



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0026739
(43) 공개일자 2018년03월13일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/713 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7003163</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년07월06일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년02월01일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/041095</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2017/007813
국제공개일자 2017년01월12일</p> <p>(30) 우선권주장
62/189,050 2015년07월06일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
알엑스아이 파마슈티칼스 코포레이션
미국 01752 매사추세츠주 말보로 스위트 101 시마
라노 드라이브 257</p> <p>(72) 발명자
카디아, 제임스
미국 02038 매사추세츠주 프랭클린 베이콘 스트리트 11
바이른, 마이클
미국 01760 매사추세츠주 나틱 로커 스트리트 8
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 김영</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 26 항

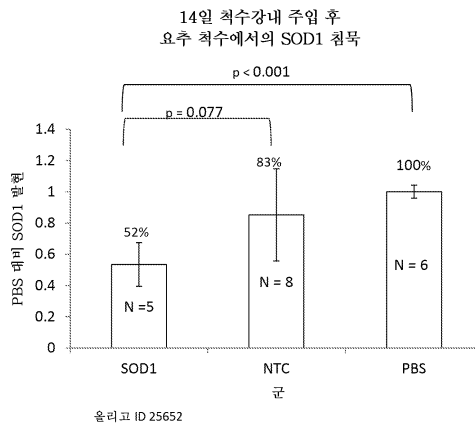
(54) 발명의 명칭 **슈퍼옥시드 디스뮤타제 1 (SOD1)을 표적화하는 핵산 분자**

(57) 요약

본 발명의 측면은 ALS의 치료를 필요로 하는 대상체에게 슈퍼옥시드 디스뮤타제 1 (SOD1)을 코딩하는 유전자에 대해 지시된 핵산 분자의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, ALS를 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도6

정상 마우스에서의 SOD1 표적화 sd-rxRNA의 14-일 척수강내 주입 후 SOD1 mRNA의 감소



(52) CPC특허분류

C12Y 115/01001 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

(72) 발명자

블록, 카렌, 지.

미국 01756 매사추세츠주 멘든 파크 스트리트 44

파브코, 파멜라, 에이.

미국 80504 콜로라도주 롱몬트 플라토 로드 822

리버틴, 린

미국 01701 매사추세츠주 프레이밍햄 너슨 로드 61

명세서

청구범위

청구항 1

가이드 가닥 및 패신저 가닥을 포함하는 슈퍼옥시드 디스뮤타제 1 (SOD1)에 대해 지시된 단리된 이중 가닥 핵산 분자이며, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 이중 가닥 영역 및 단일 가닥 영역을 포함하고, 여기서 이중 가닥인 분자의 영역은 8-15개의 뉴클레오티드 길이이고, 여기서 가이드 가닥은 2-14개의 뉴클레오티드 길이인 단일 가닥 영역을 함유하고, 여기서 가이드 가닥은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 패신저 가닥은 8 내지 15개의 뉴클레오티드 길이이고, 여기서 패신저 가닥은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 뉴클레오티드 중 적어도 40%는 변형되고, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 표 1-8에 제공된 변형 패턴을 포함하는 표 1-8 내의 서열로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 뉴클레오티드 중 적어도 60%가 변형된 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 변형된 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 뉴클레오티드 중 적어도 1개가 2'-메틸 또는 2'-플루오로 변형을 포함하는 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 적어도 1개의 가닥이 완전히 포스포로티오에이트화되거나, 또는 1개의 잔기를 제외하고 완전히 포스포로티오에이트화된 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 U 및/또는 C가 메틸, 이소부틸, 옥틸, 이미다졸 또는 티오펜으로 이루어진 군으로부터 선택된 소수성 변형을 포함하고, 여기서 변형은 U 및/또는 C의 위치 4 또는 5에 위치하는 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 6

표 1-8 내의 서열로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 단리된 이중 가닥 핵산 분자이며, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자가 표 2의 서열식별번호: 70, 71, 72, 73, 79, 80, 81 또는 84로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 경우에 가이드 가닥은 6개 초과 포스포로티오에이트 변형을 함유하는 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자에 부착된 소수성 접합체를 추가로 포함하는, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 32 또는 서열식별번호: 122를 포함하고, 가이드 가닥이 서열식별번호: 61, 서열식별번호: 91 또는 서열식별번호: 123을 포함하는 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 34 또는 서열식별번호: 126을 포함하고, 가이드 가닥이 서열식별번호: 63 또는 서열식별번호: 93을 포함하는 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 38 또는 서열식별번호: 135를 포함하고, 가이드 가닥이 서열식별번호: 68, 서열식별번호: 97 또는 서열식별번호: 136을 포함하는 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 10 또는 서열식별번호: 39를 포함하고, 가이드 가닥이 서열식별번호: 69 또는 서열식별번호: 98을 포함하는 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 127 또는 서열식별번호: 137을 포함하고, 가이드 가닥이 서열식별번호: 64, 서열식별번호: 128 또는 서열식별번호: 138을 포함하는 것인, 단리된 이중 가닥 핵산 분자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 단리된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하는 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 제2 치료제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 16

ALS의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 단리된 이중 가닥 핵산 분자 또는 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, ALS를 치료하는 방법.

청구항 17

ALS의 치료를 필요로 하는 대상체에게 가이드 가닥 및 패신저 가닥을 포함하는 슈퍼옥시드 디스뮤타제 1 (SOD 1)에 대해 지시된 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, ALS를 치료하는 방법이며, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 이중 가닥 영역 및 단일 가닥 영역을 포함하고, 여기서 이중 가닥 인 분자의 영역은 8-15개의 뉴클레오티드 길이이고, 여기서 가이드 가닥은 2-14개의 뉴클레오티드 길이인 단일 가닥 영역을 함유하고, 여기서 가이드 가닥은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 패신저 가닥은 8 내지 15개의 뉴클레오티드 길이이고, 여기서 패신저 가닥은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 뉴클레오티드 중 적어도 40%는 변형되고, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 표 1-8에 제공된 변형 패턴을 포함하는 표 1-8 내의 서열로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 것인, ALS를 치료하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자가 단리된 이중 가닥 핵산 분자에 부착된 소수성 집합체를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 적어도 1개의 가닥이 완전히 포스포로티오에이트

화되거나, 또는 1개의 잔기를 제외하고 완전히 포스포로티오에이트화된 것인 방법.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자가 중추 신경계에의 전달을 위해 제제화된 것인 방법.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 센스 가닥이 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 32 또는 서열식별번호: 122를 포함하고, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 가이드 가닥이 서열식별번호: 61, 서열식별번호: 91 또는 서열식별번호: 123을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 센스 가닥이 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 34 또는 서열식별번호: 126을 포함하고, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 가이드 가닥이 서열식별번호: 63 또는 서열식별번호: 93을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 센스 가닥이 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 38 또는 서열식별번호: 135를 포함하고, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 가이드 가닥이 서열식별번호: 68, 서열식별번호: 97 또는 서열식별번호: 136을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 센스 가닥이 서열식별번호: 10 또는 서열식별번호: 39를 포함하고, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 가이드 가닥이 서열식별번호: 69 또는 서열식별번호: 98을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산의 센스 가닥이 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 127 또는 서열식별번호: 137을 포함하고, 단리된 이중 가닥 핵산의 가이드 가닥이 서열식별번호: 64, 서열식별번호: 128 또는 서열식별번호: 138을 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제17항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자가 척수강내 주입 및/또는 주사를 통해 투여되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2015년 7월 6일에 출원된 표제 "NUCLEIC ACID MOLECULES TARGETING SUPEROXIDE DISMUTASE 1 (SOD1)"의 미국 가출원 일련 번호 62/189,050의 이익을 주장하며, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 발명의 분야
- [0004] 개시내용은, 적어도 부분적으로, 신경계 장애 예컨대 근위축성 측삭 경화증 (ALS)의 치료를 위한, SOD1을 표적화하는 개선된 생체내 전달 특성을 갖는 핵산 분자의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 상보적 올리고뉴클레오타이드 서열은 유망한 치료제이며, 유전자 기능을 규명하는데 있어서 유용한 연구

도구이다. 그러나, 선행 기술의 올리고뉴클레오타이드 분자는 그의 임상 개발을 저해할 수 있는 여러 문제를 겪고 있고, 이는 빈번하게는 이러한 조성물을 사용하여 생체내에서 유전자 발현 (단백질 합성 포함)의 의도하는 효율적 억제를 달성하는 것을 어렵게 한다.

[0006] 주요 문제는 이들 화합물의 세포 및 조직으로의 전달이다. 통상적인 이중-가닥 RNAi 화합물, 19-29개의 염기 길이는 대략 1.5×10^{-15} nm 크기의 고도로 음으로-하전된 견고한 나선을 형성한다. 이러한 막대형 분자는 세포막을 통과할 수 없으며, 그 결과 시험관내 및 생체내 둘 다에서 매우 제한된 효능을 갖는다. 그 결과, 모든 통상적인 RNAi 화합물은 그의 조직 분포 및 세포 흡수를 촉진하는 일부 종류의 전달 비히클을 필요로 한다. 이는 RNAi 기술의 주요 한계인 것으로 고려된다.

[0007] 올리고뉴클레오타이드에 화학적 변형을 가하여 그의 세포 흡수 특성을 개선시키려는 이전의 시도가 존재해왔다. 하나의 이러한 변형은 올리고뉴클레오타이드에 콜레스테롤 분자를 부착시키는 것이었다. 이러한 접근법에 대한 최초 보고는 1989년에 레트싱어(Letsinger) 등에 의한 것이었다. 후속적으로, ISIS 파마슈티칼스, 인크.(ISIS Pharmaceuticals, Inc.) (캘리포니아주 칼스배드)는 올리고뉴클레오타이드에 콜레스테롤 분자를 부착시키는 보다 진보된 기술에 대해 보고하였다 (Manoharan, 1992).

[0008] 90년대 후반에 siRNA의 발견과 함께, 그의 전달 프로파일을 증진시키기 위한 유사한 유형의 변형이 이들 분자에 대해 시도되었다. 약간 변형된 siRNA (Soutschek, 2004) 및 고도로 변형된 siRNA (Wolfrum, 2007)에 접합된 콜레스테롤 분자가 문헌에 출현하였다. 또한, 문헌 [Yamada et al., 2008]은 siRNA의 콜레스테롤 매개 흡수를 추가로 개선시키는 진보된 링커 화학물질의 사용에 대해 보고하였다. 이러한 모든 노력에도 불구하고, 이들 유형의 화합물의 흡수는 생물학적 유체의 존재 하에 억제되어 생체내 유전자 침묵에 있어서 고도로 제한된 효능을 생성함으로써, 임상 세팅에서 이들 화합물의 적용성을 제한하였다.

발명의 내용

[0009] 일부 측면에서, 개시내용은 가이드 가닥 및 패신저 가닥을 포함하는 슈퍼옥시드 디스뮤타제 1 (SOD1)에 대해 지시된 단리된 이중 가닥 핵산 분자에 관한 것이며, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 이중 가닥 영역 및 단일 가닥 영역을 포함하고, 여기서 이중 가닥인 분자의 영역은 8-15개의 뉴클레오타이드 길이이고, 여기서 가이드 가닥은 2-14개의 뉴클레오타이드 길이인 단일 가닥 영역을 함유하고, 여기서 가이드 가닥은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 패신저 가닥은 8 내지 15개의 뉴클레오타이드 길이이고, 여기서 패신저 가닥은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 뉴클레오타이드 중 적어도 40%는 변형된다.

[0010] 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 중 적어도 60%가 변형된다. 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 적어도 1개의 가닥은 완전히 포스포로티오에이트화된 백본을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 적어도 1개의 가닥은 완전히 포스포로티오에이트화되거나, 또는 1개의 잔기를 제외하고 완전히 포스포로티오에이트화된다. 일부 실시양태에서, 변형된 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로 변형을 포함한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 슈퍼옥시드 디스뮤타제 1 (SOD1)에 대해 지시된다. 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 PCT 공개 번호 W02010/033247에 기재된 서열식별번호(SEQ ID NO): 40의 변형 패턴을 포함하지 않는다.

[0012] 일부 실시양태에서, 복수의 U 및/또는 C는 메틸, 이소부틸, 옥틸, 이미다졸 또는 티오펜으로 이루어진 군으로부터 선택된 소수성 변형을 포함하고, 변형은 U 및/또는 C의 위치 4 또는 5에 위치한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 표 1-8에 제공된 변형 패턴을 포함하는 표 1-8 내의 서열로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0014] 일부 측면에서, 개시내용은 표 1-8 내의 서열로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 이중 가닥 핵산 분자에 관한 것이며, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자가 표 2의 서열식별번호: 70, 71, 72, 73, 79, 80, 81 또는 84로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 경우에, 가이드 가닥은 6개 초과인 포스포로티오에이트 변형을 함유한다. 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 단리된 이중 가닥 핵산 분자에 부착된 소수성 접합체를 추가로 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 32 또는 서열식별번호:

122의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 61, 서열식별번호: 91 또는 서열식별번호: 123의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 32 또는 서열식별번호: 122를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 61, 서열식별번호: 91 또는 서열식별번호: 123을 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 34 또는 서열식별번호: 126의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 63 또는 서열식별번호: 93의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 34 또는 서열식별번호: 126을 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 63 또는 서열식별번호: 93을 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 38 또는 서열식별번호: 135의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 68, 서열식별번호: 97 또는 서열식별번호: 136의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 38 또는 서열식별번호: 135를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 68, 서열식별번호: 97 또는 서열식별번호: 136을 포함한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 10 또는 서열식별번호: 39의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 69 또는 서열식별번호: 98의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 10 또는 서열식별번호: 39를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 69 또는 서열식별번호: 98을 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 127 또는 서열식별번호: 137의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 64, 서열식별번호: 128 또는 서열식별번호: 138의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 127 또는 서열식별번호: 137을 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 64, 서열식별번호: 128 또는 서열식별번호: 138을 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산은 헤어핀을 형성하지 않는다.

[0021] 일부 측면에서, 개시내용은 개시내용에 기재된 바와 같은 단리된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 부형제 (예를 들어, 제약상 허용되는 담체)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제2 치료제, 예컨대 핵산 (예를 들어, sd-rxRNA 등), 소분자, 펩티드, 또는 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 포함한다.

[0022] 일부 측면에서, 개시내용은 ALS의 치료를 필요로 하는 대상체에게 슈퍼옥시드 디스뮤타제 1 (SOD1)을 코딩하는 유전자에 대해 지시된 핵산 분자의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, ALS를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0023] 일부 측면에서, 개시내용은 ALS의 치료를 필요로 하는 대상체에게 가이드 가닥 및 패신저 가닥을 포함하는 슈퍼옥시드 디스뮤타제 1 (SOD1)에 대해 지시된 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, ALS를 치료하는 방법에 관한 것이며, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 이중 가닥 영역 및 단일 가닥 영역을 포함하고, 여기서 이중 가닥인 분자의 영역은 8-15개의 뉴클레오티드 길이이고, 여기서 가이드 가닥은 2-14개의 뉴클레오티드 길이인 단일 가닥 영역을 함유하고, 여기서 가이드 가닥은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 패신저 가닥은 8 내지 15개의 뉴클레오티드 길이이고, 여기서 패신저 가닥은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 뉴클레오티드 중 적어도 40%는 변형되고, 여기서 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 표 1-8에 제공된 변형 패턴을 포함하는 표 1-8 내의 서열로부터 선택된 서열의 적어도 12개의 인접 뉴클레오티드를 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 완전히 포스포로티오에이트화되거나, 또는 1개의 잔기를 제외하고 완전히 포스포로티오에이트화된다. 일부 실시양태에서, 변형된 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 뉴클레오티드 중 적어도 1개는 2'-O-메틸 또는 2'-플루오로로 변형을 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 단리된 이중 가닥 핵산 분자에 부착된 소수성 접합체를 추가로 포함한다.

- [0026] 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 중추 신경계에의 전달을 위해 제제화된다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 척수강내 주입 및/또는 주사를 통해 투여된다.
- [0028] 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 32 또는 서열식별번호: 122의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 61, 서열식별번호: 91 또는 서열식별번호: 123의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0029] 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 32 또는 서열식별번호: 122를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 61, 서열식별번호: 91 또는 서열식별번호: 123을 포함한다.
- [0030] 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 34 또는 서열식별번호: 126의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 63 또는 서열식별번호: 93의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0031] 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 34 또는 서열식별번호: 126을 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 63 또는 서열식별번호: 93을 포함한다.
- [0032] 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 38 또는 서열식별번호: 135의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 68, 서열식별번호: 97 또는 서열식별번호: 136의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0033] 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 38 또는 서열식별번호: 135를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 68, 서열식별번호: 97 또는 서열식별번호: 136을 포함한다.
- [0034] 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 10 또는 서열식별번호: 39의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 69 또는 서열식별번호: 98의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0035] 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 10 또는 서열식별번호: 39를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 69 또는 서열식별번호: 98을 포함한다.
- [0036] 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 127 또는 서열식별번호: 137의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 64, 서열식별번호: 128 또는 서열식별번호: 138의 적어도 12개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0037] 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 분자의 센스 가닥은 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 127 또는 서열식별번호: 137을 포함하고, 가이드 가닥은 서열식별번호: 64, 서열식별번호: 128 또는 서열식별번호: 138을 포함한다.
- [0038] 본 발명의 각각의 제한은 본 발명의 다양한 실시양태를 포괄할 수 있다. 따라서, 어느 하나의 요소 또는 요소의 조합을 수반하는 본 발명의 각각의 제한은 본 발명의 각각의 측면에 포함될 수 있는 것으로 예상된다. 본 발명은 그의 적용에서 하기 기재에 제시되거나 도면에 예시된 성분의 구축 및 배열의 세부사항으로 제한되지 않는다. 본 발명은 다른 실시양태일 수 있고, 다양한 방식으로 실시 또는 수행될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1. 포스포로티오에이트 함량을 감소시키는 것은 감소된 시험관내 세포 독성을 갖는 활성 ps-rxRNA 변이체를 발생시킨다. 상부 패널은 SOD1 침묵을 보여주고, 하부 패널은 세포 생존율을 보여준다. 이들 데이터는 ps-rxRNA 변이체 25635 및 25637이 25600과 비교하여 강력하고, 보다 바람직한 세포 독성 프로파일 (시험관내)을 갖는다는 것을 입증한다.
- 도 2. 포스포로티오에이트 함량을 감소시키는 것은 감소된 시험관내 세포 독성을 갖는 활성 ps-rxRNA 변이체를 발생시킨다. 상부 패널은 SOD1 침묵을 보여주고, 하부 패널은 세포 생존율을 보여준다. 이들 데이터는 ps-rxRNA 변이체 25645가 25600과 비교하여 강력하고, 약간 더 바람직한 세포 독성 프로파일 (시험관내)을 갖는다는 것을 보여준다.
- 도 3. 뇌-소뇌 (래트에서의 IC 주사). 침투는 화학 함량에서의 변화에 의해 증가한다; 흡수

25635<25637<25645< 25652. * 전두 피질, 소뇌가 아님.

도 4. 자궁경부 척수-횡측 절단. 25637 및 var 25645는 유사하지만, 둘 다 분포에서 25652 미만이다.

도 5. 자궁경부 척수-종축 절단. 25637은 조직으로의 분포에서 25652 미만이다. 원래의 fl-ps-rxRNA 화합물의 투여는 완전 뇌 및 척수 침투를 발생시킨다. 이러한 특정한 검정에서 ps-rxRNA 변이체 1 (25635)은 뇌 또는 척수 침투를 달성하는데 불충분하다. ps-rxRNA 변이체 2 및 3 (각각 25637 및 25645) 둘 다는 뇌 및 척수의 세포에 의한 흡수를 발생시키지만, 원래의 fl-ps-rxRNA (25652)보다는 덜하다.

도 6. 이식된 삼투 펌프를 사용한 C57BL/6 정상 (비-트랜스제닉) 마우스에서의 SOD1 표적화 sd-rxRNA의 14-일 척수강내 주입 후 SOD1 mRNA의 감소. 정상 마우스에서의 올리고 ID 25652에 의한 14일 침투. 14일 삼투 펌프를 10 mg/ml의 각각의 화합물의 100 μ l로 채웠다. qPCR에 의한 유전자 발현 분석을 PPIB 하우스키핑 유전자에 대해 정규화하고, PBS 군에서의 SOD1 발현과 관련하여 플롯팅하였다. 침투는 척수의 요추 영역 (카테터 배치 영역)에서만 관찰되었다. 펌프 유량은 0.25 μ l/hr였고; 따라서 60 μ g의 SOD1 표적화 또는 비-표적화 대조군 (NTC) ps-rxRNA가 14일 동안 매일 전달되었다 (총 840 μ g). 올리고 ID 25652에 대해 8마리; NTC ps-rxRNA에 대해 8마리; 및 PBS에 대해 8마리를 포함하여, 24마리의 C57BL/6J 마우스를 본 연구에 사용하였다.

도 7. 정상 마우스에서 SOD1 표적화 sd-rxRNA 변이체 3 (올리고 ID 25645)의 14-일 척수강내 주입 후 SOD1 mRNA의 감소. C57BL/6 정상 (비-트랜스제닉) 마우스에서 이식된 삼투 펌프를 사용하여 14일 척수강내 주입을 수행하였다. 14일 삼투 펌프를 10 mg/ml의 각각의 화합물의 100 μ l로 채웠다. 1일에 60 μ g의 SOD1 표적화 또는 비-표적화 대조군 (NTC) sd-rxRNA 변이체를 투여하였다. qPCR에 의한 유전자 발현 분석을 수행하여 유전자 발현을 PPIB 하우스키핑 유전자에 대해 정규화하고, PBS 군에서의 SOD1 발현과 관련하여 플롯팅하였다. 침투는 척수의 요추 영역 (카테터 배치 영역)에서만 관찰되었다. 펌프 유량은 0.25 μ l/hr였고; 따라서 60 μ g이 14일 동안 매일 전달되었다 (총 840 μ g). 올리고 ID 25645에 대해 10마리; NTC ps-rxRNA에 대해 10마리; 및 PBS에 대해 10마리를 포함하여, 30마리의 C57BL/6J 마우스를 본 연구에 사용하였다.

도 8은 SOD1 sd-rxRNA 변이체 옥틸 변형을 사용하여 생성된 데이터를 도시한다.

도 9는 SOD1 sd-rxRNA 변이체 옥틸 변형을 사용하여 생성된 데이터를 도시한다.

도 10은 SOD1 sd-rxRNA 변이체 티오펜 변형을 사용하여 생성된 데이터를 도시한다.

도 11은 SOD1 sd-rxRNA 변이체 이소부틸 변형을 사용하여 생성된 데이터를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] SOD1 (구리/아연 슈퍼옥시드 디스뮤타제)

[0041] 본원에 사용된, "SOD1"은 유해 슈퍼옥시드 라디칼을 물로 변환시키는데 수반되는 3종의 슈퍼옥시드 디스뮤타제 중 1종인 슈퍼옥시드 디스뮤타제 1 효소를 지칭한다. 모든 ALS 사례의 대략 10%는 우성 유전되고, 이들 중 ~20%는 시토졸 슈퍼옥시드 디스뮤타제 1 (SOD1)에서의 결함으로 인한 것이다. 또한, SOD1은 ALS의 비-가족성 (예를 들어 산발성) 형태에 연루되어 왔다 (Jones, C. T., Brock, D. J. H., Chancellor, A. M., Warlow, C. P., Swingle, R. J. Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) mutations and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 342: 1050-1051, 1993). 어떠한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 여러 계통의 조사는 SOD1에서의 돌연변이가 이러한 효소의 디스뮤타제 활성의 손실을 통해 ALS를 유발하지 않는다는 것을 시사하고 있다. 오히려, 돌연변이체 SOD1은 다중 대안적 메카니즘을 통해 신경독성이며, 다수가 입체형태적 불안정성 및 이상 결합 및 돌연변이 단백질의 응집을 수반한다. 돌연변이체 SOD1의 독성의 정확한 세부사항은 완전히 규정되어 있지 않지만, 동물 모델에서 돌연변이체 SOD1 단백질의 부담의 감소가 사망을 유의하게 지연시킨다는 것은 충분히 명백하다. 이는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO) (Smith et al.) 및 siRNA (Maxwell, Pasinelli et al. 2004) (Xia, Zhou et al. 2006) (Wang, Ghosh et al. 2008) 둘 다를 사용하여 달성된 바 있다. 이들 연구는 siRNA-기반 약물이 ALS 및 많은 다른 CNS 장애의 치료를 위한 잠재적으로 유의한 치료적 진보를 나타낸다는 원리를 예시한다. 둘 다의 사례에서, 효능은 장기간에 걸쳐 높은 양의 물질의 전달에 의해 달성되었고; 이들 연구는 현재 형태의 ASO 및 siRNA 요법의 주요 한계가 최적으로 효율적이고 비-독성인 생체내 전달 시스템의 결여라는 점을 예시한다 (Smith, Miller et al. 2006; Wang, Ghosh et al. 2008).

[0042] 근위축성 측삭 경화증 (ALS)

[0043] ALS는 중추 신경계의 운동 뉴런에 영향을 미치는 진행성 신경변성 질환이다. 운동 뉴런의 변성은 마비를 유발

하고, 통상적으로 호흡 부전으로 인해, 결과적으로 사망을 유발한다. 사례의 하위세트에서, ALS는 시토졸 슈퍼 옥시드 디스뮤타제 (SOD1)를 코딩하는 유전자에서 우성 전달되는 돌연변이에 의해 유발된다. 돌연변이체 SOD1의 트랜스제닉 발현은 마우스에서 ALS를 유발한다.

- [0044] 핵산 분자
- [0045] 본원에 사용된 "핵산 분자"는 sd-rxRNA, sd-rxRNA 변이체, rxRNAori, 올리고뉴클레오티드, ASO, siRNA, shRNA, miRNA, ncRNA, cp-lasiRNA, aiRNA, 단일-가닥 핵산 분자, 이중-가닥 핵산 분자, RNA 및 DNA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 화학적으로 변형된 핵산 분자, 예컨대 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오티드이다.
- [0046] sd-rxRNA 분자
- [0047] 본 발명의 측면은 sd-rxRNA 분자에 관한 것이다. 본원에 사용된 "sd-rxRNA" 또는 "sd-rxRNA 분자"는 2014년 8월 5일에 승인된 표제 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 8,796,443, 2015년 11월 3일에 승인된 표제 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 9,175,289, 및 2009년 9월 22일에 출원된 표제 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 PCT 공개 번호 W02010/033247 (출원 번호 PCT/US2009/005247)에 기재되고 이로부터 참조로 포함되는 바와 같은 자기-전달 RNA 분자를 지칭한다. 간략하게, sd-rxRNA (sd-rxRNA^{나노}로도 지칭됨)는 최소 16개의 뉴클레오티드 길이를 갖는 가이드 가닥 및 8-18개의 뉴클레오티드 길이의 패신저 가닥을 포함하는 단리된 비대칭 이중 가닥 핵산 분자이며, 여기서 이중 가닥 핵산 분자는 이중 가닥 영역 및 단일 가닥 영역을 갖고, 단일 가닥 영역은 4-12개의 뉴클레오티드 길이를 가지며 적어도 3개의 뉴클레오티드 백본 변형을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 이중 가닥 핵산 분자는 평할인 1개의 말단을 갖거나, 또는 1 또는 2개의 뉴클레오티드 오버행을 포함한다. sd-rxRNA 분자는 화학적 변형을 통해, 및 일부 경우에 소수성 접합체의 부착을 통해 최적화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 이중 가닥 핵산 분자는 PCT 공개 번호 W02010/033247에 기재된 서열식별번호: 40의 변형 패턴을 포함하지 않는다.
- [0048] 일부 실시양태에서, sd-rxRNA는 가이드 가닥 및 패신저 가닥을 포함하는 단리된 이중 가닥 핵산 분자를 포함하고, 여기서 이중 가닥인 분자의 영역은 8-15개의 뉴클레오티드 길이이고, 여기서 가이드 가닥은 4-12개의 뉴클레오티드 길이인 단일 가닥 영역을 함유하고, 여기서 가이드 가닥의 단일 가닥 영역은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하고, 여기서 이중 가닥 핵산의 뉴클레오티드 중 적어도 40%는 변형된다.
- [0049] 일부 실시양태에서, sd-rxRNA 변이체는 18 내지 23개의 뉴클레오티드 길이 가이드 가닥 (안티센스 가닥) 및 10 내지 15개의 뉴클레오티드 길이 패신저 가닥 (센스 가닥)을 함유하는 sd-rxRNA를 포함한다. 가이드 가닥 및 패신저 가닥은 비대칭 듀플렉스를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥은 6 내지 22개의, 포스포로티오에이트 변형을 포함한, 백본 변형을 함유한다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥은 2 내지 14개의, 포스포로티오에이트 변형을 포함한, 백본 변형을 함유한다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥은 소수성 접합체에 부착된다. 용어 "sd-rxRNA 변이체"는 본원에서 "ps-rxRNA"와 상호교환가능하게 사용된다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 가이드 가닥은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 포스포로티오에이트 변형을 함유한다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥은 완전히 포스포로티오에이트화된다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개의 포스포로티오에이트 변형을 함유한다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥은 완전히 포스포로티오에이트화된다. 놀랍게도, 높은 수준의 포스포로티오에이트 변형은 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 증가된 전달로 이어질 수 있다는 것이 본원에서 발견되었다.
- [0051] 본 발명과 연관된 핵산 분자는 또한 본원에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 단리된 이중 가닥 또는 듀플렉스 핵산, 올리고뉴클레오티드, 나노 분자, 나노 RNA, sd-rxRNA^{나노}, sd-rxRNA 또는 RNA 분자로 지칭된다.
- [0052] sd-rxRNA는 통상적인 siRNA와 비교하여 세포에 의해 훨씬 더 효과적으로 수용된다. 이들 분자는 표적 유전자 발현을 침묵시키는데 고도로 효율적이고, 이전에 기재된 RNAi 분자에 비해 혈청의 존재 하에서의 높은 활성, 효율적인 자기 전달, 매우 다양한 링커와의 상용성, 및 독성과 연관된 화학적 변형의 존재 감소 또는 완전한 부재를 포함한 유의한 이점을 제공한다.
- [0053] 단일-가닥 폴리뉴클레오티드와 대조적으로, 듀플렉스 폴리뉴클레오티드는 전통적으로 견고한 구조 및 막 투과를

어렵게 하는 다수의 음전하를 갖고 있기 때문에 세포로의 전달이 어려웠다. 그러나, sd-rxRNA는 부분적으로 이중-가닥이지만, 생체내에서 단일-가닥으로 인식됨에 따라 세포막을 가로질러 효율적으로 전달될 수 있다. 그 결과, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 많은 경우에 자기 전달될 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 통상적인 RNAi 작용제와 유사한 방식으로 제제화될 수 있거나, 또는 단독으로 (또는 비-전달 유형 담체와 함께) 세포 또는 대상체로 전달되어 자기 전달되도록 할 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 분자의 한 부분은 통상적인 RNA 듀플렉스와 유사하고 분자의 제2 부분은 단일 가닥인 자기 전달 비대칭 이중-가닥 RNA 분자가 제공된다.

[0054] 일부 측면에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 이중 가닥 영역, 및 5개의 뉴클레오티드 이상의 특이적 화학적 변형 패턴의 단일 가닥 영역을 포함하는 비대칭 구조의 조합을 갖고, 친지성 또는 소수성 분자에 접합된다. 이러한 부류의 RNAi 유사 화합물은 시험관내 및 생체내에서 우수한 효능을 갖는다. 단일 가닥 영역에 적용된 포스포로티오에이트 변형과 조합된 견고한 듀플렉스 영역의 크기의 감소는 관찰된 우수한 효능에 기여하는 것으로 여겨진다.

[0055] 일부 실시양태에서, 본 발명과 연관된 RNAi 화합물은 듀플렉스 영역 (8-15개의 염기 길이의, 효율적인 RISC 진입을 위해 요구됨) 및 4-12개의 뉴클레오티드 길이의 단일 가닥 영역을 포함하는 비대칭 화합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스 영역은 13 또는 14개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 6 또는 7개의 뉴클레오티드 단일 가닥 영역이 바람직하다. 일부 실시양태에서, RNAi 화합물은 2-12개의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결 (포스포로티오에이트 변형으로 지칭됨)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 6-8개의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결이 바람직하다. 일부 실시양태에서, RNAi 화합물은 안정성을 제공하고 RISC 진입에 상용성인, 고유한 화학적 변형 패턴을 포함한다. 이들 요소의 조합은 시험관내 및 생체내 RNAi 시약의 전달에 고도로 유용한 예상외의 특성을 발생시킨다.

[0056] 안정성을 제공하고 RISC 진입에 상용성인 화학적 변형 패턴은 센스 또는 패신저 가닥 뿐만 아니라 안티센스 또는 가이드 가닥에 대한 변형을 포함한다. 예를 들어, 패신저 가닥은, 안정성이 확인되고 활성을 간섭하지 않는 임의의 화학 물질로 변형될 수 있다. 이러한 변형은 2' 리보 변형 (O-메틸, 2' F, 2 데옥시 및 다른 것) 및 포스포로티오에이트 변형과 같은 백본 변형을 포함한다. 패신저 가닥에서의 바람직한 화학적 변형 패턴은 패신저 가닥 내의 C 및 U 뉴클레오티드의 O-메틸 변형을 포함하거나, 또는 대안적으로 패신저 가닥이 완전히 O-메틸 변형될 수 있다.

[0057] 예를 들어, 가이드 가닥은 또한 RISC 진입을 간섭하지 않으면서 안정성이 확인된 임의의 화학적 변형에 의해 변형될 수 있다. 가이드 가닥에서의 바람직한 화학적 변형 패턴은 2' F 변형된 대다수의 C 및 U 뉴클레오티드 및 인산화된 5' 말단을 포함한다. 가이드 가닥에서의 또 다른 바람직한 화학적 변형 패턴은 위치 1의 2'O-메틸 변형 및 위치 11-18에서의 C/U 및 5' 말단 화학적 인산화를 포함한다. 가이드 가닥에서의 또 다른 바람직한 화학적 변형 패턴은 위치 1의 2'O-메틸 변형 및 위치 11-18에서의 C/U 및 5' 말단 화학적 인산화 및 위치 2-10에서의 C/U의 2'F 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥 및/또는 가이드 가닥은 적어도 1개의 5-메틸 C 또는 U 변형을 함유한다.

[0058] 일부 실시양태에서, sd-rxRNA 내 뉴클레오티드 중 적어도 30%가 변형된다. 예를 들어, sd-rxRNA 내 뉴클레오티드 중 적어도 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 변형된다. 일부 실시양태에서, sd-rxRNA 내 뉴클레오티드 중 100%가 변형된다.

[0059] 상기 기재된 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 화학적 변형 패턴은 널리 허용되고, 비대칭 RNAi 화합물의 효능을 실제로 개선시켰다. 일부 실시양태에서, 기재된 성분 (가이드 가닥 안정화, 포스포로티오에이트 스트레치, 센스 가닥 안정화 및 소수성 접합제) 중 임의의 것의 제거, 또는 일부 경우에 크기의 증가는 준최적 효능, 및 일부 경우에 효능의 완전한 상실을 야기한다. 요소의 조합은 HeLa 세포와 같은 세포로의 수동 전달 후에도 완전히 활성인 화합물의 개발을 발생시킨다.

[0060] 일부 경우에, sd-rxRNA는 신규 유형의 화학을 사용하여 화합물의 소수성을 개선시킴으로써 추가로 개선될 수 있다. 예를 들어, 1종의 화학은 소수성 염기 변형을 사용하는 것과 관련된다. 변형이 염기의 분배 계수의 증가를 발생시키는 한, 임의의 위치의 임의의 염기가 변형될 수 있다. 변형 화학을 위한 바람직한 위치는 피리미딘의 위치 4 및 5이다. 이들 위치의 주요 이점은 (a) 합성이 용이하고 (b) RISC 복합체 로딩 및 표적 인식에 필

수적인 염기-쌍형성 및 A형 나선 형성의 간섭이 결여되어 있다는 것이다. 다중 테옥시 우리딘이 전체 화합물 효능을 간섭하지 않으면서 존재하는 sd-rxRNA 화합물의 버전을 사용하였다. 또한, 소수성 접합체의 구조를 최적화하여 조직 분포 및 세포 흡수에서 주요 개선을 얻을 수 있었다. 일부 바람직한 실시양태에서, 스테롤의 구조를 변형하여 C17 부착 쇄를 변경 (증가/감소)시켰다. 이러한 유형의 변형은 세포 흡수에서의 유의한 증가 및 생체내 조직 흡수 특성의 개선을 발생시킨다.

[0061] 본 발명에 따라 제제화된 dsRNA는 또한 rxRNAori를 포함한다. rxRNAori는 2009년 2월 11일에 출원된 표제 "MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF"의 PCT 공개 번호 WO2009/102427 (출원 번호 PCT/US2009/000852) 및 표제 "MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF"의 미국 특허 공개 번호 US 2011-0039914에 기재되고 이로부터 참조로 포함되는 RNA 분자의 부류를 지칭한다.

[0062] 일부 실시양태에서, rxRNAori 분자는 5'-말단 및 3'-말단을 갖는 센스 가닥 (여기서 센스 가닥은 2'-변형된 리보스 당에 의해 고도로 변형되고, 여기서 센스 가닥의 중심 부분의 3-6개의 뉴클레오티드는 2'-변형된 리보스 당에 의해 변형되지 않음), 및 센스 가닥 및 표적 유전자의 mRNA에 혼성화하는 5'-말단 및 3'-말단을 갖는 안티센스 가닥을 포함하는, 표적 유전자의 발현을 억제하기 위한 12-35개의 뉴클레오티드 길이의 이중-가닥 RNA (dsRNA) 구축물을 포함하며, 여기서 dsRNA는 표적 유전자의 발현을 서열-의존성 방식으로 억제한다.

[0063] rxRNAori는 본원에 기재된 변형 중 임의의 것을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, rxRNAori 내 뉴클레오티드 중 적어도 30%가 변형된다. 예를 들어, rxRNAori 내 뉴클레오티드 중 적어도 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 변형된다. 일부 실시양태에서, sd-rxRNA 내 뉴클레오티드 중 100%가 변형된다. 일부 실시양태에서, 단지 rxRNAori의 패신저 가닥만이 변형을 함유한다.

[0064] 본 발명은 그의 적용에서 하기 기재에 제시되거나 도면에 예시된 성분의 구축 및 배열의 세부사항으로 제한되지 않는다. 본 발명은 다른 실시양태일 수 있고, 다양한 방식으로 실시 또는 수행될 수 있다. 또한, 본원에 사용된 어구 및 용어는 기재를 위한 것이고, 제한하는 것으로서 간주되어서는 안된다. 본원에서 "포함하는", "포함하는" 또는 "갖는", "함유하는", "수반하는" 및 그의 변형의 사용은 이전에 열거된 항목 및 그의 등가물, 뿐만 아니라 추가의 항목을 포괄하는 것으로 의도된다.

[0065] 본 발명의 측면은 가이드 (안티센스) 가닥 및 패신저 (센스) 가닥을 포함하는 단리된 이중 가닥 핵산 분자에 관한 것이다. 본원에 사용된 용어 "이중-가닥"은, 뉴클레오모노머의 적어도 일부가 상보적이고 수소 결합하여 이중-가닥 영역을 형성한 1종 이상의 핵산 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 길이는 16-29개의 뉴클레오티드 길이 범위이다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29개의 뉴클레오티드 길이이다. 가이드 가닥은 표적 유전자에 대해 상보성을 갖는다. 가이드 가닥과 표적 유전자 사이의 상보성은 가이드 가닥의 임의의 부분에 걸쳐 존재할 수 있다. 본원에 사용된 상보성은 완전한 상보성이거나, 또는 가이드 가닥이 RNAi를 매개하는 표적에 대해 충분히 상보성인 한 덜 완전한 상보성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보성은 가이드 가닥과 표적 사이에서 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 미스매치를 지칭한다. 완전한 상보성은 100% 상보성을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 또한 표적 서열에 비해 삽입, 결실 및 단일 점 돌연변이를 갖는 siRNA 서열이 억제에 대해 효과적인 것으로 밝혀진 바 있다. 또한, siRNA의 모든 위치가 표적 인식에 동등하게 기여하는 것은 아니다. siRNA의 중심에서의 미스매치가 가장 결정적이며, 본질적으로 표적 RNA 절단을 없앤다. 중심의 상류 또는 안티센스 가닥을 참조하여 절단 부위의 상류의 미스매치는 허용되지만, 표적 RNA 절단을 유의하게 감소시킨다. 중심 또는 안티센스 가닥을 참조하여 절단 부위의 하류, 바람직하게는 안티센스 가닥의 3' 말단 주변에 위치한, 예를 들어 안티센스 가닥의 3' 말단으로부터 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 뉴클레오티드의 미스매치는 허용되고, 표적 RNA 절단을 단지 약간만 감소시킨다.

[0066] 어떠한 특정한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 일부 실시양태에서, 가이드 가닥은 적어도 16개의 뉴클레오티드 길이이고, RISC 내 아르코나우트 단백질질을 고정시킨다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥이 RISC에 로딩되는 경우에, 이는 규정된 시드 영역을 갖고, 가이드 가닥의 위치 10-11의 맞은 편에서 표적 mRNA 절단이 일어난다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 5' 말단은 인산화되거나 인산화될 수 있다. 본원에 기재된 핵산 분자는 최소 촉발 RNA로 지칭될 수 있다.

[0067] 일부 실시양태에서, 패신저 가닥의 길이는 8-15개의 뉴클레오티드 길이 범위이다. 특정 실시양태에서, 패신저

가닥은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 패신저 가닥은 가이드 가닥에 대해 상보성을 갖는다. 패신저 가닥과 가이드 가닥 사이의 상보성은 패신저 또는 가이드 가닥의 임의의 부분에 걸쳐 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 이중 가닥 영역 내에서 가이드 및 패신저 가닥 사이에 100% 상보성이 존재한다.

[0068] 본 발명의 측면은 최소의 이중 가닥 영역을 갖는 이중 가닥 핵산 분자에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 이중 가닥인 분자의 영역은 8-15개의 뉴클레오티드 길이 범위이다. 특정 실시양태에서, 이중 가닥인 분자의 영역은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 이중 가닥 영역은 13 또는 14개의 뉴클레오티드 길이이다. 가이드 및 패신저 가닥 사이에 100% 상보성이 존재할 수 있거나, 또는 가이드 및 패신저 가닥 사이에 1개 이상의 미스매치가 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 가닥 분자의 한 말단에서, 분자는 평할 말단이거나 또는 1개의 뉴클레오티드 오버행을 갖는다. 일부 실시양태에서, 분자의 단일 가닥 영역은 4-12개의 뉴클레오티드 길이이다. 예를 들어, 단일 가닥 영역은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 그러나, 특정 실시양태에서, 단일 가닥 영역은 또한 4개 미만 또는 12개 초과 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 특정 실시양태에서, 단일 가닥 영역은 적어도 6 또는 적어도 7개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0069] 본 발명과 연관된 RNAi 구축물은 -13 kkal/mol 미만의 열역학적 안정성 (ΔG)을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 열역학적 안정성 (ΔG)은 -20 kkal/mol 미만이다. 일부 실시양태에서, (ΔG)가 -21 kkal/mol 미만이 되는 경우에 효능의 손실이 존재한다. 일부 실시양태에서, -13 kkal/mol을 초과하는 (ΔG) 값이 본 발명의 측면과 상용성이다. 어떠한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 일부 실시양태에서 비교적 더 높은 (ΔG) 값을 갖는 분자는 비교적 더 높은 농도에서 활성이 될 수 있는 반면에, 비교적 더 낮은 (ΔG) 값을 갖는 분자는 비교적 더 낮은 농도에서 활성이 될 수 있다. 일부 실시양태에서, (ΔG) 값은 -9 kkal/mol 초과일 수 있다. 거의 동일한 설계이지만 보다 낮은 열역학적 안정성을 갖는 분자가 불활성인 것으로 입증된 바 있기 때문에 (Rana et al., 2004), 최소 이중 가닥 영역을 함유하는 본 발명과 연관된 RNAi 구축물에 의해 매개되는 유전자 침묵 효과는 예상외의 것이다.

[0070] 어떠한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, dsRNA 또는 dsDNA의 8-10 bp의 스트레치는 RISC의 단백질 성분 또는 RISC의 보조-인자에 의해 구조적으로 인식될 수 있다. 추가로, 단백질 성분에 의해 감지될 수 있고/거나 이러한 성분과 상호작용하기에 충분히 안정할 수 있어서 아르고나우트 단백질에 로딩될 수 있는 촉발 화합물에 대해 자유 에너지 요건이 존재한다. 최적의 열역학이 존재하고, 바람직하게는 적어도 8개의 뉴클레오티드인 이중 가닥 부분이 존재하는 경우에, 듀플렉스는 인식되어 RNAi 기구로 로딩될 것이다.

[0071] 일부 실시양태에서, 열역학적 안정성은 LNA 염기의 사용을 통해 증가된다. 일부 실시양태에서, 추가의 화학적 변형이 도입된다. 화학적 변형의 여러 비제한적 예는 5' 포스페이트, 2'-O-메틸, 2'-O-에틸, 2'-플루오로, 리보티미딘, C-5 프로피닐-dC (pdC) 및 C-5 프로피닐-dU (pdU); C-5 프로피닐-C (pC) 및 C-5 프로피닐-U (pU); 5-메틸 C, 5-메틸 U, 5-메틸 dC, 5-메틸 dU 메톡시, (2,6-디아미노퓨린), 5'-디메톡시트리틸-N4-에틸-2'-데옥시시티딘 및 MGB (작은 홈 결합제)를 포함한다. 1종 초과 화학적 변형이 동일한 분자 내에서 조합될 수 있는 것이 인식될 것이다.

[0072] 본 발명과 연관된 분자는 증가된 효력 및/또는 감소된 독성을 위해 최적화된다. 예를 들어, 가이드 및/또는 패신저 가닥의 뉴클레오티드 길이, 및/또는 가이드 및/또는 패신저 가닥 내 포스포로티오에이트 변형의 수는 일부 측면에서 RNA 분자의 효력에 영향을 미칠 수 있는 한편, 2'-플루오로 (2'F) 변형을 2'-O-메틸 (2'OMe) 변형으로 대체하는 것은 일부 측면에서 분자의 독성에 영향을 미칠 수 있다. 구체적으로, 분자의 2'F 함량의 감소는 분자의 독성을 감소시킬 것으로 예측된다. 또한, RNA 분자 내 포스포로티오에이트 변형의 수는 분자의 세포로의 흡수, 예를 들어 분자의 세포로의 수동 흡수의 효율에 영향을 미칠 수 있다. 본원에 기재된 분자의 바람직한 실시양태는 2'F 변형을 갖지 않지만, 세포 흡수 및 조직 침투에서의 동등한 효능을 특징으로 한다. 이러한 분자는 선행 기술, 예컨대 2'F의 광범위한 사용에 의해 고도로 변형된 문헌 [Accell and Wolfrum]에 기재된 분자에 비해 유의한 개선을 나타낸다.

[0073] 일부 실시양태에서, 가이드 가닥은 대략 18-19개의 뉴클레오티드 길이이고, 대략 2-14개의 포스페이트 변형을 갖는다. 예를 들어, 가이드 가닥은 포스페이트-변형된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개 또는 14개 초과 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 가이드 가닥은 RISC 진입을 간섭하지 않으면서 증가된 안정성을 부여하는 1종 이상의 변형을 함유할 수 있다. 포스페이트 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 포스포로티오에이트 변형된 뉴클레오티드는 3' 말단, 5' 말단에 있거나 또는 가이드 가닥 전반에 걸쳐 퍼져있을 수 있다. 일부 실시

양태에서, 가이드 가닥의 3' 말단의 10개의 뉴클레오티드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 포스포로티오에이트 변형된 뉴클레오티드를 함유한다. 또한, 가이드 가닥은 2'F 및/또는 2'OMe 변형을 함유할 수 있고, 이는 분자 전반에 걸쳐 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 위치 1의 뉴클레오티드(가이드 가닥의 가장 마지막 5' 위치의 뉴클레오티드)가 2'OMe 변형되고/거나 인산화된다. 가이드 가닥 내 C 및 U 뉴클레오티드가 2'F 변형될 수 있다. 예를 들어, 19 nt 가이드 가닥의 위치 2-10 (또는 상이한 길이의 가이드 가닥에서의 상응하는 위치)의 C 및 U 뉴클레오티드가 2'F 변형될 수 있다. 또한, 가이드 가닥 내 C 및 U 뉴클레오티드는 2'OMe 변형될 수 있다. 예를 들어, 19 nt 가이드 가닥의 위치 11-18 (또는 상이한 길이의 가이드 가닥에서의 상응하는 위치)의 C 및 U 뉴클레오티드가 2'OMe 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 가장 마지막 3' 말단의 뉴클레오티드는 변형되지 않는다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥 내 대부분의 C 및 U는 2'F 변형되고, 가이드 가닥의 5' 말단은 인산화된다. 다른 실시양태에서, 위치 1, 및 위치 11-18의 C 또는 U는 2'OMe 변형되고, 가이드 가닥의 5' 말단은 인산화된다. 다른 실시양태에서, 위치 1, 및 위치 11-18의 C 또는 U는 2'OMe 변형되고, 가이드 가닥의 5' 말단은 인산화되며, 위치 2-10의 C 또는 U는 2'F 변형된다.

[0074] 일부 측면에서, 최적의 패신저 가닥은 대략 11-14개의 뉴클레오티드 길이이다. 패신저 가닥은 증가된 안정성을 부여하는 변형을 함유할 수 있다. 패신저 가닥 내 1개 이상의 뉴클레오티드는 2'OMe 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥 내 C 및/또는 U 뉴클레오티드 중 1개 이상이 2'OMe 변형되거나, 또는 패신저 가닥 내 모든 C 및 U 뉴클레오티드가 2'OMe 변형된다. 특정 실시양태에서, 패신저 가닥 내 모든 뉴클레오티드가 2'OMe 변형된다. 패신저 가닥 상의 뉴클레오티드 중 1개 이상은 또한 포스포에이트-변형, 예컨대 포스포로티오에이트 변형될 수 있다. 또한, 패신저 가닥은 2' 리보, 2'F 및 2 테옥시 변형, 또는 이들의 임의의 조합을 함유할 수 있다. 가이드 및 패신저 가닥 둘 다에 대한 화학적 변형 패턴은 널리 허용될 수 있고, 화학적 변형의 조합은 RNA 분자의 증가된 효능 및 자기-전달을 발생시킬 수 있다.

[0075] 본 발명의 측면은, RNAi를 위해 이전에 사용되어온 분자와 비교하여, 이중 가닥 영역에 비해 연장된 단일-가닥 영역을 갖는 RNAi 구축물에 관한 것이다. 분자의 단일 가닥 영역을 변형시켜 세포 흡수 또는 유전자 침묵을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 가닥 영역의 포스포로티오에이트 변형은 세포 흡수 및/또는 유전자 침묵에 영향을 미친다. 포스포로티오에이트 변형된 가이드 가닥의 영역은 분자의 단일 가닥 및 이중 가닥 영역 둘 모두 내의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 가닥 영역은 2-12개의 포스포로티오에이트 변형을 포함한다. 예를 들어, 단일 가닥 영역은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 포스포로티오에이트 변형을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 단일 가닥 영역은 6-8개의 포스포로티오에이트 변형을 함유한다.

[0076] 또한, 본 발명과 연관된 분자는 세포 흡수에 대해 최적화된다. 본원에 기재된 RNA 분자에서, 가이드 및/또는 패신저 가닥은 접합체에 부착될 수 있다. 특정 실시양태에서, 접합체는 소수성이다. 소수성 접합체는 분배 계수가 10 초과인 소분자일 수 있다. 접합체는 스테롤-유형 분자, 예컨대 콜레스테롤, 또는 C17에 부착된 증가된 길이의 다중탄소 쇄를 갖는 분자일 수 있고, 접합체의 존재는 지질 형질감염 시약의 존재 또는 부재 하에 RNA 분자가 세포 내로 수용되는 능력에 영향을 미칠 수 있다. 접합체는 소수성 링커를 통해 패신저 또는 가이드 가닥에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 링커는 5-12C 길이이고/거나 히드록시피롤리딘-기반이다. 일부 실시양태에서, 소수성 접합체는 패신저 가닥에 부착되고, 패신저 및/또는 가이드 가닥의 CU 잔기는 변형된다. 일부 실시양태에서, 패신저 가닥 및/또는 가이드 가닥 상의 CU 잔기 중 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 변형된다. 일부 측면에서, 본 발명과 연관된 분자는 자기-전달된다 (sd). 본원에 사용된 "자기-전달"은 형질감염 시약과 같은 추가의 전달 비히클에 대한 필요 없이 분자가 세포 내로 전달되는 능력을 지칭한다.

[0077] 본 발명의 측면은 RNAi에서의 사용을 위해 분자를 선택하는 것에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 8-15개의 뉴클레오티드의 이중 가닥 영역을 갖는 분자가 RNAi에서의 사용을 위해 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자는 그의 열역학적 안정성 (ΔG)에 기초하여 선택된다. 일부 실시양태에서, -13 kkal/mol 미만의 (ΔG)를 갖는 분자가 선택될 것이다. 예를 들어, (ΔG) 값은 -13 , -14 , -15 , -16 , -17 , -18 , -19 , -21 , -22 또는 -22 kkal/mol 미만일 수 있다. 다른 실시양태에서, (ΔG) 값은 -13 kkal/mol 초과일 수 있다. 예를 들어, (ΔG) 값은 -12 , -11 , -10 , -9 , -8 , -7 또는 -7 kkal/mol 초과일 수 있다. ΔG 는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 계산될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 일부 실시양태에서, ΔG 는 엠폴드(Mfold) 인터넷 사이트 (mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi)를 통해 이용가능한 엠폴드를 사용하여 계산된다. ΔG 를 계산하는 방법은 하기 문헌에 기재되어 있으며, 이로부터 참조로 포함된다: 문헌 [Zuker, M. (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31(13):3406-15; Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D. H. (1999) *J. Mol. Biol.*

288:911-940; Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M., and Turner, D. H. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. 101:7287-7292; Duan, S., Mathews, D. H., and Turner, D. H. (2006) Biochemistry 45:9819-9832; Wuchty, S., Fontana, W., Hofacker, I. L., and Schuster, P. (1999) Biopolymers 49:145-165].

- [0078] 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 5'- 및/또는 3'-말단 오버행을 함유한다. 폴리뉴클레오티드의 한 말단 상의 뉴클레오티드 오버행의 수 및/또는 서열은 폴리뉴클레오티드의 다른 말단과 동일하거나 상이할 수 있다. 특정 실시양태에서, 오버행 뉴클레오티드 중 1개 이상은 화학적 변형(들), 예컨대 포스포로티오에이트 또는 2'-OMe 변형을 함유할 수 있다.
- [0079] 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 변형되지 않는다. 다른 실시양태에서, 적어도 1개의 뉴클레오티드는 변형된다. 추가 실시양태에서, 변형은 가이드 서열의 5'-말단으로부터의 제2 뉴클레오티드에서의 2'-H 또는 2'-변형된 리보스 당을 포함한다. "제2 뉴클레오티드"는 폴리뉴클레오티드의 5'-말단으로부터 제2 뉴클레오티드로 정의된다.
- [0080] 본원에 사용된 "2'-변형된 리보스 당"은 2'-OH 기를 갖지 않는 리보스 당을 포함한다. "2'-변형된 리보스 당"은 2'-데옥시리보스 (변형되지 않은 정규 DNA 뉴클레오티드에서 발견됨)를 포함하지 않는다. 예를 들어, 2'-변형된 리보스 당은 2'-O-알킬 뉴클레오티드, 2'-데옥시-2'-플루오로 뉴클레오티드, 2'-데옥시 뉴클레오티드 또는 그의 조합일 수 있다.
- [0081] 특정 실시양태에서, 2'-변형된 뉴클레오티드는 피리미딘 뉴클레오티드 (예를 들어, C/U)이다. 2'-O-알킬 뉴클레오티드의 예는 2'-O-메틸 뉴클레오티드 또는 2'-O-알릴 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0082] 특정 실시양태에서, 상기 언급된 5'-말단 변형을 갖는 본 발명의 sd-rxRNA 폴리뉴클레오티드는 명시된 5'-말단 변형을 갖지 않는 유사한 구조물과 비교할 경우 유의하게 (예를 들어, 적어도 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 그 초과) 덜한 "오프-타겟" 유전자 침묵을 나타내어, RNAi 시약 또는 치료제의 전체 특이성을 크게 개선시킨다.
- [0083] 본원에 사용된 "오프-타겟" 유전자 침묵은, 예를 들어 안티센스 (가이드) 서열과 비의도 표적 mRNA 서열 사이의 허위 서열 상동성으로 인한 비의도 유전자 침묵을 지칭한다.
- [0084] 본 발명의 이러한 측면에 따라, 특정 가이드 가닥 변형은 RNAi 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 (또는 RNAi 활성의 감소가 전혀 없이) 뉴클레아제 안정성을 추가로 증가시키고/거나 인터페론 유도를 낮춘다.
- [0085] 변형의 특정 조합은, 표적 유전자 발현을 억제하는 증진된 능력, 증진된 혈청 안정성 및/또는 증가된 표적 특이성 등에 의해 일부 증명된 바와 같이 추가의 예상외의 이점을 발생시킬 수 있다.
- [0086] 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 가이드 가닥의 5'-말단 상의 제2 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 변형 뉴클레오티드를 포함하고, 다른 변형된 뉴클레오티드를 갖지 않는다.
- [0087] 다른 측면에서, 본 발명의 sd-rxRNA 구조는 마이크로RNA 메커니즘에 의한 서열-의존성 유전자 침묵을 매개한다. 본원에 사용된 용어 "마이크로RNA" ("miRNA")는 또한 관련 기술분야에서 "소형 일시적 RNA" ("stRNA")로도 언급되고, (예를 들어, 바이러스, 포유동물 또는 식물 계통에 의해) 유전적으로 코딩되고 RNA 침묵을 지시 또는 매개할 수 있는 소형 (10-50개의 뉴클레오티드) RNA를 지칭한다. "miRNA 장애"는 miRNA의 이상 발현 또는 활성을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 지칭할 것이다.
- [0088] 마이크로RNA는 마우스, 유충류 및 포유동물에서 중요 경로, 예컨대 발생 및 암에서 표적 유전자를 하향-조절하는데 수반된다. 마이크로RNA 메커니즘을 통한 유전자 침묵은 miRNA 및 그의 표적 메신저 RNA (mRNA)의 특이적이지만 불완전한 염기-쌍형성에 의해 달성된다. 표적 mRNA 발현의 마이크로RNA-매개된 하향-조절에는 다양한 메커니즘이 사용될 수 있다.
- [0089] miRNA는 식물 및 동물의 발생 중에 전사 후 또는 번역 수준에서 유전자 발현을 조절할 수 있는 대략 22개의 뉴클레오티드의 비코딩 RNA이다. miRNA의 하나의 통상의 특색은 이들이 모두 pre-miRNA로 불리는 대략 70개의 뉴클레오티드 전구체 RNA 스템-루프로부터 대개는 다이스, RNase III-유형 효소 또는 그의 상동체에 의해 절단된다는 것이다. 자연 발생 miRNA는 생체내 내인성 유전자에 의해 발현되고, 다이스 또는 다른 RNase에 의해 헤어핀 또는 스템-루프 전구체 (pre-miRNA 또는 pri-miRNA)로부터 프로세싱된다. miRNA는 생체내에서 일시적으로 이중-가닥 듀플렉스로 존재할 수 있지만, 오직 1개의 가닥이 RISC 복합체에 의해 포획되어 유전자 침묵을 지시

한다.

- [0090] 일부 실시양태에서, 세포 흡수에 효과적이고 miRNA 활성을 억제하는 sd-rxRNA 화합물의 버전이 기재되어 있다. 본질적으로, 화합물은 RISC 진입 버전과 유사하지만, 대형 가닥 화학적 변형 패턴이 절단을 차단하고 RISC 작용의 효과적인 억제제로서 작용하는 방식으로 최적화된다. 예를 들어, 화합물은 이전에 기재된 포스포로티오에이트 함량으로 완전히 또는 거의 0-메틸 변형될 수 있다. 이러한 유형의 화합물의 경우, 일부 실시양태에서 5' 인산화가 필수적이지 않다. 세포 흡수 및 효율적인 RISC 로딩을 촉진한다는 점에서 이중 가닥 영역의 존재가 바람직하다.
- [0091] 서열-특이적 조절자로서 소형 RNA를 사용하는 또 다른 경로는 RNA 간섭 (RNAi) 경로이며, 이는 세포 내 이중-가닥 RNA (dsRNA)의 존재에 대한 진화적으로 보존된 반응이다. dsRNA는 다이스에 의해 ~20-염기쌍 (bp) 듀플렉스의 소형-간섭 RNA (siRNA)로 절단된다. 이들 소형 RNA는 RNA-유도 침묵 복합체 (RISC)라 불리는 다중단백질 이펙터 복합체로 어셈블리된다. 이어서, siRNA는 완전한 상보성을 갖는 표적 mRNA의 절단을 가이드한다.
- [0092] 생물발생, 단백질 복합체 및 기능의 일부 측면은 siRNA 경로와 miRNA 경로 사이에 공유된다. 단일-가닥 폴리뉴클레오티드는 siRNA 메카니즘에서의 dsRNA 또는 miRNA 메카니즘에서의 마이크로RNA를 모방할 수 있다.
- [0093] 특정 실시양태에서, 변형된 RNAi 구축물은 동일한 서열을 갖는 변형되지 않은 RNAi 구축물과 비교하여 혈청 및/또는 뇌 척수액에서 개선된 안정성을 가질 수 있다.
- [0094] 특정 실시양태에서, RNAi 구축물의 구조는 인간, 마우스 및 다른 설치류, 및 다른 비-인간 포유동물로부터의 1차 세포를 포함한 포유동물 1차 세포와 같은 1차 세포에서 인터페론 반응을 유도하지 않는다. 특정 실시양태에서, RNAi 구축물은 또한 무척추동물 유기체에서 표적 유전자의 발현을 억제하는데 사용될 수 있다.
- [0095] 생체내에서 대상 구축물의 안정성을 추가로 증가시키기 위해, 구조의 3'-말단을 보호기(들)로 차단할 수 있다. 예를 들어, 역전된 뉴클레오티드, 역전된 무염기성 모이어티 또는 아미노-말단 변형된 뉴클레오티드와 같은 보호기를 사용할 수 있다. 역전된 뉴클레오티드는 역전된 데옥시뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 역전된 무염기성 모이어티는 역전된 데옥시무염기성 모이어티, 예컨대 3',3'-연결된 또는 5',5'-연결된 데옥시무염기성 모이어티를 포함할 수 있다.
- [0096] 본 발명의 RNAi 구축물은 표적 유전자(들)에 의해 코딩되는 임의의 표적 단백질의 합성을 억제할 수 있다. 본 발명은 시험관내 또는 생체내 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하는 방법을 포함한다. 이로서, 본 발명의 RNAi 구축물은 표적 유전자의 과다발현을 특징으로 하는 질환을 갖는 환자를 치료하는데 유용하다.
- [0097] 표적 유전자는 세포에 대해 내인성 또는 외인성 (예를 들어, 바이러스에 의해 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 세포 내로 도입됨)일 수 있다. 이러한 방법은 표적 유전자의 발현을 억제하기에 충분한 양의 RNA를 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 예로서, 이러한 RNA 분자는, 조성물이 표적 유전자의 발현을 억제하도록 표적 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 가이드 가닥을 가질 수 있다.
- [0098] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산을 발현하는 벡터, 및 이러한 벡터 또는 핵산을 포함하는 세포에 관한 것이다. 상기 세포는 생체내 또는 배양물 내 포유동물 세포, 예컨대 인간 세포일 수 있다.
- [0099] 본 발명은 추가로 대상 RNAi 구축물, 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0100] 본 방법은 시험관내, 생체의 또는 생체내, 예를 들어 배양물 내 포유동물 세포, 예컨대 배양물 내 인간 세포에서 수행될 수 있다.
- [0101] 표적 세포 (예를 들어, 포유동물 세포)는 전달 시약, 예컨대 지질 (예를 들어, 양이온성 지질) 또는 리포솜의 존재 하에 접촉될 수 있다.
- [0102] 본 발명의 또 다른 측면은, 포유동물 세포를 대상 RNAi 구축물을 발현하는 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는, 포유동물 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0103] 본 발명의 한 측면에서, 약 16개 내지 약 30개의 뉴클레오티드 크기 범위의 제1 폴리뉴클레오티드; 약 26개 내지 약 46개의 뉴클레오티드 크기 범위의 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하는 보다 긴 듀플렉스 폴리뉴클레오티드가 제공되며, 여기서 제1 폴리뉴클레오티드 (안티센스 가닥)는 제2 폴리뉴클레오티드 (센스 가닥) 및 표적 유전자 둘 다에 상보적이고, 여기서 둘 다의 폴리뉴클레오티드는 듀플렉스를 형성하고, 여기서 제1 폴리뉴클레오티드는 6개의 염기 길이보다 긴 단일 가닥 영역을 함유하며 대안적인 화학적 변형 패턴으로 변형되고/거나 세포 전달을 용이하게 하는 접합체 모이어티를 포함한다. 이러한 실시양태에서, 패신저 가닥의 뉴클레오티드 중 약

40% 내지 약 90%, 가이드 가닥의 뉴클레오티드 중 약 40% 내지 약 90%, 및 제1 폴리뉴클레오티드의 단일 가닥 영역의 뉴클레오티드 중 약 40% 내지 약 90%는 화학적으로 변형된 뉴클레오티드이다.

- [0104] 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 듀플렉스에서 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 상기에서 상세하게 논의된 바와 같은 것일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 2' F 변형된 뉴클레오티드, 2'-O-메틸 변형된 및 2' 테옥시 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 특정한 실시양태에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 뉴클레오티드 염기의 "소수성 변형"으로 인한 것이다. 또 다른 특정한 실시양태에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트이다. 추가의 특정한 실시양태에서, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 2'-O-메틸, 2' 테옥시, 소수성 변형 및 포스포로티오에이트의 조합이다. 이러한 군의 변형은 리보스 고리, 백본 및 뉴클레오티드의 변형을 지칭하는 것이므로, 일부 변형된 뉴클레오티드가 모든 3가지 변형 유형의 조합을 보유하는 것이 가능하다.
- [0105] 또 다른 실시양태에서, 화학적 변형은 듀플렉스의 다양한 영역의 도처에서 동일하지 않다. 특정한 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드 (패신저 가닥)는 다양한 위치에서 다수의 다양한 화학적 변형을 갖는다. 이러한 폴리뉴클레오티드의 경우에, 뉴클레오티드 중 최대 90%가 화학적으로 변형되고/거나 도입된 미스매치를 가질 수 있다.
- [0106] 또 다른 실시양태에서, 제1 또는 제2 폴리뉴클레오티드의 화학적 변형은 우리딘 및 시토신의 5' 위치 변형 (4-피리딜, 2-피리딜, 인돌릴, 페닐 (C_6H_5OH); 트립토판 ((C_8H_6N) $CH_2CH(NH_2)CO$), 이소부틸, 부틸, 아미노벤질; 페닐; 나프틸 등)을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 여기서 화학적 변형은 뉴클레오티드의 염기 쌍형성 능력을 변경시킬 수 있다. 가이드 가닥의 경우에, 본 발명의 이러한 측면의 중요한 특색은 안티센스의 5' 말단에 대한 화학적 변형의 위치 및 순서이다. 예를 들어, 가이드 가닥의 5' 말단의 화학적 인산화는 통상적으로 효능에 유익하다. 센스 가닥의 시드 영역 (5' 말단에 대해 위치 2-7)에서의 O-메틸 변형은 일반적으로 널리 허용되지 않는 반면에, 2'F 및 테옥시는 널리 허용된다. 가이드 가닥의 중앙 부분 및 가이드 가닥의 3' 말단은 적용되는 화학적 변형의 유형에 있어 보다 허용성이다. 테옥시 변형은 가이드 가닥의 3' 말단에서 허용되지 않는다.
- [0107] 본 발명의 이러한 측면의 고유한 특색은 염기에 대한 소수성 변형의 사용을 수반한다. 한 실시양태에서, 소수성 변형은 바람직하게는 가이드 가닥의 5' 말단 근처에 위치하며, 다른 실시양태에서 이는 가이드 가닥의 중간에 국재화되고, 다른 실시양태에서 이는 가이드 가닥의 3' 말단에 국재화되며, 또 다른 실시양태에서 이는 폴리뉴클레오티드의 전체 길이에 걸쳐 분포한다. 동일한 유형의 패턴이 듀플렉스의 패신저 가닥에 적용될 수 있다.
- [0108] 분자의 다른 부분은 단일 가닥 영역이다. 일부 실시양태에서, 단일 가닥 영역은 7 내지 40개의 뉴클레오티드 범위인 것으로 예상된다.
- [0109] 한 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드의 단일 가닥 영역은 40% 내지 90% 소수성 염기 변형, 40%-90% 포스포로티오에이트, 40%-90% 리보스 모이어티의 변형 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 변형을 함유한다.
- [0110] RISC 복합체에 로딩되는 가이드 가닥 (제1 폴리뉴클레오티드)의 효율은 고도로 변형된 폴리뉴클레오티드로 인해 변경될 수 있고, 따라서 한 실시양태에서, 듀플렉스 폴리뉴클레오티드는 효율적인 가이드 가닥 로딩을 촉진하기 위해 가이드 가닥 (제1 폴리뉴클레오티드) 상의 뉴클레오티드 9, 11, 12, 13 또는 14 및 센스 가닥 (제2 폴리뉴클레오티드) 상의 대향하는 뉴클레오티드 사이에 미스매치를 포함한다.
- [0111] 본 발명의 보다 상세한 측면은 하기 섹션에 기재되어 있다.
- [0112] 듀플렉스 특징
- [0113] 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 2개의 개별적인 상보적 핵산 가닥에 의해 형성될 수 있다. 듀플렉스 형성은 표적 유전자를 함유하는 세포의 내부 또는 외부에서 일어날 수 있다.
- [0114] 본원에 사용된 용어 "듀플렉스"는 상보적 서열에 수소 결합된 이중-가닥 핵산 분자(들)의 영역을 포함한다. 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 표적 유전자에 대해 센스인 뉴클레오티드 서열 및 표적 유전자에 대해 안티센스인 상보적 서열을 포함할 수 있다. 센스 및 안티센스 뉴클레오티드 서열은 표적 유전자 서열에 상응하고, 예를 들어 표적 유전자 억제를 달성하기 위해 표적 유전자 서열과 동일하거나 충분히 동일하다 (예를 들어, 약 적어도 약 98% 동일, 96% 동일, 94%, 90% 동일, 85% 동일 또는 80% 동일함).

- [0115] 특정 실시양태에서, 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 그의 전장에 걸쳐 이중-가닥이고, 즉 분자의 어느 한 말단에 오버행 단일-가닥 서열을 갖지 않는, 즉 평활-말단이다. 다른 실시양태에서, 개별 핵산 분자는 상이한 길이일 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 그의 전체 길이에 걸쳐 이중-가닥이 아니다. 예를 들어, 2개의 개별 핵산 분자를 사용하는 경우에, 분자 중 1개, 예를 들어 안티센스 서열을 포함하는 제1 분자는 이에 혼성화한 제2 분자보다 길 수 있다 (분자의 일부가 단일-가닥으로 남음). 마찬가지로, 단일 핵산 분자를 사용하는 경우에, 분자의 일부가 어느 한 말단에서 단일-가닥으로 남을 수 있다.
- [0116] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 미스매치 및/또는 루프 또는 돌출을 함유하지만, 올리고뉴클레오티드 길이의 적어도 약 70%에 걸쳐 이중-가닥이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 길이의 적어도 약 80%에 걸쳐 이중-가닥이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 길이의 적어도 약 90%-95%에 걸쳐 이중-가닥이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 길이의 적어도 약 96%-98%에 걸쳐 이중-가닥이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 적어도 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 미스매치를 함유한다.
- [0117] 변형
- [0118] 본 발명의 뉴클레오티드는 당 모이어티, 포스포디에스테르 연결 및/또는 염기를 포함한 다양한 위치에서 변형될 수 있다.
- [0119] 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드의 염기 모이어티가 변형될 수 있다. 예를 들어, 피리미딘 염기는 피리미딘 고리의 2, 3, 4, 5 및/또는 6 위치에서 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시토신의 엑소시클릭 아민이 변형될 수 있다. 또한, 퓨린 염기가 변형될 수 있다. 예를 들어, 퓨린 염기는 1, 2, 3, 6, 7 또는 8 위치에서 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 아데닌의 엑소시클릭 아민이 변형될 수 있다. 일부 경우에, 염기 모이어티의 고리에서 질소 원자가 또 다른 원자, 예컨대 탄소로 치환될 수 있다. 염기 모이어티에 대한 변형은 임의의 적합한 변형일 수 있다. 변형의 예는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 염기 변형은 알킬화 퓨린 또는 피리미딘, 아실화 퓨린 또는 피리미딘, 또는 다른 헤테로사이클을 포함한다.
- [0120] 일부 실시양태에서, 피리미딘은 5 위치에서 변형될 수 있다. 예를 들어, 피리미딘의 5 위치는 알킬 기, 알킬닐 기, 알케닐 기, 아실 기 또는 그의 치환된 유도체로 변형될 수 있다. 다른 예에서, 피리미딘의 5 위치는 히드록실 기 또는 알콕실 기, 또는 그의 치환된 유도체로 변형될 수 있다. 또한, 피리미딘의 N^4 위치는 알킬화될 수 있다. 추가의 예에서, 피리미딘 5-6 결합은 포화될 수 있고/거나, 피리미딘 고리 내 질소 원자가 탄소 원자로 치환될 수 있고/거나, O^2 및 O^4 원자가 황 원자로 치환될 수 있다. 다른 변형도 또한 가능하다는 것을 이해해야 한다.
- [0121] 다른 예에서, 퓨린의 N^7 위치 및/또는 N^2 및/또는 N^3 위치가 알킬 기 또는 그의 치환된 유도체로 변형될 수 있다. 추가의 예에서, 제3 고리는 퓨린 비시클릭 고리계에 융합될 수 있고/거나 퓨린 고리계 내 질소 원자는 탄소 원자로 치환될 수 있다. 다른 변형도 또한 가능하다는 것을 이해해야 한다.
- [0122] 5 위치에서 변형된 피리미딘의 비제한적 예는 미국 특허 5,591,843, 미국 특허 7,205,297, 미국 특허 6,432,963, 및 미국 특허 6,020,483에 개시되어 있고; N^4 위치에서 변형된 피리미딘의 비제한적 예는 미국 특허 5,580,731에 개시되어 있고; 8 위치에서 변형된 퓨린의 비제한적 예는 미국 특허 6,355,787 및 미국 특허 5,580,972에 개시되어 있고; N^6 위치에서 변형된 퓨린의 비제한적 예는 미국 특허 4,853,386, 미국 특허 5,789,416, 및 미국 특허 7,041,824에 개시되어 있고; 2 위치에서 변형된 퓨린의 비제한적 예는 미국 특허 4,201,860 및 미국 특허 5,587,469에 개시되어 있고, 이는 모두 본원에 참조로 포함된다.
- [0123] 변형된 염기의 비제한적 예는 N^4, N^4 -에타노시토신, 7-테아자크산토신, 7-테아자구아노신, 8-옥소- N^6 -메틸아데닌, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록실메틸) 우라실, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸 우라실, 디히드로우라실, 이노신, N^6 -이소펜테닐-아데닌, 1-메틸아데닌, 1-메틸슈도우라실, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N^6 -메틸아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸 우라실, 5-메톡시 아미노메틸-2-티오우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오- N^6 -이소펜테닐아데닌, 슈도우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실,

4-티오우라실, 5-메틸우라실, 2-티오시토신 및 2,6-디아미노퓨린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염기 모이어티는 퓨린 또는 피리미딘 이외의 다른 헤테로시클릭 염기일 수 있다. 헤테로시클릭 염기는 임의로 변형 및/또는 치환될 수 있다.

- [0124] 당 모이어티는 천연, 비변형 당, 예를 들어 모노사카라이드 (예컨대, 펜토스, 예를 들어 리보스, 데옥시리보스), 변형된 당 및 당 유사체를 포함한다. 일반적으로, 뉴클레오모노머, 특히 당 모이어티의 가능한 변형은, 예를 들어 히드록실 기 중 1개 이상의 할로젠, 헤테로원자, 지방족 기로의 대체, 또는 히드록실 기의 에테르, 아민, 티올 등으로서의 관능화를 포함한다.
- [0125] 변형된 뉴클레오모노머의 특히 유용한 하나의 군은 2'-O-메틸 뉴클레오티드이다. 이러한 2'-O-메틸 뉴클레오티드는 "메틸화된" 것으로 언급될 수 있으며, 상응하는 뉴클레오티드는 비메틸화된 뉴클레오티드로부터 알킬화 후에 생성되거나 또는 메틸화된 뉴클레오티드 시약으로부터 직접 생성될 수 있다. 변형된 뉴클레오모노머는 비변형된 뉴클레오모노머와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 메틸화된 및 비메틸화된 뉴클레오모노머 둘 다를 함유할 수 있다.
- [0126] 일부 예시적인 변형된 뉴클레오모노머는 당- 또는 백본-변형된 리보뉴클레오티드를 포함한다. 변형된 리보뉴클레오티드는 (자연 발생 염기 대신) 비-자연 발생 염기, 예컨대 5'-위치에서 변형된 우리딘 또는 시티딘, 예를 들어 5'-(2-아미노)프로필 우리딘 및 5'-브로모 우리딘; 8-위치에서 변형된 아데노신 및 구아노신, 예를 들어 8-브로모 구아노신; 데아자 뉴클레오티드, 예를 들어 7-데아자-아데노신; 및 N-알킬화된 뉴클레오티드, 예를 들어 N6-메틸 아데노신을 함유할 수 있다. 또한, 당-변형된 리보뉴클레오티드는 H, 알콕시 (또는 OR), R 또는 알킬, 할로젠, SH, SR, 아미노 (예컨대, NH₂, NHR, NR₂), 또는 CN 기 (여기서, R은 저급 알킬, 알케닐 또는 알킬닐임)로 대체된 2'-OH 기를 가질 수 있다.
- [0127] 또한, 변형된 리보뉴클레오티드는 변형된 기에 의해 대체된 인접 리보뉴클레오티드에 연결된 포스포디에스테르 기, 예를 들어 포스포로티오에이트 기를 가질 수 있다. 보다 일반적으로, 다양한 뉴클레오티드 변형이 조합될 수 있다.
- [0128] 안티센스 (가이드) 가닥이 표적 유전자 (또는 유전자들)의 적어도 일부와 실질적으로 동일할 수 있지만, 적어도 염기 쌍형성 특성과 관련하여, 서열은 예를 들어 표적 유전자의 표현형의 발현을 억제하는데 유용하도록 완전히 동일할 필요는 없다. 일반적으로, 보다 높은 상동성이 보다 짧은 안티센스 유전자의 사용을 보완하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 안티센스 가닥은 일반적으로 (안티센스 배향이지만) 표적 유전자와 실질적으로 동일할 것이다.
- [0129] 또한, 2'-O-메틸 변형된 RNA의 사용이 세포 스트레스 반응을 최소화하는 것이 바람직한 환경에서 유익할 수 있다. 2'-O-메틸 뉴클레오모노머를 갖는 RNA는 비변형된 RNA를 인식하는 것으로 생각되는 세포 기구에 의해 인식될 수 없다. 2'-O-메틸화된 또는 부분적으로 2'-O-메틸화된 RNA의 사용은 표적 RNA 억제를 유지하면서 이중-가닥 핵산에 대한 인터페론 반응을 회피할 수 있다. 이는, 예를 들어 인터페론 반응을 유도하는 짧은 RNAi (예를 들어, siRNA) 서열 및 인터페론 반응을 유도할 수 있는 보다 긴 RNAi 서열 둘 다에서 인터페론 또는 다른 세포 스트레스 반응을 회피하는데 유용할 수 있다.
- [0130] 전체적으로, 변형된 당은 D-리보스, 2'-O-알킬 (2'-O-메틸 및 2'-O-에틸 포함), 즉, 2'-알콕시, 2'-아미노, 2'-S-알킬, 2'-할로 (2'-플루오로 포함), 2'-메톡시에톡시, 2'-알릴옥시 (-OCH₂CH=CH₂), 2'-프로파르길, 2'-프로필, 에티닐, 에테닐, 프로페닐 및 시아노 등을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 당 모이어티는 핵소스일 수 있고, 문헌 [Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)]에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오티드 내로 혼입될 수 있다. 예시적인 뉴클레오모노머는 예를 들어 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,849,902에서 찾아볼 수 있다.
- [0131] 구체적 관능기 및 화학 용어의 정의는 하기에서 보다 상세히 기재된다. 본 발명의 목적상, 화학 원소는 원소 주기율표, CAS 버전, 문헌 [Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed.] 표지 뒷면에 따라 확인되며, 구체적 관능기는 일반적으로 본원에 기재된 바와 같이 정의된다. 추가로, 유기 화학, 뿐만 아니라 구체적 관능성 모이어티 및 반응성의 일반 원리는 문헌 [Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999]에 기재되어 있으며, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.
- [0132] 본 발명의 특정 화합물은 특정한 기하 또는 입체이성질체 형태로 존재할 수 있다. 본 발명은 시스- 및 트랜스-이성질체, R- 및 S-거울상이성질체, 부분입체이성질체, (D)-이성질체, (L)-이성질체, 그의 라세미 혼합물, 및

그의 다른 혼합물을 포함한 모든 이러한 화합물이 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 고려한다. 추가의 비대칭 탄소 원자가 알킬기와 같은 치환기에 존재할 수 있다. 모든 이러한 이성질체 뿐만 아니라 그의 혼합물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0133] 임의의 다양한 이성질체 비를 함유하는 이성질체 혼합물이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 예를 들어, 단지 2종의 이성질체만을 조합하는 경우에, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1, 또는 100:0 이성질체 비를 함유하는 혼합물이 본 발명에 의해 모두 고려된다. 보다 복잡한 이성질체 혼합물에 대해 유사한 비가 고려된다는 점을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 용이하게 인식할 것이다.

[0134] 예를 들어, 본 발명의 화합물의 특정한 거울상이성질체가 요구되는 경우에, 이는 비대칭 합성 또는 키랄 보조체를 이용한 유도에 의해 제조될 수 있고, 여기서 생성된 부분입체이성질체 혼합물을 분리하고 보조기를 절단하여 순수한 목적하는 거울상이성질체를 제공한다. 대안적으로, 분자가 염기성 관능기, 예컨대 아미노, 또는 산성 관능기, 예컨대 카르복실기를 함유하는 경우에, 적절한 광학-활성 산 또는 염기를 사용하여 부분입체이성질체 염을 형성한 후, 이에 따라 형성된 부분입체이성질체를 관련 기술분야에 널리 공지된 분별 결정화 또는 크로마토그래피 방법으로 분할하고, 이어서 순수한 거울상이성질체를 회수한다.

[0135] 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 3' 및 5' 말단을 포함한다 (원형 올리고뉴클레오티드의 경우는 제외). 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 3' 및 5' 말단은, 예를 들어 3' 또는 5' 연결을 변형시켜 뉴클레아제로부터 실질적으로 보호될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,849,902 및 WO 98/13526). 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 "차단기"를 포함함으로써 저항성이 생길 수 있다. 본원에 사용된 용어 "차단기"는 합성의 경우에 보호기 또는 커플링기로서 올리고뉴클레오티드 또는 뉴클레오모노머에 부착될 수 있는 (예를 들어, OH 기 이외의) 치환기 (예를 들어, FITC, 프로필 (CH₂-CH₂-CH₃), 글리콜 (-O-CH₂-CH₂-O-) 포스페이트 (PO₃²⁻), 수소 포스포네이트 또는 포스포라미다이트)를 지칭한다. 또한, "차단기"는 올리고뉴클레오티드의 5' 및 3' 말단을 보호하는 "말단 차단기" 또는 "엑소뉴클레아제 차단기", 예컨대 변형된 뉴클레오티드 및 비-뉴클레오티드 엑소뉴클레아제 저항성 구조를 포함한다.

[0136] 예시적인 말단-차단기는 캡 구조 (예를 들어, 7-메틸구아노신 캡), 역전된 뉴클레오모노머, 예를 들어 3'-3' 또는 5'-5' 말단 역전 (예를 들어, 문헌 [Ortiagao et al. 1992. Antisense Res. Dev. 2:129] 참조), 메틸포스포네이트, 포스포라미다이트, 비-뉴클레오티드 기 (예를 들어, 비-뉴클레오티드 링커, 아미노 링커, 접합체) 등을 포함한다. 3' 말단 뉴클레오모노머는 변형된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 3' 말단 뉴클레오모노머는 올리고뉴클레오티드의 3'-엑소뉴클레아제 분해를 막는 차단기에 의해 임의로 치환될 수 있는 3'-O를 포함한다. 예를 들어, 3'-히드록실은 3'→3' 뉴클레오티드간 연결을 통해 뉴클레오티드로 에스테르화될 수 있다. 예를 들어, 알킬옥시 라디칼은 메톡시, 에톡시 또는 이소프로폭시, 및 바람직하게는 에톡시일 수 있다. 임의로, 3' 말단에서 3'→3' 연결된 뉴클레오티드는 치환 연결에 의해 연결될 수 있다. 뉴클레아제 분해를 감소시키기 위해, 5' 가장 마지막 3'→5' 연결은 변형된 연결, 예를 들어 포스포로티오에이트 또는 P-알콕시포스포트리에스테르 연결일 수 있다. 바람직하게는, 2개의 5' 가장 마지막 3'→5' 연결이 변형된 연결이다. 임의로, 5' 말단 히드록시 모이어티는 인 함유 모이어티, 예를 들어 포스페이트, 포스포로티오에이트 또는 P-에톡시포스페이트로 에스테르화될 수 있다.

[0137] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 바와 같은 합성 방법이 다양한 보호기를 사용한다는 것을 인식할 것이다. 본원에 사용된 용어 "보호기"는 특정한 관능성 모이어티, 예를 들어 O, S 또는 N을 일시적으로 차단하여 반응이 다관능성 화합물의 또 다른 반응성 부위에서 선택적으로 수행될 수 있도록 하는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, 보호기는 양호한 수율로 선택적으로 반응하여 계획된 반응에 대해 안정한 보호된 기질을 제공하고; 보호기는 용이하게 이용가능한, 바람직하게는 다른 관능기를 공격하지 않는 비-독성 시약에 의해 양호한 수율로 선택적으로 제거될 수 있어야 하며; 보호기는 용이하게 분리가능한 유도체를 (보다 바람직하게는 신규 입체생성 중심의 생성 없이) 형성하고; 보호기는 최소의 추가의 관능성을 가져 추가 반응 부위를 회피한다. 본원에 상술된 바와 같이, 산소, 황, 질소 및 탄소 보호기가 사용될 수 있다. 히드록실 보호기는 메틸, 메톡시메틸 (MOM), 메틸티오메틸 (MTM), t-부틸티오메틸, (페닐디메틸실릴)메톡시메틸 (SMOM), 벤질옥시메틸 (BOM), p-메톡시벤질옥시메틸 (PMBM), (4-메톡시페녹시)메틸 (p-AOM), 구아이어아콜메틸 (GUM), t-부톡시메틸, 4-펜테닐옥시메틸 (POM), 실록시메틸, 2-메톡시에톡시메틸 (MEM), 2,2,2-트리클로로에톡시메틸, 비스(2-클로로에톡시)메틸, 2-(트리메틸실릴)에톡시메틸 (SEMOR), 테트라히드로피라닐 (THP), 3-브로모테트라히드로피라닐, 테트라히드로티오피라닐, 1-메톡시시클로헥실, 4-메톡시테트라히드로피라닐 (MTHP), 4-메톡시테트라히드로티오피라닐, 4-메톡시테트라히드로티오피라닐 S,S-디옥시드, 1-[(2-클로로-4-메틸)페닐]-4-메톡시피페리딘-4-일 (CTMP), 1,4-

디옥산-2-일, 테트라히드로푸라닐, 테트라히드로티오푸라닐, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-옥타히드로-7,8,8-트리메틸-4,7-메타노벤조푸란-2-일, 1-에톡시에틸, 1-(2-클로로에톡시)에틸, 1-메틸-1-메톡시에틸, 1-메틸-1-벤질옥시에틸, 1-메틸-1-벤질옥시-2-플루오로에틸, 2,2,2-트리클로로에틸, 2-트리메틸실릴에틸, 2-(페닐셀레닐)에틸, t-부틸, 알릴, p-클로로페닐, p-메톡시페닐, 2,4-디니트로페닐, 벤질, p-메톡시벤질, 3,4-디메톡시벤질, o-니트로벤질, p-니트로벤질, p-할로벤질, 2,6-디클로로벤질, p-시아노벤질, p-페닐벤질, 2-피콜릴, 4-피콜릴, 3-메틸-2-피콜릴 N-옥시도, 디페닐메틸, p,p'-디니트로벤즈히드릴, 5-디벤조수베릴, 트리페닐메틸, α-나프틸디페닐메틸, p-메톡시페닐디페닐메틸, 디(p-메톡시페닐)페닐메틸, 트리(p-메톡시페닐)메틸, 4-(4'-브로모벤아실옥시페닐)디페닐메틸, 4,4',4"-트리스(4,5-디클로로프탈이미도페닐)메틸, 4,4',4"-트리스(레볼리노일옥시페닐)메틸, 4,4',4"-트리스(벤조일옥시페닐)메틸, 3-(이미다졸-1-일)비스(4',4"-디메톡시페닐)메틸, 1,1-비스(4-메톡시페닐)-1'-피레닐메틸, 9-안트릴, 9-(9-페닐)크산테닐, 9-(9-페닐-10-옥소)안트릴, 1,3-벤조디티올란-2-일, 벤즈이스티아졸릴 S,S-디옥시도, 트리메틸실릴 (TMS), 트리에틸실릴 (TES), 트리아소프로필실릴 (TIPS), 디메틸이소프로필실릴 (IPDMS), 디에틸이소프로필실릴 (DEIPS), 디메틸테실실릴, t-부틸디메틸실릴 (TBDMS), t-부틸디페닐실릴 (TBDPS), 트리벤질실릴, 트리-p-크실릴실릴, 트리페닐실릴, 디페닐메틸실릴 (DPMS), t-부틸메톡시페닐실릴 (TBMP), 포르메이트, 벤조포르메이트, 아세테이트, 클로로아세테이트, 디클로로아세테이트, 트리클로로아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 메톡시아세테이트, 트리페닐메톡시아세테이트, 페녹시아세테이트, p-클로로페녹시아세테이트, 3-페닐프로피오네이트, 4-옥소펜타노에이트 (레볼리네이트), 4,4-(에틸렌디티오)펜타노에이트 (레볼리노일디티오아세탈), 피발로에이트, 아다만토에이트, 크로토네이트, 4-메톡시크로토네이트, 벤조에이트, p-페닐벤조에이트, 2,4,6-트리메틸벤조에이트 (메시토에이트), 알킬 메틸 카르보네이트, 9-플루오레닐메틸 카르보네이트 (Fmoc), 알킬 에틸 카르보네이트, 알킬 2,2,2-트리클로로에틸 카르보네이트 (Troc), 2-(트리메틸실릴)에틸 카르보네이트 (TMSEC), 2-(페닐술포닐) 에틸 카르보네이트 (Psec), 2-(트리페닐포스포니오) 에틸 카르보네이트 (Peoc), 알킬 이소부틸 카르보네이트, 알킬 비닐 카르보네이트 알킬 알릴 카르보네이트, 알킬 p-니트로페닐 카르보네이트, 알킬 벤질 카르보네이트, 알킬 p-메톡시벤질 카르보네이트, 알킬 3,4-디메톡시벤질 카르보네이트, 알킬 o-니트로벤질 카르보네이트, 알킬 p-니트로벤질 카르보네이트, 알킬 S-벤질 티오카르보네이트, 4-에톡시-1-나프틸 카르보네이트, 메틸 디티오카르보네이트, 2-아이오도벤조에이트, 4-아지도부티레이트, 4-니트로-4-메틸펜타노에이트, o-(디브로모메틸)벤조에이트, 2-포르밀벤젠술포네이트, 2-(메틸티오메톡시)에틸, 4-(메틸티오메톡시)부티레이트, 2-(메틸티오메톡시메틸)벤조에이트, 2,6-디클로로-4-메틸페녹시아세테이트, 2,6-디클로로-4-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)페녹시아세테이트, 2,4-비스(1,1-디메틸프로필)페녹시아세테이트, 클로로디페닐아세테이트, 이소부티레이트, 모노숙시노에이트, (E)-2-메틸-2-부테노에이트, o-(메톡시카르보닐)벤조에이트, α-나프토에이트, 니트레이트, 알킬 N,N,N',N'-테트라메틸포스포디아미데이트, 알킬 N-페닐카르바메이트, 보레이트, 디메틸포스포노티오일, 알킬 2,4-디니트로페닐술포네이트, 술포에이트, 메탄술포네이트 (메실레이트), 벤질술포네이트 및 토실레이트 (Ts)를 포함한다. 1,2- 또는 1,3-디올을 보호하기 위한 보호기는 메틸렌 아세탈, 에틸리덴 아세탈, 1-t-부틸에틸리덴 케탈, 1-페닐에틸리덴 케탈, (4-메톡시페닐)에틸리덴 아세탈, 2,2,2-트리클로로에틸리덴 아세탈, 아세토니드, 시클로펜틸리덴 케탈, 시클로헥실리덴 케탈, 시클로헵틸리덴 케탈, 벤질리덴 아세탈, p-메톡시벤질리덴 아세탈, 2,4-디메톡시벤질리덴 케탈, 3,4-디메톡시벤질리덴 아세탈, 2-니트로벤질리덴 아세탈, 메톡시메틸리덴 아세탈, 에톡시메틸리덴 아세탈, 디메톡시메틸리덴 오르토 에스테르, 1-메톡시에틸리덴 오르토 에스테르, 1-에톡시에틸리덴 오르토 에스테르, 1,2-디메톡시에틸리덴 오르토 에스테르, α-메톡시벤질리덴 오르토 에스테르, 1-(N,N-디메틸아미노)에틸리덴 유도체, α-(N,N'-디메틸아미노)벤질리덴 유도체, 2-옥사시클로펜틸리덴 오르토 에스테르, 디-t-부틸실릴렌기 (DTBS), 1,3-(1,1,3,3-테트라이소프로필디실록사닐리덴) 유도체 (TIPDS), 테트라-t-부톡시디실록산-1,3-디일리덴 유도체 (TBDS), 시클릭 카르보네이트, 시클릭 보로네이트, 에틸 보로네이트 및 페닐 보로네이트를 포함한다. 아미노-보호기는 메틸 카르바메이트, 에틸 카르바메이트, 9-플루오레닐메틸 카르바메이트 (Fmoc), 9-(2-술포)플루오레닐메틸 카르바메이트, 9-(2,7-디브로모)플루오레닐메틸 카르바메이트, 2,7-디-t-부틸-[9-(10,10-디옥소-10,10,10-테트라히드로티오푸라닐)]메틸 카르바메이트 (DBD-Tmoc), 4-메톡시페나실 카르바메이트 (Phenoc), 2,2,2-트리클로로에틸 카르바메이트 (Troc), 2-트리메틸실릴에틸 카르바메이트 (Teoc), 2-페닐에틸 카르바메이트 (hZ), 1-(1-아다만틸)-1-메틸에틸 카르바메이트 (Adpoc), 1,1-디메틸-2-할로에틸 카르바메이트, 1,1-디메틸-2,2-디브로모에틸 카르바메이트 (DB-t-BOC), 1,1-디메틸-2,2,2-트리클로로에틸 카르바메이트 (TCBOC), 1-메틸-1-(4-비페닐릴)에틸 카르바메이트 (Bpoc), 1-(3,5-디-t-부틸페닐)-1-메틸에틸 카르바메이트 (t-Bumeoc), 2-(2'- 및 4'-피리딜)에틸 카르바메이트 (Pyoc), 2-(N,N-디시클로헥실카르복스아미도)에틸 카르바메이트, t-부틸 카르바메이트 (BOC), 1-아다만틸 카르바메이트 (Adoc), 비닐 카르바메이트 (Voc), 알릴 카르바메이트 (Alloc), 1-이소프로필알릴 카르바메이트 (Ipaoc), 신나밀 카르바메이트 (Coc), 4-니트로신나밀 카르바메이트 (Noc), 8-퀴놀릴 카르바메이트, N-히드록시피페리디닐 카르바메이트, 알킬디티오 카르바메이트

트, 벤질 카르바메이트 (Cbz), p-메톡시벤질 카르바메이트 (Moz), p-니트로벤질 카르바메이트, p-브로모벤질 카르바메이트, p-클로로벤질 카르바메이트, 2,4-디클로로벤질 카르바메이트, 4-메틸술포닐벤질 카르바메이트 (Msz), 9-안티릴메틸 카르바메이트, 디페닐메틸 카르바메이트, 2-메틸티오에틸 카르바메이트, 2-메틸술포닐에틸 카르바메이트, 2-(p-톨루엔술포닐)에틸 카르바메이트, [2-(1,3-디티아닐)]메틸 카르바메이트 (Dmoc), 4-메틸티오페닐 카르바메이트 (Mtpc), 2,4-디메틸티오페닐 카르바메이트 (Bmpc), 2-포스포니오에틸 카르바메이트 (Peoc), 2-트리페닐포스포니오이소프로필 카르바메이트 (Ppoc), 1,1-디메틸-2-시아노에틸 카르바메이트, m-클로로-p-아실옥시벤질 카르바메이트, p-(디히드록시보릴)벤질 카르바메이트, 5-벤즈이속사졸릴메틸 카르바메이트, 2-(트리플루오로메틸)-6-크로모닐메틸 카르바메이트 (Tcroc), m-니트로페닐 카르바메이트, 3,5-디메톡시벤질 카르바메이트, o-니트로벤질 카르바메이트, 3,4-디메톡시-6-니트로벤질 카르바메이트, 페닐(o-니트로페닐)메틸 카르바메이트, 페노티아지닐-(10)-카르보닐 유도체, N'-p-톨루엔술포닐아미노카르보닐 유도체, N'-페닐아미노티오카르보닐 유도체, t-아릴 카르바메이트, S-벤질 티오카르바메이트, p-시아노벤질 카르바메이트, 시클로부틸 카르바메이트, 시클로헥실 카르바메이트, 시클로펜틸 카르바메이트, 시클로프로필메틸 카르바메이트, p-데실옥시벤질 카르바메이트, 2,2-디메톡시카르보닐비닐 카르바메이트, o-(N,N-디메틸카르복사미도)벤질 카르바메이트, 1,1-디메틸-3-(N,N-디메틸카르복사미도)프로필 카르바메이트, 1,1-디메틸프로피닐 카르바메이트, 디(2-피리딜)메틸 카르바메이트, 2-푸라닐메틸 카르바메이트, 2-아이오도에틸 카르바메이트, 이소보르닐 카르바메이트, 이소부틸 카르바메이트, 이소니코티닐 카르바메이트, p-(p'-메톡시페닐아조)벤질 카르바메이트, 1-메틸시클로부틸 카르바메이트, 1-메틸시클로헥실 카르바메이트, 1-메틸-1-시클로프로필메틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(3,5-디메톡시페닐)에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(p-페닐아조페닐)에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-페닐에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(4-피리딜)에틸 카르바메이트, 페닐 카르바메이트, p-(페닐아조)벤질 카르바메이트, 2,4,6-트리-t-부틸페닐 카르바메이트, 4-(트리메틸암모늄)벤질 카르바메이트, 2,4,6-트리메틸벤질 카르바메이트, 포름아미드, 아세트아미드, 클로로아세트아미드, 트리클로로아세트아미드, 트리플루오로아세트아미드, 페닐아세트아미드, 3-페닐프로판아미드, 피롤린아미드, 3-피리딜카르복사미드, N-벤조일페닐알라닐 유도체, 벤즈아미드, p-페닐벤즈아미드, o-니트로페닐아세트아미드, o-니트로페녹시아세트아미드, 아세트아세트아미드, (N'-디티오벤질옥시카르보닐아미노)아세트아미드, 3-(p-히드록시페닐)프로판아미드, 3-(o-니트로페닐)프로판아미드, 2-메틸-2-(o-니트로페녹시)프로판아미드, 2-메틸-2-(o-페닐아조페녹시)프로판아미드, 4-클로로부탄아미드, 3-메틸-3-니트로부탄아미드, o-니트로신나미드, N-아세틸메티오닌 유도체, o-니트로벤즈아미드, o-(벤조일옥시메틸)벤즈아미드, 4,5-디페닐-3-옥사졸린-2-온, N-프탈아미드, N-디티아술신아미드 (Dts), N-2,3-디페닐말레이미드, N-2,5-디메틸피롤, N-1,1,4,4-테트라메틸디실릴아자시클로펜탄 부가물 (STABASE), 5-치환된 1,3-디메틸-1,3,5-트리아자시클로헥산-2-온, 5-치환된 1,3-디벤질-1,3,5-트리아자시클로헥산-2-온, 1-치환된 3,5-디니트로-4-피리돈, N-메틸아민, N-알릴아민, N-[2-(트리메틸실릴)에톡시]메틸아민 (SEM), N-3-아세톡시프로필아민, N-(1-이소프로필-4-니트로-2-옥소-3-피롤린-3-일)아민, 4급 암모늄 염, N-벤질아민, N-디(4-메톡시페닐)메틸아민, N-5-디벤조수베틸아민, N-트리페닐메틸아민 (Tr), N-[(4-메톡시페닐)디페닐메틸]아민 (MMTr), N-9-페닐플루오레닐아민 (PhF), N-2,7-디클로로-9-플루오레닐메틸렌아민, N-페로세닐메틸아미노 (Fcm), N-2-피롤릴아미노 N'-옥시드, N-1,1-디메틸티오메틸렌아민, N-벤질리덴아민, N-p-메톡시벤질리덴아민, N-디페닐메틸렌아민, N-[(2-피리딜)메시틸]메틸렌아민, N-(N',N'-디메틸아미노메틸렌)아민, N,N'-이소프로필리덴디아민, N-p-니트로벤질리덴아민, N-살리실리덴아민, N-5-클로로살리실리덴아민, N-(5-클로로-2-히드록시페닐)페닐메틸렌아민, N-시클로헥실리덴아민, N-(5,5-디메틸-3-옥소-1-시클로헥세닐)아민, N-보란 유도체, N-디페닐보린산 유도체, N-[페닐(펜타카르보닐크로뎀- 또는 텅스텐)카르보닐]아민, N-구리 킬레이트, N-아연 킬레이트, N-니트로아민, N-니트로소아민, 아민 N-옥시드, 디페닐포스핀아미드 (Dpp), 디메틸티오포스핀아미드 (Mpt), 디페닐티오포스핀아미드 (Ppt), 디알킬 포스포르아미데이트, 디벤질 포스포르아미데이트, 디페닐 포스포르아미데이트, 벤젠술포나미드, o-니트로벤젠술포나미드 (Nps), 2,4-디니트로벤젠술포나미드, 펜타클로로벤젠술포나미드, 2-니트로-4-메톡시벤젠술포나미드, 트리페닐메틸술포나미드, 3-니트로피리딘술포나미드 (Npys), p-톨루엔술포나미드 (Ts), 벤젠술포나미드, 2,3,6,-트리메틸-4-메톡시벤젠술포나미드 (Mtr), 2,4,6-트리메톡시벤젠술포나미드 (Mtb), 2,6-디메틸-4-메톡시벤젠술포나미드 (Pme), 2,3,5,6-테트라메틸-4-메톡시벤젠술포나미드 (Mte), 4-메톡시벤젠술포나미드 (Mbs), 2,4,6-트리메틸벤젠술포나미드 (Mts), 2,6-디메톡시-4-메틸벤젠술포나미드 (iMds), 2,2,5,7,8-헨타메틸크로만-6-술포나미드 (Pmc), 메탄술포나미드 (Ms), β-트리메틸실릴에탄술포나미드 (SES), 9-안트라센술포나미드, 4-(4',8'-디메톡시나프틸메틸)벤젠술포나미드 (DNMBS), 벤질술포나미드, 트리플루오로메틸술포나미드 및 페나실술포나미드를 포함한다. 예시적인 보호기는 본원에서 상술된다. 그러나, 본 발명은 이들 보호기로 제한되는 것으로 의도되지 않고; 오히려 다양한 추가의 동등한 보호기가 상기 기준을 사용하여 용이하게 확인될 수 있고 본 발명의 방법에 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 추가로, 다양한 보호기가 문헌 [Protective Groups in Organic Synthesis, Third Ed. Greene, T.W. and Wuts, P.G., Eds., John Wiley & Sons, New York:

1999]에 기재되어 있고, 그 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0138] 본원에 기재된 바와 같은 화합물은 임의의 수의 치환기 또는 관능성 모이어티로 치환될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일반적으로, 용어 "치환된" (용어 "임의로"가 선행되는지 여부에 관계없이) 및 본 발명의 화학식에 함유된 치환기는, 주어진 구조에서의 수소 라디칼의 명시된 치환기의 라디칼로의 대체를 지칭한다. 임의의 주어진 구조에서 1개 초과 위치가 명시된 기로부터 선택된 1개 초과 치환기로 치환될 수 있는 경우에, 치환기는 모든 위치에서 동일 또는 상이할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "치환된"은 유기 화합물의 모든 허용가능한 치환기를 포함하는 것으로 고려된다. 넓은 측면에서, 허용가능한 치환기는 유기 화합물의 비-시클릭 및 시클릭, 분지형 및 비분지형, 카르보시클릭 및 헤테로시클릭, 방향족 및 비방향족 치환기를 포함한다. 질소와 같은 헤테로원자는 수소 치환기 및/또는 헤테로원자의 원자가를 만족시키는 본원에 기재된 유기 화합물의 임의의 허용가능한 치환기를 가질 수 있다. 게다가, 본 발명은 유기 화합물의 허용가능한 치환기에 의해 어떠한 방식으로 제한되지 않는 것으로 의도된다. 본 발명에 의해 고려되는 치환기 및 가변기의 조합은 바람직하게는, 예를 들어 감염성 질환 또는 증식성 장애의 치료에 유용한 안정한 화합물의 형성을 발생시키는 조합이다. 본원에 사용된 용어 "안정한"은 바람직하게는, 화합물의 제조가 가능하도록 충분한 안정성을 보유하며, 검출되기에 충분한 시간 및 바람직하게는 본원에 상세하게 설명된 목적에 유용하기에 충분한 시간 동안 화합물의 완전성을 유지하는 화합물을 지칭한다.

[0139] 본원에 사용된 용어 "지방족"은, 1개 이상의 관능기로 임의로 치환된, 포화 및 불포화 둘 다의 직쇄 (즉, 비분지형), 분지형, 비-시클릭, 시클릭 또는 폴리시클릭 지방족 탄화수소를 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인식되는 바와 같이, 본원에서 "지방족"은 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 및 시클로알키닐 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는 것으로 의도된다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "알킬"은 직쇄형, 분지형 및 시클릭 알킬 기를 포함한다. 유사한 관계가 "알케닐", "알키닐" 등과 같은 다른 일반 용어에 적용된다. 게다가, 본원에 사용된 용어 "알킬", "알케닐", "알키닐" 등은 치환 및 비치환된 기 둘 다를 포괄한다. 특정 실시양태에서, 본원에 사용된 "저급 알킬"은 1-6개의 탄소 원자를 갖는 알킬 기 (시클릭, 비-시클릭, 치환, 비치환, 분지형 또는 비분지형)를 나타내는데 사용된다.

[0140] 특정 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 1-20개의 지방족 탄소 원자를 함유한다. 특정의 다른 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 1-10개의 지방족 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 1-8개의 지방족 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 1-6개의 지방족 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 1-4개의 탄소 원자를 함유한다. 따라서, 예시적인 지방족 기는, 예를 들어 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, 시클로프로필, -CH₂-시클로프로필, 비닐, 알릴, n-부틸, sec-부틸, 이소부틸, tert-부틸, 시클로부틸, -CH₂-시클로부틸, n-펜틸, sec-펜틸, 이소펜틸, tert-펜틸, 시클로펜틸, -CH₂-시클로펜틸, n-헥실, sec-헥실, 시클로헥실, -CH₂-시클로헥실 모이어티 등을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 이는 다시 1개 이상의 치환기를 보유할 수 있다. 알케닐 기는 예를 들어 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 1-메틸-2-부텐-1-일 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 대표적인 알키닐 기는 에티닐, 2-프로피닐 (프로파르길), 1-프로피닐 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0141] 본 발명 화합물의 상기 기재된 지방족 (및 다른) 모이어티의 치환기의 일부 예는 지방족; 헤테로지방족; 아릴; 헤테로아릴; 아릴알킬; 헤테로아릴알킬; 알콕시; 아릴옥시; 헤테로알콕시; 헤테로아릴옥시; 알킬티오; 아릴티오; 헤테로알킬티오; 헤테로아릴티오; -F; -Cl; -Br; -I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(O)R_x; -CO₂(R_x); -CON(R_x)₂; -OC(O)R_x; -OCO₂R_x; -OCON(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x를 포함하나 이에 제한되지는 않고, 여기서 각 경우의 R_x는 독립적으로 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴알킬을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 여기서 상기 및 본원에 기재된 임의의 지방족, 헤테로지방족, 아릴알킬 또는 헤테로아릴알킬 치환기는 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형, 시클릭 또는 비-시클릭일 수 있고, 여기서 상기 및 본원에 기재된 임의의 아릴 또는 헤테로아릴 치환기는 치환 또는 비치환될 수 있다. 일반적으로 적용가능한 치환기의 추가의 예는 본원에 기재된 구체적 실시양태에 의해 예시된다.

[0142] 본원에 사용된 용어 "헤테로지방족"은, 예를 들어 탄소 원자 대신 1개 이상의 산소, 황, 질소, 인 또는 규소 원자를 함유하는 지방족 모이어티를 지칭한다. 헤테로지방족 모이어티는 분지형, 비분지형, 시클릭 또는 비-시클릭일 수 있고, 포화 및 불포화 헤테로사이클, 예컨대 모르폴리노, 피롤리디닐 등을 포함한다. 특정 실시양태에

서, 헤테로지방족 모이어티는, 그의 수소 원자 중 1개 이상이 지방족; 헤테로지방족; 아릴; 헤테로아릴; 아릴알킬; 헤테로아릴알킬; 알콕시; 아릴옥시; 헤테로알콕시; 헤테로아릴옥시; 알킬티오; 아릴티오; 헤테로알킬티오; 헤테로아릴티오; -F; -Cl; -Br; -I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(O)R_x; -CO₂(R_x); -CON(R_x)₂; -OC(O)R_x; -OCO₂R_x; -OCON(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x를 포함하나 이에 제한되지는 않은 1개 이상의 모이어티에 의해 독립적으로 대체됨으로써 치환되고, 여기서 각 경우의 R_x는 독립적으로 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴알킬을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 여기서 상기 및 본원에 기재된 임의의 지방족, 헤테로지방족, 아릴알킬 또는 헤테로아릴알킬 치환기는 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형, 시클릭 또는 비-시클릭일 수 있고, 여기서 상기 및 본원에 기재된 임의의 아릴 또는 헤테로아릴 치환기는 치환 또는 비치환될 수 있다. 일반적으로 적용가능한 치환기의 추가의 예는 본원에 기재된 구체적 실시양태에 의해 예시된다.

[0143] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "할로" 및 "할로젠"은 플루오린, 염소, 브로민 및 아이오딘으로부터 선택된 원자를 지칭한다.

[0144] 용어 "알킬"은 직쇄 알킬 기 (예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실 등), 분지쇄 알킬 기 (이소프로필, tert-부틸, 이소부틸 등), 시클로알킬 (지환족) 기 (시클로프로필, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸), 알킬 치환된 시클로알킬 기 및 시클로알킬 치환된 알킬 기를 포함한 포화 지방족 기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알킬은 그의 백본에 6개 이하의 탄소 원자 (예를 들어, 직쇄의 경우에 C₁-C₆, 분지쇄의 경우에 C₃-C₆), 보다 바람직하게는 4개 이하의 탄소 원자를 갖는다. 마찬가지로, 바람직한 시클로알킬은 그의 고리 구조에 3-8개의 탄소 원자를, 보다 바람직하게는 고리 구조에 5 또는 6개의 탄소를 갖는다. 용어 C₁-C₆은 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알킬 기를 포함한다.

[0145] 더욱이, 달리 명시되지 않는 한, 용어 알킬은 "비치환된 알킬" 및 "치환된 알킬" 둘 다를 포함하고, 이들 중 후자는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 독립적으로 선택된 치환기를 갖는 알킬 모이어티를 지칭한다. 이러한 치환기는, 예를 들어 알케닐, 알키닐, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술폰히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술페이트, 알킬술폰일, 술폰에이트, 술폰아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다. 시클로알킬은, 예를 들어 상기 기재된 치환기로 추가로 치환될 수 있다. "알킬아릴" 또는 "아릴알킬" 모이어티는 아릴 (예를 들어, 페닐메틸 (벤질))로 치환된 알킬이다. 용어 "알킬"은 또한 천연 및 비천연 아미노산의 측쇄를 포함한다. 용어 "n-알킬"은 직쇄 (즉, 비분지형) 비치환된 알킬 기를 의미한다.

[0146] 용어 "알케닐"은, 상기 기재된 알킬에 대해 길이 및 가능한 치환 면에서 유사하지만 적어도 1개의 이중 결합을 함유하는 불포화 지방족 기를 포함한다. 예를 들어, 용어 "알케닐"은 직쇄 알케닐 기 (예를 들어, 에틸레닐, 프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 헥세닐, 헵테닐, 옥테닐, 노네닐, 데세닐 등), 분지쇄 알케닐 기, 시클로알케닐 (지환족) 기 (시클로프로페닐, 시클로펜테닐, 시클로헥세닐, 시클로헵테닐, 시클로옥테닐), 알킬 또는 알케닐 치환된 시클로알케닐 기, 및 시클로알킬 또는 시클로알케닐 치환된 알케닐 기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알케닐 기는 그의 백본에 6개 이하의 탄소 원자 (예를 들어, 직쇄의 경우에 C₂-C₆, 분지쇄의 경우에 C₃-C₆)를 갖는다. 마찬가지로, 시클로알케닐 기는 그의 고리 구조에 3-8개의 탄소 원자를, 보다 바람직하게는 고리 구조에 5 또는 6개의 탄소를 갖는다. 용어 C₂-C₆은 2 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알케닐 기를 포함한다.

[0147] 더욱이, 달리 명시되지 않는 한, 용어 알케닐은 "비치환된 알케닐" 및 "치환된 알케닐" 둘 다를 포함하고, 이들 중 후자는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 독립적으로 선택된 치환기를 갖는 알케닐 모이어티를 지칭한다. 이러한 치환기는, 예를 들어 알킬 기, 알키닐 기, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노

및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술폰히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술페이트, 알킬술피닐, 술포네이트, 술포모일, 술폰아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다.

[0148] 용어 "알키닐"은, 상기 기재된 알킬에 대해 길이 및 가능한 치환 면에서 유사하지만 적어도 1개의 삼중 결합을 함유하는 불포화 지방족 기를 포함한다. 예를 들어, 용어 "알키닐"은 직쇄 알키닐 기 (예를 들어, 에틸닐, 프로피닐, 부티닐, 펜티닐, 헥시닐, 헵타닐, 옥티닐, 노니닐, 데시닐 등), 분지쇄 알키닐 기, 및 시클로알킬 또는 시클로알케닐 치환된 알키닐 기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알키닐 기는 그의 백본에 6개 이하의 탄소 원자 (예를 들어, 직쇄의 경우에 C₂-C₆, 분지쇄의 경우에 C₃-C₆)를 갖는다. 용어 C₂-C₆은 2 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알키닐 기를 포함한다.

[0149] 더욱이, 달리 명시되지 않는 한, 용어 알키닐은 "비치환된 알키닐" 및 "치환된 알키닐" 둘 다를 포함하고, 이들 중 후자는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 독립적으로 선택된 치환기를 갖는 알키닐 모이어티를 지칭한다. 이러한 치환기는, 예를 들어 알킬 기, 알키닐 기, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술폰히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술페이트, 알킬술피닐, 술포네이트, 술포모일, 술폰아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다.

[0150] 탄소의 수가 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 "저급 알킬"은, 상기 정의된 바와 같지만 그의 백본 구조에 1 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 알킬 기를 의미한다. "저급 알케닐" 및 "저급 알키닐"은 예를 들어, 2-5개의 탄소 원자의 쇠 길이를 갖는다.

[0151] 용어 "알콕시"는 산소 원자에 공유 연결된, 치환 및 비치환된 알킬, 알케닐 및 알키닐 기를 포함한다. 알콕시 기의 예는 메톡시, 에톡시, 이소프로필옥시, 프로톡시, 부톡시 및 펜톡시 기를 포함한다. 치환된 알콕시 기의 예는 할로젠화 알콕시 기를 포함한다. 알콕시 기는 독립적으로 선택된 기, 예컨대 알케닐, 알키닐, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술폰히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술페이트, 알킬 술피닐, 술포네이트, 술포모일, 술폰아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티로 치환될 수 있다. 할로젠 치환된 알콕시 기의 예는 플루오로메톡시, 디플루오로메톡시, 트리플루오로메톡시, 클로로메톡시, 디클로로메톡시, 트리클로로메톡시 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0152] 용어 "헤테로원자"는 탄소 또는 수소 이외의 임의의 원소의 원자를 포함한다. 바람직한 헤테로원자는 질소, 산소, 황 및 인이다.

[0153] 용어 "히드록시" 또는 "히드록실"은 -OH 또는 -O⁻ (적절한 반대이온과 함께)를 갖는 기를 포함한다.

[0154] 용어 "할로젠"은 플루오린, 브로민, 염소, 아이오딘 등을 포함한다. 용어 "퍼할로젠화"는 일반적으로, 모든 수소가 할로젠 원자에 의해 대체된 모이어티를 지칭한다.

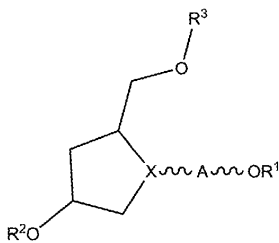
[0155] 용어 "치환된"은, 모이어티 상에 위치할 수 있으며 분자가 그것이 의도하는 기능을 수행하게 하는 독립적으로 선택된 치환기를 포함한다. 치환기의 예는 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, (CR'R')₀₋₃NR'R", (CR'R')₀₋₃CN, NO₂, 할로젠, (CR'R')₀₋₃C(할로젠)₃, (CR'R')₀₋₃CH(할로젠)₂, (CR'R')₀₋₃CH₂(할로젠), (CR'R')₀₋₃CONR'R", (CR'R')₀₋₃S(O)₁₋₂NR'R", (CR'R')₀₋₃CHO, (CR'R')₀₋₃O(CR'R')₀₋₃H, (CR'R')₀₋₃S(O)₀₋₂R', (CR'R')₀₋₃O(CR'R')₀₋₃H, (CR'R')₀₋₃COR', (CR'R')₀₋₃CO₂R', 또는 (CR'R')₀₋₃OR' 기를 포함하며, 여기서 각각의 R' 및 R"는 각각 독립적으로 수소, C₁-

C₅ 알킬, C₂-C₅ 알케닐, C₂-C₅ 알키닐 또는 아릴 기이거나, 또는 R' 및 R"는 함께 벤질리덴 기 또는 -(CH₂)₂O(CH₂)₂- 기이다.

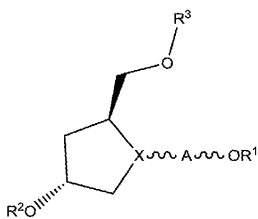
- [0156] 용어 "아민" 또는 "아미노"는 질소 원자가 적어도 1개의 탄소 또는 헤테로원자에 공유 결합된 화합물 또는 모이어티를 포함한다. 용어 "알킬 아미노"는 질소가 적어도 1개의 추가의 알킬 기에 결합된 기 및 화합물을 포함한다. 용어 "디아alkyl 아미노"는 질소 원자가 적어도 2개의 추가의 알킬 기에 결합된 기를 포함한다.
- [0157] 용어 "에테르"는 2개의 상이한 탄소 원자 또는 헤테로원자에 결합된 산소를 함유하는 화합물 또는 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 상기 용어는 또 다른 알킬 기에 공유 결합된 산소 원자에 공유 결합된 알킬, 알케닐 또는 알키닐 기를 지칭하는 "알콕시알킬"을 포함한다.
- [0158] 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", "핵산", "핵산 분자", "핵산 서열" 및 "올리고뉴클레오티드"는 2개 이상의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 DNA, RNA, 또는 그의 유도체 또는 변형된 버전일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 염기 모이어티, 당 모이어티 또는 포스페이트 백본에서 변형되어, 예를 들어 분자의 안정성, 그의 혼성화 파라미터 등을 개선시킬 수 있다. 폴리뉴클레오티드는, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록실메틸) 우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실케오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실케오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 와이부톡소신, 슈도우라실, 케오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산, 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필)우라실 및 2,6-디아미노퓨린을 포함하나 이에 제한되지 않는 군으로부터 선택된 변형된 염기 모이어티를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 변형된 당 모이어티 (예를 들어, 2'-플루오로리보스, 리보스, 2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸시티딘, 아라비노스 및 핵소스) 및/또는 변형된 포스페이트 모이어티 (예를 들어, 포스포로티오에이트 및 5'-N-포스포아미다이트 연결)를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 전형적으로 유전자 정보 (세포 기구에 의해 사용되는 정보 포함)를 운반하여 단백질 및 효소를 생성한다. 이들 용어는 이중-또는 단일-가닥 게놈 및 cDNA, RNA, 임의의 합성 및 유전자 조작된 폴리뉴클레오티드, 및 센스 및 안티센스 폴리뉴클레오티드 둘 다를 포함한다. 이는 단일- 및 이중-가닥 분자, 즉 DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 하이브리드, 뿐만 아니라 염기를 아미노산 백본에 접합시켜 형성된 "단백질 핵산" (PNA)을 포함한다.
- [0159] 용어 "염기"는 공지된 퓨린 및 피리미딘 헤테로시클릭 염기, 테아자퓨린, 및 그의 유사체 (헤테로시클릭 치환된 유사체, 예를 들어 아미노에톡시 페녹사진 포함), 유도체 (예를 들어, 1-알킬-, 1-알케닐-, 헤테로방향족- 및 1-알키닐 유도체) 및 호변이성질체를 포함한다. 퓨린의 예는 아데닌, 구아닌, 이노신, 디아미노퓨린 및 크산틴, 및 그의 유사체 (예를 들어, 8-옥소-N⁶-메틸아데닌 또는 7-디아자크산틴) 및 유도체를 포함한다. 피리미딘은 예를 들어 티민, 우라실 및 시토신, 및 그의 유사체 (예를 들어, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-(1-프로피닐)우라실, 5-(1-프로피닐)시토신 및 4,4-에타노시토신)를 포함한다. 적합한 염기의 다른 예는 비-퓨리닐 및 비-피리미디닐 염기, 예컨대 2-아미노피리딘 및 트리아진을 포함한다.
- [0160] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오모노머는 RNA 뉴클레오티드이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오모노머는 변형된 RNA 뉴클레오티드이다. 따라서, 올리고뉴클레오티드는 변형된 RNA 뉴클레오티드를 함유한다.
- [0161] 용어 "뉴클레오시드"는 당 모이어티, 바람직하게는 리보스 또는 데옥시리보스에 공유 부착된 염기를 포함한다. 바람직한 뉴클레오시드의 예는 리보뉴클레오시드 및 데옥시리보뉴클레오시드를 포함한다. 뉴클레오시드는, 아미노산, 또는 유리 카르복실 기, 유리 아미노 기 또는 보호기를 포함할 수 있는 아미노산 유사체에 연결된 염기를 또한 포함한다. 적합한 보호기는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (문헌 [P. G. M. Wuts and T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2nd Ed., Wiley-Interscience, New York, 1999] 참조).
- [0162] 용어 "뉴클레오티드"는 포스페이트 기 또는 포스페이트 유사체를 추가로 포함하는 뉴클레오시드를 포함한다.
- [0163] 핵산 분자는 세포로의 분자의 표적화 및/또는 전달을 위해 소수성 모이어티와 회합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 소수성 모이어티는 링커를 통해 핵산 분자와 회합된다. 특정 실시양태에서, 회합은 비공유 상호작용을

통한다. 다른 실시양태에서, 회합은 공유 결합을 통한다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 링커는 핵산을 소수성 모이어티와 회합시키는데 사용될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 링커는 본원에 참조로 포함되는 공개된 국제 PCT 출원 WO 92/03464, WO 95/23162, WO 2008/021157, WO 2009/021157, WO 2009/134487, WO 2009/126933, 미국 특허 출원 공개 2005/0107325, 미국 특허 5,414,077, 미국 특허 5,419,966, 미국 특허 5,512,667, 미국 특허 5,646,126, 및 미국 특허 5,652,359에 기재되어 있다. 링커는 다중-원자 링커에 대한 공유 결합만큼 간단할 수 있다. 링커는 시클릭 또는 비-시클릭일 수 있다. 링커는 임의로 치환될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 핵산으로부터 절단될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 생리학적 조건 하에 가수분해될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 효소 (예를 들어, 에스테라제 또는 포스포디에스테라제)에 의해 절단될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 핵산을 소수성 모이어티로부터 분리하기 위한 스페이스 요소를 포함한다. 스페이스 요소는 1 내지 30개의 탄소 또는 헤테로원자를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커 및/또는 스페이스 요소는 양성자화가능한 관능기를 포함한다. 이러한 양성자화가능한 관능기는 핵산 분자의 엔도솜 탈출을 촉진할 수 있다. 또한, 양성자화가능한 관능기는 세포로의 핵산의 전달을 보조하여, 예를 들어 분자의 전체적인 전하를 중성화할 수 있다. 다른 실시양태에서, 링커 및/또는 스페이스 요소는 생물학적으로 불활성이다 (즉, 이는 생성된 핵산 분자에 생물학적 활성 또는 기능을 부여하지 않음).

[0164] 특정 실시양태에서, 링커 및 소수성 모이어티를 갖는 핵산 분자는 본원에 기재된 화학식을 갖는다. 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:

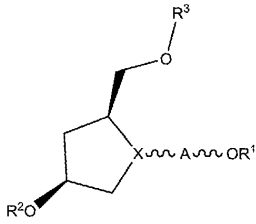


- [0165] 여기서,
- [0166] X는 N 또는 CH이고;
- [0168] A는 결합; 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이고;
- [0169] R¹은 소수성 모이어티이고;
- [0170] R²는 수소; 산소-보호기; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 지방족; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 아실; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 아릴; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 헤테로아릴이고;
- [0171] R³은 핵산이다.
- [0172] 특정 실시양태에서, 분자는 하기 화학식을 갖는다:



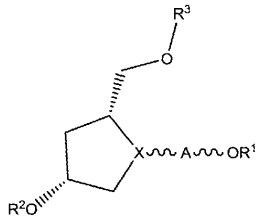
[0173]

[0174] 특정 실시양태에서, 분자는 하기 화학식을 갖는다:



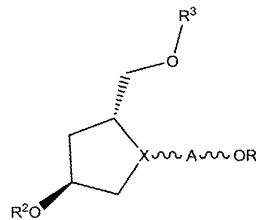
[0175]

[0176] 특정 실시양태에서, 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0177]

[0178] 특정 실시양태에서, 분자는 하기 화학식을 갖는다:

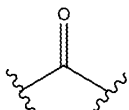


[0179]

[0180] 특정 실시양태에서, X는 N이다. 특정 실시양태에서, X는 CH이다.

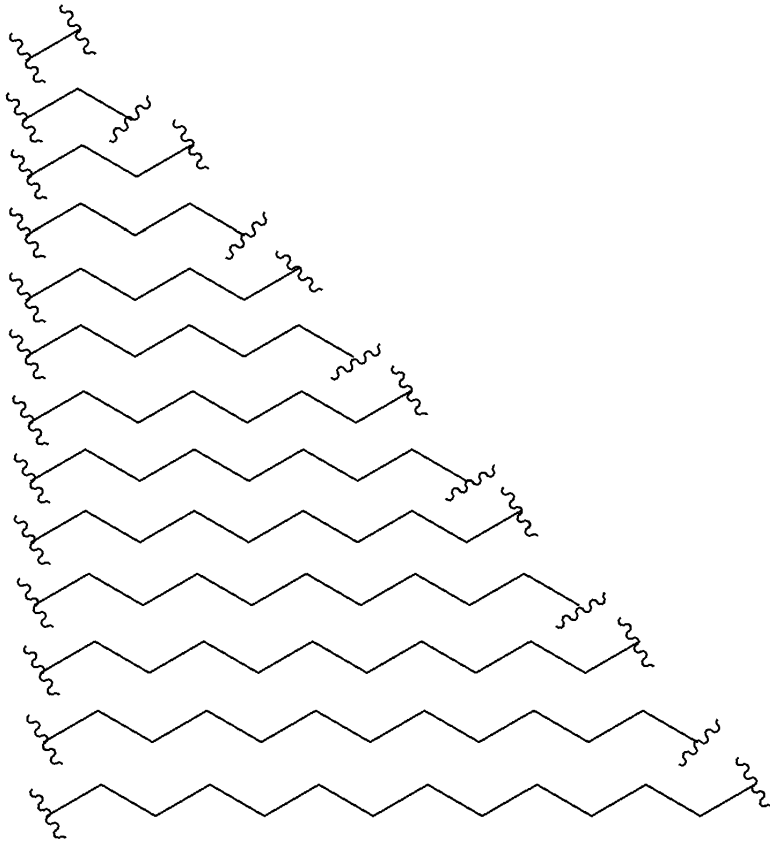
[0181] 특정 실시양태에서, A는 결합이다. 특정 실시양태에서, A는 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환, 분지형 또는 비분지형 지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환, 비분지형 알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환, 비분지형 C₁₋₂₀ 알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환, 비분지형 C₁₋₁₂ 알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환, 비분지형 C₁₋₁₀ 알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환, 비분지형 C₁₋₈ 알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환, 비분지형 C₁₋₆ 알킬이다. 특정 실시양태에서, A는 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이다. 특정 실시양태에서, A는 비-시클릭, 치환, 비분지형 헤테로지방족이다.

[0182] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



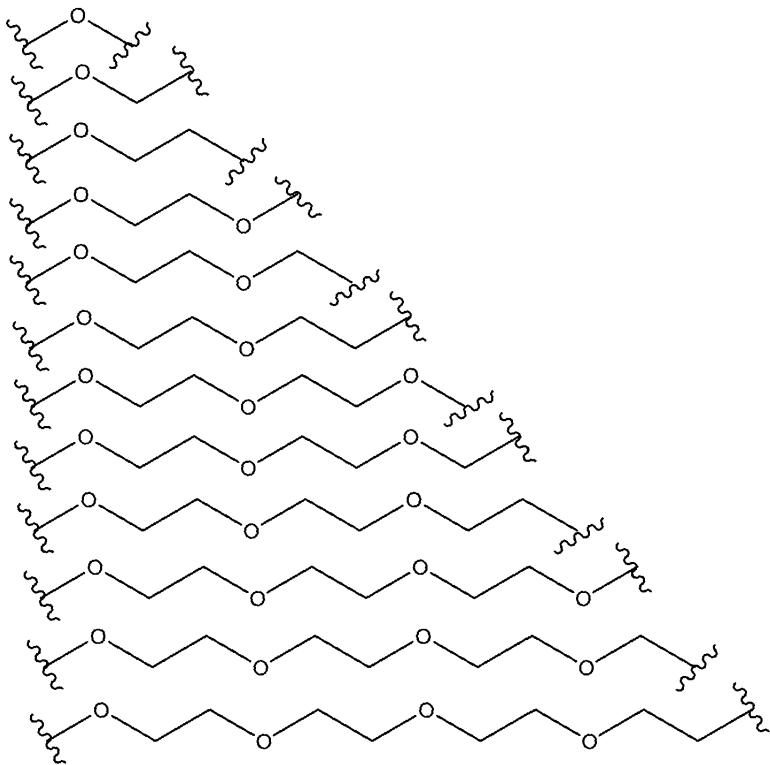
[0183]

[0184] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



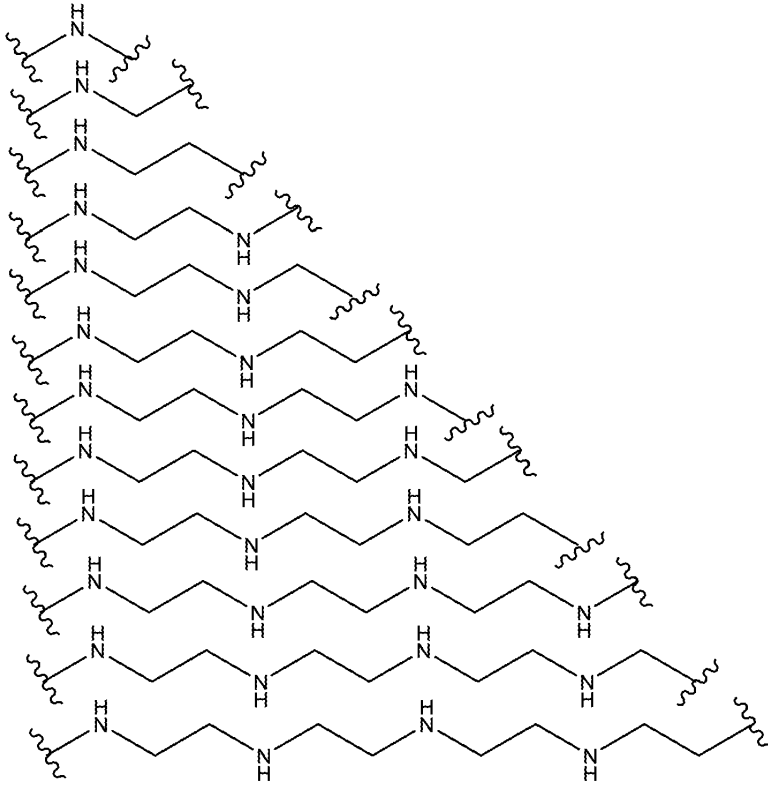
[0185]

[0186] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



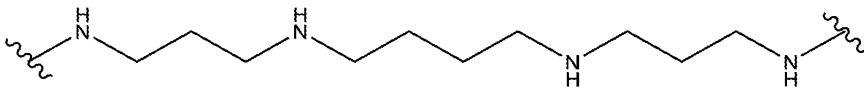
[0187]

[0188] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



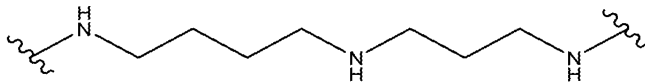
[0189]

[0190] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



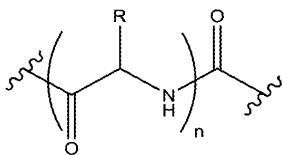
[0191]

[0192] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0193]

[0194] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:

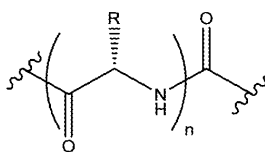


[0195]

[0196] 여기서,

[0197] 각 경우에 R은 독립적으로 천연 또는 비천연 아미노산의 측쇄이고;

[0198] n은 1 내지 20의 정수이다. 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:

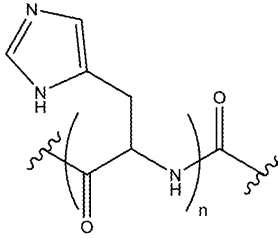


[0199]

[0200] 특정 실시양태에서, 각 경우에 R은 독립적으로 천연 아미노산의 측쇄이다. 특정 실시양태에서, n은 1 내지 15

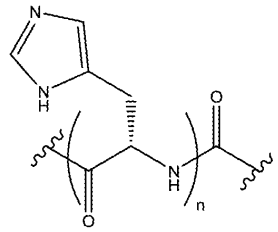
의 정수이다. 특정 실시양태에서, n은 1 내지 10의 정수이다. 특정 실시양태에서, n은 1 내지 5의 정수이다.

[0201] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0202]

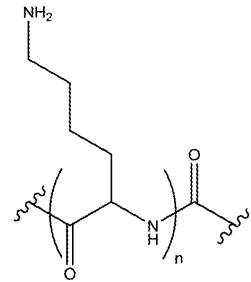
[0203] 여기서, n은 1 내지 20의 정수이다. 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0204]

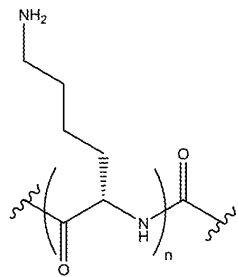
[0205] 특정 실시양태에서, n은 1 내지 15의 정수이다. 특정 실시양태에서, n은 1 내지 10의 정수이다. 특정 실시양태에서, n은 1 내지 5의 정수이다.

[0206] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0207]

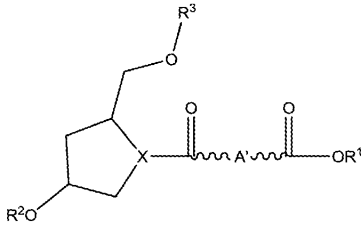
[0208] 여기서, n은 1 내지 20의 정수이다. 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0209]

[0210] 특정 실시양태에서, n은 1 내지 15의 정수이다. 특정 실시양태에서, n은 1 내지 10의 정수이다. 특정 실시양태에서, n은 1 내지 5의 정수이다.

[0211] 특정 실시양태에서, 분자는 하기 화학식을 갖는다:

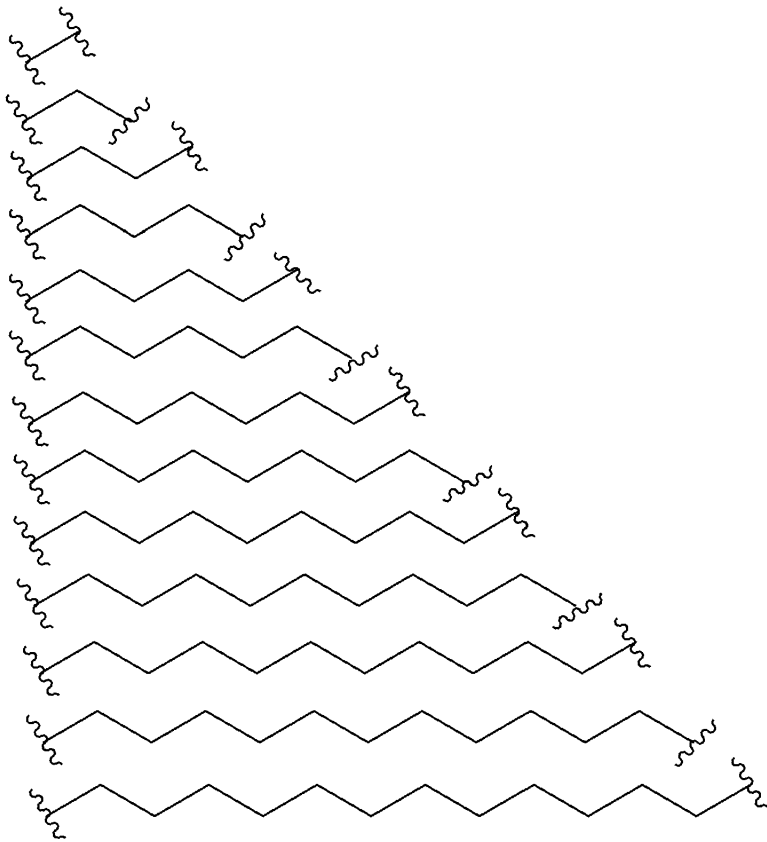


[0212]

[0213] 여기서, X, R¹, R², 및 R³은 본원에 정의된 바와 같고;

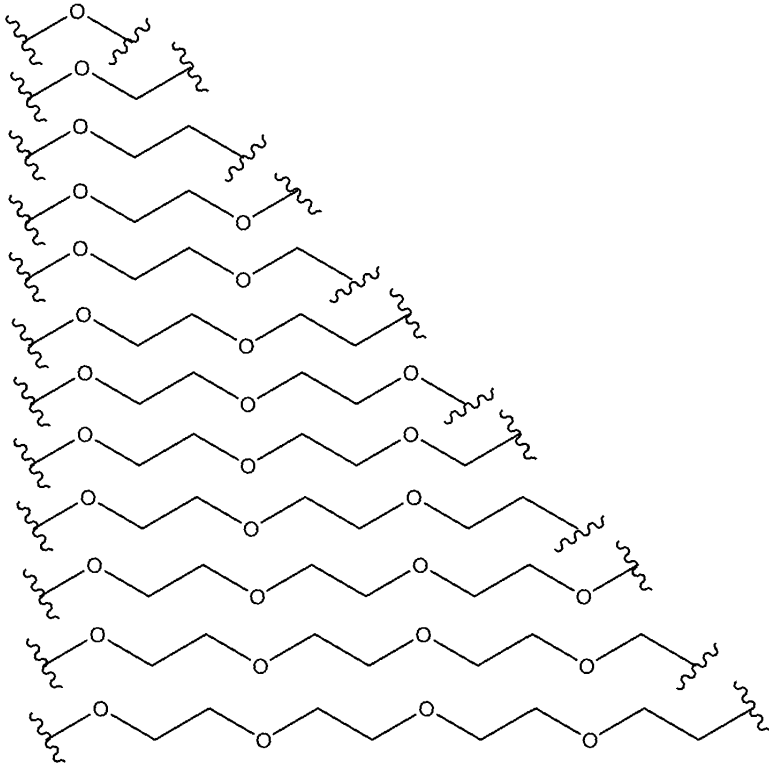
[0214] A'는 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이다.

[0215] 특정 실시양태에서, A'는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



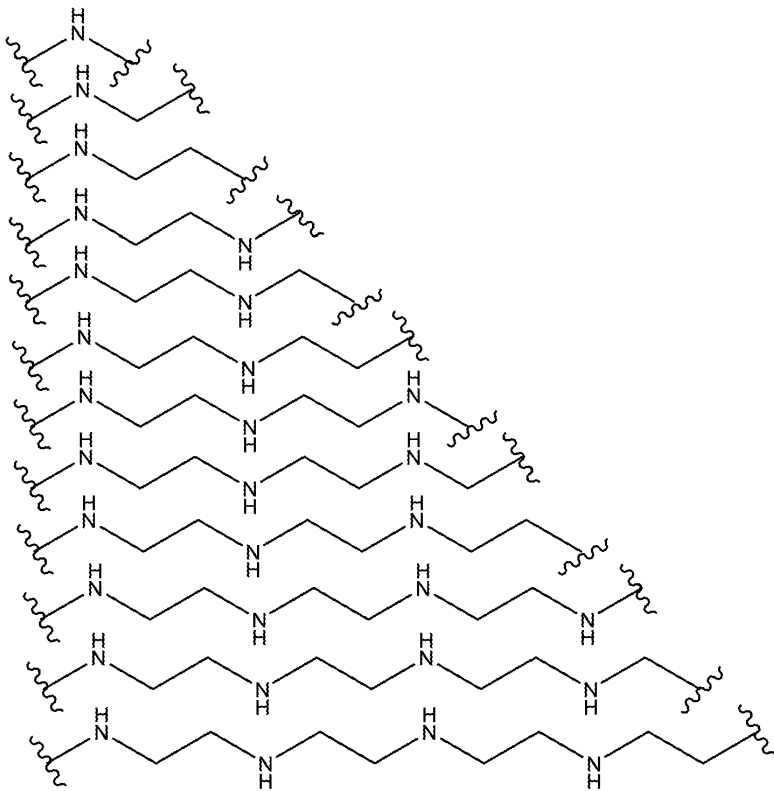
[0216]

[0217] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



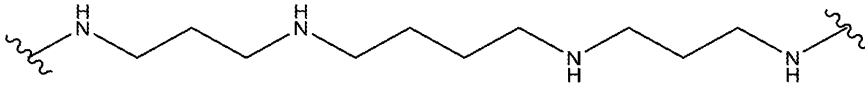
[0218]

[0219] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



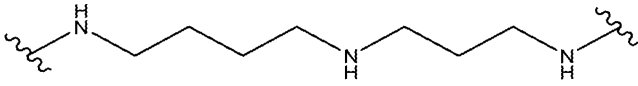
[0220]

[0221] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0222]

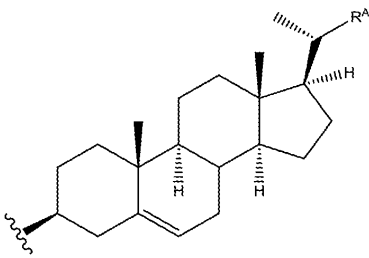
[0223] 특정 실시양태에서, A는 하기 화학식을 갖는다:



[0224]

[0225] 특정 실시양태에서, R¹은 스테로이드이다. 특정 실시양태에서, R¹은 콜레스테롤이다. 특정 실시양태에서, R¹은 친지성 비타민이다. 특정 실시양태에서, R¹은 비타민 A이다. 특정 실시양태에서, R¹은 비타민 E이다.

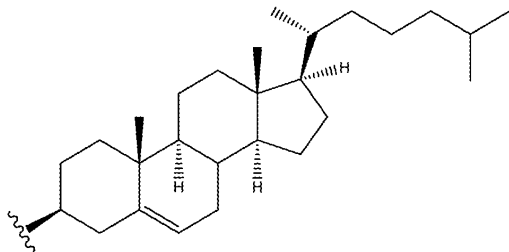
[0226] 특정 실시양태에서, R¹은 하기 화학식을 갖는다:



[0227]

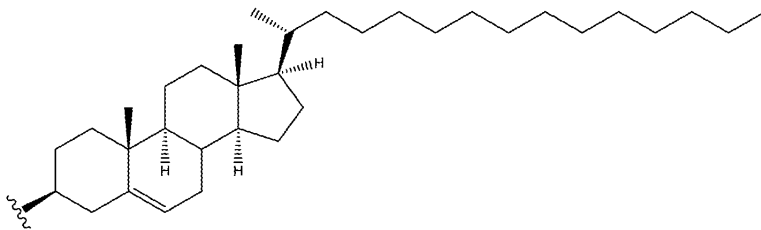
[0228] 여기서, R^A는 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이다.

[0229] 특정 실시양태에서, R¹은 하기 화학식을 갖는다:



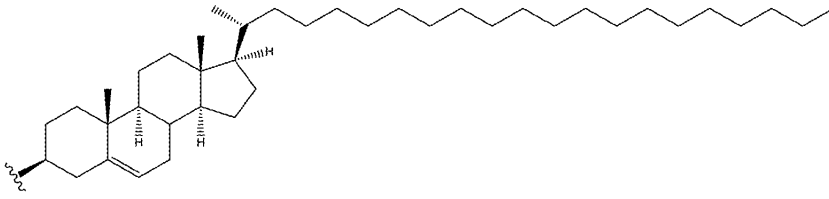
[0230]

[0231] 특정 실시양태에서, R¹은 하기 화학식을 갖는다:



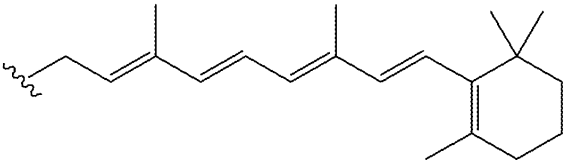
[0232]

[0233] 특정 실시양태에서, R¹은 하기 화학식을 갖는다:



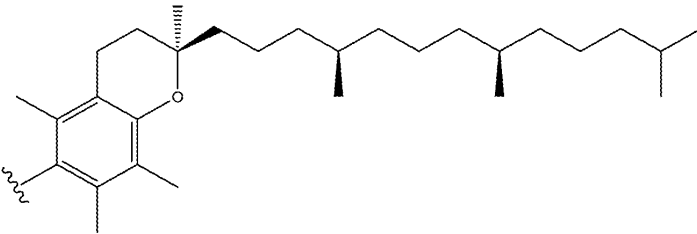
[0234]

[0235] 특정 실시양태에서, R¹은 하기 화학식을 갖는다:



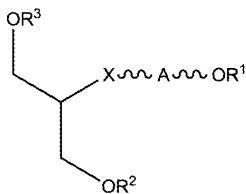
[0236]

[0237] 특정 실시양태에서, R¹은 하기 화학식을 갖는다:



[0238]

[0239] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0240]

[0241] 여기서,

[0242] X는 N 또는 CH이고;

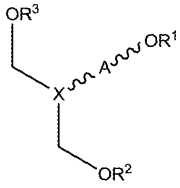
[0243] A는 결합; 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이고;

[0244] R¹은 소수성 모이어티이고;

[0245] R²는 수소; 산소-보호기; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 지방족; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 아실; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 아릴; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 헤테로아릴 이고;

[0246] R³은 핵산이다.

[0247] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0248]

[0249] 여기서,

[0250] X는 N 또는 CH이고;

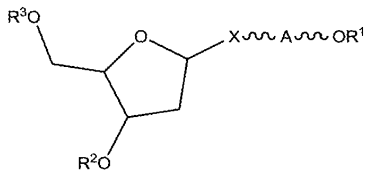
[0251] A는 결합; 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이고;

[0252] R¹은 소수성 모이어티이고;

[0253] R²는 수소; 산소-보호기; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 지방족; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 아실; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 아릴; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 헤테로아릴 이고;

[0254] R³은 핵산이다.

[0255] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0256]

[0257] 여기서,

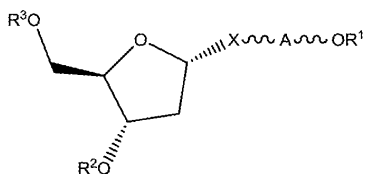
[0258] X는 N 또는 CH이고;

[0259] A는 결합; 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 지방족; 또는 치환 또는 비치환, 시클릭 또는 비-시클릭, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족이고;

[0260] R¹은 소수성 모이어티이고;

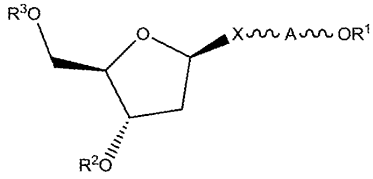
[0261] R²는 수소; 산소-보호기; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 지방족; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 아실; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 아릴; 치환 또는 비치환, 분지형 또는 비분지형 헤테로아릴 이고;

[0262] R³은 핵산이다. 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



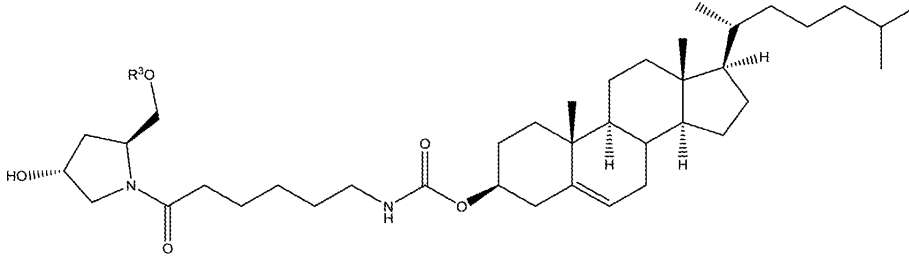
[0263]

[0264] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0265]

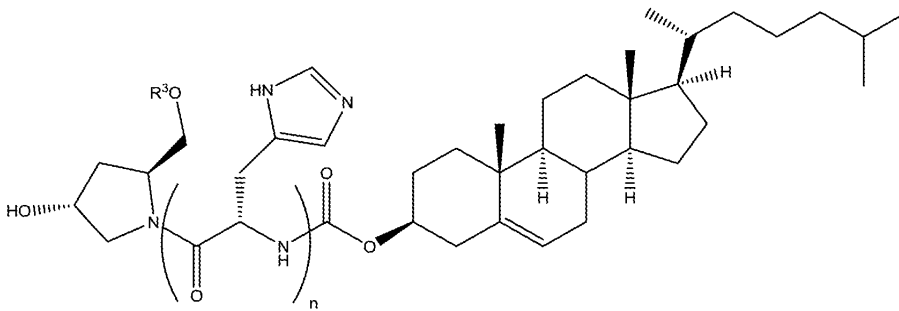
[0266] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0267]

[0268] 여기서, R³은 핵산이다.

[0269] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:

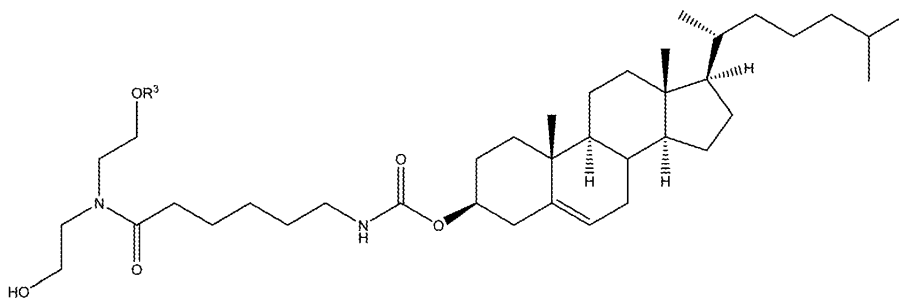


[0270]

[0271] 여기서, R³은 핵산이고;

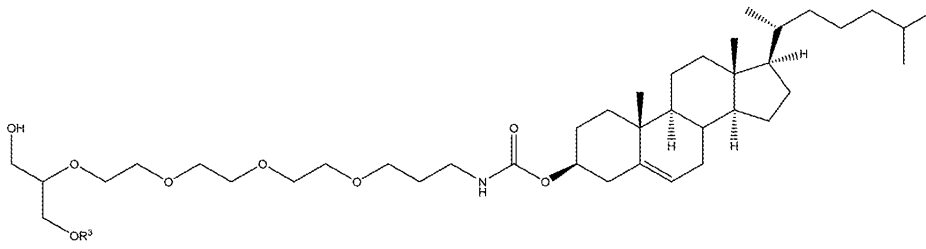
[0272] n은 1 내지 20의 정수이다.

[0273] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



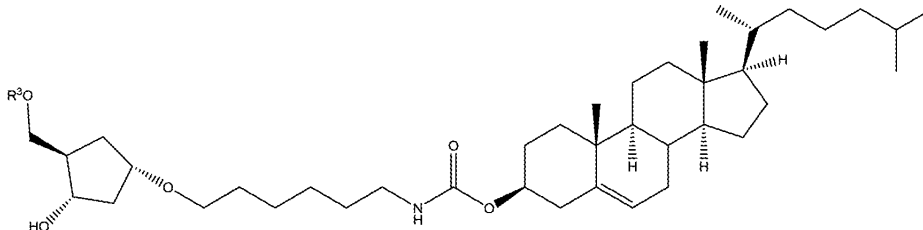
[0274]

[0275] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



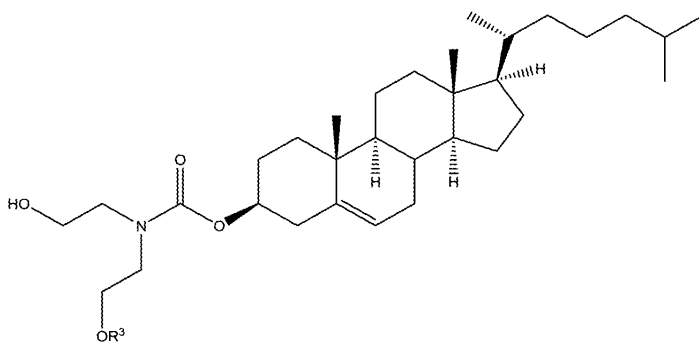
[0276]

[0277] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



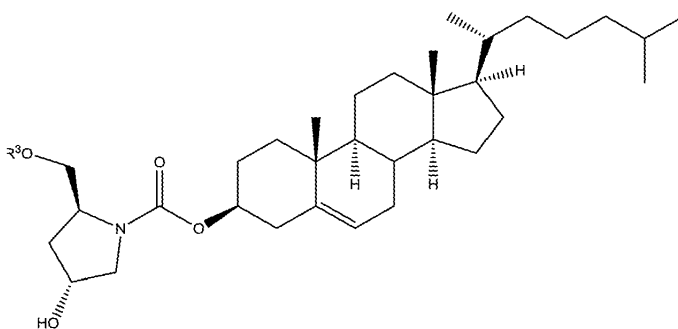
[0278]

[0279] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0280]

[0281] 특정 실시양태에서, 핵산 분자는 하기 화학식을 갖는다:



[0282]

[0283] 본원에 사용된 용어 "연결"은 뉴클레오모노머에 인접하여 공유 커플링된, 자연 발생 비변형된 포스포디에스테르 모이어티 (-O-(PO²⁻)-O-)를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "치환기 연결"은 뉴클레오모노머에 인접하여 공유 커플링된, 천연 포스포디에스테르 기의 임의의 유사체 또는 유도체를 포함한다. 치환기 연결은 포스포디에스테르 유사체, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 P-에티옥시포스포디에스테르, P-에톡시포스포디에스테르, P-알킬옥시포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 및 인 무함유 연결, 예를 들어 아세탈 및 아미드를 포함한다. 이러한 치환기 연결은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Bjergarde et al. 1991. Nucleic Acids Res. 19:5843; Caruthers et al. 1991. Nucleosides Nucleotides. 10:47]). 특정 실시양태에서, 비가수분해가능한 연결, 예컨대 포스포로티오에이트 연결이 바람직하다.

[0284] 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 소수성으로 변형된 뉴클레오티드 또는 "소수성 변형"을 포

함한다. 본원에 사용된 "소수성 변형"은, (1) 염기의 전체적인 소수성이 유의하게 증가되고/거나 (2) 염기가 규칙적인 왓슨-크릭 상호작용에 가까운 상호작용을 여전히 형성할 수 있도록 변형된 염기를 지칭한다. 염기 변형의 여러 비제한적 예는 5-위치 우리딘 및 시티딘 변형, 예컨대 페닐, 4-피리딜, 2-피리딜, 인돌릴, 및 이소부틸, 페닐 (C6H5OH); 트립토판 (C8H6N)CH₂CH(NH₂)CO), 이소부틸, 부틸, 아미노벤질; 페닐; 및 나프틸을 포함한다.

- [0285] sd-rxRNA의 말단 (3' 또는 5' 말단), 루프 영역 또는 임의의 다른 부분에 부착될 수 있는 또 다른 유형의 접합체는 스테롤, 스테롤 유형 분자, 펩티드, 소분자, 단백질 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, sd-rxRNA는 1개 초과 접합체 (동일 또는 상이한 화학적 속성)를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합체는 콜레스테롤이다.
- [0286] 표적 유전자 특이성을 증가시키거나 또는 오프-타겟 침묵 효과를 감소시키는 또 다른 방법은 가이드 서열의 제2의 5'-말단 뉴클레오타이드에 상응하는 위치에 2'-변형 (예컨대, 2'-O 메틸 변형)을 도입하는 것이다. 본 발명의 안티센스 (가이드) 서열은 RNA-유사 및 DNA-유사 영역을 포함하는 "키메라 올리고뉴클레오타이드"일 수 있다.
- [0287] 용어 "RNase H 활성화 영역"은 올리고뉴클레오타이드가 결합하는 표적 RNA 가닥을 RNase H를 동원하여 절단시킬 수 있는 올리고뉴클레오타이드의 영역, 예를 들어 키메라 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 전형적으로, RNase 활성화 영역은 DNA 또는 DNA-유사 뉴클레오타이드의 최소 코어 (적어도 약 3-5개, 전형적으로 약 3-12개, 보다 전형적으로는 약 5-12개, 보다 바람직하게는 약 5-10개의 인접 뉴클레오타이드)를 함유한다. (예를 들어, 미국 특허 번호 5,849,902 참조). 바람직하게는, RNase H 활성화 영역은 약 9개의 인접 데옥시리보스 함유 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0288] 용어 "비-활성화 영역"은 RNase H를 동원 또는 활성화시키지 않는, 안티센스 서열의 영역, 예를 들어 키메라 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직하게는, 비-활성화 영역은 포스포로티오에이트 DNA를 포함하지 않는다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 비-활성화 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 비-활성화 영역은 뉴클레아제에 대해 안정화될 수 있거나, 또는 표적에 상보적이 되어 표적 핵산 분자와 수소 결합 (올리고뉴클레오타이드에 의해 결합됨)을 형성함으로써 표적에 대한 특이성을 제공할 수 있다.
- [0289] 한 실시양태에서, 인접 폴리뉴클레오타이드의 적어도 일부는 치환기 연결, 예를 들어 포스포로티오에이트 연결에 의해 연결된다.
- [0290] 특정 실시양태에서, 가이드 서열 (2'-변형되거나 또는 변형되지 않음)을 넘어 대부분의 또는 모든 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 연결에 의해 연결된다. 이러한 구조물은 혈청 단백질에 대한 그의 보다 높은 친화도로 인해 개선된 약동학을 갖는 경향이 있다. 폴리뉴클레오타이드의 비-가이드 서열 부분에서의 포스포로티오에이트 연결은 일반적으로, 일단 가이드 가닥이 RISC로 로딩되면 가이드 가닥 활성을 방해하지 않는다. 놀랍게도, 높은 수준의 포스포로티오에이트 변형은 개선된 전달로 이어질 수 있다는 것이 본원에서 입증되었다. 일부 실시양태에서, 가이드 및/또는 패시저 가닥은 완전히 포스포로티오에이트화된다.
- [0291] 본 발명의 안티센스 (가이드) 서열은 "모르폴리노 올리고뉴클레오타이드"를 포함할 수 있다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 비-이온성이며, RNase H-비의존성 메커니즘에 의해 기능한다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 4가지 유전자 염기 (아데닌, 시토신, 구아닌 및 티민/우라실) 각각은 6-원 모르폴린 고리에 연결된다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 비-이온성 포스포로디아미레이트 서브유닛간 연결에 의해 4종의 상이한 서브유닛 유형을 연결하는 것에 의해 생성된다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제에 대한 완전한 저항성 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1996. 6:267); 예측가능한 표적화 (Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141); 세포에서의 신뢰가능한 활성 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:63); 탁월한 서열 특이성 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:151); 최소의 비-안티센스 활성 (Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141); 및 간단한 삼투성 또는 스크레이프 전달 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:291)을 포함한 많은 이점을 갖는다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 고용량에서의 그의 비-독성으로 인해 또한 바람직하다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 제조에 대한 논의는 문헌 [Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:187]에서 찾아볼 수 있다.
- [0292] 본원에 기재된 데이터에 기초하여, 본원에 기재된 화학적 변형은 RISC로의 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 로딩을 촉진하는 것으로 여겨진다. 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드는 RISC로의 로딩 및 유전자 침묵의 유도에서 활성인 것으로 제시된 바 있다. 그러나, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드의 경우에 활성의 수준은 듀플렉스 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 2 내지 4 자릿수 더 낮은 것으로 보인다.

- [0293] 본 발명은, (a) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드의 안정성을 유의하게 증가시키고, (b) RISC 복합체로의 폴리뉴클레오티드의 효율적인 로딩을 촉진하고, (c) 세포에 의한 단일 가닥 뉴클레오티드의 흡수를 개선시킬 수 있는 화학적 변형 패턴에 대한 기재를 제공한다. 화학적 변형 패턴은 리보스, 백본, 소수성 뉴클레오시드 및 접합체 유형의 변형의 조합을 포함할 수 있다. 또한, 일부 실시양태에서, 단일 폴리뉴클레오티드의 5' 말단은 화학적으로 인산화될 수 있다.
- [0294] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 RISC 억제 폴리뉴클레오티드의 기능성을 개선시키는 화학적 변형 패턴에 대한 기재를 제공한다. 단일 가닥 폴리뉴클레오티드는 사전로딩된 RISC 복합체의 활성을 기질 경쟁 메커니즘을 통해 억제하는 것으로 제시된 바 있다. 통상적으로 안타고머라 불리는 이러한 유형의 분자의 경우에, 활성은 통상적으로 고농도를 필요로 하며, 생체내 전달은 매우 효과적이지 않다. 본 발명은 (a) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드의 안정성을 유의하게 증가시키고/거나, (b) RISC에 의해 폴리뉴클레오티드를 기질로서 효율적으로 인식하는 것을 촉진하고/거나, (c) 세포에 의한 단일 가닥 뉴클레오티드의 흡수를 개선시킬 수 있는 화학적 변형 패턴에 대한 기재를 제공한다. 화학적 변형 패턴은 리보스, 백본, 소수성 뉴클레오시드 및 접합체 유형의 변형의 조합을 포함할 수 있다.
- [0295] 본 발명에 의해 제공된 변형은 모든 폴리뉴클레오티드에 적용가능하다. 이는 단일 가닥 RISC 진입 폴리뉴클레오티드, 단일 가닥 RISC 억제 폴리뉴클레오티드, 가변 길이 (15-40 bp)의 통상적인 듀플렉스 폴리뉴클레오티드, 비대칭 듀플렉스 폴리뉴클레오티드 등을 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 5' 말단, 리보스, 백본 및 소수성 뉴클레오시드 변형을 포함한 매우 다양한 화학적 변형 패턴으로 변형될 수 있다.
- [0296] 본 발명의 측면은 포스포로티오에이트 백본 변형을 갖는 고도로 변형된 핵산 분자에 관한 것이다. 고도로 활성인 완전히 포스포로티오에이트화된 화합물 (21552)이 PCT 공개 번호 W02011/119852에 개시되어 있고, 이는 본원에 참조로 포함된다. 흥미롭게도, 완전히 포스포로티오에이트 변형된 21 mer 가이드 가닥을 함유하는 화합물은 활성이었지만, 가이드 가닥 길이를 2개의 뉴클레오티드만큼, 예를 들어 19 mer 가이드 가닥 (21550)으로 감소시키는 것은 감소된 활성을 발생시켰다. 어떠한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 가이드 가닥을 19개에서 21개 뉴클레오티드 (완전히 포스포로티오에이트화된 가이드 가닥)로 증가시키는 것은 가이드 가닥과 mRNA 사이의 용융 온도를 증가시킬 수 있고, 이는 증진된 침묵 활성을 발생시킬 수 있다. 완전히 포스포로티오에이트 변형되거나 또는 6개의 포스포로티오에이트 변형을 함유하도록 13 mer 패신저 가닥 상의 포스포로티오에이트 함량을 다르게 하는 것은 변경된 활성을 발생시키지 않았다 (PCT 공개 번호 W02011/119852에 개시된 바와 같은 21551 vs 21556).
- [0297] 여러 이전 그룹들은 완전히 포스포로티오에이트화된 RNAi 화합물을 개발하기 위해 시도해왔다. 단일 가닥 영역이 결여된 완전히 포스포로티오에이트화된 듀플렉스가 이전에 설계되어 시험되었지만, 이들 화합물은 허용되는 약동학적 프로파일을 입증하지 못했다. 완전히 포스포로티오에이트화된 단일 가닥 RNAi 화합물이 또한 이전에 설계된 바 있지만, 이들 화합물은 RISC로 효율적으로 진입하지 못했다. 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 PCT 공개 번호 W02011/119852는 RISC로 효율적으로 진입하고 완전히 포스포로티오에이트화된 백본을 함유하는 하이브리드 RNAi 화합물을 개시하였다.
- [0298] 일부 측면에서, 개시내용은 고도로 포스포로티오에이트화된 백본을 갖는 (예를 들어, 완전히 포스포로티오에이트화된 백본 또는 거의 완전히 포스포로티오에이트화된 백본 (예를 들어, 1개의 비-포스포로티오에이트화된 잔기를 가짐)을 갖는 적어도 1개의 가닥을 갖는) 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 발견에 관한 것이다. 놀랍게도, 높은 수준의 포스포로티오에이트 변형은 포스포로티오에이트 변형을 덜 갖는 (예를 들어 완전히 포스포로티오에이트화되거나 또는 거의 완전히 포스포로티오에이트화된 적어도 1개의 가닥을 갖지 않는) 단리된 이중 가닥 핵산 분자에 비해, 중추 신경계 (CNS)에서 단리된 이중 가닥 핵산 분자의 증가된 수준의 세포 흡수를 매개한다는 것이 본원에서 발견되었다.
- [0299] 합성
- [0300] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 효소적 합성 및/또는 화학적 합성을 사용하여 합성될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 시험관내 (예를 들어, 효소적 합성 및 화학적 합성을 사용하여) 또는 생체내 (관련 기술분야에 널리 공지되어 있는 재조합 DNA 기술을 사용하여) 합성될 수 있다.
- [0301] 바람직한 실시양태에서, 화학적 합성은 변형된 폴리뉴클레오티드의 경우에 사용된다. 선형 올리고뉴클레오티드의 화학적 합성은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 용액 또는 고체 상 기술에 의해 달성될 수 있다. 바람

직하게는, 합성은 고체 상 방법에 의한다. 올리고뉴클레오티드는 포스포라미다이트, 포스파이트 트리에스테르, H-포스포네이트 및 포스포트리에스테르 방법을 포함한 여러 상이한 합성 절차 중 임의의 것에 의해, 전형적으로 자동화된 합성 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0302] 올리고뉴클레오티드 합성 프로토콜은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 번호 5,830,653; WO 98/13526; 문헌 [Stec et al. 1984. J. Am. Chem. Soc. 106:6077; Stec et al. 1985. J. Org. Chem. 50:3908; Stec et al. J. Chromatog. 1985. 326:263; LaPlanche et al. 1986. Nucl. Acid. Res. 1986. 14:9081; Fasman G. D., 1989. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 1989. CRC Press, Boca Raton, Fla.; Lamone. 1993. Biochem. Soc. Trans. 21:1]; 미국 특허 번호 5,013,830; 미국 특허 번호 5,214,135; 미국 특허 번호 5,525,719; 문헌 [Kawasaki et al. 1993. J. Med. Chem. 36:831]; WO 92/03568; 미국 특허 번호 5,276,019; 및 미국 특허 번호 5,264,423에서 찾아볼 수 있다.

[0303] 선택되는 합성 방법은 목적하는 올리고뉴클레오티드의 길이에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 선택은 통상의 기술자의 기술 내에서 이루어진다. 예를 들어, 포스포라미다이트 및 포스파이트 트리에스테르 방법은 175개 이상의 뉴클레오티드를 갖는 올리고뉴클레오티드를 생성할 수 있는 반면에, H-포스포네이트 방법은 100개 미만의 뉴클레오티드의 올리고뉴클레오티드의 경우에 잘 작용한다. 변형된 염기가 올리고뉴클레오티드 내로 혼입되는 경우에, 특히 변형된 포스포디에스테르 연결이 사용되는 경우에, 합성 절차는 필요한 경우에 공지된 절차에 따라 변경된다. 이와 관련하여, 문헌 [Uhlmann et al. (1990, Chemical Reviews 90:543-584)]은 변형된 염기 및 변형된 포스포디에스테르 연결을 갖는 올리고뉴클레오티드의 제조에 대한 참조를 제공하며, 이에 대한 절차를 약술한다. 올리고뉴클레오티드를 제조하는 것에 대한 다른 예시적인 방법은 문헌 [Sonveaux. 1994. "Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis"; Agrawal. Methods in Molecular Biology 26:1]에 교시되어 있다. 예시적인 합성 방법은 또한 문헌 ["Oligonucleotide Synthesis - A Practical Approach" (Gait, M. J. IRL Press at Oxford University Press. 1984)]에 교시되어 있다. 또한, 규정된 서열 (변형된 뉴클레오티드를 갖는 일부 서열 포함)의 선형 올리고뉴클레오티드는 여러 상업적 공급원으로부터 용이하게 입수가능하다.

[0304] 올리고뉴클레오티드는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 또는 겔 크로마토그래피 및 고압 액체 크로마토그래피를 포함한 다수의 크로마토그래피 방법 중 임의의 것에 의해 정제될 수 있다. 뉴클레오티드 서열, 특히 비변형된 뉴클레오티드 서열을 확인하기 위해, 막삼(Maxam) 및 길버트(Gilbert) 서열분석, 생어(Sanger) 서열분석, 모세관 전기영동 서열분석, 이동 스팟 서열분석 절차를 포함한 임의의 공지된 절차에 의해 또는 하이본드(Hybond) 페이퍼에 결합된 올리고뉴클레오티드의 선택적인 화학적 분해를 사용함으로써, 올리고뉴클레오티드를 DNA 서열분석에 적용할 수 있다. 또한, 짧은 올리고뉴클레오티드의 서열은 레이저 탈착 질량 분광분석법에 의해 또는 고속 원자 충격에 의해 분석될 수 있다 (McNeal, et al., 1982, J. Am. Chem. Soc. 104:976; Viari, et al., 1987, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 14:83; Grotjahn et al., 1982, Nuc. Acid Res. 10:4671). 서열분석 방법은 또한 RNA 올리고뉴클레오티드에 대해서도 이용가능하다.

[0305] 합성된 올리고뉴클레오티드의 품질은, 예를 들어 문헌 [Bergot and Egan. 1992. J. Chrom. 599:35]의 방법을 사용하여 모세관 전기영동 및 변성 강음이온 HPLC (SAX-HPLC)에 의해 올리고뉴클레오티드를 시험함으로써 검증될 수 있다.

[0306] 다른 예시적인 합성 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning, Volumes I and II (DN Glover Ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M J Gait Ed, 1984; Nucleic Acid Hybridisation (B D Hames and S J Higgins eds. 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); 또는 연속간행물, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)] 참조).

[0307] 특정 실시양태에서, 대상 RNAi 구축물 또는 적어도 그의 부분은 대상 구축물을 코딩하는 발현 벡터로부터 전사된다. 관련 기술분야에서 인식되는 임의의 벡터가 이러한 목적으로 사용될 수 있다. 전사된 RNAi 구축물은 목적하는 변형 (예컨대, 비변형된 센스 가닥을 변형된 것으로 대체하는 것 등)이 수행되기 전에, 단리 및 정제될 수 있다.

[0308] 세포에 의한 올리고뉴클레오티드의 흡수

[0309] 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드 조성물은 1종 이상의 세포 또는 세포 용해물과 접촉되고 (즉, 그와 접촉되도록 함, 본원에서 그에 투여 또는 전달되는 것으로도 지칭됨), 그에 의해 흡수된다. 용어 "세포"는 원핵 및 진핵 세포, 바람직하게는 척추동물 세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포를 포함한다. 바람직한 실시

양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 조성물은 인간 세포와 접촉된다.

- [0310] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 조성물은 시험관내에서, 예를 들어 시험 튜브 또는 배양 접시 내에서 (그리고 이들은 대상체 내로 도입될 수 있거나 또는 도입되지 않을 수 있음) 또는 생체내에서, 예를 들어 포유동물 대상체와 같은 대상체 내에서 세포와 접촉될 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 국소로 또는 전기천공을 통해 투여된다. 올리고뉴클레오티드는 세포내이입에 의해 느린 속도로 세포에 의해 흡수되지만, 세포내이입된 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 격리되며, 예를 들어 표적 핵산 분자로의 혼성화를 위해서는 이용가능하지 않다. 한 실시양태에서, 세포 흡수는 전기천공 또는 인산칼슘 침전에 의해 용이해질 수 있다. 그러나, 이러한 절차는 시험관내 또는 생체의 실시양태의 경우에만 유용하고, 편리하지 않으며, 일부 경우에 세포 독성과 연관된다.
- [0311] 또 다른 실시양태에서, 세포로의 올리고뉴클레오티드의 전달은, 인산칼슘, DMSO, 글리세롤 또는 텍스트란, 전기천공을 포함한 관련 기술분야에서 인식되는 적합한 방법에 의해, 또는 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 양이온성, 음이온성 또는 중성 지질 조성물 또는 리포솜을 사용한 형질감염에 의해 증진될 수 있다 (예를 들어, WO 90/14074; WO 91/16024; WO 91/17424; 미국 특허 번호 4,897,355; 문헌 [Bergan et al. 1993. Nucleic Acids Research. 21:3567] 참조). 또한, 올리고뉴클레오티드의 증진된 전달은 벡터 (예를 들어, 문헌 [Shi, Y. 2003. Trends Genet 2003 Jan. 19:9; Reichhart J M et al. Genesis. 2002. 34(1-2):1604, Yu et al. 2002. Proc. Natl. Acad Sci. USA 99:6047; Sui et al. 2002. Proc. Natl. Acad Sci. USA 99:5515] 참조), 바이러스, 폴리미린 또는 다가양이온 접합체 (폴리리신, 프로타민, 또는 Ni, N12-비스 (에틸) 스페르민과 같은 화합물을 사용함)를 사용하는 것에 의해 매개될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Bartzatt, R. et al.1989. Biotechnol. Appl. Biochem. 11:133; Wagner E. et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4255] 참조).
- [0312] 특정 실시양태에서, 본 발명의 sd-rxRNA는 2010년 3월 4일에 출원된 표제 "Formulations and Methods for Targeted Delivery to Phagocyte Cells"의 미국 가출원 번호 61/310,611에 기재되어 있고 이로부터 참조로 포함되는, GeRP (글루칸 캡슐화된 RNA 로딩된 입자)로 지칭되는 다양한 베타-글루칸 함유 입자를 사용하여 전달될 수 있다. 이러한 입자는 또한 미국 특허 공개 US 2005/0281781 A1, 및 US 2010/0040656, 미국 특허 번호 8,815,818 및 PCT 공개 WO 2006/007372, 및 WO 2007/050643에 기재되어 있고 이로부터 참조로 포함된다. sd-rxRNA 분자는 소수성으로 변형될 수 있으며, 임의로 지질 및/또는 친양쪽성 펩티드와 회합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 베타-글루칸 입자는 효모로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 페이로드 포획 분자는 중합체, 예컨대 적어도 약 1000 Da, 10,000 Da, 50,000 Da, 100 kDa, 500 kDa 등의 분자량을 갖는 것이다. 바람직한 중합체는 (제한 없이) 양이온성 중합체, 키토산 또는 PEI (폴리에틸렌아민) 등을 포함한다.
- [0313] 글루칸 입자는 진균 세포벽, 예컨대 효모 세포벽의 불용성 성분으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 효모는 베이커 효모이다. 효모-유래 글루칸 분자는 β -(1,3)-글루칸, β -(1,6)-글루칸, 만난 및 키틴 중 1종 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 글루칸 입자는 중공 효모 세포벽을 포함함으로써, 그 내부에서 RNA 분자와 같은 분자와 복합체화되거나 또는 이를 캡슐화할 수 있는, 세포와 유사한 3차원 구조를 유지한다. 효모 세포벽 입자의 사용과 연관된 일부 이점은 성분의 이용가능성, 그의 생분해성 속성 및 식세포에 표적화되는 그의 능력이다.
- [0314] 일부 실시양태에서, 글루칸 입자는, 예를 들어 베이커 효모 (플라이슈만(Fleischmann))를 1M NaOH/pH 4.0 H2O로 추출하는 것에 의해 불용성 성분을 세포벽으로부터 추출하고, 이어서 세척 및 건조시킴으로써 제조될 수 있다. 효모 세포벽 입자의 제조 방법은 미국 특허 4,810,646, 4,992,540, 5,082,936, 5,028,703, 5,032,401, 5,322,841, 5,401,727, 5,504,079, 5,607,677, 5,968,811, 6,242,594, 6,444,448, 6,476,003, 미국 특허 공개 2003/0216346, 2004/0014715 및 2010/0040656, 및 PCT 공개 출원 W002/12348에서 논의되어 있고 이로부터 참조로 포함된다.
- [0315] 글루칸 입자를 제조하기 위한 프로토콜은 또한 하기 문헌 [Soto and Ostroff (2008), "Characterization of multilayered nanoparticles encapsulated in yeast cell wall particles for DNA delivery." Bioconjug Chem 19(4):840-8; Soto and Ostroff (2007), "Oral Macrophage Mediated Gene Delivery System," Nanotech, Volume 2, Chapter 5 ("Drug Delivery"), pages 378-381; 및 Li et al. (2007), "Yeast glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines via MyD88- and Syk kinase-dependent pathways." Clinical Immunology 124(2):170-181]에 기재되어 있고 이로부터 참조로 포함된다.
- [0316] 글루칸 함유 입자, 예컨대 효모 세포벽 입자는 또한 상업적으로 입수할 수 있다. 여러 비제한적 예는, 바이오리진(Biorigin) (브라질 상파울루)으로부터의 뉴트리셀(Nutricell) MOS 55, SAF-만난 (SAF 아그리(SAF Agri),

미네소타주 미네아폴리스), 뉴트렉스(Nutrex) (센시엔트 테크놀로지스(Sensient Technologies), 위스콘신주 밀워키), 알칼리-추출 입자, 예컨대 뉴트리셉츠(Nutricepts) (뉴트리셉츠 인크.(Nutricepts Inc.), 미네소타주 번스빌) 및 ASA 바이오테크(ASA Biotech)에 의해 제조된 것, 바이오폴리머 엔지니어링(Biopolymer Engineering) 으로부터의 산-추출 WGP 입자, 및 유기 용매-추출 입자, 예컨대 알파-베타 테크놀로지, 인크.(Alpha-beta Technology, Inc.) (매사추세츠주 우스터)로부터의 아주백스(Adjuvax)TM 및 노보젠(Novogen) (코네티컷주 스탬포드) 으로부터의 마이크로미립자 글루칸을 포함한다.

- [0317] 글루칸 입자, 예컨대 효모 세포벽 입자는 제조 및/또는 추출 방법에 따라 다양한 수준의 순도를 가질 수 있다. 일부 경우에, 입자는 세포내 성분 및/또는 세포벽의 외부 만노단백질 층을 제거하기 위해 알칼리-추출되거나, 산-추출되거나 또는 유기 용매-추출된다. 이러한 프로토콜은 50% - 90% 범위의 글루칸 (w/w) 함량을 갖는 입자를 생성할 수 있다. 일부 경우에, 보다 낮은 글루칸 w/w 함량을 의미하는 보다 낮은 순도의 입자가 바람직할 수 있는 반면, 다른 실시양태에서는 보다 높은 글루칸 w/w 함량을 의미하는 보다 높은 순도의 입자가 바람직할 수 있다.
- [0318] 글루칸 입자, 예컨대 효모 세포벽 입자는 천연 지질 함량을 가질 수 있다. 예를 들어, 입자는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% 또는 20% w/w 초과 지질을 함유할 수 있다. 실시예 섹션에서, 2종의 글루칸 입자 배치의 유효성을 시험하였다: YGP SAF 및 YGP SAF + L (천연 지질 함유). 일부 경우에, 천연 지질의 존재는 RNA 분자의 복합체화 또는 포획에 도움이 될 수 있다.
- [0319] 글루칸 함유 입자는 전형적으로 대략 2-4 마이크로미터의 직경을 갖지만, 2 마이크로미터 미만 또는 4 마이크로미터 초과 직경을 갖는 입자도 또한 본 발명의 측면과 상용성이다.
- [0320] 전달되는 RNA 분자(들)는 글루칸 입자의 셀 내에 복합체화되거나 또는 "포획"된다. 입자의 셀 또는 RNA 성분은, 문헌 [Soto and Ostroff (2008) Bioconjug Chem 19:840]에 기재되어 있고 이로부터 참조로 포함되는 바와 같이, 시각화를 위해 표지될 수 있다. GeRP의 로딩 방법은 하기에 추가로 논의된다.
- [0321] 올리고뉴클레오티드의 흡수를 위한 최적의 프로토콜은 인자의 수에 따라 달라질 것이며, 가장 중요한 것은 사용되는 세포의 유형일 것이다. 흡수에 중요한 다른 인자는 올리고뉴클레오티드의 속성 및 농도, 세포의 전면생장률, 세포 배양의 유형 (예를 들어, 현탁 배양 또는 플레이팅) 및 세포가 성장하는 배지의 유형을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0322] 캡슐화제
- [0323] 캡슐화제는 소포 내의 올리고뉴클레오티드를 포획한다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 담체 또는 비히클, 예를 들어 리포솜 또는 미셀과 회합될 수 있지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인식될 바와 같이 다른 담체가 사용될 수 있다. 리포솜은 생물학적 막과 유사한 구조를 갖는 지질 이중층으로 이루어진 소포이다. 이러한 담체는 올리고뉴클레오티드의 세포 흡수 또는 표적화를 용이하게 하거나, 올리고뉴클레오티드의 약동학적 또는 독성학적 특성을 개선시키는데 사용된다.
- [0324] 또한, 예를 들어 본 발명의 올리고뉴클레오티드는, 활성 성분이 함유된 제약 조성물이 지질 층에 부착된 수성 중심 층으로 이루어진 소체에 분산되거나 다양하게 존재하는, 리포솜 내에 캡슐화되어 투여될 수 있다. 용해도에 따라, 올리고뉴클레오티드는 수성 층 및 지질 층 둘 다에, 또는 일반적으로 리포솜 현탁액으로 불리는 것에 존재할 수 있다. 일반적으로 독점적인 것은 아니지만, 소수성 층은 인지질, 예컨대 레시틴 및 스펅고미엘린, 스테로이드, 예컨대 콜레스테롤, 다소 이온성인 계면활성제, 예컨대 디아세틸포스페이트, 스테아릴아민 또는 포스파티드산, 또는 소수성 속성을 갖는 다른 물질을 포함한다. 리포솜의 직경은 일반적으로 약 15 nm 내지 약 5 마이크로미터의 범위이다.
- [0325] 약물 전달 비히클로서 리포솜을 사용하는 것은 여러 이점을 제공한다. 리포솜은 세포내 안정성을 증가시키고, 흡수 효율을 증가시키고, 생물학적 활성을 개선시킨다. 리포솜은 세포 막을 구성하는 지질과 유사한 방식으로 배열된 지질로 이루어진 중공 구형 소포이다. 이들은 수용성 화합물을 포획하기 위한 내부 수성 공간을 갖고, 0.05 내지 수 마이크로미터 직경 크기의 범위를 갖는다. 여러 연구는, 리포솜은 핵산을 세포로 전달할 수 있고 핵산은 생물학적으로 활성인 상태로 유지된다는 것을 제시한 바 있다. 예를 들어, 원래는 연구 도구로서 설계된 지질 전달 비히클, 예컨대 리포펙틴(Lipofectin) 또는 리포펙타민(LIPOFECTAMINE)TM 2000은 무손상 핵산 분자를 세포에 전달할 수 있다.
- [0326] 리포솜을 사용하는 특정 이점은, 이들이 비-독성이며 조성물 내에서 생분해성인 점; 긴 순환 반감기를 나타내는 점; 및 인식 분자가 조직으로의 표적화를 위해 그의 표면에 용이하게 부착될 수 있다는 점을 포함한다. 마지막

으로, 리포솜-기반 제약을 액체 현탁액 또는 동결건조된 생성물로 비용-효과적으로 제조하는 것은, 허용가능한 약물 전달 시스템으로서의 본 기술의 실현가능성을 입증하였다.

[0327] 일부 측면에서, 본 발명과 연관된 제제는, 자연 발생 또는 화학적 합성 또는 변형된 포화 및 불포화 지방산 잔기 부류에 대해 선택될 수 있다. 지방산은 트리글리세리드, 디글리세리드 또는 개별 지방산의 형태로 존재할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 비경구 영양을 위한 약리학에 현재 사용되는 지방산 및/또는 지방 에밀전의 널리-검증된 혼합물의 사용이 사용될 수 있다.

[0328] 리포솜 기반 제제는 올리고뉴클레오티드 전달을 위해 광범위하게 사용된다. 그러나, 상업적으로 입수가능한 지질 또는 리포솜 제제의 대부분은 적어도 1개의 양으로 하전된 지질 (양이온성 지질)을 함유한다. 이러한 양으로 하전된 지질의 존재는, 높은 정도의 올리고뉴클레오티드 로딩을 수득하고 리포솜 융합생성 특성을 증진시키기 위해 필수적인 것으로 여겨진다. 최적의 양으로 하전된 지질 화학을 확인하기 위한 여러 방법이 수행되고 공개된 바 있다. 그러나, 양이온성 지질을 함유하는 상업적으로 입수가능한 리포솜 제제는 높은 수준의 독성을 특징으로 한다. 생체내 제한된 치료 지수는, 양으로 하전된 지질을 함유하는 리포솜 제제는 RNA 침묵의 달성에 요구되는 농도보다 약간 더 높은 농도에서만 독성 (즉, 간 효소에서의 상승)과 연관된다는 것을 밝혀내었다.

[0329] 본 발명과 연관된 핵산은 소수성으로 변형될 수 있고, 중성 나노수송체 내에 포괄될 수 있다. 중성 나노수송체에 대한 추가의 기재는, 2009년 9월 22일에 출원된 표제 "Neutral Nanotransporters"의 PCT 출원 PCT/US2009/005251로부터 참조로 포함된다. 이러한 입자는 비하전된 지질 혼합물로의 정량적 올리고뉴클레오티드 혼입을 가능하게 한다. 이러한 중성 나노수송체 조성물에서 양이온성 지질의 독성 수준의 기여는 중요한 특색이다.

[0330] PCT/US2009/005251에서 입증된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드는 양이온성 지질이 없는 지질 혼합물에 효과적으로 혼입될 수 있으며, 이러한 조성물은 기능적인 방식으로, 치료적 올리고뉴클레오티드를 세포로 효과적으로 전달할 수 있다. 예를 들어, 지방 혼합물이 포스파티딜콜린 기반 지방산 및 콜레스테롤과 같은 스테롤로 구성된 경우에, 높은 수준의 활성이 관찰되었다. 예를 들어, 한 바람직한 중성 지방 혼합물 제제는 적어도 20%의 DOPC 또는 DSPC 및 적어도 20%의 스테롤, 예컨대 콜레스테롤로 구성된다. 1:5만큼 낮은 지질 대 올리고뉴클레오티드 비도 비 하전된 제제에서 올리고뉴클레오티드의 완전한 캡슐화를 얻기에 충분한 것으로 제시되었다.

[0331] 중성 나노수송체 조성물은 중성 지방 제제로의 올리고뉴클레오티드의 효율적인 로딩을 가능하게 한다. 조성물은, 분자의 소수성이 증가되도록 하는 방식으로 (예를 들어, 소수성 분자가 올리고뉴클레오티드 말단 또는 비말단 뉴클레오티드, 염기, 당 또는 백본 상의 소수성 분자에 (공유 또는 비공유) 부착됨) 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 변형된 올리고뉴클레오티드는 중성 지방 제제 (예를 들어, 적어도 25%의 콜레스테롤 및 25%의 DOPC 또는 그의 유사체를 함유함)와 혼합된다. 화물 분자, 예컨대 또 다른 지질이 조성물에 또한 포함될 수 있다. 제제의 일부가 올리고뉴클레오티드 그 자체로 구축된 이러한 조성물은 중성 지질 입자 내 올리고뉴클레오티드의 효율적인 캡슐화를 가능하게 한다.

[0332] 일부 측면에서, 바람직한 제제와의 소수성 올리고뉴클레오티드의 복합체화에 따라, 50 내지 140 nm 크기 범위의 안정한 입자가 형성될 수 있다. 제제 그 자체가 전형적으로 소형 입자를 형성하기보다는 오히려 응집체를 형성하며, 소수성 변형된 올리고뉴클레오티드의 첨가 시 50-120 nm의 안정한 입자로 변형된다는 것을 언급하는 것은 흥미롭다.

[0333] 본 발명의 중성 나노수송체 조성물은 소수성으로 변형된 폴리뉴클레오티드, 중성 지방 혼합물, 및 임의로 화물 분자를 포함한다. 본원에 사용된 "소수성으로 변형된 폴리뉴클레오티드"는, 폴리뉴클레오티드를 변형 전의 폴리뉴클레오티드보다 더 소수성이 되도록 하는 적어도 1개의 변형을 갖는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 (즉, sd-rxRNA)이다. 변형은 소수성 분자를 폴리뉴클레오티드에 (공유 또는 비공유) 부착시켜 달성될 수 있다. 일부 경우에, 소수성 분자는 친지성 기이거나 또는 이를 포함한다.

[0334] 용어 "친지성 기"는 물에 대한 그의 친화도보다 지질에 대해 더 높은 친화도를 갖는 기를 의미한다. 친지성 기의 예는 콜레스테롤, 콜레스테릴 또는 변형된 콜레스테릴 잔기, 아다만틴, 디히드로테스테론, 장쇄 알킬, 장쇄 알케닐, 장쇄 알키닐, 올레일-리토콜산, 콜렌산, 올레오일-콜렌산, 팔미틸, 헵타데실, 미리스틸, 담즙산, 콜산 또는 타우로콜산, 테옥시콜레이트, 올레일 리토콜산, 올레오일 콜렌산, 당지질, 인지질, 스펅고지질, 이소프레노이드, 예컨대 스테로이드, 비타민, 예컨대 비타민 E, 포화 또는 불포화 지방산, 지방산 에스테르, 예컨대 트리글리세리드, 피렌, 포르피린, 텍사피린, 아다만탄, 아크리딘, 비오틴, 쿠마린, 플루오레세인, 로다민, 텍사스-레드, 디콕시게닌, 디메톡시트리틸, t-부틸디메틸실릴, t-부틸디페닐실릴, 시아닌 염료 (예를 들어, Cy3 또는

Cy5), 퀵스트(Hoechst) 33258 염료, 프소랄렌 또는 이부프로펜을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 콜레스테롤을 모이어티는 환원될 수 있거나 (예를 들어, 콜레스탄에서와 같이) 또는 (예를 들어, 할로젠에 의해) 치환될 수 있다. 1개의 분자에서 상이한 친지성 기들의 조합이 또한 가능하다.

- [0335] 소수성 분자는 폴리뉴클레오티드의 다양한 위치에 부착될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 소수성 분자는 폴리뉴클레오티드의 말단 잔기, 예컨대 폴리뉴클레오티드의 3' 또는 5'-말단에 연결될 수 있다. 대안적으로, 내부 뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 분지 상의 뉴클레오티드에 연결될 수 있다. 소수성 분자는, 예를 들어 뉴클레오티드의 2'-위치에 부착될 수 있다. 소수성 분자는 또한 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드의 헤테로시클릭 염기, 당 또는 백본에 연결될 수 있다.
- [0336] 소수성 분자는 링커 모이어티에 의해 폴리뉴클레오티드에 연결될 수 있다. 임의로, 링커 모이어티는 비-뉴클레오티드 링커 모이어티이다. 비-뉴클레오티드 링커는 예를 들어, 무염기성 잔기 (디스페이스어(dSpacer)), 올리고에틸렌글리콜, 예컨대 트리에틸렌글리콜 (스페이스어 9) 또는 헥사에틸렌글리콜 (스페이스어 18), 또는 알칸-디올, 예컨대 부탄디올이다. 스페이스어 단위는 바람직하게는 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결된다. 링커 단위는 분자에서 1회만 나타날 수 있거나 또는 예를 들어 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트 또는 아마이드 연결을 통해 수회 혼입될 수 있다.
- [0337] 전형적인 접합 프로토콜은 서열의 1개 이상의 위치에 아미노링커를 보유하는 폴리뉴클레오티드의 합성을 수반하지만, 링커는 요구되지 않는다. 이어서, 아미노 기는 적절한 커플링 또는 활성화 시약을 사용하여, 접합되는 분자와 반응된다. 접합 반응은 여전히 고체 지지체에 결합된 폴리뉴클레오티드, 또는 용액 상에서 폴리뉴클레오티드의 후속 절단에 의해 수행될 수 있다. 전형적으로, 변형된 폴리뉴클레오티드를 HPLC에 의해 정제하여 순수한 물질을 생성한다.
- [0338] 일부 실시양태에서, 소수성 분자는 스테롤 유형 접합체, 피토스테롤 접합체, 콜레스테롤 접합체, 변경된 측쇄 길이를 갖는 스테롤 유형 접합체, 지방산 접합체, 임의의 다른 소수성 기 접합체 및/또는 내부 뉴클레오시드의 소수성 변형체이며, 이는 미셀로 혼입되기에 충분한 소수성을 제공한다.
- [0339] 본 발명의 목적상, 용어 "스테롤"은 A-고리의 3-위치에 히드록실 기를 갖는, 스테로이드의 하위군인 스테로이드 알콜을 지칭한다. 이들은 HMG-CoA 리덕타제 경로를 통해 아세틸-조효소 A로부터 합성된 양친매성 지질이다. 전체적인 분자는 매우 편평하다. A 고리 상의 히드록실 기는 극성이다. 지방족 쇄의 나머지는 비극성이다. 통상적으로 스테롤은 위치 17에 8 탄소 쇄를 갖는 것으로 간주된다.
- [0340] 본 발명의 목적상, 용어 "스테롤 유형 분자"는 스테롤과 구조가 유사한 스테로이드 알콜을 지칭한다. 주요 차이는 고리의 구조 및 측쇄에 부착된 위치 21에서의 탄소의 수이다.
- [0341] 본 발명의 목적상, 용어 "피토스테롤" (식물 스테롤로도 불림)은 식물에서 자연 발생하는 피토케미칼인, 스테로이드 알콜의 군이다. 200가지 초과 상이한 피토스테롤이 공지되어 있다.
- [0342] 본 발명의 목적상, 용어 "스테롤 측쇄"는 스테롤-유형 분자의 위치 17에 부착된 측쇄의 화학적 조성을 지칭한다. 표준 정의에서, 스테롤은 위치 17에 8 탄소 쇄를 보유하는 4 고리 구조로 제한된다. 본 발명에서, 통상적인 것보다 더 길고 짧은 측쇄를 갖는 스테롤 유형 분자가 기재된다. 측쇄는 분지형이거나 또는 이중 백본을 함유할 수 있다.
- [0343] 따라서, 본 발명에 유용한 스테롤은, 예를 들어 콜레스테롤 뿐만 아니라 위치 17에 2-7개 또는 9개 초과 탄소의 측쇄가 부착된 고유한 스테롤을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 다중탄소 꼬리의 길이는 5 내지 9개의 탄소로 다양하다. 이러한 접합체는 특히 간으로의 전달에 있어서 유의하게 양호한 생체내 효능을 가질 수 있다. 이러한 유형의 분자는 통상적인 콜레스테롤에 접합된 올리고뉴클레오티드보다 5 내지 9배 더 낮은 농도에서 작용할 것으로 예상된다.
- [0344] 대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 소수성 분자로서 기능하는 단백질, 펩티드 또는 양으로 하전된 화학물질에 결합될 수 있다. 단백질은 프로타민, dsRNA 결합 도메인 및 아르기닌 풍부 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 예시적인 양으로 하전된 화학물질은 스페르민, 스페르미딘, 카다베린 및 푸트레신을 포함한다.
- [0345] 또 다른 실시양태에서, 소수성 분자 접합체는 폴리뉴클레오티드의 최적의 화학적 변형 패턴 (본원에 상세하게 기재된 바와 같음) (소수성 변형, 포스포로티오에이트 변형 및 2' 리보 변형을 함유하나 이에 제한되지는 않음)과 조합되는 경우에도 보다 높은 효능을 나타낼 수 있다.
- [0346] 또 다른 실시양태에서, 스테롤 유형 분자는 자연 발생 피토스테롤일 수 있다. 다중탄소 쇄는 9개보다 더 길 수

있고, 선형, 분지형일 수 있고/거나 이중 결합을 함유할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 접합체를 함유하는 일부 피토스테롤은 다양한 조직으로의 폴리뉴클레오티드의 전달에 있어서 유의하게 보다 강력하고 활성일 수 있다. 일부 피토스테롤은 조직 선호도를 나타낼 수 있고, 이에 따라 특정한 조직에 특이적으로 RNAi를 전달하는 방법으로서 사용될 수 있다.

- [0347] 소수성으로 변형된 폴리뉴클레오티드는 중성 지방 혼합물과 혼합되어 미셀을 형성한다. 중성 지방산 혼합물은, 소수성으로 변형된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미셀을 형성할 수 있는 생리학적 pH 또는 그 근처에서 알짜 중성 또는 약간 알짜 음전하를 갖는 지방의 혼합물이다. 본 발명의 목적상, 용어 "미셀"은 비하전된 지방산과 인지질의 혼합물에 의해 형성된 소형 나노입자를 지칭한다. 중성 지방 혼합물은, 독성을 유발하지 않는 양으로 존재하는 한, 양이온성 지질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 중성 지방 혼합물은 양이온성 지질을 함유하지 않는다. 양이온성 지질을 함유하지 않는 혼합물은 1% 미만 및 바람직하게는 0%의 총 지질 (양이온성 지질)을 갖는 혼합물이다. 용어 "양이온성 지질"은 생리학적 pH 또는 그 근처에서 알짜 양전하를 갖는 지질 및 합성 지질을 포함한다. 용어 "음이온성 지질"은 생리학적 pH 또는 그 근처에서 알짜 음전하를 갖는 지질 및 합성 지질을 포함한다.
- [0348] 중성 지방은, 강력하지만 비공유 인력 (예를 들어, 정전기적, 반 데르 발스, 파이-적층 등의 상호작용)에 의해 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 결합한다.
- [0349] 중성 지방 혼합물은, 자연 발생 또는 화학적 합성 또는 변형된 포화 및 불포화 지방산 잔기 부류로부터 선택된 제제를 포함할 수 있다. 지방산은 트리글리세리드, 디글리세리드 또는 개별 지방산의 형태로 존재할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 비경구 영양을 위한 약리학에 현재 사용되는 지방산 및/또는 지방 에멀전의 널리-입증된 혼합물의 사용이 사용될 수 있다.
- [0350] 중성 지방 혼합물은 바람직하게는 콜린 기반 지방산 및 스테롤의 혼합물이다. 콜린 기반 지방산은, 예를 들어 합성 포스포콜린 유도체, 예컨대 DDPC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC, DOPC, POPC, 및 DEPC를 포함한다. DOPC (화학물질 등록 번호 4235-95-4)는 디올레오일포스파티딜콜린 (디엘라이도일포스파티딜콜린, 디올레오일-PC, 디올레오일포스포콜린, 디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 디올레오일포스파티딜콜린으로도 공지됨)이다. DSPC (화학물질 등록 번호 816-94-4)는 디스테아로일포스파티딜콜린 (1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린으로도 공지됨)이다.
- [0351] 중성 지방 혼합물에서 스테롤은, 예를 들어 콜레스테롤일 수 있다. 중성 지방 혼합물은 완전히 콜린 기반 지방산 및 스테롤로 이루어질 수 있거나 또는 임의로 화물 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중성 지방 혼합물은 적어도 20% 또는 25%의 지방산 및 20% 또는 25%의 스테롤을 가질 수 있다.
- [0352] 본 발명의 목적상, 용어 "지방산"은 지방산의 통상적인 기재에 관한 것이다. 이들은 개별 엔티티로서 또는 2- 및 트리글리세리드의 형태로 존재할 수 있다. 본 발명의 목적상, 용어 "지방 에멀전"은, 식이로 충분한 지방을 얻을 수 없는 대상체에게 정맥내로 제공된 안전한 지방 제제를 지칭한다. 이는 대두 오일 (또는 다른 자연 발생 오일) 및 난 인지질의 에멀전이다. 지방 에멀전은 일부 불용성 마취제 제제를 위해 사용된다. 이러한 개시 내용에서, 지방 에멀전은 인트라리피드(Intralipid), 리포신(Liposyn), 뉴트리리피드(Nutrilipid)와 같이 상업적으로 입수가능한 제제, 변형된 상업적 제제 (이들은 특정한 지방산이 풍부하거나 또는 지방산 및 인지질의 완전 신생-제제화 조합물임)의 일부일 수 있다.
- [0353] 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 조성물과 접촉되는 세포는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물 및 지질, 예를 들어 상기 기재된 지질 또는 지질 조성물 중 하나를 포함하는 혼합물과 약 12시간 내지 약 24시간 동안 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 조성물과 접촉되는 세포는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물 및 지질, 예를 들어 상기 기재된 지질 또는 지질 조성물 중 하나를 포함하는 혼합물과 약 1 내지 약 5일 동안 접촉된다. 한 실시양태에서, 세포는 지질 및 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물과 약 3 내지 약 30일만큼 오래 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 지질을 포함하는 혼합물은 세포와 적어도 약 5 내지 약 20일 동안 접촉된 상태로 둔다. 또 다른 실시양태에서, 지질을 포함하는 혼합물은 세포와 적어도 약 7 내지 약 15일 동안 접촉된 상태로 둔다.
- [0354] 제제 중 50%-60%는 임의로, 임의의 다른 지질 또는 분자일 수 있다. 이러한 지질 또는 분자는 본원에서 화물 지질 또는 화물 분자로서 지칭된다. 화물 분자는 인트라리피드, 소분자, 융합생성 펩티드 또는 지질, 또는 세포 흡수, 엔도솜 방출 또는 조직 분포 특성을 변경시키기 위해 첨가될 수 있는 다른 소분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 특성이 바람직한 경우에, 화물 분자를 용인하는 능력은 이들 입자의 특성의 조정에

중요하다. 예를 들어, 일부 조직 특이적 대사물질의 존재는 조직 분포 프로파일을 극적으로 변경시킬 수 있다. 예를 들어, 다양한 포화도를 갖는 보다 짧거나 보다 긴 지방쇄가 풍부한 인트라리피드 유형 제제의 사용은 이러한 유형의 제제의 조직 분포 프로파일 (및 이들의 로딩)에 영향을 미친다.

- [0355] 본 발명에 따른 유용한 화물 지질의 예는 융합생성 지질이다. 예를 들어, 쓰비터이온성 지질 DOPE (화학물질 등록 번호 4004-5-1, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민)는 바람직한 화물 지질이다.
- [0356] 인트라리피드는, 정제된 대두 오일 90 g, 정제된 난 인지질 12 g, 글리세롤 무수물 22 g, 1000 mL가 될 때까지의 적당량의 주사용수를 함유하는 이러한 1000 mL 조성으로 구성될 수 있다. pH는 수산화나트륨을 사용하여 대략 pH 8로 조정된다. 에너지 함량/L: 4.6 MJ (190 kcal). 오스몰랄농도 (대략): 300 mOsm/kg 물. 또 다른 실시양태에서, 지방 에멀전은 주사용수 중 5% 홍화 오일, 5% 대두 오일, 유화제로서 첨가되는 1.2% 이하의 난 포스파티드 및 2.5% 글리세린을 함유하는 리포신이다. 이는 또한 pH 조정을 위해 수산화나트륨을 함유할 수 있다. pH 8.0 (6.0 - 9.0). 리포신은 276 m Osmol/리터 (실제값)의 오스몰농도를 갖는다.
- [0357] 화물 지질의 동일성, 양 및 비에서의 변동은 이들 화합물의 세포 흡수 및 조직 분포 특징에 영향을 미친다. 예를 들어, 지질 꼬리의 길이 및 포화가능성 수준은 간, 폐, 지방 및 심근세포로의 상이한 흡수에 영향을 미칠 것이다. 비타민 또는 상이한 형태의 스테롤과 같은 특수한 소수성 분자의 첨가는 특정한 화합물의 대사에 수반되는 특수한 조직에 대한 분포를 선호할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비타민 A 또는 E가 사용된다. 상이한 올리고뉴클레오티드 농도에서 복합체가 형성되며, 농도가 더 높을수록 보다 효율적인 복합체 형성에 유리하다.
- [0358] 또 다른 실시양태에서, 지방 에멀전은 지질의 혼합물을 기반으로 한다. 이러한 지질은 천연 화합물, 화학적으로 합성된 화합물, 정제된 지방산 또는 임의의 다른 지질을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 지방 에멀전의 조성물은 전적으로 인공적이다. 특정한 실시양태에서, 지방 에멀전은 70% 초과 리놀레산이다. 또 다른 특정한 실시양태에서, 지방 에멀전은 적어도 1%의 카르디올리핀이다. 리놀레산 (LA)은 불포화 오메가-6 지방산이다. 이는 18-탄소쇄 및 2개의 시스 이중 결합을 갖는 카르복실산으로 이루어진 무색 액체이다.
- [0359] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 지방 에멀전의 조성의 변경은 소수성으로 변형된 폴리뉴클레오티드의 조직 분포를 변경시키기 위한 방식으로 사용된다. 이러한 방법론은 특정한 조직으로의 폴리뉴클레오티드의 특이적 전달을 제공한다.
- [0360] 또 다른 실시양태에서, 화물 분자의 지방 에멀전은 70% 초과 리놀레산 (C18H32O2) 및/또는 카르디올리핀을 함유한다.
- [0361] 인트라리피드와 같은 지방 에멀전은 이전에 일부 비-수용성 약물 (예컨대, 디프리반(Diprivan)으로서 재-제제화된 프로포폴)을 위한 전달 제제로서 사용된 바 있다. 본 발명의 고유한 특색은, (a) 변형된 폴리뉴클레오티드를 소수성 화합물(들)과 조합하여 지방 미셀에 혼입될 수 있도록 하는 개념 및 (b) 이를 지방 에멀전과 혼합하여 가역적 담체를 제공하는 것을 포함한다. 혈류로의 주사 후, 미셀은 통상적으로 알부민, HDL, LDL 및 다른 것을 포함한 혈청 단백질에 결합한다. 이러한 결합은 가역적이며, 결국 지방은 세포에 의해 흡수된다. 이어서, 미셀의 일부로서 혼입된 폴리뉴클레오티드는 세포의 표면에 인접하여 전달될 것이다. 그 후, 세포 흡수는 스테롤 유형 전달을 포함하나 이에 제한되지 않는 가변 메커니즘을 통해 일어날 수 있다.
- [0362] 착화제
- [0363] 착화제는 강력하지만 비공유 인력 (예를 들어, 정전기, 반 데르 발스, 파이-적층 등의 상호작용)에 의해 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 결합한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 착화제와 복합체화시켜 올리고뉴클레오티드의 세포 흡수를 증가시킬 수 있다. 착화제의 예는 양이온성 지질을 포함한다. 양이온성 지질을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 세포에 전달할 수 있다. 그러나, 상기 논의된 것과 같이, 양이온성 지질 무함유 제제가 일부 실시양태에서 바람직하다.
- [0364] 용어 "양이온성 지질"은 극성 및 비극성 도메인 둘 다를 갖는 지질 및 합성 지질을 포함하며, 이는 생리학적 pH 또는 그 근처에서 양으로 하전되는 것이 가능하고, 다가음이온, 예컨대 핵산에 결합하고, 세포에 핵산의 전달을 용이하게 한다. 일반적으로, 양이온성 지질은 아민, 아마이드 또는 그의 유도체의 포화 및 불포화 알킬 및 지환족 에테르 및 에스테르를 포함한다. 양이온성 지질의 직쇄 및 분지형 알킬 및 알케닐 기는 예를 들어 1 내지 약 25개의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 바람직한 직쇄 또는 분지형 알킬 또는 알케닐 기는 6개 이상의 탄소 원자를 갖는다. 지환족 기는 콜레스테롤 및 다른 스테로이드 기를 포함한다. 양이온성 지질은 예를 들어 Cl^- , Br^- , I^- , F^- , 아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 술페이트, 니트라이트 및 니트레이트를 포함한 다양한 반대

이온 (음이온)으로 제조될 수 있다.

- [0365] 양이온성 지질의 예는 폴리에틸렌아민, 폴리아미도아민 (PAMAM) 별형 덴드리머, 리포펙틴 (DOTMA 및 DOPE의 조합물), 리포펙타제, 리포펙타민™ (예를 들어, 리포펙타민™ 2000), DOPE, 시토펙틴 (길리아드 사이언시스 (Gilead Sciences), 캘리포니아주 포스터 시티), 및 유펙틴 (JBL, 캘리포니아주 샌 루이스 오비스포)을 포함한다. 예시적인 양이온성 리포솜은 N-[1-(2,3-디올레올옥시)-프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA), N-[1-(2,3-디올레올옥시)-프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 메틸술페이트 (DOTAP), 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카르바모일]콜레스테롤 (DC-Chol), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민카르복스아미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트 (DOSPA), 1,2-디미리스틸옥시프로필-3-디메틸-히드록시에틸 브로민화암모늄; 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB)로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, 양이온성 지질 N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA)는 포스포포티오에이트 올리고뉴클레오티드의 안티센스 효과를 1000-배 증가시키는 것으로 발견되었다. (Vlassov et al., 1994, *Biochimica et Biophysica Acta* 1197:95-108). 또한, 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 폴리 (L-리신) 또는 아비딘과 복합체화될 수 있으며, 지질은 이 혼합물에 포함되거나 (예를 들어, 스테릴-폴리 (L-리신)) 또는 포함되지 않을 수 있다.
- [0366] 양이온성 지질은 올리고뉴클레오티드를 세포에 전달하기 위하여 관련 기술분야에서 사용되어 왔다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,855,910; 5,851,548; 5,830,430; 5,780,053; 5,767,099; 문헌 [Lewis et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3176; Hope et al. 1998. *Molecular Membrane Biology* 15:1] 참조). 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 흡수를 용이하게 하기 위해 사용될 수 있는 다른 지질 조성물을 청구된 방법과 함께 사용할 수 있다. 상기 열거된 것에 더하여, 다른 지질 조성물이 또한 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 번호 4,235,871; 미국 특허 번호 4,501,728; 4,837,028; 4,737,323에 교시된 것을 포함한다.
- [0367] 한 실시양태에서, 지질 조성물은 올리고뉴클레오티드의 지질-매개 형질감염을 증진시키기 위한 작용제, 예를 들어 바이러스 단백질을 추가로 포함할 수 있다 (Kamata, et al., 1994. *Nucl. Acids. Res.* 22:536). 또 다른 실시양태에서, 예를 들어 미국 특허 5,736,392에서 교시된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드, 펩티드 및 지질을 포함하는 조성물의 일부로서 세포와 접촉된다. 또한, 혈청 저항성인 개선된 지질이 기재되어 있다 (Lewis, et al., 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:3176). 양이온성 지질 및 다른 착화제는 세포내 이입을 통해 세포로 운반되는 올리고뉴클레오티드의 수를 증가시키는 작용을 한다.
- [0368] 또 다른 실시양태에서, N-치환된 글리신 올리고뉴클레오티드 (펩티드)를 사용하여 올리고뉴클레오티드의 흡수를 최적화시킬 수 있다. 펩티드는 형질감염을 위한 양이온성 지질-유사 화합물을 생성하는데 사용되어 왔다 (Murphy, et al., 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1517). 펩티드는 표준 방법을 사용하여 합성할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Zuckermann, R. N., et al. 1992. *J. Am. Chem. Soc.* 114:10646; Zuckermann, R. N., et al. 1992. *Int. J. Peptide Protein Res.* 40:497]). 또한, 양이온성 지질 및 펩티드의 조합인 립티드를 사용하여 대상 올리고뉴클레오티드의 흡수를 최적화시킬 수 있다 (Hunag, et al., 1998. *Chemistry and Biology.* 5:345). 립티드는 펩티드 올리고뉴클레오티드의 정교화 및 아미노 말단 하위단량체와 지질의 그의 아미노 기를 통한 커플링에 의해 합성될 수 있다 (Hunag, et al., 1998. *Chemistry and Biology.* 5:345).
- [0369] 고도로 활성인 양이온성 지질을 생성하기 위해 양으로 하전된 아미노산을 사용할 수 있다는 것이 관련 기술분야에 공지되어 있다 (Lewis et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.A.* 93:3176). 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 전달하기 위한 조성물은 친지성 모이어티에 연결된 수많은 아르기닌, 리신, 히스티딘 또는 오르니틴 잔기를 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,777,153 참조).
- [0370] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 전달하기 위한 조성물은 약 1 내지 약 4개의 염기성 잔기를 갖는 펩티드를 포함한다. 이러한 염기성 잔기는 예를 들어 펩티드의 아미노 말단, C-말단, 또는 내부 영역에 위치할 수 있다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 관련 기술분야에 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글리신 (비극성으로 간주될 수도 있음), 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 염기성 아미노산을 제외하고, 펩티드의 다른 잔기의 대부분 또는 모두는 비-염기성 아미노산, 예를 들어 리신, 아르기닌 또는 히스티딘 이외의 아미노산으로부터 선택될 수

있다. 바람직하게는, 긴 중성 측쇄를 갖는 우세한 중성 아미노산이 사용된다.

- [0371] 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 전달하기 위한 조성물은 1개 이상의 감마 카르복시글루탐산 잔기 또는 γ -Gla 잔기를 갖는 천연 또는 합성 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 감마 카르복시글루탐산 잔기는 폴리펩티드가 서로 및 막 표면에 결합하게 할 수 있다. 다시 말해서, 접촉하게 되는 막에 관계없이 RNAi 구축물이 접촉하는 것을 돕는 일반적인 전달 양식으로서 일련의 γ -Gla를 갖는 폴리펩티드가 사용될 수 있다. 이는 적어도 RNAi 구축물이 혈류로부터 소거되는 것을 늦추고, 표적으로 돌아갈 기회를 증진시킬 수 있다.
- [0372] 감마 카르복시글루탐산 잔기는 천연 단백질에 존재할 수 있다 (예를 들어, 프로트롬빈은 10개 γ -Gla 잔기를 가짐). 대안적으로, 이들은 예를 들어 비타민 K-의존성 카르복실라제를 사용한 카르복실화에 의해, 정제되거나 재조합적으로 생성되거나 또는 화학적으로 합성된 폴리펩티드에 도입될 수 있다. 감마 카르복시글루탐산 잔기는 연속적 또는 비-연속적일 수 있으며, 폴리펩티드에서의 이러한 감마 카르복시글루탐산 잔기의 총 수 및 위치를 조절/미세 조정하여 다양한 수준의 폴리펩티드의 "점착성"을 달성할 수 있다.
- [0373] 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 조성물과 접촉되는 세포는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물 및 지질, 예를 들어 상기 기재된 지질 또는 지질 조성물 중 하나를 포함하는 혼합물과 약 12시간 내지 약 24시간 동안 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 조성물과 접촉되는 세포는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물 및 지질, 예를 들어 상기 기재된 지질 또는 지질 조성물 중 하나를 포함하는 혼합물과 약 1 내지 약 5일 동안 접촉된다. 한 실시양태에서, 세포는 지질 및 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물과 약 3 내지 약 30일만 오래 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 지질을 포함하는 혼합물은 세포와 적어도 약 5 내지 약 20일 동안 접촉된 상태로 놓인다. 또 다른 실시양태에서, 지질을 포함하는 혼합물은 세포와 적어도 약 7 내지 약 15일 동안 접촉된 상태로 놓인다.
- [0374] 예를 들어, 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 조성물은 세포와 본원에 기재된 것과 같은 장기간 인큐베이션 기간 동안 지질, 예컨대 시토펙틴 CS 또는 GSV (글렌 리서치(Glen Research)로부터 입수가 가능함; 버지니아주 스티어링), GS3815, GS2888의 존재 하에 접촉될 수 있다.
- [0375] 한 실시양태에서, 지질 및 올리고뉴클레오티드 조성물을 포함하는 혼합물과의 세포의 인큐베이션은 세포의 생존율을 감소시키지 않는다. 바람직하게는, 형질감염 기간 후에, 세포는 실질적으로 생존가능하다. 한 실시양태에서, 형질감염 후에, 세포는 적어도 약 70% 내지 적어도 약 100% 생존가능하다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 적어도 약 80% 내지 적어도 약 95% 생존가능하다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 적어도 약 85% 내지 적어도 약 90% 생존가능하다.
- [0376] 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는, 올리고뉴클레오티드를 수송하는 펩티드 서열 (본원에서 "수송 펩티드"로 지칭됨)을 세포에 부착시킴으로써 변형된다. 한 실시양태에서, 조성물은 단백질을 코딩하는 표적 핵산 분자에 상보적인 올리고뉴클레오티드 및 공유 부착된 수송 펩티드를 포함한다.
- [0377] 용어 "수송 펩티드"는 세포에의 올리고뉴클레오티드의 수송을 용이하게 하는 아미노산 서열을 포함한다. 세포에 연결되는 모이어티의 수송을 용이하게 하는 예시적인 펩티드는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 HIV TAT 전사 인자, 락토펙틴, 포진 VP22 단백질 및 섬유모세포 성장 인자 2를 포함한다 (Pooga et al. 1998. Nature Biotechnology. 16:857; 및 Derossi et al. 1998. Trends in Cell Biology. 8:84; Elliott and O'Hare. 1997. Cell 88:223).
- [0378] 올리고뉴클레오티드는 공지된 기술을 사용하여 수송 펩티드에 부착될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Prochiantz, A. 1996. Curr. Opin. Neurobiol. 6:629; Derossi et al. 1998. Trends Cell Biol. 8:84; Troy et al. 1996. J. Neurosci. 16:253], Vives et al. 1997. J. Biol. Chem. 272:16010]). 예를 들어, 한 실시양태에서, 활성화된 티올 기를 보유하는 올리고뉴클레오티드는 그 티올 기를 통해 수송 펩티드에 존재하는 시스테인 (예를 들어, 문헌 [Derossi et al. 1998. Trends Cell Biol. 8:84; Prochiantz. 1996. Current Opinion in Neurobiol. 6:629; Allinquant et al. 1995. J Cell Biol. 128:919]에 교시된 바와 같은 안테나페디아 호메오도메인의 제2 및 제3 나선 사이의 β 턴에 존재하는 시스테인)에 연결된다. 또 다른 실시양태에서, Boc-Cys-(Npys)OH기가 최종 (N-말단) 아미노산으로서 수송 펩티드에 커플링될 수 있고, SH 기를 보유하는 올리고뉴클레오티드가 펩티드에 커플링될 수 있다 (Troy et al. 1996. J. Neurosci. 16:253).
- [0379] 한 실시양태에서, 연결기는 뉴클레오모노머에 부착될 수 있고, 수송 펩티드는 링커에 공유 부착될 수 있다. 한 실시양태에서, 링커는 수송 펩티드에 대한 둘 다의 부착 부위로서 기능할 수 있고, 뉴클라아제에 대한 안정성을 제공할 수 있다. 적합한 링커의 예는 치환 또는 비치환 C_1 - C_{20} 알킬 쇠, C_2 - C_{20} 알케닐 쇠, C_2 - C_{20} 알킬닐 쇠, 펩

티드 및 헤테로원자 (예를 들어, S, O, NH 등)를 포함한다. 다른 예시적인 링커는 이관능성 가교제, 예컨대 술포숙신이미달-4-(말레이미도페닐)-부티레이트 (SMPB)를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Smith et al. Biochem J 1991.276: 417-2] 참조).

- [0380] 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 분자 접합체로서 합성되며, 이는 유전자를 세포로 전달하기 위한 수용체-매개 세포내이입 메커니즘을 사용한다 (예를 들어, 문헌 [Bunnell et al. 1992. Somatic Cell and Molecular Genetics. 18:559] 및 그에 인용된 참고문헌 참조).
- [0381] 표적화제
- [0382] 올리고뉴클레오티드의 전달은 또한 세포 수용체에의 올리고뉴클레오티드의 표적화에 의해 개선될 수 있다. 표적화 모이어티는 올리고뉴클레오티드에 접합되거나 또는 올리고뉴클레오티드에 연결된 담체 기 (즉, 폴리(L-리신) 또는 리포솜)에 부착될 수 있다. 이러한 방법은 특정한 수용체-매개 세포내이입을 나타내는 세포에 잘 적합하다.
- [0383] 예를 들어, 6-포스포만노실화 단백질에 대한 올리고뉴클레오티드 접합체는 유리 올리고뉴클레오티드보다 만노스 6-포스페이트 특이적 수용체를 발현하는 세포에 의해 20-배 더 효율적으로 내재화된다. 또한, 올리고뉴클레오티드는 생분해성 링커를 사용하여 세포 수용체에 대한 리간드에 커플링될 수 있다. 또 다른 예에서, 전달 구축물은 비오틴화 올리고뉴클레오티드와 견고한 복합체를 형성하는 만노실화 스트렙타비딘이다. 만노실화 스트렙타비딘은 비오틴화 올리고뉴클레오티드의 내재화를 20-배 증가시키는 것으로 발견되었다. (Vlassov et al. 1994. Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108).
- [0384] 또한, 특이적 리간드가 폴리리신-기반 전달 시스템의 폴리리신 성분에 접합될 수 있다. 예를 들어, 트랜스페린-폴리리신, 아데노바이러스-폴리리신 및 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 HA-2 N-말단 융합생성 펩티드-폴리리신 접합체는 진핵 세포에서 수용체-매개 DNA 전달을 매우 증진시킨다. 폐포 대식세포에서의 폴리(L-리신)에 접합된 만노실화 당단백질을 사용하여 올리고뉴클레오티드의 세포 흡수를 증진시킨다. 문헌 [Liang et al. 1999. Pharmazie 54:559-566].
- [0385] 악성 세포가 필수 영양소, 예컨대 폴산 및 트랜스페린에 대한 증가된 필요를 갖기 때문에, 이러한 영양소를 사용하여 올리고뉴클레오티드를 암성 세포에 표적화시킬 수 있다. 예를 들어, 폴산이 폴리(L-리신) 증진된 올리고뉴클레오티드에 연결된 경우에 전골수구성 백혈병 (HL-60) 세포 및 인간 흑색종 (M-14) 세포에서 흡수가 관찰된다. 문헌 [Ginobbi et al. 1997. Anticancer Res. 17:29]. 또 다른 예에서, 말레이화 소 혈청 알부민, 폴산, 또는 제2철 프로토포르피린 IX로 코팅된 리포솜은 무린 대식세포, KB 세포 및 2.2.15 인간 간세포암 세포에서 올리고뉴클레오티드의 증진된 세포 흡수를 나타낸다. 문헌 [Liang et al. 1999. Pharmazie 54:559-566].
- [0386] 리포솜은 간, 비장 및 세망내피계에서 자연적으로 축적된다 (소위, 수동 표적화). 다양한 리간드, 예컨대 항체와 리포솜의 커플링에 의한 것은 단백질 A이며, 이는 특정한 세포 집단에 활발히 표적화될 수 있다. 예를 들어, 단백질 A-보유 리포솜을 H-2K 특이적 항체로 사전처리할 수 있으며, 이는 L 세포 상에서 발현된 마우스 주요 조직적합성 복합체-코딩된 H-2K 단백질에 표적화된다. (Vlassov et al. 1994. Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108).
- [0387] RNAi 시약의 다른 시험관내 및/또는 생체내 전달은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 이를 사용하여 대상 RNAi 구축물을 전달할 수 있다. 예를 들어, 몇 가지만 언급하여, 미국 특허 출원 공개 20080152661, 20080112916, 20080107694, 20080038296, 20070231392, 20060240093, 20060178327, 20060008910, 20050265957, 20050064595, 20050042227, 20050037496, 20050026286, 20040162235, 20040072785, 20040063654, 20030157030, WO 2008/036825, WO04/065601, 및 AU2004206255B2를 참조한다 (모두 참조로 포함됨).
- [0388] 투여
- [0389] 올리고뉴클레오티드의 투여 또는 전달의 최적 과정은 목적하는 결과 및/또는 치료될 대상체에 따라 달라질 수 있다. 본원에 사용된 "투여"는 세포를 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는 것을 지칭하며, 이는 시험관내 또는 생체내에서 수행될 수 있다. 과도한 실험 없이, 예를 들어 RNA 안정성의 관독 또는 치료 반응에 의해 측정되는 것과 같이, 올리고뉴클레오티드의 투여량을 조정하여 표적 핵산 분자로부터 번역된 단백질의 발현을 최적으로 감소시킬 수 있다.
- [0390] 예를 들어, 핵산 표적에 의해 코딩된 단백질의 발현을 측정하여 투여 요법이 그에 따라 조정될 필요가 있는지 여부를 결정할 수 있다. 또한, 세포 내에서 또는 세포에 의해 생성된 RNA 또는 단백질 수준에서의 증가 또는

감소를 임의의 관련 기술분야에서 인식되는 기술을 사용하여 측정할 수 있다. 전사가 감소되었는지 여부를 결정하여, 표적 RNA의 절단의 유도에서의 올리고뉴클레오티드의 유효성을 결정할 수 있다.

- [0391] 임의의 상기 기재된 올리고뉴클레오티드 조성물은 단독으로 또는 제약상 허용되는 담체와 함께 사용될 수 있다. 본원에 사용된 "제약상 허용되는 담체"는 적절한 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 활성 성분과 비상용성인 임의의 통상적인 매질 또는 작용제를 제외하고, 이를 치료 조성물에서 사용할 수 있다. 보충 활성 성분이 또한 조성물에 혼입될 수 있다.
- [0392] 일부 실시양태에서, 개시내용은 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 단리된 이중 가닥 핵산 분자)를 포함하는 조성물 (예를 들어, 제약 조성물)에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 추가의 치료제를 포함한다. 추가의 치료제의 비제한적 예는 핵산 (예를 들어, sd-rxRNA 등), 소분자 (예를 들어, 암, 신경변성 질환, 감염성 질환, 자가면역 질환 등을 치료하는데 유용한 소분자), 펩티드 (예를 들어, 암, 신경변성 질환, 감염성 질환, 자가면역 질환 등을 치료하는데 유용한 펩티드), 및 폴리펩티드 (예를 들어, 암, 신경변성 질환, 감염성 질환, 자가면역 질환 등을 치료하는데 유용한 항체)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 개시내용의 조성물은, 일부 실시양태에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10종, 또는 그 초과에 추가의 치료제를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 10종 초과에 추가의 치료제를 포함한다.
- [0393] 비경구 투여를 위해, 올리고뉴클레오티드는 리포솜 또는 폴리에틸렌 글리콜로 변형된 리포솜 내에 혼입되거나 또는 양이온성 지질과 혼합될 수 있다. 리포솜에의 추가의 물질, 예를 들어 특이적 표적 세포에서 발견되는 막 단백질에 대해 반응성인 항체의 혼입은 특이적 세포 유형에의 올리고뉴클레오티드의 표적화를 도울 수 있다.
- [0394] 생체내 적용과 관련하여, 본 발명의 제제를 선택된 투여 경로에 적합화된 다양한 형태로, 예를 들어 비경구로, 경구로 또는 복강내로, 주입, 척수강내 전달, 실질 전달, 정맥내 전달, 또는 뇌 또는 척수 내로의 직접 주사에 의해 환자에게 투여할 수 있다.
- [0395] 본 발명의 측면은 핵산 분자, 예컨대 sd-rxRNA 또는 sd-rxRNA 변이체의 신경계에의 전달에 관한 것이다. 예를 들어, sd-rxRNA 또는 sd-rxRNA 변이체는 뇌 또는 척수에 전달될 수 있다. sd-rxRNA 변이체를 뇌 또는 척수에 전달하기 위해 임의의 적절한 전달 메카니즘이 적용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 뇌 또는 척수에의 전달은 주입, 척수강내 전달, 실질 전달, 정맥내 전달, 또는 뇌 또는 척수 내로의 직접 주사에 의해 이루어진다. 일부 실시양태에서, sd-rxRNA 또는 sd-rxRNA 변이체는 뇌의 특정 영역에 전달된다. sd-rxRNA 또는 sd-rxRNA 변이체는 혈액-뇌 장벽을 통과하기 위해 적절하게 변형되거나 제제화될 수 있다. 다른 실시양태에서, sd-rxRNA 또는 sd-rxRNA 변이체는 혈액-뇌 장벽을 가로지르지 않아도 되는 방식으로 투여된다. 일부 실시양태에서, sd-rxRNA 또는 sd-rxRNA 변이체는 펌프 또는 카테터 시스템에 의해 뇌 또는 척수 내로 전달된다. 이러한 전달의 예는 미국 특허 번호 6,093,180 (Elsberry)이 참조로 포함된다. 뇌 내로 약물을 주입하는 기술은 또한 미국 특허 번호 5,814014 (Elsberry et al.)가 참조로 포함된다.
- [0396] 일부 실시양태에서, 핵산은 하기 경로에 의한 투여를 포함한 비경구 투여에 의해 투여된다: 정맥내; 근육내; 세포사이; 동맥내; 피하; 안구내; 활막내; 경피를 포함한 경상피; 흡입을 통한 폐; 안과적; 설하 및 협측; 안과적인 것을 포함한 국소로; 피부; 안구; 직장; 및 취입을 통한 비강 흡입. 일부 실시양태에서, sd-rxRNA 분자는 피내 주사에 의해 또는 피하로 투여된다.
- [0397] 투여를 위한 제약 제제는 수용성 또는 수분산성 형태의 활성 화합물의 수용액을 포함할 수 있다. 또한, 적절한 유성 주사 현탁액으로서의 활성 화합물의 현탁액을 투여할 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 비히클은 지방 오일, 예를 들어 참깨 오일 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드를 포함한다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 물질을 함유할 수 있고, 예를 들어 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란을 포함하고, 임의로 현탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 액체 용액, 바람직하게는 생리학상 수용성인 완충제, 예컨대 헵크 용액 또는 링거액 중에 제제화될 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오티드는 고체 형태로 제제화되고, 사용 직전에 재용해되거나 현탁될 수 있다. 동결건조 형태가 또한 본 발명에 포함된다.
- [0398] 투여를 위한 제약 제제는 또한 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 점적제, 스프레이, 좌제, 액체 및 분말을 포함할 수 있다. 또한 통상적인 제약 담체, 수성, 분말, 또는 유성 베이스, 또는 증점제를 국소 투여를 위한 제약 제제에서 사용할 수 있다.
- [0399] 경구 투여를 위한 제약 제제는 또한 분말 또는 과립, 물 또는 비-수성 매질 중의 현탁액 또는 용액, 캡슐, 사체

또는 정제를 포함할 수 있다. 또한, 증점제, 향미제, 희석제, 유화제, 분산 보조제 또는 결합제를 경구 투여를 위한 제약 제제에서 사용할 수 있다.

- [0400] 경점막 또는 경피 투여를 위해, 투과되는 장벽에 적절한 침투제가 제제에서 사용된다. 이러한 침투제는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 경점막 투여를 위한 담즙 염 및 푸시드산 유도체 및 세제를 포함한다. 경점막 투여는 비강 스프레이를 통해 또는 좌제의 사용을 통해 이루어질 수 있다. 경구 투여를 위해, 올리고뉴클레오티드는 통상적인 경구 투여 형태, 예컨대 캡슐, 정제 및 토닉으로 제제화된다. 국소 투여를 위해, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 것과 같은 연고, 살브, 겔 또는 크림으로 제제화된다.
- [0401] 약물 전달 비히클은 예를 들어 시험관내, 전신 또는 국소 투여를 위해 선택될 수 있다. 이들 비히클은 느린 방출 저장소로서의 역할을 하거나 또는 그의 내용물을 표적 세포에 직접 전달하도록 설계될 수 있다. 일부 직접 전달 약물 비히클의 사용의 이점은 흡수당 다중 분자가 전달된다는 것이다. 이러한 비히클은 다르게는 혈류로부터 신속하게 소거될 약물의 순환 반감기를 증가시키는 것으로 제시된 바 있다. 이러한 카테고리에 속하는 이러한 특수화된 약물 전달 비히클의 일부 예는 리포솜, 히드로겔, 시클로텍스트린, 생분해성 나노캡슐 및 생체접착성 마이크로구체이다.
- [0402] 기재된 올리고뉴클레오티드는 대상체에게 전신 투여될 수 있다. 전신 흡수는 약물의 혈류에의 진입, 이어서 전신을 통한 분배를 지칭한다. 전신 흡수로 이어지는 투여 경로는 정맥내, 피하, 복강내 및 비강내를 포함한다. 각각의 이러한 투여 경로는 올리고뉴클레오티드를 접근가능한 이환 세포에 전달한다. 피하 투여에 따라, 치료제는 국부 림프절로 배수되고, 림프관을 통해 순환으로 진행된다. 순환으로의 진입 속도는 분자량 또는 크기의 함수인 것으로 제시된 바 있다. 리포솜 또는 다른 약물 담체의 사용은 올리고뉴클레오티드를 림프절에 국재화한다. 올리고뉴클레오티드는 세포 내로 확산되도록 변형될 수 있거나 또는 리포솜은 비변형 또는 변형된 올리고뉴클레오티드 중 하나의 세포에의 전달에 직접 참여할 수 있다.
- [0403] 선택된 전달 방법은 세포에의 진입을 발생시킬 것이다. 일부 실시양태에서, 바람직한 전달 방법은 리포솜 (10-400 nm), 히드로겔, 제어 방출 중합체, 및 다른 제약상 적용가능한 비히클, 및 미세주사 또는 전기천공을 포함한다 (생체의 치료의 경우).
- [0404] 본 발명의 제약 제제는 에멀전으로 제조 및 제제화될 수 있다. 통상적으로, 에멀전은 직경이 통상적으로 0.1 μm 를 초과하는 액적 형태로 또 다른 것에 분산된 하나의 액체의 불균질 시스템이다. 본 발명의 에멀전은 부형제, 예컨대 유화제를 함유할 수 있고, 필요에 따라 또한 안정화제, 염료, 지방, 오일, 왁스, 지방산, 지방알콜, 지방 에스테르, 합습제, 친수성 콜로이드, 보존제 및 항산화제가 에멀전 중에 존재할 수 있다. 이들 부형제는 수성 상, 유성 상 어느 하나 중의 용액으로서, 또는 그 자체가 별개의 상으로 존재할 수 있다.
- [0405] 본 발명의 에멀전 제제에 사용될 수 있는 자연 발생 유화제의 예는 라놀린, 밀랍, 포스파티드, 레시틴 및 아카시아를 포함한다. 또한, 미분된 고체는 특히 계면활성제와 조합되어 및 점성 제제에서 우수한 유화제로서 사용되어 왔다. 유화제로서 사용될 수 있는 미분된 고체의 예는 극성 무기 고체, 예컨대 중금속 히드록시드, 비팽윤 점토, 예컨대 벤토나이트, 아타풀자이트, 헥토라이트, 카올린, 몬모릴로나이트, 콜로이드성 규산알루미늄 및 콜로이드성 규산알루미늄마그네슘, 안료 및 비극성 고체, 예컨대 탄소 또는 글리세릴 트리스테아레이트를 포함한다.
- [0406] 에멀전 제제에 포함될 수 있는 보존제의 예는 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 4급 암모늄 염, 벤즈알코늄 클로라이드, p-히드록시벤조산의 에스테르 및 붕산을 포함한다. 에멀전 제제에 포함될 수 있는 항산화제의 예는 자유라디칼 스캐빈저, 예컨대 토코페롤, 알킬 갈레이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 또는 환원제, 예컨대 아스코르브산 및 메타중아황산나트륨, 및 항산화 상승작용제, 예컨대 시트르산, 타르타르산, 및 레시틴을 포함한다.
- [0407] 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 조성물은 마이크로에멀전으로 제제화된다. 마이크로에멀전은 물, 오일 및 친양쪽성 시스템이고, 이는 단일의 광학적으로 등방성이며 열역학적으로 안정한 액체 용액이다. 전형적으로, 마이크로에멀전은 먼저 오일을 수성 계면활성제 용액에 분산시킨 다음, 충분한 양의 제4 성분, 일반적으로 중간쇄-길이 알콜을 첨가하여 투명한 시스템을 형성함으로써 제조된다.
- [0408] 마이크로에멀전의 제조에 사용될 수 있는 계면활성제는 이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 브리즈 96, 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르, 폴리글리세롤 지방산 에스테르, 테트라글리세롤 모노라우레이트 (ML310), 테트라글리세롤 모노올레레이트 (MO310), 헥사글리세롤 모노올레레이트 (PO310), 헥사글리세롤 펜타올레레이트 (PO500), 데카글리세롤 모노카프레이트 (MCA750), 데카글리세롤 모노올레레이트 (MO750), 데카글리세롤 세스퀴

올레에이트 (S0750), 데카글리세롤 데카올레에이트 (DA0750)를 단독으로 또는 보조계면활성제와 조합하여 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 보조계면활성제, 통상적으로 단쇄 알콜, 에컨대 에탄올, 1-프로판올 및 1-부탄올은 계면활성제 필름에의 침투, 및 그로 인해 계면활성제 분자 사이에 생성된 공극 공간으로 인한 무질서 필름의 생성에 의해 계면 유동성을 증가시키는 역할을 한다.

[0409] 그러나, 마이크로에멀전은 보조계면활성제의 사용 없이 제조될 수 있고, 무알콜 자기-에멀전화 마이크로에멀전 시스템이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 수성 상은 물, 약물의 수용액, 글리세롤, PEG300, PEG400, 폴리글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 에틸렌 글리콜의 유도체일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 오일 상은 카프텍스(Captex) 300, 카프텍스 355, 카프몰(Capmul) MCM, 지방산 에스테르, 중쇄 (C₈-C₁₂) 모노, 디 및 트리-글리세리드, 폴리옥시에틸화 글리세릴 지방산 에스테르, 지방 알콜, 폴리글리콜화 글리세리드, 포화 폴리글리콜화 C₈-C₁₀ 글리세리드, 식물성 오일 및 실리콘 오일과 같은 물질을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0410] 특히, 마이크로에멀전은 약물 가용화 및 증진된 약물 흡수의 관점에서 관심 대상이다. 지질 기반 마이크로에멀전 (오일/물 및 물/오일 둘 다)는 약물의 경구 생체이용률을 증진시키는 것으로 제안된 바 있다.

[0411] 마이크로에멀전은 개선된 약물 가용화, 효소적 가수분해로부터 약물의 보호, 막 유동성 및 투과성에서의 계면활성제-유도된 변경으로 인한 약물 흡수의 가능한 증진, 제조의 용이성, 고체 투여 형태에 비해 경구 투여의 용이성, 개선된 임상 효력, 및 감소된 독성을 제공한다 (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11:1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85:138-143). 또한, 마이크로에멀전은 화장품 및 제약 용도 둘다에서 활성 성분의 경피 전달에 효과적이다. 본 발명의 마이크로에멀전 조성물 및 제제는 위장관으로부터 올리고뉴클레오티드의 증가된 전신 흡수를 용이하게 할 뿐만 아니라, 위장관, 질, 협강 및 다른 투여 영역 내의 올리고뉴클레오티드의 국부 세포 흡수를 개선시킬 것으로 예상된다.

[0412] 한 실시양태에서, 본 발명은 다양한 침투 증진제를 사용하여 핵산, 특히 올리고뉴클레오티드의 동물의 피부에의 효율적인 전달에 영향을 미친다. 통과되는 막을 침투 증진제로 처리하는 경우에 심지어 비-친지성 약물도 세포막을 통과할 수 있다. 세포 막을 통한 비-친지성 약물의 확산을 증가시키는 것에 더하여, 침투 증진제는 또한 친지성 약물의 투과성을 증진시키는 작용을 한다.

[0413] 본 발명에 사용될 수 있는 5가지 카테고리의 침투 증진제는 계면활성제, 지방산, 담즙 염, 킬레이트화제 및 비-킬레이트화 비-계면활성제를 포함한다. 투여되는 올리고뉴클레오티드의 침투를 증진시키기 위해 사용될 수 있는 다른 작용제는 글리콜, 에컨대 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜, 피롤, 에컨대 2-15 피롤, 아존, 및 테르펜, 에컨대 리모넨, 및 멘톤을 포함한다.

[0414] 또한, 특히 지질 제제에서 올리고뉴클레오티드는 의료 장치, 예를 들어 카테터, 에컨대 혈관성형술 풍선 카테터를 양이온성 지질 제제로 코팅하는 것에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 의료 장치를 지질 제제 또는 지질 제제 및 적합한 용매, 예를 들어 수성계 완충제, 수성 용매, 에탄올, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름 등의 혼합물에 침지시켜 코팅을 달성할 수 있다. 제제의 양이 장치의 표면에 자연적으로 부착될 것이고, 이는 후속적으로 환자에게 적절하게 투여된다. 대안적으로, 지질 제제의 동결건조된 혼합물은 장치의 표면에 특이적으로 결합될 수 있다. 이러한 결합 기술은 예를 들어 문헌 [K. Ishihara et al., Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 27, pp. 1309-1314 (1993)]에 기재되어 있고, 그의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0415] 투여되는 유용한 투여량 및 특정한 투여 방식은 세포 유형, 생체내 용도, 연령, 체중, 및 치료되는 특정한 동물 및 그의 영역, 특정한 올리고뉴클레오티드 및 사용되는 전달 방법, 고려되는 치료 또는 진단 용도, 및 제제의 형태, 예를 들어 현탁액, 에멀전, 미셀 또는 리포솜과 같은 인자에 따라 달라질 것이고, 이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다. 전형적으로, 투여량은 보다 낮은 수준에서 투여되며, 목적하는 효과가 달성될 때까지 증가된다. 지질을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 전달하는 경우에, 투여되는 지질 화합물의 양은 달라질 수 있고, 일반적으로 투여되는 올리고뉴클레오티드 작용제의 양에 의존한다. 예를 들어, 지질 화합물 대 올리고뉴클레오티드 작용제의 중량비는 바람직하게는 약 1:1 내지 약 15:1이고, 보다 바람직하게는 중량비는 약 5:1 내지 약 10:1이다. 일반적으로, 투여되는 양이온성 지질 화합물의 양은 약 0.1 밀리그램 (mg) 내지 약 1 그램 (g)으로 달라질 것이다. 보다 많은 양 및 보다 적은 양이 사용될 수 있지만, 일반적인 지침으로서 전형적으로 환자 체중 킬로그램당 각각 약 0.1 mg 내지 약 10 mg의 특정한 올리고뉴클레오티드 작용제, 및 약 1 mg 내지 약 100 mg의 지질 조성물이 투여된다.

- [0416] 본 발명의 작용제는 제약상 투여에 적합한 생물학적으로 상용성인 형태로 대상체에 투여되거나 또는 세포와 접촉된다. "투여에 적합한 생물학적으로 상용성인 형태"는 임의의 독성 효과보다 올리고뉴클레오타이드의 치료 효과가 더 큰 형태로 올리고뉴클레오타이드가 투여된다는 것을 의미한다. 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드가 대상체에 투여될 수 있다. 대상체의 예는 포유동물, 예를 들어 인간 및 다른 영장류; 소, 돼지, 말 및 농장(농업용) 동물; 개, 고양이 및 다른 가정용 애완동물; 마우스, 래트 및 트랜스제닉 비-인간 동물을 포함한다.
- [0417] 활성 양의 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 투여는 목적하는 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 기간에서 효과적인 양으로 정의된다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 활성 양은 세포의 유형, 사용되는 올리고뉴클레오타이드, 및 생체내 용도, 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 도출하는 올리고뉴클레오타이드의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 세포 내 올리고뉴클레오타이드의 치료 수준의 확립은 흡수 및 유출 또는 분해 속도에 의존한다. 분해 정도를 감소시키는 것은 올리고뉴클레오타이드의 세포내 반감기를 연장시킨다. 따라서, 예를 들어 포스페이트 백본의 변형을 갖는 화학적으로-변형된 올리고뉴클레오타이드는 다양한 투여를 필요로 할 수 있다.
- [0418] 올리고뉴클레오타이드의 정확한 투여량 및 투여되는 용량의 횟수는 실험적으로 및 임상 시험에서 생성된 데이터에 의존할 것이다. 여러 인자, 예컨대 목적하는 효과, 전달 비히클, 질환 적응증, 및 투여 경로는 투여량에 영향을 미칠 것이다. 투여량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정되며, 대상 제약 조성물로 제조화될 수 있다. 바람직하게는, 치료 지속기간은 적어도 질환 증상의 과정을 통해 연장될 것이다.
- [0419] 투여 요법을 조정하여 최적의 치료 반응을 제공할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드를 반복적으로 투여할 수 있으며, 예를 들어 여러 용량을 매일 투여하거나, 또는 용량을 치료 상황의 위급성에 의해 제시되는 바와 같이 비례적으로 감소시킬 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 올리고뉴클레오타이드가 세포에 투여되는지 대상체에 투여되는지에 관계없이 대상 올리고뉴클레오타이드의 적절한 투여 용량 및 스케줄을 용이하게 결정할 수 있을 것이다.
- [0420] sd-rxRNA의 투여는 투여 요법의 시험을 통해 최적화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 투여가 충분하다. 투여된 sd-rxRNA의 효과를 추가로 연장시키기 위해, sd-rxRNA를 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 친숙할 느린 방출 제제 또는 장치로 투여할 수 있다. sd-rxRNA 화합물의 소수성 속성은 광범위한 중합체의 사용을 가능하게 할 수 있으며, 그 중 일부는 통상적인 올리고뉴클레오타이드 전달과는 상용가능하지 않다.
- [0421] 다른 실시양태에서, sd-rxRNA는 다수회 투여된다. 일부 경우에, 이는 매일, 1주 2회, 매주, 2주마다, 3주마다, 매월, 2개월마다, 3개월마다, 4개월마다, 5개월마다, 6개월마다 또는 6개월 미만마다의 빈도로 투여된다. 일부 경우에, 이는 1일, 1주, 1개월 및/또는 1년에 다수회 투여된다. 예를 들어, 이는 대략 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간 또는 12시간 초과마다 투여될 수 있다. 이는 1일에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 또는 10회 초과 투여될 수 있다.
- [0422] 본 발명의 측면은 대상체에서의 sd-rxRNA 분자의 투여에 관한 것이다. 일부 경우에, 대상체는 환자이며, sd-rxRNA 분자의 투여는 의사 사무실에서 sd-rxRNA 분자의 투여를 수반한다.
- [0423] 일부 실시양태에서, 1개 초과 sd-rxRNA 분자가 동시에 투여된다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10종 또는 10종 초과 상이한 sd-rxRNA 분자를 함유하는 조성물이 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 2 또는 3종의 상이한 sd-rxRNA 분자를 포함한다. 조성물이 1종 초과 sd-rxRNA를 포함하는 경우에, 조성물 내의 sd-rxRNA 분자는 동일한 유전자 또는 상이한 유전자에 대해 지시될 수 있다.
- [0424] 일부 경우에, 전달되는 sd-rxRNA의 유효량은 적어도 대략 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 mg/kg 또는 100 mg/kg 초과이며, 임의의 중간값을 포함한다.
- [0425] 일부 경우에, 전달되는 sd-rxRNA의 유효량은 적어도 대략 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 µg 또는 950 µg 초과이며, 임의의 중간값을 포함한다.
- [0426] 본원에 기재된 방법을 통해 투여되는 sd-rxRNA 분자는 신경계 내의 모든 세포 유형에 효과적으로 표적화될 수 있다.

- [0427] 핵산을 대상체 (예를 들어, 대상체의 세포) 내로 도입하는 다양한 양식이 개시내용에서 고려된다. 예를 들어, 핵산 (예를 들어, 핵산을 함유하는 용액)은 대상체 내로 주사 (예를 들어, 세포 내로 주사)될 수 있거나, 또는 대상체 (예를 들어, 세포)가 핵산으로 덮힌 입자에 의해 충격될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 또는 유기체는 핵산 용액 중에 침지된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 핵산의 존재 하에서의 세포 막의 전기천공에 의해 유기체 또는 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 핵산을 포함하는 바이러스 구축물이 바이러스 입자 내로 패키징되고, 세포 내로의 핵산의 도입 및 핵산의 전사가 달성된다. 핵산을 대상체 (예를 들어, 대상체의 세포) 내로 도입하는 양식의 추가의 예는 지질-매개 담체 수송, 화학-매개 수송 (예를 들어, 인산칼슘) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0428] 핵산은 추가의 성분과 함께 도입될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 핵산은 세포에 의한 핵산 흡수를 증진시키는 성분과 함께 도입된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 단일 가닥의 어닐링을 억제하는 성분과 함께 도입된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 핵산 분자를 안정화하거나, 또는 달리 표적 유전자의 억제를 증가시키는 성분과 함께 도입된다.
- [0429] 핵산은 세포에 직접 도입되거나 (즉, 세포내), 또는 공동, 간질 공간 내로, 유기체의 순환 내로 세포의 도입되거나, 경구로 도입되거나, 또는 세포 또는 유기체를 핵산을 함유하는 용액에 담그는 것에 의해 도입될 수 있다. 혈관 또는 혈관의 순환, 혈액 또는 림프계, 및 뇌척수액이 핵산이 도입될 수 있는 부위이다.
- [0430] 일부 실시양태에서, 표적 유전자를 갖는 세포는 임의의 유기체로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 유전자를 갖는 세포는 임의의 유기체 내에 함유 (예를 들어, 그에 의해 수용, 또는 그 내에 존재)될 수 있다. 예를 들어, 유기체는 식물, 동물, 원충, 박테리아, 바이러스 또는 진균일 수 있다. 식물은 단자엽, 쌍자엽 또는 겉씨식물일 수 있고, 동물은 척추동물 또는 무척추동물일 수 있다. 바람직한 미생물은 농업 또는 산업적으로 사용되는 것이고, 식물 또는 동물에 병원성인 것이다.
- [0431] 대안적으로, 본 발명의 siRNA를 코딩하는 벡터, 예를 들어 트랜스진으로 관련 기술분야에서 인지되는 기술을 사용하여 숙주 세포 또는 트랜스제닉 동물을 조작할 수 있다.
- [0432] 본 발명의 작용제 (또는 그를 코딩하는 벡터 또는 트랜스진)에 대한 추가의 바람직한 용도는 진핵 세포 또는 진핵 비-인간 유기체, 바람직하게는 포유동물 세포 또는 유기체, 및 가장 바람직하게는 인간 세포, 예를 들어 세포주, 예컨대 HeLa 또는 293, 또는 설치류, 예를 들어 래트 및 마우스에서 수행되는 기능적 분석이다. 표적-특이적 RNA 간섭을 지시하기 위해 표적 mRNA 서열에 충분히 상보적인 적합한 프라이밍제/RNAi 작용제를 투여함으로써, 특이적 녹아웃 또는 녹다운 표현형을 표적 세포, 예를 들어 세포 배양물 또는 표적 유기체에서 수득할 수 있다.
- [0433] 따라서, 본 발명의 추가의 대상은 적어도 1개의 내인성 표적 유전자의 완전한 또는 적어도 부분적으로 결손된 발현을 포함하는 표적 유전자-특이적 녹아웃 또는 녹다운 표현형을 나타내는 진핵 세포 또는 진핵 비-인간 유기체이며, 여기서 상기 세포 또는 유기체는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 RNAi 작용제를 코딩하는 DNA를 포함하는 적어도 1개의 벡터로 형질감염된다. 본 발명이 RNAi 작용제의 특이성으로 인해 여러 상이한 내인성 유전자의 표적-특이적 녹아웃 또는 녹다운을 가능하게 한다는 점에 주목해야 한다.
- [0434] 세포 또는 비-인간 유기체, 특히 인간 세포 또는 비-인간 포유동물의 유전자-특이적 녹아웃 또는 녹다운 표현형을 분석 절차, 예를 들어 복잡한 생리학적 과정의 기능 및/또는 표현형 분석, 예컨대 유전자 발현 프로파일 및/또는 프로테오믹의 분석에 사용할 수 있다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드 기반 칩을 사용한 고처리량 방법에 의해 분석을 수행한다.
- [0435] 치료 용도
- [0436] 유전자 발현의 억제에 의해, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 조성물을 사용하여 단백질의 발현을 수반하는 임의의 질환, 예컨대 신경변성 질환을 치료할 수 있다.
- [0437] 본 발명의 측면은 신경계에 영향을 미치는 장애의 치료에서의 핵산 분자, 예컨대 sd-rxRNA 또는 sd-rxRNA 변이체 sd-rxRNA의 용도에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, sd-rxRNA는 신경변성 장애를 치료하는데 사용된다. 본원에 사용된 용어 "신경변성 장애"는 신경계의 세포 및 조직 성분의 열화에 의해 유발되는 장애, 질환 또는 상태를 지칭한다. 신경변성 장애의 일부 비제한적 예는 졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 뇌실주위 백질연화증 (PVL), 근위축성 측삭 경화증 (ALS, "루게릭병"), 광형 ALS-파킨슨-치매 복합증, 프리드리히 운동실조, 윌슨병, 다발성 경화증, 뇌성 마비, 진행성 핵상 마비 (스틸-리차드슨 증후군), 연수성 및 가성 연수

마비, 당뇨병성 망막병증, 다발경색 치매, 황반 변성, 픽병, 미만성 루이 소체 질환, 프리온 질환 예컨대 크로이츠펠트-야콥, 게르스트만-스트라우슬러-샤인커병, 쿠루병 및 치명적 가족성 불면증, 원발성 측삭 경화증, 퇴행성 운동실조, 마차도-요셉병/제3형 척수소뇌성 운동실조 및 올리브고뇌소뇌 변성, 척수성 및 척수연수성 근육 위축 (케네디병), 가족성 경직성 하반신마비, 볼파르트-쿠겔베르그-벨란더병, 테이-삭스병, 다계통 변성 (샤이드래거 증후군), 질 드 라 투렛병, 가족성 자율신경실조증 (틸리-데이 증후군), 쿠겔베르그-벨란더병, 아급성 경화성 범뇌염, 베르드니히-호프만병, 시뉴클레인병증 (다계통 위축 포함), 샌드호프병, 피질 기저 변성, 경직성 하반신부전마비, 원발성 진행성 실어증, 진행성 다초점성 백질뇌병증, 선조체흑질 변성, 가족성 경직성 질환, 신경변성과 연관된 만성 간질 상태, 빈스방거병, 및 치매 (치매의 모든 기저 병인 포함)를 포함한다.

[0438] 일부 실시양태에서, 장애는 파킨슨병 헌팅턴병 또는 ALS이다. 특정 실시양태에서, 장애는 ALS이고, sd-rxRNA 또는 sd-rxRNA 변이체는 SOD1, 슈퍼옥시드 디스뮤타제를 표적화한다.

[0439] 신경변성 장애는 또한 졸중, 머리 또는 척수에 대한 손상, 또는 급성 허혈성 손상에 의해 유발된 것을 포함한 뇌 손상 또는 외상의 결과일 수 있다. 허혈성 손상은 뇌가 불충분 혈류를 제공받았을 때 발생하는 상태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 뇌 또는 신경계에 대한 손상은 외상성 손상으로부터 유래할 수 있거나, 또는 감염, 방사선, 화학적 또는 독성 손상의 결과일 수 있다. 미만성 또는 국재화될 수 있는 뇌 및 신경계 내의 손상은 색전성 폐쇄 및 혈전성 폐쇄, 주산기 저산소성-허혈성 손상, 편타증, 흔들린 영아 증후군, 급성 허혈 후 재관류, 또는 심장 정지를 포함한, 두개내 또는 척추내 병변 또는 출혈, 뇌 허혈 또는 경색을 포함한다. 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드를 사용한 세포의 시험관내 처리를 대상체로부터 제거된 세포의 생체의 요법을 위해 (예를 들어, 백혈병 또는 바이러스 감염의 치료를 위해), 또는 대상체에서 유래되지 않았지만 대상체에게 투여될 세포의 처리를 위해 (예를 들어, 대상체에 이식될 세포 상에서의 이식 항원 발현을 제거하기 위해) 사용할 수 있다. 또한, 세포의 시험관내 처리는 비치료 세팅에서, 예를 들어 유전자 기능의 평가, 유전자 조절 및 단백질 합성의 연구, 또는 유전자 발현 또는 단백질 합성을 조정하기 위해 설계된 올리고뉴클레오티드에 대해 이루어진 개선의 평가를 위해 사용할 수 있다. 세포의 생체내 처리는 단백질의 발현의 억제에 바람직한 특정 임상 세팅에서 유용할 수 있다. 안티센스 치료가 적합한 것으로 보고되어 있는 수많은 의학적 상태 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,830,653 참조), 뿐만 아니라 호흡기 세포융합 바이러스 감염 (WO 95/22,553), 인플루엔자 바이러스 (WO 94/23,028), 및 악성종양 (WO 94/08,003)이 존재한다. 안티센스 서열의 임상 용도의 다른 예는 예를 들어 문헌 [Glaser, 1996. Genetic Engineering News 16:1]에 검토되어 있다. 올리고뉴클레오티드에 의한 절단을 위한 예시적인 표적은 예를 들어 만성 골수성 백혈병에서 발견되는 단백질 키나제 Ca, ICAM-1, c-raf 키나제, p53, c-myc 및 bcr/abl 융합 유전자를 포함한다.

[0440] 대상 핵산은 RNAi 경로를 갖는 임의의 동물, 예컨대 인간, 비-인간 영장류, 비-인간 포유동물, 비-인간 척추동물, 설치류 (마우스, 래트, 햄스터, 토끼 등), 가정용 가축 동물, 애완동물 (고양이, 개 등), 크세노푸스 (Xenopus), 어류, 곤충 (드로소필라(Drosophila) 등) 및 유충류 (씨. 엘레간스(C. elegans)) 등에서의 RNAi-기반 요법에 사용될 수 있다.

[0441] 본 발명은 대상체에게 치료제 (예를 들어, RNAi 작용제, 또는 이를 코딩하는 벡터 또는 트랜스진)를 투여하여 대상체에서 비정상적이거나 원치않는 표적 유전자 발현 또는 활성화와 연관된 질환 또는 상태를 예방하기 위한 방법을 제공한다. 적절한 경우에, 대상체를 먼저 프라이밍제로 처리하여 후속 RNAi 요법에 보다 반응성이 되도록 한다. 비정상적이거나 원치않는 표적 유전자 발현 또는 활성화에 의해 유발되거나 또는 그가 기여하는 질환에 대한 위험성이 있는 대상체는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 진단 또는 예후 검정 중 임의의 것 또는 그의 조합에 의해 확인될 수 있다. 예방제의 투여는 표적 유전자 이상의 특징인 증상의 징후 전에 행하여, 질환 또는 장애가 예방되거나 또는 대안적으로 그의 진행이 지연되도록 할 수 있다. 표적 유전자 이상의 유형에 따라, 예를 들어 표적 유전자, 표적 유전자 효능제 또는 표적 유전자 길항제를 대상체의 치료에 사용할 수 있다.

[0442] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치료 목적을 위한 표적 유전자 발현, 단백질 발현 또는 활성을 조정하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 예시적 실시양태에서, 본 발명의 조정 방법은 표적 유전자를 발현할 수 있는 세포를 표적 유전자 또는 단백질에 특이적인 (예를 들어, 상기 유전자에 의해 코딩되는 mRNA에 특이적이거나 상기 단백질의 아미노산 서열을 특정하는) 본 발명의 치료제와 접촉시켜, 표적 단백질의 발현 또는 그의 활성화 중 1종 이상이 조정되도록 하는 것을 수반한다. 이들 조정 방법은 시험관내 (예를 들어, 세포를 작용제와 함께 배양하는 것에 의해), 생체내 (예를 들어, 작용제를 대상체에 투여하는 것에 의해) 또는 생체외에서 수행될 수 있다. 전형적으로, 대상체를 먼저 프라이밍제로 처리하여, 후속 RNAi 요법에 보다 반응성이 되도록 한다. 따라서, 본 발명은 표적 유전자 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 비정상적이거나 원치않는 발현 또는 활성을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 앓고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 표적 유전자 활성화의 억제는 표적 유전자가 비정

상적으로 비조절되고/거나 감소된 표적 유전자 활성이 유의한 효과를 가질 수 있는 상황에서 바람직하다.

- [0443] 본 발명의 치료제를 개체에 투여하여 비정상적이거나 원치않는 표적 유전자 활성과 연관된 장애를 (예방적으로 또는 치유적으로) 치료할 수 있다. 이러한 치료와 관련하여, 약리유전체학 (즉, 개체의 유전자형과 외래 화합물 또는 약물에 대한 그 개체의 반응 사이의 관계의 연구)을 고려할 수 있다. 치료제의 대사에서의 차이는 약리학적 활성 약물의 용량 및 혈액 농도 사이의 관계를 변경시켜 심각한 독성 또는 치료 실패를 발생시킬 수 있다. 따라서, 의사 또는 임상가는 치료제를 투여할지 여부를 결정하는 것, 뿐만 아니라 투여량 및/또는 치료의 치료 요법을 치료제와 맞추는데 있어서 관련 약리유전체학 연구에서 수득한 지식을 적용하는 것을 고려할 수 있다. 약리유전체학은 변경된 약물 배치로 인한 약물에 대한 반응에서의 임상적으로 유의한 유전성 변동 및 영향을 받은 인간에서의 비정상적인 작용을 다룬다. 예를 들어, 문헌 [Eichelbaum, M. et al. (1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23(10-11): 983-985 및 Linder, M. W. et al. (1997) Clin. Chem. 43(2):254-266]을 참조한다.
- [0444] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되고, 이는 어떠한 방식으로든 추가로 제한하는 것으로서 해석되어서는 안된다. 본 출원 전체에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌 (문헌 참고문헌, 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 및 동시 계류 특허 출원 포함)의 전체 내용은 명백하게 본원에 참조로 포함된다.
- [0445] 실시예
- [0446] 실시예 1: SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체의 확인
- [0447] SOD1을 표적화하는 sd-rxRNA 변이체를 설계하고, 합성하고, 시험관내 스크리닝하여, sd-rxRNA 변이체가 표적 유전자 mRNA 수준을 감소시키는 능력을 결정하였다. sd-rxRNA 변이체를 HeLa 세포 (인간 자궁경부 암종 세포주, 10,000개 세포/웰, 96 웰 플레이트)에서 활성에 대해 시험하였다. HeLa 세포를 혈청 함유 배지에서 다양한 농도의 SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체 또는 비-표적화 대조군 패널로 처리하였다. 시험된 농도는 5, 1 및 0.1 μ M 이었다. 비-표적화 대조군 sd-rxRNA는 SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체와 유사한 구조를 갖고, 둘 다의 가닥에 걸쳐 유사한 안정화 변형을 함유한다. 투여 48시간 후, 세포를 용해하고, 유전자-특이적 프로브 (아피메트릭스 (Affymetrix), 캘리포니아주 산타 클라라)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 퀀티진(Quantigene) 분지형 DNA 검정에 의해 mRNA 수준을 결정하였다. 예시적인 센스 및 안티센스 서열을 하기 표 1 및 2에 제공한다. 도 1 및 2는 SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체가 HeLa 세포에서 시험관내 표적 유전자 mRNA 수준을 유의하게 감소시킨다는 것을 입증한다. 데이터를 하우스 키핑 유전자 (PPIB)에 대해 정규화하고, 비-표적화 대조군과 관련하여 그래프화하였다. 오차 막대는 생물학적 이중값의 평균으로부터의 표준 편차를 나타낸다. 도 1 및 2에 상응하는 서열은 각각 표 3 및 4에서 찾아볼 수 있다.

[0448] 표 1. 예시적인 센스 올리고뉴클레오타이드

올리고 번호	유전자 기호	센스 서열	SEQ ID NO:	센스 화학	센스 백본	주
25634	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	1	DY547mm0m00m0m0mmm	ooooooooooss o	
25635	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	2	DY547mm0m00m0m0mmm	ooooooooooss o	
25636	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	3	DY547mm0m00m0m0mmm	ooooooooooss o	
25637	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	4	DY547mm0m00m0m0mmm	ssssssssssso	
25600	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	5	mm0000m0m0mmm	ssssssssssso	
25638	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	6	DY547mm0m00m0m0mmm	ssssssssssso	
25643	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	7	DY547mm0m00m0m0mmm	ooooooooooss o	
25644	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	8	DY547mm0m00m0m0mmm	ssssssssssso	
25645	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	9	DY547mm0m00m0m0mmm	ooooooooooss o	
25652	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	10	DY547mm0000m0m0mm	ssssssssssso	
25568	SOD1	AGGZGAAAZGAA	11	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25569	SOD1	AGGYGAAAZGAA	12	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25570	SOD1	AGGZGAAAYGAA	13	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25571	SOD1	AGGYGAAAYGAA	14	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25572	SOD1	AGGUGGAAAUUGAA	15	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25573	SOD1	AGGUGGAAAUUGAA	16	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25574	SOD1	AGGUGGAAAUUGAA	17	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25575	SOD1	AGGUGGAAAUUGAA	18	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25576	SOD1	AGGUGGAAAUUGAA	19	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25578	SOD1	AGGYGAAAZGAA	20	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 티오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25579	SOD1	AGGZGAAAYGAA	21	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 티오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25580	SOD1	AGGYGAAAYGAA	22	DY547mm0m0000m0mm	ssssssssssso	Z= 티오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5

[0449]

						메틸 U
25584	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	23	DY547mm0m00000m0 mm	ssssssssssso	Z= 티오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25585	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	24	DY547mm0m00000m0 mm	ssssssssssso	Z= 티오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25586	SOD1	AGGZGGAAAZGAA	25	DY547mm0d00000d0m m	ssssssssssso	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25587	SOD1	AGGYGGAAAZGAA	26	DY547mm0m00000d0m m	ssssssssssso	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25588	SOD1	AGGZGGAAAYGAA	27	DY547mm0d00000m0m m	ssssssssssso	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25589	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	28	DY547mm0m00000m0 mm	ssssssssssso	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25590	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	29	DY547mm0m00000m0 mm	ssssssssssso	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
24560	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	30	DY547mm0m00000m0 mm	ssssssssssso	
25634 FI 표지 없음	SOD1	GAGAGCAUGUUA	31	mm0m00m0m0mmm	ooooooooooss o	
25635 FI 표지 없음	SOD1	GAGAGCAUGUUA	32	mm0m00m0m0mmm	ooooooooooss o	
25636 FI 표지 없음	SOD1	GAGAGCAUGUUA	33	mm0m00m0m0mmm	ooooooooooss o	
25637 FI 표지 없음	SOD1	GAGAGCAUGUUA	34	mm0m00m0m0mmm	ssssssssssso	
25638 FI 표지 없음	SOD1	GAGAGCAUGUUA	35	mm0m00m0m0mmm	ssssssssssso	
25643 FI 표지 없음	SOD1	GAGAGCAUGUUA	36	mm0m00m0m0mmm	ooooooooooss o	
25644 FI 표지 없음	SOD1	GAGAGCAUGUUA	37	mm0m00m0m0mmm	ssssssssssso	
25645 FI 표지 없음	SOD1	GAGAGCAUGUUA	38	mm0m00m0m0mmm	ooooooooooss o	
25652 FI 표지 없음	SOD1	GAGAGCAUGUUA	39	mm0000m0m0mmm	ssssssssssso	
25568 FI 표지 없음	SOD1	AGGZGGAAAZGAA	40	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25569 FI 표지 없음	SOD1	AGGYGGAAAZGAA	41	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25570 FI 표지 없음	SOD1	AGGZGGAAAYGAA	42	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25571 FI 표지 없음	SOD1	AGGYGGAAAYGAA	43	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25572	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	44	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5

[0450]

FI 표지 없음						메틸 C, Y= 5 메틸 U
25573 FI 표지 없음	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	45	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25574 FI 표지 없음	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	46	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25575 FI 표지 없음	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	47	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25576 FI 표지 없음	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	48	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25578 FI 표지 없음	SOD1	AGGYGAAAZGAA	49	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 테오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25579 FI 표지 없음	SOD1	AGGZGGAAAYGAA	50	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 테오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25580 FI 표지 없음	SOD1	AGGYGAAAYGAA	51	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 테오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25584 FI 표지 없음	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	52	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 테오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25585 FI 표지 없음	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	53	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 테오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25586 FI 표지 없음	SOD1	AGGZGGAAAZGAA	54	mm0d00000d0mm	ssssssssssso	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25587 FI 표지 없음	SOD1	AGGYGAAAZGAA	55	mm0m00000d0mm	ssssssssssso	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25588 FI 표지 없음	SOD1	AGGZGGAAAYGAA	56	mm0d00000m0mm	ssssssssssso	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25589 FI 표지 없음	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	57	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25590 FI 표지 없음	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	58	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
24560 FI 표지 없음	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	59	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	

[0451]

[0452]

표 2. 예시적인 안티센스 올리고뉴클레오티드

올리고 번호	안티센스 서열	SEQ ID NO:	안티센스 화학	안티센스 백본	주
25634	UAACAUGCCUCUC UUCAUCCU	60	Pm00f0f0fffff0ff0fffo	ssssssssssssssssss o	
25635	UAACAUGCCUCUC UUCAUCCU	61	Pm00f0f0fffff0ff0fffo	000000000000ssss ssso	
25636	UAACAUGCCUCUC UUCAUC	62	Pm00f0f0fffff0ff0fffo	000000000000ssss sso	
25637	UAACAUGCCUCUC UUCAUCCU	63	Pm00f0f0fffff0ff0fffo	000000000000ssss ssso	
25600	UAACAUGCCUCUC UUCAUCCU	64	Pm00f0f0fffff0ff0fffo	ssssssssssssssssss o	
25638	UAACAUGCCUCUC UUCAUCCU	65	Pm00f0f0fffff0ff0fffo	000000000000ssss ssso	
25643	UAACAUGCCUCUC UUCAUC	66	Pm00f0f0fffff0ff0fffo	ssssssssssssssssso	
25644	UAACAUGCCUCUC UUCAUC	67	Pm00f0f0fffff0ff0fffo	ssssssssssssssssso	
25645	UAACAUGCCUCUC UUCAUCCU	68	Pm00f0f0fffff0ff0fffo	ssssssssssssssssss o	
25652	UAACAUGCCUCUC UUCAUCCU	69	Pm00f0f0fffff0ff0fffo	ssssssssssssssssss o	
25568	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	70	Pmff0fffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25569	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	71	Pmff0fffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25570	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	72	Pmff0fffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25571	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	73	Pmff0fffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25572	YZXAYZXAXXZY GXXXAA	74	Pmff0fffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25573	YYXAYZXAXXZY GXXXAA	75	Pmff0fffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25574	YZXAYYXXAXXZY GXXXAA	76	Pmff0fffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25575	YZXAYZXAXXYYY GXXXAA	77	Pmff0fffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25576	YYXAYYXXAXXYYY GXXXAA	78	Pmff0fffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25578	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	79	Pmff0fffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 티오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5

[0453]

					메틸 U
25579	UUCAUUCCACCU UUGCCCAA	80	Pmff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 티오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25580	UUCAUUCCACCU UUGCCCAA	81	Pmff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 티오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25584	YZXAYYZXXAXXY GXXXAA	82	Pmff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 티오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25585	YYXAYYZXXAXXY GXXXAA	83	Pmff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 티오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25586	UUCAUUCCACCU UUGCCCAA	84	Pmff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25587	UUCAUUCCACCU UUGCCCAA	85	Pmff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25588	UUCAUUCCACCU UUGCCCAA	86	Pmff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25589	YZXAYYZXXAXZY GXXXAA	87	Pmdf0ffdf0fmdmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25590	YYXAYYZXXAXZY GXXXAA	88	Pmff0ffdf0fmdmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
24560	UUCAUUCCACCU UUGCCCAA	89	Pmff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssss o	
25634	FI 표지 없음	90	Pm00f0f0ffff0ff0ff0	ssssssssssssssssss o	
25635	FI 표지 없음	91	Pm00f0f0ffff0ff0ff0	000000000000ssss ssso	
25636	FI 표지 없음	92	Pm00f0f0ffff0ff0ff0	000000000000ssss sso	
25637	FI 표지 없음	93	Pm00f0f0ffff0ff0ff0	000000000000ssss ssso	
25638	FI 표지 없음	94	Pm00f0f0ffff0ff0ff0	000000000000ssss ssso	
25643	FI 표지 없음	95	Pm00f0f0ffff0ff0ff0	ssssssssssssssssso	
25644	FI 표지 없음	96	Pm00f0f0ffff0ff0ff0	ssssssssssssssssso	

[0454]

25645 FI 표지 없음	UAACAUGCCUCUC UUCAUCCU	97	Pm00f0f0ffffffffff0fffo	ssssssssssssssssssss o	
25652 FI 표지 없음	UAACAUGCCUCUC UUCAUCCU	98	Pm00f0f0ffffffffff0fffo	ssssssssssssssssssss o	
25568 FI 표지 없음	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	99	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25569 FI 표지 없음	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	100	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25570 FI 표지 없음	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	101	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25571 FI 표지 없음	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	102	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25572 FI 표지 없음	YZXAYZXXAXXZY GXXXAA	103	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25573 FI 표지 없음	YYXAYZXXAXXZY GXXXAA	104	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25574 FI 표지 없음	YZXAYYXXAXXZY GXXXAA	105	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25575 FI 표지 없음	YZXAYZXXAXXYY GXXXAA	106	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 옥틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25576 FI 표지 없음	YYXAYYXXAXXYY GXXXAA	107	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25578 FI 표지 없음	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	108	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 테오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25579 FI 표지 없음	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	109	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 테오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25580 FI 표지 없음	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	110	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 테오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25584 FI 표지 없음	YZXAYZXXAXXYY GXXXAA	111	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 테오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25585 FI 표지 없음	YYXAYYXXAXXYY GXXXAA	112	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 테오펜, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25586 FI 표지 없음	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	113	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25587 FI 표지	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	114	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y=

[0455]

없음					5 메틸 U
25588 FI 표지 없음	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	115	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25589 FI 표지 없음	YZXAYZXXAXXZY GXXXAA	116	Pmdf0ffdf0fmdmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
25590 FI 표지 없음	YYXAYZXXAXXZY GXXXAA	117	Pmff0ffdf0fmdmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	Z= 이소부틸, x = 5 메틸 C, Y= 5 메틸 U
24560 FI 표지 없음	UUCAUUUCCACCU UUGCCCAA	118	Pmfff0ffff0fmmmm0m mf00	ssssssssssssssssssss o	

[0456]

표 1 및 2에 대한 기호설명:	
f	= 2'플루오로
m	= 2'Ome
P	= 5' 포스페이트
s	= 포스포로티오에이트 연결
o	= 포스포디에스테르 연결
DY547	= DY547 염료
d	= 데옥시리보스

[0457]

[0458]

인간 SOD1 서열은 하기 열거된 진뱅크 수탁 번호 NM_000454.4 (서열식별번호: 119)에 의해 나타내어진다. SOD1 서열의 다중 돌연변이가 확인된 바 있고 (Rosen et al. (1993) Nature; Deng et al. (1993) Science; De Belleruche et al. (1995) J Med Genet.; Orrel et al. (1997) J Neurol.; Cudkowicz (1997) Ann. Neurol.; 및 Anderson et al. (1995) Nature Genet.), 이는 또한 본 출원에 약속된 서열을 사용하여 표적화될 수 있다:

```
GTTTGGGGCCAGAGTGGGCGAGGCGCGGAGGTCTGGCCTATAAAGTAGTCGCGG
AGACGGGGTGCTGGTTTGCCTCGTAGTCTCCTGCAGCGTCTGGGGTTTCCGTTGC
AGTCCTCGGAACCAGGACCTCGGCGTGGCCTAGCGAGTTATGGCGACGAAGGCC
GTGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGCCAGTGCAGGGCATCATCAATTTTCGAGCAG
AAGGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGGAAGCATTAAAGGACTGACTGA
AGGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATGAGTTTGGAGATAATACAGCAGGCTGTACC
AGTGCAGGTCTCAGTTTAATCCTCTATCCAGAAAACACGGTGGGCCAAAGGATG
AAGAGAGGCATGTTGGAGACTTGGGCAATGTGACTGCTGACAAAGATGGTGTGG
CCGATGTGTCTATTGAAGATTCTGTGATCTCACTCTCAGGAGACCATTGCATCATT
GGCCGCACACTGGTGGTCCATGAAAAAGCAGATGACTTGGGCAAAGGTGGAAAT
GAAGAAAGTACAAAGACAGGAAACGCTGGAAGTCGTTTGGCTTGTGGTGTAAAT
GGGATCGCCCAATAAACATTCCCTTGGATGTAGTCTGAGGCCCTTAACTCATCT
GTTATCCTGCTAGCTGTAGAAATGTATCCTGATAAACATTAACACTGTAATCTT
AAAAGTGTAAATGTGTGACTTTTTTCAGAGTTGCTTTAAAGTACCTGTAGTGAGAA
ACTGATTTATGATCACTTGGAAAGATTTGTATAGTTTTATAAACTCAGTTAAAAT
GTCGTTTCAATGACCTGTATTTTGCCAGACTTAAATCACAGATGGGTATTAAC
TTGTCAGAAATTTCTTTGTCATTCAAGCCTGTGAATAAAAACCCTGTATGGCACTTA
TTATGAGGCTATTAAGAATCCAAATTCAAACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
(SEQ ID NO: 119)
```

[0459]

[0460]

표 3. 포스포로티오에이트 함량을 감소시키는 것은 감소된 시험관내 세포 독성을 갖는 활성 ps-rxRNA 변이체를 발생시킨다 (서열은 도 1에 상응함)

올리고 ID		SEQ ID NO :	총 # PS
25634	PS	DY547.mG.mA. G.mA. G. G.mC. A.mU. G.mU*mU*mA	120
	GS	P.mU* A* A*fc* A*fu* G*fc*fc*fu*fc*fu* C*fu*fu*fc* A*fu*fc*fc* U	121
25635	PS	DY547.mG.mA. G.mA. G. G.mC. A.mU. G.mU*mU*mA	122
	GS	P.mU. A. A.fc. A.fu. G.fc.fc.fu.fc.fu.fu.fu*fu*fc* A*fu*fc*fc* U	123
25636	PS	DY547.mG.mA. G.mA. G. G.mC. A.mU. G.mU*mU*mA	124
	GS	P.mU. A. A.fc. A.fu. G.fc.fc.fu.fc.fu. C*fu*fu*fc* A*fu* C	125
25637	PS	DY547.mG*mA* G*mA* G* G*mC* A*mU* G*mU*mU*mA	126
	GS		
25600 (모 ps-rxRNA)	PS	mG*mA* G* A* G* G*mC* A*mU* G*mU*mU*mA	127
	GS	P.mU* A* A*fc* A*fu* G*fc*fc*fu*fc*fu* C*fu*fu*fc* A*fu*fc*fc* U	128

[0461]

[0462]

표 4. 포스포로티오에이트 함량을 감소시키는 것은 감소된 시험관내 세포 독성을 갖는 활성 ps-rxRNA 변이체를 발생시킨다 (서열은 도 2에 상응함)

올리고 ID		SEQ ID NO:	총 # PS
25638	PS	DY547.mG*mA* G*mA* G* G*mC* A*mU* G*mU*mU*mA	129
	GS	P.mU. A. A.fc. A.fU. G.fc.fC.fU.fC.fU.fC*fU*fU*fC* A*fU*fC*fC* U	130
25643	PS	DY547.mG.mA. G.mA. G. G.mC. A.mU. G.mU*mU*mA	131
	GS	P.mU* A* A*fC* A*fU* G*fC*fC*fU*fC*fU*fC*fU*fC* A*fU* C	132
25644	PS	DY547.mG*mA* G*mA* G* G*mC* A*mU* G*mU*mU*mA	133
	GS	P.mU* A* A*fC* A*fU* G*fC*fC*fU*fC*fU*fC*fU*fC* A*fU* C	134
25645	PS	DY547.mG.mA. G.mA. G. G.mC. A.mU. G.mU*mU*mA	135
	GS	P.mU* A* A*fC* A*fU* G*fC*fC*fU*fC*fU*fC*fU*fC* A*fU*fC*fC* U	136
25600 (모 ps-rxRNA)	PS	mG*mA* G* A* G* G*mC* A*mU* G*mU*mU*mA	137
	GS	P.mU* A* A*fC* A*fU* G*fC*fC*fU*fC*fU* C*fU*fU*fC* A*fU*fC*fC* U	138

[0463]

표 3 및 4에 대한 기호설명:	
f	= 2'플루오로
m	= 2'Ome
P	= 5' 포스페이트
*	= 포스포로티오에이트 연결
.	= 포스포디에스테르 연결
DY547	= DY547 염료
d	= 데옥시리보스

[0464]

[0465] 표 1-8에 제공된 서열 중 일부는 염료 DY547에 부착된 것으로 도시되어 있지만, 표 1-8에 제공된 모든 서열은 또한 DY547없이 본원에 개시된 것으로 인지되어야 할 것이다.

[0466] 실시예 2: CNS에서의 sd-rxRNA 변이체 흡수

[0467] 도 3-5는 다양한 수준의 포스포로티오에이트를 갖는 sd-rxRNA 화학적 변이체가 CNS 내의 세포로 흡수 및 전달된다는 것을 입증한다. sd-rxRNA 화학적 변이체의 조직 분포를 결정하기 위해, SOD1을 표적화하는 형광 표지된 화합물을 스프라그 돌리 래트에 수주내 주사 (IC 주사)에 의해 15 mg/mL 용액 15 µL로 투여하였다. 주사 24시간 후, 조직을 수거하고 공초점 현미경 용으로 처리하였다. 공초점 영상화를 사용하여 sd-rxRNA 변이체의 세포 흡수를 검출하였다. 포스포로티오에이트 함량의 수준은 CNS에서 관찰된 세포 흡수 수준과 상관되었다 (예를 들어 증가된 수준의 포스포로티오에이트 함량은 더 큰 흡수를 발생시킴).

[0468] 실시예 3: CNS에서 SOD1의 sd-rxRNA 변이체 침투

[0469] 도 6은 SOD1 표적화 sd-rxRNA 변이체 (올리고 ID 25652)의 척수강내 투여 14일 후의 생체내 (마우스, 요추 척수 (LSC)) SOD1 침투를 입증한다. 비-표적화 대조군과 비교하여 SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체로 치료된 마우스에서 SOD1 mRNA 수준의 37% 감소가 관찰되었다 (도 6).

[0470] 방법: SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체 또는 비-표적화 대조군 (NTC)을 삼투 펌프 (10 mg/mL 화합물 용액 100 µL로 채워짐)를 사용하여 14일 동안 척수강내 주입에 의해 투여하였다. 척수의 말단 생검 샘플을 제14일에 수거하였다. RNA를 단리하고, qPCR에 의한 유전자 발현 분석에 적용하였다. 데이터를 시클로필린 B (PPIB) 하우스키핑 유전자의 수준에 대해 정규화하고, 1.0으로 설정된 비-표적화 대조군과 관련하여 그래프화하였다. 오차 막대는 개별 생검 샘플 사이의 표준 편차를 나타낸다. SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체-치료군 vs PBS 군에 대한 P 값은 * p <0.001이었다.

[0471] 실시예 4: CNS에서의 SOD1의 sd-rxRNA 변이체 침투

[0472] 도 7은 SOD1 표적화 sd-rxRNA 변이체 (올리고 ID 25645)의 척수강내 투여 14일 후의 생체내 (마우스, 요추 척수 (LSC)) SOD1 침투를 입증한다. 비-표적화 대조군과 비교하여 SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체로 치료된 마우스에서 SOD1 mRNA 수준의 통계적으로 유의한 24% 감소가 관찰되었다 (도 9).

[0473] 방법: SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체 또는 비-표적화 대조군 (NTC)을 삼투 펌프 (10 mg/mL 화합물 용액 100 µL로 채워짐)를 사용하여 14일 동안 척수강내 주입에 의해 투여하였다. 척수의 말단 생검 샘플을 제14일에 수거하였다. RNA를 단리하고, qPCR에 의한 유전자 발현 분석에 적용하였다. 데이터를 시클로필린 B (PPIB) 하우스

키퍼 유전자의 수준에 대해 정규화하고, 1.0으로 설정된 비-표적화 대조군과 관련하여 그래프화하였다. 오차 막대는 개별 샘플 사이의 표준 편차를 나타낸다. SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체-치료군 vs 비-표적화 대조군에 대한 P 값은 * p < 0.01이었다.

[0474] 실시예 5: SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체의 확인

[0475] SOD1을 표적화하는, 염기의 위치 4 또는 5에서 소수성 변형을 함유하는 sd-rxRNA 변이체를 설계하고, 합성하고, 시험관내 스크리닝하여, sd-rRNA 변이체가 표적 유전자 mRNA 수준을 감소시키는 능력을 결정하였다. sd-rxRNA 변이체를 HeLa 세포 (인간 자궁경부 암종 세포주, 10,000개 세포/웰, 96 웰 플레이트)에서 활성화에 대해 시험하였다. HeLa 세포를 혈청 함유 배지에서 다양한 농도의 SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체 또는 비-표적화 대조군 패널로 처리하였다. 시험된 농도는 5, 1 및 0.1 μM이었다. 비-표적화 대조군 sd-rxRNA는 SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체와 유사한 구조를 갖고, 둘 다의 가닥에 걸쳐 유사한 안정화 변형을 함유한다. 투여 48시간 후, 세포를 용해하고, 유전자-특이적 프로브 (아피메트릭스, 캘리포니아주 산타 클라라)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 퀀티진 분지형 DNA 검정에 의해 mRNA 수준을 결정하였다. 도 8-11은 염기의 위치 4 또는 5에서 소수성 변형을 함유하는 SOD1-표적화 sd-rxRNA 변이체가 HeLa 세포에서 시험관내 표적 유전자 mRNA 수준을 유의하게 감소시킨다는 것을 입증한다. 도 8-11에 상응하는 서열은 각각 표 5-8에서 발견할 수 있다. 데이터를 하우스 키퍼 유전자 (PPIB)에 대해 정규화하고, 비-표적화 대조군과 관련하여 그래프화하였다. 오차 막대는 생물학적 이중값의 평균으로부터의 표준 편차를 나타낸다.

[0476] 표 5. SOD1 sd-rxRNA 변이체 옥틸 변형

ID	Z=	패신저 가닥	SEQ ID NO:	가이드 가닥	SEQ ID NO:
25568	옥틸 U	DY547.mA*mG* G*mZ* G* G* A* A* A*mZ* G*mA*mA	139	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	145
25569	옥틸 U	DY547.mA*mG* G*mY* G* G* A* A* A*mZ* G*mA*mA	140	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	146
25570	옥틸 U	DY547.mA*mG* G*mZ* G* G* A* A* A*mY* G*mA*mA	141	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	147
25571		DY547.mA*mG* G*mY* G* G* A* A* A*mY* G*mA*mA	142	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	148
25572	옥틸 U	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	143	P.mY*fZ*fX* A*fY*fY*fZ*fX*fX* A*fX*mX*mZ*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	149
24560		DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	144	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	150

[0477]

[0478] 표 6. SOD1 sd-rxRNA 변이체 옥틸 변형

ID	Z=	패신저 가닥	SEQ ID NO:	가이드 가닥	SEQ ID NO:
25573	옥틸	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	151	P.mY*fY*fX* A*fY*fY*fZ*fX*fX* A*fX*mX*mZ*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	157
25574	옥틸	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	152	P.mY*fZ*fX* A*fY*fY*fY*fX*fX* A*fX*mX*mZ*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	158
25575	옥틸	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	153	P.mY*fZ*fX* A*fY*fY*fZ*fX*fX* A*fX*mX*mY*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	159
25576		DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	154	P.mY*fY*fX* A*fY*fY*fY*fX*fX* A*fX*mX*mY*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	160
25577	티오펜	DY547.mA*mG* G*mZ* G* G* A* A* A*mZ* G*mA*mA	155	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	161
24560		DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	156	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	162

[0479]

[0480] 표 7. SOD1 sd-rxRNA 변이체 티오펜 변형

ID	Z=	패신저 가닥	SEQ ID NO:	가이드 가닥	SEQ ID NO:
25578	티오펜	DY547.mA*mG* G*mY* G* G* A* A* A*mZ* G*mA*mA	163	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	169
25579	티오펜	DY547.mA*mG* G*mZ* G* G* A* A* A*mY* G*mA*mA	164	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	170
25580		DY547.mA*mG* G*mY* G* G* A* A* A*mY* G*mA*mA	165	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	171
25584	티오펜	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	166	P.mY*fZ*fX* A*fY*fY*fZ*fX*fX* A*fX*mX*mY*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	172
25585	티오펜	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	167	P.mY*fY*fX* A*fY*fY*fY*fX*fX* A*fX*mX*mY*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	173
24560		DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	168	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	174

[0481]

[0482] 표 8. SOD1 sd-rxRNA 변이체 이소부틸 변형

ID	Z=	패신저 가닥	SEQ ID NO:	가이드 가닥	SEQ ID NO:
25586	이소부틸	DY547.mA*mG* G*dZ* G* G* A* A* A*dZ* G*mA*mA	175	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	181
25587	이소부틸	DY547.mA*mG* G*mY* G* G* A* A* A*dZ* G*mA*mA	176	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	182
25588	이소부틸	DY547.mA*mG* G*dZ* G* G* A* A* A*mY* G*mA*mA	177	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	183
25589	이소부틸	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	178	P.mY*dZ*fX* A*fY*fY*dZ*fX*fX* A*fX*mX*dZ*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	184
25590	이소부틸	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	179	P.mY*fY*fX* A*fY*fY*dZ*fX*fX* A*fX*mX*dZ*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	185
24560		DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	180	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	186

[0483]

표 5 내지 8에 대한 기호설명:	
X	= 5 메틸 C
Y	= 5 메틸 U
f	= 2'플루오로
m	= 2'Ome
P	= 5' 포스페이트
*	= 포스포로티오에이트 연결
.	= 포스포디에스테르 연결
DY547	= DY547 염료
d	= 데옥시리보스

[0484]

[0485] 등가물

[0486] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험을 초과하지 않는 실험을 사용하여 본원에 기재된 본 발명의 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구범위에 의해 포괄되는 것으로 의도된다.

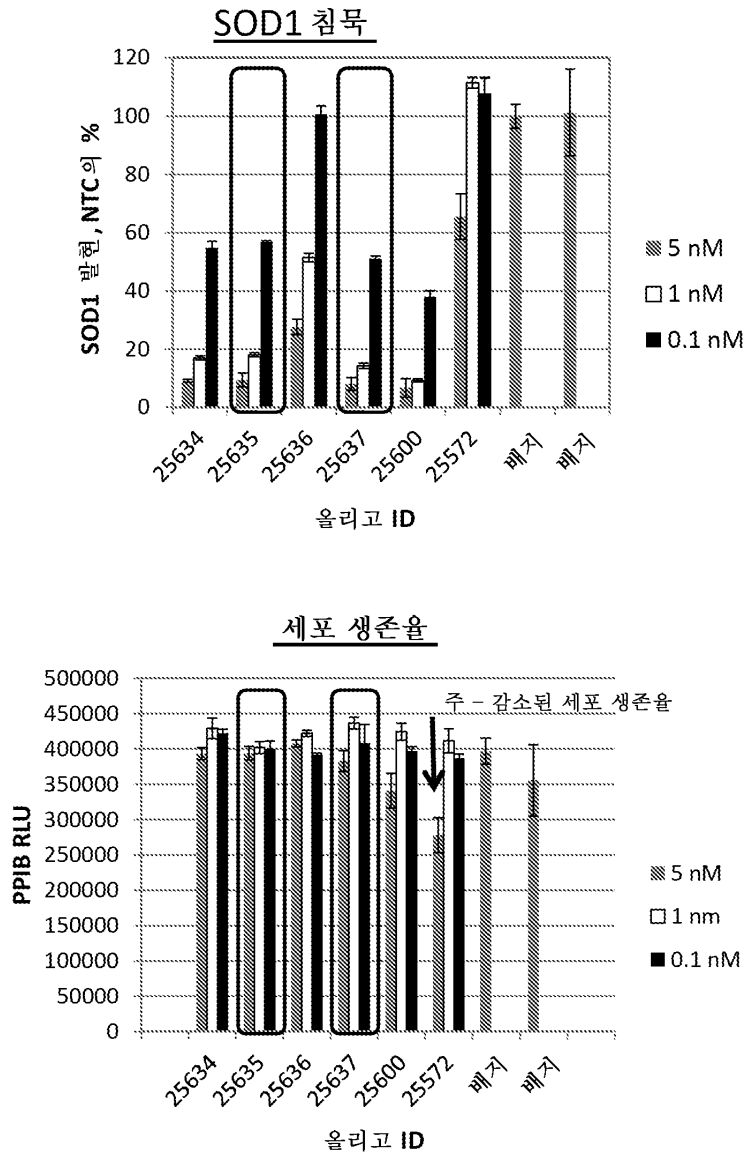
[0487] 특허 문서를 포함한 본원에 개시된 모든 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다. 본 출원은 2009년 9월 22일에 출원된 표제 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 PCT 공개 번호 WO2010/033247 (출원 번호 PCT/US2009/005247), 2012년 2월 16일에 US 2012/0040459로서 공개되고 2014년 8월 5일에 허여된 표제

"REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 8,796,443, 2015년 11월 3일에 허여된 표제 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 9,175,289, 2009년 2월 11일에 출원된 표제 "MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF"의 PCT 공개 번호 WO2009/102427 (출원 번호 PCT/US2009/000852) 및 2011년 2월 17일에 공개된 표제 "MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF"의 미국 특허 공개 번호 2011/0039914, 2011년 3월 24일에 출원된 표제 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 PCT 공개 번호 WO 2011/119852, 및 2015년 7월 14일에 허여된 표제 "REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS"의 미국 특허 번호 9,080,171의 모든 도면 및 명세서의 모든 부분 (서열 목록 또는 아미노산 / 폴리뉴클레오티드 서열 포함)을 포함한 그 전체 내용을 참조로 포함한다.

도면

도면1

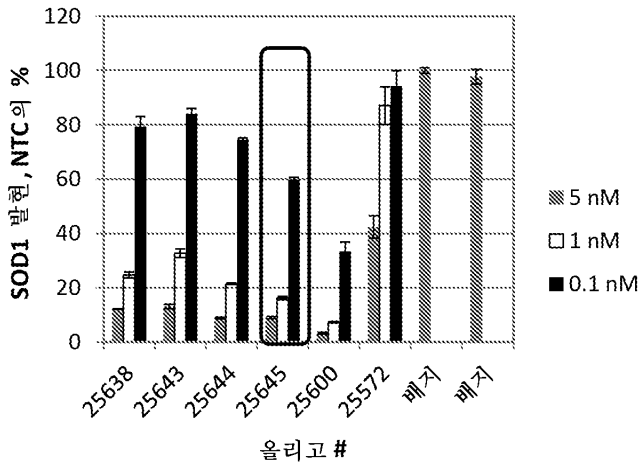
포스포로티오에이트 함량을 감소시키는 것은
 감소된 시험관내 세포 독성을 갖는 활성 ps-rxRNA 변이체를 발생시킨다



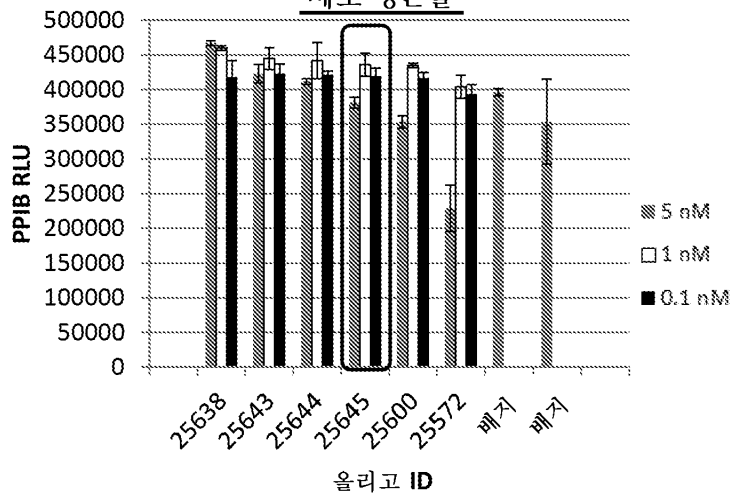
도면2

포스포로티오에이트 함량을 감소시키는 것은
 감소된 시험관내 세포 독성을 갖는 활성 ps-rxRNA 변이체를 발생시킨다

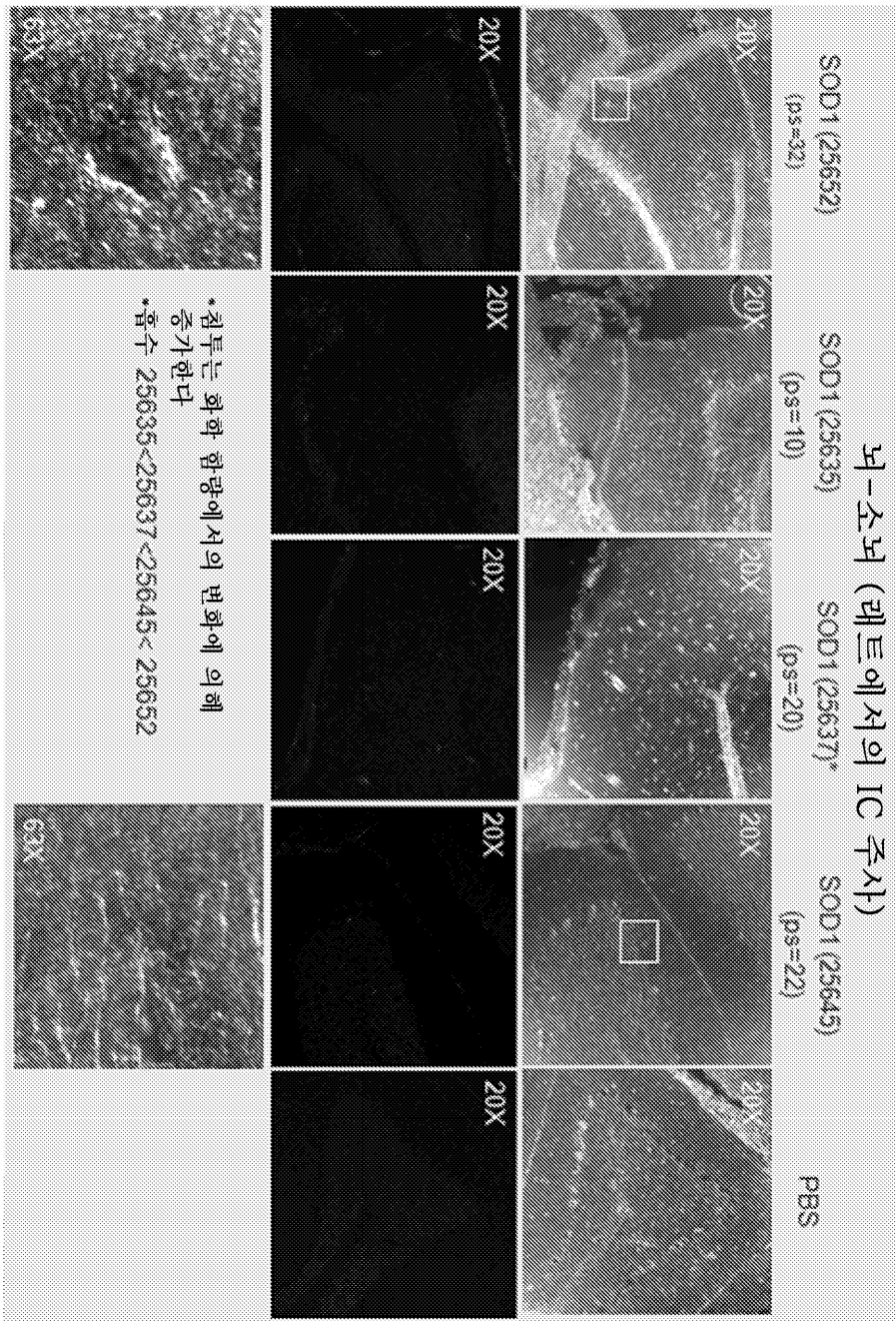
SOD1 침묵



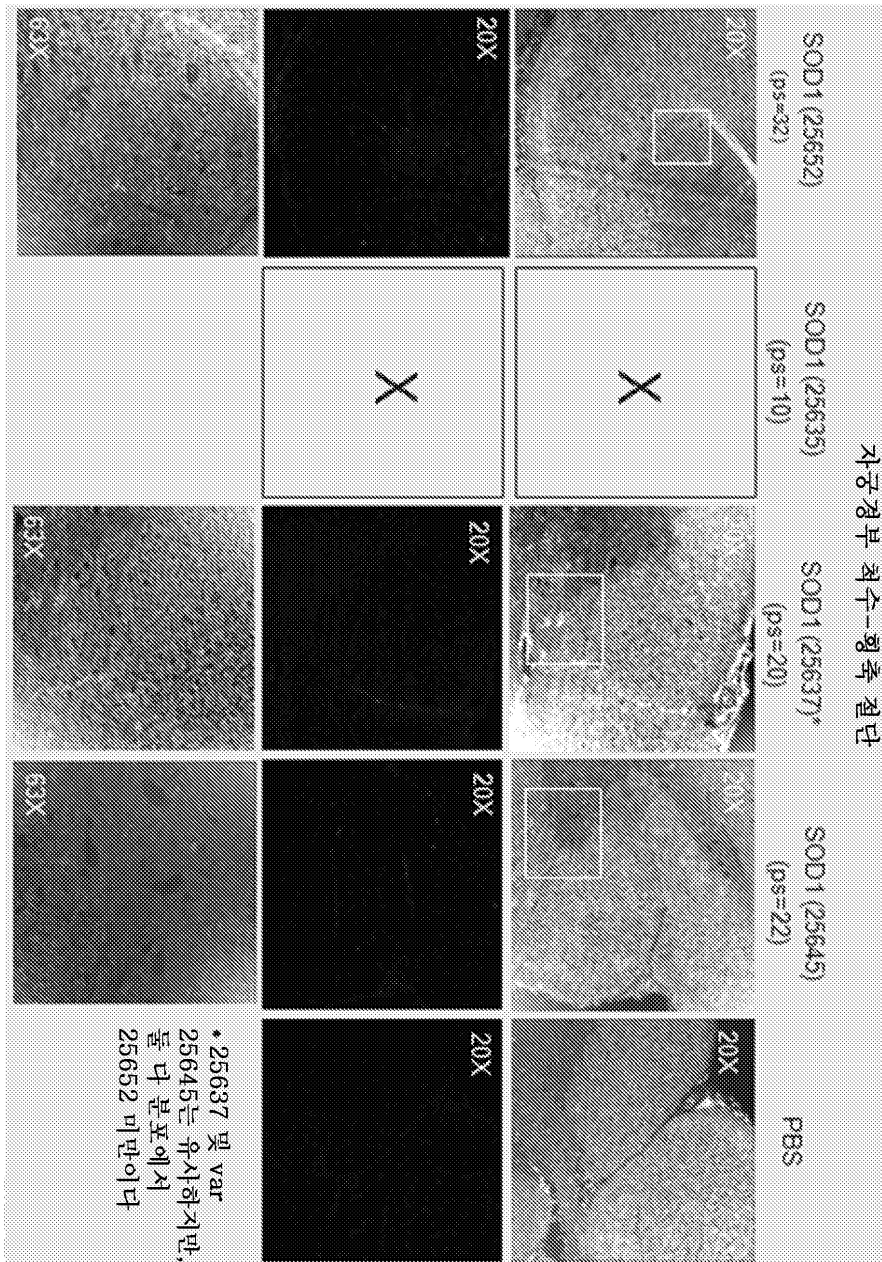
세포 생존율



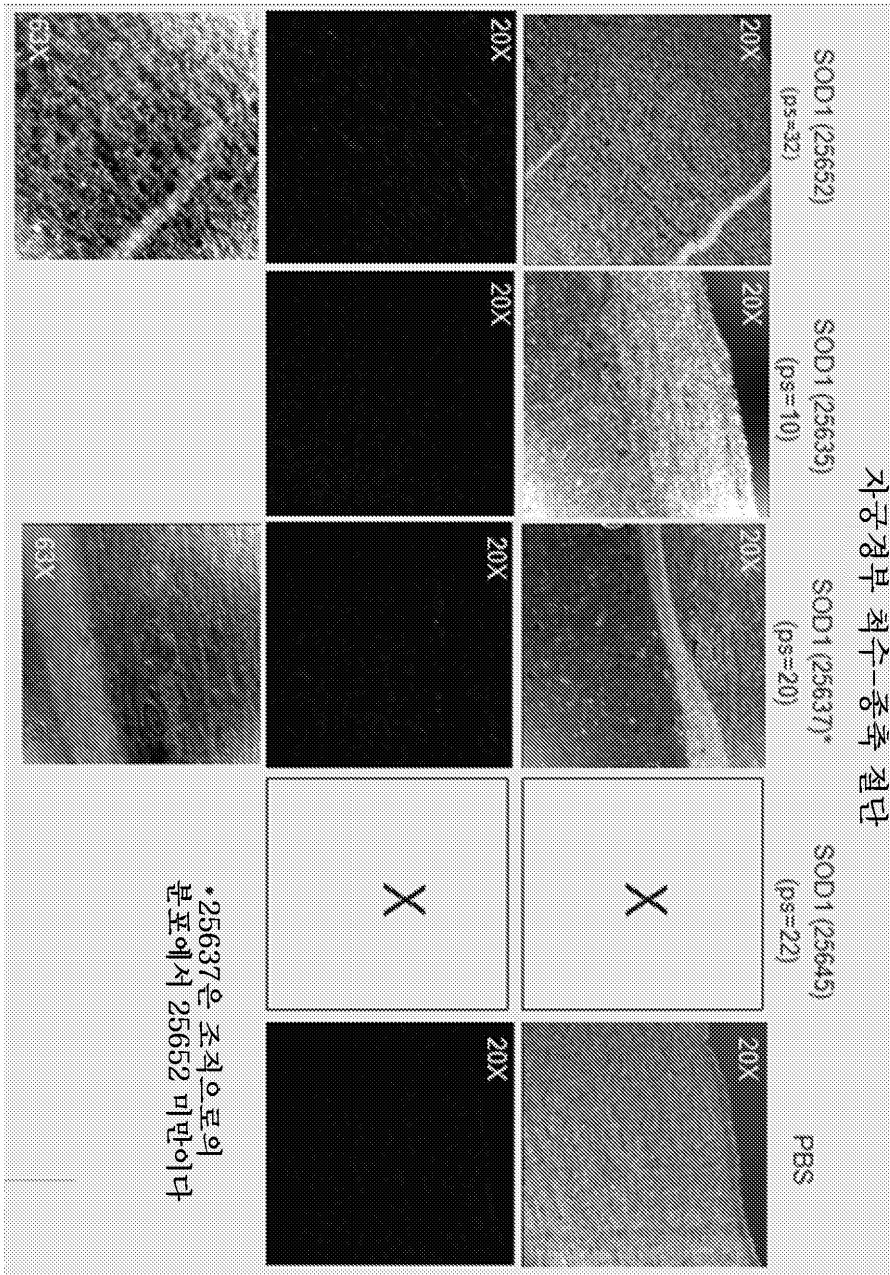
도면3



도면4

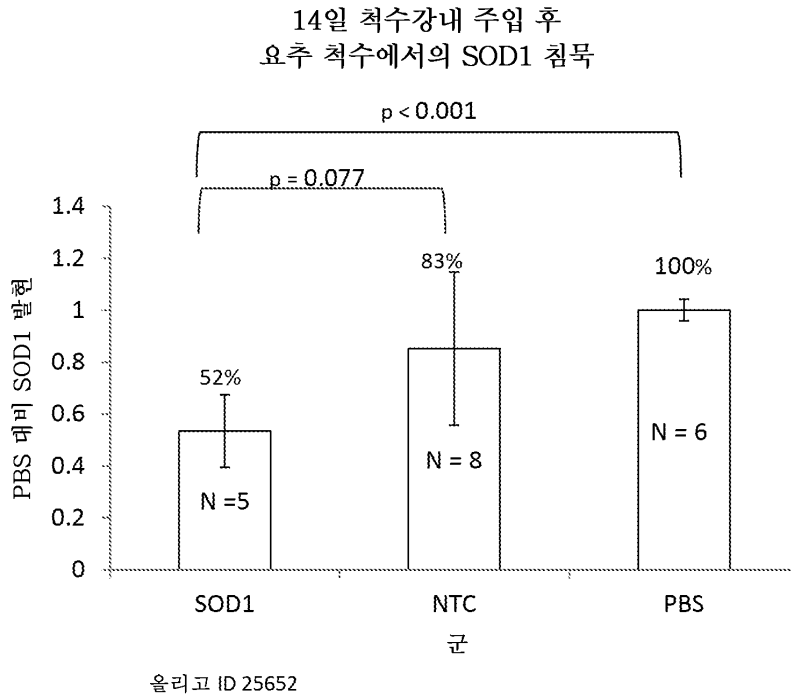


도면5



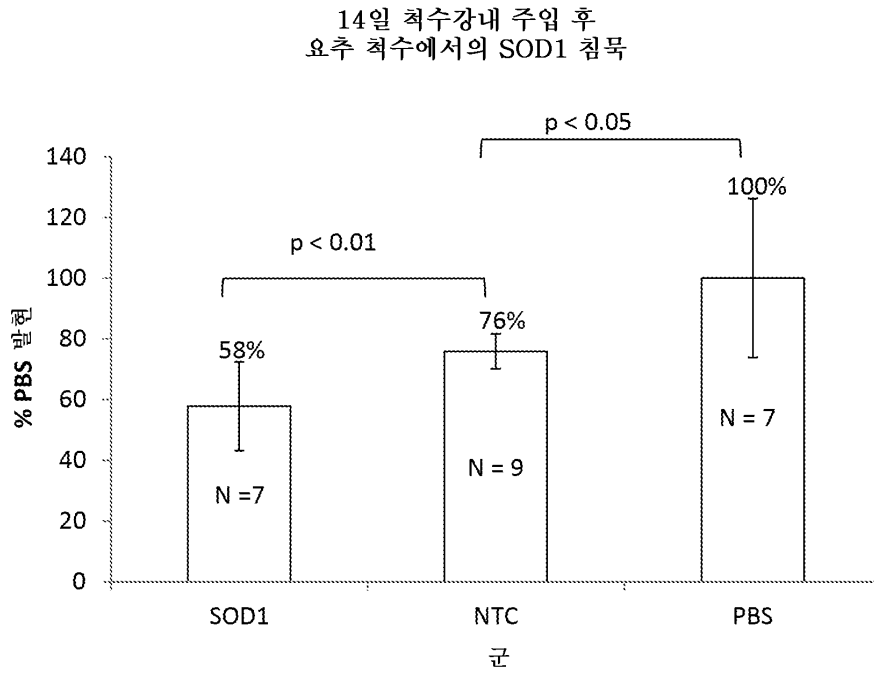
도면6

정상 마우스에서의 SOD1 표적화 sd-rxRNA의 14-일 척수강내 주입 후
SOD1 mRNA의 감소



도면7

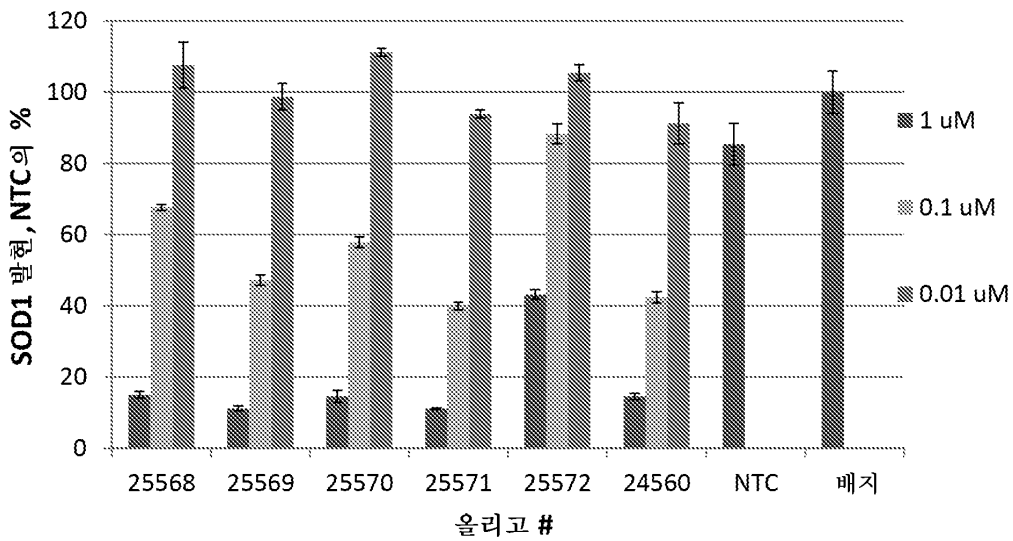
정상 마우스에서의 SOD1 표적화 sd-rxRNA 변이체 3의 14-일 척수강내 주입 후 SOD1 mRNA의 감소



올리고 ID25645

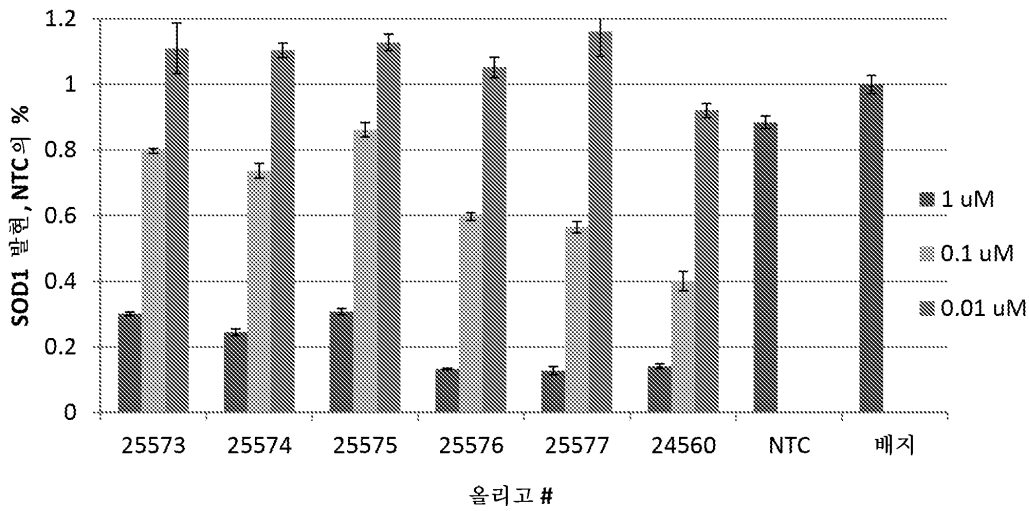
도면8

SOD1 sd-rxRNA 변이체 옥틸 변형



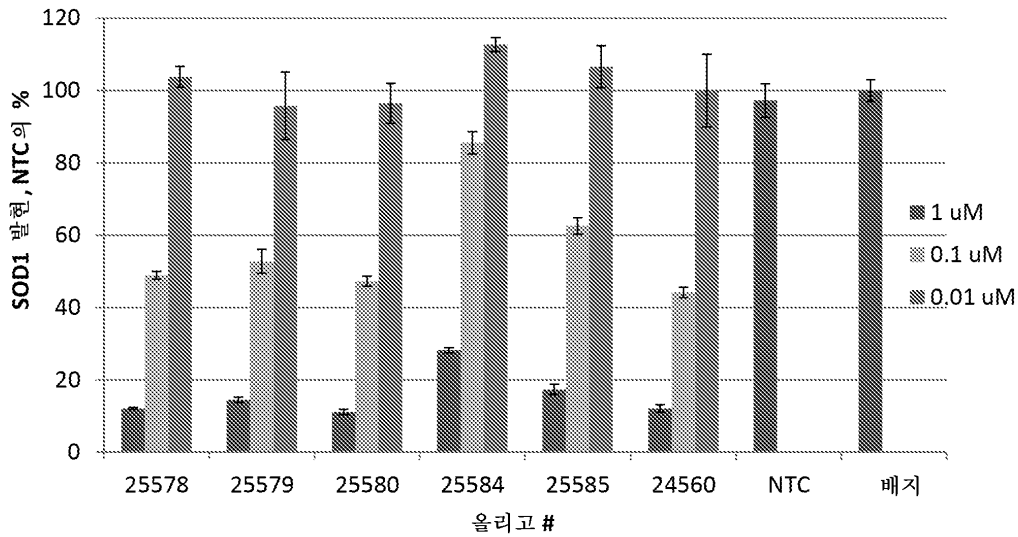
도면9

SOD1 sd-rxRNA 변이체 옥틸 변형 (계속)



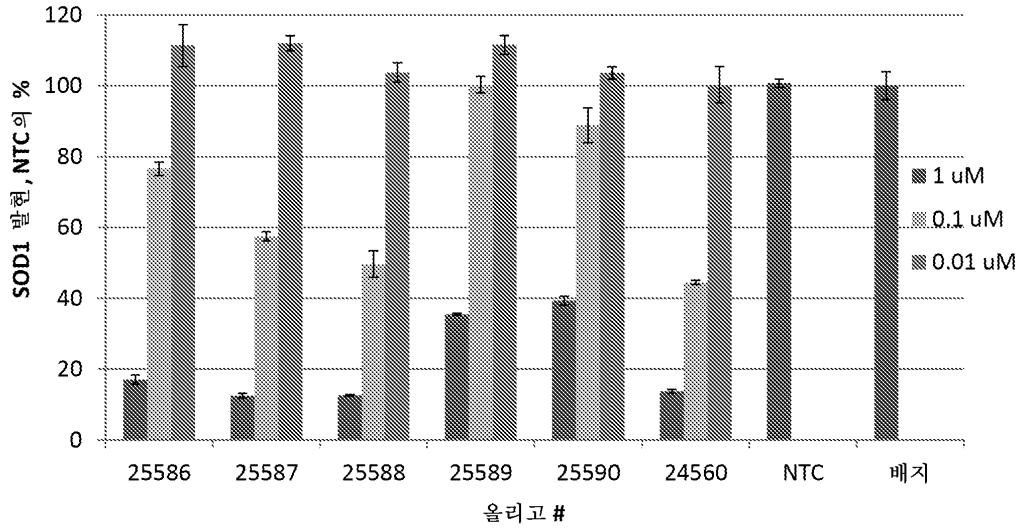
도면10

SOD1 sd-rxRNA 변이체 티오펜 변형



도면11

SOD1 sd-rxRNA 변이체 이소부틸 변형



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> RXi Pharmaceuticals Corporation
- <120> NUCLEIC ACID MOLECULES TARGETING SUPEROXIDE DISMUTASE 1 (SOD1)
- <130> R0659.70030W000
- <140> Not Yet Assigned
- <141> Concurrently Herewith
- <150> US 62/189,050
- <151> 2015-07-06
- <160> 186
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 13
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic Polynucleotide
- <220><221> misc_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> DY547 dye modified
- <220>

><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage

<400> 1

gagaggcaug uua

13

<210> 2

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223>
 > 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 2

gagaggcaug uua

13

<210> 3
 <211> 13
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(10)

<223> Phosphodiester linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 3

gagaggcaug uua

13

<210> 4

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage
 <400> 4

gagaggcaug uua

13

<210> 5
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223>
 > Phosphodiester linkage
 <400> 5
 gagaggcaug uua
 <210> 6
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified

13

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 6

gagaggcaug uua

<210> 7

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223

> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(10)

<223> Phosphodiester linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

13

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage

 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 7
 gagaggcaug uua
 <210> 8
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

13

<222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 8
 gagaggcaug uua
 <210> 9
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

13

<222> (9)..(9)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 9

gagaggcaug uua

13

<210> 10

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 10
 gagaggcaug uua
 <210> 11
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

13

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 11

agguggaaau gaa

13

<210> 12

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Octyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 12
 agguggaaau gaa

13

<210> 13
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <
 223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 13
 agguggaaau gaa
 <210> 14
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature

13

<222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221
 > misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 14
 aggggaaau gaa
 <210> 15
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified

13

<220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 15
 aguggaaau gaa

13

<210> 16
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 16
 aguggaaau gaa

13

<210> 17
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 17
 agguggaaau gaa
 <210> 18
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature

13

<222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage

<400> 18

agguggaaau gaa

13

<210> 19
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature

<222>

> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 19
 agugggaaau gaa

13

<210> 20
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

 <223> Thiophene modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 20
 aguggaaau gaa
 <210> 21
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

13

<223> Thiophene modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><
 221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 21
 agugggaaau gaa
 <210> 22
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

13

<222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 22
 aggggaaau gaa
 <210> 23
 <211
 > 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

13

<222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 23
 aggggaaau gaa
 <210> 24
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified

13

<220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 24
 agguggaaau gaa
 <210> 25
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Deoxyribose modified

13

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 25

agguggaaau gaa

13

<210> 26

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Isobutyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Deoxyribose modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 26

agguggaaau gaa

13

<210> 27

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Isobutyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Deoxyribose modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223>

> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 27
 agguggaaau gaa
 <210> 28
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220
 ><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

13

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 28

agguggaaau gaa

13

<210> 29

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 29

agguggaaau gaa

13

<210> 30

<211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage

<400> 30

agguggaaau gaa

13

<210> 31
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222>

> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage
 <400> 31
 gagaggcaug uua
 <210> 32
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

13

<222> (1)..(11)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220
 ><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 32
 gagaggcaug uua
 <210> 33
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> Phosphodiester linkage

13

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 33
 gagaggcaug uua
 <210> 34
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified

13

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 34

gagaggcaug uua

13

<210> 35

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222

> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 35

gagaggcaug uua

13

<210> 36
 <211> 13

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 36
 gagaggcaug uua
 <210> 37
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 37

13

gagaggcaug uua

13

<210> 38

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(11)

<223> Phosphodiester linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221

> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 38

gagaggcaug uua

13

<210> 39

<211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222
 > (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 39
 gagaggcaug uua
 <210> 40
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)

13

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Octyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Octyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 40

agguggaaau gaa

13

<210> 41

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 41
 agguggaaau gaa
 <210> 42
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage

 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Octyl modified

13

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 42
 agguggaaau gaa

13

<210> 43
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 43
 agguggaaau gaa
 <210> 44
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage

 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

13

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 44

agguggaaau gaa

13

<210> 45
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222>

> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage
 <400> 45

agguggaaau gaa

13

<210> 46
 <211>
 > 13

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage

<400> 46

agguggaaau gaa

13

<210> 47
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 47
 agguggaaau gaa
 <210> 48
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

13

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 48
 agguggaaau gaa
 <210> 49
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Thiophene modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

13

<223> Phosphodiester linkage

<400> 49

agguggaaau gaa

13

<210> 50

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Thiophene modified

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 50

agguggaaau gaa

13

<210> 51

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 51

agguggaaau gaa

13

<210> 52

<211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

<

223> Phosphodiester linkage

<400> 52

agguggaaau gaa

13

<210> 53

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 53

agguggaaau gaa

13

<210> 54

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Isobutyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Deoxyribose modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 54
 agguggaaau gaa
 <210
 > 55
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature

13

<222> (10)..(10)

<

223> Deoxyribose modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 55

agguggaaau gaa

13

<210> 56

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Isobutyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Deoxyribose modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 56

agguggaaau gaa

13

<210> 57

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<

223> Phosphodiester linkage

<400> 57

agguggaaau gaa

13

<210> 58
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 58

agguggaaaau gaa

13

<210> 59
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 59
 aguggaaaau gaa
 <210> 60
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified

13

<220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(12)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'Fluoro modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 60
 uaacaugccu cucucaucc u
 <210> 61
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature

 <222> (4)..(4)

21

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 61
 uaacaugccu cucucaucc u

21

<210> 62
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)

 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(18)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 62
 uaacaugccu cucucauc
 <210> 63
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature

19

<222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'Fluoro modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 63
 uaacaugccu cucucaucc u
 <210> 64
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage

21

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(12)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(20)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 64

uaacaugccu cucucaucc u

21

<210> 65

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(16)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(20)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 65

uaacaugccu cucucaucc u

21

<210> 66

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221

> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400
 > 66
 uaacaugccu cucuucac
 <210> 67
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

19

<222> (4)..(4)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(16)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 67

uaacaugccu cucucauc

19

<210> 68

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223>

> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)

 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 68
 uaacaugccu cucucaucc u
 <210> 69
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)

21

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(12)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 69

uaacaugccu cucuaucc u

21

<210> 70
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 70
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 71
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

21

<222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 71
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 72
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified

21

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 72

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 73

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 73

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 74

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)

 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage

<400> 74
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 75
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)

<223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)

<223

> Phosphodiester linkage

<400> 75

uucauuucca ccuugccca a

21

<210> 76

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

```

<222> (1)..(1)
<223> 5' Phosphate modified
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 2'OMe modified
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 5-methyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Octyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> 2'Fluoro modified
<220><221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 5-methyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(9)
<223> 5-methyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(9)
<223> 2'Fluoro modified
<220><221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 2'Fluoro modified
<220><221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 5-methyl modified
<220><221>
> misc_feature

```

<222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 76

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 77
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Octyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Octyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(15)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 77
 uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 78
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)

 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)

 <223
 > 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 78
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 79
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage

 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage

<400> 79

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 80

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 80

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 81

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223

> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 81
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 82
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <
 220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Thiophene modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)

21

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Thiophene modified

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(15)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(19)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 82

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 83

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 83
 uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 84
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 84
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 85
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified

21

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 85
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 86
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified

21

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222>

> (19)..(19)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 86

uucauuucca ccuuugccca a

<210> 87

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

21

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223>

> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Isobutyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Deoxyribose modified

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223>

2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Isobutyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Deoxyribose modified
<220><221> misc_feature
<222> (8)..(9)
<223> 5-methyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 2'Fluoro modified
<220><221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 5-methyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (12)..(15)
<223> 2'OMe modified
<220><221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Isobutyl modified

<220><221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Deoxyribose modified
<220><221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 5-methyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (17)..(18)
<223> 2'OMe modified
<220><221> misc_feature
<222> (17)..(19)
<223> 5-methyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 87

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 88

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Octyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223>
 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223>
 > 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 88
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 89
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage

 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)

21

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage

<400> 89

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 90
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature

<222> (8)..(12)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 90
 uaacaugccu cucucaucc u
 <210> 91
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature

21

<222> (8)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage

 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 91
 uaacaugccu cucucaucc u
 <210> 92
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified

21

<220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(18)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 92

uaacaugccu cucucauc

19

<210> 93
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 93
 uaacaugccu cucucaucc u
 <210> 94
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)

21

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage

<400> 94

uaacaugccu cucucaucc u

21

<210> 95
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 95
 uaacaugccu cucucauc
 <
 210> 96
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature

19

<222> (8)..(16)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 96

uaacaugccu cucucauc

19

<210> 97

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(16)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(20)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 97

uaacaugccu cucucaucc u

21

<210> 98

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(12)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 98
 uaacaugccu cucucaucc u
 <210> 99
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)

21

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 99
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 100
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature

21

<222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature

 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 100
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 101
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)

 <223> 2'Fluoro modified

21

<220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 101
 uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 102
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 102
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 103
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

21

<223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

 <222> (13)..(13)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 103
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 104

21

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Octyl modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified

<220><221
 > misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 104
 uucauuucca ccuugccca a

21

<210> 105
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)

 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)

 <223
 > Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 105
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 106
 <211> 21
 <212> RNA

21

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)

<223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221>
 > misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature

 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 106
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 107
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)

21

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage

<400> 107

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 108

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature

 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 108
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 109

 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

21

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223
 > 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 109
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 110
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 110

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 111

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Thiophene modified

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222

> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Thiophene modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)

 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 111
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 112
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

21

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(15)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 112

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 113
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 113
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 114
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature

21

<222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220
 ><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 114
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 115
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Phosphorothioate linkage

21

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature

 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 115
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 116
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' Phosphate modified

21


```

<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 2'OMe modified
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(20)

<223>

> Phosphorothioate linkage
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Isobutyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Deoxyribose modified
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> 2'Fluoro modified
<220><221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 5-methyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 5-methyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(9)
<223> 2'Fluoro modified
<220><221> misc_feature
<222> (7)..(7)

<223>

> Isobutyl modified
<220><221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Deoxyribose modified
<220><221> misc_feature
<222> (8)..(9)
<223> 5-methyl modified

```

<220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223>
 > Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 116
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 117

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Octyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Isobutyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'Fluoro modified
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)

<223> Phosphodiester linkage

<400> 117

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 118

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'Fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'Fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Phosphodiester linkage
 <400> 118
 uucauuucca ccuuugccca a 21

<210> 119
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 119

gtttggggcc agagtgggcg aggcgaggag gtctggccta taaagtagtc gcggagacgg 60
 ggtgctggtt tgcgtcgtag tctcctgcag cgtctggggt ttccgttgca gtccctcgaa 120
 ccaggacctc ggcgtggcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaaggg 180
 cgacggccca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtgaa 240
 ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcattgatt 300
 tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac tttaatcctc tatccagaaa 360

acacggtggg ccaaggatg aagagaggca tgttgagac ttgggcaatg tgactgctga 420
 caaagatggt gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca 480
 ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaaggtgg 540
 aaatgaagaa agtacaaga caggaaacgc tggaaagtgt ttggcttgtg gtgtaattgg 600
 gatcgcccaa taaacattcc cttggatgta gctgaggcc ccttaactca tctgttatcc 660
 tgctagctgt agaaatgtat cctgataaac attaaacact gtaactctaa aagtgttaatt 720
 gigtgacttt ttcagagttg ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact 780

tggaagattt gtatagtttt ataaaactca gttaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt 840
 ttgccagact taaatcacag atgggtatta aacttgtcag aatttctttg tcattcaagc 900
 ctgtgaataa aaacctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaagaat ccaaattcaa 960
 actaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 981

<210> 120
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(11)

<223> Phosphodiester linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 120

gagaggcaug uua

13

<210> 121

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> 5' phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(12)

 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 121
 uaacaugccu cucucaucc u
 <210> 122
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature

21

<222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <400> 122
 gagaggcaug uua

13

<210> 123
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)

 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 123
 uaacaugccu cucucaucc u
 <210> 124
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)

21

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <400> 124

gagaggcaug uua

13

<210> 125
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)

<223> Phosphodiester linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(12)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(19)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 125

uaacaugccu cucucauc

19

<210> 126

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'Ome modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'Ome modified
 <400> 126

gagaggcaug uua

13

<210> 127
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> 2'Ome modified

<400> 127

gagaggcaug uua

13

<210> 128

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'Ome modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(12)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(20)

<223> 2'fluoro modified

<400> 128
 uaacaugccu cucuucc u 21

<210> 129
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)
 <223> 2'Ome modified

<400> 129
 gagaggcaug uua 13

<210> 130
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)

 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 130
 uaacaugccu cucucaucc u
 <210> 131
 <211> 13
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <400> 131

gagaggcaug uua

13

<210> 132
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'Ome modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)

 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 132
 uaacaugccu cucucauc
 <210> 133
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'Ome modified

19

<

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'Ome modified

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'Ome modified

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'Ome modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> 2'Ome modified

<400> 133

gagaggaug uua

13

<210> 134

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'Ome modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 (18)..(18)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 134
 uaacaugccu cucucauc
 <210> 135
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> Phosphodiester linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature

19

<222> (9)..(9)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <400> 135
 gagaggcaug uua
 <210> 136
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothiote linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(16)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature

13

<222> (18)..(20)

<223> 2'fluoro modified

<400> 136

uaacaugccu cucuaucc u

21

<210> 137

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'Ome modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'Ome modified

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'Ome modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> 2'Ome modified

<400> 137

gagaggcaug uua

13

<210> 138

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'Ome modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(12)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(20)

<223> 2'fluoro modified

<400> 138

uaacaugccu cucucaucc u

21

<210> 139

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Octyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Octyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<400> 139

agguggaaau gaa

13

<210> 140

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 140
 agguggaaau gaa
 <210> 141
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221>
 > misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage

13

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Octyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<400> 141

agguggaaau gaa

13

<210> 142

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 142
 agguggaaau gaa
 <210> 143
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><
 221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

13

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 143
 agguggaaau gaa
 <210> 144
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222>
 (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 144
 agguggaaau gaa
 <210> 145
 <211> 21

13

13

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 145
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 146
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 146
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 147

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223>
 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 147
 uucauuucca ccuugccca a
 <210> 148

<211> 21
 <212> RNA
 <
 213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220
 ><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 148
 uucauuucca ccuuugccca a

<210> 149
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)

 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> OCtyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 149
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 150
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 150
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 151
 <211> 13

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified

<400> 151

agguggaaau gaa

13

<210> 152
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified
 <400> 152

agguggaaau gaa

13

<210> 153

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<400> 153

agguggaaau gaa

13

<210> 154

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<400> 154

agguggaaau gaa

13

<210> 155

<211> 13

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Thiophene modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

 <223> Thiophene modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 155
 aguggaaau gaa
 <210> 156
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

13

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 156
 agugggaaau gaa
 <210> 157
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)

13

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> OCtyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(19)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'fluoro modified

<400> 157

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 158

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221>
 > misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 158
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 159
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-methyl modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Octyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)

21

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Octyl modified
 <220><221>
 > misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 159

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 160

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)

 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223>
 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 160
 uucauuucca ccuugccca a
 <210> 161
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage

 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature

21

<222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 161
 uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 162
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 162
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 163
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <
 220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Thiophene modified

21

<220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 163

agguggaaau gaa

13

<210> 164
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Thiophene modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 164
 agguggaaau gaa
 <210> 165
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

13

<223> 2'OMe modified

<400> 165

agguggaaau gaa

13

<210> 166

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DY547 dye modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified

<400> 166

agguggaaau gaa

13

<210> 167

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 167

agguggaaau gaa

13

<210> 168
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)

<223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 168
 agugggaaau gaa
 <210> 169
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220
 ><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

13

<223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 169
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 170
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature

21

<222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 170
 uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 171
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'fluoro modified

<400> 171

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 172

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Thiophene modified

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-methyl modified
 <220
 ><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Thiophene modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221>
 misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 172
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 173
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)

 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified

21

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(15)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(19)

<223> 5-methyl modified

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'fluoro modified

<400> 173

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 174

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 174
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 175
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature

21

<222> (4)..(4)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 175
 aggggaaau gaa
 <210> 176
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature

13

<222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 176
 aggggaaau gaa
 <210> 177
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (4)..(4)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified

13

<220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 177
 agugggaaau gaa
 <210> 178
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified

13

<400> 178
agguggaaau gaa

13

<210> 179
<211> 13
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> DY547 dye modified
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> 2'OMe modified
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> Phosphorothioate linkage
<220><221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 2'OMe modified
<220><221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 2'OMe modified
<220><221> misc_feature
<222> (12)..(13)

<223> 2'OMe modified
<400> 179

agguggaaau gaa

13

<210> 180
<211> 13
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide
<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> DY547 dye modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'OMe modified
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 2'OMe modified
 <400> 180
 agguggaaaau gaa
 <210> 181
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage

13

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 181
 uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 182
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

<223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 182

uucauuucca ccuugccca a

21

<210> 183
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'fluoro modified

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified

<220

><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'fluoro modified

<400> 183

uucauuucca ccuuugccca a

21

<210> 184

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'Phosphate modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (7)..(7)
 <223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)

 <223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 184
 uucauuucca ccuuugccca a

<210> 185
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)

 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)

<223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223
 > 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Deoxyribose modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Isobutyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223
 > 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)

<223> 5-methyl modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'fluoro modified
 <400> 185
 uucauuucca ccuuugccca a
 <210> 186
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'Phosphate modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'OMe modified
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'fluoro modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> 2'OMe modified
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)

21

<223> 2'OMe modified

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'fluoro modified

<400

> 186

uucauuucca ccuuugccca a

21