



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0023427
(43) 공개일자 2020년03월04일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12N 15/113</i> (2010.01) <i>A61K 31/7125</i> (2006.01)
<i>A61P 1/16</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12N 15/113</i> (2013.01)
<i>A61K 31/7125</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7002542</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2018년06월29일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년01월28일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2018/040410</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2019/006375
국제공개일자 2019년01월03일</p> <p>(30) 우선권주장
62/526,971 2017년06월29일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
다이서나 파마수이티컬, 인크.
미국, 메사추세츠주 02140, 캠프릿지, 캠프릿지파크
드라이브 87</p> <p>(72) 발명자
아브람스, 마르크
미국 02140 메사추세츠주 캠프릿지 캠프릿지파크
드라이브 87
초프다, 기리쉬
미국 02140 메사추세츠주 캠프릿지 캠프릿지파크
드라이브 87
박, 지혜
미국 02140 메사추세츠주 캠프릿지 캠프릿지파크
드라이브 87</p> <p>(74) 대리인
양영준, 이상남</p> |
|---|---|

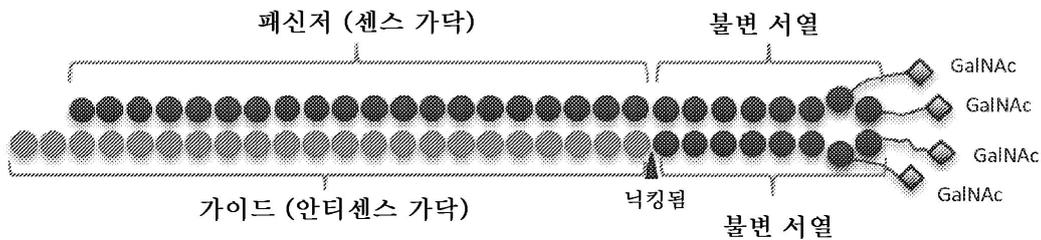
전체 청구항 수 : 총 82 항

(54) 발명의 명칭 **HMGB1 발현을 억제하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 개시내용은 특히 간세포에서 HMGB1 발현을 감소시키는데 유용한 올리고뉴클레오티드, 조성물 및 방법에 관한 것이다. HMGB1 발현의 감소를 위해 개시된 올리고뉴클레오티드는 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있고, 개선된 특징, 예컨대 뉴클레아제에 대해 더 강력한 내성 및 더 낮은 면역원성을 위해 변형될 수 있다. HMGB1 발현의 감소를 위해 개시된 올리고뉴클레오티드는 또한 특정한 세포 또는 장기, 예컨대 간의 간세포를 표적화하기 위해 표적화 리간드를 포함하도록 설계될 수 있고, 간 섬유증 및 관련 상태의 치료를 위해 사용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61P 1/16 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함하는, HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드이며, 여기서 안티센스 가닥은 서열식별번호: 374-381, 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열의 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드에 대해 상보성인, HMGB1에 대한 상보성 영역을 갖는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 안티센스 가닥이 19 내지 27개 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 안티센스 가닥이 21 내지 27개 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상보성 영역이 서열식별번호: 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열의 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드에 대해 상보성인 올리고뉴클레오티드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 15 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 추가로 포함하며, 센스 가닥이 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 6

제5항에 있어서, 센스 가닥이 19 내지 50개 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 듀플렉스 영역이 적어도 19개 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, HMGB1에 대한 상보성 영역이 서열식별번호:374-381에 제시된 서열의 적어도 19개의 인접한 뉴클레오티드에 대해 상보성인 올리고뉴클레오티드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, HMGB1에 대한 상보성 영역이 서열식별번호: 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열의 적어도 19개의 인접한 뉴클레오티드에 대해 상보성인 올리고뉴클레오티드.

청구항 10

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 193-272 또는 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 11

제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 204, 211, 364 또는 365에 제시된 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 12

제10항에 있어서, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 273-362 또는 366-370 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하

는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 13

제11항에 있어서, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 286, 367, 369 또는 370 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 14

제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 가닥이 그의 3'-말단에서 S₁-L-S₂로 제시된 스템-루프를 포함하고, S₁이 S₂에 대해 상보성이고, L이 S₁과 S₂ 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 15

안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함하는, HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드이며, 여기서 안티센스 가닥은 21 내지 27개 뉴클레오티드 길이를 갖고, HMGB1에 대한 상보성 영역을 가지며, 센스 가닥은 그의 3'-말단에서 S₁-L-S₂로 제시된 스템-루프를 포함하고, S₁은 S₂에 대해 상보성이고, L은 S₁과 S₂ 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 가닥 및 센스 가닥이 적어도 19개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 구조체를 형성하지만 공유적으로 연결되지 않은 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 16

제15항에 있어서, 상보성 영역이 HMGB1 mRNA의 적어도 19개의 인접한 뉴클레오티드에 대해 상보성인 올리고뉴클레오티드.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, L이 테트라루프인 올리고뉴클레오티드.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, L이 4개 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, L이 GAAA로 제시된 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 20

제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥이 27개 뉴클레오티드 길이이고, 센스 가닥이 25개 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드.

청구항 21

제20항에 있어서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥이 25개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 영역을 형성하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 22

제21항에 있어서, 안티센스 가닥 상에 2개 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 추가로 포함하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 23

제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 각각 21 내지 23개 범위의 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 24

제23항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 19 내지 21개 범위의 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 구조체를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 1개 이상의 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 포함하고, 3'-오버행 서열이 안티센스 가닥, 센스 가닥, 또는 안티센스 가닥 및 센스 가닥 상에 존재하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 27

제26항에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 2'-변형을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 28

제27항에 있어서, 2'-변형이 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-0-메틸, 2'-0-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산으로부터 선택된 변형인 올리고뉴클레오티드.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드가 변형된 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 31

제30항에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결이 포스포로티오에이트 연결인 올리고뉴클레오티드.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥의 5' 뉴클레오티드의 당의 4'-탄소가 포스페이트 유사체를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 33

제36항에 있어서, 포스페이트 유사체가 옥시메틸포스포네이트, 비닐포스포네이트, 또는 말로닐포스포네이트인 올리고뉴클레오티드.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 1개의 뉴클레오티드가 1개 이상의 표적화 리간드에 접합된 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 35

제34항에 있어서, 각각의 표적화 리간드가 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드 또는 지질을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 36

제35항에 있어서, 각각의 표적화 리간드가 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 37

제36항에 있어서, GalNAc 모이어티가 1가 GalNAc 모이어티, 2가 GalNAc 모이어티, 3가 GalNAc 모이어티, 또는 4가 GalNAc 모이어티인 올리고뉴클레오티드.

청구항 38

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 스템-루프의 L의 4개 이하의 뉴클레오티드 각각이 1가 GalNAc 모이어티에 접합된 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 39

제34항에 있어서, 표적화 리간드가 압타머를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 및 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 41

제40항의 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에게 올리고뉴클레오티드를 전달하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 대상체가 간 섬유증을 갖거나 또는 가질 위험이 있는 것인 방법.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, HMGB1 단백질의 발현이 대상체에게 올리고뉴클레오티드를 투여함으로써 감소되는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 대상체가 담즙정체성 또는 자가면역 간 질환을 갖는 것인 방법.

청구항 45

간 섬유증을 갖거나 또는 가질 위험이 있는 대상체에게 HMGB1의 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것을 포함하는, 간 섬유증을 갖거나 또는 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 대상체가 담즙정체성 또는 자가면역 간 질환을 갖는 것인 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 대상체가 비알콜성 지방간염 (NASH)을 갖는 것인 방법.

청구항 48

제45항에 있어서, 대상체가 간독성제에 노출되기 전에 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것인 방법.

청구항 49

제45항에 있어서, 대상체가 간독성제에 노출된 후에 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것인 방법.

청구항 50

제45항에 있어서, 대상체가 간독성제에 노출되는 것과 동시에 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것인 방법.

청구항 51

비알콜성 지방간염 (NASH)을 갖거나 또는 가질 위험이 있는 대상체에게 대상체에서 HMGB1의 발현을 감소시키는 RNAi 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것을 포함하는, 비알콜성 지방간염 (NASH)을 갖거나 또는 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 52

제41항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 간 HMGB1 수준에서의 감소를 일으키는 것인 방법.

청구항 53

제41항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 혈청 HMGB1 수준에서의 감소를 일으키는 것인 방법.

청구항 54

15 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥 및 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함하는, HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드이며, 여기서 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하고, 센스 가닥은 서열식별번호: 1-96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 97-192로부터 선택된 상보성 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 55

제54항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 1-96 중 어느 하나에 제시된 서열로 이루어지는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 56

제54항 또는 제55항에 있어서, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 97-192로부터 선택된 상보성 서열로 이루어지는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 57

15 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥 및 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함하는, HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드이며, 여기서 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하고, 센스 가닥은 서열식별번호: 193-272 또는 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 273-362 또는 366-370으로부터 선택된 상보성 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 58

제57항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 193-272 또는 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열로 이루어지는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 273-362 또는 366-370으로부터 선택된 상보성 서열로 이루어지는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 60

15 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥 및 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함하는, HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드이며, 여기서 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하고, 센스 가닥은 서열식별번호: 204, 211, 364, 365 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 286, 367, 369, 370으로부터 선택된 상보성 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 61

제60항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 204에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥이 서열식별번호:

286에 제시된 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 62

제60항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 211에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 367에 제시된 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 63

제60항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 364에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 369에 제시된 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 64

제60항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 365에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 370에 제시된 서열을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 65

제60항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 204에 제시된 서열로 이루어지고, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 286에 제시된 서열로 이루어지는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 66

제60항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 211에 제시된 서열로 이루어지고, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 367에 제시된 서열로 이루어지는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 67

제60항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 364에 제시된 서열로 이루어지고, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 369에 제시된 서열로 이루어지는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 68

제60항에 있어서, 센스 가닥이 서열식별번호: 365에 제시된 서열로 이루어지고, 안티센스 가닥이 서열식별번호: 370에 제시된 서열로 이루어지는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 69

표 7의 열로부터 선택된 센스 및 안티센스 가닥의 쌍을 포함하는, HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드.

청구항 70

제54항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 71

제70항에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 2'-변형을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 72

제71항에 있어서, 2'-변형이 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-0-메틸, 2'-0-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산으로부터 선택된 변형인 올리고뉴클레오티드.

청구항 73

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드에서 모든 뉴클레오티드가 변형된 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 74

제54항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 75

제74항에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결이 포스포로티오에이트 연결인 올리고뉴클레오티드.

청구항 76

제54항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오티드의 당의 4'-탄소가 포스페이트 유사체를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 77

제76항에 있어서, 포스페이트 유사체가 옥시메틸포스포네이트, 비닐포스포네이트, 또는 말로닐포스포네이트인 올리고뉴클레오티드.

청구항 78

제54항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 1개의 뉴클레오티드가 1개 이상의 표적화 리간드에 접합된 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 79

제78항에 있어서, 각각의 표적화 리간드가 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드 또는 지질을 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 80

제79항에 있어서, 각각의 표적화 리간드가 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 81

제80항에 있어서, GalNAc 모이어티가 1가 GalNAc 모이어티, 2가 GalNAc 모이어티, 3가 GalNAc 모이어티, 또는 4가 GalNAc 모이어티인 올리고뉴클레오티드.

청구항 82

제80항 또는 제81항에 있어서, 스템-루프의 L의 4개 이하의 뉴클레오티드 각각이 1가 GalNAc 모이어티에 접합된 것인 올리고뉴클레오티드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 하에 2017년 6월 29일에 출원한, "HMGB1 발현을 억제하기 위한 조성물 및 방법"의 명칭을 갖는 미국 가출원 일련 번호 62/526,971을 우선권으로 주장하며, 그의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 출원은 올리고뉴클레오티드 및 그의 용도, 특히 섬유증을 수반하는 상태의 치료와 관련된 용도에 관한 것이다.

[0005] **서열 목록에 대한 참고**

[0006] 본 출원은 전자 방식으로 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 2018년 6월 28일에 생성된

D0800.70002W000-SEQ.txt의 명칭을 갖는 85 킬로바이트 크기의 파일로서 제공된다. 서열 목록의 전자 방식에 대한 정보는 그의 전체가 본원에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0007]

조직 섬유증은 반흔을 일으키고 만성 장기 손상을 촉진시키는 세포외 매트릭스 및 염증성 인자의 비정상적인 축적을 특징으로 하는 상태이다. 간에서, 섬유증은 간경변 및 간세포암을 초래할 수 있는 간 손상에 대한 다세포 반응이다. 상기 반응은 종종 알콜 남용, 바이러스성 감염, 대사성 질환, 및 간 질환, 예컨대 담즙정체성 간 질환, 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD) 및 비알콜성 지방간염 (NASH)과 같은 상태와 연관된 간 손상에 의해 촉발된다. 연구는 고이동성 그룹 박스 1 (HMGB1) 단백질이 간 섬유증에서 전섬유증 역할을 갖는다고 암시하였다. (예를 들어, Li L-C, *et al.*, Emerging role of HMGB1 in fibrotic diseases, *J. Cell. Mol. Med.* Vol 18, No 12, 2014 pp. 2331-2339 참고) HMGB1은 전염증성 매개인자로서 기능하는 손상된 세포로부터 방출된 핵 단백질이며, 간 정상 세포 및 간 내피 세포를 간 손상 부위로 동원하는 것으로 확인되었다. (Seo, YS, *et al.*, HMGB1 recruits hepatic stellate cells and liver endothelial cells to sites of ethanol-induced parenchymal cell injury, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305: G838-G848, 2013.) 간 정상 세포는 간에서 섬유형성 활성을 촉진시키는 증식성 근섬유모세포로의 형질전환을 통해 간 섬유증의 진행에서 중심적인 역할을 하는 것으로 믿어진다. (Kao YH, *et al.* High-mobility group box 1 protein activates hepatic stellate cells in vitro. *Transplant Proc.* 2008; 40: 2704-5 참고)

발명의 내용

[0008]

본 개시내용의 측면은 대상체에서 섬유증 (예를 들어, 간 섬유증)을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 강력한 RNAi 올리고뉴클레오티드가 HMGB1 발현을 선택적으로 억제하기 위해 개발되었다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 RNAi 올리고뉴클레오티드는 특히 간세포에서 HMGB1 발현을 감소시키고, 이로써 섬유증을 감소시키거나 또는 예방하는데 유용하다 (예를 들어, 실시예 2-4; 도 14a-c, 17a-d, 19 및 22-27 참고). 일부 실시양태에서, 니킹된(nicked) 테트라루프 구조를 포함하는 RNAi 올리고뉴클레오티드를 GalNAc 모이어티에 접합시켜 (간세포의 표면 상에서 주로 발현되는 아시알로당단백질 수용체와의 상호작용을 통해) 간세포로의 전달을 용이하게 하여, 간 섬유증의 치료를 위해 HMGB1 발현을 억제한다. 일부 실시양태에서, 간 상태, 예를 들어 담즙정체성 간 질환, 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD) 및 비알콜성 지방간염 (NASH)을 갖거나 또는 가진 것으로 의심되는 대상체를 치료하기 위해 RNAi 올리고뉴클레오티드의 사용을 수반하는 방법이 본원에 제공된다. 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 특히 올리고뉴클레오티드-기반 접근법을 이용하여 표적화할 수 있는 HMGB1 mRNA의 핵심 영역 (핫스팟으로 지칭됨)의 식별을 기반으로 한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 섬유증을 치료하기 위해 HMGB1 발현을 억제하도록 이들 mRNA 핫스팟을 표적화하는 올리고뉴클레오티드가 개발되었다.

[0009]

본 개시내용의 한 측면은 HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 97-192, 273-362 및 366-370 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 97-192, 273-362 및 366-370 중 어느 하나에 제시된 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 273-362 및 366-370 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 286, 367, 369 또는 370에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 1-96, 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 센스 가닥을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 1-96, 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 204, 211, 364, 365에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0010]

본 개시내용의 한 측면은 HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 374-381 중 어느 하나에 제시된 HMGB1의 표적 서열에 대한 상보성 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21 또는 적어도 22 개의 인접한 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 HMGB1의 표적 서열에 대해 완전히 상보성이다. 일부 실시양태에서, HMGB1에 대한 상보성 영역은 적어도 19개의 인접한 뉴클레오티드 길이이다.

- [0011] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 19 내지 27개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 21 내지 27개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 15 내지 40개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 추가로 포함하고, 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 19 내지 40개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 27개 뉴클레오티드 길이이고, 센스 가닥은 25개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스 영역은 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20 또는 적어도 21개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 25개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 영역을 형성한다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 각각 21 내지 23개 범위의 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 19 내지 21개 범위의 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 구조체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 1개 이상의 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 포함하고, 3'-오버행 서열은 안티센스 가닥, 센스 가닥, 또는 안티센스 가닥 및 센스 가닥 상에 존재한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥 상에 2개 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 2개 뉴클레오티드 길이의 3'-오버행 서열을 포함하고, 3'-오버행 서열은 안티센스 가닥 상에 존재하고, 센스 가닥은 21개 뉴클레오티드 길이이고, 안티센스 가닥은 23개 뉴클레오티드 길이이며, 따라서 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 21개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스를 형성한다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 1-96, 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 1-96, 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 97-192, 273-362 및 366-370 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 97-192, 273-362 및 366-370 중 어느 하나에 제시된 서열로 이루어진다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 그의 3'-말단에서 S_1 -L- S_2 로 제시된 스템-루프를 포함하고, S_1 은 S_2 에 대해 상보성이고, L은 S_1 과 S_2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성한다.
- [0015] 본 개시내용의 또 다른 측면은 HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 안티센스 가닥 및 센스 가닥을 포함하고, 안티센스 가닥은 21 내지 27개 뉴클레오티드 길이이고 HMGB1에 대한 상보성 영역을 갖고, 센스 가닥은 그의 3'-말단에서 S_1 -L- S_2 로 제시된 스템-루프를 포함하고, S_1 은 S_2 에 대해 상보성이고, L은 S_1 과 S_2 사이에 3 내지 5개 뉴클레오티드 길이의 루프를 형성하고, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 적어도 19개 뉴클레오티드 길이의 듀플렉스 구조체를 형성하지만 공유적으로 연결되지는 않는다 (예를 들어, 도 2를 참고). 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 HMGB1 mRNA의 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20 또는 적어도 21개의 인접한 뉴클레오티드에 대해 완전히 상보성이다. 일부 실시양태에서, L은 테트라루프이다. 일부 실시양태에서, L은 4개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, L은 GAAA로 제시된 서열을 포함한다.
- [0016] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 2'-변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2'-변형은 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로- β -d-아라비노핵산으로부터 선택된 변형이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드는 변형된다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오티드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체이다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트, 비닐포스포네이트, 또는 말로닐포스포네이트이다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 1개의 뉴클레오티드는 1개 이상의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 각각의 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드, 또는 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 표적화 리간드는 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, GalNAc 모이어티는 1가 GalNAc 모이어티, 2가 GalNAc 모이어티, 3가 GalNAc 모이어티, 또는 4가 GalNAc 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 스템-루프의 L의 4개 이하의 뉴클레오티드 각각은 1가 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 압타머를 포함한다.

- [0019] 본 개시내용의 또 다른 측면은 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드 및 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 개시내용의 또 다른 측면은 본 개시내용의 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 간 섬유증의 감소된 수준 또는 예방을 일으킨다. 일부 실시양태에서, HMGB1 단백질의 발현은 대상체에게 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드를 투여함으로써 감소된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 담즙정체성 또는 자가면역 간 질환을 갖는다.
- [0020] 본 개시내용의 또 다른 측면은 간 섬유증을 갖거나 또는 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 대상체에게 HMGB1의 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 담즙정체성 또는 자가면역 간 질환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비알콜성 지방간염 (NASH)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 올리고뉴클레오티드는 RNAi 올리고뉴클레오티드이다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 대상체가 간독성제에 노출되기 전에 올리고뉴클레오티드를 투여한다. 일부 실시양태에서, 대상체가 간독성제에 노출된 후에 올리고뉴클레오티드를 투여한다. 일부 실시양태에서, 대상체가 간독성제에 노출되는 것과 동시에 올리고뉴클레오티드를 투여한다.
- [0022] 본 개시내용의 또 다른 측면은 비알콜성 지방간염 (NASH)을 갖거나 또는 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에서 HMGB1의 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오티드를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드의 투여는 간 HMGB1 수준에서의 감소를 일으킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드의 투여는 혈청 HMGB1 수준에서의 감소를 일으킨다.
- [0024] 본 개시내용의 또 다른 측면은 HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 15 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥 및 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하고, 센스 가닥은 서열식별번호: 1-96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 97-192로부터 선택된 상보성 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 1-96 중 어느 하나에 제시된 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 97-192로부터 선택된 상보성 서열로 이루어진다.
- [0025] 본 개시내용의 또 다른 측면은 HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 15 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥 및 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하고, 센스 가닥은 서열식별번호: 193-272 또는 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 273-362 또는 366-370으로부터 선택된 상보성 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 193-272 또는 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 273-362 또는 366-370으로부터 선택된 상보성 서열로 이루어진다.
- [0026] 본 개시내용의 또 다른 측면은 HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 15 내지 50개 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥 및 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함하고, 센스 가닥은 안티센스 가닥과 듀플렉스 영역을 형성하고, 센스 가닥은 서열식별번호: 204, 211, 364, 365 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 286, 367, 369, 370으로부터 선택된 상보성 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 204에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 286에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 211에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 367에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 364에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 369에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 365에 제시된 서열을 포함하고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 370에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 204에 제시된 서열로 이루어지고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 286에 제시된 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 211에 제시된 서열로 이루어지고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 367에 제시된 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 364에 제시된 서열로 이루어지고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 369에 제시된 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 서열식별번호: 365에 제시된 서열로 이루어지고, 안티센스 가닥은 서열식별번호: 370에 제시된 서열로 이루어진다.

[0027]

본 개시내용의 또 다른 측면은 HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 올리고뉴클레오티드는 표 7의 열로부터 선택된 센스 및 안티센스 가닥의 쌍을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 2'-변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2'-변형은 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-테옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산으로부터 선택된 변형이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드에서 모든 뉴클레오티드는 변형된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 5'-뉴클레오티드의 당의 4'-탄소는 포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트, 비닐포스포네이트, 또는 말로닐포스포네이트이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 1개의 뉴클레오티드는 1개 이상의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 각각의 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드 또는 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 표적화 리간드는 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, GalNAc 모이어티는 1가 GalNAc 모이어티, 2가 GalNAc 모이어티, 3가 GalNAc 모이어티, 또는 4가 GalNAc 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스템-루프의 L의 4개 이하의 뉴클레오티드 각각은 1가 GalNAc 모이어티에 접합된다.

도면의 간단한 설명

[0028]

본 명세서의 일부로 포함되고 그를 구성하는 첨부된 도면은 특정 실시양태를 설명하고, 서면 명세서와 함께 본원에 개시된 조성물 및 방법의 특정한 측면의 비제한적인 예를 제공하는 역할을 한다.

도 1은 세포 및 동물 모델에서 시험하기 위한 화합물을 선택하고, HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 이중-가닥 올리고뉴클레오티드를 개발하기 위해 사용되는 실험 설계를 도시하는 흐름도이다. SAR: 구조-활성 관계.

도 2는 4개의 GalNAc 모이어티 (분자의 우측에 있는 다이아몬드)에 접합된 닉킹된 테트라루프 구조를 갖는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 비제한적인 예를 도시하는 개략도이다.

도 3a-3d는 Hepa1-6 세포에서 96개 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 1 상 스크리닝 이후에 남아있는 HMGB1 mRNA의 백분율을 도시하는 일련의 그래프이다. "Mm HMGB1 533-646"은 마우스 mRNA 상에서 5' RT-PCR 부위의 위치를 나타내고, "Mm HMGB1 1541-1675"는 3' RT-PCR 부위의 위치를 나타낸다.

도 4는 Hepa1-6 세포에서 3가지 상이한 농도 (1 nM, 0.1nM 및 0.01nM)의 96개 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 HMGB1 올리고뉴클레오티드 2 상 스크리닝 이후에 남아있는 mRNA의 백분율을 도시하는 그래프이다 (3' 검정).

도 5는 상이한 변형 패턴에 맞춰진, 닉킹된 테트라루프 구조의 상이한 염기 서열의 HMGB1 올리고뉴클레오티드, 및 비변형된 대조군을 사용하는 Hepa1-6 세포에서의 스크리닝 결과를 도시하는 그래프이다.

도 6은 Hepa1-6 세포에서 용량 반응 곡선 스크리닝으로부터 선택된 6개의 HMGB1 올리고뉴클레오티드에 대한 IC₅₀ 결과를 도시하는 그래프이다.

도 7은 C57BL/6에서 10 mg/kg (mpk)의 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드를 피하 투여한지 72 시간 후에 간에 남아있는 HPRT mRNA의 양과 비교한 HMGB1 mRNA의 양을 도시하는 그래프이다.

도 8은 닉킹된 테트라루프 구조의 3개의 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 생체내 활성 평가를 도시하는 그래프이다. LNP 제형화된 올리고뉴클레오티드를 3가지 상이한 용량 (0.3 mg/kg, 1 mg/kg 및 3 mg/kg)으로 마우스에게 정맥내로 투여하였다. 데이터는 PBS 대조군 처리에 대해 정규화된, 투여한지 24 시간 후에 남아있는 HMGB1 mRNA의 양을 도시한다.

도 9는 닉킹된 테트라루프 구조의 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 생체내 활성 평가를 도시하는 그래프이다. 2개의 상이한 올리고뉴클레오티드 서열을 4가지 상이한 올리고뉴클레오티드 변형 패턴 (상이한 배열의 2'-플루오로 및 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오티드, 포스포로티오에이트 연결을 함유하는 M49, M54, M55, M56으로 지정되고, 그들의 안티센스 가닥의 5' 말단 뉴클레오티드에 위치하는 포스페이트 유사체를 포함함)으로 시험하였다. 올리고뉴클레오티드를 2가지 상이한 용량 (3 mg/kg 및 10 mg/kg)으로 마우스에게 피하 투여하였다. 데이터는 PBS 대조군 처리에 대해 정규화된, 투여한지 24 시간 후에 남아있는 HMGB1 mRNA의 양을 도시한다.

도 10은 닉킹된 테트라루프 구조의 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 생체내 활성 평가를 도시하는 그래프이다. 상이한 올리고뉴클레오티드 서열을 4가지 상이한 올리고뉴클레오티드 변형 패턴 (M49, M51, M53,

M57로 지정됨)으로 시험하였다. 올리고뉴클레오타이드를 3 mg/kg으로 마우스에게 피하 투여하였다. 데이터는 PBS 대조군 처리에 대해 정규화된, 투여한지 72 시간 후에 남아있는 HMGB1 mRNA의 양을 도시한다.

도 11은 닉킹된 테트라루프 구조의 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드의 생체내 활성 평가를 도시하는 그래프이다. 2개의 상이한 올리고뉴클레오타이드 서열을 상이한 변형 패턴 (M29, M49 및 M50으로 지정됨)으로 시험하였다. 인간, 레수스 및 마우스 서열 ("삼중 공통" 서열)에서 알고리즘에 의해 확인된 보존된 서열에 결합하도록 HMGB1 올리고뉴클레오타이드를 설계하였다. 데이터는 1 mg/kg의 피하 투여 이후 5 일째에 남아있는 (PBS 대조군 처리에 대해 정규화된) HMGB1 mRNA의 양을 도시한다.

도 12는 C57BL/6 수컷 마우스 (10 내지 11 주령)를 이용하여 APAP-유도된 간 손상에 대한 실험 모델의 흐름도를 도시하는 개략도이다. 이 모델에서, 마우스에게 12 시간의 금식 기간 이후에 350 또는 250 mg/kg APAP의 복강내 주사를 제공하였다. 혈액 및/또는 조직 샘플을 6, 24 및 48 시간째에 수집하였다.

도 13a-13b는 350 mg/kg APAP 주사, 및 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드, LNP 제형화된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS 대조군으로 처리한 후에 마우스에 남아있는 (Hprt1 mRNA에 대해 정규화된) HMGB1 mRNA의 백분율을 도시하는 그래프의 집합이다. 도 13a는 간 HMGB1 발현을 도시하고, 도 13b는 혈청 HMGB1 발현을 도시한다. 식염수-주사된 동물을 대조군으로 사용하였다. 도 13a-13b에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드는 S212-AS296-M49이다.

도 14a-14c는 350 mg/kg APAP 주사, 및 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드, LNP 제형화된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS 대조군으로 처리한 후에 마우스에서 HMGB1 처리후 AST, ALT 및 혈청 miR122 발현을 도시하는 일련의 그래프이다. 식염수-주사된 동물을 대조군으로 사용하였다. 도 14a-14c에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드는 S212-AS296-M49이다.

도 15는 APAP-유도된 간 손상에 대한 실험 모델의 흐름도를 도시하는 개략도이다. 이 동물 모델에서, 동물을 5 mg/kg의 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드의 5회 용량 또는 1.5 mg/kg의 LNP 제형화된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드의 2회 용량으로 처리하였다. 올리고뉴클레오타이드의 2 주 투여 기간 및 12 시간의 금식 기간 이후에, 마우스에게 0.9% NaCl 중 350 mg/kg APAP의 복강내 (I.P.) 주사를 제공하였다. APAP 주사를 투여한지 1 일 (24 시간) 후에, 조직 및/또는 혈액 샘플을 수확하였다.

도 16a-16b는 350 mg/kg APAP 주사, 및 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드, LNP 제형화된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS 대조군으로 처리한 후에 마우스의 간 또는 혈청에 남아있는 HMGB1 mRNA의 백분율을 도시하는 그래프이다. 도 16a는 간 HMGB1 발현을 도시하고, 도 16b는 혈청 HMGB1 발현을 도시한다. 식염수-주사된 동물을 대조군으로 사용하였다. 도 16a-16b에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드는 S212-AS296-M56이다.

도 17a-17d는 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드, LNP 제형화된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS 대조군으로 처리한 후에 350 mg/kg APAP 처리한 동물에서 ALT (도 17a), AST (도 20b), LDH (도 20c) 및 miR122 발현 (도 17d)을 도시하는 일련의 그래프이다. 식염수-주사된 동물을 대조군으로 사용하였다. 도 17a-17d에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드는 S212-AS296-M56이다.

도 18은 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드 투여 레지멘에 의해 항-섬유증 활성에 대한 사염화탄소 (CCl₄) 모델의 흐름도를 도시하는 개략도이다.

도 19는 5 또는 7 주마다 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드의 5 mg/kg의 피하 투여 또는 PBS 대조군으로 처리한 후에 항-섬유증 활성에 대한 CCl₄ 모델에서 시리우스 레드(Sirius Red) 상대 평균 강도 수준의 그래프이다. 도 19에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드는 S212-AS296-M49이다.

도 20은 5 또는 7 주마다 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드의 5 mg/kg의 피하 투여 또는 PBS 대조군으로 처리한 후에 항-섬유증 활성에 대한 CCl₄ 모델에서 알파-평활근 액틴 상대 평균 강도 수준의 그래프이다. 도 20에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드는 S212-AS296-M49이다.

도 21은 5 또는 7 주마다 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드의 5 mg/kg의 피하 투여 또는 PBS 대조군으로 처리한 후에 항-섬유증 활성에 대한 CCl₄ 모델에서 간 중량 대 체중 비의 그래프이다. 도 21에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드는 S212-AS296-M49이다.

도 22는 5 또는 7 주마다 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드의 5 mg/kg의 피하 투여 또는 PBS 대조군으로

처리한 후에 항-섬유증 활성에 대한 CCl_4 모델에서 F4/80+ 면적의 그래프이다. 도 22에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 S212-AS296-M49이다.

도 23은 5 mg/kg 피하 투여의 테트라루프 구조의 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 또는 2.5 mg/kg 정맥 내 용량의 테트라루프 구조의 LNP-제형화된 올리고뉴클레오티드로 처리한지 43 일 후에 항-섬유증 활성에 대한 CCl_4 모델에서 시리우스 레드 상대 평균 강도 수준의 그래프이다. PBS-처리된 동물 및 CCl_4 로 처리되지 않은 동물을 대조군으로 사용하였다. 도 23에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 S212-AS296-M49이다.

도 24는 실험 설계의 기본 개요를 도시하는 차트와 함께 마우스에서 콘카발린(Concavalin) A 유도된 간염 모델에 대한 흐름도를 도시하는 개략도이다.

도 25는 마우스에서 유도된 간염의 콘카발린 A 모델에서 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 처리의 결과를 입증하는 일련의 사진이다. PBS 대조군으로 처리된 마우스로부터의 데이터는 좌측에 도시된다. 10 mg/kg 피하 투여의 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드로 처리된 마우스로부터의 데이터는 우측에 도시한다. 도 25에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 S212-AS296-M49이다.

도 26a-26d는 PBS 대조군 처리와 비교하여 콜린-결핍성 아미노산-한정된 고지방 식이 (CDAHFD) 또는 대조군 고지방 식이 (HFD)에 대해 마우스에서 HMGB1 (도 26a 및 26b), Col1a1 (도 26c) 및 비멘틴 (도 26d) mRNA 수준에 대한 피하 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 처리의 결과를 입증하는 일련의 그래프이다. 도 26a-26d에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 S194-AS274-M30이다.

도 27은 PBS 대조군 처리와 비교하여 콜린-결핍성 아미노산-한정된 고지방 식이 (CDAHFD) 또는 대조군 고지방 식이 (HFD)에 대해 마우스에서 ALT 및 AST 수준에 대한 피하 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 처리의 결과를 입증하는 그래프의 집합이다. 도 27에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 S194-AS274-M30이다.

도 28은 1mg/kg의 피하 투여 이후 5 일째에 3가지 상이한 변형 패턴을 갖는 8가지 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 생체내 활성 평가를 도시하는 그래프이다. PBS로 처리된 마우스에서 남아있는 HMGB1 mRNA 수준에 대해 정규화된, 올리고뉴클레오티드를 투여한지 5 일 후에 간에 남아있는 HMGB1 mRNA의 백분율이 도시된다. 결과는 상이한 화학적 변형 패턴을 갖는 시험한 모든 HMGB1 올리고뉴클레오티드가 마우스 간세포에서 HMGB1을 녹다운시키는데 효능이 있음을 나타낸다.

도 29a-29b는 3가지 상이한 용량 (1, 0.5 또는 0.25 mg/kg)으로 8가지 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 생체내 활성 평가를 도시하는 그래프이다. PBS로 처리된 마우스에서 남아있는 HMGB1 mRNA 수준에 대해 정규화된, 올리고뉴클레오티드를 투여한지 5 일 후에 간에 남아있는 HMGB1 mRNA의 백분율을 5' qPCR 반응 (도 29a) 또는 3' qPCR 반응 (도 29b)으로 평가하였다. 결과는 시험한 모든 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 효능이 용량-의존성임을 나타낸다.

도 30a-30d는 4가지 상이한 시점에서 3가지 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 생체내 활성 평가를 도시하는 그래프이다. 데이터는 올리고뉴클레오티드의 투여후 7, 14, 21 또는 28 일째에 (PBS로 처리된 마우스에서 남아있는 HMGB1 mRNA 수준에 대해 정규화된) 남아있는 HMGB1 mRNA의 양을 도시한다. 도 30a 및 30b는 5' qPCR 반응의 결과를 도시한다. 도 30c 및 30d는 3' qPCR 반응의 결과를 도시한다. 결과는 시험한 모든 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드가 주사한지 3 주 후에 HMGB1을 녹다운시키는데 효능이 있었음을 나타내었다.

도 31a-31b는 3가지 상이한 용량 (1, 0.5, 또는 0.25 mg/kg)으로 4가지 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 생체내 활성 평가를 도시하는 그래프이다. PBS로 처리된 마우스에서 남아있는 HMGB1 mRNA 수준에 대해 정규화된, 올리고뉴클레오티드를 투여한지 5 일 후에 간에 남아있는 HMGB1 mRNA의 백분율을 5' qPCR 반응 (도 31a) 또는 3' qPCR 반응 (도 31b)으로 평가하였다. 시험한 모든 HMGB1 올리고뉴클레오티드 억제제는 약 0.5 내지 1.0 mg/kg의 ED_{50} (약물을 제공받은 수용자의 50%에 대해 효과적인 용량)을 나타내었다.

도 32a-32b는 피하 투여한지 21 일 후에 4가지 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 생체내 활성 평가를 도시하는 그래프이다. PBS로 처리된 마우스에서 남아있는 HMGB1 mRNA 수준에 대해 정규화된, 올리고뉴클레오티드를 투여한지 21 일 후에 간에 남아있는 HMGB1 mRNA의 백분율을 5' qPCR 반응 (도 32a) 또는 3' qPCR 반응 (도 32b)으로 평가하였다. 결과는 시험한 모든 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드가 주사한지 3 주 후에 HMGB1을 녹다운시키는 효능을 유지하였음을 나타내었다.

도 33a-33g는 일차 원숭이 간세포에서 2가지 GalNAc-접합체 HMGB1 올리고뉴클레오타이드의 흡수 및 활성을 입증하는 IC50 곡선이다. IC50 곡선은 모의 처리에 대해 정규화되었다. RhHMGB1 5' qPCR 반응에 대한 결과는 도 33a-33c에 도시되고, 3' qPCR 반응에 대한 결과는 도 33d-33f에 도시된다. GalNAc-접합체 LDHA 올리고뉴클레오타이드를 검정 대조군으로 사용하였다 (도 33c, 33f 및 33g). 남아있는 RhLDHA mRNA의 수준을 qPCR 검정에서 LDHA 특이적 프라이머에 의해 측정하였다 (도 33g).

도 34a-34g는 일차 인간 간세포에서 2가지 GalNAc-접합체 HMGB1 올리고뉴클레오타이드의 흡수 및 활성을 입증하는 IC50 곡선이다. IC50 곡선은 모의 처리에 대해 정규화하였다. hsHMGB1 5' qPCR 반응에 대한 결과는 도 34a-34c에 도시되고, 3' qPCR 반응에 대한 결과는 도 34d-34f에 도시된다. GalNAc-접합체 LDHA 올리고뉴클레오타이드를 검정 대조군으로 사용하였다 (도 34c, 34f 및 34g). 남아있는 HsLDHA mRNA의 수준을 qPCR 검정에서 LDHA 특이적 프라이머에 의해 측정하였다 (도 34g).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 일부 측면에 따라, 본 개시내용은 간 섬유증을 치료하기 위해 세포, 특히 간 세포 (예를 들어, 간세포)에서 HMGB1 발현을 감소시키는데 효율적인 올리고뉴클레오타이드 표적화 HMGB1 mRNA를 제공한다. 따라서, 관련 측면에서, 본 개시내용은 간에서 HMGB1 유전자 발현을 선택적으로 감소시키는 것을 수반하는, 섬유증을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 HMGB1 표적화 올리고뉴클레오타이드는 이들 조직에서 섬유증을 치료하기 위해 표적 조직의 선택된 세포 (예를 들어, 간의 간세포)로 전달되도록 설계된다.

[0030] 정의된 용어의 기재를 비롯하여 본 개시내용의 추가의 측면이 하기에 제공된다.

[0031] **I. 정의**

[0032] **대략적으로**: 본원에서 사용된 바와 같이, 1개 이상의 관심 값에 적용되는 용어 "대략적으로" 또는 "약"은 명시된 기준 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어 "대략적으로" 또는 "약"은 달리 명시되지 않거나 또는 문맥으로부터 명백하지 않다면 명시된 기준 값의 어느 방향으로 (초과 또는 미만) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만 내에 속하는 값의 범위를 지칭한다 (이러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 제외함).

[0033] **투여하는**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "투여하는" 또는 "투여"는 (예를 들어, 대상체에서 상태를 치료하기 위해) 약리학적으로 유용한 방식으로 대상체에게 물질 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)을 제공하는 것을 의미한다.

[0034] **아시알로당단백질 수용체 (ASGPR)**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "아시알로당단백질 수용체" 또는 "ASGPR"은 큰 48 kDa (ASGPR-1) 및 작은 40 kDa 서브유닛 (ASGPR-2)에 의해 형성된, 두 부분으로 나누어진 C-유형 렉틴을 지칭한다. ASGPR은 간세포의 동모양(sinusoidal) 표면 상에서 주로 발현되고, 말단 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기 (아시알로당단백질)를 함유하는 순환 당단백질의 결합, 내재화 및 후속적인 클리어런스에서 주요 역할을 한다.

[0035] **약화시키다**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약화시키다"는 감소시키거나 또는 효율적으로 중단시키는 것을 의미한다. 비제한적인 예로서, 본원에 제공된 치료 중 하나 이상은 대상체에서 간 섬유증 또는 간 염증의 발병 또는 진행을 감소시키거나 또는 효율적으로 중단시킬 수 있다. 이 약화는 예를 들어 간 섬유증 또는 간 염증의 하나 이상의 측면 (예를 들어, 증상, 조직 특징, 및 세포성, 염증성 또는 면역학적 활성 등)에서의 감소, 간 섬유증 또는 간 염증의 하나 이상의 측면의 검출가능한 진행 (약화) 없음, 또는 달리 예상될 수 있을 때 대상체에서 간 섬유증 또는 간 염증의 검출가능한 측면 없음에 의해 예시될 수 있다.

[0036] **상보성**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성"은 2개의 뉴클레오타이드가 서로 염기 쌍을 형성하는 것을 허용하는, (예를 들어, 2개의 대향 핵산 상에서 또는 단일 핵산 가닥의 대향 영역 상에서) 2개의 뉴클레오타이드 사이의 구조적 관계를 지칭한다. 예를 들어, 대향 핵산의 피리미딘 뉴클레오타이드에 대해 상보성인 한 핵산의 퓨린 뉴클레오타이드는 서로 수소 결합을 형성함으로써 함께 염기 쌍을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보성 뉴클레오타이드는 왓슨-크릭(Watson-Crick) 방식으로 또는 적합한 듀플렉스의 형성을 허용하는 임의의 다른 방식으로 염기 쌍을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 2개의 핵산은 상보성 영역을 형성하도록 서로 상보성인 다중 뉴클레오타이드의 영역을 가질 수 있다.

[0037] **데옥시리보뉴클레오타이드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "데옥시리보뉴클레오타이드"는 리보뉴클레오타이드와 비교하여 그의 펜토스 당의 2' 위치에서 히드록실 대신에 수소를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 변형된 데옥시

리보뉴클레오티드는 당, 포스페이트 기 또는 염기 내의 또는 그의 변형 또는 치환을 비롯하여, 2' 위치 이외에 있는 원자의 1개 이상의 변형 또는 치환을 갖는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

- [0038] **이중-가닥 올리고뉴클레오티드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이중-가닥 올리고뉴클레오티드"는 실질적으로 듀플렉스 형태인 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 듀플렉스 영역(들)의 상보성 염기-쌍 형성은 공유적으로 분리된 핵산 가닥의 뉴클레오티드의 역평행 서열 사이에 형성된다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 듀플렉스 영역(들)의 상보성 염기-쌍 형성은 공유적으로 연결된 핵산 가닥의 뉴클레오티드의 역평행 서열 사이에 형성된다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 듀플렉스 영역(들)의 상보성 염기-쌍 형성은 함께 염기 쌍을 형성하는 뉴클레오티드의 상보성 역평행 서열을 제공하기 위해 (예를 들어, 헤어핀을 통해) 폴딩된 단일 핵산 가닥으로부터 형성된다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 서로 완전히 듀플렉스화된 2개의 공유적으로 분리된 핵산 가닥을 포함한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 한쪽 또는 양쪽 말단에 오버행을 갖는 부분적으로 듀플렉스화된 2개의 공유적으로 분리된 핵산 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 부분적으로 상보성인 뉴클레오티드의 역평행 서열을 포함하고, 따라서 1개 이상의 미스매치를 가질 수 있으며, 여기에는 내부 미스매치 또는 말단 미스매치가 포함될 수 있다.
- [0039] **듀플렉스:** 본원에서 사용된 바와 같이, 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드)과 관련하여 용어 "듀플렉스"는 뉴클레오티드의 2개의 역평행 서열의 상보성 염기 쌍 형성을 통해 형성된 구조체를 지칭한다.
- [0040] **부형제:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "부형제"는 예를 들어 원하는 점조도 또는 안정화 효과를 제공하거나 또는 부여하기 위해 조성물에 포함될 수 있는 비치료적인 작용제를 지칭한다.
- [0041] **간세포:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "간세포" 또는 "간세포들"은 간의 실질 조직의 세포를 지칭한다. 이들 세포는 간 질량의 대략 70-85%를 구성하고, 혈청 알부민, 피브리노겐, 및 응고 인자의 프로트롬빈 그룹 (인자 3 및 4는 제외)을 제조한다. 간세포 계통 세포에 대한 마커에는 트랜스티레틴 (Ttr), 글루타민 신테타제 (Glu1), 간세포 핵 인자 1a (Hnf1a), 및 간세포 핵 인자 4a (Hnf4a)가 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 성숙한 간세포에 대한 마커에는 시토크롬 P450 (Cyp3a11), 푸마릴아세토아세테이트 히드롤라제 (Fah), 글루코스 6-포스페이트 (G6p), 알부민 (A1b), 및 OC2-2F8이 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, [Huch *et al.*, (2013), Nature, 494(7436): 247-250]을 참고하며, 간세포 마커와 관련된 내용은 본원에 참고로 포함된다.
- [0042] **간독성제:** 본원에서 사용된 바와 같이, "간독성제"는 간에 대해 그 자체로 독성인 화학적 화합물, 바이러스 또는 다른 물질이며, 가공되어 간에 대해 독성인 대사산물을 형성할 수 있다. 간독성제에는 사염화탄소 (CCl₄), 아세트아미노펜 (파라세타몰), 염화비닐, 비소, 클로로포름, 비스테로이드성 항염증성 약물 (예컨대 아스피린 및 페닐부타존)이 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0043] **간 염증:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "간 염증" 또는 "간염"은 간독성제에 대한 노출에 의해 초래될 수 있는 바와 같이, 특히 손상 또는 감염의 결과로서 붓고, 기능장애이고/거나 통증이 있는 신체 상태를 지칭한다. 증상에는 황달 (피부 또는 눈의 황변), 피로, 쇠약, 메스꺼움, 구토, 식욕 감소, 및 체중 손실이 포함될 수 있다. 간 염증을 치료하지 않고 방치한다면, 이는 섬유증, 간경변, 간부전 또는 간암으로 진행될 수 있다.
- [0044] **간 섬유증:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "간 섬유증" 또는 "간의 섬유증"은 염증 및 간 세포 사망으로 인해 콜라겐 (I, III 및 IV), 피브로넥틴, 우들린, 엘라스틴, 라미닌, 히알루로난 및 프로테오글리칸을 포함할 수 있는 세포외 매트릭스 단백질의 간에서의 과도한 축적을 지칭한다. 간 섬유증을 치료하지 않고 방치한다면, 이는 간경변, 간부전 또는 간암으로 진행될 수 있다.
- [0045] **루프:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "루프"는 서로 충분히 상보성인 핵산의 2개의 역평행 영역에 의해 플렉킹된 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드)의 쌍을 형성하지 않은 영역을 지칭하며, 이로써 적절한 혼성화 조건하에 (예를 들어, 포스페이트 완충제에서, 세포에서) 쌍을 형성하지 않은 영역을 플렉킹하는 2개의 역평행 영역이 혼성화하여 듀플렉스 ("스텝"으로 지칭됨)를 형성한다.
- [0046] **변형된 뉴클레오티드간 연결:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오티드간 연결"은 포스포디에스테르 결합을 포함하는 기준 뉴클레오티드간 연결과 비교하여 1개 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오티드간 연결을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 비-천연 발생 연결이다. 전형적으로, 변형된 뉴클레오티드간 연결은 변형된 뉴클레오티드간 연결이 존재하는 핵산에 하나 이상의 바람직한 성질을 부여한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드는 열 안정성, 분해에 대한 내성, 뉴클레아제 내성, 가용성, 생체이용률, 생활성,

감소된 번역원성 등을 개선시킬 수 있다.

- [0047] **변형된 뉴클레오티드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 아데닌 리보뉴클레오티드, 구아닌 리보뉴클레오티드, 시토신 리보뉴클레오티드, 우라실 리보뉴클레오티드, 아데닌 데옥시리보뉴클레오티드, 구아닌 데옥시리보뉴클레오티드, 시토신 데옥시리보뉴클레오티드 및 티미딘 데옥시리보뉴클레오티드로부터 선택된 상응하는 기준 뉴클레오티드와 비교하여 1개 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 비-천연 발생 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 그의 당, 핵염기 및/또는 포스페이트 기에서 1개 이상의 화학적 변형을 갖는다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 상응하는 기준 뉴클레오티드에 접합된 1개 이상의 화학적 모이어티를 갖는다. 전형적으로, 변형된 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드가 존재하는 핵산에 하나 이상의 바람직한 성질을 부여한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드는 열 안정성, 분해에 대한 내성, 뉴클레아제 내성, 가용성, 생체이용률, 생활성, 감소된 번역원성 등을 개선시킬 수 있다.
- [0048] **닉킹된 테트라루프 구조:** "닉킹된 테트라루프 구조"는 별개의 센스 (패신저) 및 안티센스 (가이드) 가닥의 존재를 특징으로 하는 RNAi 올리고뉴클레오티드의 구조이며, 센스 가닥은 안티센스 가닥에 대해 상보성 영역을 갖고, 가닥들 중 적어도 하나, 일반적으로 센스 가닥은 적어도 1개의 가닥 내에 형성된 인접한 스템 영역을 안정화시키도록 형성된 테트라루프를 갖는다.
- [0049] **올리고뉴클레오티드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "올리고뉴클레오티드"는 예를 들어 100개 미만의 뉴클레오티드 길이인 짧은 핵산을 지칭한다. 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 듀플렉스 영역을 가질 수 있거나 또는 갖지 않을 수 있다. 비제한적인 예의 집합으로서, 올리고뉴클레오티드는 소형 간섭 RNA (siRNA), 마이크로RNA (miRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 다이버시 기질 간섭 RNA (dsiRNA), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 짧은 siRNA, 또는 단일-가닥 siRNA일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 RNAi 올리고뉴클레오티드이다.
- [0050] **오버행:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "오버행"은 1개의 가닥 또는 영역이 함께 듀플렉스를 형성하는 상보성 가닥의 말단 너머로 연장된 1개의 가닥 또는 영역으로부터 생성된 말단의 염기 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드(들)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 오버행은 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 또는 3' 말단에서 듀플렉스 영역으로부터 연장된 쌍을 형성하지 않은 1개 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 오버행은 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 또는 센스 가닥 상의 3' 또는 5' 오버행이다.
- [0051] **포스페이트 유사체:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "포스페이트 유사체"는 포스페이트 기의 정전기적 및/또는 입체적 성질을 모방하는 화학적 모이어티를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 종종 효소적 제거에 민감한 5'-포스페이트 대신에 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 뉴클레오티드에 위치한다. 일부 실시양태에서, 5' 포스페이트 유사체는 포스포타제-내성 연결을 함유한다. 포스페이트 유사체의 예에는 5' 포스포네이트, 예컨대 5' 메틸렌포스포네이트 (5'-MP) 및 5'-(E)-비닐포스포네이트 (5'-VP)가 포함된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 5'-말단 뉴클레오티드에서 당의 4'-탄소 위치에 포스페이트 유사체 ("4'-포스페이트 유사체"로 지칭됨)를 갖는다. 4'-포스페이트 유사체의 예는 옥시메틸포스포네이트이고, 옥시메틸 기의 산소 원자는 당 모이어티 (예를 들어, 그의 4'-탄소에서) 또는 그의 유사체에 결합된다. 예를 들어, 2016년 9월 2일에 출원한 미국 가출원 번호 62/383,207, 및 2016년 9월 12일에 출원한 62/393,401을 참고하며, 포스페이트 유사체와 관련된 각각의 내용은 본원에 참고로 포함된다. 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 대해 다른 변형이 개발되었다 (예를 들어, WO 2011/133871; 미국 특허 번호 8,927,513; 및 Prakash *et al.* (2015), *Nucleic Acids Res.*, 43(6):2993-3011, 포스페이트 유사체와 관련된 각각의 내용은 본원에 참고로 포함됨).
- [0052] **감소된 발현:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 유전자의 "감소된 발현"은 적절한 기준 세포 또는 대상체와 비교하여 유전자에 의해 코딩된 RNA 전사체 또는 단백질의 양에서의 감소 및/또는 세포 또는 대상체에서 유전자 활성의 양에서의 감소를 지칭한다. 예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, HMGB1 mRNA 서열에 대해 상보성인 안티센스 가닥을 갖는 것)로 세포를 처리하는 작용은 이중-가닥 올리고뉴클레오티드로 처리하지 않은 세포와 비교하여 (예를 들어, HMGB1 유전자에 의해 코딩된) RNA 전사체, 단백질 및/또는 활성의 양에서의 감소를 일으킬 수 있다. 유사하게, 본원에서 사용된 바와 같이 "발현을 감소시키는"은 유전자 (예를 들어, HMGB1)의 감소된 발현을 일으키는 작용을 지칭한다.
- [0053] **상보성 영역:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 영역"은 적절한 혼성화 조건하에, 예를 들어 포스페이트 완충제에서, 세포 등에서 뉴클레오티드의 두 서열 사이에 혼성화를 허용하기 위해 뉴클레오티드의 역평행 서열에 대해 충분히 상보성인 핵산의 뉴클레오티드의 서열 (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드)을 지칭한다

다.

- [0054] **리보뉴클레오티드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "리보뉴클레오티드"는 그의 2' 위치에 히드록실 기를 함유하며 그의 펜토스 당으로서 리보스를 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 변형된 리보뉴클레오티드는 리보스, 포스페이트 기 또는 염기 내의 또는 그의 변형 또는 치환을 비롯하여 2' 위치 이외에 있는 원자의 1개 이상의 변형 또는 치환을 갖는 리보뉴클레오티드이다.
- [0055] **RNAi 올리고뉴클레오티드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "RNAi 올리고뉴클레오티드"는 (a) 표적 mRNA의 절단에서 안티센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 일부가 아르고너트(Argonaute) 2 (Ago2) 엔도뉴클레아제에 의해 사용되는 것인, 센스 가닥 (패신저) 및 안티센스 가닥 (가이드)을 갖는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드, 또는 (b) 표적 mRNA의 절단에서 안티센스 가닥 (또는 해당 안티센스 가닥의 일부)이 Ago2 엔도뉴클레아제에 의해 사용되는 것인, 단일 안티센스 가닥을 갖는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 지칭한다.
- [0056] **가닥**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "가닥"은 뉴클레오티드간 연결 (예를 들어, 포스포디에스테르 연결, 포스포로티오에이트 연결)을 통해 함께 연결된 뉴클레오티드의 단일 인접한 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 가닥은 2개의 유리 말단, 예를 들어 5'-말단 및 3'-말단을 갖는다.
- [0057] **대상체**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 마우스, 토끼 및 인간을 비롯한 임의의 포유류를 의미한다. 한 실시양태에서, 대상체는 인간 또는 비-인간 영장류이다. 용어 "개체" 또는 "환자"는 "대상체"와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0058] **합성**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "합성"은 (예를 들어, 기계 (예를 들어, 고체 상태 핵산 합성기)를 사용하여) 인공적으로 합성되거나 또는 분자를 정상적으로 생성하는 천연 공급원 (예를 들어, 세포 또는 유기체)으로부터 달리 유래되지 않는 핵산 또는 다른 분자를 지칭한다.
- [0059] **표적화 리간드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "표적화 리간드"는 관심 조직 또는 세포의 관련 분자 (예를 들어, 수용체)에 선택적으로 결합하고, 다른 물질을 관심 조직 또는 세포에 표적화시키기 위한 목적으로 또 다른 물질에 접합될 수 있는 분자 (예를 들어, 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 폴리펩티드 또는 지질)을 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오티드를 특이적인 관심 조직 또는 세포에 표적화시키기 위한 목적으로 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 세포 표면 수용체에 선택적으로 결합한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오티드에 접합될 때, 세포의 표면 상에서 발현된 수용체와의 선택적 결합을 통해 및 올리고뉴클레오티드, 표적화 리간드 및 수용체를 포함하는 복합체의 세포에 의한 엔도솜 내재화를 통해, 특정한 세포에게로 올리고뉴클레오티드의 전달을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 올리고뉴클레오티드가 세포에서 표적화 리간드로부터 방출되도록 세포성 내재화 이후에 또는 동안에 절단되는 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 접합된다.
- [0060] **테트라루프**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "테트라루프"는 뉴클레오티드의 플랭킹 서열의 혼성화에 의해 형성된 인접한 듀플렉스의 안정성을 증가시키는 루프를 지칭한다. 안정성에서의 증가는, 무작위로 선택된 뉴클레오티드 서열로 이루어진 비교가능한 길이를 갖는 루프의 집합으로부터 평균적으로 예상되는 인접한 스템 듀플렉스의 Tm보다 높은, 인접한 스템 듀플렉스의 융점 (Tm)에서의 증가로서 검출가능하다. 예를 들어, 테트라루프는 적어도 2개 염기 쌍 길이의 듀플렉스를 포함하는 헤어핀에 10 mM NaHPO₄ 중에서 적어도 50°C, 적어도 55°C, 적어도 56°C, 적어도 58°C, 적어도 60°C, 적어도 65°C 또는 적어도 75°C의 융점을 부여한다. 일부 실시양태에서, 테트라루프는 적층 상호작용에 의해 인접한 스템 듀플렉스에서 염기 쌍을 안정화시킬 수 있다. 또한, 테트라루프에서 뉴클레오티드 사이의 상호작용에는 비-왓슨-크릭 염기 쌍 형성, 적층 상호작용, 수소 결합, 및 접촉 상호작용이 포함되나 이에 제한되지 않는다 (Cheong *et al.*, Nature 1990 Aug. 16; 346(6285):680-2; Heus and Pardi, Science 1991 Jul. 12; 253(5016):191-4). 일부 실시양태에서, 테트라루프는 3 내지 6개 뉴클레오티드를 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 전형적으로 4 내지 5개 뉴클레오티드이다. 특정 실시양태에서, 테트라루프는 변형될 수 있거나 또는 변형되지 않을 수 있는 (예를 들어, 표적화 모이어티에 접합될 수 있거나 또는 접합되지 않을 수 있는) 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오티드를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 한 실시양태에서, 테트라루프는 4개의 뉴클레오티드로 이루어진다. 임의의 뉴클레오티드가 테트라루프에서 사용될 수 있고, 이러한 뉴클레오티드에 대한 표준 IUPAC-IUB 기호는 [Cornish-Bowden (1985) Nucl. Acids Res. 13: 3021-3030]에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다. 예를 들어, 문자 "N"은 임의의 염기가 해당 위치에 있을 수 있음을 의미하기 위해 사용될 수 있고, 문자 "R"은 A (아데닌) 또는 G (구아닌)이 해당 위치에 있을 수 있음을 나타내기 위해 사용될 수 있고, "B"는 C (시토신), G (구아닌), 또는 T (티민)이 해당 위치에 있을 수 있음을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 테트라루프의 예에는 테트라루프의 UCG 패밀리를 (예를 들어, UUCG), 테트라루프의 GNRA 패밀리를

리 (예를 들어, GAAA), 및 CUUG 테트라루프가 포함된다. (Woese *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1990 November; 87(21):8467-71; Antao *et al.*, Nucleic Acids Res. 1991 Nov. 11; 19(21):5901-5). DNA 테트라루프의 예에는 테트라루프의 d(GNNA) 패밀리 (예를 들어, d(GTTA)), 테트라루프의 d(GNRA) 패밀리, 테트라루프의 d(GNAB) 패밀리, 테트라루프의 d(CNNG) 패밀리, 및 테트라루프의 d(TNCG) 패밀리 (예를 들어, d(TTCG))가 포함된다. 예를 들어 [Nakano *et al.* Biochemistry, 41 (48), 14281-14292, 2002. SHINJI *et al.* Nippon Kagakkai Koen Yokoshu VOL. 78th; NO. 2; PAGE. 731 (2000)]을 참고하며, 그들의 관련 개시내용에 대해서는 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 테트라루프는 니킹된 테트라루프 구조 내에 함유된다.

[0061] **치료하다:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다"는 기존 상태 (예를 들어, 질환, 장애)와 관련하여 대상체의 건강 및/또는 복지를 개선시키기 위해 또는 상태의 발병 가능성을 예방하거나 감소시키기 위해, 예를 들어 대상체에게 치료제 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드)의 투여를 통해, 치료를 필요로 하는 대상체에게 치유를 제공하는 작용을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료는 대상체가 경험한 상태 (예를 들어, 질환, 장애)의 적어도 하나의 징후, 증상 또는 기여 인자의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 수반한다.

[0062] **II. HMGB1 발현의 올리고뉴클레오티드-기반 억제제**

[0063] **i. HMGB1 핫스팟**

[0064] 일부 실시양태에서, 치료적 이익을 달성하기 위해 사용될 수 있는, HMGB1 발현의 올리고뉴클레오티드-기반 억제제가 본원에 제공된다. 여러 상이한 종 (인간, 레수스 원숭이, 및 마우스)의 mRNA를 비롯한 HMGB1 mRNA의 실험 (예를 들어, 실시예 1 참조) 및 시험관내 및 생체내 시험을 통해, HMGB1 mRNA의 특정 영역이 표적화를 위한 핫스팟인 것으로 발견되었으며, 이들이 다른 것들에 비해 올리고뉴클레오티드-기반 억제에 더 적합하기 때문이다. 일부 실시양태에서, HMGB1의 핫스팟 영역은 서열식별번호:374-381 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 이들 HMGB1 mRNA 영역은 HMGB1 mRNA 발현을 억제하기 위한 목적으로 본원에서 논의된 올리고뉴클레오티드를 이용하여 표적화될 수 있다.

[0065] 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 세포에서 mRNA를 표적화하고 그의 발현을 억제하기 위한 목적으로 (예를 들어, HMGB1 mRNA의 핫스팟 내에) HMGB1 mRNA에 대해 상보성 영역을 갖도록 설계된다. 상보성 영역은 일반적으로 발현을 억제하기 위한 목적으로 올리고뉴클레오티드 (또는 그의 가닥)를 HMGB1 mRNA에 어닐링할 수 있기에 적합한 길이 및 염기 함량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19 또는 적어도 20개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 12 내지 30개 (예를 들어, 12 내지 30, 12 내지 22, 15 내지 25, 17 내지 21, 18 내지 27, 19 내지 27, 또는 15 내지 30개) 범위의 뉴클레오티드 길이인 HMGB1에 대한 상보성 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오티드 길이인 HMGB1에 대한 상보성 영역을 갖는다.

[0066] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 1-96 중 어느 하나에 제시된 서열 중 어느 하나에 제시된 서열에 대해 적어도 부분적으로 상보성인, (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 상에) 상보성 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 1-96 중 어느 하나에 제시된 서열에 대해 완전히 상보성인, (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 상에) 상보성 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 상에서) 올리고뉴클레오티드의 상보성 영역은 10 내지 25개 범위의 뉴클레오티드 (예를 들어, 10 내지 25, 12 내지 22, 15 내지 25, 17 내지 21, 18 내지 25, 19-25, 또는 15 내지 30개 뉴클레오티드) 길이인, 서열식별번호: 1-96, 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열의 뉴클레오티드의 인접한 서열에 대해 상보성이다. 일부 실시양태에서, (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 상에서) 올리고뉴클레오티드의 상보성 영역은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 인접한 뉴클레오티드 길이인, 서열식별번호: 1-96, 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열의 뉴클레오티드의 인접한 서열에 대해 상보성이다.

[0067] 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 1-96, 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열의 인접한 뉴클레오티드의 상보성인, 올리고뉴클레오티드의 상보성 영역은 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐있다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호:1-96, 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열의 인접한 뉴클레오티드에 대해 상보성인, 올리고뉴클레오티드의 상보성 영역은 안티센스 가닥의 전체 길이의 일부분에 걸쳐있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 193-272, 193-272 및 363-365 중 어느 하나

에 제시된 서열의 뉴클레오티드 1-19에 걸쳐있는 뉴클레오티드의 인접한 스트레치에 대해 적어도 부분적으로 (예를 들어, 완전히) 상보성인, (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥 상에) 상보성 영역을 포함한다.

[0068] 일부 실시양태에서, HMGB1에 대한 상보성 영역은 HMGB1 mRNA의 상응하는 서열과 비교하여 1개 이상의 미스매치를 가질 수 있다. 적절한 혼성화 조건하에 HMGB1 mRNA와 상보성 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 올리고뉴클레오티드 상의 상보성 영역은 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하 등의 미스매치를 가질 수 있다. 대안적으로, 적절한 혼성화 조건하에 HMGB1 mRNA와 상보성 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 올리고뉴클레오티드 상의 상보성 영역은 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하 또는 5개 이하의 미스매치를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역에 1개 초과 미스매치가 있는 경우, 올리고뉴클레오티드가 적절한 혼성화 조건하에 HMGB1 mRNA와 상보성 염기 쌍을 형성하는 능력을 유지한다면, 이들은 상보성 영역에 걸쳐 연속하여 (예를 들어, 연이어 2, 3, 4개 이상) 또는 산재하여 위치할 수 있다.

[0069] **ii. 올리고뉴클레오티드의 유형**

[0070] 본 개시내용의 방법에서 HMGB1를 표적화하는데 유용한 올리고뉴클레오티드의 다양한 구조, 예컨대 RNAi, 안티센스, miRNA 등이 있다. 본원에 또는 다른 곳에 기재된 임의의 구조가 본원에 기재된 서열 (예를 들어, HMGB1의 핫스팟 서열, 예컨대 서열식별번호: 374-381에 기재된 것)을 포함시키거나 또는 표적화하기 위한 프레임워크로서 사용될 수 있다.

[0071] 일부 실시양태에서, HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드는 다이스 수반의 상류 또는 하류에 있는 RNA 간섭 (RNAi) 경로와 결속된다. 예를 들어, RNAi 올리고뉴클레오티드는 1 내지 5개 뉴클레오티드의 적어도 1개의 3' 오버행과 함께 19-25개 뉴클레오티드의 크기를 갖는 각각의 가닥으로 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,372,968 참고). 활성 RNAi 생성물을 생성하도록 다이스에 의해 가공된 더 긴 올리고뉴클레오티드 또한 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,883,996 참고). 추가의 작업은, 가닥들 중 하나가 열역학적-안정화 테트라루프 구조를 포함하는 것인 구조를 비롯하여, 적어도 1개의 가닥의 적어도 1개의 말단이 듀플렉스 표적화 영역을 넘어서 연장된 것인, 연장된 이중-가닥 올리고뉴클레오티드를 생성하였다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,513,207 및 8,927,705, 뿐만 아니라 WO2010033225 참고, 이들 올리고뉴클레오티드의 개시내용에 대해서는 본원에 참고로 포함됨). 이러한 구조체는 단일-가닥 연장부 (분자의 한쪽 또는 양쪽 상에) 뿐만 아니라 이중-가닥 연장부를 포함할 수 있다.

[0072] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 다이스 수반 (예를 들어, 다이스 절단)의 하류에 있는 RNA 간섭 경로와 결속하도록 설계된다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥의 3' 말단에 오버행 (예를 들어, 1, 2 또는 3개 뉴클레오티드 길이)을 가질 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, siRNA)는 표적 RNA에 대해 안티센스인 21개 뉴클레오티드 가이드 가닥, 및 상보성 패신저 가닥을 포함할 수 있고, 두 가닥 모두 어닐링되어 19-bp 듀플렉스 및 하나의 또는 둘 다의 3' 말단에 2개 뉴클레오티드 오버행을 형성한다. 23개 뉴클레오티드의 가이드 가닥 및 21개 뉴클레오티드의 패신저 가닥을 갖는 올리고뉴클레오티드를 비롯한 더 긴 올리고뉴클레오티드 설계가 또한 이용가능하고, 분자의 우측 (패신저 가닥의 3'-말단/가이드 가닥의 5'-말단) 상에 평활 말단 및 분자의 좌측 (패신저 가닥의 5'-말단/가이드 가닥의 3'-말단) 상에 2개 뉴클레오티드 3'-가이드 가닥 오버행이 있다. 이러한 분자에는 21개 염기 쌍 듀플렉스 영역이 있다. 예를 들어, US9012138, US9012621 및 US9193753을 참고하며, 이들 각각은 관련 개시내용에 대해 본원에 포함된다.

[0073] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 둘 다 17 내지 26개 (예를 들어, 17 내지 26, 20 내지 25, 또는 21-23개) 범위의 뉴클레오티드 길이인 센스 및 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 둘 다 19-21개 범위의 뉴클레오티드 길이인 센스 및 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥은 동일한 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥 또는 안티센스 가닥, 또는 센스 및 안티센스 가닥 둘 다에 3'-오버행이 있도록 하는 센스 및 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 둘 다 21-23개 범위의 뉴클레오티드 길이인 센스 및 안티센스 가닥을 갖는 올리고뉴클레오티드의 경우, 센스, 안티센스, 또는 센스 및 안티센스 가닥 둘 다에 있는 3' 오버행은 1 또는 2개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 23개 뉴클레오티드의 가이드 가닥 및 21개 뉴클레오티드의 패신저 가닥을 갖고, 분자의 우측 (패신저 가닥의 3'-말단/가이드 가닥의 5'-말단) 상에 평활 말단 및 분자 좌측 (패신저 가닥의 5'-말단/가이드 가닥의 3'-말단) 상에 2개 뉴클레오티드 3'-가이드 가닥 오버행이 있다. 이러한 분자에는 21개 염기 쌍 듀플렉스 영역이 있다.

[0074] 본원에 개시된 조성물 및 방법에서 사용하기 위한 다른 올리고뉴클레오티드 설계에는 다음이 포함된다: 16합체

siRNA (예를 들어, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Blackburn (ed.), Royal Society of Chemistry, 2006 참고), shRNA (예를 들어, 19 bp 또는 그보다 짧은 스템을 가짐; 예를 들어, Moore *et al.* *Methods Mol. Biol.* 2010; 629:141-158 참고), 평활 siRNA (예를 들어, 19 bp 길이; 예를 들어, Kraynack and Baker, *RNA* Vol. 12, p163-176 (2006) 참고), 비대칭 siRNA (aiRNA; 예를 들어, Sun *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 26, 1379-1382 (2008) 참고), 비대칭의 더 짧은-듀플렉스 siRNA (예를 들어, Chang *et al.*, *Mol Ther.* 2009 Apr; 17(4): 725-32 참고), 포크 siRNA (예를 들어, Hohjoh, *FEBS Letters*, Vol 557, issues 1-3; Jan 2004, p 193-198 참고), 단일-가닥 siRNA (Elsner; *Nature Biotechnology* 30, 1063 (2012)), 덤벨-형태의 원형 siRNA (예를 들어, Abe *et al.* *J Am Chem Soc* 129: 15108-15109 (2007) 참고), 및 소형의 내부 세그먼트화된 간섭 RNA (sisiRNA; 예를 들어, Bramsen *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2007 Sep; 35(17): 5886-5897 참고). 상기 각각의 참고문헌은 관련된 개시내용에 대해 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다. HMGB1의 발현을 감소시키거나 또는 억제하기 위해 일부 실시양태에서 사용될 수 있는 올리고뉴클레오티드 구조체의 추가의 비제한적인 예는 마이크로RNA (miRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 및 짧은 siRNA (예를 들어, Hamilton *et al.*, *Embo J.*, 2002, 21(17): 4671-4679 참고; 또한 미국 출원 번호 20090099115 참고)이다.

[0075] 여전히, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 HMGB1 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥이다. 이러한 구조체에는 단일-가닥 RNAi 분자가 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 최근의 노력은 단일-가닥 RNAi 분자의 활성을 입증하였다 (예를 들어, Matsui *et al.* (May 2016), *Molecular Therapy*, Vol. 24(5), 946-955 참고). 그러나, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASOs)이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5'에서 3' 방향으로 쓰여질 때 특정한 핵산의 표적화된 세그먼트의 역 상보체를 포함하는 핵염기 서열을 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드이며, (예를 들어, 캡머로서) 세포에서 그의 표적 RNA의 RNaseH 매개된 절단을 유도하기 위해 또는 (예를 들어, 믹서로서) 세포에서 표적 mRNA의 번역을 억제하기 위해 적합하게 변형된다. 본 개시내용에서 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방식으로, 예를 들어 미국 특허 번호 9,567,587에 기재된 바와 같이 변형될 수 있으며, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 변형 (예를 들어, 길이, 핵염기 (피리미딘, 퓨린)의 당 모이어티, 및 핵염기의 헤테로시클릭 부분의 변경)과 관련된 그의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다. 추가로, 안티센스 분자는 특이적 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위해 수십년 동안 사용되어 왔다 (예를 들어, Bennett *et al.*; *Pharmacology of Antisense Drugs*, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 57: 81-105 참고).

[0076] **iii. 이중-가닥 올리고뉴클레오티드**

[0077] HMGB1 발현을 (예를 들어, RNAi 경로를 통해) 표적화하기 위한 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 서로 듀플렉스를 형성하는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥은 공유적으로 연결되지 않는다. 그러나, 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥은 공유적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 적어도 15개 (예를 들어, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 또는 적어도 21개) 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 15-30개 범위의 뉴클레오티드 길이 (예를 들어, 15 내지 30, 15 내지 27, 15 내지 22, 18 내지 22, 18 내지 25, 18 내지 27, 18 내지 30, 또는 21 내지 30개 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐있지 않다. 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이의 듀플렉스는 센스 또는 안티센스 가닥의 전체 길이에 걸쳐있다. 특정 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이의 듀플렉스는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 다의 전체 길이에 걸쳐있다.

[0078] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 표 7에 배열된 바와 같이 서열식별번호: 1-96 중 어느 하나에 제시된 서열을 갖는 센스 가닥 및 서열식별번호: 97-192로부터 선택된 상보성 서열을 포함하는 안티센스 가닥 (예를 들어, 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열식별번호: 97에 제시된 서열을 포함하는 안티센스 가닥)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 표 7에 또한 배열된 바와 같이 서열식별번호: 193-272 및 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열식별번호: 273-362 및 366-370으로부터 선택된 상보성 서열을 포함하는 안티센스 가닥 (예를 들어, 서열식별번호: 193에 제시된 서열을 포함하는 센스 가닥 및 서열식별번호: 273에 제시된 서열을 포함하는 안티센스 가닥)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 목록에 나타난 서열은 올리고뉴클레오티드 또는 다른 핵산의 구조

를 기재하기 위해 언급될 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 실시양태에서, 실제 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 핵산은, 명시된 서열과 본질적으로 동일한 또는 유사한 상보성 성질을 보유하면서, 명시된 서열과 비교하여 1개 이상의 대안적인 뉴클레오타이드 (예를 들어, DNA 뉴클레오타이드의 RNA 대응물 또는 RNA 뉴클레오타이드의 DNA 대응물) 및/또는 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드간 연결 및/또는 1개 이상의 다른 변형을 가질 수 있다.

[0079] 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는, 다이스 효소에 의해 작용될 때 성숙한 RISC에 포함하는 안티센스 가닥을 생성하는, 25개 뉴클레오타이드 센스 가닥 및 27개 뉴클레오타이드 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥은 27개보다 긴 뉴클레오타이드 (예를 들어, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개 뉴클레오타이드)이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥은 25개보다 긴 뉴클레오타이드 (예를 들어, 26, 27, 28, 29 또는 30 뉴클레오타이드)이다. 올리고뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스의 길이는 12 내지 30개 뉴클레오타이드 (예를 들어, 12 내지 30, 12 내지 27, 15 내지 25, 18 내지 30 또는 19 내지 30개 뉴클레오타이드) 길이이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스의 길이는 적어도 12개 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 적어도 12, 적어도 15, 적어도 20, 또는 적어도 25개 뉴클레오타이드 길이)이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 가닥 사이에 형성된 듀플렉스의 길이는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0080] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 다른 5' 말단과 비교하여 열역학적으로 덜 안정한 1개의 5' 말단을 갖는다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 3' 말단에서 평활 말단 및 안티센스 가닥의 3' 말단에서 오버행은 포함하는 비대칭 올리고뉴클레오타이드가 제공된다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥 상의 3' 오버행은 1-8개 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 뉴클레오타이드 길이)이다. 전형적으로, RNAi에 대한 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 (가이드) 가닥의 3' 말단 상에 2개의 뉴클레오타이드 오버행을 갖는다. 그러나, 다른 오버행이 가능하다. 일부 실시양태에서, 오버행은 1 내지 6개 뉴클레오타이드, 임의적으로 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 6개 뉴클레오타이드, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오타이드 길이를 포함하는 3' 오버행이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 오버행은 1 내지 6개 뉴클레오타이드, 임의적으로 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 6개 뉴클레오타이드, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오타이드 길이를 포함하는 5' 오버행이다.

[0081] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 2개의 말단 뉴클레오타이드는 변형된다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 2개의 말단 뉴클레오타이드는 표적에 대해 상보성이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥의 3' 말단 상의 2개의 말단 뉴클레오타이드는 표적에 대해 상보성이 아니다. 일부 실시양태에서, 닉킹된 테트라루프 구조에서 올리고뉴클레오타이드의 각각의 3' 말단 상의 2개의 말단 뉴클레오타이드는 GG이다. 전형적으로, 올리고뉴클레오타이드의 각각의 3' 말단 상의 2개의 말단 GG 뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘 다는 표적에 대해 상보성이 아니다.

[0082] 일부 실시양태에서, 센스 및 안티센스 가닥 사이에 1개 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개) 미스매치가 있다. 센스 및 안티센스 가닥 사이에 1개 초과 미스매치가 있다면, 이들은 상보성 영역에 걸쳐 연속하여 (예를 들어, 연이어 2, 3개 이상) 또는 산재하여 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥의 3' - 말단은 1개 이상의 미스매치를 함유한다. 한 실시양태에서, 2개의 미스매치가 센스 가닥의 3' 말단에 포함된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥의 3'-말단에서 염기 미스매치 또는 세그먼트 탈안정화는 가능하게는 다이스에 의한 가공을 촉진시킴으로써 RNAi에서 합성 듀플렉스의 효능을 개선시켰다.

[0083] **a. 안티센스 가닥**

[0084] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥은 "가이드 가닥"으로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 가닥이 RNA-유도된 침묵 복합체 (RISC)와 결합될 수 있고 아르고너트 단백질에 결합할 수 있거나, 또는 1개 이상의 유사한 인자와 결합하거나 또는 그와 결합할 수 있고, 표적 유전자의 침묵을 지시할 수 있다면, 이는 가이드 가닥으로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥에 대해 상보성인 센스 가닥은 "패신저 가닥"으로 지칭될 수 있다.

[0085] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 50개 이하의 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 30개 이하, 27개 이하, 25개 이하, 21개 이하, 또는 19개 이하의 뉴클레오타이드 길이)인 안티센스 가닥을 포함한다. 일

부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 12개 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 적어도 12, 적어도 15, 적어도 19, 적어도 21, 적어도 25, 또는 적어도 27개 뉴클레오타이드 길이)인 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 가닥은 12 내지 50 또는 12 내지 30개 (예를 들어, 12 내지 30, 11 내지 27, 11 내지 25, 15 내지 21, 15 내지 27, 17 내지 21, 17 내지 25, 19 내지 27, 또는 19 내지 30개) 범위의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나의 안티센스 가닥은 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 또는 50개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0086] 일부 실시양태에서 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 서열식별번호: 97-192, 273-362 또는 366-370 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열식별번호: 97-192, 273-362 또는 366-370 중 어느 하나에 제시된 서열의 적어도 12개의 (예를 들어, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 또는 적어도 23개) 인접한 뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열식별번호: 97-192, 273-362 또는 366-370 중 어느 하나에 제시된 임의의 서열의 12 내지 30개 범위의 뉴클레오타이드 (예를 들어, 12 내지 27, 12 내지 22, 15 내지 25, 17 내지 21, 18 내지 27, 19 내지 27, 또는 15 내지 27개 뉴클레오타이드) 길이인 뉴클레오타이드의 인접한 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27개의 인접한 뉴클레오타이드 길이인 서열식별번호: 97-192, 273-362 또는 366-370 중 어느 하나에 제시된 서열의 뉴클레오타이드의 인접한 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열식별번호: 97-192, 273-362 또는 366-370 중 어느 하나에 제시된 서열로 이루어진 안티센스 가닥을 포함한다.

[0087] **b. 센스 가닥**

[0088] 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 40개 이하의 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 40개 이하, 35개 이하, 30개 이하, 27개 이하, 25개 이하, 21개 이하, 19개 이하, 17개 이하, 또는 12개 이하의 뉴클레오타이드 길이)의 센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 12개 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 적어도 12, 적어도 15, 적어도 19, 적어도 21, 적어도 25, 적어도 27, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 38개 뉴클레오타이드 길이)인 센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 50개 범위의 (예를 들어, 12 내지 40, 12 내지 36, 12 내지 32, 12 내지 28, 15 내지 40, 15 내지 36, 15 내지 32, 15 내지 28, 17 내지 21, 17 내지 25, 19 내지 27, 19 내지 30, 20 내지 40, 22 내지 40, 25 내지 40, 또는 32 내지 40개) 뉴클레오타이드 길이인 센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 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 또는 40개 뉴클레오타이드 길이의 센스 가닥을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥은 27개보다 긴 뉴클레오타이드 (예를 들어, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개 뉴클레오타이드)이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 센스 가닥은 25개보다 긴 뉴클레오타이드 (예를 들어, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오타이드)이다.

[0089] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 서열식별번호: 1-96, 193-272 또는 363-365 중 어느 하나에 제시된 센스 가닥 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열식별번호: 1-96, 193-272 또는 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열의 적어도 12개의 (예를 들어, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 또는 적어도 23개) 인접한 뉴클레오타이드를 포함하는 센스 가닥을 갖는다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열식별번호: 1-96, 193-272 또는 363-365 중 어느 하나에 제시된 임의의 서열의 7 내지 36개 범위의 뉴클레오타이드 (예를 들어, 12 내지 30, 12 내지 27, 12 내지 22, 15 내지 25, 17 내지 21, 18 내지 27, 19-27, 20-36 또는 15 내지 36개 뉴클레오타이드) 길이인 뉴클레오타이드의 인접한 서열을 포함하는 센스 가닥을 갖는다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36개 뉴클레오타이드 길이인 서열식별번호: 1-96, 193-272 또는 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열의 뉴클레오타이드의 인접한 서열을 포함하는 센스 가닥을 갖는다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열식별번호: 1-96, 193-272 또는 363-365 중 어느 하나에 제시된 서열로 이루어진 센스 가닥을 갖는다.

[0090] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 그의 3'-말단에서 스템-루프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 그의 5'-말단에서 스템-루프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스템 루프를 포함하는 가닥은 2 내지 66개 범위의

뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 2 내지 66, 10 내지 52, 14 내지 40, 2 내지 30, 4 내지 26, 8 내지 22, 12 내지 18, 10 내지 22, 14 내지 26, 또는 14 내지 30개 뉴클레오타이드 길이)이다. 일부 실시양태에서, 스템 루프를 포함하는 가닥은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 스템은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개 뉴클레오타이드 길이의 듀플렉스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스템-루프는 분자에게 분해 (예를 들어, 효소적 분해)에 대한 보다 양호한 보호를 제공하고, 표적 세포로의 전달을 위한 표적화 특징을 용이하게 한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 루프는 올리고뉴클레오타이드의 유전자 발현 억제 활성화에 실질적으로 영향을 미치지 않고 변형이 이루어질 수 있는 부가된 뉴클레오타이드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 센스 가닥이 (예를 들어, 그의 3'-말단에서) S₁-L-S₂로 제시된 스템-루프를 포함하고, S₁은 S₂에 대해 상보성이고, L은 S₁과 S₂ 사이에 10개 이하의 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 뉴클레오타이드 길이)의 루프를 형성하는 것인 올리고뉴클레오타이드가 본원에 제공된다.

[0091] 일부 실시양태에서, 스템-루프의 루프 (L)는 (예를 들어, 니킹된 테트라루프 구조 내의) 테트라루프이다. 테트라루프는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드, 및 이들의 조합물을 함유할 수 있다. 전형적으로, 테트라루프는 4 내지 5개의 뉴클레오타이드를 갖는다. 그러나, 일부 실시양태에서, 테트라루프는 3 내지 6개 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 전형적으로 4 내지 5개의 뉴클레오타이드로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 테트라루프는 3, 4, 5 또는 6개 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0092] **iv. 올리고뉴클레오타이드 변형**

[0093] 올리고뉴클레오타이드는 특이성, 안정성, 전달, 생체이용률, 뉴클레아제 분해로부터의 내성, 면역원성, 염기-쌍 형성 성질, RNA 분포 및 세포 흡수, 및 치료 또는 연구 사용과 관련된 다른 특징을 개선시키거나 또는 조절하기 위해 다양한 방식으로 변형될 수 있다. 예를 들어, [Bransen *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, 2867-2881; Bransen and Kjems (*Frontiers in Genetics*, 3 (2012): 1-22)]를 참고한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 적합한 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 그의 염기 (또는 핵염기), 당 (예를 들어, 리보스, 데옥시리보스), 또는 포스페이트 기에서 변형을 갖는다.

[0094] 올리고뉴클레오타이드 상에서 변형의 개수 및 이들 뉴클레오타이드 변형의 위치는 올리고뉴클레오타이드의 성질에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 그들을 지질 나노입자 (LNP) 또는 유사한 담체에 접합시키거나 또는 포함시킴으로써 생체내로 전달될 수 있다. 그러나, 올리고뉴클레오타이드가 LNP 또는 유사한 담체에 의해 보호되지 않을 경우에는, 그의 뉴클레오타이드의 적어도 일부가 변형되는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 임의의 올리고뉴클레오타이드의 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 모든 또는 실질적으로 모든 뉴클레오타이드가 변형된다. 특정 실시양태에서, 절반이 넘는 뉴클레오타이드가 변형된다. 특정 실시양태에서, 절반 미만의 뉴클레오타이드가 변형된다. 전형적으로, 네이키드 전달에 의해, 모든 당이 2'-위치에서 변형된다. 이들 변형은 가역적일 수 있거나 또는 비가역적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 원하는 특징 (예를 들어, 효소적 분해로부터의 보호, 생체내 투여 후에 원하는 세포를 표적화하는 능력, 및/또는 열역학적 안정성)을 유발하기에 충분한 개수 및 유형의 변형된 뉴클레오타이드를 갖는다.

[0095] **a. 당 변형**

[0096] 일부 실시양태에서, 변형된 당 (본원에서 당 유사체로도 지칭됨)은 예를 들어 1개 이상의 변형이 당의 2', 3', 4' 및/또는 5' 탄소 위치에서 발생하는 것인 변형된 데옥시리보스 또는 리보스 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 당은 또한 비천연의 대안적인 탄소 구조체, 예컨대 록킹된 핵산 ("LNA") (예를 들어, Koshkin *et al.* (1998), *Tetrahedron* 54, 3607-3630 참고), 록킹되지 않은 핵산 ("UNA") (예를 들어, Snead *et al.* (2013), *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2, e103 참고), 및 브릿지된 핵산 ("BNA") (예를 들어, Imanishi and Obika (2002), *The Royal Society of Chemistry, Chem. Commun.*, 1653-1659 참고)에 존재하는 것들을 포함할 수 있다. [Koshkin *et al.*, Snead *et al.*, 및 Imanishi and Obika]는 당 변형에 관한 그들의 개시내용에 대해 본원에 참고로 포함된다.

[0097] 일부 실시양태에서, 당에서의 뉴클레오타이드 변형은 2'-변형을 포함한다. 2'-변형은 2'-아미노에틸, 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 및 2'-데옥시-2'-플루오로-β-d-아라비노핵산일 수 있다. 전형적으로, 변형은 2'-플루오로, 2'-O-메틸, 또는 2'-O-메톡시에틸이다. 일부 실시양태에서, 당에서의 변형은 당 고리의 변형

을 포함하고, 이는 당 고리의 1개 이상의 탄소의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드의 당의 변형은 당의 2'-산소가 당의 1'-탄소 또는 4'-탄소에 연결되거나 또는 에틸렌 또는 메틸렌 브릿지를 통해 2'-산소가 1'-탄소 또는 4'-탄소에 연결되는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-탄소와 3'-탄소의 결합이 결여된 아시클릭 당을 갖는다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 예를 들어 당의 4' 위치에서 티올 기를 갖는다.

[0098] 일부 실시양태에서, 포스페이트 기 또는 다른 기를 갖는 말단의 3'-말단 기 (예를 들어, 3'-히드록실)는 예를 들어 링커, 어댑터 또는 표지를 부착시키기 위해 또는 올리고뉴클레오타이드를 또 다른 핵산에 직접적으로 라이게이션시키기 위해 사용될 수 있다.

[0099] **b. 5' 말단 포스페이트**

[0100] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 포스페이트 기는 아르고너트 2와의 상호작용을 증강시킨다. 그러나, 5'-포스페이트 기를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 포스포타제 또는 다른 효소를 통해 분해되기 쉬울 수 있고, 이는 생체 내에서 그들의 생체이용률을 제한할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이러한 분해에 대해 내성인 5' 포스페이트의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트, 비닐포스포네이트, 또는 말로닐포스포네이트일 수 있다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 가닥의 5' 말단은 천연 5'-포스페이트 기의 정전기적 및 입체적 성질을 모방하는 화학적 모이어티 ("포스페이트 모방체")에 부착된다 (예를 들어, Prakash *et al.* (2015), *Nucleic Acids Res.*, *Nucleic Acids Res.* 2015 Mar 31; 43(6): 2993-3011 참고, 포스페이트 유사체에 관한 내용은 본원에 참고로 포함됨). 5' 말단에 부착될 수 있는 여러 포스페이트 모방체가 개발되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,927,513 참고, 포스페이트 유사체에 관한 내용은 본원에 참고로 포함됨). 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 대한 다른 변형이 개발되었다 (예를 들어, WO 2011/133871 참고, 포스페이트 유사체에 관한 내용은 본원에 참고로 포함됨). 특정 실시양태에서, 히드록실 기는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 부착된다.

[0101] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 당의 4'-탄소 위치에서 포스페이트 유사체 ("4'-포스페이트 유사체"로 지칭됨)를 갖는다. 예를 들어, 2016년 9월 2일에 출원한, "4'-포스페이트 유사체 및 그를 포함하는 올리고뉴클레오타이드"의 명칭을 갖는 미국 가출원 번호 62/383,207, 및 2016년 9월 12일에 출원한, "4'-포스페이트 유사체 및 그를 포함하는 올리고뉴클레오타이드"의 명칭을 갖는 62/393,401을 참고하며, 포스페이트 유사체에 관한 이들 각각의 내용은 본원에 포함된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 5'-말단 뉴클레오타이드에 4'-포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 유사체는 옥시메틸 기의 산소 원자가 (예를 들어, 그의 4'-탄소에서) 당 모이어티에 결합되어 있는 옥시메틸포스포네이트 또는 그의 유사체이다. 다른 실시양태에서, 4'-포스페이트 유사체는 티오메틸 기의 황 원자 또는 아미노메틸 기의 질소 원자가 당 모이어티의 4'-탄소에 결합되어 있는 티오메틸포스포네이트 또는 아미노메틸포스포네이트, 또는 그의 유사체이다. 특정 실시양태에서, 4'-포스페이트 유사체는 옥시메틸포스포네이트이다. 일부 실시양태에서, 옥시메틸포스포네이트는 화학식 $-O-CH_2-PO(OH)_2$ 또는 $-O-CH_2-PO(OR)_2$ 로 표현되며, 여기서 R은 H, CH_3 , 알킬 기, CH_2CH_2CN , $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCH_2CH_2Si(CH_3)_3$, 또는 보호기로부터 독립적으로 선택된다. 특정 실시양태에서, 알킬 기는 CH_2CH_3 이다. 더욱 전형적으로, R은 H, CH_3 또는 CH_2CH_3 로부터 독립적으로 선택된다.

[0102] **c. 변형된 뉴클레오타이드내 연결**

[0103] 일부 실시양태에서, 포스페이트 변형 또는 치환은 적어도 1개의 (예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3 또는 적어도 5개) 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나는 1 내지 10개의 (예를 들어, 1 내지 10, 2 내지 8, 4 내지 6, 3 내지 10, 5 내지 10, 1 내지 5, 1 내지 3 또는 1 내지 2개) 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다.

[0104] 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로디티오에이트 연결, 포스포로티오에이트 연결, 포스포트리에스테르 연결, 티오노알킬포스포네이트 연결, 티오알킬포스포트리에스테르 연결, 포스포르아미다이트 연결, 포스포네이트 연결 또는 보라노포스페이트 연결일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나의 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다.

[0105] **d. 염기 변형**

- [0106] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 1개 이상의 변형된 핵염기를 갖는다. 일부 실시양태에서, 변형된 핵염기 (본원에서 염기 유사체로도 지칭됨)는 뉴클레오타이드 당 모이어티의 1' 위치에서 연결된다. 특정 실시양태에서, 변형된 핵염기는 질소성 염기이다. 특정 실시양태에서, 변형된 핵염기는 질소 원자를 함유하지 않는다. 예를 들어, 미국 공개 특허 출원 번호 20080274462를 참고한다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 보편적 염기를 포함한다. 그러나, 특정 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 핵염기를 함유하지 않는다 (무염기).
- [0107] 일부 실시양태에서, 보편적 염기는 변형된 뉴클레오타이드에서 뉴클레오타이드 당 모이어티의 1' 위치에 또는 뉴클레오타이드 당 모이어티 치환에서 동등한 위치에 위치하는 헤테로시클릭 모이어티이며, 이는 듀플렉스로 존재할 때 듀플렉스의 구조를 실질적으로 변경시키지 않고 1가지 유형 초과 염기에 대항하여 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산에 대해 완전히 상보성인 기준 단일-가닥 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)과 비교하여, 보편적 염기를 함유하는 단일-가닥 핵산은 상보성 핵산과 함께 형성된 듀플렉스보다 낮은 T_m을 갖는, 표적 핵산과의 듀플렉스를 형성한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 보편적 염기가 단일 미스매치를 생성하도록 하는 염기로 대체된 기준 단일-가닥 핵산과 비교하여, 보편적 염기를 함유하는 단일-가닥 핵산은 미스매치된 염기를 포함하는 핵산과 함께 형성된 듀플렉스보다 높은 T_m을 갖는, 표적 핵산과의 듀플렉스를 형성한다.
- [0108] 보편적-결합 뉴클레오타이드의 비제한적인 예에는 이노신, 1-β-D-리보푸라노실-5-니트로인돌, 및/또는 1-β-D-리보푸라노실-3-니트로피롤이 포함된다 (Quay 등의 미국 특허 출원 공개 번호 20070254362; Van Aerschot *et al.*, An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside. *Nucleic Acids Res.* 1995 Nov 11;23(21):4363-70; Loakes *et al.*, 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR. *Nucleic Acids Res.* 1995 Jul 11;23(13):2361-6; Loakes and Brown, 5-Nitroindole as an universal base analogue. *Nucleic Acids Res.* 1994 Oct 11;22(20):4039-43. 이들 각각은 염기 변형에 관한 그들의 개시내용에 대해 본원에 참고로 포함됨).
- [0109] **e. 가역적인 변형**
- [0110] 표적 세포에 도달하기 전에 생체내 환경으로부터 올리고뉴클레오타이드를 보호하기 위한 특정한 변형이 이루어질 수 있지만, 이는 올리고뉴클레오타이드가 표적 세포의 시토졸에 도달하였을 때 그의 효능 또는 활성을 감소시킬 수 있다. 분자가 세포 밖에서 바람직한 성질을 유지하도록 하는 가역적인 변형이 이루어질 수 있고, 이는 세포의 시토졸 환경에 들어갈 때 제거된다. 가역적인 변형은 예를 들어 세포내 효소의 작용에 의해 또는 세포 내의 화학적 조건에 의해 (예를 들어, 세포내 글루타티온에 의한 감소를 통해) 제거될 수 있다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 가역적으로 변형된 뉴클레오타이드는 글루타티온-민감성 모이어티를 포함한다. 전형적으로, 뉴클레오타이드간 디포스페이트 연결에 의해 생성된 염의 전하를 차폐시키고, 세포 흡수 및 뉴클레아제 내성을 개선시키기 위해, 핵산 분자를 시클릭 디설피드 모이어티에 의해 화학적으로 변형시켰다. 트라베르사 테라퓨틱스, 인크.(Traversa Therapeutics, Inc.) ("Traversa")에게 원래 양도된 미국 공개 출원 번호 2011/0294869, 솔스티스 바이올로지스, 리미티드(Solstice Biologics, Ltd.) ("Solstice")에게 양도된 PCT 공개 번호 WO 2015/188197, [Meade *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2014,32:1256-1263] ("Meade"), 머크 샤프 앤 돔 코퍼레이션(Merck Sharp & Dohme Corp)에게 양도된 PCT 공개 번호 WO 2014/088920을 참고하며, 이들 각각은 이러한 변형에 관한 그들의 개시내용에 대해 참고로 포함된다. 뉴클레오타이드간 디포스페이트 연결의 이러한 가역적인 변형은 시토졸의 환원 환경 (예를 들어 글루타티온)에 의해 세포 내에서 절단되도록 설계된다. 초기 예에는 세포 내에서 절단가능한 것으로 보고된 포스포트리에스테르 변형을 중화시키는 것이 포함된다 (Dellinger *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 2003,125:940-950).
- [0112] 일부 실시양태에서, 이러한 가역적인 변형은 올리고뉴클레오타이드가 뉴클레아제 및 다른 혹독한 환경 조건 (예를 들어, pH)에 노출되는 생체내 투여 (예를 들어, 혈액 및/또는 세포의 리소솜/엔도솜 구획을 통한 이동) 동안에 보호를 가능하게 한다. 글루타티온 수준이 세포외 공간에 비해 높은 세포의 시토졸로 방출될 때, 변형이 역전되고, 결과는 절단된 올리고뉴클레오타이드이다. 가역적인 글루타티온 민감성 모이어티를 사용하면, 비가역적인 화학적 변형을 사용하여 이용가능한 옵션과 비교하여 입체적으로 더 큰 화학적 기를 관심 올리고뉴클레오타이드에 도입시키는 것이 가능하다. 이는 이들 더 큰 화학적 기가 시토졸에서 제거될 것이고, 따라서 세포의 시토졸 내에서 올리고뉴클레오타이드의 생물학적 활성을 방해하지 않아야 하기 때문이다. 결과적으로, 이들 더 큰 화학적 기는 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 대해 다양한 이점, 예컨대 뉴클레아제 내성, 친유성, 전하, 열안정성, 특이성, 및 감소된 면역원성을 부여하도록 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티의 구조는 그의 방출 동역학을 변경시키도록 조작될 수 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 뉴클레오티드의 당에 부착된다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 변형된 뉴클레오티드의 당의 2' 탄소에 부착된다. 일부 실시양태에서, 특히 변형된 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드의 5'-말단 뉴클레오티드일 때, 글루타티온-민감성 모이어티는 당의 5'-탄소에 위치한다. 일부 실시양태에서, 특히 변형된 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드의 3'-말단 뉴클레오티드일 때, 글루타티온-민감성 모이어티는 당의 3'-탄소에 위치한다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 모이어티는 술포닐 기를 포함한다. 예를 들어, 2016년 8월 23일에 출원한, "가역적으로 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물 및 그의 용도"의 명칭을 갖는 미국 가출원 번호 62/378,635를 참고하며, 그의 관련 개시내용에 대한 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0114] **v. 표적화 리간드**

[0115] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드를 하나 이상의 세포 또는 하나 이상의 장기에 대해 표적화하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 전략은 다른 장기에서 바람직하지 않은 효과를 피하는데 도움이 될 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오티드로부터 이익을 얻지 않는 세포, 조직 또는 장기로의 올리고뉴클레오티드의 과도한 손실을 피할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 특정한 조직, 세포 또는 장기의 표적화를 용이하게 하도록, 예를 들어 간으로 올리고뉴클레오티드의 전달을 용이하게 하도록 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 간의 간세포로 올리고뉴클레오티드의 전달을 용이하게 하도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 1개 이상의 표적화 리간드에 접합된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0116] 표적화 리간드는 탄수화물, 아미노 당, 콜레스테롤, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 단백질의 일부 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편) 또는 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 압타머이다. 예를 들어, 표적화 리간드는 중앙 맥관구조 또는 신경교종 세포를 표적화하기 위해 사용되는 RGD 펩티드, 중앙 맥관구조 또는 스토마를 표적화하기 위해 사용되는 CREKA 펩티드, CNS 맥관구조 상에서 발현된 트랜스페린 수용체를 표적화하기 위해 사용되는 트랜스페린, 락토페린 또는 압타머, 또는 신경교종 세포 상의 EGFR을 표적화하기 위해 사용되는 항-EGFR 항체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적화 리간드는 1개 이상의 GalNAc 모이어티이다.

[0117] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 1개 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개) 뉴클레오티드 각각은 별도의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 2 내지 4개 뉴클레오티드 각각은 별도의 표적화 리간드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드가 칫솔의 강모와 유사하고, 올리고뉴클레오티드가 칫솔과 유사하도록, 표적화 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 말단에서 2 내지 4개 뉴클레오티드에 접합된다 (예를 들어, 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 또는 3' 말단 상의 2 내지 4개 뉴클레오티드 오버행 또는 연장부에 접합됨). 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에서 스템-루프를 포함할 수 있고, 스템의 루프의 1, 2, 3 또는 4개 뉴클레오티드는 표적화 리간드에 개별적으로 접합될 수 있다.

[0118] 일부 실시양태에서, HMGB1의 발현을 감소시키는 올리고뉴클레오티드를 대상체의 간의 간세포에 대해 표적화시키는 것이 바람직하다. 임의의 적합한 간세포 표적화 모이어티가 이 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0119] GalNAc는 간세포의 동모양 표면에서 주로 발현되고, 말단 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유하는 순환 당단백질 (아시알로당단백질)의 결합, 내재화 및 후속적인 클리어런스에서 주요 역할을 하는 아시알로당단백질 수용체 (ASGPR)에 대한 고친화도 리간드이다. GalNAc 모이어티와 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드의 (간접적인 또는 직접적인) 접합은 이들 올리고뉴클레오티드를 이들 간세포 세포 상에서 발현된 ASGPR에 대해 표적화하기 위해 이용될 수 있다.

[0120] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 1가 GalNAc에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 1개 초과 1가 GalNAc에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된다 (즉, 2, 3 또는 4개의 1가 GalNAc 모이어티에 접합되고, 전형적으로 3 또는 4개의 1가 GalNAc 모이어티에 접합됨). 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 1개 이상의 2가 GalNAc, 3가 GalNAc, 또는 4가 GalNAc 모이어티에 접합된다.

[0121] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 1개 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개) 뉴클레오티드 각각은 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스템-루프의 루프 (L)의 2 내지 4개 뉴클레오티드 각각은 별도의 GalNAc에 접합된다. 일부 실시양태에서, GalNAc 모이어티가 칫솔의 강모와 유사하고, 올리고뉴클레오티

드가 칫솔과 유사하도록, 표적화 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 말단에서 2 내지 4개 뉴클레오티드에 접합된다 (예를 들어, 리간드는 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 또는 3' 말단 상에서 2 내지 4개 뉴클레오티드 오버행 또는 연장부에 접합됨). 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 센스 가닥의 5' 또는 3' 말단에서 스템-루프를 포함하고, 스템의 루프의 1, 2, 3 또는 4개 뉴클레오티드는 GalNAc 모이어티에 개별적으로 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, GalNAc 모이어티는 센스 가닥의 뉴클레오티드에 접합된다. 예를 들어, 4개의 GalNAc 모이어티가 센스 가닥의 테트라루프에서 뉴클레오티드에 접합될 수 있고, 각각의 GalNAc 모이어티는 1개의 뉴클레오티드에 접합된다.

[0122] 임의의 적절한 방법 또는 화학 (예를 들어, 클릭 화학)을 이용하여 표적화 리간드를 뉴클레오티드에 연결시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 클릭 링커를 이용하여 표적화 리간드를 뉴클레오티드에 접합시킨다. 일부 실시양태에서, 아세탈-기반 링커를 이용하여 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 뉴클레오티드에 표적화 리간드를 접합시킨다. 아세탈-기반 링커는 예를 들어 2016년 6월 23일에 출원한 국제 특허 출원 공개 번호 WO2016100401 A1에 개시되어 있으며, 이러한 링커에 관한 내용은 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 링커는 불안정한 링커이다. 그러나, 다른 실시양태에서, 링커는 상당히 적합하다.

[0123] 일부 실시양태에서, 듀플렉스 연장부 (예를 들어, 3, 4, 5 또는 6개 이하의 염기 쌍 길이)가 표적화 리간드 (예를 들어, GalNAc 모이어티)와 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 사이에 제공된다.

[0124] **III. 제형**

[0125] 올리고뉴클레오티드 사용을 용이하게 하기 위해 다양한 제형이 개발되었다. 예를 들어, 분해를 최소화하거나, 전달 및/또는 흡수를 용이하게 하거나, 또는 제형에서 올리고뉴클레오티드에 대해 또 다른 유익한 성질을 제공하는 제형을 이용하여 올리고뉴클레오티드를 대상체 또는 세포 환경으로 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, HMGB1의 발현을 감소시키기 위해 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 단일-가닥 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드)를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 이러한 조성물은 표적 세포의 직면한 환경으로 또는 전신으로 대상체에게 투여될 때 올리고뉴클레오티드의 충분한 부분이 세포에 들어가서 HMGB1 발현을 감소시키도록 적합하게 제형화될 수 있다. 임의의 다양한 적합한 올리고뉴클레오티드 제형을 이용하여 본원에 개시된 바와 같이 HMGB1의 감소를 위해 올리고뉴클레오티드를 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 완충제 용액, 예컨대 인산염 완충된 식염수 용액, 리포솜, 미셀 구조체, 및 캡시드 중에서 제형화된다.

[0126] 양이온성 지질을 갖는 올리고뉴클레오티드의 제형을 이용하여 올리고뉴클레오티드가 세포에 트랜스펙션되는 것을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 양이온성 지질, 예컨대 리포펙션, 양이온성 글리세롤 유도체, 및 다가 양이온성 분자 (예를 들어, 폴리리신)를 이용할 수 있다. 적합한 지질에는 올리고펙타민, 리포펙타민 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies)), NC388 (리보자임 파마슈티컬즈, 인크.(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.)), 콜로라도주 볼더), 또는 퓨진(FuGene) 6 (로체(Roche))이 포함되고, 이들 모두는 제조자의 지침에 따라 사용될 수 있다.

[0127] 따라서, 일부 실시양태에서, 제형은 지질 나노입자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 리포솜, 지질, 지질 복합체, 미세구, 미세입자, 나노구, 또는 나노입자를 포함하거나, 또는 그를 필요로 하는 대상체의 세포, 조직, 장기 또는 신체에 투여하기 위해 달리 제형화될 수 있다 (예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd edition, Pharmaceutical Press, 2013 참고).

[0128] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제형은 부형제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 조성물에게 활성 성분의 개선된 안정성, 개선된 흡수, 개선된 가용성 및/또는 치료적 증강을 부여한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 완충제 (예를 들어, 시트르산나트륨, 인산나트륨, 트리스 염기, 또는 수산화나트륨) 또는 비히클 (예를 들어, 완충된 용액, 바셀린, 디메틸 술폭시드, 또는 광유)이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 그의 보관 수명을 연장시키기 위해 동결건조된 다음, 사용하기 (예를 들어, 대상체에게 투여하기) 전에 용액으로 만들어진다. 따라서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나를 포함하는 조성물 중의 부형제는 동결 건조보호제 (예를 들어, 만니톨, 락토스, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 폴리비닐 피롤리돈), 또는 또는 붕괴 온도 조절제 (예를 들어, 텍스트란, 피콜 또는 젤라틴)일 수 있다.

[0129] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다. 투여 경로의 예에는 비경구, 예를 들어, 정맥내, 피내, 피하, 경구 (예를 들어, 흡입), 경피 (국소), 경점막 및 직장 투여가 포함된다.

[0130] 주사 용도에 적합한 제약 조성물은 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위해 멸균 수성 용액 (수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체에는 생리 식염수, 정균수, 크

레모포어(Cremophor) EL.TM. (바스프(BASF), 뉴저지주 파시페니) 또는 인산염 완충된 식염수 (PBS)가 포함된다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리에올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 여러 경우에, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 멸균성 주사 용액은 선택된 용매 중에 필요한 양의 올리고뉴클레오티드를 필요에 따라 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 그들의 조합물과 함께 도입시킨 후에, 멸균 여과시킴으로써 제조될 수 있다.

[0131] 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 약 0.1%의 치료제 (예를 들어, HMGB1 발현을 감소시키기 위한 올리고뉴클레오티드) 또는 그 초과를 함유할 수 있지만, 활성 성분(들)의 백분율은 총 조성물의 중량 또는 부피의 약 1% 내지 80% 또는 그 초과일 수 있다. 가용성, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 보관 수명, 뿐만 아니라 다른 약리학적 고려사항과 같은 인자가 이러한 제약 제형의 제조에 관련된 기술분야의 기술자에 의해 고려될 것이고, 따라서 다양한 용량 및 치료 레지멘이 바람직할 수 있다.

[0132] 수많은 실시양태가 본원에 개시된 임의의 올리고뉴클레오티드의 간-표적화된 전달에 관한 것이지만, 다른 조직의 표적화 또한 고려된다.

[0133] **IV. 사용 방법**

[0134] **i. 세포에서 HMGB1 발현의 감소**

[0135] 일부 실시양태에서, 세포에서 HMGB1의 발현을 감소시키기 위한 목적으로 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 유효량을 세포에 전달하는 방법이 제공된다. 본원에 제공된 방법은 임의의 적절한 세포 유형에서 유용하다. 일부 실시양태에서, 세포는 HMGB1을 발현하는 임의의 세포 (예를 들어, 간세포, 대식세포, 단핵구-유래된 세포, 전립선암 세포, 뇌, 내분비 조직, 골수, 림프절, 폐, 담낭, 간, 십이지장, 소장, 췌장, 신장, 위장관, 방광, 지방 및 연조직 및 피부의 세포)이다. 일부 실시양태에서, 세포는 대상체로부터 획득되고 제한된 횟수의 계대를 겪을 수 있는 일차 세포이며, 따라서 세포는 천연의 표현형 성질을 실질적으로 유지한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드가 전달되는 세포는 생체외 또는 시험관내에 있다 (즉, 배양물 중의 세포에 또는 세포가 존재하는 유기체에 전달될 수 있음). 구체적인 실시양태에서, 간세포에서 HMGB1의 발현만을 감소시키기 위한 목적으로 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 유효량을 세포에 전달하는 방법이 제공된다.

[0136] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액의 주사, 올리고뉴클레오티드로 피복된 입자의 충격, 올리고뉴클레오티드를 함유하는 용액에 세포 또는 유기체의 노출, 또는 올리고뉴클레오티드의 존재하에 세포 막의 전기천공을 비롯하여 적절한 핵산 전달 방법을 이용하여 도입될 수 있다. 올리고뉴클레오티드를 세포에 전달하는 다른 적절한 방법, 예컨대 지질-매개된 담체 수송, 화학물질-매개된 수송, 및 양이온성 리포좀 트랜스펙션, 예컨대 인산칼슘 등이 이용될 수 있다.

[0137] 역제 결과는 세포 또는 대상체의 하나 이상의 성질을 평가하기 위한 적절한 검정에 의해, 또는 HMGB1 발현을 나타내는 분자 (예를 들어, RNA, 단백질)를 평가하는 생화학적 기술에 의해 확인될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드가 HMGB1의 발현 수준을 감소시키는 정도는 발현 수준 (예를 들어, HMGB1의 mRNA 또는 단백질 수준)을 적절한 대조군 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드가 전달되지 않거나 또는 음성 대조군이 전달된 세포 또는 세포 집단에서 HMGB1 발현 수준)과 비교함으로써 평가된다. 일부 실시양태에서, HMGB1 발현의 적절한 대조군 수준은 예정된 수준 또는 값일 수 있고, 따라서 대조군 수준을 매번 측정할 필요는 없다. 예정된 수준 또는 값은 다양한 형태를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 예정된 수준 또는 값은 단일 컷-오프 값, 예컨대 중간 또는 평균일 수 있다.

[0138] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드의 투여는 세포에서 HMGB1 발현 수준을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, HMGB1 발현 수준에서의 감소는 HMGB1의 적절한 대조군 수준과 비교하여 1% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 15% 이하, 20% 이하, 25% 이하, 30% 이하, 35% 이하, 40% 이하, 45% 이하, 50% 이하, 55% 이하, 60% 이하, 70% 이하, 80% 이하, 또는 90% 이하로의 감소일 수 있다. 적절한 대조군 수준은 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단에서의 HMGB1 발현 수준일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 따른 세포로의 올리고뉴클레오티드의 전달 효과는 한정된 기간 후에 평가된다. 예를 들어, HMGB1 수준은 올리고뉴클레오티드를 세포에 도입한지 적어도 8 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간; 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 14 일 후에 세포에서 분석될 수 있다.

[0139] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 세포에서 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 그의 센스 및 안티센스 가

닥)를 발현하도록 조작된 트랜스진의 형태로 전달된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 본원에 개시된 임의의 올리고뉴클레오티드를 발현하도록 조작된 트랜스진을 이용하여 전달된다. 트랜스진은 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 우두 바이러스, 수두 바이러스, 아데노-연관된 바이러스 또는 단순 포진 바이러스) 또는 비-바이러스 벡터 (예를 들어, 플라스미드 또는 합성 mRNA)를 이용하여 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 대상체에게 직접적으로 주사될 수 있다.

[0140] **ii. 치료 방법**

[0141] 본 개시내용의 측면은 대상체에서 간 섬유증의 발병 또는 진행을 약화시키기 위해 HMGB1 발현을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 이러한 감소를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나의 유효량을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 치료를 이용하여, 예를 들어 임의의 유형의 간 섬유증을 늦추거나 또는 중단시킬 수 있다. 본 개시내용은 간 섬유증 및/또는 간 염증과 연관된 질환 또는 장애의 위험이 있는 (또는 그에 걸리기 쉬운) 대상체를 치료하는 예방적 및 치료적 방법 둘 다를 제공한다.

[0142] 특정 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료제 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드 또는 이를 코딩하는 벡터 또는 트랜스진)를 투여함으로써 대상체에서 본원에 기재된 질환 또는 장애를 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 치료하고자 하는 대상체는 예를 들어 간에서 HMGB1 단백질 양의 감소로부터 치료적으로 이익을 얻을 것인 대상체이다. 질환 또는 장애의 위험이 있는 대상체는 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 진단 또는 예후 검정 중 하나 또는 이들의 조합에 의해 확인될 수 있다 (예를 들어, 간 섬유증 및/또는 간 염증의 확인). 예방제의 투여는 질환 또는 장애의 특징적인 증상의 검출 또는 출현 이전에 일어날 수 있으며, 따라서 질환 또는 장애가 예방되거나 또는 대안적으로 그의 진행이 지연된다.

[0143] 본원에 기재된 방법은 전형적으로 대상체에게 올리고뉴클레오티드의 유효량, 즉, 바람직한 치료 결과를 생성할 수 있는 양을 투여하는 것을 수반한다. 치료적으로 허용가능한 양은 질환 또는 장애를 치료할 수 있는 양일 수 있다. 임의의 한 대상체에게 적절한 용량은 대상체의 크기, 신체 표면적, 연령, 투여되는 특정한 조성물, 조성물 중의 활성 성분(들), 투여 시간 및 경로, 전반적인 건강, 및 동시에 투여되는 다른 약물을 비롯하여 특정 인자에 따라 좌우될 것이다.

[0144] 일부 실시양태에서, 대상체에게 본원에 개시된 조성물 중 어느 하나를 장내로 (예를 들어, 경구로, 위 공급관에 의해, 십이지장 공급관에 의해, 위루형성술을 통해 또는 직장으로), 비경구로 (예를 들어, 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입, 동맥내 주사 또는 주입, 골내 주입, 근육내 주사, 대뇌내 주사, 뇌실내 주사, 경막내), 국소적으로 (예를 들어, 표피, 흡입, 점안제를 통해 또는 점막을 통해), 또는 표적 기관 (예를 들어, 대상체의 간)으로 직접 주사에 의해 투여한다. 전형적으로, 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드를 정맥내로 또는 피하로 투여한다.

[0145] 비제한적인 예로서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 분기별로 (3 개월마다 한번), 격월로 (2 개월마다 한번), 매달 또는 매주 투여될 것이다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 1, 2 또는 3 주마다 투여될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 매일 투여될 수 있다.

[0146] 일부 실시양태에서, 치료하고자 하는 대상체는 인간 또는 비-인간 영장류 또는 다른 포유류 대상체이다. 다른 예시적인 대상체에는 길들여진 동물, 예컨대 개 및 고양이; 가축, 예컨대 말, 소, 돼지, 양, 염소 및 닭; 및 동물, 예컨대 마우스, 래트, 기니피그 및 햄스터가 포함된다.

[0147] **실시에**

[0148] **실시예 1: 인간 및 마우스 세포-기반 검정을 이용하는 HMGB1 RNAi 올리고뉴클레오티드의 개발**

[0149] 도 1은 HMGB1 발현의 억제에 대한 후보 RNAi 올리고뉴클레오티드를 개발하기 위해 인간 및 마우스-기반 검정을 이용하는 흐름도를 도시한다. 먼저, 컴퓨터-기반 알고리즘을 이용하여 HMGB1 억제에 대한 후보 올리고뉴클레오티드 서열 (25 내지 27합체)을 생성하였다. 이어서, HMGB1 발현을 감소시키는 후보 RNAi 올리고뉴클레오티드의 능력을 평가하기 위해 세포-기반 검정 및 PCR 검정을 이용하였다.

[0150] 컴퓨터 알고리즘은 인간 HMGB1 mRNA (서열식별번호: 371, 표 1)에 대해 상보적인 RNAi 올리고뉴클레오티드 서열을 제공하였고, 그의 특정 서열은 또한 원숭이 HMGB1 mRNA (서열식별번호: 372, 표 1) 및 마우스 HMGB1 mRNA (서열식별번호: 373, 표 1)에 대해 상보성이었다.

[0151] 표 1. 인간, 레수스 원숭이 및 마우스 HMGB1 mRNA의 서열

종	진뱅크 참고 서열 번호	서열 식별자
인간	NM_002128.5	SEQ ID NO: 371
원숭이	NM_001283356.1	SEQ ID NO: 372
마우스	NM_010439.4	SEQ ID NO: 373

[0152]

[0153] 상기 알고리즘은 수백개의 RNAi 올리고뉴클레오티드 서열을 생성하였고, 그 중에서 96개의 올리고뉴클레오티드가 세포-기반 검정에서 실험적 평가에 대한 최고 후보로서 생물정보적으로 확인되었다. 이 검정에서, HMGB1을 발현하는 Hepa 1-6 (ATCC® CRL-1830™) 간세포를 올리고뉴클레오티드로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 이후에 소정 기간 동안 세포를 유지한 다음, 남아있는 HMGB1 mRNA의 수준을 TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여 측정하였다. 2가지 qPCR 검정, 3' 검정 및 5' 검정을 이용하였다. 96개의 모든 RNAi 올리고뉴클레오티드를 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드 및 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오티드의 조합물을 함유하는, M15로 지정된 동일한 변형 패턴을 이용하여 평가하였다. 시험한 올리고뉴클레오티드의 서열을 표 2에 제공하였다.

[0154] 표 2. 마우스 Hepa 1-6 세포-기반 검정에 대한 후보 올리고뉴클레오티드 서열

Hs	Rh	Mm	센스 SEQ ID NO	상응하는 안티센스 SEQ ID NO
X	X	X	1-11; 24-43; 54-69; 96	97-107; 120-139; 150-165; 192
X	X		12-23; 53; 70; 71; 73-75; 89-93; 95	108-119; 149; 166; 167; 169-171; 185-189; 191
X			44-52	140-148

[0155]

[0156] Hs: 인간, Rh: 레수스 원숭이, 및 Mm: 마우스; 센스 및 안티센스 서열식별번호 컬럼은 혼성화되어 각각의 올리고뉴클레오티드를 생성하는 센스 가닥 및 각각의 안티센스 가닥을 제공한다. 예를 들어, 서열식별번호: 1을 갖는 센스 가닥은 서열식별번호: 97을 갖는 안티센스 가닥과 혼성화하고; 시험한 각각의 올리고뉴클레오티드는 동일한 변형 패턴을 가졌다.

[0157] HMGB1 mRNA에서 핫스팟

[0158] 96개의 후보 RNAi 올리고뉴클레오티드의 스크리닝으로부터의 데이터가 도 3a-3d에 도시된다. 음성 대조군과 비교하여 25% 이하의 mRNA가 남아있게 하는, 세포 기반 검정에서 최고 성능 올리고뉴클레오티드를 추가의 실험적 특징분석을 위해 히트로서 선택하였다. HMGB1 발현을 억제하지 않는 것으로 확인된 올리고뉴클레오티드를 음성 대조군으로 사용하였다. 하우스-키핑 유전자 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (HPRT)는 그의 발현이 HMGB1의 발현을 억제함으로써 변경되지 않기 때문에 이를 HMGB1 발현에 대한 정규화 유전자로서 사용하였다.

[0159] 인간 HMGB1 mRNA에서 핫스팟은 이들 올리고뉴클레오티드의 활성 및 위치를 실험함으로써 확인되었다. 핫스팟은 대조군과 비교하여 전체 검정에서 25% 이하인 mRNA 수준을 일으키는 적어도 2개의 올리고뉴클레오티드와 연관된 인간 HMGB1 mRNA 서열 상의 스트레치로서 확인되었다. 따라서, 인간 HMGB1 mRNA 서열 내에서 하기 핫스팟이 확인되었다: 935-965; 1100-1130; 1160-1215; 1230-1270; 1470-1500; 1680-1710; 2190-2220; 및 2280-2310.

[0160] 핫스팟의 서열을 표 3에 나타내었다.

[0161] 표 3. 핫스팟의 서열

핫스팟 위치	서열	SEQ ID NO:
935-965	TAAGATTTGTTTTTAAACTGTACAGTGTCTT	374
1100-1130	TTGGTGCACAGCACAAATTAGTTATATATGG	375
1160-1215	TCTGATGCAGCTTATACGAAATAATTGTTGTTCTGTTA ACTGAATACCACTCTGTA	376
1230-1270	AAAAAAGTTGCAGCTGTTTTGTTGACATTCTGAATGCT TCT	377
1470-1500	TGAGATAGTTTTTCATCCATAACTGAACATCC	378
1680-1710	TACCATGTAATGGCAGTTATATTTTGCAGTT	379
2190-2220	TTTACACGCTTTTGTGATGGAGTGCTGTTTT	380
2280-2310	AATACTGAACATCTGAGTCTGGATGATACT	381

[0162]

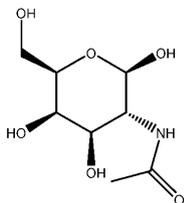
[0163] 용량 반응 분석

[0164] 종들 사이의 유전자 위치 및 서열 보존을 고려하여, 24개의 최고 성능 RNAi 올리고뉴클레오티드를 이차 스크리닝에서 분석을 위해 선택하였다. 이 이차 스크리닝에서, RNAi 올리고뉴클레오티드를 일차 스크리닝과 동일한 검정을 이용하여 시험하였으나, 3가지 상이한 농도 (1 nM, 0.1 nM 및 0.01 nM)를 이용하였다 (도 4). 이어서, 2가지 이상의 농도에서 활성을 나타내는 이들 RNAi 올리고뉴클레오티드를 추가의 분석에 적용하였다.

[0165] 이차 스크리닝으로부터의 최고 후보에 대한 이러한 추가의 분석에서, 서열을 닉킹된 테트라루프 구조 포맷 (36 합체 패신저 가닥과 22합체 가이드 가닥)으로 RNAi 올리고뉴클레오티드에 도입시켰다. 닉킹된 테트라루프 구조 포맷에서 이들 RNAi 올리고뉴클레오티드를 초기에 HMGB1 mRNA 발현을 감소시키는 그들의 능력에 대해 1nM에서 시험하였다. 도 5는 그들의 센스 및 안티센스 가닥에 상이한 배열의 2'-플루오로 및 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오티드, 및 포스포로티오에이트 및 포스포디에스테르 연결을 포함하고, 그들의 안티센스 가닥에 5' 말단 뉴클레오티드에 위치하는 포스페이트 유사체를 포함하는, 각각 M28, M47, M48 및 M52로 지정된 4가지 상이한 변형 패턴에 맞춰진, 닉킹된 테트라루프 구조를 갖는 상이한 염기 서열로 제조된 RNAi 올리고뉴클레오티드, 및 M46으로 지정된 비변형된 대조군에 대한 데이터를 도시한다. 각각의 화합물에 대한 최대 절반 억제 농도 (IC₅₀)를 측정하기 위해 Hepa1-6 세포에서 완전 용량 반응 곡선을 이용하여 최고 RNAi 올리고뉴클레오티드를 추가로 시험하였다 (도 6 참고).

[0166] 생체내 유리 실험

[0167] 상기 시험관내 실험으로부터의 데이터를 평가하여 마우스 간세포에서 HMGB1 발현의 감소를 위한 활성을 유지하면서 전달 성질을 개선시키는 테트라루프 및 변형 패턴을 확인하였다. 이어서, 이 분석을 기반으로 하여, 선택된 올리고뉴클레오티드를 GalNAc 모이어티에 접합시켰다. 도 2에 도시된 바와 같이, 1가 GalNAc 모이어티를 센스 가닥의 테트라루프에서 GAAA 서열의 각각의 뉴클레오티드에 접합시켰다. 클릭 링커를 이용하여 접합을 수행하였다. 사용된 GalNAc를 하기에 도시하였다:



[0168]

[0169] N-아세틸-β-D-갈락토사민 (CAS#: 14131-60-3)

[0170] 상이한 변형 패턴 및 닉킹된 테트라루프 구조를 갖는 GalNAc-접합된 RNAi 올리고뉴클레오티드의 그룹을 C57BL/6 마우스에게 10 mg/kg으로 피하 투여하였다. HPRT 대조군 mRNA와 비교한 HMGB1 mRNA의 백분율을 72 시간째에 측정하였다 (도 7).

[0171] TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여, PBS 대조군과 비교하여 올리고뉴클레오티드를 투여한지 24 시간 후에 남

아있는 HMGB1 mRNA의 양에 대해, 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 3개의 후보 GalNAc-접합된 올리고뉴클레오타이드를 3가지 상이한 용량에서 (0.3 mg/kg, 1 mg/kg 및 3 mg/kg) 다시 시험하였다 (도 8).

[0172] RNAi 올리고뉴클레오타이드 중 2개를 3 mg/kg 또는 3 mg/kg 및 10 mg/kg에서 상이한 변형 패턴을 이용하는 추가의 시험을 위해 선택하였다. 다시, PBS 대조군과 비교하여 올리고뉴클레오타이드를 투여한지 72 시간 후에 남아있는 HMGB1 mRNA의 백분율을 TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여 측정하였다 (각각 도 9 및 도 10 참고). 올리고뉴클레오타이드를 그들의 센스 및 안티센스 가닥에 상이한 배열의 2'-플루오로 및 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 및 포스포로티오에이트 및 포스포디에스테르 연결을 포함하고, 그들의 안티센스 가닥에 5' 말단 뉴클레오타이드에 위치하는 포스페이트 유사체를 포함하는, M49, M54, M55, M56으로 지정된 상이한 변형 패턴으로 시험하였다.

[0173] (PBS 대조군과 비교하여) 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc-접합된 HMGB1 RNAi 올리고뉴클레오타이드의 1 mg/kg 피하 투여 이후 5 일째에 남아있는 HMGB1 mRNA의 백분율을 상이한 변형을 갖는 동일한 서열의 올리고뉴클레오타이드 (도 11) 뿐만 아니라 동일한 변형 패턴을 보유한 상이한 서열의 올리고뉴클레오타이드에 대해 측정하였다.

[0174] RNAi 올리고뉴클레오타이드를 유체역학적으로 주사한 마우스 (HDI 마우스)에서의 활성에 대해 인간 HMGB1 유전자 ("인간 고유")에서만 확인된 서열과 함께 삼중-공통 서열을 또한 시험하였다. 간략히, 마우스에게 2 mL의 인간 HMGB1 및 NEOMYCIN 플라스미드-함유 용액을 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 7 초에 걸쳐 투여하였다. HDI 주사 4 일 전에 각각의 마우스에게 1 mg/kg의 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 피하로 주사하였다. 후속적으로, (NEO-168에 대해 정규화된) 남아있는 HMGB1 mRNA의 백분율을 TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여 측정하였다. 이들 결과는, 이전의 스크리닝으로부터 선택된 삼중 공통 서열에 대해 상보적인 RNAi 올리고뉴클레오타이드가 인간 고유 서열에만 결합된 선택된 올리고뉴클레오타이드에 비해 HMGB1 발현을 더욱 강력하게 하향조절하였음을 입증하였다.

[0175] **실시예 2: 간독성제 모델에서 치료의 평가**

[0176] 실시예 1에서 확인된 후보 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 APAP-유도된 (아세트아미노펜-유도된) 간 손상의 모델에서 추가로 시험하였다. 아세트아미노펜은 대사되어 활성 대사산물인 N-아세틸-p-벤조퀴논 이민 (NAPQI)을 형성하는 것으로 공지되어 있다. NAPQI는 미토콘드리아 단백질에 결합하여 NAPQI 단백질 부가물을 형성하여, 간세포 괴사를 유도한다.

[0177] **모델 1 - APAP**

[0178] 0.9 % NaCl 복강내 주사 중 250 또는 350 mg/kg APAP를 투여하기 전에 10 마리의 C57BL/6 수컷 마우스 (10-11 주령)의 그룹을 12 시간 동안 금식시켰다. 혈액 및/또는 간 조직을 6, 24 및 48 시간째에 수집하였다. 연구에 대한 종점 측정은 간 손상의 정량화 (ALT, AST, 및 GLDH-*IDEXX* 수준), 생체마커 프로파일링 (ELISA, 웨스턴 블롯 및 RT-qPCR을 통한 혈청/간 HMGB1 수준 및 miR122 수준), 및 간 염색 (H&E, HMGB1, Ly6-B, 및 F4/80 염색)이었다. 도 12에 개략적으로 도시된다.

[0179] 도 13a 및 13b는 350 mg/kg APAP vs 식염수 대조군 주사로 처리된 동물의 간 (Hprt1에 대해 정규화됨) 및 혈청 (mg/mL)에 남아있는 HMGB1의 백분율을 도시한다. HMGB1 mRNA 수준을 TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여 측정하였다. 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc 접합된 RNAi 올리고뉴클레오타이드 및 지질 나노입자 제형으로 제공된 RNAi 올리고뉴클레오타이드 (LNP 제형화된 RNAi 올리고뉴클레오타이드)는 >80%의 *HMGB1* mRNA를 하향조절하였다. 그러나, 혈청 HMGB1은 HMGB1-LNP 처리된 동물에서만 유의하게 감소되었다. 도 13a-13b에 도시된 실험에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드는 S212-AS296-M49이다.

[0180] 간 기능 검사 (LFT) 또한 350 mg/kg APAP로 처리된 동물에서 수행하였다. 이들 실험은 또한 LNP 제형화된 및 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc 접합된 HMGB1 올리고뉴클레오타이드 둘 다에서 혈청 AST, ALT 및 miR122 수준에 따라 간독성에서의 감소를 입증하였으며, LNP 제형화된 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 사용할 때 보다 큰 감소가 관찰되었다 (도 14a-14c 참고). 도 14a-14c에 도시된 실험에서의 HMGB1 올리고뉴클레오타이드는 S212-AS296-M49이다.

[0181] **모델 2 - APAP**

[0182] APAP 독성에 대한 모델을 이용하는 두번째 연구에서, 10 마리의 C57BL/6 수컷 마우스 (10-11 주령)의 그룹을 0.9 % NaCl 복강내 주사 중 350 mg/kg APAP를 투여하기 전에 12 시간 동안 금식시켰다. APAP 투여 전에 동물을 5 mg/kg의 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc-접합된 RNAi 올리고뉴클레오타이드 또는 1.5 mg/kg의 LNP 제형화된 RNAi 올리고뉴클레오타이드로 여러번 처리하였다. 혈액 및/또는 간 조직을 APAP를 투여한지 24 시

간 후에 수집하였다. 연구에 대한 중점 측정은 간 손상의 정량화 (ALT, AST, 및 GLDH-*IDEXX* 수준), 바이오마커 프로파일링 (ELISA 및 RT-qPCR을 통한 혈청/간 HMGB1 수준 및 miR122 수준), 및 간 염색 (H&E 및 HMGB1 면역조직화학)이었다. 도 15에 도시된 개략도를 참고한다.

[0183] 도 16a-16b는 350 mg/kg APAP vs 식염수 대조군 주사로 처리된 동물의 간 (Hprt1에 대해 정규화됨) 및 혈청 (mg/mL)에 남아있는 HMGB1의 백분율을 도시한다. HMGB1 mRNA 수준을 TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여 측정하였다. 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc 접합된 RNAi 올리고뉴클레오티드 및 LNP 제형화된 RNAi 올리고뉴클레오티드는 간에서 >80%의 *HMGB1* mRNA를 하향조절하였다. 혈청 HMGB1 또한 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc 접합된 RNAi 올리고뉴클레오티드 및 LNP 제형화된 RNAi 올리고뉴클레오티드 둘 다를 사용하여 유의하게 감소되었다. 도 16a-16b에 도시된 실험에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 S212-AS296-M56이다.

[0184] 추가로, ALT, AST, LDH 및 혈청 miR122 수준을 APAP-처리된 마우스에서 측정하였고, GalNAc 접합된 또는 LNP 제형화된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 투여가 간 손상을 억제하였음을 입증하였다 (도 17a-17d 참고). 도 17a-17d에 도시된 실험에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 S212-AS296-M56이다.

[0185] 집합적으로, APAP 독성 모델을 이용하는 연구는, HMGB1 올리고뉴클레오티드 처리된 동물이 대조군 동물과 비교할 때 감소된 HMGB1 혈청 수준 및 간 손상을 가짐을 입증하였다.

[0186] 모델 3 - 사염화탄소

[0187] 마우스의 그룹에게 체중 그램당 3 μ l의 올리브유와 혼합된 사염화탄소 (1:5 v/v 비의 CCl₄:올리브유) 또는 올리브유 대조군 용액을 6 주 동안 주 2회로 복강내 주사에 의해 투여하였다. 표 4 및 도 18에 도시된 바와 같이, 동물을 도시된 그룹으로 무작위화하고, 처리하지 않고 두거나, 또는 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 또는 PBS로 피하 (S.C.) 또는 정맥내 (I.V.) 주사를 통해 5 또는 6 주 동안 주 1회로 연구 설계에 따라 처리하였다.

그룹	CCl ₄	처리	용량 (mg/kg)	부피 (ml/kg)	투여 시작	투여 빈도 및 일수	마우스 마리수	경로
1	올리브유	-	-	-	-	-	10	-
2	CCl ₄	PBS	0	10	-4 일째	qw x 6 주	10	S.C.
3	CCl ₄	GalNAc-접합된 HMGB1 올리고	5	10	11 일째	qw x 5 주	10	S.C.
4	CCl ₄	GalNAc-접합된 HMGB1 올리고	5	10	-4 일째	qw x 6 주	10	S.C.
5	CCl ₄	LNP HMGB1 올리고	2.5	10	-4 일째	qw x 6 주	10	I.V.

[0188] 표 4: 그룹 설계 및 화합물 투여 스케줄

[0189] 간 손상을 나타내는 몇몇 파라미터를 연구 종료시에 마우스에서 실험하였다. PBS-처리된 동물과 비교할 때 HMGB1 RNAi 올리고뉴클레오티드-처리된 동물의 두 그룹 모두에서 섬유증 (시리우스 레드 염색을 이용함) 및 대식세포 침윤 및 활성화 (마우스 대식세포 마커인 F4/80 단백질에 대해 특이적인 항체에 의한 면역조직화학 분석을 이용함) 둘 다에서의 유의한 감소가 관찰되었다. 더 긴 투여 레지멘을 이용하여 정상 세포 활성화 (α -SMA 염색을 통해 측정됨) 및 간중 (간 중량 대 체중 비를 이용하여 측정됨) 둘 다에서 유의한 감소가 관찰되었다 (도 19-22에 도시된 데이터). 이 연구에서 사용된 HMGB1 RNAi 올리고뉴클레오티드는 S212-AS296-M49로 식별되었고, GAAA 루프의 4개 뉴클레오티드 위치 각각에 접합된 1가 GalNAc 모이어티를 갖는다.

[0191] 추가로, 상기와 같이 사염화탄소로 처리된 동물로부터의 간을 시리우스 레드 염색을 이용하여 주사후 43 일째에

실험하였다. 이들 실험은 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc-접합된 HMGB1 RNAi 올리고뉴클레오티드의 투여 (5 mg/kg 피하 투여 또는 2.5 mg/kg 정맥내 투여)가 간 샘플에서 상대적인 시리우스 레드-양성 면적을 유의하게 감소시켰음을 밝혀냈고, 이는 이들 동물에서 간 섬유증이 유의하게 감소되었음을 나타낸다 (도 23). 도 23에 도시된 실험에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 S212-AS296-M49이다.

[0192] **실시예 3: 자가면역 간 질환의 모델에서 치료의 평가**

[0193] 5 마리의 C57BL/6 수컷 마우스 (10-11 주령)의 두 그룹을 10 mg/kg의 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 또는 PBS를 피하 투여한지 6 일 후에 20 mg/kg의 정맥내 콘카발린 A로 처리하였다. 콘카발린 A를 투여한지 1 일 후에, 동물을 간의 ALT 및 AST 혈청 수준 뿐만 아니라 H&E 염색에 대해 실험하였다 (도 24에 도시된 실험 개략도). 도 25는 동물이 PBS에 비해 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc-접합된 HMGB1 RNAi 올리고뉴클레오티드로 처리하였을 때 생존할 가능성이 3배 더 높았음을 입증한다. 추가로, 생존한 HMGB1 올리고뉴클레오티드-처리된 동물은 PBS 대조군에 비해 간의 H&E 염색된 샘플에서 괴사 가 덜 하였다. 도 25에 도시된 실험에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 S212-AS296-M49이다.

[0194] **실시예 4: 콜린-결핍성 아미노산-한정된 고지방 식이 (CDAHFD)의 모델에서 치료의 평가**

[0195] C57BL/6 마우스에게 대조군 고지방 식이 (CDHFD) 또는 콜린 결핍성 아미노산 한정된 고지방 식이 (CDAHFD) 및 일반 물 또는 설탕 물을 공급하였다. CDAHFD는 CDHFD에 비해 더 낮은 메티오닌 함량을 갖는다. 메티오닌 함량에서의 차이의 결과로서, CDHFD는 지방증을 생성하는 것으로 예상되지만, CDAHFD 식이에서 관찰된 NAFLD-유사 간 병리학을 생성하는 것으로 예상되지 않는다. 표 5 및 6에 도시된 바와 같이, 동물을 처리하지 않고 두거나, 또는 PBS 대조군 또는 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc-접합된 HMGB1 RNAi 올리고뉴클레오티드를 마우스에게 고지방 식이를 실시한 이후 6 주째에 시작하여 6 주 동안 (피하 투여) 5 mg/kg으로 투여하였다.

[0196] **표 5: 고지방 대조군 식이 및 일반 물 또는 설탕 물로 동물의 처리**

처리	식이	# 마우스	부검 주
-	CDHFD + 일반 물	5	6
-	CDHFD + 일반 물	5	9
PBS	CDHFD + 일반 물	5	12
GalNAc-접합된 HMGB1 올리고	CDHFD + 일반 물	5	12
-	CDHFD + 설탕 물	5	6
-	CDHFD + 설탕 물	5	9
PBS	CDHFD + 설탕 물	5	12
GalNAc-접합된 HMGB1 올리고	CDHFD + 설탕 물	5	12

[0197]

[0198] **표 6: 콜린 결핍성 아미노산 한정된 고지방 식이 (CDAHFD) 및 일반 물 또는 설탕 물로 동물의 처리**

처리	식이	# 마우스	부검 주
-	CDAHFD + 일반 물	5	6
-	CDAHFD + 일반 물	5	9
PBS	CDAHFD + 일반 물	5	12
GalNAc-접합된 HMGB1 올리고	CDAHFD + 일반 물	5	12
-	CDAHFD + 설탕 물	5	6
-	CDAHFD + 설탕 물	5	9
PBS	CDAHFD + 설탕 물	5	12
GalNAc-접합된 HMGB1 올리고	CDAHFD + 설탕 물	5	12

[0199]

[0200] HMGB1 mRNA는 CDHFD 대조군 고지방 식이와 비교하여 콜린 결핍성 아미노산 한정된 고지방 식이 (CDAHFD)를 소비

한 마우스에서 상승되었다 (도 26a 및 26b). 추가로, 콜라겐 1a1 (Colla1) 및 비멘틴 mRNA 수준은 CDHFD 단독에 비해 CDAHFD에 의해 >100x 상승하였다 (각각 도 26c 및 26d). 닉킹된 테트라루프 구조를 함유하는 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 처리한지 6 주 후에 이들 마커에 대한 유의한 감소를 입증하였다.

[0201] AST 및 ALT 수준 또한 대조군 고지방 식이 (CDHFD)를 소비한 마우스에 비해 CDAHFD를 소비한 마우스에서 상승되었다 (도 27). GalNAc-접합된 HMGB1 RNAi 올리고뉴클레오티드는 처리한지 6 주 후에 이들 마커에 대한 중간 정도의 감소를 입증하였다. 도 26a-26d 및 27에서 사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 S194-AS274-M30이다. 이는 센스 및 안티센스 가닥에 상이한 배열의 2'-플루오로 및 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오티드, 및 포스포로티오에이트 및 포스포디에스테르 연결을 포함하고, 그의 안티센스 가닥에 5' 말단 뉴클레오티드에 위치하는 포스페이트 유사체를 포함한다.

[0202] **실시예 5. 추가의 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 활성의 시험**

[0203] 이 실시예에서 사용된 추가의 모든 HMGB1 올리고뉴클레오티드는 인간, 원숭이 (둘 다 레수스) 및 마우스 서열에서 알고리즘에 의해 확인된 보존된 서열 ("삼중 공통" 서열)에 결합하도록 설계되었다. 추가의 HMGB1 올리고뉴클레오티드를 테트라루프를 함유하고 상이한 변형 패턴에 맞추도록 실시예 1에 기재된 바와 같이 변형시켰다. 상이한 변형 패턴 (예를 들어, M58, M59, M60 또는 M61로 지정됨)은 그들의 센스 및 안티센스 가닥에 상이한 배열의 2'-플루오로 및 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오티드, 및 포스포로티오에이트 및 포스포디에스테르 연결을 포함하고, 그들의 안티센스 가닥에 5' 말단 뉴클레오티드에 위치하는 포스페이트 유사체를 포함한다. 올리고뉴클레오티드 억제제를 또한 GalNAc 모이어티에 접합시켰다. 3개의 GalNAc 모이어티를 센스 가닥 상의 테트라루프에서 뉴클레오티드에 접합시켰다. 접합을 실시예 1에 기재된 바와 같이 클릭 링커를 이용하여 수행하였다. 이어서, GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드를 마우스에서 및 시험관내 배양된 간세포에서 HMGB1 mRNA 발현을 감소시키는 그들의 능력에 대해 시험하였다.

[0204] 3가지 상이한 변형 패턴 (M58, M59 및 M60으로 변형됨)을 갖는 8개의 상이한 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 (S204-AS286, S205-AS287, S210-AS366, S211-AS367, S363-AS368, S364-AS369, S212-AS296, 및 S365-AS370)를 HMGB1을 녹다운시키는 그들의 효능에 대해 시험하였다. 특이적인 변형 패턴을 갖는 지정된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 1가지 단일 용량 (1 mg/kg)을 CD-1 마우스에게 피하 주사하였다. 주사한지 5 일 후에 마우스를 안락사시키고, 간 샘플을 수집하였다. 간 샘플로부터 RNA를 추출하여, qPCR에 의해 HMGB1 mRNA 수준을 평가하였다 (HPRT1-F576에 대해 정규화됨, 하우스키핑 유전자). 남아있는 HMGB1 mRNA의 수준을 TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여 측정하였다. 시험한 모든 HMGB1 올리고뉴클레오티드 및 변형 패턴은 HMGB1을 녹다운시키는데 효능이 있었고, 변형 패턴 M59 및 M60은 더 높은 효능을 나타내었다 (도 28).

[0205] 확증적인 용량-반응 검정을 또한 상이한 변형 패턴 (M58, M59 또는 M60)을 갖는 6개의 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 (S204-AS286, S205-AS287, S211-AS367, S364-AS369, S212-AS296, 및 S365-AS370)에 대해 수행하였다. 지정된 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 단일 용량 (1, 0.5 또는 0.25 mg/kg)을 CD-1 마우스에게 피하 투여하였다. 투여한지 5 일 후에 마우스를 안락사시키고, 간 샘플을 수집하였다. RNA를 추출하여 qPCR에 의해 HMGB1 mRNA 수준을 평가하였다 (HPRT1-F576에 대해 정규화됨, 하우스키핑 유전자). 남아있는 HMGB1 mRNA의 수준을 TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여 측정하였다. 이 실험에서 PBS를 음성 대조군으로 사용하였고, S204-AS286-M61을 양성 대조군으로 사용하였다. 시험한 거의 모든 HMGB1 올리고뉴클레오티드 억제제는 용량-의존성 효능을 입증하였다 (도 29a 및 29b). 시험한 HMGB1 올리고뉴클레오티드 억제제의 일부는 S204-AS286-M61 대조군에 비해 개선된 효능을 나타내었다 (도 29a 및 29b). 확증적인 용량-반응 검정을 S204-AS286-M59, S211-AS367-M59, S364-AS369-M60, 및 S365-AS370-M59에 대해 반복하였다. 유사한 결과가 측정되었고, 비-간세포에서 HMGB1 발현 수준이 발현 기준선으로 고려되는 경우, 시험한 모든 HMGB1 올리고뉴클레오티드 억제제는 약 0.5 내지 1.0 mg/kg의 ED₅₀을 나타내었다 (도 31a 및 31b).

[0206] 상이한 변형 패턴 (각각 M59 및 M60으로 지정됨)을 갖는 2개의 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 (S211-AS367-M59, S364-AS369-M60)를 마우스에서 HMGB1 발현을 억제하는 그들의 활성에 대해 평가하기 위해 기간 연구에서 생체 내에서 시험하였다. 이 실험에서 PBS를 음성 대조군으로 사용하였고, S204-AS286-M58을 양성 대조군으로 사용하였다. 마우스에게 지정된 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드의 단일 용량 (1 mg/kg)을 피하 주사하였다. 주사 이후 7, 14, 21 및 28 일째에 마우스를 안락사시키고, 간 샘플을 수집하였다. RNA를 추출하여 qPCR에 의해 HMGB1 mRNA 수준을 평가하였다 (HPRT1-F576에 대해 정규화됨, 하우스키핑 유전자). HMGB1 mRNA에서 상이한 영역에 대해 특이적인 2가지 상이한 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 다른 프라이머와 비교하여 5' 말단에서 프라이머를 사용하여 수행되는 qPCR은 "5' qPCR"로 지정되었다. 유사하게, 다른 프라

이며와 비교하여 3' 말단에서 프라이머를 사용하여 수행되는 qPCR은 "3' qPCR"로 지정되었다. 데이터는, (PBS 대조군 처리에 대해 정규화된) 7, 14, 21 및 28 일째에 마우스 간에 남아있는 HMGB1 mRNA의 감소된 양에 의해 나타나는 바와 같이, 시험한 모든 HMGB1 올리고뉴클레오티드가 주사한지 3 주 후에 HMGB1을 녹다운시키는데 효능이 있었음을 나타내었다 (도 30a 및 30b).

[0207] 도 31a 및 31b에서 시험한 모든 HMGB1 올리고뉴클레오티드 억제제 (S204-AS286-M59, S211-AS367-M59, S364-AS369-M60, 및 S365-AS370-M59)를 선택하여 3 주 기간 연구에서 추가로 시험하였다. 이 연구에서, 지정된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 억제제의 단일 용량 (4 mg/kg)을 CD-1 마우스에게 피하 주사하였다. 주사한지 21 일 후에 마우스를 안락사시키고, 간 샘플을 수득하였다. RNA를 추출하여 qPCR에 의해 HMGB1 mRNA 수준을 평가하였다 (HPRT1-F576에 대해 정규화된, 하우스키핑 유전자). 남아있는 HMGB1 mRNA의 수준을 TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여 수득하였다. 결과는 시험한 모든 HMGB1 올리고뉴클레오티드 억제제가 주사한지 3 주 후에 HMGB1을 녹다운시키는 효능을 보유하고 있음을 나타내었다 (도 32a 및 32b).

[0208] 각각의 억제제에 대한 최대 절반 억제 농도 (IC₅₀)를 측정하기 위해, 레우스 원숭이 또는 인간 간세포에서 완전 용량 반응 곡선을 이용하여 특정한 GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드를 추가로 시험하였다. 인간 일차 간세포 (HPCH10+, Lot #1410214, 동결보존된 제노테크(Xenotech)) 또는 원숭이 일차 간세포 (P2000.H15, Lot #1410285, 동결보존된 제노테크)를 해동시키고, 옵티플레이트(OptiPlate) 간세포 배지 (K8200) 중에서 96-웰 조 직 배양 플레이트에서 웰당 50000개 세포 (인간) 또는 100000개 (원숭이)로 플레이팅하였다. 플레이팅된 간세포를 37°C 및 5% CO₂에서 1-6 시간 동안 회복시키고, 후속적으로 옵티컬처(OptiCulture) 간세포 배지 (K8300)를 사용하여 유지시켰다. 5배 개월 희석된 (7회) GalNAc-접합된 HMGB1 올리고뉴클레오티드 (S204-AS286-M61 및 S365-AS370-M59)를 세포에 첨가하였다. 원숭이 또는 인간 일차 간세포 세포로의 올리고뉴클레오티드의 흡수는 ASGPR 수용체에 의해 매개되었다. 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 48 시간 동안 인큐베이션하였다. SV 96 총 RNA 단리 시스템 (프로메가(Promega))을 이용하여 세포로부터 RNA를 추출하여, qPCR에 의해 남아있는 HMGB1 mRNA 수준을 평가하였다 (RhPPIB 또는 HsSFRS9 및 HsPIO8에 대해 정규화된, 하우스키핑 유전자). 남아있는 HMGB1 mRNA의 수준을 TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여 수득하였다. GalNAc-접합체 LDHA 올리고뉴클레오티드를 검정 대조군으로 사용하였고 (도 33c, 33f, 33g, 34c, 34f, 34g), 남아있는 LDHA mRNA의 수준을 RhLDHA-F887 qPCR 검정에 의해 측정하였다 (도 33g 및 34g).

[0209] 결과는, 서브-nM 내지 nM의 IC₅₀ 값에 의해 입증되는 바와 같이, HMGB1 올리고뉴클레오티드 억제제가 일차 마우스 간세포에서 HMGB1을 녹다운시키는데 효능이 있었음을 (서브-nM IC₅₀ 값) 나타내었다 (도 33a, 33b, 33d 및 33e). 유사한 녹다운 효능이 서브-nM IC₅₀ 값에 의해 입증되는 바와 같이 일차 인간 간세포에서 관찰되었다 (도 34a, 34b, 34d 및 34e).

[0210] 물질 및 방법

[0211] 트랜스펙션

[0212] 첫번째 스크리닝의 경우, 효율적인 트랜스펙션을 위해 리포펙타민 RNAiMAX™를 사용하여 올리고뉴클레오티드를 복합체화하였다. 올리고뉴클레오티드, RNAiMAX 및 옵티-MEM을 플레이트에 첨가하고, 트랜스펙션하기 전에 실온에서 20 분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 능동적으로 계대시키는 플라스크로부터 배지를 흡입하였고, 세포를 37°C에서 트립신의 존재하에 3-5 분 동안 인큐베이션하였다. 세포가 플라스크에 더이상 부착되지 않은 후에, 세포 성장 배지 (페니실린 및 스트렙토마이신 결여)를 첨가하여, 트립신을 중화시키고 세포를 현탁시켰다. 10 μl 분취량을 제거하고, 혈구계에 의해 카운트하여 밀리리터당 기준으로 세포를 정량화하였다. HeLa 세포의 경우, 20,000개 세포를 100 μl의 배지 중에서 웰마다 시딩하였다. 현탁액을 공지된 세포 농도로 희석하여, 트랜스펙션되는 세포의 개수에 대해 필요한 총 부피를 수득하였다. 희석된 세포 현탁액을 옵티-MEM 중의 올리고뉴클레오티드를 이미 함유한 96 웰 트랜스펙션 플레이트에 첨가하였다. 이어서, 트랜스펙션 플레이트를 37°C에서 24 시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 24 시간 후에, 배지를 각각의 세포로부터 흡인하였다. 용해 완충제를 이용하여 프로메가 RNA 단리 키트로부터 세포를 용해시켰다. 용해 완충제를 각각의 웰에 첨가하였다. 이어서, RNA 단리를 위해 용해된 세포를 코르벳 엑스트랙터진(Corbett XtractorGENE) (쿼아엑스트랙터(QIAXtractor))으로 옮기고, -80°C에서 보관하였다.

[0213] 후속적인 스크리닝 및 실험, 예를 들어 이차 스크리닝을 위해, 리포펙타민 RNAiMax를 사용하여, 역 트랜스펙션을 위한 올리고뉴클레오티드를 복합체화하였다. RNAiMAX 및 siRNA를 옵티MEM 배지 중에서 15 분 동안 혼합함으로써 복합체를 제조하였다. 트랜스펙션 혼합물을 다중-웰 플레이트로 옮기고, 세포 현탁액을 웰에 첨가하였다.

24 시간 인큐베이션 후에, 세포를 PBS로 1회 세척한 다음에, 용해 완충제를 사용하여 프로메가 SV96 키트로부터 용해시켰다. 진공 매니폴드에서 SV96 플레이트를 사용하여 RNA를 정제하였다. 이어서, 4 마이크로리터의 정제된 RNA를 65°C에서 5 분 동안 가열하고, 4°C로 냉각시켰다. 이어서, 고품량 역전사 키트 (라이프 테크놀로지스)를 사용하여 10 마이크로리터 반응으로 역전사를 위해 RNA를 사용하였다. 이어서, cDNA를 뉴클레아제 무함유 물에 의해 50 μ l로 희석하였고, 멀티플렉싱된 5'-엔도뉴클레아제 검정 및 소패스트(SSoFast) qPCR 마스터믹스 (바이오-라드 래버러토리즈(Bio-Rad laboratories))에 의해 정량적인 PCR을 위해 사용하였다.

[0214] *cDNA 합성*

[0215] 코르벳 엑스트랙터 진™ (퀴아엑스트랙터)을 이용하여 조직 배양물 중의 포유류 세포로부터 RNA를 단리하였다. 변형된 수퍼스크립트(SuperScript) II 프로토콜을 이용하여 단리된 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 단리된 RNA (대략적으로 5 ng/ μ l)를 5 분 동안 65°C로 가열하고, dNP, 무작위 헥사머, 올리고 dT 및 물과 함께 인큐베이션 하였다. 혼합물을 15 초 동안 냉각시켰다. 물, 5X 제1 가닥 완충제, DTT, 수퍼라제·인(SUPERase·In)™ (RNA 억제제), 및 수퍼스크립트 II RTase로 이루어진 "효소 믹스"를 혼합물에 첨가하였다. 씨모사이클러를 이용하여 내용물을 1 시간 동안 42°C로 가열한 다음, 15 분 동안 70°C로 가열한 다음, 4°C로 냉각시켰다. 이어서, 생성된 cDNA를 SYBR®-기반 qPCR에 적용하였다. 반응당 2가지 5' 엔도뉴클레아제 검정을 함유하는 qPCR 반응을 멀티플렉싱하였다.

[0216] *qPCR 검정*

[0217] 프라이머 세트를 초기에 SYBR®-기반 qPCR을 이용하여 스크리닝하였다. 검정 특이성을 용융 곡선 뿐만 아니라 "마이너스 RT" 대조군을 평가함으로써 증명하였다. HeLa 및 Hepa1-6 세포로부터 cDNA 주형의 희석액 (반응당 20 ng 내지 0.02 ng의 10배 계열 희석액)을 이용하여 각각 인간 (Hs) 및 마우스 (Mm) 검정을 시험하였다. qPCR 검정을 마이크로앰프(MicroAmp) 필름으로 피복된 384-웰 플레이트에서 설정하고, 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems)로부터의 7900HT 상에서 작동시켰다. 시약 농도 및 주기 조건은 다음을 포함하였다: 10 μ l까지의 총 부피로 2x SYBR 믹스, 10 μ M 정방향 프라이머, 10 μ M 역방향 프라이머, DD H2O, 및 cDNA 주형.

[0218] 일부 경우에, 언급된 바와 같이, TAQMAN®-기반 qPCR 검정을 이용하여 qPCR을 수행하였다. 표적 mRNA (예를 들어, HMGB1)의 코딩 영역 내에서 2가지 상이한 위치 (서로에 대해 5' 및 3')를 표적으로 하는 TAQMAN® 프로브는 일반적으로 분석에서 mRNA 수준을 추가로 확인하기 위해 사용되었다.

[0219] *클로닝*

[0220] 단일 용융-곡선을 제시하는 PCR 앰플리콘을 제조자의 지시에 따라 프로메가로부터의 pGEM®-T 이지 벡터 키트에 라이게이션하였다. 제조자의 프로토콜에 따라, JM109 고효율 세포를 새로 라이게이션된 벡터로 형질전환시켰다. 이어서, 세포를 앰플리콘을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 콜로니 성장을 위해 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0221] *PCR 스크리닝 및 플라스미드 미니-프랩*

[0222] PCR을 이용하여, 라이게이션된 관심 앰플리콘을 함유하는 벡터로 형질전환된 이. 콜라이(*E. coli*)의 콜로니를 확인하였다. 삽입체를 플랭킹하는 벡터-특이적 프라이머를 PCR 반응에서 사용하였다. 이어서, 모든 PCR 생성물을 1% 아گار로스 겔 상에서 작동시키고, 염색한 후에 투과조명기에 의해 영상화하였다. 겔을 정성적으로 평가하여, 플라스미드가 예상된 크기의 라이게이션된 앰플리콘 (대략 300 bp, 사용된 프라이머에 대해 특이적인 앰플리콘 및 플랭킹 벡터 서열을 포함함)을 함유하는 것으로 보이는지를 결정하였다.

[0223] 이어서, PCR 스크리닝에 의해 형질전환체를 확인한 콜로니를 진탕시키면서 37°C에서 2 mL LB 브로스 와 앰피실린으로 이루어진 배양물에서 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, 이. 콜라이 세포를 용해시키고, 관심 플라스미드를 프로메가의 미니-프랩 키트를 사용하여 단리하였다. 플라스미드 농도를 260 nm에서 UV 흡광도에 의해 측정하였다.

[0224] *플라스미드 시퀀싱 및 정량화*

[0225] 정제된 플라스미드를 빅다이(BigDye)® 터미네이터 시퀀싱 키트를 사용하여 시퀀싱하였다. 벡터-특이적 프라이머, T7을 사용하여 삽입체에 걸쳐있는 판독 길이를 제공하였다. 시퀀싱 반응에서 하기 시약을 사용하였다: 10 μ l의 부피로 물, 5X 시퀀싱 완충제, 빅다이 터미네이터 믹스, T7 프라이머, 및 플라스미드 (100 ng/ μ l). 혼합물을 96°C에서 1 분 동안 유지한 다음, 10 초 동안 96°C, 5 초 동안 50°C, 1 분 15초 동안 60°C의 15 주기; 10 초 동안 96°C, 5 초 동안 50°C, 1 분 30 초 동안 60°C의 5 주기; 및 10 초 동안 96°C, 5 초 동안 50°C 및 2 분

동안 60°C의 5 주기에 적용하였다. 이어서, 어플라이드 바이오시스템즈의 모세관 전기영동 시퀀서를 이용하여 염료 종결 반응을 시퀀싱하였다.

[0226] 이어서, 서열-검증된 플라스미드를 정량화하였다. 이들을 단일 절단 제한 엔도뉴클레아제를 이용하여 선형화하였다. 선형성을 아가로스 겔 전기영동을 이용하여 확인하였다. 모든 플라스미드 희석액을 mL 완충제당 100 µg의 tRNA를 갖는 TE 완충제 (pH 7.5) 중에서 제조하여, 폴리프로필렌 바이알에 대한 플라스미드의 비특이적 결합을 감소시켰다.

[0227] 이어서, 선형화된 플라스미드를 1,000,000 내지 01 카피/µl로 계열 희석하고, qPCR에 적용하였다. 검정 효율을 계산하였고, 효율이 90-110%의 범위인 경우에 검정이 허용가능한 것으로 여겼다.

[0228] *멀티플렉싱 검정*

[0229] 각각의 표적에 대해, mRNA 수준을 2가지 5' 뉴클레아제 검정에 의해 정량화하였다. 일반적으로, 각각의 표적에 대해 몇몇 검정을 스크리닝한다. 선택된 2가지 검정은 양호한 효율, 낮은 검출 한계, 및 관심 유전자 (GOI)의 넓은 5'→3' 범위의 조합을 제시하였다. 상이한 형광단이 각각의 프로브에 대해 사용된 경우에는, 1개의 GOI에 대해 2가지 검정을 하나의 반응으로 조합할 수 있다. 따라서, 검정 확인에서 마지막 단계는, 이들이 동일한 qPCR에서 조합되거나 또는 "멀티플렉싱"될 때, 선택된 검정의 효율성을 결정하기 위한 것이었다.

[0230] 10배 희석액 중에서 두 검정 모두에 대해 선형화된 플라스미드를 조합하고, qPCR을 수행하였다. 각각의 검정의 효율을 상기 기재된 바와 같이 결정하였다. 허용된 효율은 90-110%이었다.

[0231] 선형화된 플라스미드 표준을 사용하는 멀티플렉싱 반응을 확인하는 동안에, 관심 표적의 C_q 값 또한 주형으로서 cDNA를 사용하여 평가하였다. 인간 또는 마우스 표적의 경우에는, 각각 HeLa 및 Hepa1-6 cDNA를 사용하였다. 이 경우에 cDNA는 트랜스펙션되지 않은 세포로부터 코르벳 상에서 단리된 RNA (물 중 ~5 ng/µl)로부터 유래되었다. 이러한 방식으로, 이 샘플 cDNA로부터 관찰된 C_q 값은 96-웰 플레이트 트랜스펙션으로부터 예상된 C_q 값을 나타내었다. C_q 값이 30 초과인 경우에, 관심 유전자의 보다 높은 발현 수준을 나타내는 다른 세포주를 구하였다. 각각의 인간 및 마우스 세포주로부터 코르벳 상에서 고처리량 방법을 통해 단리된 총 RNA의 라이브러리를 생성하였고, 표적 발현의 허용가능한 수준을 스크리닝하기 위해 사용하였다.

[0232] *올리고뉴클레오티드 명명법의 기재*

[0233] 본원에 기재된 모든 올리고뉴클레오티드는 SN₁-ASN₂-MN₃으로 지정된다. 하기 지정이 적용된다:

[0234] · N₁: 센스 가닥 서열의 서열 식별 번호

[0235] · N₂: 안티센스 가닥 서열의 서열 식별 번호

[0236] · N₃: 변형 패턴의 참고 번호, 각각의 번호는 올리고뉴클레오티드에서 변형된 뉴클레오티드의 패턴을 나타낸다.

[0237] 예를 들어, S27-AS123-M15는 서열식별번호: 27에 의해 제시된 센스 서열, 서열식별번호: 123에 의해 제시된 안티센스 서열을 갖고, 변형 패턴 번호 15에 맞춰진 올리고뉴클레오티드를 나타낸다.

[0238] 표 7: HMGB1 RNAi 올리고뉴클레오티드 서열

센스 (S) - 안티센스 (AS) 지정	센스 서열/mRNA seq	S SEQ ID NO	안티센스 서열	AS SEQ ID NO
S1-AS97	AGAUUUGUUUUUAAACUG UACAGTG	1	CACUGUACAGUUUA AAAACAAAUCUUA	97
S2-AS98	GUACAGUGUCUUUUUUUG UAUAGTT	2	AACUAUACAAAAAA AGACACUGUACAG	98
S3-AS99	ACAGUGUCUUUUUUUGUA UAGUAAA	3	UUAACUAUACAAAA AAAGACACUGUAC	99
S4-AS100	AGUGUCUUUUUUUGUAAA GUUAAACA	4	UGUUAACUAUACAA AAAAAGACACUGU	100
S5-AS101	GUGUCUUUUUUUGUAUAG UUAACAC	5	GUGUUAACUAUACA AAAAAAGACACUG	101
S6-AS102	GGUGGUUUUUUCAUAGC CACUAAAC	6	GUUAGUGGCUAUUG AAAAUACCACCAG	102
S7-AS103	GUAUUUUCAAUAGCCACU AACCUAG	7	CAAGGUUAGUGGCU AUUGAAAAUACCA	103
S8-AS104	GUGCACAGCACAAAUUAG UUUAATA	8	UAUAUAACUAAUUU GUGCUGUGCACCA	104
S9-AS105	GUUGUCUCUGAUGCAGCU UAUACGA	9	UCGUUAAGCUGCA UCAGAGACAACUG	105
S10-AS106	UCUGAUGCAGCUUAUACG AAAUAAAT	10	AUUUUUUUCGUAAA GCUGCAUCAGAGA	106
S11-AS107	CUGAUGCAGCUUAUACGA AAUAATT	11	AAUUUUUUCGUAAA AGCUGCAUCAGAG	107
S12-AS108	GAUGCAGCUUAUACGAAA UAUUUGT	12	ACAAUUUUUCGUA UAAGCUGCAUCAG	108
S13-AS109	AUGCAGCUUAUACGAAA AAUUUGT	13	AACAAUUUUUCGU AUAAGCUGCAUCA	109
S14-AS110	GCAGCUUAUACGAAAUA UUGUUGT	14	ACAACAAUUUUUC GUAUAAGCUGCAU	110
S15-AS111	CAGCUUAUACGAAAUA UGUUGT	15	AACAACAAUUUUU CGUAUAAGCUGCA	111
S16-AS112	AGCUUAUACGAAAUAUU GUUGUTC	16	GAACAACAAUUUU UCGUUAUAGCUGC	112
S17-AS113	GCUUAUACGAAAUAUU UUGUUCT	17	AGAACAACAAUUU UUCGUUAUAGCUG	113
S18-AS114	UACGAAAUAUUUGUUGU CUGUAAA	18	UUAACAGAACAACA AUUAUUUCGUUAU	114
S19-AS115	ACGAAAUAUUUGUUGU UGUUAAC	19	GUUAACAGAACAAC AAUUAUUUCGUUAU	115
S20-AS116	CGAAAUAUUUGUUGU GUUAAC	20	AGUUAACAGAACA CAAUUAUUUCGUA	116
S21-AS117	GAAAUAUUUGUUGUUG UUAAC	21	CAGUUAACAGAACA ACAUAUUUCGUUAU	117
S22-AS118	AAAUAUUUGUUGUUGU UAACUGA	22	UCAGUUAACAGAAC AACAUAUUUCGUAU	118
S23-AS119	AAUAUUUGUUGUUGU AACUGAA	23	UUCAGUUAACAGAA CAACAUAUUUCGUAU	119

[0239]

센스 (S) - 안티센스 (AS) 지정	센스 서열/mRNA seq	S SEQ ID NO	안티센스 서열	AS SEQ ID NO
S24-AS120	AUAAUUGUUGUUCUGUUA ACUGAAT	24	AUUCAGUUAACAGA ACAACA AUU AUUU	120
S25-AS121	UAAUUGUUGUUCUGUUA CUGAATA	25	UAUUCAGUUAACAG ACAACA AUU AUUU	121
S26-AS122	AAUUGUUGUUCUGUUAAC UGAAUAC	26	GUAUUCAGUUAACA GAACAACA AUU AUU	122
S27-AS123	AUUGUUGUUCUGUUAACU GAAUACC	27	GGUAUUCAGUUAAC AGAACAACA AUU AUU	123
S28-AS124	UUGUUGUUCUGUUAACUG AAUACCA	28	UGGUAUUCAGUUA CAGAACAACA AUU	124
S29-AS125	UGUUGUUCUGUUAACUGA AUACCAC	29	GUGGUAUUCAGUUA ACAGAACAACA AUU	125
S30-AS126	GUUGUUCUGUUAACUGAA UACCACT	30	AGUGGUAUUCAGUU AACAGAACAACA AUU	126
S31-AS127	UUGUUCUGUUAACUGAAU ACCACTC	31	GAGUGGUAUUCAGU U AACAGAACAACA AUU	127
S32-AS128	GUUCUGUUAACUGAAUAC CACUCTG	32	CAGAGUGGUAUUCA GUUAACAGAACA AUU	128
S33-AS129	UGUUAACUGAAUACCAUCU UGUAAT	33	AUUACAGAGUGGUA UUCAGUUAACAGA AUU	129
S34-AS130	GUUAACUGAAUACCAUCU GUAATT	34	AAUUACAGAGUGGU AUUCAGUUAACAG AUU	130
S35-AS131	UUAACUGAAUACCAUCUG UAAUTG	35	CAUUACAGAGUGG UAUUCAGUUAACA AUU	131
S36-AS132	UAACUGAAUACCAUCUGU AAUUGC	36	GCAAUUACAGAGUG GUAUUCAGUUAACA AUU	132
S37-AS133	AACUGAAUACCAUCUGUA AUUGCA	37	UGCAAUUACAGAGU GGUAUUCAGUUAACA AUU	133
S38-AS134	ACUGAAUACCAUCUGUAA UUGCAA	38	UUGCAAUUACAGAG UGGUAUUCAGUUAACA AUU	134
S39-AS135	CUGAAUACCAUCUGUAAU UGCAAAA	39	UUUGCAAUUACAGA GUGGUAUUCAGUUAACA AUU	135
S40-AS136	UGAAUACCAUCUGUAAU UGCAAAA	40	UUUUGCAAUUACAG AGUGGUAUUCAGUUAACA AUU	136
S41-AS137	GAAUACCAUCUGUAAUU GCAAAAA	41	UUUUUGCAAUUACA GAGUGGUAUUCAG AUU	137
S42-AS138	AAUACCAUCUGUAAUUGC AAAAAA	42	UUUUUUGCAAUUAC AGAGUGGUAUUCACA AUU	138
S43-AS139	AUACCAUCUGUAAUUGCA AAAAAA	43	UUUUUUUGCAAUUA CAGAGUGGUAUUCACA AUU	139
S44-AS140	AUGCAGCUUAUACGAAGA UAAUUGT	44	ACAAUUAUCUUCGU AUAAGCUGCAUCA AUU	140
S45-AS141	UGCAGCUUAUACGAAGAU AAUUGTT	45	AACAAUUAUCUUCG UAUAAGCUGCAUC AUU	141
S46-AS142	GCAGCUUAUACGAAGUA AUUGUTG	46	CAACAAUUAUCUUC GUAUAAGCUGCAUC AUU	142
S47-AS143	CAGCUUAUACGAAGUAA UUGUUGT	47	ACAACA AUU AUUCU CGUAUAAGCUGCA AUU	143
S48-AS144	GCUUAUACGAAGUAAUU GUUGUTC	48	GAACAACA AUU AUUC UUCGUUAUAAGCUG AUU	144

[0240]

센스 (S) - 안티센스 (AS) 지정	센스 서열/mRNA seq	S SEQ ID NO	안티센스 서열	AS SEQ ID NO
S49-AS145	CUUAUACGAAGUAAAUG UUGUUCT	49	AGAACAACAAUUU CUUCGUUAAGCU	145
S50-AS146	AUACGAAGUAAAUGUUG UUCUGTT	50	AACAGAAACAACAA UAUCUUCGUUAAA	146
S51-AS147	ACGAAGUAAAUGUUGU CUGUAAA	51	UUAACAGAAACA AUUAUCUUCGUU	147
S52-AS148	CGAAGUAAAUGUUGU UGUUAAC	52	GUUAACAGAAACA AAUUAUCUUCGU	148
S53-AS149	GCAGCUGUUUUGUUGA UUCUGAA	53	UUCAGAAUGUCA AAAACAGCUGCAA	149
S54-AS150	GCUGUUUUGUUGACA UGAAUGC	54	GCAUUCAGAAUG AACAAAACAGCUG	150
S55-AS151	CUGUUUUGUUGACA GAAUGCT	55	AGCAUUCAGAAUG CAACAAAACAGCU	151
S56-AS152	GUUUUGUUGACA AUGCUTC	56	GAAGCAUUCAGAA GUCAACAAAACAG	152
S57-AS153	GUUGACAUUCUGAA UCUAAGT	57	ACUUAGAAGCAU AGAAUGUCAACAA	153
S58-AS154	GACAUUCUGAAUGCU AAGUAAA	58	UUUACUUAGAAG UUCAGAAUGUCA	154
S59-AS155	ACAUUCUGAAUGCU AGUAAAAT	59	AUUUACUUAGAAG AUUCAGAAUGUCA	155
S60-AS156	AUUCUGAAUGCU UAAAUAC	60	GUAUUUACUUAGA GCAUUCAGAAUGU	156
S61-AS157	UUCUGAAUGCU AAAUACA	61	UGUAAUUUACU AGCAUUCAGAAUG	157
S62-AS158	UCUGAAUGCU AAUACA	62	UUGUAAUUUACU AAGCAUUCAGAAU	158
S63-AS159	CUGAAUGCU AUACAAT	63	AUUGUAAUUUACU GAAGCAUUCAGAA	159
S64-AS160	UGAAUGCU UACAATT	64	AAUUGUAAUUUACU AGAAGCAUUCAGA	160
S65-AS161	GAAUGCU ACAAUTT	65	AAAUUGUAAUUUACU UAGAAGCAUUCAG	161
S66-AS162	AAUGCU CAAUUTT	66	AAAAUUGUAAUUUACU UUAGAAGCAUUCA	162
S67-AS163	AUGCU AAUUUTT	67	AAAAAUUGUAAUUUACU CUUAGAAGCAUUC	163
S68-AS164	UGCU AUUUUTT	68	AAAAAUUGUAAUUUACU ACUUAGAAGCAUU	164
S69-AS165	GUUGUCCUU CUGAAAT	69	AUUUCAGACCUAUG AAAAGGACAACAA	165
S70-AS166	UGAGAUAGUU UAACUGA	70	UCAGUUAUGGAUGA AAACUAUCUCAAC	166
S71-AS167	GAGAUAGUU AACUGAA	71	UUCAGUUAUGGAUG AAAACUAUCUCA	167
S72-AS168	ACAUUUCAU GAAGAAT	72	AUUCUUCACUAUG GAUGAAAUGUUA	168
S73-AS169	CAUUUACAA UAAUCA	73	UUGAUUACUCU GUUUGUAAAUGUA	169

[0241]

센스 (S) - 안티센스 (AS) 지정	센스 서열/mRNA seq	S SEQ ID NO	안티센스 서열	AS SEQ ID NO
S74-AS170	AUUUACAAACUGAAGAGU AAUCAAT	74	AUUGAUUACUCUUC AGUUUGUAAAUGU	170
S75-AS171	ACAAACUGAAGAGUAAUC AAUCUAC	75	GUAGAUUGAUUACU CUUCAGUUUGUAA	171
S76-AS172	GUAAUGACAGUUAUUUU UGCAGTT	76	AACUGCAAAAUAUA ACUGUCAUUACAC	172
S77-AS173	AAUGACAGUUAUUUUUG CAGUUTC	77	GAAACUGCAAAAUA UAACUGUCAUUAC	173
S78-AS174	AAUACAAGACUGCUGUAC UAUUUGT	78	ACAAAUAGUACAGC AGUCUUGUAUUUU	174
S79-AS175	AUACAAGACUGCUGUACU AUUUUGTT	79	AACAAAUAGUACAG CAGUCUUGUAUUU	175
S80-AS176	UACAAGACUGCUGUACUA UUUGUTG	80	CAACAAAUAGUACA GCAGUCUUGUAUU	176
S81-AS177	ACAAGACUGCUGUACUAU UUGUUGA	81	UCAACAAAUAGUAC AGCAGUCUUGUAU	177
S82-AS178	CAAGACUGCUGUACUAUU UGUUGAC	82	GUCAACAAAUAGUA CAGCAGUCUUGUA	178
S83-AS179	GACUGCUGUACUAUUUGU UGACCTT	83	AAGGUCAACAAAUA GUACAGCAGUCUU	179
S84-AS180	ACUGCUGUACUAUUUGUU GACCUTA	84	UAAGGUCAACAAAUA AGUACAGCAGUCU	180
S85-AS181	GUGGUUUUGCCCUUAUG AAUCAGA	85	UCUGAUUCAUAAAG GGACAAACCACAG	181
S86-AS182	CAAUACAUUUGCUUUUUC UUUAUAA	86	UUUAAAAGAAAAAG CAAUGUAUUGGA	182
S87-AS183	AUACAUUUGCUUUUUCUU UAUAAAA	87	UUUUUAAAAGAAAA AGCAAUGUAUUG	183
S88-AS184	UGAUGGAGUGCUGUUAUA UAAUUTT	88	AAAAUUUAUUAACA GCACUCCAUCACA	184
S89-AS185	GAUGGAGUGCUGUUUUGU UAUAUAA	89	UUUAUUAACAAAAC AGCACUCCAUCAC	185
S90-AS186	AUGGAGUGCUGUUUUGUU AUUAAT	90	AUUUAUUAACAAA CAGCACUCCAUCA	186
S91-AS187	GGAGUGCUGUUUUGUUAU AUAUUTT	91	AAAUUAUUAACAA AACAGCACUCCA	187
S92-AS188	GAGUGCUGUUUUGUUAUA UAAUUTA	92	UAAAUUAUUAACA AAACAGCACUCCA	188
S93-AS189	CUGUUUUGUUAUUAUU UAGACTT	93	AAGUCUAAAUUAUA UAACAAAACAGCA	189
S94-AS190	CAUUUGCGUUGUUAUUGU AAUUUGA	94	UCAAAUUAUUAUA CAACGCAAUGUA	190
S95-AS191	AUGUAAUUUCAGGAGGAA UACUGAA	95	UUCAGUAUCCUCC UGAAAUUACAUAA	191
S96-AS192	GAGUCCUGGAUGAUACUA AUAAACT	96	AGUUUAUUAUUAUC AUCCAGGACUCAG	192
S193-AS273	GUACAGUGC(UUUUUUG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	193	UACAAAAAAGACA CUGUACGG	273
S194-AS274	ACAGUGC(UUUUUUGUA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	194	UAUACAAAAAAGA CACUGUGG	274

[0242]

센스 (S) - 안티센스 (AS) 지정	센스 서열/mRNA seq	S SEQ ID NO	안티센스 서열	AS SEQ ID NO
S195-AS275	UCUGAUGCAGCUUAUACG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	195	UUCGUUAUAGCUGC AUCAGAGA	275
S195-AS361	UCUGAUGCAGCUUAUACG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	195	UTCGUAUAAGCUGC AUCAGAGA	361
S196-AS276	CUGAUGCAGCUUAUACGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	196	UUUCGUUAAGCUG CAUCAGAG	276
S196-AS277	CUGAUGCAGCUUAUACGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	196	UUUCGUUAAGCUG CAUCAGGG	277
S196-AS278	CUGAUGCAGCUUAUACGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	196	UUCGUUAUAGCUGC AUCAGGG	278
S196-AS362	CUGAUGCAGCUUAUACGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	196	UTUCGUUAAGCTG CATCAGAG	362
S197-AS279	AUGCAGCUUAUACGAAAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	197	UUAUUUCGUUAAG CUGCAUGG	279
S198-AS280	GCAGCUUAUACGAAAUAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	198	UAUUUUUCGUUA AGCUGCGG	280
S199-AS281	CAGCUUAUACGAAAUAAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	199	UAAUUUUUCGUUA AAGCUGGG	281
S200-AS282	GCUUAUACGAAAUAAUUG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	200	UACAAUUUUUCGU AUAAGCGG	282
S201-AS283	AAUUAUUUGUUGUUCUGU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	201	UACAGAACAACA UUUUUUGG	283
S202-AS284	AAUUAUUUGUUGUUCUGUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	202	UUAACAGAACAACA AUUUUUGG	284
S203-AS285	AUUGUUGUUCUGUUAACU GAGCAGCCGAAAGGCUGC	203	UCAGUUAACAGAAC ACAACUGG	285
S204-AS286	UUGUUGUUCUGUUAACUG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	204	UUCAGUUAACAGAA CAACAAGG	286
S205-AS287	UGUUGUUCUGUUAACUGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	205	UUUCAGUUAACAGA ACAACAGG	287
S206-AS288	GUUGUUCUGUUAACUGAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	206	UAUCAGUUAACAG ACAACCGG	288
S207-AS289	AACUGAAUACCACUCUGUA AGCAGCCGAAAGGCUGC	207	UUACAGAGUGGUAU UCAGUUGG	289
S208-AS290	CUGAAUACCACUCUGUAAU AGCAGCCGAAAGGCUGC	208	UAUUACAGAGUGGU AUUCAGGG	290
S209-AS291	AAUACCACUCUGUAAUUGC AGCAGCCGAAAGGCUGC	209	UGCAAUUACAGAGU GGUAUUGG	291
S210-AS292	AUUCUGAAUGCUUCUAAG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	210	UACUUAGAAGCAUU CAGAAUGU	292
S210-AS293	AUUCUGAAUGCUUCUAAG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	210	UACUUAGAAGCATU CAGAAUGT	293
S210-AS366	AUUCUGAAUGCUUCUAAG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	210	UACUUAGAAGCAUU CAGAAUGG	366
S211-AS294	UUCUGAAUGCUUCUAAGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	211	UTACUUAGAAGCAU UCAGAATG	294
S211-AS295	UUCUGAAUGCUUCUAAGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	211	UUACUUAGAAGCAU UCAGAAUG	295
S211-AS367	UUCUGAAUGCUUCUAAGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	211	UUACUUAGAAGCAU UCAGAAGG	367

[0243]

센스 (S) - 안티센스 (AS) 지정	센스 서열/mRNA seq	S SEQ ID NO	안티센스 서열	AS SEQ ID NO
S212-AS296	UGAAUGCUUCUAAGUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	212	UAUUUACUUAGAAG CAUUCAGG	296
S212-AS297	UGAAUGCUUCUAAGUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	212	UAUUUACUUAGAAG CAUUCAGA	297
S212-AS298	UGAAUGCUUCUAAGUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	212	AUUUACUUAGAAGC AUUCAGG	298
S212-AS299	UGAAUGCUUCUAAGUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	212	UAUUUACUUAGAAG CATUCAGA	299
S213-AS300	GAAUGCUUCUAAGUAAA ACGCAGCCGAAAGGCUGC	213	GUAUUUACUUAGAA GCAUUCAG	300
S213-AS301	GAAUGCUUCUAAGUAAA ACGCAGCCGAAAGGCUGC	213	GTAUUUACUUAGAA GCAUTCAG	301
S214-AS302	AAUGCUUCUAAGUAAA CAGCAGCCGAAAGGCUGC	214	UGUAUUUACUUAGA AGCAUUGG	302
S215-AS303	AUGCUUCUAAGUAAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	215	UUGUAUUUACUUAG AAGCAUGG	303
S216-AS304	UGAGAUAGUUUUAUCCA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	216	UAUGGAUGAAAACU AUCUCAGG	304
S217-AS305	GAGAUAGUUUUAUCCA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	217	UUAUGGAUGAAAAC UAUCUCGG	305
S218-AS306	AUUUACAAACUGAAGAGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	218	UUACUCUUCAGUUU GUAUUUUGG	306
S219-AS307	AAUACAAGACUGCCAUAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	219	UAAUAUGGCAGUCU UGUAUUGG	307
S220-AS308	AUACAAGACUGCCAUAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	220	UUAUUUUAUGGCAGUC UUGUAUGG	308
S221-AS309	UACAAGACUGCCAUAUUA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	221	UUUUUUUAUGGCAGU CUUGUAGG	309
S222-AS310	CAAGACUGCCAUAUUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	222	UAUUUUUAUGGCAGU GUCUUGGG	310
S223-AS311	AAGACUGCCAUAUUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	223	UAAUUUUUAUGGCAGU AGUCUUGG	311
S224-AS312	AGACUGCCAUAUUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	224	UAAAAUUUAUGGCAGU CAGUCUGG	312
S225-AS313	GACUGCCAUAUUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	225	UAAAAUUUAUGGCAGU GCAGUCGG	313
S226-AS314	ACUGCCAUAUUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	226	UAAAAUUUAUGGCAGU GGCAGUGG	314
S227-AS315	AGUAUGAAUUAUCAAUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	227	UAAUUUAUGAAUUAU CAUACUGG	315
S228-AS316	GUAUGAAUUAUCAAUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	228	UUAAUUUGAAUUAU UCAUACGG	316
S229-AS317	GAUGGAGUGCUGUUUUGU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	229	UAAACAAAACAGCAC UCCAUCGG	317
S230-AS318	AUGGAGUGCUGUUUUGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	230	UUAACAAAACAGCA CUCCAUGG	318
S231-AS319	GGAGUGCUGUUUUGUUAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	231	UUUAACAAAACAG CACUCCGG	319
S232-AS320	GAGUGCUGUUUUGUUAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	232	UAUAUAACAAAACA GCACUCGG	320

[0244]

센스 (S) - 안티센스 (AS) 지정	센스 서열/mRNA seq	S SEQ ID NO	안티센스 서열	AS SEQ ID NO
S233-AS321	CUGUUUUGUUAUUAUUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	233	UAAAUAUAUAACA AAACAGGG	321
S234-AS322	UGCAGAGGUUUUUAAUAC UAGCAGCCGAAAGGCUGC	234	UAGUAUUUAAAACC UCUGCAGG	322
S235-AS323	GCAGAGGUUUUUAAUACU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	235	UUAGUAUUUAAAAC CUCUGC GG	323
S236-AS324	CAGAGGUUUUUAAUACUA GAGCAGCCGAAAGGCUGC	236	UCUAGUAUUUAAAA CCUCUGGG	324
S237-AS325	GAGGUUUUUAAUACUAGU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	237	UAACUAGUAUUUAA AACCUCGG	325
S238-AS326	AGAUUUUGUUACAUAUUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	238	UAAAAUAUGUAACA AAAUCUGG	326
S239-AS327	AUUUUGUUAUAUUUUUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	239	UUAAAAUAUGUAA CAAAAUGG	327
S240-AS328	AAAAUACUCACUUUAUGC UAGCAGCCGAAAGGCUGC	240	UAGCAUAAAAGUGAG UAUUUUGG	328
S241-AS329	AAAUACUCACUUUAUGCU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	241	UAAGCAUAAAAGUGA GUAUUUGG	329
S242-AS330	AAUACUCACUUUAUGCUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	242	UUAAGCAUAAAAGUG AGUAUUGG	330
S243-AS331	AUAAAAGGUUUUGUCAAA CAGCAGCCGAAAGGCUGC	243	UGUUUGACAAAACC UUUUAUGG	331
S244-AS332	AGGUUUUGUCAAAAUUG CAGCAGCCGAAAGGCUGC	244	UGCAAUGUUUGACA AAACCUGG	332
S245-AS333	GGUUUUGUCAAAAUUGC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	245	UUGCAAUGUUUGAC AAAACCGG	333
S246-AS334	GCAAGUAUUCGGUGCUAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	246	UUAUAGCACCGAAU ACUUGCGG	334
S247-AS335	AGAUGGAAGUUUCUACUG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	247	UACAGUAGAAACUU CCAUCUGG	335
S248-AS336	AUGGAAGUUUCUACUGUA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	248	UAUACAGUAGAAAC UCCAUGG	336
S249-AS337	GGAAGUUUCUACUGUAUA GAGCAGCCGAAAGGCUGC	249	UCUAUACAGUAGAA ACUUCGGG	337
S250-AS338	GAAGUUUCUACUGUAUAG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	250	UUCUAUACAGUAGA AACUUCGG	338
S251-AS339	AAGUUUCUACUGUAUAGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	251	UUUCUAUACAGUAG AAACUUGG	339
S252-AS340	AGUUUCUACUGUAUAGAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	252	UUUUCUAUACAGUA GAAACUGG	340
S253-AS341	CUACUGUAUAGAAAUCACC AGCAGCCGAAAGGCUGC	253	UGGUGAUUUCUAUA CAGUAGGG	341
S254-AS342	CUGUAUAGAAAUCACCAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	254	UAAUGGUGAUUUCU AUACAGGG	342
S255-AS343	GUCAUGACAACUACCAUU AGCAGCCGAAAGGCUGC	255	UAAAUGGUAGUUGU CAUGACGG	343
S256-AS344	GACAACUACCAUUUUUUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	256	UUAAAAAAUUGGUA GUUGUCGG	344
S257-AS345	AGUUGGAUGUCUAAAACU CAGCAGCCGAAAGGCUGC	257	UGAGUUUAGACAU CCAACUGG	345

[0245]

센스 (S) - 안티센스 (AS) 지칭	센스 서열/mRNA seq	S SEQ ID NO	안티센스 서열	AS SEQ ID NO
S258-AS346	GUUGGAUGUCUAAAAACUC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	258	UUGAGUUUUAGACA UCCAACGG	346
S259-AS347	GAUGUCUAAAAACUCAAGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	259	UUACUUGAGUUUUA GACAUCGG	347
S260-AS348	GAUAAGUGUAAAAGCCUUG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	260	UACAAGGCUUUACA CUUAUCGG	348
S261-AS349	AUAAGUGUAAAAGCCUUGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	261	UUACAAGGCUUUAC ACUUAUGG	349
S262-AS350	GCCUUGUAACUGAAGAUG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	262	UUCAUCUUCAGUUA CAAGGCGG	350
S263-AS351	GUGUAUAGAAAACUAAAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	263	UUAAAAUAGUUUCU AUACACGG	351
S264-AS352	AAAGACUUUGUUGACAUC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	264	UUGAUGUCAACAAA GUCUUUGG	352
S265-AS353	GAAGAUGCUIUUUAAAAAC UAGCAGCCGAAAGGCUGC	265	UAGUUUUAAAAAGC AUCUUCGG	353
S266-AS354	AAGAUGCUIUUUAAAAACU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	266	UUAGUUUUAAAAAG CAUCUUGG	354
S267-AS355	GAGCUAUUGCUGAUUAGU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	267	UAACUAAUCAGCAA UAGCUCGG	355
S268-AS356	GUGUUGUUAAAUGUUUGCU GAGCAGCCGAAAGGCUGC	268	UCAGCAAACAUUAA CAACACGG	356
S269-AS357	GUUGUUAUGUUUGCUGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	269	UUACAGCAAACAUU AACACGG	357
S270-AS358	UGUUAUUGUUUGCUGUAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	270	UAAUACAGCAAACA UUAACAGG	358
S271-AS359	GUUAUUGUUUGCUGUAUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	271	UAAAUACAGCAAAC AUUAACGG	359
S272-AS360	UUAAUGUUUGCUGUAUUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	272	UUAAAUACAGCAAA CAUUAAGG	360
S363-AS368	UCUGAAUGCUCUAAGUA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	363	UUUACUUAGAAGCA UUCAGAGG	368
S364-AS369	CUGAAUGCUCUAAGUAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	364	UUUUACUUAGAAGC AUUCAGGG	369
S365-AS370	GAAUGCUCUAAGUAAAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	365	UUUUUACUUAGAA GCAUUCGG	370

[0246]

[0247]

본원에 예시적으로 기재된 본 개시내용은 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재하에 적합하게 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본원의 각각의 예에서, 용어 "포함하는", "로 본질적으로 이루어진" 및 "로 이루어진"은 다른 두 용어와 교체될 수 있다. 사용된 용어 및 표현은 제한이 아니라 기재의 측면에서 사용되고, 이러한 용어 및 표현의 사용에 있어서 도시되고 기재된 특징 또는 그의 일부의 임의의 증가물을 제외하려는 의도는 없으며, 청구된 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능한 것으로 인식된다. 따라서, 본 발명이 바람직한 실시양태에 의해 구체적으로 개시되었지만, 본원에 개시된 개념의 임의적인 특징, 변형 및 변동이 관련 기술분야의 기술자에 의해 재분류될 수 있고, 이러한 변형 및 변동이 상기 기재 및 첨부된 청구항에 의해 한정되는 본 발명의 범위 내에서 고려된다는 것을 이해해야 한다.

[0248]

또한, 본 발명의 특징 또는 측면이 마쿠쉬 그룹 또는 다른 대인적인 그룹의 용어로 기재되는 경우에, 관련 기술분야의 기술자는 본 발명이 또한 마쿠쉬 그룹 또는 다른 그룹의 임의의 개별 구성원 또는 구성원들의 서브그룹의 측면에서 기재된다는 것을 인식할 것이다.

[0249]

본 발명의 기재하는 문맥에서 (특히 하기 청구항의 문맥에서) 단수 용어 및 유사한 지시대상의 사용은 본원에서 달리 지시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는다면 단수 및 복수 둘 다를 포함하는 것으로 파악되어야 한다. 용어 "포함하는(comprising)", "갖는(having)", "포함하는(including)" 및 "함유하는(containing)"은 달리 언급되지 않는다면 개방형 용어로서 파악되어야 한다 (즉, "포함하나 이에 제한되지 않음"을 의미함). 본원에서 값의 범위의 기재는 단지 본원에서 달리 지시되지 않는다면 상기 범위 내에 속하는 각각의 별개의 값을 개별적으로 지칭하는 약칭 방법으로서 작용하기 위해 단지 의도되는 것이고, 각각의 별개의 값은 본원에 개별적으로 인용된 것과 같이 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은 본원에서 달리 지시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는다면 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 모든 예시 또는 예시적인 표현 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 보다 잘 설명하기 위해 의도된 것이고, 달리 청구되지 않는다면 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 명세서의 어떠한 표현도 본 발명

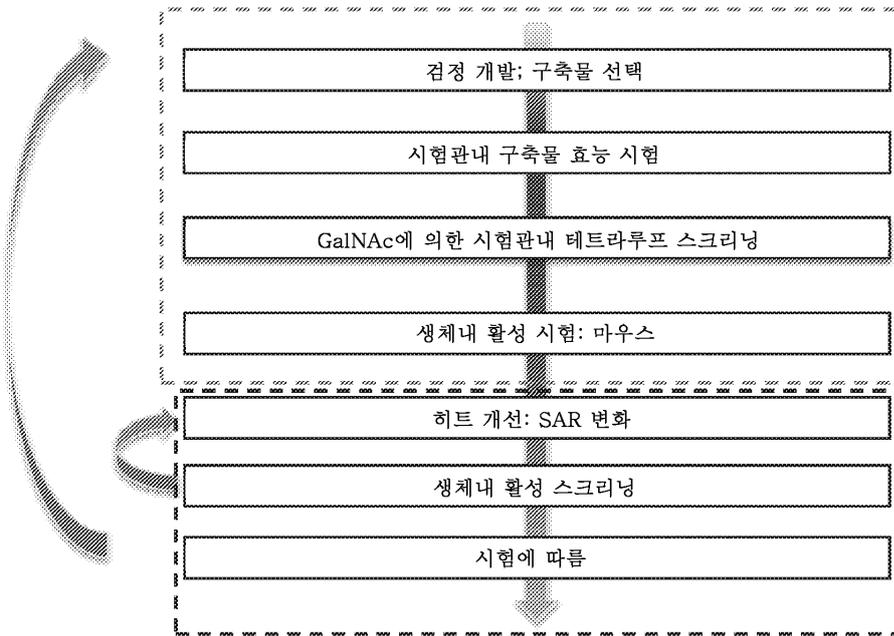
의 실시에서 필수적인 것으로 청구되지 않은 임의의 요소를 나타내는 것으로 파악되어서는 안된다.

[0250] 본 발명을 실시하기 위해 발명자들에게 공지된 최상의 방식을 비롯하여 본 발명의 실시양태가 본원에 기재된다. 이들 실시양태의 변동은 상기 기재된 후의 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 수 있다.

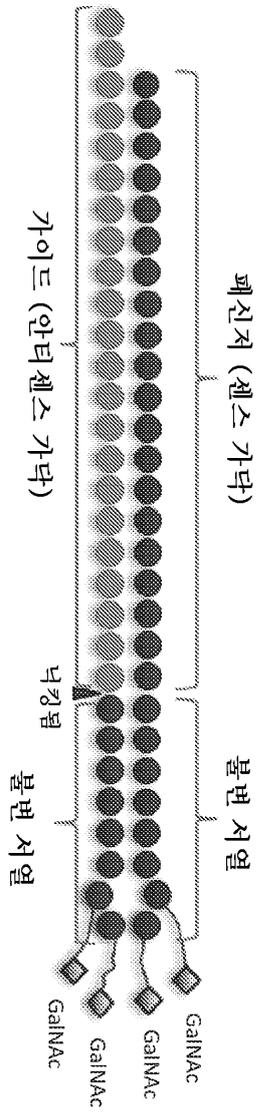
[0251] 본 발명자들은 숙련자들이 이러한 변동을 적절하게 이용할 것으로 예상하며, 본 발명자들은 본 발명이 본원에 구체적으로 기재된 것과 다르게 실시되는 것을 의도한다. 따라서, 본 발명자들은 적용가능한 법률에 의해 허용되는 바와 같이 본원에 첨부된 청구항에 인용된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 더욱이, 그의 모든 가능한 변동에서 상기 기재된 요소들의 임의의 조합은 본원에서 달리 지시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는다면 본 발명에 포함된다. 관련 기술분야의 기술자들은 일상적인 실험만으로도 본원에 기재된 본 발명의 구체적인 실시양태에 대한 여러 등가물을 인식할 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구항에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

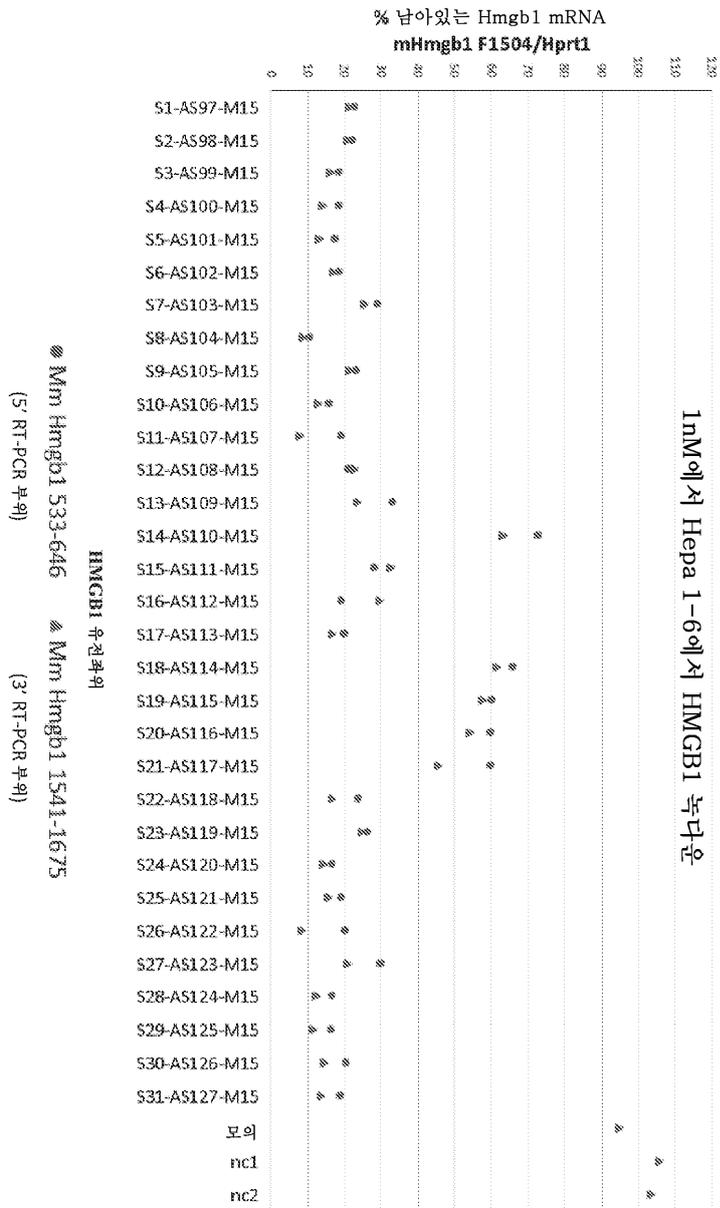
도면1



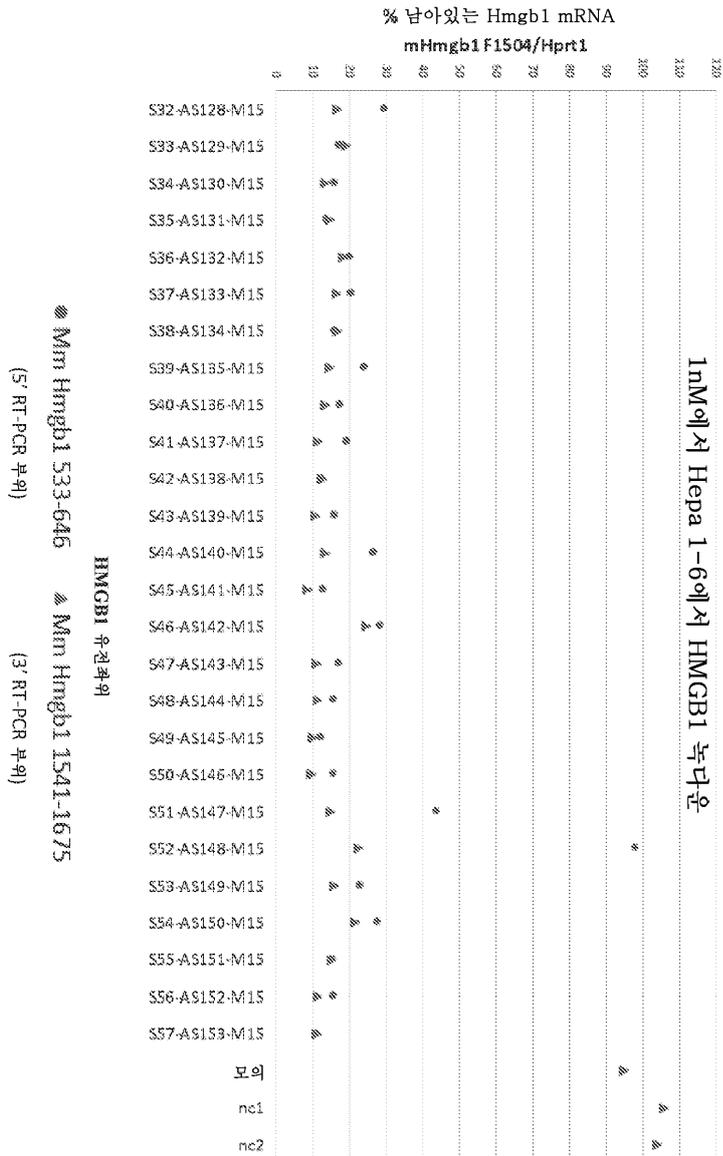
도면2



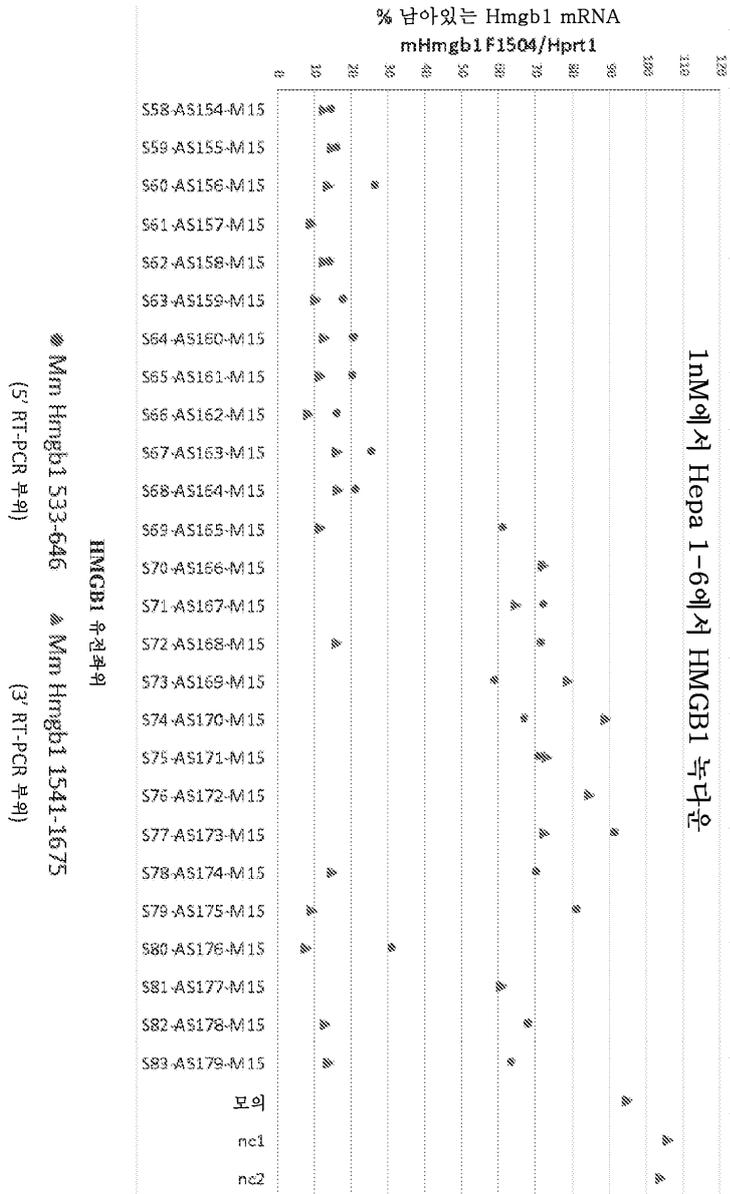
도면3a



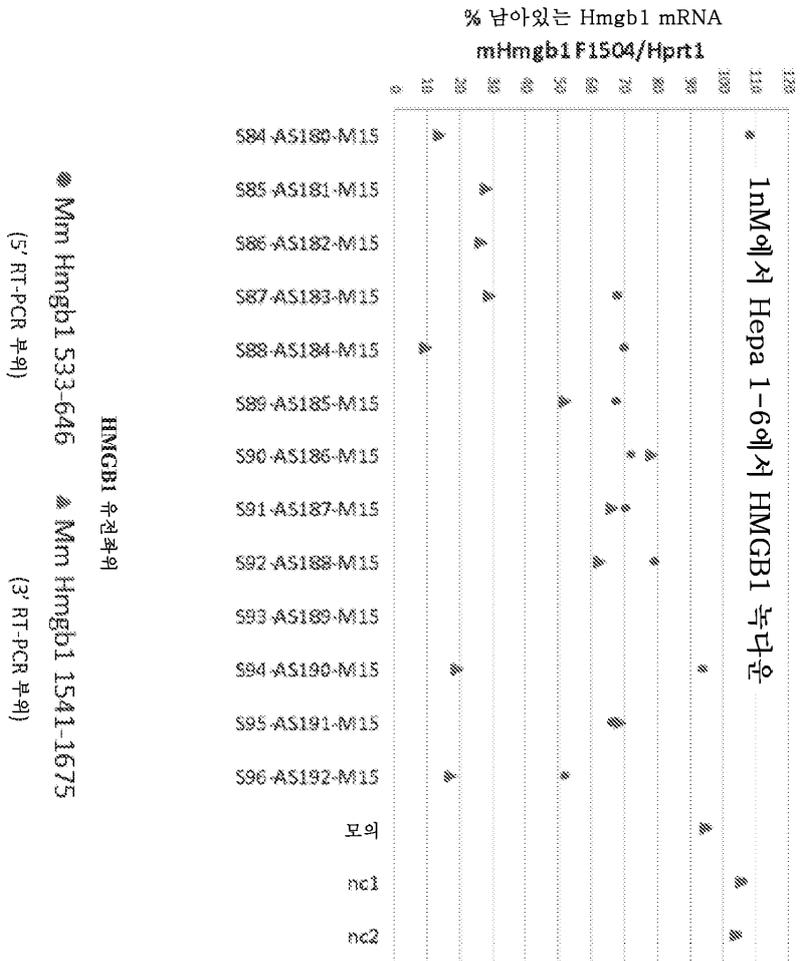
도면3b



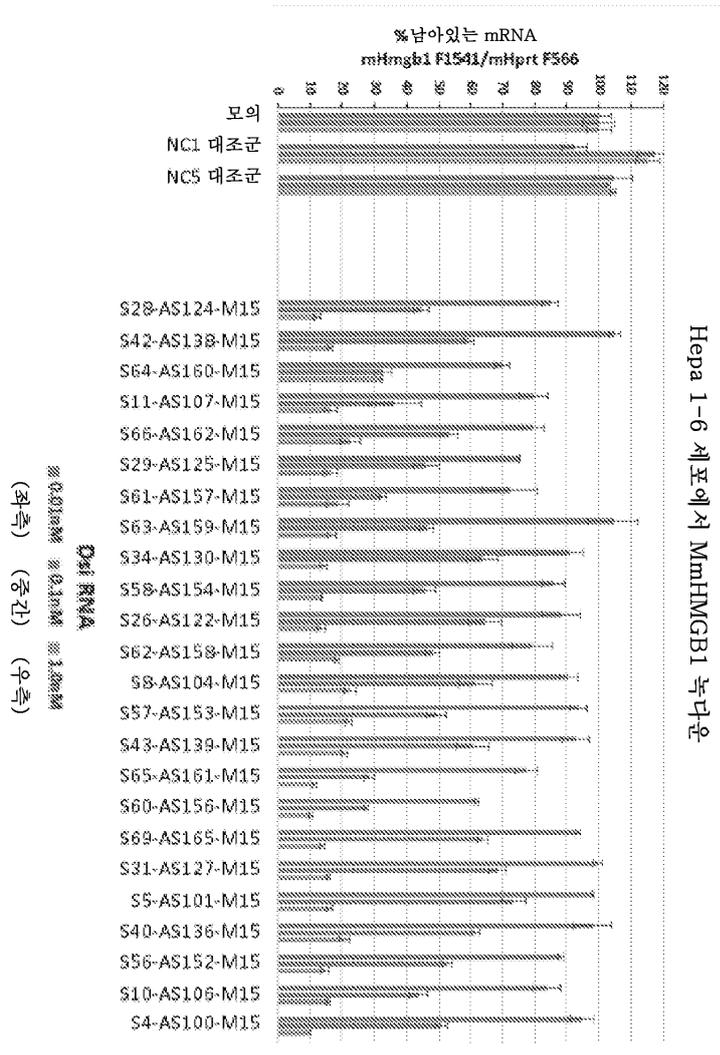
도면3c



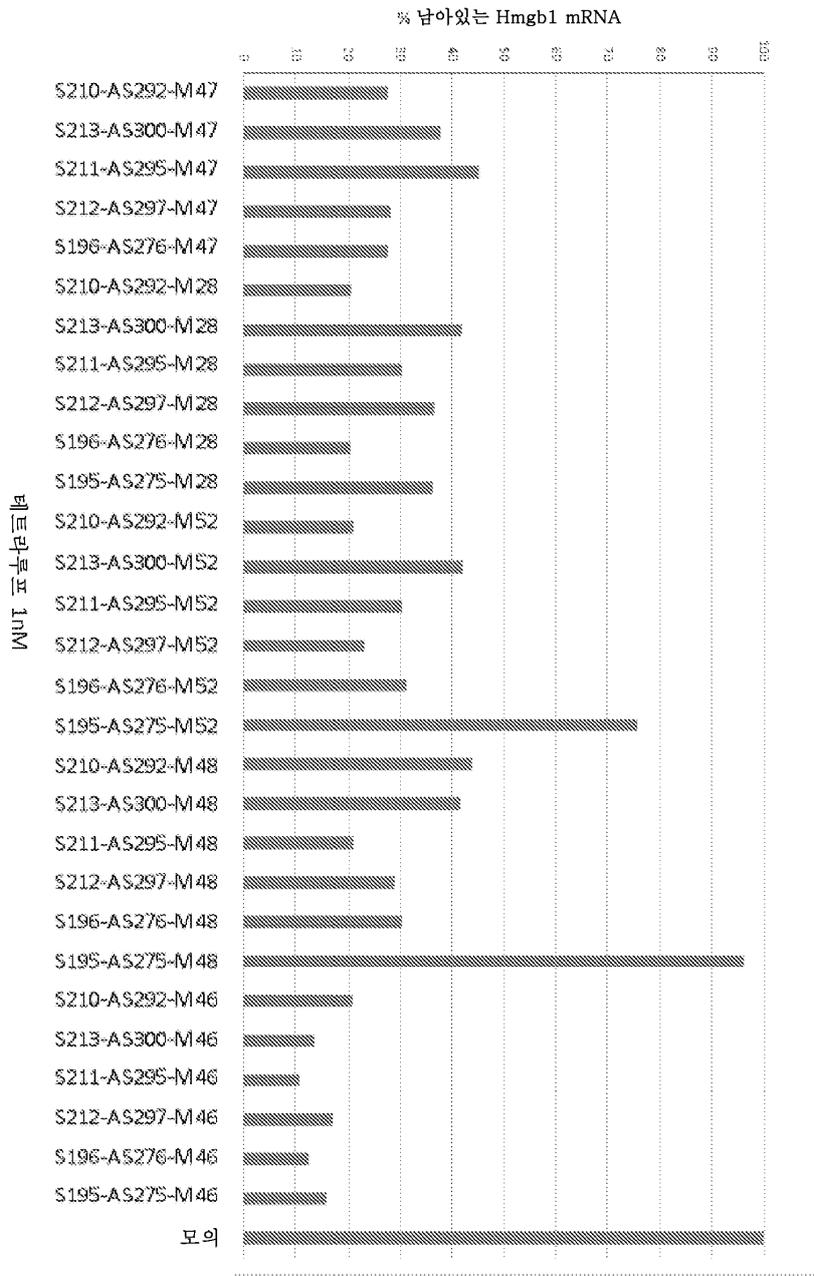
도면3d



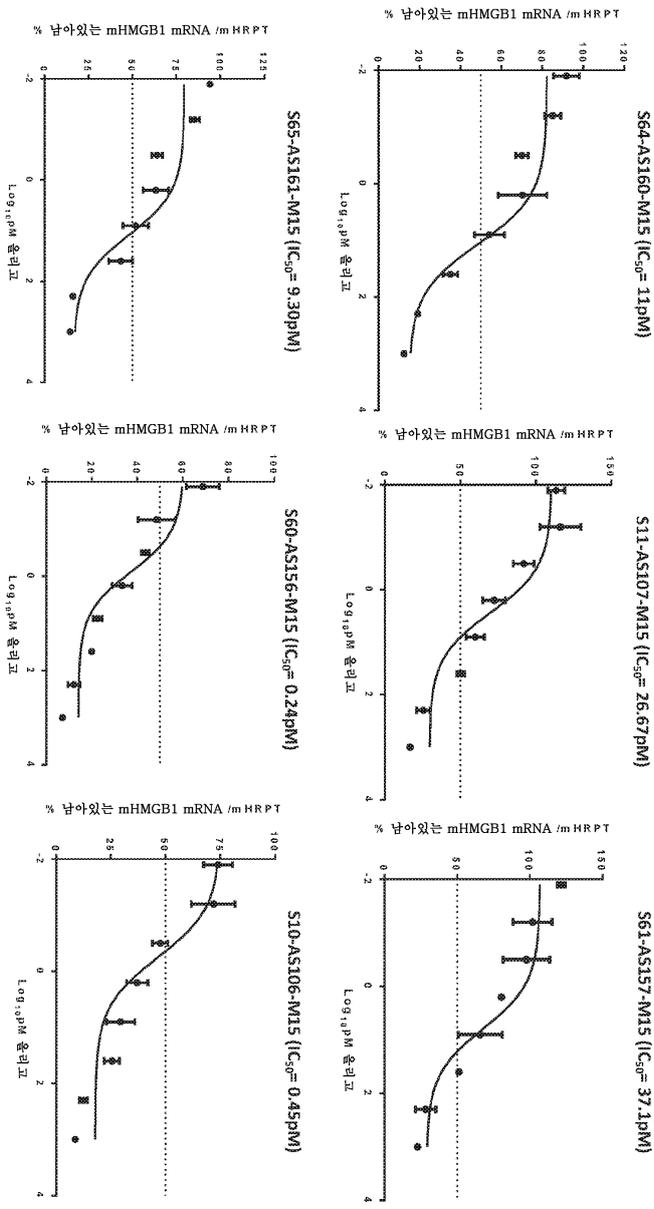
도면4



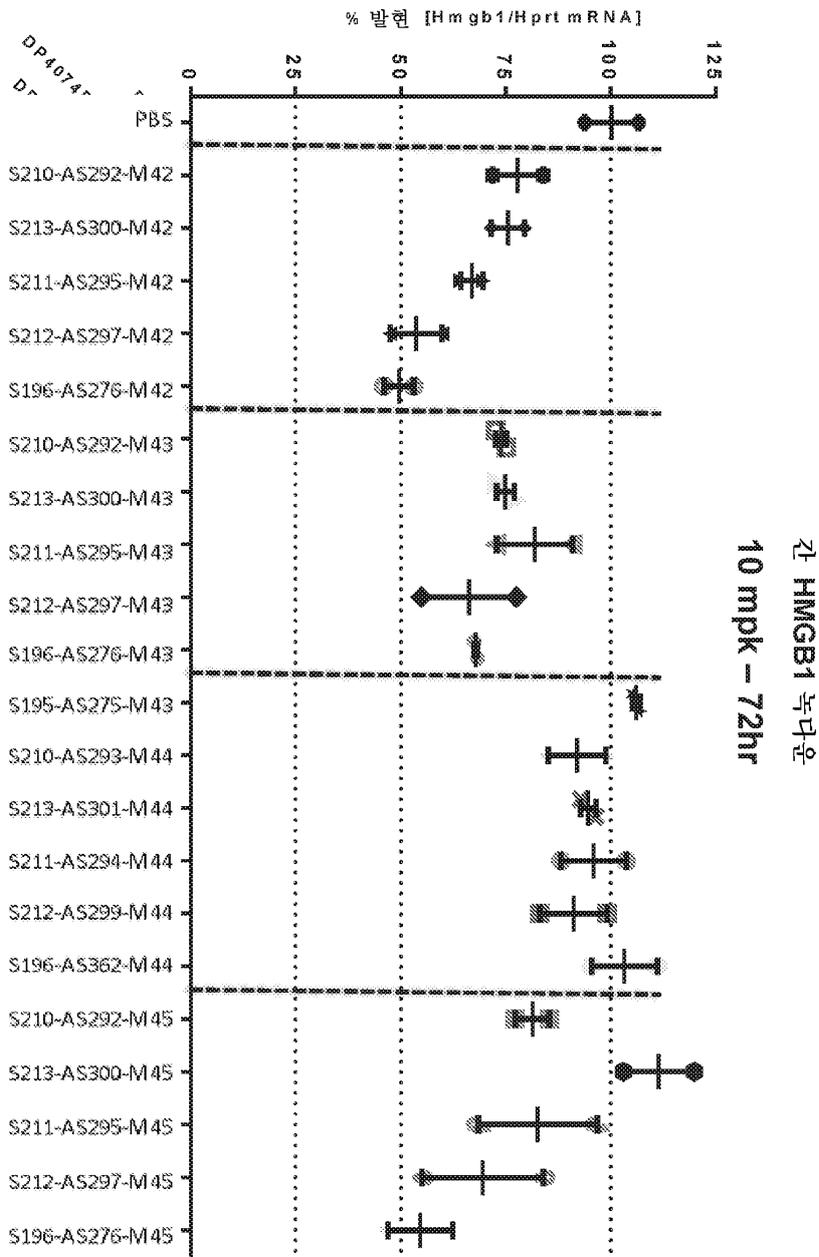
도면5



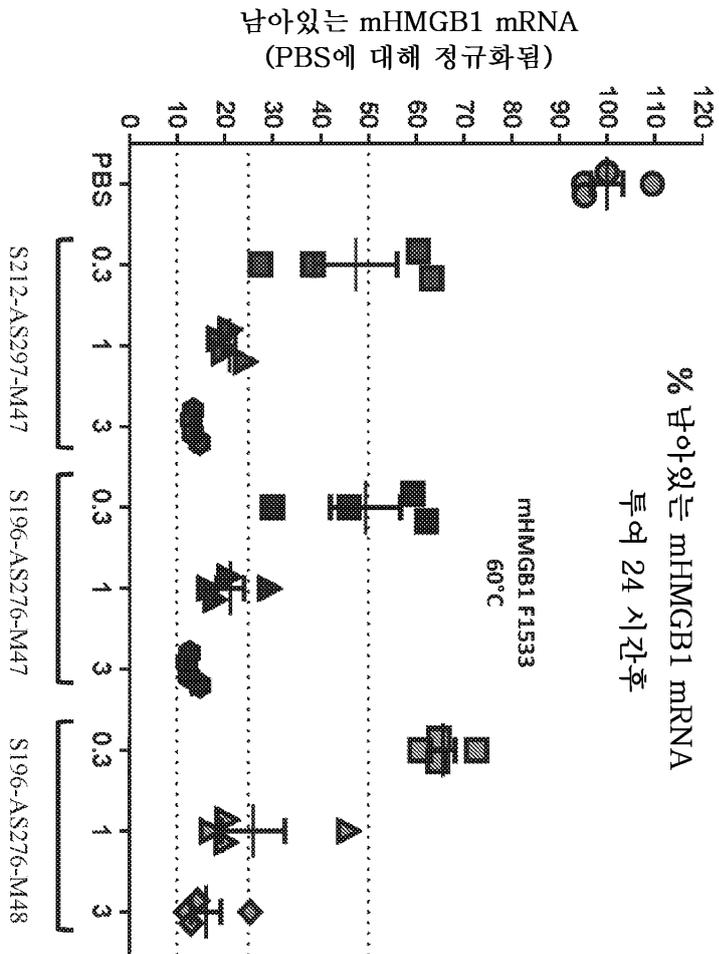
도면6



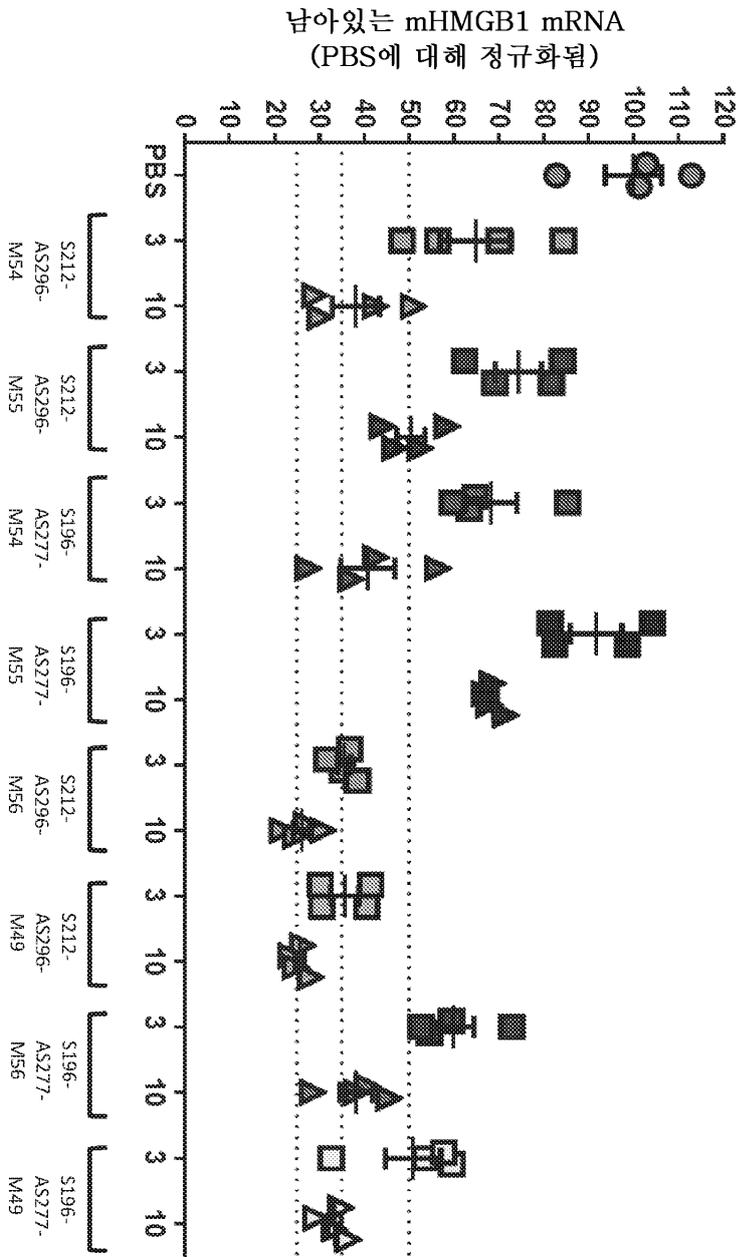
도면7



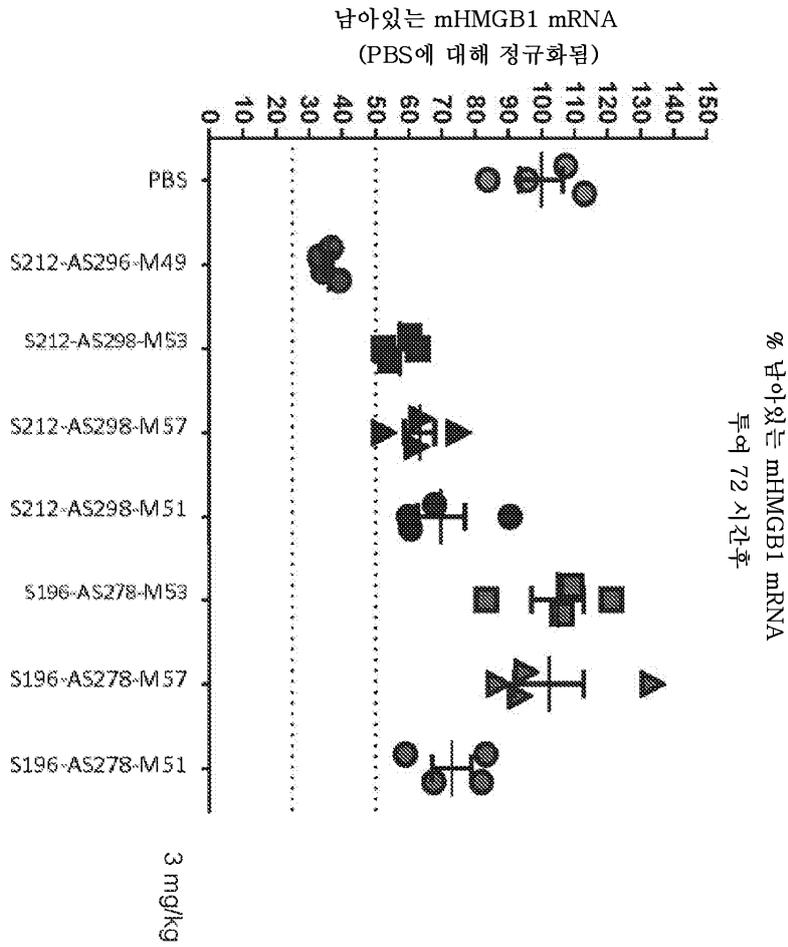
도면8



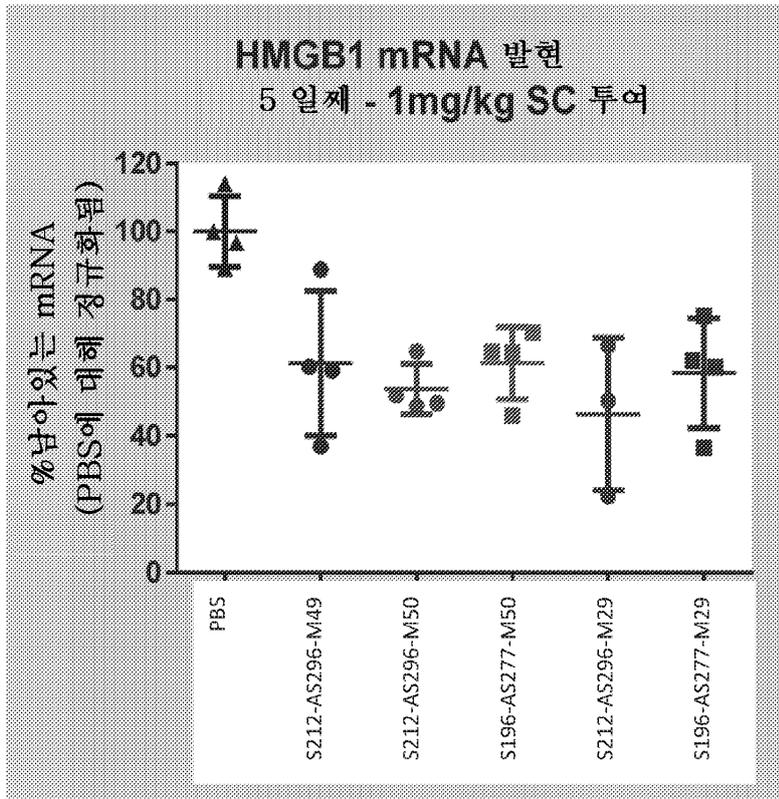
도면9



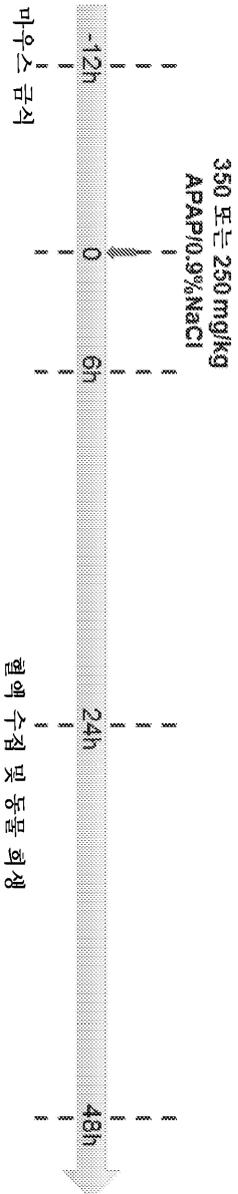
도면10



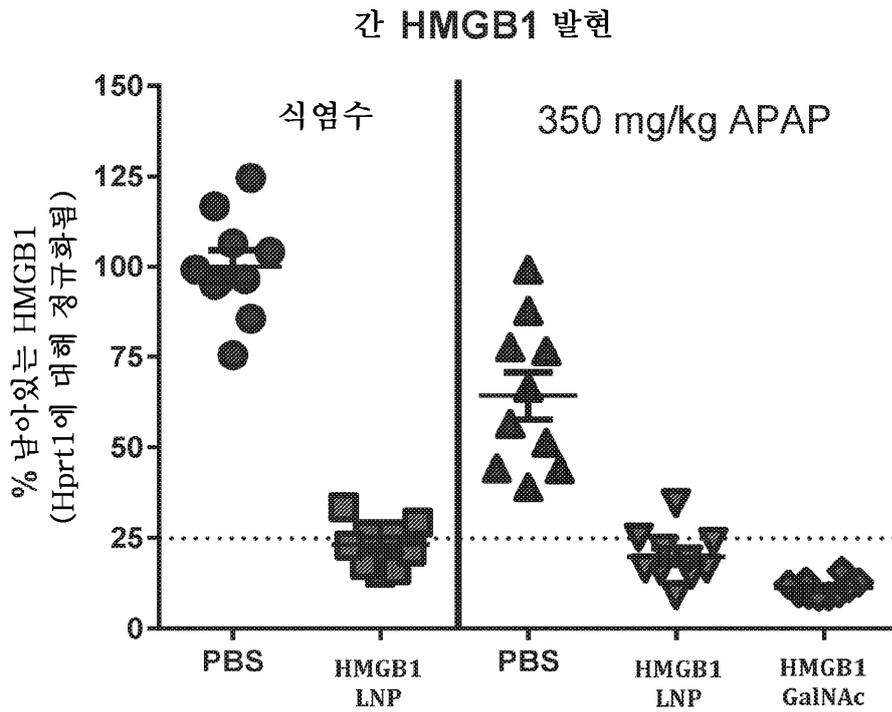
도면11



도면12

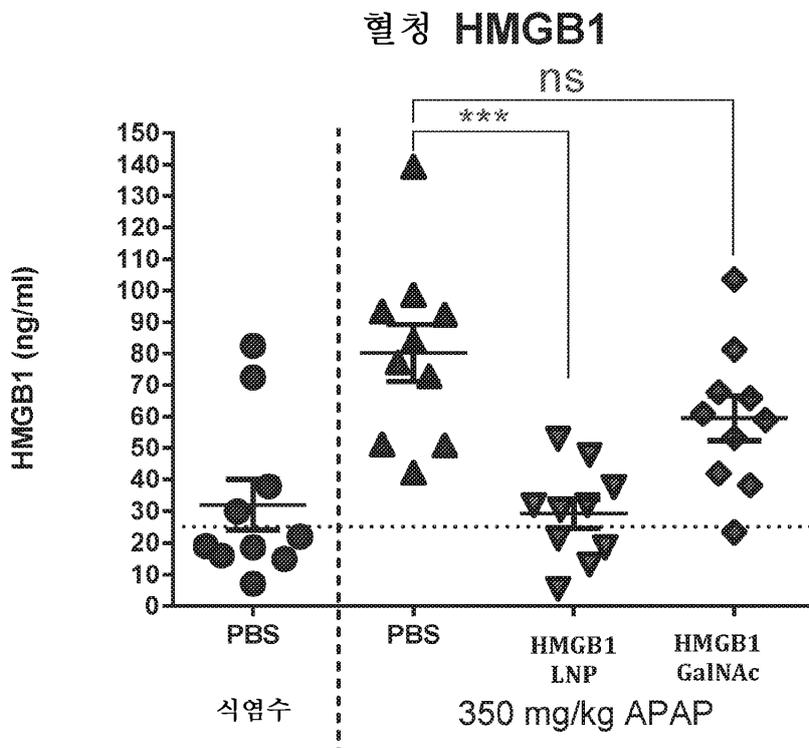


도면13a



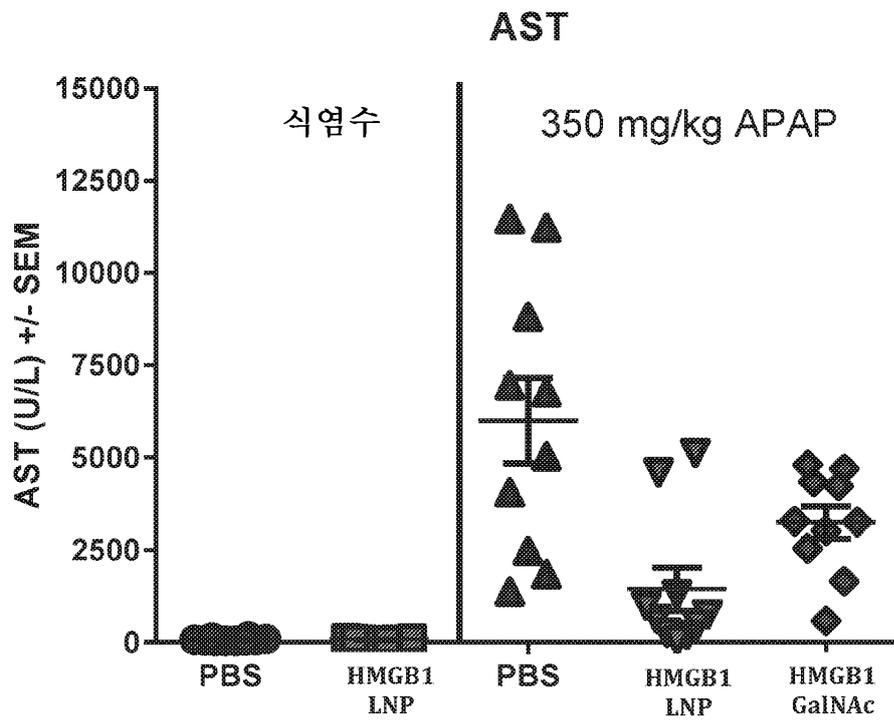
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M49

도면13b



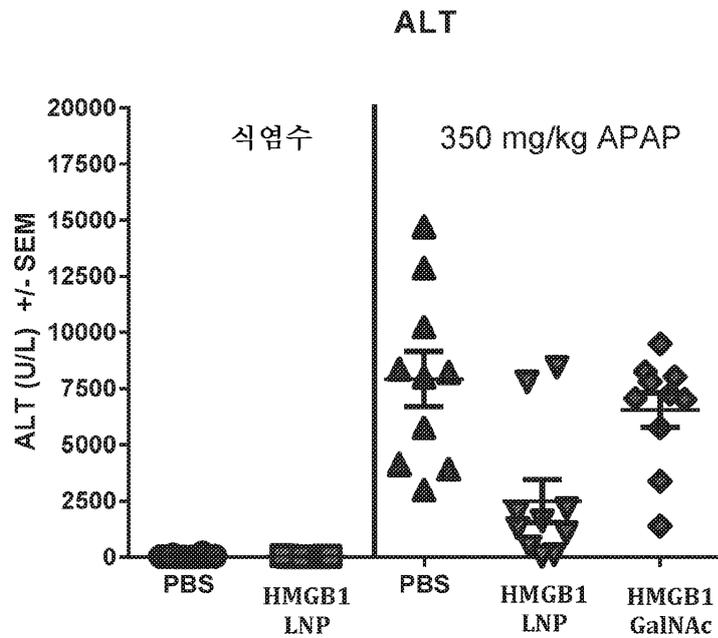
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M49

도면14a



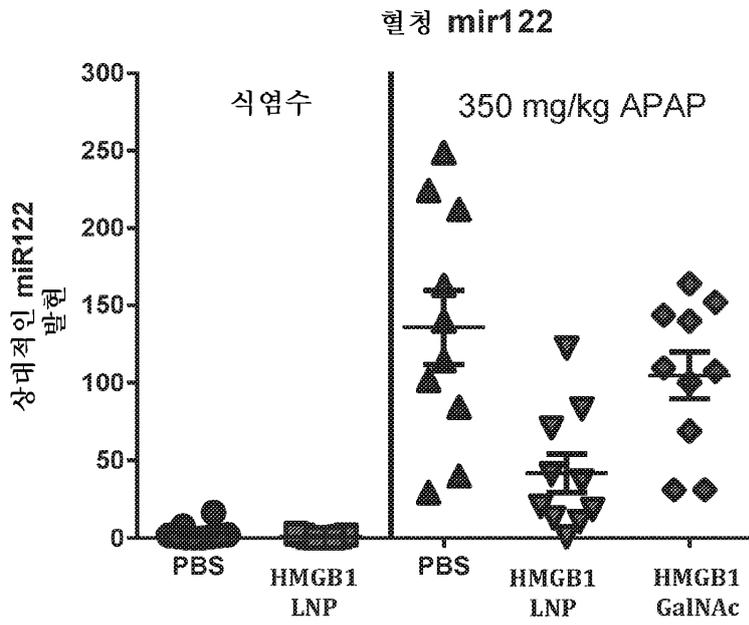
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M49

도면14b



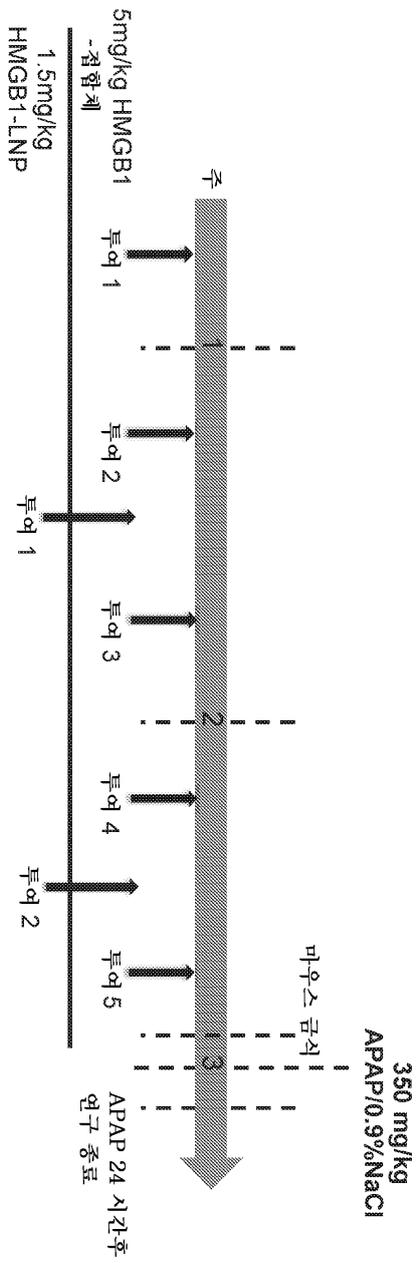
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M49

도면14c

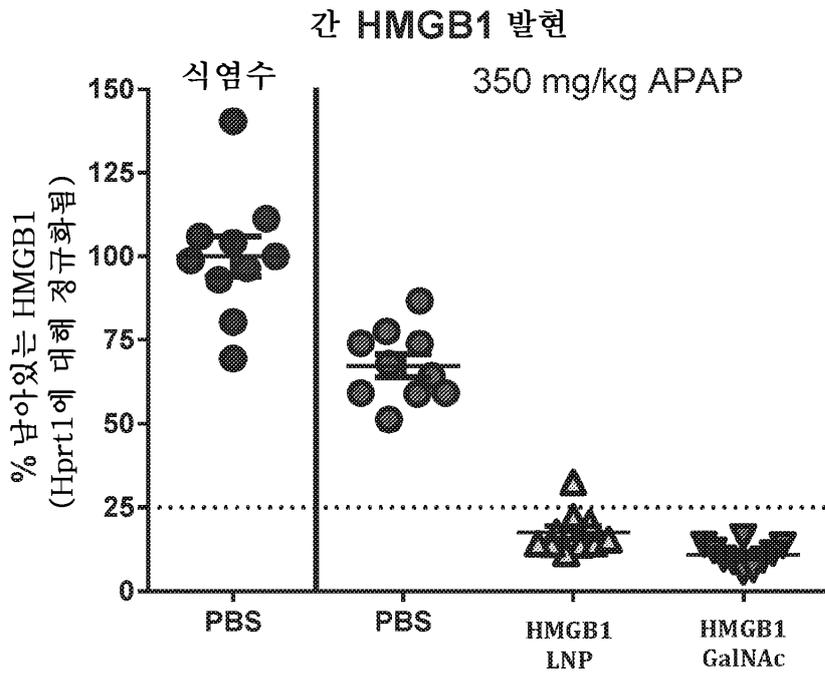


사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M49

도면15

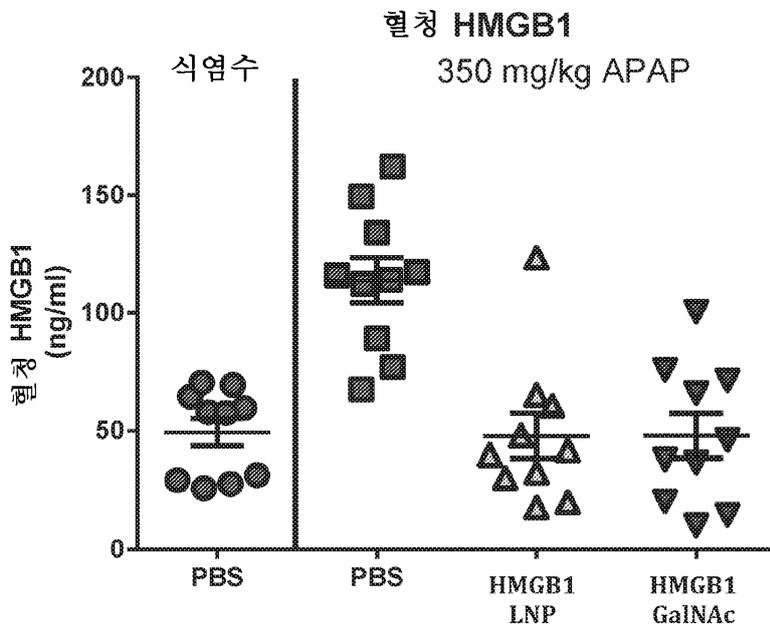


도면16a



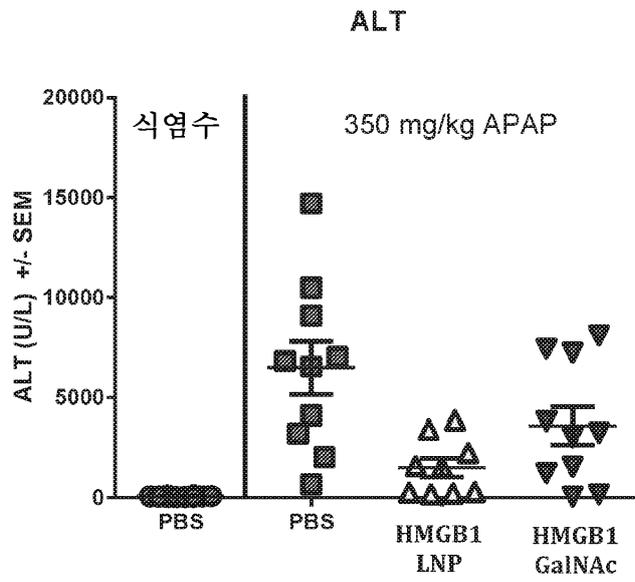
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M56

도면16b



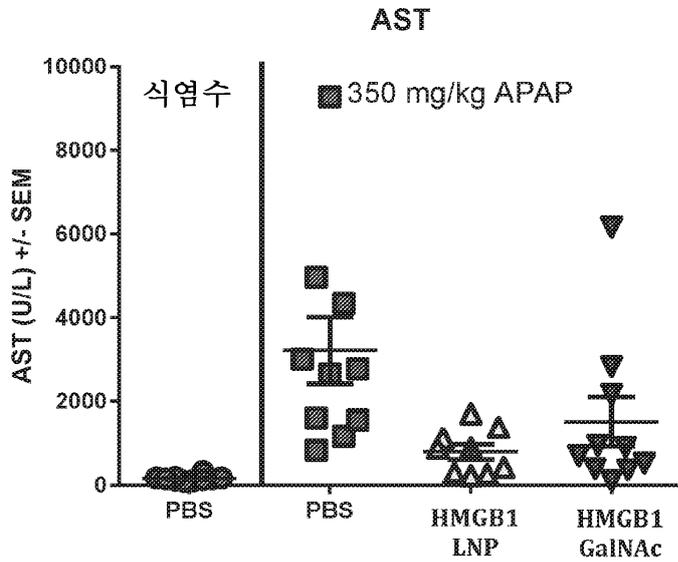
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M56

도면17a



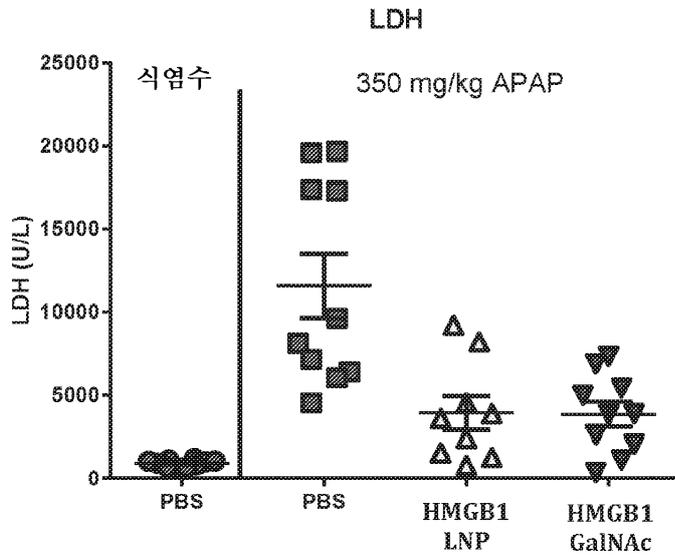
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드:
S212-AS296-M56

도면17b



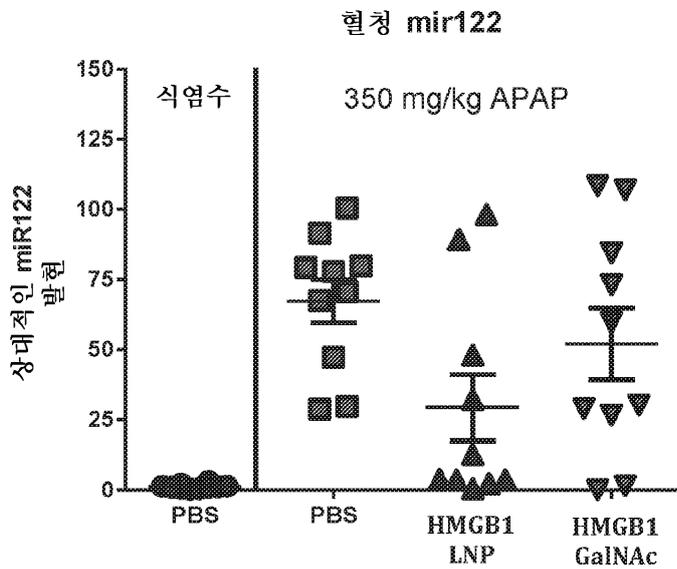
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드:
S212-AS296-M56

도면17c



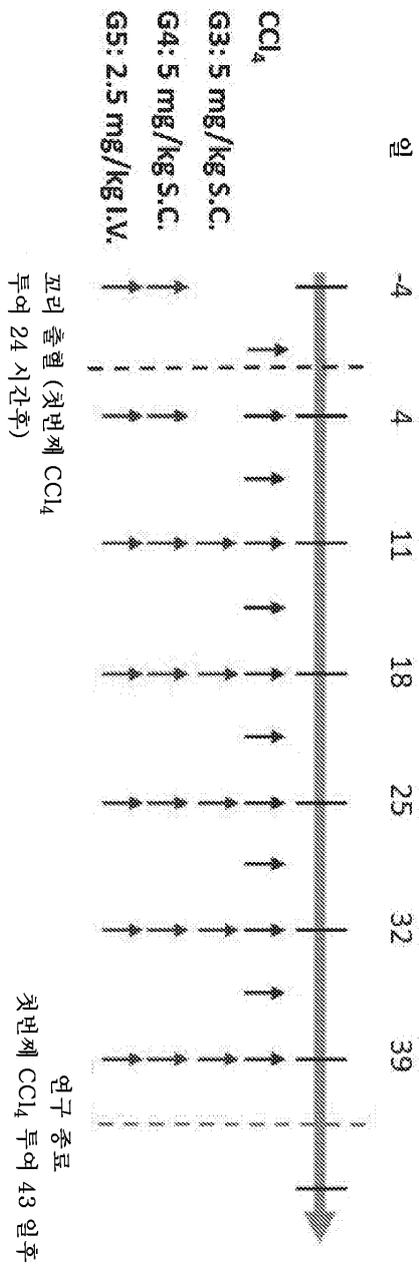
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드:
S212-AS296-M56

도면17d

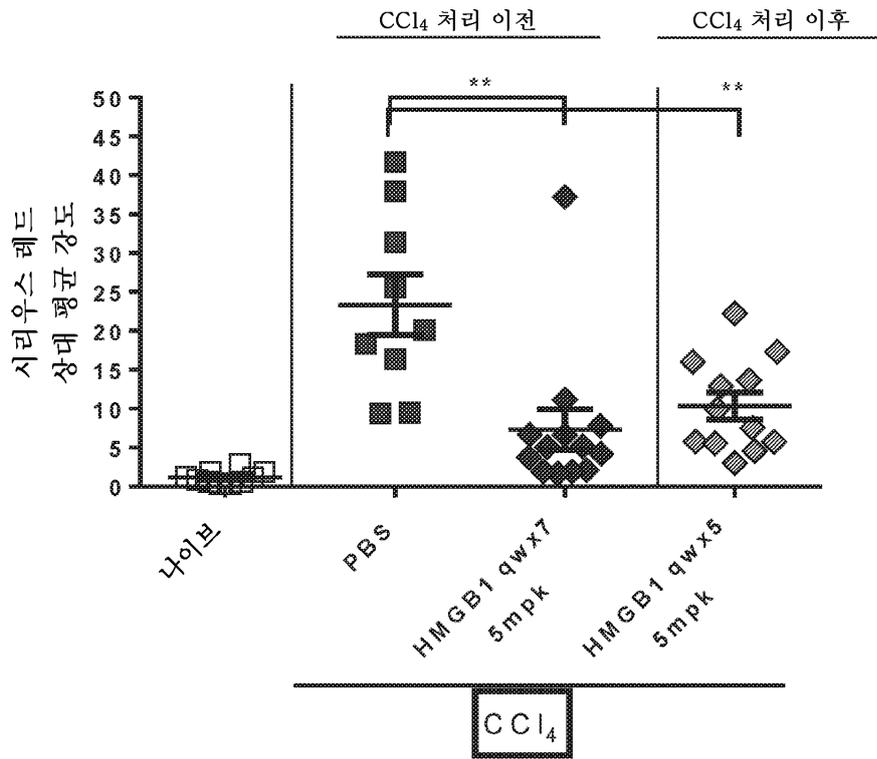


사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드:
S212-AS296-M56

도면18

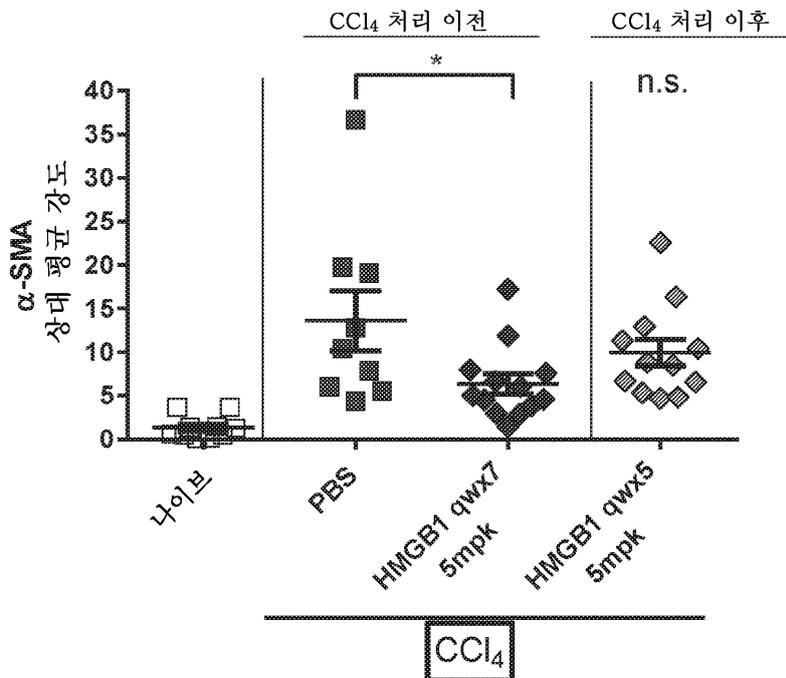


도면19



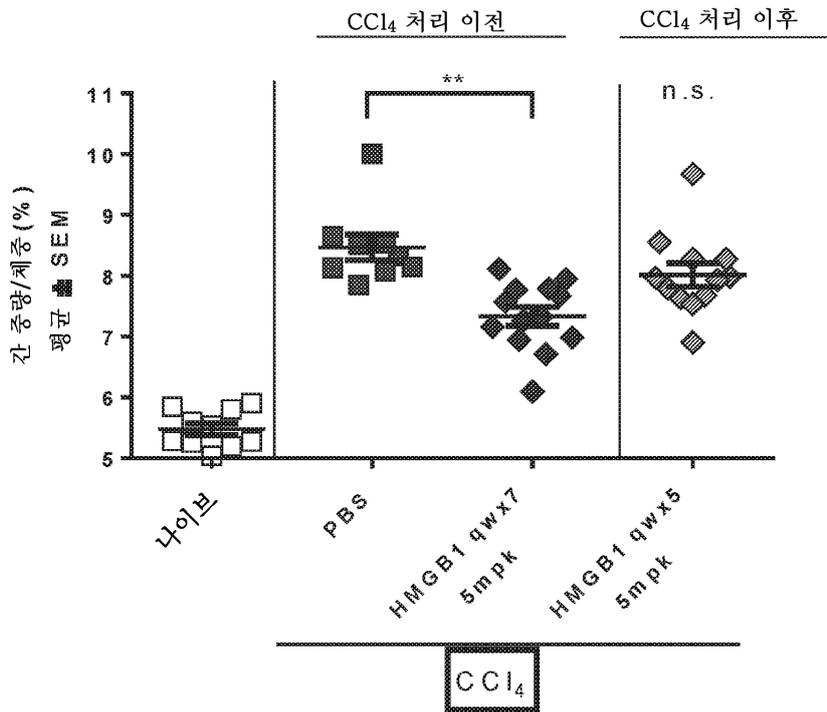
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M49

도면20



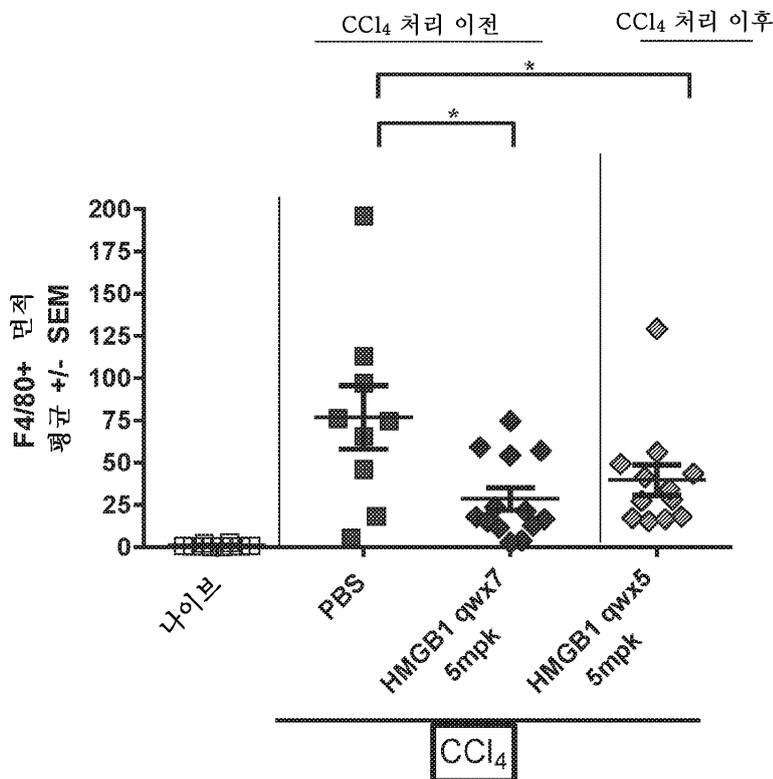
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M49

도면21



사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M49

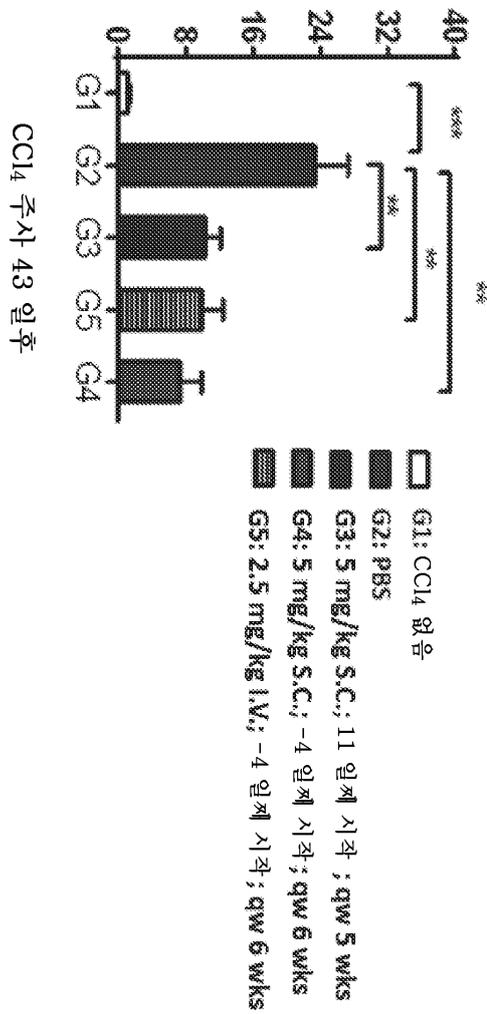
도면22



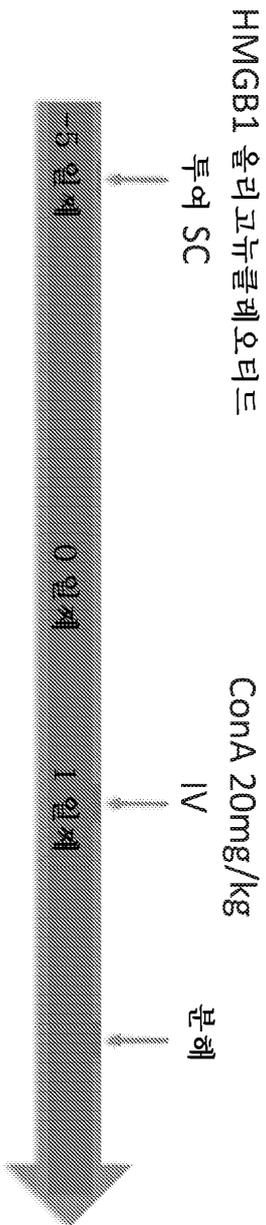
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S212-AS296-M49

도면23

상대적인 시리우스 레드+ 면적
평균 +/- SEM



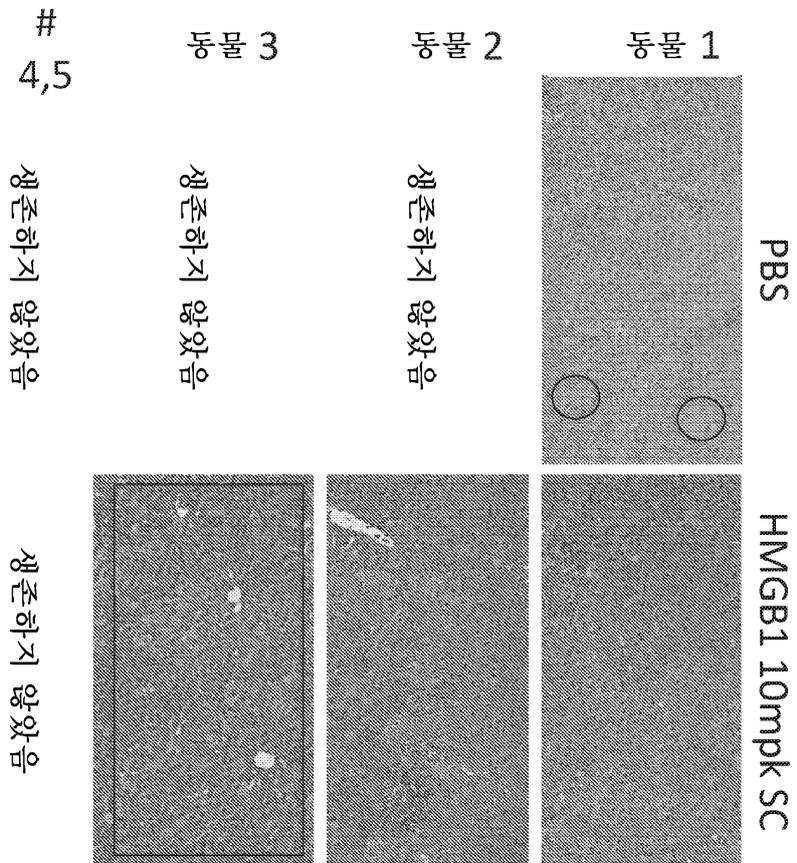
사용된 HMGB1 오픈 고뉴클레오티드: S212-AS296-M49



그룹	N	Con A (IV)	처리 (SC)	분해	종점
A	5	20mg/kg	PBS	24hr	혈액: ALT, AST 간: H&E
B	5	20mg/kg	HMGB1 (10mpk)	24hr	mRNA

도면24

도면25

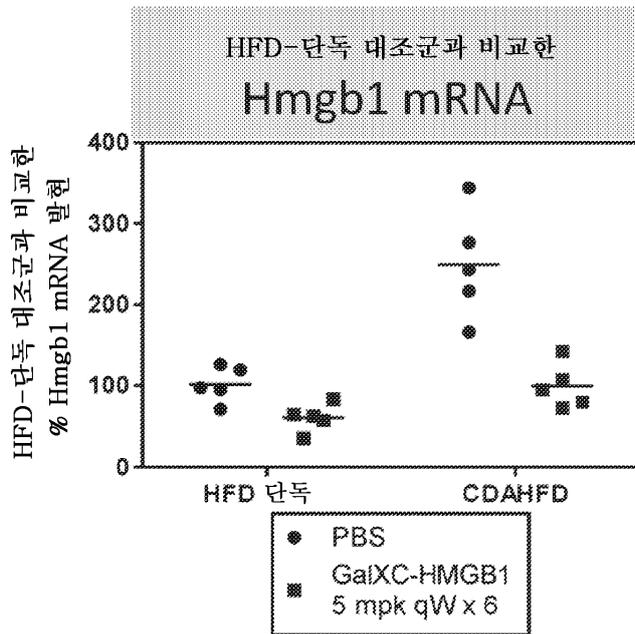


○ 괴사 영역

□ 건강한 췌선

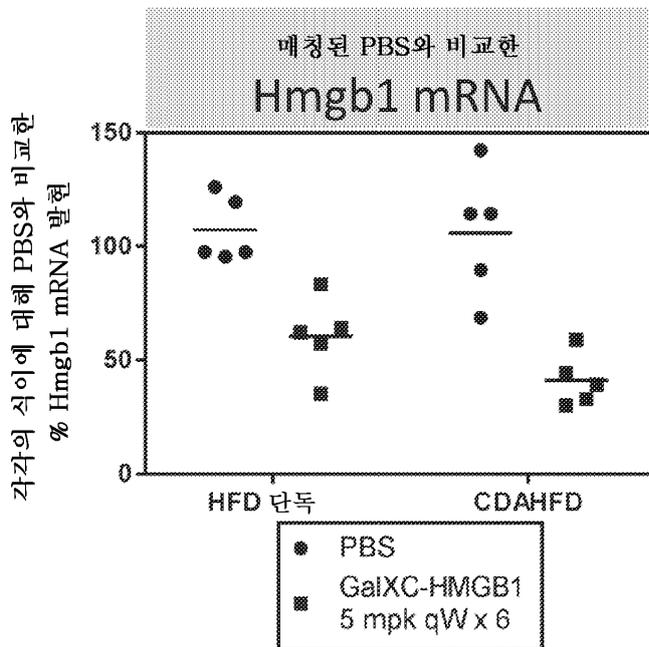
사용된
HMGB1 올리고뉴클레오티드:
S212-AS296-M49

도면26a



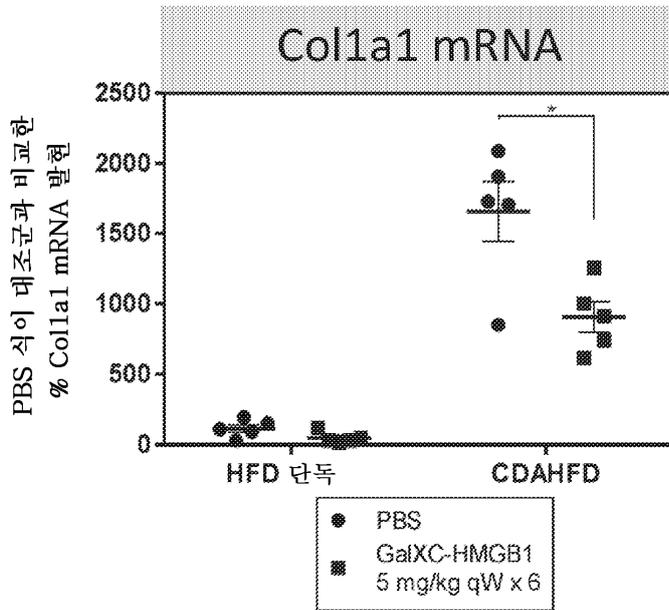
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S194-AS274-M30

도면26b



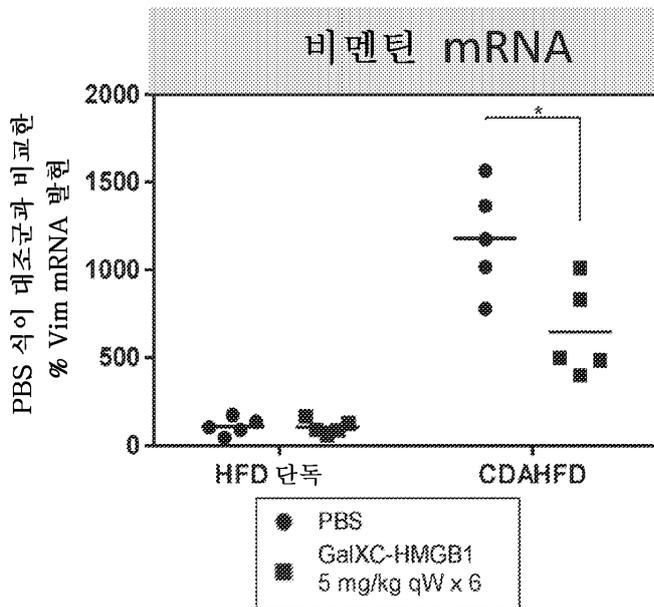
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S194-AS274-M30

도면26c



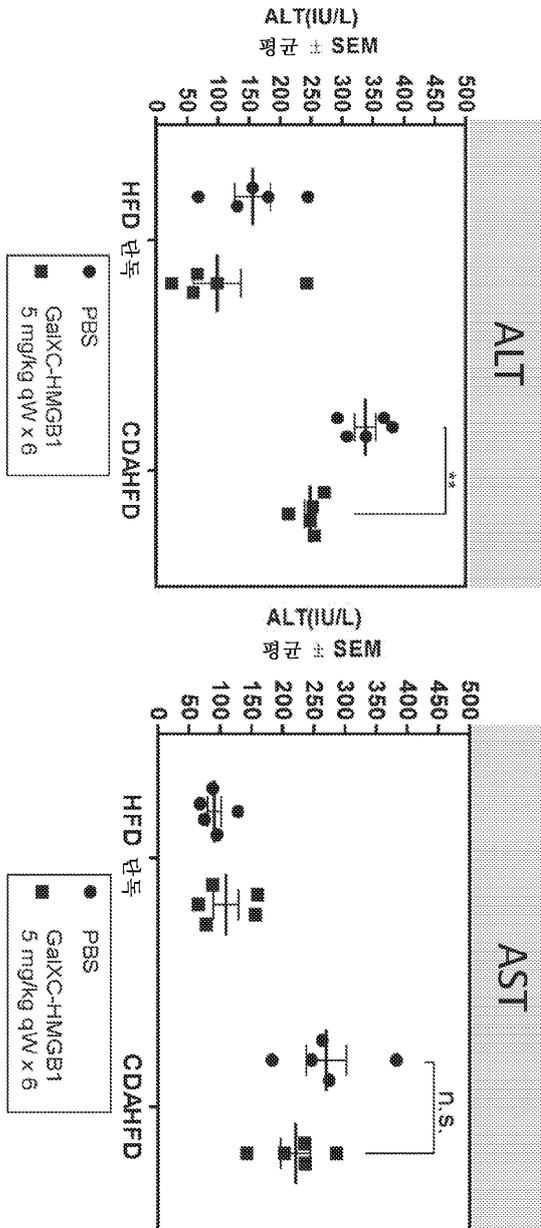
사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S194-AS274-M30

도면26d



사용된 HMGB1 올리고뉴클레오티드: S194-AS274-M30

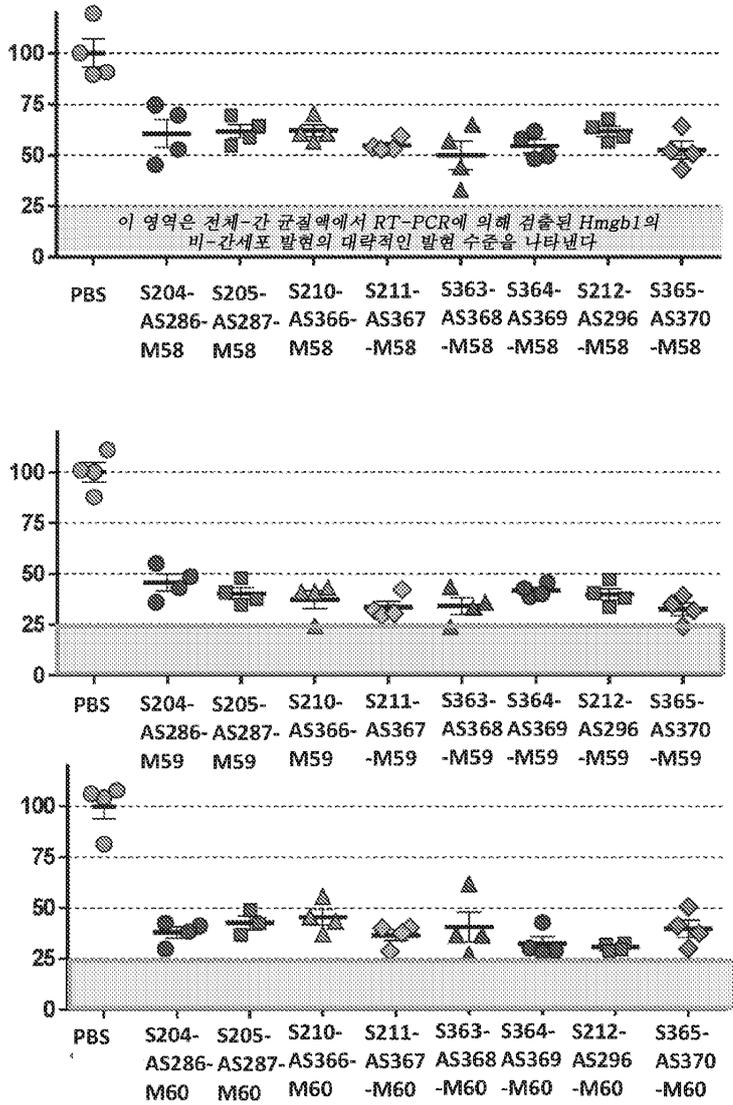
도면27



사용된 HMGBl 용리 고분자량 올리고당: S194-AS274-M30

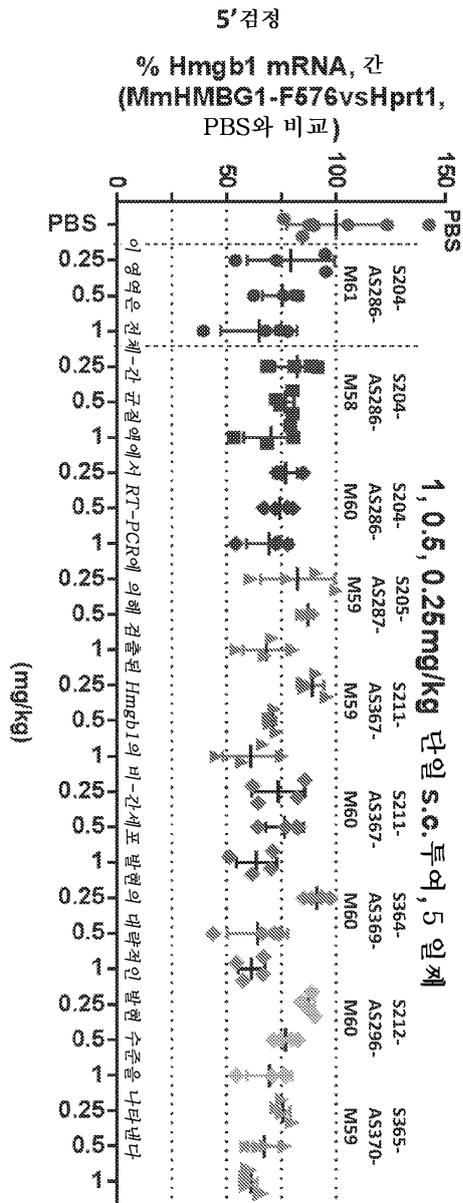
도면28

간세포에 남아있는 % Hmgb1 mRNA
(Hmgb1-F1541 vs. Hprt1-F576, PBS와 비교)

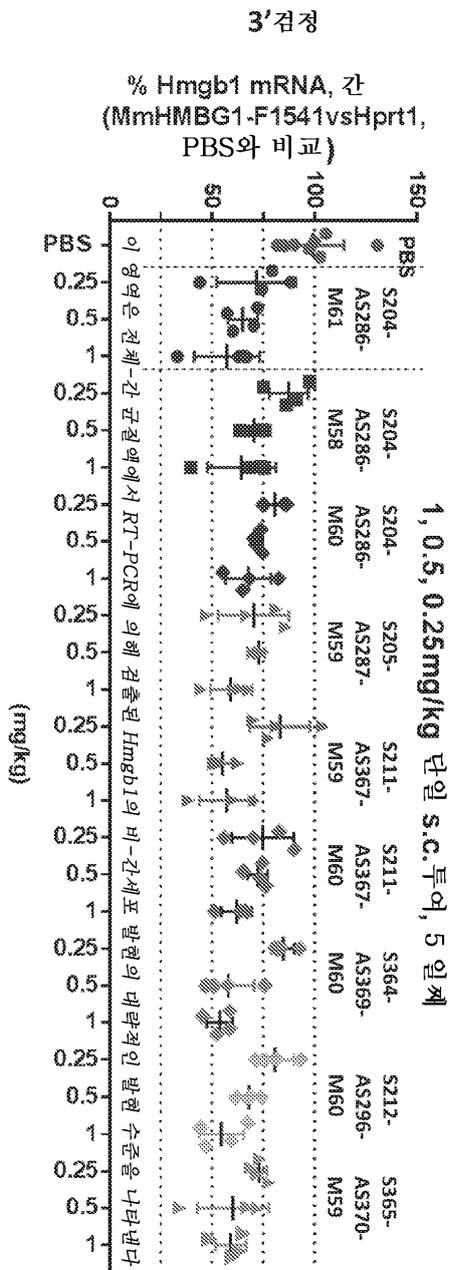


GalXC-HMGB1 표적 부위

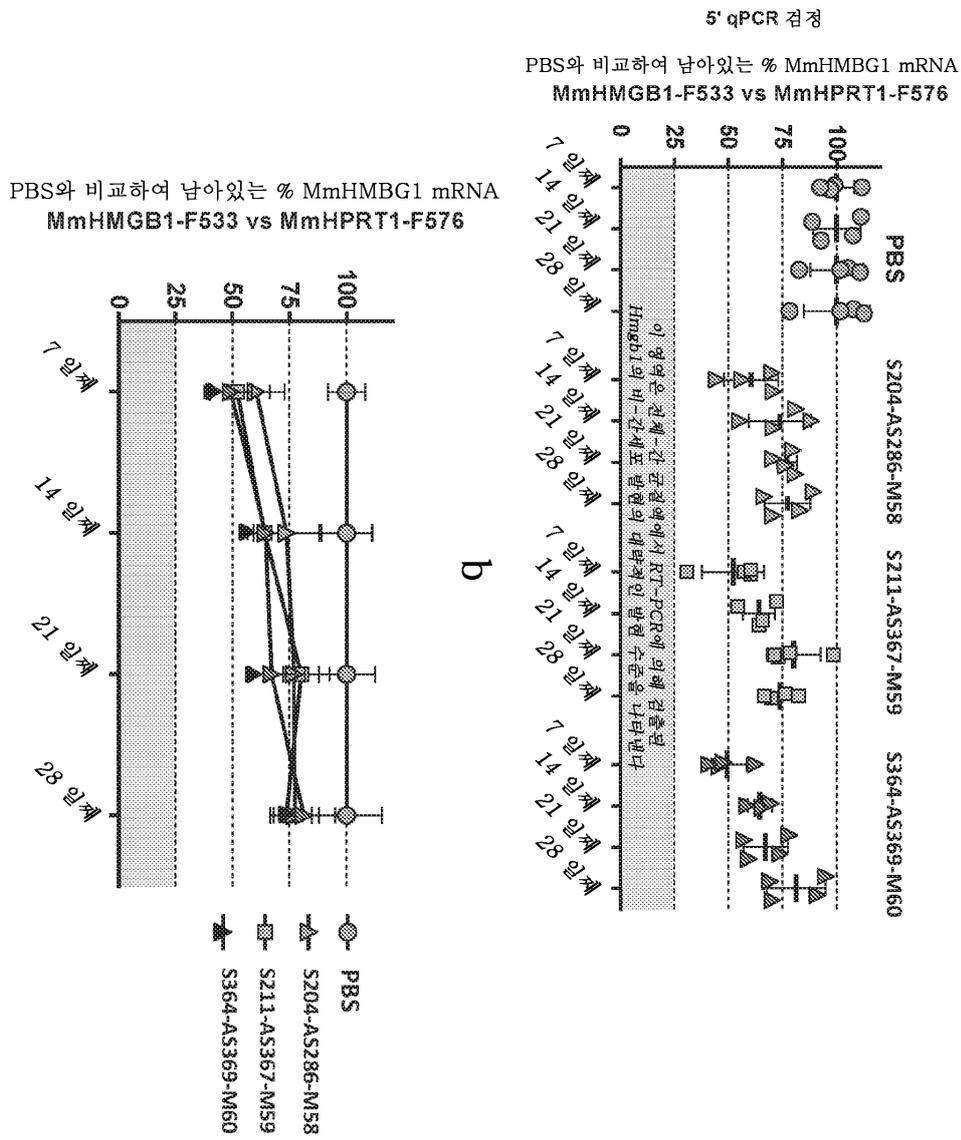
도면29a



도면29b

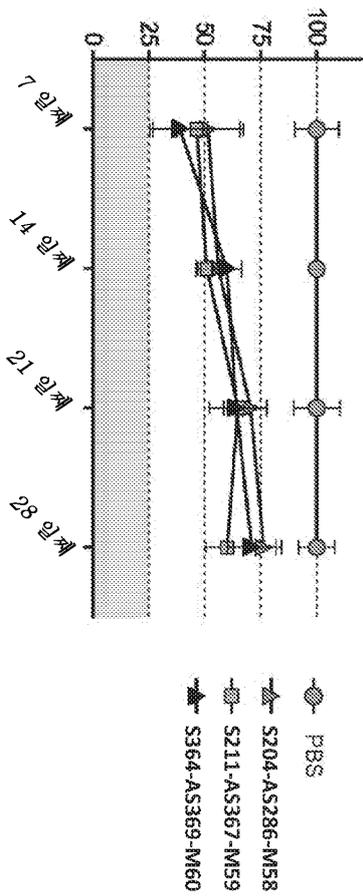


도면30i

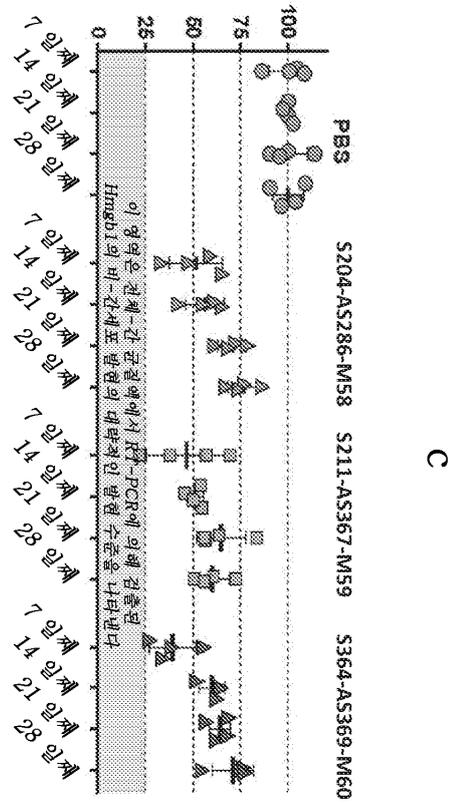


도면30ii

PBS와 비교하여 남아있는 % MmHMBG1 mRNA
MmHMGB1-F1541 vs MmHPRT1-F576



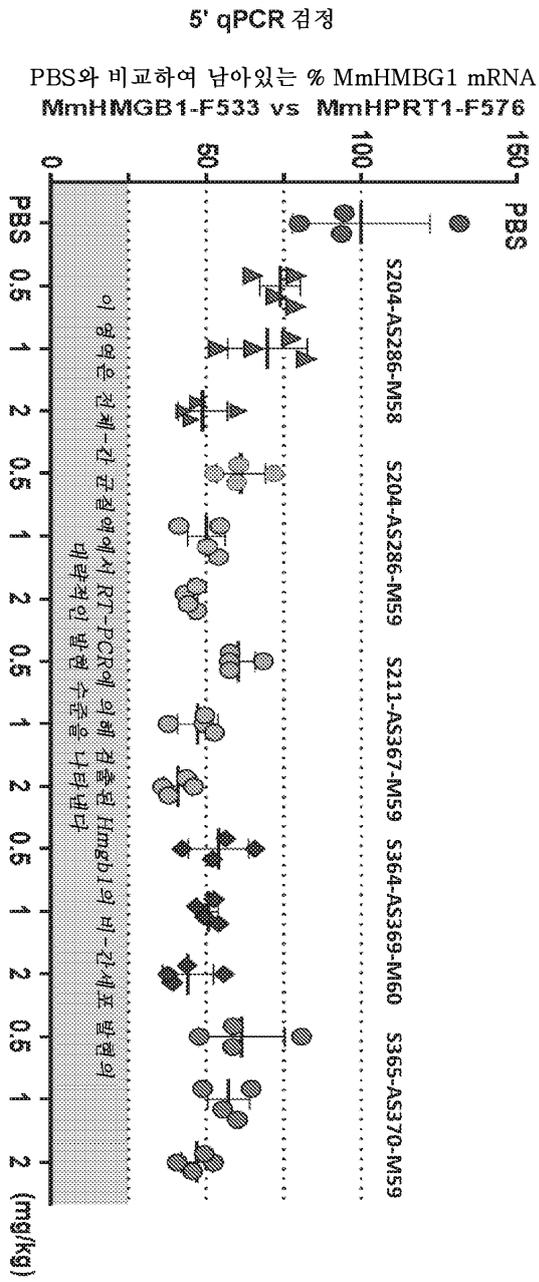
3' qPCR 검정
PBS와 비교하여 남아있는 % MmHMBG1 mRNA
MmHMGB1-F1541 vs MmHPRT1-F676



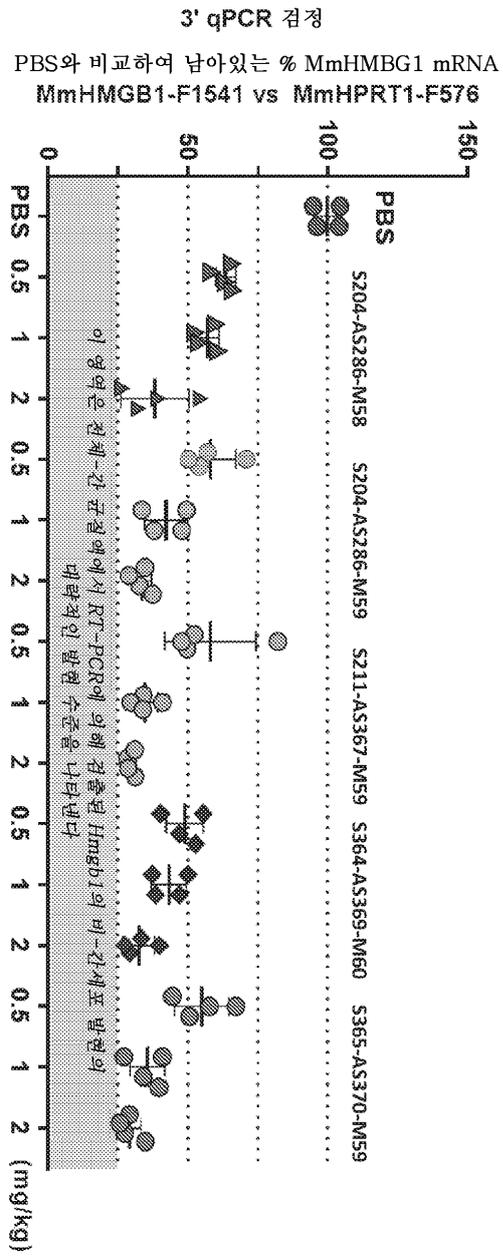
d

c

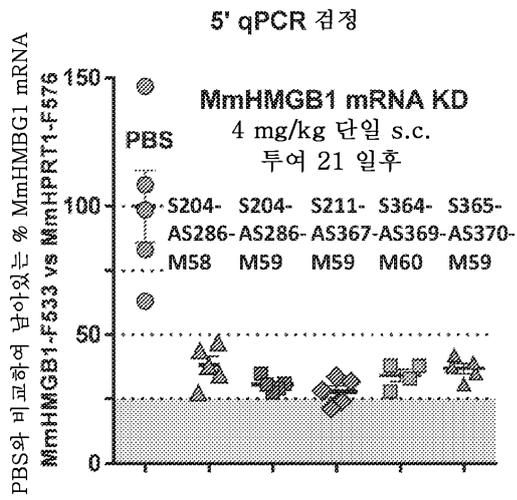
도면31a



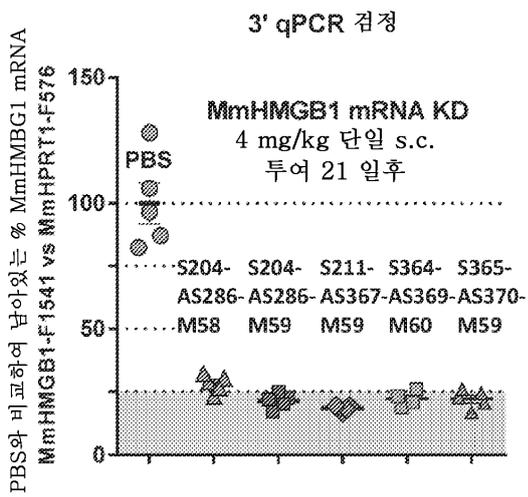
도면31b



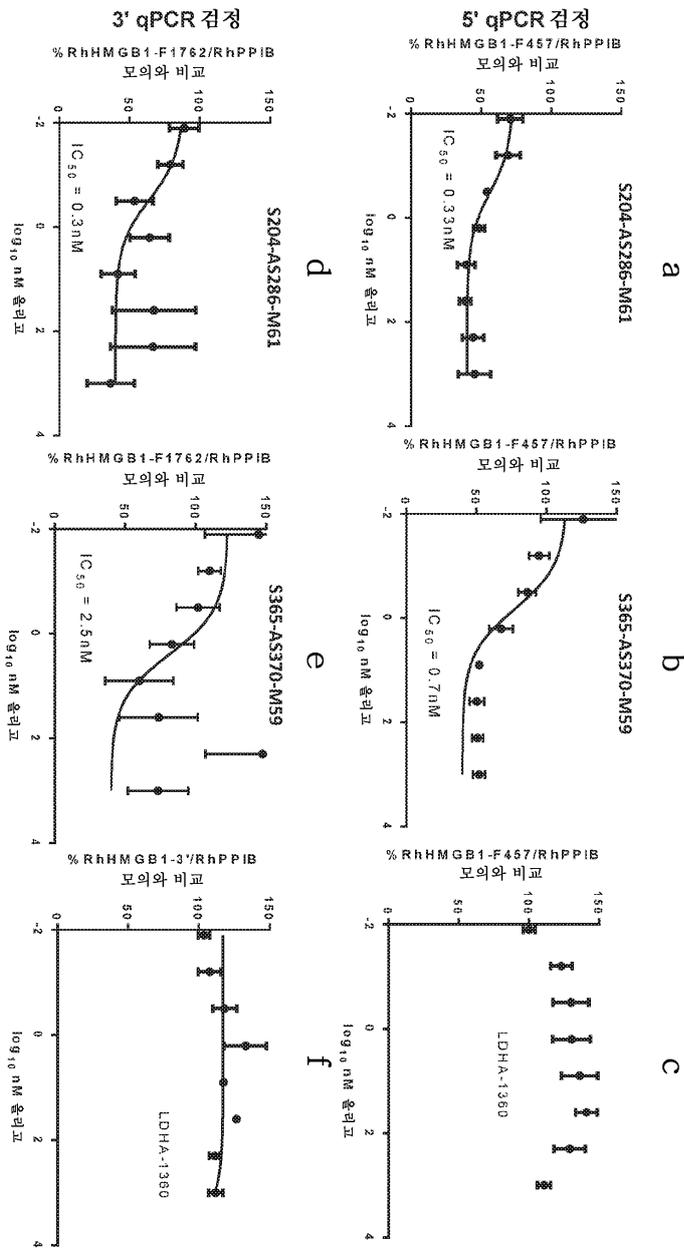
도면32a



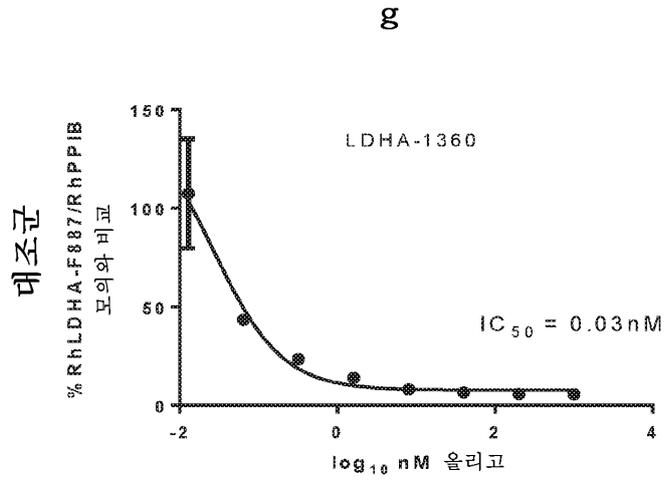
도면32b



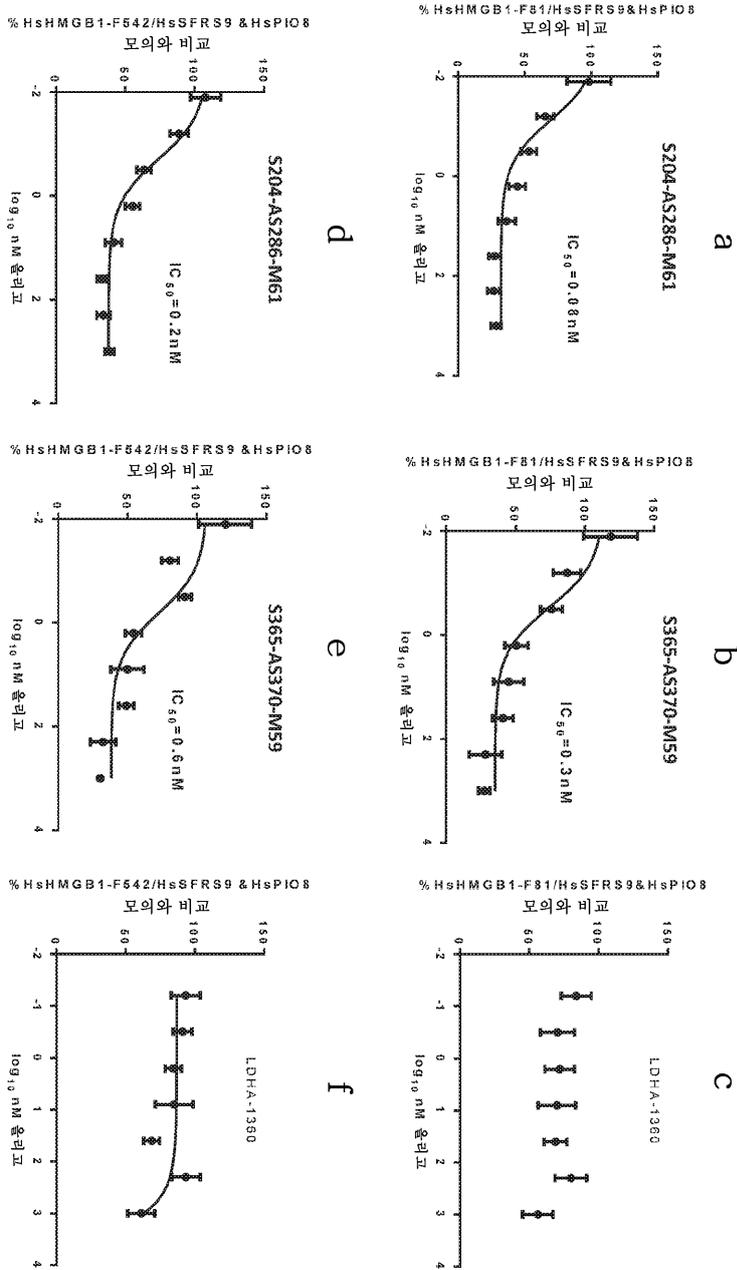
도면33i



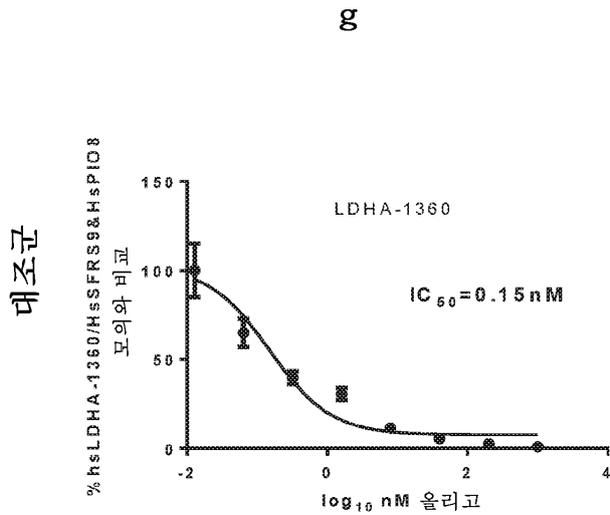
도면33i



도면34i



도면34ii



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Dicerna Pharmaceuticals, Inc.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR INHIBITING HMGB1 EXPRESSION

<130> D0800.70002W000

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/526,971

<151> 2017-06-29

<160> 381

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 1

agauuuguuu uaaacugua cagtg

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 2
 guacaguguc uuuuuugua uagtt 25
 <210> 3
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 3
 acagugucuu uuuuuuguaua guuaa 25
 <210> 4
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 4
 agugucuuuu uuuguauagu uaaca 25
 <210> 5
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 5
 gugucuuuuu uuguauaguu aacac 25
 <210> 6
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 6
 ggugguauuu ucaauagcca cuaac 25
 <210> 7
 <211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 7
 guuuuuucaa uagccacuaa ccutg 25

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 8
 gugcacagca caaauuaguu auata 25

<210> 9
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 9
 guugucucug augcagcuua uacga 25

<210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 10
 ucugaucgag cuuauacgaa auaat 25

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 11
 cugaucgagc uuauacgaaa uaatt 25

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 12
 gaugcagcuu auacgaaaua auugt 25
 <210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 13
 augcagcuua uacgaaaua uugt 25

 <210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 14
 gcagcuuua cgaauaauu guugt 25
 <210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 15
 cagcuuauac gaaauaauug uugt 25
 <210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 16

agcuuauacg aaauuuugu ugutc	25
<210> 17	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 17	
gcuuauacga aaauuuuguu guuct	25
<210> 18	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 18	
uacgaaauaa uuguuguucu guaaa	25
<210> 19	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 19	
acgaaauaau uguuguucug uuaac	25
<210> 20	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 20	
cgaaauaau guuguucugu uaact	25
<210> 21	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 21
 gaaauuuug uuguucuguu aactg 25
 <210> 22
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 22
 aaauuuugu uguucuguua acuga 25
 <210> 23
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 23
 aaauuuugu guucuguuaa cugaa 25
 <210> 24
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 24
 auuuuuug uucuguuac ugaat 25
 <210> 25
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 25
 uuuuuugu ucuguuacu gaata 25
 <210> 26
 <211> 25

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 26
 aauuguuguu cuguuaacug aauc 25
 <210> 27
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 27
 auuguuguuc uguuaacuga auacc 25
 <210> 28
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 28
 uuguuguucu guuaacugaa uacca 25

 <210> 29
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 29
 uguuguucug uuaacugaau accac 25
 <210> 30
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 30
 guuguucugu uaacugaau ccaact 25
 <210> 31

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 31
 uuguucuguu aacugaauc cactc 25

<210> 32
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 32
 guucuguaa cugaaacca cuctg 25

<210> 33
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 33
 uguuaacuga auaccacucu guaat 25

<210> 34
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 34
 guuaacugaa uaccacucug uaatt 25

<210> 35
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 35

uuaacugaau accacucugu aautg	25
<210> 36	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 36	
uaacugaaua ccacucugua auugc	25
<210> 37	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 37	
aacugaauac cacucuguaa uugca	25
<210> 38	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 38	
acugaauacc acucuguaau ugcaa	25
<210> 39	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 39	
cugaauacca cucuguaauu gcaaa	25
<210> 40	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	

<400> 40
 ugauuaccac ucuguaauug caaaa 25

<210> 41
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 41
 gaaauaccacu cuguaauugc aaaaa 25
 <210> 42
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 42
 aauaccacuc uguaaaugca aaaaa 25
 <210> 43
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 43
 auaccacucu guaaaugcaa aaaaa 25

<210> 44
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 44
 augcagcuua uacgaagaua auugt 25
 <210> 45
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 45
 ugcagcuuau acgaagauaa uugtt 25
 <210> 46
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 46
 gcagcuuaua cgaagauauu ugutg 25

 <210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 47
 cagcuuauac gaagauauu guugt 25
 <210> 48
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 48
 gcuuauacga agauauuugu ugutc 25
 <210> 49
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 49
 cuuauacgaa gauauuuguu guuct 25

 <210> 50

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 50
 auacgaagau aauuguuguu cugtt 25
 <210> 51
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 51
 acgaagauaa uguuguucu guaaa 25
 <210> 52
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 52
 cgaagauau uguuguucug uaaac 25

 <210> 53
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 53
 gcagcuguuu uguugacauu cugaa 25
 <210> 54
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 54
 gcuguuuugu ugacauucug aaugc 25

<210> 55
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 55
 cuguuuuguu gacauucuga augct 25

<210> 56
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 56
 guuuuguuga caucugaau gcutc 25

<210> 57
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 57
 guugacauuc ugaaugcuuc uaagt 25

<210> 58
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 58
 gacauucuga augcuucuaa guaaa 25

<210> 59
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 59
 acauucugaa ugcucuaag uaaat 25
 <210> 60
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 60
 auucugaaug cuucuaagua aauc 25
 <210> 61
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 61
 uucugaaugc uucuaagua auaca 25

 <210> 62
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 62
 ucugaaugcu ucuaaguaaa uacaa 25
 <210> 63
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 63
 cugaaugcu cuaaguaaa acaat 25
 <210> 64
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 64
 ugaaugcuuc uaaguaaaua caatt 25

<210> 65
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 65
 gaaugcuucu aaguaaaauac aautt 25

<210> 66
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 66
 aaugcuucua aguaaaauaca aautt 25

<210> 67
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 67
 augcuucuaa guaaauacaa uuutt 25

<210> 68
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 68
 ugcucuaag uaaaauacaau uuutt 25

<210> 69
 <211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 69
 guuguccuuu ucauaggucu gaaat 25
 <210> 70
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 70
 ugagauaguu uucauccaua acuga 25

 <210> 71
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 71
 gagauaguuu ucauccauaa cugaa 25
 <210> 72
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 72
 acauuuucau ccauaguuga agaat 25
 <210> 73
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 73
 cauuuacaaa cugaagagua aucaa 25

<210> 74
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 74
 auuuacaac ugaagaguaa ucaat 25
 <210> 75
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 75
 acaaacugaa gaguaaucaa ucuac 25
 <210> 76
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 76
 guaaugacag uuauuuuug cagtt 25

 <210> 77
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 77
 aaugacaguu auauuuugca guutc 25
 <210> 78
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 78

aauacaagac ugcuguacua uuugt 25

<210> 79

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 79

auacaagacu gcuguacuau uugtt 25

<210> 80

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 80

uacaagacug cuguacuauu ugutg 25

<210> 81

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 81

acaagacugc uguacuauuu guuga 25

<210> 82

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 82

caagacugcu guacuauuug uugac 25

<210> 83

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 83
 gacugcugua cuauuuguug acctt 25
 <210> 84
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 84
 acugcuguac uauuuguuga ccuta 25
 <210> 85
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 85
 gugguuuguc ccuuuugaa ucaga 25
 <210> 86
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 86
 caauacauu gcuuuuucuu uauaa 25
 <210> 87
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 87
 auacauuugc uuuuucuuua uaaaa 25
 <210> 88
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 88
 ugauggagug cuguuauaua auutt 25

<210> 89
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 89
 gauggagugc uguuuuguua uauaa 25

<210> 90
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 90
 auggagugcu guuuuguuau auaat 25

<210> 91
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 91
 ggagugcugu uuuguuauau auutt 25

<210> 92
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 92
 gagugcuguu uuguuauaua auuta 25

<210> 93

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 93
 cuguuuuguu auuaauuuu gactt 25
 <210> 94
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 94
 cauuugcguu guuaauguaa uuuga 25

 <210> 95
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 95
 auguaauuuc aggaggaaua cugaa 25
 <210> 96
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 96
 gaguccugga ugauacuaau aaact 25
 <210> 97
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 97

cacuguacag uuuaaaaaca aaucuua 27

<210> 98
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 98
 aacuauacaa aaaaagacac uguacag 27

<210> 99
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 99
 uuaacuauac aaaaaaagac acuguac 27

<210> 100
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 100
 uguuaacuau acaaaaaaag acacugu 27

<210> 101
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 101
 guguaacua uacaaaaaa gacacug 27

<210> 102
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 102
 guuaguggcu auugaaaaua ccaccag 27
 <210> 103
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 103
 caagguuagu ggcuauugaa aauacca 27

 <210> 104
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 104
 uauuaaacua auuugugcug ugcacca 27
 <210> 105
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 105
 ucguauaagc ugcaucagag acaacug 27
 <210> 106
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 106
 auuauuucgu auaagcugca ucagaga 27

 <210> 107
 <211> 27

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 107
 aauuauuucg uauaagcugc aucagag 27
 <210> 108
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 108
 acaauuuuuu cguauaagcu gcaucag 27
 <210> 109
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 109
 aacaauuuuu ucguauaagc ugcauca 27

 <210> 110
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 110
 acaacaauua uuucguauaa gcugcau 27
 <210> 111
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 111
 aacaacaauu auuucguaua agcugca 27
 <210> 112

<211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 112
 gaacaacaau uuuuucguau aagcugc 27

<210> 113
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 113
 agaacaaca uuuuucgua uaagcug 27

<210> 114
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 114
 uuaacagaac aacaauuau ucguaua 27

<210> 115
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 115
 guuaacagaa caacaauuau uucguau 27

<210> 116
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 116

aguuuacaga acaacaauua uuucgua 27
 <210> 117
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 117
 caguuaacag aacaacaauu auuucgu 27
 <210> 118
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 118
 ucaguuaaca gaacaacaau uuuuucg 27
 <210> 119
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 119
 uucaguuaac agaacaacaa uuuuuuc 27
 <210> 120
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 120
 auucaguuaa cagaacaaca auuuuuu 27
 <210> 121
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 121
 uauucaguua acagaacaac aauuauu 27

<210> 122
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 122
 guauucaguu aacagaacaa cauuuau 27
 <210> 123
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 123
 gguauucagu uaacagaaca acauuua 27
 <210> 124
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 124
 uggauuucag uuaacagaac aacaauu 27

<210> 125
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 125
 gugguauuca guuaacagaa caacaau 27
 <210> 126
 <211> 27
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 126
 agugguauuc aguuacaga acaaca 27
 <210> 127
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 127
 gagugguauu caguuaacag aacaaca 27

 <210> 128
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 128
 cagaguggua uucaguuac agaaca 27
 <210> 129
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 129
 auuacagagu gguauucagu uaacaga 27
 <210> 130
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 130
 aauuacagag ugguauucag uuaacag 27

 <210> 131

<211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 131
 caauuacaga gugguauuca guuaaca 27
 <210> 132
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 132
 gcaauuacag agugguauuc aguaaac 27
 <210> 133
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 133
 ugcaauuaca gagugguauu caguuaa 27

 <210> 134
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 134
 uugcauuac agagugguau ucaguua 27
 <210> 135
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 135
 uuugcauuu cagaguggua uucaguu 27

<210> 136
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 136
 uuuugcaau acagaguggu auucagu 27

<210> 137
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 137
 uuuuugcaau uacagagugg uauucag 27

<210> 138
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 138
 uuuuuugcaa uuacagagug guauuca 27

<210> 139
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 139
 uuuuuuugca auuacagagu gguauuc 27

<210> 140
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 140
 acaauuau cuuauaagc ugcauca 27

<210> 141
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 141
 aacaauuau uucguauaag cugcauc 27

<210> 142
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 142
 caacaauuau cuucguauaa gcugcau 27

<210> 143
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 143
 acaacaauu ucuucguaua agcugca 27

<210> 144
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 144
 gaacaacaau uaucuucgua uaagcug 27

<210> 145
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 145
 agaacaacaa uuauucucgu auaagcu 27

<210> 146
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 146
 aacagaacaa cauuuucuu cguauaa 27

<210> 147
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 147
 uuaacagaac aacaauuauc uucguau 27

<210> 148
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 148
 guaacagaa caacaauuau cuucgua 27

<210> 149
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 149
 uucagaaugu caacaaaaca gcugcaa 27

<210> 150
 <211> 27

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 150
 gcauucagaa ugucaacaaa acagcug 27
 <210> 151
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 151
 agcauucaga augucaacaa aacagcu 27

 <210> 152
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 152
 gaagcauuca gaaugucaac aaaacag 27
 <210> 153
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 153
 acuuagaagc auucagaaug ucaacaa 27
 <210> 154
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 154
 uuuacuuaga agcauucaga augucaa 27

<210> 155
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 155
 auuuacuuag aagcauucag aauguca 27
 <210> 156
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 156
 guuuuuacuu agaagcauuc agaaugu 27
 <210> 157
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 157
 uguuuuuacu uagaagcauu cagaauug 27

 <210> 158
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 158
 uuguuuuuac uuagaagcau ucagaau 27
 <210> 159
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 159

auuguauuuu cuuagaagca uucagaa 27
 <210> 160
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 160
 aauuguauuu acuuagaagc auucaga 27

 <210> 161
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 161
 aaauguauuu uacuuagaag caucag 27
 <210> 162
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 162
 aaaauguauu uuacuuagaa gcuuca 27
 <210> 163
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 163
 aaaaaugua uuuacuuaga agcauuc 27

 <210> 164
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 164
 aaaaaauugu auuuacuuag aagcauu 27
 <210> 165
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 165
 auuucagacc uagaaaagg acaacaa 27
 <210> 166
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 166
 ucaguuauagg augaaaacua ucucaac 27
 <210> 167
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 167
 uucaguuauug gaugaaaacu aucucaa 27
 <210> 168
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 168
 auucuucaac uauggaugaa aauguua 27
 <210> 169
 <211> 27
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 169
 uugauuacuc uucaguuugu aaaugua 27

<210> 170
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 170
 auugauuacu cuucaguuug uaaaugu 27

<210> 171
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 171
 guagauugau uacucuucag uuuguaa 27

<210> 172
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 172
 aacugcaaaa uauaacuguc auuacac 27

<210> 173
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 173
 gaaacugcaa aaauaacug ucauuac 27

<210> 174

<211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 174
 acaaaauagua cagcagucuu guauuuu 27
 <210> 175
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 175
 aacaaaugu acagcagucu uguauuu 27

 <210> 176
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 176
 caacaaaug uacagcaguc uuguauu 27
 <210> 177
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 177
 ucaacaaaua guacagcagu cuuguau 27
 <210> 178
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 178

gucaacaaau aguacagcag ucuugua 27

<210> 179
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 179

aaggucaaca aauguacag cagucuu 27

<210> 180
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 180

uaaggucaac aaauaguaca gcagucu 27

<210> 181
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 181

ucugauucau aaaggacaa accacag 27

<210> 182
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 182

uuauaaagaa aaagcaaau uauugga 27

<210> 183
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 183
 uuuuuuaaag aaaaagcaaa uguauug 27
 <210> 184
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 184
 aaaauuauu aacagcacuc caucaca 27
 <210> 185
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 185
 uuauuaaaca aaacagcacu ccaucac 27
 <210> 186
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 186
 auuauuaaac aaaacagcac uccauca 27
 <210> 187
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 187
 aaauuauaua acaaacagc acuccau 27
 <210> 188
 <211> 27

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 188
 uaaauuuauu aacaaaacag cacucca 27
 <210> 189
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 189
 aagucuaaa uauuaaaca aacagca 27
 <210> 190
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 190
 ucaaauuaca uuaacaacgc aaaugua 27

 <210> 191
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 191
 uucaguuuc cuccugaaau uacauaa 27
 <210> 192
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 192
 aguuuuuag uaucauccag gacucag 27
 <210> 193

<211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 193
 guacaguguc uuuuuugua gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 194
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 194
 acagugucuu uuuuuguaua gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 195
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 195
 ucugaugcag cuuauacgaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 196
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 196
 cugaugcagc uuauacgaaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 197
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 197

augcagcuua uacgaaauaa gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 198	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 198	
gcagcuuaua cgaauaaua gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 199	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 199	
cagcuuauac gaaauaaua gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 200	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 200	
gcuuauacga aaauuugua gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 201	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 201	
aaauuuugu uguucuguua gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 202	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	

<400> 202
 aaauuuuuuu guucuguuaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 203
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 203
 auuguuguuc uguuaacuga gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 204
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 204
 uuguuguucu guuaacugaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 205
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 205
 uguuguucug uuaacugaaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 206
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 206
 guuguucugu uaacugaaua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 207
 <211> 36
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 207
 aacugaauc cacucuguaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 208
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 208
 cugaaauacca cucuguaaau gcagccgaaa ggcugc 36

 <210> 209
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 209
 aauaccacuc uguaaauugca gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 210
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 210
 auucugaaug cuucuaagua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 211
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 211
 uucugaaugc uucuaaguaa gcagccgaaa ggcugc 36

 <210> 212

<211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 212
 ugaaugcuuc uaaguaaaaua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 213
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 213
 gaaugcuucu aaguaaaauac gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 214
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 214
 aaugcuucua aguaaaauaca gcagccgaaa ggcugc 36

 <210> 215
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 215
 augcuucuaa guaaauacaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 216
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 216
 ugagauaguu uucauccaaua gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 217
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 217
 gagauaguuu ucauccauaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 218
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 218
 auuuacaaac ugaagaguua gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 219
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 219
 aauacaagac ugccauuuua gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 220
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 220
 auacaagacu gccauuuuaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 221
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 221
uacaagacug ccauuuuuuuuu gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 222
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 222
caagacugcc auuuuuuuuu gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 223
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 223
aagacugcca uuuuuuuuuu gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 224
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 224
agacugccau uuuuuuuuuu gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 225
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 225
gacugccauuuuuuuuuu gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 226
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 226
 acugccauau uaaaaaaaaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 227
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 227
 aguaugaaau auucaaaaaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 228
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 228
 guaugaaaa uucaaaaaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 229
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 229
 gauggagugc uuuuuuuua gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 230
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 230
 auggagugcu guuuuuuaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 231
 <211> 36

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 231
 ggagugcugu uuuguuauaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 232
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 232
 gagugcuguu uuguuauaia gcagccgaaa ggcugc 36

 <210> 233
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 233
 cuguuuuguu auauauuuua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 234
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 234
 ugcagagguu uaaaauacua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 235
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 235
 gcagagguuu uaaaucuaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 236
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 236
 cagagguuuu aaauacuaga gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 237
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 237
 gagguuuuaa auacuaguua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 238
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 238
 agauuuuguu acauuuuuua gcagccgaaa ggcugc 36

 <210> 239
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 239
 auuuuguuac auauuuuuua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 240
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 240

aaaauacuca cuuuaugcua gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 241	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 241	
aaauacucac uuuaugcuua gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 242	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 242	
aauacucacu uuaugcuuaa gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 243	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 243	
aaaaaagguu uugucaaaca gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 244	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 244	
agguuuuguc aaacauugca gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 245	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 245
 gguuuuguca aacauugcaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 246
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 246
 gcaaguauuc ggugcuauaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 247
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 247
 agauggaagu uucuacugua gcagccgaaa ggcugc 36

 <210> 248
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 248
 auggaaguuu cuacuguaua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 249
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 249
 ggaaguuuuc acuguauaga gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 250
 <211> 36
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 250
 gaaguuucua cuguauagaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 251
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 251
 aaguuucua uuguauagaaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 252
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 252
 aguuucua guauagaaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 253
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 253
 cuacuguaua gaaucacca gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 254
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 254
 cuguauagaa aucacauua gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 255

<211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 255
 gucaugacaa cuaccuuuaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 256
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 256
 gacaacuacc auuuuuuaa gcagccgaaa ggcugc 36

 <210> 257
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 257
 aguuggaugu cuaaaacuca gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 258
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 258
 guuggauguc uaaaacucua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 259
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 259

gaugucuaaa acucaaguua gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 260
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 260

gauaagugua aagccuugua gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 261
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 261

auaaguguaa agccuuguaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 262
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 262

gccuuguaac ugaagaugaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 263
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 263

guguauagaa acuauuuuaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 264
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 264
 aaagacuuug uugacaucaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 265
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 265
 gaagaugcuu uuuaaaacua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 266
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 266
 aagaugcuuu uaaaaacuaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 267
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 267
 gagcuauugc ugauuaguua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 268
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 268
 guguuguuaa uguuugcuga gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 269
 <211> 36

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 269
 guuguuaaug uuugcuguaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 270
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 270
 uguuaauguu ugcuguauua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 271
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 271
 guuaauguuu gcuguauuuu gcagccgaaa ggcugc 36

 <210> 272
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 272
 uuaauguuug cuguauuuua gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 273
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 273
 uacaaaaaaaa gacacuguac gg 22
 <210> 274

<211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 274
 uauacaaaa aagacacugu gg 22

<210> 275
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 275
 uucguauaag cugcaucaga ga 22

<210> 276
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 276
 uuucguauaa gcugcaucag ag 22

<210> 277
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 277
 uuucguauaa gcugcaucag gg 22

<210> 278
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 278

uucguauaag cugcaucagg g	21
<210> 279	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 279	
uuauuucgua uaagcugcau gg	22
<210> 280	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 280	
uauuauuucg uauaagcugc gg	22
<210> 281	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 281	
uaauuauuuc guauaagcug gg	22
<210> 282	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 282	
uacaauuuuu ucguauaagc gg	22
<210> 283	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	

<400> 283
 uaacagaaca acaauuuuuu gg 22

<210> 284
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 284
 uuaacagaac aacaauuuuu gg 22
 <210> 285
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 285
 ucaguuuaca gaacaacaau gg 22
 <210> 286
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 286
 uucaguuuac agaacaacaa gg 22

<210> 287
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 287
 uuucaguuua cagaacaaca gg 22
 <210> 288
 <211> 22
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 288
 uauucaguuu acagaacaac gg 22
 <210> 289
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 289
 uuacagagug guauucaguu gg 22

 <210> 290
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 290
 uauuacagag ugguauucag gg 22
 <210> 291
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 291
 ugcaauuaca gagugguauu gg 22
 <210> 292
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 292
 uacuuagaag caucagaau gu 22

 <210> 293

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 293
 uacuuagaag catucagaau gt 22
 <210> 294
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 294
 utacuuagaa gcauucagaa tg 22
 <210> 295
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 295
 uuacuuagaa gcauucagaa ug 22

 <210> 296
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 296
 uauuuacuua gaagcauua gg 22
 <210> 297
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 297
 uauuuacuua gaagcauua ga 22

<210> 298
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 298
 auuuacuag aagcaucag g 21

<210> 299
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 299
 uuuuuacuua gaagcatuca ga 22

<210> 300
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 300
 guuuuacuu agaagcauc ag 22

<210> 301
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 301
 gtauuuacuu agaagcautc ag 22

<210> 302
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 302
 uguauuuacu uagaagcauu gg 22

<210> 303
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 303
 uuguauuuac uuagaagcau gg 22

<210> 304
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 304
 uauggaugaa aacuaucuca gg 22

<210> 305
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 305
 uuauggauga aaacuaucuc gg 22

<210> 306
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 306
 uuacucuca guuuguaau gg 22

<210> 307
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 307
 uaaauaggca gucuuguauu gg 22

<210> 308
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 308
 uuaauaggc agucuuguau gg 22

<210> 309
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 309
 uuaauaggc agucuuguau gg 22

<210> 310
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 310
 uauuuauau ggcagucuug gg 22

<210> 311
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 311
 uauuuauau ggcagucuug gg 22

<210> 312
 <211> 22

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 312
 uaaaauuuau auggcagucu gg 22
 <210> 313
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 313
 uaaaauuuaa uauggcaguc gg 22

 <210> 314
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 314
 uaaaauuuaa auauggcagu gg 22
 <210> 315
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 315
 uaaaauugaau aaaucauacu gg 22
 <210> 316
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 316
 uaaaauugaa uaaucauac gg 22

<210> 317
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 317
 uaacaaaaca gcacuccauc gg 22
 <210> 318
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 318
 uuaacaaaac agcacuccau gg 22
 <210> 319
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 319
 uuauaacaaa acagcacucc gg 22

 <210> 320
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 320
 uauauaaca aacagcacuc gg 22
 <210> 321
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 321

uaaaauauau aacaaaacag gg	22
<210> 322	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 322	
uaguauuuua aaccucugca gg	22
<210> 323	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 323	
uuaguauuuu aaaccucugc gg	22
<210> 324	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 324	
ucuaguauuu aaaaccucug gg	22
<210> 325	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 325	
uaacuaguau uaaaaccuc gg	22
<210> 326	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 326
 uaaaauauugu aacaaaaucu gg 22
 <210> 327
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 327
 uaaaaauu guaacaaaau gg 22
 <210> 328
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 328
 uagcauaaag ugaguuuuu gg 22
 <210> 329
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 329
 uaagcauaaa gugaguuuu gg 22
 <210> 330
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 330
 uuaagcauaa agugaguuuu gg 22
 <210> 331
 <211> 22
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 331
 uguuugacaa aaccuuuuau gg 22

<210> 332
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 332
 ugcaauguuu gacaaaaccu gg 22

<210> 333
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 333
 uugcaauguu ugacaaaacc gg 22

<210> 334
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 334
 uuauagcacc gaauacuugc gg 22

<210> 335
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 335
 uacaguagaa acuccaucu gg 22

<210> 336

<211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 336
 uauacaguag aaacuuccau gg 22
 <210> 337
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 337
 ucuaauacagu agaacuucc gg 22

 <210> 338
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 338
 uucuaauacag uagaacuuc gg 22
 <210> 339
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 339
 uuucuaauaca guagaacuuc gg 22
 <210> 340
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 340

uuuucuauc aguagaaacu gg 22

<210> 341
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 341

uggugauuuc uauacaguag gg 22

<210> 342
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 342

uaauggugau uucuauacag gg 22

<210> 343
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 343

uaaaugguag uugucaugac gg 22

<210> 344
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 344

uuaaaaaaaa gguaguuguc gg 22

<210> 345
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 345
 ugaguuuuag acauccaacu gg 22
 <210> 346
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 346
 uugaguuuuu gacauccaac gg 22

 <210> 347
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 347
 uuacuugagu uuuagacauc gg 22
 <210> 348
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 348
 uacaaggcuu uacacuuauc gg 22
 <210> 349
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 349
 uuacaaggcu uuacacuuau gg 22

 <210> 350
 <211> 22

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 350
 uucaucuca guuacaaggc gg 22
 <210> 351
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 351
 uuaaaauagu uucuauacac gg 22
 <210> 352
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 352
 uugaugucaa caaagucuuu gg 22

 <210> 353
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 353
 uaguuuuuuu aagcaucuuc gg 22
 <210> 354
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 354
 uuaguuuuuu aaagcaucuu gg 22
 <210> 355

<211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 355
 uaacuaauca gcaauagcuc gg 22

<210> 356
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 356
 ucagcaaaca uuaacaacac gg 22

<210> 357
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 357
 uuacagcaaa cauuacaac gg 22

<210> 358
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 358
 uaaucagca aacauaaca gg 22

<210> 359
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 359

uaaauacagc aaacauuaac gg 22
 <210> 360
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 360
 uaaaauacag caaacauuaa gg 22
 <210> 361
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 361
 utcguaaag cugcaucaga ga 22

 <210> 362
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 362
 utucguauaa gctgcatcag ag 22
 <210> 363
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 363
 ucugaaugcu ucuagaauaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 364
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 364
 cugaaugcuu cuaaguaaaa gcagccgaaa ggcugc 36

<210> 365
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 365
 gaaugcuucu aaguaaaaaa gcagccgaaa ggcugc 36
 <210> 366
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 366
 uacuuagaag cauucagaau gg 22
 <210> 367
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 367
 uuacuuagaa gcauucagaa gg 22
 <210> 368
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 368
 uuuacuuaga agcauucaga gg 22
 <210> 369
 <211> 22
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 369
 uuuuacuag aagcauucag gg 22
 <210> 370
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 370
 uuauuuacuu agaagcauuc gg 22

<210> 371
 <211> 4273
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 371
 gccaatagga gccgcgctgg ctggagagta atgttacaga gcggagagag tgaggaggct 60
 gcgtctggct cccgctctca cagccattgc agtacattga gctccataga gacagcgccg 120
 gggcaagtga gagccggacg ggcactgggc gactctgtgc ctcgctgagg aaaaataact 180
 aaacatgggc aaaggagatc ctaagaagcc gagaggcaaa atgtcatcat atgcattttt 240
 tgtgcaaact tgtcgggagg agcataagaa gaagcaccca gatgcttcag tcaacttctc 300
 agagttttct aagaagtgtc cagagagggtg gaagacatg tctgctaaag agaaaggaaa 360

atgtgaagat atggcaaaag cggacaaggc ccgttatgaa agagaaatga aaacctatat 420
 ccctcccaaa ggggagacaa aaaagaagt t caagatccc aatgcacca agaggcctcc 480
 ttcggccttc ttctcttct gctctgagta tcgccccaaa atcaaaggag aacatcctgg 540
 cctgtccatt ggtgatgtg cgaagaaact gggagagatg tggaataaca ctgctgcaga 600
 tgacaagcag cttatgaaa agaaggctgc gaagctgaag gaaaaatacg aaaaggatat 660
 tgctgcatat cgagctaaag gaaagcctga tgcagcaaaa aaggagttg tcaaggctga 720
 aaaaagcaag aaaaagaagg aagaggagga agatgaggaa gatgaagagg atgaggagga 780

ggaggaagat gaagaagatg aagatgaaga agaagatgat gatgatgaat aagttggttc 840
 tagcgagtt tttttttct tgtctataaa gcatttaacc cccctgtaca caactcactc 900
 cttttaaga aaaaaattga aatgtaaggc tgtgtaagat ttgttttaa actgtacagt 960

gtcctttttt gtatagttaa cacactaccg aatgtgtctt tagatagccc tgccttggtg 1020
 gtattttcaa tagccactaa ccttgccctgg tacagtatgg gggttgtaa ttggcatgga 1080
 aatttaaagc aggttcttgt tgggtcacag cacaaattag ttatatatgg ggatggtagt 1140
 ttttcatct tcagttgtct ctgatgcagc ttatacgaaa taattgttgt tctgttaact 1200

 gaataccact ctgtaattgc aaaaaaaaaa aaaaagtgc agctgttttg ttgacattct 1260
 gaatgcttct aagtaaatac aatttttttt attagtattg ttgtcctttt cataggtctg 1320
 aaatttttct tcttgagggg aagctagtct tttgcttttg cccattttga atcacatgaa 1380
 ttattacagt gtttatcctt tcatatagtt agctaataaa aagcttttgt ctacacaccc 1440
 tgcatatcat aatgggggta aagttaagtt gagatagttt tcatccataa ctgaacatcc 1500
 aaaatcttga tcagttaaga aatttcacat agcccactta catttaciaa ctgaagagta 1560
 atcaatctac tcaaagcatg ggattattag aatcaaacat tttgaaagtc tgccttgaa 1620

 ggactaatag aaaagtatgt tctaaccctt acatgaggac tctattcttt aactcccatt 1680
 accatgtaat ggcagttata ttttgcaagt cccacattaa agaagacctg agaatgtatc 1740
 cccaaaagcg tgagcttaaa atacaagact gccatattaa attttttgtt gacattagtc 1800
 tcagtgaaga ctatgaaaat gctggctata gatgtctttt cccattttatc taaatatgga 1860
 ctgctcagga aacgagactt tccattacia gtatttttaa ttaattgggc cagcttttca 1920
 aacaagatg ccacattcaa aatagggtat attttctat attacggttt gccctttat 1980
 aatccaagt agataggaag aaagaagaca aactttgcat ctcagtatga attattcaat 2040

 ttatttgaat gatttttctt taaaaaacia actcattcat tagtcatgtt tatctgetta 2100
 ggagtttagg gaacaatttg gcaattttgt ggttttcgag attatcgttt tcttaaagtg 2160
 ccagtatttt aaaaatagct tcttgaatt ttacacgctt ttgtgatgga gtgctgtttt 2220
 gttatataat ttagacttgg attctttcca tttgcatttg tttatgtaat ttcaggagga 2280
 atactgaaca tctgagtctt ggatgatact aataaactaa taattgcaga ggttttaaat 2340
 actagttaa tggtttcac ttaagaactt aagattttgt tacatatttt taaatcttgt 2400
 ttctaataat acctcttagc agtacctttt aaataagtat aagggatggc aaagttttc 2460

 cctttaaaaa tactcacttt atgcttataa ataggttaat gggctgataa aaggttttgt 2520
 caaacattgc aagtattcgg tgctatataa aaaggaggaa aactagttt tactttcaga 2580
 atgatttaa caagattttt aaaaacaaga tacatgcaag cgaacagcag ggttagtgat 2640
 aggctgcaat tgtgtcaac atcagatttt ttgttaagag gagcaaatga ctcaatctga 2700
 tttagatgga agtttctact gtatagaaat caccattaat caccaacatt aataattctg 2760
 atccatttaa aatgaattct ggctcaagga gaattttaa ctttagtagg tacgtcatga 2820

caactacat tttttaaga tggtgagaat gggaacagtt ttttaggt ttattctga 2880

ccacagatct taagaaaatg gacaaaacc ccttcaatc tgaagattag tatggttgg 2940

tggtctaaca gtatccccta gaagtggat gctctaaaact caagtaaat gaagtgggag 3000

gcaatttaga taagtgtaaa gccttgtaac tgaagatgat ttttttaga aagtgtatag 3060

aaactatfff aatgccaaga tagttacagt gctgtggggt ttaaagactt tggtgacatc 3120

aagaaaagac taaatctata attaattggg ccaactttta aatgaagat gctttttaa 3180

actaatgaac taagatgtat aaatcttagt tttttgtat tttaaagata ggcatatggc 3240

atattgatta acgagtcaaa tttcctaact ttgctgtgca aaggttgaga gctattgctg 3300

attagttacc acagttctga tgatcgccc atcacagtgt tgtaaatggt tgctgtatff 3360

attaatfff ttaaagtga atctgaaaa tgaatttgt gtgctctgtg tacccgaggg 3420

gtaatgatta aatgataaag ataagaaaag cgccatgta acacaaactg ccattcaaca 3480

ggtatfffcc ttactaccta aggaattgta accattgctc agacattgta ggatttaact 3540

atggtgaaaa ctacaggaga ggccgggcgc agtggctcac gcctgtaatc ccagcactff 3600

gggaggccaa ggcgggcaga tcacagggtc aggagattga gaccatcctg gctaacgtgg 3660

tgaaacccc ccttactaa aaatacaaaa aattagccaa gcgtggtgct gggcgctgt 3720

agtcccagta actcaggagg ctgaggcagg agaatggcgt gaaccggga ggcggaggtt 3780

gcagtgagcc gagattgtgc cactgcactc cagcctgggt gacagagcaa gactccatct 3840

caaaaaaaaa aaaaaaacac aggagagaca actggtffff gaatgaaata catgggtact 3900

gccttgcttg acatcacata gtccttgatg aaagttcaca tttaggtctg cttggtacaa 3960

tacgcctcct aaaaaggtcc ttgatgaaag ttcacattta ggtctgcttg gtacaacacg 4020

cctctgaaa gggctgata gctttcagta gcagtaagac acttgcattg gatggttaagg 4080

tatctgcaaa ttgacacaca ccgtacacag cttaagctt agaattaact tgctaaaatg 4140

tgagcctttg gtaattagc tgttttatta gggagtgtga taatattga atttctttc 4200

atatttgtgc tttgtgtcat tttcaaatga cccttgaat gtatftttaa agtagataaa 4260

agccagaaag tga 4273

<210> 372

<211> 2323

<212> DNA

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 372

aatgttacag agcggagaga gtgaggaggc tgcgtctggc tcccgtctc acagccattg 60

cagtacattg agctccatag agacagcgcc ggggcaagtg agagccggac gggcactggg 120
 cgactctgtg cctcgtgag gaaaaataac taacatggg caaaggagat cctaagaagc 180

 cgagaggcaa aatgtcatca tatgcatttt ttgtgcaaac ttgtcgggag gagcataaga 240
 agaagcacc agatgcttca gtcaacttct cagagttttc taagaagtgc tcagagaggt 300
 ggaagacat gtctgctaaa gagaaaggaa aatttgaaga tatggcaaag gcgacaagg 360
 cccgttacga aagagaaatg aaaacctata tcctcccaa aggggagaca aaaaagaagt 420
 tcaaggatcc caatgcacc aagaggcctc cttcgccctt cttcctgttc tgctctgagt 480
 atcgcccaa aatcaaagga gaacatcctg gcctgtccat tggatgatgt gcgaagaac 540
 tgggagagat gtggaataac actgctgcag atgacaagca gccttatgaa aagaaggctg 600

 cgaagctgaa gaaaaaatac gaaaaggata ttgctgcata tcgagctaaa gaaagcctg 660
 atgcagcaa aaaggagtt gtcaaggctg aaaaaagca gaaaaagaag gaagaggagg 720
 aagatgagga agatgaagag gatgaggagg aggaggaaga tgaagaagat gaagatgaag 780
 aagaagatga tgatgatgaa taagtgggt ctagcgcagt ttttttttc ttgtctataa 840
 agcatttaac cccctgtac acaactcact ccttttaag aaaaaattg aatgtaagg 900
 ctgtgaaga ttgttttta aactgtacag tgtcttttt tgtatagta acacactacc 960
 gaatgtgtct ttacatagcc ctgtcctggt ggtattttca atagccacta accttgctg 1020

 gtacagtatg ggggttgtaa attggcatgg aaatttaag caggttcttg ttggtgcaca 1080
 gcacaaatta gttatfatg gggatgtag tttttcctc ttcagttgtc tctgatgcag 1140
 cttatagaa ataattgtg ttctgttaac tgaataccac tctgtaattg caaaaaaaaa 1200
 aaaaaagtt gcagctgttt tgttgacatt ctgaatgctt ctaagtaaat acaatttttt 1260
 ttattagat tgtgtcctt ttcataggc tgaattttt cttcttgagg ggaagctagt 1320
 cttttgcttt tgccatttt gaatcacatg aattattaca gtgtttatcc tttcatatag 1380
 ttagctaata aaaagctttt gtctacacac cctgcatacc ataatggggg taaagttaag 1440

 ttgagatagt tttcatccat aactgaacat cgaaaatctt gatcagttaa gaaatttcac 1500
 atagccact tacatttaca aactgaagag taatcagtct actcaaagca tgggattatt 1560
 agaatcaaac atttgaaag tctgtccttg aaggactaat agaaaagtat gttctaacct 1620
 ttacatgagg actctattct ttaactccca ttaccatgta atggcagtta tattttgcag 1680
 ttcccacatt aaagaagacc tgagaatgia tccccaaaag cgtgagctta aaatacaaga 1740
 ttgcatatt aaatttttg ttgacattag tctcagttaa gactatgaaa atgctggcta 1800

tagatgtctt ttccattta tctcaatatg gactgctcag gaaacgagac tttccattac 1860

aagtatTTTT aattaattgg gccagctttt aaaatgaaga tgccacattc aaaatagggt 1920

gtattttcct atattatggg ttgccctttt ataaatcgaa gtagatagga ggaaagaaga 1980

cacttaaacT ttgcatctca gtatgaatta ttcaattgat ttgaatgatt tttctttaca 2040

aaacaaactc attagtcatc atctgcttag cagtttaggg aacaatttgg caattttgtg 2100

gtttttcgag attatcgttt tcttaaagtg ccagtatTTT aaaatagcgt tcttgaatt 2160

ttacacgctt ttgtgatgga gtgctgtttt gttatataat tttgacttgg attctttcca 2220

tttgcatttg tttatgtaat ttcaggagga atactgaaca tctgagtcct ggatgatact 2280

aataaactaa taattgcaga ggTTTTaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 2323

<210> 373

<211> 2855

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 373

cgcgctggct ggagagtaat gttacagagc ggagagagtg aggaggctgc gtctggctcc 60

cgctctcaca gccattgcag tacattgagc tccatagaga cagcgccggg gcaagcgca 120

gccggacggg cactgggcga ctctgtgcct cgcggaggaa aatcaactaa acatgggcaa 180

aggagatcct aaaaagccga gaggcaaaat gtctcatat gcattctttg tgcaacttg 240

ccgggaggag cacaagaaga agcaccggga tgccttctgc aacttctcag agttctcaa 300

gaagtgtca gagaggTgga agaccatgtc tgctaaagaa aaggggaaat ttgaagatat 360

ggcaaaggct gacaaggctc gttatgaaag agaaatgaaa acctacatcc ccccaaagg 420

ggagacaaaa aagaagtTca aggaccccaa tgcaccaag aggctcctt cggccttctt 480

cttgttctgt tctgagtacc gccccaaaat caaaggcgag catcctggct tatccattgg 540

tgatgttgca aagaaactag gagagatgtg gaacaacact gcagcagatg acaagcagcc 600

ctatgagaag aaagctgcca agctgaagga gaagtatgag aaggatattg ctgcctacag 660

agctaaagga aaacctgatg cagcgaaaaa ggggtggtc aaggctgaaa agagcaagaa 720

aaagaaggaa gaggaagatg atgaggagga tgaagaggat gaggaagagg aggaagaaga 780

ggaagacgaa gatgaagaag aagatgatga tgatgaataa gttggttcta gcgcagtttt 840

tttttcttgt ctataaagca ttttaacccc ctgtacacaa ctactcctt ttaaagaaaa 900

aaattgaaat gtaaggtgtg gtaagatttg tttttaaact gtacagtgtc tttttttgta 960

tagttaacac actaccgaat gtgtcttttag atagccctgt cctggtggtg ttttcaatag 1020

ccactaacct tgcttggfac agtctggggg ttgtaaattg gcatggaaat ttaaagcagg 1080
 ttcttgttgg tgcacagcac aaattagtta tatatgggga cagtagtttg gttttttgtt 1140

 tttttttttt tttcttttgg ttttcttttt gggttttatt tttttcatct tcagttgtct 1200
 ctgatgcagc ttatacgaag ataattgttg ttctgttaac tgaataccac tctgtaattg 1260
 caaaaaaaaa attgctggctg ttttgttgac attctgaatg cttctaagta aatacaattt 1320
 tttttattag tattgttgtc cttttcatag gtctgaaagt tttcttctca aggggaagct 1380
 agtcttttgc ttgcccatt ttgggtcaca tggattatta gtgtgttata tttcatctag 1440
 ttagctggaa gagagctttt gtccacatgc cctgccattg tggtaggta acattttcat 1500
 ccatagttag agaatctcct aaatcgtgat agttggataa gagatattat ataacctact 1560

 tggcaaagca aggagtgatc aatactgtca caccgtggga ctattaggat caagcaatct 1620
 gaacgtctgt ccttgaagga ctgatagaaa agtaccttct aatccttaca cgaggactct 1680
 cctttaaccg ccattactgt gtaatgacag ttataatttg cagtttccc tactaaagaa 1740
 gacctgagaa tgtatccca aaagtgtgag cttaaaatac aagactgctg tactatttgt 1800
 tgaccttagt cccagcgaag gctatcacia gaacgtggc tgtaaagcct ttgcccctct 1860
 atctagatat ggattgctca ggaaacttga ctgtttaaag gtatttttaa ttactgagc 1920
 cagcttttaa aattatgcca catttaaaat gaagggtata ttttcctata ctgtggtttg 1980

 tcctttatg aatcagatac aagaggataa actttgcata ttagtaccat ttgtccaata 2040
 catttgcttt ttctttataa aacccaaact cattcattaa tcaggtttaa tctgcttagt 2100
 ttagggaaca atttggcaat ttgtggatt tttttttgag attatcgttc tcttaaagtg 2160
 ccagtgtttt aaatagcgtt cttgtaattt cacgcgttt tgtgatggag tgctgttata 2220
 taattttgac ttgggttctt tacatttgcg ttgttaatgt aatttgagga ggaatactga 2280
 acatgagtcc tggatgatac taataaacta ataattacag aggtttttaa tattagttaa 2340
 atgactttca cttaagaatt taagcttttg gtcacacttt ataatagtgc cttatagtat 2400

 aaacaactga aaggctcttt ccattaaca acccttgatg ctggggccag tgagatagtg 2460
 ggtaaaaagg cagttggctg ccaaccctga caaccgatgg caaaaggagg gaaccagctt 2520
 ccaaaatgct ttgaccaaact gctccctcca ttcatgaaca cagtttttaa atgttaata 2580
 ggctagaggg cagtaaaaac aggttttttt atcgagcacc cctaactat acatatgagg 2640
 agccataatc tgaatgttaa gtgaaaagcg aggttggctc taaagattgc acgtgtgttc 2700
 ttaagcctgt agaggacctc cgcaggccgt aatggtctcg attaccaact taagaacaag 2760

tgactggcctt ggaaacttgt actgttgctt tagaactacc attgtggaca tctgttgta 2820

gtaagtgatc catttaaag tgaactctgc ctcaa 2855

<210> 374

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 374

taagatttgt ttttaaactg tacagtgtct t 31

<210> 375

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 375

ttggtgcaca gcacaaatta gttatatatg g 31

<210> 376

<211> 56

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 376

tctgatgcag cttatagaa ataattgttg ttctgttaac tgaataccac tctgta 56

<210> 377

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 377

aaaaaagttg cagctgtttt gttgacattc tgaatgcttc t 41

<210> 378

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 378

tgagatagtt ttcattcata actgaacatc c 31

<210> 379

<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 379
taccatgtaa tggcagttat attttgcagt t 31
<210> 380
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400>
> 380
tttacacgct tttgtgatgg agtgcgtgtt t 31
<210> 381
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 381
aataactgaac atctgagtc tggatgatac t 31