



공개특허 10-2023-0169197



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0169197
(43) 공개일자 2023년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7037989(분할)

(22) 출원일자(국제) 2015년11월13일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2017-7012963

원출원일자(국제) 2015년11월13일

심사청구일자 2020년11월12일

(85) 번역문제출일자 2023년11월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/060562

(87) 국제공개번호 WO 2016/077687

국제공개일자 2016년05월19일

(30) 우선권주장

62/079,588 2014년11월14일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인
보이저 테라퓨티스, 인크.
미국 매사추세츠주 02139 캠브리지 시드니 스트리트 64

(72) 별명자

사 디나 웨-이

미국 매사추세츠주 01748 흑킨턴 허클베리 로드 15

호우 진자오

미국 매사추세츠주 02478 벨몬트 아파트먼트 55 헬 로드 49
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

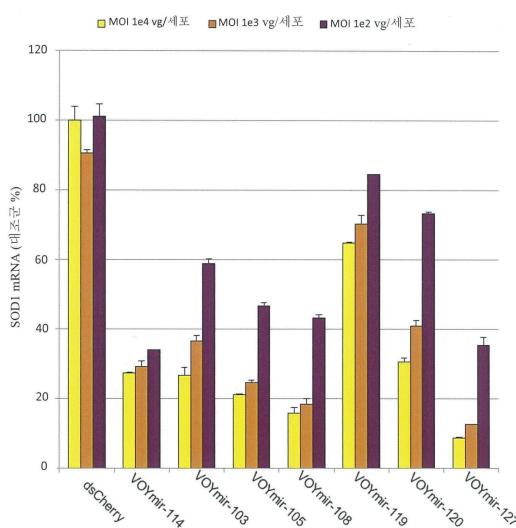
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 근위축성 측삭 경화증(ALS)을 치료하는 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 SOD1 유전자에 대한 작은 간섭 RNA(siRNA), siRNA 분자를 암호화하는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 및 이러한 siRNA 분자 및 AAV 벡터를 사용하여 근위축성 측삭 경화증(ALS)을 치료하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
C12N 15/1137 (2013.01)
C12Y 115/01001 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)

(72) 발명자

논넨마커 마티유 이.

미국 매사추세츠주 02215 보스턴 아파트먼트 10 퀸
즈베리 스트리트 98

주 평청

미국 매사추세츠주 02421 렉싱턴 뱅크스 애비뉴 17

호스바흐 마르쿠스

독일 95326 쿨름바흐 바이헤어러 슈트라쎄 30

데커트 요헨

독일 95326 쿨름바흐 오베르하켄 12

(30) 우선권주장

62/211,992 2015년08월31일 미국(US)
62/234,466 2015년09월29일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

세포에서 SOD1의 발현을 저해 또는 억제하기 위한 2개의 역위 말단 반복(ITS) 사이에 위치한 핵산 서열을 포함하는 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터로서, 상기 핵산 서열은 센스 가닥 서열 및 안티센스 가닥 서열을 포함하고, 상기 센스 가닥 서열은 표 3, 표 11 또는 표 14에 나열된 서열의 뉴클레오티드 서열과 3개 이하의 뉴클레오티드가 다른 15개 이상의 인접한 뉴클레오티드를 포함하고, 상기 안티센스 가닥 서열은 표 3, 표 11 또는 표 14에 나열된 서열의 뉴클레오티드 서열과 3개 이하의 뉴클레오티드가 다른 15개 이상의 인접한 뉴클레오티드를 포함하고, 상기 센스 가닥 서열 및 상기 안티센스 가닥 서열은 4 뉴클레오티드 이상 길이의 상보성 영역을 공유하는, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 핵산 서열은 siRNA 이중가닥의 센스 가닥 서열 및 안티센스 가닥 서열을 포함하는, AAV 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 siRNA 이중가닥은 siRNA 이중가닥 ID 번호 D-2741 내지 ID 번호 D-2985로 이루어진 군으로부터 선택되는, AAV 벡터.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 siRNA 이중가닥은 siRNA ID: D-2757, D-2806, D-2860, D-2861, D-2875, D-2871, D-2758, D-2759, D-2866, D-2870, D-2823 및 D-2858의 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, AAV 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 상보성 영역은 길이가 17 뉴클레오티드 이상인, AAV 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 상보성 영역은 길이가 19 내지 21 뉴클레오티드인, AAV 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 상보성 영역은 길이가 19 뉴클레오티드인, AAV 벡터.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 센스 가닥 서열 및 상기 안티센스 가닥 서열은 독립적으로 30 뉴클레오티드 이하인, AAV 벡터.

청구항 9

제1항에 있어서, 하나 이상의 상기 센스 가닥 서열 및 상기 안티센스 가닥 서열은 하나 이상의 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함하는, AAV 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서, 하나 이상의 상기 센스 가닥 서열 및 상기 안티센스 가닥 서열은 2개 이상의 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함하는, AAV 벡터.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47,

AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAV-DJ8 및 AAV-DJ 및 이들의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되는 캡시드 혈청형을 포함하는, AAV 벡터.

청구항 12

세포에서 SOD1 유전자의 발현을 저해하는 방법으로서, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 AAV 벡터를 포함하는 조성물을 세포에 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 세포는 포유류 세포인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 포유류 세포는 운동 뉴런인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 포유류 세포는 성상세포인 방법.

청구항 16

치료를 필요로 하는 대상에 근위축성 측삭 경화증 (ALS)을 치료 및/또는 개선하기 위한 방법으로서, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 AAV 벡터를 포함하는 치료 유효량의 조성물을 상기 대상에 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, SOD1 발현이 저해되거나 억제되는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 SOD1은 야생형 SOD1, 하나 이상의 돌연변이를 갖는 돌연변이된 SOD1, 또는 야생형 SOD1 및 하나 이상의 돌연변이를 갖는 돌연변이된 SOD1 둘 다인, 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 SOD1 발현이 약 20% 내지 약 100%까지 저해되거나 억제되는, 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 상기 ALS는 확인된 SOD1 유전자 돌연변이를 갖는 가족성 ALS인 방법.

청구항 21

제16항에 있어서, 상기 ALS는 산발성 ALS인 방법.

청구항 22

세포에서 SOD1 유전자의 발현을 억제하는 방법으로서, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 AAV 벡터를 포함하는 조성물을 상기 세포에 투여하는 것을 포함하되, 상기 SOD1 유전자는 상기 세포 내부에서 기능 효과의 수득을 야기하는 돌연변이를 포함하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 세포는 포유류 세포인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서 상기 포유류 세포는 운동 뉴런인 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 포유류 세포는 성상세포인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2014년 11월 14일자로 출원된 SOD-1을 표적화하는 siRNA를 이용한 근위축성 측삭 경화증(ALS)의 치료라는 제목의 미국 가특허출원 제62/079,588호, 2015년 8월 31일자로 출원된 근위축성 측삭 경화증(ALS)을 치료하는 조성물 및 방법이라는 제목의 미국 가특허출원 제62/211,992호, 2015년 9월 29일자로 출원된 근위축성 측삭 경화증(ALS)을 치료하는 조성물 및 방법이라는 제목의 미국 가특허출원 제62/234,466호의 이익을 주장하며, 이들 각각의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

[0003] 서열목록에 대한 참조

본 출원은 전자적으로 포맷된 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 2015년 11월 12일자로 생성된 1011PCTSL.txt라는 명칭의 파일로 제공되고, 그 크기는 126,873바이트이다. 서열 목록의 전자 포맷으로 된 정보는 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

[0005] 발명의 기술 분야

본 발명은 조절성(modulatory) 폴리펩티드, 예컨대 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 1(SOD1) 유전자를 표적화하는 작은 간섭 RNA(siRNA) 분자의 설계, 제제, 제조, 사용 및/또는 제형을 위한 조성물, 방법 및 공정에 관한 것이다. 본원에 사용된 "조절성 폴리뉴클레오티드"는 표적 유전자, 예컨대, mRNA의 수준 또는 양, 또는 단백질 수준을 조절(증가 또는 감소)하는 기능을 하는 임의의 핵산 서열(들)이다. SOD1 유전자의 표적화는 SOD1 유전자의 발현 및 SOD1 효소 생산을 방해할 수 있다. 일부 구현예에서, siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열은 재조합 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터에 삽입된다. 신경퇴행성 질환(예컨대, 근위축성 측삭 경화증(ALS))을 가진 대상에서 SOD1 유전자 발현을 저해하기 위해 siRNA 분자를 사용하는 방법이 또한 개시된다.

배경 기술

[0007] 발명의 배경

루게릭병으로도 알려진 근위축성 측삭 경화증(ALS)은 일차 운동 피질, 뇌간 및 척수에서 운동 뉴런(MN)의 두드러진 손실을 특징으로 하는 가장 치명적인 진행성 신경퇴행성 질환이다. 운동 뉴런의 손실은 호흡과 같은 기본적이고 근본적인 움직임을 파괴하고, 일반적으로 진단 후 2~5년 이내에 환자의 사망을 초래한다. 환자의 운동 기능의 점진적인 악화는 환자의 호흡 능력을 심각하게 저해하여 환자의 생존을 위한 어떤 형태의 호흡 보조기구를 필요로 한다. 다른 증상으로는 손, 팔, 다리 또는 연하 근육의 근육 약화도 포함된다. 일부 환자(예컨대, FTD-ALS)는 전두측두엽 치매를 발달시킬 수도 있다.

[0009] ALS 협회에 따르면, 미국에서 약 5,600명이 매년 ALS로 진단된다. ALS의 발병률은 100,000명 당 2명이며, 임의의 주어진 시간에 30,000명의 미국인이 이 질환을 갖는 것으로 추정된다.

[0010] 2가지 형태의 ALS가 기술되어 있다: 하나는 산발성 ALS(sALS)로, 이는 미국에서 가장 흔한 형태의 ALS이고 진단된 모든 사례의 90 내지 95%를 차지한다; 또 다른 하나는 가족성 ALS(fALS)로, 주로 우성 유전을 가진 가족 계통에서 발생하며 미국에서 모든 사례의 약 5 내지 10%만을 차지한다. sALS와 fALS는 임상적으로 구별할 수 없다.

[0011] 병리학적 연구로 확인된 바에 따르면, 소포체 스트레스(ER stress) 증가, 자유 라디칼(즉, 반응성 산소종(ROS)) 생성, 미토콘드리아 기능부전, 단백질 응집, 아폽토시스, 염증 및 글루타메이트 흥분독성(excitotoxicity)을 포함하여, 질환 발병 후 일부 세포 과정의 교란이 특히 운동뉴런(MN)에서 일어난다.

[0012] ALS의 원인은 복잡하고 이질적이다. 일반적으로, ALS는 환경 노출과 함께 다수의 유전자가 합쳐져 사람을 취약하게 만드는 복잡한 유전적 장애로 간주된다. SOD-1(Cu^{2+}/Zn^{2+} 슈퍼옥사이드 디스뮤타제), TDP-43(TARDBP, TAR DNA 결합 단백질-43), FUS(육종 융합/육종 전좌), ANG(안지오제닌), ATXN2(아탁신-2), 발로신(valosin) 함유 단백질(VCP), OPTN(옵티뉴린) 및 9번 염색체의 개방형 해독 틀 72(C9ORF72)에서 비암호화 GGGGCC 핵사뉴클레오티드 반복의 확장을 포함하여 ALS와 관련된 12개가 넘는 유전자가 발견되었다. 그러나, 운동 뉴런 퇴행의 정확

한 메커니즘은 아직 파악하기 어렵다.

[0013] 현재, ALS의 치료법은 없다. 유일하게 FDA에서 승인된 약물은 릴루졸(Riluzole)로, 클루타메이트 반응에 길항하여 ALS의 병리학적 발달을 감소시킨다. 그러나 초기 단계의 ALS 환자에 대해 단지 약 3개월의 수명 연장이 보고되었고, 후기 단계의 ALS 환자에 대한 치료학적 이점은 관찰되지 않았으며, 이는 환자를 위한 치료 선택의 부족을 나타낸다 (Bensimon G et al., *J Neurol.* 2002, 249, 609-615). 따라서, 질환 진행을 효과적으로 예방할 수 있는 새로운 치료 전략이 여전히 요구된다.

[0014] 산발성과 가족성 ALS 모두의 잠재적인 치료법에 대하여 많은 상이한 전략이 연구 중에 있다. 하나의 전략은, 뉴런의 생존을 촉진할 수 있는 신경영양 인자, 예컨대 인슐린-유사 성장 인자 I(IGF-I), 신경아교세포주 유도 신경영양인자(GDNF), 혈관내피성장인자(VEGF), 콜리밸린(Colivelin) 및 활성 의존성 신경영양 인자(ADNF) 유도된 웨პ티드의 신경보호 및/또는 재생 효과에 기초한다. 몇몇 연구들은 신경영양 인자가 운동 뉴런 기능을 보존하므로 SOD1 형질전환 마우스에서 운동 능력을 향상시킬 수 있음을 보여주었다. 그러나, 이러한 치료법은 종종 SOD1 마우스의 생존 연장에 실패하여, 신경영양 인자가 뉴런의 생존을 연장하기에는 충분하지 않음을 시사한다 (Yacila and Sari, *Curr Med Chem.*, 2014, 21(31), 3583-3593에 의한 리뷰 참조).

[0015] ALS 치료를 위한 또 다른 전략은 줄기 세포에 기초한 치료요법에 초점을 맞추어 왔다. 줄기 세포는 운동 뉴런을 생성하여 ALS의 영향을 받은 CNS, 예컨대 일차 운동 피질, 뇌간 및 척수에서 퇴행성 운동 뉴런을 대체할 잠재력이 있다. 유도만능줄기세포(iPSC), 중간엽 기질 세포(MSC)(예컨대 콜수 중간엽 기질 세포(BMSC) 및 지방 줄기 세포(ASC)) 및 신경 조직 기원 신경 줄기 세포(예컨대 태아 척수 신경 줄기 세포(NSC), 다능성 신경 전구 세포(NPC))를 포함하여, 여러 소스로부터 유도된 줄기 세포가 조사되었다(예컨대, Kim C et al., *Exp. Neurobiol.*, 2014, 23(3), 207-214에 의해 검토됨).

[0016] 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 유형 I(SOD1; Cu²⁺/Zn²⁺ 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 유형 I) 유전자에서의 돌연변이는 가장 흔한 fALS의 원인이며, 전체 fALS의 사례 중 약 20 내지 30%를 차지한다. 최근 보고는 SOD1 돌연변이가 모든 sALS 사례의 약 4% 정도와 관련이 있을 수도 있음을 나타낸다 (Robberecht and Philip, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2013, 14, 248-264). SOD1-관련 fALS는 정상 SOD1 활성의 상실에 의한 것이 아니라 독성 기능의 획득에 의한 것일 가능성이 크다. 돌연변이 SOD1-관련 fALS 독성에 대한 가설 중 하나는 비정상적인 SOD1 효소가 과산화질산염 또는 과산화수소와 같은 작은 분자를 생성하여 유해한 자유 라디칼을 생성한다고 제시한다. 돌연변이 SOD1 신경 독성에 대한 다른 가설은 프로테아좀 활성의 저해, 미토콘드리아 손상, RNA 처리과정의 파괴 및 세포 내 응집체 형성을 포함한다. ALS에서 돌연변이 SOD1 변이체 및/또는 야생형 SOD1의 비정상적인 축적은 병리학적인 봉입체(inclusion)로서 확인되는 불용성 섬유성 응집체를 형성한다. 응집된 SOD1 단백질은 미토콘드리아 스트레스(Vehvilainen P et al., *Front Cell Neurosci.*, 2014, 8, 126) 및 세포, 특히 운동 뉴런에 대해 다른 독성을 유도할 수 있다.

[0017] 이러한 발견은 SOD1이 가족성과 산발성 ALS 모두에 대한 잠재적인 치료 표적일 수 있음을 나타낸다. ALS 환자의 중추신경계에서 생산된 SOD1 단백질을 감소시킬 수 있는 치료요법은, 환자에서 운동 뉴런 퇴행 및 근육 약화 및 위축과 같은 ALS 증상을 개선할 수 있다. 야생형 및/또는 돌연변이 SOD1 단백질 응집체의 형성을 방지하는 것을 목표로 하는 제제 및 방법은 질환 진행을 예방할 수 있고 ALS 증상을 개선할 수 있다. RNA 간섭(RNAi)이 매개된 유전자 침묵은 최근에 연구자들의 관심을 불러 일으켰다. SOD1 유전자를 표적화하는 작은 이중 가닥 RNA(작은 간섭 RNA) 분자는 ALS 치료에서 이의 잠재력에 대해 당업계에서 교시되었다(미국특허 제7,632,938호 및 미국공개특허 제20060229268의 전체 내용을 참고문헌으로서 본문에 포함).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명은 질환의 치료를 위해 ALS 환자에서 SOD1의 발현을 억제 또는 예방하기 위한 RNA 간섭에 기초한 접근법을 개발한다.

[0019] 본 발명은 새로운 종류의 이중 가닥 RNA(dsRNA) 작제물과 siRNA 작제물 및 이들의 설계 방법을 제공한다. 또한, 이러한 신규한 siRNA 작제물은 합성 분자이거나 세포로 전달하기 위해 발현 벡터(하나 또는 두 가닥 모두)에 암호화될 수 있다. 이러한 벡터는 비제한적으로 임의의 AAV 혈청형의 벡터 게놈 또는 렌티 바이러스 등과 같은 기타 바이러스 전달 비히클과 같은 아데노-관련된 바이러스 벡터를 포함한다.

과제의 해결 수단

[0020] 발명의 요약

본 발명은 유전자 발현 및 단백질 생산을 특이적으로 간섭하는 RNA 분자 매개된 유전자에 관한 것이다. 운동 뉴런 퇴행성 질환, 예컨대 근위축성 측삭 경화증 치료 방법 또한 본 발명에 포함된다. 본원에 특징화된 조성물에 포함된 siRNA는 SOD1 유전자의 mRNA 전사물의 적어도 일부분에 대해 실질적으로 상보성인, 30개 이하 길이의 뉴클레오티드, 일반적으로 19 내지 24개 길이의 뉴클레오티드인 영역을 갖는 안티센스 가닥(안티센스 가닥)을 갖는 dsRNA를 포함한다.

본 발명은, SOD1 유전자 발현 및/또는 SOD1 단백질 생산을 저해하기 위해 SOD1 mRNA를 표적화하는 작은 간섭 RNA(siRNA) 듀플렉스(duplex)와 같은 짧은 이중 가닥 RNA 분자를 제공한다. 본 발명의 siRNA 듀플렉스는 SOD1 유전자에서 임의의 특정 돌연변이와는 무관하게 SOD1 유전자의 두 대립유전자를 저해할 수 있고, 특히 ALS 질환에서 발견되는 두 대립유전자와 상호작용할 수 있다.

일부 구현예에서, 이러한 siRNA 분자 또는 siRNA 분자의 단일 가닥은 아데노-관련 바이러스 벡터에 삽입되어 세포, 특히 운동 뉴런 및/또는 중추신경계의 다른 주변 세포 내에 도입된다.

본 발명의 siRNA 듀플렉스는 함께 혼성화되어 듀플렉스 구조를 형성하는 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함하며, 이때, 안티센스 가닥은 표적화된 SOD1 유전자의 핵산 서열에 대해 상보성이고, 센스 가닥은 표적화된 SOD1 유전자의 핵산 서열에 대해 상동성이다. 일부 양태에서, 안티센스 가닥의 5' 말단은 5' 인산염 기를 갖고, 센스 가닥의 3' 말단은 3' 히드록시 기를 함유한다. 다른 양태에서, 각 가닥의 3' 말단에는 하나 또는 2개의 뉴클레오티드 오버행(overhang)이 있거나 존재하지 않는다.

본 발명에 따르면, SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스의 각 가닥은 약 19 내지 25개 길이의 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 19개 길이의 뉴클레오티드, 20개 길이의 뉴클레오티드, 21개 길이의 뉴클레오티드, 22개 길이의 뉴클레오티드, 23개 길이의 뉴클레오티드, 24개 길이의 뉴클레오티드 또는 25개 길이의 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, siRNA는 변형되지 않은 RNA 분자일 수 있다.

다른 양태에서, siRNA는 염기, 당 또는 백본(backbone) 변형과 같은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다.

하나의 구현예에서, siRNA 또는 dsRNA는 서로 상보성인 2개 이상의 서열을 포함한다. dsRNA는 제1서열을 갖는 센스 가닥 및 제2서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 안티센스 가닥은 SOD1을 암호화하는 mRNA의 적어도 일부분에 대해 실질적으로 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상보성 영역은 30개 이하 길이의 뉴클레오티드, 15개 이상 길이의 뉴클레오티드이다. 일반적으로, dsRNA는 19 내지 24개 길이, 예컨대, 19 내지 21개 길이의 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, dsRNA는 약 15 내지 약 25개 길이의 뉴클레오티드이고, 다른 구현예에서, dsRNA는 약 25 내지 약 30개 길이의 뉴클레오티드이다.

dsRNA는, SOD1을 발현하는 세포와 접촉하거나, SOD1을 발현하는 세포내에서 전사되면, 본원에 기술된 방법으로 분석했을 때, SOD1 유전자의 발현을 10% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상 또는 40% 이상 저해 또는 억제한다.

본 발명에 따르면, SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스, siRNA 듀플렉스 중 하나의 가닥 또는 dsRNA를 암호화하는 핵산을 포함하는 AAV 벡터가 생산되며, AAV 벡터 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAV-DJ8 및/또는 AAV-DJ 및 이들의 변이체일 수 있다.

본 발명에 따르면, ALS에서 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA는 표 3, 표 11 또는 표 13에 나열되어 있는 siRNA 듀플렉스로부터 선택된다. 바람직하게는, ALS에서 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA는 siRNA 듀플렉스: D-2757, D-2806, D-2860, D-2861, D-2875, D-2871, D-2758, D-2759, D-2866, D-2870, D-2823 및 D-2858로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명은 또한 SOD1 유전자를 표적화하는 하나 이상의 siRNA 듀플렉스 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, siRNA 듀플렉스를 암호화하는 핵산 서열이 AAV 벡터에 삽입된다.

일부 구현예에서, 본 발명은 세포에서 SOD1 유전자 발현을 저해/침묵시키는 방법을 제공한다. 따라서, siRNA 듀

플렉스 또는 dsRNA는 세포, 특히 운동 뉴런에서 SOD1 유전자 발현을 실질적으로 저해하기 위해 사용될 수 있다. 일부 양태에서, SOD1 유전자 발현의 저해는 약 20% 이상, 바람직하게는 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%까지의 저해를 지칭한다. 따라서, 표적화된 유전자의 단백질 산물은 약 20%, 바람직하게는 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%까지 저해될 수 있다. SOD1 유전자는 야생형 유전자이거나 하나 이상의 돌연변이를 갖는 돌연변이된 SOD1 유전자일 수 있다. 따라서, SOD1 단백질은 야생형 단백질 또는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 돌연변이된 폴리펩티드이다.

[0033] 일부 구현예에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에서 비정상적인 SOD1 유전자 및/또는 SOD1 단백질과 관련된 근위축성 측삭 경화증을 치료 또는 개선하는 방법을 제공하며, 이 방법은 SOD1 유전자를 표적화하는 약제학적으로 유효한 양의 하나 이상의 siRNA 듀플렉스를 대상에 투여하는 것, 상기 siRNA 듀플렉스를 표적화된 세포에 전달하는 것, SOD1 유전자 발현 및 단백질 생산을 저해하는 것, 및 대상에서 ALS 증상을 개선하는 것을 포함한다.

[0034] 일부 구현예에서, SOD1 유전자를 표적화하는 하나 이상의 siRNA 듀플렉스를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터가 ALS의 치료 및/또는 개선을 필요로 하는 대상에 투여된다. AAV 벡터 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10 및 AAV-DJ 및 이들의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0035] 일부 양태에서, ALS는 SOD1 돌연변이와 관련된 가족성 ALS이다. 다른 양태에서, ALS는 SOD1 단백질의 비정상적인 응집 또는 SOD1 단백질 기능 또는 위치화 (localization)의 중단을 특징으로 하는 산발성 ALS이지만, 유전적 돌연변이의 결과일 필요는 없다. 본 방법에 의해 개선되는 ALS의 증상은 운동 뉴런 퇴행, 근육 약화, 근육 경직, 불분명한 발음 및/또는 호흡 곤란을 포함할 수 있다.

[0036] 일부 구현예에서, SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA 또는 이러한 siRNA를 암호화하는 분자를 포함하는 AAV 벡터가, 예컨대 두개내 주사에 의해 대상의 중추신경계 내로 직접 도입될 수 있다.

[0037] 일부 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 단독 치료요법으로서 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 병용 치료요법으로서 사용된다. 병용 치료요법은 운동 뉴런 퇴행에 신경보호 효과가 시험된 하나 이상의 신경보호제, 예컨대 작은 분자 화합물, 성장인자 및 호르몬과 병용될 수 있다.

[0038] 일부 구현예에서, 본 발명은 필요로 하는 대상에 본원에 기술된 약제학적으로 유효한 양의 플라스미드 또는 AAV 벡터를 투여하여 근위축성 측삭 경화증을 치료 또는 개선하는 방법을 제공한다. ALS는 가족성 ALS 또는 산발성 ALS일 수 있다.

도면의 간단한 설명

도면의 간단한 설명

전술한 목적 및 다른 목적, 특징 및 이점은 첨부된 도면에서 도시된 바와 같이 본 발명의 특정 구현예에 대한 다음의 설명으로부터 명백해질 것이며, 도면에서 동일한 참조 부호는 상이한 도면 전반에 걸쳐 동일한 부분을 지칭한다. 도면은 축척일 필요는 없으며, 대신에 본 발명의 다양한 구현예의 원리를 설명할 때 강조된다.

도 1은 AAV 벡터에 암호화된 작제물의 활성을 보여주는 히스토그램이다.

도 2는 HEK293T 세포에서 AAV 벡터에 암호화된 조절성 폴리뉴클레오티드의 가이드 가닥의 활성을 보여주는 히스토그램이다.

도 3은 HEK293T 세포에서 AAV 벡터에 암호화된 조절성 폴리뉴클레오티드의 패신저(passenger) 가닥의 활성을 보여주는 히스토그램이다.

도 4는 HeLa 세포에서 AAV 벡터에 암호화된 조절성 폴리뉴클레오티드의 가이드 가닥의 활성을 보여주는 히스토그램이다.

도 5는 HeLa 세포에서 AAV 벡터에 암호화된 조절성 폴리뉴클레오티드의 패신저 가닥의 활성을 보여주는 히스토그램이다.

도 6은 세포내 AAV DNA에 대한 히스토그램이다.

도 7은 인간 운동 뉴런에서 AAV 벡터에 암호화된 작제물의 활성을 보여주는 히스토그램이다.

도 8은 U251MG 세포에서 SOD1의 용량-의존적인 침묵을 보여주는 도표이다.

도 9는 인간 성상세포에서 SOD1의 용량-의존적인 침묵을 보여주는 도표이다.

도 10은 U251MG 세포에서 SOD1의 시간 경과에 따른 침묵을 보여주는 도표이다.

도 11은 자체물의 용량-의존적인 효과를 보여주는 도 11A, 도 11B 및 도 11C를 포함한다. 도 11A는 상대적인 SOD1 발현을 보여준다. 도 11B는 가이드 가닥의 퍼센트를 보여준다. 도 11C는 패신저 가닥의 퍼센트를 보여준다.

도 12는 ITR, 인트론(I) 및 폴리A(P)와 관련하여 조절성 폴리뉴클레오티드(MP)의 위치를 나타내는 다이아그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040]

발명의 상세한 설명

[0041]

본 발명은 치료제로서 조절성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 RNA 또는 DNA 분자에 관한 것이다. RNA 간섭 매개된 유전자 침묵은 특히 표적화된 유전자 발현을 저해할 수 있다. 이어서, 본 발명은 SOD1 유전자를 표적화하는 작은 이중가닥 RNA(dsRNA) 분자(작은 간섭 RNA, siRNA), 이러한 siRNA를 포함하는 약제학적 조성물 및 이들의 설계 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 신경퇴행성 질환, 특히 근위축성 측삭 경화증(ALS)을 치료하기 위한, SOD1 유전자 발현 및 단백질 생산을 저해하기 위한 이의 용법을 제공한다.

[0042]

본 발명은 SOD1 mRNA를 표적화하여 SOD1 유전자 발현 및/또는 SOD1 단백질 생산을 저해하는, 작은 간섭 RNA(siRNA) 듀플렉스(및 이를 암호화하는 조절성 폴리뉴클레오티드)를 제공한다. 본 발명의 siRNA 듀플렉스는 SOD1 유전자에서 임의의 특정 돌연변이와는 무관하게 SOD1 유전자의 두 대립유전자를 저해할 수 있고, 특히 ALS 질환에서 발견되는 두 대립유전자와 상호작용할 수 있다.

[0043]

일부 구현예에서, 이러한 siRNA 분자 또는 siRNA 분자의 단일 가닥을 암호화하는 핵산 서열은 아데노-관련 바이러스 벡터에 삽입되어 세포, 특히 운동 뉴런 및/또는 중추신경계의 다른 주변 세포 내에 도입된다.

[0044]

본 발명의 암호화된 siRNA 듀플렉스는 함께 혼성화되어 듀플렉스 구조를 형성하는 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 함유하며, 이때, 안티센스 가닥은 표적화된 SOD1 유전자의 핵산 서열에 대해 상보성이 있고, 센스 가닥은 표적화된 SOD1 유전자의 핵산 서열에 대해 상동성이다. 일부 양태에서, 안티센스 가닥의 5' 말단은 5' 인산염 기를 갖고, 센스 가닥의 3' 말단은 3' 히드록시 기를 함유한다. 다른 양태에서, 각 가닥의 3' 말단에는 하나 또는 2개의 뉴클레오티드 오버행이 있거나 이것이 존재하지 않는다.

[0045]

본 발명에 따르면, SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스의 각 가닥은 약 19 내지 25개, 19 내지 24개 또는 19 내지 21개 길이의 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 19개 길이의 뉴클레오티드, 20개 길이의 뉴클레오티드, 21개 길이의 뉴클레오티드, 22개 길이의 뉴클레오티드, 23개 길이의 뉴클레오티드, 24개 길이의 뉴클레오티드 또는 25개 길이의 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, siRNA는 변형되지 않은 RNA 분자일 수 있다.

[0046]

다른 양태에서, siRNA는 염기, 당 또는 백본 변형과 같은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다.

[0047]

하나의 구현예에서, siRNA 또는 dsRNA는 서로 상보성인 2개 이상의 서열을 포함한다. dsRNA는 제1서열을 갖는 센스 가닥 및 제2서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 안티센스 가닥은 SOD1을 암호화하는 mRNA의 적어도 일부분에 대해 실질적으로 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상보성 영역은 30개 이하 길이의 뉴클레오티드, 15개 이상의 길이의 뉴클레오티드이다. 일반적으로 dsRNA는 19 내지 25개, 19 내지 24개 또는 19 내지 21개 길이의 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, dsRNA는 약 15 내지 약 25개 길이의 뉴클레오티드이고, 다른 구현 예에서, dsRNA는 약 25 내지 약 30개 길이의 뉴클레오티드이다.

[0048]

dsRNA는, SOD1을 발현하는 세포와 접촉시 발현 벡터에 직접 투여되거나 이에 암호화되든지 간에, 본원에 기술된 방법으로 분석했을 때, SOD1 발현을 10% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상 또는 40% 이상까지 저해한다.

[0049]

본원에 기술된 조성물에 포함된 siRNA 분자는 30개 이하 길이의 뉴클레오티드, 일반적으로 19 내지 25개, 19 내지 24개 또는 19 내지 21개 길이의 뉴클레오티드인 영역을 갖는 안티센스 가닥(안티센스 가닥)을 갖는 dsRNA를 포함하며, 이는 SOD1 유전자의 mRNA 전사물의 적어도 일부분에 대해 실질적으로 상보성이다.

[0050]

본 발명에 따르면, SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스, siRNA 듀플렉스 중 하나의 가닥 또는 dsRNA의 핵

산을 포함하는 AAV 벡터가 생산되며, AAV 벡터 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAV-DJ8 및 AAV-DJ 및 이의 변이체일 수 있다.

본 발명에 따르면, ALS에서 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 표 3에 나열된 siRNA 듀플렉스로부터 선택된다. 일부 구현예에서, ALS에서 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA는 siRNA 듀플렉스: D-2757, D-2806, D-2860, D-2861, D-2875, D-2871, D-2758, D-2759, D-2866, D-2870, D-2823 및 D-2858로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명은 또한 SOD1 유전자를 표적화하는 하나 이상의 siRNA 듀플렉스 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, siRNA 듀플렉스는 AAV 벡터에 의해 암호화된다.

일부 구현예에서, 본 발명은 세포에서 SOD1 유전자 발현을 저해/침묵시키는 방법을 제공한다. 따라서, siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 세포, 특히 운동 뉴런에서 SOD1 유전자 발현을 실질적으로 저해하는데 사용될 수 있다. 일부 양태에서, SOD1 유전자 발현 저해는 적어도 약 20%까지, 예컨대 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%까지, 또는 적어도 20 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 50%, 20 내지 60%, 20 내지 70%, 20 내지 80%, 20 내지 90%, 20 내지 95%, 20 내지 100%, 30 내지 40%, 30 내지 50%, 30 내지 60%, 30 내지 70%, 30 내지 80%, 30 내지 90%, 30 내지 95%, 30 내지 100%, 40 내지 50%, 40 내지 60%, 40 내지 70%, 40 내지 80%, 40 내지 90%, 40 내지 95%, 40 내지 100%, 50 내지 60%, 50 내지 70%, 50 내지 80%, 50 내지 90%, 50 내지 95%, 50 내지 100%, 60 내지 70%, 60 내지 80%, 60 내지 90%, 60 내지 95%, 60 내지 100%, 70 내지 80%, 70 내지 90%, 70 내지 95%, 70 내지 100%, 80 내지 90%, 80 내지 95%, 80 내지 100%, 90 내지 95%, 90 내지 100% 또는 95 내지 100%까지 저해하는 것을 지칭한다. 따라서, 표적화된 유전자의 단백질 생산은 적어도 약 20%까지, 바람직하게는 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%까지, 또는 적어도 20 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 50%, 20 내지 60%, 20 내지 70%, 20 내지 80%, 20 내지 90%, 20 내지 95%, 20 내지 100%, 30 내지 40%, 30 내지 50%, 30 내지 60%, 30 내지 70%, 30 내지 80%, 30 내지 90%, 30 내지 95%, 30 내지 100%, 40 내지 50%, 40 내지 60%, 40 내지 70%, 40 내지 80%, 40 내지 90%, 40 내지 95%, 40 내지 100%, 50 내지 60%, 50 내지 70%, 50 내지 80%, 50 내지 90%, 50 내지 95%, 50 내지 100%, 60 내지 70%, 60 내지 80%, 60 내지 90%, 60 내지 95%, 60 내지 100%, 70 내지 80%, 70 내지 90%, 70 내지 95%, 70 내지 100%, 80 내지 90%, 80 내지 95%, 80 내지 100%, 90 내지 95%, 90 내지 100% 또는 95 내지 100%까지 저해될 수 있다. SOD1 유전자는 야생형 유전자이거나 하나 이상의 돌연변이를 갖는 돌연변이된 SOD1 유전자일 수 있다. 따라서, SOD1 단백질은 야생형 단백질 또는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 돌연변이된 폴리펩티드이다.

하나의 구현예에서, siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 SOD1 단백질 발현을 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%까지, 또는 적어도 20 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 50%, 20 내지 60%, 20 내지 70%, 20 내지 80%, 20 내지 90%, 20 내지 95%, 20 내지 100%, 30 내지 40%, 30 내지 50%, 30 내지 60%, 30 내지 70%, 30 내지 80%, 30 내지 90%, 30 내지 95%, 30 내지 100%, 40 내지 50%, 40 내지 60%, 40 내지 70%, 40 내지 80%, 40 내지 90%, 40 내지 95%, 40 내지 100%, 50 내지 60%, 50 내지 70%, 50 내지 80%, 50 내지 90%, 50 내지 95%, 50 내지 100%, 60 내지 70%, 60 내지 80%, 60 내지 90%, 60 내지 95%, 60 내지 100%, 70 내지 80%, 70 내지 90%, 70 내지 95%, 70 내지 100%, 80 내지 90%, 80 내지 95%, 80 내지 100%, 90 내지 95%, 90 내지 100% 또는 95 내지 100%까지 감소시키는데 사용될 수 있다. 비제한적인 예로서, SOD1 단백질 발현의 발현은 50 내지 90% 감소될 수 있다.

하나의 구현예에서, siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 SOD1 mRNA 발현을 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%까지, 또는 적어도 20 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 50%, 20 내지 60%, 20 내지 70%, 20 내지 80%, 20 내지 90%, 20 내지 95%, 20 내지 100%, 30 내지 40%, 30 내지 50%, 30 내지 60%, 30 내지 70%, 30 내지 80%, 30 내지 90%, 30 내지 95%, 30 내지 100%, 40 내지 50%, 40 내지 60%, 40 내지 70%, 40 내지 80%, 40 내지 90%, 40 내지 95%, 40 내지 100%, 50 내지 60%, 50 내지 70%, 50 내지 80%, 50 내지 90%, 50 내지 95%, 50 내지 100%, 60 내지 70%, 60 내지 80%, 60 내지 90%, 60 내지 95%, 60 내지 100%, 70 내지 80%, 70 내지 90%, 70 내지 95%, 70 내지 100%, 80 내지 90%, 80 내지 95%, 80 내지 100%, 90 내지 95%, 90 내지 100% 또는 95 내지 100%까지 감소시키는데 사용될 수 있다. 비제한적인 예로서, SOD1 mRNA 발현의 발현은 50 내지 90% 감소될 수 있다.

하나의 구현예에서, siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 하나 이상의 CNS 영역, 예컨대 비제한적으로 척수, 전뇌, 중뇌 및 후뇌에서 SOD1 단백질 및/또는 mRNA의 발현을 감소시키는데 사용될 수 있다. SOD1 단백질 및/또

는 mRNA의 발현은 하나 이상의 CNS 영역에서 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100% 까지, 또는 적어도 20 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 50%, 20 내지 60%, 20 내지 70%, 20 내지 80%, 20 내지 90%, 20 내지 95%, 20 내지 100%, 30 내지 40%, 30 내지 50%, 30 내지 60%, 30 내지 70%, 30 내지 80%, 30 내지 90%, 30 내지 95%, 30 내지 100%, 40 내지 50%, 40 내지 60%, 40 내지 70%, 40 내지 80%, 40 내지 90%, 40 내지 95%, 40 내지 100%, 50 내지 60%, 50 내지 70%, 50 내지 80%, 50 내지 90%, 50 내지 95%, 50 내지 100%, 60 내지 70%, 60 내지 80%, 60 내지 90%, 60 내지 95%, 60 내지 100%, 70 내지 80%, 70 내지 90%, 70 내지 95%, 70 내지 100%, 80 내지 90%, 80 내지 95%, 80 내지 100%, 90 내지 95%, 90 내지 100% 또는 95 내지 100% 까지 감소시킨다. 비제한적인 예로서, 척수에서 SOD1 단백질 및 mRNA의 발현은 50 내지 90%까지 감소된다.

[0057] 일부 구현예에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에서 비정상적인 SOD1 유전자 및/또는 SOD1 단백질과 관련된 근위축성 측삭 경화증을 치료 또는 개선하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 SOD1 유전자를 표적화하는 약제학적으로 유효량의 하나 이상의 siRNA 듀플렉스 또는 siRNA 듀플렉스를 암호화하는 핵산을 대상에 투여하는 것, 상기 siRNA 듀플렉스(또는 암호화된 듀플렉스)를 표적화된 세포에 전달하는 것, SOD1 유전자 발현 및 단백질 생산을 저해하는 것, 및 대상에서 ALS 증상을 개선하는 것을 포함한다.

[0058] 일부 구현예에서, SOD1 유전자를 표적화하는 하나 이상의 siRNA 듀플렉스의 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터가 ALS의 치료 및/또는 개선을 필요로 하는 대상에 투여된다. AAV 벡터 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAV-DJ8(AAVDJ8) 및 AAV-DJ(AAVDJ) 및 이들의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 하나의 구현예에서, AAV 벡터 혈청형은 AAV2이다. 또 다른 구현예에서, AAV 벡터 혈청형은 AAVDJ이다. 또 다른 구현예에서, AAV 벡터 혈청형은 AAVDJ8이다.

[0059] 하나의 구현예에서, 본 발명에서 유용할 수 있는 혈청형은 AAV-DJ8일 수 있다. AAV-DJ8의 아미노산 서열은 해파린 결합 도메인(HBD)을 제거하기 위한 2개 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 미국특허 제 7,588,772호(이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨)에서 서열번호 1로 기재된 AAV-DJ 서열은, 2개의 돌연변이를 포함할 수 있다: (1) 587번 아미노산에서 아르기닌(R; arg)이 글루타민(Q; gln)으로 바뀐 R587Q, 및 (2) 590번 아미노산에서 아르기닌(R; arg)이 트레오닌(T; thr)으로 바뀐 R590T. 또 다른 비제한적인 예로서 3개의 돌연변이를 포함할 수 있다: (1) 406번 아미노산에서 리신(K; lys)이 아르기닌(R; arg)으로 바뀐 K406R, (2) 587번 아미노산에서 아르기닌(R; arg)이 글루타민(Q; gln)으로 바뀐 R587Q, 및 (3) 590번 아미노산 590에서 아르기닌(R; arg)이 트레오닌(T; thr)으로 바뀐 R590T.

[0060] 일부 양태에서, ALS는 SOD1 돌연변이와 관련된 가족성 ALS이다. 다른 양태에서, ALS는 SOD1 단백질의 비정상적인 응집 또는 SOD1 단백질 기능 또는 위치화(localization)의 수차(abberation)를 특징으로 하는 산발성 ALS이다. 본 방법에 의해 개선되는 ALS 증상은, 비제한적으로 운동 뉴런 퇴행, 근육 약화, 근육 경직, 불분명한 발음 및/또는 호흡 곤란을 포함할 수 있다.

[0061] 일부 구현예에서, SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA 또는 이러한 siRNA 분자를 포함하는 AAV 벡터가, 예컨대 두개내 주사에 의해 대상의 중추신경계 내로 직접 도입될 수 있다.

[0062] 일부 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 단독 치료요법으로서 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 병용 치료요법으로서 사용된다. 병용 치료요법은 운동 뉴런 퇴행에 신경보호 효과가 시험된 하나 이상의 신경보호제, 예컨대 작은 분자 화합물, 성장인자 및 호르몬과 병용될 수 있다.

[0063] 일부 구현예에서, 본 발명은 필요로 하는 대상에 본원에 기술된 약제학적으로 유효한 양의 플라스미드 또는 AAV 벡터를 투여하여 근위축성 측삭 경화증을 치료 또는 개선하는 방법을 제공한다. ALS는 가족성 ALS 또는 산발성 ALS일 수 있다.

[0064] 본 발명의 하나 이상의 구현예의 세부 사항은 이하의 첨부된 설명에서 설명된다. 본원에 기술된 것과 유사 또는 동일한 임의의 물질 및 방법이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법을 이하에 설명한다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점이 이 설명으로부터 명백해질 것이다. 본 설명에서, 단수 형태는 달리 문맥에서 명확하게 지시하지 않는 한 복수도 포함한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적이고 과학적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자 중 하나에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 상충이 있는 경우, 본 설명이 우선할 것이다.

근위축성 측삭 경화증(ALS)

[0065] 성인-발병 신경퇴행성 장애인 근위축성 측삭 경화증(ALS)은 운동 피질, 뇌간 및 척수에서의 운동 뉴런의 선택적

인 사멸을 특징으로 하는 진행성이고 치명적인 질환이다. ALS의 발병률은 100,000명당 약 1.9명이다. ALS로 진단된 환자는 경직, 과다반사 또는 반사저하, 근섬유다발수축(fasciculation), 근육 위축 및 마비를 특징으로 하는 진행성 근육 표현형을 발달시킨다. 이러한 운동 장애는 운동 뉴런의 손실로 인한 근육의 탈신경화(denervation)에 기인한다. ALS의 주요 병리학적 특징은 피질척수로(corticospinal tract)의 퇴행 및 하위 운동 뉴런(LMN) 또는 전각 세포(anterior horn cell)의 광범위한 손실(Ghatak et al., *J Neuropathol Exp Neurol.*, 1986, 45, 385-395), 일차 운동 피질에서의 베츠(Betz) 세포 및 추상세포의 퇴행 및 손실(Udaka et al., *Acta Neuropathol*, 1986, 70, 289-295; Maekawa et al., *Brain*, 2004, 127, 1237-1251) 및 운동 피질 및 척수에서의 반응성 신경아교증(reactive gliosis)(Kawamata et al., *Am J Pathol.*, 1992, 140, 691-707; 및 Schiffer et al., *J Neurol Sci.*, 1996, 139, 27-33)을 포함한다. ALS는 호흡 결합 및/또는 염증에 의해 보통 진단 후 3 내지 5년 이내에 치명적이다(Rowland LP and Shneibder NA, *N Engl. J. Med.*, 2001, 344, 1688-1700).

[0067]

ALS의 세포 특징은 퇴행성 운동 뉴런 및 주변 세포(예컨대, 성상세포)에서 단백질성 유비퀴틴화된 세포질 봉입체의 존재이다. 유비퀴틴화된 봉입체(즉, 루이체 유사 봉입체 또는 스케인 유사 봉입체)는 ALS에서 가장 흔하고 특이적인 유형의 봉입체며, 척수 및 뇌간의 LMN, 및 피질척수 상위 운동 뉴런(UMN)에서 발견된다(Matsumoto et al., *J Neurol Sci.*, 1993, 115, 208-213; 및 Sasak and Maruyama, *Acta Neuropathol.*, 1994, 87, 578-585). 일부 단백질은 유비퀴틴, Cu/Zn 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 1(SOD1), 페리페린 및 도르핀(Dorfin)을 비롯하여, 봉입체의 구성요소로 확인되었다. 신경미세섬유성 봉입체는 종종 ALS의 척수 운동 뉴런에서 유리질 거대 봉입체(HCI) 및 축삭 "스페로이드(spheroid)"에서 발견된다. 다른 유형 및 덜 특이적인 봉입체는 피질 위층에서의 부니나 바디(Bunina body)(시스타틴 C-함유 봉입체)와 크레센트(Crescent) 모양의 봉입체(SCI)를 포함한다. ALS에서 나타나는 다른 신경병리학적 특징은 골지체의 분절화, 미토콘드리아의 액포화 및 시냅스 말단의 초미세구조의 비정상을 포함한다(Fujita et al., *Acta Neuropathol.*, 2002, 103, 243-247).

[0068]

추가로, 전두측두엽 치매 FTD-ALS에서의 피질 위축(전두엽 및 측두엽 포함)이 또한 관찰되며, 이는 FTD-ALS 환자에서 인지 장애를 야기할 수 있다.

[0069]

ALS는 복잡하고 다요인성 질환이고, ALS 발병기전을 담당하는 것으로 가설되는 다수의 메커니즘은 비제한적으로, 단백질 분해의 기능장애, 글루타메이트 흥분독성, 미토콘드리아 기능장애, 아폽토시스, 산화 스트레스, 염증, 단백질 미스폴딩(misfolding) 및 응집, 비정상적인 RNA 대사, 및 변경된 유전자 발현을 포함한다.

[0070]

ALS 사례의 약 10% 내지 15%는 질환의 가족력이 있으며, 이러한 환자는 가족성 ALS(fALS) 또는 유전된 환자라고 지칭되며, 일반적으로 유전 및 높은 침투도의 멘델식 우성 방식으로 유전된다. 나머지(약 85% 내지 95%)는 이들은 기록된 가족력과는 관련이 없기 때문에 산발성 ALS(sALS)으로 분류되지만, 대신에 비제한적으로 환경적인 요인, 유전적 다형성, 체세포 돌연변이 및 가능한 유전-환경적 상호작용을 포함하는 다른 위험 요소에 기인하는 것으로 생각된다. 대부분의 경우에서, 가족성(또는 유전성) ALS는 상염색체 우성 질환으로 유전되지만, 상염색체 열성 및 X-연관된 유전 및 불완전한 침투가 있는 내력이 존재한다. 산발성 및 가족성 형태는 임상적으로 구분할 수 없고, 이는 일반적인 병인을 시사한다. ALS에서 운동 뉴런의 선택적인 사멸의 정확한 원인은 여전히 불분명하다. 두 형태의 질환에 대한 fALS에서 유전적인 요인을 이해하는 과정이 밝혀질 수 있다.

[0071]

최근에, ALS의 유전적 원인으로의 폭발적인 증가는 fALS의 원인으로 공지된 10개 이상의 상이한 유전자에서 돌연변이를 발견하였다. 가장 흔한 한 가지는 Cu/Zn 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 1(SOD1; 약 20%)을 암호화하는 유전자(Rosen DR et al., *Nature*, 1993, 362, 59-62), 육종에서 응합됨/지방육종에서 번역됨(FUS/TLS; 1 내지 5%) 및 TDP-43(TARDBP; 1 내지 5%)에서 발견된다. 최근에, C9 또는 F72 유전자에서의 헥사뉴클레오티드 반복 확장(GGGGCC)_n은 서양인에서 fALS의 가장 빈번한(약 40%) 원인으로 확인되었다(Renton et al., *Nat. Neurosci.*, 2014, 17, 17-23 참조). ALS에서 돌연변이된 다른 유전자는 알신(ALS2), 세나탁신(SETX), 소포-관련된 막 단백질(VAPB), 및 안지오제닌(ANG)을 포함한다. fALS 유전자는 상이한 세포 메커니즘을 제어하며, 이는 ALS의 병인이 복잡하고 결국 운동 뉴런 퇴행을 야기하는 일부 상이한 처리과정과 관련되어 있을 수 있음을 시사한다.

[0072]

SOD1은 포유류에서 확인되고 특성확인되는 3종의 인간 슈퍼옥사이드 디스뮤타제: 구리-아연 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(Cu/ZnSOD 또는 SOD1), 망간 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(MnSOD 또는 SOD2), 및 세포외 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(ECSOD 또는 SOD3) 중 하나이다. SOD1은 서브유닛 당 하나의 구리- 및 하나의 아연-결합 부위를 갖는 153-잔기 폴리펩티드의 32 kDa의 동형이합체이며, 이는 인간 21번 염색체상의 SOD1 유전자(GeneBank 접근 번호 NM_000454.4)에 의해 암호화된다(표 2 참조). SOD1은 결합된 구리 이온에서 슈퍼옥사이드 음이온(O²⁻)의 분자

산소(O_2) 및 과산화수소(H_2O_2)로의 반응을 촉매한다. SOD1의 세포내 농도는 높으며(10 내지 100 μM 의 범위), 이는 중추신경계(CNS)에서의 총 단백질 농도의 1%를 차지한다. 단백질은 진핵생물 세포의 세포질뿐만 아니라, 핵, 리소좀, 퍼옥시좀 및 미토콘드리아 막간 공간(intermembrane space)에 위치한다(Lindenau J et al., *Glia*, 2000, 29, 25-34).

[0073] SOD1 유전자의 돌연변이는 fALS 환자에서 15 내지 20% 및 모든 ALS 경우에서 1 내지 2% 까지 나타난다. 현재, 153-아미노산 SOD1 폴리펩티드를 통해 분포된 170종 이상의 상이한 돌연변이가 ALS를 유발하는 것으로 밝혀졌고, 업데이트된 목록을 ALS 온라인 유전자 데이터베이스(ALSOD)(Wroe R et al., *Amyotroph Lateral Scler.*, 2008, 9, 249-250)에서 찾을 수 있다. 표 1은 ALS에서 SOD1의 돌연변이의 일부 예를 나열한다. 이러한 돌연변이는 결실, 삽입 및 C-말단 절단도 발생하지만, 우세하게는 단일 아미노산 치환(즉, 미스센스 돌연변이)이다. 상이한 SOD1 돌연변이는 상이한 지리적 분포 패턴을 나타낸다. 예컨대, SOD1 유전자 돌연변이에 의해 야기된 ALS를 가진 모든 미국인의 40 내지 50%는 Ala4Val(또는 A4V)의 특정 돌연변이를 갖는다. A4V 돌연변이는 전형적으로 심각한 정후 및 증상과 관련되어 있으며 생존 기간은 전형적으로 2 내지 3년이다. I113T 돌연변이는 영국에서 가장 흔한 돌연변이이다. 유럽에서 가장 흔한 돌연변이는 D90A 치환이며 생존 기간은 보통 10년 초과이다.

[0074] [표 1]

ALS에서의 SOD1 돌연변이의 예

위치	돌연변이
엑손 1(220bp)	Q22L; E21K,G; F20C; N19S; G16A,S; V14M,S; G12R; G10G,V,R; L8Q,V; V7E; C6G,F; V5L; A4T,V,S
엑손 2(97bp)	T54R; E49K; H48R,Q; V47F,A; H46R; F45C; H43R; G41S,D; G37R; V29,insA
엑손 3(70bp)	D76Y,V; G72S,C; L67R; P66A; N65S; S59I,S
엑손 4(118bp)	D124G,V; V118L,insAAAC; L117V; T116T; R115G; G114A; I113T,F; I112M,T; G108V; L106V,F; S106L,delTCACTC; I104F; D101G,Y,H,N; E100G,K; I99V; V97L,M; D96N,V; A95T,V; G93S,V,A, C,R,D; D90V,A; A89T,V; T88delACTGCTGAC; V87A,M; N86I,S,D,K; G85R,S; L84V,F; H80R
엑손 5(461bp)	I151T,S; I149T; V148I,G; G147D,R; C146R, 정지; A145T,G; L144F,S; G141E, 정지; A140A,G; N139D,K,H,N; G138E; T137R; S134N; E133V,delGAA,insTT; E132insTT; G127R,insTGGG; L126S,delTT,정지; D126,delTT

[0075]

[0076] SOD1 유전자 결함과 관련된 신경세포 사멸의 메커니즘을 조사하기 위해서, SOD1-관련 ALS의 몇몇 설치류 모델이 당업계에서 개발되었고, 이는 미스센스 돌연변이, 작은 결실 또는 삽입을 비롯하여 상이한 돌연변이를 갖는 인간 SOD1 유전자를 발현한다. 비제한적인 ALS 마우스 모델의 예로는 SOD1^{G93A}, SOD1^{A4V}, SOD1^{G37R}, SOD1^{G85R}, SOD1^{D90A}, SOD1^{L84V}, SOD1^{I113T}, SOD1^{H36R/H48Q}, SOD1^{G127X}, SOD1^{L126X} 및 SOD1^{L126delTT}가 포함된다. 2종의 상이한 인간 SOD1 돌연변이를 갖는 이러한 2종의 형질전환 랙트 모델: SOD1^{H46R} 및 SOD1^{G93R}이 존재한다. 이러한 설치류 ALS 모델은, 인간 ALS 환자와 유사한 근육 약화, 및 인간 질환의 몇몇 특징, 특히 척추 운동 뉴런의 선택적인 사멸, 운동 뉴런에서 단백질 봉입체의 응집 및 미세아교세포 활성화를 반영하는 기타 병인적 특징을 발달시킬 수 있다. 형질 전환 설치류는 인간 SOD1-관련 ALS 질환의 우수한 모델이이며, 질환 발병을 연구하고 질환 치료법을 개발하기 위한 모델을 제공한다는 것이 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0077] 동물 및 세포 모델에서의 연구는 SOD1 병원성 변이체가 기능 획득에 의해 ALS를 유발한다는 것을 보여주었다. 즉, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 효소는 SOD1 돌연변이에 의해 변경될 때 신규하지만 해로운 특성을 얻는다. 예컨대, ALS에서 일부 SOD1 돌연변이된 변이체는 산화환원 주기의 방해에 의해 산화 스트레스를 증가시킨다(예컨대, 독성의 슈퍼옥사이드 라디칼의 축적 증가). 다른 연구는 또한 ALS에서의 일부 SOD1 돌연변이된 변이체가 이의 정상적인 생리학적 기능과 독립적인 독성의 특성을 획득할 수 있음을 나타낸다(예컨대, 미스폴딩된 SOD1 변이체의 비정상적인 응집). 비정상적인 산화환원 화학적 모델에서, 돌연변이체 SOD1은 불안정하며, 비정상적인 화학을 통해 비통상적인 기질과 반응하여 반응성 산소종(ROS)의 과생산을 야기한다. 단백질 독성 모델에서, 불안정하고 미스폴딩된 SOD1은 세포질 봉입체로 응집되어 세포 처리과정에 중요한 단백질을 격리시킨다. 이러한 두 가지 가설은 상호 배타적이지 않다. 활성 부위에서 금속에 결합하는 선택된 히스티딘 잔기의 산화는 SOD1 응집을 촉진한다는 것이 밝혀졌다.

- [0078] 응집된 돌연변이체 SOD1 단백질은 또한 미토콘드리아 기능부전(Vehvilainen P et al., *Front Cell Neurosci.*, 2014, 8, 126), 축삭 수송 장애, 비정상적인 RNA 대사, 신경아교세포 병리학 및 글루타메이트 흥분독성을 유발할 수 있다. 일부 산발성 ALS 경우에서, 미스풀딩된 야생형 SOD1 단백질은 가족성 ALS-관련 SOD1 변이체에서 나타나는 것과 유사한 "독성 형태(toxic conformation)"를 형성하는 질환에 걸린 운동 뉴런에서 발견된다(Rotunno MS 및 Bosco DA, *Front Cell Neurosci.*, 2013, 16, 7, 253). 이러한 증거는, ALS가 다른 신경퇴행성 질환, 예컨대 알츠하이머병 및 파킨슨병과 유사한 단백질 풀딩 질환임을 시사한다.
- [0079] 현재, ALS를 겪는 환자가 이용가능한 치료법이 없다. 유일하게 FDA에서 승인된 약물은 글루타메이트 방출을 저해하는 릴루졸로, ALS에 대해 중간 정도의 효과를 가지며, 18개월 동안 복용하는 경우 단지 2 내지 3개월 까지만 생존을 연장시킨다. 불행하게도, 릴루졸을 복용하는 환자는 질환 진행의 늦춤 또는 근육 기능의 개선을 경험하지 못한다. 따라서, 릴루졸은 치료법 또는 효과적인 치료법을 제시하지 않는다. 연구자들은 보다 우수한 치료제를 계속해서 찾고 있다.
- [0080] SOD1 응집을 예방 또는 개선할 수 있는 치료적 접근법이 이미 시험되어 왔다. 예컨대, 히드록실아민 유도체인 애리모클로몰(arimoclomol)은 열 충격 단백질을 표적화하는 약물이며, 이는 이러한 응집체에 대한 세포 방어 메커니즘이다. 연구는 애리모클로몰을 이용한 치료가 SOD1 마우스 모델에서 근육 기능을 개선하였음을 보여주었다. ALS에서 하나 이상의 세포 결합을 표적화하는 다른 약물은 AMPA 길항제, 예컨대 운동 뉴런에 대한 글루타메이트-유도된 흥분독성을 감소시킬 수 있는 베타-락탐 항체인 탈람파넬(talampbane); 산화 유도된 운동 뉴런 사멸을 저해할 수 있는 브로모크립틴(Bromocriptine)(예컨대, 미국공개특허 제20110105517호; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨); SOD1 유전자 발현을 감소시킬 수 있는 1,3-디페닐우레아 유도체 또는 다중효소 저해제(예컨대, 미국공개특허 제20130225642호; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨); 미토콘드리아에서 산화 반응을 개선할 수 있는 도파민 작용제인 프라미펙솔(pramipexole) 및 이의 거울상이성질체인 덱스프라미펙솔(dexpramipexole); 사이클로옥시게나제 효소를 저해하는 니메술리드(nimesulide)(미국공개특허 제20060041022호 전체를 참고로서 본문에 포함함); 자유 라디칼 스캐빈저로 작용하는 약물(미국특허 제6,933,310호 및 PCT 공개특허 제WO2006075434호의 각 내용 전체를 참고문헌으로서 본문에 포함)을 포함할 수 있다.
- [0081] 비정상적인 SOD1 단백질 응집을 저해하기 위한 또 다른 접근법은 ALS에서 SOD1 유전자 발현을 침묵/저해하는 것이다. 돌연변이된 대립유저자의 특정 유전자 침묵을 위한 작은 간섭 RNA가 fALS의 치료에 대해 치료학적으로 유익하다는 것이 보고되었다(예컨대, Ralgh GS et al., *Nat. Medicine*, 2005, 11(4), 429-433; 및 Raoul C et al., *Nat. Medicine*, 2005, 11(4), 423-428; 및 Maxwell MM et al., *PNAS*, 2004, 101(9), 3178-3183; 및 Ding H et al., *Chinese Medical J.*, 2011, 124(1), 106-110; 및 Scharz DS et al., *Plos Genet.*, 2006, 2(9), e140; 이의 각 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨).
- [0082] ALS에서 SOD1 유전자를 표적화하고 SOD1 발현을 조절하는 다수의 다른 RNA 치료제가 당업계에 교시되어 있다. 이러한 RNA에 기초한 제제는 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 이중 가닥의 작은 간섭 RNA를 포함한다. 예컨대, Wang H et al., *J Biol. Chem.*, 2008, 283(23), 15845-15852); 미국특허 제7,498,316호; 제7,632,938호; 제7,678,895호; 제7,951,784호; 제7,977,314호; 제8,183,219호; 제8,309,533호 및 제8,586,554호; 및 미국공개특허 제2006/0229268 및 2011/0263680호(각 내용 전체가 본원에 참조로서 포함됨)를 참조한다.
- [0083] 본 발명은 조절성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 분자 및 이의 설계 및 제조 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터와 같은 바이러스 벡터를 이용한다. 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터는 운동 뉴런으로의 활성제의 전달을 증가시킬 수 있다. SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화하는 dsRNA는 세포내에서 SOD1 유전자 발현(예컨대, mRNA 수준)을 현저하게 저해할 수 있고; 따라서, 단백질 응집 및 봉합체 형성, 증가된 자유 라디칼, 미토콘드리아 기능부전 및 RNA 대사와 같은 세포 내에서 SOD1 발현 유도된 스트레스를 개선할 수 있다.
- [0084] 이러한 siRNA 매개된 SOD1 발현 저해가 ALS 치료에 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 환자에서 ALS의 치료 및/또는 개선 방법은, 환자에게 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터의 유효량을 세포 내로 투여하는 것을 포함한다. 이러한 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터의 투여는 SOD1 유전자 발현의 억제/침묵을 야기하는 siRNA 분자를 암호화할 것이다.
- [0085] 하나의 구현예에서, 벡터, 예컨대 조절성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 AAV는 대상에서 돌연변이체 SOD1의 발현을 감소시킨다. 돌연변이체 SOD1의 감소는 또한 독성 메커니즘, 예컨대 비제한적으로 산화 스트레스, 미토콘드리아 기능부전, 손상된 축삭 수송, 비정상적인 RNA 대사, 신경아교세포 병리학 및/또는 글루타메이트 흥분독

성을 야기할 수 있는 독성 응집체의 형성을 감소시킬 수 있다.

[0086] 하나의 구현예에서, 백터, 예컨대 AAV 백터는 치료를 필요로 하는 대상에서 SOD1의 양을 감소시키며 따라서 본원에 기술된 치료적 이익을 제공한다.

본 발명의 조성물

siRNA 분자

[0089] 본 발명은 신경퇴행성 장애를 치료하기 위한 유전자 발현의 RNA 간섭(RNAi) 유도된 저해에 관한 것이다. SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA(본원에서 집합적으로 "siRNA 분자"로 지칭됨)가 본원에서 제공된다. 이러한 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 세포, 예컨대 운동 뉴런에서 SOD1 유전자 발현을 감소시키거나 침묵시킬 수 있으며, 이에 의해 비제한적으로 운동 뉴런 사멸 및 근육 위축과 같은 ALS 증상을 개선할 수 있다.

[0090] RNAi(전사 후 유전자 침묵(PTGS), 진압(quelling), 또는 공동 억제로도 공지됨)는 RNA 분자가 서열 특이적인 방식으로 전형적으로는 특이적인 mRNA 분자를 파괴시킴으로써 유전자 발현을 저해하는 전사 후 유전자 침묵 처리 과정이다. RNAi의 활성 구성요소는 작은 간섭 RNA(siRNA)라 불리는 짧은/작은 이중 가닥의 RNA(dsRNA)이며, 이는 전형적으로 15 내지 30개의 뉴클레오티드(예컨대, 19 내지 25개, 19 내지 24개 또는 19 내지 21개의 뉴클레오티드) 및 2개의 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함하며, 표적 유전자의 핵산 서열과 일치한다. 이러한 짧은 RNA 종은 보다 큰 dsRNA의 다이서(Dicer)-매개된 절단에 의해 생체내에서 자연적으로 생성될 수 있고, 이들은 포유류 세포에서 기능적이다.

[0091] 마이크로RNA(miRNA)로 명명된 자연적으로 발현된 작은 RNA 분자는 mRNA의 발현을 조절함으로써 유전자 침묵을 유도한다. RNA 유도된 침묵 복합체(RISC)를 함유하는 miRNA는 시드(seed) 영역이라고 불리는 miRNA의 5' 영역에서 2 내지 7개의 뉴클레오티드, 및 이의 3' 영역에서 다른 염기쌍과 완벽한 서열 상보성을 제시하는 mRNA를 표적화한다. 유전자 발현의 miRNA 매개된 유전자 발현의 하향 조절은 표적 mRNA의 절단, 표적 mRNA의 번역 억제 또는 mRNA 분해에 의해 야기될 수 있다. miRNA 표적화 서열은 보통 표적 mRNA의 3'-UTR에 위치한다. 단일 miRNA는 다양한 유전자로부터 100개 초과의 전사물을 표적화할 수 있고, 하나의 mRNA는 상이한 miRNA에 의해 표적화될 수 있다.

[0092] 특정 mRNA를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA는 시험관내에서 설계되고 합성되어 RNAi 처리과정을 활성화시키기 위해 세포 내에 도입될 수 있다. Elbashir 등은, 21-뉴클레오티드의 siRNA 듀플렉스(작은 간섭 RNA라고 칭해짐)가 포유류 세포에서 면역 반응을 유도하지 않고 강력하고 특이적인 유전자 넉다운에 영향을 미칠 수 있었음을 보여주었다(Elbashir SM et al., *Nature*, 2001, 411, 494-498). 이러한 초기 보고 이후로, siRNA에 의한 번역 후 유전자 침묵은 포유류 세포에서 유전자 분석을 위한 강력한 도구로서 등장하였으며, 신규한 치료제를 생산할 잠재력이 있다.

[0093] 시험관내에서 합성된 siRNA 분자는 RNAi를 활성화시키기 위해 세포 내로 도입될 수 있다. 내인성 dsRNA와 유사한 외인성 siRNA 듀플렉스는, 이것이 세포 내로 도입될 때 조립되어, siRNA 듀플렉스의 2개의 가닥 중 하나에 상보성인 RNA 서열(즉, 안티센스 가닥)에 대해 게놈 검색을 용이하게 하는 다중유닛 복합체인 RNA 유도된 침묵 복합체(RISC)를 형성할 수 있다. 이러한 처리과정 중에, siRNA의 센스 가닥(또는 패신저 가닥)이 복합체로부터 손실되는 반면, siRNA의 안티센스 가닥(또는 가이드 가닥)은 이의 상보성인 RNA와 매칭된다. 특히, siRNA 함유 RISC 복합체의 표적은 완벽한 서열 상보성을 제시하는 mRNA이다. 그 다음, siRNA 매개된 유전자 침묵이 발생하여, 표적을 절단, 방출 및 분해한다.

[0094] 표적 mRNA와 상동성인 센스 가닥 및 표적 mRNA와 상보성인 안티센스 가닥으로 구성된 siRNA 듀플렉스는, 표적 RNA 파괴 효율의 관점에서 단일 가닥(ss)-siRNA(예컨대, 안티센스 가닥 RNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)의 사용에 비해 보다 더 많은 이점을 제공한다. 다수의 경우에서, 상응하는 듀플렉스의 효과적인 유전자 침묵 효능을 달성하기 위해서는 보다 높은 농도의 ss-siRNA가 요구된다.

[0095] 임의의 전술된 분자는 AAV 백터 또는 백터 게놈에 의해 암호화될 수 있다.

SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 이중가닥의 설계 및 서열

[0097] siRNA의 설계에 대한 일부 지침이 당업계에 제안되어 있다. 이러한 지침은 일반적으로 침묵되는 유전자에서 한 영역을 표적화하는 19-뉴클레오티드의 듀플렉스 영역, 대칭의 2 내지 3개 뉴클레오티드의 3' 오버행, 5-인산염 및 3-히드록실 기를 생성할 것을 권장한다. siRNA 서열 선호를 지배할 수 있는 다른 규칙으로는, 비제한적으로

(i) 안티센스 가닥의 5' 말단에서의 A/U; (ii) 센스 가닥의 5' 말단에서의 G/C; (iii) 안티센스 가닥의 5' 말단 1/3에서의 5개 이상의 A/U 잔기; 및 (iv) 9개 초과의 길이의 뉴클레오티드의 임의의 GC 스트레치의 부재가 포함된다. 이러한 고려에 따라, 표적 유전자의 특정 서열과 함께, 포유류의 표적 유전자 발현을 억제하기 위해 필수적인 고도로 효과적인 siRNA 분자가 용이하게 설계될 수 있다.

[0098] 본 발명에 따르면, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 분자(예컨대, siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA)가 설계된다. 이러한 siRNA 분자는 SOD1 유전자 발현 및 단백질 생산을 특이적으로 억제할 수 있다. 일부 양태에서, siRNA 분자는 세포에서 SOD1 유전자 변이체, 즉, ALS 질환을 갖는 환자에서 식별되는 돌연변이된 SOD1 전사물(예컨대, 표 1의 돌연변이)을 선택적으로 "넉아웃" 시키기 위해 설계되고 사용된다. 일부 양태에서, siRNA 분자는 세포에서 SOD1 유전자 변이체를 선택적으로 "넉다운" 시키기 위해 설계되고 사용된다. 다른 양태에서, siRNA 분자는 SOD1 유전자에서 임의의 특정 돌연변이와는 무관하게 야생형 및 SOD1 유전자의 돌연변이된 대립유전자 둘 다를 저해 또는 억제할 수 있다.

[0099] 하나의 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자는 두 가닥 모두 함께 혼성화되어 듀플렉스 구조를 형성하는, 센스 가닥 및 상보성인 안티센스 가닥을 포함한다. 안티센스 가닥은 SOD1 mRNA 서열을 표적-특이적인 RNAi를 지시하기에 충분한 상보성을 가지고 있으며, 즉, siRNA 분자는 RNAi 기구(machinery) 또는 처리과정에 의해 표적 mRNA의 파괴를 유발시키기에 충분한 서열을 가지고 있다.

[0100] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥 및 표적 mRNA 서열은 100% 상보성이다. 안티센스 가닥은 표적 mRNA 서열의 임의의 부분에 대해 상보성일 수 있다.

[0101] 다른 구현예에서, 안티센스 가닥 및 표적 mRNA 서열은 하나 이상의 미스매치(mismatch)를 포함한다. 비제한적인 예로서, 안티센스 및 표적 mRNA 서열은 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 또는 적어도 20 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 50%, 20 내지 60%, 20 내지 70%, 20 내지 80%, 20 내지 90%, 20 내지 95%, 20 내지 99%, 30 내지 40%, 30 내지 50%, 30 내지 60%, 30 내지 70%, 30 내지 80%, 30 내지 90%, 30 내지 95%, 30 내지 99%, 40 내지 50%, 40 내지 60%, 40 내지 70%, 40 내지 80%, 40 내지 90%, 40 내지 95%, 40 내지 99%, 50 내지 60%, 50 내지 70%, 50 내지 80%, 50 내지 90%, 50 내지 95%, 50 내지 99%, 60 내지 70%, 60 내지 80%, 60 내지 90%, 60 내지 95%, 60 내지 99%, 70 내지 80%, 70 내지 90%, 70 내지 95%, 70 내지 99%, 80 내지 90%, 80 내지 95%, 80 내지 99%, 90 내지 95%, 90 내지 99% 또는 95 내지 99% 상보성이다.

[0102] 본 발명에 따르면, siRNA 분자는 약 10 내지 50개 이상의 뉴클레오티드 길이, 즉, 10 내지 50개의 뉴클레오티드(또는 뉴클레오티드 유사체)를 포함하는 각각의 가닥의 길이를 갖는다. 바람직하게는, siRNA 분자는 각 가닥에서 약 15 내지 30, 예컨대 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오티드의 길이를 가지며, 가닥 중 하나는 표적 영역에 대해 충분히 상보성이다. 하나의 구현예에서, siRNA 분자는 약 19 내지 25개, 19 내지 24개 또는 19 내지 21개의 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0103] 일부 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자는 약 19개의 뉴클레오티드 내지 약 25개의 뉴클레오티드, 및 3' 말단에 2개의 오버행 뉴클레오티드를 포함하는 합성 RNA 듀플렉스일 수 있다. 일부 양태에서, siRNA 분자는 변형되지 않은 RNA 분자일 수 있다. 다른 양태에서, siRNA 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 염기, 당 또는 백본 변형을 함유할 수 있다.

[0104] 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터(예컨대, AAV 벡터), 게놈, 또는 세포로의 전달을 위한 핵산 발현 벡터에 암호화될 수 있다.

[0105] DNA 발현 플라스미드는 세포에서 본 발명의 siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA를 안정적으로 발현시키고 표적 유전자의 장기 저해를 달성하기 위해 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, siRNA 듀플렉스의 센스 및 안티센스 가닥은, 전형적으로 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)라고 불리는 줄기-루프 구조의 발현을 야기하는 짧은 스페이서 서열에 의해 연결된다. 헤어핀은 다이서에 의해 인식되고 절단되어 성숙한 siRNA 분자를 생성한다.

[0106] 본 발명에 따르면, SOD1 mRNA를 표적화하는 siRNA 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는 AAV 벡터가 제조되며, 이러한 AAV 벡터의 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAV-DJ8 및 AAV-DJ 및 이들의 변이체일 수 있다.

[0107] 일부 구현예에서, 본 발명의 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 표적 mRNA(즉, SOD1)를 억제(또는 분해)한다. 따라서, siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 세포, 예컨대 운동 뉴런에서 SOD1 유전자 발현을 실질적으로 저해하는데 사용될 수 있다. 일부 양태에서, SOD1 유전자 발현의 저해는 약 20% 이상까지, 바람직하게는 적

어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%까지, 또는 적어도 20 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 50%, 20 내지 60%, 20 내지 70%, 20 내지 80%, 20 내지 90%, 20 내지 95%, 20 내지 100%, 30 내지 40%, 30 내지 50%, 30 내지 60%, 30 내지 70%, 30 내지 80%, 30 내지 90%, 30 내지 95%, 30 내지 100%, 40 내지 50%, 40 내지 60%, 40 내지 70%, 40 내지 80%, 40 내지 90%, 40 내지 95%, 40 내지 100%, 50 내지 60%, 50 내지 70%, 50 내지 80%, 50 내지 90%, 50 내지 95%, 50 내지 100%, 60 내지 70%, 60 내지 80%, 60 내지 90%, 60 내지 95%, 60 내지 100%, 70 내지 80%, 70 내지 90%, 70 내지 95%, 70 내지 100%, 80 내지 90%, 80 내지 95%, 80 내지 100%, 90 내지 95%, 90 내지 100% 또는 95 내지 100%까지 저해를 지칭한다. 따라서, 표적화된 유전자의 단백질 생산은 적어도 약 20 까지, 바람직하게는 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%까지, 또는 적어도 20 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 50%, 20 내지 60%, 20 내지 70%, 20 내지 80%, 20 내지 90%, 20 내지 95%, 20 내지 100%, 30 내지 40%, 30 내지 50%, 30 내지 60%, 30 내지 70%, 30 내지 80%, 30 내지 90%, 30 내지 95%, 30 내지 100%, 40 내지 50%, 40 내지 60%, 40 내지 70%, 40 내지 80%, 40 내지 90%, 40 내지 95%, 40 내지 100%, 50 내지 60%, 50 내지 70%, 50 내지 80%, 50 내지 90%, 50 내지 95%, 50 내지 100%, 60 내지 70%, 60 내지 80%, 60 내지 90%, 60 내지 95%, 60 내지 100%, 70 내지 80%, 70 내지 90%, 70 내지 95%, 70 내지 100%, 80 내지 90%, 80 내지 95%, 80 내지 100%, 90 내지 95%, 90 내지 100% 또는 95 내지 100%까지 저해될 수 있다. SOD1 유전자는 야생형 유전자이거나 하나 이상의 돌연변이를 갖는 돌연변이된 SOD1 유전자일 수 있다. 따라서, 단백질은 야생형 단백질 또는 하나 이상의 돌연변이가 있는 돌연변이된 폴리펩티드이다.

[0108] 본 발명에 따라, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 배양된 세포에서 SOD1 mRNA 수준을 감소시키는 이들의 능력을 위해 설계 및 시험되었다. 이러한 siRNA 듀플렉스는 표 3에 나열된 것들을 포함한다. 비제한적인 예로서, siRNA 듀플렉스는 siRNA 듀플렉스 ID: D-2757, D-2806, D-2860, D-2861, D-2875, D-2871, D-2758, D-2759, D-2866, D-2870, D-2823 및 D-2858일 수 있다.

[0109] 하나의 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA의 3' 줄기 아암(arm)은, 5' 줄기 아암에서 패신저 가닥의 5' 말단의 상류에 13개의 뉴클레오티드들 중 11개에 대해 상보성인, 가이드 가닥의 3' 말단의 하류에 11개의 뉴클레오티드를 가질 수 있다.

[0110] 하나의 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 조절성 폴리뉴클레오티드의 3' 줄기 아암의 3' 말단의 6개의 뉴클레오티드 하류에 있는 시스테인을 가질 수 있다.

[0111] 하나의 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 가이드 가닥에 대한 miRNA 시드 매치를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 패신저 가닥에 대한 miRNA 시드 매치를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 가이드 또는 패신저 가닥에 대한 시드 매치를 포함하지 않는다.

[0112] 하나의 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 가이드 가닥에 대해 유의한 전장 비표적(off target)을 거의 갖지 않을 수 있다. 또 다른 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 패신저 가닥에 대해 유의한 전장 비표적을 거의 갖지 않을 수 있다. 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 패신저 가닥에 대해 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 1 내지 5%, 2 내지 6%, 3 내지 7%, 4 내지 8%, 5 내지 9%, 5 내지 10% 6 내지 10% 미만의 전장 비표적을 가질 수 있다. 또 다른 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 가이드 가닥 또는 패신저 가닥에 대해 유의한 전장 비표적을 거의 갖지 않을 수 있다. 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 가이드 또는 패신저 가닥에 대해 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 1 내지 5%, 2 내지 6%, 3 내지 7%, 4 내지 8%, 5 내지 9%, 5 내지 10%, 6 내지 10% 미만의 전장 비표적을 가질 수 있다.

[0113] 하나의 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 시험관내에서 높은 활성을 가질 수 있다. 또 다른 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 시험관내에서 낮은 활성을 가질 수 있다. 또 다른 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA는 시험관내에서 높은 가이드 가닥 활성 및 낮은 패신저 가닥 활성을 가질 수 있다.

[0114] 하나의 구현예에서, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 시험관내에서 높은 가이드 가닥 활성 및 낮은 패신저 가닥 활성을 갖는다. 가이드 가닥에 의한 표적 네-다운 (KD)은 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 99.5% 또는 100%일 수 있다. 가이드 가닥에 의한 표적 네-다운은 60 내지 65%, 60 내지 70%, 60 내지 75%, 60 내지 80%, 60 내지 85%, 60 내지 90%, 60 내지 95%, 60 내지 99%, 60

내지 99.5%, 60 내지 100%, 65 내지 70%, 65 내지 75%, 65 내지 80%, 65 내지 85%, 65 내지 90%, 65 내지 95%, 65 내지 99%, 65 내지 99.5%, 65 내지 100%, 70 내지 75%, 70 내지 80%, 70 내지 85%, 70 내지 90%, 70 내지 95%, 70 내지 99%, 70 내지 99.5%, 70 내지 100%, 75 내지 80%, 75 내지 85%, 75 내지 90%, 75 내지 95%, 75 내지 99%, 75 내지 99.5%, 75 내지 100%, 80 내지 85%, 80 내지 90%, 80 내지 95%, 80 내지 99%, 80 내지 99.5%, 80 내지 100%, 85 내지 90%, 85 내지 95%, 85 내지 99%, 85 내지 99.5%, 85 내지 100%, 90 내지 95%, 90 내지 99%, 90 내지 99.5%, 90 내지 100%, 95 내지 99%, 95 내지 99.5%, 95 내지 100%, 99 내지 99.5%, 99 내지 100% 또는 99.5 내지 100%일 수 있다. 비제한적인 예로서, 가이드 가닥에 의한 표적 넉-다운 (KD)은 70% 초과이다.

[0115] 하나의 구현예에서, 가장 근접한 비표적에 대한 패신저 가닥의 IC_{50} 은 표적에 대한 가이드 가닥의 IC_{50} 에 100을 곱한 것을 초과한다. 비제한적인 예로서, 가장 근접한 비표적에 대한 패신저 가닥의 IC_{50} 이 표적에 대한 가이드 가닥의 IC_{50} 에 100을 곱한 것을 초과하는 경우, 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스 또는 암호화된 dsRNA는 시험관내에서 높은 가이드 가닥 활성 및 낮은 패신저 가닥 활성을 갖는다고 일컬어진다.

[0116] 하나의 구현예에서, 시험관내 또는 생체내에서, 가이드 가닥의 5' 처리과정은 5' 말단에서 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 시간의 정확한 시작 (n)을 갖는다. 비제한적인 예로서, 가이드 가닥의 5' 처리과정은 정확하며, 시험관내에서 5' 말단에서 99% 이상의 시간의 정확한 시작(n)을 갖는다. 비제한적인 예로서, 가이드 가닥의 5' 처리과정은 정확하며, 생체내에서 5' 말단에서 99% 이상의 시간의 정확한 시작(n)을 갖는다.

[0117] 하나의 구현예에서, 시험관내 또는 생체내에서 발현된 가이드-대-패신저(G:P) 가닥의 비는 1:99, 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10, 95:5, 또는 99:1이다. 비제한적인 예로서, 시험관내에서 가이드-대-패신저 가닥의 비는 80:20이다. 비제한적인 예로서, 생체내에서 가이드-대-패신저 가닥의 비는 80:20이다.

[0118] 하나의 구현예에서, dsRNA를 암호화하는 벡터 계놈의 완전성은 작제물 전체 길이의 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 99% 초과이다.

siRNA 변형

[0120] 일부 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자는, 전구체 또는 DNA로서 전달되지 않을 때, 화학적으로 변형되어 예컨대 비제한적으로 생체내에서 siRNA의 안정성을 증가시키는 것과 같이 RNA 분자의 일부 특징을 조절할 수 있다. 화학적으로 변형된 siRNA 분자는 인간의 치료 적용에 사용될 수 있으며, siRNA 분자의 RNAi 활성을 손상시키지 않으면서 개선된다. 비제한적인 예로서, siRNA 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 다의 3' 및 5' 말단 둘다에서 변형된다.

[0121] 일부 양태에서, 본 발명의 siRNA 듀플렉스는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 비제한적으로 당 변형된 뉴클레오티드, 핵염기 변형 및/또는 백본 변형을 함유할 수 있다. 일부 양태에서, siRNA 분자는 조합된 변형, 예컨대 조합된 핵염기 및 백본 변형을 함유할 수 있다.

[0122] 하나의 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 당-변형된 뉴클레오티드일 수 있다. 당 변형된 뉴클레오티드는, 비제한적으로 2'-플루오로, 2'-아미노 및 2'-티오 변형된 리보뉴클레오티드, 예컨대 2'-플루오로 변형된 리보뉴클레오티드를 포함한다. 변형된 뉴클레오티드는 당 모이어티 뿐만 아니라, 리보실이 아닌 당 또는 이의 유사체를 갖는 뉴클레오티드상에서 변형될 수 있다. 예컨대, 당 모이어티는 만노스, 아라비노스, 글루코파라노스, 갈락토파라노스, 4'-티오리보스 및 다른 당, 헤테로사이클, 또는 카보사이클일 수 있거나 이에 기초할 수 있다.

[0123] 하나의 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 핵염기-변형된 뉴클레오티드일 수 있다.

[0124] 하나의 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 백본-변형된 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 siRNA 듀플렉스는 백본에 다른 변형을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 사용된 정상적인 "백본"은 DNA 또는 RNA 분자에서 반복적으로 교대하는 당-인산염 서열을 지칭한다. 디옥시리보스/리보스 당은 3'-히드록실 및 5'-히드록실 기 둘 다에서 "포스포디에스테르" 결합/링커(PO 연결)로도 공지된 에스테르 연결에서 인산염 기에 결합된다. PO 백본은 "포스포로티오에이트 백본"(PS 연결)으로 변형될 수 있다. 일부 경우에서, 천연 포스포디에스테르 결합은 아미드 결합으로 대체될 수 있지만, 2개의 당 단위 사이의 4개의 원자는 유지된다. 이러한 아미드 변형은 올리고뉴클레오티드의 고상 합성을 촉진시킬 수 있고, siRNA 보체로 형성된 듀플렉스의 열역학적 안정성을 증가시킬 수 있다. 예컨대, Mesmaeker et al., *Pure & Appl. Chem.*, 1997, 3, 437-440(이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨)을 참조한다.

- [0125] 변형된 염기는 하나 이상의 원자 또는 기의 대체 또는 부가에 의해 변형된 뉴클레오티드 염기, 예컨대 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민, 우라실, 잔틴, 이노신 및 케오신을 지칭한다. 핵염기 모이어티에서의 변형의 일부 예는, 비제한적으로 알킬화, 할로겐화, 티올화, 아미노화, 아미드화 또는 아세틸화된 염기를 개별적으로 또는 조합하여 포함한다. 보다 특정한 예는, 예컨대 5-프로피닐우리딘, 5-프로피닐시티딘, 6-메틸아데닌, 6-메틸구아닌, N,N,-디메틸아데닌, 2-프로필아데닌, 2-프로필구아닌, 2-아미노아데닌, 1-메틸이노신, 3-메틸우리딘, 5-메틸시티딘, 5-메틸우리딘 및 5 위치에 변형을 갖는 다른 뉴클레오티드, 5-(2-아미노)프로필 우리딘, 5-할로시티딘, 5-할로우리딘, 4-아세틸시티딘, 1-메틸아데노신, 2-메틸아데노신, 3-메틸시티딘, 6-메틸우리딘, 2-메틸구아노신, 7-메틸구아노신, 2,2-디메틸구아노신, 5-메틸아미노에틸우리딘, 5-메틸옥시우리딘, 데아자뉴클레오티드 예컨대 7-데아자-아데노신, 6-아조우리딘, 6-아조시티딘, 6-아조티미딘, 5-메틸-2-티오우리딘, 다른 티오 염기 예컨대 2-티오우리딘 및 4-티오우리딘 및 2-티오시티딘, 디히드로우리딘, 슈도우리딘, 케오신, 아케오신, 나프틸 및 치환된 나프틸 기, 임의의 0- 및 N-알킬화된 퓨린 및 피리미딘 예컨대 N6-메틸아데노신, 5-메틸카보닐메틸우리딘, 우리딘 5-옥시아세트산, 피리딘-4-온, 피리딘-2-온, 폐닐 및 변형된 폐닐 기 예컨대 아미노페놀 또는 2,4,6-트리메톡시 벤젠, G-클램프 뉴클레오티드로 작용하는 변형된 시토신, 8-치환된 시티딘 및 구아닌, 5-치환된 우라실 및 티민, 아자피리미딘, 카복시히드록시알킬 뉴클레오티드, 카복시알킬아미노알킬 뉴클레오티드 및 알킬카보닐알킬화된 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0126] 하나의 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 단지 센스 가닥 상에 있을 수 있다.
- [0127] 또 다른 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 단지 안티센스 가닥 상에 있을 수 있다.
- [0128] 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오티드는 센스 및 안티센스 가닥 둘 다에 있을 수 있다.
- [0129] 일부 구현예에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 SOD1 mRNA 서열과 같은 표적 mRNA 서열과 쌍을 이루는 안티센스 가닥의 능력에 영향을 미치지 않는다.
- [0130] 벡터
- [0131] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 siRNA 분자는 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 벡터에 의해 암호화될 수 있다. 하나의 구현예에서, siRNA 분자는 바이러스 벡터에 의해 암호화된다. 바이러스 벡터는, 비제한적으로 헤르페스바이러스(HSV) 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등일 수 있다. 일부 특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 AAV 벡터이다.
- [0132] 레트로바이러스 벡터
- [0133] 일부 구현예에서, SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스는 레트로바이러스 벡터에 의해 암호화된다(예컨대, 미국특허 제5,399,346호; 제5,124,263호; 제4,650,764호 및 제4,980,289호 참조; 이의 각 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨).
- [0134] 아데노바이러스 벡터
- [0135] 아데노바이러스는, 생체내에서 핵산을 다양한 세포 유형으로 효율적으로 전달하도록 변형될 수 있는 진핵생물 DNA 바이러스이며, 유전자를 신경 세포에 표적화하는 것을 포함하여, 유전자 치료요법 프로토콜에서 광범위하게 사용되어 왔다. 다양한 복제 결합 아데노바이러스 및 최소 아데노바이러스 벡터가 핵산 치료제로 기술되어 왔다(예컨대, PCT 공개특허 제W0199426914호, 제WO 199502697호, 제W0199428152호, 제W0199412649호, 제W0199502697호 및 제W0199622378호 참조; 각 내용의 전체가 참조로서 본원에 포함됨). 이러한 아데노바이러스 벡터는 또한 본 발명의 siRNA 분자를 세포로 전달하는데에 사용될 수 있다.
- [0136] 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터
- [0137] 아데노-관련 바이러스(AAV)는 의존적인 파보바이러스(다른 파보바이러스와 마찬가지로)이고, 약 5000개 길이의 뉴클레오티드인 게놈을 갖는 단일 가닥의 비-외피 DNA 바이러스이고, 복제(Rep) 담당 단백질 및 캡시드(Cap)의 구조적 단백질을 암호화하는 2개의 개방형 해독 틀을 함유한다. 개방형 해독 틀은 바이러스 게놈의 복제 기점으로 작용하는 2개의 역위 말단 반복(ITR) 서열에 의해 측부에 위치한다(flanked). 추가로, AAV 게놈은 포장(packaging) 서열을 함유하여 바이러스 게놈을 AAV 캡시드 내로 포장할 수 있다. AAV 벡터는 감염된 세포에서 생산적인 감염을 겪기 위해 보조-헬퍼(co-helper)(예컨대, 아데노바이러스)를 필요로 한다. 이와 같은 헬퍼 기능의 부재시, AAV 비리온은 본질적으로 숙주 세포에 들어가서 세포의 게놈에 통합된다.
- [0138] AAV 벡터는 일부 독특한 특징에 기인하여 siRNA 전달에 대해 조사되어 왔다. 비제한적인 특징의 예는, (i) 분열

및 비-분열 세포 둘 다를 감염시키는 능력; (ii) 인간 세포를 비롯하여 감염성 대한 광범위한 숙주 범위; (iii) 야생형 AAV는 임의의 질환과 관련되어 있지 않고, 감염된 세포에서 복제되지 않는 것으로 나타남; (iv) 백터에 대한 세포-매개된 면역 반응 결여; 및 (v) 숙주 염색체에서의 비-통합적인 성질로 인해 장기 발현에 대한 가능성 감소를 포함한다. 또한, AAV 백터에 의한 감염은 세포 유전자 발현의 패턴 변화에 최소한의 영향을 미친다 (Stillwell and Samulski et al., *Biotechniques*, 2003, 34, 148).

[0139] 전형적으로, siRNA 전달을 위한 AAV 백터는 바이러스 게놈내에서 기능적인 Rep 및 Cap 단백질을 암호화하는 서열이 결여된 복제 결함인 재조합 바이러스 백터일 수 있다. 일부 경우에서, 결함있는 AAV 백터는 대부분 또는 모든 암호화 서열이 결여되어 있을 수 있으며, 본질적으로 단지 하나 또는 2개의 AAV ITR 서열 및 포장 서열만을 함유한다.

[0140] AAV 백터는 또한 자기-상보성인 AAV 백터 (scAAV)를 포함할 수 있다. scAAV 백터는 함께 어닐링(annealing)되어 이중 가닥의 DNA를 형성하는 두 DNA 가닥을 함유한다. 제2가닥 합성을 생략함으로써, scAAV는 세포에서의 신속한 발현을 가능케 한다.

[0141] 하나의 구현예에서, 본 발명에 사용된 AAV 백터는 scAAV이다.

[0142] 하나의 구현예에서, 본 발명에 사용된 AAV 백터는 ssAAV이다.

[0143] AAV 백터의 생산 및/또는 변형 방법이 위형(pseudotype) AAV 백터와 같이 당업계에 공개되어 있다(PCT 공개특허 제WO200028004호; 제WO200123001호; 제WO2004112727호; 제WO 2005005610호 및 제WO 2005072364호; 이의 각 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨).

[0144] siRNA 분자에 대한 핵산 서열을 포함하는 AAV 백터가, 비제한적으로 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAV-DJ8 및 AAV-DJ를 비롯하여 다양한 혈청형으로부터 제조 또는 유도될 수 있다. 일부 경우에서, AAV의 상이한 혈청형은 함께 또는 다른 유형의 바이러스와 혼합되어 키메라 AAV 백터를 생산할 수 있다.

[0145] 하나의 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 백터는 포유류 세포 내로 도입될 수 있다.

[0146] AAV 백터는 전달 효율을 향상시키기 위해 변형될 수 있다. 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 이와 같이 변형된 AAV 백터는 효율적으로 포장될 수 있고, 고주파에서 최소의 독성으로 표적 세포를 성공적으로 감염시키는데 사용될 수 있다.

[0147] 일부 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 백터는 인간 혈청형 AAV 백터일 수 있다. 이러한 인간 AAV 백터는 임의의 공지된 혈청형, 예컨대 AAV1 내지 AAV11 중 임의의 하나의 혈청형으로부터 유도될 수 있다. 비제한적인 예로서, AAV 백터는 AAV1-유도된 캡시드에 AAV1-유도된 게놈을 포함하는 백터; AAV2-유도된 게놈에 AAV2-유도된 게놈을 포함하는 백터; AAV4 유도된 캡시드에 AAV4-유도된 게놈을 포함하는 백터; AAV6 유도된 캡시드에 AAV6-유도된 게놈을 포함하는 백터 또는 AAV9 유도된 캡시드에 AAV9-유도된 게놈을 포함하는 백터일 수 있다.

[0148] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 백터는, 2종 이상의 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래한 서열 및/또는 구성요소를 함유하는 위형 혼성 또는 키메라 AAV 백터일 수 있다. 위형 AAV 백터는 하나의 AAV 혈청형으로부터 유도된 AAV 게놈 및 적어도 부분적으로 상이한 AAV 혈청형으로부터 유도된 캡시드 단백질을 포함하는 백터일 수 있다. 비제한적인 예시로서, 이러한 위형 AAV 백터는, AAV1-유도된 캡시드에 AAV2-유도된 게놈을 포함하는 백터; 또는 AAV6-유도된 캡시드에 AAV2-유도된 게놈을 포함하는 백터; 또는 AAV4-유도된 캡시드에 AAV2-유도된 게놈을 포함하는 백터; 또는 AAV9-유도된 캡시드에 AAV2-유도된 게놈을 포함하는 백터일 수 있다. 이와 같은 방식으로, 본 발명은 임의의 혼성형 또는 키메라 AAV 백터를 고려한다.

[0149] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 백터는 siRNA 분자를 중추신경계에 전달하기 위해 사용될 수 있다(미국특허 제6,180,613호의 전체 내용을 참고문헌으로서 본문에 포함).

[0150] 일부 양태에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 백터는 비-바이러스 기원의 펩티드를 포함하여 변형된 캡시드를 추가로 포함할 수 있다. 다른 양태에서, AAV 백터는 CNS 특이적인 키메라 캡시드를 함유하여 암호화된 siRNA 듀플렉스의 뇌 및 척수로의 전달을 용이하게 할 수 있다. 예컨대, 가변 영역(VR) 서열 및 구조를 확인하기 위해, CNS 향성(tropism)을 나타내는 AAV 변이체로부터 캡 뉴클레오티드 서열을 정렬

을 작제할 수 있다.

[0151] 하나의 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터는 다시스트론성 (polycistronic) 분자인 siRNA 분자를 암호화할 수 있다. siRNA 분자는 siRNA 분자 영역 사이에 하나 이상의 링커(linker)를 추가로 포함할 수 있다.

[0152] 하나의 구현예에서, 암호화된 siRNA 분자는, 비제한적으로 SV40 인트론을 갖는 CMV, U6, CBA 또는 CBA 프로모터와 같이 발현 벡터에서 프로모터의 하류에 위치할 수 있다. 추가로, 암호화된 siRNA 분자는 또한 발현 벡터에서 아데닐산중합반응(polyadenylation) 서열의 상류에 위치할 수 있다. 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 프로모터의 하류 및/또는 아데닐산중합반응 서열의 상류로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 30 초과의 뉴클레오티드 이내에 위치할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 프로모터의 하류 및/또는 아데닐산중합반응 서열의 상류로부터 1 내지 5, 1 내지 10, 1 내지 15, 1 내지 20, 1 내지 25, 1 내지 30, 5 내지 10, 5 내지 15, 5 내지 20, 5 내지 25, 5 내지 30, 10 내지 15, 10 내지 20, 10 내지 25, 10 내지 30, 15 내지 20, 15 내지 25, 15 내지 30, 20 내지 25, 20 내지 30 또는 25 내지 30 뉴클레오티드 이내에 위치할 수 있다. 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 프로모터의 하류 및/또는 아데닐산중합반응 서열의 상류로부터 처음 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25% 또는 25% 초과의 뉴클레오티드 이내에 위치할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 프로모터의 하류 및/또는 아데닐산중합반응 서열의 상류로부터 처음 1 내지 5%, 1 내지 10%, 1 내지 15%, 1 내지 20%, 1 내지 25%, 5 내지 10%, 5 내지 15%, 5 내지 20%, 5 내지 25%, 10 내지 15%, 10 내지 20%, 10 내지 25%, 15 내지 20%, 15 내지 25%, 또는 20 내지 25% 이내에 위치할 수 있다.

[0153] 하나의 구현예에서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 아데닐산중합반응 서열의 상류에 위치할 수 있다. 추가로, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 프로모터, 예컨대 비제한적으로 SV40 인트론을 갖는 CMV, U6, CBA 또는 CBA 프로모터와 같은 프로모터의 하류에 위치할 수 있다. 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 프로모터의 하류 및/또는 아데닐산중합반응 서열의 상류로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 30 초과의 뉴클레오티드 이내에 위치할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 프로모터의 하류 및/또는 아데닐산중합반응 서열의 상류로부터 1 내지 5, 1 내지 10, 1 내지 15, 1 내지 20, 1 내지 25, 1 내지 30, 5 내지 10, 5 내지 15, 5 내지 20, 5 내지 25, 5 내지 30, 10 내지 15, 10 내지 20, 10 내지 25, 10 내지 30, 15 내지 20, 15 내지 25, 15 내지 30, 20 내지 25, 20 내지 30 또는 25 내지 30 뉴클레오티드 이내에 위치할 수 있다. 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 프로모터의 하류 및/또는 아데닐산중합반응 서열의 상류로부터 처음 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25% 또는 25% 초과의 뉴클레오티드 이내에 위치할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 프로모터의 하류 및/또는 아데닐산중합반응 서열의 상류로부터 처음 1 내지 5%, 1 내지 10%, 1 내지 15%, 1 내지 20%, 1 내지 25%, 5 내지 10%, 5 내지 15%, 5 내지 20%, 5 내지 25%, 10 내지 15%, 10 내지 20%, 10 내지 25%, 15 내지 20%, 15 내지 25%, 또는 20 내지 25% 이내에 위치할 수 있다.

[0154] 하나의 구현예에서, 암호화된 siRNA 분자는 scAAV에 위치할 수 있다.

[0155] 하나의 구현예에서, 암호화된 siRNA 분자는 ssAAV에 위치할 수 있다.

[0156] 하나의 구현예에서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 플립(filp) ITR의 5' 말단 인근에 위치할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 플립 ITR의 3' 말단 인근에 위치할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 플립(flop) ITR의 5' 말단 인근에 위치할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 플립 ITR의 3' 말단 인근에 위치할 수 있다. 하나의 구현예에서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 플립 ITR의 5' 말단과 플립 ITR의 3' 말단 사이에 위치할 수 있다. 하나의 구현예에서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 플립 ITR의 3' 말단과 플립 ITR의 5' 말단 사이 (예컨대, 플립 ITR의 5' 말단과 플립 ITR의 3' 말단 사이, 또는 플립 ITR의 3' 말단과 플립 ITR의 5' 말단 사이의 중도)에 위치할 수 있다. 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 ITR(예컨대, 플립 또는 플립 ITR)의 5' 또는 3' 말단으로부터 하류에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 30 초과의 뉴클레오티드 이내로 위치할 수 있다. 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 ITR(예컨대, 플립 또는 플립 ITR)의 5' 또는 3' 말단으로부터 상류에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,

25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 30 초과의 뉴클레오티드 이내로 위치할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 ITR(예컨대, 플립 또는 플립 ITR)의 5' 또는 3' 말단으로부터 하류에 1 내지 5, 1 내지 10, 1 내지 15, 1 내지 20, 1 내지 25, 1 내지 30, 5 내지 10, 5 내지 15, 5 내지 20, 5 내지 25, 5 내지 30, 10 내지 15, 10 내지 20, 10 내지 25, 10 내지 30, 15 내지 20, 15 내지 25, 15 내지 30, 20 내지 25, 20 내지 30 또는 25 내지 30 뉴클레오티드 이내로 위치할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 ITR(예컨대, 플립 또는 플립 ITR)의 5' 또는 3' 말단으로부터 상류에 1 내지 5, 1 내지 10, 1 내지 15, 1 내지 20, 1 내지 25, 1 내지 30, 5 내지 10, 5 내지 15, 5 내지 20, 5 내지 25, 5 내지 30, 10 내지 15, 10 내지 20, 10 내지 25, 10 내지 30, 15 내지 20, 15 내지 25, 15 내지 30, 20 내지 25, 20 내지 30 또는 25 내지 30 이내로 위치할 수 있다. 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 ITR(예컨대, 플립 또는 플립 ITR)의 5' 또는 3' 말단으로부터 상류에 처음 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25% 또는 25% 초과로 위치할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 암호화된 siRNA 분자는 발현 벡터에서 ITR(예컨대, 플립 또는 플립 ITR)의 5' 또는 3' 말단으로부터 하류에 처음 1 내지 5%, 1 내지 10%, 1 내지 15%, 1 내지 20%, 1 내지 25%, 5 내지 10%, 5 내지 15%, 5 내지 20%, 5 내지 25%, 10 내지 15%, 10 내지 20%, 10 내지 25%, 15 내지 20%, 15 내지 25%, 또는 20 내지 25%로 위치할 수 있다.

발현 벡터

[0157] 하나의 구현예에서, 발현 벡터(예컨대, AAV 벡터)는 본원에 기술된 하나 이상의 발현 벡터를 포함하는 하나 이상의 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0158] 하나의 구현예에서, 발현 벡터는, 5'에서 3'으로 지칭되는 ITR에서 ITR까지, ITR, 프로모터, 인트론, 조절성 폴리뉴클레오티드, 폴리A 서열 및 ITR을 포함할 수 있다.

개놈 크기

[0159] 하나의 구현예에서, 본원에 기술된 조절성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 개놈은 단일 가닥 또는 이중 가닥의 벡터 개놈일 수 있다. 벡터 개놈의 크기는 작거나 중간이거나 크거나 최대 크기일 수 있다. 추가로, 벡터 개놈은 프로모터 및 폴리A 테일을 포함할 수 있다.

[0160] 하나의 구현예에서, 본원에 기술된 조절성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 개놈은 작은 단일 가닥의 벡터 개놈일 수 있다. 작은 단일 가닥의 벡터 개놈은 크기가 2.7 내지 3.5 kb, 예컨대 크기가 약 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 및 3.5 kb일 수 있다. 비제한적인 예로서, 작은 단일 가닥의 벡터 개놈은 크기가 3.2 kb일 수 있다. 추가로, 벡터 개놈은 프로모터 및 폴리A 테일을 포함할 수 있다.

[0161] 하나의 구현예에서, 본원에 기술된 조절성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 개놈은 작은 이중 가닥의 벡터 개놈일 수 있다. 작은 이중 가닥의 벡터 개놈은 크기가 1.3 내지 1.7 kb, 예컨대 크기가 약 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 및 1.7 kb일 수 있다. 비제한적인 예로서, 작은 이중 가닥의 벡터 개놈은 크기가 1.6 kb일 수 있다. 추가로, 벡터 개놈은 프로모터 및 폴리A 테일을 포함할 수 있다.

[0162] 하나의 구현예에서, 본원에 기술된 조절성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 siRNA 또는 dsRNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 개놈은, 중간 크기의 단일 가닥의 벡터 개놈일 수 있다. 중간 크기의 단일 가닥의 벡터 개놈은 크기가 3.6 내지 4.3 kb, 예컨대 크기가 약 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2 및 4.3 kb일 수 있다. 비제한적인 예로서, 중간 크기의 단일 가닥의 벡터 개놈은 크기가 4.0 kb일 수 있다. 추가로, 벡터 개놈은 프로모터 및 폴리A 테일을 포함할 수 있다.

[0163] 하나의 구현예에서, 본원에 기술된 조절성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 개놈은 중간 크기의 이중 가닥의 벡터 개놈일 수 있다. 중간 크기의 이중 가닥의 벡터 개놈은 크기가 1.8 내지 2.1 kb, 예컨대 크기가 약 1.8, 1.9, 2.0, 및 2.1 kb일 수 있다. 비제한적인 예로서, 중간 크기의 이중 가닥의 벡터 개놈은 크기가 2.0 kb일 수 있다. 추가로, 벡터 개놈은 프로모터 및 폴리A 테일을 포함할 수 있다.

[0164] 하나의 구현예에서, 본원에 기술된 조절성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 siRNA 또는 dsRNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 개놈은, 큰 크기의 단일 가닥의 벡터 개놈일 수 있다. 큰 크기의 단일 가닥의 벡터 개놈은 크기가 4.4 내지 6.0 kb, 예컨대 크기가 약 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 및 6.0 kb일 수 있다. 비제한적인 예로서, 큰 크기의 단일 가닥의 벡터 개놈은 크기가 4.7 kb일 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 큰 크기의 단일 가닥의 벡터 개놈은 크기가 4.8 kb일 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 큰 크기의 단일 가닥의 벡터 개놈은 크기가 6.0 kb일 수 있다. 추가로, 벡터 개놈은 프로모터 및 폴리A 테일을 포함할 수 있다.

함할 수 있다.

[0167] 하나의 구현예에서, 본원에 기술된 조절성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 게놈은, 큰 크기의 이중 가닥의 벡터 게놈일 수 있다. 큰 크기의 이중 가닥의 벡터 게놈은 크기가 2.2 내지 3.0 kb, 예컨대 크기가 약 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 및 3.0 kb일 수 있다. 비제한적인 예로서, 크기가 큰 이중 가닥의 벡터 게놈은 크기가 약 2.4 kb일 수 있다. 추가로, 벡터 게놈은 프로모터 및 폴리A 테일을 포함할 수 있다.

프로모터

[0169] 당업자는, 표적 세포가 비제한적으로 종 특이적, 유도성, 조직-특이적 또는 세포 주기-특이적인 프로모터를 포함하는 특이적 프로모터를 필요로 할 수 있음을 알 수 있다 (Parr et al., *Nat. Med.* 3:1145-9 (1997); 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨).

[0170] 하나의 구현예에서, 프로모터는 조절성 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는데 충분하다고 여겨지는 프로모터이다.

[0171] 하나의 구현예에서, 프로모터는 표적화되는 세포에 대해 향성을 갖는 프로모터이다.

[0172] 하나의 구현예에서, 프로모터는 표적화된 조직, 예컨대 비제한적으로 신경계 조직에서 일정 기간 동안 탑재물, 예컨대 조절성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 siRNA 또는 dsRNA의 발현을 제공하는 약한 프로모터이다. 발현은 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 2주, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 3주, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일, 31일, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년 또는 10년 초과의 기간일 수 있다. 발현은 1내지 5시간, 1내지 12시간, 1내지 2일, 1내지 5일, 1내지 2주, 1내지 3주, 1내지 4주, 1내지 2개월, 1내지 4개월, 1내지 6개월, 2내지 6개월, 3내지 6개월, 3내지 9개월, 4내지 8개월, 6내지 12개월, 1내지 2년, 1내지 5년, 2내지 5년, 3내지 6년, 3내지 8년, 4내지 8년 또는 5내지 10년 동안일 수 있다. 비제한적인 예로서, 프로모터는, 신경계 조직에서 탑재물의 지속적인 발현을 위한 약한 프로모터이다.

[0173] 하나의 구현예에서, 프로모터는 1 kb 미만의 프로모터일 수 있다. 프로모터는 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800 또는 800 초과의 길이를 가질 수 있다. 프로모터는 200내지 300, 200내지 400, 200내지 500, 200내지 600, 200내지 700, 200내지 800, 300내지 400, 300내지 500, 300내지 600, 300내지 700, 300내지 800, 400내지 500, 400내지 600, 400내지 700, 400내지 800, 500내지 600, 500내지 700, 500내지 800, 600내지 700, 600내지 800 또는 700내지 800의 길이를 가질 수 있다.

[0174] 하나의 구현예에서, 프로모터는 2개 이상의 구성요소, 예컨대 비제한적으로 CMV 및 CBA의 조합일 수 있다. 각 구성요소는 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800 또는 800 초과의 길이를 가질 수 있다. 각 구성요소는 200내지 300, 200내지 400, 200내지 500, 200내지 600, 200내지 700, 200내지 800, 300내지 400, 300내지 500, 300내지 600, 300내지 700, 300내지 800, 400내지 500, 400내지 600, 400내지 700, 400내지 800, 500내지 600, 500내지 700, 500내지 800, 600내지 700, 600내지 800 또는 700내지 800의 길이를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, 프로모터는 382 뉴클레오티드의 CMV-인핸서 서열 및 260 뉴클레오티드의 CBA-프로모터 서열의 조합이다.

[0175] 하나의 구현예에서, 벡터 게놈은 표적 특이성 및 발현을 향상시키기 위한 하나 이상의 요소를 포함한다(예컨대, Powell et al., *Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy*, 2015 참조; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨). 전이유전자의 표적 특

이성 및 발현을 향상시키기 위한 요소의 비제한적인 예는, 프로모터, 내인성 miRNA, 전사 후 조절성 요소(PRE), 아데닐산중합반응(폴리 A) 신호 서열 및 상류 인핸서(USE), CMV 인핸서 및 인트론을 포함한다.

[0176] 하나의 구현예에서, 벡터 계놈은 표적 특이성 및 발현을 향상시키기 위한 하나 이상의 요소(예컨대, Powell et al., *Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy*, 2015; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨) 예컨대, 프로모터를 포함한다.

[0177] 대부분의 조직에서 발현을 촉진하기 위한 프로모터는, 비제한적으로 인간 신장 인자 1α-서브유닛(EF1 α), 전초기 사이토메갈로바이러스(CMV), 닫 β-액틴(CBA) 및 이의 유도체 CAG, β 글루쿠로니다제(GUSB), 또는 유비퀴틴 C(UBC)를 포함한다. 조직-특이적인 발현 요소는, 비제한적으로, 발현을 뉴런, 성상세포 또는 회돌기교세포로 제한하기 위해 사용될 수 있는 신경계 프로모터와 같이 발현을 특정 세포 유형으로 제한하기 위해 사용될 수 있다. 뉴런에 대한 조직-특이적인 발현 요소의 비제한적인 예는, 뉴런-특이적 에놀라제(NSE), 혈소판-유도된 성장 인자(PDGF), 혈소판-유도된 성장 인자 B-쇄(PDGF-β), 시냅신(Syn), 메틸-CpG 결합 단백질 2(MeCP2), CaMKII, mGluR2, NFL, NFH, nβ2, PPE, Enk 및 EAAT2 프로모터를 포함한다. 성상세포에 대한 조직-특이적인 발현 요소의 비제한적인 예는, 신경교 섬유질 산성 단백질(GFAP) 및 EAAT2 프로모터를 포함한다. 회돌기교세포에 대한 조직-특이적인 발현 요소의 비제한적인 예는, 수초 염기성 단백질(MBP) 프로모터를 포함한다.

[0178] 하나의 구현예에서, 벡터 계놈은 유비퀴티스 프로모터를 포함한다. 유비퀴티스 프로모터의 비제한적인 예는, CMV, CBA(유도체 CAG, CBh 등 포함), EF-1 α, PGK, UBC, GUSB(hGbp), 및 UCOE(HNRPA2B1-CBX3의 프로모터)를 포함한다. Yu 등(Molecular Pain 2011, 7:63; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨)은, 랫트 DRG 세포 및 일차 DRG 세포에서 렌티바이러스 벡터를 사용하여 CAG, EF1 α, PGK 및 UBC 프로모터 하에 eGFP의 발현을 평가하였고, UBC가 다른 3개의 프로모터에 비해 보다 약한 발현을 보였음을 발견하였고, 모든 프로모터에서 단지 10 내지 12%의 신경아교세포가 발현되었음을 발견하였다. Soderblom 등(E. Neuro 2015; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨)은, CMV 및 UBC 프로모터를 가진 AAV8 및 운동 피질에서 주사 후 CMV 프로모터를 가진 AAV2에서의 eGFP의 발현을 평가하였다. UBC 또는 EF1 α 프로모터를 함유하는 플라스미드의 비강내 투여는, CMV 프로모터에 의한 발현에 비해 보다 큰 지속적인 기도 발현을 나타냈다(예를 들면, Gi11 et al., Gene Therapy 2001, Vol. 8, 1539-1546; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨). Husain 등 (Gene Therapy 2009; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨)은, hGUSB 프로모터, HSV-1LAT 프로모터 및 NSE 프로모터를 가진 HβH 작제물을 평가하였고, 마우스 뇌에서 HβH 작제물이 NSE에 비해 보다 약한 발현을 보였음을 발견하였다. Passini와 Wolfe(J. Virol. 2001, 12382-12392, 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨)은, 신생 마우스에 뇌실내 주사 후 HβH 벡터의 장기 효과를 평가하였고, 1년 이상 동안 지속적으로 발현되었음을 발견하였다. CMV-lacZ, CMV-luc, EF, GFAP, hENK, nAChR, PPE, PPE + wpre, NSE(0.3 kb), NSE(1.8 kb) 및 NSE(1.8 kb + wpre)와 비교하여 NF-L 및 NF-H 프로모터가 사용되었을 때, 모든 뇌 영역에서의 낮은 발현이 Xu 등(Gene Therapy 2001, 8, 1323-1332; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨)에 의해 발견되었다. Xu 등은 프로모터 활성이 내림차순으로 NSE(1.8 kb), EF, NSE(0.3 kb), GFAP, CMV, hENK, PPE, NFL 및 NFH임을 발견하였다. NFL은 650 뉴클레오티드 프로모터이고, NFH는 920 뉴클레오티드 프로모터이고, 둘 모두는 간에는 없지만 NFH는 감각 자기수용(proprioceptive) 뉴런, 뇌 및 척수에 풍부하고, NFH는 심장에 존재한다. Scn8a는 470 뉴클레오티드 프로모터이고 이는 DRG, 척수 및 뇌를 통해 발현되고, 해마 뉴런 및 소뇌 푸르키네 세포, 피질, 시상 및 시상하부에서 특히 높은 발현을 보인다(예를 들면, Drews et al. 2007 및 Raymond et al. 2004 참조; 이의 각각의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨).

[0179] 하나의 구현예에서, 벡터 계놈은 UBC 프로모터를 포함한다. UBC 프로모터는 300 내지 350 뉴클레오티드 크기를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, UBC 프로모터는 332 뉴클레오티드이다.

[0180] 하나의 구현예에서, 벡터 계놈은 GUSB 프로모터를 포함한다. GUSB 프로모터는 350 내지 400개의 뉴클레오티드 크기를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, GUSB 프로모터는 378개의 뉴클레오티드이다. 비제한적인 예로서, 작제물은 AAV-프로모터-CMV/글로빈 인트론-hFXN-RBG일 수 있으며, 이때, AAV는 자기-상보성일 수 있고, AAV는 DJ 혈청형일 수 있다.

[0181] 하나의 구현예에서, 벡터 계놈은 NFL 프로모터를 포함한다. NFL 프로모터는 600 내지 700개의 뉴클레오티드 크기를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, NFL 프로모터는 650개의 뉴클레오티드이다. 비제한적인 예로서, 작제물은 AAV-프로모터-CMV/글로빈 인트론-hFXN-RBG일 수 있으며, 이때, AAV는 자기-상보성일 수 있고, AAV는 DJ 혈청형일 수 있다.

[0182] 하나의 구현예에서, 벡터 계놈은 NFH 프로모터를 포함한다. NFH 프로모터는 900 내지 950개의 뉴클레오티드 크

기를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, NFH 프로모터는 920개의 뉴클레오티드이다. 비제한적인 예로서, 작제물은 AAV-프로모터-CMV/글로빈 인트론-hFXN-RBG일 수 있으며, 이때, AAV는 자기-상보성일 수 있고, AAV는 DJ 혈청형일 수 있다.

- [0183] 하나의 구현예에서, 벡터 게놈은 scn8a 프로모터를 포함한다. scn8a 프로모터는 450 내지 500개의 뉴클레오티드 크기를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, scn8a 프로모터는 470개의 뉴클레오티드이다. 비제한적인 예로서, 작제물은 AAV-프로모터-CMV/글로빈 인트론-hFXN-RBG일 수 있으며, 이때, AAV는 자기-상보성일 수 있고, AAV는 DJ 혈청형일 수 있다.
- [0184] 하나의 구현예에서, 벡터 게놈은 FXN 프로모터를 포함한다.
- [0185] 하나의 구현예에서, 벡터 게놈은 PGK 프로모터를 포함한다.
- [0186] 하나의 구현예에서, 벡터 게놈은 CBA 프로모터를 포함한다.
- [0187] 하나의 구현예에서, 벡터 게놈은 CMV 프로모터를 포함한다.
- [0188] 하나의 구현예에서, 벡터 게놈은 간 또는 골격근 프로모터를 포함한다. 간 프로모터의 비제한적인 예는 hAAT 및 TBG를 포함한다. 골격근 프로모터의 비제한적인 예는 데스민(Desmin), MCK 및 C5-12를 포함한다.
- [0189] 하나의 구현예에서, AAV 벡터는 인핸서 요소, 프로모터 및/또는 5' UTR 인트론을 포함한다. 인핸서는 비제한적으로 CMV 인핸서일 수 있고, 프로모터는 비제한적으로 CMV, CBA, UBC, GUSB, NSE, 수냅신(Sunapsin), MeCP2, 및 GFAP 프로모터일 수 있고, 5' UTR/인트론은 비제한적으로 SV40, 및 CBA-MVM일 수 있다. 비제한적인 예로서, 조합되어 사용되는 인핸서, 프로모터 및/또는 인트론은: (1) CMV 인핸서, CMV 프로모터, SV40 5'UTR 인트론; (2) CMV 인핸서, CBA 프로모터, SV 40 5'UTR 인트론; (3) CMV 인핸서, CBA 프로모터, CBA-MVM 5'UTR 인트론; (4) UBC 프로모터; (5) GUSB 프로모터; (6) NSE 프로모터; (7) 시냅신 프로모터; (8) MeCP2 프로모터 및 (9) GFAP 프로모터일 수 있다.
- [0190] 하나의 구현예에서, AAV 벡터는 조작된 프로모터를 갖는다.
- [0191] 인트론
- [0192] 하나의 구현예에서, 벡터 게놈은 전이유전자 표적 특이성 및 발현을 향상시키기 위한 하나 이상의 요소(예로, Powell et al., *Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy*, 2015 참조; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨), 예를 들면, 인트론을 포함한다. 인트론의 비제한적인 예는, MVM(67 내지 97 bp), F.IX 절단된(truncated) 인트론 1(300 bp), β -글로빈 SD/면역글로빈 중쇄 스플라이스 수용자(250 bp), 아데노바이러스 스플라이스 공여자/면역글로빈 스플라이스 수용자(500 bp), SV40 후기 스플라이스 공여자/스플라이스 수용자(19S/16S)(180 bp) 및 혼성 아데노바이러스 스플라이스 공여자/IgG 스플라이스 수용자(230 bp)를 포함한다.
- [0193] 하나의 구현예에서, 인트론은 100 내지 500개 길이의 뉴클레오티드일 수 있다. 인트론은 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 또는 500개의 길이를 가질 수 있다. 프로모터는 80 내지 100, 80 내지 120, 80 내지 140, 80 내지 160, 80 내지 180, 80 내지 200, 80 내지 250, 80 내지 300, 80 내지 350, 80 내지 400, 80 내지 450, 80 내지 500, 200 내지 300, 200 내지 400, 200 내지 500, 300 내지 400, 300 내지 500, 또는 400 내지 500의 길이를 가질 수 있다.
- [0194] 하나의 구현예에서, AAV 벡터 게놈은 프로모터, 예컨대 비제한적으로 CMV 또는 U6을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 본 발명의 siRNA 분자에 대한 핵산 서열을 포함하는 AAV에 대한 프로모터는 CMV 프로모터이다. 또 다른 비제한적인 예로서, 본 발명의 siRNA 분자에 대한 핵산 서열을 포함하는 AAV에 대한 프로모터는 U6 프로모터이다.
- [0195] 하나의 구현예에서, AAV 벡터는 CMV 및 U6 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0196] 하나의 구현예에서, AAV 벡터는 CBA 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0197] 세포에 도입- 합성 dsRNA
- [0198] siRNA 분자(예컨대, siRNA 듀플렉스 및 dsRNA)의 화학적 및 생물학적 안정성을 확보하기 위해, siRNA 분자를 표

적 세포 내에 전달하는 것이 중요하다. 일부 구현예에서, 세포는, 비제한적으로 포유류 기원 세포, 인간 기원 세포, 배아 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포, 신경 줄기 세포 및 신경 전구 세포를 포함할 수 있다.

[0199] siRNA를 비롯한 핵산은 정상적인 생리학적 조건하에 당-인산염 백본에서 순(net) 음전하를 띠고 있다. 세포에 들어가기 위해, siRNA 분자는 세포 막의 지질 이중층과 반드시 접촉해야 하며, 이의 머리 기(head group)도 또한 음전하를 띠고 있다.

[0200] siRNA 듀플렉스는 이를 세포막을 가로지를 수 있도록 하는 담체, 예컨대 siRNA의 세포 흡수를 촉진시키는 포장 입자와 복합체화될 수 있다. 포장 입자는, 비제한적으로 리포좀, 나노입자, 양이온 지질, 폴리에틸렌이민 유도체, 덴드리머(dendrimer), 탄소 나노튜브 및 탄소로 이루어진 나노입자와 덴드리머의 조합을 포함할 수 있다. 지질은 양이온 지질 및/또는 중성 지질일 수 있다. siRNA 분자와 양이온 담체 사이에 잘 학립된 친유성 복합체 외에, siRNA 분자는 소수성 모이어티, 예컨대 콜레스테롤과 접합될 수 있다(예컨대, 미국공개특허 제20110110937호; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨). 이러한 전달 방법은 siRNA 분자의 시험관내 세포 흡수 및 생체내 약리학적 특성을 향상시킬 잠재력을 가지고 있다. 본 발명의 siRNA 분자는 또한 특정 양이온 세포-투과 웨პ티드(CPP), 예컨대 MPG, 트랜스포탄(transportan) 또는 페네트라린(penetratin)과 공유결합 또는 비공유결합으로 접합될 수 있다(예컨대 미국공개특허 제20110086425호; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨).

세포에 도입- AAV 벡터

[0202] 본 발명의 siRNA 분자(예컨대, siRNA 듀플렉스)는 임의의 다양한 접근법, 예컨대 비제한적으로 바이러스 벡터(예컨대, AAV 벡터)를 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 이러한 바이러스 벡터는 형질감염에 대해 용이하게 조작되지 않는 세포 내로 siRNA 분자의 도입을 촉진하도록 조작되고 최적화된다. 또한, 일부 합성 바이러스 벡터는 shRNA를 세포 계놈에 통합시킬 수 있는 능력을 가지고 있으며, 이에 따라 안정한 siRNA 발현 및 표적 유전자의 장기 넉다운을 유도한다. 이러한 방식으로, 바이러스 벡터는 야생형 바이러스에서 발견되는 해로운 복제 및/또는 통합 특징이 결여된 채 특이적 전달을 위한 비히클로서 조작된다.

[0203] 일부 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자는, 세포를 친유성 담체 및 벡터, 예컨대 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터를 포함하는 조성물과 접촉시킴으로써 도입된다. 다른 구현예에서, siRNA 분자는, 세포를 벡터, 예컨대 세포에서 전사될 때 siRNA 분자를 생산할 수 있는 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터로 형질감염 또는 감염시킴으로써 세포 내에 도입된다. 일부 구현예에서, siRNA 분자는, 세포를 벡터, 예컨대 세포에서 전사될 때 siRNA 분자를 생산할 수 있는 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터에 주입함으로써 세포에 도입될 수 있다.

[0204] 일부 구현예에서, 형질감염 전에, 벡터, 예컨대 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터는 세포 내로 형질감염시킬 수 있다.

[0205] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 전기 천공법에 의해 세포 내로 전달될 수 있다(예컨대, 미국공개특허 제20050014264호; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨).

[0206] 본원에 기술된 siRNA 분자에 대한 핵산 서열을 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터는, 미국공개특허 제20120264807호(이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨)에 기술된 바와 같은 광화학 내재화(photochemical internalization)를 포함할 수 있다.

[0207] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 제형은 본원에 기술된 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 벡터, 예컨대 AAV 벡터를 함유할 수 있다. 하나의 구현예에서, siRNA 분자는 하나 이상의 표적 부위에서 SOD1 유전자를 표적화할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 제형은 다수의 벡터, 예컨대 AAV 벡터를 포함하며, 각 벡터는 상이한 표적 부위에서 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. SOD1은 2, 3, 4, 5 또는 5개 초과 부위에서 표적화될 수 있다.

[0208] 하나의 구현예에서, 임의의 관련 종, 예컨대 비제한적으로 인간, 개, 마우스, 랙트 또는 원숭이로부터의 벡터, 예컨대 AAV 벡터가 세포 내로 도입될 수 있다.

[0209] 하나의 구현예에서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 치료될 질환과 관련된 세포 내로 도입될 수 있다. 비제한적인 예로서, 질환은 ALS이고, 표적 세포는 운동 뉴런 및 성상세포이다.

[0210] 하나의 구현예에서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 표적 서열의 높은 수준의 내인성 발현을 갖는 세포 내로 도입될

수 있다.

[0211] 또 다른 구현예에서, 백터, 예컨대 AAV 백터는 표적 서열의 낮은 수준의 내인성 발현을 갖는 세포 내로 도입될 수 있다.

[0212] 하나의 구현예에서, 세포는 높은 효율의 AAV 형질도입을 갖는 세포일 수 있다.

약제학적 조성물 및 제형

[0214] 약제학적 조성물(siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터) 외에, 인간에 투여하기에 적절한 약제학적 조성물이 본원에서 제공되며, 이러한 조성물은 일반적으로 임의의 다른 동물, 예컨대, 비-인간 동물, 예컨대 비-인간 포유류에 투여하기에 적절하다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 조성물을 다양한 동물에 투여하기에 적절하도록 하기 위해 인간에게 투여하기에 적절한 약제학적 조성물의 변형이 잘 알려져 있으며, 통상의 숙련된 수의학 약리학자는 단지 통상적인, 임의의 실험으로 이러한 변형을 설계 및/또는 수행할 수 있다. 약제학적 조성물의 투여가 고려되는 대상은, 비제한적으로 인간 및/또는 다른 영장류; 상업적으로 관련있는 포유류, 예컨대 소, 돼지, 말, 양, 고양이, 개, 마우스, 및/또는 랙트를 포함하는 포유류; 및/또는 상업적으로 관련있는 조류, 예컨대 가금, 닭, 오리, 거위 및/또는 칠면조를 포함하는 조류를 포함한다.

[0215] 일부 구현예에서, 조성물은 인간, 인간 환자 또는 대상에 투여된다. 본 발명의 목적을 위해, 어구 "활성 성분"은 일반적으로 합성 siRNA 듀플렉스, siRNA 듀플렉스를 암호화하는 백터, 예컨대 AAV 백터 또는 본원에 기술된 바와 같이 백터에 의해 전달되는 siRNA 분자를 지칭한다.

[0216] 본원에 기술된 약제학적 조성물의 제형은 임의의 공지된 또는 후술의 약리학 분야에서 개발된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은, 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 결합시키는 단계, 및 이어서 필요한 및/또는 바람직한 경우, 제품을 목적하는 단일- 또는 다중-용량 단위로 분할, 성형 및/또는 포장하는 것을 포함한다.

[0217] 본 발명에 따른 약제학적 조성물중의 활성 성분, 약제학적으로 허용되는 부형제, 및/또는 임의의 추가 성분의 상대적인 양은, 치료되는 대상의 개체, 크기 및/또는 상태, 및 조성물이 투여되는 경로에 따라 달라질 것이다.

[0218] 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터는, (1) 안전성 증가; (2) 세포 형질감염 또는 형질도입 증가; (3) 지속적 또는 지연된 방출 허용; (4) 생체분포 변경(예컨대, 바이러스 백터를 특정 조직 또는 세포 유형, 예컨대 뇌 및 운동 뉴런으로 표적화)을 위해 하나 이상의 부형제를 사용하여 제형화될 수 있다.

[0219] 본 발명의 제형은 제한 없이 식염수, 리피도이드, 리포좀, 지질 나노입자, 중합체, 리포플렉스, 코어-셀 나노입자, 웨티드, 단백질, 바이러스 백터로 형질감염된 세포(예컨대, 대상으로의 이식하기 위한), 나노입자 모방체 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 추가로, 본 발명의 바이러스 입자는 자기-조립된 핵산 나노입자를 사용하여 제형화될 수 있다.

[0220] 본원에 기술된 약제학적 조성물의 제형은 임의의 공지된 또는 후술의 약리학 분야에서 개발된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 결합시키는 단계를 포함한다.

[0221] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 단일 단위 용량 및/또는 다수의 단일 단위 용량으로서 대량으로 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있다. 본원에 사용된 "단위 용량"은 소정량의 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 개별적인 양을 지칭한다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상에 투여될 활성 성분의 용량과 동일하고, 이는 이러한 용량의 편리한 분획, 예컨대 이러한 용량의 1/2 또는 1/3이다.

[0222] 본 발명에 따른 약제학적 조성물중의 활성 성분, 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 임의의 추가 성분의 상대적인 양은, 치료되는 대상의 개체, 크기 및/또는 상태, 및 추가로 조성물이 투여되는 경로에 따라 달라질 수 있다. 예컨대, 조성물은 0.1% 내지 99% (w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다. 예컨대, 조성물은 0.1% 내지 100%, 예컨대 0.5 내지 50%, 1 내지 30%, 5 내지 80%, 적어도 80% (w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0223] 일부 구현예에서, 약제학적으로 허용되는 부형제는 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100% 순수할 수 있다. 일부 구현예에서, 부형제는 인간 용도 및 수의학적 용도로 승인된다. 일부 구현예에서, 부형제는 미국 식품 의약국에 의해 승인될 수 있다. 일부 구현예에서, 부형제는 약제학적 등급인 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 부형제는 미국 약전(USP), 유럽 약전(EP), 영국 약전, 및/또는 국제 약전의 표준을 만족할 수

있다.

[0224] 본원에 사용된 부형제는, 원하는 특정 투약형(dosage form)에 적절한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 희석제 또는 다른 액상 비허클, 분산제 또는 혼탁 보조제, 계면활성제, 등장제, 농후제 또는 유화제, 보존제 등을 비제한적으로 포함한다. 약제학적 조성물을 제형화하기 위한 다양한 부형제 및 조성물의 제조 기법이 당업계에 공지되어 있다(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006 참조; 이의 전체가 참조로서 본원에 포함됨). 예컨대, 임의의 원하지 않는 생물학적 효과를 생성시키거나 다른 방식으로 약제학적 조성물의 임의의 다른 구성요소(들)와 유해한 방식으로 상호작용함으로써, 임의의 통상적인 부형제 매질이 물질 또는 이의 유도체와 배합될 수 없는 한을 제외하고, 통상적인 부형 매질의 사용이 본 발명의 범위 내에서 고려될 수 있다.

[0225] 예시적인 희석제는, 비제한적으로 칼슘 카보네이트, 소듐 카보네이트, 칼슘 포스페이트, 디칼슘 포스페이트, 칼슘 설페이트, 칼슘 하이드로겐 포스페이트, 소듐 포스페이트, 락토스, 슈크로스, 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 카울린, 만니톨, 솔비톨, 이노시톨, 소듐 클로라이드, 건조 전분, 옥수수 전분, 분말 당 등 및/또는 이들의 조합을 포함한다.

[0226] 일부 구현예에서, 제형은 하나 이상의 불활성 성분을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "불활성 성분"은 제형에 포함된 하나 이상의 불활성제를 지칭한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 제형에 사용될 수 있는 불활성 성분 전부, 또는 일부는 미국 식품의약국(FDA)에 의해 승인될 수 있다.

[0227] 본 발명의 siRNA 분자에 대한 혁신 서열을 포함하는 벡터 제형은 양이온 또는 음이온을 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 제형은 금속 양이온, 예컨대 비제한적으로 Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mg⁺ 및 이들의 조합을 포함한다.

[0228] 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 염"은 개시된 화합물의 유도체를 지칭하며, 이때, 모(parent) 화합물은 기준의 산 또는 염기 모이어티를 이의 염 형태로 전환시킴으로써(예컨대, 유리 염기 기를 적절한 유기 산과 반응시킴으로써) 변형된다. 약제학적으로 허용되는 염의 예는, 비제한적으로, 아민과 같은 염기성 잔기의 무기 또는 유기산 염; 카복실산과 같은 산성 잔기의 알칼리 또는 유기 염 등을 포함한다. 대표적인 산 부가 염은 아세테이트, 아세트산, 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트 아스파테이트, 벤젠설포네이트, 벤젠 살포산, 벤조에이트, 비스설페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로페오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵토네이트, 헥사노에이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로로라이드, 하이드로요다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토비오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말레이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레아이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 페설페이트, 3-페닐프로페오네이트, 포스페이트, 페크레이트, 페발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 틀루엔설포네이트, 운데카노에이트, 및 발레르에이트 염 등을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토금속 염은, 소듐, 리튬, 포타슘, 칼슘, 마그네슘 등 및 비독성 암모늄, 4급 암모늄 및 아민 양이온, 비제한적으로 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 에틸아민 등을 포함하여 아민 양이온을 포함한다. 본 발명의 약제학적으로 허용되는 염은, 예컨대 비독성 무기 또는 유기산으로부터 형성된 모 화합물의 통상적인 비독성 염을 포함한다. 본 발명의 약제학적으로 허용되는 염은, 통상적인 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 모이어티를 함유하는 모 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 이러한 화합물의 유리 산 또는 염기 형태를 물 또는 유기 용매 중 또는 이들의 혼합물 중의 화학량론적 양의 적절한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있고; 일반적으로 비수성 매질, 예컨대 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판을 또는 아세토니트릴이 바람직하다. 적절한 염의 목록이 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, 및 Berge et al., *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19 (1977) (각 내용의 전체가 참조로서 본원에 포함됨)에서 확인된다.

[0229] 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는 용매화물"은 적절한 용매의 분자가 결정형 격자에 혼입되어 있는 본 발명의 화합물을 의미한다. 적절한 용매는 투여된 용량에서 생리학적으로 허용된다. 예컨대, 용매화물은, 유기 용매, 물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 용액으로부터 결정화, 재결정화 또는 침전에 의해 제조될 수 있다. 적절한 용매의 예는 에탄올, 물 (예컨대, 일-, 이- 및 삼-수화물), N-메틸피롤리돈(NMP), 디메틸 셀록사이드(DMSO), N,N'-디메틸포름아미드(DMF), N,N'-디메틸아세트미드(DMAC), 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논(DMEU),

1,3-디메틸-3,4,5,6-테트라하이드로-2-(1H)-피리미디논(DMPU), 아세토니트릴(ACN), 프로필렌 글리콜, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 2-피롤리돈, 벤질 벤조에이트 등이다. 물이 용매인 경우, 용매화물은 "수화물"이라고 지칭된다.

[0230] 본 발명에 따르면, 본 발명의 siRNA 분자에 대한 핵산 서열을 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터는 CNS 전달을 위해 제형화될 수 있다. 뇌 혈액 장벽을 가로지르는 제제가 사용될 수 있다. 예컨대, siRNA 분자를 뇌 혈액 장벽 내피로 표적화할 수 있는 일부 세포 침투 웹티드가 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 듀플렉스를 제형화하기 위해 사용될 수 있다 (예컨대, Mathupala, *Expert Opin Ther Pat.*, 2009, 19, 137-140; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨).

투여

[0231] 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터가 치료학적으로 유효한 결과를 가져오는 임의의 경로로 투여될 수 있다. 이는 비제한적으로, 장내(장관내), 위장내, 경막외(경질막내에), 경구(입을 통해), 경피, 경막주위, 뇌내(대뇌내), 뇌실내(대뇌뇌실내로), 상표피(피부에 도포), 진피내(피부 자체내) 피하(피부아래), 비강 투여 (코를 통해), 정맥내(정맥내로), 정맥내 대량주입, 정맥내 점적주입, 동맥내(동맥내에), 근육내(근육내에), 심장내(심장내에), 골내 주입(골수내로), 척수강내(척추관내로), 복강내(복막내 주입 또는 주사), 방광내 주입, 유리체내(안구를 통해), 해면내 주사(병적강내에), 강내(음경 기저부내), 질내 투여, 자궁내, 양막외 투여, 경피(전신 분포를 위한 손상되지 않은 피부를 통한 확산), 점막관통(점막을 통한 확산), 질경유, 흡입제(코 흡입), 혀 밑, 입술밑, 관장, 눈점안액(결막위), 귀점적, 귓바퀴(이도 안에 또는 이를 경유하여), 협측(볼쪽을 향하여), 결막, 피부, 이(치아 또는 치아들), 전기삼투, 자궁경관내, 부비강내, 기관내, 체외, 혈액투석, 침습, 간질, 복강내, 양막내, 관절내, 난관내, 기관내, 활액낭내, 연골내(연골안에), 마미내(마미내에), 수조내(소뇌숨뇌수조 큰수조 내에), 각막내(각막내로), 치아관상(dental intracornal), 관내(관상동맥내로), 음경 해면체내(음경의 음경내 해면체의 확장가능한 공간내), 층판내(디스크내에), 관내(샘관내), 십이지장내(십이지장안에), 경막내(경막내 또는 경막밑), 표피내(표피에), 식도내(식도에), 위내(위안에), 잇몸내(잇몸안에), 회장내(소장의 말초부분내), 병변내(국부적인 병변내 또는 직접 도입), 내강내(관의 내강 안에), 림프액내(림프내로), 골수내 (골수강내로), 수막내 (수막내에), 안구내 (안구내로), 난소내 (난소내로), 심장주위내(심장주위내로), 흉막내(흉막내에), 전립선내(전립선내로), 폐내(폐 또는 기관지내), 부비강내(비강 또는 안와 주위 부비동내로), 척추내(척추내에), 활액내(관절강 활액내로), 힘줄내(힘줄내로), 고환내(고환안에), 수막공간내(임의의 수준의 뇌척수축에서의 뇌척수액내), 흉곽내(가슴우리 내에), 관내(기관의 세관내로), 종양내(종양내로), 고막내(청각매질내로), 혈관내(혈관 또는 혈관들내로), 심실내(심실내로), 이온삼투압(가용성 염 이온이 신체의 조직으로 이동하는 전류에 의해), 세척(개방상처 또는 체강을 세척하거나 씻어내서), 후두(후두에 직접), 비위관(nasogastric)(코를 통해 위장으로), 밀폐 드레싱 기술(해당 영역을 밀폐하는 드레싱에 의해 덮히는 국소 경로 투여), 안구(눈 외부에), 구강인두(입과 인두에 직접), 비경구, 경피, 관절주위, 경막주위, 신경주위, 치주, 직장, 호흡기(국소 또는 전신효과를 위해 경구 또는 비강흡입에 의한 호흡관 안에), 안구 후부(교뇌 뒤 또는 안구 뒤), 연조직, 지주막하, 결막하, 점막하, 국소, 경태반(태반을 통과 또는 통해), 기관지경(기관벽을 통해), 고설경유(고설을 통과 또는 통해), 요관(요관으로), 요도(요도로), 질, 미추차단, 진단학적 신경차단, 담즙관류, 심장관류, 광분반술(photophresis) 또는 척추를 포함한다.

[0233] 특정 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터 또는 siRNA 분자가 중추신경계에 들어가서 운동 뉴런 내에 침투하는 것을 촉진시키는 방식으로 투여될 수 있다.

[0234] 일부 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터는 근육 주사에 의해 투여될 수 있다. Rizvanov 등은, 돌연변이체 인간 SOD1 mRNA를 표적화하는 siRNA 분자가 좌골 신경 (sciatic nerve)에 의해 흡수되고, 운동 뉴런의 세포체(perikarya)에 역으로 수송되어, SOD1^{G93A} 형질전환 ALS 마우스에서 돌연변이체 SOD1 mRNA를 저해한다는 것을 처음으로 밝혔다(Rizvanov AA et al., *Exp. Brain Res.*, 2009, 195(1), 1-4; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨). 또 다른 연구는 또한, 돌연변이체 SOD1 유전자에 대한 작은 헤어핀 RNA(shRNA)를 발현하는 AAV의 근육 전달은, 근육에서 유의한 돌연변이체 SOD1 낙다운 및 운동 뉴런의 신경자극전달(innervating)을 유도함을 보여주었다(Towne C et al., *Mol Ther.*, 2011; 19(2): 274-283; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨).

[0235] 일부 구현예에서, 본 발명의 siRNA 듀플렉스를 발현하는 AAV 백터는 말초 주사 및/또는 비강내 전달에 의해 투여될 수 있다. siRNA 듀플렉스에 대한 AAV 백터의 말초 투여가 중추신경계, 예컨대 운동 뉴런으로 수송될 수 있음이 당업계에 개시되었다(예컨대, 미국공개특허 제20100240739호; 및 제20100130594호; 각 내용의 전체가 참조

로서 본원에 포함됨).

- [0236] 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 백터, 예컨대 AAV 백터를 포함하는 조성물은 두개내 전달에 의해 대상에 투여될 수 있다(예로, 미국특허 제8,119,611호 참조; 이의 전체 내용은 참조 문헌으로서 본원에 포함됨).
- [0237] 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터는, 액상 용액 또는 혼탁액으로서, 액상 용액 또는 액상 용액 중의 혼탁액에 적절한 고체로서, 임의의 적절한 형태로 투여될 수 있다. siRNA 듀플렉스는 임의의 적절하고 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 제형화될 수 있다.
- [0238] 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터는 "치료학적 유효"량, 즉, 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 완화 및/또는 예방하거나, 대상의 병태의 개선을 제공하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다.
- [0239] 하나의 구현예에서, 백터, 예컨대 AAV 백터는 ALS를 갖는 대상의 기능 및/또는 생존을 개선시키기 위해 치료학적 유효량으로 CNS에 투여될 수 있다. 비제한적인 예로서, 백터는 척추강내로 투여될 수 있다.
- [0240] 하나의 구현예에서, 백터, 예컨대 AAV 백터는 척수 및/또는 뇌간에서 운동 뉴런 및 성상세포를 표적화하기 위해 siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA에 대한 치료학적 유효량으로 대상에 투여될 수 있다(예컨대 척추강내 투여를 통해 대상의 CNS로). 비제한적인 예로서, siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA는 SOD1 단백질 또는 mRNA의 발현을 감소시킬 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, siRNA 듀플렉스 또는 dsRNA는 SOD1를 억제할 수 있고 SOD1 매개 독성을 감소시킬 수 있다. SOD1 단백질 및/또는 mRNA의 감소뿐만 아니라 SOD1 매개 독성의 감소는 염증의 증가가 거의 없이 달성될 수 있다.
- [0241] 하나의 구현예에서, 백터, 예컨대 AAV 백터는 대상의 기능 저하를 늦추거나/늦추고(예컨대, 기능평가척도 (ALSFRS)와 같이 공지된 평가 방법을 사용하여 결정됨), 대상(예컨대, 감소된 사망률 또는 인공호흡기 보조 필요)의 인공 호흡기 독립적 생존을 연장시키기 위해 치료학적 유효량으로 대상에 투여될 수 있다. 비제한적인 예로서, 백터는 척추강내로 투여될 수 있다.
- [0242] 하나의 구현예에서, 백터, 예컨대 AAV 백터는 척수 운동 뉴런 및/또는 성상세포에 형질도입하기 위한 치료 유효량으로 큰수조에 투여될 수 있다. 비제한적인 예로서, 백터는 척추강내로 투여될 수 있다.
- [0243] 하나의 구현예에서, 백터, 예컨대 AAV 백터는 척수 운동 뉴런 및/또는 성상세포에 형질도입하기 위한 치료학적 유효량으로 척추강내 주입을 사용하여 투여될 수 있다. 비제한적인 예로서, 백터는 척추강내로 투여될 수 있다.
- [0244] 하나의 구현예에서, 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터는 제형화될 수 있다. 비제한적인 예로서, 제형의 염기성도 및/또는 삼투압은 중추신경계 또는 중추신경계의 영역 또는 구성요소에서 최적의 약물 분포를 보장하도록 최적화될 수 있다.
- [0245] 하나의 구현예에서, 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터는 단일 경로 투여를 통해 대상에 전달될 수 있다.
- [0246] 하나의 구현예에서, 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터는 투여의 다중-부위 경로를 통해 대상에 전달될 수 있다. 대상은 2, 3, 4, 5 또는 5 초과의 부위에 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터가 투여될 수 있다.
- [0247] 하나의 구현예에서, 대상은 볼루스 주입을 사용하여 본원에 기술된 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터가 투여될 수 있다.
- [0248] 하나의 구현예에서, 대상은 수 분, 수 시간 또는 수 일의 주기에 걸친 지속 전달을 사용하여 본원에 기술된 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터가 투여될 수 있다. 주입 속도는 대상, 분포, 제형 또는 또 다른 전달 척도에 따라 변할 수 있다.
- [0249] 하나의 구현예에서, 카테터는 다중-부위 전달을 위해 척추의 하나 이상의 부위에 위치할 수 있다. 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터, 예컨대 AAV 백터는 연속적인 및/또는 볼루스 주입으로 전달될 수 있다. 각 전달 부위는 투약 용법에 따라 상이할 수 있으며, 동일한 투약 용법이 각 전달 부위에 사용될 수 있다. 비제한적인 예로서, 전달 부위는 경부 및 요추 영역내일 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 전달 부위는 경부 영역내일 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 전달 부위는 요추 영역내일 수 있다.

- [0250] 하나의 구현예에서, 대상은 본원에 기술된 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터의 전달 전에 척추 해부학 및 병리학에 대해 분석될 수 있다. 비제한적인 예로서, 척추측만증을 갖는 대상은 척추측만증이 없는 환자와 비교하여 상이한 투약 용법 및/또는 카테터 위치를 가질 수 있다.
- [0251] 하나의 구현예에서, 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터의 전달 동안 대상의 척추 배향은 지면에 대해 수직일 수 있다.
- [0252] 또 다른 구현예에서, 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터의 전달 동안 대상의 척추 배향은 지면에 대해 수평일 수 있다.
- [0253] 하나의 구현예에서, 대상의 척추는 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터의 대상으로의 전달 동안 지면과 비교하여 일정 각도에 있을 수 있다. 지면과 비교한 대상의 척추 각도는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 또는 180 도일 수 있다.
- [0254] 하나의 구현예에서, 전달 방법 및 지속기간은 척수에서 광범위한 형질도입을 제공하도록 선택된다. 비제한적인 예로서, 척수강내 전달은 척수의 부 리(rostral)-꼬리(caudal) 길이를 따라 광범위한 형질도입을 제공하는데 사용될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 다중-부위 주입은 척수의 부리-꼬리 길이를 따라 보다 균일한 형질도입을 제공한다. 또 다른 비제한적인 예로서, 연장된 주입은 척수의 부리-꼬리 길이를 따라 보다 균일한 형질도입을 제공한다.
- [0255] 투약
- [0256] 본 발명의 약제학적 조성물은 SOD1 관련 장애(예컨대, ALS)를 감소, 예방 및/또는 치료하기 위해 임의의 유효량을 사용하여 대상에 투여될 수 있다. 필요한 정확한 양은 종, 연령 및 대상의 일반적인 상태, 질환의 중증도, 특정 조성물, 이의 투여 방식, 이의 활성 형태 등에 따라 대상마다 다를 것이다.
- [0257] 본 발명의 조성물은 투여 용이성 및 용량의 균일성을 위해 전형적으로 단위 투여형으로 제형화된다. 그러나, 본 발명의 조성물의 총 1일 사용량은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 주치의에 의해 결정될 수 있음이 이해될 것이다. 임의의 특정 환자에 대한 특정 치료 효과는 치료될 장애 및 장애의 중증도; 사용되는 특정 화합물의 활성; 사용되는 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이; 사용되는 siRNA 듀플렉스의 투여 시간, 투여 경로 및 배설 속도; 치료 지속기간; 사용되는 특정 화합물과 병용하여 또는 동시에 사용되는 약물; 및 의료업계에 공지된 인자를 비롯하여 다양한 인자에 따라 달라질 것이다.
- [0258] 하나의 구현예에서, 대상의 연령 및 성별은 본 발명의 조성물의 용량을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 비제한적인 예시로서, 나이가 많은 대상은 나이가 어린 대상에 비해 더 큰 용량의 조성물(예컨대, 5 내지 10%, 10 내지 20%, 15 내지 30%, 20 내지 50%, 25 내지 50% 또는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 또는 90% 초과)을 받을 수 있다. 비제한적인 예시로서, 나이가 어린 대상은 나이가 많은 대상에 비해 더 큰 용량의 조성물(예컨대, 5 내지 10%, 10 내지 20%, 15 내지 30%, 20 내지 50%, 25 내지 50% 또는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 또는 90% 초과)을 받을 수 있다. 비제한적인 다른 예시로서, 여자인 대상은 남자인 대상에 비해 더 큰 용량의 조성물(예컨대, 5 내지 10%, 10 내지 20%, 15 내지 30%, 20 내지 50%, 25 내지 50% 또는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 또는 90% 초과)을 받을 수 있다. 비제한적인 예시로서, 남자인 대상은 여자인 대상에 비해 더 큰 용량의 조성물(예컨대, 5 내지 10%, 10 내지 20%, 15 내지 30%, 20 내지 50%, 25 내지 50% 또는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 또는 90% 초과)을 받을 수 있다.
- [0259] 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 siRNA 듀플렉스를 전달하기 위한 AAV 벡터의 용량은 질환의 상태, 대상 및 치료 전략에 따라 맞춰질 수 있다.
- [0260] 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물의 세포의 전달은 $[VG/\text{시간} = mL/\text{시간} * VG/mL]$ (여기서, VG는 바이러스 게놈이고, VG/mL은 조성물 농도이고, mL/시간은 연장된 전달의 속도이다)로 정의된 전달 속도를 포함한다.
- [0261] 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물의 세포로의 전달은 약 1×10^6 VG 내지 약 1×10^{16} VG의 대상 당 총 농도를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 전달은 약 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} ,

3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 2.1×10^{11} , 2.2×10^{11} , 2.3×10^{11} , 2.4×10^{11} , 2.5×10^{11} , 2.6×10^{11} , 2.7×10^{11} , 2.8×10^{11} , 2.9×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 7.1×10^{11} , 7.2×10^{11} , 7.3×10^{11} , 7.4×10^{11} , 7.5×10^{11} , 7.6×10^{11} , 7.7×10^{11} , 7.8×10^{11} , 7.9×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 1.1×10^{12} , 1.2×10^{12} , 1.3×10^{12} , 1.4×10^{12} , 1.5×10^{12} , 1.6×10^{12} , 1.7×10^{12} , 1.8×10^{12} , 1.9×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 4.1×10^{12} , 4.2×10^{12} , 4.3×10^{12} , 4.4×10^{12} , 4.5×10^{12} , 4.6×10^{12} , 4.7×10^{12} , 4.8×10^{12} , 4.9×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 8.1×10^{12} , 8.2×10^{12} , 8.3×10^{12} , 8.4×10^{12} , 8.5×10^{12} , 8.6×10^{12} , 8.7×10^{12} , 8.8×10^{12} , 8.9×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 6.7×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , 9×10^{13} , 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , 9×10^{14} , 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} , 9×10^{15} , 또는 1×10^{16} VG/대상의 조성물 농도를 포함할 수 있다.

[0262] 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물의 세포로의 전달은 약 1×10^6 VG/kg 내지 약 1×10^{16} VG/kg의 대상 당 총 농도를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 전달은 약 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 2.1×10^{11} , 2.2×10^{11} , 2.3×10^{11} , 2.4×10^{11} , 2.5×10^{11} , 2.6×10^{11} , 2.7×10^{11} , 2.8×10^{11} , 2.9×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 7.1×10^{11} , 7.2×10^{11} , 7.3×10^{11} , 7.4×10^{11} , 7.5×10^{11} , 7.6×10^{11} , 7.7×10^{11} , 7.8×10^{11} , 7.9×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 1.1×10^{12} , 1.2×10^{12} , 1.3×10^{12} , 1.4×10^{12} , 1.5×10^{12} , 1.6×10^{12} , 1.7×10^{12} , 1.8×10^{12} , 1.9×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 4.1×10^{12} , 4.2×10^{12} , 4.3×10^{12} , 4.4×10^{12} , 4.5×10^{12} , 4.6×10^{12} , 4.7×10^{12} , 4.8×10^{12} , 4.9×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 8.1×10^{12} , 8.2×10^{12} , 8.3×10^{12} , 8.4×10^{12} , 8.5×10^{12} , 8.6×10^{12} , 8.7×10^{12} , 8.8×10^{12} , 8.9×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 6.7×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , 9×10^{13} , 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , 9×10^{14} , 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} , 9×10^{15} , 또는 1×10^{16} VG/kg의 조성물 농도를 포함할 수 있다.

[0263] 하나의 구현예에서, 약 10^5 내지 10^6 의 바이러스 계놈(단위)이 용량 당 투여될 수 있다.

[0264] 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물의 세포로의 전달은 약 1×10^6 VG/mL 내지 약 1×10^{16} VG/mL의 총 농도를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 전달은 약 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 6.7×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , 9×10^{13} , 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , 9×10^{14} , 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} , 9×10^{15} , 또는 1×10^{16} VG/mL의 조성물 농도를 포함할 수 있다.

[0265] 특정 구현예에서, 바람직한 siRNA 듀플렉스 용량은 다중 투여를 사용하여 전달될 수 있다 (예컨대, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14회 이상의 투여). 다중 투여가 사용되는 경우, 본원에 기술된 바와 같은 분할 투약 용법이 사용될 수 있다. 본원에 사용된 "분할 용량"은 단일 단위 용량 또는 총 1일 용량을 2회 이상의 투여, 예컨대 단일 단위 용량의 2회 이상의 투여로 나눈 것이다. 본원에 사용된 "단일 단위 용량"은 1회 용량/1회/단일 경로/단일 접촉점으로, 즉 단일 투여건으로 투여된 조절성 폴리뉴클레오티드 치료제의 용량이다. 본원에 사용된 "총 1일 용량"은 24시간 주기 내에 주어진 또는 처방된 양이다. 이는 단일 단위 용량으로서 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 조절성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터는 분할 용량으로 대상에 투여된다. 이들은 오직 완충액중에서 또는 본원에 기술된 제형중에서 제형화될 수 있다.

[0266] ALS의 치료 방법

본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터를 세포 내에 도입하는 방법이 본 발명에서 제공되며, 이러한 방법은 임의의 벡터를 표적 SOD1 mRNA의 분해가 일어나기에 충분한 양으로 세포에 도입함에 따라 세포에서 표적-특이적인 RNAi를 활성시키는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 세포는 줄기 세포, 신경 세포 예컨대 운동 뉴런, 근육 세포 및 신경아교세포 예컨대 성상세포일 수 있다.

본 발명은, 치료를 필요로하는 대상에서 비정상적인 SOD1 기능과 관련된 ALS를 치료하는 방법을 개시한다. 이러한 방법은 선택적으로 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 적어도 벡터, 예컨대 AAV 벡터를 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을 대상에 투여하는 것을 포함한다. 비제한적인 예시로서, siRNA 분자는 SOD1 유전자 발현을 침목시킬 수 있고, SOD1 단백질 생산을 저해할 수 있고, ALS가 치료학적으로 치료되도록 대상에서 ALS의 하나 이상의 증상을 감소시킬 수 있다.

일부 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터를 포함하는 조성물은 대상의 중추신경계에 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터를 포함하는 조성물은 대상의 근육에 투여된다.

특히, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터는, 운동 뉴런; 희돌기교세포를 포함하는 신경아교세포, 성상세포 및 미세아교세포; 및/또는 T 세포와 같은 신경 주변의 다른 세포를 포함하여, 특이적 유형의 표적화된 세포 내에 전달될 수 있다. 인간 ALS 환자 및 동물 SOD1 ALS 모델에서의 연구는 신경아교세포가 운동 신경의 기능부전 및 사멸에서 초기 역할을 한다는 것을 보여준다. 돌연변이체 SOD1이 운동 뉴런에 존재하더라도, 주변의 보호성 신경아교세포에서의 정상적인 SOD1은 운동 뉴런이 사멸되는 것을 막을 수 있다(예컨대, Phillips 및 Rothstein, *Exp. Neurol.*, 2014, May 22. pii: S0014-4886(14)00157-5 참조; 이의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨).

일부 특정 구현예에서, 본 발명의 siRNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 ALS에 대한 치료제로서 사용될 수 있다.

일부 구현예에서, 본 조성물은 ALS의 치료를 위한 단독 치료제 또는 병용 치료제로서 투여된다.

SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA 이중가닥을 암호화하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 하나 이상의 다른 치료제와 병용되어 사용될 수 있다. "와 병용되어"라는 것은, 이러한 전달 방법이 본 발명의 범위 내에 있음에도 불구하고, 제제가 반드시 동시에 투여되고/되거나 함께 전달되도록 제형화되어야함을 의미하는 것으로 의도되지 않는다. 조성물은 하나 이상의 다른 목적하는 치료제 또는 의학적 처치와 동시에, 그전에 또는 후에 투여될 수 있다. 일반적으로 각 제제는 제제에 대해 결정된 용량 및/또는 시간 스케줄로 투여될 것이다.

본 발명의 siRNA 분자에 대한 핵산 서열을 암호화하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터와 병용되어 사용될 수 있는 치료제는, 항산화제, 항-염증제, 항-아폽토시스제, 칼슘 조절제, 항글루타메이트제, 구조적 단백질 저해제 및 금속 이온 조절과 연관된 화합물인 작은 분자 화합물일 수 있다.

본원에 기술된 벡터와 병용하여 사용될 수 있는, ALS 치료를 위해 시험된 화합물은 비제한적으로 항글루타메이트제: 릴루졸, 토피라메이트, 탈람판넬, 라모트리진, 엑스트로메트로판, 가바펜틴 및 AMPA 길항제; 항-아폽토시스제: 미노사이클린, 소듐 페닐부틸레이트 및 아리모클로몰; 소염제: 강글리오시드, 셀레콕시브, 사이클로스포린, 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 플라즈마포레시스, 글라티라며 아세테이트 및 탈리도마이드; 세프트리악손(Berry et al., *Plos One*, 2013, 8(4)); 피트-락탐 항생제; 프라미펙솔(도파민 길항제) (Wang et al., *Amyotrophic Lateral Scler.*, 2008, 9(1), 50-58); 미국공개특허 제20060074991호의 니메술리드; 미국공개특허 제20130143873호에 개시된 디아족사이드); 미국특허 제20080161378호에 개시된 퍼라졸론 유도체; 산화 스트레스-유도 세포 사멸을 저해하는 자유 라디칼 스캐빈저, 예컨대 본문에 포함된 브로모크립틴 (미국 공개특허 제20110105517호); PCT 특허공개 제2013100571호에 논의된 페닐 카바메이트 화합물; 미국특허 제6,933,310호 및

제8,399,514호 및 미국공개특허 제20110237907호 및 제20140038927호에 개시된 신경보호 화합물; 및 미국공개특허 제20070185012호에 교시된 글리코펩티드를 포함하고; 상기 문헌의 각 내용 전체는 참조로서 본원에 포함된다.

[0276] 본 발명의 siRNA 분자에 대한 핵산 서열을 암호화하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터와의 병용 치료요법에 사용될 수 있는 치료제는 신경 손실을 보호할 수 있는 호르몬 또는 변이체, 예컨대 부신피질자극 호르몬(ACTH) 또는 이의 단편(예컨대, 미국공개특허 제20130259875호); 에스트로겐(예컨대, 미국특허 제6,334,998호 및 제 6,592,845호)(이의 각각의 내용 전체가 참조로서 본원에 포함됨)일 수 있다.

[0277] 신경영양 인자가 ALS를 치료하기 위하여 본 발명의 siRNA 분자에 대한 핵산 서열을 암호화하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터와의 병용 치료요법에 사용될 수 있다. 일반적으로, 신경영양 인자는 뉴런의 생존, 성장, 분화, 증식 및/또는 성숙을 촉진하거나, 뉴런의 증가된 활성을 자극하는 물질로서 정의된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 추가로 치료를 필요로 하는 대상에 하나 이상의 영양 인자를 전달하는 것을 포함한다. 영양 인자는, 비제한적으로, IGF-I, GDNF, BDNF, CTNF, VEGF, 콜리밸린, 잘리프로텐, 타이로트로핀-방출 호르몬 및 ADNF, 및 이들의 변이체를 포함할 수 있다.

[0278] 하나의 양태에서, SOD1 유전자를 표적화하는 하나 이상의 siRNA 이중가닥에 대한 핵산 서열을 포함하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 신경영양 인자, 예컨대 AAV-IGF-I(Vincent 등, *Neuromolecular medicine*, 2004, 6, 79-85; 이의 전체 내용이 참조로서 본원에 포함됨) 및 AAV-GDNF(Wang 등, *J Neurosci.*, 2002, 22, 6920-6928; 이의 전체 내용이 참조로서 본원에 포함됨)를 발현하는 AAV 벡터와 함께 병용투여될 수 있다.

[0279] 일부 구현예에서, ALS 치료를 위한 본 발명의 조성물은 치료를 필요로 하는 대상에, siRNA 분자 또는 siRNA 분자를 포함하는 벡터가 혈-뇌 장벽 및 혈액 척수 장벽 중 하나 또는 둘 모두를 통과할 수 있도록, 정맥내로, 근육내로, 피하로, 복강내로, 척추강내로 및/또는 심실내로 투여된다. 일부 양태에서, 이러한 방법은 대상의 중추신경계(CNS)에 본 발명의 siRNA 분자에 대한 핵산 서열을 암호화하는 벡터, 예컨대 AAV를 벡터를 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을(예컨대, 주입 펌프 및/또는 전달 스캐폴드를 사용하여) 직접 투여(예컨대, 심실내 투여 및/또는 척추강내 투여)하는 것을 포함한다. 이러한 벡터는 SOD1 유전자 발현을 침묵 또는 억제시키기 위해 사용될 수 있고/있거나 ALS가 치료학적으로 치료되도록 대상에서 ALS의 하나 이상의 증상을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[0280] 특정 양태에서, ALS의 증상은 비제한적으로 운동 뉴런 퇴화, 근육 약화, 근육 위축, 근육의 뗏뻣함, 호흡의 어려움, 불분명한 발음, 갑작스런 경련의 발달, 전두측두엽 치매를 포함하고/하거나 치료되는 대상에서 조기 사망이 개선된다. 다른 양태에서, 본 발명의 조성물은 뇌 및 척수 중 하나 또는 둘 다에 적용된다. 다른 양태에서, 근육 조정 및 근육 기능 중 하나 또는 둘 다가 개선된다. 다른 양태에서, 대상의 생존이 연장된다.

[0281] 하나의 구현예에서, 본 발명의 siRNA를 암호화하는 벡터, 예컨대 AAV 벡터의 대상으로의 투여는 대상의 CNS에서 돌연변이체 SOD1을 낫출 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 벡터, 예컨대 AAV 벡터의 대상으로의 투여는 대상의 CNS에서 야생형 SOD1을 낫출 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 벡터, 예컨대 AAV 벡터의 대상으로의 투여는 대상의 CNS에서 돌연변이체 SOD1 및 야생형 SOD1을 낫출 수 있다. 돌연변이체 및 야생형 SOD1은 대상의 CNS, CNS 영역 또는 CNS의 특정 세포에서 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%, 또는 적어도 20 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 50%, 20 내지 60%, 20 내지 70%, 20 내지 80%, 20 내지 90%, 20 내지 95%, 20 내지 100%, 30 내지 40%, 30 내지 50%, 30 내지 60%, 30 내지 70%, 30 내지 80%, 30 내지 90%, 30 내지 95%, 30 내지 100%, 40 내지 50%, 40 내지 60%, 40 내지 70%, 40 내지 80%, 40 내지 90%, 40 내지 95%, 40 내지 100%, 50 내지 60%, 50 내지 70%, 50 내지 80%, 50 내지 90%, 50 내지 95%, 50 내지 100%, 60 내지 70%, 60 내지 80%, 60 내지 90%, 60 내지 95%, 60 내지 100%, 70 내지 80%, 70 내지 90%, 70 내지 95%, 70 내지 100%, 80 내지 90%, 80 내지 95%, 80 내지 100%, 90 내지 95%, 90 내지 100% 또는 95 내지 100%까지 낫아질 수 있다. 비제한적인 예로서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 운동 뉴런(예컨대, 복각(ventral horn) 운동 뉴런) 및/또는 성상세포에서 야생형 SOD1의 발현을 50% 이상까지 낫출 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 운동 뉴런(예컨대, 복각 운동 뉴런) 및/또는 성상세포에서 돌연변이체 SOD1의 발현을 50% 이상까지 낫출 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 운동 뉴런(예컨대, 복각 운동 뉴런) 및/또는 성상세포에서 야생형 SOD1 및 돌연변이체 SOD1의 발현을 50% 이상까지 낫출 수 있다.

[0282] 하나의 구현예에서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터의 대상으로의 투여는 척수에서 돌연변이 및/또는 야생형 SOD1의 발현을 감소시킬 것이고, 돌연변이 및/또는 야생형 SOD1의 발현 감소는 대상에서 ALS의 영향을 감소시킬 것이다.

- [0283] 하나의 구현예에서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 ALS의 초기 단계에 있는 대상에 투여될 수 있다. 초기 단계 증상은, 비제한적으로 근육이 연약하고 유연하거나 뺏뻣한 근육, 팽팽하고 경련된 근육, 근육의 쪼임 및 떨림(갑작스런 경련), 근육 질량의 손실(위축증), 피로, 불량한 균형, 불분명한 발음의 말, 약한 손힘(grip), 및/또는 보행시 헛디딤 등을 포함한다. 이러한 증상은 단일 신체 영역에 제한될 수 있고, 가벼운 증상은 하나 초가의 영역에 영향을 미칠 수 있다. 비제한적인 예로서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 ALS 증상의 중증도 및/또는 발생을 감소시킬 수 있다.
- [0284] 하나의 구현예에서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 ALS의 중기 단계에 있는 대상에 투여될 수 있다. ALS의 중기 단계는, 비제한적으로 초기 단계에 비해 더 광범위하게 퍼진 근육 증상, 다른 근육은 약해지거나 영향을 받지 않은 반면 일부 근육은 마비됨, 지속적인 근육 떨림(갑작스런 경련), 사용하지 않는 근육이 수축의 원인이 되어 관절이 경직됨, 통증 및 종종 기형, 삼키는 근육 운동의 약화가 질식 및 섭취 및 침 삼킴의 보다 큰 어려움을 야기할 수 있음, 호흡 근육의 약화는 호흡의 특히 누워 있을 때 분명한 호흡의 불충분을 야기할 수 있음 및/또는 대상은 한차례의 비조절되고 부적절한 웃음 또는 울음(가성연수 효과)을 포함한다. 비제한적인 예로서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 ALS 증상의 중증도 및/또는 발생을 감소시킬 수 있다.
- [0285] 하나의 구현예에서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 후기 단계의 ALS인 대상에 투여될 수 있다. 후기 단계의 ALS는, 비제한적으로 대부분 마비된 수의 근, 폐의 공기의 내뱉는 운동을 도움주는 근육이 심각하게 약화됨, 운동성이 극도로 제한됨, 불량한 호흡이 피로, 생각이 둥동해짐, 두통 및 감염 또는 질환(예컨대, 폐렴)에 취약해짐을 야기함, 말하기가 어려워지고 입을 통한 섭취 또는 식음이 불가능해질 수 있음을 포함한다.
- [0286] 하나의 구현예에서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 C9orf72 돌연변이를 갖는 ALS를 갖는 대상을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0287] 하나의 구현예에서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 TDP-43 돌연변이를 갖는 ALS를 갖는 대상을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0288] 하나의 구현예에서, 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 FUS 돌연변이를 갖는 ALS를 갖는 대상을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0289] 정의
- [0290] 달리 언급되지 않는 한, 다음의 용어 및 어구는 후술되는 의미를 갖는다. 정의는 본질적으로 제한하는 것을 의미하는 것은 아니며, 본 발명의 특정 양상의 보다 명확한 이해를 제공하기 위해 제공된다.
- [0291] 본원에 사용된 용어 "핵산", "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 폴리디옥시리보뉴클레오티드(2-디옥시-D-리보스 포함), 또는 폴리리보뉴클레오티드(D-리보스 포함), 또는 퓨린 또는 피리미딘 염기의 N 글리코시드, 또는 변형된 퓨린 또는 피리미딘 염기인 임의의 다른 유형의 폴리뉴클레오티드로 구성된 핵산 중합체를 지칭한다. 용어 "핵산", "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드" 사이의 길이에는 의도된 구별이 없으며, 이러한 용어는 상호교환적으로 사용될 것이다. 이러한 용어는 오직 문자의 1차 구조만을 지칭한다. 따라서, 이러한 용어는 이중- 및 단일-가닥의 DNA뿐만 아니라 이중- 및 단일-가닥의 RNA를 포함한다.
- [0292] 본원에 사용된 용어 "RNA" 또는 "RNA 분자" 또는 "리보핵산 분자"는 리보뉴클레오티드 중합체를 지칭한다; 용어 "DNA" 또는 "DNA 분자" 또는 "디옥시리보핵산 분자"는 디옥시리보뉴클레오티드 중합체를 지칭한다. DNA 및 RNA는, 예컨대 DNA 복제 및 DNA 전사에 의해 각각 자연적으로 합성될 수 있거나, 화학적으로 합성될 수 있다. DNA 및 RNA는 단일-가닥(예컨대 각각 ssRNA 또는 ssDNA) 또는 다중-가닥(예컨대, 이중 가닥, 즉, 각각 dsRNA 및 dsDNA)일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "mRNA" 또는 "메신저 RNA"는 하나 이상의 폴리펩티드 쇄의 아미노산 서열을 암호화하는 단일 가닥의 RNA를 지칭한다.
- [0293] 본원에 사용된 용어 "RNA 간섭" 또는 "RNAi"는 상응하는 단백질-암호화 유전자 발현의 억제, 간섭 또는 "침묵"을 야기하는, RNA 분자에 의해 매개되는 서열 특이적인 조절 메커니즘을 지칭한다. RNAi는 식물, 동물 및 진균류를 비롯하여 많은 유형의 유기체에서 발견된다. RNAi는 외래 RNA(예컨대, 바이러스 RNA)를 제거하기 위해 세포에서 자연적으로 발생한다. 천연 RNAi는 분해 메커니즘을 다른 유사한 RNA 서열로 향하게 하는 유리 dsRNA로부터 절단된 단편을 통해 진행된다. RNAi는 RNA 유도된 침묵 복합체(RISC)에 의해 조절되며, 세포질에서 짧은/작은 dsRNA 분자에 의해 개시되고, 여기에서 이들은 촉매적 RISC 구성요소인 아르고네이트(argonaute)와 상호작용한다, dsRNA 분자는 세포에 외인성으로 도입될 수 있다. 외인성 dsRNA는 리보뉴클레아제 단백질인 다이서를 활성화시킴으로써 RNAi를 개시하고, 다이서는 dsRNA에 결합하여 절단하여 각 말단에 일부 짹지워지지 않은 오버

행 염기를 갖는 21 내지 25 염기쌍의 이중 가닥의 단편을 생성한다. 이러한 짧은 이중 가닥의 단편은 작은 간섭 RNA(siRNA)라고 일컬어진다.

[0294] 본원에 사용된 용어 "짧은 간섭 RNA", "작은 간섭 RNA" 또는 "siRNA"는 RNAi를 지시하거나 매개할 수 있는, 약 5 내지 60 뉴클레오티드(또는 뉴클레오티드 유사체)를 포함하는 RNA 분자(또는 RNA 유사체)를 지칭한다. 바람직하게는, siRNA 분자는 약 15 내지 30개의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체, 예컨대 약 16 내지 25개의 뉴클레오티드(또는 뉴클레오티드 유사체), 약 18 내지 23개의 뉴클레오티드(또는 뉴클레오티드 유사체), 약 19 내지 22개의 뉴클레오티드(또는 뉴클레오티드 유사체)(예컨대, 19, 20, 21 또는 22개의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체), 약 19 내지 25개의 뉴클레오티드(또는 뉴클레오티드 유사체), 및 약 19 내지 24개의 뉴클레오티드(또는 뉴클레오티드 유사체)를 포함한다. 용어 "짧은" siRNA는 5 내지 23 뉴클레오티드 바람직하게는 21 개의 뉴클레오티드(또는 뉴클레오티드 유사체), 예컨대, 19, 20, 21 또는 22개의 뉴클레오티드를 포함하는 siRNA를 지칭한다. 용어 "긴" siRNA는 24 내지 60개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 24 내지 25개의 뉴클레오티드, 예컨대, 23, 24, 25 또는 26개의 뉴클레오티드를 포함하는 siRNA를 지칭한다. 짧은 siRNAs는 경우에 따라, 보다 짧은 siRNA가 RNAi를 매개하는 능력을 보유하는 경우, 19개 뉴클레오티드 미만, 예컨대, 16, 17 또는 18개의 뉴클레오티드, 또는 5개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 긴 siRNAs는 경우에 따라, 보다 긴 siRNA가 짧은 siRNA에 대한 추가 처리, 예컨대 효소 처리가 없는 경우 RNAi 또는 번역 억제를 매개하는 능력을 보유하는 경우, 26 뉴클레오티드 초과, 예컨대, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 심지어는 60개의 뉴클레오티드 초과를 포함한다. siRNA는 단일 가닥의 RNA 분자(ss-siRNA) 또는 혼성화되어 siRNA 이중 가닥으로 불리는 이중가닥 구조를 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 이중 가닥의 RNA 분자(ds-siRNA)일 수 있다.

[0295] 본원에 사용된 용어 siRNA 분자의 "안티센스 가닥" 또는 "제1가닥" 또는 "가이드 가닥"은 침묵에 대해 표적화된 유전자의 mRNA의 약 10 내지 50 뉴클레오티드, 예컨대 약 15 내지 30, 16 내지 25, 18 내지 23 또는 19 내지 22 뉴클레오티드의 부분에 실질적으로 상보성인 가닥을 지칭한다. 안티센스 가닥 또는 제1가닥은 표적-특이적 침묵을 지시하기 위해 목적하는 표적 mRNA 서열에 대해 충분히 상보성인 서열을 가지며, 예컨대, 상보성은 RNAi 기구 또는 처리과정에 의해 표적 mRNA의 파괴를 유발시키기에 충분하다.

[0296] 본원에 사용된 용어 siRNA 분자의 "센스 가닥" 또는 "제2가닥" 또는 "패신저 가닥"은 안티센스 가닥 또는 제1가닥에 상보성인 가닥을 지칭한다. siRNA 분자의 안티센스 및 센스가닥은 혼성화되어 이중가닥 구조를 형성한다. 본원에 사용된 "siRNA 이중가닥"은 침묵에 대해 표적화된 유전자의 mRNA의 약 10 내지 50 뉴클레오티드 부분에 대해 충분히 상보성을 갖는 siRNA 가닥 및 siRNA 가닥과 이중가닥을 형성하기에 충분히 상보성을 갖는 siRNA 가닥 포함한다.

[0297] 본원에 사용된 용어 "상보성인"은 서로 염기쌍을 형성할 수 있는 폴리뉴클레오티드의 능력을 지칭한다. 염기쌍은 전형적으로 역평행 폴리뉴클레오티드 가닥의 뉴클레오티드 단위 사이의 수소결합에 의해 형성된다. 상보성인 폴리뉴클레오티드 가닥은 왓슨-크릭 방식(예컨대, A와 T, A와 U, C와 G)으로, 또는 이중가닥 형성을 허용하는 임의의 다른 방식으로 염기쌍을 형성할 수 있다. 당업자가 알고 있는 바와 같이, DNA와 대조적으로 RNA를 사용하는 경우, 티민 대신 우라실이 아데노신에 상보성인 것으로 간주되는 염기이다. 그러나, 본 발명의 맥락에서 U가 언급되는 경우, 달리 언급되지 않는 한, T를 치환하는 능력을 의미한다. 완전한 상보성 또는 100% 상보성은 하나의 폴리뉴클레오티드 가닥의 각 뉴클레오티드 단위가 제2폴리뉴클레오티드 가닥의 뉴클레오티드 단위와 수소 결합을 형성할 수 있는 상황을 지칭한다. 완전한 상보성보다 적은 것은, 2 가닥의 전부는 아니지만 일부 뉴클레오티드 단위가 서로 수소결합을 형성할 수 있는 상황을 지칭한다. 예컨대, 2개의 20량체에 대하여, 각 가닥의 2개의 염기쌍만이 서로 수소결합을 형성할 수 있는 경우, 폴리뉴클레오티드 가닥은 10% 상보성을 나타낸다. 동일한 예에서, 각 가닥 상에 18개의 염기쌍이 서로 수소결합을 형성할 수 있는 경우, 폴리뉴클레오티드 가닥은 90%의 상보성을 나타낸다.

[0298] 본원에 사용된 용어 "실질적으로 상보성인"은 목적하는 표적 mRNA에 결합 및 표적 mRNA의 RNA 침묵을 유발시키기에 충분한 서열(예컨대, 안티센스 가닥)을 갖는 siRNA를 의미한다.

[0299] 본원에 사용된 "표적화"는 표적 핵산에 혼성화되어 목적하는 효과를 유도하는 핵산 서열의 설계 및 선별 과정을 의미한다.

[0300] 용어 "유전자 발현"은 핵산이 성공적인 전사 및 대부분의 경우에서 번역되어 단백질 또는 웨티드를 생산하는 과정을 지칭한다. 명확하게 하기 위하여, "유전자 발현"의 측정을 지칭하는 경우, 측정이 전사의 핵산 생성물, 예컨대 RNA 또는 mRNA 또는 번역의 아미노산 생성물, 예컨대 폴리펩티드 또는 웨티드일 수 있음을 의미하는 것으로

로 이해되어야 한다. RNA, mRNA, 폴리펩티드 및 펩티드의 양 또는 수준의 측정 방법이 당업계에 공지되어 있다.

[0301] 본원에 사용된 용어 "돌연변이"는 유전자의 구조를 임의로 변화시켜 후속 세대에 전달될 수 있는 변이체 형태 ("돌연변이체"로도 지칭됨)를 생성하는 것을 지칭한다. 유전자에서의 돌연변이는, DNA에서의 단일 염기의 교체 또는 유전자 또는 염색체의 보다 큰 부분의 결실, 삽입 또는 재배열에 의해 야기될 수 있다.

[0302] 본원에 사용된 "벡터"는 이종 분자, 예컨대 본 발명의 siRNA 분자의 운반체로서 수송, 형질도입 또는 다른 방식으로 작용하는 임의의 분자 또는 모이어티이다 "바이러스 벡터"는 관심있는 분자, 예컨대 전이유전자, 폴리펩타이드 또는 다중-폴리펩티드 또는 조절성 핵산 예컨대 작은 간접 RNA(siRNA)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 암호화하거나 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 부위를 포함하는 벡터이다. 바이러스 벡터는 통상적으로 유전 물질을 세포 내로 전달하기 위해 사용된다. 바이러스 벡터는 종종 특정 적용을 위해 변형된다. 바이러스 벡터의 유형은 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 아데노-관련 바이러스 벡터를 포함한다.

[0303] 본원에 사용된 용어 "아데노-관련 바이러스" 또는 "AAV" 또는 "AAV 벡터"는 아데노-관련 벡터의 구성요소를 포함하거나 이로부터 유래하고 포유류 세포, 바람직하게는 인간 세포를 감염시키기에 적절한 임의의 벡터를 지칭한다. 용어 AAV 벡터는 전형적으로 siRNA 이중가닥을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 AAV 유형 바이러스 입자 또는 비리온을 나타낸다. AAV 벡터는 혈청형 조합(즉, "위형" AAV)을 비롯하여 다양한 혈청형 또는 다양한 계놈(예컨대, 단일 가닥의 또는 자기 상보성인)으로부터 유래될 수 있다. 추가로, AAV 벡터는 복제 결합 및/또는 표적화될 수 있다.

[0304] 본원에 사용된 어구 "유전자 발현 억제"는 유전자 발현 산물의 양의 감소를 야기하는 것을 의미한다. 발현 산물은 유전자로부터 전사된 RNA 분자(예컨대, mRNA) 또는 유전자로부터 전사된 mRNA로부터 번역된 폴리펩티드일 수 있다. 전형적으로, mRNA의 수준 감소는 이로부터 번역된 폴리펩티드의 수준 감소를 야기한다. 발현 수준은 mRNA 또는 단백질을 측정하기 위한 표준 기법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0305] 본원에 사용된 용어 "시험관내"는 사건이 유기체(예컨대, 동물, 식물 또는 미생물)내에서가 아니라, 인공적인 환경, 예컨대, 시험관 또는 반응 용기, 세포 배양, 페트리 디ッシュ, 등에서 발생하는 것을 지칭한다.

[0306] 본원에 사용된 용어 "생체내"는 사건이 유기체(예컨대, 동물, 식물 또는 미생물 또는 세포 또는 이의 조직)에서 발생하는 것을 지칭한다.

[0307] 본원에 사용된 용어 "변형된"은 본 발명의 분자의 변화된 상태 또는 구조를 지칭한다. 분자는 화학적, 구조적 및 기능적을 포함하여 다양한 방법으로 변형될 수 있다.

[0308] 본원에 사용된 용어 "합성의"는 사람의 손에 의해 생산, 준비 및/또는 제조되는 것을 의미한다. 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 또는 본 발명의 다른 분자의 합성은 화학적 또는 효소적일 수 있다.

[0309] 본원에 사용된 용어 "형질감염"은 외인성 핵산을 세포 내로 도입하는 방법을 지칭한다. 형질도입 방법은 비제한적으로 화학적 방법, 물리적 처리 및 양이온 지질 또는 혼합물을 포함한다. 세포 내로 형질감염될 수 있는 제제의 목록은 크고, 비제한적으로 siRNA, 센스 및/또는 안티-센스 서열, 하나 이상의 유전자를 암호화하고 발현 폴라스미드 내에 조직화된 DNA, 단백질, 단백질 단편 등을 포함한다.

[0310] 본원에 사용된 "비표적"은 임의의 하나 이상의 표적, 유전자 및/또는 세포 전사물에 대한 임의의 의도하지 않은 효과를 지칭한다.

[0311] 본원에 사용된 어구 "약제학적으로 허용되는"은 전전한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없고 합리적인 이득/위험 비율에 상응하는, 인간 또는 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 의미하기 위해 본원에서 사용된다.

[0312] 본원에 사용된 용어 제제의 "유효량"은 효과적인 이점의 또는 바람직한 결과, 예컨대 임상결과를 얻기에 충분한 양을 의미하고, 이러한 "유효량"은 이것이 적용되는 상황에 달려있다. 예컨대, ALS를 치료하기 위한 제제를 투여하는 상황에서, 제제의 유효량은, 예컨대 본원에 정의된 바와 같이, 제제의 투여 없이 수득된 반응에 비해 ALS의 치료를 달성하기에 충분한 양이다.

[0313] 본원에 사용된 용어 "치료학적 유효량"은 감염, 질환, 장애 및/또는 상태에 취약하거나 이를 앓고 있는 대상에 투여되어, 감염, 질환, 장애 및/또는 상태의 발병의 치료, 증상의 개선, 진단, 예방 및/또는 지역에 충분한, 전달되는 제제(예컨대, 핵산, 약물, 치료제, 진단제, 예방제, 등)의 양을 의미한다.

- [0314] 본원에 사용된 용어 "대상" 또는 "환자"는, 예컨대, 실험적, 진단적, 예방적 및/또는 치료적 목적으로 본 발명에 다른 조성물이 투여될 수 있는 임의의 유기체를 지칭한다. 전형적인 대상은 동물(예컨대, 포유류 예컨대 마우스, 랙트, 토끼, 비-인간 영장류 및 인간) 및/또는 식물을 포함한다.
- [0315] 본원에 사용된 용어 "예방하다" 또는 "예방"은 수 주, 수 개월 또는 수 년을 포함하는 일정 기간 동안 상태 또는 질환의 발병, 발달 또는 진행의 자연 또는 방지하는 것을 지칭한다.
- [0316] 본원에 사용된 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 질환의 치료 또는 개선을 위해 사용되는 하나 이상의 특정 절차의 적용을 지칭한다. 특정 구현예에서, 특정 절차는 하나 이상의 약제학적 제제의 투여이다. 본 발명의 맥락에서, 특정 절차는 SOD1 유전자를 치료하는 하나 이상의 siRNA 이중가닥 또는 암호화된 dsRNA의 투여이다.
- [0317] 본원에 사용된 용어 "개선" 또는 "개선하다"는 상태 또는 질환의 하나 이상의 징후의 중증도를 낮추는 것을 지칭한다. 예컨대, 신경퇴행성 장애의 맥락에서, 개선은 뉴런 손실의 감소를 포함한다.
- [0318] 본원에 사용된 용어 "투여하다"는 대상에 약제학적 제제 또는 조성물을 제공하는 것을 지칭한다.
- [0319] 본원에 사용된 용어 "신경퇴행"은 신경 세포 사멸을 야기하는 병리학적 상태를 지칭한다. 다수의 신경 장애는 공통의 병리학적 상태로서 신경퇴행을 공유한다. 예컨대, 알츠하이머, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증(ALS)은 모두 수 년에 걸쳐 느리고 진행적인 신경 세포 사멸을 특징으로 하는 만성 신경퇴행인 반면, 급성 신경퇴행은 허혈, 예컨대 뇌졸중, 외상, 친대 외상성 뇌손상에 기인하거나, 예컨대 척수 손상 또는 경화증에 의해 야기되는 탈수초 또는 외상에 의한 축삭횡단에 의해 기인한 갑작스런 발병의 신경 세포 사멸을 특징으로 한다. 일부 신경 장애에서, 주로 하나의 유형의 신경 세포가 퇴행이며, 예컨대 ALS에서의 운동 뉴런 퇴행이다.
- [0320] **균등률 및 범위**
- [0321] 당업자는, 통상적인 실험을 사용하여 본원에 기재된 발명에 따른 특정 구현예에 대한 다수의 균등물을 사용하여 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 전술된 설명에 한정되는 것으로 의도되는 것이 아니라, 오히려 첨부된 청구범위에서 설명되는 바와 같다.
- [0322] 청구범위에서, 단수형 명사는 문맥에 반하여 지시되지 않는 한, 하나 이상을 의미할 수 있다. 군의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은, 문맥에 반하는 것으로 명시되어 있지 않는 한, 군 구성원의 하나, 하나 이상 또는 모두가 주어진 생성물 또는 방법에 존재하거나, 사용되거나 다른 방식으로 관련이 있는 경우, 만족한 것으로 간주된다. 본 발명은 군의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 방법에 존재하거나, 사용되거나 다른 방식으로 관련되어 있는 구현예를 포함한다. 본 발명은 주어진 산물 또는 방법에 대해 하나 이상 또는 모든 군의 구성원이 존재, 사용 또는 다른 방식으로 관련되어 있는 경우의 구현예를 포함한다.
- [0323] 또한, 용어 "포함하는"은 개방되고 허용되는 것으로 의도되지만, 추가 요소 또는 단계의 포함을 요하지 않음을 유의해야 한다. 용어 "포함하는"이 사용된 경우, 용어 "로 이루어진"은 따라서 포함되고 개시된다.
- [0324] 범위가 주어진 경우, 끝점이 포함된다. 추가로, 당업자 중 한명의 맥락 및 이해로부터 달리 지시되거나 다른 방식으로 명백하지 않는 한, 범위로 표현된 값은 본 발명의 상이한 구현예에서 언급된 범위 이내의 임의의 특정 값 또는 하위범위를, 문맥이 다른 방식으로 명백하게 지시되지 않는 한, 범위의 하한 단위의 1/10으로 가정할 수 있음이 이해되어야 한다.
- [0325] 추가로, 선행기술에 속하는 본 발명의 임의의 특정 구현예가 임의의 하나 이상의 청구범위로부터 명백하게 배제될 수 있음이 이해되어야 한다. 이러한 구현예는 당업자에게 공지된 것으로 간주되므로, 본원에서 명백하게 배제가 명시되지 않아도 배제될 수 있다. 본 발명의 조성물의 임의의 특정 구현예(예컨대, 임의의 항생제, 체료제 또는 활성 성분; 임의의 생산 방법; 임의의 사용 방법 등)는 선행기술의 존재와 관계 없이, 어떤 이유로든 임의의 하나 이상의 주장으로부터 배제될 수 있다.
- [0326] 사용된 단어는 제한보다는 설명의 단어이고, 변경은 본 발명의 넓은 양태에서 본 발명의 진정한 범위 및 사상을 벗어나지 않고 첨부된 청구범위 내에서 이루어질 수 있음이 이해되어야 한다.
- [0327] 본 발명은 몇몇 설명된 구현예와 관련하여 일부 길이 및 일부 상세하게 설명되었지만, 임의의 이러한 특정 사항 또는 구현예 또는 임의의 특정한 구현예로 제한되어야 하는 것으로 의도된 것은 아니지만, 선행 기술의 관점에서 이러한 청구범위의 가장 광범위한 가능한 해석을 제공하고, 따라서 본 발명의 의도된 범위를 효과적으로 포함하도록 첨부된 청구범위를 참조하여 해석되어야 한다.

[0328] **실시예**[0329] **실시예 1. SOD1 siRNA 설계 및 합성**[0330] SOD1 siRNA 설계

[0331] 인간 SOD1 유전자를 표적화하는 siRNA를 확인하기 위해 siRNA를 설계하였다. 표 2에 기술되어 있듯, 인간에 대한 SOD1 전사물(GeneBank 접근 번호 NM_000454.4(서열번호 1)), 시노몰구스(NCBI 참조서열 모음(배포 63)(서열번호 2)로부터의 (GeneBank 접근 번호 XM_005548833.1)) 및 레수스(양상을 프로젝트(배포 75)로부터의 SOD1 전사물 ENSMMUT00000002415(서열번호 3))를 사용하여 설계하였다.

[0332] [표 2]

SOD1 유전자 서열

SOD1 전사물	접근번호	서열번호
인간 SOD1 cDNA (981bp)	NM_000454.4	1
시노몰구스 SOD1 cDNA (465bp)	XM_005548833.1	2
레수스 SOD1 cDNA (464bp)	ENSMUT00000002415	3

[0333]

[0334] 인간 SOD1 전사물과 안티센스 가닥의 2 내지 18번 위치에서 100% 동일하고 비-인간 영장류 SOD1 전사물과 안티센스 가닥의 2 내지 18번 위치에서 부분적 또는 100% 동일하도록 siRNA 듀플렉스를 설계하였다. 모든 siRNA 이 중가닥에서, 안티센스 가닥의 1번 위치를 U로 조작하고, 센스 가닥의 19번 위치를 C로 조작하여 이러한 위치에 듀플렉스를 짹짓지 않았다.

[0335] SOD1 siRNA 서열 선택

[0336] 인간, 시노몰구스 및 레수스 SOD1 유전자의 안티센스 가닥의 예측되는 선택성, 및 miRBase20.0에서 인간 서열에 대한 안티센스 가닥의 2 내지 7번 위치에서 시드 서열의 매칭 결핍에 기초하여, 총 169개의 안티센스 및 169개의 센스의 인간 SOD1 유도된 올리고뉴클레오티드를 합성하여 듀플렉스를 형성하였다(표 3). 이어서, siRNA 듀플렉스를 시험관내에서 내인성 SOD1 유전자 발현(SOD1 mRNA 수준)에 대한 저해 활성에 대해 시험하였다.

[0337]

[표 3]

인간 SOD1 dsRNA 의 센스 및 안티센스 가닥 서열

시작	siRNA 듀플렉스 ID	SS ID	센스 가닥 서열 (5'-3')	서열번 호	AS ID	안티센스 가닥 서열 (5'-3')	서열번호
26	D-2741	7414	CGGAGGUUCUGGCCUA UAACdTdT	4	741 5	UUUAUAGGCCAGACCU CCGdTdT	173
27	D-2742	7416	GGAGGUUCUGGCCUAU AAACdTdT	5	741 7	UUUAUAGGCCAGACC UCCdTdT	174
28	D-2743	7418	GAGGUUCUGGCCUAUA AAGCdTdT	6	741 9	UCUUUAUAGGCCAGAC CUCdTdT	175
29	D-2744	7420	AGGUUCUGGCCUAUAA AGUCdTdT	7	742 1	UACUUUAUAGGCCAGA CCUdTdT	176
30	D-2745	7422	GGUCUCGCCUAUAAA GUACdTdT	8	742 3	UUACUUUAUAGGCCAG ACCdTdT	177
32	D-2746	7424	UCUGGCCUAUAAGU AGUCdTdT	9	742 5	UACUACUUUAUAGGCC AGAddTdT	178
33	D-2747	7426	CUGGCCUAUAAGUA GUCCdTdT	10	742 7	UGACUACUUUAUAGGC CAGdTdT	179
34	D-2748	7428	UGGCCUAUAAGUAG UCGCdTdT	11	742 9	UCGACUACUUUAUAGG CCAddTdT	180
35	D-2749	7430	GGCCUAUAAGUAGU CGCCdTdT	12	743 1	UGCGACUACUUUAUAG GCCdTdT	181
36	D-2750	7432	GCCUAUAAGUAGUC GCGCdTdT	13	743 3	UCGCGACUACUUUAU GGCdTdT	182
37	D-2751	7434	CCUAUAAGUAGUCG CGGCdTdT	14	743 5	UCCCGCGACUACUUUAU AGGdTdT	183
74	D-2752	7436	GUCGUAGUCUCCUGCA GCCdTdT	15	743 7	UGCUGCAGGAGACUAC GACdTdT	184
76	D-2753	7438	CGUAGUCUCCUGCAGC GUCdTdT	16	743 9	UACGCUGCAGGAGACU ACGdTdT	185
77	D-2754	7440	GUAGUCUCCUGCAGCG UCCdTdT	17	744 1	UGACGCUGCAGGAGAC UACdTdT	186
78	D-2755	7442	UAGUCUCCUGCAGCGU CUCdTdT	18	744 3	UAGACGCUGCAGGAGA CUAddTdT	187
149	D-2756	7444	AUGGGGACGAAGGCC GUGCdTdT	19	744 5	UCACGCCUUCGUCGC CAUdTdT	188
153	D-2757	7446	CGACGAAGGCCGUGU GCGCdTdT	20	744 7	UCGCAACAGGCCUUCG UCGdTdT	189

[0338]

157	D-2758	7448	GAAGGCCGUGUGCGU GCUCdTdT	21	744 9	UAGCACGCACACGGCC UUCdTdT	190
160	D-2759	7450	GGCCUGUGCGUGCU GAACdTdT	22	745 1	UUUCAGCACGCACACG GCCdTdT	191
177	D-2760	7452	AGGGCGACGGCCAGU GCCdTdT	23	745 3	UGCACUGGCCGUCGC CCUdTdT	192
192	D-2761	7454	UGCAGGGCAUCAUCA AUUdTdT	24	745 5	UAUUUGAUGAUGCCU GCAddTdT	193
193	D-2762	7456	GCAGGGCAUCAUCAA UUUCdTdT	25	745 7	UAAAUGAUGAUGGCC UGCdTdT	194
195	D-2763	7458	AGGGCAUCAUCAAUU UCGdTdT	26	745 9	UCGAAAUUGAUGAUG CCCdTdT	195
196	D-2764	7460	GGGCAUCAUCAAUUU CGACdTdT	27	746 1	UUCGAAAUGAUGAU GCCdTdT	196
197	D-2765	7462	GGCAUCAUCAAUUC GAGCdTdT	28	746 3	UCUCGAAAUGAUGA UGCCdTdT	197
198	D-2766	7464	GCAUCAUCAAUUCG AGCCdTdT	29	746 5	UGCUCGAAAUGAUG AUGCdTdT	198
199	D-2767	7466	CAUCAUCAAUUCGA GCACdTdT	30	746 7	UUGCUCGAAAUGAU GAUGdTdT	199
206	D-2768	7468	AAUUUCGAGCAGAAG GAACdTdT	31	746 9	UUUCCUUCUGCUCGA AUudTdT	200
209	D-2769	7470	UUCGAGCAGAAGGAA AGUCdTdT	32	747 1	UACUUUCCUUCUGCUC GAAddTdT	201
210	D-2770	7472	UCGAGCAGAAGGAAA QUACdTdT	33	747 3	UUACUUUCCUUCUGCU CGAddTdT	202
239	D-2771	7474	AAGGUGUGGGGAAGC AUUCdTdT	34	747 5	UAUGCUUCCCCACAC CUUDdTdT	203
241	D-2772	7476	GGUGUGGGGAAGCAU UAACdTdT	35	747 7	UUUAAUGCUUCCCCAC ACCdTdT	204
261	D-2773	7478	GACUGACUGAAGGCC UGCCdTdT	36	747 9	UGCAGGCCUUCAGUCA GUCdTdT	205
263	D-2774	7480	CUGACUGAAGGCCUGC AUCdTdT	37	748 1	UAUGCAGGCCUUCAGU CAGdTdT	206
264	D-2775	7482	UGACUGAAGGCCUGC AUGCdTdT	38	748 3	UCAUGCAGGCCUUCAG UCAAddTdT	207
268	D-2776	7484	UGAAGGCCUGCAUGG AUUCdTdT	39	748 5	UAUCCAUGCAGGCCU UCAddTdT	208
269	D-2777	7486	GAAGGCCUGCAUGGA UUCCdTdT	40	748 7	UGAAUCCAUGCAGGCC UUCdTdT	209
276	D-2778	7488	UGCAUGGAAUCCAUG UUCCdTdT	41	748 9	UGAACAUUGGAAUCCAU GCAddTdT	210
278	D-2779	7490	CAUGGAUCCAUGUU CAUCdTdT	42	749 1	UAUGAACAUUGGAAUCC AUGdTdT	211
281	D-2780	7492	GGAUUCCAUGUUCAU GAGCdTdT	43	749 3	UCUCAUGAACAUUGGA UCCdTdT	212
284	D-2781	7494	UUCCAUGUCAUGAG UUUCdTdT	44	749 5	UAAACUCAUGAACAU GAAddTdT	213
290	D-2782	7496	GUUCAUGAGUUUGGA GAUCdTdT	45	749 7	UAUCUCCAAACUCAUG AACdTdT	214
291	D-2783	7498	UUCAUGAGUUUGGAG AUACdTdT	46	749 9	UUUAUCUCCAAACUCAU GAAddTdT	215
295	D-2784	7500	UGAGUUUJGGAGAUAA UACCdTdT	47	750 1	UGUAUUAUCUCCAAAC UCAddTdT	216
296	D-2785	7502	GAGUUUJGGAGAUAA ACACdTdT	48	750 3	UUGUAUUAUCUCCAA CUCdTdT	217
316	D-2786	7504	AGGCUGUACCGAGUGC AGGCdTdT	49	750 5	UCCUGCACUGGUACAG CCUdTdT	218
317	D-2787	7506	GGCUGUACCGAGUGCA GGUCdTdT	50	750 7	UACCUGCACUGGUACAA GCCdTdT	219
329	D-2788	7508	GCAGGUCCUCACUUUA AUACdTdT	51	750 9	UAUAAAAGUGAGGAC CUGCdTdT	220
330	D-2789	7510	CAGGUCCUCACUUUA UCCdTdT	52	751 1	UGAUUAAAAGUGAGGA CCUGdTdT	221
337	D-2790	7512	UCACUUUAAUCUCUCA UCCdTdT	53	751 3	UGAUAGAGGAUAAA GUGAddTdT	222

[0339]

350	D-2791	7514	CUAUCCAGAAAACACG GUCdTdT	54	751 5	UACCGUGUUUUUCUGGA UAGdTdT	223
351	D-2792	7516	UAUCCAGAAAACACG GUGCdTdT	55	751 7	UCACCGUGUUUUUCUGG AUAddTdT	224
352	D-2793	7518	AUCCAGAAAACACGG UGGCdTdT	56	751 9	UCCACCGUGUUUUUCUG GAUdTdT	225
354	D-2794	7520	CCAGAAAACACGGUG GGCCdTdT	57	752 1	UGCCCAACCGUGUUUU UGGdTdT	226
357	D-2795	7522	GAAAACACGGUGGGC CAACdTdT	58	752 3	UUUGGCCACCGUGU UUCdTdT	227
358	D-2796	7524	AAAACACGGUGGGCC AAACdTdT	59	752 5	UUUUGGCCACCGUGU UUUdTdT	228
364	D-2797	7526	CGGUGGGCCAAGGA UGACdTdT	60	752 7	UUCAUCCUUUGGCCA CCGdTdT	229
375	D-2798	7528	AGGAUGAAGAGAGGC AUGCdTdT	61	752 9	UCAUGCCUCUCAU CCUdTdT	230
378	D-2799	7530	AUGAAGAGAGGCAUG UUGCdTdT	62	753 1	UCAACAUGCCUCU CAUdTdT	231
383	D-2800	7532	GAGAGGCAUGUUGGA GACCdTdT	63	753 3	UGUCUCCAACAUGCC CUCdTdT	232
384	D-2801	7534	AGAGGAUGUUGGAG ACUCdTdT	64	753 5	UAGUCUCCAACAUGCC UCUdTdT	233
390	D-2802	7536	AUGUUGGAGACUUGG GCACdTdT	65	753 7	UUGCCAAGUCUCAA CAUdTdT	234
392	D-2803	7538	GUUGGAGACUUGGGC AAUCdTdT	66	753 9	UAUUGCCAAGUCUCC AACdTdT	235
395	D-2804	7540	GGAGACUUGGGCAAU GUGCdTdT	67	754 1	UCACAUUGCCAAGUC UCCdTdT	236
404	D-2805	7542	GGCAAUUGACUGCU GACCdTdT	68	754 3	UGUCAGCAGUCACAU GCCdTdT	237
406	D-2806	7544	CAAUGACUGACUGA CAACdTdT	69	754 5	UUUGUCAGCAGUCACA UUGdTdT	238
417	D-2807	7546	CUGACAAAGAUGGUG UGGCdTdT	70	754 7	UCCACCACAUUUGU CAGdTdT	239
418	D-2808	7548	UGACAAAGAUGGUGU GGCCdTdT	71	754 9	UGCCACACCAUCUUUG UCAddTdT	240
469	D-2809	7550	CUCAGAGACCAUUGC AUCdTdT	72	755 1	UAUGCAAUGGUCU GAGdTdT	241
470	D-2810	7552	UCAGGAGACCAUUGC AUCCdTdT	73	755 3	UGAUGCAAUGGUCU UGAddTdT	242
475	D-2811	7554	AGACCAUUGCAUCAU UGGCdTdT	74	755 1	UCCAAUGAUGCAA UCUdTdT	243
476	D-2812	7556	GACCAUUGCAUCAU GGCCdTdT	75	755 7	UGCCAUAUGAUGCAA GUCdTdT	244
480	D-2813	7558	AUUGCAUCAUUGGCC GCACdTdT	76	755 9	UUGCGGCCAAUGAUGC AAUdTdT	245
487	D-2814	7560	CAUUGGCCGACACUG GUCdTdT	77	756 1	UACCAUGUGCGGCCA AUGdTdT	246
494	D-2815	7562	CGCACACUGGUGGUCC AUCdTdT	78	756 3	UAUGGACCA GCGdTdT	247
496	D-2816	7564	CACACUGGUGGUCCAU GACdTdT	79	756 5	UUCAUGGACCA GUGdTdT	248
497	D-2817	7566	ACACUGGUGGUCCAU GAACdTdT	80	756 7	UUUCAUGGACCA UGUdTdT	249
501	D-2818	7568	UGGUGGUCCAUAGAAA AAGCdTdT	81	756 9	UCUJJUUCAUGGACCA CCAddTdT	250
504	D-2819	7570	UGGUCCAUGAAAAG CAGCdTdT	82	757 1	UCUGCUUUUCAUGGA CCAddTdT	251
515	D-2820	7572	AAAGCAGAUGACUUG GGCCdTdT	83	757 3	UGCCAAGUCAUCUGC UUUdTdT	252
518	D-2821	7574	GCAGAUGACUUGGGC AAACdTdT	84	757 5	UUUUGCCAAGUCAUC UGCdTdT	253
522	D-2822	7576	AUGACUUGGGCAAAG GUGCdTdT	85	757 7	UCACCUUUGGCCAAGU CAUdTdT	254

523	D-2823	7578	UGACUJUGGGCAAAGG UGGcdTdT	86	757 9	UCCACCUUUGCCCAAG UCAdTdT	255
524	D-2824	7580	GACUUGGGCAAAGGU GGACdTdT	87	758 1	UUCCACCUUUGCCCA GUCdTdT	256
552	D-2825	7582	GUACAAAGACAGGAA ACGcdTdT	88	758 3	UCGUUUCUGUCUUUG UACdTdT	257
554	D-2826	7584	ACAAAGACAGGAAAC GCUcdTdT	89	758 5	UAGCGUUUCCUGUCUU UGUdTdT	258
555	D-2827	7586	CAAAGACAGGAAACG CUGcdTdT	90	758 7	UCAGCGUUUCCUGUCU UUGdTdT	259
562	D-2828	7588	AGGAAACGCGUGGAAG UCGcdTdT	91	758 9	UCGACUUCCAGCGUU CCUdTdT	260
576	D-2829	7590	GUCGUUUGGUUGUG GUGcdTdT	92	759 1	UCACCCAAAGCCAAAC GACdTdT	261
577	D-2830	7592	UCGUUJUGGUUGUG UGUCdTdT	93	759 3	UACACCACAAAGCCAA CGAdTdT	262
578	D-2831	7594	CGUUUUGGUUGUGGU GUACdTdT	94	759 5	UUACACCCAAAGCCAA ACGdTdT	263
579	D-2832	7596	GUUUGGUUGUGGU UAUCdTdT	95	759 7	UUUACACCCAAAGCCAA AACdTdT	264
581	D-2833	7598	UUGGUUUGUGGU AUUCdTdT	96	759 9	UAUUUACACCCAAAGC CAAAdTdT	265
583	D-2834	7600	GGCUUUGGUUGGU UGGcdTdT	97	760 1	UCCAAUUAACACCACAA GCCdTdT	266
584	D-2835	7602	GUUUGGUUGGU GGGcdTdT	98	760 3	UCCCAAAUUAACACCAC AGCdTdT	267
585	D-2836	7604	CUUGUGGUUAUUG GGACdTdT	99	760 5	UUCCCAUAUACACCAC AAGdTdT	268
587	D-2837	7606	UGUGGUUAUUGGG AUCCdTdT	100	760 7	UGAUUCCAAUUAACACC ACAdTdT	269
588	D-2838	7608	GUGGUUAUUGGG UCGcdTdT	101	760 9	UCGAUCCAAUUAACAC CACdTdT	270
589	D-2839	7610	UGGUUAUUGGGAU CGCCdTdT	102	761 1	UGCGAUCCCAUUACAC CCAdTdT	271
593	D-2840	7612	GUAAUUGGAUCGCC CAACdTdT	103	761 3	UUUGGGCGAUCCCAU UACdTdT	272
594	D-2841	7614	UAUUGGUACGCC AAUCdTdT	104	761 5	UAUUGGGCGAUCCCA UUAdTdT	273
595	D-2842	7616	AAUUGGAUCGCC AUACdTdT	105	761 7	UUAUUUGGGCGAUCCCA AUUdTdT	274
596	D-2843	7618	AUUGGGAUCC UAACdTdT	106	761 9	UUUAUJUGGCGAUCCC AAUdTdT	275
597	D-2844	7620	UUGGUACGCC AAACdTdT	107	762 1	UUUUAUUGGGCGAUCC CAAAdTdT	276
598	D-2845	7622	UGGGAUCC AACcdTdT	108	762 3	UGUUUAUUGGGCGAU CCCAdTdT	277
599	D-2846	7624	GGGAUCGCC ACACdTdT	109	762 5	UGUUUAUUGGGCGA UCCCdTdT	278
602	D-2847	7626	AUCGCC UCCdTdT	110	762 7	UGAAUJGUUAUUGGG CGAdTdT	279
607	D-2848	7628	CCAAUAAA UGCdTdT	111	762 9	UCAAGGGAAUGUU UUGGdTdT	280
608	D-2849	7630	CAAAUACAU GGCdTdT	112	763 1	UCCAAGGGAAUGUU AUUGdTdT	281
609	D-2850	7632	AAUAAA GGACdTdT	113	763 3	UUCCAAGGGAAUGUU UAUdTdT	282
610	D-2851	7634	AUAAA GAUCdTdT	114	763 5	UAUCCAAGGGAAUGU UAUdTdT	283
611	D-2852	7636	AAA AUGCdTdT	115	763 7	UCAUCCAAGGGAAUGU UUAdTdT	284
612	D-2853	7638	AAACAU UGUCdTdT	116	763 9	UACAUCCAAGGGAAUG UUUdTdT	285
613	D-2854	7640	AAACAU GUACdTdT	117	764 1	UUACAUCCAAGGGAAU GUUdTdT	286
616	D-2855	7642	AUUC GUCCdTdT	118	764 3	UGACUACAUCCAAGGG AAUdTdT	287

[0341]

621	D-2856	7644	CUUGGAUGUAGUCUG AGGCdTdT	119	764 5	UCCUCAGACUACAUCC AAGdTdT	288
633	D-2857	7646	CUGAGGCCCUUAACU CACdTdT	120	764 7	UUGAGUUAGGGGCC UCAGdTdT	289
635	D-2858	7648	GAGGCCCUUAACUCA UCCdTdT	121	764 9	UGAUGAGUUAAGGGG CCUCdTdT	290
636	D-2859	7650	AGGCCCUUAACUCAU CUCdTdT	122	765 1	UAGAUGAGUUAAGGG GCCUdTdT	291
639	D-2860	7652	CCCCUUAACUCAUCUG UUCdTdT	123	765 3	UAACAGAUGAGUUA GGGGdTdT	292
640	D-2861	7654	CCCUUAACUCAUCUGU UACdTdT	124	765 5	UUAACAGAUGAGUUA AGGGdTdT	293
641	D-2862	7656	CCUUAAACUCAUCUGUU AUCdTdT	125	765 7	UAAAACAGAUGAGUUA AAGGdTdT	294
642	D-2863	7658	CUUAAACUCAUCUGUU AUCCdTdT	126	765 9	UGAUAAACAGAUGAGU UAAGdTdT	295
643	D-2864	7660	UUAACUCAUCUGUUA UCCCdTdT	127	766 1	UGGAUAAACAGAUGAG UUAAddTdT	296
644	D-2865	7662	UAACUCAUCUGUUAU CCUCdTdT	128	766 3	UAGGUAUACAGAUGA GUUAddTdT	297
645	D-2866	7664	AACUCAUCUGUUAUCC UGCdTdT	129	766 5	UCAGGUAACAGAUG AGUUDdTdT	298
654	D-2867	7666	GUUAUCCUGCUAGCU GUACdTdT	130	766 7	UUACAGCUAGCAGGAU AACdTdT	299
660	D-2868	7668	CUGCUAGCUGUAGAA AUGCdTdT	131	766 9	UCAUUUCUACAGCUAG CAGdTdT	300
661	D-2869	7670	UGCUAGCUGUAGAAA UGUCdTdT	132	767 1	UACAUUUUCACAGCUA GCAddTdT	301
666	D-2870	7672	GCUGUAGAAAUGUAU CCUCdTdT	133	767 3	UAGGUAUACUUUCUAC AGCdTdT	302
667	D-2871	7674	CUGUAGAAAUGUAUC CUGCdTdT	134	767 5	UCAGGUAUACAUUCUA CAGdTdT	303
668	D-2872	7676	UGUAGAAAUGUAUCC UGACdTdT	135	767 7	UUCAGGAUACAUUCU ACAddTdT	304
669	D-2873	7678	GUAGAAAUGUAUCCU GAUCdTdT	136	767 9	UAUCAGGAUACAUUC UACdTdT	305
673	D-2874	7680	AAAUGUAUCCUGUA AACCdTdT	137	768 1	UGUUUAUCAGGAUAC AUUUDdTdT	306
677	D-2875	7682	GUAUCCUGUAAAACA UUACdTdT	138	768 3	UUAAUGUUUAUCAGG AUACdTdT	307
692	D-2876	7684	UAAAACACUGUAAUC UUACdTdT	139	768 5	UUAAGAUUACAGUGU UUAddTdT	308
698	D-2877	7686	ACUGUAUACUUAAAA GUGCdTdT	140	768 7	UCACUUUAAGAUUAC AGUDdTdT	309
699	D-2878	7688	CUGUAAUCUAAAAG UGUCdTdT	141	768 9	UACACUUUAAGAUU ACAGdTdT	310
700	D-2879	7690	UGUAAUCUAAAAGU GUACdTdT	142	769 1	UUACACUUUAAGAU UACAddTdT	311
701	D-2880	7692	GUAAUCUAAAAGUG UAACdTdT	143	769 3	UUUACACUUUAAGA UUACdTdT	312
706	D-2881	7694	CUUAAAAGUGUAAUU GUGCdTdT	144	769 5	UCACAAUACACUUUU AAGdTdT	313
749	D-2882	7696	UACCUUGAGUGAGAA ACUCdTdT	145	769 7	UAGUUUCACACAG GUAddTdT	314
770	D-2883	7698	UUUAUGACUACUGGA AGACdTdT	146	769 9	UUCUJCCAAGUGAUCA UAAddTdT	315
772	D-2884	7700	AUGAUACUUGGAAG AUUCdTdT	147	770 1	UAAUCUCCAGUGAU CAUdTdT	316
775	D-2885	7702	AUCACUUGGAAGAU UGUCdTdT	148	770 3	UACAAAUCUCCAGU GAUDdTdT	317
781	D-2886	7704	UGGAAGAUUUGUAUA GUUCdTdT	149	770 5	UAAUCUACAAUCUU CCAddTdT	318
800	D-2887	7706	UAAAACUCAGUUA AAACdTdT	150	770 7	UUUUUAACUGAGUU UAUAddTdT	319

804	D-2888	7708	AAACUCAGUUAAAAU GUCCdTdT	151	770 9	UGACAUUUUACUGA GUUudTdT	320
819	D-2889	7710	GUCGUUUCAUAGAC CUGCdTdT	152	771 1	UCAGGUCAUUGAAACA GACdTdT	321
829	D-2890	7712	AUGACCUUGUAUUUG CCACdTdT	153	771 3	UUGGCAAAAUACAGG 3 UCAudTdT	322
832	D-2891	7714	ACCUGUAUUUGCCA GACCDdTdT	154	771 5	UGUCUGGCAAAUACA GGudTdT	323
833	D-2892	7716	CCUGUAUUUGCCAG ACUCdTdT	155	771 7	UAGUCUGGCAAAUAC AGGdTdT	324
851	D-2893	7718	UAUAUCACAGAUGGG UAUCdTdT	156	771 9	UAUACCCAUCUGU UUAdTdT	325
854	D-2894	7720	AUCACAGAUGGGUAU UAACdTdT	157	772 1	UUUUAUACCCAUCUG GAudTdT	326
855	D-2895	7722	UCACAGAUGGGUAU AAACdTdT	158	772 3	UUUUAUACCCAUCUG UGAdTdT	327
857	D-2896	7724	ACAGAUGGGUAUAAA ACUCdTdT	159	772 5	UAGUUUAUACCCAUC UGudTdT	328
858	D-2897	7726	CAGAUGGGUAUAAA CUUCdTdT	160	772 7	UAAGUUUAUACCCA CUGdTdT	329
859	D-2898	7728	AGAUGGGUAUAAA UUGCdTdT	161	772 9	UCAAGUUUAUACCCA UCudTdT	330
861	D-2899	7730	AUGGGUAUAAA GUCCdTdT	162	773 1	UGACAAGUUUAUACC CAudTdT	331
869	D-2900	7732	UAAAUCUGACAGAAU UUCCdTdT	163	773 3	UGAAAUCUGACAAG UUuAdTdT	332
891	D-2901	7734	UCAUUCAAAGCCUGUG AAUCdTdT	164	773 5	UAUUACAGGCUUGAA UGAdTdT	333
892	D-2902	7736	CAUUCAAAGCCUGUGA AUACdTdT	165	773 7	UUUUUCACAGGCUUGA AUGdTdT	334
906	D-2903	7738	AAUAAAACCCUGUA UGGCdTdT	166	773 9	UCCAUACAGGGUUUU AUudTdT	335
907	D-2904	7740	AUAAAACCCUGUAU GGCCdTdT	167	774 1	UGCCAUACAGGGUUUU UAudTdT	336
912	D-2905	7742	AACCCUGUAUGGCACU UACdTdT	168	774 3	UUAAGUGCCAUCAGG GUudTdT	337
913	D-2906	7744	ACCCUGUAUGGCACUU AUCCdTdT	169	774 5	UUAAGUGCCAUCAG GGudTdT	338
934	D-2907	7746	GAGGUUAUAAAAGA AUCCdTdT	170	774 7	UGAUCUUUUU CCUCdTdT	339
944	D-2908	7748	AAAGAAUCCAAUUC AAACdTdT	171	774 9	UUUUGAAUU CUUudTdT	340
947	D-2909	7750	GAAUCCAAUUCAAA CUACdTdT	172	775 1	UUAGUUUGAAU AUUCdTdT	341

[0343]

SOD1 siRNA 합성

[0345]

포스포라미다이트 올리고머화 화학에 따라 올리고리보뉴클레오티드를 ABI 3900 합성기(Applied Biosystems)에서 조립하였다. 0.2 μ mol의 합성 크기를 수득하기 위한 고상 지지체는 2'-데옥시-티미딘(Glen Research(미국 버지니아 스타팅)로부터 구입)이 탑재된 폴리스티렌이었다. 보조 합성 시약인, DNA 및 RNA 포스포라미다이트를 SAFC Proligo(독일 함부르크)로부터 입수하였다. 특히, 우리딘(U)의 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-3'-O-(2-시아노에틸-*N,N*-디이소프로필) 포스포라미다이트 단량체, 티미딘(dT), 4-*N*-아세틸시티딘(C^{Ac}), 6-*N*-벤조일아데노신(A^{bz}) 및 2'-O-*t*-부틸디메틸실릴을 가진 2-*N*-이소부티릴구아노신(G^{iBu})을 사용하여 올리고머 서열을 만들었다. 모든 포스포라미다이트(아세토니트릴 중 70 mM)의 커플링 시간은 활성화제로서 5-에틸티오-1H-테트라졸(ETT)(아세토니트릴 중 0.5 M)을 사용하여 3분이었다. 합성기에서 최종 디메톡시트리틸 기를 제거하여 서열을 합성하였다("DMT 제거(off)" 합성). 고상 합성이 완료되면, 올리고리보뉴클레오티드를 고상 지지체로부터 절단하고, 수성 메틸아민(40%) 및 에탄올중의 메틸아민(33%)의 1:1 (v/v) 혼합물을 사용하여 탈보호시켰다. 45° C에서 90분 후에, *N,N*-디메틸 포름아미드(DMF)로 용액을 회석하고 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드(TEA.HF)를 첨가하였다. 45° C에서 2시간 동안 인큐베이션시킨 후, 올리고리보뉴클레오티드를 1 M NaOAc, 및 아세톤 및 에탄올 4:1 (v/v)의 혼합물을 침전시켰다. 펠릿을 1 M 수성 NaCl 용액에 용해시키고, 크기 배제 크로마토그래피로 탈염시켰다. 이를 하이트랩(HiTrap) 5 mL 컬럼(GE 헬스케어)이 구비된 AKTA Purifier HPLC 시스템(GE 헬스케어, 독일 프라이부르크)을 사용하여 달성하였다. 올리고리보뉴클레오티드의 동일성을 MALDI 질량 분석법 또는 ESI 질량분석법으로 확인하였다. RNA 단일 가닥으로부터 siRNA를 생성하기 위해, 등물량의 상보성인 센스 및 안티센스 가닥을 혼합하고, 20 mM NaCl, 4 mM 소듐 포스페이트 pH 6.8 완충액에서 혼합하고 어닐링시켰다. siRNA를 사용하기 전까지 냉동 보관하였다.

[0346]

실시예 2. 인간 SOD1 mRNA 억제에 대한 SOD1 siRNA의 시험관내 스크리닝

[0347]

SOD1 mRNA를 정량하기 위해 bDNA(분지형 DNA) 분석법을 사용하여 HeLa 세포에서 내인성 SOD1 발현의 억제에 대해 siRNA를 표적화하는 인간 SOD1(표 3에 기술되어 있음)을 분석하였다. IC50을 계산하기 위하여, 4가지 유형의 배양된 세포에서 용량 반응 실험에서, SOD1 dsRNA 이중가닥의 서브세트를 선별하기 위하여 2회 투여량 분석 결과를 사용하였다.

[0348] 세포 배양 및 형질감염

[0349] HeLa 세포를 ATCC(LGC Standards와 합명회사인 ATCC, 독일 베젤)로부터 입수하고, 가습된 인큐베이터에서 5% CO₂를 가진 대기에서 37° C에서 10% 태아 소 혈청(GIBCO/Life Technologies의 초저 IgG) 및 1% Pen/Strep(Biochrom GmbH, 독일 베를린)을 함유하도록 보충된 HAM F-12 배지(Biochrom GmbH, 독일 베를린)에서 배양하였다.

[0350] siRNA로 형질감염시키기 위해, 96-웰 플레이트에 19,000 내지 20,000 세포/웰의 밀도로 HeLa 세포를 씨딩하였다. 제조사의 지시에 따라 리포택타민(Lipofectamine) 2000(Invitrogen/Life Technologies)을 사용하여 siRNA의 형질감염을 수행하였다. 2회-용량 스크린에 대하여, 1 nM 또는 0.1 nM 농도의 SOD1 siRNA를 사용하였다. 10, 2.5, 0.6, 0.16, 0.039, 0.0098, 0.0024, 0.0006, 0.00015, 및 0.000038 nM의 SOD1 siRNA 농도로 용량 반응 실험을 수행하였다. 대조군 웰을 루시페라제 siRNA, Aha-1 siRNA, PLGF siRNA, 또는 관련없는 siRNA의 대조군 혼합물로 형질감염시켰다.

[0351] 분지형 DNA 검정- 퀄티진(Quant iGene) 2.0

[0352] siRNA와 함께 24시간 인큐베이션한 후, 배지를 제거하고 세포를 150 μl의 용균 혼합물(1 부피의 용균 혼합물, 2 부피의 뉴클라아제가 없는 물)에서 용균시킨 다음 53° C에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 80 μl의 작동 프로브 세트(Working Probe Set) SOD1(유전자 표적) 및 90 μl의 작동 프로브 세트 GAPDH(내인성 대조군) 및 20 μl 또는 10 μl의 세포 용균물을 캡쳐 플레이트(Capture Plate)에 첨가하였다. 캡쳐 플레이트를 55° C(SOD1의 경우) 및 53° C(GAPDH의 경우)에서 배양하였다(약 16 내지 20시간). 다음날, 캡쳐 플레이트를 300 μl 이상의 1X 세척 완충액(뉴클라아제가 없는 물, 완충액 구성요소 1 및 세척 완충액 구성요소 2)으로 3회 세척하였다(마지막 세척 후, 플레이트를 뒤집어 이를 깨끗한 종이 타월로 빨아들여 닦아냈다). 100 μl의 예비-증폭기 작동 시약을 SOD1 캡쳐 플레이트에 첨가하고, 이를 알루미늄 포일로 밀봉하여 55° C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1시간 동안 인큐베이션한 후, 세척 단계를 반복한 다음 100 μl의 증폭기 작동 시약을 SOD1 및 GAPDH 캡쳐 플레이트 둘 다에 첨가하였다. 55° C(SOD1) 또는 53° C(GAPDH)에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 세척 및 건조 단계를 반복하고, 100 μl의 표지 프로브를 첨가하였다. 캡쳐 플레이트를 50° C(SOD1) 또는 53° C(GAPDH)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 1X 세척 완충액으로 세척하고, 건조시킨 다음 100 μl의 기질을 캡쳐 플레이트에 첨가하였다. 어두운 곳에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 1420 발광 계수기(WALLAC VICTOR Light, Perkin Elmer, 독일 로트가우- 유게스하임)를 사용하여 발광도를 읽었다.

[0353] bDNA 데이터 분석

[0354] 각각의 SOD1 siRNA 또는 대조군 siRNA에 대해, 4개의 웰을 동시에 형질감염시키고, 개별적인 데이터포인트를 각 웰로부터 수집하였다. 각각의 웰에 대하여, SOD1 mRNA 수준을 GAPDH mRNA 수준에 대해 정규화하였다. 주어진 SOD1 siRNA 활성을, 대조군 웰을 통해 평균화된 SOD1 mRNA 농도(GAPDH mRNA에 대해 정규화됨)에 대해 상대적인, 치료된 세포에서의 SOD1 mRNA 농도(GAPDH mRNA에 대해 정규화됨)의 퍼센트로 표현하였다.

[0355] 표 4는, 표 3에 주어진 서열인 SOD1 siRNA를 1 nM 또는 0.1 nM에서 시험한 시험관내 HeLa 스크린의 결과를 제공한다. 각 SOD1 siRNA에 대하여, 대조군에 비해 치료된 세포에 남아있는 SOD1 mRNA의 평균 백분율(GAPDH mRNA에 대해 정규화됨), 및 표준 편차가 표 4에 제시되어 있다. 1 nM에서의 SOD1 siRNA의 수는 HeLa 세포에서 SOD1 mRNA 수준을 80% 초과까지 감소시키는데 효과적이었다. 또한, 0.1 nM에서의 SOD1 siRNA의 수는 HeLa 세포에서 SOD1 mRNA 수준을 80% 초과까지 감소시키는데 효과적이었다.

[0356]

[표 4]

**SOD1 유전자 발현 억제 활성에 대한 HeLa 세포에서
SOD1 siRNA 의 시험관내 스크린의 2 회 투약 결과**

siRNA 듀플렉스 ID	잔여 SOD1 mRNA [대조군의 %] 1 nM SOD1 siRNA 24시간 후	SD [%]	잔여 SOD1 mRNA [대조군의 %] 0.1 nM SOD1 siRNA 24시간 후	SD [%]
D-2741	87.2	2.7	70.6	3
D-2742	86.9	4.3	79.5	8.5
D-2743	89.6	3.6	80.6	8.8
D-2744	83.8	7.2	75.9	8.5
D-2745	95.1	9.1	84.1	6.8
D-2746	111.3	3.6	92.0	7.2
D-2747	100.0	6.1	92.9	4.4
D-2748	100.4	3.1	91.6	12
D-2749	87.1	2.9	96.4	13
D-2750	94.2	7.1	93.1	8
D-2751	85.4	7.2	96.1	8
D-2752	27.2	3.6	70.2	6.5
D-2753	25.5	4.8	67.5	4.5
D-2754	23.2	4	70.2	2.3

[0357]

D-2755	36.6	3.7	75.5	11
D-2756	9.1	0.7	29.2	2.6
D-2757	3.9	0.6	9.0	1.8
D-2758	6.4	1.1	13.9	2.8
D-2759	6.7	1.1	14.1	1
D-2760	32.3	3.4	61.9	8.8
D-2761	12.9	3.6	41.7	8.3
D-2762	16.9	2.6	41.2	10
D-2763	5.7	1.3	10.5	3.4
D-2764	9.2	2.7	19.5	4.9
D-2765	13.6	1.9	29.4	8.8
D-2766	8.7	1.1	28.1	6.6
D-2767	10.4	1.6	24.7	5.9
D-2768	13.0	1.4	27.7	7.3
D-2769	25.3	1.9	57.4	7.5
D-2770	14.9	1.6	35.5	4.4
D-2771	11.4	1.8	32.6	8.6
D-2772	10.6	1.3	27.9	4.7
D-2773	14.3	1.4	35.7	3.1
D-2774	7.1	1.3	23.0	1.5
D-2775	9.8	0.9	31.3	3.3
D-2776	11.1	2.9	31.3	5.3
D-2777	47.8	5.5	80.9	4.6
D-2778	7.4	0.6	26.5	4.2
D-2779	7.9	0.6	17.9	3
D-2780	12.5	1.3	31.7	5.6
D-2781	16.3	2.3	39.1	8
D-2782	10.2	3.1	25.4	3
D-2783	13.5	3.5	33.4	6.5
D-2784	12.3	2.5	36.3	5.4
D-2785	14.6	3	30.5	7.4
D-2786	16.2	3.5	42.6	8

[0358]

D-2787	14.4	4.2	37.3	6.5
D-2788	9.8	3	21.6	6.6
D-2789	18.5	5.9	48.9	12
D-2790	11.6	3.8	28.1	5.6
D-2791	8.9	1.8	26.6	5.6
D-2792	8.1	1.4	25.6	5.3
D-2793	9.3	1.6	26.6	3
D-2794	8.9	1.9	25.8	4.2
D-2795	22.6	3.4	59.5	9.9
D-2796	15.1	0.7	43.0	1.9
D-2797	21.1	2.5	43.0	1.3
D-2798	10.4	1.2	28.0	5.1
D-2799	11.0	1.2	29.8	3.3
D-2800	21.3	2.4	52.4	4.7
D-2801	12.3	3.3	28.7	4
D-2802	8.4	1.8	18.8	3.7
D-2803	5.9	1	12.1	4.1
D-2804	11.8	1.6	28.9	7.5
D-2805	13.5	2.6	34.5	7.5
D-2806	5.5	1.1	10.4	2.5
D-2807	8.5	1.3	24.2	6.6
D-2808	9.5	1.5	26.0	1.4
D-2809	7.5	0.9	17.7	2.8
D-2810	12.1	2	43.1	8.3
D-2811	5.6	0.8	16.7	7
D-2812	14.2	1.4	42.5	8.2
D-2813	29.0	3.4	66.7	13
D-2814	35.7	3.5	73.4	15
D-2815	30.3	1.9	74.3	12
D-2816	14.6	2.1	47.2	5.1
D-2817	27.5	1.8	70.5	6.6
D-2818	9.6	0.8	32.9	7.2

[0359]

D-2819	9.0	0.8	29.1	3
D-2820	10.8	1.4	38.7	3.5
D-2821	5.8	0.4	19.4	6.1
D-2822	10.5	2.5	46.3	6.8
D-2823	3.5	1.1	18.8	3.5
D-2824	9.9	3.2	43.8	0.8
D-2825	6.6	2.6	29.7	1.1
D-2826	8.0	1.9	40.6	7.2
D-2827	7.0	1.2	25.2	4.5
D-2828	6.4	2.2	22.4	1.7
D-2829	14.8	2.7	45.5	7.4
D-2830	9.4	2	28.5	6.5
D-2831	8.6	2.8	28.4	6.6
D-2832	12.3	3.2	43.4	3.2
D-2833	20.5	5.2	66.7	9.1
D-2834	10.7	2.5	35.9	2.2
D-2835	11.6	2.4	37.7	4
D-2836	24.1	3.3	57.0	4.2
D-2837	98.7	12	96.7	4.3
D-2838	20.5	4	49.5	1.4
D-2839	10.0	2.4	31.9	4.3
D-2840	50.2	8.3	89.2	7.4
D-2841	70.8	11	87.1	7.9
D-2842	79.7	21	90.9	3.6
D-2843	24.2	1.2	57.2	8.4
D-2844	21.5	6.4	51.4	1
D-2845	12.9	2.2	39.4	7.3
D-2846	10.2	2.6	30.5	2.6
D-2847	40.5	9.7	70.0	6.5
D-2848	41.8	7	63.7	6
D-2849	24.7	6.8	51.3	8.1
D-2850	79.4	7.5	76.5	16

[0360]

D-2851	28.1	6.5	72.0	8.8
D-2852	13.8	2.1	56.9	4.8
D-2853	32.1	9.5	72.2	12
D-2854	21.5	3.9	58.8	10
D-2855	39.8	10	75.4	5.5
D-2856	14.4	3.4	40.4	5.8
D-2857	8.6	1	18.4	4.5
D-2858	10.1	1.1	19.1	4.8
D-2859	10.9	1.3	20.9	5.4
D-2860	7.4	1.3	11.7	3.8
D-2861	5.0	1.4	12.6	2.6
D-2862	5.5	1	13.8	2.7
D-2863	8.2	1.3	26.5	4.3
D-2864	9.1	1.6	40.2	3.4
D-2865	6.3	0.6	22.8	3.4
D-2866	7.0	1.7	17.8	4.3
D-2867	9.3	0.8	31.7	6.2
D-2868	10.3	2.5	30.8	6.5
D-2869	9.4	4.3	34.7	4.6
D-2870	5.9	0.6	18.1	2.6
D-2871	6.5	1.1	13.5	1.5
D-2872	10.5	1	31.3	5.3
D-2873	7.0	1.1	20.8	3.7
D-2874	9.4	2.4	35.3	5.7
D-2875	5.4	1.1	13.5	2.4
D-2876	14.1	4.6	45.9	5.2
D-2877	64.5	9.8	64.0	9
D-2878	57.0	14	62.9	8.1
D-2879	71.4	12	79.4	8.6
D-2880	79.7	11	100.9	4.9
D-2881	72.8	12	82.8	5.6
D-2882	64.4	8.8	73.2	6.9

[0361]

D-2883	80.1	4.9	86.3	13
D-2884	69.6	5.8	74.2	13
D-2885	76.9	2	76.7	18
D-2886	74.0	0.7	80.4	3.4
D-2887	77.7	8.7	88.6	16
D-2888	70.3	5.1	66.2	2.2
D-2889	71.2	3	67.3	7.3
D-2890	75.3	7.9	71.2	6.4
D-2891	74.6	8.4	72.4	4.3
D-2892	72.5	6.9	71.6	5.7
D-2893	73.9	3.8	83.7	2.9
D-2894	66.9	5.7	72.4	4.9
D-2895	71.6	8.9	72.1	9
D-2896	71.0	5.6	74.4	1.3
D-2897	74.4	7.9	78.0	3.8
D-2898	74.0	5.8	73.5	1.6
D-2899	71.0	10	74.1	9.7
D-2900	71.3	4.1	77.8	5.8
D-2901	64.8	9.4	82.0	11
D-2902	53.6	5.2	82.7	15
D-2903	66.8	2.6	101.1	13
D-2904	62.6	7.8	87.5	20
D-2905	67.1	14	74.0	4.1
D-2906	64.0	3.2	73.9	12
D-2907	66.4	7.3	82.0	11
D-2908	72.6	20	85.2	23
D-2909	80.0	7.3	77.2	12

[0362]

HeLa 세포에서 0.1 nM에서 가장 활성인 SOD1 siRNA 12개를 용량-반응 실험으로 평가하였다. 표 5는 HeLa 세포에서 이들 12개의 선별된 SOD1 siRNA에 대해 대조군에 비해 50% SOD1 mRNA 억제를 야기하는 IC50 농도를 제공한다. 이들 12개의 SOD1 siRNA는 실험 패러다임에서 특히 강력했으며, 1 내지 8 pM에서 IC50 값을 나타냈다.

[0364]

**SOD1 유전자 발현 억제 활성에 대한 HeLa 세포에서의
SOD1 siRNA의 시험판내 검정의 IC50 결과**

siRNA 듀플렉스 ID	IC50 평균 (pM)
D-2757	1
D-2806	4
D-2860	2
D-2861	2
D-2875	4
D-2871	5
D-2758	5
D-2759	5
D-2866	4
D-2870	4
D-2823	6
D-2858	8

[0365]

이들 12개의 SOD1 siRNA에 대한 IC50을 확인하기 위해 사용된 HeLa 세포로부터의 용량 반응 데이터를 아래 표 6에 상세히 나타냈다. 모든 12개의 siRNA는 pM IC50을 갖는 것으로 측정되었다. 표 5에서 SOD1 siRNA에 대한 IC50 데이터는 아래 표 6에 제시된 데이터의 요약이다.

[0367]

[표 6]

HeLa 세포에서 12 개의 SOD1 siRNA 에 대한 용량 반응 데이터

siRNA 듀플렉스 ID	잔여 SOD1 mRNA(대조군의 %)										
	10 nM	2.5 nM	0.6 nM	0.16 nM	0.039 nM	0.0098 nM	0.0024 nM	0.0006 nM	0.00015 nM	0.000038 nM	IC50 (nM)
D-2757	2	2	2	3	6	16	33	57	77	86	0.001
D-2806	2	3	3	6	13	32	59	83	90	105	0.004
D-2860	5	5	5	6	10	22	50	68	87	92	0.002
D-2861	4	4	4	5	10	25	51	73	81	92	0.002
D-2875	4	4	4	7	15	34	62	78	82	92	0.004
D-2871	4	5	4	8	18	43	62	78	87	90	0.005
D-2758	5	5	5	9	17	41	70	81	97	111	0.005
D-2759	4	4	4	7	15	35	63	82	87	94	0.005
D-2866	3	3	4	8	17	39	54	79	80	76	0.004
D-2870	4	5	5	8	18	41	59	77	93	101	0.004
D-2823	3	3	4	7	20	42	65	81	86	92	0.006
D-2858	5	5	5	9	21	46	72	82	88	94	0.008

[0368]

실시예 3. SH-SY5Y 세포, U87 세포 및 1차 인간 성상세포에서 내인성 SOD1 mRNA 발현에 대해 선별된 SOD1 siRNA의 시험관내 스크린

[0370]

SH-SY5Y 세포를 ATCC (LGC Standards와 합명회사인 ATCC, 독일 베젤)로부터 입수하고, 가습된 인큐베이터에서 5% CO₂를 가진 대기에서 37° C에서 15% FCS(GIBCO/Life Technologies의 초저 IgG), 1% L-글루타민(Biochrom GmbH, 독일 베를린) 및 1% Pen/Strep(Biochrom GmbH, 독일 베를린)을 함유하도록 보충된 Dulbecco MEM(Biochrom GmbH, 독일 베를린)에서 배양하였다.

[0371]

U87MG 세포를 ATCC(LGC Standards와 합명회사인 ATCC, 독일 베젤)로부터 입수하고, 가습된 인큐베이터에서 5% CO₂를 가진 대기에서 37° C에서 10% FCS(GIBCO/Life Technologies의 초저 IgG) 및 1% Pen/Strep(Biochrom GmbH, 독일 베를린)을 함유하도록 보충된 ATCC-제형화된 이글(Eagle) 최소 필수 배지(LGC Standards와 합명회사인 ATCC, 독일 베젤)에서 배양하였다.

[0372]

1차 인간 성상세포를 LONZA(Lonza Sales Ltd, 스위스 바젤)로부터 입수하고, 가습된 인큐베이터에서 5% CO₂를 가진 대기에서 37° C에서 AGM 성글뤼트(SingleQuot) 키트(Lonza Sales Ltd, 스위스 바젤)로 보충된 ABM 기본 배지(Lonza Sales Ltd, 스위스 바젤)에서 배양하였다.

[0373]

SH-SY5Y 세포에 대한 형질감염 시약이 리포펙타민2000(Invitrogen/Life Technologies)이고, U87 세포의 경우 RNAiMAX(Invitrogen/Life Technologies), 1차 인간 성상세포의 경우 리포펙타민 2000(Invitrogen/Life Technologies)이라는 것을 제외하고, HeLa세포에 대해 기술된 방식과 유사한 방식으로 SH-SY5Y 세포, U87MG 세포 및 1차 인간 성상세포를 12개의 선별된 siRNA(D-2757, D-2806, D-2860, D-2861, D-2875, D-2871, D-2758, D-2759, D-2866, D-2870, D-2823, D-2858)로 형질감염시키고, SOD1 및 GAPDH mRNA의 수준을 bDNA로 정량화하였다.

[0374]

이들 12개의 SOD1 siRNA(D-2757, D-2806, D-2860, D-2861, D-2875, D-2871, D-2758, D-2759, D-2866, D-2870, D-2823, D-2858)에 대한 IC50을 확인하기 위해 SH-SY5Y 세포, U87MG 세포 및 1차 인간 성상세포로부터의 용량 반응 데이터를 사용하였고, 아래의 표 7, 8 및 9에 각각 상세하게 나타낸다. 모든 12개의 siRNA가 U87 세포에서 pM IC50을 갖는 것으로 측정되었다.

[0375]

IC50 값이 표 10에 제공된다. 일반적으로 1차 인간 성상세포에서, IC50은 SH-SY5Y 및 U87MG 세포에서보다 더 높았다.

[0376]

[표 7]

SH-SY5Y 세포에서의 12 개 SOD1 siRNA 에 대한 용량 반응 데이터

siRNA 듀플렉스 ID	잔여 SOD1 mRNA(대조군의 %)										
	10 nM	2.5 nM	0.6 nM	0.16 nM	0.039 nM	0.0098 nM	0.0024 nM	0.0006 nM	0.00015 nM	0.000038 nM	IC50 (nM)
D-2757	8	13	16	22	36	55	72	92	107	114	0.013
D-2806	11	12	15	26	40	71	103	121	117	131	0.025
D-2860	11	15	17	26	42	63	79	86	92	96	0.022
D-2861	12	14	16	19	37	60	82	83	87	94	0.017
D-2875	20	25	35	59	79	92	96	95	99	104	0.234
D-2871	15	19	23	42	71	87	95	94	99	96	0.103
D-2758	24	35	36	58	91	96	134	123	105	94	0.369
D-2759	10	11	16	25	43	67	85	94	104	108	0.026
D-2866	17	19	24	42	72	93	93	102	103	101	0.105
D-2870	19	22	26	40	62	88	100	105	105	105	0.078
D-2823	11	16	25	47	64	84	91	98	105	95	0.099
D-2858	16	21	25	46	68	91	92	95	103	116	0.106

[0377]

[0378]

[표 8]

U87MG 세포에서의 12 개 SOD1 siRNA 에 대한 용량 반응 데이터

siRNA 듀플렉스 ID	잔여 SOD1 mRNA(대조군의 %)										
	10 nM	2.5 nM	0.6 nM	0.16 nM	0.039 nM	0.0098 nM	0.0024 nM	0.0006 nM	0.00015 nM	0.000038 nM	IC50 (nM)
D-2757	3	4	3	4	5	8	19	50	86	99	0.001
D-2806	4	3	3	3	4	8	18	49	81	106	0.001
D-2860	4	4	5	5	6	8	20	46	72	93	0.001
D-2861	5	6	6	6	8	15	39	67	87	93	0.001
D-2875	4	5	5	5	6	9	19	45	76	99	0.001
D-2871	5	5	5	6	6	11	24	50	77	86	0.001
D-2758	7	9	6	7	10	25	64	99	103	112	0.004
D-2759	6	6	5	6	8	21	50	80	93	104	0.002
D-2866	4	4	4	5	8	17	38	64	86	94	0.001
D-2870	5	5	5	5	7	7	13	31	63	85	0.003
D-2823	4	4	4	4	6	13	34	61	74	94	0.001
D-2858	7	6	6	7	8	14	33	54	71	94	0.001

[0379]

[0380]

[표 9]

1 차 인간 성상세포에서의 12 개 SOD1 siRNA 에 대한 용량 반응 데이터

siRNA 듀플렉스 ID	잔여 SOD1 mRNA(대조군의 %)										
	10 nM	2.5 nM	0.6 nM	0.16 nM	0.039 nM	0.0098 nM	0.0024 nM	0.0006 nM	0.00015 nM	0.000038 nM	IC50 (nM)
D-2757	29	30	35	48	66	87	95	101	95	103	0.123
D-2806	26	32	35	47	63	78	87	95	95	98	0.113
D-2860	29	38	39	51	68	82	94	93	94	101	0.192
D-2861	27	33	38	47	62	73	88	93	96	102	0.114
D-2875	25	28	39	47	72	80	100	105	105	118	0.151
D-2871	25	34	42	52	63	83	97	100	97	108	0.182
D-2758	27	29	31	41	51	71	86	91	95	98	0.049
D-2759	34	39	41	53	70	83	97	101	98	103	0.219
D-2866	30	32	35	46	65	78	84	87	92	95	0.118
D-2870	34	34	38	48	71	74	82	91	92	98	0.163
D-2823	27	31	40	53	67	80	84	86	92	97	0.186
D-2858	29	30	37	55	72	91	93	100	104	104	0.197

[0381]

[0382]

표 10에서 SOD1 siRNA에 대한 IC50 데이터는 아래 표 7, 8 및 9에 제시된 데이터의 요약이다.

[0383]

[표 10]

SOD1 유전자 발현 억제 활성에 대한 SH-SY5Y 세포, U87MG 세포 및 1차 인간

성상세포에서의 SOD1 siRNA의 시험관내 분석의 IC50 결과

siRNA 듀플렉스 ID	SH-SY5Y IC50 평균 (pM)	U87MG IC50 평균 (pM)	1차 인간 성상세포 IC 50 평균(pM)
D-2757	13	1	123
D-2806	25	1	113
D-2860	22	1	192
D-2861	17	1	114
D-2875	234	1	151
D-2871	103	1	182
D-2758	369	4	49
D-2759	26	2	219
D-2866	105	1	118
D-2870	78	3	163
D-2823	99	1	186
D-2858	106	1	197

[0384]

실시예 4. SOD1을 표적화하는 siRNA

[0386]

효과가 있는 것으로 밝혀진 SOD1 siRNA의 패신저-가이드 가닥 듀플렉스를 발현 벡터로 조작하고 중추신경계 세포 또는 신경세포의 세포주에 형질감염시켰다. siRNA 넉다운 연구에서 사용된 오버행이 siRNA에 대한 표준 dTdT 이지만, 작제물내의 오버행은 임의의 디뉴클레오티드 오버행을 포함할 수 있다.

[0387]

사용된 세포는 1차 세포이거나 유도 만능 줄기 세포(iPS 세포)로부터 유도될 수 있다.

[0388]

이어서, SOD1 넉다운을 측정하고, 심도 서열분석을 수행하여 발현 벡터에 투여된 각 작제물에서 처리된 정확한 패신저 및 가이드 가닥을 결정한다.

[0389]

가이드 대 패신저 가닥의 비를 계산하여 예컨대, RNA 유도된 침묵 복합체(RISC) 처리의 넉다운 효율을 결정한다.

[0390]

N-말단을 서열분석하여 절단 부위를 결정하고 표적의 퍼센트 균일(homogeneous) 절단을 결정한다. 절단은 90%보다 높을 것으로 예측된다.

[0391]

SOD1의 시험관내 넉다운을 분석하기 위해 병행 시험에서 HeLa 세포를 동시-형질감염시킨다. 루시페라제 작제물을 대조군으로서 사용하여 비표적 효과를 측정하였다.

[0392]

심도 서열분석을 다시 수행한다.

실시예 5. SOD1을 표적화하는 패신저 및 가이드 서열

[0394]

본 발명에 따라, SOD1 siRNA를 설계하였다. 이들이 표 11A 및 표 11B에 주어져 있다. 패신저 및 가이드 가닥을 이러한 표에 기술하였다. 표 11A 및 표 11B에서, 서열 명칭의 "miR" 구성요소는 miRNA 유전자의 서열 번호매김과 반드시 일치하지 않는다(예컨대, VOYmiR-101은 서열 명칭이며, 반드시 miR-101이 서열의 일부임을 의미하는 것은 아니다).

[0395]

[표 11A]

폐신저 및 가이드 서열 (5'-3')

명칭	듀플렉스 ID	SS ID	폐신저	폐신저 서열번호	AS ID	가이드	가이드 서열번호
VOYpre-001_D-2806 출발 작제물(18 개의 천연 뉴클레오티드이고 19 번 위치는 C 임; 3' 말단 CC 디뉴클레오티드)	D-2910	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAA <u>CCC</u>	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-002_D-2806_p19MMU(미스 매치 형성을 위한 19 번 위치 U)	D-2911	7754	CAAUGUG ACUGCUG ACAA <u>UCC</u>	344	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-003_D-2806_p19GU 쌍(19 번 위치는 GU 쌍 형성을 위한 G 임)	D-2912	7755	CAAUGUG ACUGCUG ACAA <u>GCC</u>	345	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-004_D-2806_p19AU 쌍(19 번 위치는 AU 쌍 형성을 위한 A 임)	D-2913	7756	CAAUGUG ACUGCUG ACAA <u>ACC</u>	346	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-005_D-2806_CMM(중심 미스매치)	D-2914	7757	CAAUGUG ACAGCUG ACAA <u>ACC</u>	347	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-006_D-2806_p19 DEL(19 번 위치가 결실됨)	D-2915	7758	CAAUGUG ACUGCUG ACAA <u>ACC</u>	348	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343

[0396]

VOYpre-007_D-2806_p19ADD(19 번 위치에서 부가된 뉴클레오티드; 부가는 U 임; C 및 말단 CC 디뉴클레오티드 유지)	D-2916	7759	CAAUGUG ACUGCUG ACAAUCC C	349	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-008_D-2806_U 루프	D-2917	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-009_D-2806_AU 루프	D-2918	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-010_D-2806_mir-22-루프	D-2919	7760	CAAUGUG ACUGCUG ACAACAC	350	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-101_pre-001 hsa-mir-155; D-2806	D-2923	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-102_pre-001 조작됨; D-2806; let-7b 줄기	D-2924	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-103_pre-002 조작됨; D-2806_p19MMU; let-7b 줄기	D-2925	7754	CAAUGUG ACUGCUG ACAAUCC	344	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-104_pre-003 조작됨; D-2806_p19GU 쌍; let-7b 줄기	D-2926	7755	CAAUGUG ACUGCUG ACAAGCC	345	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-105_pre-004 조작됨; D-2806_p19AU 쌍; let-7b 줄기	D-2927	7756	CAAUGUG ACUGCUG ACAAACC	346	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-106_pre-005 조작됨; D-2806_CMM; let-7b 줄기	D-2928	7757	CAAUGUG ACAGCUG ACAAACC	347	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-107_pre-006 조작됨; D-2806_p19DEL; let-7b 줄기	D-2929	7758	CAAUGUG ACUGCUG ACAACC	348	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343

VOYmiR-108_pre-007 조작됨; D-2806_p19ADD; let-7b 줄기	D-2930	7765	CAAUGUG ACUGCUG ACAA <u>UCC</u> C	355	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-109_pre-008 조작됨; D-2806_U 루프; let-7b 줄기	D-2931	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-110_pre-009 조작됨; D-2806_AU 루프; let-7b 줄기	D-2932	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-111_pre-010 조작됨; D-2806_mir-22-루프; let-7b 줄기	D-2933	7760	CAAUGUG ACUGCUG ACAACAC	350	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-112_pre-001 조작됨; PD; D-2806; let-7b 기초-줄기 불안정	D-2934	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-113_pre-002 조작됨; D-2806_p19MMU; let-7b 기초-줄기 불안정	D-2935	7754	CAAUGUG ACUGCUG ACAA <u>UCC</u>	344	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-114_pre-005 조작됨; D-2806_CMM; let-7b 기초-줄기 불안정	D-2936	7757	CAAUGUG ACAGCUG ACAAACC	347	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-115_pre-010 조작됨; D-2806_mir-22-루프; let-7b 기초-줄기 불안정	D-2937	7760	CAAUGUG ACUGCUG ACAACAC	350	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-116_pre-003 조작됨; D-2806_p19G 쌍; let-7b 기초-줄기 불안정	D-2938	7755	CAAUGUG ACUGCUG ACAAGCC	345	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-117_pre-001 조작됨; D-2757; let-7b 줄기	D-2939	7766	CGACGAA GGCCGUG UGCGCCC	356	7767	UCGCA CACGG CCUUC GUCGU U	357
VOYmiR-118_pre-001 조작됨; D-2823; let-7b 줄기	D-2940	7768	UGACUUG GGCAAAG GUGGCC	358	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-119_pre-001 조작됨; D-2866; let-7b 줄기	D-2941	7770	AACUCAU CUGUUAU CCUGCCC	360	7771	UCAGG AUUAC AGAUG AGUUU U	361

[0398]

VOYmiR-127	D-2942	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAAACC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-102.860	D-2943	7772	CCCCUUA ACUCAUC UGUUCCC	362	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR102.861	D-2944	7774	CCCUUAA CUCAUCU GUUACCC	364	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-102.866	D-2945	7776	AACUCAU CUGUUAU CUUGCCC	366	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-102.870	D-2946	7777	GCUGUGG AAAUGUA UCUUCCC	367	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-102.823	D-2947	7779	UGACUUG GCGAAAG GUGAGCC	369	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-104.860	D-2948	7780	CCCCUUA ACUCAUC UGUUGCC	370	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR-104.861	D-2949	7781	CCCUUAA CUCAUCU GUUAGCC	371	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-104.866	D-2950	7782	AACUCAU CUGUUAU CUUAGCC	372	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-104.870	D-2951	7783	GCUGUGG AAAUGUA UCUUGCC	373	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-104.823	D-2952	7784	UGACUUG GCGAAAG GUAGGCC	374	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-109.860	D-2953	7772	CCCCUUA ACUCAUC UGUUCCC	362	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363

[0399]

VOYmiR-104.861	D-2954	7774	CCCUUAA CUCAUCU GUUACCC	364	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-104.866	D-2955	7776	AACUCAU CUGUUAU CUJGCCC	366	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-109.870	D-2956	7777	GCUGUGG AAAUGUA UCUUCCC	367	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-109.823	D-2957	7779	UGACUUG GCGAAAG GUGAGCC	369	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-114.860	D-2958	7785	CCCCUUA ACACAUC UGUUACC	375	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR-114.861	D-2959	7786	CCCUUAA CUGAUCU GUUAACC	376	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-114.866	D-2960	7787	AACUCAU CUCUUAU CUUGCCC	377	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-114.870	D-2961	7788	GCUGUGG AAUUGUA UCUUGCC	378	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-114.823	D-2962	7789	UGACUUG GGGAAAG GUGAGCC	379	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-116.860	D-2963	7780	CCCCUUA ACUCAUC UGUUGCC	370	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR-116.861	D-2964	7781	CCCUUAA CUCAUCU GUUAGCC	371	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-116.866	D-2965	7790	AACUCAU CUGUUAU CUUGGCC	380	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361

[0400]

VOYmiR-116.870	D-2966	7783	GCUGUGG AAAUGUA UCUUGCC	373	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-116.823	D-2967	7784	UGACUUG GGCAAAG GUAGGCC	374	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VoymiR-127.860	D-2968	7791	CCCCUUA ACUCAUU UGUUCCC	381	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VoymiR-127.861	D-2969	7774	CCCUUAA CUCAUCU GUUACCC	364	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VoymiR-127.866	D-2970	7776	AACUCAU CUGUUAU CUUGCCC	366	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VoymiR-127.870	D-2971	7777	GCUGUGG AAAUGUA UCUUCCC	367	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VoymiR-127.823	D-2972	7792	UGACUUG GGCAAAG GUAGCCC	382	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-120	D-2973	7793	CAAUGUG ACUGCUG ACAAA	383	7794	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU C	384

[0401]

[0402] [표 11B]

폐신저 및 가이드 서열 (5'-3')

명칭	듀플렉스 ID	SS ID	폐신저	폐신저 서열번호	AS ID	가이드	가이드 서열번호
폐신저 가닥에서 말단 3' C 와 교환된 VOYpre- 011_D- 2806 폐신저- 가이드 가닥	D-2920	7761	UUUGUCA GCAGUCA CAUUGUC	351	7762	CAAUG UGACU GCUGA CAAAU C	352
폐신저 가닥에서 말단 3' C 와 교환된 VOYpre- 012_D-2806 폐신저-가이드 가닥	D-2921	7761	UUUGUCA GCAGUCA CAUUGUC	351	7763	CAAUG UGACU GCUGA CAAAU C	353
폐신저 가닥에서 말단 3' C 와 교환된 VOYpre- 013_D-2806 폐신저-가이드 가닥	D-2922	7764	UUUGUCA GCAGUCA CAUUGAC	354	7762	CAAUG UGACU GCUGA CAAAU C	352

[0403]

[0404] 실시예 6. AAV-miRNA 벡터에서 SOD1 siRNA 작제물

[0405]

표 11에 나열된 SOD1 siRNA의 폐신저-가이드 가닥 듀플렉스를 AAV-miRNA 발현 벡터 내로 조작한다. 5'에서 3'로 기술된 ITR에서 ITR까지로의 작제물은 돌연변이체 ITR, 프로모터(CMV, U6 또는 CB6 프로모터(CMVie 인핸서, CBA 프로모터 및 SV40 인트론을 포함함), 표 11의 폐신저 및 가이드 가닥(폐신저와 가이드 가닥 사이에 루프, 폐신저 가닥 앞에 5' 측부 영역 및 가이드 가닥 뒤에 3' 측부 영역을 가짐), 토키 글로빈 폴리A 및 야생형 ITR을 포함한다. AAV-miRNA 발현 벡터의 효율을 시험하기 위해 시험관내 및 생체내 연구를 수행하였다.

[0406] 실시예 7. HeLa 세포에서의 작제물의 활성

[0407]

실시예 6에 기술된 7개의 SOD1 siRNA 작제물(VOYmiR-103, VOYmiR-105, VOYmiR-108, VOYmiR-114, VOYmiR-119, VOYmiR-120, 및 VOYmiR-127) 및 이중 가닥의 mCherry 대조군을 HeLa 세포에 형질감염시켜 작제물의 활성을 시

험하였다.

[0408] A. 폐신저 및 가이드 가닥의 활성

[0409] 7개의 SOD1 siRNA 작제물 및 이중 가닥의 mCherry 대조군을 HeLa 세포에 형질감염시켰다. 48시간 후에 내인성 mRNA 발현을 평가하였다. 모든 7개의 SOD1 siRNA 작제물이 가이드 가닥의 75 내지 80% 낙다운의 높은 활성, 및 폐신저 가닥의 낮은 활성 또는 활성이 없음을 나타냈다. SOD1 siRNA 후보 벡터의 가이드 가닥은 SOD1의 75 내지 80% 수율의 높은 활성을 보인 반면, 폐신저 가닥은 낮거나 거의 없는 활성을 보였다.

[0410] B. SOD1에 대한 작제물의 활성

[0411] 7개의 SOD1 siRNA 작제물 및 이중 가닥의 mCherry(dsCherry) 대조군을 1e4 vg/세포, 1e3 vg/세포, 또는 1e2 vg/세포의 MOI로 HeLa 세포에 형질감염시켰다. 72시간 후에 내인성 mRNA 발현을 평가하였다. 모든 7개의 SOD1 siRNA 작제물이 1e3 vg/세포로 효율적인 낙다운을 보였다. 대부분의 SOD1 siRNA 작제물이 도 1에 나타난 바와 같이 높은 활성(75 내지 80% 낙다운)을 보였다.

[0412] 실시예 8. HEK 세포에서의 작제물의 활성

[0413] 실시예 6에 기술된 30개의 SOD1 siRNA 작제물(VOYmiR-102.860, VOYmiR-102.861, VOYmiR-102.866, VOYmiR-102.870, VOYmiR-102.823, VOYmiR-104.860, VOYmiR-104.861, VOYmiR-104.866, VOYmiR-104.870, VOYmiR-104.823, VOYmiR-109.860, VOYmiR-109.861, VOYmiR-109.866, VOYmiR-109.870, VOYmiR-109.823, VOYmiR-114.860, VOYmiR-114.861, VOYmiR-114.866, VOYmiR-114.870, VOYmiR-114.823, VOYmiR-116.860, VOYmiR-116.861, VOYmiR-116.866, VOYmiR-116.870, VOYmiR-116.823, VOYmiR-127.860, VOYmiR-127.861, VOYmiR-127.866, VOYmiR-127.870, VOYmiR-127.823) 및 VOYmiR-114 및 이중 가닥의 mCherry 대조군을 세포에 형질감염시켜 작제물의 활성을 시험하였다.

[0414] A. HEK293에서의 폐신저 및 가이드 가닥의 활성

[0415] 30개의 작제물 및 2개의 대조군을 HEK293T 세포에 형질감염시켰다. 24시간 후에 내인성 mRNA 발현을 평가하였다. 대부분의 작제물이 가이드 가닥의 높은 활성(도 2) 및 폐신저 가닥의 낮거나 없는 활성(도 3)을 보였다.

[0416] B. HeLa에서의 폐신저 및 가이드 가닥의 활성

[0417] 30개의 작제물 및 2개의 대조군을 HeLa 세포에 형질감염시켰다. 48시간 후에 내인성 mRNA 발현을 평가하였다. 대부분의 작제물이 가이드 가닥의 높은 활성(도 4) 및 폐신저 가닥의 낮거나 없는 활성(도 5)을 보였다.

[0418] C. HeLa 및 HEK293의 상호관계

[0419] 30개의 작제물의 낙다운은 HeLa 및 HEK293 세포에서 유사하였다. 30개의 작제물은 작제물의 가이드 가닥에 대한 낙다운을 나타냈다(도 2 및 도 4 참조). 작제물의 대부분의 가이드 가닥은 70 내지 90%의 낙다운을 나타냈다.

[0420] D. 캡시드 선별

[0421] HeLa 및 HEK293의 최상의 작제물을 AAV 내에 포장하여 HeLa에 감염시킬 것이다. 작제물을 포장하기 위한 최상의 AAV를 결정하기 위해, AAV2 또는 AAV-DJ8에 포장된 mCherry를 HeLa 세포에 10 vg/세포, 1e2 vg/세포, 1e3 vg/세포, 1e4 vg/세포 또는 1e5 vg/세포의 MOI로 감염시키고, 40시간째에 발현을 평가하였다. AAV2를 최상의 작제물을 포장하기 위한 캡시드로서 선별하였다.

[0422] E. AAV2 생산

[0423] HeLa 및 HEK293의 최상의 작제물을 AAV2(1.6 kb)에 포장하고 이중 가닥의 mCherry(dsCherry) 대조군을 또한 포장하였다. 분석에 앞서, 포장된 작제물을 아이도익사놀(Idoxanol) 정제를 수행하였다. AAV 역가가 표 12에 나타나있다.

[0424]

[표 12]

AAV 역가

작제물	AAV 역가(ul 당 개수)
VOYmir-102.860	5.5E+08
VOYmir-102.861	1.0E+09
VOYmir-102.823	9.1E+08
VOYmir-104.861	1.2E+09
VOYmir-104.866	8.0E+08
VOYmir-104.823	5.7E+08
VOYmir-109.860	3.1E+08
VOYmir-109.861	8.9E+08
VOYmir-109.866	6.0E+08
VOYmir-109.823	6.0E+08
VOYmir-114.860	4.7E+08
VOYmir-114.861	3.7E+08
VOYmir-114.866	1.0E+09
VOYmir-144.823	1.7E+09
VOYmir-116.860	1.0E+09
VOYmir-116.866	9.1E+08
VOYmir-127.860	1.2E+09
VOYmir-127.866	9.0E+08
dsmCherry	1.2E+09

[0425]

[0426] HeLa 세포에서의 SOD1 낭다운에 대한 형질도입 효과를 도 6에 나타낸다. 또한, HeLa 세포에서, 보다 큰 MOI(1.0E+05)에 비해 1.0E+04)는 모든 작제물에 대해 증가된 낭다운을 나타낸 것은 아니다.

[0427]

F. 인간 운동 뉴런 전구체(HMNP)에서의 작제물의 활성

[0428]

실시예 8E에 기술된 바와 같은 상위 18개의 pri-miRNA 작제물 및 mCherry 대조군을 인간 운동 뉴런 전구체(HMNP) 세포에 10E5의 MOI로 감염시켰다. 48시간 후에 내인성 mRNA 발현을 평가하였다. 약 절반의 작제물이 HMNP에서 50% 초과의 SOD1 침묵을 제공하였고, 이들 중 4개는 70% 초과의 침묵을 제공하였다(도 7).

[0429]

G. 생체내 연구를 위한 작제물 선별

[0430]

표적 서열에 주요 효과를 갖고, 카세트는 미미한 영향을 미치는 상위 12개의 작제물을 선별하였다. AAV-rh10 캡시드에 포장된 이러한 작제물을 주입을 위해 제형화하고 포유류에 투여하여 작제물의 생체내 효과를 연구하였다.

[0431]

실시예 9. 작제물의 시험관내 연구

[0432]

AAV2에 포장된 실시예 8D에 기술된 바와 같은 18개의 작제물 및 mCherry 대조군을 본 연구에 사용하였다. 본 연구를 위해, 배양 배지(500 ml의 DMEM/F-12 GLUTAMAX™ 보충물(Life Technologies, Cat#. 10565-018), 50 ml FBS (Life Technologies, Cat#. 16000-044, lot:1347556), 5 ml MEM 비필수 아미노산 용액 (100x) (Cat.# 11140-050) 및 5 ml HEPES (1M)(Life Technologies, Cat#. 15630-080))중의 HEK293T 세포(Fisher Scientific, Cat.# HCL4517), 배양 배지(500 ml의 DMEM/F-12 GLUTAMAX™ 보충물(Life Technologies, Cat#. 15630-080))중의 U251MG 세포 (P18)(Sigma, Cat#. 09063001-1VL) 또는 배양 배지(AGM 싱글쿼트 키트 보충 & 성장 인자(Lonza, Cat#. CC-4123)로 보충된 ABM 기초 배지 500 ml(Lonza, Cat#. CC-3186))중의 정상 인간 성상세포(HA) (Lonza, Cat#CC-2565)를 사용하여 작제물을 시험하였다. HEK293T 세포(96 웰 플레이트 중 5x10E4 세포/웰), U251MG 세포(96 웰 플레이트 중 2x10E4 세포/웰) 및 HA 세포(96 웰 플레이트 중 2x10E4 세포/웰)를 씨딩하고 1.0E+05의 MOI를 사용하여 세포를 감염시켰다. 48시간 후에, 세포를 분석하여 그 결과를 표 13에 나타내었다.

[0433]

[표 13]

상대적인 SOD1 mRNA 수준

작제물	상대적인 SOD1 mRNA 수준 (%) (GAPDH에 대해 정규화)		
	HEK293T	U251MG	HA
VOYmiR-102.823	19.5	49.6	87.3
VOYmiR-102.860	1.7	5.3	19.2
VOYmiR-102.861	1.1	13.9	42.6
VOYmiR-104.823	49.9	69.6	102.7
VOYmiR-104.861	1.0	10.7	36.3
VOYmiR-104.866	12.3	54.6	85.5
VOYmiR-109.823	23.0	46.1	84.6
VOYmiR-109.860	1.9	8.3	35.6
VOYmiR-109.861	1.9	22.7	57.3
VOYmiR-109.866	4.1	38.5	67.9
VOYmiR-114.823	19.3	44.7	82.3
VOYmiR-114.860	1.4	4.7	17.6
VOYmiR-114.861	1.1	9.7	48.1
VOYmiR-114.866	4.0	38.7	78.2
VOYmiR-116.860	1.1	4.8	15.8
VOYmiR-116.866	5.5	40.2	73.7
VOYmiR-127.860	1.0	2.1	7.4
VOYmiR-127.866	1.0	15.4	43.8
mCherry	100.0	100.2	100.1

[0434]

[0435] 대부분의 작제물에 대해 HEK293T 세포에서 80% 초과의 낭다운이 관찰되었다. 절반 초과의 작제물이 U251MG 세포 및 HA 세포에서 80% 초과의 낭다운을 보였다.

[0436]

실시예 10. 용량-의존적인 SOD1 강하(lowering)

[0437]

[0437] 실시예 8E에 기술된 바와 같은 상위 18개의 pri-miRNA 작제물 중 4개 및 mCherry 대조군을 인간 성상 세포주 (U251MG) 또는 1차 인간 성상세포(HA)에 1.0E+02, 1.0E+03, 1.0E+04, 1.0E+05 또는 1.0E+06의 MOI로 형질감염시켰다. 48시간 후에 내인성 mRNA 발현을 평가하고 용량-의존적인 사일런싱을 도 8(U251MG) 및 도 9(HA)에 나타났다. 모든 작제물에서, 투여량의 증가는 또한 낭다운된 SOD1 mRNA의 양의 증가와 관련이 있었다.

[0438]

실시예 11. SOD1 낭다운의 시간 경과

[0439]

[0439] 2개의 pri-miRNA 작제물(VOYmiR-120 및 VOYmiR-122), SOD1 siRNA의 음성 대조군 및 양성 대조군을 인간 성상세포주(U251MG)에 형질감염시켰다. 도 10에 나타난 바와 같이, 상대적인 SOD1 mRNA를 60시간 동안 도출하였다. hSOD1의 70 내지 75% 낭다운이 뉴클레오펙터(Nucleofector) 형질감염 후에 2개의 pri-miRNA 작제물에서 나타났으며, 12 내지 24시간 창에서 가장 큰 낭다운이 관찰되었다.

[0440]

실시예 12. SOD1 낭다운 및 표준 퍼센트

[0441]

[0441] VOYmiR-104를 50pM, 100 pM 및 150 pM의 농도로 HeLa 세포에 형질감염시키고, 비치료된(UT) 세포와 비교하였다. 도 11A 내지 도 11C에 나타난 바와 같이, 상대적인 SOD1 mRNA, 가이드 가닥의 퍼센트 및 패신저 가닥의 퍼센트를 36, 72, 108 및 144 시간에 도출하였다. 가장 높은 농도(150pM)는 가장 큰 발현의 감소를 나타냈지만, 모든 3개의 투여량은 SOD1 발현에서 유의한 감소를 나타냈다.

[0442]

실시예 13. SOD1을 표적화하는 작제물

[0443]

[0443] 개 SOD1에 대해 작제물을 설계하였고 이러한 작제물을 표 14에 나타냈다. 개 SOD1은 본 발명에서 표적화된 영역에서 인간과 100% 보존되어 있다. 패신저 및 가이드 서열이 표에 기술되어 있다. 표 14에서, 서열 명칭의 "miR" 구성요소는 miRNA 유전자의 서열 번호와 반드시 일치하지 않는다(예컨대, dVOYmiR-102는 서열 명칭이며, 반드시 miR-102이 서열의 일부임을 의미하는 것은 아니다)

[0444]

[표 14]

개 서열 (5'-3')

명칭	듀플렉스 ID	SS ID	폐신저	폐신저 서열번호	AS ID	가이드	가이드 서열번호
dVOYmiR-102.788	D-2974	7795	GCAGGUCC UCACUUUA AUGCC	385	7796	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	386
dVOYmiR-102.805	D-2975	7797	GGCAAUGU GACUGCUG ACCCC	387	7798	UGUCAGCA GUCAAUU GCCUU	388
dVOYmiR-104.788	D-2976	7799	GCAGGUCC UCACUUUA AUUCC	389	7796	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	386
dVOYmiR-104.805	D-2977	7800	GGCAAUGU GACUGCUG AUGCC	390	7798	UGUCAGCA GUCAAUU GCCUU	388
dVOYmiR-109.788	D-2978	7801	GCAGGUCC UCACUUUA AUCCC	391	7796	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	386
dVOYmiR-109.805	D-2979	7802	GGCAAUGU GACUGCUG AUACC	392	7798	UGUCAGCA GUCAAUU GCCUU	388
dVOYmiR-114.788	D-2980	7803	GCAGGUCC UGACUUUA AUCCC	393	7796	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	386
dVOYmiR-114.805	D-2981	7804	GGCAAUGU GUCUGCUG AUACC	394	7798	UGUCAGCA GUCAAUU GCCUU	388
dVOYmiR-116.788	D-2982	7801	GCAGGUCC UCACUUUA AUCCC	391	7796	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	386
dVOYmiR-116.805	D-2983	7802	GGCAAUGU GACUGCUG AUACC	392	7798	UGUCAGCA GUCAAUU GCCUU	388
dVoymiR-127.788	D-2984	7801	GCAGGUCC UCACUUUA AUCCC	391	7805	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	395
dVoymiR-127.805	D-2985	7802	GGCAAUGU GACUGCUG AUACC	392	7806	UGUCAGCA GUCAAUU GCCUU	396

[0445]

[0446]

실시예 14. 조절성 폴리뉴클레오티드의 위치 효과

[0447]

A. 바이러스 역가에 대한 효과

[0448]

도 12에 나타난 바와 같이, siRNA 분자(VOYmiR-114 또는 VOYmiR-126)를 발현벡터(게놈 크기 2400 뉴클레오티드; scAAV)의 6개의 상이한 위치에 삽입하였다. 도 12에서, "ITR"은 역위 말단 반복이고, "I"는 인트론을 나타내고, "P"는 폴리A이고 "MP"는 siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드이다. 바이러스 역가를 타크만(TaqMan) PCR을 사용하여 6번 위치 및 대조군(조절성 폴리뉴클레오티드가 없는 작제물; scAAV)에 대해 평가하였고 이의 결과를 표 15에 나타냈다.

[0449]

[표 15]

바이러스 역가

siRNA 분자	siRAN 분자 위치	바이러스 역가 (15-cm 디쉬 당 VG)
VOYmiR-114	1 번 위치	5.5E+10
VOYmiR-114	2 번 위치	5.5E+10
VOYmiR-114	3 번 위치	4.5E+10
VOYmiR-114	4 번 위치	3.7E+10
VOYmiR-114	5 번 위치	6.5E+10
VOYmiR-114	6 번 위치	2.5E+10
VOYmiR-126	1 번 위치	1.6E+10
VOYmiR-126	2 번 위치	3.2E+10
VOYmiR-126	3 번 위치	6.0E+10
VOYmiR-126	4 번 위치	1.6E+10
VOYmiR-126	5 번 위치	9.5E+09
VOYmiR-126	6 번 위치	6.0E+10
-	대조군	2.1E+11

[0450]

B. 게놈 완전성 (integrity)에 대한 효과

[0452] 도 12에 나타난 바와 같이, siRNA 분자(VOYmiR-114)를 발현벡터(게놈 크기 2400 뉴클레오티드; scAAV)의 6개의 상이한 위치에 삽입하였고, 조절성 폴리뉴클레오티드(scAAV)가 없는 대조군이다. 도 12에서, "ITR"은 역위 말단 반복이고, "I"는 인트론을 나타내고, "P"는 폴리A이고 "MP"는 siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드이다. 바이러스 게놈을 정제된 AAV 제제물로부터 추출하고 중성의 아가로스 겔에서 수행(running)시켰다. 절단된(truncated) 게놈이 모든 작제물에서 관찰되었고, 절단된 게놈의 대략적인 퍼센트(전체 중 퍼센트)가 표 16에 나타나 있다.

[0453] [표 16]

절단된 게놈

작제물	총 %
1 번 위치	50
2 번 위치	41
3 번 위치	49
4 번 위치	34
5 번 위치	33
6 번 위치	59
대조군	9

[0454]

[0455] 6번 위치에 절단된 게놈의 수가 가장 많았고, 4번 및 5번 위치에서 절단된 게놈의 양이 가장 적었다.

[0456] C. 너다운 효율에 대한 효과

[0457] 도 12에 나타난 바와 같이, siRNA 분자(VOYmiR-114)를 발현벡터(AAV2)(게놈 크기 2400 뉴클레오티드; scAAV)의 6개의 상이한 위치에 삽입하였다. 도 12에서, "ITR"은 역위 말단 반복이고, "I"는 인트론을 나타내고, "P"는 폴리A이고 "MP"는 siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드이다. HeLa 세포의 형질도입을 1×10^4 vg/세포 1, 1×10^3 vg/세포 및 1×10^2 vg/세포로 수행하였다. SOD1 mRNA 발현(대조군(eGFP)의 %로서)을 감염 72 시간 후에 결정하였고 그 결과를 표 17에 나타내었다.

[0458] [표 17]

SOD1 발현

작제물	SOD1 mRNA 발현(대조군의 %)		
	1×10^4 vg/세포 1	1×10^3 vg/세포 1	1×10^2 vg/세포 1
1 번 위치	40	59	69
2 번 위치	31	46	75
3 번 위치	50	66	81
4 번 위치	21	34	55
5 번 위치	49	52	67
6 번 위치	31	37	62
대조군(eGFP)	100	100	94

[0459]

[0460] 3번 위치에서 가장 큰 SOD1 mRNA 발현(대조군의 %로서)을 가졌고 4번 위치에서 가장 낮은 SOD1 mRNA 발현(대조군의 %로서)을 가졌다.

[0461] 실시예 15. 게놈 크기의 영향

[0462] A. 바이러스 역가에 대한 효과

[0463] 도 12에 나타난 바와 같이, siRNA 분자(VOYmiR-114)를 발현벡터(게놈 크기 2 kb; scAAV)의 1번, 2번, 5번 및 6번 위치에 삽입하였다. 도 12에서, "ITR"은 역위 말단 반복이고, "I"는 인트론을 나타내고, "P"는 폴리A이고 "MP"는 siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드이다. siRNA 분자가 없는 이중 가닥의 대조군(게놈 크기 1.6 kb; scAAV 대조군) 및 이중 가닥의 발현 벡터(scAAV miR114; ITR(105 뉴클레오티드) - 프로모터(약 900 뉴클레오티드) - siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드(158 뉴클레오티드) - 폴리A 서열(127 뉴클레오티드) 및 ITR) 뿐만 아니라 siRNA 분자가 없는 대조군(eGFP; scAAV)을 비교하였다. 바이러스 역가를 타크만 PCR을 사용하여 평가하였고 이의 결과를 표 18에 나타냈다.

[0464]

[표 18]

바이러스 역가

작제물	크기	바이러스 역가(15-cm 디쉬 당 VG)
1 번 위치	2 kb	9.5E+10
2 번 위치	2 kb	1.2E+11
scAAV miR114.	1.6 kb	1.1E+11
5 번 위치	2 kb	2.4E+10
6 번 위치	2 kb	1.1E+11
대조군	2 kb	2.2E+11

[0465]

작제물의 5번 위치에서 가장 낮은 역가가 관찰되었고, 작제물의 2번 위치에서 가장 큰 역가가 관찰되었다.

[0466]

B. 게놈 완전성 (integrity)에 대한 효과

[0467]

도 12에 나타난 바와 같이, siRNA 분자(VOYmiR-114)를 발현벡터(게놈 크기 2 kb; scAAV)의 1번, 2번, 5번 및 6번 위치에 삽입하였다. 도 12에서, "ITR"은 역위 말단 반복이고, "I"는 인트론을 나타내고, "P"는 폴리A이고 "MP"는 siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드이다. siRNA 분자가 없는 이중 가닥의 대조군(게놈 크기 1.6 kb; scAAV 대조군) 및 이중 가닥의 발현 벡터(scAAV miR114; ITR (105 뉴클레오티드) - 프로모터(약 900 뉴클레오티드)- siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드(158 뉴클레오티드)- 폴리A 서열(127 뉴클레오티드) 및 ITR) 뿐만 아니라 siRNA 분자가 없는 대조군(eGFP; scAAV)을 비교하였다. 절단된 게놈이 모든 작제물에서 관찰되었고, 절단된 게놈의 대략적인 퍼센트(전체 중 퍼센트)가 표 19에 나타나 있다.

[0468]

[표 19]

절단된 게놈

작제물	크기	총 %
1 번 위치	2 kb	34
2 번 위치	2 kb	30
scAAV miR114.	1.6 kb	20
5 번 위치	2 kb	21
6 번 위치	2 kb	46
대조군	2 kb	5

[0469]

모든 작제물은 몇몇 절단된 게놈을 갖는 것으로 확인되었다.

[0470]

상이한 siRNA 분자의 효과를 결정하기 위해 추가 연구를 수행하였다. 도 12에 나타난 바와 같이, VOYmiR-114 및 VOYmiR-126 를 분리된 발현 벡터(게놈 크기 1.6 kb; scAAV)의 3번 위치에 삽입하였다. 도 12에서, "ITR"은 역위 말단 반복이고, "I"는 인트론을 나타내고, "P"는 폴리A이고 "MP"는 siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드이다. VOYmiR-114 작제물의 경우, 벡터 게놈의 5' 말단(1526 뉴클레오티드)과 조절성 폴리뉴클레오티드의 중심(신축성 루프 (flexible loop)의 중심) 사이의 거리는 1115 뉴클레오티드이다. VOYmiR-126 작제물의 경우, 벡터 게놈의 5' 말단(1626 뉴클레오티드)과 조절성 폴리뉴클레오티드의 중심(신축성 루프의 중심) 사이의 거리는 1164 뉴클레오티드이다.

[0471]

VOYmiR-114 작제물의 경우, 바이러스 역가(15-cm 디쉬 당 VG)는 약 1.1E+11 이었다. VOYmiR-126 작제물의 경우, 인트론 프로모터 바이러스 역가(15-cm 디쉬 당 VG)는 약 1.2E+12 이었다. 대조군은 약 2.1E+11(15-cm 디쉬 당 VG) 이었다. VOYmir-114는 약 20%의 절단된 게놈을 갖고, VOYmiR-126는 약 15%의 절단된 게놈을 갖고, 대조군은 약 5%의 절단된 게놈을 갖는다.

[0472]

실시예 16. 단일 가닥의 작제물의 영향

[0473]

A. 바이러스 역가에 대한 효과

[0474]

도 12에 나타난 바와 같이, siRNA 폴리뉴클레오티드(VOYmiR-114)를 발현벡터(게놈 크기 4.7 kb; scAAV)의 1번, 3번 및 5번 위치에 삽입하고, 대조군 또한 siRNA 폴리뉴클레오티드(게놈 크기 2 kb; scAAV) 없이 시험하였다. 도 12에서, "ITR"은 역위 말단 반복이고, "I"는 인트론을 나타내고, "P"는 폴리A이고 "MP"는 siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드이다. 바이러스 역가를 타크만 PCR을 사용하여 평가하였고 이의 결과를 표 20에 나타냈다.

[0477]

[표 20]

바이러스 역가

작제물	바이러스 역가(15-cm 디쉬 당 VG)
1 번 위치	5.0E+11
3 번 위치	7.5E+11
5 번 위치	3.5E+11
대조군	2.5E+11

[0478]

3번 위치에서 가장 큰 바이러스 역가가 관찰되었고, 1번 위치 및 이어서 5번 위치가 뒤를 이었다.

B. 게놈 완전성 (integrity)에 대한 효과

[0481]

도 12에 나타난 바와 같이, siRNA 분자(VOYmiR-114)를 발현벡터(게놈 크기 4.7 kb; scAAV)의 1번, 3번 및 5번 위치에 삽입하고, 대조군 또한 조절성 폴리뉴클레오티드(게놈 크기 2 kb; scAAV) 없이 시험하였다. 도 12에서, "ITR"은 역위 말단 반복이고, "I"는 인트론을 나타내고, "P"는 폴리A이고 "MP"는 siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드이다. 바이러스 게놈을 정제된 AAV 제제물로부터 추출하고 중성의 아가로스 겔에서 수행(running)시켰다. 절단된 게놈이 모든 작제물에서 관찰되었고, 절단된 게놈의 대략적인 퍼센트(전체 중 퍼센트)가 표 21에 나타나 있다.

[0482]

[표 21]

절단된 게놈

작제물	총 %
1 번 위치	48
3 번 위치	30
5 번 위치	72
대조군	0

[0483]

5번 위치에서 가장 큰 수의 절단된 게놈을 가졌고, 3번 위치에서 가장 적은 양의 절단된 게놈을 가졌다.

C. 넉다운 효율에 대한 효과

[0486]

도 12에 나타난 바와 같이, siRNA 분자(VOYmiR-114)를 발현벡터(게놈 크기 4.7 kb; scAAV)의 1번, 3번 및 5번 위치에 삽입하고, 대조군 또한 조절성 폴리뉴클레오티드(게놈 크기 2 kb; scAAV) 없이 시험하였다. siRNA 분자(게놈 크기 2 kb; ssAAV 대조군)가 없는 단일 가닥의 대조군, siRNA 분자(게놈 크기 1.6 kb; scAAV 대조군)가 없는 이중 가닥의 대조군 및 siRNA 분자를 가진 이중 가닥의 발현 벡터(게놈 크기 2.4 kb; scAAV miR114)가 있다. 도 12에서, "ITR"은 역위 말단 반복이고, "I"는 인트론을 나타내고, "P"는 폴리A이고 "MP"는 siRNA 분자를 포함하는 조절성 폴리뉴클레오티드이다. HeLa 세포의 형질도입을 1×10^4 vg/세포, 1×10^3 vg/세포 및 1×10^2 vg/세포로 수행하였다. SOD1 mRNA 발현(대조군(eGFP)의 %로서)을 감염 72 시간 후에 결정하였고 그 결과를 표 22에 나타내었다.

[0487]

[표 22]

SOD1 발현

작제물	SOD1 mRNA 발현(대조군의 %)		
	1×10^4 vg/세포	1×10^3 vg/세포	1×10^2 vg/세포
1 번 위치	62	85	87
3 번 위치	77	93	99
5 번 위치	59	82	84
ssAAV 대조군	100	101	108
scAAV 대조군	95	97	102
scAAV miR114.	23	33	62

[0488]

3번 위치에서 가장 높은 SOD1 mRNA 발현(대조군의 %로서)을 보였고, 이어서 1번 위치였고, 가장 낮은 SOD1 mRNA 발현(대조군의 %로서)을 갖는 단일 가닥의 작제물은 5번 위치였다. 단일 가닥의 작제물 중 그 어떤 것도 siRNA 폴리뉴클레오티드를 가진 이중 가닥의 대조군 만큼의 낮은 넉다운 효율을 갖지 않았다.

[0490]

실시예 17. 생체내 SOD1 넉다운

[0491]

생체내에서 pri-miRNA의 생물학적 활성을 평가하기 위해서, 자기-상보성인 pri-miRNA(VOYmiR-114.806,

VOYmiR127.806, VOYmiR102.860, VOYmiR109.860, VOYmiR114.860, VOYmiR116.860, VOYmiR127.860, VOYmiR102.861, VOYmiR104.861, VOYmiR109.861, VOYmiR114.861, VOYmiR109.866, VOYmiR116.866, 또는 VOYmiR127.866)를 CBA 프로모터가 있는 AAV-DJ 내에 포장하였다.

[0492] 마우스에, 이와 같이 포장된 pri-miRNA 또는 대조군 비히클(5% 솔비톨 및 0.001% F-68이 있는 인산염-완충된 식염수)을 10분의 선조체내 주입으로 투여하였다. 인간 SOD1를 발현하는 약 20 내지 30 g의 체중의 암컷 또는 수컷의 Tg(SOD1)3Cje/J 마우스(Jackson Laboratory, 메인 바하버)에 선조체를 표적화하는 시험 물질 5 μ L를 단방향으로 주사하였다(정수리점(bregma)에 대해 전후측 +0.5 mm, 중외측 +2 mm; 두개골 표면에 대해 배복방향 3.8 mm). 33 케이지 바늘이 구비된 사전-충진 펌프-조 해밀턴 미세-주사기(1701 모델, 10 μ l)을 사용하여 시험 물질을 0.5 μ L/분으로 주사하였다(시험 물질 당 5 마리). 주사 후 1, 2, 3, 4 또는 6주에, 동물을 희생시키고 뇌를 제거하여 1 mm 두께 판(coronal slab) 및 인접한 1 mm 선조체의 주입 부위를 포함하는 동측 선조를 해부하여 이를 냉동시켰다. 마우스 조직 샘플을 용균시키고, 인간 SOD1 단백질 수준, SOD1 및 마우스 GAPDH(mGAPDH) mRNA 수준을 정량하였다. SOD1 단백질 수준을 ELISA(eBioscience Affymetrix, 캐나다 샌디에고)로 정량하고, 총 단백질 수준을 BCA 분석법(ThermoFisher Scientific, 마이애미 월섬)으로 정량하였다. 각 조직 샘플에 대하여, 총 단백질에 대해 정규화된 SOD1 단백질의 수준을 평균 2회 측정으로 계산하였다. 이와 같이 정규화된 SOD1 단백질 수준을 추가로 비히클 군에 대해 정규화하고, 평균화하여 군(치료) 평균을 수득하였다. SOD1 및 mGAPDH mRNA 수준을 qRT-PCR로 정량하였다. 각 조직 샘플에 대하여 SOD1/mGAPDH(정규화된 SOD1 mRNA 수준) 비를 평균 3회 측정으로 계산하였다. 이와 같은 비를 평균화하여 군(치료) 평균을 수득하였다. 이를 군 평균을 추가로 비히클 군에 대해 정규화하였다.

[0493] 시험 물질(1×10^{13} - 3×10^{13} vg의 CBA 프로모터가 있는 AAV-DJ에 포장된 pri-miRNA) 또는 비히클을 척수강내 요추 볼루수로 비인간 영장류에 투여하였다. 약 2.5 내지 8.5 kg 체중의 암컷 시노몰구스 원숭이(필리핀 원숭이(Macaca fascicularis), CR Research Model Houston, 텍사스 휴스턴)에 요추에 위치한 카테터 텁이 구비된 단일 척수강내 카테터를 이식시켰다. 약 60분 간격으로 3회의 1 mL 볼루스 주사(1 mL/분)를 포함하는 시험 물질을 투여하였다(시험 물질 당 4 마리). 투여 후 4 내지 6주에 동물을 희생시키고, 생체분석 및 조직학적 평가를 위해 선별된 조직을 회수하였다. 비히클 군에 대해 상대적인 SOD1 단백질 및 mRNA 수준을 CBA 프로모터가 있는 AAV-DJ 내에 포장된 pri-miRNA로 치료한 후 억제에 대해 평가하였다.

실시예 18. VOYmiR-114.806을 사용한 생체내 SOD1 억제

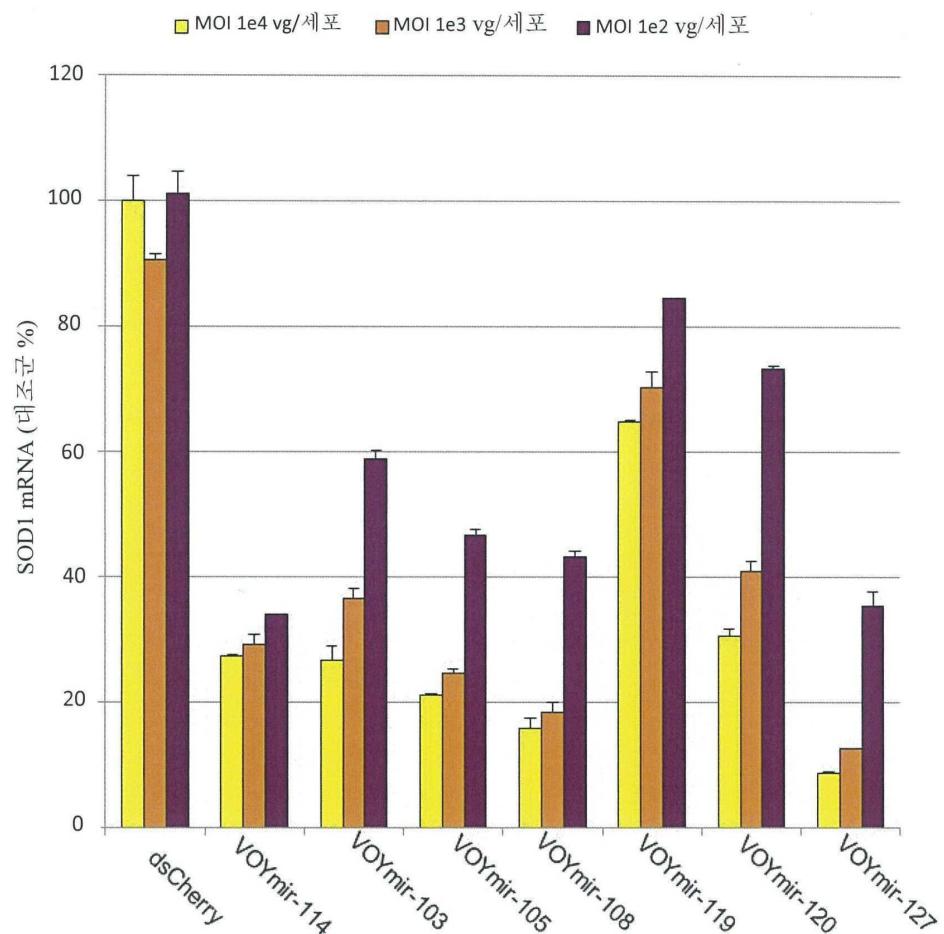
[0495] Tg(SOD1)3Cje/J 마우스에서, VOYmiR-114.806을 실시예 17에 기술된 바와 같은 CBA 프로모터가 있는 AAV-DJ 내에 포장하였다. 3.7×10^9 vg의 투여량을 단방향 선조체내 투여를 통해 마우스에 투여하였다. 1주 또는 2주 후에, 정규화된 SOD1 단백질 수준에서 유의한 감소는 없었다; 정규화된 SOD1 단백질 수준은 1주 및 2주 후에 각각 비히클 대조군의 $98 \pm 11\%$ (표준편차) 및 $98 \pm 10\%$ 였다. 3주까지, VOYmiR-114.806은 정규화된 SOD1 단백질 수준을 비히클 대조군의 $84 \pm 9.0\%$ 로 감소시켰고, 이는 통계적으로 유의한 것이었다($p < 0.05$, 둔넷(Dunnett)의 사후 분석을 이용한 일원 분산분석). 4주 및 6주까지, VOYmiR-114.806은 정규화된 SOD1 단백질 수준을 비히클 대조군의 각각 $73 \pm 7.9\%$ ($p < 0.0001$) 및 $75 \pm 7.4\%$ ($p < 0.0001$)로 감소시켰다. 이러한 결과는 CBA 프로모터가 있는 AAV-DJ 내에 포장된 VOYmiR-114.806이 생체내에서 SOD1 단백질 수준을 하향조절 하는데 효과적임을 보여준다. 추가로, 이러한 결과는, CBA 프로모터가 있는 AAV-DJ 내에 포장된 VOYmiR-114.806의 3.7×10^9 vg 만큼 낮은 총 선조체내 투여량이 SOD1 단백질 수준을 유의하게 하향 조절함을 보여준다.

[0496] 본 발명은 몇몇 설명된 구현예와 관련하여 일부 길이 및 일부 상세하게 설명되었지만, 임의의 이러한 특정 사항 또는 구현예 또는 임의의 특정한 구현예로 제한되어야 하는 것으로 의도된 것은 아니지만, 선행 기술의 관점에서 이러한 청구범위의 가장 광범위한 가능한 해석을 제공하고, 따라서 본 발명의 의도된 범위를 효과적으로 포함하도록 첨부된 청구범위를 참조하여 해석되어야 한다.

[0497] 본원에서 언급된 모든 간행물, 특히 출원, 특히 및 다른 참조문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다. 상충하는 경우, 정의를 포함하여 본 명세서에 따른다. 추가로, 섹션 말머리, 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 의도가 아니다.

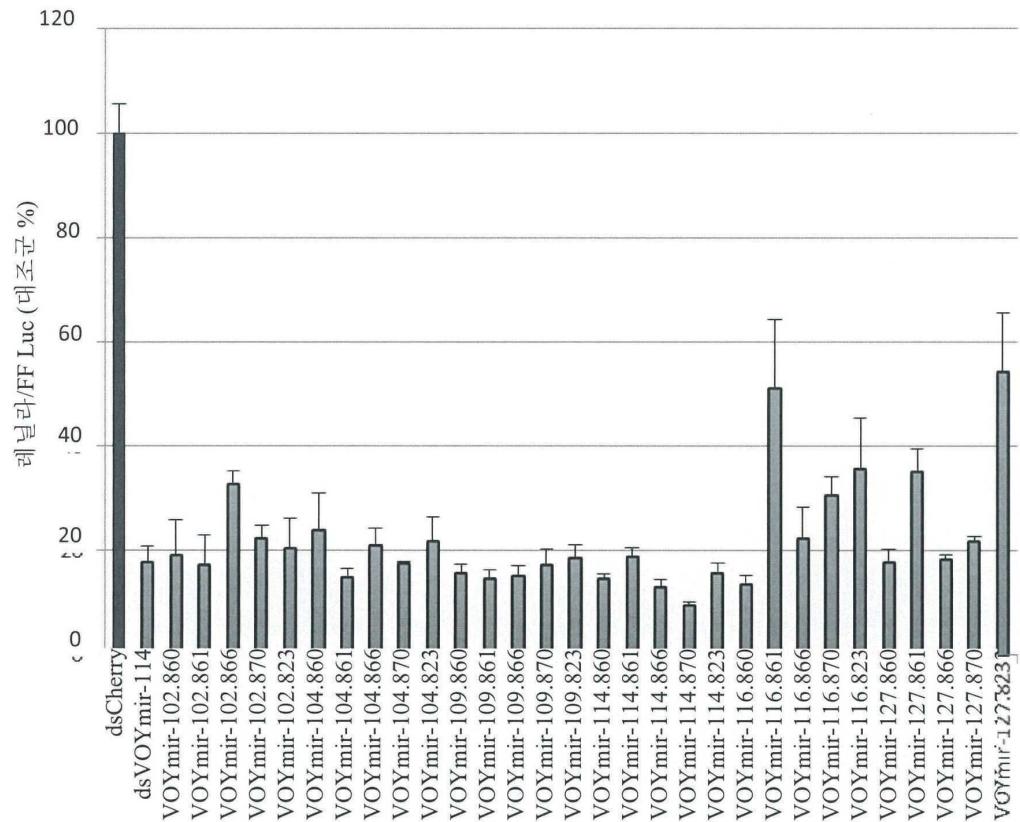
도면

도면1



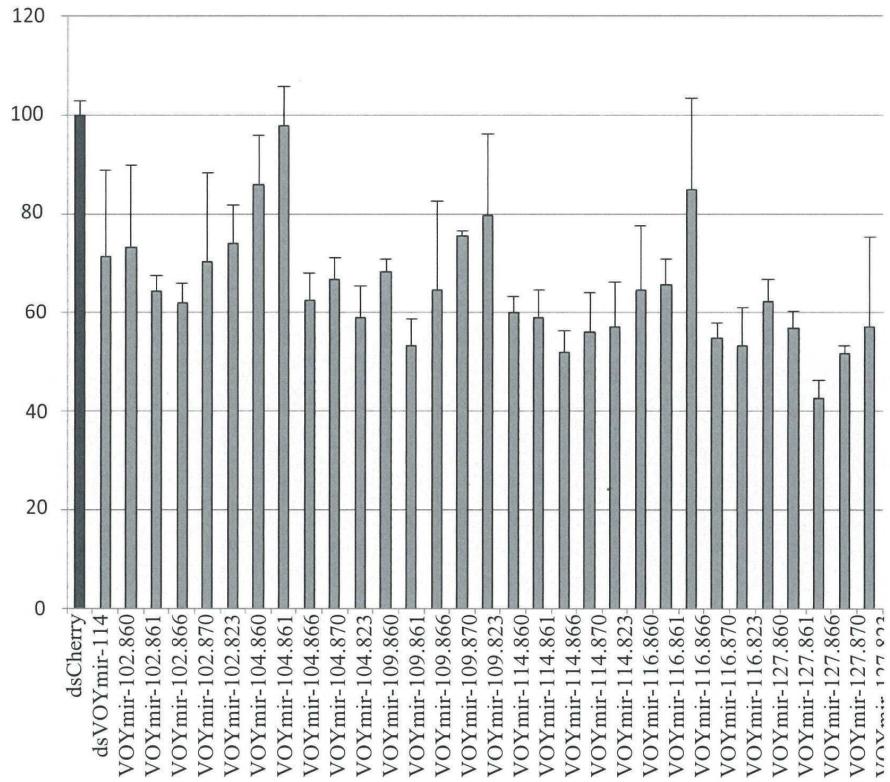
도면2

가이드 가닥- HEK-293T –
형질감염 후 24 시간



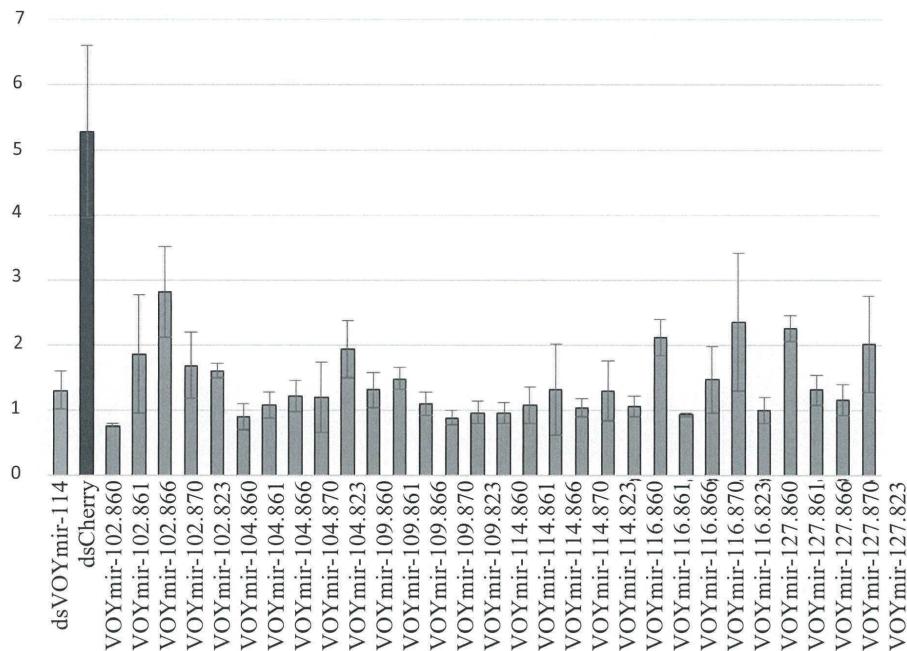
도면3

패신저 가닥 - HEK-293T - 형질감염 후 24 시간

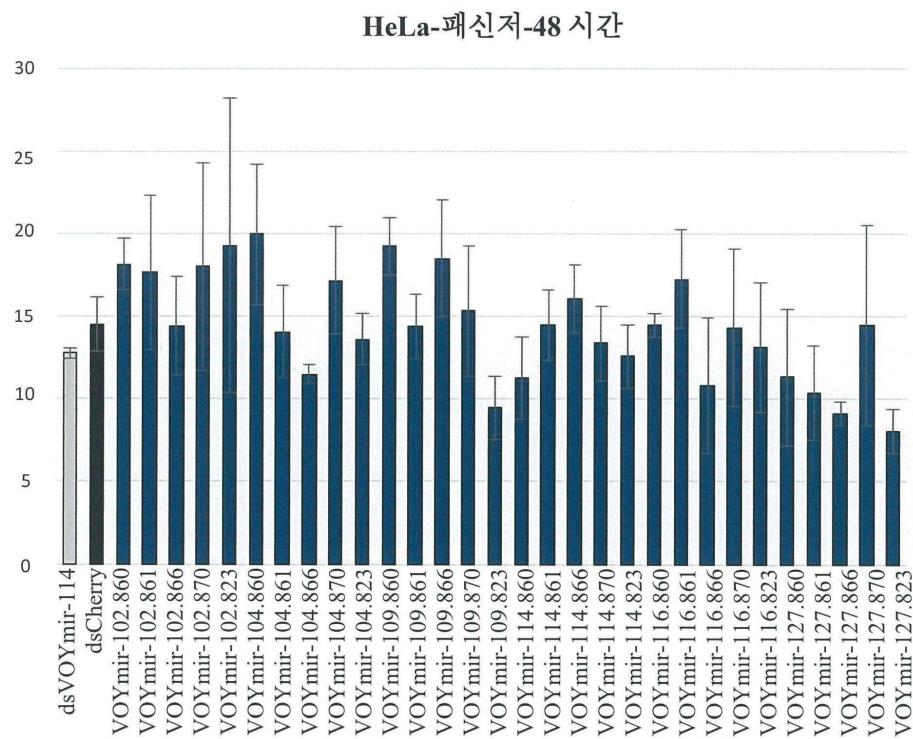


도면4

HeLa-가이드-48 시간

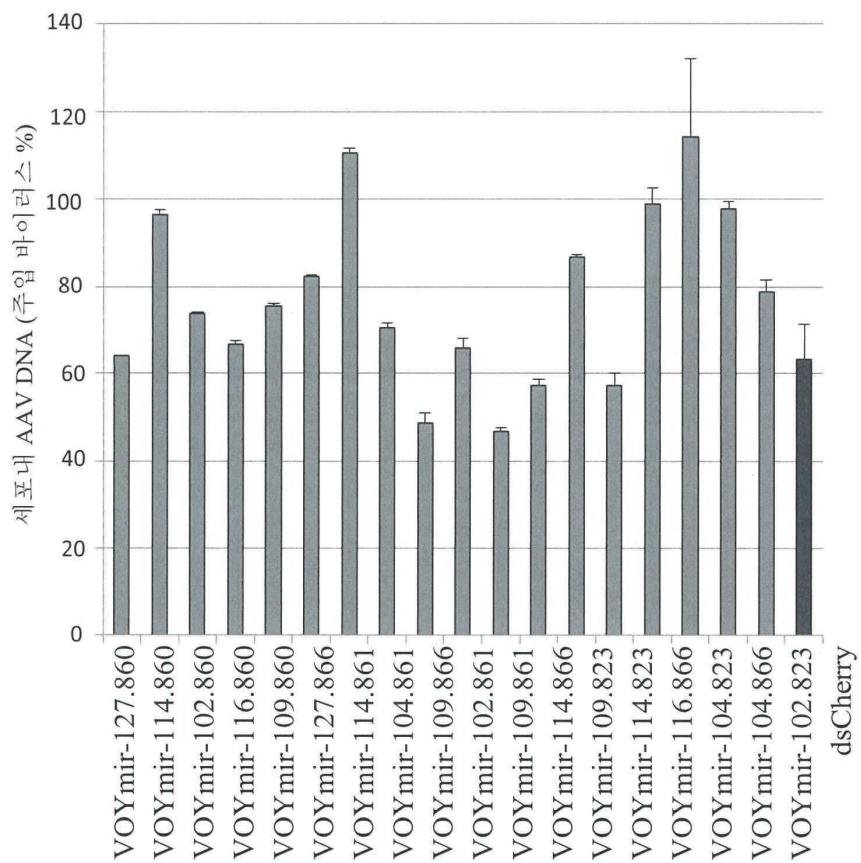


도면5

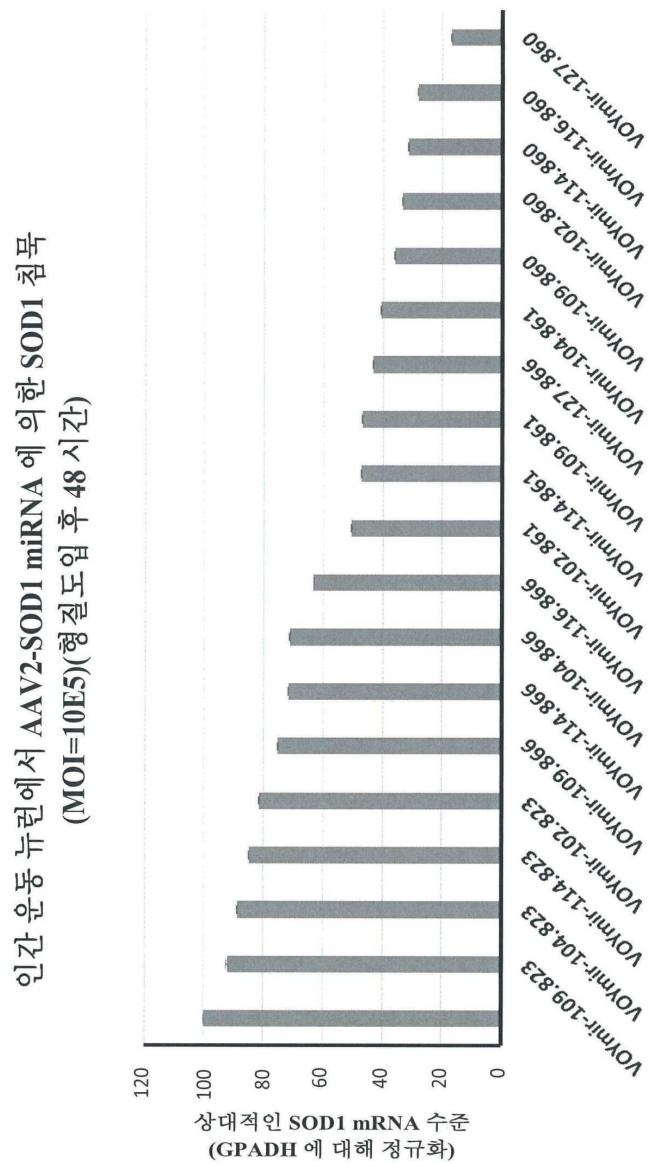


도면6

세포내 게놈

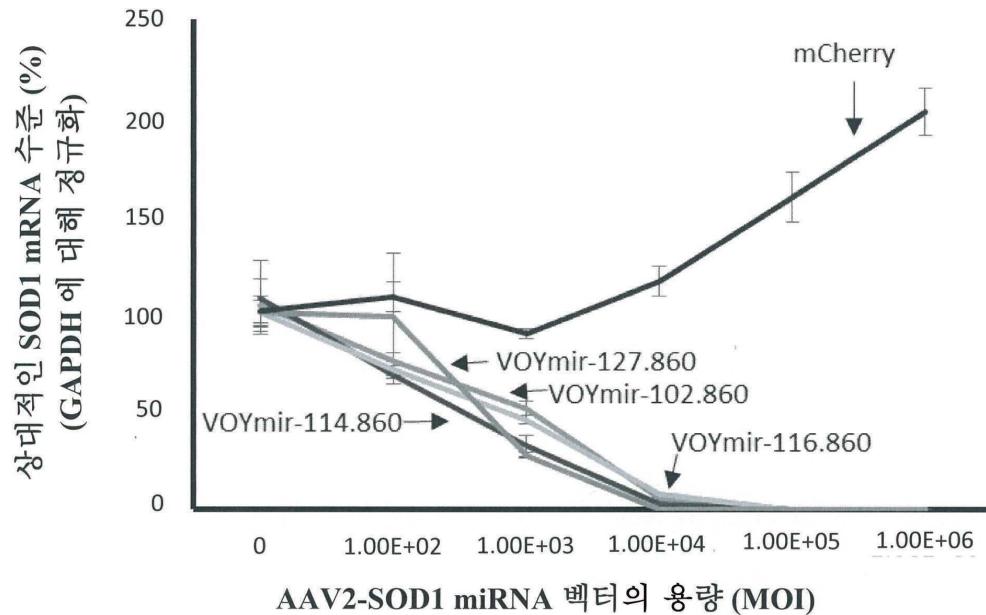


도면7



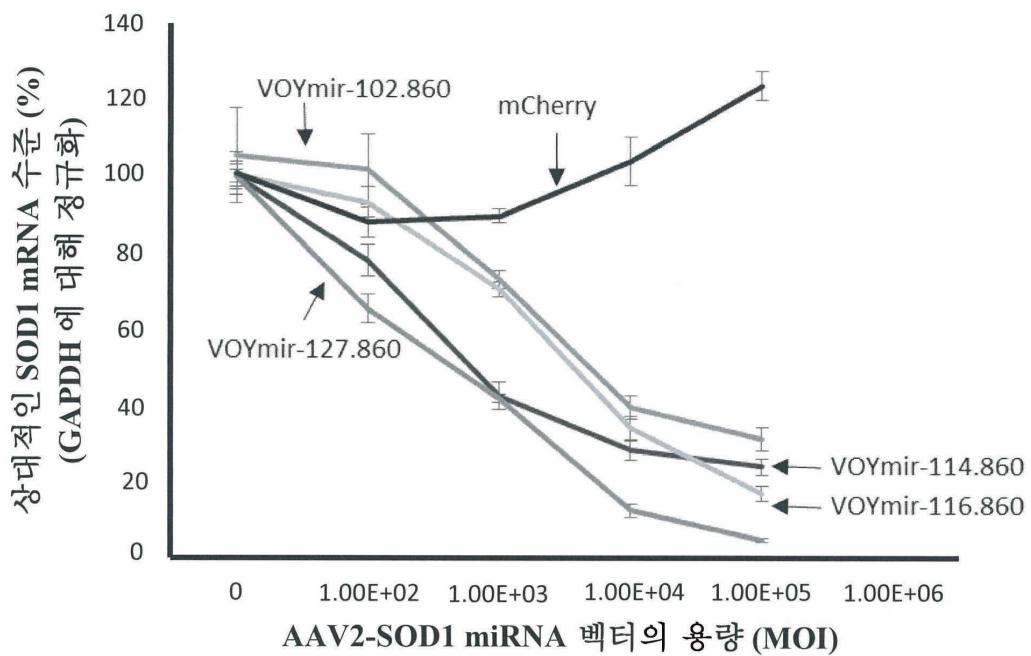
도면8

U251MG 세포에서 상이한 용량의 AAV2-miRNA 의 형질도입에 의한 용량-의존적 SOD1 침묵 (감염 후 48 시간)

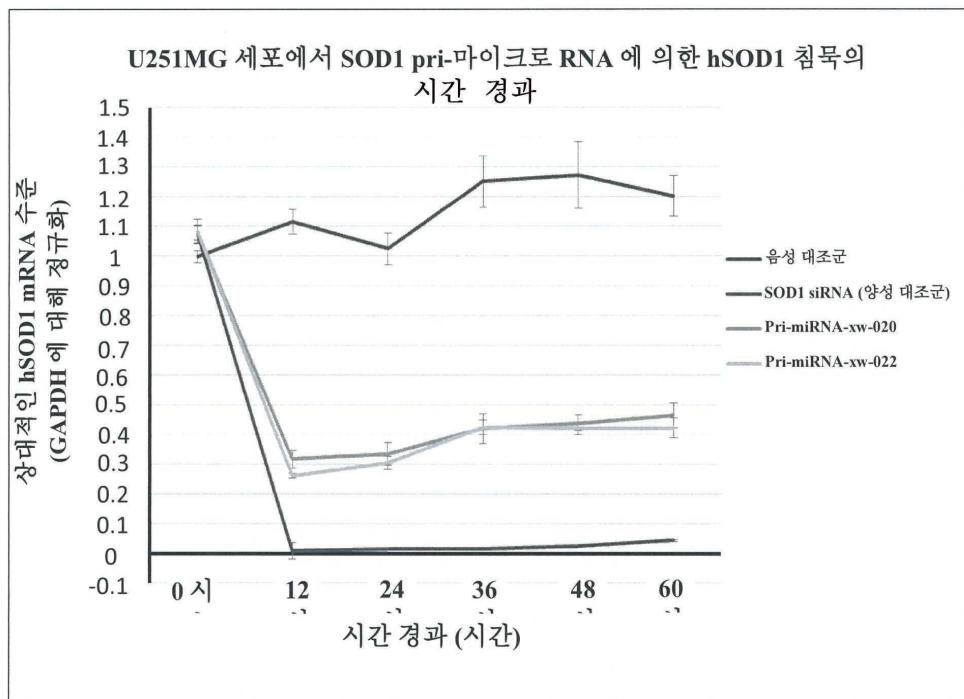


도면9

인간 성상세포(HA)에서 AAV2-SOD1 miRNA에 의한 용량-의존적 SOD1 침묵 (감염 후 48 시간)

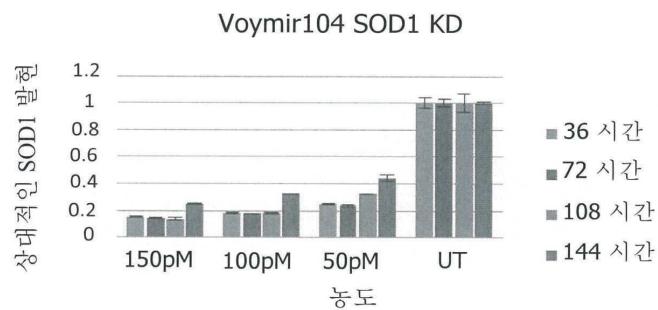


도면10

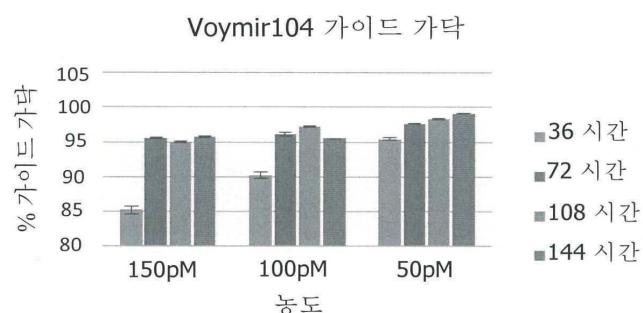


도면11

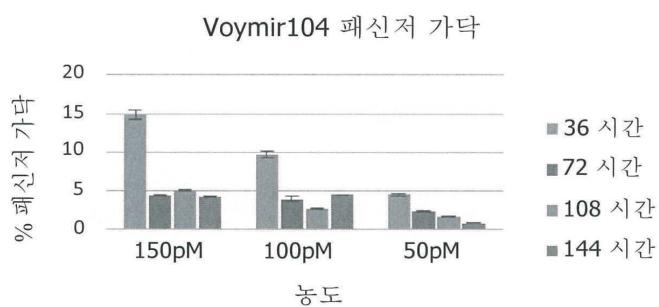
도 11A



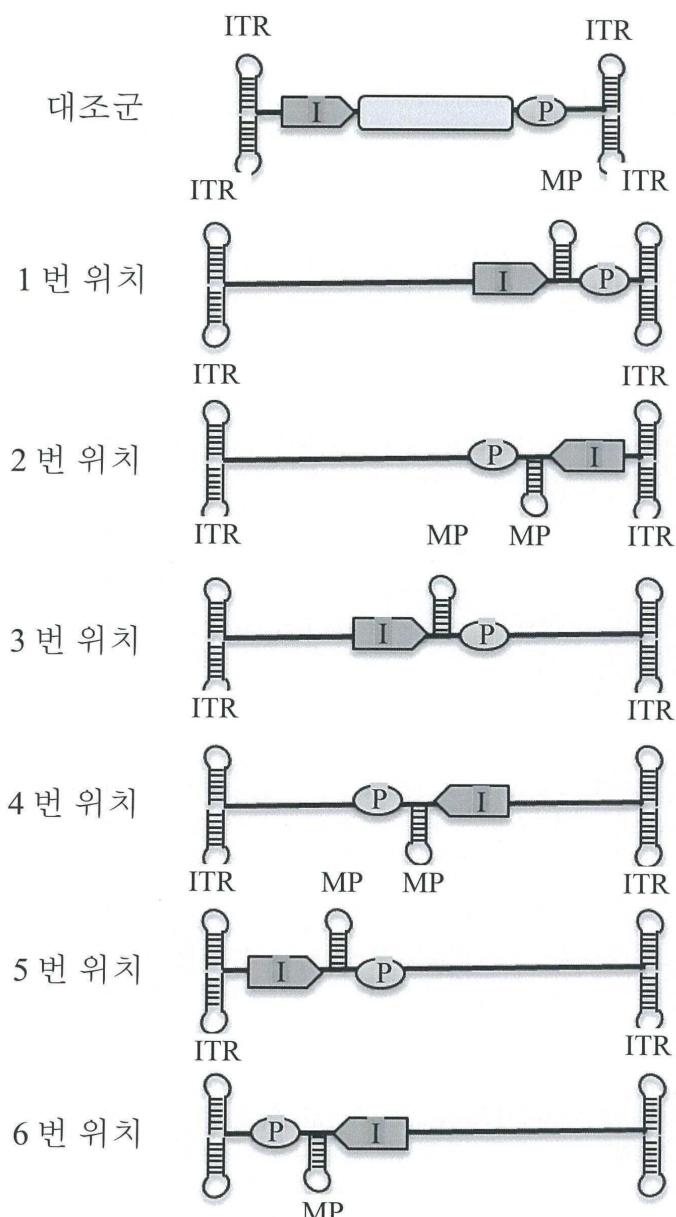
도 11B



도 11C



도면12



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> VOYAGER THERAPEUTICS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF TREATING AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)

<130> 2057.1011PCT

<150> US 62/079,588

<151> 2014-11-14

<150> US 62/211,992

<151> 2015-08-31

<150> US 62/234,466

<151> 2015-09-29

<160> 396

<170> Kopatent In 3.0

<210> 1

211 981

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ccaggacctc ggcgtggct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaaggg 180
cgacggcca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtatg gaccagtcaa 240
ggtgtggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcatgagt 300
tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac ttaatcctc tatccagaaa 360
acacgggtgg ccaaaggatg aagagaggca tgtggagac ttggcaatg tgactgctga 420
caaagatgtt gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca 480
ttgcatcatt ggccgcacac tggtgttcca tggaaaagca gatgacttgg gcaaagggtgg 540

actaaaaaaaaaaaaaaaaa a 981

<210> 2

<211> 465

<212> DNA

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 2

atggcgatga aggccgtgtg cgtgttgaag ggcgacagcc cagtgcaggg caccatcaat 60

ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattac aggattgact 120
 gaaggcctgc atggattcca tttcatcg tttggagata atacacaagg ctgtaccagt
 gcaggtcctc acttaatcc tctatccaga caacacggtg ggccaaagga tgaagagagg 240
 catgtggag acctggcaa tgtgactgt ggcaaaatgt gtgtggccaa ggtgtttc 300

gaagattctg tggatcgct ctcaggagac cattccatca ttggccgcac attggggc 360
 catgaaaaag cagatgactt gggcaaaatgt ggaaatgaag aaagaaaaa gacagggaaac 420
 gctggaggcgtc gttggcttg tgggttaatt gggatcgccc aataa 465

<210> 3

<211> 464

<212> DNA

<213> Macaca mulatta

<400> 3

atggcgatga aggccgtgt cgtgttgaag ggcgacagcc cagtgcaggg caccatcaat 60
 ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattac aggattgact 120
 gaaggcctgc atggattcca tttcatcg tttggagata atacacaagg ctgtaccagt 180

gcaggtcctc acttaatcc tctatccaga caacacggtg ggccaaagga tgaagagagg 240
 catgtggag acctggcaa tgtgactgt ggcaaaatgt gtgtggccaa ggtgtttc 300
 gaagattctg tggatcgct ctcaggagac cattccatca ttggccgcac attggggc 360
 catgaaaaag cagatgactt gggcaaaatgt ggaaatgaag aaagaaaaa gacagggaaac 420
 gctggaggcgtc gttggcttg tgggttaatt gggatcgccc aataa 464

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 4

cggaggucug gccuauaact t 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 5

ggaggucugg ccuauaaact t

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 6

gaggucuggc cuauaaagct t

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 7

aggucuggcc uauaaaguct t

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 8

ggcucuggccu auaaaguact t 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 9

ucuggccuau aaaguaguct t 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 10

cuggccuaua aaguagucct t 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 11

uggccuauaa aguagucgct t 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 12

ggccuauaaa guagucgcct t 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 13

gccuauaaag uagucgcgct t 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 14

ccuauaaagu agucgcggct t 21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 15

gucguagucu ccugcagcct t

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 16

cguagucucc ugcagcguct t

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 17

guagucuccu gcagcgucct t

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 18

uagucuccug cagcgucuct t 21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 19

auggcgacga aggccgugct t 21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 20

cgacgaaggc cgugugcgct t 21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

oligonucleotide
<400> 21
gaaggccgug ugcgugcuct t 21
<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 22
ggccgugugc gugcugaact t 21
<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 23
aggcgacgg cccagugcct t 21
<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 24
ugcaggcatt caucaauuct t 21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 25

gcagggcauc aucaauuuct t

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 26

aggcaucau caauuucgct t

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 27

gggcaucauc aauuucgact t

21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 28

ggcaucauca auuucgagct t 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 29

gcaucaucaa uuucgaggct t 21

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 30

caucaucaaau uucgaggact t 21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 31

aauuucgagc agaaggaact t 21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 32

uucgaggcaga aggaaaguct t 21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 33

ucgagcagaa gcaaaguact t 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 34

aagguguggg gaagcauuct t	21
<210> 35	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 35	
ggugugggga agcauuact t	21
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 36	
gacugacuga aggccugcct t	21
<210> 37	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide	
<400> 37	
cugacugaag gccugcauct t	21
<210> 38	
<211> 21	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 38

ugacugaagg ccugcaugct t

21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 39

ugaaggccug cauggauuct t

21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 40

gaaggccugc auggauucct t

21

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 41

ugcaugggauu ccauguuucct t 21

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 42

cauggauucc auguuauct t 21

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 43

ggauuccaugg uucaugagct t 21

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 44

uucca auguuc augaguuuct t 21

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 45

guuca auga guuugga uugga uact t 21

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 46

uuca auga guuugga uugga uact t 21

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 47

ugaguuugga gauauac t 21

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 48

gaguuuggag auauuacact t 21

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 49

aggcuguacc agugcaggct t 21

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 50

ggcuguacca gugcagguct t 21

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 51

gcagguccuc acuuuauct t 21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 52

cagguccuca cuuuaaucct t 21

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 53

ucacuuuaau ccucuaucct t 21

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
<400> 54
cuauccagaa aacacgguct t 21
<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 55
uauccagaaa acacggugct t 21
<210> 56
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 56
auccagaaaa cacgguggct t 21
<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 57
ccagaaaaaca cggugggcct t 21

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 58

gaaaaacacgg ugcccact t

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 59

aaaacacggu gggccaaact t

21

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 60

cggugggcca aaggaugact t

21

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 61

aggagaaga gaggcaugct t 21

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 62

augaagagag gcauguugct t 21

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 63

gagaggcaug uuggagacct t 21

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 64

agaggcaugu uggagacut t 21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 65

auguuggaga cuugggcact t 21

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 66

guuggagacu uggcaauct t 21

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 67

ggagacuugg gcaaugugct t 21

<210> 68

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 68

ggcaauguga cugcugacct t 21

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 69

caaugugacu gcugacaact t 21

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 70

cugacaaaga uggugugct t 21

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 71

ugacaaagau gguguggcct t 21

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 72

cucaggagac cauugcauct t 21

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 73

ucaggagacc auugcaucct t 21

<210> 74

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 74

agaccauugc aucauuggct t 21

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 75

gaccauugca ucauuggcct t 21

<210> 76

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 76

auugcauau ugcccgcact t 21

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 77

cauuggccgc acacugguct t 21

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 78

cgcacacugg ugguccauct t 21

<210> 79

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 79

cacacuggug guccaugact t 21

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 80

acacuggugg uccaugaact t 21

<210> 81

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 81

ugguggucca ugaaaaagct t 21

<210> 82

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 82

ugguccauga aaaaggcgt t 21

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 83

aaagcagaug acuugggcct t 21

<210> 84

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 84

gcagaugacu ugggcaaact t 21

<210> 85

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 85

augacuuggg caaaggugct t 21

<210> 86

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 86

ugacuugggc aaagguggct t 21

<210> 87

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 87

gacuugggca aagguggact t 21

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 88

guacaaagac aggaaacgct t 21

<210> 89

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 89

acaaggacag gaaacgcuct t 21

<210> 90

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 90

caaagacagg aaacgcugct t

21

<210> 91

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 91

aggaaacgcu ggaagucgct t

21

<210> 92

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 92

gucguuuggc uuguggugct t

21

<210> 93

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 93

ucguuuggcu ugugguguct t

21

<210> 94

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 94

cguuuggcuu gugguguact t

21

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 95

guuuggcuug ugguguaact t

21

<210> 96

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 96

uuggcuugug guguaauuct t

21

<210> 97

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 97

gcuuuggg guauuggct t 21

<210> 98

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 98

gcuuguggug uaaauuggct t 21

<210> 99

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 99

cuuguggugu aauuggact t 21

<210> 100

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 100

ugugguguaa uugggaucct t

21

<210> 101

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 101

gugguguaau uggaucgct t

21

<210> 102

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 102

ugguguaauu gggaucgcct t

21

<210> 103

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 103

guauuuggga ucgcccaact t

21

<210> 104

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 104

uaauugggau cggccaauct t

21

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 105

aauugggauc gcccaauact t

21

<210> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 106

auugggaucg cccaaauact t

21

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 107

uugggaucgc ccaaauaaact t 21

<210> 108

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 108

ugggaucgcc caauaaacct t 21

<210> 109

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 109

gggaucgccc aaauaaacact t 21

<210> 110

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
<400> 110
aucgcccaau aaacauucct t 21

<210> 111
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 111
ccaauaaaca uuccuugct t 21
<210> 112
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 112
caauaaacau uccuuggct t 21
<210> 113
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 113
aauaaacauu cccuuggact t 21

<210> 114

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 114

auaaacauuc ccuuggauct t

21

<210> 115

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 115

uaaacauucc cuuggauct t

21

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 116

aaacauucc uuggauct t

21

<210> 117

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 117

aacauuuccu uggauguact t 21

<210> 118

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 118

auuccccuugg auguagucct t 21

<210> 119

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 119

cuuggaaugua gucugaggct t 21

<210> 120

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 120

cugaggcccc uuaacucact t

21

<210> 121

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 121

gaggccccuu aacucaucct t

21

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 122

aggccccuu aacucaucct t

21

<210> 123

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 123

ccccuuaacu caucuguuct t 21

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 124

cccuuaacuc aucuguuact t 21

<210> 125

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 125

ccuuaacuca ucuguuauct t 21

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 126

cuuaacucau cuguuaucct t 21

<210> 127

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 127

uuaacucauc uguuauccct t 21

<210> 128

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 128

uaacucaucu guuauccuct t 21

<210> 129

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 129

aacucaucug uuauccugct t 21

<210> 130

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 130

guuauccugc uagcuguact t

21

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 131

cugcuagcug uagaaaugct t

21

<210> 132

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 132

ugcuagcugu agaaauguct t

21

<210> 133

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 133

gcuguagaaa uguauccuct t 21

<210> 134

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 134

cuguagaaau guauccugct t 21

<210> 135

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 135

uguagaaaug uauccugact t 21

<210> 136

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 136

guagaaaugu auccugauct t 21

<210> 137

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 137

aaauguaucc ugauaaacct t 21

<210> 138

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 138

guauccugau aaacauuact t 21

<210> 139

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 139

uuaaacacug uaaucuuact t 21

<210> 140

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 140

acuguaaucu uaaaagugct t 21

<210> 141

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 141

cuguaaucuu aaaaguguct t 21

<210> 142

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 142

uguaaucuuua aaaguguact t 21

<210> 143

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
<400> 143
guauacuuaa aaguguaact t 21
<210> 144
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 144
cuuaaaagug uaaauugugct t 21
<210> 145
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 145
uaccuguagu gagaaacuct t 21
<210> 146
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 146
uuaugaucac uuggaagact t 21

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 147

augaucacuu ggaagauuct t

21

<210> 148

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 148

aucacuugga agauuuguct t

21

<210> 149

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 149

uggaagauuu guauaguuct t

21

<210> 150

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 150

uauaaaaacuc aguuaaaact t

21

<210> 151

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 151

aaacucaguu aaaaugucct t

21

<210> 152

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

oligonucleotide

<400> 152

gucuguuuca augaccugct t

21

<210> 153

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 153

augaccugua uuuugccact t 21

<210> 154

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 154

accuguaauu ugccagacct t 21

<210> 155

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 155

ccuguaauuu gccagacuct t 21

<210> 156

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 156

uaaaucacag augguauct t	21
<210> 157	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 157	
aucacagaaug gguauuaact t	21
<210> 158	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 158	
ucacagaugg guauuaact t	21
<210> 159	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 159	
acagaugggu auuaaacuct t	21
<210> 160	
<211> 21	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 160

cagaugggua uuuaacuuct t

21

<210> 161

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 161

agauggguau uaaaacuugct t

21

<210> 162

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 162

auggguauua aacuugucct t

21

<210> 163

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 163

uaaacuuguc agaauuuucct t 21

<210> 164

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 164

ucaucaaggc cugugaauct t 21

<210> 165

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 165

caaucaagcc ugugaauct t 21

<210> 166

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 166

aauaaaaacc cuguauggct t 21

<210> 167

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 167

aauaaaaacc cuguauggct t 21

<210> 168

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 168

aacccuguau ggacuuact t 21

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 169

accuguaug gcacuuact t 21

<210> 170

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 170

gaggcuauua aaagaauucct t

21

<210> 171

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 171

aaagaaucca aaaucaaact t

21

<210> 172

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 172

gaauccaaau ucaaacuact t

21

<210> 173

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 173

uuuaauaggcc agaccuccgt t 21

<210> 174

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 174

uuuuauaggc cagaccucct t 21

<210> 175

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 175

ucuuuauagg ccagaccuct t 21

<210> 176

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

oligonucleotide
<400> 176
uacuuauaag gccagaccut t 21
<210> 177
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 177
uuacuuuaa ggccagacct t 21
<210> 178
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 178
uacuacuuua uaggccagat t 21
<210> 179
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 179
ugacuacuuu auaggccagt t 21

<210> 180

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 180

ucgacuacuu uauaggccat t

21

<210> 181

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 181

ugcgacuacu uuauaggcct t

21

<210> 182

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 182

ucgcgacuac uuuauaggct t

21

<210> 183

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 183

uccgcgacua cuuuauaggt t 21

<210> 184

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 184

ugcugcagga gacuacgact t 21

<210> 185

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 185

uacgcugcag gagacuacgt t 21

<210> 186

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 186

ugacgcugca ggagacuact t 21

<210> 187

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 187

uagacgcugc aggagacuat t 21

<210> 188

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 188

ucacggccuu cgucgcaut t 21

<210> 189

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 189

ucgcacacgg ccuucgucgt t	21
<210> 190	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 190	
uagcacgcac acggccuuct t	21
<210> 191	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 191	
uuucagcacg cacacggcct t	21
<210> 192	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 192	
ugcacugggc cgucgcccct t	21
<210> 193	
<211> 21	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 193

uaauugauga ugcccugcat t

21

<210> 194

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 194

uaauugauga auggccugct t

21

<210> 195

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 195

ucgaaauuga ugaugcccut t

21

<210> 196

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 196

uucgaaauug augaughcct t 21

<210> 197

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 197

ucucgaaauu gaugaugcct t 21

<210> 198

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 198

ugcucgaaau ugaugaugct t 21

<210> 199

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 199

uugcucgaaa uugaugaugt t 21

<210> 200

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 200

uuuccuucug cucgaaauut t 21

<210> 201

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 201

uacuuuccuu cugcucgaat t 21

<210> 202

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 202

uuacuuuccu ucugcucgat t 21

<210> 203

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 203

uaaugcuucc ccacaccuut t 21

<210> 204

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
<400> 204
uuuaaugcuu ccccacacct t 21

<210> 205

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 205

ugcaggccu cagucaguct t 21

<210> 206

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 206

uaugcaggcc uucagucagt t 21

<210> 207

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

oligonucleotide

<400> 207

ucaugcaggc cuucagucat t 21

<210> 208

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 208

uaauccaugc aggccuucat t 21

<210> 209

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

oligonucleotide
<400> 209
ugaauccaug caggccuuct t 21
<210> 210
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 210
ugaacauugga auccaugcat t 21
<210> 211
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 211
uaugaacaug gaaucgaugt t 21
<210> 212
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 212
ucucaugaac auggaaucc t 21

<210> 213

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 213

uaaacucaug aacauggaat t

21

<210> 214

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 214

uaucuccaaa cucaugaact t

21

<210> 215

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 215

uuaucuccaa acucaugaat t

21

<210> 216

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 216

uguauuaucu ccaaacucat t 21

<210> 217

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 217

uuguaauuauc uccaaacuct t 21

<210> 218

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 218

uccugcacug guacagccut t 21

<210> 219

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 219

uaccugcacu gguacagcct t 21

<210> 220

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 220

uaauuaagug aggaccugt t 21

<210> 221

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 221

ugauuaagu gaggaccugt t 21

<210> 222

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 222

ugauagagga uuuaagugat t 21

<210> 223

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 223

uaccguguu ucuggaugt t 21

<210> 224

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 224

ucaccguguu uucuggauat t 21

<210> 225

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 225

uccaccgugu uuucuggau t 21

<210> 226

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 226

ugcccacccgu guuuucuggt t

21

<210> 227

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 227

uuuggcccac cguguuuuct t

21

<210> 228

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 228

uuuuggecca ccguguuuut t

21

<210> 229

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 229

uucauccuuu ggcccacccgt t 21

<210> 230

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 230

ucaugccucu cuucauccut t 21

<210> 231

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 231

ucaacaugcc ucucuucaut t 21

<210> 232

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 232

ugucuccaac augccucuct t 21

<210> 233

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 233

uagucuccaa caugccucut t 21

<210> 234

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 234

uugcccaagu cuccaacaut t 21

<210> 235

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 235

uauugcccaa gucuccaact t 21

<210> 236

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 236

ucacauugcc caagucucct t 21

<210> 237

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 237

ugucagcagu cacauugcct t 21

<210> 238

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 238

uuugucagca gucacauugt t 21

<210> 239

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 239

uccacaccau cuuugucagt t 21

<210> 240

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 240

ugccacacca ucuuugucat t 21

<210> 241

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 241

uaugcaaugg ucuccugagt t 21

<210> 242

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 242

ugaugcaaug gucuccugat t 21

<210> 243

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 243

uccaaugaug caauggucut t 21

<210> 244

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 244

ugccaaugau gcaaugguct t 21

<210> 245

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 245

uugcggccaa ugaugcaaut t

21

<210> 246

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 246

uaccagugug cggccaaugt t

21

<210> 247

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 247

uauggaccac cagugugcgt t

21

<210> 248

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 248

uucauggacc accagugugt t

21

<210> 249

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 249

uuucauggac caccagugut t

21

<210> 250

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 250

ucuuuuucau ggaccaccat t

21

<210> 251

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 251

ucugcuuuuu cauggaccat t

21

<210> 252

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 252

ugcccaaguc aucugcuuut t 21

<210> 253

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 253

uuuugcccaa gucaucugct t 21

<210> 254

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 254

ucaccuuugc ccaagucaut t 21

<210> 255

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 255

uccaccuuug cccaaagucat t

21

<210> 256

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 256

uuccaccuuu gcccaaguct t

21

<210> 257

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 257

ucguuuccug ucuuuguact t

21

<210> 258

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 258

uagcguuucc ugucuuugut t

21

<210> 259

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 259

ucagcguuuc cugucuuugt t

21

<210> 260

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 260

ucgacuuucca gcgguuuccut t

21

<210> 261

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 261

ucaccacaag ccaaacgact t

21

<210> 262

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 262

uacaccacaa gccaaacgat t 21

<210> 263

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 263

uuacaccaca agccaaacgt t 21

<210> 264

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 264

uuuacaccac aagccaaact t 21

<210> 265

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
<400> 265
uaauuacacc acaaggcaat t 21

<210> 266
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 266
uccaauuaca ccacaaggct t 21
<210> 267
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 267
ucccaauuac accacaagct t 21
<210> 268
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 268
uucccaauua caccacaagt t 21

<210> 269

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 269

ugaucccaau uacaccacat t

21

<210> 270

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 270

ucgaauccaa uuacaccact t

21

<210> 271

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 271

ugcgauccca auuacaccat t

21

<210> 272

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 272

uuugggcgau cccaaauact t 21

<210> 273

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 273

uauugggcga ucccaauuat t 21

<210> 274

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 274

uuauugggcg aucccaauut t 21

<210> 275

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 275

uuuauuggc gaucccaut t

21

<210> 276

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 276

uuuuauuggg cgauccaa t

21

<210> 277

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 277

uguuuauugg gcgauccat t

21

<210> 278

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 278

uuguuuuauug ggcgaucct t	21
<210> 279	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 279	
ugaauguuua uugggcgaut t	21
<210> 280	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 280	
ucaaggaaau guuuauugt t	21
<210> 281	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 281	
uccaaggaa uguuuauugt t	21
<210> 282	
<211> 21	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 282

uuccaaggga auguuuauut t 21

<210> 283

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 283

uauccaaggg aauguuuaut t 21

<210> 284

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 284

ucauccaagg gaauguuuat t 21

<210> 285

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 285

uacauccaag ggauguuut t

21

<210> 286

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 286

uuacaucaa gggaauguuut t

21

<210> 287

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 287

ugacuacauc caaggaaaut t

21

<210> 288

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 288

uccucagacu acauccaagt t 21

<210> 289

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 289

uugaguuaag gggccucagt t 21

<210> 290

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 290

ugaugaguua aggggccuct t 21

<210> 291

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 291

uagaugaguua aaggggccut t 21

<210> 292

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 292

uaacagauga guuaagggt t 21

<210> 293

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 293

uuaacagaug aguuaagggt t 21

<210> 294

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 294

uauaacagau gaguuaagggt t 21

<210> 295

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 295

ugauaacaga ugaguuaagt t 21

<210> 296

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 296

uggauaacag augaguuaat t 21

<210> 297

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 297

uaggauaca gaugaguuat t 21

<210> 298

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
<400> 298
ucaggauaac agaugaguut t 21
<210> 299
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 299
uuacagcuag caggauaact t 21
<210> 300
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 300
ucauuucuac agcuagcagt t 21
<210> 301
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 301
uacauuucua cagcuagcat t 21

<210> 302

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 302

uaggauacau uucuacagct t

21

<210> 303

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 303

ucaggauaca uuucuacagt t

21

<210> 304

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 304

uucaggauac auuucuacat t

21

<210> 305

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 305

uaucaggaua cauuucuact t

21

<210> 306

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 306

uguuuauacag gauacauuut t

21

<210> 307

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 307

uuaauguuua ucaggauact t

21

<210> 308

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 308

uuaagauuac aguguuuaat t 21

<210> 309

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 309

ucacuuuuaa gauuacagut t 21

<210> 310

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 310

uacacuuuuua agauuacagt t 21

<210> 311

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 311

uuacacuuuu aagauuacat t	21
<210> 312	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 312	
uuuacacuuu uaagauuact t	21
<210> 313	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 313	
ucacaauuac acuuuuag t	21
<210> 314	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 314	
uaguuucuca cuacagguat t	21
<210> 315	
<211> 21	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 315

uucuuccaag ugaucuaat t

21

<210> 316

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 316

uaauuuucca agugaucaut t

21

<210> 317

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 317

uacaaauuu ccaagugaut t

21

<210> 318

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 318

uaacauauaca aaucuuccat t 21

<210> 319

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 319

uuuuuaacug aguuuuauat t 21

<210> 320

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 320

ugacauuuua acugaguut t 21

<210> 321

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 321

ucaggucuuu gaaacagact t 21

<210> 322

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 322

uuggcaaaau acaggucaut t 21

<210> 323

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 323

ugucuggcaa aauacaggut t 21

<210> 324

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 324

uagucuggca aauuacagggt t 21

<210> 325

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 325

uauaccccauc ugugauuuat t

21

<210> 326

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 326

uuuaauuaccc aucugugaut t

21

<210> 327

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 327

uuuuauuacc caucugugat t

21

<210> 328

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 328

uaguuuuaaua cccaucugut t 21

<210> 329

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 329

uaaguuuaua acccaucugt t 21

<210> 330

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 330

ucaaguuuua uacccaucut t 21

<210> 331

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
<400> 331
ugacaaguuu aauacccaut t 21
<210> 332
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 332
ugaaauucug acaaguuuat t 21
<210> 333
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 333
uauucacagg cuugaaugat t 21
<210> 334
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<400> 334
uuaucacag gcuugaaugt t 21

<210> 335

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 335

uccauacagg guuuuuauut t

21

<210> 336

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 336

ugccauacag gguuuuuaut t

21

<210> 337

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 337

uuaagugcca uacaggguut t

21

<210> 338

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 338

uauaagugcc auacagggt t 21

<210> 339

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 339

ugauucuuuu aaauagccct t 21

<210> 340

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 340

uuuugaauuu ggauucuuut t 21

<210> 341

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 341

uuaguuugaa uuuggauuct t

21

<210> 342

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 342

caaugugacu gcugacaacc c

21

<210> 343

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 343

uuugucagca gucacauugu u

21

<210> 344

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 344

caaugugacu gcugacaauc c

21

<210> 345

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide
<400> 345
caaugugacu gcugacaagg c 21
<210> 346
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 346
caaugugacu gcugacaagg c 21
<210> 347
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 347
caaugugaca gcugacaagg c 21
<210> 348
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 348
caaugugacu gcugacaagg c 20
<210> 349
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 349

caaugugacu gcugacaaucc 22

<210> 350

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 350

caaugugacu gcugacaaca c 21

<210> 351

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 351

uuugucagca gucacauugu c 21

<210> 352

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 352

caaugugacu gcugacaauu c 21

<210> 353

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 353

caaugugacu gcugacaauu c 21

<210> 354

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 354

uuugucagca gucacauuga c

21

<210> 355

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 355

caaugugacu gcugacaauc cc

22

<210> 356

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 356

cgacgaaggc cgugugcgcc c

21

<210> 357

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 357

ucgcacacgg ccuucgucgu u

21

<210> 358

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 358

ugacuugggc aaagguggcc c

21

<210> 359

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 359

uccaccuuug cccaagucau u

21

<210> 360

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 360

aacucaucug uuauccugcc c

21

<210> 361

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 361

ucaggauaac agaugaguuu u

21

<210> 362

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 362

ccccuuaacu caucuguucc c

21

<210> 363

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 363

uaacagaua guuaagggu u

21

<210> 364

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 364

cccuuaacuc aucuguuacc c

21

<210> 365

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 365

uuaacagaua guuaagggu u

21

<210> 366

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 366

aacucaucug uuaucuugcc c 21

<210> 367

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 367

gcuguggaaa uguaucuuucc c 21

<210> 368

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 368

uaggauacau uucuacagcu u 21

<210> 369

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 369

ugacuugggc aaaggugagc c 21

<210> 370

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 370

cccuuaacu caucuguugc c

21

<210> 371

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 371

cccuuaacuc aucuguuagc c

21

<210> 372

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 372

aacucaucug uuaucuuagc c

21

<210> 373

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 373

gcuguggaaa uguaucuugc c

21

<210> 374

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 374

ugacuugggc aaagguaaggc c

21

<210> 375

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 375

ccccuuaaca caucuguuac c

21

<210> 376

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 376

cccuuaacug aucuguuaac c

21

<210> 377

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 377

aacucaucuc uuaucuugcc c

21

<210> 378

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 378

gcuguggaaau uguaucuugc c 21

<210> 379

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 379

ugacuugggg aaaggugagc c 21

<210> 380

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 380

aacucaucug uuaucuuggc c 21

<210> 381

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 381

ccccuuaacu cauuuguucc c 21

<210> 382

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 382

ugacuugggc aaagguagcc c	21
<210> 383	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 383	
caaugugacu gcugacaaa	19
<210> 384	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 384	
uuugucagca gucacauugu c	21
<210> 385	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 385	
gcagguccuc acuuuaaugc c	21
<210> 386	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 386	
gauuaaagug aggaccugcu u	21
<210> 387	

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 387

ggcaauguga cugcugaccc c

21

<210> 388

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 388

ugucagcagu cacauugccu u

21

<210> 389

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

ggcaauguga cugcugaccc c

21

<210> 390

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

ggcaauguga cugcugaccc c

21

<210> 391

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 391

gcagguccuc acuuuaaucc c

21

<210> 392

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 392

ggcaauguga cugcugauac c

21

<210> 393

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 393

gcagguccug acuuuaaucc c

21

<210> 394

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 394

ggcaaugugu cugcugauac c

21

<210> 395

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 395

gauuaaagug aggaccugcu uu 22

<210> 396

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 396

ugucagcagu cacauugccu uu 22