



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월17일
(11) 등록번호 10-2339886
(24) 등록일자 2021년12월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/1136 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7029205
- (22) 출원일자(국제) 2017년04월10일
심사청구일자 2020년04월10일
- (85) 번역문제출일자 2018년10월10일
- (65) 공개번호 10-2018-0128423
- (43) 공개일자 2018년12월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2017/000470
- (87) 국제공개번호 WO 2017/178883
국제공개일자 2017년10월19일
- (30) 우선권주장
62/320,944 2016년04월11일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020150125388 A
WO2013176477 A1*
US20120238017 A1
WO2015002513 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
울릭스 주식회사
경기도 수원시 영통구 대학4로 17, 1014호 (이의동, 에이스광고타워1)
- (72) 발명자
이동기
대한민국 서울특별시 서초구 서초중앙로 188, 1층 C-2010호(서초동, 아크로비스타)
홍선우
대한민국 경기도 수원시 권선구 금곡로 45, 211동 1905호(금곡동, 금곡엘지아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

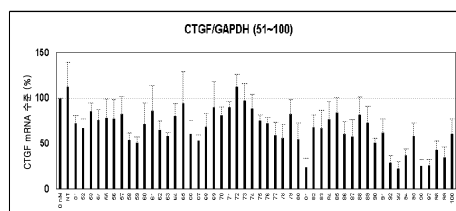
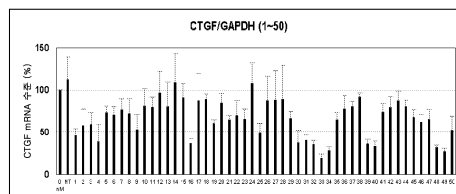
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 연결 조직 성장 인자를 표적화하는 RNA 복합체를 사용한 특발성 폐 섬유증의 치료 방법

(57) 요약

특정의 국면에서, CTGF 발현을 억제함으로써 특발성 폐 섬유증을 치료하는데 유용한 RNA 복합체(예컨대, asiRNA와 같은 비대칭 RNA 복합체 또는 세포 침투성 asiRNA)가 본원에 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/712 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/321 (2013.01)
C12N 2310/3515 (2013.01)

(72) 발명자

이태연

대한민국 서울특별시 금천구 남부순환로112길
1-10, 101호(가산동)

이새로움

대한민국 서울특별시 용산구 효창원로86라길 52,
1층 1호(청파동1가)

김지현

서울특별시 영등포구 여의대방로23길 5-2, 203(신
길동)

나유란

대한민국 경기도 부천시 소안로 63, 101동 702호(
소사본동, 대은팰리스뷰아파트)

김영동

대한민국 서울특별시 관악구 서림9길, 103-27(신림
동)

명세서

청구범위

청구항 1

CTGF mRNA 서열에 대해 서열 상보성을 갖는 안티센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥에 대해 서열 상보성을 갖는 센스 가닥을 포함하는 RNA 복합체로서, 상기 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 상기 안티센스 가닥의 5' 말단 및 상기 센스 가닥의 3' 말단이 평활 말단(blunt end)을 형성하고,

상기 센스 가닥은 서열번호 29의 뉴클레오타이드 서열을 가지고, 상기 안티센스 가닥은 21 내지 31개의 뉴클레오타이드를 갖는 RNA 복합체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 30의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 RNA 복합체.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 RNA 복합체가 세포에 의한 CTGF 발현을 억제할 수 있고, 상기 세포가 상피 세포, 폐포 세포, A549 세포, HaCaT 세포, 및 Hs68 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 RNA 복합체.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 RNA 복합체가 화학적 변형을 포함하는 RNA 복합체.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 화학적 변형이 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드, 포스포로티오에이트 결합, 또는 소수성 모이어티(moiety)인 RNA 복합체.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 RNA 복합체가 소수성 모이어티를 포함하고, 상기 소수성 모이어티가 콜레스테롤, 토크페롤, 및 탄소수 10 이상의 장쇄 지방산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, 상기 콜레스테롤 모이어티가 상기 센스 가닥의 3' 말단에 부착된 RNA 복합체.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 RNA 복합체가 하나 이상의 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드를 포함하고, 상기 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드는 센스 가닥; 및 안티센스 가닥의 3' 말단 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 위치하는 RNA 복합체.

청구항 10

청구항 6에 있어서, 상기 RNA 복합체가 포스포로티오에이트 결합을 포함하고,

상기 RNA 복합체의 센스 가닥내 리보뉴클레오타이드들 사이의 결합의 적어도 5%가 포스포로티오에이트 결합, 또는

상기 RNA 복합체의 센스 가닥내 리보뉴클레오타이드들 사이의 결합의 적어도 10%가 포스포로티오에이트 결합,

또는

상기 RNA 복합체의 센스 가닥내 리보뉴클레오타이드들 사이의 결합의 적어도 15%가 포스포로티오에이트 결합,
또는

상기 RNA 복합체의 센스 가닥내 리보뉴클레오타이드들 사이의 결합의 적어도 20%가 포스포로티오에이트 결합,
또는

상기 RNA 복합체의 안티센스 가닥내 리보뉴클레오타이드들 사이의 결합의 적어도 5%가 포스포로티오에이트
결합, 또는

상기 RNA 복합체의 안티센스 가닥내 리보뉴클레오타이드들 사이의 결합의 적어도 10%가 포스포로티오에이트 결
합, 또는

상기 RNA 복합체의 안티센스 가닥내 리보뉴클레오타이드들 사이의 결합의 적어도 15%가 포스포로티오에이트 결
합, 또는

상기 RNA 복합체의 안티센스 가닥내 리보뉴클레오타이드들 사이의 결합의 적어도 20%가 포스포로티오에이트 결
합인 RNA 복합체.

청구항 11

청구항 6에 있어서, 상기 RNA 복합체는 서열번호 29의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 센스 가닥 및 서열번호 30의
뉴클레오타이드 서열을 갖는 안티센스 가닥을 가지고,

상기 센스 가닥은 서열번호 29에서 5' 말단으로부터 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 및 15번째 부위가 2'-O-메틸화된
뉴클레오사이드이고, 14 내지 16번째 리보뉴클레오타이드간 결합이 포스포로티오에이트 결합이고, 3' 말단에 콜
레스테롤 모이어티가 부착된 것이며,

상기 안티센스 가닥은 서열번호 30에서 5' 말단으로부터 15 내지 21번째 부위가 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드
이고, 17 내지 21번째 리보뉴클레오타이드간 결합이 포스포로티오에이트 결합인 것인, RNA 복합체.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 RNA 복합체가 전달 비히클의 부재하에서 세포의 세포 막을 침투할 수 있는 RNA
복합체.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 RNA 복합체가 특발성 폐 섬유증을 치료하기 위한 것인 RNA 복합체.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 RNA 복합체가 제2 제제와 함께 특발성 폐 섬유증을 치료하기 위한 것이고, 상기 제2
제제는 성장 인자 억제제 및 스테로이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 RNA 복합체.

청구항 17

청구항 1에 있어서, 상기 RNA 복합체는 세포에 의한 CTGF 발현을 억제하기 위한 RNA 복합체.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 RNA 복합체는 대상체의 기도에 투여하기에 적합한 RNA 복합체.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 상기 RNA 복합체는 정맥내, 비경구, 또는 흡입 투여하기에 적합한 RNA 복합체.

청구항 20

청구항 1, 청구항 2, 청구항 5 내지 청구항 11, 및 청구항 14 내지 청구항 19 중 어느 한 항의 RNA 복합체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 특발성 폐 섬유증 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

- 청구항 35
삭제
- 청구항 36
삭제
- 청구항 37
삭제
- 청구항 38
삭제
- 청구항 39
삭제
- 청구항 40
삭제
- 청구항 41
삭제
- 청구항 42
삭제
- 청구항 43
삭제
- 청구항 44
삭제
- 청구항 45
삭제
- 청구항 46
삭제
- 청구항 47
삭제
- 청구항 48
삭제
- 청구항 49
삭제
- 청구항 50
삭제

- 청구항 51
삭제
- 청구항 52
삭제
- 청구항 53
삭제
- 청구항 54
삭제
- 청구항 55
삭제
- 청구항 56
삭제
- 청구항 57
삭제
- 청구항 58
삭제
- 청구항 59
삭제
- 청구항 60
삭제
- 청구항 61
삭제
- 청구항 62
삭제
- 청구항 63
삭제
- 청구항 64
삭제
- 청구항 65
삭제
- 청구항 66
삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 2016년 4월 11일자로 출원된 미국 가특허원 제62/320,944호에 대한 우선권의 이익을 청구한다.

배경 기술

[0003] 특발성 폐 섬유증특발성 폐 섬유증(IPF)은 폐 조직의 심각하고 진행성인 반흔(섬유증)에 의해 특징화된다. 많은 사람들이 진단 후 약 3 내지 5년만 생존하며, 사망은 주로 호흡 부전에 기인한다. 미국 및 유럽연합에서 대략 70,000명의 환자가 IPF로 고생하고 있다. 폐 이식 외에는 효과적인 치유법이 존재하지 않으며, 이는 환자의 1% 미만이 자격이 된다. 따라서, 환자에서 폐 섬유증을 효과적으로 억제하거나 감소시킬 수 있는 신규의 임상적으로 효과적인 IPF 치료제에 대해 유의적으로 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 몇 가지 성장 인자가 IPF의 발병에 관여되어 있다. 이들 성장 인자들 중에, 연결 조직 성장 인자(CTGF)는 다수의 세포 유형의 근섬유모세포로의 형질전환에 관여하는 것으로 여겨지며 중요한 항섬유성 및 전재생 치유 인자(proregenerative repair factor)를 손상시킨다. CTGF 수준은 IPF 환자의 혈장 속에서, 경기관 생검 시료 속에서, 및 기관지 폐포 세척액 속에서 증가된다.

[0005] 따라서, 특발성 폐 섬유증의 치료를 위해 CTGF를 표적화하는 신규하고 개선된 치료제가 요구되고 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 특정의 국면에서, CTGF를 표적화하고 특발성 폐 섬유증(IPF)을 표적화하고/하거나 예방하는데 유용한 RNA 복합체가 본원에 제공된다. 특정 국면에서, 이러한 RNA복합체를 포함하는 약제학적 조성물 및 이러한 RNA 복합체 및 약제학적 조성물을 사용하는 방법이 본원에 제공된다.

[0007] 특정 국면에서, CTGF mRNA 서열에 대해 상보성인 서열을 갖는 안티센스 가닥(antisense strand) 및 상기 안티센스 가닥에 대해 상보성인 서열을 갖는 센스 가닥을 포함하는 RNA 복합체가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, RNA 복합체는 세포(예컨대, 폐포 세포, 상피 세포, Hs68, HaCaT, 또는 A549 세포)에 의한 CTGF 발현을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서, RNA 복합체는 비대칭 짧은 간섭 RNA(asymmetric short interfering RNA: asiRNA)이다. 일부 구현예에서, RNA 복합체는 세포를 침투하는 비대칭 짧은 간섭 RNA(cell penetrating asymmetric short interfering RNA: cp-asiRNA)이다. 일부 구현예에서, RNA 복합체는 표 1, 표 2, 표 3, 또는 표 6에 나열

된 RNA 복합체이다.

- [0008] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 RNA 복합체는 화학적 변형을 포함하며, 여기서 변형은 전달 비히클(delivery vehicle)의 부재하에서 세포 막의 침투를 촉진한다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-O-메톡실화된 뉴클레오사이드, 포스포로티오에이트 결합 또는 소수성 모이어티(moiety)이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 RNA 복합체는 소수성 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 소수성 모이어티는 소수성 특성을 갖는 어떠한 화학적 구조일 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서 소수성 모이어티는 지질, 친지성 펩타이드 및/또는 친지성 단백질이다. 일부 구현예에서, 소수성 모이어티는 콜레스테롤, 토크페롤, 또는 탄소수 10 이상의 장쇄 지방산(예컨대, 스테아르산 또는 팔미트산)과 같은 지질이다. 일부 구현예에서, 소수성 모이어티는 콜레스테롤이다. 일부 구현예에서, RNA 복합체는 표 2, 표 3, 또는 표 6에 나열된 변형된 RNA 복합체이다. 특정의 구현예에서, RNA 복합체는 세포독성이 아니다.
- [0009] 특정의 국면에서, 기술된 바와 같은 RNA 복합체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 비경구, 정맥내, 또는 경구 전달용으로 제형화된다. 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 흡입용으로 제형화된다.
- [0010] 특정의 국면에서, 세포를 본원에 기술된 바와 같은 RNA 복합체와 접촉시킴을 포함하여, 세포(예컨대, 폐포 세포, 상피 세포, Hs68, HaCaT, 또는 A549 세포)에 의한 CTGF 발현을 억제하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0011] 특정의 국면에서, 대상체에게 본원에 제공된 RNA 복합체 또는 약제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 사람 대상체에서 CTGF의 유전자 발현을 억제하는 방법이 본원에 기술된다. 특정의 국면에서, 본원에 기술된 바와 같은 RNA 복합체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여함을 포함하여 IPF에 대해 사람 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 CTGF를 표적화하는 100개의 예시적인 asiRNA의 유전자 사일런싱 효능(gene silencing efficiency)을 나타낸다.
- 도 2는 CTGF를 표적화하는 18개의 예시적인 asiRNA의 유전자 사일런싱 효능을 나타낸다.
- 도 3은 CTGF를 표적화하는 13개의 예시적인 asiRNA의 유전자 사일런싱 효능을 나타낸다.
- 도 4는 CTGF를 표적화하는 18개의 예시적인 asiRNA의 혈청 뉴클레아제 안정성을 나타낸다.
- 도 5는 CTGF를 표적화하는 18개의 예시적인 네이키드(naked) 및 변형된 asiRNA의 유전자 사일런싱 효능을 나타낸다.
- 도 6은 예시적인 CTGF-표적화 세포 침투 asiRNA(cp-asiRNA, 또는 cp-asiCTGF)의 유전자 사일런싱 효능을 나타낸다.
- 도 7은 예시적인 cp-asiRNA에 의한 CTGF 단백질 발현의 억제를 나타낸다.
- 도 8은 Rat 피부에서 예시적인 cp-asiRNA에 의한 CTGF 단백질 발현의 억제를 나타낸다.
- 도 9는 블레오마이신 처리된 마우스(BLM-처리된 마우스)에서 CTGF를 표적화하는 cp-asiCTGF 93의 유전자 사일런싱 효능을 나타낸다.
- 도 10은 BLM-처리된 마우스에서 cp-asiCTGF 93에 의한 섬유증 관련 유전자의 억제를 나타낸다.
- 도 11은 BLM-처리된 마우스에서 cp-asiCTGF 93에 의한 섬유증 관련된 단백질의 생산의 억제를 나타낸다.
- 도 12a는 A549 세포에서 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF의 유전자 사일런싱 활성을 나타낸다.
- 도 12b는 HaCaT 세포에서 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF의 추가의 유전자 사일런싱 활성을 나타낸다.
- 도 12c는 Hs68 세포에서 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF의 유전자 사일런싱 활성을 나타낸다.
- 도 13은 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF의 표적 유전자 사일런싱 활성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 개요

- [0014] 특정의 국면에서, CTGF를 억제함으로써 IPF의 치료에 유용한 비대칭 RNA 복합체(예컨대, asiRNA 또는 cp-asiRNA)가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 복합체는 형질감염 비히클에 대한 요구없이 세포를 침투할 수 있도록 화학적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 복합체는 표 1, 표 2, 표 3, 또는 표 6에 나열된 RNA 복합체이다. 특정의 국면에서, 이러한 RNA 복합체를 포함하는 약제학적 조성물 및 이러한 RNA 복합체 및 약제학적 조성물을 사용하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0015] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 RNA 복합체는 asiRNA 또는 cp-siRNA이다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 asiRNA는 19-21의 nt의 안티센스 가닥 및 13-17의 nt의 센스 가닥을 갖는 이중 가닥 비대칭 짧은 간섭 RNA 분자를 지칭한다. asiRNA에 대한 추가의 정보는 이의 전문이 각각 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공보 제 2012/0238017호 및 Chang 등, Mol. Ther. 17:725-732 (2009)에서 찾을 수 있다.
- [0016] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 RNA 복합체는 리포솜, 양이온성 중합체, 세포 침투 펩타이드(CPP), 단백질 형질도입 도메인(PTD), 항체 및/또는 아프타머와 같은 전달 비히클을 사용하여 세포로 전달된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 RNA 복합체는 세포내에서 CTGF 억제를 매개하기 위해 이러한 전달 비히클의 사용을 필요로 하지 않도록 화학적으로 변형된다. 이러한 RNA 복합체는 본원에서 세포-침투 asiRNA(cp-asiRNA)로 지칭된다.
- [0017] 정의
- [0018] 편의를 위해, 본 명세서, 실시예, 및 첨부된 청구범위에 사용된 특정 용어들을 여기에 총칭한다.
- [0019] 관사("a" 및 "an")는 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)의 관사의 문법적 대상을 지칭한다. 예로서, "성분"은 하나의 성분 또는 하나 이상의 성분을 의미한다.
- [0020] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "투여하는"은 약제학적 제제 또는 조성물을 대상체에게 제공함을 의미하며, 의학 전문의에 의한 투여 및 자가-투여를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0021] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "간섭하는 핵산" 및 "억제하는 핵산"은 상호교환적으로 사용된다. 간섭하는 핵산은 일반적으로 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍화에 의해 핵산(전형적으로 RNA)내 표적 서열에 염기-쌍화 모이어티가 하이브리드화하여 표적 서열 내에서 핵산:올리고머 헤테로듀플렉스(heteroduplex)를 형성하도록 하는 소단위간 연결에 의해 연결된, 염기-쌍화 모이어티를 각각 지닌, 사이클릭 소단위의 서열을 포함한다. 간섭하는 RNA 분자는 안티센스 분자, siRNA 분자, asiRNA 분자, cp-asiRNA 분자, 단일-가닥 siRNA 분자, miRNA 분자 및 shRNA 분자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 간섭하는 핵산은 mRNA의 해독을 차단하거나 억제하거나, 프레(pre)-mRNA 스플라이스 프로세싱을 억제하거나, 표적화된 mRNA의 분해를 유도하도록 설계될 수 있으며, 이것이 하이브리드화하는 표적 서열에 "대해 지시된다" 또는 "에 대해 표적화된다"로 일컬어질 수 있다. 간섭하는 핵산은 예를 들면, 펩타이드 핵산(PNA), 록킹된 핵산(locked nucleic acid: LNA), 2'-O-메틸올리고뉴클레오타이드 및 RNA 간섭제(interference agent)(siRNA 제제)를 포함할 수 있다. RNAi 분자는 일반적으로 선택적으로 분해되거나 "녹 다운(knocked down)" 됨으로써 표적 RNA를 불활성화시키는, 표적 분자와 헤테로듀플렉스를 형성함으로써 작용한다. 일부 조건하에서, 간섭하는 RNA 분자는 또한 전사 해독을 억압하고/하거나 전사체의 전사를 억제함으로써 표적 전사체를 불활성화시킬 수 있다. 간섭하는 핵산은 위에서 기술한 방식으로 표적의 핵산에 대해 표적화되는 경우, 보다 일반적으로 단백질과 같은 생물학적으로 관련된 표적에 "대해 표적화된다"고 일컬어진다.
- [0022] 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "핵산"은 상호교환적으로 사용된다. 이들은 어떠한 조합 및 어떠한 길이에서도 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 또는 이의 유사체에 상관없이, 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 말한다. 폴리뉴클레오타이드는 어떠한 3차원 구조도 가질 수 있으며, 어떠한 작용도 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오타이드의 비-제한적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 암호화 또는 비-암호화 영역, 연결 분석으로부터 정의된 유전자자리(들), 엑손, 인트론, 전령(messenger) RNA(mRNA), 전달(transfer) RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 측쇄된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 어떠한 서열의 분리된 DNA, 어떠한 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 표지 성분과의 접합에 의해서와 같이 추가로 변형될 수 있다. 본원에 제공된 모든 핵산 서열에서, U 핵염기는 T 핵염기로 상호교환될 수 있다.
- [0023] 본원에 사용된 바와 같은 어구 "약제학적으로 허용되는 담체"는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 또는

용매 캡슐화 물질(solvent encapsulating material)과 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다.

- [0024] 올리고머가 45℃보다 실질적으로 더 높거나 적어도 50℃, 또는 적어도 60℃ 내지 80℃ 이상인 T_m을 갖는 생리학적 조건 하에서 표적에 대하여 하이브리드화하는 경우 올리고뉴클레오타이드는 표적 폴리뉴클레오타이드에 "특이적으로 하이브리드화한다". 이러한 하이브리드화는 엄격한(stringent) 하이브리드화 조건에 상응한다. 제공된 이온 강도 및 pH에서, T_m은 표적 서열의 50%가 상보성 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 온도이다. 다시, 이러한 하이브리드화는 표적 서열에 대해 안티센스 올리고머의 "거의(near)" 또는 "실질적인" 상보성으로 및 정확한 상보성으로 일어날 수 있다.
- [0025] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "대상체"는 치료 또는 치료요법을 위해 선택된 사람 또는 비-사람 동물을 의미한다.
- [0026] 본원에 사용된 바와 같은, 어구 "치료학적 유효량" 및 "유효량"은 어떠한 의학적 치료에도 적용가능한 충분한 이익/위험 비로 대상체에서 세포의 적어도 소-집단에서 바람직한 치료학적 효과를 생환하기에 효과적인 제제의 양을 의미한다.
- [0027] 대상체에서 질환을 "치료하는" 또는 질환을 가진 대상체를 "치료하는"은 대상체를 약제학적 치료, 예컨대, 약물의 투여에 적용시킴으로써 질환의 적어도 하나의 증상이 감소되거나 악화되는 것으로부터 예방되는 것을 지칭한다.
- [0028] 본원에 사용된 바와 같은, 질환 또는 상태를 "예방하는" 치료제는 질환 또는 상태의 발병 전에 통계적 샘플에 투여하는 경우, 치료되지 않은 샘플에 대해 치료된 샘플에서 질환 또는 상태의 발생을 감소시키거나, 치료되지 않은 대조군 샘플에 대해 질환 또는 상태의 하나 이상의 증상의 발병을 지연시키거나 중증도(severity)를 감소시키는 화합물을 지칭한다.
- [0029] RNA 복합체
- [0030] 특정의 국면에서, 각각 CTGF mRNA를 표적화하고 세포에 의해 CTGF 발현을 억제하는 RNA 복합체가 본원에 제공된다. 사람 CTGF cDNA의 핵산 서열은 하기 제공된다.
- [0031] 사람 CTGF mRNA 서열(NM_001901.2)

[0032] 호모 사피엔스(Homo sapiens) 연결 조직 성장 인자(CTGF), mRNA

```

1   aaactcacac aacaactctt ccccgctgag aggagacagc cagtgcgact ccacccctcca
61  gctcgacggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gtcccgggtcc
121 ccacctccga ccaccgccag cgtccaggc cccgcgctc cccgctcgcc gccaccggcgc
181 cctccgctcc gcccgcagtg ccaacctatg ccgcccagc tatgggcccc gtccgctgctg
241 ccttcgtggg cctcctcgcc ctctgcagcc ggccggccgt cggccagaac tgcagcggggc
301 cgtgccggtg cccggacgag ccggcgccgc gctgcccgcc gggcgtgagc ctctgtctgg
361 acggctgctg ctgctgcccg gtctgcgcca agcagctggg cgagctgtgc accgagcgcg
421 acccctgcga cccgcacaag ggctcttct gtgacttcgg ctccccggcc aaccgcaaga
481 tcggcgctgt caccgccaaa gatggtgctc cctgcatctt cgggtgtacg gtgtaccgca
541 gcggagagtc cttccagagc agctgcaagt accagtgcac gtgectggac ggggcgggtgg
601 gctgcatgcc cctgtgcagc atggacgttc gtctgccagc ccctgactgc ccctccccga
661 ggagggtcaa gctgccggg aaatgctgcg aggagtgggt gtgtgacgag cccaaggacc
721 aaaccgtggt tgggctgccc ctgcggctt accgactgga agacacgttt ggcccagacc
781 caactatgat tagagccaac tgctgtgccc agaccacaga gtggagcgc tgttccaaga
841 cctgtgggat ggcacatccc acccgggtta ccaatgacaa ccctcctgc aggcctagaga
901 agcagagccc cctgtgcatg gtcaggcctt gcgaagctga cctggaagag aacattaaga
961 agggcaaaaa gtgcatccgt actccccaaa tctccaagcc tatcaagttt gagctttctg
1021 gctgaccag catgaagaca taccgagcta aattctgtgg agtatgtacc gacggccgat
1081 gctgacccc ccacagaacc accaccctgc cgggtggagt caagtgcctt gacggcggag
1141 tcatgaagaa gaacatgatg tcatcaaga cctgtgctcg ccattacaac tgtcccggag
1201 acaatgacat ctttgaatcg ctgtactaca ggaagatgta cggagacatg gcatgaagcc
1261 agagagttag agacattaac tcattagact ggaactttaa ctgattcaca tctcatTTTT
1321 ccgtaaaaaa gatttcagta gcacaagtta tttaaatctg tttttctaac tgggggaaaa
1381 gattcccacc caattcaaaa cattgtgcca tgtcaacaa atagtctatc aaccaccagc
1441 actggtttga agaattgttaa gacttgacag tggaaacta ttagtacaca gcaccagaat
1501 gtatattaag gtgtggcttt aggagcagtg ggagggtacc agcagaaagg ttagtatcat
1561 cagatagcat cttatacgag taatatgcct gctatTTGaa gtgtaattga gaaggaaaat
1621 tttagcgtgc tcactgacct gcctgtagcc ccagtgcagc ctaggatgtg cattctccag
1681 ccatacaagag actgagtcac gttgttcctt aagtcagaac agcagactca gctctgacat
1741 tctgattcga atgacactgt tcaggaatcg gaatcctgtc gattagactg gacagcttgt
1801 ggcaagtgaa tttgcctgta acaagccaga ttttttaaaa tttatattgt aaatatgtg
1861 tgtgtgtgtg tgtgtgtata tatatatata tgtacagtta tctaagttaa tttaaagtgt
1921 tttgtgcctt tttatTTTTg tttttaatgc tttgatattt caatgttagc ctcaattctt
1981 gaacaccata ggtagaatgt aaagcttgtc tgatcgttca aagcatgaaa tggatactta
2041 tatggaaatt ctgctcagat agaatgacag tccgtcaaaa cagattgttt gcaaagggga
2101 ggcacagtg tccttggcag gctgatttct aggtaggaaa tgtggtagcc tcacttttaa
2161 tgaacaaatg gcctttatta aaaactgagt gactctatat agctgatcag ttttttcacc
2221 tggaaagcatt tgtttctact ttgatatgac tgtttttcgg acagtttatt tgttgagagt
2281 gtgacaaaaa gttacatggt tgcaccttct tagttgaaaa taaagtgtat attttttcta
2341 taaaaaaaaa aaaaaaaaa

```

[0033]

[0034]

특정의 국면에서, CTGF mRNA 서열(예컨대, 사람 CTGF mRNA 서열)에 대해 서열 상보성을 지닌 안티센스 가닥 및 안티센스 가닥에 대해 서열 상보성을 갖는 센스 가닥을 포함하는 RNA 복합체가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, RNA 복합체는 세포(예컨대, 폐포 세포, 상피 세포, Hs68, HaCaT, 또는 A549 세포)에 의한 CTGF 발현을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서, RNA 복합체는 비대칭 짧은 간섭 RNA(asiRNA)이다. 일부 구현예에서, RNA 복합체는 표 1, 표 2, 표 3, 또는 표 6에 나열된 RNA 복합체이다. 본원에 기술된 RNA 복합체는 RNA 염기, 비-RNA 염기 또는 RNA 염기와 비-RNA 염기의 혼합물을 함유할 수 있다. 예를 들면, 본원에 제공된 특정의 RNA 복합체는 주로 RNA 염기로 구성될 수 있지만 DNA 염기 또는 비-천연적으로 존재하는 뉴클레오타이드도 함유할 수 있다.

[0035]

일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 적어도 19개의 뉴클레오타이드(nt)이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 19 내지 21개의 nt(즉, 길이가 19, 20 또는 21개의 nt)이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 적어도 21개 뉴클레오타이드(nt)이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 21 내지 31개의 nt(즉, 길이가 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31개의 nt)이다. 일부 구현예에서, 적어도 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31개의 nt의 안티센스 가닥이 CTGF mRNA 서열에 대해 상보성이다. 완벽한 상보성은 필수적이지 않다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 CTGF mRNA 서열에 대해 완벽히 상보성이다.

[0036]

일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 적어도 24개의 nt(예컨대, 길이가 적어도 25개의 nt, 길이가 적어도

26개의 nt, 길이가 적어도 27개의 nt, 길이가 적어도 28개의 nt, 길이가 적어도 29개의 nt, 길이가 적어도 30개의 nt, 길이가 적어도 31개의 nt)이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 124개의 nt 이하(예컨대, 길이가 100개의 nt 이하, 길이가 90개의 nt 이하, 길이가 80개의 nt 이하, 길이가 70개의 nt 이하, 길이가 60개의 nt 이하, 길이가 50개의 nt 이하, 길이가 40개의 nt 이하)이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 21개의 nt이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 23개의 nt이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 25개의 nt이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 27개의 nt이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 29개의 nt이다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 길이가 31개의 nt이다. 일부 구현예에서, 적어도 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 29, 30 또는 31개의 nt의 안티센스 가닥이 CTGF mRNA 서열에 대해 상보성이다. 완벽한 상보성은 필수적이지 않다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥은 CTGF mRNA 서열에 대해 완벽히 상보성이다.

- [0037] 일부 구현예에서, 센스 가닥은 길이가 15 내지 17개의 nt(즉, 길이가 15개의 nt, 길이가 16개의 nt, 길이가 17개의 nt)이다. 일부 구현예에서, 적어도 15개의 nt, 적어도 16개의 nt 또는 적어도 17개의 nt의 센스 가닥이 안티센스 가닥의 서열에 대해 상보성이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 안티센스 가닥의 서열에 대해 완벽히 상보성이다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 길이가 16개의 nt이다.
- [0038] 일부 구현예에서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 복합체를 형성하며, 여기서 안티센스 가닥의 5' 말단 및 센스 가닥의 3' 말단은 평할 말단을 형성한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 복합체를 형성하고, 여기서 안티센스 가닥의 5' 말단은 센스 가닥의 3' 말단(예컨대, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 nt까지)에서 돌출(overhang)되어 있다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 복합체를 형성하고, 여기서 센스 가닥의 5' 말단은 안티센스 가닥의 3' 말단(예컨대, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 nt까지)에 돌출되어 있다.
- [0039] 일부 구현예에서, RNA 복합체의 안티센스 가닥 및/또는 센스 가닥은 표 1, 표 2, 표 3, 또는 표 6에 나열된 서열로부터 선택된 센스 가닥 서열 및/또는 안티센스 가닥 서열을 갖는다.
- [0040] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 RNA 복합체는 화학적 변형을 포함하며, 여기서 변형은 전달 비히클의 부재하에서 세포 막의 침투를 촉진한다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드, 포스포로티오에이트 결합 또는 소수성 모이어티이다. 일부 구현예에서, 화학적 변형은 소수성 모이어티이다. 일부 구현예에서, 소수성 모이어티는 콜레스테롤 모이어티이다. 일부 구현예에서, RNA 복합체는 표 2, 표 3, 또는 표 6에 나열된 변형된 RNA 복합체이다. 특정의 구현예에서, RNA 복합체는 세포독성이 아니다.
- [0041] 본원에 기술된 RNA 복합체는 다양한 올리고뉴클레오타이드 화학을 사용할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 화학의 예는 펩타이드 핵산(PNA), 연결된 핵산(LNA), 포스포로티오에이트, 2'-O-Me-변형된 올리고뉴클레오타이드, 및 이들 중 어느 것의 조합을 포함하는, 모르폴리노 화학을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일반적으로, PNA 화학은 2'-O-Me 올리고뉴클레오타이드에 대해 이들의 비교적 높은 표적 결합 강도로 인하여 보다 짧은 표적화 서열을 이용할 수 있다. 포스포로티오에이트 및 2'-O-Me-변형된 화학은 흔히 조합하여 포스포로티오에이트 골격을 갖는 2'-O-Me-변형된 올리고뉴클레오타이드를 생성한다. 예컨대, 이들 각각의 전문이 본원에 참고로 포함된 PCT 공보 제WO/2013/112053호 및 제WO/2009/008725호를 참고한다.
- [0042] 펩타이드 핵산(PNA)은 DNA의 유사체이며, 여기서 골격은 피리미딘 또는 푸린 염기가 부착된 N-(2-아미노에틸)글리신 단위로 이루어진, 테옥시리보스 골격을 지닌 구조적으로 이체동형(homomorphous)이다. 천연 피리미딘 및 푸린 염기를 함유하는 PNA는 왓슨-크릭 염기-쌍화 법칙에 따라 상보성 올리고뉴클레오타이드, 및 염기쌍 인식의 측면에서 모사체(mimic) DNA에 하이브리드화한다. PNA의 골격은 포스포디에스테르 골격보다는 펩타이드 골격에 의해 형성됨으로서, 이들이 안티센스 적용(하기 구조 참고)에 잘-맞도록 한다. 골격은 하전되어 있지 않아, 일반적인 열 안정성보다 더 높은 열 안정성을 나타내는 PNA/DNA 또는 PNA/RNA 듀플렉스(duplex)를 생성한다. PNA는 뉴클레아제 및 프로테아제에 의해 인지되지 않는다.
- [0043] 천연 구조에 대한 라디칼 구조적 변화에도 불구하고, PNA는 DNA 또는 RNA에 대해 나선 형태로 서열-특이적인 결합을 할 수 있다. PNA의 특징은 상보성 DNA 또는 RNA에 대한 높은 결합 친화성, 단일-염기 미스매치(mismatch)에 의해 유발된 탈안정화 효과, 뉴클레아제 및 프로테아제에 대한 내성, 염 농도와는 별도의 DNA 또는 RNA와의 하이브리드화 및 호모푸린 DNA와의 트리플렉스(triplex) 형성이다. PANAGENE.TM.은 이의 고유의 Bts PNA 단량체(Bts; 벤조티아졸-2-설포닐 그룹) 및 고유의 올리고머화 공정을 개발하였다. Bts PNA 단량체를 사용한 PNA 올리고머화는 탈보호, 커플링 및 캡핑(capping)의 반복된 주기로 구성된다. PNA는 당해 분야에 공지된 어떠한 기술을 사용하여서도 합성적으로 생산할 수 있다. 예컨대, 미국 특허 제6,969,766호, 제7,211,668호, 제7,022,851호, 제7,125,994호, 제7,145,006호 및 제7,179,896호를 참고한다. 또한 PNA의 제조에 대해서는 미

국 특허 제5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호를 참고한다. PNA 화합물에 대한 추가의 교시는 Nielsen 등, Science, 254: 1497-1500, 1991에서 찾을 수 있다. 이들 각각은 이들의 전문이 참고로 포함된다.

[0044] 간섭하는 핵산은 또한 "록킹된 핵산" 소단위(LNA)를 함유할 수 있다. "LNA"는 브릿지된 핵산(BNA)으로 불리는 변형의 부류의 구성원이다. BNA는 C3-엔도(노던: northern) 당 푸커(pucker)내 리보스 환의 형태를 록킹하는 공유 결합을 특징으로 한다. LNA의 경우, 브릿지는 2'-O 위치와 4'-C 위치 사이의 메틸렌으로 구성된다. LNA는 골격 예비조직화 및 염기 스택킹(base stacking)을 향상시켜 하이브리드화 및 열 안정성을 증가시킨다.

[0045] LNA의 구조는 예를 들면, Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54:3607, and Accounts of Chem. Research (1999) 32:301; Obika, 등, Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; (1998) 39:5401, 및 Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230에서 찾을 수 있다. 본원에 제공된 화합물은 하나 이상의 LNA를 포함할 수 있으며; 일부 경우에, 화합물은 전체적으로 LNA로 구성될 수 있다. 개개 LNA 뉴클레오사이드 소단위의 합성 방법 및 올리고뉴클레오타이드 내로의 이들의 혼입은 예를 들면, 미국 특허 제 7,572,582호, 제7,569,575호, 제7,084,125호, 제7,060,809호, 제7,053,207호, 제7,034,133호, 제6,794,499호, 및 제6,670,461호에 기술되어 있으며, 이들 각각은 이의 전문이 참고로 포함된다. 대표적인 소단위간 링커는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 모이어티; 대안적으로 비-인 함유 링커를 포함할 수 있다. 일 구현예는 LNA-함유 화합물이며, 여기서 각각의 LNA 소단위는 DNA 소단위에 의해 분리된다. 특정 화합물은 교호하는 LNA 및 DNA 소단위로 구성되며, 여기서 소단위간 링커는 포스포로티오에이트이다.

[0046] 특정의 구현예에서, RNA 복합체는 콜레스테롤 모이어티에 연결된다. 일부 구현예에서, 콜레스테롤 모이어티는 센스 가닥의 3' 말단에 부착된다. 일부 구현예에서, 콜레스테롤 모이어티는 안티센스 가닥의 3' 말단에 부착된다.. 일부 구현예에서, 콜레스테롤 모이어티는 센스 가닥의 5' 말단에 부착된다. 일부 구현예에서, 콜레스테롤 모이어티는 안티센스 가닥의 5' 말단에 부착된다.

[0047] 일부 구현예에서, RNA 복합체는 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드를 포함한다. 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드는 리보스 분자의 2'-OH 잔기에서 메틸 그룹을 수반한다. 2'-O-Me-RNA는 RNA와 동일한(또는 유사한) 거동을 나타내지만, 뉴클레아제 분해에 대해 보호된다. 2'-O-Me-RNA는 또한 추가의 안정화를 위해 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드(PTO)와 조합될 수 있다. 2'-O-Me-RNA(포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트)는 당해 분야의 통상의 기술에 따라 합성될 수 있다(참고: 예컨대, Yoo et al., Nucleic Acids Res. 32:2008-16, 2004, 이는 참고로 본원에 포함된다).

[0048] 일부 구현예에서, 2'-O-메틸 뉴클레오사이드는 센스 가닥에 위치한다. 일부 구현예에서, 2'-O-메틸 뉴클레오사이드는 센스 가닥의 3' 말단에 위치한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 다수의 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드(예컨대, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드)를 포함한다. 일부 구현예에서, 2'-O-메틸 뉴클레오사이드는 안티센스 가닥의 3' 말단에 위치한다. 일부 구현예에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 영역은 다수의 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드(예컨대, 3' 말단의 6개의 뉴클레오사이드 내 2, 3, 4, 5 또는 6개의 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드)를 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 3' 말단 둘 다는 다수의 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 변형되지 않은 뉴클레오사이드와 교호하는 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 센스 가닥은 변형되지 않은 뉴클레오사이드와 교호하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드의 연속된 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 안티-센스 가닥은 변형되지 않은 뉴클레오사이드와 교호하는 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 안티-센스 가닥은 변형되지 않은 뉴클레오사이드와 교호하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 2'-O-메틸화된 뉴클레오사이드이 연속된 서열을 포함한다.

[0049] 일부 구현예에서, RNA 복합체는 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. "포스포로티오에이트"(또는 S-올리고)는 정상 DNA의 변이체이며, 여기서 브릿지되지 않은 산소 중 하나는 황으로 대체된다. 뉴클레오사이드간 결합의 황화는 5' 내지 3' 및 3' 내지 5' DNA POL 1 엑소뉴클레아제, 뉴클레아제 SI 및 PI, RNase, 혈청 뉴클레아제 및 뱀독 포스포디에스테라제를 포함하는 엔도- 및 엑소뉴클레아제의 작용을 감소시킨다. 포스포로티오에이트는 2개의 기본 경로: 포스포산 수소에서 이황화탄소 중 황 성분의 용액의 작용에 의해, 또는 포스포이트 트리에스테르를 테트라에틸티우람 디설파이드(TETD) 또는 3H-1,2-벤조디티올-3-온 1,1-디옥사이드(DBTD)로 황화시키는 방법에 의해 제조된다(참고: 예컨대, Iyer et al., J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990). 후자의 방법은 대부분의 유기 용매 속에서 황 원소의 불용성 및 이황화탄소의 독성의 문제를 피한다. TETD 및 BDTD 방법은 또한 보다 높은 순도의 포스포로티오에이트를 수득한다.

[0050] 일부 구현예에서, RNA 복합체의 센스 가닥 속의 리보뉴클레오타이드 사이의 결합 중 적어도 1%, 5%, 10%, 15%,

20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%는 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 구현예에서, RNA 복합체의 센스 가닥 속의 리보뉴클레오타이드 사이의 결합 모두는 포스포로티오에이트 결합이다.

- [0051] 일부 구현예에서, RNA 복합체의 안티센스 가닥 속의 리보뉴클레오타이드 사이의 결합의 적어도 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%는 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 구현예에서, RNA 복합체의 안티센스 가닥 속의 리보뉴클레오타이드 사이의 결합 모두는 포스포로티오에이트 결합이다.
- [0052] 본원에 기술된 RNA 복합체는 세포와 접촉될 수 있거나 유기체(예컨대, 사람)에게 투여된다. 또한, RNA 복합체를 암호화하는 작제물 및/또는 백터는 세포 또는 유기체와 접촉하거나 이 속에 도입될 수 있다. 특정의 구현예에서, 바이러스, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 백터가 사용된다.
- [0053] 본원에 기술된 RNA 복합체는 당해 분야에 공지된 어떠한 적절한 방법에 의해서도 제조될 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 본원에 기술된 RNA 복합체는 화학 합성 또는 시험관내 전사에 의해 제조된다.
- [0054] 특정의 국면에서, 본원에 기술된 RNA 복합체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 특정의 구현예에서, 약제학적 조성물은 폐로 전달하기 위해 제형화된다(예컨대, 흡입기로서). 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 전달용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 IPF의 치료를 위한 제2 제제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 제제는 성장 인자 억제제이다. 성장 인자 억제제의 예는 닌테다닙, 피르페니돈, 게피티닙, 에를로티닙, 라파티닙, 세특시맙, 만티우무맙, 오시메르티닙, 네시투무맙, 및 반데타닙을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 제제는 스테로이드이다. 스테로이드의 예는 하이드로코르티손, 플루티카손, 무데소니드, 모메타손, 베클로메타손, 시클레소니드, 플루니솔리드 코르티손, 및 프레드니손을 포함한다. 2개 이상의 성장 인자 억제제 및/또는 스테로이드가 약제학적 조성물과 함께 이 속에 취해질 수 있다.
- [0055] 특정의 구현예에서, 약제학적 조성물은 형질감염 비히클을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 전달 비히클(예컨대, 리포솜, 양이온성 중합체, 세포 침투성 펩타이드(CPP), 단백질 형질도입 도메인(PTD), 항체 및/또는 아프타머)을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 다수(예컨대, 2개 이상)의 본원에 기술된 RNA 복합체의 조합을 포함한다.
- [0056] 이들 제형 또는 조성물을 제조하는 방법은 본원에 기술된 RNA 복합체와 담체 및, 임의로, 하나 이상의 보조 성분을 회합(association)시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 본원에 기술된 제제와 액체 담체를 균일하게 및 친밀하게 연합시켜 제조한다.
- [0057] 치료 방법
- [0058] 특정의 국면에서, 세포를 본원에 기술된 바와 같은 RNA 복합체와 접촉시킴을 포함하여, 세포에 의한 CTGF 발현을 억제하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, RNA 복합체는 변형된 RNA 복합체이고 세포는 형질감염 비히클의 부재하에서 RNA 복합체와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 전달 비히클(예컨대, 리포솜, 양이온성 중합체, 세포 침투 펩타이드(CPP), 단백질 형질도입 도메인(PTD), 항체 및/또는 아프타머(aptamer))의 존재하에서 RNA 복합체와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 사람 대상체의 기도에 존재한다. 일부 구현예에서, 대상체는 IPF를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 여성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 남성이다.
- [0059] 특정의 국면에서, 대상체에게 본원에 기술된 바와 같은 RNA 복합체 또는 약제학적 조성물을 투여함을 포함하여, IPF에 대하여 사람 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 특정의 구현예에서, RNA 복합체 또는 약제학적 조성물은 대상체의 기도에 투여된다. 일부 구현예에서, RNA 복합체 또는 약제학적 조성물은 대상체에 의해 자가-투여된다.
- [0060] 본 방법에서, 본원에 기술된 RNA 복합체는 예를 들면, 전달 비히클(예컨대 cp-asiRNA) 없이 핵산으로서, 전달 시약과 함께, 및/또는 본원에 기술된 RNA 복합체를 발현하는 서열을 포함하는 핵산으로서 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 당해 분야에 공지된 어떠한 핵산 전달 방법도 본원에 기술된 방법에 사용될 수 있다. 적합한 전달 시약은 예컨대, Mirus Transit TKO 친지성 시약; 리포펙틴; 리포펙타민; 셀펙틴; 다가양이온(예컨대, 폴리라이신), 아텔로콜라겐, 나노플렉스(nanoplex) 및 리포솜을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 핵산 분자에 대한 전달 비히클로서 아텔로콜라겐의 사용은 Minakuchi et al. *Nucleic Acids Res.*, 32(13):e109 (2004); Hanai et al. *Ann NY Acad Sci.*, 1082:9-17 (2006); 및 Kawata et al. *Mol Cancer Ther.*, 7(9):2904-12 (2008)에 기술되어 있고; 이들 각각은 이들의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 예시적인 간섭하는 핵산 전달

시스템은 미국 특허 제8,283,461호, 제8,313,772호, 제8,501,930호, 제8,426,554호, 제8,268,798호 및 제8,324,366호에 기술되어 있으며, 이들 각각은 이들의 전문이 참고로 본원에 포함된다.

- [0061] 본원에 기술된 방법의 일부 구현예에서, 리포솜을 사용하여 본원에 기술된 RNA 복합체를 대상체에게 전달한다. 본원에 기술된 방법에서 사용하기에 적합한 리포솜은 일반적으로 중성 또는 음성으로 하전된 인지질 및 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함하는, 표준 소포(vesicle)-형성 지질로부터 형성될 수 있다. 지질의 선택은 일반적으로 바람직한 리포솜 크기 및 혈류 속에서 리포솜의 반감기와 같은 인자를 고려하여 안내된다. 다양한 방법이 예를 들면, Szoka et al. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467; 및 미국 특허 제4,235,871호, 제4,501,728호, 제4,837,028호, 및 제5,019,369호에 기술된 바와 같이, 리포솜을 제조하기 위해 공지되어 있으며, 이들의 전체 개시내용은 참고로 본원에 포함된다.
- [0062] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 리포솜은 또한 변형시켜 단핵 대식구 시스템("MMS") 및 세망내피계 시스템("RES")에 의한 청소를 피할 수 있다. 이러한 변형된 리포솜은 표면에서 옹소닌화-억제 모이어티(opsonization-inhibition moiety)를 갖거나 리포솜 구조내로 포함된다.
- [0063] 본원에 기술된 리포솜을 제조하는데 사용하기 위한 옹소닌화-억제 모이어티는 리포솜 막에 결합된 전형적으로 큰 친수성 중합체이다. 본원에 사용된 바와 같은, 옹소닌화 억제 모이어티는 예컨대, 지질-가용성 앵커(anchor)의 막 자체내로의 삽입(intercalation)에 의해, 또는 막 지질의 활성 그룹으로의 직접 결합에 의해, 막에 화학적으로 또는 물리적으로 부착되는 경우, 리포솜 막에 "결합"된다. 이들 옹소닌화-억제 친수성 중합체는 예컨대, 이의 전체 개시내용이 참고로 본원에 포함된, 미국 특허 제4,920,016호에 기술된 바와 같이, MMS 및 RES에 의한 리포솜의 흡수를 유의적으로 감소시키는 보호성 표면 층을 형성한다.
- [0064] 일부 구현예에서, 리포솜을 변형시키는데 적합한 옹소닌화 억제 모이어티는 수 평균 분자량이 약 500 내지 약 40,000 달톤(dalton), 또는 약 2,000 내지 약 20,000 달톤인 수-용성 중합체이다. 이러한 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리프로필렌 글리콜(PPG) 유도체; 예컨대, 메톡시 PEG 또는 PPG, 및 PEG 또는 PPG 스테아레이트; 폴리아크릴아미드 또는 폴리 N-비닐 피롤리돈과 같은 합성 중합체; 선형, 측쇄 또는 덴드리머성 폴리아미도아민; 폴리아크릴산; 다가알코올, 예컨대, 카복실 또는 아미노 그룹이 화학적으로 연결된 폴리비닐알코올 및 폴리크실리톨, 및 강글리오사이드 GM1과 같은 강글리오사이드를 포함한다. PEG의 중합체, 메톡시 PEG, 또는 메톡시 PPG, 또는 이의 유도체가 또한 적합하다. 또한, 옹소닌화 억제 중합체는 PEG의 블록 공중합체(block copolymer) 및 폴리아미노산, 다당류, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌아민, 또는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 옹소닌화 억제 중합체는 또한 아미노산 또는 카복실산, 예컨대, 갈락투론산, 글루쿠론산, 만누론산, 하이알루론산, 펙트산, 뉴라민산, 알긴산, 카라기난을 함유하는 천연 다당류; 아민화된 다당류 또는 올리고사카라이드(직쇄 또는 측쇄); 또는 예컨대, 카복실성 그룹의 수득되는 연결을 지닌 카본산의 유도체와 반응된 카복실화된 다당류 또는 올리고사카라이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 옹소닌화-억제 모이어티는 PEG, PPG, 또는 이의 유도체이다. PEG 또는 PEG-유도체로 변형된 리포솜은 때때로 "폐길화된 리포솜(PEGylated liposome)"으로 불린다.
- [0065] 본원에 개시된 약제학적 조성물은 어떠한 적합한 투여 경로에 의해, 흡입을 통해, 경구적으로, 및 비경구적으로 전달될 수 있다. 특정의 구현예에서, 약제학적 조성물은 전신적으로(예컨대, 경구 또는 비경구 투여를 통해) 전달된다. 특정의 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 흡입을 통해 폐내로 국소 전달된다.
- [0066] 약제학적 조성물 속의 RNA 복합체의 실제 투여량 수준을 변화시켜 환자에게 독성이지 않으면서, 특수한 환자, 조성물, 및 투여 방식을 위한 바람직한 치료학적 반응을 달성하는데 효과적인 양의 RNA 복합체를 수득할 수 있다.
- [0067] 선택된 투여량 수준은 사용된 특수 제제의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특수 화합물의 배출 또는 물질대사율, 치료 기간, 사용된 특수 화합물과 함께 사용된 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 사전 의학 병력, 및 의학 분야에 잘 공지된 유사 인자를 포함하는 다양한 인자에 의존할 것이다.
- [0068] 당해 분야에 통상의 기술을 가진 주치의는 필요한 약제학적 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들면, 주치의 또는 수의사는 바람직한 치료 효과를 달성하기 위하여 요구되는 것보다 더 적은 수준으로 약제학적 조성물 속에 사용된 제제의 용량을 처방하고/하거나 투여할 수 있으며 바람직한 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다.
- [0069] 일반적으로, 본원에 기술된 RNA 복합체의 적합한 1일 용량은 치료학적 효과를 생성하는데 효과적인 최저 용량인 RNA 복합체의 양일 것이다. 이러한 유효 용량은 일반적으로 상기 기술된 인자에 의존할 것이다.

[0070] 실시예

[0071] 실시예 1: CTGF-특이적인 비대칭의 작은 간섭하는 RNA에 대한 스크리닝

[0072] 연결 조직 성장 인자(CTGF)를 억제하는 비대칭의 작은 간섭하는 RNA(asiRNA)를 확인하기 위하여, 100개의 asiRNA를 합성하고 스크리닝하였다. 예시적인 asiRNA의 핵산 서열은 표 1에 제공된다.

[0073] 표 1 예시적인 CTGF-표적화 asiRNA에 대한 핵산 서열.

서열
1CTGF S: 5'-CAUAGGUAGAAUGUAA -3'
1CTGF AS: 5'-UUACAUUCUACCUAUGGUGUU -3'
2CTGF S: 5'-UAUAGCUGAUCAGUUU -3'
2CTGF AS: 5'-AAACUGAUCAGCUAUAUAGAG -3'
3CTGF S: 5'-CCAGCAUGAAGACAUA -3'

[0074]

3CTGF AS: 5'-UAUGUCUUCAUGCUGGUGCAG -3'
4CTGF S: 5'-CCAGAAUGUAUAUUA -3'
4CTGF AS: 5'-UUAAUAUACAUUCUGGUGCUG -3'
5CTGF S: 5'-CAAUUGGCCUUUAUUA -3'
5CTGF AS: 5'-UAAUAAAGGCCAUUUGUUCAU -3'
6CTGF S: 5'-GACAUACCGAGCUAAA -3'
6CTGF AS: 5'-UUUAGCUCGGUAUGUCUUCAU -3'
7CTGF S: 5'-UCAAGUUGUCCUUA -3'
7CTGF AS: 5'-UUAAGGAACAACUUGACUCAG -3'
8CTGF S: 5'-AAGACAUACCGAGCUA -3'
8CTGF AS: 5'-UAGCUCGGUAUGUCUUCAUGC -3'
9CTGF S: 5'-ACCAGCAGAAAGGUUA -3'
9CTGF AS: 5'-UAACCUUCUGCUGGUACCCU -3'
10CTGF S: 5'-UAAUUGAGAAGGAAA -3'
10CTGF AS: 5'-UUUCCUUCUCAAUACACUU -3'
11CTGF S: 5'-ACCGCAAGAUCGGCGU -3'
11CTGF AS: 5'-ACGCCGAUCUUGCGGUUGGCC -3'
12CTGF S: 5'-CCAACCAUGACCGCCG -3'
12CTGF AS: 5'-CGGCGUCAUGGUUGGCACUG -3'
13CTGF S: 5'-UGGAGUUCAAGUGCCC -3'
13CTGF AS: 5'-GGGCACUUGAACUCCACCGGC -3'
14CTGF S: 5'-ACCCGCACAAGGGCCU -3'
14CTGF AS: 5'-AGGCCUUGUGCGGGUCGCAG -3'
15CTGF S: 5'-UGCCCUUCCGAGGA -3'
15CTGF AS: 5'-UCCUCGGGAAGGGGCAGUCAG -3'
16CTGF S: 5'-ACAGCUAGGAUGUGCA -3'
16CTGF AS: 5'-UGCACAUCUAGCUGUCACUG -3'
17CTGF S: 5'-CCAACUAUGAUUAGAG -3'
17CTGF AS: 5'-CUCUAAUCAUAGUUGGGUCUG -3'
18CTGF S: 5'-UGAAGACAUACCGAGC -3'
18CTGF AS: 5'-GCUCGGUAUGUCUUCAUGCUG -3'

[0075]

19CTGF S: 5'- AGGCUGAUUUCUAGGU -3'
19CTGF AS: 5'- ACCUAGAAAUCAGCCUGCCAA -3'
20CTGF S: 5'- CUCCAAAAUCUCCAA -3'
20CTGF AS: 5'- UUGGAGAUUUUGGGAGUACGG -3'
21CTGF S: 5'- ACUGGAAGACACGUUU -3'
21CTGF AS: 5'- AAACGUGUCUCCAGUCGGUA -3'
22CTGF S: 5'- GGGUACCAAUGACAA -3'
22CTGF AS: 5'- UUGUCAUUGGUAACCCGGGUG -3'
23CTGF S: 5'- GACCUGGAAGAGAACA -3'
23CTGF AS: 5'- UGUUCUCUCCAGGUCAGCUU -3'
24CTGF S: 5'- GGAAGAGAACAUUAAG -3'
24CTGF AS: 5'- CUUAAUGUUCUCUCCAGGTC -3'
25CTGF S: 5'- CCAAGCCUAUCAAGUU -3'
25CTGF AS: 5'- AACUUGAUAGGCUUGGAGAUU -3'
26CTGF S: 5'- CAUACCGAGCUAAAUU -3'
26CTGF AS: 5'- AAUUUAGCUCGGUAUGUCUUC -3'
27CTGF S: 5'- AAAUUCUGUGGAGUAU -3'
27CTGF AS: 5'- AUACUCCACAGAAUUUAGCUC -3'
28CTGF S: 5'- CUGGAAGAGAACAUAU -3'
28CTGF AS: 5'- UAAUGUUCUCUCCAGGUCAG -3'
29CTGF S: 5'- UGGAAGAGAACAUAUA -3'
29CTGF AS: 5'- UUAUUGUUCUCUCCAGGUCA -3'
30CTGF S: 5'- UGGAACUUGAACUGAU -3'
30CTGF AS: 5'- AUCAGUUCAAGUCCAGUCUA -3'
31CTGF S: 5'- UUCUCCAGCCAUCAAG -3'
31CTGF AS: 5'- CUUGAUGGCUGGAGAAUGCAC -3'
32CTGF S: 5'- CACCAUAGGUAGAAUG -3'
32CTGF AS: 5'- CAUUCUACCUAUGGUGUUCAG -3'
33CTGF S: 5'- CGUUCAAAGCAUGAAA -3'
33CTGF AS: 5'- UUCAUGCUUUGAACGAUCAG -3'
34CTGF S: 5'- GUUUUUCGGACAGUUU -3'

[0076]

34CTGF AS: 5'- AAACUGUCCGAAAAACAGUCA -3'
35CTGF S: 5'- AAGAUUCCACCCAAU -3'
35CTGF AS: 5'- AUUGGGUGGGAAUCUUUCC -3'
36CTGF S: 5'- GGC AUGAAGCCAGAGA -3'
36CTGF AS: 5'- UCUCUGGCUUCAUGCCAUGUC -3'
37CTGF S: 5'- CUCAUUUUUCCGUAAA -3'
37CTGF AS: 5'- UUUACGGAAAAAUGAGAUGUG -3'
38CTGF S: 5'- GUCCCGGAGACAAUGA -3'
38CTGF AS: 5'- UCAUUGUCUCCGGGACAGUUG -3'
39CTGF S: 5'- AUCGUUCAAGCAUGA -3'
39CTGF AS: 5'- UCAUGCUUUGAACGAUCAGAC -3'
40CTGF S: 5'- UCUAUAUAGCUGAUCA -3'
40CTGF AS: 5'- UGAUCAGCUAUAUAGAGUCAC -3'
41CTGF S: 5'- CCGUCCGCGUCGCCUU -3'
41CTGF AS: 5'- AAGGCGACGCGGACGGGGCCC -3'
42CTGF S: 5'- CAGCUGGGCGAGCUGU -3'
42CTGF AS: 5'- ACAGCUCGCCAGCUGCUUGG -3'
43CTGF S: 5'- GUGCACCGCCAAAGAU -3'
43CTGF AS: 5'- AUCUUUGGCGGTGCACACGCC -3'
44CTGF S: 5'- GAGCAGCUGCAAGUAC -3'
44CTGF AS: 5'- GUACUUGCAGCUGCUCUGGAA -3'
45CTGF S: 5'- UGAUUAGAGCCAACUG -3'
45CTGF AS: 5'- CAGUUGGCUCUAAUCAUAGUU -3'
46CTGF S: 5'- AGACAUACCGAGCUAA -3'
46CTGF AS: 5'- UUAGCUCGGUAUGUCUUAUG -3'
47CTGF S: 5'- ACUCAUUAGACUGGAA -3'
47CTGF AS: 5'- UCCAGUCUAAUGAGUAAAUG -3'
48CTGF S: 5'- AGAUAGCAUCUUAUAC -3'
48CTGF AS: 5'- GUAUAAGAUGCUAUCUGAUGA -3'
49CTGF S: 5'- AGAGACUGAGUCAAGU -3'
49CTGF AS: 5'- ACUUGACUCAGUCUCUUGAUG -3'

[0077]

50CTGF S: 5'- AAUGACAGUCCGUCAA -3'
50CTGF AS: 5'- UUGACGGACUGUCAUUCUAUC -3'
51CTGF S: 5'- GCCGCGUCUGCGCCAA -3'
51CTGF AS: 5'- UGGCGCAGACGCGGCAGCAGC -3'
52CTGF S: 5'- UGUGCAGCAUGGACGU -3'
52CTGF AS: 5'- ACGUCCAUGCUGCACAGGGGC -3'
53CTGF S: 5'- CUGUGCAGCAUGGACG -3'
53CTGF AS: 5'- CGUCCAUGCUGCACAGGGGCA -3'
54CTGF S: 5'- CCCUGACUGCCCCUUC -3'
54CTGF AS: 5'- GAAGGGGCAGUCAGGGCUGGG -3'
55CTGF S: 5'- GCCCUGACUGCCCCUU -3'
55CTGF AS: 5'- AAGGGGCAGUCAGGGCUGGGC -3'
56CTGF S: 5'- GUGACGAGCCCAAGGA -3'
56CTGF AS: 5'- UCCUUGGGCUCGUCACACACC -3'
57CTGF S: 5'- UGUGUGACGAGCCCAA -3'
57CTGF AS: 5'- UUGGGCUCGUCACACACCCAC -3'
58CTGF S: 5'- AGUGGGUGUGUGACGA -3'
58CTGF AS: 5'- UCGUCACACACCCACUCCUCG -3'
59CTGF S: 5'- AGGAGUGGGUGUGUGA -3'
59CTGF AS: 5'- UCACACACCCACUCCUCGCAG -3'
60CTGF S: 5'- CGAGGAGUGGGUGUGU -3'
60CTGF AS: 5'- ACACACCCACUCCUCGCAGCA -3'
61CTGF S: 5'- UGCGAGGAGUGGGUGU -3'
61CTGF AS: 5'- ACACCCACUCCUCGCAGCAUU -3'
62CTGF S: 5'- CAGACCCAACUAUGAU -3'
62CTGF AS: 5'- AUCAUAGUUGGGUCUGGGCCA -3'
63CTGF S: 5'- CCAGACCCAACUAUGA -3'
63CTGF AS: 5'- UCAUAGUUGGGUCUGGGCCAA -3'
64CTGF S: 5'- CCCAGACCCAACUAUG -3'
64CTGF AS: 5'- CAUAGUUGGGUCUGGGCCAAA -3'
65CTGF S: 5'- GAGUGGAGCGCCUGUU -3'

[0078]

65CTGF AS: 5'- AACAGGCGCUCCACUCUGUGG -3'
66CTGF S: 5'- GUCCAGACCACAGAGU -3'
66CTGF AS: 5'- ACUCUGUGGUCUGGACCAGGC -3'
67CTGF S: 5'- UGGUCCAGACCACAGA -3'
67CTGF AS: 5'- UCUGUGGUCUGGACCAGGCAG -3'
68CTGF S: 5'- CCUGGUCCAGACCACA -3'
68CTGF AS: 5'- UGUGGUCUGGACCAGGCAGUU -3'
69CTGF S: 5'- AACUGCCUGGUCCAGA -3'
69CTGF AS: 5'- UCUGGACCAGGCAGUUGGCUC -3'
70CTGF S: 5'- GGAUGGGCAUCUCCA -3'
70CTGF AS: 5'- UGGAGAUGCCCAUCCACAGG -3'
71CTGF S: 5'- UGUGGGAUGGGCAUCU -3'
71CTGF AS: 5'- AGAUGCCCAUCCACAGGUCU -3'
72CTGF S: 5'- CUGUGGGAUGGGCAUC -3'
72CTGF AS: 5'- GAUGCCCAUCCACAGGUCUU -3'
73CTGF S: 5'- AGGGCAAAAAGUGCAU -3'
73CTGF AS: 5'- AUGCACUUUUUGCCCUUCUUA -3'
74CTGF S: 5'- UAAGAAGGGCAAAAAG -3'
74CTGF AS: 5'- CUUUUUGCCCUUCUAAAUGUU -3'
75CTGF S: 5'- CUUUCUGGCUGCACCA -3'
75CTGF AS: 5'- UGGUGCAGCCAGAAAGCUCAA -3'
76CTGF S: 5'- GAGCUUUCUGGCUGCA -3'
76CTGF AS: 5'- UGCAGCCAGAAAGCUAAACU -3'
77CTGF S: 5'- CUGCCAUAACAACUGU -3'
77CTGF AS: 5'- ACAGUUGUAAUGGCAGGCACA -3'
78CTGF S: 5'- GCCUGCCAUAACAACU -3'
78CTGF AS: 5'- AGUUGUAAUGGCAGGCACAGG -3'
79CTGF S: 5'- UGCCUGCCAUAACAAC -3'
79CTGF AS: 5'- GUUGUAAUGGCAGGCACAGGU -3'
80CTGF S: 5'- GUGCCUGCCAUAACAA -3'
80CTGF AS: 5'- UUGUAAUGGCAGGCACAGGUC -3'

[0079]

81CTGF S: 5'- UGUGCCUGCCAUAACA -3'
81CTGF AS: 5'- UGUAAUGGCAGGCACAGGUCU -3'
82CTGF S: 5'- CCUGUGCCUGCCAUA -3'
82CTGF AS: 5'- UAAUGGCAGGCACAGGUCUUG -3'
83CTGF S: 5'- ACCUGUGCCUGCCAUAU -3'
83CTGF AS: 5'- AAUGGCAGGCACAGGUCUUGA -3'
84CTGF S: 5'- GACCUGUGCCUGCCAUAU -3'
84CTGF AS: 5'- AUGGCAGGCACAGGUCUUGAU -3'
85CTGF S: 5'- GUUCAUCAAGACCUGU -3'
85CTGF AS: 5'- ACAGGUCUUGAUGAACAUCAU -3'
86CTGF S: 5'- AGAUGUACGGAGACAU -3'
86CTGF AS: 5'- AUGUCUCCGUACAUCUCCUG -3'
87CTGF S: 5'- GGAAGAUGUACGGAGA -3'
87CTGF AS: 5'- UCUCCGUACAUCUCCUGUAG -3'
88CTGF S: 5'- CUACAGGAAGAUGUAC -3'
88CTGF AS: 5'- GUACAUCUCCUGUAGUACAG -3'
89CTGF S: 5'- ACAGCUUGUGGCAAGU -3'
89CTGF AS: 5'- ACUUGCCACAAGCUGUCCAGU -3'
90CTGF S: 5'- GACAGCUUGUGGCAAG -3'
90CTGF AS: 5'- CUUGCCACAAGCUGUCCAGUC -3'
91CTGF S: 5'- GGACAGCUUGUGGCAA -3'
91CTGF AS: 5'- UUGCCACAAGCUGUCCAGUCU -3'
92CTGF S: 5'- AACAAGCCAGAUUUUU -3'
92CTGF AS: 5'- AAAAAUCUGGCUUGUUACAGG -3'
93CTGF S: 5'- GUAACAAGCCAGAUUU -3'
93CTGF AS: 5'- AAAUCUGGCUUGUUACAGGCA -3'
94CTGF S: 5'- CUGUAACAAGCCAGAU -3'
94CTGF AS: 5'- AUCUGGCUUGUUACAGGCAAA -3'
95CTGF S: 5'- UCUAAGUAAUUUAAA -3'
95CTGF AS: 5'- UUUAAAUAACUAGAUAAU -3'
96CTGF S: 5'- CACCUUUCUAGUUGAA -3'

[0080]

96CTGF AS: 5'- UUCAACUAGAAAGGUGCAAAC -3'
97CTGF S: 5'- UUGCACCUUCUAGUU -3'
97CTGF AS: 5'- AACUAGAAAGGUGCAAACAUG -3'
98CTGF S: 5'- CAUGUUUGCACCUUUC -3'
98CTGF AS: 5'- GAAAGGUGCAAACAUGUAAU -3'
99CTGF S: 5'- GAGUGUGACCAAAAAGU -3'
99CTGF AS: 5'- ACUUUUGGUCACACUCUCAAC -3'
100CTGF S: 5'- AGAGUGUGACCAAAAAG -3'

[0081]

[0082]

표 1에 나열된 asiRNA를 95°C에서 2분 동안 및 37°C에서 1시간 동안 1x siRNA 듀플렉스 완충액(Bioneer Inc., Korea) 속에서 항온처리하였다. 적절한 가닥 어닐링(annealing)을 겔 전기영동을 통해 확인하였다. 스크리닝을 위해, 10% 태아 송아지 혈청(Gibco) 및 100 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 둘베코 변형 이글 배지

(Dulbecco's modified Eagle's medium)(Gibco) 속에서 배양시킨 2.5×10^4 개의 A549 세포(ATCC)를 24-웰 플레이트에 씨딩(seeding)하였다. A549 세포를 0.3 nM의 asiRNA로 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 사용하여 제조업자의 지시사항에 따라 형질감염시켰다.

[0083] 형질감염 후 24시간 켜에, CTGF mRNA 수준을 실시간 RT-PCR을 사용하여 측정하였다. 총 RNA를 Isol-RNA 분해 시약(5PRIME)을 사용하여 추출한 후, 500 ng의 추출된 RNA를 고-용량 cDNA 역 전사 키트(Applied Biosystems)를 사용하여 제조업자의 지시사항에 따라 cDNA 합성에 사용하였다. 합성된 cDNA를 희석시킨 후 정량적 RT-PCR을 StepOne RT-PCR 시스템(Applied Biosystems)을 사용하여 제조업자의 지시사항에 따라 수행하였다. 각각의 100 asiRNA에 의한 CTGF 억제 수준을 도 1에 묘사한다.

[0084] 실시예 2: CTGF-표적화 asiRNA를 사용한 CTGF mRNA 발현의 억제

[0085] 18개의 asiRNA 서열, asiCTGF 4, 9, 16, 25, 30, 32, 33, 34, 39, 40, 48, 49, 81, 92, 93, 96, 97 및 99를 CTGF 발현을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험하였다.

[0086] 선택된 asiRNA를 95°C에서 2분 동안 및 37°C에서 1시간 동안 1x siRNA 듀플렉스 완충액(Bioneer Inc., Korea) 속에서 항온처리하였다. 적절한 가닥 어닐링을 겔 전기영동을 통해 확인하였다. 스크리닝을 위해, 2.5×10^4 개의 A549 세포(ATCC)를 24-웰 플레이트에 씨딩하였다. A549 세포를 0.3 또는 0.1 nM의 asiRNA로 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 사용하여 제조업자의 지시사항에 따라 형질감염시켰다.

[0087] 형질감염된 세포에서 CTGF mRNA 수준을 RT-PCR을 사용하여 형질감염 후 24시간 켜에 측정하였다. 구체적으로, 총 RNA를 Isol-RNA 분해 시약(5PRIME)을 사용하여 추출한 후, 500 ng의 추출된 RNA를 고-용량 cDNA 역 전사 키트(Applied Biosystems)를 사용하는 cDNA 합성을 위해 사용하였다. 합성된 cDNA를 희석시킨 다음 정량적 RT-PCR을 StepOne RT-PCR 시스템(Applied Biosystems)을 사용하여 수행하였다. CTGF 유전자의 증폭을 파워 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(power SYBR green PCR master Mix)(Applied Biosystems)를 사용하여 검출하였다. GAPDH를 내부 대조군으로서 증폭시켰다. 다음의 프라이머 서열을 사용하였다:

[0088] 사람 GAPDH-전방: 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3'

[0089] 사람 GAPDH-후방: 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3'

[0090] 사람 CTGF-전방: 5'-CAA GGG CCT CTT CTG TGA CT-3'

[0091] 사람 CTGF-후방: 5'-ACG TGC ACT GGT ACT TGC AG-3'

[0092] 18개의 예시적인 asiRNA의 CTGF 억제의 수준을 도 2에 제공한다. 도 2에 나타낸 바와 같이, asiRNA 4, 9, 16, 30, 33, 34, 48, 49, 81, 92, 93, 96 및 97은 CTGF 발현을 억제하였다.

[0093] 실시예 3: CTGF-표적화 asiRNA를 사용한 CTGF mRNA 발현의 억제

[0094] 13개의 asiRNA 서열, asiCTGF 4, 9, 16, 30, 33, 34, 48, 49, 81, 92, 93, 96 및 97을 형질감염에 의해 CTGF 발현을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험하였다.

[0095] asiRNA를 95°C에서 5분 및 37°C에서 1시간 동안 1x siRNA 듀플렉스 완충액(Bioneer) 속에서 항온처리하였다. 적절한 가닥 어닐링을 겔 전기영동을 통해 확인하였다. 스크리닝을 위해, A549 세포(ATCC)를 100 mm 세포 배양 디쉬 속에서 10% 태아 송아지 혈청(Gibco) 및 100 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 최소 필수 배지(Minimum Essential medium)(Gibco) 속에서 배양시켰다. 형질감염 1일 전에, 2.5×10^4 개의 A549 세포를 24-웰 플레이트(well plate)에 씨딩(seeding)하였다. A549 세포를 0.1, 0.03 및 0.001 nM의 asiRNA 농도로 형질감염시켰다. 총 RNA를 RNAiso Plus(TaKaRa)로 추출한 후 500 ng의 추출된 RNA를 고-용량 cDNA 역 전사 키트(High-Capacity cDNA reverse transcription kit)(Applied Biosystems)를 사용하는 cDNA 합성을 위해 제조업자의 지시에 따라 사용하여 추출하였다. CTGF 유전자의 증폭을 파워 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)를 사용하여 검출하였다. GAPDH는 대조군으로 사용하였다. 13개 asiRNA의 CTGF 수준을 도 3에 묘사한다.

[0096] 실시예 4: CTGF-표적화 asiRNA를 사용한 혈청 뉴클레아제 안정성

[0097] 실시예 1로부터 선택된 asiRNA(0.1 nmole)를 50 µL의 10% 태아 송아지 혈청 용액 속에서 항온처리하였다. 7 마이크로리터의 각각의 샘플을 나타낸 시점에서 취하고 -70°C에서 즉시 동결시켰다. 3 µL의 각각의 샘플의 분취량을 이어서 10% (wt/vol)의 비-변성 폴리아크릴아미드 겔 속에서 분리하고, 에티디움 브로마이드로 염색하고, UV

투과조명법(transillumination)으로 가시화하였다. 혈청 뉴클레아제에 대한 asiCTGF의 안정성을 도 4에 묘사한다.

[0098] 실시예 5: 스크리닝을 위한 asiRNA의 초기 화학적 변형

[0099] 2'-O-메틸 RNA의 화학적 변형을 실시예 1에서 선택된 asiRNA에 적용하고 변형된 asiRNA의 유전자 사일런싱 효능을 네이키드 asiRNA를 지닌 A549 세포내에서 시험하였다. 변형된 asiRNA(표 2)를 CTGF mRNA 억제 A549 세포에 대해 스크리닝하고 CTGF mRNA 수준을 실시간 PCR로 측정하였다.

[0100] 표 2: 효능에 대해 시험된 18개의 변형된 asiRNA 서열, m = 2'-O-메틸 RNA.

서열 번호:	서열
1	4CTGF-OMe 16S: 5'- mCCmAGmAAmUGmUAmUAmUUmAA -3'
2	4CTGF-OMe 21AS: 5'- UUAAUUAUACAUUCUmGmGmUmGmCmUmG -3'
3	9CTGF-OMe 16S: 5'- mACmCAmGcAmGmAAmAGmGUmUA -3'
4	9CTGF-OMe 21AS: 5'- UAACCUUUCUGCUGmGmUmAmCmCmUmU -3'
5	16CTGF-OMe 16S: 5'- mACmAGmCUmAGmGAmUGmUGmCA -3'
6	16CTGF-OMe 21AS: 5'- UGCACAUCCUAGCmUmGmUmCmAmCmUmG -3'
7	25CTGF-OMe 16S: 5'- mCCmAAmGcCmUmAmCmAmAGmUU -3'
8	25CTGF-OMe 21AS: 5'- AACUUGAUAGGCUUmGmGmAmGmAmUmU -3'
9	30CTGF-OMe 16S: 5'- mUGmGAmACmUUmGAmACmUGmAU -3'
10	30CTGF-OMe 21AS: 5'- AUCAGUUCAAGUUCmCmAmGmUmCmUmA -3'
11	32CTGF-OMe 16S: 5'- mCmAmCCmAmAmGmGUmAGmAAmUG -3'
12	32CTGF-OMe 21AS: 5'- CAUUCUACCUAUGGmUmGmUmUmCmAmG -3'
13	33CTGF-OMe 16S: 5'- mCGmUUmCmAmAmGcAmUmGAmAA -3'
14	33CTGF-OMe 21AS: 5'- UUUCAUGCUUUGAAmCmGmAmUmCmAmG -3'
15	34CTGF-OMe 16S: 5'- mGUmUUmUUmCGmGAmCmGUmUU -3'
16	34CTGF-OMe 21AS: 5'- AAACUGUCCGAAAmAmCmAmGmUmCmA -3'

[0101]

17	39CTGF-OMe 16S: 5'- mAUmCGmUUmCmAmAmGcAmUmGA -3'
18	39CTGF-OMe 21AS: 5'- UCAUGCUUUGAACGmAmUmCmAmGmAmC -3'
19	40CTGF-OMe 16S: 5'- mUCmUAmUAmUAmGcUmGmUmCA -3'
20	40CTGF-OMe 21AS: 5'- UGAUCAGCUAUAmGmAmGmUmCmAmC -3'
21	48CTGF-OMe 16S: 5'- mAGmAmAmGmCmUmCmUUmAmUmAC -3'
22	48CTGF-OMe 21AS: 5'- GUAUAAGAUGCUUmCmUmGmAmUmGmA -3'
23	49CTGF-OMe 16S: 5'- mAGmAGmACmUGmAGmUCmAmAmGU -3'
24	49CTGF-OMe 21AS: 5'- ACUUGACUCAGUCUmCmUmUmGmAmUmG -3'
25	81CTGF-OMe 16S: 5'- mUGmUGmCCmUGmCCmAmUmAmCA -3'
26	81CTGF-OMe 21AS: 5'- UGUAAUGGCAGGCmCmAmGmGmUmCmU -3'
27	92CTGF-OMe 16S: 5'- mAAmCmAmGmCCmAGmAmUmUUmUU -3'
28	92CTGF-OMe 21AS: 5'- AAAAAUCUGGCUUGmUmUmAmCmAmGmG -3'
29	93CTGF-OMe 16S: 5'- mGUmAmAmCmAmGmCCmAGmAmUmUU -3'
30	93CTGF-OMe 21AS: 5'- AAAUCUGGCUUGUUmAmCmAmGmGmCmA -3'
31	96CTGF-OMe 16S: 5'- mCmAmCCmUUmUCmUAmGUmUGmAA -3'
32	96CTGF-OMe 21AS: 5'- UUCAACUAGAAAGGmUmGmCmAmAmAmC -3'
33	97CTGF-OMe 16S: 5'- mUUmGcAmCmCUUmUUmCUmAGmUU -3'
34	97CTGF-OMe 21AS: 5'- AACUAGAAAGGUGCmAmAmAmCmAmUmG -3'
35	99CTGF-OMe 16S: 5'- mGAmGUmGUmGAmCCmAmAmAmGU -3'
36	99CTGF-OMe 21AS: 5'- ACUUUUGGUCACAmUmCmUmCmAmAmC -3'

[0102]

[0103] 표 2에 나열한 2'-O-메틸 RNA 변형된 asiRNA를 95°C에서 2분 동안 및 37°C에서 1시간 동안 1x siRNA 듀프렉스 완충액(Bioneer Inc., Korea) 속에서 항온처리하였다. 적절한 가닥 어닐링을 겔 전기영동으로 확인하였다. 스크리닝을 위해, 100 mm 세포 배양 디쉬 속에서 10% 태아 송아지 혈청(Gibco) 및 100 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지(Gibco)에서 배양시킨 2.5 x 10⁴개의 A549 세포(ATCC)를 24-웰 플레이트에 씨딩(seeding)하였다. A549 세포를 0.1 nM의 변형된 및 네이키드 asiRNA로 Lipofectamine 2000(Invitroge

n)을 사용하여 제조업자의 지시사항에 따라 형질감염시켰다.

[0104] 형질감염 후 24시간 쯤에, 형질감염된 세포 속에서의 CTGF mRNA 수준을 실시간 RT-PCR을 사용하여 측정하였다. 총 RNA를 Iso1-RNA 분해 시약(5PRIME)으로 추출한 후, 500 ng의 추출된 RNA를 고-용량 cDNA 역 전사 키트 (Applied Biosystems)를 사용하여 제조업자의 지시사항에 따라 cDNA 합성에 사용하였다. 합성된 cDNA를 희석시킨 후 정량적 RT-PCR을 StepOne RT- PCR 시스템(Applied Biosystems)을 사용하여 제조업자의 지시사항에 따라 수행하였다. 네이키드 asiRNA 또는 2'-O-메틸 RNA 변형된 asiRNA의 CTGF 억제 수준을 도 5에 묘사한다.

[0105] 실시예 6: 자가-전달을 위한 asiRNA의 화학적 변형

[0106] 화학적 변형을 선택된 asiRNA에 적용하고 변형된 asiRNA의 세포 전달을 다른 전달 시약의 부재하에서 시험하였다. 하기 기술한 바와 같이, 특정의 변형은 asiRNA의 세포내이입(endocytosis) 및 안정성을 개선시켰다. 이러한 세포-침투 asiRNA(cp-asiRNA)는 전달 시약의 부재하에서 세포내로 전달될 수 있다.

[0107] 4개의 잠재적인 cp-asiRNA(표 3)를 A549 세포내에서 CTGF mRNA 억제에 대해 스크리닝하였다. A549 세포를 3 μM에서의 cp-asiRNA와 함께 전달 시약의 부재하에서 항온처리하였다. CTGF mRNA 수준을 실시간 PCR로 측정하였다.

[0108] 표 3: 자가-전달 및 CTGF 억제에 대해 시험한 변형된 asiRNA 서열, m = 2'-O-메틸 RNA. * = 포스포로티오에이트 결합. Choi = 콜레스테롤

서열 번호:	서열
1	cpCTGF81-16S: 5'- mUGmUGmCCmUGmCCmAUmUA*mC*A*chol -3'
2	cpCTGF81-21AS: 5'- UGUAAUGGCAGGCmCmAmG*mG*mU*mC*mU -3'
3	cpCTGF93-16S: 5'- mGUmAAmCmAmGmCCmAGmAU*mU*U*chol -3'
4	cpCTGF93-21AS: 5'- AAAUCUGGCUUGUUmAmCmA*mG*mG*mC*mA -3'
5	cpCTGF97-16S: 5'- mUUmGCmACmCmUmUUmCUmAG*mU*U*chol -3'
6	cpCTGF97-21AS: 5'- AACUAGAAAGGUGCmAmAmA*mC*mA*mU*mG -3'
7	cpCTGF99-16S: 5'- mGAmGUmGUmGAmCCmAAmAA*mG*U*chol -3'
8	cpCTGF99-21AS: 5'- ACUUUUGGUCACACmUmCmU*mC*mA*mA*mC -3'

[0109] A549 세포를 100 mm 세포 배양 디쉬 속에서 10% 태아 송아지 혈청(Gibco) 및 100 μg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지(Gibco) 속에서 배양시켰다. 표 3에 나열한 잠재적인 cp-asiRNA를 95°C에서 5분 동안 및 37°C에서 1시간 동안 OPTI-MEM 완충액(Gibco) 속에서 항온처리하였다. 적절한 가닥 어닐링을 겔 전기영동을 통해 확인하였다. cp-asiRNA 처리 1일 전에, 2.5 x 10⁴ 개의 세포를 24 웰 플레이트에 씨딩하였다. 처리 전에, A549 세포를 돌베코 변형 이글 배지(Gibco)로 세척한 후 잠재적인 cp-asiRNA의 존재하에 OPTI-MEM 완충액 속에서 24시간 동안 배양하고, 각각의 시점에서 asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다. CTGF mRNA 발현의 수준을 asiRNA 처리 후 48시간 쯤에 실시간 PCR을 사용하여 측정하였다.

[0111] 실시예 7: CTGF-표적화 cp-asiRNA를 사용한 CTGF mRNA 발현의 억제

[0112] cp-asiRNA에 의한 CTGF mRNA의 억제를 시험하였다. 각각의 잠재적인 cp-asiRNA를 A549 세포와 함께 3 μL에서 전달 시약의 부재하에서 항온처리하고 CTGF mRNA 수준을 실시간 PCR을 사용하여 측정하였다.

[0113] CTGF 세포(ATCC)를 100 mm 세포 배양 디쉬 속에서 10% 태아 송아지 혈청(Gibco) 및 100 μg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지(Gibco) 속에서 배양시켰다. cp-asiRNA를 95°C에서 5분 동안 및 37°C에서 1시간 동안 OPTI-MEM 완충액(Gibco) 속에서 항온처리하였다. 적절한 가닥 어닐링을 겔 전기영동을 통해 확인하였다. 형질감염 1일 전에, 2.5 x 10⁴ 개의 A549 세포를 24 웰 플레이트에 씨딩하였다. 처리 직전에, A549 세포를 돌베코 변형 이글 배지(Gibco)로 세척한 후 잠재적인 cp-asiRNA의 존재하에 OPTI-MEM 완충액 속에서 24시간 동안 배양하고, 이 시점에서 asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다. CTGF mRNA 발현의 수준을 asiRNA 처리 후 48시간 쯤에 실시간 PCR을 사용하여 측정하였다. 총 RNA를 RNAiso Plus(TaKaRa)를 사용하여 추출한 후, 500 ng의 추출된 RNA를 고-용량 cDNA 역 전사 키트(Applied Biosystems)를 사용하는 cDNA 합성을 위해 제조업자의 지시사항에 따라 사용하였다. CTGF 유전자의 증폭은 파워 SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa)를 사용하여 검출하였다. GAPDH를 내부 대조군으로서 증폭시켰다.

- [0114] 4개의 잠재적인 cp-asiRNA 각각에 의한 CTGF mRNA 억제의 수준을 도 6에 묘사한다. 모든 cp-asiCTGF에서 45% CTGF 단백질 억제에서 항온처리된 세포주가 관찰되었으며, cp-asiCTGF93은 상기 mRNA 수준에서 최대 효능을 보였다.
- [0115] 실시예 8: CTGF 표적화 cp-asiRNA를 사용한 CTGF 단백질 발현의 억제
- [0116] cp-asiRNA에 의한 CTGF 단백질의 억제를 시험하기 위하여, 각각의 잠재적인 cp-asiRNA를 A549 세포와 함께 3 μM에서 전달 시약의 부재하에 항온처리하였다. A549 세포(ATCC)를 100 mm 세포 배양 디쉬 속에서 10 % 태아 송아지 혈청(Gibco) 및 100 μg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지(Gibco) 속에서 배양하였다.
- [0117] cp-asiRNA를 95°C에서 5분 동안 및 37°C에서 1시간 동안 OPTI-MEM 완충액(Gibco) 속에서 항온처리하였다. 적절 한 가닥 어닐링을 켈 전기영동을 통해 확인하였다.
- [0118] 형질감염 전날에, 9 x 10⁴ 개의 A549 세포를 6-웰 플레이트에 시딩하였다. 처리 직전에, A549 세포를 돌베코 변형 이글 배지(Gibco)로 세척한 후 OPTI-MEM 완충액 속에서 cp-asiRNA의 존재하에 24 시간 동안 항온처리하고, 이 시점에서 asiRNA-함유 OPTI-MEM 배지를 혈청-함유 배지로 대체하였다.
- [0119] CTGF 단백질 발현의 수준을 asiRNA 처리 48시간 후 웨스턴 블롯(western blot)으로 측정하였다. 요약하면, 처리된 CTGFH 세포를 SDS 분해 완충액(1% SDS, 100 mM 트리스 (pH 8.8))으로 분해하였다. 20 μg의 총 단백질 추출물을 10 % SDS-PAGE 겔에 로딩(loading)하고 120 V에서 전기영동시켰다. 전기영동 후, 단백질을 메탄올(Merck)로 1시간 동안 300 mA에서 미리 활성화시킨 PVDF 막(Bio-rad)으로 이전하였다. 막을 1시간 동안 실온에서 3% BSA(Bioworld)로 차단한 후 항-CTGF 항체(Santa Cruz) 및 항-γ-투불린 항체(Bethyl)를 함유하는 3% BSA 속에서 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 이후에, 막을 1x TBST로 10분 동안 3회 세척하고 1시간 동안 실온에서 HRP-접합된 제2 항체를 포함하는 1x TBST 속에서 항온처리하였다. 막을 1x TBST로 10분 동안 세척하고 1x ECL로 1분 동안 처리하였다. CTGF 및 γ-투불린 밴드를 이후에 Chemidoc instrument(Bio-rad)를 사용하여 영상화하였다.
- [0120] 웨스턴 블롯 검정의 결과를 도 7에 묘사한다.
- [0121] 실시예 9: 동물 모델에서 cv-asiCTGF에 의한 CTGF의 억제의 억제
- [0122] CTGF 발현의 억제에 대한 cp-asiCTGF 93의 효능을 동물 모델에서 평가하였다. SD 랫트(수컷, 6 내지 8주령)을 오리엔트 바이오(Orient Bio)(한국)로부터 구입하였다. 0.4, 0.7, 또는 1 mg 농도의 cp-asiRNA를 랫트 피부에 주사하고 72시간 후, 피부 생검 샘플을 주사 부위로부터 수집하고 qRT-PCR 분석에 적용하여 CTGF의 단백질 수준을 평가하였다.
- [0123] cp-asiRNA 처리 72시간 후, 총 단백질을 포유동물 단백질 추출 완충액(Mammalian Protein Extraction Buffer)(GE Healthcare) 및 프로테아제 억제제 콕테일(Roche)을 사용하여 추출하였다. 단백질 농도를 브래드포드 검정 키트(Bradford assay kit)를 사용하여 추출하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE 겔 전기영동을 통해 용해하였다. 전기영동 후, 단백질을 메탄올(Merck)로 1시간 동안 이미 활성화시킨 PVDF 막(Bio-rad)으로 이전시켰다. 막을 1시간 동안 실온에서 5% 탈지 우유로 차단한 후 4°C에서 밤새 특이적인 항체(항-CTGF 항체: Novus and Santa Cruz, 항-β-액틴 항체: Santa Cruz, 항-GAPDH 항체: Santa Cruz)를 함유하는 5% 탈지 우유 속에서 항온처리하였다. 막을 1% 트윈-20을 함유하는 트리스-완충된 염수로 세척하고 실온에서 1시간 동안 HRP-접합된 제2 항체(Santa Cruz)가 들어있는 5% 탈지 우유 속에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 막을 ECL 기질(Thermo scientific)로 처리하였다. 표적 단백질 밴드를 이후에 Chemidoc instrument(Bio-rad)를 사용하여 영상화하였다.
- [0124] 도 8에 나타낸 바와 같이, 0.4 mg/주사액의 cp-asiCTGFs 93은 CTGF 단백질 수준에서 80% 초과 감소를 생성하였다.
- [0125] 실시예 10: 블레오마이신-유도된 폐 섬유증 동물 모델에서 CTGF 발현에 대한 cp-asiCTGF 93의 효과
- [0126] CTGF 발현의 억제에 대한 cp-asiCTGF 93의 효능을 블레오마이신-유도된 (BLM) 폐 섬유증 동물 모델에서 평가하였다.
- [0127] 7주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 오리엔트 바이오(Orient Bio)(한국 성남 소재)로부터 구입하였다. 마우스를 졸레틸(Zoletil) 50을 복강내 투여하여 마취시켰다. 블레오마이신 설페이트(Enzo, 뉴욕주 파밍데일 소재)를 1X 염수 속에 용해하고 체중 kg당 2 mg의 단일 용량으로 기관내 투여하였다. 대조군에는 염수만을 투여하였다.

[0128] 7일 후, cp-asiCTGF 93을 95℃에서 5분 동안 및 37℃에서 30분 동안 0.6X 염수 속에서 항온처리하였다. 후속적으로, cp-asiCTGF 93을 블레오마이신-처리된 마우스(BLM 처리된 마우스) 내에 기관내 투여하였다. 30마리의 마우스를 6개 그룹으로 무작위로 지정하였다: 0.6X 염수를 투여한 음성 대조군 마우스(n = 4), 블레오마이신을 투여한 BLM 마우스(n = 5), 블레오마이신 및 6.2 mg/kg의 cp-asiCTGF 93을 투여한 6.2 mpk 마우스(n = 5), 블레오마이신 및 3.1 mg/kg의 cp-asiCTGF 93을 투여한 3.1 mpk 마우스(n = 6), 블레오마이신 및 1.5 mg/kg의 cp-asiCTGF 93을 투여한 1.5 mpk 마우스(n = 5), 및 블레오마이신 및 0.75 mg/kg의 cp-asiCTGF 93을 투여한 0.75 mpk 마우스(n = 5).

[0129] 블레오마이신 투여 14일 후, 마우스를 희생시키고 CTGF mRNA의 수준을 정량적 RT-PCR을 사용하여 측정하였다. 우측 폐를 실시예 PCR(RT-PCR)에 사용하여 mRNA 수준을 측정하였다.

[0130] 총 RNA를 폐 조직으로부터 RNAiso Plus(TaKaRa, 일본)을 사용하여 추출하고, 500 ng의 추출된 RNA를 cDNA 합성에 고-용량 cDNA 역 전사 키트(Applied Biosystems)를 사용하여, 제조업자의 지시사항에 따라 사용하였다. 사용된 프라이머 및 프로브 서열은 표 4에 제공된다. 실시간 RT-PCR을 CTGF의 경우 파워 SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa, 일본) 또는 18S의 경우 THU DERBIRD® Probe qPCR Mix(Toyobo, 일본)를 사용하여 제조업자의 지시사항에 따라 수행하였다. 하우스키핑 유전자(housekeeping gene) 18S를 내부 대조군으로서 사용하여 유전자-특이적인 mRNA 발현을 18S 발현에 대해 표준화하였다.

[0131] 표 4 - 실시간 역 전사효소 폴리머라제 쇄 반응을 위한 프라이머 서열 및 프로브 정보

유전자	프라이머 서열 5' 내지 3'	
CTGF	전방	TGCAGTGGGAATTGTGACCT
	역방	GGA ATCGGACCTTACCCTGA
프로브	18S TaqMan® 프로브 (Hs03928985_g1)	

[0132]

[0133] 도 9에 나타낸 바와 같이, CTGF 발현의 BLM-유도된 상향조절의 발현은 cp-asiCTGF 93의 1회 기관내 투여로 유전적으로 억제되었다. cp-asiCTGF 93의 1회 기관내 투여는 BLM-처리된 마우스에서 CTGF mRNA를 BLM-처리된 그룹과 비교하여 >60% 까지 감소시켰다.

[0134] 실시예 11: 블레오마이신-유도된 폐 섬유증 동물 모델에서 섬유증 관련된 유전자 발현에 대한 cp-asiCTGF 93의 효과

[0135] 섬유증의 발현에 있어서 cp-asiCTGF 93 처리의 효과를 블레오마이신-유도된 폐 섬유증 동물 모델에서 평가하였다.

[0136] cp-asiCTGF 93을 블레오마이신 투여(2 mg/kg의 체중)후 7일 째에 1회로 기관내 투여하였다. 섬유증 관련된 유전자의 발현 수준을 블레오마이신 투여 14일 후 실시간 PCR을 사용하여 측정하였다.

[0137] 총 RNA를 폐 조직으로부터 RNAiso Plus(TaKaRa, 일본)을 사용하여 제조업자의 지시사항에 따라 추출하였다. 사용된 프라이머 서열은 표 5에 제공한다. 실시간 RT-PCR을 파워 SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa, 일본) 또는 THUNDERBIRD® 프로브 qPCR Mix (Toyobo, 일본)을 사용하여 수행하고 반응을 Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR machine (Applied Biosystems, 미국)을 사용하여 수행하였다. 하우스키핑 유전자 18S를 내부 대조군으로 사용하고 유전자-특이적인 mRNA 발현을 18S 발현에 대해 표준화하였다.

[0138] 표 5 - 실시간 역 전사 폴리머라제 쇠 반응을 위한 프라이머 서열

유전자	프라이머 서열 5' 내지 3'	
콜라겐 제I형	전방	TCATCGTGGCTTCTCTGGTC
	역방	GACCGTTGAGTCCGTCCTTTG
콜라겐 제III형	전방	ACGTAAGCACTGGTGGACAGA
	역방	GAGGGCCATAGCTGAACTGA
피브로넥틴	전방	GTGTAGCACAACTCCAATTACGAA
	역방	GGAATTTCCGCCTCGAGTCT

[0139]

[0140] 도 10에 나타낸 바와 같이, 피브로넥틴, 콜라겐 제I형 및 콜라겐 제III형의 발현의 BLM-유도된 상향조절은 cp-asiCTGF 93의 투여에 의해 유의적으로 억제되었다.

[0141] 실시예 12: 블레오마이신-유도된 폐 섬유증 동물 모델에 있어서 피브로넥틴 단백질의 생산에 대한 cp-asiCTGF 93의 효과

[0142] 피브로넥틴 단백질 수준에 대한 cp-asiCTGF 93 처리의 효과를 블레오마이신-유도된 폐 섬유증 동물 모델에서 평가하였다.

[0143] cp-asiCTGF 93(6.2 내지 0.75 mg/kg의 체중)을 블레오마이신 투여(2 mg/kg의 체중) 후 7일째에 1회로 기관내 투여하였다. 마우스를 블레오마이신 투여 후 14일 째에 희생시키고 평가하였다. 섬유성 폐 조직에서 피브로넥틴의 발현을 웨스턴 블롯 분석으로 측정하였다.

[0144] 피브로넥틴 및 감마 투블린을 검출하기 위해, 샘플을 500 µL의 포유동물 단백질 추출 완충액(GE healthcare) 속에 균질화하였다. 단백질 농도를 브래드포드(Bradford) 검정을 사용하여 측정하였다. 20 µg의 총 단백질 추출물을 SDS-PAGE로 10% 겔 위에서 전기영동시키고, 메탄올(Merck)로 1시간 동안 300 mA에서 미리 활성화시킨 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 여과기(Bio-Rad, USA)로 이전시켰다. 막을 1시간 동안 실온에서 5% 탈지 우유로 차단한 후 밤새 4°C에서 마우스 항-피브로넥틴(Abeam Inc, Cambridge, MA) 또는 항-감마 투블린(Santa Cruz Biotechnology, 캘리포니아주 산타 크루즈 소재) 항체가 들어있는 5% BSA(Bioword)와 함께 항온처리하였다. 제1 항체를 마우스 또는 토끼 IgG에 대한 서양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 제2 항체 및 케미독 장치(Chemidoc instrument)(Bio-Rad)를 사용하여 검출하였다.

[0145] 도 11에 나타낸 바와 같이, 피브로넥틴 단백질의 발현의 BLM-유도된 상향조절은 cp-asiCTGF 93의 투여에 의해 유의적으로 억제되었다.

[0146] 실시예 13: 상이한 안티센스 가닥을 지닌 cy-asiRNA에 의한 표적 유전자 녹다운(knockdown)의 효과

[0147] 상이한 안티센스 가닥 길이를 지닌 cp-asiRNA를 표적화하는 연결 조직 성장 인자(CTGF)를 효능에 대해 시험하였다. cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF의 서열 및 화학적 변형은 하기 표 6에서 찾을 수 있다.

[0148] 표 6

CTGF 예시적인 cp-asiRNA		
21-mer AS	SS AS	5'-CUUACCGACUGGAGAG ^{***} choi-3' 3'-GAGCGCCGAAUGGCUGACCUUCU-5' ****
23-mer AS	SS AS	5'-CUUACCGACUGGAGAG ^{***} choi-3' 3'-GAGCGCCGAAUGGCUGACCUUCU-5' ****
25-mer AS	SS AS	5'-CUUACCGACUGGAGAG ^{***} choi-3' 3'-GAGCGCCGAAUGGCUGACCUUCU-5' ****
27-mer AS	SS AS	5'-CUUACCGACUGGAGAG ^{***} choi-3' 3'-ACGCGAGCGCCGAAUGGCUGACCUUCU-5' ****
29-mer AS	SS AS	5'-CUUACCGACUGGAGAG ^{***} choi-3' 3'-GGACGGGAGCGCCGAAUGGCUGACCUUCU-5' ****
31-mer AS	SS AS	5'-CUUACCGACUGGAGAG ^{***} choi-3' 3'-CGCGACGGGAGCGCCGAAUGGCUGACCUUCU-5' ****

[0149] SS: 단일 가닥; AS: 안티센스 가닥; 밑줄친 문자: 2'-O-메틸 변형된 RNA

[0151] *: 포스포노티오에이트 결합, choi: 콜레스테롤 트리에틸렌글리콜(TEG)

[0152] 다양한 안티센스 가닥 길이를 지닌 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF의 표적 유전자 사일런싱 활성을 도 12a에서 찾을 수 있다. A549 세포를 형질감염시키고 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF와 함께 항온처리하였다. 총 RNA를 세포 분해물로부터 추출하고 정량적 실시간 폴리머라제 쉐 반응(qRT-PCR)을 통해 분석하였다. cp-asiRNA의 잠재적인 표적 유전자 사일런싱이 관찰되었다. NT는 비 처리 대조군을 나타낸다.

[0153] HaCaT 세포내에서 상이한 안티센스 가닥 길이의 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF의 표적 유전자 사일런싱 활성을 도 12b에서 찾을 수 있다. HaCaT 세포를 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF로 형질감염시켰다. HaCaT 세포를 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF와 함께 항온처리하였다. 총 RNA를 세포 분해물로부터 추출하고 정량적 실시간 폴리머라제 쉐 반응(qRT-PCR)을 통해 분석하였다. cp-asiRNA의 잠재적인 표적 유전자 사일런싱이 관찰되었다. NT는 비 처리 대조군을 나타낸다. Hs68 세포 속에서 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF의 표적 유전자 사일런싱 활성은 도 12c에서 찾을 수 있다. Hs68 세포를 상기 나타낸 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF로 형질감염/항온처리하였다. 총 RNA를 세포 분해물로부터 추출하고 정량적 실시간 폴리머라제 쉐 반응(qRT-PCR)을 통해 프로세싱하였다. cp-asiRNA의 잠재적인 표적 유전자 사일런싱이 관찰되었다.

[0154] 실시예 14: 피내 주사에 의한 생체내(in vivo) 표적 유전자 녹다운의 효과

[0155] 상이한 안티센스 가닥 길이를 지닌 cp-asiRNA를 표적화하는 연결 조직 성장 인자(CTGF)를 효능에 대해 시험하였다. cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF의 서열 및 화학적 변형은 표 6에 나타낸다.

[0156] 상이한 안티센스 가닥 길이를 지닌 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF의 표적 유전자 사일런싱 활성을 랫트 피부에서 시험하였다(표 6). 0.6X 염수 중 0.5 mg의 cp-asiRNA를 표적화하는 CTGF를 랫트 피부에 주사하였다(피내 주사). 도 13은 cp-asiRNA 투여 후 표적 mRNA 및 단백질 수준을 나타낸다. cp-asiRNA의 잠재적인 표적 유전자 사일런싱이 관찰되었다. 또한, 보다 긴 안티센스 가닥을 지닌 cp-asiRNA는 최상의 표적 유전자 녹다운을 나타내었다. NT는 비 처리 대조군을 나타낸다. 0.6X 염수는 대조군 만의 시약을 나타낸다. 이들 결과는 생체내에서 cp-asiRNA 처리에 의한 표적 유전자 녹다운을 나타낸다.

[0157] **참고문헌의 포함**

[0158] 본원에 언급된 모든 공보, 특허, 및 특허원은 각각의 개개 공보, 특허 또는 특허원이 구체적으로 및 개별적으로

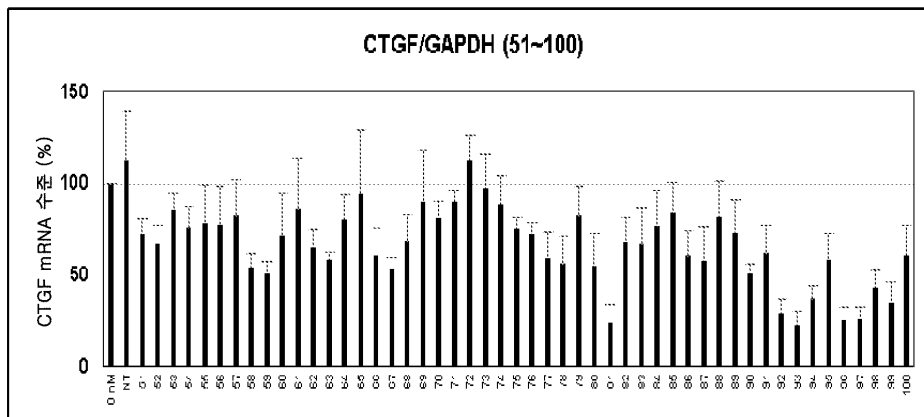
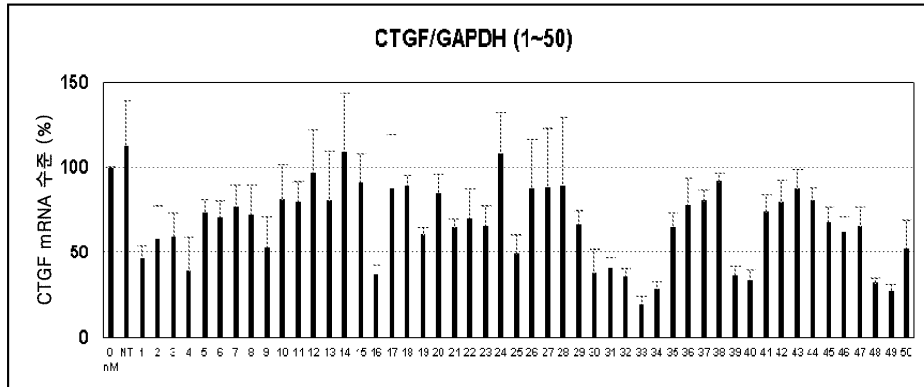
참고에 의해 포함되는 것으로 나타난 경우와 같이 이들 전문이 참고로 본원에 포함된다. 충돌이 있는 경우, 본원의 어떠한 정의를 포함한, 본 출원이 제어할 것이다.

[0159] **등가물**

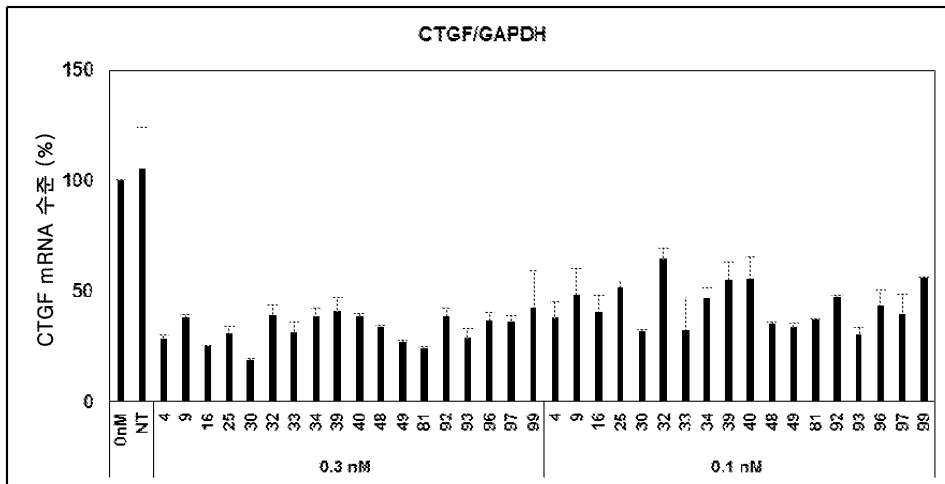
[0160] 당해 분야의 숙련가는 정규 실험 이외에, 본원에 기술된 본 발명의 구체적인 구현예에 대한 많은 등가물을 사용하여 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 다음의 청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

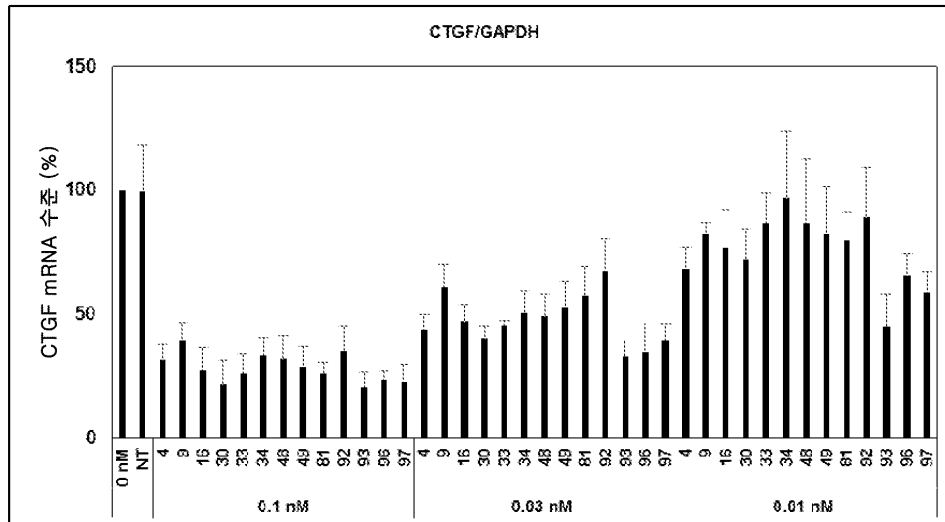
도면1



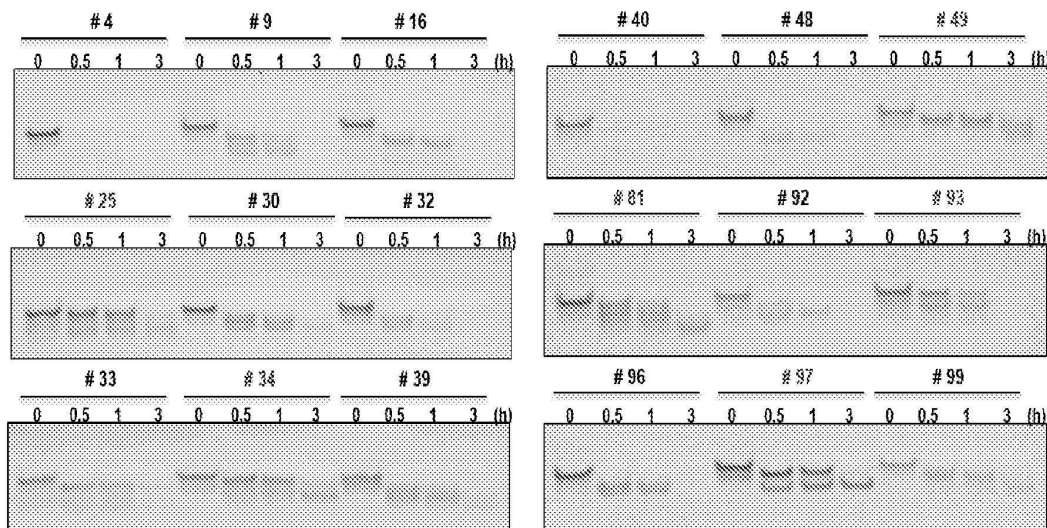
도면2



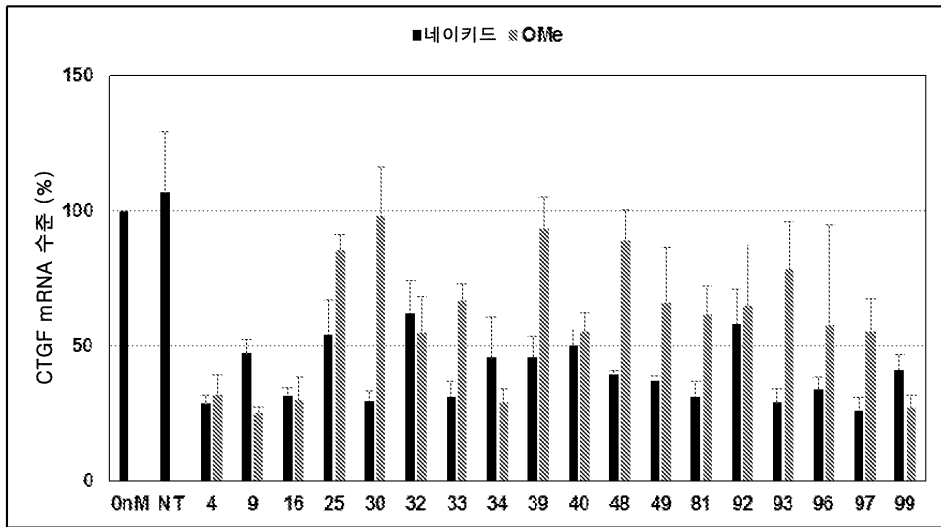
도면3



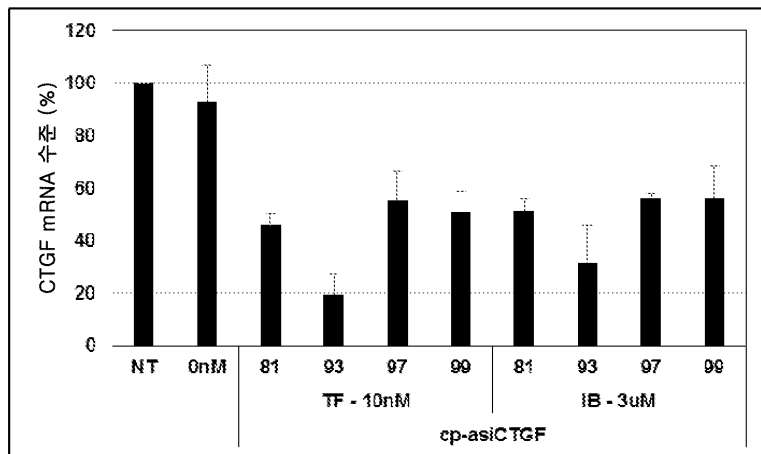
도면4



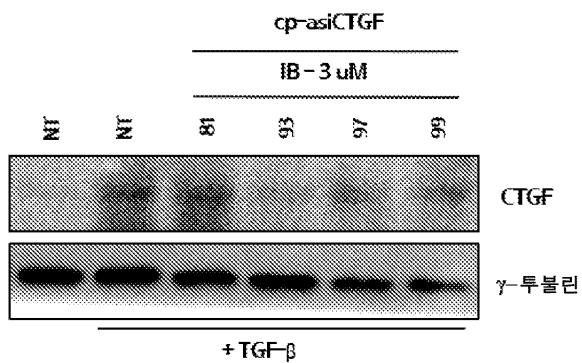
도면5



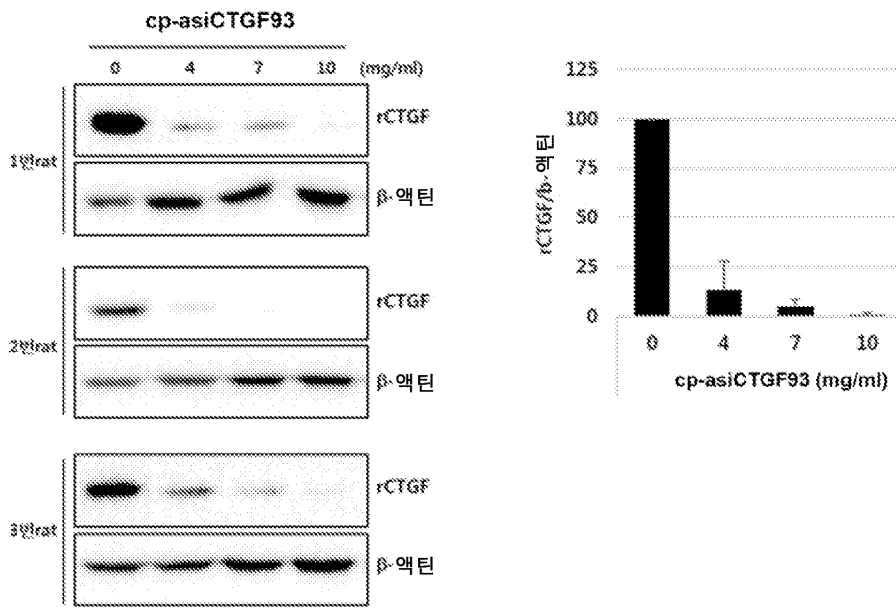
도면6



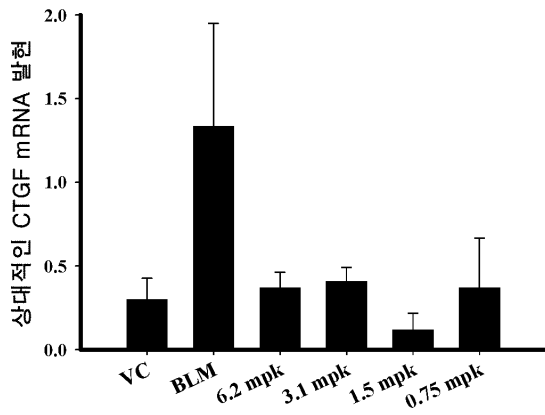
도면7



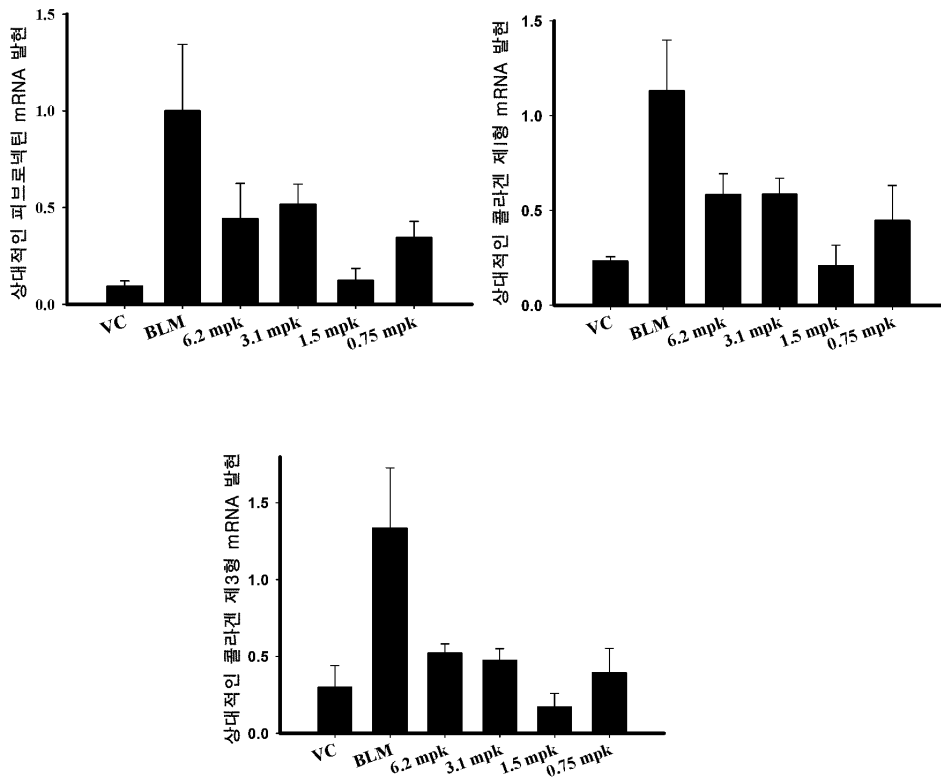
도면8



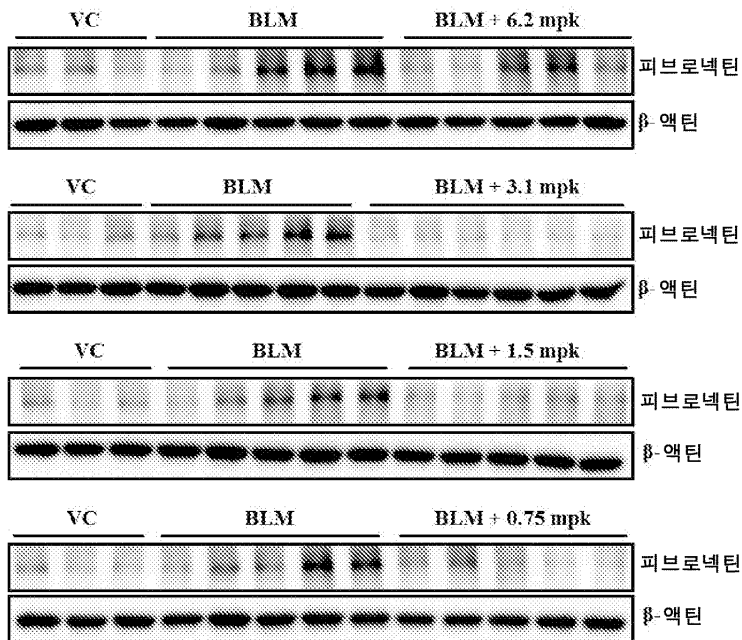
도면9



도면10

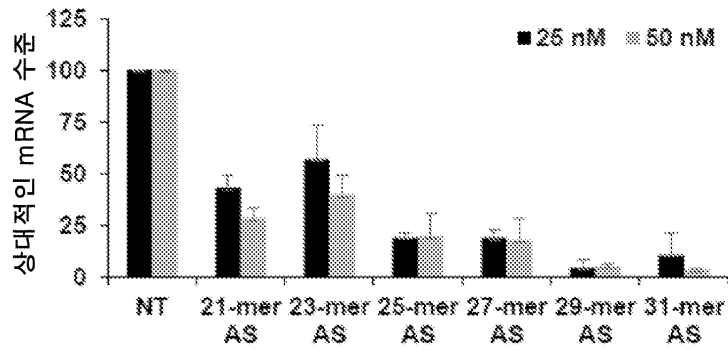


도면11

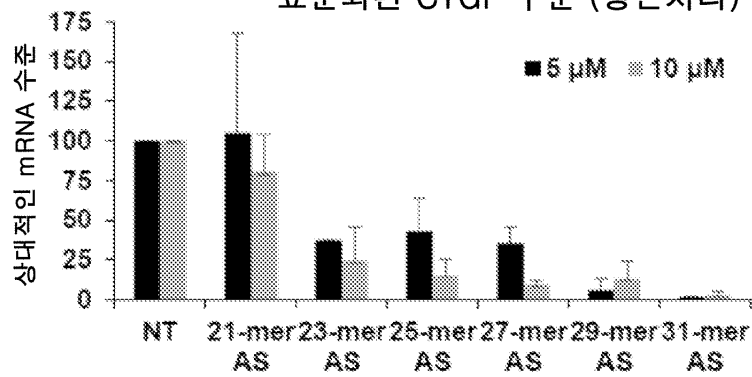


도면12a

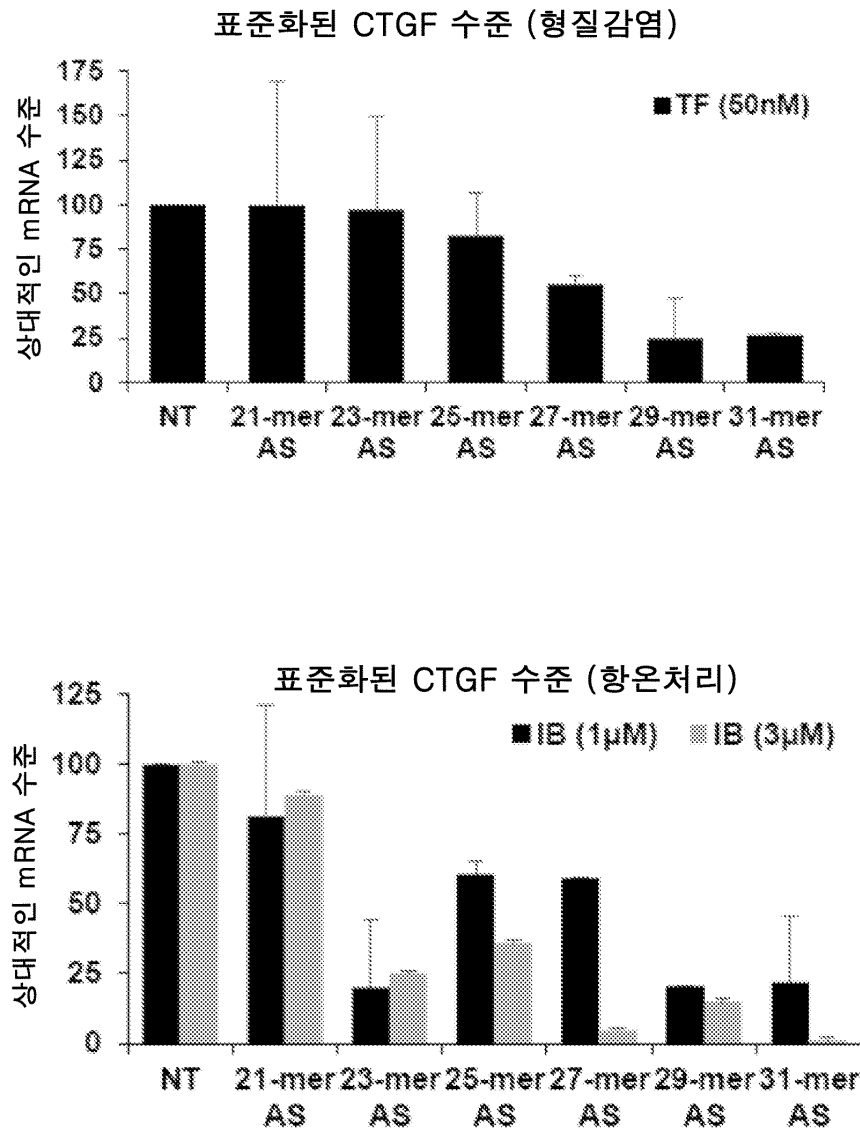
표준화된 CTGF 수준 (형질감염)



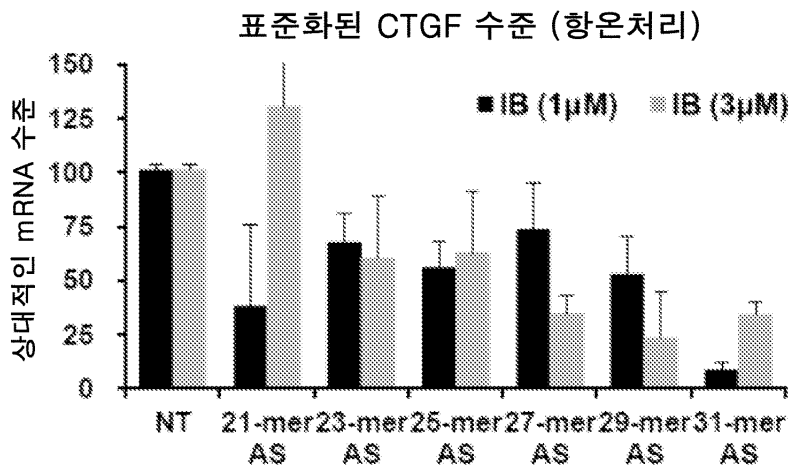
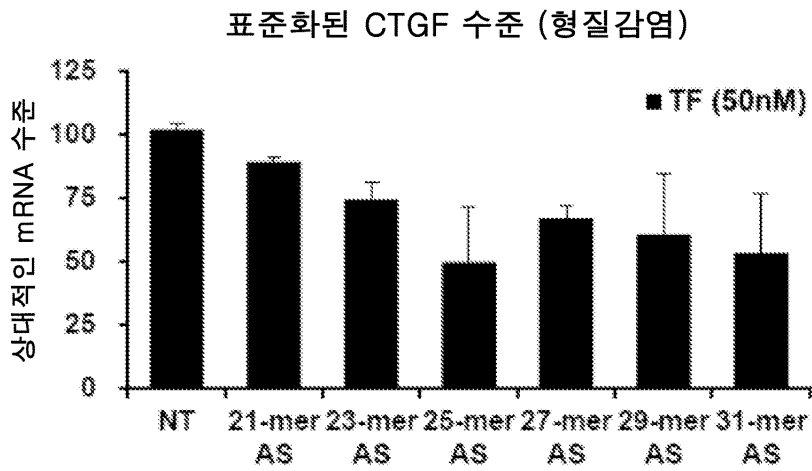
표준화된 CTGF 수준 (항온처리)



도면12b

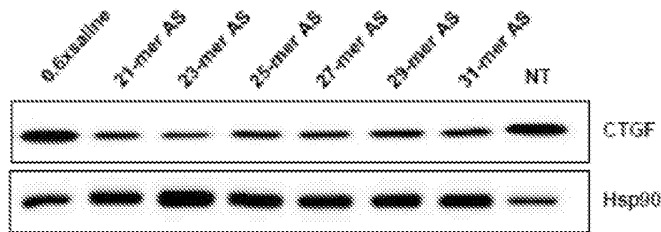
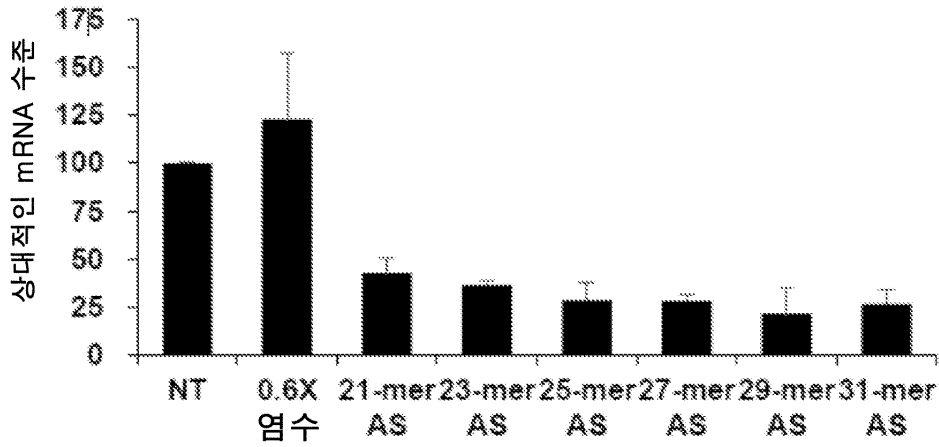


도면12c

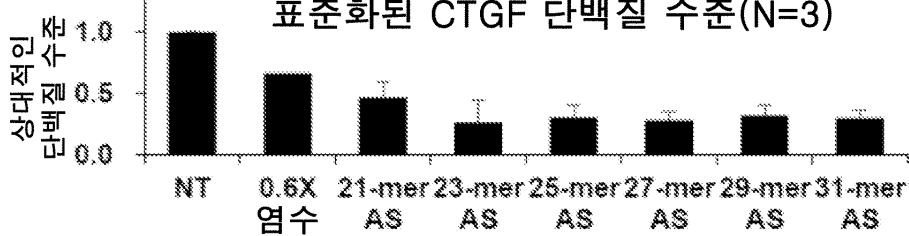


도면13

표준화된 CTGF 수준 (N=3)



표준화된 CTGF 단백질 수준(N=3)



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> LEE, DONG KI

HONG, SUN WOO

LEE, TAE YEON

LEE, SAE LO OOM

KIM, JI HYUN

NA, YU RAN

KIM, YOUNG-DONG

<120> TREATMENT OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS USING RNA COMPLEXES

THAT TARGET CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR

<130> OPH-00901

<140> 15/483,305
 <141> 2017-04-10
 <150> 62/320,944
 <151> 2016-04-11
 <160> 263
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 1
 ccagaaugua uauuaa 16

<210> 2
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 2
 uuaauauaca uucuggugcu g 21

<210> 3
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 3
 accagcagaa agguua 16

<210> 4
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 4
 uaaccuuucu gcugguaccc u 21
 <210> 5
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 5
 acagcuagga ugugca 16
 <210> 6
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 6
 ugcacauccu agcugucacu g 21
 <210> 7
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 7
 ccaagccuau caaguu 16
 <210> 8
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 8
 aacuugauag gcuuggagau u 21
 <210> 9
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 9
 uggaacuuga acugau 16
 <210> 10
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 10
 aucaguuca guuccagucu a 21
 <210> 11
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 11
 caccauaggu agaaug 16
 <210> 12
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 12

cauucuaccu augguguuca g 21

<210> 13

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 13

cguucaaaagc augaaa 16

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 14

uuucaugcuu ugaacgauca g 21

<210> 15

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 15

guuuuucgga caguuu 16

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 16
aaacuguccg aaaaacaguc a 21
<210> 17
<211> 16
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 17
aucguucaaa gcauga 16
<210> 18
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 18
ucaugcuuug aacgaucaga c 21
<210> 19
<211> 16
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 19
ucuauauagc ugauga 16
<210> 20
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 20

ugaucagcua uauagaguca c	21
<210> 21	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 21	
agauagcauc uuauac	16
<210> 22	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 22	
guauaagaug cuaucugaug a	21
<210> 23	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 23	
agagacugag ucaagu	16
<210> 24	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 24	
acuugacuca gucucuugau g	21

<210> 25
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 25
 ugugccugcc auuaca 16
 <210> 26
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 26
 uguaauggca ggcacagguc u 21
 <210> 27
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 27
 aacaagccag auuuuu 16
 <210> 28
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 28
 aaaaaucugg cuuguuacag g 21
 <210> 29
 <211> 16

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 29
 guaacaagcc agauuu 16
 <210> 30
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 30
 aaaucuggcu uguuacaggc a 21
 <210> 31
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 31
 caccuuucua guugaa 16
 <210> 32
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 32
 uucaacuaga aaggugcaaa c 21
 <210> 33
 <211> 16
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 33

uugcaccuuu cuaguu 16

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 34

aacuagaaag gugcaaacau g 21

<210> 35

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 35

gagugugacc aaaagu 16

<210> 36

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

acuuuugguc acacucuca c 21

<210> 37

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 37
 ugugccugcc auuaca 16
 <210> 38
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 38
 uguaaaggca ggcacagguc u 21
 <210> 39
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 39
 guaacaagcc agauuu 16
 <210> 40
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 40
 aaaucuggcu uguuacaggc a 21
 <210> 41
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 41
 uugcaccuuu cuaguu 16
 <210> 42
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 42
 aacuagaaag gugcaaacau g 21
 <210> 43
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 43
 gagugugacc aaaagu 16
 <210> 44
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 44
 acuuuugguc acacucuca c 21
 <210> 45
 <211> 2358
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 aaactcacac aacaactctt ccccgctgag aggagacagc cagtgcgact ccaccctcca 60

gctcgacggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gtcccgggcc 120

ccacctccga ccaccgccag cgctccagge cccgccgctc cccgctcgcc gccaccgcgc 180

cctccgctcc gcccgcagtg ccaaccatga ccgccgccag tatgggcccc gtccgcgtcg 240

ccttcgtggt cctcctcgcc ctctgcagcc ggccggccgt cggccagaac tgcagcgggc 300

cgtgccgggt cccggacgag ccggcgccgc gctgccgggc gggcgtgagc ctctgctgg 360

acggctgagg ctgctgccgc gtctgcgcca agcagctggg cgagctgtgc accgagcgcg 420

accctgcga ccgcacaag ggctcttct gtgacttcgg ctccccggcc aaccgcaaga 480

tcggcgtgtg caccgcaaaa gatggtgctc cctgcatctt cgggtgtacg gtgtaccgca 540

gctgagagtc ctccagagc agctgcaagt accagtgcac gtgcctggac ggggcggtgg 600

gctgcatgcc cctgtgcagc atggacgttc gctgcccag ccctgactgc cccttcccga 660

ggagggtcaa gctgccggg aaatgctgcg aggagtgggt gtgtgacgag cccaaggacc 720

aaacctggt tggcctgcc ctcgcggtt accgactgga agacacgttt ggcccagacc 780

caactatgat tagagccaac tgcctggtcc agaccacaga gtggagcgc tttccaaga 840

cctgtgggat gggcatctcc acccggtta ccaatgacaa cgctcctgc aggctagaga 900

agcagagccg cctgtgcatg gtcaggcctt gcgaagctga cctggaagag aacattaaga 960

agggcaaaaa gtgcatccgt actcccaaaa tctccaagcc tatcaagttt gagctttctg 1020

gctgcaccag catgaagaca taccgagcta aattctgtgg agtatgtacc gacggccgat 1080

gctgcacccc ccacagaacc accaccctgc cggaggagtt caagtgcct gacggcgagg 1140

tcatgaagaa gaacatgatg ttcatcaaga cctgtgctg ccattacaac tgtcccggag 1200

acaatgacat ctttgaatcg ctgtactaca ggaagatgta cggagacatg gcatgaagcc 1260

agagagtgag agacattaac tcatagact ggaacttga ctgattcaca tctcattttt 1320

ccgtaaaaat gatttcagta gcacaagtta tttaaatctg tttttctaac tgggggaaaa 1380

gattcccacc caattcaaaa catttgcca tgtcaaaaa atagtctatc aaccacagac 1440

actggtttga agaagttaa gacttgacag tggaactaca ttagtacaca gcaccagaat 1500

gtatattaag gtgtggcttt aggagcagtg ggagggtacc agcagaaaagg ttagtatcat 1560

cagatagcat cttatacgag taatatgcct gctatttgaa gtgtaattga gaaggaaaat 1620

tttagcgtgc tcaactgacct gcctgtagcc ccagtgcag ctaggatgtg cattctccag 1680

ccatcaagag actgagtcaa gttgttcctt aagtcagaac agcagactca gctctgacat 1740

tctgattcga atgacactgt tcaggaatcg gaatcctgtc gattagactg gacagcttgt 1800

ggcaagtgaa ttgacctgta acaagccaga ttttttaaaa tttatattgt aaatattgtg 1860
 tgtgtgtgtg tgtgtgtata tatatatata tgtacagtta tctaagttaa tttaaagttg 1920
 tttgtgcctt tttatatttg tttttaatgc tttgatattt caatgttagc ctcaatttct 1980
 gaacaccata ggiagaatgt aaagcttgic tgcacgttca aagcatgaaa tggatactta 2040
 tatggaatt ctgctcagat agaatgacag tccgtcaaaa cagattgttt gcaaagggga 2100
 ggcatcagtg tccttggcag gctgatttct aggtaggaaa tgtgtagacc tcacttttaa 2160
 tgaacaaatg gcctttatta aaaactgagt gactctatat agctgatcag tttttcacc 2220

tggaagcatt tgtttctact ttgatatgac tgtttttcgg acagtttatt tgttgagagt 2280
 gtgacaaaa gttacatgtt tgcaccttc tagttgaaaa taaagtgtat attttttcta 2340
 taaaaaaaa aaaaaaaaa 2358

<210> 46

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 46

cauagguaga auguaa 16

<210> 47

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 47

uuacauucua ccuauggugu u 21

<210> 48

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 48

uauagcugau caguuu	16
<210> 49	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 49	
aaacugauca gcuaauuaga g	21
<210> 50	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 50	
ccagcaugaa gacaua	16
<210> 51	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 51	
uaugucuca ugcuggugca g	21
<210> 52	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 52	
ccagaaugua uauuaa	16

<210> 53
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 53
 uuaauauaca uucuggugcu g 21
 <210> 54
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 54
 caaauaggccu uuauua 16
 <210> 55
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 55
 uaauaaaggc cauuguuca u 21
 <210> 56
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 56
 gacauaccga gcuaaa 16
 <210> 57

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 57
 uuuagcucgg uaugucuca u 21
 <210> 58
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 58
 ucaaguugu ccuuaa 16

 <210> 59
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 59
 uuaaggaaca acuugacua g 21
 <210> 60
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 60
 aagacauacc gagcua 16
 <210> 61
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 61

uagcucggua ugucucaug c

21

<210> 62

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 62

accagcagaa agguua

16

<210> 63

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 63

uaaccuuucu gcugguacc u

21

<210> 64

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 64

uaauugagaa ggaaaa

16

<210> 65

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 65
 uuuuccuucu caauuacacu u 21

<210> 66
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 66
 accgcaagau cggcgu 16

<210> 67
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 67
 acgccgaucu ugcgguuggc c 21

<210> 68
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 68
 ccaaccauga ccgccg 16

<210> 69
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide
 <400> 69
 cggcggucau gguuggcacu g 21
 <210> 70
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 70
 uggaguuca gugccc 16
 <210> 71
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 71
 gggcacuuga acuccaccgg c 21
 <210> 72
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 72
 accgcacaa gggccu 16
 <210> 73
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 73
aggcccuugu gcgggucgca g 21
<210> 74
<211> 16
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 74
ugccccuucc cgagga 16
<210> 75
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 75
uccucgggaa ggggcaguca g 21
<210> 76
<211> 16
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 76
acagcuagga ugugca 16
<210> 77
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 77

ugcacauccu agcugucacu g 21

<210> 78

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 78

ccaacuauga uuagag 16

<210> 79

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 79

cucuaaucau aguugggucu g 21

<210> 80

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 80

ugaagacaua ccgagc 16

<210> 81

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 81

gcucgguaug ucuucaugcu g 21

<210> 82

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 82

aggcugauuu cuaggu

16

<210> 83

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 83

accuagaaau cagccugcca a

21

<210> 84

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 84

cucccaaaau cuccaa

16

<210> 85

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 85

uuggagauuu ugggaguacg g

21

<210> 86

<211> 16

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 86
 acuggaagac acguuu 16

<210> 87
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 87
 aaacgugucu uccagucggu a 21

<210> 88
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 88
 ggguuaccaa ugacaa 16

<210> 89
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 89
 uugucauugg uaacccgggu g 21

<210> 90
 <211> 16
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 90
 gaccuggaag agaaca 16
 <210> 91
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 91
 uguucucuuc caggucagcu u 21
 <210> 92
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 92
 ggaagagaac auuaag 16
 <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
 cuuaauguuc ucuuccaggt c 21
 <210> 94
 <211> 16

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 94
 ccaagccuau caaguu 16
 <210> 95
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 95
 aacuugauag gcuuggagau u 21

<210> 96
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 96
 cauaccgagc uaaaau 16
 <210> 97
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 97
 aaaaaagcuc gguaugucuu c 21
 <210> 98
 <211> 16
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 98

aaaauucugug gaguau 16

<210> 99

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 99

auacuccaca gaauuuagcu c 21

<210> 100

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 100

cuggaagaga acauua 16

<210> 101

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 101

uaauguucuc uuccagguca g 21

<210> 102

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 102
 uggaagagaa cauuaa 16

<210> 103
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 103
 uuaauguucu cuuccagguc a 21

<210> 104
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 104
 uggaacuuga acugau 16

<210> 105
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 105
 aucaguuca guuccagucu a 21

<210> 106
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide
 <400> 106
 uuccaccagcc aucaag 16
 <210> 107
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 107
 cuugauggcu ggagaaugca c 21
 <210> 108
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 108
 caccuaggu agaaug 16
 <210> 109
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 109
 cauccuaccu augguguca g 21
 <210> 110
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 110
cguucaaagc augaaa 16
<210> 111
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 111
uuucaugcuu ugaacgauca g 21
<210> 112
<211> 16
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 112
guuuuucgga caguuu 16
<210> 113
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 113
aaacuguccg aaaaacaguc a 21
<210> 114
<211> 16
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 114

aagauuccca cccaau 16

<210> 115

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 115

auuggguggg aaucuuuucc c 21

<210> 116

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 116

ggcaugaagc cagaga 16

<210> 117

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 117

ucucuggcuu caugccaugu c 21

<210> 118

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 118

cucauuuuuc cguaaa 16

<210> 119

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 119

uuuacggaaa aaugagaugu g

21

<210> 120

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 120

gucccggaga caauga

16

<210> 121

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 121

ucauugucuc cgggacaguu g

21

<210> 122

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 122

aucguucaaa gcauga

16

<210> 123

<211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 123
 ucaugcuuug aacgaucaga c 21

<210> 124
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 124
 ucuaauauagc ugauca 16

<210> 125
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 125
 ugaucagcua uauagaguca c 21

<210> 126
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 126
 ccguccgcuu cgccuu 16

<210> 127
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 127
 aaggcgacgc ggacggggcc c 21
 <210> 128
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 128
 cagcugggcg agcugu 16
 <210> 129
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 129
 acagcucgcc cagcugcuug g 21
 <210> 130
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 130
 gugcaccgcc aaagau 16
 <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
 aucuuuggcg gtgcacacgc c 21

<210> 132
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 132
 gacgacgucg aaguac 16

<210> 133
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 133
 guacuugcag cugcucugga a 21

<210> 134
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 134
 ugauuagagc caacug 16

<210> 135
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 135

caguuggcuc uaaucauagu u

21

<210> 136

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 136

agacauaccg agcuaa

16

<210> 137

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 137

uuagcucggu augucucau g

21

<210> 138

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 138

acucuuaga cuggaa

16

<210> 139

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 139
 uuccagucua augaguuaau g 21

<210> 140
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 140
 agauagcauc uuauac 16
 <210> 141
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 141
 guauaagaug cuaucugaug a 21
 <210> 142
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 142
 agagacugag ucaagu 16
 <210> 143
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide
 <400> 143
 acuugacuca gucucuugau g 21
 <210> 144
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 144
 aaugacaguc cgucaa 16
 <210> 145
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 145
 uugacggacu gucauucua c 21
 <210> 146
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 146
 gccgcgucug cgccaa 16
 <210> 147
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 147
 uggcgcagac gcggcagcag c 21
 <210> 148
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 148
 ugugcagcau ggacgu 16
 <210> 149
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 149
 acguccaugc ugcacagggg c 21
 <210> 150
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 150
 cugucagca uggacg 16
 <210> 151
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 151

cguccaugcu gcacaggggc a 21
 <210> 152
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 152
 ccugacugc ccuuc 16
 <210> 153
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 153
 gaaggggcag ucagggcugg g 21

 <210> 154
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 154
 gccugacug cccuu 16
 <210> 155
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 155
 aaggggcagu cagggcuggg c 21
 <210> 156

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 156

gugacgagcc caagga 16

<210> 157

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 157

uccuugggcu cgucacacac c 21

<210> 158

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 158

ugugugacga gcccaa 16

<210> 159

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 159

uugggcucgu cacacacca c 21

<210> 160

<211> 16

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 160
 agugggugug ugacga 16

<210> 161
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 161
 ucgucacaca cccacuccuc g 21

<210> 162
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 162
 aggagugggu guguga 16

<210> 163
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 163
 ucacacacc acuccucgca g 21

<210> 164
 <211> 16
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 164
 cgaggagugg gugugu 16
 <210> 165
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 165
 acacaccac uccucgcagc a 21
 <210> 166
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 166
 ugcgaggagu gggugu 16
 <210> 167
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 167
 acaccacuc cucgcagcau u 21
 <210> 168
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 168
 cagacccaac uaugau 16
 <210> 169
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 169
 aucauaguug ggucugggcc a 21
 <210> 170
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 170
 ccagacccaa cuauga 16
 <210> 171
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 171
 uc auaguugg gucugggcc a 21
 <210> 172
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 172
 cccagaccca acuaug 16
 <210> 173
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 173
 cauaguuggg ucugggcaa a 21
 <210> 174
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 174
 gaguggagcg ccuguu 16
 <210> 175
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 175
 aacaggcgcu ccacucugug g 21
 <210> 176
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 176

guccagacca cagagu	16
<210> 177	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 177	
acucuguggu cuggaccagg c	21
<210> 178	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 178	
ugguccagac cacaga	16
<210> 179	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 179	
ucuguggucu ggaccaggca g	21
<210> 180	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 180	
ccugguccag accaca	16

<210> 181
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 181
 uguggucugg accaggcagu u 21

<210> 182
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 182
 aacugccugg uccaga 16

<210> 183
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 183
 ucuggaccag gcaguuggcu c 21

<210> 184
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 184
 gggauaggca ucucca 16

<210> 185

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 185
 uggagaugcc cauccacag g 21
 <210> 186
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 186
 ugugggaugg gcaucu 16
 <210> 187
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 187
 agaugcccau cccacagguc u 21
 <210> 188
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 188
 cugugggaug ggcauc 16
 <210> 189
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 189
 gaugcccauc ccacaggucu u 21
 <210> 190
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 190
 agggcaaaaa gugcau 16
 <210> 191
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 191
 augcacuuuu ugcccuucuu a 21
 <210> 192
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 192
 uaagaagggc aaaaag 16
 <210> 193
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 193

cuuuuugccc uucuuaaugu u

21

<210> 194

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 194

cuuucuggcu gcacca

16

<210> 195

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 195

uggugcagcc agaaagcuca a

21

<210> 196

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 196

gagcuuucug gcugca

16

<210> 197

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide
 <400> 197
 ugcagccaga aagcucaaac u 21
 <210> 198
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 198
 cugccauuac aacugu 16
 <210> 199
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 199
 acaguuguaa uggcaggcac a 21
 <210> 200
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 200
 gccugccauu acaacu 16
 <210> 201
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 201
 aguuguaaug gcaggcacag g 21

<210> 202
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 202
 ugccugccau uacaac 16

<210> 203
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 203
 guuguaaugg caggcacagg u 21

<210> 204
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 204
 gugccugcca uuacaa 16

<210> 205
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 205

uuguaauggc aggcacaggu c	21
<210> 206	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 206	
ugugccugcc auuaca	16
<210> 207	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 207	
uguaauggca ggcacagguc u	21
<210> 208	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 208	
ccugugccug ccauaa	16
<210> 209	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 209	
uaauggcagg cacaggucuu g	21

<210> 210
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 210
 accugugccu gccauu 16
 <210> 211
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 211
 aauggcaggc acaggucuug a 21
 <210> 212
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 212
 gaccugugcc ugccau 16
 <210> 213
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 213
 auggcaggca caggucuuga u 21
 <210> 214
 <211> 16

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 214
 guucaucaag accugu 16
 <210> 215
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 215
 acaggucuug augaacauc u 21
 <210> 216
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 216
 agauguacgg agacau 16
 <210> 217
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 217
 augucuccgu acaucuuccu g 21
 <210> 218
 <211> 16
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 218

ggaagaugua cggaga 16

<210> 219

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 219

ucuccguaca ucuuccugua g 21

<210> 220

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 220

cuacaggaag auguac 16

<210> 221

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 221

guacaucuuc cuguaguaca g 21

<210> 222

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 222
 acagcuugug gcaagu 16
 <210> 223
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 223
 acuugccaca agcuguccag u 21
 <210> 224
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 224
 gacagcuugu ggcaag 16
 <210> 225
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 225
 cuugccaca gcuguccagu c 21
 <210> 226
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 226
 ggacagcuug uggcaa 16
 <210> 227
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 227
 uugccacaag cuguccaguc u 21
 <210> 228
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 228
 aacaagccag auuuuu 16
 <210> 229
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 229
 aaaaucugg cuuguuacag g 21
 <210> 230
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 230

guaacaagcc agauuu 16

<210> 231

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 231

aaaucuggcu uguuacaggc a 21

<210> 232

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 232

cuguaacaag ccagau 16

<210> 233

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 233

aucuggcuug uuacaggcaa a 21

<210> 234

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 234

ucuaaguuaa uuuaaa 16

<210> 235

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 235

uuuaaaauaa cuuagauaac u 21

<210> 236

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 236

caccuuucua guugaa 16

<210> 237

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 237

uucaacuaga aaggugcaaa c 21

<210> 238

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 238

uugcaccuuu cuaguu 16

<210> 239

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 239
 aacuagaaag gugcaacau g 21
 <210> 240
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 240
 cauguuugca ccuuc 16
 <210> 241
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 241
 gaaaggugca aacauguaac u 21
 <210> 242
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

 oligonucleotide
 <400> 242
 gagugugacc aaaagu 16
 <210> 243
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 243
 acuuuugguc acacucucaa c 21
 <210> 244
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 244
 agagugugac caaaag 16

<210> 245
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 245
 gagtcaacgg attggtcgt 20
 <210> 246
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 246
 gacaagcttc ccgttctcag 20
 <210> 247
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 247

caagggcctc ttctgtgact 20

<210> 248

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 248

acgtgcactg gtacttgacg 20

<210> 249

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 249

tgcagtggga attgtgacct 20

<210> 250

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 250

ggaatcggac cttaccctga 20

<210> 251

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 251
 tcatcgtggc ttctctggtc 20

<210> 252
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 252
 gaccgttgag tccgtctttg 20

<210> 253
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 253
 acgtaagcac tggaggacag a 21

<210> 254
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 254
 gagggccata gctgaactga 20

<210> 255
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 255

gtgtagcaca acttccaatt acgaa 25

<210> 256

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 256

ggaatttccg cctcgagtct 20

<210> 257

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 257

cuuaccgacu ggaaga 16

<210> 258

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 258

ucuuccaguc gguaagccgc g 21

<210> 259

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 259	
ucuuccaguc gguaagccgc gag	23
<210> 260	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 260	
ucuuccaguc gguaagccgc gaggg	25
<210> 261	
<211> 27	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 261	
ucuuccaguc gguaagccgc gagggca	27
<210> 262	
<211> 29	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 262	
ucuuccaguc gguaagccgc gagggcagg	29
<210> 263	
<211> 31	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	

<400> 263

ucuuccaguc gguaagccgc gagggcaggc c

31