



등록특허 10-2677300



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월24일
(11) 등록번호 10-2677300
(24) 등록일자 2024년06월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7011322
- (22) 출원일자(국제) 2018년09월20일
심사청구일자 2021년09월17일
- (85) 번역문제출일자 2020년04월20일
- (65) 공개번호 10-2020-0117975
- (43) 공개일자 2020년10월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2018/057262
- (87) 국제공개번호 WO 2019/058304
국제공개일자 2019년03월28일
- (30) 우선권주장
102017000105372 2017년09월20일 이탈리아(IT)
- (56) 선행기술조사문현
WO2012133947 A1
JP2015535430 A
WO2014081507 A1
WO2004038380 A1
- (73) 특허권자
폰다치오네 이스티튜토 이탈리아노 디 테크놀로지아
이탈리아 제노바 비아 모레고 30 (우:16163)
스쿠오라 인타나찌오나레 수페리오레 디 스튜디아반짜티-에스.아이.에스.에스.에이
이탈리아 34136 트리에스테 비아 보노메아 265
- (72) 발명자
구스틴치크, 스텔파노
이탈리아 16163 제노바 비아 모레고 30 폰다치오네 이스티튜토 이탈리아노 디 테크놀로지아 내추켈리, 실비아
이탈리아 16163 제노바 비아 모레고 30 폰다치오네 이스티튜토 이탈리아노 디 테크놀로지아 내
- (74) 대리인
양영준, 이윤기

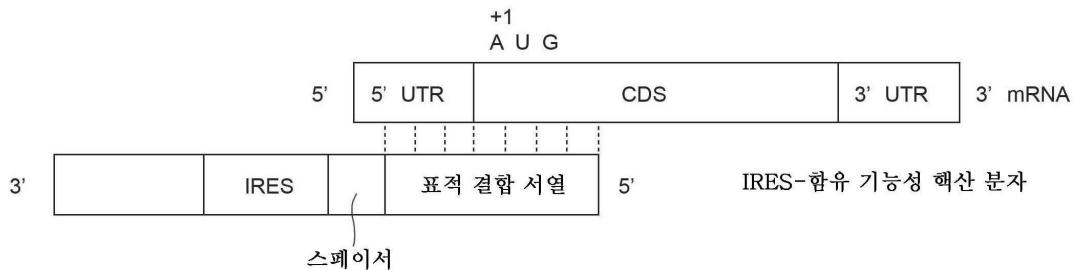
전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 기능성 핵산 분자 및 그의 용도

(57) 요약

단백질 번역을 증진시킬 표적 mRNA 서열에 역 상보적인 서열을 포함하는 진핵성 표적 결합 서열, 및 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열 또는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 유래 서열을 포함하고, 표적 mRNA 서열의 번역을 증진시키는 조절 서열을 포함하며, 여기서 조절 서열은 표적 결합 서열의 3'에 위치하는 것인, 트랜스-작용 기능성 핵산 분자를 개시한다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/3519 (2013.01)
C12N 2330/51 (2013.01)
C12N 2840/105 (2013.01)
C12N 2840/203 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- 단백질 번역을 증진시키는 진핵성 표적 mRNA 서열에 역 상보적인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및
- 표적 mRNA 서열의 번역을 증진시키는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열을 포함하는 조절 서열을 포함하며,

여기서 조절 서열은 표적 결합 서열의 3'에 위치하는 것인

트랜스-작용 기능성 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 표적 결합 서열이 3'에서 5' 방향으로 표적 mRNA 서열의, 5' 비번역 영역 (5' UTR)의 1 내지 50개의 뉴클레오티드 및 코딩 서열 (CDS)의 1 내지 40개의 뉴클레오티드에 역 상보적인 서열로 이루어진 것인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자.

청구항 3

제2항에 있어서, 표적 결합 서열이 3'에서 5' 방향으로 표적 mRNA 서열의, 5' 비번역 영역 (5' UTR)의 10 내지 45개의 뉴클레오티드 및 코딩 서열 (CDS)의 2 내지 6개의 뉴클레오티드에 역 상보적인 서열로 이루어진 것인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, IRES 서열이 트랜스-작용 기능성 핵산 분자 중에 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으로 정배향으로 배향되어 있는 것인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, IRES 서열이 서열식별번호 36 내지 서열식별번호 65로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, 트랜스-작용 기능성 핵산 분자가 RNA 분자 또는 변형된 RNA 분자인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 표적 결합 서열과 조절 서열 사이에 스페이서 서열을 추가로 포함하는 트랜스-작용 기능성 핵산 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 트랜스-작용 기능성 핵산 분자를 코딩하는 DNA 분자.

청구항 9

제8항에 따른 DNA 분자를 포함하는 밸런 벡터.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 번역을 증진시키기 위한 트랜스-작용 기능성 핵산 분자이며, 여기서 트랜스-작용 기능성 핵산 분자는 세포 내로 형질감염되는 것인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자.

청구항 11

제8항에 있어서, 단백질 번역을 증진시키기 위한 DNA 분자이며, 여기서 DNA 분자는 세포 내로 형질감염되는 것인 DNA 분자.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 트랜스-작용 기능성 핵산 분자를 포함하는 조성물.

청구항 13

제8항에 따른 DNA 분자를 포함하는 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 표적 mRNA 서열의 번역을 증진시키기 위한 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 표적 mRNA 서열의 번역을 증진시키기 위한 조성물.

청구항 16

단백질-코딩 mRNA의 하향 조절에 의해 유발되는 유전성 질환을 치료하는 데, 또는 유전자량 감소가 유해한 유전성 또는 산발성 질환을 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 트랜스-작용 기능성 핵산 분자를 포함하는 조성물.

청구항 17

단백질-코딩 mRNA의 하향 조절에 의해 유발되는 유전성 질환을 치료하는 데, 또는 유전자량 감소가 유해한 유전성 또는 산발성 질환을 치료하는 데 사용하기 위한, 제8항에 따른 DNA 분자를 포함하는 조성물.

청구항 18

삭제

발명의 설명**기술 분야****[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조**

본 출원은 2017년 9월 20일 출원된 이탈리아 특허 출원 번호 10201700015372로부터 우선권을 주장하고, 상기 특허의 개시내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명의 기술 분야

본 발명은 진핵생물에서의 특이적인 표적 mRNA의 단백질 번역을 증진시키는 기능을 갖고 있는 트랜스-작용 기능성 핵산 분자, 상기 분자를 코딩하는 DNA 분자, 상기 분자의 용도, 및 단백질 번역을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 진핵생물에서, mRNA는 주로, 개시 인자가 40S 리보솜 서브유닛을 mRNA의 5' 단부에 있는 캡 구조로 동원시키게 하는 캡-의존적 기전을 통해 주로 번역된다. 그러나, 일부 바이러스 및 세포 메시지는 캡 없이 단백질 합성을 개시한다 (Thompson SR, Trends Microbiol 2012; Jackson RJ, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013). 이러한 경우, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)로 명명되는 구조화된 RNA 요소는 40S 리보솜 서브유닛을 동원한다. IRES는 20여년 전에 피코르나바이러스에서 발견되었다. 세포에서, IRES 서열은 단백질 코딩 mRNA의 서브세트의 캡-비의존적 번역을 촉진시켜 스트레스 조건하에서 발생하는 캡-의존적 번역의 일반적인 억제를 극복한다. IRES 서열은 일반적으로 스트레스-반응 유전자를 코딩하는 세포 mRNA의 5' 비번역 영역에서 발견되며, 따라서,

그의 번역을 시스(*cis*)로 자극시킨다.

[0006] 최근 고처리량 스크리닝 시스템을 통해 세포 mRNA 내에서의 입증된 IRES 서열 목록이 확대되었다 (Weingarten-Gabbay S, et al., Science, 2016).

[0007] 유전자 특이적 번역 상향 조절은, 내부 리보솜 진입 (IRES) 서열 또는 번역 인핸서 서열을 함유하는 변형된 5' 서열을 포함하도록 단백질 코딩 mRNA를 변형시킴으로써 달성될 수 있다. 상기 시스템에서, IRES 또는 번역 인핸서 서열은 관심 특이적 유전자를 코딩하는 cDNA의 5'에 시스로 배치된다. 이러한 방법은 2개의 시스트론을 발현하는 벡터 구축을 위해, 및 과다발현된 유전자의 번역을 증진시키는 데 적용되어 왔다. 그러나, 내인적 발현 mRNA의 번역 상향 조절을 유도하는 것을 목표로 하는 경우에는 번역 증진의 시스-조절이 사용될 수 없다. 그러므로, 유전자 특이적 번역 상향 조절을 촉진시키고, 내인성 mRNA에 대해 작용하는 트랜스-조절 요소를 확인하는 것이 요구되고 있다. 비의존성 RNA 도메인으로서 작용하는 번역 상향 조절 트랜스-조절 요소 또한 요구되고 있다.

[0008] 핵산 분자를 사용하여 생체내에서 유전자 발현을 조작하는 것은 최근 진료소에서의 잠재적 적용을 위해 큰 관심을 받고 있다. 지금까지의 대부분의 노력들은 siRNA, miRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하여 독성 단백질을 하향 조절할 수 있는 능력에 집중되어져 왔다. 그러나, 다수의 질환들은 유전자량 감소에 의해 유발되며, 따라서, 단백질 생성물의 증가가 요구된다. 다수의 연구들은 전사 수준에서 문제에 접근하였지만, 번역을 증가시키기 위해 기능성 안티센스 RNA 분자 (SINEUP)를 사용하는 단 하나의 예가 존재한다 (Carrieri C., et al., Nature, 2012). SINEUP은 mRNA 수준에는 어떤 영향도 주지 않으면서, 부분적으로 중복되는 단백질-코딩 mRNA의 번역을 촉진시킬 수 있는 안티센스 긴 비-코딩 RNA이다. SINEUP 활성은 두 기능성 도메인에 의존한다: 중복 영역, 또는 "결합 도메인"은 SINEUP 특이성을 좌우하는 반면, 임베딩된(embedded) 역위 SINEB2 요소는 "이펙터 도메인"으로서 작용하고, mRNA 번역 증진을 제어한다 (Zucchelli S., et al., Front Cell Neurosci 2015; Zucchelli S., et al., RNA Biol, 2015). 그의 모듈식 구조를 이용함으로써, 합성 SINEUP는 실제로 임의의 관심 표적 유전자의 번역을 특이적으로 증진시키도록 디자인될 수 있다 (Zucchelli S., et al., Front Cell Neurosci 2015; Zucchelli S., et al., RNA Biol, 2015; Indrieri A., et al., Scientific Reports, 2016; Gustincich S., et al., Prog Neurobiol, 2016; Zucchelli S., et al., Comput Struct Biotechnol J, 2016).

[0009] EP2691522에는 SINEUP를 포함하는 기능성 핵산 분자가 개시되어 있다.

[0010] SINEUP은 그의 잠재능에도 불구하고, 마우스 계놈으로부터 유래되고, 수용자 세포에서 역전위 (한 계놈 위치에서 또 다른 위치로의 이동)가 가능한 잠재능을 갖는 서열인, 임베딩된 SINE 요소의 번역 인핸서 활성에 의존한다. 이는 불충분한 유전자량의 교정을 위해 번역 상향 조절을 포함하는 임의의 치료적 사용에는 해가 될 수 있을 것이다. 그러므로, 유전자 특이적 번역 상향 조절을 촉진시키고, 마우스 서열로부터 유래되지 않은 내인성 mRNA에 대해 작용하는 트랜스-조절 요소가 요구되고 있다. 유전자 특이적 번역 상향 조절을 촉진시키고, 전위 가능 요소로부터 유래되지 않은 트랜스-조절 요소 또한 요구되고 있다.

[0011] EP2691522의 대부분의 기능성 핵산 분자들은 길이가 상당히 긴 편이다. RNA 분자의 수용자 세포로의 전달이 더욱 효율적으로 이루어질 수 있도록 하기 위해서는, 유전자 특이적 번역 상향 조절을 촉진시키고, 내인성 mRNA에 대해 작용하는 더 짧은 트랜스-조절 요소의 확인이 요구되고 있다.

[0012] EP2691522의 기능성 핵산 분자의 번역 증진 효과는 전형적으로 세포 유형에 따라 1.5-2.0배이다. 이러한 단백질 증가 수준은, 불충분 유전자량의 교정을 위해 인간에서 번역 상향 조절을 유도하고자 하는 것을 목표로 할 경우에는 불충분할 수 있다. 그러므로, 더 높은 수준의 유전자 특이적 번역 상향 조절을 촉진시키고, 내인성 mRNA에 대해 작용하는 트랜스-조절 요소를 확인하는 것이 요구되고 있다.

발명의 내용

[0013] 그러므로, 본 발명의 목적은 상기 언급된 문제들을 해소하고, 가능하게는 또한 증진된 기능을 갖는, 기능성 핵산 분자를 제공하는 것이다.

[0014] 본 목적은 제1항에서 정의된 바와 같은 트랜스-작용 기능성 핵산 분자에 의해 달성된다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 제10항에서 정의된 바와 같은 DNA 분자, 제11항에서 정의된 바와 같은 발현 벡터, 제12항에서 정의된 바와 같은 단백질 번역을 증진시키는 방법, 제13항에서 정의된 바와 같은 조성물 및 제14항 및 제15항에서 정의된 바와 같은 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 용도를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1은 본 발명에 따른 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 2A는 선행 기술에 따른 기능성 핵산 분자 (SINEUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 2B는 각각 빈 대조군 플라스미드 (-), 전장의 SINEUP-DJ-1 (FL) 및 그의 결실 돌연변이체 (Δ ED = 이펙터 도메인이 결실된 돌연변이체, Δ BD = 결합 도메인이 결실된 돌연변이체)로 형질감염된 인간 배아 신장 293T/17 세포 (이하, HEK 293T/17 세포로도 지칭된다)의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 2C는 도 2B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 SINEUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 2D는 HEK 293T/17 세포 (N=5)에서의 내인성 DJ-1 mRNA에 대한 전장의 SINEUP-DJ-1, Δ ED 및 Δ BD 번역 증진 활성을 나타낸 그래프를 보여주는 것이다. $p<0.05$.

도 3은 DJ-1 mRNA를 표적화하는, 본 발명에 따른 일반 트랜스-작용 기능성 핵산 분자 (IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 4는 IRES-함유 기능성 안티센스 핵산 분자의 번역 상향 조절 활성을 시험하기 위한 실험 절차의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 5A는 DJ-1 유전자를 표적화하고, HCV IRES를 포함하는, 본 발명에 따른 기능성 핵산 분자 (IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 5B는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 정배향 (HCV(d)) 및 역배향 (HCV(i))으로 HCV IRES를 포함하는 IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 5C는 도 5B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 6A는 DJ-1 유전자를 표적화하고, 폴리오바이러스 IRES를 포함하는, 본 발명에 따른 기능성 핵산 분자 (IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 6B는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 정배향 (폴리오(d)) 및 역배향 (폴리오(i))으로 폴리오바이러스 IRES를 포함하는 IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 6C는 도 6B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 7A는 DJ-1 유전자를 표적화하고, 뇌심근염 바이러스 (EMCV) IRES 및 귀뚜라미 마비 바이러스 (CrPV) IRES를 포함하는, 본 발명에 따른 기능성 핵산 분자 (IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 7B는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 정배향 (EMCV(d)) 및 역배향 (EMCV(i))으로 EMCV IRES 및 정배향 (CrPV(d)) 및 역배향 (CrPV(i))으로 CrPV IRES를 포함하는 IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 7C는 도 7B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 8A 및 8B는 빈 벡터로 형질감염된 293T/17 세포 대비, 본 발명의 HCV(d) 및 HCV(i) IRUP, 폴리오(d) 및 폴리오(i) IRUP 및 EMCV(d), EMCV(i), CrPV(d) 및 CrPV(i) IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포에서의 DJ-1 단백질의 양 증가를 요약한 그래프를 보여주는 것이다.

도 9A는 DJ-1 유전자를 표적화하고, 인간 아폽토시스 웨티다제 활성화 인자 1 (Apaf-1) mRNA IRES를 포함하는, 본 발명에 따른 기능성 핵산 분자 (IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 9B는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 정배향 (Apaf-1(d)) 및 역배향 (Apaf-1(i))으로 Apaf-1 IRES를 포함하는 IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 9C는 도 9B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 10A는 DJ-1 유전자를 표적화하고, 인간 게놈 불안정 수준 증가 1(Enhanced Level of Genomic instability 1: ELG-1) mRNA IRES를 포함하는, 본 발명에 따른 기능성 핵산 분자 (IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 10B는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 정배향 (ELG-1(d)) 및 역배향 (ELG-1(i))으로 ELG-1 IRES를 포함하는 IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 10C는 도 10B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 11A는 DJ-1 유전자를 표적화하고, 인간 V-Myc 조류 골수세포증 바이러스 온코진 호몰로그 (cMYC) mRNA IRES를 포함하는, 본 발명에 따른 기능성 핵산 분자 (IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 11B는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 정배향 (cMYC(d)) 및 역배향 (cMYC(i))으로 cMYC IRES를 포함하는 IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 11C는 도 11B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 12A는 DJ-1 유전자를 표적화하고, 도 11A 내지 11C의 인간 V-Myc 조류 골수세포증 바이러스 온코진 호몰로그 (cMYC) mRNA IRES의 더 짧은 베전을 포함하는, 본 발명에 따른 기능성 핵산 분자 (IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 12B는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 정배향 (cMYC(d)) 및 역배향 (cMYC(i))으로 cMYC IRES (짧은 변이체)를 포함하는 IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 12C는 도 12B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 13A는 DJ-1 유전자를 표적화하고, 인간 디스트로핀 (DMD) mRNA IRES를 포함하는, 본 발명에 따른 기능성 핵산 분자 (IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 13B는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 정배향 (DMD(d)) 및 역배향 (DMD(i))으로 DMD IRES를 포함하는 IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 13C는 도 13B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 14A 및 14B는 빈 백터로 형질감염된 293T/17 세포 대비, 본 발명의 Apaf-1(d) 및 Apaf-1(i) IRUP, ELG-1(d) 및 ELG-1(i) IRUP, cMYC(d) 짧은 베전 및 cMYC(i) 짧은 베전 IRUP, DMD(d) 및 DMD(i) IRUP, 및 cMYC(d) 긴 베전 및 cMYC(i) 긴 베전 IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포에서의 DJ-1 단백질의 양 증가를 요약한 그레프를 보여주는 것이다.

도 15A-15D는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 HCV IRES 서열, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 폴리오 및 cMYC IRES 서열, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 Apaf-1 및 ELG-1 IRES 서열, 및 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 DMD IRES 서열을 포함하는 IRUP로 형질감염된 인간 간세포 암종 (HepG2) 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 16A 및 16B는 빈 백터로 형질감염된 HepG2 세포 대비, 본 발명의 HCV(d) 및 HCV(i) IRUP, 폴리오(d) 및 폴리오(i) IRUP, cMYC(d) 짧은 베전 및 cMYC(i) 짧은 베전 IRUP, Apaf-1(d) 및 Apaf-1(i) IRUP, ELG-1(d) 및 ELG-1(i) IRUP, 및 DMD(d) 및 DMD(i) IRUP로 형질감염된 HepG2 세포에서의 DJ-1 단백질의 양 증가를 요약한 그레프를 보여주는 것이다.

도 17A는 DJ-1 유전자를 표적화하는, 본 발명에 따른 기능성 핵산 분자의 소형 베전 (미니IRUP)의 개략적 다이

어그램을 보여주는 것이다.

도 17B는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 정배향 (HCV(d))으로 HCV IRES, 정배향 (폴리오(d)) 및 역배향 (폴리오(i))으로 폴리오바이러스 IRES, 및 정배향 (cMYC 짧은 것(d))으로 cMYC 짧은 버전 IRES를 포함하는 미니IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 17C는 도 17B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 17D는 HEK 293T/17 세포 (N=6)에서의 내인성 DJ-1 mRNA에 대한 SINEUP-DJ-1 및 미니-IRUP 번역 증진 활성을 나타낸 그래프를 보여주는 것이다.

도 18A는 DJ-1 유전자를 표적화하는, 본 발명에 따른 기능성 핵산 분자의 소형 버전 (미니IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 도 17A-17D의 미니IRUP와 관련하여, IRES-함유 기능성 핵산 서열은 상이한 프로모터의 제어하에서 클로닝된다.

도 18B는 각각, 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 정배향 (HCV(d))으로 HCV IRES, 정배향 (폴리오(d)) 및 역배향 (폴리오(i))으로 폴리오바이러스 IRES, 및 정배향으로 cMYC 짧은 버전 IRES를 포함하는 미니IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 18C는 도 18B에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 18D는 HEK 293T/17 세포 (N=6)에서의 내인성 DJ-1 mRNA에 대한 SINEUP-DJ-1 및 미니-IRUP 번역 증진 활성을 나타낸 그래프를 보여주는 것이다.

도 19A는 포유동물 세포에서의 기능성 핵산 분자 및 관심 유전자의 공동 발현을 위한 pDUAL-GFP 플라스미드의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 19B는 각각 도 19A에 제시된 빈 대조군 플라스미드, SINE-함유 (SINE) 또는 IRES-함유 (IRES) 미니-기능성 핵산 분자로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 19C는 도 19A의 구축물로 형질감염된 HEK 293T/17 세포에서의 과다발현된 GFP mRNA의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 19D는 기능성 핵산 SINE 또는 IRES RNA의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 20A는 이펙터 도메인이 SINE 또는 HCV IRES 서열로 제시되어 있는, GFP 표적화 기능성 핵산 분자를 포함하는 pDUAL-GFP 플라스미드의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

도 20B는 각각 도 20A에 제시된 빈 대조군 플라스미드, SINE-함유 (SINE) 또는 IRES-함유 (IRES) 미니-기능성 핵산 분자로 형질감염된 인간 신경모세포종 Neuro2a 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 21은 HCV IRES RNA 2차 구조를 나타낸 개략도를 보여주는 것이다.

도 22A는 각각 빈 대조군 플라스미드, SINEUP-DJ-1, 및 WT HCV IRES 및 M2 및 M5 돌연변이화된 HCV IRES를 포함하는 IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블롯의 결과를 보여주는 것이다.

도 22B는 도 22A에서의 것과 같은 샘플에 대해 수행된 내인성 DJ-1 mRNA (상단 패널) 및 IRUP RNA (하단 패널)의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 22C는 HEK 293T/17 세포 (N=7)에서의 내인성 DJ-1 mRNA에 대한 SINEUP-DJ-1 및 IRUP 번역 증진 활성을 나타낸 그래프를 보여주는 것이다.

도 23A는 IRES 서열의 5' 및 IRES-함유 세포 mRNA 내의 서열이 어떻게 결합 도메인으로서 간주될 수 있는지를 나타낸 개략도를 보여주는 것이다.

도 23B는 cMYC mRNA 참조 서열 (NM_002467) 내의 기능성 핵산 서열 요소를 보여주는 것이다. 결합 도메인 (검은색), IRES 서열 (진한 회색), 코딩 서열 또는 CDS (옅은 회색) 및 3' 비번역 영역 (흰색)이 제시되어 있다.

도 23C는 부분적으로 중복되는, 안티센스 배향의, 표적 mRNA 단백질-코딩 서열을 확인하기 위해 질의 서열로서

c-MYC mRNA를 이용한 생물정보학 분석 (BLAST)의 결과를 보여주는 것이다.

도 24A는 MYC의 전장의 mRNA (cMYC-FL)를 코딩하는 포유동물 발현 플라스미드를 나타낸 개략도를 보여주는 것이다.

도 24B는 항-JAG2, 항-DYRK2, 항-LYS, 항-UBE3A, 항-NRF1 항체를 이용한, 포유동물 SAOS 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블로트를 보여주는 것이다.

도 24C 및 24D는 내인성 JAG2, DYRK2, LIS1, UBE3A, NRF1 및 cMYC mRNA의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

도 24E는 cMyc 전장의 mRNA의 평균 수준을 보여주는 것이다.

도 25A는 MYC의 전장의 mRNA (cMYC-FL), 또는 cMYC DNA 결합 도메인이 결여되고 (델타C), 5'UTR 단독 (5'UTR) 도메인으로 또는 IRES 단독 (IRES) 도메인으로 구성된 변이체를 코딩하는 포유동물 발현 플라스미드를 나타낸 개략도를 보여주는 것이다.

도 25B는 항-JAG2, 항-DYRK2, 항-LYS, 항-UBE3A, 항-NRF1 항체를 이용한, 포유동물 SAOS 세포의 용해물에 대해 수행된 웨스턴 블로트를 보여주는 것이다.

도 25C는 내인성 JAG2, DYRK2, LIS1, UBE3A, NRF1 및 cMYC mRNA의 발현을 정량화하는 qRT-PCR의 결과를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

정의

[0018]

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 비록 본 발명의 실시 또는 시험에서 본원에 기술된 것과 유사 또는 등가인 다수의 방법 및 물질이 사용될 수는 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 하기에 기술된다. 달리 언급되지 않는 한, 본 발명과 함께 사용하기 위한 것으로 본원에 기재된 기술은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 표준 방법이다.

[0019]

"내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 유래 서열"이라는 용어는 예컨대, 그의 기능적 활성, 즉, 번역 증진 활성을 유지시키기 위해, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열과 상동성을 갖는 핵산의 서열인 것으로 의도된다. 특히, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 유래 서열은 유전자 조작 또는 화학적 변형에 의해, 예컨대, 기능성을 그대로 유지하는 IRES 서열의 특정 서열을 단리시킴으로써, 또는 IRES 서열 중 하나 이상의 뉴클레오티드를 돌연변이화/결실/도입함으로써, 또는 IRES 서열 중 하나 이상의 뉴클레오티드를 구조적으로 변형된 뉴클레오티드 또는 유사체로 대체함으로써 자연적으로 발생된 IRES 서열로부터 수득될 수 있다. 더욱 특히, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 유래 서열은 비시스템론성 구축물에서 제2 시스템론의 번역을 촉진시킬 수 있는 뉴클레오티드 서열이라는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 알고 있을 것이다. 전형적으로, 이중 루시페라제 (반딧불이 (Firefly) 루시페라제, 레닐라(Renilla) 루시페라제) 코딩 플라스미드가 실험 시험을 위해 사용된다. 최근 인간 게놈으로부터 서열을 IRES로서 작용할 수 있는 그의 능력에 대해 조사하는 데 이중 리포터 또는 비시스템론성 플라스미드 기반의 대규모 스크리닝이 사용되고 있다 (Weingarten-Gabbay S, et al., Science. 2016, 351:6270). 이중 리포터 또는 비시스템론성 검정을 이용하여, 실험에 의해 IRES인 것으로 입증된 뉴클레오티드 서열에 주석을 달기 위한 것으로 주요 데이터베이스, 즉, IRESite가 존재한다 (http://iresite.org/IRESite_web.php). IRESite 내에서, 관심 질의 서열과, 데이터베이스 내의 주석이 달리고, 실험에 의해 입증된 IRES 서열 전체 사이의, 서열 기반 및 구조 기반 유사성에 대해 검색하는 데 웹-기반 도구가 이용가능하다 (http://iresite.org/IRESite_web.php?page=search). 상기 프로그램의 출력값은 비시스템론성 구축물을 이용하는 입증 실험에서 IRES로서 작용할 수 있는 임의의 뉴클레오티드 서열에 대한 확률 점수이다. 추가의 서열 기반 및 구조 기반의 웹 기반 브라우징은 수적 예측 값을 이용하여 임의의 주어진 뉴클레오티드 서열의 IRES 활성 잠재능을 제안하는 데 이용가능하다 (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/>; <http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/index1.php>).

[0020]

본 발명의 상세한 설명

[0021]

도 1을 참조하면, 본 발명의 트랜스-작용 기능성 핵산 분자 (이는 또한 하기에서 "IRUP"로 지칭된다)는 표적 결합 서열 (이는 또한 "결합 도메인"으로 지칭된다) 및 조절 서열 (이는 또한 "이펙터 도메인"으로 지칭된다)을

포함한다.

[0022] 표적 결합 서열은, 단백질 번역을 증진시킬 진핵성 표적 mRNA 서열에 역 상보적인 서열을 포함한다.

[0023] 진핵성 표적 mRNA 서열은 바람직하게, 동물 또는 인간 표적 mRNA 서열, 더욱 바람직하게, 인간 표적 mRNA 서열이다.

[0024] 조절 서열은 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열 또는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 유래 서열을 포함하고, 표적 mRNA 서열의 번역을 증진시킨다.

[0025] 조절 서열은 표적 결합 서열의 3'에 위치한다.

[0026] 트랜스-작용 기능성 핵산 분자는 표적 결합 서열을 통해 표적 mRNA 서열에 하이브리드화하고, IRES 또는 IRES 유래 서열은 표적 mRNA 서열의 번역을 증진시킨다.

[0027] 본 발명의 기능성 핵산 분자는 실제로 임의의 세포 내인성 또는 과다발현된 단백질-코딩 mRNA의 번역의 유전자 특이적 증가를 위해 트랜스-조절 요소로서 IRES 서열을 사용할 수 있게 한다.

[0028] 바람직하게, 표적 결합 서열은 3'에서 5' 방향으로 표적 mRNA 서열의, 5' 비번역 영역 (5' UTR)의 1 내지 50개의 뉴클레오티드 및 코딩 서열 (CDS)의 1 내지 40개의 뉴클레오티드에 역 상보적인 서열로 이루어진다. 구체적인 비제한적 예는

- 표적 mRNA 서열의, 5' 비번역 영역 (5' UTR)의 40개의 뉴클레오티드 및 코딩 서열 (CDS)의 4개의 뉴클레오티드 (개시 메티오닌 코돈 또는 내부 프레임내 메티오닌 코돈으로 지칭된다)에 역 상보적인 서열;

- 표적 mRNA 서열의, 5' 비번역 영역 (5' UTR)의 40개의 뉴클레오티드 및 코딩 서열 (CDS)의 32개의 뉴클레오티드에 역 상보적인 서열;

- 표적 mRNA 서열의, 5' 비번역 영역 (5' UTR)의 14개의 뉴클레오티드 및 코딩 서열 (CDS)의 4개의 뉴클레오티드 (개시 메티오닌 코돈으로 지칭된다)에 역 상보적인 서열로 이루어진 표적 결합 서열을 포함한다.

[0032] 조절 서열은 바람직하게, 인간 바이러스 또는 인간 단백질-코딩 유전자로부터 유래된 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열을 포함한다. 48 내지 576개의 뉴클레오티드 범위의 서열을 갖는 수개의 IRES, 예컨대, 인간 C형 간염 바이러스 (HCV) IRES (서열식별번호(SEQ ID NO:) 36 및 서열식별번호 37), 인간 폴리오바이러스 IRES (서열식별번호 38 및 서열식별번호 39), 인간 뇌심근염 (EMCV) 바이러스 (서열식별번호 40 및 서열식별번호 41), 인간 귀뚜라미 마비 (CrPV) 바이러스 (서열식별번호 42 및 서열식별번호 43), 인간 Apaf-1 (서열식별번호 44 및 서열식별번호 45), 인간 ELG-1 (서열식별번호 46 및 서열식별번호 47), 인간 c-MYC (서열식별번호 48, 서열식별번호 49, 서열식별번호 50, 및 서열식별번호 51), 인간 디스트로핀 (DMD) (서열식별번호 52 및 서열식별번호 53)이 성공적으로 시험되었다. 더 상세한 설명은 실시예 섹션에서 살펴볼 수 있다. 번역 증진 활성에 중요한, IRES의 구조적 요소를 코딩하는 서열을 확인하고, 단리시키고, 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 조절 서열로서 사용하였다.

[0033] 정의에서 이미 언급된 바와 같이, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 유래 서열은 유전적으로 조작된 또는 화학적으로 변형된 IRES를 포함할 수 있다.

[0034] 화학적 변형은 하기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다:

[0035] 염기 변형: 슈도우리딘; 5'-브로모-우리딘; 5'-메틸시티딘.

[0036] 당 변형 (2' 변형): 2'-O-메틸- (2'-O-Me); 2'-O-메톡시에틸 (2'-MOE); 잠금형 핵산 (LNA).

[0037] 백본 변형 (포스페이트 백본 변형): 포스포로티오에이트 (PS); 포스포트리에스테르.

[0038] 기타 (세포 유형 특이적인 표적화 도메인): GalNAc 연결 (간세포).

[0039] 비록 IRES 서열 또는 IRES 유래 서열이 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으로 정배향 또는 역배향으로 - 트랜스-작용 기능성 핵산 분자에서 - 삽입되었는지와는 상관없이 기능성이지만, 정배향으로 배향되어 있는 것이 바람직하다. 다시 말해, "정배향"이란, IRES 서열이 기능성 핵산 분자와 동일한 5'에서 3' 배향으로 임베딩 (삽입)되어 있는 상황인 것으로 의도된다. 대신, "역배향"이란, IRES 서열의 역상보체가 핵산 분자에 삽입되어 있는 (IRES 서열이 기능성 핵산 분자 기준으로 3'에서 5'로 배향되어 있는) 상황인 것으로 의도된다.

[0040] 바람직하게, IRES 서열 또는 IRES 유래 서열은 서열식별번호 36 내지 서열식별번호 65로 이루어진 군으로부터

선택되는 서열과 75%의 상동성을 갖는 서열, 더욱 바람직하게, 서열식별번호 36 내지 서열식별번호 65로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 90%의 상동성을 갖는 서열, 더욱더 바람직하게, 서열식별번호 36 내지 서열식별번호 65로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열이다.

[0041] 트랜스-작용 기능성 핵산 분자는 바람직하게, RNA 분자 또는 변형된 RNA 분자이다. 변형의 예로는 하기의 것이다:

염기 변형: 슈도우리딘; 5'-브로모-우리딘; 5'-메틸시티딘.

당 변형 (2' 변형): 2'-O-메틸- (2'-O-Me); 2'-O-메톡시에틸 (2'-MOE); 잠금형 핵산 (LNA).

백본 변형 (포스페이트 백본 변형): 포스포로티오에이트 (PS); 포스포트리에스테르.

기타 (세포 유형 특이적인 표적화 도메인): GaINAc 연결 (간세포).

[0046] 트랜스-작용 기능성 핵산 분자는 바람직하게, 표적 결합 서열과 조절 서열 사이에 스페이서 서열을 추가로 포함한다.

[0047] 추가로, 트랜스-작용 기능성 핵산 분자는 임의적으로, 예컨대, 적절한 플라스미드로 분자를 클로닝하는 데 유용한 제한 부위를 포함하는 비-코딩 3' 테일 서열을 포함한다.

[0048] 본 발명에 따라 수개의 트랜스-작용 기능성 핵산 분자가 생성되었다.

[0049] 상기 분자 중 일부의 특징이 하기에 요약되어 있다 (BD= 결합 도메인; 괄호 안의 넘버링은 AUG 트리플렛, A=+1 을 기준으로 한 것이다).

서열식별번호 1

[0051] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0052] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV, 383개의 뉴클레오티드, 정배향

[0053] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

ED= IRES HCV (383 ntds) (서열식별번호 36)

백본= 텔타5'ASUch11

IRES 배향: 정배향.

서열식별번호 2

[0058] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0059] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV, 383개의 뉴클레오티드, 역배향

[0060] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

ED= IRES HCV (383 ntds) (서열식별번호 37)

백본= 텔타5'ASUch11

IRES 배향: 역배향 (역상보체).

서열식별번호 3

[0065] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0066] IRES: 바이러스 IRES, 인간 폴리오바이러스, 312개의 뉴클레오티드, 정배향

[0067] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

ED= IRES 폴리오바이러스 (312 ntds) (서열식별번호 38)

백본= 텔타5'ASUch11

IRES 배향: 정배향.

서열식별번호 4

[0071] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0072] IRES: 바이러스 IRES, 인간 폴리오바이러스, 312개의 뉴클레오티드, 역배향

[0073] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0074] ED= IRES 폴리오바이러스 (312 nt ds) (서열식별번호 39)

[0075] 백본= 델타5'ASUch11

[0076] IRES 배향: 역배향 (역상보체).

서열식별번호 5

[0077] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0078] IRES: 바이러스 IRES, 인간 뇌심근염 바이러스, EMCV-R, 576개의 뉴클레오티드, 정배향

[0079] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0080] ED= IRES EMCV-R (576 nt ds) (서열식별번호 40)

[0081] 백본= 델타5'ASUch11

[0082] IRES 배향: 정배향.

서열식별번호 6

[0083] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0084] IRES: 바이러스 IRES, 인간 뇌심근염 바이러스, EMCV-R, 576개의 뉴클레오티드, 역배향

[0085] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0086] ED= IRES EMCV-R (576 nt ds) (서열식별번호 41)

[0087] 백본= 델타5'ASUch11

[0088] IRES 배향: 역배향 (역상보체).

서열식별번호 7

[0089] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0090] IRES: 바이러스 IRES, 인간 귀뚜라미 마비 바이러스, CrPV, 192개의 뉴클레오티드, 정배향

[0091] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0092] ED= IRES CrPV (192 nt ds) (서열식별번호 42)

[0093] 백본= 델타5'ASUch11

[0094] IRES 배향: 정배향.

서열식별번호 8

[0095] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0096] IRES: 바이러스 IRES, 인간 귀뚜라미 마비 바이러스, CrPV, 192개의 뉴클레오티드, 역배향

[0097] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0098] ED= IRES CrPV (192 nt ds) (서열식별번호 43)

[0099] 백본= 델타5'ASUch11

[0100] IRES 배향: 역배향 (역상보체).

서열식별번호 9

- [0107] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자
- [0108] IRES: 세포 IRES, 인간 Apaf-1, 231개의 뉴클레오티드, 정배향
- [0109] (Ensembl: ENSG00000120868; MIM:602233)
- [0110] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)
- [0111] ED= IRES Apaf-1 (231 nt ds) (서열식별번호 44)
- [0112] 백본= 델타5'ASUch11
- [0113] IRES 배향: 정배향.
- [0114] 서열식별번호 10
- [0115] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자
- [0116] IRES: 세포 IRES, 인간 Apaf-1, 231개의 뉴클레오티드, 역배향
- [0117] (Ensembl: ENSG00000120868; MIM:602233)
- [0118] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)
- [0119] ED= IRES Apaf-1 (231 nt ds) (서열식별번호 45)
- [0120] 백본= 델타5'ASUch11
- [0121] IRES 배향: 역배향 (역상보체).
- [0122] 서열식별번호 11
- [0123] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자
- [0124] IRES: 세포 IRES, 인간 ELG-1, 460개의 뉴클레오티드, 정배향
- [0125] (Ensembl: ENSG00000176208; MIM:609534)
- [0126] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)
- [0127] ED= IRES ELG-1 (460 nt ds) (서열식별번호 46)
- [0128] 백본= 델타5'ASUch11
- [0129] IRES 배향: 정배향.
- [0130] 서열식별번호 12
- [0131] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자
- [0132] IRES: 세포 IRES, 인간 ELG-1, 460개의 뉴클레오티드, 역배향
- [0133] (Ensembl: ENSG00000176208; MIM:609534)
- [0134] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)
- [0135] ED= IRES ELG-1 (460 nt ds) (서열식별번호 47)
- [0136] 백본= 델타5'ASUch11
- [0137] IRES 배향: 역배향 (역상보체).
- [0138] 서열식별번호 13
- [0139] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자
- [0140] IRES: 세포 IRES, 인간 c-MYC, 395개의 뉴클레오티드, 정배향
- [0141] (Ensembl: ENSG00000136997; MIM:190080)
- [0142] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0143] ED= IRES c-MYC 전장의 (395 nt ds) (서열식별번호 48)

[0144] 백본= 델타5'ASUch11

[0145] IRES 배향: 정배향

[0146] 기타: 서열식별번호 15에 포함된 48 nt 최소 서열 (서열식별번호 50) 포함.

서열식별번호 14

[0148] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0149] IRES: 세포 IRES, 인간 c-MYC, 395개의 뉴클레오티드, 역배향

[0150] (Ensembl: ENSG00000136997; MIM:190080)

[0151] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0152] ED= IRES c-MYC 전장의 (395 nt ds) (서열식별번호 49)

[0153] 백본= 델타5'ASUch11

[0154] IRES 배향: 역배향 (역상보체)

[0155] 기타: 서열식별번호 16에 포함된 48 nt 최소 서열 (서열식별번호 51) 포함.

서열식별번호 15

[0157] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0158] IRES: 세포 IRES, 인간 c-MYC, 48개의 뉴클레오티드, 정배향

[0159] (Ensembl: ENSG00000136997; MIM:190080)

[0160] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0161] ED= IRES c-MYC (48 nt ds) (서열식별번호 50)

[0162] 백본= 델타5'ASUch11

[0163] IRES 배향: 정배향.

서열식별번호 16

[0165] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0166] IRES: 세포 IRES, 인간 c-MYC, 48개의 뉴클레오티드, 역배향

[0167] (Ensembl: ENSG00000136997; MIM:190080)

[0168] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0169] ED= IRES c-MYC (48 nt ds) (서열식별번호 51)

[0170] 백본= 델타5'ASUch11

[0171] IRES 배향: 역배향 (역상보체).

서열식별번호 17

[0173] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자

[0174] IRES: 세포 IRES, 인간 디스트로핀 (DMD), 71개의 뉴클레오티드, 정배향

[0175] (Ensembl: ENSG00000198947; MIM:300377)

[0176] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0177] ED= IRES DMD (71 nt ds) (서열식별번호 52)

[0178] 백본= 델타5'ASUch11

[0179] IRES 배향: 정배향.

서열식별번호 18

정의: IRUP 기능성 핵산 분자

IRES: 세포 IRES, 인간 디스트로핀 (DMD), 71개의 뉴클레오티드, 역배향

(Ensembl: ENSG00000198947; MIM:300377)

특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

ED= IRES DMD (71 nt ds) (서열식별번호 53)

백본= 텔타5'ASUch11

IRES 배향: 역배향 (역상보체).

서열식별번호 19

정의: IRUP 기능성 핵산 분자

IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#1, 303개의 뉴클레오티드, 텔타 II (40-119), 리보솜 단백질과 상호작용

특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

ED= HCV IRES 정배향, 텔타II (서열식별번호 54)

백본= 텔타5'ASUch11

돌연변이체#1: 텔타 II (40-119), 리보솜 단백질과 상호작용.

서열식별번호 20

정의: IRUP 기능성 핵산 분자

IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#2, 367개의 뉴클레오티드, 텔타 IIIa (156-171), eIF3 결합 부위

특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

ED= HCV IRES 정배향, 텔타IIIa (서열식별번호 55)

백본= 텔타5'ASUch11

돌연변이체#2: 텔타 IIIa (156-171), eIF3 결합 부위.

서열식별번호 21

정의: IRUP 기능성 핵산 분자

IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#3, 356개의 뉴클레오티드, 텔타 IIId (253-279), 18S rRNA 결합 영역

특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

ED= HCV IRES 정배향, 텔타IIIId (서열식별번호 56)

백본= 텔타5'ASUch11

돌연변이체#3: 텔타 IIId (253-279), 18S rRNA 결합 영역.

서열식별번호 22

정의: IRUP 기능성 핵산 분자

IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#4, 330개의 뉴클레오티드, 텔타 IV (331-383), AUG-함유 말단 서열

[0212] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0213] ED= HCV IRES 정배향, 델타IV (서열식별번호 57)

[0214] 백본= 델타5'ASUch11

[0215] 돌연변이체#4: 델타 IV (331-383), AUG-함유 말단 서열.

서열식별번호 23

[0217] 정의: IRUP 가능성 핵산 분자

[0218] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#5, 383개의 뉴클레오티드, G266→C; 단일 점 돌연변이, 18S rRNA와 접촉

[0219] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0220] ED= HCV IRES 정배향, G266→C (서열식별번호 58)

[0221] 백본= 델타5'ASUch11

[0222] 돌연변이체#5: G266→C; 단일 점 돌연변이, 18S rRNA와 접촉.

서열식별번호 24

[0224] 정의: IRUP 가능성 핵산 분자

[0225] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#6, 383개의 뉴클레오티드, U228→C; HCV IRES의 또 다른 부위에서 단일 점 돌연변이 제어, 전사 개시전 복합체 형성을 파괴하지 않으면서, IRES 활성을 감소시킴

[0226] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0227] ED= HCV IRES 정배향, U228→C (서열식별번호 59)

[0228] 백본= 델타5'ASUch11

[0229] 돌연변이체#6: U228→C; HCV IRES의 또 다른 부위에서 단일 점 돌연변이 제어, 전사 개시전 복합체 형성을 파괴하지 않으면서, IRES 활성을 감소시킴. 돌연변이화된 버전은 eIF3에 대하여 감소된 친화성을 갖는다.

서열식별번호 25

[0231] 정의: IRUP 가능성 핵산 분자

[0232] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#7, 383개의 뉴클레오티드, G267→C; IIId 루프, 단일 점 돌연변이, 18S rRNA와 접촉

[0233] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0234] ED= HCV IRES 정배향, G267→C (서열식별번호 60)

[0235] 백본= 델타5'ASUch11

[0236] 돌연변이체#7: G267→C; IIId 루프, 단일 점 돌연변이, 18S rRNA와 접촉.

서열식별번호 26

[0238] 정의: IRUP 가능성 핵산 분자

[0239] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#8, 383개의 뉴클레오티드, G268→C; IIId 루프, 단일 점 돌연변이, 18S rRNA와 접촉

[0240] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0241] ED= HCV IRES 정배향, G268→C (서열식별번호 61)

[0242] 백본= 델타5'ASUch11

- [0243] 돌연변이체#8: G268→C; IIId 루프, 단일 점 돌연변이, 18S rRNA와 접촉.
- [0244] 서열식별번호 27
- [0245] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자
- [0246] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#9, 383 뉴클레오티드, G₂₆₆G₂₆₇G₂₆₈→ C₂₆₆C₂₆₇C₂₆₈; IIId 루프, 삼중 점 돌연변이, 18S rRNA와 접촉
- [0247] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)
- [0248] ED= HCV IRES 정배향, G₂₆₆G₂₆₇G₂₆₈→ C₂₆₆C₂₆₇C₂₆₈ (서열식별번호 62)
- [0249] 백본= 텔타5'ASUch11
- [0250] 돌연변이체#9: G₂₆₆G₂₆₇G₂₆₈→ C₂₆₆C₂₆₇C₂₆₈; IIId 루프, 삼중 점 돌연변이, 18S rRNA와 접촉.
- [0251] 서열식별번호 28
- [0252] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자
- [0253] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#10, 383개의 뉴클레오티드, G266→A/G268→T; 이중 점 돌연변이체; 감염력이 부족한 HCV 5a 분리주
- [0254] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)
- [0255] ED= HCV IRES 정배향, G266→A/G268→T (서열식별번호 63)
- [0256] 백본= 텔타5'ASUch11
- [0257] 돌연변이체#10: G266→A/G268→T; 이중 점 돌연변이체; 감염력이 부족한 HCV 5a 분리주.
- [0258] 서열식별번호 29
- [0259] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자
- [0260] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#11, 383개의 뉴클레오티드, IIIa→IIIa-comp; AGTA→TCAT
- [0261] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)
- [0262] ED= HCV IRES 정배향, IIIa→IIIa-comp; AGTA→TCAT (서열식별번호 64)
- [0263] 백본= 텔타5'ASUch11
- [0264] 돌연변이체#11: HCV IRES 정배향, IIIa→IIIa-comp; AGTA→TCAT).
- [0265] 서열식별번호 30
- [0266] 정의: IRUP 기능성 핵산 분자
- [0267] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV 돌연변이체#12, 383개의 뉴클레오티드, IIe→IIe-comp; TGATAG→ACTATC
- [0268] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)
- [0269] ED= HCV IRES 정배향, IIe→IIe-comp; TGATAG→ACTATC (서열식별번호 65)
- [0270] 백본= 텔타5'ASUch11
- [0271] 돌연변이체#12: HCV IRES 정배향, IIe→IIe-comp; TGATAG→ACTATC.
- [0272] 서열식별번호 31
- [0273] 정의: 미니IRUP 기능성 핵산 분자
- [0274] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV, 383개의 뉴클레오티드, 정배향

[0275] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0276] ED= IRES HCV (383 ntds) (서열식별번호 36)

[0277] IRES 배향: 정배향.

서열식별번호 32

[0279] 정의: 미니IRUP 기능성 핵산 분자

[0280] IRES: 바이러스 IRES, 인간 폴리오바이러스, 312개의 뉴클레오티드, 정배향

[0281] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0282] ED= IRES 폴리오바이러스 (312 ntds) (서열식별번호 38)

[0283] IRES 배향: 정배향.

서열식별번호 33

[0285] 정의: 미니IRUP 기능성 핵산 분자

[0286] IRES: 바이러스 IRES, 인간 폴리오바이러스, 312개의 뉴클레오티드, 역배향

[0287] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0288] ED= IRES 폴리오바이러스 (312 ntds) (서열식별번호 39)

[0289] IRES 배향: 역배향 (역상보체).

서열식별번호 34

[0291] 정의: 미니IRUP 기능성 핵산 분자

[0292] IRES: 세포 IRES, 인간 c-MYC, 48개의 뉴클레오티드, 정배향)(Ensembl: ENSG00000136997; MIM:190080)

[0293] 특징: BD= DJ-1s (-40/+4)

[0294] ED= IRES c-MYC (48 ntds) (서열식별번호 50)

[0295] IRES 배향: 정배향.

서열식별번호 35

[0297] 정의: 미니IRUP 기능성 핵산 분자

[0298] IRES: 바이러스 IRES, 인간 C형 간염 바이러스, HCV, 383개의 뉴클레오티드, 정배향

[0299] 특징: BD= GFP (-40/+32)

[0300] ED= IRES HCV (383 ntds) (서열식별번호 36)

[0301] IRES 배향: 정배향.

[0302] 본 발명에 따른 DNA 분자는 상기 개시된 트랜스-작용 기능성 핵산 분자 중 임의의 것을 코딩한다.

[0303] 본 발명에 따른 발현 벡터는 상기 언급된 DNA 분자를 포함한다. 특히, 하기 플라스미드는 기능성 핵산 분자의 효율적인 발현을 위해 사용되었다.

포유동물 발현 플라스미드:

[0305] 플라스미드 명칭: pCS2+

[0306] 발현: CMVie92 프로모터

[0307] SV40폴리A 종결인자

[0308] 플라스미드 명칭: pCDN3.1 (-)

[0309] 발현: CMV 프로모터

- [0310] BGH 종결인자
- [0311] 플라스미드 명칭: pDUAL-eGFP Δ (peGFP-C1로부터 변형)
- [0312] 발현: H1 프로모터; CMV 프로모터
- [0313] BGH 종결인자; SV40 종결인자.
- [0314] 바이러스 벡터:
- [0315] 벡터 명칭: pAAV
- [0316] 바이러스: 아데노 연관 바이러스
- [0317] 발현: CAG 프로모터/CMV 인핸서
- [0318] SV40폴리A 종결인자
- [0319] 벡터 명칭: pLVX-TetOne-Puro
- [0320] 바이러스: 렌티바이러스
- [0321] 발현: TRE3G 프로모터 (유도가능한 발현)
- [0322] SV40폴리A 종결인자.
- [0323] 수행된 실험은 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 기능이 사용된 플라스미드에 의해 영향을 받지 않는다는 점을 강조하였다는 것에 주의하여야 한다.
- [0324] 본 발명에 따른 단백질 번역을 증진시키는 방법은 상기 개시된 트랜스-작용 기능성 핵산 분자 또는 DNA 분자 또는 발현 벡터로 세포를 형질감염시키는 단계를 포함한다.
- [0325] 본 발명에 따른 조성물은 상기 개시된 트랜스-작용 기능성 핵산 분자 또는 DNA 분자 또는 발현 벡터를 포함한다. 트랜스-작용 기능성 핵산 분자는, 임의적으로는 RNA 안정성을 증가시키기 위해 적합화된 변형을 포함하는 RNA인 네이키드 RNA로서 전달될 수 있다. 대안으로, 트랜스-작용 기능성 핵산 분자는 지질 기반 나노입자 어레이에 캡슐화된 시험관내에서 전사된 RNA, 또는 엑소좀 기반 입자에 캡슐화된 시험관내에서 전사된 RNA일 수 있다.
- [0326] 상기 개시된 트랜스-작용 기능성 핵산 분자 또는 DNA 분자 또는 발현 벡터는 표적 mRNA 서열의 번역을 증진시키는 데 사용될 수 있다. 실시예에서는 2개의 상이한 표적 mRNA 서열, PARK7/DJ-1 (이는 또한 DJ-1로도 지칭된다) 및 GFP의 번역의 증진을 보여주지만, mRNA 수준에는 영향을 주지 않으면서, 임의의 다른 mRNA 서열을 성공적으로 표적화할 수 있다.
- [0327] IRUP는 관심 유전자 그 자신의 mRNA 양에는 어떤 영향도 미치지 않으면서, 관심 유전자의 번역을 증진시킬 수 있다는 점에 주의하여야 한다.
- [0328] 그러므로, 상기 개시된 트랜스-작용 기능성 핵산 분자 또는 DNA 분자 또는 발현 벡터는 세포에서 유전자 기능을 입증할 뿐만 아니라, 재조합 단백질 제조의 파이프라인을 시행하기 위한 분자 도구로서 성공적으로 사용될 수 있다.
- [0329] 상기 개시된 트랜스-작용 기능성 핵산 분자 또는 DNA 분자 또는 발현 벡터는 단백질-코딩 mRNA의 하향 조절에 의해 유발되는 유전성 질환, 또는 특정 단백질-코딩 mRNA의 수준 감소가 유해한 산발성 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 하기의 것은 상기 질환의 예이다. 단배수결손은, 정상 표현형이 두 대립유전자 모두의 단백질 생성물을 필요로 하고, 유전자 기능의 50% 이상 감소가 비정상적인 표현형을 초래할 때에 유발되는 병태이다. 이는 특정 유형의 암, 운동 실조증, 및 발생 프로그램 부전에 기인하는 질환을 비롯한, 매우 다양한 질환의 원인이 된다. 다수의 희귀 질환은 유전자량을 감소시키는 돌연변이 또는 미세결실에 의해 유발된다. 전사 인자, 시냅스 단백질 및 크로마틴 리모델링 효소가 유전자량에 특히 민감한 것으로 보인다. 유전자 발현 감소 또한 노화 동안에 관찰될 수 있다.
- [0330] 실시예
- [0331] 실시예 1

- [0332] 도 2는 안티센스 긴 비-코딩 RNA (lncRNA) 표적화 내인성 인간 DJ-1 mRNA의 번역 상향 조절 기능을 위해서는 임베딩된 이펙터 도메인 (ED)이 요구된다는 것을 보여주는 것이다.
- [0333] 도 2A는 표적 특이적인 mRNA의 번역을 상향 조절하는 기능성 안티센스 lncRNA 분자의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. SINE B2 패밀리의 임베딩된 뮤린 전위가능 요소를 사용하는 원래의 분자가 표시되어 있다 (SINEUP). SINEUP 기능성 도메인은 강조표시되어 있다: SINEUP 결합 도메인 (BD): 센스 단백질-코딩 mRNA에 대해 안티센스 배향으로 중복되는 SINEUP 서열; SINEUP 이펙터 도메인 (ED): 단백질 합성의 활성화를 부여하는, SINEUP의 비-중복부 중의 역위 SINEB2 요소 (SINE). 센스 및 안티센스 RNA 분자는 5'에서 3' 배향으로 제시되어 있다. 표적-특이적 mRNA는 5' 비번역 영역 (5'UTR), 코딩 서열 (CDS) 및 3' 비번역 영역 (3'UTR)을 포함한다. 번역 개시 AUG 코돈 또한 제시되어 있다.
- [0334] 내인성 인간 DJ-1 mRNA를 표적화하도록 합성 SINEUP를 디자인하였다 (SINEUP-DJ-1). 결합 도메인 (Δ BD) 또는 이펙터 도메인 (Δ ED)이 결여된 SINEUP-DJ-1 돌연변이체를 생성하였다. SINEUP-DJ-1 전장 (FL) 또는 그의 결실 돌연변이체 (Δ ED = 이펙터 도메인이 결실된 돌연변이체, Δ BD = 결합 도메인이 결실된 돌연변이체)를 코딩하는 플라스미드로 인간 배아 신장 (HEK) 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 빈 대조군 플라스미드 (-)로 대조군 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블로트를 수행하였다 (도 2B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블로트 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다.
- [0335] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 SINEUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 2C). 데이터는 평균 \pm st. dev로 제시되어 있다. 데이터는 N=5 독립 반복 실험의 것을 나타낸다.
- [0336] 도 2D는 HEK 293T/17 세포 (N=5)에서의 내인성 DJ-1 mRNA에 대한 SINEUP-DJ-1 FL, Δ BD 및 Δ ED 번역 증진 활성을 나타낸 그래프를 보여주는 것이다. p<0.05.
- [0337] 실시예 2
- [0338] 내인성 인간 DJ-1 mRNA를 표적화하도록 합성 IRUP를 하기와 같이 디자인하였다. 도 3에 제시된 바와 같이, 원래의 SINE B2 서열을, 인간 바이러스로부터 유래된 IRES 서열 또는 IRES 활성을 갖는 인간 mRNA와 스와핑하여 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.
- [0339] 하기 표 1은 본 발명에 따른 트랜스-작용 기능성 핵산 분자에서 사용된 IRES 서열 중 일부의 목록을 포함한다.
- [0340] IRES 명칭, IRES 기원, 클로닝 배향 및 IRES 길이가 제시되어 있다.

[0341]

<표 1>

IRES	기원	배향	길이 (nt)
HCV	인간 바이러스	정배향	383
HCV	인간 바이러스	역배향	383
폴리오	인간 바이러스	정배향	312
폴리오	인간 바이러스	역배향	312
EMCV	인간 바이러스	정배향	576
EMCV	인간 바이러스	역배향	576
CrPV	인간 바이러스	정배향	192
CrPV	인간 바이러스	역배향	192
Apaf-1	인간 mRNA	정배향	231
Apaf-1	인간 mRNA	역배향	231
ELG-1	인간 mRNA	정배향	460
ELG-1	인간 mRNA	역배향	460
cMYC (긴 것)	인간 mRNA	정배향	395
cMYC (긴 것)	인간 mRNA	역배향	395
cMYC (짧은 것)	인간 mRNA	정배향	48
cMYC (짧은 것)	인간 mRNA	역배향	48
DMD	인간 mRNA	정배향	71
DMD	인간 mRNA	역배향	71

[0342]

[0343]

도 4는 IRES-함유 기능성 안티센스 핵산 분자의 번역 상향 조절 활성을 시험하기 위한 실험 절차의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 인간 DJ-1 중복 서열 (결합 도메인) 및 IRES 서열 (이펙터 도메인)을 포함하는, 번역 활성화를 위한 안티센스 기능성 핵산 분자를 생성하였다. 시험관내에서의 배양물 중 포유동물 세포에서의 발현을 위해 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 포유동물 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 내생적 양의 인간 DJ-1 mRNA를 발현하는 세포를 사용하였다. 세포 시딩, 세포 형질감염 및 수확을 위한 타이밍이 제시되어 있다. 세포를 수확하여 (정량적 실시간 PCR, qRT-PCR을 위해) RNA, 및 (웨스턴 블롯, WB를 위해) 단백질을 정제하였다.

[0344]

도 5A는, 이펙터 도메인이 인간 C형 간염 바이러스 (HCV)로부터의 IRES 서열인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으로 정배향 (HCV(d) - 서열식별번호 1) 또는 역배향 (HCV(i) - 서열식별번호 2)으로 클로닝된 HCV IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.

[0345]

제시된 바와 같이, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 HCV IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 5B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. SINE-함유 기능성 핵산 분자와 비교하여 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 더 높거나, 또는 유사하였다.

[0346]

형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 IRUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 5C). SINE-함유 기능성 핵산 분자 및 IRES-함유 기능성 핵산 분자 간의 RNA 양을 비교하기 위해, 이펙터 도메인의 3' 단부에 프라이머를 배치하였다. 데이터는 평균 \pm st. dev로 제시되어 있다. 데이터는 N>5 독립 반복 실험의 것을 나타낸다.

[0347]

실시예 3

[0348]

도 6A는, 이펙터 도메인이 인간 폴리오바이러스로부터의 IRES 서열인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으로 정배향 (폴리오(d) - 서열식별번호 3) 또는 역배향 (폴리오(i) - 서열식별번호 4)으로 클로닝된 폴리오 IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.

[0349]

제시된 바와 같이, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 폴리오 IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블로트를 수행하였다 (도 6B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블로트 영상 상에서 빛 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 SINE-함유 기능성 핵산 분자보다 더 높았다.

[0350]

형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 IRUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 6C). SINE-함유 기능성 핵산 분자 및 IRES-함유 기능성 핵산 분자 간의 RNA 양을 비교하기 위해, 이펙터 도메인의 3' 단부에 프라이머를 배치하였다. 데이터는 평균 \pm st. dev로 제시되어 있다. 데이터는 N>5 독립 반복 실험의 것을 나타낸다.

[0351]

실시예 4

[0352]

도 7A는, 이펙터 도메인이 각각 인간 뇌심근염 바이러스 (EMCV)로부터의 IRES 서열, 및 귀뚜라미 마비 바이러스 (CrPV)로부터의 IRES 서열인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으로 정배향 (EMCV(d) - 서열식별번호 5) 또는 역배향 (EMCV(i) - 서열식별번호 6)으로 클로닝된 EMCV IRES 서열, 및 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으로 정배향 (CrPV(d) - 서열식별번호 7) 또는 역배향 (CrPV(i) - 서열식별번호 8)으로 클로닝된 CrPV IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.

[0353]

제시된 바와 같이, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 EMCV 및 CrPV IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블로트를 수행하였다 (도 7B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블로트 영상 상에서 빛 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 SINE-함유 기능성 핵산 분자보다 더 높았다.

[0354]

형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 IRUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 7C). SINE-함유 기능성 핵산 분자 및 IRES-함유 기능성 핵산 분자 간의 RNA 양을 비교하기 위해, 이펙터 도메인의 3' 단부에 프라이머를 배치하였다. 데이터는 평균 \pm st. dev로 제시되어 있다. 데이터는 N>5 독립 반복 실험의 것을 나타낸다.

[0355]

실시예 5

[0356]

빈 벡터로 형질감염된 HEK 293T/17 세포와 비교하여, 실시예 2의 HCV(d) 및 HCV(i) IRUP, 실시예 3의 폴리오 (d) 및 폴리오(i) IRUP, 및 실시예 4의 EMCV(d), EMCV(i), CrPV(d) 및 CrPV(i) IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포에서의 내인성 DJ-1 단백질의 양 증가를 웨스턴 블로트에 의해 측정하였다.

[0357]

결과는 도 8A 및 8B에 요약되어 있다. IRES-함유 기능성 핵산 분자는 번역을 트랜스로 활성화시키고, SINE-함유 분자보다 더욱 큰 활성을 나타낸다는 것이 명백하다. 데이터는 N>5 생물 반복 실험의 평균 및 stdev를 나타낸다. 단일 별표 표시 (*)는 빈 대조군 세포 대비 통계학상 유의적인 트랜스로의 번역 증진 활성을 갖는 IRES 서열을 나타내고; 이중 별표 표시 (**)는 SINE-함유 기능성 핵산 분자 대비 통계학상 유의적인 효력 증가를 보이는 IRES 서열을 나타낸다.

[0358]

실시예 6

[0359]

도 9A는, 이펙터 도메인이 인간 아폽토시스 웨პ티다제 활성화 인자 1 (Apaf-1) mRNA로부터의 IRES 서열인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으

로 정배향 (Apaf-1(d) - 서열식별번호 9) 또는 역배향 (Apaf-1(i) - 서열식별번호 10)으로 클로닝된 Apaf-1 IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.

[0360] 제시된 바와 같이, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 Apaf-1 IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 9B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 SINE-함유 기능성 핵산 분자보다 더 높거나, 또는 유사하였다.

[0361] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 IRUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 9C). SINE-함유 기능성 핵산 분자 및 IRES-함유 기능성 핵산 분자 간의 RNA 양을 비교하기 위해, 이펙터 도메인의 3' 단부에 프라이머를 배치하였다. 데이터는 평균 ± st. dev로 제시되어 있다. 데이터는 N>5 독립 반복 실험의 것을 나타낸다.

실시예 7

[0363] 도 10A는, 이펙터 도메인이 인간 게놈 불안정 수준 증가 1 (ELG-1) mRNA로부터의 IRES 서열인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으로 정배향 (ELG-1(d) - 서열식별번호 11) 또는 역배향 (ELG-1(i) - 서열식별번호 12)으로 클로닝된 ELG-1 IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.

[0364] 제시된 바와 같이, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 ELG-1 IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 10B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. SINE-함유 기능성 핵산 분자와 비교하여 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 더 높았다.

[0365] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 IRUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 10C). SINE-함유 기능성 핵산 분자 및 IRES-함유 기능성 핵산 분자 간의 RNA 양을 비교하기 위해, 이펙터 도메인의 3' 단부에 프라이머를 배치하였다. 데이터는 평균 ± st. dev.로 제시되어 있다. 데이터는 N>5 독립 반복 실험의 것을 나타낸다.

실시예 8

[0367] 도 11A는, 이펙터 도메인이 인간 V-Myc 조류 골수세포증 바이러스 온코진 호몰로그 (cMYC) mRNA로부터의 IRES 서열인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으로 정배향 (cMYC 전장(d) - 서열식별번호 13) 또는 역배향 (cMYC 전장(i) - 서열식별번호 14)으로 클로닝된 cMYC IRES 서열 (긴 변이체)을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.

[0368] 제시된 바와 같이, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 cMYC IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 11B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. SINE-함유 기능성 핵산 분자와 비교하여 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 더 높거나, 또는 그와 유사하였다.

[0369] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 IRUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 11C). SINE-함유 기능성 핵산 분자 및 IRES-함유 기능성 핵산 분자 간의 RNA 양을 비교하기 위해, 이펙터 도메인의 3' 단부에 프라이머를 배치하였다. 데이터는 평균 ± st. dev.로 제시되어 있다. 데이터는 N>5 독립 반복 실험의 것을 나타낸다.

실시예 9

- [0371] 도 12A는, 이펙터 도메인이 실시예 8의 인간 V-Myc 조류 골수세포증 바이러스 온코진 호몰로그 (cMYC) mRNA로부터의 IRES 서열의 더 짧은 버전인 것인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으로 정배향 (cMYC 짧은 변이체(d) - 서열식별번호 15) 또는 역배향 (cMYC 짧은 변이체(i) - 서열식별번호 16)으로 클로닝된 cMYC IRES 서열 (짧은 변이체)을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.
- [0372] 제시된 바와 같이, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 cMYC IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 11B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. SINE-함유 기능성 핵산 분자와 비교하여 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 더 높거나, 또는 그와 유사하였다.
- [0373] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 IRUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 12C). SINE-함유 기능성 핵산 분자 및 IRES-함유 기능성 핵산 분자 간의 RNA 양을 비교하기 위해, 이펙터 도메인의 3' 단부에 프라이머를 배치하였다. 데이터는 평균 \pm st. dev.로 제시되어 있다. 데이터는 $N>5$ 독립 반복 실험의 것을 나타낸다.
- [0374] 실시예 10
- [0375] 도 13A는, 이펙터 도메인이 인간 디스트로핀 (DMD) mRNA로부터의 IRES 서열인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 기능성 핵산 분자의 5'에서 3' 배향 기준으로 정배향 (DMD (d) - 서열식별번호 17) 또는 역배향 (DMD (i) - 서열식별번호 18)으로 클로닝된 DMD IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.
- [0376] 제시된 바와 같이, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 DMD IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 13B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. SINE-함유 기능성 핵산 분자와 비교하여 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 더 높았다.
- [0377] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 IRUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 13C). SINE-함유 기능성 핵산 분자 및 IRES-함유 기능성 핵산 분자 간의 RNA 양을 비교하기 위해, 이펙터 도메인의 3' 단부에 프라이머를 배치하였다. 데이터는 평균 \pm st. dev.로 제시되어 있다. 데이터는 $N>5$ 독립 반복 실험의 것을 나타낸다.
- [0378] 실시예 11
- [0379] 빈 벡터로 형질감염된 HEK 293T/17 세포와 비교하여, 실시예 6의 Apaf-1(d) 및 Apaf-1(i) IRUP, 실시예 7의 ELG-1(d) 및 ELG-1(i) IRUP, 실시예 8의 cMYC 전장(d) 및 cMYC 전장(i) IRUP, 실시예 9의 cMYC 짧은 변이체(d) 및 cMYC 짧은 변이체(i) IRUP, 및 실시예 10의 DMD(d) 및 DMD(i) IRUP로 형질감염된 HEK 293T/17 세포에서의 내인성 DJ-1 단백질의 양 증가를 웨스턴 블롯에 의해 측정하였다.
- [0380] 결과는 도 14A 및 14B에 요약되어 있다. IRES-함유 기능성 핵산 분자는 번역을 트랜스로 활성화시키고, SINE-함유 분자보다 더욱 큰 활성을 나타낸다는 것을 명백하다. 데이터는 $N>5$ 생물 반복 실험의 평균 및 stdDev를 나타낸다. 단일 별표 표시 (*)는 빈 대조군 세포 대비 통계학상 유의적인 트랜스로의 번역 증진 활성을 갖는 IRES 서열을 나타내고; 이중 별표 표시 (**)는 SINE-함유 기능성 핵산 분자 대비 통계학상 유의적인 효력 증가를 보이는 IRES 서열을 나타낸다.
- [0381] 실시예 12
- [0382] 제시된 바와 같이, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 (서열식별번호 1 또는 서열식별번호 2) HCV (도 15A) IRES 서열을 포함하고, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 (서열식별번호 3, 서열식별번호 4, 서열식별번호 13 또는 서열식별번호 14) 폴리오 및 cMYC (도 15B) IRES 서열을 포함하고, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 (서열식별번호

호 9, 서열식별번호 10, 서열식별번호 11 또는 서열식별번호 12) Apaf-1 및 ELG-1 (도 15C) IRES 서열을 포함하고, 정배향 (d) 또는 역배향 (i)으로 (서열식별번호 17 또는 서열식별번호 18) DMD (도 15D) IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 인간 간세포 암종 (HepG2) 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 거의 항상 SINE-함유 기능성 핵산 분자보다 더 높았다.

[0383] 실시예 13

빈 벡터로 형질감염된 HepG2 세포와 비교하여, HCV(d) 및 HCV(i) IRUP, 폴리오(d) 및 폴리오(i) IRUP 및 cMYC 짧은 변이체(d) 및 cMYC 짧은 변이체(i) IRUP, Apaf-1(d) 및 Apaf-1(i) IRUP, ELG-1(d) 및 ELG-1(i) IRUP, DMD(d) 및 DMD(i) IRUP로 HepG2 세포에서의 내인성 DJ-1 단백질의 양 증가를 웨스턴 블롯에 의해 측정하였다.

[0385] 결과는 도 16A-16B에 요약되어 있다. IRES-함유 기능성 핵산 분자는 번역을 트랜스로 활성화시키고, SINE-함유 분자보다 더욱 큰 활성을 나타낸다. 데이터는 N>2 생물 반복 실험의 평균 및 stdev를 나타낸다.

[0386] 실시예 14

[0387] 도 17A는, 이펙터 도메인이 HCV, 폴리오바이러스 또는 cMYC 짧은 버전으로부터의 IRES 서열인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 소형 버전 (미니IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 포유동물 세포에서 RNA 폴리머라제 II에 의한 발현을 위해 SV40 기반 프로모터의 제어하에서, 정배향 (HCV(d) - 서열식별번호 31)으로 클로닝된 HCV IRES 서열을 포함하고, 정배향 (폴리오(d) - 서열식별번호 32) 및 역배향 (폴리오(i) - 서열식별번호 33)으로 클로닝된 폴리오 IRES 서열을 포함하고, 정배향 (cMYC 짧은 변이체(d) - 서열식별번호 34)으로 클로닝된 cMYC 짧은 IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.

[0388] 제시된 바와 같이, 상기 언급된 미니 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 17B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. 미니 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 SINE-함유 기능성 핵산 분자보다 더 높았다.

[0389] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 미니-IRUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 17C).

[0390] 도 17D는 HEK 293T/17 세포 (N=6)에서의 내인성 DJ-1 mRNA에 대한 SINEUP-DJ-1 및 미니-IRUP 번역 증진 활성을 나타낸 그래프를 보여주는 것이다.

[0391] 실시예 15

[0392] 도 18A는, 이펙터 도메인이 HCV, 폴리오바이러스 또는 cMYC 짧은 버전으로부터의 IRES 서열인 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 소형 버전 (미니IRUP)의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. 포유동물 세포에서 RNA 폴리머라제 III에 의한 발현을 위해 H1 기반 프로모터의 제어하에서, 정배향 (HCV(d) - 서열식별번호 31)으로 클로닝된 HCV IRES 서열을 포함하고, 정배향 (폴리오(d) - 서열식별번호 32) 및 역배향 (폴리오(i) - 서열식별번호 32)으로 클로닝된 폴리오 IRES 서열을 포함하고, 정배향 (cMYC 짧은 변이체(d) - 서열식별번호 34)으로 클로닝된 cMYC 짧은 IRES 서열을 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 생성하였다.

[0393] 제시된 바와 같이, 상기 언급된 미니 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 18B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. 미니 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 SINE-함유 기능성 핵산 분자보다 더 높았다.

높았다 (한 경우에서는 유사하였다).

[0394] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 미니-IRUP RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 18C).

[0395] 도 18D는 HEK 293T/17 세포 (N=6)에서의 내인성 DJ-1 mRNA에 대한 SINEUP-DJ-1 및 미니-IRUP 번역 증진 활성을 나타낸 그래프를 보여주는 것이다.

실시예 16

[0397] 도 19A는 포유동물 세포에서의 두 관심 유전자의 공동 발현을 위한 pDUAL-GFP 플라스미드의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다. pDUAL-GFP 플라스미드는 RNA 폴리머라제 II에 의한 GFP mRNA의 발현을 위한 CMV 프로모터 요소, 및 GFP 번역 증진을 위해 기능성 핵산 분자의 GFP-표적화 소형 베전의 발현을 위한 (반대 배향으로의) H1 프로모터를 함유한다. 번역 인해서 기능성 핵산 분자가 결여되고, 기초 수준의 GFP 단백질을 발현하는 대조군 플라스미드를 제조한다. 명시된 바와 같이, 이펙터 도메인이 SINE B2 서열로, 또는 HCV IRES로 제시된 pDUAL-GFP/미니GFP 플라스미드를 생성하였다.

[0398] GFP 단독, 또는 SINE-함유 (SINE) 또는 IRES-함유 (IRES) 미니-기능성 핵산 분자와 함께 조합된 GFP를 코딩하는 pDUAL 플라스미드로 HEK 293T/17 세포를 형질감염시켰다. pDUAL-GFP 단독인 것으로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-GFP 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 19B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다.

[0399] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 과다발현된 GFP mRNA (도 19C) 및 기능성 핵산 SINE 또는 IRES RNA (도 19D)의 발현을 모니터링하였다.

[0400] 본 결과는 GFP가 HEK 293T/17 세포에서 과다발현될 때, GFP mRNA에 대한 결합 도메인 안티센스를 보유하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자가 GFP mRNA의 번역을 증진시킨다는 것을 보여준다.

실시예 17

[0402] 도 20A는, 이펙터 도메인이 SINE 또는 HCV IRES 서열로 제시되어 있는, GFP 표적화 기능성 핵산 분자를 포함하는 pDUAL-GFP 플라스미드의 개략적 다이어그램을 보여주는 것이다.

[0403] 도 20A에 제시된 pDUAL-GFP 플라스미드로 인간 신경모세포종 Neuro2a 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-GFP 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 20B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. 미니 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 SINE-함유 기능성 핵산 분자보다 더 높았다.

실시예 18

[0405] DJ-1 표적화 결합 도메인, 및 시스로 HCV IRES 활성을 중요한 특정 돌연변이를 구조 영역 중에 포함하는 HCV IRES 이펙터 도메인을 함유하는 기능성 핵산 분자를 디자인하였다.

[0406] 도 21은 HCV IRES RNA 2차 구조를 나타낸 개략도를 보여주는 것이다. HCV IRES 구조 도메인 (IIa, IIb, IIIa, IIIb, IIIc, IIId, IIIe 및 IIIIf)은 다른 사각형에 제시되어 있다. 리보솜 RNA 및/또는 리보솜 단백질에의 접촉부와 함께, 서열의 내부 리보솜 진입 활성을 위한 각 구조 도메인의 기능 또한 제시되어 있다. 이펙터 도메인이 HCV로부터 유래되고, DJ-1 표적화 결합 도메인을 함유하는 IRES 서열로 제시되는 기능성 핵산 분자를 돌연변이유발을 위한 주형으로서 사용하였다. 진행성 번역 개시 인자 eIF3 및 리보솜 단백질 eS27과의 접촉에 관여하는 IIIa 줄기 루프의 결실에 의해 M2 돌연변이체를 제조하였다 (HCV IRES 서열의 아미노산 156-171 - IRES = 서열식별번호 55; IRUP = 서열식별번호 20). 18S rRNA에의 염기쌍 형성 및 시스로 HCV IRES 활성을 기본이 되는 뉴클레오티드 G266의 부위 지정 뉴클레오티드 치환에 의해 M5 돌연변이체를 제조하였다 (G266→C - IRES = 서열식별번호 58; IRUP = 서열식별번호 23).

실시예 19

[0408] 제시된 바와 같이, 정배향 (WT)으로 HCV IRES 서열을 포함하거나, 또는 HCV IRES DIIIa (M2) 또는 G266→C (M5) 돌연변이체를 포함하는 IRES-함유 기능성 핵산 분자를 코딩하는 포유동물 발현 플라스미드로 HEK 293T/17

세포를 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드 (-)로 형질감염시켰다. SINEUP-DJ-1로 형질감염된 세포를 IRES-함유 분자의 효력을 시험하기 위한 참조로서 사용하였다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 항-DJ-1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 22A). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. SINE-함유 기능성 핵산 분자와 비교하여 WT 및 돌연변이화된 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력이 더 높거나, 또는 그와 유사하였다.

[0409] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 DJ-1 mRNA 및 기능성 핵산 RNA의 발현을 모니터링하였다 (도 22B). SINE-함유 기능성 핵산 분자 및 IRES-함유 기능성 핵산 분자 간의 RNA 양을 비교하기 위해, 이펙터 도메인의 3' 단부에 프라이머를 배치하였다. 데이터는 평균 \pm st. dev.로 제시되어 있다.

[0410] 도 22C는 HEK 293T/17 세포 (N=7)에서의 내인성 DJ-1 mRNA에 대한 SINE- 또는 HCV IRES-임베딩된 서열을 포함하는 기능성 핵산 분자의 번역 증진 활성을 나타낸 그래프를 보여주는 것이다. 이중 별표 표시 (**)는 WT HCV IRES-함유 기능성 핵산 분자 대비 통계학상 유의적인 번역 증진 감소를 보이는 돌연변이체 IRES 서열을 나타낸다.

[0411] 본 실시예는 시스로 HCV IRES 활성을 위해 요구되는 구조 요소가 DJ-1 표적화 결합 도메인을 함유하는 기능성 핵산 분자에서 임베딩된 이펙터 도메인 (ED)으로서 트랜스로 HCV IRES의 번역 증진 활성 증가에 기여한다는 것을 보여준다.

실시예 20

[0413] 본 실시예는 표적 mRNA 중의 임의의 핵산 서열이 IRES-유래 서열 함유 기능성 핵산 분자의 결합 도메인에 의해 인식될 수 있다는 것을 보여준다.

[0414] 도 23A는 IRES 서열의 5' 및 IRES-함유 세포 mRNA 내의 서열이 어떻게 결합 도메인으로서 간주될 수 있는지를 나타낸 개략도를 보여주는 것이고, 도 23B는 cMYC mRNA 참조 서열 (NM_002467) 내의 기능성 핵산 서열 요소를 보여주는 것이다.

[0415] 도 23C는 부분적으로 중복되는, 안티센스 배향의, 표적 mRNA 단백질-코딩 서열을 확인하기 위해 질의 서열로서 c-MYC mRNA를 이용한 생물정보학 분석 (BLAST)의 결과를 보여주는 것이다. 표에는 주석이 달린 유전자 ENSEMBL 명명법, 유전자 명칭 및 유전자 쌍형성 영역이 제시되어 있다. IRES 유래 결합 도메인은 안티센스 배향으로 5' UTR, 제1 엑손, 내부 엑손 중의 표적 mRNA에 중복될 수 있고, 상이한 쌍형성 길이는 18 내지 198 범위이다.

[0416] MYC의 전장의 mRNA (cMYC-FL)를 코딩하는 포유동물 발현 플라스미드로 포유동물 SAOS 세포를 형질감염시켰다 (도 24A). 대조군 세포를 빈 벡터 플라스미드 (대조군)로 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 명시된 바와 같이, 항-JAG2, 항-DYRK2, 항-LYS, 항-UBE3A, 항-NRF1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 24B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. 형질감염 후 cMYC 단백질의 발현을 확인하기 위한 추가 대조군으로서 항-cMYC 항체를 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다 (c). cMYC IRES-함유 기능성 핵산 분자의 효력은 시험된 모든 표적 mRNA에 대해 뚜렷이 나타났고, 결합 도메인의 길이는 144 (JAG2) 내지 20 (UBE3A, NRF1) 뉴클레오티드 범위이다.

[0417] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 JAG2, DYRK2, LIS1, UBE3A, NRF1 및 cMYC mRNA의 발현을 모니터링하였다 (도 24C 및 도 24D).

[0418] 본 실시예는 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 결합 도메인과 표적 단백질-코딩 mRNA 사이의 쌍형성 영역은 그의 완전한 번역 증진 활성을 유지하면서, 위치 및 길이에 있어 달라질 수 있다는 것을 보여준다.

실시예 21

[0420] 본 실시예는 단백질-코딩 CDS 부분 및 cMYC의 DNA-결합 도메인이 부분적으로 중복되는 단백질-코딩 mRNA의 번역을 증가시키기 위한 IRES-함유 기능성 핵산 분자에는 요구되지 않음을 보여준다.

[0421] MYC의 전장의 mRNA (cMYC-FL), 또는 cMYC DNA 결합 도메인 (델타C)이 결여되고, 5'UTR 단독 (5'UTR) 도메인으로, 또는 IRES 단독 (IRES) 도메인으로 구성된 변이체 코딩하는 포유동물 발현 플라스미드로 포유동물 SAOS 세포를 형질감염시켰다 (도 25A). 대조군 세포를 빈 벡터 플라스미드 (대조군)로 형질감염시켰다. 형질감염 후

48시간 경과시, 세포를 용해시키고, 단백질 양을 위해 프로세싱하였다. 명시된 바와 같이, 항-JAG2, 항-DYRK2, 항-LYS, 항-UBE3A, 항-NRF1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 25B). β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. 형질감염 후 cMYC 단백질의 발현을 확인하기 위한 추가 대조군으로서 항-cMYC 항체를 사용하였다. β -액틴으로 정규화된 웨스턴 블롯 영상 상에서 및 빈 대조군 샘플 대비로 유도 배수를 계산하였다. 대조군 세포 대비 단백질 양의 변화 배수는 웨스턴 블롯 영상 하단에 제시되어 있다.

[0422] 형질감염된 세포로부터 RNA를 정제하였다. 특이적 프라이머를 이용하여 qRT-PCR에 의해 내인성 JAG2, DYRK2, LIS1, UBE3A, NRF1 및 cMYC mRNA의 발현을 모니터링하였고 (도 25C), 이를 통해 IRES-함유 기능성 핵산 분자의 전사 후 기전이 입증되었다.

[0423] 이점

[0424] 본 발명의 트랜스-작용 기능성 핵산 분자를 통해 표적 mRNA 수준에는 영향을 주지 않으면서, 실제로 임의의 표적 mRNA 서열의 번역을 증진시킬 수 있다.

[0425] EP 2691522에 개시된 기능성 핵산 분자와 비교하였을 때, 본 발명의 기능성 핵산 분자는 마우스 SINE 서열에 기인하는 역전위의 위험을 회피할 수 있고, 실시예 2 내지 11에서는 HEK 293T/17에서 및 실시예 12에서는 HepG2에서 나타난 바와 같이, 더 높은 수준의 단백질 번역 증진을 촉진시킬 수 있다. 특히, 더욱 강력한 IRES 서열의 예는 HEK 세포에서의 것으로 도 5 (HCV IRES, 정배향), 도 6 (폴리오 IRES, 정배향 및 역배향), 도 7 (ECMV IRES, 정배향 및 역배향; CrPV IRES, 정배향 및 역배향), 도 9 (Apaf1 IRES, 정배향), 도 10 (ELG-1 IRES, 정배향 및 역배향), 도 11 (cMYC IRES, 정배향), 도 12 (짧은 cMYC IRES, 정배향), 도 12 (DMD IRES, 정배향 및 역배향)에 제시되어 있다. 추가로 더욱 강력한 IRES 서열의 예는 또한 HepG2 세포에서의 것으로 제시되어 있다 (도 15).

[0426] 일부 IRES 서열은 40 내지 50개의 뉴클레오티드 정도로 짧다. 이를 통해 매우 짧은 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 조작이 가능하다.

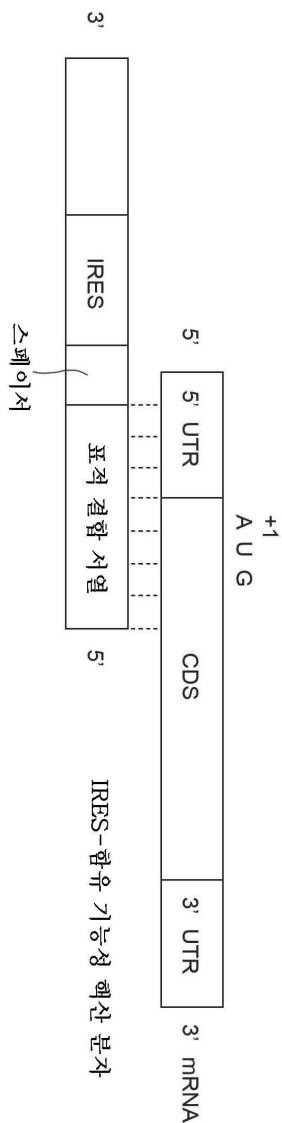
[0427] 추가로, 본 발명의 트랜스-작용 기능성 핵산 분자는 특히, EP2691522에 개시된 기능성 핵산 분자와 비교하여 특히 짧은 표적 결합 서열을 포함할 수 있다.

[0428] 제한된 길이의 조절 서열 및 표적 결합 서열, 둘 모두, 최적의 표적화 및 단백질 합성 증진을 허용하면서, 분자 길이를 짧게 유지시키는 데 기여한다. 짧은 분자를 갖는 것의 주된 이점 중 하나는 100개 뉴클레오티드보다 긴 RNA를 합성하는 데 있어 나타나는 어려움을 극복할 수 있다는 점이다.

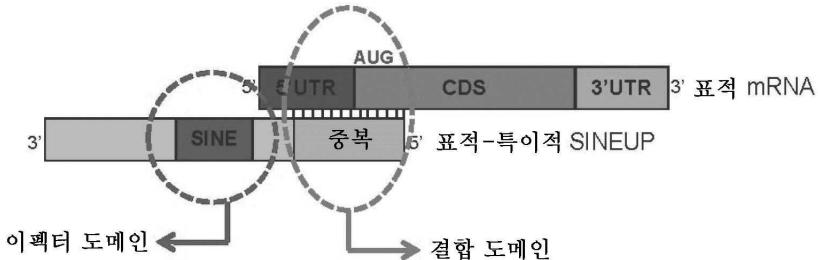
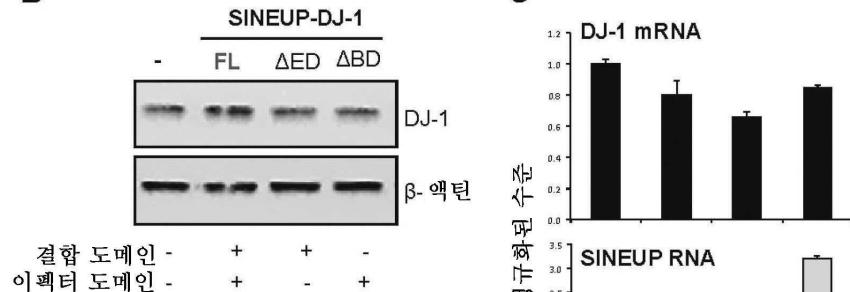
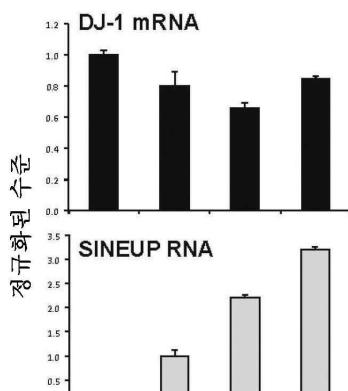
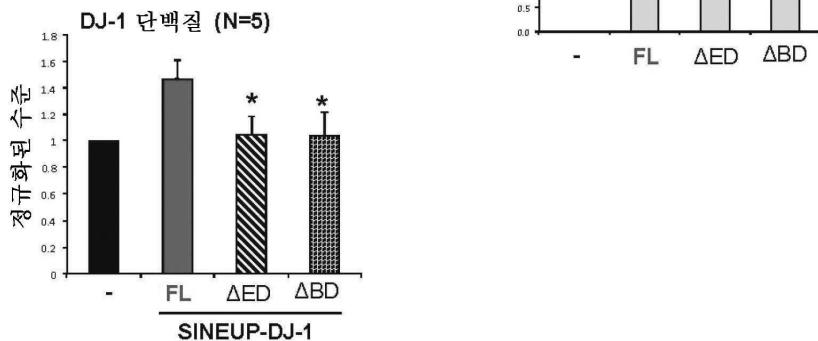
[0429] 본 발명의 트랜스-작용 기능성 핵산 분자의 또 다른 이점은 그가 모듈식 구조를 갖는다는 점, 즉, 비의존적 표적 결합 도메인 및 비의존적 이펙터 도메인을 갖는다는 점이다.

도면

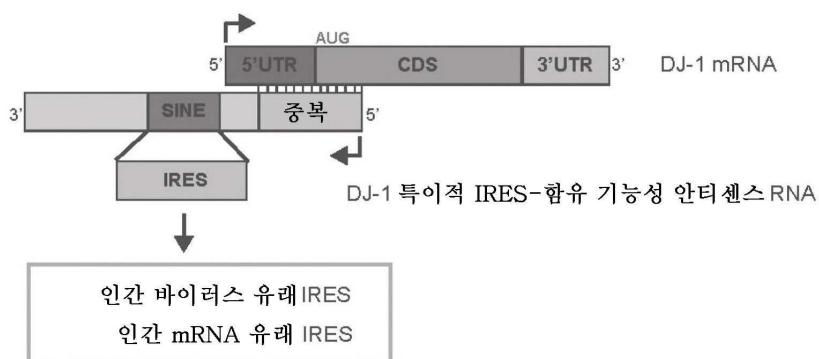
도면1



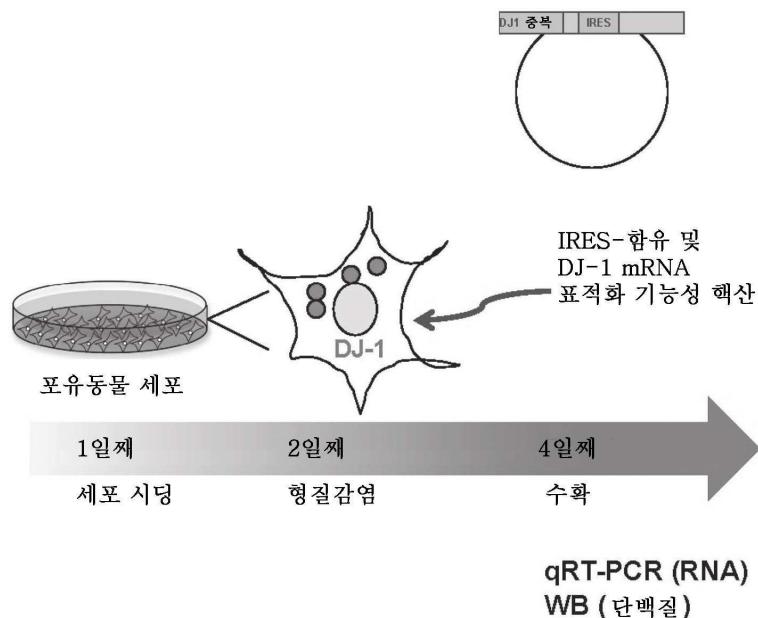
도면2

A**B****C****D**

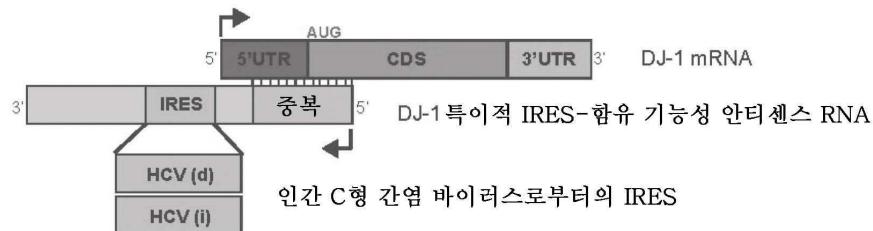
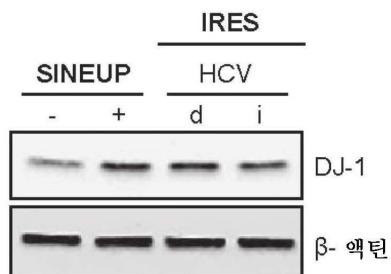
도면3



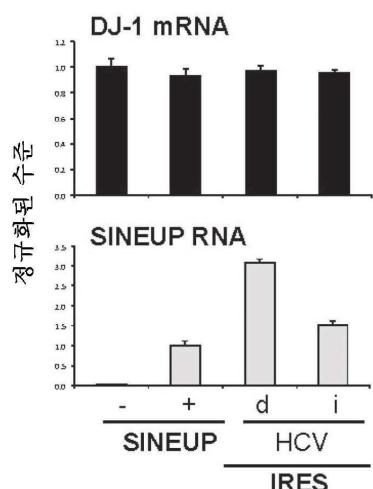
도면4



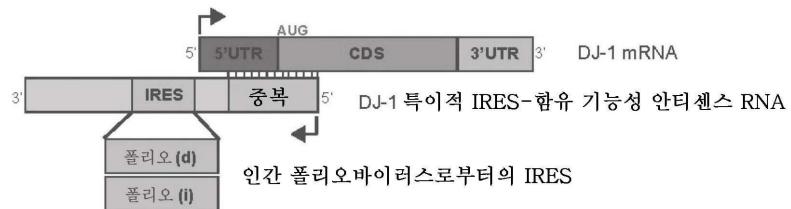
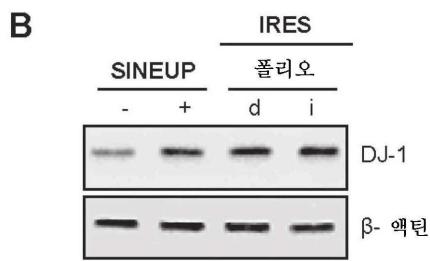
도면5

A**B**

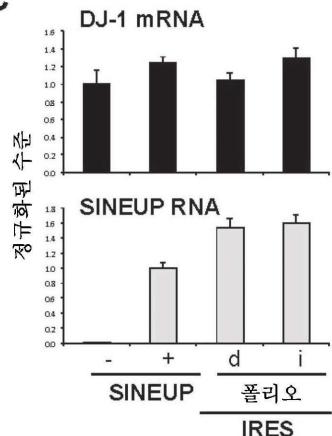
유도 배수: 1.0 1.5 1.7 1.4

C

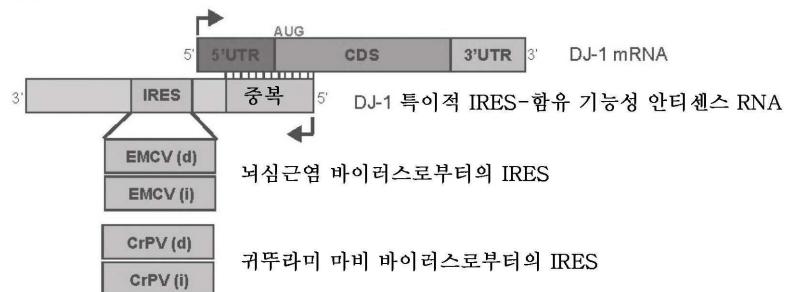
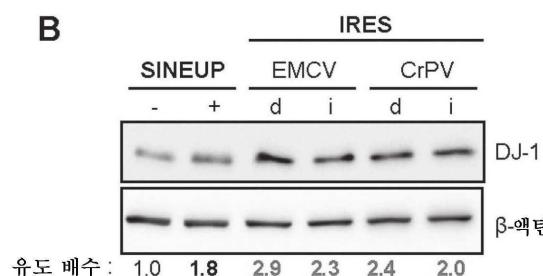
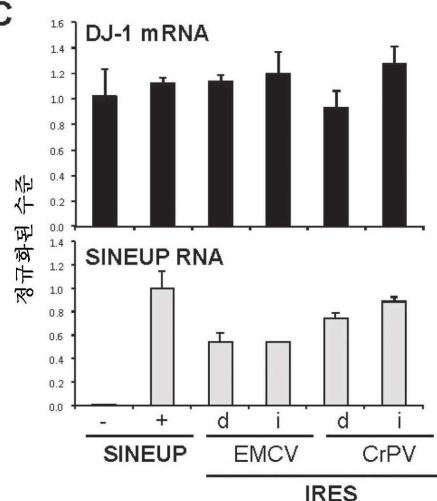
도면6

A**B**

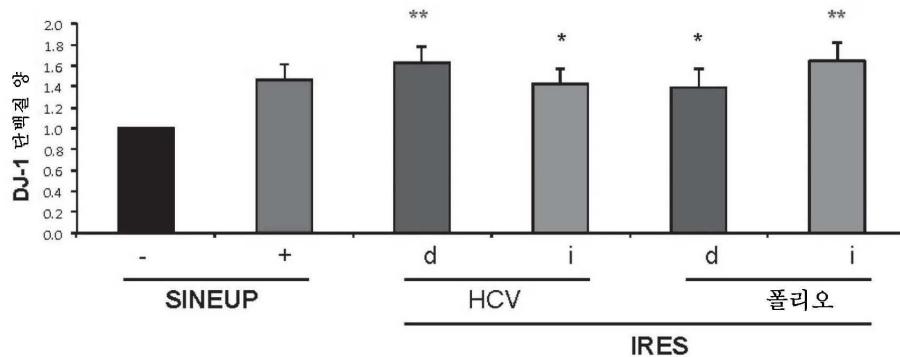
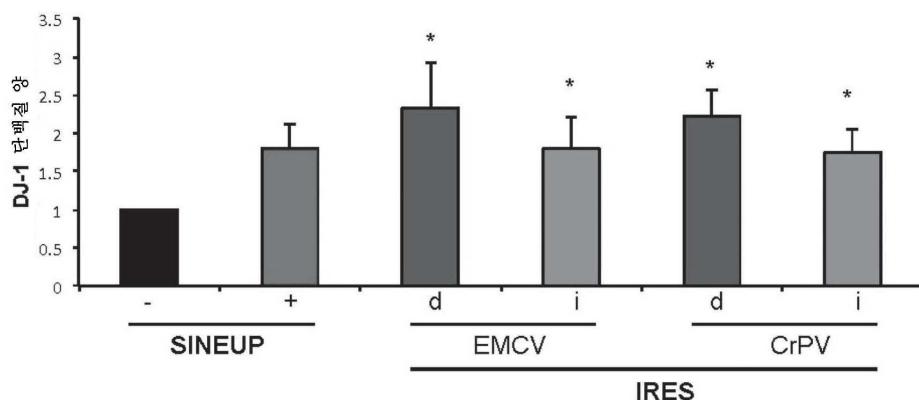
유도 배수 : 1.0 1.6 1.7 2.0

C

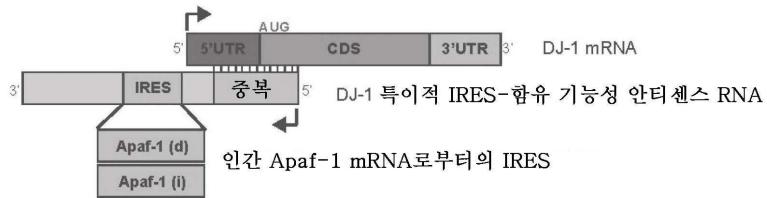
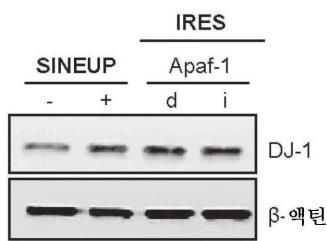
도면7

A**B****C**

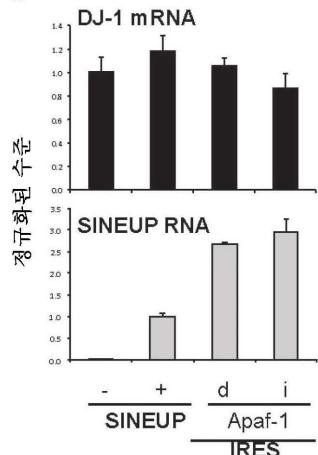
도면8

A**B**

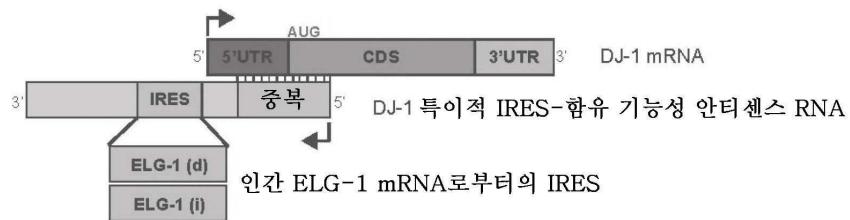
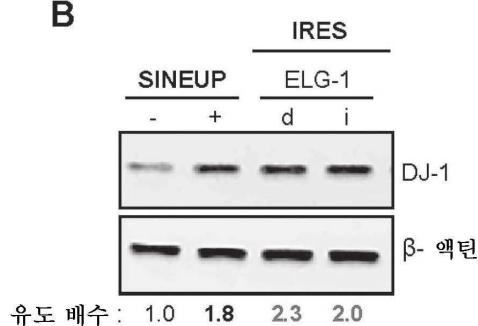
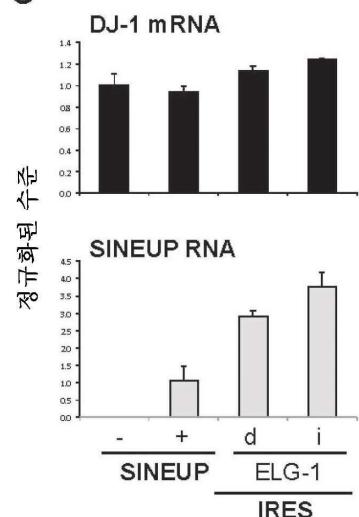
도면9

A**B**

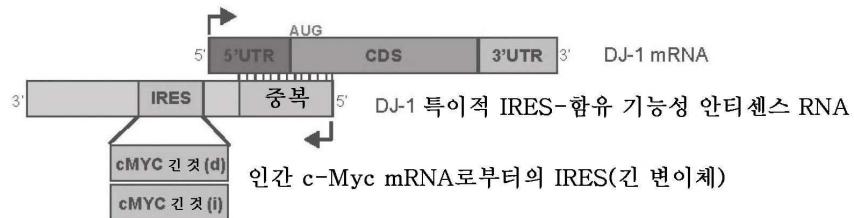
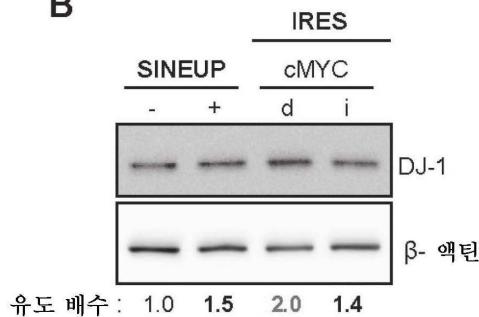
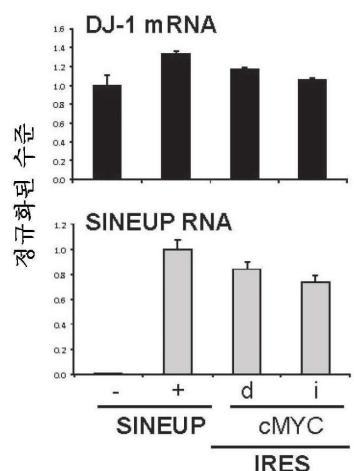
유도 배수 : 1.0 1.5 1.7 1.5

C

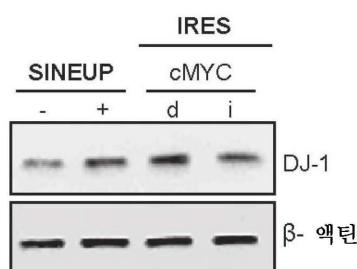
도면10

A**B****C**

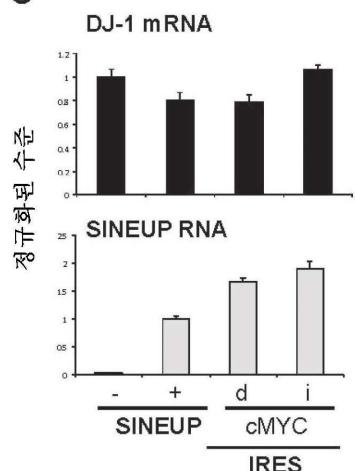
도면11

A**B****C**

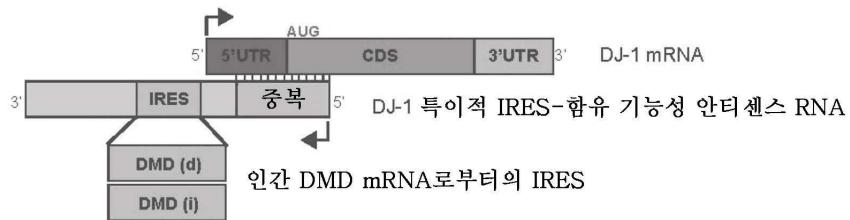
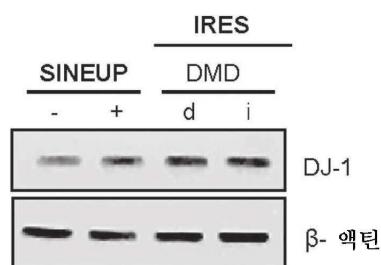
도면12

A**B**

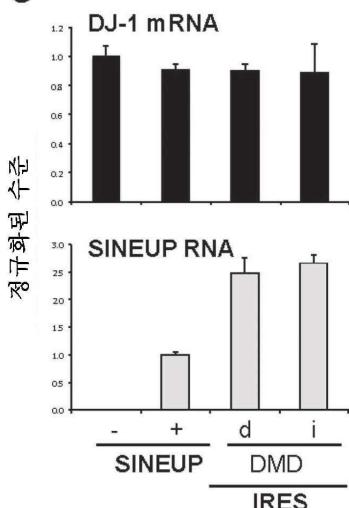
유도 배수 : 1.0 1.6 2.0 1.6

C

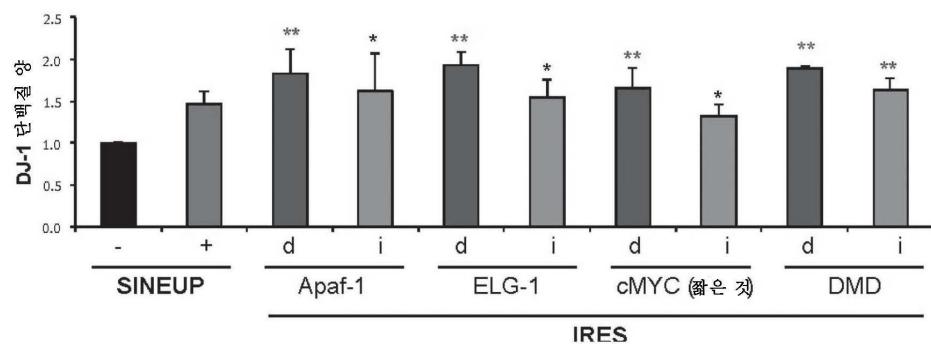
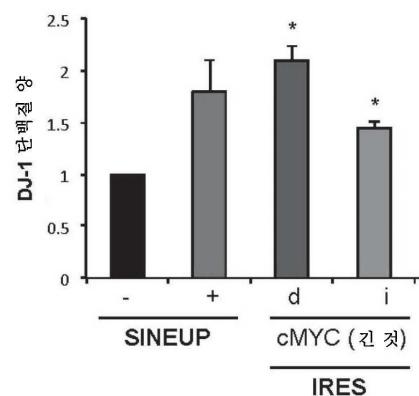
도면13

A**B**

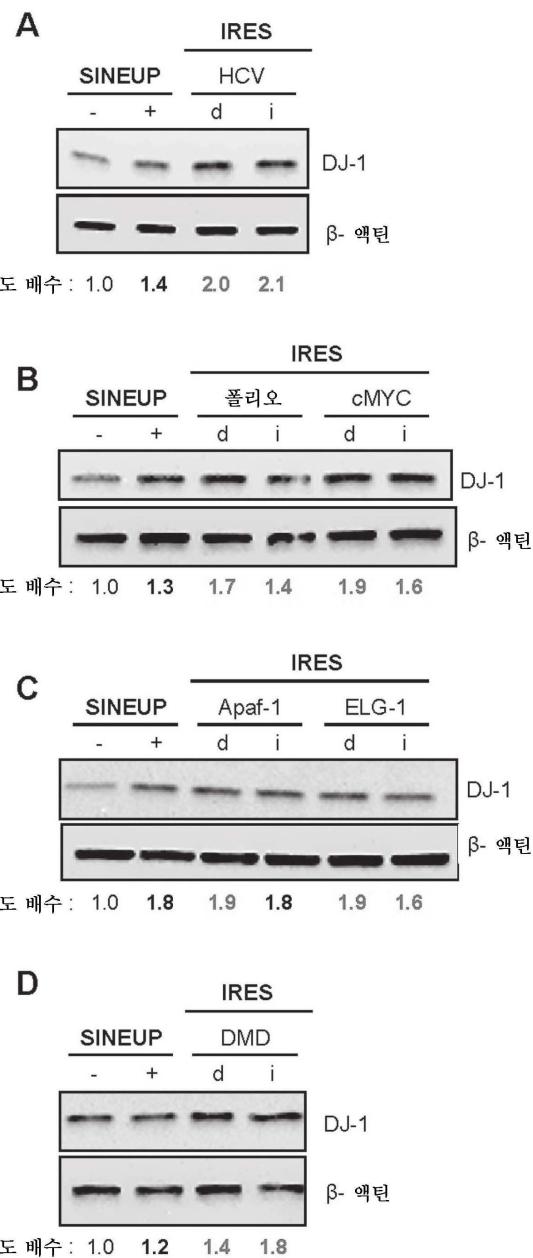
유도 배수 : 1.0 1.6 1.9 1.7

C

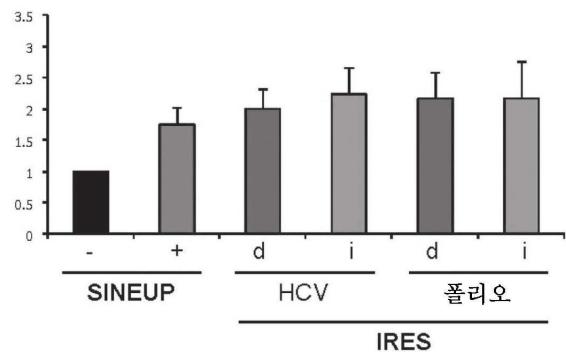
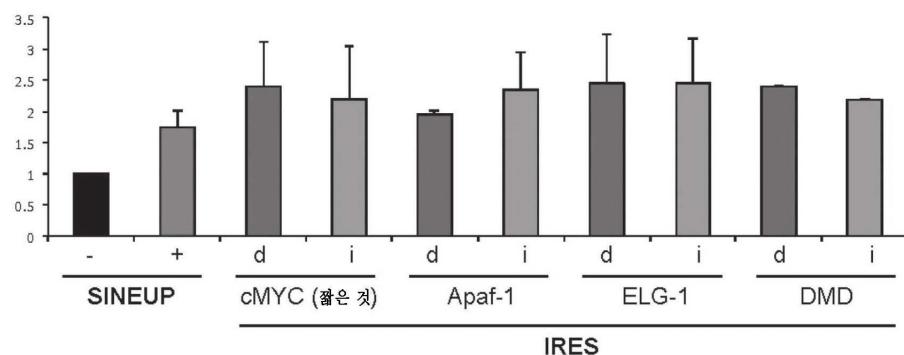
도면14

A**B**

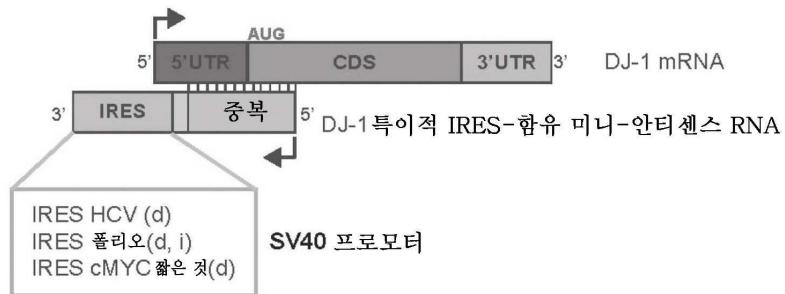
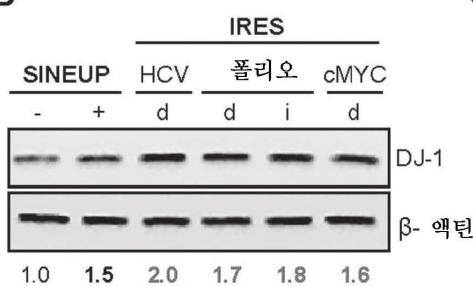
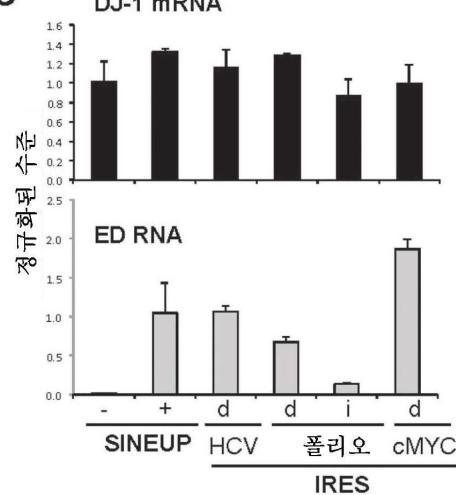
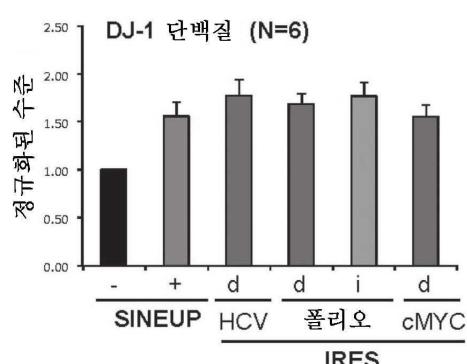
도면15



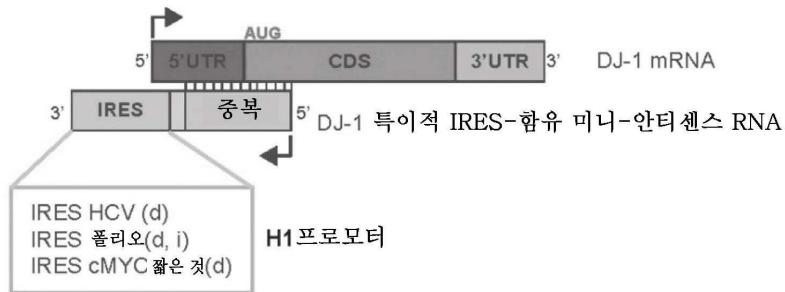
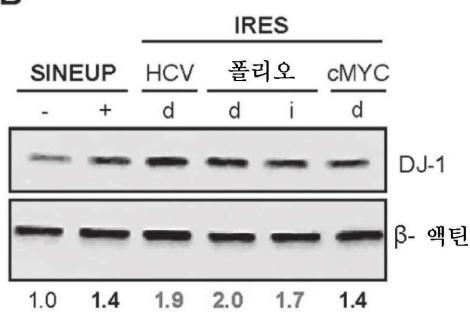
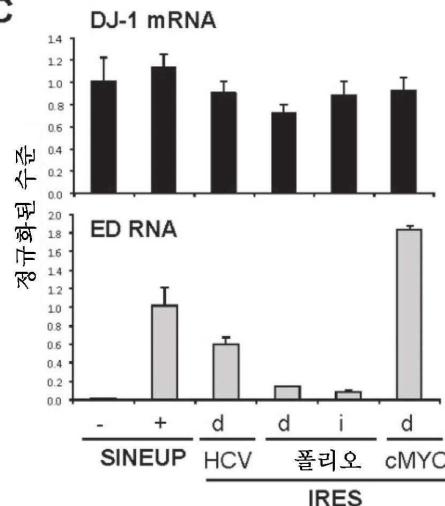
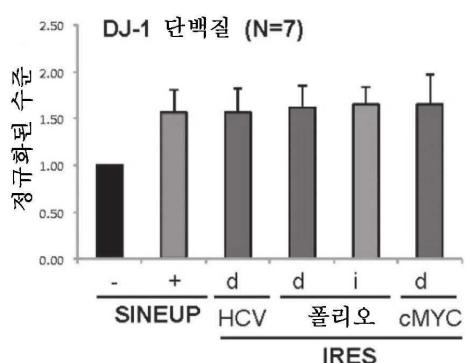
도면16

A**B**

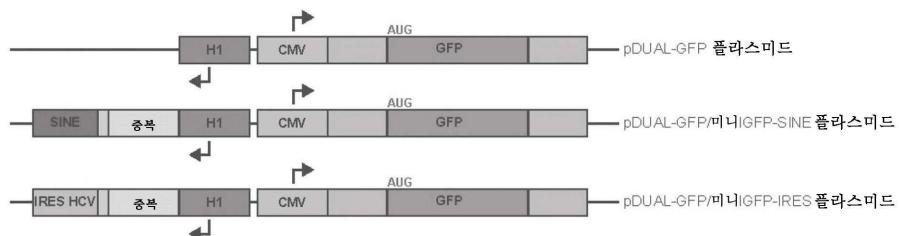
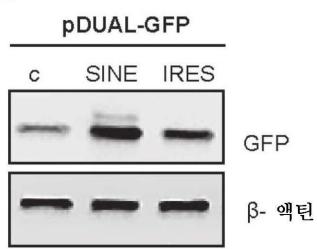
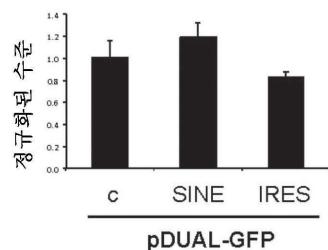
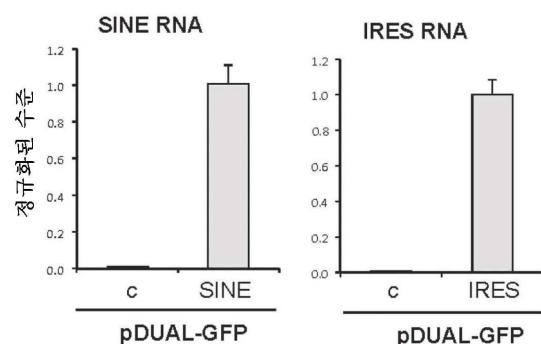
도면17

A**B****C****D**

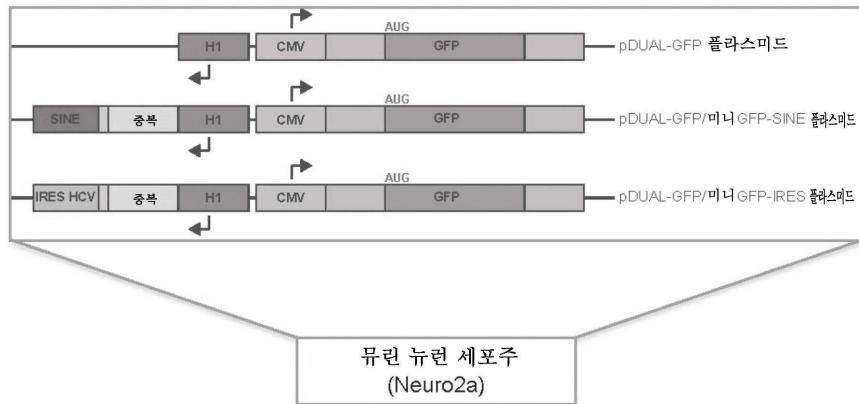
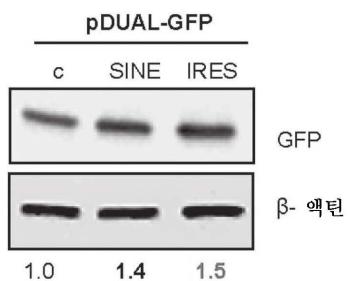
도면18

A**B****C****D**

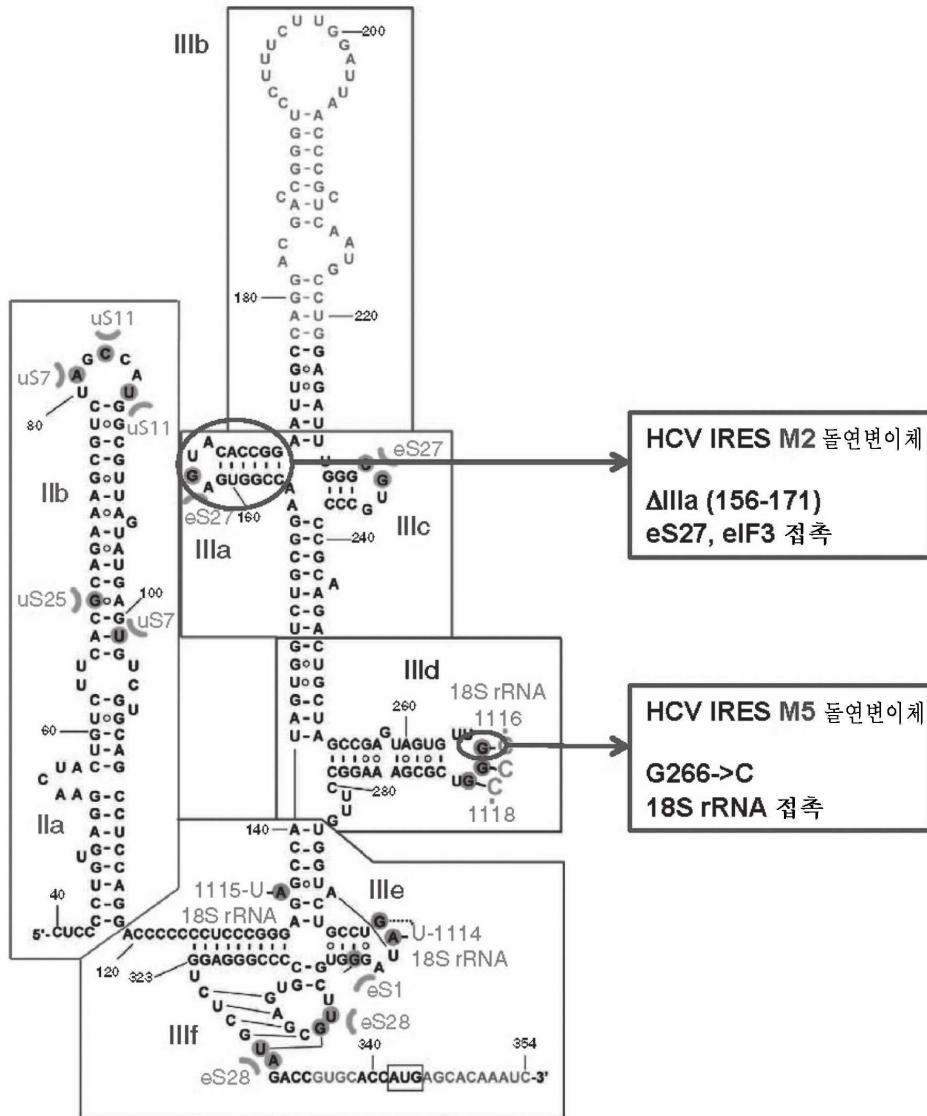
도면19

A**B****C** GFP mRNA**D**

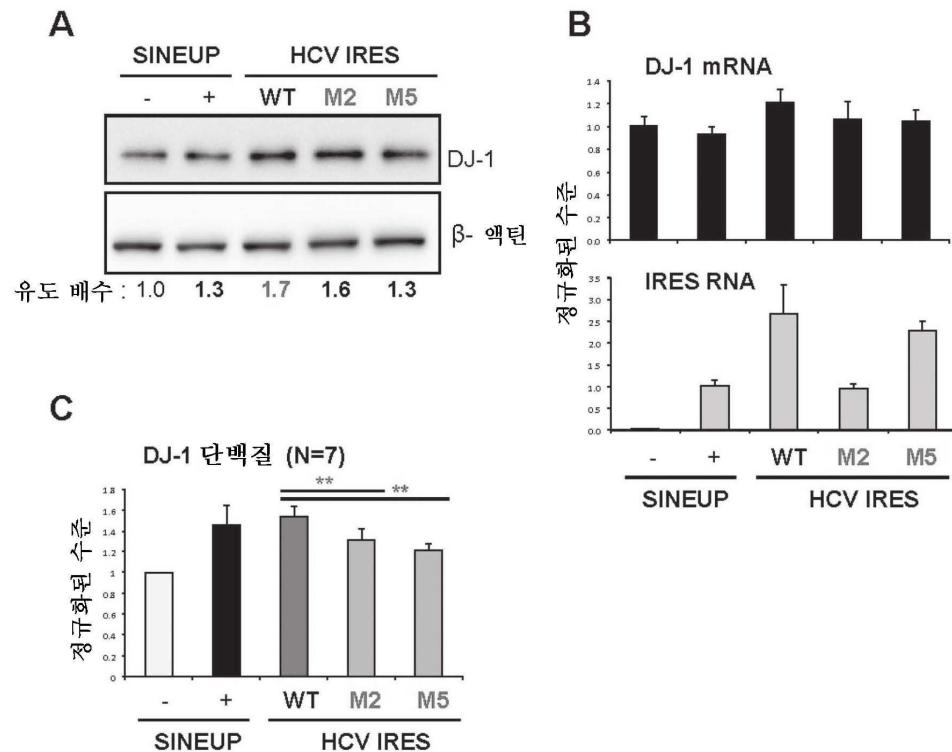
도면20

A**B**

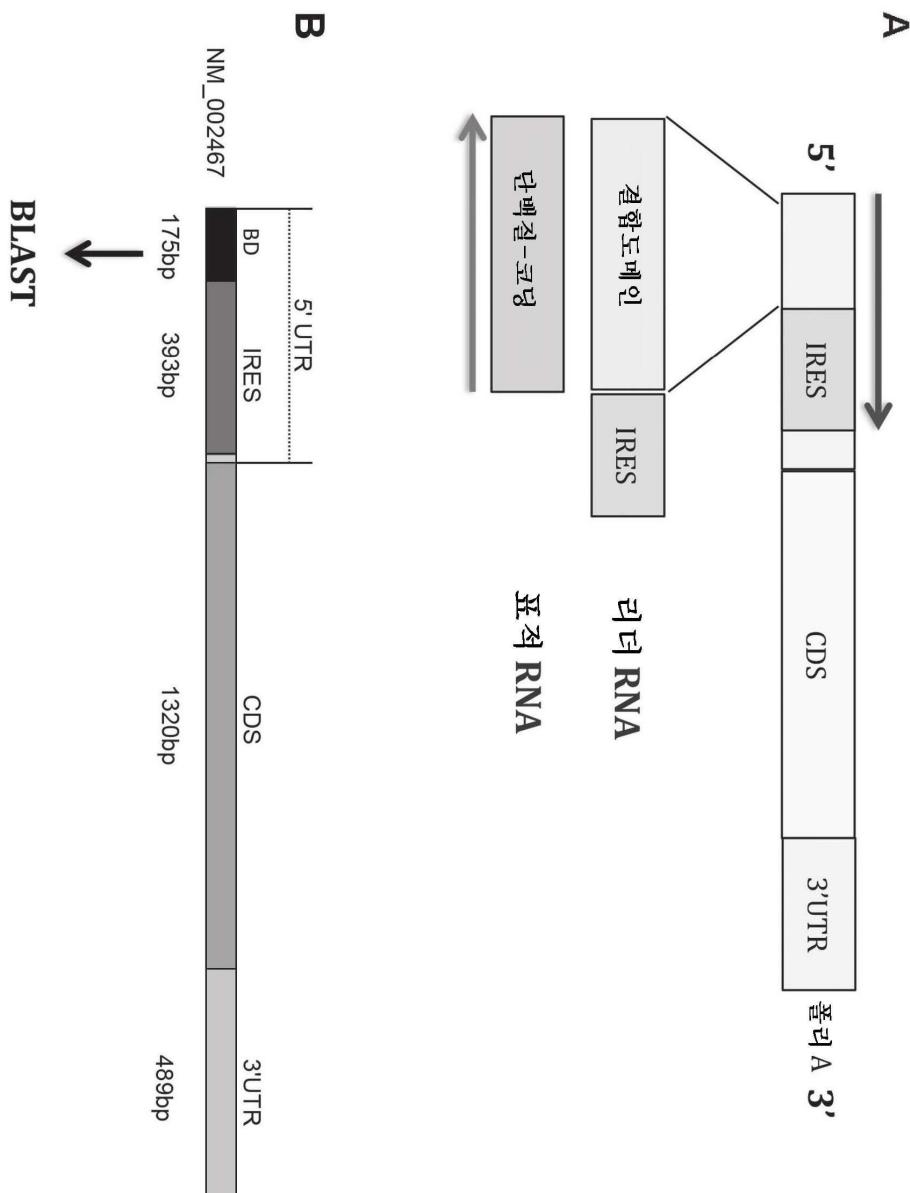
도면21



도면22



도면23i

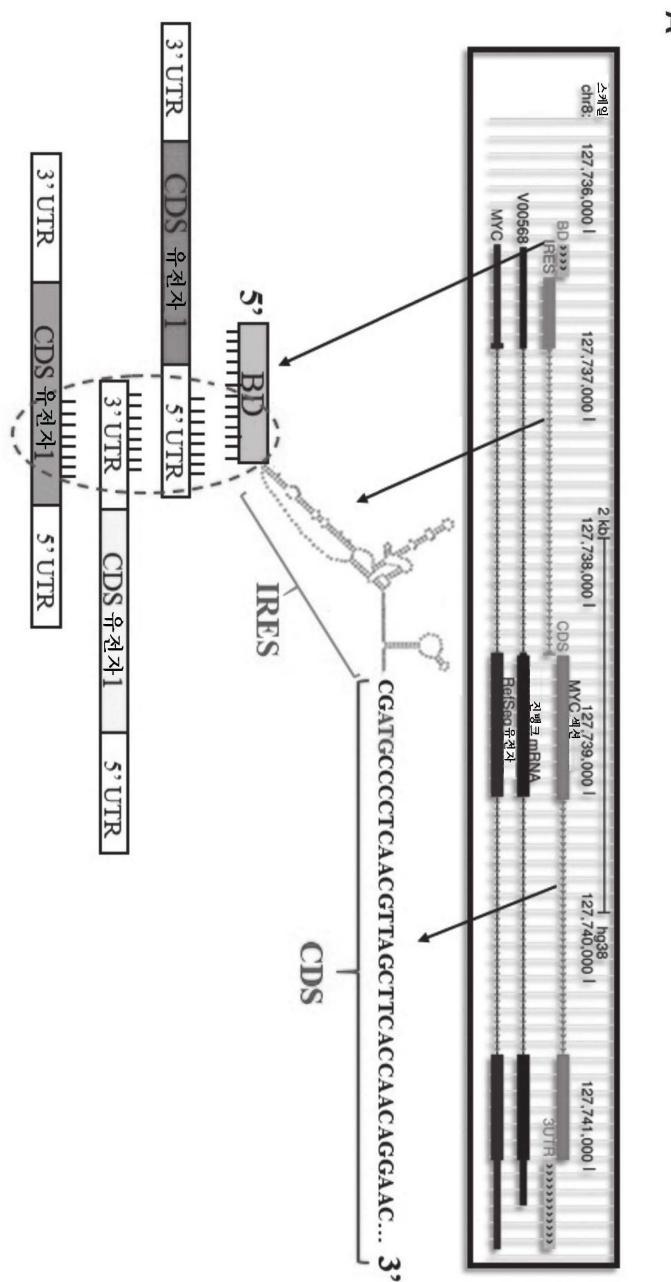


도면23ii

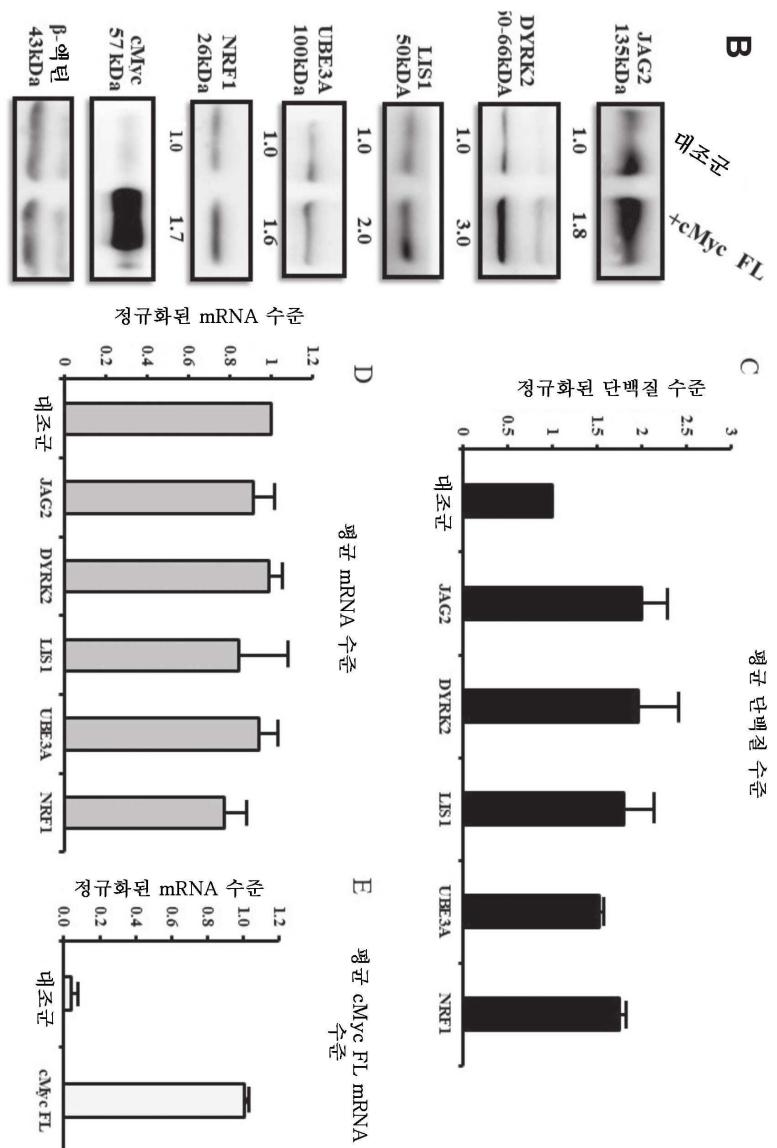
C

주석이 달린 유전자	유전자 명칭	유전자 생합성 유형	전사체 유형	위치	개军人 위치	폐향	정렬 길이	정렬률(%)	E 값	cMyc 생합성 유형
ENST00000347004	JAG2	SUTR	단백질_코딩	157-297	14105168528-105168668	폐향	144	65.97	0.014	IRES
ENST00000460665	RAB6B	SUTR	단백질_코딩	240-311	3133895526-133895597	폐향	76	72.37	0.014	IRES
ENST00000436888	C1orf5	제 1 엑손	단백질_코딩	120-183	1163768496-63768559	폐향	66	72.73	0.1	IRES
ENST00000256925	CABLES1	SUTR	단백질_코딩	3760-3787	1823259225-2352952	폐향	28	92.86	0.087	IRES
ENST00000399816	UBE2QL1	SUTR	단백질_코딩	184-201	53448806-6448823	폐향	18	100	0.57	BD
ENST00000399816	MYRF	SUTR	단백질_코딩	166-205	53448806-6448823	폐향	40	85	0.005	BD
ENST00000399816	ARH1	SUTR	단백질_코딩	1764-1785	1161783950-61783971	폐향	22	100	0.002	BD
ENST00000564062	PAFAH1B1	제 1 엑손	단백질_코딩	217-235	15727474861-727474879	폐향	19	100	0.14	BD
ENST00000575477	PAFAH1B1	제 1 엑손	프로세싱된 전사체	87-178	172593901-2593992	폐향	101	68.32	0.0002	BD
ENST00000397195	DYRK2	SUTR	단백질_코딩	156-247	172593901-72593992	폐향	101	68.32	0.0002	BD
ENST00000393555	ZIC2	SUTR	단백질_코딩	313-360	126764903-67649080	폐향	48	79.17	0.034	BD
ENST00000468291	ZIC2	SUTR	프로세싱된 전사체	378-455	13998853415-999853492	폐향	82	68.29	0.25	BD
ENST00000620342	ZIC2	SUTR	단백질_코딩	1339-1407	13998853415-999853492	폐향	83	68.67	0.092	BD
ENST0000046285	ODC1	SUTR	단백질_코딩	73-114	2104481961-0448237	폐향	43	79.07	0.67	BD
ENST00000234111	ODCI	SUTR	단백질_코딩	268-309	2104481961-0448237	폐향	43	79.07	0.67	BD
ENST00000495910	NRF1	SUTR	단백질_코딩	605-6075	173125125-5125124	폐향	20	100	0.1	BD
ENST00000209466	DNAJC17	SUTR	단백질_코딩	1000-1020	1540767866-40767886	폐향	21	100	0.028	3'UTR
ENST00000309339	OLRI	SUTR	단백질_코딩	1954-2063	12101538700-10158809	폐향	110	65.36	0.018	3'UTR
ENST0000033834	KNP3	SUTR	단백질_코딩	3200-3359	11053522801-05352479	폐향	106	66.04	0.018	3'UTR
ENST0000010980	IBTK	SUTR	단백질_코딩	4749-4819	2104481961-82170615	폐향	72	73.61	0.018	3'UTR
ENST00000295213	SPATA18	SUTR	단백질_코딩	3644-3702	452096540-52096598	폐향	60	78.33	0.018	3'UTR
ENST00000385559	TMF1	SUTR	단백질_코딩	3616-3730	3369022946-69022360	폐향	115	68.7	0.0001	3'UTR
ENST00000238497	VPS4B	SUTR	단백질_코딩	1873-1995	1159229054-10552392	폐향	138	65.22	0.0003	3'UTR
ENST00000356126	PSMD12	SUTR	단백질_코딩	2542-2626	1767339696-67339780	폐향	87	72.41	0.001	3'UTR
ENST00000526335	C1orf54	SUTR	단백질_코딩	28-117	1159229054-10552392	폐향	92	69.57	0.002	3'UTR
ENST00000359717	RHOBTB1	SUTR	단백질_코딩	2535-2612	1159229054-10552392	폐향	82	70.73	0.002	3'UTR
ENST00000392319	TMEM121	SUTR	단백질_코딩	620-696	141053529290-105523966	폐향	80	70	0.053	CDS
ENST00000325468	GYTL1B	SUTR	단백질_코딩	128-187	1159229054-105523964	폐향	60	76.67	0.053	CDS
ENST00000263754	KAT2B	SUTR	단백질_코딩	168-282	320060239-20040354	폐향	117	63.25	0.14	CDS
ENST00000543491	PCDH7	SUTR	단백질_코딩	404-595	430721340-30721522	폐향	198	61.62	0.38	CDS

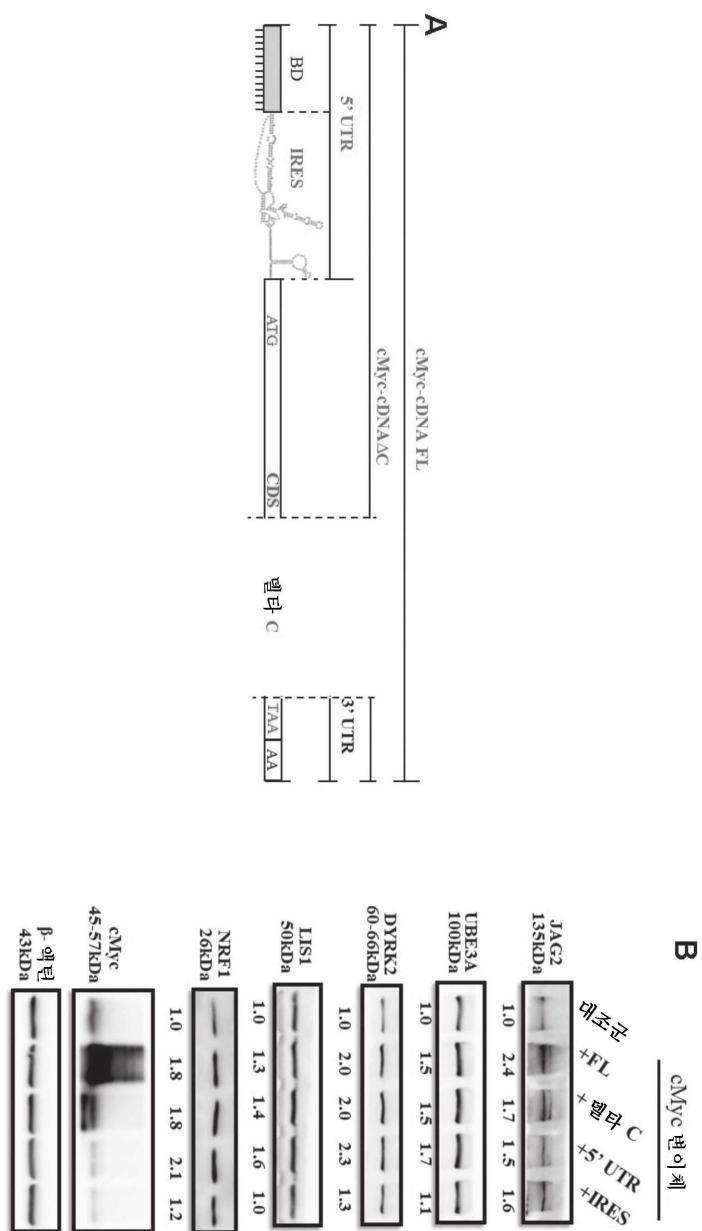
도면24i



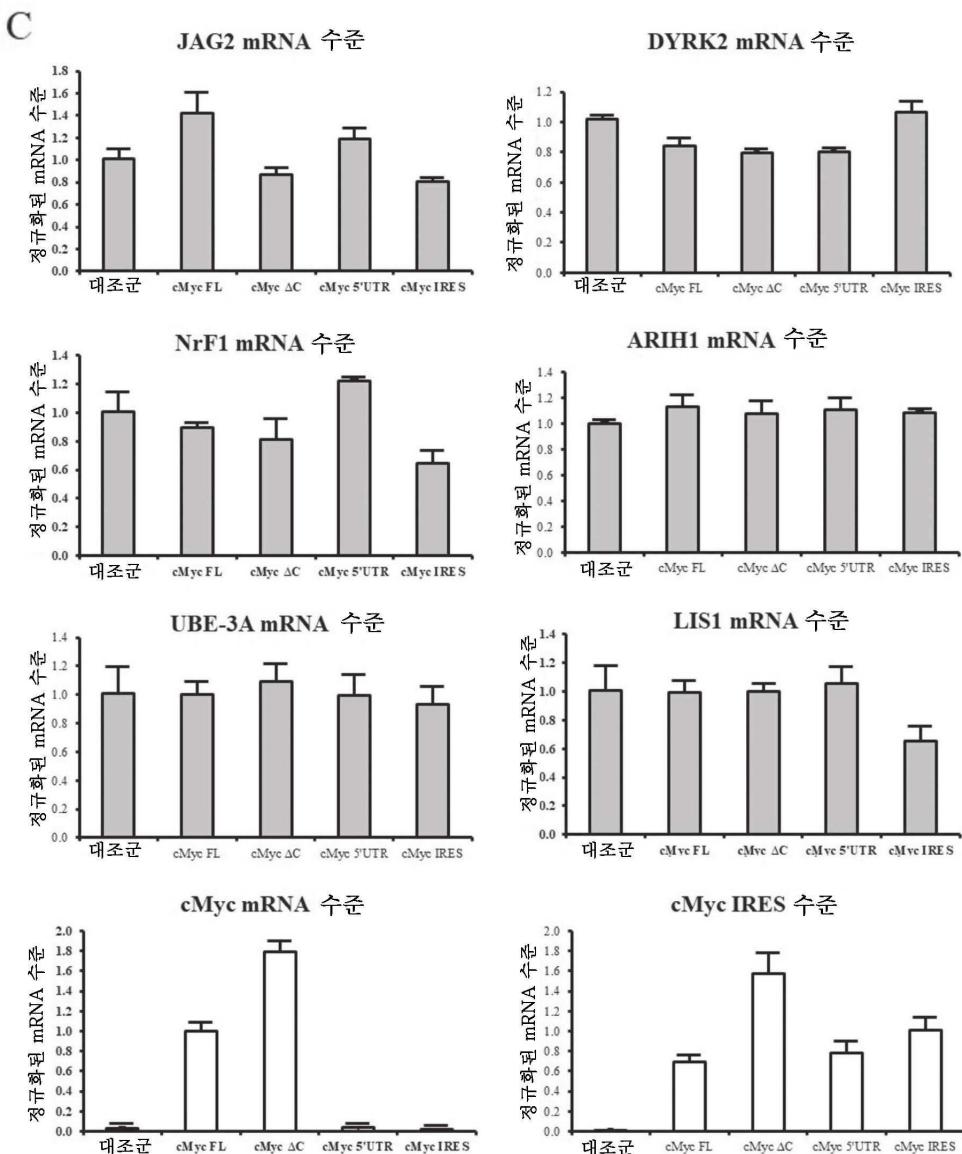
도면24ii



도면25i



도면25ii



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA

SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI

<120> FUNCTIONAL NUCLEIC ACID MOLECULE AND USE THEREOF

<130> 484-17

<160> 65

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 1437

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV(d) IRUP

<400> 1

ccauuuuuau	guuaauaguu	uacaagcccc	acaccaggcu	gaaaucugc	agaauucgcc	60
cuuggccagcc	cccugauggg	ggcgacacuc	caccaugaaau	cacuccccug	ugaggaacua	120
cugucuucac	gcagaaagcg	ucuagccaug	gctguuaguau	gagugucgug	cagccuccag	180
gaccggggcu	cccgaggagag	ccauaguggu	cugcggaacc	ggugaguaca	ccggaaauugc	240
caggacgacc	ggguccuuuc	uuggauaaac	ccgcucaaug	ccuggagauu	ugggcgugcc	300
cccgcaagac	ugcuagccga	guaguguugg	gucgcgaaag	gccuuguggu	acugccugau	360
aggugcuug	cgagugcccc	gggaggucuc	guagaccgug	caccaugagc	acgaauccua	420
aaccucaaag	aaaaacccaaa	cguaacaguc	ucuuaaaaaa	caaacaaacg	aacgaacagc	480
aagggagcug	gguaugacaa	cacauacuau	aauucuagua	cucaggaugc	ugaaacagga	540
ggauugccug	acugggagau	auaaggagaa	ucuguuguca	cccccacccc	uccccaauaaa	600
ggcagaaauaa	aagaacgucc	uauaaacaaa	aaaacaaaca	acccaauaaaa	acaaaacccaa	660
gaucucucca	ccuuuucuuu	gcuuuuucag	acuuuguaau	aaggccuuu	ggagugcagg	720
auauucggca	ggacaaggcag	agagggagac	caucaguucu	uucuuugauc	aagaagacua	780
uguuccuuag	caaacuggug	uguauuaucu	cuuaugcaau	gagccuggaa	agagggcaca	840
gccaccgagg	augguacagc	auggauggau	gguacgcuac	agagacucgg	gagcccaacu	900
gugaguggcu	gacuggcaug	guagguucag	ggaagaaauug	gccugugaag	aaauguuucu	960
ugaaaauguga	acaaggugca	ggagguagga	guggguccug	ggcaaagcag	ggggugcauc	1020
ccagccucag	ggaauagcac	agcagagguc	uguugaugca	ugcgagugca	ugaccugcuu	1080
gccaauagac	gaucaagaau	ggccaaagca	ucauggguga	ugaguggggag	aggggaugag	1140
acauuccuuu	cucccugcug	agacuuccau	ugaaccgaug	aguucugaaau	agaagaugcc	1200
cccccacccc	cccaccagug	uagaaucuga	agggaggcau	auauuacccu	auauuacucu	1260
guguuggcgg	cgagcuaucu	gacagccaac	ciuucccauac	auuucauugg	gcäuacacua	1320
augacaggaa	guuccuuuug	cuuguaugca	agagauggcu	cacacgaugg	agaauuuuaau	1380
cuugaagggc	gaaucccacc	acacuggacu	aguggauccg	agcucgguac	caagcuu	1437

<210> 2

<211> 1437

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV(i) IRUP

<400> 2

ccauuuuuau guuaauaguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaucugc agaaucgcc	60
cuuguuacgu uugguuuuuc uuugaggguu aggauucgug cucauggugc acggucuacg	120
agaccucccg gggcacucgc aagcacccua ucagggagua ccacaaggcc uuucgcgacc	180
caacacuacu cggcuagcag ucuugcggg gcacgccaa aucuccaggc auugagcgaa	240
uuuauccaag aaaggacccg gucguccugg caauuccggu guacucacccg guuccgcaga	300
ccacuauggc ucucccgga gggggguucc ugaggcugc acgacacuca uacuaacgcc	360

auggcuagac gcuuucugcg ugaagacagu aguuccucac aggggaguga uucauggugg	420
agugucgccc ccaucagggg gcuggcaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc	480
aaggaggcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga	540
ggauugccug acuggggagau auaggagaa ucuguuguca ccccccacccu ucccauaaa	600
ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaccaa	660
gaucucucca ccuuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggccuuu ggagugcagg	720
auauucggca ggacaaggcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua	780

uguiuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca	840
gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu	900
gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaaauug gccugugaag aaaauguucu	960
ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaaagcag gggugcauc	1020
ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugugagugca ugaccugcuu	1080
gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag	1140
acauuccuuu cuccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaaau agaagaugcc	1200

cccccacccccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu	1260
guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuuuccauac auuucauugg gcauacacua	1320
augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuauu	1380
cuugaagggc gaauccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcnu	1437

<210> 3

<211> 1366

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polio(d) IRUP

<400> 3

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaaauucgcc	60
cuuaugaguc uggacauccc ucacccguga cgguggucca ggcugcguug gcggccuacc	120

uauggcuaac gccaugggac gcuaguugug aacaaggugu gaagagccua uugagcuaca	180
uaagaauccu ccggccccug aaugcggcua aucccaaccu cgaggcaggu ggucacaac	240
cagugauugg ccugucguaa cgcgcaaguc cguggcgaa ccgacuacuu uguguguccg	300
uguuuccuuu uauuuuuauug ugugcugcua ugugugacaau cacagauugu uaucauaaag	360
cgaauuggau ugugccagucu cuuaaaaaac aaacaaacga acgaacagca agggagcugg	420
guaugacaac acauacuaua auucuaguac ucaggaugcu gaaacaggag gauugccuga	480
cugggagaua uaaggagaau cuguugucac ccccacccu ccccauaaag gcagaauaaa	540

agaacguccu auaaacaaau aaacaaacaa cccaaauaaaa caaaaccaag aucucuccac	600
cuuuucuuug cuuuuucaga cuuuguaaua aggccuuug gagugcagga uauucggcag	660
gacaagcaga gagggagacc aucaguucuu ucuuugauca agaagacuau guuccuuagc	720
aaacuggugu guauuaucuc uuauugcaug agccuggaaa gagggcacag ccaccgagga	780
ugguacagca uggauggaug guacgcuaca gagacucggg agcccaacug ugaguggcug	840
acuggcaugg uagguucagg gaagaauugg ccugugaaga aaauguucuu gaaaagugaa	900
caaggugcag gagguaggag ugguuccugg gcaaaggcagg gggugcaucc cagccucagg	960

gaauagcaca gcagaggucu guugaugcau gcgagugcau gaccugcuug ccaauagacg	1020
aucaagaau ggcaaagcau caugggugau gagugggaga ggggaugaga cauuccuuuc	1080
ucccugcuga gacuuccauu gaaccgauga guucugaaaua gaagaugccc ccccacccccc	1140
ccaccagugu agaaucugaa gggaggcaua uauuacccua uauuacucug uguuggcggc	1200
gagcuaucug acagccaacc uucccauaca uuucauuggg cauacacuua ugacaggaag	1260
uuccuuuugc uuguaugcaa gagauggcuc acacgaugga gaaauuaauc uugaaggcg	1320
aauuccacca cacuggacua guggauccga gcucgguacc aagcuu	1366

<210> 4

<211> 1366

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polio(i) IRUP

<400> 4

ccauuuuuau	guuauauguu	uacaagcccc	acaccaggcu	gaaaucugc	agaauucgcc	60
cuuggccaa	ccaaauucgcu	uuauugaua	aacuugugau	ugucaccaua	agcagccaca	120
auaaaaauaa	aggaaacacg	gacacccaaa	guagucgguu	ccgccacgga	cuugcgcg	180
acgacaggcc	aaucacuggu	uugugaccac	cugcucccgag	guugggauua	gccgc	240
ggggccggag	gauucuuau	uagcucaa	ggcucuuac	accuuguu	caacuagcgu	300
cccauggcgu	uagccauagg	uaggccgcca	acgcagccug	gaccac	guc accggugagg	360

gauguccaga	cucauagucu	cuuaaaaaac	aaacaaacga	acgaacagca	agggagcugg	420
guaugacaac	acauacuaua	auucuaguac	ucaggaugcu	gaaacaggag	gauugccuga	480
cugggagaua	uaaggagaau	cuguugucac	ccccacccu	ccccauaaag	gcagaauaa	540
agaacguccu	auaaacaaau	aaacaaacaa	cccaauaaaa	caaaaccaag	aucucuccac	600
cuuuucuuug	cuuuuuucaga	cuuuguaaua	aggcccuuug	gagugcagga	uauucggcag	660
gacaagcaga	gagggagacc	aucaguucuu	ucuuugauca	agaagacuau	guuccuuagc	720
aaacuggugu	guauuaucuc	uuauugcaug	agccuggaaa	gagggcacag	ccaccgagga	780

ugguacagca	uggauggaaug	guacgcuaca	gagacucggg	agcccaacug	ugaguggcug	840
acuggcaugg	uagguucagg	gaagaauugg	ccugugaaga	aaauguucuu	gaaaagugaa	900
caaggugcag	gagguaggag	uggguccugg	gcaaagcagg	gggugcaucc	cagccucagg	960
gaauagcaca	gcagaggucu	guugaugcau	gcgagugcau	gaccugcuug	ccaaugacg	1020
aucaagaaug	ggcaaagcau	caugggugau	gagugggaga	ggggauagaga	cauuccuuuc	1080
ucccugcuga	gacuuccauu	gaaccgauga	guucuguaaua	gaagaugccc	ccccacccccc	1140
ccaccagugu	agaaucugaa	gggaggcaua	uauuacccua	uauuacucug	uguuggcggc	1200

gagcuaucug	acagccaacc	uucccauaca	uuucauuggg	cauacacuaa	ugacaggaag	1260
uuccuuuugc	uuguaugcaa	gagauggcuc	acacgaugga	gaaauuaauc	uugaaggcgc	1320
aauuccacca	cacuggacua	guggauccga	gcucgguacc	aagcua		1366

<210> 5

<211> 1630

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EMCV(d) IRUP

<400> 5

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaucugc agaauucgcc	60
cuuccccccc ucucccuccc ccccccuuaa cguuacuggc cgaagccgcu uggaauaagg	120
ccggugugcg uuugucuaua uguuauuuuc caccauauug ccgucuuuug gcaaugugag	180
ggcccgaaaa ccuggccug uciuucuugac gagcauuccu aggggucuuu cccucucgc	240
caaaggaug caaggucugu ugaaugucgu gaaggaagca guuccucugg aagciuucuug	300
aagacaaaca acgucuguag cgacccuuug caggcagcgg aaccccccac cuggcgacag	360
gugccucugc gcccaaaggc cacguguaua agauacaccu gcaaaggcgg cacaacccca	420
gugccacguu gugaguugga uaguugugga aagaguaaa ugjcucuccu caagcguauu	480
caacaagggg cugaaggaaug cccagaagggu accccauugu augggaucug aucuggggcc	540
ucggugcaca ugcuuuacau guguuuaguc gagguuaaaa aacgucuagg ccccccgaac	600
cacggggacg ugguuuuccu uugaaaaaca cgaugauaaa gucucuuaaa aaacaaacaa	660
acgaacgaac agcaagggag cuggguauga caacacauac uauauuucua guacucagga	720
ugcugaaaca ggaggauugc cugacuggga gauauaagga gaaucuguug ucaccccac	780
cccuccccau aaaggcagaa uaaaagaacg uccuauaaac aaauaaacaa acaacccaaau	840
aaaacaaaac caagaucucu ccaccuuuuc uuugcuuuuu cagacuuugu aauaaggccc	900
uuuggagugc aggauauucg gcaggacaag cagagaggga gaccaucagu ucuuucuuug	960
aucaagaaga cuauguuccu uagcaaacug guguguauua ucucuuauug aaugagccug	1020
gaaagagggc acagccaccg aggaugguac agcauggaug gaugguacgc uacagagacu	1080
cgggagccca acugugagug gcugacuggc augguaggua cagggaaagaa uuggccugug	1140
aagaaaaugu ucuugaaaag ugaacaaggua gcaggaggua ggaguggguc cugggcaaag	1200
cagggggugc aucccagccu cagggaaauag cacagcagag gucuguugau gcaugcgagu	1260
gcaugaccug cuugccaaaua gacgaucaag aaugggcaaa gcaucaugg ugaugagugg	1320
gagaggggau gagacauuucc uuucuccug cugagacuuc cauugaaccg augaguucug	1380
aaauagaagau gccccccac ccccccacca guguagaauc ugaaggagg cauauauuac	1440
ccuauuuuac ucuguguugg cggcgagcua ucugacagcc aaccuuucca uacauuuucau	1500
ugggcauaca cuaaugacag gaaguuccuu uugcuugua gcaagagaug gcucacacga	1560
uggagaauuu aaucuugaag ggcgaauucc accacacugg acuaguggau ccgagcucgg	1620
uaccaagcua	1630
<210> 6	
<211> 1630	
<212> RNA	

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EMCV(i) IRUP

<400> 6

ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaucugc agaaucgcc	60
cuuuuaucau cguguuuuuc aaaggaaaac cacgucccg ugguucgggg gccuagacg	120
uuuuuuuacc ucgacuuaac acauguaaag caugugcacc gaggccccag aucagauccc	180
auacaauugg guaccuucug ggcauccuuc agccccuugu ugaauacgc ugaggagagc	240
cauuugacuc uuuccacaac uauccaacuc acaacguggc acugggguug ugccgccuu	300
gcagguguau cuuauacacg ugcuuuuugg ccgcagaggc accugucgcc aggugggggg	360
uuccgcugcc ugcaaagggu cgcuacagac guuguuuguc uucaagaagc uuccagagga	420
acugcuuccu ucacgacauu caacagaccu ugcauuccuu uggcgagagg gcaaagaccc	480
cuaggaaugc ucgucaagaa gacaggcga gguuuccggg cccucacauu gccaaaagac	540
ggcaauaugg ugaaaaauaa cauauagaca aacgcacacc ggccuuauuc caagcggcuu	600
cggccaguua cguuaggggg gggggagggg gagggggggg gucucuuaaa aaacaaacaa	660
acgaacgaac agcaagggag cuggguauga caacacauac uauauuucua guacucagga	720
ugcugaaaca ggaggauugc cugacuggga gauuaagga gaaucuguug ucaccccac	780
cccuccccau aaaggcagaa uaaaagaacg uccuauaaac aaauaaacaa acaacccaa	840
aaaacaaaac caagaucucu ccaccuuuuc uuugcuuuuu cagacuuugu aauaaggccc	900
uuuggagugc aggauauucg gcaggacaag cagagggga gaccacagu ucuiucuuug	960
aucaagaaga cuauguuccu uagcaaacug guguguauua ucucuuauugc aaugagccug	1020
gaaagagggc acagccaccg aggaugguac agcauggaug gaugguacgc uacagagacu	1080
cgggagccca acugugagug gcugacuggc augguagguu cagggagaa uuggccugug	1140
aagaaaaugu ucuugaaaag ugaacaaggu gcaggaggua ggaguggguc cuggcaaag	1200
cagggggugc auccagccu cagggaaug cacagcagag gucuguugau gcaugcgagu	1260
gcaugaccug cuugccaaaua gacgaucaag aaugggcaaa gcaucaugg ugauagagg	1320
gagaggggau gagacauucc uuucuccug cugagacuuc cauugaaccg augaguucug	1380
aauagaagau gccccccac ccccccacca guguagaau ugaagggagg cauauauac	1440
ccuaauuuac ucuguguugg cggcgagcua ucugacagcc aaccuuucca uacauuucau	1500
ugggcauaca cuaaugacag gaaguuccu uugcuuguau gcaagagaug gcucacacga	1560
uggagaauuu aaucuugaag ggcaauucc accacacugg acuaguggau ccgagcucgg	1620

uaccaagcuu	1630
<210> 7	
<211> 1140	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CrPV(d) IRUP	
<400> 7	
ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauiucgcc	60
cuuaaagcaa aaaugugauc uugcuuguaa auacaauuuu gagagguuaa uaaaauuacaa	120
guagugcuau uuuuuguaauu agguuagcua uuuagcuuua cguuccagga ugccuagugg	180
cagccccaca auauccagga agcccucucu gcgguuuuuc agauuaggua gucgaaaaac	240
cuaagaaaaa uaccuagucu cuuaaaaaac aaacaaacga acgaacagca agggagcugg	300
guaugacaac acauacuaua auucuaguac ucaggaugcu gaaacaggag gauugccuga	360
cugggagaua uaaggagaau cuguugucac ccccacccu ccccauaaag gcagaauaaa	420
agaacguccu auaaacaauu aaacaaacaa cccaaauaaaa caaaaccaag aucucuccac	480
cuuuucuuug cuuuuucaga cuuuguaaua aggcccuuug gagugcagga uauucggcag	540
gacaagcaga gagggagacc aucaguicuu uciuugauca agaagacaua guuccuuagc	600
aaacuggugu guauuaucuc uuaugcaaug agccuggaaa gagggcacag ccaccgagga	660
ugguacagca uggauggaug guacgcuaca gagacucggg agcccaacug ugaguggcug	720
acuggcaugg uagguucagg gaagaauugg ccugugaaga aaauguucuu gaaaagugaa	780
caaggugcag gagguaggag ugguuccugg gcaaaggagg gggugcaucc cagccucagg	840
gaauagcaca gcagaggucu guugaugcau gcgagugcau gaccugcuug ccaauagacg	900
aucaagaau ggc当地cau cauggugau gagugggaga ggggaugaga cauuccuuuc	960
ucccugcuga gacuuccauu gaaccgauga guucugaaua gaagaugccc ccccacccccc	1020
ccaccagugu agaaucugaa gggaggcaua uauuaccua uauuacucug uguuggcggc	1080
gagcuaucug acagccaacc uucccauaca uuucauuggg cauacacuaa ugacaggaag	1140
<210> 8	
<211> 1246	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223> CrPV(i) IRUP

<400> 8

ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaaauucgcc	60
cuuagguaaa uuuucuuaggu uuuucgacua ccuaaucuga aaaaccgcag agagggcuuc	120

cuggauauug ugccccugcc acuaggcauc cuggaacgua aagcuaaaaa gcuaaccuaa	180
auacaaaaau agcacuacuu guaauuuauu aaccucucaa aauuguauuu acaagcaaga	240
ucacauuuu gcuuagucu cuuaaaaac aaacaaacga acgaacagca agggagcugg	300
guaugacaac acauacuua auucuaguac ucaggaugcu gaaacaggag gauugccuga	360
cugggagaua uaaggagaaau cuguugucac ccccacccu ccccauaag gcagaauaaa	420
agaacguccu auaaacaaau aaacaaacaa cccaauaaaa caaaaccaag aucucuccac	480
cuuuucuuug cuuuuucaga cuuuguaaua aggccuuug gagugcagga uauucggcag	540

gacaagcaga gagggagacc aucaguucuu ucuuugauca agaagacuau guuccuuagc	600
aaacuggugu guauuaucuc uuaugcaaag agccuggaaa gagggcacag ccaccgagga	660
ugguacagca uggauggaug guacgcuaca gagacucggg agcccaacug ugaguggcug	720
acuggcaugg uagguucagg gaagaauugg ccugugaaga aauguucuu gaaaagugaa	780
caaggugcgag gagguaggag ugguuccugg gcaaagcagg ggugugcaucc cagccucagg	840
gaauagcaca gcagaggucu guugaugcau gcgagugcau gaccugcuug ccaauagacg	900
aucaagaaug gccaagcau caugggugau gagugggaga ggggaugaga cauuccuuuc	960

ucccugcuga gacuuccauu gaaccgauga guucugaaaua gaagaugccc ccccacccccc	1020
ccaccagugu agaaucugaa gggaggcaua uauuaccua uauuacucug uguuggcggc	1080
gagcuaucug acagccaacc uucccauaca uuucauuggg cauacacuua ugacaggaag	1140
uuccuuuugc uuguaugcaa gagauggcuc acacgaugga gaaaaaauc uugaagggcg	1200
aauuccacca cacuggacua guggauccga gcucgguacc aagcua	1246

<210> 9

<211> 1285

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Apaf-1(d) IRUP

<400> 9

ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaaauucgcc	60
---	----

cuucagagau ccaggggagg cgccugugag gcccggaccu gccccggggc gaagguaug	120
uggcgagaca gagccugca cccuaauuc ccgguggaaa acuccuguug ccguuuuccu	180
ccaccggccu ggagucuccc agucuugucc cggcagugcc gcccuccca cuaagaccua	240
ggcgcaagg cuuggcuau gguugacagc ucagagagag aaagaucuga ggaaagucuc	300
uuaaaaaaca aacaaacgaa cgaacagcaa gggagcuggg uaugacaaca cauacuaua	360
uucuaguacu caggaugcug aaacaggagg auugccugac ugagagauau aaggagaauc	420
uguugucacc cccacccuc cccauaaagg cagaauaaaa gaacguccua uaaacaaaua	480

aacaaacaac ccaauaaaac aaaaccaaga ucucuccacc uuuucuuugc uuuuucagac	540
uuuguaauaa ggc当地uugg agugcaggau auucggcagg acaagcagag agggagacca	600
ucaguucuuu cuuugaucaa gaagacuaug iuccuuagca aacuggugug uauuaucu	660
uaugcauga gc当地gaaag agggcacagc caccgggau gguacagcau ggauggaugg	720
uacgcuacag agacucggga gccaacugu gaguggcuga cuggcauggu agguucaggg	780
aagaauuggc cugugaagaa aauguucuug aaaagugaac aaggugcagg agguaggagu	840
ggguccuggg caaagcaggg ggugcauccc agccucaggg aauagcacag cagaggucug	900

uugaugcaug cgagugcaug accugcuugc caauagacga ucaagaaugg gcaaagcauc	960
augggugaug agugggagag gggugagagc auuuccuuuucu cccugcugag aciuuccauug	1020
aaccgaugag uucugaaauag aagaugcccc cccacccccc caccagugua gaaucugaag	1080
ggaggcauau auuacccuau auuacucugu guuggcggcg agcuaucuga cagccaaccu	1140
ucccauacau uicauugggc auacacuaau gacaggaagu uccuuuugcu uguaugcaag	1200
agauggcu cacgauggag auuuaaucu ugaagggcga auuccaccac acuggacuag	1260
uggauccgag cucguacca agcua	1285

<210> 10

<211> 1285

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Apaf-1(i) IRUP

<400> 10

ccauuuuuau guuuauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauiucgcc	60
cuuucccuca gaucuuucuc ucucugagcu gucaaccaug agccaagccu uugcgccuag	120
gucuuagugg ggagggcggc acugccggga caagacuggg agacuccagg ccgguggagg	180
gaaacggcaa caggaguuuu ccaccggaa uuagggugc agggcucugu cucgccacau	240

accuuucgcc ccggggcagg uccgggccuc acaggcgccu ccccuggauc ucugagucuc	300
uuaaaaaaca aacaaacgaa cgaacagcaa gggagcuggg uaugacaaca cauacuauaa	360
uucuaguacu caggaugcug aaacaggagg auugccugac ugugagauau aaggagaauc	420
uguugucacc cccacccuc cccauaaagg cagaauaaaa gaacguccua uaaacaaaua	480
aacaaacaac ccaauaaaac aaaaccaaga ucucuccacc uuuuuuuugc uuuuuucagac	540
uuuguaauaa ggccuuugg agugcaggau auucggcagg acaagcagag agggagacca	600
ucaguucuuu cuuugaucaa gaagacuaug uuccuuagca aacuggugug uauuaucu	660
uaugcaauga gccuggaaag agggcacagc caccgaggau gguacagcau ggauggaugg	720
uacgcuacag agacucggga gcccaacugu gaguggcuga cuggcauggu agguucaggg	780
aagaauuggc cugugaagaa aauguucuug aaaagugaac aaggugcagg agguaggagu	840
ggguccuggg caaagcaggg ggugcauccc agccucaggg aauagcacag cagaggucug	900
uugaugcaug cgagugcaug accugcuugc caauagacga ucaagaaugg gcaaagcauc	960
augggugaug agugggagag gggaugagac auuccuuuucu cccugcugag acuuccauug	1020
aaccgaugag uucugaaauag aagaugcccc cccacccccc caccagugua gaaucugaag	1080
ggaggcauau auuacccuau auuacucugu guuggcggcg agcuaucuga cagccaaccu	1140
ucccauacau uucauugggc auacacuaau gacaggaagu uccuuuugcu uguauugcaag	1200
agauggcuca cacgauggag aauuuuaaucu ugaagggcga auuccaccac acuggacuag	1260
uggauccgag cucguacca agcuu	1285
<210> 11	
<211> 1514	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> ELG-1(d) IRUP	
<400> 11	
ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc	60
cuuacuuuug gugggcäuuu aaaaauugugu guguaugugu auauauuguau guguaugua	120
guguaauauau guuaauuguau guauggaucg cguguaugug uguauuguau cauguguaug	180
uauguaauaug cauguaugug uauguguaua uauguaugug uguguauua uaugugugug	240
uauguguaug ugugugugua ugugugugug uauguaugua uguauuguau uguauuauc	300
acauauacac auauugguuu uuuuaaucau uugagaguua guugaagaua aaaacccauc	360

accccuuau guauuccaaa gaauaagaac auuguuuuau acauagcaca cuuaacaaaa	420
ucaagaaauu uaacauuaau acaguacugu uaccuaaucc guagucgauu uucaaauuu	480
gucaguuguu ccaauuaugu ccuuuauuaa uuccccgccc agcagucucu uaaaaaacaa	540
acaaacgaac gaacagcaag ggagcugggu augacaacac auacuauua ucuaguacuc	600
aggaugcuga aacaggagga uugccugacu gggagauuaa aggagaaucu guugucaccc	660
ccaccccucc ccauaaaggc agaauaaaag aacguccuau aaacaaauaa acaaacaacc	720
caauaaaaaca aaaccaagau cucuccaccu uuuuuuugcu uuuucagacu uuguaauaag	780
gcccuuugga gugcaggaua uucggcagga caagcagaga gggagaccau caguucuuuc	840
uuugaucaag aagacuaugu uccuuagcaa acuggugugu auuaucucuu augcaaugag	900
ccuggaaaga gggcacagcc accgaggaug guacagcaug gauggauggu acgcuacaga	960
gacucgggag cccaacugug aguggcugac uggcauggua gguucaggga agaaauuggcc	1020
ugugaagaaa auguucuuga aaagugaaca aggugcagga gguaggagug gguccugggc	1080
aaagcagggg gugcaucca gccucaggga auagcacagc agaggucugu ugaugcaugc	1140
gagugcauga ccugcuugcc aauagacgau caagaauuggg caaagcauca ugugugauga	1200
gugggagagg ggaugagaca uuccuuucuc ccugeugaga cuuccauuga accgaugagu	1260
ucugaaauaga agaugcccccc ccacccccc accaguguag aaucugaagg gaggcäuua	1320
uuacccuuaa uuacucugug uuggcggcga gcuaucugac agccaaccuu cccauacauu	1380
ucauugggca uacacuaug acaggaaguu ccuuuugcuu guaugcaaga gauggcucac	1440
acgauggaga auuuaaucuu gaagggcgaa uuccaccaca cuggacuagu ggaucccgagc	1500
ucgguaccaa gcuu	1514
<210> 12	
<211> 1514	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> ELG-1(i) IRUP	
<400> 12	
ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauiucgc	60
cuugcugggc gggaaauuaa uaaaggacau uauuggaaca acugacaaaa uuugaaaauc	120
gacuacggau uagguacag uacuguaua auguuaauu ucuugauuu guuaugugug	180
cuauguaaua aacaauguuc uuauiucuuug gaauacauuu aggggugug gguuuuuau	240

uuacaacuaac ucucaaaua uuaaaaaaac caauaugugu auauguguau aauacauaua	300
---	-----

cauacauaca uacauacaca cacacauaca cacacacaua cacauacaca cacauauaca	360
---	-----

uacacacaca uacauauaua cacauacaca uacaugcaua uacauacaua cacaugcaua	420
---	-----

cauacacaca uacacgcau acauacauac auauacauau auacacauac auacacauac	480
--	-----

auauauacac auacacacac auuuuuuaua gcccaccaaa aguagucucu uaaaaaaca	540
--	-----

acaaacgaac gaacagcaag ggagcugggu augacaacac auacauauau ucuaguacuc	600
---	-----

aggaugcuga aacaggagga uugccugacu gggagauaua aggagaaucu guugucaccc	660
---	-----

ccacccucc ccauaaggc agaauaaaag aacguccuau aaacaauua acaaacaacc	720
--	-----

caauaaaaca aaaccaagau cucuccaccu uuuuuuugcu uuuucagacu uuguaauaag	780
---	-----

gccccuuugga gugcaggaua uucggcagga caagcagaga gggagaccau caguucuuuc	840
--	-----

uuugaucaag aagacuaugu uccuuagcaa acuggugugu auuaucuuu augcaaugag	900
--	-----

ccuggaaaga gggcacagcc accgaggaug guacagcaug gauggauggu acgcuacaga	960
---	-----

gacucgggag cccaacugug aguggcugac uggcauggua gguucaggga agaauggcc	1020
--	------

ugugaagaaa auguucuuga aaagugaaca aggugcagga gguaggagug gguccuggc	1080
--	------

aaagcagggg gugcauccca gccucaggga auagcacagc agaggucugu ugaugcaugc	1140
---	------

gagugcauga ccugcuugcc aauagacgau caagaauggg caaagcauca ugugugauga	1200
---	------

gugggagagg ggaugagaca uuccuuucuc ccugcugaga cuuccauuga accgaugagu	1260
---	------

ucugaaauaga agaugcccccc ccacccccc accaguguag aaucugaagg gaggcauaua	1320
--	------

uuacccuaua uuacucugug uuggcggcga gcuaucugac agccaaccuu cccauacauu	1380
---	------

ucauugggca uacacuaaug acaggaaguu ccuuuugcuu guaugcaaga gauggcucac	1440
---	------

acgauggaga auuuuaucuu gaagggcgaa uuccaccaca cuggacuagu ggauccgagc	1500
---	------

ucgguaccaa gcuu	1514
-----------------	------

<210> 13

<211> 1449

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cMYC full length(d) IRUP

<400> 13

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc	60
---	----

cuuaauucca gcgagaggca gagggagcga gcggcggcc ggcuagggug gaagagccgg	120
--	-----

gcgagcagag cugcgcugcg ggccuccugg gaagggagau ccggagcgaa uagggggcuu	180
cgcucuggc ccagccucc cgcuugaucc cccaggccag cgguccgcaa cccuugccgc	240
auccacgaaa cuuugcccau agcagcgggc gggcacuuug cacuggaacu uacaacaccc	300
gagcaaggac gcgcacucc cgacgcggg aggcaauucu gcccauuugg ggacacuucc	360
ccgcccugc caggaccgc uucucugaaa ggcucuccuu gcagcugcuu agacgcugga	420
uuuuuuucgg guaguggaaa accagcagcc ucccgcaag ucucuuaaaa aacaaacaaa	480
cgaacgaaca gcaagggagc ugguuaugac aacacauacu auaauucuag uacucaggau	540
gcugaaacag gaggauugcc ugacugggag auauaaggag aaucuguugu cacccccacc	600
ccuccccaua aaggcagaaau aaaagaacgu ccuauaaaca aauaaacaaa caacccaaua	660
aaacaaaacc aagaucucuc caccuuuucu uugcuiuuuuc agacuuugua auaaggccu	720
uuggagugca ggauauucgg caggacaagc agagagggag accaucaguu cuuucuuuga	780
ucaagaagac uauguuuccuu agcaaacugg uguguauuu cucuuauugca augagccugg	840
aaagaggcga cagccaccga ggaugguaca gcauggaugg augguacgcu acagagacuc	900
gggagccaa cugugagugg cugacuggca ugguaggwu agggaaagaau ugcccuguga	960
agaaaaauguu cuugaaaagu gaacaaggug caggagguag gagugggucc ugcccuaagc	1020
agggggugca uc当地agccuc agggaaauagc acagcagagg ucuguugaug caugcgagug	1080
caugaccugc uugccaaug acgaucaaga augggcaaag caucaugggu gaugaguggg	1140
agaggggaug agacauuccu uucuccugc ugagacuucc auugaaccga ugaguucuga	1200
auagaagaug ccccccacc ccccccacag uguagaaucu gaagggaggc auauauuacc	1260
cuauauuacu cuguguuggc ggcgagcuau cugacagcca accuuuccau acauuucauu	1320
ggccauacac uaaugacagg aaguuccuu ugcuuguaug caagagaugg cucacacgau	1380
ggagaauua aucuugaagg gc当地aaucca ccacacugga cuaguggauc cgagcucggu	1440
accaagcuu	1449
<210> 14	
<211> 1449	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> cMYC full length(i) IRUP	
<400> 14	
ccauuuuuau guuaauuguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc	60

cuuucgcggg aggugcugg uuuuccacua cccgaaaaaa auccagcguc uaaggcagcug	120
caaggagagc cuuucagaga agcggguccu ggcagcggcg gggaguguc cccaauggg	180
cagaauagcc ucggcguc gggagagucg cguccuugcu cgguguugu aaguuccagu	240
gcaaagugcc cgccccgcugc uaugggcaaa guuucgugga ugcccagg guugcggacc	300
gcuggccugg gggaucaagc gggagggcug ggccagagc gaagccccu auucgcuccg	360
gaucuccuu cccaggacgc ccgcagcgca gcucugcucg cccggcucuu ccacccuagc	420
cggccgcccc cucgcuccu cugccucucg cuggaauuag ucucuuaaaa aacaaacaaa	480
cgaacgaaca gcaagggagc ugguauugac aacacauacu auauuuuag uacucaggau	540
gcugaaacag gagauugcc ugacuggag auauaaggag aaucuguugu cacccccacc	600
ccuccccaua aaggcagaau aaaagaacgu ccuauaaaca auuaaacaaa caacccaaua	660
aaacaaacc aagaucucuc caccuuuuuuc uugcuuuuuuc agacuuugua auaggccu	720
uuggagugca ggauauucgg caggacaagc agagagggag accaucaguu cuuucuuuga	780
ucaagaagac uauguuccuu agcaaacugg uguguauuau cucuuauugca augagccugg	840
aaagagggca cagccaccga ggaugguaca gcauggaugg augguacgcu acagagacuc	900
gggagccaa cugugagugg cugacuggca ugguagguuc agggaaagaau ugcccuguga	960
agaaaauguu cuugaaaagu gaacaaggug caggagguag gagugggucc ugcccuaagc	1020
agggggugca ucggcgccuc agggauuagc acagcagg ucuguugaug caugcgagug	1080
caugaccugc uugccaaug acgaucaaga augggcaaag caucauggu gaugaguggg	1140
agaggggaug agacauuccu uucuccugc ugagacuuucc auugaaccga ugaguucuga	1200
auagaagaug ccccccacc cccccaccag uguagaaucu gaagggaggc auauuuacc	1260
cuauuuuacu cuguguuggc ggccgagcuau cugacagcca accuuuccau acauuucauu	1320
ggc auacac uaaugacagg aaguuccuu ugcuuguaug caagagaugg cucacacgau	1380
ggagaauuuua auciugaagg gcgaaauucca ccacacugga cuaguggauc cgagcucggu	1440
accaagcuu	1449
<210> 15	
<211> 1102	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> cMYC short variant(d) IRUP	
<400> 15	
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaucugc agaaucgcc	60

cuugggcacu uugcacugga acuuacaaca cccgagcaag gacgcgacuc uagucucuu	120
aaaaacaaac aaacgaacga acagcaaggg agcuggguau gacaacacau acuauaauc	180
uaguacucag gaugcugaaa caggaggauu gccugacugg gagauauaag gagaucugu	240
ugucacccccc accccucccc auaaaggcag aauaaaagaa cguccuauaa acaaauaaac	300
aaacaaccca auaaaacaaa accaagaacu cuccaccuuu ucuuugcuii uucagacuuu	360
guaauaaggc ccuuggagu gcaggauuu cgccaggaca agcagagagg gagaccauca	420
guucuuuucuu ugaucaagaa gacuauguuc cuuagcaaac uguguguaau uaucucuuau	480
gcaaugagcc ugaaagagg gcacagccac cgaggauggu acagcaugga uggaugguac	540
gcuacagaga cucggagcc caacugugag ugugcugacug gcaugguagg uucagggaaag	600
aauuggccug ugaagaaaaau guucuugaaa agugaacaag gugcaggagg uaggaguggg	660
uccugggcaa agcagggggu gcaucccagc cucagggauu agcacagcag aggcuguguug	720
augcaugcga gugcaugacc ugcuugccaa uagacgauca agaaugggca aagcaucaug	780
ggugaugagu gggagagggg augagacauu ccuucuccc ugcugagacu uccauugaac	840
cgaugaguuic ugaauagaag augcccccc acccccccac caguguagaa ucugaaggga	900
ggcauaauuu acccuauuu acucuguguu ggcggcgagc uaucugacag ccaaccuucc	960
cauacauuuic aiugggcaua cacuaugac aggaaguucc uuuugcuii augcaagaga	1020
uggcucacac gauggagaau uuaaucuuga agggcgaaau ccaccacacu ggacuagugg	1080
auccgagcuc gguaccaagc uu	1102
<210> 16	
<211> 1102	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> cMYC short variant(i) IRUP	
<400> 16	
ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaucugc agaauucgcc	60
cuuagagucg cguccuugcu cggguguugu aaguuccagu gcaaagugcc cagucucuu	120
aaaaacaaac aaacgaacga acagcaaggg agcuggguau gacaacacau acuauaauc	180
uaguacucag gaugcugaaa caggaggauu gccugacugg gagauauaag gagaucugu	240
ugucacccccc accccucccc auaaaggcag aauaaaagaa cguccuauaa acaaauaaac	300
aaacaaccca auaaaacaaa accaagaacu cuccaccuuu ucuuugcuii uucagacuuu	360

guaauaaggc ccuuuggagu gcaggauuu cggcaggaca agcagagagg gagaccaua	420
guucuuuuuu ugaucaagaa gacuauguuc cuuagcaa ac ugugugua uaucucuuau	480
gcaaugagcc ugaaaagagg gcacagccac cgaggauggu acagcaugga uggaugguac	540
gcuacagaga cucggagcc caacugugag ugugcugacug gcaugguagg uucagggaa	600
aauuggccug ugaagaaaaa guucuugaaa agugaacaag gugcaggagg uaggaguggg	660
uccugggcaa agcagggggu gcaucccagc cucagggau agcacagcag aggcugug	720
augcaugcga gugcaugacc ugcuugccaa uagacgauca agaauggca aagcaucaug	780
ggugaugagu gggagagggg augagacauu ccuuucucc ugcugagacu uccauugaac	840
cgaugaguuc ugaauagaag augcccccc acccccccac caguguagaa ucugaaggaa	900
ggcauauuu acccuauuu acucuguu ggcggcgagc uaucugacag ccaaccuucc	960
cauacauuuuc auugggcaua cacuaugac aggaaguucc uuuugcuugu augcaagaga	1020
uggcucacac gauggagaau uuauucuuga agggcgaauu ccaccacacu ggacuagugg	1080
auccgagcuc gguaccaagc uu	1102
<210> 17	
<211> 1125	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> DMD(d) IRUP	
<400> 17	
ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc	60
cuuguaucuga caucguagau gaaaaucuaa aacugacucu ugguuugauu uggaauuaa	120
uccuccacug gcagagucuc uaaaaaaaca aacaaacgaa cgaacagcaa gggagcuggg	180
uaugacaaca cauacuauaa uucuaguacu caggaugcug aaacaggagg auugccugac	240
ugggagauau aaggagaauc uguugucacc cccacccuc cccauaaagg cagaauaaaa	300
gaacguccua uaaaacaaaua aacaaacaac ccaauaaaac aaaaccaaga ucucuccacc	360
uuuuucuuugc uuuuuucagac uuuguaauaa ggcuccuugg agugcaggau auucggcagg	420
acaagcagag agggagacca ucaguucuu cuuugaucaaa gaagacuaug uiuccuuagca	480
aacuggugug uauuaucucu uaugcaauga gccuggaaag agggcacagc caccgaggau	540
gguacagcau ggauggaugg uacgcuacag agacucggaa gccaacugu gaguggcuga	600
cuggcauggu agguucaggg aagaauuggc cugugaagaa aauguucuug aaaagugaac	660

aaggugcagg agguaggagu ggguccuggg caaagcaggg ggugcauccc agccucaggg	720
---	-----

aauagcacag cagaggucug uugaugcaug cgagugcaug accugcuugc caauagacga	780
---	-----

ucaagaaugg gcaaagcauc augggugaug agugggagag gggaugagac auuccuuuucu	840
--	-----

cccugcugag aciuuccauug aaccgaugag uucugaaauag aagaugcccc cccacccccc	900
---	-----

caccagugua gaaucugaag ggaggcauau auuaccuau auuacucugu guuggcggcg	960
--	-----

agcuaucuga cagccaaccu ucccauacau uucauugggc auacacuaau gacaggaagu	1020
---	------

uccuuuugcu uguauugcaag agauggcuca cacgauggag aauuuuaaucu ugaagggcga	1080
---	------

auuccaccac acuggacuag uggaucgag cucguacca agcuu	1125
---	------

<210> 18

<211> 1125

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DMD(i) IRUP

<400> 18

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaaucugc agaaauucgcc	60
---	----

cuucugccag uggaggauua uauuccaaau caaaccaga gucaguuuau gauuuuccauc	120
---	-----

uacgauguca guacagucuc uuaaaaaaca aacaaacgaa cgaacagcaa gggagcuggg	180
---	-----

uaugacaaca cauacuauaa uucuaguacu caggaugcug aaacaggagg auugccugac	240
---	-----

ugggagauau aaggagaauc uguugucacc cccacccuc cccauaaagg cagaauaaaa	300
--	-----

gaacguccua uaaacaaaua aacaaacaac ccaauaaaac aaaaccaaga ucucuccacc	360
---	-----

uuuuucuuugc uuuuucagac uuuguaauaa ggccuuugg agugcaggau auucggcagg	420
---	-----

acaagcagag agggagacca ucaguucuu cuuugaucaa gaagacuaug uuccuuagca	480
--	-----

aacuggugug uauuaucucu uaugcaauga gccuggaaag agggcacagc caccgaggau	540
---	-----

gguacagcau ggauggaugg uacgcuacag agacucggg gcccaacugu gaguggcuga	600
--	-----

cuggcauggu agguucaggg aagaauuggc cugugaagaa aauguucuug aaaagugaac	660
---	-----

aaggugcagg agguaggagu ggguccuggg caaagcaggg ggugcauccc agccucaggg	720
---	-----

aaauagcacag cagaggucug uugaugcaug cgagugcaug accugcuugc caauagacga	780
--	-----

ucaagaaugg gcaaagcauc augggugaug agugggagag gggaugagac auuccuuuucu	840
--	-----

cccugcugag aciuuccauug aaccgaugag uucugaaauag aagaugcccc cccacccccc	900
---	-----

caccagugua gaaucugaag ggaggcauau auuaccuau auuacucugu guuggcggcg	960
--	-----

agcuaucuga cagccaaccu ucccauacau uucauugggc auacacuaau gacaggaagu 1020
 uccuuuugcu uguauugcaag agauggcuca cacgauggag aauuuuaaucu ugaagggcga 1080
 auuccaccac acuggacuag uggauccgag cucguacca agcuu 1125
 <210> 19
 <211> 1357
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV delta II(d) IRUP

<400> 19

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaaauucgcc 60
 cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaaau caccccccuc cccgggagag 120
 ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaaauugc caggacgacc ggguccuuuc 180
 uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugugcugugcc cccgcaagac ugcuagccga 240
 guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau agggugcug cgagugcccc 300
 gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaaucua aaccucaaag aaaaacccaa 360
 cguaacaguc ucuiuuuuuu caaacaaacg aacgaacagc aagggagcug gguauugcaa 420

cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga ggauugccug acugggagau 480
 auaaggagaa ucuguuguca cccccacccc ucccauaaa ggcagaauaa aagaacgucc 540
 uauaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaccua gaucucucca ccuuuucuuu 600
 gcuuuuucag acuuuguaau aaggccuuu ggagugcagg auauucggca ggacaaggcag 660
 agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua uguuccuuag caaacuggug 720
 uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca gccaccgagg augguacagc 780
 auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu gugaguggcu gacuggcaug 840

guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguuuc uggaaaguga acaaggugca 900
 ggagguagga guggguccug ggcaaagcag gggugcauc ccagccucag ggaauagcac 960
 agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu gccaauagac gaucaagaau 1020
 gggcaaagca ucauggguga ugaguggag aggggaugag acauuccuuu cuccugcug 1080
 agacuuccau ugaaccgaug aguucugaaau agaagaugcc cccccacccc cccaccagug 1140
 uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu guguuggcgg cgagcuaucu 1200
 gacagccaaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua augacaggaa guuccuuuug 1260

cuuguaugca agagaaggcu cacacgaugg agaauuuau cuugaaggc gaauuccacc	1320
acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu	1357
<210> 20	
<211> 1421	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HCV delta IIIa(d) IRUP	
<400> 20	
ccauiuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaaucugc agaauiucgcc	60
cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaa cacuuccug ugaggaacua	120
cugucuuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag	180
gaccuuuccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaaaa uugccaggac gaccgggucc	240
uuucuuggau aaacccgcuc aaugccugga gauuugggchg ugcccccgca agacugcuag	300
ccgaguagug uugggucgch aaaggccuug ugguacugcc ugauagggug cuugcgagug	360
ccccgggagg ucucguagac cgugcaccau gagcacgaa ccuaaaccuc aaagaaaaac	420
caaacguaac agucucuuua aaaacaaaca aacgaacgaa cagcaaggga gcugguaug	480
acaacacaua cuuaauuucu aguacucagg augcugaaac aggaggauug ccugacuggg	540
agauauaagg agaaucuguu gucacccca cccucucca uaaaggcaga auaaaagaac	600
guccuauaaa caaaauaaca aacaacccaa uaaaacaaaa ccaagaucuc uccaccuuuu	660
cuuugcuiuu ucagacuuug uaauaaggcc cuuuggagug caggauauuc ggcaggacaa	720
gcagagaggg agaccaucag uucuuucuuu gaucaagaag acuauguucc uuagcaaacu	780
gguguguauu aucucuuau gaaugagccu ggaaagaggg cacagccacc gaggauggua	840
cagcauggau ggaugguacg cuacagagac ucgggagccc aacugugagu ggcugacugg	900
caugguaggu ucagggaga auuggccugu gaagaaaaug uucuugaaaa gugaacaagg	960
ugcaggaggu aggagugggu ccugggcaaa gcagggggug caucccagcc ucaggaaau	1020
gcacagcaga ggucuguuga ugcaugcgc ugcaugaccu gcuugccaa agacgaucaa	1080
gaaugggcaa agcaucaugg gugaugagug ggagagggga ugagacauuc cuuucuccu	1140
gcugagacuu ccauugaacc gaugaguucu gaauagaaga ugccccccca ccccccacc	1200
aguguagaau cugaagggag gcauaauua cccuaauua cucuguguug gccggcggc	1260
aucugacagc caaccuuccc auacauuuca uugggcuauc acuaaugaca ggaaguuccu	1320
uuugcuugua ugcaagagau ggcucacacg auggagaauu uaaucuugaa gggcgaauuc	1380

caccacacug gacuagugga uccgagcucg guaccaagcu u 1421

<210> 21

<211> 1410

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV delta IIId(d) IRUP

<400> 21

ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaucugc agaaucgcc	60
cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaa cacuccccug ugaggaacua	120
cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucug cagccuccag	180
gacccccc cuccggagag ccauaguggu cugcggacc ggugaguaca ccggaaugc	240
caggacgacc ggguccuuuc uuggauaac ccgcucaug ccuggagau uggcgugcc	300
cccgcaagac ugcuacuugu gguacugccu gauagggugc uugcgagugc cccggagg	360
cucguagacc gugcacaug agcacgaauc cuaaaccuca aaaaaacc aaacguaaca	420

gucucuuaaa aaacaaacaa acgaacgaac agcaagggag cuggguauga caacacauac	480
uauaaauucua guacucagga ugcugaaaca ggaggauugc cugacuggga gauauaagga	540
gaaucuguuug ucacccccc cccuccccau aaaggcagaa uaaaagaacg uccuauaac	600
aaauaaacaa acaacccaaau aaaacaaaac caagaucu ccacuuuuc uuugcuuuu	660
cagacuuugu aauaaggccc uuuggagugc aggauauugc gcaggacaag cagagaggg	720
gaccaucagu ucuuuuuug aucaagaaga cuaguuccu uagcaaacug guguguaua	780
ucucuuaugc aaugagccug gaaagaggc acagccaccg aggaugguac agcauggaug	840

gaugguacgc uacagagacu cgggagccca acugugagug gcugacuggc augguagguu	900
cagggaaagaa uuggccugug aagaaaaugu ucuugaaaag ugaacaaggu gcaggaggua	960
ggaguggguc cugggcaaag cagggggugc aucccgccu cagggauag cacagcagag	1020
gucuguugau gcaugcgagu gcaugaccug cuugccaaua gacgaucaag aaugggcaa	1080
gcaucauggg ugaugagugg gagaggggau gagacauucc uuucuccug cugagacuuc	1140
cauugaaccg augaguucug aauagaagau gccccccac ccccccacca guguagaauc	1200
ugaagggagg cauauauuac ccuauauuac ucuguguugg cggcgagcua ucugacagcc	1260

aaccuuuccca uacauuuucau uggaucuaca cuaaugacag gaaguuccuu uugcuugua	1320
gcaagagaug gcucacacga ugagaauuu aaucuugaag ggcgaauucc accacacugg	1380

acuaguggau ccgagcucgg uaccaagccu	1410
<210> 22	
<211> 1384	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HCV delta IV(d) IRUP	
<400> 22	
ccauuuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaaauucgcc	60
cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaaau cacuccccug ugaggaacua	120
cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag	180
gaccggggccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaaacc ggugaguaca ccggaaauugc	240
caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaung ccuggagauu ugcccugcc	300
cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau	360
agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guaagucu uaaaaaacaa acaaacgaac	420
gaacagcaag ggacuggggu augacaacac auacuauaa ucuaguacuc aggaugcuga	480
aacaggagga uugccugacu gggagauua aggagaauu guugucaccc ccacccucc	540
ccauaaaggc agaaauaaaag aacguccuau aaacaaauaa acaaacaacc caauaaaaca	600
aaaccaagau cucuccaccu uuuuuugcu uuuucagacu uuguaauaag gcccuiugga	660
gugcaggaua uucggcagga caagcagaga gggagaccu caguucuuuc uuugaucaag	720
aagacuaug uccuuagcaa acuggugugu auuaucucuu augcaaugag ccuggaaaga	780
gggcacagcc accgaggaug guacagcaug gauggauggu acgcuacaga gacucggag	840
cccaacugug aguggcugac uggcauggua gguucaggaa agaaauuggcc ugugaagaaa	900
augiuucuuga aaagugaaca aggugcagga gguaggagug gguccugggc aaagcagggg	960
gugcauccca gccucaggga auagcacagc agaggucugu ugaugcaugc gagugcauga	1020
ccugcuugcc aauagacgau caagaauggg caaagcauca ugugugauga gugggagagg	1080
ggaugagaca uuccuuucuc ccugcugaga cuuccauuga accgaugagu ucugaaauaga	1140
agaugcccccc ccacccccc accaguguag aaucugaagg gaggcauua uuacccuaua	1200
uuacucugug uuggcggcga gcuaucugac agccaaccuu cccauacauu ucauugggca	1260
uacacuaug acaggaaguu ccuuuugcuu guaugcaaga gauggcucac acgauggaga	1320
auuuuaucuu gaagggcgaa uuccaccaca cuggacuagu ggauccgagc ucgguaccaa	1380

gcuu	1384
------	------

<210> 23

<211> 1437

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV G266->C(d) IRUP

<400> 23

ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaucugc agaaucgcc	60
cuuggccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaa cacuccccug ugaggaacua	120
cugucuuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucug cagccuccag	180
gaccccccuc cccgggagag ccauaguggu cugcggaaacc ggugaguaca ccggaaauugc	240
caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugcccugcc	300
cccgcaagac ugcuagccga guaguguucg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau	360

agguguguug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua	420
aaccucaaag aaaaacccaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaacg aacgaacagc	480
aaggaggcug gguauugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga	540
ggauugccug acuggggagau auaggagaa ucuguuguca ccccccaccc ucccauaaa	600
ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa	660
gaucucucca ccuuuuuuuucag acuuuguaau aaggccuuu ggagugcagg	720
auauucggca ggacaaggcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua	780

uguuuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca	840
gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu	900
gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaaug gccugugaag aaauguucu	960
ugaaaauguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaaagcag gggugcauc	1020
ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu	1080
gccaaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag	1140
acauuuccuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaa agaagaugcc	1200

cccccacccccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu	1260
guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua	1320
augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuauu	1380

cuugaagggc gaauccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caaguu	1437
<210> 24	
<211> 1437	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HCV U228->C(d) IRUP	
<400> 24	
ccauuuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaaauucgcc	60
cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaa cacuccccug ugaggaacua	120
cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucug cagccuccag	180
gaccggggccu cccgggagag ccauaguggu cugcggacc ggugaguaca ccggaaugc	240
caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu cgggcgugcc	300
cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau	360
agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua	420
aaccucaaag aaaaacccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc	480
aagggagcug gguaugacaa cacauacua aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga	540
ggauugccug acugggagau auaggagaa ucuguuguca ccccccaccc uccccauaaa	600
ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa	660
gaucucucca ccuuuuuuuucu gcuuuuuucag acuuuguaau aaggccuuu ggagugcagg	720
auauucggca ggacaaggcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua	780
uguuuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuauugcaau gagccuggaa agagggcaca	840
gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu	900
gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu	960
ugaaaaaguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaagcag gggugcauc	1020
ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu	1080
gccaaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag	1140
acauuccuuu cuccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaa agaagaugcc	1200
cccccccccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu	1260
guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuuuccauac auuucauugg gcauacacua	1320
augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuuau	1380

cuugaagggc gaauccacc acacuggacu aguggauccg agcucggua	caaguu	1437
<210>	25	
<211>	1437	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	HCV G267->C(d) IRUP	
<400>	25	
ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaaucugc agaaauucgcc		60
cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaaau cacuccccug ugaggaacua		120
cugucuuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag		180
gaccggggccccc cccgggagag ccauaguggu cugcggaaacc ggugaguaca ccggaaauugc		240
caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc		300
cccgcaagac ugcuagccga guaguguugc gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau		360
agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua		420
aaccucaaag aaaaacccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc		480
aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga		540
ggauugccug acuggggagau auaggagaa ucuguuguca ccccccaccc ucccauaaa		600
ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacccaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaacccaa		660
gaucucucca ccuuuuuuu gcuuuuuucag acuuuguaau aaggccuuu ggagugcagg		720
auauucggca ggacaaggcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua		780
uguuuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuauugcaau gagccuggaa agagggcaca		840
gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu		900
gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu		960
ugaaaaugua acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaaagcag ggggugcauc		1020
ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu		1080
gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugaguggggag aggggaugag		1140
acaauuccuu cuccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaaau agaagaugcc		1200
ccccccaccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu		1260
guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuuuccauac auuucauugg gcauacacua		1320
augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuuau		1380
cuugaaggc gaauccacc acacuggacu aguggauccg agcucggua	caaguu	1437

<210> 26

<211> 1437

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV G268->C(d) IRUP

<400> 26

ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaaucugc agaaauucgcc	60
--	----

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaa cacuccccug ugaggaacua	120
cugucuucac gcagaaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag	180
gaccggggcu cccgggagag ccauaguggu cugcggaaacc ggugaguaca ccggaaauugc	240
caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaung ccuggagauu ugcccugcc	300
cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg cucgcgaaag gccuuguggu acugccugau	360
agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaaucua	420
aaccucaaag aaaaacccaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc	480

aagggagcug gguaugacaa cacauacaua aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga	540
ggauugccug acuggggagau auaggagaa ucuguuguca ccccccacccu uccccauaaa	600
ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaccaa	660
gaucucucca cccuuuucuuu gcuuuucuag acuuuguaau aaggccuuu ggagugcagg	720
auauucggca ggacaaggcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua	780
uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca	840
gccacccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu	900

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaaauug gccugugaag aaaauguucu	960
ugaaaauguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaagcag gggugcauc	1020
ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugugagugca ugaccugcuu	1080
gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag	1140
acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaaau agaagaugcc	1200
cccccacccccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu	1260
guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua	1320

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuauu	1380
cuugaagggc gaauccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcui	1437

<210> 27

<211> 1437

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV G266G267G268-> C266C267C268(d) IRUP

<400> 27

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaaauucgcc	60
cuuggccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaaau cacuccccug ugaggaacua	120
cugucuuucac gcagaaaagcg ucuagccaug gcuuuaguau gagugucgug cagccuccag	180
gaccggggccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaaauugc	240
caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaung ccuggagauu ugcccugcc	300
cccgcaagac ugcuagccga guaguguucc cucgcgaaag gccuuguggu acugccugau	360
agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaaucua	420
aaccucaaag aaaaacccaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaacg aacgaacagc	480
aagggagcug gguaugacaa cacauacau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga	540
ggauugccug acuggggagau auaggagaa ucuguuguca ccccccaccc ucccauaaa	600
ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa	660
gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuucuag acuuuguaau aaggccuuu ggagugcagg	720
auauucggca ggacaaggcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua	780
uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca	840
gccacccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu	900
gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu	960
ugaaaauguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaaacgag gggugugcauc	1020
ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugugagugca ugaccugcuu	1080
gccaaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag	1140
acauuuccuuu cucccugcug agacuuuccau ugaaccgaug aguucugaaau agaagaugcc	1200
ccccccaccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu	1260
guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaaac cuuuccauac auuucauugg gcauacacua	1320
augacagggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuauu	1380
cuugaagggc gaaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu	1437

<210> 28

<211> 1437

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV G266->A/G268->T(d) IRUP

<400> 28

ccauuuuuau	guuauauguu	uacaagcccc	acaccaggcu	gaaaaucugc	agaauucgcc	60
cuuggccagcc	cccugauggg	ggcgacacuc	caccaugaaau	cacuccccug	ugaggaacua	120
cugucuucac	gcagaaagcg	ucuagccaug	gctguuaguau	gagugucgug	cagccuccag	180
gacccccc	cccgggagag	ccauaguggu	cugcggAAC	ggugaguaca	ccggaauugc	240
caggacgacc	ggguccuuuc	uuggauaaac	ccgcucaaug	ccuggagauu	ugggcgugcc	300
cccgcaagac	ugcuagccga	guaguguuag	uucgcgaaag	gccuuguggu	acugccugau	360
agggugcuug	cgagugcccc	gggaggucuc	guagaccgug	caccaugagc	acgaaucua	420
aaccucaaag	aaaaacccaaa	cguaacaguc	ucuuaaaaaa	caaacaaacg	aacgaacagc	480
aagggagcug	gguaugacaa	cacauacau	aauucuagua	cucaggaugc	ugaaacagga	540
ggauugccug	acuggggagau	auaaggagaa	ucuguuguca	cccccccc	ucccauaaa	600
ggcagaauaa	aagaacgucc	uauaaacaaa	uaaacaaaca	acccaauaaa	acaaaaccaa	660
gaucucucca	ccuuuuuuuu	gcuuuuucag	acuuuguaau	aaggccuuu	ggagugcagg	720
auauucggca	ggacaaggcag	agagggagac	caucaguucu	uucuuugauc	aagaagacua	780
uguuuccuuag	caaacuggug	uguauuaucu	cuuaugcaau	gagccuggaa	agagggcaca	840
gccacccagg	augguacagc	auggauggau	gguacgcuac	agagacucgg	gagcccaacu	900
gugaguggcu	gacuggcaug	guagguucag	ggaagaauug	gccugugaag	aaauguucu	960
ugaaaauguga	acaaggugca	ggagguagga	guggguccug	ggcaaagcag	ggggugcauc	1020
ccagccucag	ggaauagcac	agcagagguc	uguugaugca	ugcgagugca	ugaccugcuu	1080
gccaaauagac	gaucaagaau	ggcaaagca	ucauggugua	ugaguggggag	aggggaugag	1140
acauuccuuu	cucccugcug	agaciuuccau	ugaaccgaug	aguucugaaau	agaagaugcc	1200
ccccccaccc	cccacccagug	uagaaucuga	agggaggcau	auauuacccu	auauuacucu	1260
guguuggcgg	cgagcuaucu	gacagccaac	ciucccauac	auuucauugg	gcauacacua	1320
augacaggaa	guuccuuuug	cuuguaugca	agagauggcu	cacacgaugg	agaauuuuaau	1380
cuugaagggc	gaaauuccacc	acacuggacu	aguggauccg	agcucgguac	caagcuu	1437

<210> 29

<211> 1437

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV IIIa->IIIa-comp; AGTA->TCAT(d) IRUP

<400> 29

ccauuuuuau	guuauauguu	uacaagcccc	acaccaggcu	gaaaucugc	agaauucgcc	60
cuuggccagcc	cccugauggg	ggcgacacuc	caccaugaaau	cacuccccug	ugaggaacua	120
cugucuucac	gcagaaagcg	ucuagccaug	gctguuaguau	gagugucgug	cagccuccag	180
gaccggggcu	cccgaggag	ccauaguggu	cugcggaacc	ggugucauca	ccggaauugc	240
caggacgacc	ggguccuuuc	uuggauaaac	ccgcucaaug	ccuggagauu	ugggcgugcc	300
cccgcaagac	ugcuagccga	guaguguugg	gucgcgaaag	gccuuguggu	acugccugau	360
agggugcuug	cgagugcccc	gggaggucuc	guagaccgug	caccaugagc	acgaaucua	420
aaccucaaag	aaaaacccaa	cguaacaguc	ucuuaaaaaa	caaacaacg	aacgaacagc	480
aaggaggcug	gguaugacaa	cacauacuau	aaucuacuau	cucaggaugc	ugaaacagga	540
ggauugccug	acugggagau	auaaggagaa	ucuguuguca	cccccccc	uccccauaaa	600
ggcagaauaa	aagaacgucc	uauaaacaaa	uaaacaaaca	acccaauaaa	acaaaaccaa	660
gaucucucca	ccuuuuucuuu	gcuuuuucag	acuuuguaau	aaggccuuu	ggagugcagg	720
auauucggca	ggacaaggcag	agagggagac	caucaguucu	uucuuugauc	aagaagacua	780
uguuuccuuag	caaacuggug	uguauuaucu	cuuaugcaau	gagccuggaa	agagggcaca	840
gccaccgagg	augguacagc	auggauggau	gguacgcuac	agagacucgg	gagcccaacu	900
gugaguggcu	gacuggcaug	guagguucag	ggaagaauug	gccugugaag	aaauguuucu	960
ugaaaaaguga	acaaggugca	ggagguagga	guggguccug	ggcaaagcag	ggggugcauc	1020
ccagccucag	ggaauagcac	agcagagguc	uguugaugca	ugcgagugca	ugaccugcuu	1080
gccaauagac	gaucaagaau	ggccaaagca	ucauggguga	ugaguggggag	aggggaugag	1140
acauuccuuu	cuccugcug	agacuuccau	ugaaccgaug	aguucugaaau	agaagaugcc	1200
ccccccaccc	cccacccagug	uagaaucuga	agggaggcau	auauuacccu	auauuacucu	1260
guguuggcgg	cgagcuaucu	gacagccaac	cuucccauac	auuucauugg	gcauacacua	1320
augacaggaa	guuccuuuug	cuuguaugca	agagauggcu	cacacgaugg	agaauuuuaau	1380
cuugaagggc	gaauuccacc	acacuggacu	aguggauccg	agcucgguac	caagcnu	1437

<210> 30

<211> 1437

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV IIIe->IIIe-comp; TGATAG->ACTATC(d) IRUP

<400> 30

ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaucugc agaaucgcc	60
cuuggccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaa cacuccccug ugaggaacua	120
cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag	180
gaccggcccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaaacc ggugaguaca ccggaaauugc	240
caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugcccugcc	300
cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccacua	360
ucggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaaucua	420
aaccucaaag aaaaacccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaacg aacgaacagc	480
aaggaggcug gguaugacaa cacauacau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga	540
ggauugccug acuggggagau auaggagaa ucuguuguca ccccccaccc uccccauaaa	600
ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacaaa uaaacaacaa acccaauaaa acaaaaccaa	660
gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuucag acuuuguaau aaggccuuu ggagugcagg	720
auauucggca ggacaaggcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua	780
uguuuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca	840
gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu	900
gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu	960
ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaagcag ggggugcauc	1020
ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugugagugca ugaccugcuu	1080
gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag	1140
acaauuccuu cuccugcug agaciuuccau ugaaccgaug aguucugaaau agaagaugcc	1200
cccccacccccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu	1260
guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuuuccauac auuucauugg gcauacacua	1320
augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuauu	1380
cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcnu	1437

<210> 31

<211> 446

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV(d) mini IRUP

<400> 31

ccaauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuggccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaa cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucug cagccuccag 180

gaccuuuccu cccgggagag ccauaguggu cugcggAACcc ggugaguaca ccggaaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu uggtcgugcc 300

cccgcaagac ugcuaggccga guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaaucua 420

aaccucaaag aaaaacccaaa cguaac 446

<210> 32

<211> 375

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polio(d) mini IRUP

<400> 32

ccaauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuaugaguc uggacauccc ucacgguga cgguggucca ggcugcguug gcggccuacc 120

uauggcuaac gccaugggac gcuaguugug aacaaggugu gaagagccua uugagcuaca 180

uaagaauccu ccggccccug aaugcggcua aucccaaccu cggagcaggu ggucacaaac 240

cagugauugg ccugucguaa cgcgcaaguc cguggcgaa ccgacuacuu uggtcgugcc 300

uguuuccuuu uaauuuuuauug uggtcgugccua uggtcgugccua cacagauugu uaucauaaag 360

cgaauuggau uggtcgugccua 375

<210> 33

<211> 375

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polio(i) miniIRUP

<400> 33

ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaaauucgcc	60
cuuggccaau ccaaauucgcu uuauugauaac aaucugugau ugucaccaua agcagccaca	120
auaaaaauaaa aggaaacacg gacacccaaa guagucgguu ccgccacgga cuugcgcgguu	180
acgacacggcc aaucacuggu uugugaccac cugcucccgag guugggauua gccgcäuua	240
ggggccggag gauucuuuaug uagcucaaua ggcucuuac accuuguuca caacuagcgu	300

cccauggcgu uagccauagg uaggccgcca acgcagccug gaccaccguc accggugagg	360
gauguccaga cucau	375

<210> 34

<211> 111

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cMYC short variant(d) miniIRUP

<400> 34

ccauuuuuau guuaauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaaauucgcc	60
cuugggcacu uugcacugga acuuacaaca cccgagcaag gacgcgacuc u	111

<210> 35

<211> 488

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCV(d) miniIRUP

<400> 35

ccagugaaca gcuccucgccc cuugcucacc augguggcga ccgguaucgc uagcggau	60
gacgguucac uagaugcggc cgccacugug cuggaauucg cccuugccag ccccgugau	120
ggggcgacac uccaccauga aucacucccc ugugaggaac uacugucuuac acgcagaaag	180
cgcucuagccca ugugcguuagu augagugucg ugcagccucc aggacccccc cucccgagg	240
agccauagug gucugcggaa ccggugagaa cacggaaauu gccaggacga ccggguccuu	300
ucuuggauaa acccgcucaa ugcccuggaga uuugggcgug ccccgcaag acugcuagcc	360
gaguaguguu gggucgcgaa aggccuugug guacugccug auagggugcu ugcgagugcc	420

ccggagguc ucguagaccg ugcaccauga gcacgaaucc uaaaccucaa agaaaaacca	480
aacguaac	488
<210> 36	
<211> 383	
<212> RNA	
<213> Hepatitis C virus	
<220>	
<223> HCV(d) IRES	
<400> 36	
gccagcccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug	60
ucuuacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac	120
ccccccucc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag	180
gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugcccc	240
gcaagacugc uagccgagua guguuggguc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg	300
gugcuugcga gugcccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac	360
cucaaagaaa aaccaaacgu aac	383
<210> 37	
<211> 383	
<212> RNA	
<213> Hepatitis C virus	
<220>	
<223> HCV(i) IRES	
<400> 37	
guuacguuug guuuuucuuu gagguuuagg auucgugcuc auggugcacg gucuacgaga	60
ccuccccgggg cacucgcaag cacccuauc ggcaguacca caaggccuuu cgcgacccaa	120
cacuacucgg cuagcagucu ugcggggca cgcccaaauuc uccaggcauu gagcgguuu	180
auccaagaaa ggaccgguc guccuggcaa uuccggugua cucaccgguu ccgcagacca	240
cuauggcucu cccgggaggg gggguccugg aggcugcacg acacucauac uaacgccaug	300
gcuagacgcu uucugcguga agacaguagu uccucacagg ggagugauuc augguggagu	360
gucgccccca ucagggggcu ggc	383
<210> 38	
<211> 312	
<212> RNA	

<213> Human poliovirus

<220>

<223> Polio(d) IRES

<400> 38

augagucugg acaucccuca ccggugacgg ugguccaggc ugcguuggcg gccuaccua	60
ggcuaacgcc augggacgcu aguugugaac aaggugugaa gagccuauug agcuacauaa	120

gaauccuccg gccccugaau gcggcuauac ccaaccucgg agcagguggu cacaaaccag	180
ugauuggccu gucguaacgc gcaaguccgu ggccgaaccg acuacuuugg guguccgugu	240
uuccuuuuau uuuauugugg cugcuuaugg ugacaauac agauuguuau cauaaagcga	300
auuggauugg cc	312

<210> 39

<211> 312

<212> RNA

<213> Human poliovirus

<220>

<223> Polio(i) IRES

<400> 39

ggccaaucca auucgcuuua ugauaacaau cugugauugu caccuaaagc agccacaaua	60
aaauaaaagg aaacacggac acccaaagua gucgguuccg ccacggacuu gcgcguuacg	120

acaggccaauc cacugguuug ugaccaccug cuccgaggguu gggauuagcc gcauucaggg	180
gccggaggau ucuuauuguag cucaauaggc ucuucacacc uuuguucacaa cuagcguccc	240
auggcguuag ccauagguaug gccgccaacg cagccuggac caccgucacc ggugagggau	300
guccagacuc au	312

<210> 40

<211> 576

<212> RNA

<213> Encephalomyocarditis virus

<220>

<223> EMCV(d) IRES

<400> 40

cccccccuu cccucccccc ccccuacgu uacuggccga agccgcuugg aauaaggccg	60
gugugcguuu gucuauaugu uauuuuccac cauauugccg ucuuuuggca augugagggc	120

ccggaaaccu ggcccugucu ucuugacgag cauuccuagg ggucuuuccc cucucgcaa	180
aggaaugcaa ggucuguuga augucgugaa ggaagcaguu ccucuggaag cuucuugaag	240
acaaacaacg ucuguagcga cccuuugcag gcagcgaaac cccccaccug ggcacaggug	300
ccucugccgc caaaagccac guguauaaga uacaccugca aaggcggcac aacccagug	360
ccacguugug aguuggauag uuguggaaag agucaaagg cucuccucaa gcguauucaa	420
caaggggcug aaggaaugccc agaagguacc ccauuguaug ggaucugauc ugcccucug	480
gugcacaugc uuuacaugug uuuagucgag guaaaaaac guuaggccc cccgaaccac	540

ggggacgugg uuuuuccuuug aaaaacacga ugauaa	576
--	-----

<210> 41

<211> 576

<212> RNA

<213> Encephalomyocarditis virus

<220>

<223> ECMV(i) IRES

<400> 41

uuaucaucgu guuuuucaaa gaaaaaccac gucccccugg uucgggggc cuagacguuu	60
uuuaaccucg acuaaacaca uguaaagcau gugcaccgag gccccagauc agaucccaua	120
caaugggua cciucugggc auccuucagc cccuuguuga auacgcuuga ggagagccau	180
uugacucuuu ccacaacuau ccaacucaca acguggcacu gggguugugc cgccuuugca	240
gguguaucuu auacacgugg cuuuuggccg cagaggcacc ugucgccagg ugccccuuc	300

cgcugccugc aaagggucgc uacagacguu guuugucuuc aagaagcuuc cagaggaacu	360
gcuuccuua cgcacauuaa cagaccuugc auuccuuugg cgagagggga aagaccccua	420
ggaaugcucg ucaagaagac agggccaggu uuccgggccc ucacauugcc aaaagacggc	480
aauauggugg aaaaauaacau auagacaaac gcacaccggc cuuauuccaa gcggcuucgg	540
ccaguaacgu uagggggggg ggagggagag gggggg	576

<210> 42

<211> 192

<212> RNA

<213> Cricket paralysis virus

<220>

<223> CrPV(d) IRES

<400> 42

aaagcaaaaa ugugaucuug cuuguaaaaua caauuuugag agguuaauaa auuacaagua 60
 gugcuauuuu uguauuuagg uuagcuauuu agcuuuacgu uccaggaugc cuaguggcag 120
 ccccacaaua uccaggaagc ccucucugcg guuuuucaga uuagguaguc gaaaaaccua 180
 agaaauuuac cu 192
 <210> 43
 <211> 192
 <212> RNA
 <213> Cricket paralysis virus
 <220>
 <223> CrPV(i) IRES
 <400> 43
 agguaaaauuu cuuagguuuu ucgacuaccu aaucugaaaa accgcagaga gggcuuccug 60
 gauauugugg ggcugccacu aggcauccug gaacguaaag cuaaauagcu aaccuaaua 120
 caaaaauagc acuacuugua auuuaauaac cucuaaaaau uguauuuaca agcaagauca 180
 cauuuuugcu uu 192
 <210> 44
 <211> 231
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Apaf-1(d) IRES
 <400> 44
 cagagaucca ggggaggcgc cugugaggcc cggaccugcc cggggcgaa ggguaugugg 60
 cgagacagag cccugcaccc cuauuucccg guggaaaacu ccuguugccg uuuccucca 120
 ccggccugga gucucccagu cuugucccg cagugccgcc cuccccacua agaccuaggc 180
 gcaaaggcuu ggcucauggu ugacagcuca gagagagaaa gaucugaggg a 231
 <210> 45
 <211> 231
 <212> RNA
 <213>
 > Homo sapiens
 <220>
 <223> Apaf-1(i) IRES

<400> 45

ucccucagau	cuuucucucu	cugagcuguc	aaccaugagc	caagccuuug	cgccuagguc	60
uuagugggga	ggcgacu	gccggacaa	gacugggaga	cuccaggccg	guggaggaa	120
acggcaacag	gaguuuucca	ccggaaauua	ggggugcagg	gcucugucuc	gccacauacc	180
cuucgccccg	ggcaggucc	ggccucaca	ggcgccuccc	cuggaucucu	g	231

<210> 46

<211> 460

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ELG-1(d) IRES

<400> 46

acuuuuggug	ggcauuuaaa	aaugugugug	uauguguaua	uauguaugug	uauguaugug	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

uaauauaugua	uauguaugua	uguaucgcgu	guaugugugu	auguaugcau	guguauguaau	120
guauaugcau	guauguguau	guguaauau	guaugugugu	guauguaau	gugugugua	180
guguaugugu	guguguaugu	gugugugua	guauguaugu	auguauaugu	auuaucaca	240
uaucacacaua	uugguuuuuu	uaaucauuug	agaguuaguu	gaagauaaaa	acccaucacc	300
ccuaaaugua	uuccaaagaa	uaagaacauu	guuuuauaca	uagcacacuu	aacaaaauca	360
agaaaauuaa	cauuaauaca	guacuguuac	cuaauccgua	gucgauuuuc	aaauuuuguc	420
aguuguucca	auaauguccu	uuauauauuc	ccgcccagc			460

<210> 47

<211> 460

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ELG-1(i) IRES

<400> 47

gcugggcggg	gaauauauaa	aggacauuau	uggaacaacu	gacaaaauuu	gaaaaaucgac	60
uacggauuag	guaacaguac	uguauuaug	uuuaauuuucu	ugauuuuguu	aagugugcua	120
uguauaaaac	aauguucuu	uucuuuggaa	uacauuuagg	ggugauuggu	uuuuaucuuc	180
aacuaacucu	caaaugauua	aaaaaaccaa	uauguguaua	uguguauaa	acauauacau	240
acauacauac	auacacacac	acauacacac	acacauacac	auacacacac	auauacauac	300

acacacauac auauauacac auacacauac augcauauac auacauacac augcauacau 360

acacacauac acgcgauaca uacauacaua uacauauua cacauacaua cacauacaua 420
uauacacaua cacacacauu uuuaaugcc caccaaaagu 460

<210> 48

<211> 395

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> cMYC full length(d) IRES

<400> 48

aauuccagcg agaggcagag ggagcgagcg ggcggccggc uaggguggaa gagccggcg 60
agcagagcug cgcugcggc guccugggaa gggagauccg gagcgaauag gggcuucgc 120
cucuggccca gcccucccgc uugauccccc aggccagcgg uccgcaaccc uugccgcauc 180
cacgaaacuu ugcccauagc agcggcggg cacuuugcac uggaacuuac aacacccgag 240

caaggacgct acucucccgta cgcgaaaaagg cuauucugcc cauuuggggta cacuuccccgt 300
ccgcugccag gacccgcuuc ucugaaaggc ucuccuugca gcugcuuaga cgccuggauuu 360
uuuucggua guggaaaacc agcagccucc cgctgt 395

<210> 49

<211> 395

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> cMYC full length(i) IRES

<400> 49

ucgcgggagg cugcugguuu uccacuaccc gaaaaaaaauc cagcgucuaa gcagcugcaa 60
ggagagccuu ucagagaagc ggguccuggc agcggcgggg aagugucccc aaaugggcag 120
aaauagccucc ccgcgucggg agagucgcgu cciugcucgg guguuguaag uuccagugca 180

aagugccgc ccgcugcuau gggcaaaguu ucguggaung gcgaaggguu gcggaccgcu 240
ggccuggggg aucaagcggg agggcugggc cagaggcgaa gccccuauu cgccucggau 300
cuccuuccc aggacgccc cagcgccgcu cugcucgcgg ggcucuucca cccuagccgg 360
ccgccccgcuc gcucccucug ccucucgcug gaauu 395

<210> 50

<211> 48

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> cMYC short variant(d) IRES

<400> 50

gggcacuuug cacuggaacu uacaacaccc gagcaaggac gcgacucu 48

<210> 51

<211> 48

<212>

> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> cMYC short variant(i) IRES

<400> 51

agagucgcgu ccuugcucgg guguuguaag uuuccagugca aaugugccc 48

<210> 52

<211> 71

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> DMD(d) IRES

<400> 52

guacugacau cguagaugga aaucauaaac ugacucuugg uuugauuugg aauauaaucc 60

uccacuggca g 71

<210> 53

<211> 71

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> DMD(i) IRES

<400> 53

cugccagugg aggauuaau uccaaaucaa accaagaguc aguuuaugau uuccaucuac 60

gaugucagua c 71

<210> 54

<211> 303

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> HCV delta II(d) IRES

<400> 54

gccagcccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac ccccccuccc gggagagcca	60
uaguggucug cggaaccggu gagauacaccg gaauugccag gacgaccggg uccuuucuug	120
gauaaacccg cucaauggcu ggagauuugg gcgugcccc gcaagacugc uagccgagua	180
guguuggguc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg gugcuugcga gugccccggg	240
aggucucgua gaccgugcac caugagcagc aauccuaaac cucaaagaaa aaccaaacgu	300

aac

303

<210> 55

<211> 367

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> HCV delta IIIa(d) IRES

<400> 55

gccagcccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac ucccuuguga ggaacuacug	60
ucuuacgcga gaaagcgucu agcccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac	120
ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cgaaaaauug ccaggacgac cggguccuuu	180
cuuggauaaa cccgcucaaau gccuggagau uugggcgugc cccgcaga a cugcuagccg	240
aguaguguug ggucgcgaaa ggccuugugg uacugccuga uagggugcuu gcgagugccc	300

cgggaggugu cguagaccgu gaccaugag cacgaaucu aaaccuaaa gaaaaaccaa	360
--	-----

acquaac

367

<210> 56

<211> 356

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> HCV delta IIId(d) IRES

<400> 56

gccagcccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug	60
ucuuucacgca gaaagcgugu agcccauggcg uuaguauugag ugucgugcag ccuccaggac	120
ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag	180
gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugcccc	240

gcaagacugc uacuuguggu acugccugau agggugcuug cgagugccccc gggaggucuc	300
guagaccgug caccaugagc acgaaucua aaccucaaag aaaaacccaaa cguaac	356

<210> 57

<211> 330

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> HCV delta IV(d) IRES

<400> 57

gccagcccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug	60
ucuuucacgca gaaagcgugu agcccauggcg uuaguauugag ugucgugcag ccuccaggac	120
ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag	180
gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugcccc	240

gcaagacugc uagccgagua guguuggguc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg	300
---	-----

gugcugcga gugcccccggg aggucucgua	330
----------------------------------	-----

<210> 58

<211> 383

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> HCV G266->C(d) IRES

<400> 58

gccagcccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug	60
ucuuucacgca gaaagcgugu agcccauggcg uuaguauugag ugucgugcag ccuccaggac	120
ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag	180
gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugcccc	240

gcaagacugc uagccgagua guguucgguc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg	300
---	-----

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac	360
cucaaagaaa aaccaaacgu aac	383
<210> 59	
<211> 383	
<212> RNA	
<213> Hepatitis C virus	
<220>	
<223> HCV U228->C(d) IRES	
<400> 59	
gccagccccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug	60
ucuuucacgca gaaagcgugu agccauggcg uuaguaugag ugugcugcag ccuccaggac	120
ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaaugccag	180
gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaauggccu ggagauucgg gcgugccccc	240
gcaagacugc uagccgagu guguuggguc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg	300
gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac	360
cucaaagaaa aaccaaacgu aac	383
<210> 60	
<211> 383	
<212> RNA	
<213> Hepatitis C virus	
<220>	
<223> HCV G267->C(d) IRES	
<400> 60	
gccagccccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug	60
ucuuucacgca gaaagcgugu agccauggcg uuaguaugag ugugcugcag ccuccaggac	120
ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaaugccag	180
gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaauggccu ggagauuugg gcgugccccc	240
gcaagacugc uagccgagu guguugcguc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg	300
gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac	360
cucaaagaaa aaccaaacgu aac	383
<210> 61	
<211> 383	
<212> RNA	

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> HCV G268->C(d) IRES

<400> 61

gccagcccc ugauggggc gacacuccac caugaaucac ucccuuguga ggaacuacug 60

ucuuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaauggccu ggagauuugg gcgugcccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguuggcuc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugcccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

<210> 62

<211> 383

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> HCV G266G267G268->C266C267C268(d) IRES

<400> 62

gccagcccc ugauggggc gacacuccac caugaaucac ucccuuguga ggaacuacug 60

ucuuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaauggccu ggagauuugg gcgugcccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguucccuc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugcccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

<210> 63

<211> 383

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> HCV G266->A/G268->T(d) IRES

<400> 63

gccagcccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug	60
ucuuucacgca gaaagcgugu agcccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac	120
ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag	180
gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaauggccu ggagauuugg gcgugccccc	240
gcaagacugc uagccgagua guguuaguuc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg	300
gugcuugcga gugcccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac	360
cucaaagaaa aaccaaacgu aac	383
<210> 64	
<211> 383	
<212> RNA	
<213> Hepatitis C virus	
<220>	
<223> HVC IIIa->IIIa-comp; AGTA->TCAT(d) IRES	
<400> 64	
gccagcccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug	60
ucuuucacgca gaaagcgugu agcccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac	120
ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu guaucaccg gaauugccag	180
gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaauggccu ggagauuugg gcgugccccc	240
gcaagacugc uagccgagua guguuggguc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg	300
gugcuugcga gugcccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac	360
cucaaagaaa aaccaaacgu aac	383
<210> 65	
<211> 383	
<212> RNA	
<213> Hepatitis C virus	
<220>	
<223> HCV IIIe->IIIe-comp; TGATAG->ACTATC(d) IRES	
<400> 65	
gccagcccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug	60
ucuuucacgca gaaagcgugu agcccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac	120
ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag	180
gacgaccggg uccuuuucuug gauaaacccg cucaauggccu ggagauuugg gcgugccccc	240

gcaagacugc uagccgagua guguuggguc gcgaaaggcc uugugguacu gccacuaucg	300
gugcuugcga gugcccgaaa aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac	360
cucaaagaaa aaccaaacgu aac	383