



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월28일

(11) 등록번호 10-1669944

(24) 등록일자 2016년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7025174

(22) 출원일자(국제) 2007년03월16일

심사청구일자 2012년03월12일

(85) 번역문제출일자 2008년10월15일

(65) 공개번호 10-2008-0111063

(43) 공개일자 2008년12월22일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2007/050128

(87) 국제공개번호 WO 2007/107789

국제공개일자 2007년09월27일

(30) 우선권주장

0605337.5 2006년03월17일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문현

WO2005004794 A1

Sapru et al., Experimental neurology, academic press, NEW YORK, Vol. 198(2), pages 382-390(2006.1.7. 공개)

(73) 특허권자

실렌티스 에스.에이.유.

스페인 마드리드 트레스 칸토스 28760 씨/산티아고 그리솔리아 넘버 2 파크 테크놀로지코 드 마드리드

(72) 발명자

지메네즈 안톤 아나 이사벨

스페인 이-28670 마드리드 빌라비시오사 데 오돈씨/페르디세스 17에이

세스토 야구에 안젤라

스페인 이-28003 마드리드 안드레스 멜라도 85 이스칼레라 이지크⁶ 비(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

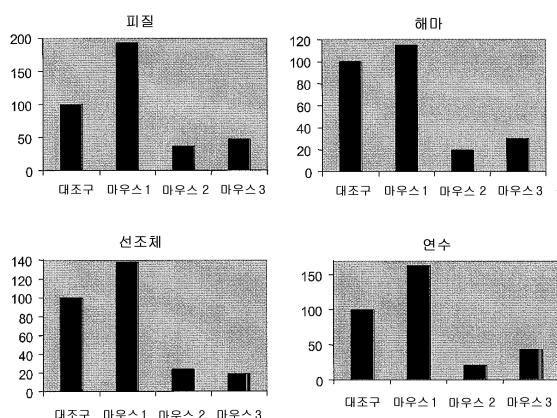
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 CNS 질환의 치료

(57) 요약

RNA 간섭에 의해 CNS(Central Nervous System)의 병리적 상태에 관여된 유전자의 발현 및/또는 활성을 조절하는 조성물의 비강내 투여에 의해 상기 상태를 치료하는 방법 및 그 조성물이 개시된다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

지메니즈 고메즈 마 콘셉시온

스페인 이-28670 마드리드 빌라비시오사 데 오돈
씨/ 올리보스 3

고메즈-아세보 굴론 에두아르도

스페인 이-28224 마드리드 포주엘로 데 알라르콘
산치드리안 18

명세서

청구범위

청구항 1

비정상적인 tau 발현과 연관된 중추신경계(CNS)의 신경퇴행성 질환의 치료를 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물은 RNA 간섭을 유발하고 CNS에서 발현되는 tau 유전자의 발현을 조절하는 siRNA를 포함하고, 상기 조성물은 비강내 투여를 위해 제제화되며, 상기 siRNA는 서열번호 1 내지 160으로부터 선택된 서열을 갖는 뉴클레오티드 서열을 표적으로 하거나, 또는 상기 siRNA는 서열번호 161 내지 318로부터 선택된 서열을 갖는 것인 약제학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 질환은 CNS의 tau 유전자의 돌연변이와 관련된 선천성 질병인 것인 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 tau 유전자 발현은 CNS의 세포에서 조절되는 것인 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 siRNA는 변형된 뉴클레오티드 및 비-포스포디에스테르 결합 중 하나 이상을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 siRNA는 40 bp(base pair) 이하의 길이인 것인 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 siRNA는 3' 오버행을 갖는 것인 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 복수 종의 siRNA가 이용되는 것인 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 siRNA는 CNS의 tau 유전자의 돌연변이와 관련된 선천성 질병에 관여된 tau 유전자의 발현을 조절하는 것인 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

siRNA를 인간을 제외한 포유동물(non-human mammal)에게 비강내로 투여하는 단계를 포함하고, 상기 siRNA는 서열번호 1 내지 160으로부터 선택된 서열을 갖는 뉴클레오티드 서열을 표적으로 하거나, 상기 siRNA는 서열번호 161 내지 318로부터 선택된 서열을 갖는 것인, 인간을 제외한 포유동물에서 CNS 내의 표적 tau 유전자의 발현을 감소시키는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 표적 tau 유전자는 상기 인간을 제외한 포유동물에서 정상 수준으로 발현되고, 상기 siRNA는 상기 유전자의 기능을 조사하기 위해 투여되는 것인 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 RNA 간섭(RNA interference)에 의해 중추신경계(CNS)의 병리적 상태에 관여된 유전자의 발현 및/또는 활성을 조절하는 조성물의 비강내(intranasal) 투여에 의해 CNS의 병리적 상태를 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 작은 간섭 RNA(siRNA)를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 짧은 간섭 핵산 분자(siNA: short interfering nucleic acid) 및 관련 화합물을 포함한다. 바람직한 구체예에서, tau, 헌팅틴 (huntingtin), 아세틸트랜스퍼라아제 및 CNS의 상기 유전자 또는 다른 유전자의 돌연변이된 대립형질을 표적화하는 비강내로 전달된 siNA 분자는 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병 및/또는 파킨슨병 및 CNS의 유전자의 돌연변이와 연관된 선천성 질환과 같은 CNS 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서 유용하다.

배경기술

[0002]

유전자 발현을 조절하는 도구인 RNAi

[0003]

RNA 간섭은 이중가닥 RNA(ds RNA)에 의해 매개되는 서열-특이적 전사후 유전자 침묵(sequence-specific post-transcriptional gene silencing)의 과정을 의미한다. 1990년대 초 식물에서 RNA 간섭의 발견 후에, Andy Fire 와 Cris Mello는 dsRNA가 카에노랍디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*)에서 매우 효율적인 방식으로 유전자 발현을 특이적으로 및 선택적으로 억제했다는 것을 입증했다(Fire et al., 1998). 제1 가닥(센스 RNA)의 서열은 표적 메신저 RNA(mRNA)의 상응하는 영역의 서열과 일치했다. 제2 가닥(안티센스 RNA)은 mRNA에 상보적이었다. 결과물인 dsRNA는 상응하는 단일-가닥 RNA 분자(특히, 안티센스 RNA)보다 수배 더 효율적인 것으로 확인되었다.

[0004]

효소 DICER이 dsRNA를 만나서, dsRNA를 작은-간섭 RNA 또는 siRNA라 불리는 조각들로 절단할 때, RNAi 과정이 개시된다. 이 단백질은 RNase III 뉴클레아제 패밀리에 속한다. 단백질의 복합체가 RNA 잔류물을 모으고, 세포 내에서 표적 mRNA와 같은, 상응하는 서열(matching sequence)을 갖는 RNA를 탐색하고 파괴하기 위해 그들의 코드를 가이드로 이용한다(Bosher & Labouesse, 2000; 및 Akashi et al., 2001).

[0005]

유전자 넉다운(knowdown)을 위해 RNAi를 적용하는 시도에서, 포유동물 세포들이 이 접근방법의 이용을 방해할 수 있는, 바이러스 감염에 대한 다양한 보호 메카니즘을 개발한다는 것이 인식되었다. 실제로, 매우 낮은 수준의 바이러스성 dsRNA의 존재는 인터페론 반응을 유발하여, 번역의 전반적인 비-특이적 억제를 초래하고, 뒤이어 아포토시스(apoptosis)를 유발한다(Williams, 1997, Gil & Esteban, 2000).

[0006]

2000년에, dsRNA가 마우스 난모세포 및 초기 배아에서 세 개의 유전자들을 특이적으로 억제한다는 것이 보고되었다. 배아가 지속적으로 발달하면서, 번역 정지(translational arrest), 및 따라서, PKR 반응은 관찰되지 않았다(Wianny & Zernicka-Goetz, 2000). Ribopharma AG(Kulmbach, Germany)에서의 연구는 급성기 반응(acute-phase response)의 개시 없이, 인간 세포에서 유전자를 스위치-오프 시키기 위해 짧은(20-24개의 염기쌍) dsRNA를 이용하여, 포유동물 세포에서 RNAi의 기능을 입증하였다. 다른 연구 그룹에 의해 수행된 유사한 실험이 이 결과들을 확인했다(Elbashir et al., 2001; Caplen et al., 2001). 다양한 인간 및 마우스의 정상 및 암 세포 주에서의 테스트에 의해, shRNA(short hairpin RNA)가 그들의 siRNA 대응물(counterpart)만큼 효율적으로 유전자를 침묵시킬 수 있다는 것이 확인되었다(Paddison et al., 2001). 최근에, 또 다른 그룹의 작은 RNA(21-25개의 염기쌍)가 유전자 발현의 하향조절을 매개하는 것으로 확인되었다. 이 RNA들, 작은 일시적 조절 RNA(small temporally regulated RNA: stRNA)는 카에노랍디티스 엘레간스에서 발생 동안 유전자 발현의 시기를 조절한다(검토를 위해, Banerjee & Slack, 2002 및 Grosshans & Slack, 2002를 참조함).

[0007]

과학자들은 카에노랍디티스 엘레간스, 초파리, 트리파노소ーム(trypanosome) 및 기타 무척추동물을 포함한 여러 시스템에서 RNAi를 이용하였다. 여러 그룹들이 최근에 상이한 포유동물 세포주(특히, HeLa 세포)에서 단백질 생합성의 특이적 억제를 제시하여, 인 비트로에서 RNAi가 유전자 침묵을 위해 광범위하게 적용가능한 방법이라는 것을 입증하였다. 이 결과에 근거하여, RNAi는 빠르게 유전자 기능을 검증(식별 및 부여)하기 위한 인정된 도구가 되었다. 작은 dsRNA 올리고뉴클레오티드를 이용하는 RNAi는 부분적으로 서열결정된 유전자의 기능의 이해를 제공할 것이다.

[0008]

최근에, Krutzfeldt 및 동료들은 'antagomirs'로 불리는 종류의 특이적으로 조작된 화합물이 유전자 발현을 조절하는 RNA의 비-코딩 조각인 miRNA(microRNA)의 작용을 효과적으로 침묵시킬 수 있다는 것을 입증하였다

(Krutzfeldt et al., 2005)

[0009] siRNA 생성물의 비강내 전달

폐 질환의 치료에 대해, 바이러스 벡터, 중합체, 계면활성제 또는 부형제를 이용한 핵산의 폐로의 에어로졸 전달이 개시되었다. dsDNA, dsRNA, ssDNA, ssRNA, 짧은 간섭 RNA, 마이크로-RNA, 및 안티센스 RNA를 포함한, 비강내 전달을 위해 적합한 핵산이 제안되었다(US2005/0265927 및 WO2005/115358 참조).

[0011] RNAi-유도제의 폐로의 전달을 위한 바람직한 작용제는 도입을 위해 적합한 양이온성 중합체, 변형된 양이온성 중합체, 지질, 및 계면활성제를 포함한다(US 20050008617 참조).

[0012] CNS로의 전달

[0013] CNS 질환의 치료를 위한 비강내 전달은 갈란타민 및 갈란타민의 다양한 염 및 유도체와 같은 아세틸콜린에스테라제 저해제에 의해서만 이루어졌고(예를 들면, US2006003989, WO2004/002402, WO2005/102275 참조), 작은 간섭 RNA의 CNS로의 방출에 의한 신경퇴행성 질환의 치료는 이전에 수술에 의해 카테터를 이식하는 것에 의해 이루어졌다(예를 들면, WO2005/116212 참조). W002/086105는 비강으로부터 기원하는 신경 경로를 통해 CNS로 올리고뉴클레오티드를 전달하는 방법을 기재한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 용도가 검토되나, RNA 간섭에 대한 언급은 없었다. 또한, 이 문헌에 전달된 올리고뉴클레오티드의 생리적 활성의 개시는 없다. 정맥내로 투여된 siNA는 혈액-망막 장벽(blood-retina barrier)을 통과하고 눈에서의 유전자 발현을 조절하는 것으로 입증되었다(WO03/087367, US2005/0222061). 베타-세크레타아제(BACE), 아밀로이드 전구체 단백질(APP), PIN-1, PS-1(Presenilin-1) 및/또는 PS-2와 같은, 알츠하이머병에 관여된 일부 유전자, 및 헌팅틴(huntingtin) 및 아타신-1(ataxin-1)과 같은 헌팅턴병에 관여된 유전자의 발현 조절이 이미 세포 배양 및 인 비보에서 척수강내 투여 및 뇌실내(intracerebroventricular) 투여, 카테터 및 펌프의 이식, 혈액-뇌 장벽의 화학적 또는 삼투성 개방, 또는 뇌동맥계(즉, 선조체, 피질, 내)로의 직접 주입 또는 관류에 의해 siNA에 의해 수득되었다-예를 들면, WO2005/003350, US2005/042646, 및 GB2415961 참조.

[0014] RNAi에 의한 Tau 표적화

[0015] Tau는 알츠하이머병(AD)을 포함한, 선천성 및 후천성 노인성 치매에서 중요한 역할을 갖는다(Hardy & Selkoe, 2002; Lee et al., 2001; Mullan et al., 1992; Poorkaj et al., 1998; Hutton et al., 1998). AD는 두 가지 주요한 병리적 특징을 갖는다: 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 절단으로부터 유래된 베타-아밀로이드(AP)를 포함하는, 노인성 반점(senile plaque); 및 필라멘트형 tau 단백질을 포함하는 신경섬유의 다발성 병변(neurofibrillary tangle). 드문 유전형 AD는 모든 형태의 산발성 및 유전성 AD의 발병에서 AP 생성에 대해 필수적인 역할을 밝혔다(Hardy & Selkoe, 2002). 가족성 AD(familiar AD)를 유발하는 것으로 알려진 3개의 유전자-APP, 프리세닐린 1 및 프리세닐린 2를 코딩하는 유전자-의 돌연변이가 주로 신경독성 베타-아밀로이드의 생성을 증가시키기 위해 작용한다(Hardy & Selkoe, 2002).

[0016] 신경섬유의 다발성 병변의 주요한 성분인 Tau는 마찬가지로 AD 발병에서 유중요한 역할을 수행한다(Lee et al., 2001). tau의 돌연변이는 유사한 우성 유전 신경 퇴행성 질환인 FTDP-17(Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17)를 유발한다. FTDP-17에서, tau 돌연변이는 tau 단백질 서열을 변형시키거나, 또는 이상 스플라이싱(aberrant splicing)을 초래한다(Lee et al., 2001; Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2003). tau 발현의 이상은 또한 진행성 핵상 마비 및 CBGD(cortical basal ganglionic degeneration)를 포함한, 여러 다른 중요한 신경퇴행성 질환에 기여한다(Houlden et al., 2001). 따라서, 전반적으로 또는 대립 형질-특이적 방식으로 tau 발현을 감소시키기 위한 노력은 FTDP-17, AD 또는 다른 tau-관련 질환에서 치료적으로 유용한 것으로 입증될 수 있다.

[0017] RNAi에 의한, tau 돌연변이 및/또는 관련 SNP(single-nucleotide polymorphism)의 대립형질-특이적 침묵이 이미 세포 배양에서 달성되었다(Miller et al. 2003, 2004). 또한, 목적 siRNA가 미 정맥(tail vein)으로의 주사에 의해 마우스 모델로 성공적으로 전달되었다(US2004/0241854).

[0018] 전술은 CNS로의 전달 방법 및 RNAi에 대한 관련된 기술의 검토이다. 상기 검토는 하기에 기재되는 본 발명의 이해를 위해서만 제공되며, 기술된 연구가 본 발명에 대한 선행 기술이라는 것을 인정하는 것은 아니다. siNA 분자가 CNS로 전달될 수 있고, 그와 같은 전달이 RNA 간섭 활성을 초래하는 편리한 방법에 대한 요구가 본 발명

이 속하는 기술 분야에서 충족되지 않았다. 본 발명자들은 비강내 투여에 의해 siRNA 분자를 CNS로 표적화하는 것에 의해 CNS 질환을 치료하기 위해 인 비보에서 유전자 발현을 조절하는 기법을 개발하였다.

발명의 상세한 설명

[0019]

발명의 요약

[0020]

본 발명은 RNA 간섭을 유발하는 화합물의 비강내 투여에 의해 중추신경계(CNS)의 질환을 치료하는 방법 및 조성물을 제공한다.

[0021]

본 발명의 조성물은 작은 간섭 RNA(siRNA), 이중가닥 RNA(dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로-RNA(miRNA), 안타고미르(antagomir), 및 RNA 간섭을 중재할 수 있는 분자를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 짧은 간섭 핵산 분자(siNA) 및 관련 화합물을 포함한다.

[0022]

본 발명의 방법은 CNS의 병리적 상태를 치료하기 위해 하나 이상의 본 발명에 따른 siRNA의 유효량을 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 치료적 siNA의 비강내 투여를 포함한다. 특히, 본 발명의 조성물은 치매, 알츠하이머병, 헌팅تون병 및/또는 파킨슨병, 및 CNS의 유전자의 돌연변이와 관련된 선천성 질환을 포함한 CNS 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서 이용될 수 있다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 질환 및 질병은 바람직하게는 해마(hippocampus), 피질 및/또는 선조체(striatum)에 영향을 미치는 질병들을 포함한다.

[0023]

일 구체예에서, 본 발명은 tau, 헌팅틴, 또는 아세틸콜린에스테라아제 유전자, 및 궁극적으로 생성된 단백질의 양을 조절하는 CNS의 상기 유전자 또는 다른 유전자의 돌연변이된 대립형질의 mRNA 발현을 방해하는, siNA 또는 유사한 화학적 합성 물질(chemically synthesized entity)에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 성분들은 CNS 내의 목적 유전자의 비정상 버전을 특이적으로 표적화하기 위해 비강내로 투여된다.

[0024]

발명의 상세한 설명

[0025]

본 발명은 RNAi를 유발하는 화합물의 비강내 투여에 의해 CNS 질환을 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 CNS의 비정상적인 상태와 관련된 표적 유전자의 발현을 조절하는 짧은 간섭 핵산 분자(siNA)를 포함한다.

[0026]

본 발명의 방법은 하나 이상의 본 발명의 siNA의 유효량을 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0027]

siRNA의 설계

[0028]

유전자는 예를 들면, siNA가 선택적으로 병리적 상태에 관여된 유전자 또는 유전자의 대립형질의 발현을 감소시키거나 또는 억제하는 경우, 본 발명에 따른 siNA에 의해 "표적화(targeted)"된다. 대안적으로, siNA가 엄격한 조건(stringent condition) 하에 유전자 전사물에 혼성화하는 경우, siNA는 그 유전자를 표적으로 한다.

[0029]

1999년에, Tuschl 등은 siRNA의 침묵 효과를 해독하고, 그 효율성이 듀플렉스의 길이, 3'-말단 오버행(overhang)의 길이 및 상기 오버행의 서열의 함수라는 것을 보여주었다.

[0030]

표적 유전자 내에서 올바른 상동성 영역을 선택하는 것이 정확한 침묵화(silencing)을 위해 매우 중요하다. 표적 유전자 서열의 짧은 단편(예를 들면, 19-40개의 뉴클레오티드로 구성된 길이)이 본 발명의 siNA의 서열로 선택된다. 대안적으로, 목적 대립형질의 가변 영역이 siNA 화합물의 표적으로 선택된다. 일 구체예에서, 상기 siNA는 siRNA이다. 그와 같은 구체예에서, 표적 유전자 서열의 짧은 단편은 표적 유전자 mRNA의 단편이다. 바람직한 구체예에서, 표적 유전자 mRNA로부터 후보 siRNA 분자가 될 서열 단편을 선택하는 기준은: 1) 원형의 (native) mRNA 분자의 5' 또는 3' 말단으로부터의 50 내지 100개 이상의 뉴클레오티드인, 표적 유전자 mRNA로부터 유래된 서열; 2) 30 내지 70%, 가장 바람직하게는 약 50%의 G/C 함량을 갖는, 표적 유전자 mRNA로부터 유래된 서열; 3) 반복 서열(예를 들면, AAA, CCC, GGG, TTT, AAAA, CCCC, GGGG, TTTT)을 포함하지 않는, 표적 유전자 mRNA로부터 유래된 서열; 및 5) 표적 유전자에 독특한, 표적 유전자 mRNA로부터 유래된 서열을 포함한다. 표적 유전자 mRNA로부터의 서열 단편은 하나 이상의 전술된 확인된 기준을 충족시킬 수 있다. 바람직한 구체예에서, siRNA는 60% 미만의 G/C 함량을 갖고 및/또는 반복 서열을 갖지 않는다.

[0031]

실제로, 목적 유전자가 최적 올리고뉴클레오티드의 설계를 위해 전술된 모든 변수를 고려하는 예측 프로그램에

뉴클레오티드 서열로 입력된다. 이 프로그램은 siRNA에 의해 표적화될 수 있는 영역에 대한 mRNA 뉴클레오티드 서열을 스캐닝한다. 이 분석의 결과물은 가능한 siRNA 올리고뉴클레오티드의 점수이다. 최고 점수가 통상적으로 화학적 합성에 의해 제조되는, 이중가닥 RNA 올리고뉴클레오티드(다른 길이도 가능하나, 통상적으로 21 bp 길이임)를 설계하기 위해 이용된다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려진, dsRNA 올리고뉴클레오티드의 안정성 또는 이용률(availability)을 증가시키는 것을 목적으로 하는 여러 화학적 변형이 또한 이루어질 수 있다.

[0032] 후보 올리고뉴클레오티드는 동물 임상 연구로부터 인간 임상 연구로의 전환을 촉진하기 위해 종간 서열 보존 (interspecies sequence conservation)에 대해 더 선별될 수 있다.

[0033] 표적 영역에 대해 완벽하게 상보적인 siNA 외에, 상동성 영역을 표적화하기 위해 축퇴성(degenerate) siNA 서열이 이용될 수 있다. WO2005/045037은 예를 들면, 추가적인 표적 서열을 제공할 수 있는, 비-정규(non-canonical) 염기쌍, 예를 들면, 불일치(mismatch) 및/또는 워블 염기쌍(wobble base-pair)을 내포시키는 것에 의해 그와 같은 상동성 서열을 표적화하기 위한 siNA 분자의 설계를 기재한다. 불일치가 확인되는 경우, 비-정규 염기쌍(예를 들면, 불일치 및/또는 워블 염기)이 하나 이상의 유전자 서열을 표적화하는 siNA 분자를 생성하기 위해 이용될 수 있다. 비-한정적인 예에서, UU 및 CC 염기쌍과 같은 비-정규 염기쌍들이 서열 상동성을 공유하는 상이한 표적에 대해 서열을 표적화할 수 있는 siNA 분자를 생성하기 위해 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 siNA를 이용하는 하나의 장점은 단일 siNA가 상동성 유전자 간에 보존된 뉴클레오티드 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함하도록 설계될 수 있다는 것이다. 이 방식으로, 상이한 유전자를 표적화하기 위해 하나 이상의 siNA 분자를 이용하는 대신, 하나 이상의 유전자의 발현을 억제하기 위해 단일 siNA가 이용될 수 있다.

[0034] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 서열 비교 및 정렬 알고리즘(Gribskov and Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991, 및 그에 인용된 참조문헌 참조)에 의해 서열 동일성(sequence identity)이 계산될 수 있고, 뉴클레오티드 서열 간의 백분율 차이를 예를 들면, 디폴트 파라미터를 이용한 BESTFIT 소프트웨어 프로그램(예를 들면, University of Wisconsin Genetic Computing Group)에서 구현된 바와 같은 Smith-Waterman 알고리즘에 의해 뉴클레오티드 서열 간의 백분율 차이가 계산될 수 있다. siNA와 표적 유전자의 부분 간의 90%, 95%, 또는 99%보다 높은 서열 동일성이 바람직하다. 대안적으로, siNA와 원형의 RNA 분자 간의 상동성이 혼성화 및 표적 유전자의 발현을 감소 또는 저해하는 능력에 의해 기능적으로 정의될 수 있다. siNA가 유전자 발현에 영향을 미치는 능력은 인 비보 또는 인 비트로에서 경험적으로 결정될 수 있다.

[0035] 본 발명의 바람직한 siNA 분자들은 이중 가닥이다. 일 구체예에서, 이중 가닥 siNA 분자는 평활 말단(blunt end)을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 이중 가닥 siNA 분자는 오버행 뉴클레오티드(예를 들면, 1-5개의 뉴클레오티드로 구성된 오버행, 바람직하게는 2개의 뉴클레오티드로 구성된 오버행)를 포함한다. 특정한 구체예에서, 상기 오버행 뉴클레오티드는 3' 오버행이다. 또 다른 특정한 구체예에서, 상기 오버행 뉴클레오티드는 5' 오버행이다. 임의의 종류의 뉴클레오티드가 상기 오버행의 일부일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 오버행 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드들은 데옥시리보핵산이다. 바람직한 구체예에서, 상기 오버행 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드들은 티미딘 뉴클레오티드이다. 또 다른 구체예에서, 상기 오버행 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드들은 변형된 또는 비-고전적 뉴클레오티드이다. 또 다른 구체예에서, 상기 오버행 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드들은 비-고전적 뉴클레오티드간 결합(non-classical internucleotide bond)(예를 들면, 포스포디에스테르 결합이 아닌 결합)을 가질 수 있다.

[0036] siNA 듀플렉스의 합성

[0037] siNA는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 임의의 방법에 의해 합성될 수 있다. 바람직하게는, RNA는 적합하게 보호되는 리보뉴클레오시드 포스포라미디트(rinucleoside phosphoramidite) 및 통상적인 DNA/RNA 합성기를 이용하여 화학적으로 합성된다. 추가적으로, siRNA는 ProLigo(Hamburg, Germany), Dharmacon Research(Lafayette, CO, USA), Glen Research(Sterling, VA, USA), ChemGenes(Ashland, MA, USA), 및 Cruachem(Glasgow, UK), Qiagen(Germany), Ambion(USA) 및 Invitrogen(Scotland)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 상업적인 RNA 올리고 합성 공급업체로부터 수득될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 siNA 분자는 세포를 프로모터의 조절 하에 있는 역 상보 siNA(reverse complement siNA) 서열을 포함하는 벡터로 형질감염시키는 것에 의해 세포에서 발현될 수 있다.

[0038] 단일-가닥 RNA 분자로 작업하는 경우, 어닐링(annealing) 단계가 필요하다. RNA를 어닐링시키기 위해, 30 μ l의 각 RNA 올리고 50 μ M 용액을 100 mM 포타슘 아세테이트, 30 mM HEPES-KOH pH 7.4, 2 mM 마그네슘 아세테이트와

조합한다. 그 후, 상기 용액을 90°C에서 1분간 인큐베이션 시키고, 15초간 원심분리하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시킨다.

[0039] siRNA가 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)인 구체예에서, siRNA 분자의 두 가닥은 링커 영역(예를 들면, 뉴클레오티드 링커 또는 비-뉴클레오티드 링커)에 의해 연결될 수 있다.

[0040] siNA의 화학적 변형

[0041] 본 발명의 siNA는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 및/또는 비-포스포디에스테르 결합을 포함할 수 있다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려진 화학적 변형은 siNA의 안정성, 이용률, 및/또는 세포 흡수(cell uptake)를 증가시킬 수 있다. 당업자는 RNA 분자로 내포될 수 있는 다른 종류의 화학적 변형을 알 것이다(변형의 종류의 개요를 위해 국제출원 공개 WO03/070744 및 WO2005/045037 참조)

[0042] 일 구체예에서, 변형은 분해에 대한 개선된 내성 또는 개선된 흡수를 제공하기 위해 이용될 수 있다. 그와 같은 변형의 예는 포스포로티오에이트, 뉴클레오티드간 결합(internucleotide linkage), 2'-0-메틸 리보뉴클레오티드(특히, 이중-가닥 siRNA의 센스 가닥 상에 있는 것), 2'-데옥시-플루오로 리보뉴클레오티드, 2'-데옥시 리보뉴클레오티드, "유니버설 염기(universal base)" 뉴클레오티드, 5-C-메틸 뉴클레오티드, 및 역전된 데옥시 비-염기성(inverted deoxyabasic) 잔기의 내포를 포함한다(전반적으로, GB2406568 참조).

[0043] 또 다른 구체예에서, 변형은 siRNA의 안정성을 강화하거나 또는 표적화(targeting) 효율성을 증가시키기 위해 이용될 수 있다. 변형은 siRNA의 두 개의 상보적 가닥 간의 화학적 가교 형성, siRNA의 가닥의 3' 또는 5' 말단의 화학적 변형, 당 변형, 뉴클레오베이스(nucleobase) 변형 및/또는 백본 변형, 2'-플루오로 변형된 리보뉴클레오티드 및 2'-데옥시 리보뉴클레오티드를 포함한다(전반적으로 국제출원 공개 WO2004/029212를 참조함).

[0044] 또 다른 구체예에서, 변형은 표적 mRNA 및/또는 상보적 siNA 가닥에 있는 상보적 뉴클레오티드에 대한 친화도를 증가 또는 감소시키기 위해 이용될 수 있다(전반적으로 국제출원 공개 WO2005/044976을 참조함). 예를 들면, 변형되지 않은 피리미딘 뉴클레오티드가 2-티오, 5-알키닐, 5-메틸, 또는 5-프로파닐 피리미딘로 대체될 수 있다. 추가적으로, 변형되지 않은 퓨린이 7-데자(deza), 7-알킬, 또는 7-알케닐 퓨린으로 대체될 수 있다.

[0045] 또 다른 구체예에서, siNA가 이중-가닥 siRNA인 경우, 3'-말단 뉴클레오티드 오버행 뉴클레오티드가 데옥시리보뉴클레오티드에 의해 대체될 수 있다(전반적으로, Elbashir et al., 2001 참조).

[0046] 일 구체예에서, 본 발명은 표적 유전자, 바람직하게는 CNS에서 발현되는 유전자, 보다 바람직하게는 MAPT 유전자의 발현을 하향-조절하는 이중 가닥 짧은 간접 핵산(siNA) 분자를 특징으로 하고, 상기 siNA 분자는 하나의 단편은 상기 siNA 분자의 센스 영역을 포함하고, 제2 단편은 상기 siNA 분자의 안티센스 영역을 포함하는 것인 두 개의 별개의 올리고뉴클레오티드 단편으로부터 조립된다. 또 다른 구체예에서, 상기 siNA 분자의 각 단편의 약 19개의 뉴클레오티드는 상기 siNA 분자의 나머지 단편의 상보적 뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하고 상기 siNA 분자의 각 단편의 두 개 이상의 3' 말단 뉴클레오티드는 상기 siNA 분자의 나머지 가닥의 뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하지 않는다(즉, 상기 siNA 분자는 각 가닥 상에 두 개 이상의 뉴클레오티드로 구성된 오버행을 포함한다). 일 구체예에서, 상기 siNA 분자의 각 단편의 두 개의 3' 말단 뉴클레오티드 각각은 2'-데옥시-티미딘과 같은 2'-데옥시-피리미딘 뉴클레오티드이다. 또 다른 구체예에서, 상기 siNA 분자의 각 단편의 모든 21개의 뉴클레오티드는 상기 siNA 분자의 나머지 단편의 상보적 뉴클레오티드와 염기쌍을 형성한다. 또 다른 구체예에서, 안티센스 영역의 약 19개의 뉴클레오티드는 표적 유전자에 의해 코딩되는 RNA의 뉴클레오티드 서열 또는 그의 일부와 염기쌍을 형성한다. 또 다른 구체예에서, 안티센스 영역의 약 21개의 뉴클레오티드는 표적 유전자에 의해 코딩되는 RNA의 뉴클레오티드 서열 또는 그의 일부와 염기쌍을 형성한다. 임의의 전술된 구체예에서, 상기 안티센스 영역을 포함하는 단편의 5'-말단은 선택적으로 포스페이트기를 포함할 수 있다.

[0047] 일 구체예에서, 본 발명은 센스 또는 안티센스 가닥 중 하나 또는 두 가닥 모두가 하나 이상, 예를 들면, 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상, 바람직하게는 1개 내지 5개의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합 및/또는 하나 이상(예를 들면, 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상), 바람직하게는 1개 내지 5개의 유비버설 염기 변형된 뉴클레오티드, 및 선택적으로, 센스 또는 안티센스 가닥 중 하나 또는 양 가닥 모두의 3'-말단, 5'-말단, 또는 3'- 및 5'-말단에 말단 캡 분자(terminal cap molecule)를 포함하는 것인 siRNA 분자를 특징으로 한다. 또 다른 구체예에서, 상기 센스 및/또는 안티센스 siNA 가닥의 하나 이상, 예를

들면, 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상, 바람직하게는 1개 내지 5개의 피리미딘 뉴클레오티드가 2'-데옥시, 2'-0-메틸, 및/또는 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오티드, 선택적으로 하나 이상, 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상, 바람직하게는 1개 내지 5개의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합 및/또는 센스 또는 안티센스 가닥 중 하나 또는 양 가닥 모두의 3'-말단, 5'-말단, 또는 3'- 및 5'-말단에 말단 캡 문자로 화학적으로 변형되고, 이들은 동일한 가닥 또는 상이한 가닥에 존재한다.

[0048] 일 구체예에서, 본 발명은 siNA 문자의 각 가닥에 약 1개 내지 약 5개 또는 그 이상(구체적으로 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상)의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 갖는 화학적으로-변형된 짧은 간접핵산(siNA) 문자를 특징으로 한다.

[0049] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 2'-5' 뉴클레오티드간 결합을 포함하는 siNA 문자를 특징으로 한다. 상기 2'-5' 뉴클레오티드간 결합(들)은 하나의 siNA 서열 가닥 또는 양 가닥의 3'-말단, 5'-말단 또는 3'-말단과 5'-말단 모두에 존재할 수 있다. 또한, 상기 2'-5' 뉴클레오티드간 결합(들)은 하나의 siNA 서열 가닥 또는 양가닥 모두 내의 상이한 다른 위치들에 존재할 수 있고, 예를 들면, siNA 문자의 하나의 가닥 또는 양 가닥에 피리미딘 문자의 모든 뉴클레오티드간 결합을 포함하여, 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상의 피리미딘 문자의 뉴클레오티드간 결합이 2'-5' 뉴클레오티드간 결합을 포함할 수 있거나, 또는 siNA 문자의 하나의 가닥 또는 양 가닥에 피리미딘 뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드간 결합을 포함하여, 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상의 퓨린 뉴클레오티드의 뉴클레오티드간 결합이 2'-5' 뉴클레오티드간 결합을 포함할 수 있다.

[0050] 일 구체예에서, 본 발명의 siNA 문자는 예를 들면, siNA 문자의 5'-말단, 3'-말단, 5'- 및 3'-말단, 또는 이들의 임의의 조합에 하나 이상(예를 들면, 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상)의 LNA(locked nucleic acid) 뉴클레오티드를 포함한다.

[0051] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 siNA 문자는 예를 들면, siNA 문자의 5'-말단, 3'-말단, 5'- 및 3'-말단, 또는 이들의 임의의 조합에 하나 이상(예를 들면, 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상)의 비환식(acyclic) 뉴클레오티드를 포함한다.

[0052] 일 구체예에서, 본 발명은 센스 또는 안티센스 영역 중 하나 또는 두 영역 모두에 존재하는 임의의(예를 들면, 하나 이상 또는 모든) 피리미딘 뉴클레오티드가 2'-데옥시-2'-플루오로 피리미딘 뉴클레오티드이고, 센스 또는 안티센스 영역 중 하나 또는 두 영역 모두에 존재하는 임의의(예를 들면, 하나 이상 또는 모든) 퓨린 뉴클레오티드가 2'-데옥시 퓨린 뉴클레오티드인 것인 화학적으로-변형된 짧은 간접핵산(siNA) 문자를 특징으로 한다. 선택적으로, 상기 센스 또는 안티센스 영역에 존재하는 3'-말단 뉴클레오티드 오버행을 포함하는 임의의 뉴클레오티드는 2'-데옥시 뉴클레오티드이다.

[0053] 일 구체예에서, 본 발명은 센스 또는 안티센스 영역 중 하나 또는 두 영역 모두에 존재하는 임의의(예를 들면, 하나 이상 또는 모든) 피리미딘 뉴클레오티드가 2'-데옥시-2'-플루오로 피리미딘 뉴클레오티드이고 센스 또는 안티센스 영역 중 하나 또는 두 영역 모두에 존재하는 임의의(예를 들면, 하나 이상 또는 모든) 퓨린뉴클레오티드가 2'-0-메틸 퓨린 뉴클레오티드인 것인 화학적으로-변형된 짧은 간접핵산(siNA) 문자를 특징으로 한다. 선택적으로, 상기 센스 또는 안티센스 영역에 존재하는 3'-말단 뉴클레오티드 오버행을 포함하는 임의의 뉴클레오티드는 2'-데옥시 뉴클레오티드이다.

[0054] 일 구체예에서, 본 발명은 RNA 간접을 통해, 표적 RNA, 바람직하게는 CNS에서 발현되는 RNA, 보다 바람직하게는 MAPT RNA의 절단을 유도하는 화학적으로 합성된 이중가닥 RNA 문자를 특징으로 하며, 상기 RNA 문자의 각 가닥은 약 21개 내지 약 23개의 뉴클레오티드로 구성된 길이이며; 상기 RNA 문자의 하나의 가닥은 상기 RNA가 RNA 간접을 통해 상기 표적 RNA의 절단을 유도하기 위해 표적 RNA에 대한 충분한 상보성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 상기 RNA 문자의 하나 이상의 가닥은 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 예를 들면, 데옥시뉴클레오티드, 2'-0-메틸 뉴클레오티드, 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오티드, 2'-0-메톡시에틸 뉴클레오티드 등을 포함한다.

[0055] 일 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 siRNA 문자를 포함하는 약제를 특징으로 한다.

[0056] 일 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 siNA 문자를 포함하는 활성 성분을 특징으로 한다.

[0057] 일 구체예에서, 본 발명은 표적 유전자, 바람직하게는 CNS에서 발현되는 유전자, 보다 바람직하게는 MAPT 유전자의 발현을 하향-조절하는 이중-가닥 짧은 간접핵산(siNA) 문자로서, 상기 siNA 문자는 하나 이상의 화학적

변형을 포함하고, 상기 이중 가닥 siNA의 각 가닥은 약 18개 내지 약 28개 또는 그 이상(예를 들면, 약 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 또는 28개, 또는 그 이상)의 뉴클레오티드로 구성된 길이를 갖는 것인 이중 가닥 짧은 간접 핵산 (siNA) 분자의 용도를 특징으로 한다.

[0058] 일 구체예에서, 본 발명은 표적 유전자, 바람직하게는 CNS에서 발현되는 유전자, 보다 바람직하게는 MAPT 유전자의 발현을 저해하는 이중-가닥 짧은 간접 핵산(siNA) 분자로서, 상기 이중-가닥 siNA 분자의 가닥 중 하나는 표적 RNA 또는 그의 일부의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥이고, 나머지 가닥은 상기 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 가닥이고, 상기 이중-가닥 siNA 분자에 존재하는 대부분의 퍼리미딘 뉴클레오티드는 당 변형(sugar modification)을 포함하는 것인 이중 가닥 짧은 간접 핵산(siNA) 분자를 특징으로 한다. 바람직하게는, 상기 표적 RNA 또는 그의 일부는 단백질 또는 그의 일부를 코딩한다. 선택적으로, 상기 안티센스 가닥의 5'-말단은 포스페이트기를 포함한다. 상기 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 서열 또는 그의 일부는 상기 표적 RNA의 비번역 영역(untranslated region) 또는 그의 일부의 뉴클레오티드 서열에 상보적일 수 있다.

[0059] 일 구체예에서, 상기 siNA 분자의 각 가닥은 약 18개 내지 약 29개 또는 그 이상(예를 들면, 약 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 또는 29개 또는 그 이상)의 뉴클레오티드를 포함하고, 상기에서 각 가닥은 나머지 가닥의 뉴클레오티드에 상보적인 약 18개 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일 구체예에서, 상기 siNA 분자는 두 개의 올리고뉴클레오티드 단편으로부터 조립되고, 상기에서 하나의 단편은 상기 siNA 분자의 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 서열을 포함하고 제2 단편은 상기 siNA 분자의 센스 영역의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구체예에서, 센스 가닥은 폴리뉴클레오티드 링커 또는 비-뉴클레오티드(non-nucleotide) 링커와 같은 링커 분자를 통해 안티센스-가닥에 연결된다. 또 다른 구체예에서, 상기 센스 가닥에 존재하는 퍼리미딘 뉴클레오티드는 2'-데옥시-2' 플루오로 퍼리미딘 뉴클레오티드이고, 상기 센스 영역에 존재하는 퓨린 뉴클레오티드는 2'-데옥시 퓨린 뉴클레오티드이다. 또 다른 구체예에서, 상기 센스 가닥에 존재하는 퍼리미딘 뉴클레오티드는 2'-데옥시-2' 플루오로 퍼리미딘 뉴클레오티드이고, 상기 센스 영역에 존재하는 퓨린 뉴클레오티드는 2'-0-메틸 퓨린 뉴클레오티드이다. 또 다른 구체예에서, 상기 안티센스 가닥에 존재하는 퍼리미딘 뉴클레오티드는 2'-데옥시-2' 플루오로 퍼리미딘 뉴클레오티드이고, 상기 안티센스 영역에 존재하는 임의의 퓨린 뉴클레오티드는 2'-데옥시 퓨린 뉴클레오티드이다. 또 다른 구체예에서, 상기 안티센스 가닥은 하나 이상의 2'-데옥시-2'-플루오로 퍼리미딘 뉴클레오티드 및 하나 이상의 2'-0-메틸 퓨린 뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 안티센스 가닥에 존재하는 퍼리미딘 뉴클레오티드는 2'-데옥시-2' 플루오로 퍼리미딘 뉴클레오티드이고, 상기 안티센스 가닥에 존재하는 임의의 퓨린 뉴클레오티드이다. 또 다른 구체예에서, 상기 센스 가닥은 말단 캡 모이어티(예를 들면, 역전된 데옥시 비염기성(abasic) 모이어티 또는 역전된 티미딘과 같은 역전된 데옥시 뉴클레오티드 모이어티)가 상기 센스 가닥의 5'-말단, 3'-말단, 또는 5' 및 3' 말단에 존재하는 것인 3' 말단 및 5' 말단을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 안티센스 가닥은 상기 안티센스 가닥의 3' 말단에 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 안티센스 가닥은 3' 말단에 글리세릴 변형을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 안티센스 가닥의 5'-말단은 포스페이트기를 포함한다.

[0060] 표적 유전자, 바람직하게는 CNS에서 발현되는 유전자, 보다 바람직하게는 MAPT 유전자의 발현을 저해하는 이중-가닥 짧은 간접 핵산(siNA) 분자로서, 상기 이중가닥 siNA 분자에 존재하는 대부분의 퍼리미딘 뉴클레오티드는 당 변형을 포함하는 것인 이중가닥 짧은 간접 핵산(siNA) 분자의 전술된 임의의 구체예에서, 상기 siNA 분자의 두 가닥 각각은 약 21개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 siNA 분자의 각 가닥의 약 21개의 뉴클레오티드는 상기 siNA 분자의 나머지 가닥의 상보적 뉴클레오티드와 염기쌍을 형성한다. 또 다른 구체예에서, 상기 siNA 분자의 각 가닥의 약 19개의 뉴클레오티드는 상기 siNA 분자의 나머지 가닥의 상보적 뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하고, 상기 siNA 분자의 각 가닥의 2개 이상의 3' 말단 뉴클레오티드는 상기 siNA 분자의 나머지 가닥의 뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하지 않는다. 또 다른 구체예에서, 상기 siNA 분자의 각 단편의 두개의 3'-말단 뉴클레오티드 각각은 2'-데옥시-티미딘과 같은 2'-데옥시-퍼리미딘이다. 일 구체예에서, 상기 siNA 분자의 각 가닥은 상기 siNA 분자의 나머지 가닥의 상보적 뉴클레오티드와 염기쌍을 형성한다. 일 구체예에서, 상기 안티센스 가닥의 약 19개의 뉴클레오티드는 표적 RNA 또는 그의 일부의 뉴클레오티드 서열과 염기쌍을 형성한다. 일 구체예에서, 상기 안티센스 가닥의 약 21개의 뉴클레오티드는 표적 RNA 또는 그의 일부의 뉴클레오티드 서열과 염기쌍을 형성한다.

[0061] 일 구체예에서, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제에 담긴 본 발명의 siNA 분자를 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0062] 비-한정적인 예에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드의 핵산 분자로의 도입은 외래로부터 전달된 원형의 RNA 분자에 내재된 인 비보 안정성 및 생체이용률의 잠재적 한계를 극복하는데 강력한 도구를 제공한다. 예를 들면, 화학적으로 변형된 핵산 분자의 이용은 화학적으로 변형된 핵산 분자는 혈청 내에서 보다 긴 반감기를 갖는 경향이 있기 때문에, 주어진 치료 효과를 위해 특정한 핵산 분자의 보다 낮은 투여량을 가능하게 한다. 또한, 특정한 화학적 변형은 특정한 세포 또는 조직을 표적화하고 및/또는 핵산 분자의 세포 흡수를 개선하는 것에 의해 핵산 분자의 생체 이용률을 개선할 수 있다. 따라서, 화학적으로 변형된 핵산 분자의 활성이 원형의 핵산 분자, 예를 들면, RNA 단독-핵산 분자(all-RNA nucleic acid)에 비해 감소된다 하더라도, 상기 변형된 핵산 분자의 전체 활성은 상기 분자의 개선된 안정성 및/또는 전달 때문에 원형 분자(native molecule)보다 더 클 수 있다. 원형의 비변형 siNA와 달리, 화학적으로 변형된 siNA는 인간에서 인터페론 활성을 활성화시킬 가능성을 최소화할 수 있다.

[0063] 본 명세서에 기재된 siNA 분자의 임의의 구체예에서, 본 발명의 siNA 분자의 안티센스 영역은 상기 안티센스 영역의 3'-말단에 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 siNA 분자의 임의의 구체예에서, 안티센스 영역은 상기 안티센스 영역의 5'-말단에 약 1개 내지 약 5개의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 siNA 분자의 임의의 구체예에서, 본 발명의 siNA 분자의 3'-말단 뉴클레오티드 오버행은 핵산 당, 염기 또는 백본에서 화학적으로 변형된 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 siNA 분자의 임의의 구체예에서, 3'-말단 뉴클레오티드 오버행은 하나 이상의 유니버설 염기 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 siNA 분자의 임의의 구체예에서, 3'-말단 뉴클레오티드 오버행은 하나 이상의 비환식 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0064] 다른 구체예에서, siNA 분자는 평활 말단을 갖는다.

[0065] 일 구체예에서, 본 발명은 40개 이하의 뉴클레오티드 길이이고, 도 8의 서열번호 1 내지 160 중 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 siNA 분자를 포함한다. 특정한 구체예에서, 상기 siNA는 21개 내지 30개의 뉴클레오티드로 구성된 길이이고 도 8의 서열번호 161 내지 318 중 어느 하나를 포함한다.

[0066] 일 구체예에서, 본 발명은 대상 또는 개체에서 표적 유전자, 바람직하게는 CNS에서 발현되는 유전자, 보다 바람직하게는 MAPT 유전자의 발현을 조절하는 방법으로서, (a) 화학적으로 변형될 수 있고, siNA의 가닥 중 하나의 가닥은 상기 표적 유전자의 RNA에 상보적인 서열을 포함하는 것인, 본 발명의 siNA 분자를 합성하는 단계, 및 (b) 상기 대상 또는 개체에서 상기 표적 유전자의 발현을 조절하기에 적합한 조건 하에서 상기 대상 또는 개체로 상기 siNA 분자를 도입하는 단계를 포함하는 것인 방법을 특징으로 한다. 표적 단백질 또는 RNA의 수준은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려진 다양한 방법을 이용하여 결정될 수 있다.

[0067] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 대상 또는 개체에서 하나 이상의 표적 유전자, 바람직하게는 CNS에서 발현되는 유전자, 보다 바람직하게는 하나 이상의 MAPT 유전자의 발현을 조절하는 방법으로서, (a) 화학적으로 변형될 수 있고, siNA의 가닥 중 하나의 가닥은 상기 표적 유전자의 RNA에 상보적인 서열을 포함하는 것인, 본 발명의 siNA 분자를 합성하는 단계, 및 (b) 상기 대상 또는 개체에서 상기 표적 유전자의 발현을 조절하기에 적합한 조건 하에서 상기 대상 또는 개체로 상기 siNA 분자를 도입하는 단계를 포함하는 것인 방법을 특징으로 한다. 표적 단백질 또는 RNA의 수준은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려진 다양한 방법을 이용하여 결정될 수 있다.

[0068] 일 구체예에서, 본 발명은 세포 내에서 표적 유전자, 바람직하게는 CNS에서 발현되는 유전자, 보다 바람직하게는 MAPT 유전자의 발현을 조절하는 방법으로서, (a) 화학적으로 변형될 수 있고, siNA는 표적 유전자의 RNA에 대해 상보성을 갖는 단일 가닥 서열을 포함하는 것인, 본 발명의 siNA 분자를 합성하는 단계, 및 (b) 상기 세포에서 상기 표적 유전자의 발현을 조절하기에 적합한 조건 하에서 상기 siNA 분자를 세포로 도입하는 단계를 포함하는 것인 방법을 특징으로 한다.

[0069] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 세포 내에서 하나 이상의 표적 유전자, 바람직하게는 CNS에서 발현되는 유전자, 보다 바람직하게는 하나 이상의 MAPT 유전자의 발현을 조절하는 방법으로서, (a) 화학적으로 변형될 수 있고, siNA는 표적 유전자의 RNA에 대해 상보성을 갖는 단일 가닥 서열을 포함하는 것인, 본 발명의 siNA 분자를 합성하는 단계, 및 (b) 상기 세포에서 상기 표적 유전자의 발현을 조절하기에 적합한 조건 하에서 상기 세포를 인비트로 또는 인 비보로 상기 siNA 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 방법을 특징으로 한다.

[0070] siRNA 듀플렉스의 인 비트로 테스팅

[0071] siRNA 간섭의 특이성을 확인하기 위해, 표적 유전자를 발현하는 세포 배양에서 예비 테스트를 수행할 수 있다.

[0072] 기본적으로, 세포를 해당하는 siRNA 듀플렉스와 인큐베이션시키고, 뒤이어 유전자 발현 수준을 분석한다. 배양된 세포에서 siRNA 넉다운을 특정한 표현형과 연결시키기 위해, 표적 단백질의 감소를 입증하거나, 또는 적어도 표적 mRNA의 감소를 입증하는 것이 필요하다. 표적 유전자의 mRNA의 수준은 실시간 PCR(RT-PCR)에 의해 정량될 수 있다. 또한, 단백질 수준은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려진 다양한 방법으로 결정될 수 있고, 예를 들면, 상이한 표적에 대한 특이적 항체에 의한 웨스턴 블롯 분석은 표적화된 단백질의 감소를 직접적으로 모니터링할 수 있게 한다.

[0073] siRNA는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려진 형질감염 기법에 의해 세포 내로 도입된다. siRNA 듀플렉스의 단일 형질감염이, 예를 들면, 리포펙타민 2000 시약(Invitrogen)과 같은 양이온성 지질을 이용하여 수행되고, 뒤이어, 형질감염 24시간, 48시간 및 72시간 후 침묵 효율(silencing efficiency)의 분석이 수행될 수 있다.

[0074] 형질감염의 효율성은 세포 종류에 의존적일 수 있으나, 또한 세포의 계대 수(passage number) 및 합류도 (confluence)에도 의존적일 수 있다. siRNA-리포좀 복합체의 형성 시간 및 방법(예를 들면, 역전(inversion) 대비 볼텍싱(vortexing))도 중요하다. 낮은 형질감염 효율성이 성공적이지 못한 침묵화의 가장 빈번한 원인이다. 우수한 형질감염은 사소하지 않은 이슈이며, 사용될 새로운 세포주 각각에 대해 세심하게 조사되어야 한다. 리포터 유전자, 예를 들면, CMV-지시 EGFP-발현 플라스미드(CMV-driven EGFP-expression plasmid)(예를 들면, Clontech 사로부터 유래된 플라스미드) 또는 B-Gal 발현 플라스미드를 형질감염시키는 형질감염 효율성이 테스트되고, 그 후, 다음날에 위상차 현미경 및/또는 형광 현미경에 의해 평가될 수 있다.

[0075] 표적화된 단백질의 양(abundance) 및 수명(life time)(또는 교체율(turnover))에 따라, 1 내지 3일 후, 또는 그 이후에 넉-다운 표현형이 명확해질 수 있다. 표현형이 전혀 관찰되지 않는 경우, 면역형광 또는 웨스턴 블로팅에 의해 단백질의 고갈이 관찰될 수 있다.

[0076] 약제학적 제제 및 투여 경로

[0077] 본 발명은 siNA 분자의 하나 이상의 종(species)의 동시 투여를 포함할 수 있다. 이와 같은 종들은 하나 이상의 표적 유전자를 표적하도록 선택될 수 있다.

[0078] 일 구체예에서, siNA의 단일 종류가 본 발명의 치료 방법에서 투여된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 siNA가 또 다른 본 발명의 siNA 및/또는 CNS의 질병 상태의 치료, 예방 또는 관리에 유용한 하나 이상의 비-siNA 치료제(non-siNA therapeutic agent)와 조합되어 투여된다. 용어 "조합되어(in combination with)"는 치료제의 정확한 동시 투여에 한정되지 않고, 본 발명의 siNA 및 다른 작용제가 조합의 효과가 다른 방식으로 투여되는 경우보다 더 클 수 있도록 순차적으로 일정한 시간 간격 내에 투여된다는 것을 의미한다. 예를 들면, 각 치료제는 동시에 투여되거나 또는 상이한 시점에 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있다; 그러나, 동시에 투여되지 않는 경우, 그들은 원하는 치료 효과를 제공할 수 있도록 시간적으로 충분히 근접해서 투여되어야 한다.

[0079] 각 치료제는 별개로, 적합한 제형으로 및 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0080] 본 발명의 siNA는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 통상적인 기법에 의해 약학적 조성물로 제제화될 수 있다(예를 들면, Alfonso, G. et al., 1995, in: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing, Easton PA, 19th ed.). 본 발명의 방법에서 사용될 하나 이상의 siNA를 포함하는 제제는 다수의 제형으로 존재할 수 있고, 각 환자에 특이적인 다양한 인자들(예를 들면, 질환의 종류 및 중증도(severity), 투여되는 siNA의 종류, 환자의 연령, 체중, 반응 및 과거 병력), 제제 내의 siNA의 수 및 종류, 조성물의 제형(예를 들면, 액체, 반-액체, 또는 고체 제형) 및/또는 치료 계획(therapeutic regime)(예를 들면, 치료제가 완속 주입(slow infusion), 단일 볼루스(single bolus)로, 1일 1회, 1일 수회 또는 수일 간격으로 투여되는지 여부)에 의존적일 수 있다.

[0081] 본 발명의 siNA 분자 및 그의 제제 또는 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 일반적으로 알려진 바와 같이, 직접적으로 또는 국소로 투여될 수 있다. 예를 들면, siNA 분자는 개체로의 투여를 위해, 리포좀을 포함한, 전달 비히클(delivery vehicle)을 포함할 수 있다. 담체 및 희석제 및 그들의 염이 약제학적으로 허용가능한 제제로 존재할 수 있다. 혁산 분자는 리포좀으로의 캡슐화(encapsulation), 이온삼투요법(iontophoresis),

생분해성 중합체, 히드로겔, 사이클로덱스트린 폴리(락트-코-글리콜)산(PLGA) 및 PLCA 미세소포, 생분해성 나노 캡슐, 및 생부착성 미세소포(bioadhesive micosphere), 또는 단백질성 벡터와 같은 다른 비히클로의 내포 (incorporation)를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산 분자는 또한, 폴리에틸렌이민-폴리에틸렌글리콜-N-아세틸갈락토사민(PEI-PEG-GAL) 또는 폴리에틸렌이민-폴리에틸렌글리콜-트리-N-아세틸갈락토사민(PEI-PEG-triGAL) 유도체와 같은 폴리에틸렌이민 및 그의 유도체에 의해 제제화되거나 또는 이들과 복합체를 형성할 수 있다.

[0082] 본 발명의 siNA 분자는 막 파괴제(membrane disruptive agent) 및/또는 양이온성 지질 또는 헬퍼 지질 분자와 복합체를 형성할 수 있다.

[0083] 본 발명과 함께 이용될 수 있는 전달 시스템은 예를 들면, 수성 및 비수성 젤, 크림, 다중 에멀젼(multiple emulsion), 마이크로에멀젼, 리포좀, 연고, 수성 및 비수성 용액, 로션, 에어로졸, 탄화수소 베이스 및 분말을 포함하고, 가용화제, 투과 강화제(permeation enhancer)(예를 들면, 지방산, 지방산 에스테르, 지방산 알코올 및 아미노산), 및 친수성 중합체(예를 들면, 폴리카르보필 및 폴리비닐피롤리돈)와 같은 부형제를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 약제학적으로 허용가능한 담체는 리포좀 또는 경피 강화제(transdermal enhancer)이다.

[0084] 본 발명의 약제학적 제제는 세포 또는 개체, 예를 들면, 인간으로의 투여, 예를 들면, 전신 투여 또는 국소 투여에 적합한 제형일 수 있다. 적합한 제형은, 부분적으로, 용도 또는 투여 경로, 예를 들면, 경구, 경피 또는 주사에 의존적일 수 있다. 다른 인자들이 본 발명이 속하는 기술 분야에서 알려져 있고, 독성 및, 조성물 또는 제제가 그 효과를 발휘할 수 없게 하는 제형과 같은 고려사항을 포함한다.

[0085] 본 발명은 또한 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제 내에 원하는 화합물의 약제학적 유효량(pharmaceutically effective amount)을 포함하는 보관 또는 투여를 위해 제조된 조성물을 포함한다. 치료적 용도를 위해 허용가능한 담체 또는 희석제는 약제학 분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들면, 보존제, 안정화제, 염료 및 향미제(flavoring)가 제공될 수 있다. 이들은 소디움 벤조에이트, 소르브산 및 p-히드록시벤조산의 에스테르를 포함한다. 또한, 항산화제 및 혼탁제가 이용될 수 있다.

[0086] 약제학적 유효량은 질병 상태의 발생을 예방, 저해하거나 또는 질병 상태의 증상을 치료(어느 정도까지, 바람직하게는 모든 증상을 경감)하기 위해 요구되는 투여량이다. 약제학적 유효량은 질병의 종류, 사용되는 조성물, 투여 경로, 치료대상 포유동물의 종류, 고려대상인 특정한 포유동물의 신체적 특징, 동시 투약, 및 의약 분야의 당업자가 인식할 다른 인자들에 의존적이다.

[0087] 본 발명의 제제는 통상적인 무-독성의 약제학적으로 허용가능한 담체, 아쥬반트(adjuvant), 및/또는 비히클을 포함하는 투여량 단위 제제(dosage unit formulation)로 투여될 수 있다. 경구 용도의 제제는 또한 활성 성분이 비활성 고체 희석제, 예를 들면, 탄산칼슘, 인산칼슘 또는 카올린과 혼합되는 것인 경질 젤라틴 캡슐(hard gelatin capsule), 또는 활성 성분이 물 또는 오일 매질, 예를 들면, 피넛 오일, 액체 파라핀, 또는 올리브 오일과 혼합되는 것인 연질 젤라틴 캡슐(soft gelatin capsule)로 제공될 수 있다.

[0088] 수성 혼탁액은 활성 물질을 수성 혼탁액의 제조를 위해 적합한 부형제와의 혼합물로 포함한다. 그와 같은 부형제는 혼탁제, 예를 들면, 소디움 카르복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 히드로프로필 메틸셀룰로오스, 소디움 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈, 겉 트라가칸스 및 겉 아카시아이고; 분산제 또는 습윤제(wetting agent)는 천연 포스파티드(phosphatide), 예를 들면, 레시틴, 또는 알킬렌 옥시드와 지방산의 축합 산물(condensation product), 예를 들면, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 에틸렌 옥시드와 장쇄 지방족 알코올의 축합 산물, 예를 들면, 헬타데카에틸렌옥시세티놀, 또는 에틸렌 옥시드와, 지방산으로부터 유래된 부분 에스테르(partial ester) 간의 축합 산물 및 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올리에이트와 같은 헥시톨, 또는 에틸렌 옥시드와 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유래된 부분 에스테르 간의 축합 산물, 예를 들면, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올리에이트일 수 있다. 수성 혼탁액은 또한 하나 이상의 보존제, 예를 들면, 에틸, 또는 n-프로필 p-히드록시벤조에이트, 하나 이상의 착색제, 하나 이상의 향미제, 및 수크로오스 또는 사카린과 하나 이상의 감미제(sweetening agent)를 포함할 수 있다.

[0089] 오일 혼탁액(oily suspension)은 활성 성분을 식물성 오일, 예를 들면, 아라키스유(arachis oil), 올리브 오일, 참기름 또는 코코넛 오일, 또는 액체 파라핀과 같은 광유(mineral oil)에 혼탁시키는 것에 의해 제조될 수 있다. 오일 혼탁액은 증점제(thickening agent), 예를 들면, 밀납(beeswax), 하드 파라핀, 또는 세틸 알코올을 포함할 수 있다. 이 조성물들은 아스코르브산과 같은 항산화제의 첨가에 의해 보존될 수 있다.

[0090] 물의 첨가에 의한 수성 혼탁액의 제조를 위해 적합한 분산성(dispersible) 분말 및 과립은 분산제 또는 습윤제, 혼탁제 및 하나 이상의 보존제와 혼합된 활성 성분을 제공한다. 적합한 분산제 또는 습윤제 또는 혼탁제는 전술된 것들에 의해 예시될 수 있다. 추가적인 부형제, 예를 들면, 감미제, 향미제 및 착색제가 또한 존재할 수 있다.

[0091] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 수중유(oil-in-water) 에멀젼의 제형일 수 있다. 오일상은 식물성 오일 또는 광유 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 유화제는 천연 겸, 예를 들면, 겸 아카시아 또는 겸 트라가칸스, 천연 포스파티드, 예를 들면, 대두, 레시틴 및 지방산과 헥시톨 무수물로부터 유래된 에스테르 또는 부분 에스테르, 예를 들면, 소르비탄 모노올리에이트, 및 상기 부분 에스테르와 에틸렌 옥시드의 축합 산물, 예를 들면, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올리에이트일 수 있다. 에멀젼은 또한 감미제 및 향미제를 포함할 수 있다.

[0092] 이 혼탁액은 전술된 적합한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁제를 이용하여 공지된 기술에 따라 제제화될 수 있다.

[0093] 무균 주사 제제(sterile injectable preparation)는 또한 무독성의 비경구로 허용가능한 희석제 또는 용매, 예를 들면, 1,3-부탄디올 용액 중의 무균 주사 용액 또는 혼탁액일 수 있다. 이용될 수 있는 허용가능한 비히클 및 용매는 물, 링거 용액(Ringer's solution) 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 또한, 무균 고정유(sterile, fixed oil)가 통상적으로 용매 또는 혼탁 매질로 이용될 수 있다. 이 목적을 위해, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함한 임의의 블랜드 고정유(bland fixed oil)가 이용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산이 주사제의 제조에서 용도를 찾을 수 있다.

[0094] 대안적으로, 본 발명의 특정한 siNA 분자들은 진핵세포 프로모터로부터 세포 내에서 발현될 수 있다. 상기 siNA 분자를 발현할 수 있는 재조합 벡터가 표적 세포로 전달되어 유지될 수 있다. 대안적으로, 핵산 분자의 일시적 발현을 제공하는 벡터가 이용될 수 있다. 그와 같은 벡터들은 필요에 따라 반복적으로 투여될 수 있다. 일단 발현되면, siNA 분자는 표적 mRNA와 상호작용하고 RNAi 반응을 생성한다. siNA 분자를 발현하는 벡터의 전달은 예를 들면, 정맥내 투여 또는 근육내 투여에 의해, 또는 개체로부터 외식된(ex-planted) 표적 세포로의 투여 및 뒤이은 개체로의 재도입에 의해, 또는 원하는 표적 세포로의 도입을 가능하게 하는 다른 수단에 의해 전신성일 수 있다.

0095] siNA의 비강내 투여

[0096] 비강내 siNA 전달 연구가 GFP C57BL/6-TG(ACTB-EGFP) 마우스에서 수행되었다. 이 형질전환 마우스 계통은 "The Jackson Laboratory"로부터 구입하였다. 이 형질전환 유전자에 대한 동형접합형 마우스는 출생 후 최초 2주 내에 사망하기 때문에 형질전환 마우스를 이용하였다. 치킨 베타-액틴 프로모터 및 CMV(cytomegalovirus) 인핸서의 제어 하에 "강화된(en hacned)" GFP(EGFP) cDNA를 갖는 형질전환 마우스 계통은 적혈구 및 털을 제외한 모든 조직이 여기광(excitation light) 하에서 녹색으로 보이게 한다. 이 마우스 변종은 C57BL/6 마우스로부터 생성되었다. EGFP(enhanced green fluorescent protein)를 코딩하는 마우스 cDNA를 치킨 베타 액틴 프로모터 및 CMV 인핸서에 연결시켰다. 소의 글로빈 폴리아데닐화 신호(bovine globin polyadenylation signal)도 작제물(construct)에 포함시켰다. 치킨 베타-액틴 프로모터 및 CMV 인핸서, 베타-액틴 인트론 및 소 글로빈 폴리-아데닐화 신호를 포함하는 pCAGGS 발현 벡터로 증폭된 EGFP cDNA를 도입하기 위해 PCR 프라이머에 포함된 EcoRI 부위들을 이용하였다. 상기 프로모터 및 코딩 서열을 갖는 전체 삽입물을 Bam-HI 및 SalI으로 절단하고 겔에서 정제하였다.

[0097] EGFP mRNA 내의 하기의 서열을 표적화하는 EGFP mRNA 발현을 하향조절하기 위해 이용된 siRNA(서열번호 319): 5'-GGC UAC GUC CAG GAG CGC ACC-3'. siRNA 듀플렉스의 센스 가닥은 5'-GGC UAC GUC CAG CGC ACC-3'이고, 안티센스 가닥은 5'-P U GCG CUC CUG GAC GUA GCC UU-3'(서열번호 320)이었다. 하기의 실험에서 이용된 siRNA 듀플렉스는 두 개의 티미딘 뉴클레오티드로 구성된 3' 오버행을 가졌다.

실시예

[0107] 실험 프로토콜

[0108] 비강내 전달 실험을 위해, C57BL/6-TG(ACTB-EGFP) 수컷 마우스(8주령)를 이용하였다. NaCl 0.9%로 희석시킨 siRNA를 비강내로 투여한 마우스를 비히클(NaCl 0.9%)을 투여한 대조군 마우스와 비교하였다. 동물들을 이소플루오란으로 마취시키고 20 μ l의 각 용액을 각각의 콧구멍 내로 떨어뜨렸다.

- [0109] 상이한 투여량의 EGFP mRNA에 대한 siRNA(-/+ 형질감염 지질)를 비강내로 최종 용량 $20\mu\text{l}$ 로 투여하였다. 대조군 동물을 비히클로만 처리하였다. 모든 경우에, 최적의 간접 시간을 찾기 위해, 약물 투여 후 수일의 범위 내에 동물들을 희생시켰다.
- [0110] 조직 분석을 위해, 마우스를 CO_2 에 의해 희생시키고, 뇌를 냉각시킨 플레이트(ice-cold plate) 상으로 신속하게 적출시켰다. 절반은 웨스턴 블로팅을 위해 처리하고, 나머지 절반은 면역조직화학을 위해 처리하였다.
- [0111] 상이한 뇌 영역으로부터 시료 조직을 채취하고 웨스턴 블로트 및 실시간 PCR에 의해 분석하였다. 상이한 처리 조건에서 GFP 발현을 Adobe Photoshop 프로그램을 이용하여 측정하였다. 상이한 조직에서 구성적으로 (constitutively) 발현되는 베타-액틴 유전자에 대한 정규화 후에 저해 수준을 수득하였다.
- [0112] 실험 조건은 표 1에 개시된 바와 같이 분배하였다(각 조건들은 2배수 또는 3배수로 분석하였다). GFP에 대한 노출된(naked) siRNA $530\ \mu\text{g}$ (40 나노몰)의 단일 투여량을 비강내로 처리한 마우스를 마우스 1, 2, 및 3으로 명명하고, siRNA의 접종 후 3일 및 5일차에 희생시켰다. 또 다른 실험군(마우스 4, 5, 6, 7, 8 및 9로 명명됨)은 안정화된 siRNA $265\ \mu\text{g}$ (20 나노몰)의 두 개의 투여량으로 처리한 동물들로 구성되었고 3일, 5일 및 8일차에 희생시켰다(표 1).
- [0113] 시료 조직을 두 방법에 의해 채취하였다: 하나는 단백질 완충액 용해 매질(protein buffer lysis medium)에 채취하고, 다른 하나는 RNAlater(Ambion)에 채취하였다. 그 후, 조직에서 GFP 단백질의 면역형광 신호를 분석하기 위해 조직의 작은 조각들을 OCT에 포함시켰다. 데이터 처리시까지 모든 시료들을 -80°C 에 보관하였다.
- [0114]
- | 마우스 번호 | 비강내 치료 처리 |
|---------------|---|
| CI, CII, CIII | 비히클 대조군 투여 |
| 1, 2, 3 | $530\ \mu\text{g}$ siRNA의 단일 투여 |
| 4, 5 | $265\ \mu\text{g}$ siRNA의 단일 투여, 3일차 희생 |
| 6, 7 | $265\ \mu\text{g}$ siRNA의 단일 투여, 5일차 희생 |
| 8, 9 | $265\ \mu\text{g}$ siRNA의 단일 투여, 8일차 희생 |
- [0115] 표 1: 비강내 siRNA 전달을 위한 실험 조건의 개략적 분배. siRNA의 투여량은 표에 표시되었다.
- [0116] 웨스턴 블로트 분석을 위한 추출물을 $20\ \text{mM}$ HEPES, $\text{pH}\ 7.4$, $100\ \text{mM}$ NaCl, $20\ \text{mM}$ NaF, 1% 트리톤 X-100, $1\ \text{mM}$ 소디움 오르토바나데이트, $5\ \text{mM}$ EDTA, $1\ \mu\text{M}$ 오카다산(okadaic acid) 및 프로테아제 억제제($2\ \text{mM}$ PMSF, $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 아프로티닌, $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 류펩틴, 및 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 웨스타틴)로 구성된 차가운 추출 완충액에서 뇌 영역을 균질화시키는 것에 의해 제조하였다. 시료를 균질화시키고 4°C 에서 20분 동안 15,000 X g로 원심분리시켰다. 상층액에 함유된 단백질을 브래드포드(Bradford)에 의해 결정하였다. 30 마이크로그램의 총 단백질을 10% 소디움 도데실 술페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리하고 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 형질전환 유전자를 검출하기 위해 이용된 1차 항체는 EGFP 항체($1/1000$)(Sigma) 및 항- β -액틴($1/2500$)(Sigma)이었다. 상기 막을 4°C 에서 5% 탈지분유(nonfat dried milk)에서 밤새 상기 항체와 인큐베이션시켰다. 면역검출(immunodetection)을 위해 2차 염소-항-마우스 항체($1/1000$; Invitrogen, San Diego, CA) 및 ECL 검출 시약(Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL)을 이용하였다. 밀도계(densitometry)에 의해 단백질 수준을 정량하고 GFP 핵을 단백질 적재량의 편차에 대해 보정하기 위해 액틴에 대해 정규화시켰다.
- [0117] 면역조직화학 분석을 위한 뇌를 소렌슨 완충액(Sorensen's buffer)에 담긴 4% 파라포름알데히드에서 고정시키고, 30% 수크로오스 용액에서 동결방지시켰다. 뇌를 동결 마이크로톱(freezing microtome)(Leica, Nussloch, Germany) 상에서 30 마이크로미터 시상절편(sagittal section)으로 절단하고, 30% 에틸렌 글리콜, 26% 글리세롤 및 포스페이트 완충액, pH 7.2로 구성된 동결방지 용액에 회수하였다. 그 후, 뇌 절편을 형광 현미경에 의해 분석하였다.
- [0118] RNAlater에서 분리된 조직을 -80°C 에 보관하였다. RNA 추출 전에 밀도 때문에 RNAlater를 제거하였다. 제조사의 프로토콜에 따라, 트리졸 시약(Invitrogen)으로 RNA를 분리하였다. 정량적 PCR에 의해 GFP 발현을 측정하기 전에 DNase 처리를 수행하였다.
- [0119] siRNA의 뇌로의 전달이 일어나는지 여부를 결정하기 위해 siRNA 적용을 수행하였다. 목적은 GFP 유전자 전사물의 하향 조절을 결정하는 것이었기 때문에, siRNA 적용 후 형광 수준을 측정하였다. 실험 프로토콜에 따른 동물에서 부수적 효과는 관찰되지 않았다.

- [0120] 결과
- [0121] 중추신경계(CNS) 인 비보 전달 모델
- [0122] 실시예 1.
- [0123] CNS에서 적절한 비강내 siRNA 전달을 결정하기 위해 siRNA 적용을 수행하였다. 20 μ l의 NaCl(0.9%)(대조군), 또는 20 μ l의 1nmol/ μ l 농도의 siRNA(마우스 1), 2nmol/ μ l 농도의 siRNA(마우스 2), 또는 2nmol/ μ l 농도의 siRNA + Transfection Lipid TransIT-TKO(마우스 3)로 처리된 마우스를 처리 48시간 후 희생시켰다. 실험 프로토콜 동안 동물에서 부수적 효과는 관찰되지 않았다.
- [0124] CNS의 상이한 영역(피질, 해마, 선조체 또는 연수) 또는 상이한 조직(기관, 폐, 코 상피, 식도)의 시료를 추출하고 전술된 바와 같이 GFP를 특이적으로 인식하는 항체에 의한 웨스턴 블롯 및 면역형광에 의해 더 분석하였다. 적재 대조군/loading control)으로서, 베타-액틴에 대한 항체(antibody vs beta-actin)를 이용하였다.
- [0125] 베타-액틴에 대한 정규화 후, CNS의 상이한 영역에서 GFP-발현 저해 수준의 결과가 도 1에 도시된다. 관찰될 수 있는 바와 같이, 최고의 저해 효과는 형질감염 지질 없이, 2 nmol/ μ l의 투여량으로 수득하였다. 또한, 피질, 해마, 선조체, 및 연수를 포함한, CNS의 다양한 조직에서 저해를 관찰하였다. 이 결과는 또한, 실시간 PCR에 의해 확인하였다.
- [0126]
- [0127] 실시예 2.
- [0128] GFP 마우스 모델에서 비강내 siRNA 투여의 상이한 농도 및 시기를 이용하였다. 20 μ l의 NaCl(0.9%)(대조군), 또는 40 nmol 또는 20 nmol 농도의 siRNA 20 μ l로 처리된 마우스를 처리 3일, 5일 및 8일 후 희생시켰다. 실험 프로토콜 동안 동물에서 부수적 효과는 관찰되지 않았다.
- [0129] CNS의 상이한 영역(피질, 해마, 선조체, 소뇌, 뇌간 또는 연수)의 시료를 추출하고 GFP를 특이적으로 인식하는 항체에 의한 웨스턴 블롯 및 면역형광에 의해 더 분석하였다. 적재 대조군/loading control)으로서, 베타-액틴에 대한 항체(antibody vs beta-actin)를 이용하였다.
- [0130] 베타-액틴에 대한 정규화 후, CNS의 상이한 영역에서 GFP-발현 저해 수준의 결과가 도 2에 도시된다. 관찰될 수 있는 바와 같이, 저해 효과는 뇌의 영역에 의존적이었다. 피질, 해마, 선조체 및 연수에서 최대의 GFP 침묵(silencing)을 관찰하였다. 웨스턴 블롯 실험의 결과를 정량적 PCR에 의해 확인하였다(도 3). 도 3에서, GFP mRNA 수준의 하향 조절을 피질 및 선조체에서 분석하고 이 수준들의 명확한 감소를 마우스 조건 8 및 9에서 관찰하였다.
- [0131]
- [0132] 실시예 3. MAPT siRNA 듀플렉스의 인비트로 테스팅
- [0133] siRNA의 특이성을 확인하기 위해, MAPT(microtubule associated protein tau) 발현 세포 배양에서 MAPT 간섭을 분석하였다. 이 실험에서 이용된 세포는 인간 MDA-MB-435 세포였다. 상응하는 siRNA 듀플렉스와의 인큐베이션 후에 MAPT mRNA의 수준을 분석하였다. 배양된 세포에서 siRNA 넉다운을 특정한 표현형으로 연결시키기 위해, 표적화된 단백질의 감소를 입증하거나 또는 적어도 표적화된 mRNA의 감소를 입증하는 것이 필요하다.
- [0134] 세포 배양에서 siRNA 듀플렉스의 형질감염
- [0135] siRNA 형질감염을 위한 기법의 다양한 예가 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려져 있다. siRNA 듀플렉스의 형질감염은 Lipofectamine 2000 시약(Invitrogen)과 같은 양이온성 지질을 이용하여 siRNA 듀플렉스의 단일 형질감염을 수행하는 단계 및 형질감염 24시간, 48시간 및 72시간 후 침묵화에 대한 판독을 수행하는 단계로 구성된다.
- [0136] 전형적인 형질감염 프로토콜을 하기와 같이 수행할 수 있다: 6-웰 플레이트의 하나의 웰 당, 본 발명자들은 siRNA의 최종 농도로 인간 MDA-MB-435 세포에 대해 100 nM을 이용하여 형질감염시켰다. Lipofectamine 2000 시약 프로토콜에 따라, 형질감염을 수행하기 전날, 본 발명자들은 DMEM, 10% 혈청, 항생제 및 글루타민을 포함하

는 적합한 성장 배지 3 ml에 웰 당 2-4 x 10⁵개의 세포를 접종하고, 정상적인 성장 조건(37°C 및 5% CO₂) 하에서 세포들을 인큐베이션시켰다. 형질감염을 수행한 날에, 세포들은 30-50% 합류 수준이어야 했다. 본 발명자들은 250 μl의 DMEM으로 12.5 μl의 20 μM siRNA 듀플렉스(100 nM 최종 농도에 해당함) 또는 25 μl의 20 μM siRNA 듀플렉스(200 nM 최종 농도에 해당함)를 희석하고 혼합했다. 또한, 6 μl의 Lipofectamine 2000 시약을 250 μl의 DMEM에 희석시키고 혼합하였다. 실온에서 5분의 인큐베이션 후에, 희석된 올리고머(siRNA 듀플렉스)와 희석된 Lipofectamine을 조합하고 실온에서 20분 인큐베이션 동안 복합체가 형성되게 하였다. 그 후에, 본 발명자들은 상기 복합체를 항생제의 농도가 낮은 2 ml의 신선한 성장 배지와 함께 세포들 상에 접적하고 상기 플레이트를 앞뒤로 흔드는 것에 의해 부드럽게 혼합하여, 형질감염 복합체의 균일한 분포를 형성하였다. 본 발명자들은 정상적인 성장 조건 하에서 세포들을 인큐베이션하고 그 다음날, 상기 복합체를 제거하고 신선하고 완전한 성장 배지를 첨가하였다. 유전자 침묵을 모니터링하기 위해, 형질감염 24시간, 48시간 및 72시간 후 세포들을 수집하였다.

[0137]

형질감염의 효율성은 세포 종류 및 계대 수 및 세포들의 합류도에 의존적일 수 있다. siRNA-리포좀 복합체의 형성 시간 및 방식(예를 들면, 역전 대 볼텍싱)도 중요하다. 낮은 형질감염 효율성이 성공적이지 못한 침묵의 가장 빈번한 이유이다. 우수한 형질감염은 사소하지 않은 이슈이고 사용될 각각의 새로운 세포주에 대해 세심하게 조사되어야 한다. 리포터 유전자, 예를 들면, CMV-유도 EGFP-발현 플라스미드(예를 들면, Clontech사 제품) 또는 B-Gal 발현 플라스미드를 형질감염시키는 형질감염 효율성을 테스트하고 그 다음날 위상차 현미경 및/또는 형광 현미경에 의해 평가할 수 있다.

[0138]

표적화된 단백질의 양 및 수명(또는 교체율)에 따라, 1 내지 3일 후, 또는 그 이후에 넉-다운 표현형이 명확해질 수 있다. 표현형이 전혀 관찰되지 않는 경우, 면역형광 또는 웨스턴 블로팅에 의해 단백질의 고갈이 관찰될 수 있다.

[0139]

형질감염 후, 세포로부터 추출된 총 RNA 분획을 DNase I으로 전-처리하고 랜덤 프라이머를 이용한 역전사를 위해 이용하였다. 프리-mRNA(pre-mRNA)의 증폭을 조절하기 위해, 하나 이상의 엑손-엑손 연접(exon-exon junction)을 포함하는 특이적 프라이머로 PCR-증폭시켰다. 비-표적 mRNA의 RT/PCR도 대조군으로 필요하다. mRNA의 효과적 고갈 및 표적 단백질의 검출가능하지 않은 감소는 안정된 단백질의 큰 저장고(reservoir)가 세포 내에 존재할 수 있다는 것을 나타낸다. 대안적으로, 실시간 PCR 증폭이 mRNA의 감소 또는 소실을 보다 정확한 방식으로 테스트하기 위해 이용될 수 있다. 정량적 PCR은 각 PCR 사이클 동안 앰플리콘(amplicon) 생성의 지표로서 반응 동안 방출되는 형광을 모니터링한다. 이 신호는 반응에서 PCR 생성물의 양에 직접적으로 비례하여 증가한다. 각 사이클에서 형광 방출의 양을 기록하는 것에 의해, PCR 생성물의 양의 최초의 유의성 있는 증가는 표적 주형의 초기량과 상관관계를 갖는 것인 지수기(exponential phase) 동안 PCR 반응을 모니터링하는 것이 가능하다.

[0140]

세포 배양에서 차등적으로 발현되는 MAPT 유전자의 간접 패턴을 확인하기 위해, 제조사 프로토콜(Applied Biosystems)에 따라 qRT-PCR을 수행하였다. Applied Biosystems 7300에 대한 반응 조건을 수립하고 1단계 RT-PCR 반응을 구현하였다. 25 μl의 반응 부피는 100 ng의 주형 RNA와 혼합된, 2X SyBr 그린, MultiscribeTM 역전 사효소 6.25U, RNase 저해제 및 50 nM의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 구성되었다. MAPT에 대한 특이적 프라이머를 설계하고 하우스키핑(housekeeping) 유전자로 18S를 분석하였다. 정방향 프라이머는 서열 AAGAGCCGCCTGCAGACA(서열번호 321)를 가지며, 역방향 프라이머는 서열 GAGCCGATCTGGACTTGACA(서열번호 322)를 가졌다.

[0141]

역전사를 48°C에서 30초 동안의 최초 단계로 수행하였다. 열 순환(thermal cycling) 파라미터는 95°C에서의 10분 및, 95°C에서의 10초 및 60°C에서의 1분의 40회 사이클이었다. 증폭 특이성을 확인하기 위해 해리 곡선(dissociation curve)을 분석하였다. siRNA 형질감염 후 각 유전자의 하향조절의 백분율을 결정하기 위해 각 시료의 역치 사이클(threshold cycle)(C_t)값을 대조군 24시간차 시료에 비교하였다.

[0142]

증폭된 PCR 생성물의 특이성을 평가하기 위해, 융해 곡선(melting curve) 분석을 수행하였다. 결과물인 융해 곡선은 프라이머-이합체 및 특이적 PCR 생성물 간의 식별을 가능하게 한다.

[0143]

MAPT siRNA의 인 비트로 분석법

[0144]

RNAi 기술을 이용하여 MAPT 표적의 저해를 결정하기 위해, 제1단계는 MDA-MB-435 세포 배양에서 실험을 수행하

는 것이었다. 이 분석법들은 두 부분으로 수행되었다. 먼저, 도 7에 기재된 MAPT 돌연변이에 대해 설계된 siRNA를 형질감염시켰다. 그 후, MAPT 야생형에 대한 siRNA를 설계하고 형질감염 후 MAPT의 하향조절을 분석하였다. 도 4는 도 7에 앞서 기재된 MAPT의 일부 돌연변이에 대한 정량적 PCR 실험의 대표적인 결과를 보여준다. 도 8은 siRNA가 설계된 MAPT의 표적 서열(서열번호 1-160)을 보여준다. siRNA 듀플렉스는 서열번호 161-318로 주어진다.

[0145] MAPT mRNA의 수준을 하향조절하는 돌연변이 MAPT P310L(표적 영역은 서열번호 159로 제시됨) 및 MAPT R406W(표적 영역은 서열번호 160으로 제시됨)에 대해 설계된 siRNA를 분석하였다. 도 4에 표시된 값들은 대조군 세포로 정규화된 유전자 발현에 대한 siRNA 간섭의 백분율의 평균 및 그들의 표준편차를 나타낸다. 대조군 세포에 비해, 48시간차의 MAPT 전사물의 수준은 siRNA 서열번호 159(MAPT P310L에 특이적임) 처리 후 20% 감소했다. 그러나, siRNA 서열번호 160(MAPT R406W에 특이점임)의 형질감염후 MAPT의 감소는 대조군 수준의 40%까지 도달했다.

[0146] 실험의 후반부(second round)에, MAPT wt에 대한 상이한 siRNA를 설계하였다. MAPT는 상이한 이소형을 갖기 때문에, 서열 정렬을 수행하고 공통 영역에 대해 siRNA를 설계하였다. MAPT 이소형의 기준 서열(reference sequence)의 수탁 번호는 NM_005910, NM_016834, NM_016835 및 NM_016841로 열거된다. 서열번호 128 및 서열번호 139에 해당하는, MAPT wt에 대한 두 개의 상이한 siRNA를 MDA-MB-435 세포에 형질감염시켰다. 하기의 도 5는 정량적 PCR 분석의 대표적인 결과를 보여준다. 그 값들은 대조군 세포로 정규화된, 각 유전자 발현에 대한 siRNA 간섭의 백분율의 평균 및 그들의 표준편차를 나타낸다. 대조군 세포에 비해, 24시간, 48시간, 또는 72시간 차에 MAPT 전사물의 수준은 특정한 siRNA 처리 후 유의성 있게 감소되었다. 서열번호 128에 해당하는 siRNA는 MAPT 전사물을 70% 감소시켰고, 이 감소는 48시간 및 72시간차까지 지속되었다. siRNA 서열번호 129도 가상 형질감염된(mock transfected) 세포 대비 약 60%의 우수한 MAPT의 하향조절 수준에 도달했다.

[0147] 실시예 4. MAPT siRNA 듀플렉스의 인 비보 테스팅

[0148] 질병 모델에서 비강내 전달의 개념의 입증을 제공하기 위해, 전측두엽 치매(frontal-temporal dementia)에 관여된 MAPT가 적합한 MAPT 형질변환 마우스 모델에서 하향조절되었다.

[0149] 마우스 변종 설명

[0150] MAPT 형질전환 마우스의 생성을 위해, 두 개의 N-말단 엑손을 갖는 인간 4-repeat tau 이소형(human 4-repeat tau isoform)을 코딩하는 플라스미드 pSGT42(Montejo de Garcini et al., 1994)를 Quickchange (Stratagene) 절차에 따라 FTDP-17 돌연변이 G272V 및 P310L을 별개로 도입하기 위한 주형으로 이용하였다. 그 후, 플라스미드 pSGTVLW를 생성하기 위해, 삼중 돌연변이체(triple mutant) tau cDNA를 제한효소처리 단편 SacII/AseI(G272V 돌연변이 포함)와 AseI/HindIII(P301L 돌연변이 포함)을 이전에 SacII/HindIII로 절단한 플라스미드 pSGTR406W로 라이케이션시켜 조립하였다(Perez, M., Lim, F., Arrasate, M., and Avila, J. 2000. The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules. *J. Neurochem.* 74: 2583-2589). 돌연변이 tau 개방 해독 프레임을 pSGTLVW로부터 BamHI/BglII 단편으로 절제하고 CMV 프로모터에 대해 정방향 배향으로 PBKCMV(Stratagene)의 BamHI 부위로 라이케이션시켜 pBKLW를 생성했다. 그 후, pBKLW의 SalI/XhoI 단편을 thy1 프로모터에 대해 정방향 배향으로 pTSC21k(Luthi et al., 1997)의 XhoI 부위로 라이케이션시켰다. SacII-HindIII 영역의 서열결정에 의해 결과물인 플라스미드 pTTVLW가 세 개의 특정한 아미노산 변화, G272V, P301L 및 R406W를 코딩하는 것으로 확인하였다. NotI 처리에 의해 벡터 서열을 제거하고 큰 단편을 절 정제하고, 이를 단일-세포 CBA3C57BL/6 배아로 전핵주입에 의해 도입시켰다. PCR에 의해 시조 마우스(founder mouse)를 확인하고 야생형 C57BL/6 마우스와 교배시켰다. 분석된 모든 형질전환 마우스는 이형접합체였다. 마우스를 우리 당 4마리씩 수용하고 물과 사료를 자유롭게 제공하고 12/12 시간 광-암 사이클 하에 온도-조절 환경을 유지하고, 광기는 07:00에 개시시켰다. 올리고뉴클레오티드 TT1, 5'-CTCTGCCCTCTGTTCTCTGG-3'(서열번호 323, 마우스 thy1 유전자의 엑손 2에 존재함); TT2, 5'-CCTGTCCCCAACCCGTACG-3'(서열번호 324, 인간 tau cDNA의 5' 말단에 존재함); 및 THY, 5'-CGCTGATGGCTGGGTTCATG-3'(서열번호 325, 마우스 thy1 유전자의 인트론 2에 존재함)를 이용하여 꼬리 DNA에 대해 PCR 스크리닝을 수행하였다. 본 발명자들은 내생 마우스 DNA가 아닌, 형질전환 마우스로부터 특이적으로 407-bp 생성물을 증폭하기 위해 TT1 및 TT2를 이용하였고, DNA에 대한 내부 대조군으로, 형질전환 유전자가 아닌, 마우스 게놈 DNA로부터 특이적으로 450-bp 생성물을 증폭시키기 위해 TT1 및 THY를 이용하였다. 형질전환

유전자는 해면 및 전측두엽 피질에서 주로 발현되었다.

[0151] 실험 프로토콜

[0152] 형질전환 MAPT 마우스 모델에서 비강내 siRNA 투여의 상이한 농도 및 시점을 이용하였다. 마우스를 $20\mu\text{l}$ 의 NaCl(0.9%)(대조군), 또는 20 nmol 농도의 siRNA $20\mu\text{l}$ 로 처리하였다.

[0153] 실험 조건은 표2에 기재된 바와 같이 분배하였다(각 조건은 삼배수로 분석하였다). 마우스를 MAPT에 대한 siRNA(서열번호 160)의 1회 투여량 또는 2회 투여량으로 비강내로 처리하고 siRNA의 접종 후 상이한 시점에 희생시켰다.

마우스 번호	비강내 치료 처리
CI, CII, CIII	비히클 대조군 투여량
1, 2, 3	$265\ \mu\text{g}$ siRNA의 단일 투여, 3일차 희생
4, 5, 6	$265\ \mu\text{g}$ siRNA의 단일 투여, 5일차 희생
7, 8, 9	$265\ \mu\text{g}$ siRNA의 단일 투여, 7일차 희생
10, 11	$132\ \mu\text{g}$ siRNA의 2회 투여, 8일차 희생

[0155] 표 2: 비강내 siRNA 전달을 위한 실험 조건의 개략적 분배. siRNA의 투여량은 표에 표시되었다.

[0156] CNS의 상이한 영역(피질, 해마, 선조체, 소뇌, 뇌간 또는 연수)의 시료를 추출하고, 웨스턴 블롯, 면역형광 및 정량적 PCR에 의해 더 분석하였다. 돌연변이된 인간 MAPT를 특이적으로 인식하는 항체를 이용하였다. 적재 대조군(loading control)으로서, 베타-액틴에 대한 항체(antibody vs beta-actin)를 이용하였다. 상이한 처리 조건에서의 MAPT 발현을 Adobe Photoshop 프로그램을 이용하여 측정하였다. 상이한 조직에서 구성적으로 발현되는, 베타-액틴 유전자에 대한 정규화 후에 저해 수준을 수득하였다.

[0157] 베타-액틴에 대한 정규화 후, CNS의 상이한 영역에서 MAPT 발현 저해 수준의 결과가 도 6에 도시된다. 관찰될 수 있는 바와 같이, MAPT 발현에 대한 저해 효과는 상기 형질전환 단백질이 높은 수준으로 발현되는 해마에서 관찰되었다. 유전자 발현의 하향조절이 최고수준인 동물 조건은 siRNA 주입 후 7일차에 희생시킨 동물이었다. 웨스턴 블롯 실험의 결과를 정량적 PCR에 의해 확인하였다.

[0158]

참조문헌

Akashi H, Miyagishi M, Taira K. Suppression of gene expression by RNA interference in cultured plant cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2001, 11(6):359-67.

Banerjee D, Slack F. Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *Bioessays*, 2002, 24(2):119-29.

Bosher JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2):E31-6.

Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. & Morgan, R.A. Specific inhibition of gene expression by small double stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 9742-9747.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, 15(2):188-200.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669):806-11.

Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, 2000, 5(2):107-14.

Grosshans H, Slack FJ. Micro-RNAs: small is plentiful. *J Cell Biol*, 2002, 156(1):17-21.

Hardy, J & Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 2002; Vol. 297, no. 5580, pp. 353 - 356.

[0159]

Houlden, H., Baker, M., Morris, H.R., et al. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology*, 2001; 56: 1702 - 1706.

Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu P., et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, 1998; 393: 702-705.

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005, 438(7068):685-9.

Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.*, 2001;24:1121-59.

Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W., et al. Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. *Science*, 2001; 293. no. 5534, pp. 1487 – 1491.

Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, Paulson HL. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res.*, 2004 Jan 30;32(2):661-8.

Miller VM, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003 Jun 10;100(12):7195-200.

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet.*, 1992 Aug;1(5):345-7.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 2003;39(3):409-21.

[0160] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 2002, 16(8):948-58.

Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol.*, 1998 Jun;43(6):815-25.

Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.*, 1999; 13(24):3191-7.

Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol.*, 2000, 2(2):70-5.

Williams BR. Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans*, 1997, 25(2):509-13.

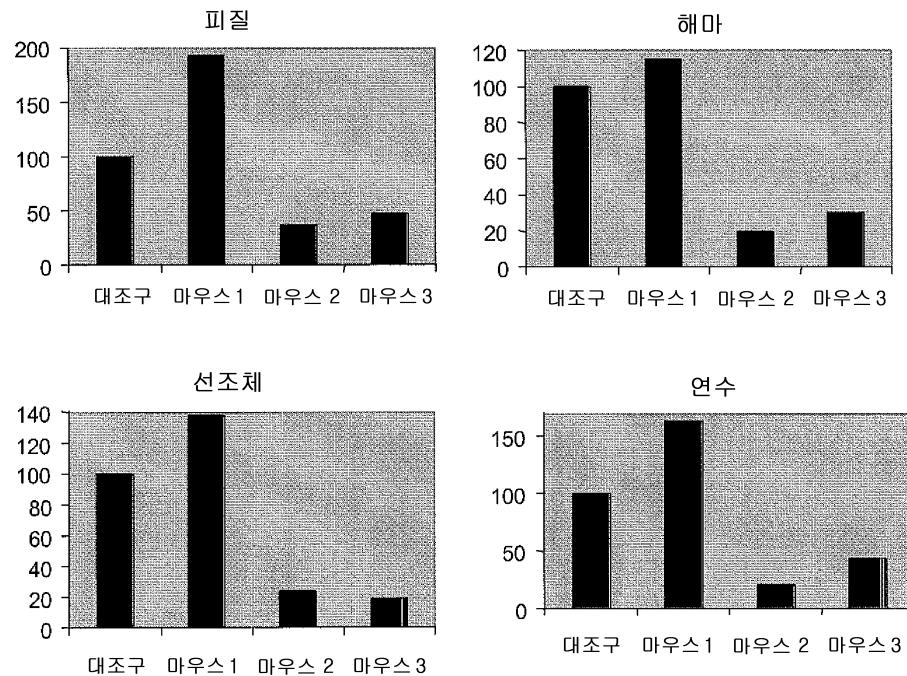
도면의 간단한 설명

[0098] 본 발명은 하기의 도면을 참조하여 예시로서만 설명된다.

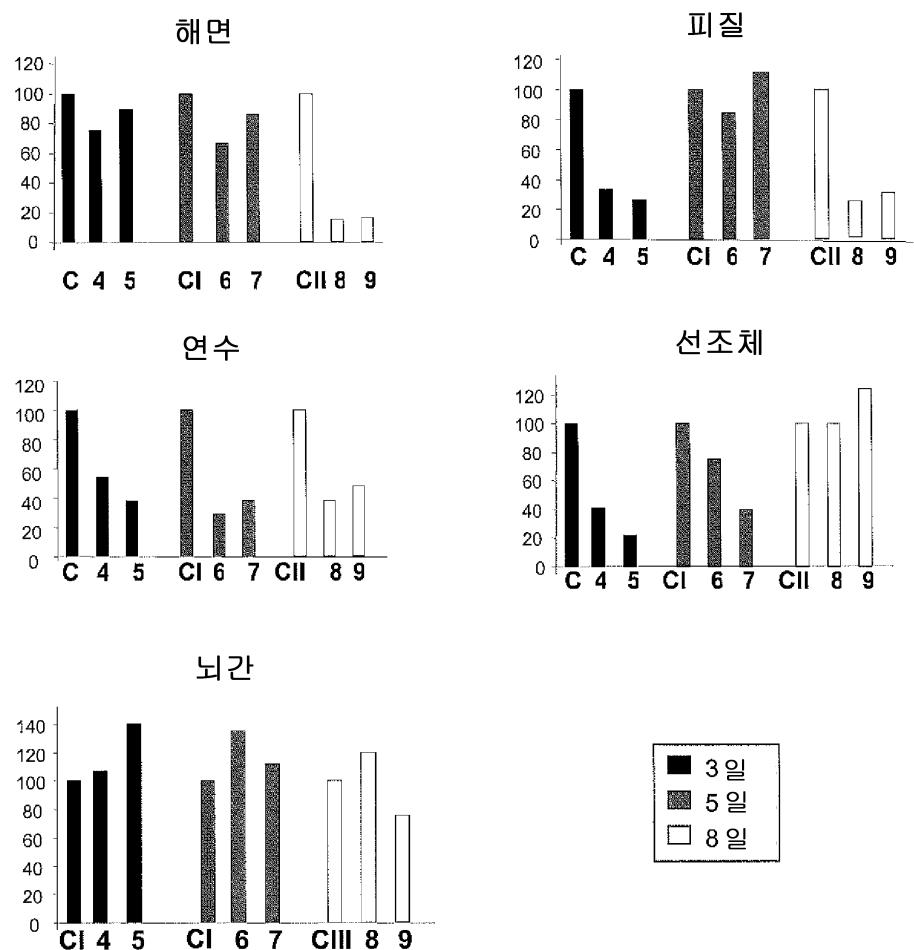
- [0099] 도 1. 0.9% NaCl(대조군), 1 nmol/ μ l siRNA-GFP(마우스 1), 2 nmol/ μ l siRNA-GFP(마우스 2), 및 2 nmol/ μ l siRNA-GFP + TransIT-TKO(마우스 3)의 마우스로의 비강내 투여 후 GFP 발현 수준. CNS의 피질, 해마, 선조체 및 연수(bulb)의 분석을 수행하였다.
- [0100] 도 2. siRNA는 GFP 단백질의 수준을 감소시킨다. GFP에 대해 설계된 siRNA를 형질전환 GFP 마우스에 비강내로 투여하였다. 상이한 시기에 동물들을 희생시키고 채취된 조직을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 염수 대조군을 마우스 CI, CII 및 CIII에 대조군으로 투여하였다. 값들은 대조군 마우스의 GFP 단백질로 정규화된(normalized) GFP 단백질 수준을 보여준다.
- [0101] 도 3. siRNA는 GFP mRNA 수준을 감소시킨다. GFP에 대해 설계된 siRNA를 형질전환 GFP 마우스에 비강내로 투여하였다. 상이한 시기에 동물들을 희생시키고 채취된 조직을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 이 도면에서, 선조체와 피질의 GFP mRNA 발현은 정량적 PCR에 의해 분석되었다.
- [0102] 도 4. siRNA는 상이한 돌연변이를 갖는 MAPT 유전자 전사물의 수준을 감소시킨다. 상이한 돌연변이에 대해 설계된 siRNA는 서열번호 159(P301L 돌연변이) 및 서열번호 160(R406W 돌연변이)으로 분석되었다. 48시간 동안 특정한 siRNA로 처리된 세포로부터 RNA를 준비하였다. MAPT에 대한 특이적 프라이머를 이용한 정량적 PCR에 의해 시료를 분석하였다(본문에 설명됨). 값들은 대조군인 가상 형질감염된(mock transfected) 세포에 대한 18S로 정규화된 상이한 전사물의 평균 발현 수준을 보여준다.
- [0103] 도 5. siRNA는 MAPT 유전자 전사물의 수준을 감소시킨다. 상이한 siRNA로 24시간, 48시간 및 72시간 동안 처리된 MDA-MB-435 세포로부터 RNA를 준비하였다. 본문에 기재된 바와 같이, 시료를 특이적 프라이머를 이용한 실시간 PCR에 의해 분석하였다. 값들은 가상 형질감염 대조군에 대한 18S로 정규화된 상이한 전사물의 평균 발현 수준을 보여준다.
- [0104] 도 6. R406W 돌연변이에 대해 설계된 siRNA 서열번호 160은 인 비보에서 MAPT 단백질 수준을 감소시킨다. siRNA 서열번호 160을 형질전환 MAPT 마우스에 비강내로 투여하였다. siRNA 투여 후 7일차에 동물들을 희생시키고 해면 조직을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다.
- [0105] 도 7. MAPT 돌연변이와 유전자 서열 수탁 번호의 목록.
- [0106] 도 8. 본 발명의 siRNA에 의해 표적화된 MAPT의 영역 및 이 영역들을 표적화하는 siRNA 듀플렉스(duplex)의 서열 목록.

도면

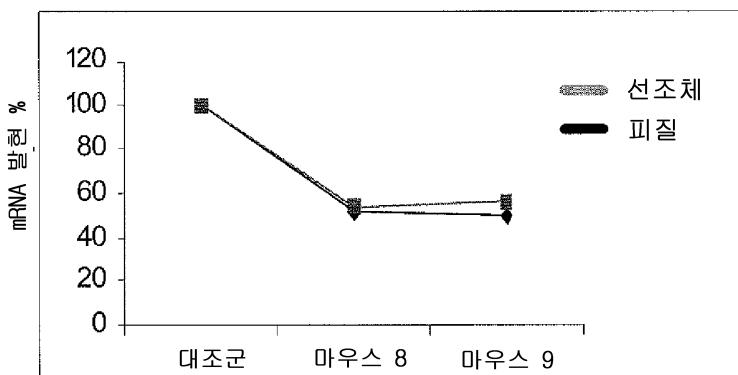
도면1



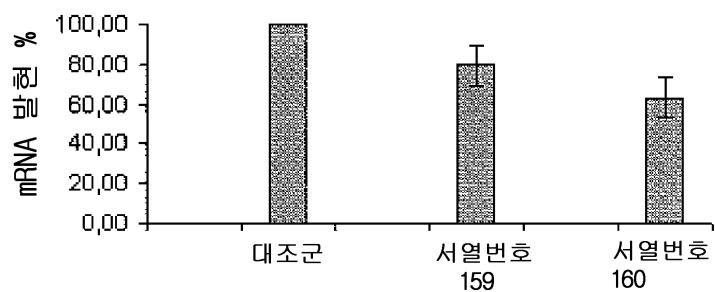
도면2



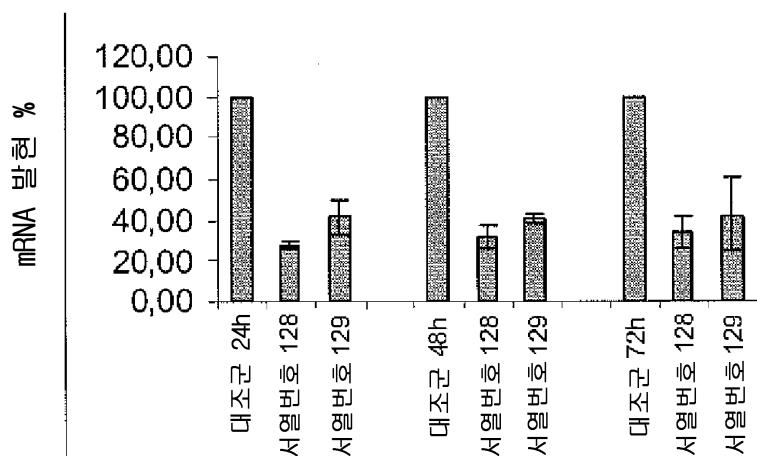
도면3



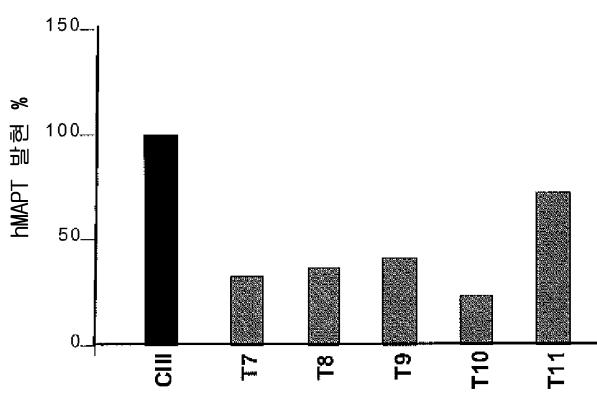
도면4



도면5



도면6



도면7a

미스센스/넌센스

수탁번호	코돈 변화	아미노산 변화	코돈 번호	표현형
CM020737	CGC-CAC	Arg-His	5	전족두엽 치매
CM022222	CGC-CTC	Arg-Leu	5	진행성 핵상 마비
CM003942	AAG-ACG	Lys-Thr	257	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CM014799	gATC-GTC	Ile-Val	260	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CM030233	cCTG-GTG	Leu-Val	266	전족두엽 치매
CM981233	GGC-GTC	Gly-Val	272	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CM981234	AATa-AAG	Asn-Lys	279	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CM014584	tAAT-CAT	Asn-His	296	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CM993836	cCCG-TCG	Pro-Ser	301	전족두엽 치매 / 피질기저핵 변성
CM981235	CCG-CTG	Pro-Leu	301	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CM992927	AGT-AAT	Ser-Asn	305	전족두엽 치매
CM032951	CTG-CGG	Leu-Arg	315	전족두엽 치매
CM043764	AAG-ATG	Lys-Met	317	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CM020738	TCC-TTC	Ser-Phe	320	전족두엽 치매
CM042738	CAG-CGG	Gln-Arg	336	전족두엽 치매
CM981236	gGTG-ATG	Val-Met	337	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CM003156	GAG-GTG	Glu-Val	342	전족두엽 치매
CM034824	TCG-TTG	Ser-Leu	352	호흡부전
CM013000	AAA-ATA	Lys-Ile	369	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CM004888	cGGG-AGG	Gly-Arg	389	전족두엽 치매
CM994385	cGGG-CGG	Gly-Arg	389	전족두엽 치매
CM981237	aCGG-TGG	Arg-Trp	406	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CM043765	ACG-ATG	Thr-Met	427	전족두엽 치매

스플라이싱

수탁번호	IVS	공여체(donor) /수용체 (acceptor)	위치	치환	표현형
CS991445	9 ds		+33	G-A	전족두엽 치매
CS034626	9 as		-177	C-T	전족두엽 치매

도면7b

				관련
CS994525	10	ds	-64	T-C 파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CS003183	10	ds	-28	T-C 전족두엽 치매/ 피질기저핵 변성
CS004157	10	ds	-1	T-C 진행성 핵상 마비
CS982264	10	ds	+3	G-A 파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CS012211	10	ds	+11	T-C 파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CS000864	10	ds	+12	C-T 전족두엽 치매
CS982261	10	ds	+13	A-G 파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CS982262	10	ds	+14	C-T 파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CS982263	10	ds	+16	C-T 파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매
CS033125	10	ds	+19	C-G 전족두엽 치매
CS033126	10	ds	+29	G-A 전족두엽 치매
CS000463	11	ds	+34	A-G 알짜하이마병, 증가된 리스크, 관련

조절

수탁번호	서열	표현형
CR994768	CCCGAAGGAGGACACCCACCCCC ACAAACGA(G- C)ACAAAGACTCCAACACAGGAG GTGGAGAA 전사개시부위로부터 -266	진행성 핵상 마비, 관련

작은 결실

수탁번호	결실	코돈	표현형
CD991787	GATAATT^AAATaggAAG CTGGATC	279	전족두엽 치매
CD013179	CTCAAAG^GATaatATC AAACACG	295	파킨슨병을 동반한 전족두엽 치매

도면8a

Microtubule associated protein tau 1 (MAPT)	
SEQ ID 1	GTGATGGAAGATCACGCTG
SEQ ID 2	GATCACGCTGGGACGTACG
SEQ ID 3	AGATCAGGGGGGCTACACC
SEQ ID 4	GATCAGGGGGGCTACACCA
SEQ ID 5	GACCAAGAGGGTGACACGG
SEQ ID 6	GAGGGTGACACGGACGCTG
SEQ ID 7	AGAATCTCCCTGAGACC
SEQ ID 8	GAATCTCCCTGAGACCC
SEQ ID 9	TCTCCCCCTGAGACCCCCA
SEQ ID 10	CGGGGCTCTAACCTCTG
SEQ ID 11	ACCTCTGATGCTAACAGACA
SEQ ID 12	CCTCTGATGCTAACAGAC
SEQ ID 13	GAGCACTCCAACAGCGGAA
SEQ ID 14	CAGCGGAAGATGTGACAGC
SEQ ID 15	GATGTGACACACCCCTAG
SEQ ID 16	GCAGGCTGCCCGCAGCCCC
SEQ ID 17	GGAACCACAGCTAACAGAAG
SEQ ID 18	CCACAGCTAACAGCAGCAGG
SEQ ID 19	GAAGCAGGACATTGGAGACA
SEQ ID 20	GCAGGCATTGGAGACACCC
SEQ ID 21	GACGAAGCTGCTGGTACCG
SEQ ID 22	GCTGCTGGTCACGTGACCC
SEQ ID 23	GAGCCTGAAAGTGGTAAGG
SEQ ID 24	AGTGGTAAGGTGGTCCAGG
SEQ ID 25	GTGGTAAGGTGGTCCAGGA
SEQ ID 26	GCTGGTCCAGGAAGGCTTC
SEQ ID 27	GGCTCTCTCCGAGAGCCAG
SEQ ID 28	CCTCGGGGACAGGACCTG
SEQ ID 29	GCACCAGCTCTAGGAGAC
SEQ ID 30	GGGGCAGGGGCAAAGAG
SEQ ID 31	AGAGAGGCCGGGGAGCAAG
SEQ ID 32	GAGAGGCCGGGGAGCAAGG
SEQ ID 33	GGAGGAGGTGGATGAAGAC
SEQ ID 34	GACCGCGACGTGATGAGT
SEQ ID 35	GACTCCCCCTCCCTCAAGG
SEQ ID 36	GGCTCCCCAGCCAAGAT
SEQ ID 37	GATGGGCGGCCCTCCCAAGA
SEQ ID 38	GCCACCAGCATCCCAAGGCT
SEQ ID 39	AGTTTCCACAGAGATCCCA
SEQ ID 40	GTTCACAGAGATCCCAG
SEQ ID 41	AGGGCAGGATGCCCTCTG
SEQ ID 42	GGGCAGGATGCCCTCTGG
SEQ ID 43	ATCACACCCAACGTGCAGA
SEQ ID 44	TCACACCCAACGTGCAGAA
SEQ ID 45	CGTGCAGAAGGAGCAGGCG
SEQ ID 46	GGAGCAGGCGCACTCGGAG
SEQ ID 47	GGGCTGCATTTCCAGGGGC
SEQ ID 48	AAGAGGCTGACCTTCAGA
SEQ ID 49	AGAGGCTGACCTTCAGAG
SEQ ID 50	GAGGCTGACCTTCAGAGC
SEQ ID 51	AAGCAGCCTGCTGCTGCTC
SEQ ID 52	AGCAGCCTGCTGCTGCTCC
SEQ ID 53	GCAGCTGCTGCTGCTCCG
SEQ ID 54	GCCCGTCAGCCGGTCCCT
SEQ ID 55	CTCAAAGCTCCATGGTCA
SEQ ID 56	AGCTCGCATGGTCAGTAAA
SEQ ID 57	GCTCGCATGGTCAGTAAA
SEQ ID 58	AAGCAAAGACGGGACTTGA
SEQ ID 59	AGCAAAGACGGGACTTGA
SEQ ID 60	GCAAGACGGGACTTGAAG
SEQ ID 61	AGACGGGACTTGAAGCGAT
SEQ ID 62	GACGGGACTTGAAGCGATG
SEQ ID 63	GCGATGACAAAAAGCCAA
SEQ ID 64	AAAAGCCAAGACATCCACA
SEQ ID 65	AAAGCCAAGACATCCACAC
SEQ ID 66	AAGCCAAGACATCCACACG
SEQ ID 67	AGCCAAGACATCCACACGT
SEQ ID 68	GCCAAGACATCCACACGT
SEQ ID 69	GACATCCACACGTTCT
SEQ ID 70	ACCTTGAAGGACTTGAAG
SEQ ID 71	ACCTTGAAGGACTTGAAG
SEQ ID 72	CCTTGAAGGACTTGAAG
SEQ ID 73	AAATAGGCCTTGCCTTAGC
SEQ ID 74	AATAGGCCTTGCCTTAGC
SEQ ID 75	ATAGGCCTTGCCTAGCCC
SEQ ID 76	TAGGCCTTGCCTAGCCC
SEQ ID 77	ACACCCACTCCTGGTAGC
SEQ ID 78	CACCCCACTCCTGGTAGC
SEQ ID 79	CCCTCCAGCCCTGCTGTGT
SEQ ID 80	ACACGTCTCTGTCACT
SEQ ID 81	CACCTCTCTCTGTCACTT
SEQ ID 82	CTGGCAGTTCTGGAGCAA
SEQ ID 83	AGGAGATGAAACTCAAGGG
SEQ ID 84	GGAGATGAAACTCAAGGG
SEQ ID 85	ACTCAAGGGGGCTGATGGT
SEQ ID 86	CTCAAGGGGGCTGATGGT
SEQ ID 87	GGGGCTGATGGAAAACG
SEQ ID 88	AACGAAGATGCCACACCG
SEQ ID 89	ACGAAGATGCCACACCGC
SEQ ID 90	CGAAGATGCCACACCGCG
SEQ ID 91	GATGCCACACCGCGGGGA
SEQ ID 92	GGGCCAGGCAAACGCCACC
SEQ ID 93	CGCCACCCAGGATTCCAGCA
SEQ ID 94	AAACCCCGCCCGCTCCAAAG
SEQ ID 95	AAACCCCGCCCGCTCCAAAG

도면8b

SEQ ID 96	ACCCCGCCCGCTCCAAAGA	SEQ ID 129	ACCAGTTGACCTGAGCAAG
SEQ ID 97	CCCGGCCCGCTCCAAAGAC	SEQ ID 130	CCAGTTGACCTGAGCAAGG
SEQ ID 98	AGACACCACCCAGCTCTGG	SEQ ID 131	GGTACCCCTCCAAGTGTGGC
SEQ ID 99	GACACCAACCCAGCTCTGGT	SEQ ID 132	GTGTGGCTATTAGGCAAC
SEQ ID 100	CCTCCAAAATCAGGGATC	SEQ ID 133	CATCCATCATAAACAGGA
SEQ ID 101	AATCAGGGGATCGCAGCGG	SEQ ID 134	ACCAGGAGGTGGCCAGGTG
SEQ ID 102	ATCAGGGGATCGCAGCGG	SEQ ID 135	CCAGGAGGTGGCCAGGTG
SEQ ID 103	TCAGGGGATCGCAGCGG	SEQ ID 136	GTAAAATCTGAGAACGTTG
SEQ ID 104	CCCCACCCACCCGGGAGCC	SEQ ID 137	AATCTGAGAACGCTTGACTT
SEQ ID 105	GAAGGTGGCAGTGGTCCGT	SEQ ID 138	ATCTGAGAACGCTTGACTTC
SEQ ID 106	GGTGGCAGTGGTCCGTACT	SEQ ID 139	TCTGAGAACGCTTGACTTC
SEQ ID 107	GTCGCCGTCTCCGCCAAG	SEQ ID 140	GCTTGACTTCAAGGACAGA
SEQ ID 108	GAGCCGCCGTGAGACAGCC	SEQ ID 141	GGACAGAGTCCAGTCGAAG
SEQ ID 109	GAATGTCAAGTCCAAGATC	SEQ ID 142	GATTGGGTCCCTGGACAAT
SEQ ID 110	TGTCAGTCCAAGATCGGC	SEQ ID 143	TATCACCCACGTCCTGGC
SEQ ID 111	GTCAGATCGGCCACT	SEQ ID 144	ATAAAAAGATTGAAACCCA
SEQ ID 112	GATCGGCCACTGAGAAC	SEQ ID 145	AAAAAAGATTGAAACCCAC
SEQ ID 113	CCTGAAGCACCAAGCCGGG	SEQ ID 146	AAAGATTGAAACCCACAAG
SEQ ID 114	GCACCAAGCCGGGAGGCGGG	SEQ ID 147	AAGATTGAAACCCACAAGC
SEQ ID 115	GGTGCAGATAATTAAATAAG	SEQ ID 148	AGATTGAAACCCACAAGCT
SEQ ID 116	TTAATAAGAAGCTGGATCT	SEQ ID 149	GATTGAAACCCACAAGCTG
SEQ ID 117	TAAGAACGCTGGATCTTAGC	SEQ ID 150	ACCCACAAGCTGACCTTCC
SEQ ID 118	GAAGCTGGATCTTAGCAAC	SEQ ID 151	CCCACAAGCTGACCTTCC
SEQ ID 119	GCTGGATCTTAGCAACGTC	SEQ ID 152	GCTGACCTTCCCGCGAGAAC
SEQ ID 120	CGTCCAGTCCAAGTGTGGC	SEQ ID 153	CGCCAAAGCCAAGACAGAC
SEQ ID 121	GTGTGGCTCAAAGGATAAT	SEQ ID 154	AGCCAAGACAGACCCACGGG
SEQ ID 122	AGGATAATATCAAACACGT	SEQ ID 155	GCCAAGACAGACCCACGGGG
SEQ ID 123	GGATAATATCAAACACGT	SEQ ID 156	GACAGACCACGGGCGGGAG
SEQ ID 124	TATCAAACACGTCCCGGG	SEQ ID 157	GTCGCCAGTGGTGTCTGGG
SEQ ID 125	ACACGTCCCGGGAGGCGGC	SEQ ID 158	TGTCTCCCTCACCGGCAGC
SEQ ID 126	CACGTCCCGGGAGGCGGC	SEQ ID 159	TATTAACACGTCCCTGGGA
SEQ ID 127	ATAGTCTACAAACCAAGTTG	SEQ ID 160	ACGTCTCCATGGCATCTCA
SEQ ID 128	TAGTCTACAAACCAAGTTG		

도면8c

Microtubule associated protein tau 1 (MAPT)		SEQ ID 183	3'
	5' GUGAUGGAAGAACUGCGCUG 3'	5' CGACGACCAGUGCACUGGG 5'	3'
SEQ ID 161	3' CACUACCCUUCUAGUGCGGAC 5'	5' GAGCCGUAAGCUGGUAGG 3'	5'
	5' GAUCACCGCUGGGACCUAUG 3'	5' CUCGACAUUUUACCAUCC 5'	3'
SEQ ID 162	3' CUAGUGCGACCCUGCAUGC 5'	5' AGUUGUAAGCUGGUCCAGG 3'	5'
	5' GAUCAGGGGGCUACACC 3'	5' UCACCAUUCACCAAGGUCC 5'	3'
SEQ ID 163	3' UCUAGUGCCCGGCUAUGGG 5'	5' GUAGCGGGGCUACACC 3'	5'
	5' GACCAAGAGGGUGACACCG 3'	5' CACAUCCACCAAGGUCC 5'	3'
SEQ ID 164	3' CUAGUCCCCCGAUAUUGUA 5'	5' GCGGAGGAGGCUCCUGGU 5'	3'
	5' GACCAAGAGGGUGACACCG 3'	5' CGGAAAGGAGGAGGCUCCUGGU 5'	3'
SEQ ID 165	3' CUGGUUCUCCACUGUGCC 5'	5' GAGGGUGUGACACGGACCUU 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' GGUUCUCCCGAGGAGGCG 3'	3'
SEQ ID 166	3' CUCCACUGUGCCUGCGAC 5'	5' AGAAUUCUCCCCUUGACAGCC 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CGGUUCUCCCGAGGAGGCG 3'	3'
SEQ ID 167	3' UCUUAGAGGGGCAUCUGGG 5'	5' GAAUCUCCCCCUUGACAGCC 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CGGAAAGGAGGAGGAGGAG 3'	3'
SEQ ID 168	3' CUUAGAGGGGAGUCUGGG 5'	5' UCUCUCCUCUGACAGCCCCA 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CCUCUCCGCCCCUUGUUCU 5'	3'
SEQ ID 169	3' AGAGGGGAGCUGUUGGGGU 5'	5' CCCGGCUCUQGAACCCUCU 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' AGAAGGCCCGGGAGGAGA 3'	3'
SEQ ID 170	3' GGGCCGAGACUUJUGGAGAC 5'	5' ACCUCUGAUCUGAGACCA 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CCUCUCCACUGUGCC 3'	3'
SEQ ID 171	3' UGGAGACUUCGAAUUGCUU 5'	5' CCUCUGAUCUGUAAGACAC 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CGGAGGAGGAGGAGGAG 3'	3'
SEQ ID 172	3' GGAGACUACAGAACUUCGUU 5'	5' GAGCACUCCAAACAGCGGA 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' GACUCUCCUCCUCCUCAAGG 3'	3'
SEQ ID 173	3' CUCUGUAGGUUGUCCUU 5'	5' CAGGGAAAGAUUGUACACC 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CUGACGGGAGGGAGGUUCC 5'	3'
SEQ ID 174	3' GUCGCCUUCUACACUGUCG 5'	5' GAUGUGACAGCACCCUJGU 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' GGCACCCAGAACUCCAGGU 3'	3'
SEQ ID 175	3' CUACACUGUGGGGAAUC 5'	5' GCAGGCGUGCGCGCAGCCC 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CGGUGGUUCUAGGUCCGG 5'	3'
SEQ ID 176	3' CGUCCACAGCGCGCUCGGG 5'	5' GGAACACACAGCUGAGAAG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' AGUJUUCACAGAGAUCCCCA 3'	3'
SEQ ID 177	3' CCUUGGUUGUCAUCUUC 5'	5' CCACACCUUAGAAGCAGG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' UCAAAAGGUUCUUCJAGGGU 5'	3'
SEQ ID 178	3' GGUUCUCCACUUCUCCUC 5'	5' GAACACAGGCAUJUGSAGACA 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' GUTUCCACRAGAGAACCCAG 3'	3'
SEQ ID 179	3' CUUJGUCCUUAACCTJGU 5'	5' GCAGGCAUJUGGAGACACCC 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CAAAGGUUCUUCUAGGGGUUCC 5'	3'
SEQ ID 180	3' CGUUCGUUACCUUCUGUGG 5'	5' GACCAAGCUGUGUGUCCACC 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' AGGGCAAGGUUCGCCCCCUU 3'	3'
SEQ ID 181	3' CUGGUUCUAGCAGCACGGC 5'	5' GCUUCGUUAGCAGCACCC 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' UCCGGUUCUACCGGGGGAC 5'	3'
SEQ ID 182	3' GCUUCGUUAGCAGCACCC 5'	5' GCGCAGGAGUAGCCCCCUU 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CCCGUCCUACGGGGGAC 5'	3'
SEQ ID 183	3' GUGAUGGAAGAACUGCGCUG 3'	5' AUACACACCAAGUGCAGG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' UAGUGUGGUUGUACGCUU 5'	3'
SEQ ID 184	3' CACUACCCUUCUAGUGCGGAC 5'	5' UCACCAUUCACCAAGGUCC 5'	5'
	5' GAUCACCGCUGGGACCUAUG 3'	5' AGUGUGGUUGUACGCUU 5'	3'
SEQ ID 185	3' CUAGUGCGACCCUGCAUGC 5'	5' GUGGUAGGUCCAGGUCC 5'	5'
	5' AGAUCAGGGGGCUACACC 3'	5' CACAUCCACCAAGGUCC 5'	3'
SEQ ID 186	3' UCUAGUGCCCGGCUAUGGG 5'	5' GGGGUAGGUCCAGGUCC 5'	5'
	5' GACCAAGAGGGUGACACCG 3'	5' CCACACACCAAGUGCAGG 5'	3'
SEQ ID 187	3' CUAGUCCCCCGAUAUUGUA 5'	5' GCGUAGGAGGAGGUCC 5'	5'
	5' GACCAAGAGGGUGACACCG 3'	5' CCCUUCGCCCCUUGUUCU 5'	3'
SEQ ID 188	3' CUGGUUCUCCACUGUGCC 5'	5' GCAACAGGUUCUACAGGAG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CGGUUCUCCCGGGGGAC 3'	3'
SEQ ID 189	3' CUCCACUGUGCCUGCGAC 5'	5' GGGGGCAGGGGGCAACAG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CCCCGUCCCCCGUUIUCU 5'	3'
SEQ ID 190	3' UCUUAGAGGGGCAUCUGGG 5'	5' AGAAGGCCCGGGAGGAGA 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' UCUCUCCGGCCCCUCCUGU 5'	3'
SEQ ID 191	3' CUUAGAGGGGAGUCUGGG 5'	5' GAGAGGCCCGGGAGGAGA 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CUCUCGCCCCUCCUGUUCU 5'	3'
SEQ ID 192	3' AGAGGGGAGCUGUUGGGGU 5'	5' GACUCUCCUCCUCCUCAAGG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' GGAGAGGUUGGAJAGAGA 3'	3'
SEQ ID 193	3' CUCUCCUCCACUCCUCCUGU 5'	5' CCUCUCCACUCCUCCUCCAG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CCUCUCCACUCCUCCUCCAG 3'	3'
SEQ ID 194	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' GACUCUCCUCCUCCUCAAGG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CUGACGGGGAGGGAGGUUCC 5'	3'
SEQ ID 195	3' CUCUCCUCCACUCCUCCAG 3'	5' GGCUCUCCACAGGGGAAU 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CGGGAGGGUUCGGGGGUUCC 5'	3'
SEQ ID 196	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' GAGGGCGGAGCUCAGUAGU 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CUGGCCUCUACCUACUACA 5'	3'
SEQ ID 197	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' GACUCUCCUCCUCCUCAAGG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CUGACGGGGAGGGAGGUUCC 5'	3'
SEQ ID 198	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' AGUJUUCACAGAGAUCCCCA 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' UCAAAAGGUUCUUCJAGGGU 5'	3'
SEQ ID 199	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' GUTUCCACRAGAGAACCCAG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CGGUGGUUCUAGGUCCGG 5'	3'
SEQ ID 200	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' AGGGCAAGGUUCGCCCCCUU 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' UCCGGUUCUACCGGGGGAC 5'	3'
SEQ ID 201	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' GCGCAGGAGUAGCCCCCUU 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CCCGUCCUACGGGGGAC 5'	3'
SEQ ID 202	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' AUACACACCAAGUGCAGG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' UAGUGUGGUUGUACGCUU 5'	3'
SEQ ID 203	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' UCACCAUUCACCAAGGUCC 5'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' AGGGCAAGGUUCGCCCCCUU 3'	3'
SEQ ID 204	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' GUGUGGUUGUACGCUU 5'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CGACGACCAGUGCACUGGG 5'	3'
SEQ ID 205	3' CUCUCCGCCCCUCCUGUUCU 5'	5' GAGCCGUAAGCUGGUAGG 3'	5'
	5' CUGGUUCUCCACUGUGCC 3'	5' CUCGACAUUUUACCAUCC 5'	3'

도면8d

SEQ ID 206	5' GGAGCAGGCCACUCGGAG 3' 3' CCUCGUCCGCGUGAGCCUC 5'	SEQ ID 230	3' CUGUAGGUGUGCAAGGACA 5' 5' ACCUUUGAAAAAUAGGCCU 3' 3' UUGGAAACUUUUUUAUCGGCA 5'
SEQ ID 207	5' GGGCUGCAUUCAGGGGC 3' 3' CCCGACGUAAAAGGUCCCG 5' 5' AAGAGGCGACGUCCUCCAGA 3'	SEQ ID 231	5' ACCUUUGAAAAAUAGGCCU 3' 3' UGGAACUUUUUUAUCGGCA 5' 5' CCUUGAAAAAUAGGCCUUG 3'
SEQ ID 208	3' UUCUCGACUCCAGGUAGGUU 5' 5' AGAGGCGACGUCCUCCAGAG 3'	SEQ ID 232	3' GGAACUUUUUUAUCGGGAAC 5' 5' AAAUAGGCCUUGGCCUJAGC 3'
SEQ ID 209	3' UCUCCGACUGGAAAGGUUC 5' 5' GAGGCUGACUCCAGAGC 3'	SEQ ID 233	3' UUUAUCGGAAACGGAAUUCG 5' 5' AAUAGGCCUUGCCUUAAGCC 3'
SEQ ID 210	3' CUCCGACUGGAAAGGUUCG 5' 5' AAGCACCCUCUCUGUCUC 3'	SEQ ID 234	3' UUACCGGAAACGGAAUUCGG 5' 5' AUAGGCCUUGCCUAGCCC 3'
SEQ ID 211	3' UUCGUCGGACGACGACGAG 5' 5' AGCAGCCUUCGUCUGCUCC 3'	SEQ ID 235	3' UAUCCGGAAACGGAAUUCGG 5' 5' TAGGCCUUGCCUUAAGCCC 3'
SEQ ID 212	3' UCGUCGGACACAGCAGCAGG 5' 5' CCACCCUCUGGUCCUCUCG 3'	SEQ ID 236	3' AUCCGAAACGGAAUUCGGG 5' 5' ACACCCACUCUUCUGGUAGC 3'
SEQ ID 213	3' CGUCGAGACGACGGAGCC 5' 5' GCCCCUCAGCGACGGAGCC 3'	SEQ ID 237	3' UGLGGGGUGAGGACCAUCG 5' 5' CACCCACUCCUGGUAGCU 3'
SEQ ID 214	3' CGGGCAGUCGGCCAGGGG 5' 5' CUCAAAGCUCGCAUUGUCA 3'	SEQ ID 238	3' GUUGGGGUAGGAGACAUUGA 5' 5' CCCUCCAGCCCCUUGUGGU 3'
SEQ ID 215	3' GAGUUUCGACGUUACCCAGU 5' 5' AGCUCGCAUUGUCAUAAA 3'	SEQ ID 239	3' GGGAGGUCGGSACACACA 5' 5' ACACGUUCUUUCUUCUACU 3'
SEQ ID 216	3' UCCAGCCUACCAAGCUAUU 5' 5' GCUUCGCAUUGUCAUAAA 3'	SEQ ID 240	3' UGUUCAGAGAAAGACAGUGA 5' 5' CACGUUCUUCUUCUACUU 3'
SEQ ID 217	3' CGAGCCUACCAAGCUAUU 5' 5' AAGCAAAAGACGGGACUGGA 3'	SEQ ID 241	3' GUUGAGAGAGACAGUGAA 5' 5' CTGGCGAGUUUCUGGACAAA 3'
SEQ ID 218	3' UUCGUUUCUCCUGGUACCU 5' 5' AGCAAAGACGGGACUGGAA 3'	SEQ ID 242	3' GACCCGUCAAGACCUUCGUU 5' 5' AGGAGAUGAAAUCUCAAGCC 3'
SEQ ID 219	3' UCGUUUCUCCUGGUACCU 5' 5' GCAAAGACGGGACUGGAAG 3'	SEQ ID 243	3' UCCUCUACUUUCAGGUUCCC 5' 5' GGAGAUAGAAACUUCAGGG 3'
SEQ ID 220	3' CGUUCUUCGCGCUCGUACCU 5' 5' AGACCGGGACUGGAAGCGAU 3'	SEQ ID 244	3' CCCUUCUACUUUAGUUCCCC 5' 5' ACUCAAGGGGCGUGAUJGGU 3'
SEQ ID 221	3' UCUGGCCUACGUCCUUCGU 5' 5' GACGGGACUGGAAGCGAU 3'	SEQ ID 245	3' UGAGUUCCCGGAGACUACCA 5' 5' CUCUACGGGGCUGAGUQUA 3'
SEQ ID 222	3' CUCCGCGUACCCUUCGUAC 5' 5' GCGGAUGCAAAAAGCCAA 3'	SEQ ID 246	3' CAGUUCCCCGACUACCAU 5' 5' GGGGGCUGAGUJAAAACCG 3'
SEQ ID 223	3' CGCUACGUUUUUUCGGGU 5' 5' AAAACCCAAGACAUCCACA 3'	SEQ ID 247	3' CCCCCGACUACCAUUUJGC 5' 5' AACGAAGAUCCCAACACCG 3'
SEQ ID 224	3' UUUUCGGGUUCGUAGGUU 5' 5' AAGCCAAAGACACUCCACAC 3'	SEQ ID 248	3' UUGCUUCUAGCGGGUGGGC 5' 5' ACCGAAGAUUCGCCACACCC 3'
SEQ ID 225	3' UUUCGUUCGUAGGUUGUG 5' 5' AAGCCAAAGACACUCCACAGC 3'	SEQ ID 249	3' UGGCUUCUAGCGGUUGGGC 5' 5' CGAAGAUUCGCCACACCGCG 3'
SEQ ID 226	3' UUUCGGGUUCGUAGGUUGUC 5' 5' AGCCAAAGACACUCCACAGU 3'	SEQ ID 250	3' GCCUCUAGCGGGUGGGC 5' 5' GAUCGUCACACCGGGGG 3'
SEQ ID 227	3' UCGGUUCGUAGGUUGUGCA 5' 5' GCCAAGACACUCCACACGU 3'	SEQ ID 251	3' CUAGCGGUUGGUUGGGCC 5' 5' GGGCCAGGCCAACGCCACCC 3'
SEQ ID 228	3' CGGUUCGUAGGUUGUGCAA 5' 5' GACAUCCACACGUUCCUCU 3'	SEQ ID 252	3' CCCGGUCCGGUUGGGUGG 5'
SEQ ID 229			

도면8e

SEQ ID 253	5' CGCCACCAAGGAUUCAGCA 3' 3' GCGGUGGUCCUAGGUUCU 5' 5' AAACCCGCCGCUCCAAA 3'	SEQ ID 277	3' AAUUAUUCUUCGACCUAGA 5' 5' UAGAAGCUGGAGCUUAGC 3' 3' AUUCUUCGACCUAGAUUC 5' 5' GAAGCUGGAUCUANGCAAC 3' 3' CUUCGACCUUAGAAUCGUUG 5'
SEQ ID 254	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUU 5'	SEQ ID 278	5' AACCCCGCCCCGUCCAAAG 3' 3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' ACCCGCCGCGCUCCAAAGA 3'
SEQ ID 255	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' ACCCGCCGCGCUCCAAAGA 3'	SEQ ID 279	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' ACCCUAGNAUCCUUCGAG 3' 3' CCUCAGUCCAAAGUUCGGC 3'
SEQ ID 256	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' CCUCAGUCCAAAGUUCGGC 3'	SEQ ID 280	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' GAGGUCAGGUUCACACCG 3' 3' GUUGGGCUCAAGGAUAAA 3'
SEQ ID 257	3' GGGCGGGCGAGGUUUCUG 5' 5' ACACACCAACAGCUCUGG 3'	SEQ ID 281	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' ACACACCAACAGCUCUGG 3'
SEQ ID 258	3' UCUGUGGUUGGUUCGAGACC 5' 5' GACACACCCACGUUCUUGU 3'	SEQ ID 282	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' GAGAUAUAUACAAACAGCUC 3'
SEQ ID 259	3' CUGUGUGGGUGCGAGACC 5' 5' CCUCACAAACAGGGGAUC 3'	SEQ ID 283	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' CCUCACAAUAGUJUGUJUGCAG 5'
SEQ ID 260	3' GGAGGUUUAUAGCCUAG 5' 5' AAUCAGGGGAUCCAGCGG 3'	SEQ ID 284	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' ACACCUCCCGGGAGGGCGG 3'
SEQ ID 261	3' UUAGUCCCUUAGCUCGCGC 5' 5' AUCAACGGGAUCCAGCGC 3'	SEQ ID 285	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' CACGUCCCCGGAGGGCGGA 3'
SEQ ID 262	3' UAGUCCCCUAAGCUCGCG 5' 5' UCAGGGGAUCCAGCGCG 3'	SEQ ID 286	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' AUAGUCUACAAACAGUUG 3'
SEQ ID 263	3' AGUCCCCUAAGCUCGCG 5' 5' CCCCCACCCACCGGGAGCC 3'	SEQ ID 287	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' UACAGAGGUUUGGUUCAAC 5'
SEQ ID 264	3' GGGUGGGUGGGCCCCUUG 5' 5' GAAGGUUGCAUGGUUCGG 3'	SEQ ID 288	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' UAGCUUACAAACAGUUGA 3'
SEQ ID 265	3' CUUCCACCGUACCCAGCA 5' 5' GGUGGCGAGUGGUUCUACU 3'	SEQ ID 289	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' AUCAAGUJUGUJUGUJACU 5'
SEQ ID 266	3' CCACCGUACACAGCGAUG 5' 5' EUCCCGUUCUCCCGCCAG 3'	SEQ ID 290	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' ACCAGUJUGACUAGCAG 3'
SEQ ID 267	3' CAGCGCAGAAGCGCGUUC 5' 5' GAGCGCCUUCAGACAGCC 3'	SEQ ID 291	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' CCAGUUGACCUAGGCAAGC 3'
SEQ ID 268	3' CUCGGGGACGUUCUGUCCG 5' 5' GAAUGUCAAGUCCAGAUC 3'	SEQ ID 292	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' GUUCAACUCCACUUCUUC 5'
SEQ ID 269	3' CUUACAGUUCAGUUCUAC 5' 5' UGUCAAGUCCAAAGUOUC 3'	SEQ ID 293	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' GUAGOUAGUAAUJUGGUUCU 5'
SEQ ID 270	3' ACAGUUCAGGUUCUAGCCG 5' 5' GUCCAAGAUCGGCUCCACU 3'	SEQ ID 294	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' ACCAGAGGUUGGCCAGGUUG 3'
SEQ ID 271	3' CAGGUUCUAGCGGAGGUUC 5' 5' GAUCGGCUCCACUQGAAC 3'	SEQ ID 295	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' GUAAAUCUGAGAACGUUG 3'
SEQ ID 272	3' CUAGCCAGGUACUCUUCG 5' 5' CCUGAAGCACCAGCGGGGA 3'	SEQ ID 296	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' CAUUUUAGACUUCUUCGAC 5'
SEQ ID 273	3' GGACUUCUGGUUCGUCGG 5' 5' CCACCAAGCGGGAGGCCCG 3'	SEQ ID 297	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' AAUCUGAGAACGUUCACU 3'
SEQ ID 274	3' CGUGUGGCCCUUCCGGCC 5' 5' GGUGCGAGUUAUUAUJAG 3'	SEQ ID 298	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' UACUGAGAACGUUCACUUC 3'
SEQ ID 275	3' CCACGUCAUUAUUAUACU 5' 5' UUAAAAGAACGUUGAACU 3'	SEQ ID 299	3' UUUGGGCGGGCGAGGUUUC 5' 5' AGACUCUUCGAAUCUGAGU 5'
SEQ ID 276			

도면8f

SEQ ID 300	5' GCUUAGACUUCAAGGACAGA 3' 3' CGAACUGAAGUCCUGUCU 5' 5' GGACAGAGUCCAGUCGAG 3' 	SEQ ID 310	5' ACCCACAAAGCUGACCUCC 3' 3' UGGGUUUCUGACUGGAAGG 5' 5' CCCACAACCUGACCUUCGG 3'
SEQ ID 301	3' CCGUCUCAGGUCCAGCUUC 5' 5' GAUUGGGUCCUGACRAU 3' 	SEQ ID 311	3' GGGGUUUCGACUGGAAGGC 5' 5' CCUGACCUUCGGCGAGAAC 3'
SEQ ID 302	3' CUAAACCCAGGGACCUGUUA 5' 	SEQ ID 312	3' CGACUGGAAGGCUCUUG 5' 5' CGCCAAAGCCAAGACAGAC 3'
SEQ ID 303	5' UAUCACCCACGUCCUUGC 3' 3' AUAGUGGGUGCAGGAGCG 5' 5' AUAAAAGAUUGAAACCCA 3' 	SEQ ID 313	3' CGGGGUUUCGGUUCUUCUG 5' 5' AGCCAGACAGACACACGGC 3'
SEQ ID 304	3' UAUUUUUCUACAUUUGGGU 5' 5' UAAAAAGAUJUGAACCCAA 3' 	SEQ ID 314	3' UCCGUUCUGUCUGUGGCC 5' 5' GCCAAGACAGACTCACGGGG 3'
SEQ ID 305	3' AUUUUUCUACUUUGGGUG 5' 5' AAACAUUUGAAACCCACAAG 3' 	SEQ ID 315	3' CGGUUCUGUCUGGUCCCC 5' 5' GACAGACCAAGGGCGCGAG 3'
SEQ ID 306	3' UUUCUAACTUUUGGGUGUUC 5' 5' AAGAUUGAAACCCACAAGC 3' 	SEQ ID 316	3' CGUCUUGGUUCCCGCCUC 5' 5' GUUGCCAGUGUGUUCUGGG 3'
SEQ ID 307	3' UUCUAACTUUUGGGUGUUC 5' 5' AGAUUUGAAACCCACAAGCU 3' 	SEQ ID 317	3' CAGCGUCACACAGACGCC 5' 5' UGUCUUCUACACCGGCCAGC 3'
SEQ ID 308	3' UCUAACUUUUGGGUGUCCA 5' 5' GAUUGAAACCCACAAGCUG 3' 	SEQ ID 318	3' ACACAGGAGGUGGCCGUCG 5'
SEQ ID 309	3' CUAACTUUUGGGUGUUCGA 5'		

서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Sylentis S.A.

<120> Treatment of CNS conditions

<130> WPP290637

<140> PCT/GB2007/050128

<141> 2007-03-16

<150> GB0605337

<151> 2006-03-17

<160> 318

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 1
gtgatggaag atcacgctg 19

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 2
gatcacgctg ggacgtacg 19

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 3
agatcagggg ggctacacc 19

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 4

gatcaggggg gctacacca

19

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 5
 gaccaagagg gtgacacgg

19

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 6
 gagggtgaca cggacgctg

19

<210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 7
 agaatctccc ctgcagacc

19

<210> 8

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 8
 gaatctcccc tgccagaccc 19

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 9
 tctccctgc agacccca 19

<210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 10
 ccgggctctg aaacctctg 19

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 11
 acctctgatg ctaagagca 19

<210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 12
 cctctgatgc taagagcac 19

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 13
 gagcactcca acagcgaa 19

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 14
cagcggaga tgtgacagc

19

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 15
gatgtgacag cacccttag

19

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 16
gcaggctgcc gcgcagccc

19

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 17

ggaaccacag ctgaagaag

19

<210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 18
 ccacagctga agaaggcagg

19

<210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 19
 gaagcaggca ttggagaca

19

<210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 20
 gcaggcattg gagacaccc

19

<210> 21

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 21
 gacgaagctg ctggcacg 19

<210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 gctgctggtc acgtgaccc 19

<210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 23
 gagcctgaaa gtggtaagg 19

<210> 24
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 24
agt ggt aagg tgg tccagg

19

<210> 25
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 25
gtggtaaggt ggtccagga

19

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 26
ggtggtccag gaaggctc

19

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 27
ggcttcctcc gagagccag

19

<210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 28
 ccttcgggga caggacctg 19

<210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 29
 gcaccagctt ctaggagac 19

<210> 30
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 30
 gggggcaggg ggcaaagag 19

<210> 31
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 31
 agagaggccg gggagcaag 19

<210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 32
 gagaggccgg ggagcaagg 19

<210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 33
 ggaggaggtg gatgaagac 19

<210> 34
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 34
gaccgcgacg tcgatgagt

19

<210> 35
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 35
gactccctc cctccaagg

19

<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 36
ggcctccca gccaaagat

19

<210> 37
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 37

gatggcgcc ctccccaga

19

<210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 38
 gccaccagca tcccaggct

19

<210> 39
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 39
 agtttccaca gagatccca

19

<210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 40
 gtttccacag agatccag

19

<210> 41

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 41
 agggcaggat gcccccctg 19

<210> 42
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 42
 gggcaggatg ccccccctgg 19

<210> 43
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 43
 atcacaccca acgtgcaga 19

<210> 44
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 44
 tcacacccaa cgtgcagaa 19

<210> 45
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 45
 cgtgcagaag gagcaggcg 19

<210> 46
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 46
 ggagcaggcg cactcgag 19

<210> 47
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 47
gggctgcatt tccagggc

19

<210> 48
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 48
aagaggctga ccttccaga

19

<210> 49
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 49
agaggctgac ctccagag

19

<210> 50
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 50

gaggctgacc ttccagagc

19

<210> 51
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 51
 aagcagcctg ctgctgctc

19

<210> 52
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 52
 agcagcctgc tgctgctcc

19

<210> 53
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 53
 gcagcctgct gctgctccg

19

<210> 54

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 54
 gccccgtcagc cgggtccct 19

<210> 55
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 55
 ctcaaagctc gcatggtca 19

<210> 56
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 56
 agctcgcattg gtcatgtaaa 19

<210> 57
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 57
 gctcgcatgg tcagtaaaa 19

<210> 58
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 58
 aagcaaagac gggactgga 19

<210> 59
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 59
 agcaaagacg ggactggaa 19

<210> 60
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 60
gcaaagacgg gact ggaag

19

<210> 61
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 61
agacgggact ggaagcgat

19

<210> 62
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 62
gacgggactg gaagcgatg

19

<210> 63
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 63

gcgatgacaa aaaagccaa

19

<210> 64
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 64
 aaaagccaag acatccaca

19

<210> 65
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 65
 aaagccaaga catccacac

19

<210> 66
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 66
 aagccaagac atccacacg

19

<210> 67

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 67
 agccaagaca tccacacgt 19

<210> 68
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 68
 gccaagacat ccacacgtt 19

<210> 69
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 69
 gacatccaca cgttcctct 19

<210> 70
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 70
 aaccttgaaa aataggcct 19

<210> 71
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 71
 accttgaaaa ataggcctt 19

<210> 72
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 72
 ccttgaaaaa taggcctt 19

<210> 73
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 73
aaataggcct tgccttagc

19

<210> 74
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 74
aataggcctt gccttagcc

19

<210> 75
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 75
ataggccttg ccttagccc

19

<210> 76
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 76

taggccttgc cttagcccc

19

<210> 77
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 77
 acaccccaact cctggtagc

19

<210> 78
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 78
 caccccaactc ctggtagct

19

<210> 79
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 79
 ccctccagcc ctgctgtgt

19

<210> 80

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 80
 acacgtctct tctgtcact 19

<210> 81
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 81
 cacgtctctt ctgtcactt 19

<210> 82
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 82
 ctggcagttc tggagcaaa 19

<210> 83
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 83
 aggagatgaa actcaaggg 19

<210> 84
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 84
 ggagatgaaa ctcgggg 19

<210> 85
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 85
 actcaagggg gctgtatgg 19

<210> 86
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 86
ctcaaggggg ctgatggta

19

<210> 87
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 87
gggggctgat ggtaaaacg

19

<210> 88
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 88
aacgaagatc gccacacccg

19

<210> 89
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 89

acgaagatcg ccacaccgc

19

<210> 90
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 90
 cgaagatcgcc cacaccgcg

19

<210> 91
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 91
 gatcgccaca ccgcgggga

19

<210> 92
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 92
 gggccaggcc aacgccacc

19

<210> 93

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 93
 cgccaccagg attccagca 19

<210> 94
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 94
 aaacccggcc cgctccaaa 19

<210> 95
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 95
 aacccggccc gctccaaag 19

<210> 96
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 96
accccgccccg ctccaaaga

19

<210> 97
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 97
ccccggccgc tccaaagac

19

<210> 98
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 98
agacaccacc cagctctgg

19

<210> 99
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 99
gacaccaccc agctctgg

19

<210> 100
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 100
 cctccaaat cagggatc 19

<210> 101
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 101
 aatcagggga tcgcagcgg 19

<210> 102
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 102
 atcagggat cgcagcggc 19

<210> 103
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 103
 tcagggatc gcagcgct 19

<210> 104
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 104
 ccccacccac ccgggagcc 19

<210> 105
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 105
 gaaggtggca gtggtccgt 19

<210> 106
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 106
gttggcagtg gtccgtact

19

<210> 107
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 107
gtcgccgtct tccgccaag

19

<210> 108
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 108
gagccgcctg cagacagcc

19

<210> 109
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 109

gaatgtcaag tccaagatc

19

<210> 110
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 110
 tgtcaagtcc aagatcggc

19

<210> 111
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 111
 gtccaagatc ggctccact

19

<210> 112
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 112
 gatcggtcc actgagaac

19

<210> 113

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 113
 cctgaagcac cagccggga 19

<210> 114
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 114
 gcaccagccg ggaggcggg 19

<210> 115
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 115
 ggtcagata attataag 19

<210> 116
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 116
 ttaataagaa gctggatct 19

<210> 117
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 117
 taagaagctg gatcttagc 19

<210> 118
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 118
 gaagctggat cttagcaac 19

<210> 119
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 119
gctggatctt agcaacgtc

19

<210> 120
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 120
cgtccagtc aagtgtggc

19

<210> 121
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 121
gtgtggctca aaggataat

19

<210> 122
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 122

aggataatat caaacacgt

19

<210> 123
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 123
 ggataatatc aaacacgtc

19

<210> 124
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 124
 tatcaaacac gtcccgga

19

<210> 125
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 125
 acacgtcccg ggaggcggc

19

<210> 126

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 126
 cacgtccgg gaggcggca 19

<210> 127
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 127
 atagtctaca aaccagttg 19

<210> 128
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 128
 tagtctacaa accagttga 19

<210> 129
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 129
 accagttgac ctgagcaag 19

<210> 130
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 130
 ccagttgacc tgagcaagg 19

<210> 131
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 131
 ggtgacacctcc aagtgtggc 19

<210> 132
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 132
gtgtggctca ttaggcaac

19

<210> 133
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 133
catccatcat aaaccagga

19

<210> 134
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 134
accaggaggt gcccaggtg

19

<210> 135
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 135

ccaggaggtg gccagggtgg

19

<210> 136
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 136
 gtaaaaatctg agaagcttg

19

<210> 137
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MPAT

<400> 137
 aatctgagaa gcttgactt

19

<210> 138
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 138
 atctgagaag cttgacttc

19

<210> 139

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 139
 tctgagaagg ttgacttca 19

<210> 140
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 140
 gcttgacttc aaggacaga 19

<210> 141
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 141
 ggacagagtc c agtcgaag 19

<210> 142
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 142
 gattgggtcc ctggacaat 19

<210> 143
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 143
 tatcacccac gtccctggc 19

<210> 144
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 144
 ataaaaagat tgaaaccca 19

<210> 145
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 145
taaaaagatt gaaacccac

19

<210> 146
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 146
aaagattgaa acccacaag

19

<210> 147
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 147
aagattgaaa cccacaagc

19

<210> 148
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT

<400> 148

agattgaaac ccacaagct

19

<210> 149
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 149
 gattgaaacc cacaagctg

19

<210> 150
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 150
 acccacaaggc tgaccttcc

19

<210> 151
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 151
 cccacaaggc gacccctccg

19

<210> 152

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 152
 gctgacccttc cgcgagaac 19

<210> 153
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 153
 cgccaaagcc aagacagac 19

<210> 154
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 154
 agccaagaca gaccacggg 19

<210> 155
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 155
 gccaaagacag accacgggg 19

<210> 156
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 156
 gacagaccac gggcgagg 19

<210> 157
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAPT

<400> 157
 gtcgccagtg gtgtctgg 19

<210> 158
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> MAPT

<400> 158
tgtctccccc accggcagc

19

<210> 159
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 159
tattaaacac gtccctggga

19

<210> 160
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> MAPT<400> 160
acgtctccat ggcatactca

19

<210> 161
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 161

gugauggaag aucacgcug

19

<210> 162
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 162
 gaucacgcug ggacguacg

19

<210> 163
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 163
 gaucacgcug ggacguacg

19

<210> 164
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 164
 cuagcccccc cgauguggua

20

<210> 165

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 165
 gaccaagagg gugacacgg 19

<210> 166
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 166
 gagggugaca cggacgcug 19

<210> 167
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 167
 agaaucucc cugcagacc 19

<210> 168
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 168
 gaaucucccc ugcagaccc 19

<210> 169
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 169
 ucuccccugc agacccca 19

<210> 170
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 170
 ccggcucug aaaccucug 19

<210> 171
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 171
 accucugau g cuaaaggca 19

<210> 172
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 172
 ccucugaugc uaagagcac 19

<210> 173
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 173
 gagcacucca acagcggaa 19

<210> 174
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 174
 cagcggaga ugugacagc 19

<210> 175
 <211> 19
 <212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 175

gcaggcugcc gcgcagccc

19

<210> 176

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 176

ggaaccacag cugaagaag

19

<210> 177

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 177

ccacagcuga agaaggcagg

19

<210> 178

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 178
 gaagcaggca uuggagaca 19

<210> 179
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 179
 gcaggcauug gagacaccc 19

<210> 180
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 180
 gacgaagcug cuggucacg 19

<210> 181
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 181

gacgaagcug cuggucacg

19

<210> 182
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 182
 gcugcugguc acgugaccc

19

<210> 183
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 183
 gagccugaaa gugguaagg

19

<210> 184
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 184
 agugguaagg ugguccagg

19

<210> 185

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 185
 gugguaaggu gguccagga 19

<210> 186
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 186
 ggugguccag gaaggcuuc 19

<210> 187
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 187
 ggcuuccucc gagagccag 19

<210> 188
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 188
 ccuucgggga caggaccug 19

<210> 189
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 189
 gcaccagcuu cuaggagac 19

<210> 190
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 190
 ggggcaggg ggcaaagag 19

<210> 191
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 191
agagaggccg gggagcaag

19

<210> 192
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 192
gagaggcccg ggagcaagg

19

<210> 193
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 193
ggaggaggug gaugaagac

19

<210> 194
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 194

gaccgcgacg ucgaugagu

19

<210> 195
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 195
 gacuccccuc ccuccaagg

19

<210> 196
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 196
 ggccuccccca gcccaagau

19

<210> 197
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 197
 gaugggcgac cuccccaga

19

<210> 198

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 198
 gccaccagca ucccaggcu 19

<210> 199
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 199
 aguuuccaca gagauccca 19

<210> 200
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 200
 guuuccacag agauccag 19

<210> 201
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 201
 agggcaggau gcccccug 19

<210> 202
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 202
 gggcaggaug ccccccugg 19

<210> 203
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 203
 aucacaccca acgugcaga 19

<210> 204
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 204
ucacacccaa cgugcagaa

19

<210> 205
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 205
cgugcagaag gagcaggcg

19

<210> 206
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 206
ggagcaggcg cacucggag

19

<210> 207
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 207

gggcugcauu uccagggc

19

<210> 208
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 208
 aagaggcuga ccuuccaga

19

<210> 209
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 209
 agaggcugac cuuccagag

19

<210> 210
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 210
 gaggcugacc uuccagagc

19

<210> 211

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 211
 aagcagccug cugcugcuc 19

<210> 212
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 212
 agcagccugc ugcugcucc 19

<210> 213
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 213
 gcagccugcu gcugcuccg 19

<210> 214
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 214
 gccccguacgc cgguccu 19

<210> 215
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 215
 cucaaaggcuc gcaugguca 19

<210> 216
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 216
 agcucgcuaug gucaguaaa 19

<210> 217
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 217
gcucgcaugg ucaguaaaa

19

<210> 218
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 218
aagcaaagac gggacugga 19

<210> 219
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 219
agcaaagacg ggacuggaa 19

<210> 220
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 220

gcaaagacgg gacuggaag

19

<210> 221
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 221
 agacgggacu ggaagcgau

19

<210> 222
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 222
 gacgggacug gaagcgaug

19

<210> 223
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 223
 gcgaugacaa aaaagccaa

19

<210> 224

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 224
 aaaagccaag acauccaca 19

<210> 225
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 225
 aaagccaaga cauccacac 19

<210> 226
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 226
 aagccaagac auccacacg 19

<210> 227
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 227
 agccaagaca uccacacgu 19

<210> 228
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 228
 gccaagacau ccacacguu 19

<210> 229
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 229
 gacauccaca cguuccucu 19

<210> 230
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 230

aaccuugaaa aauaggccu

19

<210> 231

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 231

accuugaaaa auaggccuu

19

<210> 232

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 232

ccuugaaaaa uaggccuug

19

<210> 233

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 233

aaauaggccu ugccuuagc

19

<210> 234
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 234
 aauaggccuu gccuuagcc

19

<210> 235
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 235
 auaggccuug ccuuagccc

19

<210> 236
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 236
 uagggccuugc cuuagcccc

19

<210> 237

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 237
 acaccccacu ccugguagc 19

<210> 238
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 238
 caccccacuc cugguagcu 19

<210> 239
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 239
 cccuccagcc cugcugugu 19

<210> 240
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 240
 acacgucucu ucugucacu 19

<210> 241
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 241
 cacgucucuu cugucacuu 19

<210> 242
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 242
 cuggcaguuc uggagcaaa 19

<210> 243
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 243
aggagaugaa acucaaggaa

19

<210> 244
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 244
ggagaugaaa cucaaggaa

19

<210> 245
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 245
acucaaggaa gcugauuu

19

<210> 246
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 246

cucaaggggg cugauggua

19

<210> 247
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 247
 gggggcugau gguaaaacg

19

<210> 248
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 248
 aacgaagauc gccacacccg

19

<210> 249
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 249
 acgaagaucg ccacacccg

19

<210> 250

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 250
 cgaagaucgc cacaccgca 19

<210> 251
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 251
 gaucgccaca ccgcgggga 19

<210> 252
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 252
 gggccaggcc aacgccacc 19

<210> 253
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 253
 cgccaccagg auuccagca 19

<210> 254
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 254
 aaaccccgcc cgcucaa 19

<210> 255
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 255
 aaccccgccc gcuccaa 19

<210> 256
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 256

accccgcccg cuccaaaga

19

<210> 257

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 257

ccccggccgc uc当地aagac

19

<210> 258

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 258

agacaccacc cagcucugg

19

<210> 259

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 259

gacaccaccc agcucuggu

19

<210> 260
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 260
 ccuccaaau caggggauc

19

<210> 261
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 261
 aaucagggga ucgcagcgg

19

<210> 262
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 262
 aucaggggau cgcagcggc

19

<210> 263

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 263
 ucaggggauc gcagcggcu 19

<210> 264
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 264
 ccccacccac ccgggagcc 19

<210> 265
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 265
 gaagguggca gugguccgu 19

<210> 266
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 266
 gguggcagug guccguacu 19

<210> 267
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 267
 gucccgugu uccgccaag 19

<210> 268
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 268
 gagccgcccug cagacagcc 19

<210> 269
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 269
gaaugucaag uc当地gauc

19

<210> 270
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 270
ugucaagucc aagaucggc

19

<210> 271
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 271
guccaagauc ggcuccacu

19

<210> 272
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 272

gaucggcucc acugagaac

19

<210> 273
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 273
 ccugaaggcac cagccggga

19

<210> 274
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 274
 gcaccagccg ggaggcggg

19

<210> 275
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 275
 ggugcagaua auuaauaag

19

<210> 276

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 276
 uuaauaagaa gcuggauca 19

<210> 277
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 277
 uaagaagcug gaucuuagc 19

<210> 278
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 278
 gaagcuggau cuuagcaac 19

<210> 279
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 279
 gcuggaucuu agcaacguc 19

<210> 280
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 280
 cguccagucc aaguguggc 19

<210> 281
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 281
 guguggcuca aaggauau 19

<210> 282
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 282

aggauauau caaacacgu

19

<210> 283

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 283

ggauauauac aaacacguc

19

<210> 284

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 284

uaucaaacac guccggga

19

<210> 285

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 285

acacgucccg ggaggcggc

19

<210> 286
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 286
 cacgucccg gaggcggca

19

<210> 287
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 287
 auagucuaca aaccaguug

19

<210> 288
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 288
 uagucuacaa accaguuga

19

<210> 289

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 289
 accaguugac cugagcaag 19

<210> 290
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 290
 ccaguugacc ugagcaagg 19

<210> 291
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 291
 ggugaccucc aaguguggc 19

<210> 292
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 292
 guguggcuca uuaggcaac 19

<210> 293
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 293
 cauccauau aaaccagga 19

<210> 294
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 294
 accaggaggu ggccaggug 19

<210> 295
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 295

ccagggaggug gccaggugg

19

<210> 296

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 296

guaaaaaucug agaagcuug

19

<210> 297

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 297

aaucugagaa gcuugacuu

19

<210> 298

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 298

aucugagaag cuugacuuc

19

<210> 299
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 299
 ucugagaagc uugacuca

19

<210> 300
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 300
 gcuugacuuc aaggacaga

19

<210> 301
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 301
 ggacagaguc cagucgaag

19

<210> 302

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 302
 gauugggucc cuggacaaau 19

<210> 303
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 303
 uaucacccac guccuggc 19

<210> 304
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 304
 auaaaaagau ugaaacca 19

<210> 305
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 305
 uaaaaagauu gaaacccac 19

<210> 306
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 306
 aaagauugaa acccacaag 19

<210> 307
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 307
 aagauugaaa cccacaagc 19

<210> 308
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 308

agauugaaac ccacaagcu

19

<210> 309

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 309

gauugaaacc cacaaggcug

19

<210> 310

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 310

acccacaaggc ugaccuuucc

19

<210> 311

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 311

cccacacaaggc gaccuuccg

19

<210> 312
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 312
 gcugaccuuc cgcgagaac

19

<210> 313
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 313
 cgccaaagcc aagacagac

19

<210> 314
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 314
 agccaaggaca gaccacggg

19

<210> 315

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 315
 gccaagacag accacgggg 19

<210> 316
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 316
 gacagaccac gggcgagg 19

<210> 317
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 317
 guccgcagug gugucuggg 19

<210> 318
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> RNAi, 5'-3' strand of double stranded molecule

<400> 318
ugucuccucc accggcagc 19