



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0039840
(43) 공개일자 2023년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0122155

(22) 출원일자 2021년09월14일

심사청구일자 2021년09월14일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

이상수

서울특별시 양천구 목동중앙로7길 32, 105동 901호(목동, 이편한세상)

아쉬시 란잔 샤르마

강원도 춘천시 성심로 67

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김남혁

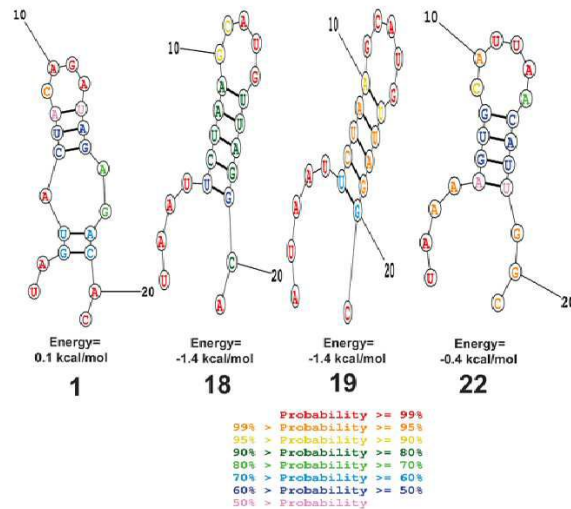
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 RdRp 유전자 상쇄를 통한 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 바이러스 감염증을 예방, 치료 또는 진단할 수 있는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 코로나 바이러스에 특이적으로 결합하는 siRNA를 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 진단용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)

A61P 31/14 (2018.01)

C12Q 1/70 (2022.05)

(72) 발명자

엠디 아슈라풀 하산

방글라데쉬, 다카-1216, 미푸르13, 틴셔드 지구,
290호

키란지브 차크라바티

인도, 웨스트 벵갈주, 24피지예스노던시,
칼린디동, 칼린디 아파트 P-121동 6호

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 117로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 표적 유전자는 서열번호 1 내지 2에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제제는 서열번호 118로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 작용부를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 작용부는 서열번호 23 및 105에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 작용부는 가이드 가닥인 것인, 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 제제는 상기 작용부와 이합체를 형성하는 안정화부를 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 안정화부는 서열번호 45로 표시되는 뉴클레오타이드를 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 바이러스는 코로나 바이러스인 것인, 조성물.

청구항 9

서열번호 117로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 바이러스 검출용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 제제는 상기 표적 유전자에 상보적으로 결합하는 작용부를 포함하는 것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 코로나 바이러스 감염증을 예방, 치료 또는 진단할 수 있는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 코로나 바이러스에 특이적으로 결합하는 siRNA를 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] SARS-CoV-2에 의한 COVID-19, 즉 코로나바이러스감염증-19는 2019년 12월에 중국에서 발병한 이후 전 세계적으로 높은 이환율과 사망률을 일으키고 있어, 이러한 대유행 상태는 전 세계적으로 혼란을 야기하였다. 그 결과 WHO는 COVID-19를 글로벌 보건 비상사태로 선포하였다. 이전에는 2003년 4월에 SARS, 즉 중증급성호흡기증후군으로 사망률이 약 9.6%를 기록하였고, 2015년에 MERS, 즉 중동호흡기증후군이 중동에서 전 세계로 퍼지면서 사망률이 약 36%를 기록한 바 있었다.

[0003] 상기 COVID-19로 인한 병리학적 진행은 고유한 단계를 따른다. 흡입된 SARS-CoV-2가 비강의 상피 세포에 결합할 가능성이 있는 경우, 감염 초기 하루 내지 이틀 동안 무증상 상태를 거친다. 다음으로 세포의 복제는 제한된 선천적 면역 반응을 발휘하여 바이러스의 국소 증식을 유도한다. 감염의 두 번째 단계에서는 바이러스의 전파와 기도로의 이동은 심각한 면역 반응을 일으키는 등 임상 증상이 분명해진다. 감염된 환자의 약 20%는 질병의 세 번째 단계에 들어가는데, 폐 침윤이 발생하여 급성 호흡 곤란 증후군(즉, ARDS)을 유발한다. 폐포 상피 세포의 막대한 손상과 진행성 호흡 부전은 심각한 경우 환자의 사망으로 이어질 수 있다.

[0004] 현재까지 치명적인 COVID-19에 대한 효과적인 치료를 위하여 백신, 올리고 뉴클레오타이드 기반 요법, 소분자 약물, 단일 클론 항체, 인터페론 요법 및 펩타이드의 개발을 포함하여 COVID-19를 예방 또는 통제하기 위해 여러 전략이 진행 중이나, 현재 채택된 치료법들은 덱사메타손, 토실리주맙 및 사틸루맙 등을 사용하여 사이토카인 폭풍을 경감시키는 대증요법에 관한 것 또는 기존 항바이러스제인 렘데시비르 및 파비피라비르 등을 사용하는 것이 있으나 이러한 접근법은 임상 결과를 개선할 수 있는 최적의 수준을 충족하지 못하였다. 따라서 COVID-19 발병을 억제하기 위해서는 더 강력하고 구체적인 치료제를 식별하는 것이 시급하다.

[0005] 상기 COVID-19와 같은 코로나 바이러스 감염증의 원인이 되는 코로나 바이러스는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 바이러스로, 스파이크단백질(S), 막단백질(M), 외피단백질(E) 및 뉴클레오패시드(N)로 구성되는 구조 단백질을 포함한다. 막 횡단 삼중 스파이크 당 단백질은 바이러스 표면에서 돌출되어 있으며, S1 및 S2와 같은 두 개의 기능성 서브 유닛으로 구성된다. S1 서브 유닛은 숙주 세포의 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2) 수용체에 대한 SARS-CoV-2의 상호 작용에 기여하는 반면, S2 서브 유닛은 바이러스 및 숙주 세포막의 융합에 작용한다. 바이러스 복제는 바이러스 게놈을 숙주 세포에 통합한 후 중요한 단계이며, 이는 바이러스 비 구조 단백질의 다중 서브 유닛 복제/전사 복합 인자에 의해 매개된다. 상기 복합체에는 RNA 의존성 RNA 중합효소(RNA-dependent RNA polymerase; RdRp)가 필수적인데, 이는 코로나 바이러스가 DNA 단계를 거치지 않는 RNA 바이러스에 해당하기 때문이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 일 목적은 바이러스 감염증 또는 상기 감염에 의해 유발된 다양한 질환을 예방, 치료 또는 진단할 수 있는 다양한 용도의 조성물을 제공하자 한다.
- [0007] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 117로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한 본 발명에서, 상기 표적 유전자는 서열번호 1 내지 2에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다.
- [0010] 또한 본 발명에서, 상기 제제는 서열번호 118로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 작용부를 포함하는 것일 수 있다.
- [0011] 또한 본 발명에서, 상기 작용부는 서열번호 23 및 105에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다.
- [0012] 또한 본 발명에서, 상기 작용부는 가이드 가닥인 것일 수 있다.
- [0013] 또한 본 발명에서, 상기 제제는 상기 작용부와 이합체를 형성하는 안정화부를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0014] 또한 본 발명에서, 상기 안정화부는 서열번호 45로 표시되는 뉴클레오타이드를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0015] 또한 본 발명에서, 상기 바이러스는 코로나 바이러스일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 서열번호 117로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 바이러스 검출용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0017] 또한 본 발명에서, 상기 제제는 상기 표적 유전자에 상보적으로 결합하는 작용부를 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에서는 중요한 매개 변수를 고려한 알고리즘을 통하여, 코로나 바이러스 RdRp에 특이적인 siRNA를 설계하였고, 그 결과 설계된 상기 siRNA 분자는 강력한 유전자 침묵(RNAi) 효과 및 안정성을 가지는 것을 확인하였다. 또한, 설계된 siRNA의 표적은 전체 인간 게놈 내에서 유의미한 일치를 나타내지 않았으므로, siRNA에 의한 표적 외 침묵 가능성을 배제하였다. 또한, 표적 부위에 대한 siRNA 분자의 접근성을 확인하였다. 선택된 siRNA 분자와 RNAi 경로의 구성 요소 간의 분자 도킹 연구는 탁월한 결과를 제공하였고, siRNA-argonaute 복합체, 가이드 RNA 및 표적 단백질 복합체에서 구조적 안정성을 보여주었다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 SARS-CoV-2의 RdRp 유전자 서열에 대해 효과적인 siRNA 분자를 설계하기 위한 간략한 순서도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 siRNA 가이드 가닥의 효과적인 최저 접힘 자유 에너지 구조를 탐색하여, 그 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 siRNA와 표적의 RNA-RNA 상호 작용의 열역학을 RNA 구조 웹 서버의 도움으로 예측하여 나타낸 것이다.
- 도 4는 컨센서스 표적 서열 1 siRNA 및 컨센서스 표적 서열 11 siRNA의 온도 함수로서 양상불 열 용량(Cp) 및 용융 온도(Tm)를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 특정 siRNA에 대한 mRNA 내부 표적 부위의 명확한 목표 위치에 대한 접근성을 평가한 것을 나타내었다.
- 도 6은 설계된 siRNA의 RdRp 유전자의 전사 후 유전자 침묵 현상(post-transcriptional gene silencing; PTGS)

메커니즘을 나타낸 것이다.

도 7은 siRNA 및 argonaute 단백질이 도킹된 자유 에너지 및 리간드 RMSD를 계산하여 나타낸 것이다.

도 8은 분자역학(MD) 시뮬레이션을 사용하여 siRNA-argonaute 및 도킹된 단백질-siRNA 복합체의 원자와 분자의 물리적 움직임을 검사한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 분자역학(MD) 시뮬레이션을 사용하여 siRNA-argonaute 및 도킹된 단백질-siRNA 복합체의 원자와 분자의 물리적 움직임을 검사한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적인 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예 내지 구현예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0021] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속하고, 일 구현예에서 생략된 기재는 다른 구현예에서 기재된 바와 같은 방식으로 해석될 수 있다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0023] 본 발명에서, 발현 억제 대상이 되는 표적 유전자는 RNA 바이러스의 RdRp 유전자로, 서열번호 1 내지 26 및 117에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 117로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 서열번호 117은 5'-TCTCTATCTGTAGTACTAT-3'인 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명에서, 상기 표적 유전자는 서열번호 1 내지 2에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명에서, 상기 표적 유전자를 억제하는 제제는 상기 표적 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 작용부를 포함할 수 있다. 상기 작용부는 서열번호 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 및 118에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 118로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 서열번호 118은 5'-UAGUACUACAGAUAGAGA-3'인 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서, 상기 작용부는 서열번호 23 및 105에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 표시되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서, 상기 제제는 상기 작용부와 이합체를 형성하는 안정화부를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서, 상기 안정화부는 서열번호 45로 표시되는 뉴클레오타이드를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서, 상기 작용부 및 상기 안정화부는 RNAi를 이용한 안티센스 분자(antisense molecules)일 수 있으며, 앵타머(aptamer), 앵타고미어(antagomir), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 디코이 올리고뉴클레오타이드(decoy oligonucleotide), 터프 디코이 올리고뉴클레오타이드(tough decoy oligonucleotide), 리보자임(Ribozyme) 또는 DNA:RNA 하이브리드를 인지하는 항체 일 수 있고, 바람직하게는 siRNA인 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 "안티센스(antisense)"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로 이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브 유닛 간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 상기 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.
- [0031] 본 발명에서, 상기 작용부는 안티센스 가닥(anti-sense strand)인 siRNA의 가이드 가닥(guide strand)일 수 있

고, 상기 안정화부는 siRNA의 패신저 가닥(passenger strand)일 수 있다.

- [0032] 본 발명에서, 상기 “짧은 헤어핀 RNA(shRNA)”는 작은 헤어핀 RNA라고도 하며, 일반적으로 벡터를 통해 상보적인 표적 mRNA에 RNAi를 일으키는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서, 상기 “작은 간섭 RNA(siRNA)”는 상보적인 표적 mRNA를 중화하여, 전사 후 유전자 침묵(PTGS)을 사용하는 siRNA 기반 치료에 이용될 수 있는 것으로, 본 발명의 siRNA는 복제-전사 복합체의 일부로서 기능하는 바이러스 RdRp 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명에서, 상기 안티센스 분자는 DNA, RNA, PNA(peptide nucleic acid), LNA(Locked Nucleic Acid), 2'-O-변형 올리고뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트-백본 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 포스포로티오에이트-백본 리보뉴클레오타이드를 포함하여 구성된 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 상기 "LNA(Locked nucleic acids)"는 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다. LNA 뉴클레오사이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 상기 “PNA(peptide nucleic acids)”는 당-포스페이트 백본 대신에 펩타이드-기반 백본을 포함하는 것이다. 2'-O-변형 올리고뉴클레오타이드는 2'-O-알킬 올리고뉴클레오타이드, 2'-O-C1-3 알킬 올리고뉴클레오타이드, 또는 2'-O-메틸 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서, 예방, 치료 및 진단이 대상이 되는 바이러스는 RNA 바이러스일 수 있다. 상기 “바이러스”는 RNA를 유전물질로 사용하고 RdRp를 발현시키는 모든 바이러스를 의미한다. 예를 들어, 상기 RNA 바이러스는 코로나비리대(Coronaviridae), 아말가비리대(Amalgaviridae), 비르나비리대(Birnaviridae), 크리스비리대(Chrysoviridae), 시스토비리대(Cystoviridae), 엔도르나비리대(Endornaviridae), 하이포비리대(Hypoviridae), 메가비르나비리대(Megabirnaviridae), 파르티티비리대(Partitiviridae), 피코비르나비리대(Picobirnaviridae), 레오비리대(Reoviridae), 토티비리대(Totiviridae), 콰드리비리대(Quadriviridae), 아르테리비리대(Arteriviridae), 메소니비리대(Mesoniviridae), 로니비리대(Roniviridae), 디시스트로비리대(Dicistroviridae), 이플라비리대(Ifilaviridae), 마르나비리대(Marnaviridae), 피코르나비리대(Picornaviridae), 세코비리대(Secoviridae), 알파플렉시비리대(Alphaflexiviridae), 베타플렉시비리대(Betaflexiviridae), 감마플렉시비리대(Gammaflexiviridae), 티모비리대(Tymoviridae), 보르나비리대(Bornaviridae), 필로비리대(Filoviridae), 파라믹소비리대(Paramyxoviridae), 랍도비리대(Rhabdoviridae), 니아미비리대(Nyamiviridae), 칼리시비리대(Caliciviridae), 플라비비리대(Flaviviridae), 루테오비리대(Luteoviridae), 토가비리대(Togaviridae), 뉴모바라대(Pneumoviridae), 아레나비리대(Arenaviridae), 델타비리대(Deltavirus) 또는 오르토믹소비리대(Orthomyxoviridae) 바이러스일 수 있으나, 바람직하게는 코로나비리대일 수 있으며, 보다 바람직하게는 코로나비리대에 속하는 코로나 바이러스일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서, 상기 "코로나 바이러스(Coronavirus)"는 코로나 바이러스과(Coronaviridae)의 코로나 바이러스아과(Coronavirinae)에 4개의 속(알파, 베타, 감마, 델타)이 있으며, 유전자 크기 27 내지 32kb의 RNA 바이러스로 사람과 동물의 호흡기와 소화기계 감염을 유발하는 것으로 알려져 있다. 주로 점막 전염, 비말 전파로 쉽게 감염되며, 사람은 일반적으로 경미한 호흡기 감염을 일으키지만 드물게 치명적인 감염을 일으키기도 하며, 소와 돼지는 설사, 닭은 호흡기 질환이 발생하기도 한다.
- [0040] 본 발명에서, 상기 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 및 HCoV-HKU1에서 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명에서, 상기 코로나 바이러스는 자연적으로 또는 인공적으로 돌연변이가 발생한 변이체를 포함한다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 바이러스 감염은 감염 자체 및 감염으로 인한 질환을 모두 포함하며, 상기 감염 질환은 코로나 바이러스성 장염, 코로나 바이러스성 설사, 중증 급성 호흡기 증후군(severe acute respiratory syndrome; SARS), 중등 호흡기 증후군(Middle East respiratory syndrome; MERS), 또는 이들의 조합일 수 있으나, 본 발명의 목적 상 상기 코로나 바이러스 감염에 의해 유발될 수 있는 질환이라면 제한없이 포함될 수 있다.

- [0043] 본 발명의 조성물은 단독으로, 혹은 종전의 항바이러스제를 혼합하여 사용할 수 있고, 혹은 항혈청과 같은 생물학적 제제와 병용하여 사용할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 조성물은 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 용도로 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 바이러스의 감염 또는 증식을 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 바이러스의 감염 또는 증식을 억제하여 바이러스 감염 또는 증식이 억제되어 개체의 상태가 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0050] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스페이트, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 따른 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 경구 또는 비경구로 투여하는 것일 수 있고, 상기 비경구 투여는 피하, 피내, 설하, 직장, 정맥내, 동맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 골수내, 심장내, 병소내 및 두개골내 투여일 수 있고, 좌제, 주사 또는 그 밖의 주입기술로 투여할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 식이, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로도 제형될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 조성물을 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 바이러스 감염의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명에서, 상기 "개체"란 바이러스 감염 증상이 있거나 의심되어, 바이러스 활성을 억제하는 등으로 바이러스 감염 또는 상기 감염에 기인하여 유발된 질환을 예방, 개선 또는 치료가 필요한 대상으로, 상기 바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다.
- [0056] 본 발명의 상기 "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 유효성분을 도입하는 과정을 의미하는 것으로서, 본 발명의 상기 치료 방법에서 투여 방법은 경구 또는 비경구 등의 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 목적상, 목적하는 개체에 대한 구체적인 약학적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우

에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 상기 유효성분을 포함하는 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 상기 유효성분을 포함하는 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시에 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[0059] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 바이러스 검출용으로 사용될 수 있다.

[0060] 본 발명에서, 용어 “검출”은 검출하고자 하는 특정 유전자와 같은 바이오 마커의 존재 여부, 생물학적 시료 내의 농도, 발현 수준 등을 측정하고 비교하기 위한 것일 수 있고, 상기 검출 결과 바이오 마커 수준의 증가는 상기 바이오 마커를 인코딩하는 유전자의 수의 증가, 유전자 전사의 증가(예를 들어, 구성성 프로모터의 제어 하에 유전자를 배치함으로써), 유전자의 번역의 증가, 경쟁 유전자의 낙아웃 또는 이들 및/또는 다른 방법의 조합을 포함하는 다수의 방법에 의할 수 있고, 이는 생물학적 시료 내 농도의 증가로 이어질 수 있다. 반면, 바이오 마커 수준의 감소는 유전자 수의 감소, 유전자의 전사의 감소, 경쟁 유전자의 발현 등에 의할 수 있고, 이는 생물학적 시료 내 농도의 감소로 이어질 수 있다. 일 예로, 개체의 바이러스 수준이 대조군보다 높다는 것은 상기 개체로부터 유래된 시료에 포함된 바이러스의 MOI 또는 활성도가 높은 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0061] 본 발명에서 상기 “프로브”란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[0062] 본 발명에서, 상기 검출은 혈액 내지 혈장 내 검출 내지 측정의 대상이 되는 바이오 마커의 농도 내지 수준을 확인하는 것일 수 있다.

[0064] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물을 포함하는 키트를 제공하는 것일 수 있다.

[0065] 본 발명에서, 용어 “키트”는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 프로브를 검출 가능한 표지로 표지하여 바이오 마커의 발현 수준을 평가할 수 있는 도구를 말한다. 프로브와 관련하여 검출 가능한 물질을 기질과의 반응에 의해서 직접적으로 표지하는 것뿐만 아니라, 직접적으로 표지된 다른 시약과의 반응성에 의한 발색하는 표지체가 접합된 간접적 표지도 포함한다. 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 기타 다른 용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하여 제작될 수 있다.

[0066] 본 발명에서 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소, 역전사효소, DNase, RNase 억제제, 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 예후 예측용 유전자를 검출하기 위한 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관을 포함하고 기관은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 상기 키트는 당 업계에 공지되어 있는 것이라면, 이에 제한되지 않는다. 상기 키트는 RT-PCR 키트 또는 DNA 칩 키트일 수 있으나, DNA를 분석하기 위한 것이라면 제한없이 포함될 수 있다.

[0067] 본 발명의 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에서 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 암호화하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산 서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로써, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

- [0068] 또한, 본 발명의 상기 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 상기 키트는 고정체를 더 포함할 수 있고, 상기 고정체로는 니트로셀룰로오즈 막, PVDF 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트(Well plate), 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명의 상기 키트에서 2차 항체의 표지체는 발색 반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), FITC(폴리 L-라이신-플루오로세인 아이소티오시아나이드), RITC(로다민-B-아이소티오시아나이드) 등의 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등의 표지체가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 본 발명의 상기 키트에서 발색을 유도하기 위한 발색 기질은 발색 반응을 하는 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB(3,3',5,5'-테트라메틸 베지딘), ABTS[2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)], OPD(o-페닐렌다이아민) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색 기질은 완충 용액(0.1 M NaAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. TMB와 같은 발색기질은 이차 항체 접합체의 표지체로 사용된 HRP에 의해 분해되어 발색 침적체를 생성하고, 이 발색 침적체의 침적 정도를 육안으로 확인함으로써 상기 마커 단백질들의 존재 유무를 검출한다.
- [0072] 본 발명의 상기 키트에서 세척액은 인산염 완충 용액, NaCl 및 트윈 20을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02 M 인산염 완충용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05% 트윈 20으로 구성된 완충 용액(PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합 반응 후 항원-항체 결합체에 2차 항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 첨가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지 용액은 황산 용액(H₂SO₄)이 바람직하게 사용될 수 있다.
- [0073] 본 발명에서, 용어 "시료" 내지 "생물학적 시료"는 바이러스가 감염되었거나 감염이 의심되는 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있다.
- [0074] 본 발명에서, 용어 "대조군"은 바이러스가 감염되지 않은 일반 개체를 의미하는 것일 수 있다.
- [0076] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세하게 설명한다. 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0078] **실시예 1. siRNA 분자 설계**
- [0080] 도 1에 따라, SARS-CoV-2의 RdRp 유전자 서열에 대해 효과적인 siRNA 분자를 설계하였다.
- [0082] 1-1. RdRp 서열 확인
- [0083] 하기 표 1 및 표 2에서 나타난 것처럼, GenBank 데이터베이스에서 사용할 수 있는 26개의 SARS-CoV-2 RdRp 유전자 서열을 선정하였다. 상기 서열들은 프로테아제 인식 부위 분석에 사용되었다. 하기 표 2와 같이 서로 다른 SARS-CoV-2 균주의 26개 RdRp 유전자 서열은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 입수

할 수 있는 GenBank에서 검색되었다.

표 1

[0085]

순번	인간 CoVs 계통명	추가정보(S-단백질)	단백질 길이
1	SARS-CoV-2	ACCESSION: YP_00972 4390	1273 aa
2	SARS-CoV	ACCESSION: YP_00982 5051	1255 aa
3	MERS-CoV	ACCESSION: YP_009047204	1353 aa
4	HCoV-229E	ACCESSION: NP_073551	1173 aa
5	HCoV-NL63	ACCESSION: YP_003767	1356 aa
6	HCoV-OC43	ACCESSION: YP_009555241	1353 aa
7	HCoV-HKU1	ACCESSION: YP_173238	1356 aa

표 2

[0087]

순번	Genebank/Accession ID	위치	순번	Genebank/Accession ID	위치
1	LC522350.1	필리핀제도	14	MT042778.1	중국우한
2	MN938385.1	중국심천	15	MT050414.1	호주
3	MN938386.1	중국심천	16	MT050415.1	호주
4	MN970003.1	태국	17	MT050416.1	호주
5	MN970004.1	태국	18	MT050417.1	호주
6	MN975263.1	중국심천	19	MT066157.1	말레이시아
7	MN975264.1	중국심천	20	MT066158.1	말레이시아
8	MN975265.1	중국심천	21	MT066159.1	말레이시아
9	MT042773.1	중국통지	22	MT072668.1	벨기에
10	MT042774.1	중국통지	23	MT127116.1	베트남
11	MT042775.1	중국통지	24	MT159778.1	나이지리아
12	MT042776.1	중국우한	25	MT232869.1	이란
13	MT042777.1	중국우한	26	MT232870.1	이란

[0089]

1-2. siRNA 분자 후보 조건 결정

[0090]

다음으로 상기 RdRp 표적을 확인하여 siRNA 분자를 설계하였다. siDirect 버전 2.0 및 RNAs 웹 서버를 사용하여 SARS-COV-2 RdRp 유전자 서열에 대한 효과적이고 표적 특이적인 siRNA 분자를 설계하였다. 검색된 RdRp 유전자 서열 데이터는 FASTA 형식을 가지고, 하기 표 3 및 표 4의 조건을 만족하며, 하기 표 5의 점수를 합산하였을 때 6점 이상을 만족하는 서열을 선택하였다.

표 3

[0092]

순번	내용
1	sense/패신저 가닥의 5'말단은 G / C 포함해야 함
2	antisense/가이드 가닥의 5'말단은 A / U 포함해야 함
3	sense 가닥의 5'말단 7 염기 / 패신저 가닥의 5 '말단 4 염기가 A / U 포함해야 함
4	GC stretch의 길이는 9 뉴클레오타이드 이하여야 함

표 4

[0094]

순번	내용
1	이중중단의 A / U 차이 > 0 이어야 함
2	5' sense/패신저 가닥이 견고하게 부착되어야 함
3	위치1에는 U 이외의 염기가 있어야 함
4	위치6에는 A가 연속적으로 있어야 함
5	3' sense/패신저 가닥의 약한 부착위치 19는 G 이외의 염기를 포함해야 함

표 5

[0096]

순번	내용
1	설계된 siRNA는 GC 함량을 30 % ~ 52 %로 유지해야 함(1 점)
2	sense/패신저 가닥은 15 와 19 사이의 위치에서 ≥ 3 A / U 염기쌍을 유지해야 함(이 도메인 내 모든 A / U = 1 점)
3	설계된 siRNA의 T_m (용융온도)은 -20°C 보다 커야 함(1 점)
4	sense/패신저 가닥의 위치 19에 A가 있어야 함(1 점)
5	sense/패신저 가닥의 위치 3에는 A가 포함되어야 함(1 점)
6	sense/패신저 가닥의 위치 10에 U가 있어야 함(1 점)
7	sense/패신저 가닥의 위치 13은 G 이외의 모든 염기를 포함해야 함(1 점)

[0098]

또한 siRNA가 표적을 벗어나 작용하는 것을 피하기 위하여, 다른 비-표적 전사체와 적어도 두 개의 불일치가 있는 siRNA 서열을 선택하였다. 상기 선택된 26개의 RdRp 유전자 서열 중 siRNA의 8nt seed 부위의 접근성 임계 값 : 0.01157, siRNA의 16nt 접근성 임계 값 : 0.001002, self-접힘 에너지 : 0.9022, 시퀀스 및 에너지 비대칭 : 0.5 및 0.4655, 자유 말단 : 0.625을 만족하는 것을 선별하였고, siRNA 디자인의 경우 관련 표적 서열을 표시함과 동시에 기능성 siRNA를 비 기능성 siRNA로부터 최적화하여 분리하였다.

[0100]

1-3. siDirect 2.0를 이용한 잠재적인 siRNA 분자의 표적 특이적 설계 및 합의 표적 개시

[0101]

표적-directed siRNA 설계용 siDirect 버전 2.0에서는 상기 표 3, 표 4 및 표 5의 규칙을 따랐으며, 이를 통하여 효과적인 뉴클레오타이드 기반 유전자 침묵에 필요한 충분한 후보들을 도출할 수 있게 되었다. 이에 더하여, 이합체의 용융 온도(T_m)가 21.5°C (Seed 이합체 안정성: 최대 21.5°C) 아래를 유지되는 것과 같이, Seed 의존적 표적 외 적중을 최소화하기 위해 몇 가지 기본 매개 변수가 선택되었다. 3개 이상의 서로 다른 비-표적 전사체(즉, 3개의 불일치 내 표적 외 적중 개수)에 대해 2개 이상의 불일치를 갖는 siRNA만이 선택되었다. siDirect 2.0 도구를 177개의 표적 서열에 대해 총 177개의 추정 siRNA를 얻어, 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0103]

표적 유전자 순번	표적 유전자에 작용하는 siRNA 표적			RNA 올리고 서열		Seed-이합체 $T_m(^{\circ}\text{C})$	
	순번	서열	위치	21nt 가이드 (5' → 3') 21nt 패신저 (5' → 3')		가이드	패신저
1	1	GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG	15-37	UAGUACUACAGAUAGAGACAC GUCUCUAUCUGUAGUACUAUG		18.8	20.2
	2	TAGTACTATGACCAATAGACAGT	28-50	UGUCUAUUGGUCAUAGUACUA GUACUAUGACCAAUAGACAGU		14.5	13.1
	3	GACCAATAGACAGTTTCATCAAA	37-59	UGAUGAAACUGUCUAUUGGUC CCAAUAGACAGUUUCAUCAA		16.3	13.4
	4	ATCAAAAATTATTGAAATCAATA	54-76	UUGAUUUCAAUAAUUUUGAU CAAAAUAUUGAAUCAAUA		16.3	-12.0

2	5	ATGCACTTTTCGCATATACAAAA	19-41	UUGUAUAUGCGAAAAGUGCAU GCACUUUUCGCAUUAUACAAAA	8.2	10.3
	6	CCCTACTATAACTCAAATGAATC	53-75	UUCAUUUGAGUUAUAGUAGGG CUACUAUAACUCAAUGAAUC	13.8	7.9
	7	ATGCCATTAGTGCAAAGAATAGA	82-104	UAUUCUUUGCACUAAUGGCAU GCCAUUAGUGCAAAGAAUAGA	5.3	17.4
	8	GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG	121-143	UAGUACUACAGAUAGAGACAC GUCUCUAUCUGUAGUACUAUG	18.8	20.2
	9	TAGTACTATGACCAATAGACAGT	134-156	UGUCUAUUGGUCAUAGUACUA GUACUAUGACCAAUAGACAGU	14.5	13.1
	10	GACCAATAGACAGTTTCATCAAA	143-165	UGAUGAAACUGUCUAUUGGUC CCAAUAGACAGUUUCAUAAA	16.3	13.4
	11	ATCAAAAATTATTGAAATCAATA	160-182	UUGAUUUCAAUAAUUUUUGAU CAAAAAUUUUGAAAUCAUA	16.3	-12.0
3	12	ATGCACTTTTCGCATATACAAAA	19-41	UUGUAUAUGCGAAAAGUGCAU GCACUUUUCGCAUUAUACAAAA	8.2	10.3
	13	CCCTACTATAACTCAAATGAATC	53-75	UUCAUUUGAGUUAUAGUAGGG CUACUAUAACUCAAUGAAUC	13.8	7.9
	14	ATGCCATTAGTGCAAAGAATAGA	82-104	UAUUCUUUGCACUAAUGGCAU GCCAUUAGUGCAAAGAAUAGA	5.3	17.4
	15	GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG	121-143	UAGUACUACAGAUAGAGACAC GUCUCUAUCUGUAGUACUAUG	18.8	20.2
	16	TAGTACTATGACCAATAGACAGT	134-156	UGUCUAUUGGUCAUAGUACUA GUACUAUGACCAAUAGACAGU	14.5	13.1
	17	GACCAATAGACAGTTTCATCAAA	143-165	UGAUGAAACUGUCUAUUGGUC CCAAUAGACAGUUUCAUAAA	16.3	13.4
	18	ATCAAAAATTATTGAAATCAATA	160-182	UUGAUUUCAAUAAUUUUUGAU CAAAAAUUUUGAAAUCAUA	16.3	-12.0
4	19	TTGGAATGTAGTGCATATAAAGA	37-59	UUUAUACGCACUACAUUCCAA GGAAUGUAGUGCGUAUAAAGA	8.5	16.1
	20	GCGTATAAAGATTGTACAAATGT	49-71	AUUUGUACAAUCUUUAUACGC GUAAUAAAGAUUGUACAAUUGU	14.7	-2.3
	21	ATGTAAAGTGACACACTTAAAAA	68-90	UUUAAGUGUGUCACUUAACAU GUUAAGUGACACACUUAUAAA	11.8	11.8
	22	TGGCTTTGAGTTGACATCTATGA	127-149	AUAGAUGUACUCAAAGCCA GCUUUGAGUUGACAUUAUGA	20.3	16.6
	23	ATGAAGTATTTTGTGAAAATAGG	146-168	UAUUUUCACAAAAUACUUAU GAAGUAUUUUGUGAAAAUAGG	7.4	4.6
	24	TGGCATCATTCTATTGGATTGTA	242-264	AAAUCCAUAUGAAUGGCCA GCAUCAUUCUAUUGGAUUUGA	20.1	13.6
	25	TTGGATTGATTACGTCTATAAT	255-277	UAUAGACGUAUCAAUCCAA GGAUUUGAUUACGUCUAUAAU	20.9	16.3
	26	TGGATTGATTACGTCTATAATC	256-278	UUUAUAGACGUAUCAAUCCAA GAUUUGAUUACGUCUAUAAUC	15.8	7.2

5	27	TTGGAATGTAGTGCCTATAAAGA	37-59	UUUAUACGCACUACAUUCCAA GGAAUGUAGUGCGUAUAAAGA	8.5	16.1
	28	GCGTATAAAGATTGTACAAATGT	49-71	AUUUGUACAAUCUUUAUACGC GUAAUAAAGAUUGUACAAUUGU	14.7	-2.3
	29	ATGTTAAGTGACACACTTAAAA	68-90	UUUAAGUGUGACUUAACAU GUUAAGUGACACACUAAAAA	11.8	11.8
	30	TGGCTTTGAGTTGACATCTATGA	127-149	AUAGAUUCAACUCAAAGCCA GCUUUGAGUUGACAUUAUGA	20.3	16.6
	31	ATGAAGTATTTTGTGAAATAGG	146-168	UAUUUUCACAAAAUACUUAU GAAGUAUUUUGUGAAAAUAGG	7.4	4.6
	32	TGGCATCATCTATTGGATTGGA	242-264	AAAUCCAUAUGAUGGCCA GCAUCAUUCUAUUGGAUUUGA	20.1	13.6
	33	TTGGATTGATTACGTCTATAAT	255-277	UAUAGACGUAAUCAAUCCAA GGAUUUGAUUACGUCUAUAAU	20.9	16.3
	34	TGGATTGATTACGTCTATAATC	256-278	UUUAUAGACGUAAUCAAUCCA GAUUUGAUUACGUCUAUAAUC	15.8	7.2
6	35	ATGCACTTTTCGCATATACAAAA	19-41	UUGUAUAUGCGAAAAGUGCAU GCACUUUUCGCAUAUACAAAA	8.2	10.3
	36	CCCTACTATAACTCAATGAATC	53-75	UUCAUUUGAGUUAUAGUAGGG CUACUAUAACUCAAAUGAAUC	13.8	7.9
	37	ATGCCATTAGTGAAAGAATAGA	82-104	UAUUCUUUGCACUAAUGGCAU GCCAUUAGUGCAAAGAAUAGA	5.3	17.4
	38	GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG	121-143	UAGUACUACAGAUAGAGACAC GUCUCUAUCUGUAGUACUAUG	18.8	20.2
	39	TAGTACTATGACCAATAGACAGT	134-156	UGUCUAUUGGUCAUAGUACUA GUACUAUGACCAAUAGACAGU	14.5	13.1
	40	GACCAATAGACAGTTTCATCAAA	143-165	UGAUGAAACUGUCUAUUGGUC CCAAUAGACAGUUUCAUAAA	16.3	13.4
	41	ATCAAAAATTATTGAAATCAATA	160-182	UUGAUUUCAAUAUUUUUGAU CAAAAAUUUUGAAAUCAAUA	16.3	-12.0
7	42	ATGCACTTTTCGCATATACAAAA	19-41	UUGUAUAUGCGAAAAGUGCAU GCACUUUUCGCAUAUACAAAA	8.2	10.3
	43	CCCTACTATAACTCAATGAATC	53-75	UUCAUUUGAGUUAUAGUAGGG CUACUAUAACUCAAAUGAAUC	13.8	7.9
	44	ATGCCATTAGTGAAAGAATAGA	82-104	UAUUCUUUGCACUAAUGGCAU GCCAUUAGUGCAAAGAAUAGA	5.3	17.4
	45	GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG	121-143	UAGUACUACAGAUAGAGACAC GUCUCUAUCUGUAGUACUAUG	18.8	20.2
	46	TAGTACTATGACCAATAGACAGT	134-156	UGUCUAUUGGUCAUAGUACUA GUACUAUGACCAAUAGACAGU	14.5	13.1
	47	GACCAATAGACAGTTTCATCAAA	143-165	UGAUGAAACUGUCUAUUGGUC CCAAUAGACAGUUUCAUAAA	16.3	13.4
	48	ATCAAAAATTATTGAAATCAATA	160-182	UUGAUUUCAAUAUUUUUGAU CAAAAAUUUUGAAAUCAAUA	16.3	-12.0

8	49	ATGCACTTTTCGCATATACAAAA	19-41	UUGUAUAUGCGAAAAGUGCAU GCACUUUUCGCAUUAACAAAA	8.2	10.3
	50	CCCTACTATAACTCAAATGAATC	53-75	UUCAUUUGAGUUAUAGUAGGG CUACUAUAACUCAAAUGAAUC	13.8	7.9
	51	ATGCCATTAGTGCAAAGAATAGA	82-104	UAUUCUUUGCACUAAUGGCAU GCCAUUAGUGCAAAGAAUAGA	5.3	17.4
	52	GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG	121-143	UAGUACUACAGAUAGAGACAC GUCUCUAUCUGUAGUACUAUG	18.8	20.2
	53	TAGTACTATGACCAATAGACAGT	134-156	UGUCUAUUGGUCAUAGUACUA GUACUAUGACCAAUAGACAGU	14.5	13.1
	54	GACCAATAGACAGTTTCATCAAA	143-165	UGAUGAAACUGUCUAUUGGUC CCAAUAGACAGUUUCAUAAA	16.3	13.4
	55	ATCAAAAATTATTGAAATCAATA	160-182	UUGAUUUCAAUAUUUUUGAU CAAAAAUUAUUGAAAUCAAUA	16.3	-12.0
9	56	TGCTAATAGTGTTTTAAACATTT	129-151	AUGUUA AAAACACUAUUAGCA CUAAUAGUGUUUUUAAACAUUU	7.2	6.3
	57	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	166-188	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAAUGUUA AUGCACUUUUAUC	10.3	6.9
	58	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	186-208	AUUUUGUUAACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAAACAAAUUG	5.6	20.3
	59	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	239-261	UAUAGAGACACUCAUAAAGUC CUUUUAGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
10	60	TGCTAATAGTGTTTTAAACATTT	129-151	AUGUUA AAAACACUAUUAGCA CUAAUAGUGUUUUUAAACAUUU	7.2	6.3
	61	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	166-188	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAAUGUUA AUGCACUUUUAUC	10.3	6.9
	62	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	186-208	AUUUUGUUAACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAAACAAAUUG	5.6	20.3
	63	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	239-261	UAUAGAGACACUCAUAAAGUC CUUUUAGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
11	64	TGCTAATAGTGTTTTAAACATTT	129-151	AUGUUA AAAACACUAUUAGCA CUAAUAGUGUUUUUAAACAUUU	7.2	6.3
	65	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	166-188	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAAUGUUA AUGCACUUUUAUC	10.3	6.9
	66	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	186-208	AUUUUGUUAACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAAACAAAUUG	5.6	20.3
	67	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	239-261	UAUAGAGACACUCAUAAAGUC CUUUUAGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
12	68	TGCTAATAGTGTTTTAAACATTT	129-151	AUGUUA AAAACACUAUUAGCA CUAAUAGUGUUUUUAAACAUUU	7.2	6.3
	69	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	166-188	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAAUGUUA AUGCACUUUUAUC	10.3	6.9
	70	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	186-208	AUUUUGUUAACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAAACAAAUUG	5.6	20.3
	71	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	239-261	UAUAGAGACACUCAUAAAGUC CUUUUAGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
13	72	TGCTAATAGTGTTTTAAACATTT	129-151	AUGUUA AAAACACUAUUAGCA CUAAUAGUGUUUUUAAACAUUU	7.2	6.3
	73	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	166-188	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAAUGUUA AUGCACUUUUAUC	10.3	6.9
	74	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	186-208	AUUUUGUUAACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAAACAAAUUG	5.6	20.3
	75	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	239-261	UAUAGAGACACUCAUAAAGUC CUUUUAGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
14	76	TGCTAATAGTGTTTTAAACATTT	129-151	AUGUUA AAAACACUAUUAGCA CUAAUAGUGUUUUUAAACAUUU	7.2	6.3

14	77	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	166-188	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAAUGUAAUUGCACUUUAUC	10.3	6.9
	78	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	186-208	AUUUUGUUACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAACAAAUUG	5.6	20.3
	79	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	239-261	UAUAGAGACACUCAUAAAGUC CUUUAUGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
15	80	TGCCTAACATGCTTAGAATTATG	12-34	UAAUUCUAAGCAUGUUAGGCA CCUACAUGCUUAGAAUUAUG	6.9	11.6
	81	GCCTAACATGCTTAGAATTATGG	13-35	AUAAUUCUAAGCAUGUUAGGC CUACAUGCUUAGAAUUAUGG	6.9	13.5
	82	TGCTAATAGTGT TTTTAACATTT	202-224	AUGUUA AAAACACU AUUAGCA CUAAUAGUGUUUUAACAUUU	7.2	6.3
	83	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	239-261	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAAUGUAAUUGCACUUUAUC	10.3	6.9
	84	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	259-281	AUUUUGUUACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAACAAAUUG	5.6	20.3
	85	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	312-334	UAUAGAGACACUCAUAAAGUC CUUUAUGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
	86	TGCGTAAACATTTCTCAATGATG	381-403	UCAUUGAGAAAUGUUACGCA CGUAAACAUUUCUCAAUGAUG	18.1	14.7
	87	GGCTAGCATAAAGAACTTTAAGT	463-485	UUAAGUUCUUUAUGCUAGCC CUAGCAUAAAGAACUUUAAGU	4.9	20.9
16	88	TGCCTAACATGCTTAGAATTATG	12-34	UAAUUCUAAGCAUGUUAGGCA CCUACAUGCUUAGAAUUAUG	6.9	11.6
	89	GCCTAACATGCTTAGAATTATGG	13-35	AUAAUUCUAAGCAUGUUAGGC CUACAUGCUUAGAAUUAUGG	6.9	13.5
	90	TGCTAATAGTGT TTTTAACATTT	202-224	AUGUUA AAAACACU AUUAGCA CUAAUAGUGUUUUAACAUUU	7.2	6.3
	91	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	239-261	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAAUGUAAUUGCACUUUAUC	10.3	6.9
	92	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	259-281	AUUUUGUUACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAACAAAUUG	5.6	20.3
	93	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	312-334	UAUAGAGACACUCAUAAAGUC CUUUAUGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
	94	TGCGTAAACATTTCTCAATGATG	381-403	UCAUUGAGAAAUGUUACGCA CGUAAACAUUUCUCAAUGAUG	18.1	14.7
	95	GGCTAGCATAAAGAACTTTAAGT	463-485	UUAAGUUCUUUAUGCUAGCC CUAGCAUAAAGAACUUUAAGU	4.9	20.9
17	96	TGCCTAACATGCTTAGAATTATG	12-34	UAAUUCUAAGCAUGUUAGGCA CCUACAUGCUUAGAAUUAUG	6.9	11.6
	97	GCCTAACATGCTTAGAATTATGG	13-35	AUAAUUCUAAGCAUGUUAGGC CUACAUGCUUAGAAUUAUGG	6.9	13.5
	98	TGCTAATAGTGT TTTTAACATTT	202-224	AUGUUA AAAACACU AUUAGCA CUAAUAGUGUUUUAACAUUU	7.2	6.3
	99	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	239-261	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAAUGUAAUUGCACUUUAUC	10.3	6.9
	100	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	259-281	AUUUUGUUACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAACAAAUUG	5.6	20.3
	101	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	312-334	UAUAGAGACACUCAUAAAGUC CUUUAUGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
	102	TGCGTAAACATTTCTCAATGATG	381-403	UCAUUGAGAAAUGUUACGCA CGUAAACAUUUCUCAAUGAUG	18.1	14.7
	103	GGCTAGCATAAAGAACTTTAAGT	463-485	UUAAGUUCUUUAUGCUAGCC CUAGCAUAAAGAACUUUAAGU	4.9	20.9
18	104	TGCCTAACATGCTTAGAATTATG	12-34	UAAUUCUAAGCAUGUUAGGCA CCUACAUGCUUAGAAUUAUG	6.9	11.6

18	105	GCCTAACATGCTTAGAATTATGG	13-35	AUAAUUCUAAGCAUGUUAGGC CUAACAUUGC UUAGAAUUAUGG	6.9	13.5
	106	TGCTAATAGTGT TTTTAACATTT	202-224	AUGUUAAAAACACUUAUAGCA CUAAUAGUGUUUUUAACAUUU	7.2	6.3
	107	GCCAATGT TAATGCACTTTTATC	239-261	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAAUGUUA AUGCACUUUAUC	10.3	6.9
	108	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	259-281	AUUUUGUUACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAACAAAUUG	5.6	20.3
	109	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	312-334	UAUAGAGACACUCAAAAAGUC CUUU AUGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
	110	TGCGTAAACATTTCTCAATGATG	381-403	UCAUUGAGAAAUGUUUACGCA CGUAAACAUUUCUCAUGAUG	18.1	14.7
	111	GGCTAGCATAAAGAACTTTAAGT	463-485	UUAAAGUUCUUUAUGCUAGCC CUAGCAUAAAGAACUUUAAGU	4.9	20.9
19	112	TTGGAATGTAGTGC GTATAAAGA	37-59	UUUAUACGCACUACAUUCCAA GGAAUGUAGUGCGUAUAAAGA	8.5	16.1
	113	GCGTATAAAGATTGTACAAATGT	49-71	AUUUGUACAAUCUUUAUACGC GUAAUAAAGAUUGUACAAUUGU	14.7	-2.3
	114	ATGTTAAGTGACACACTTAAAAA	68-90	UUUAAGUGUGUCACUUAACAU GUUAAGUGACACACUUAAAAA	11.8	11.8
	115	TGGCTTTGAGTTGACATCTATGA	127-149	AUAGAUGUCAACUCAAGCCA GCUUUGAGUUGACAUCUAUGA	20.3	16.6
	116	ATGAAGTATTTTGTGAAAATAGG	146-168	UAUUUUCACAAAAUACUUCAU GAAGUAUUUUGUGAAAAUAGG	7.4	4.6
	117	TGGCATCATCTATTGGATTGTA	242-264	AAAUCCAUAUGAUGAUGCCA GCAUCAUUCUAUUGGAUUUGA	20.1	13.6
	118	TTGGATTGATTACGTCTATAAT	255-277	UAUAGACGUAUAUCAAUCCAA GGAUUUGAUUACGUCUAUAAU	20.9	16.3
	119	TGGATTGATTACGTCTATAATC	256-278	UUUAUAGACGUAUAUCAAUCCA GAUUUGAUUACGUCUAUAAUC	15.8	7.2
20	120	TTGGAATGTAGTGC GTATAAAGA	37-59	UUUAUACGCACUACAUUCCAA GGAAUGUAGUGCGUAUAAAGA	8.5	16.1
	121	GCGTATAAAGATTGTACAAATGT	49-71	AUUUGUACAAUCUUUAUACGC GUAAUAAAGAUUGUACAAUUGU	14.7	-2.3
	122	ATGTTAAGTGACACACTTAAAAA	68-90	UUUAAGUGUGUCACUUAACAU GUUAAGUGACACACUUAAAAA	11.8	11.8
	123	TGGCTTTGAGTTGACATCTATGA	127-149	AUAGAUGUCAACUCAAGCCA GCUUUGAGUUGACAUCUAUGA	20.3	16.6
	124	ATGAAGTATTTTGTGAAAATAGG	146-168	UAUUUUCACAAAAUACUUCAU GAAGUAUUUUGUGAAAAUAGG	7.4	4.6
	125	TGGCATCATCTATTGGATTGTA	242-264	AAAUCCAUAUGAUGAUGCCA GCAUCAUUCUAUUGGAUUUGA	20.1	13.6
	126	TTGGATTGATTACGTCTATAAT	255-277	UAUAGACGUAUAUCAAUCCAA GGAUUUGAUUACGUCUAUAAU	20.9	16.3
	127	TGGATTGATTACGTCTATAATC	256-278	UUUAUAGACGUAUAUCAAUCCA GAUUUGAUUACGUCUAUAAUC	15.8	7.2

21	128	TTGGAATGTAGTGCCTATAAAGA	37-59	UUUAUACGCACUACAUUCCAA GGAAUGUAGUGCGUAUAAAGA	8.5	16.1
	129	GCGTATAAAGATTGTACAAATGT	49-71	AUUUGUACAAUCUUUAUACGC GUAAUAAAGAUUGUACAAUUGU	14.7	-2.3
	130	ATGTTAAGTGACACACTTAAAA	68-90	UUUAAGUGUGUCACUUAACAU GUUAAGUGACACACUAAAAA	11.8	11.8
	131	TGGCTTTGAGTTGACATCTATGA	127-149	AUAGAUGUCAACUCAAGCCA GCUUUGAGUUGACAUCUAUGA	20.3	16.6
	132	ATGAAGTATTTTGTGAAAATAGG	146-168	UAUUUUCACAAAAUACUUCAU GAAGUAUUUUGUGAAAAUAGG	7.4	4.6
	133	TGGCATCATTCTATTGGATTGA	242-264	AAAUCCAUAUGAAUGAGCCA GCAUCAUUCUAUUGGAUUUGA	20.1	13.6
	134	TTGGATTGATTACGTCTATAAT	255-277	UAUAGACGUAAUCAAUCCAA GGAUUUGAUUACGUCUAUAAU	20.9	16.3
	135	TGGATTTGATTACGTCTATAATC	256-278	UUUAAGACGUAAUCAAUCCA GAUUUGAUUACGUCUAUAAUC	15.8	7.2
22	136	CCCTACTATAACTCAAATGAATC	31-53	UUCAUUUGAGUUAUAGUAGGG CUACUAUAACUCAAAUGAAUC	13.8	7.9
	137	ATGCCATTAGTGCAAAGAATAGA	60-82	UAUUCUUUGCACUAAUGGCAU GCCAUUAGUGCAAAGAAUAGA	5.3	17.4
	138	GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG	99-121	UAGUACUACAGAUAGAGACAC GUCUCUAUCUGUAGUACUAUG	18.8	20.2
	139	TAGTACTATGACCAATAGACAGT	112-134	UGUCUAUUGGUCUAGUACUA GUACUAUGACCAUAGACAGU	14.5	13.1
	140	GACCAATAGACAGTTTCATCAA	121-143	UGAUGAAACUGUCUAUUGGUC CCAAUAGACAGUUUCAUCAA	16.3	13.4
	141	ATCAAAAATTATTGAAATCAATA	138-160	UUGAUUUCAAUAAUUUUUGAU CAAAAAUUAUUGAAAUCAAUA	16.3	-12.0
	142	TGCCTAACATGCTTAGAATTATG	300-322	UAAUUCUAAGCAUGUAGGCA CCUACAUGCUUAGAAUUAUG	6.9	11.6
	143	GCCTAACATGCTTAGAATTATGG	301-323	AUAAUUCUAAGCAUGUAGGC CUACAUGCUUAGAAUUAUGG	6.9	13.5
	144	TGCTAATAGTGTTTTAAACATTT	490-512	AUGUUA AAAACACUAUUAGCA CUAAUAGUGUUUUUACA UUU	7.2	6.3
	145	GCCAA TGTTAATGCACTTTTATC	527-549	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAUGUUA AUGCACUUUUU AUC	10.3	6.9
	146	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	547-569	AUUUUGUUAACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAAACAAA UUG	5.6	20.3
	147	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	600-622	UAUAGAGACACUCAAAAAGUC CUUU AUGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
	148	TGCGTAAACATTTCTCAATGATG	669-691	UCAUUGAGAAAUGUUUACGCA CGUAAACAUUUCUCAAUGAUG	18.1	14.7
	149	GGCTAGCATAAAGAACTTTAAGT	751-773	UUAAAGUUCUUUAUGCUAGCC CUAGCAUAAAGAACUUUAAGU	4.9	20.9
23	150	TGCCTAACATGCTTAGAATTATG	70-92	UAAUUCUAAGCAUGUAGGCA CCUACAUGCUUAGAAUUAUG	6.9	11.6
	151	GCCTAACATGCTTAGAATTATGG	71-93	AUAAUUCUAAGCAUGUAGGC CUACAUGCUUAGAAUUAUGG	6.9	13.5
	152	TGCTAATAGTGTTTTAAACATTT	260-282	AUGUUA AAAACACUAUUAGCA CUAAUAGUGUUUUUACA UUU	7.2	6.3
	153	GCCAA TGTTAATGCACTTTTATC	297-319	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAUGUUA AUGCACUUUUU AUC	10.3	6.9
	154	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	317-339	AUUUUGUUAACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAAACAAA UUG	5.6	20.3
	155	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	370-392	UAUAGAGACACUCAAAAAGUC CUUU AUGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9

24	156	TGCCTAACATGCTTAGAATTATG	2-24	UAAUUCUAAGCAUGUUAGGCA CCUACAUGCUUAGAAUUAUG	6.9	11.6
	157	GCCTAACATGCTTAGAATTATGG	3-25	AUAAUUCUAAGCAUGUUAGGC CUACAUGCUUAGAAUUAUGG	6.9	13.5
	158	TGCTAATAGTGTTTTAAACATTT	192-214	AUGUAAAAACACUAAUAGCA CUAAUAGUGUUUUAACAUUU	7.2	6.3
	159	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	229-251	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC CAUGUUAUAGCACUUUAUC	10.3	6.9
	160	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	249-271	AUUUUGUUACCAUCAGUAGAU CUACUGAUGGUAACAAAUUG	5.6	20.3
	161	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	302-324	UAUAGAGACACUCAAAAAGUC CUUUUAGAGUGUCUCUAUAGA	20.2	8.9
	162	TGCGTAAACATTTCTCAATGATG	371-393	UCAUUGAGAAAUGUUACGCA CGUAAACAUUUCUCAUGAUG	18.1	14.7
	163	GGCTAGCATAAAGAACTTTAAGT	453-475	UUAAGUUCUUUAUGCUAGCC CUAGCAUAAAGAACUUUAAGU	4.9	20.9
25	164	ATGCACTTTTCGCATATACAAAA	50-72	UUGUAUAUGCGAAAAGUGCAU GCACUUUUCGCAUUAACAAAA	8.2	10.3
	165	CCCTACTATAACTCAAATGAATC	84-106	UUCAUUUGAGUUAUAGUAGGG CUACUAUAACUCAAAUGAAUC	13.8	7.9
	166	ATGCCATTAGTGCAAAGAATAGA	113-135	UAUUCUUUGCACUAAUGGCAU GCCAUUAGUGCAAAGAAUAGA	5.3	17.4
	167	GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG	152-174	UAGUACUACAGAUAGAGACAC GUCUCUAUCUGUAGUACUAUG	18.8	20.2
	168	TAGTACTATGACCAATAGACAGT	165-187	UGUCUAUUGGUCAUAGUACUA GUACUAUGACCAAUAGACAGU	14.5	13.1
	169	GACCAATAGACAGTTTCATCAAA	174-196	UGAUGAAACUGUCUAUUGGUC CCAAUAGACAGUUUCAUAAA	16.3	13.4
	170	ATCAAAAATTATTGAAATCAATA	191-213	UUGAUUUCAAUAUUUUUGAU CAAAAAUUUUGAAAUCAAUA	16.3	-12.0
	171	ATGCACTTTTCGCATATACAAAA	50-72	UUGUAUAUGCGAAAAGUGCAU GCACUUUUCGCAUUAACAAAA	8.2	10.3
26	172	CCCTACTATAACTCAAATGAATC	84-106	UUCAUUUGAGUUAUAGUAGGG CUACUAUAACUCAAAUGAAUC	13.8	7.9
	173	ATGCCATTAGTGCAAAGAATAGA	113-135	UAUUCUUUGCACUAAUGGCAU GCCAUUAGUGCAAAGAAUAGA	5.3	17.4
	174	GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG	152-174	UAGUACUACAGAUAGAGACAC GUCUCUAUCUGUAGUACUAUG	18.8	20.2
	175	TAGTACTATGACCAATAGACAGT	165-187	UGUCUAUUGGUCAUAGUACUA GUACUAUGACCAAUAGACAGU	14.5	13.1
	176	GACCAATAGACAGTTTCATCAAA	174-196	UGAUGAAACUGUCUAUUGGUC CCAAUAGACAGUUUCAUAAA	16.3	13.4
	177	ATCAAAAATTATTGAAATCAATA	191-213	UUGAUUUCAAUAUUUUUGAU CAAAAAUUUUGAAAUCAAUA	16.3	-12.0

[0105] 다음으로 상기 표 6에서 나타난 177개의 표적 서열 중에서, 서열 유사성 지수에 기초한 22개의 표적 그룹을 하기 표 7과 같이 나타내었다.

표 7

순번/ 서열번호	유전자 표적 그룹	포함하는 표적
1	GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG	1, 8, 15, 38, 45, 52, 138, 167, 174

2	GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA	59, 63, 67, 71, 75, 79, 85, 93, 101, 109, 147, 155, 161
3	TAGTACTATGACCAATAGACAGT	2, 9, 16, 39, 46, 53, 139, 168, 175
4	GACCAATAGACAGTTTCATCAAA	3, 10, 17, 40, 47, 54, 140, 169, 176
5	ATGAAGTATTTTGTGAAAATAGG	23, 31, 132, 124, 116
6	TTGGAATGTAGTGCATATAAAGA	19, 27, 112, 120, 128
7	GCGTATAAAGATTGTACAAATGT	20, 28, 113, 121, 129
8	TGCTAATAGTGTTTTAACATTT	106, 144, 158, 90, 98, 72, 76, 68, 152, 64, 82, 56, 60
9	ATCTACTGATGGTAACAAAATTG	58, 62, 66, 70, 74, 78, 84, 92, 100, 108, 146, 154, 160
10	ATCAAAAATTATTGAAATCAATA	170, 177, 141, 4, 11, 18, 41, 48, 55
11	ATGCCATTAGTGCAAAGAATAGA	7, 14, 37, 44, 51, 137, 166, 173
12	CCCTACTATAACTCAAATGAATC	6, 13, 36, 43, 50, 136, 165, 172
13	GGCTAGCATAAAGAACTTTAAGT	87, 95, 103, 111, 149, 163
14	ATGTAAAGTGACACACTTAAAAA	21, 29, 114, 122, 130
15	TGGCTTTGAGTTGACATCTATGA	22, 30, 115, 123, 131
16	TTGGATTGATTACGTCTATAAT	25, 33, 118, 126, 134
17	TGGCATCATTCTATTGGATTGA	24, 32, 117, 125, 133
18	TGCCTAACATGCTTAGAATTATG	80, 88, 96, 104, 156, 142, 150
19	GCCTAACATGCTTAGAATTATGG	81, 89, 97, 105, 143, 151, 157
20	TGCGTAAACATTCTCAATGATG	148, 162, 110, 102, 94, 86
21	ATGCACTTTTCGCATATACAAAA	5, 12, 35, 42, 49, 164, 171
22	GCCAATGTTAATGCACTTTTATC	145, 153, 159, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 83, 91, 99, 107

[0109] 또한 상기 표적 서열에 대응하는 siRNA 서열을 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

[0111]

컨센서스 표적 서열	가이드 서열		패신저 서열	
서열번호	서열번호	RNA 올리고 서열 21nt (5' → 3')	서열번호	RNA 올리고 서열 21nt (5' → 3')
1	23	UAGUACUACAGAUAGAGACAC	45	GUCUCUAUCUGUAGUACUAUG
2	24	UAUAGAGACACUCAUAAAGUC	46	CUUUAUGAGUGUCUCUAUAGA
3	25	UGUCUAUUGGUCAUAGUACUA	47	GUACUAUGACCAAUAGACAGU
4	26	UGAUGAAACUGUCUAUUGGUC	48	CCAAUAGACAGUUUCAUAAA
5	27	UAUUUUCACAAAACUUAUUAU	49	GAAGUAUUUUGUGAAAAUAGG
6	28	UUUAUACGCACUACAUUCCAA	50	GGAAUGUAGUGCGUAUAAAGA
7	29	AUUUGUACAAUCUUUAUACGC	51	GUAAAAAGAUUGUACAAUUGU
8	30	AUGUAAAAACACUAAUAGCA	52	CUAAUAGUGUUUUUAACAUUU
9	31	AUUUUGUUACCAUCAGUAGAU	53	CUACUGAUGGUAACAAAUUG
10	32	UUGAUUUCAAUAAUUUUGAU	54	CAAAAAUUAUUGAAUCAAUA
11	33	UAUUCUUUGCACUAAUGGCAU	55	GCCAUUAGUGCAAAGAAUAGA
12	34	UUCAUUUGAGUUAUAGUAGGG	56	CUACUAUAAACUAAAUGAAUC
13	35	UAAAAGUUCUUUUGCUAGCC	57	CUAGCAUAAAGAACUUUAAGU
14	36	UUUAAGUGUGUCACUUAACAU	58	GUUAAGUGACACACUAAAAA
15	37	AUAGAUGUCAACUAAAGCCA	59	GCUUUGAGUUGACAUUAUGA
16	38	UAUAGACGUAAUCAAUCCAA	60	GGAUUUGAUUACGUCUAUAU
17	39	AAAUCCAUAAGAUAUGCCA	61	GCAUCAUUCUAUUGGAUUUGA
18	40	UAAUUCUAAGCAUGUAGGCA	62	CCUAAACUGCUUAGAAUUAUG
19	41	AUAAUUCUAAGCAUGUAGGC	63	CUAAACUGCUUAGAAUUAUGG
20	42	UCAUUGAGAAAUGUUACGCA	64	CGUAAACAUUUCUAAUGAUG
21	43	UUGUAUAUGCGAAAGUGCAU	65	GCACUUUUCGCAUAUACAAA
22	44	UAAAAGUGCAUUAACAUUGGC	66	CAAUUUUUAUGCACUUUUAUC

[0113] 1-4. RNAXs를 이용한 잠재적인 siRNA 분자의 표적 특이적 설계 및 합의 표적 개시

[0114] 마찬가지로, 검색된 26개의 RdRp 유전자 서열을 RNAXs 프로그램에 입력하여 기능성 siRNA를 설계하고 관련 표적을 밝힌 결과, 총 78 개의 siRNA 분자가 생성되어, 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

[0116]

표적 유전자			유전자에 작용하는 표적 서열	siRNA 서열
순번	수탁번호	표적		
1	LC522350.1	1	TCTCTATCTGTAGTACTAT	AUAGUACUACAGAUAGAGA
		2	AGTAATTGGAACAAGCAAA	UUUGCUUGUCCAUAUACU
		3	AGACAGTTTCATCAAAAAT	AUUUUUGAUGAAACUGUCU
2	MN938385.1	4	GACAGTTTCATCAAAAATT	AAUUUUUGAUGAAACUGUC
		5	CCCTACTATAACTCAAATG	CAUUUGAGUUUAUAGUAGGG
		6	ACAGTTTCATCAAAAATTA	UAAUUUUUGAUGAAACUGU
3	MN938386.1	7	TCCCTACTATAACTCAAAT	AUUUGAGUUUAUAGUAGGGA
		8	AGACAGTTTCATCAAAAAT	AUUUUUGAUGAAACUGUCU
		9	GCATATACAAAACGTAATG	CAUUAACGUUUUGUAUAUGC
4	MN970003.1	10	TCCACTGCTTCAGACACTT	AAGUGUCUGAAGCAGUGGA
		11	TGACATCTATGAAGTATTT	AAAUACUUCAUAGAUGUCA
		12	GACATCTATGAAGTATTTT	AAAAUACUUCAUAGAUGUC
5	MN970004.1	13	TGACATCTATGAAGTATTT	AAAUACUUCAUAGAUGUCA
		14	TCCACTGCTTCAGACACTT	AAGUGUCUGAAGCAGUGGA
		15	AGGACTTCCTTGGAAATGTA	UACAUUCCAAGGAAGUCCU
6	MN975263.1	16	TCCCTACTATAACTCAAAT	AUUUGAGUUUAUAGUAGGGA
		17	CCCTACTATAACTCAAATG	CCCUACUAUAACUCAAAUG
		18	CGCATATACAAAACGTAAT	AUUACGUUUUGUAUAUGCG
7	MN975264.1	19	CAGTTTCATCAAAAATTAT	AAUUUUUGAUGAAACUGUC
		20	CAGTTTCATCAAAAATTAT	CAGUUUCAUAAAAUUUAU
		21	TCCCTACTATAACTCAAAT	AUUUGAGUUUAUAGUAGGGA
8	MN975265.1	22	TCCCTACTATAACTCAAAT	AUUUGAGUUUAUAGUAGGGA
		23	GCATATACAAAACGTAATG	CAUUAACGUUUUGUAUAUGC
		24	CGCATATACAAAACGTAAT	AUUACGUUUUGUAUAUGCG
9	MT042773.1	25	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUUGGCC
		26	GCCAATGTTAATGCACTTT	AAAGUGCAUUAACAUUGGC
		27	CGGTTCATATATGTTAAA	UUUAACAUUAAGUGAACCG
10	MT042774.1	28	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUUGGCC
		29	CACACCGTTTCTATAGATT	AAUCUAUAGAAACGGUGUG
		30	GCCAATGTTAATGCACTTT	AAAGUGCAUUAACAUUGGC
11	MT042775.1	31	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUUGGCC
		32	GCCAATGTTAATGCACTTT	AAAGUGCAUUAACAUUGGC
		33	CGGTTCATATATGTTAAA	UUUAACAUUAAGUGAACCG
12	MT042776.1	34	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUUGGCC
		35	GCCAATGTTAATGCACTTT	AAAGUGCAUUAACAUUGGC
		36	CGGTTCATATATGTTAAA	UUUAACAUUAAGUGAACCG
13	MT042777.1	37	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUUGGCC
		38	GCCAATGTTAATGCACTTT	AAAGUGCAUUAACAUUGGC
		39	CGGTTCATATATGTTAAA	UUUAACAUUAAGUGAACCG
14	MT042778.1	40	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUUGGCC
		41	CACACCGTTTCTATAGATT	AAUCUAUAGAAACGGUGUG
		42	GCCAATGTTAATGCACTTT	AAAGUGCAUUAACAUUGGC
15	MT050414.1	43	CAGTTCCTTTATTATCAAAA	UUUUGAUAAUAAAGAACUG
		44	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUUGGCC
		45	GCTTGTCACACCGTTTCTA	UAGAAACGGUGUGACAAGC

16	MT050415.1	46	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUGGCC
		47	GCTTGTCACACCGTTTCTA	UAGAAACGGUGUGACAAGC
		48	CCTAACATGCTTAGAATTA	UAAUUCUAAGCAUGUUAGG
17	MT050416.1	49	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUGGCC
		50	GCTTGTCACACCGTTTCTA	UAGAAACGGUGUGACAAGC
		51	TCAGTTCCTTTATTATCAAA	UUUGAUAAUAAAGAACUGA
18	MT050417.1	52	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUGGCC
		53	TCTTTATTATCAAAAACAAT	AUUGUUUUGAUAAUAAAGA
		54	GCTTGTCACACCGTTTCTA	UAGAAACGGUGUGACAAGC
19	MT066157.1	55	TGACATCTATGAAGTATTT	AAAUACUUCAUAGAUGUCA
		56	GACATCTATGAAGTATTT	AAAAUACUUCAUAGAUGUC
		57	TCCACTGCTTCAGACACTT	AAGUGUCUGAAGCAGUGGA
20	MT066158.1	58	GACATCTATGAAGTATTT	AAAAUACUUCAUAGAUGUC
		59	TCCACTGCTTCAGACACTT	AAGUGUCUGAAGCAGUGGA
		60	TGACATCTATGAAGTATTT	AAAUACUUCAUAGAUGUCA
21	MT066159.1	61	TGACATCTATGAAGTATTT	AAAUACUUCAUAGAUGUCA
		62	GACATCTATGAAGTATTT	AAAAUACUUCAUAGAUGUC
		63	TCCACTGCTTCAGACACTT	AAGUGUCUGAAGCAGUGGA
22	MT072668.1	64	TCCCTACTATAACTCAAAT	AUUUGAGUUUAUAGUAGGGA
		65	AGACAGTTTCATCAAAAAT	AUUUUUGAUGAAACUGUCU
		66	CGCATATACAAAACGTAA	AUUACGUUUUGUUAUUGCG
23	MT127116.1	67	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUGGCC
		68	GGATTATCCTAAATGTGAT	AUCACAUUAGGAUAAUCC
		69	GCCAATGTTAATGCACTTT	AAAGUGCAUUAACAUGGC
24	MT159778.1	70	CCTAACATGCTTAGAATTA	UAAUUCUAAGCAUGUUAGG
		71	GGCCAATGTTAATGCACTT	AAGUGCAUUAACAUGGCC
		72	GCTAGCATAAAGAACTTTA	UAAAGUUCUUUAUGCUAGC
25	MT232869.1	73	GACAGTTTCATCAAAAATT	AAUUUUUGAUGAAACUGUC
		74	CCCTACTATAACTCAAATG	CAUUUGAGUUUAUAGUAGGG
		75	ACAGTTTCATCAAAAATTA	UAAUUUUUGAUGAAACUGU
26	MT232870.1	76	CCCTACTATAACTCAAATG	CAUUUGAGUUUAUAGUAGGG
		77	AGACAGTTTCATCAAAAAT	AUUUUUGAUGAAACUGUCU
		78	GACAGTTTCATCAAAAATT	AAUUUUUGAUGAAACUGUC

[0118] 다음으로 상기 표 9에서 나타난 26개의 표적 서열 중에서, 서열 유사성 지수에 기초하여 26개의 표적 그룹을 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

순번	서열번호	컨센서스 표적 서열	포함하는 표적
A	67	GGCCAATGTTAATGCACTT	25, 28, 31, 34, 37, 40, 49, 67, 52, 44, 46, 71
B	68	GCCAATGTTAATGCACTTT	42, 69, 38, 35, 32, 30, 26
C	69	GCTAGCATAAAGAACTTTA	72, 59, 63, 10, 14
D	70	TCCACTGCTTCAGACACTT	57, 76, 17, 5, 64
E	71	CCCTACTATAACTCAAATG	74, 16, 21, 22, 11
F	72	TCCCTACTATAACTCAAAT	7, 62, 58, 12
G	73	GACATCTATGAAGTATTTT	56, 61, 13, 55
H	74	TGACATCTATGAAGTATTT	60, 41, 50, 54
I	75	CACACCGTTTCTATAGATT	29, 47, 36, 39
J	76	GCTTGTCACACCGTTTCTA	45, 33, 65, 77
K	77	CGGTTCATATATGTTAAA	27, 8, 78, 19
L	78	CAGTTCCTTTATTATCAAAA	43, 73, 24
M	79	TCAGTTCCTTTATTATCAAA	51, 75
N	80	TCTCTATCTGTAGTACTAT	1, 70

O	81	AGACAGTTTCATCAAAAAT	3, 66
P	82	GACAGTTTCATCAAAAATT	4, 23
Q	83	ACAGTTTCATCAAAAATTA	6
R	84	CAGTTTCATCAAAAATTAT	20
S	85	TCTTTATTATCAAAACAAT	53
T	86	AGTAATGGGAACAAGCAA	2
U	87	CCTAACATGCTTAGAATTA	48
V	88	AGGACTTCCTTGGGAATGTA	15
W	89	CGCATATACAAAACGTAAT	18
X	90	GCATATACAAAACGTAATG	9
Y	91	GGATTATCCTAAATGTGAT	68

[0121] 다음으로 상기 26개의 RdRp 유전자 서열에 대하여 RNAs 프로그램을 적용하여 총 78개의 siRNA 분자를 생성하였고, 이를 표 11에 나타내었다.

표 11

컨센서스 표적 서열		siRNA	
순번	서열번호	서열번호	서열
A	67	92	AAGUGCAUUAACAUUGGCC
B	68	93	AAAGUGCAUUAACAUUGGC
C	69	94	UAAAGUUCUUUAUGCUAGC
D	70	95	AAGUGUCUGAAGCAGUGGA
E	71	96	CAUUUGAGUUUAAGUAGGG
F	72	97	AUUUGAGUUUAAGUAGGGA
G	73	98	AAAAUACUUCAUAGAUGUC
H	74	99	AAUACUUCAUAGAUGUCA
I	75	100	AAUCUUAAGAAACGGUGUG
J	76	101	UAGAAACGGUGUGACAAGC
K	77	102	UUUAAACAUUAAGUAACCG
L	78	103	UUUUGAUAAUAAAGAACUG
M	79	104	UUUGAUAAUAAAGAACUGA
N	80	105	AUAGUACUACAGAUAGAGA
O	81	106	AUUUUUGAUGAAACUGUCU
P	82	107	AAUUUUUGAUGAAACUGUC
Q	83	108	UAAUUUUUGAUGAAACUGU
R	84	109	CAGUUUCAUAAAAUUUAU
S	85	110	AUUGUUUUGAUAAUAAAGA
T	86	111	UUUGCUUGUCCAAUUACU
U	87	112	UAAUUCUAAGCAUGUUAGG
V	88	113	UACAUUCCAAGGAAGUCCU
W	89	114	AUUACGUUUUGUAUAGCG
X	90	115	CAUUCGUUUUGUAUAGC
Y	91	116	AUCACAUUAGGAUAAUCC

[0125] 1-5. 표적 및 표적 외 유사성 분석

[0126] 상기 컨센서스 표적(즉, siDirect 2.0에서 22개의 컨센서스 표적 및 RNAs 웹 서버에서 25개의 컨센서스 표적)을 NCBI-BLAST에 적용하여 전체 인간 게놈에 대한 유사성을 검색하여, 일치되지 않음을 확인하였다. 따라서, 상기 표적은 표적 외 뉴클레오타이드 침묵에 대한 가능성을 배제할 수 있음을 확인하였다.

[0128] 1-6. 컨센서스 표적 서열의 공통 부분을 결정하기 위한 다중 서열 정렬

[0129] 다음으로, siDirect 2.0 및 RNAxs 웹 서버에서 얻은 컨센서스 표적 서열의 공통 부분을 확인하기 위하여 다중 서열 정렬을 시행하여 하기 표 12에 나타내었다.

표 12

[0131]	컨센서스 표적 서열 순번	다중 서열 정렬
	12	-----CCCTACTATAACTCAAATGAATC-
	E	-----CCCTACTATAACTCAAATG-----
	F	-----TCCCTACTATAACTCAAAT-----
	19	-----GCCTAACATGCTTAGAATTATGG-
	U	-----CCTAACATGCTTAGAATTA-----
	18	-----TGCCTAACATGCTTAGAATTATG--
	3	----TAGTACTATGACCAATAGACAGT----
	T	-----AGTAATTGGAACAAGCAAA-----
	13	---ATGTTAAGTGACACACTTAAAA-----
	O	-----AGACAGTTTCATCAAAAAAT-----
	P	-----GACAGTTTCATCAAAAAATT-----
	Q	-----ACAGTTTCATCAAAAAATTA-----
	R	-----CAGTTTCATCAAAAAATTAT-----
	4	-GACCAATAGACAGTTTCATCAAA-----
	8	-----TGCTAATAGTGTTTTAAACATTT-----
	D	-----TCCACTGCTTCAGACACTT-----
	13	-----GGCTAGCATAAAGAAGCTTTAAGT-
	C	-----GCTAGCATAAAGAAGCTTTA-----
	22	-----GCCAATGTTAATGCACCTTTTATC-
	B	-----GCCAATGTTAATGCACCTTT-----
	A	-----GGCCAATGTTAATGCACCTT-----
	9	-----ATCTACTGATGGTAACAAAATTG--
	G	-----GACATCTATGAAGTATTTT-----
	H	-----TGACATCTATGAAGTATTT-----
	5	-----ATGAAGTATTTGTGAAAAATAGG--
	10	-----ATCAAAAATTATTGAAATCAATA--
	V	-----AGGACTTCCTTGGAAATGTA-----
	17	-----TGGCATCATCTATTGGATTGA-----
	Y	-----GGATTATCCTAAATGTGAT-----
	W	-----CGCATATACAAAACGTAAT-----
	X	-----GCATATACAAAACGTAATG-----
	21	ATGCACTTTTCGCATATACAAAA-----
	7	-----GCGTATAAAGATTGTACAAATGT-
	20	-----TGCGTAAACATTTCTCAATGATG-
	1	-----GTGTCTCTATCTGTAGTACTATG
	N	-----TCTCTATCTGTAGTACTAT--
	K	-----CGGTTCACTATATGTTAAA-----
	I	-----CACACCGTTTCTATAGATT-
	J	-----GCTTGTCACACCGTTTCTA-----
	2	-----GACTTTATGAGTGTCTCTATAGA--
	15	-----TGGCTTTGAGTTGACATCTATGA--
	16	-----TTGGATTGATTACGTCTATAAT--
	6	-----TTGGAATGTAGTGGGTATAAAGA-
	14	-----ATGTTAAGTGACACACTTAAAA--
	L	-----CGGTTCACTATATGTTAAA-----
	M	-----TCAGTCTTATTATCAAA-----
	S	-----TCTTTATTATCAAAACAAT--

[0133] 상기 표 12에서 나타난 바와 같이, 다중 서열 정렬을 시행한 결과 6개의 표적 유전자 서열이 siDirect 2.0 및 RNAs에서 공통점을 가지는 것을 확인하였다.

[0135] 실시예 2. siRNA 정제를 위한 매개변수 확인

[0137] siRNA 정제를 위한 매개변수를 확인하였다. NCBI 데이터베이스의 표준 뉴클레오타이드 BLAST는 임의의 비-표적 (off-target) 뉴클레오타이드 서열 유사성을 검출하기 위해, 예상 임계 값 10을 적용하여 전체 GenBank 데이터 베이스에 대해 사용되었다. GC 계산기는 선택한 siRNA 서열의 GC 함량을 계산하는 데 사용되었다. siRNA 가이드 가닥의 2차 구조 예측은 siRNA의 효능을 결정하기 위한 필수 매개 변수로 간주되었다. siRNA의 2차 구조는 RNA-RNA 간 접힘 자유 에너지 및 예측된 가이드 siRNA와 표적 유전자 간의 열역학적 상호 작용을 분석하는 데에도 사용되었다. 구체적으로는 RNA 또는 DNA의 두 서열을 가장 낮은 하이브리드 자유 에너지 형태로 접은 후, 컨센 서스 siRNA 표적 가닥에 대한 열 용량 및 농도 플롯을 생성하였다.

[0139] 2-1. siRNA GC 함량 계산

[0140] RNAi 활성을 높이기 위하여 GC 함량이 낮은 siRNA 서열을 선택하였다. 앞서 얻은 컨센서스 표적 서열 중 siDirect 2.0 및 RNAs 모두에 공통되는 서열에 대하여 GC 계산기 프로그램을 사용한 결과를 하기 표 13에 나타 내었다.

표 13

[0142]	컨센서스 표적 서열 (서열번호)	37 °C에서 예측된 21 nt 가이드/패신저 이합체	GC (%)	접힘 ΔG (kcal/mol)	결합 ΔG (kcal/mol)	TmCp (°C)	TmConc. (°C)
	1	서열번호 23/서열번호 45	38.09	0.1	-35.2	79.3	80.6
	12	서열번호 34/서열번호 56	30.95	-	-32.0	72.6	73.8
	13	서열번호 35/서열번호 57	30.95	-	-31.8	73.7	75.1
	18	서열번호 40/서열번호 62	33.33	-1.4	-32.5	76.2	77.4
	19	서열번호 41/서열번호 63	33.33	-1.4	-32.1	74.1	75.3
	22	서열번호 44/서열번호 66	33.33	-0.4	-31.6	79.2	80.5

[0144] 상기 표 13에서 나타난 것처럼, 컨센서스 표적 서열 1, 18, 19, 22에 대해 선택된 siRNA의 GC 함량은 31.6% 내 지 57.9% 범위인 것으로 확인되었다.

[0146] 2-2. siRNA 가이드 가닥의 2차 구조 결정

[0147] siRNA 가이드 가닥의 가능한 접힘과 최소 자유 에너지(MFE)는 온라인 RNA 구조 웹 서버를 사용하여 계산되었으 며, 접힘 자유 에너지가 양의 값을 가지는 siRNA가 표적에 대해 더 많은 유전자 침묵을 촉진하는 것을 가능하게 할 수 있습니다. RNA 구조 웹 서버는 최소 자유 에너지 상태 계산 검색을 기반으로 RNA 이차 구조 예측에 가장 일반적으로 사용되는 알고리즘을 따라, siRNA 가이드 가닥의 효과적인 최저 접힘 자유 에너지 구조를 탐색하여, 그 결과를 도 2 및 상기 표 13에 나타내었다.

[0148] 도 2 및 상기 표 13에서 나타난 것처럼, 컨센서스 표적 서열 1(서열번호 1)에 대한 siRNA 서열인 서열번호 23의 가이드 가닥 분자만이 0.1 kcal/mol로 양의 접힘 자유 에너지를 가지는 반면, 다른 siRNA 가이드 가닥 분자의 경우 0 kcal/mol 미만의 접힘 자유 에너지를 가지는 것으로 확인되었다.

[0150] 2-3. RNA-RNA 상호 작용 분석

[0151] siRNA의 효율성을 확인하기 위하여 각 mRNA 표적에 대한 결합 자유 에너지를 확인하였다. 구체적으로는, siRNA와 표적의 RNA-RNA 상호 작용의 열역학을 RNA 구조 웹 서버의 도움으로 예측하여 도 3 및 상기 표 13에 나타내었다.

[0152] 도 3 및 상기 표 13에 나타난 것과 같이, 컨센서스 표적 서열들(서열번호 1, 12, 13, 18, 19 및 22)에 대한 siRNA의 결합 자유 에너지는 -35.2 kcal/mol, -32.0 kcal/mol, -31.8 kcal/mol, -32.5 kcal/mol, -32.1 kcal/mol 및 -31.6 kcal/mol으로 나타났다. 최적의 자유 에너지는 뉴클레오타이드 가닥의 의도된 표적 부위에만 siRNA 결합을 선호하므로, 최적의 결합 자유 에너지인 -35.2 kcal/mol를 갖는 컨센서스 표적 서열 1(서열번호 1)에 작용하는 siRNA인 서열번호 23의 가이드 가닥(이하, 컨센서스 표적 서열 1 siRNA) 및 서열번호 45의 패시저 가닥의 경우 다른 siRNA보다 표적 부위가 더 유리하게 결합하는 것을 확인하였다.

[0154] 2-4. 열 용량 및 이중 농도 플롯 결정

[0155] DINAMelt 웹 서버를 통하여 하이브리드 핵산 쌍의 용융 온도를 추정하고 전체 평형의 용융 프로파일을 결정하기 위하여, 컨센서스 표적 서열 1 siRNA 및 컨센서스 표적 서열 11 siRNA의 온도 함수로서 양상불 열 용량(Cp) 및 용융 온도(Tm)를 확인한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0156] 도 4에서 나타난 것처럼, 포괄적인 열 용량 그래프는 양상불 열 용량 내 각 siRNA 종의 관련성을 보여주었다. 용융 온도에서 표시된 농도(TmConc.) 범위에서, 용융 온도(Tm)는 최대 값의 절반인 이중 가닥 분자의 농도로 정의되었다. 더 높은 열 용량 및 이합체 농도 표시값은 매우 효과적인 siRNA 종을 나타내었다. 상기 표 13에서와 같이, 컨센서스 표적 서열 1(서열번호 1)에 대한 siRNA는 선택된 모든 siRNA 중에서 가장 높은 용융 온도에서의 열 용량(TmCp)을 나타냈고, 용융 온도에서의 농도(TmConc.) 역시 각각 79.3℃ 및 80.6℃로 가장 높은 것으로 나타났다.

[0158] **실시예 3. siRNA 분자의 효과 검증**

[0160] 3-1. 예측되는 siRNA 분자 검증

[0161] 예측되는 siRNA 분자를 SVM(support vector machine) 알고리즘 기반으로 검증하였다. 상기 알고리즘을 위한 서버를 이용하여 21 및 19 mer siRNA 서열의 쿼리에 대한 실제 효과를 예측하였다. 본 발명에서 컨센서스 표적 서열 1 siRNA의 효능은 이진 패턴을 사용하였고, 2182 siRNA 유형으로 구성된 주요 21 mer 데이터 세트에 대해 균질한 실험 조건 하에서 평가되었다.

[0162] 컨센서스 표적 서열 1(서열번호 1)에 대한 siRNA인 서열번호 23의 가이드 가닥 및 서열번호 45의 패시저 가닥은 siRNA GC 함량, siRNA 가이드 가닥의 2차 구조 결정, 가이드-표적 상호 작용, 열용량 등의 매개 변수의 분석에서 관찰된 결과 효율적인 분자로 확인되었다. 이에 더하여 컨센서스 표적 서열 1 siRNA 분자 추가 검증용 siRNAPred 웹 서버를 사용하기 위하여, 높은 siRNAPred 점수를 기반으로 높은 정확도로 10 개의 최상위 siRNA를 전달하였다. 여기서 siRNAPred 알고리즘 점수가 1.0 이상일 경우, siRNA가 매우 높은 효능을 가질 것으로 예측되고, 상기 점수가 0.8-0.9 범위일 경우 siRNA가 높은 효능을 가질 것으로 예측되며, 0.7-0.8 범위일 경우 siRNA가 중간 정도의 효능을 가질 것으로 예측되는데, 상기 siRNA 분자에 대해서는 0.857의 예측 점수가 확인되어, 고효율의 siRNA임을 확인하였다.

[0164] 3-2. 표적 mRNA 내 siRNA 표적 부위 접근성 예측

[0165] 다음으로 siRNA 매개 유전자 침묵의 효능을 확인하기 위하여, 표적 mRNA 내 siRNA의 표적 부위 접근성을 평가하였다. 구체적으로는, siRNA 모듈이 Sfold 웹 서버 내부에서 특정 siRNA 분자에 대한 표적 부위 접근성을 결정하기 위해 채택되었다. siRNA 모듈 내의 알고리즘은 표적 mRNA를 입력 서열로 간주하고 확률 프로파일, 루프 특정 프로파일 및 siRNA 내부 안정성과 같은 다른 중요한 매개 변수를 사용하여, 특정 siRNA에 대한 mRNA 내부 표적 부위의 명확한 목표 위치에 대한 접근성을 평가하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

- [0166] 이때 단일 RdRp유전자(수탁 번호 LC522350.1)는 분석 목적으로 무작위로 선택되었으며, 선택된 유전자의 mRNA 서열은 표준 BioModels 전사 및 번역 도구를 사용하여 달성되었다. 상기 LC522350.1 RdRp 유전자 서열은 siRNA 부착 부위가 15번과 37번 위치에 있는 것이다.
- [0167] 도 5에 나타난 것처럼, 컨센서스 표적 서열 1의 해당 특정 영역에 대한 상기 siRNA의 결합을 정확하게 예측하였다. 구체적으로는 도 5A에 나타난 것처럼, 컨센서스 표적 서열 1의 표적 부위 가용성에 대한 확률 프로파일은 siRNA 결합에 대해 고도로 접근 가능한 mRNA 내 15와 33 사이의 위치인 것을 분명히 입증하였다. 또한, 루프 특정 확률 프로파일은 표적 결합 부위의 접힘 패턴을 보이는 표적 부위 접근성을 평가하기 위하여 중요한데, 도 5B의 팽창 고리(Bplot), 도 5C의 헤어핀 고리(Hplot), 도 5D의 내부 고리(Iplot) 및 도 5E의 다중 분기 고리(Mplot)와 같이 컨센서스 표적 서열 1에 대한 siRNA 표적 부위 접근성에 대한 루프 특정 확률 프로파일은 다양한 접힘 패턴을 보여주었다. 따라서 헤어핀, 팽창 및 다중 분기 고리/접힘 팽창에 참여하지 않은 상기 siRNA와 컨센서스 표적 서열 1의 15 내지 33 mRNA 사이에서 결합하는 것을 확인하였고, 결합한 부위인 것을 확인하였다. 또한, 표적 서열의 내부 고리(Watson-Crick 염기 쌍이 없기 때문에 이중 가닥 RNA 분리)가 형성되는 것 역시 상기 사실을 지지한다.
- [0168] 또한 도 5F와 같이, 특정 표적 부위에 대한 siRNA의 내부 안정성도 Sfold 웹 서버의 Srna 알고리즘을 사용하여 계산되었다. 그 결과 컨센서스 표적 서열 1 siRNA의 안티센스 가닥의 자유 에너지는 $-6.5 \sim -9.5$ kcal/mol(-10 kcal/mol 이내) 범위였으며, 이는 상기 siRNA가 효과적임을 확인한 것이다.

[0170] 3-3. RNA 모델링 및 상호 작용 패턴 분석

- [0171] RNA 모델링 및 상호 작용 패턴을 분석을 수행하여, 설계된 siRNA의 RdRp 유전자의 전사 후 유전자 침묵 현상(post-transcriptional gene silencing; PTGS) 메커니즘을 도 6에 나타내었다. RNAi-매개 바이러스 유전자 침묵과 관련된 적합한 항 바이러스 반응의 촉발은 RISC 복합체 내에서 가이드 siRNA 및 표적 mRNA와 함께 siRNA 이합체(주로 가이드 가닥)과 RISC 복합체 간 적절한 상호 작용과 관련되어 있다. 이때 상호 작용 패턴 분석을 위해 가이드 가닥인 siRNA와 argonaute 단백질 사이에 컴퓨터 지원 분자 도킹 및 분자역학(MD) 시뮬레이션이 사용되었다. 가이드 siRNA의 3D 모델 구조(PDB 파일)는 직관적인 분자 편집기 및 시각화 도구, 즉 Avogadro 1.2.0 소프트웨어 프로그램에 의해 생성되었다. 그 다음에는 동일한 프로그램을 사용하여 UFF(Universal Force Field) 및 분자역학(300K)으로 구조 최적화가 이어졌다. 인간 argonaute 단백질의 X-선 결정 구조는 RCSB 단백질 데이터 은행(PDB ID: 4F3T)에서 검색되었다.

[0173] 3-4. 가이드 siRNA 및 argonaute 단백질의 분자 도킹 및 분자역학(MD) 시뮬레이션

- [0174] 가이드 siRNA 및 argonaute 단백질 간의 분자 도킹은 HDock 서버를 사용하여 수행되었다. 상기 서버는 계층적 FFT(Fast Fourier Transform) 관련 도킹 프로그램인 HDock(HDock 알고리즘) 라이트 프로그램을 사용하는 것이고, 상기 알고리즘은 무료 도킹 및 템플릿 기반 모델링을 사용하고 높은 효율성과 견고성을 보여주는 하이브리드 도킹 알고리즘이다. 단백질-siRNA 복합체의 2D 표현 및 분석은 UCSF Chimera 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 최고의 모델은 가이드 siRNA 및 argonaute 단백질 도킹 모델 중 상위 10개에서 선택되었다. 선택한 모델은 도 7에서와 같이 두 가지 결과를 보여주었다.
- [0175] 다음으로 복합체에서 siRNA-argonaute 도킹 복합체의 내구성을 확인하기 위해, 분자역학(MD) 시뮬레이션을 사용하여 siRNA-argonaute 및 도킹된 단백질-siRNA 복합체의 원자와 분자의 물리적 움직임을 검사한 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다. 구체적으로는, 분자역학(MD) 시뮬레이션 시 에너지 구성 요소, 밀도, 압력, 부피, 온도 및 시스템 내 도킹된 복합체의 안정성을 조사하였다. 다음으로 원하는 단백질-단백질 복합체의 구조적 안정성은 초기 형태와 관련하여 단백질 백본 및 도킹된 구조의 모든 측쇄 잔기의 제곱 평균 제곱근 편차(Root Mean Square Deviation; RMSD) 및 제곱 평균 제곱근 편차(Root Mean Square Fluctuation; RMSF)의 변화를 통해 평가되었다. 복합체는 NAMD 2.14 소프트웨어에 내장된 CHARMM force-field 매개 변수를 사용하여 에너지를 최소화하였다. RMSF는 argonaute로 도킹된 siRNA에 대해서도 계산된 모든 잔기에 대한 RMSD의 시간의 평균으로 도출되었다. 이때 도킹 분자의 2000프레임(2000ps) 궤도 실행이 생성되었다. RMSF는 C α 원자에 대해 계산되었으며 RMSD에서는 전체 복합체가 C α 의 백본에 대해 선택되었다. 평가를 위해, 분자역학(MD) 시뮬레이션 동안 가이드 siRNA-표적 단백질 잔류물 유연성, 분자의 모든 잔류물의 RMSF 및 RMSD는 200프레임 단계 시뮬레이션 실행(200ps = 2ns)에서 계산되었다.

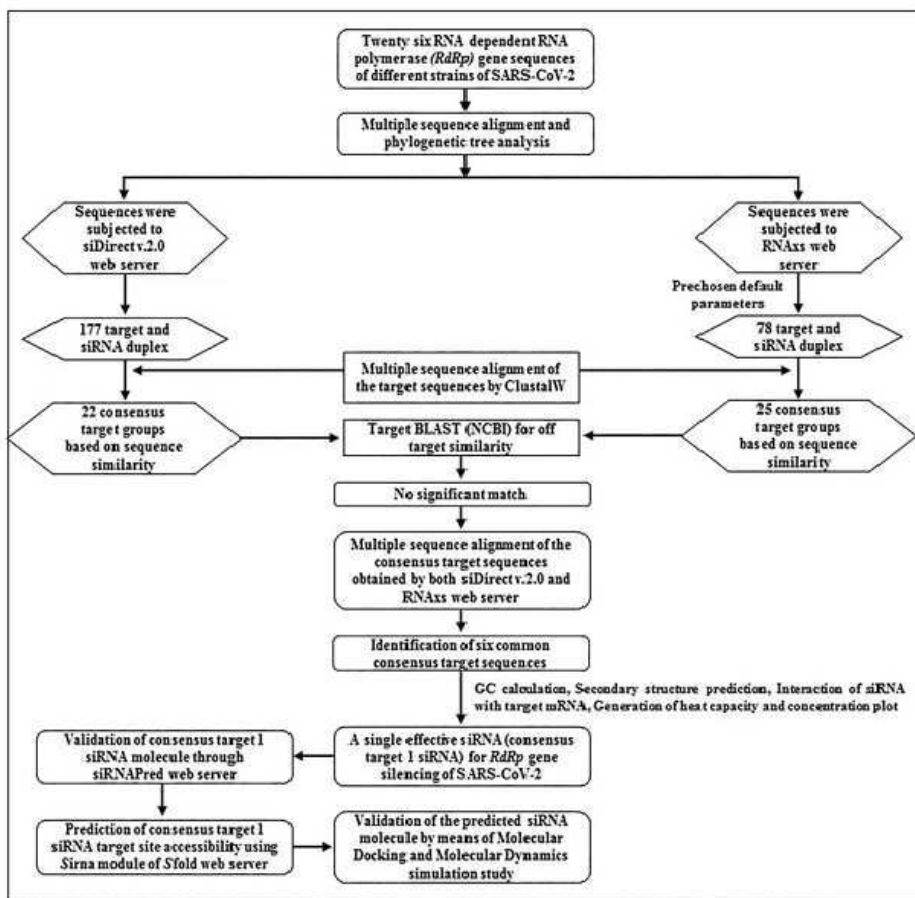
[0176] 도 7에서 나타난 것처럼, 도킹 점수(최소 자유 에너지)는 -344.12로, 리간드 RMSD는 94.65 옹스트롬으로 관찰되었다. 그 후, 가장 낮은 에너지 구조를 갖는 siRNA-argonaute 도킹 복합체가 분자역학(MD) 시뮬레이션 연구를 위해 선택되었다.

[0177] 도 8에서 나타난 것처럼, 복합체는 시뮬레이션 내내 거의 안정적이었다. 또한 도 9에서 나타난 것처럼, 0-1400 원자를 제외한 가이드-표적 잔류물 변동의 값은 안정적인 형태를 형성하였다.

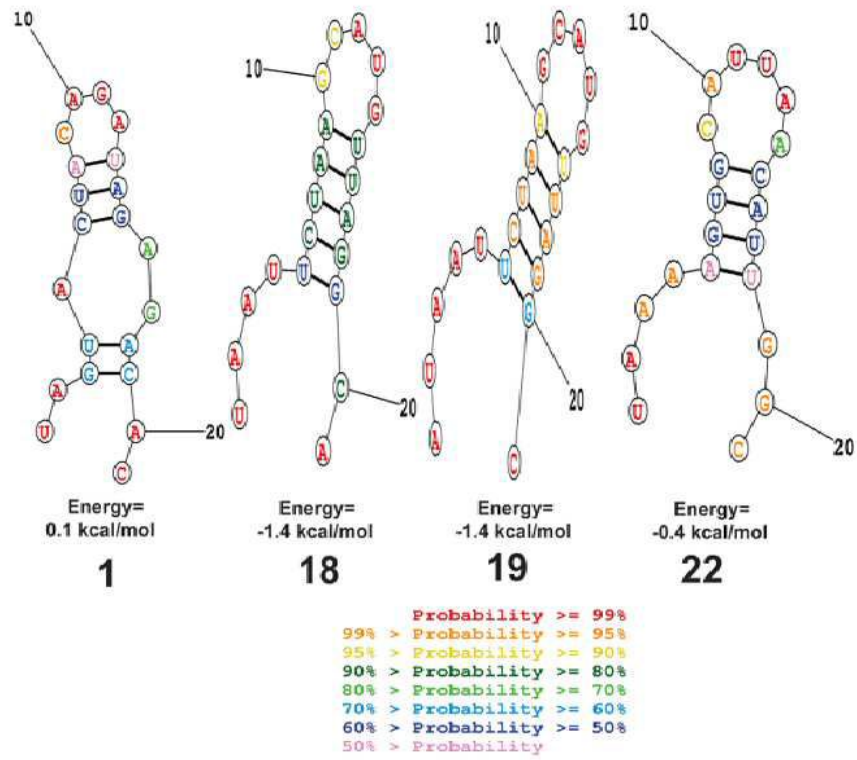
[0179] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

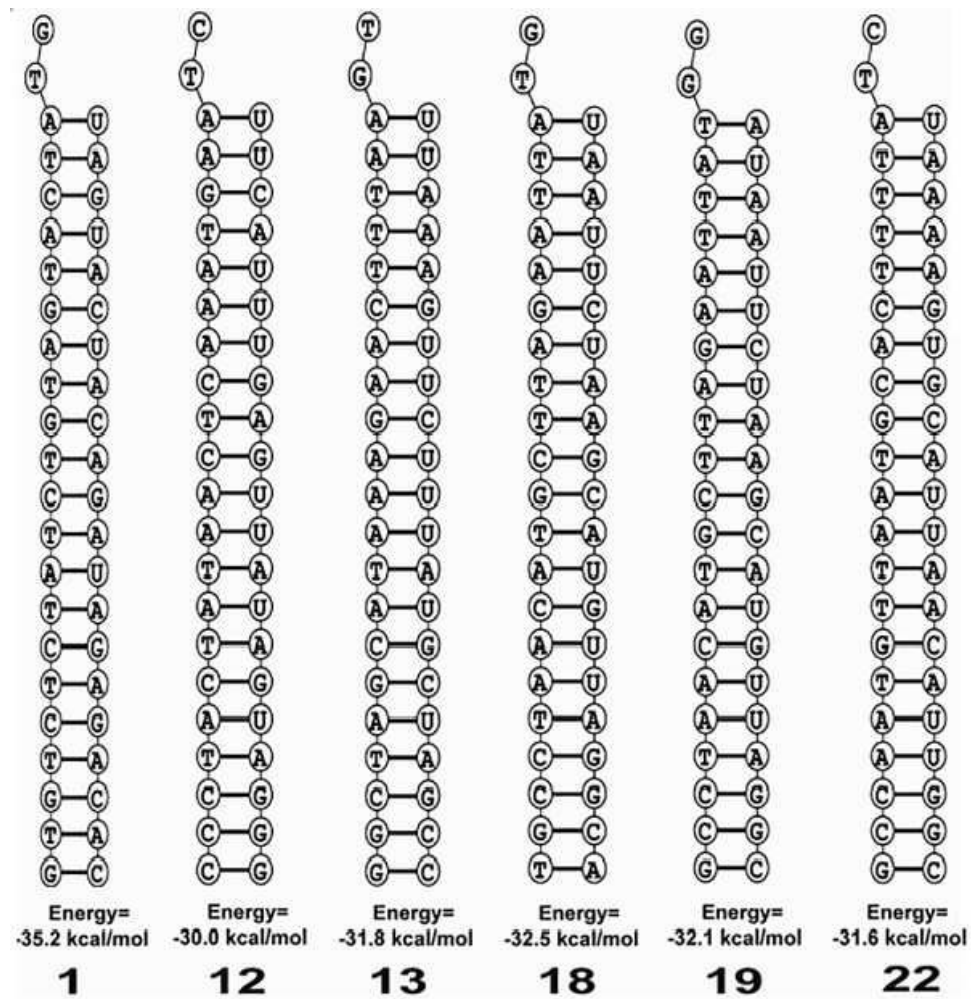
도면1



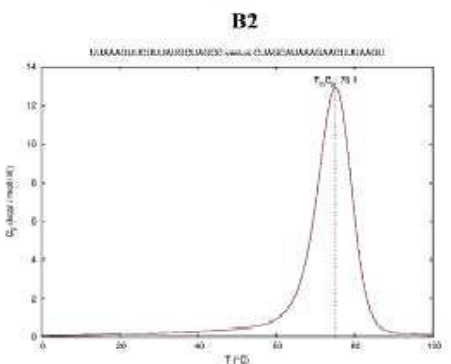
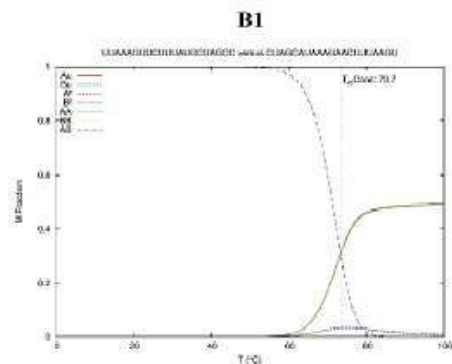
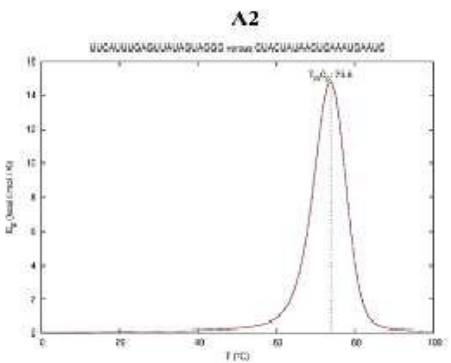
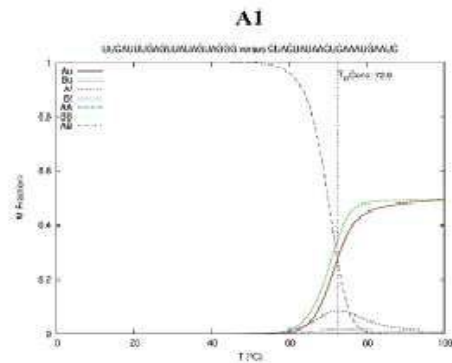
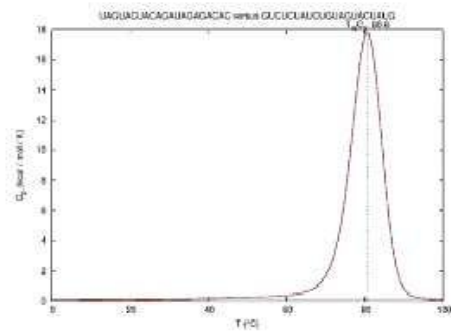
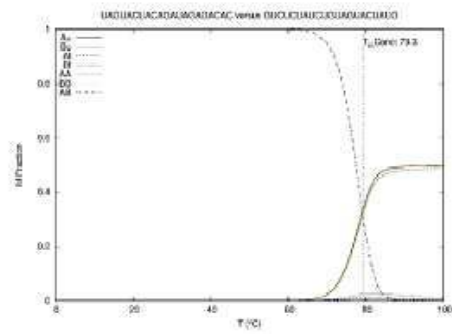
도면2



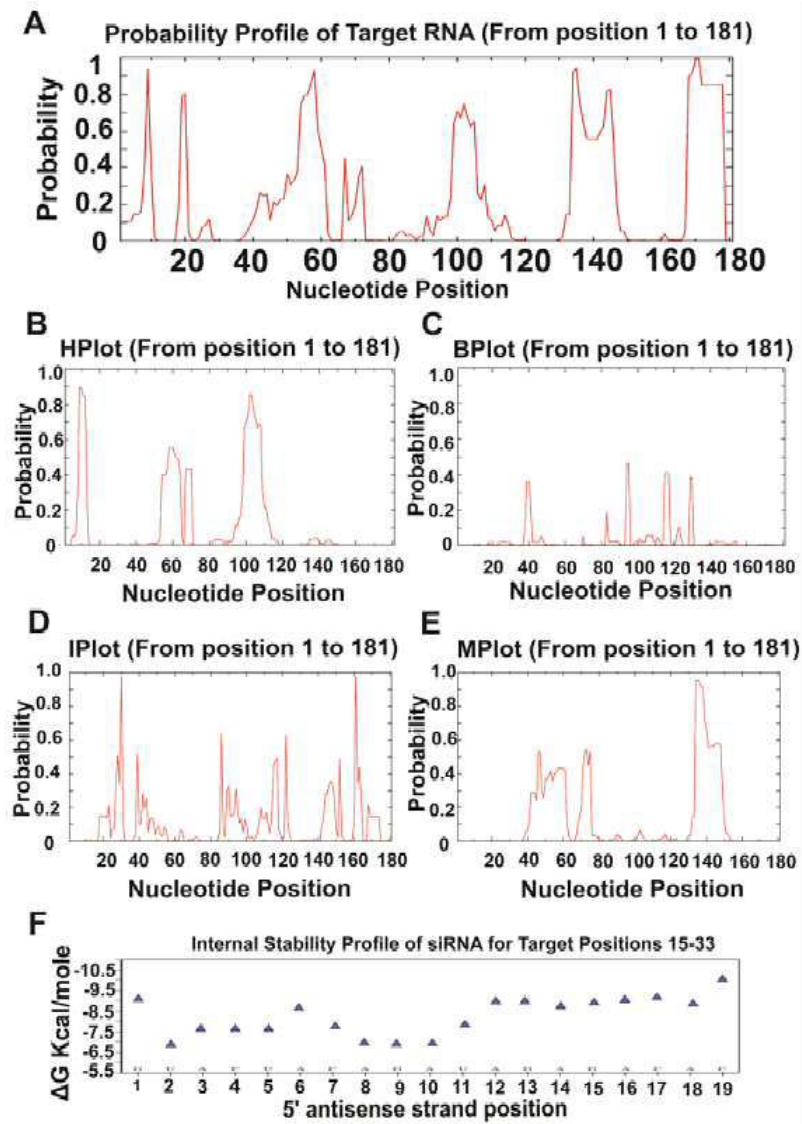
도면3



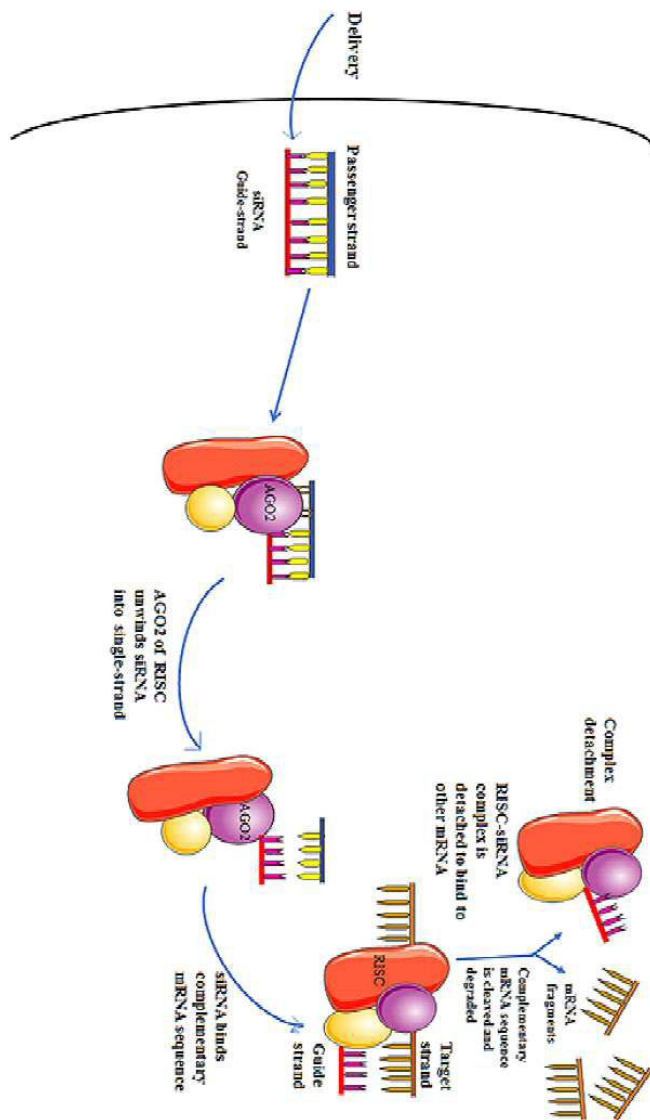
도면4



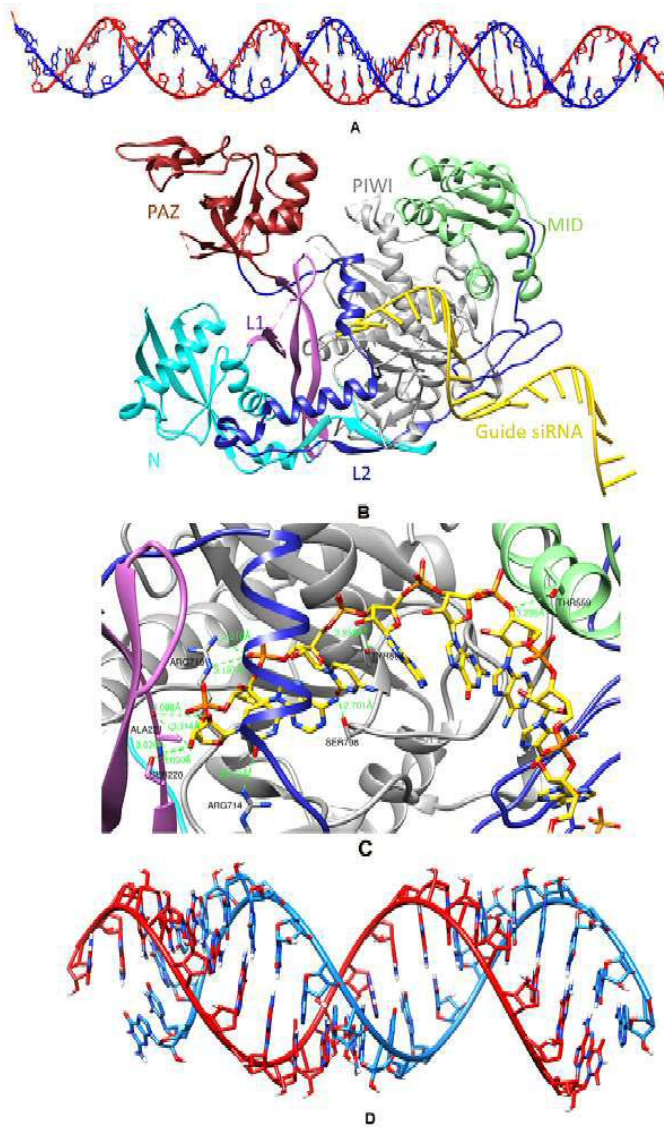
도면5



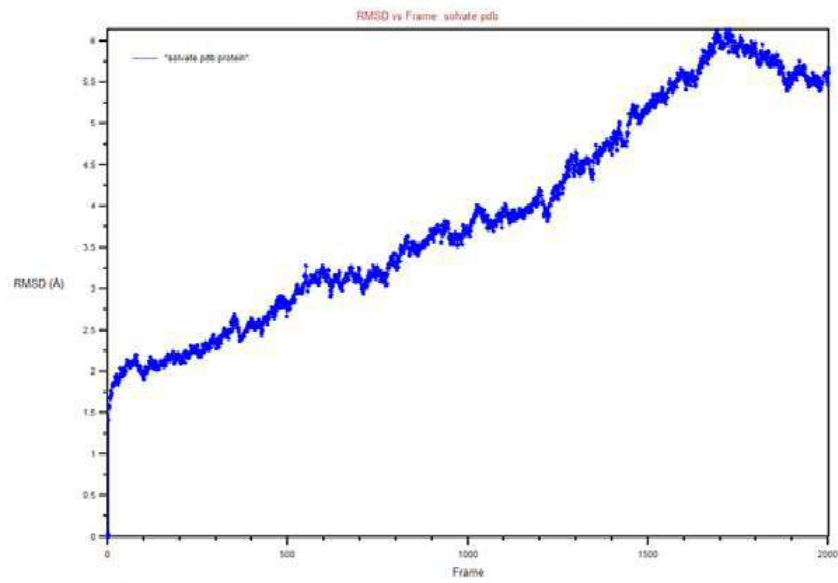
도면6



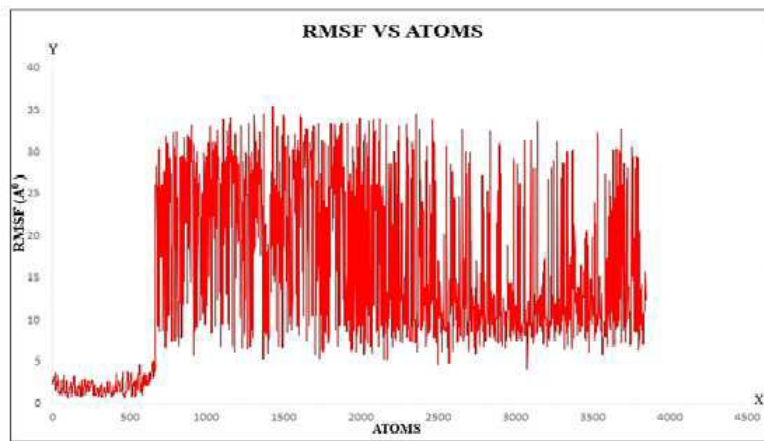
도면7



도면8

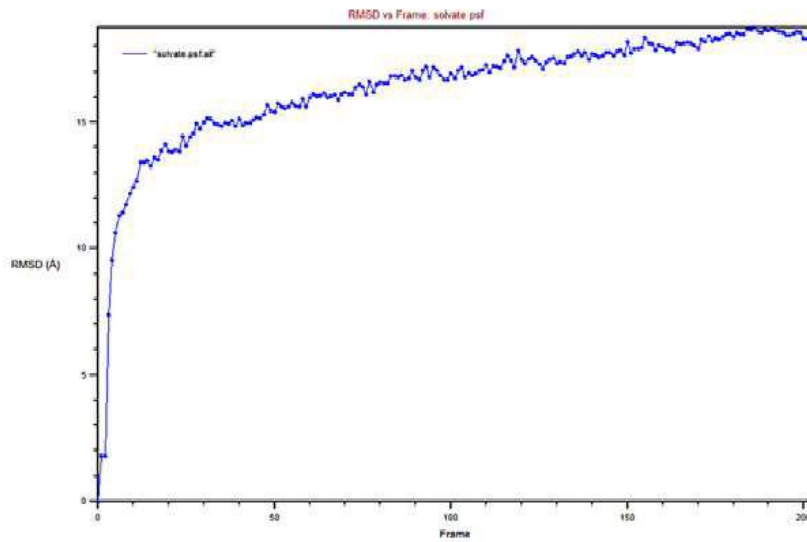


A

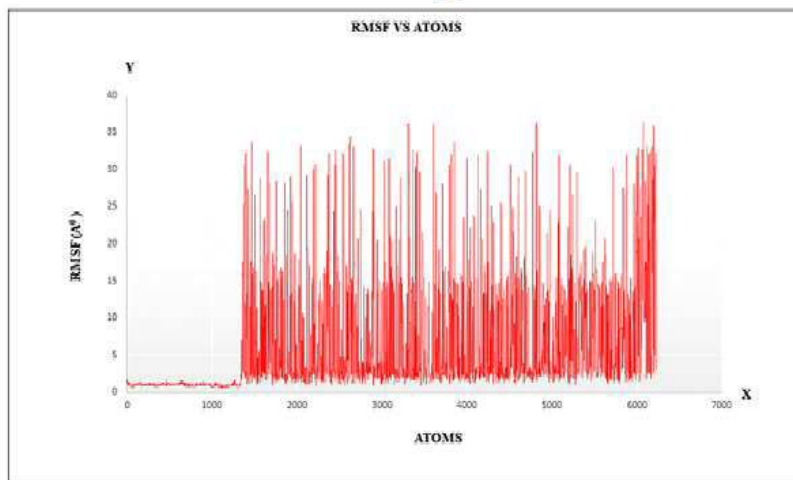


B

도면9



A



B

서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION HALLYM UNIVERSITY
- <120> Composition for preventing or treating coronavirus infection
- <130> P212120
- <160> 118
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
- <400> 1

gtgtctctat ctgtagtact atg 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 2

gactttatga gtgtctctat aga 23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 3

tagtactatg accaataagac agt 23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 4

gaccaataga cagtttcac aa 23

<210> 5

<211>

> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 5

atgaagtatt ttgtgaaaat agg 23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 6

ttggaatgta gtgcgtataa aga 23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 7

gcgtataaag attgtacaaa tgt 23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 8

tgctaatagt gtttttaaca ttt 23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 9

atctactgat ggtaacaaaa ttg 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 10

atcaaaaatt attgaaatca ata 23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 11
 atgccattag tgcaaagaat aga 23
 <210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 12
 ccctactata actcaaata atc 23
 <210> 13

 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 13
 ggctagcata aagaacttta agt 23
 <210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 14
 atgttaagt acacactta aaa 23
 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 15

 tggctttgag ttgacatcta tga 23

<210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 16
 ttggatttga ttacgtctat aat 23
 <210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 17
 tggcatcatt ctattggatt tga 23
 <210> 18
 <211> 23

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 18
 tgcctaacat gcttagaatt atg 23
 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 19
 gcctaacatg cttagaatta tgg 23
 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 20

tgcgtaaaca ttctcaatg atg	23
<210> 21	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene	
<400> 21	
atgcactttt cgcatatata aaa	23
<210> 22	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene	
<400> 22	
gccaatgtta atgcactttt atc	23
<210> 23	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA guide strand	
<400> 23	
uaguacuaca gauagagaca c	21
<210> 24	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA passenger strand	
<400> 24	
uauagagaca cucauaaagu c	21
<210> 25	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> siRNA guide strand
 <400> 25
 ugucuaauugg ucuauguacu a 21
 <210> 26

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA passenger strand
 <400> 26
 ugaugaaacu gucuauuggu c 21
 <210> 27
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 27
 uauuuucaca aaauacuua u 21
 <210> 28
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA passenger strand
 <400> 28

uuuauacgca cuacauucca a 21
 <210> 29
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 29
 auuuguacaa ucuuuauacg c 21
 <210> 30
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA passenger strand
 <400> 30
 auguuaaaaa cacuauuagc a 21
 <210> 31
 <211> 21

 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 31
 auuuuguuac caucaguaga u 21
 <210> 32
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA passenger strand
 <400> 32
 uugauuucaa uaauuuuuga u 21
 <210> 33
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 33
 uauucuuugc acuaauggca u 21

 <210> 34
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA passenger strand
 <400> 34
 uucauuugag uuauaguagg g 21

<210> 35
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 35
 uuuaaguucu uuaugcuagc c 21
 <210> 36
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA passenger strand
 <400> 36
 uuuaagugug ucacuuuaca u 21
 <210> 37
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 37
 auagauguca acucuaagcc a 21
 <210> 38
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA passenger strand
 <400> 38
 uauagacgua aucaaaucca a 21
 <210> 39
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand

<400>	39	
aaauccaaua gaugaugcc a		21
<210>	40	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA passenger strand	
<400>	40	
uaauucuaag cauguuagc a		21
<210>	41	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	41	
auaaauucuaa gcauguuagg c		21
<210>	42	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA passenger strand	
<400>	42	
ucauugagaa auguuuacgc a		21
<210>	43	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	43	
uuguauaugc gaaaagugca u		21
<210>	44	
<211>	21	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA passenger strand

<400> 44

uaaaagugca uuaacauugg c 21

<210> 45

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA guide strand

<400> 45

gucucuaucu guaguacau g 21

<210> 46

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA passenger strand

<400> 46

cuuuagagu gucucuauag a 21

<210> 47

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA guide strand

<400> 47

guacuaugac caauagacag u 21

<210> 48

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA passenger strand

<400> 48

ccaauagaca guuucacaa a 21

<210> 49

<211> 21

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	49	
	gaaguauuuu gugaaaauag g	21
<210>	50	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA passenger strand	
<400>	50	
	ggaauaguagu gcguauaaag a	21
<210>	51	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	51	
	guauaaagau uguacaaaug u	21
<210>	52	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA passenger strand	
<400>	52	
	cuaauagugu uuuuaacauu u	21
<210>	53	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	53	
	cuacugaugg uaacaaaauu g	21

<210> 54
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA passenger strand
 <400> 54

caaaaauuau ugaaaucaau a 21

<210> 55
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 55

gccauuagug caaagaauag a 21

<210> 56
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA passenger strand
 <400> 56

cuacuauaac ucaaaugaau c 21

<210> 57
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 57

cuagcauaaa gaacuuuaag u 21

<210> 58
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA passenger strand

<400>	58	
guuaagugac acacuaaaa a		21
<210>	59	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	59	
gcuuugaguu gacaucuaug a		21
<210>	60	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA passenger strand	
<400>	60	
ggauuugauu acgucuaaaa u		21
<210>	61	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	61	
gcaucauucu auuggauuug a		21
<210>	62	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA passenger strand	
<400>	62	
ccuaacaugc uuagaauuau g		21
<210>	63	
<211>	21	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA guide strand

<400> 63

cuaacaugcu uagaauuau g 21

<210> 64

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA passenger strand

<400> 64

cguaaacauu ucucuaugau g 21

<210> 65

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA guide strand

<400> 65

gcacuuuucg cauauacaaa a 21

<210> 66

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA passenger strand

<400> 66

caauguuaau gcacuuuuau c 21

<210> 67

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 67

ggccaatggtt aatgcactt 19

<210> 68

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 68
 gccaatgtta atgcacttt 19
 <210> 69
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 69
 gctagcataa agaacttta 19
 <210> 70
 <211> 19

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 70
 tccactgctt cagacactt 19
 <210> 71
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 71
 ccctactata actcaaatg 19
 <210> 72
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 72

tcctactat aactcaaat	19
<210> 73	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene	
<400> 73	
gacatctatg aagtatttt	19
<210> 74	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene	
<400> 74	
tgacatctat gaagtattt	19
<210> 75	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene	
<400> 75	
cacaccgttt ctatagatt	19
<210> 76	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene	
<400> 76	
gcttgtcaca ccgtttcta	19
<210> 77	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 77
 cggttcacta tatgttaaa 19
 <210> 78

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 78
 cagttcttta ttatcaaaa 19
 <210> 79
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 79
 tcagttctttt attatcaaa 19
 <210> 80
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 80

tctctatctg tagtactat 19
 <210> 81
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 81
 agacagtttc atcaaaaat 19
 <210> 82
 <211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 82
 gacagtttca tcaaaaatt 19
 <210> 83
 <211> 19

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 83
 acagtttcat caaaaatta 19
 <210> 84
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 84
 cagtttcatc aaaaattat 19
 <210> 85
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 85
 tctttattat caaaacaat 19

 <210> 86
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 86
 agtaattgga acaagcaaa 19

<210> 87
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 87
 cctaacatgc ttagaatta 19
 <210> 88
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 88
 aggacttcct tggaatgta 19
 <210> 89
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 89
 cgcatataca aaacgtaat 19
 <210> 90
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene
 <400> 90
 gcatatacaa aacgtaatg 19
 <210> 91
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-COV-2 RdRP gene

<400> 91
ggattatcct aaatgtgat 19

<210> 92
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> siRNA guide strand
<400> 92
aagugcauua acauuggcc 19

<210> 93
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> siRNA guide strand
<400> 93

aaagugcauu aacauuggc 19

<210> 94
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> siRNA guide strand
<400> 94

uaaaguucuu uaugcuagc 19

<210> 95
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> siRNA guide strand
<400> 95

aagugucuga agcagugga 19

<210> 96
<211> 19
<212>
> RNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	96	
	cauuugaguu auaguaggg	19
<210>	97	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	97	
	auuugaguua uaguaggga	19
<210>	98	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	98	
	aaaauacuuc auagauguc	19
<210>	99	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	99	
	aaauacuuc uagauguca	19
<210>	100	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	100	
	aaucuauaga aacggugug	19
<210>	101	
<211>	19	

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	101	
	uagaaacggu gugacaagc	19
<210>	102	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	102	
	uuuaacauau agugaaccg	19
<210>	103	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	103	
	uuuugauaau aaagaacug	19
<210>	104	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	104	
	uuugauaaua aagaacuga	19
<210>	105	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	105	
	auaguacuac agauagaga	19

<210> 106
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 106

auuuuugaug aaacugucu 19

<210> 107
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 107

aaauuuugau gaaacuguc 19

<210> 108
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 108

uaauuuuuga ugaaacugu 19

<210> 109
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand
 <400> 109

caguuucauc aaaaauuau 19

<210> 110
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA guide strand

<400>	110	
auuguuuuga	uaauaaaga	19
<210>	111	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	111	
uuugcuuguu	ccaauuacu	19
<210>	112	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	112	
uaauucuaag	cauguuagg	19
<210>	113	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	113	
uacauuccaa	ggaaguccu	19
<210>	114	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	114	
auuacguuuu	guauaugcg	19
<210>	115	
<211>	19	
<212>	RNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	115	
	cauuacguuu uguauaugc	19
<210>	116	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	116	
	aucacauuuu ggauaaucc	19
<210>	117	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SARS-COV-2 RdRP gene	
<400>	117	
	tctctatctg tagtactat	19
<210>	118	
<211>	18	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA guide strand	
<400>	118	
	uaguacuaca gauagaga	18