(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0022167
(43) 공개일자 2023년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7041508
(22) 출원일자(국제) 2021년05월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년11월25일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/091834
(87) 국제공개번호 WO 2021/249064
국제공개일자 2021년12월16일
(30) 우선권주장
202010524139.1 2020년06월10일 중국(CN)

(71) 출원인
락티젠 세러퓨틱스
중국 226400 장쑤 난통 뤼동 카운티 쳬강 스트리트 주장 로드 넘버 888 뤼동 가오신 디스트릭트 라이프 앤드 헬스 인더스트리 파크 빌딩 18
(72) 발명자
리 롱청
중국 226400 장쑤 난통 뤼동 쳬강 애비뉴 주장 로드 888 뤼동 라이프 앤드 헬스 인더스트리 파크 빌딩 18
강 무림
중국 226400 장쑤 난통 뤼동 쳬강 애비뉴 주장 로드 888 뤼동 라이프 앤드 헬스 인더스트리 파크 빌딩 18
(74) 대리인
특허법인코리아나

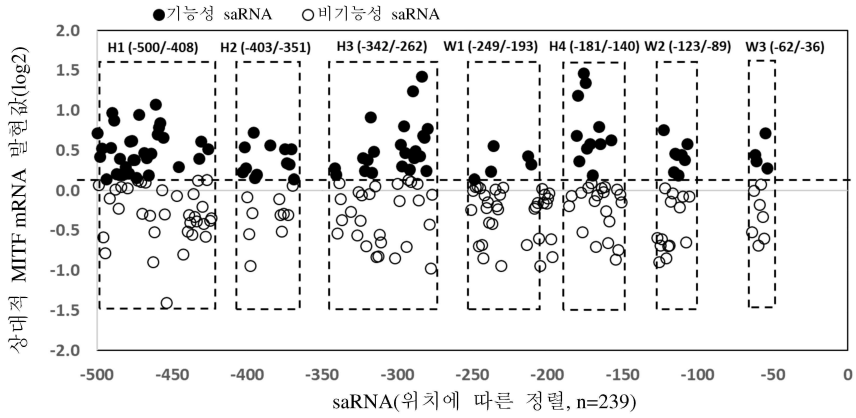
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **MITF 유전자를 표적으로 하는 핵산 분자 및 이의 사용**

(57) 요 약

이중 가닥 핵산 분자, 특히 작은 활성화 핵산 분자가 제공되며, 상기 작은 활성화 핵산 분자는 MITF 유전자를 표적으로 하는 핵산 분자이고, 적어도 제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 상기 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물 또는 제제 및 이들의 사용이 추가로 제공된다. 상기 작은 활성화 핵산 분자, 또는 상기 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 상기 조성물 또는 제제는 세포 내 상기 MITF 유전자 발현을 활성화 또는 상향 조절하고, MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세를 치료하는 데 사용될 수 있다

대 표 도 - 도2



도 2

(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
C12N 2310/122 (2013.01)
C12N 2310/322 (2013.01)
C12N 2310/335 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 MITF 유전자의 프로모터 영역에서 길이가 16 내지 35개 뉴클레오티드로 이루어진 임의의 연속 단편과 적어도 75% 상동성 또는 상보성을 갖는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 적어도 포함하는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 작은 활성화 핵산 분자는 완전 상보성 또는 불완전 상보성에 의해 이중 가닥 구조를 형성하는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함하는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 서열번호 299, 서열번호 300, 서열번호 301, 서열 번호 302, 서열 번호 303, 서열 번호 304 또는 서열 번호 305에서 길이가 16 내지 35개 뉴클레오티드로 이루어진 임의의 연속 단편과 적어도 75% 상동성 또는 상보성을 갖는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 서열번호 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75% 상동성 또는 상보성을 갖는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 서열번호 105 내지 201로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 상기 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 서열번호 202내지 298로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥의 길이가 16 내지 35개의 뉴클레오티드이고, 상기 제2 올리고뉴클레오티드 가닥의 길이가 16 내지 35개의 뉴클레오티드인, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 7

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 작은 활성화 핵산 분자는 이중 가닥 핵산이고, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 상기 이중 가닥 핵산의 두 가닥에 위치하는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및/또는 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 5' 말단 및/또는 3' 말단에 오버행을 갖는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 오버행은 길이가 0 내지 6 뉴클레오티드의 오버행인, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 오버행은 dTdT 또는 dTdTdT인, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 11

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 작은 활성화 핵산 분자는 이중 가닥 영역을 형성할 수 있는 헤

어핀 구조를 갖는 단일 가닥 핵산, 또는 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 상기 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 이중 가닥 구조를 형성할 수 있는 상보적 영역을 갖는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥와 상기 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 75%의 상보성을 갖는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 작은 활성화 핵산 분자를 구성하는 상기 뉴클레오티드는 천연 및 비화학적으로 변형된 뉴클레오티드인, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 작은 활성화 핵산 분자의 하나 이상의 뉴클레오티드가 화학적 변형을 갖는 뉴클레오티드인, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 화학적 변형은 하기 변형: 뉴클레오티드의 포스포디에스테르 결합의 변형, 뉴클레오티드의 리보스의 2'-OH의 변형 및 뉴클레오티드의 염기 변형 중 하나 이상으로부터 선택되는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 화학적 변형은 하기 변형: 티오포스페이트 변형, 보라노포스페이트 변형, 2'-플루오로 변형, 2'-옥시메틸 변형, 2'-옥시에틸리덴 메톡시 변형, 2,4'-디니트로페놀 변형, 잠금 핵산 변형, 2'-아미노 변형, 2'-데옥시 변형, 5'-브로모우라실 변형, 5'-요오도우라실 변형, *N*-메틸우라실 변형 및 2,6-디아미노퓨린 변형 중 하나 이상으로부터 선택되는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및/또는 상기 제2 올리고뉴클레오티드 가닥의 상기 말단은 친유성 기에 연결되고, 상기 친유성 기는 리포솜, 거대분자 중합체, 폴리펩타이드 및 콜레스테롤로 중 하나 이상으로부터 선택하는, 작은 활성화 핵산 분자.

청구항 18

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 핵산 분자를 인코딩하는 단편을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 핵산 분자는 발현 벡터인, 핵산 분자.

청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 핵산 분자 또는 제18항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자를 포함하는, 세포.

청구항 21

약제학적 조성물로서:

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 핵산 분자 또는 제18항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 및

선택적으로, 약제약적으로 허용 가능한 운반체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 핵산 분자, 제18항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 핵

산 분자, 제20항에 따른 세포, 또는 제21항에 따른 약제학적 조성물을 포함하는, 제제.

청구항 23

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 핵산 분자, 제18항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 제20항에 따른 세포, 또는 제21항에 따른 약제학적 조성물을 포함하는, 키트.

청구항 24

세포 내 상기 MITF 유전자 발현을 활성화/상향 조절하기 위한 약물 또는 제제를 제조하는 데 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 핵산 분자, 또는 제18항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 또는 제20항에 따른 세포, 또는 제21항 중 어느 한 항에 따른 약제학적 조성물의 사용.

청구항 25

세포 내 상기 MITF 유전자 발현을 활성화/상향 조절하기 위한 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 핵산 분자, 또는 제18항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 또는 제21항에 따른 조성물, 또는 제22항에 따른 제제를 세포에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 26

MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세를 치료하기 위한 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 핵산 분자, 또는 제18항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 또는 제21항에 따른 조성물, 또는 제22항에 따른 제제를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세를 치료하기 위한 약물을 제조하는 데 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 작은 활성화 핵산 분자, 또는 제18항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 또는 제20항에 따른 세포, 또는 제21항에 따른 약제학적 조성물의 사용.

청구항 28

제27항에 있어서, MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 상기 질환 또는 병세는 백반증, 또는 바르덴부르크 증후군 2A형 또는 티체 증후군인, 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 핵산의 기술 분야에 관한 것으로, 구체적으로는 유전자 활성화와 관련된 이중 가닥 구조를 갖는 핵산 분자, 예컨대 작은 활성화 핵산 분자에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 MITF 유전자를 표적으로 하는 핵산 분자, 및 유전자 전사에서 소안구증 관련 전사 인자(MITF)를 활성화/상향 조절하기 위한 작은 활성화 핵산 분자의 사용에 관한 것이다. 본 발명은 일반적으로 화합물, 약제학적 조성물 및 이의 사용 방법을 제공하는 것으로, 보다 구체적으로는, 본 발명은 증가된 MITF 유전자 발현으로부터 이익을 얻는 질환, 예컨대 백반증의 치료에 사용될 것이다.

배 경 기 술

[0002] 백반증은 표피와 모발의 멜라닌 세포가 국소적으로 감소한 후 불규칙한 하얀 반점이 형성되는 것을 특징으로 하는 후천성 저색소침착 피부 질환이다. 통계적으로, 백반증 환자는 명백한 성별 차이 없이 전 세계 인구의 약 0.5% 내지 2%를 차지한다(Picardo 등, 2015). 백반증은 임상 양상에 따라 심상성 백반증과 분절성 백반증으로 나눌 수 있는데, 여기서 심상성 백반증은 자가면역 조절이나 산화 스트레스로 인한 멜라닌 세포 손상과 관련되고, 분절성 백반증은 유전적 요인과 관련이 있다(Gauthier, Cario Andre 및 Taieb 2003; Dell'Anna 및 Picardo 2006).

[0003] 백반증은 가족 유전, 자가면역 조절, 산화 스트레스 및 기능적 멜라닌 세포 손상과 같은 요인과 관련이 있다.

백반증의 발병은 뚜렷한 가족 집단 경향이 있으며, 백반증 환자의 가족력 양성률은 약 6.25% 내지 40%이며, 직계 가족의 백반증 발병 위험은 일반 인구의 18배이며, 양성의 가족력이 있는 환자의 경우 일반적으로 백반증이 더 일찍 발병한다(Sehgal 및 Srivastava 2007). 체외 실험에서 다량의 전염증 인자가 백반증 환자의 면역 반응에 의해 생성되는 사이토카인(IL-6, TNF-α, IL-1β 및 IL-8)의 증가로 인해 멜라닌 합성 및 멜라닌 합성과 관련된 전사 인자의 발현을 억제할 수 있음을 나타낸다(Kotobuki 등, 2012). 항 멜라닌세포 항체는 50% 내지 93%의 백반증 환자의 혈청에서 검출 가능하며 이러한 항체는 면역 복합체 활성화 보체 및/또는 항체 의존적 세포 매개 세포독성을 통해 멜라닌 세포의 감소 또는 소멸을 유발할 수 있다(Kemp 등, 2007). Dell'Anna 연구실에서는 백반증 환자의 산화 스트레스 불균형이 표피 세포의 비정상적인 카디오리핀으로 인해 발생할 수 있어, 이는 미토콘드리아 전자전달계 활성도의 감소를 야기하고, 활성 산소종(ROS)의 과도한 생성을 유도하고, 멜라닌 세포 사멸을 유발할 수 있음을 시사한다(Dell'Anna 등, 2007).

[0004] 멜라닌 세포의 손실은 백반증 발병의 핵심 요인이며, 멜라닌 세포는 물리적 및 화학적 손상 후 항원을 방출하고 유기체를 자극하여 항 멜라닌 세포 항체를 생성함으로써 다량의 멜라닌 세포를 비활성화시키고 표피 탈색을 악화시킨다. 실험에 따르면 피부 병변의 멜라닌은 표피를 통과할 때 손상되거나 손실되며, 이는 기저막과 각질세포에 대한 멜라닌 세포의 접착 제한때문일 수 있다(Kumar, Parsad 및 Kanwar 2011). 멜라닌 세포 기능 장애는 주로 멜라닌 세포 수 감소, 멜라닌 세포 접착 및 이동 기능 장애, 멜라닌 세포의 과도한 세포자멸사, 멜라닌 세포의 비정상적인 성장 및 분화 등으로 나타난다.

[0005] MITF 유전자에 의해 인코딩되는 소안구증 관련 전사 인자는 염기성 나선-루프-헬릭스 류신 지퍼(basic-helix-loop-helix-leucine zipper, bHLH-Zip) 구조를 가지며 이량체 형태로 DNA에 결합하는 전사 인자이다. MITF는 멜라닌 세포, 망막 색소 상피 세포, 파골 세포 및 비만 세포의 성장에 중요한 역할을 한다. MITF는 전사 인자 EB(TFEB), TFE3 및 TFEC를 포함한 관련 인자와 함께 MiT 패밀리를 구성한다(Hemesath 등, 1994). MITF는 정상적인 멜라닌 세포 성장에 중요한 역할을 하는 MiT 패밀리의 유일한 인자이다(Levy, Khaled 및 Fisher 2006). MITF는 멜라닌 세포의 성장, 증식 및 생존에 필요한 조절 인자일 뿐만 아니라 관련 효소 및 멜라노솜 단백질의 발현을 조절하는 데 중요한 역할하기도 한다. 세 가지 주요 색소 침착 관련 효소 티로시나아제인 TYRP1 및 DCT의 프로모터는 MITF 전사 조절을 위한 표적 유전자인 MITF(TCATGTG)에 대한 보편적인 결합 부위를 함유한다(Bentley, Eisen 및 Goding 1994).

[0006] MITF 돌연변이는 바르덴부르크 증후군 2A형(Waardenburg syndrome type 2A, WS2A), 티체 증후군(Tietze syndrome) 및 COMMAD 증후군을 포함한 다양한 인간 질환을 유발할 수 있으며, 이들은 모두 심각한 청각 장애 및 색소 침착 장애를 나타내며 전자의 두 가지가 상염색체 우성 유전으로 나타났다.

[0007] 현재 백반증을 치료하기 위한 방법은 다양하지만, 백반증을 철저히 치료할 수 있는 방법은 없다. 하얀 반점을 미용적으로 마스킹함으로써 단순한 외모 개선을 보장할 수 있으며 다른 치료로는 스테로이드 호르몬, 자외선 조사, 수술 등이 포함된다. 자외선 B 조사는 하얀 반점의 경계를 흐리게 할 수 있지만 광선 요법은 발암 위험이 있다. 초기 단계에서 Kwinter 등이 70명의 소아 백반증 환자를 치료하기 위해 매우 강력한 글루코코르티코이드를 국소 도포하여 효과적인 비율이 최대 64%인 반면(Kwinter 등, 2007) 높은 재발률을 보였다. 소랄렌 유사 약물은 피부 병변에서 멜라닌 세포의 합성 및 항 세포 사멸 효과를 개선하기 위해 장파 자외선과 협력하여 백반증 환자에게 소랄렌 플러스 자외선 A 광화학 요법 (PUVA)을 수행하는 감광제로서 임상적으로 일반적으로 사용된다(Iannella 등, 2016). 아파멜라노타이드(Afamelanotide)는 전임상 테스트를 위해 미국 식품의약국(FDA)에서 승인한 유일한 약물이지만 아파멜라노타이드는 협대역 자외선 B 광선 요법(NB-UVB)과 함께 테스트해야 한다. 멜라노코르틴 수용체 1(MCIR)을 활성화하기 위해 협대역 자외선 B 광선 요법(NB-UVB)이 필요한 경우, 아파멜라노타이드는 MCIR에 결합하여 멜라닌을 생성하지만(Lim 등, 2015; Grimes 등, 2013), 특정 NB -UVB 작용 지속 시간과 약물 투여량은 추가 실험이 필요하다. 자가 흉터 표피 이식, 자가 미세 이식, 자가 멜라닌 세포 이식, 혼합 표피 이식, 미세 염색 등을 포함하는 외과수술적 치료도 좋은 치료 효과를 보이지만, 이러한 외과수술은 금기사항이 엄격하고 치료 방법이 제한적이다.

[0008] 각각의 치료법이 일정한 효과는 있지만, 증상이 쉽게 재발하고, 치료법에 따른 부작용이 크며, 유효 절약량을 더 확인해야 하므로 임상적 치료에 큰 제한이 있다.

발명의 내용

[0009] 위의 하나 이상의 측면의 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 작은 활성화 핵산(small activated RNA, saRNA) 분자를 제공하며, 상기 작은 활성화 핵산은 MITF 유전자 발현을 활성화/상향 조절함으로써 MITF 단백질 결핍 또는 부족, 또는 백반증, 바르덴부르크 증후군 2A형 또는 티체 증후군과 같은 MITF 단일 대립형질 돌연변이에 의

해 야기되는 질환 또는 병세를 치료하기 위한 RNA 활성화 과정을 기반으로 한다.

[0010] 본 발명의 일 목적은 MITF 유전자 전사를 활성화/상향 조절하여 MITF 단백질 발현 수준을 증가시키는 RNA 활성화 과정을 기반으로 하는 작은 활성화 핵산 분자, 또는 MITF 단백질 결핍 또는 부족과 관련된 질환 또는 병세를 치료하기 위한 약물을 제조하기 위한 작은 활성화 핵산 분자의 사용을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물이나 제제를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 세포 내 MITF 유전자 발현을 활성화/상향 조절하기 위한 약물을 제조하기 위한 작은 활성화 핵산 분자 또는 이를 포함하는 조성물 또는 제제의 사용을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 세포 내 MITF 유전자 발현을 활성화/상향 조절하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 MITF 단일 대립유전자 돌연변이에 의해 유발되는 질환, 예컨대 바르덴부르크 증후군 2A형 또는 티체 증후군의 치료에 사용될 수 있는, 세포 내 MITF 유전자 발현을 활성화/상향 조절하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 MITF 단백질 결핍 또는 부족과 관련된 질환 또는 병세, 예컨대 백반증을 치료하기 위한 약물을 제조하기 위한 작은 활성화 핵산 분자 또는 이를 포함하는 조성물 또는 제제의 사용을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 MITF 유전자의 단리된 작은 활성화 핵산 분자 표적 부위를 제공하는 것이며, 여기서 표적 부위는 서열 번호 299 내지 서열 번호 305로부터 선택된 임의의 서열의 임의의 16 내지 35개의 연속 뉴클레오티드로 이루어진 서열, 또는 임의의 16 내지 35개의 연속 뉴클레오티드로 구성된 서열과 적어도 75%, 예컨대 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 상동성을 갖는 서열을 포함한다.

[0017] 본 발명의 일 측면에서, 작은 활성화 RNA(saRNA) 분자와 같은 작은 활성화 핵산 분자가 제공되며, 상기 작은 활성화 핵산 분자는 인간 MITF 유전자의 프로모터 영역에서 길이가 16 내지 35개 뉴클레오티드로 이루어진 임의의 연속 단편과 적어도 75% 상동성 또는 상보성을 갖는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 적어도 포함한다. 또한, 상기 인간 MITF 유전자의 프로모터 영역은 바람직하게는 상기 MITF 유전자의 전사 시작 부위(transcription start site, TSS)로부터 이의 업스트림(서열번호 1)까지의 길이가 500개 뉴클레오티드인 영역이고, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 MITF 유전자의 전사 시작 부위(TSS)로부터 이의 업스트림(서열 번호 1)까지 길이가 500개 뉴클레오티드의 영역에서 길이가 16 내지 35개 뉴클레오티드의 임의의 연속 단편과 적어도 75% 상동성 또는 상보성을 갖는다.

[0018] 본 발명의 일 측면에서, 세포 내 MITF 유전자 발현을 활성화 또는 상향 조절하는 작은 활성화 RNA(saRNA) 분자와 같은 작은 활성화 핵산 분자가 제공된다. 상기 작은 활성화 핵산 분자의 한 가닥은 MITF 유전자의 프로모터 영역에서 길이가 16 내지 35개 뉴클레오티드의 임의의 핵산 서열과 적어도 75% 상동성 또는 상보성을 가짐으로써, MITF 유전자 발현을 활성화 또는 상향 조절하게 되며, 여기서 프로모터 영역은 전사 시작 부위의 업스트림에 500개의 뉴클레오티드(서열 번호 1)를 포함한다. 구체적으로는, 상기 작은 활성화 핵산 분자의 한 가닥은, MITF 유전자 프로모터의 전사 시작 부위로부터 떨어진 위치 -500 내지 -408(영역 H1, 서열 번호 299), -403 내지 -351(영역 H2, 서열 번호 300), -342 내지 -262(영역 H3, 서열 번호 301), -181 내지 -140(영역 H4, 서열 번호 302), -250 내지 -193(영역 W1, 서열 번호 303), -123 내지 -89(영역 W2, 서열 번호 304) 및 -62 내지 -36(영역 W3, 서열번호 305)에서 길이가 16 내지 35개 뉴클레오티드로 이루어진 연속 서열과 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 상동성 또는 상보성을 갖는 핵산 서열을 포함하거나 이로부터 선택되며, 핫스팟 영역과 윔스팟 영역은 표 5에 나타나 있다. 더 구체적으로는, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자의 한 가닥은 서열 번호 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 상동성 또는 상보성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자의 한 가닥은 서열 번호 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 상동성 또는 상보성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발의 작은 활성화 핵산 분자의 한 가닥은 서열 번호 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 상동성 또는 상보성을 갖는 핵산 서열로 구성된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자의 한 가닥은 서열 번호 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 상동성 또는 상보성을 갖는 핵산 서열이다.

[0019] 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자는 MITF 유전자의 프로모터 영역을 표적으로 하는 이중 가닥 작은 활성화 핵산 분자, 예컨대 작은 활성화 RNA(saRNA) 분자를 포함하며, 이는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함하고, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 MITF 유전자 프로모터의 전사 시작 부위로부터 떨어진 위치 -500 내지 -408(영역 H1, 서열 번호 299), -403 내지 -351(영역 H2, 서열 번호 300), -342 내지 -262(영역 H3, 서열 번호 301), -181 내지 -140(영역 H4, 서열 번호 302), -250 내지 -193(영역 W1, 서열 번호 303), -123 내지 -89(영역 W2, 서열 번호 304) 및 -62 내지 -36(영역 W3, 서열 번호 305)에서 길이가 16 내지 35개 뉴클레오티드로 이루어진 연속 서열과 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 상동성 또는 상보성을 갖으며, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 세포 내 MITF 유전자 발현을 활성화할 수 있는 이중 가닥 핵산 구조를 상보적으로 형성할 수 있다.

[0020] 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자의 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 2개의 상이한 핵산 가닥 또는 동일한 핵산 가닥에 존재할 수 있다. 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥이 2개의 상이한 가닥에 위치하는 경우, 작은 활성화 핵산 분자의 적어도 한 가닥은 5' 말단 및/또는 3' 말단에 오버행, 예를 들어 3' 말단에서 길이가 0 내지 6개 뉴클레오티드의 오버행(예컨대 길이가 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오티드의 오버행)을 가질 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자의 두 가닥은 모두 오버행을 가지며; 보다 바람직하게는, 상기 작은 활성화 핵산 분자의 두 가닥의 3' 말단은 길이가 0 내지 6개 뉴클레오티드의 오버행, 예를 들어 길이가 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오티드의 오버행; 및 가장 바람직하게는, 길이가 2 또는 3개 뉴클레오티드의 오버행을 가질 수 있다. 바람직하게는, 오버행의 뉴클레오티드는 dT(티민 데옥시뉴클레오티드, 또는 T로 표기됨)일 수 있다. 바람직하게는, 5' 말단 및/또는 3' 말단에서의 오버행은 dTdT 또는 dTdTdT이다.

[0021] 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자는 또한 이중 가닥 영역 헤어핀 구조를 형성할 수 있는 작은 활성화 핵산 분자, 예를 들어 단일 가닥 작은 활성화 RNA 분자를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자는 MITF 유전자의 프로모터 영역을 표적으로 하는 단일 가닥 작은 활성화 RNA 분자를 포함하고, 여기서 단일 가닥 작은 활성화 핵산 분자는 이중 가닥 영역 헤어핀 구조를 형성할 수 있다. 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 상기 제2 올리고뉴클레오티드 가닥이 동일한 올리고뉴클레오티드 가닥에 존재하는 경우, 바람직하게는, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자는 헤어핀 단일 가닥 핵산 분자가 될 수 있으며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 이중 가닥 핵산 구조를 형성할 수 있는 상보적 영역을 가지며, 상기 이중 가닥 핵산 구조는 예를 들어, RNA 활성화 메커니즘을 통해 세포 내 MITF 유전자의 발현을 촉진할 수 있다.

[0022] 전술한 작은 활성화 핵산 분자에서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 16 내지 35개의 뉴클레오티드(예를 들어, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35개 뉴클레오티드)의 길이를 가질 수 있다.

[0023] 일 실시양태에서, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자의 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 서열 번호 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 동일성 또는 상동성 또는 상보성을 갖고, 또는 상기 작은 활성화 핵산 분자의 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 서열 번호 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 동일성 또는 동일성 또는 상보성을 갖는다. 일 실시양태에서, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자의 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 서열 번호 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 동일성 또는 상동성 또는 상보성을 갖는 핵산 서열을 포함하거나 서열 번호 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 동일성 또는 상동성 또는 상보성을 갖는 핵산 서열로 구성되고; 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자의 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 서열 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100% 동일성 또는 상동성 또는 상보성을 갖는 핵산 서열을 포함하거나, 서열 번호 8 내지 104로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 95%, 약 99% 또는 100% 동일성 또는 상동성 또는 상보성을 갖는 핵산 서열로 구성된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자의 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 서열 번호 105 내지 201로부터 선택된 임의의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 및/또는 이의 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 서열 번호 202 내지 298로부터 선택된 임의의 뉴클레

오티드 서열을 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 본원에 기재된 작은 활성화 핵산 분자는 체외에서 합성되고 전사되거나 벡터에 의해 발현될 수 있다.

[0024] 본원에 기재된 작은 활성화 핵산 분자의 모든 뉴클레오티드는 비화학적으로 변형된 천연 뉴클레오티드가 될 수 있거나 적어도 하나의 변형을 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 본원에 기재된 작은 활성화 핵산 분자의 변형은 화학적 변형을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 적어도 하나의 뉴클레오티드는 화학적 변형을 가질 수 있으며, 본 발명에서 사용되는 화학적 변형은 하기 변형 중 하나 이상 또는 임의의 조합을 포함하거나 이로부터 선택될 수 있다.

[0025] (1) 작은 활성화 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열 내 뉴클레오티드의 인산디에스테르 결합의 변형;

[0026] (2) 작은 활성화 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열 내 리보오스 2'-OH의 변형;

[0027] (3) 작은 활성화 핵산 분자의 뉴클레오티드 내 염기의 변형; 및

[0028] (4) 작은 활성화 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열 내 적어도 하나의 뉴클레오티드가 고정된 핵산임.

[0029] 본원에 기재된 화학적 변형은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 상기 인산디에스테르 결합의 변형은 인산디에스테르 결합 내 산소 변형을 의미하고, 포스포로티오에이트 변형 및 보라노포스페이트 변형을 포함하되 이에 한정되지 않는다. 이러한 두 가지 변형은 saRNA 구조를 안정화시키고 염기 짝짓기를 위해 높은 특이성 및 높은 친화성을 유지할 수 있다.

[0030] 상기 리보오스 변형은 뉴클레오티드의 펜토오스 내 2'-OH 변형, 즉, 리보오스의 수산기 위치에 특정 치환기(예를 들어, 2'-플루오로 변형, 2'-옥시메틸 변형, 2'-옥시에틸리덴 메톡시 변형, 2,4'-디니트로페놀 변형, 고정 핵산(LNA), 2'-아미노 변형, 2'-데옥시 변형 등을 포함하되 이에 한정되지 않음)에 대한 접합을 의미한다.

[0031] 상기 염기 변형은 예를 들어, 5'-브로모우라실 변형, 5'-요오드우라실 변형, *N*-메틸우라실 변형, 2,6-디아미노퓨린 변형 등을 포함하되 이에 한정되지 않는 뉴클레오티드 염기의 변형을 의미한다.

[0032] 이러한 변형은 상기 작은 활성화 핵산 분자의 생체 이용률을 증가시키고, 표적 서열의 친화성을 개선하며, 세포 내 뉴클레아제 가수분해에 대한 저항성을 향상시킬 수 있다.

[0033] 또한, 세포에 대한 작은 활성화 핵산 분자의 액세스를 촉진하기 위해, 전술한 변형을 기반으로 하여, 친유성기(예컨대 콜레스테롤)를 상기 작은 활성화 핵산 분자의 제1 올리고뉴클레오티드 및/또는 제2 올리고뉴클레오티드의 말단에 접합시켜 지질 이중층으로 구성되는 세포막 및 핵막을 통해 세포핵 내 유전자 프로모터 영역과의 상호작용을 용이하게 만든다.

[0034] 세포를 접촉시키거나 세포에 도입한 후, 본 발명에 의해 제공되는 작은 활성화 핵산 분자는 바람직하게는 적어도 30%만큼 세포 내 MITF 유전자 발현을 효과적으로 활성화 또는 상향 조절할 수 있다.

[0035] 본 발명의 다른 측면은 또한 본원에 기재된 작은 활성화 핵산 분자를 인코딩하는 핵산에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 상기 핵산은 DNA 분자가 될 수 있다. 일 실시양태에서, 상기 핵산은 세포 내로 도입시 본원에 기재된 작은 활성화 핵산 분자를 발현할 수 있는 본원에 기재된 작은 활성화 핵산 분자를 인코딩하는 단편을 포함하는 발현 벡터이다.

[0036] 본 발명의 다른 측면은 전술한 작은 활성화 핵산 분자 또는 본원에 기재된 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 제공한다. 일 실시양태에서, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자는 MITF 유전자의 프로모터 영역을 표적으로 하는 이중 가닥 작은 활성화 핵산 분자, 예컨대 이중 가닥 작은 활성화 RNA(saRNA) 분자일 수 있고, 이는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자는 MITF 유전자의 프로모터 영역을 표적으로 하는 이중 가닥 작은 활성화 핵산 분자, 예컨대 단일 가닥 작은 활성화 RNA(saRNA) 분자일 수 있다.

[0037] 본 발명의 다른 측면은 조성물(예컨대, 약제학적 조성물)을 제공한다. 상기 조성물은 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본원에 기재된 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 선택적으로, 약제학적으로 허용 가능한 운반체를 포함한다. 일 실시양태에서, 상기 약제학적으로 허용 가능한 운반체는 리포솜, 고분자 폴리머 및 폴리펩티드를 포함하거나 이들로부터 선택된다.

[0038] 본 발명의 다른 측면에서, 제제가 제공되며, 상기 제제는 본원에 기재된 작은 활성화 핵산 분자, 본원에 개재된 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산

분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0039] 본 발명의 다른 측면에서, 키트가 제공되며, 상기 키트는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본원에 개재된 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0040] 본 발명의 다른 측면은 세포 내 MITF 유전자 발현을 활성화/상향 조절하기 위한 약물 또는 제제를 제조하는 데 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물의 사용에 관한 것이다.

[0041] 본 발명의 다른 측면은 또한 세포 내 MITF 유전자 발현을 활성화/상향 조절하기 위한 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물 또는 제제를 세포에 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시양태에서, 세포 내 MITF 유전자 발현을 활성화/상향 조절하기 위한 방법은 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물을 세포에 투여하는 단계를 포함한다, 위의 세포는 포유동물 세포, 예를 들어 인간 표피 멜라닌 세포(HEM) 및 정상 인간 표피 케라티노사이트(NHEK)와 같은 인간 세포를 포함하며, 이는 체외에 있을 수 있거나 인체와 같은 포유동물 신체에 존재할 수 있다.

[0042] 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자는 세포에 직접 도입되거나, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 세포로 도입한 후 상기 세포에서 생성될 수 있다. 상기 세포는 바람직하게는 포유동물 세포, 보다 바람직하게는 인간 세포이다. 전술한 세포는 세포계 또는 세포주와 같은 체외에 있을 수 있거나, 인체와 같은 포유동물 신체에 존재할 수 있다. 상기 인체는 MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세로 고통받고 있는 환자일 수 있다. 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자가 MITF 단백질 양의 결핍 또는 MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세를 치료하기에 충분한 용량으로 투여될 수 있다. 구체적으로, MITF 단백질 양의 결핍 또는 MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세는 예를 들어 백반증을 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 다른 측면은 MITF 유전자의 프로모터 영역에서 길이가 16 내지 35 뉴클레오티드로 이루어진 임의의 연속 서열(서열 번호 1)을 갖는 MITF 유전자의 단리된 작은 활성화 핵산 분자 표적 부위를 제공하며, 바람직하게는, 상기 표적 부위는 서열 번호 299 내지 305로부터 선택된 임의의 서열의 임의의 16 내지 35개의 연속 뉴클레오티드로 이루어진 서열을 포함하거나 이로부터 선택된다. 구체적으로는, 상기 표적 부위는 서열 번호 8 내지 104에 제시된 임의의 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로부터 선택될 수 있다.

[0044] 본 발명의 다른 측면은 개체 내 MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세를 치료하기 위한 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 치료적 유효량의 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시양태에서, 본 발명의 개체에서 불충분하거나 감소된 MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세를 치료하기 위한 방법은 치료적 유효량의 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물, 및 치료적 유효량의 다른 제제를 개체에게 투여하는 단계는 포함하며, 여기서 다른 제제는 예를 들어, 미세분자 화합물, 항체, 폴리펩티드 및 단백질을 포함한다. 상기 개체는 예를 들어 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다. 일 실시양태에서, MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세는 예를 들어 백반증을 포함할 수 있다. 백반증은 임상 양상에 따라 심상성 백반증과 분절성 백반증으로 나눌 수 있는데, 여기서 심상성 백반증은 자가면역 조절이나 산화 스트레스로 인한 멜라닌 세포 손상과 관련되고, 분절성 백반증은 유전적 요인과 관련이 있다. 백반증은 가족 유전, 자가면역 조절, 산화 스트레스 및 기능적 멜라닌 세포 손상과 같은 요인과 관련이 있다.

[0045] 본 발명의 다른 측면은 개체의 백반증을 치료하기 위한 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 치료적 유효량의 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시양태에서, 본 발명에서 개체의 백

반증을 치료하기 위한 방법은 치료적 유효량의 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물, 및 치료적 유효량의 다른 제제를 개체에게 투여하는 단계는 포함하며, 여기서 다른 제제는 예를 들어, 미세분자 화합물, 항체, 폴리펩티드 및 단백질을 포함한다. 상기 개체는 예를 들어 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다. 위의 방법에서, 백반증은 심상성 백반증, 분절성 백반증 등을 포함한다. 위의 방법에서, 개체는 포유동물, 예를 들어 인간을 포함한다.

[0046] 또한, 본 발명의 다른 측면은 MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세를 치료하기 위한 약물을 제조하는 데 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물의 사용에 관한 것이다. 상기 개체는 포유동물, 예를 들어 인간이 될 수 있다. 일 실시양태에서, MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환은 예를 들어 백반증을 포함할 수 있다. 바람직하게는, MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세는 백반증이고, 보다 바람직하게는 MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세는 심상성 백반증, 분절성 백반증 등을 포함한다.

[0047] 일 실시양태에서, MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환, 예컨대 백반증을 치료하기 위한 약물을 제조하는 데 사용되는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물이 제공된다. 일 실시양태에서, MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환은 예를 들어 백반증을 포함할 수 있다. 바람직하게는, MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세는 백반증이고, 보다 바람직하게는 MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 병세는 심상성 백반증, 분절성 백반증 등을 포함한다.

[0048] 본 발명의 다른 측면은 백반증을 치료하기 위한 약물 또는 약제학적 조성물을 제조하는 데 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물 또는 제제의 사용에 관한 것이다. 바람직하게는, 백반증은 심상성 백반증, 분절성 백반증 등을 포함한다.

[0049] 일 실시양태에서, MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환을 치료하기 위한 약물 또는 약제학적 조성물을 제조하는 데 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자를 포함하는 조성물의 사용이 제공된다.

[0050] 종래기술과 비교하면, 본 발명은 일 측면 또는 여러 측면에서 하기 유익한 효과를 갖는다.

[0051] 본 발명에서 제공하는 MITF 유전자 발현을 활성화/상향 조절할 수 있는 작은 활성화 핵산 분자, 예컨대 작은 활성화 RNA(saRNA)는 MITF 유전자를 지속적으로 활성화할 수 있고, MITF 유전자 및 단백질 발현이 효율적이고 특이적으로 상향 조절되거나 회복될 수 있도록 하며, 한편, 상기 작은 활성화 핵산 분자는 독성 및 부작용이 낮으며 MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 증상, 예컨대 백반증을 치료하고, 또는 MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소와 관련된 질환 또는 증상, 예컨대 바르덴부르크 증후군 2A형 또는 티체 증후군을 치료하기 위한 약물 또는 제제를 제조하는 데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 saRNA에 의해 매개되는 인간 MITF mRNA 발현의 변화를 나타낸다. 인간 MITF 프로모터를 표적으로 하는 239개의 saRNA를 25nM의 최종 농도에서 HEM 세포로 형질감염시켰다. 형질감염 72시간 후, MITF mRNA 발현을 1단계 RT-qPCR로 분석하였다. 도면에는 대조 처리군(Mock) 대비 MITF mRNA 발현(log2)의 변화의 내림차순 정렬이 나타나 있다. 세로좌표 값은 2회 반복 후의 평균값±SD를 나타낸다.

도 2는 saRNA가 인간 MITF 프로모터에서 소재하는 핫스팟 영역을 나타낸다. 인간 MITF 프로모터를 표적으로 하는 239개의 saRNA를 72시간 동안 25nM의 최종 농도에서 HEM 세포로 형질감염시켰다. 형질감염이 완료된 후, MITF mRNA 발현을 1단계 RT-qPCR로 분석하였다. 도면에는 MITF 프로모터에서 saRNA의 표적 위치에 따라 -500에서 -0까지 정렬된 대조 처리군(Mock) 대비 MITF 발현의 변화를 나타낸다. 검은색으로 채워진 점은 기능적 saRNA를 나타내고, 흰색 속이 빈 점은 비기능적 saRNA를 나타내며, 점선 프레임은 기능적 saRNA의 핫스팟 영역

(H1~H4) 및 윔스팟 영역(W1~W3)을 나타낸다. 세로좌표 값은 2회 반복 후의 평균값±SD를 나타낸다.

도 3은 2단계 RT-qPCR로 검증된 고처리량 스크리닝 결과를 나타낸다. 도 3에 나타낸 saRNA를 72시간 동안 25nM의 최종 농도에서 HEM 세포에 형질감염시켰다. 형질감염이 완료된 후 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 RNA를 추출하였다. 역전사 후 ABI 7500 고속 실시간 PCR 시스템을 사용하여 qPCR 증폭을 수행하였다. 이와 동시에 HPRT1 유전자는 내부 참조로서 증폭되었다. 도면에는 단일 saRNA로 세포를 처리한 후의 상대적인 MITF mRNA 발현 값을 나타낸다. Mock, dsCon2 및 RAG4-618i는 각각 블랭크 형질감염, 비특이적 대조 이중체 RNA 형질감염 및 작은 간섭 RNA 대조 형질감염이다. 세로좌표 값은 2회 반복 후의 평균값±SD를 나타낸다.

도 4는 2단계 RT-qPCR로 검증된 고처리량 스크리닝 결과를 나타낸다. 도 4에 나타낸 saRNA를 72시간 동안 25nM의 최종 농도에서 NHEK 세포에 형질감염시켰다. 형질감염이 완료된 후 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 RNA를 추출하였다. 역전사 후 ABI 7500 고속 실시간 PCR 시스템을 사용하여 qPCR 증폭을 수행하였다. 이와 동시에 HPRT1 유전자는 내부 참조로서 증폭되었다. 도면에는 단일 saRNA로 세포를 처리한 후의 상대적인 MITF mRNA 발현 값을 나타낸다. Mock, dsCon2 및 RAG4-618i는 각각 블랭크 형질감염, 비특이적 대조 이중체 RNA 형질감염 및 작은 간섭 RNA 대조 형질감염이다. 세로좌표 값은 2회 반복 후의 평균값±SD를 나타낸다.

도 5는 saRNA가 인간 NHEK 세포 내 MITF 단백질 발현을 촉진한다는 것을 나타낸다. 도 5에 나타낸 saRNA를 5일 동안 25nM의 최종 농도에서 NHEK 세포에 형질감염시켰다. 세포를 수집하여 전체 세포 단백질을 추출한 후 웨스턴 블롯을 사용하여 MITF 단백질 발현 수준을 검출하였다. 이와 동시에 내부 대조군으로서 Tubulin(α/β-Tubulin)이 검출되었다. 도면에는 단일 saRNA 처리된 세포의 상대적인 MITF 단백질 발현값을 나타낸다. Mock, dsCon2 및 RAG4-618i는 각각 블랭크 형질감염, 비특이적 대조 이중체 RNA 형질감염 및 작은 간섭 RNA 대조 형질감염이다.

도 6은 saRNA가 인간 HEM 세포 내 MITF 단백질 발현을 촉진한다는 것을 나타낸다. 도 6에 나타낸 saRNA를 72시간 동안 25nM의 최종 농도에서 HEK 세포에 형질감염시켰다. 세포를수집하여 전체 세포 단백질을 추출한 후 웨스턴 블롯을 사용하여 MITF 단백질 발현 수준을 검출하였다. 이와 동시에 내부 대조군으로서 Tubulin(α/β-Tubulin)이 검출되었다. 도면에는 단일 saRNA 처리된 세포의 상대적인 MITF 단백질 발현값을 나타낸다. Mock, dsCon2 및 RAG4-618i는 각각 블랭크 형질감염, 비특이적 대조 이중체 RNA 형질감염 및 작은 간섭 RNA 대조 형질감염이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 본 발명에서 사용되는 관련 용어는 다음과 같이 정의된다.

[0054] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "상보적"이란 두 개의 올리고뉴클레오티드 가닥 사이에서 염기쌍을 형성할 수 있는 능력을 의미한다. 상기 염기쌍은 일반적으로 역평행 올리고뉴클레오티드 가닥의 뉴클레오티드 사이에서 수소결합을 통해 형성된다. 상기 상보적 올리고뉴클레오티드 가닥의 염기는 왓슨-크릭 방식(예컨대, A 대 T, A 대 U, 및 C 대 G) 또는 이중체의 형성을 허용하는 다른 방식(예컨대, 후그스틴 또는 역 후그스틴 염기쌍)에 의해 짝짓기될 수 있다.

[0055] 상보성에는 완전 상보성 및 불완전 상보성이 포함된다. "완전 상보성" 또는 "100% 상보성"이란 제1 올리고뉴클레오티드 가닥에 있는 각 뉴클레오티드가 "잘못 짝짓기" 없이 상기 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 분자의 이중 가닥 영역에서 제2 올리고뉴클레오티드 가닥의 대응하는 위치에 있는 뉴클레오티드와의 수소결합을 형성할 수 있음을 의미한다. "불완전 상보성"이란 상기 두 가닥의 모든 뉴클레오티드 유닛이 서로 수소결합을 통해 결합되지 않음을 의미한다. 예를 들어, 상기 이중 가닥 영역에서 길이가 각각 20개 뉴클레오티드의 2개의 올리고뉴클레오티드 가닥에 대해, 수소결합을 통해 그 이중 가닥 영역에서 2개의 염기쌍만이 형성될 수 있을 경우, 상기 올리고뉴클레오티드 가닥은 10% 상보성을 가진다. 같은 예시에서, 수소결합을 통해 그 이중 가닥 영역에서 18개 염기쌍이 형성될 수 있을 경우, 상기 올리고뉴클레오티드 가닥은 90% 상보성을 가진다. 상당한 상보성이란 적어도 약 75%, 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100%의 상보성을 의미한다.

[0056] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "올리고뉴클레오티드"란 뉴클레오티드 폴리머를 의미하며, DNA, RNA, 또는 DNA/RNA 하이브리드의 단일 가닥 또는 이중 가닥 분자, 규칙적 및 불규칙적 교대 데옥시리보실 부분과 리보실 부분을 함유하는 올리고뉴클레오티드 가닥, 및 이러한 올리고뉴클레오티드의 변형, 천연적 또는 비천연적으로 존재하는 프레임워크를 포함하되 이에 한정되지 않는다. 본원에 기재된 표적 유전자 전사를 활성화하기 위한 올리고뉴클레오티드는 작은 활성화 핵산 분자이다.

[0057] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "올리고뉴클레오티드 가닥" 및 "올리고뉴클레오티드 서열"이란 35개 미만의 염기를 가진 짧은 뉴클레오티드 서열 가닥(데옥시리보핵산 DNA 또는 리보핵산 RNA 포함된 뉴클레오티드 가닥 포함, 또한 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 및 하나 이상의 리보뉴클레오타이드로부터 수집하여 형성된 혼합 올리고뉴클레오타이드 가닥 포함)에 대한 일반 용어를 의미하며 서로 교환해서 사용할 수 있다. 본 발명에서 올리고뉴클레오티드 가닥은 길이가 16 내지 35개의 뉴클레오티드 중 어느 하나일 수 있다.

[0058] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제1 올리고뉴클레오티드 가닥"은 센스 가닥이나 안티센스 가닥이 될 수 있다. 작은 활성화 RNA의 센스 가닥이란 표적 유전자의 프로모터 DNA 서열의 코딩 가닥과 동일성을 갖는 작은 활성화 RNA 이중체에 함유된 핵산 가닥을 의미하며, 안티센스 가닥이란 상기 센스 가닥과 서로 상보되는 작은 활성화 RNA 이중체 내 핵산 가닥을 의미한다.

[0059] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제2 올리고뉴클레오티드 가닥"은 또한 센스 가닥이나 안티센스 가닥이 될 수 있다. 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥이 센스 가닥인 경우, 상기 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 안티센스 가닥이며; 상기 제1 올리고뉴클레오티드 가닥이 안티센스 가닥인 경우, 상기 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 센스 가닥이다.

[0060] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "유전자"란 폴리펩티드 사슬을 인코딩하거나 기능성 RNA를 전사하는 데 필요한 모든 뉴클레오티드 서열을 의미한다. "유전자"는 내생적이거나 숙주 세포에 대한 완전 또는 부분적 재조합 유전자가 될 수 있다(예를 들어, 외인성 올리고뉴클레오티드 및 프로모터를 인코딩하기 위한 코딩 서열이 숙주 세포로 도입되거나, 외인성 코딩 서열에 인접한 이종 프로모터가 숙주 세포에 도입되었기 때문에). 예를 들어, 용어 "유전자"는 엑손 및 인트론으로 구성된 핵산 서열을 포함한다. 단백질 코딩 서열은 예를 들어 개시 코돈과 종료 코돈 사이에서 오픈 리딩 프레임의 엑손 내에 함유된 서열이며, 본원에서 사용된 바와 같이, "유전자"는 예컨대 유전자 조절 서열, 예컨대 프로모터, 인핸서, 및 다른 유전자의 전사, 발현이나 활성도를 제어하기 위한 당업계에서 알려진 다른 모든 서열을 포함하며, 상기 유전자가 코딩 서열이나 비코딩 서열을 포함하는지 여부는 상관없다. 일례로, 예를 들어 "유전자"는 프로모터 또는 인핸서와 같은 조절 서열을 포함하는 기능성 핵산을 설명하는 데 사용될 수 있다. 재조합 유전자의 발현은 한 가지 이상의 이종 조절 서열에 의해 제어될 수 있다.

[0061] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "표적 유전자"란 유기체 내에 자연적으로 존재하는 핵산 서열, 전이유전자, 바이러스 서열 또는 박테리아 서열을 의미할 수 있으며, 염색체 또는 염색체외 유전자이 될 수 있고, 및/또는 세포 및/또는 이의 염색질에 일시적 또는 안정적으로 형질감염되거나 통합될 수 있다. 상기 표적 유전자는 단백질 코딩 유전자 또는 비단백질 코딩 유전자가 될 수 있다(예컨대, microRNA 유전자 및 긴 비코딩 RNA 유전자). 상기 표적 유전자는 일반적으로 프로모터 서열을 함유하며, 표적 유전자에 대한 양성 조절은 작은 활성화 핵산 분자이 프로모터 서열과의 서열 동일성(상동성이라고도 불림)을 갖도록 설계됨으로써 달성되고, 표적 유전자 표현에 대한 상향 조절으로 특징화될 수 있다. "표적 유전자 프로모터의 서열"이란 표적 유전자의 비코딩 서열을 의미하며, 본 발명의 "표적 유전자 프로모터 서열과 상보됨"이라는 문구에서 표적 유전자 프로모터 서열이란 상기 서열의 코딩 가닥을 의미하며, 이는 또한 비템플릿 가닥, 즉, 상기 유전자의 코딩 서열과 같은 서열을 갖는 핵산 서열로 알려져 있다. "표적" 또는 "표적 서열"이란 작은 활성화 핵산 분자의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 일치하거나 상보되는 표적 유전자 프로모터의 서열 내 서열 단편을 의미한다.

[0062] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "센스 가닥"과 "센스 핵산 가닥"이란 교환해서 사용할 수 있으며, 작은 활성화 핵산 분자의 센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 작은 활성화 핵산 분자 이중체 내 표적 유전자 프로모터 서열의 코딩 가닥과 동일성을 갖는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 의미한다.

[0063] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "안티센스 가닥"과 "안티센스 핵산 가닥"이란 교환해서 사용할 수 있으며, 작은 활성화 핵산 분자의 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥은 작은 활성화 핵산 분자 이중체 내 센스 올리고뉴클레오티드 가닥과 상보되는 제2 올리고뉴클레오티드 가닥을 의미한다.

[0064] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "코딩 가닥"이란 전사에 사용할 수 없는 표적 유전자의 DNA 가닥을 의미하며, 그 가닥의 뉴클레오티드 서열은 전사에서 생성된 RNA의 뉴클레오티드 서열과 동일하다(RNA에서 DNA의 T는 U로 교체된다). 본원에 기재된 표적 유전자 프로모터의 이중 가닥 DNA 서열의 코딩 가닥이란 표적 유전자의 DNA 코딩 가닥과 동일한 DNA 가닥에 있는 프로모터 서열을 의미한다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "템플릿 가닥"이란 표적 유전자의 이중 가닥 DNA에 있는 코딩 가닥과 상보되는 다른 가닥을 의미하며, 즉, 상기 가닥은 템플릿으로서 RNA에 전사될 수 있으며, 그 가닥은 전사된 RNA와 상보(A

대 U, G 대 C)됨을 의미한다. 전사 과정에서 RNA 폴리머라제는 템플릿 가닥과 결합하고, 상기 템플릿 가닥의 3'→5' 방향으로 이동하며, 5'→3' 방향으로 RNA의 합성을 촉매한다. 본원에 기재된 표적 유전자 프로모터의 이중 가닥 DNA 서열의 템플릿 가닥은 상기 표적 유전자의 DNA 템플릿 가닥과 같은 DNA 가닥에 있는 프로모터 서열을 의미한다.

[0066] 본원에서 사용된 용어인 "프로모터"란 단백질 코딩 또는 RNA 코딩 핵산 서열을 공간적으로 연관시켜 이들의 전사에서 조절하는 역할을 하는 서열을 의미한다. 일반적으로, 진핵 유전자 프로모터에는 100 내지 5000개의 염기쌍이 함유되어 있지만, 이런 길이 범위는 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "프로모터"를 제한하려고 하는 것이 아니다. 상기 프로모터 서열이 일반적으로 단백질 코딩 또는 RNA 코딩 서열의 5' 말단에 위치하고 있지만, 상기 프로모터 서열은 엑손 서열 및 인트론 서열에도 존재할 수 있다.

[0067] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "전사 시작 부위"란 유전자의 템플릿 가닥에 있는 전사 시작점을 마킹하는 뉴클레오티드를 의미한다. 상기 전사 시작 부위는 프로모터 영역의 템플릿 가닥에 나타날 수 있다. 유전자는 하나를 초과하는 전사 시작 부위를 가질 수 있다.

[0068] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "동일성" 또는 "상동성"이란 작은 활성화 RNA의 하나의 올리고뉴클레오티드 가닥(센스 또는 안티센스 가닥)이 표적 유전자 프로모터 서열의 영역 내 코딩 가닥이나 템플릿 가닥과 유사성을 가진다는 의미이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "동일성" 또는 "상동성"은 적어도 약 75%, 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 100%일 수 있다.

[0069] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "오버행"이란 올리고뉴클레오티드 가닥의 말단(5' 또는 3')에 있고 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 다른 하나의 가닥으로부터 확장된 한 가닥에 의해 형성되는 비염기쌍 뉴클레오티드를 의미한다. 이중체의 3' 말단 및/또는 5' 말단로부터 확장되는 단일 가닥 영역을 오버행이라고 지칭한다.

[0070] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어인 "유전자 활성화", "유전자 발현 활성화", "유전자 상향 조절" 및 "유전자 발현 상향 조절"이란 세포 내 또는 유전자의 기관계 내에서 전사 수준, mRNA 수준, 단백질 수준, 효소 활성, 메틸화 상태, 염색질 상태나 구조, 번역 수준 또는 활성 또는 상태를 측정함으로써 결정된 바와 같이, 특정 핵산의 전사, 번역, 발현 또는 활성도를 증가시키는 것을 의미하며, 교환하여 사용할 수 있다. 이들 활성도나 상태는 직접 또는 간접적으로 측정될 수 있다. 또한, "유전자 활성화", "유전자 발현 활성화", "유전자 상향 조절" 또는 "유전자 발현 상향 조절"이란 핵산 서열과 연관된 활성도를 이러한 활성화의 메커니즘과 상관없이 증가시킨다는 것을 의미한다. 예를 들어, 상기 핵산 서열은 조절 서열로서 조절 역할을 하고, 상기 핵산 서열은 RNA로 전사되며 상기 RNA는 단백질로 번역되어 단백질 발현을 증가시킨다.

[0071] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "작은 활성화 RNA", "saRNA" 및 "작은 활성화 핵산 분자"는 교환하여 사용할 수 있으며, 표적 유전자 발현을 상향 조절할 수 있는 핵산 분자를 의미하며, 표적 유전자의 비코딩 핵산 서열(예를 들어, 프로모터 및 인핸서)과 서열 동일성 또는 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 함유한 제1 핵산 단편(안티센스 핵산 가닥, 또한 안티센스 올리고뉴클레오티드 가닥이라고도 지칭함)과, 상기 제1 핵산 단편과 상보되는 뉴클레오티드 서열을 함유한 제2 핵산 단편(센스 핵산 가닥, 또한 센스 올리고뉴클레오티드 가닥이라고도 지칭함)으로 구성되며, 여기서 제1 핵산 단편 및 제2 핵산 단편은 이중체를 형성한다. 상기 작은 활성화 핵산 분자는 또한 상기 분자 내에서 2개의 상보적 영역에 의해 헤어핀 구조를 형성할 수 있는 합성 또는 벡터 발현된 단일 가닥 RNA 분자로 구성될 수 있으며, 여기서 제1 영역은 유전자 프로모터의 표적 서열과 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 제2 영역은 상기 제1 영역과 상보되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 작은 활성화 핵산 분자에 있는 이중체 영역의 길이는 일반적으로 약 10개 내지 약 50개, 약 12개 내지 약 48개, 약 14개 내지 약 46개, 약 16개 내지 약 44개, 약 18개 내지 약 42개, 약 20개 내지 약 40개, 약 22개 내지 약 38개, 약 24개 내지 약 36개, 약 26개 내지 약 34개, 약 28개 내지 약 32개의 염기쌍이며, 일반적으로 약 10개, 약 15개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 35개, 약 40개, 약 45개 또는 약 50개의 염기쌍이다. 또한, 용어 "saRNA", "작은 활성화 RNA" 및 "작은 활성화 핵산 분자"는 또한 상기 리보뉴클레오티드를 제외한 핵산을 포함하며, 변형 뉴클레오티드 또는 유사체를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0072] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "핫스팟(H 영역)"이란 길이가 적어도 25bp인 유전자 프로모터 영역을 의미한다. 기능성 작은 활성화 핵산 분자의 표적 집단이 이들 핫스팟 영역에 나타나며, 여기서 이들 핫스팟 영역을 표적으로 하는 적어도 30%의 작은 활성화 핵산 분자는 표적 유전자의 mRNA 발현에서 1.1배 이상의 변화를 유도할 수 있고, 용어 "윔스팟(W 영역)"이란 길이가 적어도 25bp인 유전자 프로모터 영역을 의미한다. 기능성 작은 활성화 핵산 분자의 표적 집단이 이들 핫스팟 영역에 나타나며, 이들 핫스팟 영역을 표적으로 하는 8% 내지 30%의 작은 활성화 핵산 분자는 표적 유전자의 mRNA 발현에서 1.1배 이상의 변화를 유도할 수 있다.

[0073] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "합성"이란 화학 합성, 체외 전사, 및/또는 벡터 기반 발현과 같은 RNA 합성을 허용하는 모든 방법을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 합성 방법을 의미한다.

[0074] 본 발명에 따르면, MITF 유전자 발현은 RNA 활성화에 의해 상향 조절되고, MITF 단백질 발현 수준을 증가시켜 관련 질환(특히 백반증)을 치료한다. 본 발명의 MITF 유전자는 때때로 표적 유전자라고도 불린다.

[0075] 본 발명에 의해 제공된 작은 활성화 핵산 분자를 제조하기 위한 방법은 서열 설계 및 서열 합성을 포함한다.

[0076] 본 발명의 작은 활성화 핵산 분자 서열의 합성은 화학적 합성을 적용함으로써 수행하거나 핵산 합성을 전문으로 하는 생명공학 회사에 위임할 수 있다.

[0077] 일반적으로, 화학적 합성은 하기 네 단계: (1) 올리고머 리보뉴클레오티드 합성, (2) 탈보호, (3) 정제 및 분리; 및 (4) 탈염 및 어닐링을 포함한다.

[0078] 예를 들어, 본원에 기재된 saRNA를 화학적으로 합성하기 위한 특정 단계는 다음과 같다.

[0079] (1) 올리고머 리보뉴클레오티드의 합성

[0080] RNA 1μM의 합성을 자동 DNA/RNA 합성기(예: Applied Biosystems EXPEDITE8909)에서 설정하고, 또한 각 주기의 결합 시간을 10분 내지 15분으로 설정한다. 고체상 결합 5'-O-p-디메톡시트리페닐메틸-티미딘 기질을 개시제로 하여, 제1주기에서 하나의 염기를 상기 고체상 기질과 결합한 다음, 제n주기에서(19 ≥ n ≥ 2), 제n-1주기에서 결합된 상기 염기에 하나의 염기를 결합하였다. 전체 핵산 서열의 합성이 완료될 때까지 그 과정을 반복하였다.

[0081] (2) 탈보호

[0082] 상기 saRNA와 결합된 상기 고체상 기질을 테스트 튜브에 넣고, 1mL의 에탄올 및 수산화암모늄 혼합 용액(부피비: 1:3)을 상기 테스트 튜브에 첨가하였다. 그 다음 상기 테스트 튜브를 밀봉하여 인큐베이터에 배치하고, 혼합물을 25 내지 70℃에서 2시간 내지 30시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 saRNA와 결합된 고체상 기질을 함유하는 용액을 여과하고 여과물을 수집하였다. 상기 고체상 기질을 이중 증류수로 2번 세척하고(매번 1mL) 여과물을 수집하였다. 수집된 용리액을 결합하고 1시간 내지 12시간 동안 진공 하에서 건조하였다. 그 다음 상기 용액을 1mL의 테트라하이드로푸란 기반 플루오르 테트라부틸암모늄 용액(1M)에 첨가하고, 실온에서 4시간 내지 12시간 놓아둔 다음, 2mL의 *n*-부탄올을 첨가하였다. 침전물을 수집하고 고속 원심분리를 통해 saRNA의 단일 가닥 조생성물을 획득하였다.

[0083] (3) 정제 및 분리

[0084] 얻어진 saRNA 조생성물을 1mol/L 농도의 아세트산 트리에틸아민 용액 2mL에 용해하고, 상기 용액을 역상 C18컬럼 고압 액체 크로마토그래피로 분리하여 정제된 saRNA 단일 가닥 생성물을 획득하였다.

[0085] (4) 탈염 및 어닐링

[0086] 겔 여과(크기 배제 크로마토그래피)를 통해 염을 제거하였다. 단일 센스 올리고머 리보핵산 가닥 및 단일 안티센스 올리고머 리보핵산 가닥을 1:1의 몰 비율로 1mL 내지 2mL의 버퍼(10mM Tris, pH = 7.5~8.0, 50mM NaCl)에 혼합하였다. 상기 용액을 95℃로 가열한 다음 실온에서 서서히 냉각하여 saRNA를 함유하는 용액을 획득하였다.

[0087] 본 연구 결과, 전술한 saRNA는 세포에 도입한 후 MITF mRNA 및 단백질 발현을 효과적으로 증가시킬 수 있음이 밝혀졌다.

[0088] 본 발명은 하기의 특정 실시예 및 도면을 참조하여 추가적으로 설명될 것이다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아님을 이해해야 한다. 하기 실시예에서, 특정 조건이 없는 연구 방법은 일반적으로 Sambrook 등, *Molecular Cloning: Laboratory Manual*(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)에 기재된 조건과 같은 기존 조건 또는 제조업체가 권장하는 조건을 따랐다.

[0089] 이하, 실시예를 참조하여 본 공개의 실시양태를 상세히 설명하나, 당업자는 하기 실시예는 본 공개를 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안 됨을 이해할 것이다. 예시에 특정 조건이 명시되지 않은 경우에는 기존 조건 또는 제조업체가 권장하는 조건을 적용해야 한다. 제조사가 지정되지 않은 경우, 본원에 사용된 시약 또는 기구는 시장에서 구매할 수 있는 기존 제품이다.

[0090] **실시예 1. 인간 MITF 프로모터를 표적으로 하는 saRNA의 설계 및 합성**

[0091] 500bp 길이의 MITF 프로모터 서열을 템플릿으로 하여 MITF 유전자 발현을 활성화할 수 있는 기능적 작은 활성화

RNA를 스크리닝하기 위해 TSS의 -500bp 업스트림에서 19bp 길이의 표적을 선택하였다. 그런 다음 표적 서열을 여과하여 하기 기준에 부합하는 것을 유지했다: (1) 40%와 65% 사이의 GC 함량; (2) 연속된 5개 미만의 동일한 뉴클레오티드; (3) 3개 이하의 디뉴클레오티드 반복 서열; (4) 3개 이하의 트리뉴클레오티드 반복 서열. 여과 후, 나머지 표적 서열 239개는 후보로서 스크리닝 과정에 진입되었다. 상응하는 이중 가닥 작은 활성화 RNA는 이러한 후보 서열을 기반으로 하여 화학적으로 합성되었다.

[0092] 본 연구에 사용된 이중 가닥 작은 활성화 RNA 내 각각의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 길이가 21개의 뉴클레오티드이었다. 이중 가닥 saRNA의 제1 리보핵산 가닥(센스 가닥)의 5' 영역 내 19개의 뉴클레오티드는 상기 프로모터의 표적 서열과 100% 동일성을 가지었고, 상기 제1 리보핵산 가닥의 3' 말단은 TT 서열을 함유하였다. 제2 리보핵산 가닥의 5' 영역 내 19개의 뉴클레오티드는 제1 리보핵산 가닥 서열과 상보되며, 상기 제2 리보핵산 가닥의 3' 말단은 TT 서열을 함유하였다. 전술한 이중 가닥 saRNA의 가닥 2개를 1:1 몰 비율로 혼합하였다. 어닐링 후, 이중 가닥 saRNA가 형성되었습니다.

[0093] 인간 MITF 프로모터의 서열은 하기와 같이 나타나며, 서열 목록에서 서열 번호 1의 5'에서 3'의 위치 1 내지 위치 500에 상응한다.

```
-500 gcgaaggaaa gttcttcctc gttgttccaa tccgaggaca agctgatatg
-450 tcgcagcagc ccagggaagc atgcgagctg ataggaagtc cttttatttt
-400 aagacaggct cgaatgctaa aactttcttg tgccaaaacc cttgactatt
-350 ttatttttaa aataagcact tggcgtgccc tcgcagatgt ctgagctgag
-300 aggtcggggc gatggtagaa gagcagtcag tgtccattct tattcatatt
-250 aagtagccaa gtctgtaccc ttgaagcaag tggggagaga ggagggagag
-200 gagctgctga cattgacaat gaatccaaac aggagttgca ctagcggtgt
-150 ccaccacgtt gcctctcccc cgcctggcct tctgggagct gtagttttcg
-100 tgggagcggc tccccaggcg agctgggaat gccccgcccg ggccgaacta
 -50 cagatcccag gcggcgctcg gccgccagcc cctcccgccc gggtgcgagt
```

[0094]

[0095] **실시예 2. 인간 MITF 프로모터를 표적으로 하는 saRNA의 고처리량 스크리닝**

[0096] (1) 세포 배양 및 형질감염

[0097] 인간 표피 멜라닌 세포(HEM)(Beina Chuanglian Biotechnology Co., Ltd(Beijing)에서 구매, BNCC350795) 및 정상 인간 표피 각질 세포(NHEK)(Beina Chuanglian Biotechnology Co., Ltd(Beijing)에서 구매, BNCC340593)를 10% 신생아 송아지 혈청(Sigma-Aldrich) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)을 함유하는 DMEM 배지(Gibco)에서 배양했다. 세포를 5% CO_2 및 37℃에서 배양하였다. HEM 세포를 96-웰 플레이트에 2000개 세포/웰로 플레이팅하고; 제조업체가 제공한 지침에 따라 RNAiMax(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 72시간 동안 25nM(달리 명시되지 않는 한) 농도에서 작은 활성화 RNA를 형질감염시켰고, 각 처리에 2개의 복제 웰을 사용했다.

[0098] (2) 1단계 RT-qPCR

[0099] 형질감염 후, 상기 배지는 폐기되었으며, 각 웰은 150μL PBS로 세척되었다. PBS를 폐기한 다음, 각 웰에 50μL의 세포 용해 용액을 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베인션하였다. 각 웰에서 1μL의 세포 용해 용액을 취하여 1단계 TB GreenTM PrimeScripTM RT-PCR 키트 II(Takara, RR086A)를 사용하여 ABI 7500 고속 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems)에서 qPCR 분석을 수행했고, 각 샘플은 3개의 복제 웰에서 반복적으로 증폭되었다. PCR 반응 조건은 아래의 표 1에 나타나 있다.

[0100] 표 1. PCR 반응 제조

시약	부피
2 × 1단계 TB Green RT-PCR 버퍼 4	2.5μl
PrimeScript 1단계 효소 혼합물 2	0.2μl
정방향 및 역방향 프라이머 혼합물(5μM)	0.4μl
RNase dH_2O 제외	1.4μl
조 용해액(RNA)	0.5μl
총합	5μl

[0101]

[0102] 반응 조건은 하기와 같았다: 역전사 반응(1단계) 42℃에서 5분, 95℃에서 10초; PCR 반응(2단계) 95℃에서 5초, 60℃에서 20초, 45주기 증폭. HPRT1 및 TBP는 내부 참조 유전자로서 사용되었다. MITF, HPRT1 및 TBP에서 사용하는 PCR 프라이머는 표 2에 나타나 있으며, 여기서 MITF는 MITF F1/R1 프라이머 쌍을 사용하여 증폭되었다.

[0103] 표 2. RT-qPCR 분석용 프라이머 서열

프라이머	서열 번호	서열(5'-3')
MITF F1 MITF R1	서열 번호 2 서열 번호 3	CGACAGAAGAAACTGGAGCAC CCCGTGGATGGAATAAGGGAAA
HPRT1 F HPRT1 R	서열 번호 4 서열 번호 5	AAAGATGGTCAAGGTCGCAAG TAGTCAAGGGCATATCCTACAAC
TBP F TBP R	서열 번호 6 서열 번호 7	TGCTCACCCACCAACAATTTAG TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG

[0104]

[0105] 대조 처리군(Mock) 대비 saRNA 형질감염된 샘플의 MITF(표적 유전자) 발현 값(Erel)을 계산하기 위해, 상기 표적 유전자 및 2개의 내부 참조 유전자의 Ct 값을 계산용 식 1에 치환하였다.

$$E_{rel} = 2^{(CtT_m - CtT_s)} / ((2^{(CtR1_m - CtR1_s)} * 2^{(CtR2_m - CtR2_s)})^{(1/2)}) \quad (식\ 1)$$

[0106]

[0107] 여기서, CtTm은 대조 처리군(모의) 샘플로부터의 표적 유전자의 Ct 값이고; CtTs는 saRNA 처리된 샘플로부터의 표적 유전자의 Ct 값이고; CtR1m은 Mock 처리된 샘플로부터의 내부 참조 유전자 1의 Ct 값이고; CtR1s는 saRNA 처리된 샘플로부터의 내부 참조 유전자 1의 Ct 값이고; CtR2m은 대조 처리군 샘플로부터의 내부 참조 유전자 2의 Ct 값이고; CtR2s는 saRNA 처리된 샘플로부터의 내부 참조 유전자 2의 Ct 값이다.

[0108] (3) 기능성 saRNA의 스크리닝

[0109] MITF 전사를 활성화할 수 있는 saRNA를 얻기 위해, 전술한 239개의 saRNA를 25nM의 형질감염 농도에서 HEM 세포에 개별적으로 형질감염시켰다. 형질감염 72시간 후, 위에 기재된 바와 동일한 방법에 의해, 세포를 용해시키고 1단계 RT-qPCR 분석을 수행하여 각 saRNA 처리된 샘플의 상대적(대조 처리군과 비교함) MITF 유전자 발현 값을 얻었다. 표 3에 나타난 바와 같이, 29개(12.1%) saRNA는 높은 활성화(≥ 1.5배), 68개(28.5%) saRNA는 약한 활성화(≥ 1.1배), 142개(59.4%) saRNA는 MITF 발현에 대한 상향 조절 효과를 나타내지 않았다. 최대 활성화는 2.75배, 최대 억제는 0.38배였으며, 활성화 활성이 있는 saRNA를 기능성 saRNA라고 지칭하였다.

[0110] 표 3. 인간 MITF saRNA의 고처리량 스크리닝 결과

saRNA 활성도	MITF 변화의 log_2 값(배수)	saRNA 개수	비율
높은 활성도	≥ 0.58(1.50) ~ ≤1.46(2.75)	29	12.1%
약한 활성도	≥ 0.13(1.10) ~ < 0.58(1.50)	68	28.5%
활성화 효과 없음	< 0.13(1.10)	142	59.4%
총합		239	100%

[0111]

[0112] 도 1에 나타난 바와 같이, 인간 MITF saRNA의 MITF 발현 변화가 내림차순으로 추가로 나타나 있다. MITF 활성 saRNA 서열(기능적 saRNA 서열), 활성 표적 서열 및 MITF mRNA 발현의 변화는 표 4에 나타나 있다(표 4에 나열된 각각의 활성 표적 서열은 서열 목록의 서열 번호 8 내지 104에 상응, 각각의 saRNA 센스 서열은 서열 목록의 서열 105 내지 201에 상응, 각 saRNA 안티센스 서열은 서열 목록의 서열 번호 202 내지 298에 상응). 표 5는 상이한 핫스팟 영역 및 윔스팟 영역 및 기능성 saRNA가 위치하는 관련 서열(서열번호 299 내지 305)을 나타낸다.

[0113] 표 4. 기능성 saRNA 서열, 이의 활성 표적 서열 및 이로 인한 MITF mRNA 발현의 변화

	saRNA	활성 표적 서열(5'-3')	기능성 saRNA 서열(5'-3')	상대적인 MITF mRNA 발현 수준의 변화 배수
핫스팟 영역	RAG4-500	GCGAAGGAAAGTTCTTCCT	GCGAAGGAAAGUUCUUCCUTT (센스) AGGAAGAACUUUCCUUCGCTT (안티센스)	1.64
	RAG4-498	GAAGGAAAGTTCTTCCTCG	GAAGGAAAGUUCUUCCUCGTT (센스) CGAGGAAGAACUUUCCUUCTT (안티센스)	1.34
	RAG4-497	AAGGAAAGTTCTTCCTCGT	AAGGAAAGUUCUUCCUCGUTT (센스) ACGAGGAAGAACUUUCCUUTT (안티센스)	1.44
	RAG4-494	GAAAGTTCTTCCTCGTTGT	GAAAGUUCUUCCUCGUUGUTT (센스) ACAACGAGGAAGAACUUUCTT (안티센스)	1.10

[0114]

	RAG4-491	AGTTCTTCCTCGTTGTTCC	AGUUCUUCCUCGUUGUUCCTT (센스) GGAACAACGAGGAAGAACUTT (안티센스)	1.45
	RAG4-490	GTTCTTCCTCGTTGTTCCA	GUUCUUCCUCGUUGUUCCATT (센스) UGGAACAACGAGGAAGAACTT (안티센스)	1.97
	RAG4-489	TTCTTCCTCGTTGTTCCAA	UUCUUCCUCGUUGUUCCAATT (센스) UUGGAACAACGAGGAAGAATT (안티센스)	1.84
	RAG4-487	CTTCCTCGTTGTTCCAATC	CUUCCUCGUUGUUCCAAUCTT (센스) GAUUGGAACAACGAGGAAGTT (안티센스)	1.15
	RAG4-485	TCCTCGTTGTTCCAATCCG	UCCUCGUUGUUCCAAUCCGTT (센스) CGGAUUGGAACAACGAGGATT (안티센스)	1.32
	RAG4-483	CTCGTTGTTCCAATCCGAG	CUCGUUGUUCCAAUCCGAGTT (센스) CUCGGAUUGGAACAACGAGTT (안티센스)	1.16
	RAG4-482	TCGTTGTTCCAATCCGAGG	UCGUUGUUCCAAUCCGAGGTT (센스) CCUCGGAUUGGAACAACGATT (안티센스)	1.16
	RAG4-481	CGTTGTTCCAATCCGAGGA	CGUUGUUCCAAUCCGAGGATT (센스) UCCUCGGAUUGGAACAACGTT (안티센스)	1.23
	RAG4-479	TTGTTCCAATCCGAGGACA	UUGUUCCAAUCCGAGGACATT (센스) UGUCCUCGGAUUGGAACAATT (안티센스)	1.16
	RAG4-478	TGTTCCAATCCGAGGACAA	UGUUCCAAUCCGAGGACAATT (센스) UUGUCCUCGGAUUGGAACATT (안티센스)	1.53
	RAG4-477	GTTCCAATCCGAGGACAAG	GUUCCAAUCCGAGGACAAGTT (센스) CUUGUCCUCGGAUUGGAACTT (안티센스)	1.54
	RAG4-476	TTCCAATCCGAGGACAAGC	UUCCAAUCCGAGGACAAGCTT (센스) GCUUGUCCUCGGAUUGGAATT (안티센스)	1.31
	RAG4-475	TCCAATCCGAGGACAAGCT	UCCAAUCCGAGGACAAGCUTT (센스) AGCUUGUCCUCGGAUUGGATT (안티센스)	1.30
	RAG4-474	CCAATCCGAGGACAAGCTG	CCAAUCCGAGGACAAGCUGTT (센스) CAGCUUGUCCUCGGAUUGGTT (안티센스)	1.12
	RAG4-473	CAATCCGAGGACAAGCTGA	CAAUCCGAGGACAAGCUGATT (센스) UCAGCUUGUCCUCGGAUUGTT (안티센스)	1.10
	RAG4-472	AATCCGAGGACAAGCTGAT	AAUCCGAGGACAAGCUGAUTT (센스) AUCAGCUUGUCCUCGGAUUTT (안티센스)	1.93
	RAG4-469	CCGAGGACAAGCTGATATG	CCGAGGACAAGCUGAUAUGTT (센스) CAUAUCAGCUUGUCCUCGGTT (안티센스)	1.39
	RAG4-467	GAGGACAAGCTGATATGTC	GAGGACAAGCUGAUAUGUCTT (센스) GACAUAUCAGCUUGUCCUCTT (안티센스)	1.33
	RAG4-466	AGGACAAGCTGATATGTCG	AGGACAAGCUGAUAUGUCGTT (센스) CGACAUAUCAGCUUGUCCUTT (안티센스)	1.14
	RAG4-464	GACAAGCTGATATGTCGCA	GACAAGCUGAUAUGUCGCATT (센스) UGCGACAUAUCAGCUUGUCTT (안티센스)	1.37
	RAG4-461	AAGCTGATATGTCGCAGCA	AAGCUGAUAUGUCGCAGCATT (센스) UGCUGCGACAUAUCAGCUUTT (안티센스)	2.10
	RAG4-460	AGCTGATATGTCGCAGCAG	AGCUGAUAUGUCGCAGCAGTT (센스) CUGCUGCGACAUAUCAGCUTT (안티센스)	1.63

[0115]

	RAG4-459	GCTGATATGTCGCAGCAGC	GCUGAUAUGUCGCAGCAGCTT GCUGCUGCGACAUAUCAGCTT	(센스) (안티센스)	1.72
	RAG4-458	CTGATATGTCGCAGCAGCC	CUGAUAUGUCGCAGCAGCCTT GGCUGCUGCGACAUAUCAGTT	(센스) (안티센스)	1.79
	RAG4-456	GATATGTCGCAGCAGCCCA	GAUAUGUCGCAGCAGCCCATT UGGGCUGCUGCGACAUAUCTT	(센스) (안티센스)	1.58
	RAG4-446	AGCAGCCCAGGGAAGCATG	AGCAGCCCAGGGAAGCAUGTT CAUGCUUCCCUGGGCUGCUTT	(센스) (안티센스)	1.23
	RAG4-432	GCATGCGAGCTGATAGGAA	GCAUGCGAGCUGAUAGGAATT UUCCUAUCAGCUCGCAUGCTT	(센스) (안티센스)	1.32
	RAG4-431	CATGCGAGCTGATAGGAAG	CAUGCGAGCUGAUAGGAAGTT CUUCCUAUCAGCUCGCAUGTT	(센스) (안티센스)	1.53
	RAG4-427	CGAGCTGATAGGAAGTCCT	CGAGCUGAUAGGAAGUCCUTT AGGACUUCCUAUCAGCUCGTT	(센스) (안티센스)	1.10
	RAG4-426	GAGCTGATAGGAAGTCCTT	GAGCUGAUAGGAAGUCCUUTT AAGGACUUCCUAUCAGCUCTT	(센스) (안티센스)	1.43
	RAG4-403	TTTAAGACAGGCTCGAATG	UUUAAGACAGGCUCGAAUGTT CAUUCGAGCCUGUCUUAAATT	(센스) (안티센스)	1.17
	RAG4-402	TTAAGACAGGCTCGAATGC	UUAAGACAGGCUCGAAUGCTT GCAUUCGAGCCUGUCUUAATT	(센스) (안티센스)	1.46
	RAG4-401	TAAGACAGGCTCGAATGCT	UAAGACAGGCUCGAAUGCUTT AGCAUUCGAGCCUGUCUUATT	(센스) (안티센스)	1.21
	RAG4-396	CAGGCTCGAATGCTAAAAC	CAGGCUCGAAUGCUAAAACTT GUUUUAGCAUUCGAGCCUGTT	(센스) (안티센스)	1.65
	RAG4-395	AGGCTCGAATGCTAAAACT	AGGCUCGAAUGCUAAAACUTT AGUUUUAGCAUUCGAGCCUTT	(센스) (안티센스)	1.12
	RAG4-394	GGCTCGAATGCTAAAACTT	GGCUCGAAUGCUAAAACUUTT AAGUUUUAGCAUUCGAGCCTT	(센스) (안티센스)	1.15
	RAG4-385	GCTAAAACTTTCTTGTGCC	GCUAAAACUUUCUUGUGCCTT GGCACAAGAAAGUUUUAGCTT	(센스) (안티센스)	1.48
	RAG4-375	TCTTGTGCCAAAACCCTTG	UCUUGUGCCAAAACCCUUGTT CAAGGGUUUUGGCACAAGATT	(센스) (안티센스)	1.43
	RAG4-374	CTTGTGCCAAAACCCTTGA	CUUGUGCCAAAACCCUUGATT UCAAGGGUUUUGGCACAAGTT	(센스) (안티센스)	1.27
	RAG4-372	TGTGCCAAAACCCTTGACT	UGUGCCAAAACCCUUGACUTT AGUCAAGGGUUUUGGCACATT	(센스) (안티센스)	1.26
	RAG4-371	GTGCCAAAACCCTTGACTA	GUGCCAAAACCCUUGACUATT UAGUCAAGGGUUUUGGCACTT	(센스) (안티센스)	1.43
	RAG4-369	GCCAAAACCCTTGACTATT	GCCAAAACCCUUGACUAUUTT AAUAGUCAAGGGUUUUGGCTT	(센스) (안티센스)	1.11
	RAG4-342	AAAATAAGCACTTGGCGTG	AAAAUAAGCACUUGGCGUGTT CACGCCAAGUGCUUAUUUUTT	(센스) (안티센스)	1.21
	RAG4-341	AAATAAGCACTTGGCGTGC	AAAUAAGCACUUGGCGUGCTT GCACGCCAAGUGCUUAUUUTT	(센스) (안티센스)	1.15

[0116]

	RAG4-323	CCCTCGCAGATGTCTGAGC	CCCUCGCAGAUGUCUGAGCTT (센스) GCUCAGACAUCUGCGAGGGTT (안티센스)	1.32
	RAG4-322	CCTCGCAGATGTCTGAGCT	CCUCGCAGAUGUCUGAGCUTT (센스) AGCUCAGACAUCUGCGAGGTT (안티센스)	1.19
	RAG4-320	TCGCAGATGTCTGAGCTGA	UCGCAGAUGUCUGAGCUGATT (센스) UCAGCUCAGACAUCUGCGATT (안티센스)	1.30
	RAG4-318	GCAGATGTCTGAGCTGAGA	GCAGAUGUCUGAGCUGAGATT (센스) UCUCAGCUCAGACAUCUGCTT (안티센스)	1.89
	RAG4-317	CAGATGTCTGAGCTGAGAG	CAGAUGUCUGAGCUGAGAGTT (센스) CUCUCAGCUCAGACAUCUGTT (안티센스)	1.17
	RAG4-316	AGATGTCTGAGCTGAGAGG	AGAUGUCUGAGCUGAGAGGTT (센스) CCUCUCAGCUCAGACAUCUTT (안티센스)	1.40
	RAG4-298	GTCGGGGCGATGGTAGAAG	GUCGGGGCGAUGGUAGAAGTT (센스) CUUCUACCAUCGCCCCGACTT (안티센스)	1.49
	RAG4-297	TCGGGGCGATGGTAGAAGA	UCGGGGCGAUGGUAGAAGATT (센스) UCUUCUACCAUCGCCCCGATT (안티센스)	1.24
	RAG4-296	CGGGGCGATGGTAGAAGAG	CGGGGCGAUGGUAGAAGAGTT (센스) CUCUUCUACCAUCGCCCCGTT (안티센스)	1.75
	RAG4-295	GGGGCGATGGTAGAAGAGC	GGGGCGAUGGUAGAAGAGCTT (센스) GCUCUUCUACCAUCGCCCCTT (안티센스)	1.39
	RAG4-293	GGCGATGGTAGAAGAGCAG	GGCGAUGGUAGAAGAGCAGTT (센스) CUGCUCUUCUACCAUCGCCTT (안티센스)	1.10
	RAG4-292	GCGATGGTAGAAGAGCAGT	GCGAUGGUAGAAGAGCAGUTT (센스) ACUGCUCUUCUACCAUCGCTT (안티센스)	1.20
	RAG4-290	GATGGTAGAAGAGCAGTCA	GAUGGUAGAAGAGCAGUCATT (센스) UGACUGCUCUUCUACCAUCTT (안티센스)	2.37
	RAG4-289	ATGGTAGAAGAGCAGTCAG	AUGGUAGAAGAGCAGUCAGTT (센스) CUGACUGCUCUUCUACCAUTT (안티센스)	1.33
	RAG4-288	TGGTAGAAGAGCAGTCAGT	UGGUAGAAGAGCAGUCAGUTT (센스) ACUGACUGCUCUUCUACCATT (안티센스)	1.41
	RAG4-285	TAGAAGAGCAGTCAGTGTC	UAGAAGAGCAGUCAGUGUCTT (센스) GACACUGACUGCUCUUCUATT (안티센스)	1.35
	RAG4-284	AGAAGAGCAGTCAGTGTCC	AGAAGAGCAGUCAGUGUCCTT (센스) GGACACUGACUGCUCUUCUTT (안티센스)	2.68
	RAG4-283	GAAGAGCAGTCAGTGTCCA	GAAGAGCAGUCAGUGUCCATT (센스) UGGACACUGACUGCUCUUCTT (안티센스)	1.61
	RAG4-282	AAGAGCAGTCAGTGTCCAT	AAGAGCAGUCAGUGUCCAUTT (센스) AUGGACACUGACUGCUCUUTT (안티센스)	1.58
	RAG4-281	AGAGCAGTCAGTGTCCATT	AGAGCAGUCAGUGUCCAUUTT (센스) AAUGGACACUGACUGCUCUTT (안티센스)	1.19
	RAG4-280	GAGCAGTCAGTGTCCATTC	GAGCAGUCAGUGUCCAUUCTT (센스) GAAUGGACACUGACUGCUCTT (안티센스)	1.71
	RAG4-181	TGAATCCAAACAGGAGTTG	UGAAUCCAAACAGGAGUUGTT (센스) CAACUCCUGUUUGGAUUCATT (안티센스)	1.61

[0117]

	RAG4-180	GAATCCAAACAGGAGTTGC	GAAUCCAAACAGGAGUUGCTT (센스) GCAACUCCUGUUUGGAUUCTT (안티센스)	2.28
	RAG4-179	AATCCAAACAGGAGTTGCA	AAUCCAAACAGGAGUUGCATT (센스) UGCAACUCCUGUUUGGAUUTT (안티센스)	1.29
	RAG4-176	CCAAACAGGAGTTGCACTA	CCAAACAGGAGUUGCACUATT (센스) UAGUGCAACUCCUGUUUGGTT (안티센스)	2.75
	RAG4-175	CAAACAGGAGTTGCACTAG	CAAACAGGAGUUGCACUAGTT (센스) CUAGUGCAACUCCUGUUUGTT (안티센스)	2.54
	RAG4-174	AAACAGGAGTTGCACTAGC	AAACAGGAGUUGCACUAGCTT (센스) GCUAGUGCAACUCCUGUUUTT (안티센스)	1.44
	RAG4-172	ACAGGAGTTGCACTAGCGG	ACAGGAGUUGCACUAGCGGTT (센스) CCGCUAGUGCAACUCCUGUTT (안티센스)	1.49
	RAG4-170	AGGAGTTGCACTAGCGGTG	AGGAGUUGCACUAGCGGUGTT (센스) CACCGCUAGUGCAACUCCUTT (안티센스)	1.14
	RAG4-166	GTTGCACTAGCGGTGTCCA	GUUGCACUAGCGGUGUCCATT (센스) UGGACACCGCUAGUGCAACTT (안티센스)	1.73
	RAG4-165	TTGCACTAGCGGTGTCCAC	UUGCACUAGCGGUGUCCACTT (센스) GUGGACACCGCUAGUGCAATT (안티센스)	1.50
	RAG4-158	AGCGGTGTCCACCACGTTG	AGCGGUGUCCACCACGUUGTT (센스) CAACGUGGUGGACACCGCUTT (안티센스)	1.55
웜스팟 영역	RAG4-249	AGTAGCCAAGTCTGTACCC	AGUAGCCAAGUCUGUACCCTT (센스) GGGUACAGACUUGGCUACUTT (안티센스)	1.10
	RAG4-238	CTGTACCCTTGAAGCAAGT	CUGUACCCUUGAAGCAAGUTT (센스) ACUUGCUUCAAGGGUACAGTT (안티센스)	1.18
	RAG4-236	GTACCCTTGAAGCAAGTGG	GUACCCUUGAAGCAAGUGGTT (센스) CCACUUGCUUCAAGGGUACTT (안티센스)	1.47
	RAG4-213	AGAGGAGGGAGAGGAGCTG	AGAGGAGGGAGAGGAGCUGTT (센스) CAGCUCCUCUCCCUCCUCUTT (안티센스)	1.35
	RAG4-211	AGGAGGGAGAGGAGCTGCT	AGGAGGGAGAGGAGCUGCUTT (센스) AGCAGCUCCUCUCCCUCCUTT (안티센스)	1.25
	RAG4-123	CCTTCTGGGAGCTGTAGTT	CCUUCUGGGAGCUGUAGUUTT (센스) AACUACAGCUCCCAGAAGGTT (안티센스)	1.69
	RAG4-116	GGAGCTGTAGTTTTCGTGG	GGAGCUGUAGUUUUCGUGGTT (센스) CCACGAAAACUACAGCUCCTT (안티센스)	1.17
	RAG4-115	GAGCTGTAGTTTTCGTGGG	GAGCUGUAGUUUUCGUGGGTT (센스) CCCACGAAAACUACAGCUCTT (안티센스)	1.38
	RAG4-114	AGCTGTAGTTTTCGTGGGA	AGCUGUAGUUUUCGUGGGATT (센스) UCCCACGAAAACUACAGCUTT (안티센스)	1.36
	RAG4-113	GCTGTAGTTTTCGTGGGAG	GCUGUAGUUUUCGUGGGAGTT (센스) CUCCCACGAAAACUACAGCTT (안티센스)	1.14
	RAG4-111	TGTAGTTTTCGTGGGAGCG	UGUAGUUUUCGUGGGAGCGTT (센스) CGCUCCCACGAAAACUACATT (안티센스)	1.36
	RAG4-109	TAGTTTTCGTGGGAGCGGC	UAGUUUUCGUGGGAGCGGCTT (센스) GCCGCUCCCACGAAAACUATT (안티센스)	1.30

[0118]

	RAG4-107	GTTTTCGTGGGAGCGGCTC	GUUUUCGUGGGAGCGGCUCTT (센스) GAGCCGCUCCCACGAAAACTT (안티센스)	1.49
	RAG4-62	CGGGCCGAACTACAGATCC	CGGGCCGAACUACAGAUCCTT (센스) GGAUCUGUAGUUCGGCCCGTT (안티센스)	1.36
	RAG4-61	GGGCCGAACTACAGATCCC	GGGCCGAACUACAGAUCCCTT (센스) GGGAUCUGUAGUUCGGCCCTT (안티센스)	1.29
	RAG4-55	AACTACAGATCCCAGGCGG	AACUACAGAUCCCAGGCGGTT (센스) CCGCCUGGGAUCUGUAGUUTT (안티센스)	1.64
	RAG4-54	ACTACAGATCCCAGGCGGC	ACUACAGAUCCCAGGCGGCTT (센스) GCCGCCUGGGAUCUGUAGUTT (안티센스)	1.21

[0119]

[0120] 표 5. 핫스팟 영역 및 웜스팟 영역 및 기능성 saRNA의 서열

핫스팟 영역	핫스팟 영역의 서열
H1 (-500/-408)	gcgaaggaaagttcttcctcgttgttccaatccgaggacaagctgatatgtcgcagcagcccagggaagcatgcgagctgataggaagtcctt
H2 (-403/-351)	tttaagacaggctcgaatgctaaaactttcttgtgccaaaaccttgactatt
H3 (-342/-262)	aaaataagcacttggcgtgccctcgcagatgtctgagctgagaggtcggggcgatggtagaagagcagtcagtgtccattc
H4 (-181/-140)	tgaatccaaacaggagttgcactagcggtgtccaccacgttg
웜스팟 영역	웜스팟 영역의 서열
W1 (-249/-193)	agtagccaagtctgtacccttgaagcaagtggggagagaggagggagaggagctgct
W2 (-123/-89)	ccttctgggagctgtagttttcgtgggagcggctc
W3 (-62/-36)	cgggccgaactacagatcccaggcggc

[0121]

[0122] **실시예 3. 인간 표피 멜라닌 세포(HEM)에서 MITF mRNA 발현을 촉진하는 saRNA**

[0123] (1) 세포 배양 및 형질감염

[0124] 세포 배양은 실시예 2에 기재되었고, 인간 표피 멜라닌 세포(HEM)는 20×10^4개 세포/웰로 6-웰 플레이트에 플레이팅되었고, 작은 활성화 RNA는 72시간 동안 25nM의 최종 농도에서 형질감염되었고, 2개의 복제 웰을 각 처리에 사용했다.

[0125] (2) 2단계 RT-qPCR

[0126] 형질감염 후 배지를 폐기하고 각 웰에 500μL의 세포 용해 용액을 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 RNA를 추출했다. 역전사 후, ABI 7500 고속 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems)에서 qPCR 분석을 하고, 각 샘플을 3개의 복제 웰에서 반복적으로 증폭시켰다. PCR 반응 조건은 아래의 표 6 및 표 7에 나타나 있다.

[0127] 표 6. RT 반응 제조

시약(RT 반응 1)	부피
5× gDNA Eraser 버퍼	2μl
gDNA Eraser	1μl
RNA 총량(1μg) + D.W	7μl
최종 부피	10μl
42°C에서 2분 및 4°C에서 보관	

시약(RT 반응 2)	부피
5× PrimeScript 버퍼 2	4μl
PrimeScript RT 효소 혼합물 1	1μl
RT 프라이머 혼합물	1μl
RNase dH_2O 제외	4μl
RT 반응 1	10μl
최종 부피	20μl
37°C에서 15분, 85°C에서 5초, 4°C에서 보관	

[0128]

[0129] 표 7. RT-qPCR 반응 제조

시약	부피
SYBR Premix Ex Taq II(2×)	5μl
ROX 참조용 염료 II(50×)	0.2μl
정방향 및 역방향 프라이머 혼합물(5μM)	0.8μl
cDNA(RT 생성물)	4μl
총합	10μl

[0130]

[0131] 반응 조건은 하기와 같았다: 95℃에서 30초, 95℃에서 5초, 60℃에서 30초, 40주기 증폭. 이와 동시에 내부 참조로서 HPRT1 유전자를 증폭시켰고, MITF F1/R1 프라이머 쌍을 사용하여 MITF를 증폭시켰으며, 증폭 프라이머는 표 2에 니타나 있다.

[0132] 대조 처리군(Mock) 대비 saRNA 형질감염된 샘플의 MITF(표적 유전자) 발현 값(Erel)을 계산하기 위해, 상기 표적 유전자 및 하나의 내부 참조 유전자의 Ct 값을 계산용 식 2에 치환하였다.

$$E_{rel} = 2^{(CtTm-CtTs)} / 2^{(CtRm-CtRs)} \qquad (식\ 2)$$

[0133]

[0134] 여기서, CtTm은 대조 처리군(Mock) 샘플로부터의 표적 유전자의 Ct 값; CtTs는 saRNA 처리 샘플로부터의 표적 유전자의 Ct 값; CtRm은 대조 처리군 Mock 처리 샘플로부터의 내부 참조 유전자의 Ct 값; 및 CtRs는 saRNA 처리 샘플로부터의 내부 참조 유전자의 Ct 값이다.

[0135] 도 3은 상이한 saRNA 처리된 세포의 상대적인 MITF mRNA 발현 값을 나타낸다. 대조군(Mock)은 블랭크 형질감염 대조군으로서 사용하였으며, siRNA(RAG4-618i)군의 상대 mRNA 발현값은 대조군에 비해 81.0% 넉다운되었으며, 이는 siRNA가 작은 활성화 RNA 대조 형질감염으로 볼 때 성공했음을 나타낸다. 대조군과 비교하면, MITF mRNA 발현은 세포가 상이한 saRNA에 의해 처리된 후에 증가되었고, 특히 MITF 발현은 RAG4-175, RAG4-176 및 RAG4-290에 의해 각각 3.9배, 3.1배 및 6.1배 상향 조절되었다. 다른 saRNA(RAG4-284, RAG4-123, RAG4-396, RAG4-461, RAG4-490, RAG4-316 및 RAG4-318)는 상대 MITF mRNA 발현을 약 2배 증가시켰다. 이는 무작위로 선택된 기능적 saRNA가 HEM 세포에서 활성도에 대해 검증될 수 있음을 나타냈다.

[0136] **실시예 4. NHEK 내 MITF mRNA 발현을 촉진하는 saRNA**

[0137] 세포 배양은 실시예 2에 기재되었고, 정산 인간 표피 각질형성세포(NHEK)는 20×10^4개 세포/웰로 6-웰 플레이트에 플레이팅되었고, 작은 활성화 RNA는 72시간 동안 25nM의 최종 농도에서 형질감염되었고, 2개의 복제 웰을 각 처리에 사용했다. 2단계 RT-qPCR는 실시예 3에 기재된 바와 같았다.

[0138] 도 4은 상이한 saRNA 처리된 세포의 상대적인 MITF mRNA 발현 값을 나타낸다. 대조군(Mock)은 블랭크 형질감염 대조군으로서 사용하였으며, siRNA(RAG4-618i)군의 상대 mRNA 발현값은 대조군에 비해 88.5% 감소되었으며, 이는 siRNA가 작은 활성화 RNA 대조 형질감염으로 볼 때 성공했음을 나타낸다. 대조군과 비교하면, RAG4-290으로 처리 후 siRNA는 특히 뚜렷한 활성화 효과를 나타내었고, 상대 MITF mRNA 발현 값은 13.1배 증가하였다. RAG4-175, RAG4-176 및 RAG4-316 그룹의 mRNA의 상대적 발현 값은 대조군보다 높았고, 세 그룹의 mRNA의 상대적 발현 값은 각각 5.7배, 3.7배, 3.5배 증가했고, 세 그룹의 siRNA는 뚜렷한 활성화 효과를 가졌다. RAG4-284, RAG4-123, RAG4-396, RAG4-461, RAG4-490 및 RAG4-318 그룹의 mRNA 상대 발현 값은 대조군에 비해 약 2배 높았으며, 이들 그룹의 siRNA는 특정 활성화 효과가 있다. 이는 무작위로 선택된 기능적 saRNA가 NHEK 세포에서 활성도에 대해 검증될 수 있음을 나타냈다.

[0139] **실시예 5. NHEK 내 MITF 단백질 발현을 촉진하는 saRNA**

[0140] 세포 배양은 실시예 2에 기재되었고, 정상 인간 표피 각질형성세포(NHEK)를 20×10^4개 세포/웰로 6-웰 플레이트에 플레이팅하고, 작은 활성화 RNA를 5일 동안 25nM의 최종 농도에서 형질감염시켰다. 프로테아제 억제제(1x RIPA 완충액, Cell Signaling Technology)를 함유하는 적절한 양의 세포 용해 용액을 용해에 사용하였다. BCA

방법을 사용하여 단백질을 정량화하고, 그 다음 폴리아크릴아미드겔 전기영동 분리를 수행하여, 단백질을 0.45 μm PVDF 세포막에 형질감염시켰다. 토끼 모노클로날 항-MITF(Cell Signaling Technology, #12590) α/β-튜불린 항체(Cell Signaling Technology, 2148s)를 블롯을 검출하기 위한 1차 항체로서 사용했다. 항 토끼 IgG, HRP 결합 항체(Cell Signaling Technology)는 2차 항체로서 사용되었다. Image Lab(BIO-RAD, Chemistry Doc™ MP 이미징 시스템)을 사용하여 스캐닝하여 신호를 검출하였다.

[0141] 도 5는 상이한 saRNA로 처리된 세포에서 상대적인 MITF 단백질 발현 수준을 나타낸다. 대조군과 비교하면 siRNA(RAG4-618i)군의 상대 MITF 단백질 발현 수준이 약 50% 감소하며, 이는 siRNA가 작은 간섭 RNA 대조군 형질감염으로 볼 때 성공했음을 나타낸다. 대조군과 비교하면, 각각의 saRNA는 MITF 단백질 발현 수준을 향상시킬 수 있었으며, 여기서 MITF 단백질 발현 수준은 RAG4-416, RAG4-490 및 RAG4-318에 의해 1.5배 초과 조절되었고, 특히 RAG4-318의 활성화 효과가 가장 뚜렷하였고, MITF 단백질 발현 수준은 1.71배 증가했다. 이는 무작위로 선택된 기능적 saRNA가 단백질 수준에서 활성도에 대해 검증될 수 있음을 나타냈다.

[0142] **실시예 6. 인간 표피 멜라닌 세포(HEM) 내 MITF 단백질 발현을 촉진하는 saRNA**

[0143] 세포 배양은 실시예 2에 기재었고, 인간 표피 멜라닌 세포(HEM)를 20×10^4개 세포/웰로 6웰 플레이트에 플레이팅하고, 작은 활성화 RNA를 72시간 동안 25nM의 최종 농도에서 형질감염시켰다. 단백질 용해 및 검출 방법은 실시예 5에 기재된 바와 같았다.

[0144] 도 6는 상이한 saRNA로 처리된 세포에서 상대적인 MITF 단백질 발현 수준을 나타낸다. 대조군과 비교하면, 각각의 saRNA는 MITF 단백질 발현 수준을 개선할 수 있었고, RAG4-396 및 RAG4-490 그룹의 단백질 발현 수준은 1.4배 증가하였다. RAG4-175, RAG4-176, RAG4-290, RAG4-284 및 RAG4-123의 각 군에서 MITF 단백질 발현 수준은 대조군보다 높았고, 활성화 수준은 1.5배 초과하였고, 활성화 효과가 뚜렷했다. 이는 무작위로 선택된 기능적 saRNA가 단백질 수준에서 활성도에 대해 검증될 수 있음을 나타냈다.

[0145] 위의 결과를 기반으로 하여, 인간 MITF 유전자 프로모터를 표적으로 하는 saRNA의 고속 스크리닝을 통해 MITF 유전자 발현을 활성화할 수 있는 다수의 인간 saRNA를 발견하였다. 이들 saRNA는 mRNA 및 단백질 발현 수준에서 세포 내 MITF 유전자 발현을 상향 조절할 수 있고, MITF 단백질 발현의 부족 또는 감소로 초래되는 질환 또는 증상, 예컨대 백반증을 위해 사용될 수 있고, 또는 상기 질환 또는 증상을 치료하기 위한 방법 또는 약물을 제조하는 데 사용될 수 있다.

[0146] 본 공개의 다양한 실시양태에 대해서는 위에 기재하였으며, 위의 설명은 예시적이나, 철저한 것이 아니며, 공개된 실시양태에 한정되는 것은 아니다. 기재된 실시양태의 범위 및 정신을 벗어나지 않으면서 많은 수정 및 변형이 당업자에게 명백할 것이다. 본원에서 선택된 용어는 다양한 실시양태의 원리, 실제 적용 또는 시장에 대한 기술적 향상을 가장 잘 설명하거나, 본원에 공개된 다양한 실시양태를 당업자가 이해할 수 있도록 하기 위해 사용되었다.

[0147] **참고 문헌**

[0148] 1. Picardo, M., M. L. Dell'Anna, K. Ezzedine, I. Hamzavi, J. E. Harris, D. Parsad, and A. Taieb. 2015. 'Vitiligo', Nat Rev Dis Primers, 1: 15011.

[0149] 2. Gauthier, Y., M. Cario Andre, and A. Taieb. 2003. 'A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy?', Pigment Cell Res, 16: 322-32.

[0150] 3. Dell'anna, M. L., and M. Picardo. 2006. 'A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo', Pigment Cell Res, 19: 406-11.

[0151] 4. Sehgal, V. N., and G. Srivastava. 2007. 'Vitiligo: compendium of clinico-epidemiological features', Indian J Dermatol Venereol Leprol, 73: 149-56.

[0152] 5. Kotobuki, Y., A. Tanemura, L. Yang, S. Itoi, M. Wataya-Kaneda, H. Murota, M. Fujimoto, S. Serada, T. Naka, and I. Katayama. 2012. 'Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris', Pigment Cell Melanoma Res, 25: 219-30.

[0153] 6. Kemp, E. H., N. G. Gavalas, D. J. Gawkrodger, and A. P. Weetman. 2007. 'Autoantibody responses to melanocytes in the depigmenting skin disease vitiligo', Autoimmun Rev, 6: 138-42.

[0154] 7. Dell'Anna, M. L., M. Ottaviani, V. Albanesi, A. P. Vidolin, G. Leone, C. Ferraro, A. Cossarizza, L. Rossi, and M. Picardo. 2007. 'Membrane lipid alterations as a possible basis for melanocyte degeneration in vitiligo', J Invest Dermatol, 127: 1226-33.

[0155] 8. Kumar, R., D. Parsad, and A. J. Kanwar. 2011. 'Role of apoptosis and melanocytorrhagy: a comparative study of melanocyte adhesion in stable and unstable vitiligo', Br J Dermatol, 164: 187-91.

[0156] 9. Hemesath, T. J., E. Steingrimsson, G. McGill, M. J. Hansen, J. Vaught, C. A. Hodgkinson, H. Arnheiter, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and D. E. Fisher. 1994. 'microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family', Genes Dev, 8: 2770-80.

[0157] 10. Levy, C., M. Khaled, and D. E. Fisher. 2006. 'MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene', Trends Mol Med, 12: 406-14.

[0158] 11. Kwinter, J., J. Pelletier, A. Khambalia, and E. Pope. 2007. 'High-potency steroid use in children with vitiligo: a retrospective study', J Am Acad Dermatol, 56: 236-41.

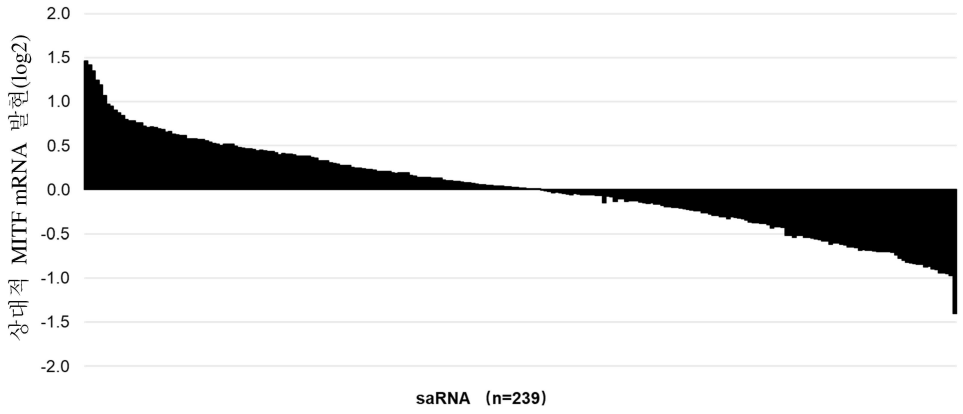
[0159] 12. Iannella, G., A. Greco, D. Didona, B. Didona, G. Granata, A. Manno, B. Pasquariello, and G. Magliulo. 2016. 'Vitiligo: Pathogenesis, clinical variants and treatment approaches', Autoimmun Rev, 15: 335-43.

[0160] 13. Lim, H. W., P. E. Grimes, O. Agbai, I. Hamzavi, M. Henderson, M. Haddican, R. V. Linkner, and M. Lebwohl. 2015. 'Afamelanotide and narrowband UV-B phototherapy for the treatment of vitiligo: a randomized multicenter trial', JAMA Dermatol, 151: 42-50.

[0161] 14. Grimes, P. E., I. Hamzavi, M. Lebwohl, J. P. Ortonne, and H. W. Lim. 2013. 'The efficacy of afamelanotide and narrowband UV-B phototherapy for repigmentation of vitiligo', JAMA Dermatol, 149: 68-73.

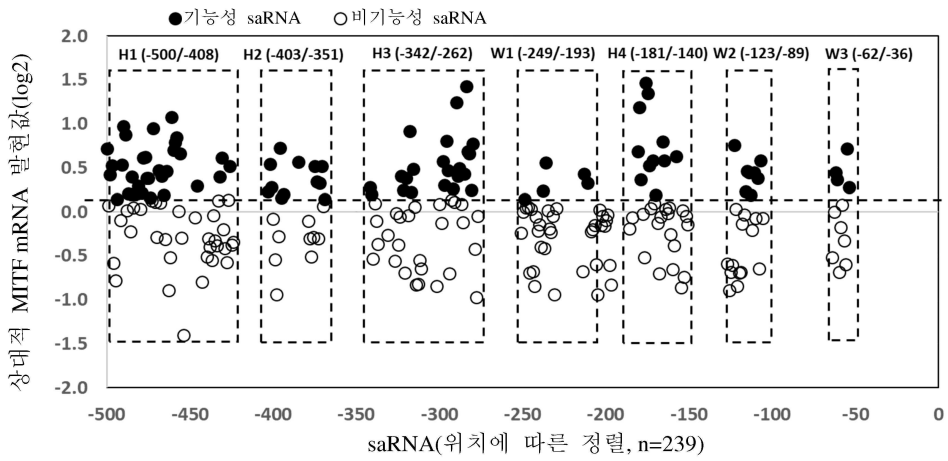
도면

도면1



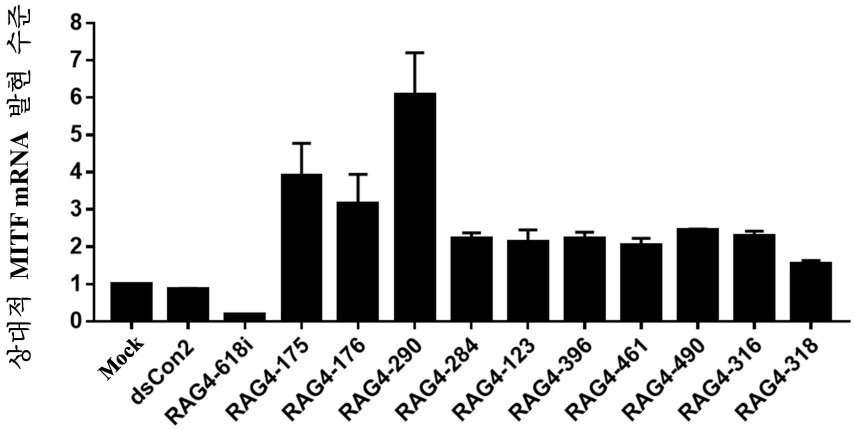
도 1

도면2


●기능성 saRNA ○비기능성 saRNA
H1 (-500/-408)
H2 (-403/-351)
H3 (-342/-262)
W1 (-249/-193)
H4 (-181/-140)
W2 (-123/-89)
W3 (-62/-36)
상대적 MITF mRNA 발현값(log2)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-500
-450
-400
-350
-300
-250
-200
-150
-100
-50
0
saRNA(위치에 따른 정렬, n=239)

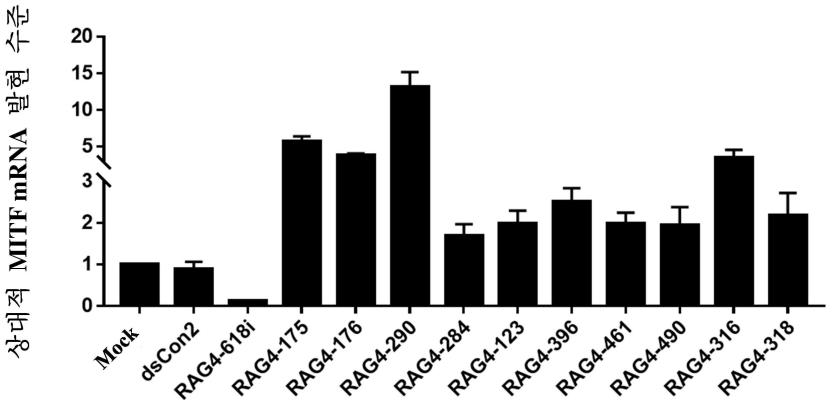
도 2

도면3


상대적 MITF mRNA 발현 수준
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Mock
dsCon2
RAG4-618i
RAG4-175
RAG4-176
RAG4-290
RAG4-284
RAG4-123
RAG4-396
RAG4-461
RAG4-490
RAG4-316
RAG4-318

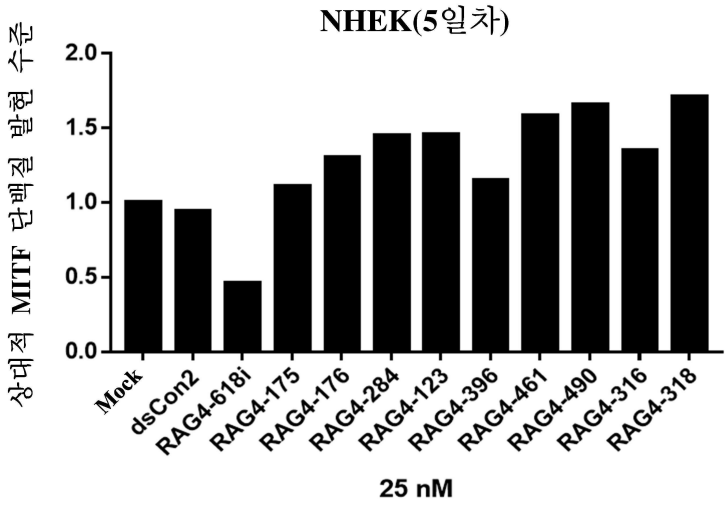
도 3

도면4


상대적 MITF mRNA 발현 수준
20
15
10
5
3
2
1
0
Mock
dsCon2
RAG4-618i
RAG4-175
RAG4-176
RAG4-290
RAG4-284
RAG4-123
RAG4-396
RAG4-461
RAG4-490
RAG4-316
RAG4-318

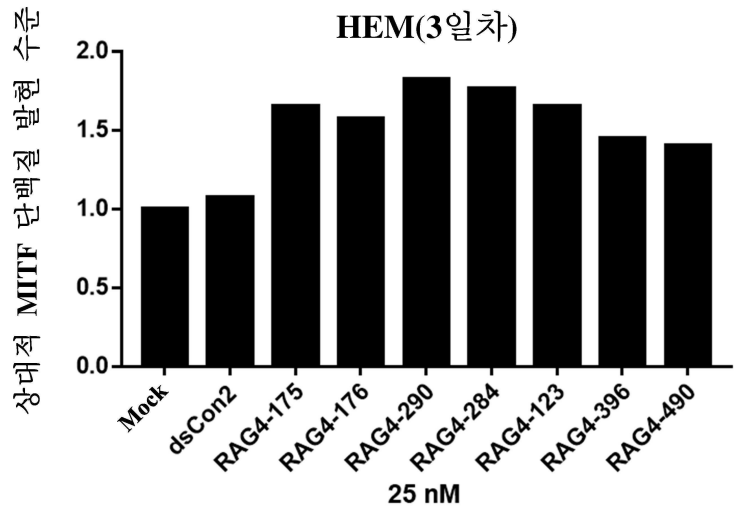
도 4

도면5


NHEK(5일차)
상대적 MITF 단백질 발현 수준
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Mock
dsCon2
RAG4-618i
RAG4-175
RAG4-176
RAG4-284
RAG4-123
RAG4-396
RAG4-461
RAG4-490
RAG4-316
RAG4-318
25 nM

도 5

도면6



도 6

서 열 목 록

<110> Ractigen Therapeutics

<120> NUCLEIC ACID MOLECULE TARGETING MITF GENE AND USE THEREOF

<130> 065786.11075-9US1

<150> CN202010524139.1

<151> 2020-06-10

<150> PCT/CN2021/091834

<151> 2021-05-06

<160> 305

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gcgaaggaaa gttcttcctc gttgttccaa tccgaggaca agctgatatg tcgcagcagc 60

ccagggaagc atgcgagctg ataggaagtc cttttatttt aagacaggct cgaatgctaa 120

aactttcttg tgccaaaacc cttgactatt ttatttttaa aataagcact tggcgtgccc 180

tcgcagatgt ctgagctgag aggtcggggc gatggtagaa gagcagtcag tgtccattct 240

tattcatatt aagtagccaa gtctgtaccc ttgaagcaag tggggagaga ggagggagag 300

gagctgctga cattgacaat gaatccaaac aggagttgca ctagcggtgt ccaccacgtt 360

gcctctcccc cgcctggcct tctgggagct gtagttttcg tgggagcggc tccccaggcg 420

agctgggaat gccccgcccg ggccgaacta cagatcccag gcggcgctcg gccgccagcc 480

cctcccgccc gggtgcgagt 500

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MITF F1 Primer

<400> 2

cgacagaaga aactggagca c 21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MITF R1 Primer

<400> 3

cccgtggatg gaataaggga aa 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPRT1 F Primer

<400> 4

aaagatggtc aaggtcgcaa g 21

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPRT1 R Primer

<400> 5

tagtcaaggg catatcctac aac 23

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TBP F Primer

<400> 6

tgctcaccca ccaacaattt ag 22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TBP R Primer

<400> 7

tctgctctga ctttagcacc tg 22

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-500 Active Target Sequence

<400> 8

gcgaaggaaa gttcttcct 19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-498 Active Target Sequence

<400> 9

gaaggaaagt tcttcctcg 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-497 Active Target Sequence

<400> 10

aaggaaagtt cttcctcgt 19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-494 Active Target Sequence

<400> 11

gaaagttctt cctcgttgt 19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-491 Active Target Sequence

<400> 12

agttcttcct cgttgttcc 19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-490 Active Target Sequence

<400> 13

gttcttcctc gttgttcca 19

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-489 Active Target Sequence

<400> 14

ttcttcctcg ttgttccaa 19

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-487 Active Target Sequence

<400> 15

cttcctcgtt gttccaatc 19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-485 Active Target Sequence

<400> 16

tcctcgttgt tccaatccg 19

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-483 Active Target Sequence

<400> 17

ctcgttgttc caatccgag 19

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-482 Active Target Sequence

<400> 18

tcgttgttcc aatccgagg 19

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-481 Active Target Sequence

<400> 19

cgttgttcca atccgagga 19

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-479 Active Target Sequence

<400> 20

ttgttccaat ccgaggaca 19

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-478 Active Target Sequence

<400> 21

tgttccaatc cgaggacaa 19

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-477 Active Target Sequence

<400> 22

gttccaatcc gaggacaag 19

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-476 Active Target Sequence

<400> 23

ttccaatccg aggacaagc 19

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-475 Active Target Sequence

<400> 24

tccaatccga ggacaagct 19

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-474 Active Target Sequence

<400> 25

ccaatccgag gacaagctg 19

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-473 Active Target Sequence

<400> 26

caatccgagg acaagctga 19

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-472 Active Target Sequence

<400> 27

aatccgagga caagctgat 19

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-469 Active Target Sequence

<400> 28

ccgaggacaa gctgatatg 19

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-467 Active Target Sequence

<400> 29

gaggacaagc tgatatgtc 19

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-466 Active Target Sequence

<400> 30

aggacaagct gatatgtcg 19

<210> 31

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-464 Active Target Sequence

<400> 31

gacaagctga tatgtcgca 19

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-461 Active Target Sequence

<400> 32

aagctgatat gtcgcagca 19

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-460 Active Target Sequence

<400> 33

agctgatatg tcgcagcag 19

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-459 Active Target Sequence

<400> 34

gctgatatgt cgcagcagc 19

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-458 Active Target Sequence

<400> 35

ctgatatgtc gcagcagcc 19

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-456 Active Target Sequence

<400> 36

gatatgtcgc agcagccca 19

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-446 Active Target Sequence

<400> 37

agcagcccag ggaagcatg 19

<210> 38

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-432 Active Target Sequence

<400> 38

gcatgcgagc tgataggaa 19

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-431 Active Target Sequence

<400> 39

catgcgagct gataggaag 19

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-427 Active Target Sequence

<400> 40

cgagctgata ggaagtcct 19

<210> 41

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-426 Active Target Sequence

<400> 41

gagctgatag gaagtcctt 19

<210> 42

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-403 Active Target Sequence

<400> 42

tttaagacag gctcgaatg 19

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-402 Active Target Sequence

<400> 43

ttaagacagg ctcgaatgc 19

<210> 44

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-401 Active Target Sequence

<400> 44

taagacaggc tcgaatgct 19

<210> 45

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-396 Active Target Sequence

<400> 45

caggctcgaa tgctaaaac 19

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-395 Active Target Sequence

<400> 46

aggctcgaat gctaaaact 19

<210> 47

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-394 Active Target Sequence

<400> 47

ggctcgaatg ctaaaactt 19

<210> 48

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-385 Active Target Sequence

<400> 48

gctaaaactt tcttgtgcc 19

<210> 49

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-375 Active Target Sequence

<400> 49

tcttgtgcca aaacccttg 19

<210> 50

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-374 Active Target Sequence

<400> 50

cttgtgccaa aacccttga 19

<210> 51

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-372 Active Target Sequence

<400> 51

tgtgccaaaa cccttgact 19

<210> 52

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-371 Active Target Sequence

<400> 52

gtgccaaaac ccttgacta 19

<210> 53

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-369 Active Target Sequence

<400> 53

gccaaaaccc ttgactatt 19

<210> 54

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-342 Active Target Sequence

<400> 54

aaaataagca cttggcgtg 19

<210> 55

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-341 Active Target Sequence

<400> 55

aaataagcac ttggcgtgc 19

<210> 56

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-323 Active Target Sequence

<400> 56

ccctcgcaga tgtctgagc 19

<210> 57

<211> 19

<212 DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-322 Active Target Sequence

<400> 57

cctcgcagat gtctgagct 19

<210> 58

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-320 Active Target Sequence

<400> 58

tcgcagatgt ctgagctga 19

<210> 59

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-318 Active Target Sequence

<400> 59

gcagatgtct gagctgaga 19

<210> 60

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-317 Active Target Sequence

<400> 60

cagatgtctg agctgagag 19

<210> 61

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-316 Active Target Sequence

<400> 61

agatgtctga gctgagagg 19

<210> 62

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-298 Active Target Sequence

<400> 62

gtcggggcga tggtagaag 19

<210> 63

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-297 Active Target Sequence

<400> 63

tcggggcgat ggtagaaga 19

<210> 64

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-296 Active Target Sequence

<400> 64

cggggcgatg gtagaagag 19

<210> 65

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-295 Active Target Sequence

<400> 65

ggggcgatgg tagaagagc 19

<210> 66

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-293 Active Target Sequence

<400> 66

ggcgatggta gaagagcag 19

<210> 67

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-292 Active Target Sequence

<400> 67

gcgatggtag aagagcagt 19

<210> 68

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-290 Active Target Sequence

<400> 68

gatggtagaa gagcagtca 19

<210> 69

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-289 Active Target Sequence

<400> 69

atggtagaag agcagtcag 19

<210> 70

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-288 Active Target Sequence

<400> 70

tggtagaaga gcagtcagt 19

<210> 71

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-285 Active Target Sequence

<400> 71

tagaagagca gtcagtgtc 19

<210> 72

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-284 Active Target Sequence

<400> 72

agaagagcag tcagtgtcc 19

<210> 73

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-283 Active Target Sequence

<400> 73

gaagagcagt cagtgtcca 19

<210> 74

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-282 Active Target Sequence

<400> 74

aagagcagtc agtgtccat 19

<210> 75

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-281 Active Target Sequence

<400> 75

agagcagtca gtgtccatt 19

<210> 76

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-280 Active Target Sequence

<400> 76

gagcagtcag tgtccattc 19

<210> 77

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-181 Active Target Sequence

<400> 77

tgaatccaaa caggagttg 19

<210> 78

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-180 Active Target Sequence

<400> 78

gaatccaaac aggagttgc 19

<210> 79

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-179 Active Target Sequence

<400> 79

aatccaaaca ggagttgca 19

<210> 80

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-176 Active Target Sequence

<400> 80

ccaaacagga gttgcacta 19

<210> 81

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-175 Active Target Sequence

<400> 81

caaacaggag ttgcactag 19

<210> 82

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-174 Active Target Sequence

<400> 82

aaacaggagt tgcactagc 19

<210> 83

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-172 Active Target Sequence

<400> 83

acaggagttg cactagcgg 19

<210> 84

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-170 Active Target Sequence

<400> 84

aggagttgca ctagcggtg 19

<210> 85

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-166 Active Target Sequence

<400> 85

gttgcactag cggtgtcca 19

<210> 86

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-165 Active Target Sequence

<400> 86

ttgcactagc ggtgtccac 19

<210> 87

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-158 Active Target Sequence

<400> 87

agcggtgtcc accacgttg 19

<210> 88

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-249 Active Target Sequence

<400> 88

agtagccaag tctgtaccc 19

<210> 89

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-238 Active Target Sequence

<400> 89

ctgtaccctt gaagcaagt 19

<210> 90

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-236 Active Target Sequence

<400> 90

gtaccttga agcaagtgg 19

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-213 Active Target Sequence

<400> 91

agaggaggga gaggagctg 19

<210> 92

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-211 Active Target Sequence

<400> 92

aggagggaga ggagctgct 19

<210> 93

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-123 Active Target Sequence

<400> 93

ccttctggga gctgtagtt 19

<210> 94

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-116 Active Target Sequence

<400> 94

ggagctgtag ttttcgtgg 19

<210> 95

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-115 Active Target Sequence

<400> 95

gagctgtagt tttcgtggg 19

<210> 96

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-114 Active Target Sequence

<400> 96

agctgtagtt ttcgtggga 19

<210> 97

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-113 Active Target Sequence

<400> 97

gctgtagttt tcgtgggag 19

<210> 98

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-111 Active Target Sequence

<400> 98

tgtagttttc gtgggagcg 19

<210> 99

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-109 Active Target Sequence

<400> 99

tagttttcgt gggagcggc 19

<210> 100

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> RAG4-107 Active Target Sequence

<400> 100

gttttcgtgg gagcggctc 19

<210> 101

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-62 Active Target Sequence

<400> 101

cgggccgaac tacagatcc 19

<210> 102

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-61 Active Target Sequence

<400> 102

gggccgaact acagatccc 19

<210> 103

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-55 Active Target Sequence

<400> 103

aactacagat cccaggcgg 19

<210> 104

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAG4-54 Active Target Sequence

<400> 104

actacagatc ccaggcggc 19

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA sequence

<400> 105

gcgaaggaaa guucuuccut t 21

<210> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 106

gaaggaaagu ucuuccucgt t 21

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<

400> 107

aaggaaaguu cuuccucgut t 21

<210> 108

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 108

gaaaguucuu ccucguugut t 21

<210> 109

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 109

aguucuuccu cguuguucct t 21

<210> 110

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 110

guucuuccuc guuguuccat t 21

<210> 111

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 111

uucuuccucg uuguuccaat t 21

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 112

cuuccucguu guuccaauct t 21

<210> 113

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 113

uccucguugu uccaauccgt t 21

<210> 114

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 114

cucguuguuc caauccgagt t 21

<210> 115

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 115

ucguuguucc aauccgaggt t 21

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 116

cguuguucca auccgaggat t 21

<210> 117

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 117

uuguuccaau ccgaggacat t 21

<210> 118

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 118

uguuccaauc cgaggacaat t 21

<210> 119

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 119

guuccaaucc gaggacaagt t 21

<210> 120

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 120

uuccaauccg aggacaagct t 21

<210> 121

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 121

uccaauccga ggacaagcut t 21

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 122

ccaauccgag gacaagcugt t 21

<210> 123

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 123

caauccgagg acaagcugat t 21

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 124

aauccgagga caagcugaut t 21

<210> 125

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 125

ccgaggacaa gcugauaugt t 21

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 126

gaggacaagc ugauauguct t 21

<210> 127

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 127

aggacaagcu gauaugucgt t 21

<210> 128

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 128

gacaagcuga uaugucgcat t 21

<210> 129

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 129

aagcugauau gucgcagcat t 21

<210> 130

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 130

agcugauaug ucgcagcagt t 21

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 131

gcugauaugu cgcagcagct t 21

<210> 132

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 132

cugauauguc gcagcagcct t 21

<210> 133

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 133

gauaugucgc agcagcccat t 21

<210> 134

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 134

agcagcccag ggaagcaugt t 21

<210> 135

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 135

gcaugcgagc ugauaggaat t 21

<210> 136

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 136

caugcgagcu gauaggaagt t 21

<210> 137

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 137

cgagcugaua ggaaguccut t 21

<210> 138

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 138

gagcugauag gaaguccuut t 21

<210> 139

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 139

uuuaagacag gcucgaaugt t 21

<210> 140

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 140

uuaagacagg cucgaaugct t 21

<210> 141

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 141

uaagacaggc ucgaaugcut t 21

<210> 142

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 142

caggcucgaa ugcuaaaact t 21

<210> 143

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 143

aggcucgaau gcuaaaacut t 21

<210> 144

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 144

ggcucgaaug cuaaaacuut t 21

<210> 145

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 145

gcuaaaacuu ucuugugcct t 21

<210> 146

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 146

ucuugugcca aaacccuugt t 21

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 147

cuugugccaa aacccuugat t 21

<210> 148

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 148

ugugccaaaa cccuugacut t 21

<210> 149

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 149

gugccaaaac ccuugacuat t 21

<210> 150

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 150

gccaaaaccc uugacuauut t 21

<210> 151

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 151

aaaauaagca cuuggcgugt t 21

<210> 152

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 152

aaauaagcac uuggcgugct t 21

<210> 153

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 153

cccucgcaga ugucugagct t 21

<210> 154

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 154

ccucgcagau gucugagcut t 21

<210> 155

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 155

ucgcagaugu cugagcugat t 21

<210> 156

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 156

gcagaugucu gagcugagat t 21

<210> 157

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 157

cagaugucug agcugagagt t 21

<210> 158

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 158

agaugucuga gcugagaggt t 21

<210> 159

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 159

gucggggcga ugguagaagt t 21

<210> 160

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 160

ucggggcgau gguagaagat t 21

<210> 161

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 161

cggggcgaug guagaagagt t 21

<210> 162

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 162

ggggcgaugg uagaagagct t 21

<210> 163

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 163

ggcgauggua gaagagcagt t 21

<210> 164

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 164

gcgaugguag aagagcagut t 21

<210> 165

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 165

gaugguagaa gagcagucat t 21

<210> 166

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 166

augguagaag agcagucagt t 21

<210> 167

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 167

ugguagaaga gcagucagut t 21

<210> 168

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 168

uagaagagca gucaguguct t 21

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 169

agaagagcag ucagugucct t 21

<210> 170

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 170

gaagagcagu caguguccat t 21

<210> 171

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 171

aagagcaguc aguguccaut t 21

<210> 172

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 172

agagcaguca guguccauut t 21

<210> 173

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 173

gagcagucag uguccauuct t 21

<210> 174

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 174

ugaauccaaa caggaguugt t 21

<210> 175

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 175

gaauccaaac aggaguugct t 21

<210> 176

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 176

aauccaaaca ggaguugcat t 21

<210> 177

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 177

ccaaacagga guugcacuat t 21

<210> 178

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 178

caaacaggag uugcacuagt t 21

<210> 179

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 179

aaacaggagu ugcacuagct t 21

<210> 180

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 180

acaggaguug cacuagcggt t 21

<210> 181

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 181

aggaguugca cuagcggugt t 21

<210> 182

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 182

guugcacuag cgguguccat t 21

<210> 183

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 183

uugcacuagc gguguccact t 21

<210> 184

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 184

agcggugucc accacguugt t 21

<210> 185

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 185

aguagccaag ucuguaccct t 21

<210> 186

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 186

cuguacccuu gaagcaagut t 21

<210> 187

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 187

guacccuuga agcaaguggt t 21

<210> 188

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 188

agaggaggga gaggagcugt t 21

<210> 189

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 189

aggagggaga ggagcugcut t 21

<210> 190

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 190

ccuucuggga gcuguaguut t 21

<210> 191

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 191

ggagcuguag uuuucguggt t 21

<210> 192

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 192

gagcuguagu uuucgugggt t 21

<210> 193

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 193

agcuguaguu uucgugggat t 21

<210> 194

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 194

gcuguaguuu ucgugggagt t 21

<210> 195

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 195

uguaguuuuc gugggagcgt t 21

<210> 196

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 196

uaguuuucgu gggagcggct t 21

<210> 197

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 197

guuuucgugg gagcggcuct t 21

<210> 198

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 198

cgggccgaac uacagaucct t 21

<210> 199

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 199

gggccgaacu acagauccct t 21

<210> 200

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 200

aacuacagau cccaggcggt t 21

<210> 201

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 201

acuacagauc ccaggcggct t 21

<210> 202

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 202

aggaagaacu uuccuucgct t 21

<210> 203

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 203

cgaggaagaa cuuuccuuct t 21

<210> 204

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 204

acgaggaaga acuuuccuut t 21

<210> 205

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 205

acaacgagga agaacuuuct t 21

<210> 206

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 206

ggaacaacga ggaagaacut t 21

<210> 207

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 207

uggaacaacg aggaagaact t 21

<210> 208

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 208

uuggaacaac gaggaagaat t 21

<210> 209

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 209

gauuggaaca acgaggaagt t 21

<210> 210

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 210

cggauuggaa caacgaggat t 21

<210> 211

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 211

cucggauugg aacaacgagt t 21

<210> 212

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 212

ccucggauug gaacaacgat t 21

<210> 213

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 213

uccucggauu ggaacaacgt t 21

<210> 214

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 214

uguccucgga uuggaacaat t 21

<210> 215

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 215

uuguccucgg auuggaacat t 21

<210> 216

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 216

cuuguccucg gauuggaact t 21

<210> 217

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 217

gcuuguccuc ggauuggaat t 21

<210> 218

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 218

agcuuguccu cggauuggat t 21

<210> 219

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 219

cagcuugucc ucggauuggt t 21

<210> 220

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 220

ucagcuuguc cucggauugt t 21

<210> 221

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 221

aucagcuugu ccucggauut t 21

<210> 222

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 222

cauaucagcu uguccucggt t 21

<210> 223

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 223

gacauaucag cuuguccuct t 21

<210> 224

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 224

cgacauauca gcuuguccut t 21

<210> 225

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 225

ugcgacauau cagcuuguct t 21

<210> 226

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 226

ugcugcgaca uaucagcuut t 21

<210> 227

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 227

cugcugcgac auaucagcut t 21

<210> 228

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 228

gcugcugcga cauaucagct t 21

<210> 229

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 229

ggcugcugcg acauaucagt t 21

<210> 230

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 230

ugggcugcug cgacauauct t 21

<210> 231

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 231

caugcuuccc ugggcugcut t 21

<210> 232

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 232

uuccuaucag cucgcaugct t 21

<210> 233

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 233

cuuccuauca gcucgcaugt t 21

<210> 234

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 234

aggacuuccu aucagcucgt t 21

<210> 235

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 235

aaggacuucc uaucagcuct t 21

<210> 236

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 236

cauucgagcc ugucuuaaat t 21

<210> 237

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 237

gcauucgagc cugucuuaat t 21

<210> 238

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 238

agcauucgag ccugucuuat t 21

<210> 239

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 239

guuuuagcau ucgagccugt t 21

<210> 240

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 240

aguuuuagca uucgagccut t 21

<210> 241

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 241

aaguuuuagc auucgagcct t 21

<210> 242

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 242

ggcacaagaa aguuuuagct t 21

<210> 243

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 243

caaggguuuu ggcacaagat t 21

<210> 244

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 244

ucaaggguuu uggcacaagt t 21

<210> 245

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 245

agucaagggu uuuggcacat t 21

<210> 246

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 246

uagucaaggg uuuuggcact t 21

<210> 247

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 247

aauagucaag gguuuuggct t 21

<210> 248

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 248

cacgccaagu gcuuauuuut t 21

<210> 249

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 249

gcacgccaag ugcuuauuut t 21

<210> 250

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 250

gcucagacau cugcgagggt t 21

<210> 251

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 251

agcucagaca ucugcgaggt t 21

<210> 252

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 252

ucagcucaga caucugcgat t 21

<210> 253

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 253

ucucagcuca gacaucugct t 21

<210> 254

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 254

cucucagcuc agacaucugt t 21

<210> 255

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 255

ccucucagcu cagacaucut t 21

<210> 256

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 256

cuucuaccau cgccccgact t 21

<210> 257

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 257

ucuucuacca ucgccccgat t 21

<210> 258

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 258

cucuucuacc aucgccccgt t 21

<210> 259

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 259

gcucuucuac caucgcccct t 21

<210> 260

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 260

cugcucuucu accaucgcct t 21

<210> 261

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 261

acugcucuuc uaccaucgct t 21

<210> 262

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 262

ugacugcucu ucuaccauct t 21

<210> 263

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 263

cugacugcuc uucuaccaut t 21

<210> 264

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 264

acugacugcu cuucuaccat t 21

<210> 265

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 265

gacacugacu gcucuucuat t 21

<210> 266

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 266

ggacacugac ugcucuucut t 21

<210> 267

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 267

uggacacuga cugcucuuct t 21

<210> 268

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 268

auggacacug acugcucuut t 21

<210> 269

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 269

aauggacacu gacugcucut t 21

<210> 270

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 270

gaauggacac ugacugcuct t 21

<210> 271

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 271

caacuccugu uuggauucat t 21

<210> 272

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 272

gcaacuccug uuuggauuct t 21

<210> 273

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 273

ugcaacuccu guuuggauut t 21

<210> 274

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 274

uagugcaacu ccuguuuggt t 21

<210> 275

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 275

cuagugcaac uccuguuugt t 21

<210> 276

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 276

gcuagugcaa cuccuguuut t 21

<210> 277

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 277

ccgcuagugc aacuccugut t 21

<210> 278

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 278

caccgcuagu gcaacuccut t 21

<210> 279

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 279

uggacaccgc uagugcaact t 21

<210> 280

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 280

guggacaccg cuagugcaat t 21

<210> 281

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 281

caacguggug gacaccgcut t 21

<210> 282

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 282

ggguacagac uuggcuacut t 21

<210> 283

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 283

acuugcuuca aggguacagt t 21

<210> 284

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 284

ccacuugcuu caaggguact t 21

<210> 285

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 285

cagcuccucu cccuccucut t 21

<210> 286

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 286

agcagcuccu cucccuccut t 21

<210> 287

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 287

aacuacagcu cccagaaggt t 21

<210> 288

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 288

ccacgaaaac uacagcucct t 21

<210> 289

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 289

cccacgaaaa cuacagcuct t 21

<210> 290

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 290

ucccacgaaa acuacagcut t 21

<210> 291

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 291

cucccacgaa aacuacagct t 21

<210> 292

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 292

cgcucccacg aaaacuacat t 21

<210> 293

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 293

gccgcuccca cgaaaacuat t 21

<210> 294

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 294

gagccgcucc cacgaaaact t 21

<210> 295

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 295

ggaucuguag uucggcccgt t 21

<210> 296

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 296

gggaucugua guucggccct t 21

<210> 297

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 297

ccgccuggga ucuguaguut t 21

<210> 298

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic DNA/RNA Functional saRNA Sequence

<400> 298

gccgccuggg aucuguagut t 21

<210> 299

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hot spot region H1 (-500/-408)

<400> 299

gcgaaggaaa gttcttcctc gttgttccaa tccgaggaca agctgatatg tcgcagcagc 60

ccagggaagc atgcgagctg ataggaagtc ctt 93

<210> 300

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hot spot region H2 (-403/-351)

<400> 300

tttaagacag gctcgaatgc taaaactttc ttgtgccaaa acccttgact att 53

<210

> 301

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hot spot region H3 (-342/-262)

<400> 301

aaaataagca cttggcgtgc cctcgcagat gtctgagctg agaggtcggg gcgatggtag 60

aagagcagtc agtgtccatt c 81

<210> 302

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hot spot region H4 (-181/-140)

<400> 302

tgaatccaaa caggagttgc actagcggtg tccaccacgt tg 42

<210> 303

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Warm spot region W1 (-249/-193)

<400> 303

agtagccaag tctgtaccct tgaagcaagt ggggagagag gagggagagg agctgct 57

<210> 304

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Warm spot region W2 (-123/-89)

<400> 304

ccttctggga gctgtagttt tcgtgggagc ggctc 35

<210> 305

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Warm spot region W3 (-62/-36)

<400> 305

cgggccgaac tacagatccc aggcggc 27