



등록특허 10-2772402



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월26일

(11) 등록번호 10-2772402

(24) 등록일자 2025년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7105 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C12N 15/113 (2013.01)  
A61K 31/7105 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7004802

(22) 출원일자(국제) 2016년07월26일

심사청구일자 2021년05월25일

(85) 번역문제출일자 2018년02월19일

(65) 공개번호 10-2018-0026778

(43) 공개일자 2018년03월13일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2016/001169

(87) 국제공개번호 WO 2017/017523

국제공개일자 2017년02월02일

(30) 우선권주장  
62/197,370 2015년07월27일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR100949791 B1\*

KR101207561 B1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

올릭스 주식회사

경기도 성남시 수정구 대왕판교로 953(고등동)

(72) 발명자

홍선우

대한민국 경기도 수원시 권선구 금곡로 45 엘지 빌리지 아파트 211동 1905호

홍이수

대한민국 서울특별시 구일로10길 27 에스케이 허브 수 27동 703

김지현

서울특별시 영등포구 여의대방로23길 5-2, 203호 (신길동, 그린앰 하우스)

(74) 대리인

리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 11 항

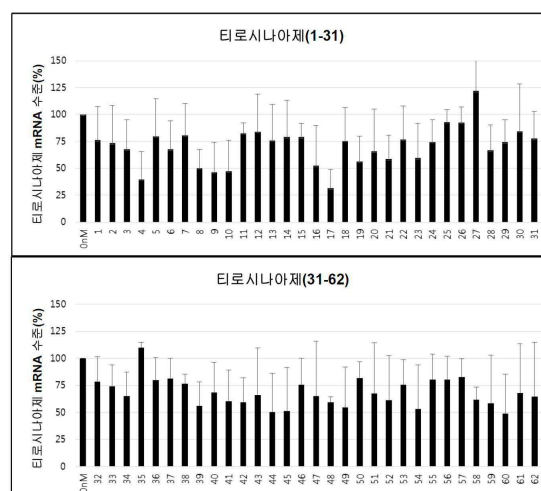
심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 멜라닌 생성을 억제하는 RNA 복합체

## (57) 요약

특정 양태에서, 본원은 티로시나아제 발현을 억제하여, 멜라닌 생성을 감소시키고 과도한 멜라닌 생성과 연관된 색소침착-관련 장애, 예컨대 기미 및 검버섯을 치료하는데 유용한 RNA 복합체(예를 들어, asiRNA 또는 lasiRNA와 같은 비대칭 RNA 복합체)를 제시한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12Y 114/18001** (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/3515 (2013.01)

C12N 2310/3521 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

티로시나아제(tyrosinase) mRNA 서열에 대한 서열 상보성을 갖는 안티센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥에 대한 서열 상보성을 갖는 센스 가닥을 포함하고,

상기 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 5' 말단과 센스 가닥의 3' 말단이 평활 말단(blunt end)을 형성하는 복합체를 형성하고,

상기 센스 가닥은 GCUGACAGGAGAUG\*A\*A\*콜레스테롤이고, 상기 안티센스 가닥은 하기 표에서 선택되는 어느 하나이고,

NO	서열
1	UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*C*U*G
2	UUCAUCUCCUGUCAGCmU*mU*mC*mU*mG
3	UUCAUCUCCUGUCAG*C*U*U*C
4	UUCAUCUCCUGUCAG*C*mU*mU*mC
5	UUCAUCUCCUGUCAmG*mC*mU*mU*mC
6	UUCAUCUCCUGUC*A*G*C*mU*mU*mC

상기 \*은 포스포로티오에이트 결합, 상기 m은 2'-O-메틸 RNA를 나타내는 것인, RNA 복합체.

#### 청구항 2

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

#### 청구항 3

제1항에 있어서, RNA 복합체가 세포에 의한 멜라닌 생성을 억제할 수 있는 RNA 복합체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, RNA 복합체가 전달 비히클(vehicle)의 부재시 세포의 세포막을 침투할 수 있는 RNA 복합체.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, RNA 복합체가 세포독성이 아닌 RNA 복합체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 RNA 복합체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 과도한 멜라닌 생성과 연관된 피부 색소침착 장애 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 과도한 멜라닌 생성과 연관된 피부 색소침착 장애가 기미 또는 검버섯인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 조성물이 국소 전달을 위해 제형화되는 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

제6항에 있어서, 약제학적 조성물이 크림 또는 로션인 약제학적 조성물.

**청구항 10**

제6항에 있어서, 약제학적 조성물이 제2 피부 미백제를 더 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 제2 피부 미백제가 히드로퀴논, 알부틴, 트레티노인, 코지산, 아젤라산 및 트라넥사민산 으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **연관 출원**

[0002] 본 출원은 2015년 7월 27일에 제출된 미국 가특허 출원 제62/197,370호의 우선권 이익을 주장하며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

**배경 기술**

[0003] **배경**

[0004] 멜라노사이트(melanocyte)에 의한 과도한 멜라닌 생성은 기미 및 검버섯(age spot)을 포함하여, 다양한 피부 색소침착-관련 장애와 연관되어 있다. 기미에서, 멜라닌의 과도한 생성은 상피 피부층에 존재하는 멜라노사이트에서 검은색 침착(black deposit)을 야기한다. 기미는 여성의 피부에서 발생하는 주요 불응성 질환 중 하나이다. 기미는 보통 임신한 여성 및 경구 또는 패치(patch) 피임약을 복용중이거나 호르몬 대체 요법을 받고 있는 여성에서 발생한다.

[0005] 티로시나아제(tyrosinase)는 멜라닌 합성에서의 속도 제한 효소이므로, 과색소침착(hyperpigmentation)을 감소시키고 피부 색소침착-관련 장애를 치료하는 약제에 대해 중요한 치료 표적인 산화효소이다. 인간에서, 티로시나아제 효소는 TYR 유전자에 의해 코딩된다. 손상된 티로시나아제 생성을 야기하는 TYR 유전자에서의 돌연변이는 I형 눈피부백색증(oculocutaneous albinism)을 야기한다.

[0006] 과도한 멜라닌 생성과 연관된 피부 색소침착-관련 장애의 현재 이용가능한 치료는 히드로퀴논, 알부틴, 트레티노인(tretinoin), 아젤라산, 코지산(kojic acid), 화학적 박피 및 마이크로더마브레이션(microdermabrasion)을



포함한다. 그러나, 상기 치료는 보통 비효과적이며, 상당한 부작용을 가질 수 있다. 상기 장애가 있는 사람은 보통 과도한 피부 색소침착 부분을 숨기기 위해 화장품에 의지할 필요가 있다.

[0007] 따라서, 멜라닌 생성의 억제 및 기미와 검버섯을 포함한 피부 색소침착-관련 장애의 치료를 위한 개선된 조성물 및 방법이 요청되고 있다.

## 발명의 내용

[0008] 요약

[0009] 특정 양태에서, 본원은 티로시나아제를 억제하고, 멜라닌 생성 감소 및 기미와 검버섯을 포함한 색소침착-관련 장애의 치료에 유용한 RNA 복합체를 제시한다. 특정 양태에서, 본원은 상기 RNA 복합체를 포함한 억제학적 조성물 및 상기 RNA 복합체 및 억제학적 조성물을 사용하는 방법을 제시한다.

[0010] 특정 양태에서, 본원은 티로시나아제 mRNA 서열(예를 들어, 인간 티로시나아제 mRNA 서열)에 대한 서열 상보성을 갖는 안티센스 가닥(antisense strand) 및 안티센스 가닥에 대한 서열 상보성을 갖는 센스 가닥을 포함하는 RNA 복합체를 제시한다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 세포(예를 들어, 멜라노사이트)에 의한 티로시나아제 발현을 억제할 수 있다. 특정 실시양태에서, RNA 복합체는 세포(예를 들어, 멜라노사이트)에 의한 멜라닌 생성을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 비대칭 짧은 간섭 RNA(asymmetric short interfering RNA)(asiRNA)이다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 긴 비대칭 짧은 간섭 RNA(long asymmetric short interfering RNA)(lasiRNA)이다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 표 1, 표 2, 표 4, 표 5 및 표 6에 열거된 RNA 복합체이다.

[0011] 일부 실시양태에서, 본원에 제시된 RNA 복합체는 화학적 변형을 포함하고, 여기서 변형은 전달 비히클(vehicle)의 부재시 세포막의 침투를 가능하게 한다. 일부 실시양태에서, 변형은 2'-O-메틸화 뉴클레오시드, 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 결합 또는 콜레스테롤 모이어티(moiety)이다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 표 2 또는 표 4에 열거된 변형 RNA 복합체이다. 특정 실시양태에서, RNA 복합체는 세포독성이 아니다.

[0012] 특정 양태에서, 본원은 본원에 제시된 RNA 복합체 및 억제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 억제학적 조성물을 제시한다. 특정 실시양태에서, 억제학적 조성물은 국소 전달을 위해 제형화된다. 일부 실시양태에서, 억제학적 조성물은 크림 또는 로션이다. 일부 실시양태에서, 억제학적 조성물은 제2 피부 미백제(skin lightening agent)(예를 들어, 히드로퀴논, 알부틴, 트레티노인, 코지산, 아젤라산 또는 트라넥사민산(tranexamic acid))을 더 포함한다.

[0013] 특정 양태에서, 본원은 세포를 본원에 제시된 RNA 복합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포(예를 들어, 멜라노사이트)에 의한 티로시나아제 발현을 억제하는 방법을 제시한다. 특정 양태에서, 본원은 세포를 본원에 제시된 RNA 복합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포(예를 들어, 멜라노사이트)에 의한 멜라닌 생성을 억제하는 방법을 제시한다.

[0014] 특정 양태에서, 본원은 본원에 제시된 RNA 복합체 또는 억제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 인간 대상체의 피부에서 멜라닌 생성을 억제하는 방법을 제시한다. 특정 양태에서, 본원은 본원에 제시된 RNA 복합체 또는 억제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 과도한 멜라닌 생성과 연관된 피부 색소침착 장애(예를 들어, 기미 또는 검버섯)에 대해 인간 대상체를 치료하는 방법을 제시한다.

## 도면의 간단한 설명

[0015] 도면의 간단한 설명

도 1은 티로시나아제를 표적화하는 62개의 예시적 asiRNA의 유전자 침묵 효율(gene silencing efficiency)을 도시한 것이다. asiRNA를 0.3 nM 농도로 A375P에 형질감염시켰으며, 24시간 이후에 티로시나아제 mRNA 발현의 정도를 실시간 PCR을 사용하여 측정하였다. 그래프는 3개의 반복 실험의 평균 및 표준 편차를 도시한 것이다.

도 2는 다양한 화학적 변형이 적용된 예시적 티로시나아제-표적화 세포 침투성 asiRNA(cell penetrating asiRNA)(cp-asiRNA, 또는 cp-asiTYR)의 유전자 침묵 효율을 도시한 것이다. cp-asiRNA를 1  $\mu$ M 농도의 MNT-1 세포의 존재 하에 형질감염 비히클(vehicle) 없이 배양하였으며, 48시간 이후에 티로시나아제 mRNA 발현의 정도를 실시간 PCR을 사용하여 측정하였다. 그래프는 3개의 반복 실험의 평균 및 표준 편차를 도시한 것이다.

도 3은 예시적 cp-asiRNA에 의한 티로시나아제 단백질 발현의 억제를 도시한 것이다. cp-asiRNA를 형질감염 비

히클 없이 MNT-1 세포와 접촉시켰으며, 72시간 이후에 단백질을 추출하고 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하였다(NT = 비치료(no treatment)).

도 4는 형질감염 비히클 없이 예시적 cp-asiRNA를 이용하여 MNT-1 세포를 치료한지 72시간 이후에 수행된 멜라닌 함량 에세이(assay)의 결과를 도시한 것이다(NT = 비치료).

도 5는 예시적 cp-asiRNA에 의한 색소침착 억제를 도시한 것이다. 패널 (a)는 형질감염 비히클 없이 cp-asiRNA를 이용하여 치료한지 72시간 이후에 MNT-1 세포의 색 변화를 도시한 것이다. 패널 (b)는 비히클 없이 cp-asiRNA를 이용하여 MNT-1 세포를 치료한지 72시간 이후에 MNT-1 세포주로부터 얻어진 멜라닌의 색 변화를 도시한 것이다(NT = 비치료).

도 6은 LDH 에세이 및 CCK-8 에세이를 사용하여 형질감염 비히클 없이 예시적 cp-asiRNA를 이용하여 치료된 세포의 세포독성을 도시한 것이다. 패널 (a)는 LDH 에세이에 의해 결정된 바와 같이 예시적 cp-asiRNA 또는 지시 대조군을 이용하여 치료한지 24시간 이후에 MNT-1 세포에서의 세포독성을 도시한 것이다. 패널 (b)는 CCK-8 에세이에 의해 결정된 바와 같이 cp-asiRNA 또는 지시 대조군을 이용하여 치료한지 24시간 이후에 MNT-1 세포에서의 세포독성을 도시한 것이다. 패널 (c)는 LDH 에세이에 의해 결정된 바와 같이 cp-asiRNA 또는 대조군을 이용하여 치료한지 24시간 이후에 HaCaT 세포에서의 세포독성을 도시한 것이다. 패널 (d)는 CCK-8 에세이에 의해 결정된 바와 같이 cp-asiRNA 또는 대조군을 이용하여 치료한지 24시간 이후에 HaCaT 세포의 세포독성을 도시한 것이다(NT = 비치료).

도 7은 상이한 안티센스 가닥 길이(21 또는 19 뉴클레오타이드) 및 2'-O-메틸화 변형을 함유하는 예시적 cp-asiRNA의 유전자 침묵 효과를 도시한 것이다. 각각의 cp-asiRNA를 1  $\mu$ M 농도로 형질감염 비히클 없이 MNT-1에 접촉시켰으며, 48시간 이후에 결과적 티로시나아제 mRNA 생성을 실시간 PCR에 의해 측정하였다.

도 8은 예시적 cp-asiRNA에 의한 티로시나아제 단백질 발현의 억제를 도시한 것이다. 표시된 cp-asiRNA를 형질감염 비히클 없이 MNT-1 세포에 접촉시켰으며, 72시간 이후에 단백질을 추출하고 웨스턴 블롯을 수행하였다(NT = 비치료).

도 9는 형질감염 비히클 없이 예시적 cp-asiRNA를 이용하여 MNT-1 세포를 치료한지 72시간 이후에 수행된 멜라닌 함량 에세이에 의해 생성된 결과를 도시한 것이다(NT = 비치료).

도 10은 예시적 cp-asiRNA에 의한 티로시나아제 단백질 발현의 억제를 도시한 것이다. 표시된 cp-asiRNA를 형질감염 비히클 없이 MNT-1 세포에 접촉시켰으며, 72시간 이후에 단백질을 추출하고 웨스턴 블롯을 수행하였다(NT = 비치료).

도 11은 예시적 asiRNA 및 lasiRNA를 이용한 MNT-1 세포의 치료 효과를 도시한 것이다. 확인된 각각의 복합체를 지시된 농도로 48시간 동안 MNT-1 세포와 함께 배양하였으며, 티로시나아제 mRNA 발현을 실시간 RT-PCR에 의해 결정하였다.

도 12는 예시적 asiRNA 및 lasiRNA를 이용한 MNT-1 세포의 치료 효과를 도시한 것이다. 패널 (a)는 예시적 asiRNA, lasiRNA 또는 대조군을 이용하여 치료한지 72시간 이후에 MNT-1 세포에 의한 티로시나아제 발현에 대하여 웨스턴 블롯에 의해 생성된 결과를 도시한 것이다. 패널 (b)는 예시적 asiRNA, lasiRNA 또는 대조군을 이용하여 치료한지 72시간 이후에 MNT-1 세포의 멜라닌 함량을 도시한 것이다(NT = 비치료).

도 13은 인간 티로시나아제 mRNA 서열을 제시한다.

도 14는 예시적 cp-asiRNA에 의한 재구성 피부 모델에서의 멜라닌 합성 억제를 도시한 것이다. 패널 (a)는 cp-MEL-300-B 샘플이 배지에서 asiTYR#4-1로 13일 동안 매일 치료(13회)되었던 연구에 대한 실험 도식을 도시한 것이다. 패널 (b)는 비치료 대조군 샘플(NT), cp-asiTYR#4-1 치료된 샘플, 및 코지산 치료된 샘플에서 멜라노사이트의 광학 현미경 분석을 도시한 것이다. 패널 (c)는 비치료 대조군 샘플(NT), cp-asiTYR#4-1 치료된 샘플, 및 코지산 치료된 샘플에서의 멜라닌 분석을 위한 폰타나-마손(Fontana-Masson) 염색을 도시한 것이다. 패널 (d)는 실시간 PCR을 사용하여 측정된 바와 같은 14일차의 티로시나아제 mRNA 수준을 도시한 것이다. 패널 (e)는 웨스턴 블롯에 의해 측정된 14일차의 티로시나아제 단백질 수준을 도시한 것이다. 패널 (f)는 멜라닌 함량 에세이를 사용하여 측정된 14일차의 샘플의 멜라닌 함량을 도시한 것이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 상세한 설명

[0016]

- [0017] 일반
- [0018] 특정 양태에서, 본원은 티로시나아제 발현을 억제하여, 멜라닌 생성을 감소시키고 과도한 멜라닌 생성과 연관된 색소침착-관련 장애, 예컨대 기미 및 검버섯을 치료하는데 유용한 비대칭 RNA 복합체(예를 들어, asiRNA 또는 lasiRNA)를 제시한다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 화학적으로 변형되어 형질감염 비히클의 필요 없이 세포에 침투할 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 표 1, 표 2, 표 4, 표 5 및 표 6에 열거된 RNA 복합체이다. 특정 양태에서, 본원은 상기 RNA 복합체를 포함하는 약제학적 조성물 및 상기 RNA 복합체와 약제학적 조성물을 사용하는 방법을 제시한다.
- [0019] 티로시나아제는 멜라닌 합성에서 핵심 역할을 하는 단백질이다. 히드로퀴논, 레티노산 및 코지산을 포함하여, 티로시나아제를 표적화하는 다양한 소분자 억제제가 피부-미백 제품의 활성 성분으로서 사용되어 왔다. 그러나 상기 치료는 보통 비효과적이며, 보통 심각한 부작용, 예컨대 가려움증 및 피부 갈변(browning)을 야기한다.
- [0020] 특정 실시양태에서, 본원에 제시된 RNA 복합체는 현재 피부 미백을 위해 사용되는 종래의 소분자에 비해 부작용에 대한 위험을 감소시켰다. 본원에 개시된 바에 있어서, 본원에 제시된 예시적 RNA 복합체는 현재의 피부-미백제에 비해 1000배 낮은 농도에서도 현저한 티로시나아제 억제 효과를 갖는다. 따라서, 본원에 제시된 RNA 복합체는 개선된 피부-미백 효과를 위해 현재 이용 가능한 소분자 제품을 대체하거나 보충할 수 있다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNA 복합체는 asiRNA 또는 lasiRNA이다. 본원에 사용된 바에 있어서, 용어 asiRNA는 19-21 nt 안티센스 가닥 및 13-17 nt 센스 가닥을 갖는 이중-가닥 비대칭 짧은 간접 RNA 분자를 지칭한다. asiRNA에 대한 추가 정보는 미국 특허공개 제2012/0238017호 및 Chang *et al.*, *Mol. Ther.* 17:725-732 (2009)에서 찾아볼 수 있으며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 본원에 사용된 바에 있어서, 용어 lasiRNA는 13-21 nt 센스 가닥 및 24 nt를 초과하는 안티센스 가닥을 갖는 이중-가닥 긴 비대칭 간접 RNA 분자를 지칭한다. lasiRNA에 대한 추가 정보는 미국 특허공개 제2013/0273657호에서 찾아볼 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNA 복합체는 전달 비히클, 예컨대 리포솜, 양이온성 중합체, 세포 침투성 펩티드(cell penetrating peptide)(CPP), 단백질 형질도입 도메인(protein transduction domain)(PTD), 항체 및/또는 압타머(aptamer)를 사용하여 세포에 전달된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNA 복합체는 세포에서의 티로시나아제 억제를 증대하기 위한 상기 전달 비히클의 사용을 필요로 하지 않도록 화학적으로 변형된다. 상기 RNA 복합체는 본원에서 세포-침투성 asiRNA(cp-asiRNA) 또는 세포-침투성 lasiRNA(cp-lasiRNA)로서 지칭된다.
- [0023] 정의
- [0024] 편의를 위해, 본 명세서에서 사용된 특정 용어, 실시예, 및 첨부된 청구항이 여기에서 종합된다.
- [0025] 관사 "하나" 및 "한"("a" 및 "an")은 본원에서 관사의 문법적 대상의 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 사용된다. 예로서, "an element"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.
- [0026] 본원에 사용된 바에 있어서, 용어 "투여"는 약제학적 제제 또는 조성물을 대상체에 제공하는 것을 의미하며, 전문 의료진에 의한 투여 및 자가-투여를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본원에 사용된 바에 있어서, 용어 "간접 핵산", "억제 핵산"은 상호교환적으로 사용된다. 간접 핵산은 일반적으로 시클릭 서브유닛(cyclic subunit)의 서열을 포함하고, 이들 각각은 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성(base pairing)에 의해 염기쌍 모이어티가 핵산(전형적으로 RNA) 내의 표적 서열에 혼성화되어, 표적 서열 내에 핵산:올리고머 이형2중나선(heteroduplex)을 형성하게 하는 서브유닛 사이의 연결에 의해 연결된 염기쌍 모이어티를 보유한다. 간접 RNA 분자는 안티센스 분자, siRNA 분자, asiRNA 분자, lasiRNA 분자, 단일-가닥 siRNA 분자, miRNA 분자 및 shRNA 분자를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 간접 핵산은 mRNA의 번역을 차단 또는 억제하거나, 천연 프리-mRNA(pre-mRNA) 스플라이싱(splice) 과정을 억제하거나, 표적 mRNA의 분해를 유도하도록 설계될 수 있으며, 혼성화되는 표적 핵산에 "지향" 또는 "표적화"된다고 할 수 있다. 간접 핵산은, 예를 들어 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)(PNA), LNA(locked nucleic acid), 2'-O-메틸 올리고뉴클레오타이드 및 RNA 간섭제(siRNA제)를 포함할 수 있다. RNAi 분자는 일반적으로 선택적으로 분해되거나 "녹 다운(knocked down)"되는 표적 분자와 함께 이형2중나선을 형성하는 것에 의해, 표적 RNA를 비활성화함으로써 작용한다. 일부 조건 하에서, 간접 RNA 분자는 또한 전사물 번역을 억압하고/하거나 전사물의 전사를 억제함으로써 표적 전사물을 비활성화시킬 수 있다. 간접 핵산은 더욱 일반적으로 상기 개시된 방식으로 표적의 핵산에 표적화되었을 때

단백질과 같은 생물학적 관련 표적에 대하여 "표적화"된다고 한다.

- [0028] 용어 "폴리뉴클레오티드", 및 "핵산"은 상호교환적으로 사용된다. 이들은 임의의 조합 및 임의의 길이의 테옥시 리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 또는 이의 유사체에 상관 없이, 뉴클레오티드의 중합 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오티드의 비제한적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 연관 분석으로부터 정의된 유전자 자리들(유전자자리)(loci(locus)), 엑손, 인트론, 전령 RNA(mRNA), 운반 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의 서열의 단리된 DNA, 임의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브(probe), 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 변형 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 이전 또는 이후에 주어질 수 있다. 폴리뉴클레오티드는, 예컨대 라벨링(labeling) 성분과의 접합에 의해 더 변형될 수 있다. 본원에 제시된 모든 핵산 서열에서, U 뉴클레오티드는 T 뉴클레오티드와 상호교환적이다.
- [0029] 본원에 사용된 바와 같은 구절 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 약제학적으로 허용 가능한 재료, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체 필러(filler), 희석제, 부형제, 또는 용매 캡슐화 재료를 의미한다.
- [0030] 생리학적 조건 하에서 실질적으로 45℃ 초과, 또는 적어도 50℃, 또는 적어도 60℃-80℃ 또는 그 이상의 Tm으로 올리고머가 표적에 혼성화되는 경우, 올리고뉴클레오티드는 표적 폴리뉴클레오티드에 "특이적으로 혼성화된다". 상기 혼성화는 엄격한(stringent) 혼성화 조건에 상응한다. 소정 이온 강도 및 pH에서, Tm은 표적 서열의 50%가 상보적 폴리뉴클레오티드에 혼성화되는 온도이다. 다시 말해, 상기 혼성화는 표적 서열에 대한 안티센스 올리고머의 "근사" 또는 "실질적" 상보성으로뿐 아니라, 정확한 상보성으로 발생할 수 있다.
- [0031] 본원에 사용된 바에 있어서, 용어 "대상체"는 치료 또는 요법을 위해 선택된 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.
- [0032] 본원에 사용된 바와 같은 구절 "치료적 유효량" 및 "유효량"은 대상체내 세포의 적어도 하위-집단에서 소망하는 치료적 효과를 임의의 의학적 치료에 적용 가능할 타당한 유익성/위험성 비율(benefit/risk ratio)로 생성하기에 효과적인 약제의 양을 의미한다.
- [0033] 대상체에서의 질환을 "치료"하거나 또는 질환을 가진 대상체를 "치료"하는 것은 대상체를 약제학적 치료에 처리하는 것, 예를 들어 약물을 투여하여, 질환의 적어도 하나의 증상이 감소되거나 악화를 예방하도록 하는 것을 지칭한다.
- [0034] RNA 복합체
- [0035] 특정 양태에서, 본원은 티로시나아제 mRNA를 표적화하고 세포에 의한 티로시나아제 발현을 억제하는 RNA 복합체를 제시한다. 티로시나아제는 멜라닌의 생성을 조절하는 속도-제한 효소인 산화효소이다. 인간 티로시나아제 mRNA의 핵산 서열은 NCBI 등록번호 NM\_000372로 입수 가능하며 도 13에 제시되어 있다.
- [0036] 특정 양태에서, 본원은 티로시나아제 mRNA 서열(예를 들어, 인간 티로시나아제 mRNA 서열)에 대한 서열 상보성을 갖는 안티센스 가닥 및 안티센스 가닥에 대한 서열 상보성을 갖는 센스 가닥을 포함하는 RNA 복합체를 제시한다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 세포(예를 들어, 멜라노사이트)에 의한 티로시나아제 발현을 억제할 수 있다. 특정 실시양태에서, RNA 복합체는 세포(예를 들어, 멜라노사이트)에 의한 멜라닌 생성을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 비대칭 짧은 간섭 RNA(asiRNA)이다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 긴 비대칭 짧은 간섭 RNA(lasiRNA)이다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 표 1, 표 2, 표 4, 표 5 및 표 6에 열거된 RNA 복합체이다. 본원에 개시된 RNA 복합체는 RNA 염기, 비-RNA 염기 또는 RNA 염기와 비-RNA 염기의 혼합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 본원에 제시된 특정 RNA 복합체는 주로 RNA 염기로 구성될 수 있으나, DNA 염기 또는 비-천연 산출 뉴클레오티드 또한 함유할 수 있다.
- [0037] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 적어도 19 뉴클레오티드(nt) 길이이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 19 내지 21 nt 길이(즉, 19, 20 또는 21 nt 길이)이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 적어도 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 nt는 티로시나아제 mRNA 서열에 대해 상보적이다. 완벽한 상보성은 필요하지 않다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 티로시나아제 mRNA 서열에 대해 완전히 상보적이다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 적어도 24 nt 길이(예를 들어, 적어도 25 nt 길이, 적어도 26 nt 길이, 적어도 27 nt 길이, 적어도 28 nt 길이, 적어도 29 nt 길이, 적어도 30 nt 길이 또는 적어도 31 nt 길이)이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 124 nt 길이 이하(예를 들어, 100 nt 길이 이하, 90 nt 길이 이하, 80 nt



길이 이하, 70 nt 길이 이하, 60 nt 길이 이하, 50 nt 길이 이하 또는 40 nt 길이 이하)이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 31 nt 길이이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 적어도 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 29, 30 또는 31 nt는 티로시나아제 mRNA 서열에 대해 상보적이다. 완벽한 상보성은 필요하지 않다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 티로시나아제 mRNA 서열에 대해 완전히 상보적이다.

[0039] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 15 내지 17 nt 길이(즉, 15 nt 길이, 16 nt 길이 또는 17 nt 길이)이다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 적어도 15 nt, 적어도 16 nt 또는 적어도 17 nt는 안티센스 가닥의 서열에 대해 상보적이다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 안티센스 가닥의 서열에 대해 완전히 상보적이다.

[0040] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 5' 말단과 센스 가닥의 3' 말단이 평활 말단(blunt end)을 형성하는 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 안티센스 가닥의 5' 말단이 센스 가닥의 3' 말단에 오버행(overhang)된(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 nt 만큼) 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 센스 가닥의 5' 말단이 안티센스 가닥의 3' 말단에 오버행된(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 nt 만큼) 복합체를 형성한다.

[0041] 일부 실시양태에서, RNA 복합체의 안티센스 가닥 및/또는 센스 가닥은 표 1, 표 2, 표 4, 표 5 및 표 6에 열거된 서열로부터 선택되는 센스 가닥 서열 및/또는 안티센스 가닥 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 1(SEQ ID NO: 1)의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 2의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 3의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 4의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 5의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 6의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 7의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 8의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 9의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 10의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 11의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 12의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 13의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 14의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 15의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 16의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 17의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 18의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 19의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 20의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 21의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 22의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 23의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 24의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 25의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 26의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 27의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 28의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 29의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 30의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 31의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 32의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 33의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 34의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 35의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 36의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 37의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 38의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 39의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 40의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 41의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 42의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 43의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 44의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 45의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 46의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 47의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 48의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 49의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 50의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 51의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 2의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 53의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 54의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 55의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 56의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 57의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 58의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 59의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 60의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 61의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 62의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 63의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 64의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 65의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 66의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 67의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 68의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 69의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 70의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 71의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 72의 서열을 갖는다. 일부 실시

양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 73의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 74의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 75의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 76의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 77의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 78의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 79의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 80의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 81의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 82의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 83의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 84의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 85의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 86의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 87의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 88의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 89의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 90의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 91의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 92의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 93의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 94의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 95의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 96의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 97의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 98의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 99의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 100의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 101의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 102의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 103의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 104의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 105의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 106의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 107의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 108의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 109의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 110의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 111의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 112의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 113의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 114의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 115의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 116의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 117의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 118의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 119의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 120의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 121의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 122의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 123의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 124의 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열 번호 125의 서열을 갖고 안티센스 가닥은 서열 번호 126의 서열을 갖는다.

[0042] 일부 실시양태에서, 본원에 제시된 RNA 복합체는 화학적 변형을 포함하고, 여기서 변형은 전달 비히클의 부재시 세포막의 침투를 가능하게 한다. 일부 실시양태에서, 변형은 2'-O-메틸화 뉴클레오시드, 포스포로티오에이트 결합 또는 콜레스테롤 모이어티이다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 표 2 또는 표 4에 열거된 변형 RNA 복합체이다. 특정 실시양태에서, RNA 복합체는 세포독성이 아니다.

[0043] 본원에 개시된 RNA 복합체는 다양한 올리고뉴클레오타이드 화학을 이용할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 화학의 예는, 비제한적으로 펩티드 핵산(PNA), 연결 핵산(linked nucleic acid)(LNA), 포스포로티오에이트, 2'-O-Me-변형 올리고뉴클레오타이드, 및 모르폴리노 화학과, 상기 것들 중 임의의 것의 조합을 포함한다. 일반적으로, PNA 및 LNA 화학은 2'-O-Me-변형 올리고뉴클레오타이드에 비해 상대적으로 높은 표적 결합 강도 때문에 짧은 표적화 서열을 이용할 수 있다. 포스포로티오에이트 및 2'-O-Me-변형 화학은 보통 조합되어 포스포로티오에이트 백본(backbone)을 갖는 2'-O-Me-변형 올리고뉴클레오타이드를 생성한다. 예를 들어, PCT 공개번호 WO/2013/112053호 및 WO/2009/008725호를 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0044] 펩티드 핵산(PNA)은 백본이 데옥시리보오스 백본과 구조적으로 동형인 DNA의 유사체이며, 피리미딘 또는 퓨린 염기가 부착된 N-(2-아미노에틸) 글리신 단위로 구성된다. 천연 피리미딘 및 퓨린 염기를 함유한 PNA는 왓슨-크릭 염기쌍 형성 규칙을 따르는 상보적 올리고뉴클레오타이드, 및 염기 쌍 인식 면에서 모방 DNA에 혼성화된다. PNA의 백본은 포스포디에스테르 결합보다는 펩티드 결합에 의해 형성되어, 그것들이 안티센스 적용에 잘 맞추어지게 한다(하기 구조 참조). 백본은 하전되지 않아, 정상을 초과하는 열 안정성을 나타내는 PNA/DNA 또는 PNA/RNA 이중나선(duplex)을 야기한다. PNA는 뉴클레아제 또는 프로테아제에 의해 인식되지 않는다.

[0045] 천연 구조에 대한 근본적 구조 변화에도 불구하고, PNA는 DNA 또는 RNA에 대한 나선 형태로 서열-특이적 결합이 가능하다. PNA의 특징은 상보적 DNA 또는 RNA에 대한 높은 결합 친화성, 단일-염기 미스매치(mismatch)에 의해 야기된 불안정화 효과(destabilizing effect), 뉴클레아제 및 프로테아제에 대한 내성, 염 농도와 독립적인 DNA 또는 RNA와의 혼성화 및 호모퓨린(homopurine) DNA와의 삼중나선(triplex) 형성을 포함한다. PANAGENE.TM.은

자사 고유의 Bts PNA 모노머(Bts; 벤조티아졸-2-설폰닐기(benzothiazole-2-sulfonyl group)) 및 자사 고유의 올리고머화 과정을 개발하였다. Bts PNA 모노머를 사용한 PNA 올리고머화는 탈보호(deprotection), 커플링(coupling) 및 캡핑(capping)의 반복 주기로 구성된다. PNA는 당업계에 알려진 임의의 기법을 사용하여 인공적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,969,766호, 제7,211,668호, 제7,022,851호, 제7,125,994호, 제7,145,006호 및 제7,179,896호 참조. 또한, PNA의 제조에 대해서는 미국 특허 제5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호 참조. PNA 화합물의 추가 교시는 Nielsen *et al.*, *Science*, 254:1497-1500, 1991에서 찾아볼 수 있다. 상기 것들 각각은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0046] 간접 핵산은 또한 "LNA(locked nucleic acid)" 아단위를 함유할 수 있다. "LNA"는 가교 핵산(bridged nucleic acid)(BNA)으로 지칭되는 변형 부류의 멤버이다. BNA는 C3-엔도(노던) 슈가 푸커(C3-endo (northern) sugar pucker)에서 리보오스 고리의 배좌(conformation)를 고정시키는 공유 결합이 특징이다. LNA에 대해, 가교는 2'-O와 4'-C 위치 사이의 메틸렌으로 구성된다. LNA는 백본 사전조직화(preorganization) 및 염기 중첩을 향상시켜 혼성화 및 열 안정성을 증가시킨다.

[0047] LNA의 구조는, 예를 들어 Wengel, *et al.*, *Chemical Communications* (1998) 455; *Tetrahedron* (1998) 54:3607, 및 *Accounts of Chem. Research* (1999) 32:301; Obika, *et al.*, *Tetrahedron Letters* (1997) 38:8735; (1998) 39:5401, 및 *Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008) 16:9230에서 찾아볼 수 있다. 본원에 제시된 화합물은 1종 이상의 LNA를 포함할 수 있으며; 일부 경우에, 화합물은 완전히 LNA로 구성될 수 있다. 개별 LNA 뉴클레오타이드 아단위의 합성 및 이들의 올리고뉴클레오타이드로의 혼입 방법은, 예를 들어 미국 특허 제7,572,582호, 제7,569,575호, 제7,084,125호, 제7,060,809호, 제7,053,207호, 제7,034,133호, 제6,794,499호, 및 제6,670,461호에 개시되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참고로 포함된다. 전형적인 아단위 간의 링커(linker)는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 모이어티를 포함하며; 대안적으로, 비-인(phosphorous) 함유 링커가 이용될 수 있다. 일 실시양태는 각각의 LNA 아단위가 DNA 아단위에 의해 분리되어 있는 LNA-함유 화합물이다. 특정 화합물은 아단위 간의 링커가 포스포로티오에이트인 교대되는(alternating) LNA 및 DNA 아단위로 구성된다.

[0048] 특정 실시양태에서, RNA 복합체는 콜레스테롤 모이어티에 연결된다. 일부 실시양태에서, 콜레스테롤 모이어티는 센스 가닥의 3' 말단에 부착된다. 일부 실시양태에서, 콜레스테롤 모이어티는 안티센스 가닥의 3' 말단에 부착된다. 일부 실시양태에서, 콜레스테롤 모이어티는 센스 가닥의 5' 말단에 부착된다. 일부 실시양태에서, 콜레스테롤 모이어티는 안티센스 가닥의 5' 말단에 부착된다.

[0049] 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드를 포함한다. 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드는 리보오스 분자의 2'-OH 잔기에 메틸기를 수반한다. 2'-O-Me-RNA는 RNA와 동일한(또는 유사한) 거동을 나타내지만, 뉴클레아제 분해에 대해 보호된다. 2'-O-Me-RNA는 또한 추가 안정화를 위해 포스포티오에이트 올리고뉴클레오타이드(phosphothioate oligonucleotide)(PTO)와 조합될 수 있다. 2'-O-Me-RNA(포스포디에스테르 또는 포스포티오에이트)는 당업계의 일상적 기법에 따라 합성될 수 있다(예를 들어, Yoo *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 32:2008-16, 2004를 참조하며, 이는 본원에 참고로 포함된다).

[0050] 일부 실시양태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 센스 가닥의 3' 말단에 위치한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 3' 말단 영역은 복수의 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드(예를 들어, 3' 말단의 6 뉴클레오타이드 내의 2, 3, 4, 5 또는 6 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 안티센스 가닥의 3' 말단에 위치한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 영역은 복수의 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드(예를 들어, 3' 말단의 6 뉴클레오타이드 내의 2, 3, 4, 5 또는 6 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 3' 말단 영역 및 안티센스 가닥의 3' 말단 영역 둘 다는 복수의 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 비변형 뉴클레오타이드와 교대되는 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 비변형 뉴클레오타이드와 교대되는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드의 인접 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티-센스 가닥은 비변형 뉴클레오타이드와 교차하는 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티-센스 가닥은 비변형 뉴클레오타이드와 교대되는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 2'-O-메틸화 뉴클레오타이드의 인접 서열을 포함한다.

[0051] 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. "포스포로티오에이트"(또는 S-올리고)는 비가교 산소 중 하나가 황으로 치환된 정상 DNA의 변이체이다. 뉴클레오타이드 사이의 결합의 황화(sulfurization)는 5' → 3' 및 3' → 5' DNA POL 1 엑소뉴클레아제(exonuclease), 뉴클레아제 S1 및 P1, RNase, 혈청 뉴클레아제 및 뱀 독 포스포디에스테라아제(snake venom phosphodiesterase)를 포함한 엔도- 및



엑소뉴클레아제의 작용을 감소시킨다. 포스포로티오에이트는 2개의 주요 경로: 수소 포스포네이트(hydrogen phosphonate) 상의 이황화탄소에서 원소 황의 용액의 작용에 의해, 또는 테트라에틸티우람 디설파이드(tetraethylthiuram disulfide)(TETD) 또는 3H-1,2-벤조디티올-3-온 1,1-다이옥사이드(3H-1,2-benzodithiol-3-one 1,1-dioxide)(BDTD)로 포스파이트 트리에스테르(phosphite triester)를 황화시키는 방법에 의해 제조된다 (예를 들어, Iyer *et al.*, *J. Org. Chem.* 55, 4693-4699, 1990 참조). 후자의 방법은 대부분의 유기 용매에서 원소 황의 불용성 및 이황화탄소의 독성의 문제를 회피한다. TETD 및 BDTD 방법은 또한 고순도 포스포로티오에이트를 제공한다.

[0052] 일부 실시양태에서, RNA 복합체의 센스 가닥에서 리보뉴클레오타이드 사이의 결합 중 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%는 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체의 센스 가닥에서 리보뉴클레오타이드 사이의 모든 결합은 포스포로티오에이트 결합이다.

[0053] 일부 실시양태에서, RNA 복합체의 안티센스 가닥에서 리보뉴클레오타이드 사이의 결합 중 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%는 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체의 안티센스 가닥에서 리보뉴클레오타이드 사이의 모든 결합은 포스포로티오에이트 결합이다.

[0054] 본원에 개시된 RNA 복합체는 세포와 접촉되거나 생물(예를 들어, 인간)에 투여될 수 있다. 대안적으로, RNA 복합체를 코딩하는 작제물(construct) 및/또는 벡터는 세포 또는 생물과 접촉되거나 이들로 도입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 바이러스, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 사용된다.

[0055] 본원에 개시된 RNA 복합체는 당업계에 알려진 임의의 적절한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNA 복합체는 화학 합성 또는 시험관내(in vitro) 전사에 의해 제조된다.

[0056] 약제학적 조성물

[0057] 특정 양태에서, 본원은 본원에 제시된 RNA 복합체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제시한다. 특정 실시양태에서, 약제학적 조성물은 국소 전달을 위해 제형화된다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물은 크림 또는 로션이다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물은 제2 피부 미백제(예를 들어, 히드로퀴논, 알부틴, 트레티노인, 코지산, 아젤라산 또는 트라넥사민산)를 더 포함한다. 특정 실시양태에서, 약제학적 조성물은 형질감염 비히클(리포솜, 양이온성 중합체, 세포 침투성 펩티드(CPP), 단백질 형질도입 도메인(PTD), 항체 및/또는 압타머)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 본원에 개시된 RNA 복합체의 다수(예를 들어, 2중 이상)의 조합을 포함한다.

[0058] 하기 상세하게 개시된 바에 있어서, 본원에 개시된 약제학적 조성물은 국소 투여에 적합한 형태(예를 들어, 크림 또는 로션)를 포함하여, 투여를 위해 고체 또는 액체 형태로 특별히 제형화될 수 있다.

[0059] 이들 제형 또는 조성물을 제조하는 방법은 본원에 개시된 RNA 복합체와 담체 및 임의로 1종 이상의 부성분(accessory ingredient)을 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 본원에 개시된 약제와 액상 담체를 균일하고 밀접하게 결합시킴으로써 제조된다.

[0060] 본원에 개시된 약제학적 조성물은 임의의 화장용 및/또는 피부과적으로 적합한 형태, 예를 들어 에멀전, 크림, 무스, 젤, 폼(foam), 로션, 마스크, 연고, 포마드, 용액, 세럼(serum), 스프레이, 스틱(stick), 패치, 또는 타월렛(towelette)으로 형성될 수 있다. 예를 들어, 국소 투여용 약제학적 조성물은 다소 유동적일 수 있으며, 백색 또는 유색 크림, 연고, 유액(milk), 로션, 세럼, 페이스트(paste), 무스 또는 젤의 외형을 가질 수 있다. 적절한 경우, 그것은 에어로졸 형태로 피부에 적용될 수 있다. 또한, 그것은 고체 형태로 존재할 수 있으며, 예를 들어 스틱의 형태로 존재할 수 있다. 그것은 케어(care) 제품 및/또는 피부 메이크업 제품으로 사용될 수 있다.

[0061] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약제학적 조성물은 RNA 복합체 이외에 다음으로부터 선택되는 적어도 1종의 화합물을 함유한다: 히드로퀴논, 알부틴, 트레티노인, 아젤라산, 트라넥사민산, α-히드록시산; 살리실산 및 이의 유도체, 예컨대 n-옥타노일-5-살리실산; HEPES; 프로시스테인(procysteine); 0-옥타노일-6-D-말토오스; 메틸글리신디아세트산의 디소듐 염(disodium salt); 세라미드; 스테로이드, 예컨대 디오스게닌 및 DHEA의 유도체; 코지산; N-에틸옥시카르보닐-4-파라아미노페놀; 아스코르브산 및 이의 유도체; 빌베리(bilberry) 추출물; 레티노이드, 및 특히 레티놀 및 이의 에스테르; 폴리펩티드 및 이의 아실화 유도체; 식물 호르몬(phytohormone); 효모 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 추출물; 조류(algal) 추출물; 비트레오실라 필리포르미스(*Vitreoscilla filiformis*)의 추출물; 대두, 루핀(lupin), 옥수수 및/또는 완두콩의 추출물; 알베린(alverine) 및 이의 염, 특히 알베린 시트레이트; 레스베라트롤(resveratrol); 카로티노이드 및, 특히 리코펜;



토코페롤 및 이의 에스테르; 코엔자임 Q10 또는 유비퀴논; 크산틴(xanthine) 및, 특히 카페인 및 이를 함유한 천연 추출물; 부처스 브room(butcher's-broom) 및 호스-체스트너트(horse-chestnut)의 추출물; 및 이의 혼합물.

[0062] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약제학적 조성물은 적어도 1종의 UVA 및/또는 UVB 필터를 함유할 수 있다. 일광차단(sunscreen) 필터는 유기 필터와 무기 필터 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다.

[0063] UV-A 및/또는 UV-B의 투과를 차단하는 유기 필터의 예는 다음을 포함한다: 파라아미노벤조산의 유도체(예를 들어, PABA, 에틸 PABA, 에틸디히드록시프로필 PABA, 에틸헥실디메틸 PABA, 글리세릴 PABA, PEG-25 PABA), 살리실 유도체(예를 들어, 호모살레이트, 에틸헥실 살리실레이트, 디프로필렌글리콜 살리실레이트, TEA 살리실레이트), 디벤조일메탄의 유도체(예를 들어, 부틸메톡시디벤조일메탄, 이소프로필디벤조일메탄), 신남산(cinnamic) 유도체(예를 들어, 에틸헥실 메톡시신나메이트, 이소프로필메톡시신나메이트, 이소아밀메톡시신나메이트, 시녹세이트, DEA 메톡시신나메이트, 디이소프로필 메틸신나메이트, 글리세릴 에틸헥사노에이트 디메톡시신나메이트),  $\beta, \beta'$ -디페닐아크릴레이트의 유도체(예를 들어, 옥토크릴렌, 에토크릴렌), 벤조페논의 유도체(예를 들어, 벤조페논-1, 벤조페논-2, 벤조페논-3 또는 옥시벤존, 벤조페논-4, 벤조페논-5, 벤조페논-6, 벤조페논-8, 벤조페논-9, 및 벤조페논-12), 벤질리덴 캄퍼(camphor)의 유도체(예를 들어, 3-벤질리덴 캄퍼, 4-메틸벤질리덴 캄퍼, 벤질리덴 캄퍼 설펜산, 캄퍼 벤잘코늄(benzalkonium) 메토설펜레이트, 테레프탈릴리덴(terephthalylidene) 디캄퍼 설펜산 및 폴리아크릴아미도메틸 벤질리덴 캄퍼), 페닐 벤지미다졸의 유도체(예를 들어, 페닐벤지미다졸 설펜산, 및 벤지미다질레이트), 트리아진의 유도체(예를 들어, 안이소트리아진(anisotriazine), 에틸헥실 트리아진, 및 디에틸헥실-부트아미도트리아진), 페닐 벤조트리아졸의 유도체(예를 들어, 드로메트리졸 트리실록산), 안트라닐 유도체(벤틸 안트라닐레이트), 이미다졸린 유도체(예를 들어, 에틸헥실디메톡시-벤질리덴디옥소이미다졸린 프로피오네이트), 벤잘말로네이트의 유도체(폴리오가노실록산) 및 이들의 조합.

[0064] UV-A 및/또는 UV-B의 투과를 차단하는 무기 필터의 예는 다음을 포함한다: 코팅되지 않은 금속 산화물 나노안료(nanopigment)(1차 입자의 평균 크기: 일반적으로 5 nm 내지 100 nm, 바람직하게는 10 nm 내지 50 nm), 예컨대 티타늄 산화물(비정질이거나 금속성 및/또는 예측성 형태로 결정화됨), 철 산화물, 아연 산화물, 지르코늄 산화물 또는 세륨 산화물의 나노안료. 또한, 코팅제는 알루미늄 및/또는 알루미늄 스테아레이트이다.

[0065] 특정 실시양태에서, 본원에 제시된 약제학적 조성물은 또한 다른 화장품 및 피부과적 성분, 예컨대 친수성 또는 친유성 젤라틴화제, 보존제, 향산화제, 용매, 계면활성제, 증점제(thickener), 향수, 필러, 안료, 흡취제 및 착색 물질을 함유한다.

[0066] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 약제학적 조성물은 또한 오일을 함유한다. 본원에 개시된 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 오일의 예는 다음을 포함한다: 동물 기원의 탄화수소 오일(예를 들어, 퍼히드로스쿠알렌(perhydrosqualene)), 식물 기원의 탄화수소 오일(예를 들어, 4개 내지 10개 탄소 원자를 포함하는 액체 지방산 트리글리세리드 및 카리테 버터(karite butter)의 액체 분획), 지방산의 합성 에스테르 및 에테르(예를 들어, 화학식  $R^1COOR^2$  및  $R^1OR^2$ 의 오일(여기서,  $R^1$ 은 8개 내지 29개 탄소 원자를 포함하는 지방산의 잔기를 나타내고,  $R^2$ 는 3개 내지 30개 탄소 원자를 함유하는 분지 또는 미분지 탄화수소 사슬을 나타낸다), 예컨대 퍼셀린 오일(Purcellin's oil), 이소노닐 이소노나노에이트(isononyl isononanoate), 이소프로필 미리스테이트, 에틸-2-헥실 팔미테이트, 옥틸-2-도데실 스테아레이트, 옥틸-2-도데실 에루케이트(erucate), 및 이소스테아릴 이소스테아레이트; 수산화 에스테르, 예컨대 이소스테아릴 락테이트, 옥틸히드록시스테아레이트, 옥틸도데실 히드록시스테아레이트, 디이소스테아릴말레이트, 트리아이소세틸 스테아레이트, 및 지방알코올의 헵타노에이트, 옥타노에이트 및 데카노에이트; 폴리올 에스테르, 예컨대 프로필렌 글리콜 디옥타노에이트, 네오펜틸글리콜 디헵타노에이트 및 디에틸렌글리콜 디이소노나노에이트; 및 펜타에리트리톨 에스테르, 예컨대 펜타에리트리톨 테트라이소스테아레이트), 미네랄 또는 합성 기원의 선형 또는 분지된 탄화 수소(예를 들어, 휘발성 또는 비휘발성 파라핀 오일 및 이의 유도체, 페트롤라툼, 폴리데센(polydecene), 및 수소화된 폴리이소부텐, 예컨대 팔레암 오일(parleam oil)), 8개 내지 26개 탄소 원자를 갖는 지방 알코올(예를 들어, 세틸 알코올 및 스테아릴 알코올 및 이의 혼합물, 옥틸도데카놀, 2-부틸옥타놀, 2-헥실데카놀, 2-운데실헵타데카놀, 올레인 알코올 또는 리놀레인 알코올(linoleic alcohol)), 부분 탄화수소 및/또는 실리콘 불소화 오일(partially hydrocarbonaceous and/or siliconaceous fluorinated oil), 실리콘 오일(예를 들어, 선형 또는 환형 실리콘쇄를 가지며, 주위 온도에서 액체 또는 페이스트인 휘발성 또는 비휘발성 폴리메틸실록산(polymethylsiloxane)(PDMS), 특히 시클로헥사실록산과 같은 시클로폴리-디메틸실록산(시클로메티콘); 펜던트(pendent)이거나 실리콘쇄의 말단에 존재하는 알킬, 알콕시 또는 페닐기를 2개 내지 24개 탄소 원자를 갖는 기와 함께 포함하는 폴리디메틸실록산; 페닐화 실리콘, 예컨대 페닐트리메티콘, 페닐디메티콘, 페닐-트리메틸실록시디페닐실록산, 디페닐디메티콘, 디페닐메틸디페닐트

리실록산, 2-페닐에틸트리메틸실록시실리케이트 및 폴리메틸페닐실록산), 및 이들의 조합.

- [0067] 본원에 개시된 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 유화제 및 보조유화제(coemulsifier)의 예는 O/W 유화제, 예컨대 지방산 및 폴리에틸렌 글리콜의 에스테르, 특히 PEG-100 스테아레이트, 및 지방산 및 글리세롤의 에스테르, 예컨대 글리세릴 스테아레이트뿐 아니라 W/O 유화제, 예컨대 옥시에틸렌화 폴리(메틸세틸)(디메틸)-메틸실록산 또는 에틸렌 글리콜 아세틸 스테아레이트와 글리세릴 트리스테아레이트의 혼합물을 포함한다.
- [0068] 본원에 개시된 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 친수성 젤라틴화제는 카르복시비닐 중합체(carboxyvinyl polymer)(카르보머(carbomer)), 아크릴 중합체, 예컨대 아크릴레이트/알킬 아크릴레이트 공중합체, 폴리아크릴 아미드, 다당류, 천연 검 및 클레이(clay)를 포함하는 한편, 언급될 수 있는 친유성 젤라틴화제는 변형 클레이, 예컨대 벤토나이트, 지방산의 금속염, 소수성 실리카 및 폴리에틸렌이다.
- [0069] 본원에 개시된 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 필러의 예는 안료, 실리카 분말, 탈크(talc), 옥테닐숙신 무수물과 교차 결합된 녹말(starch), 폴리아미드 입자, 폴리에틸렌 분말, 아크릴 공중합체를 기초로 하는 마이크로스피어(microsphere), 팽창 분말, 예컨대 중공(hollow) 마이크로스피어, 실리콘 수지 마이크로비드(microbead) 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0070] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 약제학적 조성물은 적합한 피부 침투 증진제(skin penetration enhancer)가 있거나 없이, 패치 등과 같이 경피 방식의 전달을 위해 제형화된다. 따라서, 조성물 또는 제형(보통 피부 침투 증진 조성물과 함께) 피부에 전달하는 경피 수단은 경피 패치 또는 당업계에 공지되거나 개시된 바와 같은 유사 장치이다. 상기 장치의 예는 미국 특허 제5,146,846호, 제5,223,262호, 제4,820,724호, 제4,379,454호 및 제4,956,171호에 개시되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 미세침(microneedle) 패치에 의해 전달된다. 예시적 미세침 패치는 미국 특허 제5,697,901호, 제6,503,231호, 제6,611,707호, 제6,660,987호, 제8,162,901호, 제8,696,637호 및 제8,784,363호에 개시되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참고로 포함된다.
- [0071] 치료 방법
- [0072] 특정 양태에서, 본원은 세포를 본원에 제시된 RNA 복합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포(예를 들어, 멜라노사이트)에 의한 티로시나아제 발현을 억제하는 방법을 제시한다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 변형 RNA 복합체이고, 세포는 형질감염 비히클의 부재시 RNA 복합체와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 세포는 전달 비히클(예를 들어, 리포솜, 양이온성 중합체, 세포 침투성 펩티드(CPP), 단백질 형질도입 도메인(PTD), 항체 및/또는 압타머)의 존재시 RNA 복합체와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간 대상체의 피부에 존재한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 과도한 멜라닌 생성과 연관된 피부 색소침착 장애(예를 들어, 기미 또는 검버섯)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 여성이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 임신중이거나 경구 또는 패치 피임약을 복용중이거나 호르몬 대체 요법을 받고 있는 중이다.
- [0073] 특정 양태에서, 본원은 세포를 본원에 제시된 RNA 복합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포(예를 들어, 멜라노사이트)에 의한 멜라닌 생성을 억제하는 방법을 제시한다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체는 변형 RNA 복합체이고, 세포는 형질감염 비히클의 부재시 RNA 복합체와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 세포는 전달 비히클(예를 들어, 리포솜, 양이온성 중합체, 세포 침투성 펩티드(CPP), 단백질 형질도입 도메인(PTD), 항체 및/또는 압타머)의 존재시 RNA 복합체와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간 대상체의 피부에 존재한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 과도한 멜라닌 생성과 연관된 피부 색소침착 장애(예를 들어, 기미 또는 검버섯)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 여성이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 임신중이거나 경구 또는 패치 피임약을 복용중이거나 호르몬 대체 요법을 받고 있는 중이다.
- [0074] 특정 양태에서, 본원은 본원에 제시된 RNA 복합체 또는 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 인간 대상체의 피부에서 멜라닌 생성을 억제하는 방법을 제시한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 과도한 멜라닌 생성과 연관된 피부 색소침착 장애(예를 들어, 기미 또는 검버섯)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 여성이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 임신중이거나 경구 또는 패치 피임약을 복용중이거나 호르몬 대체 요법을 받고 있는 중이다. 특정 실시양태에서, RNA 복합체 또는 약제학적 조성물은 대상체의 피부에 국소로 투여된다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체 또는 약제학적 조성물은 대상체에 의해 자가-투여된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제2 피부 미백제(예를 들어, 히드로퀴논, 알부틴, 트레티노인, 코지산, 아젤라산 또는 트라넥사민산)를 대상체에 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0075] 특정 양태에서, 본원은 본원에 제시된 RNA 복합체 또는 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는,

과도한 멜라닌 생성과 연관된 피부 색소침착 장애(예를 들어, 기미 또는 검버섯)에 대해 인간 대상체를 치료하는 방법을 제시한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 여성이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 일부 실시양태에서, 대상체는 임신중이거나 경구 또는 패치 피임약을 복용중이거나 호르몬 대체 요법을 받고 있는 중이다. 특정 실시양태에서, RNA 복합체 또는 약제학적 조성물은 대상체의 피부에 국소로 투여된다. 일부 실시양태에서, RNA 복합체 또는 약제학적 조성물은 대상체에 의해 자가-투여된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제2 피부 미백제(예를 들어, 히드로퀴논, 알부틴, 트레티노인, 코지산, 아젤라산 또는 트라넥사민산)를 대상체에 투여하는 단계를 더 포함한다.

[0076] 본 방법에서, 본원에 개시된 RNA 복합체는, 예를 들어 전달 비히클(예를 들어, cp-asiRNA 및 cp-lasiRNA를 위한 것) 없이, 전달 시약과 조합된 핵산으로서, 및/또는 본원에 개시된 RNA 복합체를 발현하는 서열을 포함하는 핵산으로서 대상체에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 당업계에서 알려진 임의의 핵산 전달 방법이 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 적합한 전달 시약은, 예를 들어 미러스 트랜짓(Mirus Transit) TKO 친유성 시약; 리포펙틴; 리포펙타민; 셀펙틴(cellfectin); 폴리양이온(polycation)(예를 들어, 폴리리신), 아텔로콜라겐(atelocollagen), 나노플렉스(nanoplex) 및 리포솜을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 핵산 분자용 전달 비히클로서 아텔로콜라겐의 사용은 Minakuchi *et al. Nucleic Acids Res.*, 32(13):e109 (2004); Hanai *et al. Ann NY Acad Sci.*, 1082:9-17 (2006); 및 Kawata *et al. Mol Cancer Ther.*, 7(9):2904-12 (2008)에 개시되어 있으며; 이들 각각은 그 전체가 본원에 포함된다. 예시적 간접 핵산 전달 시스템은 미국 특허 제8,283,461호, 제8,313,772호, 제8,501,930호, 제8,426,554호, 제8,268,798호 및 제8,324,366호에서 제시되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0077] 본원에 개시된 방법의 일부 실시양태에서, 리포솜은 본원에 개시된 RNA 복합체를 대상체에 전달하기 위해 사용된다. 본원에 개시된 방법에 사용하기에 적합한 리포솜은 표준 소포(vesicle)-형성 지질로부터 형성될 수 있으며, 이는 일반적으로 중성이거나 음으로 하전된 인지질 및 스테롤, 예컨대 콜레스테롤을 포함한다. 지질의 선택은 일반적으로 소망하는 리포솜 크기 및 혈류에서 리포솜의 반감기와 같은 인자를 고려하여 안내된다. 예를 들어, Szoka *et al.* (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467; 및 미국 특허 제4,235,871호, 제4,501,728호, 제4,837,028호, 및 제5,019,369호에 개시된 바와 같이 리포솜을 제조하기 위한 다양한 방법이 알려져 있으며, 이들의 전체 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0078] 본 방법에서 사용하기 위한 리포솜은 또한 변형되어 단핵 대식세포계(mononuclear macrophage system)("MMS") 및 세망내피계(reticuloendothelial system)("RES")에 의한 클리어런스(clearance)를 회피할 수 있다. 상기 변형 리포솜은 표면 상에 있거나 리포솜 구조 내에 결합된 옹소닌화(opsonization)-억제 모이어티를 갖는다.

[0079] 본원에 개시된 리포솜을 제조하는데 사용하기 위한 옹소닌화-억제 모이어티는 전형적으로 리포솜 막에 결합된 큰 친수성 중합체이다. 본원에 사용된 바에 있어서, 옹소닌화 억제 모이어티는, 예를 들어 자체적인 막 내로의 지용성 앵커(anchor)의 인터칼레이션(intercalation)에 의하거나, 막 지질의 활성기에 대한 직접 결합에 의해 화학적으로 또는 물리적으로 막에 부착되었을 때, 리포솜 막에 "결합"된다. 이들 옹소닌화-억제 친수성 중합체는, 예를 들어 미국 특허 제4,920,016호(이의 전체 개시내용은 본원에 참고로 포함된다)에 개시된 바와 같이 MMS 및 RES에 의한 리포솜의 흡수를 유의미하게 감소시키는 보호 표면층을 형성한다.

[0080] 일부 실시양태에서, 리포솜을 변형시키기에 적합한 옹소닌화 억제 모이어티는 약 500 내지 약 40,000 달톤(dalton), 또는 약 2,000 내지 약 20,000 달톤의 수평균 분자량을 갖는 수용성 중합체이다. 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)(PEG) 또는 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol)(PPG) 유도체; 예를 들어, 메톡시 PEG 또는 PPG, 및 PEG 또는 PPG 스테아레이트; 폴리아크릴아미드 또는 폴리 N-비닐 피롤리돈과 같은 합성 중합체; 선형, 분지형, 또는 덴드리머(dendrimeric) 폴리아미도아민; 폴리아크릴산; 폴리알코올, 예를 들어 카르복시기 또는 아미노기가 화학적으로 연결되는 폴리비닐알코올 및 폴리자일리톨뿐 아니라, 강글리오시드, 예컨대 강글리오시드 GM1을 포함한다. PEG, 메톡시 PEG, 또는 메톡시 PPG의 공중합체, 또는 이의 유도체가 또한 적합하다. 또한, 옹소닌화 억제 중합체는 PEG와 폴리아미노산, 다당류, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌아민, 또는 폴리뉴클레오타이드의 블록(block) 공중합체일 수 있다. 옹소닌화 억제 중합체는 또한 아미노산 또는 카르복시산, 예를 들어, 갈락투론산, 글루쿠론산, 마누론산, 히알루론산, 펙트산, 노이라민산, 알긴산, 카라기난(carrageenan)을 함유한 천연 다당류; 아미노화 다당류 또는 올리고당(선형 또는 분지형); 또는 예를 들어, 탄산의 유도체와 반응하여 결과적인 카르복시기의 연결을 갖는 카르복실화 다당류 또는 올리고당일 수 있다. 일부 실시양태에서, 옹소닌화-억제 모이어티는 PEG, PPG, 또는 이들의 유도체이다. PEG 또는 PEG-유도체를 이용하여 변형된 리포솜은 간혹 "페길화된(PEGylated) 리포솜"으로 지칭된다.

- [0081] 본원에 개시된 약제학적 조성물은 국소, 경구 및 비경구를 포함하는 임의의 적합한 투여 경로에 의해 전달될 수 있다. 특정 실시양태에서, 약제학적 조성물은 일반적으로 전달된다(예를 들어, 경구 또는 비경구 투여를 통하여). 다른 특정 실시양태에서, 약제학적 조성물은 피부에 대한 직접 투여를 통해 국부적으로 전달된다.
- [0082] 약제학적 조성물에서 RNA 복합체의 실제 투여량 수준은 특정 환자에 대해 소망하는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 RNA 복합체의 양, 환자에 독성이 없는 조성물, 및 투여 방식을 얻도록 변경될 수 있다.
- [0083] 선택된 복용량 수준은 사용된 특정 약제의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설률 또는 대사율, 치료 기간, 사용된 특정 화합물과 조합적으로 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 병태, 일반 건강 및 이전 병력, 및 의료 업계에 잘 알려진 유사 인자를 포함한 다양한 인자에 의존할 것이다.
- [0084] 당업계의 통상의 지식을 가진 의사는 필요한 약제학적 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 소망하는 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 것에 비해 낮은 수준으로 약제학적 조성물에 사용되는 약제의 용량을 처방하고/하거나 투여하고, 소망하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 유사하게는, 개별 사용자는 소망하는 미백 수준이 달성될 때까지 증가하는 양의 조성물을 적용할 수 있다.
- [0085] 일반적으로, 본원에 개시된 RNA 복합체의 적합한 일일 용량은 치료 효과를 생성하기에 효과적인 최저 용량인 RNA 복합체의 양일 것이다. 상기 유효 용량은 일반적으로 상기 개시된 인자에 의존할 것이다.
- [0086] **예시**
- [0087] 실시예 1: 티로시나아제-특이적 비대칭 짧은 간섭 RNA에 대한 스크리닝(screening)
- [0088] 높은 효율로 티로시나아제를 억제하는 비대칭 짧은 간섭 RNA(asiRNA)를 식별하기 위해, 62개의 asiRNA를 합성하고 스크리닝하였다. 스크리닝된 asiRNA의 핵산 서열을 표 1에 나타내었다.



표 1

표 1: 예시적 티로시나아제-표적화 asiRNA의 핵산 서열

서열 번호	서열
1	asiTYR(1)S : CAGGGCUUGUGAGCUU
2	asiTYR(1)AS : AAGCUCACAAGCCCUGCCAGC
3	asiTYR(2)S : AUAGAGUAGGGCCAAA
4	asiTYR(2)AS : UUUGGCCCUCACUCUAUUGCCU
5	asiTYR(3)S : GAAAUCCAGAAGCUGA
6	asiTYR(3)AS : UCAGCUUCUGGAUUUCUUGUU
7	asiTYR(4)S : GCUGACAGGAGAUGAA
8	asiTYR(4)AS : UUCAUCUCCUGUCAGCUUCUG
9	asiTYR(5)S : AACAAGAAAUCCAGAA
10	asiTYR(5)AS : UUCUGGAUUUCUUGUUCCAC
11	asiTYR(6)S : GAUUGGAGGAGUACAA
12	asiTYR(6)AS : UUGUACUCCUCCAAUCGGCUA
13	asiTYR(7)S : ACAAGCGAGUCGGAUC
14	asiTYR(7)AS : GAUCCGACUCGCUUGUUCCAA
15	asiTYR(8)S : GCCGAUUGGAGGAGUA
16	asiTYR(8)AS : UACUCCUCCAAUCGGCUACUA
17	asiTYR(9)S : UGAAGCACCAGCUUUU
18	asiTYR(9)AS : AAAAGCUGGUGCUUCAUGGGC
19	asiTYR(10)S : AAUGAAAAAUGGAUCA
20	asiTYR(10)AS : UGAUCCAUUUUUCAUUUGGCC
21	asiTYR(11)S : ACAAGAAAUCCAGAAG
22	asiTYR(11)AS : CUUCUGGAUUUCUUGUUCCCA
23	asiTYR(12)S : CCGAUUGGAGGAGUAC

[0089]

24	asiTYR(12)AS : GUACUCCUCCAAUCGGCUACA
25	asiTYR(13)S : CAGCUGAUGUAGAAUU
26	asiTYR(13)AS : AAUUCUACAUCAGCUGAAGAG
27	asiTYR(14)S : CUGGCGGGAUGCAGAA
28	asiTYR(14)AS : UUCUGCAUCCCGCCAGUCCCA
29	asiTYR(15)S : AGGAGUACAACAGCCA
30	asiTYR(15)AS : UGGCUGUUGUACUCCUCCAAU
31	asiTYR(16)S : GCUAUGACUAUAGCUA
32	asiTYR(16)AS : UAGCUAUAGUCAUAGCCCAGA
33	asiTYR(17)S : CCCAUGUUUAACGACA
34	asiTYR(17)AS : UGUCGUUAAACAUGGGUGUUG
35	asiTYR(18)S : UAGACUCUUCUUGUUG
36	asiTYR(18)AS : CAACAAGAAGAGUCUAUGCCA
37	asiTYR(19)S : CUGUGGAGUUUCCAGA
38	asiTYR(19)AS : UCUGGAAACUCCACAGCAGGC
39	asiTYR(20)S : CAGGCAGAGGUUCCUG
40	asiTYR(20)AS : CAGGAACCUCUGCCUGAAAGC
41	asiTYR(21)S : GGACCUGCCAGUGCUC
42	asiTYR(21)AS : GAGCACUGGCAGGUCCUAUUA
43	asiTYR(22)S : UACUCAGCCCAGCAUC
44	asiTYR(22)AS : GAUGCUGGGCUGAGUAAGUUA
45	asiTYR(23) S : UCAGUCUUUAUGCAAU
46	asiTYR(23) AS : AUUGCAUAAAGACUGAUGGCU
47	asiTYR(24) S : ACAAGAUUCAGACCCA
48	asiTYR(24) AS : UGGGUCUGAAUCUUGUAGUA
49	asiTYR(25) S : CAAGCGAGUCGGAUCU
50	asiTYR(25) AS : AGAUCCGACUCGCUUGUCCA
51	asiTYR(26) S : UAAAAGGCUUAGGCAA
52	asiTYR(26) AS : UUGCCUAAGCCUUUUAUAAAU
53	asiTYR(27) S : CUAUAUGAAUGGAACA
54	asiTYR(27) AS : UGUUCCAUAUCAUAUAGAUGUG
55	asiTYR(28) S : AAGAUCUGGGCUAUGA
56	asiTYR(28) AS : UCAUAGCCCAGAUCUUUGGAU
57	asiTYR(29) S : GUCCAAUGCACCACUU
58	asiTYR(29) AS : AAGUGGUGCAUUGGACAGAAG
59	asiTYR(30) S : UCACAGGGGUGGAUGA

[0090]

60	asiTYR(30) AS : UCAUCCACCCCUGUGAAGGGA
61	asiTYR(31) S : GGCCUUCCGUCUUUA
62	asiTYR(31) AS : UAAAAGACGGAAGGCCACGAC
63	asiTYR(32) S : CUGCAAGUUUGGCUUU
64	asiTYR(32) AS : AAAGCCAAACUUGCAGUUUCC
65	asiTYR(33) S : CAGAGAAGGACAAAUU
66	asiTYR(33) AS : AAUUUGUCCUUCUCUGGGGCA
67	asiTYR(34) S : GCAUACCAUCAGCUCA
68	asiTYR(34) AS : UGAGCUGAUGGUAUGCUUUGC
69	asiTYR(35) S : UUGGGGGAUCUGAAAU
70	asiTYR(35) AS : AUUUCAGAUCCCCCAAGCAGU
71	asiTYR(36) S : UCAGCACCCCACAAAU
72	asiTYR(36) AS : AUUUGUGGGGUGCUGACCUCC
73	asiTYR(37) S : GCCCGAGGGACCUUA
74	asiTYR(37) AS : UAAAGGUCCCUCGGGCGUCC
75	asiTYR(38) S : CCAUGUUUAACGACAU
76	asiTYR(38) AS : AUGUCGUUAAACAUGGGUGUU
77	asiTYR(39) S : UGACAGGAGAUGAAAA
78	asiTYR(39) AS : UUUUCAUCUCCUGUCAGCUUC
79	asiTYR(40) S : CAACUUCAUGGGAUUC
80	asiTYR(40) AS : GAAUCCCAUGAAGUUGCCAGA
81	asiTYR(41) S : GUUCCUGUCAGAAUAU
82	asiTYR(41) AS : AUAUUCUGACAGGAACCUCUG
83	asiTYR(42) S : CCUAUGGCCAAAUGAA
84	asiTYR(42) AS : UUCAUUUGGCCAUAGGUCCCU
85	asiTYR(43) S : UUCCUGUCAGAAUAUC
86	asiTYR(43) AS : GAUAUUCUGACAGGAACCUCU
87	asiTYR(44) S : AGGUUCCUGUCAGAAU
88	asiTYR(44) AS : AUUCUGACAGGAACCUCUGCC
89	asiTYR(45) S : GGCAACUUCAUGGGAU
90	asiTYR(45) AS : AUCCCAUGAAGUUGCCAGAGC
91	asiTYR(46) S : AACUUCAUGGGAUUA
92	asiTYR(46) AS : UGAAUCCCAUGAAGUUGCCAG
93	asiTYR(47) S : ACCUAUGGCCAAAUGA
94	asiTYR(47) AS : UCAUUUGGCCAUAGGUCCCUA
95	asiTYR(48) S : UAUGGCCAAAUGAAAA

[0091]



96	asiTYR(48) AS : UUUUCAUUUGGCCAUAGGUCC
97	asiTYR(49) S : CUGACAGGAGAUGAAA
98	asiTYR(49) AS : UUUCAUCUCCUGUCAGCUUCU
99	asiTYR(50) S : AGCUGACAGGAGAUGA
100	asiTYR(50) AS : UCAUCUCCUGUCAGCUUCUGG
101	asiTYR(51) S : ACCCAUGUUUAACGAC
102	asiTYR(51) AS : GUCGUUAAACAUGGGUGUUGA
103	asiTYR(52) S : AACACCCAUGUUUAAC
104	asiTYR(52) AS : GUUAAACAUGGGUGUUGAUCC
105	asiTYR(53) S : CAGUCUUUAUGCAAUG
106	asiTYR(53) AS : CAUUGCAUAAAGACUGAUGGC
107	asiTYR(54) S : AUCAGUCUUUAUGCAA
108	asiTYR(54) AS : UUGCAUAAAGACUGAUGGCUG
109	asiTYR(55) S : CUUGGUGAGAAGAAAC
110	asiTYR(55) AS : GUUUCUUCUCACCAAGAGUCG
111	asiTYR(56) S : CUGCCAACGAUCCUAU
112	asiTYR(56) AS : AUAGGAUCGUUGGCAGAUGCC
113	asiTYR(57) S : UCCUACAUGGUUCCUU
114	asiTYR(57) AS : AAGGAACCAUGUAGGAUUGCC
115	asiTYR(58) S : CUUUGUCUGGAUGCAU
116	asiTYR(58) AS : AUGCAUCCAGACAAAGAGGUC
117	asiTYR(59) S : ACAUUUGCACAGAUGA
118	asiTYR(59) AS : UCAUCUGUGCAAAUGUCACAC
119	asiTYR(60) S : GCGGAUGCCUCUCAA
120	asiTYR(60) AS : UUUGAGAGGCAUCCGCUAUCC
121	asiTYR(61) S : AACCGGGAUCCUACA
122	asiTYR(61) AS : UGUAGGAUUGCCGGUUAUGUC
123	asiTYR(62) S : GGACAUAAACCGGGAU
124	asiTYR(62) AS : AUUCCCGGUUAUGUCCAAUGG

[0092]

[0093]

표 1에 열거된 asiRNA를 1x siRNA 이중나선(duplex) 버퍼(에스티팜(STpharm)) 중, 95℃에서 2분 동안, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 적절한 가닥 아닐링(annealing)을 겔 전기영동을 통해 확인하였다. 스크리닝을 위해, 100 mm 세포 배양 접시에 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum)(김코(Gibco))과 100 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)(김코)에서 배양된 1.6 x 10<sup>4</sup>개 A375 세포(ATCC)를 24개 웰 플레이트(well plate)에 파종하였다. 제조사의 지시에 따라 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 (인비트로젠(Invitrogen))을 사용하여 A375 세포를 0.3 nM의 asiRNA로 형질감염시켰다.

[0094]

형질감염된 세포에서 티로시나아제 mRNA 수준을 형질감염 24시간 이후에 실시간 RTPCR를 사용하여 측정하였다. 구체적으로, 총 RNA를 아이솔(isol)-RNA 용균 시약(5프라임(5PRIME))을 사용하여 추출하였으며, 이어서 제조사의 지시에 따라 고효율 cDNA 반전 전사 키트(어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems))를 사용하는 cDNA 합성을 위해 500 ng의 추출된 RNA를 사용하였다. 합성된 cDNA를 희석시켰으며, 이어서 제조사의 지시에 따라 스텝원(StepOne) 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템스)을 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 파워 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(Mix)(어플라이드 바이오시스템스)를 사용하여 티로시나아제 유전자의 증폭을 검출하였다. GAPDH를 내부 대조군으로서 증폭시켰다. 다음 프라이머 서열을 사용하였다:



인간 GAPDH-정방향 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3' (서열 번호 125)

인간 GAPDH-역방향 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3' (서열 번호 126)

인간 티로시나아제-정방향 : 5'-GGA TCT GGT CAT GGC TCC TT-3' (서열 번호 127)

인간 티로시나아제-역방향 : 5'-GTC AGG CTT TTT GGC CCT AC-3' (서열 번호 128)

[0095]

[0096]

62개 asiRNA 각각에 의한 티로시나아제 억제 수준을 도 1에 나타내었다. 6개의 asiRNA 서열, asiTYR(4), asiTYR(9), asiTYR(10), asiTYR(17), asiTYR(44) 및 asiTYR(45)을 추적 연구에서 사용하기 위해 선택하였다.

[0097]

실시예 2: 자가-전달을 위한 asiRNA의 화학적 변형

[0098]

실시예 1에서 선택된 6개 asiRNA에 대해 화학적 변형을 인가하였으며, 변형된 asiRNA의 세포 전달을 다른 전달 비히클의 부재 하에서 검사하였다. 하기 개시된 바에 있어서, 특정 변형은 asiRNA의 엔도시토시스(endocytosis) 및 안정성을 개선시켰다. 상기 세포 침투성 asiRNA(cp-asiRNA)는 전달 비히클의 부재시 세포 내로 전달될 수 있다.

[0099]

38개 잠재적 cp-asiRNA(표 2)를 MNT-1 세포에서의 티로시나아제 mRNA 억제에 대해 스크리닝하였다. 각각의 잠재적 cp-asiRNA를 전달 비히클 없이 인간 흑색종 세포주인 1  $\mu$ M의 MNT-1 세포와 함께 배양하였으며, 티로시나아제 mRNA 수준을 실시간 PCR에 의해 측정하였다.

표 2

표 2. 자가-전달 및 티로시나아제 억제에 대해 검사된 변형 asiRNA 서열.  
m = 2'-O-메틸 RNA. \* = 포스포로티오에이트 결합.

asiTYR(4)-1 S : GCUGACAGGAGAUG*A*A*콜레스테롤
asiTYR(4)-1 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*C*U*G
asiTYR(4)-2 S : GCUGACAGGAGAUG*A*A*콜레스테롤
asiTYR(4)-2 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*mC*mU*mG
asiTYR(4)-3 S : GCUGACAGGAGAUG*A*A*콜레스테롤
asiTYR(4)-3 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCmU*mU*mC*mU*mG
asiTYR(4)-4 S : mGCmUGmACmAGmGAmGAmUG*mA*A*콜레스테롤
asiTYR(4)-4 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*C*U*G
asiTYR(4)-5 S : mGCmUGmACmAGmGAmGAmUG*mA*A*콜레스테롤
asiTYR(4)-5 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*mC*mU*mG
asiTYR(4)-6 S : mGCmUGmACmAGmGAmGAmUG*mA*A*콜레스테롤
asiTYR(4)-6 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCmU*mU*mC*mU*mG
asiTYR(9)-1 S : UGAAGCACCAGCUU*U*U*콜레스테롤
asiTYR(9)-1 AS : AAAAGCUGGUGCUUCAU*G*G*G*C
asiTYR(9)-3 S : UGAAGCACCAGCUU*U*U*콜레스테롤
asiTYR(9)-3 AS : AAAAGCUGGUGCUUCAmU*mG*mG*mG*mC
asiTYR(9)-4 S : mUGmAAmGCmACmCmGCmUU*mU*U*콜레스테롤
asiTYR(9)-4 AS : AAAAGCUGGUGCUUCAU*G*G*G*C
asiTYR(9)-6 S : mUGmAAmGCmACmCmGCmUU*mU*U*콜레스테롤
asiTYR(9)-6 AS : AAAAGCUGGUGCUUCAmU*mG*mG*mG*mC
asiTYR(10)-1 S : AAUGAAAAAUGGAU*C*A*콜레스테롤
asiTYR(10)-1 AS : UGAUCCAUUUUUCAUUU*G*G*C*C
asiTYR(10)-3 S : AAUGAAAAAUGGAU*C*A*콜레스테롤
asiTYR(10)-3 AS : UGAUCCAUUUUUCAUUmU*mG*mG*mC*mC
asiTYR(10)-4 S : mAAmUGmAAmAAmAUmGGmAU*mC*A*콜레스테롤
asiTYR(10)-4 AS : UGAUCCAUUUUUCAUUU*G*G*C*C
asiTYR(10)-6 S : mAAmUGmAAmAAmAUmGGmAU*mC*A*콜레스테롤
asiTYR(10)-6 AS : UGAUCCAUUUUUCAUUmU*mG*mG*mC*mC
asiTYR(17)-1 S : CCCAUGUUUAACGA*C*A*콜레스테롤
asiTYR(17)-1 AS : UGUCGUUAAACAUGGGU*G*U*U*G
asiTYR(17)-2 S : CCCAUGUUUAACGA*C*A*콜레스테롤
asiTYR(17)-2 AS : UGUCGUUAAACAUGGGU*G*mU*mU*mG
asiTYR(17)-3 S : CCCAUGUUUAACGA*C*A*콜레스테롤
asiTYR(17)-3 AS : UGUCGUUAAACAUGGGmU*mG*mU*mU*mG

[0100]

asiTYR(17)-4 S : mCCmCAmUGmUUmUAmACmGA*mC*A*콜레스테롤
asiTYR(17)-4 AS : UGUCGUUAAACAUGGGU*G*U*U*G
asiTYR(17)-5 S : mCCmCAmUGmUUmUAmACmGA*mC*A*콜레스테롤
asiTYR(17)-5 AS : UGUCGUUAAACAUGGGU*G*mU*mU*mG
asiTYR(17)-6 S : mCCmCAmUGmUUmUAmACmGA*mC*A*콜레스테롤
asiTYR(17)-6 AS : UGUCGUUAAACAUGGGmU*mG*mU*mU*mG
asiTYR(44)-1 S : AGGUUCCUGUCAGA*A*U*콜레스테롤
asiTYR(44)-1 AS : AUUCUGACAGGAACCUC*U*G*C*C
asiTYR(44)-3 S : AGGUUCCUGUCAGA*A*U*콜레스테롤
asiTYR(44)-3 AS : AUUCUGACAGGAACCUmC*mU*mG*mC*mC
asiTYR(44)-4 S : mAGmGUmUCmCmGUmCmGA*mA*U*콜레스테롤
asiTYR(44)-4 AS : AUUCUGACAGGAACCUC*U*G*C*C
asiTYR(44)-6 S : mAGmGUmUCmCmGUmCmGA*mA*U*콜레스테롤
asiTYR(44)-6 AS : AUUCUGACAGGAACCUmC*mU*mG*mC*mC
asiTYR(45)-1 S : GGCAACUUCAUGGG*A*U*콜레스테롤
asiTYR(45)-1 AS : AUCCCAUGAAGUUGCCA*G*A*G*C
asiTYR(45)-3 S : GGCAACUUCAUGGG*A*U*콜레스테롤
asiTYR(45)-3 AS : AUCCCAUGAAGUUGCCmA*mG*mA*mG*mC
asiTYR(45)-4 S : mGGmCmAmACmUUmCmAmUGmGG*mA*U*콜레스테롤
asiTYR(45)-4 AS : AUCCCAUGAAGUUGCCA*G*A*G*C
asiTYR(45)-6 S : mGGmCmAmACmUUmCmAmUGmGG*mA*U*콜레스테롤
asiTYR(45)-6 AS : AUCCCAUGAAGUUGCCmA*mG*mA*mG*mC

[0101]

[0102]

20% 소 태아 혈청(김코), 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신, 10% 200 mM HEPES(웰진(Welgene)) 및 10% 둘베코 변형 이글 배지(웰진)를 함유한 최소 필수 배지(Minimum Essential Media)(웰진)에서 MNT-1 세포(성균관 대학교로부터 입수)를 배양하였다.

[0103]

표 2에 열거된 잠재적 cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(김코) 중 95°C에서 2분 동안 및 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 잠재적 cp-asiRNA의 적절한 가닥 아닐링을 겔 전기영동에 의해 확인하였다.

[0104]

cp-asiRNA 치료 하루 전에,  $2.0 \times 10^4$  개 세포를 24개 웰 플레이트에 식중(seed)하였다. 치료 직전에, MNT-1 세포를 1 x DPBS 버퍼(김코)로 세척하고, 이어서 OPTI-MEM 버퍼 중 잠재적 cp-asiRNA의 존재 하에서 24시간 동안 배양하였으며, 상기 시점에서 cp-asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 교체하였다. 24시간 이후에, MNT-1 세포에 존재하는 티로시나아제 mRNA 수준을 결정하였다.

[0105]

38개의 잠재적 cp-asiRNA 각각에 의한 티로시나아제 억제 수준을 도 2에 나타내었다. 검사된 잠재적 cp-asiRNA 중에서, cp-asiTYR(4)-1을 추가 연구를 위해 선택하였다.

[0106]

실시예 3: 티로신-특이적 cp-asiRNA를 사용하는 티로시나아제 단백질 및 멜라닌의 억제

[0107]

티로시나아제 단백질의 억제 및 멜라닌 생성의 억제에 대한 cp-asiTYR(4)-1의 효능을 검사하였다. 비-특이적 효과에 대해 검사하기 위해, 티로시나아제 mRNA 서열에 대한 서열 상보성이 결여된 돌연변이화 cp-asiTYR(cp-asiTYR(파종 돌연변이)로도 지칭됨) 또한 검사하였다. cp-asiTYR(파종 돌연변이)의 서열을 표 3에 나타내었다.

### 표 3

**표 3. cp-asiRNA(4)-1 (식중 돌연변이(seed mutation))에서 사용된 서열 m = 2'-O-메틸 RNA. \* = 포스포로티오에이트 결합.**

cp-asiTYR(4)-1(식중 돌연변이) S : GCUGACAGGUCUAC*U*A*chol.
cp-asiTYR(4)-1(식중 돌연변이) AS : UAGUAGACCUGUCAGCU*U*C*U*G

[0108]

- [0109] cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(깁코) 중 95℃에서 2분 동안 및 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 잠재적 cp-asiRNA의 적절한 가닥 아닐링을 겔 전기영동에 의해 확인하였다.
- [0110] 20% 소 태아 혈청(깁코), 100  $\mu\text{g/ml}$  페니실린/스트렙토마이신, 10% 200 mM HEPES(웰진) 및 10% 둘베코 변형 이글 배지(웰진)를 함유한 최소 필수 배지(웰진)에서 MNT-1 세포를 배양하였다. 치료 하루 전에,  $6.5 \times 10^4$ 개 MNT-1 세포를 12개 웰 플레이트에 파종하였다. 치료 직전에, MNT-1 세포를 1 x DPBS 버퍼(깁코)로 세척하고, 이어서 OPTI-MEM 버퍼 중 1  $\mu\text{M}$  또는 3  $\mu\text{M}$ 의 cp-asiRNATYR(4)-1의 존재 하에 24시간 동안 배양하였으며, 상기 시점에서 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 교체하였다.
- [0111] cp-asiTYR(4)-1을 배양한지 72시간 이후에, 웨스턴 블롯을 통해 티로시나아제 단백질 발현의 수준을 결정하였다. 간략하게는, 치료된 MNT-1 세포를 RIPA 버퍼(GE)로 용해시켰다. 총 단백질 추출물 중 15  $\mu\text{g}$ 을 12% SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 120 V로 전기영동하였다. 전기영동 이후에, 상기 단백질을 300 mA에서 1시간 동안 메탄올(머크(Merck))에 의해 이미 활성화된 PVDF 막(바이오-라드(Bio-rad))으로 이동시켰다. 상기 막을 실온에서 1시간 동안 5% 탈지유(서울 우유(Seoul Milk))로 차단시켰으며, 이어서 항-티로시나아제 항체(산타 크루즈(Santa Cruz)) 및 항- $\beta$ -액틴 항체(산타 크루즈)를 함유한 5% 탈지유 중 4℃에서 밤새 배양하였다. 그 후에, 상기 막을 1x TBST로 10분 동안 3회 세척하였으며, HRP-접합된 2차 항체와 함께 5% 탈지유 중 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 막을 1x TBST로 10분 동안 세척하였으며, 1x ECL로 1분 동안 치료하였다. 그 후에, 케미독(Chemidoc) 기기(바이오-라드)를 사용하여 티로시나아제 및  $\beta$ -액틴 밴드(band)를 이미지화하였다.
- [0112] 웨스턴 블롯 에세이의 결과를 도 3에 도시하였다. 결과적으로, 모든 cp-asiTYR #4-1 배양 세포주에서, 70% 이상의 티로시나아제 단백질 억제력을 확인하였다. 또한, cp-asiTYR은 티로시나아제 억제력에 있어서 히드로퀴논 및 알부틴과 같은 다른 티로시나아제 억제제에 비해 더 높은 효율을 갖는 것으로 나타났다(도 3).
- [0113] 상기 개시된 바와 같이 cp-asiTYR(4)-1로 처리된 MNT-1 세포를 멜라닌 함량에 대해 검사하였다. cp-asiTYR의 존재 하에서 배양한지 72시간 이후에, MNT-1 세포를 수집하였으며, RIPA 버퍼(GE)로 용해시키고 13000 rpm으로 원심분리시켰다. 결과적 멜라닌 펠릿(pellet)을 100  $\mu\text{L}$ 의 1N NaOH(10% DMSO 함유) 중 85℃에서 15분 동안 용해시켰으며, 광 흡수 및 멜라닌 생성을 측정하였다.
- [0114] 도 4에 도시된 바와 같이, 1  $\mu\text{M}$  cp-asiTYR(4)-1로 처리된 MNT-1 세포는 멜라닌 생성에 있어서 60%를 초과하는 억제를 나타내었으며, 이는 히드로퀴논(20  $\mu\text{M}$ ) 및 알부틴(2 mM)을 포함하여, 멜라닌 생성에 대해 일반적으로 사용되는 화합물로 치료되었을 때에 비해 높다.
- [0115] 실시예 4: cp-asiRNA를 이용한 치료 이후의 MNT-1 세포 미백
- [0116] MNT-1 세포의 색을 미백시키는 cp-asiRNA(4)-1의 능력을 검사하였다.
- [0117] 실시예 3에서와 같이, MNT-1 세포를 1  $\mu\text{M}$  또는 3  $\mu\text{M}$  asiTYR(4)-1의 존재 하에 배양하였다. 72시간 이후에, 세포를 펠릿화하였으며, 세포의 색 변화를 관찰하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, cp-asiTYR(4)-1 치료된 세포의 색은 비처리된 MNT-1 대조군 세포(NT), 히드로퀴논 치료된 세포 및 알부틴 치료된 세포에 비해 더 밝았다.
- [0118] 실시예 5: cp-asiRNA의 세포독성
- [0119] cp-asiRNA의 세포독성을 검사하기 위해, 인간 흑색종 세포주인 MNT-1, 및 인간 케라티노사이트(keratinocyte) 세포주인 HaCaT를 cp-asiTYR #4-1 및 히드로퀴논으로 처리하였다.
- [0120] cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(깁코) 중 95℃에서 2분 동안 및 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 잠재적 cp-asiRNA의 적절한 가닥 아닐링을 겔 전기영동에 의해 확인하였다.
- [0121] cp-asiRNA(4)-1을 이용한 치료 하루 전에,  $5.0 \times 10^3$ 개 MNT-1 세포 또는  $1.0 \times 10^4$ 개 HaCaT 세포를 96개 웰 플레이트에 파종하였다. 치료 직전에, 세포를 1 x DPBS 버퍼(깁코)로 세척하고, 이어서 1  $\mu\text{M}$  또는 3  $\mu\text{M}$ 의 cp-asiRNATYR(4)-1의 존재 하의 OPTI-MEM 버퍼에서 24시간 동안 배양하였으며, 상기 시점에서 제조사의 지시에 따라 CytoTox96 비-방사성 세포독성 에세이(Non-Radio Cytotoxicity assay)(프로메가(Promega))를 사용하여 세포 독성 수준을 측정하였다. 그 후에, 배지를 혈청-함유 배지로 교체하였으며, 제조사의 지시에 따라 세포 집계 키트(cell counting kit)-8(엔조(Enzo))를 사용하여 세포 생존력을 측정하였다.
- [0122] 도 6에 도시된 바와 같이, cp-asiRNA를 이용한 치료로 인해 MNT-1 또는 HaCaT에서는 세포독성 또는 세포 생존력 손실이 관찰되지 않았다. 반면에, 히드로퀴논 또는 알부틴을 이용하여 치료된 HaCaT 세포에서는 세포독성이 관



찰되었다.

[0123] 실시예 6: 추가의 cp-asiRNA 구조

[0124] 상이한 가닥 길이 및 2'-O-메틸화 변형의 수를 갖는 다양한 잠재적 cp-asiTYR 구조를 합성하고, 티로시나아제 발현을 억제하는 이들의 능력에 대해 검사하였다(표 4).

#### 표 4

표 4. 추가 cp-asiRNA 서열. m = 2'-O-메틸 RNA. \* = 포스포로티오에이트 결합.

cp-asiTYR(4) S : GCUGACAGGAGAUG*A*A*콜레스테롤
cp-asiTYR(4) 21AS-1 : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*C*U*G
cp-asiTYR(4) 21AS-2 : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*mC*mU*mG
cp-asiTYR(4) 21AS-3 : UUCAUCUCCUGUCAGCmU*mU*mC*mU*mG
cp-asiTYR(4) 19AS-4 : UUCAUCUCCUGUCAG*C*U*U*C
cp-asiTYR(4) 19AS-5 : UUCAUCUCCUGUCAG*C*mU*mU*mC
cp-asiTYR(4) 19AS-6 : UUCAUCUCCUGUCAmG*mC*mU*mU*mC

[0125]

[0126] MNT-1 세포에서 티로시나아제 mRNA를 억제하는, 표 4에 열거된 1  $\mu$ M의 잠재적 cp-asiRNA 각각의 능력을 검사하였다.

[0127] 20% 소 태아 혈청(집코), 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신, 10% 200mM HEPES(웰진) 및 10% 둘베코 변형 이글 배지(웰진)를 함유한 최소 필수 배지(웰진)에서 MNT-1 세포를 배양하였다.

[0128] 표 4에 열거된 잠재적 cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(집코) 중 95°C에서 2분 동안 및 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 잠재적 cp-asiRNA의 적절한 가닥 아닐링을 겔 전기영동에 의해 확인하였다.

[0129] 치료 하루 전에,  $2.0 \times 10^4$  개 MNT-1 세포를 24개 웰 플레이트에 식중하였다. 치료 직전에, MNT-1 세포를 1 x DPBS 버퍼(집코)로 세척하고, 이어서 OPTI-MEM 버퍼 중 잠재적 cp-asiRNA의 존재 하에 24시간 동안 배양하였으며, 상기 시점에서 cp-asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 교체하였다. 24시간 이후에, MNT-1 세포에 존재하는 티로시나아제 mRNA 수준을 결정하였다.

[0130] 도 7에 나타난 바와 같이, 21 뉴클레오타이드 안티센스 가닥 상에 4개 포스포로티오에이트 결합을 함유하는 티로시나아제 mRNA 잠재적 cp-asiRNA 및 19 안티센스 가닥 상에 3개 2'-O-메틸화 및 4개 포스포로티오에이트 결합을 함유하는 잠재적 cp-asiRNA가 최고 수준의 티로시나아제 억제를 나타내었다. cp-asiTYR(4) 21AS-1 및 cp-asiTYR(4) 19AS-5를 추가 실험을 위해 선택하였다.

[0131] 티로시나아제 단백질의 생성 및 멜라닌 생성에 대한 cp-asiTYR(4) 21AS-1 및 cp-asiTYR(4) 19AS-5의 효과를 검사하였다.

[0132] cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(집코) 중 95°C에서 2분 동안 및 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 잠재적 cp-asiRNA의 적절한 가닥 아닐링을 겔 전기영동에 의해 확인하였다.

[0133] 20% 소 태아 혈청(집코), 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신, 10% 200 mM HEPES(웰진) 및 10% 둘베코 변형 이글 배지(웰진)를 함유한 최소 필수 배지(웰진)에서 MNT-1 세포를 배양하였다. 치료 하루 전에,  $6.5 \times 10^4$  개 MNT-1 세포를 12개 웰 플레이트에 과중하였다. 치료 직전에, MNT-1 세포를 1 x DPBS 버퍼(집코)로 세척하고, 이어서 OPTI-MEM 버퍼에서 1  $\mu$ M 또는 3  $\mu$ M의 cp-asiRNA(4)-1의 존재 하에 24시간 동안 배양하였으며, 상기 시점에서 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 교체하였다.

[0134] 1  $\mu$ M 및 3  $\mu$ M cp-asiRNA로 처리한 후 MNT-1 세포에 의한 티로시나아제 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통해 결정하였다. 간략하게는, 형질감염된 MNT-1 세포를 RIPA 버퍼(GE)로 용해시켰다. 총 단백질 추출물 중 15  $\mu$ g을 12% SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 120 V로 전기영동하였다. 전기영동 이후에, 300 mA로 1시간 동안 메탄올(머크)에 의해 이미 활성화된 PVDF 막(바이오-라드)으로 단백질을 이동시켰다. 상기 막을 실온에서 1시간 동안 5% 탈지유(서울 우유)로 차단시켰으며, 이어서 항-티로시나아제 항체(산타 크루즈) 및 항- $\beta$ -액틴 항체(산타 크루즈)를 사용하여 검출하였다.

즈)를 함유한 5% 탈지유 중 4℃에서 밤새 배양하였다. 그 후에, 상기 막을 1x TBST로 10분 동안 3회 세척하였으며, HRP-접합된 2차 항체와 함께 5% 탈지유 중 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 막을 1x TBST로 10분 동안 세척하였으며, 1x ECL로 1분 동안 처리하였다. 그 후에, 케미독 기기(바이오-라드)를 사용하여 티로시나아제 및  $\beta$ -액틴 밴드를 이미지화하였다.

[0135] 도 8에 나타난 바와 같이, cp-asiTYR(4) 21AS-1 또는 cp-asiTYR(4) 19AS-5를 이용한 처리는 티로시나아제 단백질 수준에 있어서 70%를 초과하는 억제를 야기하였다. 또한, cp-asiTYR(4) 19AS-5를 이용하여 cp-asiTYR(4) 21AS-1에 비해 약간 높은 억제 활성을 나타내었다.

[0136] 상기 개시된 바와 같은 cp-asiTYR(4) 21AS-1 또는 cp-asiTYR(4) 19AS-5로 처리된 MNT-1 세포를 멜라닌 함량에 대해 검사하였다. cp-asiTYR의 존재 하에서 배양한지 72시간 이후에, MNT-1 세포를 수집하였으며, RIPA 버퍼(GE)로 용해하고 13000 rpm으로 원심분리하였다. 결과적으로 얻은 멜라닌 펠렛을 100  $\mu$ L의 1N NaOH(10% DMSO 함유)에서 85℃로 15분 동안 용해시켰으며, 광 흡수 및 멜라닌 생성을 측정하였다.

[0137] 도 9에 나타난 바와 같이, 1  $\mu$ M cp-asiTYR(4) 21AS-1 또는 cp-asiTYR(4) 19AS-5로 처리된 MNT-1 세포는 멜라닌 생성에 있어서 약 50% 억제를 나타내었으며, 이는 2 mM 알부틴을 이용하여 처리된 MNT-1 세포에서 나타난 억제에 비해 더 높다.

[0138] 상이한 가닥 길이 및 2'-O-메틸화 변형의 수 및 포스포로티오에이트 결합의 수를 갖는 추가의 잠재적 cp-asiTYR 구조를 합성하고, 티로시나아제 발현을 억제하는 이들의 능력을 검사하였다(표 5).

## 표 5

표 5. 추가의 cp-asiRNA 서열. m = 2'-O-메틸 RNA. \* = 포스포로티오에이트 결합.

cp-asiTYR(4) S : GCUGACAGGAGAUG*A*A*콜레스테롤
cp-asiTYR(4) 21AS-1 : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*C*U*G
cp-asiTYR(4) 19AS-7 : UUCAUCUCCUGUC*A*G*C*mU*mU*mC

[0139]

[0140] 티로시나아제 단백질 생성에 대한 cp-asiTYR(4) 21AS-1 및 cp-asiTYR(4) 19AS-7의 효과를 검사하였다.

[0141] cp-asiRNA를 OPTI-MEM 버퍼(집코) 중 95℃에서 2분 동안 및 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 잠재적 cp-asiRNA의 적절한 가닥 아닐링을 겔 전기영동에 의해 확인하였다.

[0142] 20% 소 태아 혈청(집코), 100  $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신, 10% 200 mM HEPES(웰진) 및 10% 둘베코 변형 이글 배지(웰진)를 함유한 최소 필수 배지(웰진)에서 MNT-1 세포를 배양하였다. 처리 하루 전에,  $6.5 \times 10^4$ 개 MNT-1 세포를 12개 웰 플레이트에 파종하였다. 처리 직전에, MNT-1 세포를 1 x DPBS 버퍼(집코)로 세척하고, 이어서 OPTI-MEM 버퍼에서 1  $\mu$ M, 0.6  $\mu$ M, 0.3  $\mu$ M 및 0.1  $\mu$ M의 cp-asiTYR(4) 21AS-1 및 cp-asiTYR(4) 19AS-7의 존재 하에 24시간 동안 배양하였으며, 상기 시점에 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 교체하였다.

[0143] 1  $\mu$ M, 0.6  $\mu$ M, 0.3  $\mu$ M 및 0.1  $\mu$ M cp-asiRNA로 처리 후 MNT-1 세포에 의한 티로시나아제 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통해 결정하였다. 간략하게는, 형질감염된 MNT-1 세포를 RIPA 버퍼(GE)로 용해시켰다. 총 단백질 추출물 중 15  $\mu$ g을 12% SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 120 V로 전기영동하였다. 전기영동 이후에, 300 mA로 1시간 동안 메탄올(머크)에 의해 이미 활성화된 PVDF 막(바이오-라드)으로 단백질을 이동시켰다. 상기 막을 실온에서 1시간 동안 5% 탈지유(서울 우유)로 차단시켰으며, 이어서 항-티로시나아제 항체(산타 크루즈) 및 항- $\beta$ -액틴 항체(산타 크루즈)를 함유한 5% 탈지유에서 4℃로 밤새 배양하였다. 그 후에, 상기 막을 1x TBST로 10분 동안 3회 세척하였으며, HRP-접합된 2차 항체와 함께 5% 탈지유 중 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 막을 1x TBST로 10분 동안 세척하였으며, 1x ECL로 1분 동안 처리하였다. 그 후에, 케미독 기기(바이오-라드)를 사용하여 티로시나아제 및  $\beta$ -액틴 밴드를 이미지화하였다.

[0144] 도 10에 도시된 바와 같이, cp-asiTYR(4) 21AS-1 또는 cp-asiTYR(4) 19AS-7을 이용한 처리는 티로시나아제 단백질 수준에 있어서 70%를 초과하는 억제를 야기하였다. 또한, cp-asiTYR(4) 21AS-1를 이용하여 cp-asiTYR(4)

19AS-7에 비해 약간 높은 억제 활성을 나타내었다.

[0145] 실시예 7: asiRNA 및 lasiRNA를 이용한 세포 침투성 펩티드의 사용

[0146] 다른 형질 감염 시약의 사용 없이 티로시나아제 mRNA 및 단백질 수준의 억제에 대해 asiRNAs 또는 lasiRNA와 펩펙트(Pepfect) 6(PF6) 세포 침투성 펩티드의 조합을 검사하였다.

[0147] asiTYR(4) 및 lasiTYR(21)(표 6)을 OPTI-MEM 버퍼(김코) 중 95℃에서 2분 동안 및 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. asiRNA 및 lasiRNA의 적절한 가닥 아닐링을 겔 전기영동에 의해 확인하였다. DEPC 중의 아닐링된 RNA 및 PF6을 100  $\mu$ l 0.6 x DPBS에 1:10의 RNA 복합체:PF6 몰비로 희석시켰으며, 이어서 복합체 형성을 위해 실온에서 30분 동안 배양하였다. 적절한 복합체 형성을 겔 전기영동에 의해 확인하였다.

## 표 6

표 6. asiTYR(4) 및 lasiTYR(21)의 핵산 서열.

asiTYR(4)S : GCUGACAGGAGAUGAA (서열 번호 7)
asiTYR(4)AS : UUCAUCUCCUGUCAGCUUCUG (서열 번호 8)
lasiTYR(21)S : GGUUCCUGUCAGAAUA (서열 번호 125)
lasiTYR(21)AS : UAUUCUGACAGGAACCUCUGCCUGAAAGCUG (서열 번호 126)

[0148]

[0149] 20% 소 태아 혈청(김코), 100 $\mu$ g/ml 페니실린/스트렙토마이신, 10% 200mM HEPES(웰진) 및 10% 둘베코 변형 이글 배지(웰진)를 함유한 최소 필수 배지(웰진)에서 MNT-1 세포를 배양하였다. 처리 하루 전에,  $6.5 \times 10^4$  개 MNT-1 세포를 12개 웰 플레이트에 파종하였다. 처리 4시간 전에, 세포 배지를 900  $\mu$ l의 FBS-함유 배지로 교체하였다. PF6-복합 asiRNA 또는 lasiRNA를 상기 세포에 첨가하고, 상기 세포를 24시간 동안 배양하였으며, 상기 시점에서 배지를 교체하였다. 배지를 교체한지 24시간 이후에 실시간 RT-PCR을 사용하여 티로시나아제 mRNA 수준을 측정하였다.

[0150] 도 11에 나타난 바와 같이, PF6-복합 asiRNA 또는 lasiRNA로 처리된 MNT-1 세포주는 대조군에 비해 티로시나아제 mRNA 수준이 유의미하게 감소하였다.

[0151] 티로시나아제 단백질 발현 및 멜라닌 생성에 대해 치료된 MNT-1 세포를 검사하기 위해, 배지를 교체한지 48시간 이후에 상기 개시된 바와 같이 웨스턴 블롯 및 멜라닌 함량 에세이를 수행하였다.

[0152] 도 12에 나타난 바와 같이, asiTYR(4)/PF6 복합체 및 lasiTYR(21)/PF6 복합체로 치료된 세포주는 대조군에 비해 적어도 70% 티로시나아제 단백질 억제를 나타내었다. 또한, asiTYR(4)/PF6 복합체 및 lasiTYR(21)/PF6 복합체로 치료된 세포는 대조군에 비해 적은 멜라닌 생성을 나타내었다.

[0153] 실시예 8: 예시적 cp-asiRNA를 사용한 재구성 피부 모델에서 멜라닌 합성의 억제

[0154] 티로시나아제 발현 및 멜라닌 수준을 cp-asiTYR#4-1 치료된 3-D 피부 모델에서 분석하였다. MEL-300-B(매트텍(MatTek)), 재구성 피부 모델을 본 연구에서 사용하였다. cp-asiTYR#4-1를 이용한 처리 24시간 전에 EPI-100-NMM-113 배지에서 MEL-300-B를 안정화시켰다. 아닐링을 위해, DEPC-처리수(treated water)에 용해된 cp-asiTYR#4-1를 95℃에서 2분 동안 및 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배지에 cp-asiTYR#4-1를 직접 첨가함으로써 13일 동안 매일(최종 농도 = 5  $\mu$ M) cp-asiTYR#4-1로 MEL-300-B 샘플을 처리하였다. 대조군으로서, 다른 MEL-300-B 샘플을 도 14(a)에 도시된 바와 같이 코지산(시그마, 2% 최종)으로 처리하였다. 14일차에 샘플을 수집하고, 광학 현미경을 사용하여 상기 샘플 중의 멜라노사이트를 분석하였다. 도 14(c)에 나타난 바와 같이, cp-asiTYR#4-1 처리는 처리된 재구성 피부 모델 샘플에서 멜라노사이트의 수준을 감소시켰다. 폰타나-마손 염색을 사용하여 각각의 샘플에서의 멜라닌 수준을 분석하였다. 도 14(c)에 나타난 바와 같이, ci-asiTYR#4-1 처리는 처리된 재구성 피부 모델 샘플에서 멜라닌의 수준을 감소시켰다.

[0155] 14일차의 mRNA 수준을 분석하기 위해, 아이솔-RNA 용균 시약(5프라임)에서 샘플을 수집하고, 균질기(IKA)를 사용함으로써 균질화하였다. 각각의 샘플로부터의 총 RNA를 추출하였다. 각각의 샘플에 대해, 제조사의 지시에 따라 고품질 cDNA 반전 전사 키트(어플라이드 바이오시스템스)를 이용한 cDNA 합성을 위해 500 ng의 추출된 RNA를 사용하였다. 그 후에, 스탭원 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템스)을 사용하여 정량적 실시간 PCR을

수행하였다. 파워 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(어플라이드 바이오시스템스)를 사용하여 티로시나아제 cDNA의 증식을 검출하였다. GAPDH를 내부 대조군으로서 증식시켰다. 도 14(d)에 도시된 바와 같이 ci-asiTYR#4-1 처리는 처리된 재구성 피부 모델 샘플에서 티로시나아제 mRNA의 수준을 감소시켰다.

[0156] 웨스턴 블롯을 사용하여 단백질 수준 분석을 실시하였다. 균질기를 사용함으로써 RIPA 버퍼(GE)에서 수득된 샘플을 균질화하였으며, 각각의 샘플로부터의 단백질을 얻었다. 총 단백질 추출물 중 15 마이크로그램을 12% SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 120 V로 전기영동시켰다. 전기영동 이후에, 300 mA로 1시간 동안 메탄올(머크)로 사전에 활성화된 PVDF 막(바이오-라드)으로 단백질을 이동시켰다. 상기 막을 실온에서 1시간 동안 5% 탈지유(서울우유)로 차단시켰으며, 이어서 항-티로시나아제 항체(산타 크루즈) 및 항-β-액틴 항체(산타 크루즈)를 함유한 5% 탈지유 중 4℃에서 밤새 배양하였다. 그 후에, 상기 막을 1x TBST로 10분 동안 세척하였으며, HRP-접합된 2차 항체와 함께 5% 탈지유 중 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 막을 1x TBST로 10분 동안 세척하였으며, 1x ECL로 1분 동안 처리하였다. 그 후에, 케미독 기기(바이오-라드)를 사용하여 티로시나아제 및 β-액틴 밴드를 이미지화하였다. 도 14e에 도시한 바와 같이, cp-asiTYR#4-1 처리된 재구성 피부 모델 샘플에서 티로시나아제 단백질의 강한 녹다운이 관찰되었다.

[0157] 멜라닌 함량을 검사하기 위해, 14일차에 샘플을 수집하였으며, RIPA 버퍼(GE)로 용해시키고 13000 rpm으로 원심 분리하였다. 결과적으로 얻은 펠릿을 100 μL의 1N NaOH(10% DMSO 함유) 중 85℃에서 15분 동안 용해시켰으며, 광 흡수 및 멜라닌 생성을 측정하였다. 도 14(f)에 도시한 바와 같이, cp-asiTYR#4-1 처리는 처리된 재구성 피부 모델 샘플에서 멜라닌 수준을 감소시켰다.

[0158] **참고로 포함**

[0159] 본원에서 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 표시된 경우와 같이, 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 상충되는 경우에, 본원의 임의의 정의를 포함하여 본 출원이 지배적일 것이다.

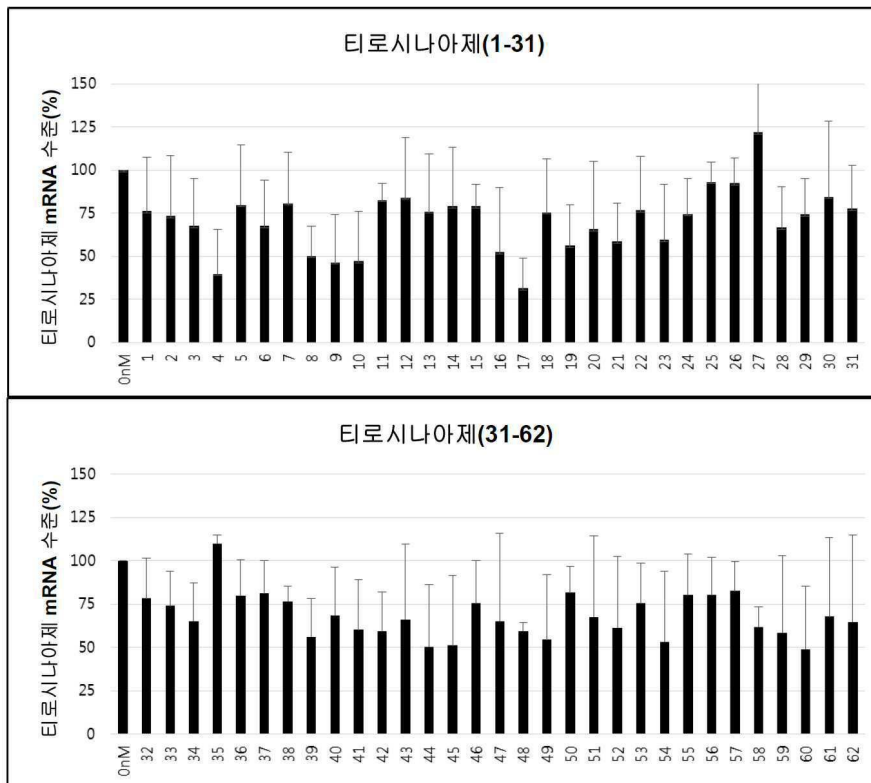
[0160] **균등물**

[0161] 당업자는 일상적 실험만을 사용하여 본원에 개시된 본 발명의 구체적 실시양태에 대한 많은 균등물을 인식하거나, 확인할 수 있다. 상기 균등물은 다음 청구항에 포함되는 것으로 의도된다.

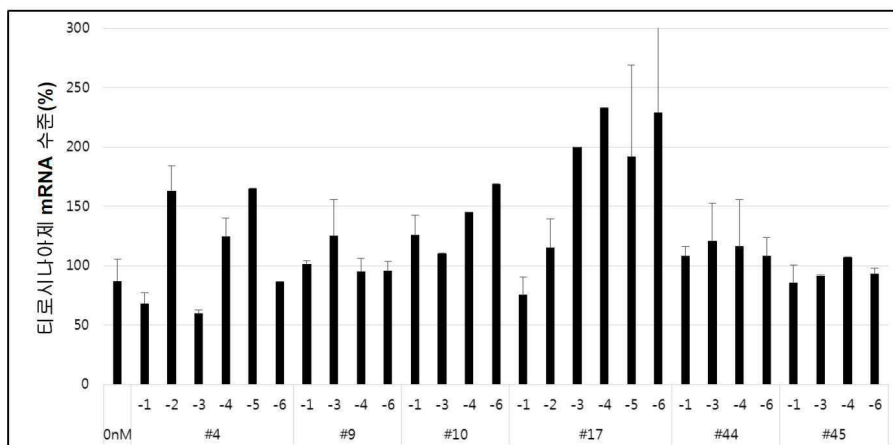


도면

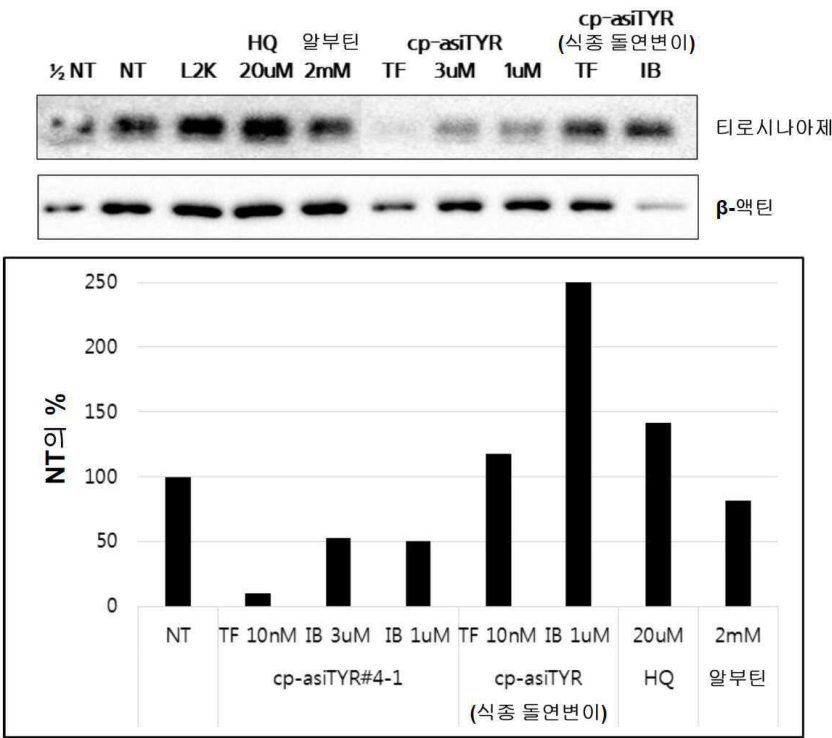
도면1



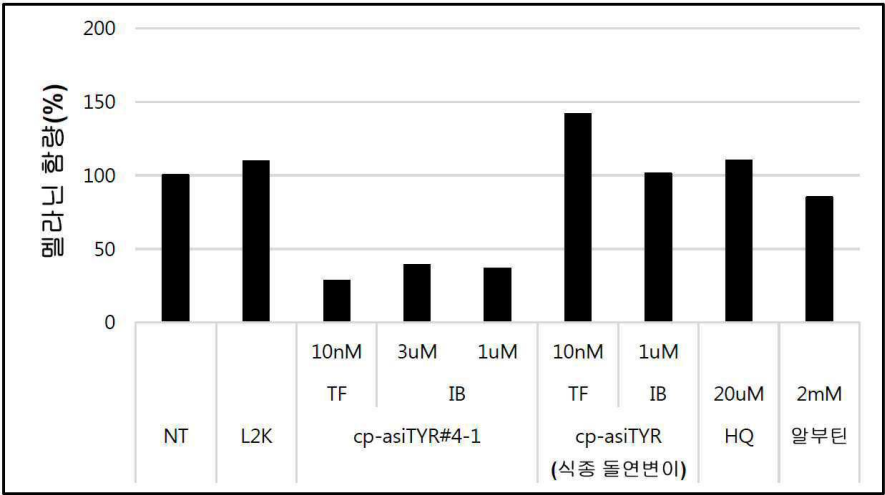
도면2



도면3

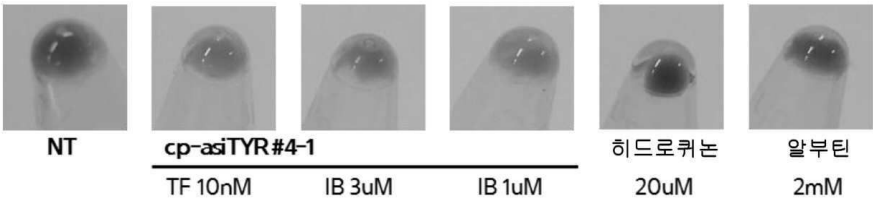


도면4

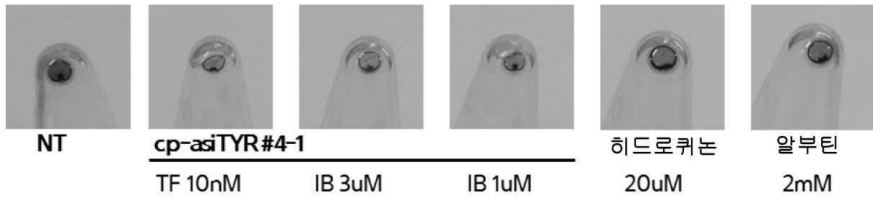


도면5

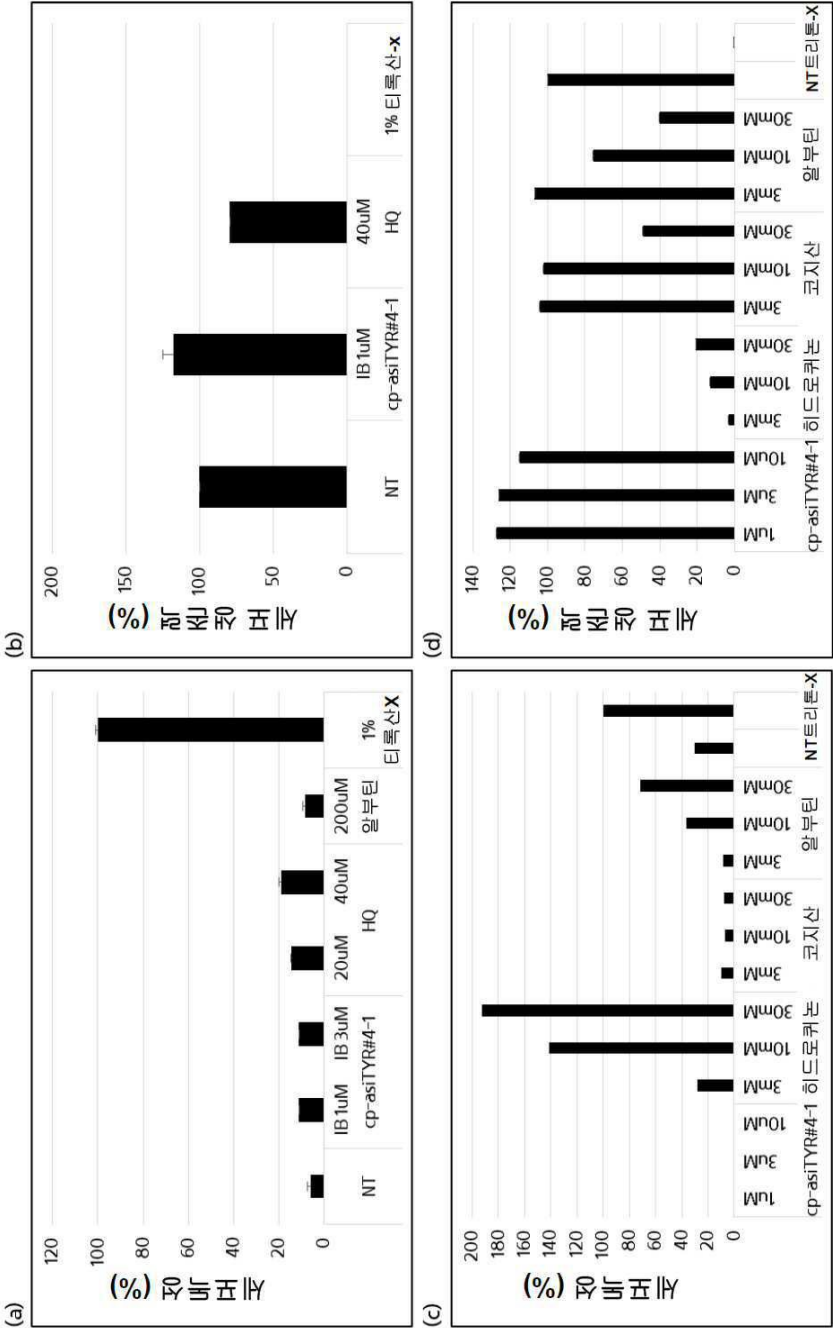
(a)



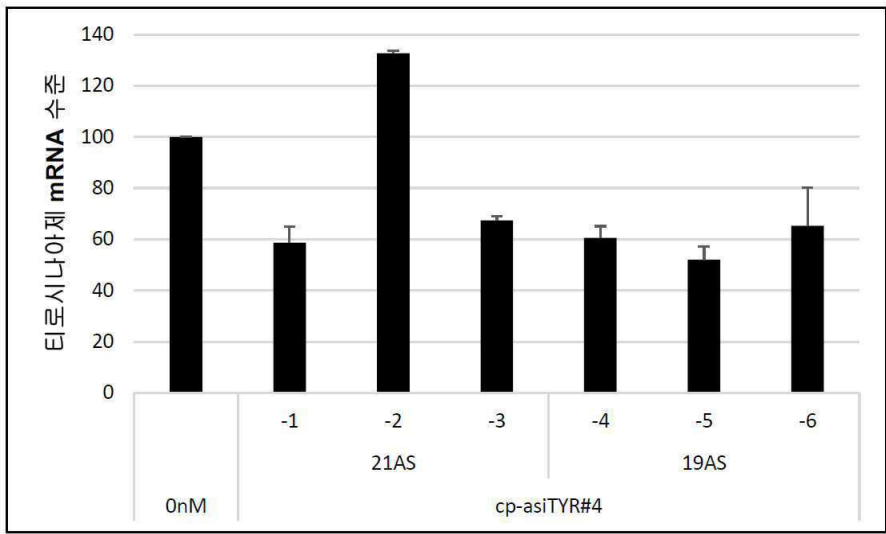
(b)



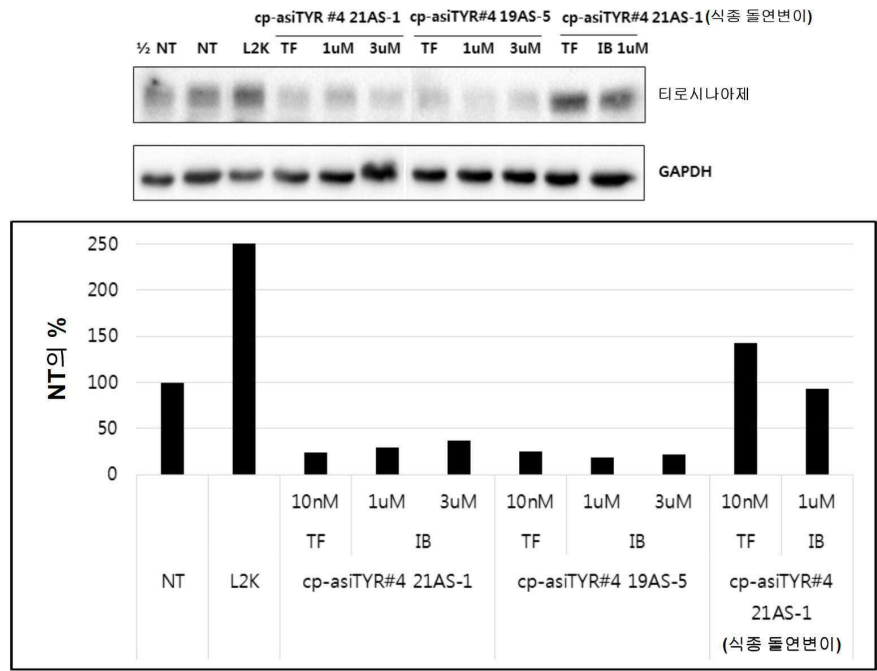
도면6



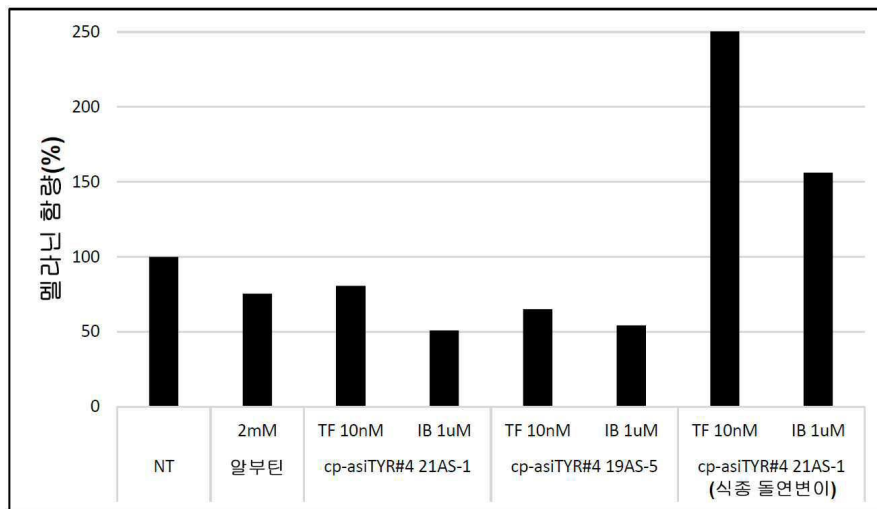
도면7



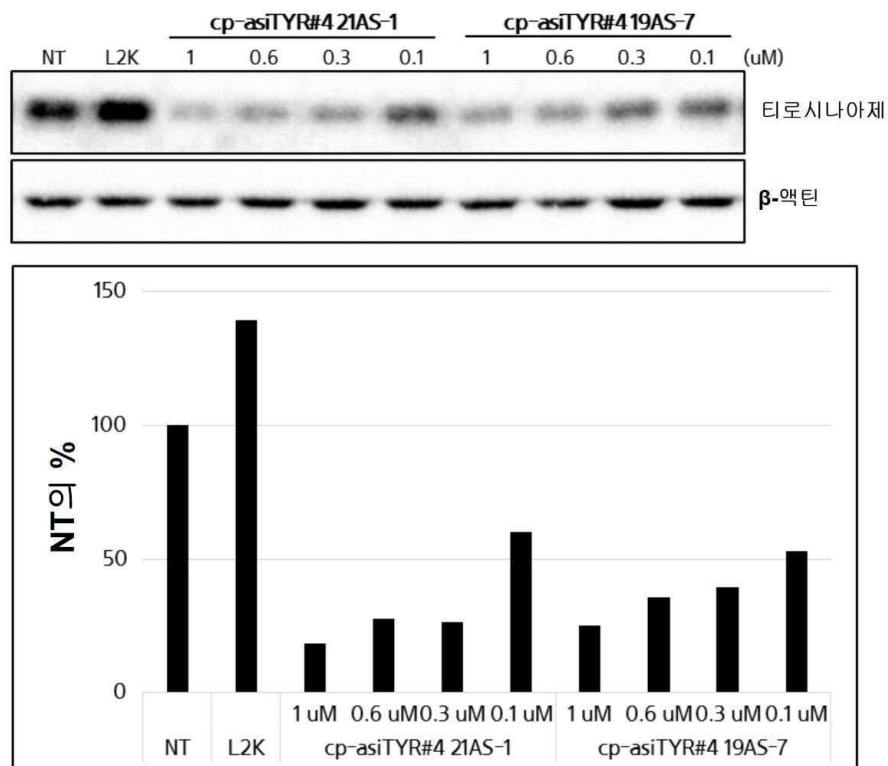
도면8



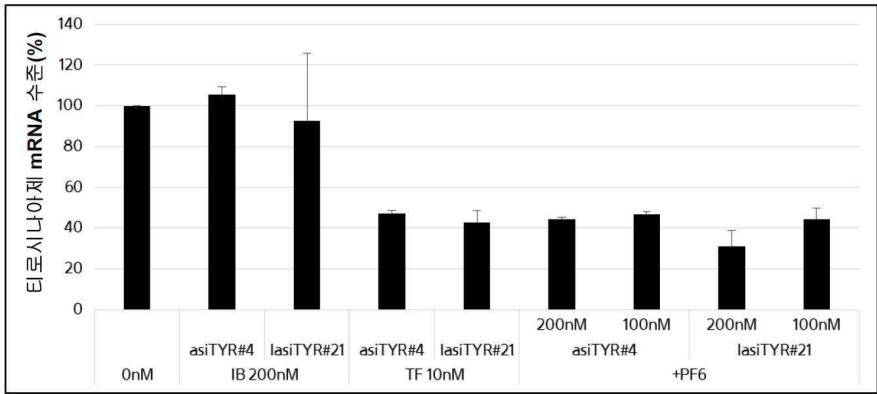
도면9



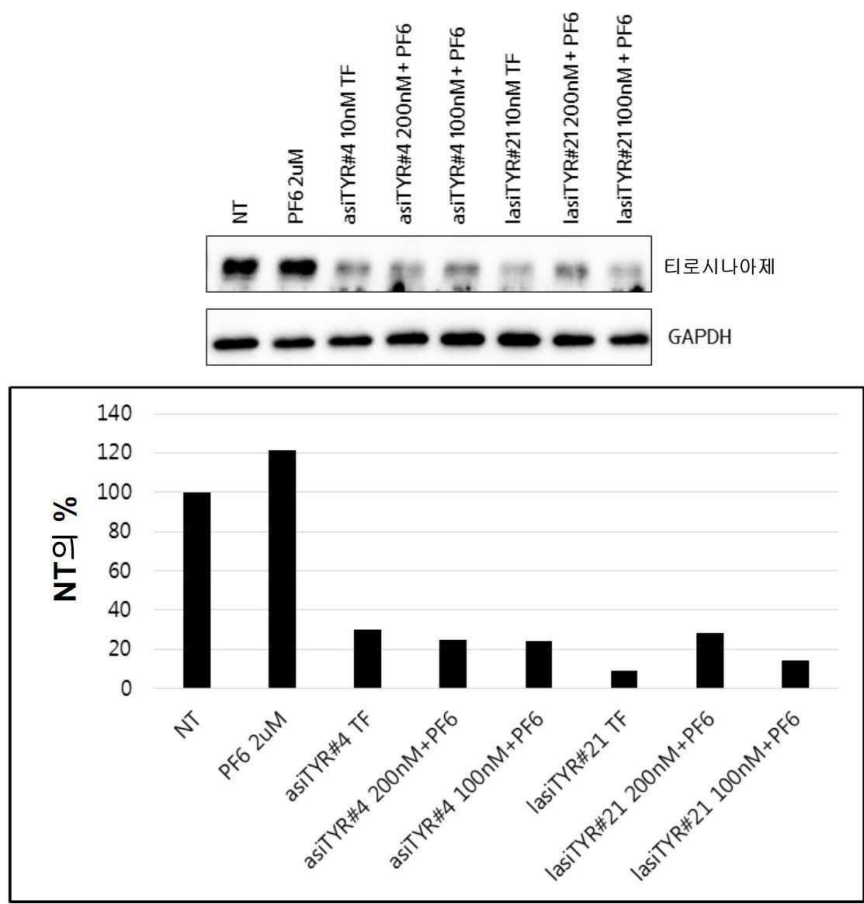
도면10



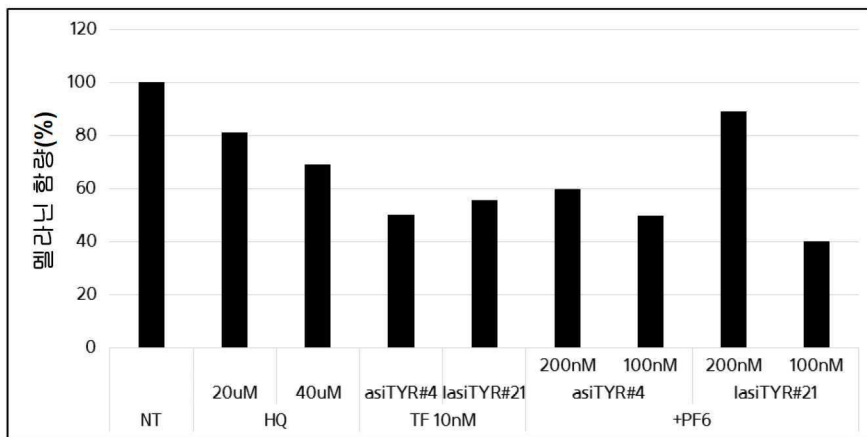
도면11



도면12a



도면12b



도면13

인간 티로시나아제 mRNA 서열.

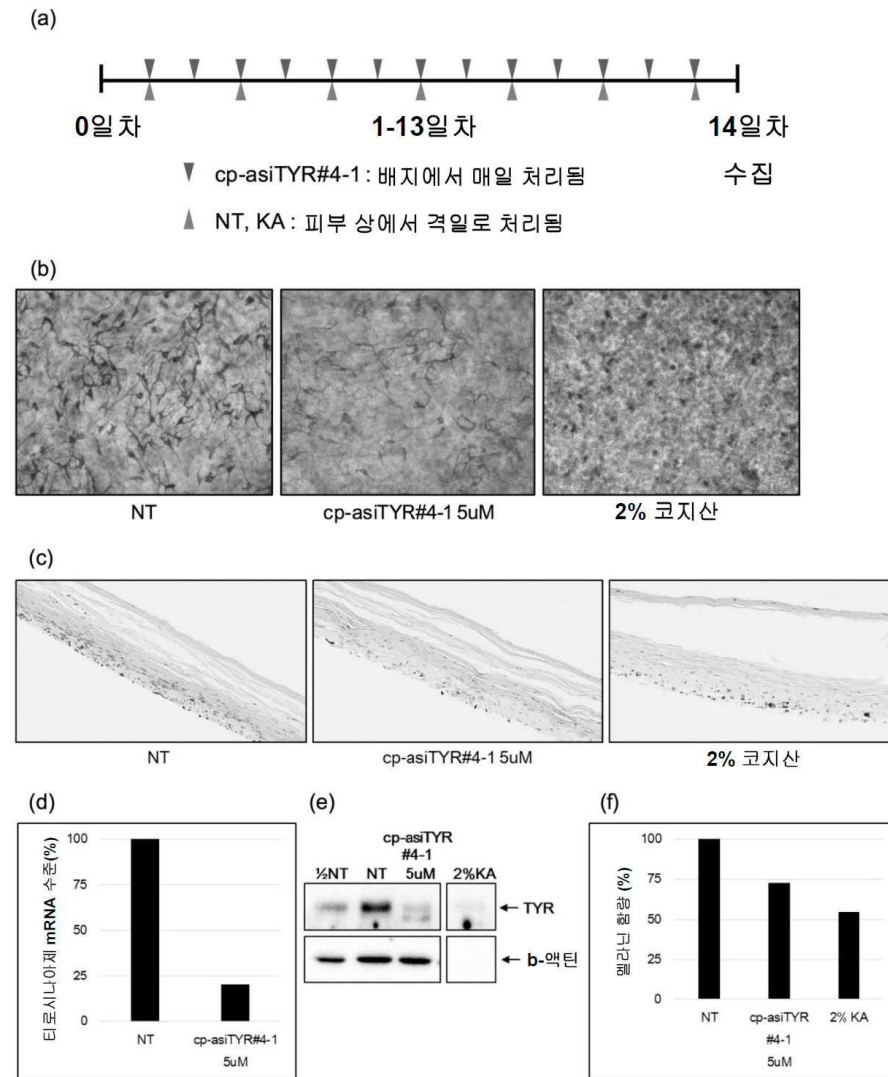
```

1  atcactgtag tagtagctgg aaagagaaat ctgtgactcc aattagccag ttcctgcaga
61  ccttgtgagg actagaggaa gaatgctcct ggctgttttg tactgcctgc tgtggagttt
121 ccagacctcc gctggccatt tccctagagc ctgtgtctcc tctaagaacc tgatggagaa
181 ggaatgctgt ccaccgtgga gcggggacag gactccctgt ggccagcttt caggcagagg
241 ttcctgtcag aatatccttc tgtccaatgc accacttggg cctcaatttc ccttcacagg
301 ggtgtagtac cgggagtcgt ggccctccgt cttttataat aggacctgcc agtgctctgg
361 caacttcatg ggattcaact gtggaactg caagtttggc ttttggggac caaactgcac
421 agagagacga ctcttggtga gaagaaacat cttcgatttg agtgccccag agaaggacaa
481 attttttgcc tacctcactt tagcaaagca taccatcagc tcagactatg tcatcccat
541 agggacctat ggccaaatga aaaatggatc aacacccatg tttaacgaca tcaatattta
601 tgacctcttt gtctggatgc attattatgt gtcaatggat gcaactgctg ggggatctga
661 aatctggaga gacattgatt ttgcccataa agcaccagct tttctgcctt ggcatagact
721 cttcttggtg cgggtgggaa aagaaatcca gaagctgaca ggagatgaaa acttcactat
781 tccatattgg gactggcggg atgcagaaaa gtgtgacatt tgcacagatg agtacatggg
841 aggtcagcac cccacaaatc ctaacttact cagcccagca tcattcttct cctcttgcca
901 gattgtctgt agccgatttg aggagtacaa cagccatcag tctttatgca atggaacgcc
961 cgagggacct ttacggcgta atcctggaaa ccatgacaaa tccagaaccc caaggctccc
1021 ctcttcagct gatgtagaat tttgcctgag tttagcccaa tatgaatctg gttccatgga
1081 taaagctgcc aatttcagct ttagaataac actggaagga tttgctagtc cacttactgg
1141 gatagcggat gcctctcaaa gcagcatgca caatgccttg cacatctata tgaatggaac
1201 aatgtcccag gtacagggat ctgccaacga tcctatcttc cttcttcacc atgcatttgt
1261 tgacagtatt tttgagcagt ggctccgaag gcaccgtcct cttcaagaag tttatccaga
1321 agccaatgca cccattggac ataaccggga atcctacatg gttcctttta taccactgta
1381 cagaaatggt gatttcttta tttcatccaa agatctgggc tatgactata gctatctaca
1441 agattcagac ccagactctt ttcaagacta cattaagtcct tatttggaac aagcgagtcg
1501 gatctggtca tggctccttg gggcgcgcat ggtaggggccc gtccctcactg cctgctggc
1561 agggccttgg agcttgctgt gtcgtcacia gagaaagcag cttcctgaag aaaagcagcc
1621 actcctcatg gagaaagagg attaccacag cttgtatcag agccatttat aaaaggctta
1681 ggcaatagag tagggccaaa aagcctgacc tcactctaac tcaaagtaat gtccagggtc
1741 ccagagaata tctgtgggta ttttctgta aagaccattt gcaaaattgt aacctaatc
1801 aaagtgtagc cttcttccaa ctcaaggtaga acacacctgt ctttgtcttg ctgttttcac
1861 tcagcccttt taacattttc ccctaagccc atatgtctaa ggaaaggatg ctatttggta
1921 atgaggaact gttatttggta tgtgaattaa agtgctctta ttttaaaaaa ttgaaataat
1981 tttgattttt gccttctgat tatttaaaaga tctatatatg ttttattggc ccctcttcta
2041 ttttaataaa acagtggagaa atctaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```



# 도면14



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> HONG, SUN WOO

HONG, ISU

KIM, JI HYUN

<120> RNA COMPLEXES THAT INHIBIT MELANIN PRODUCTION

<130> OPH-00335

<140> 15/220,767

<141> 2016-07-27

<150> 62/197,370

<151> 2015-07-27

<160> 163

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

cagggcuugu gagcuu

16

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

aagcucacaa gccugccag c

21

<210> 3

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

auagaguagg gccaaa

16

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

uuuggccua cucuauugcc u

21

<210> 5  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                   oligonucleotide  
 <400> 5  
 gaaauccaga agcuga 16  
 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                   oligonucleotide  
 <400> 6  
 ucagcuucug gauuucuugu u 21  
 <210> 7  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                   oligonucleotide  
 <400> 7  
 gcugacagga gaugaa 16  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                   oligonucleotide  
 <400> 8  
 uucaucccu gucagcuucu g 21  
 <210> 9

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 9

aacaagaaau ccagaa 16

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 10

uucuggauuu cuuguucca c 21

<210> 11

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

gauuggagga guacaa 16

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

uuguacuccu ccaaucgcu a 21

<210> 13

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 13

acaagcgagu cggauc

16

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 14

gauccgacuc gcuuguucca a

21

<210> 15

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 15

gccgauugga ggagua

16

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 16

uacuccucca aucggcuacu a

21

<210> 17

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence



<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 17  
ugaagcacca gcuuuu 16  
<210> 18  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 18  
aaaagcuggu gcuucauggg c 21  
<210> 19  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 19  
aaugaaaaau ggauca 16  
<210> 20  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 20  
ugauccauuu uucauuuggc c 21  
<210> 21  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 21

acaagaauc cagaag 16

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 22

cuucuggauu ucuuguuccc a 21

<210> 23

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 23

ccgauuggag gaguac 16

<210> 24

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 24

guacuccucc aaucggcuac a 21

<210> 25

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 25	
cagcugaugu agaauu	16
<210> 26	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 26	
aaauucuacau cagcugaaga g	21
<210> 27	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 27	
cuggcgggau gcagaa	16
<210> 28	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 28	
uucugcaucc cgccaguccc a	21
<210> 29	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 29	

aggaguacaa cagcca	16
<210> 30	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 30	
uggcuguugu acuccuccaa u	21
<210> 31	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 31	
gcuaugacua uagcua	16
<210> 32	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 32	
uagcuauagu cauagcccag a	21
<210> 33	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 33	
cccauguuuu acgaca	16

<210> 34  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
  
 oligonucleotide  
 <400> 34  
 ugucguuaaa cauggguguu g 21  
 <210> 35  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 35  
 uagacucuuc uuguug 16  
 <210> 36  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 36  
 caacaagaag agucuaugcc a 21  
  
 <210> 37  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide  
 <400> 37  
 cuguggaguu uccaga 16  
 <210> 38



<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 38

ucuggaaacu ccacagcagg c 21

<210> 39

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 39

caggcagagg uuccug 16

<210> 40

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 40

caggaaccuc ugccugaaag c 21

<210> 41

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 41

ggaccugcca gugcuc 16

<210> 42

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 42

gagcacuggc agguccuauu a 21

<210> 43

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 43

uacucagccc agcauc 16

<210> 44

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 44

gaugcugggc ugaguaaguu a 21

<210> 45

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 45

ucagucuuua ugcaau 16

<210> 46

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 46

auugcauaaa gacugauggc u 21

<210> 47

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 47

acaagauuca gaccca 16

<210> 48

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 48

ugggucugaa ucuuguagau a 21

<210> 49

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 49

caagcgaguc ggaucu 16

<210> 50

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 50  
agaucgacu cgcuuguucc a 21

<210> 51  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 51  
uaaaaggcuu aggcaa 16

<210> 52  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 52  
uugccuaagc cuuuuauaaa u 21

<210> 53  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 53  
cuauaugaau ggaaca 16

<210> 54  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 54

uguuccauuc auauagaugu g 21

<210> 55

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 55

aagaucuggg cuauga 16

<210> 56

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 56

ucauagccca gaucuuugga u 21

<210> 57

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 57

guccaaugca ccacuu 16

<210> 58

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 58  
aaguggugca uggacagaa g 21  
<210> 59  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 59  
ucacaggggu ggauga 16  
<210> 60  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 60  
ucauccaccc cugugaaggg a 21  
<210> 61  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 61  
ggccuuccgu cuuuua 16  
<210> 62  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 62

uaaaagacgg aaggccacga c	21
<210> 63	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 63	
cugcaaguuu ggcuuu	16
<210> 64	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 64	
aaagccaaac uugcaguuuc c	21
<210> 65	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 65	
cagagaagga caaaau	16
<210> 66	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 66	
aaauuguccu ucucuggggc a	21
<210> 67	



<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 67

gcuaaccauc agcuca

16

<210> 68

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 68

ugagcugaug guaugcuuug c

21

<210> 69

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 69

uugggggauc ugaaau

16

<210> 70

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 70

auuucagauc cccaagcag u

21

<210> 71

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 71

ucagcacccc acaau 16

<210> 72

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 72

auuuguggggg ugcugaccuc c 21

<210> 73

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 73

gcccgaggga ccuuua 16

<210> 74

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 74

uaaagguccc ucgggcguuc c 21

<210> 75

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 75

ccauguuuuaa cgacau

16

<210> 76

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 76

augucguuaa acaugggugu u

21

<210> 77

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 77

ugacaggaga ugaaaa

16

<210> 78

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 78

uuuucaucuc cugucagcuu c

21

<210> 79

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 79  
caacuucaug ggauuc 16  
<210> 80  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 80  
gaaucceaug aaguugccag a 21  
<210> 81  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 81  
guuccuguca gaauau 16  
<210> 82  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 82  
auauucugac aggaaccucu g 21  
<210> 83  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 83

ccuauggcca aaugaa 16

<210> 84

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 84

uucuuuuggc cauaggucce u 21

<210> 85

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 85

uuccugucag aaauac 16

<210> 86

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 86

gauauucuga caggaaccuc u 21

<210> 87

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 87

agguuccugu cagaau	16
<210> 88	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 88	
auucugacag gaaccucugc c	21
<210> 89	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 89	
ggcaacuca ugggau	16
<210> 90	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 90	
aucccaugaa guugccagag c	21
<210> 91	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 91	
aacuucaugg gauuca	16

<210> 92  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 92  
 ugaaucccau gaaguugcca g 21

<210> 93  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 93  
 accuauggcc aaauga 16

<210> 94  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 94  
 ucuuuuggcc auaggucctu a 21

<210> 95  
 <211> 16  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           oligonucleotide  
 <400> 95  
 uauggccaaa ugaaaa 16

<210> 96



<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 96

uuuucuuug gccauagguc c 21

<210> 97

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 97

cugacaggag augaaa 16

<210> 98

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 98

uuucaucucc ugucagcuuc u 21

<210> 99

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 99

agcugacagg agauga 16

<210> 100

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 100

ucaucuccug ucagcuucug g 21

<210> 101

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 101

acccauguuu aacgac 16

<210> 102

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 102

gucguuaaac auggguguug a 21

<210> 103

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 103

aacaccaug uuuaac 16

<210> 104

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 104

guuaaacaug gguguugauc c

21

<210> 105

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 105

cagucuuuau gcaaug

16

<210> 106

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 106

cauugcauaa agacugaugg c

21

<210> 107

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 107

aucagucuuu augcaa

16

<210> 108

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide	
<400> 108	
uugcauaaag acugauggcu g	21
<210> 109	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 109	
cuuggugaga agaaac	16
<210> 110	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 110	
guuucuucuc accaagaguc g	21
<210> 111	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 111	
cugccaacga uccuau	16
<210> 112	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	

<400> 112  
auaggaucgu uggcagaucc c 21

<210> 113  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 113  
uccuacaugg uuccuu 16

<210> 114  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 114  
aaggaaccu guaggauucc c 21

<210> 115  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 115  
cuuugucugg augcau 16

<210> 116  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 116

augcauccag acaaagaggu c	21
<210> 117	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 117	
acauuugcac agauga	16
<210> 118	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 118	
ucaucugugc aaaugucaca c	21
<210> 119	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 119	
gcggaugccu cucaaa	16
<210> 120	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 120	
uuugagaggc auccgcuauc c	21

<210> 121	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 121	
aaccgggaau ccuaca	16
<210> 122	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 122	
uguaggauuc ccgguaugu c	21
<210> 123	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 123	
ggacauaacc gggaa	16
<210> 124	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 124	
auucccgguu auguccaaug g	21
<210> 125	
<211> 16	



<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 125

gguuccuguc agaaua

16

<210> 126

<211> 31

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 126

uauucugaca ggaaccucug ccugaaagcu g

31

<210> 127

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 127

ggatctggtc atggctcctt

20

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 128

gtcaggcttt ttggccctac

20

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 129

gagtcaacgg atttggtcgt 20

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 130

gacaagcttc ccgttctcag 20

<210> 131

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 131

gcugacagga gaugaa 16

<210> 132

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 132

uucaucuccu gucagcuucu g 21

<210> 133

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 133  
uucaucuccu gucagcuucu g 21  
<210> 134  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 134  
uucaucuccu gucagcuucu g 21  
<210> 135  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 135  
gcugacagga gaugaa 16  
<210> 136  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide  
<400> 136  
ugaagcacca gcuuuu 16  
<210> 137  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 137

aaaagcuggu gcuucauggg c 21

<210> 138

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 138

aaaagcuggu gcuucauggg c 21

<210> 139

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 139

ugaagcacca gcuuuu 16

<210> 140

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 140

aaugaaaaau ggauca 16

<210> 141

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 141

ugauccauuu uucauuuggc c	21
<210> 142	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 142	
ugauccauuu uucauuuggc c	21
<210> 143	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 143	
aaugaaaaau ggauca	16
<210> 144	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 144	
cccauguuuu acgaca	16
<210> 145	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 145	
ugucguuaaa cauggguguu g	21

<210> 146

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 146

ugucguuaaa cauggguguu g 21

<210> 147

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 147

ugucguuaaa cauggguguu g 21

<210> 148

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 148

cccauguuuu acgaca 16

<210> 149

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 149

agguuccugu cagaau 16

<210> 150

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 150

auucugacag gaaccucugc c 21

<210> 151

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 151

auucugacag gaaccucugc c 21

<210> 152

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 152

agguuccugu cagaau 16

<210> 153

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 153

ggcaacuca ugggau 16

<210> 154

<211> 21



<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 154

aucccaugaa guugccagag c 21

<210> 155

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 155

aucccaugaa guugccagag c 21

<210> 156

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 156

ggcaacuuca uggaau 16

<210> 157

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 157

gcugacaggu cuacua 16

<210> 158

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 158

uaguagaccu gucagcuucu g

21

<210> 159

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 159

uucaucuccu gucagcuuc

19

<210> 160

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 160

uucaucuccu gucagcuuc

19

<210> 161

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 161

uucaucuccu gucagcuuc

19

<210> 162

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 162

uucaucuccu gucagcuuc 19

<210> 163

<211> 2082

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 163

atcactgtag tagtagctgg aaagagaaat ctgtgactcc aattagccag ttcctgcaga 60  
ccttgtgagg actagaggaa gaatgctcct ggctgttttg tactgcctgc tgtggagttt 120  
ccagacctcc gctggccatt tccctagagc ctgtgtctcc tctaagaacc tgatggagaa 180  
ggaatgctgt ccaccgtgga gcggggacag gaggccctgt ggccagcttt caggcagagg 240  
ttctgtcag aatatcttc tgtccaatgc accactggg cctcaatttc cttcacagg 300  
ggtggatgac cgggagtcgt ggccttccgt cttttataat aggacctgcc agtgctctgg 360

caacttcatt ggattcaact gtggaaactg caagtttggc ttttggggac caaactgcac 420  
agagagacga ctcttggtga gaagaacat cttcgatttg agtgccccag agaaggacaa 480  
atTTTTtGCC tacctcactt tagcaaagca taccatcagc tcagactatg tcatcccat 540  
agggacctat ggccaaatga aaaatggatc aacacccatg ttttaacgaca tcaatattta 600  
tgacctcttt gtctggatgc attattatgt gtcaatggat gcactgcttg ggggatctga 660  
aatctggaga gacattgatt ttgccccatga agcaccagct tttctgcctt ggcatagact 720  
cttcttggtg cggtggggaac aagaaatcca gaagctgaca ggagatgaaa acttcactat 780

tccatattgg gactggcggg atgcagaaaa gtgtgacatt tgcacagatg agtacatggg 840  
aggtcagcac cccacaaatc ctaacttact cagcccagca tcattcttct cctcttggca 900  
gattgtctgt agccgattgg aggagtacaa cagccatcag tctttatgca atggaacgcc 960  
cgagggacct ttacggcgta atcctggaaa ccatgacaaa tccagaaccc caaggctccc 1020  
ctcttcagct gatgtagaat tttgcctgag ttgacccaa tatgaatctg gttccatgga 1080  
taaagctgcc aatttcagct ttagaaatac actggaagga tttgctagtc cacttactgg 1140  
gatagcggat gcctctcaaa gcagcatgca caatgccttg cacatctata tgaatggaac 1200

aatgtcccag gtacagggat ctgccaacga tcctatcttc cttcttcacc atgcatttgt 1260  
tgacagtatt tttagcagct ggctccgaag gcaccgtcct cttcaagaag tttatccaga 1320

agccaatgca cccattggac ataaccggga atcctacatg gttcctttta taccactgta	1380
cagaaatggt gatttcttta tttcatccaa agatctgggc tatgactata gctatctaca	1440
agattcagac ccagactctt ttcaagacta cattaagtcc tatttgaac aagcgagtcg	1500
gatctggta tggctccttg gggcggcgat ggtaggggcc gtcctcactg ccctgctggc	1560
agggcttggt agcttgctgt gtcgtcaca gagaaagcag cttcctgaag aaaagcagcc	1620
actcctcatg gagaaagagg attaccacag cttgtatcag agccatttat aaaaggctta	1680
ggcaatagag tagggccaaa aagcctgacc tcactctaac tcaaagtaat gtccaggttc	1740
ccagagaata tctgctggta tttttctgta aagaccattt gcaaaattgt aacctaatac	1800
aaagtgtagc cttcttccaa ctacaggtaga acacacctgt ctttgtcttg ctgttttcac	1860
tcagcccttt taacattttc ccctaagccc atatgtctaa ggaaaggatg ctatttggtta	1920
atgaggaact gttatttgta tgtgaattaa agtgctctta ttttaaaaaa ttgaaataat	1980
tttgattttt gccttctgat tatttaaaga tctatatatg ttttattggc cccttcttta	2040
ttttaataaa acagtgagaa atctaataaa aaaaaaaaaa aa	2082