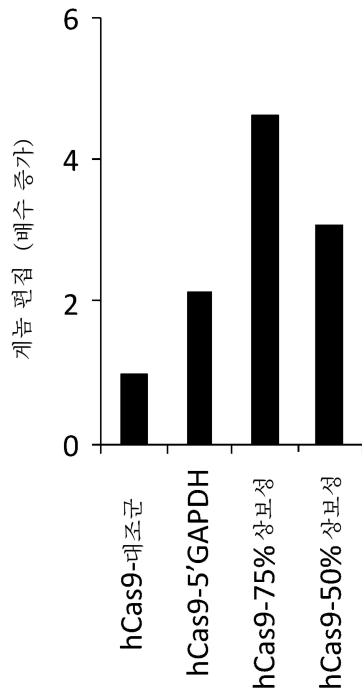
도면23



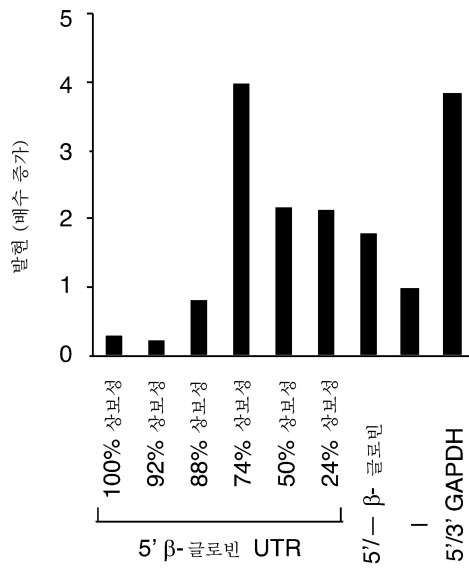
도면24



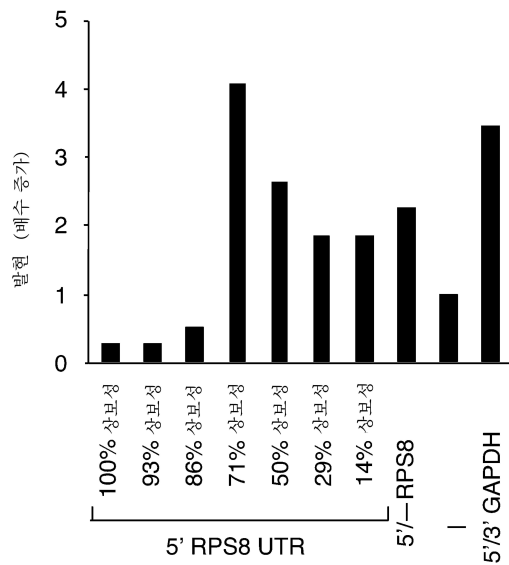
도면25



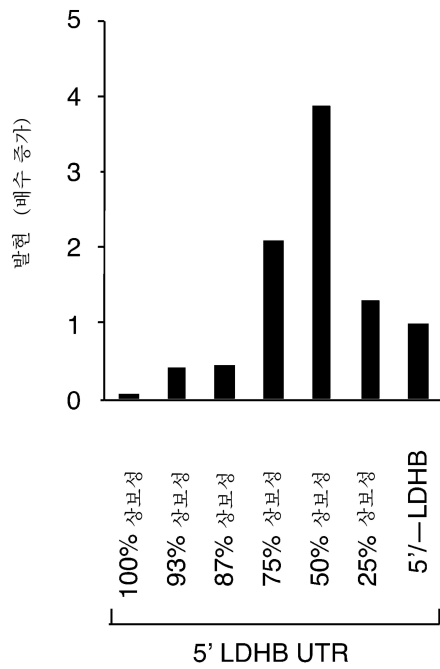
도면26



도면27



도면28



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA CITY UNIVERSITY

<120> mRNA and use thereof

<130> PA0467WO

<150> JP 2019-189929

<151> 2019-10-17

<160> 116

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

cgctctctgc tcctcctggt cgacagtcag ccgcattctt ttttgcgtcg ccagccgagc 60

cacatc 66

<210> 2

<211> 74

<212> DNA
 <213
 > Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 tcgagatgtg gctcggctgg cgacgcaaaa gaagatgcgg ctgactgtcg aacaggagga 60
 gcagagagcg gtac 74
 <210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 aaggaattcg acccctggac caccagc 27
 <210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 ttttctagaa ctggttgagc acagggta 28

 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 ttaggtaccg gtgcgcgggg aggtggaggg 30
 <210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6

tgcctcgagc ttgcttctcc tgccgccgtc 30
 <210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 agggaattca ttgcttaaac ttgacaac 30

 <210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ttttctagaa atgattgatc tgatgttcct 30
 <210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 aacggtagcc ccctctccc tccttcgaga 30
 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 agtctcgagt ttgcacagga gagagaaggc 30

 <210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 11
 gacgaattcc tagtgagctc taggctgtag 30
 <210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 ttttctagac aactacaat agttaatttt 30
 <210> 13
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 aattatgtgg ctggctggc gacgcaaaag aagatgcggc tgactgtcga acaggaggag 60
 cagagagc 68
 <210> 14
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 ctaggctctc tgctctctct gttcgacagt cagccgcac tcttttgcg tcgccagccg 60
 agccacat 68
 <210> 15
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 aattatgtgg ctggctggg gacgcaaaag aagatccggc tgactgtcga agaggaggag 60

cagagagg 68

<210> 16

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

ctagcctctc tgctctctct cttcgacagt cagccggatc ttcttttgcg tccccagccg 60

agccacat 68

<210> 17

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

aattatgtgg cacggctggg gacgcaacag aagatccggc tgagtgtcga agaggaggaa 60

cagagagg 68

<210> 18

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

ctagcctctc tgttctctct cttcgacact cagccggatc ttctgttgcg tccccagccg 60

tgccacat 68

<210> 19

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

aattatgcgg cacggatgga gactcaacag acgatccgga tgagtgtaga agaggcggaa 60

cagtgagg 68

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTAGCCTCACTGTTCCGCCTTCTTACTCATCCGGATCGTCTGTTGAGTCTCCATCCGTGCCG
CAT

<400> 20

agtctcgagt ttgcacagga gagagaaggc 30

<210> 21

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

aattacgcga cacagatcga gtctctacat acgctccaga tcagtctagt agacgcgcaa 60

ctgtgcgg 68

<210> 22

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

ctagccgcac agttgcgcgt ctactagact gatctggagc gtatgtagag actcgatctg 60

tgtcgcgt 68

<210> 23

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

aattacacga aacacatcaa gtgtetccat tcgccccaaa tctgtcaagt tgacacgcta 60

ctttgcag 68

<210> 24

<211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 24
 ctagctgcaa agtagcgtgt caacttgaca gatttggggc gaatggagac acttgatgtg 60
 tttcgtgt 68

<210> 25
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 25
 tgcaagcttt cagtctgagt caggcctt 28

<210> 26
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 26
 gtcaagctta tggaggagcc gcagtcag 28

<210> 27
 <211> 64
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 gcucucugcu ccuccuguuc gacagucagc cgcaucuucu uuugcgucgc cagccgagcc 60
 acau 64

<210> 28
 <211> 203
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 28

gacccucgga ccaccagccc cagcaagagc acaagaggaa gagagagacc cucacugcug 60

gggaguccu gccacacuca gucccccacc acacugaauc ucccuccuc acaguugcca 120

uguagacccc uugaagaggg gaggggccua gggagccgca ccuugucaug uaccaucaau 180

aaaguacccu gugcucaacc agu 203

<210> 29

<211> 131

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

ggugcgcggg gagguggagg gcgagggcg gggcuaccuc aggucccgcc gcggcaggc 60

cuguggcgug cgaggaggag cuuugccuag cuugcaggca gcgcagggca gacggcgcca 120

ggagaagcaa g 131

<210> 30

<211> 224

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

auugcuuaaa cuuugaacaa ccucaaauuc uuuuuuacu aauaaaguac uagguugcaa 60

uaugugaaau cagaggacca aaguacagau ggaaaccauu uccuacauca caaaaacca 120

aguuuacagc uuguacuuua cuuuuauug uauuacuca cucaagguac aagacaaug 180

cauuuacau uguuauaaa aaaaggaaca ucagaucau cauu 224

<210> 31

<211> 111

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

cccuccucc cuccuugcag agccggcgcc ggaggagacg cacgcagcug acuuugucuu 60

cuccgcacga cuguuacaga ggucuccaga gccuucucuc uccugugcaa a 111

<210> 32

<211> 200

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 32	
cuagugagcu cuaggcugua gaaauuuaaa aacuacaug ugauuaacuc gagccuuuag	60
uuuucacca uguacaugga ucacaguug cuuugaucuu cuucaauaug ugaauuuggg	120
cucacagaau caaagccuau gcuugguuua augcuugcaa ucugagcucu ugaacaaaua	180
aaauuaacua uuguagugug	200
<210> 33	
<211> 64	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 33	
auguggcugc gcuggcgacg caaaagaaga ugcggcugac ugucgaacag gaggagcaga	60
gagc	64
<210> 34	
<211> 64	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 34	
auguggcugc gcuggggacg caaaagaaga uccggcugac ugucgaagag gaggagcaga	60
gagg	64
<210> 35	
<211> 64	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 35	
auguggcacg gcuggggacg caacagaaga uccggcugag ugucgaagag gaggaacaga	60
gagg	64
<210> 36	
<211> 64	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400>	
> 36	
augcggcacg gauggagacu caacagacga uccggaugag uguagaagag gcggaacagu	60
gagg	64

<210>	37	
<211>	64	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	37	
acgcgacaca gaucgagucu cuacauacgc uccagaucag ucuaguagac gcgcaacugu		60
gcgg		64
<210>	38	
<211>	64	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	38	
acacgaaaca caucaagugu cuccaauucgc cccaaaucug ucaaguugac acgcuacuuu		60
gcag		64
<210>	39	
<211>	1182	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	39	
atggaggagc cgcagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca		60
gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg		120
gatgatattga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tcaactgaaga cccaggtcca		180
gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct cccccctgg cccctgcacc agcagctcct		240
acaccggcgg ccctgcacc agccccctcc tggcccctgt catcttctgt cccttcccag		300
aaaacctacc agggcageta cggtttccgt ctgggttct tgcattctgg gacagccaag		360
tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt tttgccaact ggccaagacc		420
tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca cccccgccg gcaccgcgt ccgcgccatg		480
gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctgccc ccacatgag		540
cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcacc ttatccgagt ggaaggaaat		600
ttgcgtgtgg agtatttggg tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat		660
gagccgcctg aggttggctc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt		720
tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcatcacact ggaagactcc		780

agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgctg tttgtgcctg tcttgggaga 840
 gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc 900
 ccaggagca ctaagcgagc actgccaac aacaccagct cctctccca gccaaagaag 960
 aaaccactgg atggagaata tttcacctt cagatccgtg ggcgtgagcg cttcgagatg 1020
 ttccgagagc tgaatgagc cttggaactc aaggatgccc aggcctggaa ggagccaggg 1080
 gggagcaggg ctactccag ccacctgaag tccaaaaagg gtcagtctac ctcccgcct 1140

aaaaaactca tgttcaagac agaaggcct gactcagact ga 1182

<210> 40

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln

1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu

 20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp

 35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro

 50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro

65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser

 85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly

 100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro

 115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln

 130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met

145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
 165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
 180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
 195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
 355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
 370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 385 390

<210> 41

<211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 41
 acatttgctt ctgacacaac tgtgttcaact agcaacctca aacagacacc 50
 <210> 42
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 42
 tcgaggtgtc tgtttgaggt tgctagtgaac cacagttgtg tcagaagcaa atgtgtac 58

 <210> 43
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 43
 aattggtgtc tgtttgaggt tgctagtgaac cacagttgtg tcagaagcaa atgt 54
 <210> 44
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 44
 ctagacattt gcttctgaca caactgtgtt cactagcaac ctcaaacaga cacc 54
 <210> 45
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 45

aattgctgtc tgtttgaggt tactagtgaa cacagttctg tcagaagcaa atgc 54

<210> 46
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 46

ctaggcattt gcttctgaca gaactgtgtt cactagtaac ctcaaacaga cagc 54

<210> 47
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 47

aattgctgtc tgggtgaggt tactagtgat cacagttctg tcagacgcaa atgc 54

<210> 48
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 48

ctaggcattt gcgtctgaca gaactgtgat cactagtaac ctcacacaga cagc 54

<210> 49
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 49

aattgctgta tgggtgatgt tactactgat caccgttctg taagacgcac atgc 54

<210> 50
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 50
 ctaggcatgt gcgtcttaca gaacggatgat cagtagtaac atcacacata cagc 54
 <210> 51
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 51
 aattgctata tctgtcatgc tacgactcat ctccgatctc taacacggac acgc 54

 <210> 52
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 52
 ctaggcgtgt ccgtgttaga gatcggagat gtagtcgtagc atgacagata tagc 54
 <210> 53
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 53
 aattgctaga tcagtcttgc aacgcctcat ctgcgagctc gaactcggtc actc 54
 <210> 54
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 54
 ctaggagtga ccgagttcga gctcgcagat gaggcgttgc aagactgatac tagc 54

 <210> 55
 <211> 57

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 55
 gttttacaaa ccgaaccgtg aatctttgcg gtttctcttt ccagccagcg ccgagcg 57
 <210> 56
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 56
 tcgacgctcg gcgctggctg gaaagagaaa ccgcaaagat tcacggttcg gtttgtaaaa 60
 cgtac 65
 <210> 57
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 57
 aattcgctcg gcgctggctg gaaagagaaa ccgcaaagat tcacggttcg gtttgtaaaa 60
 <210> 58
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 58
 ctagttttac aaaccgaacc gtgaatcttt gcggtttctc tttccagcca gcgccgagcg 60
 <210> 59
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 59
 aattagctcg gcgctggcag gaaagagaaa cctcaaagat tcacggctcg gtttgtaaaa 60

<210> 60
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><
 223> primer
 <400> 60
 ctagttttac aaaccgagcc gtgaatcttt gaggtttctc tttctgcca gcgccgagct 60
 <210> 61
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 61
 aattagctcg gagctggcag gaaagcgaac cctcaaagac tcacggctcg gttcgtaaaa 60
 <210> 62
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 62
 ctagttttac gaaccgagcc gtgagtcttt gaggtttcgc tttctgcca gctccgagct 60
 <210> 63
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 63
 aattagctgg gagcttgcag gatagcgaat cctcaatgac tcaaggctcg cttcgtaaaa 60
 <210> 64
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400> 64
ctagttgtac gaagcgagcc ttgagtcatt gaggattcgc tatcctgcaa gctcccagct 60
<210> 65
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 65
aattagatgt gagattgcag cattgcgcat cctccatcac tgaaggctag cgtcgcacaa 60
<210> 66
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 66
ctagttgtgc gacgctagcc ttcagtgatg gaggatgcgc aatgctgcaa tctcacatct 60
<210> 67
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 67
aattatatgt gatattccac cattgcacat gcttcatcac ggaatgcgag cgtcacacta 60
<210> 68
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 68
ctagtagtgt gacgctcgca ttccgtgatg aagcatgtgc aatggtggaa tatcacatat 60
<210> 69
<211> 60
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 69

aattataggt gatagtcac cttgcactt gcttcctcac ggcatgcgat cgtcactcta 60

<210> 70

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 70

ctagtagagt gacgatcgca tgccgtgagg aagcaagtgc aagggtggac taccacctat 60

<210> 71

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 71

aattcagtcg tgcggagaag acaaagtcag ctgcgtgggt ctcctccggc gccggctctg 60

caag 64

<210> 72

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 72

ctagcttgca gagccggcgc cggaggagac ccacgcagct gactttgtct tctccgcacg 60

actg 64

<210> 73

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 73

aattcagtcg tgcggagatg acaaagtcag ctgggtgggt ctctccgac gccggctctg 60
caac 64
<210> 74
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 74
ctaggttgca gagccggcgt cggaggagac ccaccagct gactttgtca tctccgcacg 60
actg 64
<210> 75
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 75
aattcagacg tgcggtgaag acacagtcag cagcgtgggg ctctctctgc gccggatctg 60
caac 64
<210> 76
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 76
ctaggttgca gatccggcgc aggaggagcc ccacgtgct gactgtgtct tcaccgcacg 60
tctg 64
<210> 77
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 77
aattcaggcg tacggcgaac acacagtgag cagcgcggga ctctctctgc gccggatcta 60

caac	64
<210> 78	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 78	
ctaggttgta gatccgccg aggacgagtc ccgcgctgct cactgtgtgt tcgccgtacg	60
cctg	64
<210> 79	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 79	
aattccggcc taccgcgtac agacagtgc cagagcgcga cgcgtactgg ggcagatgta	60
ctac	64
<210> 80	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 80	
ctaggtagta catctgcccc agtacgcgtc gcgctctggt cactgtctgt acgcggtagg	60
ccgg	64
<210> 81	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 81	
aattccagcc aaccacgttc agccagggac aagaccgcca cgggtagtgg cgcaaatgga	60
cttc	64

<210> 82
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > primer
 <400> 82
 ctaggaagtc catttgcgcc actaccctg gcggtcttgt ccctggctga acgtggttg 60
 ctgg 64
 <210> 83
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 83
 atggacaaga agtactccat tgggctcgat 30
 <210> 84
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 84
 gattcacacc ttctcttct tcttggg 27

 <210> 85
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 85
 ccgggcctcc atggccatca g 21
 <210> 86
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 86
 catcttcttt tgcgtcgcca gccgagccac atctcgagcc caccatggca tcaatg 56
 <210> 87
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 87
 cggctgactg tcgaacagga ggagcagaga gcggtaccca attcgccta tagtga 56

 <210> 88
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 88
 cggatgagtg tagaagaggc ggaacagtga ggcatttatt ttcattgcaa tgatgtctag 60
 <210> 89
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 89
 gatcgtctgt tgagtctcca tccgtgccgc attcacacct tcctcttctt cttggg 56
 <210> 90
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 90
 cagatcagtc tagtagacgc gcaactgtgc ggcatttatt ttcattgcaa tgatgtctag 60

 <210> 91
 <211> 56

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 91
 gagcgtatgt agagactcga tctgtgtcgc gttcacacct tcctcttctt cttggg 56
 <210> 92
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 92
 ccatttctctg gagccatctc tctcc 25
 <210> 93
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 93
 ctctcctggg cttgccaagg actca 25

 <210> 94
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 94
 acauuugcuu cugacacaac uguguucacu agcaaccuca aacagacacc 50
 <210> 95
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 95
 ggugucuguu ugagguugcu agugaacaca guugugucag aagcaaaugu 50
 <210> 96
 <211> 50
 <212> RNA

<213> Homo sapiens
 <400> 96
 gcugucuguu ugagguuacu agugaacaca guucugucag aagcaaaugc 50
 <210> 97
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 97

 gcugucugug ugagguuacu agugaucaca guucugucag acgcaaaugc 50
 <210> 98
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 98
 gcuguaugug ugauguuacu acugaucacc guucuguaag acgcacaugc 50
 <210> 99
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 99
 gcuaauaucug ucaugcuacg acucaucucc gaucucuaac acggacacgc 50
 <210> 100
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 100
 gcuagaucag ucuugcaacg ccucaucugc gagcucgaac ucggucacuc 50

 <210> 101
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 101
 uuuuacaaac cgaaccguga aucuuugcgg uuucucuuc cagccagcgc cgagcg 56

<210> 102
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 102
 cgcucggcgc uggcuggaaa gagaaaccgc aaagauucac gguucgguuu guaaaa 56
 <210> 103
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 103
 agcucggcgc uggcaggaaa gagaaaccuc aaagauucac ggcucgguuu guaaaa 56
 <210> 104
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400>
 > 104
 agcucgggagc uggcaggaaa gcgaaaccuc aaagacucac ggcucgguuc guaaaa 56
 <210> 105
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 105
 agcugggagc uugcaggaua gcgaaaccuc aaugacucac ggcucgcuuc guacaa 56
 <210> 106
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 106
 agaugugaga uugcagcauu gcgcauccuc caucacugaa ggcuaagcuc gcacaa 56
 <210> 107
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 107
 auaugugaua uuccaccauu gcacaugcuu caucacggaa ugcgagcguc acacua 56

<210> 108
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 108
 auaggugaua guccacccuu gcacuugcuu ccucacggca ugcgaucguc acucua 56

<210> 109
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 109
 cagucgugcg gagaagacaa agucagcugc gugggucucc uccggcgccg gcucugcaag 60

<210> 110
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 110
 cagucgugcg gagaugacaa agucagcugg gugggucucc uccgacgccg gcucugcaac 60

<210> 111
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400>
 > 111
 cagacgugcg gugaagacac agucagcagc guggggucucc uccugcgccg gaucugcaac 60

<210> 112
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 112
 caggcguacg gcgaacacac agugagcagc gcgggacucg uccugcgcg gaucuacaac 60

<210> 113

<211> 60
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 113
 ccggccuacc gcguacagac agugaccaga gcgcgacgcg uacuggggca gauguacuac 60
 <210> 114
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 114
 ccagccaacc acguucagcc agggacaaga cgccacggg uaguggcgca aauggacuuc 60

<210> 115
 <211> 4140
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 115
 atggacaaga agtactccat tgggctcgat atcggcacaa acagcgtcgg ctgggcccgtc 60
 attacggacg agtacaaggt gccgagcaaa aaattcaaag ttctgggcaa taccgatcgc 120
 cacagcataa agaagaacct cattggcgcc ctctgttcg actccgggga gacggccgaa 180
 gccacgcggc tcaaaagaac agcacggcgc agatataccc gcagaaagaa tcggatctgc 240
 tacctgcagg agatctttag taatgagatg gctaagggtg atgactcttt cttccatagg 300
 ctggaggagt cctttttggt ggaggaggat aaaaagcacg agcgccacc aatctttggc 360

aatatcgtgg acgaggtggc gtacatgaa aagtaccaa ccatatatca tctgaggaag 420
 aagctttag acagtactga taagctgac ttgcggtga tctatctgc gctggcgcac 480
 atgatcaaat ttcggggaca ctctctcacc gagggggacc tgaaccaga caacagcgat 540
 gtcgacaaac tcittatcca actggttcag acttacaatc agcttttcga agagaacccg 600
 atcaacgcat ccggagtga cgcaaagca atcctgagcg ctaggctgtc caaatcccgg 660
 cggctcgaaa acctcatgc acagctccct ggggagaaga agaacggcct gtttgtaat 720
 cttatcgccc tgcactcgg gctgaccccc aactttaaat ctaacttcga cctggccgaa 780

gatgccaage ttcaactgag caaagacacc tacgatgatg atctcgacaa tctgctggcc 840
 cagatcggcg accagtacgc agacctttt ttggcgcaa agaacctgtc agacgccatt 900
 ctgctgagtg atattctgcg agtgaacacg gagatcacca aagctccgct gagcgtagt 960

atgatcaagc gctatgatga gcaccaccaa gacttgactt tgctgaaggc ccttgtcaga 1020
 cagcaactgc ctgagaagta caaggaaatt ttcttcgatc agtctaaaaa tgcttacgcc 1080
 ggatacattg acggcggagc aagccaggag gaattttaca aatttattaa gcccatcttg 1140
 gaaaaaatgg acggcaccca ggagctgctg gtaaagctta acagagaaga tctgttgccg 1200

 aaacagcgca ctttcgacaa tggaaagcatc ccccaccaga ttcacctggg cgaactgcac 1260
 gctatcctca ggcggcaaga ggatttctac ccctttttga aagataacag ggaaaagatt 1320
 gagaaaatcc tcacatttcg gatacctac tatgtaggcc ccctcggccg gggaaattcc 1380
 agattcgcgt ggatgactcg caaatcagaa gagacatca ctccttgaa cttcaggaa 1440
 gtcgtggata agggggcctc tgcccagtcc ttcacgaaa ggatgactaa ctttgataaa 1500
 aatctgccta acgaaaaggt gcttcctaaa cactctctgc tgtacgagta cttcacagtt 1560
 tataacgagc tcaccaaggt caaatcgtc acagaaggga tgagaaagcc agcattcctg 1620

 tctggagagc agaagaaagc tatcgtggac ctctcttca agacgaaccg gaaagtacc 1680
 gtgaaacagc tcaaagaaga ctatttcaaa aagattgaat gtttcgactc tgttgaatc 1740
 agcggagtgg aggatcgtt caacgcatcc ctgggaacgt atcacgatct cctgaaaatc 1800
 attaaagaca aggacttctt ggacaatgag gagaacgagg acattcttga ggacattgtc 1860
 ctaccctta cgttgtttga agataggag atgattgaag aacgcttga aacttacgct 1920
 catctcttcg acgacaaagt catgaacag ctcaagagge gccgatatac aggatggggg 1980
 cggctgtcaa gaaaactgat caatgggatc cgagacaagc agagtggaaa gacaatcctg 2040

 gattttctta agtccgatgg atttccaac cggaacttca tgcagttgat ccatgatgac 2100
 tctctcacct ttaaggagga catccagaaa gcacaagttt ctggccaggg ggacagtctt 2160
 cacgagcaca tcgctaattc tgcaggtagc ccagctatca aaaagggaat actgcagacc 2220
 gttaaagtcg tggatgaact cgtcaaagta atgggaagge ataagcccga gaatatcgtt 2280
 atcgagatgg cccgagagaa ccaactacc cagaaggac agaagaacag tagggaaagg 2340
 atgaagagga ttgaagagg tataaaagaa ctgggtccc aatccttaa ggaacacca 2400
 gttgaaaaca cccagcttca gaatgagaag ctctacctgt actacctgca gaacggcagg 2460

 gacatgtacg tggatcagga actggacatc aatcggctct ccgactacga cgtggatcat 2520
 atcgtcccc agtcttttct caaagatgat tctattgata ataaagtgtt gacaagatcc 2580
 gataaaaata gagggaaagag tgataacgtc ccctcagaag aagtgtcaa gaaaatgaaa 2640
 aattattggc ggcagctgct gaacccaaa ctgatcacac aacggaagtt cgataatctg 2700
 actaaggctg aacgaggtgg cctgtctgag ttggataaag ccggcttcat caaaaggcag 2760
 ctgtttgaga cacccagat caccaagcac gtggcccaaa ttctcgattc acgatgaac 2820

accaagtacg atgaaaatga caaactgatt cgagaggtga aagttattac tctgaagtct 2880

 aagctggctc cagatttcag aaaggacttt cagttttata aggtgagaga gatcaacaat 2940
 taccaccatg cgcatgatgc ctacctgaat gcagtggttag gcactgcaact tatcaaaaaa 3000
 tatccaagc ttgaatctga atttgtttac ggagactata aagtgtagca tgtaggaaa 3060
 atgatcgcaa agtctgagca ggaaataggc aaggccaccg ctaagtactt cttttacagc 3120
 aatattatga attttttcaa gaccgagatt acaactggcca atggagagat tcggaagcga 3180
 ccacttatcg aaacaaacgg agaaacagga gaaatcgtgt gggacaaggg tagggatttc 3240
 gcgacagtcc ggaaggtcct gtccatgccg caggtgaaca tcgttaaaaa gaccgaagta 3300

 cagaccggag gcttctccaa ggaaagtatc ctcccgaana ggaacagcga caagctgatc 3360
 gcacgcaaaa aagattggga cccaagaaa tacggcggat tcgattctcc tacagtcgct 3420
 tacagtgtac tggttgtggc caaagtggag aaaggaagt ctaaaaaact caaaagcgtc 3480
 aaggaactgc tgggcatcac aatcatggag cgatcaagct tcgaaaaaaa ccccatcgac 3540
 tttctcgagg cgaagagata taaagaggtc aaaaaagacc tcatcattaa gcttccaag 3600
 tactctctct ttgagcttga aaacggccgg aaacgaatgc tcgctagtgc gggcgagctg 3660
 cagaaaggtg acgagctggc actgcctctt aaatacgtta atttcttgta tctggccagc 3720

 cactatgaaa agctcaaagg gtctcccga gataatgagc agaagcagct gttcgtggaa 3780
 caacacaaac actaccttga tgagatcatc gagcaataa gcgaattctc caaaagagtg 3840
 atcctcgccc acgctaacct cgataagggtg ctttctgctt acaataagca cagggataag 3900
 cccatcaggg agcaggcaga aaacattatc cacttgitta ctctgaccaa ctgggcgcg 3960
 cctgcagcct tcaagtactt cgacaccacc atagacagaa agcgggtacac ctctacaaag 4020
 gaggtcctgg acgccacact gattcatcag tcaattacgg ggctctatga aacaagaatc 4080
 gacctctctc agctcgggtg agacagcagg gctgacceca agaagaagag gaaggtgtga 4140

<210> 116

<211> 1379

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20

25

30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
 35 40 45
 Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
 50 55 60
 Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
 85 90 95
 Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
 100 105 110
 His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
 115 120 125
 His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
 130 135 140
 Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
 145 150 155 160
 Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
 165 170 175
 Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
 195 200 205
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
 260 265 270
 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
 530 535 540
 Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
 545 550 555 560
 Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
 565 570 575
 Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
 580 585 590
 Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
 595 600 605
 Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
 610 615 620
 Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
 625 630 635 640
 His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
 645 650 655
 Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
 660 665 670
 Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
 675 680 685
 Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
 690 695 700
 Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
 705 710 715 720
 His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
 725 730 735
 Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
 740 745 750
 Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
 755 760 765
 Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
 1025 1030 1035
 Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
 1040 1045 1050
 Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
 1055 1060 1065
 Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
 1070 1075 1080
 Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
 1085 1090 1095
 Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
 1100 1105 1110
 Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
 1115 1120 1125
 Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
 1130 1135 1140
 Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
 1145 1150 1155
 Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
 1160 1165 1170
 Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
 1175 1180 1185
 Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
 1190 1195 1200
 Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
 1205 1210 1215
 Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
 1220 1225 1230
 Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
 1235 1240 1245
 Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys

1250	1255	1260
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile	Glu Gln Ile Ser Glu	Phe Ser Lys
1265	1270	1275
Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala	Asn Leu Asp Lys Val	Leu Ser Ala
1280	1285	1290
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys	Pro Ile Arg Glu Gln	Ala Glu Asn
1295	1300	1305
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu	Thr Asn Leu Gly Ala	Pro Ala Ala
1310	1315	1320
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr	Ile Asp Arg Lys Arg	Tyr Thr Ser
1325	1330	1335
Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala	Thr Leu Ile His Gln	Ser Ile Thr
1340	1345	1350
Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile	Asp Leu Ser Gln Leu	Gly Gly Asp
1355	1360	1365
Ser Arg Ala Asp Pro Lys Lys	Lys Arg Lys Val	
1370	1375	