



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월03일  
(11) 등록번호 10-1357016  
(24) 등록일자 2014년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07H 21/02 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2007-7009173  
(22) 출원일자(국제) 2005년09월27일  
심사청구일자 2010년09월27일  
(85) 번역문제출일자 2007년04월23일  
(65) 공개번호 10-2007-0083764  
(43) 공개일자 2007년08월24일  
(86) 국제출원번호 PCT/IL2005/001035  
(87) 국제공개번호 WO 2006/035434  
국제공개일자 2006년04월06일  
(30) 우선권주장  
60/613,991 2004년09월28일 미국(US)  
(뒷면에 계속)  
(56) 선행기술조사문헌  
W02003064625 A1  
전체 청구항 수 : 총 28 항

(73) 특허권자  
쿠아크 파마수티칼스 인코퍼레이티드  
미국 캘리포니아주 94555 프리몬트 덤바튼 서클  
6501  
(72) 발명자  
파인스테인, 엘레나  
이스라엘 레호보트 하하가나 스트리트 12/29  
쥬르, 다니엘  
이스라엘 허즐리아 피투아크 예호슈아 빈 눈 58  
얼리치, 샤이  
미국 캘리포니아 94598 월넛 크릭 멘로 코트 300  
(74) 대리인  
송봉식, 정삼영

심사관 : 이현송

(54) 발명의 명칭 **탈모증, 급성신부전증 및 다른 질환의 치료를 위한올리고리보뉴클레오타이드 및 그것의 사용방법**

(57) 요약

본 발명은 사람 p53 유전자의 발현을 하향조절하는 이중 가닥 화합물, 바람직하게는 올리고리보뉴클레오타이드에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 화합물, 또는 올리고리보뉴클레오타이드 화합물을 발현할 수 있는 벡터, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 환자를 치료하기 위하여 환자에게 약학적 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한 탈모증 또는 급성신부전증 또는 다른 질환을 가진 환자를 치료하는 방법을 고려한다. 탈모증은 화학치료 또는 방사선치료에 의하여 유도될 수 있으며, 환자는 암, 특히 유방암으로 고생할 수 있다.

(30) 우선권주장

60/658,196 2005년03월02일 미국(US)

60/703,020 2005년07월26일 미국(US)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기 구조를 가진 이중 가닥 siRNA 화합물로서,

5' (N)<sub>x</sub> -Z 3' (안티센스 가닥)

3' Z' - (N')<sub>y</sub> 5' (센스 가닥)

N 및 N' 각각은 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 또는 2'-O-메틸 당 변형된 리보뉴클레오타이드이고 (N)<sub>x</sub>와 (N')<sub>y</sub> 각각은 각각의 연속적인 N 또는 N'가 공유결합에 의하여 다음 N 또는 N'에 연결된 올리고리보뉴클레오타이드이며;

x 및 y 각각은 19 내지 40의 정수이고;

Z 및 Z' 각각은 존재하거나 존재하지 않을 수 있지만, 존재한다면 dTdT이고 그것이 존재하는 가닥의 3' 말단에 공유결합되며;

안티센스 가닥과 센스 가닥 둘다에서 변갈아 일어나는 리보뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 당 변형되고 안티센스 가닥의 5' 말단 및 3' 말단에 있는 2'-O-메틸 당 변형된 리보뉴클레오타이드를 갖고 센스 가닥의 5' 말단 및 3' 말단에 있는 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드를 가지며,

(N)<sub>x</sub>의 서열은

5' ugaaggggugaaauuucuc 3' (SEQ ID NO:48)

을 포함하고,

(N')<sub>y</sub>의 서열은

3' acuccccacuuuuaagag 5' (SEQ ID NO:25)

을 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 공유결합은 포스포디에스테르 결합인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, x=y인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 4

제 3 항에 있어서, x=y=19인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 5

제 4 항에 있어서, Z 및 Z'는 모두 존재하지 않은 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 3' 말단 및 5' 말단에서 인산화되지 않은 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 3' 말단에서 인산화된 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 8

하기 구조를 가진 이중 가닥 siRNA 화합물로서,

5' ugaaggugaaauuucuc 3' (안티센스 가닥 SEQ ID NO:48)

3' acuucccacuuuaagag 5' (센스 가닥 SEQ ID NO:25)

a, c, u 및 g 각각은 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 또는 2'-O-메틸 당 변형된 리보뉴클레오타이드이고 각각 연속된 리보뉴클레오타이드는 공유결합에 의하여 다음 리보뉴클레오타이드에 연결되며;

안티센스 가닥과 센스 가닥 둘다에서 변갈아 일어나는 리보뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 당 변형되고 안티센스 가닥의 5' 말단 및 3' 말단에 있는 2'-O-메틸 당 변형된 리보뉴클레오타이드를 갖고 센스 가닥의 5' 말단 및 3' 말단에 있는 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드를 갖는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 9

제 8 항에 있어서, 공유결합은 포스포디에스테르 결합인 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 10

제 8 항에 있어서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 3' 말단 및 5' 말단에서 인산화되지 않거나, 또는 3' 말단에서 인산화된 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 11

제 10 항에 있어서, 안티센스 가닥의 첫 번째, 세 번째, 다섯 번째, 일곱 번째, 아홉 번째, 열한 번째, 열세 번째, 열다섯 번째, 열일곱 번째 및 열아홉 번째 리보뉴클레오타이드 각각은 2'-O-메틸 당 변형된 리보뉴클레오타이드이고;

센스 가닥의 두 번째, 네 번째, 여섯 번째, 여덟 번째, 열 번째, 열두 번째, 열네 번째, 열여섯 번째 및 열여덟 번째 리보뉴클레오타이드 각각은 2'-O-메틸 당 변형된 리보뉴클레오타이드이고;

안티센스 가닥 과 센스 가닥은 3'-말단과 5'-말단에서 인산화되지 않은 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 12

제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 전신투여를 위한 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 13

사람 p53 유전자의 발현을 하향 조절하기에 효과적인 양으로 제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 화합물; 그리고 담체를 포함하는 급성신부전증 또는 탈모증 치료용 조성물.

#### 청구항 14

제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 스트레스의 결과로 p53이 활성화되거나 또는 높아진 환자를 치료하는데 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 15

제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 급성신부전증에 걸린 환자 또는 급성신부전증의 진행 위험에 있는 환자를 치료하는데 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 16

제 15 항에 있어서, 환자는 주요 수술의 결과로 급성신부전증의 진행 위험에 있는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 17

제 16 항에 있어서, 수술은 심장 수술 또는 혈관 수술인 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 18

제 15 항에 있어서, 급성신부전증의 진행 위험에 있는 환자는 신장 이식 환자인 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 19

제 15 항에 있어서, 급성신부전증은 허혈-재관류 유도된 급성신부전증, 패혈증 연관 급성신부전증 및 화학치료 처치로 인한 독성 급성신부전증로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 20

제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 수술 환자를 치료하는데 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 21

제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 척수 손상, 뇌 손상, 발작, 파킨슨씨병, 알츠하이머병으로부터 선택된 중추신경계 질환에 걸린 환자에서 p53-의존적 신경 사멸을 감소 또는 제거하는데 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 22

제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 암 치료의 부작용에 걸린 환자를 치료하는데 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 23

제 22 항에 있어서, 암 치료는 화학치료 또는 방사선 치료로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 24

제 22 항에 있어서, 부작용은 탈모증, 림프양 및 조혈계에 대한 중증 손상 및 장 상피에 대한 중증 손상으로 부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 25

제 14 항에 있어서, 스트레스는 화상, 고열, 저산소증, 허혈증 및 심근 경색증으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 26

제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 기관 이식을 받은 환자를 치료하는데 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 27

제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 시스플라틴-유도된 난청, 시스플라틴-유도된 신장부전증, 독소루비신-유도된 심장독성, 급성 간부전, 상처 또는 심근 경색/심부전에 걸린 환자를 치료하는데 사용하기 위한 화합물.

#### 청구항 28

제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 줄기세포의 생체외 증식, 이식 전의 기증자 기관/조직의 보존 또는 이식 후 이식 조직 생존의 개선에 사용하기 위한 화합물.

#### 청구항 29

삭제

#### 청구항 30

삭제

#### 청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

## 명세서

### 배경기술

- [0001] 본 출원서 전반에 다양한 특허 및 과학 문헌들이 인용된다. 이들 문헌들에 대한 개시는 그 전체로서 본 발명이 속한 최신회기술을 보다 충분히 설명하기 위하여 본 출원서 내에 참고문헌으로 포함된다.
- [0002] siRNA 및 RNA 간섭
- [0003] RNA 간섭(RNAi)은 이중 가닥(ds) RNA-의존적 유전자 특이적 전사후 사일런싱에 관련된 현상이다. 처음에는, 이 현상을 연구하고 포유동물 세포를 실험적으로 조작하려는 시도가 긴 dsRNA 분자에 반응하여 활성화된 활성, 비 특이적 항바이러스 방어 메커니즘에 의하여 좌절되었다; 문헌(Gil et al. 2000, Apoptosis, 5:107-114)을 참조하라. 나중에 21 뉴클레오타이드 RNA의 합성 듀플렉스는 일반적 항바이러스 방어 메커니즘의 자극 없이 포유동물 세포에서 유전자 특이적 RNAi를 매개할 수 있다는 것이 발견되었다(Elbashir et al. Nature 2001, 411:494-498 및 Caplen et al. Proc Natl Acad Sci 2001, 98:9742-9747 참조). 결과적으로, 작은 이중 가닥 RNA인 작은 간섭 RNA(siRNA)는 유전자 기능을 이행하려는 시도에 있어서 강력한 도구가 되었다.
- [0004] 따라서, RNA 간섭(siRNA)은 작은 간섭 RNA(siRNA)(Fire et al, 1998, Nature 391, 806) 또는 마이크로RNA(miRNA) (Ambros V. Nature 431:7006,350-355(2004); 및 Bartel DP. Cell. 2004 Jan 23; 116(2):281-97 MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function)에 의하여 매개된 포유동물에서의 서열-특이적 전

사후 유전자 사일런싱의 과정을 말한다. 대응되는 식물에서의 과정은 통상 특이적 전사후 유전자 사일런싱 또는 RNA 사일런싱이라 불리고 균류에서는 또한 진압(quelling)이라 불린다. siRNA는 그것의 내인성 (세포의) 상대방의 유전자/mRNA의 발현을 하향조절 또는 침묵(억제)시키는 이중 가닥 RNA 분자이다. 따라서, RNA 간섭 반응은 통상 RNA-유도된 사일런싱 복합체(RISC)라고 불리는 siRNA를 함유한 엔도뉴클레아제 복합체를 특징으로 하고, 이는 siRNA 듀플렉스의 안티센스 가닥에 상보적인 서열을 가진 단일 가닥 RNA의 절단을 매개한다. 표적 RNA의 절단은 siRNA 듀플렉스의 안티센스 가닥에 상보적인 지역의 중간에서 이루어질 수 있다(Elbashir et al 2001, Genes Dev., 15, 188). 더 상세히 말하면, 더 긴 dsRNA는 제3형 RNA에 의하여 작은(17-29 bp) dsRNA 단편들(작은 억제성 RNA-"siRNA"라고도 함)로 분해된다(DICER, DROSHA, 등, Bernstein et al., Nature, 2001, v.409, p.363-6; Lee et al., Nature, 2003, 425, p.415-9). RISC 단백질 복합체는 이들 단편 및 상보적 mRNA를 인식한다. 전체 과정은 표적 mRNA의 엔도뉴클레아제 절단에 의하여 완결된다(McManus & Sharp, Nature Rev Genet, 2002, v.3, p.737-47; Paddison & Hannon, Curr Opin Mol Ther. 2003 Jun; 5(3): 217-24). 이들 용어 및 제시된 메커니즘에 대한 정보는, 문헌(Bernstein E., Denli AM. Harmon GJ: 2001 The rest is silence. RNA. I; 7(11): 1509-21; Nishikura K.: 2001 A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. Cell. I 16; 107(4): 415-8 및 PCT 공보 WO 01/36646 (Glover et al))을 참조하라.

[0005] 공지된 유전자에 대응된 siRNA의 선택 및 합성은 널리 보고되어 있으며, 예를 들어 문헌(Chalk AM, Wahlestedt C, Sonnhhammer EL. 2004 Improved and automated prediction of effective siRNA Biochem. Biophys. Res. Commun. Jun 18; 319(1): 264-74; Sioud M, Leirdal M., 2004, Potential design rules and enzymatic synthesis of siRNAs, Methods Mol Biol; 252:457-69; Levenkova N, Gu Q, Rux JJ. 2004 , Gene specific siRNA selector Bioinformatics. I 12; 20(3): 430-2. 및 Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K., Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequence for mammalian and chick RNA interference Nucleic Acids Res. 2004 I 9;32(3):936-48)을 참조하라. 또한 문헌(Liu Y, Braasch DA, NuIf CJ, Corey DR. Efficient and isoform-selective inhibition of cellular gene expression by peptide nucleic acids, Biochemistry, 2004 I 24;43(7):1921-7)을 참조하라. 또한(PCT 공보 WO 2004/015107 (Atugen) 및 WO 02/44321 (Tuschl et al), 및 Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis, RNA 2003 Sep;9(9):1034-48 및 변형된/더 안정한 siRNA의 생산에 대한 I 특허 제5898031호 및 제6107094호 (Crooke))을 참조하라.

[0006] 일부 그룹은 세포 내에서 siRNA를 생성할 수 있는 DNA-기재 벡터의 개발을 설명하였다. 이 방법은 대체로 세포 내에서 siRNA를 형성하도록 효율적으로 가공된 작은 헤어핀 RNA의 전사와 관련된다. Paddison et al. PNAS 2002, 99:1443-1448; Paddison et al. Genes & Dev 2002, 16:948-958; Sui et al. PNAS 2002, 8:5515-5520; 및 Brummelkamp et al. Science 2002, 296:550-553. 이 보고들은 많은 내생 및 외생적으로 발현된 유전자를 특이적으로 표적화할 수 있는 siRNA를 생성하는 방법을 설명한다.

[0007] 최근 siRNA는 영장류에서 억제를 위하여 성공적으로 사용되었으며, 더 상세한 것은 문헌(Tolentino et al., Retina 24(1) 2004년 2월 I 132-138)을 참조하라.

#### [0008] p53 유전자 및 폴리펩티드

[0009] 사람 p53 유전자는 주지되고 고도로 연구된 유전자이다. p53 폴리펩티드는 다양한 다른 자극, 예를 들면 감마-조사(照射), 전사 또는 복제의 활성화, 및 암유전자 형질전환과 같은 DNA 상해 상태를 세포 성장 정지 또는 아포프토시스로 변환시킴으로써 세포의 스트레스 반응 메커니즘에서 핵심적 역할을 한다(Gottlieb et al, 1996, Biochem.Biophys. Acta, 1287, p.77). p53 폴리펩티드는 이러한 자극에 대한 반응으로서 세포예정사 또는 "아포프토시스"의 유도에 필수적이다. 대부분의 항암 치료는 천연 p53을 함유한 정상 세포에 손상을 주거나 정상 세포를 죽여서 건강한 세포의 상해 또는 사멸과 연관된 심각한 부작용을 야기한다. 이러한 부작용은 광범위하게 정상 세포의 p53-매개된 사멸에 의하여 결정되기 때문에, 항암 치료의 급성기 동안의 p53의 일시적 억제는 이들 심각한 독성 부작용을 피하는 치료 전략으로 제시되었다. 이는 문헌(미국 특허 제6,593,353호 및 Komarov PG et al , 1999, A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy., Science, 285(5434): 1651, 1653)에 설명된다. p53은 화학치료 및 방사선 유도된 탈모증과 관련되어 있는 것으로 나타났다(Botcharev et al, 2000, p53 is essential for Chemotherapy-induced Hair Loss, Cancer Research, 60, 5002-5006).

#### [0010] 탈모증

[0011] 최근 모낭 형성 및 모발 성장을 조절하는 분자 및 경로의 이해에 극적인 진전이 있었다. 화학치료는 모간을 생

성하는 성장 별브에서의 매트릭스 케라틴 세포의 증식을 파괴한다. 이는 모낭이 모간의 강도가 약화되어 모발이 부서지고 떨어져 나가는 영양실조 퇴화 단계로 들어가게 한다. 90% 이상의 두피낭은 어느 때나 성장 단계에 있기 때문에, 이들 모발은 화학치료 후 빠르게 손실되며 따라서 탈모증은 빠르고 광범위하다(George Cotsarelis and Sarah E. Millar, 2001, Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment, TRENDS in Molecular Medicine Vol.7 No.7). 탈모를 야기할 가능성이 높은 화학치료 약물에는 시스플라티늄, 시타라빈, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 이포스파미드 및 빈크리스틴이 있다. 방사선 유도된 일반 탈모증은 특히 300 rad 및 그 이상의 전체 뇌 방사선(WBR)을 수용한 환자들 중 실질적으로 100%에서 관찰된다.

[0012] 화학치료 후 탈모가 결국 재생하기는 하지만, 탈모는 암에 걸린 환자들 간에 화학치료의 가장 두려운 부작용 중 하나이다. 환자들의 시각에서, 탈모(탈모증)는 화학치료의 괴로운 부작용으로 구역질 다음으로 2위를 차지한다. 환자들 중 약 75%는 화학치료 유도된 탈모를 암으로 야기된 통증과 동등한 또는 더 파괴적인 것이라고 설명한다.

[0013] 따라서, 모발 장애가 생명을 위협하지는 않지만, 환자들의 사회적 상호작용 및 심리학적 웰빙에 미치는 이들의 심각한 충격은 부인할 수 없다. 탈모 치료에 대한 요구는 수십억 달러 산업을 야기시켰다. 그럼에도 불구하고, FDA가 오로지 두 개의 탈모 치료를 승인한 사실이 증거하는 바와 같이, 대부분의 현재 거래되는 제품들은 효과가 없다. 공지된 치료법 또는 요법들 중 어떤 것도 암 치료-유도된 탈모증에 효과적이지 않다.

#### [0014] 급성신부전증(ARF)

[0015] ARF는 수 일 내에 발생한 신장 기능의 급속한 퇴화를 특징으로 하는 임상 증후군이다. ARF의 주요 특징은 질소 노폐물(요소, 크레아티닌)의 보유를 야기하는 사구체 여과 속도의 갑작스런 감소이다. 대체로, 백만명의 인구당 세계 인구 170-200명의 중증 ARF가 매년 발생한다. 현재까지, 만성 ARF에 대한 특이적 치료는 없다. 몇몇 약물이 다른 동물 모델에서 낮은 혈청 크레아티닌 수준, 감소된 조직학적 손상 및 신장 기능의 빠른 회복으로 증명된 바와 같이 독성 및 허혈성 실험용 ARF를 개선하는 것으로 확인되었다. 이들은 항산화제, 칼슘 채널 차단제, 이뇨제, 혈관작용물질, 성장 인자, 항염증제 등을 포함한다. 그러나, 임상시험에서 연구된 이들 약물들은 어떤 이점도 나타내지 않았고 임상 ARF에 이것들을 사용하는 것은 승인되지 않았다.

[0016] 병원에 입원한 환자들 중 대다수의 경우에, ARF는 허혈성 및/또는 신독성 손상으로부터 기인된 급성 세뇨관 괴사(ATN)에 의하여 야기된다. 신장 저관류는 혈관수축 약물의 투여 또는 신혈관 손상에 의한 저혈량성, 심장성, 패혈성 쇼크에 의하여 야기된다. 신독소는 미오글로빈과 같은 내생 독소뿐만 아니라 조영제, 아미노글리코시드와 같은 외인성 독소를 포함한다. 그러나, 최근 연구는 신장 조직에서의 아포프토시스가 ARF의 대부분의 사람의 경우에 현저하다는 것을 지지하고 있다. 아포프토시스성 세포 사멸의 주요 부위는 원위 네프론이다. 허혈성 손상의 초기 단계 동안, 액틴 세포골격 전체의 손실은 브러시 보더의 손실, 초점 세포 접촉의 손실, 및 하부 기저층 세포의 연속적인 이탈로 상피의 평탄화를 유도한다. 아포프토시스성 세뇨관 세포 사멸은 괴저성 세포 사멸보다 기능적 변화를 더 예측할 수 있는 것으로 제시되어 왔다(Komarov et al. Science. 1999 Sep 10;285(5434):1733-7); 또한 문헌(Supavekin et al. Kidney Int. 2003 May;63(5): 1714-24)을 참조하라.

[0017] 결론적으로, 현재 독성 탈모증 및 급성신부전증의 예방 및/또는 치료에 대한 요법의 만족스러운 방식도 없고, p53 폴리펩티드의 상승된 수준이 수반되는 많은 다른 질환 및 장애에 대한 만족스러운 방식도 없으므로, 이 목적을 위하여 신규 화합물을 개발해야 할 필요가 있다.

#### 발명의 상세한 설명

[0018] 본 발명은 p53 유전자를 억제하는 신규 이중 가닥 올리고리보뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명은 또한 하나 이상의 이러한 올리고리보뉴클레오타이드 및 올리고리보뉴클레오타이드를 발현시킬 수 있는 벡터를 포함한 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 환자를 치료하기 위하여 치료적으로 효과적인 양으로 전형적으로 약학적 조성물인 하나 이상의 올리고리보뉴클레오타이드를 환자에게 투여하는 단계를 포함한, p53 활성의 일시적(가역적) 억제가 이로인한 질환으로 고생하는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 p53 폴리펩티드의 상승된 수준을 수반하는 다른 장애들을 치료하는 것을 고려한다. 장기간 p53 비활성화는 암의 위험을 현저히 증가시킬 수 있기 때문에, 본 발명의 분자를 사용한 p53의 억제는 일시적인 것이 바람직하다.

[0019] 한 바람직한 구체예에서, 본원에 개시된 신규 siRNA 분자는 p53 siRNA를 사용한 p53의 일시적 억제가 종래의 화학치료(본원에 설명된) 또는 방사선치료와 함께 이로인한 경우에 종양의 치료에 사용될 수 있다. 예를 들면, 본원에 개시된 신규 siRNA 분자는 정상 p53-함유 세포를 화학치료 또는 방사선치료-유도된 아포프토시스로부터 보호



한다. 본원에 개시된 신규 siRNA 분자는 p53 억제제가 이들 세포에서 아포프토시스성 세포 괴사를 강화시키는 경우에 특정 암세포에서의 p53 발현의 억제에 사용될 수 있다. 구체적으로, 방사선 치료 및 화학치료는 림프양 및 조혈계 및 장 상피에 대한 중증 손상과 같은 심각한 부작용을 야기할 수 있는데, 이는 이들 치료의 효과를 제한하며, 심리적 고통을 야기하는 탈모를 야기할 수 있다. 이들 부작용은 p53-매개된 아포프토시스에 의하여 야기된다. 따라서, 암 치료와 연관된 역 부작용을 제거하거나 감소시키기 위하여, 본 발명의 siRNA 분자를 사용하여 정상 세포에서의 p53 활성의 일시적 억제를 유도함으로써 정상 조직을 보호하는 것이 이롭다.

[0020] 다른 바람직한 구체예에서, 본원에 개시된 신규 siRNA 분자는 신장 조직에서 아포프토시스성 세포 사멸과 연관된 신장 기능의 급속한 퇴화를 특징으로 하는 급성신부전증(ARF)의 치료에 사용될 수 있다.

[0021] 본원에 개시된 신규 siRNA 분자는 또한 p53이 심근경색증, 발작 및 허혈에서와 같이 차단된 혈액 공급과 연관된 화상, 고열, 저산소증과 같은 상해와 연관된 다양한 스트레스의 결과로 활성화되는 다른 조건에서 사용될 수 있다. 본 발명의 siRNA 분자를 사용한 일시적 p53 억제는 중추신경계에서 p53-의존적 신경 사멸, 즉 뇌 및 척수 손상을 감소 또는 제거하고, 이식 전의 조직 또는 기관의 보존, 골수 이식을 위한 숙주의 준비, 및 발작하는 동안 신경 손상을 감소 또는 제거하는 데 치료적으로 효과적일 수 있다.

[0022] p53은 또한 세포 노화에 중요한 역할을 한다. 특히, 노화와 연관된 정상 세포의 형태학적 및 생리학적 변화는 p53 활성에 관련될 수 있다. 오랜 시간 동안 조직에 축적된 노쇠한 세포는 매우 높은 수준의 p53-의존적 전사를 유지하는 것으로 알려져 있다. 노쇠 세포에 의한 성장 억제제의 p53-의존적 분비는 노화 조직에 축적된다. 따라서, 본원에 설명된 siRNA 분자는 또한 조직 노화의 억제에 사용될 수 있다.

## 실시예

[0131] 분자생물학의 일반적 방법

[0132] 구체적으로 설명되지 않은, 당업계에서 공지된 표준 분자생물학 기술은 일반적으로 문헌(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) 및 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) 및 Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, New York (1988), 및 Watson et al., Recombinant DNA, Scientific American Books, New York 및 Birren et al (eds) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)) 및 미국 특허 제4,666,828호; 제4,683,202호; 제4,801,531호; 제5,192,659호 및 제5,272,057호에 나타나 있고, 본원에 참고문헌으로 포함된 방법을 따른다. 중합효소 연쇄반응(PCR)은 일반적으로 PCR 프로토콜: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990)에 따라 수행되었다. 유체세포추정법과 조합된 원위치(세포내) PCR은 특정 DNA 및 mRNA 서열을 함유한 세포의 검출에 사용될 수 있다(Testoni et al., 1996, Blood 87:3822). 또한 RT-PCR을 수행하는 방법은 당업계에 주지되어 있다.

[0133] 실시예 1: 활성 siRNA 화합물을 위한 서열의 생성

[0134] 사육 알고리즘 및 유전자 p53의 공지된 서열(SEQ ID NO:1)을 사용하여, 많은 잠재적 siRNA의 서열을 생성하였다. 표 A는 현재까지 선택되고, 화학적으로 합성되었으며 활성에 대하여 시험한 23개의 siRNA를 나타낸다(실시예 2 참조). 이들 모든 siRNA는 19-mer이다.

표 A

번호	색인	센스 가닥	안티센스 가닥	종	NM_000546 (사람)	NM_011640 (마우스)	NM_0309 89(레트)
1	Mo3	GUACAUGUUAUAGCUCC	GGAGCUAUUACACAUGUAC	마우스	3	1232-1250	2 불일치
2	Hu2*	GACUCCAGUGGUAUUCUAC	GUAGAUAUACACUGGAGUC	사람 *	1026-1044	3 불일치	2 불일치
3	QHM0 n1	CAGACCUAUGGAAACUACU	AGUAGUUUCCAUGGUCUG	사람, 원숭이	310-328	3 불일치	4 불일치
4	QHM0 n2	CUACCUCCGCGCAUAAAA	UUUUUAUGGCGGGAGGUAG	사람, 원숭이	1378-1396	1 불일치	1 불일치
5	QH1	CCCAAGCAUUGGAUGAUUU	AAAUCAUCCAUUGCUUGGG	사람	361-379	없음	없음
6	QH2	CCCGGACGAUUAUGAACAA	UUGUUAUUAUUGGUCGGG	사람	389-407	없음	없음
7	QM1	GAGUCACAGUGGAUAUCA	UGAUUCCGACUGUGACUC	마우스	없음	552-570	2 불일치
8	QM2	GGAGUUGAGGAGUUUUUU	AAAAAACUCCUACAACUCC	마우스	없음	680-698	4 불일치
9	QM3	CAUCUUUUUGUCCUUCUCA	UGAGAAGGGACAAAGAUG	마우스	2 불일치	808-826	2 불일치
10	QM6	GGAAUAGGUUGAUAGUUGU	ACAACUAUACAACCUAUUCC	마우스	없음	1870-1888	없음
11	QM4	GGACAGCCAAGUCUGUUAU	AUAACAGACUUGGCUGUCC	마우스, 레트	2 불일치	877-895	527-545
12	QM5	GAAGAAAUUUCCGCAAAA	UUUUGCGGAAAUUUUCUUC	마우스, 레트	3 불일치	1383-1401	1033-1051
13	A17	CUGGGACAGCCAAGUCUGU	ACAGACUUGGCUUGCCAG	사람, 마우스	598-616	874-892	2 불일치
14	E2	UCAUCACACUGGAAGACUC	GAGUCUCCAGUGUGAUGA	사람, 마우스, 레트	1012-1030	1288-1306	938-956
15	E6	CACACUGGAAGACUCCAGU	ACUGGAGUCUCCAGUGUG	사람, 마우스, 레트	1016-1034	1292-1310	942-960
16	B1	GCGCCAUGGCCAUCAACA	UUGUAGAUGGCCAUGGCGC	사람, 원숭이, 마우스	724-742	1000-1018	652-668(17)
17	B2	CGCCAUGGCCAUCAACAAG	CUUGUAGAUGGCCAUGGCG	사람, 원숭이, 마우스	725-743	1001-1019	652-669(18)
18	C1	AGUCACAGCACAUGACGGA	UCCGCAUGUGGCUUGUGACU	사람, 원숭이, 마우스	745-763	1021-1039	2 불일치
19	F2	UCCGAGUGGAAGGAAUUUU	AAAUUCCUCCACUCGGA	사람, 원숭이, 개	835-853	1 불일치	3 불일치
20	F3	CCGAGUGGAAGGAAUUUU	CAAAUUCUCCACUCGCG	사람, 원숭이, 개	836-854	1 불일치	3 불일치
21	G1	GACAGAAACACUUUCGAC	GUCGAAAAGUGUUUCUGUC	사람, 원숭이, 개	873-891	없음	없음
22	H2	GUGUGGUGGUGCCUUAUGA	UCAUAGGGCACCAACACAC	사람, 원숭이, 개	895-913	3 불일치	3 불일치
23	I5	GAGAAUAUUCACCCUUA	UGAAGGUGAUAUUCUC	사람, 원숭이, 개	1225-1243	2 불일치	1 불일치

[0135]

[0136]

상기 표 A에서, siRNA 1-23의 센스 가닥은 각각 SEQ ID NO: 3-25를 가지고, siRNA 1-23의 안티센스 가닥은 각각 SEQ ID NO: 26-48을 가진다는 것을 주의하라. siRNA 화합물 No 1 (SEQ ID NO: 3 및 26)은 문헌(Dirac and Bernards, Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of P53J. Biol. Chem.(2003) 278: 11731)으로부터 공지되고 siRNA No 2 (SEQ ID NO:4 및 27)는 또한 문헌(Brummelkamp et al. Science 2002, 296:550-553)으로부터 공지된다. 그러나, 본원에 개시된 치료방법으로 이들 화합물을 사용하는 것은 이전에 개시되지 않았으며 따라서 신규하다.

[0137]

하기 표 B는 사유 알고리즘에 의하여 생성된 71개의 추가 19-mer siRNA를 나타낸다.

표 B

번호	공급원	센스	안티센스	gi13097806 gbBC003596.1 (사람)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (원숭이) (마카카 방사종(원숭이))	gi53575emb X01237 .1MMP53R (마우스 mRNA)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (개) (마린스 파멸(대왕))
1	사람	GUACCACCAUCCACUACA	UUGUAGUGGAGUGGUGUAC	[806-824]		[835-852]	
2	사람	GGAAACUACUCCUGAGAAA	UUUUCAGGAAGUAGUUUCC	[188-206]		[234-247]	
3	사람	AGACUCCAGUGGUAUUCUA	UAGAUUACCAUGGAGUCU	[894-912]		[922-933]	
4	사람	CCAUCCACUACAACUACU	AUGUAGUUGUAGUGGAGUG	[812-830]		[840-858]	
5	사람	CCACCAUCCACUACAACUA	UAGUUGUAGUGGAGUGGUG	[809-827]		[837-852]	
6	사람	AAACACUUUUCGACAUAGU	ACUAGUGCAAAAGUGUUU	[747-765]		-	
7	사람	CAUGAGCGCUGCAGAUUA	UAUCUGAGCAGCGCUAUG	[655-673]		[683-696]	
8	사람	CAUGGCCAUUCUACAAGCA	UGCUUGUAGUAGGCCAUGG	[596-614]		[624-640]	
9	사람	CCAAGUCUGUACUUGCAC	GUGCAAGUCACAGACUUGG	[476-494]		-	
10	사람	AAACUUUGGCCAAAAAAA	UUUUUUGGCAGCAAGUUU	[2476-2494]		-	
11	사람	CCUCCUUCUCCUUUUUA	UAAAAAGGAGAAAGAGGG	[2421-2439]		-	
12	사람	GCAAGCACUUGCAUUUU	AAAAUGCAGAUUGCUUGC	[2389-2407]		-	
13	사람	GGGUCAACAUCUUUAU	AUGUAAAAAGUUGUACCC	[2367-2385]		-	
14	사람	GAAGGUGCAACUUCUUUA	UAAAAGAUUGUACCCUUC	[2364-2382]		-	
15	사람	CUGGAAGGUGCAACUUCU	AAGAUGUUGACCCUCCAG	[2361-2379]		-	
16	사람	CCAGAGUGGUGGAUUA	UGUAAUCCAGCACUCUGG	[2321-2339]		-	
17	사람	GAUGGGGUCUACAGUGUU	AACACUGUGAGACCCUAC	[2249-2267]		-	
18	사람	GCCAACUUUUGCAUGUUUU	AAAAACUAGCAAAAGUUGGC	[2225-2243]		-	
19	사람	CCAUGGCCAGCAACUUUU	AAAAAGUUGGUGGCCAUGG	[2216-2234]		-	
20	사람	AGACCCAGUCCAGAUAAA	UUCAUCUGGACCGGGUCU	[288-306]		-	
21	사람, 마우스	CCAUCAUCACACUGGAAGA	UCUCCAGUGUGAUGAUGG	[878-896]		[906-924]	
22	사람, 마우스	CAUCACACUGGAAGACUCC	GGAGUCUCCAGUGUGAUG	[882-900]		[910-928]	
23	사람, 마우스	CAUCAUCACACUGGAAGAC	GUCUCCAGUGUGAUGAUG	[879-897]		[907-925]	
24	사람, 마우스	ACCAUCAUCACACUGGAAG	CUCCAGUGUGAUGAUGGU	[877-895]		[905-923]	
25	사람, 마우스	AUCAUCACACUGGAAGACU	AGUCUCCAGUGUGAUGAU	[880-898]		[908-926]	
26	사람, 마우스	CACUGGAAGACUCCAGUGG	CCACUGGAGUCUCCAGUG	[887-905]		[915-933]	
27	사람, 원숭이, 마우스	ACACUGGAAGACUCCAGUG	CACUGGAGUCUCCAGUGU	[886-904]	[766-784]	[914-932]	
28	사람, 원숭이, 마우스	UCACACUGGAAGACUCCAG	CUGGAGUCUCCAGUGUGA	[884-902]	[764-782]	[912-930]	

[0138]

29	사람, 원숭이, 마우스	AUCACACUGGAAGACUCCA	UGGAGUCUCCAGUGUGAU	[883-901]	[763-781]	[911-929]	
30	사람, 원숭이, 마우스	CACAGCACAUAGCGGAGGU	ACCUCGUCUAGUGUGUG	[617-635]	[497-515]	[645-663]	
31	사람, 원숭이, 마우스	CACUGGAAGACUCCAGUGG	CCACUGGAGUCUCCAGUG	[887-905]	[767-785]	[915-933]	
32	사람, 원숭이, 마우스	UCACAGCACAUAGCGGAGG	CCUCCGUCUAGUGUGUGA	[616-634]	[496-514]	[644-662]	
33	사람, 원숭이, 마우스	GUCACAGCACAUAGCGGAG	CUCGUCUAGUGUGUGAC	[615-633]	[495-513]	[643-661]	
34	사람, 원숭이, 개	CCAUCCACUACAACUACAU	AUGUAGUUGUAGUGGAUGG	[812-830]	[692-710]		[702-720]
35	사람, 원숭이, 개	CCACCAUCCACUACAACUA	UAGUUGUAGUGGAUGUGG	[809-827]	[689-707]		[699-717]
36	사람, 원숭이, 개	GAUAUUAUCCCUUCAGA	UCUGAAGGGUGAAUAUUC	[1096-1114]	[976-994]		[986-1004]
37	사람, 원숭이, 개	CGAGUGGAAGGAAUUGC	GCAAAUUAUCCUCCACUCG	[706-724]	[586-604]		[596-614]
38	사람, 원숭이, 개	GAGAAUUAUCCCUUCA	UGAAGGGUGAAUAUUCUC	[1094-1112]	[974-992]		[984-1002]
39	사람, 원숭이, 개	CUACAUGUGUAACAGUUC	GGAACUGUUAACAUAGUAG	[825-843]	[705-723]		[715-733]
40	사람, 원숭이, 개	AACUACAUGUGUAACAGUU	AACUGUUAACAUAGUAGUU	[823-841]	[703-721]		[713-731]
41	사람, 원숭이, 개	CAACUACAUGUGUAACAGU	ACUGUUAACAUAGUAGUUG	[822-840]	[702-720]		[712-730]
42	사람, 원숭이, 개	CACUACAACUACAUGUGUA	UACAUAGUAGUUGUAGUG	[817-835]	[697-715]		[707-725]
43	사람, 원숭이, 개	CCACUACAACUACAUGUGU	ACACAUGUAGUUGUAGUGG	[816-834]	[696-714]		[706-724]

[0139]

44	사람, 원숭이, 개	GACAGAAACAUUUCGAC	GUCGAAAAGUGUUUCUGUC	[742-760]	[622-640]		[632-650]
45	사람, 원숭이, 개	GGAGAAUUAUUCACCCUUC	GAAGGGUGAAUAUUCUCC	[1093-1111]	[973-991]		[983-1001]
46	사람, 원숭이, 개	GUGUAAACAGUUCUGCAUG	CAUGCAGGAACUGUACAC	[831-849]	[711-729]		[721-739]
47	사람, 원숭이, 개	ACAACUACAUGUGUAACAG	CUGUUAACAUAGUAGUUGU	[821-839]	[701-719]		[711-729]
48	사람, 원숭이, 개	ACUACAACUACAUGUGUAA	UUACAUAGUAGUUGUAGU	[818-836]	[698-716]		[708-726]
49	사람, 원숭이, 개	ACCAUCCACUACAACUACA	UGUAGUUGUAGUGGAUGGU	[811-829]	[691-709]		[701-719]
50	사람, 원숭이, 개	ACCACCAUCCACUACAACU	AGUUGUAGUGGAUGGUGGU	[808-826]	[688-706]		[698-716]
51	사람, 원숭이, 개	UACCACCAUCCACUACAAC	GUUGUAGUGGAUGGUGGUA	[807-825]	[687-705]		[697-715]
52	사람, 원숭이, 개	ACAGAAACAUUUCGACA	UGUCGAAAAGUGUUUCUGU	[743-761]	[623-641]		[633-651]
53	사람, 원숭이, 개	GAGUGGAAGGAAUUGCG	CGCAAAUUAUCCUCCACUC	[707-725]	[587-605]		[597-615]
54	사람, 원숭이, 개	AUAUUAUCCCUUCAGAU	GAUCUGAAGGGUGAAUAU	[1098-1116]	[978-996]		[988-1006]
55	사람, 원숭이, 개	AAUAUUAUCCCUUCAGAU	AUCUGAAGGGUGAAUAU	[1097-1115]	[977-995]		[987-1005]
56	사람, 원숭이, 개	AGAAUAUUAUCCCUUCAG	CUGAAGGGUGAAUAUUCU	[1095-1113]	[975-993]		[985-1003]
57	사람, 원숭이, 개	UGGAGAAUAUUAUCCCUU	AAGGGUGAAUAUUCUCA	[1092-1110]	[972-990]		[982-1000]
58	사람, 원숭이, 개	ACAUGUGUAACAGUUCUG	CAGGAACUGUUAACAUAGU	[827-845]	[707-725]		[717-735]
59	사람, 원숭이, 개	UACAACUACAUGUGUAACA	UGUUAACAUAGUAGUUGUA	[820-838]	[700-718]		[710-728]

[0140]

60	사람, 원숭이, 개	CUACAACUACAUUGUAAC	GUUACACAUAGUUGUAG	[819-837]	[699-717]	[709-727]
61	사람, 원숭이, 개	UCCACUACAACUACAUUG	CACAUAGUUGUAGUGGA	[815-833]	[695-713]	[705-723]
62	사람, 원숭이, 개	AUCCACUACAACUACAU	ACAUGUAGUUGUAGUGGAU	[814-832]	[694-712]	[704-722]
63	사람, 원숭이, 개	CAUCCACUACAACUACAU	CAUGUAGUUGUAGUGGAUG	[813-831]	[693-711]	[703-721]
64	사람, 원숭이, 개	CACCAUCCACUACAACUAC	GUAGUUGUAGUGGAUGGUG	[810-828]	[690-708]	[700-718]
65	사람, 원숭이, 개	UGUGUAAACAGUUCUGCAU	AUGCAGGAACUGUACACA	[830-848]	[710-728]	[720-738]
66	사람, 원숭이, 개	CAUGUGUAAACAGUUCUGC	GCAGGAACUGUACACAUG	[828-846]	[708-726]	[718-736]
67	사람, 원숭이, 개	UACAUGUGUAAACAGUCCU	AGGAACUGUACACAUGUA	[826-844]	[706-724]	[716-734]
68	사람, 원숭이, 개	ACUACAUGUGUAAACAGUUC	GAACUGUACACAUGUAGU	[824-842]	[704-722]	[714-732]
69	사람, 원숭이, 개	AUCCGAGUGGAAGGAAAUU	AAUUAUCCUCCACUGGGAU	[703-721]	[583-601]	[593-611]
70	사람, 원숭이, 개	UCACUCCAGCCACCUAGAG	CUUCAGGUGGUGGAGUGA	[1212-1230]	[1092-1110]	[1102-1120]
71	사람, 원숭이, 개	CUCACUCCAGCCACCUAGAA	UUCAGGUGGUGGAGUGAG	[1211-1229]	[1091-1109]	[1101-1119]

[0141]

[0142] 상기 표 B에서, siRNA 1-71의 센스 가닥은 각각 SEQ ID NO: 49-119을 가지고, siRNA 1-71의 안티센스 가닥은 각각 SEQ ID NO: 120-190을 가진다는 것을 주의하라.

[0143] 하기 표 C는 사유 알고리즘에 의하여 생성된 63개의 추가 21-mer siRNA를 나타낸다.

표 C

번호	공급원	센스 siRNA	안티센스 siRNA	gi13097806 gbCC003596.1 (사람)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (원숭이) (마카카 유사콜리마르스)	gi53575emb X01237.1M MP53R (마우스 mRNA)	gi4996229dbj AB020761.1 (개) (캐니스 파울리아리스)
1	사람	GGAAGAGAAUCCCGCAAGAA	UUCUUGCGGAGAUUCUUC	[975-995]	-	-	-
2	사람	GUACCAUCCACUACAACU	AGUUGUAGUGGAGUGGUAC	[806-826]	[686-706]	[835-852]	[697-716]
3	사람	GGACCAUUGGAAACAUGGUU	AACCAUUGUCAAUAUCGUCC	[261-281]	-	-	-
4	사람	CCAGCCACCGAAGUCCAAA	UUUUGGACUUCAGUGGCGUG	[1217-1237]	[1097-1115]	-	[1107-1120]
5	사람	GAGAAUUAUUCACCCUUCAGA	UCUGAAGGUGAAUAUUCUC	[1094-1114]	[974-994]	[1122-1137]	[984-1004]
6	사람	AGAAACACUGGAGUGGAGAAU	AUUCUCCAUCAGUGGUUUCU	[1079-1099]	[959-979]	-	-
7	사람	CUACUGGACGGAACAGCUUU	AAAGCUUUCGUCCAGUAG	[910-930]	[790-810]	-	-
8	사람	AGACUCCAGUGGUAUUCUACU	AGUAGAUUACCAUGGAGUCU	[894-914]	[774-794]	[922-933]	[784-795]
9	사람	CUGGAAGACUCCAGUGGUAU	AUUACCAUGGAGUCUCCAG	[889-909]	[769-789]	[917-933]	[779-795]
10	사람	GAAACUACUCCUGAAACAA	UUGUUUUCAGGAAGUAGUUC	[189-209]	[69-87]	[235-247]	[122-135]
11	사람	GGAACUACUCCUGAAACAA	UGUUUUCAGGAAGUAGUUC	[188-208]	[68-87]	[234-247]	[122-134]
12	사람	AAACACUUUUCGACAUAGUGU	ACACUUAUGCGAAAGUGUUU	[747-767]	[627-647]	-	[637-657]
13	사람	GGAGUAUUGGAGACAGAAA	UUUCUGUAUCCAAUACUCC	[729-749]	[609-629]	-	-
14	사람	UCAGACCUUUGGAACUACUU	AAGUAGUUUCCAUAGGUCUGA	[178-198]	[58-78]	[231-244]	-
15	사람	CCAAGGCCAUUACAAGCAGU	ACUGCUUGUAGAUAGGCAUGG	[596-616]	[476-496]	[624-640]	[485-495]
16	사람	CCAAGCUGUGACUUGCAGU	ACUGGCAAGUCACAGCUUGG	[476-496]	[356-376]	-	-
17	사람	GGACAGCAAGUCUUGGACUU	AAGUCACAGCUUGGCUUGCC	[470-490]	[352-370]	[498-513]	[357-377]
18	사람	CCUCCUUCUCCUUUUUUAU	UAUAAAAGGAGGAAGGAGG	[2421-2441]	-	[1721-1731]	-
19	사람, 원숭이, 개	CCAUCACUACAACUACAU	ACAUGUAGUUGUAGUGGAGUG	[812-832]	[692-712]	[840-860]	[702-722]
20	사람, 원숭이, 개	CCACCAUCCACUACAACUACA	UGUAGUUGUAGUGGAGUGUG	[809-829]	[689-709]	[837-857]	[699-719]
21	사람, 원숭이, 개	GAGAAUUAUUCACCCUUCAGA	UCUGAAGGUGAAUAUUCUC	[1094-1114]	[974-994]	-	[984-1004]
22	사람, 원숭이, 개	GGAGAAUUAUUCACCCUUCAG	CUGAAGGUGGAAUAUUCUCC	[1093-1113]	[973-993]	-	[983-1003]
23	사람, 원숭이, 개	CUACAUGUGUAAACAGUCCUG	CAGGAACUGUUAACAUGUAG	[825-845]	[705-725]	-	[715-735]
24	사람, 원숭이, 개	ACAACUACAUGUGUAAACAGUU	AACUGUUAACAUGUAGUUGU	[821-841]	[701-721]	-	[711-731]
25	사람, 원숭이, 개	CCACUACAACUACAUGUGUAA	UUACACAUGUAGUUGAGUGG	[816-836]	[696-716]	-	[706-726]

[0144]

26	사람, 원숭이, 개	CACCAUCCACUACAACUACAU	AUGUAGUUGUAGUGGAUGGUG	[810-830]	[690-710]	[700-720]
27	사람, 원숭이, 개	GAAUAUUUCACCCUUCAGAU	GAUCUGAAGGGUGAAUAUUC	[1096-1116]	[976-996]	[986-1006]
28	사람, 원숭이, 개	AGAAUAUUUCACCCUUCAGAU	AUCUGAAGGGUGAAUAUUCU	[1095-1115]	[975-995]	[985-1005]
29	사람, 원숭이, 개	UACCACCAUCCACUACAACUA	UAGUUGUAGUGGAUGGUGUA	[807-827]	[687-707]	[697-717]
30	사람, 원숭이, 개	GAUGGAGAAUAUUUCACCCU	AAGGGUGAAUAUUCUCCAUC	[1090-1110]	[970-990]	[980-1000]
31	사람, 원숭이, 개	CCGAGUGGAAGGAAAUUUGCG	CGCAAAUUCUCCACUCGG	[705-725]	[585-605]	[595-615]
32	사람, 원숭이, 개	AACUACAUGUGUACAGUUC	GGAACUGUACACAGUAGUU	[823-843]	[703-723]	[713-733]
33	사람, 원숭이, 개	CAACUACAUGUGUACAGUUC	GAAUGUACACAGUAGUUG	[822-842]	[702-722]	[712-732]
34	사람, 원숭이, 개	ACUACAACUACAUGUGUAACA	UGUACACAGUAGUUGUAGU	[818-838]	[698-718]	[708-728]
35	사람, 원숭이, 개	CACUACAACUACAUGUGUAA	GUUACACAGUAGUUGUAGUG	[817-837]	[697-717]	[707-727]
36	사람, 원숭이, 개	UCCACUACAACUACAUGUGUA	UACACAGUAGUUGUAGUGGA	[815-835]	[695-715]	[705-725]
37	사람, 원숭이, 개	CAUCCACUACAACUACAUGUG	CACAGUAGUUGUAGUGGAUG	[813-833]	[693-713]	[703-723]
38	사람, 원숭이, 개	ACCAUCCACUACAACUACAUG	CAUGUAGUUGUAGUGGAUGGU	[811-831]	[691-711]	[701-721]
39	사람, 원숭이, 개	UGGAGAAUAUUUCACCCUACA	UGAAGGGUGAAUAUUCUCCA	[1092-1112]	[972-992]	[982-1002]
40	사람, 원숭이, 개	AUGUGUAAACAGUCCUGCAUG	CAUGCAGGAACUGUACACAU	[829-849]	[709-729]	[719-739]
41	사람, 원숭이, 개	CAUGUGUAAACAGUCCUGCAU	AUGCAGGAACUGUACACAU	[828-848]	[708-728]	[718-738]

[0145]

42	사람, 원숭이, 개	UACAACUACAUGUGUAAACAGU	ACUGUACACAGUAGUUGUA	[820-840]	[700-720]	[710-730]
43	사람, 원숭이, 개	CUACAACUACAUGUGUAAACAG	CUGUACACAGUAGUUGUAG	[819-839]	[699-719]	[709-729]
44	사람, 원숭이, 개	AUCCACUACAACUACAUGUGU	ACACAGUAGUUGUAGUGGAU	[814-834]	[694-714]	[704-724]
45	사람, 원숭이, 개	ACCACCAUCCACUACAACUAC	GUAGUUGUAGUGGAUGGUGGU	[808-828]	[688-708]	[698-718]
46	사람, 원숭이, 개	AAUAUUUCACCCUUCAGAUCC	GGAUCUGAAGGGUGAAUAUUC	[1097-1117]	[977-997]	[987-1007]
47	사람, 원숭이, 개	ACUACAUGUGUAAACAGUCCU	AGGAACUGUACACAGUAGU	[824-844]	[704-724]	[714-734]
48	사람, 원숭이, 개	AUGGAGAAUAUUUCACCCUUC	GAAGGGUGAAUAUUCUCCA	[1091-1111]	[971-991]	[981-1001]
49	사람, 원숭이, 개	UGUGUAAACAGUCCUGCAUGG	CCAUGCAGGAACUGUACACA	[830-850]	[710-730]	[720-740]
50	사람, 원숭이, 개	UCCGAGUGGAAGGAAAUUUGC	GCAAAUUCUCCACUCGGA	[704-724]	[584-604]	[594-614]
51	사람, 원숭이, 개	AUCCGAGUGGAAGGAAAUUUG	CAAAUUCUCCACUCGGAU	[703-723]	[583-603]	[593-613]
52	사람, 원숭이, 마우스	UCACACUGGAAGACUCCAGUG	CACUGGAGUCUCCAGUGUGA	[884-904]	[764-784]	[912-932]
53	사람, 원숭이, 마우스	AUCACACUGGAAGACUCCAGU	ACUGGAGUCUCCAGUGUGAU	[883-903]	[763-783]	[911-931]
54	사람, 원숭이, 마우스	CACACUGGAAGACUCCAGUGG	CCACUGGAGUCUCCAGUGUG	[885-905]	[765-785]	[913-933]
55	사람, 마우스	UCAUCACACUGGAAGACUCCA	UGGAGUCUCCAGUGUGAUGA	[881-901]		[909-929]
56	사람, 마우스	CCAUCACACACUGGAAGACU	AGUCUCCAGUGUGAUGAUGG	[878-898]		[906-926]
57	사람, 마우스	CAUCACACUGGAAGACUCCAG	CUGGAGUCUCCAGUGUGAUG	[882-902]		[910-930]
58	사람, 마우스	CAUCAUCACACUGGAAGACUC	GAGUCUCCAGUGUGAUGAUG	[879-899]		[907-927]

[0146]

59	사람, 마우스	AOCAUCAACACUGGAAGAC	GUCUCCAGUGUGAUGAUGGU	[877-897]		[905-925]
60	사람, 마우스	UCACACUGGAAGACUCCAGUG	CACUGGAGUCUCCAGUGUGA	[884-904]		[912-932]
61	사람, 마우스	AUCACACUGGAAGACUCCAGU	ACUGGAGUCUCCAGUGUGAU	[883-903]		[911-931]
62	사람, 마우스	AUCAUCAACACUGGAAGACUC	GGAGUCUCCAGUGUGAUGAU	[880-900]		[908-928]
63	사람, 마우스	CACACUGGAAGACUCCAGUGG	CCACUGGAGUCUCCAGUGUG	[885-905]		[913-933]

[0147]

[0148]

상기 표 C에서, siRNA 1-63의 센스가닥은 각각 SEQ ID NO:191-253을 가지고, siRNA 1-63의 안티센스 가닥은 각각 SEQ ID NO:254-316을 가진다는 것을 주의하라.

- [0149] 실시예 2: 항-p53 활성을 위한 siRNA 화합물의 시험
- [0150] 프로토콜
- [0151] I. siRNA의 제조(이중 가닥 올리고뉴클레오티드)
- [0152] 동결건조된 올리고뉴클레오티드를 RN아제 제거된 증류수에 용해시켜 최종 농도 100  $\mu$ M을 만들었다. 희석된 올리고뉴클레오티드를 15분 동안 실온에 유지하고 즉시 액체 질소에서 동결시켰다.
- [0153] 올리고뉴클레오티드를 -80°C에 저장하고 사용하기 전에 PBS로 희석하였다.
- [0154] II. 리포펙타민2000 시약을 통한 사람 세포에 siRNA의 트랜스팩션
- [0155]  $2 \times 10^5$  p53-wt HCT116 또는 SW480 세포를 6 웰 플레이트에 시딩하였다. 24h 후, 리포펙타민2000 시약(Invitrogen에서 구입)을 사용하여 세포를 p53 올리고뉴클레오티드로 트랜스팩션하였다.
- [0156] 하기 과정을 수행하였다:
- [0157] 1. 트랜스팩션 전에, 세포 배지를 항생제가 없는 1500  $\mu$ l 새 배지로 교체하였다.
- [0158] 2. 멸균 플라스틱 튜브에, 리포펙타민2000 시약(양은 웰 당 5  $\mu$ l에 따라서 측정된다)을 250  $\mu$ l 혈청 제거된 배지에 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다.
- [0159] 3. 다른 튜브에서, 사람 항-p53 올리고뉴클레오티드(웰 당 원하는 최종 농도를 맞춘 다양한 양)를 250  $\mu$ l 혈청 제거된 배지에 첨가하였다.
- [0160] 4. 리포펙타민2000 복합체를 p53 올리고뉴클레오티드 용액과 혼합시키고 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다.
- [0161] 5. 생성된 혼합물을 세포에 한 방울씩 첨가하고, 세포를 37°C에서 인큐베이션하였다.
- [0162] 6. SW480 세포: 트랜스팩션 48 시간 후에 세포를 수확하고 단백질을 RIPA 완충액을 사용하여 추출하였다.
- [0163] 7. HCT116 세포:
- [0164] • 트랜스팩션 40 시간 후에, 5Fu(Sigma)를 세포에 첨가하여 최종 농도 25  $\mu$ g/ml을 만들었다. 세포 트랜스팩션 48 시간 후(5Fu 처리 8 시간 후), 세포를 수확하고 단백질을 RIPA 완충액을 사용하여 추출하였다.
- [0165] 8. 모노클로날 항체(Do-1 클론, 산타쿠르스)를 사용한 웨스턴 블롯 분석에 의하여 p53 발현을 결정하였다. 표준화를 위해서, 블롯을 튜블린 발현에 대하여 검사하였다.
- [0166] III. 리포펙타민2000 시약을 사용하여 PC3 세포에 마우스 p53 유전자 및 마우스 p53 올리고뉴클레오티드의 공동-트랜스팩션
- [0167]  $2 \times 10^5$  p53-제거된(null) PC3 세포를 6 웰 플레이트에 웰 마다 시딩하였다. 24시간 후, 리포펙타민2000 시약(Invitrogen)을 사용하여 세포를 마우스 p53 유전자 및 GFP 유전자 및 마우스 p53 올리고뉴클레오티드로 공동-트랜스팩션하였다. 하기 과정을 수행하였다:
- [0168] 1. 트랜스팩션하기 전에, 세포 배지를 항생제가 없는 1500  $\mu$ l 새 배지로 교체하였다.
- [0169] 2. 멸균 플라스틱 튜브에, 리포펙타민2000 시약(웰 당 5  $\mu$ l)을 250  $\mu$ l 혈청 제거된 배지에 첨가하고, 실온에 5분 동안 인큐베이션하였다.
- [0170] 3. 다른 튜브에, 4  $\mu$ g DNA(p53 유전자:GFP 유전자, 10:1) 및 사람 p53 올리고뉴클레오티드를 250  $\mu$ l 혈청 제거된 배지에 첨가하였다.
- [0171] 4. 리포펙타민2000 복합체를 p53 올리고뉴클레오티드 용액과 혼합하고 실온에서 20 분 동안 인큐베이션하였다.
- [0172] 5. 혼합물 용액을 세포에 한 방울씩 첨가하고, 세포를 37°C에서 인큐베이션하였다.
- [0173] 6. 트랜스팩션 48 시간 후, 세포를 수확하고 단백질을 RIPA 완충액을 사용하여 추출하였다.
- [0174] 7. 모노클로날 항체(Clone240, Chemicon)를 사용한 웨스턴 블롯 분석에 의하여 p53 발현을 결정하였다. 표준화를 위해서, 블롯을 GFP 발현에 대하여 검사하였다.



[0175] **결과:**

[0176] A. 사람 p53 올리고뉴클레오타드:

**표 D**

번호	올리고	종	공급원	시험의 결과	
				SW480	HCT116
2	Hu2'	사람	문현	(-)	(+)
3	QHMon1	사람, 원숭이	사유	(++)	(+++)
4	QHMon2	사람, 원숭이	사유	(-)	시험 안함
5	QH1	사람	사유	(+++)	(+++)
6	QH2	사람	사유	(-)	시험 안함
13	A17	사람, 마우스	사유	(-)	시험 안함
14	E2	사람, 마우스, 레트	사유	(+)	시험 안함
15	E6	사람, 마우스, 레트	사유	(-)	시험 안함
16	B1	사람, 마우스, 레트	사유	(-)	시험 안함
17	B2	사람, 마우스, 레트	사유	(-)	시험 안함
18	C1	사람, 원숭이, 마우스	사유	(-)	시험 안함
19	F2	사람, 원숭이, 개	사유	(-)	시험 안함
20	F3	사람, 원숭이, 개	사유	(+++)	(+++)
21	G1	사람, 원숭이, 개	사유	(+++)	시험 안함
22	H2	사람, 원숭이, 개	사유	(+)	
23	I5	사람, 원숭이, 개	사유	(+++)	

[0177]

[0178] 주의: 표 D에 있는 번호는 표 A에 있는 번호에 대응되며, siRNA 1-23의 센스 가닥은 각각 SEQ ID NO:3-25을 가지고, siRNA 1-23의 안티센스 가닥은 각각 SEQ ID NO:26-48을 가진다.

[0179] 표 D에 도시된 바와 같이, 상기 프로토콜 II에 따라서, 4개의 사람 올리고뉴클레오타드를 두 시스템 SW480 및 HCT116에서 시험하였다. 시험결과를 기초로 한 대표적 결과(웨스턴 블롯)를 도 3에 나타내었다.

[0180] B. 마우스 p53 올리고뉴클레오타드:

**표 E**

	올리고	종	공급원	시험의 결과
				PC3 제거 세포/ 외인성 마우스 p53
1	Mo3	마우스	문현	(+++)
7	QM1	마우스	사유	(-)
8	QM2	마우스	사유	(-)
9	QM3	마우스	사유	(-)
10	QM6	마우스	사유	(-)
11	QM4	마우스, 레트	사유	(+++)
12	QM5	마우스, 레트	사유	(+++)
13	A17	사람, 마우스	사유	(-)
14	E2	사람, 마우스, 레트	사유	(++)
15	E6	사람, 마우스, 레트	사유	(-)
16	B1	사람, 원숭이, 마우스	사유	(-)
17	B2	사람, 원숭이, 마우스	사유	(++)
18	C1	사람, 원숭이, 마우스	사유	(++)
21	G1	사람, 원숭이, 개	사유	(++)
20	F3	사람, 원숭이, 개	사유	(+++)
23	I5	사람, 원숭이, 개	사유	(-)
3	QHMon1	사람, 원숭이	사유	(++)

[0181]

[0182] 주의: 표 E(표 D에 대한)에 있는 번호는 표 A에서 사용된 번호에 대응되며, siRNA 1-23의 센스 가닥은 각각 SEQ ID NO:3-25을 가지고, siRNA 1-23의 안티센스 가닥은 각각 SEQ ID NO:26-48을 가진다. 시험결과를 기초로 한 대표적인 웨스턴 블롯 결과를 도 4에 나타내었다.

[0183] 실시예 3: 탈모의 모델 시스템

- [0184] 하기 시스템에서 활성 siRNA의 시험을 수행하였다:
- [0185] a. 탈모의 마우스 모델
- [0186] b. 생체의 배양된 사람 모낭
- [0187] c. 누드 마우스에 사람 모낭 이식
- [0188] 주의: 활성 siRNA를 시험하기 위한 시스템은 문헌(Botcharev et al, 2000, p53 is essential for Chemotherapy-induced Hair Loss, Cancer Research, 60, 5002-5006)에 설명된다.
- [0189] **실시예 4: 급성신부전증(ARF)의 모델 시스템**
- [0190] 패혈증 유도된 ARF 또는 허혈-재관류 유도된 ARF를 사용하여 ARF를 치료하기 위한 활성 siRNA를 시험할 수 있다.
- [0191] 1. 패혈증 유도된 ARF
- [0192] 패혈증 유도된 ARF의 두 예상 모델은 문헌(Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA, 2003, Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice, Kidney Int. Nov;64(5):1620-31)에 설명된다. 이들 두 모델은 마우스에, 바람직하게는 노령의 마우스에 지질다당류를 투여한 것과 맹장 결찰 구멍이 난 것이다.
- [0193] 2. 허혈-재관류 유도된 ARF
- [0194] 이 예상 동물 모델은 문헌(Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC, 2003년 1월, P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor, J Am Soc Nephrol.; 14(1):128-38)에 설명된다.
- [0195] 허혈-재관류 손상은 좌우 양측 신장 동맥 클램프 45분 후 및 24 시간의 재관류를 허용하는 클램프의 연속적인 방출 후 레트에서 유도되었다. 250 ug의 p53 siRNA (QM5 서열, 표 A)를 클램프 2 시간 전 및 30분 후에 경정맥에 주사하였다. 추가 250 ug의 siRNA를 클램프 4 시간 및 8 시간 후에 꼬리 정맥을 통하여 주사하였다. GFP에 대한 siRNA는 음성 대조군으로 작용하였다. 본원에 설명된 실험에 사용된 siRNA는 센스 및 안티센스 가닥의 3' 말단에 인산기를 가졌다. 3'-비인산화된 siRNA는 동물 모델에서 대응된 3'-인산화된 siRNA와 유사한 생물학적 활성을 가진 것으로 확인되었다. ARF의 진행과정은 수술 전 및 수술 후 24 시간에 혈청 크레아티닌 수준의 측정 에 의하여 모니터링되었다. 실험 말기에, 레트를 내재하는 대퇴부선을 통하여 데운 PBS 및 4% 파라포름알데히드로 관류시켰다. 좌 신장을 제거하고 계속적 조직학적 분석을 위하여 4% 파라포름알데히드에 보관하였다. 급성신부전증은 흔히 기준선으로부터 혈청 크레아티닌 수준의 격렬한 증가로 정의된다. 혈청 크레아티닌의 dL 당 적어도 0.5 mg 또는 L 당 44.2  $\mu$ mol의 증가가 급성신부전증의 지표로 고려된다. 수술 전 0 시간 및 ARF 수술 후 24 시간에 혈청 크레아티닌을 측정하였다.
- [0196] 레트 신장에서 p53 siRNA의 분포를 연구하기 위하여, 당 잔기에서 번갈아 일어나는 O-메틸 변형을 가진 Cys3-표지된 19-mer 평할 말단의 siRNA 분자(2 mg/kg)를 3-5 분 동안 정맥내로 투여한 후, 두 광자 공초점 현미경을 사용하여 생체내 영상화를 수행하였다. 공초점 현미경 분석은 신장에 있는 대다수의 siRNA가 근위세뇨관의 엔도솜 부분에 집중된다는 것을 밝혔다. 엔도솜 및 세포질 siRNA 형광은 모두 전달 후 처음 2 시간 동안 상대적으로 안정적이었고 24시간에 사라졌다.
- [0197] 도 5에 분명이 나타난 바와 같이, 신장 좌우 양측의 동맥 클램프 처리(PBS 처리) 후 혈청 크레아티닌의 수준이 10배 증가하였다. p53 siRNA의 4번의 주사(QM5 서열, 표 A)(클램프 전 2 시간 및 클램프 후 30분, 4 시간, 8 시간)는 혈청의 크레아티닌 수준을 50%( $p < 0.001$ ) 현저히 감소시켰다. 이들 결과는 p53 siRNA가 허혈-재관류 손상의 효과로부터 신장 조직을 보호하고 따라서 ARF의 중증을 감소시킬 수 있다는 것을 제시한다.
- [0198] 신장 허혈-재관류 손상에 대한 p53 siRNA 치료의 효과는 신장 조직에서 세뇨관 피사의 범위를 분석함으로써 더 결정하였다. 세뇨관 피사는 다음과 같이 점수를 매길 수 있다: 손상 없음(손상 점수 0), 단일 세포, 패치 분리된 피사(손상 점수 1), 조직의 25% 미만의 세뇨관 피사(손상 점수 2), 조직의 25% 내지 50%의 세뇨관 피사(손상 점수 3) 및 조직의 50% 이상의 세뇨관 피사(손상 점수 4). 도 6은 허혈-재관류 손상이 없는 동물(1 군)에서 또는 PBS (2 군), p53 siRNA의 2회 주사 (3 군), p53 siRNA의 3회 주사 (4 군) 또는 p53 siRNA의 4회 주사 (5 군)로 처리한 후의 허혈-재관류 손상 동물에서 손상 점수(Y 축)로 표현된 세뇨관 신장 손상을 나타낸다. 도 6에 나타난 바와 같이, p53 siRNA의 4회 주사는 PBS 대조군과 비교해서 세뇨관 신장 손상의 현저한 감소를



가져왔다. 도 7은 4회 주사한 p53 siRNA 치료는 허혈-재관류 손상을 당한 동물의 신장의 피질 부분에서 아포프토시스 촉진 유전자 Puma의 발현을 하향조절하였다는 것을 나타낸다. 이것은 p53 siRNA 치료가 허혈-재관류 손상 후 신장에서 아포프토시스 과정을 억제할 수 있다는 것을 나타낸다.

### 도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 사람 p53 유전자 SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- [0024] 도 2는 사람 p53 폴리펩티드 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 나타낸다.
- [0025] 도 3은 p53 발현에 미치는 다양한 사람 p53 siRNA의 효과를 증명한 웨스턴 블롯을 나타낸다.
- [0026] 도 4는 p53 발현에 미치는 다양한 마우스 p53 siRNA의 효과를 증명한 웨스턴 블롯을 나타낸다.
- [0027] 도 5는 좌우양측 신장 동맥 클램프를 받고 지시된 바와 같이 p53 siRNA 화합물 또는 대조군으로 처리된 동물에서 급성신부전증의 표시로서 혈청 크레아티닌의 수준을 나타낸다.
- [0028] 도 6은 좌우양측 신장 동맥 클램프를 받고 p53 siRNA 화합물로 처리된 동물의 신장 조직에서 세뇨관 괴사의 범위를 나타낸다.
- [0029] 도 7은 p53 siRNA 치료가 허혈-재관류 신장이 손상된 동물의 신장의 피질 부분에서 아포프토시스 촉진 유전자 Puma의 발현을 하향조절하였다는 것을 나타낸다.

### [0030] 발명의 상세한 설명

- [0031] 본 발명은 대체로 특히 신규 작은 간섭 RNA(siRNA)에 대한 p53 유전자의 발현을 하향조절하는 화합물 및 다양한 질환 및 의학적 상태, 특히 탈모증 또는 급성신부전증 또는 p53 폴리펩티드의 상승된 수준을 수반하는 장애의 치료에서 이들 신규 siRNA의 사용에 관한 것이다. 본 발명의 발명자는 상기 질환 또는 장애 중 어느 것을 치료하기 위하여 p53의 일시적 억제를 유도하는 것이 이롭다는 것을 발견하였다. p53을 억제하는 방법, 분자 및 조성물은 본원에 상세히 논의되며, 상기 분자 및/또는 조성물 중 어떤 것은 상기 상태 중 어떤 것으로 고생하는 환자의 치료에 유리하게 채용될 수 있다.
- [0032] 본 발명은 생체내에서 표적 p53 유전자의 발현을 억제하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 대체로, 상기 방법은 특정 p53 mRNA에 표적화되고 생물학적 조건 하(세포 내)의 mRNA 또는 RNA 간섭 메커니즘에 의하여 표적 유전자의 발현을 하향조절하기에 충분한 양으로 세포에 siRNA를 생성할 수 있는 핵산 물질에 혼성화되거나 그것과 상호작용하는 작은 간섭 RNA(즉, siRNA)와 같은 올리고뉴클레오티드를 투여하는 단계를 포함한다. 특히, 본 발명은 질환의 치료를 위한 p53 유전자의 발현을 억제하는 데 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따라서, siRNA 분자 또는 p53 유전자의 억제체는 다양한 병리, 특히 탈모증 또는 급성신부전증 또는 p53 폴리펩티드의 상승된 수준을 수반한 다른 장애를 치료하는 약물로 사용될 수 있다. 장기간 p53 비활성화는 암의 위험을 현저히 증가시킬 수 있기 때문에, 본 발명의 분자를 사용한 p53의 억제는 일시적/가역적인 것이 바람직하다.
- [0034] 본 발명은 p53 유전자의 발현을 하향조절하는 이중 가닥 올리고리보뉴클레오티드(siRNA)를 제공한다. 본 발명의 siRNA는 센스 가닥이 p53 유전자의 mRNA 서열에서 유래되고 안티센스 가닥은 센스 가닥에 상보적인 듀플렉스 올리고리보뉴클레오티드이다. 대체로, 표적 mRNA 서열의 약간의 편차는 siRNA 활성의 약화없이 허용된다(예를 들어, Czauderna et al 2003 Nucleic Acids Research 31.(11), 2705-2716 참조). 본 발명의 siRNA는 mRNA를 파괴하거나 또는 파괴하지 않으면서 전사후 단계에서의 유전자 발현을 억제한다. 이론에 얽매이지 않고, siRNA는 특이적 절단 및 분해를 위하여 mRNA를 표적화할 수 있고/있거나 표적화된 메시지로부터 번역을 억제할 수 있다.
- [0035] 4 가지 이상의 변이체 p53 폴리펩티드가 있다(Bourdon et al. Genes Dev..2005;19:2122-2137 참조). 도 1에 나타난 서열은 gi-8400737의 뉴클레오티드 서열이다. 대응된 폴리펩티드 서열은 393 아미노산 서열이다; 도 2 참조. 모든 변이체 및 어떤 다른 유사한 소수 변이체는 p53 폴리펩티드의 정의 및 그것들을 코딩하는 p53 유전자의 정의에 포함된다.
- [0036] 본원에 사용된 용어 "p53 유전자"는 당업계에 주지된, 고엄격 혼성화의 조건 하에서 SEQ ID NO:1의 영역을 코딩하는 아미노산 또는 p53 유전자에 결합하는 핵산 서열에 대하여 바람직하게는 90% 상동성, 더 바람직하게는 95% 상동성, 그리고 보다 더 바람직하게는 98% 상동성을 가진 p53 유전자의 어떤 동족체로 정의된다(예를 들면, 문

현(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988), 1995 및 1998에 갱신)을 참조하라)

- [0037] 본원에 사용된 용어 "p53" 또는 "p53 폴리펩티드"는 SEQ ID NO:2에 대하여 바람직하게는 90% 상동성, 더 바람직하게는 95% 상동성, 그리고 보다 더 바람직하게는 98% 상동성을 가진 p53 폴리펩티드의 어떤 동족체로서, 전체 길이 또는 단편 또는 그것의 도메인으로서, 스폰라이싱된 변이체 핵산 서열에 의하여 코딩된 돌연변이체 또는 폴리펩티드로서, 다른 폴리펩티드와의 키메라로서 정의되며, 다만 상기 중 어떤 것도 p53 폴리펩티드와 동일한 또는 실질적으로 동일한 생물학적 기능을 가진다.
- [0038] 일반적으로, 본 발명에 사용된 siRNA는 이중 가닥 구조를 포함한 리보핵산을 포함하고, 이중 가닥 구조는 첫 번째 가닥 및 두 번째 가닥을 포함하며, 첫 번째 가닥은 인접 뉴클레오타이드의 첫 번째 스트레치를 포함하고, 상기 첫 번째 스트레치는 표적 핵산에 적어도 부분적으로 상보적이며, 두 번째 가닥은 인접 뉴클레오타이드의 두 번째 스트레치를 포함하고, 상기 두 번째 스트레치는 표적 핵산에 적어도 부분적으로 일치하며, 상기 첫 번째 가닥 및/또는 두 번째 가닥은 2'-위치에 변형을 가진 복수의 변형된 뉴클레오타이드의 그룹을 포함하고, 가닥 내에 변형된 뉴클레오타이드의 각 그룹은 뉴클레오타이드의 양쪽에 인접한 그룹에 의하여 한쪽 면 또는 양쪽 면에 인접하게 되며, 뉴클레오타이드의 양쪽에 인접한 그룹을 형성하는 양쪽에 인접한 뉴클레오타이드는 변형되지 않은 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드의 변형과 상이한 변형을 가진 뉴클레오타이드이다. 나아가, 상기 첫 번째 가닥 및/또는 상기 두 번째 가닥은 상기 복수의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고 상기 복수의 변형된 뉴클레오타이드의 그룹을 포함할 수 있다.
- [0039] 변형된 뉴클레오타이드의 그룹 및/또는 양쪽에 인접한 뉴클레오타이드의 그룹은 많은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 그 수는 1 뉴클레오타이드 내지 10 뉴클레오타이드를 포함한 군에서 선택된다. 본원에 열거된 어떤 범위와 관련하여, 각 범위는 상기 범위를 한정하는 상기 두 수를 포함한 범위를 한정하는 데 사용된 각 수 사이의 각각의 어떤 정수를 개시하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서 본 경우에는, 그룹은 한 개의 뉴클레오타이드, 두 개의 뉴클레오타이드, 세 개의 뉴클레오타이드, 네 개의 뉴클레오타이드, 다섯 개의 뉴클레오타이드, 여섯 개의 뉴클레오타이드, 일곱 개의 뉴클레오타이드, 여덟 개의 뉴클레오타이드, 아홉 개의 뉴클레오타이드 및 열 개의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0040] 상기 첫 번째 가닥의 뉴클레오타이드 패턴은 두 번째 가닥의 변형된 뉴클레오타이드 패턴에 비해서 하나 이상의 뉴클레오타이드에 의하여 이동될 수 있다.
- [0041] 상기 논의된 변형은 유럽 특허 EP 0 586 520 B1 또는 EP 0 618 925 B1에 설명된 아미노, 플루오로, 메톡시 알콕시, 알킬, 아미노, 플루오로, 클로로, 브로모, CN, CF, 이미다졸, 카르복실레이트, 티오에이트, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 하위 알킬, 치환된 하위 알킬, 알카릴 또는 아랄킬, OCF<sub>3</sub>, OCN, O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>; 헤테로지클로알킬; 헤테로지클로알카릴; 아미노알킬아미노; 폴리알킬아미노 또는 치환된 실릴 등을 포함한 기에서 선택될 수 있다.
- [0042] siRNA의 이중 가닥 구조는 한쪽 면 또는 양쪽 면에서 평할 말단일 수 있다. 더 구체적으로, 이중 가닥 구조는 첫 번째 가닥의 5'-말단 및 두 번째 가닥의 3'-말단에 의하여 한정된 이중 가닥 구조의 측면에서 평할 말단일 수 있거나, 이중 가닥 구조는 첫 번째 가닥의 3'-말단 및 두 번째 가닥의 5'-말단에 의하여 한정된 이중 가닥 구조의 측면에서 평할 말단일 수 있다.
- [0043] 추가로, 두 가닥 중 적어도 하나는 5'-말단에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 오버행을 가질 수 있고, 오버행은 적어도 하나의 디옥시리보뉴클레오타이드로 구성될 수 있다. 가닥 중 적어도 하나는 또한 3'-말단에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 오버행을 선택적으로 가질 수 있다.
- [0044] siRNA의 이중 가닥 구조의 길이는 전형적으로 약 17 내지 21, 더 바람직하게는 18 또는 19 염기이다. 또한, 상기 첫 번째 가닥의 길이 및/또는 상기 두 번째 가닥의 길이는 서로서로 독립적으로 약 15 내지 약 23 염기, 17 내지 21 염기 및 18 또는 19 염기의 범위를 포함한 군에서 선택될 수 있다.
- [0045] 추가로, 상기 첫 번째 가닥과 표적 핵산 간의 상보성은 완전하거나, 또는 첫 번째 가닥과 표적 핵산 간에 형성된 듀플렉스는 적어도 15 뉴클레오타이드를 포함할 수 있는데, 여기서 상기 첫 번째 가닥과 상기 이중-가닥 구조를 형성하는 표적 핵산 간의 한 개의 불일치 또는 두 개의 불일치가 있다.
- [0046] 일부 경우에는, 첫 번째 가닥과 두 번째 가닥은 각각 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드의 그룹과 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 양쪽에 인접한 그룹을 포함하고, 변형된 각 그룹은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함하고

뉴클레오타이드의 각 양쪽에 인접한 그룹은 두 번째 가닥에 뉴클레오타이드의 양쪽에 인접한 그룹과 정렬된 첫 번째 가닥의 변형된 뉴클레오타이드의 각 그룹을 가진 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함하며, 첫 번째 가닥의 대부분의 말단 5' 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드의 그룹의 뉴클레오타이드이고, 두 번째 가닥의 대부분의 말단 3' 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 양쪽에 인접한 그룹의 뉴클레오타이드이다. 변형된 뉴클레오타이드의 각 그룹은 단일 뉴클레오타이드로 구성될 수 있고/있거나 뉴클레오타이드의 각 양쪽에 인접한 그룹은 단일 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다.

- [0047] 추가로, 첫 번째 가닥에 뉴클레오타이드의 양쪽에 인접한 그룹을 형성하는 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드의 그룹을 형성하는 뉴클레오타이드에 비해서 3' 방향으로 배열된 변형되지 않은 뉴클레오타이드이고, 두 번째 가닥에서 변형된 뉴클레오타이드의 그룹을 형성하는 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 양쪽에 인접한 그룹을 형성하는 뉴클레오타이드에 비해서 5' 방향으로 배열된 변형된 뉴클레오타이드인 것은 가능하다.
- [0048] 또한, siRNA의 첫 번째 가닥은 변형된 뉴클레오타이드의 8 내지 12, 바람직하게는 9 내지 11 그룹을 포함할 수 있고, 두 번째 가닥은 변형된 뉴클레오타이드의 7 내지 11, 바람직하게는 8 내지 10 그룹을 포함할 수 있다.
- [0049] 첫 번째 가닥과 두 번째 가닥은 루프 구조로 연결될 수 있고, 특히 폴리에틸렌 글리콜과 같은 비-핵산 폴리머로 구성될 수 있다. 대안적으로, 루프 구조는 핵산으로 구성될 수 있다.
- [0050] 또한, siRNA의 첫 번째 가닥의 5'-말단은 두 번째 가닥의 3'-말단에 연결될 수 있거나, 첫 번째 가닥의 3'-말단은 두 번째 가닥의 5'-말단에 연결될 수 있으며, 상기 연결은 전형적으로 10-2000 뉴클레오타이드 길이를 가진 핵산 링커를 통하여 이루어진다.
- [0051] 특히, 본 발명은 구조 A를 가진 화합물을 제공한다:
- [0052] 5' (N)<sub>x</sub> - Z 3' (안티센스 가닥)
- [0053] 3' Z'-(N')<sub>y</sub> 5' (센스 가닥)
- [0054] 여기서, N 및 N'는 그것의 당 잔기에서 변형되거나 변형되지 않을 수 있는 리보뉴클레오타이드이고, 각각 연속된 N 또는 N'는 공유결합에 의하여 다음 N 또는 N'에 연결된 올리고머이며;
- [0055] x와 y 각각은 19 내지 40의 정수이고;
- [0056] Z와 Z' 각각은 존재하거나 존재하지 않을 수 있는데, 존재한다면 dTdT이고 그것이 존재하는 가닥의 3' 말단에 공유결합되며;
- [0057] (N)<sub>x</sub>의 서열은 p53의 mRNA에 대한 안티센스 서열, 특히 표 A, B 및 C 중 어느 것에 존재하는 안티센스 서열 중 어느 것을 포함한다.
- [0058] 본 발명의 화합물은 공유결합을 통하여 연결된 복수의 뉴클레오타이드로 구성되는 것으로 당업자에게 쉽게 이해될 것이다. 이러한 각각의 공유결합은 각각의 가닥의 뉴클레오타이드 서열의 길이를 따라서 포스포디에스테르 결합, 포스포티오에이트 결합, 또는 이 둘의 조합일 수 있다. 다른 가능한 백본 변형은 특히 미국 특허 제5,587,361호; 제6,242,589호; 제6,277,967호; 제6,326,358호; 제5,399,676호; 제5,489,677호; 및 제5,596,086호에 설명된다.
- [0059] 특정 구체예에서, x와 y는 약 19 내지 약 27, 가장 바람직하게는 약 19 내지 약 23의 정수이다. 본 발명의 화합물의 특정 구체예에서, x는 y와 동일할 수 있고(즉, x=y), 바람직한 구체예에서, x=y=19 또는 x=y=21이다. 특히 바람직한 구체예에서, x=y=19이다.
- [0060] 본 발명의 화합물의 한 구체예에서, Z와 Z'는 모두 존재하지 않고; 다른 구체예에서, Z 또는 Z' 중 하나는 존재한다.
- [0061] 본 발명의 화합물의 한 구체예에서, 화합물의 리보뉴클레오타이드 모두는 그것들의 당 잔기에서 변형되지 않는다.
- [0062] 본 발명의 화합물의 바람직한 구체예에서, 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드는 그것의 당 잔기에서 변형, 바람직하게는 2' 위치에서 변형된다. 2' 위치에서의 변형은 바람직하게는 아미노, 플루오로, 메톡시, 알콕시 및 알킬기로 구성된 군 중에서 선택된 부분의 존재를 야기한다. 현재 가장 바람직한 구체예에서, 2' 위치에서의 부분은 메톡시이다(2'-O-메틸).
- [0063] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 변갈아 일어나는 리보뉴클레오타이드는 화합물의 안티센스와 센스 가닥 모두에서

변형된다. 특히 실시예에 사용된 siRNA는 2' O-Me기가 안티센스 가닥의 첫 번째, 세 번째, 다섯 번째, 일곱 번째, 아홉 번째, 열한 번째, 열세 번째, 열다섯 번째, 열일곱 번째 및 열아홉 번째 뉴클레오타이드에 존재하도록 변형되었고, 그와 동일한 변형, 즉 2'-O-Me기는 센스 가닥의 두 번째, 네 번째, 여섯 번째, 여덟 번째, 열 번째, 열두 번째, 열네 번째, 열여섯 번째 및 열여덟 번째 뉴클레오타이드에 존재하였다. 추가로, 본 발명에 따른 이들 특정 핵산의 경우에 첫 번째 스트레치는 첫 번째 가닥과 동일하고 두 번째 스트레치는 두 번째 가닥과 동일하며 이들 핵산은 또한 평활 말단이라는 것을 주의해야 한다.

[0064] 특히 바람직한 구체예에서, siRNA의 서열은 표 A에 있는 I5의 서열이다.

[0065] 본 발명의 한 바람직한 구체예에 따르면, siRNA 분자의 안티센스와 센스 가닥은 3'-말단에서만 인산화되고 5'-말단에서는 인산화되지 않는다. 본 발명의 다른 바람직한 구체예에 따르면, 안티센스와 센스 가닥은 3'-말단과 5'-말단 모두에서 인산화되지 않는다. 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에 따르면, 센스 가닥의 5' 위치에 있는 첫 번째 뉴클레오타이드는 생체내 5'-인산화의 어떤 가능성을 제거하도록 특이적으로 변형된다.

[0066] 본 발명의 화합물의 다른 구체예에서, 안티센스 가닥의 5' 및 3' 말단에 있는 리보뉴클레오타이드는 그것들의 당 잔기에서 변형되고, 센스 가닥의 5' 및 3' 말단에 있는 리보뉴클레오타이드는 그것들의 당 잔기에서 변형되지 않는다.

[0067] 본 발명은 세포에서 변형되지 않은 형태로 앞서 언급한 올리고리보뉴클레오타이드 중 어떤 것을 발현할 수 있는 벡터를 더 제공하는데, 그 후에 적합한 변형이 이루어질 수 있다.

[0068] 본 발명은 또한 담체, 바람직하게는 약학적으로 허용되는 담체에 본 발명의 하나 이상의 화합물을 포함한 조성물 제공한다. 이 조성물은 두 개 이상의 상이한 siRNA의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0069] 본 발명은 또한 사람 p53을 억제하기에 효과적인 양으로 본 발명의 하나 이상의 화합물에 공유결합 또는 비공유 결합된 본 발명의 상기 화합물 및 담체를 포함한 조성물을 제공한다. 이 조성물은 내인성 세포 복합체에 의하여 세포내에서 가공되어 본 발명의 하나 이상의 올리고리보뉴클레오타이드를 생성할 수 있다.

[0070] 본 발명은 세포에서 사람 p53의 발현을 하향조절하기에 효과적인 양으로 담체 및 본 발명의 하나 이상의 화합물을 포함한 조성물을 제공하는데, 이 화합물은 (N)<sub>x</sub>의 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함한다.

[0071] 추가로, 본 발명은 유전자 p53의 mRNA 전사체를 본 발명의 하나 이상의 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한 대조군에 비해서 50% 이상 유전자 p53의 발현을 하향조절하는 방법을 제공한다.

[0072] 한 구체예에서, 올리고리보뉴클레오타이드는 p53을 하향조절하는데, p53의 하향조절은 p53 기능의 하향조절, p53 폴리펩티드의 하향조절 및 p53 mRNA 발현의 하향조절을 포함한 군에서 선택된다.

[0073] 한 구체예에서, 화합물은 p53을 하향조절하는데, p53의 하향조절은 p53 기능의 하향조절(특히 천연 유전자/폴리펩티드의 공지된 상호작용자로 효소 분석 또는 결합 분석에 의하여 검사할 수 있다), p53 단백질의 하향조절(특히, 웨스턴 블롯, ELISA 또는 면역-침전에 의하여 검사할 수 있다) 및 p53 mRNA 발현의 하향조절(특히, 노던 블롯, 정량적 RT-PCR, 원위치(in-situ) 혼성화 또는 마이크로어레이 혼성화에 의하여 검사할 수 있다)을 포함한 군 중에서 선택된다.

[0074] 본 발명은 또한 p53 폴리펩티드의 상승된 수준을 수반하는 질환으로 고생하는 환자를 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 치료적 유효량으로 본 발명의 조성물을 환자에게 투여하여 환자를 치료하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명은 p53의 일시적 억제가 이로운 질환으로 고생하는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 화학치료 또는 방사선치료와 연관된 탈모증을 예방하기 위하여 종래의 화학치료 또는 방사선치료와 함께 종양의 치료를 위하여 사용된다. 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 급성신부전증의 치료를 위하여 사용된다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 심근경색, 발작 및 허혈과 같은 차단된 혈액 공급과 연관된 화상, 고열, 저산소증과 같은 손상과 연관된 다양한 스트레스의 결과로 p53이 활성화된 상태에서 사용된다. 본 발명의 siRNA 분자를 사용한 일시적 p53 억제는 중추신경계에서 p53-의존적 신경의 괴사, 즉 뇌 및 척수 손상의 감소 또는 제거, 이식 전 조직 또는 기관의 보존, 골수 이식을 위한 숙주의 준비, 발작하는 동안 신경의 손상의 감소 또는 제거 및 조직 노화의 억제에 치료적으로 효과적일 수 있다.

[0075] 본 발명은 또한 탈모증 또는 급성신부전증으로 고생하는 환자에서와 같이, p53 폴리펩티드의 상승된 수준을 수반한 질환의 치료용 조성물의 제조를 위하여 본 발명의 하나 이상의 화합물의 치료적 유효량의 사용을



제공한다.

- [0076] 더 구체적으로, 본 발명은 한 가닥이 5'에서 3'으로 SEQ ID NO: 3-25(표 A, 센스 가닥) 또는 SEQ ID NO:49-119(표 B, 센스 가닥) 또는 SEQ ID NO:191-253 (표 C, 센스 가닥) 또는 그것의 동족체에 나타난 서열을 가진 연속적 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공하는데, 각 말단 영역에 있는 뉴클레오타이드의 2개 까지에서 염기가 변경된다.
- [0077] 올리고뉴클레오타이드의 말단 영역은 19-mer 서열에서 1-4 및/또는 16-19 염기 및 21-mer 서열에서 1-4 및/또는 18-21 염기를 말한다.
- [0078] 추가로, 본 발명은 한 가닥이 SEQ ID NO:26-48 (표 A, 안티센스 가닥) 또는 SEQ ID NO:120-190 (표 B, 안티센스 가닥) 또는 SEQ ID NO:254-316 (표 C, 안티센스 가닥) 또는 그것의 동족체에 나타난 서열을 가진 연속적 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공하는데, 각 말단 영역에 있는 뉴클레오타이드의 2개 까지에서 염기가 변경된다.
- [0079] 본 발명의 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 표 D에서 사람 p53 올리고뉴클레오타이드 일련번호 3, 5, 20 및 23이고, 표 E에서 마우스 p53 올리고뉴클레오타이드 일련번호 1, 11, 12, 14, 17 및 18이다. 이들은 표 A에서 일련번호 3, 5, 20 및 23 (사람) 및 또한 11, 12, 14, 17 및 18 (마우스)와 동일하다. 본 발명의 가장 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 표 A에서 일련번호 23의 서열을 가진 사람 p53 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0080] 현재 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명은 평활 말단 19-mer 올리고뉴클레오타이드, 즉,  $x=y=19$ 이고 Z 및 Z'는 모두 존재하지 않는다. 올리고뉴클레오타이드 분자는 센스 및 안티센스 가닥 모두의 3' 말단에서 인산화되거나 전혀 인산화되지 않거나; 또는 생체내 5'-인산화의 어떤 가능성도 제거하도록 특이적으로 변형된 센스 가닥의 5' 위치에 첫 번째 뉴클레오타이드를 가진다. 번갈아 일어나는 리보뉴클레오타이드는 안티센스 및 센스 가닥 모두의 2' 위치에서 변형되는데, 2' 위치에서의 부분은 메톡시(2'-O-메틸)이고, 안티센스 가닥의 5' 및 3' 말단의 리보뉴클레오타이드는 그것들의 당 잔기에서 변형되고, 센스 가닥의 5' 및 3' 말단의 리보뉴클레오타이드는 그것들의 당 잔기에서 변형되지 않는다. 현재 가장 바람직한 이러한 화합물은 표 A에서 일련번호 23을 가진 서열을 포함한 이러한 변형된 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0081] 본 발명의 한 양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이중가닥 구조를 포함하는데, 이러한 이중 가닥 구조는
- [0082] 첫 번째 및 두 번째 가닥을 포함하고,
- [0083] 첫 번째 가닥은 연속적 뉴클레오타이드의 첫 번째 스트레치를 포함하고 두 번째 가닥은 연속적 뉴클레오타이드의 두 번째 스트레치를 포함하며, 두 번째 가닥은 p53을 코딩하는 핵산 서열에 일치하거나 상보적이다.
- [0084] 한 구체예에서, 첫 번째 스트레치 및/또는 두 번째 스트레치는 약 14 내지 40 뉴클레오타이드, 바람직하게는 약 18 내지 30 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 약 19 내지 27 뉴클레오타이드 그리고 가장 바람직하게는 약 19 내지 23 뉴클레오타이드, 특히 약 19 내지 21 뉴클레오타이드를 포함한다. 이러한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 길이가 17-40 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0085] 추가로, 본 발명에 따른 다른 핵산은 표에 있는 폴리뉴클레오타이드 중 어떤 하나의 적어도 14 연속 뉴클레오타이드 및 더 바람직하게는 상기에 설명된 첫 번째 스트레치와 두 번째 스트레치로 구성된 이중 가닥 구조의 어느 말단에 14 연속 뉴클레오타이드 염기쌍을 포함한다.
- [0086] 한 구체예에서, 첫 번째 스트레치는 올리고뉴클레오타이드의 적어도 14 연속 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는데, 이러한 올리고뉴클레오타이드는 SEQ. ID. No 3-316를 포함한 군, 바람직하게는 일련번호 3, 5, 20 또는 23(사람) 중 어느 것의 서열을 가지거나 표 A에 있는 일련번호 11, 12, 14, 17 및 18(마우스) 중 어느 것의 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드를 포함한 군, 더 바람직하게는 표 A에 있는 일련번호 3, 5, 20 또는 23 중 어느 것의 서열을 가진 군에서 선택된다.
- [0087] 추가로, 본 발명에 따른 다른 핵산은 SEQ. ID. NO. 3 내지 316 중 어느 것의 적어도 14 연속 뉴클레오타이드, 및 더 바람직하게는 상기에 설명된 첫 번째 스트레치 및 두 번째 스트레치로 구성된 이중 가닥 구조 중 어느 말단에 14 연속 뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명에 따른 핵산 및 특히 본 발명에 따라서 이러한 핵산을 형성하는 각 스트레치의 잠재적 길이에 관해서는, 각 측면에 대한 p53의 코딩 서열에 비해서 약간의 이동이 가능한데, 이러한 이동은 양쪽 방향에서 1, 2, 3, 4, 5 및 6 뉴클레오타이드 까지일 수 있고, 그렇게 생성된 이중 가닥 핵산 분자는 또한 본 발명 내에 있다.

- [0088] 전달: 포유동물 세포로의 siRNA의 향상되고 개선된 전달을 특히 목적으로 하는 전달 시스템이 개발되었는데, 예를 들면 문헌(Shen et al (FEBS letters 539:111-114 (2003)), Xia et al., Nature Biotechnology 20:1006-1010 (2002), Reich et al., Molecular Vision 9:210-216 (2003), Sorensen et al. (J.Mol.Biol. 327:761-766 (2003), Lewis et al., Nature Genetics 32:107-108 (2002) 및 Simeoni et al., Nucleic Acids Research 31, 11:2717-2724 (2003))을 참조하라. siRNA는 최근 영양류에서 억제제를 위하여 성공적으로 사용되어 왔는데, 더 상세한 것은 문헌(Tolentino et al., Retina 24(1) February 2004 I 132-138)을 참조하라. siRNA에 대한 흡입용 제제는 Davis et al.의 미국 특허출원 제2004/0063654호에 설명된다. 콜레스테롤-콘주게이션된 siRNA(및 다른 스테로이드 및 지질 콘주게이션된 siRNA)는 전달을 위해 사용될 수 있는데, 문헌(Soutschek et al Nature 432:173-177(2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs; 및 Lorenz et al. Bioorg. Med. Chemistry. Lett. 14:4975-4977 (2004) Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells)을 참조하라.
- [0089] 본 발명의 siRNA 또는 약학적 조성물은 각 환자의 임상 상태, 치료될 질환, 투여 부위 및 방법, 투여 스케줄, 환자 연령, 성, 체중 및 의사에게 공지된 다른 요소를 고려하여, 좋은 의료 관행에 따라서 투여된다.
- [0090] 따라서 본원의 목적상 "치료적 유효량"은 당업계에 공지된 이러한 고려사항에 의하여 결정된다. 투여량은, 한정하는 것은 아니지만, 당업자에 의하여 적합한 측정치로 선택된 개선된 생존율 또는 더 빠른 회복, 또는 증상 및 다른 지표의 개선 또는 제거를 포함한 개선을 달성하기에 효과적이어야 한다. 본 발명의 화합물은 투여의 종래 경로 중 어느 것에 의하여 투여될 수 있다. 화합물은 화합물 또는 약학적으로 허용되는 염으로 투여될 수 있고 단독으로 또는 약학적으로 허용되는 담체, 용매, 희석제, 첨가제, 보조제 및 비히클과 조합하여 활성 성분으로 투여될 수 있다. 화합물은 경구, 피하 또는 비경구, 예를 들면 척수경막내 및 주입 기술뿐만 아니라 정맥내, 동맥내, 근육내, 복막내, 및 비강내 투여로 투여될 수 있다. 또한 화합물의 임플란트는 유용하다. 액체 형태는 주사용으로 제조될 수 있는 데, 이 용어는 피하, 경피, 정맥내, 근육내, 척수경막내 및 투여의 다른 비경구 경로를 포함한다. 액체 조성물은 유기 보조용제, 수성 또는 오일 현탁액, 식용 오일과의 에멀션뿐만 아니라 유사한 약학적 비히클을 갖거나 갖지 않는 수성용액을 포함한다. 또한, 어떤 상황 하에서, 본 발명의 신규 치료에 사용하기 위한 조성물은 비강내로 투여하는 것과 같이 에어로졸로 형성될 수 있다. 치료받는 환자는 온혈동물이고, 특히 사람을 포함한 포유동물이다. 약학적으로 허용되는 담체, 용매, 희석제, 첨가제, 보조제 및 비히클뿐만 아니라 임플란트 담체는 일반적으로 본 발명의 활성 성분과 반응하지 않는 비활성, 비독성 고체 또는 액체 필터, 희석제 또는 캡슐에 넣는 물질을 말하고 이것들은 리포솜 및 미소구체를 포함한다. 본 발명에 유용한 전달 시스템의 예는 미국 특허 제5,225,182호; 제5,169,383호; 제5,167,616호; 제4,959,217호; 제4,925,678호; 제4,487,603호; 제4,486,194호; 제4,447,233호; 제4,447,224호; 제4,439,196호; 및 제4,475,196호를 포함한다. 이러한 많은 다른 임플란트, 전달 시스템, 및 모듈은 당업자에게 주지되어 있다. 본 발명의 한 특정 구체예에서, 외용 및 경피형 제제가 특히 바람직하다.
- [0091] 대체로, 사람을 위한 화합물의 활성 투여량은 1-4주 또는 더 긴 기간 동안 하루에 1회 투여 또는 하루에 2회 또는 3회 또는 그 이상 투여하는 섭생법으로, 하루에 1 ng/kg 내지 약 20-100 mg/체중kg, 바람직하게는 하루에 약 0.01 mg 내지 약 2-10 mg/체중kg의 범위이다.
- [0092] 본 발명에 따라서 신장 근위세뇨관에 있는 표적 세포에 siRNA 화합물을 전달하는 것은 급성신부전증의 치료에 특히 효과적이다. 이론에 얽매이지 않고, 이것은 보통 siRNA 분자가 신장 근위세뇨관의 세포를 통하여 몸에서 배출된 사실 때문일 수 있다. 따라서, 노출된 siRNA 분자는 자연적으로 급성신부전증의 치료를 위하여 표적이 되는 세포에 집중된다.
- [0093] 본원에 사용된 용어 "치료"는 질환과 연관된 증상을 개선하고, 증증을 완화하거나 질환을 치료하거나, 질환이 발병하는 것을 방지하는 데 효과적인 치료 물질의 투여를 말한다.
- [0094] 특정 구체예에서, 투여는 정맥내 투여를 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 투여는 국소 또는 국부 투여를 포함한다.
- [0095] 본 발명의 다른 양태는 환자를 치료하기 위하여 본 발명의 약학적 조성물을 치료적 유효량으로 환자에게 투여하는 단계를 포함한, 탈모증 또는 급성신부전증 또는 p53 폴리펩티드의 상승된 수준을 수반한 장애로 고생하는 환자를 치료하는 방법이다.
- [0096] 탈모증의 치료를 위한 바람직한 구체예에서, 투여는 국소 또는 국부 투여를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 투여는 경피 투여를 포함한다. 특정 구체예에서, 약학적 조성물을 환자의 두피에 바른다. ARF의 치료를 위

한 바람직한 구체예에서, 투여는 정맥내, 동맥내 또는 복막내 투여를 포함한다.

- [0097] 본 발명의 다른 양태는 환자를 치료하기 위하여 본 발명의 약학적 조성물을 치료적 유효량으로 환자에게 투여하는 단계를 포함한, 탈모증을 야기하는 치료를 받는 환자에게서 탈모증을 예방하는 방법이다.
- [0098] 본 발명의 다른 양태에서, 상기 올리고리보뉴클레오티드(SEQ ID NO:3-316) 중 어느 것 또는 벡터 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한 약학적 조성물이 제공된다. 본 발명의 다른 양태는 p53의 상승된 수준을 수반한 탈모증 또는 급성신부전증 또는 장애로 고생하는 환자의 회복을 촉진하는 의학의 제조를 위한 상기 올리고리보뉴클레오티드(SEQ ID NO:3-316) 중 어느 것 또는 벡터의 치료적 유효량의 사용이다.
- [0099] 바람직한 구체예에서, 의학은 국소 의학을 포함한다. 특정 구체예에서, 의학은 환자의 두피에 바른다. 다른 바람직한 구체예에서, 의학은 경피 투여를 포함한다.
- [0100] 본 발명의 상기 모든 양태에서, 탈모증은 화학치료 또는 방사선치료에 의하여 유도될 수 있으며, 그래서 "독성 탈모증"이라고 불린다. 더 상세히 말하면, 독성 탈모증은 감마선 조사와 같은 조사 또는 에토포시드, 5-FU (5-플루오로우라실), cis-플라티늄, 독소루비신, 빈카 알칼로이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노레빈, 텍솔, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 클로람부실, 부술판, 메클로레타민, 미토마이신, 다카르바진, 카보플라티늄, 티오테파, 다우노루비신, 이다루비신, 미톡산트론, 블레오마이신, 에스페라미신 A1, 닥티노마이신, 플리카마이신, 카르무스틴, 로무스틴, 타우로무스틴, 스트렙토조신, 멜팔란, 프로카바진, 텍사메타손, 프레드니손, 2-클로로디옥시아테노신, 시타라빈, 도세탁셀, 플루다라빈, 켈시타빈, 허셉틴, 히드록시우리아, 이리노테칸, 메토티렉세이트, 옥살리플라틴, 리톡신, 세무스틴, 에피루비신, 에토포시드, 토무텍스 및 토포테칸과 같은 화학치료제, 또는 이들 화학치료제의 화학적 유사체에 의하여 야기될 수 있다. 탈모를 야기할 가능성이 높은 화학치료제는 cis-플라티늄, 시타라빈, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 이포스파미드 및 빈크리스틴이다.
- [0101] 본 발명의 화합물은 바람직하게는 급성신부전증, 특히 수술 후 환자에서 허혈로 인한 급성신부전증, 및 시스플라틴 투여와 같은 화학치료 처치로 인한 급성신부전증 또는 패혈증 연관된 급성신부전증을 치료하는 데 사용된다. 본 발명의 화합물의 바람직한 사용은 주요 심장 수술 또는 혈관 수술을 받은 고위험의 환자에서 급성신부전증의 예방을 위한 것이다. 급성신부전증으로 진행될 고위험이 있는 환자는 Cleveland Clinic algorithm 또는 US Academic Hospitals (QMMI) 및 Veterans' Administration(CICSS)에 의하여 개발된 방법과 같은 다양한 기록 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 본 발명의 화합물의 다른 바람직한 사용은 신장 이식 환자에서 허혈성 급성신부전증의 예방 또는 화학치료를 받은 환자에서 독성 급성신부전증의 예방을 위한 것이다. 다른 사용은 상처 치료, 급성간부전, 시스플라틴-유도된 난청(아마도 국소적으로), 조혈 줄기세포의 생체외 증식, siRNA 용액을 흡수함으로써(아마도 전기천공법에 의하여) 이식하기 전에 기증자 기관/조직의 보존 및 이식 후 이식 조직 생존의 계속적인 개선을 위한 것이다. 다른 지표는 발작, 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 독소루비신-유도된 심장독성, 심근경색/심부전 및 (전신투여에 의한) 이식 후 이식 조직 생존의 개선일 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 이들 모든 장애들은 p53 폴리펩티드의 상승된 수준을 수반한다.
- [0102] 본 발명은 또한 약학적 조성물을 제조하는 과정을 제공하는 데, 이 과정은:
- [0103] 본 발명의 하나 이상의 이중 가닥 화합물을 얻는 단계; 및
- [0104] 상기 화합물을 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0105] 본 발명은 또한 본 발명의 하나 이상의 화합물을 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계를 포함한, 약학적 조성물을 제조하는 과정을 제공한다.
- [0106] 바람직한 구체예에서, 약학적 조성물의 제조에 사용된 화합물은 담체와 약학적 유효량으로 혼합된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 화합물은 스테로이드 또는 지질 또는 다른 적합한 분자, 예를 들면 콜레스테롤에 콘쥬게이션된다.
- [0107] 뉴클레오티드의 변형 또는 유사체는 뉴클레오티드의 치료적 특성을 개선하도록 도입될 수 있다. 개선된 특성은 뉴클레아제 저항성 및/또는 세포막을 투과하는 증가된 능력을 포함한다.
- [0108] 따라서, 본 발명은 또한 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 본 발명의 모든 유사체, 또는 변형을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 이러한 변형은 뉴클레오티드의 염기 부분, 뉴클레오티드의 당 부분, 및/또는 뉴클레오티드의 인산 부분과 관련된다.

- [0109] 본 발명의 구체예에서, 뉴클레오티드는 자연적으로 발생하는 또는 합성적으로 변형된 염기 중에서 선택될 수 있다. 자연적으로 발생하는 염기는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실을 포함한다. 올리고뉴클레오티드의 변형된 염기는 이노신, 크산틴, 히포크산틴, 2-아미노아데닌, 6-메틸-, 2-프로필- 및 다른 알킬-아데닌, 5-할로 우라실, 5-할로 시토신, 6-아자 시토신 및 6-아자 티민, 슈도 우라실, 4-티우라실, 8-할로 아데닌, 8-아미노아데닌, 8-티올 아데닌, 8-티올알킬 아데닌, 8-히드록실 아데닌 및 다른 8-치환된 아데닌, 8-할로 구아닌, 8-아미노 구아닌, 8-티올 구아닌, 8-티올알킬 구아닌, 8-히드록실 구아닌 및 다른 치환된 구아닌, 다른 아자 및 데아자 아데닌, 다른 아자 및 데아자 구아닌, 5-트리플루오로메틸 우라실 및 5-트리플루오로 시토신을 포함한다.
- [0110] 게다가, 뉴클레오티드의 구조가 근본적으로 변경되고 치료용 또는 실험용 시약으로 보다 적합화된 뉴클레오티드의 유사체를 제조할 수 있다. 뉴클레오티드 유사체의 예는 DNA(또는 RNA) 중의 디옥시리보스(또는 리보스) 인산 백본이 펩티드에서 발견된 것과 유사한 폴리아미드 백본으로 대체된 펩티드 핵산(PNA)이다. PNA 유사체는 효소에 의한 분해에 내성이 있고 생체내 및 시험관내에서 수명을 연장한 것으로 나타났다. 또한, PNA는 DNA 분자보다는 상보적 DNA 서열에 더 강하게 결합한 것으로 나타났다. 이 발견은 PNA 가닥과 DNA 가닥 간의 전하 반발력의 결핍 때문이다. 올리고뉴클레오티드에 행해질 수 있는 다른 변형은 폴리머 백본, 고리형 백본, 또는 비고리형 백본을 포함한다.
- [0111] 한 구체예에서, 변형은 인산 부분의 변형인데, 변형된 인산 부분은 포스포티오에이트를 포함한 군에서 선택된다.
- [0112] 본 발명의 화합물은 리보뉴클레익(또는 디옥시리보뉴클레익) 올리고뉴클레오티드의 합성을 위한 당업계에 주지된 방법 중 어느 것에 의하여 합성될 수 있다. 이러한 합성은 다른 것들 중에서 문헌(Beaucage S. L. 및 Iyer R.P., *Tetrahedron* 1992; 48: 2223-2311, Beaucage S.L. 및 Iyer R.P., *Tetrahedron* 1993; 49: 6123-6194 및 Caruthers M.H. et. al., *Methods Enzymol.* 1987; 154: 287-313)에 설명되고; 티오에이트의 합성은 다른 것들 중에서 문헌(Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 1985; 54: 367-402)에 설명되며, RNA 분자의 합성은 문헌(Sproat B., in *Humana Press* 2005 edited by Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31)에 설명되고 각 하류 과정은 다른 것들 중에서 문헌(Pingoud A. et. al., in *IRL Press* 1989 edited by Oliver R.W.A.; Kap. 7: 183-208 및 Sproat B., in *Humana Press* 2005 edited by Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 (상기 참조))에 설명된다.
- [0113] 다른 합성 과정, 예를 들면 문헌(Usman et al., 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7845; Scaringe et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 5433; Wincott et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684; 및 Wincott et al., 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59)에 설명된 과정은 당업계에 공지되어 있고, 이들 과정은 공통된 핵산 보호기 및 결합기, 예를 들면 5' 말단에서의 디메톡시트리틸 및 3' 말단에서의 포스포라미드트를 이용할 수 있다. 변형된(예를 들면, 2'-O-메틸화된) 뉴클레오티드 및 변형되지 않은 뉴클레오티드는 원하는 대로 혼입된다.
- [0114] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 예를 들면 리게이션(Moore et al., 1992, *Science* 256, 9923; Draper et al., 국제 PCT 공보 W093/23569; Shabarova et al., 1991, *Nucleic Acids Research* 19, 4247; Bellon et al., 1997, *Nucleosides & Nucleotides*, 16, 951; Bellon et al., 1997, *Bioconjugate Chem.* 8, 204)에 의하여, 또는 합성 및/또는 탈보호 후 혼성화에 의하여 개별적으로 합성되고 합성 후에 서로 결합될 수 있다.
- [0115] 상업적으로 구입가능한 기계(특히 Applied Biosystems에서 구입가능)를 사용할 수 있으며, 본원에 개시된 서열에 따라서 올리고뉴클레오티드를 제조한다. 화학적으로 합성된 단편의 오버랩되는 쌍은 당업계에 주지된 방법을 사용하여 리게이션될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 제6,121,426호를 참조하라). 가닥은 개별적으로 합성되고 그 후 튜브에서 서로 어닐링된다. 그 다음, 이중 가닥 siRNA는 HPLC에 의하여 어닐링되지 않은(예를 들면, 그것들 중 한 개의 초과 때문에) 단일 가닥 올리고뉴클레오티드에서 분리된다. 본 발명의 siRNA 또는 siRNA 단편과 관련하여, 둘 이상의 이러한 서열은 본 발명에 사용하기 위하여 합성되고 서로 연결될 수 있다.
- [0116] 본 발명의 화합물은 또한 미국 특허출원 공보 US2004/0019001 (McSwiggen)에 설명된 탠덤 합성 방법을 통하여 합성될 수 있는데, 두 siRNA 가닥은 단일 연속 올리고뉴클레오티드 단편 또는 연속적으로 절단되는 절단가능한 링커에 의하여 분리된 가닥, 또는 혼성화하고 siRNA 듀플렉스의 정제를 허용하는 가닥으로 합성된다. 링커는 폴리뉴클레오티드 링커 또는 비-뉴클레오티드 링커일 수 있다.
- [0117] 본 발명은 또한 본원에 언급된 질환 또는 상태 중 어느 것의 치료를 위한 두 개 이상의 siRNA 분자를 포함한 약학적 조성물을 제공하는 데, 상기 두 분자는 동등하거나 그렇지 않으면 이로운 활성을 발생하는 양으로 약학적 조성물에서 물리적으로 서로 혼합될 수 있거나, 또는 2-100, 바람직하게는 2-30 뉴클레오티드 범위의 길이의 핵산 링커에 의하여 공유결합 또는 비공유결합되거나, 또는 서로 연결될 수 있다. 한 구체예에서, siRNA 분자는



본원에 설명된 이중 가닥 핵산 구조로 구성되는데, 두 siRNA 서열은 표 A-C, 바람직하게는 표 A, ID No: 3, 5, 20 및 23 (사람 서열) 및 11, 12, 14, 17 및 18 (마우스 서열) 중에서 선택된다.

- [0118] 다른 구체예에서, siRNA는 이중 가닥 핵산 구조로 구성되는데, 첫 번째 siRNA 서열은 표 A-C, 바람직하게는 표 A, ID No: 3, 5, 20 및 23 (사람 p53 서열) 또는 11, 12, 14, 17 및 18 (마우스 p53 서열) 중에서 선택되고, 두 번째 siRNA 분자는 아포토시스 촉진 유전자를 표적으로 함으로써, 이로써 활성을 제공한다. 2 이상의 siRNA 서열을 포함한 텐덤 이중 가닥 구조는 세포내에서 가공되어 2 이상의 다른 siRNA를 형성한다. 이러한 두 번째 siRNA 분자는 바람직하게는 아포토시스 촉진 유전자를 표적으로 하는 siRNA 분자이다.
- [0119] siRNA 분자는 공유결합 또는 비공유결합되거나 또는 링커에 의하여 연결되어 텐덤 siRNA 분자를 형성한다. 두 siRNA 서열을 포함한 이러한 텐덤 siRNA 분자는 전형적으로 길이가 38-150 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 길이가 38 또는 40-60 뉴클레오타이드이고, 따라서 두 개 이상의 siRNA 서열이 텐덤 분자에 포함된다면 더 길어진다. 또한 내부 세포 가공을 통하여 생성된 siRNA를 코딩하는 두 개 이상의 더 긴 서열로 구성된 더 긴 텐덤 분자, 예를 들면 긴 dsRNA는 두 개 이상의 shRNA를 코딩하는 텐덤 분자와 같이 관찰된다. 또한 이러한 텐덤 분자는 본 발명의 일부인 것으로 고려된다.
- [0120] p53을 표적으로 하는 siRNA 분자는 약학적 조성물 중의 주요 활성 성분이거나, 두 개 이상의 siRNA를 함유한 약학적 조성물의 한 활성 성분일 수 있으며(또는 두 개 이상의 siRNA를 코딩하거나 또는 내생적으로 생성하는 분자, 분자들의 혼합물 또는 두 개 이상의 siRNA를 코딩하는 하나 이상의 텐덤 분자), 상기 약학적 조성물은 또한 하나 이상의 추가 유전자를 표적으로 하는 하나 이상의 추가 siRNA 분자로 구성된다. p53 및 상기 추가 유전자(들)의 동시적 억제에는 아마도 본원에 개시된 질환의 치료를 위한 추가적 또는 상승작용적 효과를 가질 것이다.
- [0121] 구체적 예에서, 본원에 개시된 질환의 치료를 위한 약학적 조성물은 하기 화합물의 조합으로 구성될 수 있다: 1) p53 siRNA 및 Fas siRNA; 2) p53 siRNA 및 Bax siRNA; 3) p53 siRNA 및 Noxa siRNA; 4) p53 siRNA 및 Puma siRNA; 5) p53 siRNA 및 RTP801 siRNA; 6) p53 siRNA 및 PIDD siRNA; 7) p53 siRNA, Fas siRNA 및 트리머 또는 폴리머를 형성하는 RTP801 siRNA, Bax siRNA, Noxa siRNA 또는 Puma siRNA 또는 PIDD siRNA 중 어느 것(즉, 세 siRNA를 코딩하는 텐덤 분자). p53 siRNA와 조합되는 아포토시스 촉진 유전자의 다른 바람직한 선택은 TNF  $\alpha$ , 캐스파제 2, 캐스파제 3, 캐스파제 9, E2F1, 및 PARP-I이다. 본 발명에 따른 바람직한 조합은 p53 siRNA와 RTP801 siRNA이다(PCT 특허출원 PCT/EP 2005/008891).
- [0122] 추가로, p53 siRNA 또는 p53 siRNA를 포함하거나 코딩하는 어떤 핵산 분자는 본원에 개시된 질환의 치료를 위한 향상된 표적화를 달성하기 위하여 표적 세포에 발현된 세포 표면 내재화된 분자에 대한 항체에 (공유 또는 비공유)결합할 수 있다. 예를 들면, 항-Fas 항체(바람직하게는 중성화 항체)는 p53 siRNA 분자와 조합될 수 있다.
- [0123] 본 발명의 화합물은 직접 또는 바이러스성 또는 비-바이러스성 벡터로 전달될 수 있다. 직접 전달할 때, 서열을 일반적으로 뉴클레아제 내성이게 만든다. 대안적으로, 서열은 발현 카세트 또는 구성체에 혼입되어 서열이 본원의 하기에 논의되는 바와 같이 세포에서 발현될 수 있다. 일반적으로 구성체는 적합한 조절 서열 또는 프로모터를 함유하여 서열이 표적 세포에서 발현되게 한다. 본 발명의 화합물의 전달에 선택적으로 사용되는 벡터는 상업적으로 구입가능하며, 당업자에게 공지된 방법에 의하여 본 발명의 화합물의 전달의 목적상 변형될 수 있다.
- [0124] 또한 스템 영역이 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 서열을 포함한, 하나 이상의 스템 루프 구조를 포함한 긴 올리고뉴클레오타이드(전형적으로 길이가 25-500 뉴클레오타이드)는 담체, 바람직하게는 약학적으로 허용되는 담체로 전달될 수 있고, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드인 하나 이상의 더 작은 이중 가닥의 올리고뉴클레오타이드(siRNA)를 생성하는 내인성 세포 복합체(예를 들면, 전술한 DROSHA 및 DICER에 의하여)에 의하여 세포내에서 가공될 수 있는 것으로 파악된다. 이 올리고뉴클레오타이드를 텐덤 shRNA 구성체라고 부를 수 있다. 이 긴 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 스템 루프 구조를 포함한 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드이고, 각 스템 영역은 p53 유전자의 센스 및 대응되는 안티센스 siRNA 서열을 포함하는 것으로 파악된다. 특히, 이 올리고뉴클레오타이드는 표 A, B 또는 C 중 어느 하나에 도시된 센스 및 안티센스 siRNA 서열을 포함하는 것으로 파악된다.
- [0125] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드"는 폴리펩티드뿐만 아니라 올리고펩티드, 펩티드 및 완전한 단백질을 말한다.
- [0126] **p53 비활성화 화합물의 스크리닝:**
- [0127] 본 발명의 화합물 및 조성물의 일부는 p53의 활성을 조절하는 화합물, 특히 탈모증 또는 급성신부전증 또는 p53 폴리펩티드의 상승된 수준을 수반한 장애를 조절하는 화합물을 확인하고 분리하기 위한 스크리닝 분석에 사용될 수 있다. 스크리닝되는 화합물은 특히 소 화학분자 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 물질을 포함한다.

[0128] p53 폴리펩티드 활성화에 대한 본 발명의 화합물의 억제적 활성 또는 p53에 대한 본 발명의 결합은 예를 들어 추가 화합물이 p53 억제를 위하여 본 발명의 올리고뉴클레오티드와 경쟁하는 경우, 또는 추가 화합물이 상기 억제를 구조하는 경우 추가 화합물과 p53 폴리펩티드의 상호작용을 결정하는 데 사용될 수 있다. 억제 또는 활성화는 특히 p53 폴리펩티드의 활성화의 생성물을 위한 분석 또는 방사선 또는 형광 경쟁 분석에서 p53 폴리펩티드로부터 결합 화합물의 전치와 같은 다양한 수단에 의하여 시험할 수 있다.

[0129] 본 발명은 실시예와 관련하여 아래에서 상세하게 설명되지만, 이것에 한정된 것으로 고려되지 않는다.

[0130] 본원에서 어떤 문헌의 인용은 이러한 문헌이 타당한 선행 기술이거나 본 출원의 어떤 청구항의 특허가능성에 대하여 고려하는 자료라는 것을 승인하는 의도는 아니다. 어떤 문헌의 내용 또는 날짜에 대한 어떤 진술은 출원시의 출원인에 대한 정보에 기초하며 이러한 진술의 정확성에 대하여 승인하는 것은 아니다.

## 도면

### 도면1

사람 종양 단백질 p53 (리-프라우메니 증후군) (TP53), mRNA  
gi|8400737|ref|NM\_000546.2.

```

Hum-TP53 1  ACTTGTGTCG GCGACTGTCC AGCTTTGTGC CAGGAGCCTC GCAGGGGTTG ATGGGATTGG GGTTTTCCCC 70
Hum-TP53 71  TCCCATGTGC TCAAGACTGG CGCTAAAAGT TTTGAGCTTC TCAAAAGTCT AGAGCCACCG TCCAGGGAGC 140
Hum-TP53 141 AGGTAGCTGC TGGGCTCCGG GGACACTTTG CGTTCGGGCT GGGAGCGTGC TTTCACGAC GGTGACAGCG 210
Hum-TP53 211 TTCCCTGGAT TGGCAGCCAG ACTGCTTCC GGTCACTGC CATGGAGGAG CCGCAGTCAG ATCCTAGCGT 280
Hum-TP53 281 CGAGCCCCCT CTGAGTCAGG AAACATTTTC AGACCTATGG AAACACTTTC CTGAAACAA CTTCTGTGTC 350
Hum-TP53 351 CCCTTGCGGT CCCAAGCAAT GGATGATTG ATGCTGTCCC CGGACGATAT TGAACAAATG TTCACCTGAG 420
Hum-TP53 421 ACCCAGGTCC AGATGAAGCT CCCAGAATGC CAGAGGCTGC TCCCGCGTG GCCCTGCAC CAGCAGCTCC 490
Hum-TP53 491 TACACCGGCG GCCCTGCA CAGCCCCCTC CTGGCCCTGT TCATCTTCTG TCCCTTCCCA GAAACACTAC 560
Hum-TP53 561 CAGGGCAGCT ACGTTTCCG TCTGGGCTTC TTGCATTCTG GGCAGCCAA GTCTGTGACT TGCACGTACT 630
Hum-TP53 631 CCCCTGCCCT CAACAGATG TTTTGCCAAC TGGCCAAGAC CTGCCCTGTG CAGCTGTGGG TTGATTCCAC 700
Hum-TP53 701 ACCCCGCGCC GGCACCCGCG TCCGCGCCAT GGCATCTAC AAGCAGTCAC AGCAGATGAC GGAAGTTGTG 770
Hum-TP53 771 AGGCGCTGCC CCCACCATGA GCGCTGCTCA GATAGCGATG GTCTGGCCCC TCCTCAGCAT CTTATCCGAG 840
Hum-TP53 841 TGGAAAGAAA TTTGCGTGTG GAGTATTGAG ATGACAGAAA CACITTTTGA CATAGTTGG TGGTCCCTTA 910
Hum-TP53 911 TGAGCGCGCT GAGGTGGCT CTGACTGTAC CACCATCCAC TACAACACCA TGTGTAAACG TTCTGCAATG 980
Hum-TP53 981 GCGCGCATGA ACCGAGGCC CATCCTACC ATCATCACAC TGGAAAGACT CAGTGGTAAT CTACTGGGAC 1050
Hum-TP53 1051 GGAACAGCTT TGAGGTGCT GTTTGTGCT GTCTGGGAG AGACCGGCGC ACAGAGGAAG AGAATCTCCG 1120
Hum-TP53 1121 CAAGAAAGGG GAGCCTCACC ACGAGCTGCC CCCAGGGAGC ACTAAGCGAG CACTGCCCAA CAACACCAGC 1190
Hum-TP53 1191 TCCTCTCCCC AGCCAAAGAA GAAACCACTG GATGAGAAAT ATTTCACCT TCAGATCCGT GGGCGTGAGC 1260
Hum-TP53 1261 GCTTCGAGAT GTTCCGAGAG CTGAATGAGG CCTTGGAAT CAAGGATGCC CAGGCTGGGA AGGAGCCAGG 1330
Hum-TP53 1331 GGGGAGCAGG GCTCACTCCA GCCACCTGAA GTCCAAAAG GGTCACTCTA CCTCCGCA TAAGAAATCT 1400
Hum-TP53 1401 ATGTTCAAGA CAGAGGGGCC TGACTCAGAC TGAATCTCT CACTTCTGT TCCCACTGA CAGCCTCCA 1470
Hum-TP53 1471 CCCCATCTC TCCTCCCTCT GCCATTTGG GTTTTGGGTC TTTGAACCT TGCTTGCAAT AGGTGTGCGT 1540
Hum-TP53 1541 CAGAAGCACC CAGGACTTCC ATTTGCTTGG TCCCGGGGCT CCACTGAACA AGTTGGCCTG CACTGGGTGT 1610
Hum-TP53 1611 TTGTTGTGGG GAGGAGGATG GGGAGTAGGA CATACCACT TAGATTTTAA GGTTTTACT GTGAGGATG 1680
Hum-TP53 1681 TTTGGGAGAT GTAAGAAATG TTCTTGCACT TAAGGGTAG TTTACAATCA GCCACATCT AGGTAGTAG 1750
Hum-TP53 1751 GGGCCCACTT CACCGTACTA ACCAGGGAAG CTGTCCCTCA TGTGAATTT TCTCTAATC CAAGGCCAT 1820
Hum-TP53 1821 ATCTGTGAAA TGCTGGCATT TGCACTTACC TCACAGAGTG CATTGTGAGG GTTAATGAAA TAATGTACAT 1890
Hum-TP53 1891 CTGGCCCTGA AACCACTTT TATTACATGG GGTCTAAAAC TTGACCCCT TGAGGGTGGC TGTTCCTCT 1960
Hum-TP53 1961 CCTCTCCCT GTTGGCTGGT GGGTTGGTAG TTCTACAGT TGGGCAGCTG GTTAGGTAGA GGGAGTTGTC 2030
Hum-TP53 2031 AAGTCTTGCT GGCACAGCA AACCTGTCT GACAACCTCT TGGTGAACCT TAGTACCTAA AAGGAAATCT 2100
Hum-TP53 2101 CACCCCATCC CACACCTGAG AGGATTTCAT CTCTGTGATA TGATGATCTG GATCCACCA GACTTGTTTT 2170
Hum-TP53 2171 ATGCTCAGGG TCAATTTCTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTCTTTTTC TTGAGACTG GGTCTGCTT 2240
Hum-TP53 2241 TGTTCGCCAG GCTGGAGTGG AGTGGCTGA TCTTGGCTTA CTGCAGCCTT TGCTTCCC GCTCGAGCAG 2310
Hum-TP53 2311 TCCTGCTCA GCCTCCGAG TAGCTGGAC CACAGTTCA TGCCACCATG GCCAGCCAAC TTTTGCATGT 2380
Hum-TP53 2381 TTTGTAGAGA TGGGTCTCA CAGTGTGCC CAGGCTGGTC TCAAACTCT GGGCTCAGGC GATCCACCTG 2450
Hum-TP53 2451 TCTCAGCCTC CCAGAGTCTT GGGATTCAA TTGTAGCCA CCACTGGAG CTGGAAGGT CAACATCTTT 2520
Hum-TP53 2521 TACATTCTGC AAGCACATCT GCATTTTAC CCCACCTTC CCTTCTTCT CCTTTTAT ATCCCATTTT 2590
Hum-TP53 2591 TATATCGATC TCTATTTTA CAATAAACT TTGCTGCCA 2629

```

시작코돈(ATG) 및 종결코돈(TGA)은 밑줄이 그어져 있음을 주의하라.

도면2

단백질 - 사람 종양 단백질 p53 (리-푸라우메니 증후군) (TP53)

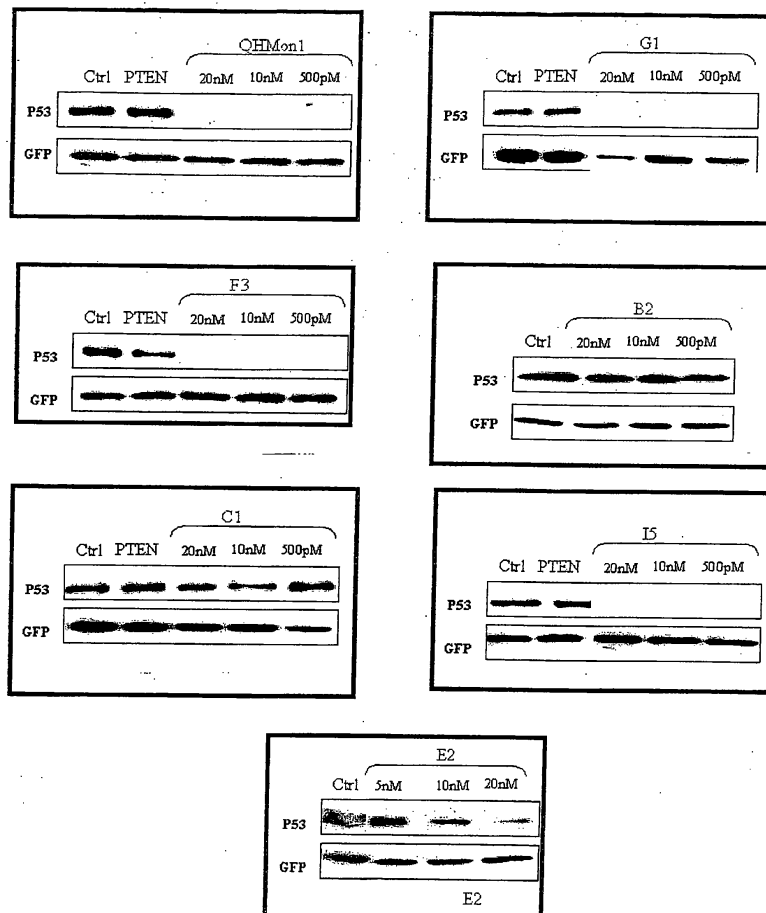
```

Hum_TP53_prot 1  MEEFQSDPSV EPPLSQETFS DLWKLLPENN VLSPLPSQAM DDLMLSPDDI EQWFTEDPGP DEAPRMPEAA
Hum_TP53_prot 71  PRVAPAPAAP TPAAPAPAPS WPLSSSVPSQ KTYQGSYGR LGFLHSGTAK SVTCTYSPAL NKMFCQLAKT
Hum_TP53_prot 141 CPVQLWVDST PPPGTRVRAM AIYQSQHMT EVVRCPPHHE RCSDSDGLAP PQHLIRVEGN LRVEYLDNRN
Hum_TP53_prot 211 TFRHSVVVPY EPPEVGSDDCT TIHYNMNCNS SCMGGMNRRP ILTIITLED SGNLLGRNSF EVRVCACTGR
Hum_TP53_prot 281 DRRTEENLR KKGEPPHELP PGSTKRALN NTSSSPQPKK KPLDGEYFTL QIRGRERFEM FRELNEALEL
Hum_TP53_prot 351 KDAQAGKEPG GSRAHSSHLK SKKGQSTSRH KKLMPKTEGP DSD 393

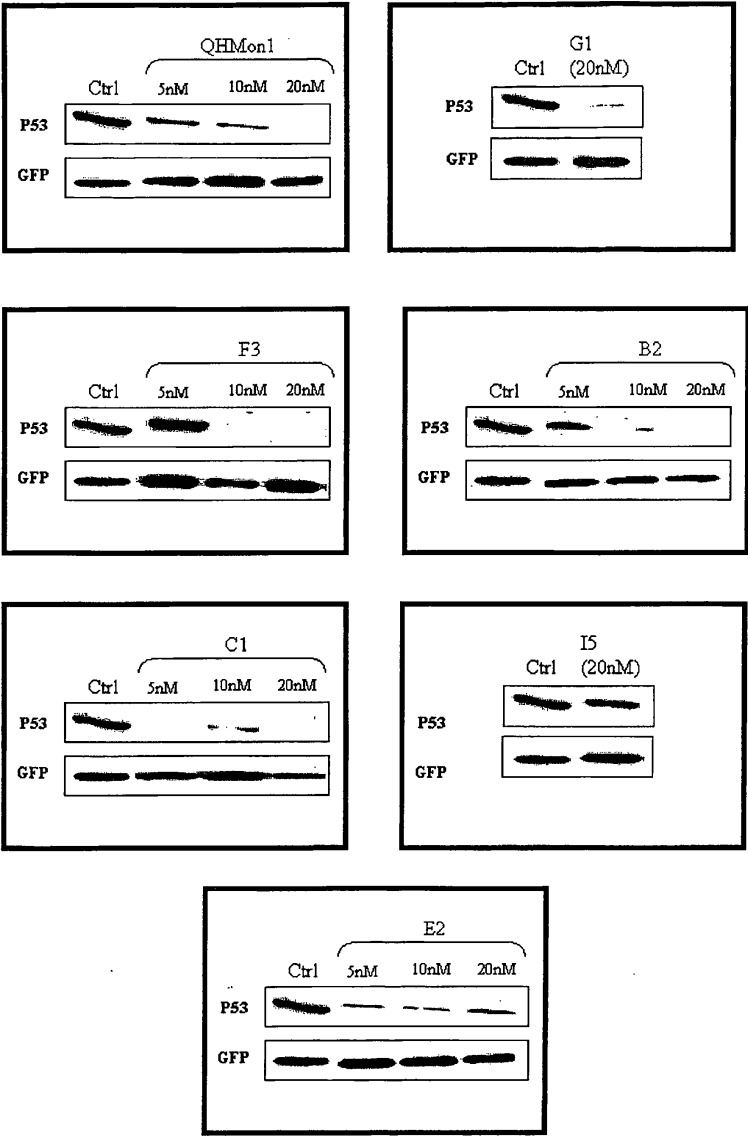
```

GeneBank에서 다른 사람 참가자들의 변이 (gi- 23491728; gi-35209; gi-13097806):  
R72 -> P  
R273 -> H  
P278 -> A  
P309 -> S

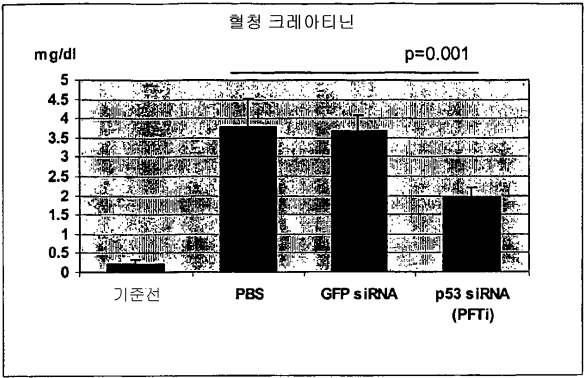
도면3



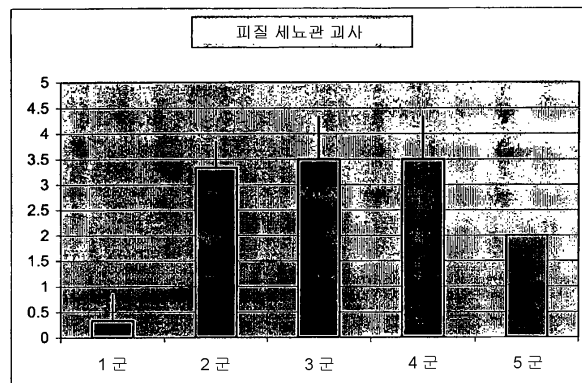
도면4



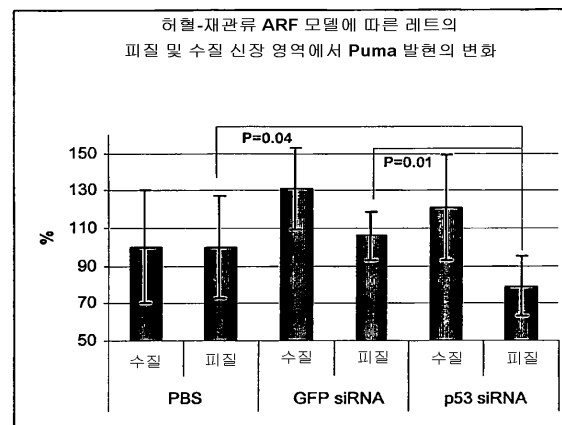
도면5



도면6



도면7



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

- <110> Quark Biotech, Inc.
- <120> Oligoribonucleotides And Methods Of Use Thereof For Treatment Of Alopecia, Acute Renal Failure And Other Medical Conditions
- <130> 144/PCT1
- <140> PCT/IL 2005/001035
- <141> 2005-09-27
- <150> US 60/613,991
- <151> 2004-09-28

<150> US 60/658,196  
<151> 2005-03-02

<150> US 60/703,020  
<151> 2005-07-26

<160> 316

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1  
<211> 2629  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 1  
acttgtcatg gcgactgtcc agctttgtgc caggagcctc gcaggggttg atgggattgg 60  
  
ggttttcccc tcccatgtgc tcaagactgg cgctaaaagt tttagcttc tcaaaagtct 120  
  
agagccaccg tccagggagc aggtagctgc tgggtccgg ggacatttg cgttcgggct 180  
  
gggagcgtgc ttccacgac ggtgacacgc ttccctggat tggcagccag actgccttc 240  
  
gggtcactgc catggaggag ccgcagtcag atcctagcgt cgagccccct ctgagtcagg 300  
  
aaacattttc agacctatgg aaactacttc ctgaaaacaa cgttctgtcc cccttgccgt 360  
  
ccaagcaat ggatgatttg atgtgtccc cggacgatat tgaacaatgg ttactgaag 420  
  
accaggtcc agatgaagct ccagaatgc cagaggctgc tccccgctg gccccgcac 480  
  
cagcagctcc tacaccggcg gccccgcac cagccccctc ctggccccctg tcattcttg 540  
  
tcccttccca gaaaacctac cagggcagct acggtttccg tctgggttc ttgcattctg 600  
  
ggacagccaa gtctgtgact tgcacgtact cccctgcct caacaagatg ttttgccaac 660

tggccaagac ctgccctgtg cagctgtggg ttgattccac acccccgcgc ggcacccgcg	720
tccgcgccat ggccatctac aagcagtcac agcacatgac ggaggtttgt aggcgctgcc	780
cccacatga gcgtgtctca gatagcgaag gtctggcccc tcctcagcat cttatccgag	840
tggaaggaaa ttigcgtgtg gagtatttgg atgacagaaa cacttttcga catagtgtgg	900
tggtgccta tgagccgcct gaggttggct ctgactgtac caccatccac tacaactaca	960
tgtgtaacag ttcttgcatt ggccgcatga accggaggcc catcctcacc atcatcacac	1020
tggaagactc cagtggtaat ctactgggac ggaacagctt tgaggtgcgt gtttgtcct	1080
gtcttgggag agaccggcgc acagaggaag agaattctcg caagaaagg ggcctcacc	1140
acgagctgcc cccaggagc actaagcgag cactgcccc caacaccagc tcctctcccc	1200
agccaaagaa gaaaccactg gatggagaat atttaccct tcagatccgt gggcgtgagc	1260
gttctgagat gttccgagag ctgaatgagg ccttggaaact caaggatgcc caggctggga	1320
aggagccagg ggggagcagg gctcactcca gccacctgaa gtccaaaaag ggtcagtcta	1380
cttcccgcca taaaaaactc atgttcaaga cagaagggcc tgactcagac tgacattctc	1440
catttctgt tccccactga cagcctcca ccccatctc tccctccct gccattttgg	1500
gttttgggtc ttgaacctc tgcttgaat aggtgtgcgt cagaagcacc caggacttcc	1560
atttgccttg tcccggggt cactgaaca agttggcctg cactggtgtt ttgttgtggg	1620
gaggaggatg gggagtagga cataccagct tagattttaa ggtttttact gtgagggatg	1680
tttgggagat gtaagaaatg ttcttgcagt taagggttag ttacaatca gccacattct	1740
aggtaggtag gggccactt caccgtacta accagggaag ctgtccctca tgttgaattt	1800
ttcttaactt caagcccat atctgtgaaa tctggcatt tgcacctacc tcacagagtg	1860

cattgtgagg gttaatgaaa taatgtacat ctggccttga aaccaccttt tattacatgg 1920

ggctctaaaac ttgacccctt tgagggtgcc tgttccctct cctctccctt gttggctggg 1980

gggttggttag ttctacagt tgggcagctg gttaggtaga gggagtgttc aagtcttgct 2040

ggcccagcca aaccctgtct gacaacctct tggtcgacct tagtacctaa aaggaaatct 2100

caccccatcc cacaccctgg aggatttcat ctcttgata tgatgatctg gatccaccaa 2160

gacttgtttt atgctcaggg tcaatttctt tttctttttt tttttttttt tttcttttct 2220

tttgagactg ggtctcgctt tgttgcccag gctggagtgg agtggcgtga tcttgctta 2280

ctgcagcctt tgcctccccg gctcgagcag tcctgcctca gcctccggag tagctgggac 2340

cacaggttca tgccaccatg gccagccaac ttttgcattg tttgtagaga tggggtctca 2400

cagtgttgcc caggctggtc taaaactcct gggctcagge gatccacctg tctcagcctc 2460

ccagagtgtc gggattacaa ttgtgagcca ccacgtggag ctggaagggt caacatcttt 2520

tacattctgc aagcacatct gcattttcac cccacccttc ccttcttctt ccttttttat 2580

atcccatttt tatatcgatc tcttatttta caataaaact ttgctgcca 2629

<210> 2  
 <211> 393  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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 Arg 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> 3

<211> 19

<212> RNA  
<213> Mus musculus

<400> 3  
guacaugugu aaugcucc 19

<210> 4  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
gacuccagug gaaucucac 19

<210> 5  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
cagaccuau gaaucucu 19

<210> 6  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
cuaccuccg ccuaaaaa 19

<210> 7  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
cccaagcau ggauguuu 19

<210> 8  
<211> 19  
<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

cccggacgau auugaacaa

19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 9

gagucacagu cggauauca

19

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 10

ggauguugag gaguuuuuu

19

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 11

cauuuuugu ccuucuca

19

<210> 12

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 12

ggaauagguu gauaguugu

19

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 13

ggacagccaa gucuguuau

19

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 14

gaagaaaau uccgcaaaa

19

<210> 15

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

cugggacagc caagucugu

19

<210> 16

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

ucaucacacu ggaagacuc

19

<210> 17

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

cacacuggaa gacuccagu

19

<210> 18

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gcgccauggc caucuaca

19

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

cgccauggcc aucuacaag

19

<210> 20

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

agucacagca caugacgga

19

<210> 21

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

uccgagugga aggaaauuu

19

<210> 22

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

ccgaguggaa ggaaauuug

19

<210> 23

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

gacagaaaca cuuuucgac

19

<210> 24

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gugugguggu gcccuauga

19

<210> 25

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

gagaauauuu cacccuuc

19

<210> 26

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 26

ggagcuauua cacauguac

19

<210> 27

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

guagauuacc acuggaguc

19

<210> 28

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

aguaguuucc auaggucug

19

<210> 29

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

uuuuuauaggc gggagguag

19

<210> 30

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

aaaucaucca uugcuuggg

19

<210> 31

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

uuguucaua ucguccggg

19

<210> 32

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 32

ugauauccga cugugacuc

19

<210> 33

<211> 19

<212> RNA



<213> Mus musculus

<400> 33

aaaaaacucc ucaacaucc

19

<210> 34

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 34

ugagaaggga caaaagaug

19

<210> 35

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 35

acaacuauca accuauucc

19

<210> 36

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 36

auaacagacu uggcugucc

19

<210> 37

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 37

uuuugcggaa auuuucuuc

19

<210> 38

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

acagacuugg cugucccag

19

<210> 39

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

gagucuucca gugugauga

19

<210> 40

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

acuggagucu uccagugug

19

<210> 41

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

uuguagaugg ccauggcgc

19

<210> 42

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

cuuguagaug gccauggcg

19

<210> 43

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

uccgucaugu gcugugacu

19

<210> 44

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

aaaauuccuu ccacucgga

19

<210> 45

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

caaaauuccu uccacucgg

19

<210> 46

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

gucgaaaagu guuucuguc

19

<210> 47

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

ucauagggca ccaccacac

19

<210> 48

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

ugaaggguga aaauuucuc

19

<210> 49

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

guaccaccau ccacuacaa

19

<210> 50

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

ggaaacuacu uccugaaaa

19

<210> 51

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

agacuccagu gguaaucua

19

<210> 52

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

ccauccacua caacuacau

19

<210> 53

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

ccaccaucca cuacaacua

19

<210> 54

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

aaacacuuuu cgacauagu

19

<210> 55

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

caugagcgcu gcucagaua

19

<210> 56

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

ccauggccau cuacaagca

19

<210> 57

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

ccaagucugu gacuugcac

19

<210> 58

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

aaacuuugcu gccaaaaaa

19

<210> 59

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

cccuccuucu cccuuuuua

19

<210> 60

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 60

gcaagcacau cugcauuuu

19

<210> 61

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 61

gggucaacau cuuuuacau

19

<210> 62

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 62

gaagggucac caucuuuuu

19

<210> 63

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

cuggaagggu caacauuu

19

<210> 64

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

ccagagugcu gggauuaca

19

<210> 65

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 65

gauggggucu cacaguguu

19

<210> 66

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 66

gccaacuuuu gcauguuuu

19

<210> 67

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 67

ccauggccag ccaacuuuu

19

<210> 68

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 68

agaccaggu ccagaugaa

19

<210> 69

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 69

ccaucacac acuggaaga

19

<210> 70

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 70

caucacacug gaagacucc

19

<210> 71

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 71

caucauca cuggaagac

19

<210> 72

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 72

accucauca cacuggaag

19

<210> 73

<211> 19

<212> RNA



<213> Homo sapiens

<400> 73

aucaucacac uggaagacu

19

<210> 74

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 74

cacuggaaga cuccagugg

19

<210> 75

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 75

acacuggaag acuccagug

19

<210> 76

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 76

ucacacugga agacuccag

19

<210> 77

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 77

aucacacugg aagacucca

19

<210> 78

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 78

cacagcacau gacggaggu

19

<210> 79

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 79

cacuggaaga cuccagugg

19

<210> 80

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 80

ucacagcaca ugacggagg

19

<210> 81

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 81

gucacagcac augacggag

19

<210> 82

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 82

ccauccacua caacuacau

19

<210> 83

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 83

ccaccaucca cuacaacua

19

<210> 84

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 84

gaauauuua cccuucaga

19

<210> 85

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 85

cgaguggaag gaaauuugc

19

<210> 86

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 86

gagaauauu caccuuca

19

<210> 87

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 87

cuacaugugu aacaguucc

19

<210> 88

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 88

aacuacaugu gaaacaguu

19

<210> 89

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 89

caacuacaug uguaacagu

19

<210> 90

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 90

cacuacaacu acaugugua

19

<210> 91

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 91

ccacuacaac uacaugugu

19

<210> 92

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 92

gacagaaaca cuuuucgac

19

<210> 93

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 93

ggagaauuu ucacccuuc

19

<210> 94

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 94

guguaacagu uccugcaug

19

<210> 95

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 95

acaacuacau guguaacag

19

<210> 96

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 96

acuacaacua cauguguua

19

<210> 97

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 97

accauccacu acaacuaca

19

<210> 98

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 98

accaccaucc acuacaacu

19

<210> 99

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 99

uaccaccauc cacuacaac

19

<210> 100

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 100

acagaaacac uuuucgaca

19

<210> 101

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 101

gaguggaagg aaauuugcg

19

<210> 102

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 102

auauuucacc cuucagauc

19

<210> 103

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 103

aaauuuucac ccuucagau

19

<210> 104

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 104

agaauuuuc acccuucag

19

<210> 105

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 105

uggagaauau uucacccuu

19

<210> 106

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 106

acauguguaa caguuccug

19

<210> 107

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 107

uacaacuaca uguguaaca

19

<210> 108

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 108  
cuacaacuac auguguaac 19

<210> 109  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 109  
uccacuacaa cuacaugug 19

<210> 110  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 110  
auccacuaca acuacaugu 19

<210> 111  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 111  
cauccacuac aacuacaug 19

<210> 112  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 112  
caccauccac uacaacuac 19

<210> 113  
<211> 19  
<212> RNA



<213> Homo sapiens

<400> 113

uguguaacag uuccugcau

19

<210> 114

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 114

cauguguaac aguuccugc

19

<210> 115

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 115

uacaugugua acaguuccu

19

<210> 116

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 116

acuacaugug uacaguuc

19

<210> 117

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 117

auccgagugg aaggaaaau

19

<210> 118

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 118

ucacuccagc caccugaag

19

<210> 119

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 119

cucacuccag ccaccugaa

19

<210> 120

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 120

uuguagugga uggugguac

19

<210> 121

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 121

uuuucaggaa guaguuucc

19

<210> 122

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 122

uagauuacca cuggagucu

19

<210> 123

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 123

auguaguugu aguggaugg

19

<210> 124

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 124

uaguuguagu ggauggugg

19

<210> 125

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 125

acuaugucga aaaguguuu

19

<210> 126

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 126

uaucugagca gcgcuaug

19

<210> 127

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 127

ugcuuguaga uggccaugg

19

<210> 128

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 128

gugcaaguca cagacuugg

19

<210> 129

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 129

uuuuuuggca gcaaaguuu

19

<210> 130

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 130

uaaaaaggga gaaggaggg

19

<210> 131

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 131

aaaaugcaga ugugcuugc

19

<210> 132

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 132

auguaaaaga uguugaccc

19

<210> 133

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 133

uaaaagaugu ugacccuuc

19

<210> 134

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 134

aagauguuga ccuuccag

19

<210> 135

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 135

uguaauccca gcacucugg

19

<210> 136

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 136

aacacuguga gacccauc

19

<210> 137

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 137

aaaacaugca aaaguuggc

19

<210> 138

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 138

aaaaguuggc uggccaugg

19

<210> 139

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 139

uucaucugga ccugggucu

19

<210> 140

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 140

ucuuccagug ugaugaugg

19

<210> 141

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 141

ggagucuucc agugugaug

19

<210> 142

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 142

gucuuccagu gugaugaug

19

<210> 143

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 143

cuuccagugu gaugauggu

19

<210> 144

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 144

agucuuccag ugugaugau

19

<210> 145

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 145

ccacuggagu cuuccagug

19

<210> 146

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 146

cacuggaguc uuccagugu

19

<210> 147

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 147

cuggagucuu ccaguguga

19

<210> 148

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 148

uggagucuuc cagugugau

19

<210> 149

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 149

accuccguca ugugcugug

19

<210> 150

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 150

ccacuggagu cuuccagug

19

<210> 151

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 151

ccuccgucau gugcuguga

19

<210> 152

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 152

cuccgucaug ugcugugac

19

<210> 153

<211> 19

<212> RNA



<213> Homo sapiens

<400> 153

auguaguugu aguggaugg

19

<210> 154

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 154

uaguuguagu ggauggugg

19

<210> 155

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 155

ucugaagggu gaaaauuuc

19

<210> 156

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 156

gcaaaauucc uuccacucg

19

<210> 157

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 157

ugaaggguga aaauuucuc

19

<210> 158

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 158

ggaacuguua cacauguag

19

<210> 159

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 159

aacuguuaca cauguaguu

19

<210> 160

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 160

acuguuacac auguaguug

19

<210> 161

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 161

uacacaugua guuguagug

19

<210> 162

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 162

acacauguag uuguagugg

19

<210> 163

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 163

gucgaaaagu guuucuguc

19

<210> 164

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 164

gaaggugaa auauucucc

19

<210> 165

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 165

caugcaggaa cuguuacac

19

<210> 166

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 166

cuguuacaca uguaguugu

19

<210> 167

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 167

uuacacaugu aguuguagu

19

<210> 168

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 168

uguaguugua guggauggu

19

<210> 169

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 169

aguuguagug gaugguggu

19

<210> 170

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 170

guuguagugg augguggua

19

<210> 171

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 171

ugucgaaaag uguuucugu

19

<210> 172

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 172

cgcaaaauuc cuuccacuc

19

<210> 173

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 173  
gaucugaagg gugaauau 19

<210> 174  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 174  
aucugaaggg ugaaauuu 19

<210> 175  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 175  
cugaagggug aaauuuu 19

<210> 176  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 176  
aagggugaaa uauucucca 19

<210> 177  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 177  
caggaacugu uacacagu 19

<210> 178  
<211> 19  
<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 178

uguuacacau guaguugua

19

<210> 179

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 179

guuacacaug uaguuguag

19

<210> 180

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 180

cacauaguagu uguagugga

19

<210> 181

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 181

acauguaguu guaguggau

19

<210> 182

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 182

cauguaguug uaguggaug

19

<210> 183

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 183

guaguuguag uggauggug

19

<210> 184

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 184

augcaggaac uguuacaca

19

<210> 185

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 185

gcaggaacug uuacacaug

19

<210> 186

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 186

aggaacuguu acacaugua

19

<210> 187

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 187

gaacuguuac acauguagu

19

<210> 188

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 188

aaauuccuuc cacucggau

19

<210> 189

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 189

cuucaggugg cuggaguga

19

<210> 190

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 190

uucagguggc uggagugag

19

<210> 191

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 191

ggaagagaau cuccgcaaga a

21

<210> 192

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 192

guaccaccau ccacuacaac u

21

<210> 193

<211> 21

<212> RNA



<213> Homo sapiens

<400> 193

ggacgauuu gaacauggu u

21

<210> 194

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 194

ccagccaccu gaaguccaaa a

21

<210> 195

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 195

gagaauuuu cacccuucag a

21

<210> 196

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 196

agaaaccacu ggauggagaa u

21

<210> 197

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 197

cuacugggac ggaacagcuu u

21

<210> 198

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 198

agacuccagu gguaaucuac u

21

<210> 199

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 199

cuggaagacu ccagugguaa u

21

<210> 200

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 200

gaaacuacuu ccugaaaaca a

21

<210> 201

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 201

ggaaacuacu uccugaaaac a

21

<210> 202

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 202

aaacacuuuu cgacauagug u

21

<210> 203

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 203

ggaguauuug gaugacagaa a

21

<210> 204

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 204

ucagaccuau ggaaacuacu u

21

<210> 205

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 205

ccauggccau cuacaagcag u

21

<210> 206

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 206

ccaagucugu gacuugcacg u

21

<210> 207

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 207

ggacagccaa gucugugacu u

21

<210> 208

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 208

cccuccuucu cccuuuuuau a

21

<210> 209

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 209

ccauccacua caacuacaug u

21

<210> 210

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 210

ccaccaucca cuacaacuac a

21

<210> 211

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 211

gagaauauuu cacccuucag a

21

<210> 212

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 212

ggagaauauu ucacccuuc a

21

<210> 213

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 213

cuacaugugu aacaguuccu g

21

<210> 214

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 214

acaacuacau guguaacagu u

21

<210> 215

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 215

ccacuacaac uacaugugua a

21

<210> 216

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 216

caccauccac uacaacuaca u

21

<210> 217

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 217

gaauauuua cccuucagau c

21

<210> 218

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 218

agaauuuuc acccuucaga u

21

<210> 219

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 219

uaccaccauc cacuacaacu a

21

<210> 220

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 220

gauggagaa auuucacccu u

21

<210> 221

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 221

ccgaguggaa ggaaauugc g

21

<210> 222

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 222

aacuacagu guaacaguuc c

21

<210> 223

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 223

caacuacaug uguaacaguu c

21

<210> 224

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 224

acuacaacua cauguguaac a

21

<210> 225

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 225

cacuacaacu acauguguaa c

21

<210> 226

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 226

uccacuacaa cuacaugugu a

21

<210> 227

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 227

cauccacuac aacuacaugu g

21

<210> 228

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 228

accauccacu acaacuacau g

21

<210> 229

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 229

uggagaauau uucacccuuc a

21

<210> 230

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 230

auguguaaca guuccugcau g

21

<210> 231

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 231

cauguguaac aguuccugca u

21

<210> 232

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 232

uacaacuaca uguguaacag u

21

<210> 233

<211> 21

<212> RNA



<213> Homo sapiens

<400> 233

cuacaacuac auguguaaca g

21

<210> 234

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 234

auccacuaca acuacaugug u

21

<210> 235

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 235

accaccaucc acuacaacua c

21

<210> 236

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 236

aauauuucac ccuucagauc c

21

<210> 237

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 237

acuacaugug uacaguucc u

21

<210> 238

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 238

auggagaaua uuucacccuu c

21

<210> 239

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 239

uguguaacag uuccugcaug g

21

<210> 240

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 240

uccgagugga aggaaauuug c

21

<210> 241

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 241

auccgagugg aaggaaauu g

21

<210> 242

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 242

ucacacugga agacuccagu g

21

<210> 243

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 243

aucacacugg aagacuccag u

21

<210> 244

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 244

cacacuggaa gacuccagug g

21

<210> 245

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 245

ucaucacacu ggaagacucc a

21

<210> 246

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 246

ccaucacac acuggaagac u

21

<210> 247

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 247

caucacacug gaagacucca g

21

<210> 248

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 248

caucaucaca cuggaagacu c

21

<210> 249

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 249

accaucauca cacuggaaga c

21

<210> 250

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 250

ucacacugga agacuccagu g

21

<210> 251

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 251

aucacacugg aagacuccag u

21

<210> 252

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 252

aucaucacac uggaagacuc c

21

<210> 253

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 253

cacacuggaa gacuccagug g

21

<210> 254

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 254

uucuugcgga gauucucuuc c

21

<210> 255

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 255

aguuguagug gaugguggua c

21

<210> 256

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 256

aaccauuguu caauaucguc c

21

<210> 257

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 257

uuuuggacuu cagguggcug g

21

<210> 258

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 258

ucugaagggu gaaauuuuc c

21

<210> 259

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 259

auucuccauc cagugguuc u

21

<210> 260

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 260

aaagcuguuc cgucccagua g

21

<210> 261

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 261

aguagauuac cacuggaguc u

21

<210> 262

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 262

auuaccacug gagucuucca g

21

<210> 263

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 263

uuguuuucag gaaguaguuu c

21

<210> 264

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 264

uguuuucagg aaguaguuuc c

21

<210> 265

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 265

acacuauguc gaaaaguguu u

21

<210> 266

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 266

uuucugucau ccaaauacuc c

21

<210> 267

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 267

aaguaguuuc cauaggucug a

21

<210> 268

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 268

acugcuugua gauggccaug g

21

<210> 269

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 269

acgugcaagu cacagacuug g

21

<210> 270

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 270

aagucacaga cuuggcuguc c

21

<210> 271

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 271

uauaaaaagg gagaaggagg g

21

<210> 272

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 272

acauguaguu guaguggaug g

21

<210> 273

<211> 21

<212> RNA



<213> Homo sapiens

<400> 273

uguaguugua guggauggug g

21

<210> 274

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 274

ucugaagggu gaaauauucu c

21

<210> 275

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 275

cugaaggug aaauauucuc c

21

<210> 276

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 276

caggaacugu uacacagua g

21

<210> 277

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 277

aacuguuaca cauguaguug u

21

<210> 278

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 278

uuacacaugu aguuguagug g

21

<210> 279

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 279

auguaguugu aguggauggu g

21

<210> 280

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 280

gaucugaagg gugaaauuu c

21

<210> 281

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 281

aucugaaggg ugaaauuuc u

21

<210> 282

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 282

uaguuguagu ggaugguggu a

21

<210> 283

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 283

aagggugaaa uauucuccau c

21

<210> 284

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 284

cgcaaaauuc cuuccacucg g

21

<210> 285

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 285

ggaacuguaa cacauguagu u

21

<210> 286

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 286

gaacuguuac acauguagu g

21

<210> 287

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 287

uguuacacau guaguuguag u

21

<210> 288

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 288

guuacacaug uaguuguagu g

21

<210> 289

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 289

uacacaugua guuguagugg a

21

<210> 290

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 290

cacauaguagu uguaguggau g

21

<210> 291

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 291

cauguaguug uaguggaugg u

21

<210> 292

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 292

ugaaggguga aaauuuccc a

21

<210> 293

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 293

caugcaggaa cuguuacaca u

21

<210> 294

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 294

augcaggaac uguuacacau g

21

<210> 295

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 295

acuguuacac auguaguugu a

21

<210> 296

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 296

cuguuacaca uguaguugua g

21

<210> 297

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 297

acacauguag uuguagugga u

21

<210> 298

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 298

guaguuguag uggauggugg u

21

<210> 299

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 299

ggaucugaag ggugaaauau u

21

<210> 300

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 300

aggaacuguu acacauaguag u

21

<210> 301

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 301

gaagggugaa auauucucca u

21

<210> 302

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 302

ccaugcagga acuguuacac a

21

<210> 303

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 303

gcaaaauucc uccacucgg a

21

<210> 304

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 304

caaaauuccu uccacucgga u

21

<210> 305

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 305

cacuggaguc uccagugug a

21

<210> 306

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 306

acuggagucu uccaguguga u

21

<210> 307

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 307

ccacuggagu cuuccagugu g

21

<210> 308

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 308

uggagucuuc cagugugaug a

21

<210> 309

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 309

agucuuccag ugugaugaug g

21

<210> 310

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 310

cuggagucuu ccagugugau g

21

<210> 311

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 311

gagucuucca gugugaugau g

21

<210> 312

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 312

gucuuccagu gugaugagg u

21

<210> 313

<211> 21

<212> RNA



<213> Homo sapiens

<400> 313

cacuggaguc uuccagugug a

21

<210> 314

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 314

acuggagucu uccaguguga u

21

<210> 315

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 315

ggagucuucc agugugauga u

21

<210> 316

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 316

ccacuggagu cuuccagugu g

21